



PONTIFICIA **UNIVERSIDAD CATÓLICA** DEL PERÚ

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons
Reconocimiento-No comercial-Compartir bajo la misma licencia 2.5 Perú.

Para ver una copia de dicha licencia, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL
PERÚ
ESCUELA DE GRADUADOS**



**Contribución al Estudio Químico y
Farmacológico
de la *Gentianella umbellata* (G. Don) Fabris**

Tesis presentada por

JUAN JOSÉ SALAZAR DÍAZ

Para optar el Grado Académico de

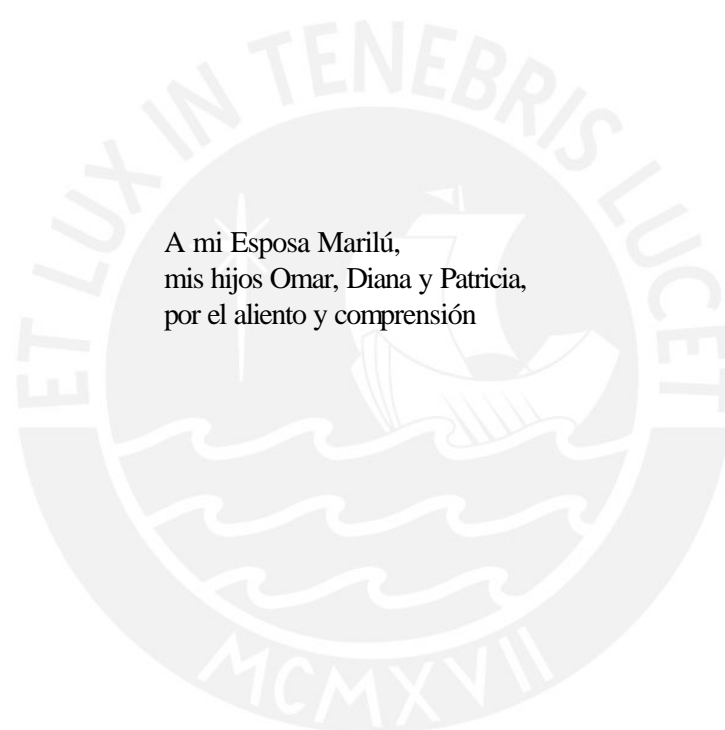
MAGÍSTER EN QUÍMICA

LIMA-PERÚ

A la memoria de mi Padre
y el afecto de Estela, mi Madre



A Niceto y Lola, por e
apoyo invaluable



A mi Esposa Marilú,
mis hijos Omar, Diana y Patricia,
por el aliento y comprensión

2003

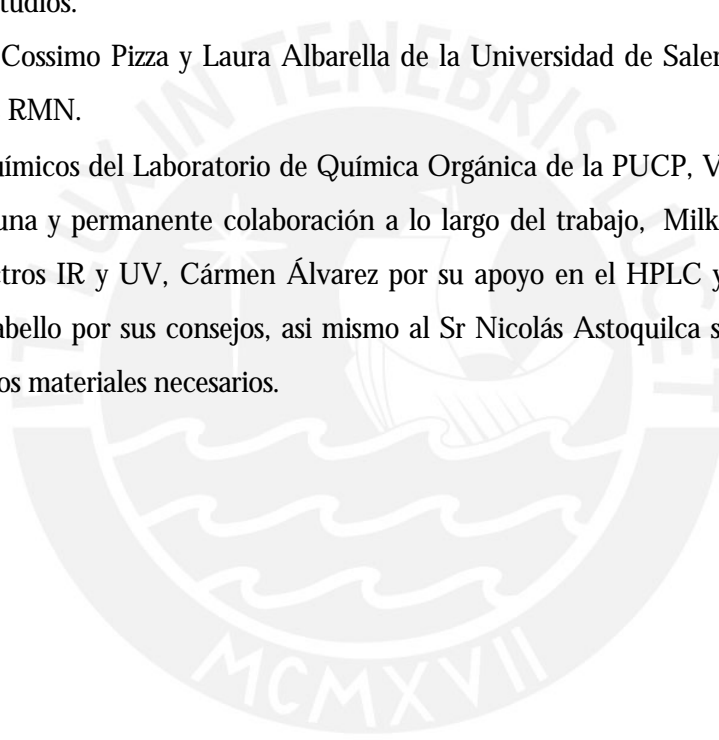
Agradecimiento

A mi Asesora Ing. MSc. Olga Lock Sing por su invaluable apoyo y constante asesoramiento.

A los Docentes de la Maestría en Química por sus conocimientos brindados a lo largo de mis estudios.

Al Prof. Cossimo Pizza y Laura Albarella de la Universidad de Salerno - Italia por los espectros RMN.

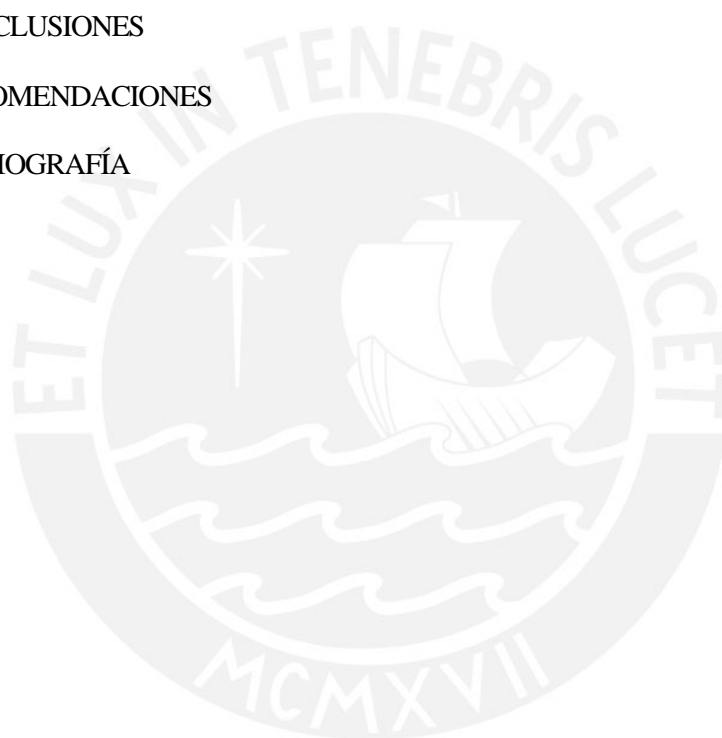
A los Químicos del Laboratorio de Química Orgánica de la PUCP, Víctor Doroteo por su oportuna y permanente colaboración a lo largo del trabajo, Milka Cajahuanca por los espectros IR y UV, Carmen Álvarez por su apoyo en el HPLC y Ninosca Callo e Isabel Cabello por sus consejos, así mismo al Sr Nicolás Astoquilca siempre solícito en facilitar los materiales necesarios.



ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.	vii
Índice de tablas.	x
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	6
2.1 La Planta	6
2.1.1 Material vegetal	6
2.1.2 Descripción morfológica de <i>Gentianella umbellata</i>	6
2.1.3 Taxonomía	8
2.1.4 Distribución geográfica de la especie	8
2.2 Preparación de extractos	8
2.3 Ensayos fitoquímicos preliminares	10
2.3.1 Cromatografía en capa delgada	10
2.3.2 Cromatografía líquida de alta performance	10
2.3.3 Evaluación preliminar	11
2.4 Separación y purificación	14
2.4.1 Fraccionamiento del extracto metanólico de flores	14
2.4.2 Evaluación por CCD de las fracciones colectadas	16
2.4.3 Separación y purificación de fracciones	17
Fracción B5	17
Fracción C60	25
Fracción D50	39
Fracción D51	54
Fracción F50	61
Fracción H50	61
Fracción I50	66
2.5 Pruebas de actividad farmacológica	66
2.5.1 Determinación de actividad hipoglicemiante	74
2.5.2 Determinación de actividad hipolipemiante	75
2.6 Actividad antioxidante	79
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	82
3.1 De los compuestos aislados.	82
Compuestos B50-3	82
Compuesto RB-I	83
Compuesto C60-2 a	84
Compuesto C60-2c	85

Compuesto D505-I	88
Compuesto D508/1	89
Compuestos D51-I	90
Compuesto D51-II	91
Compuesto D51-III	91
Compuesto F501	92
Compuesto H52a	92
Compuesto I50-1	92
3.2 De la actividad farmacológica y antioxidante	93
4. CONCLUSIONES	98
5. RECOMENDACIONES	99
6. BIBLIOGRAFÍA	100



Índice de Figuras

1. <i>Gentianella umbellata</i> (G. Don) Fabris	7
2. Proceso de obtención de los extractos	9
3. HPLC de extractos diclorometánico de flores y, tallos y hojas	12
4. HPLC de extractos metanólicos de flores y, tallos y hojas	13
5. Esquema de fraccionamiento	15
6. HPLC de la fracción B50	18
7. HPLC y espectros UV de B50-3-I	21
8. HPLC y espectros UV de B50-3-II	22
9. HPLC y espectro UV de B50-3-III	23
10. Espectro IR del compuesto RB-I	26
11. HPLC y espectros UV de la fracción C60	27
12. Espectro UV (MeOH) del compuesto C60-2a	29
13. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe y $AlCl_3$) del compuesto C60-2a	30
14. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOAc y H_3BO_3) del compuesto C60-2a	31
15. Espectro UV del compuesto C60-2c	33
16. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe y $AlCl_3$) del compuesto C60-2c	34
17. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOAc y H_3BO_3) del compuesto C60-2c	35
18. Espectro RMN- 1H del compuesto C60-2c	36
19. Correlación heteronuclear ^{13}C - 1H del compuesto C60-2c	37
20. Correlación heteronuclear ^{13}C - 1H por acoplamiento a larga distancia del compuesto C60-2c	38
21. HPLC y espectro UV del compuesto D505-I	42
22. Espectros UV con reactivos de desplazamiento ($AlCl_3$ y HCl) del compuesto D505-I	43

23. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe, NaOAc y H_3BO_3) del compuesto D505-I	44
24. Espectro IR del compuesto D505-I	45
25. HPLC y espectro UV del compuesto 8-O-glc -desmetilbellidifolina	47
26. HPLC de los compuestos D505-I + 8-O-glc -desmetilbellidifolina	48
27. HPLC y espectro UV de compuesto D508/1	50
28. Espectros UV con reactivos de desplazamiento ($AlCl_3$ y $AlCl_3 / HCl$) del compuesto D508/1	51
29. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe, NaOAc y H_3BO_3) del compuesto D508/1	52
30. Espectro IR del compuesto D508/1	53
31. HPLC y espectros UV de la fracción D51	55
32. HPLC y espectro UV del compuesto mangiferina	57
33. HPLC de los compuestos D51-I + mangiferina	58
34. HPLC de los compuestos D51-II + 8-O-glc -desmetilbellidifolina	59
35. HPLC comparativo de los compuestos D51-III + D508/1	60
36. HPLC y espectro UV de la fracción F501	62
37. HPLC y espectro UV de la fracción H52	64
38. HPLC y espectro UV del compuesto H52a	65
39. Espectro RMN- 1H del compuesto H52a	67
40. Correlación homonuclear 1H - 1H del compuesto H52a	68
41. Correlación homonuclear 1H - 1H ampliada (0,5 - 3,5 ppm) del compuesto H52a	69
42. Correlación homonuclear 1H - 1H ampliada (2,5 - 5,5 ppm) del compuesto H52a	70
43. Correlación homonuclear 1H - 1H ampliada (7,0 - 8,5 ppm) del compuesto H52a	71
44. HPLC y espectro UV de la fracción I50	72
45. HPLC comparativo de los compuestos I50-1 + bellidifolina	73

46. Comparación del control de la glicemia de los extractos diclorometánico (DCM) y metanólico (MeOH) de <i>G. umbellata</i>	94
47. Comparación de la actividad hipolipemiante de los extractos diclorometánico (DCM) y metanólico (MeOH) de la <i>G. umbellata</i>	96
48. Actividad antioxidante de tres fracciones de <i>G. umbellata</i> comparado con BHA (antioxidante comercial)	97



Índice de Tablas

1. Comparación de cromatogramas de los extractos metanólicos	14
2. Fracciones eluidas y reunidas en columnas I al IV del extracto metanólico de las flores	15
3. Fracciones evaluadas y reunidas de las columnas I al IV	16
4. Fracciones colectadas de las columnas I al IV de LPLC de B50	19
5. Fracciones reunidas de las columnas I al IV de LPLC de B50	20
6. Señales de CCD, t_R y $\lambda_{m\acute{a}x}$ de B50-3	24
7. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del compuesto C60-2a	32
8. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del compuesto C60-2c	39
9. Fracciones colectadas de LPLC I y II de la fracción D50	40
10. Fracciones reunidas de LPLC I y II de la fracción D50	41
11. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del compuesto D505-I	46
12. Absorciones UV de los compuestos D505-I y 8-O-glc-desmetilbellidifolina	46
13. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del compuesto D508/1	49
14. Absorciones UV de los compuestos de la fracción D51	54
15. Resultados del tratamiento hipoglicemiante	75
16. Actividad hipolipemiante de <i>G. umbellata</i> en ratas hipercolesterolémicas a los 30 días de tratamiento	78
17. Absorbancias promedio de las muestras sometidas a actividad antioxidante	81
18. Porcentaje de la actividad antioxidante	81
19. Asignación y comparación de señales RMN ^1H y ^{13}C del compuesto C60-2c	87
20. Comparación de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de los compuestos C60-2c y el aislado de <i>G. campestris</i> L	88

- | | |
|---|----|
| 21. Comparación de t_R y absorciones UV de los compuestos mangiferina y D51-I | 90 |
| 22. Comparación de t_R y absorciones UV de los compuestos 8-O-gluc-desmetilbellidifolina y D51-II | 91 |



RESUMEN

El presente Trabajo de Tesis, intitulado, **Contribución al Estudio Químico y Farmacológico de la *Gentianella umbellata* (G. Don) Fabris**, tiene como objetivo contribuir al conocimiento sobre la composición química de la planta y su actividad farmacológica, entre ellas, la actividad hipoglicemiante que se le atribuye.

Para su estudio, la planta se separa en dos partes : flores y tallos y hojas; los extractos se obtuvieron consecutivamente con diclorometano y metanol. Se evalúan los extractos por CCD y HPLC; por los resultados preliminares se opta trabajar con el extracto metanólico. Este extracto es fraccionado por cromatografía líquida, mediante filtración en gel Sephadex LH-20 usando metanol como eluyente; se evalúan por CCD y se reúnen finalmente en 12 fracciones, de las cuales se estudian siete, que corresponden a fracciones que resuelven los componentes mayoritarios del extracto.

Se han separado por métodos cromatográficos 11 compuestos, de los cuales se han identificado por métodos físico-químicos, cromatográficos y espectroscópicos: 1 flavonoide, Swertisina (4,5-dihidroxi-7-metoxi-6-gluco-flavona); 2 xantonas, Mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxi-2-C-glucosil-xantona), 8-O-glc-desmetilbellidifolina (1,3,5-trihidroxi-8-O-glucosil-xantona) y 1 triterpeno, ácido oleanólico (ác. β -hidroxi-olean-12-en-28-oico). Así mismo se ha logrado separar y detectar; 3 secoiridoides, con valores de absorción UV a 235,2 ; 237,2 y 237,9 nm; 1 flavonoide, 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona y 4 xantonas, compuestos D508/1, D51-III, I50 y H52a.

El estudio químico se ha complementado con ensayos farmacológicos y pruebas de actividad antioxidante; como resultado el extracto metanólico mostró tener perfil como hipoglicemiante e hipolipemiante y las xantonas de la fracción metanólica

(mangiferina y 8-O-gc-desmetilbellidifolina principalmente) muestran mejor actividad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Gentianaceae* consta de unos 75 géneros y cerca de 1000 especies, distribuidas en muchas zonas, pero más comunmente en regiones templadas, subtropicales y montaña tropical [1]. El género *Gentiana* incluyendo *Gentianella*, abarca cerca de 400 especies, ordenadas en 19 secciones y 2 subgéneros, *Eugentiana* y *Gentianella*, aunque recientemente varios autores adoptaron *Gentianella* como un género separado.

Investigaciones fitoquímicas de especies americanas entre ellas *Gentiana affinis*, *G. algida*, *G. calycosa*, *G. cerastioidea*, *G. detonsa* y *G. strictiflora*, determinaron la quimiotaxonomía de las *Gentianas*, caracterizadas por la presencia de principios amargos, secoiridoides glicosidados; flavonas C-glicosidadas y xantonas (agliconas y glicósidos). Secoiridoides y flavonas C-glicosidadas ocurren en casi todas las especies estudiadas, pero las xantonas demostraron ser los marcadores más útiles. El patrón de oxidación es generalmente uniforme dentro de una sección en particular y es de primera importancia en la quimiotaxonomía de gentianas, las especies pueden ser diferenciadas solamente por características de glicosilación. Las *Gentianellas* son caracterizadas por la presencia de xantonas 1,3,5,8-tetraoxigenadas y 1,3,4,5,8-pentaoxigenadas, patrón de oxidación importante en el estudio quimiotaxonomico de este género [2].

Los secoiridoides glicosidados, constituyen los principios amargos de las *Gentianas*, la *Gentiana lutea* figura en la Farmacopea Europea como planta oficial, además de *G. pannonica Scop*, *G. punctata L.* y *G. purpurea L.* de las montañas alpinas. Para la determinación cuantitativa de constituyentes amargos de *gentianas*, se han desarrollado métodos mediante el HPLC y el uso de estándares amargos eluidos de estas especies, como amarogentina, amaroswerina, amaropanina,

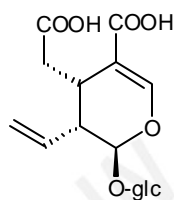
gentiopicrósido y gentiobiosa, pues los ensayos organolépticos de amargor son dificultosos [3].

Las xantonas son pigmentos fenólicos amarillos, estructuralmente se relacionan con los flavonoides, teniendo similar comportamiento en sus reacciones y en su movilidad cromatográfica; ambas estructuras son bastante frecuentes en las *Gentianas*. Las xantonas pueden ser extraídas del material seco que los contiene mediante solventes, diclorometano (CH_2Cl_2) o metanol (MeOH) y separadas por cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida en columna mediante filtración en gel Sephadex LH-20 o por columnas de fase reversa (RP-8) a baja presión; eluyendo con metanol puro o mezclado con diclorometano o por sistemas en gradiente. La cromatografía líquida de alta performance con detector UV arreglo de diodos, es otra técnica muy importante en los análisis, provee los espectros UV de cada componente conforme ocurre la elución; en este caso suele usarse columnas RP-18 con sistema H_2O -MeCN (0,05 % TFA) en diferentes proporciones y detector UV 254 nm [4].

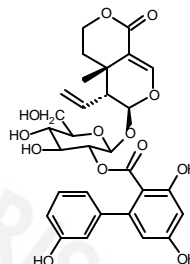
Las *Gentianas* como se ha mencionado, son conocidas por tener xantonas y secoiridoides, dos clases de compuestos con interesante actividad biológica. Ciertamente xantonas como bellidifolina (1,5,8-trihidroxi-3-metoxixantona) y gentiacauleina (1,3-dihidroxi-7,8-dimetoxixantona) son potentes inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO); mientras los secoiridoides son principios amargos usados como tónicos amargos [5].

La *Gentianella nítida*, especie peruana comunmente conocida como "Hercampuri", es una planta herbácea de los andes, el extracto acuoso de toda la planta es usada en la medicina tradicional peruana, como remedio para la hepatitis, como un colagogo y en el tratamiento de la obesidad. Un primer estudio químico [6] ha identificado 12 metabolitos conocidos, entre ellos: tres secoiridoides (**1,2,3**), flavonoide C-glicosidado (**4**), cinco xantonas glicosidadas (**5,6,7,8,9**) y tres xantonas agliconas (**10,11,12**). Así mismo, reportes recientes de estudios químico-farmacológicos de

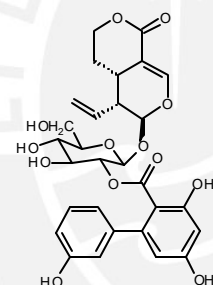
Gentianella nítida y *G. tristicha*, han confirmado una buena actividad hipoglucemiante del extracto de estas plantas y adicionalmente a los compuestos conocidos, fueron identificados otras xantonas entre ellas: cinco xantonas agliconas (13,14,15,16,17) de *G. nítida* y xantonas agliconas y glicósidos de *G. tristicha* (18,19) [7], siendo las estructuras:



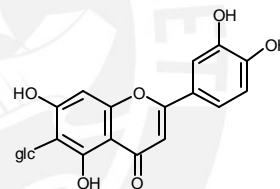
1 Secologanósido



2 Amaroswerina

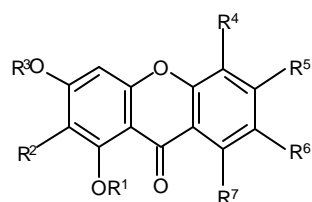


3 Amarogentina



4 Isoorientina

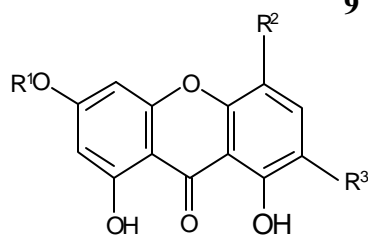
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
5	H	glc	H	H	OH	OH	H
6	glc	H	H	H	H	OH	OH
7	Prim	H	Me	H	H	OH	OH
8	H	H	Me	H	H	OH	O-glc
9	H	H	H	OH	H	H	O-glc



- 5 Mangiferina
- 6 1-O-glc-norswertianina
- 7 1-O-prim-swertianina

8 8-O-glc-swertianina

9 8-O-glc-desmetilbellidifolina



	R ¹	R ²	R ³
10	H	H	OH
11	Me	H	OH
12	H	OH	H

10 Norswertianina

11 Swertianina

12 Desmetilbellidifolina

13 1,3,5,6-OMe-xantona

14 1-OH-3,5-OMe-xantona

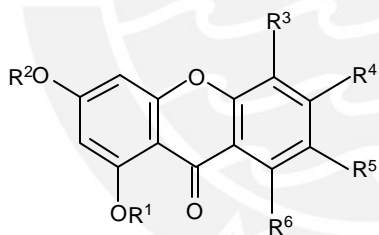
15 Gentiseina

16 Gentsina

17 Swerchirina

18 Bellidifolina

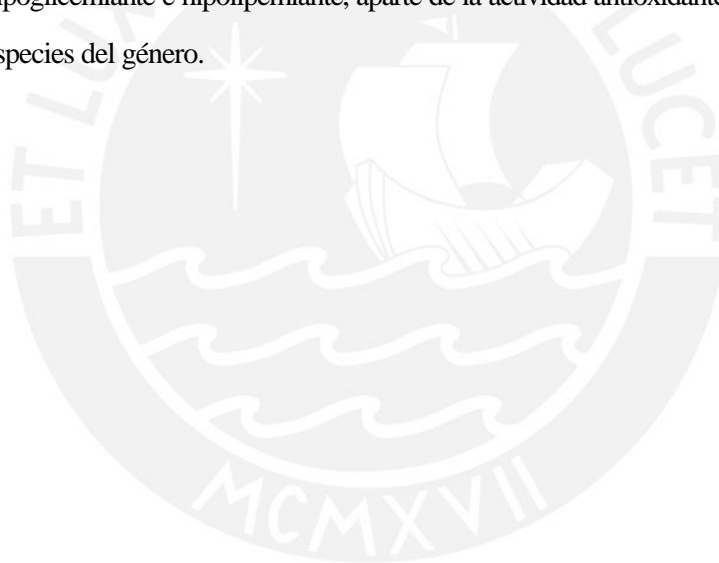
19 8-O-glc-bellidifolina



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
13	Me	Me	OMe	OMe	H	H
14	H	Me	OMe	H	H	H
15	H	H	H	OH	H	H
16	H	Me	H	H	OH	H
17	H	Me	OMe	H	H	OH
18	H	Me	OH	H	H	OH
19	H	Me	OH	H	H	O-glc

Un estudio reciente de *Gentianella umbellata*, reportó el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico en *Rattus rattus* variedad albinus, habiendo tenido respuesta significativa por vía intraperitoneal. La marcha fitoquímica, indicó la presencia de cumarinas, esteroides, flavonoides, leucoantocianinas, saponinas, taninos y triterpenos [8].

El objetivo principal del presente trabajo, es contribuir al estudio del Género *Gentianella*, mediante la elucidación de los principales componentes de la *Gentianella umbellata* y la comprobación de su actividad farmacológica como hipoglucemiante e hipolipemiante, aparte de la actividad antioxidante mostrada por otras especies del género.



2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 La planta

2.1.1 Material vegetal

La planta fue proporcionada en agosto de 1997, por el Quim. Farm. Hugo Casanova Herrera, Profesor de la Universidad Nacional de Trujillo; el mismo que fue adquirido en el mercado zonal de Palermo (Trujillo). El material consta de tallo leñoso, hojas y flores (Fig. 1), con un peso de materia seca de 650 gramos.

2.1.2 Descripción morfológica de *Gentianella umbellata*

Hierba perenne, bien ramificada, las flores son hermafroditas, completas, su tamaño varía mucho. El cáliz de color verde, gamosépalo, con 5 lóbulos, de borde lanceolado, ligeramente estriado longitudinalmente desde su nacimiento hasta el ápice del borde libre. La corola es regular, gamopétala, su color es lila ó violeta. El Androceo, formado por estambres que son regulares y sus filamentos se encuentran adheridos a los pétalos uno a uno. El Gineceo, formado por ovario, estilo y estigmas.

El fruto es una cápsula de dehiscencia septicida que abre por dos válvulas y contiene un gran número de semillas. Las hojas basales levemente pecioladas, generalmente ya no existen en la planta adulta; las demás son sentadas y opuestas, todas tienen borde entero y presentan color verde tanto en el haz como en el envés. Su raíz es cilíndrica, larga, fibrosa, ligeramente estriada a lo largo, de color castaño oscuro. Las semillas son pequeñas, lisas,

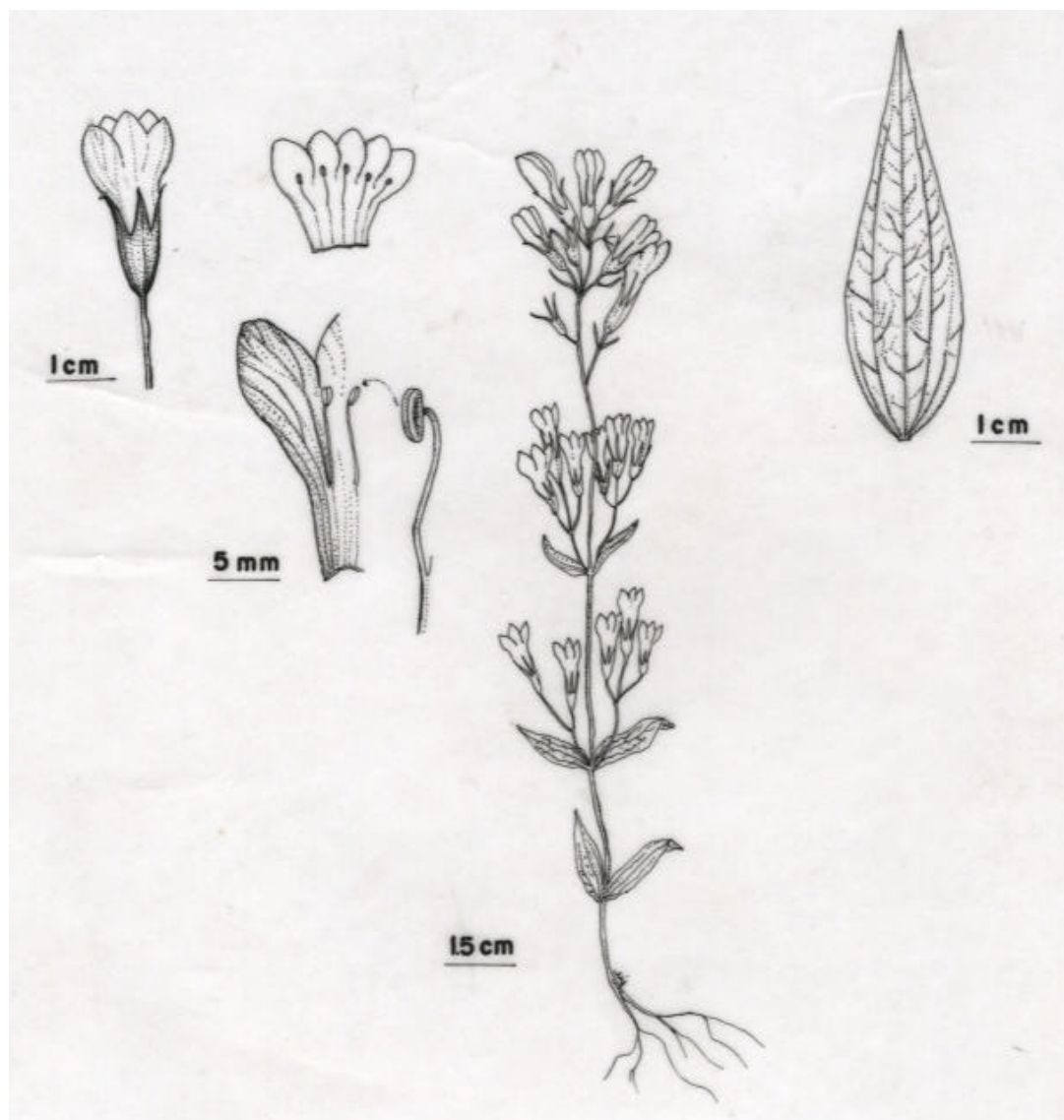


Fig. 1. *Gentianella umbellata* (G. Don) Fabris

de color negro ó marrón oscuro. El tallo lampiño y un poco cuadrangular, erguido, hueco, de color marrón parduzco en parte y morado en otro, con nudos donde se encuentran las hojas y nacen los pedúnculos florales.

En La Libertad y Cajamarca se le conoce como “corpus huay”, “corpus huayta”, “campanilla morada” [8]. También en otras zonas, su nombre vulgar es “huaita clavel”, “huita-clavi” [9].

2.1.3 Taxonomía

El Taxón de esta planta [8], tiene el siguiente ordenamiento:

División	:	Angiospermas
Clase	:	Dicotiledóneas
Orden	:	Contortales
Familia	:	<i>Gentianaceas</i>
Género	:	<i>Gentianella</i>
Especie	:	<i>Gentianella umbellata (G.Don) Fabris</i>
Sinonimias [10]:		<i>Gentiana umbellata R & P.</i> <i>Gentianella ruizii (Grisebach) Holub</i> <i>Eurythalia umbellata G.Don</i> <i>Gentiana lobbii Gilg</i>

2.1.4 Distribución geográfica de la especie

Se distribuye extensamente desde Ecuador hasta Colombia. En el Perú, se conoce en los Departamentos de La Libertad y Cajamarca entre los 3100 - 4000 msnm [8]; Huánuco (Pillao, Acomayo a Chinchao, en lugares rocosos musgosos de Mito); Junín (en las colinas herbosas de Palca a Carpapata a 2900 m Huacapistana); Huancavelica (Surcubamba); Ayacucho (Huanta, Pampalca, Osno); Cuzco (Lares, valle del Urubamba) [11]. En los valles interandinos del norte (alto Marañón) entre los 900 - 2000 m, en el estrato herbáceo, formando colonias puras o mixtas [12].

2.2 Preparación de extractos

La muestra seca fue separada en dos partes, el correspondiente a tallos y hojas y la otra parte flores; la muestra es molida finamente y después sometida a extracción discontinua sucesiva (Fig. 2), utilizando dos tipos de solvente, diclorometano (CH_2Cl_2) y metanol (MeOH). Cada extracción fue por 48 horas, repitiéndose el proceso dos veces con 750 mL de cada solvente.

Se realizó la extracción de 157,1 g de las flores y 458,2 g de los tallos y hojas, obteniéndose los siguientes pesos de cada uno de los extractos concentrados a sequedad :

Extracto diclorometánico de flores	7,7 g
Extracto diclorometánico de tallos y hojas	9,4 g
Extracto metanólico de flores	28,7 g
Extracto metanólico de tallos y hojas	17,4 g

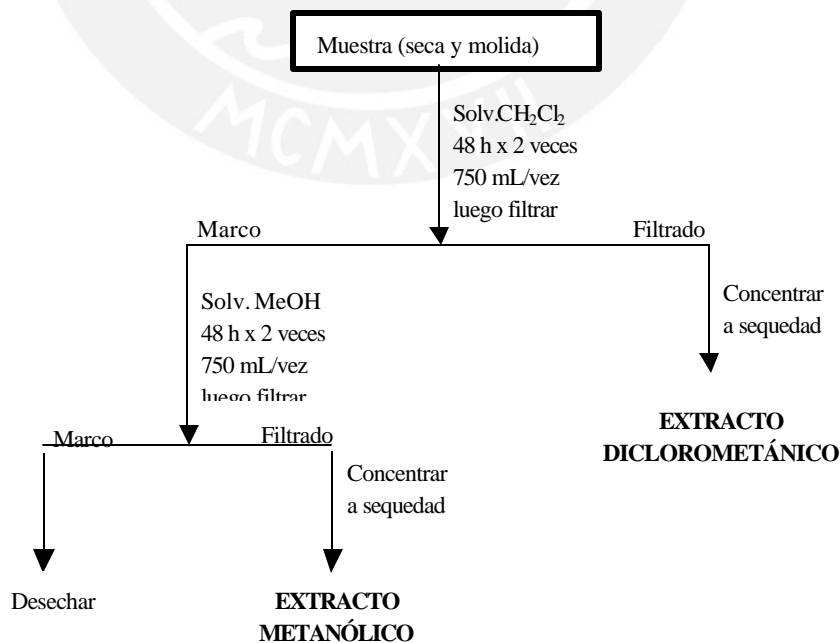


Fig. 2. Proceso de obtención de los extractos

2.3 Ensayos fitoquímicos preliminares

2.3.1. Cromatografía en capa delgada

Para el extracto de CH_2Cl_2 , se ensayó su comportamiento por cromatografía en capa delgada (CCD)*, en los sistemas: Hex- CH_2Cl_2 (1:1), Hex-AcOEt (3:2) y (1:1), obteniéndose mejor resolución con el sistema Hex-AcOEt (1:1), siendo idéntico el perfil cromatográfico tanto en la muestra de flores como en tallos y hojas, observándose 5 manchas a la luz UV-254 nm; al aspersar con ácido sulfúrico 10 % en EtOH y calentando la placa a 110 °C, aparecen manchas de colores marrón, verde, amarillo, verde y marrón, consecutivamente desde el origen .

De igual manera se procedió con los extractos metanólicos, observando el comportamiento en CCD, con sistemas CH_2Cl_2 -MeOH (15:1), (10:1) y (5:1), dando mejor resolución el sistema (10:1). Tanto el extracto de flores como el de tallos y hojas, presentan 5 manchas consecutivamente de colores gris, rojo, rojo, amarillo y rojo, revelando con H_2SO_4 al 10 % en EtOH y calentando la placa a 110 °C; adicionalmente a un R_f de 0,5 se observa una mancha grande verde en la muestra de flores. Como parte de la muestra queda en el origen, se ensayó nuevamente otra CCD con un sistema mas polar, AcOEt- MEK-HOAc- H_2O (5:3:1:1); en este sistema se resuelve totalmente la muestra, apareciendo 6 manchas, lo que permite deducir la relativa complejidad de la muestra y la posible metodología a seguir en la separación de los componentes.

2.3.2 Cromatografía líquida de alta performance

A efecto de conocer mejor la matriz de los extractos MeOH y CH_2Cl_2 correspondiente a flores y tallos con hojas y, direccionar la elución de los principales metabolitos, se hizo un análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta performance con detector UV arreglo de diodos * Los análisis CCD, han sido realizados en cromatofolios de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) (HPLC-UV-DAD)*. 10 mg de cada extracto fueron disueltos en 3,5 mL de un sistema ACN-MeOH (4:3) para extractos diclorometánicos y (1:1) para extractos metanólicos. Debido a la presencia de insolubles o sólidos gomosos, cada una de las muestras fueron filtradas antes de la inyección. En el cromatógrafo se inyectaron 12 μL de cada una de las muestras, usándose como fase móvil ACN-H₂O (1:1) y velocidad del sistema de registro gráfico de 2 mm/min (Fig. 3 y 4).

2.3.3 Evaluación preliminar

Extracto Diclorometánico: Tanto la muestra de flores como de tallos y hojas, no presentaron picos significativos, el de mayor altura relativa, está a un tiempo de retención (t_r) de 7,09 min (flores) y 7,19 min (tallos y hojas).

Extracto Metanólico: En estos extractos, tanto de flores como de tallos y hojas, se observó la presencia de varios picos de alturas significativas, así como t_r de cierta similitud. Picos de mayor intensidad aparecieron tanto en la muestra de flores como en la muestra de tallos y hojas (Tabla 1).

Estos resultados llevaron a realizar el trabajo de fraccionamiento y separación del extracto metanólico de las flores, que reviste una particular importancia, pues la información obtenida del cromatograma HPLC, indicaría la existencia de metabolitos, que son de interés del presente estudio.

* HPLC, Merck-Hitachi, sistema La Chrom HSM D-7000, Detector DAD L-7450A, Bomba cuaternaria L-7100

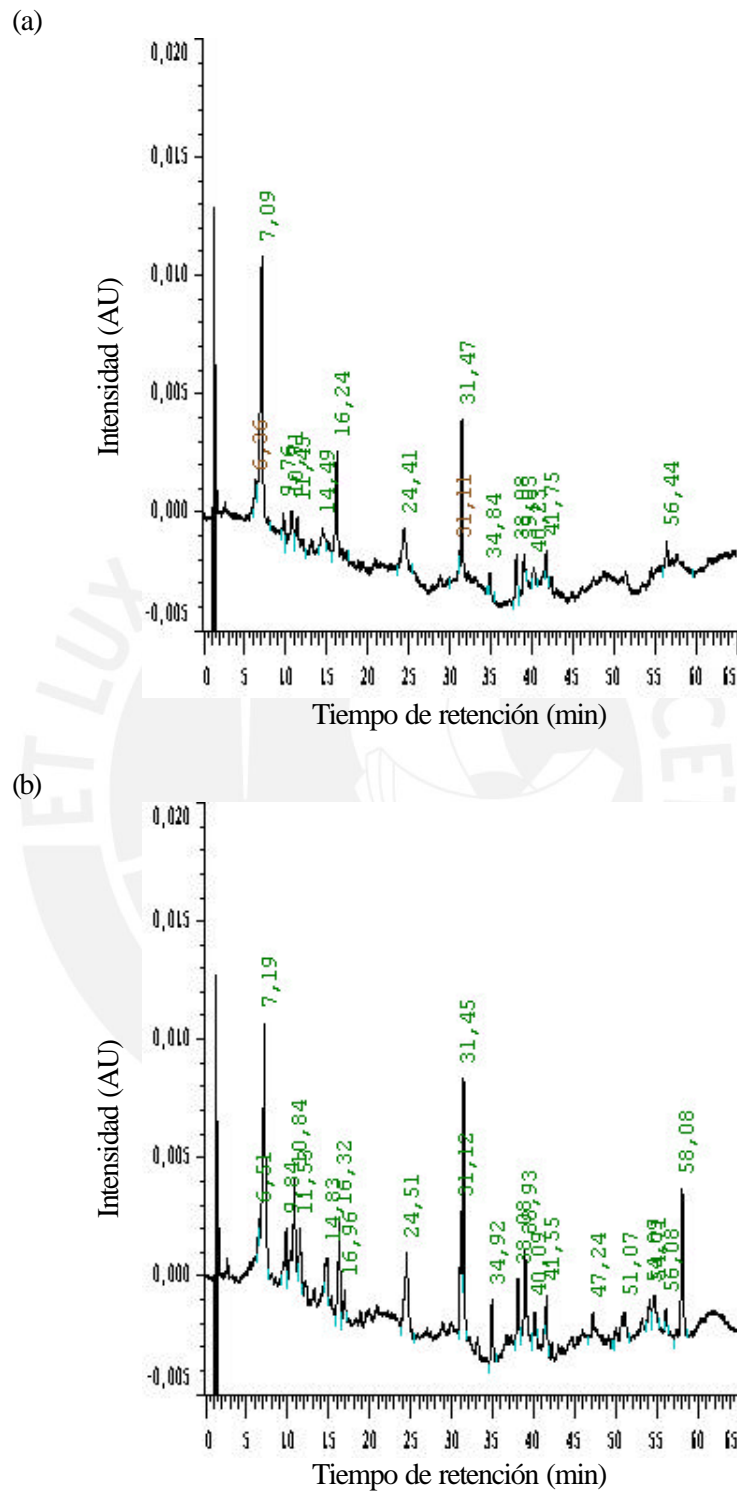


Fig. 3. HPLC de extractos CH₂Cl₂ de (a) Flores y (b) Tallos y hojas

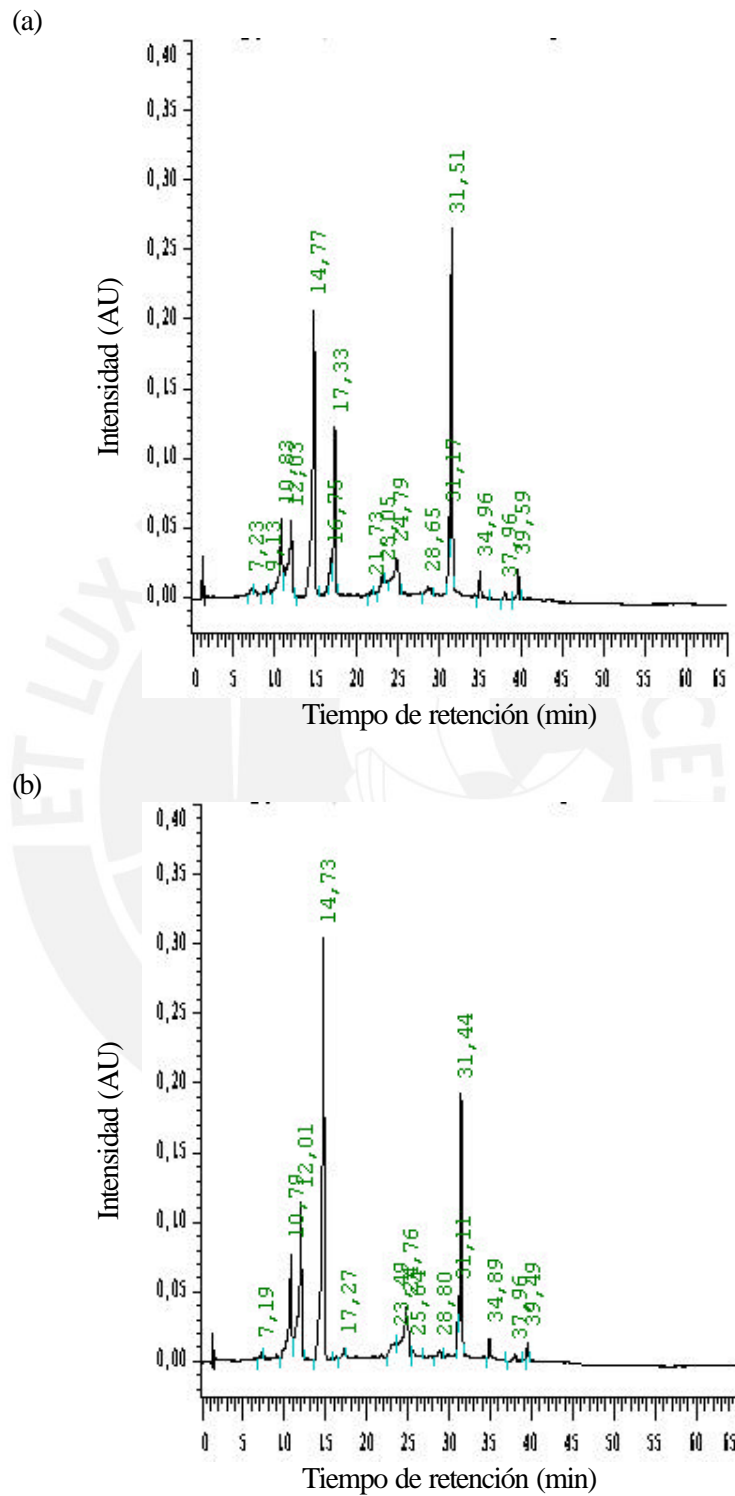


Fig. 4. HPLC de extractos MeOH (a) Flores y (b) Tallos y hojas

Tabla 1. Comparación de cromatogramas de los extractos metanólicos

Extracto de flores		Extracto de tallos y hojas	
No. de pico	t _R , min	No. de pico	t _R , min
1	7,23	1	7,19
2	9,13	2	10,79 ++
3	10,83+	3	12,01++
4	12,03+	4	14,73 +++
5	14,77++	5	24,76 +
6	16,75	6	31,11
7	17,33++	7	31,44 ++
8	23,05+	8	34,89
9	24,79+	9	39,49
10	31,17+		
11	31,51+++		
12	34,96		
13	39,59		

+ alturas de intensidad relativas

2.4 Separación y purificación

2.4.1 Fraccionamiento del extracto metanólico de flores

Una muestra de 2,5 g y tres de 3,0 g cada una del extracto metanólico de *G. umbellata* (Flores), se suspendieron en MeOH, filtrándose el residuo insoluble. El filtrado de cada muestra se sometió a fraccionamiento por cromatografía líquida en columna (CLC, I al IV), mediante cromatografía en gel, utilizando una columna de 90 x 2,70 cm, empacada con 100 g de Sephadex LH-20 y como eluyente metanol, la velocidad de elución fue de 2,5 mL/min.

El eluyente se colectó en volúmenes de 20 mL cada uno, los cuales se evaluaron por CCD, uniéndose y agrupándose los volúmenes de igual composición en 11 fracciones (A → K, Fig. 5), indicadas en la Tabla 2.

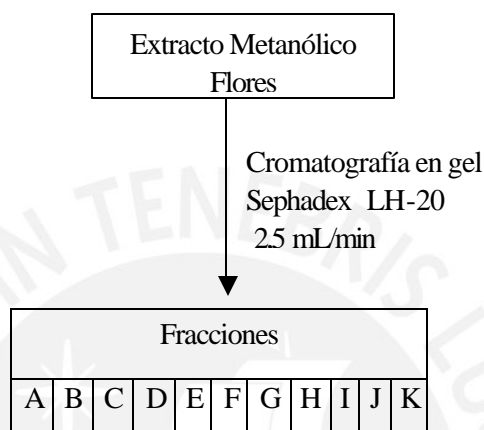


Fig. 5. Esquema de fraccionamiento

Tabla 2. Fracciones eluidas y reunidas en columnas I al IV del extracto metanólico de las flores

Fracción	Columna I		Columna II		Columna III		Columna IV	
	mL	mg	mL	mg	mL	mg	mL	mg
Resid.insol.	-	345,9	-	377,5	-	472,1	-	412
A	175	272,0	100	80,1	100	142,1	100	211
B	75	801,1	125	1314,0	100	1208,0	120	1301
C	125	276,7	125	280,1	80	185,7	60	187
D	75	135,7	225	286,6	200	264,2	60	105
E	125	103,8	475	97,7	260	61,5	40	48
F	300	63,7	875	32,7	260	51,5	240	130
G	900	54,1	900	107,1	180	9,0	100	10
H	800	101,1	-	-	740	31,4	240	54
I	-	-	-	-	1000	2,1	140	51

J	-	-	-	-	-	660	6
K	-	-	-	-	-	1000	22

2.4.2 Evaluación por CCD de las fracciones colectadas

Se evaluó mediante CCD, cada una de las fracciones obtenidas en las columnas del I al IV, utilizando como fase móvil el sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (11:7:1:1), reuniéndose las fracciones idénticas y reduciéndose las mismas en las fracciones indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Fracciones evaluadas y reunidas de las columnas I al IV

Fracciones reunidas	Procedencia original*	Cantidad (mg)
A5	A1,A2,A3,A4	740,1
B5	B1,B2,B3,B4	4 648,8
C13	C1 (part. soluble)	258,0
C60	C1,C2,C3,C4	159,8
D50	D1,D2,E1	646,0
D51	D3,D4,E4	178,7
F	F1,F2,E2,G1	257,8
F50	F4,G3	156,5
G2	G2	49,5
H50	F3,H4	120,7
I50	H3,I4	37,5
I51	H1,I3	33,9

* Según fracción y columna de procedencia.

Estas fracciones reunidas fueron evaluadas por CCD; las fracciones relativamente puras se limpiaron para su análisis posterior, para las fracciones de más de un componente se planificó una nueva separación, adaptando un

método de acuerdo al comportamiento en la CCD y la complejidad observada.

2.4.3 Separación y purificación de fracciones

Según los resultados de la evaluación, se trabajaron las fracciones menos complejas; habiéndose efectuado los procesos de separación y aislamiento de las fracciones: B5, C60, D50, D51, F50, H50 y I50.

Fracción B5

Esta fracción de color marrón, viscoso, tiene un peso de 4,648 g; al agregar MeOH dejó un insoluble por lo que se realizaron lavados sucesivos, separándose dos partes: la soluble (fracción B50) y la insoluble (fracción B60); se continuó trabajando la fracción B50.

Fracción B50

Esta fracción todavía presentó cierta sedimentación al agregar MeOH, se separó la parte insoluble llamándola Sólido RB, luego se evaluó por CCD la parte soluble de B50, que tiene un peso de 4,316 g, aspecto viscoso, de color marrón y aroma azucarado. Un análisis por HPLC muestra picos con t_R menores a 20 min (Fig. 6), dada la alta polaridad de los compuestos, se ensaya una CCD fase reversa RP-18, con sistema H_2O -MeOH en gradiente (7:3 \rightarrow 0:10) observándose la elución gradual de los componentes, apareciendo 4 manchas al UV 254 y 1 mancha al UV 366.

Se optó por una cromatografía líquida de baja presión (LPLC). 350 mg de muestra, se suspendieron en una mezcla H_2O -MeOH (85:15); se filtró por existir sólidos y se inyectó a la columna (Lichroprep RP-8, 40-63 μm). Se trabajó con presión de 2,5 bar, flujo de 2,5 mL/min y sistema en

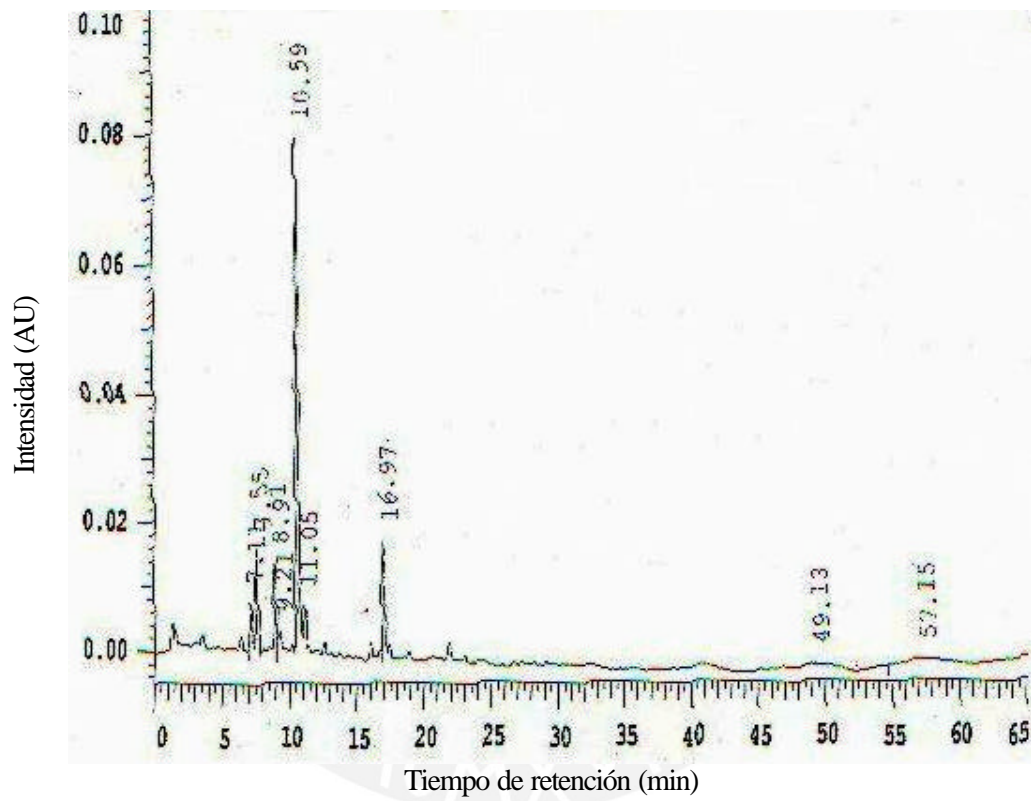


Fig. 6. HPLC de la fracción B50

gradiente H₂O-MeOH (85:15 → 0:100), colectándose 63 volúmenes de 15 mL cada uno, se evaluó por CCD en silicagel con sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (5:3:1:1), reuniéndose en 9 fracciones.

Dado el poco peso obtenido, se repitió una nueva LPLC con 350 mg de muestra, corriéndose en esta vez con el sistema ACN-H₂O, inicialmente 300 mL (5:95), seguido de 300 mL (10:90), luego 150 mL de ACN puro y finalmente 300 mL de MeOH puro, colectándose 8 fracciones. Según la CCD de cada una de ellas, en el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), los compuestos de interés se encontraban en la tercera fracción. Se repitió dos procesos más en las mismas condiciones, procesando en cada uno 350 mg de muestra (Tabla 4).

Previa evaluación por CCD de los 4 fraccionamientos efectuados, se reunieron en 6 fracciones totales (Tabla 5); según los resultados observados, se continuó trabajando la fracción B50-3.

Tabla 4. Fracciones colectadas de las columnas I al IV de LPLC de B50

Frac- ción	Columna I		Columna II		Columna III		Columna IV	
	mL	mg	mL	mg	mL	mg	mL	mg
1	110	27,5	150	118,8	150	114,9	150	120,1
2	35	3,6	150	4,1	150	6,3	150	6,7
3	70	12,9	150	7,5	150	2,2	150	10,6
4	70	10,2	150	10,3	150	2,5	150	12,2
5	70	5,6	75	8,9	75	20,2	75	47,9
6	70	15,9	80	48,6	75	23,7	75	0,5
7	250	11,3	180	2,5	150	2,6	150	1,4
8	100	6,4	200	8,4	150	6,7	150	0,5

9	270	16,6	-	-	-	-	-	-
---	-----	------	---	---	---	---	---	---

Tabla 5. Fracciones reunidas de las columnas I al IV de LPLC de B50

Fracción	Peso, mg	Número de manchas en CCD	
		UV-254	Vainillina + H ₂ SO ₄
B50-1	400,1	-	1 (origen)
B50-2	23,4	3	3
B50-3	63,4	3	3
B50-4	175,6	4	3
B50-5	6,7	3	3
B50-6	30,6	1	1 (cola)

Fracción B50-3.

Se obtuvo un peso de 63,4 mg, verificándose su complejidad por CCD en sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), aparecen 4 manchas al UV-254 y ninguna al UV-366, al revelarse con vainillina y ácido sulfúrico se observaron 6 manchas de diferentes intensidades y colores.

Se realizó una separación por CCD preparativa, en cromatoplas de silicagel de 20 x 10 cm, espesor 0,2 mm, en el mismo sistema, con un recorrido de 5,5 cm. Se procesaron 20 mg de muestra, desorbiéndose 3 bandas con el mismo sistema: B50-3-I (2 mg), B50-3-II (0,3 mg) y B50-3-III (2,2 mg).

Por CCD, sólo las fracciones B50-3-I y B50-3-II, mostraron una sola mancha, observándose igual resultado al revelar con vainillina y ácido

sulfúrico. Un análisis por HPLC-UV-DAD (Fig. 7, 8, 9), mostró la composición de cada fracción, indicadas en Tabla 6.

Compuestos B50-3

En la Tabla 6, se muestra las señales de los compuestos y no se continuó con el trabajo por el poco peso obtenido, sin embargo considerando que los compuestos están relacionados estrechamente, los denominamos: compuestos B50-3-I, B50-3-II y B50-3-III.

Tabla 6. Señales de CCD, t_R y λ máx de los compuestos B50-3

Compuestos	N° de manchas por CCD*		HPLC-UV-DAD	
	UV-254	Vainillina+ H ₂ SO ₄	t_R	λ max (nm)
B50-3-I	1 (con cola)	1 (cola), color rojo violeta.	7,81	237,2
			9,33	235,2
B50-3-II	1 (con cola)	1(cola),color rojo violeta	6,64	237,9
			7,71	237,2
			9,24	235,2
B50-3-III	2, la 2da más intensa que la primera.	2 color marrón 1 color amarillo 1 color violeta	7,69	237,2

* El número de señales reveladas con vainillina + H₂SO₄, incluye (salvo contadas excepciones), a las señales que también son reveladas con luz UV-254 nm

Sólido RB

Polvo blanco, proveniente de la fracción B50, con peso de 117 mg, muy poco soluble en MeOH, por análisis a la gota con reactivo de Lieberman Burchard, dió una coloración rosada; luego por CCD en sistema CHCl₃-MeOH (3:1), revelado con vainillina y H₂SO₄ etanólico, mostró una coloración violeta, notándose presencia de impurezas por la forma de la mancha.

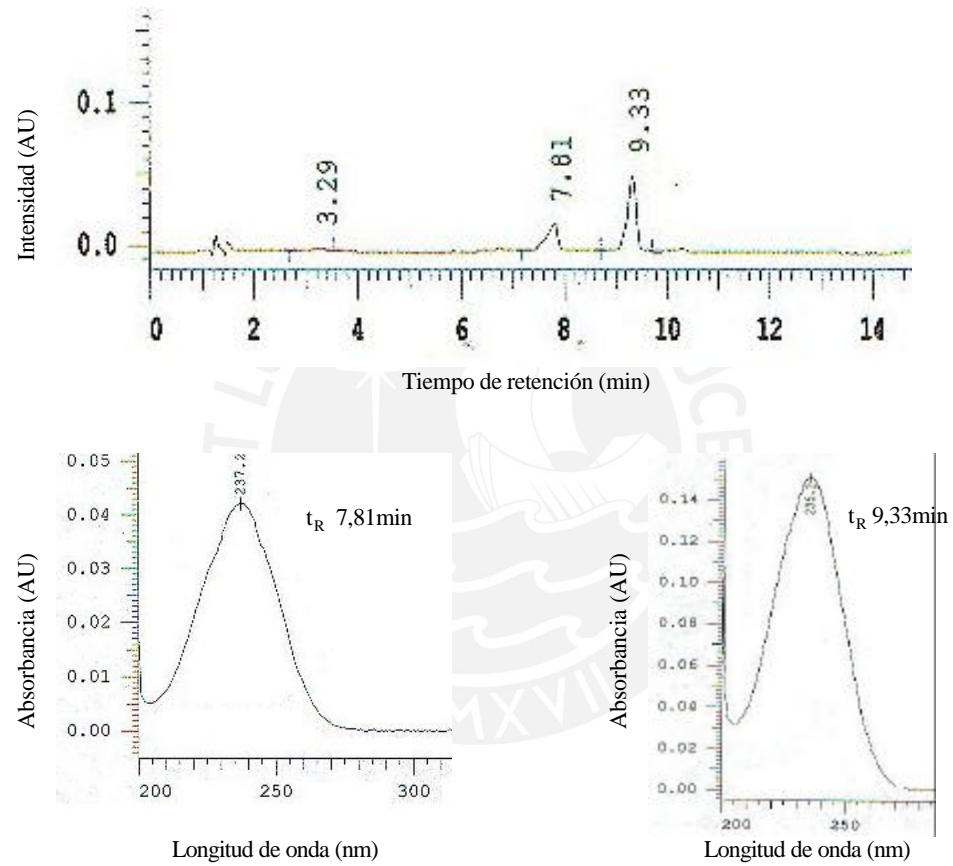


Fig. 7. HPLC y espectros UV de B50-3-I

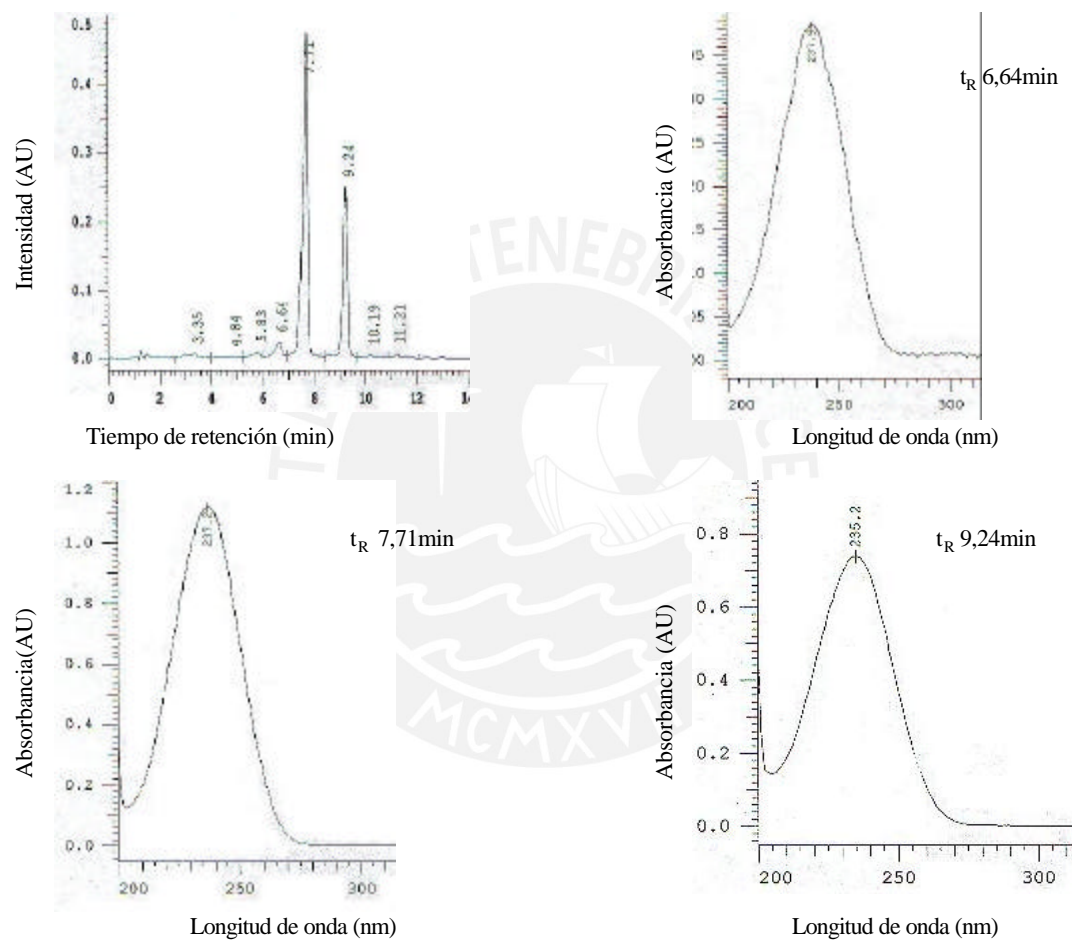


Fig. 8. HPLC y espectros UV de B50-3-II

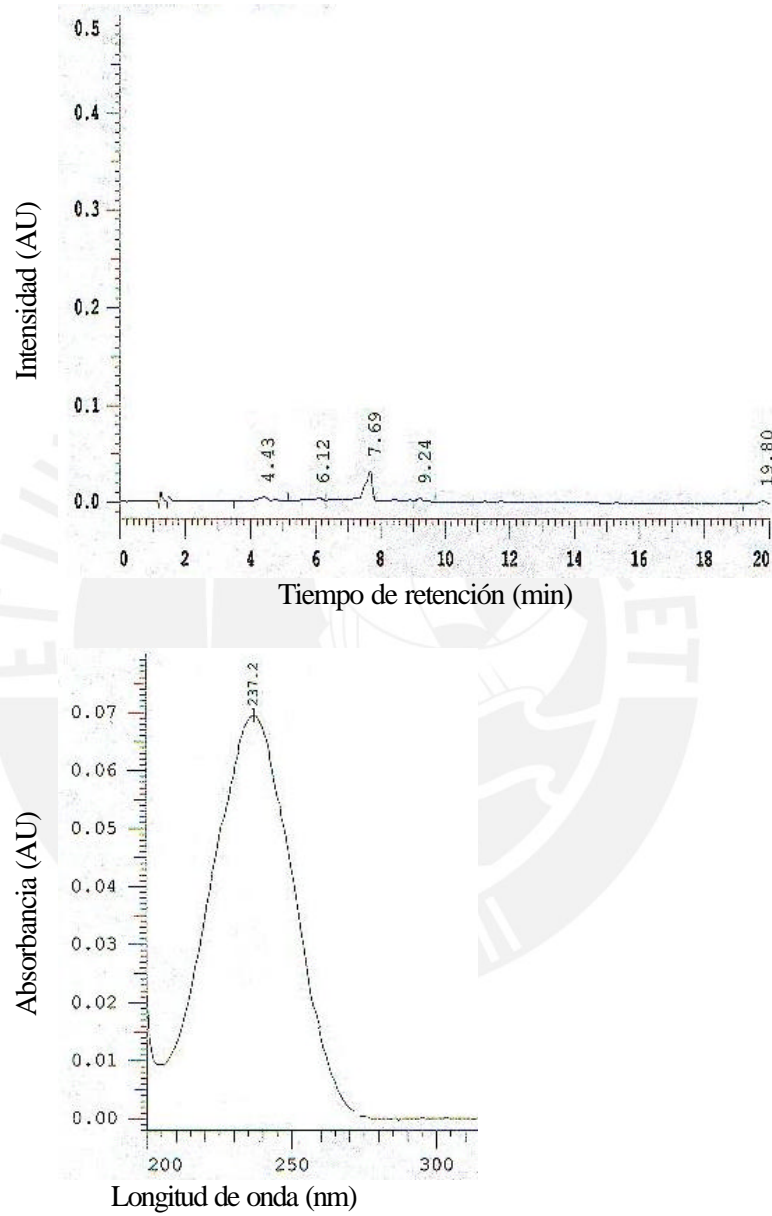


Fig. 9. HPLC y espectro UV de B50-3-III

Se hizo una separación por CCD preparativa, en cromatoplasmas de silicagel de 20 x 7,50 cm, sistema CH_2Cl_2 -MeOH (12:1), desorbiéndose con el mismo sistema, obteniendo el compuesto más purificado, RB-I.

Compuesto RB-I

Sólido de color blanco, con peso de 0,70 mg, la CCD en el sistema CH_2Cl_2 -MeOH (12:1) presentó un R_f 0,50, al revelarse con el reactivo de Lieberman Burchard dió color violeta, con punto de fusión entre 245 y 250 °C. Al compararse con un estándar de ácido oleanólico por CCD, presentó idéntico comportamiento, la Fig. 10 muestra su espectro IR*.

Fracción : C 60

Polvo amarillo oscuro, con peso de 159,8 mg, poco soluble en MeOH, por sucesivos lavados con este solvente se obtuvo un polvo de color amarillo claro, con un peso de 130 mg. Se analizó por CCD en cromatofolios de silicagel y como fase móvil AcOEt-MeOH- H_2O (77:15:8), observándose al visible una mancha intensa de color amarillo, que se intensificó al exponerse a vapores de amoníaco; después de una hora, ésta se desdobra, observándose una de color verde y otra inmediatamente inferior de color ocre. Analizada la muestra por HPLC-UV-DAD, se detectó la presencia de hasta 3 compuestos, con t_r 14,93; 16,75 y 17,35 min, siendo este último el mayoritario. En la Fig. 11 se muestra el cromatograma con los respectivos espectros UV.

Se ensayaron varios métodos para su separación; por CCD en fase reversa RP-8, con sistema MeOH- H_2O en gradiente (4:1 \rightarrow 1:1), observándose que las dos manchas corren una muy junto a la otra. Se ensayó otra CCD en silicagel, con mezclas de CHCl_3 -MeOH (10:1), (5:1), (5:2), (5:3) y (5:4), mostrando una mejor resolución con sistema (5:3), se reveló la placa

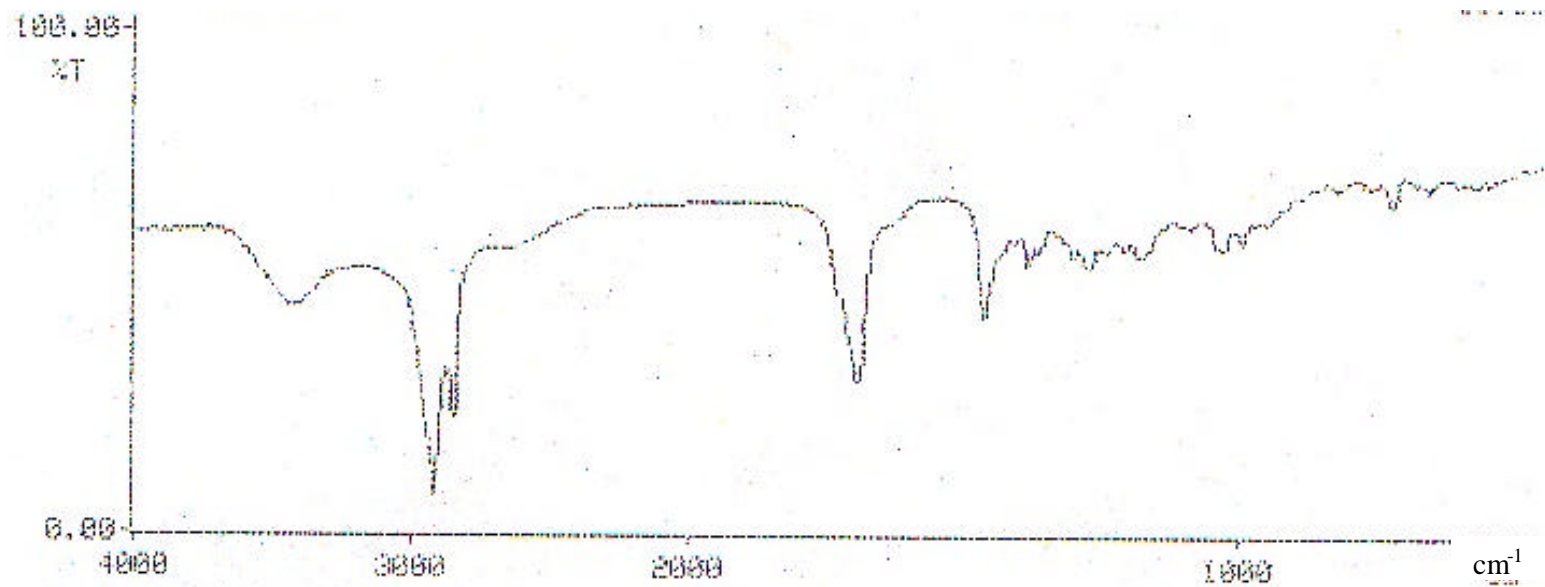


Fig. 10. Espectro IR del compuesto RB-I

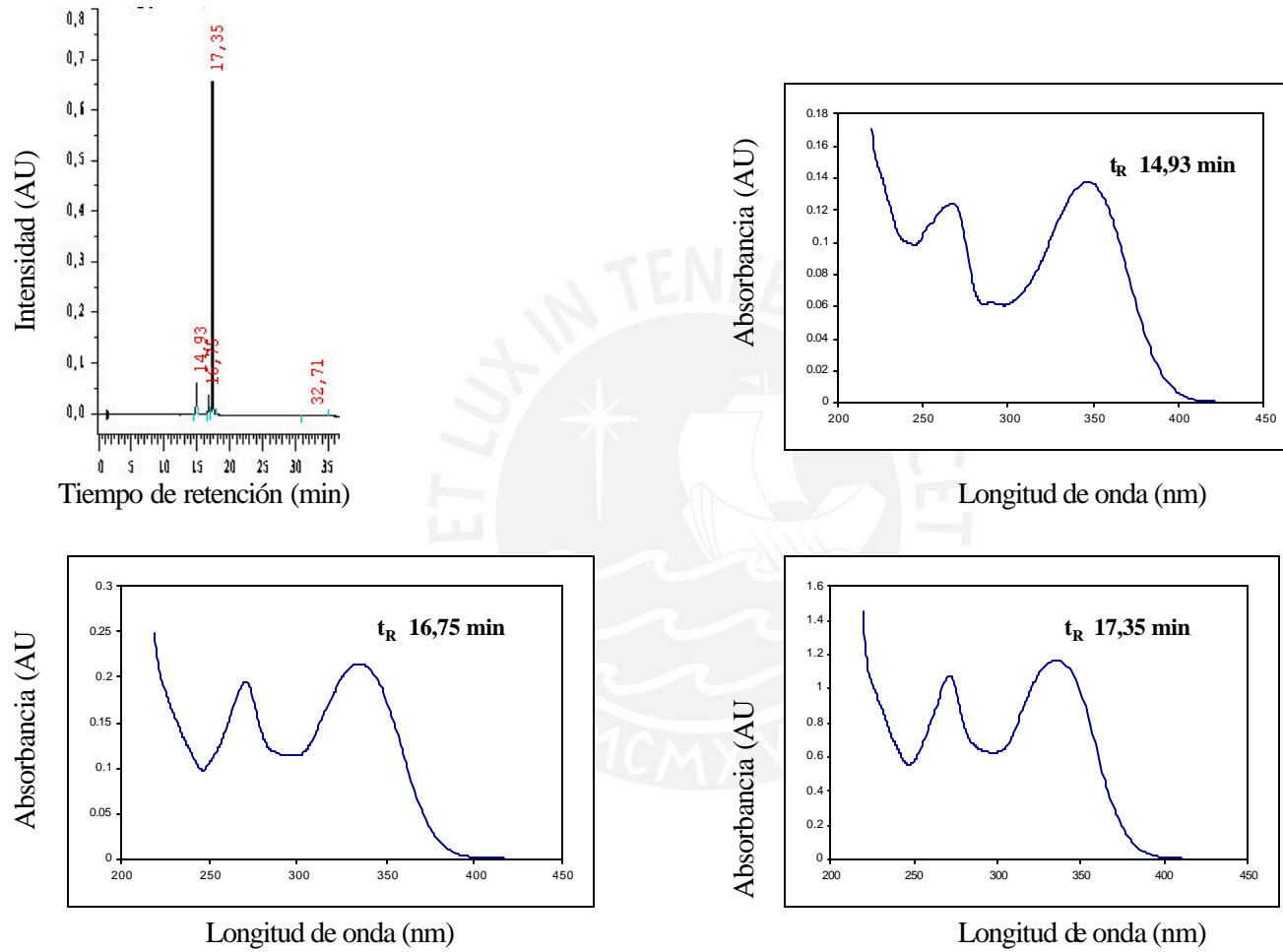


Fig. 11. HPLC y espectros UV de fracción C60

aspersando con NP/PEG**, observadas al UV-366 aparecen 2 manchas, una superior de color amarillo con cola y otra inferior de color naranja.

* Todos los espectros IR fueron realizados en un equipo Perkin-Elmer serie 1600, Laboratorio PUCP

Con este nuevo sistema, se ensayó una CLC, de 40 x 1,5 cm, ** Acido difenilborlotetrolamina (NP), polietilenglicol 4000 (PEG)

empacada con 40 g de silicagel 60, se colocó 20 mg de muestra, colectándose 25 fracciones de 2 mL c/u a una velocidad de elución de 1 mL/min. Analizadas por CCD se observó que todas las fracciones tienen la mezcla y parte de la muestra quedó adsorbida en la columna; por consiguiente se decidió realizar una CCD preparativa, con una muestra de 10 mg de C60 en cromatoplasmas de vidrio de 20 x 20 cm con silicagel 60 con un recorrido de 4,5 cm, usando sistema CHCl_3 - MeOH (5:3) y desorbido con el sistema; si bien se tuvo el problema de adsorción, se logró separar los compuestos puros, llamándolos C60-2a (0,4 mg) y C60-2c (2,3 mg) con los cuales se realizaron los análisis por HPLC, análisis espectroscópicos UV con reactivos de desplazamiento y RMN- ^1H y ^{13}C .

Compuesto C60-2a

Polvo de color amarillo claro, con peso de 0,4 mg, componente minoritario de la fracción C60. Al revelarse con NP/PEG, al UV-366 aparece un color naranja; el espectro ultravioleta (Fig. 12), muestra las absorciones máximas: Banda I (341 nm) y Banda II (270 nm).

Con reactivos de desplazamiento*, los espectros mostraron desplazamientos significativos de las bandas (Tabla 7), especialmente de la Banda I (Fig.13 y 14). Analizando por HPLC-UV-DAD, éste compuesto presentó un t_R de 14,93 min.

Compuesto C60-2c

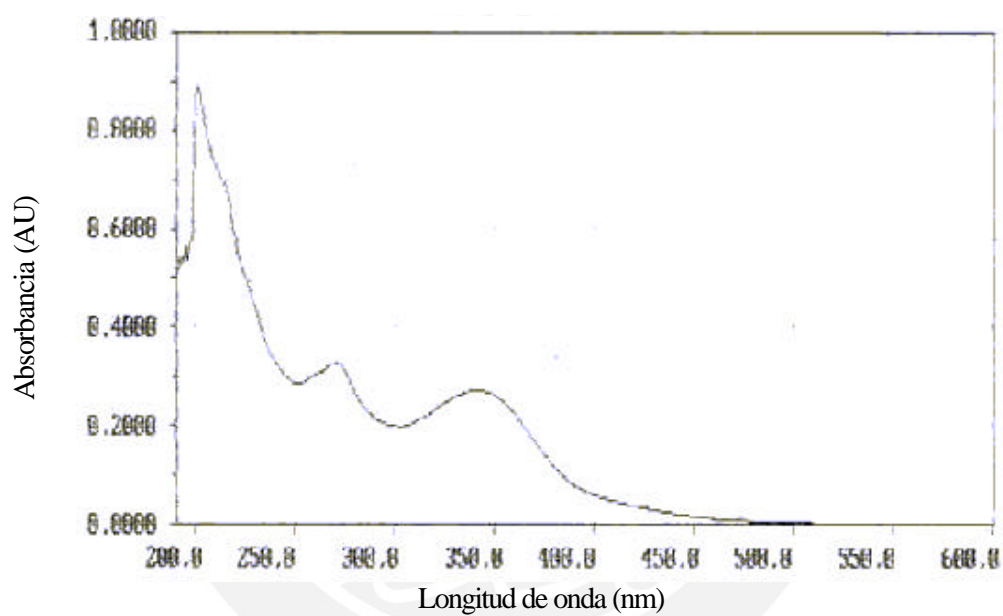


Fig. 12. Espectro UV (MeOH) del compuesto C60-2a

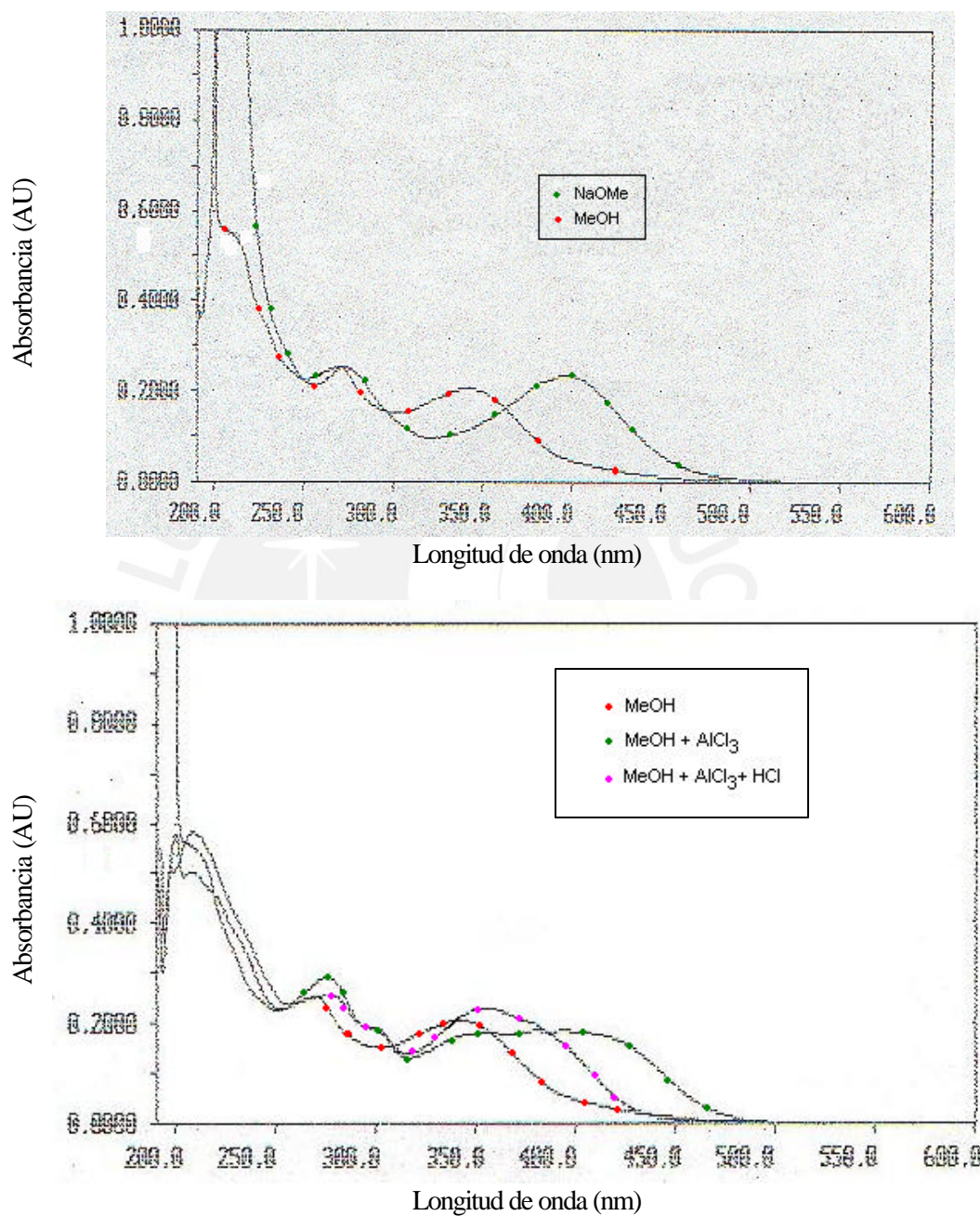


Fig. 13. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe y AlCl₃) del compuesto C60-2a

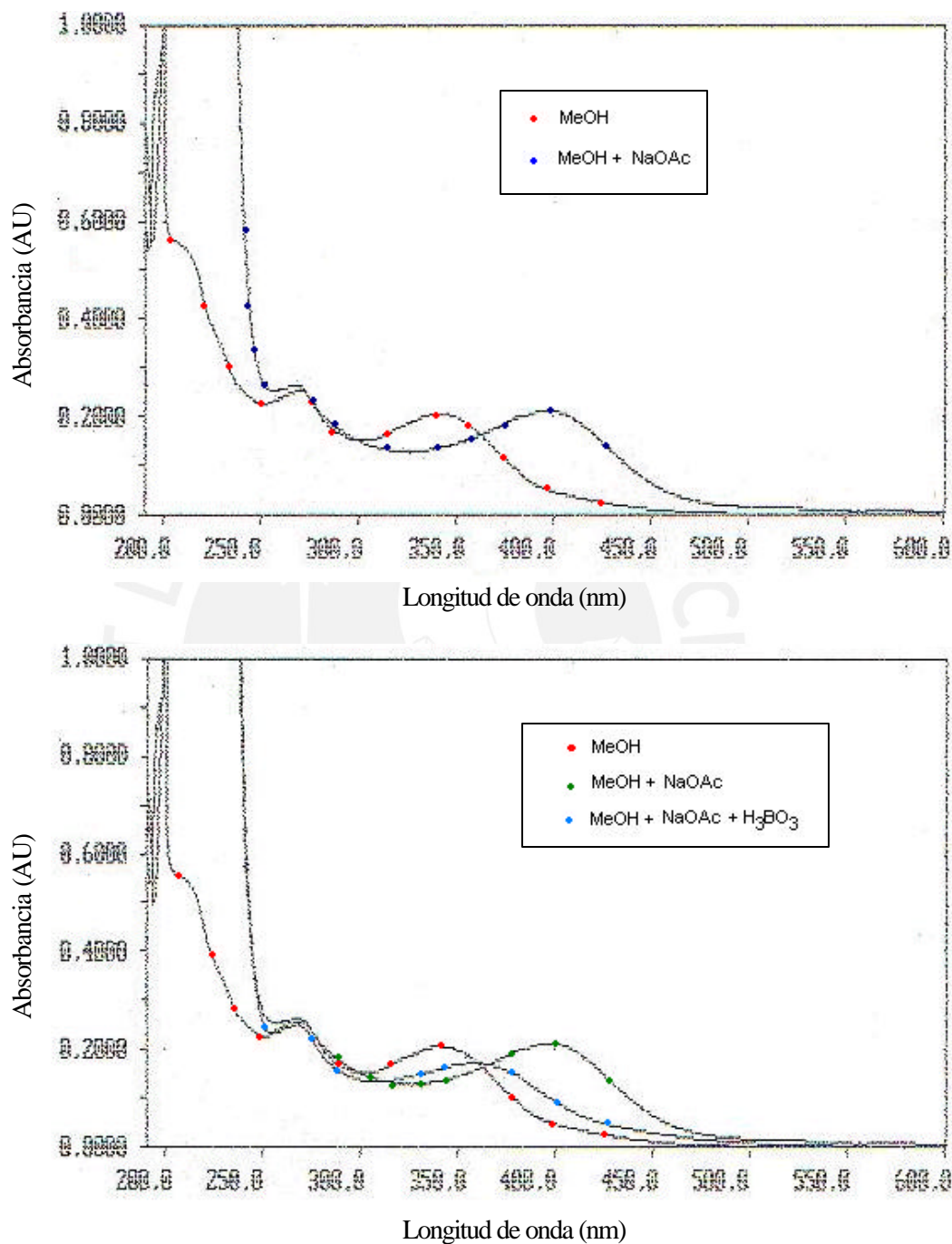


Fig. 14. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOAc y H₃BO₃) del compuesto C60-2a

Se obtuvo 2,3 mg, siendo el componente mayoritario de la fracción C60, en las CCD siempre aparece de un color amarillo al visible, revelando con NP/PEG, se observó al UV-366 un color amari-

* Todos los espectros con reactivos de desplazamiento fueron realizados en un Espectrofotómetro UV/VIS, Perkin Elmer Lambda 2, Lab. PUCP.

Tabla 7. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del Compuesto C60-2a.

Reactivos	Absorciones UV ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)
MeOH	270; 341
NaOMe	272; 396
AlCl ₃	275; 303(h); 381
AlCl ₃ /HCl	276; 303(h); 354
NaOAc	270; 400
NaOAc/ H ₃ BO ₃	265; 356

llo intenso, con el tiempo se vuelve marrón al visible. El espectro ultravioleta en MeOH (Fig. 15), mostró los siguientes máximos: Banda I (334 nm) y Banda II (272 nm).

Con reactivos de desplazamiento (Tabla 8), el espectro mostró desplazamientos, especialmente de la Banda I (Fig. 16 y 17). En el análisis de la mezcla por HPLC-UV-DAD (Fig. 11), el compuesto eluye con un t_r de 17,35 min. Así mismo se tiene el espectro RMN-¹H* y las correlaciones RMN ¹³C - ¹H, heteronuclear y acoplamiento a larga distancia (Fig. 18, 19, 20).

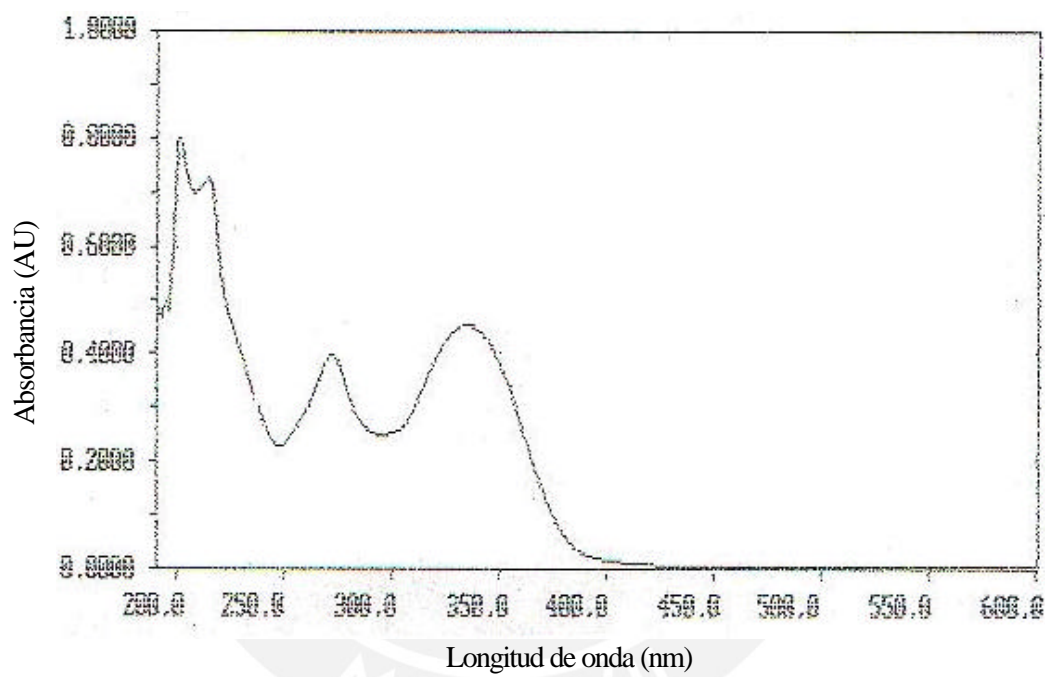


Fig. 15. Espectro UV (MeOH) del compuesto C60-2c

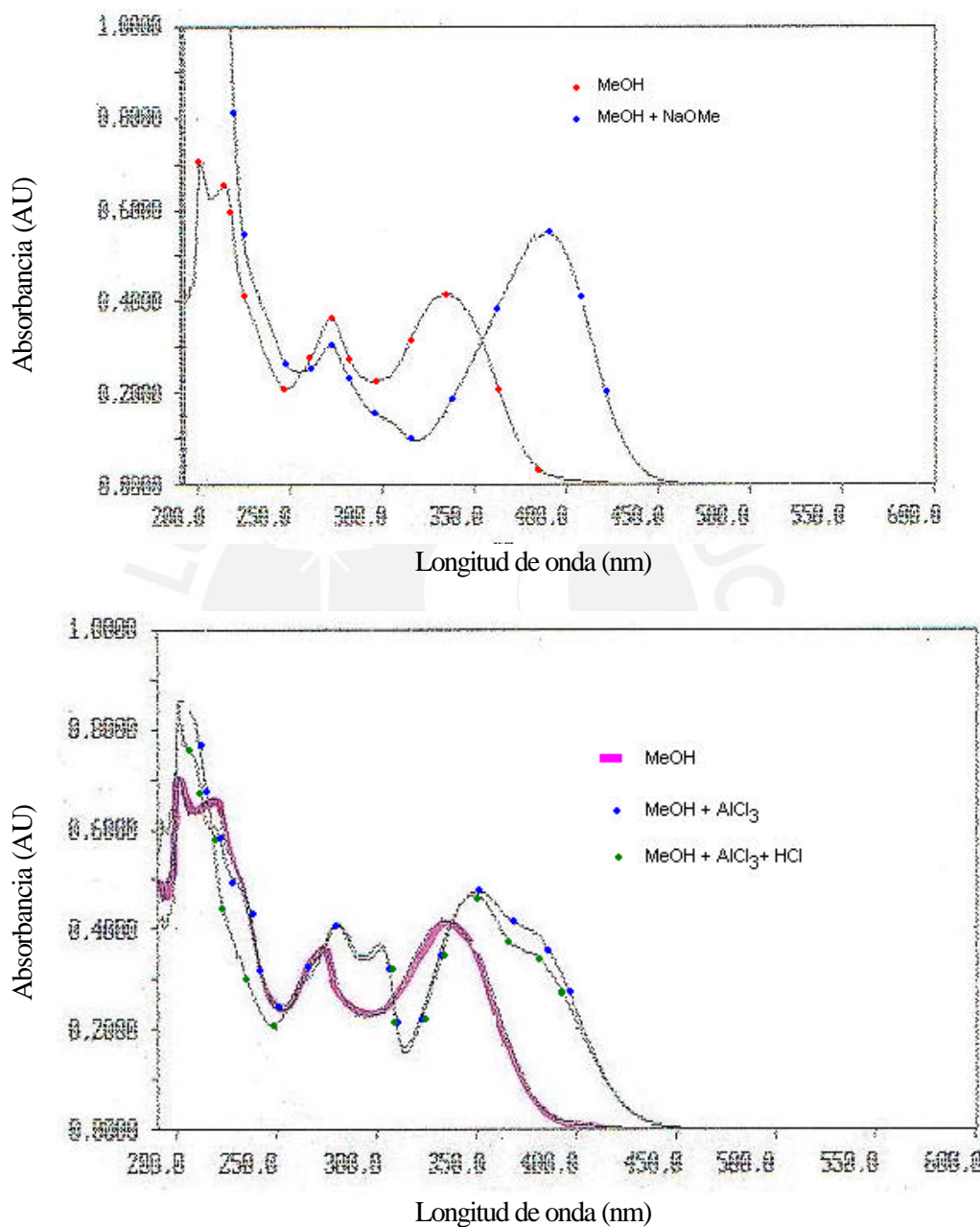


Fig. 16. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe y AlCl₃) del compuesto C60-2c

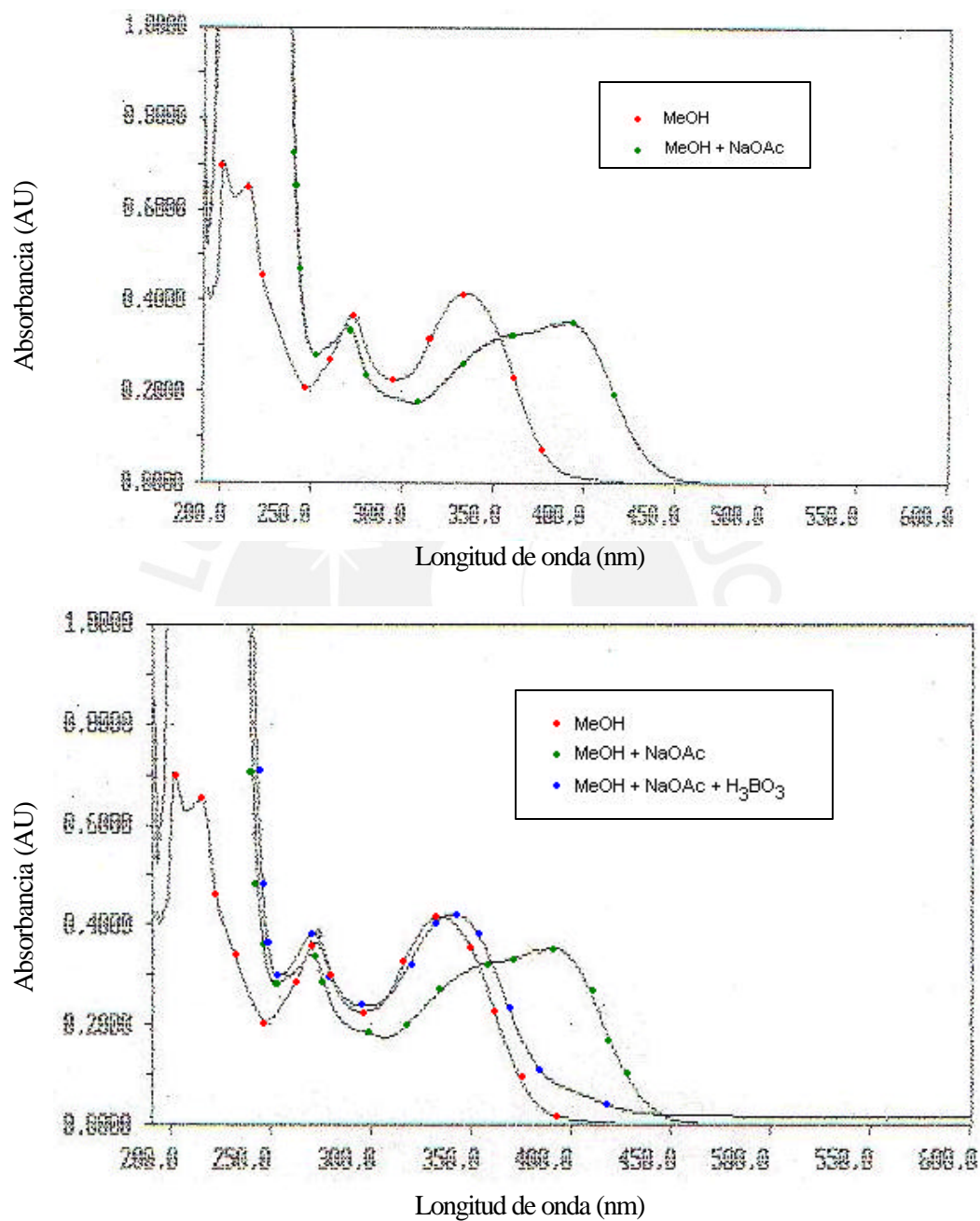


Fig. 17. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOAc y H₃BO₃) del compuesto C60-2c

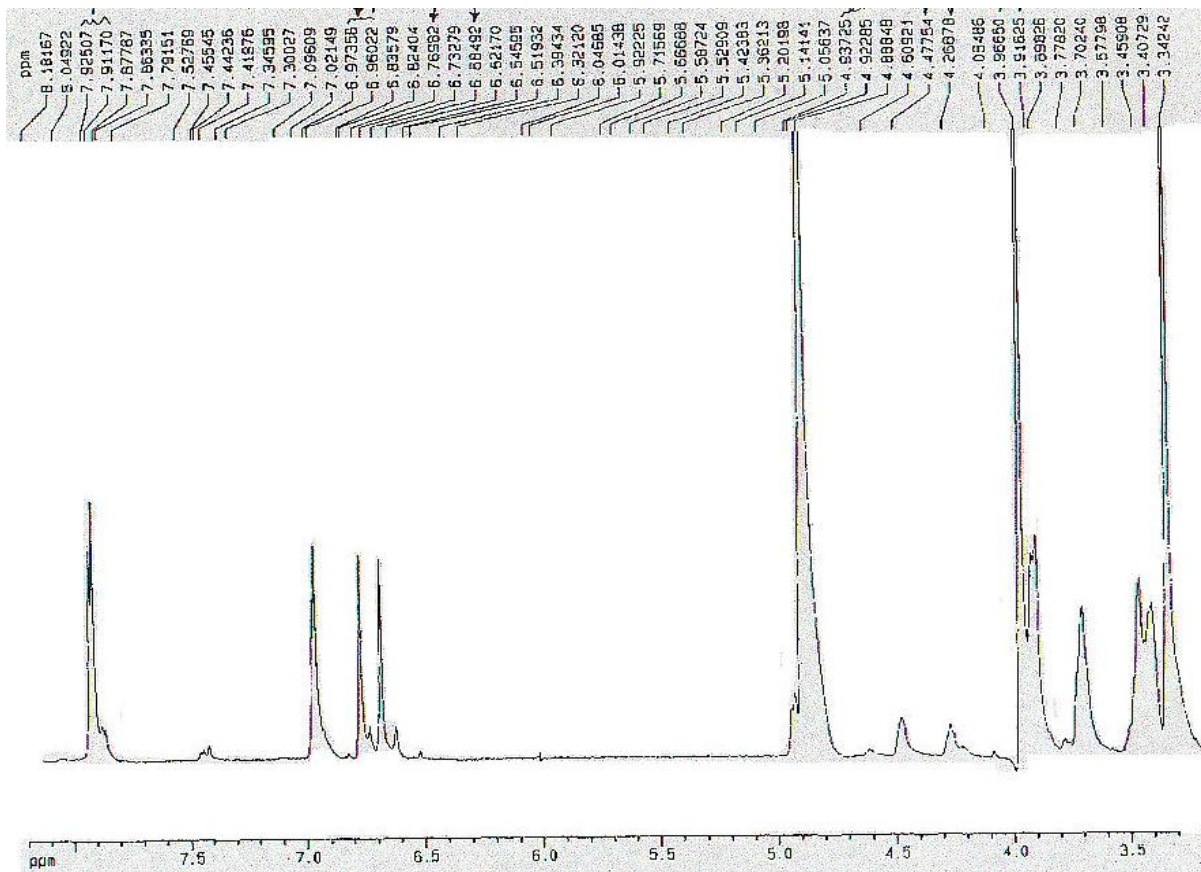


Fig. 18. Espectro RMN-¹H de C60-2c

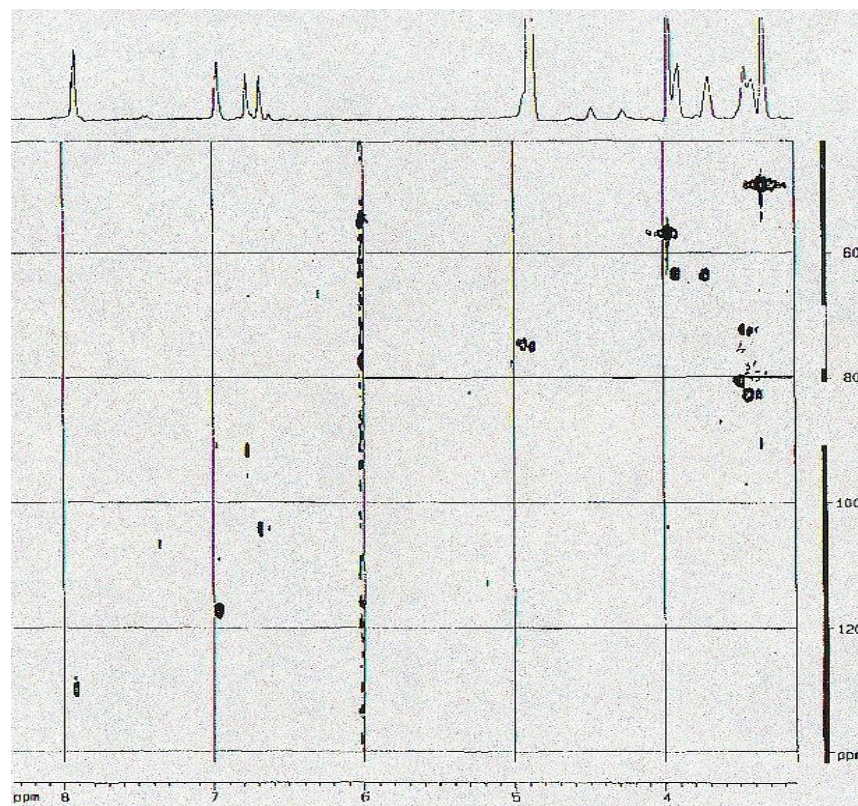


Fig. 19. Correlación heteronuclear RMN $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ del compuesto C60-2c

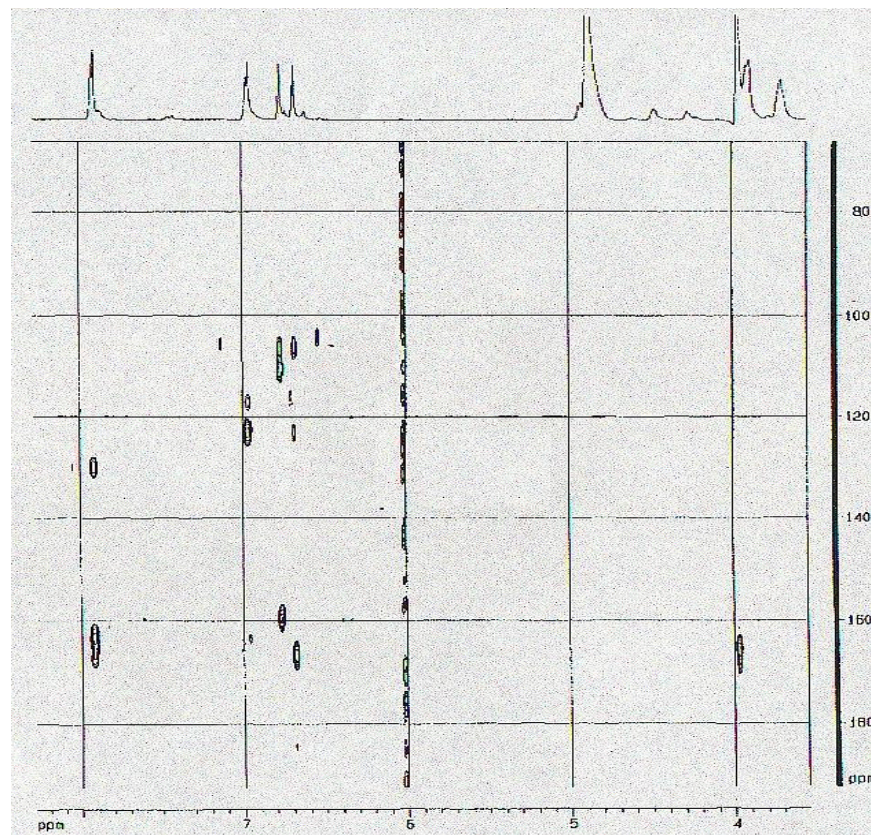


Fig. 20. Correlación heteronuclear RMN ^{13}C - ^1H por acoplamiento a larga distancia del compuesto C60-2c

* Todos los espectros RMN ^1H y correlaciones fueron obtenidos en un equipo Bruker DRX-600, 599,19 MHz para ^1H y 150,858 MHz para ^{13}C , de la Universidad de Salerno, Italia.

Tabla 8. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del Compuesto C60-2c.

Reactivos	Absorciones UV ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)
MeOH	272; 334
NaOMe	271; 389
AlCl_3	280; 302; 350; 377(h)
AlCl_3/HCl	280; 301; 348; 380(h)
NaOAc	269; 300(h); 350(h); 390
NaOAc/ H_3BO_3	270; 340

Fracción : D50

Fracción relativamente compleja, con un peso de 646 mg. Mediante una corrida cromatográfica con el sistema AcOEt-MEK-HOAc- H_2O (11:7:1:1) se observó una mancha amarillo-verdosa visible, que a la luz UV-254 fue de color marrón, apareciendo además una mancha celeste y otra de color marrón cerca al origen. Como la fracción mostró tener una alta polaridad, se ensayó una CCD fase reversa RP-18 F_{254} , con sistema gradiente H_2O -MeOH (80:20 \rightarrow 0:100), se observó la separación gradual de los componentes conforme se cambió la polaridad hasta la elución total de la muestra; mediante este sistema se detectó hasta 6 componentes. Similar complejidad se observó al analizar la fracción por HPLC.

En base a estos resultados se trabajó una LPCL, con 300 mg de la fracción D50, usando columna RP-8, presión de trabajo 2,5 bar y un flujo de 4,40 mL/min, colectándose 66 fracciones de 25 mL cada una, repitiéndose el proceso con una segunda muestra en las mismas condiciones. Se evaluó por CCD, con sistema AcOEt-MEK-HOAc- H₂O (11:7:1:1), uniéndose los volúmenes de igual o similar composición en 12 fracciones (Tabla 9).

Tabla 9. Fracciones colectadas de LPLC I y II de la fracción D50

Fracción	Columna I		Columna II	
	mL	mg	mL	mg
1	50	17,1	60	17,5
2	75	5,7	140	5,4
3	60	1,3	80	6,7
4	90	6,3	100	14,8
5	160	17,5	60	8,9
6	160	10,0	100	21,5
7	120	15,4	100	18,4
8	60	14,6	160	20,5
9	120	23,6	120	8,6
10	120	17,5	100	26,0
11	160	62,8	200	24,1
12	140	11,9	-	-

Estas fracciones fueron nuevamente evaluadas por CCD y reunidas finalmente en 10 fracciones indicadas en la Tabla 10. Al revisar el grado de pureza de éstas, usando el sistema CHCl₂-MeOH-H₂O (13: 7: 4) fase inferior; se observó que únicamente las fracciones D505 y D508 aparecían relativamente puras, las placas fueron reveladas con FeCl₃ ac., apareciendo manchas verde y marrón respectivamente. Por consiguiente se continuó el análisis con estas fracciones.

Fracción D505

Sólido de color amarillo oscuro, con 10,2 mg, poco soluble en MeOH, por continuos lavados se obtuvo un producto de color amarillo más claro.

Por CCD con sistema CH_2Cl_2 - MeOH - H_2O (13:7:4) fase inferior; apareció una mancha amarilla al visible, marrón al UV-254 y revelada con FeCl_3 ac., se observó como mancha verde, lo denominamos compuesto D505-I.

Tabla 10. Fracciones reunidas de LPLC I y II de la fracción D50

Fracción	Peso, mg	N° de manchas en CCD *	
		UV-254	Vainillina + H_2SO_4
D501	21,9	3	4
D502	3,7	3	5
D503	3,0	1	3
D504	30,3	1 (cola)	2 (cola)
D505	10,2	2	2
D506	40,5	2 (cola)	3 (cola)
D507	18,9	1 (cola)	3 (cola)
D508	159,0	2	2
D509	27,2	1 (cola)	1 (cola)
D5010	17,6	2	2

* El número de señales reveladas con vainillina + H_2SO_4 , incluye (salvo excepciones) a las señales que también son reveladas con luz UV-254 .

Compuesto D505-I

Sólido amarillo de aspecto esponjoso, con un peso de 9,5 mg, fundió con descomposición entre 280-283 °C. Se analizó la pureza del compuesto por

HPLC-UV-DAD, observándose que eluye con un t_R de 15,16 min. Su espectro UV del HPLC mostró máximos de absorción a 253; 274(h); 329; 373(h) nm (Fig. 21). Se presentan las absorciones UV con reactivos de desplazamiento (Fig. 22 y 23) así como los valores de absorción (Tabla 11) y el espectro IR (Fig. 24).

Tabla 11. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del compuesto D505-I

Reactivos	Absorciones UV ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm)
MeOH	251; 274 ; 329; 380(h)
NaOMe	258; 296; 358; 418(h)
AlCl ₃	254; 265; 280(h); 333(h); 357(h); 421(h)
AlCl ₃ /HCl	255; 266; 280; 321(h); 357; 420(h)
NaOAc	261(h); 294; 355
NaOAc/ H ₃ BO ₃	250(h); 274; 333 ; 382(h)

Siendo el espectro UV de este compuesto muy similar al del compuesto 8-O-glc-desmetilbellidifolina, se hizo un análisis comparativo con un estándar* por HPLC-UV-DAD. Primero se disolvió el estándar en ACN-H₂O al 65% (1mg/mL), inyectando a la columna 5 μ L a 30 °C, eluyendo con un t_R de 15,09 min (Fig. 25). En seguida se mezcló en volúmenes iguales, la solución del estándar con solución (1mg/mL) del compuesto D505-I, inyectándose nuevamente a la columna, a la misma temperatura, apareciendo una misma señal a t_R 15,07 min (Fig. 26), los valores comparativos se dan en la Tabla 12.

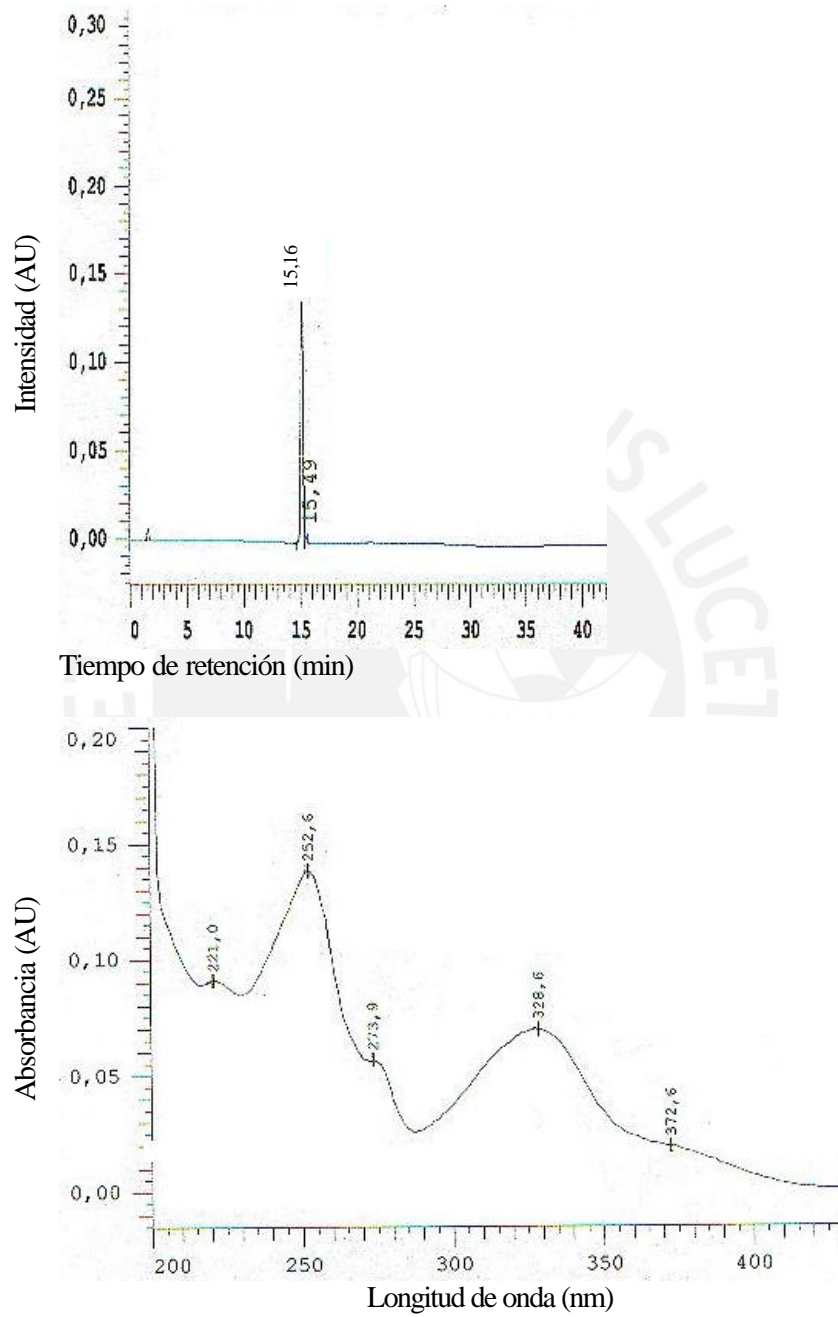


Fig. 21. HPLC y espectro UV del compuesto D505-I

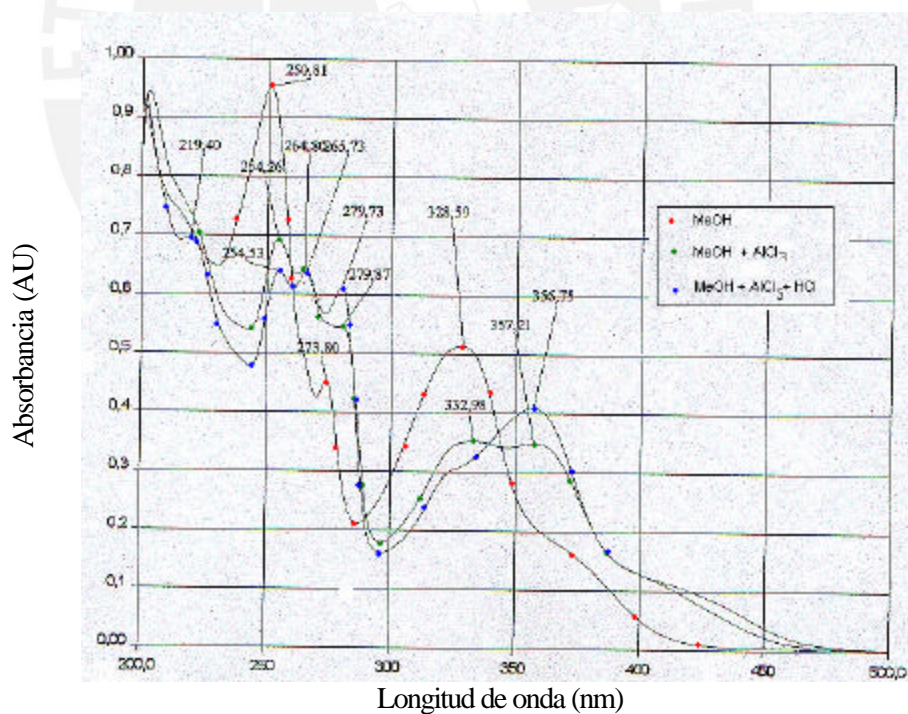
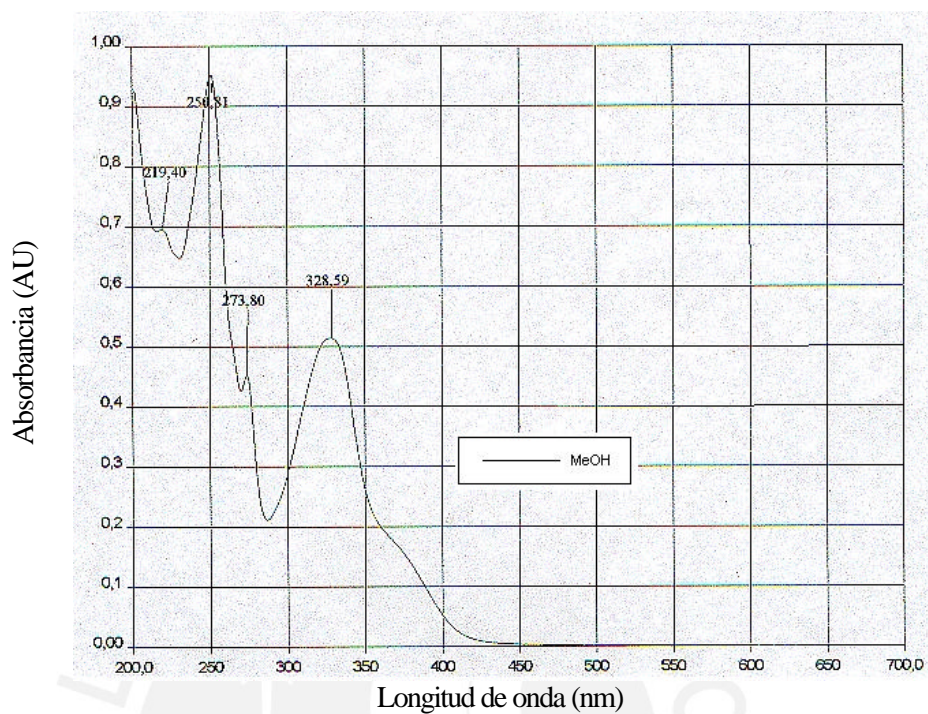


Fig. 22. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (AlCl₃ y HCl) del compuesto D505-I

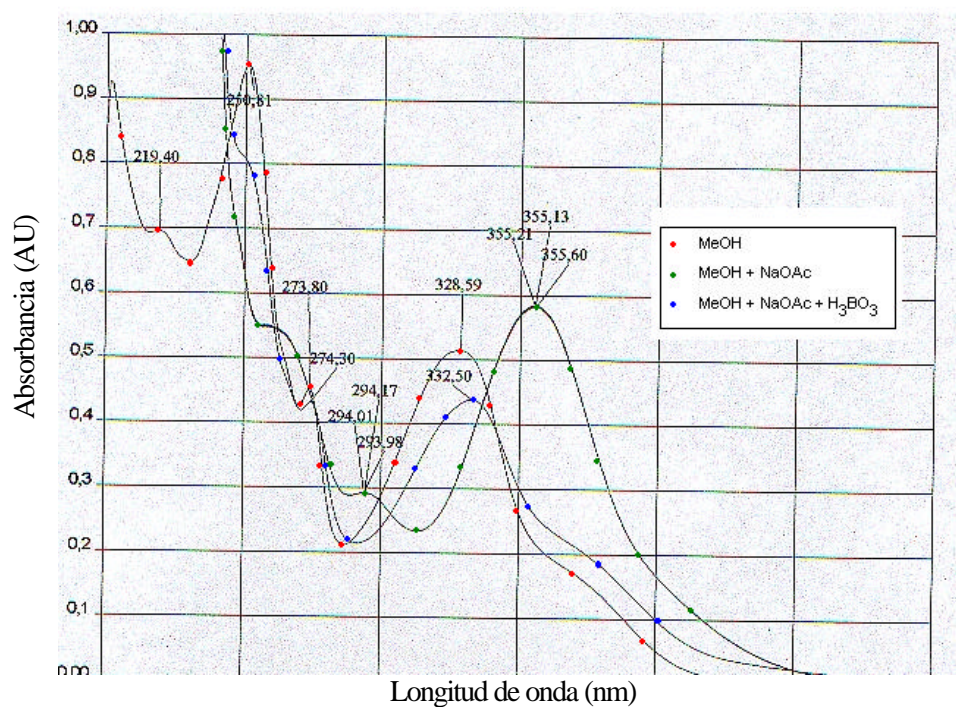
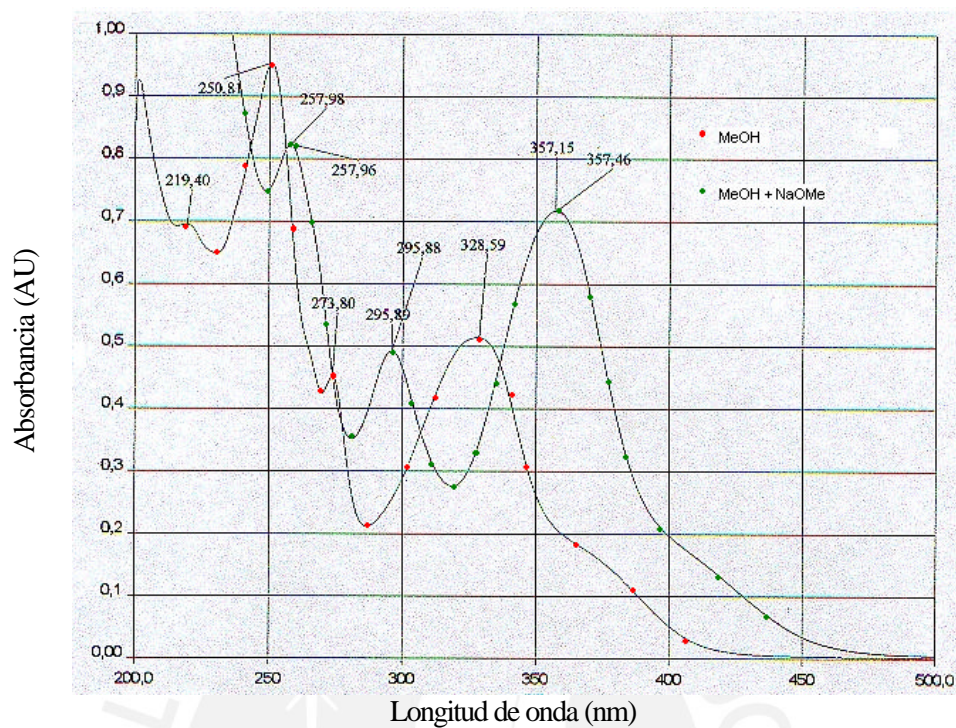


Fig. 23. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe, NaOAc y H_3BO_3) del compuesto D505-I

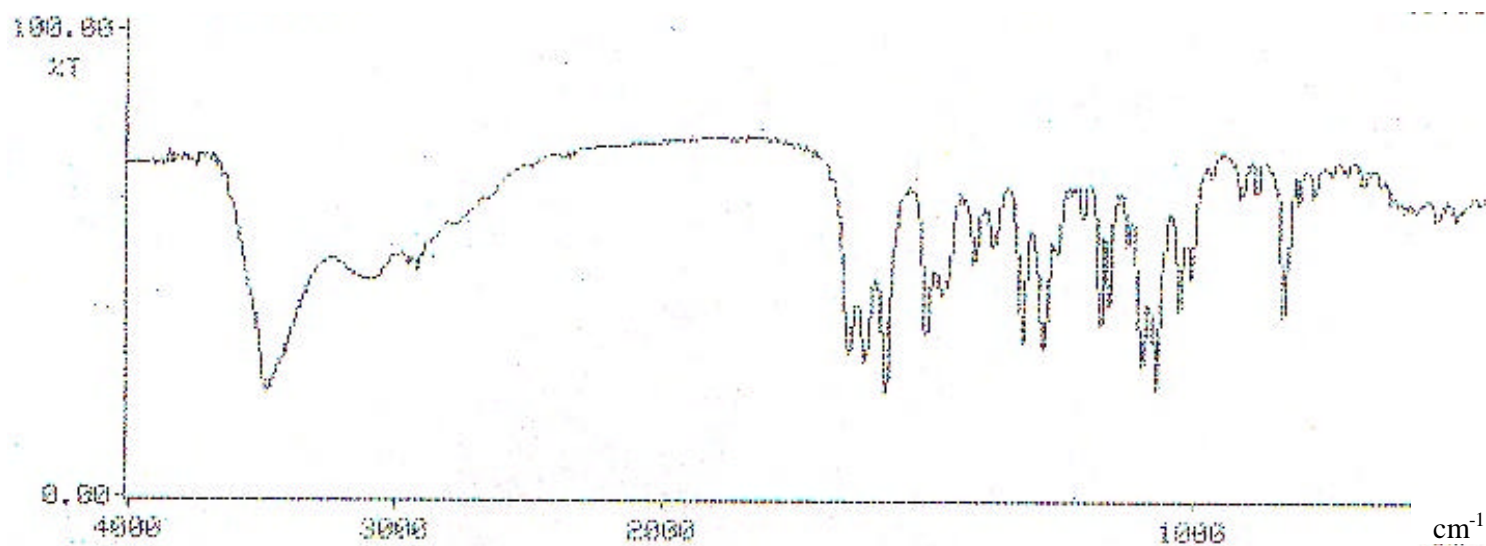


Fig. 24. Espectro IR del compuesto D505-I

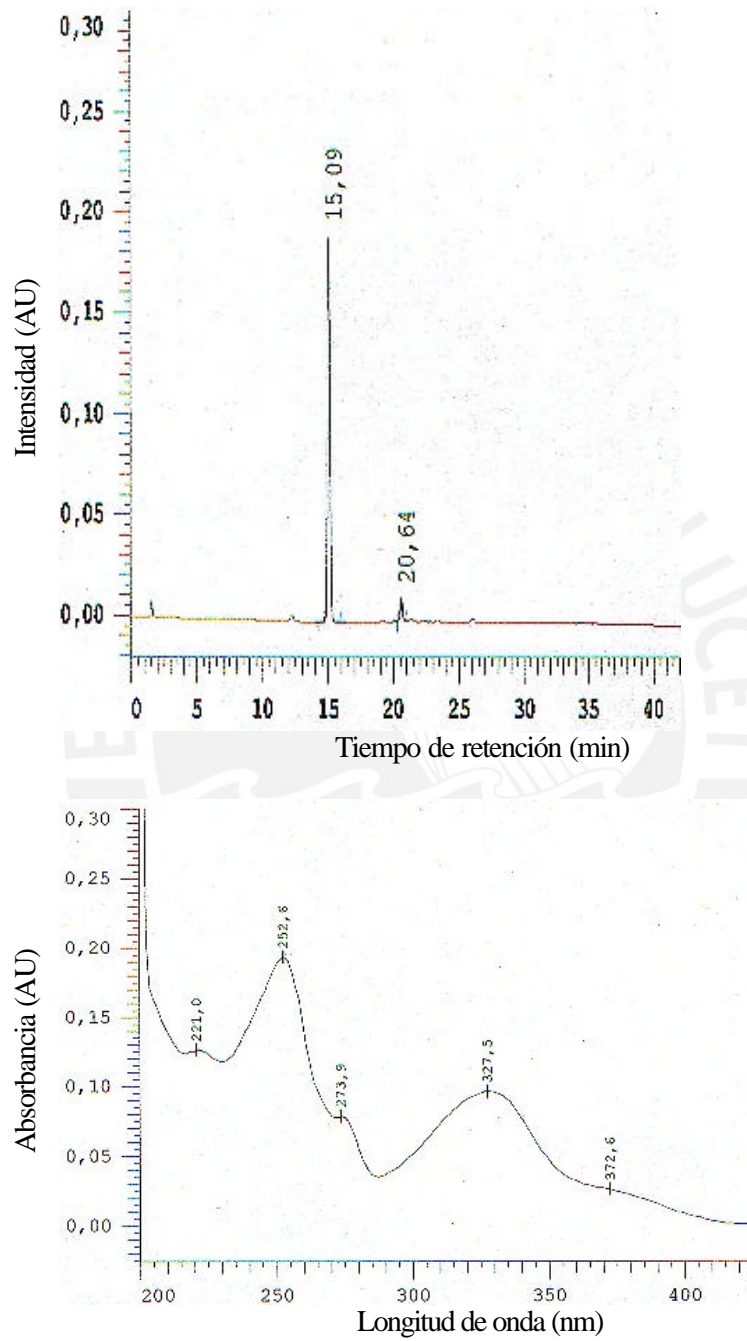


Fig. 25. HPLC y espectro UV del compuesto 8-O-glucosilbellidifolin

Tabla 12. Absorciones UV de los compuestos D505-I y 8-O-glc-desmetilbellidifolina

Compuesto	t_R , min	$\lambda_{m\acute{a}x}$
D505-I	15,16	253; 274(h); 329; 373(h)
8-O-glc-desmetilbellidifolina	15,09	253; 273(h); 328; 373(h)

Fración D508 por la Prof. O. Lock.

Polvo de color amarillo oscuro, con peso de 159 mg. Al agregar MeOH se disolvió parcialmente quedando un residuo, el que fue separado por continuos lavados. La CCD comparativa de ambas partes en el sistema CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (13:7:4) fase inferior, reveló una mayor pureza de la parte soluble, el que fue denominado compuesto D508/1.

Compuesto D508/1

Polvo de color amarillo oscuro, con peso de 11,1 mg, con descomposición a partir de 275°C sin observarse la fusión del compuesto. Se analizó 1 mg de la muestra por HPLC-UV-DAD, eluyendo a 31,29 min; el espectro UV, muestra máximos de absorción a 254, 276, 331, 395(h) nm (Fig. 27), las absorciones UV con reactivos de desplazamiento se muestran en la Tabla 13 y las Figuras 28 y 29; así como el espectro IR del compuesto en la Figura 30.

Tabla 13. Absorciones UV con reactivos de desplazamiento del

compuesto D508/1

Reactivos	Absorciones UV ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)
MeOH	254; 277; 334; 390(h)
NaOMe	259; 302; 357
AlCl ₃	257; 288; 329; 371; 464(h)
AlCl ₃ /HCl	256; 287; 328; 372; 459(h)
NaOAc	268; 350
NaOAc/ H ₃ BO ₃	253; 278; 337; 400(h)

Fracción : D51

Polvo amarillo oscuro con peso de 178,7 mg, poco soluble en metanol, propiedad utilizada para su separación. Su purificación se realizó por continuos lavados con pequeñas porciones de metanol; analizadas por CCD, con sistema AcOEt-MeOH-HOAc-H₂O (5:3:1:1) y observadas al UV-254, aparecieron 3 manchas marrones claramente definidas, con R_f de 0,465; 0,62 y 0,915; reveladas con vainillina y H₂SO₄ dan colores marrón, amarillo y marrón respectivamente.

La fracción luego fue analizada por HPLC-UV-DAD, observándose 3 picos claramente definidos (Fig. 31), con t_R de 12,27; 15,04 y 31,69 min, los espectros UV muestran 4 máximos (Tabla 14).

Tabla 14. Absorciones UV de los compuestos de la fracción D51.

Comp.	t _R , min	$\lambda_{\text{máx}}$, nm
D51-I	12,27	242; 260; 318; 365

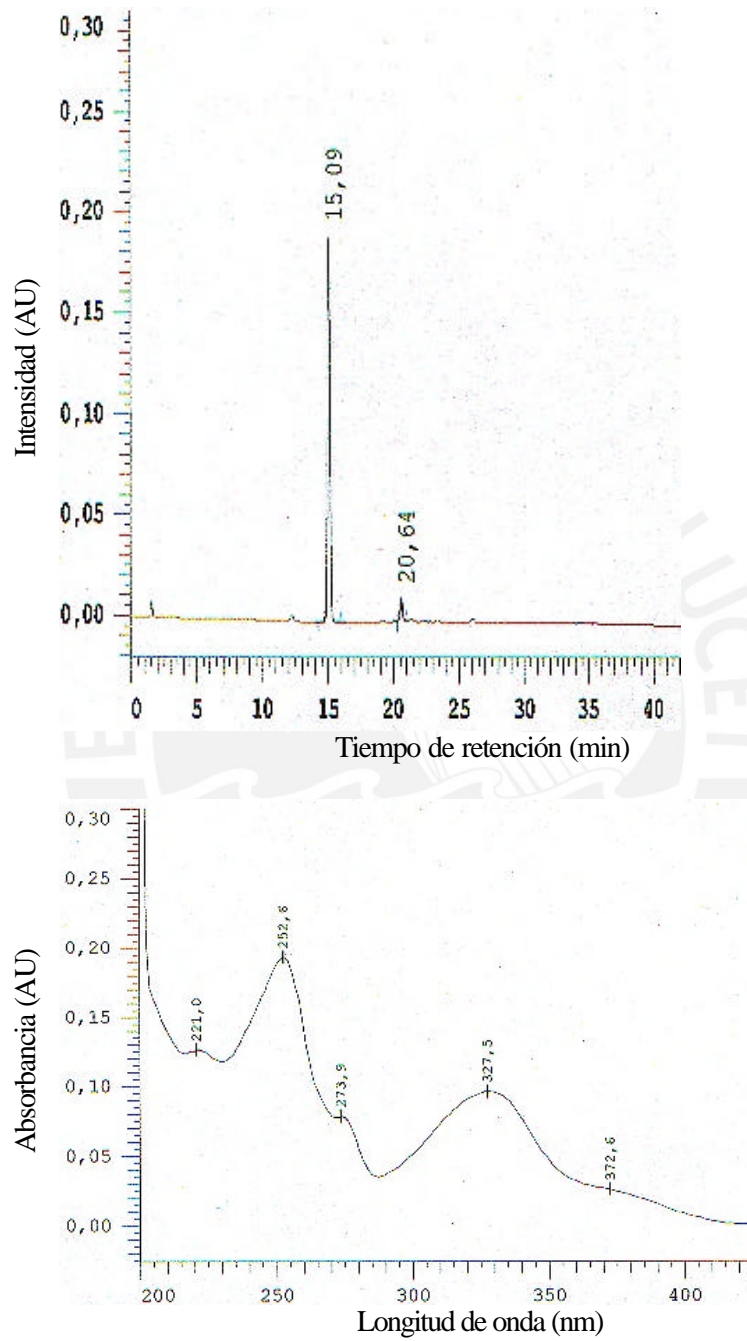


Fig. 25. HPLC y espectro UV del compuesto 8-O-glc-desmetilbellidifolina

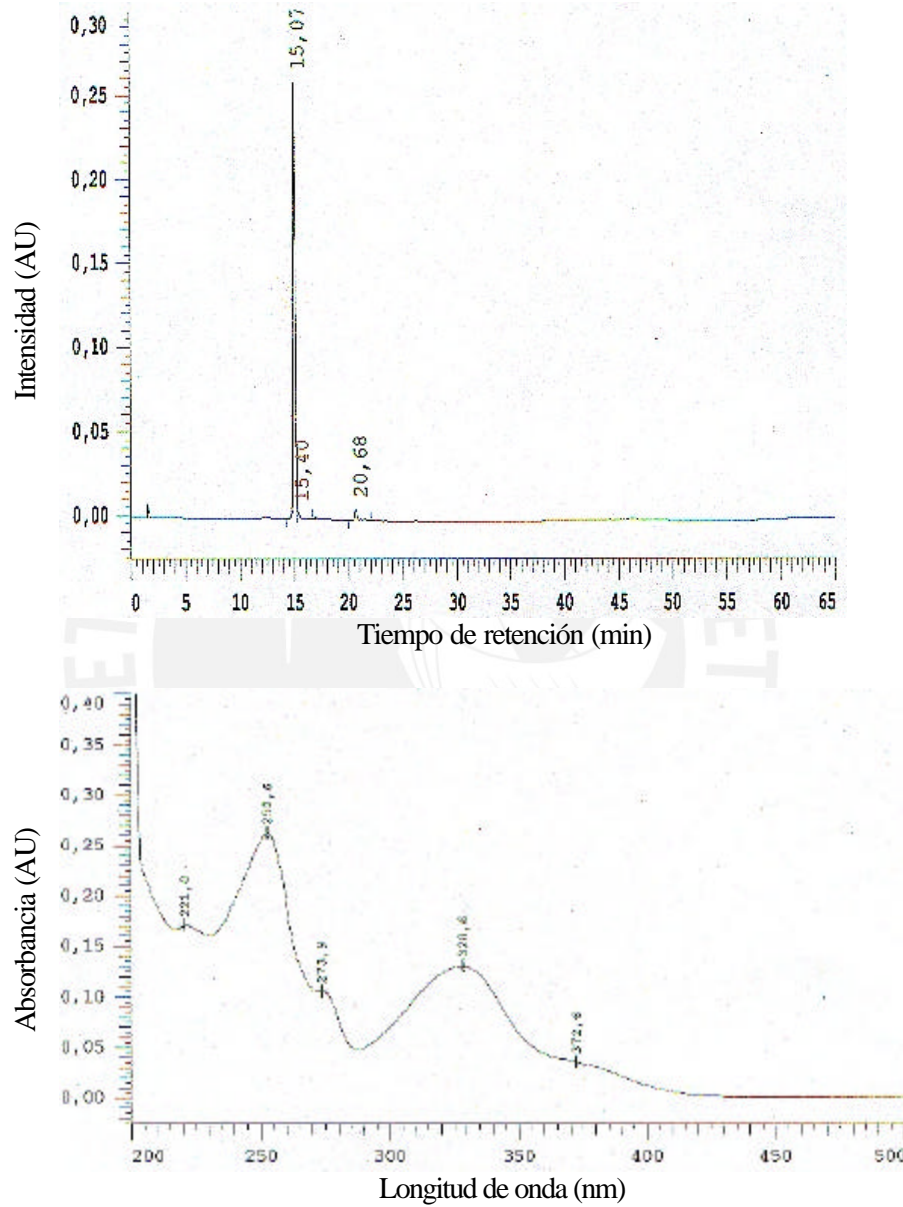


Fig. 26. HPLC y espectro UV de los compuestos D505-I + 8-O-glc-desmetilbellidifolina

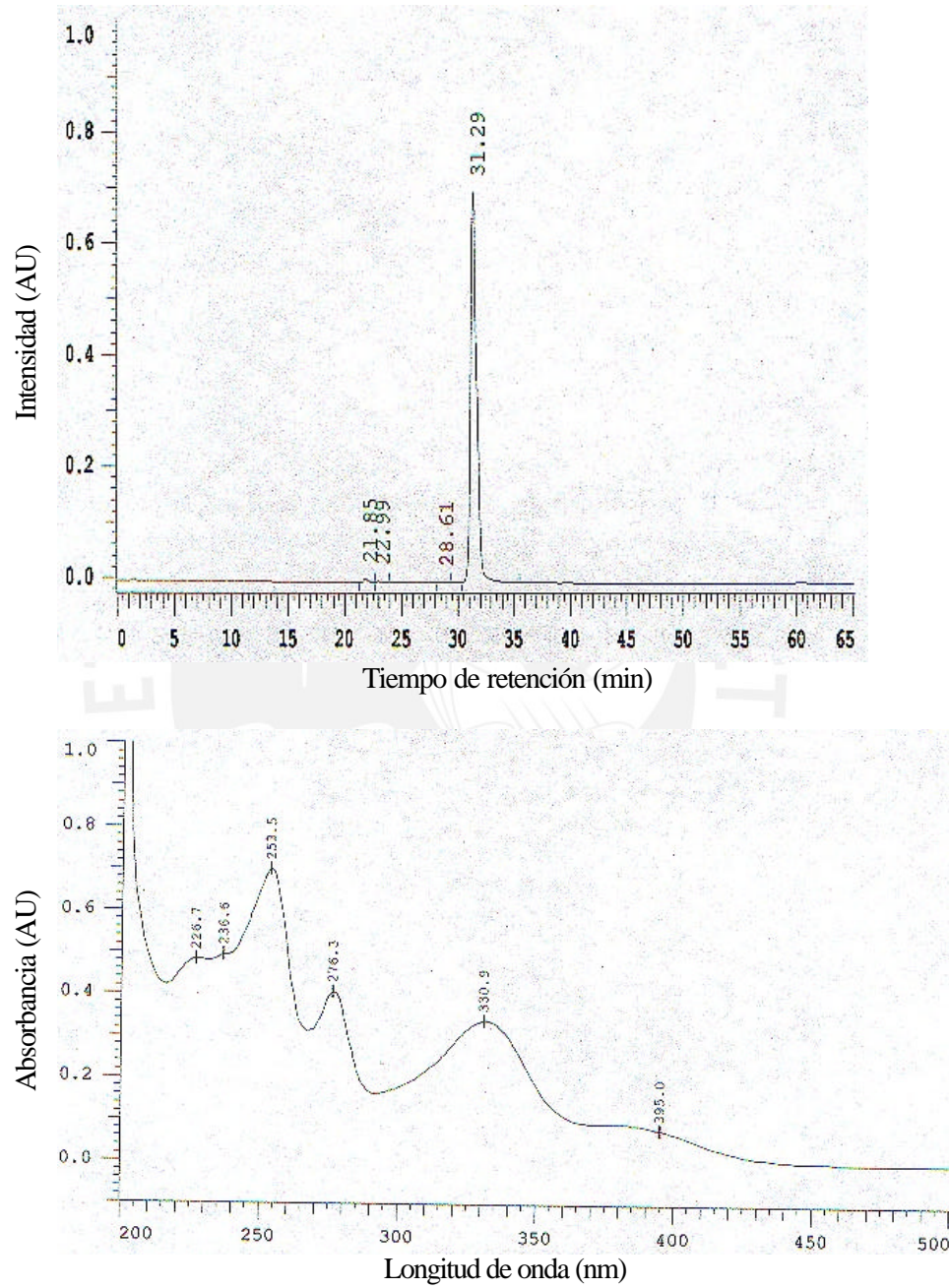


Fig. 27. HPLC y espectro UV del compuesto D508/1

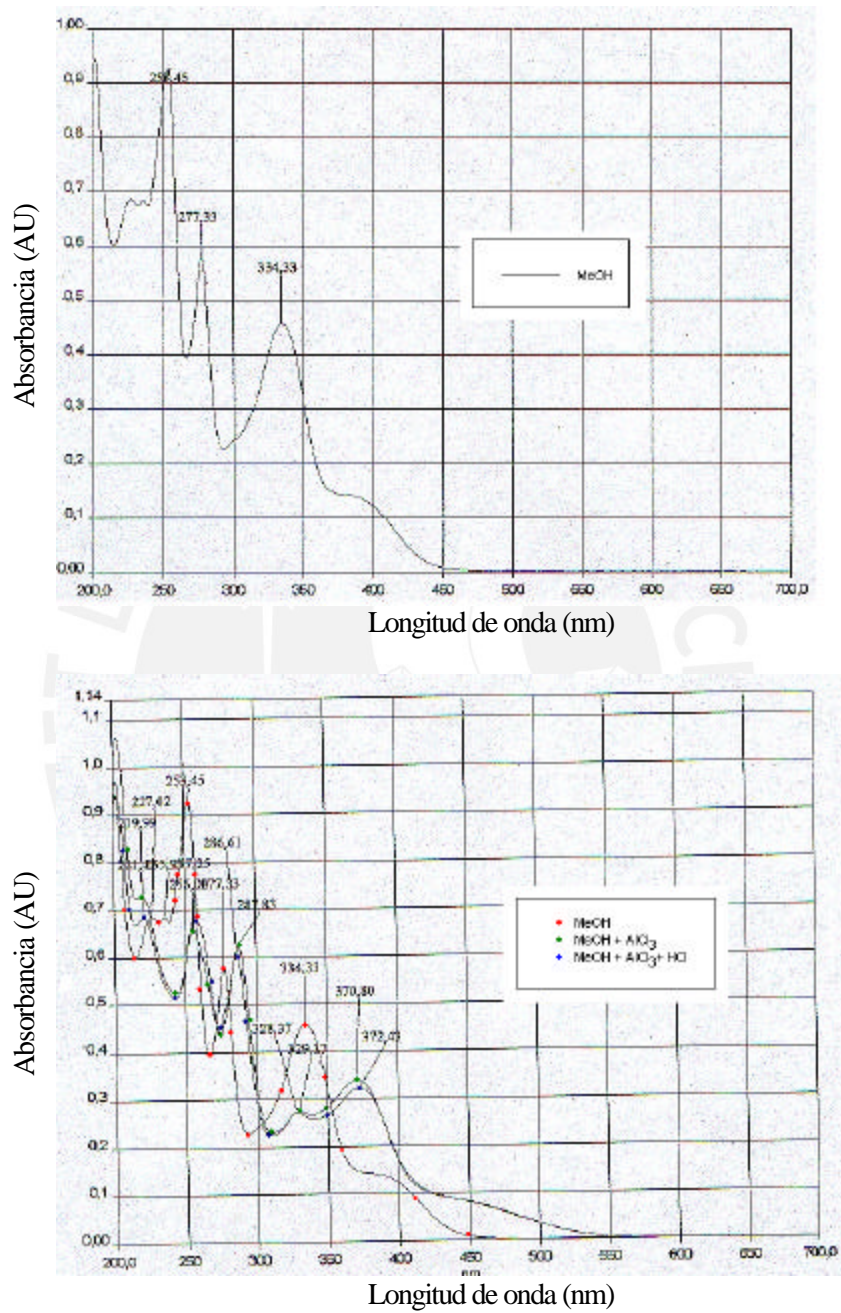


Fig. 28. Espectros de UV con reactivos de desplazamiento (AlCl₃ y AlCl₃/HCl) del compuesto D508/1

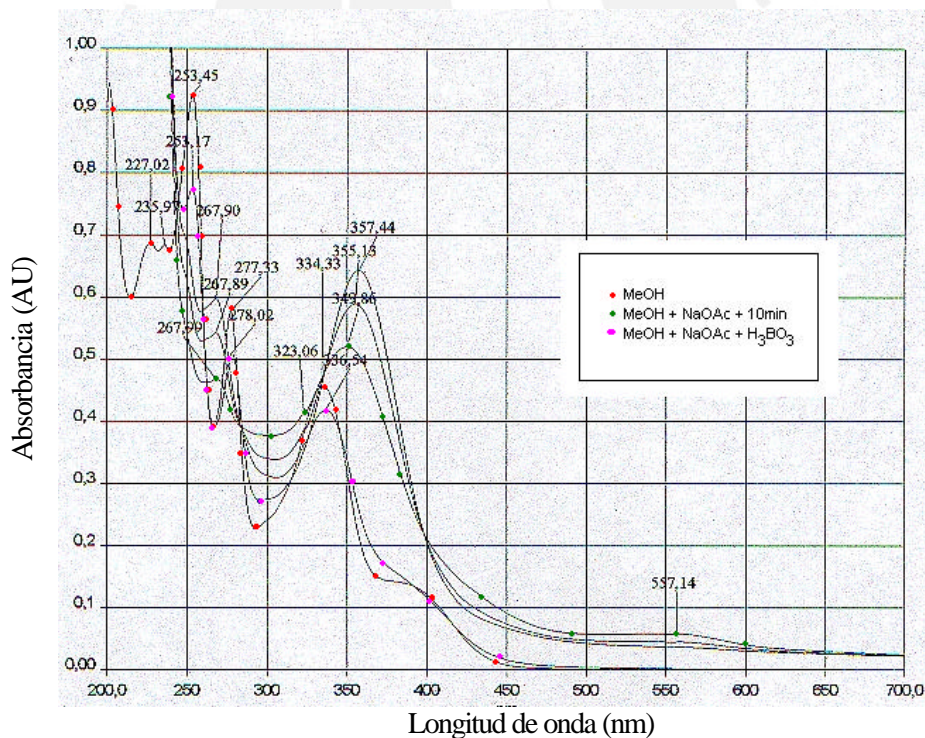
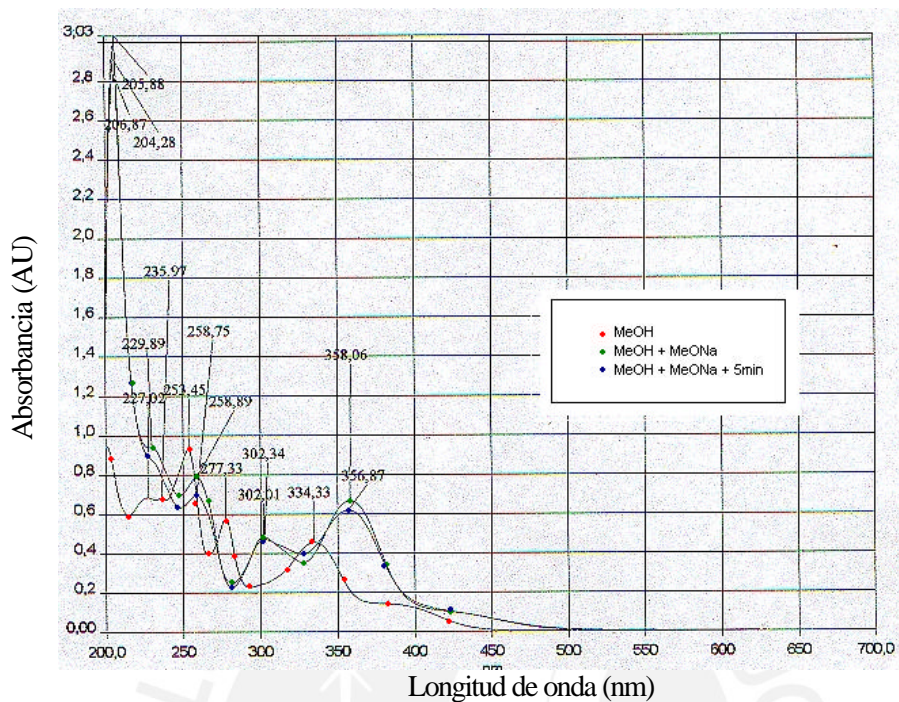


Fig. 29. Espectros UV con reactivos de desplazamiento (NaOMe, NaOAc y H_3BO_3) del compuesto D508/1

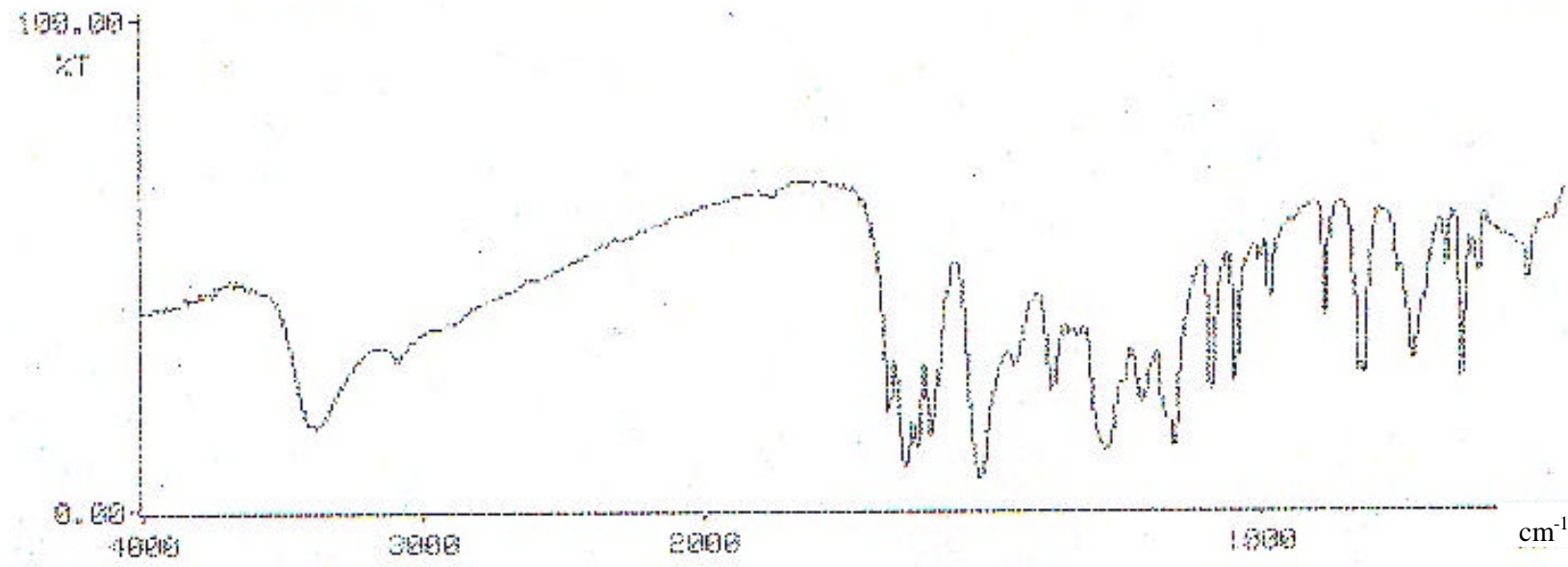


Fig. 30. Espectro IR del compuesto D508/1

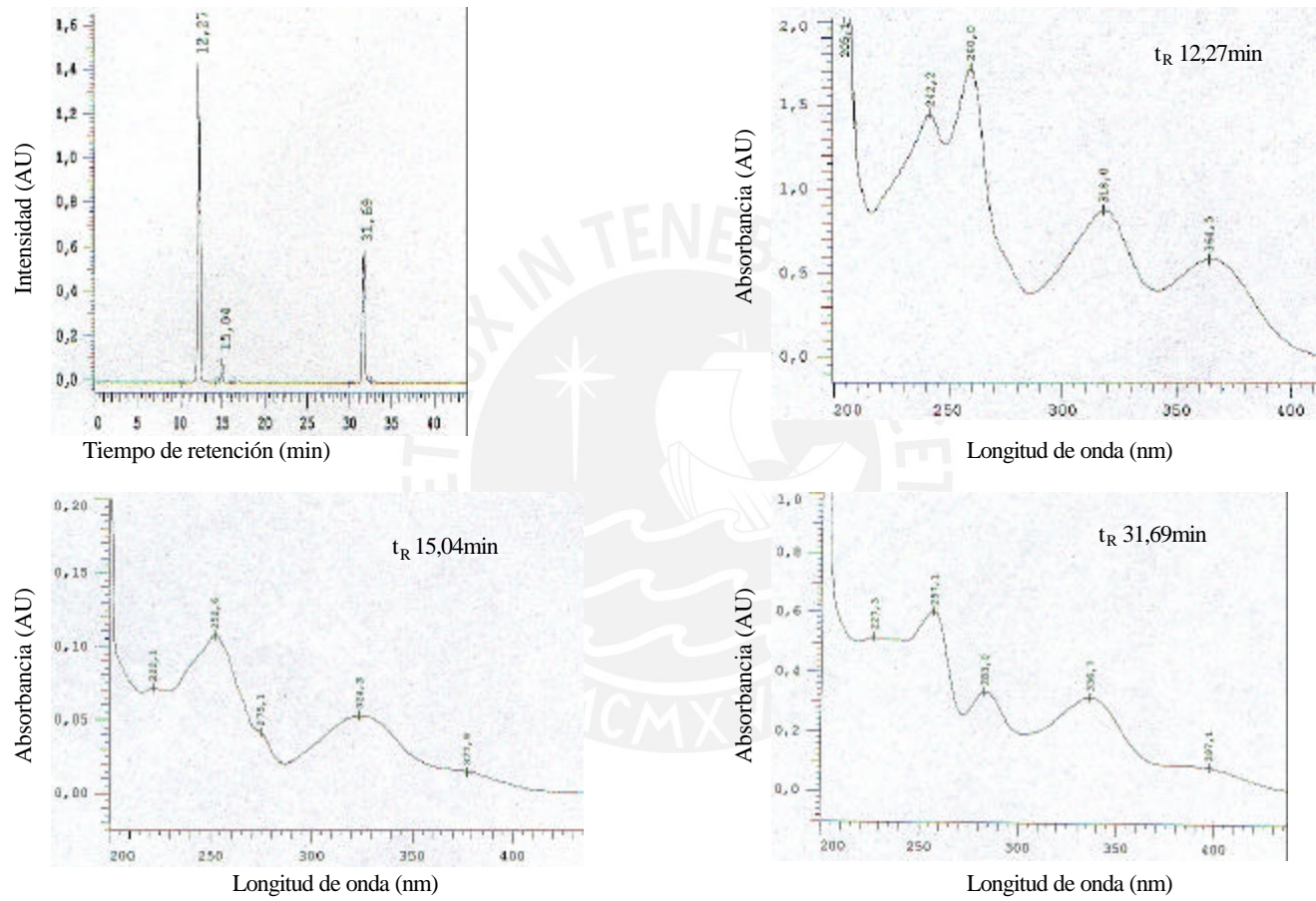


Fig. 31. HPLC y espectros UV de la fracción D51

D51-II 15,04 253; 275(h); 324; 378(h)

D51-III 31,69 257; 283; 337; 397(h)

Habiendo mostrado la fracción, señales bastante claras y tiempos de retención de compuestos comunes; no se intentó separarlos, por lo que se les designó, compuestos D51-I, D51-II y D51-III respectivamente.

Compuesto D51-I

Analizando los datos del compuesto, se realizó una CCD comparativa, con un estándar de mangiferina*, notándose similar comportamiento en el sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (5:3:1:1), con un R_f común de 0,465.

* Proporcionada por la Prof. O. Lock.

Se analizó por HPLC-UV-DAD, la solución del estándar (1,04 mg/mL), en ACN-H₂O al 65 %, fue inyectada a la columna (5 µL) a 30 °C; el compuesto eluyó con t_R 12,27 min (Fig. 32). Luego el estándar se mezcló en volúmenes iguales con la fracción D51 conteniendo el compuesto D51-I preparado en las mismas condiciones, se inyectó a la columna 2,5 µL a 30 °C, apareciendo el mismo pico con mayor intensidad (Fig. 33).

Compuesto D51-II

Existiendo bastante similitud de datos (t_R y λ_{máx}) de este compuesto con la 8-O-glc-desmetilbellidifolina, se hizo un análisis comparativo por HPLC-UV-DAD. La solución en ACN-H₂O al 65 % (1,12 mg/mL) del estándar eluyó a 15,09 min (Fig. 25). Se mezcló en volúmenes iguales con la fracción D51 conteniendo el compuesto D51-II, preparado en las mismas condiciones; se inyectó 2,5 µL, desarrollándose la cromatografía a 30 °C, apareciendo la misma señal a t_R 15,09 min (Fig. 34).

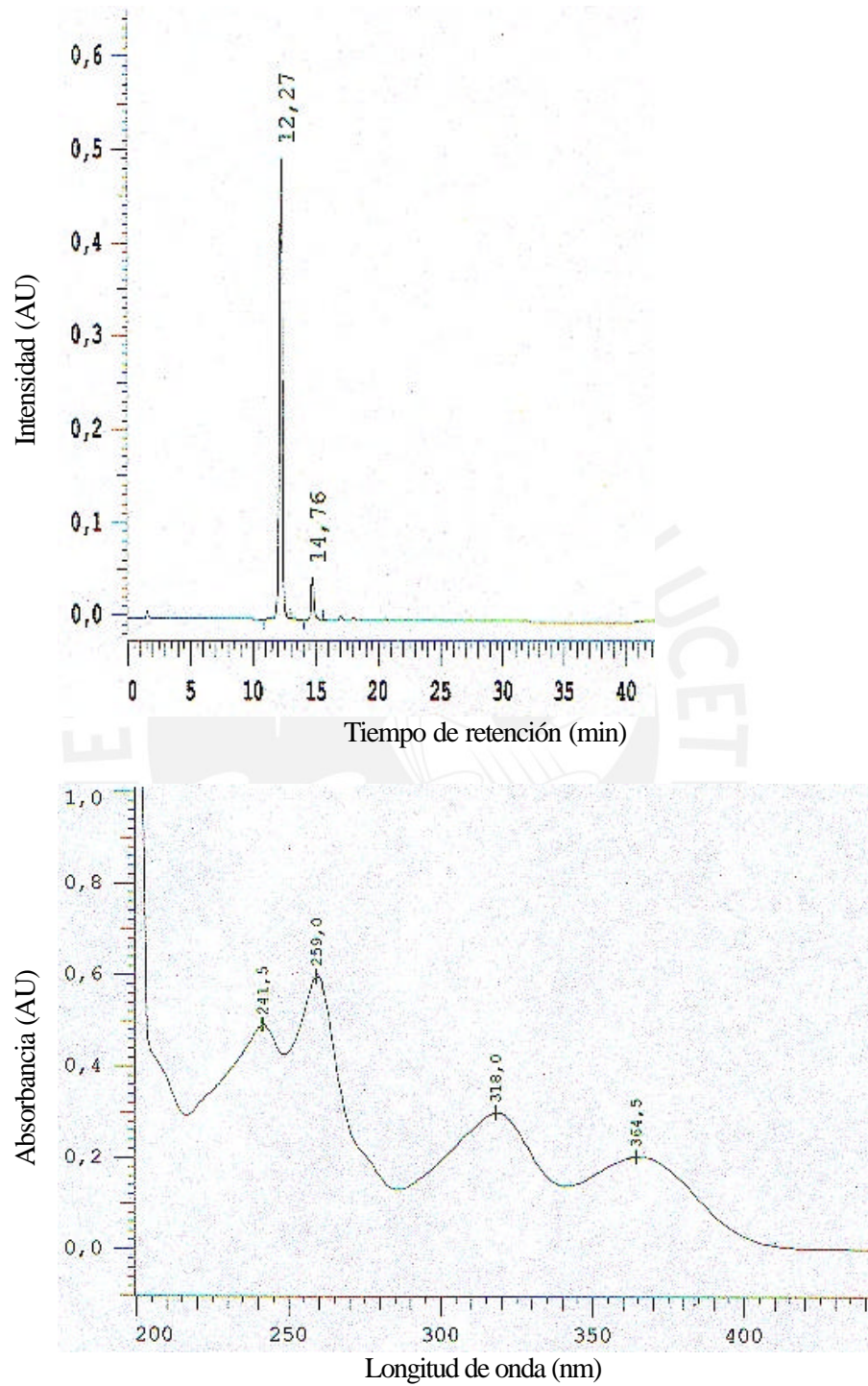


Fig. 32. HPLC y espectro UV del compuesto mangiferina

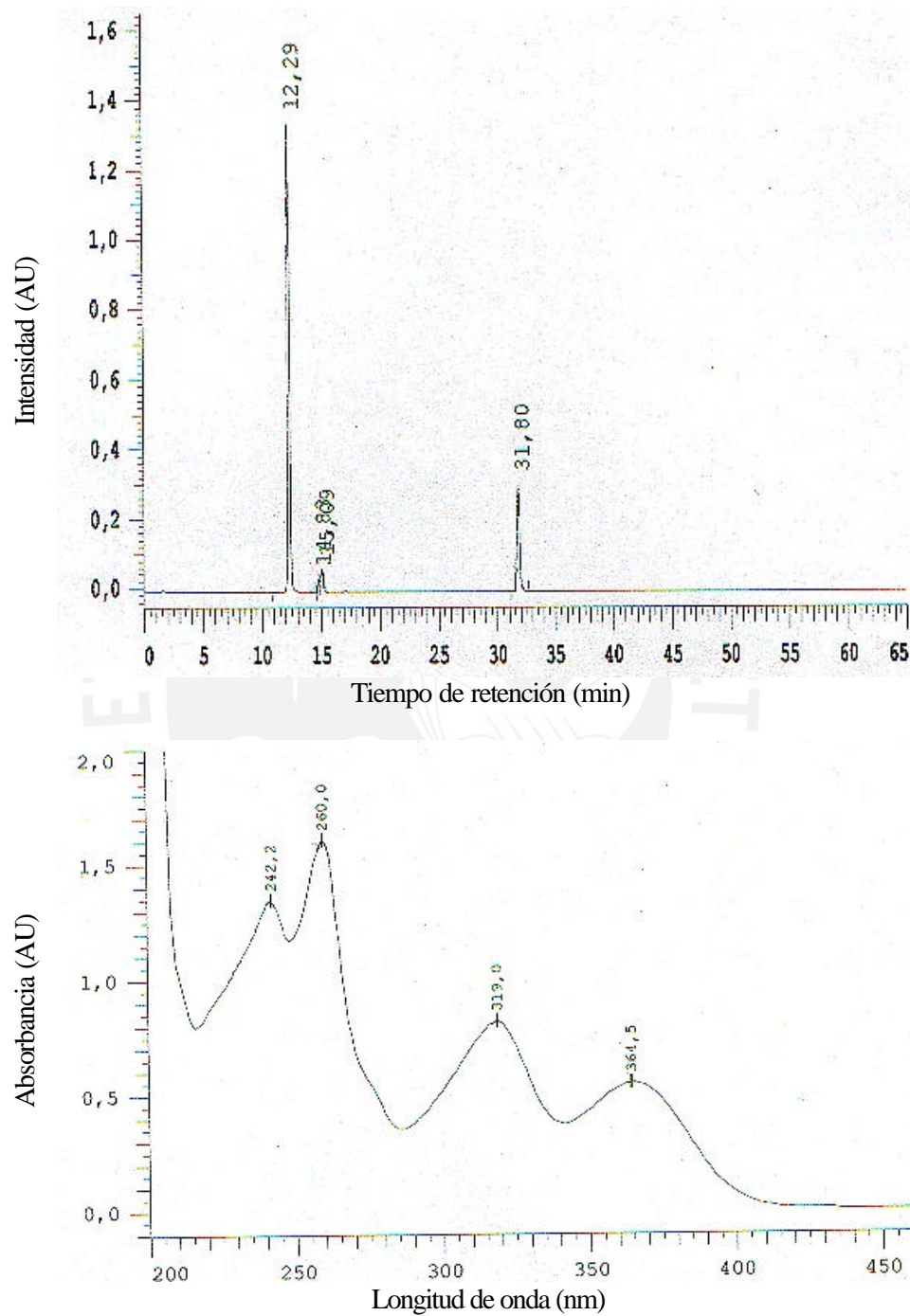


Fig. 33. HPLC y espectro UV de los compuestos D51-I + mangiferina

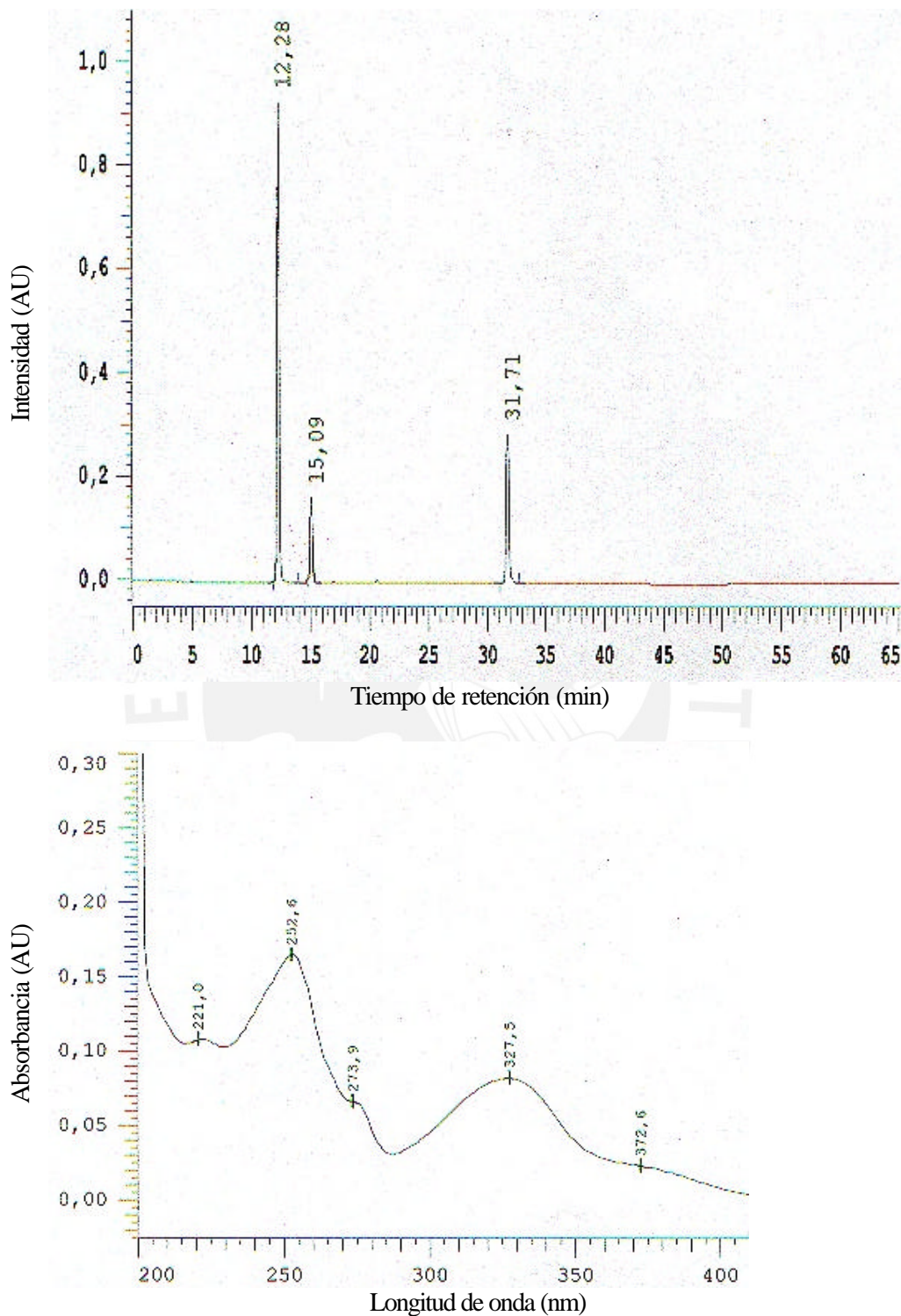


Fig. 34. HPLC y espectro UV de los compuestos D51-II + 8-O-glc-desmetilbellidifolina

Compuesto D51-III

Es el menos polar de la mezcla, en el sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (5:3:1:1), revelado con vainillina y H₂SO₄ aparece una mancha marrón con R_f 0,915. Por HPLC-UV-DAD presentó un t_r de 31,69 min y su espectro UV tiene máximos de absorción a 257, 283, 337, 397(h) nm (Fig. 31). Existiendo similitud en las absorciones UV con el compuesto D508/1, se hizo un análisis comparativo por HPLC, apareciendo con diferentes t_r (Fig. 35).

Fracción : F50

Sólido de color amarillo oscuro, con peso de 156,5 mg; por CCD en el sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (11:7:1:1), se observó al visible una mancha amarillo verdosa, marrón al UV-254 y dos manchas al UV-366; reveladas con vainillina y H₂SO₄ apareció una mancha violeta en el mismo lugar observado al visible.

Al agregar MeOH, se disolvió parcialmente, separándose un insoluble (F501), denominándose F502 a la parte soluble. Se realizó una CCD comparativa de ambas partes, en el sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (13:7:4) fase inferior, apareciendo una sola mancha en F501 y 2 manchas con cola en F502.

Compuesto F501

Sólido amarillo, con peso de 16,4 mg; por CCD en el sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (13:7:4) fase inferior, apareció una sola mancha al UV-254 (R_f 0,48), de color marrón al ser revelado con vainillina y H₂SO₄. Mediante un análisis por HPLC-UV-DAD (Fig. 36), eluye a 31,29 min y su espectro UV mostró absorciones máximas a 254, 276, 332, 389(h) nm; se hizo una CCD comparativo con el compuesto D508/1, utilizando el mismo sistema, mostrando tener similar comportamiento.

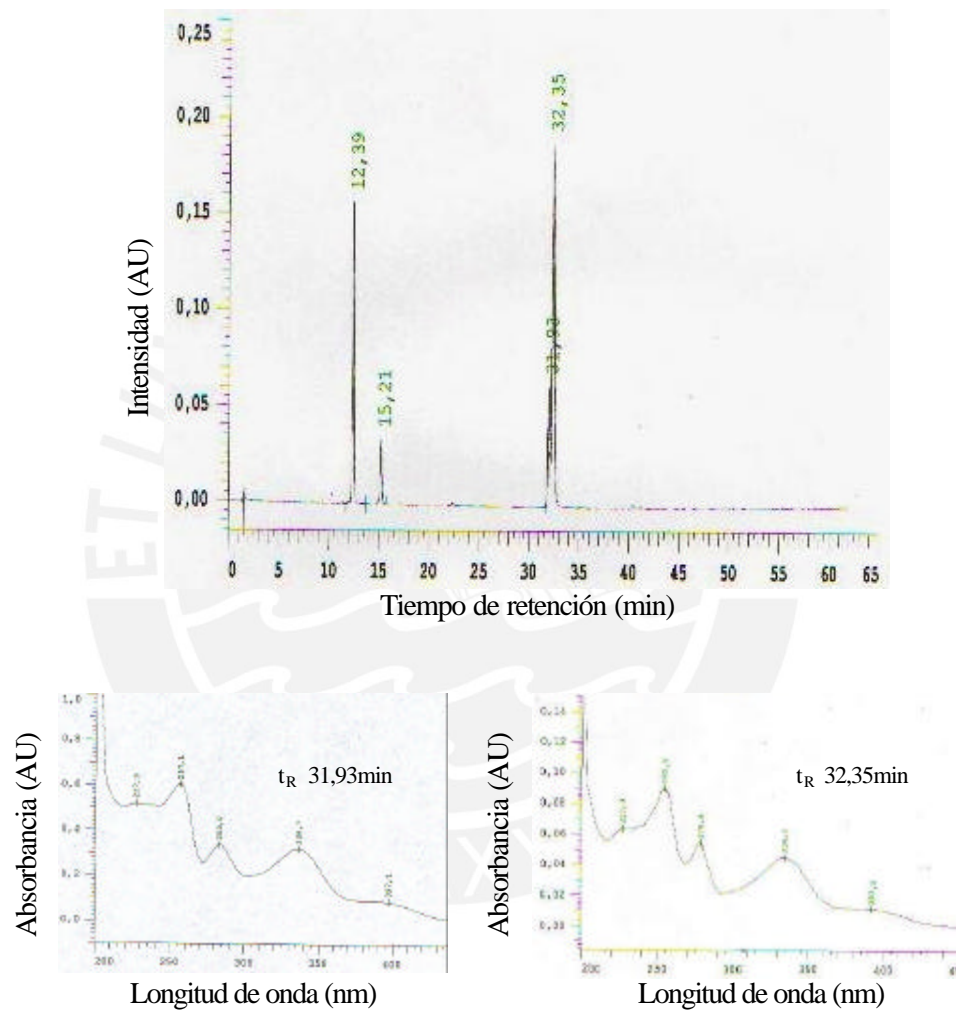


Fig. 35. HPLC comparativo de los compuestos D51-III + D508/1

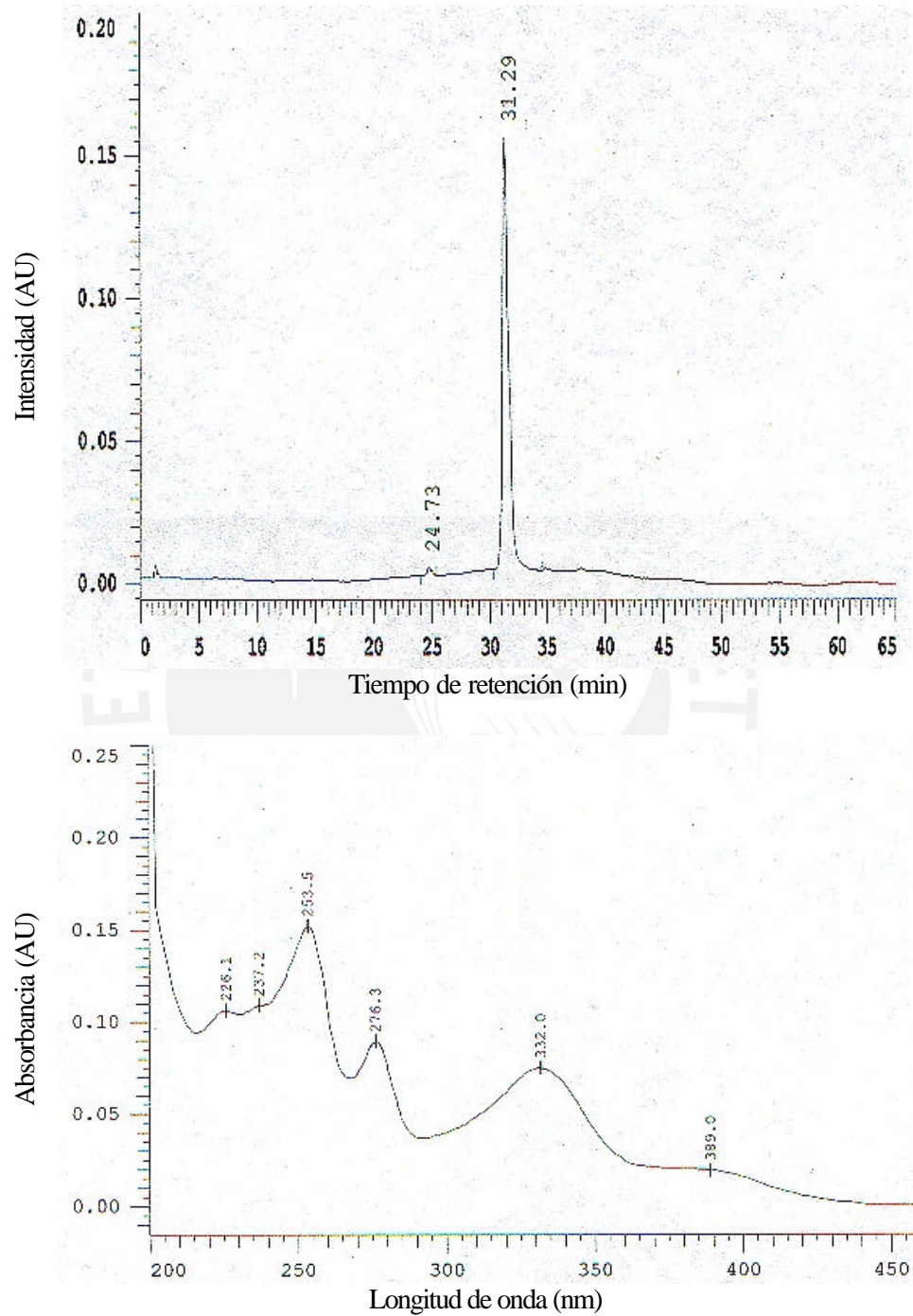


Fig. 36. HPLC y espectro UV del compuesto F501

Fracción : H50

Polvo amarillo oscuro, con peso de 120,7 mg; por CCD en el sistema AcOEt-MEK-HOAc-H₂O (11:7:1:1), se observan 3 manchas amarillas al visible, dos al UV-254 y otras dos, una mas intensa que la otra, al UV-366 (algunas señales corresponden a la misma mancha); reveladas con vainillina y H₂SO₄, apareció una mancha intensa amarillo verdosa; se realizó una limpieza de la fracción, mediante lavados sucesivos con MeOH, separándose en una parte soluble llamada H51 y otra insoluble (H52); se evaluaron ambas fracciones por CCD en el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), observando en H52 una sola mancha amarillo oscura al ser revelada con vainillina y H₂SO₄, y en H51 una mancha de similar color con cola. Se evaluó H52 por HPLC (Fig. 37) y se decidió continuar trabajando con esta fracción.

Fracción H52

Sólido amarillo, con un peso de 60,3 mg, poco soluble en MeOH. En CCD con el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), apareció como mancha de color amarillo al visible y marrón al UV-254. Se trabajó 10 mg de la muestra, mediante cromatografía líquida en columna fase normal, usando el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), no lográndose una buena separación por problemas de adsorción.

Luego se optó por una CCD preparativa, en cromatoplasmas de sílicagel de 20 x 6,5 cm; se aplicó 20 mg de muestra y se eluyó con el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8), con recorrido de 5 cm, observándose en la parte inferior una mancha amarilla al visible y otra con fluorescencia celeste al UV 366 en la parte superior. Se desorbieron las dos franjas, llamándolas H52a y H52b respectivamente. Se evaluó nuevamente por CCD en el mismo sistema, revelando con vainillina + H₂SO₄; H52a mostró mayor pureza que H52b.

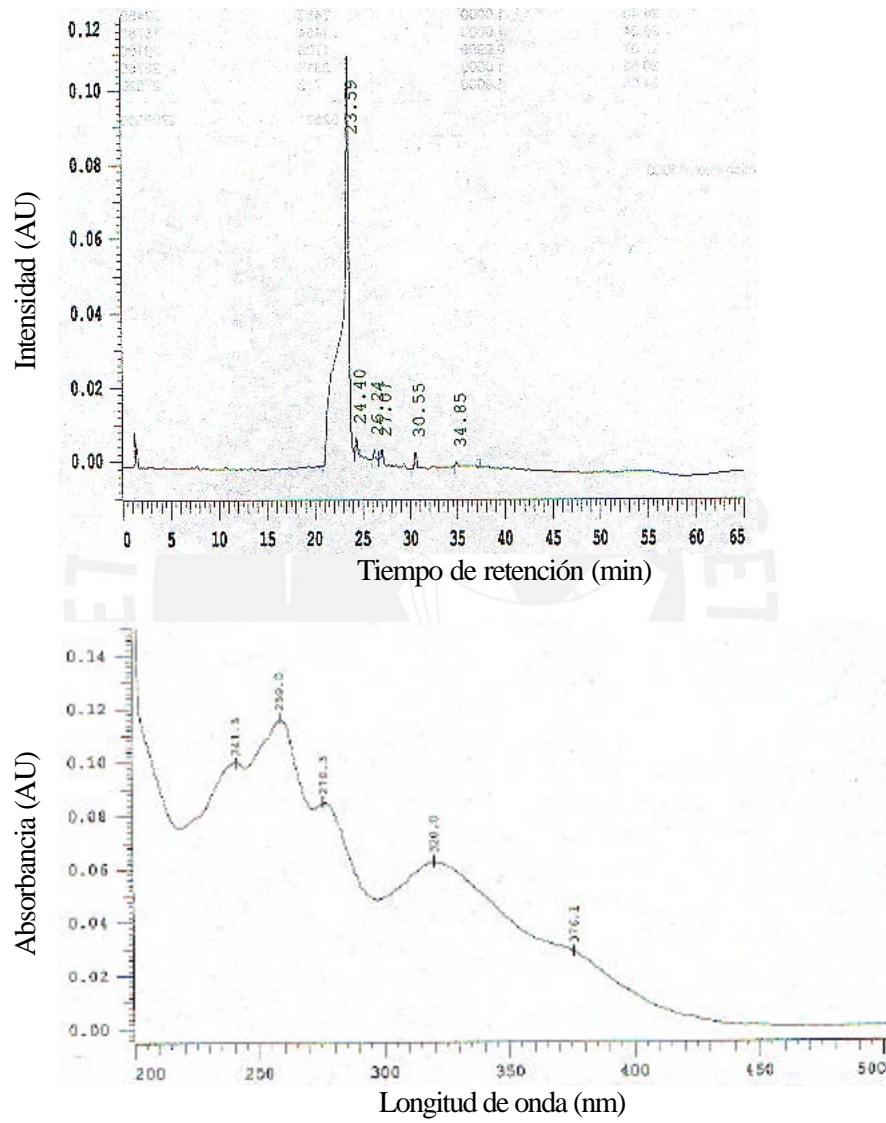


Fig. 37. HPLC y espectro UV de la fracción H52

Compuesto H52a

Sólido amarillo con un peso de 7 mg. Una CCD en el sistema AcOEt-MeOH-H₂O (77:15:8) produjo una mancha amarilla con un R_f de 0,56. Analizado por HPLC-UV-DAD, eluyó con t_R 23,97 min, sin embargo el cromatograma no se resuelve convenientemente, apareciendo un hombro junto al pico eluido, similar al cromatograma de la fracción H52, el espectro UV muestra 5 máximos de absorción, 242, 254(h), 260(h), 279, 323 y 376(h) nm (Fig. 38). Se presenta su espectro RMN-¹H y sus correlaciones homonucleares ¹H-¹H (Fig. 39, 40, 41, 42 y 43).

Fracción : I50

Colectada del fraccionamiento en las columnas III y IV de Sephadex LH-20, con un peso de 37,5 mg. El análisis por CCD en sílicagel, con el sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (13:7:4) fase inferior; mostró una sola mancha amarilla al visible. Analizada por HPLC-UV-DAD, mostró un pico mayoritario con t_R 39,57 min y tres pequeños picos adicionales, siendo una fracción pequeña, no se continuó trabajando, denominándose al componente mayoritario compuesto I50-1.

Compuesto I50-1

Componente mayoritario de la fracción I50, por CCD en el sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (13:7:4) fase inferior, aparece a un R_f de 0,39; por HPLC-UV-DAD, eluye a 39,57 min y su espectro UV muestra máximos de absorción a 258, 282, 337 , 399(h) nm (Fig. 44).

Teniendo similitud de t_R y valores de absorción UV con el compuesto bellidifolina, se hizo un HPLC-UV-DAD comparativo (Fig. 45), demostraron ser diferentes.

2.5 Pruebas de actividad farmacológica

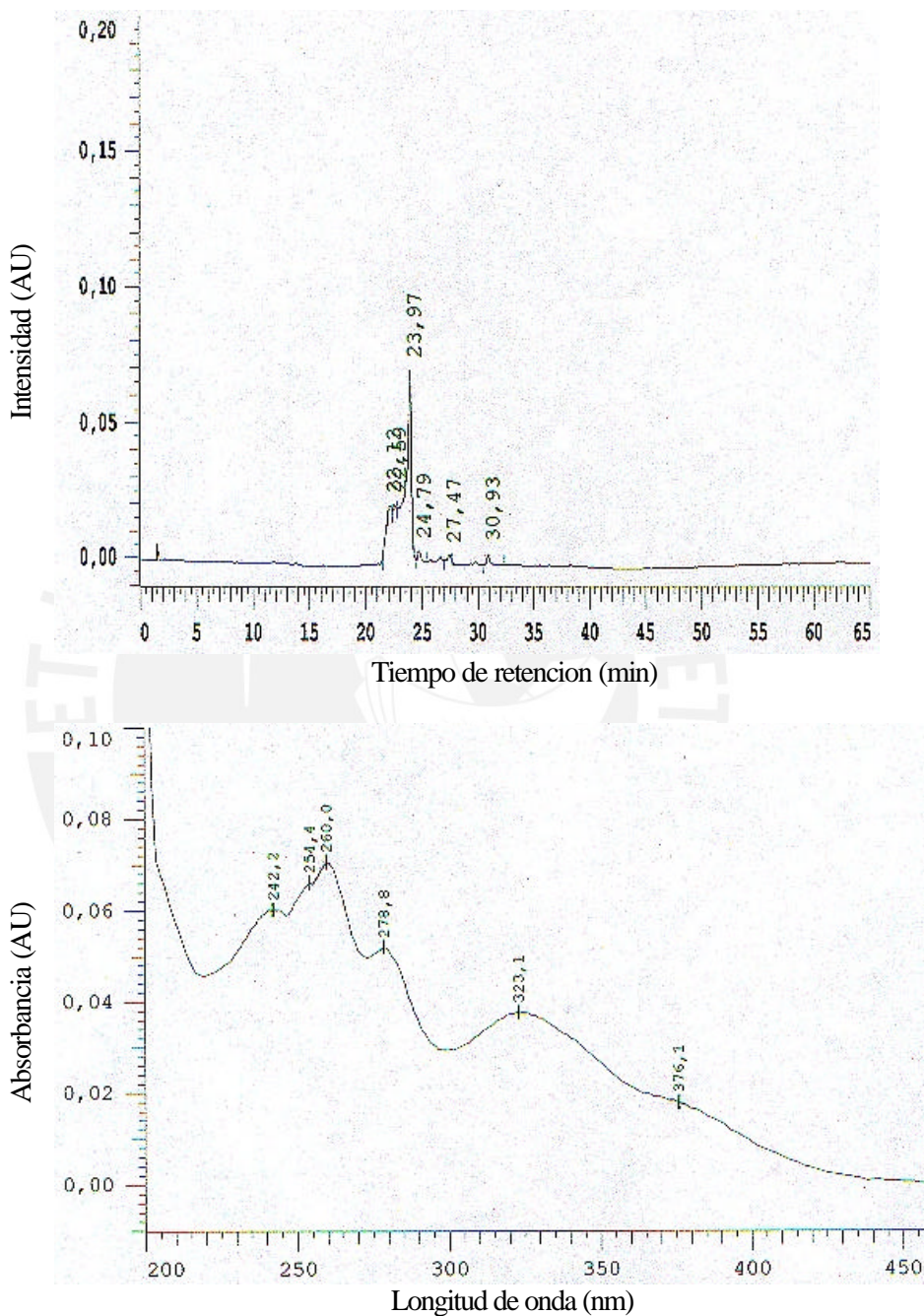


Fig. 38. HPLC y espectro UV del compuesto H52a

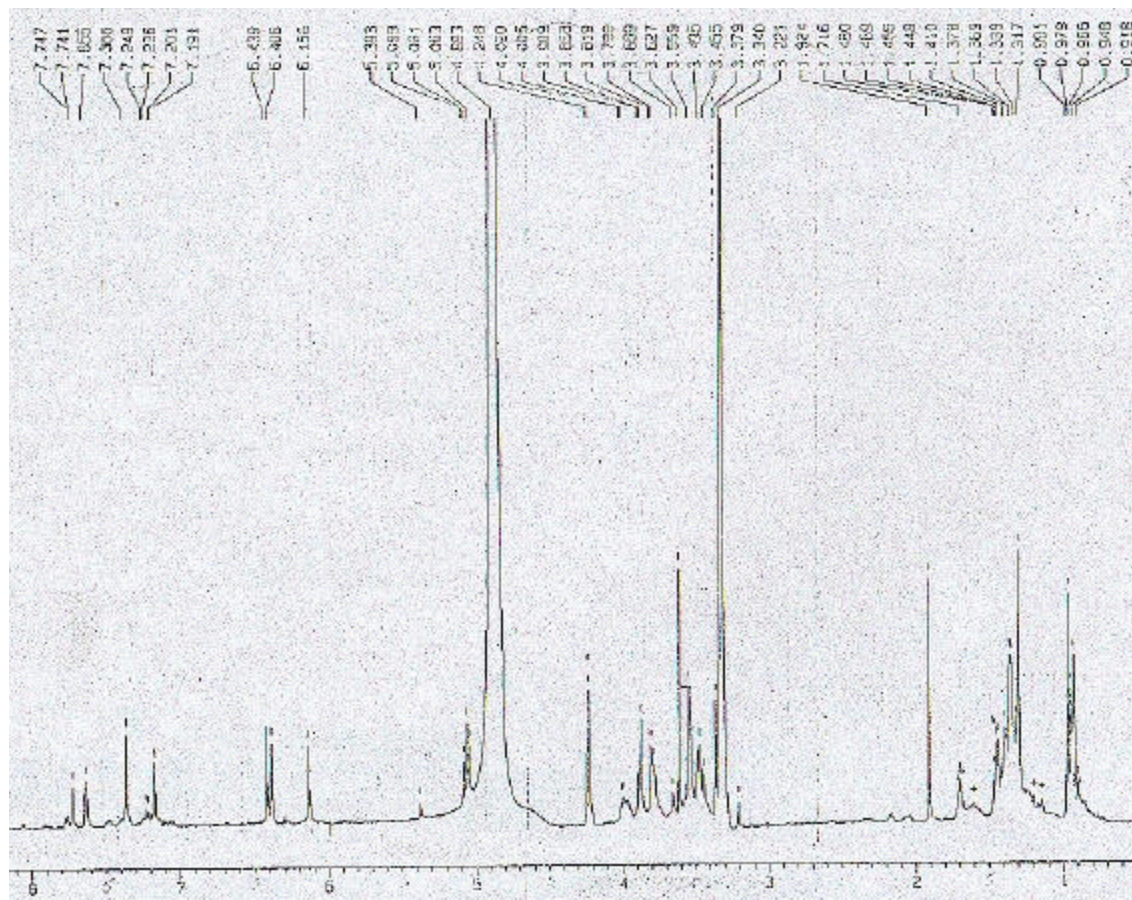


Fig. 39. Espectro RMN- ^1H del compuesto H52a

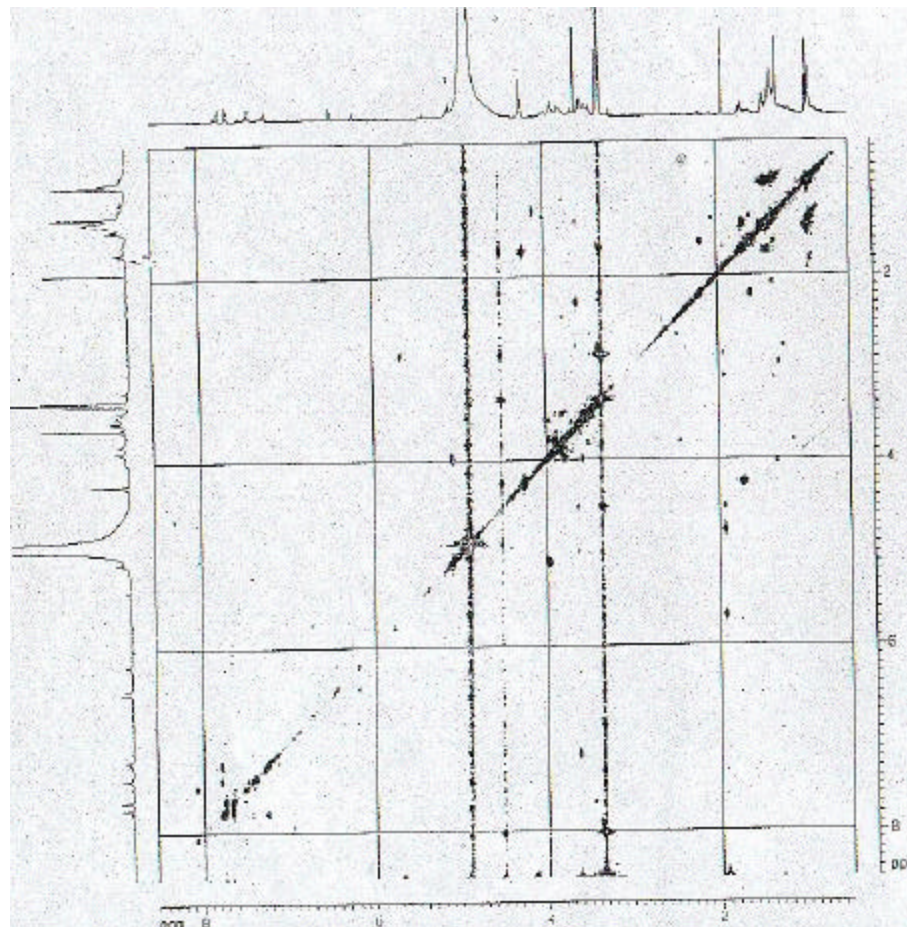


Fig. 40. Correlación homonuclear ^1H - ^1H del compuesto H52a

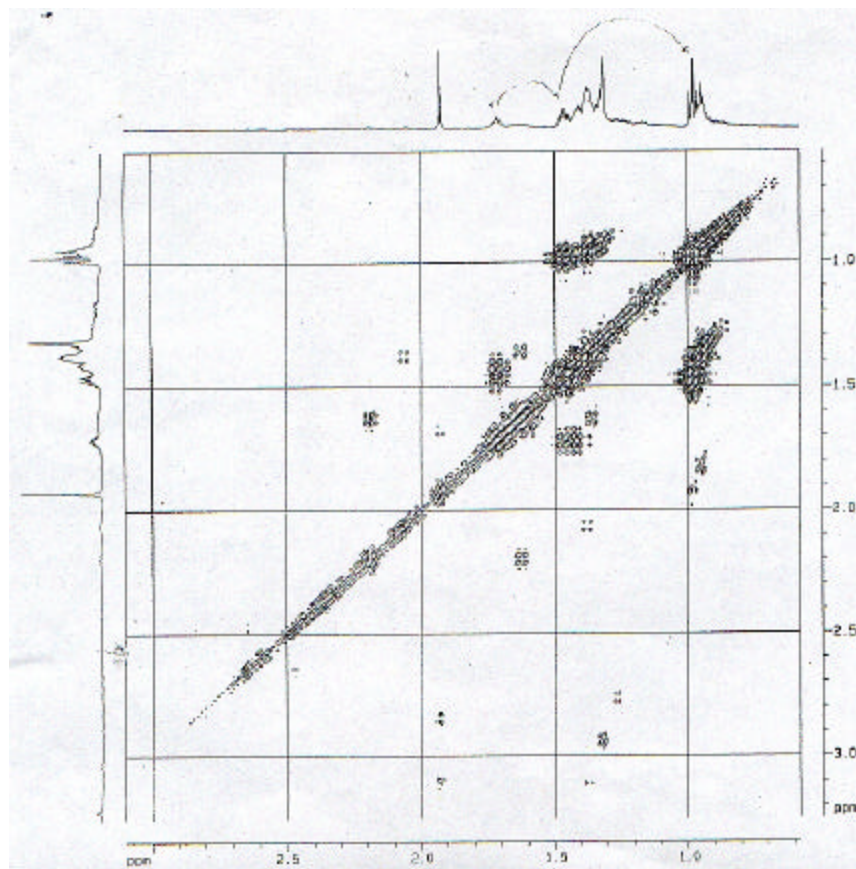


Fig. 41. Correlación homonuclear ^1H - ^1H ampliada (0,5– 3,5 ppm) del compuesto H52a

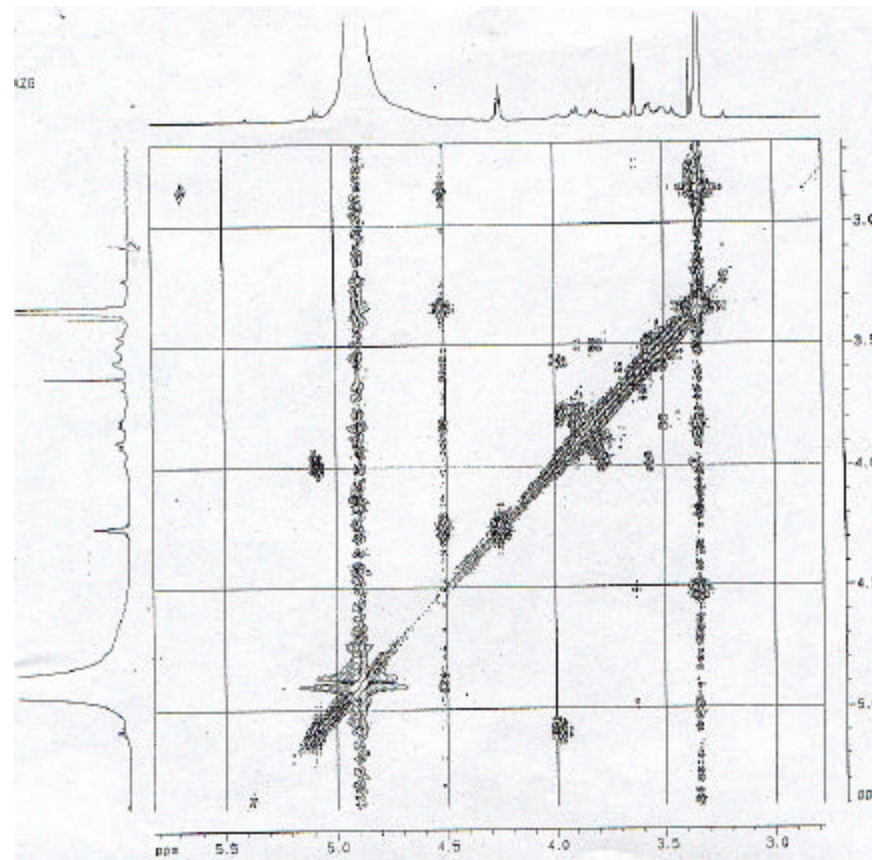


Fig. 42. Correlación homonuclear ^1H - ^1H ampliada (2,5 – 5,5 ppm) del compuesto H52a

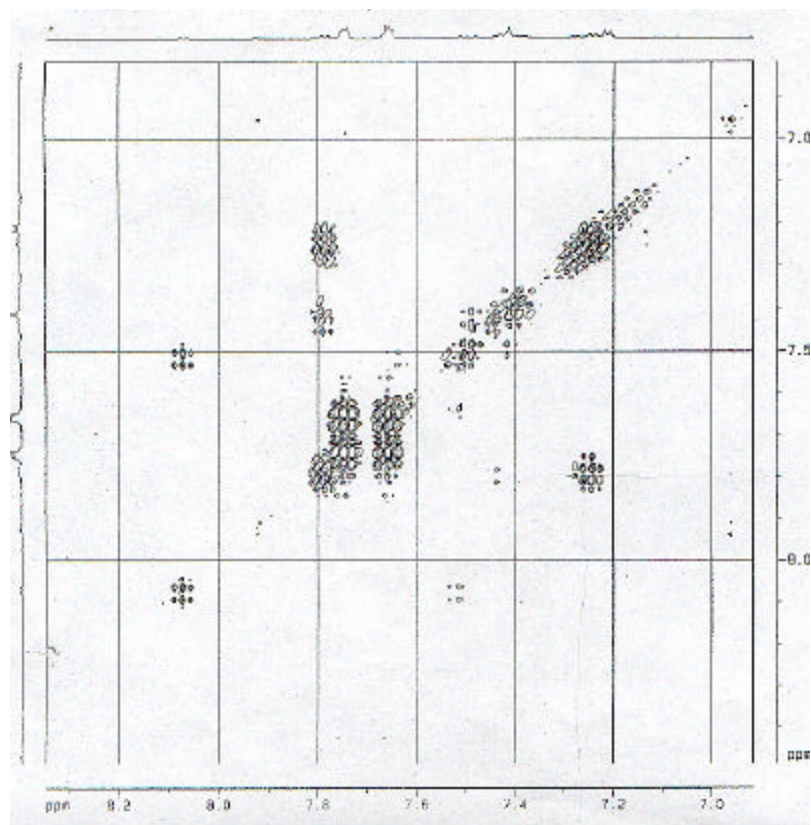


Fig. 43. Correlación homonuclear ^1H - ^1H ampliada (7,0 – 8,5 ppm) del compuesto H52a

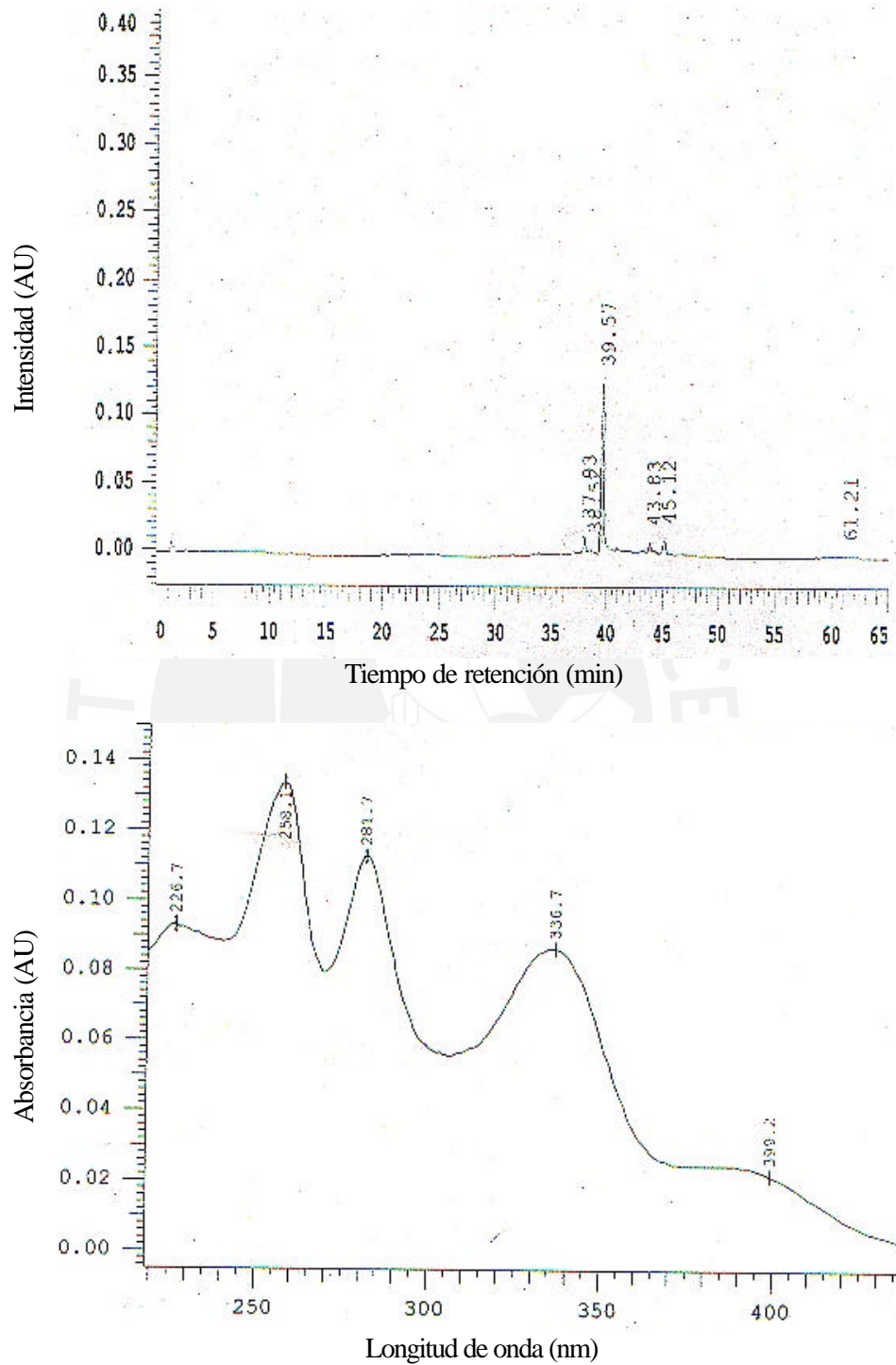


Fig. 44. HPLC y espectro UV de la fracción I50

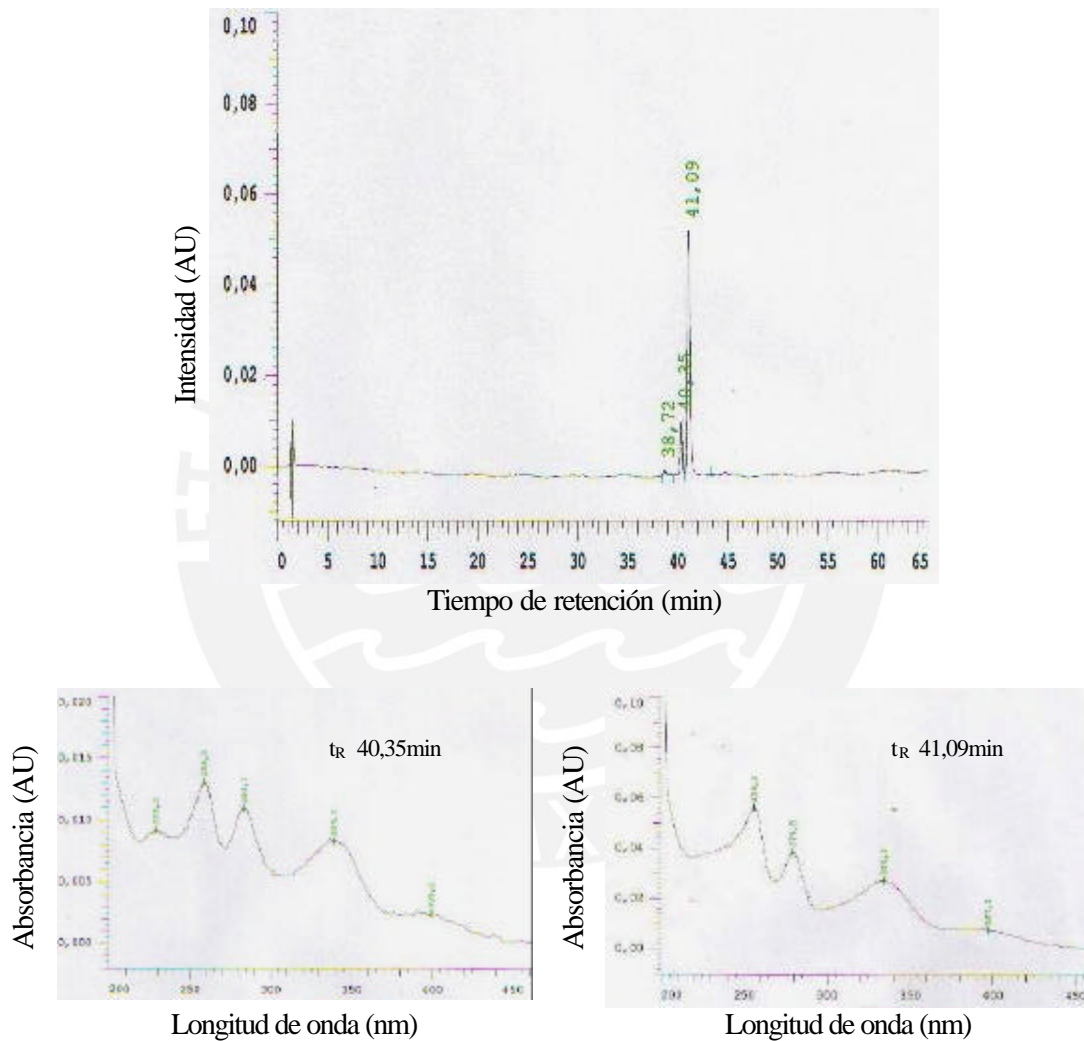


Fig. 45. HPLC comparativo de los compuestos I50-1 + bellidifolina

Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos .

2.5.1 Determinación de la actividad hipoglicemiante

Generalidades

La glucosa es una sustancia necesaria en el metabolismo y es el estímulo principal de la secreción regulada de insulina en el organismo, el mismo que estimula el transporte de glucosa a través de las glucoproteínas que son las transportadoras hacia los músculos y tejidos. Un desbalance en la producción de insulina deviene en una hiperglicemia, conduciendo a una alteración en el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas y un mayor riesgo de complicaciones por enfermedades vasculares [13].

Experimento

Para el experimento se utilizaron 24 ratones de cepa F-1, entre 41-45 g de peso, los que fueron separados al azar en tres grupos de 8 ratones cada uno. La diabetes fue inducida y administrada por vía intraperitoneal, mediante una dosis de 80 mg/kg de Streptozotocina, disuelta en una solución buffer citrato 0,01 M, pH = 4,5 y utilizada inmediatamente después de su preparación. La diabetes fue determinada cualitativamente por una prueba de glucosuria mediante tiras indicadoras, después la glicemia se cuantifica por análisis de la sangre extraída del plexo retroorbital del animal.

Tratamiento

Se usaron extractos de CH_2Cl_2 y MeOH disueltos y resuspendidos en una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,4 % y administrados oralmente mediante una sonda, según el detalle siguiente:

Grupo I	Control CMC.
Grupo II	Extracto CH_2Cl_2 , 120 mg/kg
Grupo III	Extracto MeOH, 100 mg/kg

Resultados

Se muestra en la Tabla 15, al inicio y luego de 1, 5 y 24 horas.

Tabla 15. Resultados del tratamiento hipoglicemiante.

Tratamiento	Glicemia (mg/dL)			
	Tiempo en horas			
	0	1	5	24
Control (CMC)	298,3	300,4	299,6	296,1
Extracto CH_2Cl_2	304,6	293,6 (3,6%)	230,9 (24,2%)	245,7 (19,3%)
Extracto MeOH	316,6	274,5 (13,3%)	195,4 (38,3%)	251,4 (20,6%)

2.5.2 Determinación de la actividad hipolipemiante

Introducción

Las hiperlipoproteinemias son condiciones en las cuales la concentración de lipoproteínas plasmáticas portadoras de colesterol y triglicéridos excede un límite normal. Existen 4 clases de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL), baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL).

Estas partículas de diferente diámetro, son degradadas paulatinamente durante el metabolismo; las lipoproteínas VLDL (\varnothing 30-80 nm) son degradadas produciendo remanentes IDL (\varnothing 25-35 nm), siendo una parte depurada rápidamente por el hígado y la mayor cantidad convertida en lipoproteínas LDL (\varnothing 18-28 nm), las que constituyen el principal reservorio de colesterol en el plasma para los procesos metabólicos.

Un nivel deseado de colesterol plasmático total es de 200 mg/dL y superior a 240 mg/dL se considera elevado, definiéndose ésto como hipercolesterolemia, que puede acelerar el desarrollo de aterosclerosis con su secuela de trombosis e infarto. Estudios recientes han demostrado que, reduciendo la concentración de colesterol LDL se disminuye la incidencia de la morbilidad y la mortalidad de los enfermos coronarios, esto tiene correlación con un descenso del colesterol LDL, aumento del colesterol HDL y una disminución de triglicéridos plasmáticos.

El tratamiento de la hipercolesterolemia implica la administración de fármacos, como el probucol, lovastatina, fenofibrato (en experimentación), neomicina, β -sitosterol, que disminuyen las concentraciones plasmáticas de LDL; aún así se continua investigando extractos de plantas que tengan un buen efecto hipocolesterolémico[13].

Animales de experimentación

Se utilizaron 24 ratas machos de cepa Balbc, con un peso corporal promedio de 180-220 g, mantenidas en jaulas metálicas y en condiciones adecuadas de aire, temperatura y humedad. Tuvieron libre acceso al agua y alimentados con pellets de purina Nutrimax; antes de una determinación sérica son sometidas a ayuno de 18 horas.

Los extractos diclorometánico y metanólico de *G. umbellata*, fueron disueltos en una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,4 %, a fin de ser administrados oralmente por 30 días.

Inducción de la hipercolesterolemia

La hipercolesterolemia fue inducida mediante la adición a la dieta de colesterol (1 %) y aceite de coco (2,5 %).

Determinación de lípidos séricos

Se utilizó el método espectrofotométrico, empleando los kits comerciales para colesterol, LDL-colesterol, HDL-colesterol (Merck) método CHOP-PAP y triglicéridos (Merck) método Trinder.

Las determinaciones fueron realizadas a los 30 días de iniciado el experimento, extrayendo las muestras de sangre por punción cardiaca en las ratas, bajo anestesia con éter.

Tratamiento

Los animales fueron repartidos en 4 grupos de 6 cada uno y elegidos al azar, las dosis fueron administradas mediante el vehículo CMC, según el detalle siguiente:

- Grupo I 10 mg/kg de CMC con dieta normal
- Grupo II 10 mg/kg de CMC + 1 % colesterol + 2,5 % aceite de coco
(control negativo)
- Grupo III 10 mg/kg de CMC + 2 mg/kg de sinvastatina (control positivo)
- Grupo IV 10 mg/kg de CMC + 1 % colesterol + 2,5 % aceite de coco + 10 mg/kg de extracto diclorometánico de *G. umbellata*
- Grupo V 10 mg/kg de CMC + 1 % colesterol + 2,5 % aceite de coco + 10 mg/kg de extracto metanólico de *G. umbellata*

Los resultados se presentan en la Tabla 16.

2.6 Actividad antioxidante.

Generalidades

La autooxidación, es una reacción lenta en presencia de oxígeno, produciendo radicales libres; es un proceso en cadena, que forma hidroperóxidos, los que deterioran los materiales orgánicos.

Los antioxidantes o inhibidores, son sustancias que disminuyen la rapidez de oxidación de los materiales autooxidables y su eficiencia requiere de una concentración menor de 0,01 % [14]. El antioxidante actúa como un interruptor de la cadena, evitando la oxidación de muchas moléculas de materiales autooxidables.

En la industria se emplea una gran variedad de agentes antioxidantes, en cosmética se utilizan sulfito de sodio, tiosulfito de sodio, hidroquinona, galato de propilo, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisolato butilado (BHA); y en alimentos, tocoferol, lecitina, ácido ascórbico, BHT, BHA, etc. Son de suma importancia los antioxidantes naturales, contenidos en algunos productos como resina de guayaco, benjuí, resinas vegetales, taninos, aceite de germen de trigo, etc [15].

2.6.1 Procedimiento experimental.

Metodología

Se utilizó el método espectrofotométrico de absorción ultravioleta, midiendo la absorbancia de la muestra (a diferentes concentraciones) mezclada con una cantidad constante de radical libre y un blanco del mismo. La disminución de la absorción del radical libre indica la proporción de oxidación y, al mismo tiempo, representa la proporción de actividad antioxidante de la muestra [16]. El porcentaje de actividad antioxidante (% A.O.), se determina por la siguiente relación:

$$\% A.O. = \left[1 - \left(\frac{A_m}{A_b} \right) \right] \times 100$$

donde :

A_m = Absorbancia de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco.

Preparación de la muestra

Se determinó la actividad antioxidante de las siguientes fracciones:

Fracción D51 → Mezcla de 3 xantonas

Fracción H52 → Xantonas

Fracción F50 → Xantonas

2,5 mg de cada muestra se suspendieron en 40 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), llevándose a 25 mL con agua destilada (concentración de 100 μ g/mL). Con esta solución, por dilución con agua destilada, se prepararon volúmenes de 10 mL, conteniendo 10 y 1 μ g/mL de cada muestra.

Preparación de la solución del radical libre

Como radical libre se utilizó 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) al 90 % de pureza, suspendiendo 2 mg de DPPH en 100 mL de MeOH (concentración 20 µg/mL).

Medida de la absorbancia

2,25 mL de cada muestra (concentraciones de 100, 10, 1 µg/mL), se mezclaron con 4,5 mL de DPPH (concentración 20 µg/mL) por duplicado. Se midió la absorbancia a 518 nm*, de la muestra y de un blanco. Los resultados se muestran en Tabla 17.

Tabla 17. Absorbancias promedio de las muestras sometidas a actividad antioxidante.

Muestra	Absorbancias		
	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
D51	0,0280	0,1846	0,3485
H52	0,0662	0,2295	**
F50	0,0564	0,2678	0,3612
DPPH (20 µg/mL)	0,3631		

** absorbancia mayor que el blanco.

Se determinó el % A.O. (Tabla 18), para cada una de las muestras a la concentración indicada, comparado con la actividad antioxidante de un producto comercial, Hidroxianisolato butilado (BHA).

Tabla 18. Porcentaje de la actividad antioxidante.

Muestra	% A.O.		
	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
D51	92,3 ± 0,28	49,2 ± 6,43	4,1 ± 1,2

H52	$81,8 \pm 0,07$	$36,8 \pm 4,60$	N.D.
F50	$84,5 \pm 0,85$	$26,2 \pm 5,73$	3,6 **
BHA	91,03	78,55	11,49

** sólo una muestra medible.

3. * Espectrofotómetro UV-VIS, Perkin-Elmer, Lambda-2, Laboratorio PUCP.

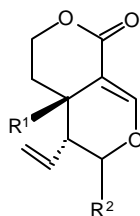
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 De los compuestos aislados.

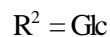
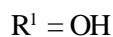
Compuestos B50-3

Estos compuestos, por las señales de CCD al revelar con vainillina y ac. sulfúrico, muestran color rojo violeta, indicando una relación estrecha de sus estructuras. Todos eluyen con t_R menores a 10 minutos, con una sola banda de absorción entre 230 y 240 nm, característica atribuible a compuestos secoiridoides [17] que contienen un cromóforo o sistema conjugado; secoiridoides con un doble enlace conjugado adicional mostrarán dos máximos de absorción [5].

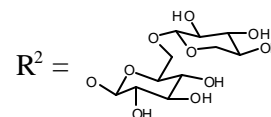
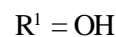
Compuestos secoiridoides como swertiamarina (238 nm), chironiosida (238 nm), eustomosida (235 nm), eustomorussida (235 nm.) contienen en su estructura un cromóforo, siendo la mayoría glicosidados [5].

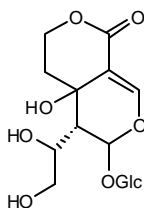


Swertiamarina

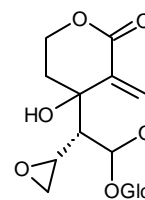


Chironiosida





Eustomosida



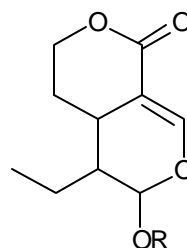
Eustomorussida

En consecuencia, esta mezcla de compuestos serían secoiridoides probablemente glicosidados según el comportamiento al revelar con vainillina y H_2SO_4 cuyas características son similares.

La figura 7 muestra dos componentes mayoritarios a t_R 7,81 y 9,33 min; con UV 237,2 y 235,2 nm respectivamente; la figura 8, tres componentes mayoritarios a t_R 6,64 ; 7,71 ; y 9,24 min; con UV 237,9 ; 237,2 y 235,2 nm y la figura 9, un componente a t_R 7,69 min con UV 237,2 nm.

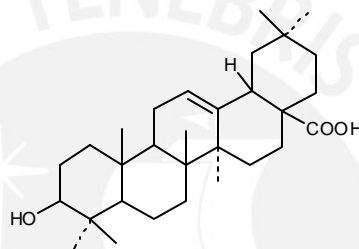
El análisis de estos cromatogramas sugiere la presencia de tres compuestos secoiridoides, uno a t_R ~9,3 min con UV 235,2 nm; otro con t_R ~7,7 min con UV 237,2 nm y a t_R ~6,6 min con UV 237,9 nm.

La estructura básica de estos compuestos en base al esqueleto secoiridoidal [18] y los compuestos nombrados líneas arriba, sería la siguiente:


 Estructura básica
 de los
 secoiridoides B50-3

Compuesto RB-I

Sólido blanco, soluble en CH_2Cl_2 y parcialmente en MeOH. Por su comportamiento frente al reactivo de Lieberman-Burchard, se trataría de un compuesto triterpénico [19]. Su espectro IR (Fig. 10), muestra señales de absorción a 3429 cm^{-1} (estiramiento OH), 2918 y 2849 cm^{-1} (estiramiento C-H de grupos CH_2 , CH_3) y 1694 cm^{-1} (estiramiento de grupo CO) [20], características que son compatibles con el ácido oleanólico. Una CCD comparativa con un estándar del mismo confirma la identidad del compuesto como ácido oleanólico.



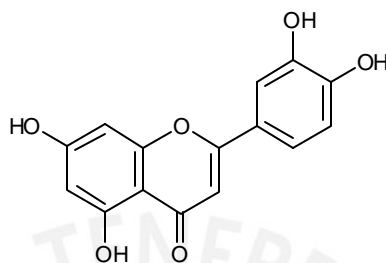
ac. oleanólico

Compuesto C60-2a

Por CCD al revelar con NP/PEG, aparece de color naranja indicativo de 3',4'-dihydroxiflavonas y flavonoles [19]. Los máximos de absorción UV a 341 y 270 nm (Fig. 12) están dentro de los rangos de absorción de una flavona[19], por lo que se trataría de una 3',4'-dihydroxiflavona.

La absorción con AlCl_3 (Fig. 13), muestra un desplazamiento batocrómico de BI (40 nm), característica de un OH libre en C-5 [21] que formaría complejo con el grupo ceto, al agregar HCl (Fig. 13) hay un desplazamiento hipsocrómico de 27 nm , que confirma un grupo orto-dihidroxi en 3' y 4' [22]; estas sustituciones se confirman también con NaOMe (Fig. 13) que exhibe un desplazamiento largo de BI (55 nm) y con NaOAc (Fig. 14) hay un desplazamiento de B-I a 400 nm , señal de OH en C-7.

Siendo las únicas sustituciones que han podido ser detectadas por los espectros, el compuesto tendría como base la estructura de una 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona.



3',4',5,7- tetrahidroxiflavona

Compuesto C60-2c

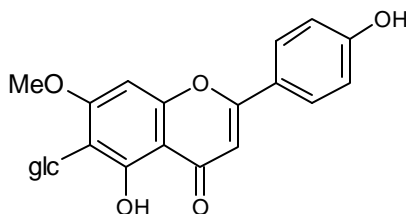
Por los resultados de CCD y el color revelado con NP/PEG se presume que se trata de una flavona oxigenada en C-4'. Se confirma la estructura básica por las bandas de absorción a 334 nm (BI) y 272 nm (BII) (Fig. 15), donde la BII tiene menor intensidad que BI, característico de una Flavona [19].

La adición de NaOMe (Fig.16) produce un desplazamiento batocrómico grande de la BI ($\lambda = 55$ nm), diagnóstico de un grupo 4'-OH libre, lo que se evidencia también por la aparición de un hombro pronunciado de la BI por efecto de la ionización. Con AlCl₃ (Fig. 16) hay un desplazamiento batocrómico de BI y BII que no desaparece por la adición de ácido, lo que indicaría la formación de complejos con grupos hidroxilcetona vecinos, sugiriendo la existencia de OH libre en C-5 que puede interaccionar con un grupo ceto; se descarta la existencia de grupos orto-dihidroxis por la reacción con NaOAc/H₃BO₃ (Fig. 17) en la que no se observa desplazamiento batocrómico, con lo cual indicaría tener la estructura de una 4',5- dihidroxiflavona.

Los dupletes a $\delta = 7,92$ y $\delta = 6,96$ ppm del RMN- ^1H (Fig. 20), son característicos de protones en anillo B de un flavonoide oxigenado en 4', correspondiendo éstos a protones en C-2', C-6' y C-3', C-5', respectivamente.

El singlete a $\delta = 6,76$ ppm debe corresponder a un protón en el anillo A, pues es frecuente que los protones en C-6 y C-8, teniendo hidroxilación en C-5 y C-7, aparezcan como dupletes. Siendo H-6 de campo mayor que H-8, la señal de H-6 aparecería a un δ menor que H-8. Además cuando el anillo A tiene un solo protón y con oxidación en C7, éste produce un singlete a campos mas bajos que el protón en C-3 [21]; por lo que las señales de $\delta = 6,76$ y $\delta = 6,69$ ppm corresponden a los protones en C-8 y C-3 respectivamente. El singlete de alta intensidad a $\delta = 3,96$ ppm es propio de grupo OCH_3 en C-7.

El duplete a $\delta = 4,94$ ppm es una señal característica de un grupo C-glc que debe corresponder a C6, pues no hay señal de protón en esta posición. La ubicación del enlace y el tipo de azúcar presente, es de difícil determinación, ocasionando múltiples signos y ensanchamiento de picos en RMN- ^{13}C [23], correlaciones hetero-nucleares y acoplamiento a larga distancia (Fig. 19, 20), permiten determinar la asignación de señales RMN- ^1H y ^{13}C mostradas en la Tabla 19; los valores de absorción UV-VIS (Tabla 20) permiten proponer la estructura del compuesto C60-2c, como el 4',5-dihidroxi-7-metoxi-6-C-glucoflavona, idéntico al compuesto aislado de *Gentiana campestris* L [24].



4',5-dihidroxi-7-metoxi-6-C-glucoflavona

Tabla 19. Asignación y comparación de señales de RMN-¹H y ¹³C
del compuesto C60-2c



Protón	δ , ppm	Carbono	Compuesto C60-2c δ , ppm	4',5-dihidroxi-7-metoxi-6-C- glucoflavona* δ , ppm
		C-2	166,7	164,0
H-3	6,69	C-3	104,0	103,1
		C-4	-	182,1
		C-5	-	160,9
		C-6	110,6	109,8
		C-7	164,5	164,2
H	3,96	C-7-OCH ₃	56,0	55,4
H-8	6,77	C-8	91,5	90,7
		C-9	159,6	156,9
		C-10	106,2	104,1
		C-1'	123,1	121,1
H-2'	7,92	C-2'	129,8	128,5
H-3'	6,96	C-3'	117,1	116,0
		C-4'	163,1	161,3
H-5'	6,96	C-5'	117,1	116,0
H-6'	7,92	C-6'	129,8	128,5
6-C-glc.		6-C-glc		
H-1'	4,94	C-1''	80,5	79,3
H-2'	4,28	C-2''	72,2	70,3
H-2'a	4,48	C-2''a	71,3	
H-3'	3,49	C-3''	74,4	72,9
H-4'	3,47	C-4''	71,9	71,1
H-5'	3,44	C-5''	82,2	81,5
H-6'	3,70	C-6''	63,1	62,0
H-6'a	3,92			

* Compuesto aislado de *Gentiana campestris* [24]

Tabla 20. Comparación de absorciones UV-VIS de los compuestos

C60-2c y el aislado de *G. campestris* L.

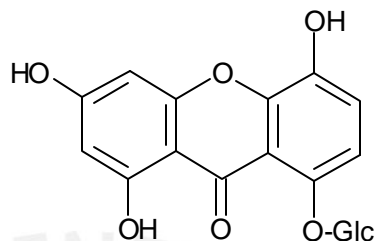
	C60-2c	<i>G. campestris</i> L.[24]
MeOH	272; 334	272; 334
NaOMe	271; 389	272; 388
AlCl ₃	280; 302; 350; 377(h)	281; 302; 350; 376
AlCl ₃ /HCl	280; 301; 348; 380(h)	282; 302; 346; 376
NaOAc	269; 300(h); 350(h); 390	272; 380
NaOAc/H ₃ BO ₃	270; 340	

Compuesto D505-I

El comportamiento en CCD frente a los reactivos de coloración, indica que se trata de un compuesto fenólico. Las 4 bandas de absorción de intensidad decreciente son característicos de las xantonas [17]. Por el tiempo de retención obtenido se trataría de un glicósido [6]. Analizando la forma del espectro (Fig. 21), podría ser atribuido a una xantona con oxidaciones en las posiciones 1,3,5,8 [25]. Su espectro IR (Fig. 24) muestra señales a 3486 cm⁻¹ (OH), 1652 cm⁻¹ (carbonilo conjugado), 1621 cm⁻¹ y 1582 cm⁻¹ (enlace C=C aromático). La absorción de las bandas sufre un desplazamiento batocrómico con AlCl₃ (Fig. 22), que no varía con la adición de HCl, indicando la presencia de un grupo OH, pero a la función carbonilo (posición 1 ó 8), con NaOAc (Fig 23), hay un desplazamiento batocrómico, atribuible a OH en posición 3 ó 6 y con H₃BO₃ (Fig. 23) el espectro muestra similar absorción inicial, indicando la inexistencia de grupos orto dihidroxilos [4]. El compuesto podría ser una 1,3,5,8-tetrahidroxixantona.

Este compuesto, muestra bandas de absorción similares a la 8-O-gluc-desmetilbellidifolina, aislado de la *G. nítida* [6] y otras especies. De acuerdo al análisis comparativo con un estándar de muestra auténtica realizado

por HPLC (Fig. 26), se observa super-posición de picos a t_R 15,07 min, confirmando de esta manera que el compuesto D505-I es 8-O-glc-desmetilbellidifolina o 1,3,5-trihidroxi-8-O-glucosilxantona.

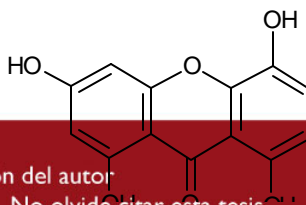


1,3,5-trihidroxi-8-O-glucosilxantona

Compuesto D508/1

Por los máximos de absorción y t_R , este compuesto sería una xantona aglicona[25]; el espectro UV (Fig. 27) muestra la B-I de alta intensidad, decreciendo gradualmente las demás bandas, típico de una xantona tetraoxigenada en posiciones 1,3,5,8 [22]. El espectro IR (Fig. 30) exhibe bandas de absorción a 3378 cm^{-1} (OH), 1669 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} (carbonilo conjugado), 1618 cm^{-1} y 1594 cm^{-1} (enlace C=C aromático) [26], señales presentes en toda xantona.

Con reactivos de desplazamiento, el espectro sufre cambios en las bandas de absorción; con AlCl_3 (Fig. 28) hay un desplazamiento batocrómico de la banda (37 nm) y con HCl (Fig. 28) no hay variaciones significativas del espectro, señal de un OH libre peri a la función carbonilo y ausencia de grupo orto dihidroxil, con NaOAc (Fig. 29) se observa un desplazamiento de 23 nm, indicativos de un grupo fenólico ácido en posición C-3. Con esta información se postula una xantona tetraoxigenada en posiciones 1,3,5,8 que probablemente esté sustituido en posiciones 5 ú 8, siendo la estructura básica la siguiente:



Estructura básica de 1,3,5,8-tetrahidroxixantona

Mezcla de compuestos D51

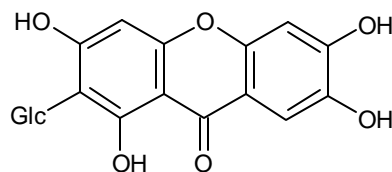
Compuesto D51-I

Un análisis comparativo por HPLC, con una estándar de mangiferina, eluyen con el mismo tiempo de retención, con picos superpuestos totalmente, los demás datos comparativos se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación de t_R y absorciones UV de los compuestos mangiferina y D51-I

Compuesto	t_R , min	Absorciones UV, nm
mangiferina	12,27	242; 259; 318; 365
D51-I + mangiferina	12,29	242; 260; 319; 365

Por lo que se concluye que el compuesto D51-I es mangiferina o 1,3,6,7-tetrahidroxi-2-C- β -glucopiranosilxantona cuya estructura es :



mangiferina

Compuesto D51-II

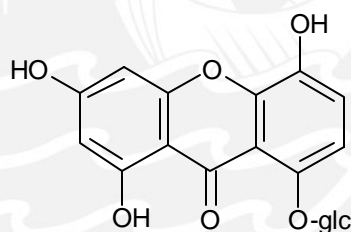
En el análisis comparativo por HPLC-UV-DAD, con un estándar de 8-O-glc-desmetilbellidifolina, se observó que tienen el mismo comportamiento

cromatográfico, eluyendo con el mismo t_R y mostrando similares absorciones en el UV (Tabla 22).

Tabla 22. Comparación de t_R y absorciones UV de los compuestos 8-O-glc-desmetilbellidifolina y D51-II

Compuesto	t_R , min	Absorciones UV, nm
8-O-glc-desmetilbellidifolina	15,09	253; 274(h); 328; 373(h)
D51-II + 8-O-glc-desmetilbellidifolina	15,09	253; 274(h); 328; 373(h)

Por lo que se concluye que el compuesto D51-II es la 8-O-glc-desmetilbellidifolina ó 1,3,5-trihidroxi-8-O- β -D-glucopiranosilxantona.



8-O-glc-desmetilbellidifolina

Compuesto D51-III

El tiempo de retención es característico de una xantona aglicona y la forma del espectro corresponde a una xantona tetraoxigenada en 1,3,5,8 [25]. Por los resultados del HPLC comparativo, se concluye que es diferente al compuesto D508/1 (Fig. 35).

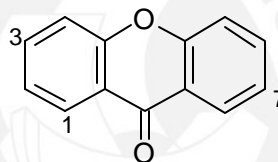
Compuesto F501

El t_R es caraterístico de una xantona aglicona [26] y la forma del espectro corresponde a una xantona tetraoxigenada en 1,3,5,8 [22].

Comparando con el compuesto D508/1, se propone que es el mismo, sus valores de t_R y absorciones UV son bastante cercanos (Fig. 27, 36).

Compuesto H52a

Según los valores de t_R y UV (Fig. 38), este compuesto correspondería a una xantona glicosidada, lo cual puede confirmarse por el espectro RMN- ^1H , donde las señales entre 3,5–5,2 ppm corresponderían a los OH del azúcar; las señales de los protones de la xantona, en posiciones H-2 y H-4 aparecen entre 6,1–6,4 ppm; para los protones H-5 y H-6 entre 7,1–7,4 ppm y para H-8 entre 7,6–7,8 ppm; con lo cual se propone que se trata de una xantona glicosidada con oxidación en las posiciones 1, 3 y 7.



Núcleo básico de xantona indicando posiciones de oxidación propuestas

Compuesto I50-1

Por el espectro UV y el valor de t_R (Fig. 44), tendría estructura de xantona aglicona, el cual tiene bastante similitud con el espectro UV del compuesto bellidifolina aislado de *G. tristicha*. [7]

Por los resultados del HPLC comparativo con un estándar de bellidifolina, se concluye que es diferente al compuesto mencionado (Fig. 45).

3.2. De la actividad farmacológica y antioxidante

Actividad hipoglicemiante

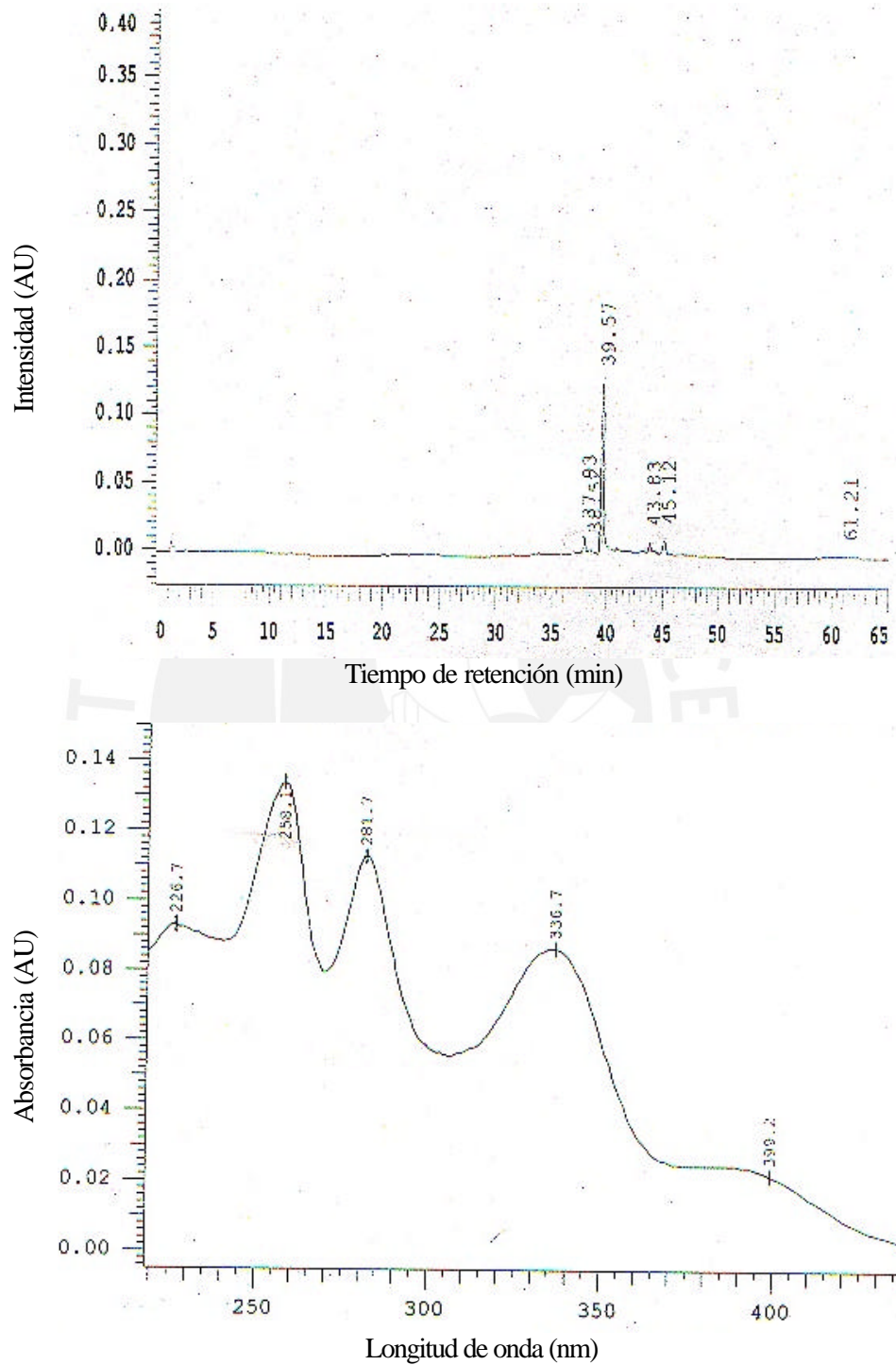


Fig. 44. HPLC y espectro UV de la fracción I50

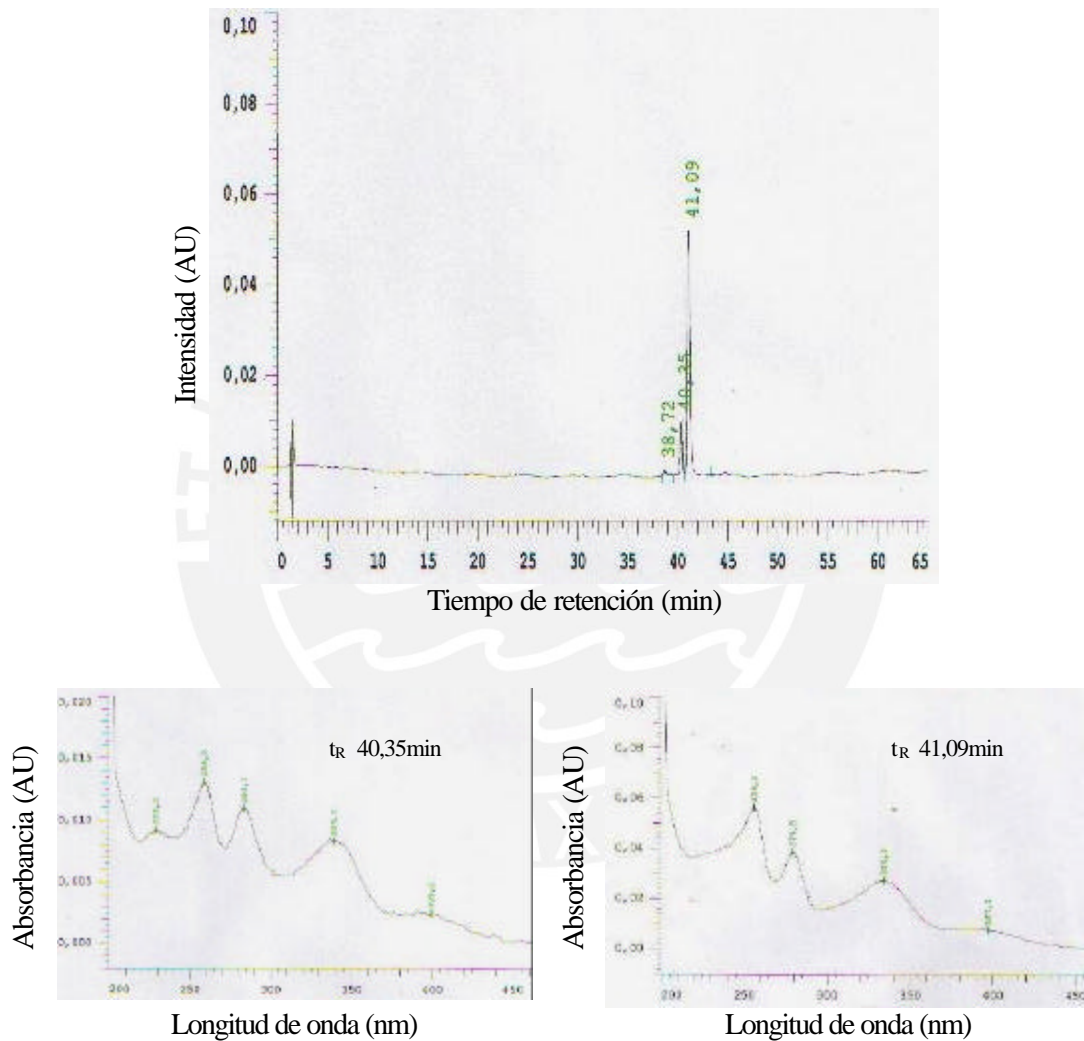


Fig. 45. HPLC comparativo de los compuestos I50-1 + bellidifolina

De acuerdo a los resultados (Tabla 15), se observa que el extracto de CH_2Cl_2 produce la máxima reducción de la glicemia a las 5 horas de la administración en un 24,2 % y aún mantiene su actividad a las 24 horas en un porcentaje menor (19,3 %). El extracto metanólico produce su máxima actividad a las 5 horas reduciendo la glicemia en 38,3 %, esta actividad a las 24 horas se reduce en 20,6 % (Fig. 46). Estudios similares efectuados con *G. thyrsoides* [27] reportaron una reducción de 25,4 % a las 5 horas y 21,8 % a las 24 horas con el extracto diclorometánico y de 51,4 % a 39,9 % con el extracto metanólico respectivamente; por lo que la *G. thyrsoides* tendría un mejor perfil hipoglicémico; aunque los resultados no son concluyentes. Pues esta relativa actividad hipoglicémica se justificaría por cuanto el extracto metanólico de *G. umbellata* contiene xantonas de efecto hipoglicémico [7, 28], al igual que el extracto etanólico de *Swertia japonica* [29].

Actividad hipolipémica

Se puede observar que la combinación de colesterol y aceite de coco, es una forma efectiva y adecuada, para inducir rápidamente un incremento de los niveles de colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) y triglicéridos, disminuyendo los HDL-colesterol.

El extracto diclorometánico (Tabla 16) reduce el colesterol en un 16,15 %, los triglicéridos en 15,20 %, los HDL-colesterol aumentan en 7,97 %, y el LDL-colesterol se reduce en 1,75 %. El extracto metanólico (Tabla 16) muestra niveles más elevados, reduciendo el colesterol en 25 %, los triglicéridos en 18,54 %, los HDL-colesterol aumentan en 16,01 % y el LDL-colesterol se reduce en 7,39 % (Fig. 47).

En pruebas similares realizadas con extractos de *G. thyrsoides* [27], se observa reducciones de colesterol, triglicéridos y LDL-colesterol en 44,22 %; 33,02 % y 27,78 % respectivamente y un aumento de 3,25 % de HDL-

Tabla 16. Actividad hipolipemiante de *G. umbellata* en ratas hipercolesterolémicas a los 30 días de tratamiento

Tratamiento	Colesterol mg/dL	Triglicéridos mg/dL	HDL-Colesterol mg/dL	LDL-Colesterol mg/dL
G.I : Dieta normal Vehículo, 10 mg/kg	56,32 ± 8,23	95,42 ± 10,32	38,23 ± 9,25	21,16 ± 5,41
G.II : Control negativo Vehículo, 10 mg /kg	131,63 ± 0,96	154,26 ± 9,16	19,68 ± 6,54	54,26 ± 6,49
G.III: Control positivo Sinvastatina, 2 mg/kg	55,46 ± 3,28 (57,87 %)	107,82 ± 10,48 (30,01 %)	34,78 ± 8,63 (76,62 %)	27,69 ± 7,21 (48,97 %)
G.IV: Extracto diclo- rometánico, 10 mg/kg	110,45 ± 6,66 (16,15 %)	131,26 ± 8,89 (15,20 %)	21,25 ± 9,45 (7,97 %)	55,20 ± 7,6 (1,75 %)
G.V : Extracto meta- nólico, 10 mg/kg	98,73 ± 7,01 (25 %)	125,66 ± 7,98 (18,54 %)	22,83 ± 9,03 (16,01 %)	50,20 ± 8,21 (7,39 %)

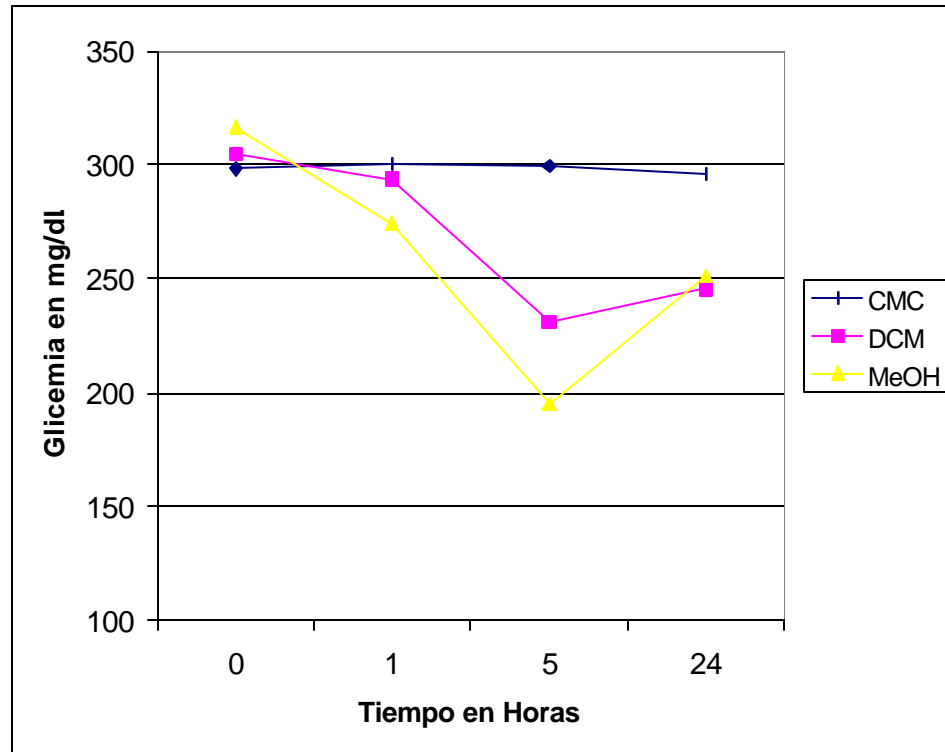


Fig. 46. Comparación del control de la glicemia de los extractos diclorometánico (DCM) y metanólico (MeOH) de *G. umbellata*

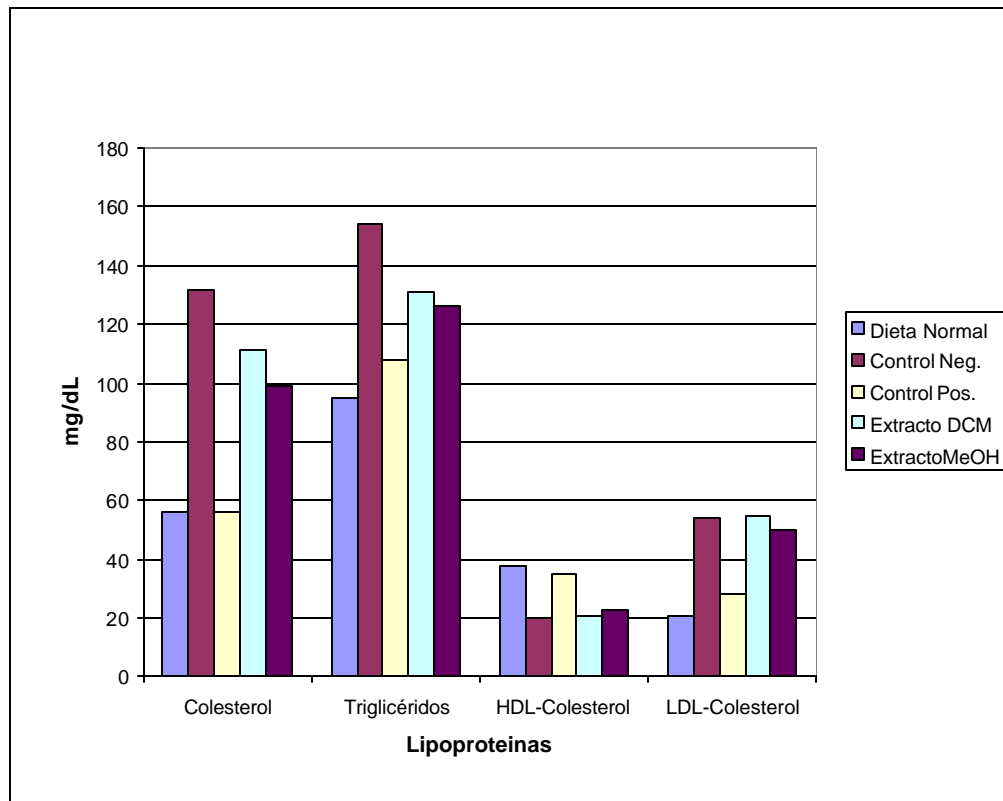


Fig. 47. Comparación de la actividad hipolipemiante de los Extractos diclorometánico (DCM) y metanólico (MeOH) de *G. umbellata*

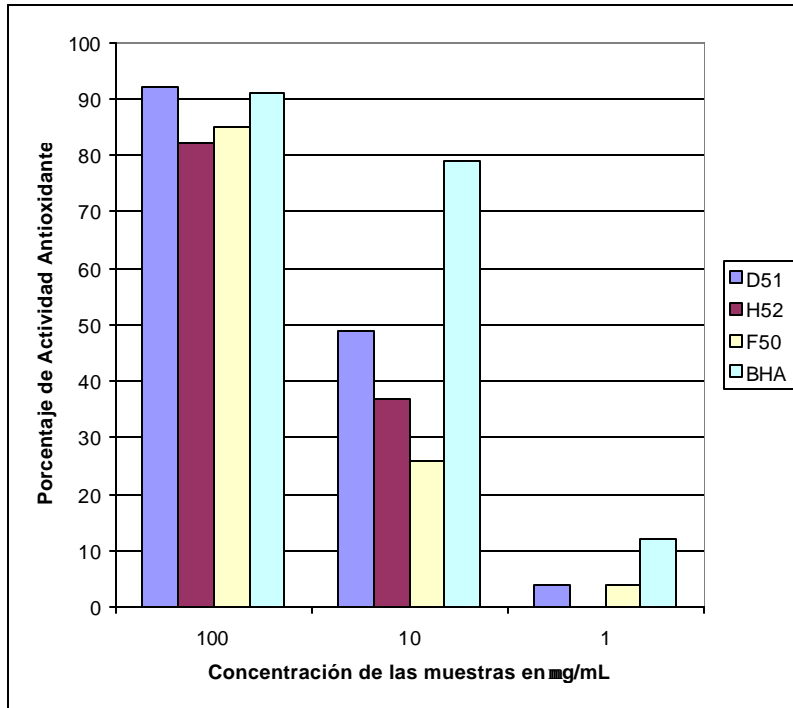


Fig. 48. Actividad antioxidante de 3 fracciones de *G. umbellata*, comparado con BHA (antioxidante comercial)

colesterol con extracto diclorometánico. Con el extracto metanólico se reduce en 47,40 %; 38,23 %; 28,10 % y aumenta en 42,98 % respectivamente. Como se observa, con los extractos metanólicos se obtienen mejores resultados y la *G. umbellata* posee un menor perfil hipolipemiente que *G. thyrsoides*, sin embargo esta menor actividad requeriría mayores estudios.

Actividad antioxidante

Los resultados de la Tabla 18, muestran una buena actividad de las fracciones a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, reduciéndose esta actividad en aproximadamente 48 %, al reducir la concentración 10 veces.

Comparando con el producto comercial BHA (Fig. 48), tenemos que la fracción D51, cuyos componentes mayoritarios son las xantonas mangiferina y 8-O-glc-desmetilbellidifolina, muestra tener un nivel ligeramente superior al BHA a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a 10 $\mu\text{g/mL}$, los niveles son de 49,2 % para D51 y 78,55 % para BHA, lo que demuestra un nivel de importancia de estas fracciones como antioxidantes a 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.- CONCLUSIONES

4.1 La *G. umbellata*, contiene el mismo patrón de metabolitos secundarios encontrado en otras *Gentianellas*, como son: secoiridoides, flavonoides y xantonas, tanto en forma de glicósidos como agliconas.

- 4.2 Se han separado e identificado un flavonoide (swertisina), dos xantonas (mangiferina y 8-O-glc-desmetilbellidifolina) y el triterpeno ácido oleanólico.
- 4.3 Se han separado un flavonoide 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona y 4 xantonas: 3 agliconas (D508/1, D51-III y I50-1) y un glicosido (H52a), cuyas estructuras aún falta determinar.
- 4.4 Los secoiridoides se encuentran en pequeña cantidad, dificultando su purificación para los ensayos de identificación; habiéndose determinado 3 diferentes con valores de absorción UV a 235,2; 237,2 y 237,9 nm.
- 4.5 Las actividades hipoglicemiante e hipolipemiante, tienen mejor resultado con el extracto metanólico, sin embargo estos resultados no son concluyentes.
- 4.6 La actividad antioxidante, mostró tener un mejor resultado con la fracción conteniendo mayoritariamente mangiferina y 8-O-glc-desmetilbellidifolina, en una concentración de 100 µg/mL.

5.- RECOMENDACIONES

- 5.1 Continuar con el estudio químico de la planta, que aun presenta xantonas y flavonoides por identificar.

- 5.2 Evaluar las actividades farmacológicas con otras dosis y con mayor tiempo de seguimiento, utilizando además los compuestos aislados de la especie.
- 5.3 Al seguir el estudio de la planta, es conveniente hacer la separación aplicando una cromatografía líquida al vacío, seguido de purificaciones por cromatografía líquida de baja presión.



6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- CRONQUIST A. (1981) **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. The New York Botanical Garden. Columbia University Press, New York.

- 2.- HOSTETTMANN-KALDAS M., HOSTETTMANN K., STICHER O. (1981) Xanthonas, flavones and secoiridoids of American *Gentiana* species. *Phytochem.* **20**, 443-446.
- 3.- QUERCIA V., BATTAGLIANO G., PIERINI N., TURCHETTO L. (1980) Determination of the bitter constituents of the *Gentiana* root by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **193**, 163-169.
- 4.- LOCK, O. (1997) **Colorantes Naturales**, 1ra Edición, Fondo Editorial PUCP, Lima.
- 5.- WOLFENDER J., HAMBURGER M., HOSTETTMANN K., MSONTHI J., MAVIS S. (1993) Search for bitter principles in *Chironia* species by LC-MS and isolation of a new secoiridoid diglycoside from *Chironia krebsii*. *Journal of Natural Products*, **56**(5), 682-689.
- 6.- ALETH M., DUBOIS L., KATJA G., WAGNER H. (1996) Secoiridoids and xanthonas from *Gentianella nítida*. *Planta Médica*, **62**, 365-368.
- 7.- CALLO N., LOCK O., ALVAREZ C., JURUPE H. (2001) Xanthonas y actividad hipoglicémica de *Gentianella nítida* y *G. tristicha*. *Bol. Soc. Qca. del Perú*, LXVII(3), 195-206.
- 8.- RIOS R., VENTURA J. (1995) Estudio fitoquímico de *Gentianella umbellata* y efecto de su extracto en la hiperglicemia experimental en *Rattus rattus* var. *Albinus*. Tesis(Br), Universidad Nacional de La Libertad, Trujillo.
- 9.- SOUKUP, J. (1988) **Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana**, Edit. Salesiana, Lima.
- 10.- BRAKO L., ZARUCCHI J. (1993) **Catalogue of The Flowering Plants and Gymnosperms of Perú**, Missouri Botanical Garden, Missouri.

- 11.- MACBRIDE F. (1959) **Flora of Perú**, Botanical Series vol. XIII part. V(1), Chicago.
- 12.- FERREIRA R. (1986) **Flora y Vegetación del Perú**, En Gran Geografía del Perú, Naturaleza y Hombre. Vol. II, Edic. Manfer-Juan Mejia Baca, Barcelona.
- 13.- GOODMAN Y GILMAN A. (1991) **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**, Editorial Médica Panamericana, 8va Edición, Buenos Aires.
- 14.- WILKINSON J.B., MOORE R.J. (1990) **Cosmetología de Harry**, Editorial Diaz de Santos S.A., Madrid.
- 15.- KIRK-OTHMER (1961) **Enciclopedia de Tecnología Química**, UTEHA, Tomo II, México.
- 16.- FEJEI S., BLAZOVICS A., LUGASI A., LEMBERKOVICS E., PETRI G., KERY A. (2000) *In Vitro* Antioxidant Activity of *Anthriscus corefolium* L (Hoffm) Extracts. *J. Ethnopharma.* **69**, 259-265.
- 17.- RODRIGUEZ S., WOLFENDER J., ODONTUYA G., PUREV O., HOSTETTMANN K. (1995) Xanthones, Secoiridoids and Flavonoids from *Halenia corniculata*. *Phytochem.* **40**(4), 1265-1272.
- 18.- BOROS C., STERMITZ F. (1991) Iridoids an Updated Review, Part II. *Journal of Natural Products* **54**(5), 1173-1246.
- 19.- LOCK, O. (1994) **Investigación Fitoquímica**, 2da. Edición, Fondo Editorial PUCP, Lima.
- 20.- LIN CH., CHUNG M., GAN K., CHIANG J. (1987) Xanthones from Formosan *Gentianaceous* Plants. *Phytochem.* **26**(8), 2381-2384.
- 21.- MABRY T., MARKHAM K., THOMAS B. (1970) **The Systematic Identification of Flavonoids** . Springer-Verlag, Berlin.

- 22.- TERREAUX CH., MAILLARD M., GUPTA M., HOSTETT-
MANN K. (1995) Xanthonas from *Schultesia lisianthoides*.
Phytochem. **40**(6), 1791-1795.
- 23.- AGRAWAL P. (1989) **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier,
Amsterdam.
- 24.- KALDAS M., HOSTETTMANN K. JACOT GUILLARMOND A.
(1975) Contribution a la Phytochimie Du Genre *Gentiana*, XIII. Etude
des composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles de
Gentiana campestris L. *Helvética Chimica Acta.* (**58**)7, 2189-2192.
- 25.- WOLFENDER J., HAMBURGUER M., MSONTHI J. y
HOSTETTMANN K. (1991) Xanthonas from *Chironia krebsii*
Phytochem. **30**(11), 3625-3629.
- 26.- KHETWAL K., BISHT R. (1988) A Xanthone Glycoside from
Swertia speciosa. *Phytochem.* **27**(6), 1910-1911.
- 27.- TOMAS G. (2000) Estudio Químico y Farmacológico de la
Gentianella thyrsoidea Hooker Fabris, Tesis(Mag) PUCP, Lima.
- 28.- CHAKRAVARTY A.K., MUKHOPADHYAY S. y DAS B.
(1991) Swertane triterpenoids from *Swertia chirata*. *Phytochem.*
30(12), 4087-4092.
- 29.- BASNET P., KADOTA S., SHIMIZU M., NAMBA T. (1994)
Bellidifolin : A potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)
induced diabetic rats from *Swertia japonica*, *Planta Médica* **60**,
507-511.