

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO



**ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE LA *Bauhinia guianensis*
var. *kuntiana* Aubl.**

TESIS

PRESENTADO POR:

GOLFER MUEDAS TAIPE

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAGÍSTER EN QUÍMICA

ASESORA: DRA. JUANA ROSA MARÍA ROBLES CAYCHO

**LIMA – PERÚ
2013**

A Dios que nunca me deja solo.

A mis padres, ejemplos de perseverancia y trabajo.

A mis hermanos y sobrinos, que siempre los tengo presente.

A Jacqueline, quien es la luz especial e inspiración de muchos logros en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a mi asesora, Dra. Juana Robles Caycho, por su invaluable apoyo y los consejos brindados durante la realización del presente trabajo.

A la Dra. Olga Lock Sing, por las enseñanzas y constante apoyo en las primeras etapas de la realización de esta tesis.

Al Dr. Adolfo La Rosa Toro Gómez, (Universidad Nacional de Ingeniería) por el apoyo para el análisis electroquímico.

Al Lic. Víctor Hugo Doroteo Ortega, por el apoyo y consejo durante el desarrollo de la tesis.

A la M.Sc. Blga. Irma Fernández Valderrama, (Universidad Peruana Cayetano Heredia) por la identificación botánica del vegetal.

Al Ing. Alexander Nieva Chávez y la Dra. Helena Maruenda Castillo, por el apoyo y facilidades brindadas para la obtención de los espectros de masas, y de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H), carbono (RMN ^{13}C), ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HETCOR.

A la Lic. Milka Cahahuanca Collao, por el apoyo brindado para la realización de los análisis espectrofotométrico y para la obtención de los espectros ultravioleta (UV) e infrarrojo (IR).

A los Integrantes del Laboratorio N° 4 de la Pontificia Universidad Católica del Perú, con quienes compartimos momentos de enseñanzas, alegrías y tristezas.

A los Profesores de la Maestría en Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por sus enseñanzas y sugerencias.

Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo y que siempre los tengo presente.

RESUMEN

**ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE LA *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.**

Los antioxidantes son sustancias de mucho interés, considerados como protectores de los sistemas biológicos contra la oxidación, que ocasionan procesos degenerativos por la presencia de radicales libres. La evaluación de la actividad antioxidante de la especie vegetal se realizó aplicando dos métodos: el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el método electroquímico, empleando la voltametría cíclica. De la separación, guiada por la actividad antioxidante, de la fracción AE de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., se aisló el compuesto con mayor actividad, la 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol) con p.f= 216 °C, quien ha sido identificado mediante sus espectros IR, UV, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR. El flavonoide eriodictiol aislado presentó la mayor actividad antioxidante, de 90,42 % a la concentración de 10 µg/mL y un potencial de oxidación a ϵ_{pa1} 0,206 V. El valor determinado para su EC₅₀ fue de 1,81 µg/mL, lo que indica que a muy baja concentración presenta buena actividad antioxidante y es comparable con los estándares rutina y quercetina. Se encontró la relación entre estructura – actividad – potencial redox del principio activo responsable de la actividad antioxidante en la especie. El grupo catecol (dos -OH adyacentes) en el compuesto, es el responsable de la mayor actividad antioxidante a un menor potencial de oxidación.

Palabras clave: antioxidante, DPPH, voltametría cíclica, potencial de oxidación, *Bauhinia guianensis*.

**ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA
Bauhinia guianensis var. *kuntiana* Aubl.**

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PRESENTACIÓN	2
1.2	OBJETIVOS DE LA TESIS	3
2.	GENERALIDADES	4
2.1	GÉNERO <i>Bauhinia</i>	5
2.1.1	Distribución y ubicación	5
2.1.2	Composición química del género <i>Bauhinia</i>	5
2.1.3	Aspectos farmacológicos del género <i>Bauhinia</i>	7
2.1.4	<i>Bauhinia guianensis</i>	8
2.2	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	10
2.2.1	Radicales libres	10
2.2.2	Antioxidantes	11
2.2.3	Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	16
2.3	IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS	19
2.3.1	Espectrometría de Masas, EM	19
2.3.2	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , RMN ^1H	21
2.3.3	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , RMN ^{13}C	23
2.3.4	Espectroscopía de Resonancia Magnética Bidimensional	25
2.3.5	Espectroscopía de Infrarrojo, IR	26
2.3.6	Espectroscopía de Ultravioleta, UV	28

3. PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	31
3.1.1 Reactivos	31
3.1.2 Instrumentación	31
3.1.3 Material vegetal	33
3.2 SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	34
3.2.1 Extracción etanólica de tres especies vegetales	34
3.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante	34
3.2.3 Clasificación de los extractos etanólicos	36
3.2.4 Fraccionamiento del extracto etanólico y evaluación de la actividad antioxidante de la especie seleccionada	37
3.3 ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	40
3.3.1 Extracción sólido-líquido: Obtención del extracto bruto orgánico, EBO	40
3.3.2 Análisis cualitativo (marcha fitoquímica) del extracto bruto orgánico, EBO	41
3.3.3 Fraccionamiento biodirigido del extracto bruto orgánico, EBO	41
3.3.4 Separación cromatográfica biodirigida de la fracción de acetato de etilo, AE	52
3.3.5 Identificación espectroscópica del principio activo con mayor actividad antioxidante	56
3.3.6 Evaluación de la actividad antioxidante del principio activo con mayor actividad antioxidante	78
3.3.7 Determinación de la concentración efectiva media, EC ₅₀ del principio activo con mayor actividad antioxidante	79

4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
4.1	DE LA SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	82
4.2	DEL ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	85
4.2.1	Del fraccionamiento biodirigido del extracto bruto orgánico, EBO	85
4.2.2	De la separación cromatográfica biodirigida de la fracción de acetato de etilo, AE	86
4.2.3	De la identificación espectroscópica del principio activo con mayor actividad antioxidante	88
5.	CONCLUSIONES	104
6.	RECOMENDACIONES	107
7.	BIBLIOGRAFÍA	109
8.	ANEXOS	119
Anexo N° 1.	Identificación botánica de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	120
Anexo N° 2.	Protocolo para la evaluación de la actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	121
Anexo N° 3.	Metodología general de investigación	124
Anexo N° 4.	Marcha fitoquímica preliminar	125
Anexo N° 5.	Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl	131
Anexo N° 6.	Pruebas específicas para la detección de flavonoides presentes en plantas	132

Anexo N° 7.	Curvas de calibración de muestras y estándares para determinar la concentración efectiva media, EC_{50}	134
Anexo N° 8.	Análisis espectral ultravioleta para flavonoides con reactivos de desplazamiento	137



ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Especie vegetal de <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	9
2.	Compuestos presentes en la <i>Bauhinia guianensis</i>	10
3.	Agentes captadores de radicales (radical scavengers)	12
4.	Antioxidantes secundarios o agentes preventivos	13
5.	Fraccionamiento del extracto etanólico de la especie vegetal	38
6.	Fraccionamiento del extracto etanólico de la <i>Bauhinia guianensis</i>	42
7.	Voltamograma cíclico de la quercetina en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	46
8.	Voltamograma cíclico del resorcinol en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	47
9.	Voltamograma cíclico del EBO en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	48
10.	Voltamograma cíclico de la fracción de acetato de etilo (AE) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	49
11.	Voltamograma cíclico de la fracción de hexano (HE) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	49
12.	Separación cromatográfica de la fracción de acetato de etilo (AE)	54
13.	Separación cromatográfica de la fracción f8'-f9'	55
14.	Separación cromatográfica de la fracción G1-G2	55
15.	Espectro de masas del compuesto activo en modo ión positivo [M+H] ⁺ y [M+Na] ⁺ con voltaje de capilar -4500 V	58
16.	Espectro de masas del compuesto activo en modo ión negativo [M-H] ⁻ con voltaje de capilar +3500 V	58
17.	Espectro de masas del compuesto activo en modo ión positivo [M+H]: 289 con voltaje capilar de -4500 V obtenido de la <i>Bauhinia</i>	

<i>guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	59
18. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	62
19. Espectro DEPT (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	66
20. Espectro RMN ¹³ C (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	67
21. Espectro ¹ H- ¹ H COSY (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	69
22. Espectro ¹ H- ¹³ C HETCOR (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl	71
23. Espectro Infrarrojo del compuesto activo obtenido de la <i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	73
24. Espectro ultravioleta del compuesto activo G3 en metanol	76
25. Espectro ultravioleta del compuesto activo G3 en metóxido de sodio	76
26. Espectro ultravioleta del compuesto activo G3 en acetato de sodio	77
27. Espectro ultravioleta del compuesto activo G3 en cloruro de aluminio y ácido clorhídrico	77
28. Espectro ultravioleta del compuesto activo G3 en ácido bórico y acetato de sodio	78
29. Voltamograma cíclico del compuesto G3 en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s	79
30. Estructuras de resonancia del DPPH	82
31. Interacción entre el solvente etanol (EtOH) y el radical libre DPPH	83
32. Comparación de actividad antioxidante de las especies vegetales y estándares a la concentración de 10 µg/mL	84

33.	Comparación de actividad antioxidante de fracciones del EBO de la <i>Bauhinia guianensis</i> y estándares a la concentración de 10 µg/mL	85
34.	Estructura básica de una flavanona	89
35.	Formación de complejos del AlCl ₃ con una flavanona en ausencia y presencia de HCl	90
36.	Formación de complejos del H ₃ BO ₃ con una flavanona en presencia de NaOAc	91
37.	Nomenclatura y diagnóstico de fragmentación de principales picos en modo ión positivo del compuesto activo G3	92
38.	Ecuaciones de fragmentación del espectro de masas EM-ESI positivo: m/z 289 ([M+H] ⁺)	94
39.	Estereoquímica de una flavanona	95
40.	Valores de desplazamiento químico de RMN ¹³ C del compuesto activo G3 (flavanona)	97
41.	Estructura química de la 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol)	99
42.	Mecanismo de captación del radical DPPH por el eriodictiol	101
43.	Aspectos estructurales de los flavonoides que determinan su actividad antioxidante	102

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Principales compuestos aislados del género <i>Bauhinia</i>	6
2.	Clasificación de extractos por su actividad antioxidante	18
3.	Peso de muestras secas y extractos etanólicos de especies vegetales	34
4.	Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y estándares	36
5.	Clasificación de los extractos etanólicos según su actividad antioxidante	36
6.	Peso de las fracciones obtenidas del extracto etanólico	38
7.	Actividad antioxidante de las fracciones del extracto etanólico	39
8.	Peso de fracciones del extracto etanólico, EBO, de la <i>Bauhinia guianensis</i>	42
9.	Pruebas específicas de flavonoides para fracciones del EBO	44
10.	Actividad antioxidante de estándares	45
11.	Actividad antioxidante del EBO y sus fracciones	45
12.	Potencial de oxidación de los polifenoles sintéticos medidos bajo condiciones estándar	47
13.	Potencial de oxidación del EBO y sus fracciones, medidos bajo condiciones estándar	50
14.	Relación entre el potencial de oxidación y la actividad antioxidante de los compuestos estándares	51
15.	Relación entre el potencial de oxidación y la actividad antioxidante del EBO y sus fracciones	51
16.	Relación entre actividad antioxidante y concentración de las muestras y estándares	80
17.	Concentración efectiva media, EC_{50} , de muestras y estándares	80

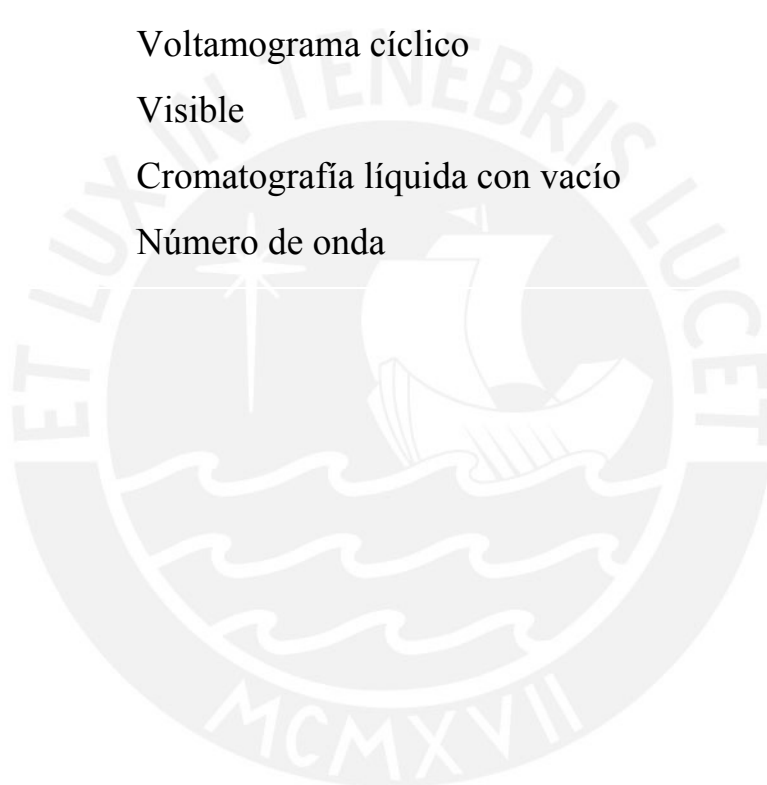
LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
% AA	Porcentaje de actividad antioxidante
AC	Fracción acuosa
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Fracción de acetato de etilo
ax	Axial
B.	<i>Bauhinia</i>
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
°C	Grado centígrado
CCD	Cromatografía en capa delgada
¹³C-DEPT	Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
dd	Doble doblete
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil
EBO	Extracto bruto orgánico
EC₅₀	Concentración efectiva media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de masas
ε_{pa}	Potencial anódico
eq	Ecuatorial

ESI	Ionización por electroespray
ET	Trasferencia de electrones
EtOH	Etanol
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
g	Gramo
G3	Muestra con actividad antioxidante
h	Hora
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
^1H-^{13}C HETCOR	Espectroscopia de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C
HE	Fracción hexánica
^1H-^1H COSY	Espectroscopía de correlación ^1H - ^1H
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta performancia
I	Número de espín
IN	Fracción insoluble
IR	Infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
<i>m</i>	Multiplete
M	Molaridad
M^\ddagger	Ión molecular
mA	Miliamperios
ME	Fracción metanólica
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz

mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/z	Relación masa/carga
N°	Número
NaOAc	Acetato de sodio
NaOMe	Metóxido de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NP	Difenilboriloxietilamina
ORAC	Capacidad de absorber radicales oxígeno
p.f	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
QUER	Quercetina
R²	Factor de correlación
RESOR	Resorcinol
R_f	Factor de retención
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
ROH	Compuesto flavonoide
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Fase reversa
RUT	Rutina
s	Singulete
t	Triplete
% T	Porcentaje de transmitancia
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TMS	Tetrametilsilano

TRAP	Parámetro antioxidante que atrapan los radicales totales
µg/mL	Relación microgramo/mililitro
µL	Micro litro
µm	Micrómetro
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Relación volumen/volumen
VC	Voltamograma cíclico
Vis	Visible
VLC	Cromatografía líquida con vacío
□	Número de onda





1.1 PRESENTACIÓN

La Química de Productos Naturales representa un tema de estudio particularmente importante para el Perú, en razón de la gran riqueza de su flora, de la amplia utilización que se ha dado en el pasado y que continúa dándose actualmente.

Los antioxidantes son sustancias de mucho interés en diferentes campos industriales como la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia; ya que son considerados protectores de los sistemas biológicos contra la oxidación que ocasionan procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres¹.

En nuestra región andina y amazónica encontramos una variada flora y, dentro de ella muchas especies vegetales con reconocida actividad, muy benéfica para la salud. Por este motivo, el presente trabajo constituye un aporte a la búsqueda de fuentes de antioxidantes naturales².

La presente Tesis, en la línea de Productos Naturales, comprendió la evaluación preliminar de la actividad antioxidante en tres especies vegetales: *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., *Carpotroche longifolia* (Poepp.) Benth y *Campomanesia lineatifolia* (Ruiz & Pav.). A la especie que presentó mayor actividad antioxidante (*Bauhinia guianensis*), se le realizó el estudio químico, así como la separación e identificación estructural de el(los) principio(s) activo(s) responsable(s) de dicha actividad.

El trabajo, desde la separación e identificación del compuesto con actividad antioxidante, se desarrolló en el Laboratorio N° 4 del Departamento de Ciencias - Sección Química, de la Pontificia Universidad Católica del Perú. La evaluación de la actividad antioxidante por el método de voltametría cíclica, se realizó en el

Laboratorio de Electroquímica - Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Ingeniería.

1.2 OBJETIVOS DE LA TESIS

1.2.1 Objetivo general

Estudio químico de especies vegetales con actividad benéfica para la salud, en particular especies con actividad antioxidante.

1.2.2 Objetivos específicos

- i Seleccionar la especie vegetal con mayor actividad antioxidante a partir de: *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., *Carpotroche longifolia* (Poepp.) Benth y *Campomanesia lineatifolia* (Ruiz & Pav.).
- ii Aislar el principio activo de la especie vegetal con mayor actividad antioxidante guiado por ensayos químicos y electroquímicos.
- iii Identificar y elucidar el principio activo responsables de la actividad antioxidante.
- iv Encontrar la relación estructura - actividad - potencial redox del principio activo responsable de la actividad en la especie vegetal.

El objetivo principal es el aislamiento e identificación del principio activo responsable de la actividad antioxidante en la especie vegetal seleccionada, el cual lleva al estudio y experimentación de los diversos procedimientos de aislamiento y de las técnicas de identificación espectroscópicas.

El aislamiento comprende las etapas de extracción por solventes, separación y purificación. Asimismo, se describe la aplicación de la espectrometría de Masas y de Resonancia Magnética Nuclear de RMN ^1H , RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HETCOR, en la identificación de la estructura molecular.



2.1 GÉNERO *Bauhinia*

2.1.1 Distribución y ubicación

Entre las numerosas especies vegetales de interés medicinal se encuentran las plantas del género *Bauhinia*, perteneciente a la familia Fabaceae, las cuales son encontradas principalmente en áreas tropicales del planeta, comprendiendo aproximadamente 300 especies³.

Muchas de las plantas del género *Bauhinia* son usadas como remedio en medicina popular en varias regiones del mundo, incluyendo a África, Asia y América Central y del Sur³.

2.1.2 Composición química del género *Bauhinia*

Algunas especies del género *Bauhinia* fueron estudiadas fitoquímica y farmacológicamente. Así fueron encontrados diferentes clases de compuestos orgánicos de interés medicinal: lactonas, flavonoides, terpenoides, esteroides, triterpenos, taninos y quinonas^{3,4,5}.

Dentro de las especies más estudiadas fitoquímicamente, podemos mencionar a la *B. manca*, *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* y *B. splendens*. En la Tabla N° 1, se muestran los principales compuestos aislados del género *Bauhinia*³.

Existen otras especies del género *Bauhinia* conocidas y muy usadas en medicina tradicional como *B. guianensis*, *B. monandra*, *B. holophylla* y *B. rufa*, de las cuales se encuentran pocos estudios de constitución química y actividad farmacológica³.

	Benzenoide	Galato de etilo
<i>B. tomentosa</i>	Flavonoides	Isoquercitrina; quercetina; rutina
<i>B. thonningii</i>	Lactona	Grifonilida
<i>B. uruguayensis</i>	Esteroides	Estigmasta-1,3,5-trieno; estigmasta-3,5-dieno; campesterol; estigmasterol; sitosterol; estigmasta-4,6-dien-3-ona; sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranósido; sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido; sitosterol-3-O- α -D-xiluronofuranósido; sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido
	Flavonoides	Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido; kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido
	Aminoácidos	Ácido aspártico; treonina; serina; ácido glutámico; prolina; glicina; alanina; valina; metionina; isoleucina; leucina; tirosina; fenilalanina; histidina; colina
<i>B. vahlii</i>	Esteroides	Campesterol; estigmasterol; sitosterol
	Flavonoides	Quercetina; quercetina-3-glucósido; kaempferol; agathisflavona
	Triterpenoides	Ácido botulínico
<i>B. megalandra</i>	Flavonoides	5,7,5'-trihidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona
<i>B. variegata</i>	Esteroides	Sitosterol
	Triterpenoides	Lupeol
	Flavonoides	Narigenina-5,7-dimetoxi-4-glucósido; kaempferol-3-galactósido; kaempferol-3-ramno-glucósido

2.1.3 Aspectos farmacológicos del género *Bauhinia*

Según los estudios bibliográficos realizados, se conoce muy poco respecto a la actividad farmacológica de las plantas del género *Bauhinia*.

Este género es frecuentemente estudiado en cuanto a su posible acción hipoglicemiante, ya que en la medicina popular son usadas para el tratamiento de la diabetes³. Además, otros efectos biológicos o farmacológicos que se han comprobado en las especies del género *Bauhinia* son: antifúngicos, antimaláricos, antioxidantes, antibacterianos y analgésicos^{3,6}.

Una de las plantas que ha sido estudiada en cuanto a su actividad hipoglicemiante es la *B. divaricata*, conocida en México como “pezuña de vaca”. Una infusión a 20 % de las hojas secas de esta especie, reduce en 39 % la glicemia inducida por la aloxana³.

Otra especie que presenta mayor número de estudios en cuanto a la actividad hipoglicemiante es la *B. forficata*, siendo considerada muchas veces por la comunidad rural como “pata de vaca”^{3,6}.

2.1.4 *Bauhinia guianensis*

Esta especie es una liana del bosque primario (selva baja), que presenta un tallo aplanado y ancho, con hendiduras que le dan un aspecto de escalera y hojas divididas en forma de uña de vaca⁶.

La especie vegetal fue clasificada por la Bióloga-Botánica Irma Fernández Valderrama, de la siguiente forma:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Bauhinia*

Especie: *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

Nombre común: “Escalera del mono” (Figura N° 1)

Se utiliza para combatir los malestares de los riñones y tuberculosis. También presenta actividad antioxidante, antimalárica, antimicrobiana, analgésico, antiinflamatorio y especialmente antidiabético^{3,6}.



Figura N° 1. Especie vegetal de *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.
(Foto <http://picasaweb.google.com/lh/photo/AUznDe-YXuDJ-ZdsDhTg3g>)

Respecto a los estudios químicos de la especie, se han realizado muy pocas investigaciones. Así, Viana et al.⁴ reportaron nuevos constituyentes de la corteza de los tallos de la *Bauhinia guianensis* Aubl. Los compuestos reportados fueron β -sitosterol, estigmasterol, 4'-hidroxi-7-metoxiflavano y la naftoquinona lapachol, obtenidos del extracto de diclorometano.

En otro trabajo, Viana et al.⁵ aislaron el estigmasterol y las naftoquinonas lapachol y dihidro- α -lapachona a partir del extracto bruto en acetato de etilo de la *B. guianensis* Aublet. (Figura N° 2).

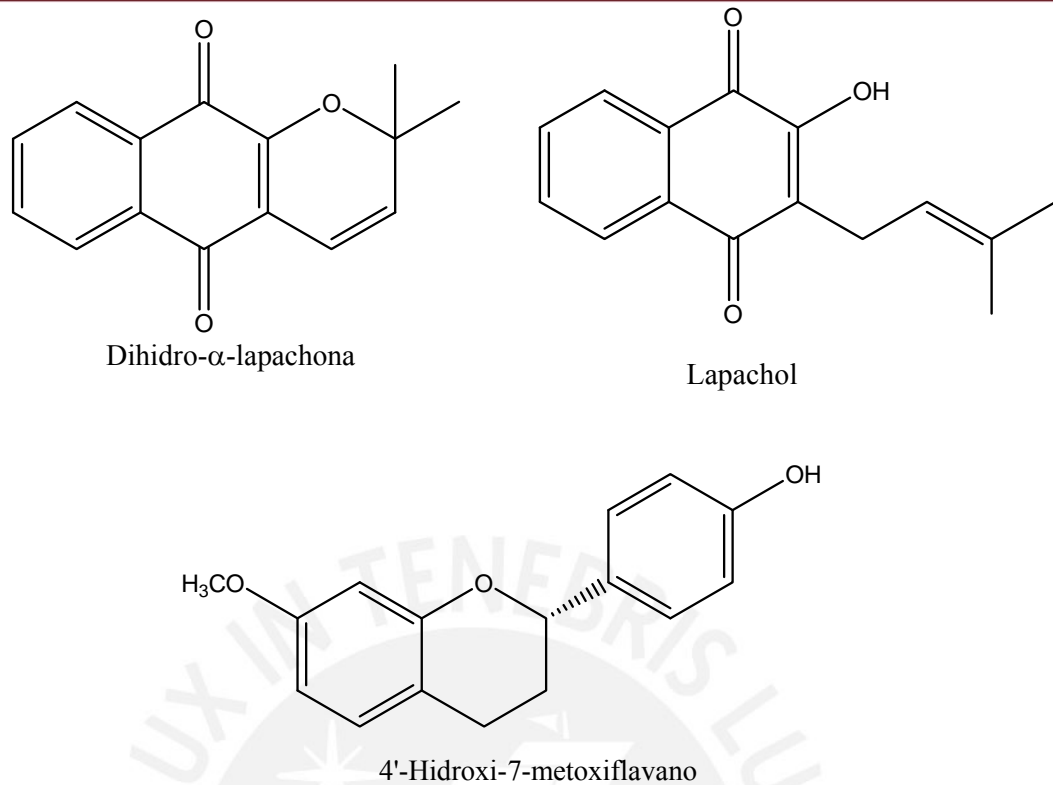


Figura N° 2. Compuestos presentes en la *Bauhinia guianensis*

2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.2.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas (átomos, iones o moléculas) con uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. Estos son muy reactivos y son producidos por el metabolismo celular normal o patológico^{7,8}.

Los aceptores de electrones así como el oxígeno molecular reaccionan fácilmente con los radicales libres, llegando a ser radicales ellos mismos (especies reactivas de oxígeno, ROS)^{9,10,11}.

Los reactantes más importantes en la bioquímica de los radicales libres en las células aeróbicas son el oxígeno y sus radicales derivados. Entre los ROS más importantes tenemos a $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, $RO\cdot$, $NO\cdot$, y las moléculas no-radicalarias $HOCl$, O_3 , H_2O_2 , O_2 ⁹.

La corta vida de las especies reactivas generadas *in situ* puede

generar una reacción en cadena. De esta manera, la peroxidación de membranas de lípidos a radicales orgánicos peróxidos se inicia con una reacción en cadena que se puede explicar por los efectos de ROS^{9,10,12}.

Muchas de las especies radicalarias cumplen funciones fisiológicas normales, pero si se generan en exceso pueden resultar muy tóxicas dañando al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos^{11,13}.

Existen fuentes endógenas de ROS como las mitocondrias, las peroxisomas, las células fagocitarias y el citocromo P450. Entre las fuentes exógenas tenemos la contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, reactivos y solventes industriales¹¹.

2.2.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables.

Por su modo de acción los podemos clasificar como: primarios y secundarios (o preventivos)⁷.

Antioxidantes primarios: son los que interrumpen la fase de propagación de los procesos radicalarios en cadena, generando un radical menos activo. Tenemos a los agentes captadores de radicales (radical scavengers) como los fenoles, cuya estructura en general debe poseer dos características importantes: la presencia de sustituyentes voluminosos en las dos posiciones vecinas al hidroxilo y, en la posición “*para*”, la presencia de algún grupo que contribuya a la deslocalización del electrón desapareado. Por ejemplo, tenemos a los compuestos fenólicos sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), fenoles naturales como flavonoides, cumarinas, lignanos, ácido cafeico, resveratrol, entre otros^{7,10,14}.

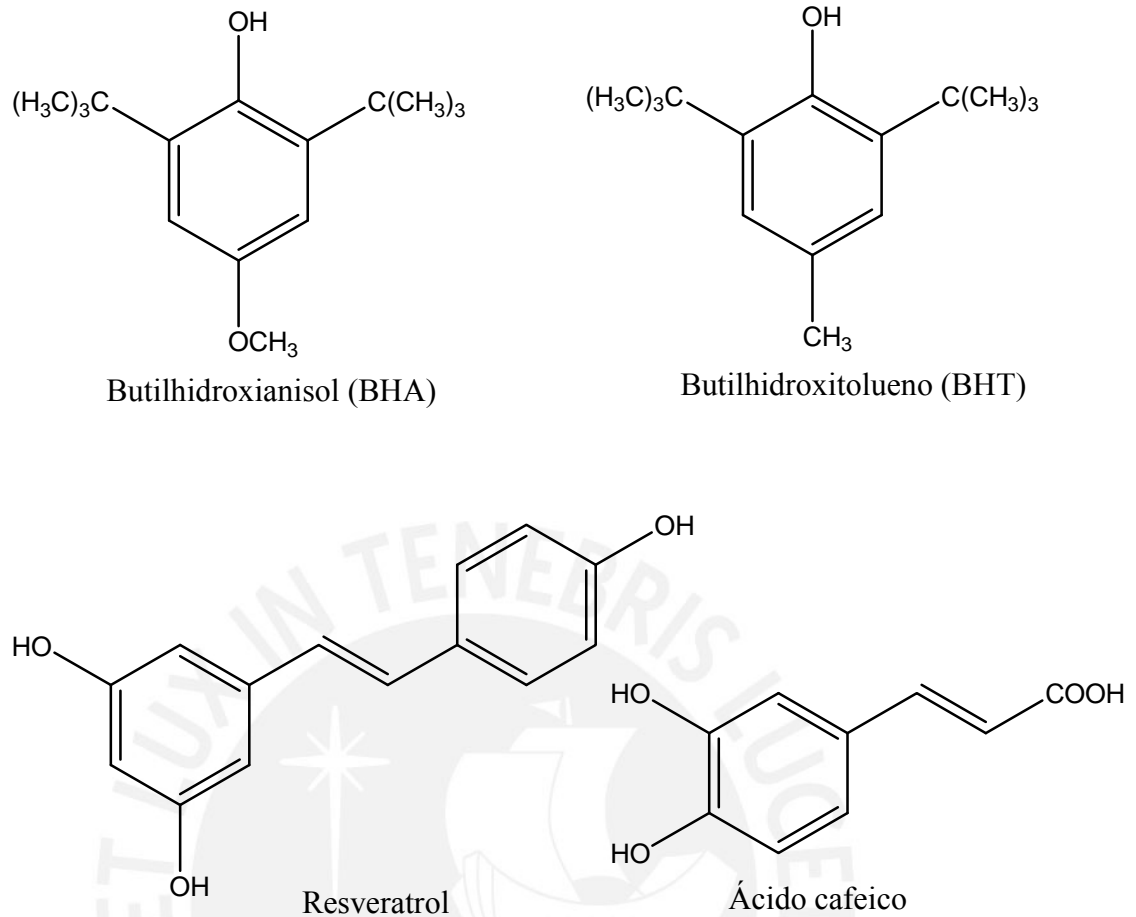


Figura N° 3. Agentes captadores de radicales (radical scavengers)

Antioxidantes secundarios (o preventivos): son los agentes quelantes los que actúan atrapando a los cationes metálicos que intervienen en la descomposición del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo, evitando así la formación de estos últimos¹⁴. En este grupo tenemos a la penicilamina, EDTA, y el profármaco dexrazoxano. También están incluidas las enzimas antioxidantes, las que actúan degradando al peróxido de hidrógeno como la glutatión peroxidasa, la catalasa y los fármacos que las mimetizan constituidos por ciertos complejos metálicos como los derivados del manganeso (SC 55858) y seleniuros (ebselen)^{7,15}.

Dentro de los antioxidantes primarios, los compuestos fenólicos son de ocurrencia natural en plantas y de mucho interés como

protectores de sistemas biológicos contra la oxidación^{16,17}. Estos compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Dada la naturaleza aromática de los compuestos fenólicos, ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo¹⁶.

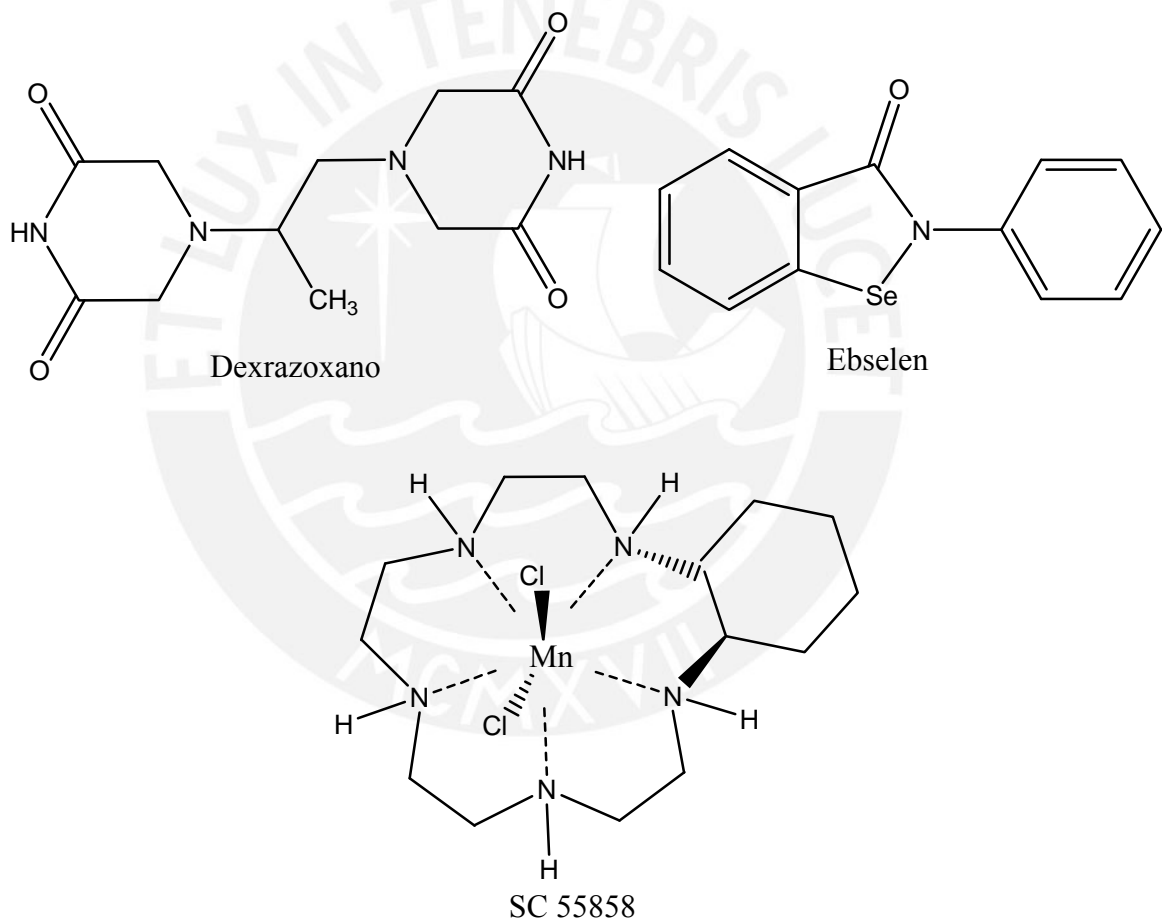


Figura N° 4. Antioxidantes secundarios o agentes preventivos

Los compuestos fenólicos que presentan propiedades antioxidantes, actúan como captadores de radicales libres y agentes quelantes¹⁸.

Los flavonoides son derivados fenólicos presentes en cantidades sustanciales en las plantas (0,5 - 1,5 %) ¹⁹, y tienen una amplia variedad de propiedades biológicas ²⁰. En la actualidad, los flavonoides tienen un considerable interés como componentes de la dieta humana y como agentes farmacológicos ^{20,21}.

A causa de la importancia de las plantas (productos derivados y sus extractos) en la nutrición de los humanos; sus actividades antioxidantes potenciales han sido siempre estudiadas desde que fueron descubiertos, existiendo así diversas investigaciones publicadas de diferentes tipos de especies vegetales ²²⁻³¹.

Los estudios de la distribución de compuestos marcados radioquímicamente revelaron que la mayor porción de flavonoides ingerido está presente en el tracto gastrointestinal, antes que ellos sean excretados en la bilis. Consecuentemente, es razonable asumir que la acción de los flavonoides como antioxidantes bioquímicos, toman lugar durante los procesos oxidativos en la digestión ¹⁹.

Químicamente, existen tres características principales que confieren a los flavonoides sus propiedades antioxidantes remarcadas ²⁷:

- El grupo hidroxilo unido al anillo aromático en la estructura del flavonoide, que permite a los flavonoides llevar a cabo una reacción redox, ayudando a capturar fácilmente a los radicales.
- Un sistema de deslocalización estable, conformado por anillos aromáticos y heterocíclicos con enlaces múltiples insaturados, lo que ayuda a deslocalizar a los radicales libre resultante, y
- La presencia de grupos estructurales capaces de formar complejos metal de transición-quelantes, y de esta manera puedan regular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Existen diversos métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de los flavonoides. Así, Jovanovic et al.¹⁹ estudiaron las propiedades antioxidantes de los flavonoides basados en las propiedades espectrales, ácido-base y redox de los radicales fenólicos derivados de los flavonoides seleccionados, como catequinas, hesperetina, hesperidina, quercetina, rutina, kaempferol, entre otros.

En otro trabajo, Born et al.¹⁸ utilizaron tres pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante: inhibición de oxidación de proteínas, inhibición de peroxidación de lípidos y, un tercer método electroquímico basado en la medición del potencial redox. Como resultado de este trabajo, se obtuvo que los compuestos catecoles (quercetina, verbascosida, ácido clorogénico, mangiferina y 1,3,6,7-tetrahidroxixantona) presentan buena actividad antioxidante.

Kook et al.⁹ reportaron procedimientos para evaluar la actividad antioxidante de aproximadamente 700 plantas de diversas familias. Los más utilizados fueron: método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y método de actividad para inhibición de xantina/xantina oxidasa. En particular varios compuestos flavonoides y otros compuestos polifenólicos fueron aislados de extractos de plantas mediante el fraccionamiento guiado por bioensayos e identificados como potentes antioxidantes.

Otras investigaciones que se han realizado en el Laboratorio de Química Orgánica de la Pontificia Universidad Católica del Perú, acerca de plantas medicinales, han estado orientadas a la evaluación de la actividad antioxidante e identificación estructural de compuestos (metabolitos secundarios) responsables de dicha actividad. Así, Castillo⁷ ha realizado el trabajo de investigación sobre la evaluación de la actividad antioxidante de 53 especies vegetales y el estudio químico y de actividad antioxidante de *Lepechinia meyenii*

(Walp.).

Resulta indispensable realizar investigaciones en este tema con la finalidad de estar en condiciones de proporcionar fuentes de antioxidantes naturales y hacer la identificación espectroscópica de los compuestos responsables de dicha actividad.

2.2.3 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante^{32,33,34}

Existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante de los compuestos, los que se clasifican en dos categorías:

La primera, mide la inhibición de la oxidación en un sistema modelo por monitoreo a los cambios asociados usando medios físicos, químicos o instrumentales.

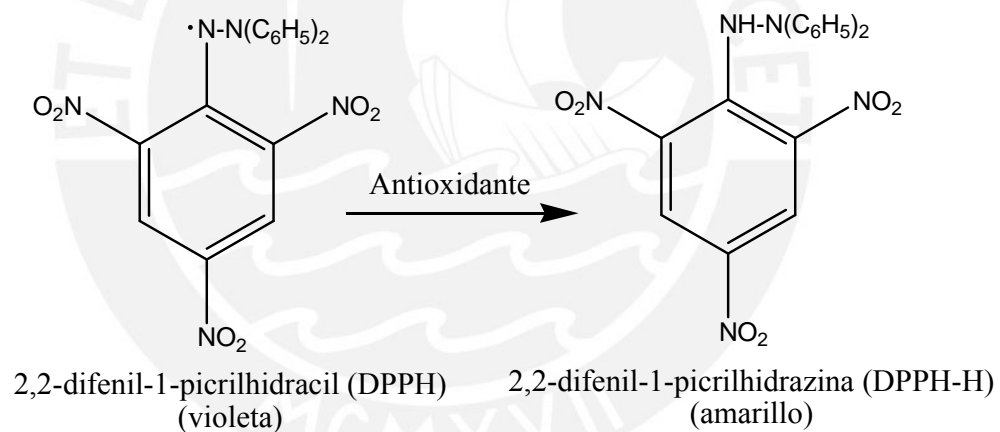
La segunda, involucra a los ensayos captadores de radicales, los cuales incluyen métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o transferencia de electrones (ET). Los ensayos ORAC (capacidad de absorber radicales oxígeno) y TRAP (parámetro antioxidante que atrapan los radicales totales), son los mejores métodos utilizados para medir el HAT. Los ensayos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox), FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) representan a los métodos basados en ET. Es interesante notar que el radical DPPH es usado en las pruebas de actividad antioxidante por su capacidad de abstracción de átomos de hidrógeno de polifenoles.

En el presente trabajo de investigación, la evaluación de la actividad antioxidante se realiza aplicando dos métodos: el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el método electroquímico, empleando la voltametría cíclica.

a) Neutralización del radical libre DPPH

El radical libre DPPH es estable y con él se mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta un máximo de absorbancia a 517 nm.

La reacción química consiste en que el radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto químico puro o extracto), y como consecuencia de esta reacción se desarrolla un cambio de color, de violeta a amarillo, al disminuir la concentración del radical libre. El cambio de intensidad se lee espectrofotométricamente después de 30 minutos de reacción³⁵⁻³⁸.



La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_{control}} \right\}$$

Donde,

- % AA : Porcentaje de actividad antioxidante
- A_m : Absorbancia de la muestra con DPPH
- A_b : Absorbancia del blanco de la muestra
- $A_{control}$: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(A_m - A_b)/A_{control}$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra (muestra pura o extracto).

Los extractos se clasifican por su actividad antioxidante (% AA) a la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ ³⁵, según como se muestra en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2. Clasificación de extractos por su actividad antioxidante

Categoría	% AA a $10 \mu\text{g/mL}$
G-I	(0 - 25 %)
G-II	(25,1 - 50 %)
G-III	(50,1 - 75 %)
G-IV	(75,1 % - más)

b) Voltametría cíclica

Este método consiste en la evaluación del potencial redox de los compuestos polifenólicos mediante la aplicación de un barrido de potencial, siendo posible cuantificar la respuesta dada en valores de corriente.

Los extractos y compuestos son disueltos a concentraciones de 0,3-1,0 mM, en una mezcla de etanol y un buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,4 (1:1). Las soluciones son purgadas con N_2 realizándose los experimentos en atmósfera inerte. Se obtienen los voltamogramas cíclicos (VC) a una velocidad de barrido de 50 ó 100 mV/s. El carbón vítreo es pulido antes de cada experimento utilizando una lija N° 1200 con la que se elimina la película polimérica formada durante el barrido potencioestático, la reproducibilidad del potencial del pico voltamétrico es del orden de $\pm 0,1 \text{ V}$, dependiendo del pretratamiento del carbón vítreo. Para cada compuesto se obtienen varios VC a partir del cual se obtiene el pico de oxidación con el potencial más bajo^{18,39-43}.

El potencial anódico (ϵ_{pa}) es una medida de la facilidad de oxidación del compuesto antioxidante (ROH), que se realiza mediante la reacción⁴⁰:



2.3 IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

Actualmente está plenamente establecido que las cinco técnicas espectroscópicas, a saber, la Espectrometría de Masas (EM), la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y de Carbono (RMN ^{13}C), la espectroscopía Infrarroja (IR) y la espectroscopía Ultravioleta (UV), son las herramientas principales para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos^{44,45}.

El alcance de cada método está dado por la cantidad de información útil obtenible de ella, lo cual es función no solamente de la cantidad total de información sino también de su facilidad de interpretación. Éste varía de problema a problema, y cada método tiene sus ventajas; sin embargo, podemos afirmar que la utilidad para este estudio disminuye en el orden⁴⁶:



2.3.1 Espectrometría de Masas, EM

La EM es un método de análisis que se basa en la determinación de masas de especies atómicas o moleculares individuales de la muestra analizada, lo que permite recabar información su naturaleza, su composición y sobre su estructura⁴⁷.

Una cantidad muy pequeña del compuesto analizar, bajo la forma más conveniente (gaseosa o similar), está ionizada: las

especies portadoras de carga eléctrica resultantes son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnético según el equipo. El estudio de las trayectorias seguidas, en un recipiente sometido al vacío, permite determinar la relación masa/carga (m/z) de los iones, así como, eventualmente, su naturaleza. Este método destruye el compuesto analizado, aunque sólo es necesaria una cantidad mínima, pero muestra una gran sensibilidad⁴⁷.

En un espectrómetro de masas, la ionización por bombardeo de electrones tiene el efecto de producir un ión de carga positiva (con un número impar de electrones, un catión radical) denominada “ión molecular” y se representa por $M^{\dot{+}}$. Además, estos iones que se encuentran en un estado excitado, poseen un exceso de energía, lo que provoca la fragmentación inmediata de mucho de ellos^{44,45,47}.

La ionización por electrospray, comienza por transformar la fase líquida móvil en una fina niebla acuosa que contiene la especie a analizar. La fase móvil puede aportar iones H^+ , según el pH de la disolución y contener cationes tales como NH_4^+ , Na^+ , K^+ . Las microgotas que se forman en el extremo de un fino capilar de sílice metalizado superficialmente son llevadas a un elevado potencial, el cual le confiere una importante densidad de carga. Por efecto de un gas seco, las gotitas se evaporan progresivamente perdiendo las moléculas del disolvente hasta tal punto que explotan expulsando moléculas del analito portadoras de diversas cargas⁴⁷.

Luego de la ionización, el espectrómetro de masas separa la mezcla de iones resultante de acuerdo a su relación de masa/carga, m/z , y se registra la abundancia relativa de cada fragmento iónico. El espectrómetro presenta estos resultados en una gráfica donde aparece las intensidades de los fragmentos iónicos positivos respecto a m/z (esto es, respecto a su masa, puesto que la carga de los iones es

unitaria); obteniendo así el espectro de masas^{44,45,46}.

A la señal (o pico) más intensa en el espectro, denominada “pico base” se le asigna un valor de 100 %, y las intensidades de los otros picos, incluyendo al ión molecular, son reportados como porcentaje del pico base.

La espectrometría de masas tiene dos aplicaciones importantes en el estudio de compuestos orgánicos⁴⁷:

- i La determinación de la masa molecular del compuesto analizado, en la cual su precisión es superior a cualquier otro método.
- ii La deducción de la estructura del compuesto a partir del análisis cuidadoso de los diversos fragmentos que constituyen el espectro de masas.

Actualmente, la espectrometría de masas (EM) se utiliza en el análisis de mezclas de compuestos orgánicos, a condición de separar previamente los compuestos de la mezcla. Los acoplamientos en línea, de equipos acoplados de cromatografía de gases-CG/EM y de cromatografía líquida-HPLC/EM, con diferentes procedimientos de ionización, constituyen una de las principales técnicas para analizar mezclas^{46,47,48}.

2.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN ¹H

Se conoce como RMN al proceso de absorción de energía que experimenta el núcleo de un elemento, en este caso el hidrógeno, cuando se le coloca en un campo magnético fuerte y simultáneamente se lo irradia con energía electromagnética⁴⁴.

Esta absorción de energía, al igual que todos los procesos que se llevan a cabo a escala atómica y molecular, está cuantizada: la absorción de energía sólo se verifica cuando la fuerza de campo

magnético y la frecuencia de radiación electromagnética (sobre un núcleo de hidrógeno particular) tienen valores específicos^{44,45}.

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (80, 200, 300, 500 u 800 MHz) mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando éste alcanza la fuerza correcta, los núcleos de hidrógeno absorben energía y se produce la “resonancia”. Esta absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado⁴⁵.

El espectro de RMN constituye la gráfica de la frecuencia de los picos de absorción (expresado δ , en partes por millón - ppm) en función de las intensidades de tales señales.

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las tres principales características que presentan estos espectros⁴⁷:

- i Los “desplazamientos químicos”, esto es la posición y número de señales diferentes que aparecen en el espectro: proporciona información sobre los diferentes tipos de hidrógeno en la molécula y el entorno químico de cada tipo de protón.
- ii La intensidad de cada señal, registrada experimentalmente por el equipo de RMN como una “integración”: nos indica el número de hidrógenos que corresponde a cada señal.
- iii El “acoplamiento spin-spin”, esto es la interacción entre hidrógenos vecinos, que se presenta en el espectro como divisiones de cada señal: nos indica el número de hidrógenos vecinos que tiene el protón que origina la señal.

Un espectro de RMN se considera plenamente identificado

cuando a cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar uno o un grupo de hidrógenos de la molécula en estudio. Esto es, a cada hidrógeno, o grupo de hidrógenos equivalentes de la molécula, debe corresponderle una señal en el espectro, que satisfaga los requerimientos de desplazamiento químico, integración e interacción spin-spin correspondientes^{44,45,46}.

2.3.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN ¹³C

La RMN ¹³C se ha convertido en la técnica principal para dilucidar la estructura de compuestos orgánicos. Mientras la RMN ¹H nos permite identificar los protones enlazados a la estructura de la molécula, la RMN ¹³C nos permite identificar los átomos de carbono; por ello, la RMN ¹³C es un complemento perfecto de la RMN ¹H para dilucidar la estructura completa de un compuesto^{44,45}.

Igual que en el isótopo de hidrógeno ¹H, el núcleo del isótopo de carbono-13, ¹³C, tiene un número de espín I=1/2 que permite utilizarlo, ya que dará una señal en espectroscopía de RMN y por ello, los principios físicos de la RMN ¹³C son los mismos que los de la RMN ¹H. Sin embargo, se presenta una diferencia, la RMN ¹H estudia al isótopo natural más común del hidrógeno, ¹H, cuya abundancia es del 99,98 % del total de hidrógenos. Por el contrario, la RMN¹³C estudia al isótopo de carbono menos abundante, al ¹³C, que constituye el 1,1 % del elemento carbono, lo que genera menor sensibilidad. Esta deficiencia deviene en una ventaja, en razón de que no se observan desdoblamiento del tipo ¹³C-¹³C en los espectros de RMN ¹³C, a pesar que dichos núcleos vecinos pueden desdoblar sus señales entre sí, pero la probabilidad que se encuentren dos núcleos de ¹³C resulta muy escasa^{44,46,47}.

Una desventaja de la baja abundancia isotópica del ^{13}C es que se hace necesario utilizar técnicas especiales que hacen que en el espectro, las áreas de los picos no sean proporcionales al número real de carbonos en la molécula. Por ello, la integración de la señal no se practica en la RMN ^{13}C ⁴⁴.

Otra desventaja es que debe utilizarse una cantidad de muestra mayor (aproximadamente 20 mg) que la requerida para obtener un espectro de RMN ^1H (aproximadamente 4 mg)⁴⁵.

Al igual que la RMN ^1H , la RMN ^{13}C proporciona información del entorno electrónico en el que se encuentra cada átomo de carbono en la molécula. Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son más o menos paralelos a los de la RMN ^1H . El compuesto de referencia, tetrametilsilano, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, TMS, absorbe a campo alto, mientras que los átomos de carbono aldehídico y carboxílico lo hacen a campos más bajos^{44,47}.

Los desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C son mucho mayores que los observados en la RMN ^1H , extendiéndose la zona de absorción en el rango de 0 a 250 ppm (δ) hacia campo bajo de la señal del TMS. Esto hace que los espectros de RMN ^{13}C sean más sencillos que los de hidrógeno, ya que en un espectro de ^{13}C es poco probable que se observen señales sobrepuestas⁴⁴.

Existen dos clases de espectros de RMN ^{13}C : en uno se observa los acoplamientos spin-spin $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (espectro acoplado a ^1H)^{44,48}, y en el otro no (espectro desacoplado a ^1H)^{44,48}.

Además, existe el método con secuencias de pulsos (45° , 90° y 135°) denominado **RMN ^{13}C -DEPT** (en inglés, “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”, es decir, transferencia por polarización aumentada y no distorsionada)⁴⁴. Este espectro permite distinguir el tipo de carbono CH_3 , CH_2 , CH o $\text{C}_{\text{cuaternario}}$, al que

pertenece una determinada señal. En particular, es especialmente útil para superar la confusión de un espectro de RMN ^{13}C acoplado a ^1H en el que se superponen las señales multipletes próximas. El experimento DEPT consta de tres espectros: un primer espectro registrado con pulsos de 45° (DEPT-45) en el que aparecen señales de CH , CH_2 y CH_3 ; un segundo espectro registrado con pulsos de 90° (DEPT-90) que solo muestra las señales de los carbonos unidos a un solo hidrógeno (CH); y por último un tercer espectro registrado con pulsos de 135° (DEPT-135) en el que aparecen señales positivas para CH y CH_3 , absorciones negativas para CH_2 , y en el que los carbonos cuaternarios carecen de señal^{44,48}.

2.3.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional

Existen diversos experimentos de resonancia magnética nuclear de dos dimensiones, y entre los más utilizados se encuentran los experimentos de RMN bidimensional homonuclear COSY, y de RMN bidimensional heteronuclear HETCOR.

Los experimentos bidimensionales, **COSY** y **HETCOR**, muestran dos ejes de coordenadas, los cuales están representados por desplazamientos químicos (δ , en ppm)^{44,48}.

a) Espectros ^1H - ^1H COSY

En los espectros ^1H - ^1H COSY se pueden observar la correlación de pares de núcleos de hidrógeno por medio del acoplamiento spin-spin, a través de un diagrama de entorno. En este diagrama, el espectro de hidrógeno aparece a lo largo de la diagonal, como manchas contorneadas, las cuales representan la intensidad de los picos. Fuera de la diagonal se observan otras manchas contorneadas, las cuales son el resultado de la correlación de pares de núcleos por

medio del acoplamiento spin-spin^{44,48}.

En principio este tipo de espectros abarca a los acoplamientos intensos (geminales y vecinales). Hay que notar que en los espectros ^1H - ^1H COSY, se muestran manchas contorneadas de menor intensidad con respecto a las examinadas. Estas manchas se deben a que también se pueden detectar interacciones entre núcleos enlazados a larga distancia (tres y hasta cuatro enlaces)^{44,48}.

b) Espectros ^1H - ^{13}C HETCOR

En los espectros ^1H - ^{13}C HETCOR, se correlacionan los picos del espectro de ^1H con los picos del espectro de ^{13}C . El espectro de ^1H es presentado en el eje axial vertical y el espectro de ^{13}C de banda ancha desacoplado está presente en el eje horizontal. La correlación de ^1H - ^{13}C se representa por un diagrama de entorno, al igual que los espectros de ^1H - ^1H COSY^{44,48}.

El arreglo bidimensional obtenido en este experimento permite asociar las señales del protón con las del carbono, de tal manera que fácilmente se identifica los protones enlazados a los carbonos de la molécula.

2.3.5 Espectroscopía Infrarroja, IR

La región del infrarrojo (IR), desde el punto de vista analítico, reagrupa una variedad de métodos no destructivos de identificación y determinación basados en la absorción o la reflexión, por parte de la muestra, de radiaciones electromagnéticas comprendidas entre 1 a 50 μm . Esta banda espectral se divide en IR cercano (1 - 2,5 μm) e IR medio (2,5 - 50 μm)⁴⁷.

Para realizar estos análisis se dispone de una variedad de instrumentos, desde espectrofotómetros de transformada de Fourier

hasta analizadores industriales de tipo dispersivo y no dispersivo⁴⁷.

En el IR, la absorción de la radiación por la materia tiene su origen en la interacción entre las radiaciones de la fuente luminosa y los enlaces químicos. Es decir, los átomos situados en dos extremos de un enlace están afectados por un movimiento de vibración, uno en relación al otro, y que si son diferentes forman un dipolo eléctrico que oscila a esta misma frecuencia. Si se irradia un determinado enlace no simétrico con una fuente luminosa monocromática, cuya frecuencia sea la misma que la frecuencia de vibración, se producirá una interacción con el dipolo eléctrico del enlace⁴⁷.

Las absorciones de la muestra pueden presentarse en un registro inicial, denominado espectro IR. Este espectro es una representación gráfica de la longitud de onda λ ó del número de onda σ , en el rango de radiación infrarroja (4000 a 200 cm^{-1}), en relación a la transmitancia (% T) o absorbancia (A) que presenta la muestra.

A diferencia de los espectros de masas y de RMN, los espectros IR aún de moléculas muy simples, pueden ser extremadamente complejos. Sin embargo, el químico orgánico toma ventaja de esta complejidad cuando compara el espectro de un compuesto desconocido con aquel de una muestra de referencia^{44,47}.

A pesar de esta complejidad y del hecho que el espectro IR es característico de toda la molécula, ciertos grupos de átomos (los grupos funcionales) originan bandas a, o cerca de, la misma frecuencia, sin importar la estructura del resto de la molécula, lo que permite al químico obtener útil información estructural acerca de los grupos funcionales presentes (por ejemplo: el grupo oxhidrilo OH, el grupo carbonilo C=O, etc.) mediante simple inspección del espectro y la referencia a las tablas de frecuencias de tales grupos^{44,47}.

2.3.6 Espectroscopía Ultravioleta, UV

La absorción de radiación UV por la materia ha sido frecuentemente estudiada desde un punto de vista fundamental. El origen de la absorción se debe a la interacción de los fotones incidentes con las especies de la muestra. De este modo, cuando una molécula aislada absorbe un fotón de la región UV, la energía de uno o varios electrones aumentan, produciéndose así numerosas transiciones⁴⁷.

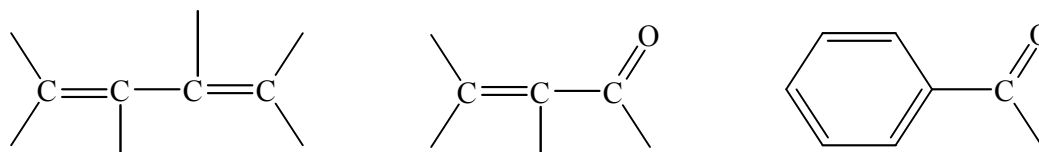
Generalmente, los espectrofotómetros UV-Vis están constituidos por tres partes diferenciadas: la fuente, el sistema dispersivo (frecuentemente un monocromador) y el detector. La muestra se coloca en el trayecto óptico antes o después del sistema dispersivo, dependiendo del tipo de detector⁴⁷.

Los equipos UV-Vis permiten obtener el espectro UV de un compuesto, el cual es una representación gráfica de la longitud de onda λ de absorción, en el rango de la radiación ultravioleta cercano (200 a 400 nm), en relación a la intensidad de absorción (expresada como absorbancia $A \times 100$; o absortividad molar $\log \epsilon$). El espectro UV consiste en una banda ancha de absorción extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición y su intensidad^{44,47}.

La posición de la absorción UV se especifica como $\lambda_{\text{máx}}$ (nm), es decir la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica^{44,47}.

Los espectros UV proporcionan menor información acerca de la estructura de los compuestos, que aquella proporcionada por los

espectros de masas y de RMN, y se aplica principal y prácticamente de manera exclusiva al estudio de sistemas conjugados, tales como⁴⁷:





3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Reactivos

El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) fue obtenido de Sigma. Los reactivos estándares rutina, quercetina, hidroxianisol butilado y resorcinol fueron obtenidos de Merck.

Los solventes: etanol, metanol, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, hexano, acetonitrilo y acetona fueron obtenidos de Merck.

Las placas para la cromatografía en capa delgada (CCD) fueron los cromatofolios de aluminio y silicagel: TLC - Kieselgel 60 GF₂₅₄ 15 µm (Art. 11678, Merck) y placas de fase reversa RP-18. F₂₅₄ (Art. 1.15683, Merck). Fueron revelados con luz UV (254 y 366 nm), con solución de H₂SO₄ 5 % en etanol con vainillina, con solución etanólica de DPPH (5 mg / 10 mL etanol 95 %) y con solución de NP 1 % en etanol (difenilboriloxietilamina) para identificar flavonoides.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando como fases estacionarias: Sílica gel 60 Merck (0,063 - 0,200 mm) y TLC - Kieselgel 60 GF₂₅₄ Merck (15 µm) para la cromatografía líquida con vacío (VLC)⁴⁹.

Para el análisis UV se utilizaron los reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio + ácido clorhídrico, ácido bórico + acetato de sodio (NaOAc). Estos fueron obtenidos de Merck y Sigma.

Todos los reactivos utilizados, incluyendo solventes, fueron de grado *para análisis*.

3.1.2 Instrumentación

Los extractos obtenidos fueron concentrados en un rotavapor a

40 °C y a presión reducida.

Los voltamogramas cíclicos (VC) fueron obtenidos utilizando un potenciostato Pineinstruments AFRDE5E conectado a una tarjeta A/D Cassy 524010 y un sistema de tres electrodos compuesto de carbón vítreo (electrodo de trabajo), platino (electrodo auxiliar) y Ag/AgCl/KCl 3,0 M (electrodo de referencia). La velocidad de barrido fue de 50 mV/s. Los VC fueron obtenidos bajo condiciones estándar: buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v). Este análisis se realizó en el Laboratorio de Investigación en Electroquímica Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Para el análisis de antioxidantes, empleando el método de DPPH, se utilizó el espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453E.

El EM fue obtenido en un espectrómetro de masas Esquire 6000 con ionización por electroespray (ESI). El flujo de la muestra fue de 240 μ L/h (5 ng /mL en Metanol:H₂O 50 %).

Los espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR fueron obtenidos en un equipo Bruker 300 UltraShield™ (300 MHz). El compuesto aislado fue disuelto en acetona deuterada: 20 mg de muestra x 0,6 mL de acetona.

El espectro IR fue obtenido en un Espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer - Serie 1600. La pastilla fue preparada con 1% de muestra en KBr.

El espectro UV fue obtenido en un Espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer - Lambda 2. La muestra fue preparada en metanol: 0,1 mg de muestra x 10 mL metanol.

Los análisis instrumentales (EM, RMN, COSY, HETCOR, IR y UV) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Instrumentación, Sección Química, Departamento de Ciencias de la Pontificia

Universidad Católica del Perú.

El punto de fusión fue obtenido en un equipo Fisher - Johns, ubicado en el Laboratorio N° 12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

3.1.3 Material vegetal

Para la selección de la especie vegetal con mayor actividad antioxidante, se trabajó con la corteza de tres especies: *Carpotroche longifolia* (Poepp.) Benth., *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. y *Campomanesia lineatifolia* (Ruiz & Pav.). Todos ellos fueron colectados en diferentes periodos de tiempo y depositados en el Laboratorio de Orgánica (Laboratorio N° 4) de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Para el estudio químico y de actividad antioxidante, se trabajó con la corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. que fue colectado en el Bosque Primario* del Puerto Almendras - Río Nanay, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, el 07 de diciembre del 2005. La especie vegetal fue identificada por la Bióloga-Botánica Irma Fernández Valderrama (ver Anexo N° 1).

La corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se secó a temperatura ambiente en la Provincia de Maynas, durante 8 días. La muestra seca se pulverizó a grano fino en un molino de platos en el Laboratorio de Química de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

* Coordenadas: S 03° 41' 50'' / W 73° 16' 55''.

3.2 SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.2.1 Extracción etanólica de tres especies vegetales

Se trabajó con la corteza de tres especies vegetales, a partir de las cuales se prepararon los extractos etanólicos.

La muestra seca y molida se extrajo con etanol por el método de percolación. El extracto obtenido fue concentrado en un rotavapor a 40 °C y a presión reducida hasta sequedad (ver Tabla N° 3).

Tabla N° 3. Peso de muestras secas y extractos etanólicos de especies vegetales

Especie vegetal	Peso de muestra seca (g)	Peso de extracto etanólico (g)
<i>Carpotroche longifolia</i> (Poepp.) Benth.	91,5	13,63
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	219,5	14,07
<i>Campomanesia lineatifolia</i> (Ruiz & Pav.)	780,0	20,67

3.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante

A los extractos obtenidos se evaluó la actividad antioxidante por el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), que fue estandarizado y validado a las condiciones del laboratorio.

Una muestra de 1 mg del extracto etanólico seco obtenido de las muestras vegetales, se disolvió en 10 mL de etanol al 95 %, a partir del cual se prepararon diluciones de 10 µg/mL y de 50 µg/mL.

Se prepararon soluciones de rutina y quercetina, como estándares, de 10 µg/mL y de 50 µg/mL a partir de 0,1 mg/mL de rutina en etanol al 95 % (ver Anexo N° 2).

Cada una de las diluciones de las muestras y estándares, se trataron con la solución de DPPH de la siguiente manera:

En viales, se colocaron 1,25 mL de las muestras y estándares preparados, a los que se les adicionó 0,5 mL de la solución de DPPH 0,3 mM en etanol al 95 %. Se dejó en reposo en ausencia de luz, a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 517 nm.

Se prepararon los blancos de las muestras y estándares, adicionando 0,5 mL de solución etanólica para cada una de las concentraciones. Se dejó en reposo durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 517 nm.

Finalmente se preparó un tubo control de DPPH en etanol (0,5 mL de la solución de DPPH 0,3 mM en 1,25 mL de etanol al 95 %), el que fue leído a 517 nm.

Para medir las absorbancias, se utilizó el espectrofotómetro UV-Visible. La actividad antioxidante se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_{control}} \right\}$$

Donde,

- $\% AA$: Porcentaje de actividad antioxidante
- A_m : Absorbancia de la muestra con DPPH
- A_b : Absorbancia del blanco de la muestra
- $A_{control}$: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(A_m - A_b)/A_{control}$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra (muestra pura o extracto).

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los tres extractos etanólicos se muestran en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos y estándares

Especie vegetal y estándar	Peso de extracto etanólico y estándar (mg)	Concentración (µg/mL)	Actividad antioxidante (%)
<i>Carpotroche longifolia</i> (Poepp.) Benth.	1,07	10 50	71,90 89,49
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	1,04	10 50	86,50 92,14
<i>Campomanesia lineatifolia</i> (Ruiz & Pav.)	1,04	10 50	55,88 92,26
Rutina	1,02	10 50	73,73 82,88
Quercetina	5,0	10 50	94,08 96,63

3.2.3 Clasificación de los extractos etanólicos

Los extractos etanólicos de las especies se clasificaron en cuatro grupos: G-I (0-25 %), G-II (25,1-50 %), G-III (50,1-75 %) y G-IV (75,1 % a más), dependiendo de los resultados de su actividad antioxidante (a la concentración de 10 µg/mL) determinado por el método de neutralización de radical libre DPPH. Los resultados se muestran en la Tabla N° 5.

Tabla N° 5. Clasificación de los extractos etanólicos según su actividad antioxidante

Categoría	Especie vegetal y estándar	% Actividad antioxidante (a 10 µg/mL)
G-III	<i>Carpotroche longifolia</i> (Poepp.) Benth.	71,90
G-IV	<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	86,50
G-III	<i>Campomanesia lineatifolia</i> (Ruiz & Pav.)	55,88
G-III	Rutina	73,73

De las tres especies vegetales, la *B. guianensis* presentó una actividad antioxidante de 86,50 y 92,14 % a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estos porcentajes de actividad antioxidante son mejores que los presentados por las otras especies incluyendo al estándar rutina.

Según la actividad antioxidante obtenida para los extractos etanólicos de las tres especies vegetales estudiadas (Tabla N° 4), la *Bauhinia.guianensis* var. *kuntiana* Aubl. presentó una mayor actividad antioxidante (G-IV, 86,50 %) a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Esto indicó que la especie contiene metabolitos secundarios con gran actividad antioxidante. Este criterio determinó la selección de la especie vegetal para el presente trabajo de investigación.

3.2.4 Fraccionamiento del extracto etanólico y evaluación de la actividad antioxidante de la especie seleccionada

Para determinar los tipos de compuestos responsables de la actividad antioxidante presentes en el extracto etanólico de la especie vegetal seleccionada, se realizó el fraccionamiento con solventes de distinta polaridad: hexano, acetato de etilo, metanol y agua. El extracto etanólico (1,0 g) de la *Bauhinia.guianensis* var. *kuntiana* Aubl. fue fraccionado según el esquema mostrado en la Figura N° 5.

Con esta separación se obtuvieron cuatro fracciones: hexánica (HE), metanólica (ME), acetato de etilo (AE) y acuosa (AC). Una quinta fracción de insolubles (IN), se obtuvo en el proceso de separación de la fase acuosa con acetato de etilo.

Los pesos obtenidos de cada una de la fracciones se muestran en la Tabla N° 6.

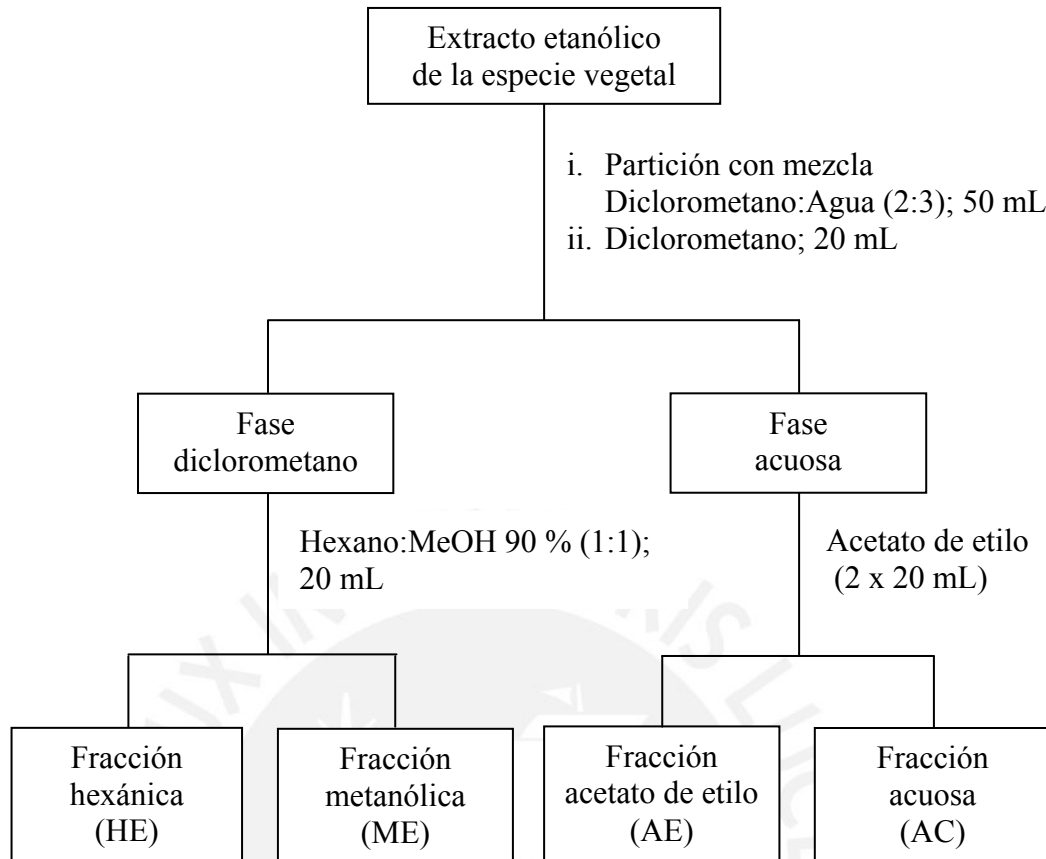


Figura N° 5. Fraccionamiento del extracto etanólico de la especie vegetal

Tabla N° 6. Peso de las fracciones obtenidas del extracto etanólico

Especie vegetal	Peso de extracto etanólico (g)	Código de fracción	Peso de fracción (mg)
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	1,0066	AE	111,6
		IN	268,3
		AC	579,3
		ME	14,7
		HE	65,7

Analizando los resultados de la Tabla N° 6, se observa que las fracciones: acuosa (AC), insolubles (IN) y acetato de etilo (AE)

presentaron una mayor masa en comparación con las otras fracciones, lo que se atribuye a la presencia de compuestos con polaridad relativamente altos.

A las cinco fracciones obtenidas de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se les evaluó la actividad antioxidante, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 7.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que los compuestos con mayor actividad antioxidante estaban presentes en las fracciones polares (acuosa y acetato de etilo) así como en la fracción de insolubles. Esto indica que los compuestos con mayor actividad antioxidante del extracto etanólico, de cada especie vegetal, son compuestos polares, lo que tendría una relación directa con los compuestos flavonoides, xantonas, quinonas y esteroides hidroxilados y glicosidados presentados en la bibliografía^{3,4}.

Tabla N° 7. Actividad antioxidante de las fracciones del extracto etanólico

Especie vegetal	Código de fracción	Peso de fracción (mg)	Concentración (µg/mL)	Actividad antioxidante (%)
<i>Bauhinia guianensis</i> var. <i>kuntiana</i> Aubl.	AE	1,04	10	88,50
			50	92,78
	IN	1,06	10	86,70
			50	90,04
	AC	1,00	10	70,38
			50	91,26
	ME	1,04	10	6,82
			50	70,55
	HE	0,99	10	-12,68
			50	-8,87

3.3 ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

Para realizar investigaciones en especies vegetales se ha establecido una metodología general (ver Anexo N° 3) que involucra varias etapas importantes.

3.3.1 Extracción sólido-líquido: Obtención del extracto bruto orgánico, EBO

a) Maceración con etanol

Una porción de la muestra seca y molida (950 g) se colocó en dos frascos de vidrio de 10 L y se adicionó a cada uno 4 L de etanol. Se agitó y se dejó macerar durante 2 días. La solución final adquirió un color marrón rojizo oscuro.

Se decantó y filtró el extracto a través de un embudo de vidrio de 20 cm de diámetro y papel de filtro “rápido” (Whatman 41), lavando este último con aproximadamente 20 mL del solvente usado.

A cada frasco que contenía al sólido residual, se le adicionó una nueva porción de 2 L de etanol y se dejó macerando durante 5 días. Se decantó y filtró el extracto utilizando papel de filtro “rápido”, obteniéndose un extracto de color marrón rojizo más claro que el primer extracto.

La muestra sólida residual se volvió a tratar de la misma manera 4 veces más, obteniéndose en el último extracto una solución de color pardo claro.

b) Eliminación del solvente

Todos los extractos orgánicos obtenidos se reunieron y concentraron en el rotavapor, a 40 °C y presión reducida, hasta sequedad, obteniendo así el Extracto Bruto Orgánico (EBO = 86,8 g), de color marrón oscuro.

3.3.2 Análisis cualitativo (marcha fitoquímica) del extracto bruto orgánico, EBO

La marcha fitoquímica preliminar se basa en el fraccionamiento de un extracto metanólico de la muestra vegetal estudiada en diferentes solventes y la identificación de los tipos de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

Muestra: 1,0 g EBO de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

Procedimiento: Reyna (1999)⁵⁰, de acuerdo a Rondina & Coussio (1969)⁵¹ (ver Anexo N° 4).

Resultados

Los resultados de la muestra analizada se detallan en el Anexo N° 5 y se resume a continuación:

- a) **Contiene:** Grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, flavonoides y saponinas.
- b) **No se detecta:** Aminogrupos primarios y/o secundarios, quinonas, alcaloides y catequinas.

3.3.3 Fraccionamiento biodirigido del extracto bruto orgánico, EBO

a) Obtención de fracciones

El fraccionamiento del extracto bruto orgánico, EBO, (80 g) fue realizado en dos etapas (40 g del extracto etanólico por cada etapa), según el esquema mostrado en la Figura N° 6.

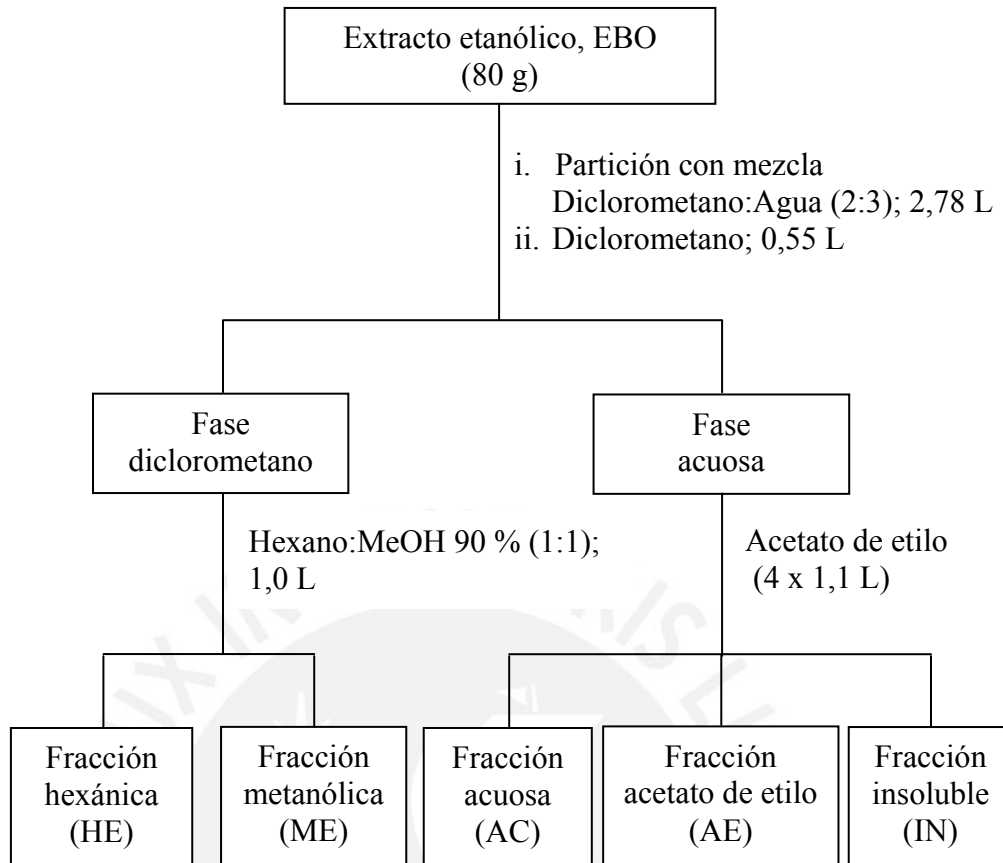


Figura N° 6. Fraccionamiento del extracto etanólico de la *Bauhinia guianensis*

Siguiendo el fraccionamiento, se obtuvieron cinco fracciones: hexánica (HE), metanólica (ME), acetato de etilo (AE), insoluble (IN) y acuosa (AC). Los pesos obtenidos de cada una de la fracciones se muestran en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Peso de fracciones del extracto etanólico, EBO, de la *Bauhinia guianensis*

Peso de extracto etanólico (g)	Código de fracción	Peso de fracción (g)
80,0	ME	1,7
	HE	1,2
	AE	13,2
	AC	31,7
	IN	32,2

Según los resultados de la Tabla N° 8, se observa que las fracciones de acetato de etilo (AE), acuoso (AC) e insolubles (IN), presentan una mayor masa en comparación con las otras fracciones, lo que indica que las especies contiene gran cantidad de compuestos con polaridad relativamente altos.

b) Pruebas específicas

Para la detección de flavonoides en especies vegetales, se realizan diferentes ensayos específicos de coloración

Siguiendo el procedimiento de Shinoda, se realizaron las pruebas específicas para determinar la presencia de flavonoides.

Se colocaron 0,5 g de cada muestra (EBO y fracciones) en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y se adicionaron 2,0 mL de solvente para su disolución. Luego, se agregaron 1,0 mL de ácido clorhídrico concentrado y limaduras de magnesio. Después de dejar en reposo los tubos por 5 minutos, se adicionaron 1,0 mL de alcohol amílico a cada tubo, se agitaron y se dejaron en reposo nuevamente. Se observó el color de la fase amílica. Una coloración roja o rosada en la fase amílica indicó la presencia de flavonoides (excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

Asimismo, se realizaron otros ensayos más específicos para identificar varias clases de flavonoides (ver Anexo N° 6).

Los resultados del análisis que se muestran en la Tabla N° 9, indican la presencia de flavonoides (flavanonas, flavanonoles y flavonoles) en la fracciones de acetato de etilo (AE) e insoluble (IN), principalmente¹⁶.

Tabla N° 9. Pruebas específicas de flavonoides para fracciones del EBO

Código de fracción	Resultado	Compuestos	Observación (color de la fase amilica)
ME	+	Flavonas, isoflavonas	amarillo claro
HE	-	No contiene	verde claro
AE	+	Flavanonas, flavanonoles, flavonoles	rojo oscuro
AC	-	No contiene	anaranjado claro
IN	+	Flavanonas, flavanonoles, flavonoles	rojo oscuro
EBO	+	Flavonas, isoflavonas, flavanonoles, flavonoles	anaranjado

c) Evaluación de la actividad antioxidante

Método de neutralización del radical libre DPPH

Según el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), se evaluó la actividad antioxidante de 4 compuestos estándares a las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 10. A la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, la quercetina y la rutina muestran una mayor actividad antioxidante (94,68 y 73,83 %, respectivamente) en comparación al BHA y el resorcinol que presentaron una actividad antioxidante de 71,49 % y 12,98 %, respectivamente (Tabla N° 10).

Asimismo, se evaluó la actividad antioxidante del EBO, y sus fracciones, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 11, donde se observa que el EBO presentó una alta actividad antioxidante de 87,02 %. Las fracciones acetato de etilo (AE) e insoluble (IN) mostraron una actividad antioxidante de 88,52 y 84,83 %, respectivamente.

Tabla N° 10. Actividad antioxidante de estándares

Estándar	Código de estándar	Peso de fracción (mg)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad antioxidante (%)
Quercetina	QUER	5,0	10	94,68
			50	97,63
Rutina	RUT	5,1	10	73,83
			50	84,79
Hidroxianisol butilado	BHA	5,0	10	71,49
			50	86,12
Resorcinol	RESOR	5,0	10	12,98
			50	35,79

Según los porcentajes de actividad y la clasificación de extractos, el EBO y las fracciones mencionadas se clasifican en el grupo G-IV (75,1 % a más, clasificación de extractos por su actividad antioxidante a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla N° 11. Actividad antioxidante del EBO y sus fracciones

Código de muestra	Peso de fracción (mg)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad antioxidante (%)
EBO	5,0	10	87,02
		50	93,14
AE	5,0	10	88,52
		50	92,92
IN	5,0	10	84,83
		50	91,79
AC	5,1	10	70,41
		50	91,27
ME	5,1	10	6,92
		50	69,76
HE	5,0	10	-12,98
		50	-8,09

Método por voltametría cíclica

Se obtuvieron los VC de los compuestos estándares. Estos compuestos se clasifican en dos grupos¹⁸:

Catecoles. Este primer grupo de compuestos está formado por la quercetina y la rutina. Estos compuestos tiene en común un grupo catecol (dos -OH adyacentes), el cual es electroquímicamente activo.

En el VC (Figura N° 7), la quercetina presenta un ε_{pa} de 0,156 V debido a la oxidación de los -OH del grupo catecol, mientras que la rutina mostró un ε_{pa} de 0,227 V.

Fenoles. El segundo grupo está formado por el hidroxianisol butilado, BHA y el resorcinol. Estos compuestos tienen al menos un grupo fenólico y mostraron un pico de oxidación a un potencial ε_{pa} que varía entre 0,4 - 0,7 V.

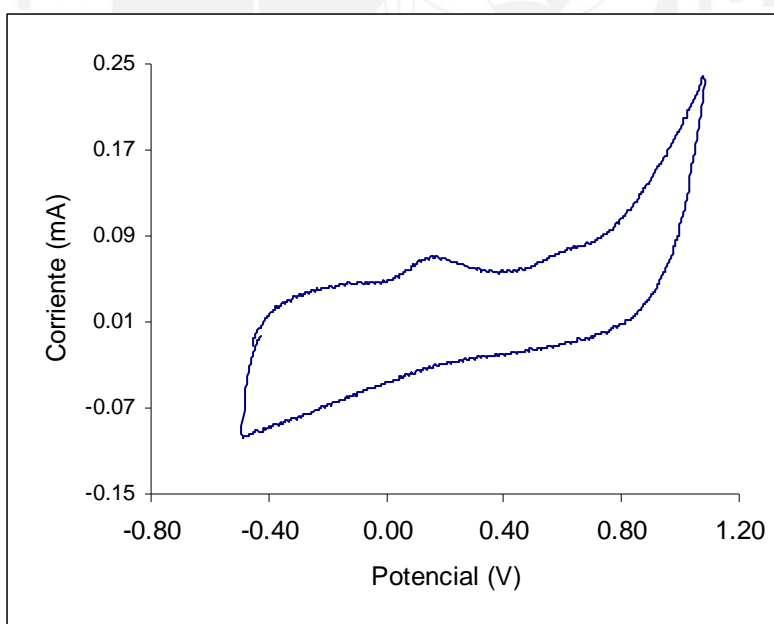


Figura N° 7. Voltamograma cíclico de la quercetina en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

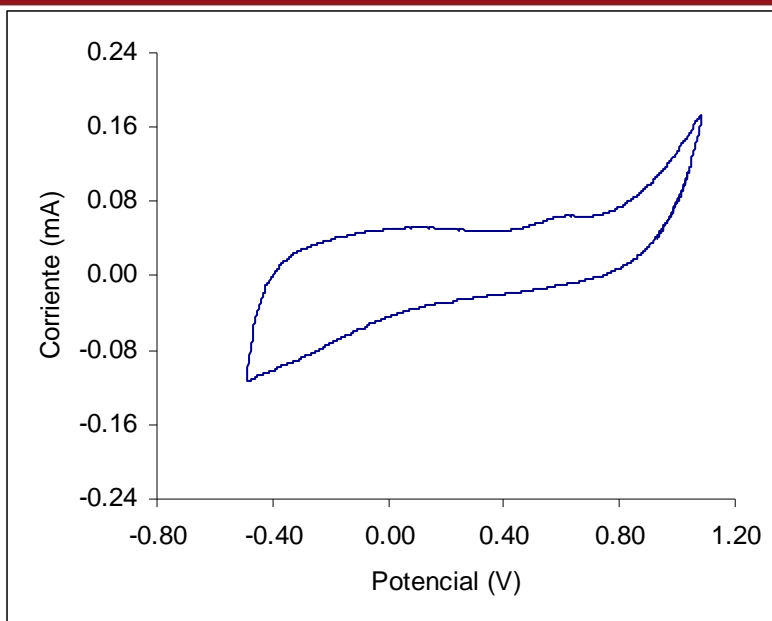


Figura N° 8. Voltamograma cíclico del resorcinol en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

En el VC, el BHA presentó un ε_{pa} de 0,618 V debido al grupo fenólico presente en la estructura. El resorcinol (Figura N° 8) muestra un ε_{pa} de 0,638 V, debido a la presencia del grupo fenólico (1,3-dihidroxi).

Los resultados de los potenciales de oxidación de los compuestos estándares se muestran en la Tabla N° 12.

Tabla N° 12. Potencial de oxidación de los polifenoles sintéticos medidos bajo condiciones estándar

Estándar	Código de estándar	Potencial de oxidación ε_{pa} (V)
Quercetina	QUER	0,156
Rutina	RUT	0,227
Hidroxianisol butilado	BHA	0,618
Resorcinol	RESOR	0,638

Asimismo, se obtuvieron los VC del EBO y sus fracciones de la *Bauhinia guianensis*:

Según el VC, el extracto alcohólico (EBO) con un potencial de oxidación ε_{pa} de 0,171 V (Figura N° 9), pertenece al primer grupo, por lo que presenta compuestos con grupos catecólicos.

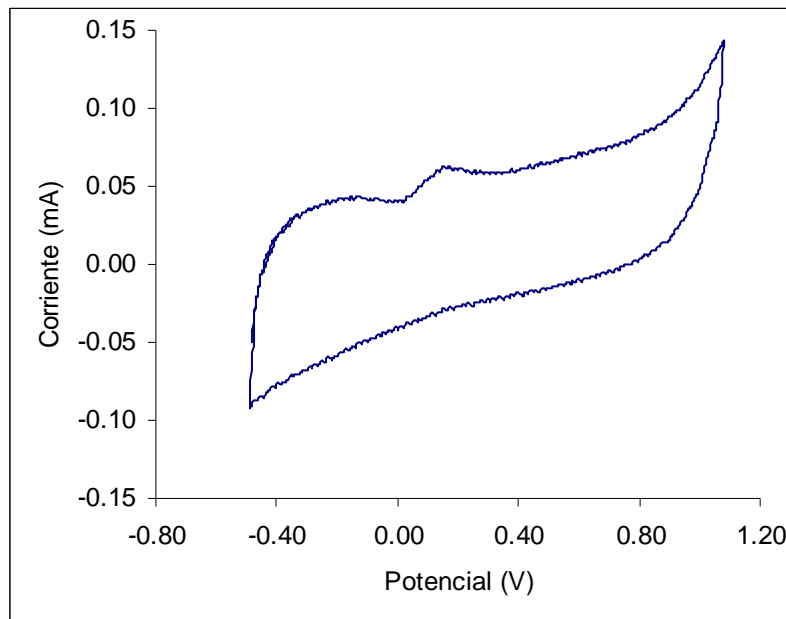


Figura N° 9. Voltamograma cíclico del EBO en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

Según la Tabla N° 13, las fracciones derivadas del EBO: fracciones de acetato de etilo (AE) e insoluble (IN), presentan un potencial de oxidación ε_{pa} menor a 0,200 V (Figura N° 10), por lo que son clasificados dentro del primer grupo (catecólicos).

Los VC de las fracciones acuosa (AC) y metanólica (ME), muestran un ε_{pa} de 0,494 V y 0,624 V, respectivamente, clasificándose dentro del segundo grupo (fenólicos).

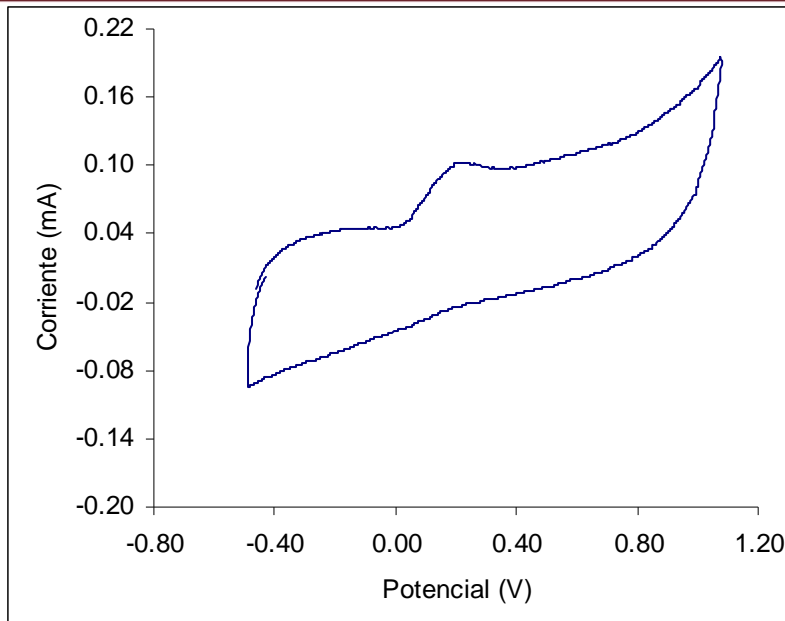


Figura N° 10. Voltamograma cíclico de la fracción de acetato de etilo (AE) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

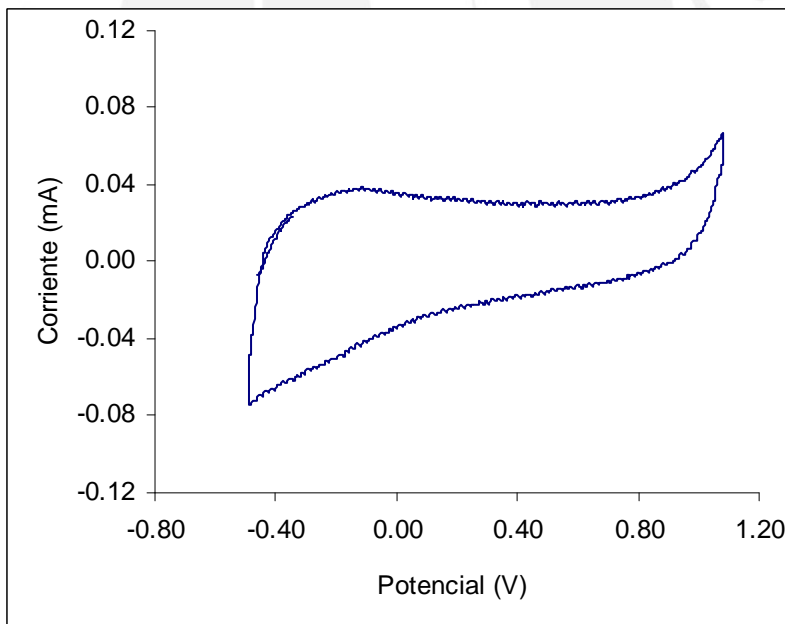


Figura N° 11. Voltamograma cíclico de la fracción de hexano (HE) en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

La fracción de hexano (HE), según el VC (Figura N° 11), no presentó ningún pico de oxidación, por lo que esta fracción es electroquímicamente inactiva.

Los compuestos examinados mostraron una relación cualitativa entre la estructura molecular, el primer potencial de oxidación y la actividad antioxidante.

La clasificación química en catecoles, fenoles y no fenoles, está relacionada con la medición de su potencial de oxidación por voltametría cíclica y en la actividad antioxidante según el análisis por DPPH.

Tabla N° 13. Potencial de oxidación del EBO y sus fracciones medidos bajo condiciones estándar

Código de muestra	Potencial de oxidación ϵ_{pa} (V)
EBO	0,171
AE	0,147
IN	0,174
AC	0,494
ME	0,624
HE	Sin picos

El primer grupo examinado corresponde a los catecoles, quienes mostraron un potencial de oxidación más bajo que 0,300 V. Estos compuestos fueron también los más activos en la prueba de antioxidantes de DPPH a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Tablas N° 14 y 15).

El segundo grupo analizado corresponde a los fenoles quienes mostraron un potencial de oxidación mayor a 0,400 V.

Tabla N° 14. Relación entre el potencial de oxidación y la actividad antioxidante de los compuestos estándares

Grupo	Estándar	Código de estándar	Potencial de oxidación ϵ_{pa} (V)	Actividad antioxidante (%)
Grupo 1 Catecoles	Quercetina	QUER	0,156	94,68
	Rutina	RUT	0,227	73,83
Grupo 2 Fenoles	Hidroxianisol butilado	BHA	0,618	71,49
	Resorcinol	RESOR	0,638	12,98

Tabla N° 15. Relación entre el potencial de oxidación y la actividad antioxidante del EBO y sus fracciones

Grupo	Muestra	Código de muestra	Potencial de oxidación ϵ_{pa} (V)	Actividad antioxidante (%)
Grupo 1 Catecoles	Extracto bruto orgánico	EBO	0,171	87,02
	Acetato de etilo	AE	0,147	88,52
	Insoluble	IN	0,174	84,83
Grupo 2 Fenoles	Acuoso	AC	0,494	70,41
	Metanol	ME	0,624	6,92
Grupo 3 No fenoles	Hexano	HE	Sin picos	-12,98

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla N° 15, la fracción de acetato de etilo (AE) presentó una buena actividad antioxidante, lo que lo clasifica como promisorio para obtener al compuesto responsable de esta actividad.

3.3.4 Separación cromatográfica biodirigida de la fracción de acetato de etilo, AE

El objetivo de este procedimiento cromatográfico fue obtener la fracción enriquecida, preferiblemente pura, del compuesto con mayor actividad antioxidante.

A partir de la fracción de acetato de etilo (AE) obtenida del extracto bruto orgánico (EBO), se realizó la separación cromatográfica, según el esquema mostrado en la Figura N° 12.

La fracción AE (3,0 g) fue separada mediante una VLC eluída inicialmente con cloroformo (CHCl_3) y luego se aumentó la polaridad del eluyente por la adición gradual de metanol (MeOH). Se obtuvieron 19 fracciones que, luego de ser analizadas por CCD fueron reunidas en 9 grupos de fracciones. Para evaluar la actividad antioxidante, se realizó una CCD para los grupos obtenidos y revelados con solución de DPPH. Se obtuvieron 2 grupos g3 - g4 (187 mg) con buena actividad antioxidante (manchas amarillas intensas). A estos grupos obtenidos (g3 - g4) se les realizó una segunda separación cromatográfica en una columna con sílica gel 60 eluída inicialmente con cloroformo (CHCl_3), luego con acetato de etilo (AcOEt) y metanol a diferentes concentraciones hasta metanol puro, tal como se muestra en la Figura N° 12. Se obtuvieron 50 fracciones y luego de ser analizadas por CCD se reunieron en 18 grupos de fracciones. La actividad antioxidante de estos grupos fue evaluada mediante CCD y revelados con solución de DPPH, mostrando manchas amarillas sólo en dos grupos. El grupo g7' (G1), presentó una sola mancha ($R_f = 0,47$) mediante CCD (CHCl_3 -AcOEt 2:3), lo cual nos indica una aparente pureza conteniendo al compuesto antioxidante. El otro grupo g8'- g9' presentó tres manchas ($R_{f1} = 0,32$; $R_{f2} = 0,41$ y $R_{f3} = 0,48$), por lo que se realizó una

nueva separación cromatográfica según el esquema mostrados en la Figura N° 13.

La separación cromatográfica del grupo g8'- g9' (27 mg) se realizó en una columna con sílica gel 60 eluída con CHCl₃, mezclas de CHCl₃-AcOEt, AcOEt-MeOH en distinta proporción hasta MeOH puro. Se obtuvieron 26 fracciones, de las cuales sólo la fracción f6 (**G2**) con R_f= 0,48 (CHCl₃-AcOEt 2:3) presentó buena actividad antioxidante al ser analizados mediante CCD y revelados con solución de DPPH.

Finalmente, según CCD se reunieron las fracciones **G1-G2** (33 mg) y se realizó una separación cromatográfica de acuerdo al esquema mostrado en la Figura N° 14. La separación se realizó mediante una VLC eluída con un mezcla Hex-CHCl₃-Acetona (3:2:2), obteniéndose 20 fracciones que luego de ser analizadas por CCD (Hex-CHCl₃-Acetona 3:2:2) fueron reunidas en 6 grupos de fracciones. El grupo g2'' (**G3, 29 mg**), sólido de color crema (punto de fusión, p.f.= 216 °C), presentó buena actividad antioxidante frente al DPPH. Los otros grupos fueron obtenidos en pequeñas cantidades y dieron negativo ante DPPH. El análisis mediante CCD (CHCl₃-AcOEt 2:3) revelado con UV (254 nm) presentó una sola mancha de color púrpura oscuro. Asimismo, al ser revelado con solución de H₂SO₄ 5 % en etanol, se observó una mancha de color rojo oscuro (R_f= 0,48) lo que indica la presencia de un compuesto con aparente pureza. Se realizó la identificación de este compuesto con mayor actividad antioxidante **G3** mediante técnicas espectroscópicas.

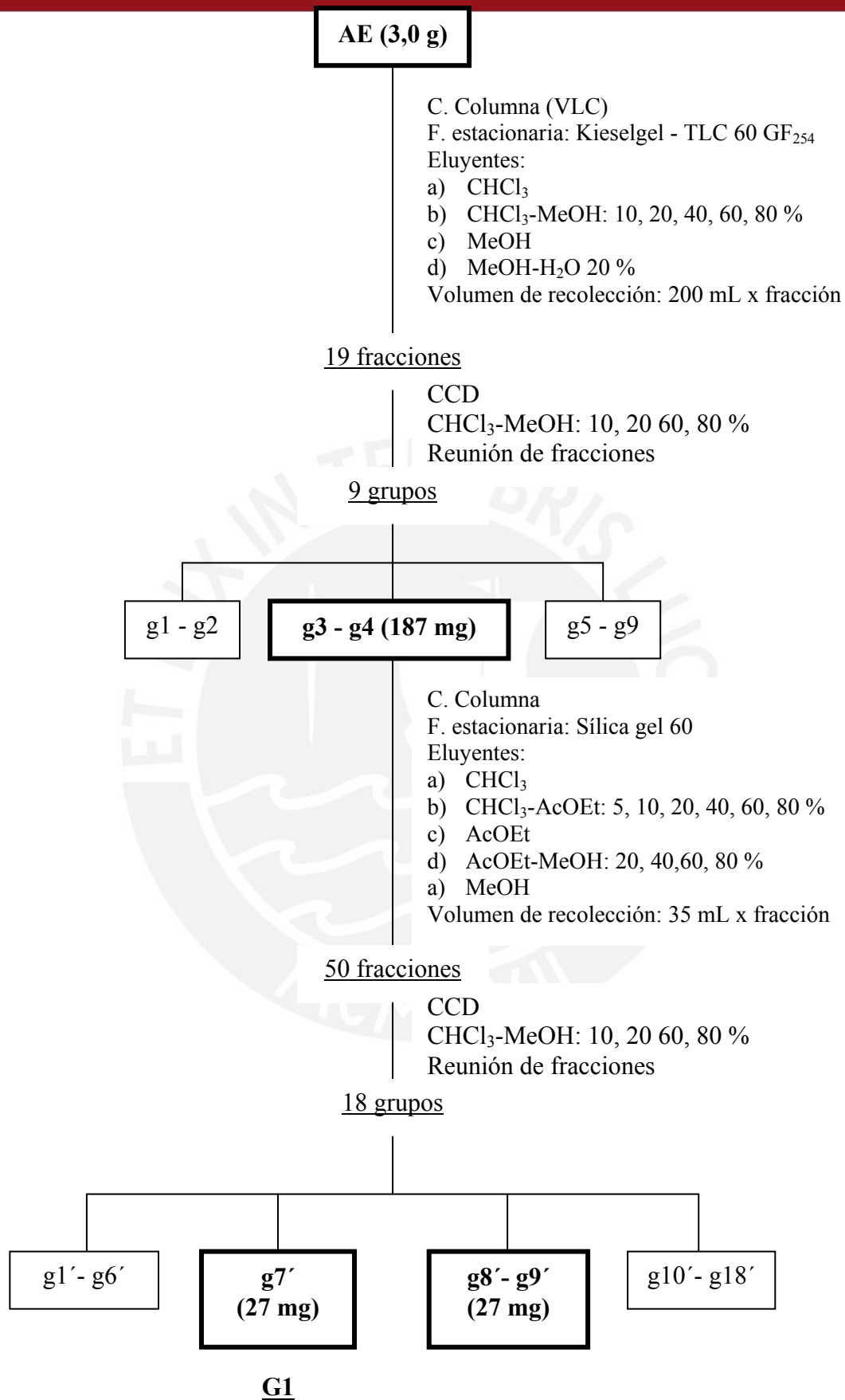


Figura N° 12. Separación cromatográfica de la fracción de acetato de etilo (AE)

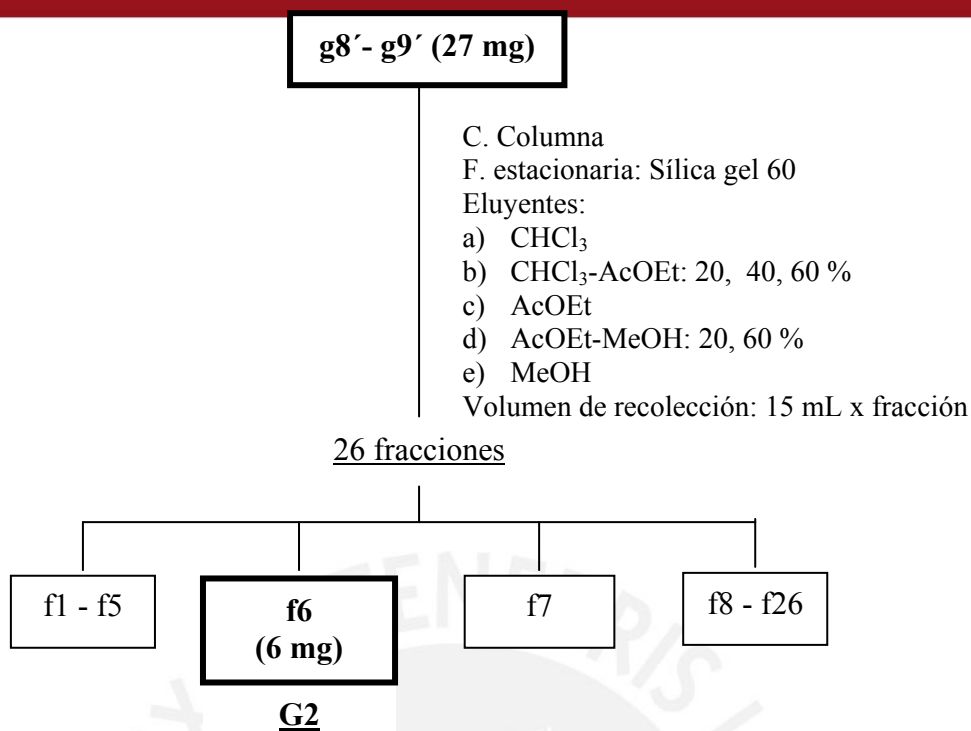


Figura N° 13. Separación cromatográfica de la fracción g8' - g9'

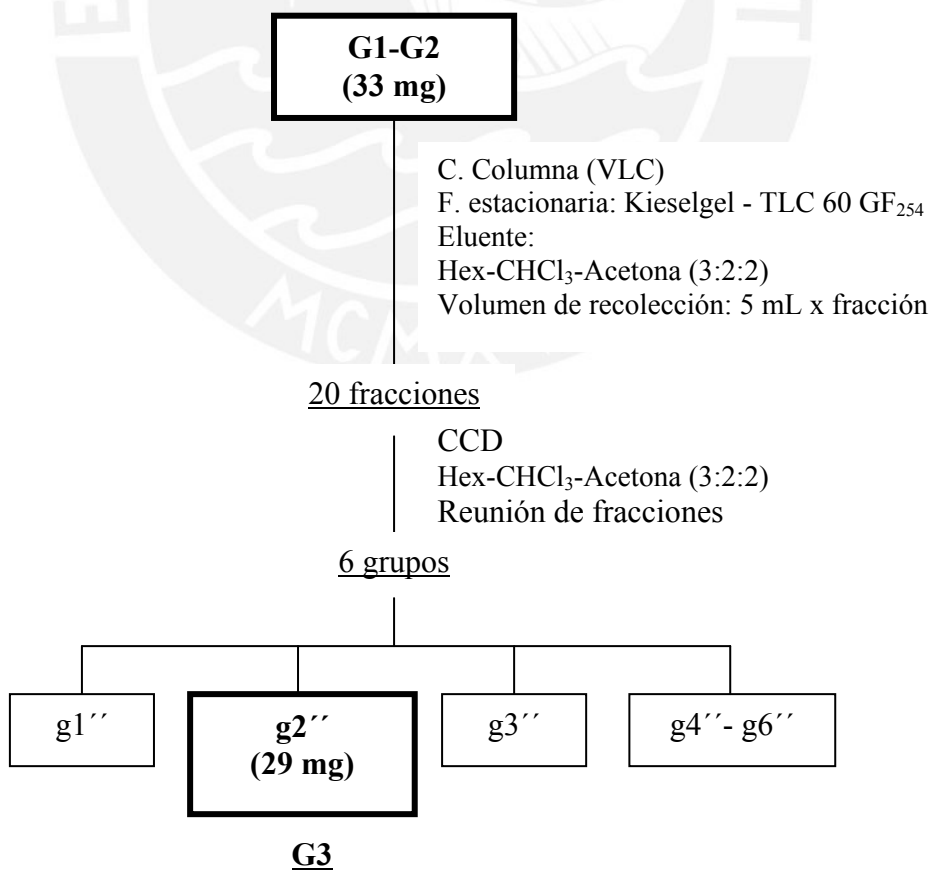


Figura N° 14. Separación cromatográfica de la fracción G1-G2

3.3.5 Identificación espectroscópica del principio activo con mayor actividad antioxidante

La determinación estructural del compuesto activo con mayor actividad antioxidante obtenida de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se realizó mediante el análisis de sus espectros de Masas, de RMN ^1H , de RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HETCOR, IR y UV.

La muestra analizada fue la fracción **G3** (29 mg) obtenida según el esquema mostrado en la Figura N° 14.

a) Espectro de masas, EM

Muestra: **G3**, Flujo de 240 $\mu\text{L}/\text{h}$ (5 ng /mL en Metanol:H₂O 50 %), analizada el 26.Oct.2009.

a.1 Características del espectro (Figura N° 17)

EM-ESI Positivo: m/z 289,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100 %)

m/z 311,1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 30,6 %)

EM-ESI Negativo: m/z 287,1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100 %)

m/z 289 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 271 (10,2 %), 179 (26,2 %), 163 (pico base, 100 %), 153 (46,1 %), 145 (14,1 %), 117 (6,01 %).

a.2 Análisis del espectro

Según la Figura N° 15, el espectro de masas EM-ESI positivo muestra el pico a m/z 289,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Asimismo, la Figura N° 16 muestra el espectro de masas EM-ESI Negativo que presenta el pico a m/z 287,1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$). De ambos espectros, el compuesto con mayor actividad antioxidante presenta un masa molecular de 288.

La identificación de los siete fragmentos iónicos en el espectro EM-ESI (Figura N° 17) corresponden a los picos m/z 289, 271, 179, 163, 153, 145 y 117.

a.3 Conclusión

El espectro de masas EM-ESI muestra picos que corresponden a la estructura básica de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.



MS/MS Automatic
Auto MS/MS off

Fragmentation Options

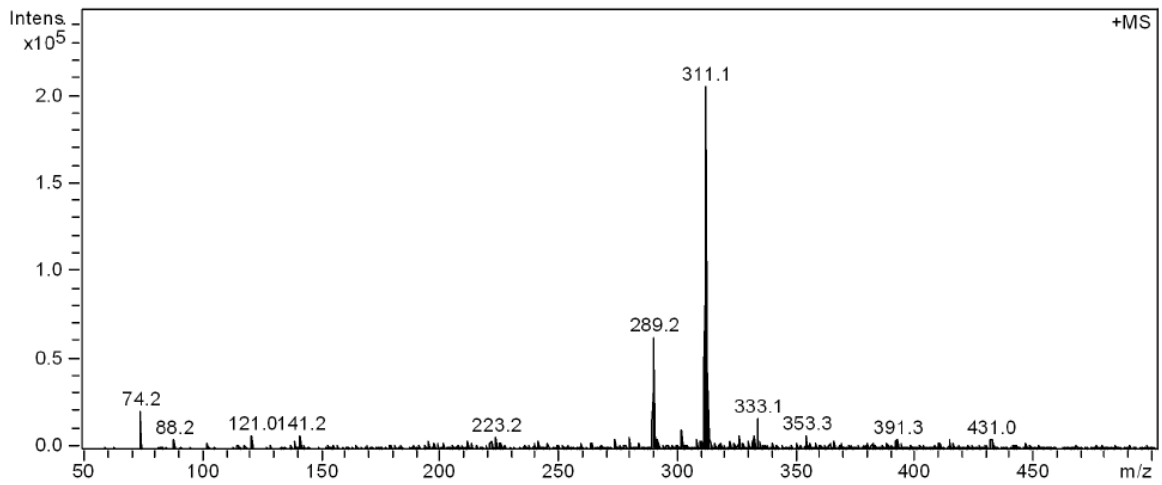


Figura N° 15. Espectro de masas del compuesto activo en modo ión positivo $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ con voltaje de capilar -4500 V

MS/MS Automatic
Auto MS/MS off

Fragmentation Options

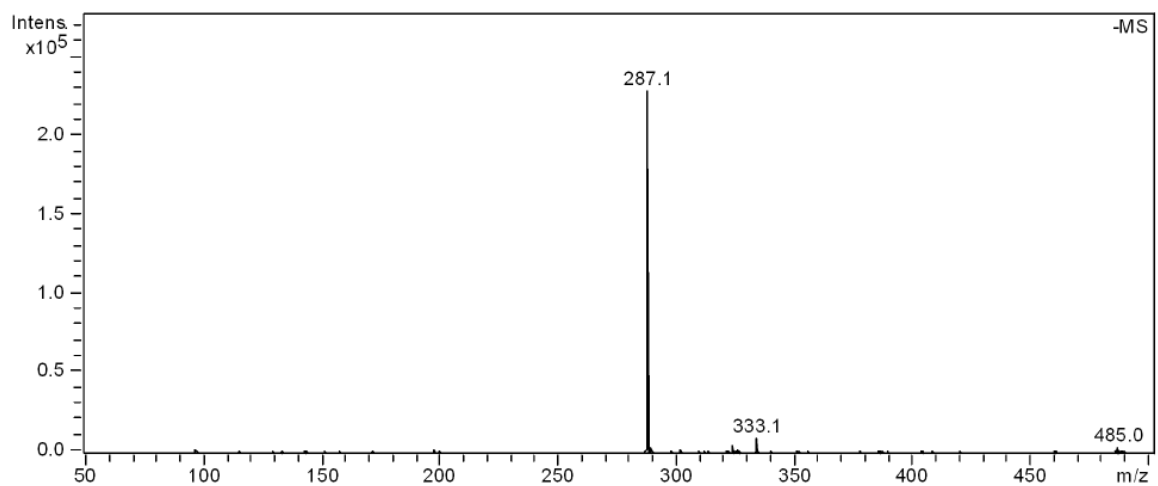


Figura N° 16. Espectro de masas del compuesto activo en modo ión negativo $[M-H]^-$ con voltaje de capilar +3500 V

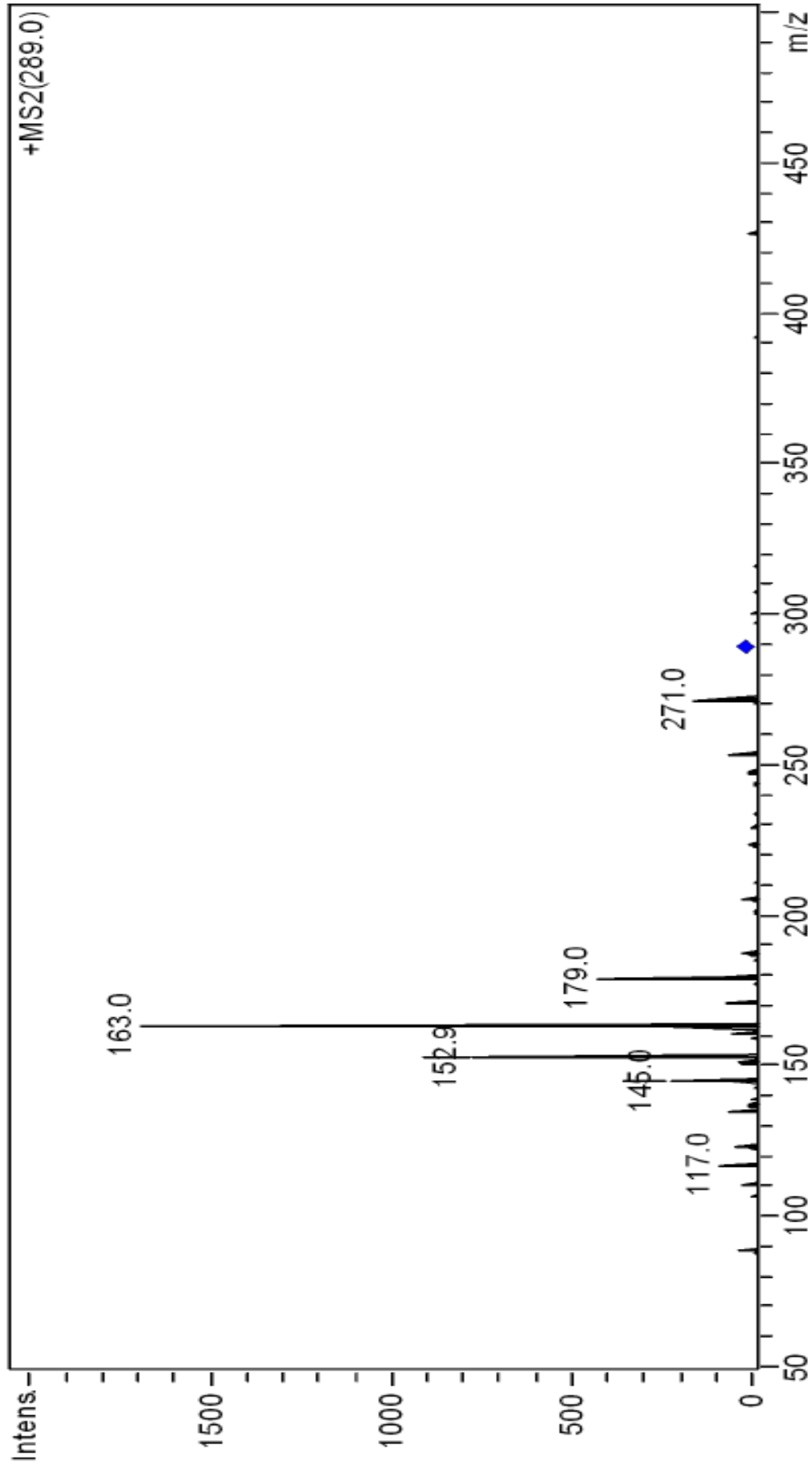


Figura N° 17. Espectro de masas del compuesto activo en modo ión positivo [M+H]⁺: 289 con voltaje de capilar de -4500 V obtenido de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

b) Espectro de RMN ^1H

Muestra: **G3** (20 mg de muestra x 0,6 mL de acetona deuterada),
analizada el 31.Ago.2009.

b.1 Características del espectro (Figura N° 18)

δ (ppm)	Características
2,72	<i>dd</i> , H-3eq, $J(3\text{eq}-2)$ 3,0; $J(3\text{eq}-3\text{ax})$ 17,1
3,14	<i>dd</i> , H-3ax, $J(3\text{ax}-2)$ 12,9; $J(3\text{ax}-3\text{eq})$ 17,1
5,40	<i>dd</i> , H-2, $J(2-3\text{eq})$ 3,0; $J(2-3\text{ax})$ 12,6
5,94	<i>d</i> , H-6, $J(6-8)$ 2,1
5,96	<i>d</i> , H-8, $J(8-6)$ 2,4
6,87	<i>m</i> , H-5'/H-6'
7,04	<i>m</i> , H-2'
8,53	<i>s</i> (OH), H-7/H-3'/H-4'
12,18	<i>s</i> (OH), H-5

b.2 Análisis del espectro

Según la Figura N° 18, el espectro RMN ^1H muestra 8 señales los cuales corresponden a 12 átomos de hidrógeno. La identificación de los diferentes tipos de hidrógenos correspondientes al compuesto activo se resume a continuación:

δ (ppm)	Tipo de Señal	Integración	Tipo de Hidrógeno
2,72	<i>dd</i>	1H	H (posición 3eq)
3,14	<i>dd</i>	1H	H (posición 3ax)
5,40	<i>dd</i>	1H	H (posición 2)
5,94	<i>d</i>	1H	H (posición 6)
5,96	<i>d</i>	1H	H (posición 8)
6,87	<i>m</i>	2H	H (posición 5' y 6')
7,04	<i>m</i>	1H	H (posición 2')
8,53	<i>s</i>	3H	OH (posición 7, 3' y 4')
12,18	<i>s</i>	1H	OH (posición 5)

b.3 Conclusión

El espectro RMN ^1H obtenido muestra señales que corresponden a la estructura básica de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.

c) Espectro de RMN ^{13}C

Muestra: **G3** (20 mg de muestra x 0,6 mL de acetona deuterada),
analizada el 31.ago.2009

c.1 Características del espectro DEPT (Figura N° 19)

DEPT-45 (Señales CH, CH₂ y CH₃)

δ (ppm): 43,54 (CH₂, C-3); 79,95 (CH, C-2); 95,83 (CH, C-8);
96,76 (CH, C-6); 114,72 (CH, C-2'); 116,02 (CH, C-5'); 119,26
(CH, C-6').

DEPT-90 (Señales CH)

δ (ppm): 79,95 (CH, C-2); 95,83 (CH, C-8); 96,76 (CH, C-6);
114,72 (CH, C-2'); 116,02 (CH, C-5'); 119,26 (CH, C-6').

DEPT-135 (Señales CH, CH₂ y CH₃)

i Señales hacia arriba (CH y CH₃):

δ (ppm): 79,95 (CH, C-2); 95,83 (CH, C-8); 96,76 (CH, C-6);
114,72 (CH, C-2'); 116,02 (CH, C-5'); 119,26 (CH, C-6').

ii Señales hacia abajo (CH₂):

δ (ppm): 43,54 (CH₂, C-3).

Observación.- En los espectros tipo DEPT no se registran carbonos cuaternarios.

c.2 Características del espectro RMN ^{13}C (Figura N° 20)

En este tipo de espectro aparecen todos los carbonos:

δ (ppm): 43,54 (*t*, C-3); 79,95 (*d*, C-2); 95,83 (*d*, C-8); 96,76 (*d*,
C-6); 103,23 (*s*, C-10); 114,72 (*d*, C-2'); 116,02 (*d*, C-5'); 119,26 (*d*,
C-6'); 131,57 (*s*, C-1'); 145,99 (*s*, C-3'); 146,36 (*s*, C-4'); 164,34 (*s*,
C-9); 165,27 (*s*, C-5); 167,28 (*s*, C-7); 197,25 (*s*, C-4).

c.3 Análisis del espectro DEPT

Según la Figura N° 19, el espectro DEPT-45 muestra 7 señales de átomos de carbonos, de los cuales 6 señales corresponden a átomos de carbono del tipo CH, que corresponderían a átomos de carbono cíclicos y aromáticos y una señal del átomo de carbono del tipo CH₂ cíclico.

Según el espectro DEPT-90, se muestran 6 señales que corresponden a átomos de carbonos del tipo CH. Asimismo, el espectro DEPT-135 muestra 7 señales de átomos de carbonos, de los cuales 6 señales corresponden a átomos de carbono del tipo CH (señales hacia arriba) y una señal que corresponde a un átomo de carbono del tipo CH₂ (señales hacia abajo).

c.4 Análisis del espectro RMN ¹³C

En el espectro de desacoplamiento de ¹H de banda ancha (Figura N° 20) se muestra 15 señales, las cuales corresponden a diferentes tipos de átomos de carbono del compuesto con mayor actividad antioxidante.

N° de átomo de carbono	Tipo de carbono	δ(ppm)
2	CH (CH-O, metino)	79,95
3	CH ₂ (metileno)	43,54
4	C (C=O)	197,25
5	C (C-OH, aromático)	165,27
6	CH (aromático)	96,76
7	C (C-OH, aromático)	167,28
8	CH (aromático)	95,83
9	C (aromático)	164,34
10	C (aromático)	103,23
1'	C (aromático)	131,57

2'	CH (aromático)	114,72
3'	C (C-OH, aromático)	145,99
4'	C (C-OH, aromático)	146,36
5'	CH (aromático)	116,02
6'	CH (aromático)	119,26

c.5 Conclusión

Los espectros DEPT y RMN ^{13}C obtenidos muestran señales que corresponden a la estructura básica de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.



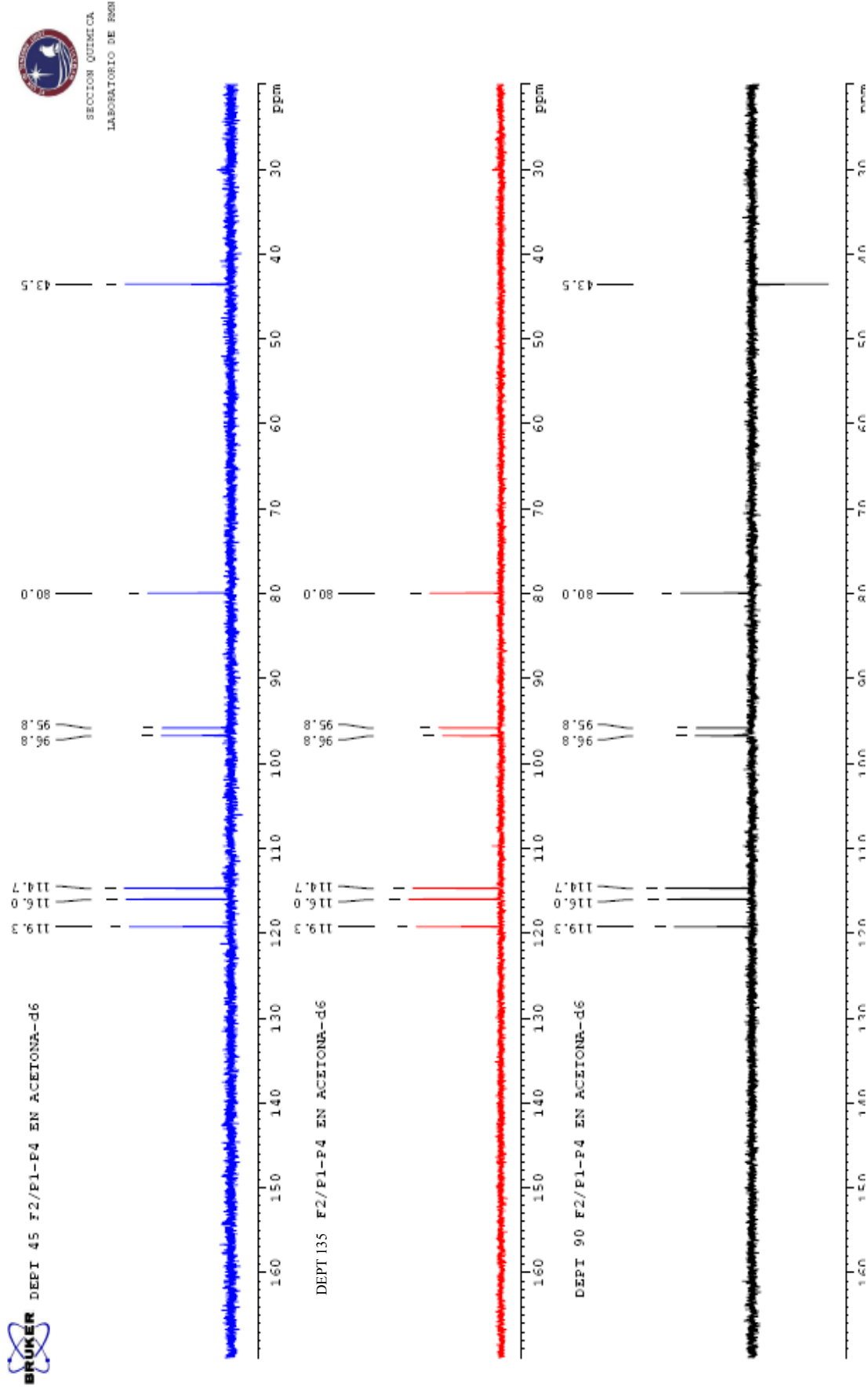
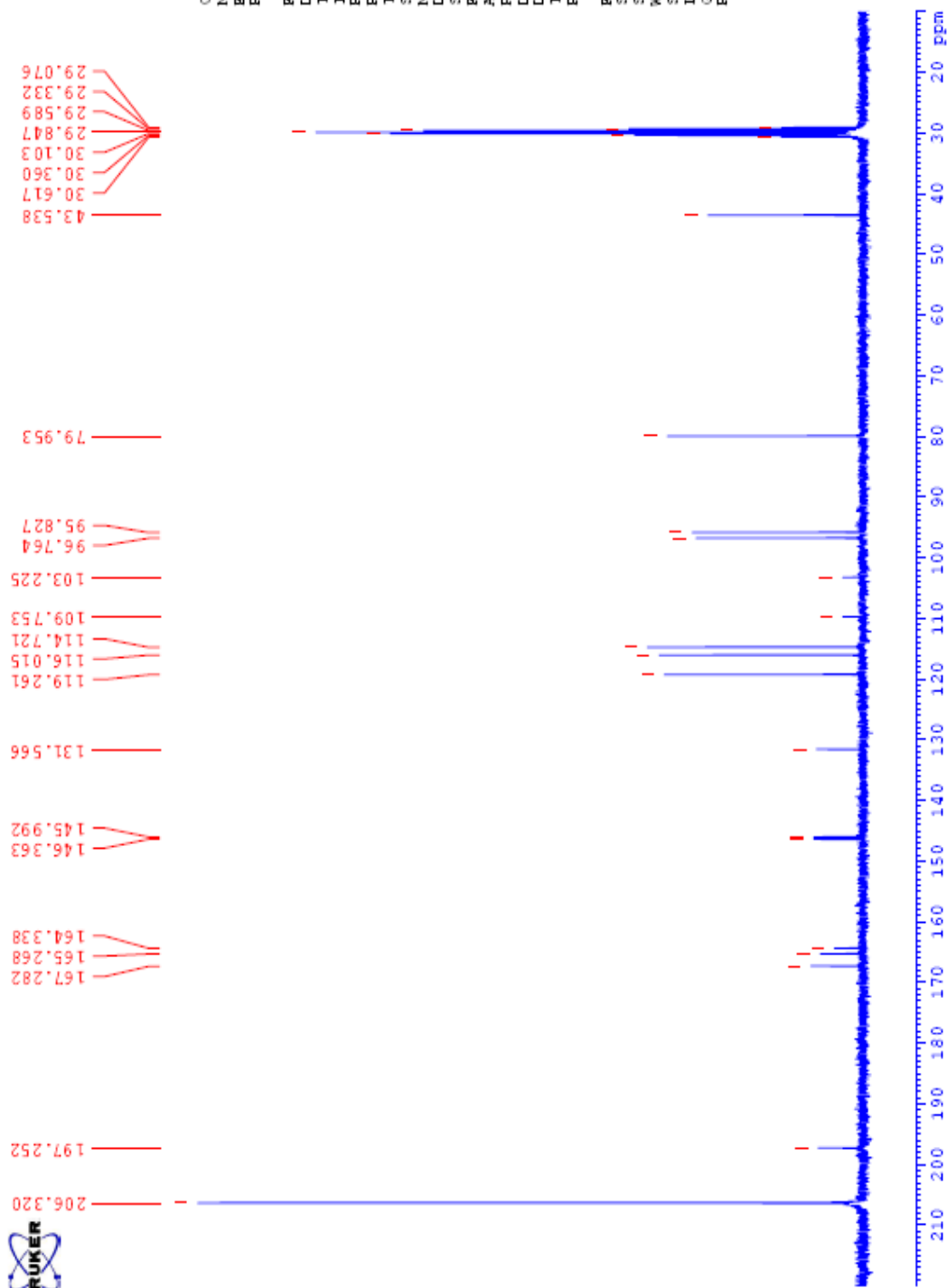


Figura N° 19. Espectro DEPT (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

¹³C F2/P1-P4 EN ACETONA-d6



SECCION QUIMICA
LABORATORIO DE RMN

Current Data Parameters
NAME GMPIF4C
EXNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20090831
Time_ 10.58
INSTRUM AC-300
PROBHD zg
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT ACETONA-d6
NS 512
DS 2
SWH 16518.518 Hz
FIDRES 0.282570 Hz
AQ 1.7695220 sec
RG 200
DM 27.000 usec
DE 33.80 usec
TE 284.0 K
FW 8.00 usec

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 75.4689203 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.60

Figura N° 20. Espectro RMN ¹³C (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

d) Espectro ^1H - ^1H COSY

Muestra: **G3** (20 mg de muestra x 0,6 mL de acetona deuterada),
analizada el 31.ago.2009

d.1 Características del espectro (Figura N° 21)

Correlaciones observadas en el espectro ^1H - ^1H COSY:

H (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados (δ ppm)
H-3eq (2,72)	H-3ax (3,14), H-2 (5,40)
H-3ax (3,14)	H-3eq (2,72), H-2 (5,40)
H-2 (5,40)	H-3eq (2,72), H-3ax (3,14), H-6/H-8 (5,94/5,96)
H-6/H-8 (5,94/5,96)	H-2 (5,40), H-5'/H-6' (6,87), H-2' (7,04)
H-5'/H-6' (6,87)	H-6/H-8 (5,94/5,96)
H-2' (7,04)	H-6/H-8 (5,94/5,96)

d.2 Conclusión

El espectro ^1H - ^1H COSY muestra las correlaciones entre los átomos de hidrógeno que corresponden a la estructura básica de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.



SECCION QUIMICA
LABORATORIO DE RMN

Current Data Parameters
NAME GNE1F4CO
EXPNO 1
PROCNO 1

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 1024
SF01 300.1369 MHz
FIDRES 4.035382 Hz
SW 13.769 Fpm
EnMODE undefined

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 128
SF01 300.1332 MHz
FIDRES 32.283059 Hz
SW 13.769 Fpm
EnMODE undefined

F2 - Processing parameters
SI 512
SF 300.1349259 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 4.00

F1 - Processing parameters
SI 128
MC2 OF
SF 300.1312031 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

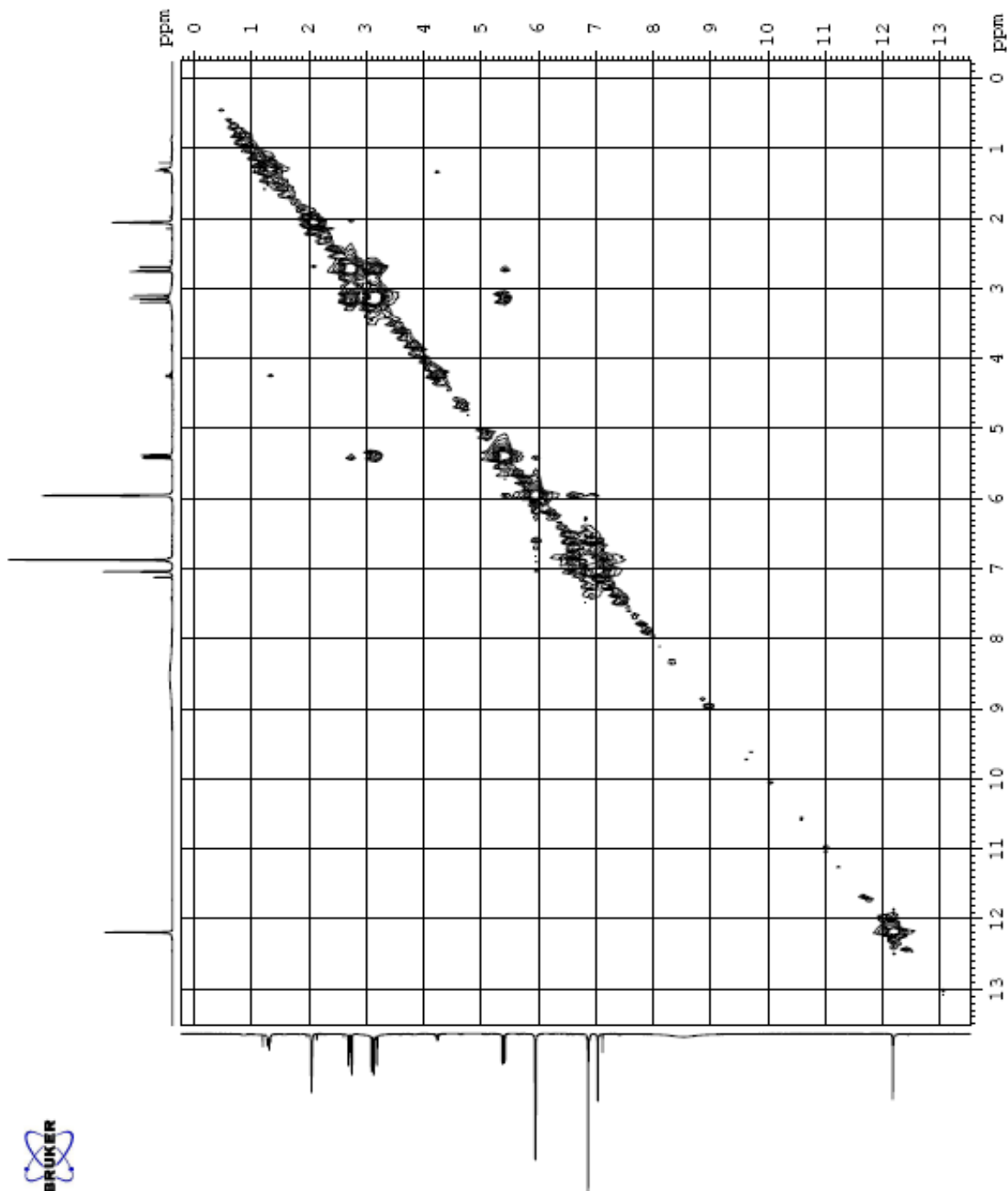


Figura N° 21. Espectro ¹H-¹H COSY (300 MHz) del compuesto activo obtenido de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

e) Espectro ^1H - ^{13}C HETCOR

Muestra: **G3** (20 mg de muestra x 0,6 mL de acetona deuterada),
analizada el 31.Ago.2009.

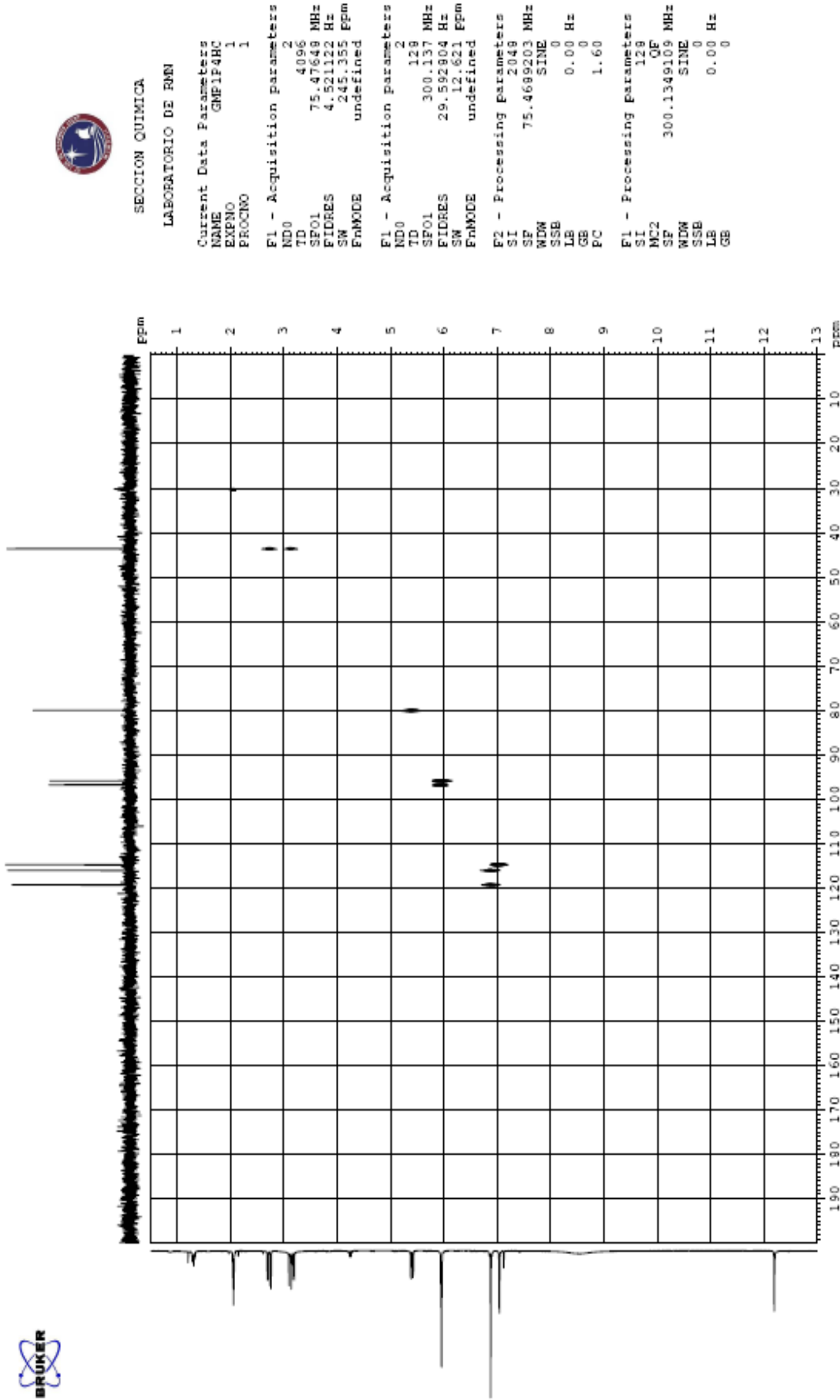
e.1 Características del espectro (Figura N° 22)

Correlaciones observadas en el espectro ^1H - ^{13}C HETCOR:

C (δ ppm)	Hidrógenos correlacionados (δ ppm)
C-3 (43,54)	H-3eq (2,72), H-ax (3,14)
C-2 (79,95)	H-2 (5,40)
C-8 (95,83)	H-8 (5,96)
C-6 (96,76)	H-6 (5,94)
C-2' (114,72)	H-2' (7,04)
C-5' (116,02)	H-5' (6,87)
C-6' (119,26)	H-6' (6,87)

e.2 Conclusión

El espectro ^1H - ^{13}C HETCOR muestra las correlaciones entre los átomos de carbono e hidrógeno que corresponden a la estructura básica de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.



SECCION QUIMICA

LABORATORIO DE RMN

Current Data Parameters
 NAME GMFLP4RC
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F1 - Acquisition parameters
 ND0 2
 TD 4096
 SF01 75.47648 MHz
 FIDRES 4.521122 Hz
 SW 245.355 ppm
 ENMODE undefined

F1 - Acquisition parameters
 ND0 2
 TD 128
 SF01 300.137 MHz
 FIDRES 29.592804 Hz
 SW 12.621 ppm
 ENMODE undefined

F2 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 75.4689203 MHz
 SINE
 WDW 0
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.60

F1 - Processing parameters
 SI 128
 MC2 QF
 SF 300.1349109 MHz
 SINE
 WDW 0
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

f) Espectro Infrarrojo, IR

Muestra: **G3** (Pastilla con 1% de muestra en KBr), analizada el 30.Oct.2009.

f.1 Características del espectro (Figura N° 23)

□ (cm^{-1}): 3370, 1605, 1450, 1260, 1160, 1085, 820, 730, 550.

f.2 Análisis del espectro

Las bandas observadas en el espectro IR (Figura N° 23) corresponden a los siguientes grupos funcionales:

□ (cm^{-1})	Grupo funcional
3370	OH de fenoles (elongación)
1605	C=O carbonilos cíclicos (elongación)
1450	C=C de aromáticos (elongación)
1260-1160	C-O de éteres cíclicos (elongación)
1085	C-O de fenoles (elongación)
820-550	C-H de aromáticos (deformación fuera del plano)

f.3 Conclusión

El espectro IR muestra las bandas principales que corresponden a los grupos funcionales de la estructura de un flavonoide, el cual representa al compuesto con mayor actividad antioxidante **G3**.

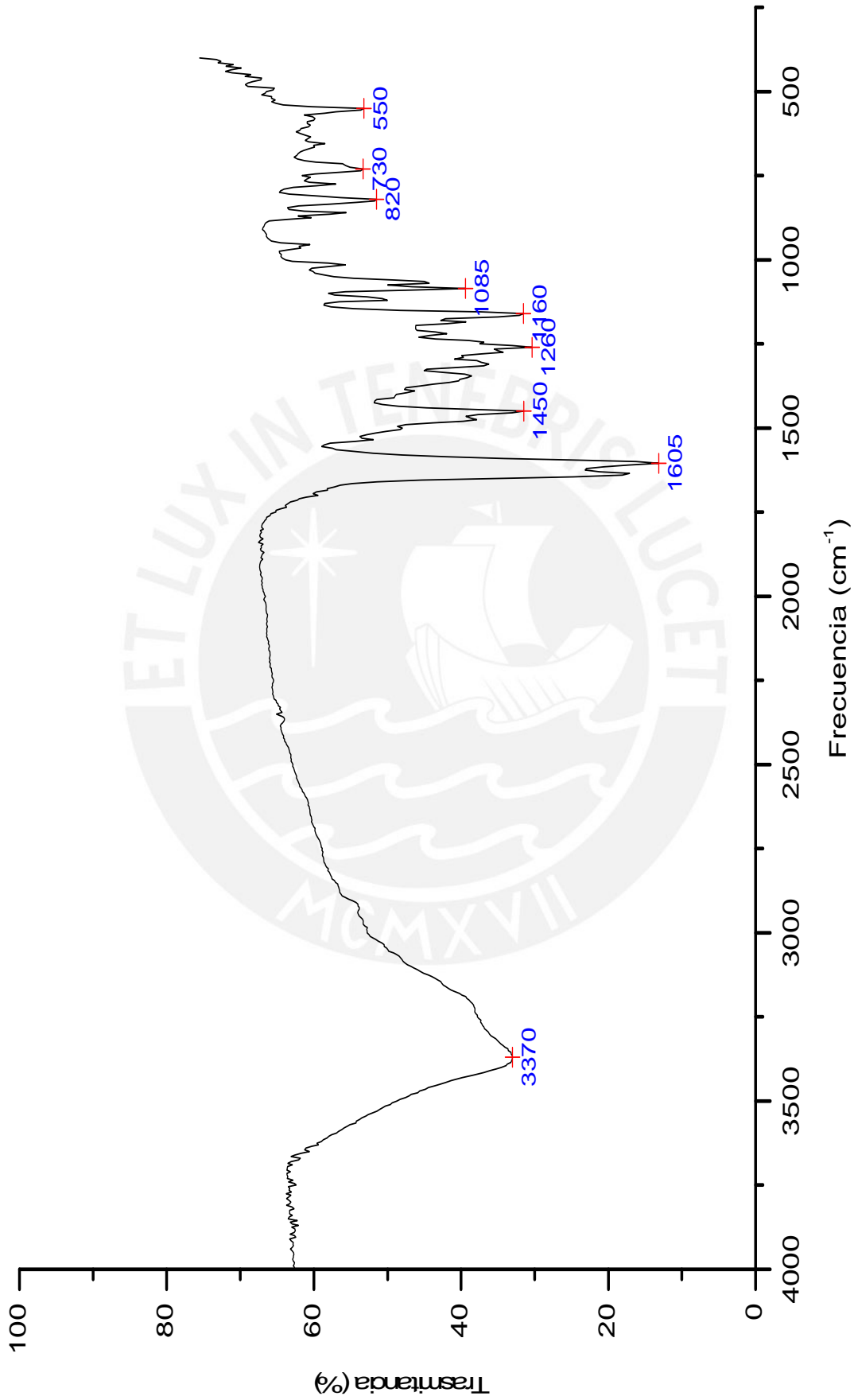


Figura N° 23. Espectro Infrarrojo del compuesto activo obtenido de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

g) Espectro Ultravioleta, UV

Muestra: **G3** (0,1 mg de muestra x 10 mL metanol), analizada el 30 Oct.2009.

g.1 Características del espectro

Espectro UV en metanol (MeOH) (Figura N° 24)

Máximo de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 298 (Banda II), 338 (Banda I)

Espectro UV con reactivos de desplazamiento (Figuras N° 25, 26, 27 y 28)

- i Metóxido de sodio (NaOMe), $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 333 (Banda II)
- ii Acetato de sodio (NaOAc), $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 333 (Banda II)
- iii Cloruro de aluminio (AlCl_3) + ácido clorhídrico (HCl), $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 318 (Banda II), 372 (Banda I)
- iv Ácido bórico (H_3BO_3) + acetato de sodio (NaOAc), $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 299 (Banda II), 338 (Banda I).

g.2 Análisis del espectro

Según el espectro del compuesto activo **G3** en metanol (Figura N° 24), se observa dos bandas de máxima absorción:

Banda II: 298 nm (alta intensidad)

Banda I: 338 nm (baja intensidad)

Según los espectros obtenidos con la adición de reactivos químicos (Figuras N° 25, 26, 27 y 28) se observan los siguientes desplazamientos:

Metóxido de sodio: Desplazamiento batocrómico de la Banda II en 35 nm, debido a que ioniza a todos los grupos hidroxilos.

Acetato de sodio: Desplazamiento batocrómico de la Banda II, en 35 nm, debido provoca la ionización del grupo 7-hidroxilo.

Cloruro de aluminio + ácido clorhídrico: Desplazamiento batocrómico de la Banda II en 20 nm y de la Banda I en 34 nm, debido a la formación de complejos estables por la presencia de grupos orto-dihidroxilo y hidroxil-cetona vecinos.

Ácido bórico + acetato de sodio: Desplazamiento batocrómico de la Banda II con la adición de acetato de sodio que luego desaparece con la adición del ácido bórico. Este comportamiento se debe a la presencia de grupos orto-dihidroxilo.

g.3 Conclusión

El espectro UV muestra las bandas principales que corresponden a la estructura general de un flavonoide. Asimismo, los espectros obtenidos con los reactivos de desplazamiento confirman las posiciones de los grupos hidroxilos y carbonilos en la estructura del compuesto que tiene mayor actividad antioxidante **G3**.

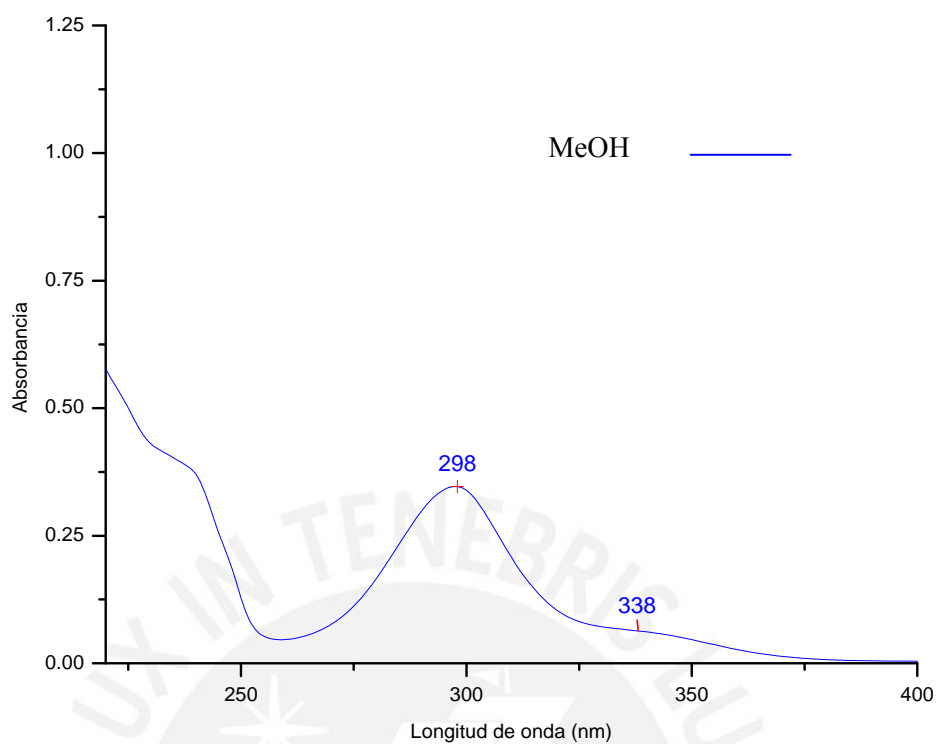


Figura N° 24. Espectro ultravioleta del compuesto activo **G3** en metanol

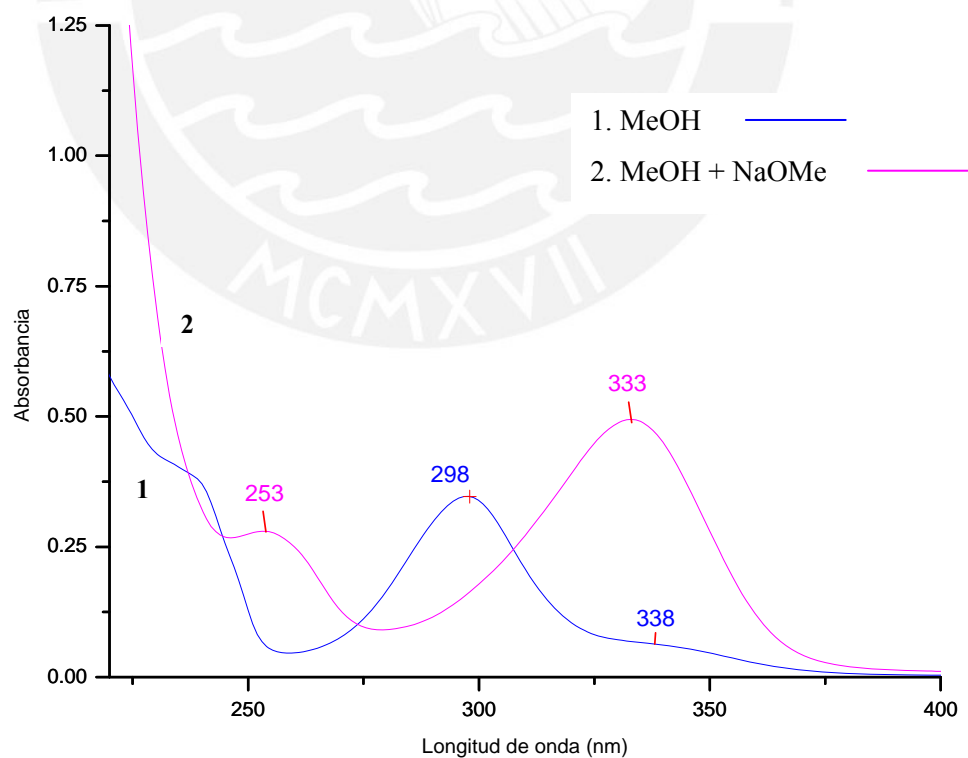


Figura N° 25. Espectro ultravioleta del compuesto activo **G3** en metóxido de sodio

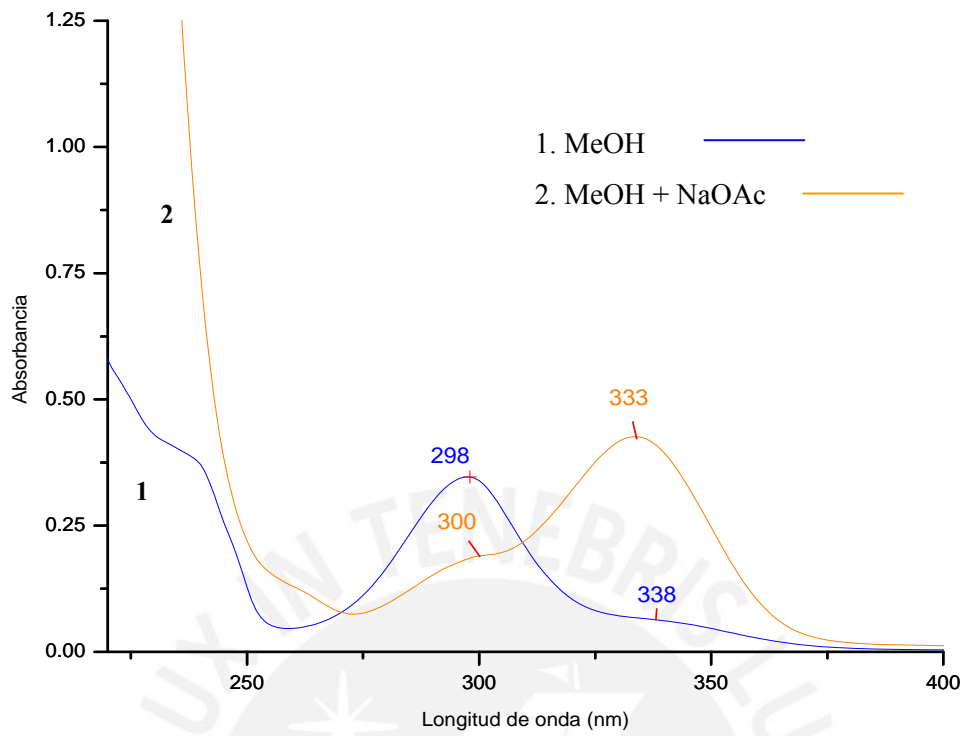


Figura N° 26. Espectro ultravioleta del compuesto activo **G3** en acetato de sodio

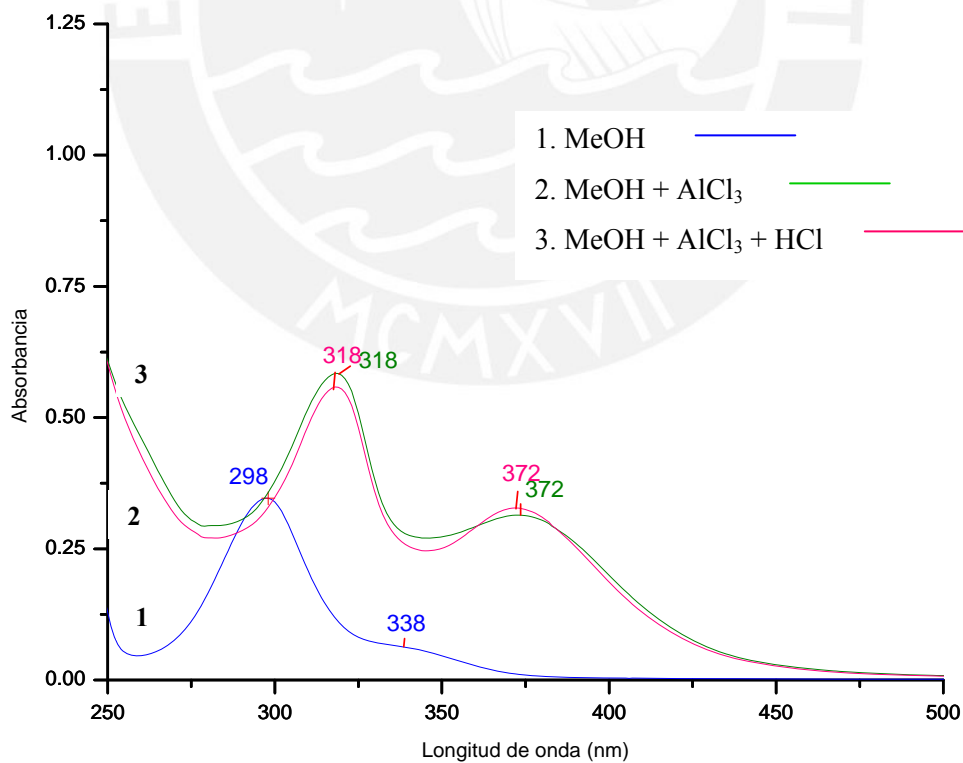


Figura N° 27. Espectro ultravioleta del compuesto activo **G3** en cloruro de aluminio y ácido clorhídrico

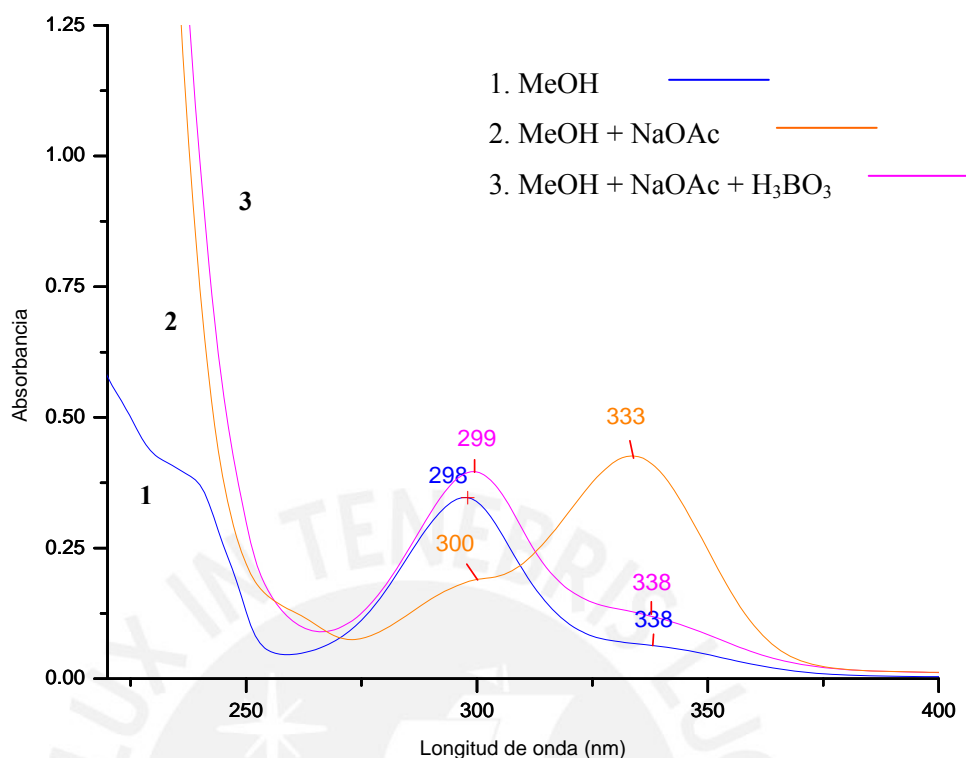


Figura N° 28. Espectro ultravioleta del compuesto activo **G3** en ácido bórico y acetato de sodio

3.3.6 Evaluación de la actividad antioxidante del principio activo con mayor actividad antioxidante

Según el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), se evaluó la actividad antioxidante del compuesto **G3**, a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo una actividad de 90,42 %.

Asimismo, se evaluó la actividad antioxidante del compuesto **G3** mediante el método electroquímico. En el voltamograma cíclico (Figura N° 29) el compuesto presenta un ε_{pa} de 0,206 V debido a la oxidación de los $-\text{OH}$ presente en la estructura química.

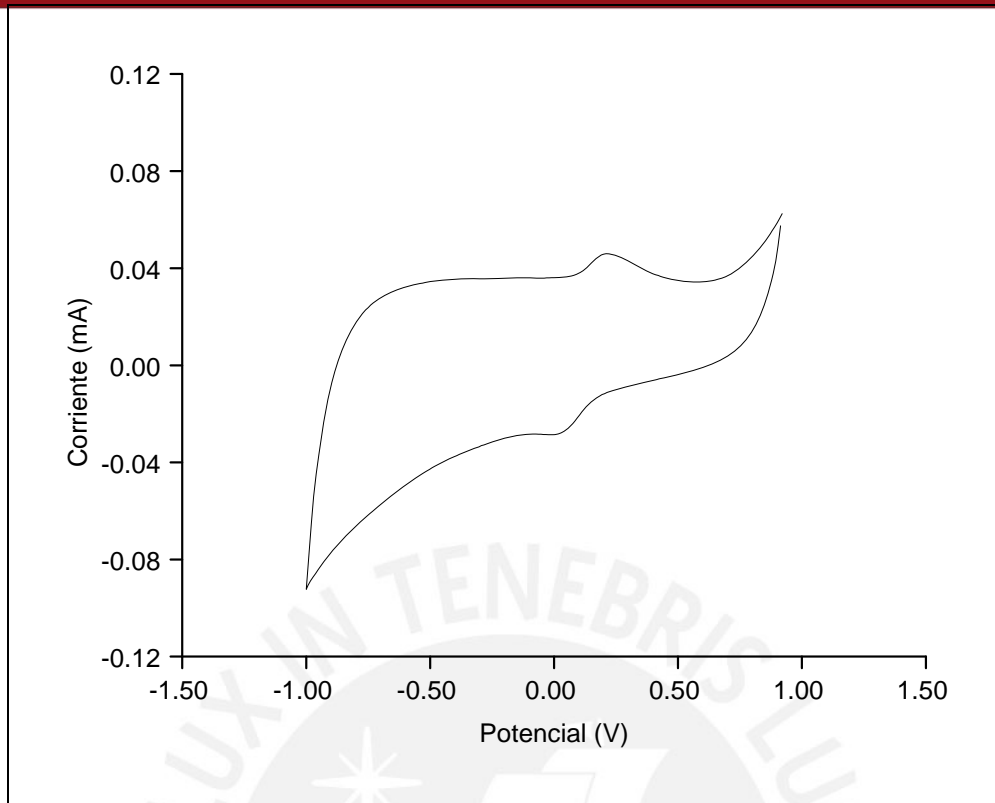


Figura N° 29. Voltamograma cíclico del compuesto **G3** en buffer de fosfato (pH 7,4)/EtOH 1:1 (v/v) a velocidad de barrido 50 mV/s

3.3.7 Determinación de la concentración efectiva media, EC_{50} del principio activo con mayor actividad antioxidante

Se determinó la concentración efectiva media, EC_{50} , de las muestras: extracto bruto orgánico (EBO), acetato de etilo (AE) y la fracción activa **G3**. Asimismo, se determinó la EC_{50} de tres estándares: rutina, quercetina y hidroxianisol butilado (BHA).

Se prepararon soluciones de las muestras y estándares a diferentes concentraciones y luego se determinó el porcentaje de actividad antioxidante, tal como se muestra en la Tabla N° 16.

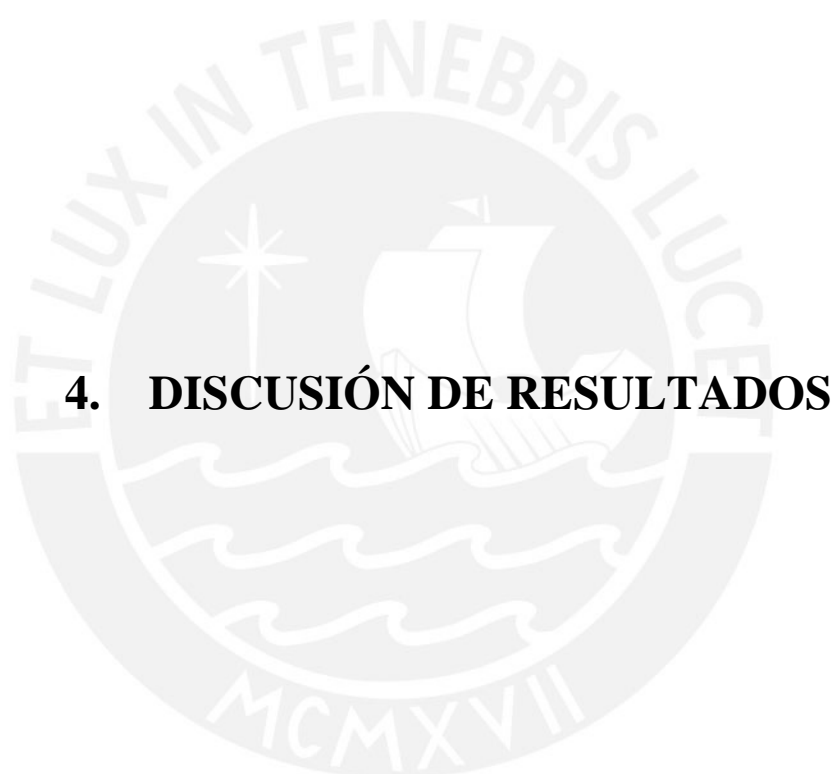
Los resultados de la EC_{50} , según el ajuste lineal ($y = ax + b$, con el factor de correlación R^2), para las muestras y estándares se muestran en la Tabla N° 17.

Tabla N° 16. Relación entre actividad antioxidante y concentración de las muestras y estándares

Muestra	Actividad antioxidante (%)				
	2 µg/mL	4 µg/mL	6 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL
EBO	36,17	49,57	61,08	79,87	87,79
AE	31,86	54,68	68,57	78,42	88,30
G3	52,66	58,98	69,14	81,65	90,42
Quercetina	57,30	69,16	80,22	90,60	94,72
Rutina	45,68	54,85	60,74	73,05	75,53
BHA	42,19	48,77	58,88	65,70	72,82

Tabla N° 17. Concentración efectiva media, EC₅₀, de muestras y estándares

Muestra	a	b	R ²	EC ₅₀ (µg/mL)
EBO	6,677	22,834	0,9891	4,07
AE	6,381	23,380	0,9626	3,90
G3	4,909	41,113	0,9899	1,81
Quercetina	4,814	49,516	0,9767	0,10
Rutina	3,895	38,600	0,9722	2,93
BHA	3,9095	34,215	0,9952	4,04



4.1 DE LA SELECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La selección y clasificación de los extractos de las tres especies vegetales se realizó evaluando su actividad antioxidante mediante el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil, DPPH.

Se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, debido a que permite un análisis más rápido, aplicación a diversas muestras, relativamente económica y reproducible. Asimismo, permite medir la capacidad de neutralización de radicales libres por antioxidantes fenólicos, principalmente. La característica del radical libre DPPH, es que no se dimeriza, exhibiendo una absorbancia estable para un amplio rango de pH^{12,52,53}. El radical DPPH es estabilizado por conjugación del electrón deslocalizado entre los átomos de nitrógeno N₁ y N₂, tal como se muestra en la Figura N° 30.

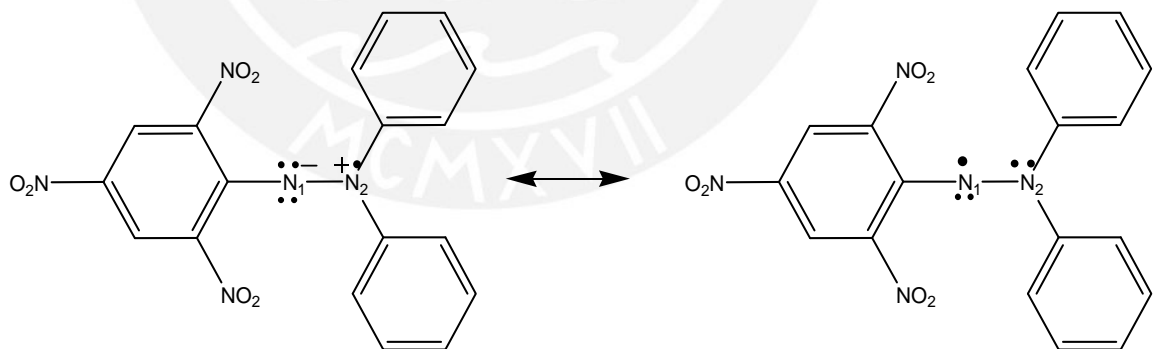


Figura N° 30. Estructuras de resonancia del DPPH

Asimismo, según las investigaciones realizadas por Tsimogiannis y Oreopoulou¹², el solvente tiene influencia en la cinética de la reacción con DPPH por medio de la capacidad del solvente de donar o aceptar protones. Así, los alcoholes incrementan

la cinética de la reacción debido a su capacidad de donar el protón del solvente al N₂ del DPPH. Como consecuencia, el electrón desapareado del DPPH llega a estar más localizado en N₁ y la reactividad del radical aumenta¹².

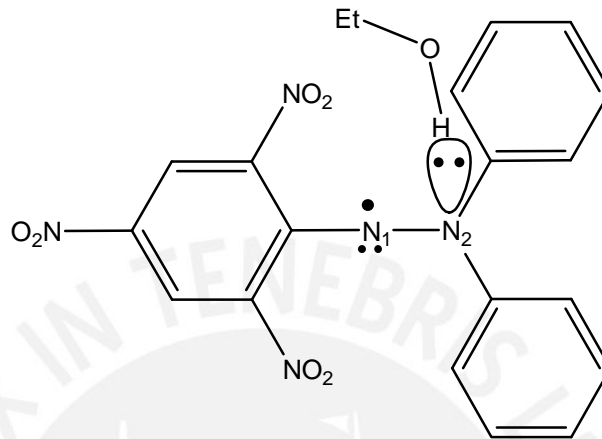


Figura N° 31. Interacción entre el solvente etanol (EtOH) y el radical libre DPPH

De las especies vegetales estudiadas (Tabla N° 3), la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. presentó una mayor actividad antioxidante de 86,50 % y 92,14 % a la concentración de 10 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente (Tabla N° 4).

La *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. a la concentración de 10 µg/mL, muestra una actividad antioxidante comparable con los valores presentados por los compuestos polifenólicos: rutina y quercetina, empleados como estándar, tal como se muestra en la Figura N° 32.

Los extractos etanólicos de las especies se clasifican en cuatro grupos: G-I (0-25 %), G-II (25,1-50 %), G-III (50,1-75 %) y G-IV (75,1 % a más), dependiendo de los resultados de su actividad antioxidantes (a la concentración de 10 µg/mL). Las especies *Carpotroche longifolia* (Poepp.) Benth y *Campomanesia lineatifolia* (Ruiz & Pav.) se encuentran clasificados dentro del grupo G-III,

mientras que la especie *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. pertenece al grupo G-IV (Tabla N° 5).

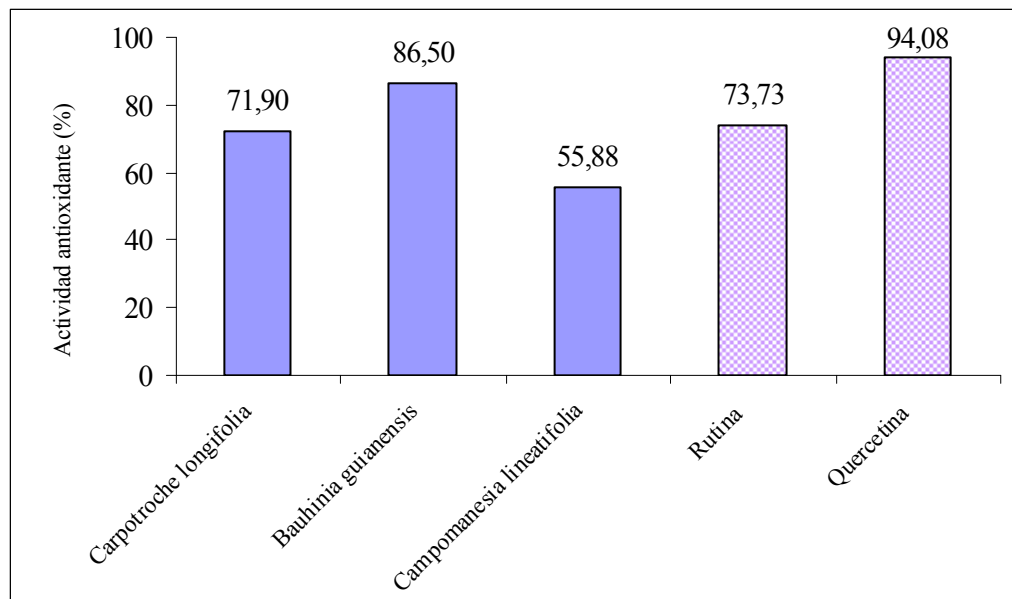


Figura N° 32. Comparación de actividad antioxidante de las especies vegetales y estándares a la concentración de 10 µg/mL

Se realizó el fraccionamiento del extracto etanólico de la especie seleccionada *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., obteniéndose las fracciones: hexánica (HE), metanólica (ME), acetato de etilo (AE) y acuosa (AC). Además, una quinta fracción de insolubles (IN), se obtuvo en el proceso de separación de la fase acuosa con acetato de etilo (Figura N° 5).

Se evaluó la actividad antioxidante a las fracciones obtenidas (Tabla N° 7). Las fracciones AE, AC e IN presentaron buena actividad antioxidante. De estos, la fracción AE presentó la mayor actividad antioxidante (88,50 %) a la concentración 10 µg/mL (Figura N° 33). Este resultado nos indica que la fracción AE de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. contiene al(los) compuesto(s) biológicamente más activo(s).

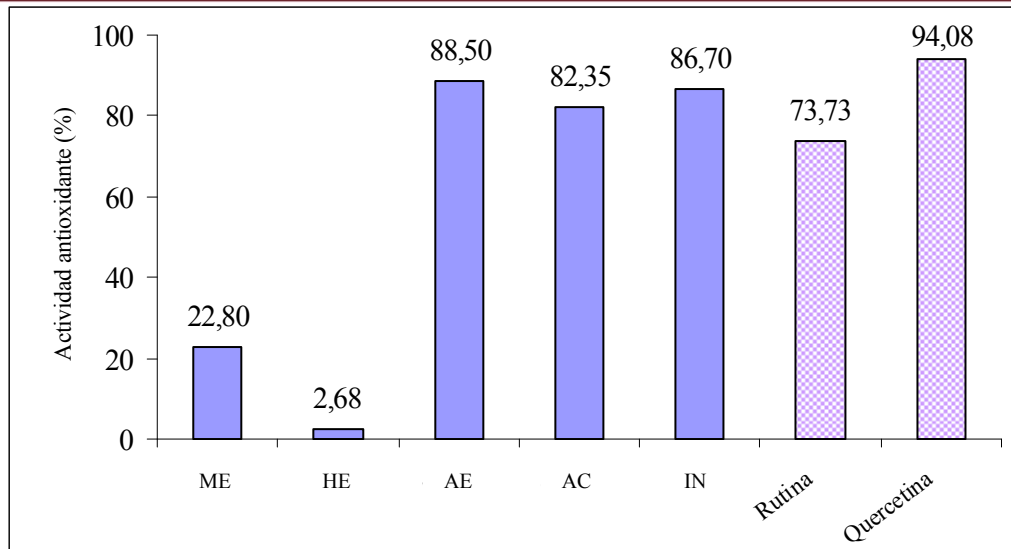


Figura N° 33. Comparación de actividad antioxidante de fracciones del EBO de la *Bauhinia guianensis* y estándares a la concentración de 10 µg/mL

4.2 DEL ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

4.2.1 Del fraccionamiento biodirigido del extracto bruto orgánico, EBO

Para encontrar el metabolito secundario con mayor actividad antioxidante de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. se siguieron dos métodos: químico (DPPH) y electroquímico (voltametría cíclica).

A partir de la corteza de la especie vegetal, se obtuvo 86,8 g de extracto bruto orgánico (EBO), el cual fue separado en 5 fracciones de polaridad creciente. A las fracciones obtenidas se evaluaron su actividad antioxidante, cuyos resultados muestran que la fracción de acetato de etilo (AE) presentó la mayor actividad antioxidante mediante método de neutralización del radical libre DPPH (88,52 % a 10 µg/mL) (Tabla N° 11) y el método por voltametría cíclica (ϵ_{pa} 0,147 V) (Tabla N° 13).

Asimismo, se evaluó la actividad antioxidante de compuestos estándares, cuyos resultados se muestran en la Tabla N° 10. A la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, la quercetina y la rutina mostraron una mayor actividad antioxidante (94,68 y 73,83 %, respectivamente). Mediante el método por voltametría cíclica la quercetina presentó ε_{pa} de 0,156 V y la rutina de ε_{pa} 0,227 V (Tabla N° 12). Estos resultados obtenidos, son comparables con la fracción AE, lo que indica que ésta fracción contiene compuestos con mayor actividad antioxidante.

Los compuestos estándares evaluados así como los compuestos presentes en la fracción AE pertenecen al grupo de los catecoles¹⁸, quienes muestran un potencial de oxidación más bajo que 0,3 V. Estos compuestos fueron también los más activos en la prueba de antioxidantes de DPPH.

Para determinar los tipos de compuestos presentes en el EBO y AE, responsables de la actividad antioxidante, se realizó un análisis cualitativo (reacción de Shinoda), obteniéndose como resultado la presencia de flavonoides principalmente.

4.2.2 De la separación cromatográfica biodirigida de la fracción de acetato de etilo, AE

A partir de la fracción de acetato de etilo (AE), se realizó la separación cromatográfica biodirigida mediante dos cromatografías en columna (Figura N° 12). La primera separación se realizó mediante cromatografía líquida con vacío (VLC), obteniéndose 9 grupos de fracciones luego de ser monitoreadas mediante CCD. El grupo g3 - g4 (187 mg) presentó buena actividad antioxidante al realizar una CCD revelado con solución de DPPH.

La segunda separación se realizó mediante una cromatografía en columna normal al grupo g3 - g4. Se obtuvieron 18 grupos de

fracciones luego de ser reunidas y monitoreadas mediante CCD. De estas, el grupo $g7'$ (**G1**, 27 mg) con $R_f = 0,47$ presentó una aparente pureza (una mancha amarilla) y buena actividad antioxidante en una CCD revelado con DPPH. El grupo $g8'$ - $g9'$ (27 mg), mezcla de compuestos, también presentó actividad antioxidante con DPPH.

Se realizó una separación cromatográfica al grupo $g8'$ - $g9'$ (Figura N° 13) que luego de ser reunidas y monitoreadas con CCD, se obtuvieron 26 fracciones. La fracción $f6$ (6 mg) con $R_f = 0,48$ (representado por **G2**) presentó buena actividad antioxidante con DPPH, mientras que las otras fracciones dieron negativo a esta prueba.

Con la finalidad de purificar aun más las fracciones obtenidas con buena actividad antioxidante, se reunieron **G1** y **G2** (33 mg) y se realizó una cromatografía líquida con vacío (VLC) (Figura N° 14). Se obtuvieron 20 fracciones, que luego de ser monitoreadas mediante CCD se reunieron a 6 grupos de fracciones. El grupo $f2$ (29 mg) (representado por **G3**) presentó una sola mancha amarilla intensa ($R_f = 0,48$) con muy buena actividad antioxidante mediante CCD revelado con DPPH. Asimismo, según el análisis mediante una CCD en fase reversa (ACN- H_2O 2:3), se observó una mancha roja oscura a un $R_f = 0,30$ al ser revelados con solución de H_2SO_4 5 %.

Los agentes cromogénicos (UV, NP 1 %, H_2SO_4 5 %, DPPH) utilizados en el análisis de CCD, presentando diferentes coloraciones, indican que **G3** corresponde a un compuesto de flavonoide^{16,54}.

4.2.3 De la identificación espectroscópica del principio activo con mayor actividad antioxidante

Se realizó la determinación estructural de la fracción **G3**, el cual es el compuesto activo con mayor actividad antioxidante obtenida de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., mediante el análisis de sus espectros IR, UV, Masas, de RMN ^1H , de RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HETCOR.

En el espectro infrarrojo (Figura N° 23), se presentaron las siguientes señales (cm^{-1}): 3370, 1605, 1450, 1260, 1160, 1085, 820, 730, 550.

La señal a 3370 cm^{-1} corresponde al grupo OH de fenoles (elongación), 1605 cm^{-1} a la presencia del grupo C=O cíclicos (elongación), 1450 cm^{-1} a C=C de aromáticos (elongación), 1260 - 1160 cm^{-1} correspondiente a C-O de éteres cíclicos (elongación), 1085 cm^{-1} a C-O de fenoles (elongación) y finalmente 820 - 550 cm^{-1} perteneciente a C-H de aromáticos (deformación fuera del plano). La presencia de estos grupos funcionales correspondiente a las señales guarda relación con lo reportado en la bibliografía^{16,44}.

En el espectro ultravioleta en metanol (MeOH) (Figura N° 24), se presentaron dos máximos de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 298 (Banda II, intenso), 338 (Banda I, débil), que corresponde a un tipo de flavonoide, equivalente a una dihidroflavona (flavanona)^{16,55}, tal como se muestra en la Figura N° 34. Para identificar el modelo de oxigenación, se define mejor mediante el uso de reactivos de desplazamiento, los cuales, como su nombre indica, provocan el desplazamiento de las bandas de absorción^{16,54}.

Con metóxido de sodio (NaOMe), el espectro UV de las flavanonas con hidroxilación en el anillo A muestra un desplazamiento batocrómico de la Banda II. Así, en la Figura N° 25,

se observa que el espectro UV del compuesto activo **G3** en presencia de NaOMe muestra un desplazamiento batocrómico en 35 nm así como un incremento en la intensidad de la Banda II. Esta característica mencionada corresponde a una 5,7-dihydroxiflavanona⁵⁴.

Con acetato de sodio (NaOAc) (Figura N° 26), se observa que el espectro UV del compuesto activo **G3** muestra un desplazamiento batocrómico de 35 nm en el pico de mayor absorción (Banda II). Este desplazamiento se debe a que el NaOAc ioniza a grupos hidroxilos más ácidos y corresponde a una 7-hidroxiflavanona^{16,54}.

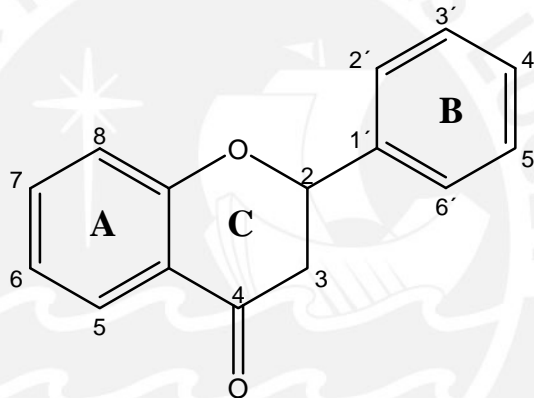


Figura N° 34. Estructura básica de una flavanona¹⁶

Con cloruro de aluminio (AlCl_3) (Figura N° 27), se observa que el espectro UV del compuesto activo **G3** presenta un desplazamiento batocrómico de la Banda II en 20 nm y de la Banda I en 34 nm. El desplazamiento de la Banda II se debe a la formación de un complejo muy estable del AlCl_3 con el grupo 5-hidroxilo de una flavanona⁵⁴. Asimismo, el desplazamiento batocrómico de la Banda I se debe a la formación de complejos lábiles por la presencia de grupos orto-dihidroxilo (3',4'-dihydroxiflavanona)^{16,54}.

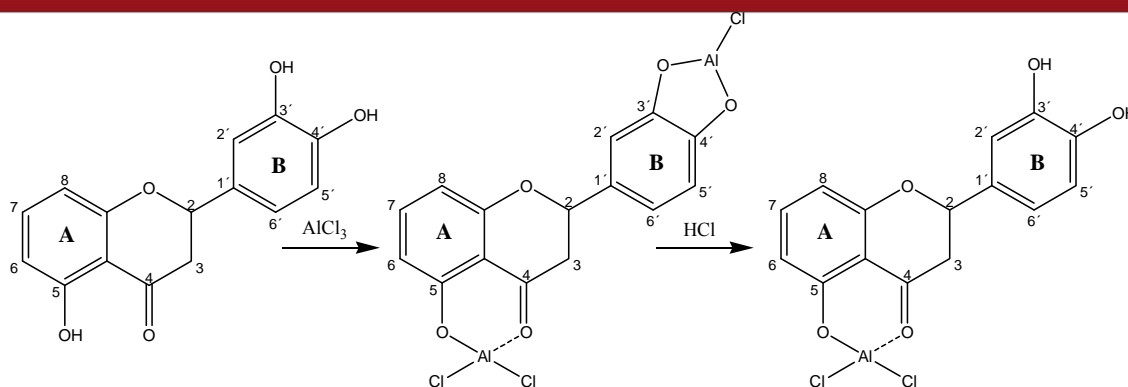


Figura N° 35. Formación de complejos del AlCl_3 con una flavanona en ausencia y presencia de HCl ⁵⁴

En la Figura N° 35, se muestra que el complejo del AlCl_3 entre el grupo funcional ceto del C-4 y el grupo 5-hidroxil es estable en la presencia del HCl , mientras que el complejo formado entre el AlCl_3 y el grupo orto-dihidroxil se descompone por la presencia del ácido^{16,54}.

Con acetato de sodio (NaOAc) y ácido bórico (H_3BO_3) (Figura N° 28) se observa un desplazamiento batocrómico de la banda II con la adición de NaOAc que luego desaparece con la adición de H_3BO_3 . Este comportamiento se debe a que los grupos orto-dihidroxilo del anillo B no son detectables por el efecto de $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ debido a la pobre conjugación del anillo B con el cromóforo principal⁵⁴. En la Figura N° 36 se muestra el complejo formado del H_3BO_3 en presencia de NaOAc .

El espectro de masas del compuesto activo **G3**, EM-ESI positivo, (Figura N° 14) presenta el pico a m/z 289,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) y el pico m/z 287,1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) en el espectro de masas EM-ESI Negativo (Figura N° 15). Ambos espectros, importantes en la elucidación estructural, indican que el compuesto **G3** presenta un masa molecular de 288.

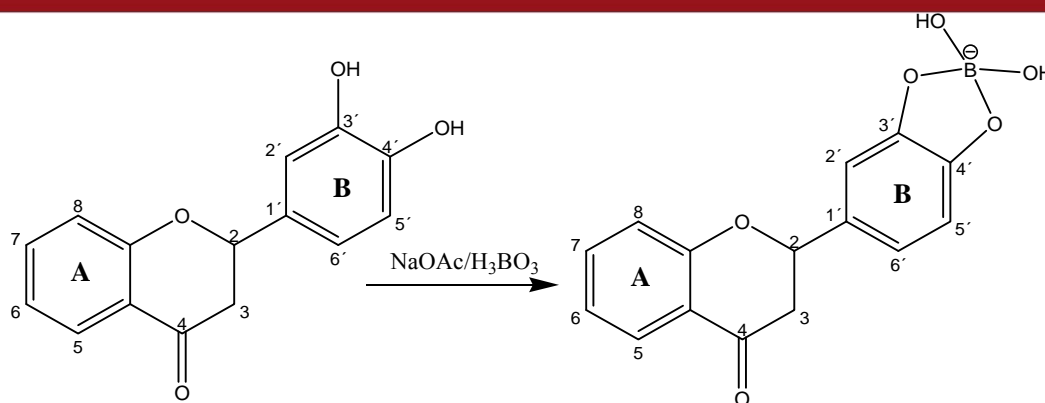


Figura N° 36. Formación de complejos del H_3BO_3 con una flavanona en presencia de NaOAc ⁵⁴

Asimismo, los fragmentos iónicos (Figura N° 16) correspondientes a los picos m/z 179 ($[\text{M}+\text{H}-110]^+$), 163 ($[\text{M}+\text{H}-126]^+$) y 153 ($[\text{M}+\text{H}-136]^+$) nos permiten predecir la estructura del compuesto como una flavanona. En adición, también existen pérdidas neutrales características de las flavanonas como CO , H_2O , H_2 ^{16,55}.

El núcleo básico de una flavanona tiene una masa molecular de 224 uma ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$)^{55,56}. La diferencia respecto a la masa molecular del compuesto **G3** ($288-224=64$ uma) corresponde a 4 átomos de oxígeno como sustituyentes en el anillo como grupos hidroxilo. Así, la fórmula molecular del compuesto **G3** sería $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$.

En la Figura N° 37, se muestra la fragmentación de acuerdo a la nomenclatura adoptada por Portet et al.⁵⁵, en la cual los fragmentos representados como A^- o B^- significa que el compuesto retiene a la parte del anillo A o B.

Los siete fragmentos iónicos identificados en el espectro EM-ESI (Figura N° 17) corresponden a los picos m/z 289, 271, 179, 163, 153, 145 y 117, cuyas ecuaciones de fragmentación^{44,55-59} se muestran en la Figura N° 38.

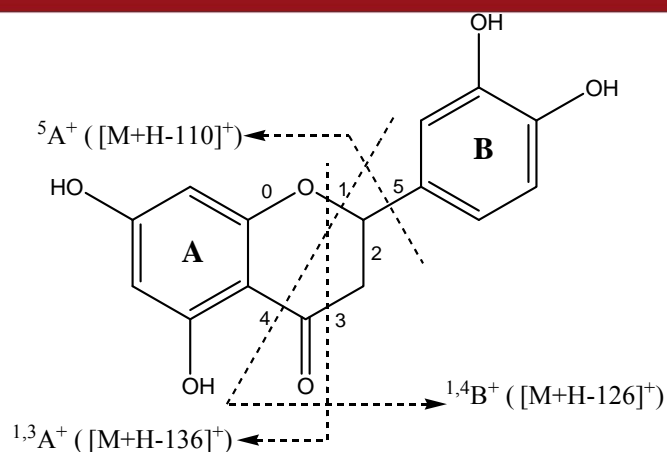
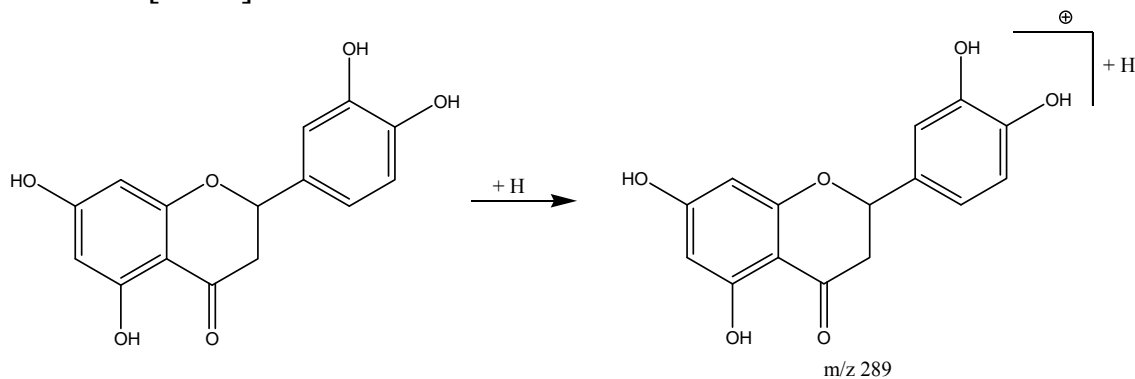


Figura N° 37. Nomenclatura y diagnóstico de fragmentación de principales picos en modo ión positivo del compuesto activo G3

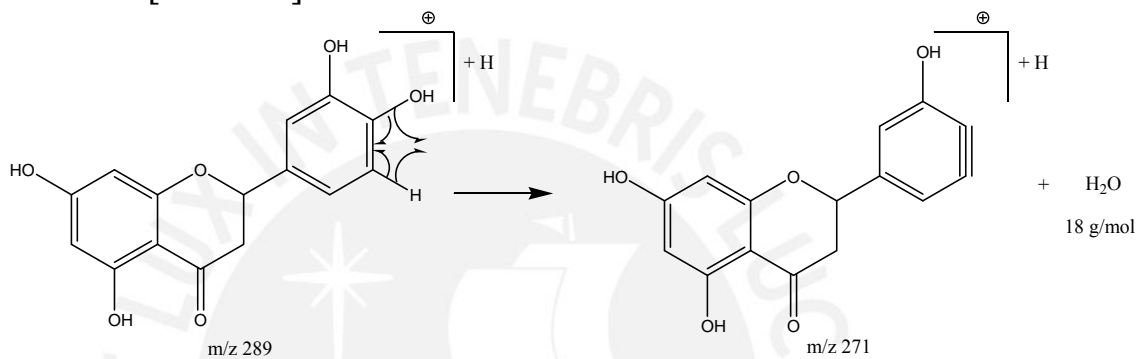
El espectro RMN ^1H (Figura N° 18) muestra 8 señales, las cuales corresponden a 12 átomos de hidrógeno deducidos mediante EM-ESI. La señal a δ 5,94 [*d*, H-6, $J(6-8)$ 2,1] pertenece a un protón de C-6 y δ 5,96 [*d*, H-8, $J(8-6)$ 2,4] al protón de C-8 del anillo A⁶⁰. Este desplazamiento corresponde a flavanonas que contiene sustituciones 5,7-dihidroxilo que muestran dos dobletes (δ 5,75 - 5,95 ppm para H-6 y 5,90 - 6,10 ppm para H-8)⁵⁴. Las señales de protones del anillo A aparecen a campos más altos que en los correspondientes flavonas y flavonoles⁵⁴.

Los protones del anillo B usualmente aparecen en el rango de δ 6,7 - 7,9 ppm, el cual está a campo mas bajo de la región donde absorbe los protones del anillo A^{16,54}. Las flavanonas 3',4'-oxigenados dan un multiplete complejo, usualmente dos picos, para los protones del C-2', C-5' y C-6' en la región de δ 6,7 - 7,1 ppm⁵⁴. Así el espectro (Figura N° 18) muestra las señales de los protones a δ 6,87 [*m*, H-5'/H-6'] y 7,04 [*m*, H-2'] para los protones del anillo B⁶⁰. Estos protones tienen posiciones *orto* o *para* respecto a los sustituyentes de oxígeno, por lo que muestran desplazamientos químicos similares⁵⁴.

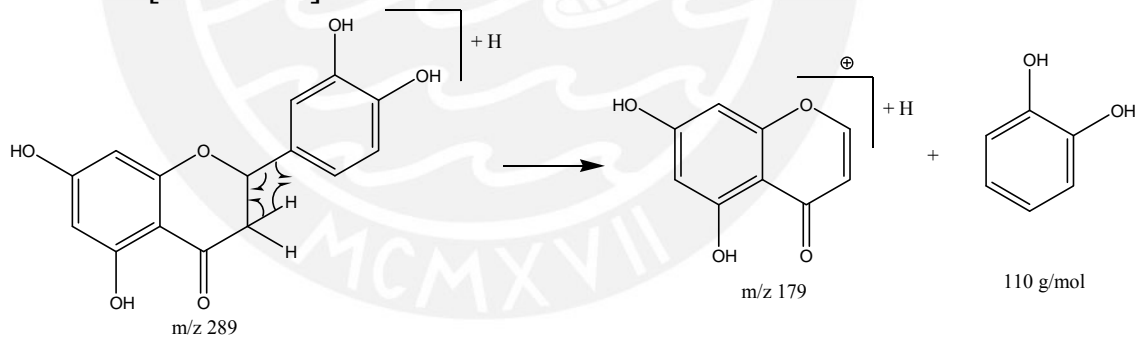
i m/z 289: $[M+H]^+$



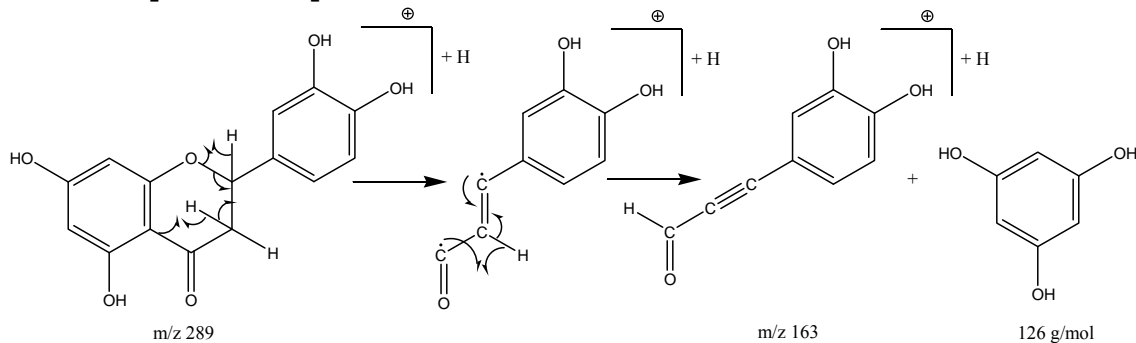
ii m/z 271: $[M+H-18]^+$



iii m/z 179: $[M+H-110]^+$

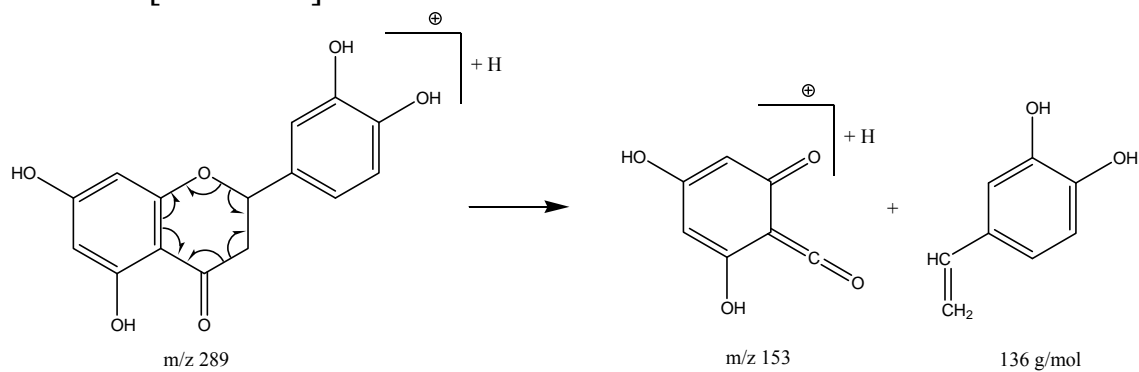


iv m/z 163: $[M+H-126]^+$

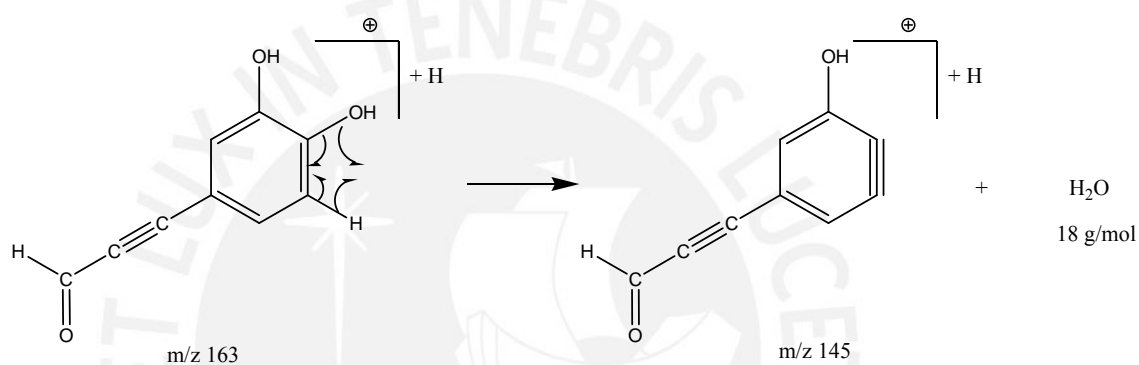


...continúa

v m/z 153: $[M+H-136]^+$



vi m/z 145: $[M+H-126-18]^+$



vii m/z 117: $[M+H-126-18-28]^+$

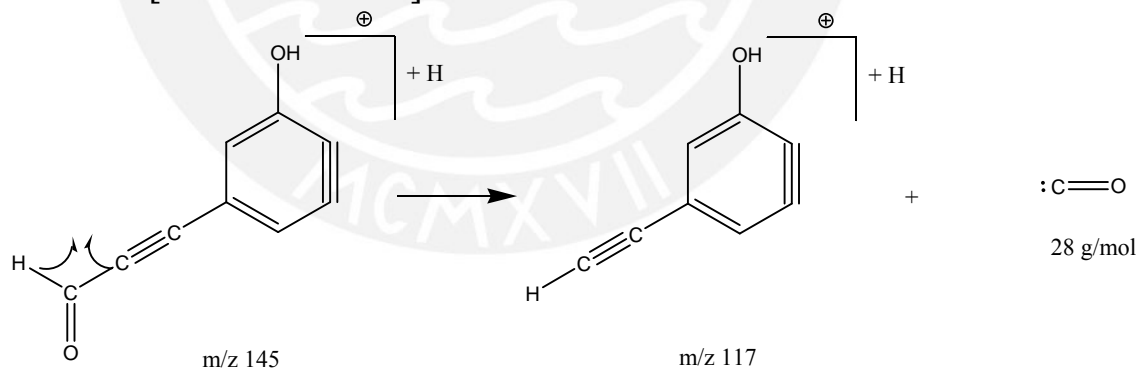


Figura N° 38. Ecuaciones de fragmentación del espectro de masas EM-ESI positivo:
 m/z 289 ($[M+H]^+$)

La señal del protón del C-2 del anillo C de las flavanonas aparece con un cuarteto (dos dobletes) cerca a δ 5,2 ppm como resultado del acoplamiento del protón del C-2 con los protones del C-3⁵⁴. En el espectro (Figura N° 18), la señal del protón del C-2 aparece a δ 5,40 [*dd*, H-2, *J*(2-3eq) 3,0; *J*(2-3ax) 12,6] acoplado con los protones el C-3 (H-3ax y H-3eq)⁶⁰. Los protones del C-3 dan dos señales de cuarteto (dos dobletes) cercanos a δ 2,8 ppm, debido al acoplamiento entre ellos y el protón del C-2⁵⁴. En el espectro la señal H-3eq aparece a δ 2,72 ppm y H-3ax a δ 3,14 ppm⁶⁰.

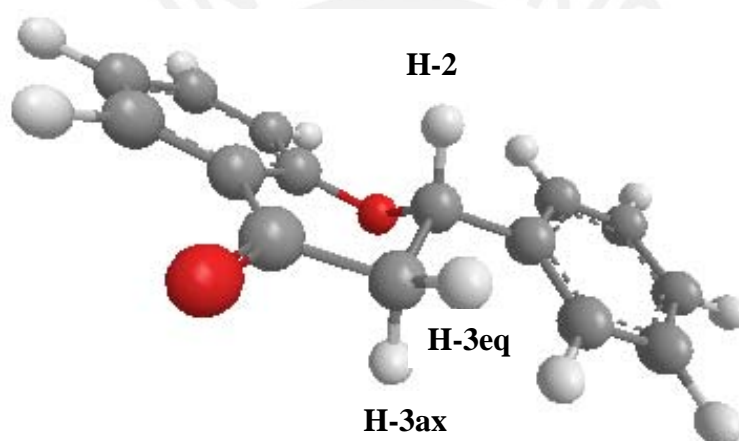


Figura N° 39. Estereoquímica de una flavanona

Los protones de los sustituyentes hidroxilos aparecen en una señal ancha de δ 8,53 [*s*(OH), H-7/H-3'/H-4'] y en un señal a campo muy bajo de δ 12,18 [*s*(OH), H-5]. Estos valores están comprendidos con lo reportado en la bibliografía^{54,60}.

Para determinar la multiplicidad de los picos de los átomos de carbono y así de esta manera poder establecer diferencias entre los tres tipos de carbono protonados y los carbonos cuaternarios, se utilizó el método DEPT⁶¹.

En el espectro DEPT (Figura N° 19), según el DEPT-45 se presentan 7 señales de átomos de carbonos, de las cuales 6 señales

corresponden a átomos de carbono del tipo metino (CH) y una señal del átomo de carbono del tipo metileno (CH₂).

El espectro DEPT-90 muestra 6 señales que corresponden a átomos de carbonos del tipo metino (CH). Asimismo, el espectro DEPT-135 presenta 7 señales de átomos de carbonos, de las cuales 6 señales corresponden a átomos de carbono del tipo CH y no para carbonos del tipo metilo (CH₃) (señales hacia arriba: para CH y CH₃) y una señal que corresponde a un átomo de carbono del tipo CH₂ (señales hacia abajo: sólo para CH₂).

Del análisis realizado según el DEPT, podemos establecer que la estructura del compuesto **G3** (de 15 átomos de carbono) presenta 8 carbonos tipo cuaternario (C), 6 carbonos del tipo metino (CH) y un carbono del tipo metileno (CH₂).

El espectro RMN ¹³C desacoplado de ¹H de banda ancha (Figura N° 20) muestra 15 señales correspondientes a los átomos de carbono del compuesto activo **G3**. Los valores de desplazamiento químico obtenidos se muestran en la Figura 40. Estas señales tienen correlación con lo reportado en la bibliografía⁶¹⁻⁶³.

El desplazamiento químico del C-2 depende de las sustituciones en C-2' y C-6'. Así el C-2 resuena a δ 79,0 ppm en flavanonas no sustituidas, mientras que en 2',6'-dioxiflavanonas la resonancia se da a campo más alto δ 75,4 ppm⁶¹. En el espectro, el C-2 absorbe a δ 79,95 ppm, por lo que se descarta las sustituciones en C-2' y C-6' del anillo B^{61,62}.

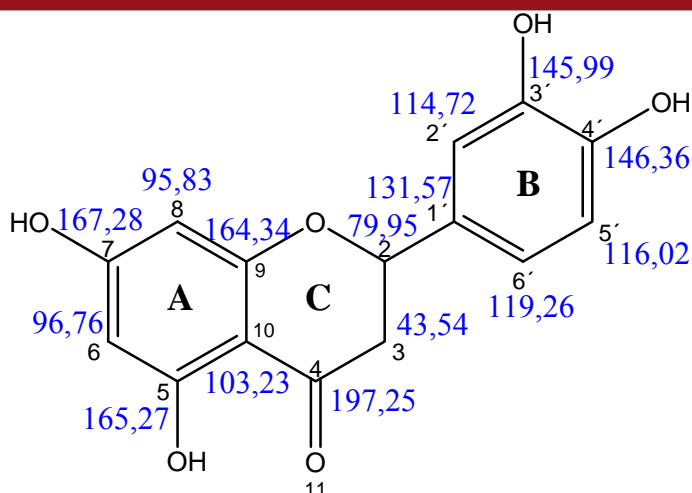


Figura N° 40. Valores de desplazamiento químico de RMN ^{13}C del compuesto activo G3 (flavanona)

El desplazamiento químico de la resonancia del C-3 no muestra alguna dependencia con las sustituciones en los anillos aromáticos (anillos A y B), por lo que en el espectro aparece a una resonancia de δ 43,54 ppm y se encuentra dentro del rango presentado por la bibliografía para el C-3 metileno alifático entre δ 39,5 - 46,4 ppm^{61,62}.

Las flavanonas 3-hidroxisustituida (flavanonoles) presentan la resonancia del C-2 y C-3 entre δ 70,9 y 85,6 ppm, es decir hay un desplazamiento a campo mas bajo de δ 30 y 5 ppm para el C-3 y C-2 respectivamente, en comparación de una flavanona⁶¹.

La resonancia del C-4 del carbonilo (C=O) depende de la presencia o ausencia del sustituyente en el C-5. En el caso de flavanonas C-5 no sustituidas el C-4 absorbe entre δ 189,7 - 191,7 ppm. Sin embargo, en las flavanonas 5-hidroxilada el C-4 resuena a campo más bajo δ 195,6 - 197,3 ppm, debido a que involucra una quelación (interacción de puente de hidrógeno) con el hidroxilo del C-5⁶¹. El espectro de RMN ^{13}C muestra la resonancia del C-4 a δ 197,25 ppm, lo que indica la presencia del sustituyente hidroxilo en

el C-5^{61,62}.

Según las comparaciones de los desplazamientos químicos de ¹³C en flavanonas con o sin sustituyentes en el anillo A y B, indican que la resonancia del anillo A no están afectados por los sustituyentes del anillo B y viceversa⁶¹. Así según los estudios realizados han concluido que la absorción de resonancia del C-6 está alrededor de 1 ppm desplazado respecto a la resonancia del C-8, con la resonancia de C-6 metino a campo más bajo que el C-8⁶¹. El espectro muestra los desplazamientos a δ 96,76 y 95,83 ppm correspondientes a los C-6 y C-8^{61,62}.

Los carbonos oxiarilos C-5, C-7 y C-9 aparecen entre δ 162,9 - 166,7 ppm. La resonancia en la posición a campo más bajo fue asignada a C-7, mientras que la posición a campo alto es para el C-9⁶¹. En el espectro de RMN ¹³C (Figura N° 20), el C-9 presenta una resonancia a δ 164,34 ppm, el C-5 a δ 165,27 ppm y a campo más bajo δ 167,28 ppm para el C-7^{61,62}.

La pérdida de conjugación entre los anillos B y C, provoca un desplazamiento a campo bajo de los carbonos del anillo B⁶². En el espectro, el C-1' presenta una resonancia a δ 131,57 ppm, mientras que los carbonos tipo metino C-2', C-5' y C-6' aparecen en δ 114,72; 116,02 y 119,26 ppm respectivamente. Estos valores tienen correspondencia con las señales reportados en la bibliografía^{61,62}.

Los carbonos hidroxilados C-3' y C-4' presentan una resonancia a campo más alto que el C-5 y C-7. El espectro de resonancia presenta el C-3' a δ 145,99 ppm y C-4' a δ 146,36 ppm^{61,62}.

La técnica de RMN bidimensional es muy utilizada en la asignación y confirmación estructural.

El espectro ^1H - ^1H COSY (Figura N° 21), muestra los acoplamientos entre los protones para la estructura planteada del compuesto G3 (flavanona). Así en el espectro, se observa que el protón H-3eq (2,72 ppm) acopla con los protones H-3ax (3,14 ppm) y H-2 (5,40 ppm). También podemos observar los acoplamientos débiles de los otros protones del anillo A y B.

La otra técnica complementaria, ^1H - ^{13}C HETCOR (Figura N° 22) muestra a los protones que están correlacionadas con los carbonos. De esta manera según el espectro se confirmó la asignación de cada uno de los protones a los carbonos de la estructura planteada de una flavanona para el compuesto **G3**.

A partir del análisis de los espectros IR, UV, EM, RMN ^1H , RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HETCOR, y la comparación de éstos con lo publicado en referencias bibliográficas, el compuesto con mayor actividad antioxidante **G3** es un flavonoide identificado como una flavanona (dihidroflavona) denominada 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol).

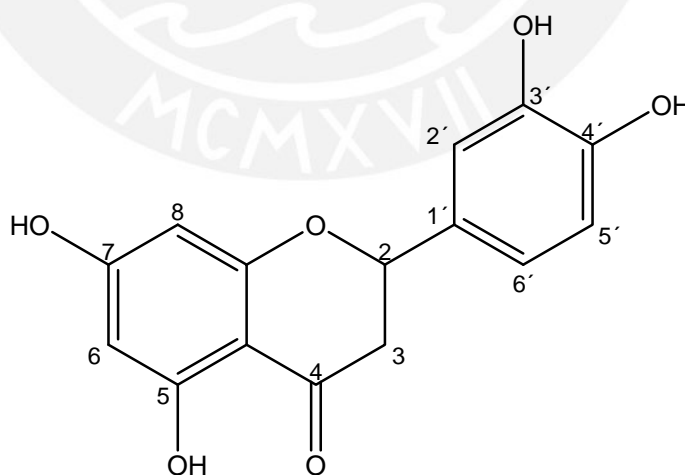


Figura N° 41. Estructura química de la 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol)

El eriodictiol fue el compuesto aislado con mayor actividad

antioxidante, de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. El compuesto es un sólido de color crema con punto de fusión, p.f.= 216 °C. Presenta 90,42 % de actividad antioxidante a la concentración de 10 µg/mL según el método de DPPH (Tabla N° 16). El mecanismo propuesto de captación del radical libre DPPH⁶⁴ se muestra en la Figura N° 42.

Asimismo, según el voltamograma cíclico obtenido para el compuesto activo (Figura N° 29), presenta un potencial de oxidación a ε_{pa1} 0,206 V, lo que comprueba su buena actividad. El proceso de oxidación del flavonoide (ROH) ocurre mediante la reacción⁴⁰:



Según la estructura elucidada para el flavonoide eriodictiol (Figura N° 41), podemos encontrar la relación entre estructura - actividad - potencial redox del principio activo responsable de la actividad antioxidante en la especie.

Existen tres criterios para evaluar la efectividad de la potencia de captación de radicales libres por los flavonoides^{65,66,67}:

- La estructura *orto*-dihidroxi en el anillo B, el cual le confiere alta estabilidad del radical formado y participa en la deslocalización del electrón.
- El 2,3 doble enlace en conjugación con la función 4-oxo en el anillo C, el cual es responsable de la deslocalización del electrón del anillo B. La actividad antioxidante está relacionada con la estructura en términos de la deslocalización del electrón del núcleo aromático. Cuando el compuesto reacciona con los radicales libres, el radical fenoxilo producido es estabilizado por efecto de resonancia del núcleo aromático.
- Los grupos 3- y 5-OH con la función 4-oxo en los anillos A y C

se requieren para obtener la máxima captación de los radicales.

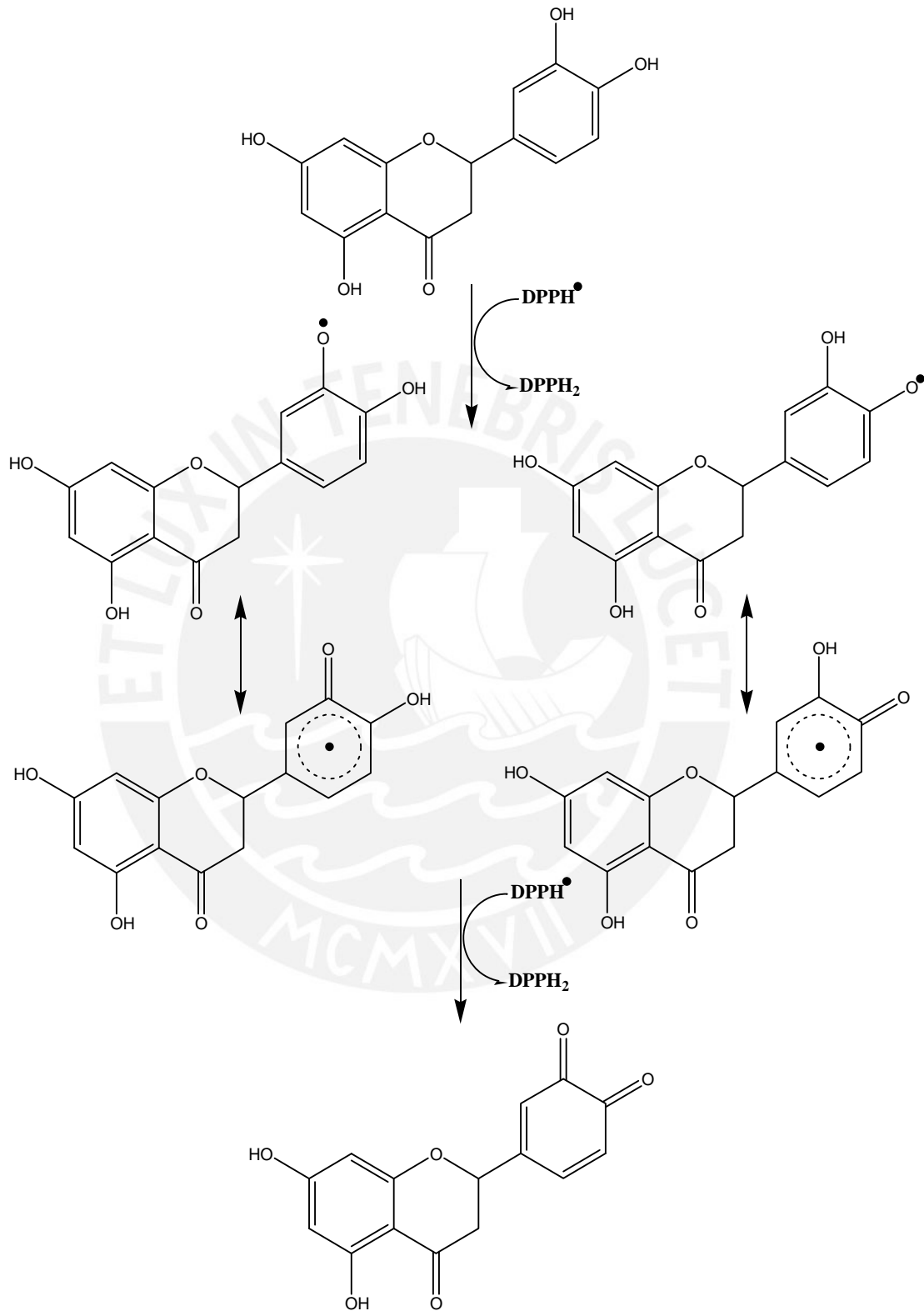


Figura N° 42. Mecanismo de captación del radical DPPH por el eriodictiol⁶⁴

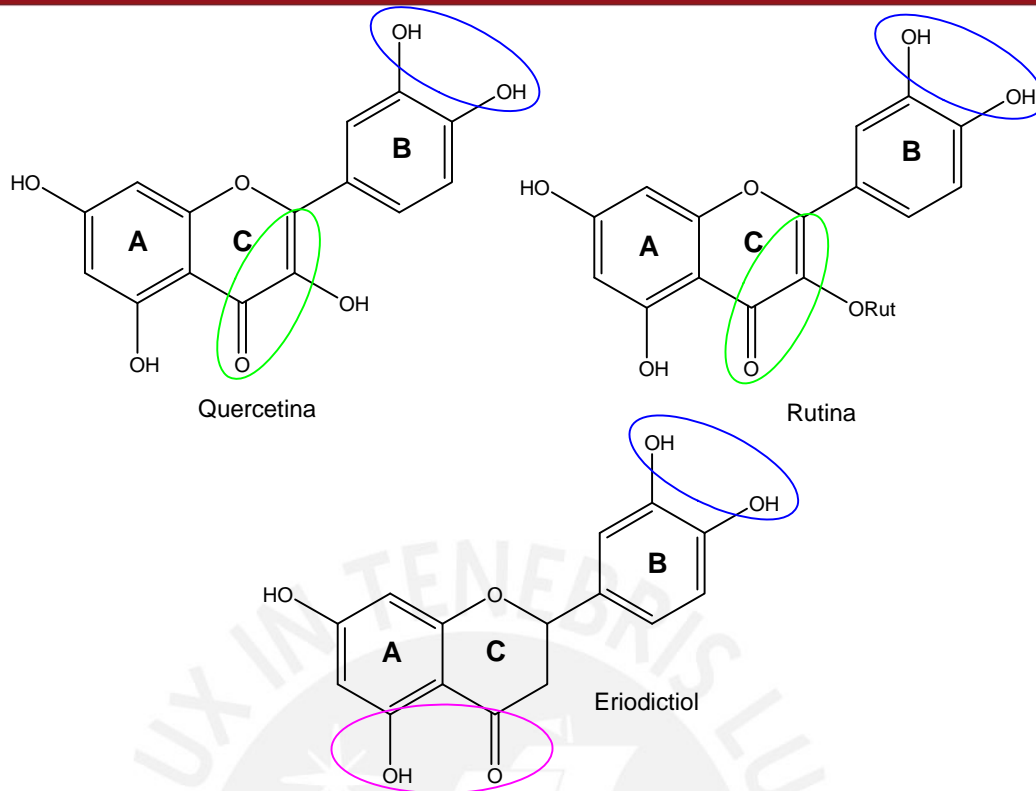


Figura N° 43. Aspectos estructurales de los flavonoides que determinan su actividad antioxidante

El 2,3 doble enlace no es tan relevante cuando el anillo B carece del arreglo *orto*-dihidroxi y solamente contiene un sustituyente hidroxilo, debido a que el anillo monofenólico no es un dador efectivo de hidrógeno⁶⁵.

La O-metilación de las sustituciones hidroxilo inactiva la actividad antioxidante de los flavonoides⁶⁸. Asimismo, la glicosilación de los flavonoides reduce su actividad antioxidante cuando se compara con sus correspondientes agliconas. Glicosidando el grupo 3-hidroxilo (o removiendo el grupo 3-OH) disminuye la actividad antioxidante^{68,69}. Este comportamiento estructural se muestra cuando comparamos a los flavonoides quercetina, rutina y eriodictiol (Figura N° 43).

La conjugación entre los anillos A y B del flavonoide no afecta de manera preponderante a la actividad antioxidante. Las flavanonas

tienen un anillo C heterocíclico saturado, lo que carece de conjugación entre el anillo A y B⁷⁰.

La presencia de la estructura tipo catecol (dos -OH adyacentes) del anillo B en el compuesto aislado, eriodictiol, es el más importante y responsable de la mayor actividad antioxidante (90,42 % a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$) a un menor potencial redox (ϵ_{pa1} 0,206 V) (electroquímicamente activo).

Asimismo, se determinaron los valores de EC_{50} para las fracciones estándares y compuesto activo aislado (Tabla N° 17). Entre los estándares, la quercetina presenta un EC_{50} muy bajo de 0,10 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica, que a muy baja concentración presenta buena actividad antioxidante. El compuesto aislado, eriodictiol, presenta un menor valor de EC_{50} (1,81 $\mu\text{g/mL}$) comparado con la rutina (EC_{50} 2,93 $\mu\text{g/mL}$). Esto indica que el eriodictiol presenta mayor actividad antioxidante que la rutina.



1. De los tres extractos alcohólicos de las especies vegetales estudiadas: *Carpotroche longifolia* (Poepp.) Benth., *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. y *Campomanesia lineatifolia* (Ruiz & Pav.), la *Bauhinia guianensis* presentó una mayor actividad antioxidante de 86,50 % a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, evaluados por el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).
2. La evaluación de la actividad antioxidante de la especie seleccionada se realizó aplicando dos métodos: el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el método electroquímico, empleando la voltametría cíclica.
3. Se evaluó la actividad antioxidante del extracto alcohólico (EBO) de corteza de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. y las fracciones derivadas del EBO: hexano (HE), acetato de etilo (AE), metanol (ME), acuoso (AC) e insolubles (IN), empleando como estándares 4 polifenoles sintéticos: quercetina, rutina, hidroxianisol butilado (BHA) y resorcinol. La fracción AE presentó la mayor actividad antioxidante de 88,52 % (a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$) a un potencial de oxidación de ε_{pa} 0,147 V.
4. Comparando los potenciales de oxidación y las propiedades antioxidantes de los compuestos estándares, el EBO y fracciones, se concluye que a muy bajo potencial de oxidación (entre 0,14 y 0,23 V) presentan una buena actividad antioxidante (entre 73 y 95 %).
5. El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (marcha fitoquímica) del EBO de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., mediante el procedimiento de Reyna (1999)⁵⁰ y Rondina & Coussio

- (1969)⁵¹, indica que contiene: grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, flavonoides y saponinas. Asimismo, según la prueba específica de la fracción AE, mediante la reacción de Shinoda nos indica que contiene flavonoides: flavanonas, flavanonoles y flavonoles.
6. De la separación, guiada por la actividad antioxidante, de la fracción AE de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., se aisló el compuesto con mayor actividad, la 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol), quien ha sido identificado mediante sus espectros IR, UV, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C, ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HETCOR, y la comparación de estos con lo publicado en las referencias bibliográficas.
 7. El flavonoide eriodictiol aislado presentó la mayor actividad antioxidante de 90,42 % a la concentración de 10 µg/mL y un potencia de oxidación a ϵ_{pa1} 0,206 V. El valor determinado para su EC₅₀ fue de 1,81 µg/mL, lo que indica que a muy baja concentración presenta buena actividad antioxidante y es comparable con los estándares rutina y quercetina.
 8. Se encontró la relación entre estructura - actividad - potencial redox del principio activo responsable de la actividad antioxidante en la especie. El grupo catecol (dos -OH adyacentes) en el anillo B del compuesto, es el principal responsable de la mayor actividad antioxidante a un menor potencial de oxidación (electroquímicamente activo).



1. Debido a que los antioxidantes son sustancias de mucho interés en diferentes campos industriales, principalmente en la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia, se recomienda continuar con la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidante naturales.
2. Luego de realizar el estudio químico y de la actividad antioxidante de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl., se recomienda llevar a cabo el bioensayo *in vivo*, realizando la evaluación preclínica.
3. Para la aplicación a nivel industrial se recomienda llevar a cabo procesos de retrosíntesis, de tal manera de encontrar al sustrato principal y reactivos para sintetizar el compuesto aislado eriodictiol.
4. Para el desarrollo de medicamentos sintéticos, se recomienda realizar estudios de optimización del compuesto prototipo de tal manera de obtener compuestos de alta eficacia y baja toxicidad.
5. Se recomienda realizar los estudios preclínicos y clínicos del medicamento sintético para que el producto pueda salir al mercado.
6. Para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* a nivel industrial, se recomienda aplicar el método químico (DPPH) y electroquímico (VC).



1. Suhartono, E., Viani, E., Apriyansa Rahmadhan, M., Syahuri Gultom, I., Farid Rakhman, M., Indrawardhana, D. (2012). Total Flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian. *APCBEE Procedia*, 4, 235-239.
2. Škrovánková, S., Mišurcová, L., Machů, L. (2012). Chapter Three - Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67, 75-139.
3. Luize da Silva, K., Cechinel Filho, V. (2002). Plantas del Género *Bauhinia*: Composición Química y Potencial Farmacológico. *Química Nova*, 3, 449-454.
4. Viana, E. P., Santa-Rosa, R. S., Almeida, S. S. M. S., Santos, L. S. (1999). Constituents of the Stem Bark of *Bauhinia guianensis*. *Fitoterapia*, 70, 111-112.
5. Viana, E. P., Santa-Rosa, R. S., Almeida, S. S. M. S., Santos, L. S. (2000). Naftaquinonas do Caule de *Bauhinia guianensis*. Brasil. Recuperado el 26 de mayo del 2009, de:
<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0997-2/index.html>.
6. Brack Egg, A. (1999). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Perú: Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas”.
7. Castillo, P. C. (2004). Estudio Químico y de Actividad Antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). Tesis de Maestría en Química, Mención Productos Naturales, Escuela de Graduados, Pontificia Universidad Católica del Perú.
8. Chávez, R., Plaza, A., Lock, O. (1996). Antioxidantes de Origen Vegetal. *Revista de Química*, X (1), 71-101.
9. Kook Lee, S., Mbwambo, Z. H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E. J. C., Mehta, R. G., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M. (1998). Evaluation

- of the Antioxidant Potencial of Natural Products. *Combinatorial Chemistry & High Troughput Screening*, 1, 35-46.
10. Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. (1986). Antioxidant Activity of Flavonoids and Reactivity with Peroxy Radical. *Phytochemistry*, 25 (2), 383-385.
 11. Silva, C. G., Herdeiro, R. S., Mathias, C. J., Panek, A. D., Silveira, C. S., Rodrigues, V. P., Rennó, M. N., Falcão, D. Q., Cerqueira, D. M., Minto, A. B. M., Nogueira, F. L. P., Quaresma, C. H., Silva, J. F. M., Menezes, F. S., Eleutherio, E. C. A. (2005). Evaluations of Antioxidant Activity of Brazilian Plants. *Pharmacological Research*, 52, 229-233.
 12. Tsimogiannis, D. I., Oreopoulou, V. (2004). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of 5,7,3',4'-Hydroxi-Substituted Flavonoids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 523-528.
 13. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
 14. Husain, S. R., Cillard, J., Cillard, P. (1987). Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Phytochemistry*, 26 (9), 2489-2491.
 15. Avendaño, L. (2001). Introducción a la Química Farmacéutica (2da edición). España: McGraw-Hill/Interamericana.
 16. Lock Sing, O. (1994). Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales (2da edición). Perú: Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidad Católica del Perú.
 17. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. (1995). Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine*, 19 (4), 481-486.

18. Born, M., Carrupt, P. A., Zini, R., Brée, F., Tillement, J. P., Hostettmann, K., Testa, B. (1996). Electrochemical Behaviour Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenols. *Helvetica Chimica Acta*, 79, 1147-1158.
19. Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, Simic, M. G. (1994). Flavonoids as Antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 116, 4846-4851.
20. Costa, J., Lock, O. (1993). Los Flavonoides como Compuestos Biológicamente Activos. *Revista de Química*, VII (1), 73-87.
21. Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., De Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid Interaction and its Effect on their Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 121, 691-696.
22. Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M. (2009). Major Flavonoids with Antioxidant Activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112, 885-888.
23. Šaric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kušic, B., Šverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D., Marotti, T. (2009). Antioxidant Effects of Flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. Rich bee Pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 547-554.
24. Leong, C. N. A., Tako, M., Hanashiro, I., Tamaki, H. (2008). Antioxidant Flavonoid Glycosides from the Leaves of *Ficus pumila* L. *Food Chemistry*, 109, 415-420.
25. Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Larondelle, Y. (2007). Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Fifteen Selected Plant Species from the Amazonian Region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
26. Gabrieli, C. N., Kefalas, P. G., Kokkalou, E. L. (2005). Antioxidant Activity of Flavonoids from *Sideritis raeseri*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 423-428.

27. Peng, Z. F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N. K., Chia, T. F., Tan, S. N., Chia, L. S. (2003). Antioxidant Flavonoids from Leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62, 219-228.
28. Braca, A., Sortino, Ch., Politi, M., Morelli, I., Mendez, J. (2002). Antioxidant Activity of Flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 379-381.
29. Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001). Antioxidant Principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64 (7), 892-895.
30. Gordon, M. H., An, J. (1995). Antioxidant Activity of Flavonoids Isolated from Licorice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (7), 1784-1788.
31. Igile, G. O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fafunso, M., Fasanmade, A. A. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (11), 2445-2448.
32. Shahidi, F., Ho, C. T. (2007). Antioxidant Measurement and Applications: An Overview. *Antioxidant Measurement and Applications*, 956 (1), 2-7. Recuperado el 15 de octubre del 2009, de: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-2007-0956.ch001>.
33. Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. (2011). Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (α TEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay. *Food Chemistry*, 129, 139-148.
34. Zhang, D., Chu, L., Liu, Y., Wang, A., Ji, B., Wu, W., Zhou, F., Wei, Y., Cheng, Q., Cai, S., Xie, L., Jia, G. (2011). Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density

- Functional Theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (18), 10277-10285.
35. Doroteo, V. (2005). Protocolo para la Evaluación de la Actividad Antioxidante (% AA) con DPPH. Pontificia Universidad Católica del Perú. Manuscrito no publicado.
 36. Castillo, P. C., Lock, O. (2005). Compuestos con Actividad Antioxidante en la Especie *Lepechinia meyenii* (Walp.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 71 (4), 227-236.
 37. Casado, R., Landa, A., Rehecho, S., Calvo, M. (2007). Estudio Comparativo de la Actividad Antioxidante de los Extractos de *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae) y de sus Flavonoides, respecto a Antioxidantes Alimentarios. En 3er Congreso Internacional. III Congreso Peruano de Plantas Medicinales. Trabajos presentados (p. 72-75). Lima, Perú
 38. Burda, S., Oleszek W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Favonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 2774-2779.
 39. Muedas, G., La Rosa Toro, A., Robles, J. (2008). Evaluación Electroquímica de la Actividad Antioxidante del Extracto Alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74 (4), 233-246.
 40. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. (2005). Evaluation of the Antioxidant Activity of Flavonoids by “Ferric Reducing Antioxidant Power” Assay and Cyclic Voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 174-184.
 41. Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A. (2004). Electrochemical Approach for Discriminating and Measuring Predominant Flavonoids and Phenolic Acids Using Differential Pulse Voltammetry: Towards an Electrochemical Index of Natural Antioxidants. *Analytica Chimica*

- Acta*, 511, 71-81.
42. Alonso, A. M., Guillén, D. A., Barroso, C. G. (2003). Development of an Electrochemical Method for the Determination of Antioxidant Activity. Application to Grape-Derived Products. *European Food Research and Technology*, 216, 445-448.
 43. Rapta, P., Mišik, V., Staško, A., Vrabel, I. (1995). Redox Intermediates of Flavonoids and Caffeic Acid Esters from Propolis: An EPR Spectroscopy and Cyclic Voltammetry Study. *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (5), 901-908.
 44. Silverstein, R., Bassler, G., Morrall, T. (1998). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (6ta edición). New York: Wiley International.
 45. Solomons, T. W. G. (1996). *Organic Chemistry* (6ta edición). New York: John Wiley & Sons, Inc.
 46. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1999). *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica* (2da edición). New York: Síntesis S.A.
 47. Rouessac, F., Rouessac, A. (2003). *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas* (5ta edición). España: McGraw-Hill/Interamericana.
 48. San Feliciano, A., Pérez, A. L., Del Olmo, E. (2007). *Manual de Determinación Estructural de Compuestos Naturales*. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología, CYTEC; Organización del Convenio Andrés Bello.
 49. Coll, J. C., Bowden, B. F. (1986). The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *Journal of Natural Products*, 49 (5), 934-936.
 50. Reyna, V. (1999). *Marcha Fitoquímica. Práctica de Laboratorio del Curso de Química de Productos Naturales*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería. Manuscrito no publicado.

51. Rondina, R., Coussio. (1969). Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales. *Revista de Investigaciones Agropecuarias-INTA*, 6 (33), 351-366.
52. Fukumoto, L. R., Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8), 3597-3604.
53. Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., Zhang, H. Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS⁺ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), 4669-4674.
54. Mabry, T., Markham, K., Thomas, M. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. Berlín: Springer-Verlag New York Inc.
55. Portet, B., Fabre, N., Rozenberg, R., Habib-Jiwan, J. L., Moulis, C., Quetin-Leclercq, J. (2008). Analysis of Minor Flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* Using Liquid Chromatography Couple with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210, 45-54.
56. March, R. E., Lewars, E. G., Stadey, C. J., Miao, X. S., Zhao, X., Metcalfe, C. D. (2006). A Comparison of Flavonoid Glycosides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248, 61-85.
57. Shi, P., He, Q., Song, Y., Qu, H., Cheng, Y. (2007). Characterization and Identification of Isomeric Flavonoid *O*-diglycosides from Genus *Citrus* in Negative Electrospray Ionization by Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 598, 110-118.
58. Kazuno, S., Yanagida, M., Shindo, N., Murayama, K. (2005). Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glycosyl Flavonoids, Including Dihydrochalcones with Neutral Loss Scan

- Mode. *Analytical Biochemistry*, 347, 182-192.
59. Lhuillier, A., Fabre, F., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., Moulis, C. (2007). Comparison of Flavonoid Profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by Liquid Chromatography-UV Diode Array Detection-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1160, 13-20.
60. Harborne, J. B. (1994). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (1ra edición). London: Chapman & Hall.
61. Agrawal, P. K. (1989). *Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids*. New York: Elsevier Science Publishing Company INC.
62. Harborne, J. B., Mabry, T. J. (1982). *The Flavonoids: Advances in Research* (1ra edición.). London: Chapman & Hall Ltd.
63. Méndez, B., Rojas, A. C., Bahsas, A., Jaimes, R., Triana, J. (1980). Estudio por Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 de Algunos Flavonoides Naturales. *Acta Científica Venezolana*, 31, 394-397.
64. Tsimogiannis, D. I., Oreopoulou V. (2006). The Contribution of Flavonoid C-Ring on the DPPH Free Radical Scavenging Efficiency. A Kinetic Approach for the 3',4'-hydroxy Substituted Members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7, 140-146.
65. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
66. Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., Wang, J. (1996). Antioxidant Activity of Natural Flavonoids is Governed by Number and Location of Their Aromatic Hydroxyl Groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79, 157-163.
67. Wolfe, K. L., Hai Liu, R. (2008). Structure-Activity Relationships of

- Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (18), 8404-8411.
68. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22 (5), 749-760.
69. Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N. (2005). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids Isolated from Different Plant Species. *Food Chemistry*, 92, 349-355.
70. Tsimogiannis, D. I., Oreopoulou V. (2007). Defining the Role of Flavonoid Structure on Cottonseed Oil Stabilization: Study of A- and C- Ring Substitution. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 129-136.
71. Muedas, G. (2006). Estudio Químico de las Hojas del Toe (*Datura sanguínea* (R. & P.) D. Don). Tesis de Licenciatura en Química, Mención en Productos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería.



ANEXO N° 1

**IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA de la *Bauhinia guianensis*
var. *kuntiana* Aubl.**

El profesional que suscribe deja Constancia que:

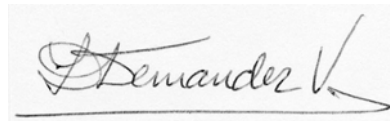
La muestra vegetal de procedencia del Bosque Primario del Puerto Almendras- Río Nanay, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto; recibida por el Licenciado Golfer Muedas Taipe, ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de A. Cronquist de 1981 como sigue:

DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Rosidae
ORDEN : Fabales
FAMILIA : Fabaceae
GÉNERO : *Bauhinia*
ESPECIE : *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

N.V. : “Escalera del mono”

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado.

Lima, 09 de julio del 2009



Mg. Irma Fernández Valderrama
Bióloga-Botánica
CBP 1165
Dpto. de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias
Universidad Peruana Cayetano Heredia

ANEXO N° 2

**PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE CON EL RADICAL LIBRE 2,2-DIFENIL-1-
PICRILHIDRACIL (DPPH)**

El protocolo para la evaluación de la actividad antioxidante con DPPH³⁵ nos indica la forma correcta de preparar las soluciones y luego medir las absorbancias a ciertos tiempos de reacción.

1. Preparación de las muestras a las concentraciones de 10 y 50 µg/mL

Proceder según la Tabla N° 1, por duplicado.

Tabla N° 1. Preparación de muestra y estándar a 10 y 50 µg/mL

	Código	Concentración (µg/mL)	Muestra (µL)	Etanol 95° (µL)
	DPPH	-----	-----	1250
Rutina	RUT10	10	175	1075
	RUT50	50	875	375
Muestra	M10	10	175	1075
	M50	50	875	375

Nota N° 1.- Se preparan por duplicado, pues uno de ellos se utilizará para el blanco (paso N° 3) y el otro para la reacción (paso N° 4).

2. A los dos viales con código DPPH, adicione 500 µL de DPPH.

Leer la Nota N° 2.

Código	DPPH (µL)
DPPH	500

Nota N° 2.- Programar la adición de etanol o DPPH de tal manera que las lecturas se efectúen 30 minutos después de cada adición.

3. Preparación de los blancos (rutina y muestras), adicione 500 μL de etanol 95°.

Proceder según la Tabla N° 2. Lea las notas N° 1 y N° 2.

Tabla N° 2. Preparación de los blancos (muestra y estándar) a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Blancos	Código	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Etanol 95° (μL)
Rutina	BRUT10	10	500
	BRUT50	50	500
Muestra	BM10	10	500
	BM50	50	500

4. Para las reacciones, adicione 500 μL de solución de DPPH.

Proceder según la Tabla N° 3. Leer las notas N° 1 y N° 2.

Tabla N° 3. Adición de DPPH para muestras a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Reacción	Código	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DPPH (μL)
Rutina	RUT10	10	500
	RUT50	50	500
Muestra	M10	10	500
	M50	50	500

Observaciones

- i Todas las muestras se encontrarán en un volumen final de 1,75 mL.
- ii Se recomienda la siguiente secuencia de lecturas:
 - Primero: DPPH
 - Segundo: Blancos a las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ese orden, de cada muestra.
 - Tercero: Reacciones a las concentraciones de 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ese orden, de cada muestra.

Cálculos

El porcentaje de la actividad antioxidante (% AA) se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_{control}} \right\}$$

Donde,

- % AA : Porcentaje de actividad antioxidante
 A_m : Absorbancia de la muestra con DPPH
 A_b : Absorbancia del blanco de la muestra
 $A_{control}$: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(A_m - A_b)/A_{control}$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra (muestra pura o extracto).

Preparación de las soluciones

Importante: Tanto los reactivos como las muestras deben ser pesados en la balanza semi-microanalítica (precisión de 0,01 mg):

- a) DPPH: 0,3 mM de DPPH en etanol de 95° (2,95 mg en fiola de 25 mL). Proteger la solución de la luz y en refrigeradora (-10 °C) hasta 30 minutos antes de su uso. La solución puede guardarse hasta por cinco días en refrigeradora y protegida de la luz.
- b) RUTINA: 0,1 mg/mL de rutina en etanol de 95° (1,0 mg en fiola de 10 mL).
- c) MUESTRA: 0,1 mg/mL de muestra en etanol de 95° (1,0 mg en fiola de 10 mL).

Disolver el DPPH, la rutina y las muestras con ayuda de un sonicador a temperatura ambiente.

ANEXO N° 3

METODOLOGÍA GENERAL DE INVESTIGACIÓN

Para realizar sus investigaciones los químicos orgánicos en especies vegetales han establecido una metodología general⁷¹ que involucra las siguientes etapas, agrupadas en dos partes principales:

A. Trabajo Preliminar

1. Selección de la planta
2. Encuesta etnobotánica
3. Colección de la planta
4. Determinación sistemática (identificación botánica)
5. Estudio bibliográfico

B. Trabajo experimental en el laboratorio

1. Secado y molienda de la planta
2. Extracción sólido-líquido de la muestra vegetal: Extracto Bruto Orgánico
3. Metodología para la evaluación de la actividad antioxidante (% AA)
 - a. Evaluación de la actividad antioxidante (% AA) con 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).
 - b. Evaluación de la actividad antioxidante mediante mediciones electroquímicas.
4. Aislamiento de compuestos puros por métodos cromatográficos: guiados por ensayos químicos y electroquímicos.
5. Identificación del compuesto puro:
 - a. Procedimientos clásicos: punto de fusión, composición centesimal, cromatografía en capa fina.
 - b. Procedimientos espectroscópicos: IR, UV, Masas, RMN ¹H, RMN ¹³C y bidimensionales.

ANEXO N° 4

MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

La Marcha Fitoquímica Preliminar propuesta por Reyna (1999)⁵⁰ de acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio (1969)⁵¹ se basa en el fraccionamiento de un extracto metanólico de la muestra vegetal estudiada en diferentes solventes y la identificación de los tipos de principios activos presentes en cada uno de ellos mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

1. Obtención de las fracciones**a. Fracción (a)**

- i Se toman 6,0 g de muestra seca y pulverizada y se mezclan en un balón de 100 mL con 50 mL de metanol. Se deja macerar durante 70 horas a temperatura ambiente.
- ii La mezcla se calienta a reflujo durante 4 horas. Se filtra en caliente lavando el residuo con metanol hasta completar 50 mL. Esto constituye la *fracción (a)*.

b. Fracción (b)

- i Se separa 5 mL de la *fracción (a)* y el resto se lleva a sequedad en un rotavapor.
- ii El residuo se extrae con 10 mL de ácido clorhídrico al 1 % y se filtra utilizando papel de filtro lento. La operación se repite con 5 mL de ácido clorhídrico al 1 %. Las soluciones ácidas se reúnen en un erlenmeyer de 50 mL y se guardan.
- iii Los residuos insolubles en la solución ácida se disuelven en 5 mL de cloroformo con ayuda de calor y fuerte agitación. Esta solución se filtra a través de celita completando a través del filtro a 5 mL. Esto constituye la *fracción (b)*.

c. Fracción (c)

- i La solución ácida que se guardó en la etapa anterior se lleva a pH 9 y utilizando $\text{NH}_{3(\text{ac})}$ 15 N, y luego se extrae dos veces con 25 mL de cloroformo CHCl_3 en un embudo de separación de 125 mL.
- ii La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua. El agua de lavado se reúne con la fase acuosa obtenida.
- iii La fase clorofórmica se seca con sulfato de sodio y se filtra completando a 50 mL. Esto constituye la *fracción (c)*.

d. Fracción (d)

- i La fase acuosa obtenida anteriormente se semisatura con sulfato de sodio agregando 0,1 g de sal por mL de solución. Luego se extrae dos veces con 25 mL de una mezcla de cloroformo-etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL.
- ii Se lava la fase orgánica con 10 mL de solución semisaturada de sulfato de sodio reuniendo toda la fase acuosa.
- iii La fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se filtra obteniéndose la *fracción (d)*.

e. Fracción (e)

- i La fase acuosa obtenida en la etapa anterior constituye la *fracción (e)*.

f. Fracción (f)

- i En un tubo de ensayo de 18 x 160 mm se calienta a 100 °C y con agitación 1 g de muestra pulverizada en 10 mL de agua durante 15 minutos.
- ii Se filtra en caliente utilizando papel de filtro rápido, se completa el filtrado a 10 mL, y se deja enfriar. Esta solución constituye la *fracción (f)*.

2. Pruebas de identificación de principios activos.

a. Prueba de la ninhidrina sobre las *fracciones (a)* y *(f)* (Aminogrupos primarios y/o secundarios).

- i Sobre papel de filtro lento de 5 cm de diámetro se agregan dos gotas de la fracción (a) y sobre otro papel, dos gotas de la fracción (f) con una pipeta Pasteur. Los papeles se dejan secar por 5 minutos.
- ii Sobre cada uno de los papeles se agregan dos gotas de solución de ninhidrina al 0,2 % en etanol.
- iii Se preparan blancos de metanol-ninhidrina y agua-ninhidrina del mismo modo.
- iv Los papeles se colocan en una estufa a 110 °C durante 30 minutos.

Observación.- La aparición de una mancha de color violeta indica la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios.

b. Reacción con cloruro férrico sobre la solución acuosa de la *fracción (a)* (Grupos fenólicos libres).

- i El resto de la fracción (a) se lleva a sequedad en el rotavapor.
- ii El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua y se filtra dicha solución (“solución a”), a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro utilizando papel de filtro lento, a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.
- iii Se colocan dos gotas de “solución a” sobre una placa de toque blanca y se agrega una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1 %.

Observación.- La observación da un color azul, verde, negro o marrón indica la presencia de grupos fenólicos libres.

c. Reacción con solución de gelatina sobre la solución acuosa de la *fracción (a)* (Taninos).

- i Se colocan cuatro gotas de “solución a” (ver 2.b.ii) sobre una luna de reloj de 7,5 cm de diámetro apoyada en fondo negro, y se adicionan dos gotas de solución de gelatina al 0,5 %.

Observación.- La formación de un precipitado blanco indica la

presencia de taninos.

d. Reacción de Liebermann-Burchard sobre las *fracciones (b), (c)* y la “solución b” de la *fracción (d)* (Triterpenoides y esteroides).

Nota: El color y la intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

- i Se separan 10 mL de la *fracción (c)* en un tubo de 18 x 160 mm. Se concentra hasta un volumen de 0,5 mL en el rotavapor y se traslada la solución a un tubo de 0,9 cm de diámetro.
- ii En dos tubos de ensayo de 0,9 cm de diámetro se adicionan 8 gotas de la *fracción (b)*.
- iii Se agrega a cada tubo 8 gotas de anhídrido acético y se agita fuertemente durante 20 segundos.
- iv Se deja resbalar por la pared de cada tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar y se observa.
- v La *fracción (d)* se lleva a sequedad con un rotavapor y se redisuelve en 2,5 mL de etanol. Se filtra la solución a través de un embudo de 3,5 cm de diámetro y papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. Esto constituye la “solución b”.
- vi Se coloca 0,8 mL de la “solución b” en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se lleva a sequedad con la ayuda de un baño maría. El residuo se disuelve en 0,5 mL de cloroformo y se siguen los pasos iii y iv.

Observación.- La formación de una fase superior verde, azul o negra a partir de una interfase de color rojo o naranja indica reacción positiva para triterpenos y esteroides.

e. Reacción de Bornträger sobre la *fracción (b)* (Naftoquinonas y antraquinonas, antranas y antranoles).

- i El resto de la *fracción (b)* se dispone en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm, se añade 5 mL de hidróxido de sodio al 5 % en agua y se agita.

Observación.- Una coloración roja en la fase acuosa indica la presencia

de quinonas, antronas o antranoles.

f. Reacciones para alcaloides sobre la *fracción (c)* y la “solución b” (Ver sección 2.d.v)

i Se lleva a sequedad la *fracción (c)* y el residuo se disuelve en 2 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1 %. Se colocan 3 gotas de la solución ácida en cada una de tres lunas de reloj de 7,5 mm de diámetro apoyadas sobre fondo negro. A la primera luna se le agregan 2 gotas del reactivo de Dragendorff, a la segunda, 2 gotas del reactivo de Mayer, y a la tercera, 2 gotas del reactivo de Wagner.

ii En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se lleva a sequedad 0,8 mL de la “solución b” con la ayuda de rotavapor. El residuo se disuelve en 0,3 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1%. Se filtra a través de papel de filtro lento y se reparte el filtrado en tres lunas de reloj de 7,5 cm de diámetro. Luego se adicionan los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente.

Observación.- La observación de turbidez o precipitados anaranjado, crema y marrón en las reacciones de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente indican la presencia de alcaloides. La ausencia de precipitado o turbidez para alguno de los reactivos indica que la muestra no tiene alcaloides.

g. Reacción de Rosenheim sobre la “solución b” (Ver sección 2.d.v) y sobre la *fracción (e)* (Leucoantocianidinas y catequinas).

i En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la *fracción (e)*.

ii A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se agita y se calienta durante 10 minutos en baño maría.

iii Se deja enfriar las mezclas, se agrega en cada tubo 8 gotas de alcohol amílico y se agita.

iv Las mezclas se dejan en reposo y luego se observan las fases amílicas.

Observación.- Una coloración roja en la fase amílica indica la presencia de leucoantocianidinas, un color marrón indica la presencia de catequinas.

h. Reacción de Shinoda sobre la “solución b” (Ver 2.d.v) y sobre la *fracción (e)*. (Flavonoides, excepto chalconas, dihidrochalconas, catequinas e isoflavonas).

i En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se colocan tres gotas de la “solución b” y se agrega 2 mL de agua. En otro tubo igual se colocan 2 mL de la *fracción (e)*.

ii A cada tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agita bien.

iii A cada tubo se agregan limaduras de magnesio y se agita. Luego se deja reposar los tubos por 5 minutos.

iv Se adicionan 8 gotas de alcohol amílico a cada tubo, se agita y se deja reposar nuevamente. Se observa el color de la fase amílica.

Observación.- Una coloración roja o rosada en la fase amílica indica la presencia de flavonoides (excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

i. Prueba de la espuma sobre la *fracción (f)* (saponinas)

i Se coloca 1 mL de la *fracción (f)* en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se agita durante 15 segundos. Luego se deja en reposo durante 15 minutos. Se mide la altura de la espuma.

Observación.- La formación de espuma de una altura mayor a 5 mm y que permanezca por lo menos 15 minutos indica la presencia de saponinas.

ANEXO N° 5

RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

DE LA *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.

Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultado	Observación (color de solución y/o precipitado)
Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	-	Mancha de color marrón
		f	-	Mancha de color marrón
Grupos fenólicos libres	Cloruro férrico	a	+	Precipitado de color verde a negro
Taninos	Gelatina	a	+	Formación de precipitado marrón
		b	+	Anillos anaranjado
Triptenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	c	+	Anillos anaranjado
		d	+	Anillos anaranjado
Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	-	Fase acuosa de color verde-amarillo
		c	-	No hay formación de precipitado
		d	-	No hay formación de precipitado
Alcaloides	Reactivo de Mayer	c	-	No hay formación de precipitado
		d	-	No hay formación de precipitado
	Reactivo de Wagner	c	-	No hay formación de precipitado
		d	-	No hay formación de precipitado
Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembeim	d	+	Fase amílica de color rojo oscuro
		e	-	Fase amílica de color amarillo claro
Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	+	Fase amílica de color amarillo
		e	+	Fase amílica de color rojo
Saponinas	Prueba de la espuma	f	+	Formación de espuma (h=5mm)

ANEXO N° 6

PRUEBAS ESPECÍFICAS PARA LA DETECCIÓN DE FLAVONOIDES PRESENTES EN PLANTAS

Para la detección de flavonoides se realizan diferentes ensayos de coloración. A continuación se describen un ensayo general como es el ensayo de Shinoda, y otros ensayos más específicos para varias clases de flavonoides¹⁶.

1. Reacción de Shinoda

En la reacción de Shinoda, los flavonoides al ser tratados con ácido clorhídrico y magnesio dan complejos coloreados (de rojo pálido a oscuro). Al añadir un poco de alcohol isoamílico y agitar, el color pasa a la capa isoamílica.

Procedimiento

- i Se colocan 2-3 g de muestra vegetal seca y molida en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm.
- ii Se adiciona 20 mL de metanol y se coloca en un “baño maría” y se hace hervir por 5 minutos.
- iii Se filtra la solución metanólica, a través de papel filtro “rápido” y un embudo de vidrio pequeño, recibiendo los filtrados en un tubo de ensayo seco de 18 x 150 mm.
- iv Se concentra la solución metanólica hasta 4-5 mL y se coloca en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.
- v Luego, al tubo se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agita bien.
- vi Se agregan limaduras de magnesio y se agita. Luego se deja reposar los tubos por 5 minutos.
- vii Se adicionan 1 mL de alcohol amílico a cada tubo, se agita y se deja

reposar nuevamente. Se observa el color de la fase amíllica.

Observación.- Una coloración roja o rosada en la fase amíllica indica la presencia de flavonoides (excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas).

2. Otros ensayos

Reacción con álcalis

Los extractos acuosos pueden mostrar variación de color al adicionar un álcali; así, la presencia de flavonas, flavanoles e isoflavonas dan una coloración amarilla; flavononas y flavonoles cambian de amarillo a naranja; chalconas de naranja a rojizo.

Prueba de Marini Bettolo

Los flavonoides con una solución de SbCl_5 en CCl_4 , en general, dan colores característicos o formación de precipitados. Así, por ejemplo, las flavonas dan precipitado amarillo o anaranjado, y las chalconas rojo oscuro o violeta.

Reacción con ácido sulfúrico, H_2SO_4 concentrado

Las flavonas y flavonoles dan coloraciones fuertemente amarillas; las flavanonas, anaranjadas o guindas; las chalconas y auronas, rojo guinda o rojo azulado.

Reacción con solución acuosa o etanólica de FeCl_3

Presenta una coloración con cualquier compuesto fenólico. Pero la aparición de un color verde sugiere la presencia de un derivado de catecol y un color azul de un derivado de pirogalol.

ANEXO N° 7

**CURVAS DE CALIBRACIÓN DE MUESTRAS Y ESTÁNDARES
PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA,
EC₅₀**

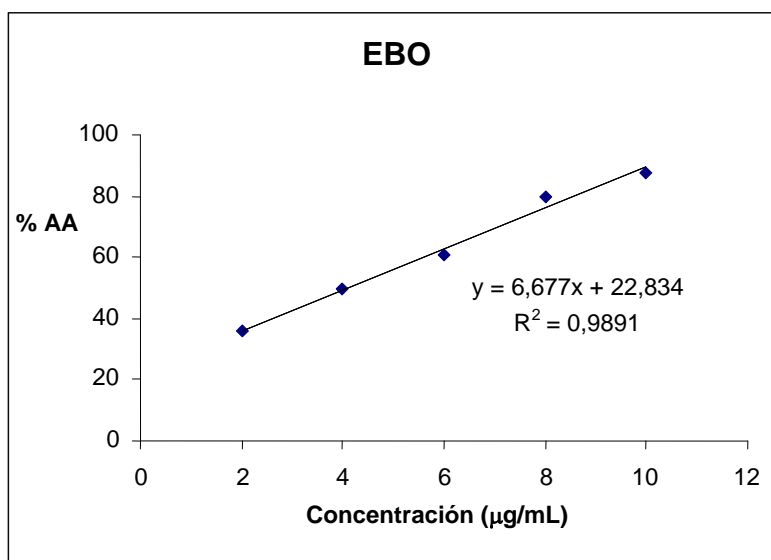


Figura N° 1. Curva de calibración del extracto bruto orgánico (EBO)

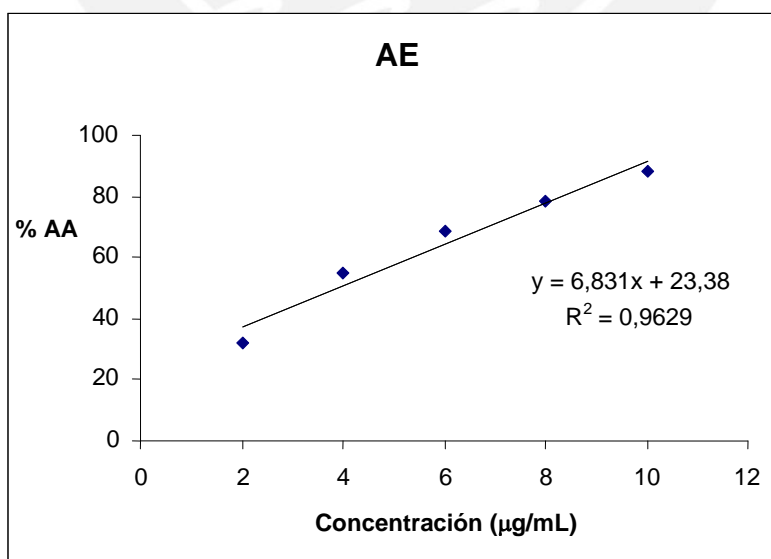


Figura N° 2. Curva de calibración del acetato de etilo (AE)

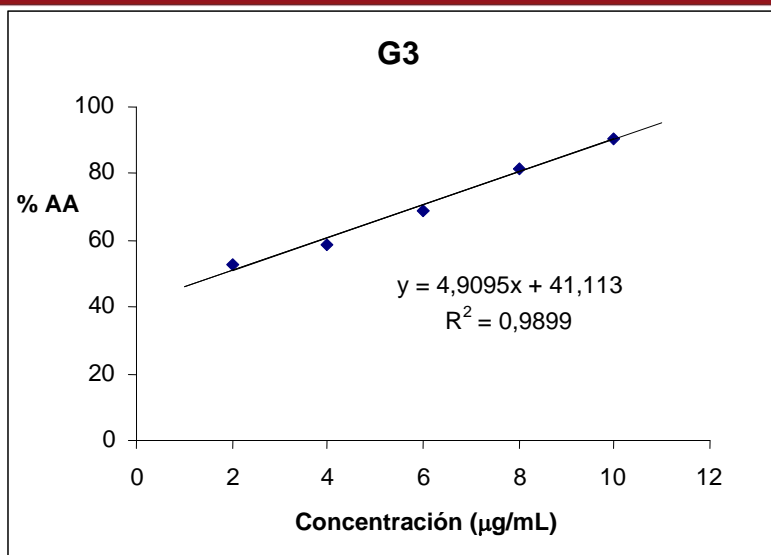


Figura N° 3. Curva de calibración de la fracción activa G3

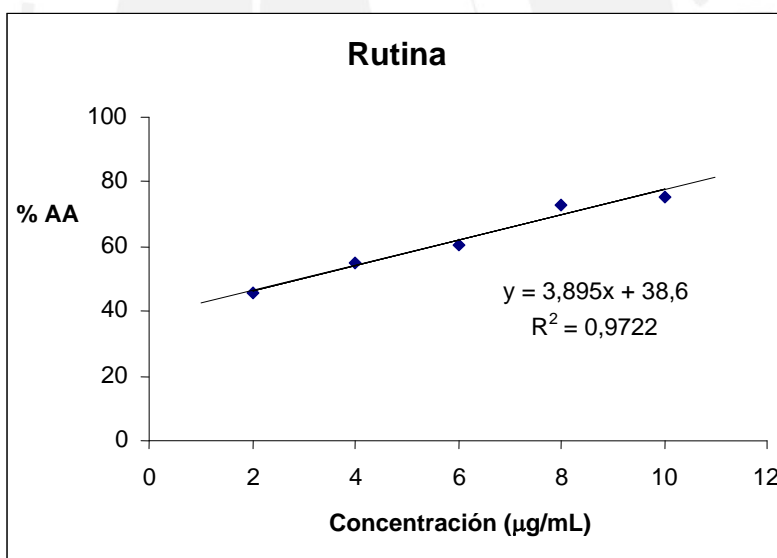


Figura N° 4. Curva de calibración del estándar rutina

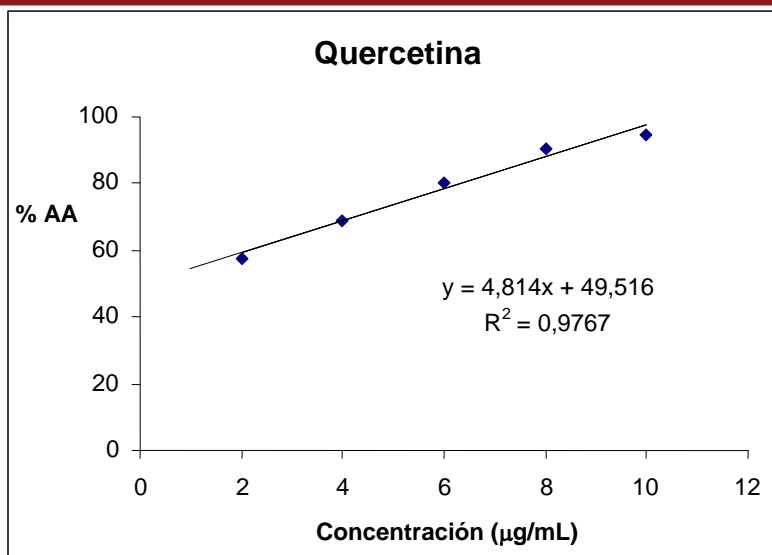


Figura N° 5. Curva de calibración del estándar quercetina

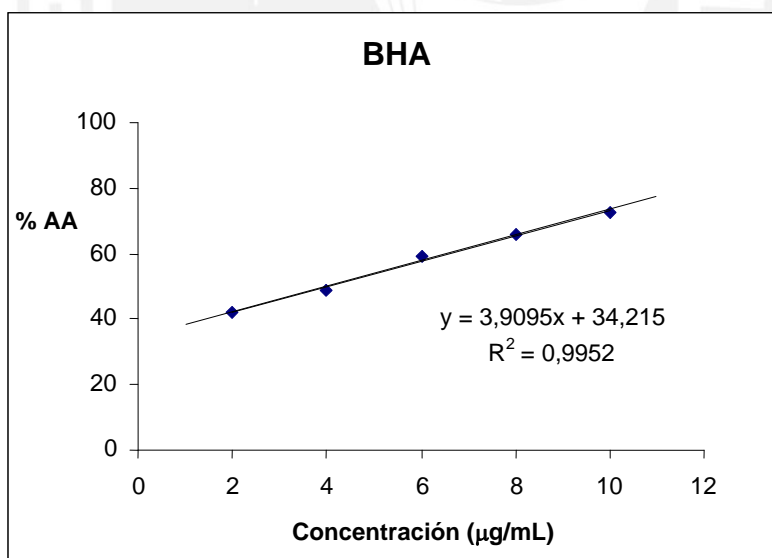


Figura N° 6. Curva de calibración del estándar hidroxianisol butilado (BHA)

ANEXO N° 8

ANÁLISIS ESPECTRAL ULTRAVIOLETA PARA FLAVONOIDES CON REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO

El método más usual para determinar el tipo de flavonoide, así como su modelo de oxigenación, es la absorción UV-Visible. Este modo de identificación puede ser definido por el uso de reactivos de desplazamiento (batocrómico) de las bandas de absorción^{16,54}.

1. Preparación de soluciones

a. Flavonoide: *Solución (a)*

Disolver 0,1 mg del flavonoide en 10 mL de metanol de grado espectroscópico.

b. Metóxido de sodio: *Solución (b)*

Agregar cuidadosamente 0,25 g de sodio metálico recién cortado a 10 mL de metanol grado espectroscópico.

c. Cloruro de aluminio: *Solución (c)*

Agregar cuidadosamente 0,5 g de AlCl_3 anhidro a 10 mL de metanol grado espectroscópico.

d. Ácido clorhídrico: *Solución (d)*

Mezclar 5 mL de HCl concentrado con 10 mL de agua destilada.

e. Acido bórico: *Solución (e)*

Agregar H_3BO_3 anhidro en polvo a 10 mL de metanol grado espectroscópico hasta obtener una solución saturada.

2. Análisis espectral

a. En metanol. Medir el espectro con 2 mL de la *solución (a)*.

Observación.- Los espectros de flavonoides presentan dos máximos de absorción en los rangos 240 - 285 nm (Banda II) y 300 - 550 nm

(Banda I).

- b. En metóxido de sodio.** Medir inmediatamente después de la adición de 3 gotas de la *solución (b)* a 2 mL de la *solución (a)*. Medir nuevamente el espectro después de 5 minutos.

Observación.- Provoca la ionización de todos los grupos hidroxilos, la degradación del espectro con el tiempo es un buen indicador de la presencia de grupos sensibles a álcalis.

- c. En cloruro de aluminio.** Medir inmediatamente después de la adición de 3 gotas de la *solución (c)* a 2 mL de la *solución (a)*.

Observación.- Forma complejos con grupos *orto*-dihidroxilo y con grupos hidroxil-cetona vecinos.

- d. En AlCl_3/HCl .** Medir inmediatamente después de la adición de 3 gotas de la *solución (d)* a la solución obtenida anteriormente (*solución 2.c*).

Observación.- El complejo formado con los grupos *orto*-dihidroxilo es lábil ante la presencia de HCl, mientras que en el segundo caso el complejo formado con grupos hidroxil-cetona es estable.

- e. En acetato de sodio.** Medir inmediatamente después de agregar un exceso de acetato de sodio en polvo a 2 mL de la *solución (a)*. Registrar dentro de 2 y 5 minutos de la adición para comprobar si hubo o no descomposición.

Observación.- Provoca la ionización del grupo 7-hidroxilo.

- f. En acetato de sodio/ H_3BO_3 .** Se aplica uno de los dos métodos:

- i** Con descomposición. Agregar 5 gotas de la *solución (e)* a 2 mL de la *solución (a)*. Saturar rápidamente la solución con acetato de sodio en polvo y registrar el espectro.
- ii** Sin descomposición. A la solución obtenida anteriormente (*solución 2.e*) agregar H_3BO_3 en polvo hasta obtener una solución saturada y registrar el espectro.

Observación.- Formación de complejos con grupos *orto*-dihidroxilo.