

TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE *PASSIFLORA EDULIS* SIMS (MARACUYÁ)

J. Rojas A.¹, G. Tomás Ch.²

RESUMEN

Los objetivos de la presente investigación fueron determinar los principales grupos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de la hojas y el jugo del fruto de *Passiflora edulis*, así como la actividad antioxidante in vitro del extracto metanólico de las hojas. El tamizaje fitoquímico fue realizado según la técnicas usuales de química; y para la actividad antioxidante se utilizó el 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) y 4 concentraciones de la muestra: 200, 100, 50 y 10 µg/mL; la absorbancia se midió a una longitud de onda de 517 nm. Se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (CI₅₀). Se encontró en hojas y jugo del fruto la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, quinonas y alcaloides. Se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis, determinándose una CI₅₀ = 124 µg/mL. Se concluye que los diversos metabolitos secundarios se encuentran tanto en hojas como en fruto, destacando la mayor cantidad de flavonoides en el jugo del fruto; por otra parte, el extracto metanólico de las hojas fue eficaz antioxidante in vitro.

Palabras clave: *Passiflora edulis*, maracuyá, metabolitos secundarios, antioxidante.

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *PASSIFLORA EDULIS* SIMS (PASSION FRUIT)

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the main groups of secondary metabolites in the ethanol extract of the leaves and the fruit juice of *Passiflora edulis*, and in vitro antioxidant activity of methanol extract of the leaves. The phytochemical screening was done following the usual techniques of chemistry; and for antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazil (DPPH) and four sample concentrations: 200, 100, 50 and 10 µg / mL, the absorbance was measured at a wavelength of 517 nm. We calculated the concentration of the extract caused a 50% decrease in absorbance of the solution of DPPH (IC₅₀). We found in leaves and fruit juice the presence of tannins, flavonoids, saponins, coumarins, quinones and alkaloids. Antioxidant capacity was observed dose-dependent, so an IC₅₀ = 124 mg / mL. It is concluded that the diverse secondary metabolites are found in both leaves and fruit, highlighting the greater amount of flavonoids in the fruit juice, on the other hand, the methanol extract of the leaves was effective antioxidant in vitro.

Keywords: *Passiflora edulis*, passion fruit, secondary metabolites, antioxidant.

1 jprojasarmas@yahoo.com, Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina - UNMSM.

2 gloriaeva7@hotmail.com, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química e Ing. Química - UNMSM.

I. INTRODUCCIÓN

Passiflora edulis Sims es una planta originaria de la amazonía brasileña, conocida con el nombre común de maracuyá, parchita, calala, maracujá, yellow passion-fruit^[1]. La palabra maracuyá proviene del portugués-brasileño maracuya, de origen indígena que significa "Comida preparada en Totuma"^[2].

Es una especie cultivada ampliamente en países tropicales y subtropicales y existen dos variedades: *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*, cuyos frutos son amarillos, crece desde el nivel del mar hasta 1000 msnm; y, *Passiflora edulis* Sims var. *purpurea*, con frutos color púrpura y que se adapta a zonas altas por encima de 1200 msnm^[3]. Se caracteriza por ser una planta leñosa perenne de hábito trepador y de rápido desarrollo que puede alcanzar hasta 10 m de largo; las hojas son simples, alternas, con estipulas y un zarcillo en la axila, con márgenes aserrados; las flores son solitarias y axilares, fragantes y vistosas; el fruto es una baya esférica, globosa o elipsoide que mide hasta 10 cm de diámetro y pesa hasta 190 g, de color amarillo o purpúreo, con una pulpa muy aromática^[4].

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden sufrir cambios cualitativos y/o cuantitativos debido a las variaciones medioambientales como clima, altitud, composición del suelo, etc., por lo que al no existir estudios de la composición química de muestras de *Passiflora edulis* procedente del Perú, realizamos la presente investigación con el objetivo de determinar los principales metabolitos secundarios en hojas y fruto de *Passiflora edulis*; y como las propiedades antioxidantes de las plantas están relacionadas con importantes beneficios para la salud, también determinamos la actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de dicha planta.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de la muestra

Las hojas y el fruto maduro de *Passiflora edulis* Sims fueron recolectados en el distrito de Moche, provincia de Trujillo, departamento de la Libertad, Perú. Una parte de la planta con hojas y flor fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la identificación taxonómica. De acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist 1981^[5], se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: Magnoliopsida
SUBCLASE: Caryophyllidae
ORDEN: Violales
FAMILIA: PASSIFLORACEAE
GENERO: *Passiflora*
ESPECIE: *Passiflora edulis* Sims

Nombre vulgar en el Perú: maracuyá

Preparación de la muestra

El jugo fue obtenido del fruto maduro y se pasó por un colador para separarlo de las semillas, finalmente se filtró utilizando papel de filtro rápido con poros de 4.7 – 4.6 micras y se liofilizó a -45°C y 100 atmósferas de presión durante 24 horas.

Las hojas fueron desecadas a 38 °C en un horno con aire circulante en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Los extractos etanólico y metanólico de las hojas fueron preparados según la técnica del CYTED, 1995^[6]. El material seco y pulverizado de las hojas fue macerado con etanol al 96% o con metanol durante 72 horas a temperatura ambiente. Se filtró a través de filtro rápido (poros de 4.7 – 4.6 micras) y el filtrado se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor®). El residuo fue disuelto en agua y liofilizado a -45 °C y 100 atmósferas de presión durante 24 horas. El liofilizado fue conservado en un frasco color ámbar a 4 °C hasta su uso.

Determinación de metabolitos secundarios^[7, 8]

Determinación de saponinas

Prueba de la espuma

A una solución acuosa de la muestra, se sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de saponina fue indicada por la formación de una espuma persistente durante tres minutos.

Reactivo de Liebermann – Buchard

A una pequeña cantidad de la muestra se añadió unas pocas gotas de ácido acético más 3 mL de anhídrido acético/H₂SO₄ (50:1), en el que las saponinas triterpenoidales dan color rosado a púrpura mientras las esteroideas dan azul-verdoso.

Determinación de taninos

Con gelatina – cloruro de sodio: A 1 mL de muestra se agregó 3 gotas de reactivo, en un principio se forma una sustancia en forma de nube en la solución, luego de centrifugar queda en el fondo un precipitado de color blanco. Este confirma la presencia de taninos.

Con Cloruro Férrico o Alumbre férrico.- La muestra se mezcló con cloruro férrico o alumbre férrico, la coloración negra azulada indica que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico y si da verde deriva de la catequina.

Determinación de flavonoides

Con R. Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añadió 3 gotas de HCl concentrado. Se observa un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color anaranjado intenso. Lo que indica un resultado positivo.

Determinación de cumarinas

Se colocó 2 gotas de extracto en una tira de papel Whatman y se colocó sobre ella una gota de NaOH 10%. La observación de fluorescencia verde amarillenta bajo la lámpara UV 365 nm indicó la presencia de cumarinas fijas.

Determinación de quinonas

Se pesaron dos gramos de muestra y se trituraron hasta un polvo muy fino en un mortero luego se realizaron los siguientes ensayos químicos:

Solubilidad en NaOH al 5%

En un tubo de ensayo se introdujeron 10 mg de la muestra molida, se añadió 0,2 mL de etanol y 0,4 mL de NaOH al 5%. El cambio de coloración nos indicó la presencia de compuestos quinónicos.

Reacción de Bornträger

Un gramo de muestra se trató con NaOH 5% en caliente, se filtró, enfrió y se aciduló con HCl 20%, se añadió benceno se agitó y se dejó en reposo. Luego se separó la fase bencénica a la cual se le añadió NH₄OH. La formación de una coloración rosada a roja, indicó la presencia de antraquinonas. Fue necesario dejar un buen tiempo, para que la reacción ocurra.

Determinación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff

Se disolvió 8 g de Bi(NO₃)₃·5H₂O en 20 mL de HNO₃ y mezcló con 50 mL de una solución acuosa con 27,2 g de KI, se dejó reposar la solución, decantó el supernadante y diluyó a un volumen de 100 mL. Al agregar unas cuantas gotas de este reactivo a una solución ácida de la muestra se observa la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo.

Reactivo de Mayer

Se disolvió 1,36 g de HgCl₂ en 60 mL de agua y se adicionó 10 mL de una solución que

con 5 g de KI y se diluyó hasta un volumen de 100mL. Al agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada de la muestra se observa la aparición de un precipitado de blanco a crema.

Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

Se siguió el método de Chang *et al.*, 2001^[9] con modificaciones. Se preparó una solución de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) a una concentración de 20 µg/mL en metanol y del extracto metanólico de *Passiflora edulis* a concentraciones de 200, 100, 50 y 10 µg/mL en metanol. Se colocó 0.4 mL de cada concentración de la muestra y se adicionó 0.8 mL de DPPH, al mismo tiempo se preparó un control con 0.4 mL de etanol y 0.8 mL de DPPH, y un blanco con 0.4 mL de etanol y 0.8 mL de metanol. Se usó el siguiente diseño experimental.

DPPH: 20 µg/mL en metanol

Problema: Extracto metanólico de hojas maracuyá: 200, 100, 50 y 10 µg/mL

Problema: 0.4 mL + 0.8 mL DPPH

Control: 0.4 mL etanol + 0.8 mL DPPH

Blanco: 0.4 mL etanol + 0.8 mL metanol

Se mezclaron los tubos y dejó en reposo a temperatura ambiente alejado de la luz durante 30 minutos. Se midió la absorbancia

de estas soluciones en un espectrofotómetro UV-VIS Labo Med a una longitud de onda de 517 nm. Se calculó la Capacidad Antioxidante (CA) según la siguiente ecuación:

$$CA(\%) = 100 \times (Ac - As)/Ac$$

Donde As es la absorbancia de la muestra y Ac es la absorbancia del control. El experimento se realizó 3 veces y se realizó el cálculo de la media aritmética ± desviación estándar, mediante el software estadístico SPSS 15.0. Se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (C_{I50}), por regresión lineal de la curva concentración-respuesta, donde la abscisa representó la concentración (µg/mL) del extracto y la ordenada el porcentaje de capacidad antioxidante.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El screening fitoquímico demostró que existen diferencias en la composición química del jugo del fruto y el extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis*, tal como se muestra en la Tabla N.º 1. Se determinó mayor cantidad de flavonoides y alcaloides en el jugo del fruto, así como la presencia de saponinas de tipo esterooidal y quinonas; mientras que en el extracto etanólico de las hojas se encontró mayor cantidad de cumarinas, así como saponinas de tipo triterpenoide y taninos de tipo catéquico.

Tabla N.º 1. Metabolitos secundarios encontrados en el extracto etanólico de las hojas y el jugo del fruto de *Passiflora edulis*.

Metabolito secundario	Extracto etanólico de las hojas	Jugo del fruto
Saponinas	++ (tipo triterpenoide)	++ (tipo esterooidal)
Taninos	++ (tipo catéquico)	-
Flavonoides	+	+++
Cumarinas	+++	++
Quinonas	-	+++
Alcaloides	+	++

-, ausente; +, poca cantidad; ++, mediana cantidad; +++, mayor cantidad

Los metabolitos secundarios de *Pasiflora edulis* identificados en este estudio coinciden con los resultados obtenidos con muestras de otros lugares que han sido reportados por la literatura^[10], destacando el alto contenido de flavonoides, los cuales se encuentran en mayor cantidad en el jugo del fruto.

Evaluación de la actividad antioxidante in vitro

La actividad secuestradora del radical libre DPPH (capacidad antioxidante) del extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* se muestra en la Tabla N.º 2. Se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis.

Tabla N.º 2. Actividad secuestradora de DPPH por el extracto metanólico de *P. edulis*.

Concentración (µg/mL)	Capacidad antioxidante (%)
200	75.85 ± 2.06
100	44.89 ± 3.68
50	24.15 ± 1.97
10	4.33 ± 0.24

Valores expresados como media aritmética ± desviación estándar del experimento realizado en triplicado

La curva concentración-respuesta fue ajustada mediante un análisis de regresión lineal utilizando el software MS Excel 2007, tal como se muestra en la Figura N.º 1. Esto nos permitió calcular gráficamente la CI_{50} , la cual fue 124 µg/mL.

En este estudio, el extracto metanólico de *Passiflora edulis* mostró actividad antioxidante con una CI_{50} de 124 µg/mL, semejante al flavonoide kaempferol para el cual se ha reportado una CI_{50} de 120 µg/mL^[11], y mejor que el vino tinto que se calculó una CI_{50} de 42270 µg/mL^[12]. Giorgi *et al.*, 2008 ha demostrado que la propiedad antioxidante de *Achillea collina* estuvo correlacionada sig-

nificativamente con el contenido de fenoles totales^[13]. Los flavonoides como: rutina, dihidroquercetina, epigalo catequina-3-galato y quercetina fueron efectivos antioxidantes^[14]. Otras plantas medicinales mostraron buena actividad antioxidante, entre ellas: boldo (*Pneumus boldus*)^[15], albahaca (*Ocimum basilicum*)^[16], Té verde (*Thea sinensis*)^[17], menta (*Mentha piperita*) y té negro (*Camelia sinensis*)^[18], jugo de papaya (*Carica papaya*)^[19] y perejil (*Petroselinum crispum*)^[20].

En los últimos años, el interés en las propiedades antioxidantes y secuestradoras de radicales libres de las plantas y sus extractos han crecido enormemente por su importancia, especialmente de los polifenoles, en la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis, debido a que los grupos fenólicos en los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, por lo tanto rompiendo la cadena de reacciones de oxidación en los componentes celulares^[21].

Se ha demostrado, por ejemplo, que el estrés oxidativo causa severa hipertensión arterial^[22]. Las especies reactivas del oxígeno pueden contribuir a la generación y/o mantenimiento de la hipertensión arterial por varios mecanismos que incluyen: inactivación de óxido nítrico derivado del endotelio, generación no enzimática de isoprostanos F_2 vasoconstrictores por peroxidación de ácido araquidónico y depleción del cofactor tetrahi-

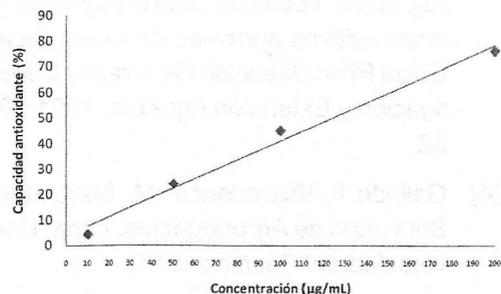


Figura N.º 1. Curva dosis-respuesta ajustada por regresión lineal de la capacidad antioxidante (%) vs concentración del extracto metanólico de *P. edulis* (µg/mL) y determinación de la CI_{50} .

drobiopterina de sintasa de óxido nítrico, comprobándose que la terapia antioxidante puede mejorar la hipertensión, disminuir la excreción urinaria de metabolitos de óxido nítrico y atenuar la regulación a la alta compensatoria de óxido nítrico sintasa^[23].

Probablemente la actividad antioxidante de *Passiflora edulis* observada en este estudio se deba en parte a los flavonoides, dado que en España, Ferreres *et al.*, 2007 demostró que el extracto de las hojas de *Passiflora edulis* tuvo actividad antioxidante y en esa muestra caracterizó 16 derivados de los flavonoides apigenina y luteolina^[24].

IV. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la existencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios de *Passiflora edulis*, encontrándose los flavonoides en mayor cantidad en el jugo del fruto.
2. El extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* fue eficaz antioxidante in vitro.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] García M. Guía Técnica: Cultivo de maracuyá amarillo. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. 2002:80-85.

[2] Centro Experimental "Dr. Jesús Aguilar Paz". El cultivo de maracuyá (*Passiflora Edulis* Sims). Honduras. 2002.

[3] Ministerio de Agricultura y Ganadería. Aspectos Técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. Costa Rica: Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. 1991:30-32.

[4] Galindo F, Villavicencio M. Maracuyá. Seminario de Agronegocios. Lima: Universidad del Pacífico. 2000.

[5] Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York. 1981.

[6] CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación; 1995. p. 48, 215-225.

[7] Lock de Ugaz, O. "Investigación Fitoquímica" Segunda edición 1994. Editorial Fondo Pontificia Universidad Católica del Perú.

[8] Domínguez A. "Métodos de Investigación Fitoquímica" Editorial Limusa 1973.

[9] Chang S, Wu J, Wang S, Kang P, Yang N, Shyur L. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confuse* bark and heartwood. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3420-3424.

[10] Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 94:1-23.

[11] De Beck P, Cartier G, David B, Dijoux M, Mariotte A. Antioxidant Flavonoids and Phenolic Acids from Leaves of *Leea guineense* G. Don (Leeaceae). *Phytother. Res.* 2003;17:345-347.

[12] Fernández A, Muñoz A, Cambillo E, Ramos F, Ortiz C. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta Med Per* 2007;24(3):145-152.

[13] Giorgi A, Bombelli R, Luini A, Speranza G, Cosentino M, Lecchini S, et al. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Infusions from Leaves and Inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rchb. *Phytother. Res.* 2008. disponible en internet [Citado el 20 de enero de 2009] en: www.interscience.wiley.com

[14] Potapovich A, Kostyuk V. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids. *Biochemistry* (Moscow). 2003; 68(5):514-519.

[15] Schmeda G, Rodríguez J, Theodulo C, Astudillo S, Feresin G, Tapia A. Free-ra-

- dical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radical Research*. 2003;37(4):447-452.
- [16] Gülçin I, Elmastat M, Aboul-Enein H. Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. *Phytother. Res*. 2007;21:354-361.
- [17] Fournéau C, Laurens A, Hocquemiller R, CavCA. Radical Scavenging Evaluation of Green Tea Extracts. *Phytother. Res*. 1996;10:529-530.
- [18] Szabo M, Mester M, Chambre D, Idioiu C, Jianu I. DPPH analysis for antioxidant effect of mint, bilberry and black tea, aqueous extracts. *Scien. and Techn. Bull. of Univ. A. Vlaicu Arad* 2006;11(12):117-121.
- [19] Mehdipour S, Yasa N, Dehghan G, Khorasani R, Mohammadirad A, Rahimi R, et al. Antioxidant Potentials of Iranian *Carica papaya* juice *in vitro* and *in vivo* are Comparable to α -Tocopherol. *Phytother. Res*. 2006;20:591-594.
- [20] Popovic M, Kaurinovic B, Jakovljevic V, Mimica-Dukic M, Bursa M. Effect of Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill, Apiaceae) Extracts on some Biochemical Parameters of Oxidative Stress in Mice treated with CCl₄. *Phytother. Res*. 2007;21:717-723.
- [21] Scalvert A, Manach C, Morand C, Rémesi C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005;45:287-306.
- [22] Vaziri N, Wang X, Oveisi F, Rad B. Induction of Oxidative Stress by Glutathione Depletion Causes Severe Hypertension in Normal Rats. *Hypertension*. 2000;36:142-146.
- [23] Vaziri N, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs D. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hipertensión*. 2000; 36:957-964.
- [24] Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Andrade P, Seabra R, Gil-Izquierdo A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *J Agric Food Chem*. 2007;55(25):10187-10193.