

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas



Facultad de Química-Farmacia

**Tesis para optar por el Título de Licenciado
en Ciencias Farmacéuticas**

**Título: Aislamiento y Caracterización de metabolitos a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*.
*Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico.***

Diplomante: Elide Charles.

Tutoras: Dra. C Dulce M^a González Mosquera.

MSc. Yannarys Hernández Ortega

Asesora: MSc. Yanelis Saucedo Hernández

Santa Clara, 2010



Pensamiento



“La ciencia trascendental es la verdad única, generadora y matriz de todo género y toda clase de verdades”.

José Martí



Dedicatoria

A mis padres, mis hermanos, y mi sobrina Erlandie Yanisleydis Charles

A mi tía Marie-Claudette Saillant por ser mi segunda madre

A Lyns Nelson por su amor y su cariño

En memoria De Gerrard Pierre-Charles



Agradecimientos

Hoy es el día más importante de mi vida por estar terminando mis estudios de pre grado que recordaré en toda mi vida, por eso quiero agradecer a todos los que me han dado su apoyo y su contribución de una forma u otra para la realización de este trabajo.

Quiero dar gracias a Dios por protegerme, por ser mi luz, mi paz, mi amor, mi fuerza, mi verdad y por dejarme llegar hasta este día.

Un agradecimiento especial a mi madre preferida Anna-Louise Saillant por todo su apoyo, su amor, su consejo y por todos sus sacrificios para la realización de este trabajo. Quiero que sepas que te admiro y siento mucho amor por ti.

A mi querido padre Elusca Charles quien considero como un esposo, un amigo además de ser mi padre, por todos sus sacrificios para poder llegar a esta etapa de mi vida. Padre, te quiero mucho porque sin tu apoyo no hubiese podido concluir este trabajo.

A todos mis hermanos: Evens, Weldy y Elucson Dubois Charles que estuvieron siempre a mi lado desde Secundaria hasta la Universidad, por su amor, por su cariño y por estar siempre en mis mejores momentos.

A todos mis tíos y tías por su apoyo, amor, y su ayuda. Especialmente a Mi tía Marie-Claudette Saillant quien considero como mi segunda madre, la persona que me enseñó a hablar, caminar y la persona con quien viví durante 12 años, por todos sus sacrificios, por dedicarme su tiempo y sus atenciones cuando era niña. Tía, te quiero decir que los consejos que me diste me han servido de mucho. Gracias por tu cariño y tu paciencia.

A tío Rev. Fritzner, Ing. Schumann y su esposa Assia Pierre por todo lo que han hecho por mí, finalmente a tía Ismael Saillant por su ayuda y su amor.

A todos mis primos y primas por su admiración y su cariño, especialmente Bideline, Judeline y Kelly.

A mi querido Lyns Nelson quien tiene mucha importancia en mi vida, el hombre que amo mucho. Te agradezco mucho por tus consejos y por los bellos momentos que hemos pasado. Amor, sin ti ese día no hubiera llegado, quiero que sepas que me has ayudado mucho y tus palabras tan bonitas me hacen crecer más y me den más ganas de vivir a tu lado. Gracias por darme tu vida.

A mis queridas tutoras Dr. Dulce María González Mosquera Msc. Yannarys Hernández Ortega Msc. Yanelis Saucedo Hernández por transmitirme parte de sus conocimientos. Sin Uds. no hubiese llegado a este fin. Muchas gracias por su ayuda y por su valiosa colaboración en este trabajo.

A todos mis amigos en especial Msc. Vanneur Pierre, Juna Paul, Bénita Saint-Ilmond, René Lynda, Kendersly Cadet, Tonuse Nelson, Keteline Pierre, Sandra Desronvil, Nassa Pierre, Nathalie Isemenord, Dr. Cleophat Jean-Verna, Dr. Jean –Marry Dezamour, Ing. Roudy Devil quienes siempre han estado conmigo brindándome su ayuda, sus consejos, amistad sincera y su cariño.

A todos mis amigos de estudio Nathanael Clairveau, Arq. Gustave Jeannel, Rose Philomene Pierre, Anoul Louis, Sanon, Anette Noel, Marie- Chantal Ociel, Fabienne Ligondé, Dr. Jorenel Philius, Joseph Diakité, y Calixte Luckenson por su apoyo.

A Ing. Ronel Mervil quien estuvo conmigo durante la secundaria. Gracias por todos los momentos, los difíciles y los alegres.

A Yvena Lacombe quien se preocupó mucho por mí como si fuera una madre, una hermana durante todos estos 5 años en Santa Clara. Te doy un agradecimiento muy especial por todo tu amor, tu cariño y tu apreciación.

A todos mis compañeros de estudios en especial Borady, Yamila, Yelien, Yanisleidys y Saily por estar siempre a mi lado y por hacer suyos mis problemas.

A todos los profesores del Departamento de la carrera especialmente Elisa, Liliana, Xiomara, Venancio, Urbano, Josefa.... A todos gracias por su colaboración.

Finalmente gracias a todos.



Índice



Introducción.....	1
I. Revisión Bibliográfica.....	3
1.1. Generalidades de la <i>familia Nyctaginaceae</i>	3
1.2. Antecedentes químicos de la familia.....	3
1.3. Antecedentes farmacológicos de la familia.....	3
1.4. Generalidades de <i>Boldoa purpurascens</i>	4
1.4.1. Generalidades de la especie	4
1.4.2. Descripción botánica de la planta.....	5
1.4.3. Hábitat, distribución, fenología y cultivo.....	5
1.5. Usos en la medicina tradicional.....	5
1.6. Antecedentes farmacológicos de <i>Boldoa purpurascens</i>	6
1.7. Antecedentes químicos de la especie.....	6
1.8. Generalidades de los flavonoides.....	7
1.8.1. Aspectos estructurales.....	9
1.8.2. Aislamiento y purificación de los flavonoides.....	10
1.8.3. Técnicas analíticas empleadas en la identificación y caracterización estructural de los flavonoides.....	11
1.8.3.1. Cromatografía en Capa Delgada.....	12
1.8.3.2. Espectroscopia Ultravioleta- visible.....	13
1.8.3.3. Espectro infrarrojo.....	14
1.8.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	14
1.9. Aspectos químicos y Farmacológicos del Gomphrenol.....	15
1.10. Propiedades antioxidantes de los flavonoides.....	15
1.10.1. Consideraciones Históricas. Conceptos.....	16
1.10.2. Generalidades.....	16
1.10.3. Estrés oxidativo.....	17
1.10.4. Daño oxidativo a biomoléculas.....	17
1.10.5. Procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con los radicales libres	18
1.10.6. Función de los antioxidantes.....	18
1.10.6.1. Sistema enzimático.....	18



1.10.6.2. Sistema no enzimático.....	19
1.10.6.3. Sistemas reparadores.....	19
1.10.6.3.1. Directo.....	19
1.10.6.3.2. Indirecto.....	19
1.10.7. Características de los antioxidantes.....	19
1.10.8. Antioxidantes en alimentos.....	20
1.10.9. Antioxidantes indispensables para la salud.....	20
1.10.10. Fuentes naturales de los antioxidantes.....	21
1.10.11. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.....	21
1.10.11.1. Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).....	22
1.10.11.2. Método del DPPH*.....	22
II. Materiales y Métodos.....	24
Reactivos con especificaciones de calidad.....	24
Disolventes.....	24
Equipos empleados.....	24
Material básico.....	24
2.1. Preparación del material vegetal.....	25
2.1.1. Recolección.....	25
2.1.2. Selección.....	25
2.1.3. Secado.....	25
2.1.4. Molinado.....	25
2.2. Proceso extractivo.....	26
2.2.1. Aislamiento y caracterización.....	26
2.2.2. Desarrollo de la columna cromatográfica.....	28
2.3. Caracterización estructural.....	29
2.3.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los compuestos aislados	29
2.4. Determinación de flavonoides totales en base a Rutina.....	29
2.4.1. Desarrollo de la técnica espectrofotométrica	



ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides totales en base a rutina.....	29
2.5. Evaluación del comportamiento lineal de la técnica de la espectrofotométrica ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides totales en base a rutina.....	29
2.5.1. Linealidad.....	30
2.6. Comprobación de la actividad antioxidante del extracto Hidroalcohólico.....	31
2.6.1. Actividad secuestradora del radical DPPH.....	31
2.6.2. Medida del poder reductor	32
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1. Preparación del material vegetal.....	34
3.2. Obtención de extractos con disolventes de diferente polaridad.....	34
3.2.1. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios.....	34
3.2.2. Fraccionamiento por columna clásica.....	35
3.2.2.1. Aislamiento y purificación de los compuestos del sobrenadante de la fracción hidroalcohólica.....	36
3.3. Caracterización estructural.....	37
3.3.1. Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear. Propuesta estructural para F1.....	37
3.4. Determinación de flavonoides totales en base a rutina.....	40
3.5. Evaluación del comportamiento lineal de la técnica espectrofotométrica ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides en base a rutina.....	41
3.5.1. <u>Linealidad</u>	41
3.6. Comprobación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico.	
3.6.1. Actividad secuestradora del radical libre del extracto hidroalcohólico.....	43
3.6.2. Medida del poder reductor.....	46
Conclusiones.....	48



Recomendaciones.....	49
Referencias Bibliográficas	
Anexos	



Resumen



RESUMEN

Boldoa purpurascens es una especie que crece en latino América y el Caribe; es utilizada en varios países para combatir afecciones urinarias, se ha comprobado que es una especie rica en compuestos polifenólicos lo cual pudiera tener relación con el potencial antioxidante que posea dicha especie. Se realizó un proceso de fraccionamiento, aislamiento y purificación que permitió obtener ocho compuestos de los cuales por análisis por espectroscopia RMN ^{13}C e ^1H permitió conocer la presencia de dos flavonoides uno de ellos (F2) aislado y caracterizado en el año 2006 y el otro no se conocía su presencia en esta especie (Gomphrenol).

El extracto hidroalcohólico mostró efecto antioxidante en los ensayos realizados, lo cual sugiere que los flavonoides presente el mismo tengan relación con dicho efecto. Adicionalmente se determinó que existe un 0,62% de flavonoides totales en base a rutina en dicho extracto.



Introducción



INTRODUCCIÓN.

En países como Cuba el empleo terapéutico de las plantas en la medicina tradicional constituye una parte importante de la cultura sumado a la elevada biodiversidad, resulta especialmente necesario el estudio de las reservas vegetales. El género *Boldoa* ha merecido la atención de varios investigadores que buscan correlacionar diversas acciones farmacológicas atribuidas al género y los constituyentes químicos encontrados en algunos de las especies, especialmente los fitofenoles.

En Cuba, como en el resto del mundo, la fototerapia está recuperando terreno debido a la demostración científica de su beneficio terapéutico (Graf, 1999, Rodríguez 2001).

Boldoa purpurascens Cav, es tal vez una de las especies menos conocidas dentro del género y la familia Nyctaginaceae; sin embargo en Cuba y otras regiones de América crece de forma silvestre en jardines y parques y se emplea como un potente diurético (Roig, 1978).

Se ha conocido muchas especies de diferentes familias de plantas con determinada acción biológica, entre ellos está la familia Nyctaginaceae. Se ha encontrado en la mayoría de los estudios realizados en los diferentes géneros y especies que los flavonoides se encuentran tan mayoritariamente y pueden ser los que en mayor medida contribuyen a los efectos biológicos que aparecen informados para dicha familia.

De esta especie se han aislado y caracterizado varios compuestos de tipo flavonoide que resultaron ser nuevas identidades moleculares, los que pudieran contribuir a la actividad funcional revelada recientemente por la planta (hipoglicemiante) (By and González, 2010) y que puede estar correlacionado con el potencial antioxidante que estos compuestos demuestran poseer. Esta especie no posee estudios que validen su utilidad en patologías degenerativas por su potencial antioxidante, por lo que se requiere profundizar en el estudio químico y farmacológico de la especie y para ello se plantea el siguiente problema científico:



Problema Científico

De los extractos hidroalcohólico al 80% y acetona de las hojas de *Boldoa purpurascens* se han aislado varios flavonoides, pero no existen estudios científicos que avalen el potencial antioxidante de la especie y su correlación con la presencia de los flavonoides.

Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens* Cav posee actividad antioxidante debido a la presencia de flavonoides en el mismo.

Objetivo general

Realizar evaluaciones fitoquímicas y del poder antioxidante al extracto hidroalcohólico al 80% de las hojas de *Boldoa purpurascens* que permitan avalar su uso en diversas patologías.

Objetivos específicos

1. Realizar procesos de fraccionamiento, aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos obtenidos a partir de extractos de (80%) de *Boldoa purpurascens*.
2. Determinar el contenido de flavonoides totales en base a Rutina en el extracto hidroalcohólico al 80% de la especie.
3. Evaluar el potencial antioxidante in vitro del extracto hidroalcohólico al 80% de *B.purpurascens*.



1.1. Generalidades de la familia Nyctaginaceae

Los miembros de la familia Nyctaginaceae se encuentran en abundancia en los países cálidos y en su mayor parte en América. Son muy poco conocidas químicamente. Familia que comprende 38 géneros y 350 especies de plantas compuestas por hierbas, arbustos o árboles, distribuidos por zonas tropicales y subtropicales. Plantas dicotiledóneas, orden centrospermales, herbáceas o leñosas, las hojas son opuestas, alternas, simples, generalmente enteras, sin estípulas. Las flores parecen en cimas umbeliformes, a menudo con involucre coroliforme ancho y vistoso, y sin pétalos. El fruto es un aquenio o núcula, donde frecuentemente persiste la base del cáliz. Los géneros más estudiados son *Boerhaavia*, *Bougainvillea* *Mirabilis* y *Pisonea*, el género *Mirabilis* es de más amplia distribución y el más diverso con siete especies. La mayoría son americanas. El nombre de la familia es derivado de Nyctago proviene de *nyx* (noche): que quiere decir flor de noche cuyas plantas se abren en la noche y se cierran de día, que denominó al hoy llamado *Mirabilis* (Pérez et al., 2000).

1.2. Antecedentes químicos de la familia

Los compuestos que han sido informados en la literatura para los géneros de esta familia son los alcaloides, flavonoides, proantocianidinas, saponinas y saponeninas. Entre ellos, Kamferol, y quercetina han sido los compuestos químicos más corrientemente informados (González, 2006).

1.3. Antecedentes farmacológicos de la familia

La familia Nyctaginaceae, a la cual pertenece el género *Boerhaavia* está siendo en los últimos 20 años muy estudiada, por las diferentes propiedades atribuidas popularmente. Es así como se han realizados estudios quimiotaxonómicos, en diferentes especies de esta familia como: *Boerhaavia difusa*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia spectabilis*, *Boerhaavia Scandens*. Todas ellas han sido utilizadas en la medicina tradicional con fines similares a la *boerhaavia difusa* como antiespasmódicos, contra los accidentes epilépticos para el histerismo, la corea,



como expectorantes, para la secreción biliar y para las congestiones del hígado, entre otros(Castro-Méndez et al., 2001).

En la India la raíz de Boerhaavia difusa en decocción con azúcar tiene gran utilidad, donde es dada para la pérdida de conocimiento y para la expulsión de la placenta. La decocción y el jugo de las hojas frescas de la misma son usados en la medicina tradicional de Martinica como analgésicos y antiinflamatorios, las raíces son usadas en la cura de úlceras corneales, ceguera nocturna, como hepatoprotectores y por sus propiedades antivirales, las hojas son usadas contra la dispepsia, la ictericia, el ensanchamiento del bazo y para dolores abdominales(Souza Brito et al., 1999)

En Brasil usan extractos de *B.hirsuta* Willd, como diuréticos, colagogos.

En Cuba, en las provincias de Camagüey y la Habana se emplea como depurativa.

1.4. Generalidades de *Boldoa purpurascens*

1.4.1. Generalidades de la especie.

Boldoa purpurascens, comúnmente llamada en Cuba nitro, es una planta herbácea, pertenece a la familia Nyctaginaceae. Esta planta fue descubierta por Cavanilles en América y depositada en el jardín botánico de Madrid en 1816 por Lagasca, un discípulo de Cavanilles e introducida en Cuba en 1842. En Cuba también se le conoce como tostón(Roig Mesa, 1988)

A esta planta se le conocen tres sinonimias como *Boldoa ovatifolia* Lag; *Cryptocarpus Globosus* HBK y *Salpianthus purpurascens* HOOK & Arn. Es la única especie de su género.

Clasificación taxonómica de *Boldoa purpurascens* Cav.

Nombre Científico: *Boldoa purpurascens*, Cav

Familia: Nyctaginaceae

Género: *Boldoa*

Sinonimia: *Boldoa ovatifolia* Lag; *Cryptocarpus globosus* HBK y *Salpianthus purpurascens* Hook. & Arn

División: Magnoliopsida

Especie: *Boldoa purpurascens*

Subclase: Magnoliophyta



Orden: Caryophyllales

1.4.2. Descripción botánica de la planta

Boldoa purpurascens, Cav ex Lag. Es una planta silvestre de tallo erecto de 1 metro de altura aproximadamente, ramoso y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas. Hojas alternas, pecioladas, anchamente ovales, agudas, enteras, con base subtruncada y decurrente en el peciolo, lampiñas de color verde claro; flores verdosas, pequeñas, sésiles, conglomerado, racimosos cortos. El cáliz es fructífero, pubescente, cuadridentado en el ápice. Presenta cuatro estambres, con hipóginos libres, anteras biloculares, dídimas. Los ovarios son ovoideos, sésiles. Los estilos son simples, adelgazándose insensiblemente hasta terminar en el estigma aleznado, agudo. Aquenio comprimido, apeciado. Embrión subanular, endospermo carno-farinaceo. Fruto de 1,5mm de diámetro, semilla negra, lustrosa, crece en terrenos yermos (Roig Mesa, 1988, León, 1957).

1.4.3. Hábitat, distribución, fenología y cultivo

Es una planta silvestre que crece en los terrenos de serpentina y calcáreos, bastante abundante en las cercanías de la Habana por Guanabacoa y Marianao (Roig, 1984). Habita en México, Nicaragua, Costa Rica, Venezuela y Guatemala (León, 1957). Es una planta muy abundante en el Caribe y centro América, aunque es poco conocida por la población.

En Cuba florece de Diciembre a Mayo, las hojas alcanzan su mayor tamaño en los meses de Junio y Julio.

1.5. Usos en la medicina tradicional

En los estudios etnobotánicos se informa su uso como diurético y antiséptico de las vías urinarias. En algunos lugares de Cuba se ha usado para la eliminación de cálculos renales, es posible que esta acción (aún no demostrada) sea cierta, atendiendo al potente efecto diurético que se le atribuye, lo que lleva consigo una eliminación considerable de líquido, lo que puede ocasionar la fragmentación de los cálculos, y pudiendo ser arrastrados del órgano (riñón) Se refiere el empleo de sus hojas y renuevos (Roig Mesa, 1988).



En 1951 los sacerdotes Alain y León refieren su venta en la Habana, como un poderoso diurético.

1.6. Antecedentes farmacológicos de *Boldoa purpurascens*

Dentro del género existen aproximadamente siete especies: *Boldoa arenareus*, *Boldoa lanceolata* var. *Macrodonta*, *Boldoa ovatifolia*, *Boldoa paniculata*, *Boldoa repens* y *Boldoa purpurascens* (Dequan, 1996).

Estudios recientes mostraron que los extractos de esta planta poseen actividad diurética, actividad está demostrada científicamente por (González, 2006). Se comprobó que el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* (Nitro) tiene actividad diurética similar a la furosemida, es capaz de eliminar una orina abundante y tiende a conservar los niveles normales de agua y sales en el medio interno. En este propio estudio se informa el aislamiento y caracterización estructural de cuatro nuevos flavonoides que contribuyen a la actividad diurética de la planta así como informes preliminares de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de la misma. Recientemente, se evaluó la actividad antiinflamatoria de un crudo de flavonoides obtenido a partir de la planta (Prieto, 2003)

Se evaluó la actividad antibacteriana de un extracto acuoso al 20% de las hojas de *Boldoa purpurascens* frente a cepas de bacterias gran positivas y negativas. Se empleó el método de difusión radial en medio agarizado con cortes cilíndricos. No se detectó actividad inhibitoria sobre ninguno de los 22 cultivos bacterianos probados por no presentar acción directa sobre los microorganismos (Castro-Méndez et al., 2004).

1.7. Antecedentes químicos de la especie

La planta presenta una gran variedad de metales entre los que se encuentran: el cinc, cadmio, hierro, cobre, cromo magnesio, níquel, sodio, manganeso, estando en mayor proporción el potasio (Martínez, 1998), aunque el sodio, magnesio y cadmio se haya también en cantidades importantes.

Se demostró que esta planta en su composición química presenta un predominio de ácidos grasos como el palmítico, el esteárico, el oleico, el mirístico y el



pentadecanoico entre sus metabolitos secundarios, posee triterpenos, esteroides, saponinas, fenoles y/ o taninos, flavonoides y compuestos con grupos aminos (Milián, 2000 ;Rodríguez 2001)

1.8. Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente angiospermas), y solo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en diferentes partes de las plantas (especialmente en las partes aéreas); y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros.

Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glicósidos.

Se pueden clasificar en varias clases: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides (Martínez, 2005.).

Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar (Miranda and Cuéllar, 2000, Martínez, 2005.).

Estos metabolitos junto a otros pigmentos han sido responsables de la explosión otoñal, del espectro del amarillo, rojo y naranja en el florecimiento de las plantas (Ielpo, 2002) y en general de la coloración, función que favorece la participación de



estos compuestos como señales químicas. También juegan un valioso papel en la defensa de la planta frente a las radiaciones UV, bacterias, virus y animales herbívoros, además de participar en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Zbinden and Flury-Roversi, 1991). Los flavonoides son el grupo más amplio de los fenoles naturales, conociéndose en la actualidad más de 2000 compuestos (Evans, 1991).

Aunque en los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23mg/día, siendo predominantes los flavonoles especialmente la quercetina. Las fuentes alimenticias principales de los flavonoles son, entre otras, el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra que contiene cerca de 4g/kg de quercetina, y bebidas alcohólicas como vino y cerveza.

De los alimentos, el té es una de las fuentes principales de quercetina, principalmente en Japón y los países Bajos, el vino tinto lo es en Italia y las cebollas en los Estados Unidos y Grecia. La ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día (Rimm et al., 1996,). Excede, por tanto, a la de otros antioxidantes en la dieta, tales como el beta-caroteno (2-3mg/día) y la vitamina E (7-10mg/día) y es igual aproximadamente a un tercio de la vitamina C (70-100mg/día). Los flavonoides representan, pues, una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana (Martínez-Flórez et al., 2002).

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos (Rimm et al., 1996,). La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina (Shargel and Yu, 1992), parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Rowland et al., 1995).



Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los más importante aspectos es la biodisponibilidad, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución y eliminación. Por ejemplo, existen diferencias de biodisponibilidad entre la quercetina y la catequina dependientes del metabolismo, habiéndose demostrado que las concentraciones plasmáticas de los metabolitos de quercetina presentan una vida media más larga que los metabolitos de la catequina .Esta diferencia es mayor en ratas adaptadas a una dieta rica en quercetina durante varios días, que en ratas adaptadas de igual forma con catequina. La quercetina experimenta una mayor metilación en plasma que la catequina; además los metabolitos de la catequina son únicamente glucuronidados, mientras que los metabolitos de la quercetina son también sulfatados. Estos factores podrían afectar a la solubilidad de los metabolitos en los fluidos orgánicos y ser responsables de la diferente vía de eliminación de ambos flavonoides, ya que la catequina se elimina principalmente por la orina mientras que la quercetina se elimina por la bilis(Martínez-Flórez et al., 2002).

1.8.1. Aspectos estructurales

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors et al., 1990). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.



3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
5. Antocianidinas - cianidina y apigenidina

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda (Letan, 1966)

La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres. El tipo de compuestos, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante, según (Rice-Evans et al. 1996).

1.8.2. Aislamiento y purificación de los flavonoides

Los flavonoles y las flavonas glicosídicas son compuestos generalmente estables y pueden ser extraídos desde el material vegetal secado, con disolventes en frío o en caliente.

Ambos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, como pigmentos, junto con los antocianinas en los pétalos y en hojas superiores, generalmente en forma glucosilada. Aunque se conocen gran cantidad de flavonoles. Los más importantes son quercetina, derivada del quercetol y la miricetina y el kaemferol derivados del miricetol y típicos de uvas tintas, está presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta (Alfonso Valenzuela 2004).

Son de color amarillo, suelen ser incoloro y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Pueden encontrarse en forma libre o conjugada a azúcares. Las cantidades varían de 10 a 100mg.⁻¹.

Algunos flavonoides, como los flavonoles no existen normalmente glicosilados, pero si pueden encontrarse acilados, especialmente con ácido gálico. La galoilación



afecta menos al coeficiente de reparto y no influye sobre la biodisponibilidad de modo tan drástico como la glicosilación. De este modo, los flavonoles podrían atravesar las membranas biológicas sin desconjugación ni hidrólisis (Santos - Buelga, 2007). Los aglicones de los flavonoles y flavonas son raramente encontrados como constituyentes internos de los vegetales, ellos son frecuentemente localizados sobre las superficies externas de hojas (Harbone and Williams, 1982, Harbone, 1988) . Esos flavonoides tienden a ser menos polares, cuando están a menudo metilados o acilados y requieren disolventes menos polares para su extracción, tales como el éter, hexano y diclorometano.

Los disolventes de elección son combinaciones de agua con metanol, etanol o acetona (en relación 1:5 y 1:1), siendo la baja proporción de agua requerida (1:5), en material seco (Cody, 1982)

Para la separación de una gran cantidad de flavonoides es usada la cromatografía en columna, utilizando celulosa microcristalina y como fases móviles metanol: terbutanol: ácido acético: agua, n-butanol: ácido acético: agua; sílice gel (tamaño de partícula 0.06-0.03), se recomiendan otros sistemas de elución como benceno: cloroformo (1:1), cloroformo: acetato de etilo, cloroformo: metanol, cloroformo: metanol (15:1 y 3:1). Adicionalmente en esta separación se puede utilizar como fases móviles la mezcla de diclorometano: metanol: agua (80:19:1), acetato de etilo: metanol (9:1), esto estará en dependencia de la polaridad que muestran los componentes a separar; poliamida, en este caso utilizando como eluyentes metanol: ácido acético: agua (18:1:1), agua: n-butanol: acetona :dioxano (70:15:10:5) y tolueno: hexano: metiletilcetona: metanol(30: 9:2:1,5). Son usados con más frecuencia el sephadex LH-20, amberlite XAD-7 lichroprep RP-18 (Markham, 1989). Otros de los métodos usados con estos fines es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), generalmente para las flavonas y los flavonoles es usada la fase reversa RP-18. Para la separación de una gran cantidad de flavonoides es usada la cromatografía en fase reversa C₈ o C₁₈, usualmente como disolventes son empleadas las mezclas metanol: ácido acético: agua, metanol: agua: ácido fórmico, acetona: ácido acético: agua en gradientes o en modo isocrático(González, 2006).



1.8.3. Técnicas analíticas empleadas en la identificación y caracterización estructural de los flavonoides

Existen muchas técnicas para la identificación y caracterización estructural de las variadas estructuras flavonoides presentes en la naturaleza. Entre ellas se encuentran las reacciones de coloración. Las reacciones de coloración también pueden usarse para evidenciar la presencia de flavonoides una de las más específicas es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo de núcleo de flavonoides, espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría infrarroja, espectrofotometría de masas, la combinación de la cromatografía en capa delgada, difracción de rayos X, y resonancia magnética nuclear que aporta evidencias de incuestionable valor en este sentido.

Como características generales se observan: la solubilidad en solventes polares su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.

1.8.3.1. Cromatografía en Capa Delgada

En la determinación de los flavonoides mediante la cromatografía en capa delgada se emplean materiales adsorbentes como la poliamida, sílice gel C-8 ó C-18 en fase reversa. Las condiciones cromatográficas sugeridas en la identificación de flavonoides son las siguientes:

Los flavonoides en forma de glicósidos son determinados empleando como adsorbentes celulosa, poliamida, sílice gel y C-18 en fase reversa. Son utilizados como fases móviles mezclas de ter-butanol- butanol-agua, butanol-ácido acético – agua, metanol- ácido acético-agua y agua-butanol-acetona-dioxano.

Para los polihidroxilados se emplean de igual forma que la anterior como materiales de cubierta, celulosa, poliamida, sílice y C-18 en fase reversa. Se proponen para este caso fases móviles como mezclas de ter-butanol- butanol- agua, metanol-ácido acético –agua, benceno-ácido acético-agua, metanol-ácido acético-agua, benceno-piridina-ácido fórmico, cloroformo-tolueno-acetona, acetato de etilo-



metiletilcetona, ácido fórmico y agua. Las combinaciones de metanol-agua son sugeridas para la aplicación de la cromatografía en fase reversa.

Los flavonoides altamente metilados, son separados cromatográficamente mediante el empleo de iguales fases estacionarias que los compuestos anteriormente señalados y empleando como fases móviles cloroformo-metanol, tolueno-hexano – metilcetona-metanol, así como otros disolventes de baja polaridad (Mabry et al., 1970).

La propuesta de las condiciones cromatográficas descritas para la identificación de estructuras flavonoides se considera adecuada, atendiendo a la utilización de variadas combinaciones de adsorbentes y eluyentes propuestos.

Como puede apreciarse en la identificación de los compuestos flavonoides que presentan una polaridad media se emplean mezclas medianamente polares que incluyen generalmente la utilización de disolventes como butanol, metanol, ácido acético y agua. El diclorometano no aparece informado en la preparación de estos sistemas de elusión, siendo este un disolvente a tener en consideraciones de acuerdo a su polaridad (González, 2006).

1.8.3.2. Espectroscopía Ultravioleta- visible

La espectroscopía de absorción ultravioleta /visible es usada ampliamente en la determinación de las estructuras tipo flavonoides. Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos .Usualmente los espectros de flavonas y flavonoles y otros flavonoides son realizados en metanol y menos satisfactorio en etanol (Markham, 1982).

Usualmente las flavonas y flavonoles muestran dos bandas: la banda I, de mayor longitud de onda en el intervalo 300-390 nm y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático.

Esta técnica aporta una amplia información estructural sobre todo para este tipo de compuesto, lo cual constituye una herramienta muy útil en la elucidación estructural de dichos metabolitos (González, 2006).



1.8.3.3. Espectro infrarrojo

El espectro infrarrojo aportan datos adicionales de la mayoría de los compuestos orgánicos y puede dividirse en dos partes: las bandas de vibración de sustituyentes específicos entre 1300 y 4000 cm^{-1} las bandas e vibración del esqueleto hidrocarburo (C-C y C-H) entre 650 y 1400 cm^{-1}

En el análisis estructural, la zona entre 1400 y 4000 cm^{-1} es de gran utilidad. Las bandas entre 1600 y 1800 cm^{-1} indican C=O y según el valor exacto, puede interpretarse la situación del carbonilo; la presencia de dobles enlaces (aislados o conjugados) y de sistemas aromáticos; los distintos tipos de sustitución sobre anillos bencénicos (Navarro and Fabiola, 2002).

1.8.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear se señala como una técnica de caracterización estructural de valor indiscutible. Es importante tener en cuenta la selección cuidadosa de los disolventes empleados, los cuales deben originar señales fuera del área seleccionada del espectro donde los compuestos dan señales típicas. Los disolventes comúnmente empleados en la realización del espectro protónico son Cloroformo (CDCl_3) (7.25 ppm), dimetilsulfoxido- d_6 (DMSO-d_6) (2,5ppm), metanol- d_4 (CDOH-d_4) (3,35 ppm), acetona- d_6 (2,05 ppm), y piridina – d_5 (7,0; 7,35 y 8,5ppm).

Los flavonoides y sus glicósidos son mayormente solubles en disolventes polares tales como el DMSO-d_6 y piridina DMSO-d_5 . El DMSO-d_6 tiene la ventaja que puede disolver a ambos además de la aglicona.

Complementariamente al espectro de resonancia magnética protónico (RMN^1H), el de resonancia magnética de carbono 13 (RMH^{13}C) ofrece el número y el entorno de los átomos de carbonos presentes en la estructura, así como la identificación de las uniones entre los carbonos presentes en la estructura y los azúcares que puedan estar como sustituyentes en sus formas glicosídicas. Estas técnicas son de gran



importancia e indispensables para realizar la caracterización estructural de todo compuesto químico en estudio (González, 2006)

1.9. Aspectos químicos y Farmacológicos del Gomphrenol

El Gomphrenol es un flavonol que caracteriza como aglicón a los metilendioxi flavonoles. Esta estructura fue obtenida por primera vez a partir de la Gomphrena Globosus. Ese aglicón forma parte o el núcleo de los flavonoides a partir del extracto alcohólico de la *Boldoa purpurascens*.

1.10. Propiedades antioxidantes de los flavonoides

1.10.1. Consideraciones Históricas. Conceptos

Antioxidantes son comúnmente comprendidos como sustancias capaces de inhibir o retardar sustancialmente la extensión de un proceso oxidativo. También una molécula que es capaz de prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes pueden ser de naturaleza diversa, siendo de origen natural o sintético(Ortiz et al., 2009).

Los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles y polifenoles. Los Antioxidantes son una de las defensas del organismo contra los radicales libres, son pequeñas moléculas que se producen durante los procesos metabólicos normales. La producción excesiva de radicales libres daña las células y sus componentes, incluido ADN (material genético) celular, y se cree que tiene un papel fundamental en el proceso de envejecimiento, así como en muchas enfermedades degenerativas y relacionadas con la vejez.

1.10.2. Generalidades

En las plantas que habitan en ecosistemas tropicales, la síntesis de antioxidantes puede verse favorecida por presiones evolutivas resultantes de las propiedades del ambiente. Por ejemplo, compuestos como los flavonoides actúan como filtros internos de la luz, ya que protegen a las células del daño que les podría provocar la radiación ultravioleta. Sobre la base de las consideraciones anteriores, y



aprovechando la tradición etnobotánica de la región amazónica, los autores de esta nota han encarado el estudio de la actividad antioxidante de dos plantas medicinales ampliamente utilizadas en el sudoeste de esa cuenca: la “hoja Santamaría o cipu-cipu” –*Pothomorphe peltata*, familia Piperácea- y “la uña de gato”-*Uncaria tomentosa*, familia Rubiácean (Desmachelier and Ciccia, 1998).

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides. Primero, el radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular con carga negativa. Segundo, la reacción de los radicales flavonoides con la vitamina E, que es termodinámicamente factible para algunos radicales flavonoides, tiene un obstáculo adicional a causa de la repulsión electrostática entre el anión del radical flavonoide y la membrana fosfolipídica cargada negativamente, donde la vitamina E se incrusta. Tercero, la oxidación de un solo electrón de los flavonoides por cualquier oxidante tendrá una barrera entrópica, porque por lo menos dos protones se intercambian en la reacción. Los protones pueden intercambiarse entre los reactantes o con el solvente en el estado de transición, en este caso, la interfase del enlace con hidrógeno debe tenerse en cuenta. (Safiya, 2008)

1.10.3. Estrés oxidativo

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (Davis, 1995) representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermedios parcialmente reducidos y dotados de una variedad alta conocida como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se



generan especie moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica.

El oxígeno, es el principal radical libre, ya que él tiene dos electrones desapareados.

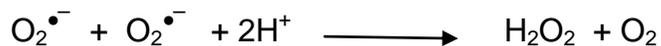
Entre las ROS destacan:

Radicales: ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) radical hidroxilo ($\bullet OH$), alcoxilo (RO^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y oxido de nitrógeno (NO^{\bullet})

No radicales: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete $\bullet O_2$ y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$).

1.10.4. Daño oxidativo a biomoléculas

Son muchas las ROS que actúan como oxidantes biológicos, pero el $O_2^{\bullet-}$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} , convirtiéndose este en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen en las ecuaciones siguientes:



Las ROS producen acciones diversas sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glicósidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis



1.10.5. Procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con los radicales libres

Ante el estrés oxidativo el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente, desencadenando diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

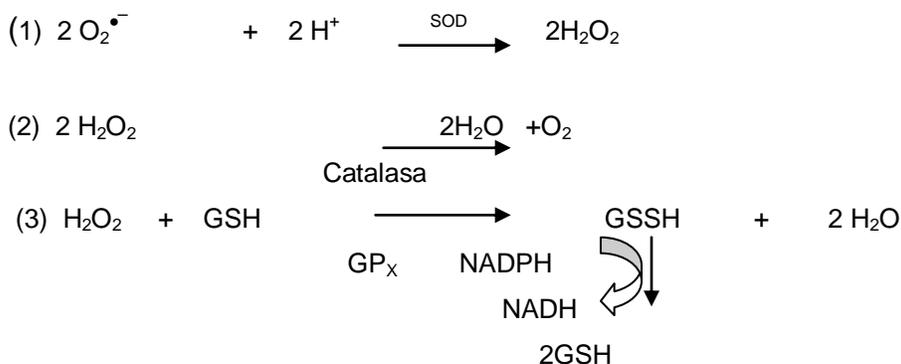
En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: Mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, diabetes, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento celular, etc. (Rice-Evans, 1995); (Halliwell, 1996.)

1.10.6. Función de los antioxidantes

Los sistemas biológicos en ambientes oxigenados han desarrollado mecanismos de defensa, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos se destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 y a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas. A continuación se resumen los mecanismos de defensa bioquímicos:

1.10.6.1. Sistema enzimático. Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP_X) y DT-diaforasa, que actúan tal y como se muestra en las ecuaciones siguientes.

La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , que en reacciones posteriores, catalizadas por la catalasa o por la GP_X , se convierte en H_2O y O_2 . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su función principal consiste en eliminar el H_2O_2 generando de la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GP_X degrada el H_2O_2 citoplasmático. La DT-diaforasa, cataliza la reducción de quinona a quinol y participa en la reducción de drogas de estructura quinónica (Muñiz et al., 2000.).



1.10.6.2. Sistema no enzimático. Las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes o captadores de radicales libres como son: vitamina E, vitamina C, β -caroteno, ferritina, ceruloplasmina, selenio, glutatión reducido (GSH), manganeso, ubiquinona, zinc, ácido úrico, flavonoides, coenzimas Q, melatonina, bilirrubina, taurina, cisteína entre otros. Los flavonoides que son extraídos de determinados alimentos interactúan de manera directa con la especie reactiva para producir complejos estables o de menor reactividad, mientras que en otras ejerce la función de co-substrato en la acción catalítica algunas enzimas.

1.10.6.3. Sistemas reparadores. A su vez éstos se subdividen en dos grandes grupos, los directos y los indirectos:

1.10.6.3.1. Directo. Reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

1.10.6.3.2. Indirecto. En primer lugar se reconoce el daño molecular siendo éste eliminado o degradado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de cadenas hidrocarbonadas, así como en las oxidaciones del ADN y ARN.

1.10.7. Características de los antioxidantes

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la



estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990.) (Gordon, 1990.) Da una clasificación de los antioxidantes, mencionando que; hay dos tipos principales antioxidantes, el “primario” (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el “secundario” o “preventivo”. Los mecanismos antioxidantes “secundarios” pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes” primarios”, eliminar el oxígeno singulete, etc.

Por lo anterior se puede definir como antioxidantes en el ámbito de los alimentos como “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas” (Chipault, 1962).

1.10.8. Antioxidantes en alimentos

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos, *vide supra*. Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos(Cao et al., 1997;, Young et al., 1999)

1.10.9. Antioxidantes indispensables para la salud

En los últimos años ha cobrado especial interés, el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Los polifenoles en vegetales, frutas y té pueden prevenir enfermedades degenerativas, incluyendo canceres, con la acción antioxidante.



Se ha comprobado también su capacidad para actuar como donadores de hidrógenos o quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Hertog et al., 1993.). Cabe mencionar que algunos polifenoles (como los aislados del té) inhiben la oxidación de las LDL in vitro (Riemersma et al., 2001). En experimentos in vitro, también se ha confirmado el papel protector de la quercetina, la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon (Ranelletti et al., 1992), glándula mamaria y ovario (Scambia G et al., 1990.) y en la leucemia (Yoshida et al., 1990.) etc. En experiencias con animales, una dosis oral de polifenoles suprimió la carcinogénesis de ovario (Sakakibara H. et al., 2003.). Los polifenoles también demuestran actividad de vasorrelajación y antialérgica (Sakakibara H. et al., 2003.).

1.10.10. Fuentes naturales de los antioxidantes

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres (Martínez-Valverde et al., 2000.) Una gran cantidad de estudios han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas incluyendo los flavonoides son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Rice-Evans et al., 1997.) La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, ya que ha sido blanco de un sin número de estudios; este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres.

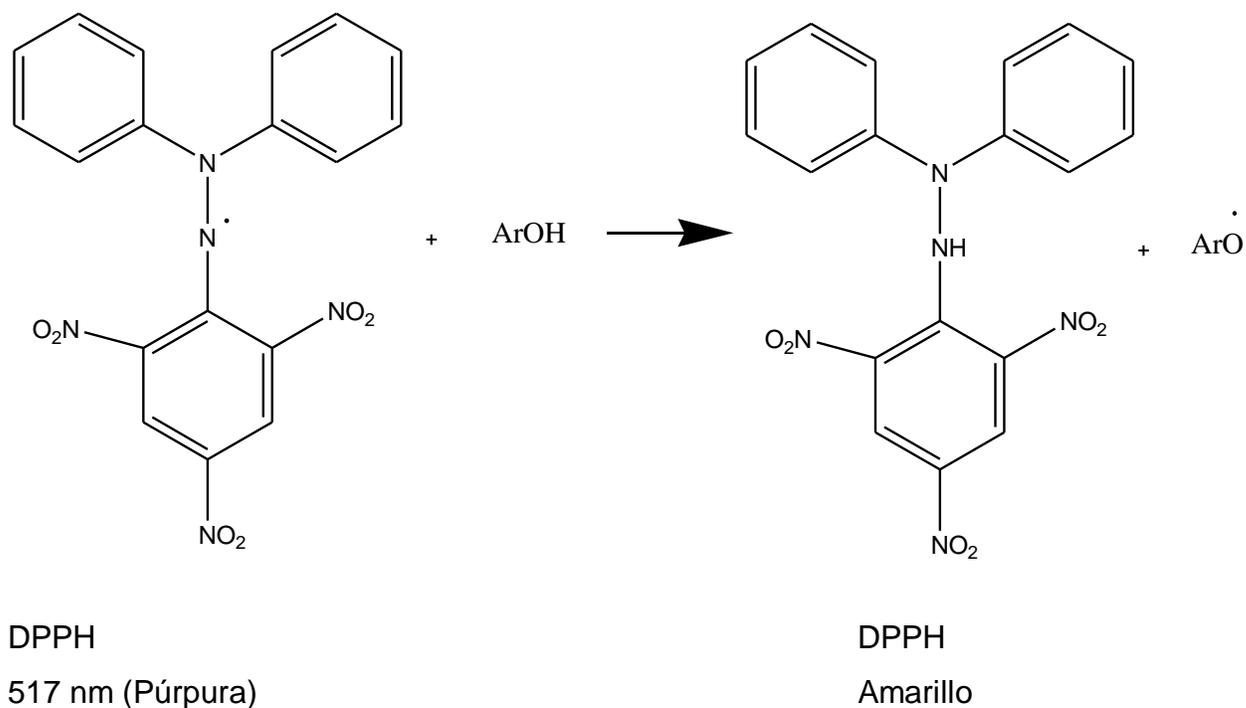


Figura 1. Antioxidantes como secuestradores de radicales libres. (pH 5,0-6,5)

1.10.11. Métodos para evaluar la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse in vitro por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre moléculas.

Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos. (Marco 1968.).

Los siguientes son ejemplos de los modelos in vitro más frecuentemente usados para la evaluación de la actividad antioxidante.

1.10.11.1. Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP)

El análisis de FRAP fue introducido por (Benzie and Strain, 1996., Pulido et al., 2000.) para medir la actividad antioxidante y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} . Este método fue modificado recientemente para su uso en microplacas de 96-pozos (Tsao and Zeyuan 2004.), dando una



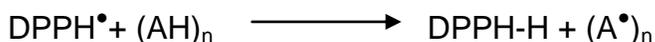
reproducibilidad mejor y un rendimiento de procesamiento más alto de muestras. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una absorción alta a una longitud de onda de 700 nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir una actividad antioxidante alta (Roginsky and Lissi, 2005).

El valor de FRAP se ha usado para determinar la actividad antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia Kalbreyeri Harms* (Ortiz et al., 2009).

1.10.11.2. Método del DPPH*

(Brand-Williams et al., 1995.).Evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPHP) en una solución metanólica. La solución para secuestrar los radicales libres DPPH está en función del contenido del principio activo presente en cada una de las plantas en estudio. La reducción de la concentración del DPPH indicada como el decremento de la absorbancia en el tiempo. El DPPH como radical libre en solución etanólica presenta un color violeta intenso cuando reacciona con la muestra, el electrón se aparea y la solución cambia de coloración. (Blois, 1958).

La reacción producida es la siguiente.



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles.El nuevo radical formado(A^{\bullet}) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables(DPPH-A,A-A).La reacción entre el DPPH^{\bullet} y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo,por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.



Materiales y Métodos



II. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV) en el Laboratorio de Química -Farmacéutica, en el período comprendido desde Diciembre 2009 hasta Junio 2010.

Reactivos con especificaciones de calidad

Disodio-hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4) (Riedel-de Haën); dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) (UNI-CHEM)^R, Ferrocianuro Férrico (PANREAC); ácido tricloro acético (PANREAC); rutina, (ACROS ORGANICS); 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (SIGMA-ALDRICH); quercetina (ACROS ORGANICS); ácido ascórbico (UNI-CHEM); hidróxido de sodio (UNI-CHEM)^R; nitrito de sodio (UNI-CHEM)^R, tricloruro de aluminio (UNI-CHEM)^R, hidroxitolueno butilado (BHT); cloruro férrico (MERCK).

Disolventes

Etanol; n butanol, ácido acético glacial, metanol, cloroformo, diclorometano, acetona etanol absoluto (UNI-CHEM)^R y H_2O destilada.

Equipos empleados

Espectrofotómetro UV-visible y cubetas de cuarzo (RAYLEIGH UV-1601) Beijing, balanza técnica (SARTORIUS), baño de agua (Grant Sub 14), lámpara UV (CAMAG), plancha de calentamiento (Stuart SD 300), balanza analítica (SARTORIUS), columna (POBEL), desecadora y estufa (BINDER), rotoevaporador (Marca BUCHI 100), centrifuga 5702 (EPPENDORF) Alemania, agitador magnético (SELECTA P) ,(balanza digital BOECO) Alemania, PH meter (HANNA) Rumania

Material básico

Matraz aforado de 10, 25, 50 y 100 mL; erlenmeyer de 250 mL; pipetas de 1, 2 y 5 mL; probeta de 5, 10 y 500 mL ,balones de 500mL y 1000mL, tubos de ensayo y micropipetas de 1 mL.



2.1. Preparación del material vegetal

2.1.1. Recolección

El material vegetal empleado en el estudio se recolectó en áreas cercanas a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, específicamente en la estación experimental “Las Antillas” procedentes de un suelo carbonatado, en los meses de Diciembre de 2009 a Marzo de 2010. Comprendió ejemplares que se encontraban en estado de floración y fructificación y se realizó en horas tempranas de la mañana tomando partes aéreas de la planta. Para el desarrollo del trabajo sólo se utilizaron las hojas, por ser las que presentan informes sobre su uso en la medicina tradicional. La planta se conservó en el herbario del Jardín Botánico de la propia Universidad Central, identificada por el Dr. Cristóbal Albuerne especialista en taxonomía vegetal.

2.1.2. Selección

Las muestras en estudio se trasladaron hasta el laboratorio de Química-Farmacéutica y Farmacognosia del Departamento de Farmacia donde se procedió a la selección de las hojas y eliminación de las materias extrañas.

2.1.3. Secado

El proceso secado suele ser de gran importancia pues reduce sustancialmente el volumen y la masa de la droga vegetal, lo que permite el almacenamiento durante el tiempo que se establece para cada especie así poder disponer de ella en diferentes épocas del año, este proceso mejora la estabilidad química, física y microbiológica (Miranda and Cuéllar, 2000, organization., 2004). Se realizó mediante calor artificial utilizando estufa durante 3 días a una temperatura de 40⁰C con aire recirculado (González, 2006).

2.1.4. Molinado

La droga se trituró en un molino de cuchillas de 5 pulgadas, marca Chisty & Norris con un tamaño de partículas de 0.75 mm.



2.2. Proceso extractivo

Para realizar el proceso de extracción a partir del material vegetal, se procedió según el diagrama en la figura 3.

2.2.1. Aislamiento y caracterización

Para el aislamiento de los metabolitos a partir de los extractos obtenidos de las hojas de la planta se realizó una variante al método propuesto por Miranda y col. Se realizó una extracción continua en Soxhlet a 58⁰C con Acetona, hasta agotamiento de la droga, posteriormente se concentró en rotoevaporador. Los productos se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD), empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fases móviles diclorometano: Metanol en proporción (8:2), n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5). Para el revelado se empleó lámpara UV (CAMAG) a λ 254-366nm, cloruro de aluminio al 5% en etanol y vapores de amoníaco.

El sobrenadante del precipitado que se obtuvo de la fracción de Acetona (F1) se concentró a sequedad, se redisolvió en Metanol y se precipitó sobre Acetato de Etilo y se obtuvo un nuevo precipitado de color carmelita oscuro (F4).

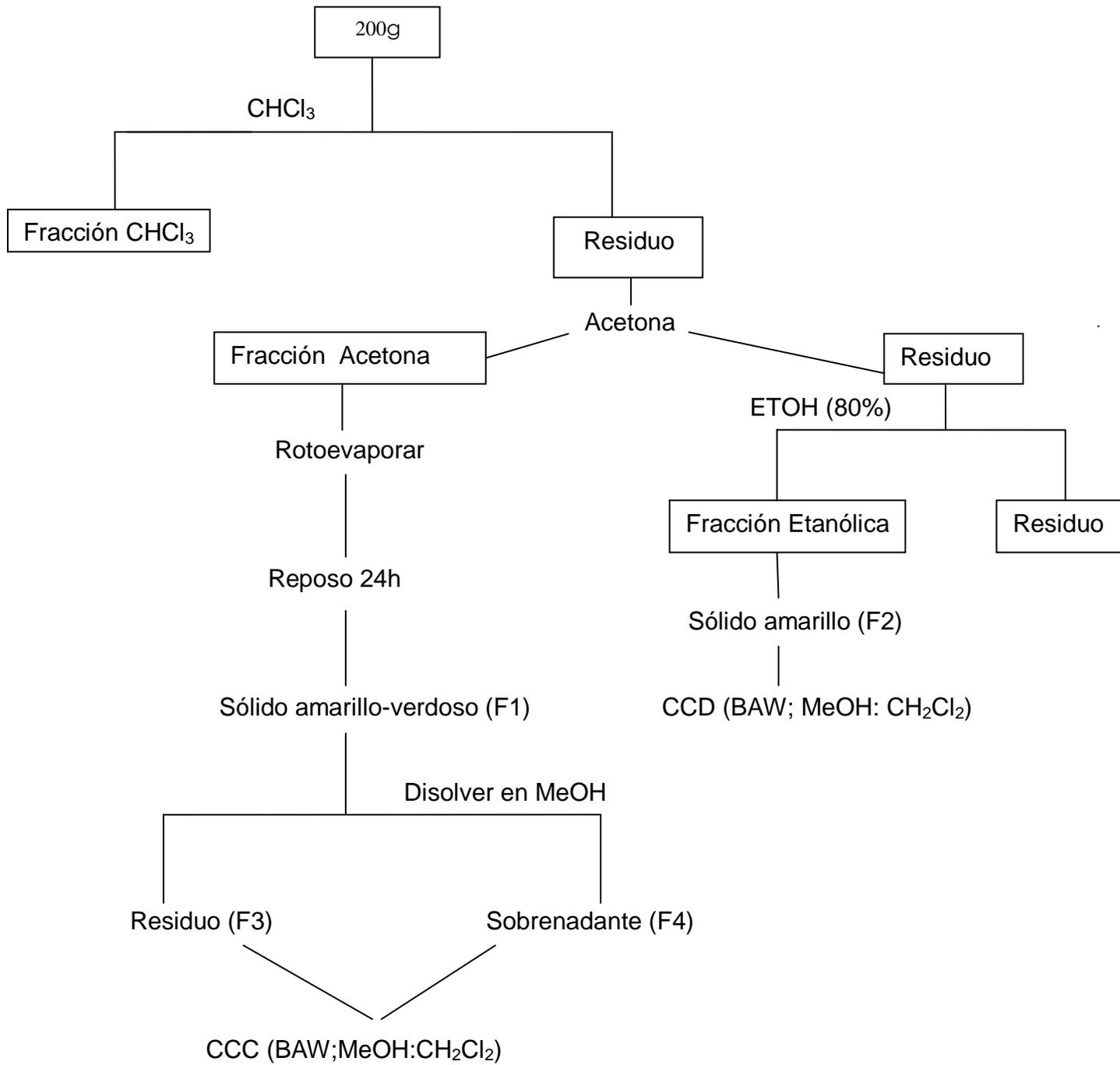


Figura 2. Diagrama del proceso extractivo



2.2.2. Desarrollo de la columna cromatográfica

Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) para observar su perfil cromatográfico y reunir las para su posterior cristalización (28). Para ello se emplearon placas de gel de sílice 60, cámara cromatográfica y como fases móviles n-butanol/ácido acético/agua (superior) en proporciones (4:1:5), (6:1:3) y diclorometano: metanol (8:2). Para el relevado se empleó lámpara UV a λ 254-366nm, amoníaco y tricloruro de aluminio (5% en etanol) (Lock de Ugaz, 1998). Una vez obtenido el perfil cromatográfico, las fracciones se reagruparon en 15 nuevas fracciones 1-2 (C1) ,3-4 (C2) ,6 (C3), 7 (C4), 8 (C5), 9 (C6) ,10-13 (C7) ,14-20 (C8) ,21 (C9) ,22 (C10) ,23-26 (C11), 25 (C12), 27 (C14) y 28 (C15).

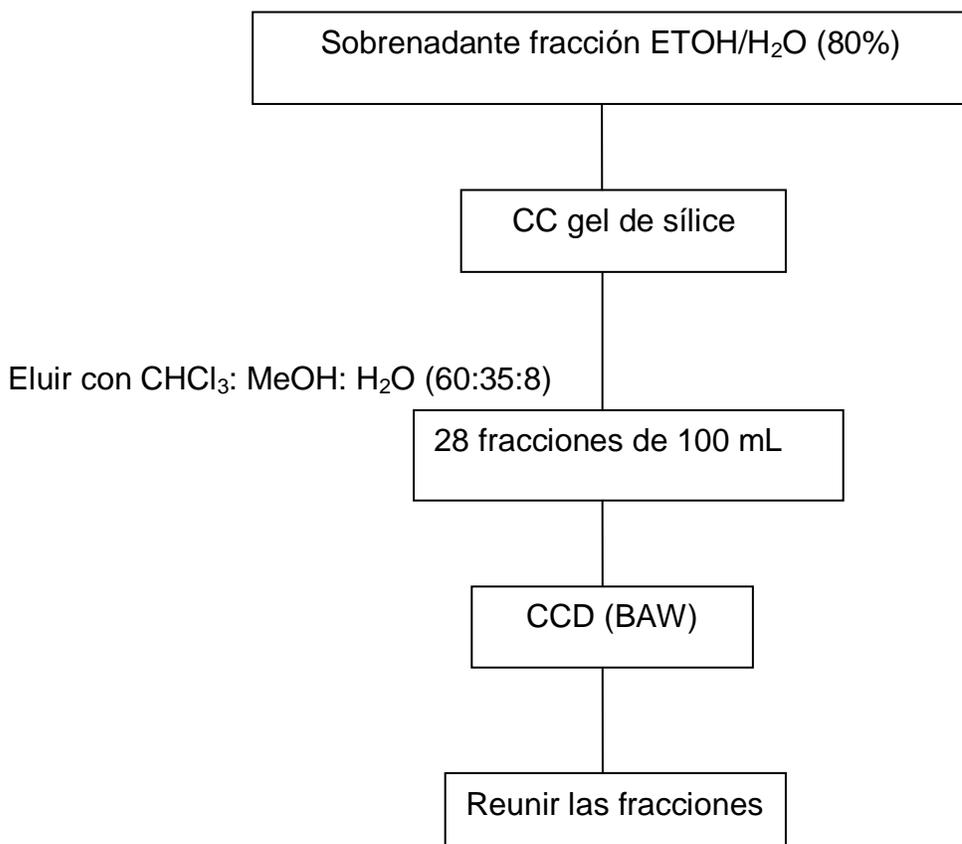


Figura 3. Diagrama del desarrollo de la columna



2.3. Caracterización estructural

Las fracciones obtenidas F1, F2 y F3 se enviaron para su caracterización espectroscópica a Bélgica.

2.3.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los compuestos aislados

Los compuestos aislados por el procedimiento extractivo a partir de la droga vegetal, se analizaron por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear unidimensional (RMN ^1H , ^{13}C y DEPT-135), en dimetilsulfóxido (DMSO), en un instrumento Bruker DRX400 (400 y 100 MHz).

2.4. Determinación de flavonoides totales en base a Rutina

2.4.1. Desarrollo de la técnica espectrofotométrica ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides totales en base a rutina

Preparación de muestra

Se pesó 70 g del material vegetal se realizó una extracción continua en equipo soxhlet con cloroformo y luego con etanol (80%) (400mL). El extracto hidroalcohólico se concentró en rotoevaporador hasta un mínimo volumen. Se pipeteó 0,5 mL del extracto y se adicionó 4mL de agua destilada, a la solución obtenida se agregó 0,3 mL de nitrito de sodio (5%). Se incubó durante 5 min, se adicionó 0,3 mL de tricloruro de aluminio (10%) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 min. A continuación se adicionaron 2 mL después de hidróxido de sodio (1mol/L), y se completó a un volumen de 10 mL con agua destilada. Se efectuó la lectura de absorbancia a 510 nm (Kumaran and Karunakaran, 2007).

Preparación de la disolución patrón de rutina (0,5mg/ml)

Se pesaron 5mg de rutina y se enrasó a un volumen de 10 mL con metanol (0.5mg/mL). Se pipeteó 0,5mL de la disolución patrón y se desarrollo un procedimiento similar descrito con anterioridad para la preparación de muestra a partir de la adición de agua destilada.

Procedimiento para la cuantificación



Las disoluciones de muestra y patrón se prepararon tal y como se describió anteriormente. Se realizaron tres réplicas. La expresión de cálculo para determinar el porcentaje de flavonoides totales en base a rutina en el material vegetal mediante la técnica espectrofotométrica es la siguiente:

$$\% = \frac{X_{(mg)}}{P_m} \times 100$$

Donde

‰: por ciento de flavonoides totales

X: masa inicial de flavonoides totales contenidas en 400 ml

Pm: peso de la muestra (mg)

2.5. Evaluación del comportamiento lineal de la técnica de la espectrofotométrica ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides totales en base a rutina

2.5.1. Linealidad

Se preparó una disolución de rutina (0.5mg/mL) en metanol. A partir de esta disolución madre se prepararon tres curvas de calibración de concentraciones crecientes (0,025; 0,05; 0,075; 0,1 y 0,125 mg/mL. Cada disolución se mezcló con 4mL de agua destilada, se adicionó 0,3 mL de nitrito de sodio al 5%, cada una se incubó durante 5 minutos y posteriormente se adicionó 0,3 mL de tricloruro de aluminio y se dejó en reposo durante 6 minutos para añadir 2 mL de hidróxido de sodio 1mol/mL, finalmente se completó a 10 mL con agua destilada. La absorbancia de la disolución se midió a 510 nm. Se utilizó como blanco el metanol. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se realizó el tratamiento estadístico de los resultados (coeficiente de correlación, coeficiente de variación de los factores de respuesta, desviación estándar relativa de la pendiente, análisis de varianza (ANOVA) y coeficiente de calidad (CC) (ICH, 2005a y b).



2.6. Comprobación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico al 80%, se comparó con los antioxidantes sintéticos BHT, ácido ascórbico, quercetina y rutina por diferentes métodos tales como actividad secuestradora del radical libre DPPH y medida del poder reductor.

2.6.1. Actividad secuestradora del radical DPPH

Preparación de las diluciones: Se tomaron 1ml del extracto hidroalcohólico que contiene una concentración de 4,14 mg/ml se llevó hasta 10 mL en un matraz aforado, obteniéndose la solución madre.

Solución de DPPH: Se pesaron 0.004g de DPPH, se disolvió con etanol absoluto, llevándolo hasta 100 mL en un matraz aforado para obtener una solución de 0.04 mg/mL, la misma se cubrió con papel de aluminio para protegerla de la luz.

Procedimiento

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *B.purpurascens* fue evaluada en base a la actividad secuestradora del radical libre estable 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH). Se tomaron alícuotas de (200, 400,600, 800 y 100 uL) del extracto hidroalcohólico, completando hasta 1 mL con etanol absoluto obteniéndose las siguientes concentraciones. A 3 mL de una solución de DPPH a concentración 0,004% (p/v) se adicionó 1mL del extracto a diferentes concentraciones en etanol (0.8, 1.656, 2.484, 3.312, 4.14 mg/mL).Las muestras se colocaron durante 30 minutos en la obscuridad y fue medida la absorbancia a 517nm frente a un blanco previamente preparado que es a mL de etanol se añade 3 mL del 2,2-difenil-1-

picril-hidracilo (DPPH) (Ohinishi, 2005). El por ciento de inhibición del radical libre DPPH se calculó empleando la ecuación:



$$\%efecto\ secuestrador = \frac{[A_{DPPH} - A_{MUESTRA}]}{A_{DPPH}} \times 100$$

Donde:

A_{DPPH} es la absorbancia del blanco (contiene todo los reactivos excepto la muestra).

El valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50% los radicales libres) fue calculado a partir de la ecuación de regresión preparada a partir de concentraciones del extracto etanólico y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales libres. Los antioxidantes sintéticos: BHT, ácido ascórbico, Quercetina y Rutina se emplearon como controles positivos. Para cada uno de estos se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de /mL con el objetivo de determinar el valor del IC_{50} a partir de la ecuación de regresión obtenida en cada caso. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.6.2. Medida del poder reductor

El poder reductor del extracto vegetal se determinó siguiendo la metodología descrita por (Oyaizu, 1986), una alícuota de 0,1 mL del extracto crudo se llevó con metanol hasta 1 mL. Se mezcló con Buffer fosfato (2,5 mL, 0,2M, pH 6,6) y ferrocianuro de potasio (2,5 mL, 1%), se incubó a temperatura constante (50 °C, 20 min) se adicionó ácido tricloro acético (2,5 mL, 10%), la mezcla resultante se centrifugó (548xg, 10 min); se tomó una alícuota del sobrenadante (2,5 mL) la cual fue disuelta en agua destilada, inmediatamente se agregó cloruro férrico (0,5 mL, 0,1%); finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm. Se utilizó como control positivo ácido ascórbico a igual concentración (4,14mg/mL),



ácido ascórbico, quercetina e hidroxitolueno butilado (BHT). El incremento de la absorbancia en la mezcla de reacción es indicativo del incremento del poder reductor. Los ensayos se realizaron por triplicado.



Resultados y Discusión



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Preparación del material vegetal

El material vegetal una vez secado y molinado conservó las características macromorfológicas establecidas para la droga (NRSP 309 y 310, 1992). Se almacenó en bolsas de polietileno en una desecadora protegida de la luz y la humedad hasta el momento de su utilización.

3.2. Obtención de extractos con disolventes de diferente polaridad

La especie *B.purpurascens*, solo posee escasos informes que confirman la existencia de determinados metabolitos, se conoce lo informado por el tamizaje fitoquímico, y en años más recientes se identificaron varios ácidos grasos y se aislaron cuatro nuevos flavonoides a partir del extracto acuoso de la especie por (González, 2006), por lo que se decidió comenzar a realizar la obtención de extractos de las hojas de la planta, primeramente eliminando la clorofila y otros componentes grasos que no resultaban de interés para este trabajo.

Posteriormente se empleó en el proceso extractivo Acetona con la finalidad de extraer metabolitos de mediana polaridad que pudieran tener relación con los usos de la especie en la medicina tradicional, además de investigaciones en años anteriores se conocía la presencia de metabolitos de diferentes polaridades en las hojas de la especie, pero solamente se han aislado varios de elevada polaridad a partir del extracto acuoso.

3.2.1. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

La fracción de Acetona se concentró y dejó en reposo para tratar de cristalizar algunos de los metabolitos solubilizados en dicha fracción, al cabo de las 24 horas se formó un precipitado de color amarillo verdoso el cual se denotó como F1. El sólido (F1) se lavó con Metanol y el residuo del lavado se concentró, se sometió a cristalización en Acetona y se obtuvo un nuevo precipitado de color amarillo más intenso (F3).

La evaluación del compuesto F1 por CCD bajo las condiciones descritas en el epígrafe 2.2.1 indicó pureza cromatográfica, al observarse en las diferentes fases



móviles empleadas la visualización de una única mancha, por lo que se decidió realizar la caracterización espectroscópica por Resonancia Magnética Nuclear.

El residuo de la fracción de acetona se extrajo una vez más con una mezcla de Etanol/Agua (80:20 v/v) para eluir los metabolitos de mayor polaridad, que no se solubilizaron en dicho disolvente lo cual permitió separar otros componentes presentes en el material vegetal.

Del año 2006 se conocía que cuando se empleaba el etanol como disolvente de extracción para las hojas de la planta se obtenía un 8,4 % de rendimiento de sustancias solubles extraíbles referido al peso de sólidos contenido en 1mL de extractos, por lo que se decidió realizar procesos de fraccionamiento a partir de este extracto. El extracto hidroalcohólico se concentró y se dejó en reposo por 24 horas para favorecer el proceso de cristalización, a partir de este tiempo se observó un sólido de color amarillo de forma abundante en esta fracción (F2), el cual se separó por decantación del sobrenadante. El sólido F2 se lavó con Acetona y se realizó una evaluación cromatográfica en CCD para analizar su pureza, se apreció en el cromatograma una sola mancha que al ser revelada en UV a 336 nm se tornó de color púrpura, por lo que se decidió enviar para identificación y caracterización estructural.

La identidad del compuesto F2 se determinó por RMN y reveló que esta estructura correspondía a un glicósido flavonoide aislado y caracterizado en el año 2005 por González y colaboradores. Se continuó trabajando con el sobrenadante de la fracción hidroalcohólica, ya que en el seguimiento por cromatografía en capa delgada se observó la posibilidad de aislar otros compuestos presentes en la fracción, por su posible relación con la actividad antioxidante.

3.2.2. Fraccionamiento por columna clásica

Los métodos de fraccionamiento empleados para las hojas de la especie *B.purpurascens* con vista a obtener una fracción bioactiva conllevaron a proponer en ambos casos la presencia de flavonoides en dichos extractos y a escoger el extracto hidroalcohólico para realizar el aislamiento de otros metabolitos que podían tener relación con la actividad antioxidante atribuida a los compuestos fenólicos



entre ellos los flavonoides. Además, la selección del extracto hidroalcohólico para el aislamiento de metabolitos secundarios relacionada con la actividad biológica, estuvo dada por el porcentaje de extracción que permitió la mezcla (8,21%).

Del fraccionamiento se obtuvieron 28 fracciones de 100 mL cada una, las que se analizaron por CCD con el empleo de las fases móviles indicadas en el epígrafe 2.2.2, esto permitió teniendo en cuenta el perfil cromatográfico reunir las fracciones para continuar con otros procedimientos de aislamiento de otros metabolitos.

La fracción hidroalcohólica parcialmente purificada (sobrenadante) obtenida de la planta se encuentra enriquecida en flavonoides, generalmente en forma glicosilada, como lo demostró su comportamiento en cromatografía en capa delgada, en la fase móvil cloroformo: metanol: agua (60:35:8) y con el uso de reveladores (AlCl_3 , UV y amoníaco), frente a los cuales estos compuestos tienen un comportamiento típico. En el cromatograma se observaron solo cuatro manchas de color púrpura con R_f (0.49, 0.50, 0.52, 0.82) que sugirió la presencia de estos metabolitos ya que coincidieron los R_f y el revelado con el informado en la literatura para este tipo de compuesto (Markham, 1982, Miranda and Cuéllar, 2000). Por un procedimiento sencillo se logró la obtención de una fracción rica en flavonoides de la cual se pudieron aislar y purificar 6 compuestos mediante el uso de la cromatografía en columna y posterior cristalización, aunque estos no han podido ser caracterizados espectroscópicamente.

3.2.2.1. Aislamiento y purificación de los compuestos del sobrenadante de la fracción hidroalcohólica

Las fracciones descritas en el epígrafe 2.2.2 se reunieron en 15 nuevas fracciones denominadas: 1-2 (C1) ,3-4 (C2) ,6 (C3), 7 (C4), 8 (C5), 9 (C6) ,10-13 (C7) ,14-20 (C8) ,21 (C9) ,22 (C10) ,23-26 (C11), 25 (C12), 27 (C14) y 28 (C15). Las fracciones C4, C5, C6 y C7 se sometieron a cristalización en metanol ya que en la cromatografía en capa delgada se observó para la fracción C6 sólo una mancha y para las tres restantes C4, C5 y C7 se observaron dos manchas para C4 y C7 y tres para C5, por lo que este procedimiento pudiera favorecer la cristalización de algunos de los compuestos presentes en estas fracciones.



La fracción C4 originó un sólido de color amarillo por cristalización en MeOH de masa 318 mg, que al ser evaluado cromatográficamente sugiere estar puro y se destinó para caracterización espectroscópica. El sobrenadante se llevó a sequedad y se redisolvió en acetona, y al cabo de 24h, se obtuvo otro sólido equivalente a 6,4mg.

De la fracción C5 precipitó un sólido de color carmelita de consistencia gomosa con una masa de 32,5 mg, se analizó por cromatografía en capa delgada y se comprobó que no estaba puro, pues aparecieron 3 manchas. Por la poca complejidad de la fracción se decidió separar por CLAE preparativa en fase reversa utilizando un gradiente desde metanol 50% en agua hasta 100% de metanol. Aun bajo de estas condiciones no ha podido purificar esta dicha fracción.

En el caso de la fracción C6, en la propia mezcla de elución al cabo de las 24 horas se observó un precipitado de color amarillo, equivalente a 53,7 mg el cual aparentaba estar puro al analizarlo por CCD.

Además se obtuvo otra fracción C7 (10-13) que el análisis por CCD apareció contaminando con otro compuesto y que al concentrarla y añadirle metanol apareció un polvo amorfo de color amarillo oscuro de masa 36,9 mg, este se separó y el sobrenadante se concentró y se adicionó acetona obteniéndose un nuevo sólido de color amarillo muy claro.

Todos los compuestos obtenidos, se evaluaron por CCD bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas en el epígrafe 2.2.2, y al observar pureza cromatográfica se destinaron para una futura caracterización espectroscópica.

3.3. Caracterización estructural

3.3.1. Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear. Propuesta estructural para F1

El análisis de las señales que aparecen en el espectro de RMN¹H y ¹³C permitió sugerir la posible identidad del compuesto F1. En primer lugar en el espectro de RMN de ¹³C (Anexo 1) aparecieron 15 señales indicativas de la presencia de un aglicón de flavonoide, adicionalmente apareció una señal en el espectro RMN DEPT lo cual indicó por el valor del corrimiento químico observado a 102,6 ppm la



aparición de un grupo metilendioxi unido al aglicón, lo cual se correspondía con un singuleto que se observó a un corrimiento de 6,2 ppm en el espectro de RMN ^1H (Anexo 2 y 3).

La aparición de siete protones corroboró que se trataba de una estructura de flavonoide no glicosilada.

El singuleto ancho centrado a 8 ppm evidenció la presencia del grupo OH en posición 5 del anillo A, con un corrimiento químico a campo bajo de δ 177 ppm del anillo C (Naissy et al., 2004) (tabla 1 y 2), lo cual se refleja en las señales del espectro de ^{13}C RMN. Este valor responde al establecimiento de una interacción por puente de hidrógeno entre el protón del grupo OH del C-5 y el oxígeno del grupo carbonilo situado en la posición cuatro del anillo C (C-4). En el patrón de sustitución del anillo A se observa un singuleto de protón aromático a δ 6,91 ppm y otro fuera de esta zona a 6,2 ppm, indicando la presencia de un sistema trisustituido. La localización del grupo metilendioxi en las posiciones 6 y 7 del anillo A se estableció comparando los resultados del espectro de RMN ^{13}C de este compuesto con el conocido compuesto (4',5- dihidroxi 6,7-metilendioxi-3-O-D-glucopiranosido) (Hiroshi and Hiroshi, 1998). Como resultado de esta comparación pudo establecerse la identidad estructura del compuesto F1.

Se evidenció una total correspondencia en las señales para este sistema común entre ambos compuestos. La aparición de un sistema AB comprendiendo dos dobletes (2H) y las señales a 8,05 ppm y 86-9 ppm demostraron que el anillo B era parasustituido.

Las señales correspondientes al compuesto F1 en los espectros RMN ^1H y ^{13}C concuerdan con una estructura de flavonoide con grupo dioxalano (Anexo 4).



Tabla.1. Corrimientos químicos en el espectro ^1H RMN del compuesto F1

Protón	Corrimiento químico(DMSO-d ₆)
2'6'	8,06(d)
3'5	6,93(d)
8	6,91(s)
O-CH ₂ -O	6,2(s)

Tabla 2. Corrimiento químico en el espectro ^{13}C RMN del compuesto F1

Carbono	Corrimiento ppm(DMSO-d ₆)
2	159,3
3	135,7
4	176,2
5	139,7
6	128,4
7	153,7
8	89,3
9	147,4
10	105,8
1'	121,4
3'5'	115,4
2'6'	129,4
4'	151,4
O-CH ₂ -O	102,6



3.4. Determinación de flavonoides totales en base a rutina

Se desarrolló un procedimiento similar al descrito por (Kumaran and Karunakaran, 2007) para la cuantificación de flavonoides totales en base a rutina presentes en el material vegetal. El porcentaje de flavonoides totales obtenido mediante la técnica espectrofotométrica UV indirecta es de 0,62 %.

El tricloruro aluminio en medio ácido puede formar complejo con 4-ceto-5-hidroxilo y finalmente el 4-ceto-3 hidroxilo, fundamentalmente en flavonoides que pueden formar complejos con ácidos lábiles presentes. Como resultado de esta reacción se obtiene un efecto batocrómico en la banda I representando en el espectro UV.

Este cambio en los corrimientos químicos en la reacción con el $AlCl_3$ en la banda I es indicativo de la presencia de 2 grupos OH en el anillo B.

Tabla 3. Corrimientos químicos en la reacción con $AlCl_3$ en medio ácido.

Reactivos	Banda I(nm)	Interpretación
$AlCl_3/HCl$	+35 -55	5-OH
	+10-20	5-OH en posición 6 del O no aparece unión con C-6 glicósido
	No corrimiento	5-OH no es libre o posiblemente 5-OH con grupo 6 fenilo
	+50-60	3 OH posible (con o sin 5-OH)
$AlCl_3/H^+$	+30-40	Anillo B: diOH
$AlCl_3/H^+$	+20-25	Anillo A: diOH



3.5. Evaluación del comportamiento lineal de la técnica espectrofotométrica ultravioleta indirecta para la determinación de flavonoides en base a rutina

3.5.1. Linealidad:

Según el análisis de las tres réplicas realizadas a las curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 y 0,125 mg/mL de rutina, se obtuvo el siguiente modelo matemático: $y = 7.8573x + 0.0121$ (fig. 5). Donde x: concentración de analito en mg/mL y y: respuesta (absorbancia). Los resultados estadísticos cumplen con lo establecido para este parámetro, por lo cual que se puede afirmar que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado (tabla 4).

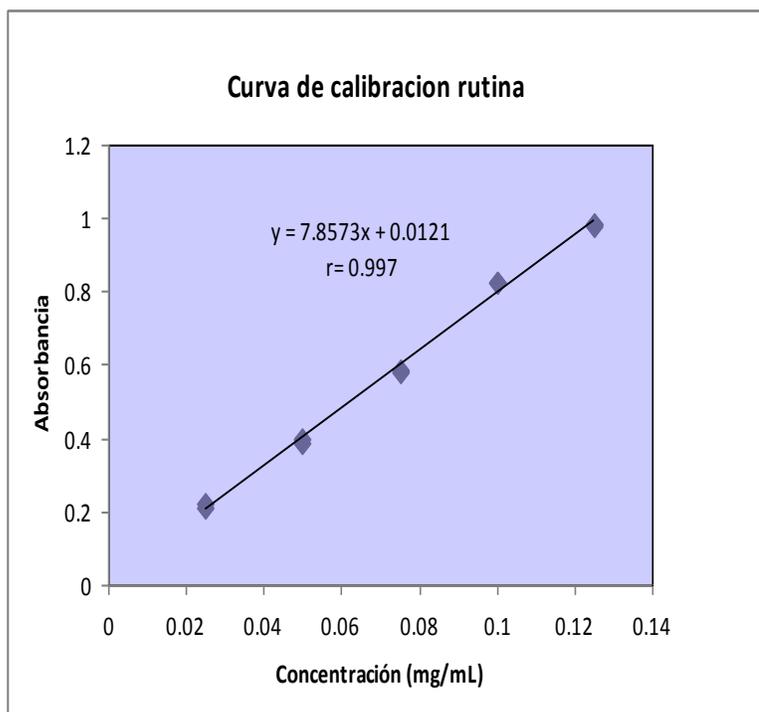


Figura 4. Curva de calibración de rutina.



Tabla 4. Resultados estadísticos de la linealidad de la técnica analítica UV indirecta.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.998003
Coefficiente de determinación R^2	0.99600998
R^2 ajustado	0.99561098
Error típico	0.01936092
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0.93570855	0.93570855	2496.25217	2.4929E-13
Residuos	10	0.00374845	0.00037485		
Total	11	0.939457			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0.012092784	0.01394659	0.867078123	0.406224151	-0.018982157	0.043167724
Variable X 1	7.857319588	0.157264316	49.96250767	2.49287E-13	7.506912857	8.207726318

QC (Quality coeficient):1,99≤2,5≤2%



3.6. Comprobación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico al 80% se comparó con los antioxidantes sintéticos BHT, ácido ascórbico, quercetina y rutina por diferentes métodos tales como actividad del radical libre DPPH y medida del poder reductor.

3.6.1. Actividad secuestradora de radicales libres del extracto hidroalcohólico

La evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la especie *Boldoa purpurascens* se realizó utilizando una solución etanólica del radical libre DPPH, el cual presenta la ventaja de ser inalterado en ciertas reacciones como la quelación de iones metálicos y la inhibición enzimática provocadas por algunas sustancias presentes en matrices complejas (Amarowing et al., 2004). La solución del DPPH recién preparada es de color púrpura oscuro, con un máximo de absorbancia a 517 nm, este color, generalmente disminuye cuando un antioxidante está presente en el medio; así, las moléculas antioxidantes pueden disminuir los radicales libres del DPPH (aportando átomos de hidrógeno o electrones que eventualmente reaccionan con el DPPH) y los convierte en un producto amarillo (2,2-difenil-hidrazina o análogos de hidracina sustituidos) produciendo una disminución en la absorbancia a 517nm (Yamaguchi et al., 1998).

En este ensayo se procesaron los porcentajes del efecto secuestrador y las concentraciones para obtener las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los patrones utilizados (BHT, rutina, quercetina y ácido ascórbico) de igual forma se procedió para el extracto en estudio, de las cuales se obtuvieron las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada caso (figura 5). Estas curvas permitieron determinar el valor de IC50 para cada muestra, valores que aparecen descritos en la tabla (5). Los bajos valores del IC50 corresponden con una elevada actividad secuestradora de radicales libres.

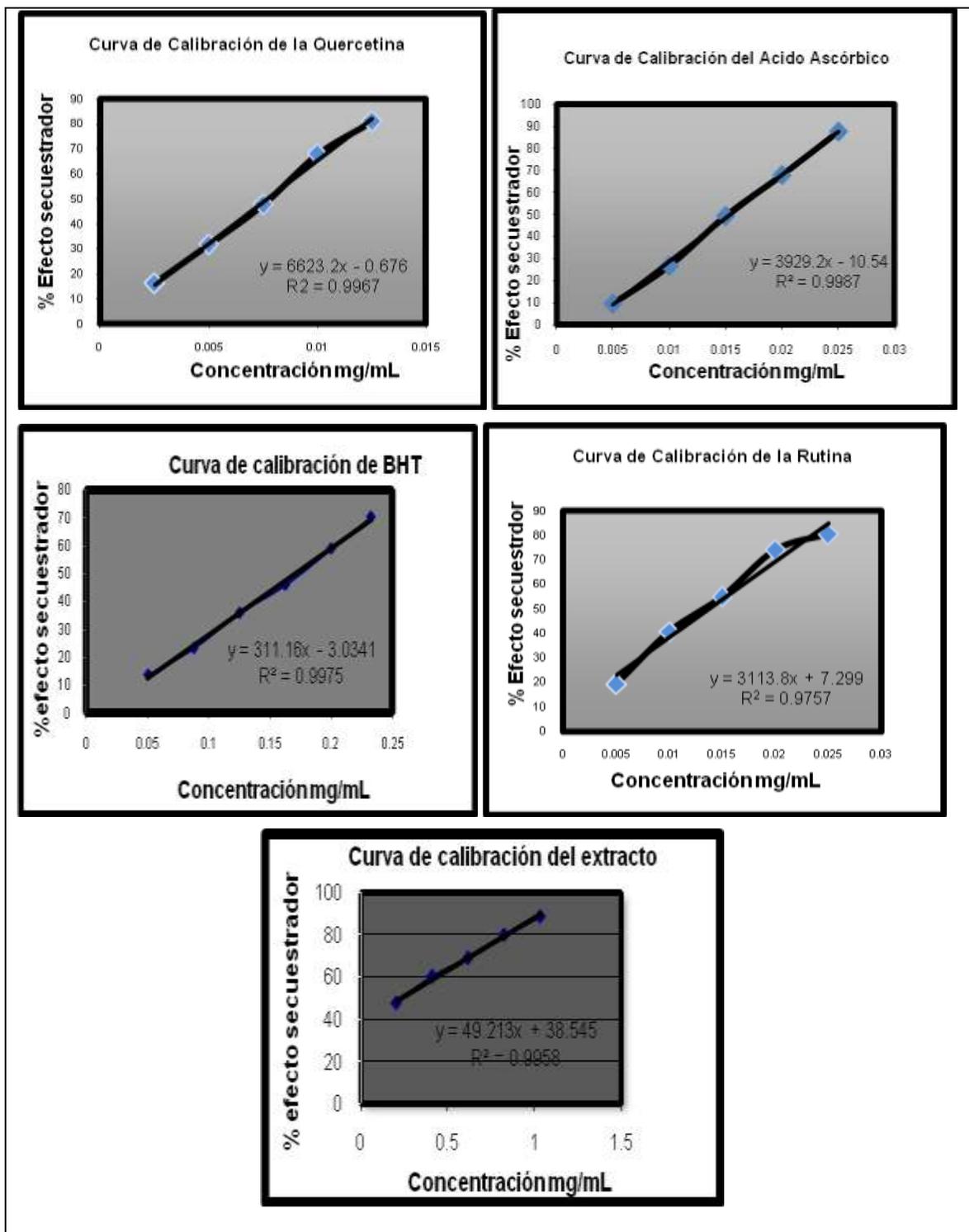


Figura 5. Curvas de calibración obtenidas para los patrones y el extracto durante el estudio de la actividad secuestradora del radical DPPH



Tabla 5. Actividad secuestradora del radical DPPH de los patrones y del extracto hidroalcohólico de la *Boldoa purpurascens*

Muestras	Concentración (mg/mL)	Efecto secuestrador (%)	IC50 valores (mg/mL)
Acido ascórbico	0.005	9.9	0.015
	0.0100	26.97	
	0.0150	49.51	
	0.0200	67.99	
	0.0025	87.99	
Hidroxitolueno butilado (BHT)	0.0050	13.74	0.13
	0.0875	23.32	
	0.1250	35.96	
	0.1625	46.07	
	0.2000	59.07	
	0.2325	70.45	
Quercetina	0.0025	16.34	0.007
	0.0050	31.81	
	0.0075	47.82	
	0.0100	67.97	
	0.0012	81.05	
Rutina	0.0050	19.42	0.014
	0.0010	40.78	
	0.0150	55.10	
	0.0200	74.15	
	0.0225	80.58	
Extracto	0.2070	47.56	0.60
	0.4140	60.28	
	0.6210	69.07	
	0.8280	79.96	
	1.0350	88.66	



En la reacción del extracto hidroalcohólico de la especie se observó que al evaluar la reacción con el aumento de concentración la coloración del reactivo DPPH, varía desde púrpura hasta amarillo, lo cual indicó que el extracto evaluado posee actividad antioxidante.

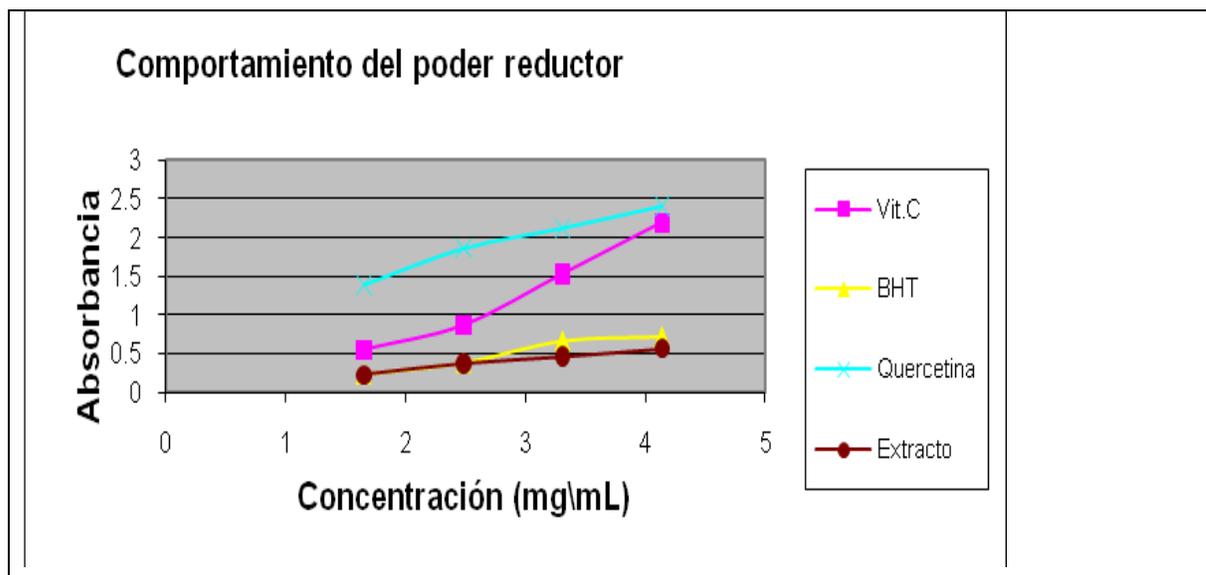
El valor calculado para el IC₅₀ del extracto de las hojas de la *Boldoa purpurascens* Cav muestra una gran diferencia al compararlo con los valores obtenidos de este parámetro para los antioxidantes sintéticos (Vitamina C, BHT, quercetina y rutina. Si se tiene en cuenta que los valores bajos de IC₅₀ obtenidos para los antioxidantes sintéticos representan una marcada actividad antioxidante (Singh, 2008), se puede referir que la actividad antioxidante del extracto, por este mecanismo de acción antioxidante (Actividad secuestradora de radicales libres), es baja para las concentraciones estudiadas.

3.6.2. Medida del poder reductor

La actividad antioxidante se complementó midiendo su capacidad para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺, monitoreando la formación de un complejo coloreado. Los cambios de coloración observados durante la reacción del extracto alcohólico de la especie frente al cloruro férrico en las condiciones descritas en el epígrafe 2.6.2 mostraron el poder reductor del extracto evaluado, la figura 6 ilustra el poder reductor del extracto hidroalcohólico comparado con los patrones BHT, quercetina y ácido ascórbico. Muchos autores sostienen que la actividad antioxidante de algunos extractos polares es debida, al menos en parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones). En cualquier caso es importante la estructura planar y espacial del compuesto antioxidante presente en el extracto (Murillo et al., 2007). De acuerdo a estos resultados se pudo observar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens* a las concentraciones probadas tiene un comportamiento similar al BHT, en el proceso de reducción del Fe³⁺ hasta Fe²⁺, mientras que al compararlo con el ácido ascórbico y a la quercetina mostró un menor poder reductor para poder reducir el



Fe³⁺ a Fe²⁺. Los resultados observados se encuentran avalados por la presencia de compuestos polihidroxiados de tipo flavonoides encontrados en las hojas de la especie.



Es conocido que en años anteriores se han aislados y caracterizados varios compuestos polihidroxiados de tipo flavonoide a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*, estos compuestos aparecen descritos en la literatura el efecto antioxidante, teniendo en cuenta la presencia de los grupos hidroxilos en estas moléculas. Así los resultados obtenidos se corresponden con lo descrito, el hecho de que en los ensayos realizados muestran un menor poder antioxidante para el extracto evaluado, no es indicativo que esta actividad pueda estar influenciada por las concentraciones empleadas en el experimento, a partir de lo cual se sugiere la evaluación de otros niveles de concentración y/o de sustancias puras aisladas a partir de la planta.



Conclusiones



CONCLUSIONES

1. El proceso de fraccionamiento propuesto para el aislamiento de metabolitos secundarios a partir del extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens* permitió aislar y purificar ocho compuestos de los cuales se caracterizó el Gomphrenol.
2. Se comprobó que el extracto hidroalcohólico de la especie *Boldoa purpurascens* posee actividad antioxidante de acuerdo a los experimentos realizados.
3. El contenido de flavonoides totales determinado a partir del extracto hidroalcohólico de *Boldoa purpurascens* en base a rutina representa el 0.62% de los componentes de la planta.



Recomendaciones



RECOMENDACIONES.

1. Realizar la caracterización espectroscópica de los compuestos aislados.
2. Evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico y los compuestos aislados empleando otros ensayos y diferentes niveles de concentración.

A green oval graphic with a black outline, containing the text 'Referencias Bibliográficas' in a green, italicized serif font.

Referencias Bibliográficas



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFONSO VALENZUELA, B. 2004. El consumo del té y la salud: Características y propiedades. Rev. Chil. Nutr, 31.
 2. AMAROWING, R., PEGG, R. B. & RAHIMI, R. B. 2004. Scavenging capacity antioxidant, activity of selected plant the Canadian prairies. Food Chemistry, 84, 551-562.
 3. BENZIE, I. F. F. & STRAIN, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. J. Anal. Biochem.239, 70-76.
 4. BLOIS, N. S. 1958. Antioxidant determinations by use of the stable free radical libre.Nature 181. 1199-1200.
 5. BORS, W., HELLER, W., CHRISTA, M. & COLS. 1990. Flavonoids as antioxidants. Methods Enzymol, determination of radical-scavenging efficiencies, 186, 343-355.
 6. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. & BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *In*: TECHNOL., F. S.
 7. BY, B. & GONZÁLEZ, D. M. 2010. Comprobación de actividad hipoglicemiante en rata, aislar y caracterización de D-pinitol. Trabajo de diploma, Universidad Central "Marta Abreu "De Las villas.
 8. CAO, G., E, S. & R.L., P. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radicals Biol. Med., 22, 749-760.
-



9. CHIPAULT, J. R. 1962. Antioxidants for food use. *In Lunderberg WO. Autoxidation and antioxidants*, New York, Wiley.
 10. CASTRO-MÉNDEZ, I., RIVERO-MARTÍNEZ, R. & DÍAZ-GONZÁLEZ, A. 2004. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens*, Cav. *Rev Cubana Plant Med*, (2), 67-72.
 11. CHIPAULT, J. R. 1962. Antioxidants for food use. *In Lunderberg WO. Autoxidation and antioxidants*. New York,.
 12. CODY, V. 1982. Plant flavonoids: Pharmacological and Structure activity relationships *In: Champman an Hall In: HARBONES, J. B. (ed.) the flavonoides-advances in Research*. London
 13. DAVIS, J. K. 1995. Oxidative stress. The paradox of aerobic life. *Biochem.Soc.Symp*, 61, 1-31.
 14. DEQUAN, L. 1996. *Nyctaginaceae.*, Fl. Republ., Popularis Sin.
 15. DESMACHELIER, C. & CICCIA, G. 1998. Antioxidante. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la asociación Ciencia Hoy* [Online], 8. Available: [www./Ciencia Hoy](http://www.Ciencia Hoy) 44 antioxidantes vegetales.
 16. EVANS, W. 1991. *Farmacognosia*.
 17. GONZÁLEZ, D. 2006. Evaluación Fotoquímica y Farmacológica de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*. Tesis presentada en opción Instituto de farmacia y Alimentos.
 18. GORDON, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vivo. *Food Antioxidants*, Elsevier, 1-18.
-



19. HALLIWELL, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 16, 33-50.
 20. HARBONE, J. & WILLIAMS, C. 1982. *The flavonoids-advances in Research*, London.
 21. HARBONE, J. B. 1988. *Plants Flavonoids in biology and medical properties*, New York.
 22. HERTOOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study, 1007-1011.
 23. HIROSHI, K. & HIROSHI, J. 1998. Novel flavonoid and glycoside there of Tokyo Koho, *UTAISAN KK*.
 24. HIROSHI, K. & HIROSHI, J. (eds.) 1998. Novel flavonoid and glycoside *there of Tokyo Koho*.
 25. ICH. Year. Validation of analytical procedures and Methodology. *In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 2005 Harmonized Tripartite Guideline*. Geneva.
 26. ICH 2005a. "International Conference on Harmonization; Guideline on Validation of analytical Procedures. *In: GUIDELINE*, H. T. (ed.). USA, Geneva: Federal Register.
 27. KÜHNAU, J. 1976. The Flavonoids: a class of semi-essential food Components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24, 117-190.
-



28. KUMARAN, A. & KARUNAKARAN, R. J. 2007. In vitro antioxidant activity of methanol extracts of us *Phyllanthus* species. India: Published by Elsevier.p.v.
 29. LEÓN, A. 1957. Flora Cubana. Contribuciones ocasionales del Museo de historia Natural del Colegio de la salle, 26-26.
 30. LETAN, A. 1966. The relation of structure to antioxidant activity of quercitin and some of its derivates.
 31. MABRY, J, MARKHAN, K. & THOMAS, M. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer, New York: Harbone J B.
 32. MARCO, G. J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem., 594-598.
 33. MARKHAM, K. 1982. Techniques of flavonoid identification, London-New York-Paris, Academic Press.
 34. MARKHAM, K. 1989. Flavones, Flavanols and their glycoside. Inc: Methods in plant Biochemistry, 1, 197-235.
 35. MARKHAM, K. R. 1982. Techniques of flavonoid identification, Academic Press,, London-New York-Paris.
 36. MARTÍNEZ, A. 2005. Flavonoides. [Online]. Medellín, Colombia. Avalable: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>. [(2mai 2010).].
 37. MARTÍNEZ, Y. 1998. Estudio farmacológico y toxicológico de *Boldoa purpurascens*. Trabajo de Diploma., UCLV.
-



38. MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M. & TUÑÓN, M. J. 2002. Propiedades acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp.*, 6, 271-278.
 39. MARTÍNEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M. J. & ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer.*, 5-18.
 40. MILIÁN, L. 2000. Estudio fitoquímico y genotóxico del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*. Trabajo de Diploma, UCLV.
 41. MIRANDA, M. & CUÉLLAR, A. 2000. Farmacognosia y Productos Naturales.
 42. MIRANDA, M. & CUÉLLAR, A. 2000. Manual de Práctica Laboratorio de farmacognosia y productos naturales, Cuba, Universidad de La Habana.
 43. MUÑIZ, P., SÁEZ, G. & VALLS, V. 2000. Función y mecanismos antioxidantes. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes. 63-70.
 44. MURILLO, E., LOMBO, O., TIQUE, M. & MÉNDEZ, J. J. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms. *Información Tecnológica*, 18(6), 65-74.
 45. NAISSY, B., UM, B., LOBSTEIN, A., WENIGER, B., KONÉ, M. & ANTOU, R. 2004. Studies on chemical continents from. The root of *Mirabilis Jalapa*. 7(12), 993-996.
 46. NAMIKI, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29, 273-300.
-



47. NAVARRO, G. & FABIOLA, R. 2002. Comprobación del efecto cicatrizante de *peperomi scutellaefolia* R.EtP., Aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudios químicos. UNMSM.
 48. OHINISHI, M. 2005. Inhibitory effects of chlorogenic on linoleic acid peroxidation and hemolytic, 97(2), 261-266.
 49. ORGANIZATION. W. H. 2004. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines' in pharmacovigilance. System.Genen [Online], 14.
 50. ORTIZ, H., SÁNCHEZ, J., MÉNDEZ, A. & MURILLO, P. 2009. Potencial antioxidante de Hojas y Corteza de *Bauhinia Kalbreyeri Harms*: Contribución de sus flavonoides en esta actividad. Botánica, 33, 183-191.
 51. OYAIZU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese journal of nutrition, 63, 1035-1042.
 52. PÉREZ, L., FERNÁNDEZ, R. & ARREGUÍN, M. 2000. La familia Nyctaginaceae en la cuenca del río Balsas. Polibotánica. México.
 53. PRIETO, T. 2003. Diseño preliminar del libro "*Fitoterapia Antinflamatoria*". Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
 54. PULIDO, R., BRAVO, L. & SAURA-CALIXTO, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay J. Agric. 3396-3402.
 55. RANELLETTI, F. O, RICCI, R. & L.M., L. 1992. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int. J. Cancer.*, 50, 486-492.
-



56. RICE-EVANS, C. 1995. The radicals' antioxidants in normal and pathological processes. In *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*, 1-32.
57. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compound. *Trends Plant Sci.*, 2, 152-159.
58. RIEMERSMA, R. A., RICE-EVANS, C., TYRRELL, R. M., CLIFFORD, M. N. & LEAN, M. E. 2001. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM*, 94, 277-282.
59. RIMM, E., KATAN, M., ASCHERIO, A., STAMPFER, M. & WILLET, W. 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 384-389
60. ROGINSKY, V. & LISSI, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. 235-254.
61. ROIG, M. 1984. Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos *In: TÉCNICO, E. C. (ed.)* tercera ed. La Habana.
62. ROIG MESA, J. 1988. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Científico Técnica.
63. ROWLAND, M., TOZER, T. & MESA, J. 1995. *Concepts and Applications*, Baltimore.
64. SAFIYA, A. H. 2008. Determinación de compuestos fenólicos, Metales y su efecto sobre el potencial antioxidante en mieles procedentes de la especie
-



- Apis mellifera*. Trabajo de diploma, Universidad Central "Marta Abreu" De Las Villas.
65. SAKAKIBARA H., HONDA Y., NAKAGAWA S., ASHIDA H. & K., K. 2003. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *Food Chem.*, 571-581.
66. SANTOS -BUELGA, C. 2007. *IMPLICACIONES EN LA SALUD DE LOS POLIFENOLES DE LA DIETA*. [Online]. Conferencias Sección A: Nutrición y Dietética. Available: www.vinosalmundo.com [20 Abril 2010].
67. SCAMBIA G, RANELLETTI, F. O. & PANICI, P. B. 1990. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cell. *Br. J. Cancer*, 62,, 942-947.
68. SHARGEL, L. & YU, A. B. C. 1992. Prentice Hall International (UK) Limited. London.
69. SOUZA BRITO, A., ROBINEAU, L., BJE, B., GRACIOSO, J. & HIRUMA-LIMA, C. 1999. Antinociceptive effect of boerhaavia difusa L. (Nyctaginaceae) in mice. *J. Ethnopharmacol*, (en prensa).
70. TSAO, R. & ZEYUAN, D. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. 85-99.
71. YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H. & MATOBA, T. 1998. HPLC, Method for evaluation of the radical scavenging activity of foods by using 1-1, diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnology Biochem*, 62, 1201-1204.
-



72. YOSHIDA, M., SAKAI, T. & HOSOKAWA, N. 1990. The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. 10-13.
73. YOUNG, J. F., NIELSEN, S. E., HARALDSDOTTIER, J., DANESFVAR, B., LAURIDSEN, S. T., KNUTHSEN P, C. A., SANDSTROM, B. & DRAGSTED, L. O. 1999. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr*, 69, 87-94.
74. ZBINDEN, G. & FLURY-ROVERSI, M. 1991. Significance of the LD50 test for Toxicological Evaluation of the Chemical Substance. *Arch Toxicology*, 47-77.
-



Anexos

Anexo 1

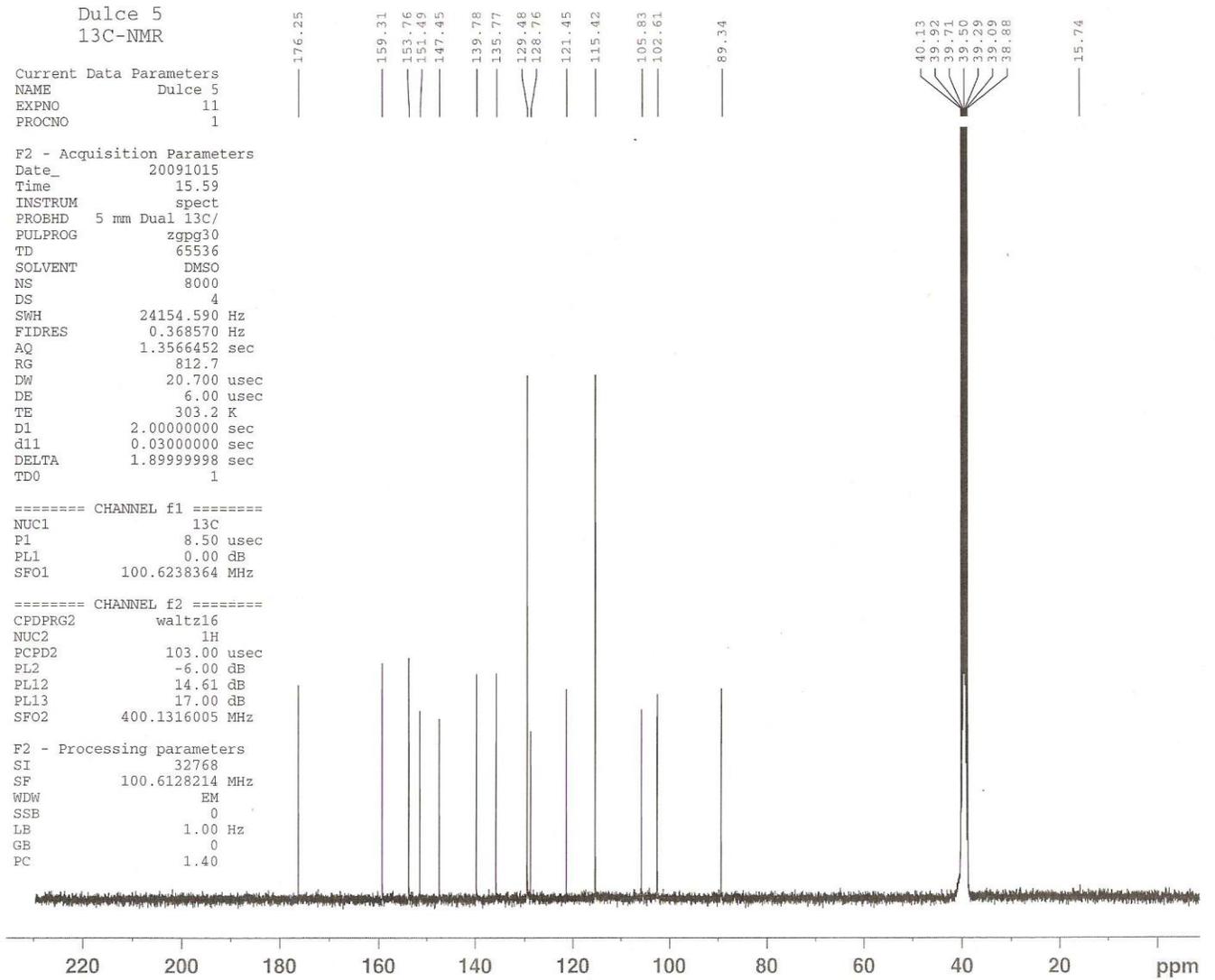


Figura 7. Espectro de RMN ¹³C del compuesto F1

Anexo 2

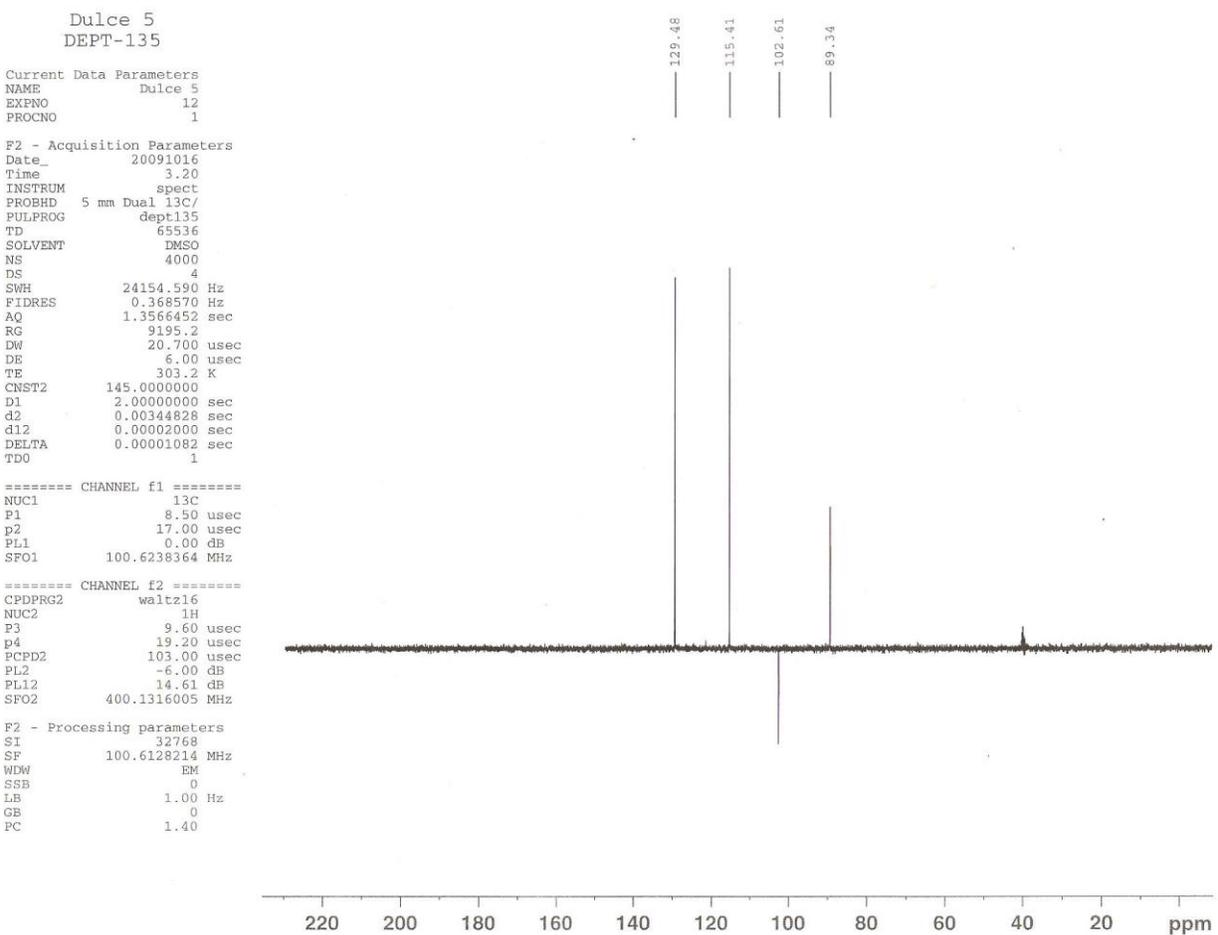


Figura 8. Dept 135 del compuesto F1

Anexo 3

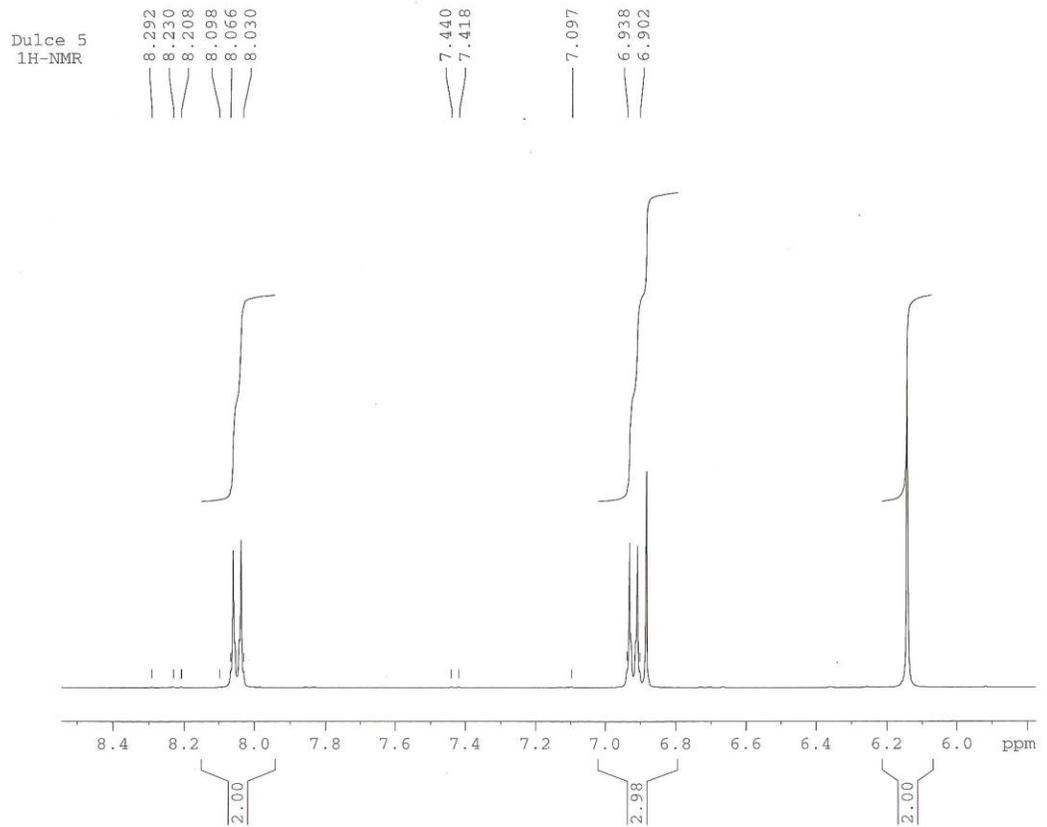


Figura 9. Espectro de RMN¹H del compuesto F1

Anexo 4

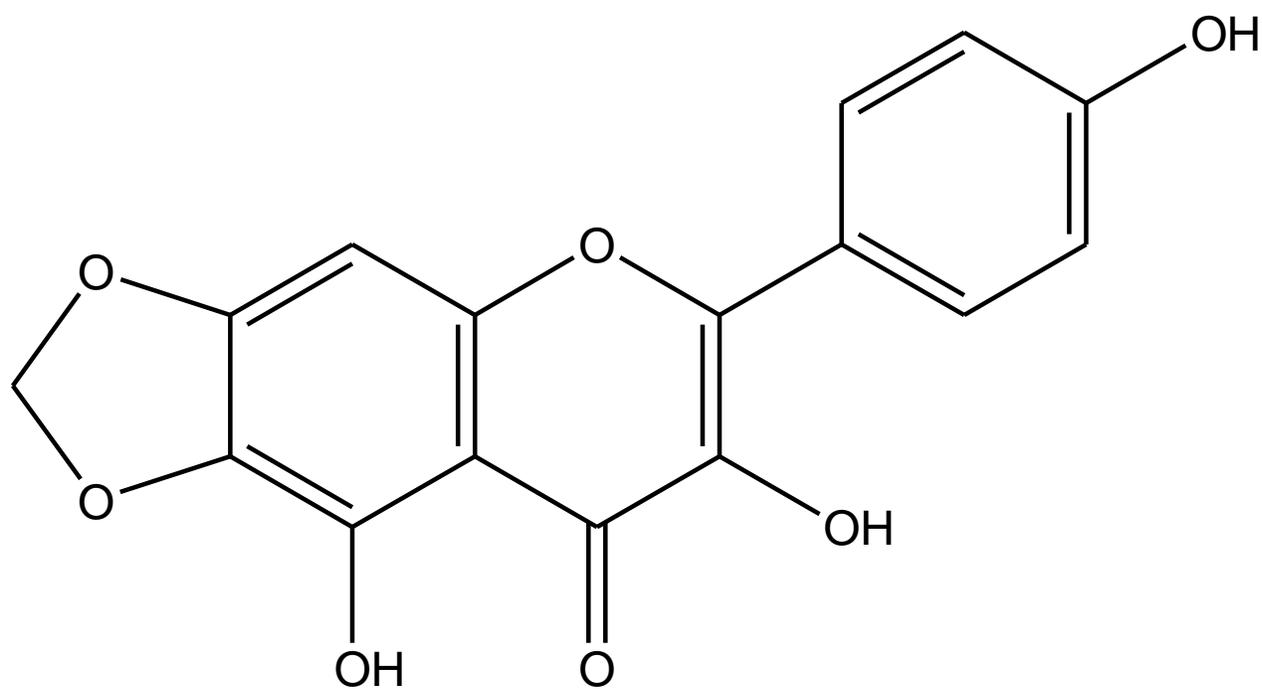


Figura 10. Estrutura del Gomphrenol

