

Identificación de C-glicosilflavonas por HPLC y FTIR en extractos acuoso y metanólico de *Passiflora caerulea* y *P. foetida* (Passifloraceae)

Marta E. Petenatti¹, María A. Gette¹, Mariana C. Popovich¹, María F. Garro¹, Gerardo Camí², Leslie Aragón³, Luis A. Del Vitto¹, Elisa M. Petenatti^{1*}

¹ Herbario UNSL/Proyecto 22/Q-016, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional San Luis, Ejército de los Andes 950, (D5700HHW) San Luis, Argentina.

² Área de Química Inorgánica, FQByF, UNSL.

³ Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, FQByF, UNSL.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: elipete@unsl.edu.ar

Resumen

Diversas especies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) son usadas en medicina tradicional en el tratamiento de la ansiedad, el insomnio y otros trastornos nerviosos. De ellas han sido aisladas varias C-glicosilflavonas. En este trabajo se determinó la presencia de C-glicosilflavonas en *Passiflora caerulea* L. y *P. foetida* L., por medio de HPLC y se utilizó FTIR en forma comparativa, con el objeto de hacer un aporte al control de calidad y caracterizar los extractos acuoso y metanólico de ambas especies. Los cromatogramas de HPLC de ambos extractos mostraron tiempos de retención característicos a 12,10 min (vitexina), 17,94 min (isovitexina), 19,93 min (orientina) y 25,11 min (isorientina), con espectros UV característicos. *P. caerulea* presentó las cuatro C-glicosilflavonas mencionadas, mientras que *P. foetida* careció solo de isorientina en el extracto acuoso y únicamente presentó vitexina e isovitexina en el extracto metanólico. En la zona de la “huella dactilar” de los perfiles FTIR se observaron diferencias cualitativas sustanciales. *P. foetida* presentó una banda a 1.250 cm⁻¹, que no se detectó en *P. caerulea*. En esta última la relación de áreas CO/CH del extracto acuoso fue de 3,87; mientras que para *P. foetida* fue de 1,58; en el extracto metanólico la relación de áreas CO/CH resultó 17,09 para *P. caerulea* y 15,40 para *P. foetida*. Estos datos espectrales aportan herramientas que pueden facilitar la caracterización de ambas especies durante el control de calidad de las drogas crudas y de los medicamentos herbarios que las contengan en su formulación.

HPLC and FTIR C-glycosylflavones identification in aqueous and methanolic extracts in *Passiflora caerulea* and *P. foetida* (Passifloraceae)

Summary

Several species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) are used in traditional medicine for the treatment of anxiety, insomnia, and other nervous disorders. Various C-glycosylflavones have been isolated from these species. In this study the presence of C-glycosylflavones in *Passiflora caerulea* L., and *P. foetida* L. was determined by HPLC, and FTIR was used in a comparative form, in order to contribute to the quality control as well as the identification and authentication of these compounds from crude drugs, aqueous extracts and methanolic

Palabras clave: C-glicosilflavonas - FTIR - HPLC - *Passiflora caerulea* - *P. foetida*.

Key words: C-glycosylflavones - FTIR - HPLC - *Passiflora caerulea* - *P. foetida* - Passifloraceae.

extracts of these species, with which some herbal medicines are prepared. HPLC chromatograms of both, aqueous and methanolic extracts, showed characteristic peaks at retention time 12.10 min (vitexin), 17.94 min (isovitexin), 19.93 min (orientin), and 25.11 min (isorientin) with characteristic UV spectra. *P. caerulea* contained the four mentioned C-glycosylflavones, while *P. foetida* showed a lack of isorientin in the aqueous extract, and contained only vitexin and isovitexin in the methanolic extract. Substantial qualitative differences in the “fingerprint” region of the FTIR profile were found. *P. foetida* showed a band at 1250 cm^{-1} which was not detected in *P. caerulea*. The CO/CH ratio in the aqueous extract was 3.87 in *P. caerulea*, while 1.58 in *P. foetida*. The CO/CH ratio in the methanolic extract in *P. caerulea* was 17.09 and 15.40 in *P. foetida*. These spectral data helped to characterize both species during quality control of crude drugs and herbal medicines containing these plants in their formulation

Introducción

La familia de plantas Passifloraceae incluye alrededor de 18 géneros y 630 especies originarias de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Para América del Sur solo se acepta la presencia del género *Passiflora* L., que abarca 42 especies en Sudamérica austral (Deginani y Cervi, 2008).

Diversas especies de este género son usadas en medicina tradicional para el tratamiento de trastornos, como ansiedad, insomnio y otras perturbaciones nerviosas (Brasseur y Angenot, 1984; Carlini, 2003; de Castro y col., 2007; Deng y col., 2010; Dhawan y col., 2004; Li y col., 2011; Mendes y col., 2012).

Los principales constituyentes fitoquímicos de las especies de *Passiflora* son glucósidos (particularmente glucósidos flavonoides), alcaloides y compuestos fenólicos. Muchas C-glicosilflavonas del tipo de orientina, isorientina, vitexina e isovitexina fueron aisladas de este género (de Paris y col., 2002; Pereira y col., 2004; Zeraik y Yariwake, 2010; Zucolotto y col., 2012).

Dos especies de amplia distribución en la Argentina, *P. caerulea* L. y *P. foetida* L., donde son conocidas bajo diversos nombres comunes y se expenden y emplean para el tratamiento de distintas dolencias.

P. caerulea es una liana de hojas palmatipartidas, con flores vistosas provistas de sépalos verde brillante con bordes hialinos, y pétalos cuculados blanco-verdoso; la corona presenta los *radii* blancos en la porción superior, y morados en la porción inferior; *pali* capilares, en 2 series, morados; *operculum* erecto, membranáceo, con filamentos morados, inclinados hacia el androginóforo verdoso (Figura 1). Se la conoce con los nombres de “birucuyá”,

“burucuyá”, “flor de Cristo”, “flor de pasión”, “flor de la pasión”, “granadilla”, “maracujá de cobra”, “mburucuyá”, “mburucuyá común”, “ocara”, “pasionaria”, “piogola” y “umburucuyá”.

Las sumidades, tanto en floración como en fructificación, y más raramente su raíz, son empleadas en medicina popular. La infusión de las hojas y las flores al 1 % es utilizada tradicionalmente para combatir la ansiedad, la tensión nerviosa y el insomnio; se le atribuyen propiedades como diurético (parte aérea y frutos), espasmolítico (parte aérea), eupéptico (decocción del fruto), antihelmíntico (hoja o raíz), regulador del ciclo menstrual (raíz), anticonceptivo (raíz), antiictérico (frutos y hojas), antiescorbútico (frutos), antiinfeccioso urinario (frutos), hasta anti-tusivo y antiasmático (parte aérea).

Esta especie es frecuentemente utilizada en asociación con “melisa” (*Melissa officinalis*), “tilo” (*Tilia* spp.), “kava” (*Piper methysticum*) o “valeriana” (*Valeriana officinalis*) en casos de insomnio, y con “espino albar” (*Crataegus oxyacantha*) en caso de palpitations y taquicardia (Barboza y col., 2009; Deginani, 2001; Del Vitto y col., 1997; 2011; Gupta, 1995; Lahitte y col., 1998; Roig 2001).

Figura 1.- Flores y frutos de *Passiflora caerulea*



Por su parte, *P. foetida* es una liana perenne con pilosidad de velutina a hirsuta, blanquecina, que incluye abundantes glándulas pediceladas. Además presenta láminas tripartidas, en menor proporción pentapartidas, pilosas; sus flores son vistosas, más pequeñas que *P. caerulea*. Las brácteas están muy divididas y glutinosas. Los sépalos son verdosos con pilosidad velutina. Los pétalos son levemente cuculados, blanco-violáceos, eglandulosos, glabros. La corona tiene los *radii* blancos, con el cuarto superior azulado. El *pali* capilar se presenta en dos series, azulado (Figura 2). Se la conoce con varios nombres vernáculos, como “mburucuyá miní”, “pasionaria hedionda”, “granadilla”, “mburucuyá menor”, “mburucuyá”, “corona de Cristo”, “mburucuyá aceitoso”, “mburucuyá campero”, “mburucuyá rastrero”, “pasionaria”, “pocoto”, “pedón”, y “hón-tayek” (Deginani, 2001).

La parte aérea, y particularmente las hojas, se emplean en infusión en medicina vernácula como antiinflamatorio y antiespasmódico y para el tratamiento del insomnio; al igual que la raíz se aplican como emenagogo y antihistérico; además, la raíz es considerada astringente y vulneraria; las flores se utilizan como expectorante y antiasmático (Barboza y col. 2009; Del Vitto y col., 1997; 2011; Toursarkissian, 1980).

En este trabajo se determinó la presencia de C-glicosilflavonas en *Passiflora caerulea* L. y *P. foetida* L., por medio de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y se utilizó espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en forma comparativa, con el objeto de aportar a la caracterización de estas drogas vegetales y determinar la presencia de estos compuestos en los extractos acuoso (EA) y metanólico (EM) de ambas especies.

Materiales y métodos

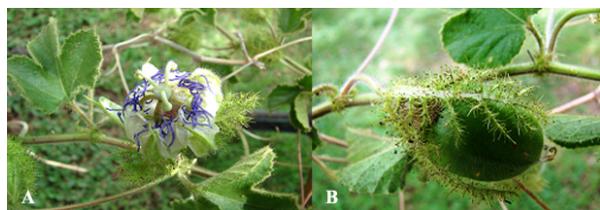
Los especímenes que se documentaron son los siguientes: *Passiflora caerulea* L., San Luis, Dpto. Pringles, Río Grande, Del Vitto & Petenatti #9431, III-2009 (UNSL); *Passiflora foetida* L.: San Luis, Dpto. Junín, Piedra Blanca, Del Vitto *et al.* #9272, I-2009 (UNSL).

Las partes aéreas de ambas especies fueron coleccionadas e inmediatamente secadas en estufa de aire forzado a 40 °C hasta humedad higroscópica; luego fueron molidas con un molino a cuchillas. Los EA y EM de ambas especies se obtuvieron a partir de 5g de muestra. Para la obtención del EA la muestra fue extraída con 100 ml de agua en estado de ebullición (Farmacopea Argentina, 2010). Posteriormente se procedió a la liofilización con un liofilizador Rificor® LT-16. Por su parte, el EM se obtuvo por maceración de 5 g de muestra con 100 ml de metanol (24 h, tres veces consecutivas) y posterior evaporación con evaporador rotatorio Büchi®.

Para el análisis por HPLC, se disolvió un gramo de cada uno de los extractos liofilizados en acetonitrilo: ácido fosfórico 0,05 % (20:80) y se llevó a 100 ml. Alícuotas de 20 µL fueron inyectadas en un equipo HPLC-UV/DAD UltiMate® 3.000 (Dionex), equipado con una columna Gemini C18 (Phenomenex®) usando como fase móvil acetonitrilo: ácido fosfórico 0,05 % (20:80) con un flujo de 0,8 ml min⁻¹. Se trabajó a una longitud de onda de 330 nm y los espectros UV fueron registrados en el intervalo de 200-367 nm. Los datos obtenidos de los cromatogramas fueron procesados con el *software* Chromeleon® asociado al equipo.

Para obtener los espectros de FTIR, se prepararon pastillas de KBr con cada uno de los extractos (EA liofilizado y EM sometido a evaporación) de las dos especies en estudio, en la proporción 3:100. La homogeneización se realizó en un mortero. Aproximadamente 100 mg de la mezcla homogeneizada fueron colocados entre dos discos metálicos, dentro del cilindro de una prensa hidráulica, se aplicó luego una presión de 500 kg cm⁻² durante 5 min, se descomprimió y se colocó la pastilla obtenida en el portamuestra; se registró el espectro en un espectrómetro Protégé® 460 (Nicolet), con un divisor de haz de luz de CsI y se midió entre 4.000 y 460 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹. Todos los reactivos utilizados fueron de pureza analítica o de grado HPLC.

Figura 2.- Flores y frutos de *Passiflora foetida*



Resultados

El análisis de los cromatogramas HPLC de *P. caerulea* indicó que esta especie contiene cuatro C-glicosilflavonas (vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina) tanto en el EA como en el EM (Figuras 3 y 4).

Figura 3.- Perfiles de HPLC de extracto acuoso de *Passiflora caerulea*

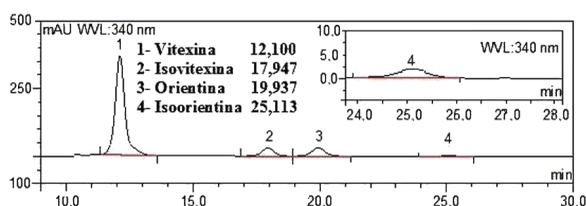
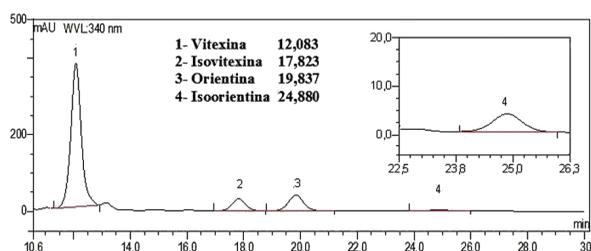


Figura 4.- Perfiles de HPLC de extracto metanólico de *Passiflora caerulea*



Por su parte, el EA de *P. foetida* solo carece de isoorientina (Figura 5), mientras que el EM solamente contiene vitexina e isovitexina (Figura 6). Las C-glicosilflavonas mostraron espectros característicos a tiempos de retención de 12,10 min para vitexina; 17,94 min para isovitexina; 19,93 min para orientina y 25,11 min para isoorientina.

Figura 5.- Perfil HPLC de extracto acuoso de *Passiflora foetida*

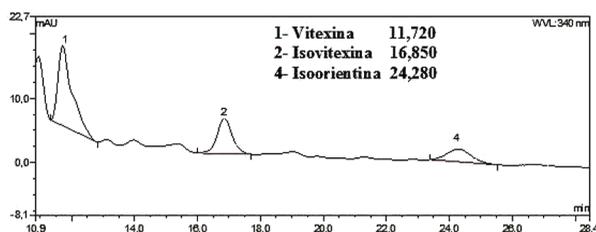
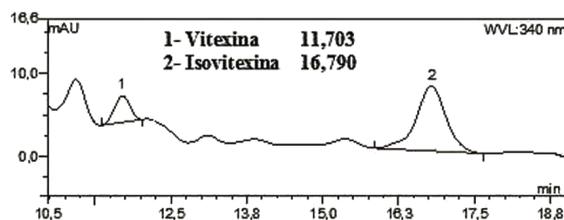


Figura 6.- Perfil HPLC de extracto metanólico de *Passiflora foetida*



En cuanto a los espectros de FTIR, se mostró de utilidad en la diferenciación de ambas especies de plantas, particularmente considerando la zona llamada “huella dactilar” (entre 1.400 y 400 cm^{-1}), donde se presentan diferencias cualitativas sustanciales. *P. foetida* presentó una banda a 1.250 cm^{-1} , que no se observa en *P. caerulea*. Esta situación es coincidente con la que plantearon diversos autores en la caracterización de otras especies de *Passiflora* (Adiana y Mazura, 2011; Konwar y Baruah, 2011; Muruganatham y col., 2009; Rui y col., 2014).

Asimismo, el cálculo de la relación de áreas CO/CH para cada especie estudiada contribuyó a diferenciarlas, ya que en *P. caerulea* fue de 3,87 para el EA, mientras que para *P. foetida* resultó de 1,58; por su parte, en el EM la relación fue de 17,09 para *P. caerulea* y 15,40 para *P. foetida* (Figuras 7 y 8). Esta relación de áreas ha sido empleada con anterioridad en la caracterización de algunas Pteridophyta fósiles (Pšenička y col., 2013; Zodrow y col., 2010).

Figura 7.- Espectro FTIR de extracto acuoso (rojo) y extracto metanólico (azul) de *Passiflora caerulea*

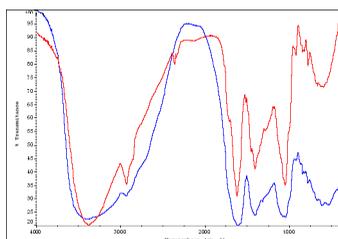
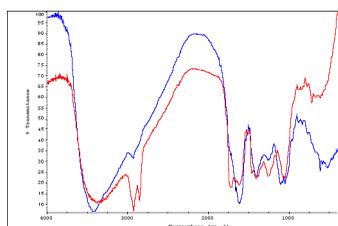


Figura 8.- Espectro FTIR de extracto acuoso (rojo) y extracto metanólico (azul) de *Passiflora foetida*



Conclusiones

Los cromatogramas HPLC y los espectros de FTIR son herramientas útiles para evaluar la calidad de los medicamentos a base de hierbas, considerando globalmente sus múltiples constituyentes químicos. En este caso, los espectros HPLC indican que *P. caerulea* contiene cuatro C-glicosilflavonas (vitexina, isovitexina, orientina e isorientina), tanto en el EA como en el EM; por su parte, el EA de *P. foetida* presenta vitexina, isovitexina y orientina, mientras que su EM solo contiene vitexina e isovitexina.

Los espectros de FTIR también muestran diferencias cualitativas sustanciales; que evidencian mayor presencia de compuestos oxigenados en el EM que en el EA de ambas especies, ya que la relación CO/CH es mayor; por otra parte, la cantidad de compuestos oxigenados extraídos es comparativamente mayor en *P. caerulea* que en *P. foetida*.

Los resultados obtenidos aportan herramientas para la caracterización de las drogas crudas y los medicamentos herbarios que contengan *Passiflora caerulea* y *P. foetida*, dos especies frecuentes en la región, y por lo tanto, facilitan su control de calidad.

Agradecimientos

Expresamos nuestra gratitud al Comité Editorial y a los evaluadores anónimos que aportaron a la comprensión de este trabajo, que ha contado además, con apoyo financiero de los Proyectos 22Q/016 SPU-ME y 2-1014 SECyT-UNSL.

Referencias bibliográficas

- Adiana, M.A.; Masura, M.P. (2011). Study on *Senna alata* and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 991: 84-91.
- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A.; Ariza-Espinar, L. (2009). "Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora". *Kurtziana* 34(1-2): 7-365.
- Brasseur, T.; Angenot, L. (1984). "Contribution à l'étude pharmacognostique de la passiflore". *Journal de Pharmacie de Belgique* 39: 15-22.
- Carlini, E.A. (2003). "Plants and the central nervous system". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75: 501-512.
- de Castro, P.C.F.; Hoshino, A.; da Silva, J.C.; Mendes, F.R. (2007). "Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models". *Phytotherapy Research* 21: 481-484.
- Deginani, N.B. (2001). "Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae)". *Darwiniana* 39(1-2): 43-129.
- Deginani, N.B.; Cervi, A. (2008). "Passifloraceae" en: Zuloaga, O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J. (ed.), *Catálogo de las plantas Vasculares del Cono Sur*, Vol. 2. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.: 107.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M.; Petenatti, M.E. (1997). "Recursos herbolarios de San Luis (Argentina) Primera parte: Plantas nativas". *Multequina* 6: 49-66.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M.; Petenatti, M.E. (2011). *Flores y plantas de la Reserva Natrural "Mogote Bayo" y Costa de la Sierra de Comchingones, Merlo, San Luis, Argentina*. Fundación Espacios Verdes, Buenos Aires: 97-99.

- Deng, J.; Zhou, Y.J.; Bai, M.M.; Li, H.W.; Li, L. (2010). "Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*". *Journal of Ethnopharmacology* 128: 148-153.
- De-Paris, F.; Petry, R.; Regginatto, F.; Gosmann, G.; Quevedo, J.; Salguero, J.; Kapczinski, F.; Gonzales Ortega, G.; Schenkel, E. (2002). "Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 21(1): 5-8.
- Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. (2004). "*Passiflora*: a review update". *Journal of Ethnopharmacology* 94: 1-23.
- Farmacopea Argentina (2010). 8ª ed. ANMAT/ INAME, Buenos Aires: 512.
- Gupta, M.P. (1995). *270 plantas medicinales Ibero-americanas*. SECAB; Ciencia y Tecnología N° 55, Santafé de Bogotá: 617 p.
- Konwar, M.; Baruah, G. D. (2011). "On the nature of vibrational bands in the FTIR spectra of medicinal plant leaves". *Archives of Applied Science Research* 3(1): 214-21.
- Lahitte, H.; Hurrell, J.A.; Belgrano, M.J. (1998). *Plantas medicinales Rioplatenses*. L.O.L.A., Buenos Aires: 1-240.
- Li, H.W.; Zhou, P.; Yang, Q.Q.; Shen, Y.; Deng, J., Li, L., Zhao, D. (2011). "Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'". *Journal of Ethnopharmacology* 133: 1085-1090.
- Mendes F.R.; Negri, G.; Duarte-Almeida, J.M.; Tabach, R.; Carlini, E.A. (2012). "The action of plants and their constituents on the central nervous system" en: Cechinel-Filho, V. (ed.). *Plant Bioactives and Drug discovery: Principles, Practices and Perspectives*. Wiley 4th ed.: 161-204.
- Muruganantham, S.; Anbalagan, A.; Ramamurthy, N. (2009). FT-IR and SEM-EDS comparative analysis of medicinal plants, *Eclipta alba* Hassk. and *Eclipta prostrata* Linn. *Romanian Journal of Biophysics* 19(4): 285-94.
- Pereira, C.; Yariwake, J.; Lancas, F.; Wauters, J.; Tits, M.; Angenot, L. (2004). "A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method". *Phytochemical Analysis* 15(4): 241-8.
- Pšenička, J.; Zodrow, E.L.; D'Angelo, J.A. (2013). Sterile foliage of fertile *Sydneia manleyi* and synangial chemistry (Eusporangiate fern, late Asturian, Canada): a new Subfamily Sydneideae. *Folia* 47(1-2): 1-13.
- Roig, F.A. (2001) *Flora medicinal mendocina*. Ed. EDIUNC, Mendoza: 144.
- Rui, J.L.; Sun, S.Q.; Wang, X.X.; Xu, C.H.; Chen, J.B.; Qun, Z.; Lu, G.H. (2014). "Differentiation of five species of *danggui* raw material by FTIR combined with 2D-COS IR". *Journal of Molecular Structure* 1069: 229-235.
- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 178 pp.
- Zeraik, M y Yariwake, J. (2010). "Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruits pulp by HPLC-UV/DAD". *Microchemical Journal* 96(1): 86-91.
- Zodrow, E.L.; D'Angelo, J.A.; Mastalerz, M.; Cleal, C.J.; Keefe, D. (2010). Phytochemistry of the fossilized-cuticle from *Macroneuropteris macrophylla* (Pennsylvania seed fern, Canada). *Int. J. Coal Geology* 84: 71-82.
- Zucolotto, S.M.; Fagundes, C.; Reginato, F.H.; Ramos, F.A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E.P. (2012). "Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS". *Phytochemical Analysis* 23(3): 232-9.