



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*



*ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE EN *Lepechinia meyenii* (Walp.)*

*Tesis presentada por:*

*Patricia Cecilia Castilla Romera*

*Para optar el Grado Académico de:*  
**MAGISTER EN QUÍMICA**

LIMA - PERÚ  
2004

*A Dios que me acompaña siempre*

*A mi madre ejemplo  
de perseverancia y  
trabajo.*

A large, faint watermark of the university's logo is centered on the page. It features the Latin motto "ET LUX IN TENEBRIS LUCET" at the top and "MCMXVII" at the bottom, with a central emblem depicting a ship and a star.

*A la memoria de mi padre  
con quien hubiera querido  
compartir este logro.*

*A mis hermanos y  
sobrinos que me apoyaron  
siempre.*

## *Agradecimientos*

*Mi especial agradecimiento a:*

*La Dra. Olga Lock Sing por su invaluable apoyo, enseñanzas y por la Asesoría brindada en la realización del presente trabajo.*

*Al Dr. Jan Kopecký, Embajador de la República Checa en el Perú, por darme la oportunidad de viajar a su país lo que contribuyó al desarrollo del presente trabajo de investigación, al Dr. Václav Suchý, Rector de la Universidad de Veterinaria y Ciencias Farmacéuticas, Brno; al Prof. Karel Ubik, del Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de la Academia de Ciencias de la República Checa, Praga, y al Ing. Emil Svajdlenka por acogerme en sus laboratorios.*

*También hago extensivo mi agradecimiento a los Profesores de la Maestría en Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú por sus enseñanzas, a los Integrantes del Laboratorio de Química Orgánica y de Instrumental por su amistad y colaboración.*

*A la Universidad "San Luis Gonzaga" y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por el apoyo brindado para mi capacitación profesional.*

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. GENERALIDADES</b> .....	2
<b>2.1 GÉNERO <i>LEPECHINIA</i></b> .....	2
2.1.1 Distribución y ubicación	2
2.1.2 Química del género	2
2.1.3 <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)	4
<b>2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	8
2.2.1 Radicales libres	8
2.2.2 Antioxidantes	9
2.2.3 Actividad neutralizadora de radicales libres DPPH	12
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	14
<b>3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE 53 ESPECIES VEGETALES</b> .....	14
3.1.1 Muestras vegetales	14
3.1.2 Procedimiento para evaluar la actividad antioxidante	14
3.1.3 Clasificación de los extractos etanólicos	15
3.1.4 Determinación de la concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ).	15
<b>3.2 ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)</b> .....	19
3.2.1 Material vegetal	19
3.2.2 Tratamiento de la muestra	20
3.2.3 Tratamiento del extracto etanólico y determinación de actividad antioxidante	21
a. Detección de metabolitos secundarios	21
b. Obtención de fracciones	21
c. Evaluación de la actividad antioxidante	23
d. Análisis por HPLC	23

e.	Separación de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.	24
f.	Determinación de la concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ) de los compuestos mayoritarios.	52
2.2.4	Análisis del aceite esencial y su actividad antioxidante	71
a.	Análisis por HPLC	71
b.	Análisis por cromatografía de gases	71
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES VEGETALES</b> .....	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>DEL ESTUDIO QUÍMICO Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)</b> .....	<b>79</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>94</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>96</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Distribución de las especies del Género <i>Lepechinia</i>	3
2.	Compuestos reportados para el Género <i>Lepechinia</i>	5
3.	Compuestos reportados en el aceite esencial del Género <i>Lepechinia</i>	6
4.	Porcentaje de actividad antioxidante de los 62 extractos etanólicos	16
5.	Clasificación de los extractos etanólicos según actividad antioxidante	17
6.	Concentración vs actividad antioxidante de los compuestos elegidos para hallar la EC <sub>50</sub>	18
7.	Resultados de la concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ) de los extractos más activos	19
8.	Resultados de la detección de tipos de compuestos en el extracto etanólico	21
9.	Resultado de los rendimientos y de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico	23
10.	Compuestos mayoritarios según HPLC y espectros UV a 254 nm de las fracciones del extracto etanólico.	25
11.	Resultado de la actividad antioxidante de las subfracciones de PEA1	51
12.	Resultado de la actividad antioxidante de las subfracciones de PEA1-4 y de PEA1-6.	53
13.	Concentraciones versus actividad antioxidante de los compuestos aislados, y de rutina y quercetina.	70
14.	Resultado de la concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ) de los compuestos aislados, y de rutina y quercetina.	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.	Compuestos reportados para <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)	7
2.	Tipos de agentes antioxidantes	10
3.	Algunos agentes antioxidantes	11
4.	Esquema de separación del extracto etanólico	22
5.	Cromatograma HPLC del extracto etanólico y espectros UV de los compuestos	26
6.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEA1	30
7.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEE2	33
8.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEO1	36
9.	Espectro infrarrojo de PEO1	37
10.	Espectro de masas (MS-EI) de PEO1	38
11.	Espectro de masas (MS-FAB) de PEO1 (a), y su composición elemental (b)	39
12.	Comparación del espectro de masas de PEO1 con el patrón carnosol	40
13.	Esquema de separación de PEE2	41
14.	Espectro Infrarrojo de PEE2-a	42
15.	Espectros de masas de PEE2-a	43
16.	Comparación del espectro de masas de PEE2-a con ácido ursólico	44
17.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEE2-b	45
18.	Espectros de masas por electrospray y por impacto de electrones de PEE2-b	46
19.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de PEE2-b	47
20.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H bidimensional de PEE2-b	48
21.	Esquema de separación de PEA1	50
22.	Cromatograma de HPLC y espectros UV de PEA1-3a y PEE2-b	54
23.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEA1-4-3	55
24.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEA1-4-3a	56
25.	Cromatograma HPLC y espectro UV de la mezcla PEA1-4-3a y ácido cafeico	57
26.	Espectro de masas de PEA1-4-3a	58
27.	Comparación del espectro de masas del ácido cafeico y PEA1-4-3a	59

28.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEA1-4-6b	60
29.	Espectro de masas de PEA1-4-6b	61
30.	Espectro infrarrojo de PEA1-4-6b	62
31.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEA1-6-5a	63
32.	Espectro de masas (EM-EI) de PEA1-6-5a	64
33.	Espectro de masas de alta resolución y composición elemental de PEA1-6-5a	65
34.	Espectros ultravioleta de PEA1-6-5a en metanol y con reactivos de desplazamiento.	66
35.	Cromatograma HPLC y espectro UV de PEA1-6-6b	68
36.	Espectro de masas de PEA1-6-6b	69
37.	Cromatograma HPLC y espectros UV del aceite esencial	73
38.	Comparación de cromatogramas HPLC del aceite esencial y del extracto etanólico	74
39.	Cromatograma de gases del aceite esencial y de los cristales del aceite esencial	75
40.	Clasificación de los extractos etanólicos según actividad antioxidante.	77
41.	Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos etanólicos más activos, quercetina y BHA comparado con rutina a 10µg/mL.	77
42.	Comparación del EC <sub>50</sub> de los extractos etanólicos más activos con rutina.	78
43.	Esquema de fragmentación de PEE2-b por espectrometría de masas	85
 <b>ANEXOS</b>		
44.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEO2-A	100
45.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEO2-B	101
46.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEO3	102
47.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEE1-A	103
48.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEE1-B	104
49.	Cromatograma HPLC y espectros UV de PEA2	105
50.	Cromatograma HPLC y espectros UV de la subfracción de PEA1-4,1	106
51.	Cromatograma HPLC y espectros UV de la subfracción de PEA1-4,2	107
52.	Cromatograma HPLC y espectros UV de la subfracción de PEA1-4,7	108
53.	Cromatograma HPLC y espectros UV de la subfracción de PEA1-4,8	109

## RESUMEN

### ESTUDIO QUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN *Lepechinia meyenii* (Walp).

Autor: Patricia Cecilia Castillo Romero  
Asesora: Olga Lock Sing  
Escuela de Post Grado. Maestría en Química

En el afán de contribuir a la búsqueda de antioxidantes naturales se seleccionó a la especie *Lepechinia meyenii* (Walp.) para el estudio de la actividad antioxidante.

*Lepechinia meyenii* (Walp.) (salvia, pacha salvia, kotapuriña) es una especie vegetal que crece en Argentina, Bolivia y Perú y es usada popularmente contra cólicos, fiebre tifoidea, reumatismo, afecciones hepáticas y malaria.

Los objetivos de esta investigación fueron evaluar 53 especies vegetales procedentes de la región andina y amazónica del País y determinar las de mayor actividad antioxidante; separar e identificar el (los) compuesto(s) responsable de la actividad en *Lepechinia meyenii* (Walp.)

Se prepararon extractos etanólicos de las especies en estudio y se evaluó su actividad antioxidante *in vitro* usando el método de neutralización del radical libre DPPH. El extracto M13639 presentó la mas alta actividad antioxidante.

En el extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* (Walp.) a través de un estudio dirigido por la actividad antioxidante se han aislado los compuestos de mayor actividad, el ácido 2-hidroxicafeico ( $EC_{50} = 3,46 \mu\text{g/mL}$ ), el ácido cafeico ( $EC_{50} = 5,62 \text{ ug/mL}$ ) y los ésteres metílico ( $EC_{50} = 5,63 \text{ ug/mL}$ ) y etílico ( $EC_{50} = 5,65 \text{ ug/mL}$ ) del ácido 2-hidroxicafeico, también se aisló al carnosol ( $EC_{50} = 8,19 \text{ ug/mL}$ ). El ácido 2-hidroxicafeico presentó la mayor actividad antioxidante, superior al de rutina ( $EC_{50} = 7,09 \text{ ug/mL}$ ) y al de quercetina ( $EC_{50} = 3,96 \text{ ug/mL}$ ). Otros compuestos aislados fueron el ácido ursólico y la flavona diosmetina de escasa actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de esta especie puede atribuirse a los derivados del ácido caféico y al carnosol. Cabe destacar que a pesar de ser compuestos conocidos, el ácido cafeico y sus derivados no habían sido reportados antes en especies del género *Lepechinia*.

## I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye un aporte al estudio de actividad antioxidante en plantas que se viene realizando en el Laboratorio de Química Orgánica de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser usados en la industria de alimentos, cosméticos y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo.

La región andina y amazónica de nuestro país posee una variada flora y dentro de ella, muchas especies con reconocida actividad benéfica para la salud. En el afán de contribuir a la búsqueda de fuentes de antioxidantes naturales se seleccionaron plantas procedentes de estas regiones con el objetivo de determinar las especies vegetales que presentan mayor actividad antioxidante.

Se trabajó con 62 extractos etanólicos procedentes de 53 especies vegetales, después de una evaluación de sus actividades antioxidantes y en concordancia con la disponibilidad del material vegetal, se eligió a la especie *Lepechinia meyenii* (Walp.) para el estudio que constituye la tesis “Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.)” cuyo objetivo específico fue separar e identificar el (los) compuesto(s) responsable de la actividad antioxidante.

La primera parte de esta tarea, obtención y evaluación de la actividad antioxidante de extractos etanólicos, se realizó en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Católica del Perú. La separación de metabolitos secundarios con actividad antioxidante se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia de la Universidad de Veterinaria y Ciencias Farmacéuticas-Brno, República Checa.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 GÉNERO *LEPECHINIA* WILLD

#### 2.1.1 Distribución y ubicación

El Género *Lepechinia* fue descrito en 1806 por Willdenow tomando el nombre del botánico Ruso Ivan Ivanovic Lepechin (1737-1802). Epling señaló a los géneros *Alguelaguen*, *Stachys*, *Sphacele* y *Astemon* como sinónimos de *Lepechinia*<sup>1</sup>. En la actualidad el Género comprende 39 especies, las que fueron agrupadas en 8 secciones por Epling y en 2 por Hart<sup>1,2</sup>. Están distribuidas en el continente americano y su habitat es el páramo y subpáramo (3200 – 4500 msnm)<sup>1,3</sup>.

El lugar de procedencia de las especies y su ubicación dentro del género se muestran en la Tabla 1.

#### 2.1.2 Química del género

Estudios fitoquímicos indican que las especies de este género biosintetizan principalmente, diterpenos tricíclicos, triterpenos y flavonoides<sup>1,4-9</sup>.

Dentro de los diterpenos se reportan principalmente ácidos derivados de los núcleos abietano y pimarano, aislados a partir de *L. caulescens*, *L. bullata*, *L. glomerata*, *L. hastata*, *L. meyenii* y *L. urbaniana*. Algunos de ellos son el ácido carnósico, rosmanol<sup>8</sup>, 7-metoxirosmanol, etoxirosmanol<sup>1</sup>, ácido 7 $\beta$ -hidroxi-abieta-8(14)-en-18-oico-9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -endoperóxido, el ácido 8 $\alpha$ (9 $\alpha$ ),13 $\alpha$ (14 $\alpha$ )-diepoxi-abietan-18-oico, y el ácido 7 $\alpha$ -hidroxidehidroabiético<sup>6,7</sup>. También se han encontrado diterpenquinonas citotóxicas como las 6,7-dehidroroyleanona, horminona y 7-O-metilhorminona en *L. bullata*<sup>4</sup>.

Dentro de los triterpenos se reporta al ácido ursólico, oleanólico, betulínico y sus 2 $\alpha$ -hidroxiderivados aislados a partir de *L. glomerata*, *L. caulescens* y *L. chamaedryoides*<sup>1,5,6</sup>. En *L. caulescens* se reporta al stigmasterol y el  $\beta$ -sitosteril- $\beta$ -D-glucósido; en cuanto a los flavonoides se han identificado a salvigenina (de *L. caulescens*), artemetina y santina (de *L. urbaniana*)<sup>5,6,10</sup>.

Tabla 1: Distribución de las especies del género *Lepechinia*<sup>1</sup>

HART (1983)	EPLING (1948)	ESPECIE	LUGAR DE PROCEDENCIA
LEPECHINIA	EULEPECHINIA	<i>L. shiedeana</i> (SCHLECHTD) VATKE	México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Colombia
		<i>L. tomentosa</i> (BENTH) EPL	Perú
		<i>L. caulescens</i> (ORT) EPL	Guatemala, México
		<i>L. meyenii</i> (WALP) EPL	Argentina, Bolivia, Perú
		<i>L. rufocampii</i> EPL	Ecuador
	THYRSIFLORAE	<i>L. hastata</i> (GRAY) EPL	México, Hawai (USA)
		<i>L. nelsonii</i> (FERN) EPL	México
	GLOMERATAE	<i>L. glomerata</i> EPL	México
	CALYCINAE	<i>L. calycina</i> (BENTH) EPL	California (USA)
		<i>L. fragans</i> (GREENE) EPL	California (USA)
		<i>L. ganderi</i> (EPL)	California (USA)
		<i>L. cardiophylla</i> EPL	California (USA)
		<i>L. mexicana</i> (SCHAUER) EPL	México
	CAMPANULATAE	<i>L. chamaedryoides</i> (BALBIS) EPL	Chile
		<i>L. marica</i> EPL & MATHIAS	Perú
	ESPECIOSAE	<i>L. salviae</i> (LINDLEY) EPL	Chile
		<i>L. especiosa</i> (ST.HIL) EPL	Brasil
		<i>L. lamifolia</i> (BENTH) EPL	Perú
		<i>L. bella</i> EPL	Bolivia
	SALVIAEFOLIAE	<i>L. floribunda</i> (BENTH) EPL	Perú, Bolivia, Argentina
		<i>L. urbaniana</i> (BRIQU) EPL	República Dominicana. Hawai (USA)
		<i>L. salviaefolia</i> (KUNTH) EPL	Venezuela, Colombia
		<i>L. codon</i> EPL	Perú
		<i>L. lanciifolia</i> (RUSBY) EPL	Bolivia
		<i>L. cocuyensis</i> J.R.I. WOOD.	Colombia
		<i>L. velutina</i> J.R.I. WOOD.	Colombia
	PARVIFLORAE	<i>L. graveolens</i> (REGEL) EPL	Bolivia, Argentina
		<i>L. vesiculosa</i> (BENTH) EPL	Bolivia, Perú
<i>L. bullata</i> (KUNTH) EPL		Venezuela, Colombia	
<i>L. heteromorfa</i> (BRIG) EPL		Ecuador, Perú, Bolivia	
<i>L. conferta</i> (BENTH) EPL		Colombia	
<i>L. radula</i> (BENTH) EPL		Ecuador, Perú	
<i>L. paniculata</i> (KUNTH) EL		Ecuador	
<i>L. betonicaefolia</i> (LAM) EPL		Colombia, Ecuador	
<i>L. mutica</i> (BENTH) EPL		Ecuador	
<i>L. mollis</i> (EPL) EPL		Perú	
<i>L. scobina</i> EPL		Perú	
<i>L. dioica</i> HART		Ecuador	
<i>L. vulcanicola</i> J.R.I. WOOD.		Colombia	

En la Tabla 2 se resume los tipos de compuestos aislados en el Género *Lepechinia*.

Respecto a los compuestos volátiles-aceites esenciales, hasta hoy han sido estudiadas 11 especies del género *Lepechinia*. Los resultados de esta búsqueda se recopilan en la Tabla 3; indicándose los compuestos reportados. Dada la heterogeneidad de los componentes en el aceite esencial no es posible establecer un patrón para el género<sup>1,11-19</sup>.

### 2.1.3 *Lepechinia meyenii* (Walp.)

Es una especie vegetal de ocurrencia natural en Argentina, Bolivia y Perú, entre los 3800 y 4200 msnm<sup>1, 15</sup>. Es una hierba perenne, de tallos subterráneos y hojas opuestas. Crece en terrenos llanos, secos y en laderas. En el Perú está distribuido en Ancash, Huánuco, Junín, Huancavelica, Cajamarca, Cuzco, La Libertad y Puno<sup>20</sup>.

Estudios químicos y farmacológicos

De las partes aéreas de *L. meyenii* (extracto de acetona) se han aislado los derivados abietatrienos, pisiferol (8,11,13-abietatrieno-12,20-diol), ácido carnósico (ácido 11,12-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-20-oico), rosmanol o salvín (7 $\alpha$ ,11,12-trihidroxi-8,11,13-abietatrien-20,6 $\beta$ -ólido), salvicanol (10 $\beta$ ,11-dihidroxi-12-metoxi-9(10 $\rightarrow$ 20)abeo-abieta-8,11,13-trieno), isosalvicanol (10 $\beta$ ,12-dihidroxi-11-metoxi-9(10 $\rightarrow$ 20)abeo-abieta-8,11,13-trieno) y un 12 formilbietano derivado (ácido 12-formil-11-hidroxi-8,11,13-abietatrien-20-oico,metiléster)<sup>8</sup>.

Las estructuras de diterpenos aislados de *L. meyenii* se presentan en la Fig. 1.

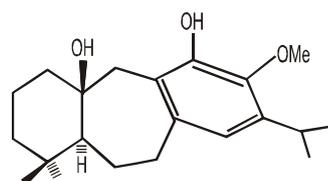
Para el aceite esencial se reporta la presencia del sesquiterpeno guaiol en *L. meyenii*<sup>15</sup>.

Tabla 2: Compuestos reportados en el Género *Lepechinia*

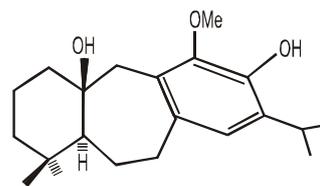
LEPECHINIA	CLASE DE COMPUESTOS	TIPO DE ESTRUCTURA	Referencias
<i>L. bullata</i>	diterpenquinonas	abietano (royleanona y horminona)	4
<i>L. caulescens</i>	diterpenos (ácido)	abietano	5
	triterpenos	ursano, lupano, oleanano,	
	flavonoides	flavona: salvigenina	
<i>L. chamaedryoides</i>	diterpenos	abietano	6
	triterpenos	ursano, lupano, oleanano,	
	esteroides	estigmasterol, y derivados del sitosterol	
<i>L. chamaedryoides</i>	triterpenos	ursano, lupano, oleanano	3
<i>L. glomerata</i>	triterpenos	oleanano	7
	diterpenos	pimarano	
<i>L. hastata</i>	diterpenos	abietano	8
	diterpenos	abietano	9
<i>L. meyenii</i>	diterpenos	abietano	8
<i>L. urbaniana</i>	diterpenos	abietano	10
	flavonoides	artemetina, santina	

Tabla 3: Compuestos reportados en el aceite esencial del Género *Lepechinia*

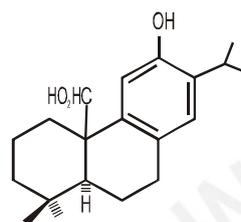
<i>Lepechinia</i> "nombre común"	Compuesto principal (%)	Procedencia	Referencia
<i>L. bullata</i>	sesquiterpeno espiroterpeno premaspirodieno	Venezuela Santo Domingo	11
<i>L. calycina</i>	1,8 cineol 19,7 canfor 17,5 $\Delta^3$ -careno 17,4 canfeno 7,8 $\alpha$ -pineno 3,0 $\beta$ -cariofileno 5,7	USA (California)	12
<i>L. caulescens</i> "betónica"	borneol canfor p-cimeno $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno canfeno	México	1
<i>L. chamaedryoides</i> "salvia"	$\beta$ -felandreno 13,0 t-cadinol 10,4 $\beta$ -cariofileno 10,3 espatulenol 6,4 limoneno 6,0 $\gamma$ -cadineno 5,9 $\delta$ -3-careno 5,3	Chile	13
<i>L. floribunda</i> "salvia morada"	borneol 21,4 $\beta$ -cariofileno 15,1 ledylacetato 16,9 aromadendreno 5,5 viridifloral 4,3 $\alpha$ -humuleno 3,2	Argentina	14
<i>L. graveolens</i> "salvia blanca"	$\beta$ -cariofileno 20,0 1,8-cineol 15,0 linalilacetato 14,0 limoneno 12,0 canfeno 9,0 linalool 8,0	Argentina	1
<i>L. meyenii</i> "pasa salvia"	Guaiol	Perú (Puno)	15
<i>L. salviae</i> "salvia"	limoneno + 1,8-cineol 30,0 felandreno 15,0 timol 9,0 $\alpha$ -pineno 3,0 $\beta$ -pineno 3,0 linalool 2,0 terpineol 2,0	Chile	16
<i>L. schiedeana</i> "salvia negra"	ledol 16,3 $\Delta^3$ -careno 21,4 $\beta$ -pineno 11,3 $\beta$ -felandreno 11,1 $\gamma$ -terpineno 9,5	Colombia	17
	$\beta$ -pineno 26,6 cis-pinocanfeno 25,1 $\delta$ -3-careno 6,1 trans-pinocanfona 4,0 canfor 3,8 $\beta$ -cariofileno 3,7	Costa Rica	18
<i>L. espiciosa</i>	bornilacetato 19,1 limoneno 18,2 canfor 6,5 borneol 6,1 $\alpha$ -pineno 2,2 $\beta$ -pineno 2,2 sesquiterpeno 45,5	Brasil	19
<i>L. urbaniana</i> "rucilla"	$\Delta^3$ -careno 32,6 $\alpha$ -copaeno 13,8 $\delta$ -cadineno 12,5 $\beta$ -felandreno 4,5 $\gamma$ -cadineno 3,4	Republica Dominicana	1



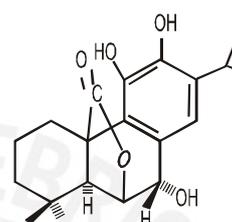
Salvicanol (\*)



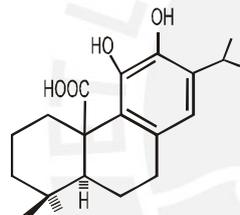
Isosalvicanol (\*)



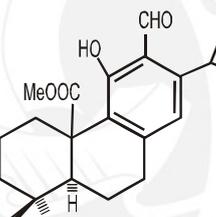
Pisiferol



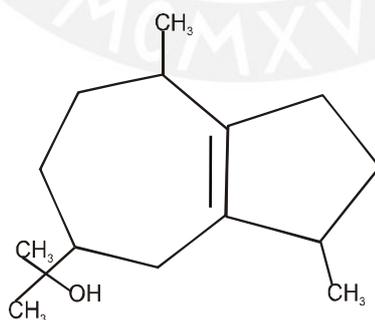
Rosmanol o Salvin



Ac. Carnósico



Ácido 12 - formil - 11 - hidroxí -  
8, 11, 13 - abietatrien - 20 -  
oico metiléster (\*)



Guaiol

(\*) podrían ser artefactos producidos durante la separación con diazometano

Fig. 1. Compuestos reportados para *Lepechinia meyenii* (Walp.)

Respecto a los estudios farmacológicos de esta especie se reporta actividad antibacteriana contra microorganismos gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus faecalis* y *Streptococcus beta-hemoliticus*) y gram negativo (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*)<sup>20,21</sup>.

#### Usos

Las hojas son usadas en la medicina popular contra el dolor de estómago, como digestivo, para el tratamiento de fiebre tifoidea, ciclo menstrual irregular, reumatismo, malaria y como un desinfectante para evitar la tuberculosis<sup>1,8,15</sup>. En el Callejón de Huaylas, entre Caraz y Huaraz y en la Región de los Libertadores Wari, los pobladores la usan como infusión de planta entera sola o combinada con culén y orégano blanco para el tratamiento de diarreas, cólicos, afecciones hepáticas y como aperitivo<sup>20</sup>.

## 2.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 2.2.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas (átomos, iones o moléculas) con uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. Son muy reactivos y no pueden ser aislados pero están presentes como intermediarios en numerosas reacciones de gran relevancia biológica<sup>22</sup>.

Los reactantes más importantes en la bioquímica de los radicales libres en las células aeróbicas son el oxígeno y sus radicales derivados, los que son conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROS). Entre estos tenemos al superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), peroxilo ( $RO_2^{\cdot-}$ ), alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ); además de especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido

hipocloroso (HOCl) y oxígeno singulete ( $O_2$ ). Muchas de estas cumplen funciones fisiológicas normales, pero si se generan en exceso pueden resultar muy tóxicos dañando al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos. Existen fuentes endógenas de especies reactivas como las mitocondrias, los peroxisomas, las células fagocíticas y citocromo P450 y entre las fuentes exógenas tenemos la contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, reactivos y solventes industriales<sup>22-24</sup>.

### 2.2.2 Antioxidantes

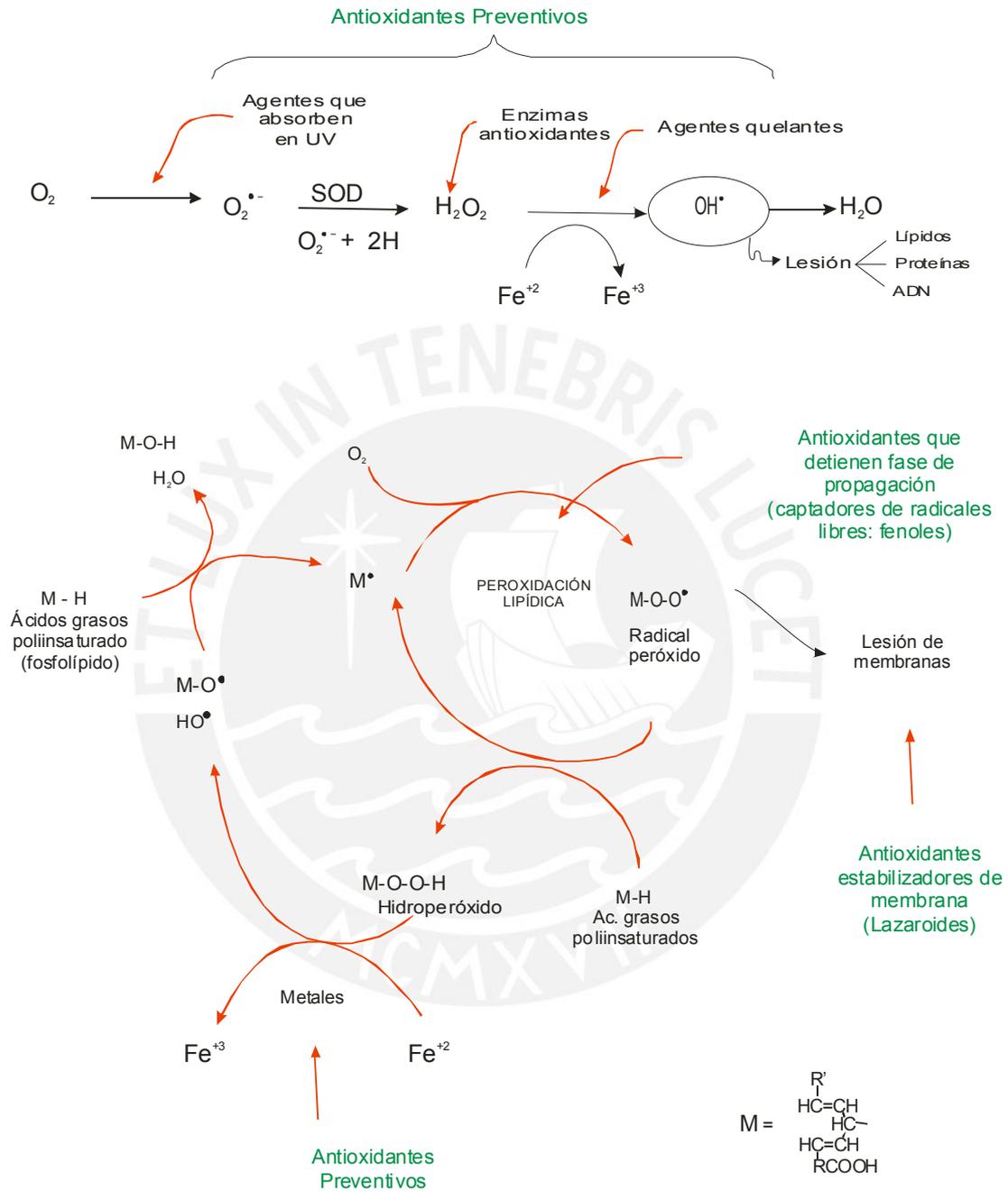
Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables<sup>25</sup>.

Bajo condiciones fisiológicas, el organismo puede prevenir el daño producido por las especies oxidantes, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes.

Los principales procesos relacionados con la formación de radicales libres en el organismo, se resumen en la Fig. 2; indicándose también los puntos en los que es posible la interferencia mediante el empleo de agentes antioxidantes.

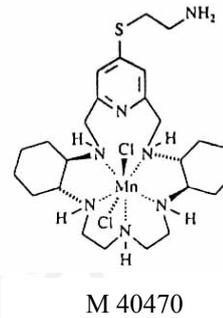
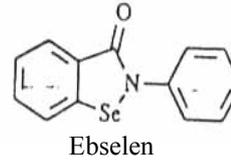
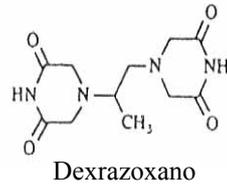
Así tenemos dentro de los agentes antioxidantes.

- a. Antioxidantes preventivos, como los agentes quelantes, los que actúan atrapando a los cationes metálicos que intervienen en la descomposición del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo; evitando así la formación de estos últimos. En este grupo están la penicilamina, el EDTA y el profármaco dexrazoxano. También están incluidas las enzimas antioxidantes, las que actúan degradando al peróxido de hidrógeno como la glutathion peroxidasa, catalasa y fármacos que las mimetizan constituidos por ciertos complejos metálicos como los derivados del manganeso (SC55858 y M40470) y seleniuros (ebselen)<sup>26</sup> (Fig. 3).

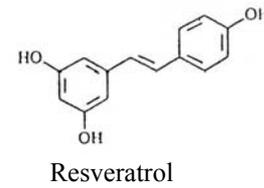
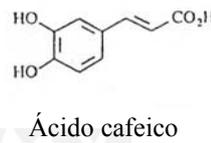
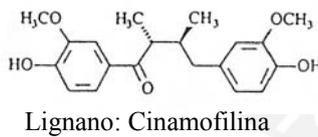
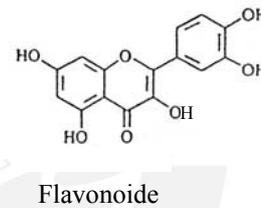
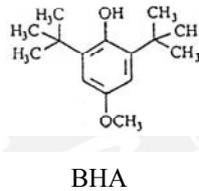
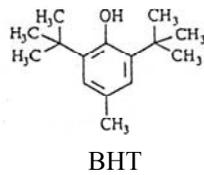


**Fig. 2. Tipos de agentes antioxidantes**

Agentes preventivos



Agentes “scavengers”



Agentes estabilizadores de membranas

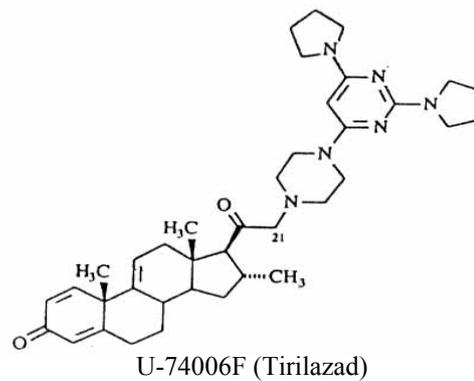
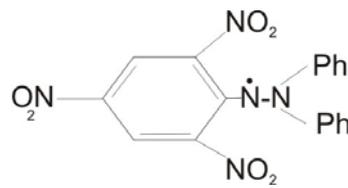


Fig. 3. Algunos agentes antioxidantes

- b. Antioxidantes que interrumpen la fase de propagación de procesos radicalarios, tenemos a los agentes captadores de radicales (radical “scavenger”) como los fenoles, cuya estructura en general debe poseer dos características importantes, la presencia de sustituyentes voluminosos en las dos posiciones vecinas al hidroxilo y en la posición “para” la presencia de algún grupo que contribuya a la deslocalización del electrón desapareado. Por ejemplo los tocoferoles, fenoles sintéticos como BHA y BTA, fenoles naturales como flavonoides, cumarinas, lignanos, ácido cafeico, resveratrol; además otros captadores de electrones no fenólicos como ácido ascórbico y derivados, tioles y polienos como carotenoides<sup>26</sup> (Fig. 3).
- c. Antioxidantes que actúan por estabilización de membrana como los lazaroides, un grupo de esteroides con sustituyentes muy básicos en la posición 21 siendo el Tirilazad (U-74006F) el representante más conocido. El modo de acción es complejo y todavía no está aclarado. Los efectos de estos contribuyen a cambiar las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares dificultando la extensión del proceso de peroxidación<sup>26</sup> (Fig. 3).

### 2.2.3 Actividad neutralizadora de radicales libres

Existen muchos métodos para evaluar la actividad antioxidantes en fuentes vegetales, como plantas medicinales y alimentos. Uno de ellos es el método de neutralización del radical libre 2,2-difenildipicrilhidracil (DPPH). El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa<sup>27</sup>.



DPPH

La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia a 517 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuesto puro o extracto) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio del color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción<sup>28,29</sup>.

La reacción entre la sustancia a evaluar (HA) y el DPPH es la siguiente:



La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula<sup>27</sup>.

$$\text{AA}\% = 100 - \left\{ \frac{(\text{Am} - \text{Ab}) 100}{\text{Acontrol}} \right\}$$

Donde: AA% = Porcentaje de actividad antioxidante

Am = Absorbancia de la muestra

Ab = Absorbancia del blanco

A control = Absorbancia del reactivo DPPH

La concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) se define como la concentración de la muestra en la que se produce el 50 % de actividad antioxidante.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE 53 ESPECIES VEGETALES

Se recolectaron 53 especies vegetales procedentes de la sierra y selva del país, a partir de las cuales se prepararon 62 extractos etanólicos (en algunas especies se contó con más de un órgano para el estudio).

En cada uno de los extractos se evaluó la actividad antioxidante por el método de neutralización del radical libre DPPH. Con fines de comparación se utilizó rutina, quercetina y butilhidroxianisol, BHA.

##### 3.1.1 Muestras vegetales

Las muestras vegetales se seleccionaron, codificaron, secaron en estufa a 40 °C, y molieron en un molino manual.

50 a 100 g de muestra seca y molida se extrajo con etanol por el método de percolación. El extracto obtenido fue concentrado en un rotavapor a presión y temperatura reducida hasta sequedad.

##### 3.1.2 Procedimiento para la evaluación de la actividad antioxidante

Se utilizó el método de neutralización del radical libre difenildipicrilhidracil (DPPH) el que fue estandarizado y validado a las condiciones del laboratorio.

1 mg de extracto etanólico seco de las muestras vegetales se disolvió en 10 mL de etanol al 95 %, a partir del cual se prepararon diluciones de 10 µg/mL y de 50 µg/mL. Cada una de estas diluciones se trataron con la solución de DPPH de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo se colocó 1,25 mL de muestra y 0,5 mL de la solución de DPPH (SIGMA®) 0,3 mM en etanol al 95 %. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante treinta minutos. Se midió la absorbancia a 517 nm. Se preparó un blanco de la muestra en solución

etanólica. Estas determinaciones se realizaron por triplicado. El tubo control consistió en una solución de DPPH en etanol, el que fue leído a 517 nm. Los cálculos del porcentaje de actividad se realizan de acuerdo a la fórmula indicada en 2.2.3.

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los 62 extractos etanólicos se muestran en la Tabla 4.

### **3.1.3 Clasificación de los extractos etanólicos según actividad antioxidante**

Los extractos se clasificaron en cuatro grupos: G-I (0-25 %), G-II (25,1-50 %), G-III (50,1-75 %) y G-IV (75 % a +), dependiendo de los resultados de su actividad antioxidante (a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) determinado por el método de neutralización del radical libre DPPH ya descrito. Los resultados de la clasificación se muestran en la Tabla 5.

### **3.1.4 Determinación de la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ )**

Se determinó la concentración efectiva media de aquellos extractos cuya actividad fue mayor a 25 % frente al DPPH. Para este ensayo se tuvo en cuenta la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) en que cada extracto manifestó su actividad antioxidante y a partir de este dato se prepararon las diluciones ensayadas para determinar la concentración efectiva media, tal como se detalla en la Tabla 6. La Concentración Efectiva Media,  $EC_{50}$ , se determina por análisis de regresión lineal (% de actividad vs concentración) de los extractos clasificados en los grupos II, III y IV. Los resultados se indican en la Tabla 7.

A fin de comparar los valores del  $EC_{50}$  de los extractos ensayados se determinó la  $EC_{50}$  para la rutina.

Tabla 4: Actividad antioxidante (%) de los 62 extractos etanólicos

Muestras (Códigos)	% Actividad Antioxidante		Muestras (Códigos)	% Actividad Antioxidante	
	10 µg/mL	50 µg/mL		10 µg/mL	50 µg/mL
M 02	3,93	15,38	M13590	3,18	15,29
M 04	8,77	38,25	M13591	5,47	10,86
M 06	6,04	25,29	M13592	9,63	44,25
M 07	22,83	85,24	M13594	3,64	16,49
M 09	12,76	64,50	M13596	5,07	14,47
M 21	20,53	80,07	M13597	11,23	14,63
M 22	36,50	91,10	M13598	18,54	26,13
M 23	25,49	87,54	M13600	3,82	11,73
M 48	24,39	88,29	M13601	2,83	12,14
M 49	12,15	56,19	M13602	3,76	13,98
M 51	1,35	16,63	M13603	1,14	7,72
M 58	9,09	42,10	M13604	5,29	23,61
M 59	4,64	17,97	M13605	6,08	41,82
M 60	9,08	41,63	M13624	0,46	6,83
R - 1	6,36	28,70	M13625	2,20	21,70
R - 2	15,27	57,71	M13626	22,11	87,83
R - 3	16,35	85,83	M13627	10,46	47,82
R - 4	0,91	25,25	M13628	69,14	95,47
R - 5	42,96	92,24	M13629	10,33	36,69
R - 6	18,61	74,31	M13630	6,69	35,90
R - 7	23,62	89,47	M13631	2,62	3,60
R - 8	8,35	38,39	M13639	83,96	94,73
R - 9	23,92	89,92	M13648	0,19	12,68
R - 10	0,4	6,54	M13656	15,41	67,02
R - 11	41,84	95,23	M13657	41,21	91,84
R - 12	1,16	15,49	M13658	41,49	90,90
R - 13	10,43	66,40	M13660	0,30	5,93
R - 14	3,17	20,53	M13661	2,58	19,52
R - 15	1,44	14,84	M13662	61,82	92,43
R - 16	6,26	15,79	M13664	0,00	12,64
<b>Rutina</b>	<b>70,61</b>	<b>90,76</b>	M13665	0,00	12,76
<b>Quercetina</b>	<b>93,92</b>	<b>93,50</b>	M13686	2,66	8,16
<b>BHA</b>	<b>74,18</b>	<b>93,05</b>			

Tabla 5: Clasificación de los extractos etanólicos según actividad antioxidante

Grupo	Código Muestra	% AA						
I (0-25%)	13664	0,00	13686	2,66	R-16	6,26	R-2	15,27
	13665	0,00	13601	2,83	R-1	6,36	13656	15,41
	13668	0,19	R-14	3,17	13630	6,69	R-3	16,35
	13660	0,30	13590	3,18	R-8	8,35	13598	18,54
	R-10	0,40	13594	3,64	M-04	8,77	R-6	18,61
	13624	0,46	13602	3,76	M-60	9,08	M-21	20,53
	R-4	0,91	13600	3,82	M-58	9,09	13626	22,11
	13603	1,14	02	3,93	13592	9,63	M-07	22,83
	R-12	1,16	59	4,64	13629	10,33	R-7	23,62
	R-15	1,14	13596	5,07	R-13	10,43	R-9	23,92
	M-51	1,35	13604	5,29	13627	10,46	M-48	24,39
	M13625	2,20	13591	5,47	13597	11,23		
	13661	2,58	06	6,04	M-49	12,15		
13631	2,62	13605	6,58	M-109	12,76			
II (25,1-50%)	M23	25,49						
	M22	36,50						
	13657	41,21						
	13658	41,49						
	R - 11	41,89						
	R - 5	42,96						
III (50,1 – 75%)	13662	61,82						
	13628	69,14						
IV (75,1% a +)	13639	83,96						

Tabla 6: Concentraciones versus actividad antioxidante de los extractos elegidos para hallar EC<sub>50</sub>

MUESTRAS (Códigos)	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE									
	2 µg/mL	4 µg/mL	6 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL	16 µg/mL	18 µg/mL	24 µg/mL	30 µg/mL
M13639	25,34	38,98	57,68	70,68	83,68	96,68	----	----	----	----
M13628	19,82	32,52	45,22	53,63	62,04	70,45	----	----	----	----
M13662	13,01	24,76	36,52	46,2	55,88	68,85	85,14	93,64	----	----
R-5	----	27,4	29,42	31,44	----	41,42	53,92	60,22	----	----
R-11	7,49	13,12	18,75	24,37	31,11	37,08	48,72	54,1	70,24	----
M13658	8,56	15,72	22,88	30,05	37,14	44,23	56,4	62,42	80,18	----
M13657	3,46	11,27	19,08	26,89	34,7	40,04	50,71	56,4	69,64	----
M-22	8,48	16,88	25,28	33,68	42,08	48,06	60,01	65,98	73,95	----
M-23	3,23	----	12,8	----	22,37	----	33,98	37,85	49,46	61,08
Rutina	7,28	24,96	42,64	61,07	73,78	86,01	----	----	----	----

Tabla 7: Concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) de los extractos mas activos y de Rutina

Muestras Código	a	b	r <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub>
M13639	11,793	7,1971	0,9960	5,31
M13628	12,268	5,0017	0,9887	7,54
M13662	5,1345	5,0385	0,9960	8,90
M-22	7,2054	3,0955	0,9653	13,82
M13658	3,3993	3,2699	0,9978	14,25
R-5	14,832	2,4192	0,9731	14,54
M13657	1,0404	3,0283	0,9851	16,17
R-11	1,7836	2,8893	0,9993	16,69
M-23	0,5717	2,045	0,9979	24,17
Rutina	-6,564	7,9791	0,9930	7,09

### 3.2 DEL ESTUDIO QUÍMICO Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Lepechinia meyenii* (Walp.)

Para la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antioxidante se eligió una especie vegetal que se encuentre dentro de los grupos II, III o IV y que permita su recolección en cantidad suficiente. Estos criterios determinaron que el trabajo se realice con R-5; que es una planta andina de nombre científico *Lepechinia meyenii* (Walp.).

#### 3.2.1 Material vegetal

*Lepechinia meyenii* (Walp.) (planta entera) fue recolectada a 3000 msnm en la quebrada de Llaca, provincia de Huaraz, departamento de Ancash, en el mes de Julio del 2002.

La certificación de la especie y la clasificación botánica fueron realizadas por la bióloga Irma Fernández y es como sigue:

(Sistema de clasificación: Engler y Prantl)

Reino	:	Plantae
División	:	Angiospermae
Clase	:	Dicotyledoneae
Sub Clase	:	Sympetalaе (metaclamydeae)
Orden	:	Tubiflorales
Familia	:	Labiatae
Género	:	<i>Lepechinia</i>
Especie	:	<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.)Epling
Sinonimia botánica	:	<i>Sphacele meyenii</i> (Walp.), <i>Stachys meyenii</i> (Walp.)
Nombres comunes	:	salvia, pasasalvia, salvigateadora, pacha salvia y kota puriña .

### 3.2.2 Tratamiento de la muestra

El material vegetal (planta entera) fue seleccionado y procesado para la obtención del extracto etanólico y el aceite esencial de la siguiente manera:

4,54 kg de planta entera fue secada a temperatura ambiente bajo sombra y en estufa a 40 °C, posteriormente fue reducida a polvo fino en un molino manual y pesada. El material seco y molido obtenido (1,46 kg) se extrajo por maceración (12 horas) y percolación sucesiva con etanol hasta agotamiento. La solución etanólica (10 L) se concentró a presión y temperatura reducida y en estufa a 40 °C hasta la obtención de un extracto etanólico seco. El porcentaje de humedad fue de 67 %, el extracto etanólico (197 g) dio un rendimiento de 13,49 %.

A partir de hojas frescas (0,73 kg) y por arrastre de vapor se obtuvo 2 mL (0,27 %) de aceite esencial el cual luego de un breve reposo a temperatura ambiente se separaron unos cristales blanquecinos.

### 3.2.3 Tratamiento del extracto etanólico y determinación de su actividad antioxidante

El extracto etanólico fue sometido a las siguientes etapas de estudio:

#### a. *Detección de metabolitos secundarios*

En el extracto etanólico total se ensayaron reacciones de coloración y de precipitación<sup>30</sup> (Tabla 8).

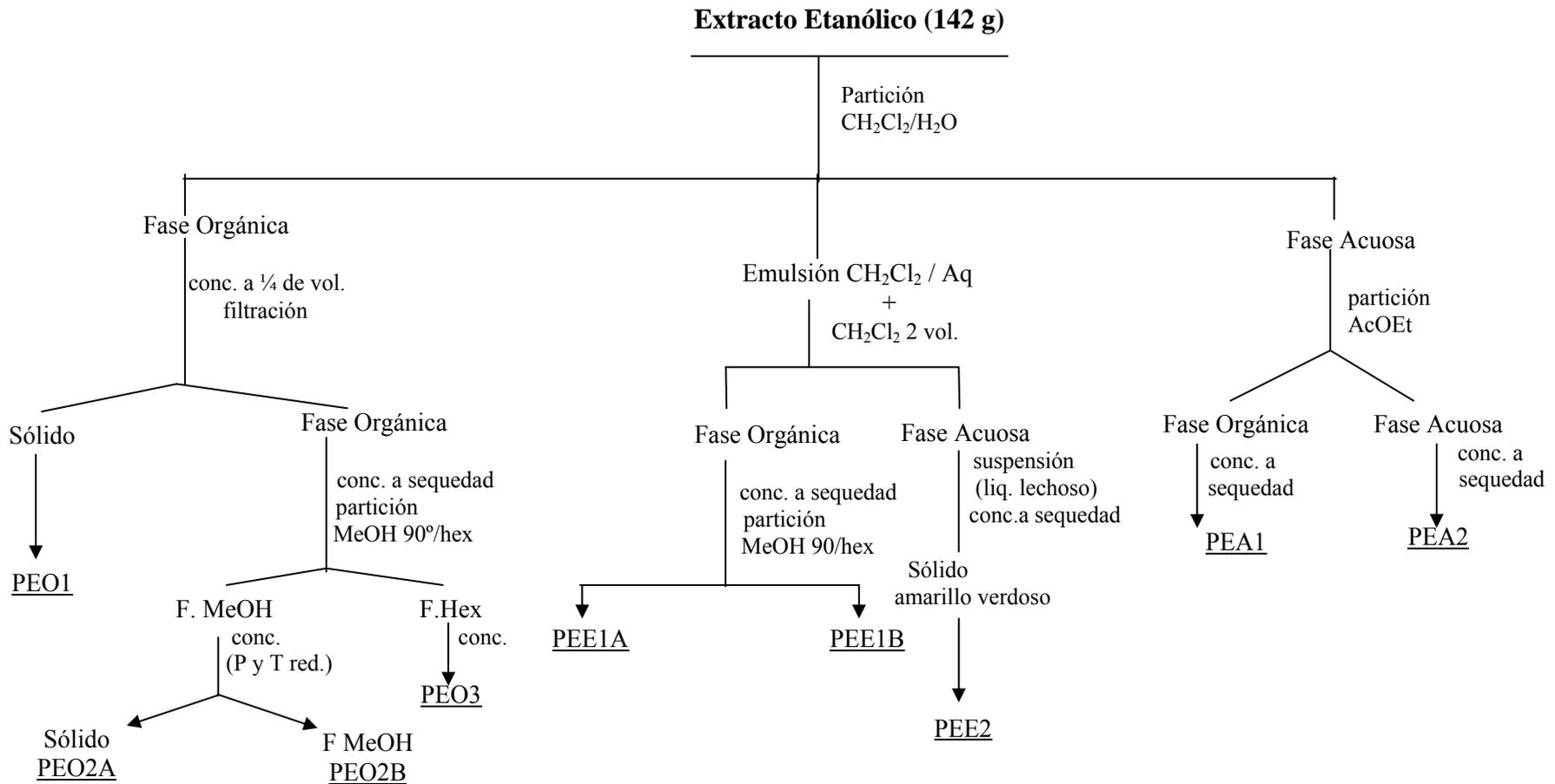
Tabla 8: Resultados de la detección de los tipos de compuestos en el extracto etanólico.

Metabolitos Secundarios	Reacciones de coloración y/o precipitación	Resultado
Taninos	Reacción de Gelatina	-
	Reacción de FeCl <sub>3</sub>	+
Triterpenos y/o Esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	+
Nafto y antraquinonas	Reacción de Bornträger	-
	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
	Dragendorff	-
Flavonoides	Shinoda	-
Leucoantocianidina y catequinas	Reacción de Rosenheim	-

De los resultados se deduce que el extracto etanólico contiene grupos fenólicos libres, triterpenos y/o esteroides.

#### b. *Obtención de fracciones*

142 g del extracto etanólico fue fraccionado según el esquema mostrado en la Fig. 4.



**Fig. 4. Separación del extracto etanólico**

**c. Evaluación de la actividad antioxidante**

En el extracto etanólico y sus fracciones se determinó la actividad antioxidante a las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , por el método de neutralización del radical libre DPPH según el procedimiento descrito en 2.2.3. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Rendimiento y actividad antioxidante de las fracciones del extracto etanólico

Extracto Etanólico y sus Fracciones	Rendimiento		Actividad Antioxidante	
	Porcentaje	Peso (g)	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
Etanólico	100	142	39,25	94,10
PE01	0,02	0,03	60,84	96,29
PE02A	34,70	49,28	15,76	68,84
PE02B	2,08	2,96	23,48	93,11
PE03	24,60	34,93	9,62	43,90
PEE1A	0,38	0,54	0,00	15,99
PEE1B	0,53	0,75	8,66	41,33
PEE2	3,04	4,32	4,11	20,75
PEA1	6,97	9,91	90,36	96,24
PEA2	27,66	39,28	15,99	38,45

El resultado de la actividad antioxidante indicó a PEA1 (90,36 % a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) como promisorio para obtener este tipo de compuestos.

**d. Análisis por HPLC**

Para el análisis, se utilizó un equipo HPLC-UV Hewlett Packard HP serie 1100, con detector ultravioleta y arreglo de diodos; columna (150 x 4,6 mm; 3  $\mu\text{m}$ -tamaño de partícula) Supercosil ABZ-Plus RP18. El sistema de gradiente de elución fue:

0 min: 10 % acetonitrilo, 90 % de HCOOH 2 %, y a 36 min 100 % acetonitrilo.

La velocidad de flujo: 1 mL/min, temp 30 °C.

El extracto y las fracciones analizadas fueron disueltas en MeOH, filtradas y llevadas al equipo de HPLC-UV.

Los cromatogramas y espectros ultravioleta del extracto etanólico y las fracciones PEA1 y PEE2 se muestran en las Figs. 5, 6 y 7. Los cromatogramas de las otras fracciones se muestran en el anexo (Figs. 44, 45, 46, 47, 48 y 49).

En el cromatograma HPLC-UV (254 nm) del extracto etanólico (Fig. 5) se observaron 3 compuestos mayoritarios a tr 13,11; 18,36 y 23,37 min, cuyos espectros ultravioleta mostraron características diferentes y por tanto tipos diferentes de compuestos. Estos compuestos se distribuyeron en las diferentes fracciones según el análisis de los cromatogramas HPLC de cada uno de ellas, sin embargo dos de los compuestos mayoritarios del extracto etanólico (a tr 13,11 y tr 18,36 min) se encuentran en buena concentración en las fracciones PEA1 y PEE2 presentándose a un tr de 12,75 min (Fig. 6) y a tr 18,35 min (Fig. 7) respectivamente; tal como se muestra en la Tabla 10.

*e. Separación de metabolitos secundarios con actividad antioxidante*

Para la separación de metabolitos secundarios de las fracciones se tuvo como criterio en orden de importancia:

- El resultado de la evaluación de la actividad antioxidante,
- La separación de compuestos mayoritarios del extracto etanólico según el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.

Tabla 10 : Compuestos mayoritarios según HPLC-UV:254 de las fracciones del extracto etanólico

N°	Fracción	tr de compuestos en min y (área)
1	PEO1	<u>23,36</u> (1094,6)
2	PEO2A	<u>18,35</u> (474); <u>23,36</u> (627); <u>26,21</u> (206); <u>26,40</u> (138)
3	PEO2B	<u>13,12</u> (293); <u>18,35</u> (528); <u>14,32</u> (117); <u>22,32</u> (116); <u>23,37</u> (43)
4	PEO3	18,27 (25); <u>23,37</u> (176); <u>26,22</u> (105); <u>26,41</u> (196); <u>38,42</u> (92,7)
5	PEE1A	<u>18,38</u> (13); <u>23,35</u> (33); <u>26,22</u> (36); <u>26,41</u> (62); <u>26,6</u> (90)
6	PEE1B	<u>18,35</u> (88); <u>23,38</u> (45,2); <u>26,22</u> (16); <u>26,41</u> (20)
7	PEE2	<u>13,17</u> (35); <u>18,35</u> (940)
8	PEA1	7,93 (537); <u>12,75</u> (16913); 14,88 (93); <u>18,35</u> (707)
9	PEA2	<u>2,41</u> (140); <u>9,05</u> (27,57); <u>9,62</u> (92,4); <u>13,33</u> (635,8); 18,28 (18,3)

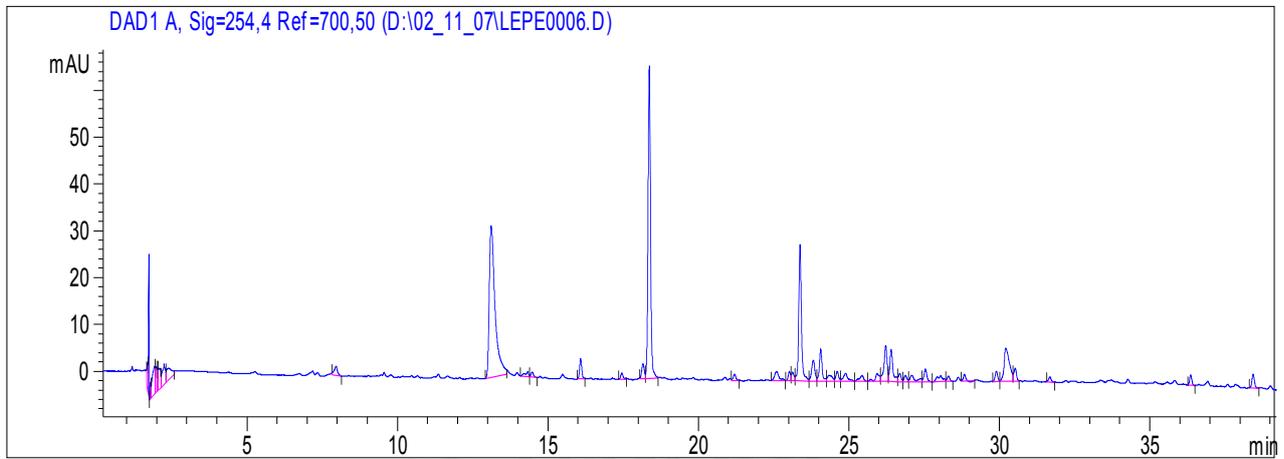
— Compuestos mayoritarios de las fracciones

— Compuestos mayoritarios del extracto etanólico

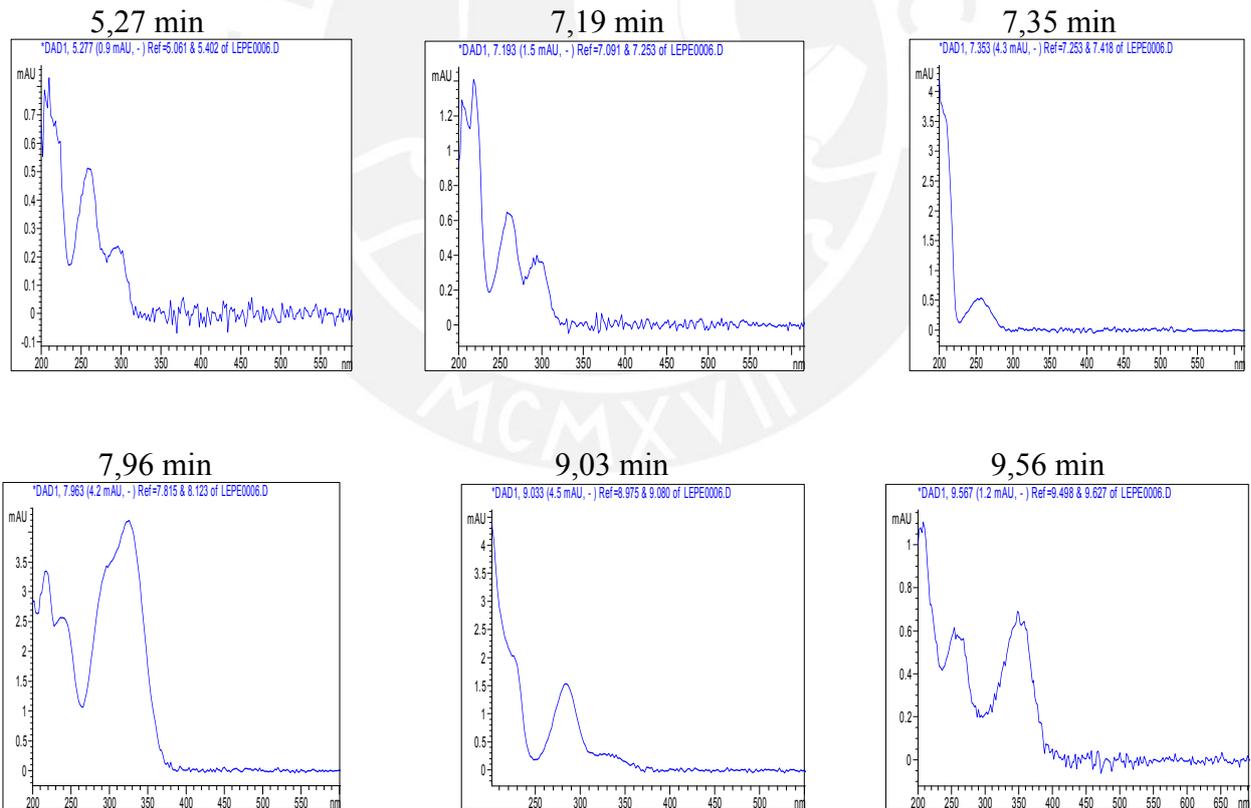
### *e.1 De la fase orgánica (diclorometano)*

Después de la partición del extracto etanólico (Fig. 4) y durante la concentración de la fase de diclorometano se observó la precipitación de un sólido, el que fue separado por filtración y pesado. Se obtuvo 30 mg de un sólido de aspecto cristalino, denominado PEO1, soluble en diclorometano y metanol.

a.- Cromatograma HPLC



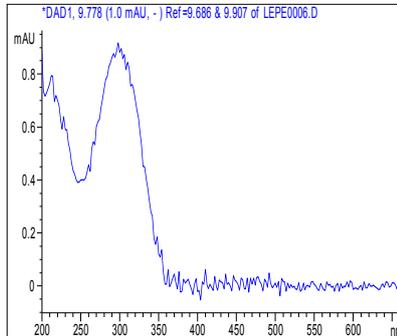
b.- Espectros ultravioleta de los compuestos



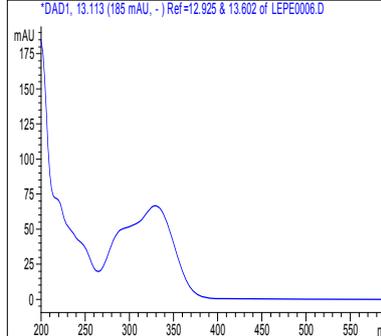
**Fig. 5. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta del extracto etanólico**

Continuación...

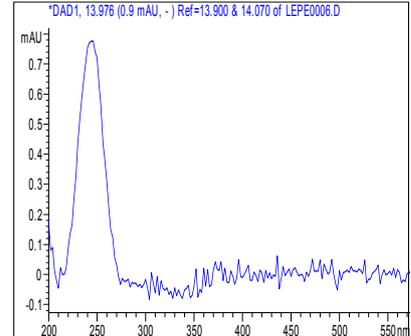
9,77 min



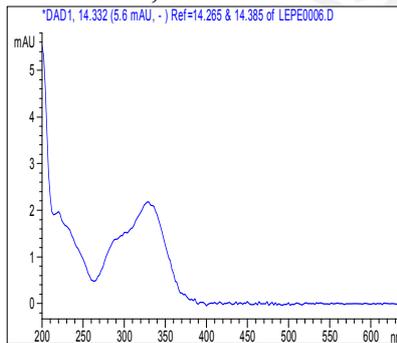
13,11 min



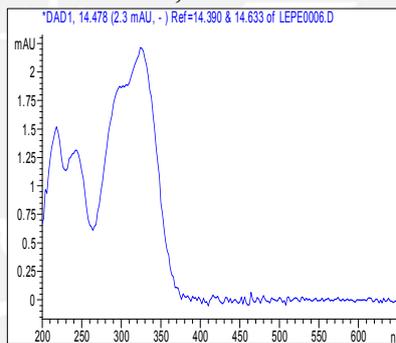
13,97 min



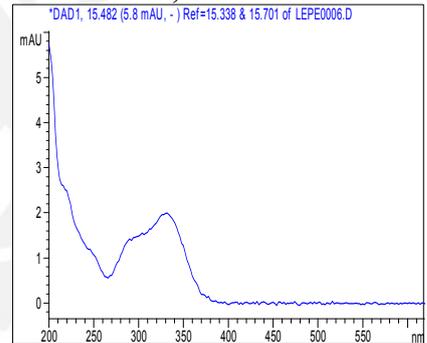
14,33 min



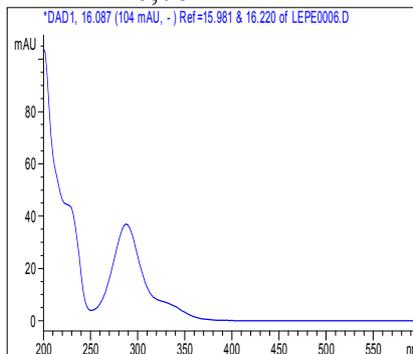
14,47 min



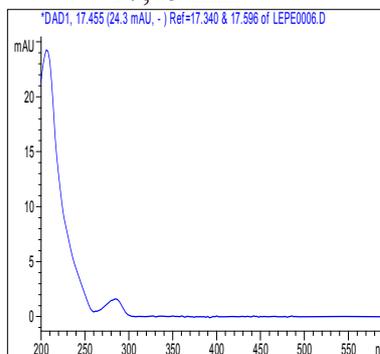
15,48 min



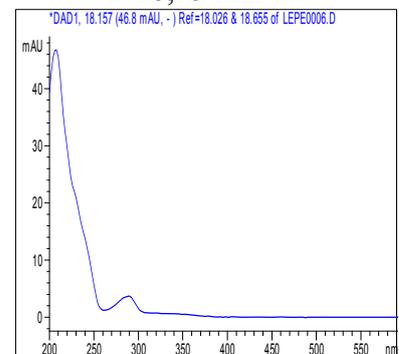
16,08 min



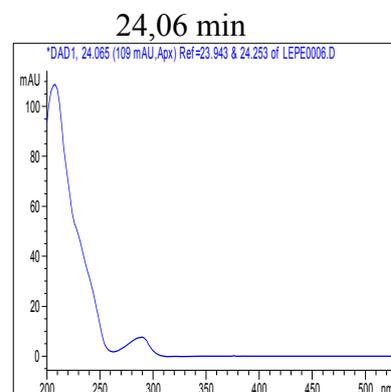
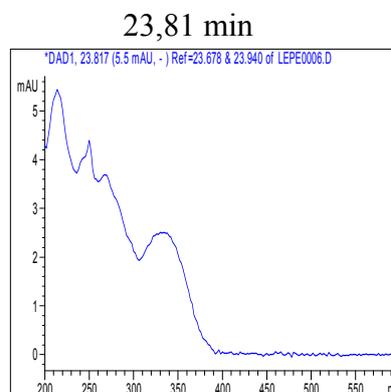
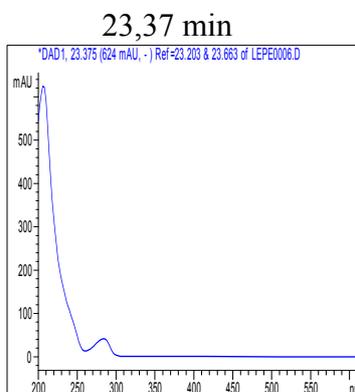
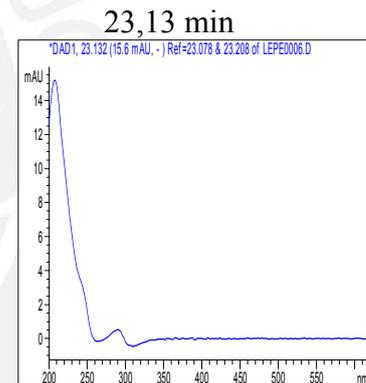
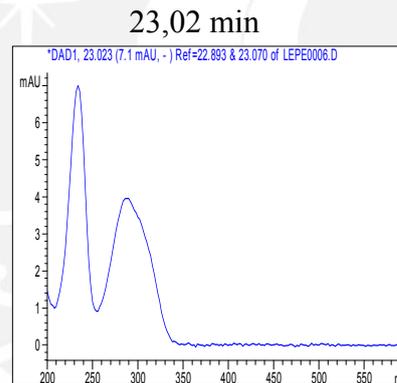
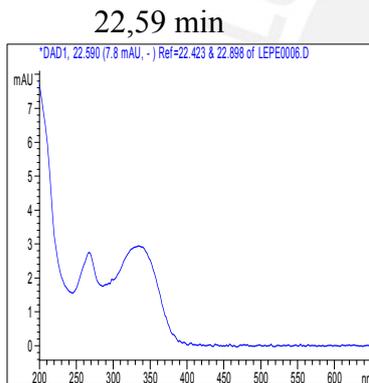
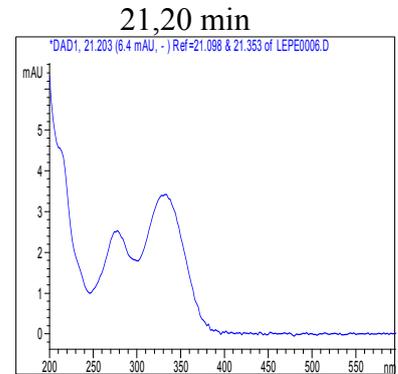
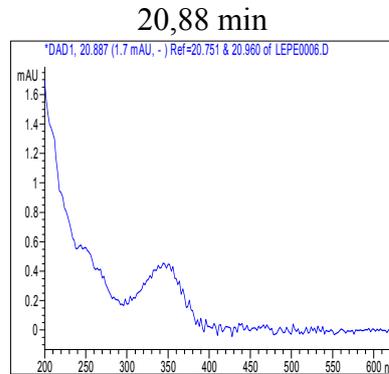
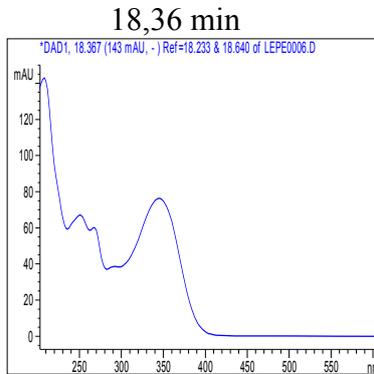
17,45 min



18,15 min

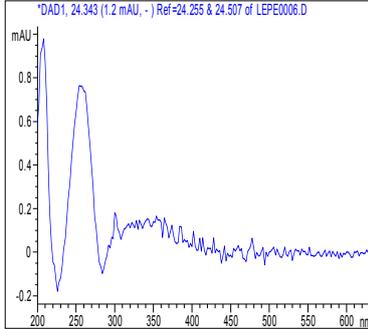


Continuación...

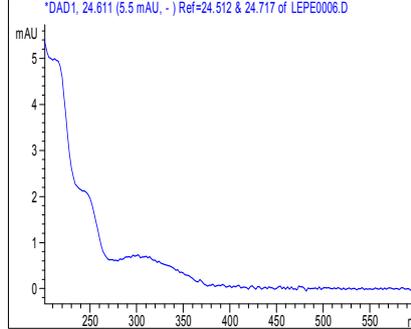


Continuación...

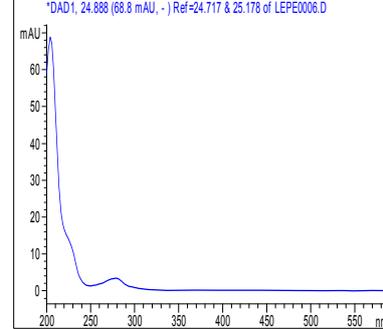
24,34 min



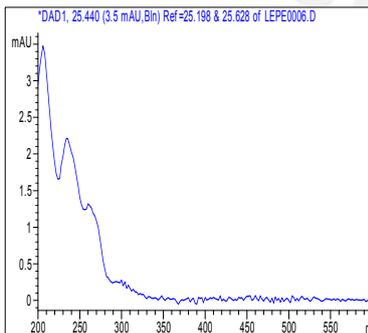
24,61 min



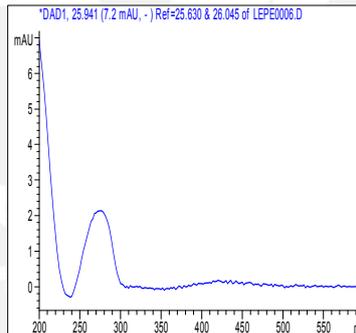
24,88 min



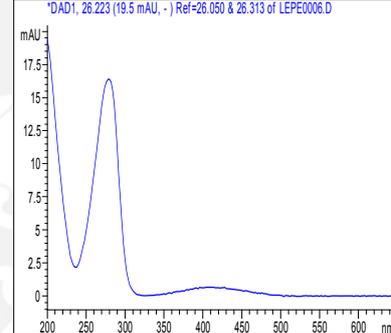
25,44 min



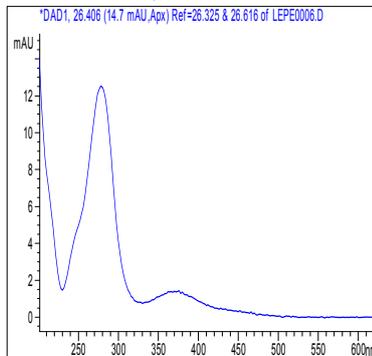
25,94 min



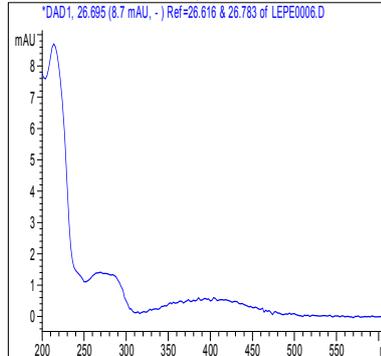
26,22 min



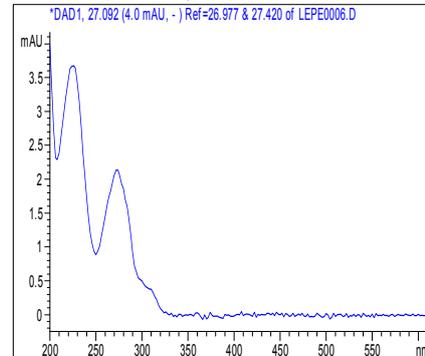
26,40 min



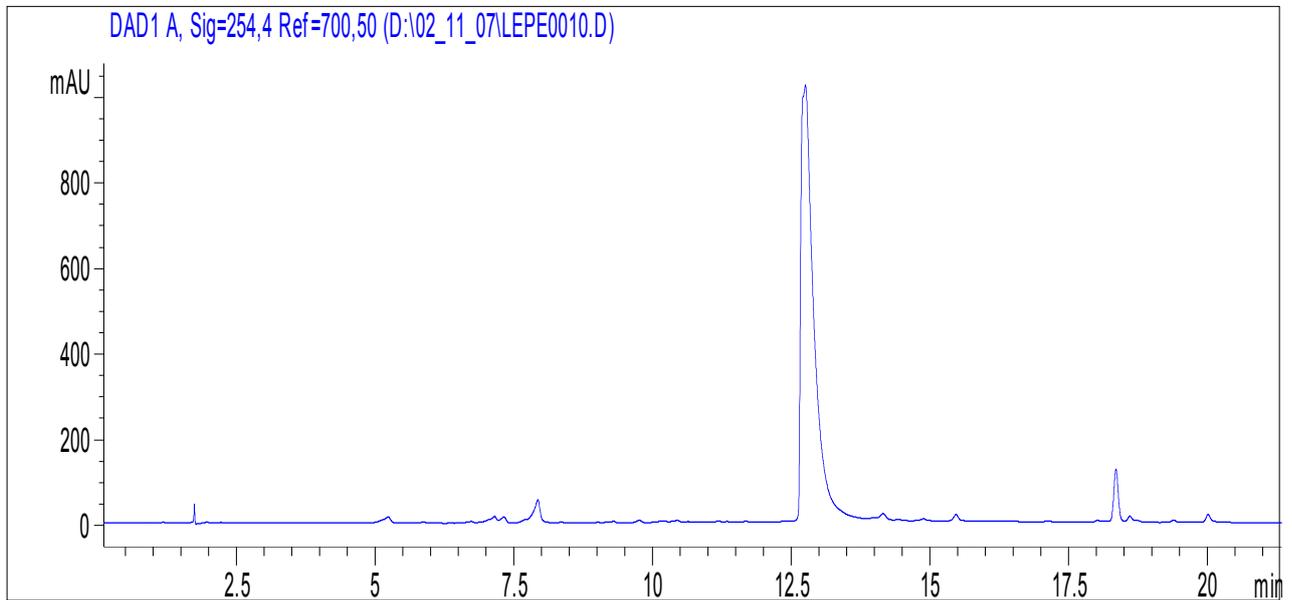
26,69 min



27,09 min



a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta de los compuestos

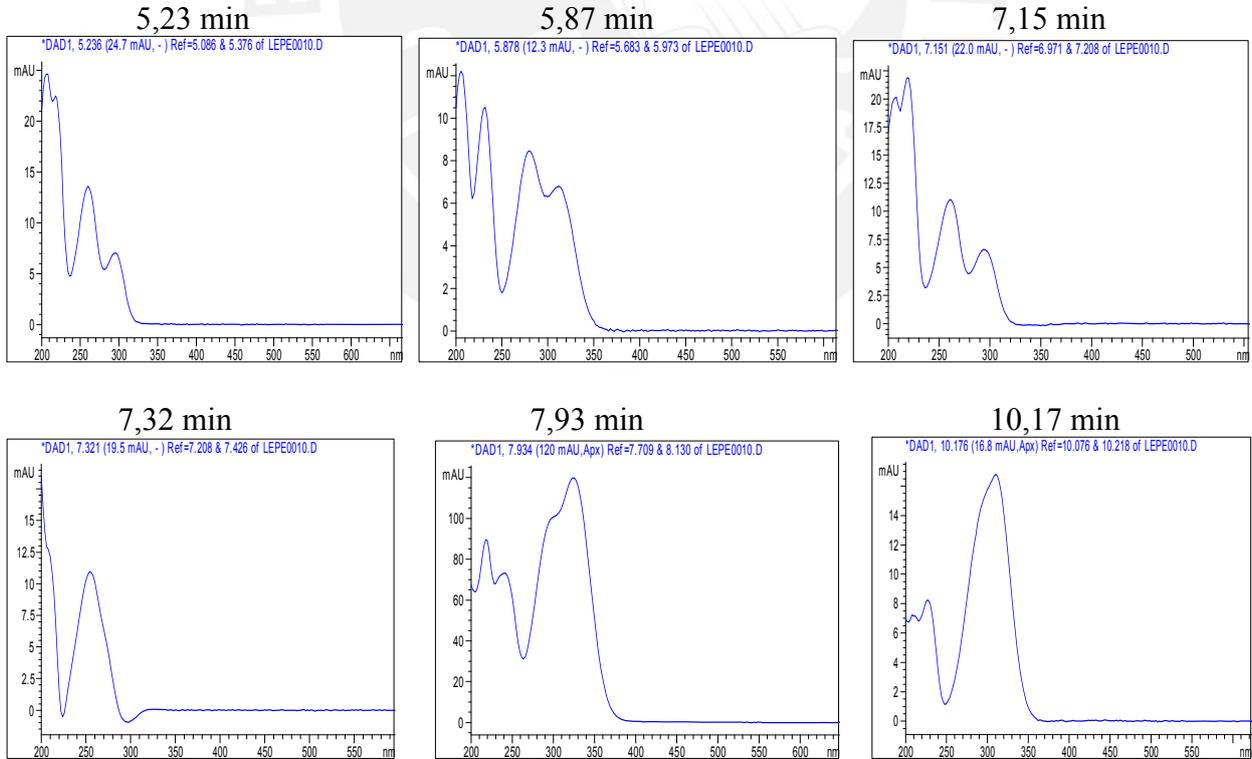
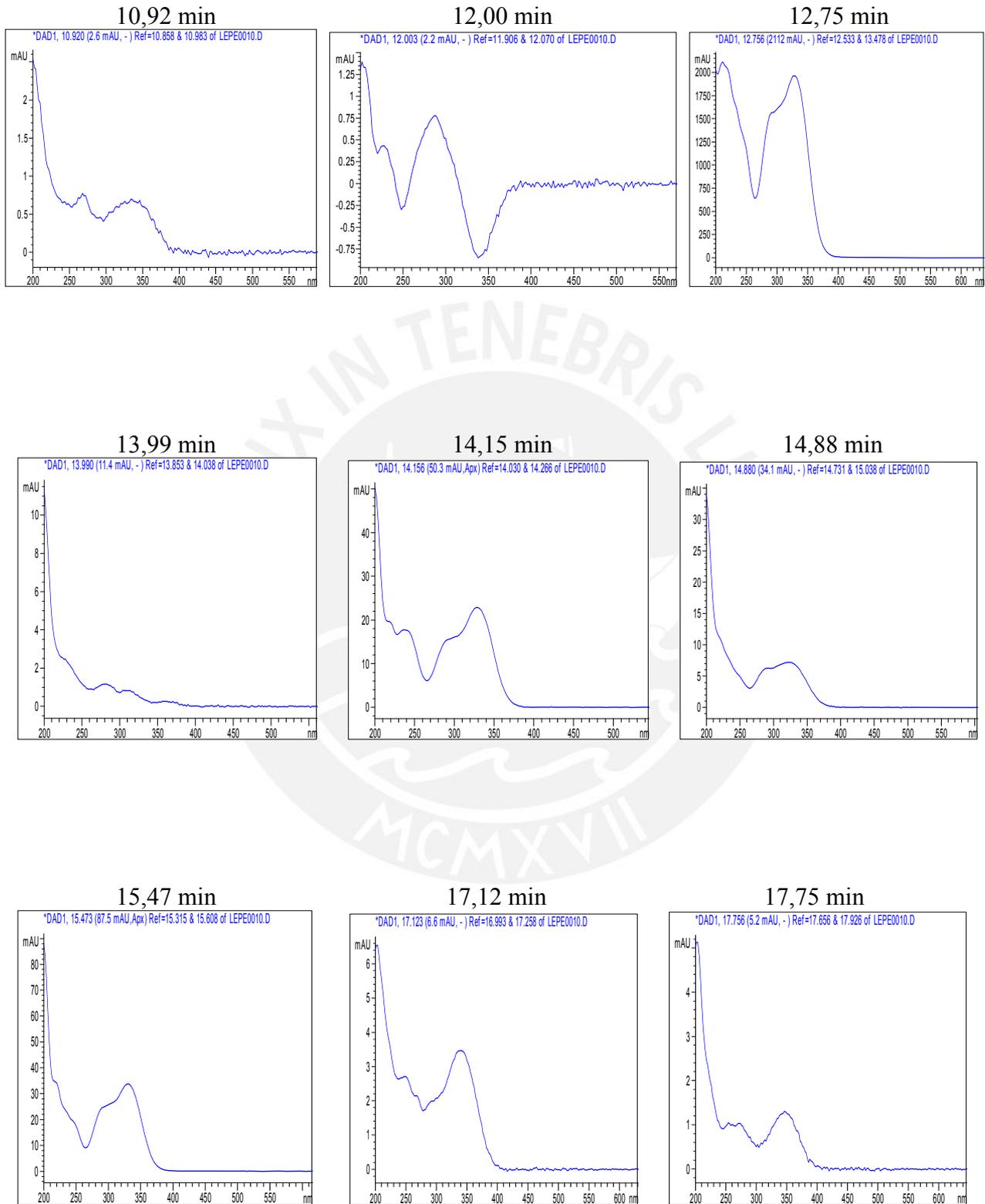
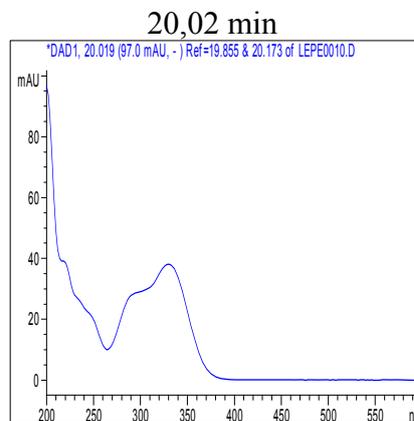
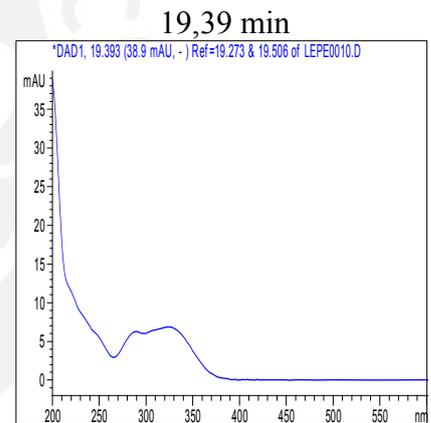
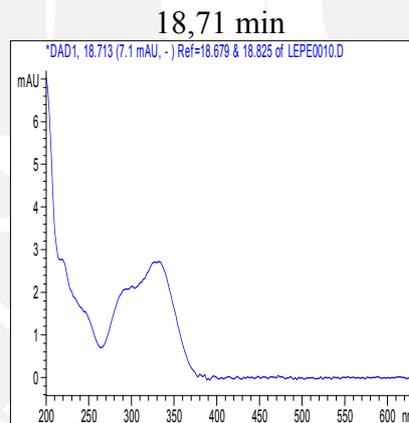
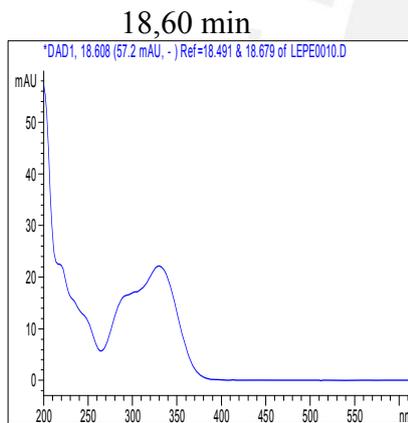
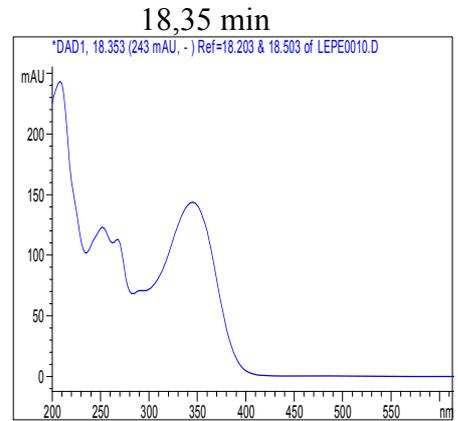
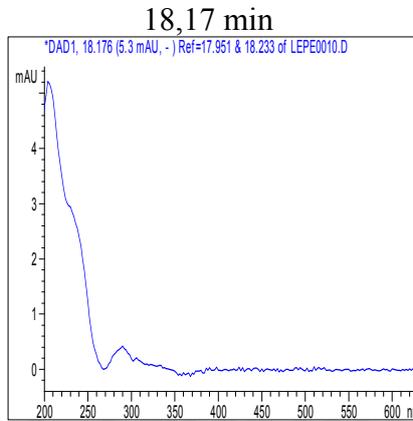
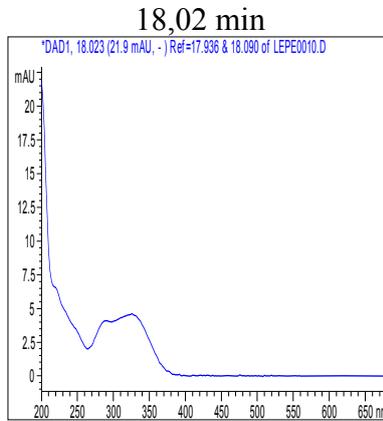


Fig. 6. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEA1

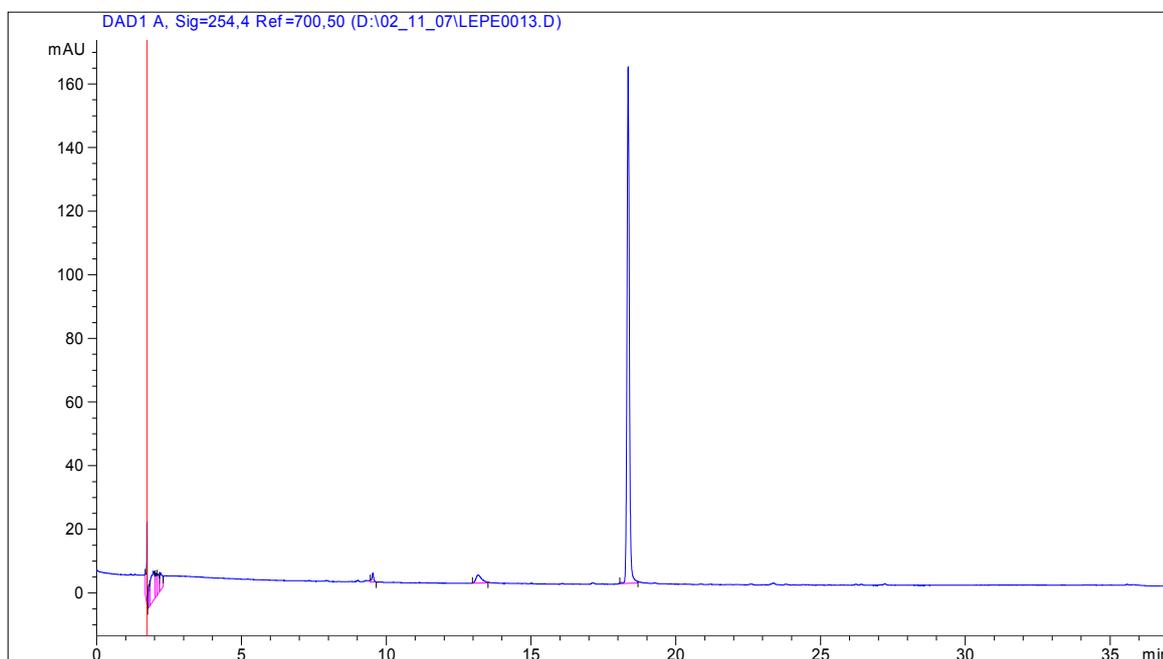
Continuación ...



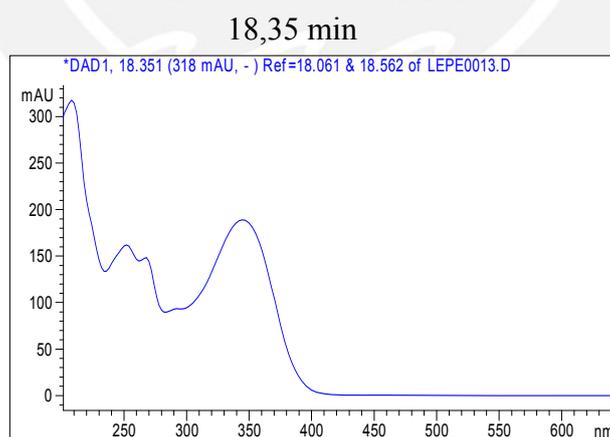
Continuación...



## a.- Cromatograma HPLC



## b.- Espectro ultravioleta

**Fig. 7. Cromatograma y espectro ultravioleta de PEE2**

*PEOI*, presentó buena actividad antioxidante (60,84 %) a 10  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 9) y fue uno de los compuestos mayoritarios del extracto etanólico (tr 23,37 min) según el cromatograma HPLC (Fig. 5).

*PEOI*, fue lavado con hexano y benceno, analizado por cromatografía en capa fina (CCD) y por HPLC (Fig. 8). El punto de fusión fue de 211-213  $^{\circ}\text{C}$  determinado en un equipo electrónico Buchi 537. Se determinó el espectro infrarrojo (Nicolet-USA, modelo Impact 410) así como el espectro de masas (ZAB-EQ, micromass-Manchester, United Kingdom) (Figs. 9, 10, 11, 12).

#### *e.2 De la emulsión*

Durante la partición del extracto etanólico se formó un volumen considerable de emulsión (Fig. 4), la que fue tratada con 2 volúmenes de diclorometano, separándose una suspensión de aspecto lechoso. Esta fase se concentró a presión y temperatura reducida hasta 1/3 de su volumen observándose la formación de un precipitado que se separa por filtración. Se obtuvo 4 g de un sólido de color amarillo verdoso soluble en diclorometano y etanol, el que se denominó PEE2.

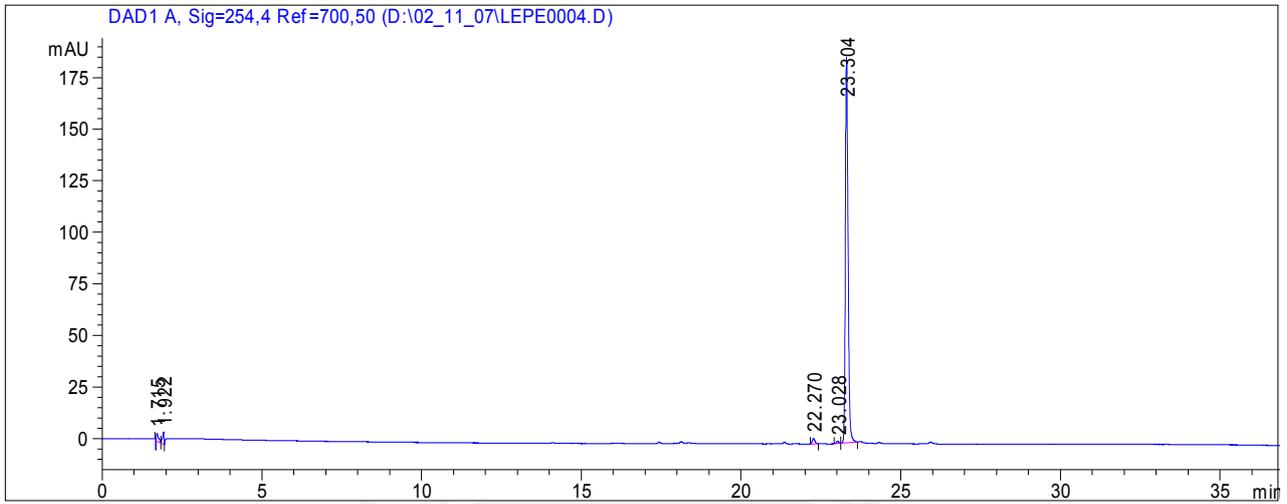
Por CCD en el sistema  $\text{CHCl}_3\text{-Tol-MeOH}$  8:1:1 y revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 25 % se observaron dos compuestos mayoritarios a  $R_f$  de 0,43 y 0,58. En el análisis por HPLC de PEE2 (Fig. 7) se observó un compuesto de mayor abundancia a 254 nm con un tiempo de retención de 18,38 min, constituyendo uno de los compuestos mayoritarios del extracto etanólico, analizado por HPLC. El análisis de

actividad antioxidante de PEE2 dio 4,11 % de actividad a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 9).

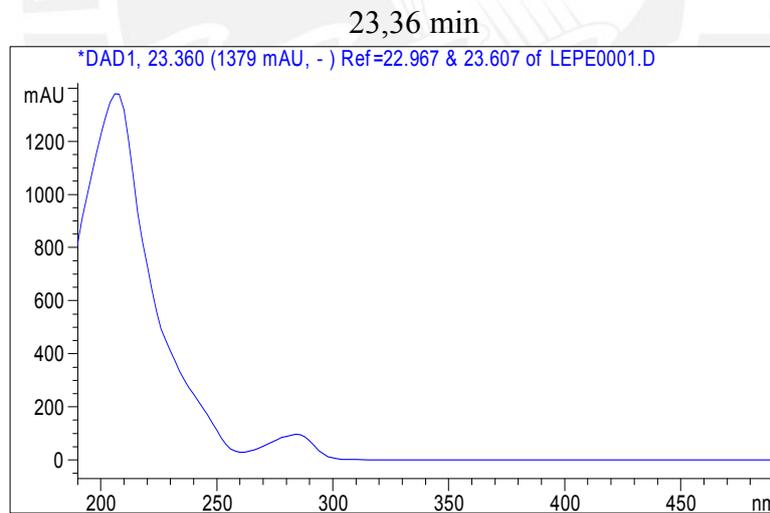
PEE2 (2 g) se sometió a separación cromatográfica tal como se observa en la Fig. 13; a partir de esta se logró separar 2 compuestos, PEE2-a (80 mg de sólido blanquecino) y PEE2-b (50 mg de cristales amarillos).

Se realizó el ensayo de actividad antioxidante tanto en PEE2-a como en PEE2-b. PEE2-a, se presentó como un sólido blanco para el cual se determinó el punto de fusión, se realizaron los análisis por CCD y reacciones de coloración. Además se obtuvo su espectro infrarrojo y de masas (Figs 14, 15, 16). No presentó actividad antioxidante a 10 ni a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . PEE2-b, se presentó como un sólido cristalino amarillo, se determinaron su punto de fusión, CCD, HPLC-UV, espectros ultravioleta, RMN- $^1\text{H}$  (Bruker ultrashield 400) y de masas (Figs. 17, 18, 19, 20). Su actividad antioxidante fue de 1,33 % a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 12,53 % a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectro ultravioleta de PEO1



**Fig. 8. Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta de PEO1**

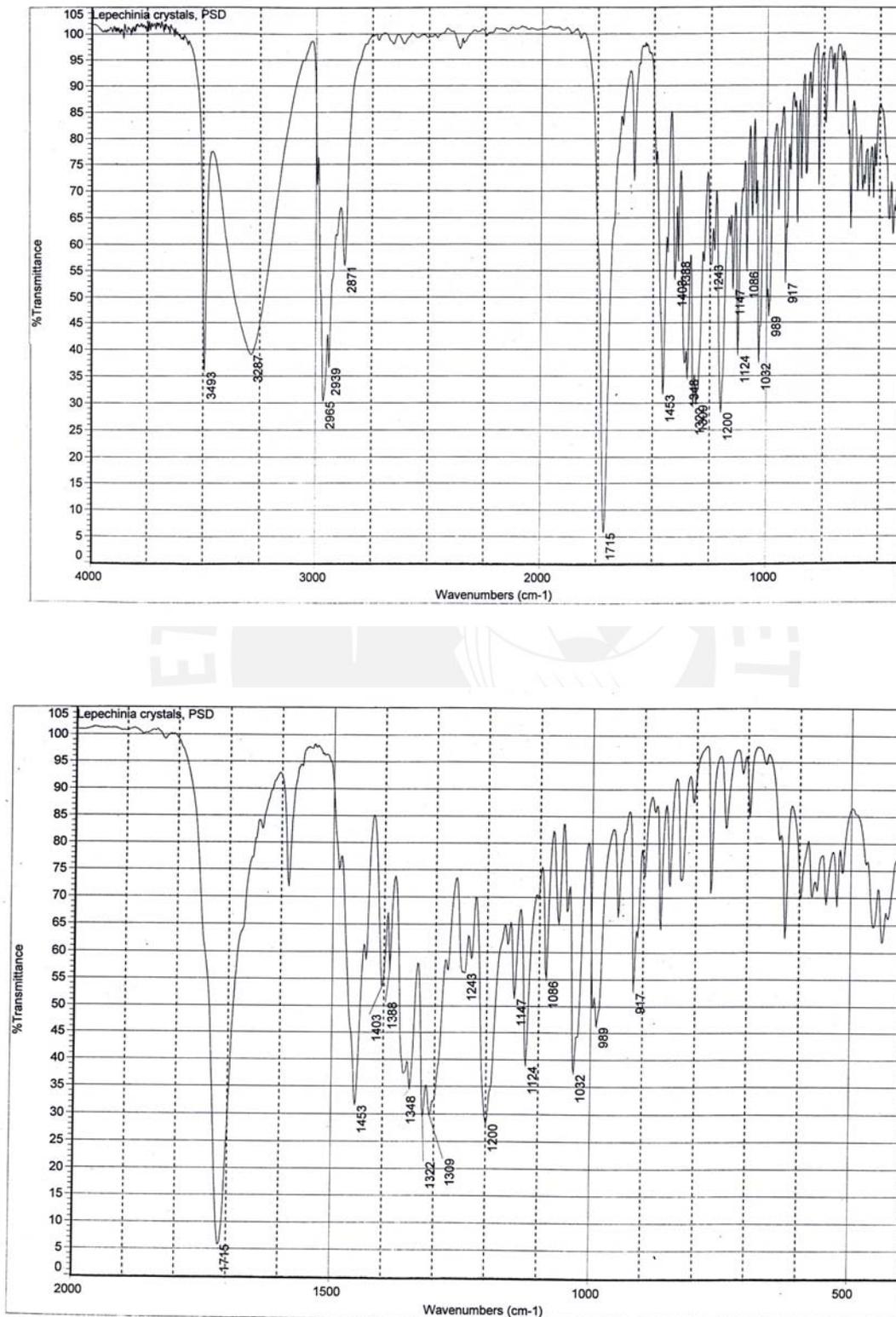


Fig. 9. Espectro infrarrojo de PEO1

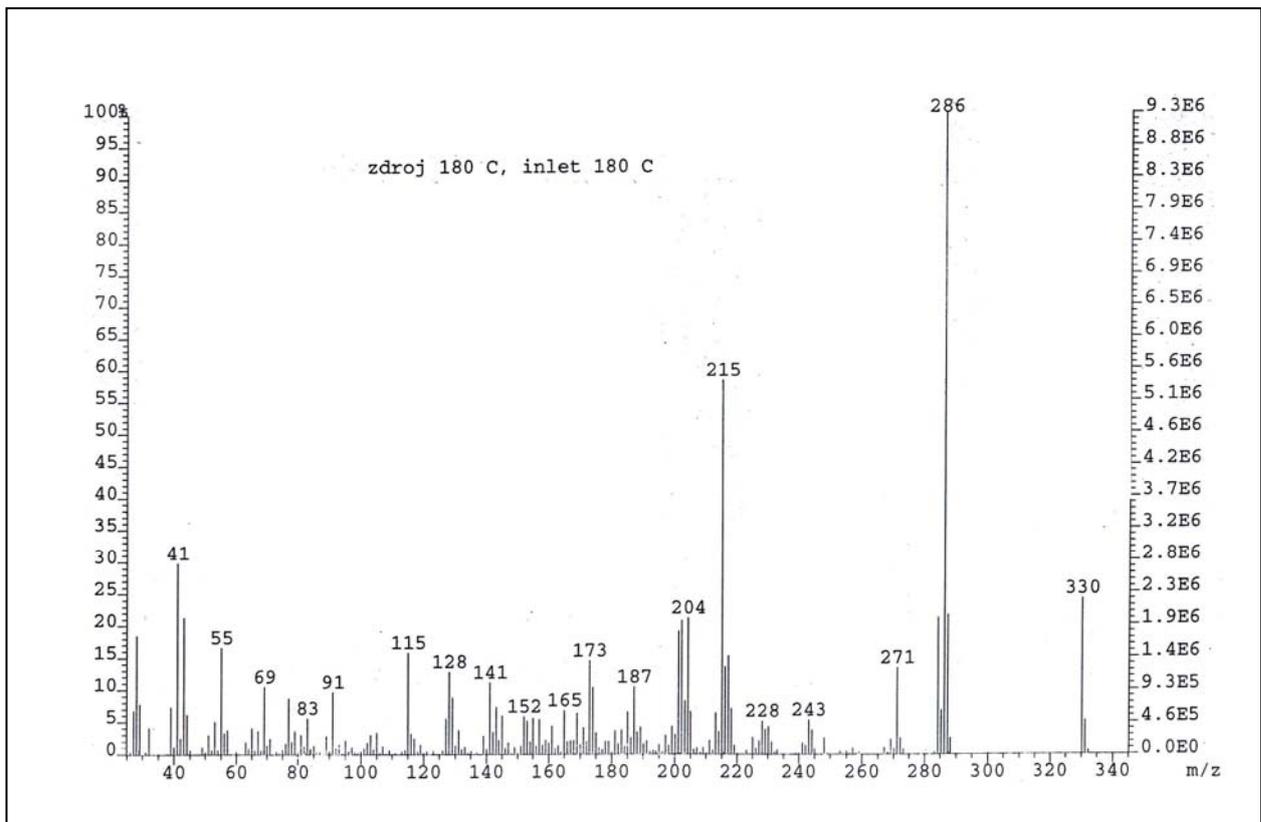
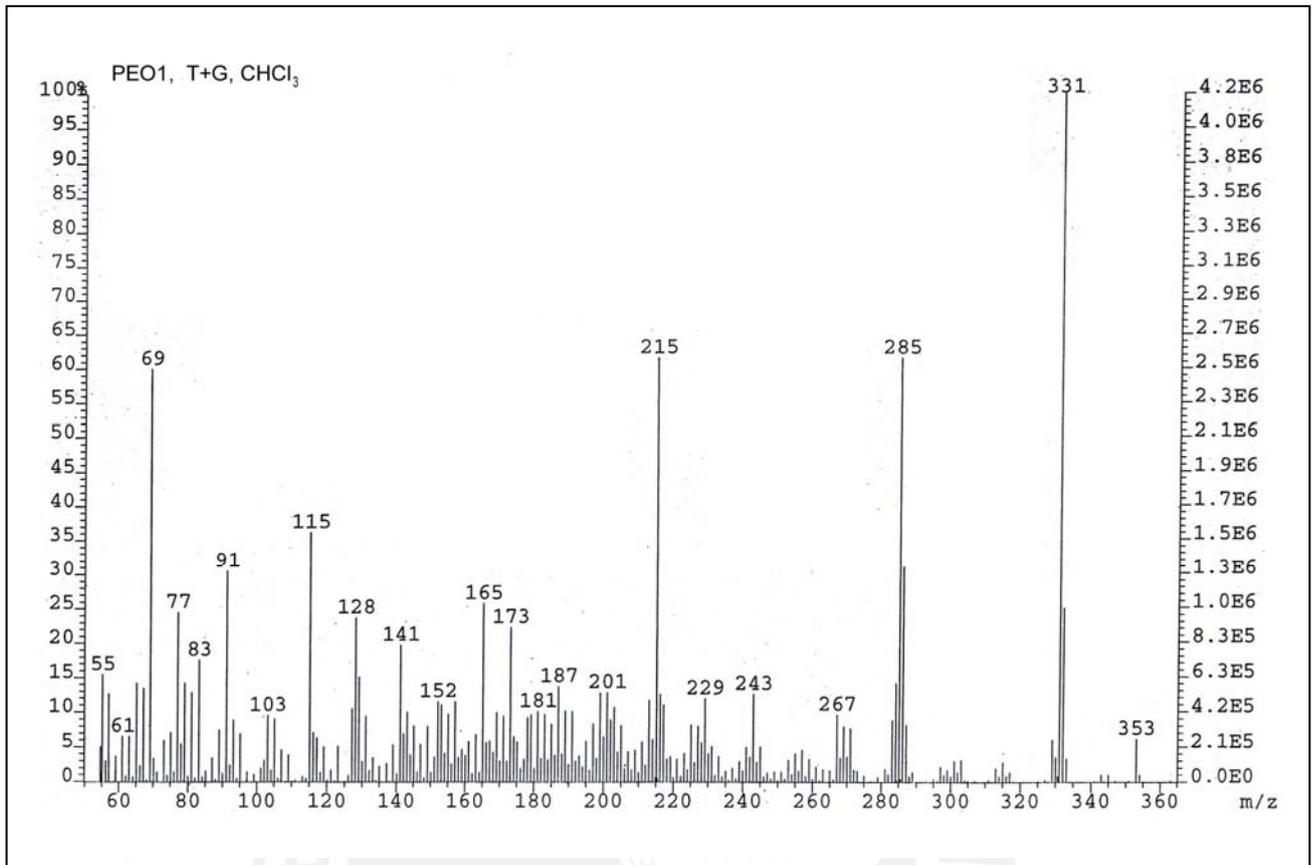


Fig. 10. Espectro de masas (EM-EI) de PEO1



**Elemental Composition**

File:L11PSDHR1 Ident:15\_21 Win 200PPM Acq:28-NOV-2002 14:49:37 +3:30  
 ZAB-SEQ EI+ Magnet BpM:286 BpI:4104777 TIC:43850124 Flags:ACC  
 File Text:PATRICIA PSD  
 Heteroatom Max: 20 Ion: Both Even and Odd  
 Limits:

201.000	12.0					-0.5	10	10	0	
332.000	100.0				10.0	20.0	24	36	4	
Mass	%RA	Pks	Std	PPM	mDa	Calc. Mass	DBE	C	H	O
330.182654	30.5	7	9.1	1.4	0.5	330.183110	8.0	20	26	4
287.195966	19.1	7	5.5	17.9	5.1	287.201105	6.5	19	27	2
286.192219	100.0	7	11.2	3.7	1.1	286.193280	7.0	19	26	2
284.177657	16.8	7	21.7	-0.1	0.0	284.177630	8.0	19	24	2
271.167238	12.6	7	15.5	9.5	2.6	271.169805	7.5	18	23	2
217.121121	14.8	7	11.2	8.0	1.7	217.122855	6.5	14	17	2
215.108663	46.2	7	12.1	-6.8	-1.5	215.107205	7.5	14	15	2
204.116848	19.3	7	16.1	-8.9	-1.8	204.115030	6.0	13	16	2
202.099287	19.8	7	14.3	0.5	0.1	202.099380	7.0	13	14	2
201.093481	16.0	7	14.3	-9.6	-1.9	201.091555	7.5	13	13	2

**Fig. 11. Espectro de masas (EM-FAB) de PEO1 (a) y su composición elemental (b)**

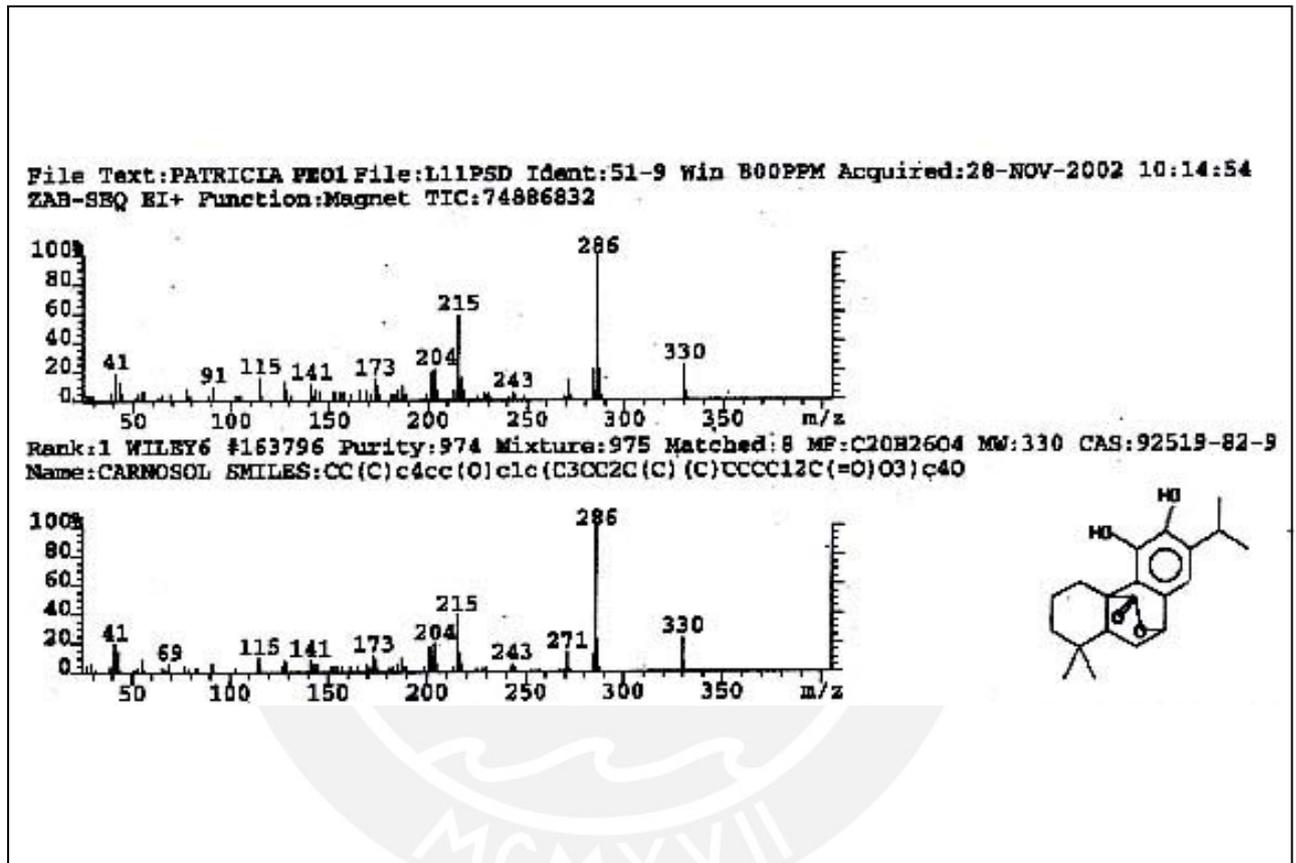
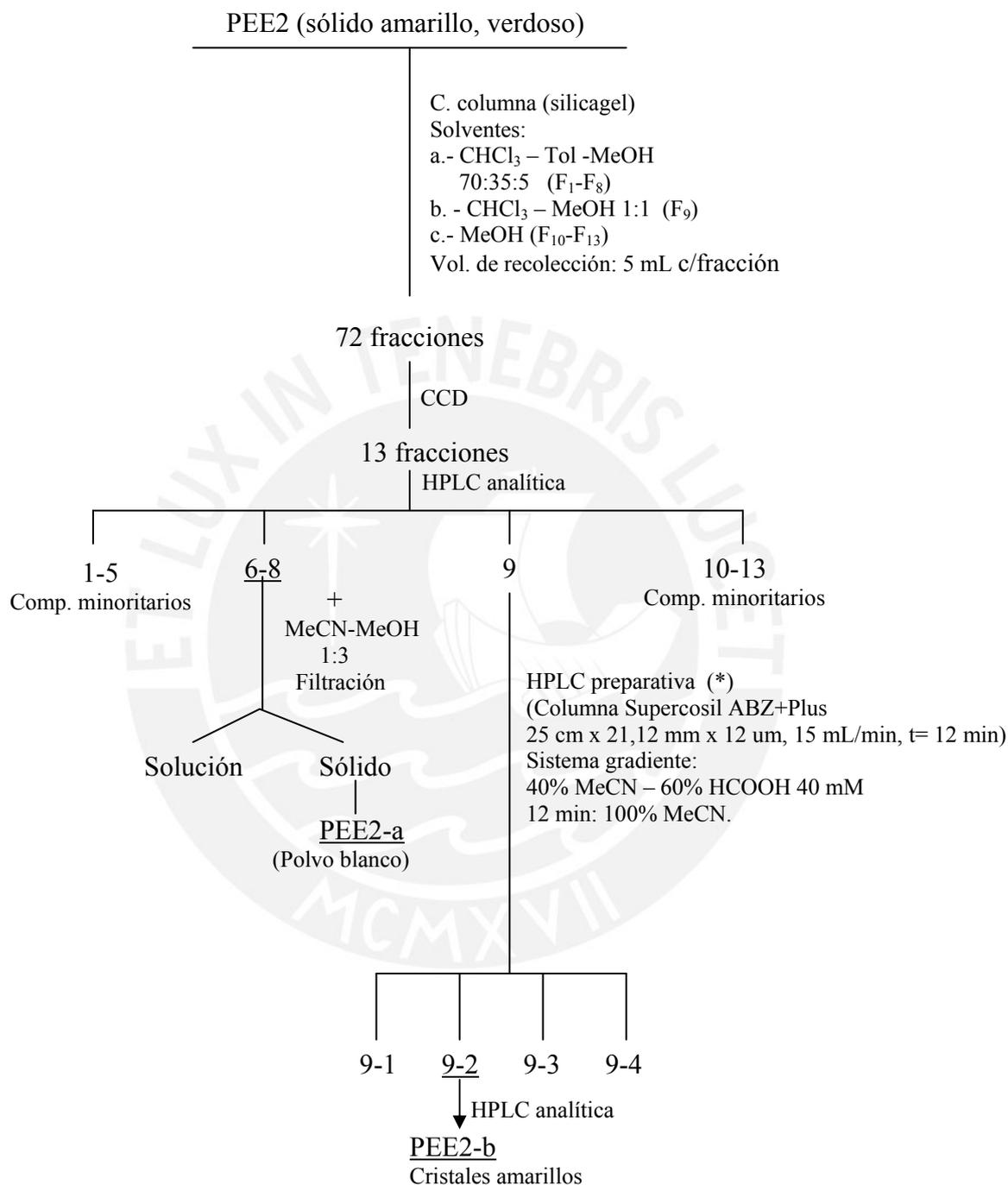


Fig. 12. Comparación del espectro de masas de PEO1 con carnosol



(\*) HPLC – Preparativa: Agilent (USA), Ecom. Prag.

**Fig. 13. Esquema de la separación de PEE2**

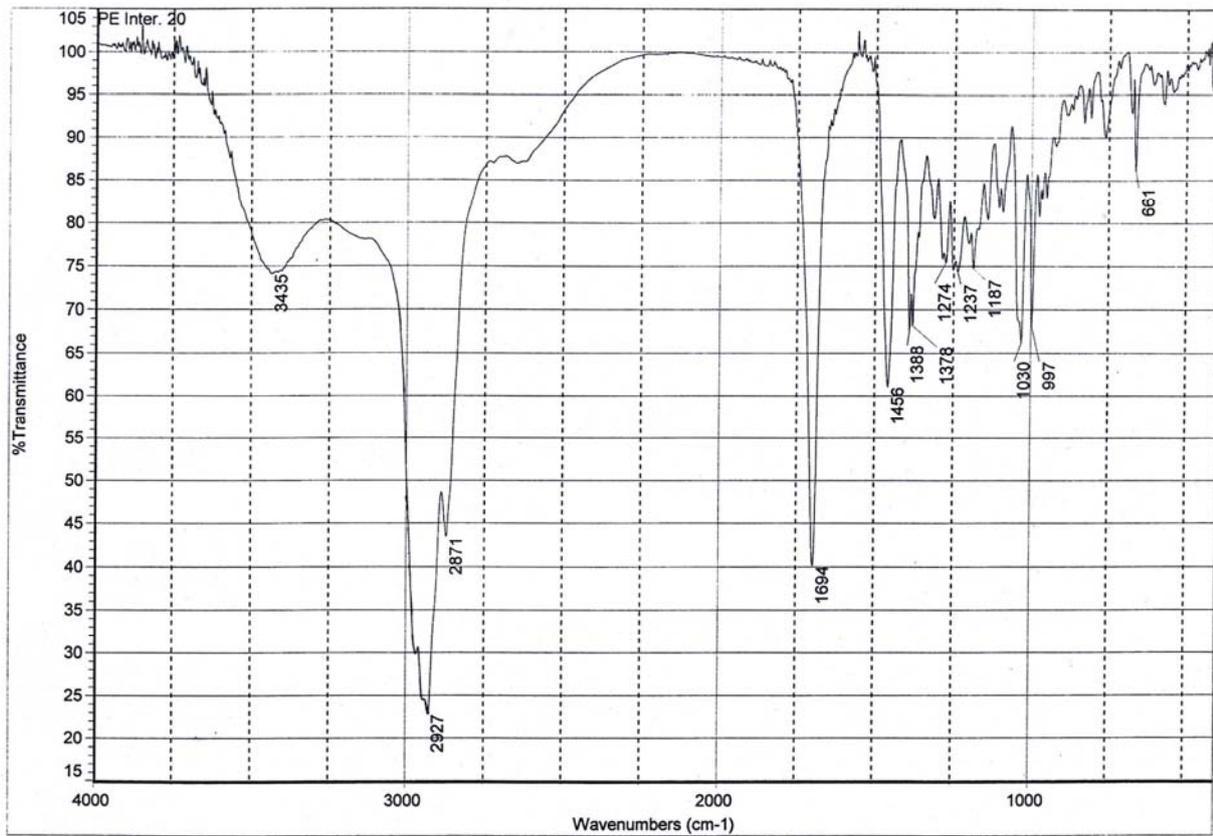


Fig. 14. Espectro infrarrojo de PEE2-a

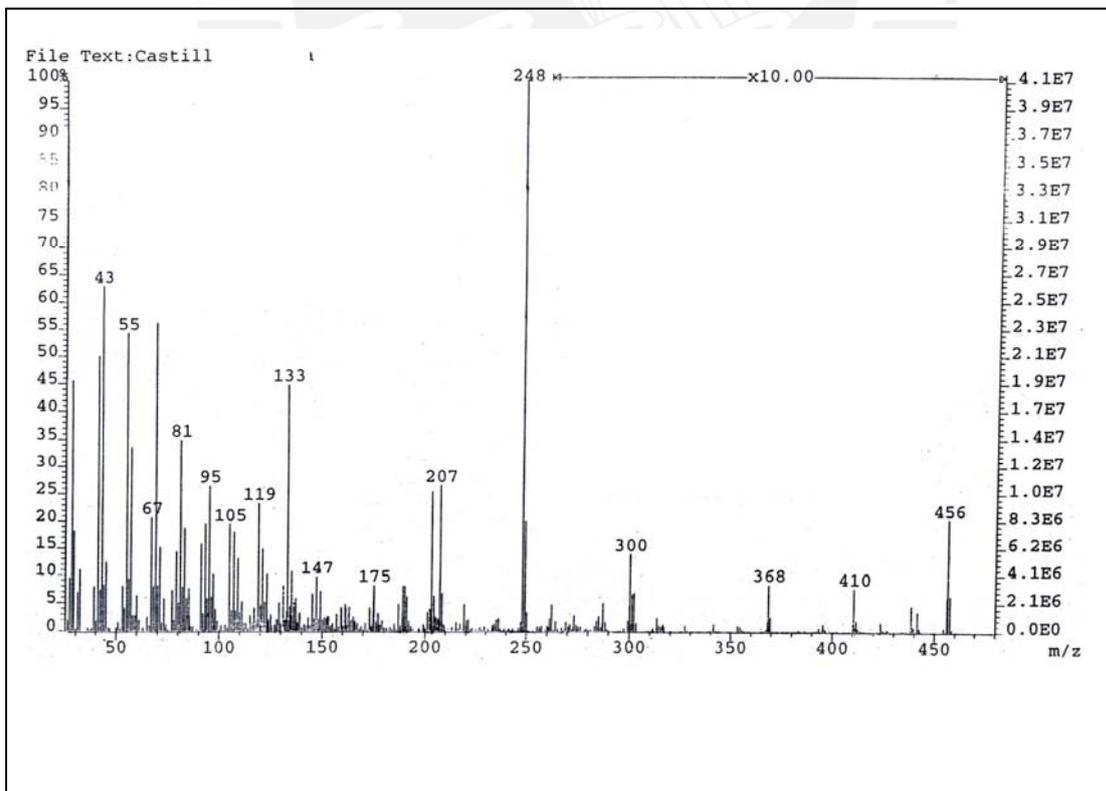
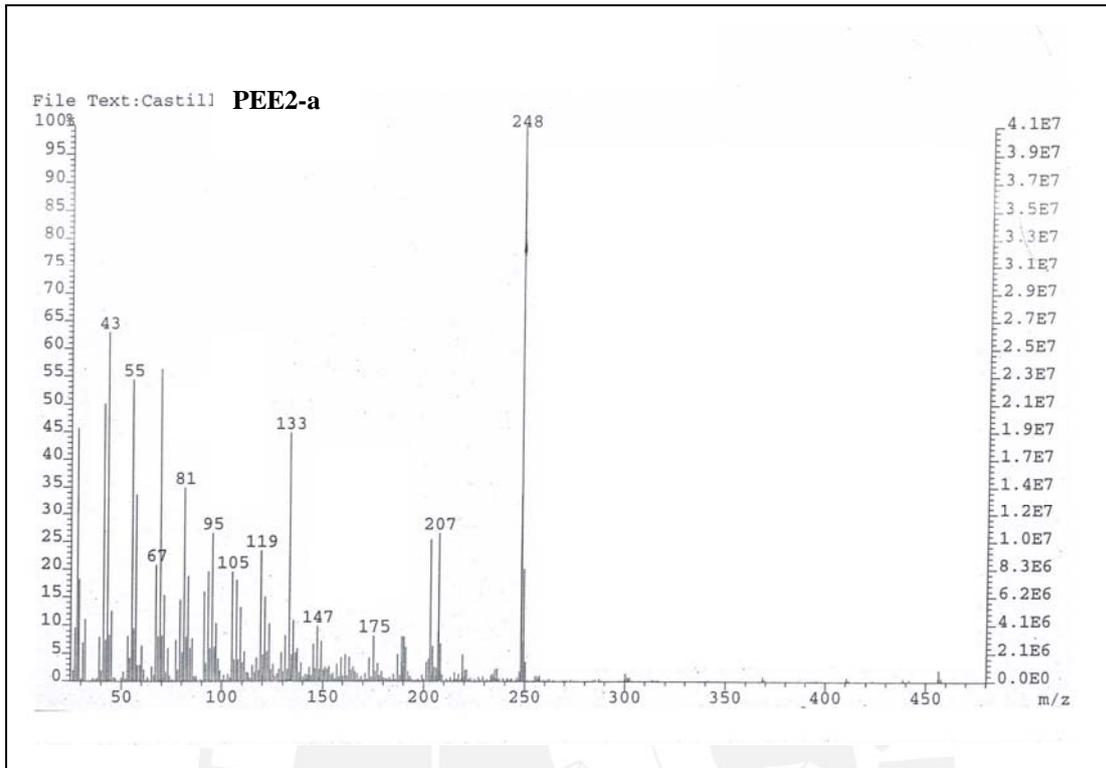
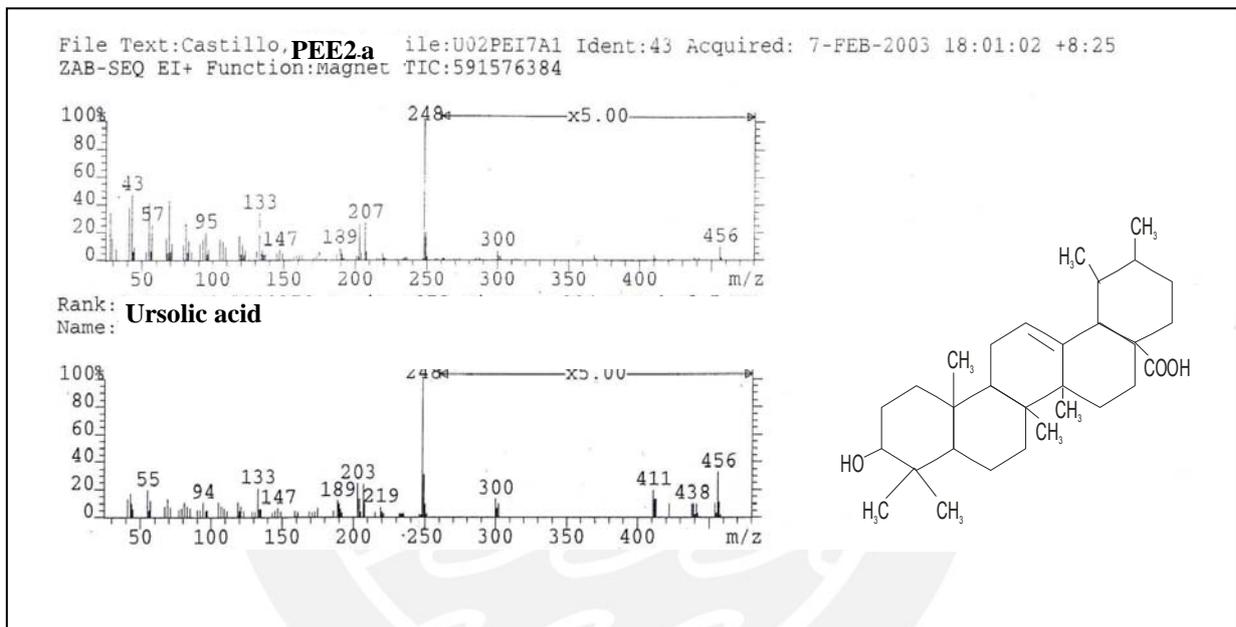
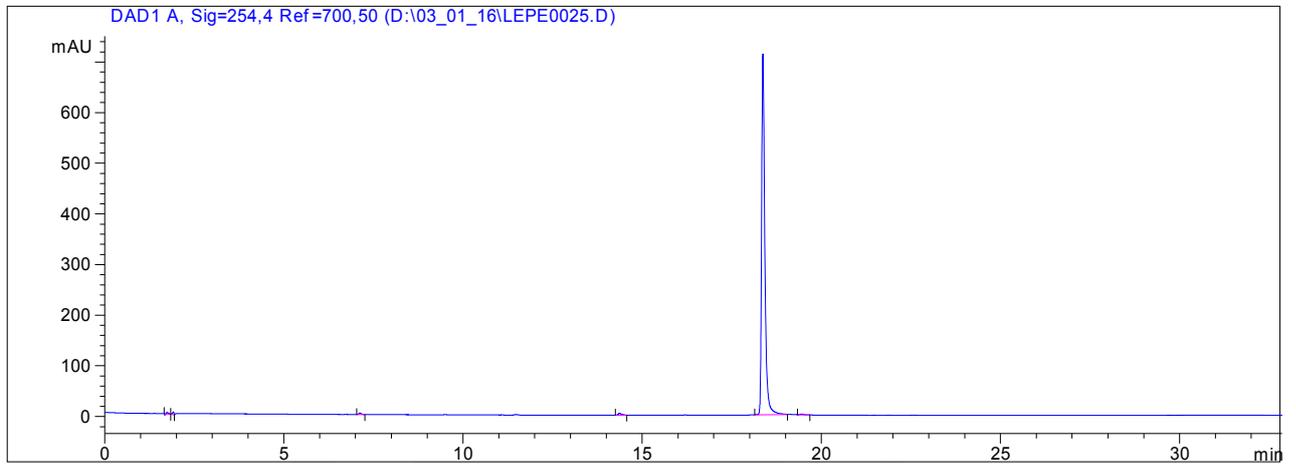


Fig. 15. Espectro de masas de PEE2-a



**Fig. 16. Comparación del espectro de masas de PEE2-a con ácido ursólico**

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectro ultravioleta

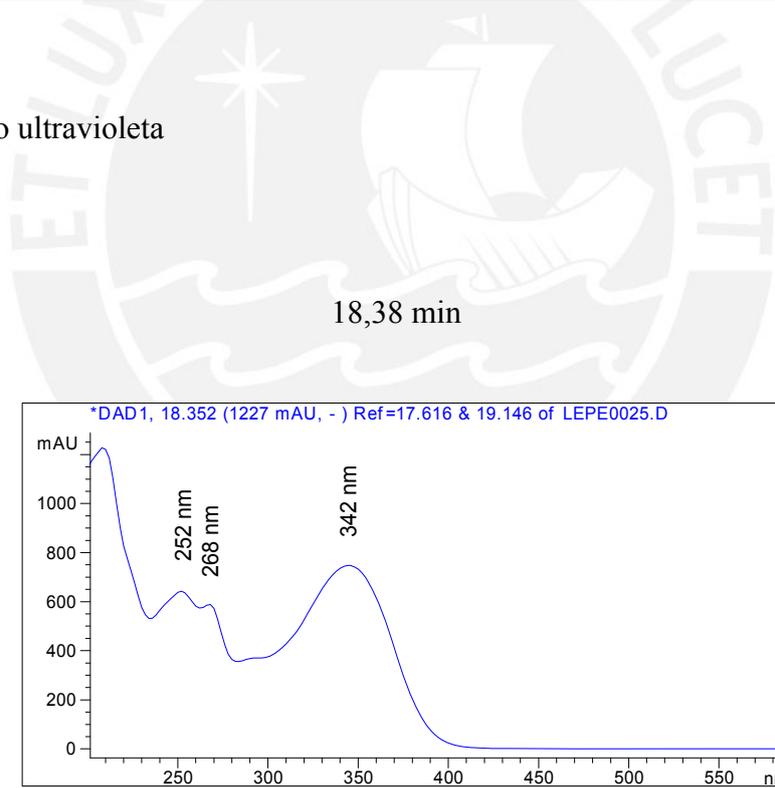
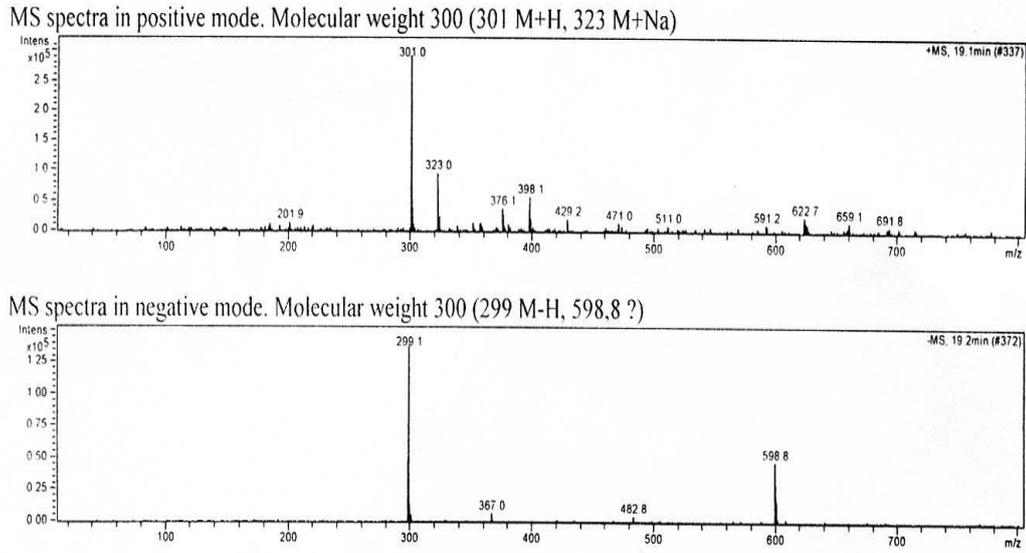


Fig. 17. Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta de PEE2-b

a.- Espectro de masas – electrospray (ESI)



b.- Espectro de masas – impacto de electrones (EI)

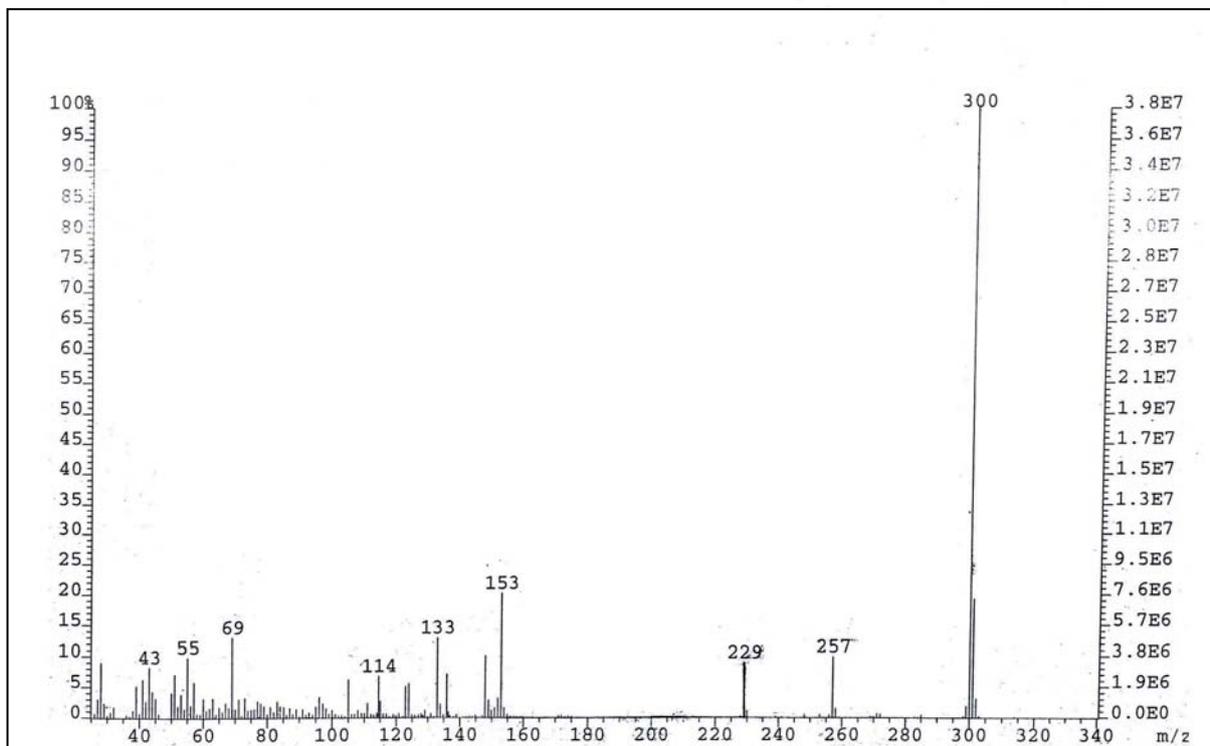


Fig. 18. Espectro de masas por ESI y por EI del compuesto PEE2-b

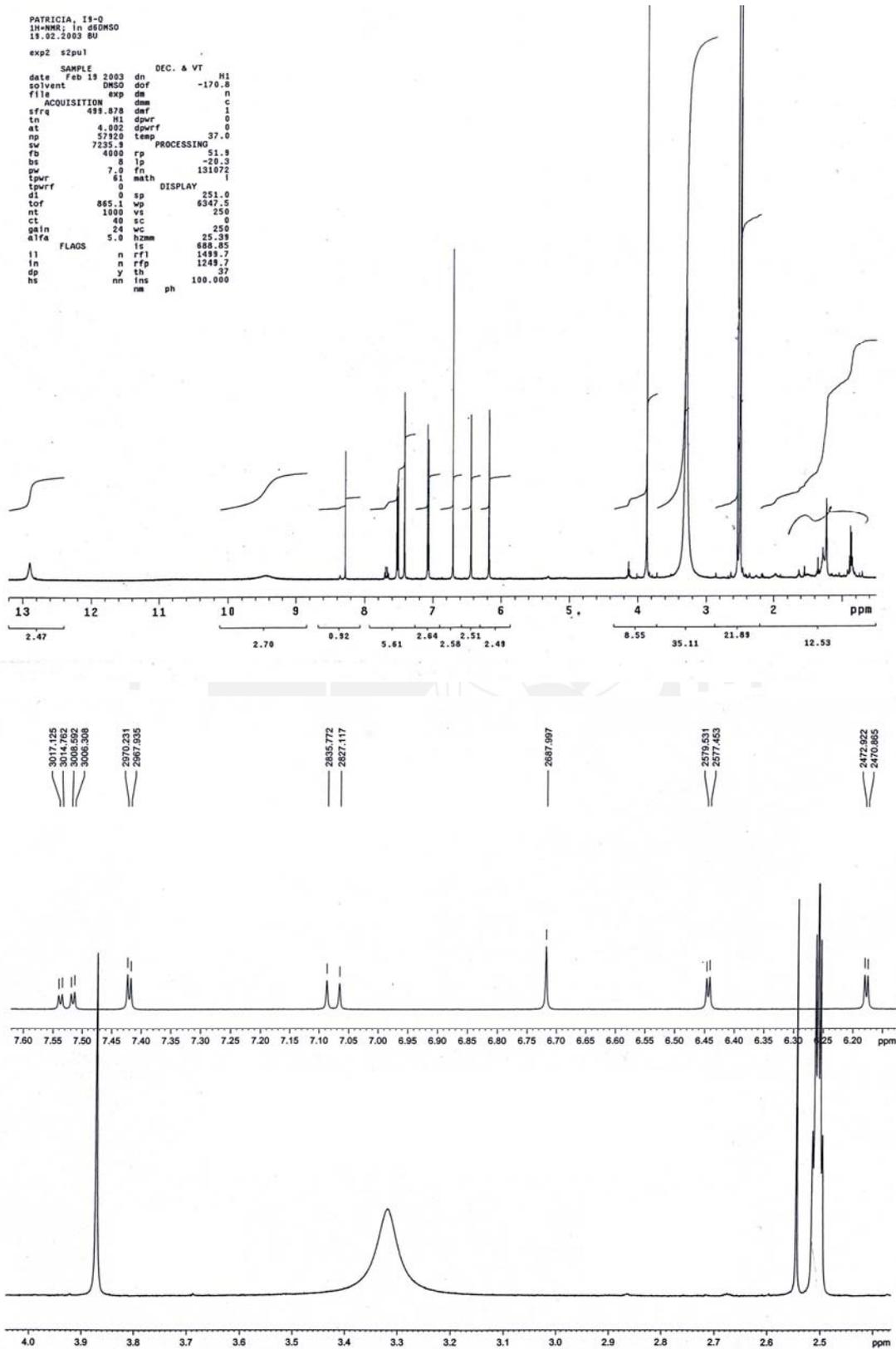


Fig. 19. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de PEE2-b

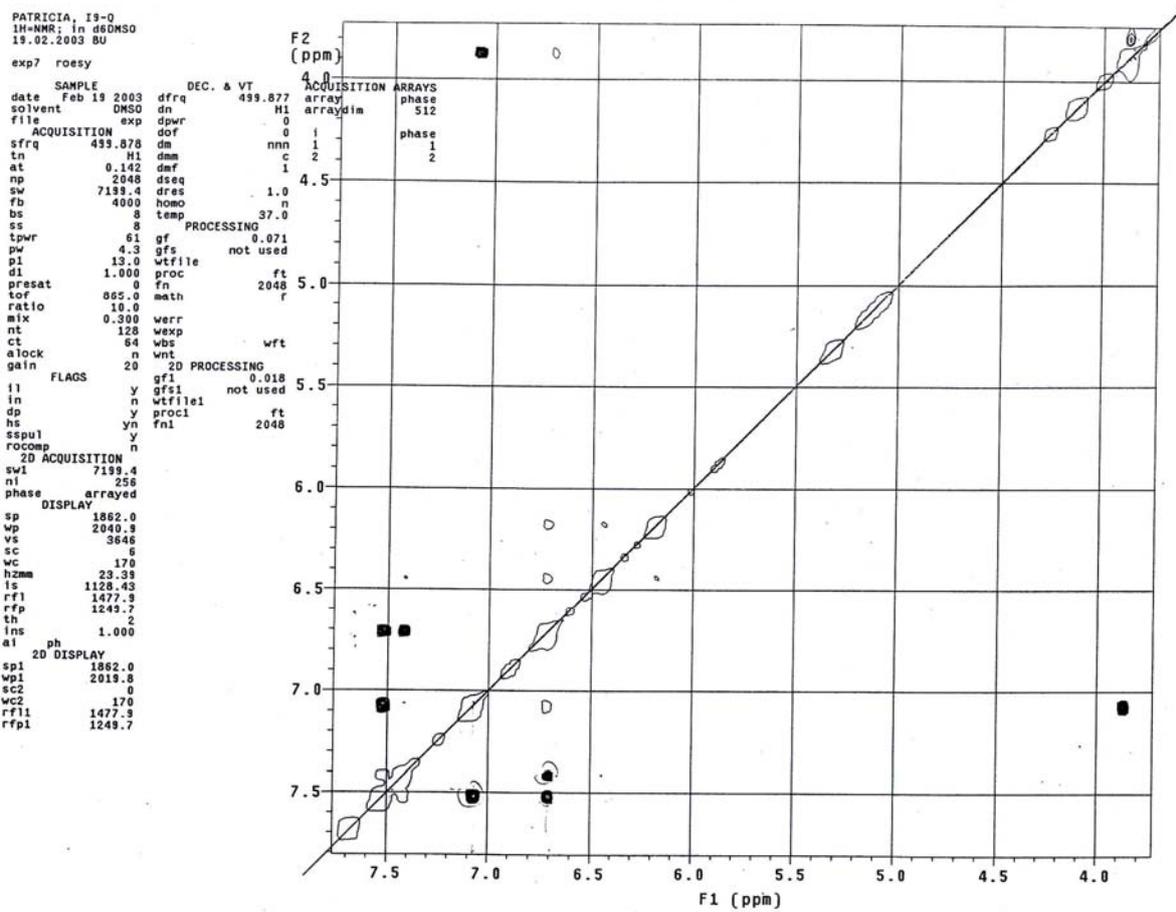


Fig. 20. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H bidimensional de PEE2-b

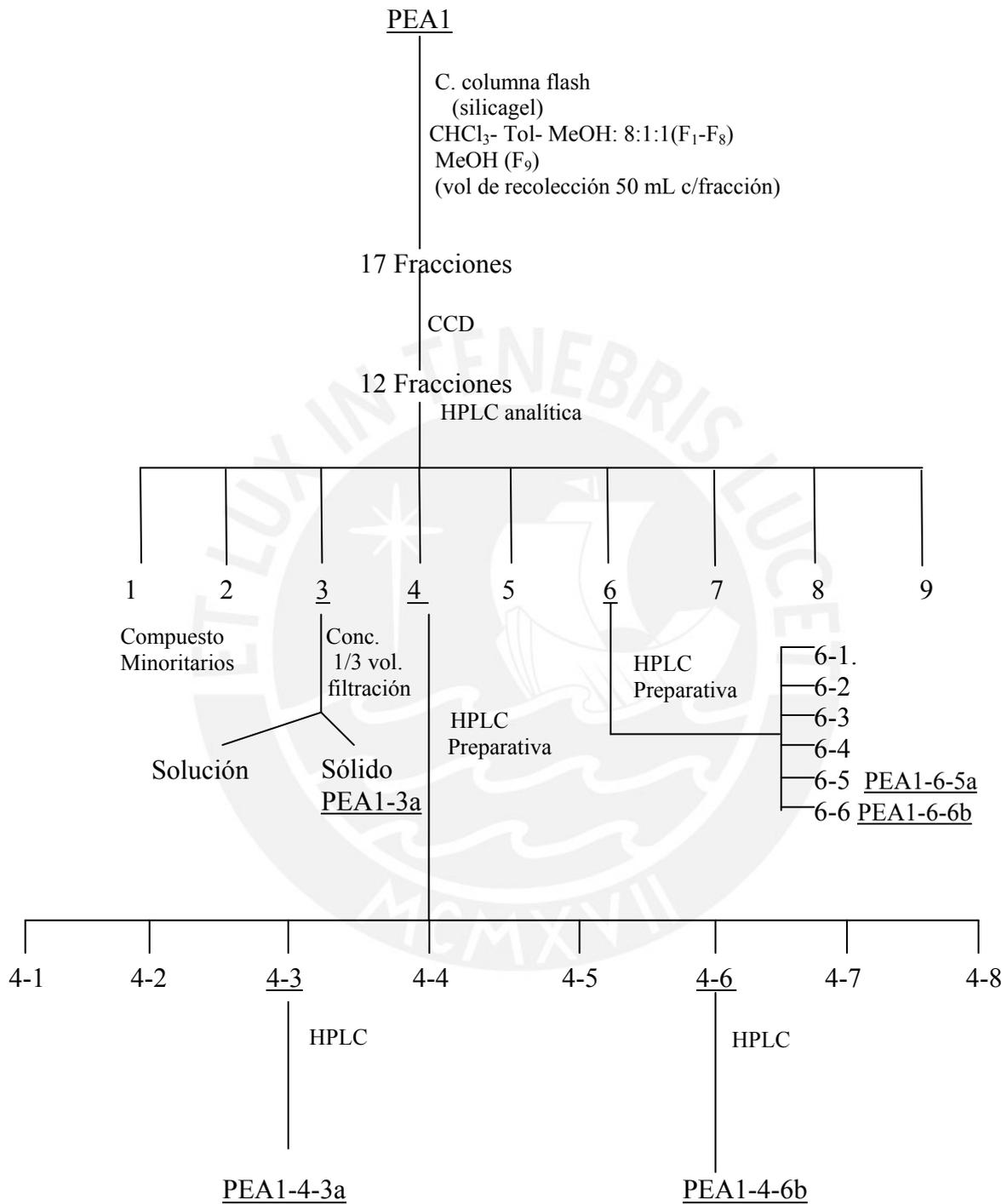
### e.3 De la fase acuosa

La fase acuosa (Fig. 4) luego de una partición con acetato de etilo presentó dos fracciones, fase orgánica y fase acuosa. De la fase orgánica, por evaporación a sequedad, se obtuvo PEA1 (9,91 g).

PEA1, fue la fracción que presentó la más alta actividad antioxidante a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  (90,36 %) (Tabla 9). Se sometió a una separación cromatográfica (Fig. 21), por cromatografía flash con silicagel se recolectaron 17 fracciones las que previo análisis por CCD, se reunieron en 12. Cada una de ellas fue analizada por HPLC y reunidas finalmente en 9 fracciones (PEA1-1 a PEA1-9) a las que se determinó la actividad antioxidante (Tabla 11). Las fracciones PEA1-6 y PEA1-4 presentaron mayor actividad antioxidante a 10  $\mu\text{g/mL}$  (93,99 y 89,79 % de actividad respectivamente).

- De la fracción PEA1-3 luego de su concentración a 1/3 de volumen se separó por filtración un sólido amarillo denominado PEA1-3a el que fue analizado por HPLC y comparado con el cromatograma y espectro UV de PEE2-b (Fig. 22), determinándose que corresponde al mismo compuesto.

- La fracción PEA1-4 se separó por HPLC preparativa obteniéndose 8 fracciones (PEA1-4-1 a PEA1-4-8) (Fig. 21) las que fueron analizadas por HPLC analítica y determinada su actividad antioxidante (Tabla 12).



**Fig. 21. Esquema de la separación de PEA1**

Tabla 11: Resultados de la actividad antioxidante de las subfracciones de PEA1

Fracciones	Actividad Antioxidante (%)	
	10 µg/mL	50 µg/mL
PEA1	90,36	96,24
PEA1- 1	5,83	17,11
PEA1 - 2	20,01	94,80
PEA1 - 3a	25,06	89,80
PEA1 - 3b	1,33	12,53
PEA1 - 4	89,79	93,27
PEA1- 5	81,42	92,37
PEA1 - 6	93,99	94,90
PEA1 - 7	82,00	94,10
PEA1 - 8	82,02	94,11
PEA1 - 9	85,17	94,16

De la subfracción PEA1-4-3 se separó un polvo amarillo pálido denominado *PEA1-4-3a*, el que fue analizado por HPLC (las condiciones de trabajo se indicaron en la página 23) presentando un tiempo de retención de 7,86 min (Fig. 23) y de tr 9,6 min en el HPLC (Merck-Hitachi LaChrom D-7000. Columna Lichrosphere C18, 125 x 4 mm, 5 µm. Solventes: A: ACN y B: H<sub>2</sub>O 0,05 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Gradiente: 5 a 80 % de A x 50 min). PEA1-4-3a fue comparado con el ácido cafeico (Figs. 24 y 25).

Se determinó su espectro ultravioleta (Fig. 24) y el ión molecular por espectrometría de masas (Figs. 26 y 27).

La subfracción PEA1-4-6 denominada PEA1-4-6b se analizó por HPLC-UV, por espectrometría de masas y espectroscopia infrarroja (Figs. 28, 29, 30).

- La fracción PEA1-6, se separó por HPLC preparativa en 6 subfracciones (PEA1-6-1 a PEA1-6-6) (Fig. 21). En cada una de ellas se evaluó la actividad antioxidante (Tabla 12).

Las subfracciones PEA1-6-5 y PEA1-6-6 se denominaron PEA1-6-5a y PEA1-6-6b respectivamente.

PEA1-6-5a, se presentó como un sólido verde cristalino, por HPLC analítica tuvo un tiempo de retención de 12,88 min. Fue analizado por CCD, espectrometría de masas y por espectroscopia ultravioleta con reactivos de desplazamiento (Figs. 31, 32, 33, 34).

PEA1-6-6b, por HPLC-UV, presentó dos picos a 13,53 min y a 14,06 min, se determinaron sus características en el espectro ultravioleta y por espectrometría de masas (Figs. 35 y 36).

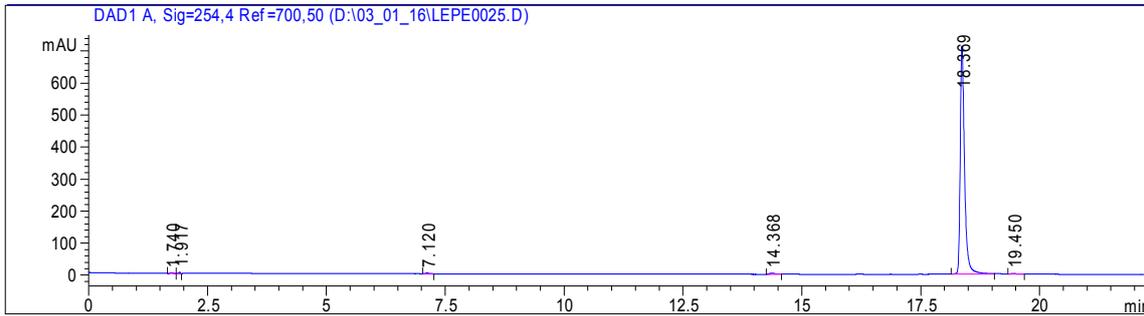
*f. Determinación de la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de los compuestos aislados*

Se determinó la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) del compuesto mayoritario del extracto etanólico (PEA1-6-5a), de PEA1-4-3a, PEA1-4-6b, PEA1-6-6b y de PEO1. Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (Tabla 13) y se procedió tal como se indica en 2.2.3. Con fines de comparación se determinó la  $EC_{50}$  de quercetina y de rutina, los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 12 : Resultados de la actividad antioxidante de las subfracciones de PEA1-4 y de PEA1-6

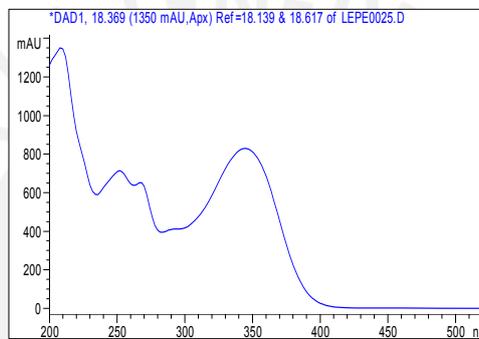
Fracciones	Actividad Antioxidante (%)	
	10 µg/mL	50 µg/mL
<b>PEA1 - 4</b>	<b>89,79</b>	<b>93,27</b>
PEA1- 4-1	92,22	91,93
PEA1- 4-2	87,34	93,23
PEA1- 4-3	90,34	95,21
PEA1- 4-4	15,0	53,49
PEA1- 4-5	80,29	88,99
PEA1- 4-6	88,46	89,24
PEA1- 4-7	87,46	90,13
PEA1- 4-8	90,79	91,88
<b>PEA1 - 6</b>	<b>93,99</b>	<b>94,90</b>
PEA1 - 6-1	20,89	77,65
PEA1 - 6-2	11,05	61,76
PEA1 - 6-3	4,65	28,68
PEA1 - 6-4	70,28	95,18
PEA1 - 6-5	94,15	95,18
PEA1 - 6-6	88,72	91,74

a.- Cromatograma HPLC de PEA1-3a

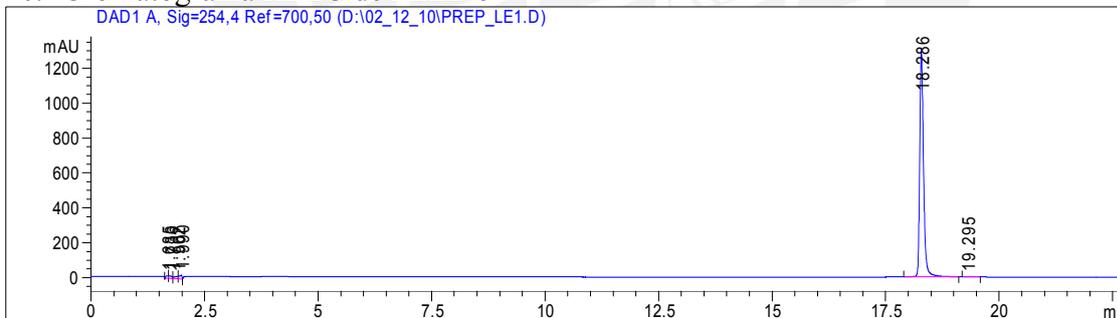


b.- Espectro ultravioleta

18,36 min



c.- Cromatograma HPLC de PEE2-b



d.- Espectro Ultravioleta

18,28 min

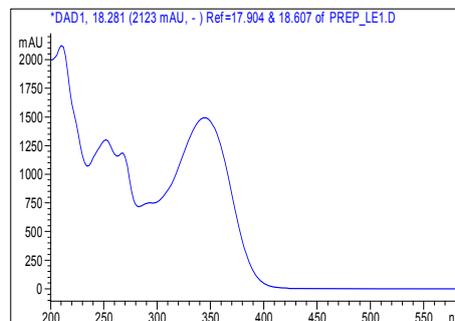
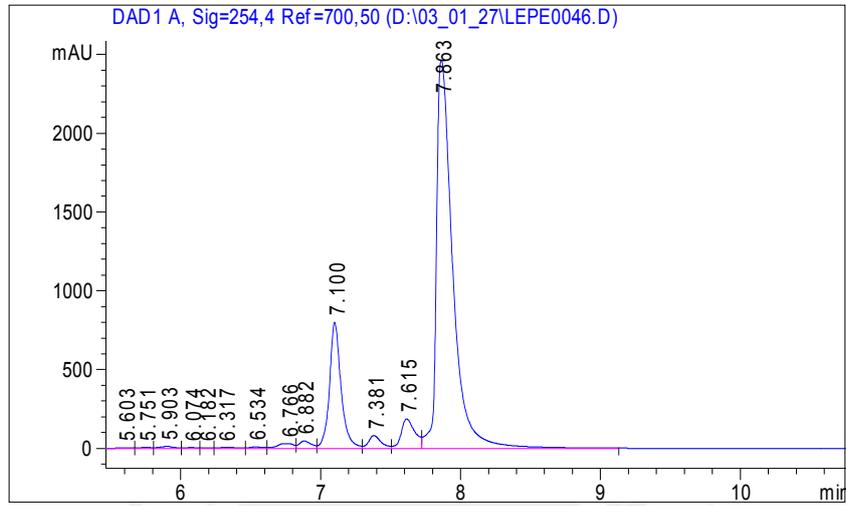
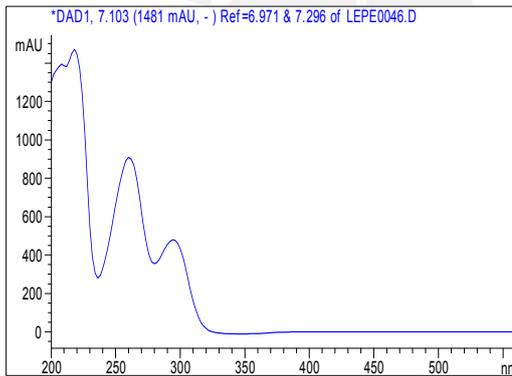


Fig. 22. Cromatogramas HPLC y espectros ultravioleta de PEA1-3a y PEE2-b

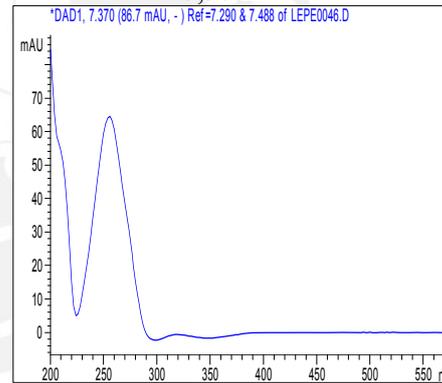
a.- Cromatograma HPLC



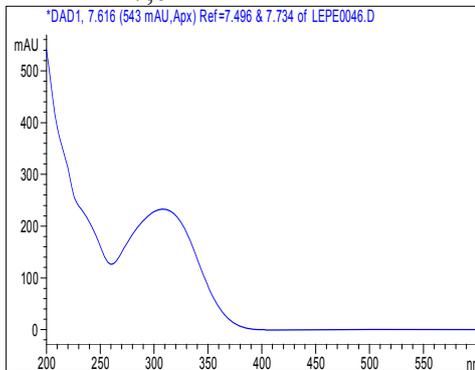
b.- Espectros Ultravioleta  
7,1 min



7,37 min



7,6 min



7,86 min

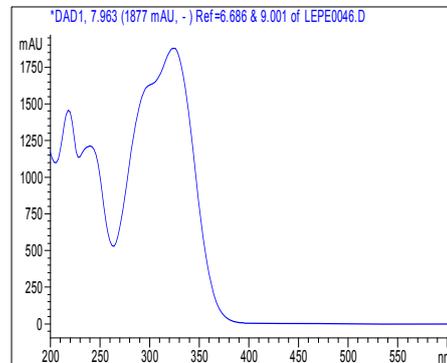
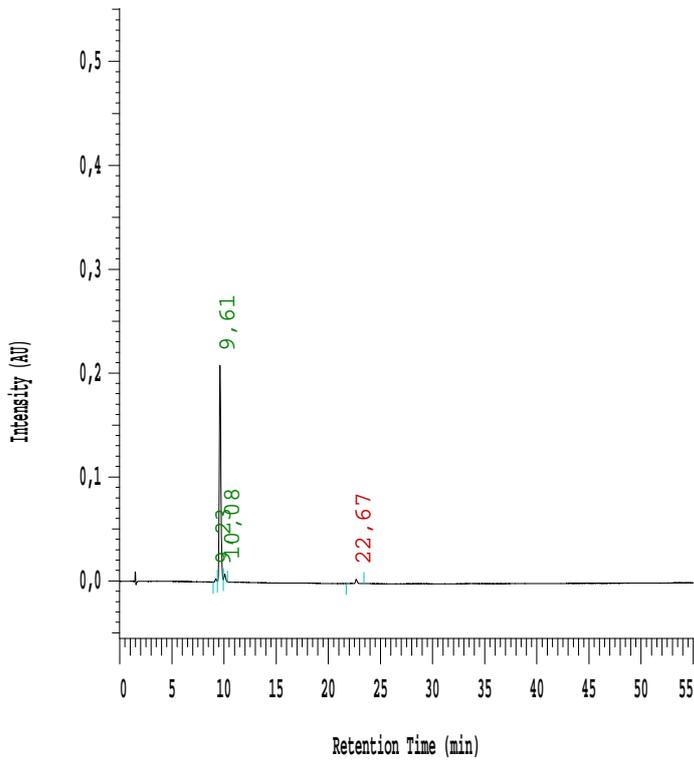
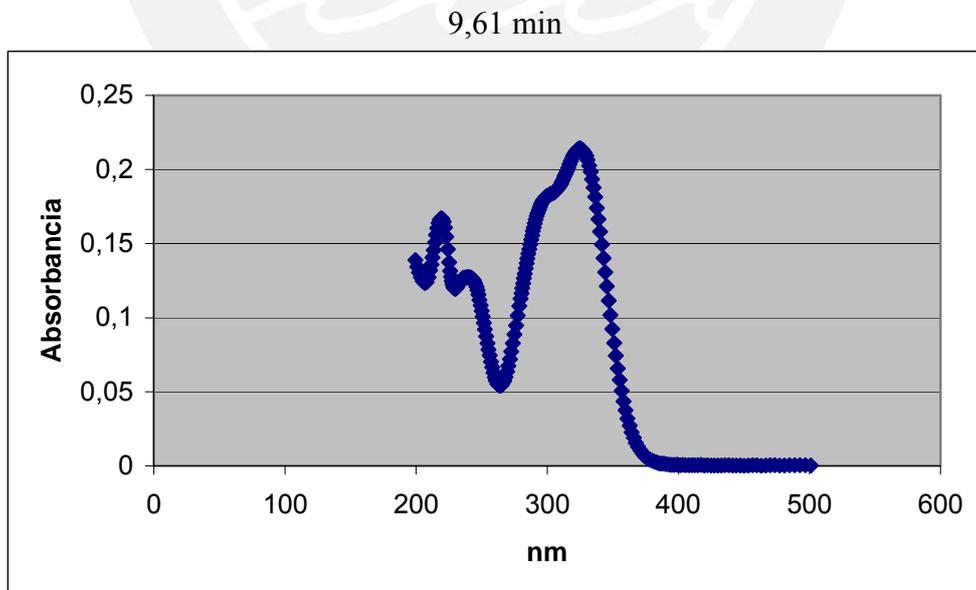


Fig. 23 Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEA1-4-3

a.- Cromatograma HPLC

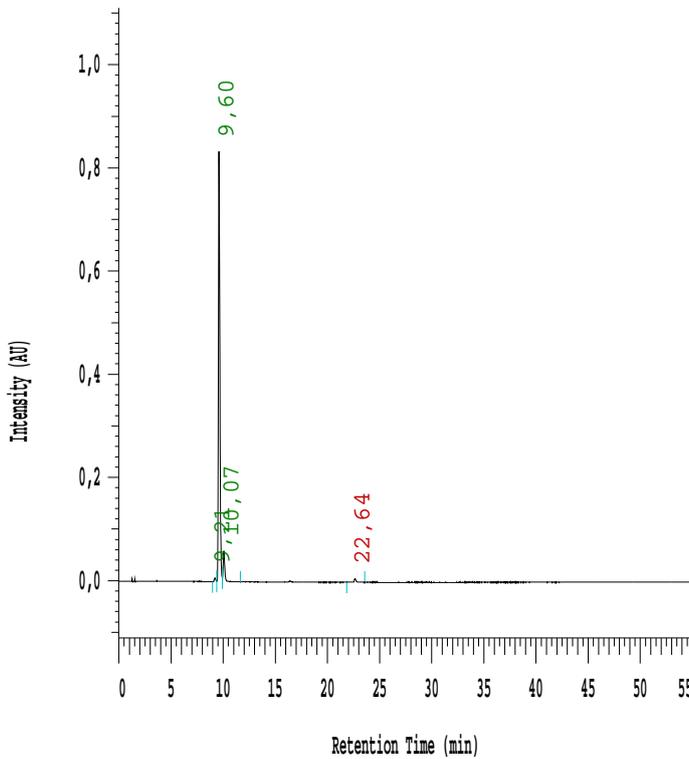


b.- Espectro ultravioleta



**Fig. 24. Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta de PEA1-4-3a**

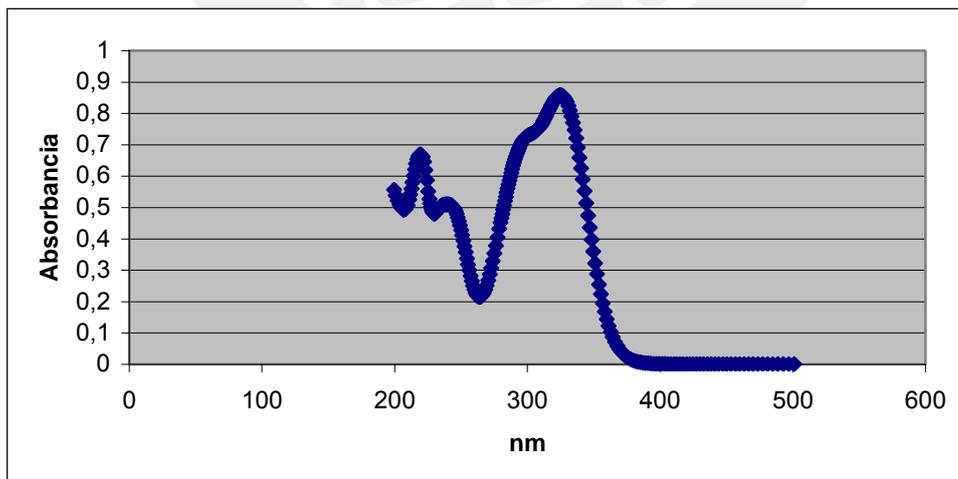
a.- Cromatograma HPLC del ácido cafeico y del compuesto PEA1-4-3a



<b>Title:</b>	D-7000 HPLC System Manager Report
<b>Analyzed:</b>	04/07/03 12:44 p.m.
<b>Reported:</b>	04/07/03 02:02 p.m.
<b>System Name:</b>	Sys 1
<b>Method Title:</b>	<b>MET_PROP1</b>
<b>Application:</b>	LICENCIATURA
<b>Series Name:</b>	37
<b>Vial Number:</b>	8
<b>Sample Name:</b>	(4-3) + ác. cafeico
<b>Vial Type:</b>	UNK
<b>Volume:</b>	2,5 ul
<b>Injection:</b>	1 of 1
<b>Sample Description:</b>	Mezcla 2,5 : 1 (v/v)
<b>Peak Quantitation:</b>	AREA
<b>Calc. Method:</b>	EXT-STD
<b>Sample Amount :</b>	
<b>INT STD Amount :</b>	
<b>Scale Factor 1:</b>	1.000
<b>Scale Factor 2:</b>	

b.- Espectro ultravioleta

9,6 min



**Fig. 25. Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta de la mezcla de PEA14-3a y ácido cafeico**

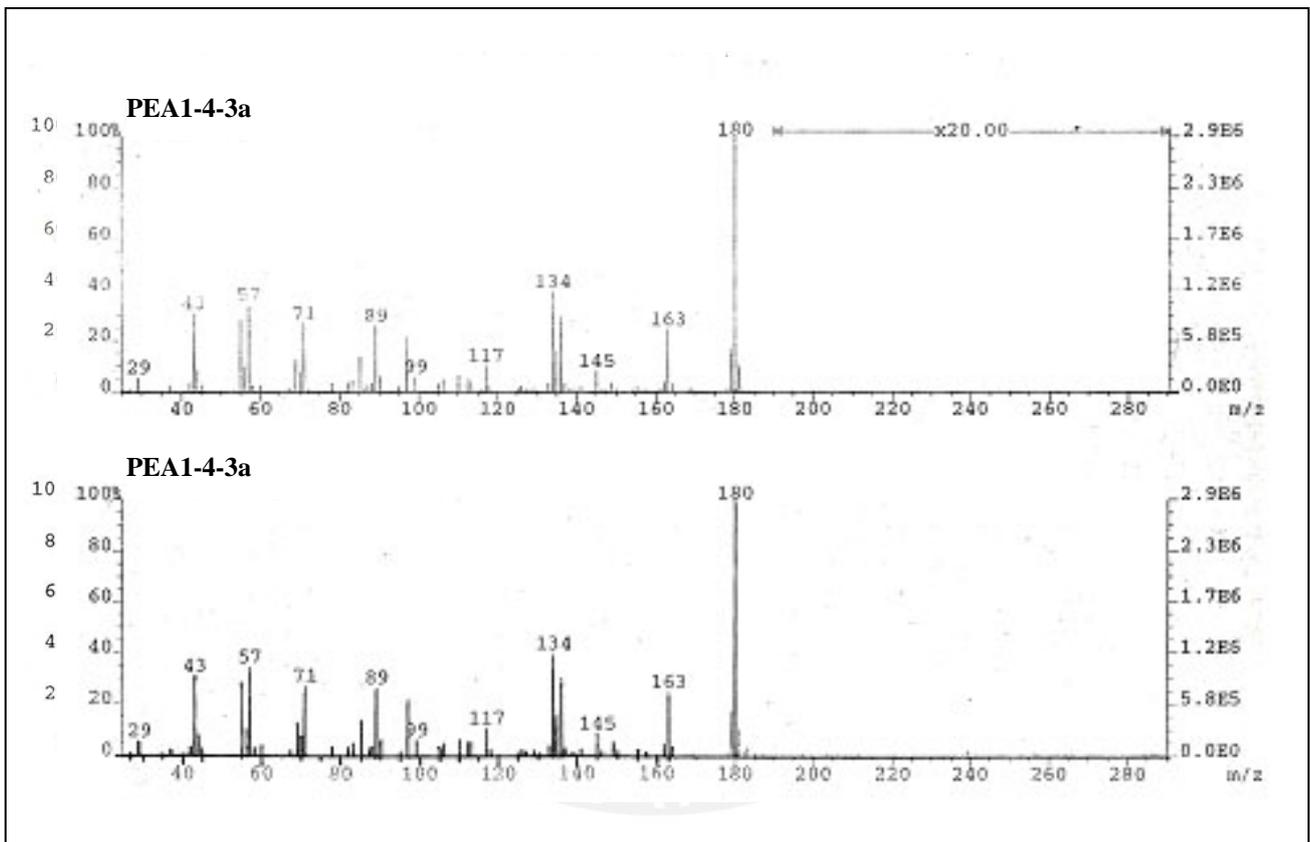
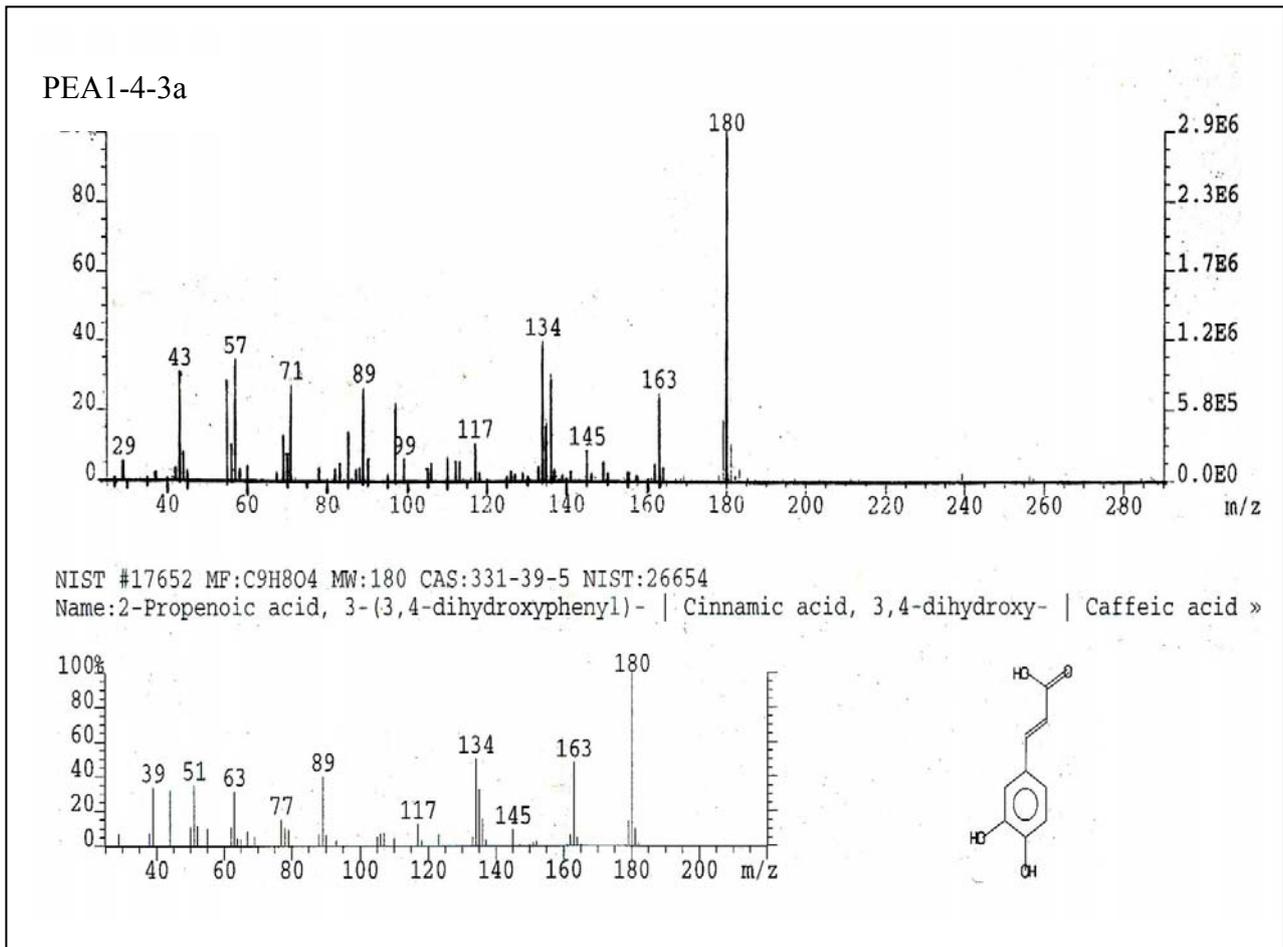
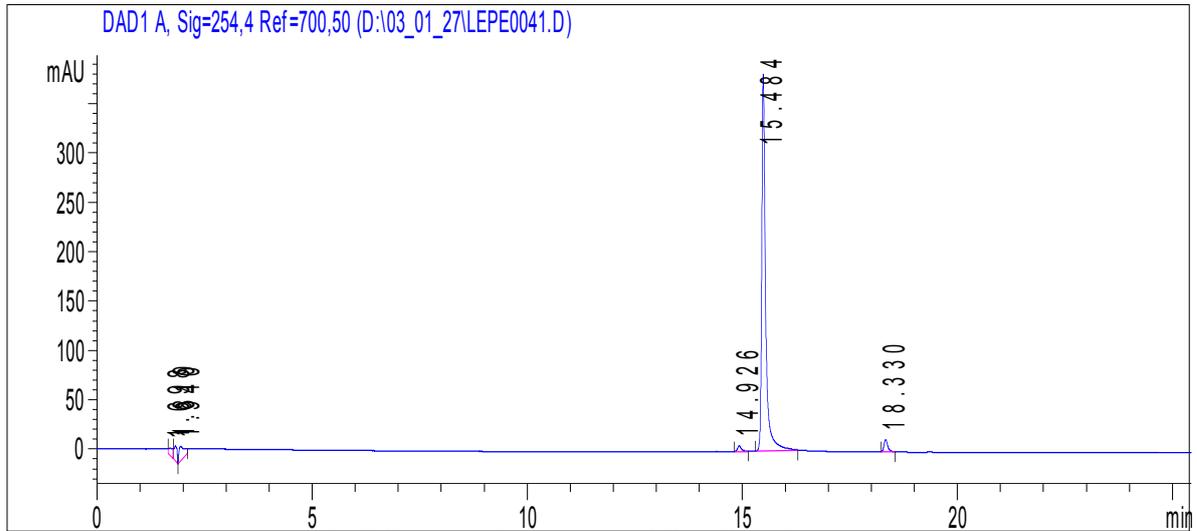


Fig. 26. Espectro de masas de PEA1-4-3a

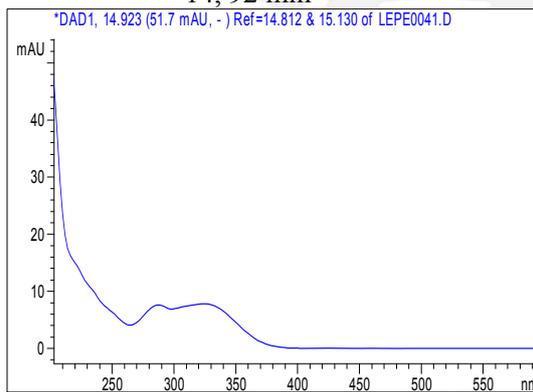


**Fig. 27.** Comparación del espectro de masas del ácido cafeico y de PEA1-4-3a

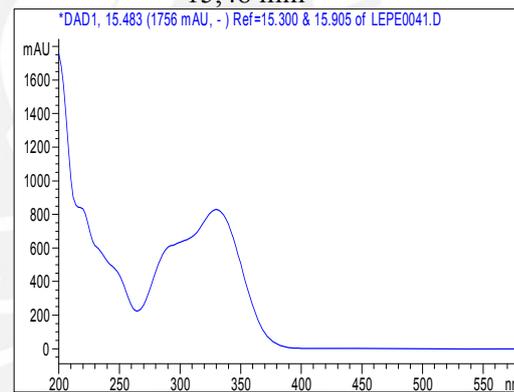
a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta  
14,92 min



15,48 min



18,33 min

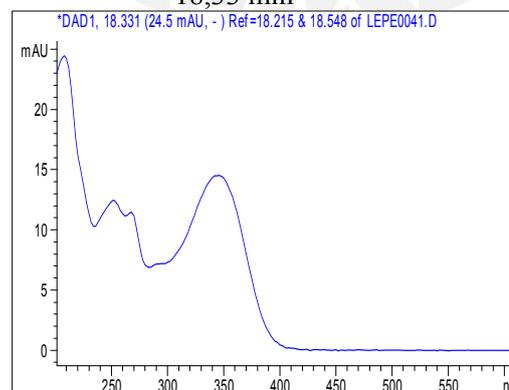
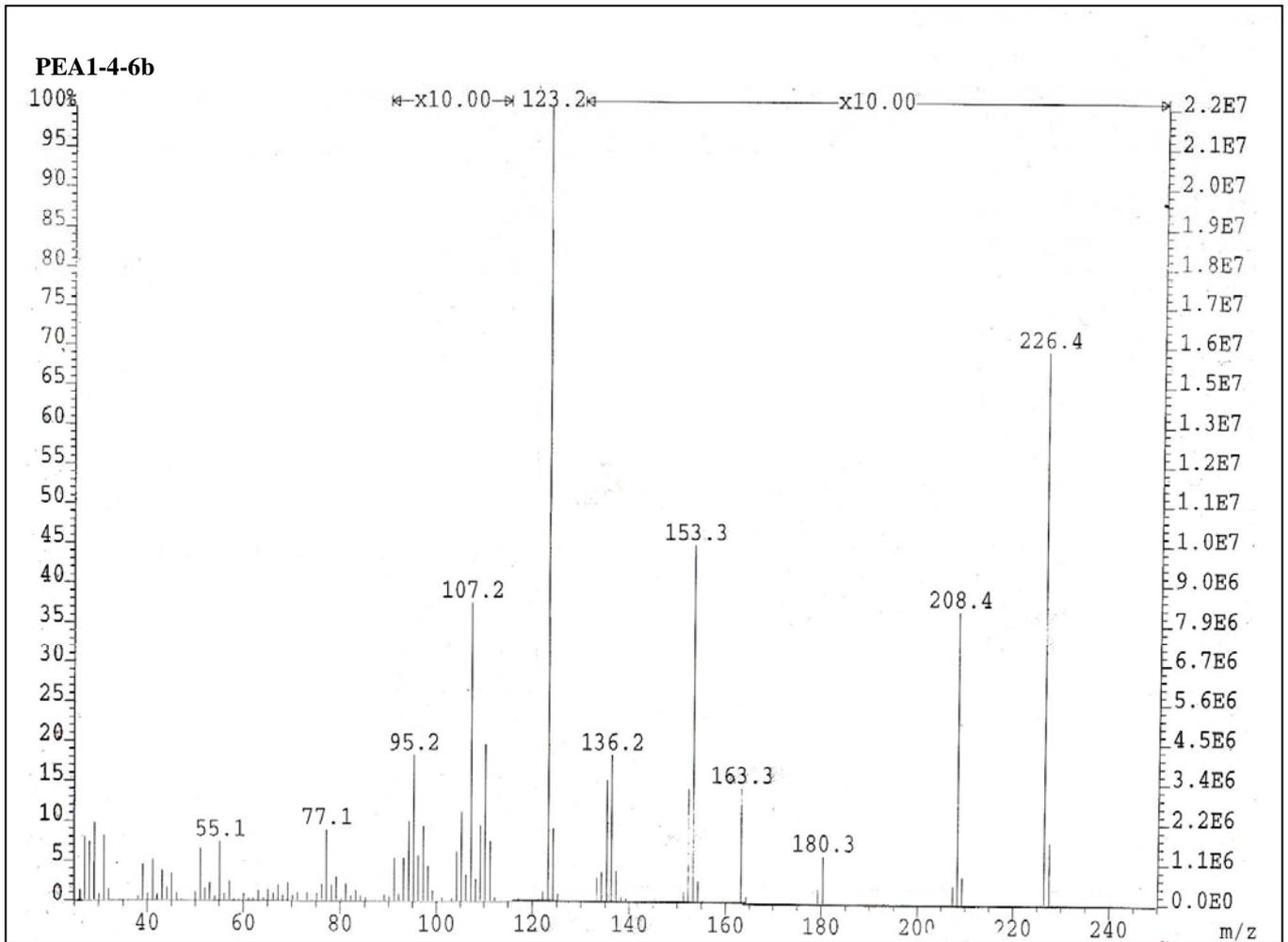


Fig. 28. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEA1-4-6b



**Fig. 29. Espectro de masas de PEA1-4-6b**

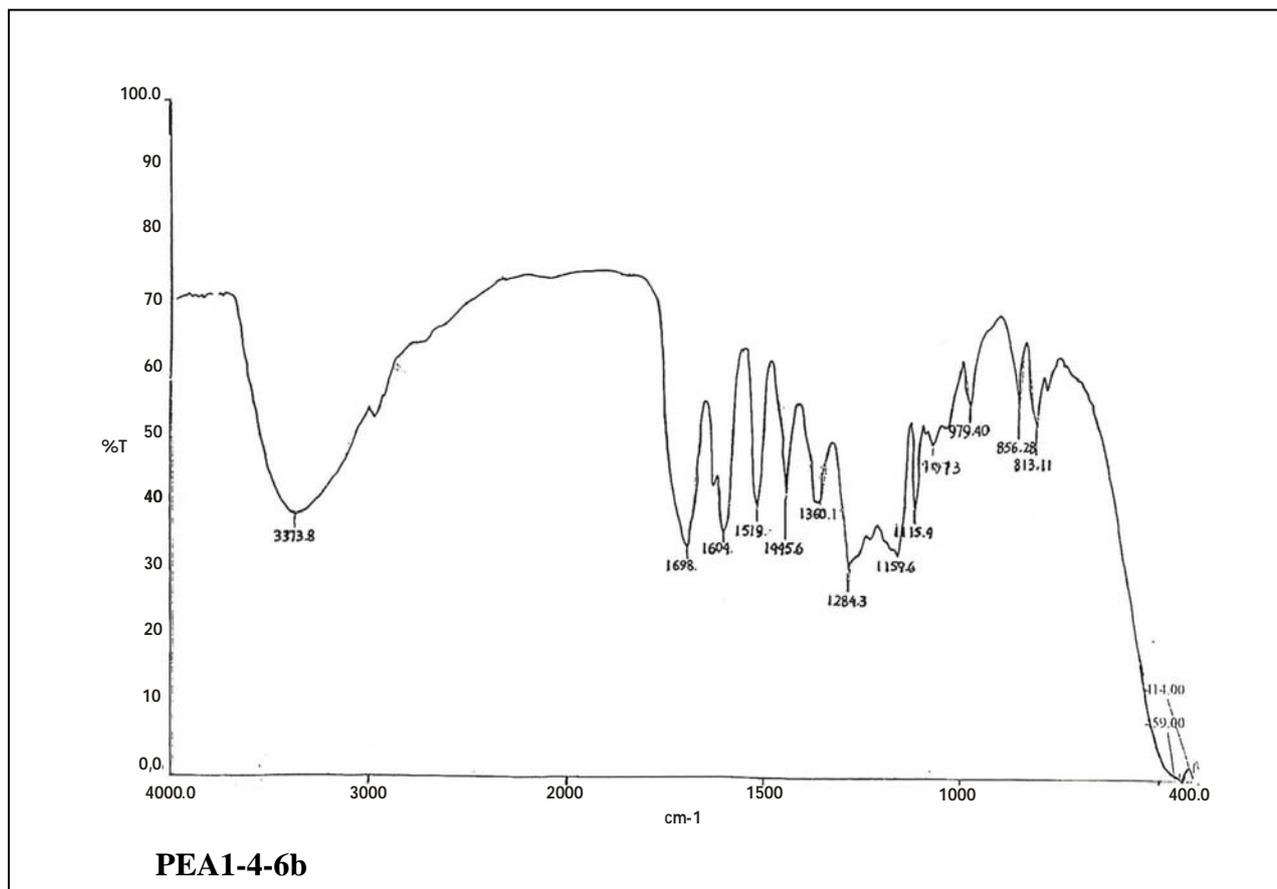
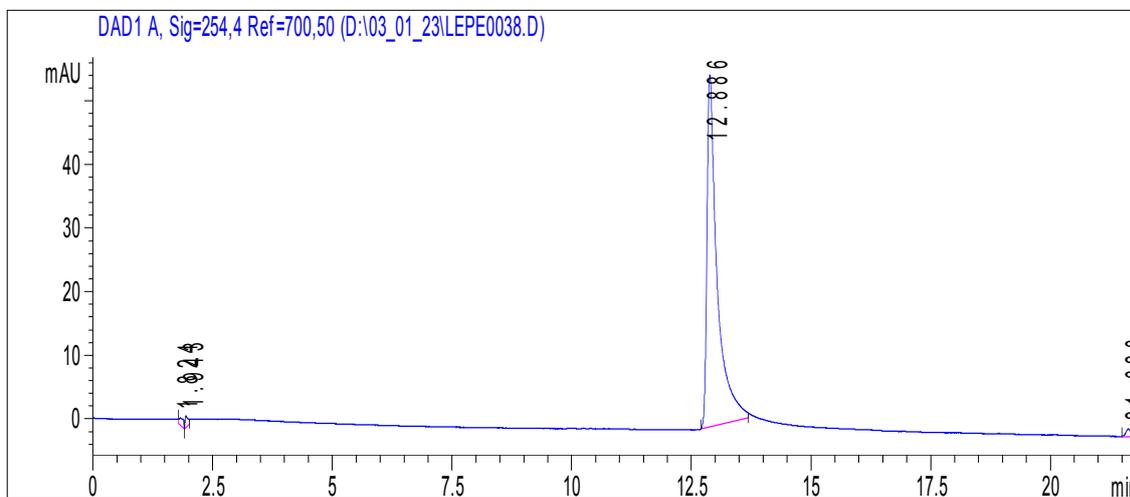
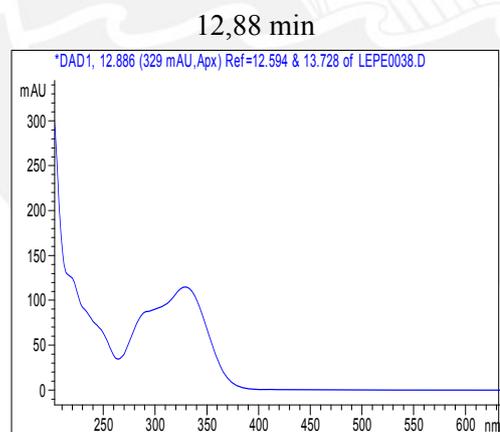


Fig. 30. Espectro infrarrojo de PEA1-4-6b

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectro ultravioleta



**Fig. 31. Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta de PEA1-6-5a**

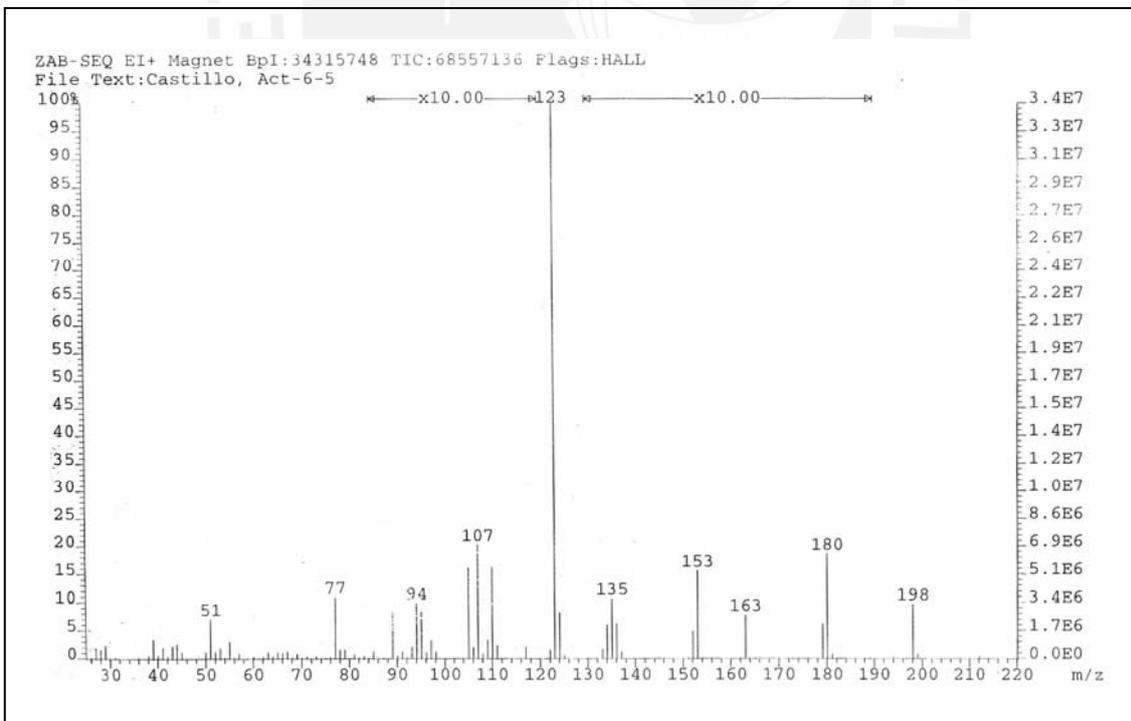
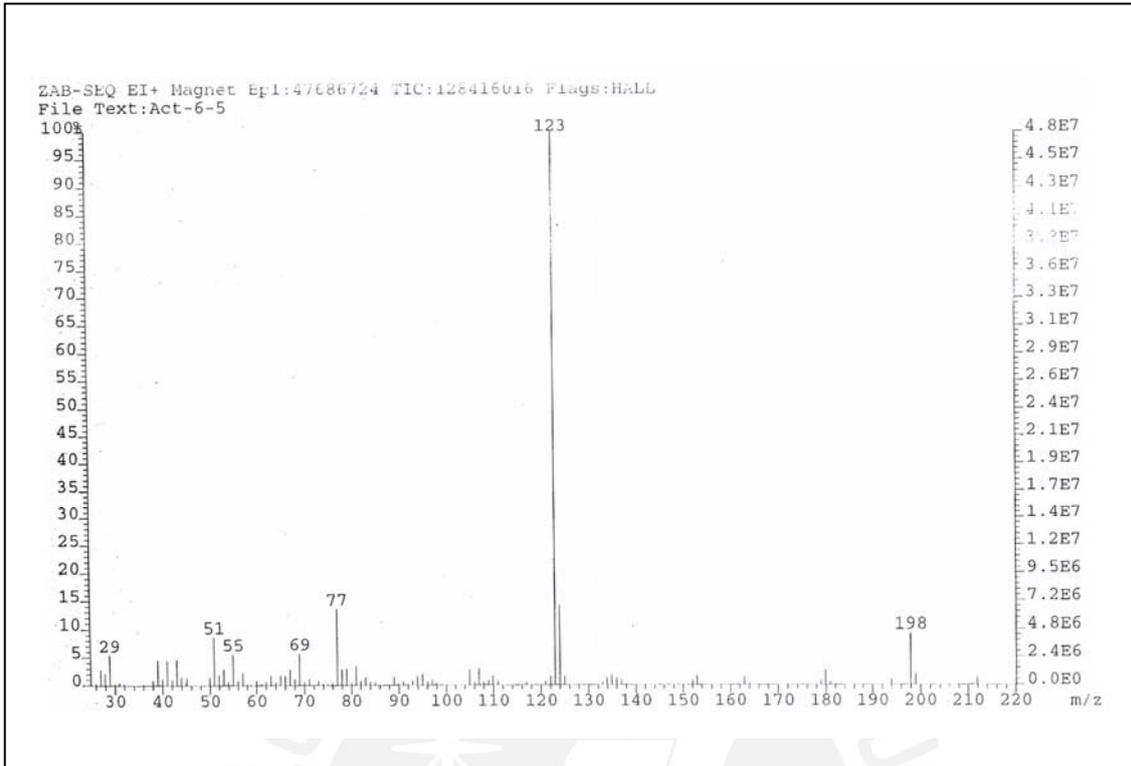
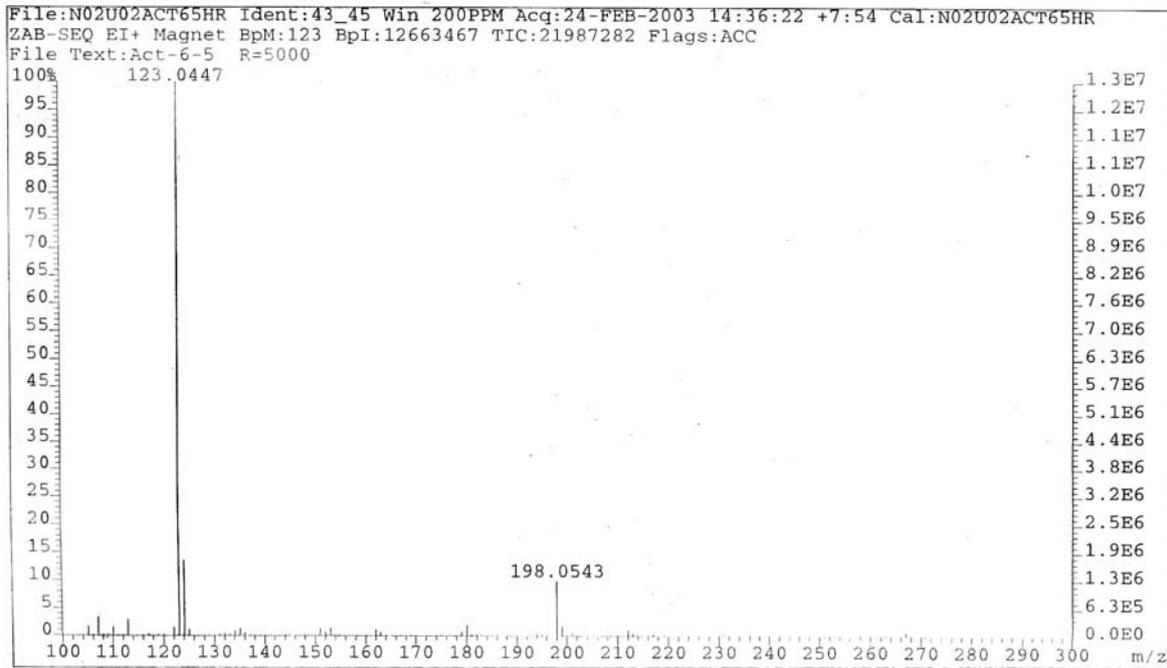


Fig. 32. Espectro de masas (EI) de PEA1-6-5a



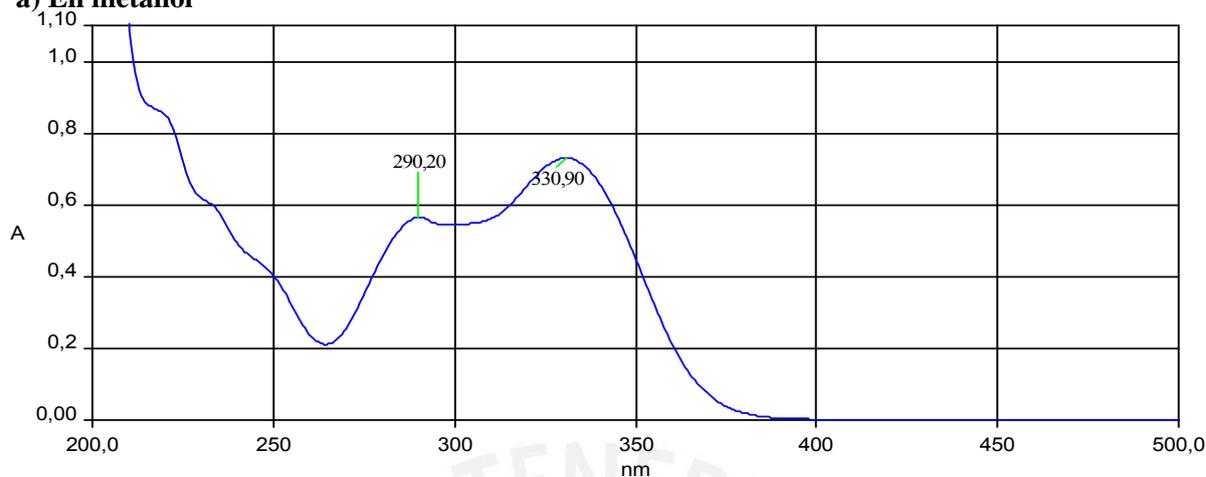
**Elemental Composition**

File: N02U02ACT65HR Ident: 43\_45 Win 200PPM Acq: 24-FEB-2003 14:36:22 +7:54  
 ZAB-SEQ EI+ Magnet BpM: 123 BpI: 12663467 TIC: 21987282 Flags: ACC  
 File Text: Act-6-5 R=5000  
 Heteroatom Max: 20 Ion: Both Even and Odd  
 Limits:

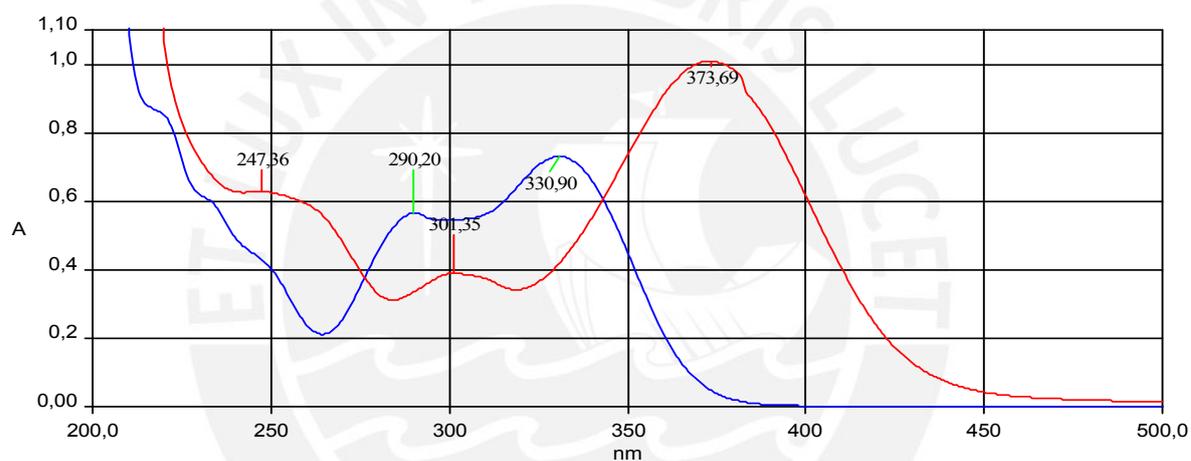
Mass	%RA	Pks	Std	PPM	mDa	Calc. Mass	DBE	C	H	O
116.083	5.0					-0.5	5	5	0	
204.925	100.0			5.0		20.0	20	30	5	
198.054281	10.0	3	2.0	-7.4	-1.5	198.052824	5.0	9	10	5
124.049781	13.8	3	14.2	21.3	2.6	124.052430	4.0	7	8	2
123.044730	100.0	3	11.2	-1.0	-0.1	123.044605	4.5	7	7	2

**Fig. 33. Espectro de masas de alta resolución (EI) y composición elemental de PEA1-6-5a**

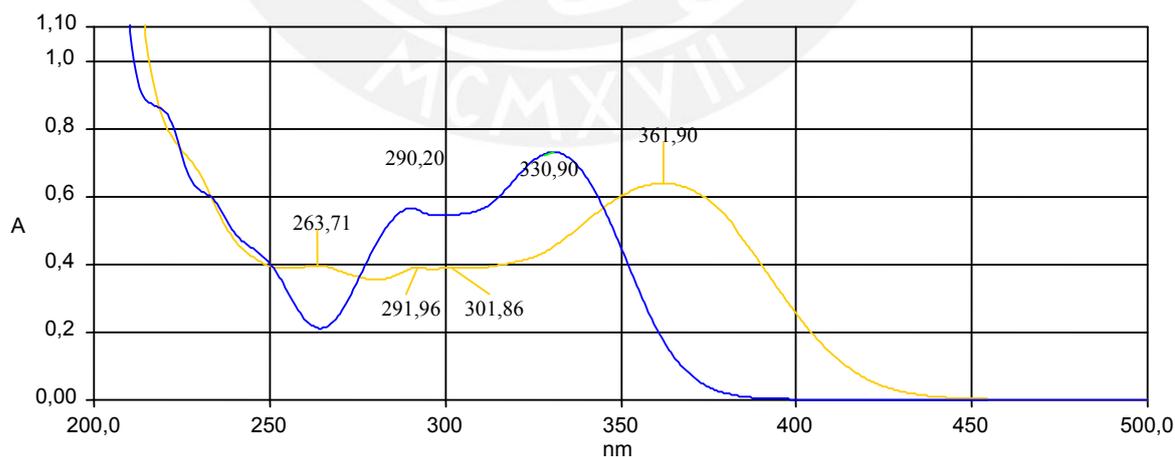
## a) En metanol



## b) Con metoxido de sodio



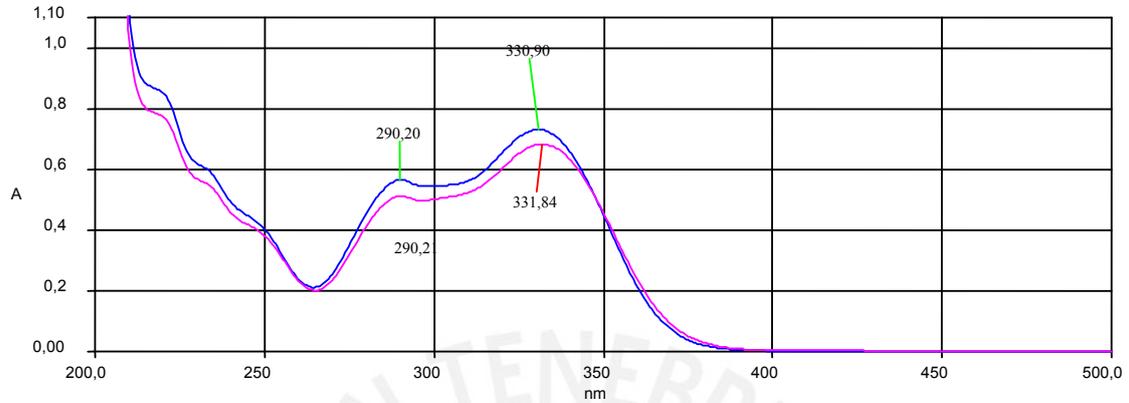
## c) Con tricloruro de aluminio



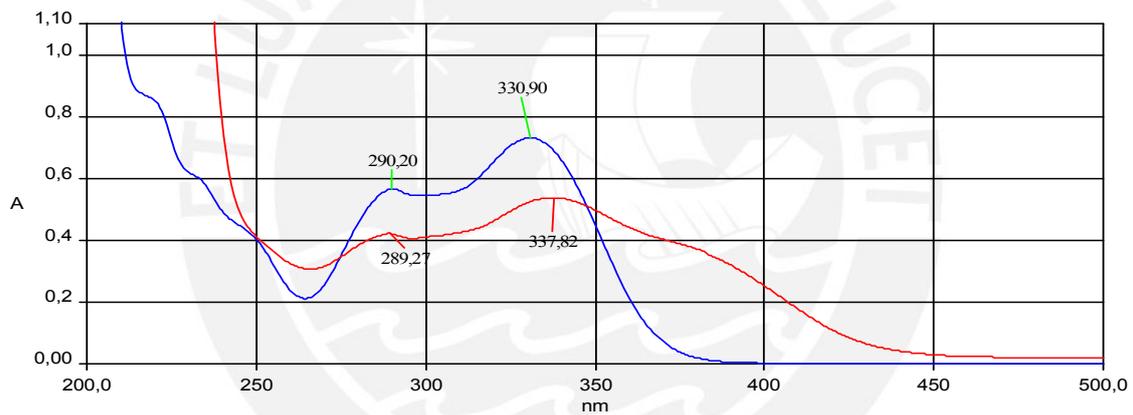
**Fig. 34.** Espectros ultravioleta de PEA1-6-5a en metanol y con reactivos de desplazamiento

Continuación...

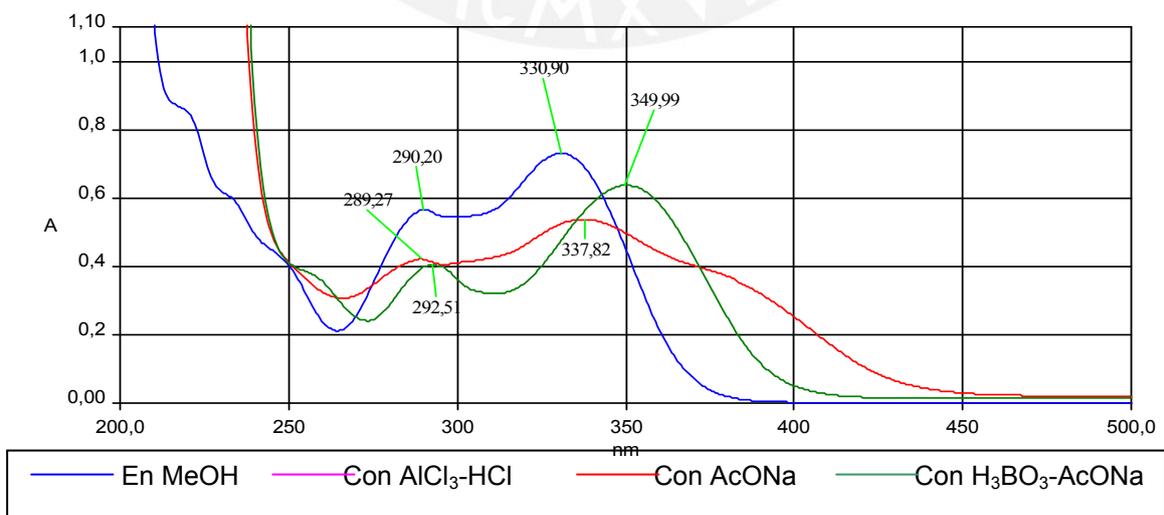
**d) Con tricloruro de aluminio-ácido clorhídrico**



**e) Con acetato de sodio**

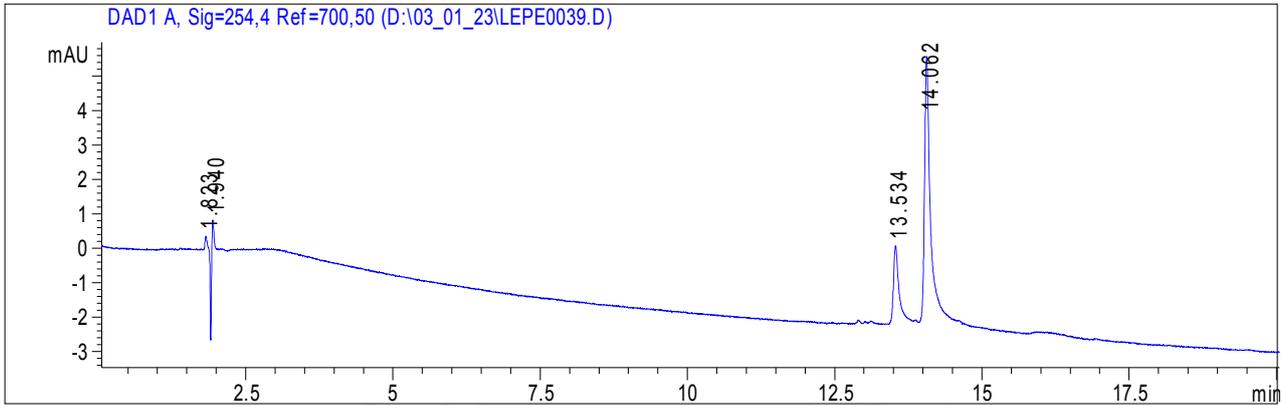


**f) Con ácido bórico-acetato de sodio**



— En MeOH    — Con AlCl<sub>3</sub>-HCl    — Con AcONa    — Con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-AcONa

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta

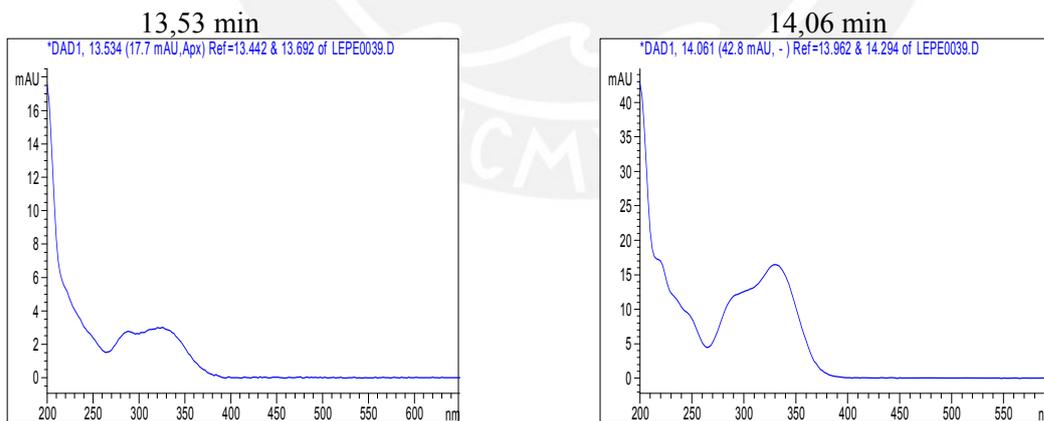


Fig. 35. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEA1-6-6b

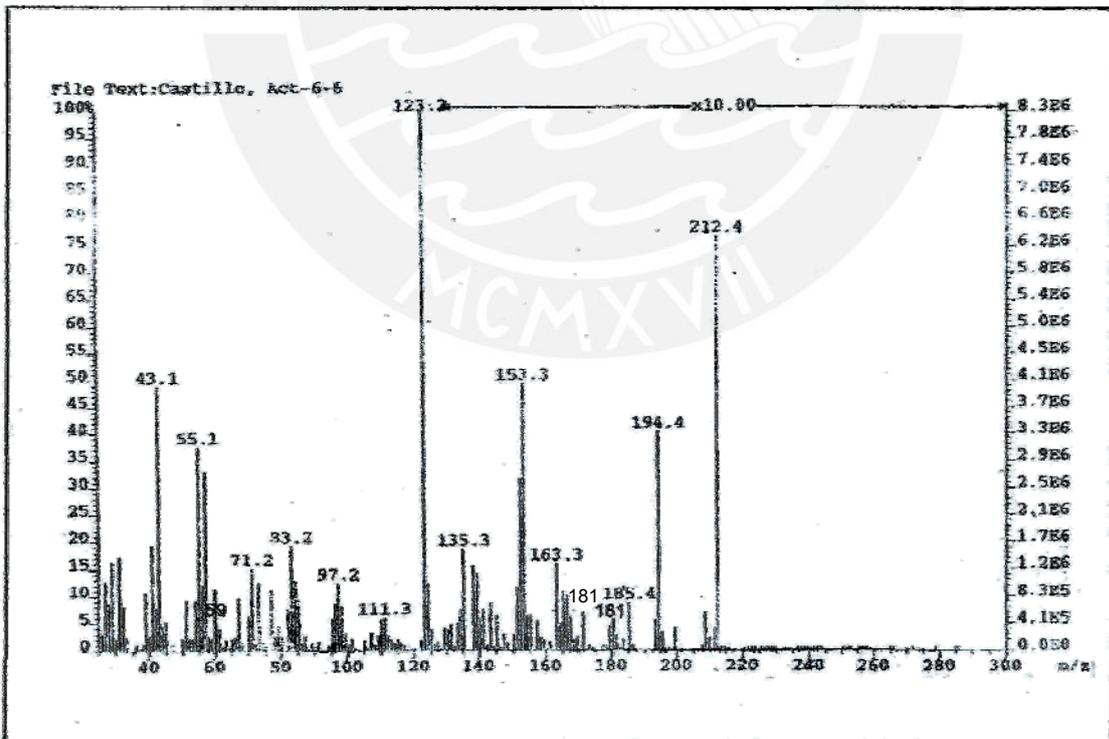
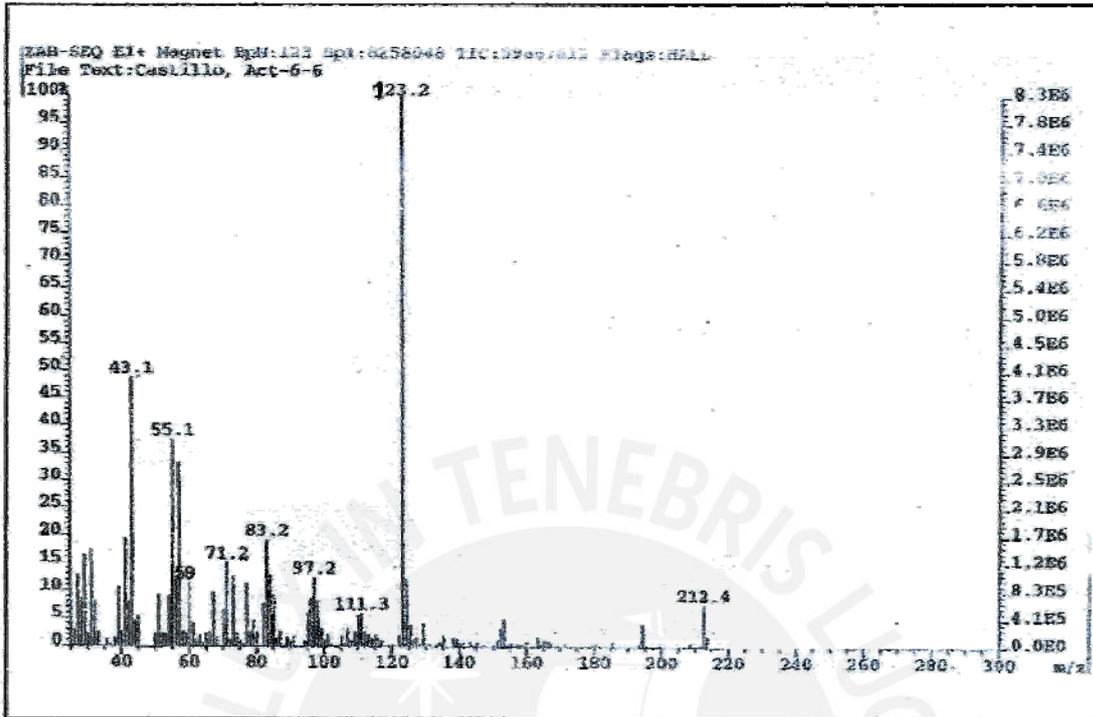


Fig. 36. Espectro de masas de PEA1-6-6b

Tabla 13: Concentraciones versus actividad antioxidante de los compuestos aislados , y de rutina y quercetina

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	MUESTRAS						
	1	2	4	6	8	10	12
PEO1	-----	11,99	23,8	36,74	49,37	60,68	-----
PEA1-6-5a	17,25	36,08	60,66	87,73	93,92	-----	-----
PEA1-6-6b	-----	-----	35,20	53,10	69,85	88,72	94,80
PEA1-4-3a	-----	-----	34,96	52,98	70,69	88,60	93,05
PEA1-4-6b	-----	-----	35,10	52,98	68,95	88,46	90,01
Rutina	-----	7,28	24,96	42,64	61,07	73,78	-----
Quercetina	14,81	26,42	58,76	85,99	89,58	-----	-----

Tabla 14: Resultados de la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de los compuestos aislados, y de rutina y quercetina

MUESTRAS	a	b	$r^2$	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
PEO1	-0,2790	6,1385	0,9996	8,19
PEA1-6-5a	12,1450	10,948	0,9708	3,46
PEA1-6-6b	6,406	7,741	0,9789	5,63
PEA1-4-6b	8,98	7,265	0,9561	5,64
PEA1-4-3a	7,336	7,59	0,9696	5,62
Rutina	-6,5640	7,9791	0,993	7,09
Quercetina	6,0637	11,103	0,9799	3,96

## 2.2.4 Análisis del aceite esencial y su actividad antioxidante

### a. Análisis por HPLC

10  $\mu\text{L}$  del aceite esencial disuelto en metanol (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) se llevó al equipo de HPLC. Se tomó el cromatograma siguiendo las mismas condiciones de trabajo que para el extracto etanólico. El cromatograma y los espectros ultravioleta de los compuestos mayoritarios se muestran en la Fig. 37. El aceite esencial mostró picos entre 10 y 37 min.

A fin de determinar la existencia de compuestos similares con el extracto etanólico, se comparó ambos cromatogramas tal como se observa en la Fig. 38. Los cromatogramas muestran una gran diferencia entre la composición del extracto etanólico (línea azul) y el aceite (línea roja). De lo que se deduce que el extracto etanólico pierde la mayoría de los compuestos volátiles por secado de la muestra y después de la evaporación del solvente en el rotavapor.

### b. Análisis por cromatografía de gases

2  $\mu\text{L}$  de la solución del aceite esencial (líquido) y de los cristales disueltos en metanol (1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) se inyectaron en el Cromatógrafo de Gases HP5890 acoplado a un espectrómetro de masas ZB-EQ, VG, Analytical, Great Brit Micromass, Manchester, United Kingdom. Tiempo de corrida 50 min. Temperatura: 50, 180 y 220  $^{\circ}\text{C}$ . Columna HP-5 (Crosslinked 5 % PhMesilicone: 25 m x 0,32 mm x 0,52  $\mu\text{m}$ ).

El cromatograma de gases del aceite esencial y de sus cristales se presenta en la Fig. 39, en este se observan múltiples picos a baja concentración con excepción de 4 de ellos. La cristalización del aceite a temperatura ambiente separa el compuesto a scan 1208 tal como se observa en el cromatograma inferior de la misma figura (a scan 1222).

Se determinó la identidad de algunos de los compuestos presentes en el aceite mediante el uso del cromatógrafo de gases acoplado al

espectro de masas y la base de datos Wiley NBs Registry of Mass Spectra Data.

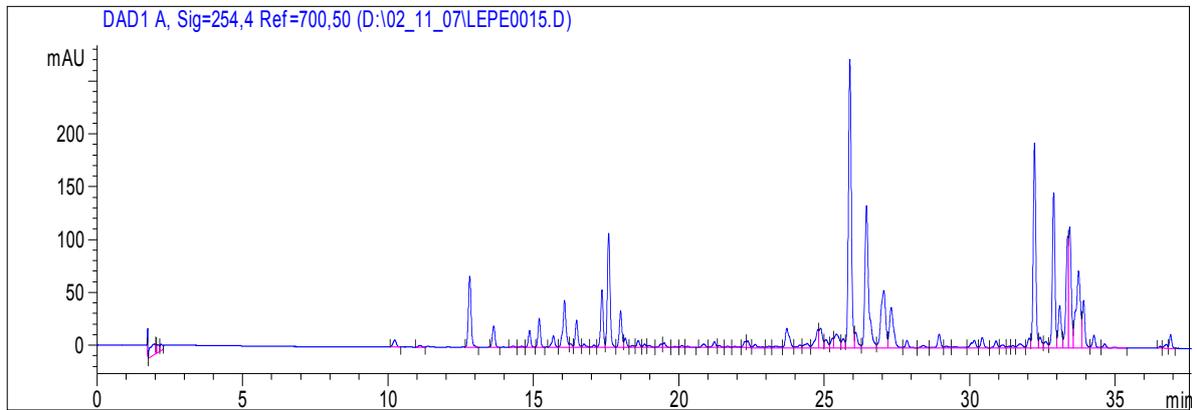
Los compuestos identificados fueron los siguientes:

1. Scan 145: compuesto de PM 136:  $\alpha$ -pineno
2. Scan 198: compuesto de PM 136:  $\beta$ -pineno
3. Scan 273: compuesto de PM 136: limoneno
4. Scan 278: compuesto de PM 154: 1,8-cineol (eucaliptol)
5. Scan 386: compuesto de PM 154: linalool
6. Scan 461: compuesto de PM 152: trans-verbenol
7. Scan 485: compuesto de PM 152: pinocanfona
8. Scan 730: compuesto de PM 192: trans-pino-carvenilacetato
9. Scan 776: compuesto de PM 199: mirtenilacetato
10. Scan 1069: compuesto de PM 204:  $\beta$ -bisaboleno
11. Scan 1091: compuesto de PM 204:  $\delta$ -cadineno
12. 1208: compuesto de PM 222: guaiol

**c. Actividad antioxidante**

Se evaluó la actividad antioxidante del aceite esencial a las concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$  siguiendo el procedimiento detallado en 2.2.3, la que fue de 0,31 % a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y de 3,36 % a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; motivo por el cual no se consideró necesario continuar con el estudio del aceite.

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta

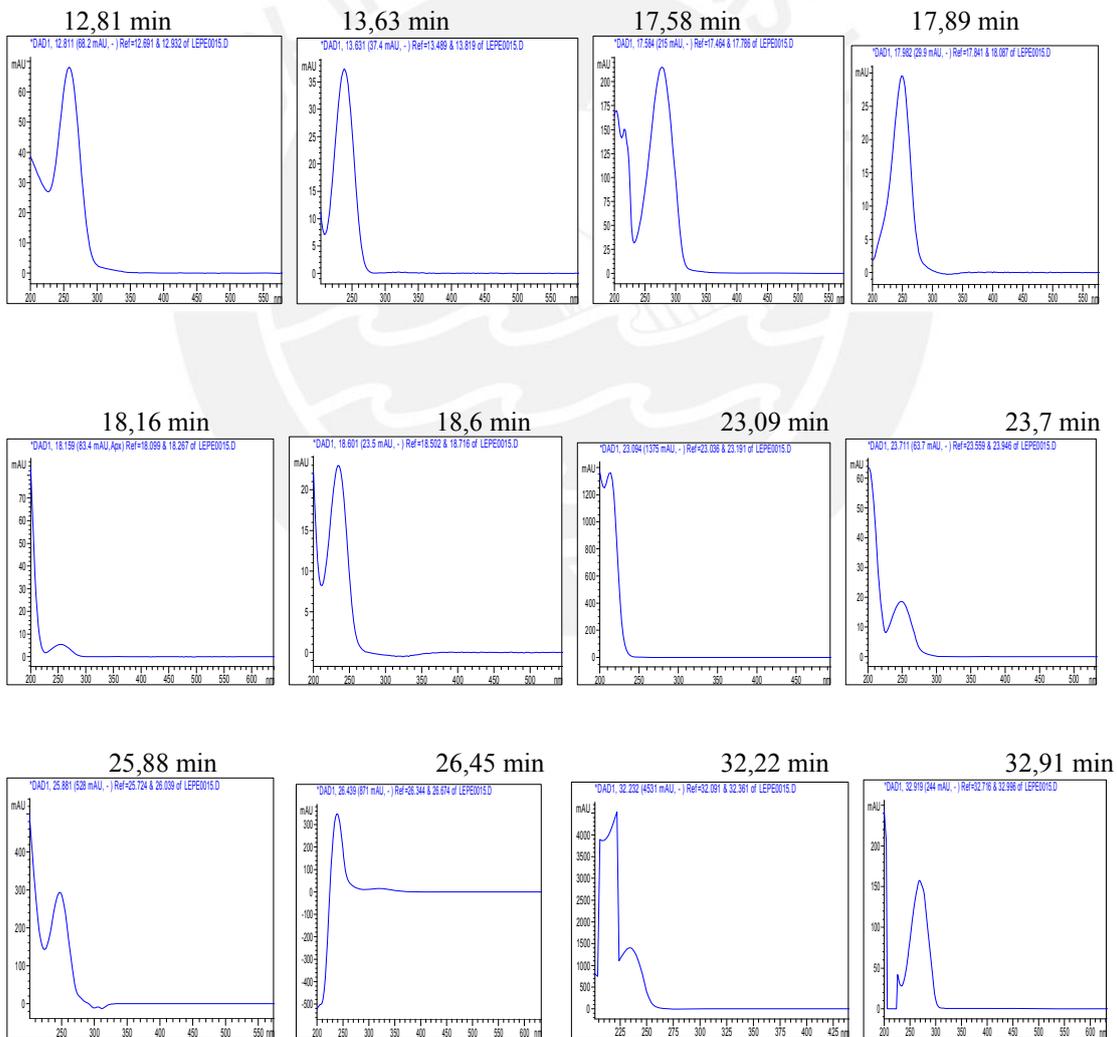
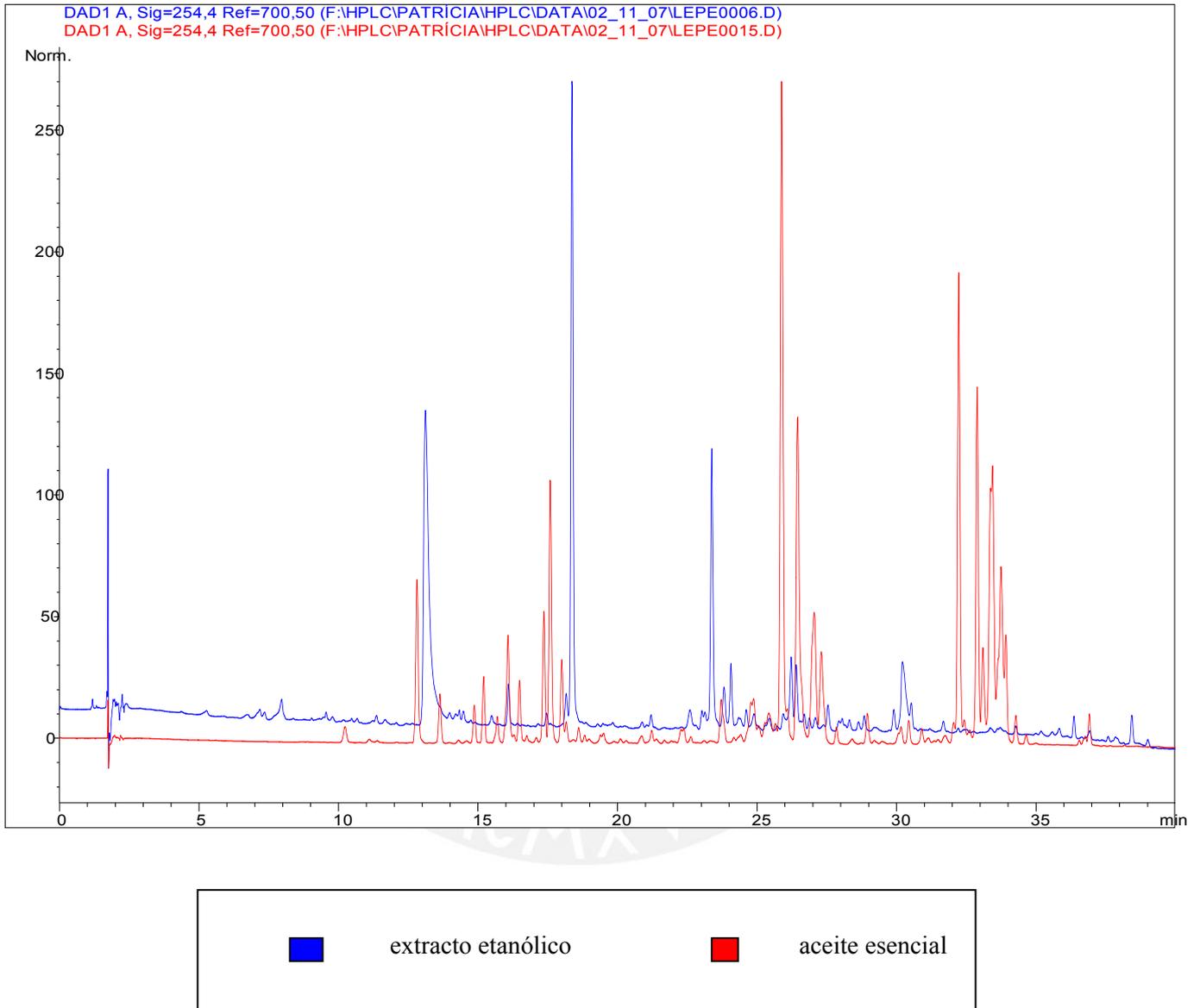


Fig. 37. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta del aceite esencial



**Fig. 38. Comparación de cromatogramas de HPLC del aceite esencial y el extracto etanólico**

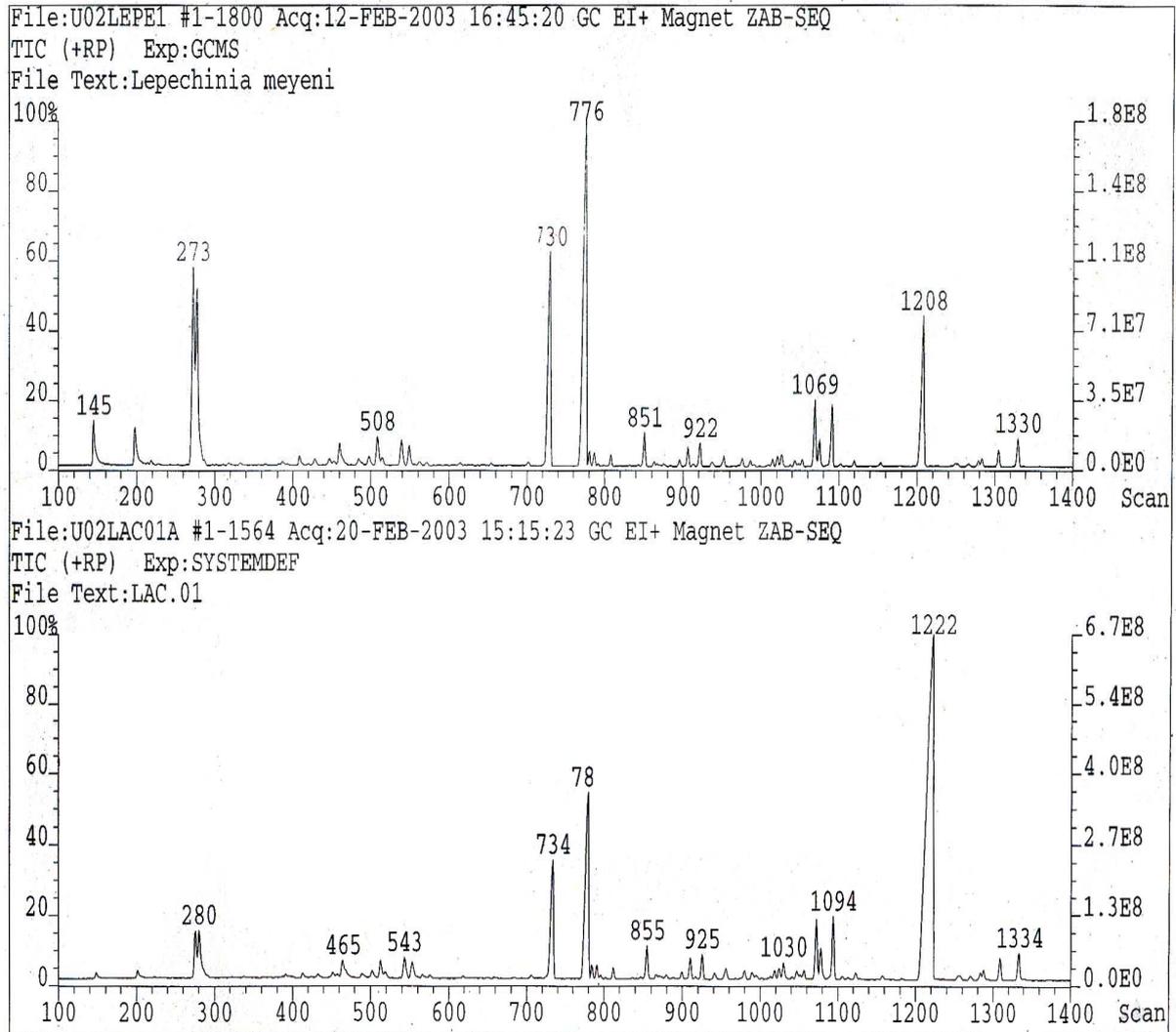


Fig. 39. Cromatograma de gases del aceite esencial y sus cristales

## IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

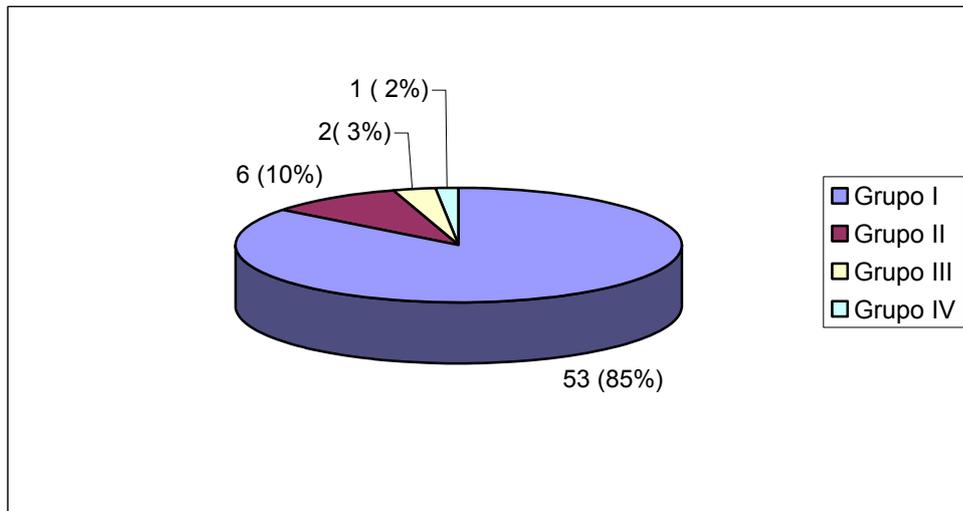
### 4.1 DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS 53 ESPECIES VEGETALES

Para la detección y clasificación de extractos con actividad antioxidante fue necesario elegir el método que permita rapidez, facilidad de aplicación a una variedad de muestra (extractos y compuestos puros); que sea relativamente económico y fácilmente reproducible.

Se eligió el método de neutralización del radical libre DPPH, el cual permite estimar la capacidad de neutralización o captación de radicales libres por antioxidantes fenólicos principalmente. Este radical DPPH tiene como característica que no dimeriza, es decir se mantiene en su estado monomérico en solución, exhibiendo una absorbancia estable sobre un amplio rango de pH<sup>28,29</sup>.

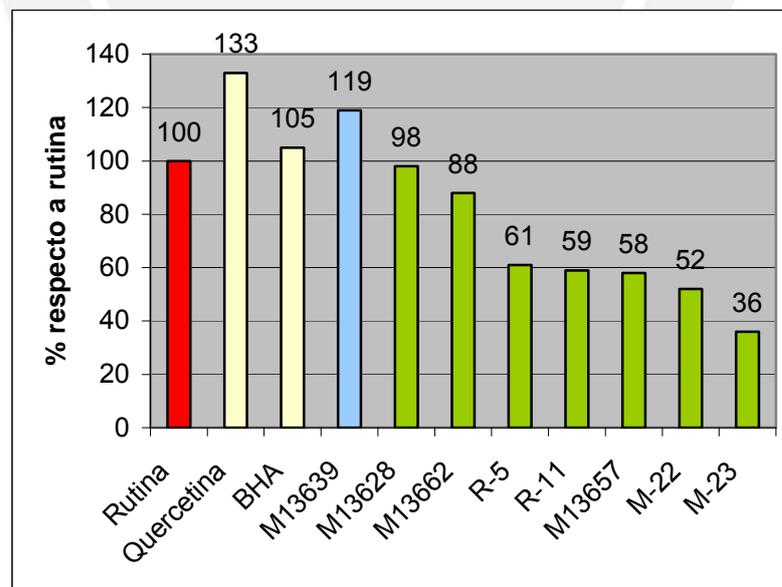
Protocolos analíticos publicados para este método difieren en el uso de la concentración de DPPH, solvente y tiempo de reacción. El etanol ha sido utilizado por Nenadis<sup>29</sup> demostrando ser importante para la evaluación de la actividad antioxidante luego de la comparación con otros solventes y además recomienda que el tiempo de reacción no debe ser menor a 20 minutos. Mensor y colaboradores<sup>27</sup>, para evaluar la actividad antioxidante de extractos de plantas brasileñas por este método; utilizaron solución de DPPH 0,3 mM y etanol como solvente. En base a estas consideraciones y al trabajo realizado por Mensor y colaboradores se eligieron y aplicaron los parámetros de trabajo.

62 extractos de plantas peruanas fueron evaluadas y clasificadas por este método de los cuales seis extractos (9,68 %) mostraron actividad antioxidante entre 25-50 %; dos extractos (3,22 %) entre 50,1 y 75 % y un extracto (1,61 %) mayor de 75 % de actividad, según se observa en la Fig. 40.



**Fig. 40. Clasificación de los extractos etanólicos según actividad antioxidante**

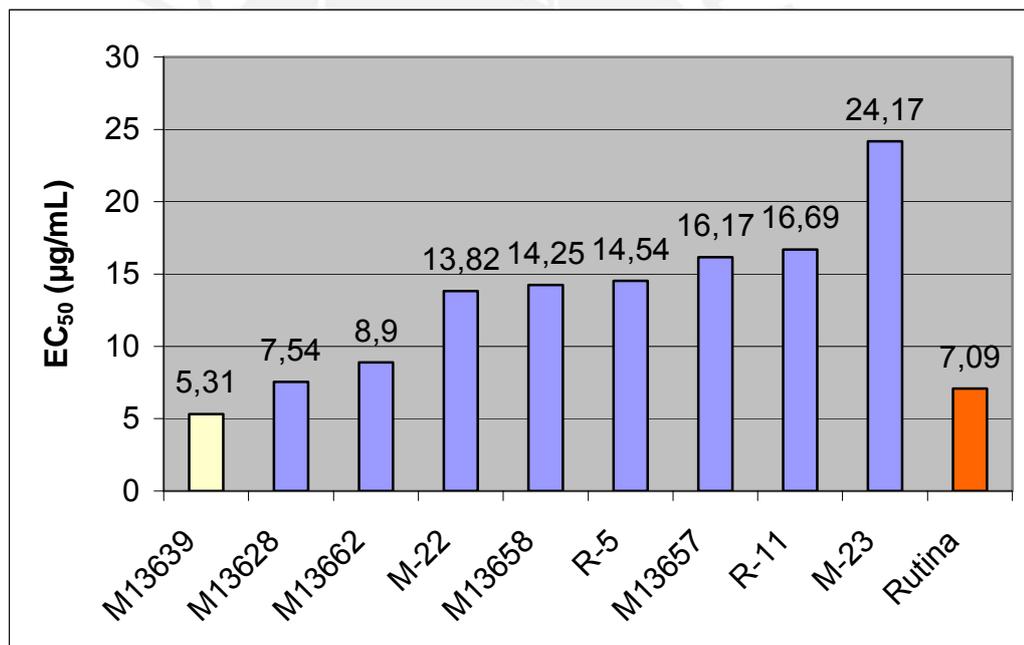
Los 9 extractos más activos fueron comparados con rutina, quercetina y BHA; el más activo de ellos (M13639) resultó ser mayor que la rutina y BHA (en 19 y 14 % respectivamente) mientras que la quercetina posee una actividad mayor (14 %). Los resultados se muestran en las Tablas 4, 5 y Fig. 41.



**Fig. 41. Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos etanólicos más activos, quercetina, BHA comparados con rutina a 10 µg/mL**

Para comparar los valores de  $EC_{50}$  de los extractos etanólicos ensayados, se tuvo que escoger el patrón de comparación el cual resultó de un estudio entre las actividades antioxidantes de quercetina, rutina y BHA (Tabla 4). Se eligió la rutina como patrón por ser un compuesto químico de procedencia natural y de valores experimentalmente más manejables.

En la Fig. 42 se observa los valores de  $EC_{50}$  respecto a la rutina, el extracto M13639 es más activo que rutina, ocho extractos presentan actividad menor que ella y el extracto R-5 tiene aproximadamente la mitad de la actividad antioxidante.



**Fig. 42. Comparación del  $EC_{50}$  de los extractos etanólicos más activos con rutina.**

## 4.2 DEL ESTUDIO QUÍMICO Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Lepechinia meyenii* (Walp.)

Para la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antioxidante se tuvo que elegir una especie vegetal comprendida en alguno de los grupos II, III o IV y que permita su recolección en cantidad suficiente. Estos criterios determinaron que el trabajo se realice con R-5, que es una planta andina de nombre científico *Lepechinia meyenii* (Walp.).

### 4.2.1 Del extracto etanólico

El extracto etanólico fue separado obteniéndose 9 fracciones. Por los resultados de la actividad antioxidante, la fracción PEA1 fue considerada como la más importante para la obtención de compuestos con esta actividad (90,36 % a 10 µg/mL) (Tabla 9).

Del análisis por HPLC-UV del extracto etanólico (Fig. 5), los compuestos a tr (min) 5,27; 7,19; 7,96; 9,77; 13,11; 14,33; 14,47; 15,48; 23,02 y 27,09 por la posición y la forma de sus espectros constituyen derivados de ácidos fenólicos; de los cuales los compuestos a tr (min) 5,27; 7,19; 23,02; 27,09 serían derivados del ácido benzóico [ $\lambda_{\text{máx.}}$ : 200 a 290 nm] y los compuestos a tr (min) 7,96; 9,77; 13,11; 14,33; 14,47 y 15,48 compuestos derivados del ácido cinámico [ $\lambda_{\text{máx.}}$  entre: 200 – 290 y 270 – 360 nm]<sup>31</sup>.

Los compuestos a tr (min) 9,56; 18,36; 21,20 y 22,59 por la similitud en posición y forma de sus espectros ultravioleta con los flavonoides<sup>30</sup> pertenecerían a este tipo de compuestos.

Los compuestos a tr (min) 7,35; 17,45; 18,15; 23,13; 23,37 y 24,06 presentan las mismas características en el espectro ultravioleta y por lo tanto el mismo tipo de compuesto, habiéndose identificado al carnosol, diterpeno abietano a tr 23,37 min.

Así también los compuestos a tr (min) 13,97; 24,34; 25,94; 26,22 y 26,40 presentan las mismas características en el espectro ultravioleta.

#### 4.2.2 De la separación de metabolitos secundarios con actividad antioxidante

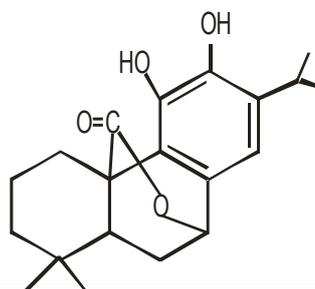
##### a. Sólido PEOI

Se presentó como cristales blanquecinos, solubles en diclorometano y metanol. En el cromatograma HPLC (Fig. 8) se observa un pico mayoritario a 23,36 min (área 1094,6).

Por CCD, en el sistema  $\text{CHCl}_3$ -Benz-MeOH 70:15:5 se presentó como una mancha oscura en la región 254 nm de la lámpara ultravioleta, y luego de la aspersion con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 % se presentó como una mancha de color verde a un  $R_f$  de 0,47. Su punto de fusión fue de 211-213 °C.

En el espectro ultravioleta presentó dos absorciones a 205 y a 284 nm, esta última de pequeña intensidad (Fig. 8), y en el espectro infrarrojo (Fig. 9) se presentan las siguientes señales:  $\nu \text{ cm}^{-1}$ : 3493 (aguda), 3287 (amplia) correspondientes al estiramiento OH libre y enlazado; a 2965, 2937, 2871, a los estiramientos C-H alifáticos; a 1715 (intenso) característico del estiramiento  $\text{C}=\text{O}$ <sup>32</sup>, otras señales a 1453, 1403, 1388, 1348, 1322, 1309, 1200, 1147, 1086, 1032, 989 y 917.

En el espectro de masa (Figs. 10, 11), el ión molecular fue de  $m/z$  330 (EI-MS y FAB-MS). Se determinó la composición elemental del compuesto siendo su fórmula global de  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$ . Por comparación con la base de datos Wiley/NBS se determinó que el compuesto corresponde a Carnosol (diterpeno oxidado del ácido carnósico, Fig 12).



Carnosol

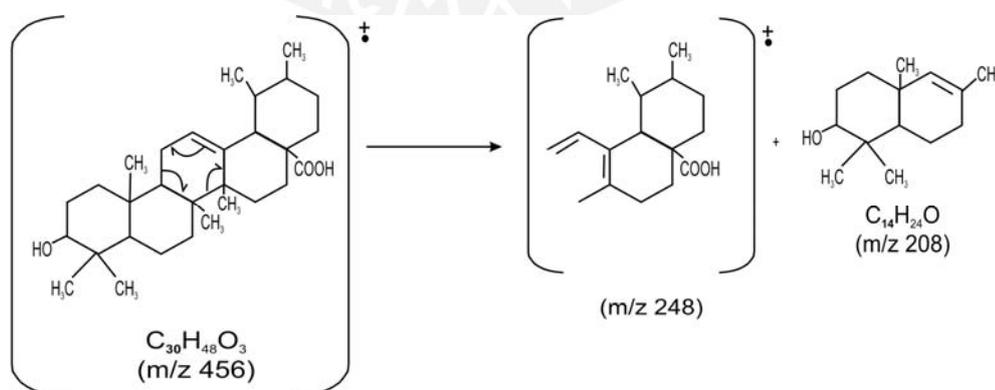
**b. Sólido PEE2-a**

Se presentó como un sólido blanco de pf 258 – 260 °C soluble en  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , benceno y metanol.

Por CCD en el sistema  $\text{CHCl}_3$ -Tol-MeOH 8:1:1 presentó un  $R_f$  de 0,57 luego de ser revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (mancha grosella que cambió con el tiempo a violeta y marrón oscuro). No absorbió a 254 ni 366 nm de la región ultravioleta. Dio positivo la reacción de Liebermann Burchard; por estas características se puede decir que es un triterpeno y/o esteroide.

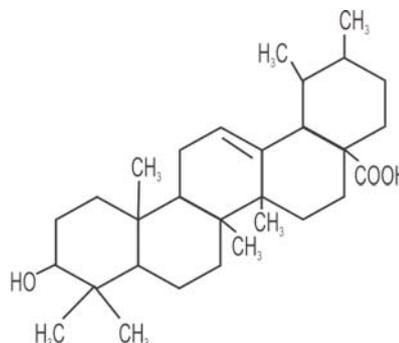
En el espectro infrarrojo (Fig 14), presentó una señal amplia a  $3435\text{ cm}^{-1}$  característica del grupo O-H, a 2980 y 2800 (estiramiento C-H de metilo y metilenos), a 1694 una señal intensa debido al estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  del grupo carboxilo [ $1710\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ ], entre otras<sup>30,32</sup>.

Por espectrometría de masas, el peso molecular fue de  $m/z$  456. El pico padre a  $m/z$  248 se debe a una escisión típica de compuestos  $\Delta^{12}$  ursano u oleanano ya que según la literatura<sup>33</sup> los compuestos  $\alpha\text{-}\Delta^{12}$  ursanos ó  $\beta\text{-}\Delta^{12}$  oleananos experimentan fragmentación tipo retrodiels alder originando un pico característico a  $m/z$  248, lo que podría explicarse de la siguiente manera:



Por comparación con la base de datos Wiley/NBS, el espectro de masa es muy similar al espectro de masa del ácido ursólico (Fig. 16), por lo

que el compuesto PEE2-a corresponde al ácido ursólico. PEE2-a no presentó actividad antioxidante a 10 ni a 50  $\mu\text{g/mL}$ .



Acido Ursólico

**c. Sólido PEE2-b**

Se presentó como un sólido amarillo cristalino, poco soluble en metanol, soluble en cloroformo y dimetilsulfóxido. Su punto de fusión fue de 247-249  $^{\circ}\text{C}$ .

Por HPLC analítica (Fig. 17) presentó un tiempo de retención de 18,38 min. Por CCD en el sistema  $\text{CHCl}_3$ -Benz-MeOH 8:1:1; luego del revelado con NP/PEG y también con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 25 % se presentó como una mancha amarilla de  $R_f$  0,41.

En el espectro ultravioleta (Fig. 17), se observaron dos señales a  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  252 (268h) y a 342 nm características de una flavona [BII 250-280 y BI 310-350 nm]<sup>34</sup>.

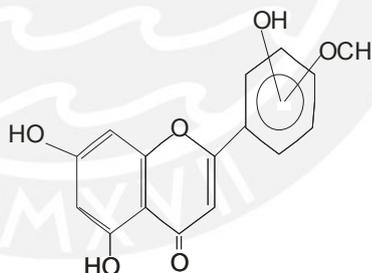
Por espectrometría de masas con electrospray, se determinó que presentaba un peso molecular de 300, el que fue confirmado usando la determinación por espectrometría de masas con impacto de electrones (Fig.18).

El núcleo básico de una flavona tiene un peso molecular de 222 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ). La diferencia con el peso molecular 300 constituye grupos

sustituyentes en el anillo ( $PM - 222 = 78$ ). Si consideramos la presencia de 4 oxígenos como sustituyentes ( $16 \times 4 = 64$ ), queda una diferencia de 14 que podría corresponder al grupo  $CH_2$ , por lo que se deduce la presencia de 3 grupos hidróxilo y 1 grupo metoxilo como sustituyentes.

El análisis de los fragmentos nos permite predecir la estructura del compuesto especialmente por la presencia de los picos a  $m/z$  257, 229, 153 y 133<sup>30</sup>.

El posible esquema de fragmentación se indica en la Fig. 43; en el que se observa un claro fraccionamiento tipo retrodiels-alder en el anillo C dando lugar a la ruptura del ión molecular en dos fragmentos ( $m/z$  153 y 148) ambos capaces de retener la carga lo que permite confirmar la presencia de sustituyentes en los anillo A y B del flavonoide<sup>35</sup> por lo tanto, la posible estructura de la flavona PEE2-b con los grupos OH y metoxilo en alguna posición en el anillo B es:



Para establecer la posición del grupo hidroxilo y metoxilo se utilizó la resonancia magnética nuclear mono y bidimensional.

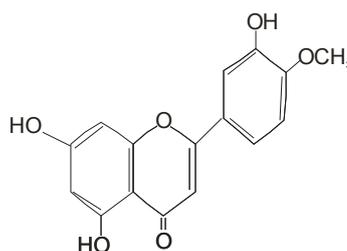
En el espectro de  $RMN-^1H$ , los protones del anillo B de flavonas se encuentran desplazados a campo más bajo por los protones del anillo A, frecuentemente entre  $6,7 - 7,9$  ppm<sup>34</sup>.

En el espectro  $RMN-^1H$  de PEE2-B (Fig. 19) se observan 4 señales en esta región, de las cuales la señal a 6,7 ppm (singlete) corresponde al

protón del C-3 de la flavona. Las otras señales pertenecen a 3 protones del anillo B, confirmando que se trata de un anillo disustituido. En flavonas 3' y 4'- dioxigenadas las señales de los protones H<sub>2</sub>' y H<sub>6</sub>' aparecen frecuentemente entre 7,2 - 7,9 ppm<sup>34</sup> y en flavonas con grupo metoxilo en posición 4' el protón en C<sub>2</sub>' esta generalmente desplazado a campo ligeramente más alto que el protón del C<sub>6</sub>', siendo lo inverso en flavonas 3-metoxilados. En el espectro estas señales corresponden a 7,41 (d) ppm para el protón de C-2' y 7,52 ppm (dd) para el protón de C-6'.

Para el anillo A, las señales de los protones de flavonas 5,7-dihidroxiladas aparecen entre 6 - 6,5 ppm encontrándose el hidrógeno del C-6 a campo más alto que el H del C-8<sup>34</sup>. En el espectro estas señales corresponderían a 6,18 ppm (d) para el protón de C-6 y a 6,44 ppm (d) para el H del C-8.

Por RMN-<sup>1</sup>H bidimensional (Fig. 20), se observan las relaciones entre los protones; el protón a 6,7 ppm muestra relaciones con los protones a 7,41 y 7,52 ppm. lo que nos permite deducir la ausencia de sustituyentes en las posiciones C-2' y C-6'; el protón en C-5' a 7,05 ppm está relacionado a distancia con la señal a 3,86 ppm de los protones del grupo metoxilo. Esto nos confirmaría la clara posición del grupo metoxilo en posición 4' y no en 3', por lo tanto el flavonoide PEE2-b corresponde a la flavona 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona que según la literatura es conocido como Diosmetina,<sup>36</sup> PEE2-b presentó 1,33 % de actividad antioxidante a 10 µg/mL y de 12,53 % a 50 µg/mL.



Diosmetina

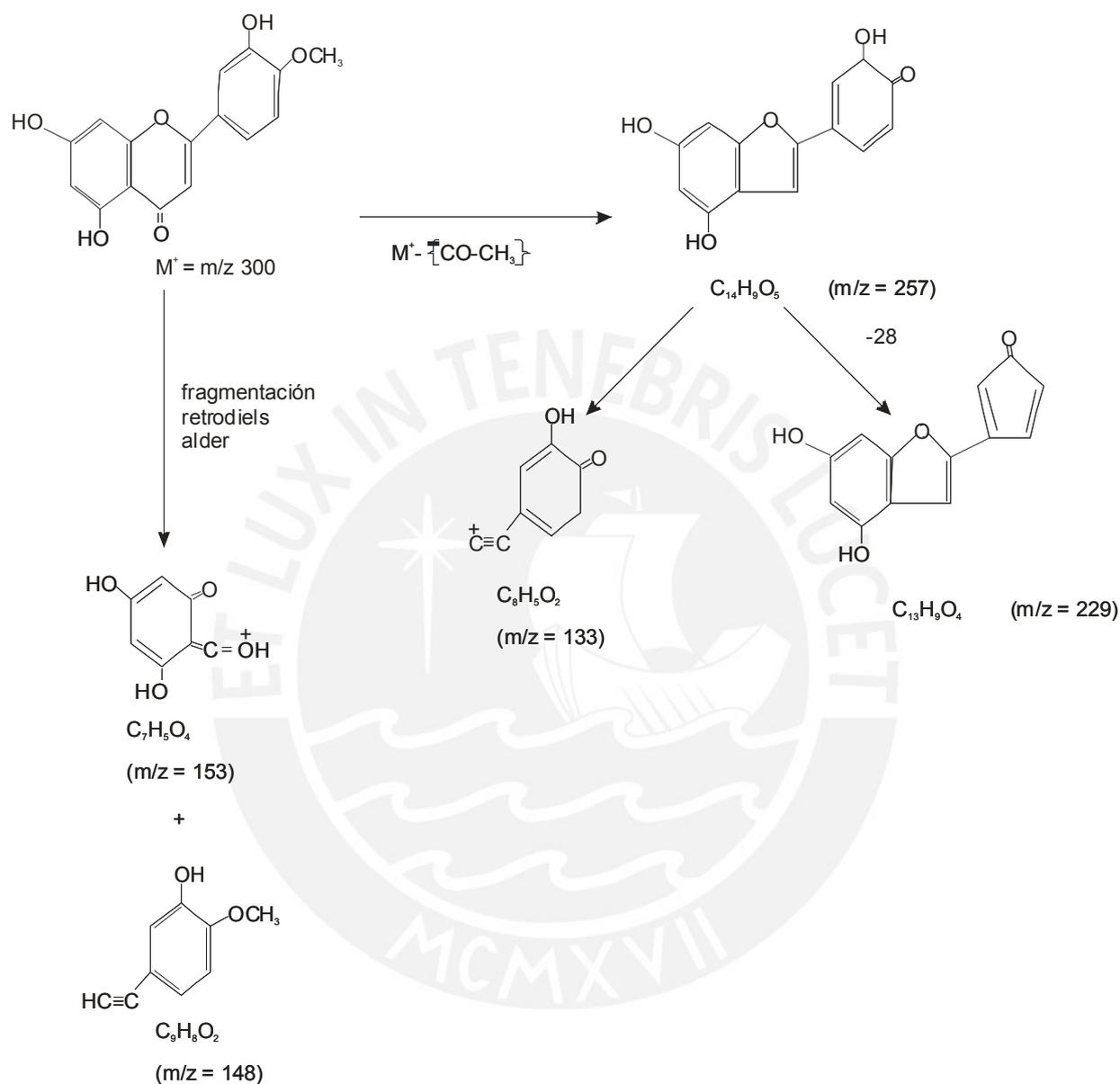


Fig. 43. Esquema de fragmentación de PEE2-b por espectrometría de masas

**d. Sólido PEA1-3a**

Se presentó como un sólido amarillo cristalino de tiempo de retención de 18,38 min en HPLC (Fig. 22). Su espectro ultravioleta así como su solubilidad, punto de fusión y CCD fueron iguales que PEE2-b y corresponden al mismo compuesto (flavona: diosmetina).

**e. Sólido PEA1-4-3a**

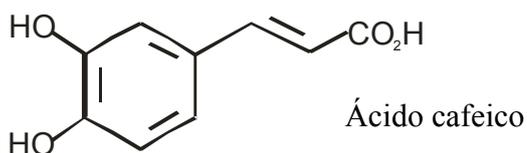
Sólido blanco amarillento, por HPLC analítica presentó un tiempo de retención de 7,86 min (Fig. 23).

En el espectro de masas (EI-MS) presentó un peso molecular de 180 (Fig. 26).

En el espectro ultravioleta se presentan dos absorciones, a 212 nm con un hombro a 240 nm y la otra a 330 nm con un hombro a 295 nm característico de un derivado del ácido cinámico<sup>31</sup> (Fig. 23).

Por HPLC analítica (Figs. 24 y 25) y por espectrometría de masas por comparación con la base de datos Wiley/NB (Fig. 27), se encontró similar comportamiento que el ácido cafeico.

Los resultados del análisis por HPLC y por espectrometría de masas nos permiten deducir que el sólido PEA1-4-3a es ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico).

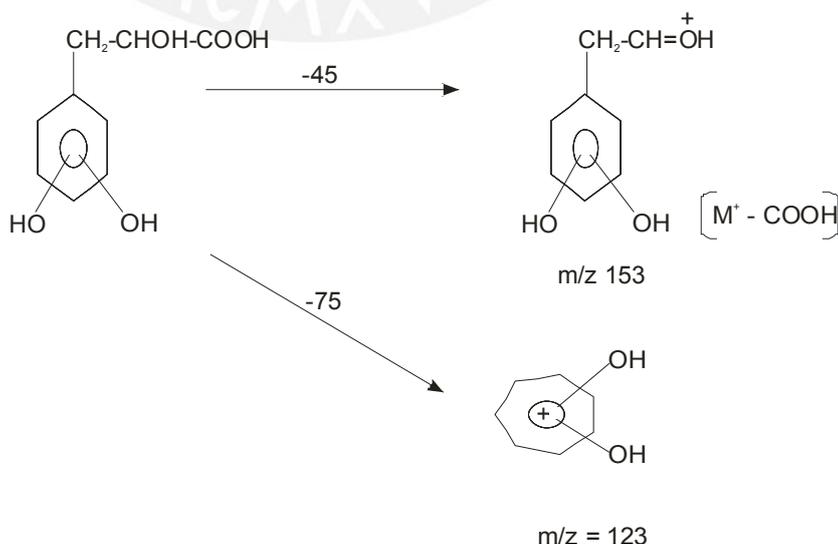


*f. Sólido PEAI-6-5a*

Se presentó como un sólido verde cristalino, soluble en metanol y etanol. En el cromatograma de HPLC (Fig. 31) se presenta a un tr de 12,88 min, por CCD en el sistema AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O 37:5:3 presentó un R<sub>f</sub> de 0,22 luego de revelar con NP/PEG.

Por espectrometría de masas (Fig. 32) el ión molecular es de 198 confirmado por espectrometría de masas de alta resolución (Fig. 33). La fórmula global que le corresponde es de C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>.

El análisis de los fragmentos nos permiten hacer las siguientes aseveraciones: la pérdida inicial de 18 unidades corresponde a la pérdida de una molécula de agua debido a la presencia de un grupo hidroxilo. El pico a 153 m/z corresponde a la pérdida de un grupo carboxilo (M-45). El pico base a 123 m/z es típico de un fragmento bencílico dihidroxilado que por rearreglo origina un ión cíclico de 7 miembros. Estos fragmentos permiten reconstruir la siguiente estructura:



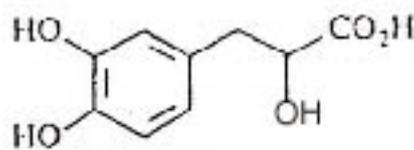
Para determinar la posición de los grupos hidroxilo se utilizó espectroscopía ultravioleta y reactivos de desplazamiento (Fig. 34). El espectro en metanol presentó una absorción a 330,9 nm y un pequeño hombro a 290,2 nm característico de compuestos derivados del ácido cinámico<sup>31</sup>.

Con MeONa se observó desplazamiento batocrómico (de 42,79 nm) e hiperocrómico de la banda a 330,9 nm. Esto se explicaría por la presencia de grupos hidroxilo en la molécula, los que sufren una ionización con este reactivo<sup>30,34</sup>.

Con tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), se observó desplazamiento batocrómico de la señal a 330 nm (hasta 361,9 nm) que luego de la adición de HCl desaparece; este comportamiento es característico de los grupos hidroxilo en posición orto, debido a que forman complejos lábiles con el  $\text{AlCl}_3$  descomponiéndose en presencia de ácido<sup>30,34</sup>. Con ácido bórico/acetato de sodio, también los compuestos orto-dihidroxilo presentan desplazamiento batocrómico observándose este efecto en la banda principal.

Por el comportamiento descrito se confirmó que el compuesto PEA1-6-5a presenta los grupos hidroxilos en la posición orto.

Luego el compuesto PEA1-6-5a es un derivado del ácido cafeico cuya estructura es la siguiente:



Ácido 2 - hidroxicafeico

**g. PEA1-6-6b**

Por HPLC analítica se observan dos picos a 14,06 min y a 13,53 min (Fig. 35).

En el espectro ultravioleta el compuesto mayoritario presenta una absorción a 330 nm y un pequeño hombro a 285 nm característico de compuestos derivados del ácido cinámico<sup>31</sup>.

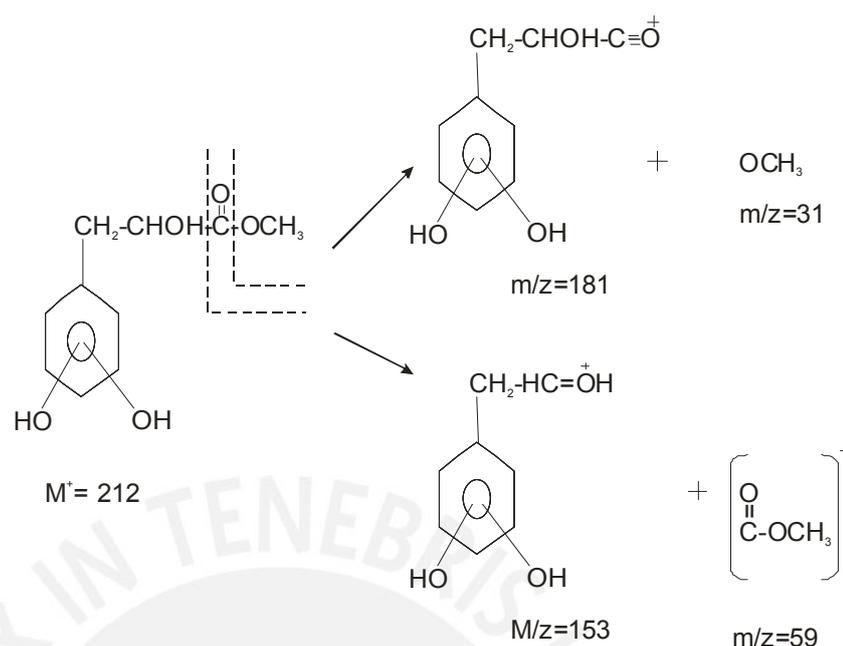
Por espectrometría de masas el compuesto (a tr 14,06 min) presenta un peso molecular de  $m/z$  212 (Fig. 36); picos importantes a 123  $m/z$  y a 153  $m/z$  contribuyen a la propuesta de su estructura y corresponden a los mismos fragmentos estructurales presentes en PEA1-6-5a; a 123  $m/z$  indica la presencia de un fragmento bencílico dihidroxilado y a 153  $m/z$  a un sustituyente hidroxilo en carbono  $\beta$  de la cadena lateral del anillo fenólico. El peso molecular 212 menos el fragmento 153, corresponde a la pérdida de 59 uma lo que permite deducir dos posibilidades para este fragmento:

- Un grupo carboxilo y un grupo metileno ( $-\text{CH}_2\text{-COOH} = 59$  uma) ó
- Un grupo éster metílico ( $-\text{COO-CH}_3 = 59$  uma).

La falta de evidencia de pérdida de un grupo carboxilo ácido a partir del ión molecular y también de un grupo metileno permite descartar la primera posibilidad (a).

En el espectro de masas los grupos éster sufren ruptura en ambos lados del grupo carbonilo<sup>35</sup>, el compuesto PEA1-6-6b presenta iones fragmentos correspondientes a esta ruptura (Fig. 36).

Esto permite proponer la siguiente estructura para PEA1-6-6b:



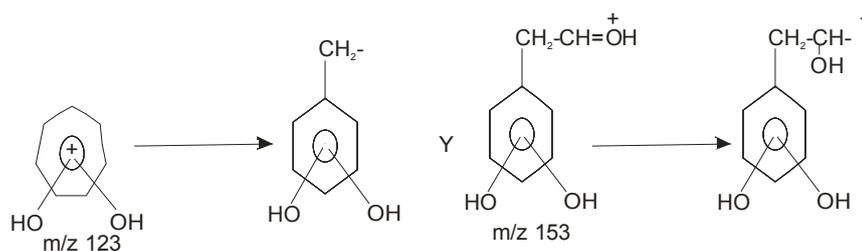
La poca cantidad de muestra obtenida no permitió realizar mayores ensayos para este compuesto.

#### *h. PEA1-4-6b*

Se presentó como una sustancia resinosa. En el cromatograma HPLC (Fig. 28), a un tiempo de retención de 15,48 min se presenta el compuesto mayoritario además de impurezas a 14,42 y a 18,33 min.

Por espectrometría de masas (Fig. 29), el compuesto mayoritario presentó un peso molecular de 226. En el espectro ultravioleta se observó una absorción a 330 nm y un hombro a 285 nm similar al espectro ultravioleta de los compuestos PEA1-6-5a y PEA1-6-6b, típicos de derivados del ácido cinámico<sup>31</sup>.

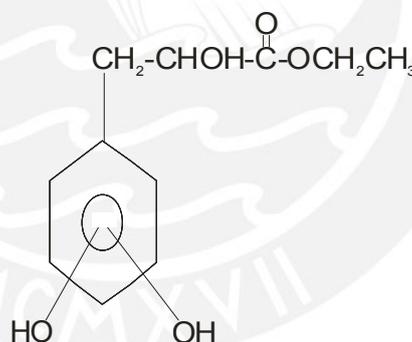
En el espectro de masas, se observaron los picos a m/z 153 y a 123, igual que para PEA1-6-5a y a PEA1-6-6b presentando por lo tanto los mismos fragmentos y por tanto los siguientes grupos:



En relación al peso molecular 226, y al fragmento 153 la diferencia corresponde a 73 uma, lo que permite considerar dos posibilidades:

- Un grupo carboxilo ácido y dos grupos metileno ó
- Un grupo éster etílico.

El espectro infrarrojo (Fig. 30) permite descartar la primera posibilidad por ausencia del estiramiento O-H característico del ácido carboxílico (banda amplia entre  $3300 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ , centrada en  $3000 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>32</sup>. Por lo tanto la estructura propuesta para PEA1-4-6b es la siguiente:



Ester etílico del ácido 2-hidroxicafeico

Es posible que PEA1-4-6b sea un artefacto formado por reacción del ácido 2-hidroxicafeico con el etanol utilizado durante el proceso de extracción.

## COMENTARIO DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Del extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* (Walp.), siguiendo el método descrito en el presente trabajo se han identificado cinco compuestos: carnosol, diosmetina, ácido ursólico, ácido cafeico y ácido 2-hidroxicafeico; además se han propuesto las estructuras de dos derivados del ácido hidroxicafeico.

En *Lepechinia meyenii* (Walp.) se ha reportado la presencia de ácido carnósico<sup>8</sup>, un diterpeno de conocida inestabilidad y facilidad a degradarse por acción de la temperatura y el pH<sup>36</sup>. El carnosol es considerado como el primer producto de oxidación del ácido carnósico y es conocida su importante contribución a la actividad antioxidante en especies como en el *Rosmarinus officinalis*, *L. hastata* y otras<sup>9,37</sup>; sin embargo en esta especie este diterpeno pareciera no ser el compuesto que le confiere la mayor actividad.

El flavonoide Diosmetina (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona) presenta una baja actividad antioxidante y no ha sido reportado en otras especies de este género.

El compuesto PEE2-a, ácido ursólico, si bien resultó ser un triterpeno carente de actividad antioxidante por el método utilizado, es importante resaltar algunas de sus propiedades como: protector contra daños hepáticos en animales de experimentación, antiinflamatorio, antihiperlipidémico y promotor de los efectos antitumorales. Por estas propiedades y por ser relativamente no tóxico es usado en cosméticos y en productos médicos, en la terapia para pacientes<sup>38</sup>.

De las nueve fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico, la fracción PEA1 presentó la mejor actividad antioxidante; luego de su fraccionamiento, la subfracción 6 la superó en actividad, siguiéndole la subfracción 4. El compuesto PEA1-6-5a, ácido 2- hidroxicafeico

presentó una actividad antioxidante a 10  $\mu\text{g/mL}$  de 94,15 %, mayor que la determinada para la fracción de la cual proviene (90,36 %), y su  $\text{EC}_{50}$  (3,36  $\mu\text{g/mL}$ ) resultó ser mejor que el de la rutina (7,09  $\mu\text{g/mL}$ ) y comparable al de la quercetina (3,96  $\mu\text{g/mL}$ ). El ácido cafeico y los compuestos derivados del ácido 2-hidroxicafeico presentan también buena actividad antioxidante (Tablas 13 y 14) y debe destacarse que estos compuestos a pesar de ser conocidos no habían sido reportados en especies del Género *Lepechinia*.

La presencia en el extracto etanólico y sus fracciones de otros compuestos con similares espectros ultravioleta a PEA1-6-5a, PEA1-6-6b, PEA1-4-6b y al ácido cafeico permiten deducir la existencia de otros derivados del ácido cafeico en este extracto. El ácido cafeico y sus derivados son conocidos por su buena actividad antioxidante<sup>39-42</sup>. La presencia de estos en el extracto de *Lepechinia meyenii* (Walp.) serían los principales responsables de su actividad antioxidante.

#### **DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN OTRAS FRACCIONES**

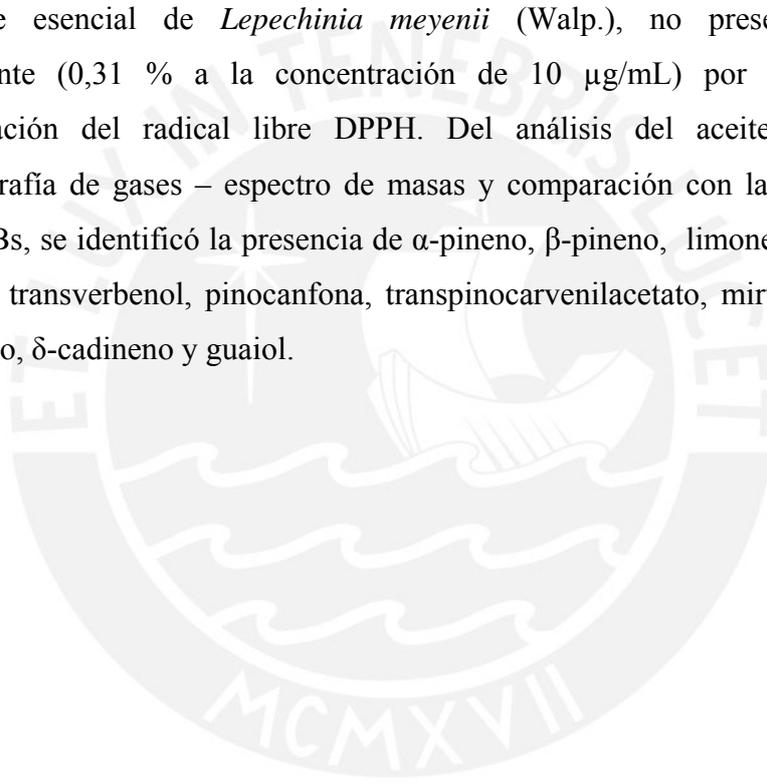
Las subfracciones de PEA1: 4-1, 4-2, 4-7 y 4-8 fueron analizadas por HPLC (Anexo: Figs. 50, 51, 52 y 53) mostrando escasa complejidad. Por las características de sus espectros ultravioleta se puede deducir que algunos de los compuestos son derivados del ácido cafeico. La poca cantidad de muestra obtenida en cada caso no permitió realizar mayores ensayos para determinar sus estructuras.

## V. CONCLUSIONES

- 1.- De los 62 extractos etanólicos procedentes de 53 especies vegetales de la zona andina y amazónica del Perú, evaluados por el método de neutralización del radical libre DPPH sólo 9 presentaron actividad destacable. Seis (9,68 %) de los extractos presentaron actividad antioxidante entre 25-50 %, dos (3,22 %) entre 50,1 y 75 % y el extracto M13639 (1,61 %) presentó más del 75 % de actividad antioxidante a 10  $\mu\text{g/mL}$ .
- 2.- De la comparación del  $EC_{50}$  de los 9 extractos más activos con rutina ( $EC_{50} = 7,09 \mu\text{g/mL}$ ), el extracto M13639 fue 25 % más activo ( $EC_{50} = 5,31 \mu\text{g/mL}$ ) y el extracto M13628 ( $EC_{50} = 7,54 \mu\text{g/mL}$ ) fue 6,35 % menos activo.
- 3.- El extracto R-5, *Lepechinia meyenii* (Walp.), procedente del departamento de Ancash estuvo incluido entre los extractos más activos, presentando 42,96 % de actividad antioxidante a 10  $\mu\text{g/mL}$  y su  $EC_{50}$  fue de 14,54  $\mu\text{g/mL}$ .
- 4.- Del fraccionamiento del extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* (Walp.), la fracción que presentó la mayor actividad antioxidante fue PEA1 con 90,36 % a 10  $\mu\text{g/mL}$  y de 96,24 % a 50  $\mu\text{g/mL}$ ; y de este las subfracciones PEA1-4 y PEA1-6 a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  presentaron las mayores actividades (89,79 y 93,99 % de actividad respectivamente).
- 5.- De la separación guiada por la actividad antioxidante se aisló el compuesto de mayor actividad, el ácido 2-hidroxicafeico con un 94,15 % de actividad a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ; valor mayor al de la fracción de donde procede y al del extracto etanólico total. Su  $EC_{50}$  fue de 3,46  $\mu\text{g/mL}$  superior al de rutina (7,09  $\mu\text{g/mL}$ ) y al de quercetina (3,96  $\mu\text{g/mL}$ ). También se aisló el diterpeno carnosol con una actividad antioxidante de 60,83 % a 10  $\mu\text{g/mL}$ ; su  $EC_{50}$  fue de 8,19  $\mu\text{g/mL}$ .
- 6.- Se identificó al ácido cafeico ( $EC_{50} = 5,62$ ) de reconocida actividad antioxidante y a dos ésteres del ácido 2-hidroxicafeico, el 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiropa-

noato de metilo ( $EC_{50} = 5,63$ ) y al 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanoato de etilo ( $EC_{50} = 5,64$ ).

- 7.- Otros compuestos aislados a partir del extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* (Walp.) fueron: el ácido ursólico y el flavonoide 3, 5,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona (diosmetina) los que no presentaron significativa actividad antioxidante (0,0 % y 1,33 % a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente).
- 8.- El aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.), no presentó actividad antioxidante (0,31 % a la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) por el método de neutralización del radical libre DPPH. Del análisis del aceite esencial por cromatografía de gases – espectro de masas y comparación con la base de datos Wiley-NBs, se identificó la presencia de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol, linalool, transverbenol, pinocanfona, transpinocarvenilacetato, mirtenilacetato,  $\beta$ -bisaboleno,  $\delta$ -cadineno y guaiol.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Eggers, M. 2000. Zusammen setzung und variation ätherischer öle von Pflanzender venezolanischen Anden unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Lepechinia* Willd. (Lamiaceae). Tesis doctoral. Pharmazie. Universität Hamburg.
- 2.- Hart, C. 1983. Systematic and evolutionary studies in the genus *Lepechinia* (Lamiaceae). Dissertation, Harvard, USA. Bazé KZP-zobrazení vice údajů zaznanmu. <http://www.omega.nkp.cz:4001/>
- 3.- Epling, C. 1937. Sinopsis of South American Labiatae. *Rep. sp. novarum, Beihefte* **85**.
- 4.- Jonathan, L.; Chun-Tao Ch.; Pezzuto J.; Fong H. y Farnsworth N. 1989. 7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpenequinones from *Lepechinia bullata*. *J. Natural Products* **52** (3), 571 – 575.
- 5.- Delgado, G.; Sánchez, J; Hernández, J.; Chávez, M. 1992. Abietanoid acid from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry* **31**, 3159-3161
- 6.- Delgado, G.; Hernández, J.; Chávez, M.; Álvarez, L.; Gonzaga, V. y Martínez. E. 1994. Di-and-triterpenoid acids from *L. caulescens*. *Phytochemistry* **37**, 1119-1121.
- 7.- Delgado, G.; Sánchez, E.; Cárdenas, X.; Álvarez, L.; Romo de Vivar, A.; Pereda-Miranda, R. 1986. New oleanane and isopimarane terpenoids from *Lepechinia glomerata*. *J. Chem. Res. Miniprint* **8**, 2565-2579.
- 8.- Bruno, M.; Savona, G.; Piozzi, F.; De La Torre, M.; Rodríguez, M. 1991. Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyenii* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry* **30**, 2339-2343.
- 9.- Dimayuga, R.; García, S.; Nielsen, P.; Christophersen, C. 1991. Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) III: Carnosol, a antibiotic from *Lepechinia hastata*. *J. Ethnopharmacol.* **31**, 43-48.
- 10.- Ahmed, A.; Adams, A.; Mabry, T. 1996. Sesquiterpenes from *Lepechinia urbaniana*. *Planta Médica* **62**, 385-386.

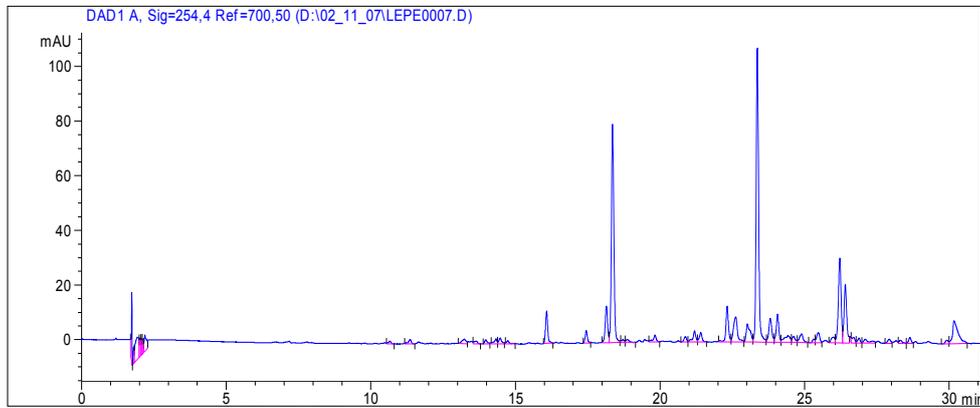
11. - Eggers, M.; Sinmwel, V.; Stahl-Biskup, E. 1999. Spirolepechinina, a spirosesquiterpene from *Lepechinia bullata*. (Lamiaceae). *Phytochemistry* **51**, 987-990.
12. - Lawrence, B.; Morton, J. 1979. Volatile constituents of *Lepechinia calycina*. *Phytochemistry* **18**, 1887.
- 13.- Valenzuela, L.; Vila, R.; Canigual, S.; Adzet, T. 1992. The esencial oil of *Sphacele chamaedryoides*. *Planta Médica* **58**, 273-274.
- 14.- Velazco, A.; Pérez-Alonso, J.; Esteban, J; Guzman, C.; Zygadlo, J and Ariza-Espinar, L. 1994. Essential oil of *Lepechinia floribunda*. (Benth). *Epl. J. Essential oil Res.* **6**; 539-540.
- 15.- Mango, R.; Chavez, J.; Lock, O. 1990. Sesquiterpene guaiol from *Lepechinia meyenii*. *Rev. Latinoamer. Quim.* **21** (2), 63-66.
- 16.- Montes, M.; Valenzuela, R.; Wilkominsky, F. 1983. Aceite esencial de salvia. *Lepechinia salviae* (Lindl.) *Epl. Anal Real Acad. Farm.* **49**, 257-262.
17. - Stashenko, E.; Puertas, M.; Martinez, J. 2002. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 70-74.
18. - Ciccó, J.; Soto, V. and Poveda, L. 1999. Essential oil of *Lepechinia schiedeana* (Lamiaceae) from Costa Rica. <http://www.ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/47-2/ciccioEs.html>.
- 19.- Alpande, A.; Correa, J.; Goltlieb, O. 1972. Óleos terpénicos do Estado do Rio de Janeiro. *Anal. Acad. Brasil. Cienc.* **44**, 320.
- 20.- Rossi, C.; Arias, G.; Lozano, N. 2002. Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyenii* (Walp.) “Salvia”. Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. Farmacia, Lima. *Ciencia e investigación* **5** (1).  
[http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/ciencia/vol\\_5N1\\_2002/evaluaci%C3%B3n\\_antimicrobiana.htm](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/ciencia/vol_5N1_2002/evaluaci%C3%B3n_antimicrobiana.htm).

21. - Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernandez, I.; Alban, J.; Lock, O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J. Ethopharmacol.* **88** (2-3) 199-204.
- 22.- Cheeseman, K. & Slater, T. 1993. Free Radicals in Medicine. British Medical Bulletin Vol **49** (3), pp. 481 – 491. Churchill, Livingstone.
23. - Luigi Dorio, E. 2002 .CD-ROMs test and oxidative stress assessment. DIACRON INTERNATIONAL, s.r.l. [www.diacron.com](http://www.diacron.com)
- 24.- Sang Kook Lee; Zakaria, H.; Mbwambo, H.; Gomez, E.; Mehta, R.; Douglas, A. and Pezzuto, J. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High throughput Screening* **1**, 35-46.
25. - Chavez, R.; Plaza, A.; Lock, O. 1996. Antioxidantes de origen vegetal. *Revista de Química*, **X**. (1), 71 - 101.
- 26.- Avendaño L, C. 2001. Introducción a la Química Farmacéutica. 2da edición Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, pp. 575 – 598.
- 27.- Mensor, L.; Menezes, F.; Leitao, G.; Reis, A.; Dos Santos, T.; Coube, C.; Leitao, S. 2001. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free radical method. *Phytotherapy Res.* **15**, 127-130.
28. - Fukumoto, L.; Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3597-3604.
29. - Nenadis, N.; Tsimidov, M. 2002. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compound using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. (DPPH) Tests. *JAOCs*, **79** (12), 1191 - 1195.
- 30.- Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
- 31.- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2866 – 2887.
32. - Silverstein, R. 1998. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Wiley International. New York.

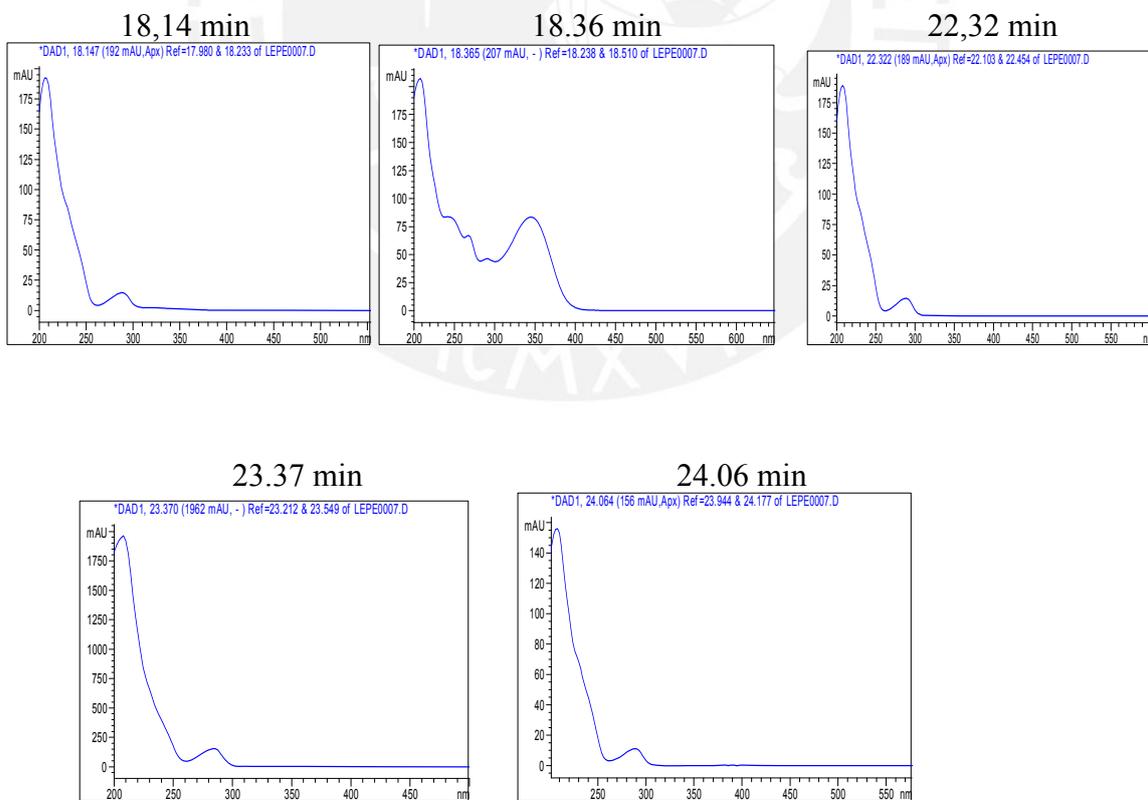
33. - Budzikiewicz, H. and col. 1964. Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. **Vol II**: Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes. Holden-Day, INC.
34. - Mabry, T; Markham, K. and Thomas, M. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. Berlín.
35. - Hesse, M.; Meier, H. y Zeeh, B. 1999. Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica. 2da edición. Editorial Síntesis. S.A.
- 36.- Wagner, H. and Mohan, V. 1976.  $C^{13}$ -NMR – Spektren natürlich vorkommender flavonoide. *Tetrahedron Letters* **21**, 1799 – 1802.
- 37.- Backleth, M.; Leupold G. and Parlar, H. 2003. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1297 – 1301.
38. - Liu, Jie. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68.
- 39.- Takenaka, M.; Yan, X.; Yoshida, M.; Nagata, T. and Nakanishi, T. 2003. Caffeic acid derivatives in the roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 793-796.
- 40.- Bratt, K.; Sunnerheim, K.; Bryngelsson, S.; Fagerlund, A.; Engman, L.; Anderson, R. and Dimberg, L. 2003. Avenanthramides in oats (*Avena sativa L.*) and structure-antioxidant activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 594-600.
41. - Lamaison J., and col. 1991. Rosmarinic acid content and antioxidant activity in French Lamiaceae. *Fitoterapia* **LXII** (2), 166 – 171.
- 42.- Hong, J.; Ho, Ch. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374 – 2378.

## VII. ANEXOS

### a.- Cromatograma HPLC

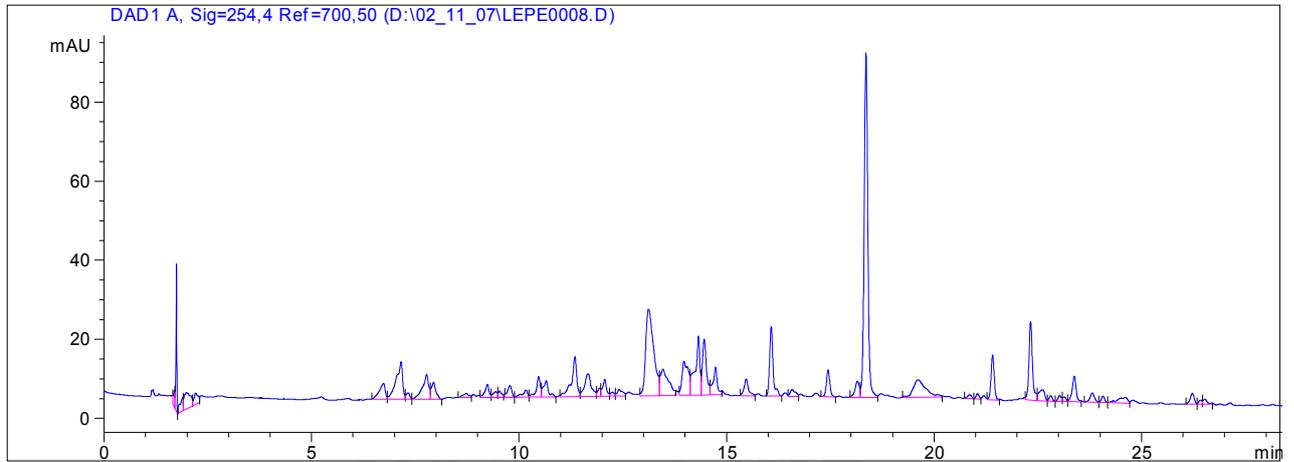


### b.- Espectros Ultravioleta de algunos compuestos



**Fig. 44. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEO2A**

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta de algunos compuestos

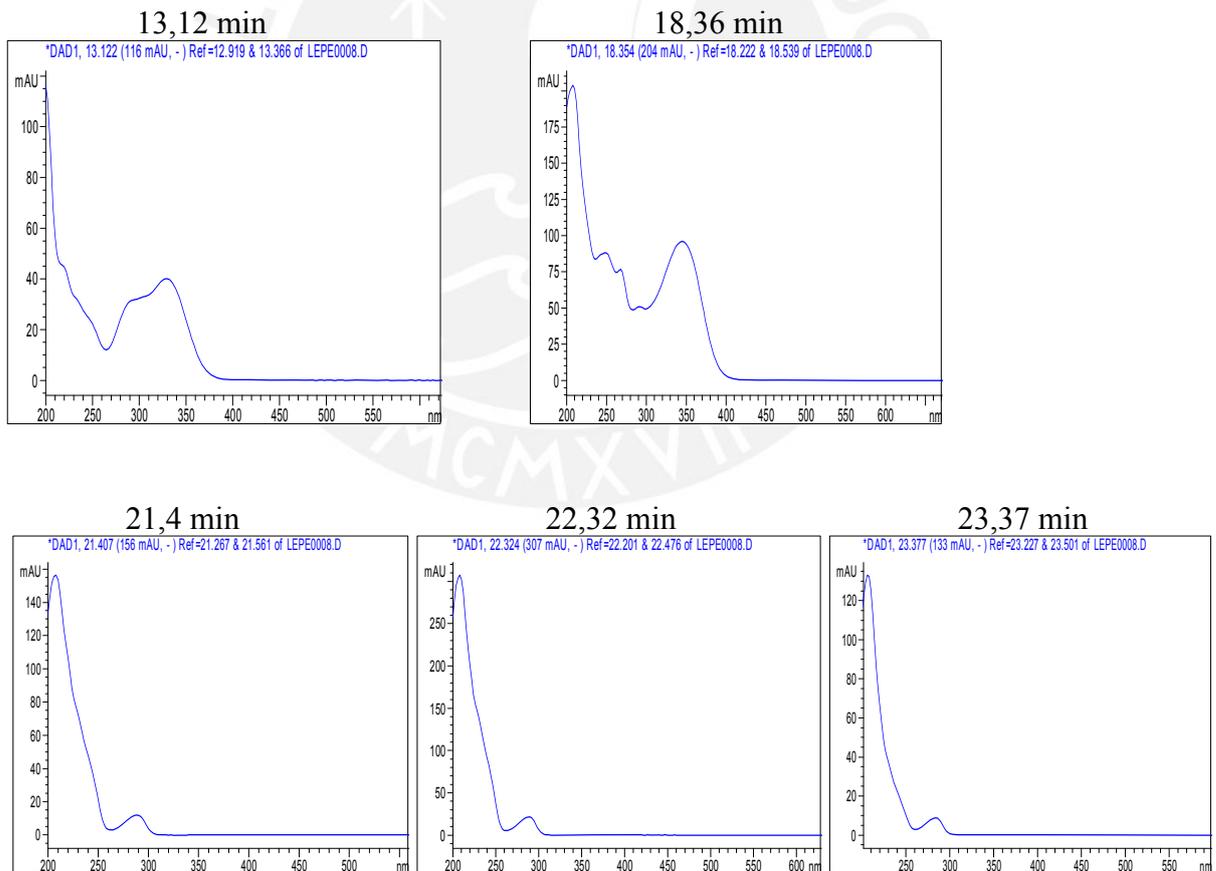
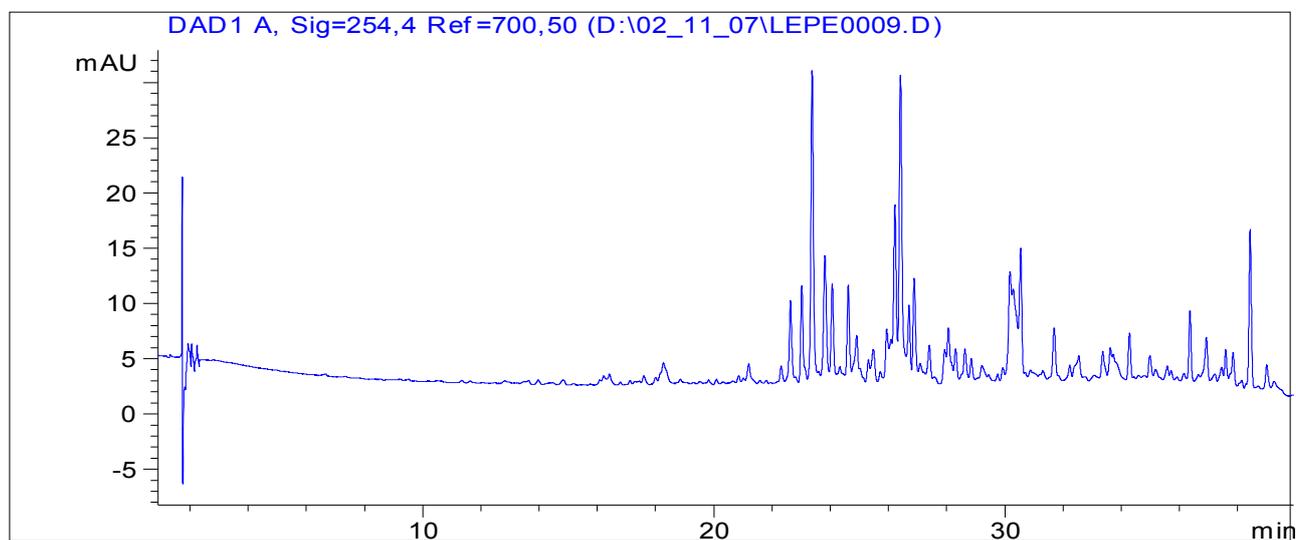
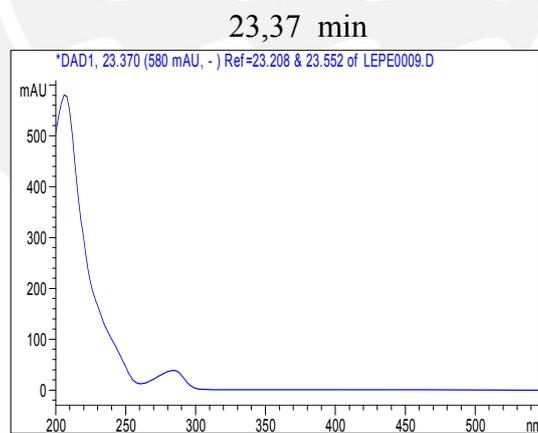


Fig. 45. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEO2B

## a.- Cromatograma HPLC

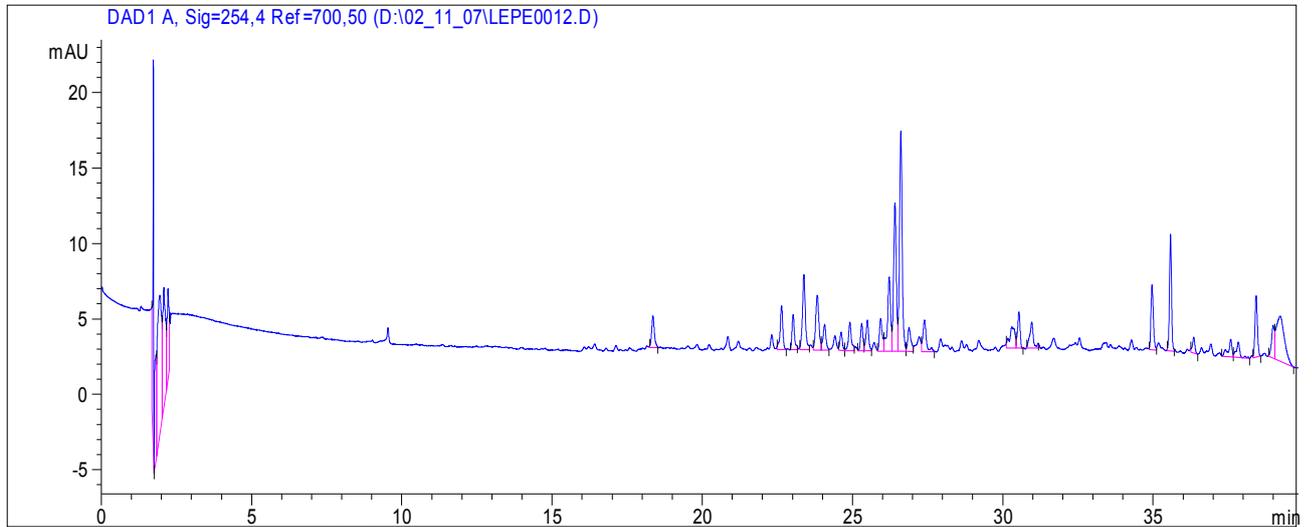


## b.- Espectro ultravioleta

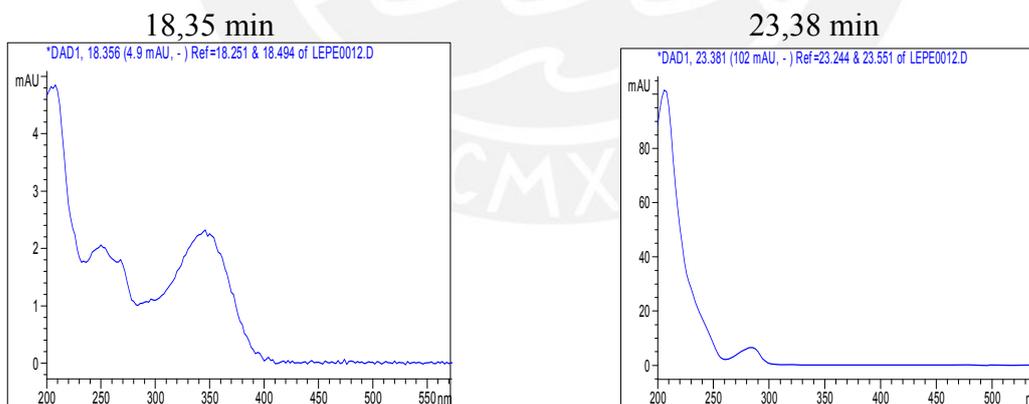


**Fig. 46. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEO3**

a.- Cromatograma HPLC

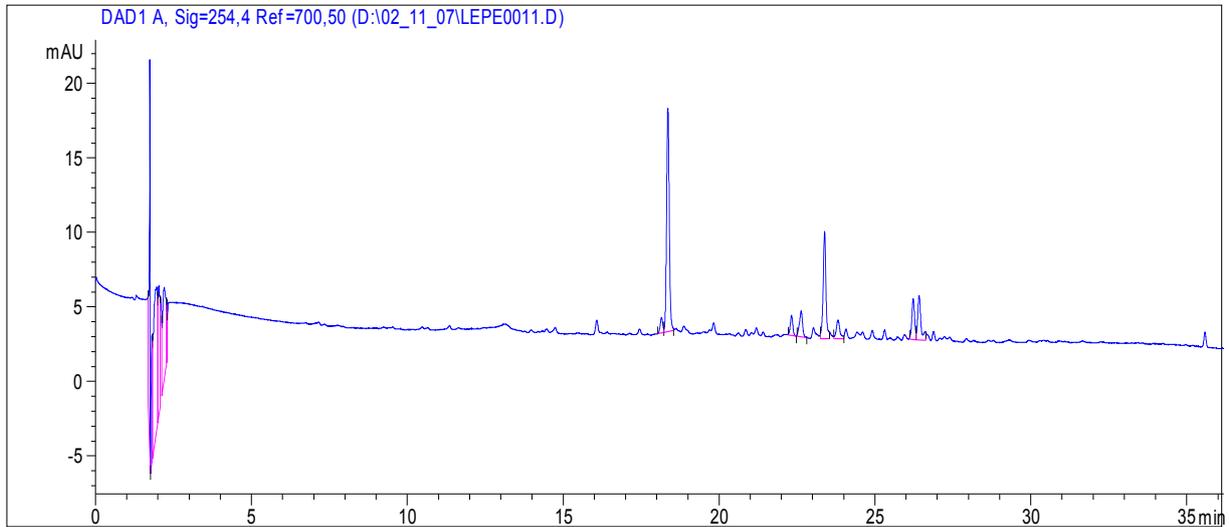


b.- Espectros ultravioleta

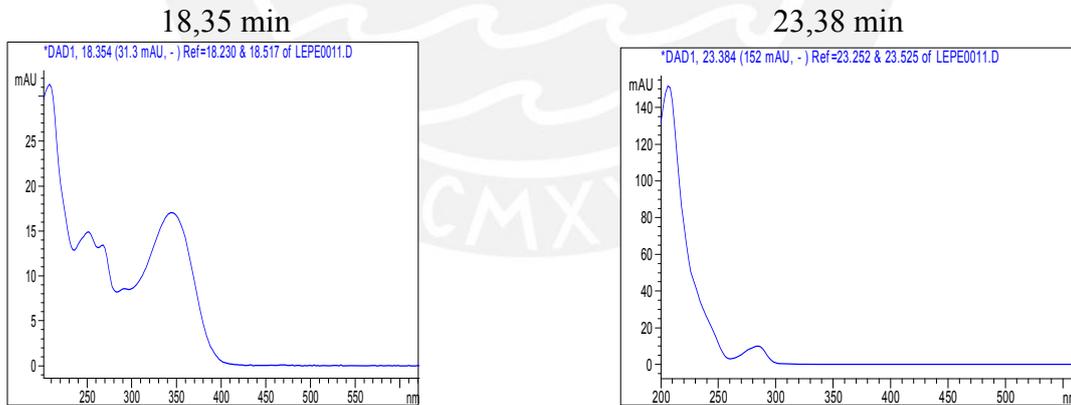


**Fig. 47. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEE1A**

a.- Cromatograma HPLC

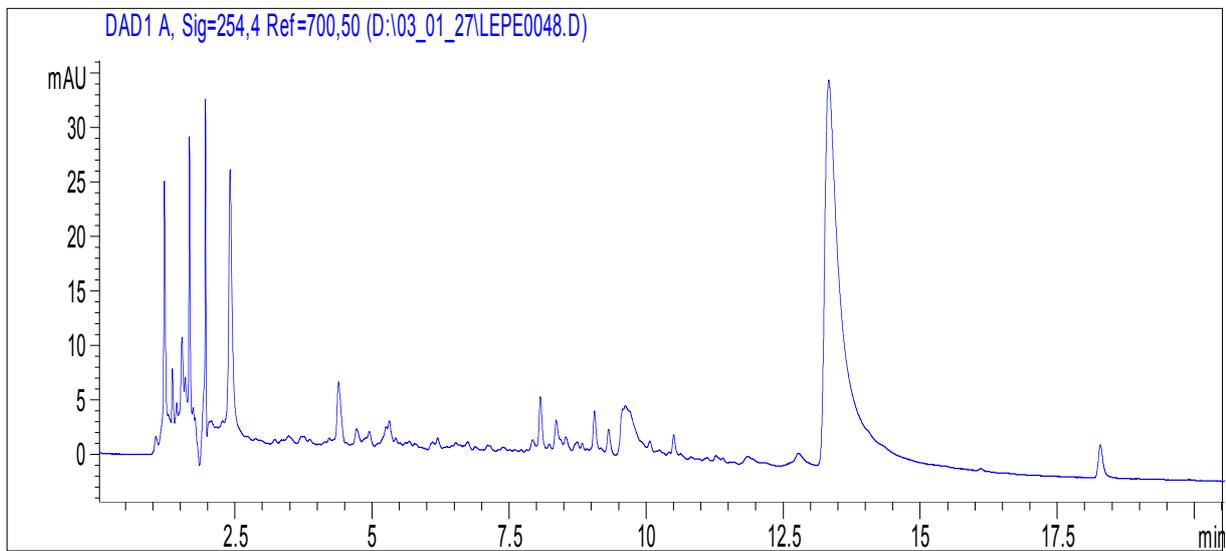


b.- Espectros ultravioleta de algunos compuestos

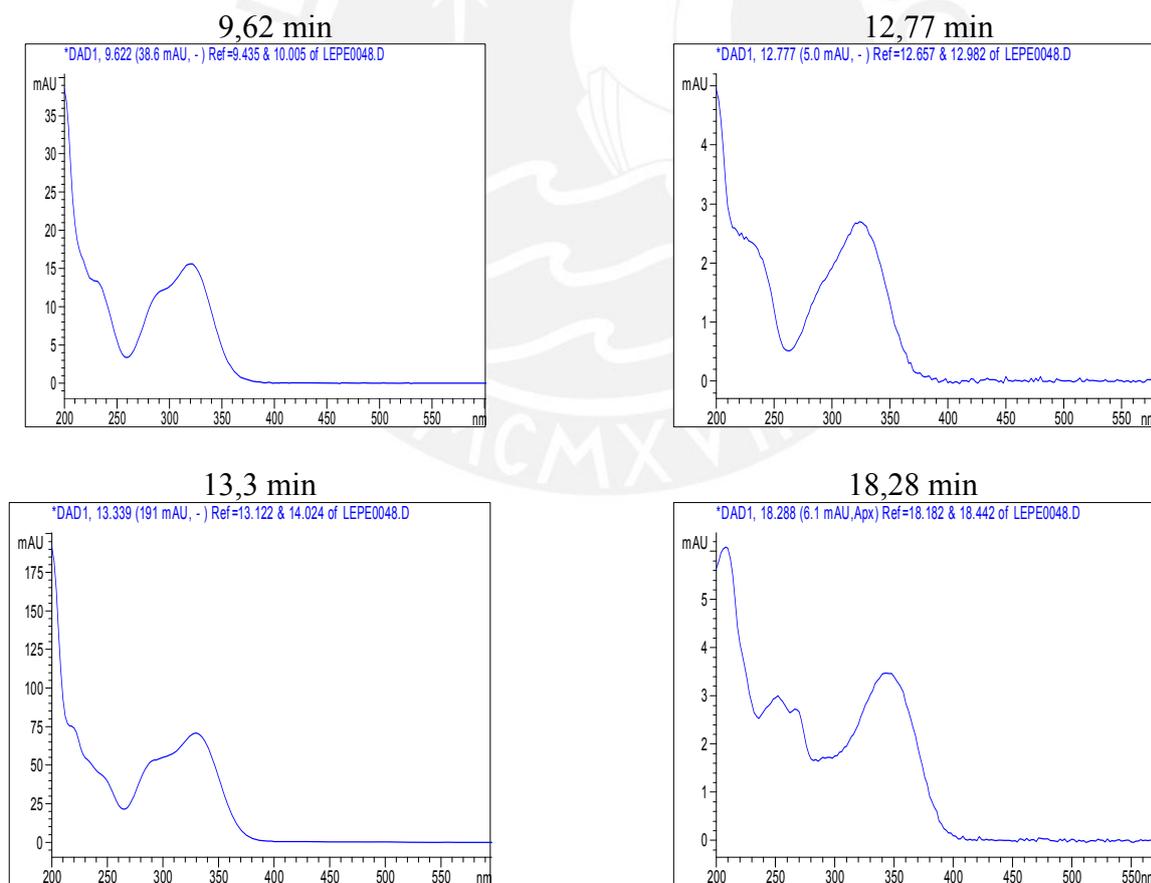


**Fig. 48. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEE1B**

a.- Cromatograma HPLC

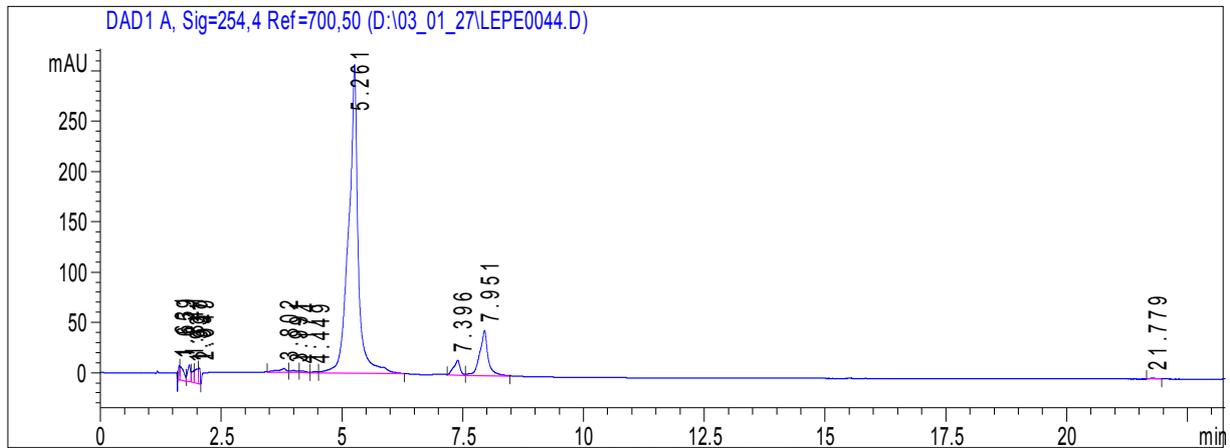


b.- Espectros ultravioleta



**Fig. 49. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de PEA2**

a.- Cromatograma HPLC



b- Espectros ultravioleta

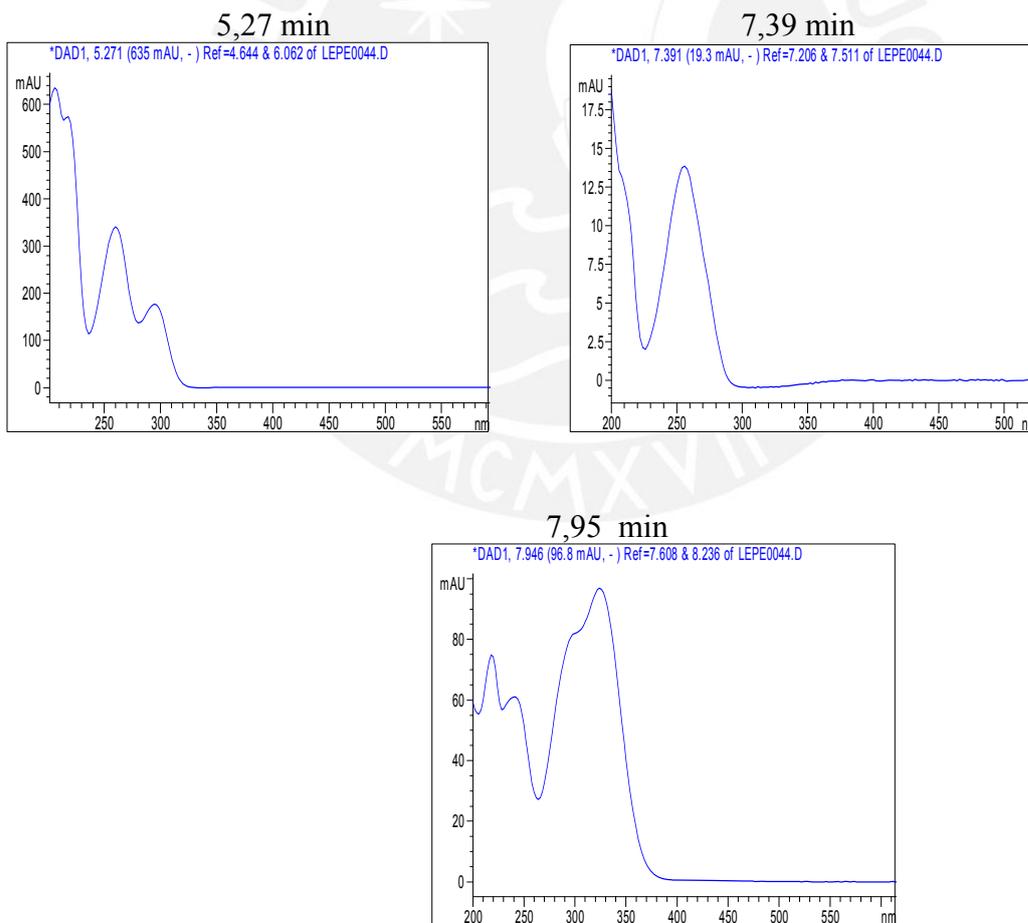
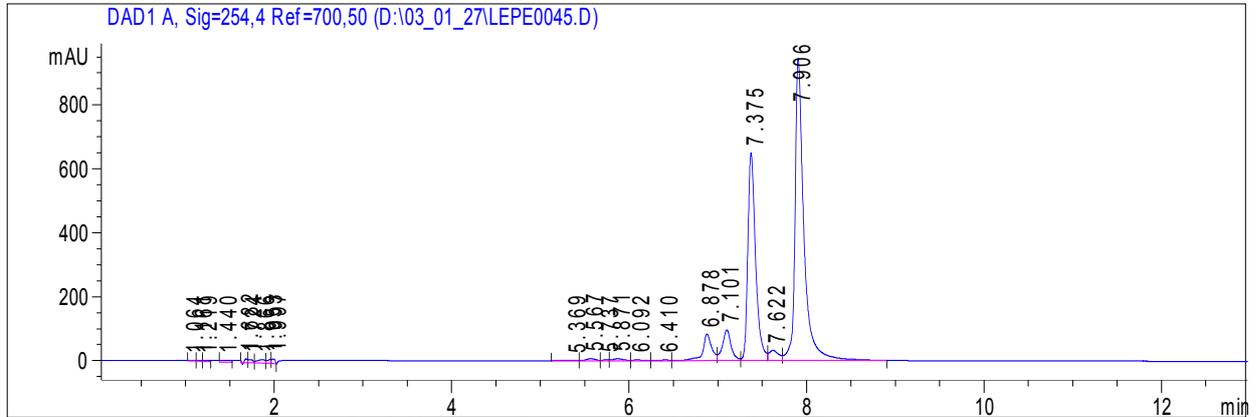


Fig. 50. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de la subfracción PEA1-4,1

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta

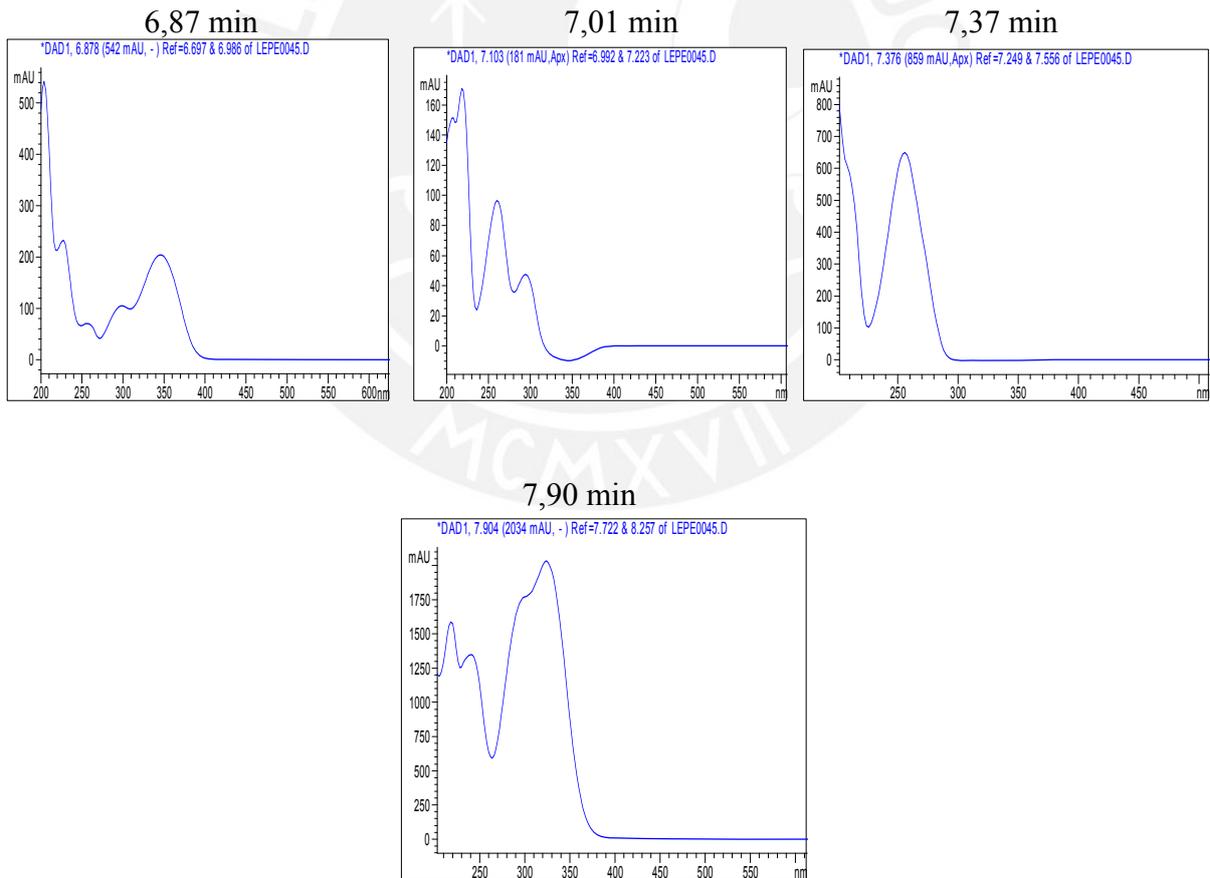
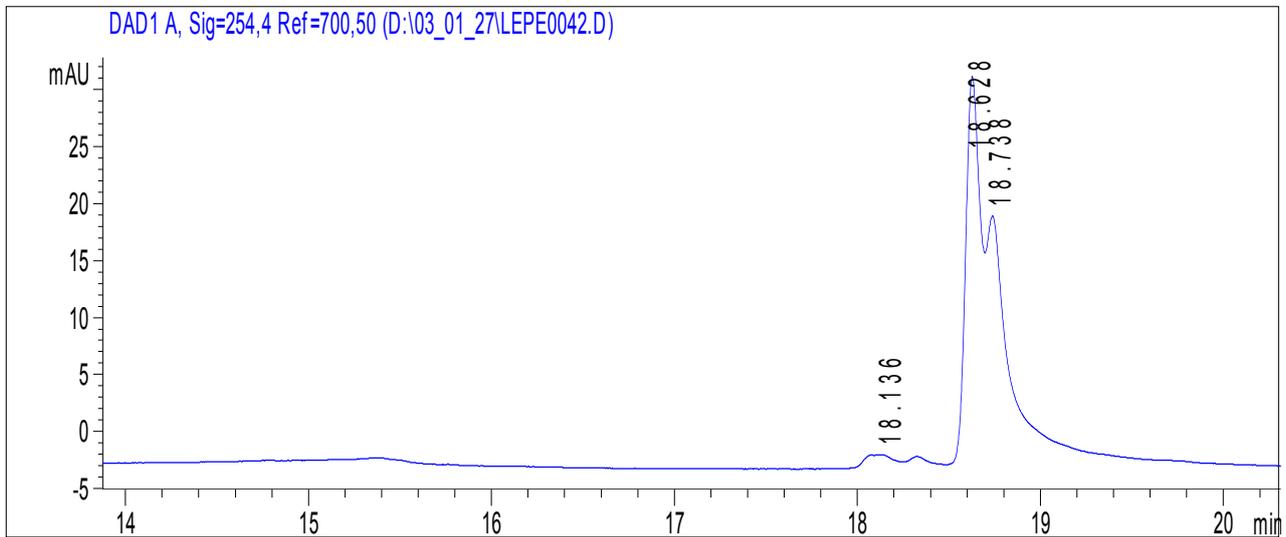
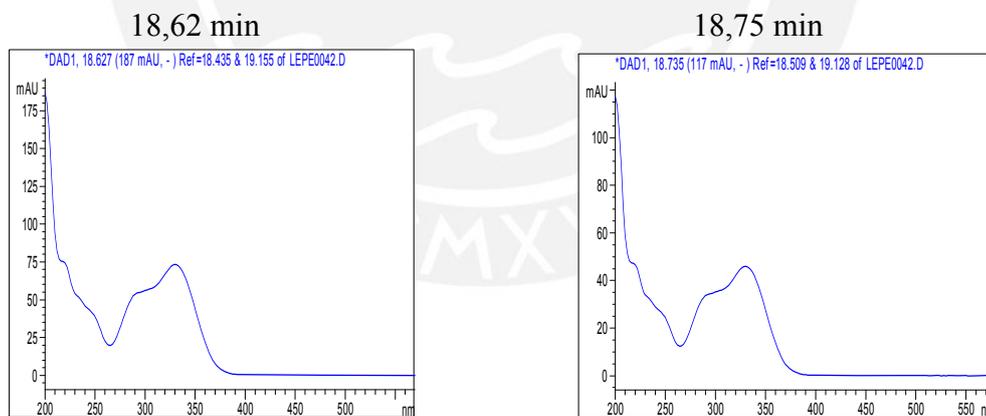


Fig. 51. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de subfracción PEA1-4,2

a.- Cromatograma HPLC

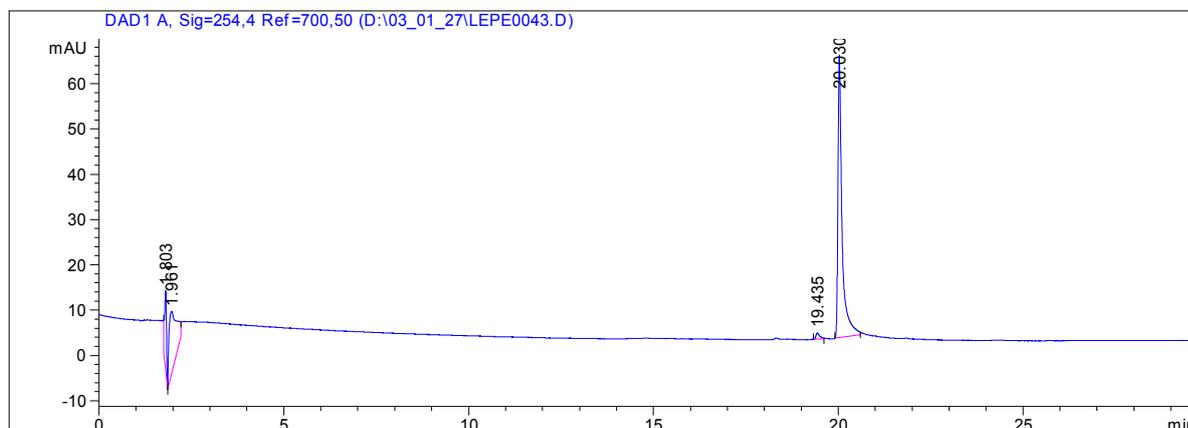


b.- Espectros ultravioleta



**Fig. 52. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de subfracción PEA1-4,7**

a.- Cromatograma HPLC



b.- Espectros ultravioleta

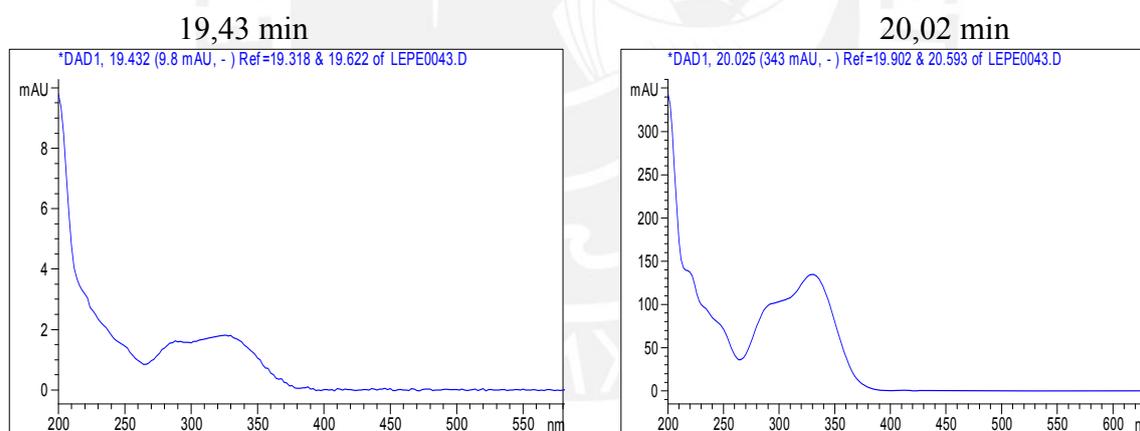


Fig. 53. Cromatograma HPLC y espectros ultravioleta de la subfracción PEA1-4,8