

Análisis de Flavonoides en Extracto Acuoso de Hojas de *Passiflora ligularis* por Electroforesis Capilar

Laura Gómez Devia ¹

¹ Programa de pregrado en biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Resumen

Los flavonoides y C-glucosilflavonoides son reconocidos por tener propiedades anti-diabéticas. La presencia de estos compuestos en *Passiflora ligularis* (granadilla) ha despertado un alto interés en su investigación. Este estudio analiza los perfiles químicos de flavonoides presentes en un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* por Electroforesis Capilar, al no haber estudios previos en este aspecto. Se propuso esta técnica al demostrar ser eficiente y versátil. El desarrollo del método para el análisis de flavonoides, se logró al examinar diferentes condiciones electroforéticas (voltaje y temperatura) y diferentes composiciones del buffer de corrida (concentración tetraborato de sodio y porcentaje de metanol). Adicionalmente, se estudiaron los efectos del pH del buffer de corrida en la movilidad electroforética de tres flavonoides de interés (crisina, quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-glucósido). Se determinó que un alto porcentaje de metanol influye negativamente en la resolución de los picos, que una alta concentración de tetraborato de sodio influye negativamente en el límite de detección y que la movilidad electroforética de los flavonoides disminuye a medida que aumenta el pH del buffer de corrida. Adicionalmente, se cuantificaron quercetina-3-O-glucósido ($8.59 \pm 2.61 \mu\text{g}/\text{mg}$) y kaempferol-3-O-glucósido ($2.19 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{mg}$), en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

Introducción

El género *Passiflora* de la familia Passifloraceae abarca alrededor de 170 especies descritas en Colombia de las cuales el 98% son nativas y el 32% endémicas (Hernández & Jørgensen, 2015). Entre estas, una que ha demostrado ser un producto promisorio y de alta importancia económica en la canasta exportadora de frutas de Colombia es *Passiflora ligularis* (granadilla) (Espinal et al 2005). El crecimiento óptimo de la granadilla se da desde los 1800 hasta los 3200 msnm, a temperaturas que oscilan entre los 16 y 24 °C (Miranda et al 2009). La siembra de granadilla en Colombia ha ido en aumento desde el 2003, y para el 2010, Colombia ya era categorizado como el principal exportador a nivel mundial, siendo el departamento del Huila el principal productor (Parra et al 2011). Para el 2018, se registra un área de siembra de 5,720 ha y una producción de 48,705 toneladas (Granados-Pérez & Lara-Prado 2018); y aunque la exportación ha seguido aumentando en los últimos años, todavía es mayor el consumo nacional.

A nivel popular, se reconocen los diferentes usos de la granadilla, en especial en jugo o infusión, como descongestionante y tranquilizante (Pabón et al 2014). Pero, lo que ha despertado mayor interés son sus posibles propiedades antidiabéticas. En el escenario actual, los tratamientos antidiabéticos se han enfocado en la inhibición de la enzima α -glucosidasa (Saravanan & Parimelazhagan 2014). Los flavonoides, compuestos fenólicos naturales han demostrado ser eficientes inhibidores de la enzima α -glucosidasa (Gupta et al., 2012; Miroddi et al., 2013; Colomeu et al., 2014), considerándose agentes hipoglicémicos orales que impiden la degradación de disacáridos y monosacáridos, permitiendo mantener normales los niveles de azúcar en la sangre (Saravanan & Parimelazhagan 2014). En *P. ligularis*, como en otras especies del género *Passiflora* se reconoce la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y C-glucosilflavonoides (Zucolotto et al 2011; Saravanan & Parimelazhagan 2014; Gadioli et al 2018). Teniendo esto presente, se propuso el proyecto de Colciencias “Estudio de la actividad antidiabética de un extracto nanovehiculizado de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla)” (Número de registro 57134), con el fin de proponerlo como una alternativa terapéutica para el tratamiento de diabetes melitus. De forma conjunta surge la necesidad de obtener el perfil químico de flavonoides del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* mediante un metodo analítico, puesto que esto no ha sido realizado y para así brindar herramientas para una estandarización del mismo. HPLC es la técnica analítica más popular para la separación de flavonoides (Wu et al 2018), pero estudios demuestran que Electroforesis Capilar (EC) es una técnica promisoría en el análisis de metabolitos secundarios de plantas (Tomás-Barberán 1995) entre estos los flavonoides (Suntornsuk 2001; Herrero et al 2005; Wu et al 2018). En base a esto surge la pregunta de investigación, ¿Qué tan adecuado se muestra analizar flavonoides de un extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* por Electroforesis Capilar?

EC fue descrita originalmente por Hjerten en 1967 como *solución libre electroforética en capilares*; pero la primera demostración del potencial de la técnica para análisis químicos fue realizada por Jorgenson y Lukas en 1981 (Tomás-Barberán 1995). La característica diferencial de EC consiste en que la separación de los compuestos se consigue en un campo eléctrico y la electroforesis ocurre en un capilar con electrolitos (Suntornsuk 2001), el cual suele ser de sílica fundida (Tomás-Barberán 1995). En el capilar se forma una doble capa eléctrica como parte del fenómeno de transporte que ocurre en su interior. La primera, la capa compacta, se encuentra en la inmediata proximidad con la superficie del capilar, en esta los diferentes grupos silanol (SiOH), de carácter ácido débil, se ionizan y adquieren una carga negativa por la interacción con moléculas de agua e iones deshidratados unidos fuertemente por diferentes fuerzas cohesivas y electrostáticas. El centro de estos iones define el plano conocido como “la capa interna de Helmholtz” (IHP). La segunda, la capa difusa se forma por iones hidratados que se acercan a la superficie, pero se unen débilmente a esta. El centro de estos iones define el plano conocido como “la capa externa de Helmholtz” (OHP) (Tavares & McGuffin, 1995). Al aplicar voltaje al capilar, las fuerzas eléctricas actúan sobre la capa difusa, generando un movimiento unilateral de iones hacia el electrodo de carga opuesta (Tavares & McGuffin, 1995). Durante la migración, los iones arrastran las demás moléculas en solución induciendo el movimiento de toda la solución, originando el flujo electroosmótico (Tavares & McGuffin, 1995; Watson 2012). La velocidad de la solución es cero en la proximidad inmediata a la superficie y va aumentando a medida que se aleja de esta, en el punto

donde la solución puede fluir se conoce como el plano de desplazamiento (*plane of shear*) y el potencial que se genera en este punto es el potencial ζ (Tavares & McGuffin, 1995).

En un análisis típico por EC los analitos son introducidos por el ánodo y son detectados en dirección al cátodo (Suntornsuk 2001). De esta forma, los primeros en ser analizados son analitos de carga positiva, de menor a mayor y tamaño, seguido de los analitos de carga negativa de mayor a menor tamaño (Watson 2012). La separación de los analitos de carga neutra, se logra a través de cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC), la cual fue implementada por Terabe y colaboradores en 1984 (Tomás-Barberán 1995). Aunque se reconoce que los parámetros involucrados en la optimización de la separación de compuestos por EC hace que la técnica sea más compleja en comparación con la más popular HPLC, esta ofrece mayor versatilidad y eficiencia, menores tiempos de análisis, menor consumo de reactivos y menores costos (columnas más económicas) (Tomás-Barberán 1995; Suntornsuk 2001; Herrero et al 2005; Wu et al 2018).

En ciertas especies del género *Passiflora* (*P. incarnata*, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. bogotensis*, *P. tripartita*), ya se han llevado a cabo separaciones de flavonoides mediante EC (Marchart et al 2002; Costa et al 2016), que han demostrado ser adecuadas para la identificación y cuantificación de los mismos. No obstante, *P. ligularis* aún no ha sido analizada bajo esta técnica, siendo esto lo que se pretende hacer en este Trabajo de Grado: analizar flavonoides presentes en un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* por EC. Para esto, se plantea en primer lugar el desarrollo de un método que permita establecer los parámetros adecuados para una óptima separación de flavonoides, y en segundo lugar la cuantificación de tres flavonoides de interés previamente descritos por estar presentes en *P. ligularis*, crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-*O*-glucósido.

Metodología

Equipos y reactivos

Todos los análisis se realizaron en el equipo de Electroforesis Capilar *Agilent 7100 CE* equipado con detector DAD (*diode array detector*), con dispositivo de control de temperatura y automuestreador. Los datos fueron procesados en el software *Agilent ChemStation®*. El Metanol HPLC utilizado era marca Merck. EL agua tipo I fue purificada por un sistema Milli-Q. Para los análisis de EC, se prepararon soluciones madre del electrolito tetraborato de sodio (TBS) a 100 mM, el cual fue comprado a MpBiomedicals. Las soluciones de hidróxido de sodio a 1 y 0.1 M y de ácido clorhídrico al 5% también se prepararon, a partir de los reactivos adquiridos en PanReac y Merck respectivamente. Todas las sales utilizadas eran de grado reactivo analítico. Las soluciones estándar de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido se compraron a Sigma-Aldrich®. Todos los solventes y soluciones fueron filtrados por una membrana de 0.45 μm , antes de ser usadas.

Material vegetal y extracto

El extracto fue producido y entregado por el grupo de Tecnología en Productos Naturales (TECPRONA), del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia a partir de hojas colectadas en el municipio de Anolaima en el Departamento de Cundinamarca-Colombia, en el ámbito de Proyecto de Colciencias ya mencionado. De modo general, se obtuvo por infusión de las hojas proporción 1:10 (gramo vegetal: mL solvente); siendo 10 minutos el tiempo de extracción. Posteriormente, el extracto fue filtrado, congelado y liofilizado.

Ensayos Preliminares

En primer lugar y como parte de un trabajo de pasantía realizado en el periodo 2018-3, se realizaron diferentes pruebas analíticas, para así generar un primer acercamiento a las técnicas de análisis químico y al extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* a evaluar. Así siendo, se determinó la presencia de flavonoides y de saponinas en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, mediante marchas fitoquímicas y por análisis de cromatografía en capa delgada (CCD). Posteriormente, se determinó fenoles y flavonoides totales en el extracto. Por último se realizó un análisis comparativo del perfil de flavonoides por UPLC con respecto a los resultados obtenidos por Sepúlveda, M 2018 por UHPLC (**Anexo 1**). Con esta información previa fue posible proseguir con el Trabajo de Grado, el cual se basó en la técnica de EC.

Análisis de flavonoides por EC

1.1 Desarrollo de un método por Electroforesis Capilar para el análisis de flavonoides del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

Para el desarrollo de un método óptimo para el análisis de flavonoides en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, se ensayaron diferentes condiciones electroforéticas (voltaje y temperatura) y se varió la composición del buffer de corrida (BGE), alterando la concentración de TBS y porcentaje de MeOH, como se ilustra en la **Tabla 1** (resultados). Todos los análisis se realizaron en un capilar de sílica fundida de 48.5 cm (40 cm efectivos) 50µm diámetro interno. Para el primer uso, el capilar fue purgado con NaOH 1M durante 30 min. A diario el capilar se acondicionó con NaOH 0.1M (5 min), tiempo de espera (1 min), agua tipo I (5 min) y BGE (5 min). Entre corridas se inyectó BGE (2 min). Los espectros DAD fueron obtenidos en un rango de 200-500 nm y a partir de estos se estableció 270 nm, como longitud de onda para la detección de flavonoides. Las muestras eran introducidas al sistema por inyección hidrodinámica (50mbar/10s). El extracto fue evaluado en todos los análisis a una concentración de 2mg/mL (agua tipo I). Para la identificación de tres flavonoides previamente descritos, en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, se emplearon soluciones estándar de cada uno de estos, crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido. La identidad de los

flavonoides se estableció por espectro UV, comparación de los tiempos de migración y co-inyección de cada solución estándar con el extracto.

1.2 Estudio de movilidad

Se estudió el cambio en la movilidad electroforética (ME) de: crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido, en función del pH del BGE. Los análisis se realizaron en un capilar de sílica fundida de 64 cm (55.5 cm efectivos) 50 µl diámetro interno, con ventana expandida. Se establecieron las condiciones electroforéticas y el BGE seleccionados como óptimos para la separación de flavonoides en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, según los resultados del apartado anterior: voltaje a 20 kV, temperatura a 20°C y TBS 50 mM con 5% de metanol como BGE. El pH del BGE fue ajustado con NaOH 1M, NaOH 0.1M y HCl al 5%, estableciendo siete valores diferentes: 5.51, 6.15, 7.03, 8.32, 9.32, 10.33 y 11.08. A partir de esto se observó el cambio en los tiempos de migración de cada una de las soluciones estándar de los flavonoides de interés y se analizó la ME mediante la siguiente ecuación:

$$v = \mu_e * E$$

donde v es la velocidad del ión μ_e la movilidad electroforética y E el campo eléctrico aplicado (Watson, 2012). Posteriormente, bajo las mismas condiciones se analizó el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* a una concentración de 2mg/mL (agua tipo I), y se observó cómo los diferentes valores de pH del BGE también afectaban la movilidad de este.

2. Cuantificación de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido, en extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*

A partir de los parámetros establecidos como óptimos en los dos apartados anteriores (voltaje 20 kV; temperatura 20°C; BGE TBS 50 mM con 5% pH 9.3), se realizó la cuantificación de los flavonoides de interés crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido. Todos los análisis se realizaron en un capilar de sílica fundida de 64 cm (55.5 cm efectivos) 50 µl diámetro interno, con ventana expandida.

Para la cuantificación de crisina y kaempferol-3-*O*-glucósido, se preparó una solución madre de 500 µg/mL (metanol HPLC). Mediante diluciones seriadas se establecieron siete concentraciones diferentes: 166.66, 55.55, 18.52, 6.17, 2.06, 0.686, 0.2287 µg/mL. Por otro lado, para quercetina-3-*O*-glucósido se preparó una solución madre de 841 µg/mL (metanol HPLC) y mediante diluciones seriadas se establecieron siete concentraciones diferentes: 280.33, 93.44, 31.15, 10.38, 3.46, 1.55, 0.38 µg/mL. La cuantificación de los compuestos individuales se realizó usando una curva de calibración de cinco puntos ($r^2 = 0.995$). Todas las soluciones estándar fueron analizadas por triplicado y se midió el promedio del área.

La validación de los procedimientos analíticos se realizó de acuerdo a las directrices de the ICH guidelines (ICH 2005). Los parámetros de validación fueron: especificidad, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de cuantificación (LDC) y límite de detección óptico (LDO).

LDC y LDO fueron determinados experimentalmente, el primero al observar el análisis que aún mostrará la presencia del pico pero la cuantificación de este no fuera posible y el segundo al observar el análisis en que ya no fuera perceptible la presencia del pico. Adicionalmente, se hizo una determinación teórica mediante las siguientes ecuaciones:

$$LDC = \frac{m*10}{b} \quad LDO = \frac{m*3}{b}$$

Donde m representa la pendiente de la ecuación de la curva de calibración y b el punto intersección.

La precisión se determinó por repetibilidad (ensayos intra-diarios) y precisión intermedia (ensayos inter-diarios). Los ensayos intra-diarios se realizaron por triplicado en tres concentraciones diferentes, baja, media y alta, de las las curvas de calibración de cada una de las soluciones estándar. Los ensayos inter-diarios se realizaron al analizar una concentración intermedia de la curva de calibración, en tres días diferentes. Ambos resultados se expresaron en términos de desviación estándar relativa (DER).

La exactitud se determinó mediante co-inyecciones del extracto con una concentración de la solución estándar similar a la obtenida en la cuantificación (1:1v/v), por triplicado, y se calculó en términos de porcentaje de recuperación, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{y*100}{x}$$

Donde y es la suma del área obtenida en el análisis de co-inyección del extracto con la solución estándar de la respectiva concentración analizada; y x es la suma del área del pico del flavonoide analizado en el extracto/2 + el área del pico de la solución estándar en la concentración analizada/2.

Resultados y discusión

1. Análisis de flavonoides por EC

1.1 Desarrollo de un método por Electroforesis Capilar para el análisis de flavonoides del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

Para todos los análisis se buscó la mejor resolución, por lo cual se usaron diferentes condiciones electroforéticas (**Tabla 1**). No obstante, en algunos casos la resolución y detección de todos los picos

no fue posible, independientemente de las variaciones de voltaje y temperatura; atribuyendo así las complicaciones a las diferentes composiciones de BGE empleadas.

Tabla 1 Condiciones electroforéticas de los diferentes análisis realizados.

| Análisis | TBS ^a mM | MeOH (%) | SDS ^b mM | Voltaje kV | Temperatura °C | Tiempo |
|----------|---------------------|----------|---------------------|------------|----------------|--------|
| 1 | 50 | 5 | - | 20 | 20 | 11 |
| 2 | 50 | 20 | - | 25 | 25 | 25 |
| 3 | 75 | 5 | - | 20 | 35 | 16 |
| 4 | 75 | 20 | - | 25 | 35 | 20 |
| 5 | 20 | - | 40 | 15 | 17 | 18 |

TBS ^a = Tetraborato de sodio. SDS ^b = Dodecil sulfato de sodio

El mejor perfil de flavonoides del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* se obtuvo bajo los parámetros utilizados en el análisis No 1 (**Tabla 1**) (50mM TBS con 5% MeOH como BGE, Vol 20 kV; Temp 20°C; Tiempo 11 min) (**Figura 1**). Por esta razón en este se prosiguió con la identificación de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido (**Figura 1**). Siendo crisina el de menor tiempo de migración (5.7 min), seguido de kaempferol-3-*O*-glucósido (6.5 min) y por último quercetina-3-*O*-glucósido (6.9 min). Además de estos, otros compuestos fenólicos han sido reportados en hojas de *P. ligularis*: 6,8-di-C α -L-arabinopiranosil apigenina, 6-C- α -L-arabinopiranosil-8-C- β -L-arabinopiranosil apigenina, 6-C- β -L-arabinopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosil apigenina, 6-C- β -Dxilopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosil apigenina y orientina (Meneses 2015).

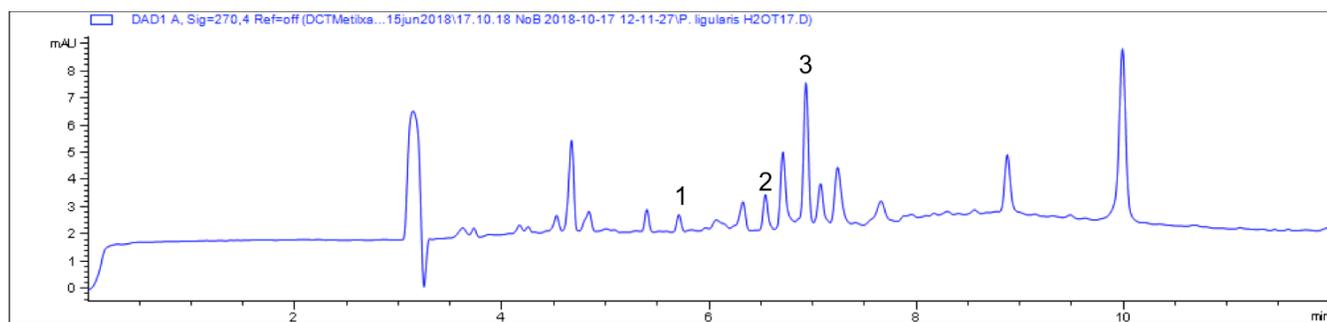


Figura 1. Electroferograma de extracto de hojas de *P. ligularis*. **1:** crisina **2:** kaempferol-3-*O*-glucósido y **3:** quercetina-3-*O*-glucósido. Condiciones electroforéticas: voltaje 20 kV; temperatura 20°C, BGE: TBS 50mM; 5% MeOH; (pH 9-10); detección UV 270 nm.

Mediante los resultados de los demás análisis se explica como la composición de los BGE empleados, pudo haber impedido la óptima separación y visualización de los flavonoides del extracto acuoso de

hojas de *P. ligularis*. En los análisis 2 y 4, (20% MeOH), se observó un aumento en el tiempo de análisis (a pesar de haber usado valores de voltaje y temperatura más altos), además de una fusión de los picos reduciendo su resolución. Esto pudo ser debido a que los modificadores orgánicos hacen que el flujo electroosmótico sea más lento (Watson, 2012) aumentando los tiempos de migración de los compuestos (Jiang et al 2004; Watson, 2012; Johnson & Lunte 2016). En este caso un aumento el porcentaje de metanol en el BGE, influyó negativamente en la separación de flavonoides, pero en otros estudios se observa lo contrario. Marchart y colaboradores (2003) lograron la separación de flavonoides en *P. incarnata* usando un BGE con 20% de MeOH; y Jian y colaboradores (2004) lograron la separación de flavonoides en *Saussurea mongolica* usando un BGE con 40% de MeOH. Demostrando que el porcentaje de solvente orgánico en el BGE debe ser revisado de forma individual para cada especie.

El aumento en la concentración de TBS en el BGE también aumentó los tiempos de análisis. Esto es coherente con los resultados de Schmitt-Kopplin (1998); Jian (2004) y Wang & Huang (2004). No obstante, se observa un fenómeno adicional, la disminución en el número de picos en los análisis con una alta concentración de TBS (3 y 4, 75 mM TBS) . Diferentes estudios mencionan que la resolución aumenta directamente con la concentración de TBS (Jiang et al 2004; Wang & Huang 2004); sin embargo Wu y colaboradores (2007) resaltan que al exceder concentraciones de 60 mM hay un efecto negativo en el límite de detección, además de un aumento en el efecto de Joule y su componente de calentamiento. Esto es visible en otros estudios donde el TBS no excede de 50 mM para la óptima separación de flavonoides (25 mM, Marchart et al 2003; 30 mM, Jiang et al 2004; 50mM, Xu et al 2006; 50 mM, Costa et al 2016).

El perfil obtenido mediante el análisis No 5 (BGE: 20mM TBS, 40 mM SDS; Vol 15 kV; Temp 17°C; tiempo 18 min) también fue adecuado (**Anexo 2, Figura 15**), no obstante es importante señalar que este es diferente al obtenido en el análisis No 1. En este análisis el BGE además de TBS tenía Sodio dodecil sulfato (SDS). Al usar un surfactante micelar, la separación de los compuestos ya no solo depende de la carga, si no también de las interacciones hidrofóbicas de las moléculas con este (Unger 2009). Esto explica, porque el perfil obtenido mediante este análisis es diferente al obtenido en el análisis No 1.

El uso de un surfactante logra extender la técnica de EC a la separación de compuestos neutros. Luego, la ventaja de esta técnica es la carga que brinda el surfactante a la molécula, que puede ser negativa o positiva dependiendo de la naturaleza del mismo (Watson 2012), en este caso anionico (SDS). El surfactante genera una una fase pseudo-estacionaria al englobar las moléculas; la cabeza polar del surfactante constituye la superficie externa y la parte apolar hidrofóbica de la molécula constituye el núcleo lipofílico (Unger 2009). El surfactante debe añadirse a concentraciones por encima de la concentración micelar crítica (CMC), pues esta es la concentración mínima a la cual se forman micelas de forma espontánea en la disolución. En el caso del SDS es 8.0×10^{-3} mol dm⁻³ (Dominguez et al 1997; Naseem et al 2004).

El uso de solventes orgánicos reduce la partición del analito a la micela, cambiando así la interacción entre estos (Watson, 2012). Sería favorable hacer más ensayos en los que se variará el porcentaje de MeOH, para determinar de qué forma influye este en la separación de flavonoides.

1.2 Estudio de movilidad

Al realizarse los análisis de las soluciones estándar de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido con BGE a pH 6.15 y 5.51, la corriente no se mantenía estable o se caía abruptamente, por lo que estos no fueron incluidos en el estudio de movilidad electroforética. Esta pérdida de corriente, se puede atribuir al hecho de que el establecimiento de la capa compacta, en el capilar depende principalmente de la ionización de la sílica, la cual se ve afectada por el pH del BGE (Tavares & McGuffin 1995). Cuando el pH es menor al pK_a de la superficie de sílica (5.9) puede ocurrir una sobre-protonación de los grupos silanol, generando una disminución en la densidad de carga en la doble capa (Tavares & McGuffin,1995). Esta disminución en la densidad de carga, puede afectar la conductividad del BGE y se ve reflejada en menores corrientes (Unger 2009). Esto es coherente con diferentes artículos que reportan que la separación de flavonoides se ha logrado con valores de pH entre 7 y 12 del BGE (Unger 2009) y el estudio de movilidad electroforética de Jiang y colaboradores (2004) usando pH entre 7 y 12.

En base a lo anterior, el estudio de movilidad electroforética se realizó con los BGE pH entre 7 y 11. Los resultados demuestran que a medida que aumenta el pH, también aumentan los tiempos de migración (**Figura 2**), lo cual se ve reflejado en la disminución de la ME (**Figura 3**). Esto sucede por el carácter de ácido débil de los flavonoides (Jiang et al 2004). A medida que aumenta el pH mayor es la disociación de los grupos OH (aumenta la carga negativa de las moléculas). Esto permite evidenciar como la carga neta de los analitos puede ser manipulada mediante el valor de pH del BGE (Unger 2009).

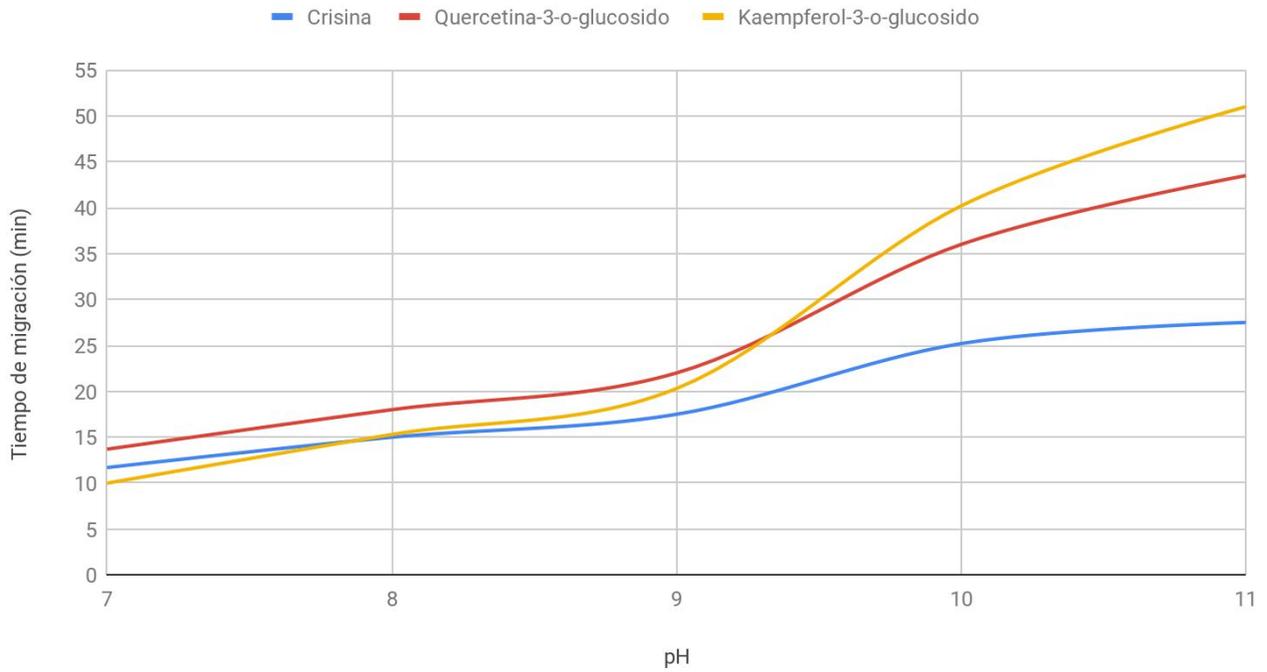


Figura 2. Variación en los tiempo de migración de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido en función del pH del BGE.

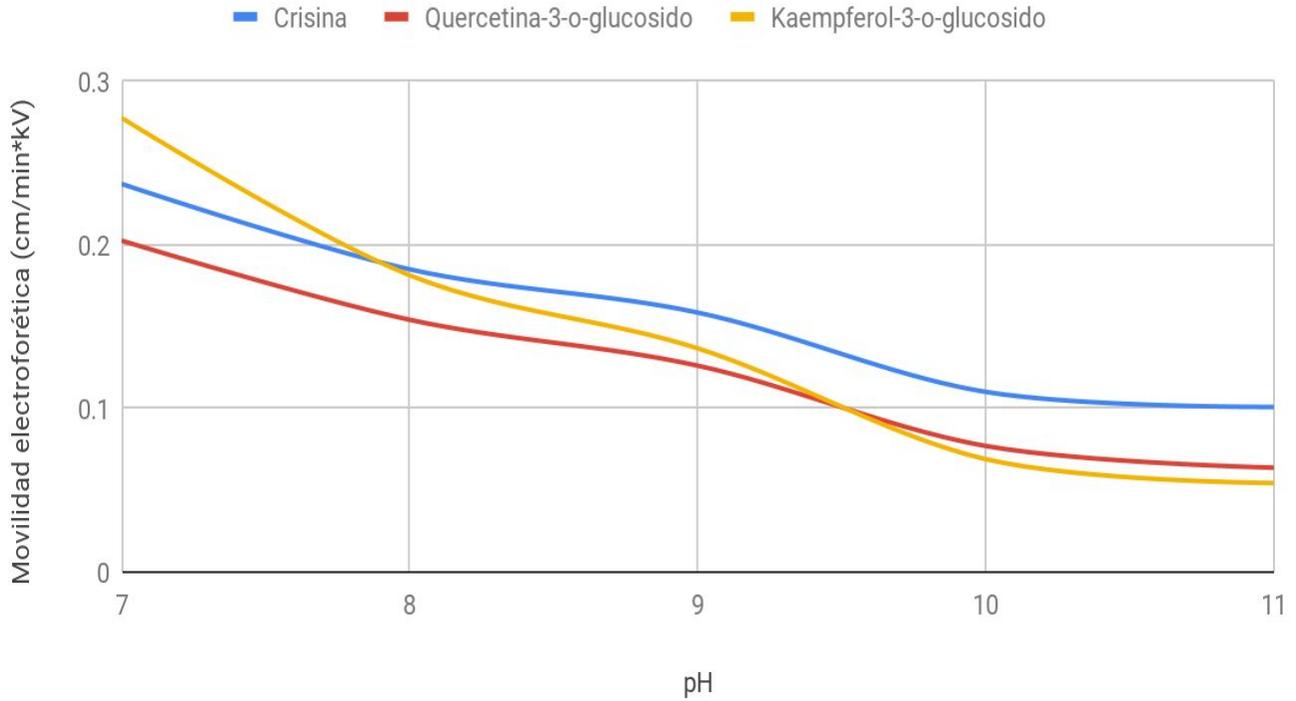


Figura 3. Variación de la movilidad electroforética de crisina, quercetina-3-*O*-glucosido y kaempferol-3-*O*-glucosido en función del pH del BGE. Los valores de movilidad electroforética calculados mediante la ecuación: $v = \mu_e * E$.

Para hacer un análisis más detallado de la ME de los flavonoides es necesario tener presente que el tamaño, la estructura de la molécula y la disociación de los grupos hidroxilo con respecto a sus valores de pK_a , son factores influyentes en esta. El tamaño y el valor de pK_a de los grupos hidroxilo, afectan de forma simultánea, pero la movilidad de los analitos se puede ver más afectada por uno o por el otro, dependiendo de su naturaleza y forma molecular (Tavares, 1995, Voirin et al 2000, Unger 2009). Por otro lado, se reconoce que los flavonoides pueden interactuar con los analitos borato del TBS presentes en el BGE. De pH neutros a básicos en azúcares y glúcidos neutros, en grupos hidroxilos vecinales con configuración *cis* se favorece la formación de complejos analito-borato (Morin & Dreux 1993; Unger 2009). El efecto en la ME de los flavonoides varía dependiendo de la ubicación en donde se forme el complejo. Si la formación del complejo ocurre en un grupo *cis*-1,2, diol de la azúcar esta adquiere una carga negativa, aumentando su carga neta y con esto su tiempo de migración (Voirin et al 2000). Por otro lado, si el complejo se forma en el esqueleto flavonoide, ocurre una pérdida de la carga negativa, puesto que el grupo catecol dos veces desprotonado es reemplazado por uno grupo catecol-borato mono-aniónico (Voirin et al 1995). Esto evidencia el complejo comportamiento de los analitos de extractos de plantas bajo la técnica de EC.

En cuanto a esto, la discusión se desglosa de tal manera que permita una mayor comprensión de las interacciones que influyen en la variación de la ME de los flavonoides a medida que aumenta el pH del BGE. Para un mejor entendimiento se provee la estructura de las moléculas de los flavonoides en la **Figura 4**.

En base a la estructura de los flavonoides, especialmente por la cantidad de grupos hidroxilos, se puede inferir la existencia de diferentes valores de pK_a ; en el caso de crisina al menos dos, en el de quercetina cinco y en el de kaempferol cuatro; aunque aún no todos han sido identificados (Álvarez-Diduk et al 2013). En la **Tabla 2** se presentan algunos de los valores de pK_a reportados por la literatura en los flavonoides de interés. En algunos casos se encuentran discrepancias relativamente altas, pero esto aún no ha sido explicado (Álvarez-Diduk et al 2013). No obstante, según los resultados obtenidos, se puede hallar mayor concordancia con ciertos valores reportados. El primer punto de inflexión de los tres flavonoides se observa entre pH 7.8 y 8.3, esto refleja la disociación del grupo hidroxilo en posición 7, el cual es reconocido por ser el más ácido (Musialik et al 2009). Posteriormente, a $pH \approx 9.5$ kaempferol-3-*O*-glucósido, muestra otro punto de inflexión, lo cual es congruente con el valor de pK_a de su grupo hidroxilo en posición 4'. Es en este punto donde kaempferol-3-*O*-glucósido disminuye su ME con respecto a quercetina-3-*O*-glucósido. Esto es coherente con los resultados obtenidos por McGuie & Markham (1994), donde quercetina-3-*O*-glucósido presenta mayores tiempos de migración a pH 9.5 y en Johnson & Lunte (2016) a pH 9.3, con respecto a kaempferol-3-*O*-glucósido. En el caso de quercetina-3-*O*-glucósido es necesario tener en cuenta la formación de complejos con el anión borato del TBS presentes en el BGE, con los grupos hidroxilo vecinales en posición 3' y 4', del esqueleto flavonoide (**Figura 5**) (McGuie & Markham, 1994; Voirin 2000; Johnson & Lunte 2016). La formación del complejo se pudo haber visto favorecida a pH neutros, esto indicaría como a pH menores a 9 esto influye de forma negativa en su

ME al tener dos cargas negativas (una en posición 7 y otra en posición 3' y 4' por la formación del complejo con el anión borato) lo cual es visible en la **Figura 2** donde presenta la menor ME en comparación a los otros flavonoides. Sin embargo, a pH mayores a 9 la formación del complejo en quercetina-3-*O*-glucósido hace que esta no disminuya su ME con respecto a la de kaempferol-3-*O*-glucósido por el aumento en su tamaño, el cual brinda una menor densidad de carga.

Tabla 2. Valores de pK_a publicados de los grupos fenólicos de quercetina, kaempferol y 5-7 Dihydroxiflavona (crisina).

| | 7-OH | 8-OH | 4'-OH | 6-OH | 3-OH | 3'-OH | 5-OH |
|----------------------|--|------|------------------|------|------|-------|------|
| Kaempferol | 8.2 ¹ 7.05 ² | - | 9.5 ¹ | | 10.5 | | 12.5 |
| Quercetina | 7.3 ¹ 7.71 ² 8.21 ³ | - | 8.4 ¹ | - | - | - | - |
| 5-7 Dihydroxiflavona | 7.3 ¹ 7.9 ³ | | | | | | |

¹ McGuie & Markham, 1994

² Álvarez-Diduk et al 2013

³ Musialik et al 2009

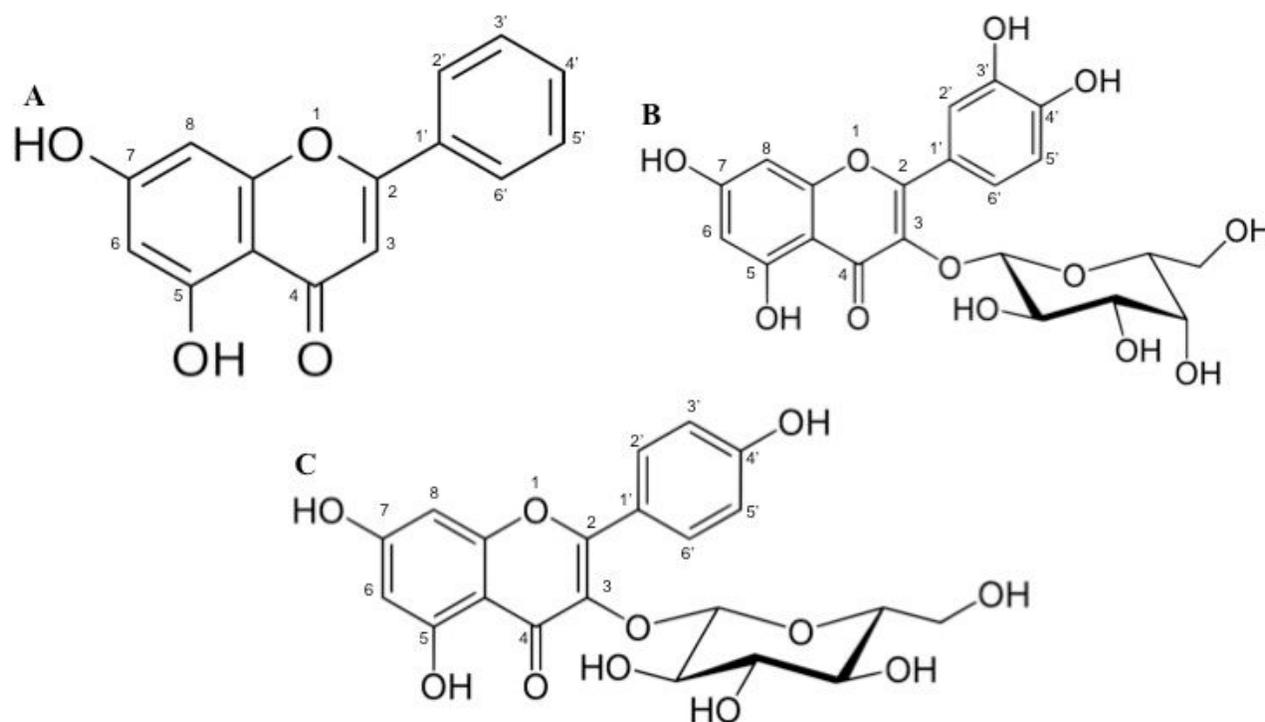


Figura 4. A crisina B quercetina-3-*O*-glucósido C kaempferol-3-*O*-glucósido

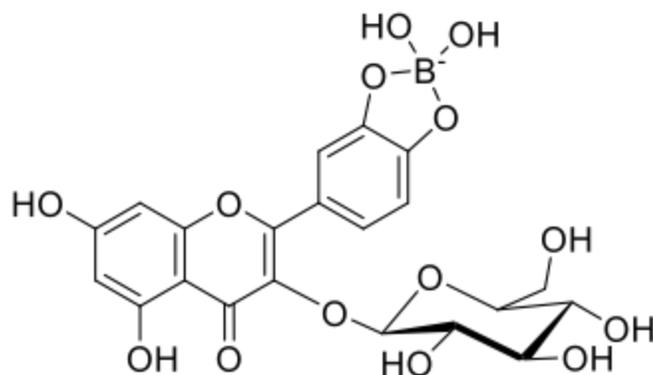


Figura 5. Formación de complejo borato en grupos hidroxilos 3' y '4 de quercetina-3-*O*-glucósido.

Resumiendo lo anterior, es posible decir que los resultados son coherentes con la teoría en cuanto a al aumento de la ME de los flavonoides a medida que aumenta el pH del BGE y los factores que en esta influyen: el tamaño, la estructura de la molécula y la disociación de los grupos OH, con respecto a sus valores de pK_a . 1) kaempferol-3-*O*-glucósido es el que presenta menor ME a pH 11 y presenta dos cargas negativas, 2) quercetina-3-*O*-glucósido es el siguiente con menor ME y también presenta dos cargas negativas, pero su mayor tamaño le brinda una menor densidad de carga. 3) crisina presenta la mayor ME y solo presenta una carga negativa. No obstante, en la literatura no hay suficiente información para explicar dos fenómenos que se presentan en los resultados. 1) el hecho de que kaempferol-3-*O*-glucósido presente una mayor ME con respecto a crisina a pH 7, a pesar de ser más grande y 2) el punto de inflexión a $pH \approx 9.5$ de crisina y quercetina-3-*O*-glucósido. En cuanto al último, no es posible decir que ocurre la disociación del grupo hidroxilo en posición 5, pues este se reconoce por su carácter de ácido débil y por tener valores de pK_a mayores a los del grupo hidroxilo en posición 4' (Musialik et al 2009). Aunque en los resultados de Jiang y colaboradores (2004), se observa este mismo punto de inflexión en quercetina-3-*O*-glucósido.

Al hacer el análisis de la variación del pH del BGE con el extracto acuoso de *P.ligularis* se observa que los tiempos de migración también aumentan con el aumento en el pH (**Anexo Figura 16**). Esto refleja que para una muestra compleja la variación del pH en el BGE tiene una influencia similar en los tiempos de migración de los flavonoides. A pH 7 y 8 hay un mayor solapamiento de los picos, posiblemente por la alta disminución en los tiempos de migración, lo cual es coherente con los resultados de Wu, T et al (2007), quien expone que la resolución de los picos es muy baja a pH menores a 9.0. A pH 11 el tiempo de análisis es menor que a pH 10, no obstante esto se debe a la completa deformación de los picos que impide realmente mostrar un perfil del extracto. Por otro lado, se observó que los tiempos de migración de los flavonoides eran diferentes al ser analizados de forma individual y al ser analizados en el extracto, fenómeno que también se puede observar en los resultados obtenidos por Jiang y colaboradores (2004). Esto puede ser debido a que al haber un mayor número de compuestos en la solución, la influencia tanto en la carga neta de los analitos por el BGE, como la formación de complejos analito-borato se vea disminuida.

2. Cuantificación de crisina, quercetina-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-glucósido, en extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*

Las curvas de calibración de las soluciones estándar de crisina, quercetina-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-glucósido, mostraron una adecuada relación lineal entre el área del pico y la concentración ($R^2 < 0.995$) (**Tabla 3**). En cuanto al LDC y LDO de crisina y kaempferol-3-O-glucósido se observa que los valores calculados teóricamente son mayores a los obtenidos en la práctica. En quercetina-3-O-glucósido el valor LDC no pudo ser calculado en la práctica, puesto que en la siguiente concentración analizada a 3.46 µg/ mL (último valor de la curva) ya no era perceptible el pico. A partir de esto se asume que LDC de quercetina-3-O-glucósido está entre 3.46 y 1.15 µg/ mL. Los calculos teoricos en este caso muestran mayor coherencia, al estar el LDC entre los valores propuestos y LDO al ser menor a 1.15 µg/ mL (**Tabla 3**). Los contenidos de quercetina-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-glucósido se muestran en la **Tabla 4**. No fue posible cuantificar crisina, puesto que su concentración en el extracto era menor a las alcanzadas por la curva de calibración, a pesar de que se concentrará hasta cuatro veces más el extracto, en comparación con los análisis de quercetina-3-O-glucósido y kaempferol-3-O-glucósido, donde el extracto se analizó a una concentración de 2mg/mL (agua tipo I). No hay reportes en la literatura acerca de la cuantificación de flavonoides en *P. ligularis* mediante EC, sin embargo se encuentra coherencia con los resultados de (Sepúlveda, M 2018) (**Anexo 1 Figura 13**), en análisis realizado por UHPLC, en donde el pico de mayor área es quercetina-3-O-glucósido, seguido de kaempferol-3-O-glucósido y por último crisina. Mediante EC, hay otros estudios acerca de la cuantificación de flavonoides en otras especies del género *Passiflora* (Marchart et al 2002; Costa et al 2016). Aunque, estos revisan otros flavonoides: isoscoparina-2"-O-β-D-glucopiranosido, isoorientina, swertisina, orientina, vitexina.

En la literatura se encuentran análisis de cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de diferentes extractos de *P. ligularis*, mediante otras técnicas de análisis. Rotta y colaboradores (2019) realizaron una cuantificación de distintos compuesto fenólicos, entre ellos quercetina, en extracto QuEChERS de frutas de *P. ligularis* por UHPLC-MS/MS. En este no fue posible determinar el contenido de quercetina, puesto que su concentración era menor a la del límite de cuantificación (35 µg/kg). Y Saravanan y Parimelazhagan (2014) cuantificaron compuestos fenólicos por HPLC en extracto acetónico de frutas de *P. ligularis*, entre ellos kaempferol (3.05 mg/g extract).

Tabla 3. Datos de calibración soluciones estándar

| Estandár | Ecuación de calibración | Factor de correlación (r^2) | Practico | | Teórico | |
|----------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | LDC ^a (µg/ mL) | LDO ^b (µg/ mL) | LDC ^a (µg/ mL) | LDO ^b (µg/ mL) |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Crisina | $y = 27.335x - 57.963$ | 0.998 | 0.686 | 0.229 | 4.72 | 1.57 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucosido | $y = 5.9387x - 20.217$ | 0.999 | - | 1.15 | 2.94 | 0.88 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosido | $y = 6.9336x - 14.019$ | 0.997 | 0.686 | 0.229 | 4.95 | 1.63 |

^a LDC= límite de cuantificación; ^b LDO= límite de detección óptica.

Tabla 4. Contenido de flavonoides de interés en extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*

| Estandár | Concentración ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|-----------------------------------|---|
| Crisina ^a | - |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido | 8.59 ± 2.61 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido | 2.19 ± 0.95 |

^a en términos de mg/mL de extracto \pm DE (n = 3).

Es importante enfatizar que el perfil de flavonoides obtenido usando el capilar de sílica fundida de 48.5 cm (40 cm efectivos) \times 50 μm diámetro interno, era más apropiado para la cuantificación de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido, puesto que permitía una mejor separación de los compuestos, además de tiempos de análisis más cortos (11 min) (**Figura 1**). No obstante, por cuestiones técnicas y de tiempo este no pudo ser utilizado para obtener las curvas de calibración, por lo que fue necesario cuantificar los compuestos en el perfil obtenido con el capilar de sílica fundida de 64 cm (55.5 cm efectivos) \times 50 μm diámetro interno, con ventana expandida. Aunque en los resultados el error calculado no es muy alto, es recomendable repetir la cuantificación de los compuestos en un capilar de menor longitud, similar al utilizado en el desarrollo del método.

Se obtuvo buena precisión en los ensayos intra-diarios, en concentraciones bajas, medias y altas de la curva de calibración de cada una de las soluciones estándar (DER < 4%) (**Tabla 5**). Con respecto a la precisión de ensayos inter-diarios, solo crisina obtuvo valores mayores a los recomendados en la literatura (DER > 5%) (ICH 2005) (**Tabla 5**). Esto pudo ser debido a los problemas técnicos que presentó el equipo durante los análisis (pérdida de corriente). En cuanto a la exactitud, para crisina y kaempferol-3-*O*-glucósido se realizó la co-inyección del extracto con la solución estándar de concentración 2.06 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y para quercetina-3-*O*-glucósido la co-inyección se realizó con la solución estándar de concentración 10.38 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Se observó una un alto porcentaje de recuperación en todas las soluciones estándar (**Tabla 6**). Esto puede ser debido a la naturaleza de los análisis electroforéticos.

Tabla 5. Datos de repetibilidad y precisión intermedia de soluciones estándar

| Estandár | Repetibilidad ^a | Presición intermedia ^a |
|----------|----------------------------|-----------------------------------|
|----------|----------------------------|-----------------------------------|

| | Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | D.E.R % | Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | D.E.R % |
|-----------------------------------|--|----------------------|--|------------|
| Crisina | 166.66 18.52 6.17 | 0.94 1.85 3.60 | 18.52 | 14.38 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucosido | 280.33 93.44 10.38 | 2.57 0.90 2.70 | 93.44 | 2.99 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosido | 166.66 55.55 2.06 | 2.18 1.60 3.19 | 6.17 | 4.19 |

^a Límites D.E.R: < 5%

Tabla 6. Datos de exactitud de soluciones estándar

| Compuesto | Recuperación | |
|-----------------------------------|--------------|---------|
| | Promedio (%) | DER (%) |
| Crisina | 106.55 | 4.02 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucosido | 103.45 | 2.52 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosido | 106.74 | 1.82 |

Conclusiones

El método para una óptima separación de flavonoides en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* se logró en 11 minutos, usando un capilar de sílica fundida de 48.5 cm (40 cm efectivos) 50 μm diámetro interno, TBS 50 mM con 5% de metanol como BGE (pH 9.3) y manteniendo un voltaje de 20 kV y temperatura 20 °C. Se determinó que un alto porcentaje de MeOH influye negativamente en la resolución de los picos y una alta concentración de TBS influye negativamente en el límite de detección. Se demostró que la ME de los flavonoides disminuye a medida que aumenta el pH del BGE y que el tamaño, la estructura de la molécula, la disociación de los grupos OH con respecto a sus valores de pK_a y las interacciones con los aniones borato de TBS en el BGE, son factores influyentes en esta. Se logró la cuantificación de quercetina-3-*O*-glucósido ($8.59 \pm 2.61 \mu\text{g}/\text{mL}$) y kaempferol-3-*O*-glucósido ($2.19 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Perspectivas

Se sugiere una repetición de las curvas de calibración de los flavonoides de interés, para lograr una mayor exactitud y precisión en la cuantificación, usando un capilar de menor longitud, similar al utilizado en el desarrollo del método. Por otro lado, al haber demostrado la presencia de saponinas en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*, se presenta la posibilidad de analizarlas por la técnica de EC. Es necesario tener presente que las saponinas muestran una baja absorción UV, por lo que se recomiendan ciertos parámetros para aumentar la respuesta de detección UV: el uso de BGE con TBS, el cual permite la formación de complejos (Emara et al 2001) y establecer valores de pH bajos (Wang & Cheng 2006). Por otro lado, es necesario el uso de surfactante, puesto que las saponinas no presentan carga.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Trabajo de Grado, Geison Modesti Costa, por el apoyo que me brindó durante todo el proyecto; escuchándome durante todos los problemas que se presentaron y siendo un guía en un campo en el que no tenía amplios conocimientos. Al departamento administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS por financiar este proyecto (No 836, 2017). A la Pontificia Universidad Javeriana por la formación que me ha dado como bióloga y científica, y por facilitar los medios para que este Trabajo de Grado se llevará a cabo. A Flavio Henrique Reginatto por ser mi evaluador y por su retroalimentación. A Andrés Martínez quién también me brindó sus conocimientos en química para lograr una mayor comprensión del tema. Y por último a mis padres, sin ellos nada de esto hubiera sido posible; por su apoyo, paciencia e incondicionalidad.

Bibliografía

- Álvarez-Diduk, R., Ramírez-Silva, M. T., Galano, A., & Merkoçi, A. (2013). *Deprotonation Mechanism and Acidity Constants in Aqueous Solution of Flavonols: a Combined Experimental and Theoretical Study*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(41), 12347–12359. doi:10.1021/jp4049617
- Colomeu, T. C., Figueiredo, D., Cazarin, C. B. B., Schumacher, N. S. G., Maróstica, M. R., Meletti, L. M. M., & Zollner, R. L. (2014). *Antioxidant and anti-diabetic potential of Passiflora alata Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice)*. *International Immunopharmacology*, 18(1), 106–115.
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Zucolotto, S. M., Castellanos, L., Ramos, F. A., Reginatto, F. H., & Schenkel, E. P. (2016). Chemical profiles of traditional preparations of four South American Passiflora species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.005>

- Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E., & Montenegro, L. (1997). Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*, 74(10), 1227. <https://doi.org/10.1021/ed074p1227>
- Emara, S., Mohamed, K. M., Masujima, T., & Yamasaki, K. (2001). Separation of naturally occurring triterpenoidal saponins by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 15(4), 252–256. doi:10.1002/bmc.66
- Espinal, C., Martínez, H., & Peña, Y (2005). LA CADENA DE LOS FRUTALES DE EXPORTACIÓN EN COLOMBIA UNA MIRADA GLOBAL DE SU ESTRUCTURA Y DINAMICA 1991-2005. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia*.
http://www.asohofrucol.com.co/archivos/Cadenas/caracterizacion_frutales_exporta_2005.pdf
- Gadioli, I. L., Cunha, M. de S. B. da, Carvalho, M. V. O. de, Costa, A. M., & Pineli, L. de L. de O. (2018). A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 785–807. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>
- Granados-Pérez & Lara-Prado (2018) CADENA DE PASIFLORAS Indicadores e Instrumentos Mayo - Junio 2018. *Minagricultura; Todos por un nuevo País*.
<https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202018%20Mayo%20Pasifloras.pdf>
- Gupta, R. K., Kumar, D., Chaudhary, A. K., Maithani, M., & Singh, R. (2012). Antidiabetic activity of Passiflora incarnata Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3), 801–806. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.021>
- Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*, 28(9–10), 883–897. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400104>
- Hernández, A. & P.M. Jørgensen 2018-11-04. *Passiflora*. En Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- ICH-International Conference of Harmonization. (2005) *Validation of analytical procedures: Text and Methodology - Q2(R1)*, London.
- Jiang, T., Li, Y., & Shi, Y. (2004) Determination of Six Major Flavonoid Glycosides in *Saussurea mongolica* by Capillary Electrophoresis. *Planta Medica*, 70(3), 284–287. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818927>

- Johnson, R. T., & Lunte, C. E. (2016). A capillary electrophoresis electrospray ionization-mass spectrometry method using a borate background electrolyte for the fingerprinting analysis of flavonoids in Ginkgo biloba herbal supplements. *Analytical Methods*, 8(16), 3325–3332. <https://doi.org/10.1039/C6AY00463F>
- Marchart, E., Krenn, L., & Kopp. (2003) BQuantification of the Flavonoid Glycosides in *Passiflora incarnata* by Capillary Electrophoresis. *Planta Medica*, 69(5), 452–456. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39699>
- McGhie, T. K., & Markham, K. R. (1994). Separation of flavonols by capillary electrophoresis: The effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochemical Analysis*, 5(3), 121–126. <https://doi.org/10.1002/pca.2800050307>
- Meneses M. C. (2015). Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, Colombia.
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W., & Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.
- Miroddi, M., Calapai, G., Navarra, M., Minciullo, P. L., & Gangemi, S. (2013). *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.047>
- Morin, P., & Dreux, M. (1993). Factors Influencing the Separation of Ionic and Non-Ionic Chemical Natural Compounds in Plant Extracts by Capillary Electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography*, 16(17), 3735–3755. <https://doi.org/10.1080/10826079308019664>
- Musialik, M., Kuzmicz, R., Pawłowski, T. S., & Litwinienko, G. (2009). *Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids*. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(7), 2699–2709. doi:10.1021/jo802716v
- Naseem, B., Sabri, A., Hasan, A., & Shah, S. S. (2004). Interaction of flavonoids within organized molecular assemblies of anionic surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.01.012>
- Pabón, C. D., Marina, L., Turbay, S., Marelly Álvarez, L., Rodríguez, A., Alvarez, J. M., Bonilla K., Restrepo S & Parra, M. (2014). Relación entre los usos populares de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) y su composición fitoquímica. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2).

- Parra, M., Aguilera, A., Escobar, W., Rubiano, V., & Rodríguez, A. (2011). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de granadilla en el departamento del Huila. Corporación Cepass. Neiva. 166 p.
- Rotta, E. M., Rodrigues, C. A., Jardim, I. C. S. F., Maldaner, L., & Visentainer, J. V. (2019). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *LWT*, *100*, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.052>
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, *3*(2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>
- Schäfer, A., & Högger, P. (2007). Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *77*(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.10.011>
- Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Garrison, A. W., Freitag, D., & Kettrup, A. (1998). Influence of Borate Buffers on the Electrophoretic Behavior of Humic Substances in Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *70*(18), 3798–3808. doi:10.1021/ac971223j
- Suntornsuk, L. (2002). Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *27*(5), 679–698. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00531-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00531-3)
- Tavares, M. F. M., & McGuffin, V. L. (1995). Theoretical Model of Electroosmotic Flow for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *67*(20), 3687–3696. <https://doi.org/10.1021/ac00116a012>
- Tomás-Barberán, F. A. (1995). Capillary electrophoresis: A new technique in the analysis of plant secondary metabolites. *Phytochemical Analysis*, *6*(4), 177–192. <https://doi.org/10.1002/pca.2800060402>
- Unger, M. (2009). Capillary Electrophoresis of Natural Products: Current Applications and Recent Advances. *Planta Medica*, *75*(07), 735–745. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185453>
- Voirin, B., Sportouch, M., Raymond, O., Jay, M., Bayet, C., Dangles, O., & El Hajji, H. (2000). Separation of flavone C-glycosides and qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. *Phytochemical Analysis*, *11*(2), 90–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200003/04\)11:2<90::AID-PCA497>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200003/04)11:2<90::AID-PCA497>3.0.CO;2-R)

- Wang, S.-P., & Huang, K.-J. (2004). *Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 1032(1-2), 273–279. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.099
- Wang, S., Ye, S., & Cheng, Y. (2006). *Separation and on-line concentration of saponins from Panax notoginseng by micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1109(2), 279–284. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.023
- Watson, D. G. (2012). *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists* (3rd ed). Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone Elsevier.
- Wu, T., Guan, Y., & Ye, J. (2007). *Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. *Food Chemistry*, 100(4), 1573–1579. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.042
- Wu, T., Yu, C., Li, R., & Li, J. (2018). Minireview: Recent advances in the determination of flavonoids by capillary electrophoresis. *Instrumentation Science & Technology*, 46(4), 364–386. <https://doi.org/10.1080/10739149.2017.1394877>
- Xu, X., Yu, L., & Chen, G. (2006). *Determination of flavonoids in Portulaca oleracea L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2), 493–499. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.013
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, 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: Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American Passifloras. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 232–239. <https://doi.org/10.1002/pca.1348>

Anexo 1

Evaluación de Extracto Acuoso de Hojas de *Passiflora ligularis* Mediante Diferentes Técnicas de Análisis Químico

Metodología

1. Marchas fitoquímicas

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar para observar la presencia de flavonoides y saponinas en el extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis*. Para cada una de las pruebas se tuvo en cuenta un control negativo y dos controles positivos. En el caso de flavonoides se usaron rutina y extracto acuoso de hojas de *P. alata* como controles positivos; y para saponinas extracto hidroalcohólico de hojas de *Ilex guayusa* y el mismo extracto acuoso de hojas de *P. alata*; extractos ya estudiados por el grupo de investigación. Para esto se tomó una muestra de 2mg de cada extracto (*P. ligularis*, *P. alata* e *I. guayusa*), se diluyó en etanol y se sonicó hasta que estuviera completamente solubilizado. Luego se realizaron las respectivas pruebas.

1.1 FLAVONOIDES

Prueba Shinoda: se toman 0.5 mL extracto, se añade un trozo de magnesio metálico y 5 gotas de HCl 10%. Positivo: coloración rojiza (Ruíz-Reyes et al 2010).

Prueba Rosenhein: se toman 0.5 mL de extracto y se mezclan con 0.5 mL de HCl concentrado, se calienta en baño de maría durante 10 min. Posteriormente se dejan enfriar y se agrega 0.4 mL de alcohol amílico. Positivo: observación fase amílica (doble fase). Leucoantocianidinas: rojo Antocianidinas: marrón (Ruíz-Reyes et al 2010).

1.2 SAPONINAS

Prueba de espuma: se mezcla 1 ml de extracto con 5 mL de agua y se agita durante 2 min. Positivo: espuma estable de aproximadamente un cm de altura (Ballesteros et al 2013).

Liebermann-Burchard: se toman 0.5ml de extracto y se añaden 8 gotas de reactivo Liebermann-Burchard. Positivo: coloración rojiza para esteroides y azul-verde para triterpénicas (Valencia et al 2005).

2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

Se realizó un análisis de flavonoides y saponinas se hizo por CCD y se compararon los perfiles de las plantas: *P. alata*, *P. ligularis* y *P. quadrangularis*. Se utilizó como fase estacionaria una placa de sílica en fase normal y como fase móvil acetato de etilo: acetona: ácido acético: agua. Para flavonoides se usaron las proporciones 45:15:4:3 (v:v) y se reveló con reactivo natural, UV 360 nm. Para saponinas se usaron las proporciones 6:2:1:1 (v:v) y se aplicó anisaldehído sulfúrico que tras poner en placa de calentamiento permitió revelar la placa.

3. Determinación Espectrofotométrica de Fenoles y Flavonoides totales.

3.1 Determinación Espectrofotométrica de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales se hizo de acuerdo al método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se tomaron alícuotas de 50µl de solución metanólica de extracto de *P. ligularis* (4 mg/mL) y de estándar (ácido gálico) y se mezclaron con 800 µL de agua destilada y 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10% en agua, esta reacción se dejó reposar durante 8 min en la oscuridad. Luego se adicionaron 50 µL de carbonato de sodio al 7.5% en agua y se dejó reposar durante dos horas en la oscuridad. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 760 nm usando el equipo *Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*. Mediante una curva de calibración de ácido gálico de seis puntos (0.625-20 mg/ml) se estimó el contenido total de fenoles por triplicado. A las absorbancias obtenidas se les calculó el promedio, la desviación estándar (DE) y la desviación estándar relativa (DER). A partir del promedio se interpoló en la gráfica y se obtuvo la concentración de fenoles en µg equivalente de ácido gálico (mg EAG)/ml. Luego teniendo en cuenta que la muestra fue diluida cuando se añadieron los reactivos, se calculó la concentración de fenoles en la muestra:

$$C_f * 1000\mu l = C_i * 50\mu l$$

Por último se calculó la concentración de fenoles en el extracto expresándose en mg EAG/mg de extracto.

3.2 Determinación Espectrofotométrica de Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides totales se hizo de acuerdo a Zhishen y colaboradores (1999). Para esto se tomaron alícuotas de 150 μ L de solución metanólica de extracto de *P. ligularis* (4 mg/mL) y de estándar (rutina), estas se mezclaron con 150 μ L de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 2% y 150 μ L de acetato de sodio 0.1M, luego se dejó reposar durante 40 min. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 420 nm usando el equipo *Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*. Usando una curva de calibración de rutina de cinco puntos (31.25-500 μ g/ml) se estimó el contenido total de flavonoides por triplicado. A las absorbancias obtenidas se les calculó el promedio, la DE y la DER. A partir del promedio se interpoló en la gráfica y se obtuvo la concentración de flavonoides en μ g equivalente rutina (ER μ g)/mL. Luego teniendo en cuenta que la muestra fue diluida cuando se añadieron los reactivos, se calculó la concentración de flavonoides en la muestra:

$$C_f * 450\mu l = C_i * 150\mu l$$

Por último se calculó la concentración de flavonoides en el extracto expresándose en mg ER/mg de extracto.

4. Perfil Cromatográfico de Flavonoides de *Passiflora ligularis* por UPLC .

La separación cromatográfica del extracto de hojas de *P. ligularis* por UPLC se realizó usando un método de 16 min establecido previamente por Sepulveda, M (2018) (datos no publicados). Para esto se usó el equipo *UPLC Acquity Waters* y una columna de fase reversa Phenomenex® Kinetex C18 (100 \times 2.1 mm; 2.6 μ m). La muestra evaluada tenía una concentración de 2mg/ml (metanol HPLC:agua

tipo I; 1:1 v/v). Para la la separación cromatográfica se empleó una fase móvil de ácido fórmico 0.5% (A) y acetonitrilo (B) manteniendo un flujo de 0.3µl/min a 25°C. El perfil de gradiente fue: 0-8 min, 10-35% B; 8-9 min, 35% B; 9-15 min, 35-85% B; 15-16 min, 85-10% B. La detección se hizo a 340 nm.

Resultados y Discusión

1. Marchas fitoquímicas

Tabla 1. Resultados marcha fitoquímica extracto hojas de *P. ligularis*.

| | Prueba | Resultados |
|-------------|--------------------------|------------|
| Flavonoides | Shinoda | ++ |
| | Rosenhein | +++ |
| Saponinas | Espuma | ± |
| | Liebermann -Burchard: | - |

Convenciones: + = poco, ± = dudoso, ++ = moderado, +++ = abundante , - = negativo

1.1 Flavonoides

Prueba Shinoda: El cambio de color rojizo- rosa sucede por la reacción del magnesio con el ácido clorhídrico: $Mg + 2HCl = MgCl_2 + H_2$. El cloruro de magnesio formado genera complejos con los flavonoides dando como resultado esta coloración característica (Ojeda 2013; Ruíz-Reyes et al 2010). Se puede observar el rosado claro en *P. ligularis* (**Figura 1**) indicando la prueba positiva.

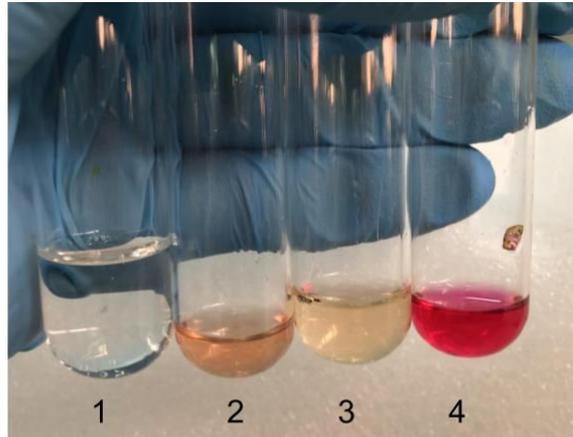


Figura 1. Prueba Shinoda 1) Control negativo, 2) *P. alata*, 3) *P. ligularis*, 4) Rutina.

Prueba Rosenhein: Al poner calor, el ácido clorhídrico produce la deshidratación del grupo hidroxilo en la posición 3 de las leucoantocianidinas y antocianinas y la ruptura del anillo heterocíclico. Posteriormente el alcohol amílico extrae estos compuestos formandose la respectiva coloración de la fase orgánica (leucoantocianidinas rojo; antocianidinas marrón) (Ruíz-Reyes et al 2010). En este caso la prueba es positiva y se observa una coloración marrón en *P. ligularis* (**Figura 2**) indicando la presencia de antocianinas.

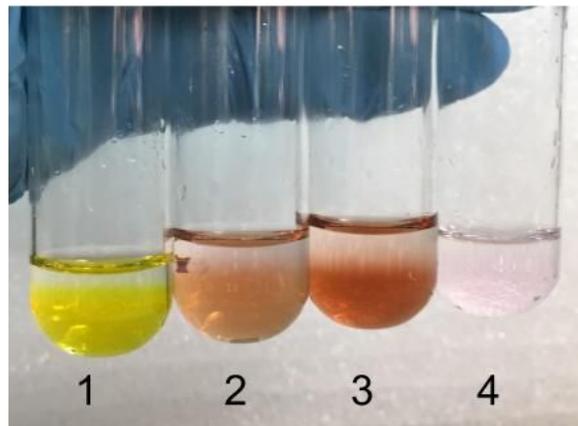


Figura 2. Prueba Rosenhein 1) Rutina 2) *P. alata* 3) *P. ligularis* 4) Control negativo

1.2 Saponinas

Prueba espuma: La espuma se forma por la capacidad surfactante de las saponinas. Al reducir la tensión superficial del agua se genera un agregado de moléculas en suspensión coloidal (Ballesteros et al 2013). Al no haberse generado espuma abundante (**Figura 3**) se considera que el resultado de esta prueba es dudoso.

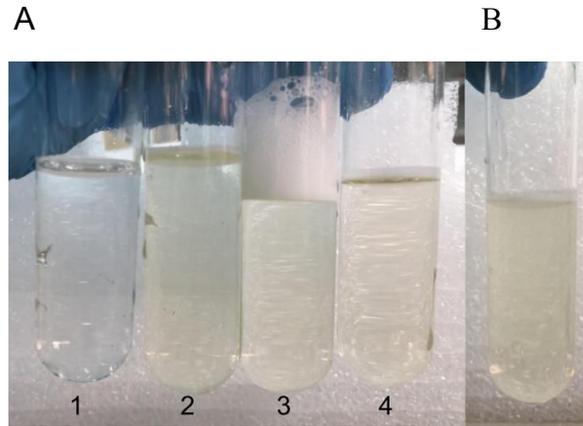


Figura 3. Prueba espuma A) 1) Control negativo, 2) *P. ligularis* 3) *P. alata*, 4) *I. guayusa* B) Acercamiento *P. ligularis*.

Prueba Liebermann-Burchard: Esta prueba se usa para la identificación de esteroides y consiste en la reacción entre el anhídrido acético (compuesto presente en reactivo Liebermann- Burchard) y el núcleo esterooidal o triterpenoide (Ruíz-Reyes et al 2010). Es necesario que esta reacción ocurra en un medio anhidro, pues el agua podría interferir y reaccionar con el anhídrido acético (Ruíz-Reyes et al 2010). En esta prueba no se observó ningún cambio, posiblemente porque el reactivo estaba vencido, por lo cual se reporta como negativa y sería necesario repetirla (**Figura 4**).

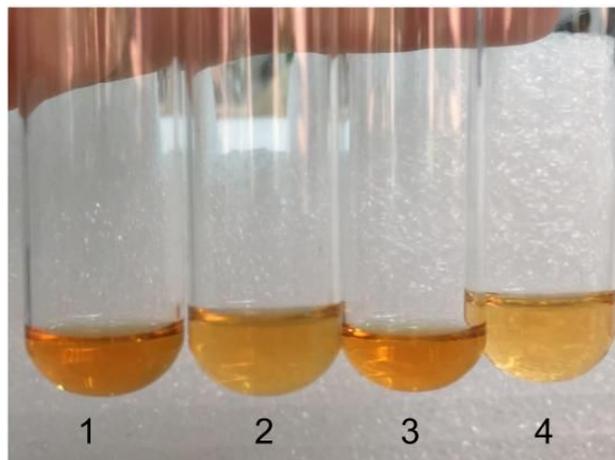


Figura 4. Prueba Liebermann- Burchard 1) *I. guayusa* 2) *P. alata* 3) *P. ligularis* 4) Control negativo.

2. Cromatografía en Capa Delgada

En cuanto al análisis de flavonoides por CCD, en *P. ligularis* se pueden distinguir dos bandas amarillas (**Figura 5B**), la primera con un $R_f \approx 0.23$, la segunda con un $R_f \approx 0.45$ y una banda verde con un $R_f \approx 0.51$. El comportamiento de la fluorescencia de los flavonoides cuando expuestos al reactivo natural es dependiente de la estructura (H. Wagner & S. Bladt, 1996); se ha demostrado que el color amarillo es característico de núcleos flavonas y flavonoles y el color verde de núcleos *flavonas*.

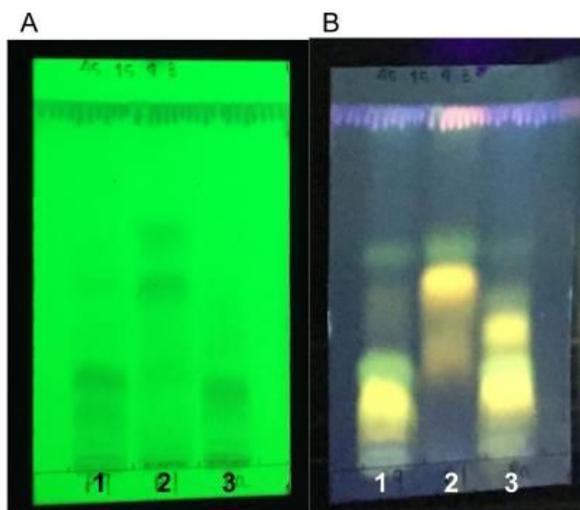


Figura 5. CCD flavonoides Fase estacionaria: sílica en fase normal. Fase móvil: acetato de etilo: acetona: ácido acético: agua (45:15:4:3). (A) CCD visualizada en luz UV (254 μ m); (B) CCD visualizada en luz UV (360 μ m) tras haber aplicado Reactivo Natural. 1 *P. quadrangularis*, 2 *P. ligularis* 3 *P. alata*.

En anteriores estudios se ha identificado la presencia de quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido (Sepúlveda, M 2018) (datos no publicados) lo que es coherente a los colores observados.

En cuanto al análisis de saponinas por CCD, en *P. ligularis* se puede observar una banda rosada ($R_f \approx 0.46$) (**Figura 8B**). Es posible inferir que esta banda corresponde a saponinas, puesto que al calentar la

CCD el anisaldehído sulfúrico permite evidenciar la presencia de núcleos terpenos y esteroides (Gerlach et al 2018); representados por coloración que varía entre azul-violeta-rosa (Hostettmann, & Marston, 2005).

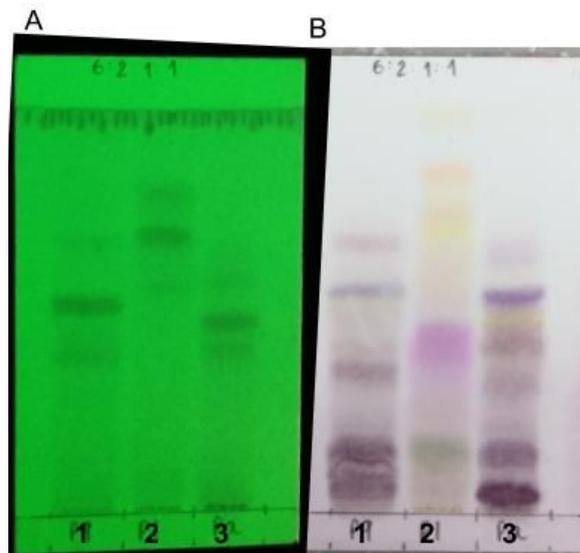


Figura 8. CCD saponinas Fase estacionaria: sílica en fase normal. Fase móvil: acetato de etilo: acetona: ácido acético: agua (6:2:1:1). (A) CCD, UV (254µm). (B) CCD tras haber aplicado anisaldehído sulfúrico/calor. 1 *P. quadrangularis*, 2 *P. ligularis* 3 *P. alata*

3. Determinación Espectrofotométrica de Fenoles y Flavonoides totales.

3.1 Determinación Espectrofotométrica de Fenoles Totales

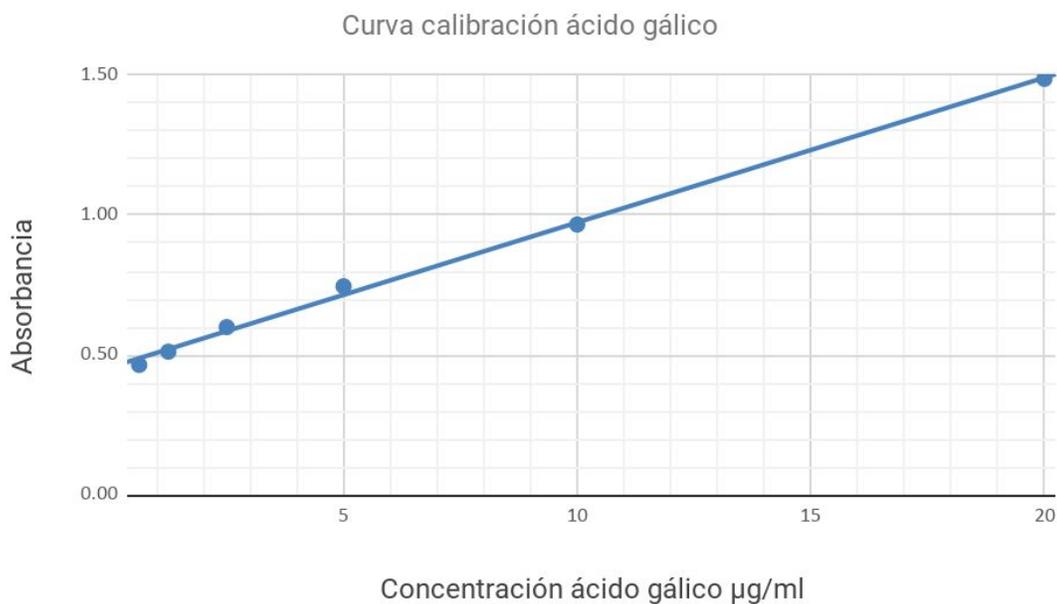


Figura 9. Curva de calibración ácido gálico. Ecuación: $y = 0.0517X + 0.457$ $R^2 : 0.9975$.

La lectura de la absorbancia para conocer el contenido de fenoles totales se basa en la reacción que hay entre los reductores y el molibdeno (el compuesto activo del Folin-Ciocalteu es molibdato de sodio (Na_2MoO_4) (Singleton et al 1999). El electrón de los antioxidantes reduce el molibdeno de Mo(VI) a Mo(V), en este caso los fenoles del ácido gálico y de la muestra de *P. ligularis*, resultando en la formación de un complejo azul que absorbe luz a 750-760 nm (Magalhães et al 2008). Se ha demostrado que hay una correlación lineal entre la absorbancia del complejo y la concentración de especies reductoras (Mathea, 2012). Al hacer una comparación de los valores obtenidos en este trabajo con otras publicaciones, es posible observar que el contenido total de fenoles totales evaluado empleando el método de Folin- Ciocalteu, varió cuantiosamente entre estudio y estudio, como se observa en la **Tabla 1**; tanto para *P. ligularis* como para otras especies del género *Passiflora*. Las variaciones se pueden deber a diferentes factores como: clima del lugar donde se recolectó la muestra, maduración de la muestra, método de extracción (Vasco et al 2012; Saravanan & Parimelazhagan 2014) y longitud de onda de la lectura. En cuanto a esto, Saravanan, & Parimelazhagan (2014) muestran que el mayor contenido de fenoles fue obtenido empleando acetona como solvente de extracción de frutos de *P. ligularis*, pero Ramaiya y colaboradores (2014) obtuvieron un mayor contenido de fenoles empleando metanol como solvente de extracción de hojas de *P. edulis* y *P. quadrangularis*.

Tabla 1. Comparación resultados fenoles totales de distintas publicaciones

| Espece | Parte de la planta | Solvente de extracción | Concentración fenoles totales | Lectura de absorbancia nm | Publicación |
|---------------------|--------------------|------------------------|---|---------------------------|----------------------|
| <i>P. ligularis</i> | Hojas | Diclorometano | 30.80±2.49 µg de ácido gálico/ g de extracto, | 765 | Marroquín et al 2012 |
| | | Metanol | 31.93±1.67 µg de ácido gálico/ g de extracto, | | |

| | | | | | |
|------------------|--|-----------------------------|---|-----|---------------------------------------|
| | Fruto | Metanol:agua (50:50 v/v) | 91 ± 43 “mg GAE/100 g sample FW” | 750 | Vasco et al 2007 |
| | | Acetona | 640.70 ± 2.95 mg EAG/mg extracto | 725 | Saravanan & Parimelazhagan 2014 |
| | | Metanol | 137.90 ± 1.52 mg EAG/mg extracto | | |
| <i>P. alata</i> | Rebrotos | Etanol | 34.22 ± 0.39 mg EAG/g extracto | 725 | Vasic et al 2012 |
| | | Acetona | 14. 04 ± 0.49 mg EAG/mg extracto | | |
| <i>P. edulis</i> | Hojas | Diclorometano | 7.28 ± 1.70 µg de ácido gálico/ g de extracto | 765 | Marroquín et al 2012 |
| | | Metanol | 11.73 ± 1.08 µg de ácido gálico/ g de extracto; | | |
| | | Acetona | 2.03 ± 0.08 g AGE por 100 g PS de extracto | 740 | Ramaiya et al 2014 |
| Metanol | 2.37 ± 0.11 g AGE por 100 g PS de extracto | | | | |

| | | | | | |
|--------------------------|-------|---------------|--|-----|----------------------|
| <i>P. incarnata</i> | Hojas | Diclorometano | 14.00 ± 1.85 µg de ácido gálico/ g de extracto | 765 | Marroquín et al 2012 |
| | | Metanol | 22.38 ± 1.40 g de ácido gálico/ g | | |
| <i>P. quadrangularis</i> | Hojas | Acetona | 1.39 ± 0.06 g AGE por 100 g PS de extracto | 740 | Ramaiya et al 2014 |
| | | Metanol | 2.17 ± 0.43 g AGE por 100 g PS de extracto | | |

Vasco y colaboradores (2007) hacen una jerarquización de los valores del contenido fenólico total y clasifican: niveles altos entre 2200 y 1000 “mg GAE/100 g sample FW”, niveles intermedios entre 500 y 200 “mg GAE/100 g sample FW” y niveles bajos entre 100 y 0 “mg GAE/100 g sample FW”. En base a esto los resultados obtenidos, clasificarían al extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* en niveles bajos de contenido fenólico, 72.40 mg EAG/mg extracto (**Tabla 2**). No obstante, en comparación con las otras especies de *Passiflora* (**Tabla 1**), el contenido fenólico obtenido en este trabajo es mayor al de las demás; únicamente los resultados obtenidos por Ramaiya et al (2014) en *P. edulis* y *P. quadrangularis* superan el contenido fenólico de *P. ligularis* aquí reportado.

Tabla 2. Resultados concentración de fenoles y flavonoides totales

| | mg EAG/mg extracto hojas | µg ER/mg extracto hojas | DE | DER |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------|--------|
| Fenoles | 72.40 | | 0.5321 | 0.7349 |
| Flavonoides | | 43.005 | 0.084 | 0.195 |

3.2 Determinación Espectrofotométrica de Flavonoides Totales

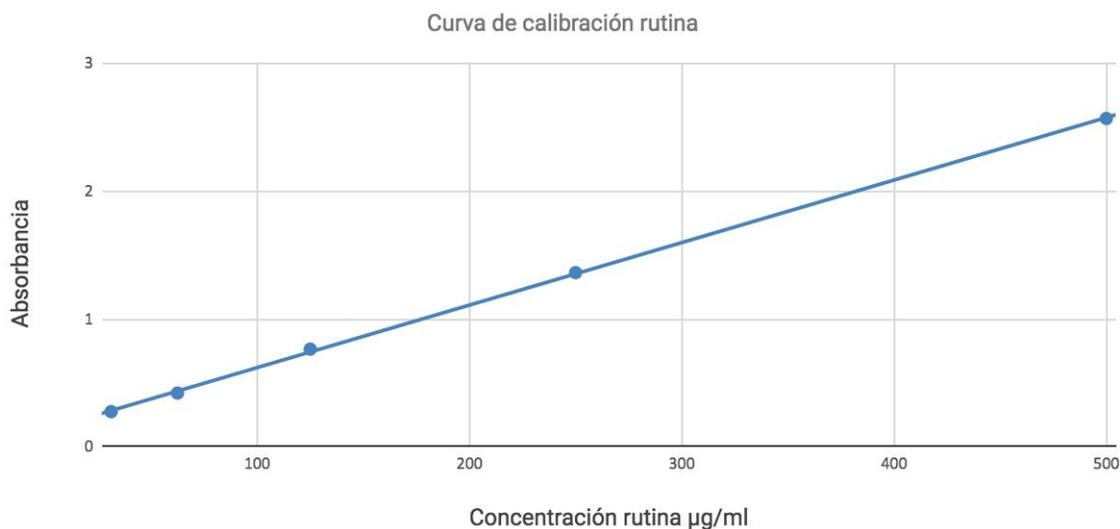


Figura 10. Curva de calibración rutina. Ecuación: $y = 0.0049X + 0.1312$ $R^2 : 0.9997$.

El método usado para la cuantificación de flavonoides totales es específico únicamente para flavonas y flavonoles (Pekal & Pyrzyńska, 2014). Este se basa en la formación de complejos ácidos estables entre el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) y el grupo ceto C-4 y el grupo hidroxilo en posición 3 o 5, de las flavonas y flavonoles (Bag et al 2014) (**Figura 10A y 10B**). Estos complejos emiten fluorescencia que absorbe luz a 410-430 nm (Pekal & Pyrzyńska, 2014) y que responde linealmente en función a la concentración de especies en reacción (Pirogov et al 2016).

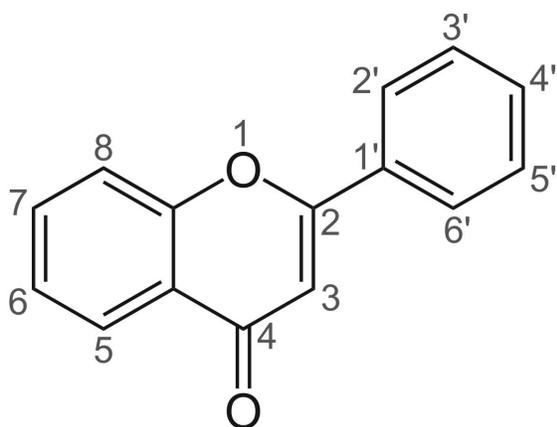


Figura 10A. Estructura general flavonas

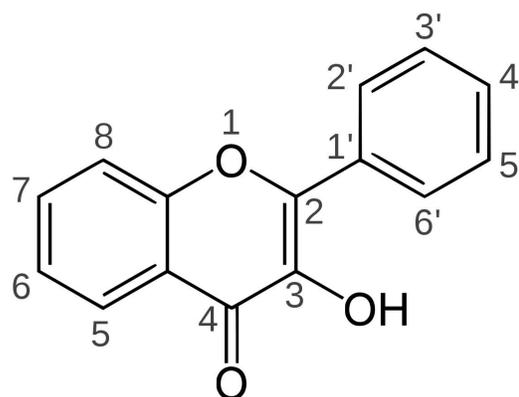


Figura 10B. Estructura general flavonoles

En cuanto a flavonoides totales, se observa que las curvas de calibración son realizadas usando rutina o catequina como estándar. En este caso para plantear las comparaciones solo se tuvieron en cuenta aquellos que emplearon rutina. Como se observa en la **Tabla 4**, los resultados obtenidos del contenido total de flavonoides en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* es mucho menor, 43.005 µg ER/mg extracto hojas, a los de otras especies de *Passiflora* y a los resultados obtenidos por Marroquín y colaboradores (2012) quienes igualmente evaluaron *P.ligularis*.

Tabla 4. Comparación resultados flavonoides totales de distintas publicaciones

| Especie | Parte de la planta | Solvente de extracción | Concentración flavonoides totales | Lectura de absorbancia nm | Publicación |
|----------------------|--------------------|------------------------|---|---------------------------|---------------------------------|
| <i>P. ligularis</i> | Hojas | alcoholico 60% | 6.86 ± 0.10 mg rutina/ g material vegetal | 394 | Marroquín et al 2012 |
| | Fruto | Acetona | 387.33 ± 1.08 mg ER/g extracto | 510 | Saravanan & Parimelazhagan 2014 |
| | | Metanol | 233.33 ± 0 .53 mg ER/g extracto | | |
| <i>P. alata</i> | Rebrotos | Etanol | 62.30 ± 2.02 mg RU/g extracto | 430 | Vasic et al 2012 |
| | | Acetona | 34. 49 ± 0.37 mg RU/g extracto | | |
| <i>P. subpeltata</i> | Frutos | Acetona | 287.33a ±1.08 mg ER/g extracto | 510 | Saravanan & Parimelazhagan 2013 |
| | | Metanol | 231.31b ±1.50 mg ER/g extracto | | |

4. Perfil cromatográfico de flavonoides de *Passiflora ligularis* por UPLC

En el cromatograma se presentan once picos con buena resolución, con un tiempo de análisis de 16 min, por lo que se puede afirmar que el método utilizado es bueno para la correcta separación de los diferentes flavonoides presentes en el extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*. A partir de las co-inyecciones de soluciones estándar de crisina, quercetina-3-*O*-glucósido y kaempferol-3-*O*-glucósido, realizadas por Sepúlveda en la Universidad Nacional de Colombia fue posible establecer la identidad de estos: quercetina-3-*O*-glucósido (**1**) (5.2 min); kaempferol-3-*O*-glucósido (**2**) (5.9 min); y crisina (**3**) (12.2) min (**Figura 13**).

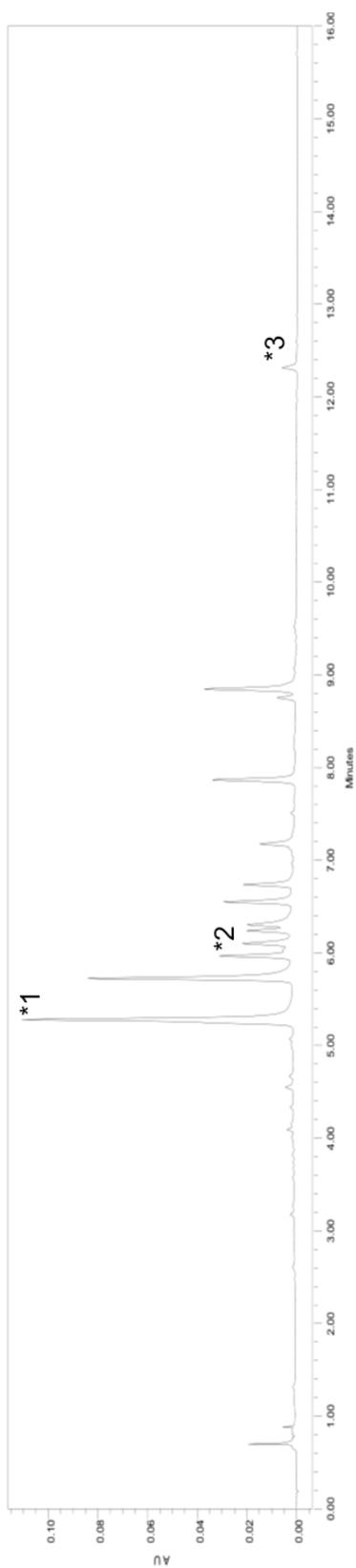


Figura 13. Cromatograma UPLC extracto hojas *P. ligularis*. *1 quercetina-3-*O*-glucósido 5.2min, *2 kaempferol-3-*O*-glucósido 5.7min y *3 crisina 12.2min.

Al comparar el cromatograma obtenido en este trabajo con el de Sepúlveda, (2018) se pueden observar ciertas diferencias, que se deben al hecho de que tanto los equipos como las columnas empleadas para hacer el análisis eran distintas.

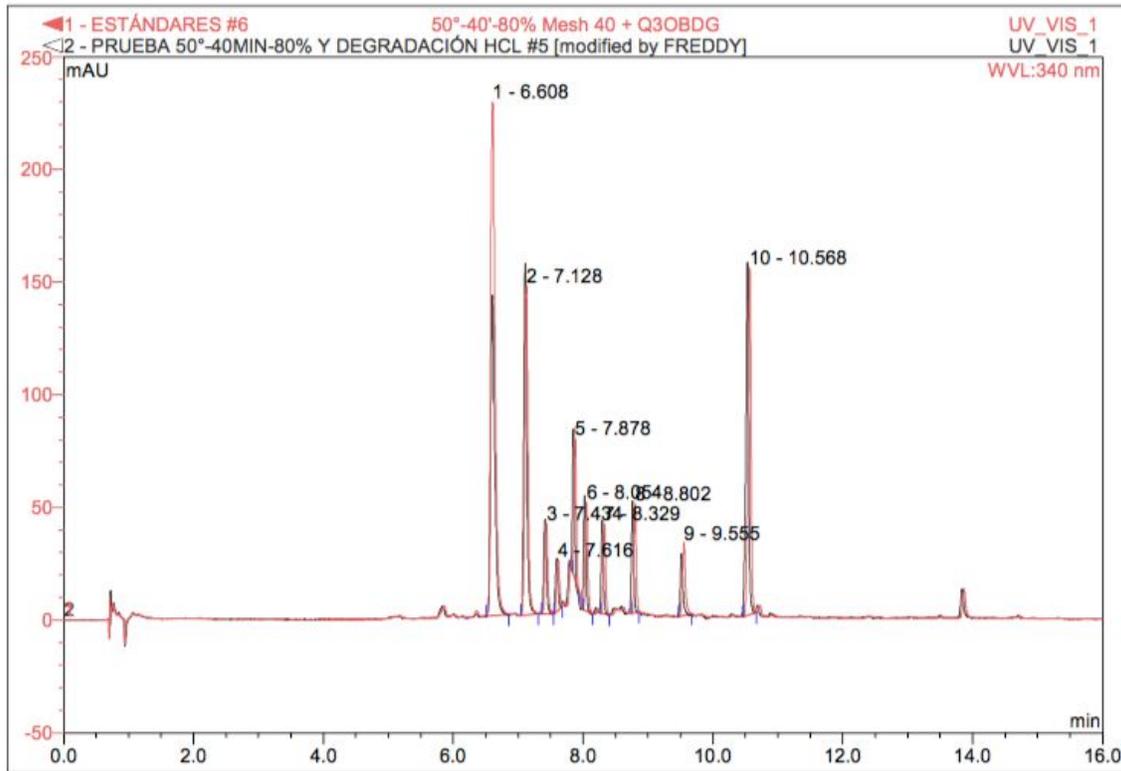


Figura 14. Cromatograma UHPLC extracto hojas *P. ligularis*. Realizado por Michelle Sepulveda en la Universidad Nacional de Colombia.

Bibliografía Anexo 1

- Bag, G. C., Devi, P. G., & Bhaigyabati, T. (2014). Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley, (28), 6.
- Ballesteros, O. J. V., Perea, E. M., Méndez, J. J., Arango, W. M., & Noreña, D. A. (2013). Quantification, chemical and biological characterization of the saponosides material from *Sida cordifolia* L. (escobilla). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2). Retrieved from <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/51>
- H. Wagner & S. Bladt, (1996), *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Hostettmann, K., & Marston, A. (2005). *Saponins*. Cambridge University Press.

- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Marroquín, M. N., Cruz, S. M., & Cáceres, A. (2012). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS IN THREE SPECIES OF PASSIFLORACEAE (PASSIFLORA EDULIS, P. INCARNATA, P. LIGULARIS) FROM GUATEMALA. *Acta Horticulturae*, (964), 93–98. doi:10.17660/actahortic.2012.964.11
- Mathea, S (2012) *Preliminary investigation of Herniaria incana Lam. Determination of the total flavonoid content, antioxidant properties and free radical scavenging capacity* (Tesis de maestría) University of Bergen (UIB), Noruega
- Pirogov, A., Sokolova, L., Sokerina, E., Tataurova, O., & Shpigun, O. (2016). Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC method with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(4), 220–224. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1147462>
- Pełkal, A., & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Ojeda, K (2013) “*Estudio Fitoquímico y Actividad Biológica de Plantas Utilizadas en Medicina Mapuche*” (Tesis de pregrado) Universidad Austral de Chile, Chile.
- Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., & Zakaria, M. H. (2014). Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Passiflora Species. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/167309
- Ruiz-Reyes, R., Guillermo, S., Arturo, V. C. E., Gaona, C., Haydée, M., & Lisset, E. S. C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de Morinda citrifolia L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales, 12.
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2013). Total phenolic content, Free radical scavenging and Antimicrobial activities of Passiflora subpeltata seeds. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6.
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of Passiflora ligularis Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, 3(2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Valencia, E. F., Donald, D. M., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*, 6.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Vasic, S. M., Stefanovic, O. D., Licina, B. Z., Radojevic, I. D., & Comic, L. R. (2012). Biological activities of extracts from cultivated *Granadilla Passiflora alata*. *EXCLI Journal*, 11, 208–218.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

Anexo 2

Análisis de flavonoides por EC

5.1 Desarrollo de método por electroforesis capilar para el análisis de flavonoides del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

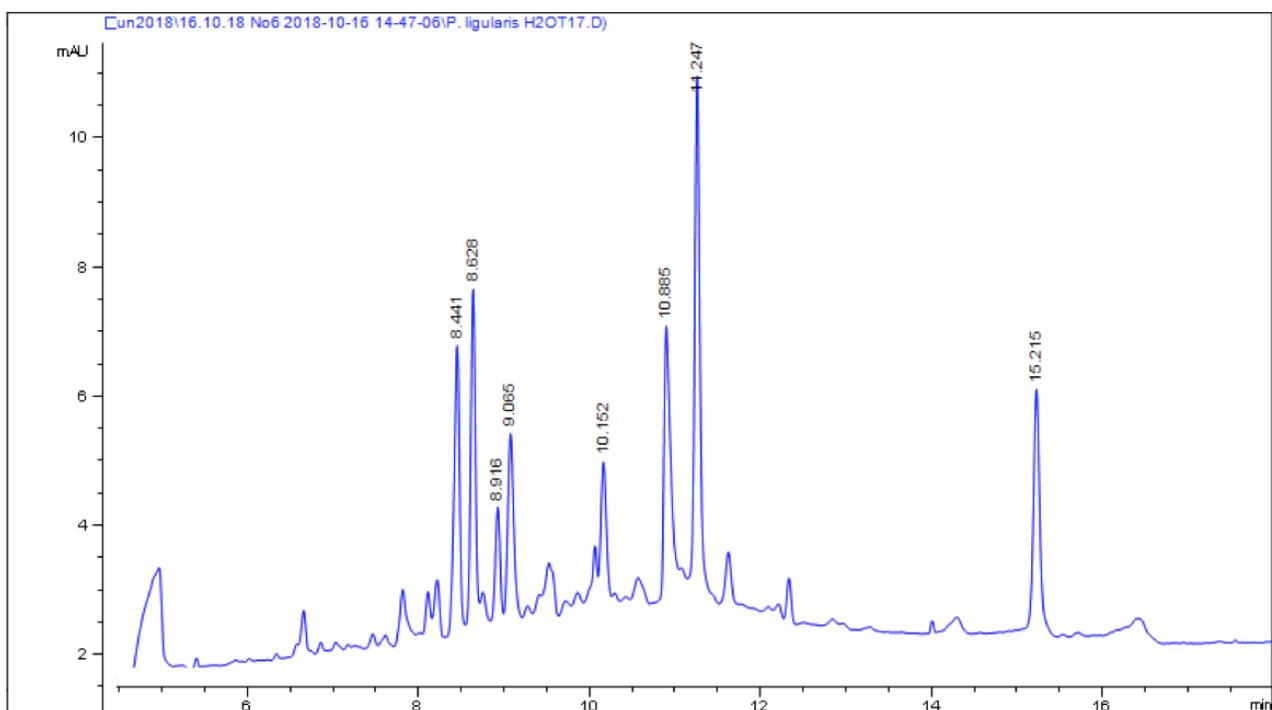


Figura 15. Electroferograma de extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*. Condiciones de separación: voltaje 15 kV; temperatura 17°C, BGE: 20 mM TBS; 40 mM SDS; (pH 9-10): detección UV 270 nm

5.2 Estudio de movilidad

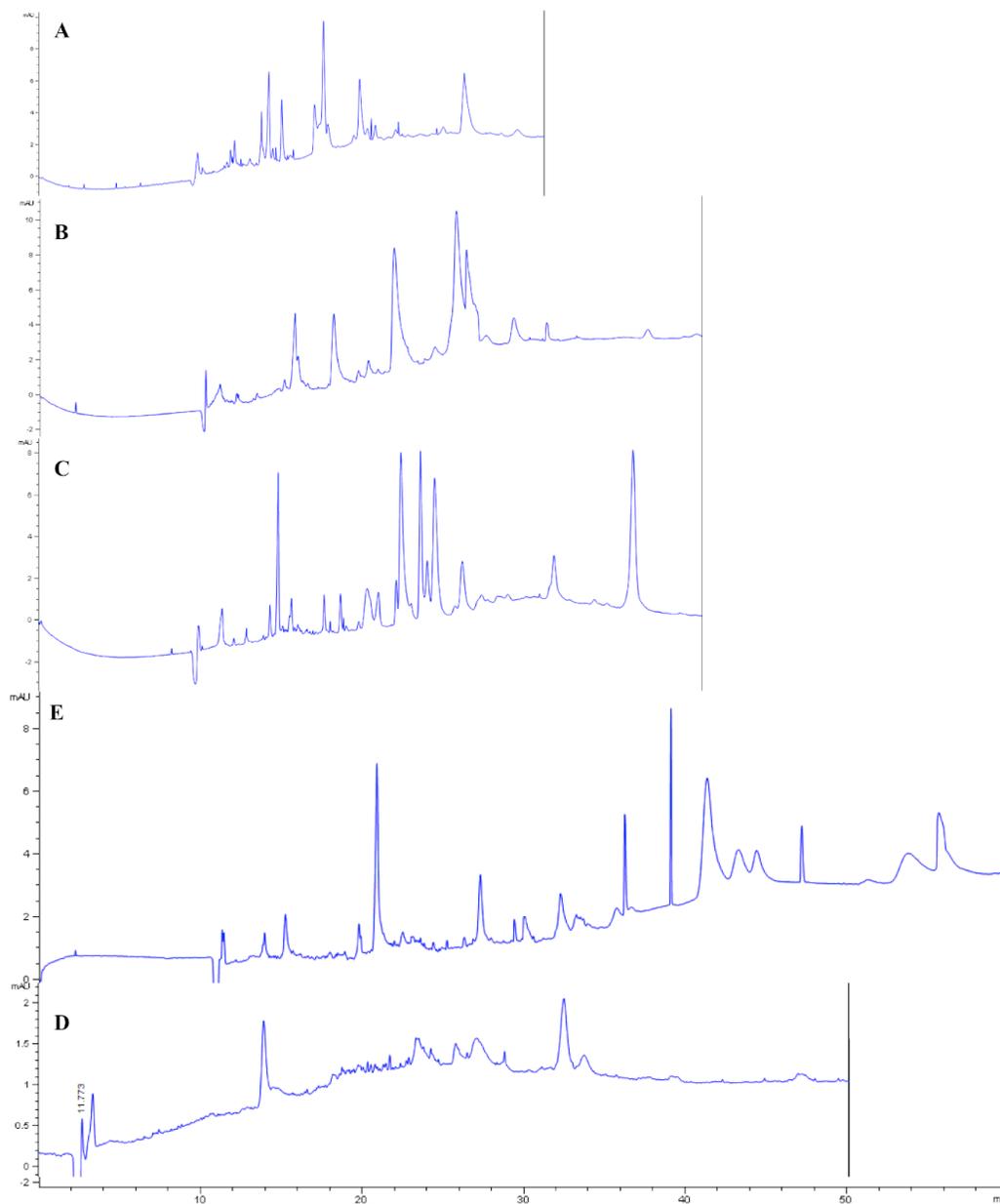


Figura 16. Electroferogramas del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*. Condiciones de separación: voltaje 20 kV; temperatura 20 °C BGE 50mM TBS 5% MeOH a diferentes valores de pH; **A** pH 7.03, tiempo de análisis 30 min. **B** pH 8.32, tiempo de análisis 40 min **C** pH 9.32, tiempo de análisis 40 min **D** pH 10. 33, tiempo de análisis 60 min **E** pH 11.08, tiempo de análisis 50 min.

Bibliografía

- Bag, G. C., Devi, P. G., & Bhaigyabati, T. (2014). Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley, (28), 6.
- Ballesteros, O. J. V., Perea, E. M., Méndez, J. J., Arango, W. M., & Noreña, D. A. (2013). Quantification, chemical and biological characterization of the saponosides material from *Sida cordifolia* L. (escobilla). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2). Retrieved from <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/51>
- H. Wagner & S. Bladt, (1996), *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Hostettmann, K., & Marston, A. (2005). *Saponins*. Cambridge University Press.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Marroquín, M. N., Cruz, S. M., & Cáceres, A. (2012). *ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS IN THREE SPECIES OF PASSIFLORACEAE (PASSIFLORA EDULIS, P. INCARNATA, P. LIGULARIS) FROM GUATEMALA*. *Acta Horticulturae*, (964), 93–98. doi:10.17660/actahortic.2012.964.11
- Mathea, S (2012) *Preliminary investigation of Herniaria incana Lam. Determination of the total flavonoid content, antioxidant properties and free radical scavenging capacity* (Tesis de maestría) University of Bergen (UIB), Noruega
- Pirogov, A., Sokolova, L., Sokerina, E., Tataurova, O., & Shpigun, O. (2016). Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC method with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(4), 220–224. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1147462>
- Pełkal, A., & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

- Ojeda, K (2013) “*Estudio Fitoquímico y Actividad Biológica de Plantas Utilizadas en Medicina Mapuche*” (Tesis de pregrado) Universidad Austral de Chile, Chile.
- Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., & Zakaria, M. H. (2014). *Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Passiflora Species. The Scientific World Journal, 2014, 1–10.* doi:10.1155/2014/167309
- Ruiz-Reyes, R., Guillermo, S., Arturo, V. C. E., Gaona, C., Haydée, M., & Lisset, E. S. C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales, 12.
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2013). Total phenolic content, Free radical scavenging and Antimicrobial activities of *Passiflora subpeltata* seeds. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6*.
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness, 3*(2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*, 144–158.
- Valencia, E. F., Donald, D. M., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*, 6.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry, 111*(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Vasic, S. M., Stefanovic, O. D., Licina, B. Z., Radojevic, I. D., & Comic, L. R. (2012). Biological activities of extracts from cultivated *Granadilla Passiflora alata*. *EXCLI Journal, 11*, 208–218.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry, 64*(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

