

# C-glucosilflavonas de tres especies del género *Passiflora*. Actividad antibacteriana, antioxidante y cuantificación

## C-Glucosylflavone of three species of the genus *Passiflora*. Antibacterial, antioxidant activity and quantification

NERY M PÉREZ IBÁÑEZ<sup>1\*</sup>, STEPHEN TILLET<sup>2</sup>, ANTONIETA TADDEI<sup>3</sup>

### RESUMEN

Las C-glucosilflavonas isovitexina, vitexina, saponarina, swertisina e isoswertisina fueron aisladas de los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *P. gracilis*, *P. multiformis* y *P. punctata*, empleando métodos convencionales de extracción, separación y purificación, e identificadas mediante técnicas espectroscópicas, espectrometría de masas y datos de la literatura. Estos compuestos no habían sido previamente reportados en las especies. Se evaluó la actividad antibacteriana contra *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y la levadura *C. tropicalis* usando el método de difusión sobre placas de agar, así como la actividad antioxidante por bioautografía en cromatografía de capa fina (CCF) utilizando DPPH'. La mayoría de los flavonoides fueron activos contra las bacterias gram+ y gram-, e incluso la levadura. También mostraron valores de límite de detección diferentes, comparados con el antioxidante de referencia de rutina. Por otra parte, se determinó espectrofotométricamente el contenido de flavonoides totales en estas especies. Las hojas de *P. gracilis* mostraron el mayor porcentaje de estas sustancias, el cual es bastante significativo cuando se compara con el de *P. incarnata*, especie reconocida internacionalmente por su contenido de flavonoides.

**Palabras clave:** *Passiflora gracilis*, *Passiflora multiformis*, *Passiflora punctata*, C-glucosilflavonas, actividad antibacteriana, actividad antioxidante.

### ABSTRACT

The C-glucosylflavone isovitexin, vitexin, saponarin, swertisin and isoswertisin were isolated from ethanolic extracts obtained from leaves of *P. gracilis*, *P. multiformis* and *P. punctata*, using conventional methods of extraction, separation and purification, and identified by spectroscopic techniques, mass spectrometry and literature data. These compounds have not previously been reported in these species. They were evaluated for antibacterial activity against *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and the yeast *C. tropicalis*, using the diffusion method on agar plates. Most of these compounds were active against bacteria and yeast. The antioxidant activity of C-glucosylflavone by bioautography on thin layer chromatography (TLC) using DPPH' was also evaluated. These compounds showed values of different detection limits compared with the rutin reference antioxidant. Furthermore, the content of total flavonoids in these species was determined spectrophotometrically. The leaves of *P. gracilis* showed the highest content, which is quite significant when compared with that of *P. incarnata*, the species recognized internationally for its flavonoids content.

**Key words:** *Passiflora gracilis*, *Passiflora multiformis*, *Passiflora punctata*, C-glucosylflavone, antibacterial activity, antioxidant activity.

<sup>1</sup> Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Laboratorio de Farmacognosia y Medicamentos Herbarios.

<sup>2</sup> Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Herbario «Victor Manuel Ovalles» (MYF).

<sup>3</sup> Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología Celular.

Email: \*nery.perez@ucv.ve

## Introducción

El género *Passiflora* (Passifloraceae) está constituido por 565 especies aproximadamente. Son nativas de los Neotrópicos, pero cerca de 25 especies provienen de los Paleotrópicos (Stevens, 2001). En Venezuela existen 87 especies, 4 de las cuales son endémicas (Hokche y col., 2008). Muchas se cultivan como plantas ornamentales por sus llamativas flores, pero varias son importantes económicamente en los trópicos por sus frutos comestibles como la parcha y parchita (Bailey y Bailey, 1976). Desde el punto de vista medicinal, las hojas de la especie *P. incarnata* es la más utilizada como sedante y antiespasmódica (Miroddi, 2013). Flavonoides, glicósidos cianogénicos y alcaloides son los compuestos químicos que caracterizan al género *Passiflora*. Entre los flavonoides predominan los del tipo C-glucosilflavonas como vitecina, isovitecina, orientina, isoorientina y sus derivados glicosilados (Dhawan y col., 2004). Estudios sobre la actividad biológica del género *Passiflora* han sido reportados, destacándose los de actividad antibacteriana y antioxidante. Estos efectos están relacionados con el contenido de flavonoides en estas plantas, los cuales son bien conocidos por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes (Ingale y Hivrale, 2010; Ramaiya y col., 2014). Las especies *P. gracilis*, *P. multiformis* y *P. punctata*, nativas de varios países latinoamericanos como Venezuela (Kingma y Moerman, 2001; Steyermark y col., 2003), han sido muy poco investigadas. Romero y col. (2013) demostraron que los extractos etanólicos de estas tres especies de *Passiflora* poseen propiedades antimicrobianas, alta capacidad absorbente de las radiaciones solares y una relevante actividad antirradical, las cuales se atribuyen a los flavonoides detectados en los extractos. Por lo anterior, se planteó para este trabajo aislar e identificar estos metabolitos en *P. gracilis*, *P. multiformis* y *P. punctata*, así como evaluar su posible actividad antibacteriana, antioxidante y cuantificación.

## Materiales y métodos

El material vegetal fue recolectado (*P. gracilis*: julio 2010, *P. punctata*: junio 2012, *P. multiformis*: julio 2011) en la Qta. Niorbo, San Diego de los Altos, Edo. Miranda e identificadas por el Dr. Stephen Tillett. Se registró en el Herbario Víctor Manuel Ovalles (MYF) de la Facultad de Farmacia, UCV, Caracas, con los números MYF 16260 (*P. gracilis*), 28375 (*P. multiformis*) y 19989 (*P. punctata*). Cromatografía de capa fina (CCF): cromatofolio de sílicagel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm, 0.25 mm, Merck), fase móvil: acetato de etilo (Merck) / etilmetilcetona (Merck) / ácido fórmico (Merck) / H<sub>2</sub>O destilada (50:30:10:10). Lámpara UV (Entela). Reacti-

vo Naturstoff (Sigma) al 1% en MeOH (Merck). Cromatografía de columna (CC): sílicagel 60 F<sub>254</sub> (0,2-0,5 mm; 35-70 mesh ASTM, Merck), Sephadex LH-20 (Farmacia), fase móvil: CHCl<sub>3</sub> (Riedel de Haën), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Merck), MeOH y H<sub>2</sub>O dest. Espectrofotómetro UV Beckman Du-6, espectrofotómetro IR 470 Shimadzu, espectrómetro de RMN Eclipse-JOEL, 270 MHz, espectrómetro de IES Perkin-Elmer API 100. Solventes deuterados: DMSO-d<sub>6</sub> (Aldrich).

### AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS PG-1, PG-2, PM-1, PP-1 Y PP-2.

Las hojas fueron secadas ( $\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C} \times 3$  días), molidas, pesadas (40 g *P. gracilis*, 40 g *P. multiformis* y 50 g *P. punctata*) y extraídas con EtOH (600 ml) por Soxhlet (24 h). El solvente se evaporó hasta sequedad (rotaevaporador, Cole Palmer) obteniéndose los extractos crudos respectivos (4,43 g *P. gracilis*, 7,57 g *P. multiformis* y 11,93 g *P. punctata*). El extracto crudo de *P. gracilis* fue fraccionado con los siguientes solventes: Hexano (Burdick & Jacson), CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y butanol (Merck). La fracción butanólica se evaporó a sequedad, obteniéndose un residuo de consistencia viscosa (650 mg), que con MeOH se obtuvo un sólido amorfo. Éste fue decantado, lavado con pequeñas porciones de MeOH, secado, pesado y denominado PG-2 (34,1 mg). La solución metanólica madre se evaporó a sequedad, el residuo obtenido (580 mg) fue fraccionado por CC utilizando sílicagel (15 g) y una mezcla de solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH en gradiente (80:20, 60:40 y 40:20) como fase móvil. Se recolectó 60 fracciones de  $\pm 3$  ml c/u, que luego de ser evaluadas por CCF fueron unidas las similares, resultando 3 fracciones. La fracción 1 se evaporó a sequedad, pesó y denominó PG-1 (200,9 mg). Por otra parte, durante el proceso de evaporación de los extractos etanólicos de *P. multiformis* y *P. punctata* se formaron sólidos amorfos, los cuales fueron decantados, lavados con MeOH, secados, pesados y denominados PM-1 (412 mg) y PP-1 (49 mg), respectivamente. El extracto crudo (2 g) de *P. punctata* se fraccionó en columna (100 g de sílicagel) utilizando mezcla de solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH en gradiente (80:20, 60:40, 40:20, 20:80 y 100). Se recolectó 60 fracciones de  $\pm 20$  ml, que fueron evaluadas por CCF y unidas las que resultaron similares, quedando 9 fracciones. De la fracción 1 se aisló el compuesto PP-2 (27 mg), realizando repetidas CC con Sephadex y MeOH.

**Compuesto PG-1.** Isovitecina (5,7,4-trihidroxi-flavona-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa). UV  $\lambda$  max nm: (MeOH) 271, 333; (NaOMe) 279, 329, 397; (NaOAc) 278, 386; (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 273, 339; (AlCl<sub>3</sub>) 279, 303, 345, 380; (AlCl<sub>3</sub>/HCl) 279, 301, 343, 380. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  ppm (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Tabla II. RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm

(67,9 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla III. HETCOR (correlaciones a un enlace  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 128,9 $\rightarrow$ 7,89; 116,6 $\rightarrow$ 6,91; 103,3 $\rightarrow$ 6,76; 94,3 $\rightarrow$ 6,53; 73,7 $\rightarrow$ 4,58; 70,9 $\rightarrow$ 4,03; 62,0 $\rightarrow$ 3,60; 3,40. FLOCK (correlaciones a dos y tres enlaces  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 164,1 $\rightarrow$ 6,76; 161,7 $\rightarrow$ 7,89; 161,2 $\rightarrow$ 4,58; 156,8 $\rightarrow$ 6,53; 121,7 $\rightarrow$ 6,91; 109,4 $\rightarrow$ 4,58; 6,53; 103,9 $\rightarrow$ 6,76; 6,53. MS (m/z, intensidad relativa (%)): 157 (65), 391 (45), 433 (100).

**Compuesto PG-2.** Vitexina (5,7,4 -trihidroxi-7-O-D-glucopiranosil-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa). UV  $\lambda$  max nm: (MeOH) 271, 337; (NaOMe) 279, 329, 395; (NaOAc) 279, 387; (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 272, 325, 355; (AlCl<sub>3</sub>) 277, 303, 347, 382; (AlCl<sub>3</sub>/HCl) 278, 302, 343, 382. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  ppm (270 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla II. RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm (67,9 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla III. HETCOR (correlaciones a un enlace  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 129,4 $\rightarrow$ 8,01; 116,5 $\rightarrow$ 6,88; 103,0 $\rightarrow$ 6,78; 98,6 $\rightarrow$ 6,28; 74,0 $\rightarrow$ 4,67. MS (m/z, intensidad relativa (%)): 325 (38), 431 (100), 467 (73).

**Compuesto PM-1.** Saponarina (5,4 -dihidroxi-7-O-D-glucopiranosil-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa). UV  $\lambda$  max nm: (MeOH) 271, 334; (NaOMe) 270, 395; (NaOAc) 270, 394; (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 271, 338; (AlCl<sub>3</sub>) 279, 300, 346; (AlCl<sub>3</sub>/HCl) 279, 299, 346. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  ppm (270 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla II. RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm (67,9 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla III. HETCOR (correlaciones a un enlace  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 129,1 $\rightarrow$ 7,94; 116,6 $\rightarrow$ 6,92; 103,5 $\rightarrow$ 6,89; 94,3 $\rightarrow$ 6,87; 101,8 $\rightarrow$ 4,95; 73,2 $\rightarrow$ 4,67. FLOCK (correlaciones a dos y tres enlaces  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 164,7 $\rightarrow$ 6,87; 161,9 $\rightarrow$ 7,94; 157,1 $\rightarrow$ 6,87; 121,7 $\rightarrow$ 6,92; 111,1; 105,5 $\rightarrow$ 6,89. MS (m/z, intensidad relativa (%)): 325 (22), 593 (100), 609 (44), 628 (23).

**Compuesto PP-1.** Swertesina (5,4 -dihidroxi-7-metoxiflavona-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa). UV  $\lambda$  max nm: (MeOH) 271, 337; (NaOMe) 269, 391; (NaOAc) 270, 392; (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 272, 338; (AlCl<sub>3</sub>) 279, 301, 355, 380sh; (AlCl<sub>3</sub>/HCl) 280,5 349, 355, 380sh. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  ppm (270 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla II. RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm (67,9 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla III. HETCOR (correlaciones a un enlace  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 129,0 $\rightarrow$ 7,94; 116,5 $\rightarrow$ 6,92; 103,6; 91,6/90,7 $\rightarrow$ 6,89; 73,4/73,1 $\rightarrow$ 4,59; 57,0/56,8 $\rightarrow$ 3,87/3,85. FLOCK (correlaciones a dos y tres enlaces  $\delta^{13}C / \delta^1H$ ): 165,5 $\rightarrow$ 3,87/3,85; 164,3 $\rightarrow$ 6,89; 161,8 $\rightarrow$ 7,94; 157,3/157,2 $\rightarrow$ 6,89; 121,6 $\rightarrow$ 6,92; 110,3; 104,9 $\rightarrow$ 6,89. MS (m/z, intensidad relativa (%)): 263 (22), 320 (29), 391 (58), 447 (100).

**Compuesto PP-2.** Isoswertesina (5,4 -dihidroxi-7-metoxiflavona-8-C- $\beta$ -D-glucopiranososa) UV  $\lambda$  max nm: (MeOH) 271, 337; (NaOMe) 269, 391; (NaOAc) 270, 392; (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 272, 338; (AlCl<sub>3</sub>) 279, 301, 355, 380sh; (AlCl<sub>3</sub>/HCl) 280,5 349, 355, 380sh. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  ppm (270 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla II. RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm (67,9 MHz, DMSO- $d_6$ ): Tabla III. MS (m/z, intensidad relativa (%)): 306 (24), 445 (100), 491 (61), 506 (25).

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La evaluación de la actividad antibacteriana de los flavonoides aislados se realizó utilizando el método de difusión sobre placas de agar y los resultados se expresaron como el diámetro del halo de inhibición en mm (Janssen y col., 1987; Sambrook y col., 1989). Se prepararon soluciones de 5 mg/ml de los compuestos, empleando las mezclas de solventes siguientes: H<sub>2</sub>O/EtOH/MeOH (50:30:20) para los compuestos PG-1, PG-2 y PM-1, CHCl<sub>3</sub>/EtOH/ Acetona (40:40:20) para PP-1 y PP-2. Luego estas soluciones (7  $\mu$ l) fueron colocadas en discos de papel absorbente ( $\Phi$  = 5 mm). La actividad antibacteriana se evaluó contra los microorganismos Gram +: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25963) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), así como contra los microorganismos Gram-: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). También se evaluó la actividad antimicótica utilizando la levadura *Candida tropicalis* (MLDM 345611). Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: amikacina, ampicilina-sulbactam, ofloxacina, tilmicosina y polimixina B (BBL-Sensi-Disc); como controles negativos se emplearon las mezclas de solventes utilizada para solubilizar los compuestos.

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se determinó mediante la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina usando 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH') como agente de detección (Ripardo y col., 2005). Se preparó una solución (1 mg/ml) en MeOH de c/u de los compuestos, las cuales fueron diluidas sucesivamente. 10  $\mu$ l de cada dilución (250; 125; 62,5; 31,25 y 15,625  $\mu$ g/ml) se aplicaron en cromatofolios de sílicagel 60 F254 (0,25 mm). Luego fueron atomizados con una solución 0,5 mM de DPPH' (Sigma) en MeOH. La actividad antioxidante se observó con la aparición de manchas blancas o amarillas en un fondo púrpura. El flavonoide rutina (Sigma) fue utilizado como sustancia antioxidante de referencia.

## CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método espectrofotométrico descrito en la British Pharmacopoeia (2012) para la especie *P. incarnata*.

## Resultados y discusión

### ASLAMIENTO DE LOS FLAVONOIDES

Los extractos etanólicos de las especies de *Pasiflora* fueron analizados por CCF. Todos los cromatogramas

togramas exhibieron manchas fluorescentes intensas verdes y amarillas bajo la luz UV 365 nm, luego de ser atomizados con Naturstoff. Esto sugirió la presencia de flavonas (Wagner y col., 1984). Estos extractos fueron sometidos a métodos convencionales de separación y purificación, aislándose cinco flavonoides denominados: PG-1 (200,9 mg) y PG-2 (34,1 mg) de *P. gracilis*, PM-1 (412 mg) de *P. multififormis*, PP-1 (49 mg) y PP-2 (27 mg) de *P. punctata*.

La espectroscopía UV es quizás el método más utilizado para analizar la estructura de un flavonoide, ya que permite identificar tanto los núcleos como el patrón de oxigenación de estos compuestos. La Tabla I muestra las absorciones máximas de los espectros UV, en MeOH, de los flavonoides aislados y sus desplazamientos batocrómicos en presencia de reactivos alcalinos y metálicos. La mayoría de los datos son muy similares y su análisis sugirió que todos los compuestos poseen un núcleo flavona hidroxilada en posición 5 y 4, sin embargo, el desplazamiento batocrómico de 7 nm de la banda II, determina que los compuestos PG-1 y PG-2 poseen un grupo hidroxilo libre en la posición C-7, mientras que, el no desplazamiento indica que este grupo está sustituido en los demás compuestos (Mabry y col., 1970; Markham y col., 1975; Markham, 1982). Por lo tanto, la estructura 5,7,4-trihidroxi-flavona se atribuyó a los compuestos PG-1 y PG-2, mientras que la estructura 5,4-dihidroxi-flavona con el grupo OH sustituido en C-7 a los compuestos PM-1, PP-1 y PP-2.

**Tabla I**

**Absorciones máximas (nm) de los espectros UV en MeOH de PG-1, PG-2, PM-1, PP-1 y PP-2 y sus desplazamientos batocrómicos (nm) en presencia de NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> y AlCl<sub>3</sub>/HCl**

| Compuestos | MeOH     | NaOMe  | NaOAc   | NaOAc/<br>H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | AlCl <sub>3</sub> | AlCl <sub>3</sub> /HCl |
|------------|----------|--------|---------|--|-------------------|------------------------|
| PG-1       | 271, 333 | 64 (I) | 7 (II)  | nd                                       | 47(I)             | 47(I)                  |
| PG-2       | 271, 337 | 58 (I) | 7 (II)  | nd                                       | 45(I)             | 45(I)                  |
| PM-1       | 271, 334 | 61 (I) | nd (II) | nd                                       | 46(I)             | 46(I)                  |
| PP-1       | 271, 337 | 54 (I) | nd (II) | nd                                       | 43(I)             | 43(I)                  |
| PP-2       | 271, 334 | 57 (I) | nd (II) | nd                                       | 41(I)             | 41(I)                  |

nd: no desplazamiento

El espectro de protones de PG-1 confirma la estructura 5,7,4-trihidroxi-flavona atribuida a este compuesto mediante las siguientes señales: el singlete en  $\delta$  13,56 ppm correspondiente al protón del grupo hidroxilo en C-5, el cual se encuentra formando puente de hidrógeno con el oxígeno en C-4. En la región aromática, los dos dobletes característicos de

un sistema de acoplamiento A,A /B,B, que ratifica la sustitución del anillo B en posición C-4. Los dos singletes en  $\delta$  6,76 y 6,53 ppm que corresponden a los protones H-3 y H-8, respectivamente. Sin embargo, la ausencia de la señal del protón H-6, que oscila entre 6,16-6,25 ppm, indica que esta posición se encuentra sustituida. A campo más alto aparecieron las señales de un azúcar. El doblete en  $\delta$  4,58 (1H,  $J = 10,8$  Hz) ppm corresponde al protón anomérico. La magnitud de la constante de acoplamiento caracteriza al anómero  $\beta$ -glucopiranososa y el desplazamiento químico sugiere la presencia de un C-glicósido, al contrario del protón anomérico de los O-glicósidos que resuena a campo más bajo ( $\delta$  5,0-5,8 ppm) (Mabry y col., 1970; Markham y col., 1975; Markham, 1982; Markham y Geiger, 1993). Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C, DEPT 135 y HETCOR mostraron las resonancias de los metinos aromáticos C-2,6 ( $\delta$  128,9 ppm) y C-3,5 ( $\delta$  116,6 ppm), que ratifican el sistema de acoplamiento A,A /B,B, las señales características de C-3 y C-8 en  $\delta$  103,3 en  $\delta$  94,3 ppm, respectivamente (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989), así como las resonancias de cinco metinos alifáticos ( $\delta$  82,0; 79,5; 73,7; 71,1; 70,9 ppm) y de un metileno ( $\delta$  62,0 ppm) que identifican la molécula de glucosa. La señal en  $\delta$  73,7 ppm corresponde al carbono anomérico tras observar su correlación con la señal del protón en  $\delta$  4,58 ppm en el espectro HETCOR. Este desplazamiento químico relativamente a campo alto confirma que la unión glicosídica es de tipo C-C, en contraste al carbón anomérico en los O-glicósidos que por lo general resuena cerca de  $\delta$  100,0 ppm. También se observó la resonancia correspondiente a C-4 en  $\delta$  182,4 ppm, la cual aparece desapantallada debido al puente de hidrógeno formado entre los grupos ceto en C-4 e hidroxilo en C-5 (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989). La señal del metino en  $\delta$  109,4 ppm se atribuye a C-6, que debido a la glicosilación es desplazada alrededor de 10 ppm a campo más bajo de su valor normal ( $\delta$  99 ppm) (Markham, 1982; Agrawal, 1989). El espectro FLOCK confirma esta asignación a través de la correlación a dos enlaces de las señales del carbono C-6 con el protón anomérico. Igualmente este espectro permitió identificar la mayoría de los carbonos cuaternarios. Las resonancias en  $\delta$  164,1 y 156,8 ppm se asignaron a C-2 y C-9 por sus correlaciones a dos enlaces con las señales de los protones H-3 y H-8, respectivamente. La resonancia en  $\delta$  161,2 ppm fue atribuida al carbono C-5 por la conexión a tres enlaces con la señal del protón anomérico, así como la resonancia en  $\delta$  103,9 ppm al carbono C-10 por sus vinculaciones a tres enlaces con las señales H-3 y H-8. Los datos espectroscópicos obtenidos sugirieron la fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>, la cual fue confirmada por el espectro

de masas IES al exhibir un ion pseudomolecular ( $M+H^+$ ) en  $m/z$  433 (100), correspondiente a una masa molecular de 432 uma. Toda esta información permitió proponer la estructura 5,7,4 -trihidroxi flavona-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa para el compuesto PG-1 (Figura 1), la cual quedó confirmada al comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para isovitexina (Delazar y col., 2006). Los datos espectroscópicos de RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  están indicados en las Tablas II y III.

El espectro de RMN- $^1H$  del compuesto PG-2 mostró señales parecidas a las del compuesto PG-1, puesto que se trata de otra 5,7,4 -trihidroxi flavona con una unidad de azúcar (tabla II). La diferencia básica es el singlete en  $\delta$  6,28 (1H) ppm, característico del

protón H-6. La ausencia de la señal correspondiente a H-8 ( $\delta$  6,39-6,56 ppm) sugirió que el azúcar se encuentra unido a la aglicona en esa posición (Markham, 1982; Markham y Geiger, 1993). Los espectros de RMN- $^{13}C$ , DEPT 135 y HETCOR exhibieron las resonancias de 21 átomos de carbonos (1 metileno, 11 metinos, 9 carbonos cuaternarios), pertenecientes a un flavonoide con una unidad de azúcar.

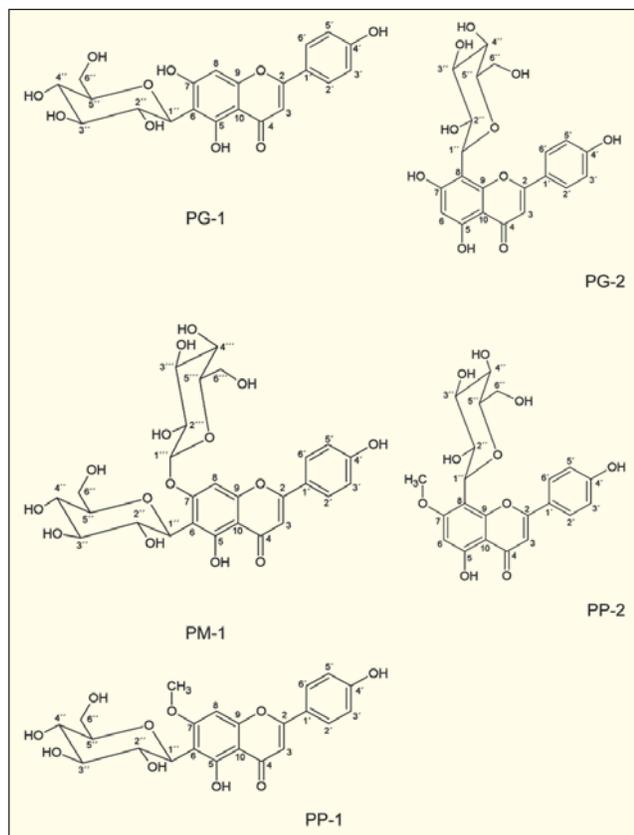
Los desplazamientos químicos fueron comparables con los del compuesto PG-1, sin embargo, difieren dos señales, la correspondiente a un metino en  $\delta$  98,7 ppm, que caracteriza a C-6, y la del carbono cuaternario en  $\delta$  105,2 ppm atribuida a C-8. Esta última señal aparece desplazada, alrededor de 10 ppm, a campo más bajo de su valor normal ( $\delta$  94,4 ppm)

**Tabla II**  
**Datos espectroscópicos de RMN- $^1H$  de los compuestos PG-1, PG-2, PM-1, PP-1 y PP-2 en DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm (multiplicidad, J Hz)**

| Compuestos | H-3      | H-6      | H-8      | H-2',6'      | H-3',5'      | H-1"          | H-2"-H-6"   | H-1'''   | H-2'''-H-6''' | 5-OH            | 4'-OH      | 7-OCH <sub>3</sub> |
|------------|----------|----------|----------|--------------|--------------|---------------|---|----------|---------------|-----------------|------------|--------------------|
| PG-1       | 6,76 (s) | -        | 6,55 (s) | 7,89 (d;8,1) | 6,91 (d;8,1) | 4,58 (d;10,8) | 3,10-4,10 (m), 3,67 (d;11,2; H-6"), 3,41 (dd;10,8;4,7;H-6") | -        | -             | 13,56 (s)       | -          | -                  |
| PG-2       | 6,78 (s) | 6,28 (s) | -        | 8,01 (d;8,4) | 6,88 (d;8,9) | 4,67 (m)      | 3,16-4,0 (m)  | -        | -             | 13,40 (s)       | 10,40 (sa) | -                  |
| PM-1       | 6,89 (s) | -        | 6,87 (s) | 7,94 (d;8,6) | 6,92 (d;8,8) | 4,67 (m)      | 3,16-3,92 (m)   | 4,95 (m) | 3,16-3,92 (m) | 13,56 (s)       | 10,53 (sa) | -                  |
| PP-1       | 6,89 (s) | -        | 6,89 (s) | 7,94 (d;8,6) | 6,92 (d;8,6) | 4,58 (m)      | 3,10-3,87 (m)   | -        | -             | 13,47/13,44 (s) | 10,54 (sa) | 3,89/3,87 (s)      |
| PP-2       | 6,81 (s) | 6,50 (s) | -        | 8,02 (d;7,9) | 6,89 (d;7,9) | 4,70 (d;9,8)  | 3,16-3,49 (m)   | -        | -             | 13,35 (sa)      | -          | 3,87 (s)           |

**Tabla III**  
**Datos espectroscópicos de RMN- $^{13}C$  de los compuestos PG-1, PG-2, PM-1, PP-1 y PP-2 en DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm)**

| Compuestos | C-2   | C-3   | C-4   | C-5   | C-6   | C-7   | C-8    | C-9    | C-10   | C-1'   | C-2',6' | C3',5' | C-4'  | OCH <sub>3</sub> |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|-------|------------------|
| PG-1       | 164,1 | 103,5 | 182,4 | 161,2 | 109,4 | 164,1 | 94,3   | 156,8  | 103,9  | 121,7  | 128,9   | 116,6  | 161,7 | -                |
| PG-2       | 164,5 | 103,0 | 182,6 | 160,9 | 98,6  | 163,1 | 105,2  | 156,5  | 104,0  | 122,2  | 129,4   | 116,5  | 161,7 | -                |
| PM-1       | 164,7 | 103,5 | 182,5 | 160,0 | 111,1 | 163,1 | 94,3   | 157,1  | 105,5  | 121,5  | 129,1   | 116,6  | 161,7 | -                |
| PP-1       | 164,3 | 103,6 | 182,7 | 160,8 | 110,3 | 165,5 | 91,6   | 157,3  | 104,9  | 121,6  | 129,0   | 116,5  | 161,8 | 57,0             |
|            |       |       | 182,4 | 160,0 |       |       | 90,7   | 157,2  |        |        |         |        |       |                  |
| PP-2       | 165,0 | 102,9 | 182,7 | 162,2 | 95,6  | 163,9 | 106,2  | 155,7  | 105,0  | 121,7  | 129,5   | 116,5  | 162,2 | 57,1             |
| Compuestos | C-1"  | C-2"  | C-3"  | C-4"  | C-5"  | C-6"  | C-1''' | C-2''' | C-3''' | C-4''' | C-5'''  | C-6''' |       |                  |
| PG-1       | 73,7  | 71,1  | 79,5  | 70,9  | 82,0  | 62,0  | -      | -      | -      | -      | -       | -      |       |                  |
| PG-2       | 74,0  | 71,5  | 79,3  | 71,2  | 82,3  | 62,0  | -      | -      | -      | -      | -       | -      |       |                  |
| PM-1       | 73,2  | 71,4  | 79,5  | 70,2  | 81,5  | 61,2  | 101,8  | 74,3   | 76,3   | 70,1   | 77,8    | 60,9   |       |                  |
| PP-1       | 73,4  | 71,5  | 79,6  | 70,8  | 82,3  | 62,3  |        |        |        |        |         |        |       |                  |
|            | 73,1  | 71,4  |       | 70,2  | 82,1  | 62,4  | -      | -      | -      | -      | -       | -      |       |                  |
| PP-2       | 73,6  | 71,4  | 79,1  | 71,1  | 82,4  | 61,8  | -      | -      | -      | -      | -       | -      |       |                  |



**Figura 1. Estructuras químicas de los flavonoides aislados de las especies de *Passiflora*. PG-1: isovitexina, PG-2: vitexina, PM-1: saponarina, PP-1: swertisina y PP-2: isoswertisina.**

debido a la probable glicosilación en esa posición (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989). Por otra parte, el espectro de masas IES mostró un ion pseudomolecular ( $M-H^+$ ) en  $m/z$  431 (100), correspondiente a una masa molecular de 432 uma y una fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{10}$ , igual a la del compuesto PG-1. Este conjunto información permitió sugerir la estructura 5,7,4-trihidroxiflavona-8-C- $\beta$ -D-glucopiranososa para el compuesto PG-2 (Figura 1), la cual fue corroborada al contrastar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para vitexina (Hirota y col., 2012). Los datos espectroscópicos de RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  están indicados en las tablas II y III.

El compuesto PM-1 se trata de una 5,4-dihidroxi-flavona con el grupo OH sustituido en C-7, según el análisis espectroscópico UV. Su espectro de RMN- $^1H$  fue semejante a los de los compuestos anteriores, sin embargo entre  $\delta$  5,3-3,16-ppm aparecen múltiples señales atribuibles a más de una molécula de azúcar, y los dos singletes en la región aromática, aparecen desplazados a campo más bajo en  $\delta$  6,89 (1H) y 6,87 (1H) ppm, posiblemente por glicosilación del grupo hidroxilo en la posición C-7. Estos desplazamientos químicos fueron atribuidos solo a H-3 y H-8, respectivamente, ya que el protón H-6 en las mismas circunstancias resuena entre  $\delta$  6,33-6,48 ppm.

Asimismo, su inexistencia sugiere que la posición C-6 se halla también sustituida (Markham, 1982; Agrawal, 1989; Markham y Geiger, 1993). Los espectros de RMN- $^{13}C$ , DEPT 135 y HETCOR presentaron las resonancias de 27 átomos de carbonos (2 metileno, 16 metinos y 9 carbonos cuaternarios) características para un flavonoide con dos unidades de azúcar. Estas señales fueron comparables a las de los compuestos PG-1 y PG-2. Las resonancias de los carbonos metinos en  $\delta$  103,5 y 94,3 ppm corresponden a C-3 y C-8, respectivamente. Las señales en  $\delta$  101,8 y  $\delta$  73,2 ppm se atribuyeron a los carbonos anomérico de los dos azúcares, los cuales se encuentran unidos a la aglicona a través de un enlace O- y C-glicosídico, respectivamente (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989). La señal del carbono cuaternario en  $\delta$  111,1 ppm se asigna al carbono C-6, tras observar su correlación con la del protón H-8 en el espectro FLOCK. Este espectro también permitió identificar las señales de los carbonos cuaternarios en  $\delta$  157,1 y 105,5 ppm como C-9 y C-10 a partir de sus acoplamientos con el protón H-8 y las señales en  $\delta$  164,7 y 161,9 ppm como C-2 y C-4 por sus correlaciones con los protones H-3 y H2 /H6, respectivamente. Los datos espectroscópicos obtenidos indicaron una fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{15}$ . El espectro de masas IES afirma esta fórmula al mostrar un ion pseudomolecular ( $M-H^+$ ) en  $m/z$  593 (100), correspondiente a una masa molecular de 594 uma. Este conjunto de datos permitió plantear la estructura 5,4-dihidroxiflavona,7-O-D-glucopiranosil-6-C- $\beta$ -D-glucopiranososa para el compuesto PM-1 (Figura 1), la cual fue reafirmada al comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para saponarina (Markham y col., 2003; Seo y col., 2014). Los datos espectroscópicos de RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  están indicados en las tablas II y III.

El espectro de RMN- $^1H$  del compuesto PP-1 desplegó resonancias muy similares a las del compuesto PM-2, ya que se refiere a otra 5,4-dihidroxiflavona con el grupo OH sustituido en C-7. El singlete en 6,89 ppm, que integra para dos protones, se atribuyó a H-3 y H-8. Sin embargo, la señal en  $\delta$  3,87/3,85 (3H, d) ppm indicó la existencia de un grupo metoxilo aromático. (Markham, 1982; Markham y Geiger, 1993). Esta señal como la del protón del grupo hidroxilo en C-5 ( $\delta$  13,47/13,44 ppm) aparecen como dobletes, posiblemente debido a la rotación restringida alrededor del enlace C6-C1", que indica la presencia de dos rotámeros (Frank y col., 2012). Los espectros de RMN- $^{13}C$ , DEPT 135 y HETCOR también mostraron resonancias parecidas a las del compuesto PM-1. Las diferencias fundamentales fueron: la señal del metino en  $\delta$  91,0/90,8 ppm atribuida a C-8, el cual aparece más apantallado, y la señal del carbono metilo en

δ 57,0/56,8 ppm característica de un grupo metoxilo (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989). Además, se pudo observar, que como en el espectro de protones, tanto las dos señales anteriores como las correspondientes a C-4 (182,7/182,4 ppm) y las de los carbonos del azúcar aparecen como duplicado, proponiendo la existencia de dos rotámeros (Frank y col., 2012). Por otra parte, el espectro FLOCK permitió identificar la señal del carbono cuaternario en δ 165,5 ppm como C-7 por su acoplamiento a dos enlaces con los protones del grupo metilo, de igual forma las señales de los carbonos cuaternarios en δ 164,3; 110,3; 157,3; 104,9; 121,6 y 161,8 ppm como C-2, C-6, C-9, C-10, C-1 y C-4, respectivamente. Los datos espectroscópicos sugirieron la fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, que fue confirmada por el espectro de masas IES al exhibir un ion pseudomolecular (M+H<sup>+</sup>) en m/z 447 (100), correspondiente a una masa molecular de 446 uma. El conjunto de información obtenido permitió presentar la estructura 5,4 -dihidroxi-7-metoxiflavona-6-C-β-D-glucopiranososa para el compuesto PP-1 (Figura 1), la cual fue reafirmada al comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para swertesina (Frank y col., 2012). Los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C están indicados en las tablas II y III.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PP-2 también muestra señales semejantes a las del compuesto PP-1, la diferencia básica es el singlete en δ 6,50 (1H) ppm, que caracteriza a H-6. Esta señal aparece desplazada a campo más bajo por la presencia del grupo metoxilo en posición C-7 (Markham, 1982; Markham y Geiger, 1993). Del mismo modo, los espectros de RMN-<sup>13</sup>C y DEPT 135 presentaron desplazamientos químicos parecidos a los de PM-1 y PP-1. La señal del metino en δ 95,6 ppm corresponde al carbono C-6 (Pelter y col., 1976; Agrawal, 1989). Los datos espectroscópicos indicaron la misma fórmula molecular de PP-1, la cual fue corroborada por el espectro de masas IES al exhibir un ion pseudomolecular (M-H<sup>+</sup>) en m/z 445 (100), correspondiente a una masa molecular de 446 uma. La información obtenida permitió indicar la estructura 5, 4 -dihidroxi-7-metoxiflavona-8-C-β-D-glucopiranososa para el compuesto PP-2 (Figura 1), que fue ratificada al cotejar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para isoswertesina (Chopin y col., 1978; Agrawal, 1989). Los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C están indicados en las tablas II y III.

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

La actividad antibacteriana de las C-glucosilflavonas aisladas fue evaluada contra cinco organismos patógenos, las bacterias *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*

y *P. aeruginosa* y la levadura *C. tropicalis*, usando el método de difusión sobre placas de agar. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV y se expresan como diámetro del halo de inhibición reportados en mm. Los compuestos PG-1 (isovitexina), PG-2 (vitexina), PM-1 (saponarina) e PP-2 (isoswertesina) evidenciaron actividad antimicrobiana de amplio espectro, es decir, que fueron activos contra bacterias Gram+ y Gram- incluyendo la levadura. Aquí cabe destacar la actividad contra *P. aeruginosa*, puesto que se trata de una bacteria muy resistente a gran cantidad de antibióticos comerciales. Swertesina (PP-1) sólo fue activo contra *B. cereus* y la levadura *C. tropicalis*, esto coincide con los valores reportados por Kumarasamy y col. (2004). La actividad antibacteriana de los flavonoides está siendo cada vez más documentada. Muchos grupos de investigación han aislado e identificado flavonoides que poseen actividad antibacteriana, entre los cuales se encuentran vitexina, isovitexina y saponarina (Basilea y col., 1999; Bylka y col., 2004; Becker y col., 2005; Cushnie y Lamb, 2005; Ling y col., 2010; Awolola y col., 2014). Sin embargo, este trabajo constituye el primer reporte sobre la actividad antibacteriana para la flavona isoswertesina.

**Tabla IV**

**Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de las especies *P. gracilis*, *P. multiformis* y *P. punctata*, expresada como diámetro del halo de inhibición (mm) contra las bacterias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida tropicalis***

| Compuestos*                 | DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) |                  |                |                      |                      |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|                             | Microorganismos                      |                  |                |                      |                      |
|                             | Gram+                                |                  | Gram-          |                      | Levadura             |
|                             | <i>B. cereus</i>                     | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. tropicalis</i> |
| PG-1 (Isovitexina)          | 12                                   | 12               | 16             | 15                   | 14                   |
| PG-2 (Vitexina)             | 12                                   | 13               | 15             | 14                   | 13                   |
| PM-1 (Saponarina)           | 13                                   | 12               | 12             | 14                   | 15                   |
| PP-1 (Swertesina)           | 10                                   | -                | -              | -                    | 8                    |
| PP-2 (Isoswertesina)        | 13                                   | 12               | 12             | 10                   | 12                   |
| <b>Controles</b>            |                                      |                  |                |                      |                      |
| Amicacina (30 g)            | 15                                   | 16               | 18             | 15                   | 16                   |
| Ampicilina/Sulbactam (20 g) | 16                                   | -                | 16             | 12                   | -                    |
| Ofloxacina (5 g)            | 24                                   | 22               | 24             | 22                   | 20                   |
| Tilmicosin (15 g)           | 28                                   | 26               | 29             | 18                   | 23                   |
| Polimixina B: (300 UI)      | -                                    | -                | -              | -                    | -                    |
| Mezcla de solventes         | -                                    | -                | -              | -                    | -                    |

\*Concentración de los compuestos = 5 mg/ml, - = no inhibición

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de las C-glucosilflavonas aisladas fue evaluada mediante la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina usando DPPH<sup>•</sup> como agente de detección. El método se basa en la capacidad para captar radicales libres de los flavonoides. El radical DPPH<sup>•</sup> de color azul-violeta va decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción con una sustancia antioxidante. Los flavonoides mostraron diferentes valores de límite de detección (LD), los cuales fueron comparados con el antioxidante de referencia rutina (< 15,625 µg). El orden de incremento de actividad antioxidante basado en los límites de detección fue PP-2 (isoswertisina) (>250 µg) < PM-1 (saponarina) (250 µg) < PP-1 (swertisina) (125 µg) < PG-1 (isovitexina) y PG-2 (vitexina) (< 31,25 µg). Estudios in vitro reportados en la literatura han evidenciado la actividad antioxidante de la mayoría de los compuestos aislados utilizando DPPH<sup>•</sup> (Kumarasamy y col., 2004; Kim y col., 2005; Shibano y col., 2008; Nan y col., 2009; Ueyama y col., 2011; Hassan y col., 2014). La sustancia de referencia rutina muestra una actividad antioxidante mayor que los demás compuestos, el grupo OH adicional en el anillo B de esta sustancia, indica la importante función del número hidroxilos en la actividad antioxidante de los flavonoides. Igualmente, las flavonas PG-1 y PG-2, con tres grupos OH, exhiben mayor actividad antioxidante que los compuestos PM-1, PP-1 y PP-2, con dos grupos OH. Estos resultados son consistentes con los reportados, que muestran que múltiples grupos OH en la molécula tienen una actividad antioxidante sustancial, que grupos OCH<sub>3</sub> y la glucosa en posición 6 y 8 afecta negativamente la actividad antioxidante, debido al efecto estérico que despliegan (Heim y col., 2002; Zeng y col., 2013).

## CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

El contenido de flavonoides totales en las tres especies de *Passiflora* fue determinado empleando el método espectrofotométrico UV descrito en la monografía para las flores de la pasión (*Passiflora incarnata*) de la Farmacopea Británica (2012). El porcentaje de flavonoides totales (expresados como vitexina) en *P. gracilis*, *P. punctata* y *P. multiformis* fue de 1,98 ± 0,05; 0,95 ± 0,02 y 0,58 ± 0,01, respectivamente. Las hojas de *P. gracilis* presentaron mayor contenido de flavonoides totales comparado con las demás especies. Además, este resultado es bastante significativo, si se compara con el contenido de flavonoides totales de la especie *Passiflora incarnata* (> 1,5 %), la cual es reconocida internacionalmente por su contenido de flavonoides (British Pharmacopoeia, 2012).

## Conclusiones

Las tres especies estudiadas de *Passiflora* presentaron C-glucosilflavonas, las cuales fueron identificados como isovitexina, vitexina en *P. gracilis*, saponarina en *P. multiformis*, swertisina y isoswertisina en *P. punctata*. Estos compuestos no habían sido previamente reportados en las especies estudiadas. La mayoría de las C-glucosilflavonas fueron activas contra las bacterias *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, y la levadura *C. tropicalis*. La actividad antibacteriana de los flavonoides es bastante conocida, sin embargo, este es el primer reporte para la flavona isoswertisina. Igualmente, la mayoría de las C-glucosilflavonas mostraron actividad antioxidante por DPPH<sup>•</sup>, la cual es influenciada por el número y la posición de los sustituyentes presentes en los compuestos. Los efectos exhibidos por los flavonoides aislados indican que éstos son responsables, en cierto grado, de la actividades antibacteriana y antioxidante de los extractos etanólicos de *P. gracilis*, *P. multiformis* y *P. punctata*, previamente reportadas. Las hojas de *P. gracilis* presentaron el mayor contenido de flavonoides totales, el cual es bastante significativo al compararlo con el de *P. incarnata*, especie reconocida internacionalmente por su contenido de flavonoides.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (Proyecto N°: IFF 01/2013) de la Facultad de Farmacia y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (Proyecto N°: PI-06-8057-2011/1) de la Universidad Central de Venezuela.

## Referencias bibliográficas

- Agrawal P. Carbón-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1989, pp. 123-150.
- Awolola G, Koorbanally N, Chenia H, Shode F, Baijnath H. 2014. Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* Warb. subsp. *sansibarica* (Moraceae) extracts. Afr J Tradit Complement Altern Med 11(3): 124-3.
- Bailey L, Bailey E. Hortus Third: A Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada, Macmillan, New York, 1976, p. 825.
- Basilea A, Giordano S, López-Sáez J, Castaldo R. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. Phytochemistry 52: 1479-1482.
- Becker H, Scher J, Speakman J, Zapp J. 2005. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. Fitoterapia 76(6): 580-584.
- British Pharmacopoeia. 2012. Accedida el 14 de mayo de 2013, desde <http://bp2012.infostar.com.cn/Bp2012.aspx?tab=browse&a=display&n=236&id=4951>.
- Bylka W, Matlawska I, Pilewski N. 2004. Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents. J. Am Neutraceut Assoc 7: 24-31.

- Cushnie T, Lamb A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26: 343-356.
- Chopin J, Bouillant M, Ramachandran A, Ramash P, Mabry T. 1978. New C-glycosylflavones from *Mollusgo distica*. *Phytochem* 17: 299-300.
- Delazar A, Gibbons S, Kosari A, Nazemiyeh H, Modarresi M, Nahar L, Sarker S. 2006. Flavone C-glycosides and curcubitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DARU* 14(3): 109-114.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94: 1-23.
- Frank J, Powder-George Y, Ramsewack Y, Reynolds W. 2012. Variable-temperature 1H-NMR Studies on Two C-glycosylflavones. *Molecules* 17: 7914-7926.
- Hassan E, Hassan R, El-Toumy S, Mohamed S, Omer E. 2014. Phenolic metabolites and antioxidant activity of *Codiaeum variegatum* CV. Spirale. *J Pharm Res* 8(5): 619-623.
- Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.
- Hirota B, Miyazaki C, Mercali C, Verdan M, Kalegari M, Gemina A, Lordello A, Miguel M, Miguel O. 2012. C-glycosylflavones and a comparative study of the antioxidant, hemolytic and toxic potential of *Jathopha multifida* leaves and bark. *Int J Phytomed* 4(1): 1-5.
- Hokche O, Berry P, Huber O. Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas, Venezuela, 2008, pp. 541-543.
- Ingale A, Hivrale A. 2010. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *Afri J Plant Sci* 4(10): 417-426.
- Janssen A, Scheffer J, Baerheim S. 1987. An Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Review. *Aspects of Tests Methods. Planta Med* 53: 395-398.
- Kim J, Lee B, Kim J, Sim G, Lee D, Lee K, Yun Y, Pyo H. 2005. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Arch Pharm Res* 28(2): 195-202.
- Kingma K, Moerman P. *Passiflora*: Exotische verrassingen in de Lage Landen, Lannoo Warnsveld, 2001, p. 241.
- Kumarasamy Y, Byres M, Cox P, Delazar A, Jaspars M, Nahar L, Shoeb M, Sarker S. 2004. Isolation, structure elucidation, and biological activity of flavone 6-C-Glycosides from *Alliaria petiolata*. *Chem Nat Compd* 40(2): 122-128.
- Ling T, Ling W, Chen Y, Wan X, Xia T, Du X, Zhang Z. 2010. Antiseptic activity and phenolic constituents of the aerial parts of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*. *Molecules* 15(11): 8469-77.
- Mabry T, Markham K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970, pp. 35-55.
- Markham KR, Mabry TJ. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. En: *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975, 46-77.
- Markham K. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London New York, 1982, pp. 79-85.
- Markham K, Geiger H. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulphoxide. En Harborne, J. (Ed), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall, London, 1993, pp. 441-498.
- Markham K, Mitchell K. 2003. The Mis-identification of the Major Antioxidant Flavonoids in Young Barley (*Hordeum vulgare*) Leaves. *Z. Naturforsch* 58c: 53-56.
- Miroddi M. 2013. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J Ethnopharmacol* 150 (3): 791-804.
- Nan W, Kuang F, Yu-Jie F, Yuan-Gang Z, Fang-Rong Ch, Yung-Husan Ch, Xiao-Lei. L, Yu K., Wei L, Cheng-Bo G. 2009. Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) Leaves. *Molecules* 14: 1032-1043.
- Pelter A, Ward R, Gray T. 1976. The carbon-13 nuclear resonance spectra of flavonoids and related compounds. *J C S. Perkin I*: 2475-2483.
- Ramaiya S, Bujang J, Zakaria M. 2014. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. *Scientific World Journal*, 2014, Article ID 167309, 10 pages. doi:10.1155/2014/167309.
- Ripardo H, Pacheco L, Andrade A, Correa M, Araújo R, Guilhon G, Joyce Kelly R, Da Silva J, Santos L. 2005. Xanthones from the roots of *Moutabea guianensis* Aubl. *Molecules* 20: 127-134.
- Romero A, Sifontes G, Contreras M, Rincón A, Infante W, Pérez N. 2013. Especies latinoamericanas del género *Passiflora* utilidad en cosmética. *Anales del Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos COLAMIQC XXI*: 600-614.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3 Appendix A, 2nd. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, p. A.1.
- Seo K., Park M, Cha J, Ra J, Han S, Nam M, Kim L, Lee J, Seo W. 2014. Saponarin from barley sprouts inhibits Nf-kB and MAPK on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Food Funct* 5(11): 3005-3013.
- Shibano M, Kakutani K, Taniguchi M, Yasuda M, Baba K. 2008. Antioxidant constituents in the dayflower (*Comelina communis* L.) and their  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activity. *J Nat Med* 62: 349-353.
- Stevens P. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Accedido el 18 de mayo de 2015, desde: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Steyermark J, Berry P, Yatskievych K, Holst B. *Flora of the Venezuelan Guayana*, Vol. 7, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, USA, 2003, pp. 647-648.
- Ueyama H, Aotsuka Y, Okawa M, Ogura Y, Ukeguchi M, Hoashi K, Kinjo J. 2011. Antioxidant activities of lutonarin isolated from young barley leaves. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 58(4): 170-172.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski E. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984, pp. 164-165.
- Zeng P, Zhang Y, Pan Ch, Jia Q, Guo F, Li Y, Zhu W, Chen. 2013. Advances in studying of the pharmacological activities and structure-activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. *Acta Pharm Sinica* B 3(3): 154-162.

**Recibido:** 4 de junio de 2016  
**Aceptado:** 18 de julio de 2016