



Universidad de Valparaíso
Facultad de Farmacia
Departamento de Ciencias Química y Recursos Naturales

“Estudios químicos en la especie *Passiflora caerulea* L.”

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

JOHN OLIVER FRANCIS DÍAZ

Director: Dr. Rodrigo Díaz Viciedo

VALPARAÍSO
2012



El desarrollo de esta Tesis ha sido financiado por la Farmacopea Chilena a través del Proyecto Innova Chile 07 CN13 ISM-169 en conjunto con la Universidad de Valparaíso.

Agradecimientos.

En el desarrollo de esta tesis participaron grandes personas a las cuales quisiera agradecer por todo lo que supieron aportar y por el apoyo entregado.

Primero quisiera agradecer a mi familia quienes en todo momento me dieron su completo apoyo y cariño, sin los cuales no podría haber culminado esta gran etapa de mi vida.

A mi mamá Jacqueline por toda su constancia, cariño y dedicación, los cuales fueron una fuerza impulsora y motivadora para poder terminar esta Tesis.

A mi hermana Aileen quien me entregó sus conocimientos profesionales durante el desarrollo de esta Tesis y gracias a los cuales esta pudo finalizar.

A mi abuelita Dionisia quien supo con sus actos entregar todo lo necesario para lograr completar mi formación profesional.

A mis abuelitos Lidia y Oliver quienes con alegría y amor me entregaban día a día palabras de apoyo en este largo viaje que culmina.

A mi tío Pedro quien, con sus emotivas palabras y desinteresados actos, me entrego todo su apoyo sin nada a cambio.

A mi papá Herbert y mi hermano Ian quienes, desde lo alto, no dejaron de acompañarme en todo momento, y a quienes dedico esta Tesis.

A mi sobrino Stefano por ser una de las motivaciones más fuertes para culminar esta Tesis.

A mis tías Karina y Mirtha por compartir sus experiencias y ayudarme a plasmarlas en esta Tesis.

A Claudia, mi polola, por su compañía, amor y ayuda los cuales lograron transformar los momentos más difíciles en situaciones llenas de alegría y conocimientos.

A mi director de Tesis, Dr. Rodrigo Díaz, por toda su ayuda, paciencia, conocimientos y por sobre todo, su amistad entregada en el transcurso de esta tesis y de la gran parte de mi vida académica.

A la profesora Cecilia Rubio por su comprensión, ayuda y palabras de aliento en los momentos en que más los necesitaba.

A la profesora Lorena Sáez por todos los aportes realizados a esta Tesis, los cuales fueron de gran ayuda.

A la profesora Wanda Quilhot por darme el privilegio de su amistad y el honor de compartir más de una conversación con ella.

A Claudia Santibáñez y Claudia Hernández por su invaluable ayuda y el gran sentido del humor que me entregaron en todo momento.

A todo el equipo profesional de la Farmacopea Chilena, Daniela, Denny y Adolfo, por su ayuda y la gran disposición entregada en todo el desarrollo de esta Tesis.

A Iván Montenegro por sus consejos, compañía y por sobre todo por su amistad entregada en los momentos más difíciles.

A mis amigos y compañeros de carrera Mauricio y René por la amistad entregada, sabios consejos otorgados y el gran placer de poder ser amigos.

A todos ustedes y a todos lo que no he nombrado, pero que estuvieron presentes en esta Tesis, solo les puedo decir... Gracias, nunca los olvidare.

Índice.

	Páginas
Resumen.	
Abstract.	
Abreviaturas.	
Introducción.	11
Hipótesis.	27
Objetivos.	28
Materiales y Métodos.	
1. Materiales.	
Equipos.	29
Reactivos.	30
2. Métodos.	
2.1 Recepción, análisis organoléptico y de calidad.	33
2.2 Técnicas espectroscópicas de identificación.	34
2.3 Extracción y aislamiento de compuestos.	35
2.4 Estudios químicos.	39
Resultados.	
1. Análisis macro y microscópico.	45
2. Determinación de humedad y cenizas.	46
3. Obtención de extractos y determinación estructural a partir de pruebas espectrofotométricas y espectroscópicas.	47

4. Identificación de la especie por TLC.	50
5. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría UV-Vis.	53
6. Análisis de ácidos grasos en el extracto hexánico.	55
7. Evaluación de la actividad antioxidante.	56
8. Evaluación de la actividad antirradicalaria.	57
Discusión.	58
Conclusión.	73
Referencias.	75
Anexos.	82

Resumen.

Passiflora caerulea L. es el nombre científico de la especie vegetal llamada vulgarmente como *Mburucuya* o Pasionaria Azul, la cual se caracteriza por ser una planta de rápido crecimiento, de tallos trepadores, de hojas perennes y de una flor de características muy especiales.

Al igual que el común de los representantes del Reino Plantae, esta especie es capaz de sintetizar metabolitos secundarios que le son útiles tanto a la misma planta, como a la Medicina, por cuanto dichos metabolitos tienen una aplicación terapéutica conocida. Una de las características más conocidas es la de poseer propiedades sedantes, las que sinergizan cuando es administrada en conjunto con otras plantas medicinales de similar efecto, lo que le confiere su acción tranquilizante.

En este contexto, y con el propósito de obtener mayor información sobre la naturaleza de estos metabolitos secundarios, en la presente tesis se realizará un estudio químico de éstos, utilizando para ello técnicas fotoquímicas convencionales, con el fin de comparar los resultados obtenidos con la información bibliográfica ya existente, lo que conllevará a obtener una monografía más detallada para ser utilizada con fines terapéuticos, científicos y comerciales.

Abstract.

Passiflora caerulea L. is the scientific name of a plant species commonly known as *Mburucuya* or Blue Passion Flower, which is characterized for a fast growing, with climbing stems, evergreen leaves and flowers with very special characteristics.

As well as other representatives of the Kingdom Plantae, this species is able to synthesize secondary metabolites that are useful both to itself and to medicine, because these metabolites have a known therapeutic application. One of the most popular in this area is this plant has sedative properties, which synergize when administered together with other herbs of similar effect, giving it soothing action.

In this context, and in order to obtain more information on the nature of these secondary metabolites, in this study there will be carried out a chemical study of them, using conventional photochemical techniques in order to compare the results with the existing bibliographic information, which will lead to obtain a more detailed paper to be used for therapeutic, scientific and commercial.

Abreviaturas.

°C: Grados Celsius.

AcOEt: Acetato de etilo.

BF₃: Trifloruro de boro.

CC: Cromatografía en columna.

CDCL₃: Cloroformo deuterado.

CG: Cromatografía en fase gaseosa.

cm: Centímetros.

DPPH: 2,2 – difenil - 1 – picrilhidrazilo.

D.S.: Desviación standard.

δ: Desplazamiento químico.

FID: *Fire induced detector*.

Fig.: Figura.

g: Gramos.

h: Horas.

H: Hiperósido.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IR: Infrarrojo.

J: Constante de acoplamiento.

KBr: Bromuro de potasio.

Kg: Kilogramos.

L: Litro.

MC: Muestra comercial.

mg: Miligramo.

MHz: Megahertz.

mL: Mililitros.

MP: Muestra problema.

MeOH: Metanol.

m: Metros.

N: Nitrógeno.

N₂: Nitrógeno molecular gaseoso.

ng: Nanogramos.

nm: Nanómetros.

R: Rutina.

μg: Microgramo.

μL: Microlitro.

μm: Micrómetro.

p/p: Peso/peso.

ppm: Partes por millón.

PSi: Libra por pulgada cuadrada.

Rf: *Ratio of front*.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

TLC: Cromatografía en capa fina.

\bar{x} : Promedio.

UV: Ultravioleta.

Introducción.

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha utilizado las plantas para diversos fines, desde alimentación, vestimenta, fuente energética, construcción y medicinal (Guarrera, 2005). Es, quizás, este último fin el que más ha acercado al hombre a este Reino, dado que al encontrar en las plantas una fuente única de drogas y compuestos con actividad farmacológica, comenzó el estudio exhaustivo de su morfología, de los compuestos generados por las plantas, de la actividad que estos tendrían sobre los seres vivos y, por sobre todo, en los seres humanos. Por lo mismo, en la actualidad, se han optimizado las metodologías botánicas y fisicoquímicas para poder aislar y mejorar estos compuestos.

Variadas son las plantas descritas en las diferentes Farmacopeas del mundo, las cuales presentan actividad farmacológica útil en los seres humanos. Dentro de este conjunto de especímenes destacan las de la familia *Passifloraceae*, entre las que podemos mencionar *Passiflora incarnata*, *Passiflora edulis* y *Passiflora caerulea*. Esta gran familia de plantas fue descubierta en el año 1529 por los misioneros cristianos españoles que arribaron a América. Su nombre original fue “Flor de la Pasión de Cristo”, ya que estos misioneros aseguraban ver en sus flores las armas con las que Jesucristo habría sido torturado y crucificado (Patel y cols., 2009a). Ya en el año 1610, el botánico Jack Boccio publicó en Europa dibujos sobre esta planta, destacando su fisonomía, la belleza de sus flores y las propiedades medicinales que se le atribuían, considerándola como uno de los grandes descubrimientos de la naturaleza realizados en el suelo del “Nuevo Mundo” (Fuentes y cols., 2000).

La especie *Passiflora caerulea* L. pertenece al género *Passiflora Lindeniana*, el cual a su vez pertenece a la familia *Passifloraceae* (**Fig. 1**) (Patel y cols., 2009a). Su nombre deriva del color azul que presentan sus flores (latín *caerulea*: azulado) y fue llamada “mburucuya” por los indígenas *guaraníes*, cuyo

significado es “criadero de moscas” (Barboza y cols., 2009). Esta especie es originaria de América del Sur, siendo descrita en Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Uruguay, lo que la transforma en una de las especies de *Passiflora* más abundante de Latinoamérica. Esta gran abundancia se debe, entre otros factores, a que sólo necesita de climas templados para crecer y veranos marcados para poder florecer (Méndez y cols., 2001). Esta especie de *Passiflora* ha sido utilizada ampliamente por los indígenas ubicados al norte de Argentina, siendo una de las flores postuladas por el gobierno trasandino para transformarse en flor nacional, lo cual también la ha llevado a diezmar notoriamente su población salvaje (Severin y cols., 2004).

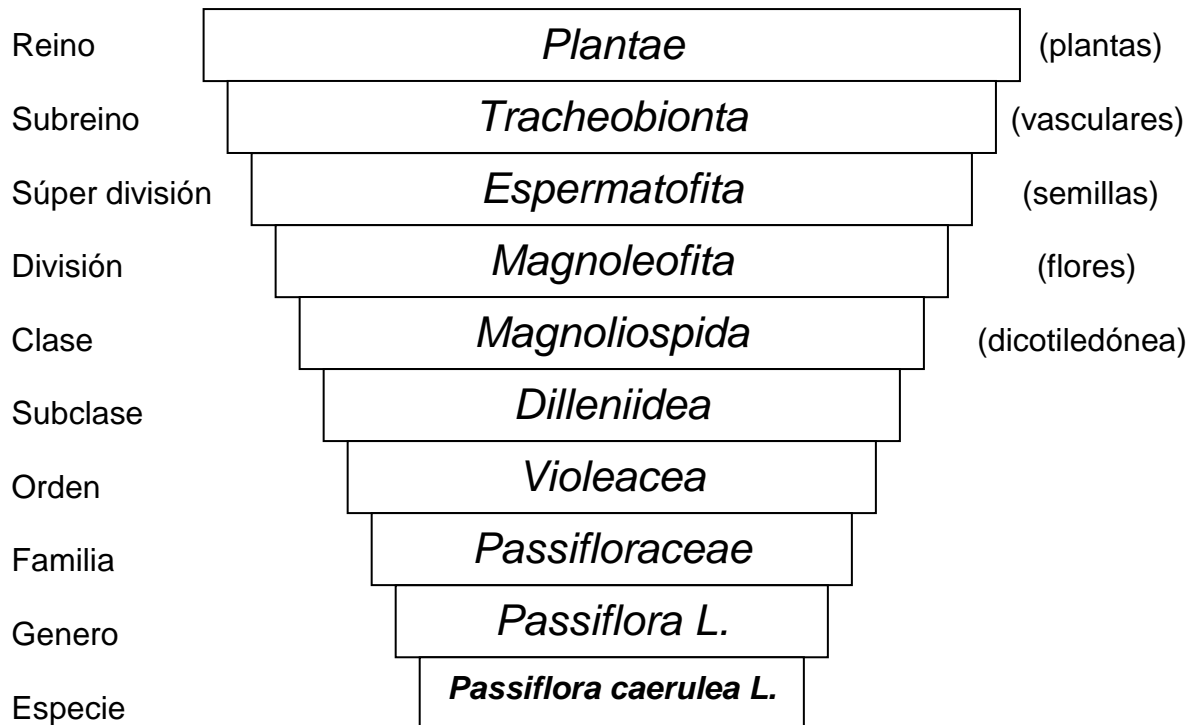


Fig. 1: Clasificación taxonómica de *Passiflora caerulea L.*

No obstante, no es la única especie de *Passiflora* que se puede encontrar en América del Sur; entre las especies distribuidas por toda América, podemos destacar *P. edulis* (maracuyá), *P. incarnata*, *P. laurifolia* (granadilla) y *P. mollissima*,

entre otras, existiendo en la actualidad más de 530 especies descritas (Deginani, 2001); presentando ciertas similitudes propias de su clase (son plantas trepadoras, dicotiledóneas con flores y frutos comestibles), diferenciándose por el color de sus flores y frutos y en la acumulación de ciertos metabolitos primarios y secundarios formados por cada una, los cuales, si bien no varían drásticamente de una especie a otra, sí pueden llegar a presentar algunas diferencias cuantitativamente significativas.

La morfología y crecimiento de *Passiflora caerulea* L. es bastante particular. Una vez formada la plántula, su cotiledón toma forma ovalada con una apariencia serosa (Mendiondo y Amela, 2009). Si bien puede crecer como plántula (espermatófita), es más común que crezca a partir de brotes derivados de injertos perennes, dadas algunas dificultades que presenta la semilla para poder germinar, sobre todo ambientales (Mendiolo y Amela, 2006). Con el tiempo se vuelve una liana herbácea, trepadora y rastrera, pudiendo alcanzar alturas entre 600 y 1000 cm de largo, con tallos cubiertos de finos pelillos. Sus hojas son alternas y de 5 o más lóbulos, siendo raro encontrar trilobuladas, con profundas separaciones, presentando finos pelillos en ambas caras, de 6 a 15 cm a lo largo del nervio medio y de 12 a 15 cm a lo largo de los nervios laterales. Su pecíolo es de aproximadamente 8 cm con dos glándulas en el ápice. Sus flores crecen en el área entre las hojas y el tallo (zona axilar), presentándose generalmente solas (Bruneton, 2001). Sus flores son muy características, resaltando la belleza y la mezcla de colores, siendo de un color azulado o lila en sus pétalos, un cáliz con cinco sépalos unidos por la base formando una copa y presentando filamentos en la corona separados en varias series de un llamativo color morado. El diámetro de las flores puede llegar a los 9 cm. Sus frutos son bayas comestibles de un color anaranjado y de un diámetro de hasta 6 cm. Su interior es carnoso y contiene una gran cantidad de semillas reticuladas de color café oscuro (Grainer y Wichtl, 2001). Una de las claves morfológicas que pueden ayudar a diferenciarla de otras

especies es que presente una lámina foliar palmatipartida, con 5 segmentos, raro 3 (Fig. 2).



Fig. 2: Fotografía frontal de la flor y partes aéreas de *P. Caerulea*. (Fotografía: R. Díaz Viciado)

Dentro de la Farmacognosia, *P. caerulea* no es una planta de gran interés, puesto que *P. incarnata*, sigue siendo la especie más estudiada de toda la familia y la utilizada oficialmente como droga cruda por las diferentes Farmacopeas del mundo. Sin embargo, *P. caerulea* desarrolla de igual forma una gran cantidad de metabolitos primarios (intracelulares) y secundarios (extracelulares) que se acumulan en hojas, flores y frutos (García y cols., 2009), lo que la puede transformar en un nuevo objetivo de investigaciones futuras.

Los metabolitos primarios que se pueden encontrar en frutos o en las hojas de *P. caerulea* están descritos de manera somera, superficial y general en la

literatura, a diferencia de los descritos en otras especies como *P. incarnata*, de la cual podemos extrapolar cierta similitud en la concentración y tipo de metabolito descrito en *P. caerulea*. De los metabolitos primarios descritos en los frutos de *P. incarnata* podemos observar gran cantidad de carbohidratos (representando entre un 24-70% de la materia seca de los frutos) entre los que destacan fructosa, glucosa y sacarosa, siendo este último el de mayor cantidad (3,1%) (Arjona y cols., 1991). Por otro lado, los aminoácidos como tirosina, prolina y fenilalanina están presentes mayoritariamente en las hojas (5%) y flores de la planta, y otros como valina y glutamina están presentes en los frutos (Patel y cols., 2009b).

Pese a no ser una de las partes más utilizadas de la planta, diversos metabolitos primarios han sido descritos en el néctar floral de *P. caerulea*, del cual se pueden obtener aproximadamente 24,54 mg de azúcares totales por flor. Entre los azúcares de mayor concentración están la fructosa (35,51%), glucosa (36,80%) y sucrosa (27,69%). Los aminoácidos también han sido cuantificados en el extracto floral, encontrándose en una concentración de 2805,55 ng/ μ L de néctar extraído aproximadamente, siendo los de mayor concentración la prolina (1198,29 ng/ μ L), la histidina (414,24 ng/ μ L) y la arginina (227,65 ng/ μ L). Cabe destacar que la mayor concentración de azúcares y aminoácidos se consiguen en los estadios 1 y 2 de la flor, probablemente por la senectud de las flores y la resorción que sufren estos metabolitos (Amela y cols., 2009).

En las semillas de *P. caerulea* han sido descritos un número importante de ácidos grasos, entre los de mayor concentración figuran el ácido linoleico (63,1%), ácido oleico (17,6%) y ácido palmítico (10,1%), también se describe la presencia del ácido α -linolénico y de otros ácidos grasos con cadena de 18 carbonos, pero estos no superan más del 4% del total. Quizás el dato más relevante encontrado fue el gran porcentaje de proteínas que presentan las semillas (23,8%), en donde destaca la presencia del aminoácido lisina (4,49 g/16gN) el cual dada la

concentración encontrada cumple con las necesidades de ingesta diarias de este aminoácido esencial (Quiroga y cols., 2000).

El gran interés que se refleja en la familia Passifloraceae radica en la gran cantidad de metabolitos secundarios que esta produce y a los efectos farmacológicos con los que están relacionados. Estos metabolitos pueden variar en cada especie de *Passiflora* y su rendimiento está estrechamente ligado a factores ambientales, como la cantidad de luz y humedad, composición química del suelo e inclusive la fecha y hora en la que la planta es recolectada (Fuentes y cols., 2001). En general la mayor cantidad de flavonoides y alcaloides se logra cuando la recolección se realiza entre primavera y verano, en suelos con baja cantidad de hierro, boro y cobre (Reimberg y cols. 2009).

Entre los metabolitos comunes encontrados en las diferentes especies de *Passiflora*, uno de los más importantes y abundantes son los polifenoles del tipo flavonoides, los cuales pueden encontrarse en concentraciones cercanas al 3,0% en las partes aéreas secas de la planta (Chabariberi y cols., 2009), siendo algunos de ellos los derivados C-heterósidos como la isovitexina (**1**), vitexina (**2**), isoorientina (**3**), orientina (**4**) (**Fig. 3**), escaftósido, isoescaftósido, isovitexina-2'-O-glucopiranósido, 2-glucosilapigenina, swertesina, entre otros (Pereira y cols., 2005). De los derivado flavonoles y flavonas encontramos el kempferol, quercetina, luteolina, crisina y apigenina (Dhawan y cols., 2004). Todos estos flavonoides se encuentran principalmente en las hojas de la planta, teniendo su máximo de concentración entre los periodos pre y post florales (Méndez y cols. 2001).

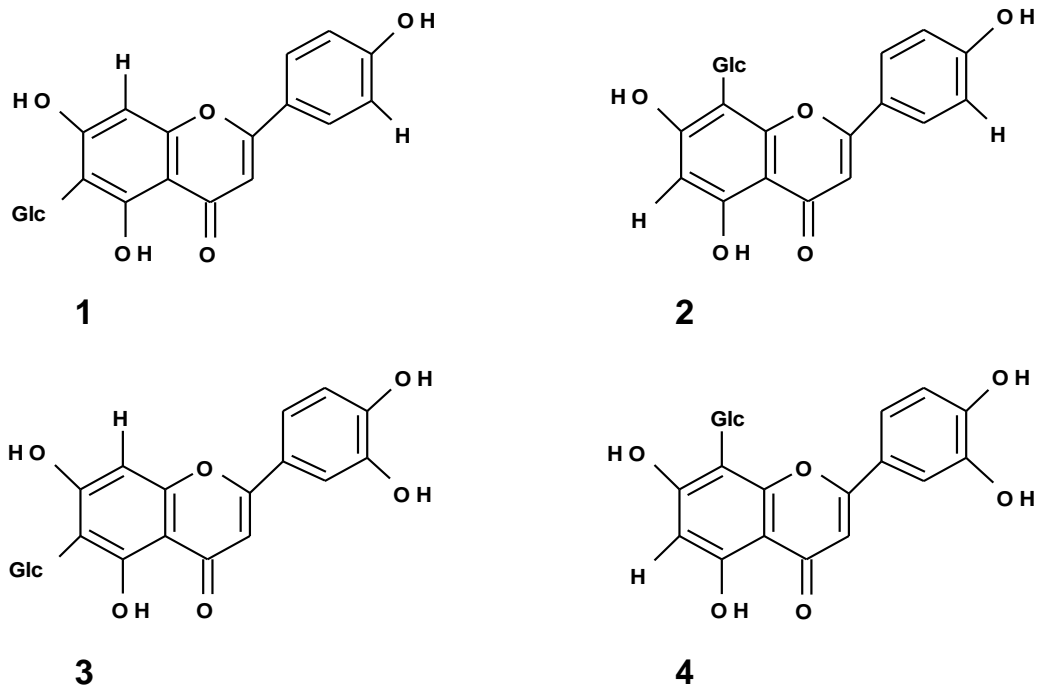


Fig. 3: Estructuras de los principales flavonoides encontrados en las especies de *Passiflora*.

Los alcaloides, por su parte están presentes en concentraciones cercanas al 0,1% aproximadamente y son derivados del sistema cíclico β -carbolina, siendo los principales el harmano (**5**) y la harmina (**7**) (Frye y Haustein, 2007), encontrados en concentraciones de 0,012% y 0,007% respectivamente. Otros alcaloides son el harmol (**6**), harmalol (**8**) y harmalina (**9**) (**Fig. 4**) (Grice y cols., 2001).

Otros metabolitos encontrados son los derivados de la benzopirona como el maltol e isomaltol (Patel y cols. 2009a), glicósidos cianogénicos como la tetrafilina β sulfato (Jaroszewsky y cols., 2002), gran cantidad de aceites esenciales entre los que podemos nombrar 2-pentanol, 2-heptanol 2-nonanol, hexanol (1.4%), alcohol bencílico (4.1%), linalool (3.2%), 2-feniletíl alcohol (1.2%), metil éster del ácido 2-hidroxibenzoico (1.3%), carvona (8.1%), trans-anetol (2.6%), eugenol (1.8%), isoeugenol (1.6%), β -ionona (2.6%), α -bergamotol (1.7%) y fitol (1.9%)

(Wohlmuth y cols. 2010). Algunos constituyentes que le otorgan su aroma característico son limoneno, zizaeno y α -pinenol. Algunos fitoesteros también están presentes como el sitoesterol y estignaesterol (Dhawan y cols., 2004).

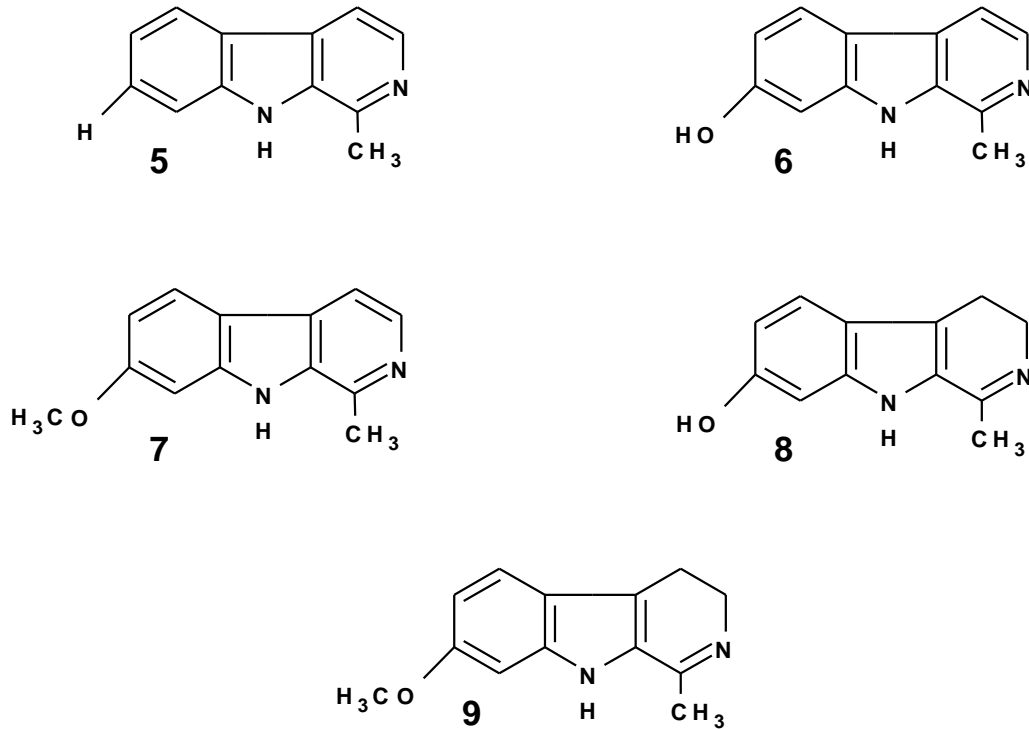


Fig. 4: Estructuras de los principales alcaloides encontrados en las especies de *Passiflora*.

Dentro de los flavonoides encontrados, la crisina (5,7-dihidroxiavona) (**11**) (**Fig. 5**) es uno de los que mayor interés reúne y uno de los pocos que se encuentran casi exclusivamente en *P. caerulea*. Este flavonoide parece ser el responsable de la gran parte de los efectos farmacológicos de *P. caerulea*, ya que se han demostrado sus efectos ansiolíticos en ratas, pero no en humanos, evaluando la teoría que probablemente modula los receptores GABA-a del cerebro, ya que al ser suministrado el antagonista flumazenilo a las ratas, su efecto ansiolítico disminuyó radicalmente (Wolfman y cols., 1994). Otro efecto

fisiológico que tiene la crisina es sobre las hormonas sexuales, en donde puede estimular la producción de testosterona en las células de Leydig, a través de un mecanismo que involucra la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, la cual es la encargada de la transferencia mitocondrial del colesterol (Jana y cols., 2008), de forma paralela también se ha vinculado con una posible actividad como antagonista de la aromatasa y sobre la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP), todas estas propiedades sobre las hormonas sexuales y en proteínas de expulsión podrían ser de utilidad clínica en el tratamiento del cáncer, sobre todo en cáncer de mama. Finalmente se ha investigado su efecto como posible inhibidor de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) al bloquear las señales mediadas por interleukina-6 (IL-6) y otros mediadores de la inflamación como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Shin y cols., 2009).

Estudios realizados en otras especies de *Passiflora* mencionan diversos compuestos, los cuales si bien no fueron aislados de *P. caerulea* no se descarta que estén presentes en esta especie. Uno de estos compuesto es un derivado poliacetilénico, denominado passicol, (presente en la especie *Passiflora edulis*), compuesto que tendría grandes propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Birner y Nicolls, 1973). Otros son metabolitos del tipo terpenos entre los que destacan los derivados del cicloartano triterpeno (ácido ciclopasifloico) y diversas saponinas derivadas de terpenos denominadas ciclopasiflocidos (Yoshikawa y cols., 2000a), ambos compuestos aislados en *P. alata* y *P. edulis*. Si bien estos últimos metabolitos no cuentan con estudios que avalen alguna propiedad farmacológica, en la actualidad se les pretende dar un uso como marcadores propios de cada especie para lograr identificarlas de manera precisa (Yoshikawa y cols., 2000b). Finalmente cabe destacar el derivado α -pirona, también denominado “passifloricina”, el cual ha sido aislado de *P. foetida* (Echeverri y cols., 2001) y al que se le vincula grandes propiedades antiparasitarias, sobre todo en *Leishmania panamensis* (Cardona y cols., 2004).

Probablemente el metabolito que más atracción genera es un derivado de la flavona, la 5,6-benzoflavona, también denominado β -naftoflavona (**10**) (**Fig. 5**). Básicamente este fitosustituyente está formado por un anillo bencénico unido a una flavona, y si bien su descubrimiento fue en *P. incarnata*, no se descarta que esté presente en otras especies de *Passiflora* (Wang y Morris, 2008). Grandes son las cualidades farmacológicas atribuibles a esta molécula, entre las que podemos destacar su capacidad detoxificante, al ser un inductor del complejo enzimático P₄₅₀ y de la uridindifosfoglucuronato glucuronosiltransferasa (UGT), lo que le daría ciertas propiedades quimiopreventivas. Por otra parte estudios realizados en ratas adictas al alcohol etílico, demostraron que la administración de esta flavona, ayuda radicalmente en la reducción del stress post abstinencia, posiblemente por una modulación del sistema endocannabinoide (Dhawan y cols., 2003a). Otra propiedad farmacológica que ha sido descrita es que este metabolito actúa como un inhibidor de la aromatasa, esta propiedad estaría involucrada en un posible efecto afrodisíaco, el cual ha sido experimentado en ratas con resultados alentadores (Dhawan y cols., 2003b).

Los alcaloides, sobre todo el harmano, han sido identificados como potentes inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), lo cual le podría conferir ciertas aplicaciones como antidepresivo. También se está investigando sobre su capacidad vasodilatadora y neuroprotectora (Ingale e Hirbale, 2010).

Como fue mencionado anteriormente, el nuevo metabolito, 5,6-benzoflavona, es actualmente el más estudiado de todos, esto en vista de que sus propiedades farmacológicas han sido múltiples y variadas (Dhawan y Sharma, 2003), siendo éste vinculado como el principal responsable de sus efectos en el sistema nervioso central, aunque todavía esto no está del todo aclarado (Patel y cols., 2011).

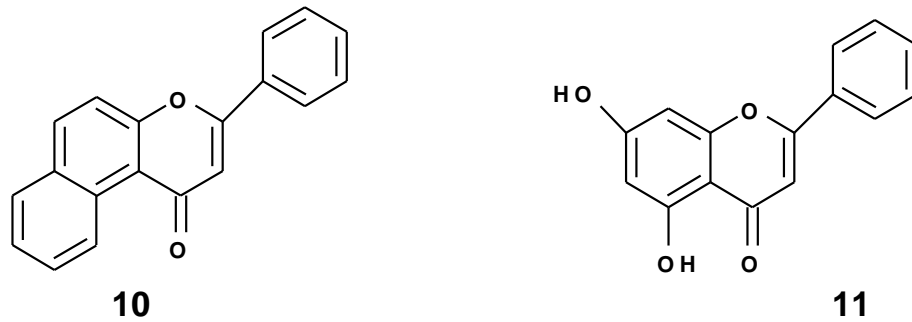


Fig. 5: Estructuras de nuevos metabolitos encontrados en la especie *Passiflora*.

Una propiedad farmacológica que ha sido estudiada, pero a la cual no se hace referencia para su uso terapéutico, es la capacidad antioxidante y antirradicalaria que presenta esta familia. En un estudio realizado por Borneo y cols. (2009), se comparó la capacidad antioxidante de diferentes especies vegetales de Argentina, por medio de la medición del poder antioxidante del hierro reducido (FRAP), el cual demostró que *P. caerulea* posee una capacidad antioxidante de nivel medio. De similar forma un estudio realizado por Mastekiova y cols. (2008) que evaluó la capacidad antirradicalaria de *P. incarnata*, por medio del ensayo con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), demostró que esta especie posee una gran capacidad antirradicalaria. Esta actividad fue vinculada a los flavonoides quercetina, isovitexina y orientina (siendo este último el de mayor capacidad captadora de radicales libres), todos los cuales también han sido descritos en *Passiflora caerulea*. Estas propiedades no serían las mismas en todas las especies de *Passiflora*, ya que la concentración de estos metabolitos varía de una a otra especie y también del extracto utilizado de la planta, siendo el de mayor actividad antioxidante y antirradicalaria el extracto etanólico.

Como se puede apreciar de las investigaciones realizadas, el extracto flavonoico de la planta es vinculado como el principal responsable de sus efectos ansiolíticos y tranquilizantes (Akhondzadeh y cols., 2001), pese a que aún no está del todo dilucidado cuál sería el o los principales flavonoides responsables de este

efecto, en donde se piensa que la vitexina, la 5,6-benzoflavona y la crisina estarían encabezando esta lista (Brown y cols., 2007), puesto que son diversos los estudios que muestran una actividad agonista sobre los receptores GABA-a e inhibidora de la reacción de las fibras rápidas Na⁺-dependientes. Los flavonoides tendrían en parte una gran capacidad antirradicalaria, lo que se vincula con una posible neuroprotección (Masteikova y cols., 2008).

Si bien la gran mayoría de los estudios realizados sobre los metabolitos secundarios de las distintas especies de *Passiflora* y sus propiedades farmacológicas son modernos, la utilización de la especie como medicamento se remonta a civilizaciones precolombinas, como los “piel roja” de Norteamérica (Dhawan y cols., 2004) y los indígenas *guaraníes* de Argentina. Diversas son las Farmacopeas mundiales, como la Española, Japonesa y Europea que mencionan a *Passiflora incarnata* L. como elixir ansiolítico, inductor del sueño y antiespasmódico, pero no se hace una mayor referencia a *Passiflora caerulea* para ser usada con estos fines farmacológicos. En la actualidad se están investigando una gran cantidad de aplicaciones terapéuticas, entre ellas su uso como antitusivo, broncodilatador, antimicrobiano (Patil, 2010), anticancerígeno, antihipertensivo, anticonvulsivante, afrodisíaco y coadyuvante en el tratamiento de las adicciones a drogas (nicotina, marihuana, opiáceos) (Dhawan y Sharma, 2003).

Pese a que su perfil toxicológico no refleja mayores problemas, se han descrito reacciones adversas como mareos, náuseas, somnolencia, hipotensión y rash cutáneo, los cuales, dependiendo de la dosis y de la sensibilidad individual, pueden progresar a vómitos, desmayos, vasculítis cutánea, bradicardia, arritmia, reacciones de hipersensibilidad y alteraciones del intervalo QT (Fisher y col., 2000). Pese a esto aún conserva un perfil muy amplio de seguridad, puesto que son muy escasos los pacientes que han sufrido estos signos y síntomas

suministrando las dosis adecuadas, siendo los afectados pacientes que abusaron de su medicación (Tabach y cols. 2009).

En virtud de los beneficios terapéuticos que tiene esta planta y los bajos efectos secundarios que presenta, es que ha estado incluida en muchas Farmacopeas a nivel mundial, bajo diversas formas farmacéuticas (gotas hidroalcohólicas, extractos fluidos, tinturas madres, comprimidos, cápsulas, entre otras) y en donde es especificado cuales son las características físicoquímicas que debe cumplir la planta para ser utilizada con fines medicinales. Para estandarizar la droga cruda, en general, la Farmacopea Europea señala que primero se debe realizar un análisis organoléptico a la materia prima, lamentablemente sólo se especifican técnicas que permiten corroborar que se trata de *Passiflora incarnata* L., la cual en la actualidad es la única permitida para ser usada como ansiolítico (única indicación terapéutica aprobada); posteriormente la planta debe ser sometida a un análisis químico, en donde se debe cuantificar la concentración de alcaloides (expresados como concentración de harmano) y de flavonoides (expresados como concentración de vitexina) los cuales no pueden ser menores a 0,01% y 1,5% respectivamente (Nápoles y cols., 2007).

En la Farmacopea Chilena del año 1941 (oficial hasta la fecha) se hace referencia a una descripción macromorfológica de la especie *Passiflora incarnata* Linn, sólo con fines de identificación visual, no señalándose ningún tipo de análisis químico cualitativo ni cuantitativo. De igual manera no se citan ni describen las indicaciones terapéuticas de la planta.

Por otra parte la Farmacopea Europea contiene una descripción y análisis bastante detallado sobre la *Passiflora incarnata* L. En ella podemos apreciar una breve descripción macromorfológica y micromorfológica de la planta, además de las partes que deben ser utilizadas, que son señaladas como las partes aéreas

(hojas, flores, frutos) y análisis de identificación y estandarización tanto físicos como químicos.

Dentro de los procesos físicos señalados para la estandarización de la especie y las partes de esta a utilizar se señalan la cuantificación de humedad y ceniza de las partes aéreas. Para cuantificar la humedad se deben pulverizar cerca de 1,000 g de partes aéreas ya secas de la planta, luego introducirla en una estufa a 105 °C por 2 horas (h), para finalmente dejar enfriar en desecadora y pesar el contenido. Similar experiencia se realiza a la hora de cuantificar cenizas, en donde se pulverizan las partes aéreas y se pasan por una malla de tamiz N°20 (mesh), luego se introducen en una mufla a 105 °C por una hora y se aumenta gradualmente la temperatura hasta llegar a los 650 °C, en donde se retira y pesa la muestra. Los porcentajes de humedad y ceniza que debe tener la muestra no deben ser superiores a 10% y 13% del total, respectivamente.

Como técnica de identificación entre una especie de *Passiflora* y otra se señala la utilización de Cromatografía en Capa Fina (TLC). Esta técnica se basa en la afinidad que tienen los diferentes metabolitos que hay en el extracto de la especie vegetal con el solvente (fase móvil) utilizado para esos fines. Esta técnica es rápida y económica, por lo que resulta bastante útil para poder diferenciar especies vegetales, pero no obstante presenta problemáticas que limitan o ponen en duda la real utilidad de la técnica, ya que depende mucho de la experticia del analista, al tener que interpretar éste los diferentes colores que se ven en la placa, no tiene utilidad para cuantificar y sólo se hace referencia en la Farmacopea Europea a tres especies de *Passiflora* (*P. incarnata*, *P. caerulea* y *P. edulis*).

Finalmente se señala en la Farmacopea Europea que la cuantificación de los flavonoides de las sumidades aéreas secas e la planta o del extracto de ésta, por medio de técnicas espectrofotométricas, es el método estándar para determinar si la especie de *Passiflora* a utilizar como droga es la adecuada para

tal uso. En esta técnica el extracto alcohólico de la planta es tratado con una mezcla de metanol (MeOH) y ácido acético, para luego aplicar otra mezcla de ácido bórico y ácido oxálico, ambos disueltos en ácido acético, se esperan 30 minutos y se mide la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 401 nm. Finalmente se procede a corregir matemáticamente el valor de absorbancia obtenido, el cual no debe ser menor a un 1,5% de flavonoides (expresados como vitexina). Esta técnica toma radical importancia a la hora de ver las diferencias en concentraciones que podemos encontrar entre diferentes especies de *Passifloras* (Muller y cols., 2005). Un estudio realizado por De-Pairs y cols. (2002), demostró una diferencia notable en la concentración de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de las especies *P. alata* D. y *P. edulis* S., siendo notoriamente mayor el de *P. edulis*, requiriendo incluso la mitad menos de dosis que *P. alata* (100 mg/Kg para *P. alata* y 50 mg/Kg para *P. edulis*) para obtener un efecto ansiolítico en ratas.

Como se puede observar las técnicas de identificación y de control de calidad descritas anteriormente son rápidas, económicas y fáciles de realizar, no obstante en la actualidad se han puesto en relieve una serie de problemáticas que pueden llegar a cuestionar la real utilidad y fiabilidad de las técnicas descritas en la Farmacopea Europea. Entre las problemáticas descritas podemos mencionar los nuevos estudios que demuestran una gran actividad farmacológica de los alcaloides, los cuales no son cuantificados, la falta de claridad a la hora de asignar el efecto ansiolítico a algún metabolito secundario, la variabilidad que hay en el contenido de metabolitos secundarios de una especie a otra y las falencias que muestran las técnicas convencionales de estandarización (TLC y espectrofotométricas) (Pereira y cols., 2004). Todas estas observaciones conllevan a que en un futuro se deban aplicar otro tipo de técnicas para estandarizar los parámetros a medir a la hora de identificar que especie de *Passiflora* se está utilizando y su real utilidad como fármaco. Probablemente las técnicas de separación y cuantificación cromatográficas, tal como la Cromatografía

Líquida de Alta Resolución (HPLC), se muestran como una de las mejores técnicas para este propósito. En general el HPLC ha demostrado tener una gran utilidad a la hora de identificar y cuantificar los diversos metabolitos descritos en las especies de *Passiflora*, demostrando ser una técnica confiable y con una sensibilidad mayor al de otras técnicas (Pereira y cols., 2005).

Por todo lo anterior, es interesante profundizar aún más en el estudio de la especie *Passiflora caerulea* L., sobre todo en métodos que permitan su estandarización, identificación y cuantificación de sus metabolitos secundarios, con el fin de obtener información más actualizada, útil y detallada para el desarrollo de futuras monografías, las que serán de gran ayuda para establecer parámetros de calidad, eficacia y seguridad de esta planta como medicamento, y en forma paralela aportar información en la búsqueda de nuevas aplicaciones terapéuticas, tanto en humanos como en animales, de la misma.

Hipótesis.

Existen evidencias experimentales sobre la producción de metabolitos secundarios, tanto de polifenoles como de alcaloides, por parte de las especies de *Passiflora*, que son utilizados por una parte como mecanismos de homeostasis y defensa de la misma especie vegetal y por otra parte por la medicina debido a sus propiedades farmacológicas, las cuales son mencionadas en las diversas Farmacopeas mundiales, oficiales y no oficiales.

La especie *Passiflora caerulea* L. podría presentar similares características fisicoquímica a la de otras especies de *Passiflora* ya caracterizadas y estandarizadas, convirtiéndola en una potencial droga que podría ser utilizada como fitofármaco, incluyéndola en las actuales Farmacopeas.

Objetivos.

1. Objetivo general

- Contribuir al conocimiento químico de la especie *Passiflora caerulea* L.

2. Objetivos específicos

- Extraer, aislar, caracterizar y cuantificar, mediante técnicas convencionales fitoquímicas, los diferentes metabolitos acumulados en la especie *Passiflora caerulea* L.
- Determinar si la presencia y concentración de estos metabolitos cumplen con los estándares de calidad, descritos por las Farmacopeas oficiales, para otras especies de *Passiflora*, con el fin de poder utilizar la especie *Passiflora caerulea* como medicamento.
- Incorporar a la nueva Farmacopea Chilena un método de identificación y estandarización de *Passiflora caerulea* L. que garantice su calidad en los preparados farmacéuticos nacionales y como materia prima para exportación e importación.
- Determinar la posible actividad antirradicalaria y antioxidante del extracto metanólico de *Passiflora caerulea* L.
- Comparar químicamente el extracto metanólico de *P. caerulea* L. con tres preparados hidroalcohólicos comerciales a base de *P. incarnata* L.

Materiales y Métodos.

1. Materiales.

1.1 Equipos.

- Cromatógrafo de gas Auto System XL con detector FID, Perkin Elmer.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear AVANCE 400, Bruker.
- Espectrofotómetro UV-Vis Lambda EZ201, Perkin Elmer.
- Espectrofotómetro IR- FT Spectrum 100, Perkin Elmer.
- Baño ultrasónico 3069 USC 3, Rapidograph.
- Pulverizador para TLC Merck con cabeza pulverizadora.
- Rotavapor R-200, Büchi.
- Balanza analítica AUX 120, Shimadzu.
- Balanza granataria de precisión LT-620, Acculab.
- Placa calefactora HMS-102, Fargo.
- Lámpara compacta UV (254 y 365 nm) Crisol UVGL-25.
- Molino de laboratorio A11 Basic 230V IKA.

- Tamizador de malla metálica ASTM de mech N°7, N°20 y N°40, Cisa.
- Microscopio Leica.
- Estufa BD-53, Binder.
- Mufla Vulcan 3-S50, Ney.
- Material volumétrico de vidrio clase A.
- Cromatoplasmas de sílica gel F₂₅₄, Merck.
- Columna de sílica fundida de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µL de diámetro SPtm-2560, Supelcotm.
- Filtros de membrana de PVDF 0,45 µL de poro, Supelco.
- Jeringa con filtro de sílica C-18 Discovey DSC-18 SPE, Supelco.
- Jeringas estériles 5 mL Millex-HV.
- Jeringa punta roma 5 µL, Hamilton.
- Flash sílica gel 32-63 µm, Dynamic Adsorbents Inc.

1.2 Reactivos.

- Bromuro de potasio para IR, Merck.

- Cloroformo 99,9% grado HPLC, J.T. Barker.
- Metanol 99,9% grado HPLC, J.T. Barker.
- Metanol GA técnico.
- Acido fórmico anhídrido 99,8% p.a., Merck.
- Hidróxido de sodio en lentejas, Interlab.
- Acetato de etilo 99,8% p.a., Winkler.
- Acetato de etilo GA técnico.
- Aminoetiléster del ácido difenilbórico, Sigma-Aldrich.
- Polietilen glicol 400.
- Acido acético glacial 99,8% p.a., Merck.
- Acido bórico 99,8% p.a., Merck
- Acido oxálico 99,8% p.a., Merck
- Éter de petróleo 30-60, 99,8% p.a., Winkler.
- Éter dietílico 99,8% p.a., Merck.

- Etanol 99,8% p.a., Merck.
- Trifloruro de boro, Sigma-Aldrich.
- Hexano GA técnico.
- Acetonitrilo 99,8% p.a., Merck.
- Arena de mar p.a., Merck.
- Celita R-566, Supelco Analytical.
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, Sigma-Aldrich.
- β -caroteno tipo 1 aprox. 95% UV, Sigma-Aldrich.
- Estándares polifenoles: Quercetina, ácido cafeico, keampferol, daidzeína, genisteína y formonometina, grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Polifenoles: Rutina e hiperósido, grado HPLC, Chromadex.
- Solución de hidrato de cloral al 60% p/p para microscopía.
- Tinciones Sudán III, Lugol y Azul de Toluidina para microscopía.

2. Métodos.

2.1 Recepción, análisis organoléptico y de calidad a *Passiflora caerulea* (métodos extraídos de la Farmacopea de la Unión Europea).

La muestra de *P. caerulea* fue donada por Laboratorios Knop y corresponden a 1130,33 g de muestra seca, la cual se encontraba limpia, no obstante, se desconocen datos de su origen, del estadio y fecha en que fue recolectada.

Se observó detalladamente la muestra entregada, tomando principal énfasis en el color, composición de las sumidades, aroma, estado de conservación y pureza de las partes de la planta a analizar, basándonos principalmente en la descripción macromorfológica entregada por la Farmacopea Europea para *P. incarnata*. Luego fue pesada y se procedió a separar una contramuestra equivalente al 6,62% de la muestra total (aproximadamente 80,21 g).

2.1.1 Identificación micromorfológica.

Se pulverizaron 5 g de la contramuestra con el molino de laboratorio, para posteriormente tamizarla en una malla metálica de mesh 40, obteniendo así un polvo fino. Se preparó un portaobjeto con muestra, a la cual se agregaron 2-3 gotas de una solución de hidrato de cloral al 60% p/p y se observó al microscopio con un aumento de 40x, 100x y 400x. Luego de realizar las observaciones, se prepararon tres nuevas muestras a las cuales se les agregó las tinciones Sudán III, Lugol y Azul de Toluidina respectivamente y se observaron al microscopio con un aumento de 40x.

2.1.2 Cuantificación de humedad y ceniza.

De la contramuestra de *P. caerulea*, se tomaron tres muestras de 2,4924 g, 2,4997 g y 2,8571 g, respectivamente, las cuales fueron pasadas por un tamiz de mesh N°7 y puestas por separado en diferentes cápsulas Petri, para luego ser llevadas a la estufa a 105 °C por 2 h. Una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron enfriadas en desecador y pesadas. El proceso anterior fue repetido, hasta peso constante.

Para la determinación de cenizas se pesaron 11,9801 g de la contramuestra, se pulverizaron en el molino y se pasaron por un tamiz de mesh N°20, Se tomaron 3 muestras de este polvo, las cuales fueron puestas en tres crisoles previamente calcinados a 180 °C por 5 h en la mufla para eliminar la humedad presente en ellos. Los crisoles con la muestra se dejaron 1 h a 105 °C, luego se incrementó gradualmente la temperatura hasta llegar a los 605 °C, en donde se dejaron las muestras por 4 h. Transcurrido el tiempo se retiraron las muestras, se enfriaron en desecador y se pesaron.

2.2 Técnicas espectroscópicas para la identificación del compuesto extraído de *P. caerulea*.

El espectro de resonancia magnética nuclear monodimensional (1D ¹H-RMN, ¹³C-RMN y 135-DEPT) y bidimensional (2D HSQC) se registraron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker modelo AVANCE 400; ¹H a 400,13 MHz y ¹³C a 100,62 MHz, utilizando como solvente para la muestra cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) (Reyes, 2010).

El espectro de absorción infrarrojo de la muestra se registró en un espectrofotómetro IR-FT Perkin Elmer, modelo Spectrum 100, el cual utilizó bromuro de potasio (KBr) para preparar la pastilla; esto se logró moliendo en un mortero de ágata 1 parte de la muestra y 100 partes de KBr y comprimiendo la muestra en una prensa de troquel hasta obtener la pastilla translúcida, luego la muestra fue medida a una longitud de onda entre los 4000 y 450 cm^{-1} .

2.3 Extracción y aislamiento de compuestos en *Passiflora caerulea*.

Para la extracción de los metabolitos de *P. caerulea* se tomaron los 1130,33 g de muestra y se sometieron a extracciones sucesivas a temperatura ambiente. Primero se dejó macerar con hexano por 1 semana al interior de un recipiente, agitando la mezcla diariamente. Finalizado el proceso de maceración se filtró con gasa/algodón y se almacenó el líquido obtenido. La operación anterior fue repetida con el marco obtenido de la primera filtración y se almacenó la nueva solución obtenida. El marco resultante fue guardado. Las dos soluciones obtenidas fueron reunidas y concentradas en rotavapor a una temperatura entre 50-52 °C, hasta extraer todo el hexano. Del extracto hexánico total obtenido (11,90 g) se separó una contramuestra de 0,10 g, la cual fue guardada en frasco ámbar a temperatura ambiente.

El marco obtenido de la extracción anterior fue secado y puesto a macerar con metanol durante 72 h. La muestra fue filtrada y el líquido obtenido almacenado. Se repitió este proceso de maceración con metanol por 72 h y el extracto obtenido fue mezclado con el primero y concentrado a sequedad en rotavapor a una temperatura entre 60-65 °C. Del extracto metanólico total obtenido (125,22 g) se separó una contramuestra de 8,2460 g y se guardó en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

2.3.1 Extracto hexánico.

Antes de proceder a separar los compuestos obtenidos del extracto hexánico de *P. caerulea* (11,80 g), éste fue disuelto en un vaso precipitado con una mezcla de hexano:cloroformo (1:1) y se le agregó 150 mL de acetonitrilo. Esta solución fue dejada en placa calefactora a 50 °C por 1 h y fue retirada y sometida a golpe de frío (baño de hielo), de esta manera se pudo obtener un precipitado grueso (*cake*), el cual corresponde a las ceras obtenidas en el extracto. Posteriormente al extracto hexánico libre de ceras (0,6479 g), se le realizaron sucesivas TLC con el objeto de determinar la fase móvil que entregue una mejor resolución entre los metabolitos a separar, resultando que la mejor mezcla es la de hexano:acetato de etilo (AcOEt) (9:1), respectivamente. Luego el extracto fue purificado mediante Cromatografía en Columna (CC) utilizando sílica gel de 0,032-0,063 nm como fase estacionaria, arena de mar como filtro y una mezcla de hexano:AcOEt de polaridad creciente como fase móvil, recolectando las fracciones obtenidas en tubos de ensayo de 20 mL y monitoreándolas por TLC

2.3.2 Extracto metanólico.

El extracto metanólico (116,97 g) fue sometido a una extracción de clorofila y ceras la cual fue realizada por filtración en dos pasos. Primero se eluyó este extracto, previamente disuelto en metanol, a través de una columna cromatográfica, la cual contenía en su interior, algodón, arena y celita pulverizada. Posterior a esto se recolectó el líquido obtenido de la columna y se hizo pasar por un embudo de porcelana, el cual tenía adosado un filtro de roca y en donde fueron agregados 3,5 cm de celita pulverizada y 1 cm de arena de mar y se filtró al vacío en matraz Kitasato. El líquido recolectado en el matraz Kitasato se hizo pasar nuevamente por el embudo. Una vez terminado el proceso de filtración, la muestra fue concentrada en rotavapor a 60 °C. Una vez obtenido el extracto metanólico libre de clorofila (66,79 g), se procedió a realizar diferentes TLC para determinar la

fase móvil en la que se podrían separar la mayor cantidad de metabolitos secundarios, dando como resultado la mezcla de hexano:AcOEt (70:30).

Finalizado este proceso se separaron los metabolitos obtenidos del extracto metanólico por CC, utilizando como fase estacionaria sílica gel de 0,032-0,063 nm y arena de mar como filtro. Como fase móvil se usó una mezcla de hexano/AcOEt de polaridad creciente, recolectando las fracciones obtenidas en tubos de ensayo de 20 mL y monitoreándolas por TLC. Alrededor de las fracciones 1000 a 1200 (fase móvil hexano:AcOEt (90:10)) se observó un precipitado blanco, el cual fue cristalizado en una mezcla de éter de petróleo:éter dietílico (1:1) y puesto al refrigerador a una temperatura de -20 °C. Una vez obtenido los cristales, estos fueron resuspendidos en hexano y purificados a través una jeringa con sílica gel C-18 (**Fig. 6**).

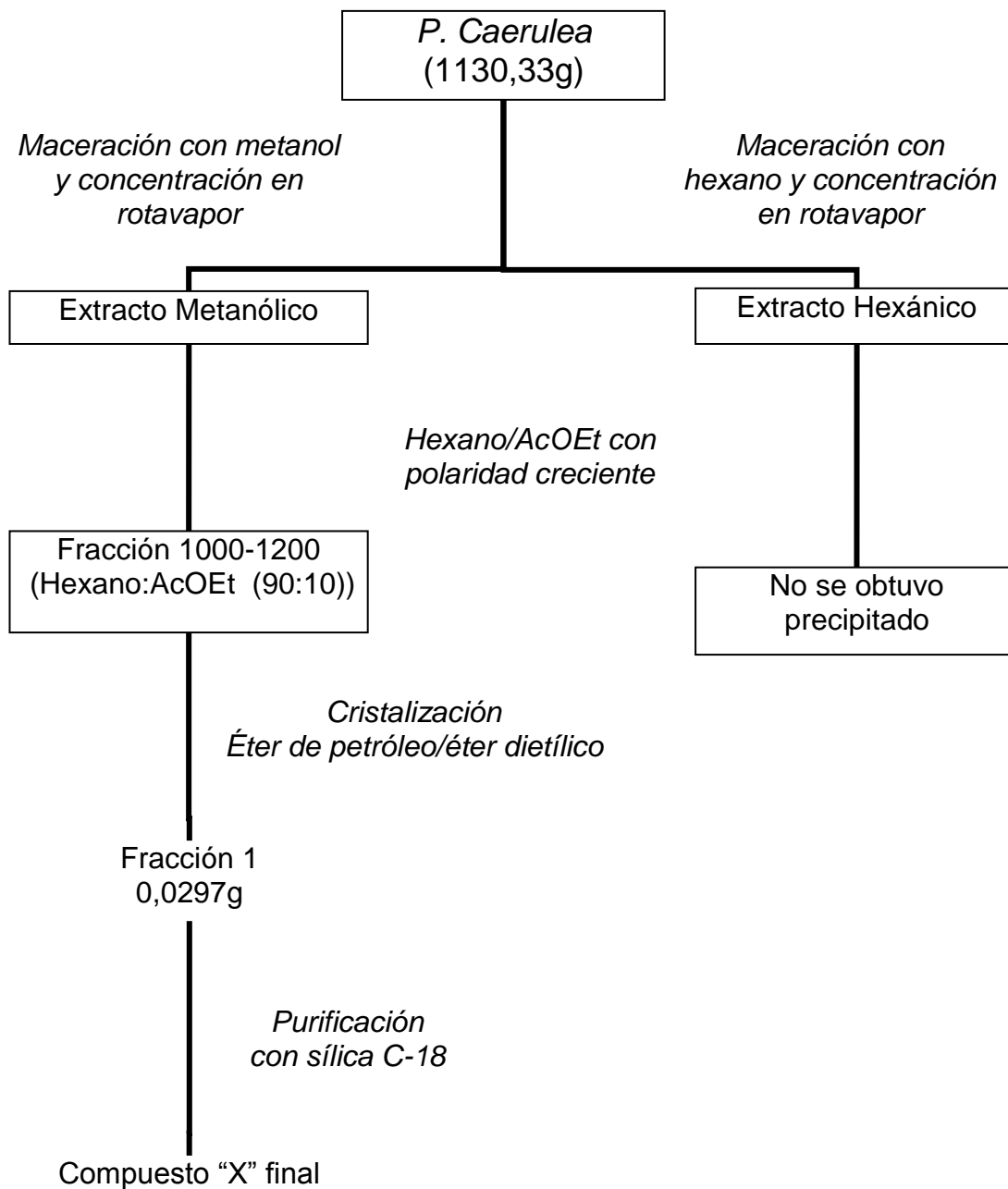


Fig. 6: Esquema de separación y purificación de los extractos hexánico y metanólico de *P. caerulea*.

2.4 Análisis químico a *P. caerulea*.

2.4.1 Identificación de la especie por TLC (Wagner y Blad, 1996).

De la contramuestra del extracto metanólico (8,2460 g) se tomaron 0,0050 g y fueron diluidos en un matraz de aforo de 10 mL con MeOH, a modo de generar nuestra muestra problema de *P. caerulea* (MP). En paralelo se prepararon los estándares de referencia, disolviendo por separado 2,0 mg de rutina, 2,0 mg de hiperósidos, 2,0 mg de quercetina, 2,0 mg de ácido cafeico, 2,0 mg de keampferol, 2,0 mg de daidzeina, 2,0 mg de genisteina y 2,0 mg de formonometina; en matraces de aforo de 10 mL con MeOH. Paralelamente a esto, se utilizaron como patrones comerciales de comparación, tres formas farmacéuticas comerciales de extractos etanólicos de *Passiflora incarnata*, los cuales fueron rotulados para efectos de este estudio como muestra comercial MCA, MCB y MCC. Una vez preparada la MP y los patrones se realizó una TLC (placa de 14 cm de largo por 8 cm de ancho) de estas, utilizando como fase móvil una solución de AcOEt:ácido acético glacial:ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Una vez retirada la placa de la cámara, se dejó secar a temperatura ambiente y se roció con una solución de ácido aminoetilesterdifenilbórico en MeOH de concentración 10 g/L y luego con una solución de polietilenglicol 400 en MeOH de concentración 50 g/L, para dejar secar por 30 minutos a temperatura ambiente, revelando con lámpara UV a 365 nm.

Para cuantificar la distancia recorrida por cada compuesto separado por TLC de la muestra problema se utilizó el cálculo del *ratio of front* (Rf) el cual se expresa como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil desde el origen hasta su frente}}$$

El experimento se repitió, pero esta vez se sembró en la placa para TLC las tres muestras comerciales, la MP y como estándar de polifenoles sólo se utilizó el hiperósido y la rutina. Esta TLC también utilizó como fase móvil la descrita anteriormente y fue rociada con ácido aminoetilesterdifenilbórico y polietilenglicol 400, para finalmente revelar a la misma longitud de onda anterior.

2.4.2 Cuantificación de flavonoides en extracto metanólico por espectrofotometría UV-Vis.

0,0538 g de la contramuestra del extracto metanólico fueron disueltos con etanol al 60% v/v, filtrado con filtro de PVDF y llevados a matraz de aforo hasta completar 100 mL de solución. Luego se tomó una alícuota de 5 mL y se evaporó el solvente en rotavapor, obteniendo un residuo seco el cual fue reconstituido con 8 mL de una solución de MeOH:ácido acético glaciado (10:100) y llevado a un matraz aforado de 25 mL. El recipiente fue lavado con 3 mL más de solución y se incorporó al matraz anterior. Se agregaron 10 mL de una solución formada por una disolución de ácido bórico 25 g/L y ácido oxálico 20 g/L ambos diluidos en ácido fórmico, para finalmente completar con ácido acético glaciado hasta aforar los 25 mL. La operación fue realizada por triplicado en donde la única variante fueron las muestras extraídas y pesadas, al inicio del experimento, de la contramuestra del extracto metanólico, siendo los otros dos pesos de 0,0541 g y 0,0551 g.

Paralelo a esto a cada muestra preparada se le formuló una solución blanco. Para esto se tomaron 5 mL de la muestra stock y se secaron a rotavapor. El residuo seco fue recolectado con 8 mL de una solución de MeOH:ácido acético glaciado (10:100) y llevados a un matraz de aforo de 25 mL. El recipiente fue lavado con 3 mL de la solución MeOH:ácido acético glaciado y se incorporaron al matraz de aforo. Luego se le agregaron 10 mL de ácido fórmico y se aforo con ácido acético glaciado hasta completar los 25 mL.

Luego de 30 minutos ambas muestras fueron llevadas al espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda EZ201 y se midió la absorbancia a 401 nm. El porcentaje de flavonoides se expresara como porcentaje de vitexina y se calculó con la siguiente formula:

$$\text{\% Flavonoides = (Expresados como vitexina) } \frac{A \times 0,8}{m}$$

En donde:

- A = Absorbancia obtenida.
- m = Masa en gramos de la muestra utilizada.

Para comparar los datos obtenidos en nuestra muestra de *P. caerulea*, se realizó el mismo procedimiento detallado anteriormente, pero esta vez para la muestra MCA, debido a que era el extracto que presentaba la mayor cantidad de muestra. Dado que el extractos de la muestra MCA se encontraba en una solución hidro-alcohólica la cual no detallaba la concentración de extracto o la cantidad de droga vegetal utilizada en su preparación, se tomaron cuatro alícuotas (para tres muestras y un blanco) de 5 mL cada una y se llevaron a rotavapor a 60 °C hasta obtener el extracto libre de solvente. Posteriormente estos extractos fueron sometidos al procedimiento descrito anteriormente y se leyó la absorbancia a 401 nm. Las tres muestras, libres de solvente, de la MCA pesaron 0,1330 g, 0,1402 g y 0,1489 g.

2.4.3 Análisis y cuantificación de ácidos grasos.

Para el análisis de ácidos grasos del extracto hexánico de *P. caerulea* primero se procedió a saponificar la muestra a analizar. Para esto se pesaron 0,0860 g de contramuestra del extracto hexánico y se le agrego 1 mL de una solución de hidróxido de sodio en metanol al 0,5% y se dejó saponificar por 5

minutos a baño maría. Luego se le realizaron a la muestra 2 lavados consecutivos con 5 mL de hexano, el cual fue desechado posteriormente, para finalmente agregar 2 mL de trifloruro de boro (BF_3) y dejar derivatizando por 12 h. Finalizado el proceso de derivatización de la muestra se procedió a lavarla 2 veces con 5 mL de hexano y el solvente fue evaporado con nitrógeno (N_2). La muestra fue reconstituida con 1 mL de cloroformo para finalmente obtener la muestra la cual fue inyectada al Cromatógrafo de Gas (CG) Perkin Elmer modelo Auto System XL bajo las siguientes condiciones:

- Gas carrier: Nitrógeno molecular (N_2).
- Presión del gas carrier: 30 psi.
- Temperatura del inyector: 225 °C.
- Temperatura del detector FID: 240 °C.

2.4.4 Capacidad captadora de radicales libres (Hostettman y cols., 2008).

Se pesaron 0,0670 g de la contramuestra del extracto metanólico y se disolvieron en un matraz de aforo de 10 mL con metanol. Paralelo a esto se prepararon dos muestras separadas con 2 mg de rutina y 2 mg de hiperósido ambos en 10 mL de metanol, los cuales fueron utilizados como patrones, en conjunto con las tres muestras comerciales de *Passiflora incarnata*, citadas anteriormente en la sección 2.3.3. Se realizó una TLC con las tres muestras comerciales de *P. incarnata*, la solución problema de *P. caerulea* y los dos polifenoles usados como patrones. La placa se depositó en una cámara de elución y se utilizó como fase móvil una solución compuesta por AcOEt:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Una vez retirada de la cámara, la placa fue secada a temperatura ambiente y fue rociada con una solución de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) al 0,2% en metanol y se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente para finalmente ser observada a la luz del día (**Fig. 7**).

2.4.5 Prueba para la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Passiflora caerulea* (Hostettman y cols., 2008).

Se pesaron 0,0670 g de la contramuestra del extracto metanólico y se disolvieron en un matraz de aforo de 10 mL con metanol. Paralelo a esto se prepararon dos muestras separadas con 2 mg de rutina y 2 mg de hiperósido ambos en 10 mL de metanol, los cuales fueron utilizados como patrones, en conjunto con las tres muestras comerciales de *Passiflora incarnata*, citadas anteriormente en la sección 2.3.3. Se realizó una TLC con las tres muestras comerciales de *P. incarnata*, la solución problema de *P. caerulea* y los dos polifenoles usados como patrones. La placa se depositó en una cámara de elución y se utilizó como fase móvil una solución compuesta por AcOEt:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Una vez retirada de la cámara la placa fue secada a temperatura ambiente y fue rociada con una solución de β -caroteno al 0,05% en cloroformo y se expuso por 1 h a luz UV de 254 nm, hasta que el fondo de la placa se decoloró (**Fig. 7**).

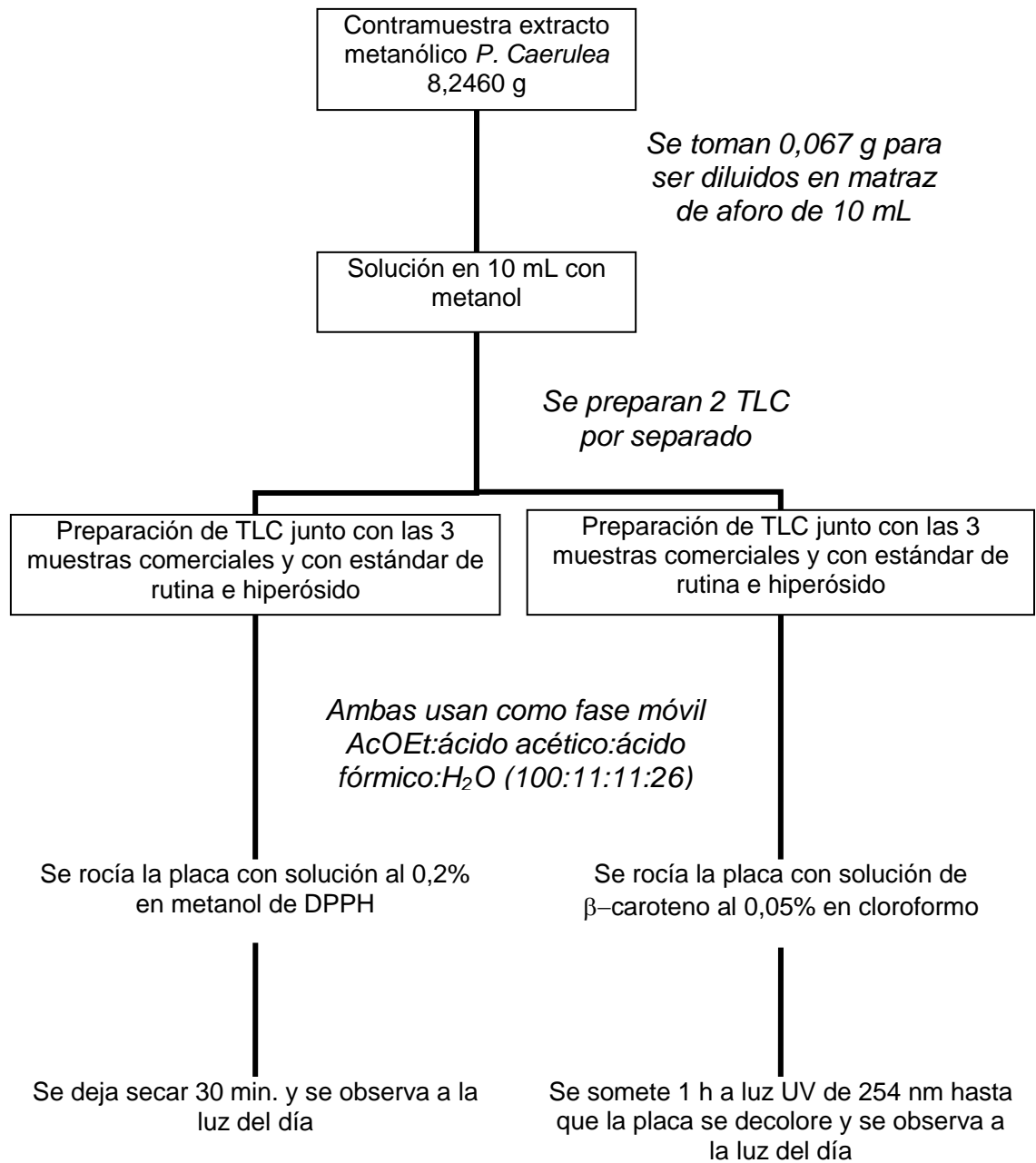


Fig. 7: Esquema de actividad antirradicalaria y antioxidante en *P. caerulea*.

Resultados.

1. Análisis macro y microscópico de la muestra de *P. caerulea*.

Tras el análisis microscópico se constató que la muestra estaba compuesta por hojas, tallos y partes aéreas secas de la planta, sin observarse la presencia de insectos, hongos u otro material ajeno a la planta.

Al observar la muestra pulverizada al microscopio, utilizando hidrato de cloral y un aumento de 40x, se pudo apreciar una gran cantidad de restos de tallos con venas y circulaciones (**Fig. 13**), una pequeña cantidad de cristales de oxalato en conjunto con cristales de apreciable color amarillo (posiblemente parénquima) (**Fig. 14**) y restos de hojas con estomas anomocíticos en su epidermis (**Fig. 15**). Al cambiar el aumento a 400x se pudieron observar los triporatos de polen con forma alveolar (**Fig. 16**), los cuales formaban grandes aglomeraciones (*cluster*) en ciertas zonas de la muestra (**Fig. 17**), también se pudo observar células con vellos falciformes (forma de garfio) principalmente uniseriados (**Fig. 18**). No se observaron restos de flores o frutos.

Al utilizar Sudán III no se observó gran diferencia en la coloración, lo que demuestra la poca presencia de ácidos grasos, los cuales al parecer están en mayor concentración en los restos de tallos de la muestra (**Fig. 19**). La tinción con Lugol no presenta cambios drásticos de color, lo que demuestra la inexistencia de almidones en la muestra (**Fig. 20**). Finalmente al utilizar Azul de Toluidina se observó una fuerte coloración azul en la pared celular de las hojas, lo cual es señal de la presencia de estructuras celulósicas (**Fig. 21**).

2. Determinación de humedad y cenizas.

Para obtener el porcentaje de humedad de la muestra se calculó el porcentaje de pérdida de materia de las tres muestras a las 4 h y se promediaron. El cálculo del promedio arrojó un resultado de humedad para la muestra de 9,85% (**Tabla 1**).

De igual forma para el cálculo de cenizas se procedió a sumar los pesos finales obtenidos de las tres muestras calcinadas y de esta forma calcular el promedio final de cenizas el cual fue de 9,43% (**Tabla 2**).

Tabla 1: Pesos obtenidos de las muestras tras análisis de humedad.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
Peso Inicial (g)	2,4924	2,4907	2,8571	2,6134
1° peso (g) (2 h a 105°C)	2,2503	2,2452	2,5743	2,3566
2° peso (g) (4 h 105°C)	2,2503	2,2439	2,5737	2,3560
%humedad	9,71%	9,91%	9,92%	9,85% de humedad

Tabla 2: Pesos obtenidos de las muestras tras el análisis de cenizas.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
Peso Inicial (g)	2,1547	2,0083	2,0159	2,0596
Peso final (g)	0,1780	0,2461	0,1571	0,1937
%cenizas	8,26%	12,25%	7,79%	9,43% de ceniza

3. Obtención de extractos y determinación estructural a partir de pruebas espectrofotométricas y espectroscópicas.

Los extractos tanto hexánico como metanólico presentaron un color café oscuro, con tenues notas verdosas y un fuerte olor característico. Luego de la extracción tanto de ceras del extracto hexánico como de clorofila del extracto metanólico, las características organolépticas de los extractos no sufrieron grandes modificaciones, sólo en su opacidad. En la **Tabla 3** se muestran los pesos de los extractos obtenidos y su proporción en función de la muestra inicial.

Luego de limpiar de clorofila el extracto metanólico y separar sus metabolitos por CC, se pudo obtener 0,0297 g de un sólido blanco, de textura cerosa y completamente desconocido, al cual denominaremos como compuesto "X".

Tabla 3: Cantidad de extracto obtenido luego de maceración con hexano y metanol.

	Extracto hexánico	Extracto metanólico
Peso inicial de la droga (g)	1130,33	Marco (1118,43 aprox.)
Peso final obtenido (g)	11,90	125,22
% extracto bruto obtenido	1,05	11,20
Peso extracto sin contramuestra (g)	11,80	116,97
Peso ceras extraídas (g)	11,1521	-----
Peso clorofila extraída (g)	-----	50,18
% ceras (del extracto sin contramuestra)	93,72	-----
% clorofila (del extracto sin contramuestra)	-----	42,89
Peso final extracto separado en CC (g)	0,6479	66,79

El análisis del compuesto "X" en el espectrofotómetro IR (**Fig. 22**) dio como resultado una fuerte banda ubicada en las zonas de los 3430 cm^{-1} , la cual señala la presencia de grupos -OH asociados a puentes de hidrógeno hidroxilos o posiblemente fenólicos; dos fuertes bandas ubicadas entre los 2961 y 2937 cm^{-1} , las cuales son propias de los grupos alcanos (C-H) de cadena larga (hibridación sp^3); una banda débil ubicada en los 1650 cm^{-1} , la cual señala la presencia del grupo alqueno C=C; dos bandas de mediana intensidad ubicadas entre los 1465 y 1380 cm^{-1} , bandas que señalan la presencia de grupos metileno (-CH₂-) y grupos metilo (-CH₃) respectivamente; finalmente observamos una banda de mediana intensidad a los 1054 cm^{-1} , la cual es propia de los alcoholes primarios y por ende confirma la presencia de grupos hidroxilo en la molécula. No se observaron bandas propias de los ácidos carboxílicos (1820 - 1660 cm^{-1}), del grupo alquilo (3100 cm^{-1}) y de grupos amino (3600 - 3500 cm^{-1}) (Pavia y cols., 2009).

En la **tabla 4** se muestra de manera más resumida los diferentes grupos funcionales asociados a cada banda obtenida en el espectro IR de la molécula analizada.

El análisis de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) (**Fig. 23**) (**Fig. 25**) dado su complejidad, no fue posible dilucidar en su totalidad la estructura química del compuesto "X". Sin embargo, se observaron bandas singletes (δ 0,90, 1,04, 1,07, 1,27, 1,94) propias de grupos metilos; una banda singlete (δ 5,35) de un posible metileno (olefina); y un multiplete (δ 3,50) posiblemente de un alcohol unido a un -CH₂-, características de posibles estructuras cicloartánicas triterpénicas sustituidas (Pavia y cols., 2009).

Tabla 4: Principales bandas obtenidas tras el análisis IR del compuesto "X" y grupos funcionales asociados a cada una.

Grupo Funcional	Longitud de onda (cm⁻¹)	Intensidad	Estructura	Observación
Alcanos	2961-2853	Fuerte	C-H	Puentes de hidrogeno
	1475	Media	-CH ₂	Metileno
	1375	Media	-CH ₃	Metil terminal
Alqueno	3030	Débil	=CH-	Parte de la cadena
	1642	Débil	C=C	Ubicación <i>trans</i>
Alcohol	3430	Fuerte	O-H	Posible fenol
	1062-1054	Media	C-O	Alcohol primario

4. Identificación de la especie por TLC.

La determinación de la especie de *Passiflora* por TLC fue realizada según Wagner y Blad y comprobada según lo citado por la Farmacopea Europea.

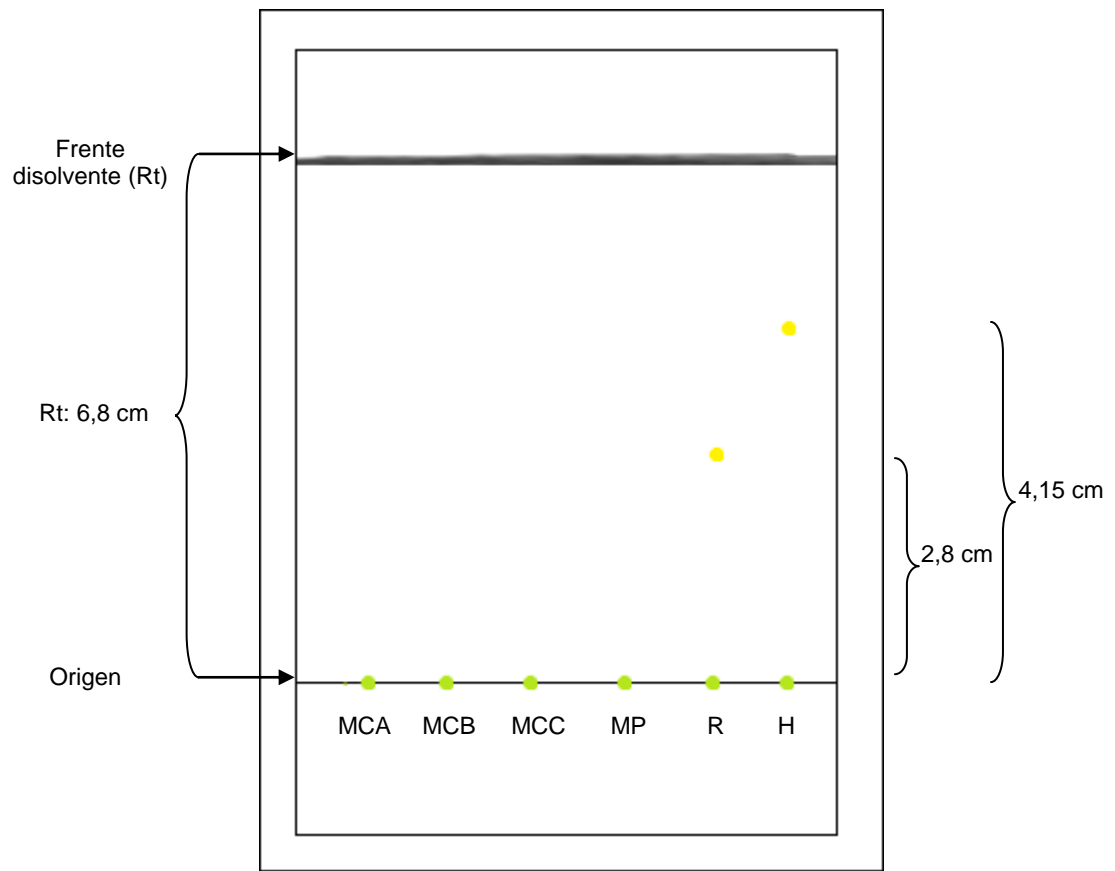
Tras revelar la primera placa cromatográfica se puede observar que los flavonoides rutina e hiperósido eluyeron según lo esperado, no obstante los demás flavonoides no muestran la elución esperada, muy por el contrario, muchos de ellos fueron arrastrados por la fase móvil hasta el límite superior de la placa (**Fig. 29**).

Por otra parte, en la segunda placa cromatográfica donde sólo fueron sembrados las tres muestras comerciales de *P. incarnata*, nuestra muestra problema y los flavonoides rutina e hiperósido, fueron calculados los distintos Rf para cada metabolito separado según lo esquematizado en la **Fig. 8**, los cuales fueron identificados según los datos de Wagner y Blad (1996) y la Farmacopea Europea (**Tabla 5**). Cabe destacar que para ambas placas reveladas el Rf de rutina e hiperósido fue de 0,41 y 0,61, respectivamente (**Fig. 30**).

Se observa que las muestras MCA, MCB y MCC no presentan manchas verdes y amarillas, comprendidas entre la zona de las diglicosilflavonas (Rf 0,30 y 0,35), identificados como Vitexina-2''-O-ramnósido e Isovitexina-2''-O-ramnósido respectivamente. Por otra parte, las cuatro muestras sembradas muestran en la zona superior de la rutina las cuatro bandas características de color amarillo, verde, amarillo y verde azulado, manchas que representan a la isoorientina, isovitexina, orientina y vitexina, respectivamente.

Tabla 5: Distancias recorridos por los distintos metabolitos flavonólicos de *P. caerulea*.

Rt: 6,8cm			
N°	Distancia recorrida (cm)	Rf	Metabolito
1	1	0,15	Desconocido
2	1,4	0,21	Isovitexina-2''-O-glucósido
3	1,8	0,26	Vitexina-2''-O-glucósido
4	2,05	0,30	Vitexina-2''-O-ramnósido
5	2,4	0,35	Isovitexina-2''-O-ramnósido
6	3,45	0,51	Isoorientina
7	3,85	0,57	Isovitexina
8	4,3	0,63	Orientina
9	4,65	0,68	Vitexina
10	6,1	0,90	Ácido cafeico



MC = Muestra comercial; M.P. = Muestra problema; R = Rutina; H = Hiperósido

$$R_f \text{ Rutina} = 2,8 \text{ cm} / 6,8 \text{ cm} = 0,41 \quad R_f \text{ Hiperósido} = 4,15 / 6,8 = 0,61$$

Fig. 8: Esquema del cálculo efectuado para determinar Rf de metabolitos obtenidos en TLC (ej. Rutina e Hiperósido).

5. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría UV-Vis.

A la absorbancia obtenida para cada muestra analizada en el espectrofotómetro UV-Vis se le aplicó la fórmula matemática descrita anteriormente, a modo de corregir matemáticamente los datos y exponerlos como porcentaje de flavonoides expresados como vitexina, los cuales fueron sumados y promediados a modo de obtener un único y representativo porcentaje, el cual fue de un 4,44% de flavonoides expresados como vitexina (**Tabla 6**).

Cabe destacar que a las absorbancias obtenidas de las muestras analizadas ya les fue restada la absorbancia obtenida del blanco utilizado, los cuales fueron preparados según las indicaciones mencionadas en la Farmacopea de la Unión Europea.

Tabla 6: Absorbancias y porcentaje de flavonoides obtenidos en extracto MeOH de *P. caerulea*.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	\bar{x}	D.S.
Peso Inicial de extracto MeOH (g)	0,0538	0,0541	0,0551	0,0543	0,0006
Absorbancia	0,271	0,308	0,325	0,301	0,023
Flavonoides en extracto MeOH (%)	4,03	4,56	4,72	4,44	0,30

\bar{x} = Promedio; D.S. = Desviación standart

Por otra parte tras realizar el análisis espectrofotométrico a la muestra MCA y luego de aplicar la corrección matemática obtuvimos que la muestra MCA presenta un 1,49% de flavonoides expresados como vitexina (**Tabla 7**).

Al igual que con el resultados obtenidos de la muestra problema del extracto metanólico de *P. caerulea*, a las absorbancias obtenidas para la muestra MCA les fue restada la absorbancia obtenida con la solución blanco.

Tabla 7: Absorbancias y porcentaje de flavonoides obtenidos para la muestra comercial A.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	\bar{x}	D.S.
Peso Inicial extracto comercial (g)	0,1330	0,1402	0,1489	0,1407	0,0079
Absorbancia	0,246	0,261	0,277	0,261	0,016
Flavonoides en extracto comercial (%)	1,48	1,49	1,49	1,49	0,01

\bar{x} = Promedio; D.S. = Desviación standart

6. Análisis de ácidos grasos en el extracto hexánico.

Después de saponificar y analizar la muestra de extracto hexánico en el CG se procedió a generar una curva de calibrado con distintos ácidos grasos tanto de cadena carbonatada media como larga (**Fig. 31**), con lo que se pudo obtener el porcentaje relativo de cada ácido graso en la muestra hexánica analizada (**Tabla 8**).

Tabla 8: Porcentaje de ácidos grasos obtenidos del extracto hexánico de *P. caerulea*.

Acido Graso	Fórmula	% Relativo
Acido undecanoico	C11:0	0,25
Acido láurico	C12:0	2,39
Acido mirístico	C14:0	2,11
Acido palmítico	C16:0	14,22
Acido esteárico	C18:0	4,28
Acido oleico	C18:1n9c	2,85
Acido linoleico	C18:2n6c	19,14
Acido α -linolénico	C18:3n3c	11,25
Acido araquidónico	C20:0	2,02
Acido heneicosanoico	C21:0	2,37
Acido lignosérico	C24:0	0,53

7. Evaluación de la actividad antioxidante.

Tras revelar la TLC donde fue evaluada la actividad antioxidante se puede apreciar que la zona donde esta ubicada la isoorientina (Rf 0,51) presenta una intensa coloración amarillo-blanquecina sobre el fondo púrpura, siendo la muestra problema de *P. caerulea* la que presenta mayor contraste, avalando su actividad como antioxidante. Por otra parte se puede apreciar que en diferentes flavonoides se muestra una tenue coloración blanca (**Fig. 32**).

Los flavonoides, sus Rf y la intensidad de color (interpretado como intensidad de efecto antioxidante) serán expresados en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Metabolitos asilados en TLC de *P. caerulea* y su efecto antioxidante.

Rt: 6,8cm			
N°	Intensidad color	Rf	Metabolito
1	Medio	0,15	Desconocido
2	Medio	0,21	Isovitexina-2''-O-glucósido
3	Fuerte	0,26	Vitexina-2''-O-glucósido
4	Medio	0,30	Vitexina-2''-O-ramnósido
5	Medio	0,35	Isovitexina-2''-O-ramnósido
6	Fuerte	0,51	Isoorientina
7	Medio	0,57	Isovitexina
8	Nulo	0,63	Orientina
9	Nulo	0,68	Vitexina
10	Medio	0,90	Ácido cafeico

8. Evaluación de la actividad antirradicalaria.

Tras revelar la TLC donde fue evaluada la actividad antirradicalaria de los diferentes flavonoides separados en cada una de las especies de *Passiflora* analizada, se puede observar que la mancha donde se encuentra la isoorientina (Rf 0,51) presenta la mayor coloración blanca sobre el fondo púrpura, siendo mayor esta coloración en la muestra de *P. caerulea* (**Fig. 33**). No obstante la zona donde están las diglicosilflavonas (Rf 0,21 a 0,35) también presentan este contraste de colores, lo que señala su actividad antirradicalaria.

Los flavonoides, sus Rf y la intensidad de color (interpretado como intensidad de efecto antirradicalario) serán expresados en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Metabolitos aislados en TLC de *P. caerulea* y su efecto antirradicalario.

Rt: 6,8cm			
N°	Intensidad color	Rf	Metabolito
1	Medio	0,15	Desconocido
2	Medio	0,21	Isovitexina-2''-O-glucósido
3	Medio	0,26	Vitexina-2''-O-glucósido
4	Medio	0,30	Vitexina-2''-O-ramnósido
5	Medio	0,35	Isovitexina-2''-O-ramnósido
6	Fuerte	0,51	Isoorientina
7	Bajo	0,57	Isovitexina
8	Bajo	0,63	Orientina
9	Bajo	0,68	Vitexina
10	Nulo	0,90	Ácido cafeico

Discusiones.

Al analizar la bibliografía y los estudios referentes a la especie *Passiflora* nos encontramos con la problemática que éstos no se refieren en detalle a las características físicas o químicas propias de la especie *P. caerulea*, sólo es comparada con otras especies de *Passiflora* o bien se realizaron estudios sobre su producción (Severin y cols., 2004), nuevas técnicas de cultivo (Mendiando y Amela, 2009) o diferencias entre la misma especie cultivada de diferente manera (Busilacchi y cols., 2008). De forma similar, se han logrado aislar metabolitos primarios de *P. caerulea*, tanto en semillas (Quiroga y cols., 2000) como en el néctar floral de ésta (Amela y Gottsberger, 2009); estudios que ofrecen una fuente importante de información sobre *P. caerulea*, pero que carecen de utilidad a la hora de corroborar la existencia de metabolitos secundarios en la especie, como flavonoides o alcaloides, a los cuales se les atribuyen las propiedades farmacológicas propias de la especie *Passiflora* (Ingale e Hibrade, 2010; Patel y cols., 2011).

Por otra parte, las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la especie *Passiflora incarnata* están bien detalladas (Dhawan y cols., 2004), lo cual ha dado por resultado que esta sea la especie oficial de *Passiflora*, la cual está incluida en diversas Farmacopeas, como la Británica, Española y Chilena. Esta información nos ofrece la oportunidad de poder comparar los resultados obtenidos en el desarrollo de esta investigación con los ya existentes para la especie *P. incarnata*, determinando de esta manera las similitudes y diferencias en las propiedades, tanto físicas como químicas, que tienen estas dos especies de *Passiflora*, corroborando así las propiedades únicas de *Passiflora caerulea*, a fin de desarrollar una adecuada estandarización de ésta para futuras monografías.

Los análisis microscópicos realizados en la especie *P. caerulea*, revelan que ésta cumple satisfactoriamente con los estándares señalados en la

Farmacopea Europea para *P. incarnata*, encontrando características propias de la especie como los estomas amonocíticos encontrados en cortes transversales de sus hojas, las venas con notorio engrosamiento de sus paredes producto de células epidermiales, incrustaciones de cristales de oxalato y la presencia de grandes triporatos de polen. Si bien este análisis no es de ayuda a la hora de diferenciar qué tipo de especie de *Passiflora* es la que se observa, es de suma importancia para determinar si la muestra esta contaminada con algún material extraño, ya sea otra especie vegetal, insecto o contaminante físico, los cuales eventualmente pueden afectar la calidad de la droga cruda a utilizar como fármaco.

Paralelo a esto podemos observar que las tinciones realizadas en la muestra de *Passiflora caerulea* son coincidentes con las características químicas observadas en otros experimentos desarrollados por nosotros, puesto que la muestra analizada no reaccionó ante la tinción con Sudán III, lo que demuestra la baja cantidad de ácidos grasos o aceites esenciales presentes en las partes aéreas de la planta, de igual forma no hubo reacción al agregar la tinción Lugol, lo que podría reflejar una cantidad baja de almidón presente en hojas y partes aéreas de la planta. Finalmente con el Azul de Toluidina se tiñeron levemente las paredes, lo que refleja la presencia de restos celulósicos de la epidermis que las rodea.

En general, las observaciones realizadas coinciden en gran parte con la descripción efectuada por Eschrich (2004) para *Passiflora incarnata* y con las descripciones detalladas en la Farmacopea Europea para la misma especie. Esto pone de manifiesto el parecido morfológico y estructural por parte de ambas especies, demostrando que el análisis microscópico presenta utilidad a la hora de identificar la familia vegetal y las partes anatómicas que están siendo analizadas.

Por otra parte los análisis físicos de control de calidad realizados a la muestra, como son el cálculo de humedad y de ceniza, estuvieron dentro del rango de especificaciones que establece la Farmacopea Europea para *P. incarnata*, los cuales describen que la muestra no tenga más del 10% de humedad y 13% de cenizas. Como se observa en los resultados obtenidos por Nápoles y cols. (2007) para *P. incarnata*, este tipo de análisis permite definir si la droga cumple con estándares básicos para su uso como fitofármaco. Estas técnicas resultaron prácticas y rápidas de realizar, sin embargo sólo se limitan a lograr detectar la presencia de elementos extraños en la muestra, lo cual les confiere tener un cierto grado de utilidad si lo que se desea es generar un método de estandarización, preciso y confiable, para definir la calidad y la utilidad de *P. caerulea* como fitofármaco.

Durante la maceración de las partes aéreas de *P. caerulea* en hexano y luego en metanol, se pudo apreciar las diferencias de rendimiento que hay entre ambos extractos, asumiendo de esta manera que el extracto metanólico es el más indicado para una futura extracción de metabolitos presentes en la especie, ya que su rendimiento fue aproximadamente 10 veces mayor que el del extracto hexánico (11,20% de extracto metanólico y 1,05% de extracto hexánico). El extracto metanólico es el que concentra la mayor cantidad de metabolitos secundarios con actividad farmacológica (García y cols., 2009). Respecto a la extracción de ceras en el extracto hexánico y clorofila del extracto metanólico, no se encontró referencia bibliográfica al respecto, sólo se realizó el método de extracción descrito por Hostettman y cols. (2008), ante lo cual se desconoce la real proporción de ambos compuestos en *P. caerulea* y la composición de estos.

Luego de su obtención y purificación, se analizó el compuesto "X" por medio de dos técnicas espectroscópicas, IR y RMN. Por su parte el análisis del compuesto por medio de espectrofotometría IR no es suficiente *per se* como para dilucidar la estructura del compuesto, sin embargo nos entregó la noción de que el

compuesto que aislamos presenta en su estructura grupos hidroxilos (-OH), probablemente fenólicos, los cuales estarían unidos a una larga cadena alifática, la cual también contiene carbonos con doble enlace (alquenos), alcoholes primarios y grupos metilo (Silverstein y cols., 2005). Sin embargo esto no es suficiente para lograr dilucidar en su totalidad la estructura química del compuesto "X", del cual tampoco se pudo encontrar en la bibliografía alguna referencia de algún compuesto con similar espectro IR, no obstante, esta técnica tiene gran utilidad a la hora de complementar los datos estructurales que se puedan obtener de diferentes moléculas y es, sin duda, una de las técnicas fundamentales a la hora de dilucidar la estructura química de moléculas desconocidas (Pavia y cols., 2009).

Tras analizar la muestra por espectroscopía RMN y obtener los espectros ^1H y ^{13}C , no fue posible dilucidar la estructura molecular del compuesto analizado. Esto debido principalmente a que los espectros obtenidos presentan una serie de bandas que no coinciden con los espectros de compuestos consultados en las referencias bibliográficas. Estas bandas probablemente son producto de la formación de artefactos en el proceso de extracción, cristalización o almacenamiento del compuesto, posiblemente por la hidrólisis, enzimática o química, de algún sustituyente glicosil en la molécula (Jaroszewski y cols., 2002). Estos posibles artefactos podrían haberse evitado si el compuesto hubiese sido hidrolizado completamente previo a su análisis en el espectrómetro RMN (Reginatto y cols., 2001). Por otra parte, la CC de donde se obtuvo el compuesto "X" se realizó con una gran cantidad de extracto metanólico (> 84 g) lo cual aumentó el tiempo y la dificultad de obtención y purificación de metabolitos, por lo que cabe la posibilidad de que el compuesto estuviese contaminado. Sin embargo para evitar esto, se realizaban sucesivas TLC a las fracciones obtenidas del compuesto "X" y los cristales generados tras la su cristalización, corroborando así la pureza de éste. Pese a estos resguardos, resulta imposible determinar la estructura química del compuesto "X", no obstante presenta ciertas características

semejantes a compuestos cicloartánicos triterpénicos sustituidos, entre éstas el hecho de que al revelar las TLC con el compuesto "X" en ácido sulfúrico, éstas generaban una coloración púrpura, reacción característica de los triterpenos al ácido sulfúrico (Bruneton, 2000), otra característica es que este compuesto presenta afinidad con el metanol, solvente al cual no son afines los triterpenos (son más afines a los solventes apolares), salvo si presentara grupos que aumentaran su polaridad, como azúcares. Estas características, junto con los datos que se lograron obtener de los espectros realizados, hacen suponer que probablemente el compuesto "X" sea un derivado del cicloartano triterpeno glicosilado. Compuestos de este tipo han sido descritos por Reginatto y cols. (2002) en la especie *P. alata*, sin embargo, sus análisis espectroscópicos no coinciden del todo con los datos obtenidos para el compuesto "X". Probablemente el análisis por medio de la espectrometría de masa, podría entregarnos datos esenciales del compuesto "X", como el peso atómico, los cuales serían de gran utilidad para lograr dilucidar su estructura química definitiva (Silverstein y cols., 2005). Cabe destacar que este tipo de compuestos aún no han sido descrito para *Passiflora caerulea*, por lo que se vuelve sumamente necesario seguir investigando al respecto, ya que podrían tener una potencial utilidad como marcadores específicos para la especie (Yoshikawa y cols., 2000a).

Al analizar las dos placas cromatográficas desarrolladas para identificar a las especies de *Passiflora*, podemos observar que en la primera TLC (**Fig. 29**) en donde se utilizaron las tres muestras comerciales, la muestra problema y diversos flavonoides, no se logro identificar con claridad si las muestras presentaban esos flavonoides, sólo se logra apreciar la presencia del ácido cafeico. Esto en parte puede deberse a que las especies de *Passiflora* analizadas no sintetizan dichos flavonoides (Patel y cols., 2011) o que la fase móvil utilizada no fue la adecuada (García y cols., 2009).

Contrariamente a la experiencia anterior, en la segunda placa cromatográfica realizada (**Fig. 30**), en donde sólo se utilizaron las tres muestras comerciales, la muestra problema, la rutina y el hiperósido, se logró observar con gran detalle una serie de bandas características para estas dos especies de *Passiflora*, sobre todo para la muestra de *P. caerulea*, la cual mostraba una amplia gamma de colores y con gran brillo, presumiblemente por encontrarse en mayor concentración. Primero se logró identificar una serie de 4 compuestos característicos, en las 4 muestras analizadas, los cuales son descritos como isoorientina, isovitexina, orientina y vitexina (Rf 0,51, 0,57, 0,63 y 0,68 respectivamente), los cuales son descritos como “característicos” de ambas especies (Busilacchi y cols., 2008; Nápoles y cols., 2007). Por otra parte los flavonoides asociados a uno o más azúcares (entre Rf 0,21 y 0,35) son los que recorrieron la menor distancia, esto debido a la afinidad que tienen con la sílica de la TLC, puesto que esta tiene un carácter polar, similar a las flavonas glicosiladas, las cuales debido a su gran cantidad de grupos –OH de los azúcares (polioles) le confieren características más polares (De Rijke y cols., 2006). Finalmente el compuesto de color azul (Rf 0,90) correspondería al ácido cafeico, el cual es un metabolito común en plantas con alto contenido de flavonoides (Wagner y Blad, 1996) y que puede ser corroborado en la TLC que fue desarrollada con este flavonoides, entre otros (**Fig. 29**).

Sin embargo lo que más llama la atención es que se pueden observar en la muestra de *P. caerulea* dos bandas ubicadas debajo del patrón de rutina, las cuales presentan una coloración amarilla y verde, numeradas como 4 y 5 (Rf 0,30 y 0,35 respectivamente) (**Fig. 30**), las cuales según las descripciones de la Farmacopea Europea no corresponden a bandas propias de la especie *P. incarnata*, tratándose probablemente de *P. caerulea* o *P. edulis*. Analizando los patrones desarrollados por Wagner y Blad (1996) podemos deducir que estas bandas son vitexina-2''-O-ramnósido (**Fig. 9**) y la isovitexina-2''-O-ramnósido (Rf 0,30 y 0,35 respectivamente), los cuales no estarían presentes en *P. incarnata*. La

presencia de diglicósidos en su estructura le otorga un carácter polar lo que genera que sea retenido por más tiempo por la sílica de la TLC (Ligor y Buszewski, 2007). Esta afirmación queda de manifiesto al observar las bandas obtenidas por las tres muestras comerciales analizadas de *P. incarnata*, las cuales no presentan dichos metabolitos en sus respectivas bandas. No obstante aún no queda del todo claro si la muestra utilizada por nosotros corresponde a *P. caerulea* o a *P. edulis*. En un estudio desarrollado por Pereira y cols. (2004) se realizaron TLC para las especies *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. caerulea*, revelando la presencia de orientina e isoorientina en las 4 muestras vegetales, no obstante la vitexina (Rf 0,68) sólo fue observada en *P. incarnata* y en *P. caerulea*, lo cual puede ser señal de que este compuesto no está presente, por lo menos, en *P. edulis*, ya que al revisar la bibliografía encontramos cierta dualidad de opiniones, puesto que por una parte no se hace referencia de este compuesto en los extractos de *P. edulis* (Patel y cols., 2009a; Dhawan, 2004), pero por otra se ha identificado este compuesto, por medio de HPLC, pero sin señalar la cantidad, sólo indicando que está en muy baja concentración (de-Paris y cols., 2002).

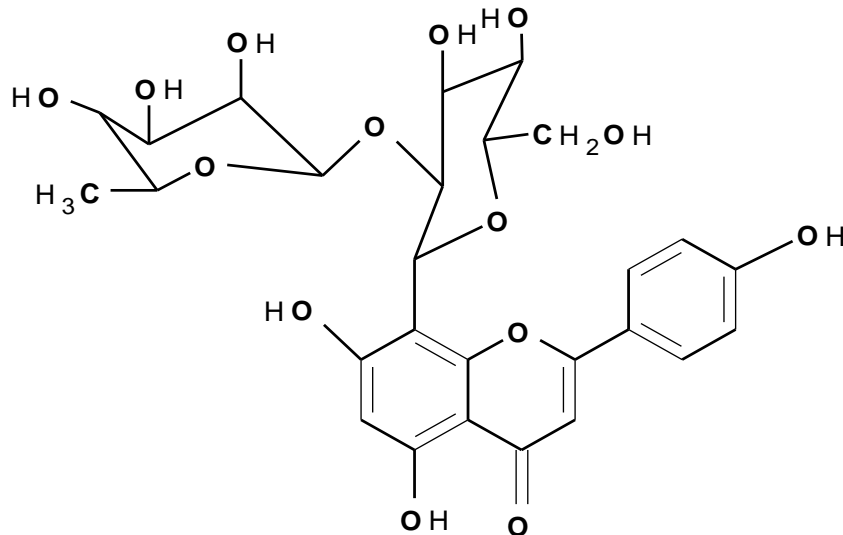


Fig. 9: Estructura química de Vitexina-2''-O-ramnósido

De todo esto podemos inferir que el método de identificación por TLC es de gran utilidad para identificar ciertas especies de *Passiflora*, dado su coste económico, su rapidez y relativa sencillez tanto en la ejecución del método como en su interpretación, de igual manera la fase móvil utilizada logró separar con gran resolución los distintos flavonoides a analizar. No obstante, esta técnica presenta ciertas deficiencias, como la analizada anteriormente, en donde es extremadamente difícil diferenciar entre *P. caerulea* y *P. edulis*, sin embargo en un estudio realizado por Birk y cols. (2005), se roció una placa de TLC, que contenía muestras de *P. caerulea* y *P. alata*, entre otras, con anisaldehído en ácido sulfúrico, logrando aumentar la resolución de ambas bandas, al extremo que las diferencias entre una y otra eran notoriamente visibles, sobre todo en la presencia de vitexina.

Al analizar el método de cuantificación de flavonoides en extracto metanólico por espectroscopía UV-Vis, podemos apreciar que el porcentaje de flavonoides totales en el extracto metanólico de *P. caerulea* se asemeja a los obtenidos por Aquila (2005), el cual oscila entre un 4-5% para el extracto metanólico de *P. caerulea* y supera con creces el porcentaje de flavonoides descritos en la bibliografía para *P. incarnata* (Nápoles y cols., 2007) y el porcentaje de flavonoides obtenidos tras analizar el extracto de la muestra MCA; sin embargo cabe destacar que el análisis espectrofotométrico de flavonoides totales en extracto metanólico no es comparable con el mismo análisis desarrollado a las partes aéreas de las distintas especies de *Passiflora*, pese a que en la Farmacopea Europea se detallan tanto el análisis espectrofotométrico a las sumidades aéreas de la planta como de su extracto seco, el cual está autorizado en países como Alemania desde 1992. Por otra parte en una investigación desarrollada por Müller y cols. (2005) se obtuvo una mayor concentración de flavonoides en el análisis espectrofotométrico a las partes aéreas de *P. alata* que en el análisis a su extracto metanólico, si bien esta diferencia no supera el 0,3%, puede deberse según el autor a una posible degradación biológica de los

flavonoides en el extracto metanólico. Pese a estas diferencias un estudio de disolución desarrollado por Costa y cols. (2011) demostró que si bien hay una concentración de flavonoides levemente mayor en capsulas con las partes aéreas pulverizadas que en capsulas con el extracto seco de *P. incarnata*, éste ultimo presenta una mayor capacidad de disolución, lo cual podría justificar su uso para preparados farmacéuticos. Otro dato a tomar en cuenta es que ciertas condiciones en las cuales se realizó el análisis espectrofotométrico para la muestra MCA no fueron las mismas en comparación a las condiciones en que se realizó dicho análisis para la muestra problema de *P. caerulea*, esto debido en parte a que la muestra comercial estaba en solución (desconociendo completamente la concentración de ésta), por lo que antes hubo que extraer el solvente, el cual quizás no fue del todo extraído, modificando de alguna manera el peso del extracto, otro factor es que se desconoce si el extracto comercial fue previamente desgrasado, lo cual también afecta al porcentaje de flavonoides (Müller y cols., 2005), finalmente desconocemos la fecha de recolección de la droga cruda usada en la muestra MCA, ya que se sabe que en los meses de verano es cuando tiene la mayor acumulación de flavonoides (Fuentes y cols., 2001); no obstante los resultados obtenidos para la muestra MCA son coincidentes con los datos analizados en la bibliografía consultada (Grice y cols., 2001; Patel y cols., 2011), lo cual es una señal de que el método fue desarrollado de forma correcta y puede eventualmente perfilarse como el método estándar de confianza para la identificación de flavonoides totales en el extracto metanólico, tanto en *Passiflora incarnata* como en *Passiflora caerulea*.

El método espectrofotométrico realizado tiene su fundamento en la capacidad que tienen los flavonoides para absorber la luz a determinadas longitudes de onda. Esta capacidad está dada por la presencia de un anillo benzoílo, derivado del acetil CoA, el cual tiene su máxima absorción entre los 240 y 285 nm (banda II) y el anillo cinamoil, derivado de la fenilalanina, el cual tiene su máxima absorción entre los 300 y 400 nm (banda I) (Chabariberi y cols., 2009)

(**Fig. 10**). Estas estructuras son adquiridas por los flavonoides durante su proceso biosintético (**Fig. 11**). Dado estas características estructurales, posiblemente el ácido bórico genere un complejo entre los -OH del subtituyente glicosil de las gliconas o bien forme un quelato con los hidroxilos en posición *orto* del anillo C de la orientina, lo que ocasionaría un corrimiento batocrómico de la banda I de entre 12 a 36 nm (Simopoulos, 2008) (Andersen y Markham, 2006). Esto pone de manifiesto la gran utilidad del método espectrofotométrico a base de la solución bórico-oxálica, la cual es señalada como la mejor alternativa para cuantificación flavonoides C-glicósidos (Müller y cols., 2005; Costa y cols., 2010).

Estos estudios corroboran la gran utilidad que tendría *P. caerulea* para ser utilizada como fitofármaco, pero también refleja la necesidad de investigar y cuantificar cuál sería la posología de un futuro preparado farmacéutico a base de esta especie, puesto que si se utiliza la misma posología que para *P. incarnata* se pueden correr los riesgos de sobredosificación e intoxicación.

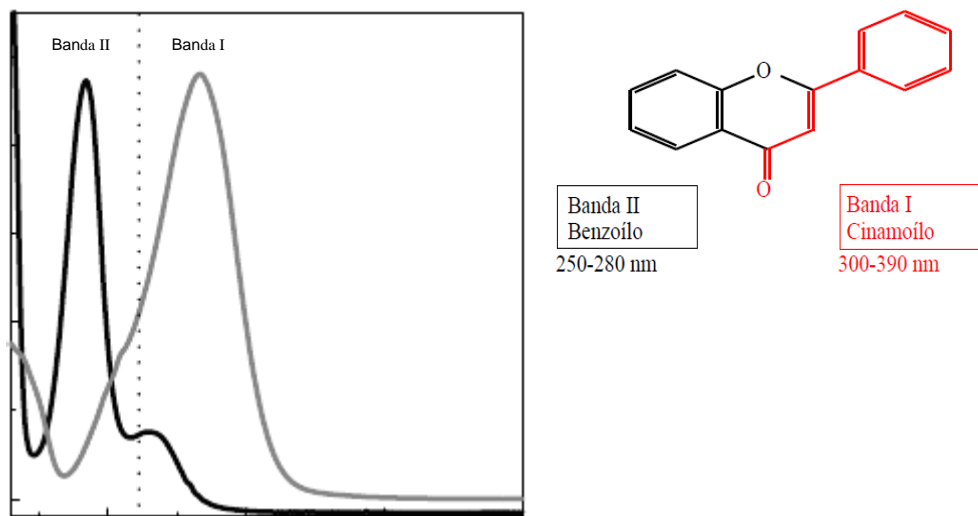


Fig. 10: Espectro de absorción UV de los flavonoides según su estructura molecular (Dibujo: E. González, 2005)

Este caso manifiesta cierta similitud con el estudio realizado por De-Paris y cols. (2002), en donde demostró la mayor cantidad de flavonoides en *P. edulis*, comparándola con *P. alata*, lo que significó utilizar una dosis doblemente menor del extracto de *P. edulis* para obtener el mismo efecto farmacológico. Por otra parte cabe destacar que la fórmula que se utilizó está descrita en la Farmacopea

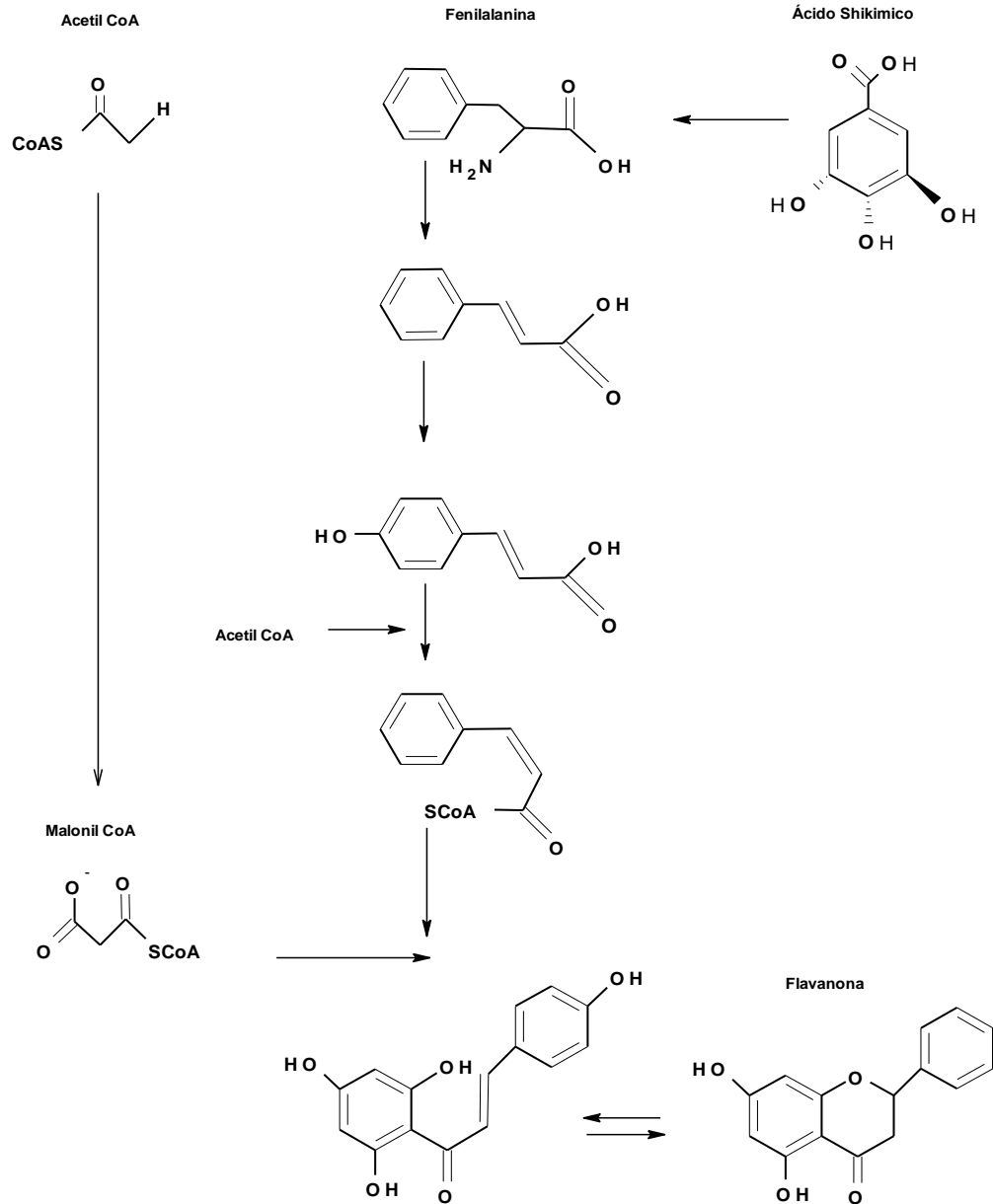


Fig. 11: Origen Biosintético de los flavonoides (Bruneton, 2001).

Europea para *P. incarnata*, derivando su fórmula y los valores de ésta, de la curva de calibrado desarrollada posiblemente con vitexina (rutina suele ser más utilizada por ser una glicona, su menor coste y mayor accesibilidad) (Costa y cols., 2011), lo cual no ofrecería mayores problemas para poder utilizar esta fórmula en el análisis de los flavonoides en *P. caerulea*. Sin embargo, para realizar una determinación más exacta de los flavonoides se debería realizar una curva de calibrado con vitexina cada vez que se realizara este método.

Tras realizar el análisis de ácidos grasos del extracto hexánico en CG, se pudo constatar la gran gama de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, presentes en las partes aéreas de *P. caerulea*, los cuales dan un total de 61,41% relativo de ácidos grasos en el extracto hexánico, lo cual representa el 0,65% aproximado de la muestra, siendo el de mayor concentración relativa el ácido linoleico (19,14%), seguido del ácido palmítico (14,22%), del ácido α -linolénico (11,25%) y del ácido esteárico (4,28%). Todos los demás ácidos grasos están en concentraciones relativas menores al 3%. La concentración en la que se encuentran estos ácidos grasos en el extracto hexánico, si bien están en una correcta relación omega-6: omega-3, 1-2:1 respectivamente, no logran satisfacer los requerimientos diarios de ingesta (Simopoulos, 2008), lo cual limita su posible uso como nutracéutico. No obstante diversas investigaciones demuestran un alto contenido de ácidos grasos insaturados (omega-6 y omega-3) en las semillas de los frutos de distintas especies de *Passiflora*, como en *P. edulis* la cual contiene aproximadamente un 28% de ácidos grasos en sus frutos, de los cuales un 67,0% es ácido linoleico y un 15,7% ácido oleico, Similar caso para *P. nitida* la cual tiene aproximadamente un 30% de ácidos grasos en sus frutos, de los cuales un 52,0% es ácido linoleico y un 24,1% ácido oleico (Miranda y cols., 2010). En las semillas del fruto de *P. caerulea* la situación es bastante similar, ya que presenta aproximadamente un 29,9% de ácidos grasos, siendo el ácido linoleico y el ácido oleico los de mayor concentración (63,1% y 16,6% respectivamente) (Quiroga y

cols., 2000). Por su alta concentración de ácido linoleico, las semillas de los frutos de *Passiflora* son usadas como nutracéutico, como es el caso del Lipex® de laboratorios AAK. Esto pone de manifiesto un potencial futuro uso que se le pueda dar a los ácidos grasos extraídos de diversas partes de *P. caerulea*, ya que si sumamos los ácidos grasos obtenidos de semillas con los ácidos grasos obtenidos de las hojas, podríamos obtener una gran fuente de ácido linoleico, suficiente como para la preparación de alimentos, como margarinas más saludables (Nyanzi y cols., 2005). Por otra parte se puede establecer el perfil de ácidos grasos como un método de identificación de la especie *Passiflora*, puesto que esta mantiene un perfil de ácidos grasos bastante característico y relativamente constante con otras especies de *Passiflora*.

Al analizar la actividad antioxidante se puede observar que la isoorientina es la que presenta la mayor intensidad de color, lo que pone de manifiesto una gran actividad como antioxidante. Este resultado es similar al obtenido por Rudnicki y cols. (2007) quienes demostraron la actividad antioxidante de *P. edulis* y *P. alata*, la cual fue atribuida a los compuestos fenólicos (como flavonoides) encontrados en estas especies de *Passiflora*, recomendando su posible uso como antioxidante. Estos compuestos fenólicos también están presentes en *P. caerulea*. La utilidad que pudiese tener la evaluación de la actividad antioxidante estaría dada por la capacidad de ciertos metabolitos para evitar la formación de especies radicalarias, producto de agresiones externas, como en este caso, la luz UV.

De manera similar, al evaluar la actividad antirradicalaria encontramos que el metabolito que generó la mayor intensidad de color es la isoorientina. Esto podría explicarse por la cantidad de grupos –OH que presenta la isoorientina, los cuales son fundamentales para lograr ceder el hidrogeno faltante de la especie radicalaria (en este caso el DPPH) y “secuestrar” el radical formado en esta sustancia (**Fig. 12**). Por otra parte la actividad antirradicalaria de estos metabolitos está estrechamente ligada a la concentración de estos (Masteikova y cols., 2008),

los cuales, como se pudo demostrar en el análisis espectrofotométrico de flavonoides, están en mucha mayor concentración de *P. caerulea* que en *P. incarnata*.

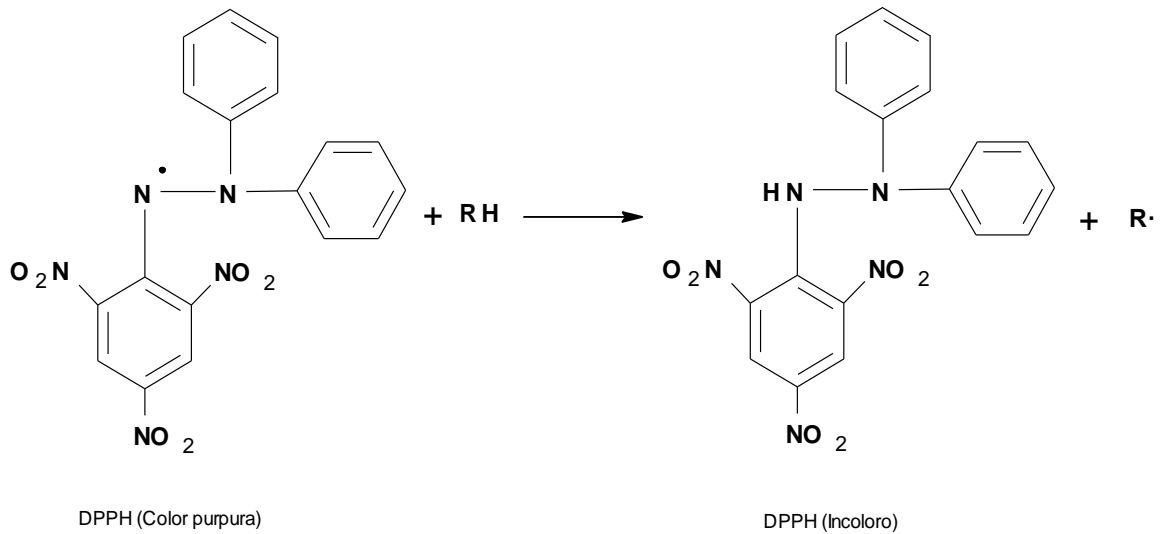


Fig. 12: Reacción y cambio de color del DPPH tras la captación de su radical por compuestos hidroxilados.

Estas propiedades antioxidantes de *P. caerulea* podrían eventualmente otorgarle nuevos usos medicinales, ya que se ha logrado demostrar que especies como *P. alata* logran proteger, tanto *in vivo* como *ex vivo* a las proteínas del daño oxidativo (Rudnicki y cols., 2007). De forma similar se investigó la capacidad del extracto hidroalcohólico de *P. edulis* y *P. alata* para inhibir la capacidad oxidante de los neutrófilos y de la enzima mieloperoxidasa de los neutrófilos granulados, los cuales son fuertes generadores de especies reactivas de oxígeno, dando como efecto una actividad pro-inflamatoria. Se demostró la actividad antioxidante sobre estas células y la enzima, actividad que es proporcional a la concentración de isoorientina en estas especies de *Passiflora* (Zeraik y cols., 2011).

En general podemos apreciar que las técnicas de identificación y cuantificación realizadas cumplen con las normas ya establecidas por la

Farmacopea Europea. Cabe destacar que las técnicas empleadas se están volviendo cada vez más necesarias a la hora de poder caracterizar una especie vegetal para poder utilizarla como fitofármaco, no sólo por lo estipulado en diferentes Farmacopeas, sino por diferentes guías y normas gubernamentales que se han ido implementando en la actualidad, como es el caso de la “Guía para la producción industrial de drogas de origen botánico” desarrollada por la Food and Drugs Administration (FDA) de EE.UU, la cual, independiente de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), establece normas sanitarias claras para este tipo de fármacos, entre las que destacan la cuantificación de los metabolitos con actividad farmacológica y el desarrollo de una “identificación” (*fingerprint*) de la especie vegetal a utilizar por medio de TLC.

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en esta investigación se consideran de fundamental importancia en la estandarización de *Passiflora caerulea* como objeto para nuevas preparaciones farmacéuticas, para el desarrollo de futuras monografías sobre esta especie vegetal y en general como contribución al conocimiento químico de ésta.

Los compuestos flavonólicos de *P. caerulea* se lograron caracterizar por medio de TLC, confirmando la gran sensibilidad y fácil ejecución que presenta el método para lograr identificar estos metabolitos secundarios y así lograr identificar la especie de *Passiflora* con la que se está trabajando.

Se logró cuantificar de manera confiable los flavonoides totales en el extracto metanólico de *P. caerulea* por medio del método espectrofotométrico UV-Vis descrito en la Farmacopea Europea, determinando la idoneidad del extracto de *P. caerulea* para ser utilizado como fitofármaco, postulando el establecimiento de esta técnica como la oficial para caracterizar flavonoides totales en *P. caerulea*.

Se demostró la actividad antioxidante y antirradicalaria de los compuestos flavonólicos de *P. caerulea*, respaldando así un potencial nuevo uso farmacoterapéutico para la especie.

Se compararon por los métodos descritos, las características de la especie en estudio con la especie *P. incarnata*, destacando las diferencias fitoquímicas y similitudes morfológicas para ambas especies, por lo que se proponen estos métodos para incorporarlos en una futura monografía de la especie *P. caerulea*.

El análisis de ácidos grasos en el extracto hexánico de *P. caerulea* se propone como nuevo parámetro de identificación de la especie y se establecen las bases para seguir investigando sobre un potencial uso como nutracéutico.

No fue posible determinar la estructura del compuesto denominado "X" por las técnicas espectroscópicas utilizadas.

Bibliografía.

- Akhondzadeh S., Naghavi H.R., Vazirian M., Shayeganpour A., Rashidi H. y Khani M.: “*Passionflower in the Treatment of Generalized Anxiety: A Pilot Double-blind Randomized Controlled Trial with Oxazepam.*” J. Clin. Pharm. Therap., 2001, (26): 363-367.
- Amela M. y Gottsberger G.: “*Composition of the Floral Nectar of Different Subgenera of Argentinian Passiflora Species.*” Plant. Syst. Evol., 2009, 283: 133-147.
- Andersen Ø. y Markham K. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application. 1ª Edición, CRC Press, EE.UU, 2006. 18 – 19 pp.
- Aquila S., Conforti P., Spegazzini E., Debenedetti S. y Volonté M.: “*Análisis Cualitativo y Cuantitativo de los Flavonoides Presentes en Passiflora caerulea L. Cultivada in Vitro vs. P. caerulea Planta Madre.*” Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fotoquímica, 2005.
- Arjona H., Matta F. y Garner J.: “*Growth and Composition of Passion Fruit (Passiflora edulis) and Maypop (P. incarnata).*” Hortscience, 1991, 96(7):921-923.
- Barboza G., Cantero J., Nuñez C., Pacciaroni A. y Espinar L.: “*Medicinal Plants: A General Review and a Phytochemical and Ethnopharmacological Screening of the Native Argentina Flora.*” Kurtziana, 2009, 34(1-2): 7-365.
- Birk C., Provensi G. y Gosmann G.: “*TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from Passiflora Species.*” J. Liquid Chrom. & Related Tech., 2005, 28: 2285-2291.
- Birner J. y Nicolls J.: “*Passicol, an Antibacterial and Antifungal Agent Produced by Passiflora Plant Species: Preparation and Physicochemical Characteristics.*” Antimicrob. Ag. Chemother., 1973, 3(1): 105-109.
- Borneo R., Leon A., Aguirre A., Ribotta P. y Cantero J.: “*Antioxidant Capacity of Medicinal Plants from the province of Córdoba (Argentina) and their in vitro Testing in a Model Food System.*” Food Chemistry, 2009, 112: 664-670.
- Brown E., Hurd N., McCall S. y Ceremuga T.: “*Evaluation of the Anxiolytic Effect of Chrysin, a Passiflora Incarnata Extract, in the Laboratory Rats.*” AANA Journal, 2007, 75(5): 333-337.

- Bruneton J. Farmacognosia. 2ª Edición, Acribia S.A., España, 2001. 329-331 pp.
- Busilacchi H., Severin C., Gattuso M., Aguirre A., Di Sapio O. y Gattuso S.: "Field Culture of Micropropagated *Passiflora caerulea* L. Histological and Chemical Studies." Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas, 2008, 7(5): 257-263.
- Cardona W., Quiñones W. y Echeverri F.: "Leishmanicidal Activity of Passifloricin A and Derivates." Molecules, 2004, 9: 666-672.
- Chabariberi R., Pozzi A., Zeraik M.L. y Yariwake J.: "Determinação Espectrométrica dos Flavonóides das Folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e Comparação com Método CLAE-UV." Rev. Bras. Farmacog., 2009, 19(4): 860-864.
- Costa A., Alvez S., da Conceição E., Garrote C., Paula J. y Bara M.: "Dissolution Test of Herbal Medicines Containing *Passiflora* sp." Braz. J. of Pharmacognosy, 2011, 21(3): 525-531.
- De-Paris F., Petry R., Reginatto F., Gosmann G., Quevedo J., Salgueiro J., Kapczinski F., Gonzalez G. y Schenkel E.: "Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims." Acta Farm. Bonaerense, 2002, 21(1): 5-8.
- De Rijke E., Out P., Niessen W., Ariese F., Gooijer C. y Brinkman U.: "Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids." J. Chromatogr. A, 2006, 1112: 31-63.
- Deginani N.: "Las Especies Argentinas del Genero *Passiflora* (Passifloraceae)." Darwiniana, 2001, 39(1-2): 29-129.
- Dhawan K. y Sharma A.: "Restoration of Chronic- Δ^9 -THC-Induced Decline in Sexuality in Male Rats by a Novel Benzoflavone Moiety from *Passiflora incarnata* Linn." Brit. J. Pharm., 2003a, 138(1): 117-120.
- Dhawan K., Kumar S. y Sharma A.: "Aphrodisiac Activity of Methanol Extract of Leaves of *Passiflora incarnata* Linn in Mice." Phytother. Res., 2003b, 17(4): 401-403.
- Dhawan K., Dhawan S. y Sharma A.: "Passiflora: A Review Update." J. Ethnopharm., 2004, (94): 1-23.

- Echeverri F., Arango V., Quiñones W., Torres F., Escobar G., Rosero Y. y Archbold R.: "*Passifloricins, Poliketides α -pyrones from Passiflora foetida Resin.*" *Phytochemistry*, 2001, 56: 881-885.
- Eschrich W. *Pulver-Atlas der Drogen: der Deutschsprachigen Arzneibücher.* 8ª Edición. Deutschen Apotheken Verlag Stuttgart. Wissen y Praxis. Alemania. 2004. 144 pp.
- *European Pharmacopeia 6ª Edición*, Council of Europe, Strasbourg, 2007.
- *Farmacopea Chilena 3ª Edición.* Ministerio de Salubridad, Previsión y Asistencia Social. Chile. 1941.
- Fisher A., Purcell P. y Le Couteur D.: "*Toxicity of Passiflora incarnata L.*" *Clin. Toxicol.*, 2000, 38(1): 63-66.
- Fuentes V., Lemes C., Rodríguez C., Sánchez P. y Méndez G.: "*Instructivo Técnico del Cultivo de Passiflora incarnata L.*" *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2000, 5(3): 118-122.
- Frye A. y Haustein C.: "*Extraction, Identification and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of Passiflora.*" *Am. J. Undergra. Re.*, 2007, 6(3): 19-26.
- Fuentes V., Lemes C., Rodríguez C., Méndez G., Soler B., González R. y López E.: "*Dinámica de Acumulación Mensual y Diaria de Alcaloides y Flavonoides en Passiflora incarnata L.*" *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2001, (3): 105-11.
- García C., Kim N., Bich N., Tillan J., Romero J., López O. y Fuste V.: "*Metabolitos Secundarios en los Extractos Secos de Passiflora incarnata L., Matricaria recutita L. y Morinda citrifolia L.*" *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2009, 14(2): 1-7.
- Grainger N. y Wichtl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals.* 2ª Edición. Medpharm Scientific Publ. CRC Press. Alemania. 2001. 363-364 pp.
- Grice I.D., Ferreira L. y Griffiths L.: "*Identification and Simultaneous Analysis of Harmaline, Harmine, Harmol, Isovitexine and Vitexin in Passiflora incarnata Extracts with a Novel HPLC Method.*" *J. Liq. Chrom. y Rel. Technol.*, 2001, 24(16): 2513-2523.

- Guarrera P.M.: “*Tradicional Phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium)*.” *Fitoterapia*, 2005, 76: 1-25.
- Guidance for Industry Botanical Drug Products, U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drugs Administration, EE.UU, 2000. (disponible en <http://www.fda.gov/eder/guidance/index.htm>)
- Hostettman K., Gupta M., Marston A. y Ferreira E. Manual de Estrategias para el Aislamiento de Productos Naturales Bioactivos. 3ª Edición. SECAB y CYTED. 2008. 36, 37 y 42 pp.
- Ingale A. e Hibrle A.: “*Pharmacological Studies of Passiflora sp. and their Bioactive Compounds*.” *Afr. J. Plant. Sci.*, 2010, 4(10): 417-426.
- Jana K., Yin X., Schiffer R., Chen J., Pandey., Stocco D., Grammas P. y Wang X.: “*Chrysin, a Natural Flavonoid Enhances Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Expression in Mouse Leydig Cell*.” *J. Endocrin.*, 2008, 197: 315-323.
- Jaroszewski J., Olafsdottir E., Wellendorph P., Christensen J., Franzyk H., Somanadhan B., Budnik B., Jorgensen L. y Clausen V.: “*Cyanohydrin Glycosides on Passiflora: Distribution Pattern, a Saturated Cyclopentane Derivate from P. guatemalensis, and Formation of Pseudocyanogenic α -hydroxyamides as Isolation Artefacts*.” *Phytochemistry*, 2002, 59: 501-511.
- Ligor M. y Buszewski B.: “*Thin Layer Chromatographic Techniques (TLC, OP TLC) for Determination of Biological Activated Compounds from Herb Extracts*.” *J. Liquid Chromat. & Related Tech.*, 2007, 30: 2617-2628
- Masteikova R., Bernatoniene J., Bernatoniene R. y Velziene S.: “*Antirradical Activity of the Extract of Passiflora incarnata*.” *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2008, 65(5): 577-583.
- Méndez G., Fuentes V., Soler B., Villanueva G., Lemes C. y Rodríguez C.: “*Variación en Índices Farmacognósticos en Passiflora incarnata L. con la Época y Hora de Cosecha de la Droga*.” *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2001, (3): 98-104.
- Mendiando G. y Amela M.: “*Emergence of Passiflora caerulea Seeds Simulating Possible Natural Destinies*.” *Fruits*, 2006, 61(4): 251-258.

- Mendiondo G. y Amela M.: “*Germination of Stored and Scarified Seeds of Passiflora caerulea L. (Passifloraceae).*” *Plant Biosystems*, 2009, 143(2): 369-376.
- Miranda R., Cássio A., Gelape F., Barbosa D., Fontes R. y Da Silveira T.: “*Estudo Comparativo do Perfil de Ácidos Graxos em Semente de Passifloras Nativas do Cerrado Brasileiro.*” *Rev. Bras. Frutic.*, 2010, 32(2): 498-506.
- Müller S., Vasconcelos S., Coslho M. y Biavatti M.: “*LC and UV Determination of Flavonoids from Passiflora alata Medicinal Extracts and Leaves.*” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37: 399-403.
- Nápoles R., López Y. y Rodríguez M.: “*Caracterización Físico-Química de Passiflora incarnata L. para su Uso en la Industria Farmacéutica.*” *Rev. Cubana Quim.*, 2007, 19(1): 78-80.
- Neira A. Aislamiento e Identificación de los Compuestos con Actividad Antioxidante del Extracto de Cloroformo de la Orquídea Comestible *Prosthechea michuacana*. Tesis para optar al título de maestro en ciencias en alimentos. Instituto Politécnico Nacional, México D.F., 2009.
- Nyanzi S., Carstensen B. y Schwack W.: “*A Comparative Study of Fatty Acid Profiles of Passiflora Seed Oils from Uganda.*” *JAOCs*, 2005, 82(1): 41-44.
- Patel S., Kumar N. y Gauthaman K.: “*Passiflora Incarnata Linn: A Review on Morphology, Phytochemistry and Pharmacological Aspects.*” *Phcog. Rev.*, 2009a, 3(5): 186-192.
- Patel S., Saleem T., Ravi B., Shrestha B., Verma N. y Gauthaman K.: “*Passiflora Incarnata Linn: A Phytopharmacological Review.*” *Int. J. Green. Pharm.*, 2009b, (2): 277-280.
- Patel S., Soni H., Mishra K. y Singhai A.: “*Recent Updates on the Genus Passiflora: A Review.*” *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.*, 2011, 1(1): 1-16.
- Patil A.: “*Exploring Passiflora incarnata (L.): A Medicinal Plants Secondary Metabolites as Antibacterial Agent.*” *J. Med. Plant. Res.*, 2010, 4(14): 1496-1501.
- Pavia D., Lampman G., Kriz G. y Vyvyan J. Introduction to Spectroscopy. 4^o Edición, Brooks/Cole, 2009, EE.UU. 15-30 pp.

- Pereira C., Yariwake J. y McCullagh M.: “*Distinction of the C-glycosylflavone Isomer Pairs Orientin/Isoorientin and Vitexin/Isovitexin Using HPLC-MS Exact Mass Measurement and In-source CID.*” *Phytochem. Anal.*, 2005, 16: 295-301.
- Pereira C., Yariwake J., Lancas F., Wauters J., Tits M. y Angenot L.: “*A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoides from Passiflora alata, P. edulis, P. incarnate and P. caerulea and Comparison with HPLC Method.*” *Phytochem. Anal.*, 2004, 15: 241-248.
- Quiroga O., Bou S., Vigo M. y Nolasco S.: “*Chemical Characteristics of Passiflora caerulea Seed Oil and Residual Seed Meal.*” *Molecules*, 2000, 5: 376-378.
- Real Farmacopea Española 3ª Edición, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2005.
- Reginatto F., Kauffmann C., Schripsema J., Guillaume D., Gosmann G. y Schenkel E.: “*Steroidal and Triterpenoidal Glucosides from Passiflora alata.*” *J. Braz. Chem. Soc.*, 2001, 12(1): 32-36
- Reimberg M.C., Colombo R. y Yariwake J.: “*Multivariate Analysis of the Effects of Soil Parameters and Environmental Factors on the Flavonoid Content of Leaves of Passiflora incarnata L., Passifloraceae.*” *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2009, 19(4): 853-859.
- Reyes F. Estudios Químicos en el Género *Leptogium* (Ach.) S.F. Gray (*Collembataceae*, Ascomycota Liqueñizada). Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 2010.
- Rudnicki M., de Oliveira M., Pereira T., Reginatto F., Dal-Pizzol F. y Fonseca J.: “*Antioxidant and Antiglycation Properties of Passiflora alata and Passiflora edulis Extracts.*”, *Food Chemistry*, 2007, 100: 719-724.
- Severin C., Salinas A., Gattuso S., Gattuso M., Busilacchi H., Giubileo G. y Aguirre A.: “*Estimulación de la Germinación de Semillas de Passiflora caerulea L. Cultivadas in Vitro.*” *Rev. Inv. Fac. Cie. Agra.*, 2004, 4(6): 55-58.
- Shin E., Kwon H., Kim Y., Shin H. y Kim J.: “*Chrysin, a Natural Flavone, Improves Murine Inflammatory Bowel Diseases.*” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 381: 502-507.

- Silverstein R., Webster F. y Kiemle D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7^o Edición, John Wiley & Sons, 2005, EE.UU. 72-108 pp.
- Simopoulos A.: “*The Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio, Genetic Variation, and Cardiovascular Disease.*” Asia Pac. J. Clin. Nutr., 2008, 17: 131-134.
- Tabach R., Rodríguez E. y Carlini E.: “*Preclinical Toxicological Assessment of a Phytotherapeutic Product – CPV (Based on Dry Extracts of Crataegus oxyacantha L., Passiflora incarnata L., and Valeriana officinalis L.)*.” Phytother. Res., 2009, 23: 33-40.
- Wagner H. y Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2^a Edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1996. 202, 230 y 231 pp.
- Wang X. y Morris M.: “*Pharmacokinetics and Bioavailability of the Flavonoid 7,8-Benzoflavone in Rats.*” J. Pharma. Sci., 2008, 97(10): 4546-4556.
- Wohlmuth H., Penman K. Pearson T. y Lehmann R.: “*Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (Passiflora incarnata L.)*.” Biol. Pharm. Bull., 2010, 33(6): 1015-1018.
- Wolfman C., Viola H., Paladini A., Dajas F. y Medina J.: “*Possible Anxiolytic Effects of Chrysin, a Central Benzodiazepine Receptor Ligand Isolated from Passiflora coerulea.*” Pharmacol. Biochem. Behav., 1994, 47(1): 1-4.
- Yoshikawa K., Katsuta S., Mizumori J. y Arihara S.: “*Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from Passiflora edulis.*” J. Nat. Prod., 2000a, 63: 1229-1234.
- Yoshikawa K., Katsuta S., Mizumori J. y Arihara S.: “*New Cycloartane Triterpenoid from Passiflora edulis.*” J. Nat. Prod., 2000b, 63: 1377-1380.
- Zeraik M., Serteyn D., Deby-Dupont G., Wauters J., Tits M., Yariwake J., Angenot L. y Franck T.: “*Evaluation of the Antioxidant Activity of Passion Fruit (Passiflora edulis and Passiflora alata) Extracts on Stimulated Neutrophils and Myeloperoxidase Activity Assays.*” Food Chem., 2011, 128: 259-265.
- Zucolotto S., Fagundes C., Reginatto F., Ramos F., Castellanos L., Duque C. y Schenkel E.: “*Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS.*” Phytochem. Anal., 2011.

Anexos.

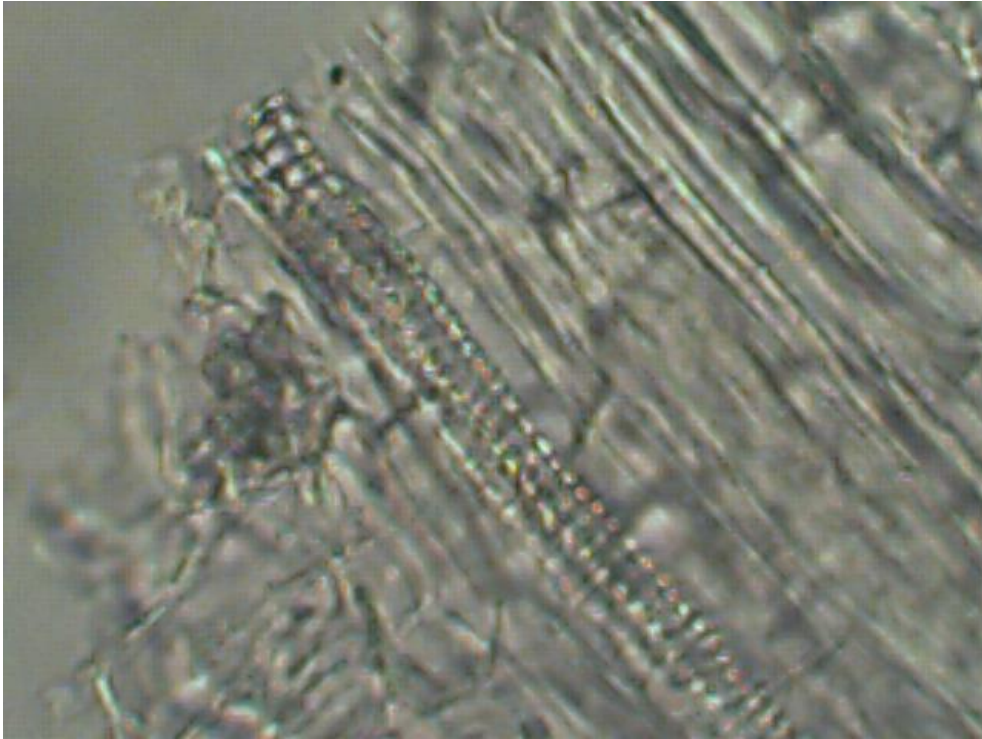


Fig. 13: Vista microscópica (40x) de vasos conductores en muestra de *P. caerulea*.

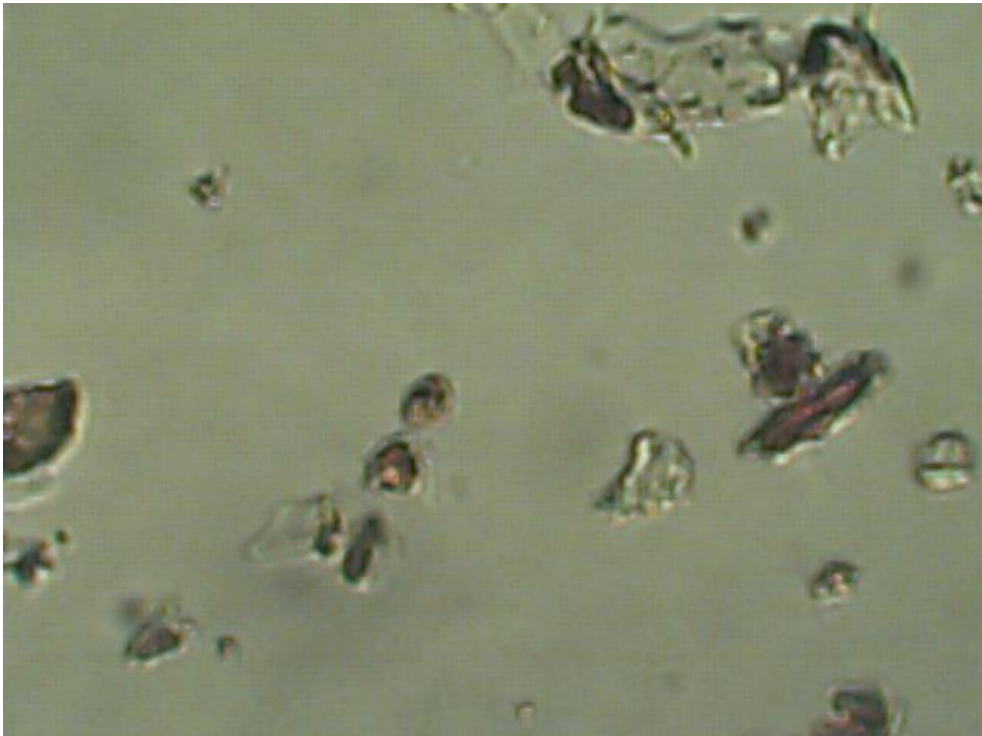


Fig. 14: Vista microscópica (40x) de cristales de oxalato y otras formas minerales en muestra de *P. caerulea*.

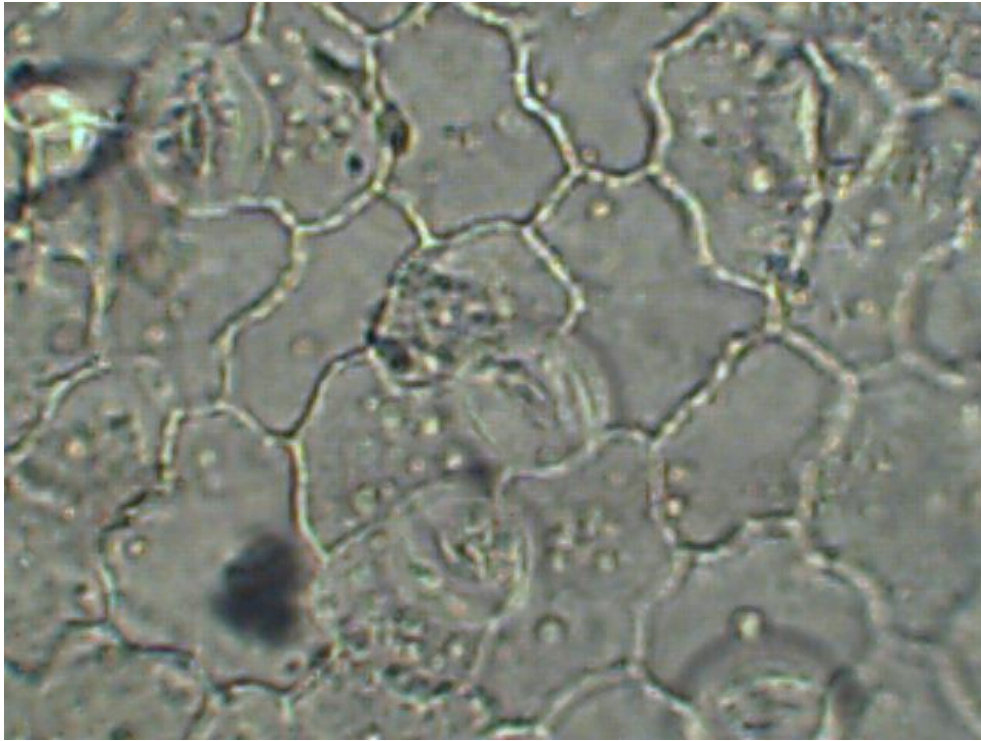


Fig. 15: Vista microscópica (100x) de estomas anomocíticos en muestra de *P. caerulea*.

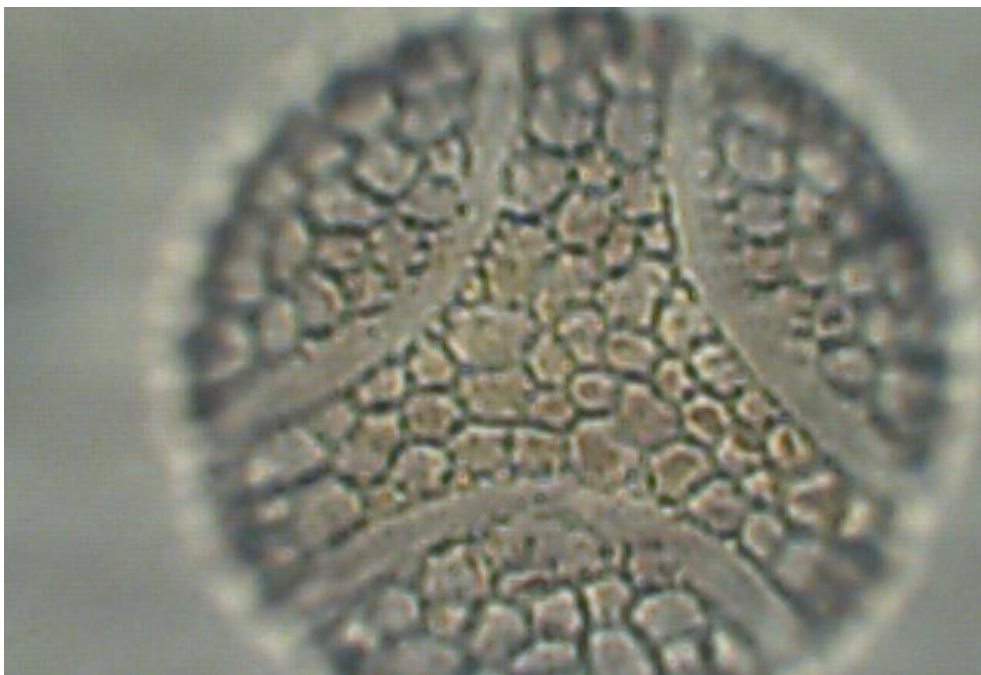


Fig. 16: Vista microscópica (400x) de triporato de polen en muestra de *P. caerulea*.



Fig. 17: Vista microscópica (40x) de agrupación de polen en muestra de *P. caerulea*.

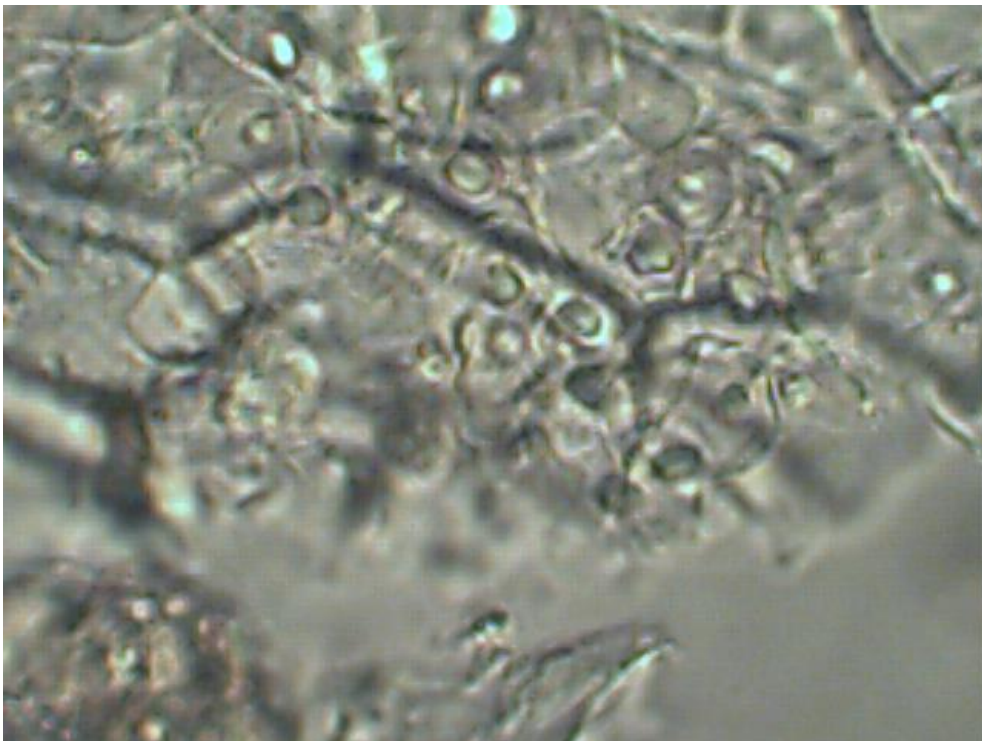


Fig. 18: Vista microscópica (100x) de células con vellos falciformes en muestra de *P. caerulea*.

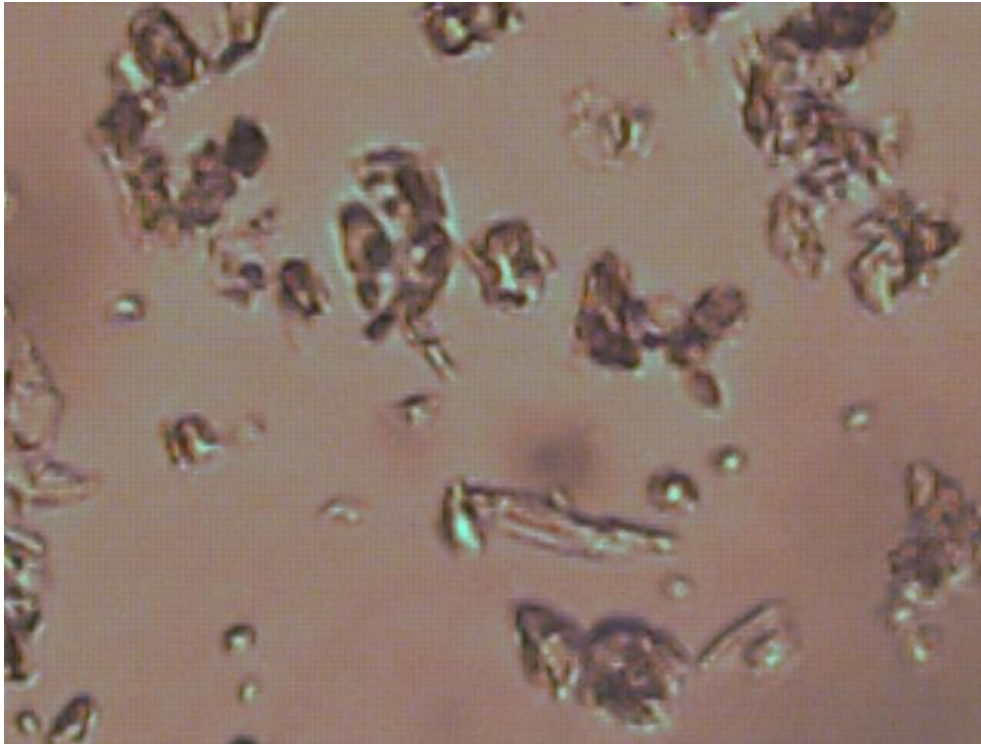


Fig. 19: Vista microscópica (40x) de muestra de *P. caerulea* teñida con Sudán III.

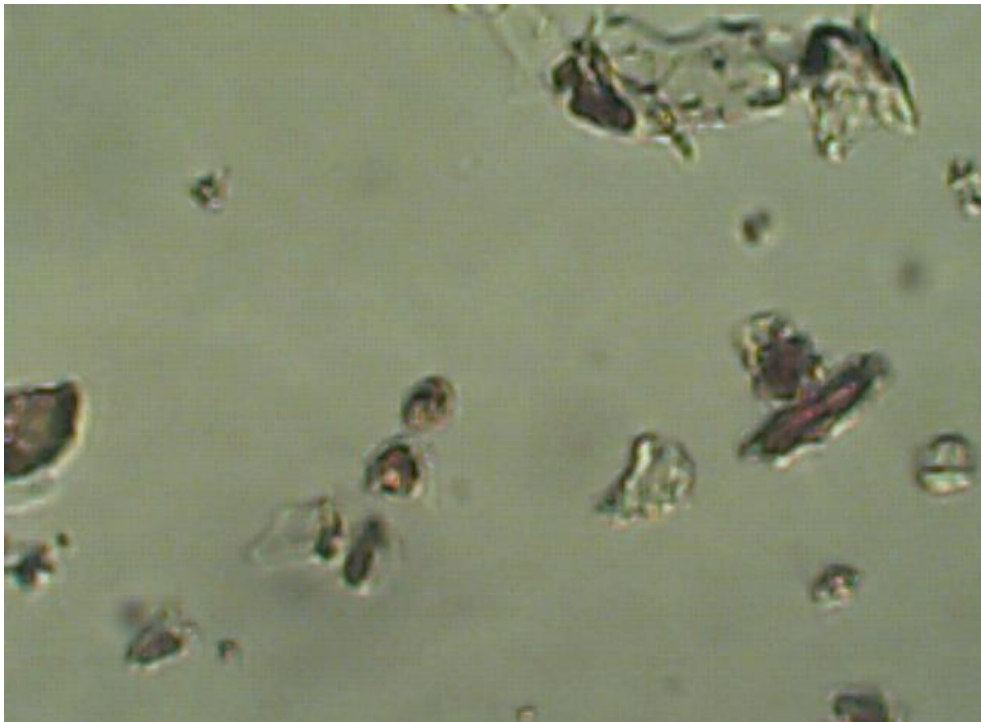


Fig. 20: Vista microscópica (40x) de muestra de *P. caerulea* teñida con Lugol.



Fig. 21: Vista microscópica (40x) de muestra de *P. caerulea* teñida con Azul de Toluidina.

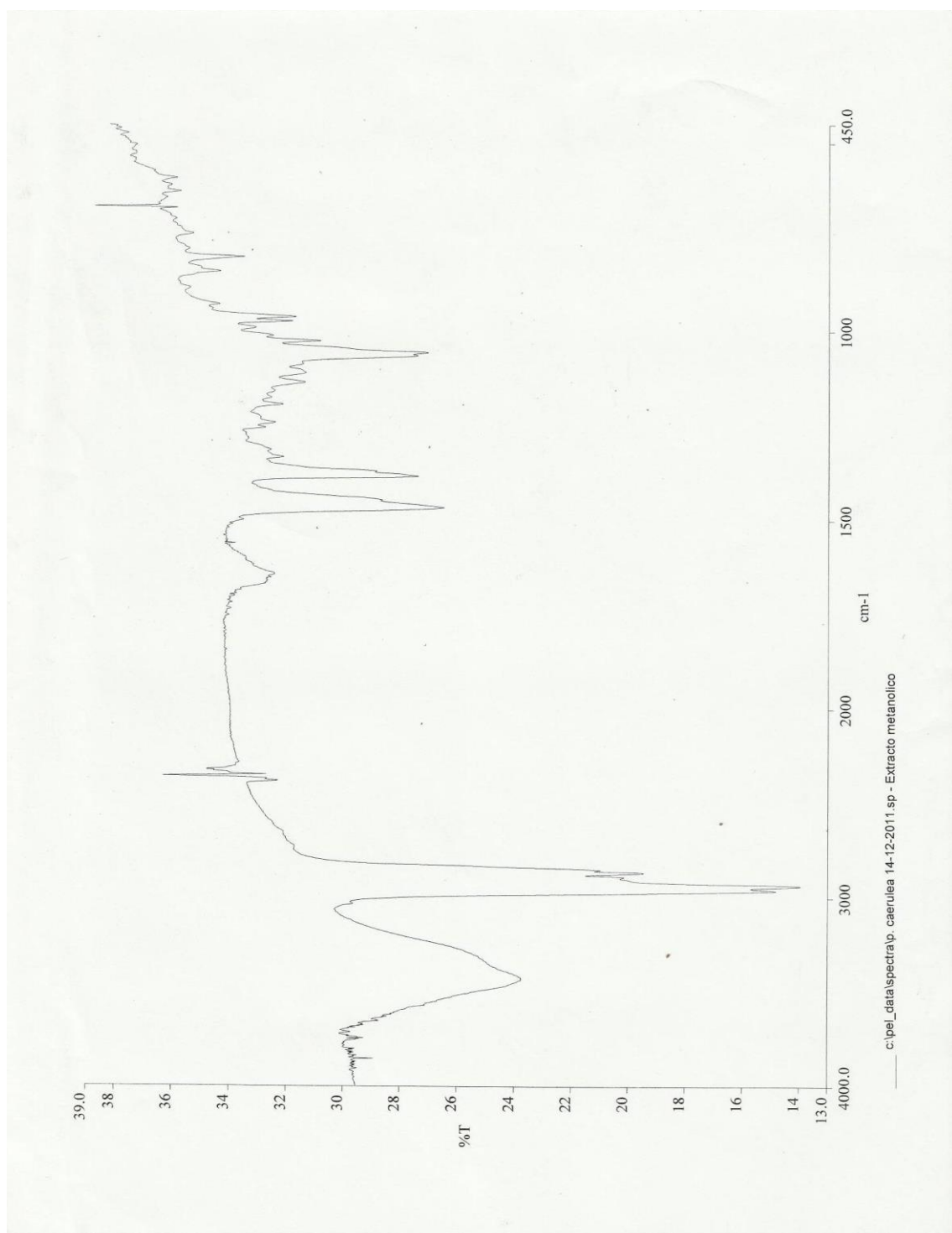


Fig. 22: Espectro IR de compuesto "X".

John Francis Diaz
Pasiflora 20/01/2012
CDC13

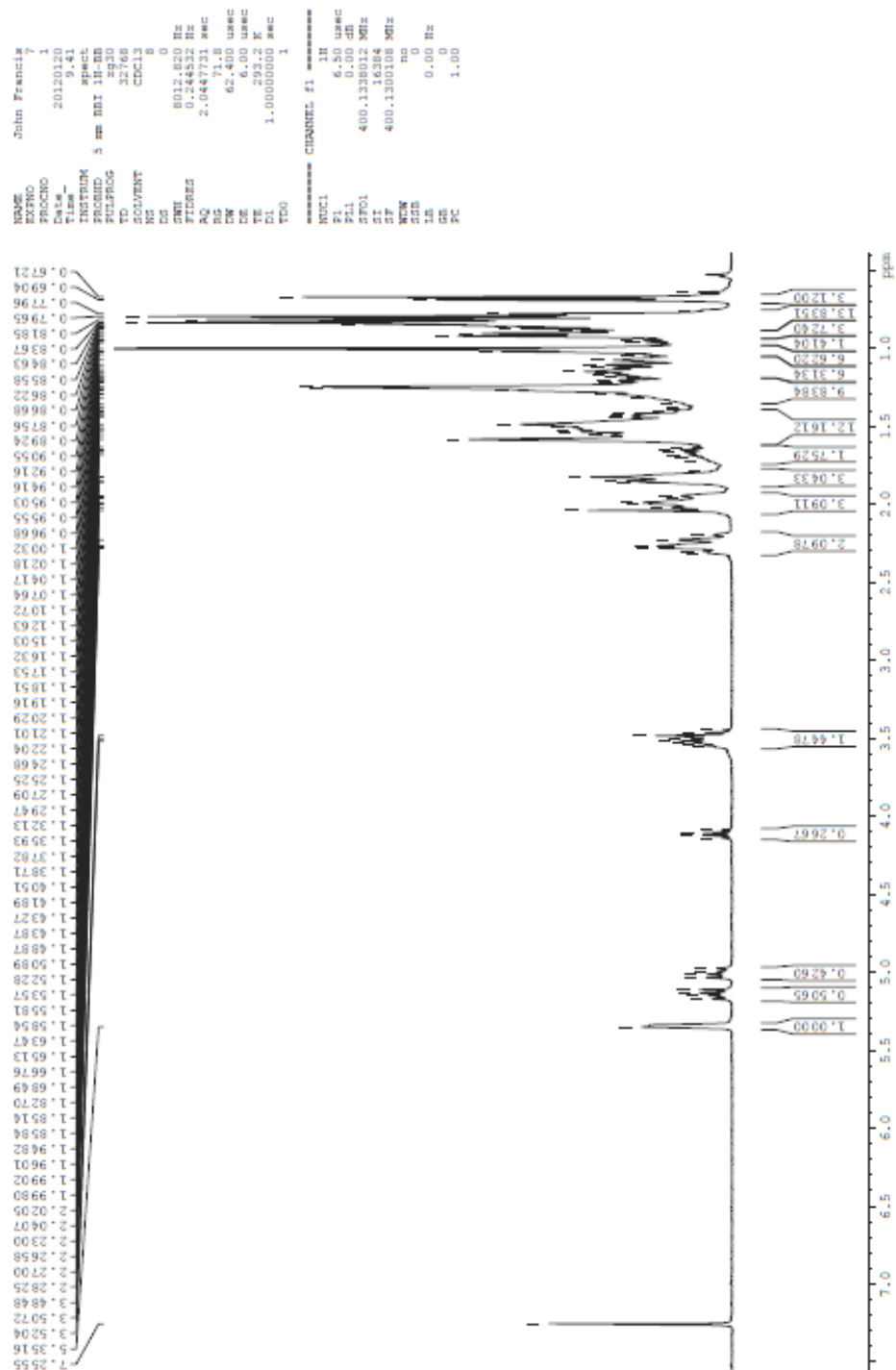
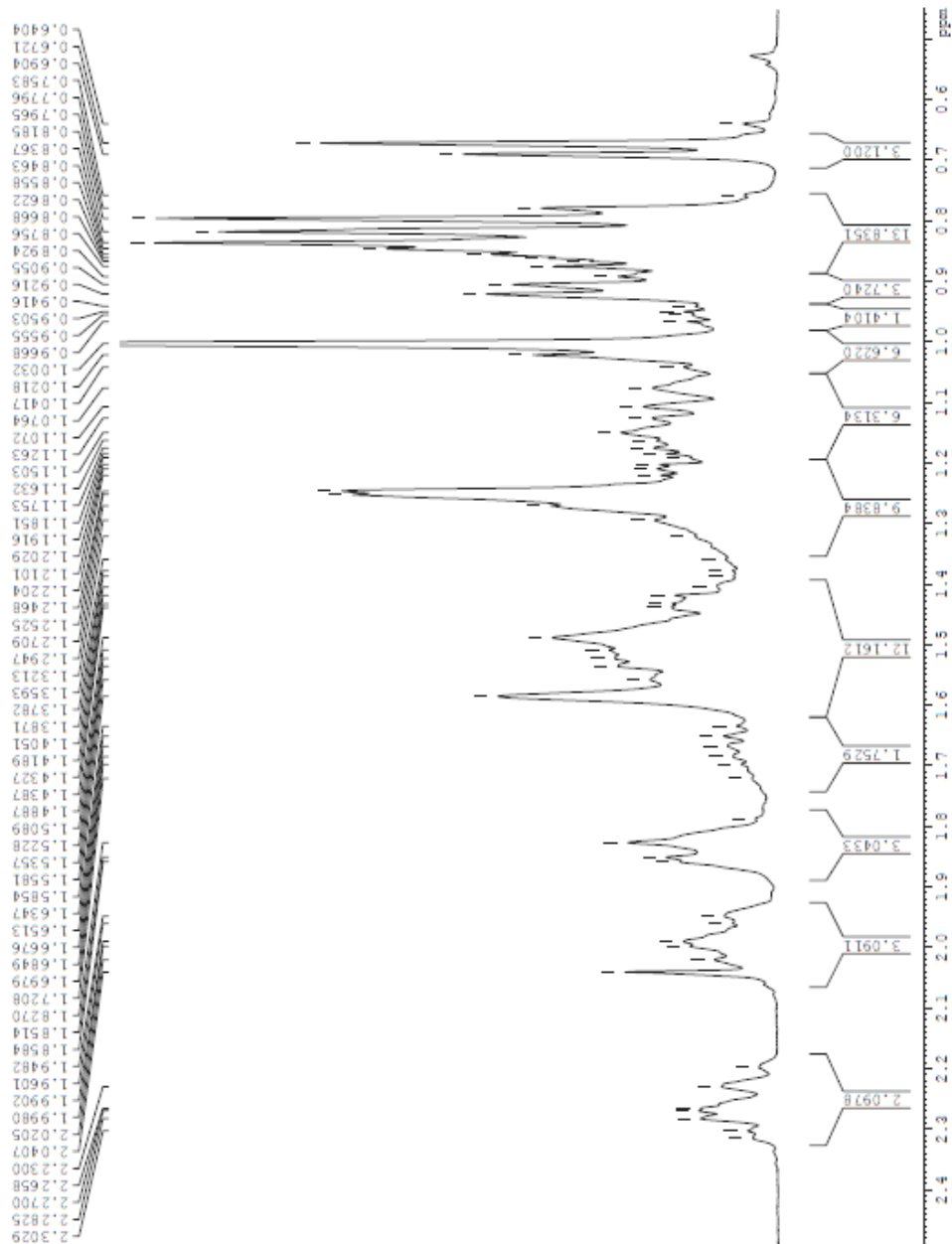


Fig. 23: Espectro $^1\text{RMN-H}$ compuesto "X".

John Francis Díaz
Pasiflora 20/01/2012
CDC13



NAME John Francis
EXPNO 7
PROCNO 1
Date_ 20120120
Time_ 9.41
INSTRUM spect
PULPROG 5 ms BBI 18-90
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 8
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 7160
DW 62.100 usec
DE 6.000 usec
TE 293.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
P1 6.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 400.133012 MHz
SI 16384
SF 400.1330108 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

Fig. 24: Espectro $^1\text{RMN}-\text{H}$ compuesto "X" ampliado zona 0,6 – 2,4 ppm.

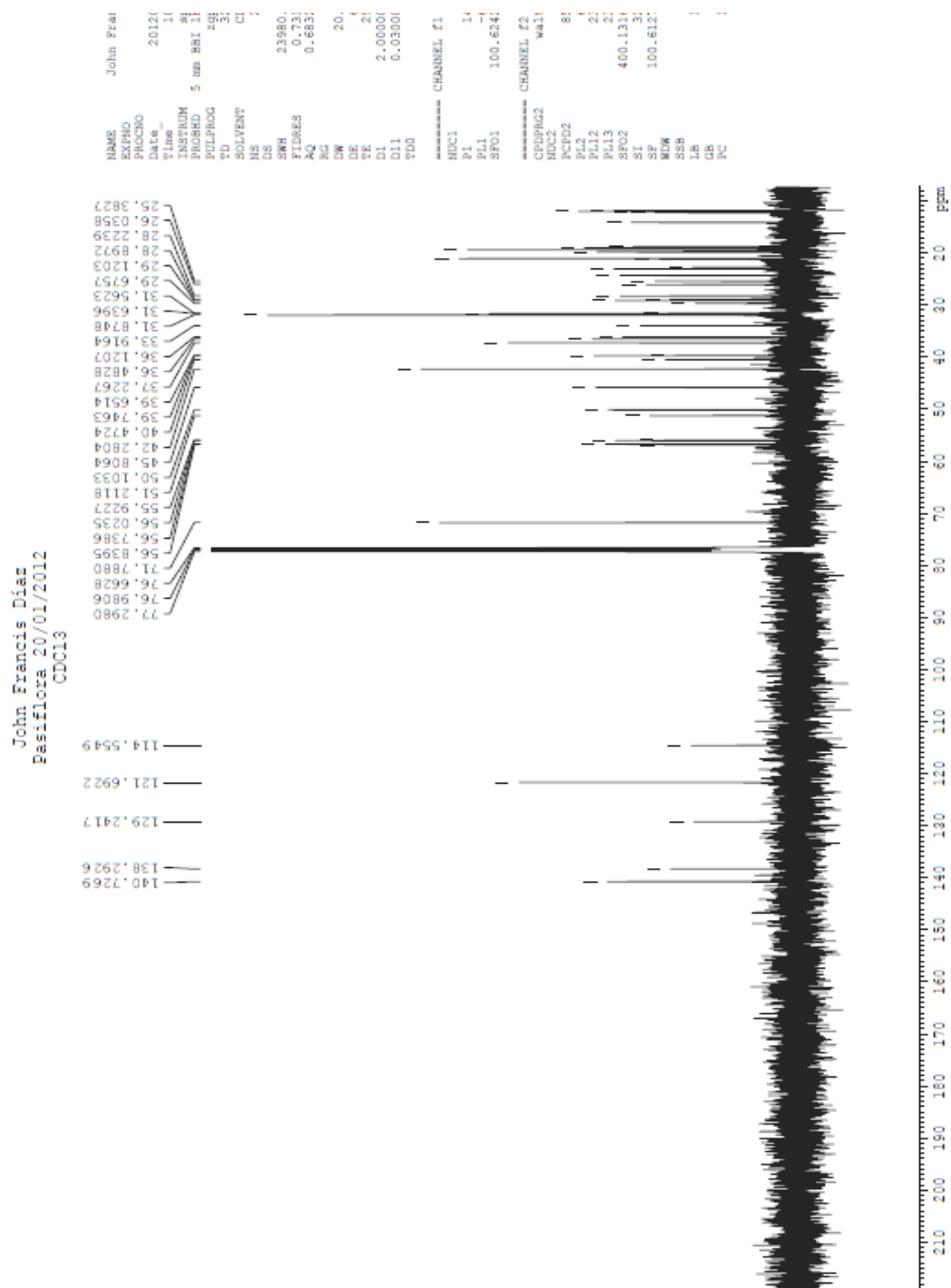


Fig. 25: Espectro $^{13}\text{C}-\text{RMN}$ compuesto "X".

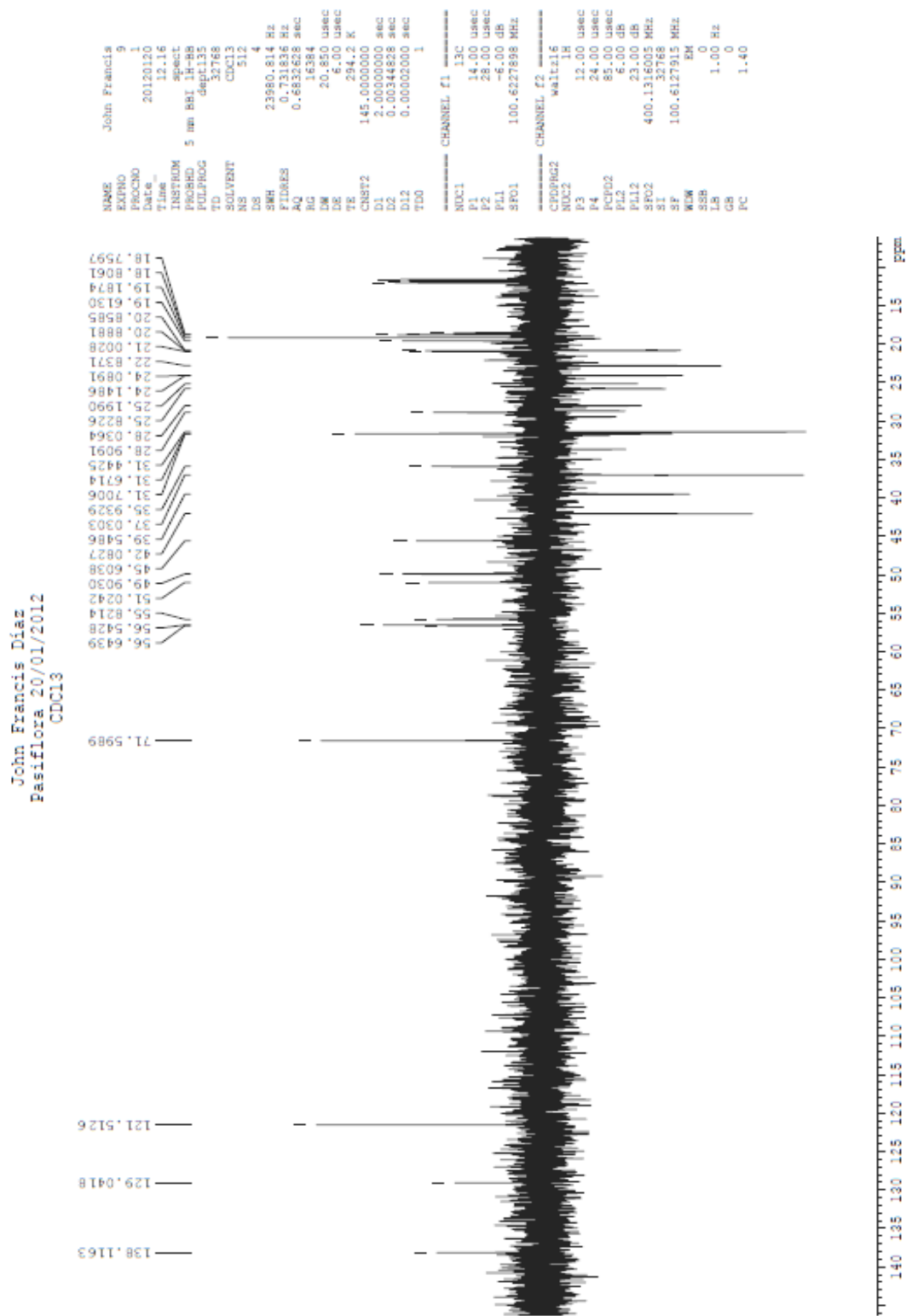


Fig. 26: Espectro DEPT-135 compuesto "X".

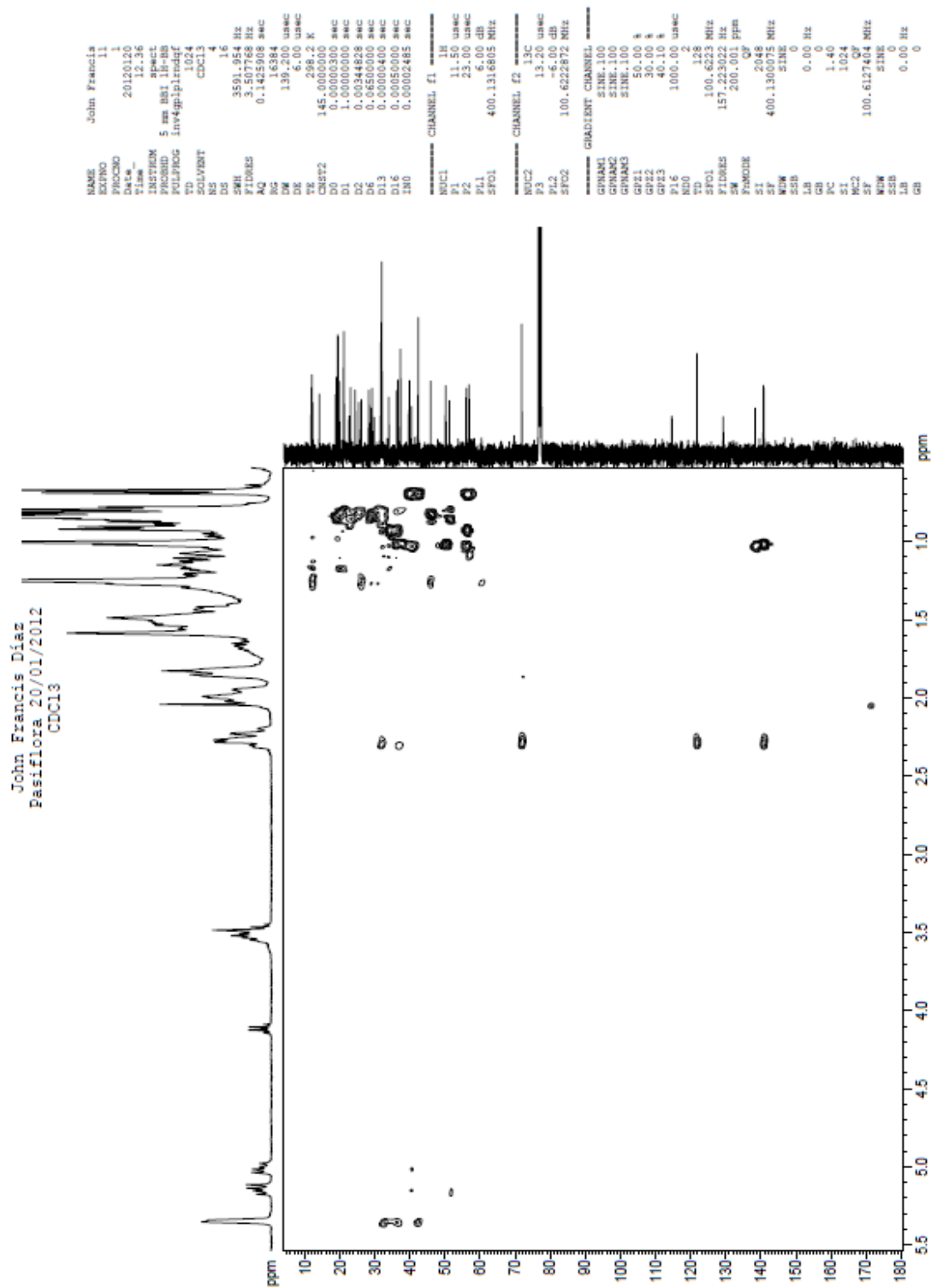


Fig. 28: Espectro 2D HSQC compuesto "X".

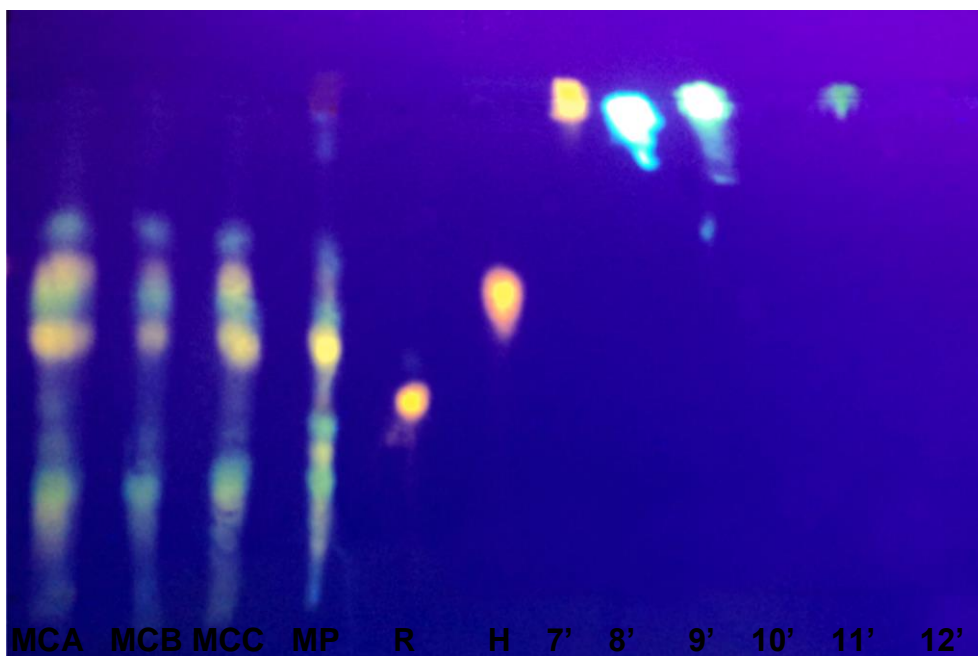


Fig. 29: TLC a luz UV 365 nm en donde MC: Muestra comercial, MP: Muestra problema, R: Rutina, H: Hiperósido, 7': Quercetina, 8': Ácido cafeico, 9': Kemferol, 10': Daideina, 11': Genisteina y 12': Formonometina.

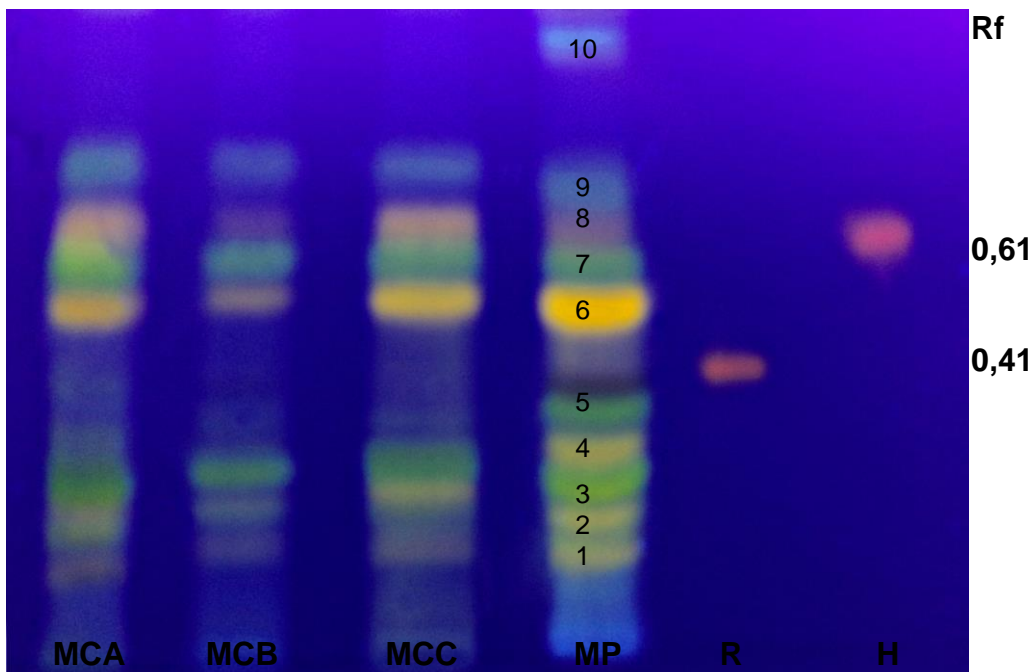


Fig. 30: TLC a luz UV 365 nm en donde MC: Muestra comercial, MP: Muestra problema, R: Rutina e H: Hiperósido.

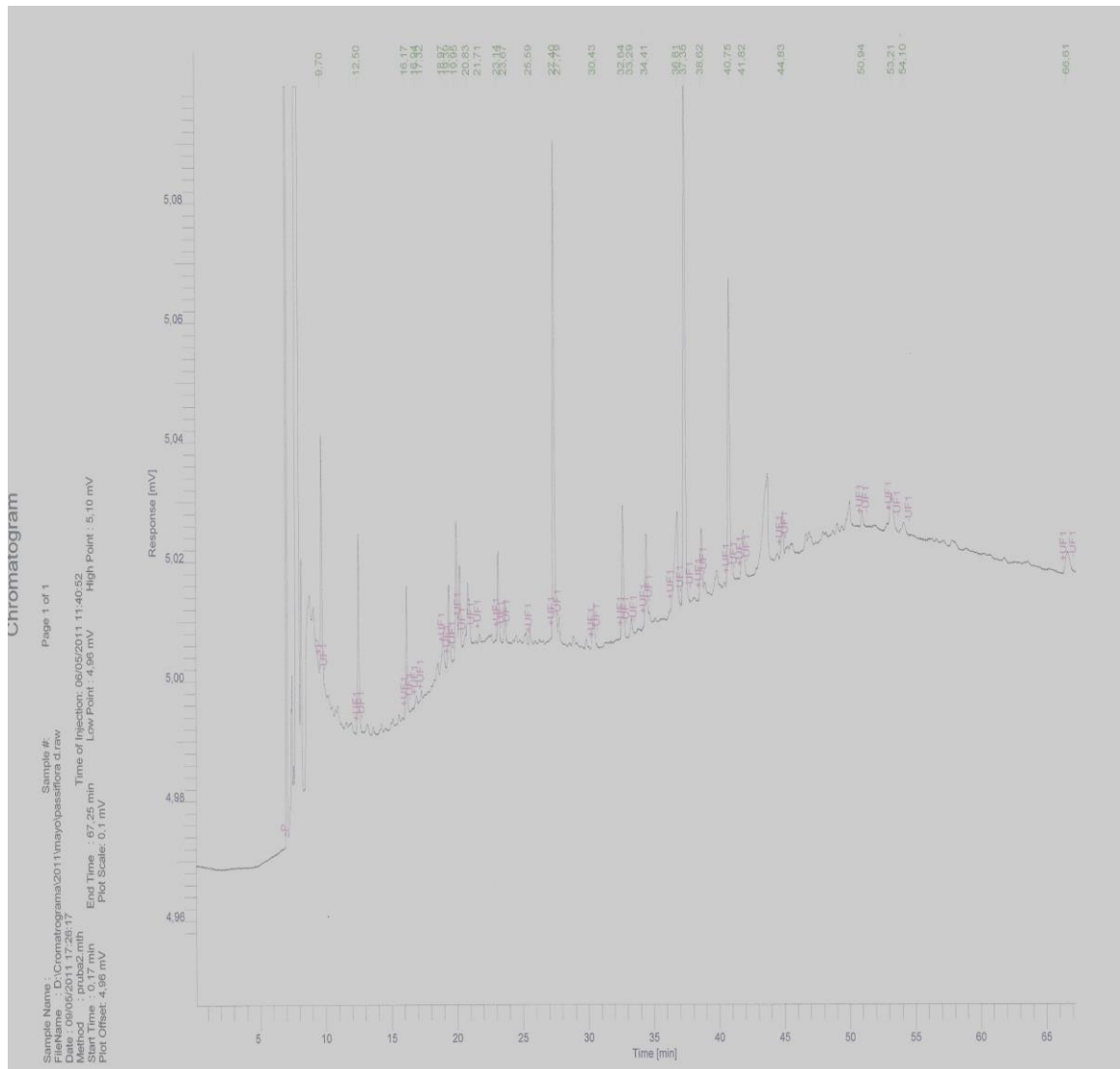


Fig. 31: Cromatograma tras analizar en CG extracto hexánico de *P. caerulea*.

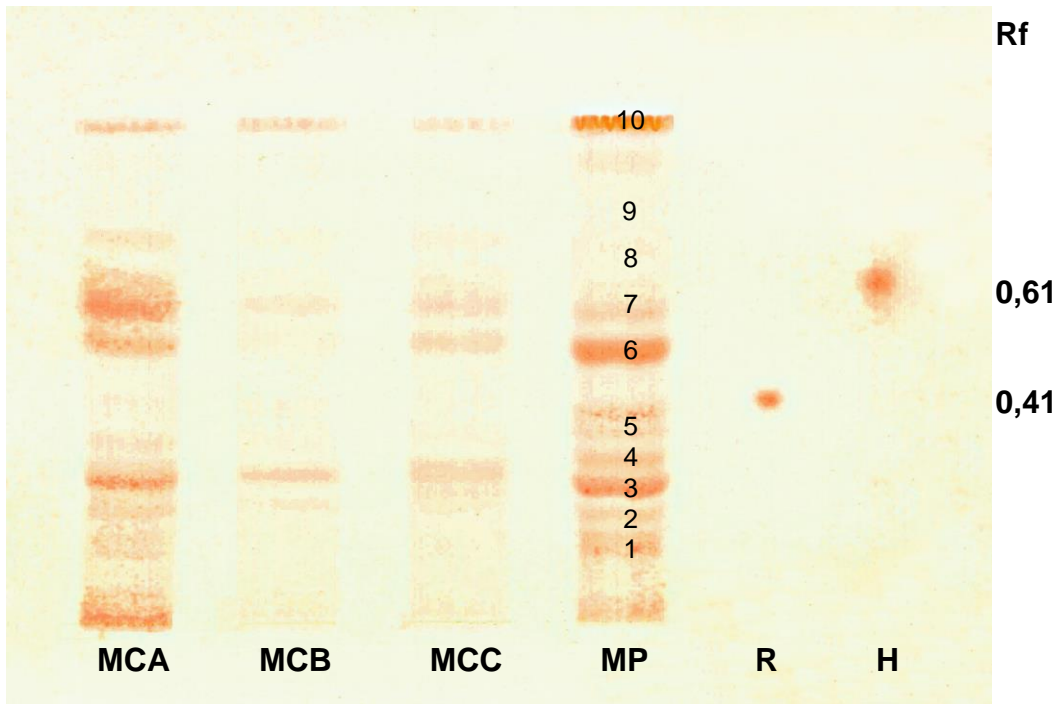


Fig. 32: TLC revelada con β -caroteno en donde MC: Muestra comercial, MP: Muestra problema, R: Rutina e H: Hiperósido.

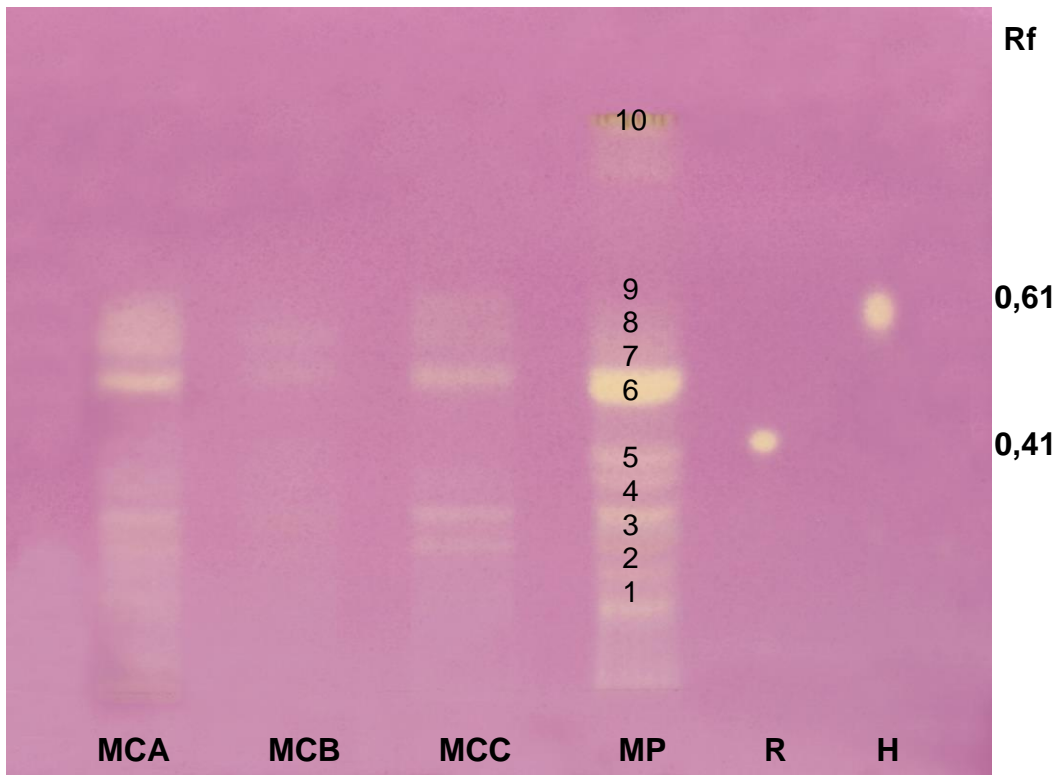


Fig. 33: TLC revelada con DPPH a luz UV 365 nm en donde MC: Muestra comercial, MP: Muestra problema, R: Rutina e H: Hiperósido.