

**IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
PRESENTES EN *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae)**

CÉSAR AUGUSTO MARTÍNEZ GARCÍA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

2014

**IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
PRESENTES EN *Alchornea coelophylla***

CÉSAR AUGUSTO MARTÍNEZ GARCÍA

Código: 1112779852

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial

DIRECTOR DEL PROYECTO

Dr. OSCAR MARINO MOSQUERA MARTÍNEZ

Profesor Titular

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

2014

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 GENERALIDADES DE LOS RADICALES LIBRES.....	14
2.1.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	14
2.1.2 Mecanismos generadores de ROS.....	16
2.1.3 Toxicidad de las ROS	20
2.1.4 Compuestos antioxidantes	26
2.1.5 Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante	32
2.2 GENERALIDADES DE LOS FLAVONOIDES	34
2.2.1 Estructura de los flavonoides.....	34
2.2.2 Actividad biológica de los flavonoides	36
2.2.3 Acomplejamiento con AlCl ₃	38
2.2.4 Reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu.....	39
2.2.5 Separación de flavonoides	39
2.2.6 Identificación de flavonoides.....	42
2.3 GENERALIDADES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE.....	48
2.3.1 Descripción morfológica de la familia Euphorbiaceae	48
2.3.2 Potencial aprovechamiento de la familia Euphorbiaceae y su distribución geográfica.....	48
2.3.3 Descripción taxonómica, morfológica y distribución de <i>Alchornea coelophylla</i>	49
2.3.4 Flavonoides del género <i>Alchornea</i>	51
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 OBJETIVO GENERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. JUSTIFICACIÓN.....	54
5. METODOLOGÍA.....	56
5.1 LUGAR DONDE SE REALIZARÁ EL TRABAJO	56

5.2	MATERIALES	56
5.2.1	Reactivos.....	56
5.2.2	Materiales y equipos.....	56
5.2.3	Material Vegetal.....	57
5.3	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	57
5.4	CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y RECONOCIMIENTO DE FLAVONOIDES.....	58
5.5	IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	62
5.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	62
5.6.1	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo de ABTS ⁺	62
5.6.2	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo de DPPH.....	64
5.6.3	Actividad antioxidante (A.A.) como equivalentes TROLOX	66
5.7	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO POR MEDIO DE ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU.....	66
5.8	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	68
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	69
6.1	SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES	69
6.1.1	Obtención y caracterización del extracto metanólico.....	69
6.1.2	Separación cromatográfica.....	70
6.2	IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	78
6.2.1	Espectroscopía de absorción ultravioleta (UV) e infrarroja (IR).....	78
6.2.2	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	81
6.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES.....	95
6.3.1	Actividad captadora de radicales libres por el método de DPPH.....	95
6.3.2	Actividad captadora de radicales libres por el método de ABTS ⁺	98
6.3.3	Capacidad antioxidante en equivalentes trolox (TEAC).....	101
6.3.4	Cuantificación de fenoles por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu.....	105
6.3.5	Cuantificación de flavonoides con AlCl ₃	107
7.	CONCLUSIONES.....	110
8.	RECOMENDACIONES.....	111
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	112

ANEXOS 124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paradoja Biológica de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)...	15
Figura 2. Metabolismo mitocondrial de las ROS y la ETC, formación del anión radical superóxido.....	18
Figura 3. Reducción univalente del oxígeno molecular, dando lugar a la formación de agua.....	19
Figura 4. NADPH oxidasa y su activación.....	20
Figura 5. Algunas reacciones implicadas en el proceso de peroxidación lipídica.....	21
Figura 6. Asociación de diferentes lesiones de ADN persistentes con cáncer humano.....	22
Figura 7. Reactividad de las ROS frente a diferentes bio-moléculas: A) Radical hidroxilo; B) Oxígeno singlete.....	23
Figura 8. Oxidación de la cadena principal de las proteínas por el radical hidroxilo.....	24
Figura 9. Mecanismos diamida y α -amidación para la ruptura de los enlaces peptídico.....	25
Figura 10. Sistema enzimático antioxidante.....	28
Figura 11. α -Tocoferol y sus estructuras resonantes.....	31
Figura 12. El rol del ácido ascórbico (AA) en la desintoxicación de las ROS....	32
Figura 13. Estructura general de los flavonoides.....	34
Figura 14. Estructuras básicas de los flavonoides.....	36
Figura 15. Probables estructuras de algunos complejos ferro-metálicos con quercetina	38
Figura 16. Complejos metálicos formados con $AlCl_3$ y su ácido-labilidad.....	39
Figura 17. Perfil cromatográfico de algunos compuestos flavonólicos.....	42
Figura 18. Grupos cromóforos de los flavonoides.....	43
Figura 19. Estructuras resonantes implicadas en la actividad electrónica del anillo pirónico.....	43
Figura 20. Distribución mundial de la familia Euphorbiaceae.....	49
Figura 21. <i>Alchornea coelophylla</i> (Euphorbiaceae).....	50
Figura 22. Quercetina-3-4'-di-acetato aislado de <i>Alchornea laxiflora</i>	52
Figura 23. Procedimiento de obtención de los extractos de material vegetal...	58
Figura 24. Procedimiento general para la separación de los flavonoides presentes en la especie <i>Alchornea coelophylla</i> (Euphorbiaceae).....	60
Figura 25. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo ABTS ⁺	63

Figura 26. Protocolo para determinar la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo DPPH·	65
Figura 27. Distribución general de la microplaca para las determinaciones de actividad antioxidante.....	66
Figura 28. Determinación del contenido fenólico total por medio del ensayo por Folin-Ciocalteu.....	67
Figura 29. Distribución general de la microplaca para la determinación de actividad antioxidante por medio del ensayo por Folin-Ciocalteu.....	68
Figura 30. Cuantificación de flavonoides con AlCl ₃	69
Figura 31. Flavonoides presentes en el extracto metanólico crudo de <i>Alchornea coelophylla</i> por CCD visualizados bajo luz ultravioleta de onda corta 254 nm.....	70
Figura 32. Fracciones de la uno a la diez de la columna cromatográfica DIAION HP-20.....	73
Figura 33. Fracciones de la once a la veinte de la columna cromatográfica DIAION HP-20.....	74
Figura 34. Fracciones de la veintiuno a la veintinueve de la columna cromatográfica DIAION HP-20.....	74
Figura 35. Cromatoplasmas de la Fracción 11 con el nuevo sistema de elución, visualizado para flavonoides	76
Figura 36. Colectados de la segunda columna cromatográfica.....	77
Figura 37. Fracciones resultantes de la segunda columna cromatográfica.....	78
Figura 38. Espectro de absorción infrarroja para el compuesto presente en la fracción C	80
Figura 39. Estructuras químicas de los compuestos con los desplazamientos descritos en las Tablas 16 y 17. A) estructura básica de un flavonoide, B) glucosa, C) ramnosa.....	82
Figura 40. Correlaciones de los protones anoméricos con el protón dos para los carbohidratos A) β-glucosa, B) α-ramnosa.....	84
Figura 41. Disposición simétrica del sistema aromático B, reflejando una sustitución <i>para</i>	85
Figura 42. Espectro bidimensional heteronuclear HSQC-TOCSY del compuesto de la Fracción C.....	86
Figura 43. Espectro bidimensional homonuclear COSY del compuesto de la Fracción C.....	87
Figura 44. Detección de los hidrógenos permutables H ₆ y H ₈ , respecto del carbono carbonílico C ₄	88
Figura 45. Detección del C ₂ con los protones aromáticos H ₆ y H ₈ y el protón H ₃ de la insaturación	88
Figura 46. Espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto de la fracción C	89

Figura 47. Detección del protón anomérico de la glucosa, con los carbonos C ₇ y C ₉ del anillo aromático A.....	90
Figura 48. Detección del carbono C ₃ de la glucosa, con los protones anoméricos de la glucosa y la ramnosa.....	91
Figura 49. Expansión del espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto de la fracción C.....	91
Figura 50. Estructura del compuesto presente en la Fracción C.....	95
Figura 51. Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones más representativas en masa de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de DPPH'.....	97
Figura 52. Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones más representativas en masa de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de ABTS'+.....	100
Figura 53. Curva de calibración Trolox para la actividad antioxidante determinado por medio del ensayo de ABTS'+.....	102
Figura 54. Curva de calibración Trolox para la actividad antioxidante determinado por medio del ensayo de DPPH'.....	103
Figura 55. Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos de metanol para los ensayos ABTS'+ y DPPH'.....	105
Figura 56. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....	106
Figura 57. Fenoles totales de las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de Folin-Ciocalteu.....	106
Figura 58. Curva de calibración de kaempferol para la cuantificación de flavonoides.....	107
Figura 59. Flavonoides totales de las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20 con AlCl ₃	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Periodos de tiempos de vida media de las ROS más representativas...	16
Tabla 2. Algunas modificaciones oxidativas de los amino ácidos.....	26
Tabla 3. Algunos antioxidantes de uso terapéutico.....	27
Tabla 4. Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> ...	33
Tabla 5. Desplazamientos químicos más comunes de ¹³ C-RMN para flavonoides.....	46
Tabla 6. Variaciones en los desplazamientos químicos de ¹³ C-RMN para flavonoides con patrones de glicosilación.....	46
Tabla 7. Desplazamientos químicos de protón (¹ H-RMN) para los carbohidratos más representativos.....	47
Tabla 8. Desplazamientos químicos de carbono (¹³ C-RMN) para los carbohidratos más representativos.....	47
Tabla 9. Especies pertenecientes al género <i>Alchornea</i> en las cuales se reporta la presencia de flavonoides.....	51
Tabla 10. Condiciones para la caracterización fitoquímica del extracto metanólico de <i>Alchornea coelophylla</i>	59
Tabla 11. Sistemas de elución de la columna cromatográficas DIAION HP-20..	61
Tabla 12. Núcleos fitoquímicos del extracto metanólico de <i>Alchornea coelophylla</i>	70
Tabla 13. Masas y rendimientos porcentuales de las fracciones finales obtenidas luego del proceso de elución de la columna cromatográfica DIAION HP-20.....	71
Tabla 14. Fracciones eluidas de la columna cromatográfica de Sílica gel con el sistema AcOEt-MeOH-AcOH-H ₂ O (70:20:5:5)	77
Tabla 15. Bandas de absorción infrarroja del compuesto presente en la fracción C.....	81
Tabla 16. Desplazamientos químicos para las señales del espectro ¹ H-RMN presente en el Anexo IX para la fracción C.....	82
Tabla 17. Desplazamientos químicos para las señales del espectro ¹³ C-RMN presente en el Anexo IX para la fracción C.....	83
Tabla 18. Señales ausentes de algunos grupos flavonólicos.....	83
Tabla 19. Desplazamientos químicos de protón para compuestos similares al compuesto presente en la Fracción C.....	93
Tabla 20. Desplazamientos químicos de carbono para compuestos similares al compuesto presente en la Fracción C.....	94
Tabla 21. Valores de actividad antioxidantes por los métodos de DPPH [•] , ABTS ^{•+} y equivalentes Trolox de capacidad antioxidante (TEAC) para el extracto metanólico de <i>Alchornea coelophylla</i>	96

Tabla 22. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH· el extracto metanólico evaluado a diferentes concentraciones.....	96
Tabla 23. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH· de la Fracción C evaluado a diferentes concentraciones.....	98
Tabla 24. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS·+ el extracto metanólico evaluado a diferentes concentraciones.....	99
Tabla 25. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS·+ de la Fracción C a diferentes concentraciones.....	100
Tabla 26. Porcentajes de actividad antioxidante para diferentes concentraciones de equivalentes Trolox.....	101
Tabla 27. Porcentajes de actividad antioxidante para diferentes concentraciones de equivalentes Trolox.....	102
Tabla 28. Concentración en equivalentes Trolox de las fracciones obtenidas con la columna cromatográfica DIAION HP-20 por los métodos de DPPH· y ABTS·+.....	103

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I	125
ANEXO II	131
ANEXO III	135
ANEXO IV	139
ANEXO V	140
ANEXO VI	141
ANEXO VII	142
ANEXO VIII	143
ANEXO IX	145

AGRADECIMIENTOS

El autor del proyecto quiere expresar su gratitud a:

A cada uno de los integrantes del Grupo Biotecnología – Productos Naturales (GB-PN) por facilitarme desde el primer momento su apoyo incondicional y mi completa integración al mismo, en especial a los profesores Oscar Marino Mosquera Martínez y Jaime Niño Osorio por su paciencia y enseñanzas, por nunca escatimar su amplio conocimiento conmigo y mi proyecto.

A la Universidad Tecnológica de Pereira, por parte de la Vicerrectoría de Investigación, Innovación y Extensión (VIIyE) por la financiación destinada a la realización del proyecto investigativo.

A la Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a su Departamento de Química, en especial a los profesores Luiz Cláudio de Almeida Barbosa y José Dias de Souza Filho por su acompañamiento durante mi estancia investigativa, y todas aquellas personas que hicieron de mi estancia en Brasil una experiencia constructiva desde todos los ámbitos.

A todas aquellas personas que a través de su acompañamiento, hicieron posible la realización de forma exitosa de este proyecto investigativo.

A mi familia, que con su apoyo y consejos promovieron mi crecimiento personal para la finalización de mi carrera y motivaron el sentimiento de entrega que conllevó la conclusión de esta experiencia investigativa.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos antioxidantes son agentes que intervienen los procesos de oxidación, con el fin de evitar, disminuir o retrasar los daños oxidativos de una molécula (Procházková *et al.*, 2011). Por otro lado los agentes altamente oxidantes, corresponden a especies radicalarias de alta energía o especies reactivas de oxígeno (ROS), provenientes de diversas fuentes metabólicas coadyuvados por agentes físicos. Un desbalance respecto de la existencia de este tipo de agentes radicalarios en el organismo desencadena un fenómeno conocido como estrés oxidativo y la posterior acumulación de daños efectuados a las biomoléculas puede estar relacionada con gran un número de enfermedades crónicas (Aruoma *et al.*, 1998).

Se pueden distinguir a los flavonoides, un grupo de metabolitos secundarios derivados de plantas, como compuestos con potente actividad antioxidante previniendo en daño causado por los radicales libres por muchos mecanismos diversos (Procházková *et al.*, 2011). Esto, sumado con la amplia presencia que estos metabolitos tienen en el reino vegetal, los ha convertido en un importante foco de investigación dada la necesidad de conocer compuestos antioxidantes naturales, puesto que al parecer, el consumo de antioxidantes sintéticos puede estar relacionado con la iniciación de procesos carcinogénicos (Hocman *et al.*, 1988).

Considerando los numerosos reportes de relaciones existentes entre el consumo de antioxidantes exógenos vegetales y la disminución en diversas dolencias como obesidad (Williams *et al.*, 2013) y enfermedades neurodegenerativas (Halliwell *et al.*, 2001), se visualiza la investigación de este tipo de compuestos como fuentes de futuros agentes comercialmente más aceptados.

Por esta razón, se plantea el aislamiento de un flavonoide relacionado con la actividad antioxidante determinada a el extracto metanólico de *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae) en estudios previos realizados en el Grupo de Biotecnología – Productos Naturales, a través de la utilización de diversas técnicas espectroscópicas y cromatográficas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LOS RADICALES LIBRES

Los radicales libres, son átomos o compuestos reactivos con números impares de electrones (Bergendi *et al.*, 1999) en su capa de valencia que resultan de procesos metabólicos aeróbicos y que poseen un alto grado de reactividad química (Valdez *et al.*, 2000), de éstos los que desarrollan funciones más trascendentales en sistemas biológicos son las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y las Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS) (Valko *et al.*, 2007).

2.1.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Gran parte de los roles que desempeña el oxígeno como sustento de la mayoría de tipos de vida que se conocen es debido a las diversas formas que éste elemento puede adoptar para cumplir diferentes tipos de tareas.

Éste es el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS), formas reactivas derivadas del oxígeno molecular, que cumplen diversas funciones benéficas en el organismo como moléculas de señalización y regulación de autofagia (Wen *et al.*, 2013), destructores de agentes infecciosos mediante fagocitosis (Halliwell *et al.*, 2006) y en general especies que a bajas concentraciones han propiciado condiciones aptas para la formación de vida en la tierra (Juránek *et al.*, 2013), dado que cuando sus niveles intracelulares aumentan estos pueden actuar como mediadores de daños celulares en macroproteínas, proceso conocido como estrés oxidativo (Grigorov *et al.*, 2012).

Esto constituye un hecho paradójico en cuanto a la existencia de este tipo de especies reactivas de oxígeno. Pues si bien a estas se les atribuyen el desarrollo de procesos biológicos importantes (Véase Figura 1), tales como apoptosis de células dañadas o hasta la variabilidad genómica; es importante conocer que estas mismas moléculas pueden acarrear significativos daños a los tejidos bajo condiciones que superan la capacidad antioxidante celular normal.

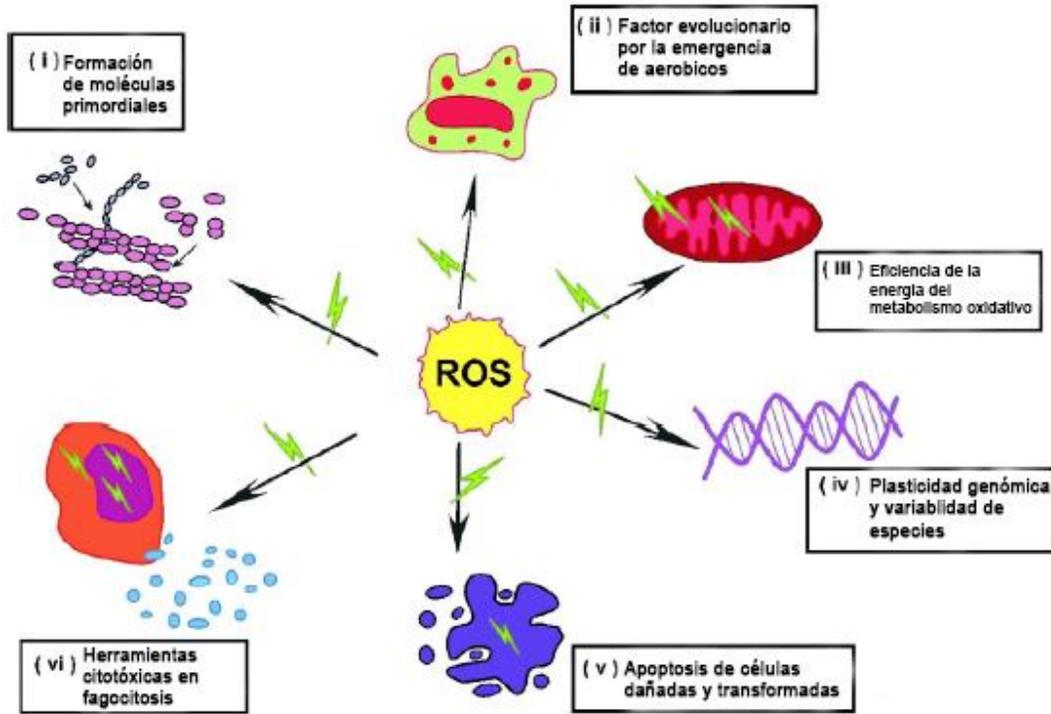


Figura 1. Paradoja Biológica de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Juránek et al., 2013).

El término ROS enmarca una gran cantidad de especies químicas de diferentes grados de reactividad y tiempos de vida media. Así que dentro de esta familia se encuentran especies muy reactivas y poco estables como los radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), alcoxi ($\text{RO}\cdot$), y peroxilo ($\text{ROO}\cdot$); también se han detectado especies radicalarias con tiempos de vida mayores como el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$); finalmente se hallan especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión peroxinitrito (ONOO^-), los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y el ácido hipocloroso (HOCl), entre otros (Simon *et al.*, 2000).

Tabla 1. Periodos de tiempos de vida media de las ROS más representativas (Bergendi *et al.*, 1999).

Radical	Fórmula	Tiempo de vida media [s]
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
Radical alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	10^{-6}
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	10^{-5}
Anión peroxinitrito	$\text{ONOO}\cdot$	0.05-1
Radical peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	7
Óxido nítrico	$\cdot\text{NO}$	1 – 10
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Descomposición enzimática
Radical anión superóxido	O_2	Descomposición enzimática

2.1.2 Mecanismos generadores de ROS

Existen diversos mecanismos para la formación de las ROS dado que estos pueden ser generados por tres diferentes tipos de mecanismos: físicos, químicos y biológicos.

2.1.2.1 Agentes físicos que estimulan la generación de ROS

2.1.2.1.1 Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes causan diversos estímulos en los sistemas biológicos. Como primera medida se tiene la excitación y posible disociación del agua (H_2O) en diversas especies como agua ionizada (H_2O^+), radical hidrógeno ($\text{H}\cdot$) y las ROS; y como segunda medida se tiene el aumento de los niveles intracelulares de las ROS demostrando el aumento de procesos biológicos productores de los mismos, como puede ser el caso de un aumento en la actividad mitocondrial (Yamamori *et al.*, 2012).

2.1.2.1.2 Agentes químicos que estimulan la generación de ROS

Actualmente se estudian diversos productos que se considera pueden estimular de algún modo la producción de especies reactivas de oxígeno.

Cabe resaltar que existen avances en el estudio de los efectos secundarios inducidos por el uso de fármacos, entre los cuales se ha logrado demostrar que

ciertos tipos de drogas inmunosupresoras (Kraaij *et al.*, 2011), así como los tratamientos con quimioterapéuticos relacionados con la reproductividad (Lavranos *et al.*, 2012) han logrado intensificar mediante diferentes mecanismos la producción de ROS en el organismo.

Adicionalmente ciertos tipos de compuestos pueden ejercer un efecto tóxico en el organismo, como es el caso de las micotoxinas producidas por cierto tipos de hongos encontrados en cultivos y alimentos (Bouaziz *et al.*, 2013), de esta forma se ha logrado demostrar que toxinas como la zearalenona y la toxina T-2 producidas por varias especies pertenecientes al género *Fusarium* inducen un efecto potencializador en la producción de las ROS en tejidos de riñón (Bouaziz *et al.*, 2013) y hepático (Bouaziz *et al.*, 2008).

Por último, otros factores químicos como la acumulación de metales en el organismo pueden inducir a la pérdida de la regulación redox de las células debido al aumento en la producción de las ROS, como es el caso de la incorporación de hierro para el tratamiento de la anemia (Koskenkorva-Frank *et al.*, 2013), los altos niveles de ingesta de selenio (Wang *et al.*, 2014) y aluminio (Wu *et al.*, 2012).

2.1.2.1.3 Agentes biológicos envueltos en la generación de ROS

En el organismo la producción de ROS está mediada tanto por factores endógenos como por factores exógenos.

2.1.2.1.3.1 Mitochondria

La mitocondria es una organela que cumple una gran cantidad de funciones en el metabolismo celular, destacándose la producción energética celular a partir de combustibles metabólicos conduciendo a la generación de ATP, proceso denominado fosforilación oxidativa que tiene lugar en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (ETC).

La oxidación tiene lugar en una serie de pasos sucesivos, que compromete muchos centros de óxido-reducción que pueden ser organizados de forma general en cuatro complejos proteicos alojados en la membrana interna mitocondrial, como se ilustra en la Figura 2; así aproximadamente el 90% del oxígeno consumido por un mamífero es reducido a agua en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa mitocondrial (Venditti *et al.*, 2013).

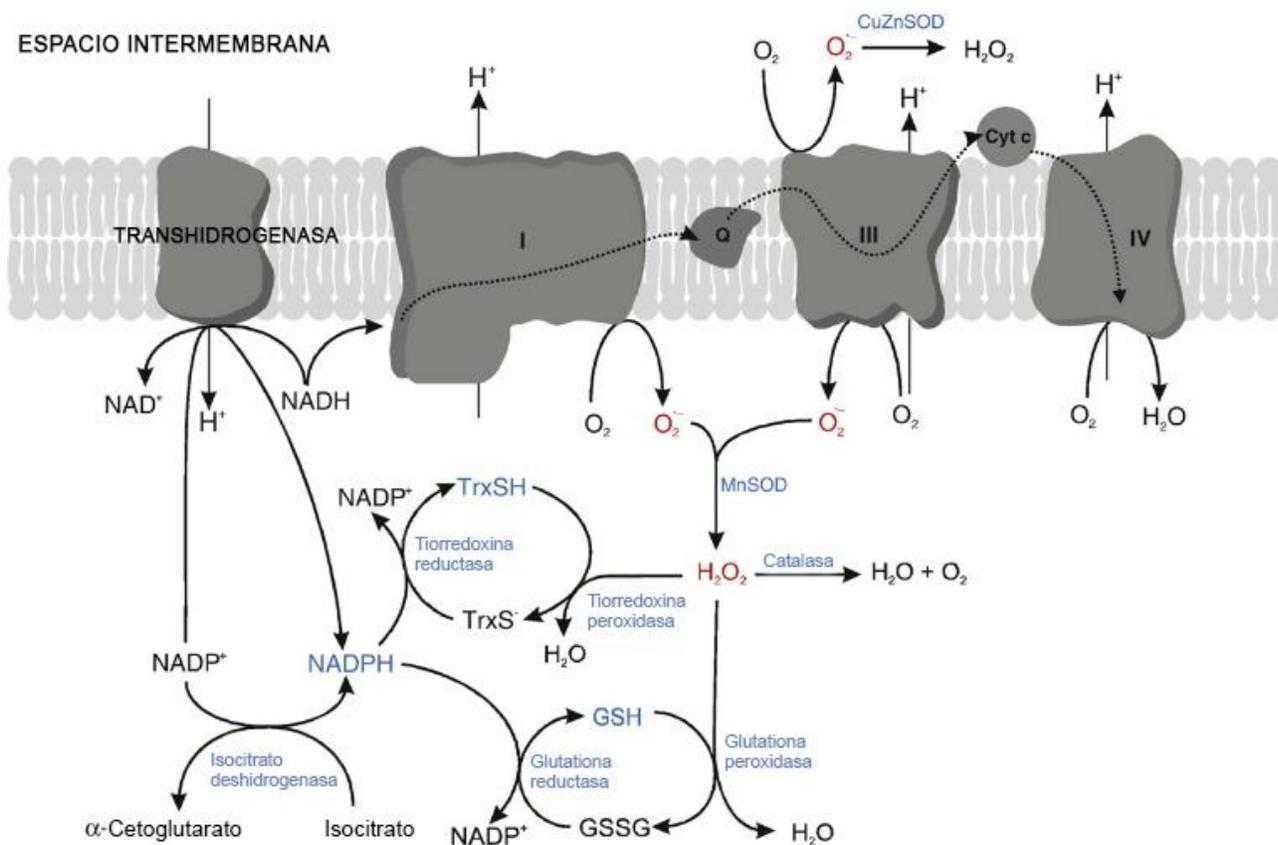


Figura 2. Metabolismo mitocondrial de las ROS y la ETC, formación del anión radical superóxido (Kowaltowski et al., 2009).

Finalmente cualquier pérdida de electrones a lo largo de la ETC resulta en la generación del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a partir de oxígeno molecular (O_2). Estas fugas de electrones tienen lugar principalmente en los complejos I y III en los sistemas de transporte de electrones mitocondriales (Bellot *et al.*, 2013). A partir de la formación de este radical primario, otros radicales secundarios pueden ser obtenidos; de esta manera, el anión radical superóxido puede ser convertido a peróxido de hidrógeno con la ayuda de la enzima Manganeso – superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Kim *et al.*, 2011), y finalmente por medio de reacciones tipo fenton (Bellot *et al.*, 2013) se puede obtener el muy reactivo radical hidroxilo (OH^{\cdot}), que finalmente tras reaccionar con cualquier tipo de bio-compuestos dan lugar a agua. Esquema que se puede observar de forma general en la Figura 3.

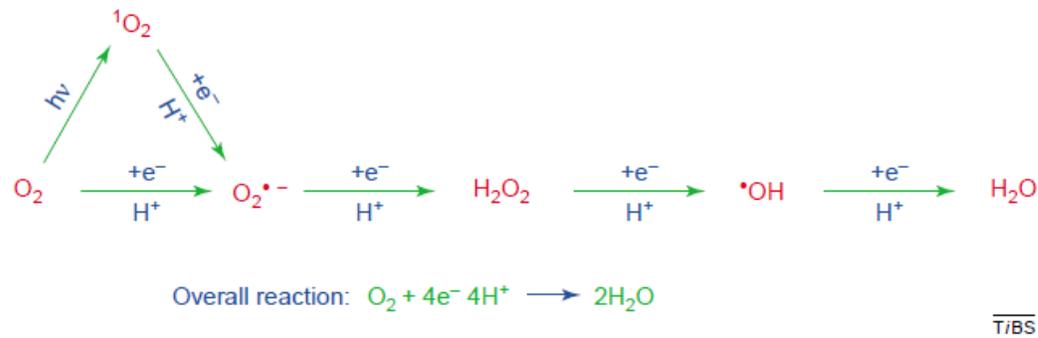


Figura 3. Reducción univalente del oxígeno molecular, dando lugar a la formación de agua (Scandalios *et al.*, 2002).

2.1.2.1.3.2 Fagocitosis

Un mecanismo de defensa para la erradicación de agentes intrusos potencialmente patógenos, es la utilización de macrófagos, células dispuestas con una gran variedad de sistemas antimicrobianos capaces de generar grandes cantidades de ROS (Björkman *et al.*, 2008).

Este proceso de defensa se concentra en un evento llamado “Estallido Oxidativo”, mediado por el complejo NADPH-oxidasa que es ensamblada rápidamente luego de la activación de los neutrófilos, posterior a ello el neutrófilo produce las ROS $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 capaces de generar otro tipo de radicales al reaccionar con otros constituyentes bioquímicos, proceso ilustrado en la Figura 3 (Robinson *et al.*, 2008).

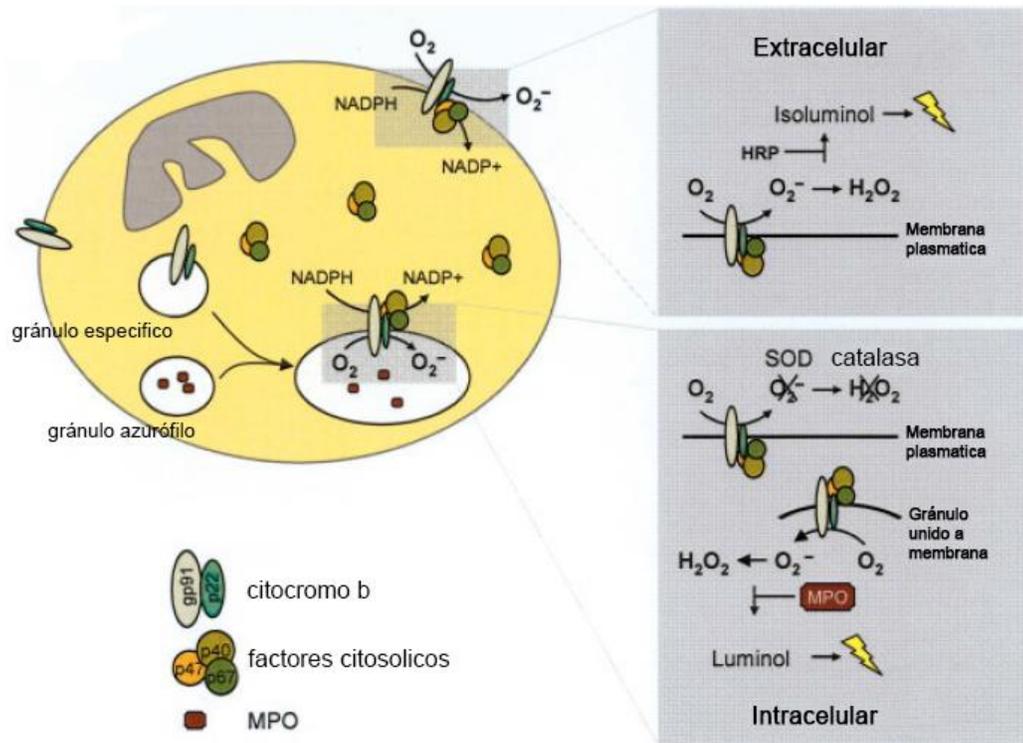


Figura 4. NADPH oxidasa y su activación (Björkman *et al.*, 2008).

2.1.3 Toxicidad de las ROS

Dada la reactividad de estas especies de oxígeno, tras su formación, puede haber serios daños en los tejidos, dado que las ROS no son selectivas y rápidamente reaccionarán no solo con sus moléculas objetivo sino que también lo harán con biomoléculas constitutivas, ocasionando daño a lípidos, proteínas y ADN.

2.1.3.1 Interacción de las ROS con los lípidos

Una característica del tipo de reacciones de los radicales libres es la facilidad con la que pueden iniciar reacciones en cadena, dado que cuando estos reaccionan con moléculas biológicas (moléculas generalmente no radicalarias), el resultado es otro radical (Halliwell *et al.*, 1993).

Es de esta manera, cuando los radicales altamente reactivos, como es el caso de los radicales hidroxilo (OH·) y oxígeno singlete ($^1/2O_2^{\cdot}$) interactúan con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), estos reaccionan con los grupos metilenos formando radicales centrados en el carbono para dar lugar a radicales peroxilos al haber reaccionado con el oxígeno molecular. Posteriormente, el radical peroxilo tras reaccionar con otro PUFA da lugar a un hidroperóxido lipídico que puede sufrir una reacción de escisión con metales reducidos, como el Fe⁺²

liberando finalmente un radical alcoxilo lipídico que con otro ácido graso puede dar inicio a la reacción en cadena (Blokhina *et al.*, 2003), como se resumen en la Figura 5.

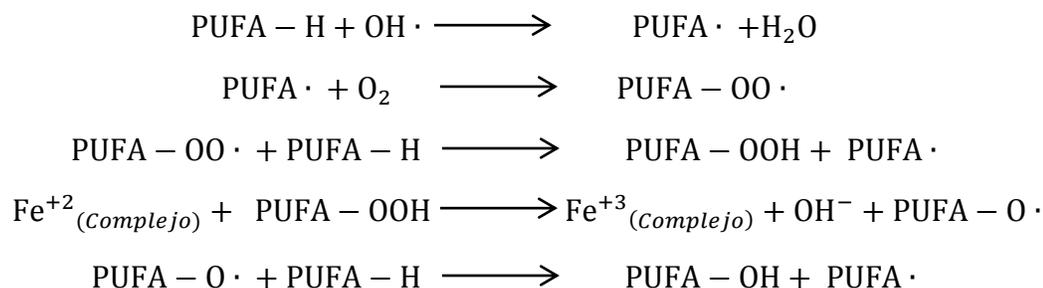


Figura 5. Algunas reacciones implicadas en el proceso de peroxidación lipídica (Blokhina *et al.*, 2003).

2.1.3.2 Interacción de las ROS con el ADN

El radical hidroxilo (OH·) puede sufrir reacciones de adición a los dobles enlaces presentes en las bases nitrogenadas que integran las secuencias de ADN o de sustracción de hidrógenos de los grupos metilos de la timina o de los enlaces C-H de la 2'-deoxiribosa. Así, la adición al doble enlace presente entre los C5-C6 de las pirimidinas da como resultado aductos C5-OH y C6-OH, y adiciones a las purinas generan igualmente aductos C4, C5 y/o C8 sustituidos por grupos hidroxilo (Cooke *et al.*, 2003).

De forma adicional las lesiones al material genético pueden ser de diferentes formas, por ejemplo, generando rupturas de una sola cadena o en las que ambas hebras de la doble hélice se ven comprometidas; pueden también existir lesiones oxidativas aisladas o en grupo (OCDLs, por sus siglas Oxidative Clustered DNA Lessions), siendo estas últimas consideradas cuando dos o más lesiones están presentes en una secuencia de por lo menos de 10 pares de bases (Sedelnikova *et al.*, 2010) (Véase Figura 6).

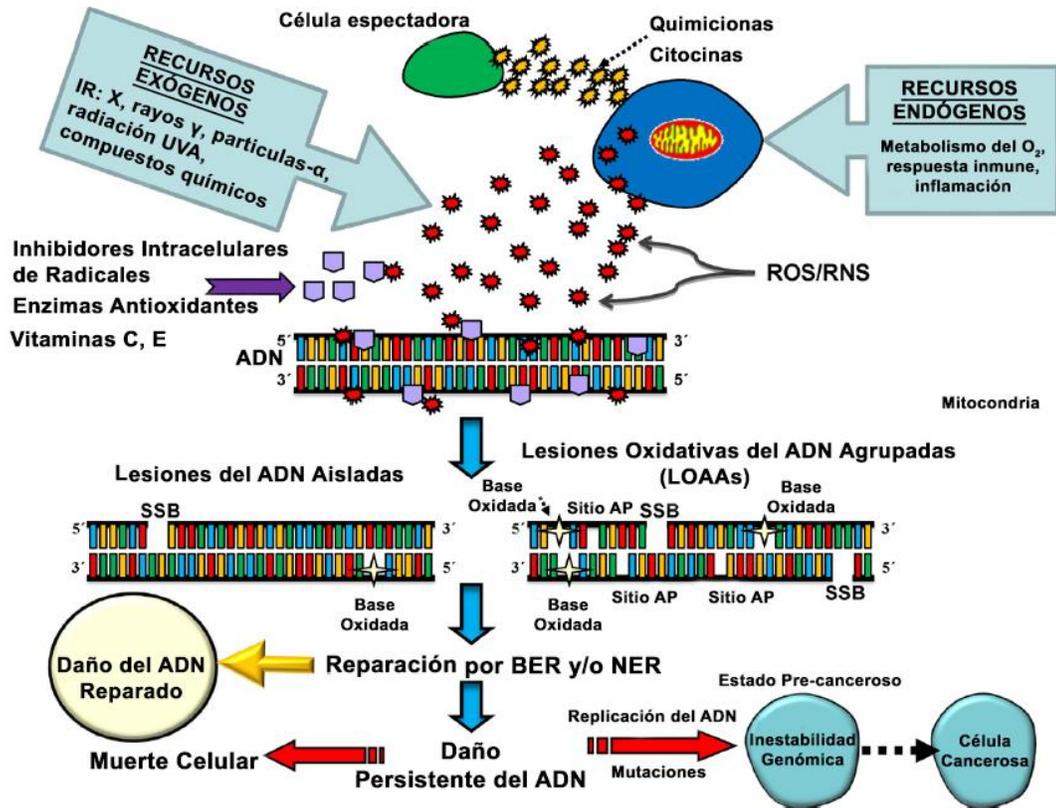


Figura 6. Asociación de diferentes lesiones de ADN persistentes con cáncer humano (Kryston *et al.*, 2011).

2.1.3.3 Interacción de las ROS con las proteínas

Una vez ocurre el estrés oxidativo, estas especies altamente reactivas pueden tener como blanco a cualquier bio-molécula, siendo las proteínas el blanco principal de las especies más reactivas como los radicales hidroxilo ($HO\cdot$) y oxígeno singlete ($^1/2O_2\cdot$), esto se puede evidenciar en la figura 7, donde la susceptibilidad de las proteínas es mucho más marcada que la del resto de las bio-moléculas.

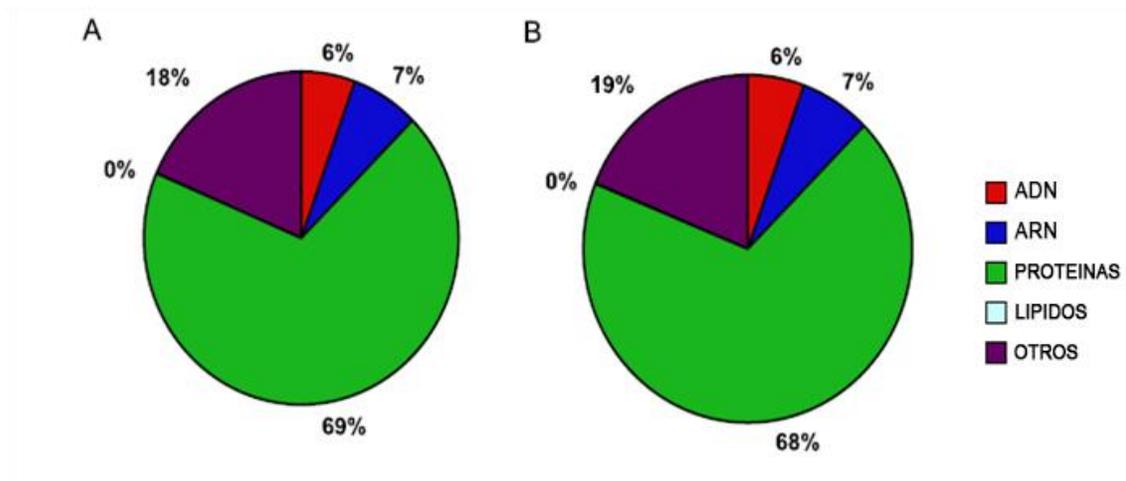


Figura 7. Reactividad de las ROS frente a diferentes bio-moléculas: A) Radical hidroxilo; B) Oxígeno singlete (Davies *et al.*, 2005).

El mecanismo mediante el cual el daño a las proteínas ocurre puede tener lugar mediante diferentes procesos, uno es la oxidación de la cadena principal en la cual el radical hidroxilo sustrae un átomo de hidrógeno de un residuo de aminoácido para dar lugar a un radical centrado en el carbono y para luego de reaccionar con varias especies de oxígeno (O_2 , $HO_2\cdot$ y/o reacciones tipo Fenton) para dar lugar a un derivado hidroxilado de la proteína inicial (Figura 8).

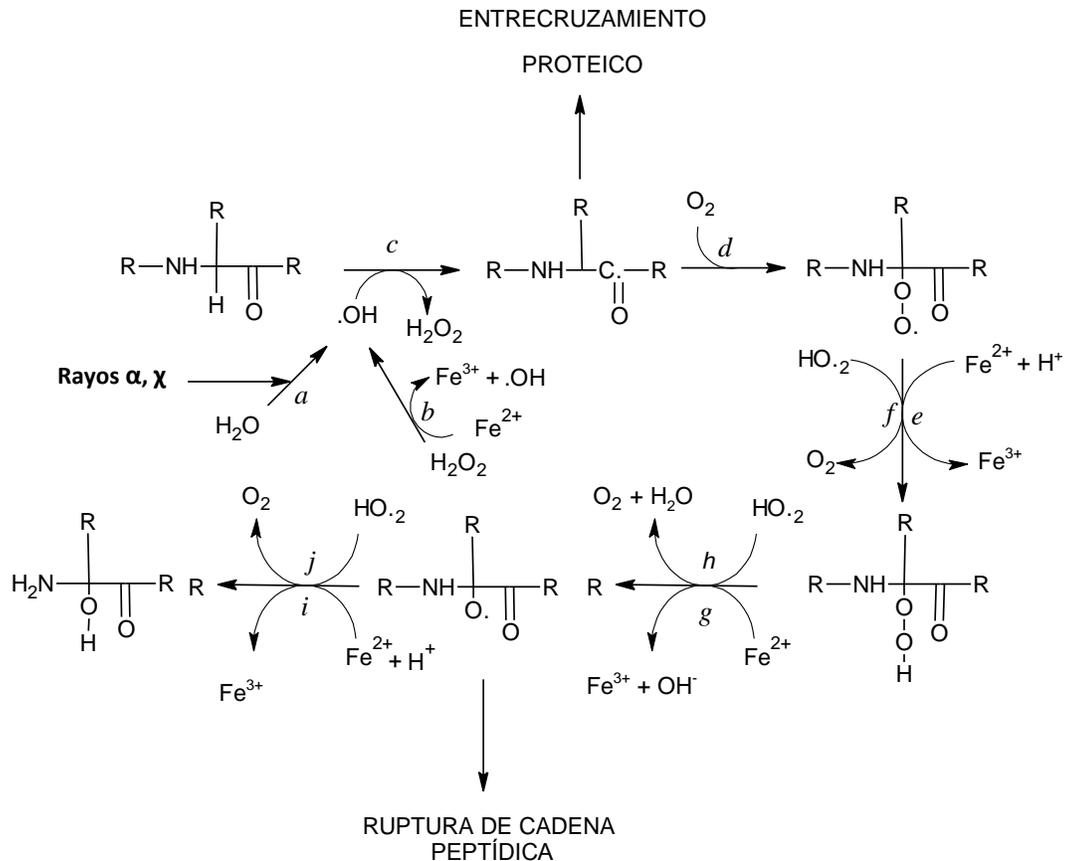


Figura 8. Oxidación de la cadena principal de las proteínas por el radical hidroxilo (Berlett *et al.*, 1997).

Otro producto de este mecanismo de oxidación de la cadena principal, bajo condiciones anóxicas es el entrecruzamiento de proteínas, mediante la inhibición de la reacción *d* de la Figura 8, en la que un radical libre centrado en el carbono puede reaccionar con otro para dar lugar a un enlace entre proteínas o residuos de aminoácidos presentes en una misma cadena, resultando en proteínas con distintos patrones de plegado. Algunas veces cuando las estructuras hidrofóbicas de las proteínas son blanco de estos ataques, las atracciones electrostáticas responsables de minimizar la superficie de contacto entre los residuos hidrofóbicos y el medio hidrofílico pueden aumentar las interacciones entre los radicales centrados en el carbono resultando en estructuras altamente entrecruzadas, material usualmente referido como lipofuscina (Höhn *et al.*, 2013).

El segundo mecanismo para el daño de proteínas mediado por especies reactivas de oxígeno es el rompimiento de la cadena principal una vez se forma el radical alcoxilo (Figura 8, reacciones *g* y *h*), o por cualquiera de los dos mecanismo descritos en la Figura 9. El mecanismo de la reacción *a*, resulta en la formación de una estructura diamida (mecanismo diamida) por parte del

fragmento N-terminal y otro compuesto con estructura isocianato por parte del fragmento C-terminal; de forma análoga, por medio de la reacción b se obtienen compuestos amida y derivados N- α -cetoacilos (mecanismo α -amidación), ambos por una reorganización espontánea intramolecular (Berlett *et al.*, 1997)

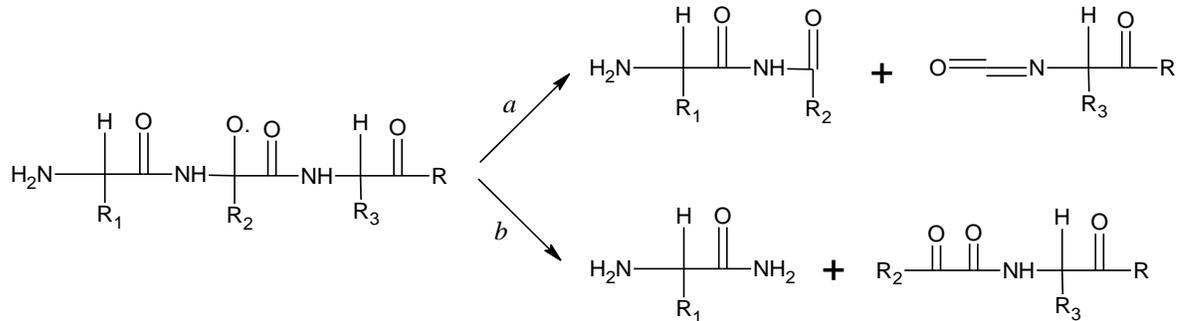


Figura 9. Mecanismos diamida (Reacción a) y α -amidación (Reacción b) para la ruptura de los enlaces peptídicos (Berlett *et al.*, 1997).

Por último, también puede existir algún tipo de daño a proteínas por medio de reacciones con los amino ácidos, dado que solo ciertos productos de oxidación de los residuos que contienen azufre (cisteína y metionina), pueden ser revertidos (Chondrogianni *et al.*, 2014). Las alteraciones a amino ácidos por reacciones con radicales libres, son listado a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas modificaciones oxidativas de los amino ácidos (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Categoría del Compuesto	Ejemplos
Cisteína	Oxidación de un grupo sulfhidrilo (Cys-SH) a la formas derivadas sulfénico (Cys-SO ₂ H) o sulfónico (Cys-SO ₃ H) Formación de un puente disulfuro (Cys-S-S-Cys) entre dos cisteínas cercanas dentro de una proteína (Entrecruzamiento intramolecular) o entre dos proteínas (Entrecruzamiento intermolecular) Formación de un disulfuro mixto (Cys-S-S-glutaciona) entre un grupo sulfhidrilo y glutaciona (S-glutacionación)
Ácido glutámico, tirosina, lisina, leucina, valina, prolina, isoleucina	Hidroperóxido
Histidina	2-oxo-histidina
Lisina, cisteína, histidina	Formación de un derivado carbonilo por reacción secundaria con compuestos carbonilos reactivo derivado de la oxidación de carbohidratos (productos de glicoxidación), lípidos (malondialdehído, 4-hidroxinonal, acroleína) y productos finales de reacciones avanzadas de glicación y lipoxidación
Lisina, arginina, prolina, treonina	Formación de un derivado carbonilo por ataque oxidativo directa en cadenas laterales de aminoácidos (semialdehído α -adípico de lisina, semialdehído glutámico de arginina, 2-pirrolidona de prolina, y ácido 2-amino-3-cetobutírico de treonina)
Metionina	Sulfóxidos de metionina
Fenilalanina	<i>o</i> -tirosina, <i>m</i> -tirosina
Triptófano	<i>N</i> -formilquinurenina, quinurenina, 5-hidroxitriptófano, 7-hidroxitriptófano
Tirosina	3,4-dihidroxifenilalanina, 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina, ditirosina (Tyr-Tyr)

2.1.4 Compuestos antioxidantes

En la naturaleza existe gran variedad de moléculas que están en capacidad de combatir los radicales libres a través de diferentes mecanismos. Este tipo de compuestos se pueden encontrar tanto dentro de nuestro cuerpo (Compuestos endógenos), como afuera (Compuesto exógenos), a continuación se hace un resumen general de los antioxidantes más comunes encontrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunos antioxidantes de uso terapéutico (Halliwell *et al.*, 2011).

Categoría del Compuesto	Ejemplos
Naturales	SOD (CuZnSOD, MnSOD, EC-SOD; recombinante o purificada), superóxido reductasa, tocoferoles, tocotrienoles, coenzima Q, ácido lipóico, vitamina C, adenosina, transferrin, lactoferrina, cisteína, GSH, dipéptidos conteniendo histidina, piridoxamina, carotenoides, flavonoides, otros fenoles de plantas, desferroxiamina, otros quelantes naturales de hierro, melatonina, coelenterazina y antibióticos.
Sintéticos	Tioles (Mercaptopropionilglicina, N-acetilcisteína), quelantes sintéticos de hierro (ICRF-187, Exjade, hidroxipiridonas), fulerenos, inhibidores de la xantina oxidasa, inhibidores de superóxido por fagocitos o por otras NADPH oxidasas, antioxidanes fragmentadores de cadena lipofílicos, inhibidores de adhesión de fagocitos, precursores de GSH, mimetizadores de SOD/Catalasa, derivados de vitamina E o C, derivados de coelenterazina, antibióticos modificados, antioxidantes mitocondrialmente dirigidas, NXY-059, PBN.
Agentes actualmente con uso clínico que pueden tener actividad antioxidante <i>in vivo</i> (pero no desarrollados como antioxidantes)	Penicilina, bucilamina, aminosalicatos, apomorfina, selegilina, flupirtina, omeprazol, 4-hidroxitamoxifen, inhibidores ACE (quinapril, ramipril, captopril) o receptores antagonistas de la angiotensina II, ketoconazol, probucol, propofol, algunos β bloqueadores (carvedilol, metoprolol), cimetidina, algunos bloqueadoras de canales de calcio, fenilbutazona, nitecapona, entecapona, idebenona, troglitazona, tacrolimus.

2.1.4.1 Antioxidantes endógenos

Dentro de los compuestos naturalmente producidos en nuestro organismo, se pueden encontrar muchos tipos de moléculas de diferente naturaleza capaces de neutralizar los radicales libres mediante diferentes mecanismos. Por esto, se hará una clasificación más general en la que se agruparán los compuestos como sistemas de defensa antioxidante enzimáticos o no enzimáticos.

2.1.4.1.1 Sistemas enzimáticos

A continuación se encuentra una descripción gráfica, en la Figura 10, del funcionamiento del sistema enzimático antioxidante que compromete la interacción de diferentes especies enzimáticas.

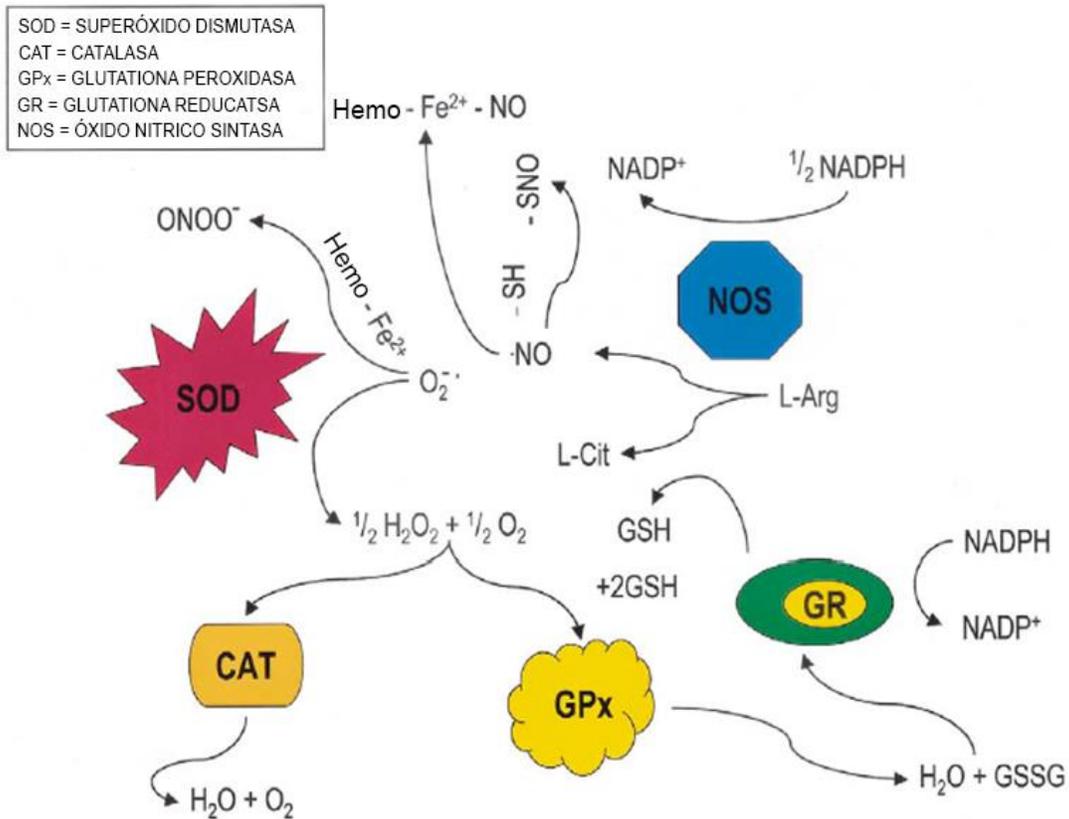


Figura 10. Sistema enzimático antioxidante.

2.1.4.1.1 Superóxido Dismutasa (SOD)

Las Superóxido dismutasas son una familia de metalo-enzimas que de forma general logran llevar a cabo la conversión de dos aniones radicales superóxidos en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Reacción, Figura 10) (Kehrer *et al.*, 2010). Típicamente, en la mitocondria se encuentra el tipo de Superóxido Dismutasa ligada a manganeso (Mn-SOD2); mientras que en el resto de los constituyentes celulares la actividad antioxidante se debe a la acción de la metalo-enzima Cu/Zn SOD1 (Reddi *et al.*, 2009).

2.1.4.1.2 Catalasa

Las catalasas son un grupo de enzimas que incluyen hemo-enzimas, y manganeso-enzimas encargadas de la dismutación del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua (Reacción, Figura 10) (Nicholls *et al.*, 2012). En los

mamíferos, esta se expresa en todos los tejidos, encontrándose en altas concentraciones en el hígado, riñones y eritrocitos (Nishikawa *et al.*, 2009).

2.1.4.1.1.3 Glutaciona Dismutasa y Reductasa

Las glutación peroxidasas (GPx) catalizan la conversión de la Glutaciona (GSH) dependiente para llevar a cabo la reducción del peróxido de hidrógeno usando una molécula de selenio como sitio activo, produciendo agua y glutación disulfuro (GSSG). Estas enzimas también pueden reducir ácidos grasos hidroperóxidos simples e hidroperóxidos fosfolipídicos (Doroshov *et al.*, 1995; Kehrer *et al.*, 2010).

La glutación Reductasa (GRx), cataliza la conversión reductiva del GSSG de nuevo a GSH, vía NADPH.

2.1.4.1.2 Sistemas no enzimáticos

2.1.4.1.2.1 Ácido úrico

El ácido úrico es un producto final enzimático de la degradación de nucleósidos purínicos y demás bases libres, lo que genera niveles altos del mismo en la sangre (Muraoka *et al.*, 2003). El ácido úrico es un buen agente neutralizador de radicales centrados en el carbono, radicales peroxilos, oxígeno singlete y radicales hidroxilo, siendo el más efectivo de todos los metabolitos basados en la purina, en medio hidrofílico, dado que pierde dicha habilidad en medios lipofílicos (Sautin *et al.*, 2008). Se estima que esta molécula puede ser responsable de hasta el 70% de la capacidad del sistema de defensa antioxidante en la saliva humana (Nagler *et al.*, 2002).

La reacción de este agente antioxidante con agentes oxidantes muy fuertes como el radical hidroxilo (OH \cdot), puede generar especies radicalarias que predominantemente prefieren atacar los lípidos (LDL y membranas) (Sautin *et al.*, 2008).

2.1.4.1.2.2 Glutaciona

Es el tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) de bajo peso molecular más abundante, su conversión a glutaciona disulfuro (GSSG) conforma el mayor conjunto redox (GSH/GSSG) en las células animales. Gracias a su residuo de cisteína, el GSH puede ser fácilmente oxidado no enzimáticamente, mecanismo sobre el cual basa su acción protectora (Chiou *et al.*, 2000).

La glutaciona es una molécula efectiva captando radicales libres y ROS (OH \cdot , ROO \cdot , ONOO \cdot , H $_2$ O $_2$, etc.) directa e indirectamente. Esta última está mediada

por la acción de las glutatión Reductasa y Peroxidasa sobre la GSH dependiente (Wu *et al.*, 2004).

2.1.4.1.2.3 Vitamina E

Familia de vitaminas liposolubles con un alto nivel de actividad antioxidante. Compuesta por ocho estereoisómeros α , β , γ , δ tocoferol y α , β , γ , δ tocotrienol, de donde el α -tocoferol es el más bioactivo en humanos actuando en membranas celulares, previniendo la peroxidación lipídica (Rao *et al.*, 2011).

Esta molécula liposoluble debe su actividad antioxidante al hecho de que puede atrapar los peróxidos lipídicos ($\text{LOO}\cdot$) reduciéndolos a hidroperóxidos lipídicos (LOOH), mediante la siguiente reacción:



Donde la especie radicalaria de la vitamina E es muy estable debido a la deslocalización electrónica del electrón desapareado, evidenciada en las estructuras de resonancia del mismo (Figura 11), además de que la última estructura es energéticamente favorable (Bast *et al.*, 1991).

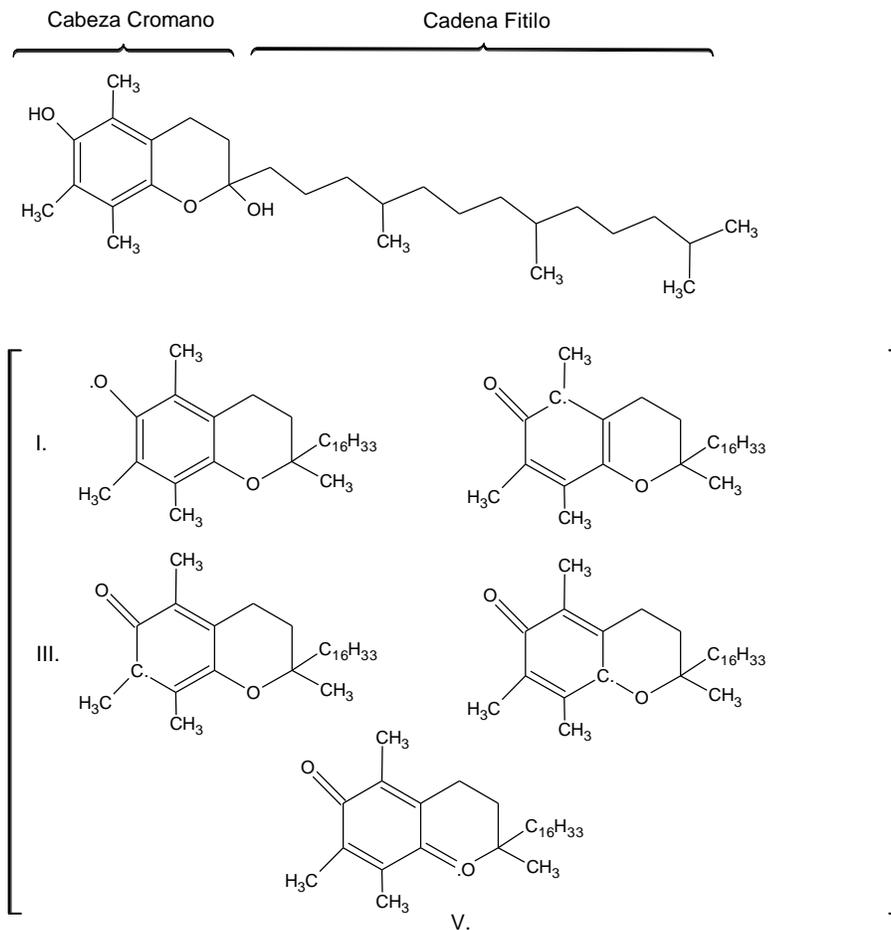


Figura 11. α -Tocoferol y sus estructuras resonantes (Bast *et al.*, 1991).

2.1.4.2 Sistemas exógenos

2.1.4.2.1 Ácido Ascórbico

Compuesto presente en muchas frutas y vegetales con una apreciable actividad antioxidante de forma directa a través de la captación de las ROS y especies radicalarias formadas en procesos metabólicos como los radicales α -tocoferil y los que se originan del ácido úrico, formados cuando este último reacciona con compuestos altamente oxidantes como el radical hidroxilo (Halliwell *et al.*, 1990).

Su ausencia en el cuerpo humano puede deberse a la ausencia de la *L*-gulonolactona oxidasa (GulL-ox), la última enzima en su ruta biosintética (Arrigoni *et al.*, 2002). Debido a esto y a pesar de la continua regeneración del ácido ascórbico a partir de su radical de ascorbato (AFR) y de su derivado, ácido deshidroascórbico (DHA), se requiere un continuo consumo del ácido ascórbico,

dato que tanto el ácido ascórbico como el DHA se mantienen en continua degradación. Sin dejar de lado que grandes dosis de ácido ascórbico pueden generar efectos pro-oxidantes en presencia de oxígeno o a través de reacciones con metales, debido a la formación de peróxido de hidrógeno (Yen *et al.*, 2002).

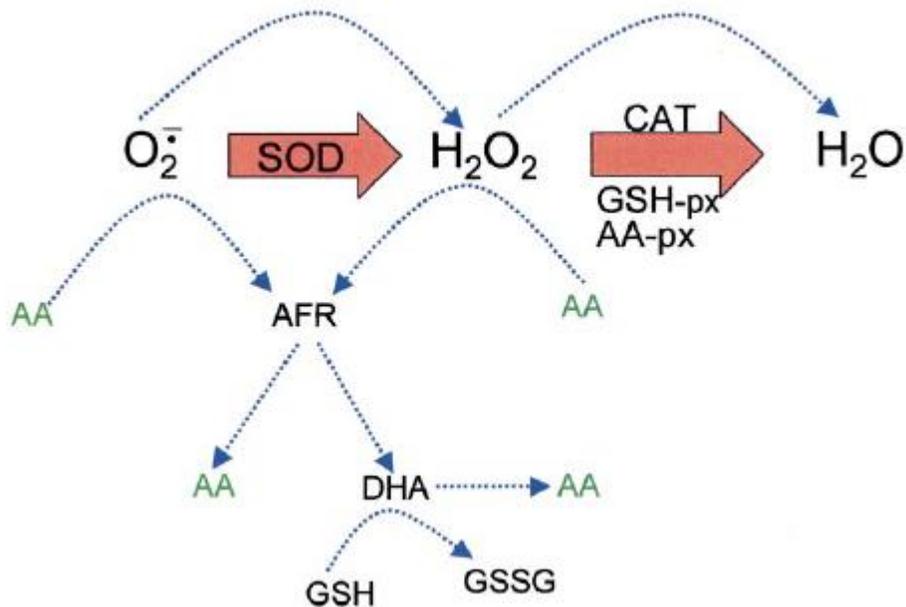


Figura 12. El rol del ácido ascórbico (AA) en la desintoxicación de las ROS (Arrigoni *et al.*, 2002). (AFR: Radical libre de ascorbato; DHA: Ácido deshidroascórbico; AA-px: Ascorbato peroxidasa).

2.1.5 Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante

Los ensayos para la determinación de la actividad antioxidante pueden clasificarse según la naturaleza del mecanismo sobre el cual los antioxidantes neutralizan los radicales libres; de esta forma, existen ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de electrones. A continuación en la Tabla 4 se mencionan los ensayos más usados para la determinación de la actividad antioxidante y su clasificación según el mecanismo de acción.

Tabla 4. Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* (Huang *et al.*, 2005).

<p>Ensayos que Implican Hidrógeno</p> <p>Reacciones de Transferencia de Átomos</p> <p>ROO· + AH ROOH + A·</p> <p>ROO· + LH ROOH + L·</p>	<p>ORAC (Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno)</p> <p>TRAP (Parámetro Antioxidante de Captura de Radicales Totales)</p> <p>Ensayo de Blanqueamiento Crocin</p> <p>IOU (Consumo por Oxígeno Inhibido)</p> <p>Inhibición de la Oxidación de Ácido Linoleico</p> <p>Inhibición de la Oxidación de LDL</p>
<p>Ensayos por Transferencia de Electrones</p> <p>Reacción</p> <p>M(n) + e(from AH) AH.</p> <p>+ M(n-1)</p>	<p>TEAC (Capacidad Antioxidante de Equivalentes TROLOX)</p> <p>FRAP (Parámetro Antioxidante de la Reducción del Ión Férrico)</p> <p>DPPH (Difenil-1-picrilhidrazil)</p> <p>Capacidad de Reducción de Cobre (II)</p> <p>Ensayo de Fenoles Totales por Reactivo de Folin-Ciocalteu</p>
<p>Otros Ensayos</p>	<p>TOSC (Capacidad Total de Barrido Oxidante)</p> <p>Inhibición de la Reacción de Oscilación de Briggs-Rauscher</p> <p>Quimioluminiscencia</p> <p>Electroquimioluminiscencia</p>

2.1.5.1 Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Este tipo de ensayos miden la capacidad de un antioxidante de neutralizar los radicales libres a través de la donación de átomos de hidrógeno. En este tipo de ensayos la reactividad relativa del compuesto antioxidante es determinada a través de la energía de disociación de enlaces (BDE) del grupo donador de hidrógeno, es por esto que este tipo de reacciones son independientes del tipo de solvente y el pH. Cabe destacar que la cinética de este tipo de reacciones es usualmente rápida, completándose en cuestión de segundo o minutos (Prior *et al.*, 2005).

2.1.5.2 Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)

Los métodos espectrofotométricos basados en la transferencia de electrones, miden la capacidad de un antioxidante de reducir un agente oxidante, ocurriendo generalmente un cambio de color sobre el compuesto reducido. En estos casos

el cambio de color es directamente proporcional a la concentración de los antioxidantes en la muestra. Los casos más representativos son la pérdida de color de los ensayos realizados con el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•) y el radical catión ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺•)) (Apak *et al.*, 2007).

La reactividad relativa en los métodos de estos ensayos están basados en la deprotonación y el potencial de ionización (IP) del grupo funcional reactivo, por lo que este tipo de reacciones si se ven afectadas por el pH y el solvente, dado que generalmente los valores de IP descienden con el aumento del pH, reflejando un aumento en la capacidad donadora de electrones con la deprotonación. Este tipo de reacciones son un poco más lentas, requiriendo mayores tiempos (Prior *et al.*, 2005).

2.2 GENERALIDADES DE LOS FLAVONOIDES

2.2.1 Estructura de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos derivados del benzo- γ -pirano (Škerget *et al.*, 2005; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008), conformados principalmente por un esqueleto básico dado por C₆ – C₃ – C₆ (Véase Figura 13), en el cual se establecen diferenciaciones claras para cada uno de los grupos de compuestos establecidos dentro de esta familia de moléculas, como (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008):

- La presencia/ausencia del grupo carbonilo en el carbono 4
- La presencia/ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3
- La sustitución del grupo fenil (Anillo B) en el carbono 2 o 3

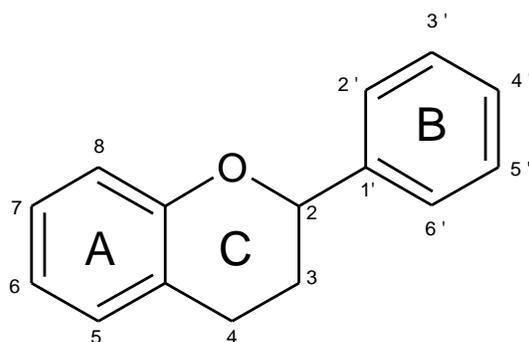


Figura 13. Estructura general de los flavonoides.

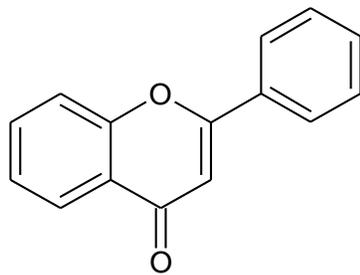
Al igual que la posición y naturaleza de los sustituyentes (Heim *et al.*, 2002) que las acompañan, debido a la gran cantidad de flavonoides hasta hoy identificados se ha observado una sustitución frecuente en los carbonos 3' y 5' por grupos

funcionales como metoxilos (-OCH₃), hidroxilos (-OH), o monosacáridos cuando se encuentran glicosilados.

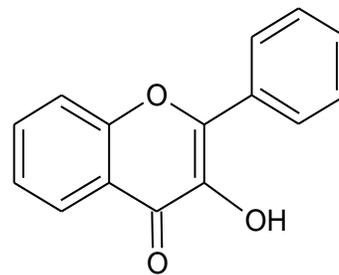
Presentan una actividad antioxidante fuerte y notable por tres mecanismos (Magalhães *et al.*, 2012):

- Expulsión de la actividad de los radicales libres vía transferencia de hidrógeno o donación de electrones (Magalhães *et al.*, 2012; Havsteen *et al.*, 2002).
- Prevención de reacciones catalizadas por metales de transición como reacciones tipo Fenton, debido a la quelación del metal (Pérez *et al.*, 2001; Havsteen *et al.*, 2002).
- Acciones cooperativas con otros antioxidantes (Apak *et al.*, 2007).

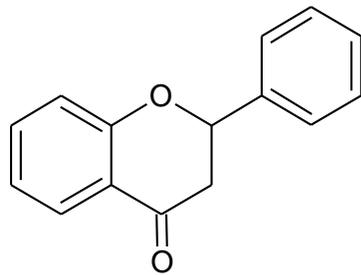
Una vez se conocen las diferenciaciones estructurales, y sus posibles consecuencias en el carácter antioxidante de las moléculas, se distinguen los principales grupos de flavonoides como antocianidinas, auronas, catequinas, chalconas, isoflavonas, flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles:



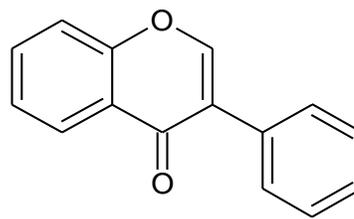
Flavona



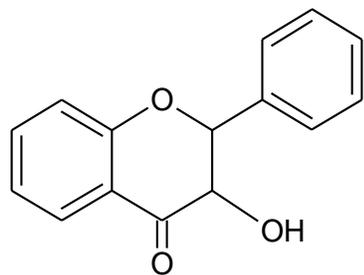
Flavonol



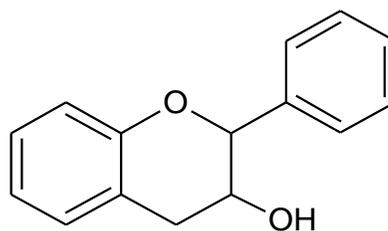
Flavanona



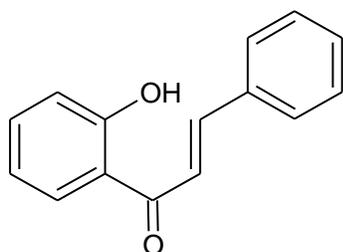
Isoflavona



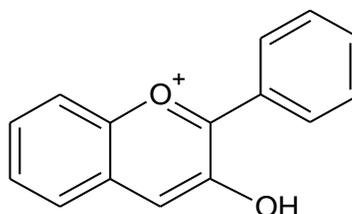
Flavonol



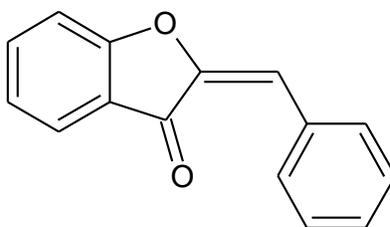
Catequina



Chalcona



Antocianidina



Aurona

Figura 14. Estructuras básicas de los flavonoides (Apak *et al.*, 2007; Rijke *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2006).

2.2.2 Actividad biológica de los flavonoides

Dentro de los numerosos componentes de las plantas, frutas y vegetales (Nandakumar *et al.*, 2008), los flavonoides son los compuestos muchas veces responsables de colores como el rojo, rosado, color de malva, púrpura, azul o violeta en muchas flores y plantas, en forma de antocianinas (Sampietro *et al.*, 2009) estando de forma simultánea presentes en las células fotosintéticas (Škerget *et al.*, 2005), también han jugado un papel muy importante en cuanto a

la prevención de las afecciones ocasionadas por radicales libres (Hazra et al., 2010), quizás resultantes de la constante exposición a radiación UV.

Se ha encontrado que la actividad de los flavonoides puede ser afectada por la naturaleza de los sustituyentes presentes en su estructura al igual que su posición, estableciendo así condiciones generalizadas, para una actividad antioxidante significativa (Apak *et al.*, 2007) tales como:

- Una sustitución orto-dihidroxi en el anillo B, impartiendo estabilidad a los radicales ariloxi formados por la oxidación del flavonoide posiblemente por puentes de hidrógeno y/o electrón-deslocalización (Apak *et al.*, 2007).
- Un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 que facilita la transferencia de electrones en conjugación con la función carbonilo del carbono 4 a través de electrón-deslocalización.
- Presencia de grupos hidroxilo en ambos carbonos 3 y 5 que ayudan a la formación de estructuras estables una vez los flavonoides se hayan oxidado.

En el caso de las flavonas y flavanonas las cuales no poseen sustitución por parte del grupo hidroxilo en el carbono 3 y subsecuente a ello no presentan actividad antioxidante significativa (Apak *et al.*, 2007).

Adicional a los métodos tradicionales encontrados en los flavonoides para su actividad antioxidante, también se considera, que estos pueden presentar inhibición de oxidasas (Pérez *et al.*, 2003), tales como lipoxigenasa (LO) y la ciclooxigenasa (CO), entre otras (Enciso et al., 2011; Havsteen *et al.*, 2002).

Otro mecanismo mediante el cual este tipo de moléculas pueden sustentar muchas de sus actividades biológicas puede ser la formación de complejos metálicos como la protección de ADN, interacción con el ADN de células tumorales (Dolatabadi *et al.*, 2011) y regulación del nivel de metales en la sangre (Tarahovsky *et al.*, 2014).

Este tipo de reacciones tiene lugar gracias a la proximidad de dos grupos hidroxilo o un carbonilo y un hidroxilo, como la interacción de los grupos catecol (grupos hidroxilos orto en las posiciones 3' y 4' del anillo B), los grupos 3-hidroxilo y 4-carbonilo y los grupos 5-hidroxilo y 4-carbonil (Ver Figura 15).

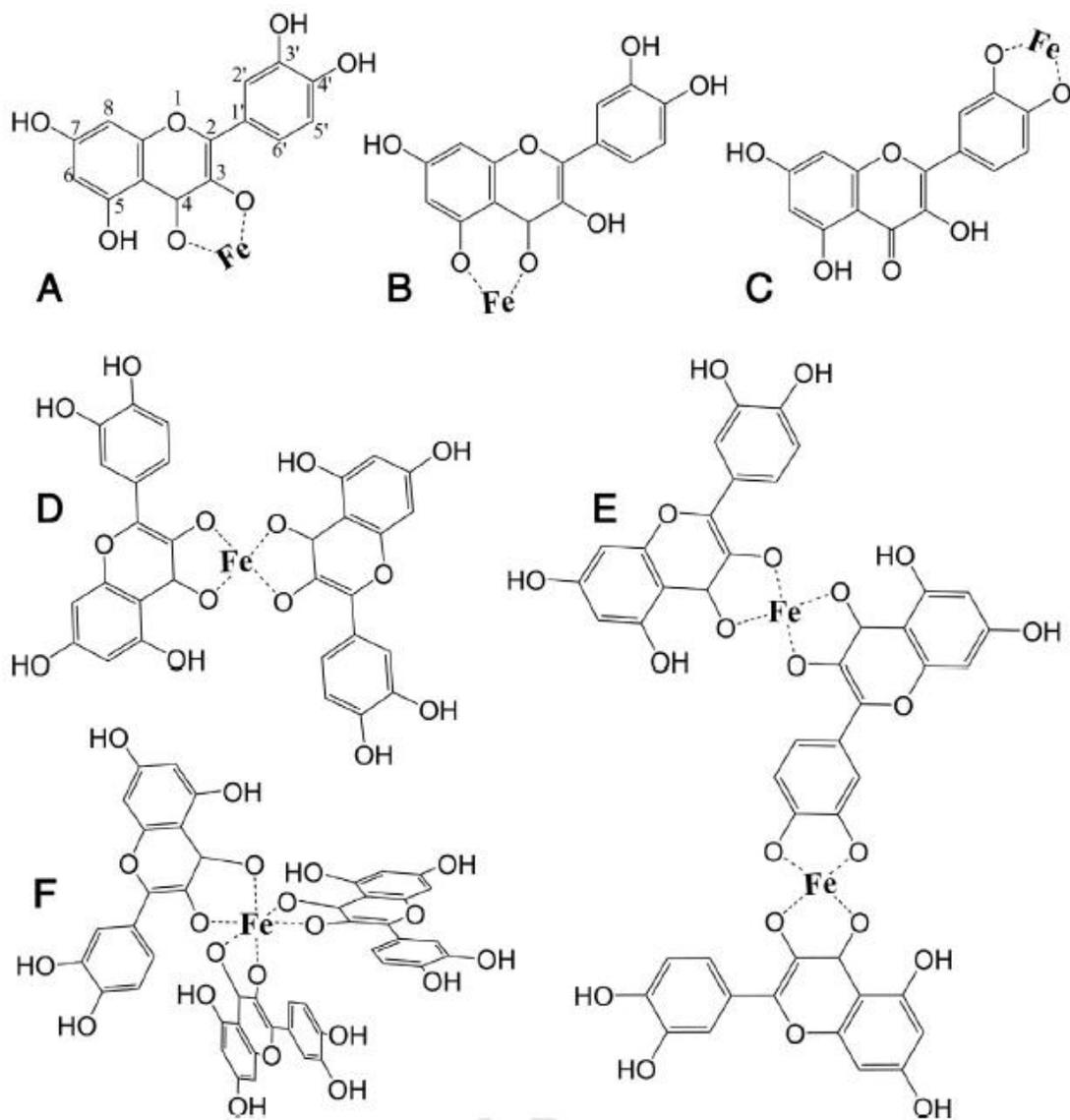


Figura 15. Probables estructuras de algunos complejos ferro-metálicos con quercetina, con estequiometría de 1:1 (A-C), 2:1 (D), 3:2 (E) y 3:1 (F) (Ren *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2007).

2.2.3 Acomplejamiento con $AlCl_3$

La fundamentación de algunas técnicas espectroscópicas para la determinación del contenido de flavonoides en determinadas matrices está relacionada con la capacidad de formación de diferentes complejos con dicho tipo de compuestos (Pekal *et al.*, 2014).

De esta manera, cuando soluciones alcohólicas se hacen reaccionar con dichos compuestos, se forman complejos metálicos con los sistemas -4 ceto-5/3-hidroxi, al igual que con los grupos O-dihidroxi del anillo aromático B, generando un

desplazamiento batocrómico de la Banda de Absorción I de alrededor de 60 nm (Bohm *et al.*, 1998).

Se obtiene mayor información si posterior a ello se realiza una acidificación del medio, debido a la ácido-labilidad del último complejo mencionado, pues a pH bajo el complejo que involucra el grupo oxo del carbono 4 permanece estable, de esta manera flavonas o flavonoles pueden ser diferenciados del resto de núcleos flavonólicos, como se muestra en la Figura 16.

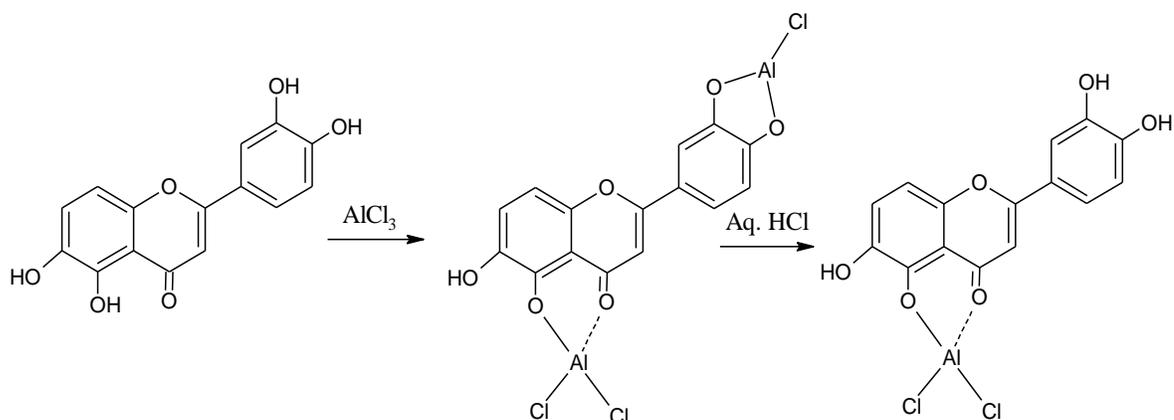


Figura 16. Complejos metálicos formados con AlCl₃ y su ácido-labilidad (Ulubelen *et al.*, 2005).

2.2.4 Reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu

Una técnica para la estimación de fenoles totales en muestras vegetales o productos alimenticios muy utilizada es la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. El fundamento de dicha reacción está basada en la habilidad de los compuestos fenólicos de auto-oxidarse con el fin de reducir la mezcla de ácidos fosfotúngstico/fosfomolibdico a un complejo azul, cuantificable espectroscópicamente (Malgalhães *et al.*, 2010).

Dicha reacción fue descubierta y publicada inicialmente por O. Folin y W. Denis (Folin *et al.*, 1912a, b), pero dado que el cromóforo formado es muy inestable a pH alcalino, se requiere un exceso de reactivo para completar la reacción, dicho exceso de reactivo forma un precipitado, por lo cual esta reacción fue mejorada por O. Folin y V. Ciocalteu (Folin *et al.*, 1927), al adicionar sulfato de litio (Blainski *et al.*, 2013).

Finalmente, la estructura del complejo cromóforo formado al igual que los mecanismos a través de los cuales transcurre dicha reacción no se conocen a profundidad (Schofield *et al.*, 2001).

2.2.5 Separación de flavonoides

Como se ha dicho antes, la potencialidad de estas biomoléculas ha impulsado la investigación de extractos vegetales, implicando con ello la separación y purificación de los flavonoides con el fin de conocer sus estructuras químicas, mecanismos de acción y actividades biológicas. Para lograr este acometido, la química de productos naturales ha desarrollado gran cantidad de técnicas de purificación que van desde los clásicos métodos cromatográficos, hasta los más refinados como electroforesis.

2.2.5.1 Extracción de flavonoides

La química de productos naturales ha utilizado una gran cantidad de técnicas para llevar a cabo la extracción de flavonoides desde el material vegetal.

Las primeras fueron la extracción por maceración con solvente y reflujos con calentamiento, operaciones que generalmente tomaban grandes cantidades de tiempo y de solventes químicos, con el objetivo de reducir tal cantidad de solventes potencialmente explosivos y/o tóxicos se han desarrollado otras alternativas para la extracción de este tipo de metabolitos secundarios (Biesaga *et al.*, 2011).

Una de ellas consiste en la extracción con agua a temperatura y presión elevada con el fin de disminuir la constante dieléctrica del agua (78,5 a temperatura y presión ambiente) y con ellos modificar el poder disolvente del agua, dado que el agua supercrítica es un excelente solvente para todo tipo de compuestos orgánicos. A pesar de ello, muchos compuestos de baja polaridad son suficientemente solubles para ser arrastrados por el agua por debajo de las condiciones críticas, de esta manera isoflavonas han sido extraídas de frijol (*Phaseolus vulgaris*); catequinas y proantocianidinas de residuales de la industria vinícola a temperaturas de hasta 150 °C y 60 bar (Hartonen *et al.*, 2007).

En otras técnicas se ha utilizado CO₂ supercrítico, debido a su no toxicidad y bajo costo, obteniendo buenos resultados en poco tiempo. A veces también modificadores orgánicos como etanol o metanol son usados en este tipo de extracciones (Shan *et al.*, 2012).

Extracciones asistidas por ultrasonido facilitan el transporte de masa de solvente a las células vegetales, consumiendo menos energía dado que requiere temperaturas menores e implica tiempos de extracción bajos (Yang *et al.*, 2013). Finalmente, el uso microondas influencia las propiedades de textura, mejorando la suavidad e incrementando la permeabilidad celular, siendo capaz de lograr la ruptura celular debido a su alto poder penetrante, resultando en transferencia de masa fuera de los tejidos vegetales (Huma *et al.*, 2009).

2.2.5.2 Aislamiento de flavonoides

Para el aislamiento de flavonoides diversas técnicas cromatográficas pueden ser utilizadas.

La primera y más básica herramienta es la utilización de la cromatografía de capa delgada (CCD) para la visualización de los flavonoides debido a su fluorescencia natural frente a la luz ultravioleta, propiedad que puede ser mejorada luego de rociar la placa con una solución al 1% de difenilboriloxietilamina en MeOH y subsecuentemente revelada con PEG-4000 al 5% en EtOH, el cual disminuye el límite de detección de 10 µg (límite de detección promedio para flavonoides en CCD) a 2,5 µg (Andersen *et al.*, 2006), se obtienen resultados similares cuando la placa es rociada con una solución de AlCl₃ al 1% en EtOH (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Las fases estacionarias más utilizadas son Sílica gel y ODS. De forma análoga para efectos de aislamiento, placas de CCD preparativas pueden ser utilizadas siguiendo la misma metodología.

Quizás la técnica que ha sido más utilizada para la purificación de productos naturales en general, es la cromatografía en columna. Para realizar cromatografía de columna los soportes más utilizados son Sephadex LH-20, ODS y poliamida, aunque la utilización de resinas como DIAION HP-20 y Amberlite XAD-2 o XAD-7, con gradientes de elución de metanol – agua, son un excelente método para la obtención de fracciones ricas en flavonoides (Andersen *et al.*, 2006).

De igual forma, en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), las aplicaciones más comunes corresponden a la utilización de soportes de fase reversa (RP-18) y la utilización de mezclas como acetonitrilo-agua o metanol-agua, requiriendo la utilización de algún tipo de modificador ácido como fórmico, acético, trifluoroacético, entre otros, con el fin de eliminar la ionización de los grupos fenólicos (Andersen *et al.*, 2006). En este tipo de casos, la cromatografía de fase normal no es tan utilizada a menos que se quiera buscar flavonoides de baja polaridad como flavonas polimetoxiladas (Andersen *et al.*, 2006). Generalmente los detectores de arreglo de diodos son utilizados, debido a que con ellos es posible registrar la separación a diferentes longitudes de onda, además de la adquisición de los espectros de absorción UV para los compuestos separados. A continuación en la Figura 17 se muestra un ejemplo del perfil cromatográfico que se obtendrían con de este tipo de compuestos:

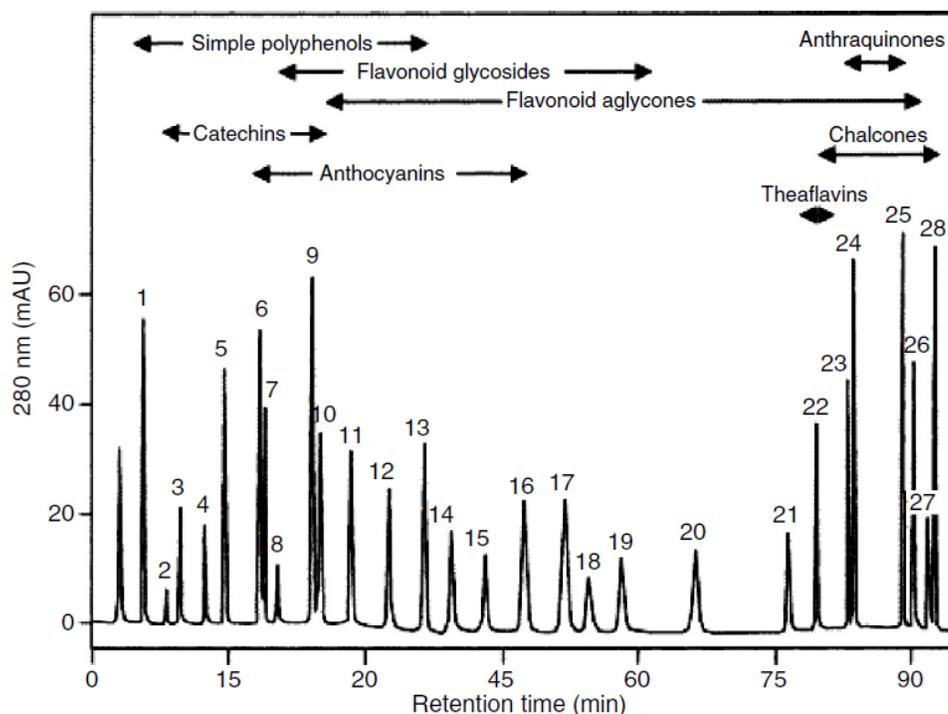


Figura 17. Perfil cromatográfico de algunos compuestos flavonólicos (Sakakibara *et al.*, 2003).

2.2.6 Identificación de flavonoides

2.2.6.1 Patrones de absorción ultravioleta

Todas las variantes estructurales existentes dentro de la familia de los flavonoides, tienden a absorber dentro de un rango que va desde los 220 a los 600 nm. Presentando generalmente dos máximos de absorción que varían en intensidad y longitudes de onda según la naturaleza del núcleo flavonólico (Andersen *et al.*, 2006); uno a longitud de onda corta (320-385 nm) referido como banda I correspondiente al sistema aromático B y otro a longitud de onda larga (250-285 nm) referido como banda II correspondiente al sistema aromático A, debido a la existencia de dos grupos cromóforos ilustrados en la Figura 18, los grupo cinamoilo y benzoilo, respectivamente (Ulubelen *et al.*, 2005).

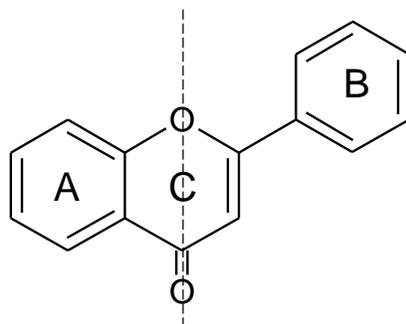


Figura 18. Grupos cromóforos de los flavonoides (Ulubelen *et al.*, 2005).

La insaturación entre los carbonos 2 y 3, la posición de los grupos hidroxilo en las agliconas, o la presencia de residuos de carbohidratos afectan la absorción de los núcleos causando desplazamientos bato e hipsocrómicos, debido a que este tipo de grupos auxocromos (grupos hidroxilos) contribuyen electrónicamente a los sistemas aromáticos, al tiempo que las insaturaciones favorecen la conjugación del grupo fenilo (anillo B) con el grupo carbonilo encontrado en el anillo heterocíclico tipo pirona (Kumas *et al.*, 2013), como se puede apreciar en las estructuras de resonancia tanto del anillo A, como del anillo B en la Figura 19.

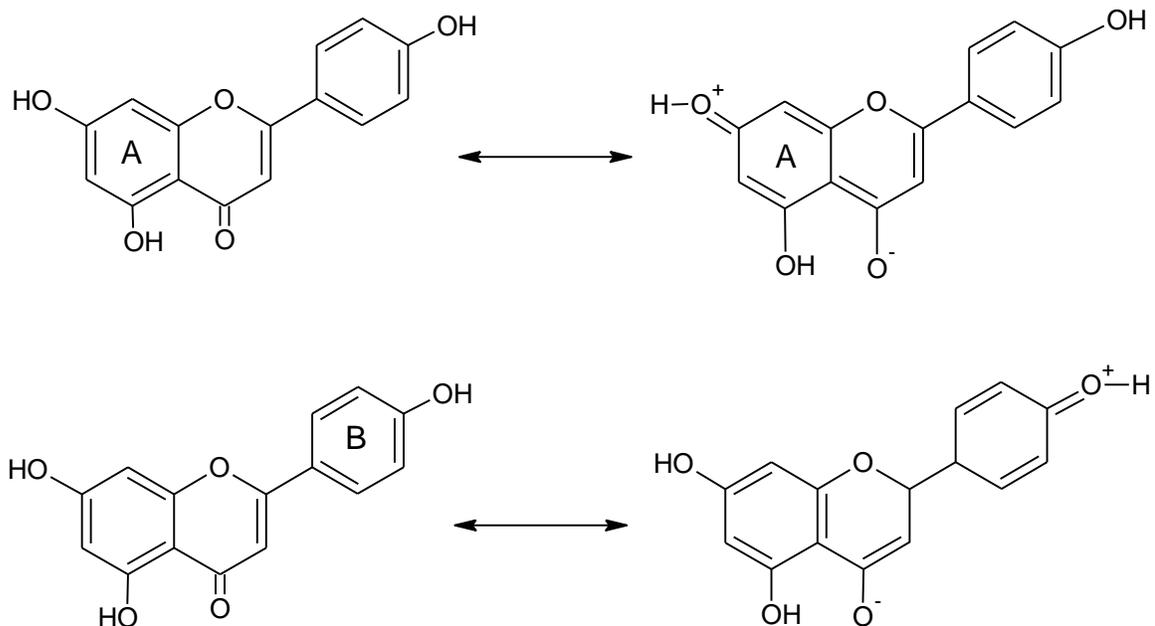


Figura 19. Estructuras resonantes implicadas en la actividad electrónica del anillo pirónico (Bohm *et al.*, 1998).

De esta manera, las flavonas y flavonoles, por contar con su insaturación entre los carbonos 2 y 3 del anillo pirano, presentan sus dos bandas de absorción de

intensidad considerable en los rangos (310-350) nm y (350-385) nm para la banda I, y (250-280) nm para las bandas II, respectivamente. Es de destacar el hecho de que la absorción de la banda I en flavonoles 3-sustituidos sufre un desplazamiento a longitudes de ondas más cortas (desplazamiento hipsocrómico) (Andersen *et al.*, 2006).

Igualmente, las flavononas que carecen de insaturación entre el carbono 2 y 3 solo se observa una señal de absorción considerable por parte de la banda II dado que el cromóforo cinamoilo desaparece y el grupo benzoilo permanece intacto. Este efecto también es observado en las isoflavonas debido a que el enlace del anillo B en el carbono 3 imposibilita la conjugación del grupo fenilo (Anillo B) con el carbonilo del anillo pirona, reduciendo en ambos casos la absorción de la banda II a solo un hombro con respecto de la otra señal de absorción (Bohm *et al.*, 1998).

Finalmente las chalconas, auronas y antocianinas presentan los siguientes patrones de absorción ultravioleta.

- Chalconas: Banda I (365-390) nm intensa y Banda II (240-270) nm de menor intensidad.
- Auronas: Banda I (390-430) nm intensa y Banda II (240-270) nm de menor intensidad.
- Antocianinas: Banda I (465-560) nm y Banda II (270-280) nm, ambas de intensidad media.

2.2.6.2 Identificación de flavonoides por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Esta herramienta espectrocópica, se ha convertido tal vez en la técnica que mayor información brinda, puesto que con ella pueden dilucidarse estructuras completas, incluyendo isomería y configuraciones anoméricas en el caso de los carbohidratos; por esta razón la química de productos naturales se vuelve de vital importancia contar con tal tipo de información cuando se pretende elucidar estructuralmente cualquier tipo de molécula aislada, incluyendo los flavonoides.

Al realizar la toma de espectros deben considerarse algunas variables, como el tipo de solvente a utilizar y los experimentos a realizar. El primero de ellos, puede depender de la muestra estudiada y su polaridad, por lo cual dada la naturaleza del núcleo flavonólico altamente polar, el uso de hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO- d_6) y tetradeuterometanol (CD₃OD) ha sido altamente difundido, de igual forma, al estudiar flavonoides de baja polaridad puede considerarse la utilización de deuterocloroformo (CDCl₃), pentadeuteropiridina, entre otros. Otro factor que afecta la elección del solvente a utilizar es la temperatura de los experimentos a realizar dado que la utilización de sondas criogénicas pueden acarrear problemas relacionados con el alto punto de fusión del DMSO (18 °C) o la toma de

experimentos de alta temperatura como los realizados para observar la conformación rotamérica de los núcleos glicosilados pueden afectarse por el bajo punto de ebullición del cloroformo (Andersen *et al.*, 2006).

Con respecto de los experimentos a utilizar, los clásicos experimentos unidimensionales ^1H -RMN y ^{13}C -RMN pueden brindar información acerca del número de hidrógenos y carbonos que constituyen la molécula, descartar o no la presencia de los carbohidratos más comunes y su configuración anomérica (Agrawal *et al.*, 1992), pero generalmente para completar la distribución espacial de este tipo de compuestos es muy necesario conocer las interacciones de núcleos vecinos sean o no de la misma naturaleza, para lo cual los experimentos de dos dimensiones (2D-RMN) pueden ser muy útiles.

De esta manera, experimentos de correlación como COSY (Correlation Spectroscopy) y TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) pueden mostrar las interacciones homonucleares de protón y heteronucleares protón-carbono hasta distancias correspondientes a 4J , respectivamente. Además de ello, experimentos como HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) y HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) pueden mostrar interacciones espaciales a través de varios carbonos o la relación únicamente entre átomos geminales, respectivamente.

Finalmente, con los amplios estudios realizados sobre este tipo de compuestos, se ha logrado la identificación de los desplazamientos de protón y de carbono más comunes para los diferentes tipos de núcleos flavonólicos conocidos y los efectos de la glicosilación sobre los mismos, mostrados en las Tablas 5 y 6.

Además de ello, para elucidar la estructura de las formas glicosiladas aisladas del material vegetal se hace importante tener en cuenta los patrones de resonancia de los carbohidratos, los cuales son observados en rangos muy estrechos para la totalidad de los átomos que los componen, debido a la similitud de ambientes químicos que presentan los protones metinos y metilenos, para tal fin se muestran algunos de los desplazamientos químicos para los carbohidratos más comunes en la Tabla 7 y 8 (Agrawal *et al.*, 1992).

Tabla 5. Desplazamientos químicos más comunes de ^{13}C -RMN para flavonoides. (Ternai *et al.*, 1975; Ternai *et al.*, 1976; Ternai *et al.*, 1977).

	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C_{10}	$\text{C}_{1'}$	$\text{C}_{2'}$	$\text{C}_{3'}$	$\text{C}_{4'}$	$\text{C}_{5'}$	$\text{C}_{6'}$
FLAVONAS	163,2	107,6	178,4	125,7	125,2	133,7	118,1	156,3	174	131,8	126,3	129	131,6	129	126,3
FLAVONOLES	149,69	138,13	173,83	125,45	125,45	134,52	118,83	155,45	121,53	123,42	116,32	145,44	148,08	116,71	121,72
DIHIDROFLAVONAS	78,2	42	195,6	163,3	95,8	166,4	94,9	162,7	101,9	128,9	127,6	115,1	157,4	115,1	127,6
DIHIDROFLAVONOLES	83,1	71,7	197,1	163,3	96,1	166,8	95,1	162,5	100,6	128,1	115,3	144,9	145,7	115,3	119,2
FLAVANOS	78,1	65,1	28	156,4	95,6	156,3	94,5	155,7	98,8	130,7	118,1	144,4	144,5	115	118,1
ISOFLAVONAS	153,7	123,4	174,5	126,9	115,6	161,4	103,9	156,9	118,7	125,6	109,3	147	147	107,9	122,2
	α	β		$\text{C}_{2'}$	$\text{C}_{3'}$	$\text{C}_{4'}$	$\text{C}_{5'}$	$\text{C}_{6'}$	$\text{C}_{1'}$	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
CHALCONAS	143,8	117,8	191,4	164,6	102,6	165,4	107,9	132,3	113,2	125,8	130,6	115,8	159,9	115,8	130,6

Tabla 6. Variaciones en los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN para flavonoides con patrones de glicosilación. (Ternai *et al.*, 1977).

	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C_{10}	$\text{C}_{1'}$	$\text{C}_{2'}$	$\text{C}_{3'}$	$\text{C}_{4'}$	$\text{C}_{5'}$	$\text{C}_{6'}$
7-O-Glucosa					0,75	-1,35	1,05		1,7						
7-O-Ramnosa					0,75	-2,35	1		1,7						
3-O-Glucosa	9,2	-2,1	1,6	0,4					1	-0,8	1,1	-0,3	0,7	-0,4	1,45
3-O-Ramnosa	10,3	-1,05	1,95	0,6					1,1						
5-O-Glucosa	-2,8	2,2	-6	-2,7	4,4	-3	3,2	1,4	4,3	-1,3	-1,2	-0,4	-0,8	-1	-1,8
5-O-Ramnosa	-3,7	4,3	-6,1	-1,6	-2,4	-1,3	1,2	1,7	2,3	0,2	-0,7	-0,2	-0,5	-0,2	-0,7
3'-O-Glucosa	-0,5	0,4									1,6		1,4	0,4	3,2
4'-O-Glucosa	0,1	1								3,7	0,4	2	-1,2	1,4	

Tabla 7. Desplazamientos químicos de protón (^1H -RMN) para los carbohidratos más representativos. (Agrawal *et al.*, 1992).

	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆
α-D-Arabinosa	4,16	3,43	3,57	3,85	3,82; 3,57	-
β-D-Arabinosa	4,72	3,74	3,72	3,89	3,55; 3,77	-
α-D-Galactosa	4,73	3,72	3,68	3,86	3,78	3,67; 3,61
β-D-Galactosa	4,2	3,39	3,53	3,81	3,57	3,69; 3,64
α-D-Glucosa	4,7	3,46	3,56	3,29	3,54	3,77; 3,66
β-D-Glucosa	4,27	3,15	3,38	3,27	3,36	3,82; 3,62
α-D-Manosa	5,18	3,94	3,86	3,68	3,82	3,74; 3,86
β-D-Manosa	4,89	3,95	3,66	3,6	3,38	3,75; 3,91
α-L-Ramnosa	5,12	3,92	3,81	3,45	3,86	1,28
β-L-Ramnosa	4,85	3,93	3,59	3,38	3,39	1,3

Tabla 8. Desplazamientos químicos de carbono (^{13}C -RMN) para los carbohidratos más representativos. (Agrawal *et al.*, 1992).

	C₁	C₂	C₃	C₄	C₅	C₆
α-D-Arabinosa	97,6	72,9	73,5	69,9	67,2	-
β-D-Arabinosa	93,4	69,5	69,5	69,5	63,4	-
α-D-Galactosa	93,2	69,3	70,1	70,3	71,3	62
β-D-Galactosa	97,4	72,9	73,8	69,7	75,9	61,8
α-D-Glucosa	93	72,4	73,7	70,7	76,7	61,8
β-D-Glucosa	96,8	75,2	76,7	70,7	76,7	61,8
α-D-Manosa	94,9	71,7	71,2	67,9	73,3	62
β-D-Manosa	94,5	72,1	74	67,7	77	62
α-L-Ramnosa	94,8	71,8	71	73,2	69,1	17,7
β-L-Ramnosa	94,4	72,2	73,8	72,8	72,8	17,6

2.3 GENERALIDADES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

2.3.1 Descripción morfológica de la familia Euphorbiaceae

La Familia Euphorbiaceae es cosmopolita con distribución pantropical, perteneciente al orden Malpighiales, conformada por alrededor de 300 géneros.

Es una familia con una morfología bastante amplia, comprendiendo árboles, arbustos, lianas o hierbas. Caracterizándose en todos los casos por la presencia de látex exudado coloreado y estípulas de diversas formas. Sus hojas son simples generalmente, cuando compuestas, palmadas; espiraladamente dispuestas, siendo opuestas en muy pocos casos. Presencia de glándulas sobre la lámina y el pecíolo.

Flores imperfectas, arregladas en inflorescencias, siendo característico el ciatio en especies *Euphorbia*. Generalmente apétalas, con ovario súpero generalmente formado por dos o tres carpelos.

Sus frutos dispuestos en cápsulas esquizocárpicas, algunas veces dehiscentes; solo presentándose drupas en casos más limitados (Murillo *et al.*, 2004; López *et al.*, 2004).

2.3.2 Potencial aprovechamiento de la familia Euphorbiaceae y su distribución geográfica

Al considerar la distribución cosmopolita de esta familia (Figura 20), estando presente en todos los continentes, pero más fuertemente representada en las zonas pantropicales; y su composición compleja, al conformarse por 317 géneros, asociados en 49 tribus distribuidas en 5 subfamilias (Webster *et al.*, 1994) conteniendo un número cercano a 8100 especies (Webster *et al.*, 1999).

La increíble diversidad botánica y química resultante, ha resultado en un muy amplio espectro de aplicaciones muy aprovechables para la sociedad, como alimento, medicinas, aceites, ceras, componentes para pinturas y otros materiales industriales. Registros de aplicaciones para las civilizaciones desarrolladas no son las únicas, dado que existe un altísimo registro de aplicaciones etnobotánicas de esta familia, dentro de las que se destacan la aplicación de diversas especies del género *Alchornea* para el tratamiento de la diarrea (Schultes *et al.*, 1987).

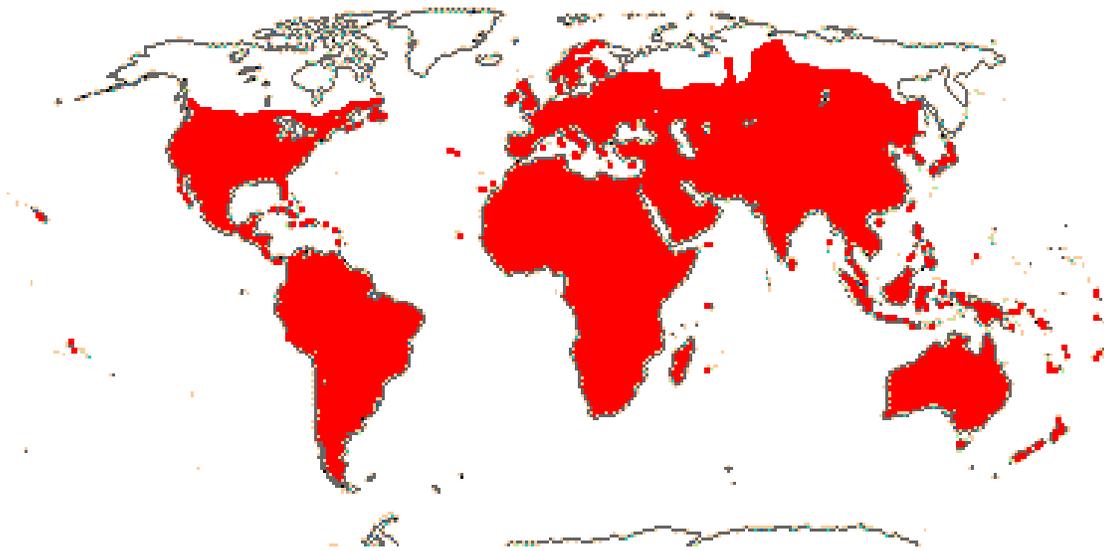


Figura 20. Distribución mundial de la familia Euphorbiaceae (Stevens *et al.*, 2001).

Finalmente, esta familia se encuentra representada en Colombia por 78 géneros, 390 especies, 12 subespecies y 9 variedades. Ampliamente distribuidas en todas las regiones del país, siendo la región andina la que cuenta con mayor número de especies (210 spp.), seguido por la región amazónica, el caribe, la región pacífica y la orinoquía, encontrándose principalmente en zonas bajas, menores a los 1500 msnm (Murillo *et al.*, 2004).

Cabe destacar la presencia de 19 especies pertenecientes al género *Alchornea* en el país. Con presencia de cinco de estas en la región del Quindío, *A. latifolia*, *Alchornea grandiflora*, *Alchornea grandis*, *Alchornea glandulosa* y *Alchornea coelophylla* (Maya *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2002).

2.3.3 Descripción taxonómica, morfológica y distribución de *Alchornea coelophylla*.

La especie *Alchornea coelophylla* Pax & Hoffm, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, puede ser clasificada según la aproximación al ordenamiento de angiospermas APG III (Grupo Filogenético de Angiospermas, por sus siglas en inglés), de la siguiente forma (Missouri Botanical Garden)

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta
- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Nývák ex. Takht
- Superorden: Rosanae Takht
- Orden: Malpighiales Juss. ex. Bertch & J. Presl

- Familia: Euphorbiaceae Juss.
- Género: *Alchornea* Sw.
- Subfamilia: Acalyphoide
- Tribu: Alchorneae
- Subtribu: Alchorneinae
- Especie: *Alchornea coelophylla* Pax & Hoffm.



Figura 21. *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae).

Esta especie puede ser descrita como un arbusto de subdosel e interior de bosques maduros y cañadas, frecuentemente observada como individuos de pocos centímetros de diámetro y escasos metros de altura. Lámina lanceolada a ovada, que puede variar de 8 a 10 centímetros de largo, presentando márgenes con dientes cortos e inflorescencias péndula y delgada, ovario bicapelar con estilos mayores a 1,5 centímetros de largo. Estructuras pubescentes, tricomas simples. Pecíolos morado-verdosas (Maya *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2002).

La presencia de esta especie en el país, está ampliamente dispersa, pudiéndose encontrar individuos en los departamentos de Boyacá (Duitama), Cundinamarca (Medina), Quindío (Finlandia), Risaralda (Pereira), Santander (Suaita y Suratá),

y Nariño (Providencia, Ricaurte, La Florida y La unión), en altitudes comprendidas entre los 1600 y 2700 msnm (SiB Colombia).

2.3.4 Flavonoides del género *Alchornea*

Gracias a la gran variedad de aplicaciones y adopciones que han ganado varias especies pertenecientes a este género en el folclore de muchos pueblos de diversas regiones del mundo como la región central de Brasil y algunas regiones tropicales de África como Camerún, Nigeria, la República Democrática del Congo y Senegal, para el tratamiento de un amplio rango de patologías (Kouakou *et al.*, 2013; Noundou *et al.*, 2014).

Gran cantidad de estudios y tamizados fitoquímicos se han realizado a diversas especies pertenecientes al género *Alchornea* (Euphorbiaceae), encontrándose la presencia de compuestos de naturaleza flavonólica las especies enlistadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Especies pertenecientes al género *Alchornea* en las cuales se reporta la presencia de flavonoides.

Espece	Referencia
<i>Alchornea castaneaefolia</i>	(Hiruma-Lima <i>et al.</i> , 2006)
<i>Alchornea cordifolia</i>	(Manga <i>et al.</i> , 2004; Osadebe <i>et al.</i> , 2012)
<i>Alchornea floribunda</i>	(Noundou <i>et al.</i> , 2014)
<i>Alchornea glandulosa</i>	(Urrea-Bulla <i>et al.</i> , 2004)
<i>Alchornea laxiflora</i>	(Ogundipe <i>et al.</i> , 2001)
<i>Alchornea triplinervia</i>	(Braca <i>et al.</i> , 2002)

Cabe destacar que de la especie *Alchornea laxiflora* se ha aislado rutina, quercetina y derivados de quercetina (Figura 22) como compuestos azufrados, compuestos de donde se evidenció que la acetilación en algunas posiciones específicas potencializaba la actividad antimicrobiana observada por parte del extracto de dicha planta. Al mismo tiempo dichas especies están asociadas al tratamiento de diversas enfermedades y actividades biológicas como, antiulcerogénica, antiinflamatoria, hepatoprotectiva, antioxidante, antibacterial, citotóxica y antiséptica, respectivamente, por su contenido de flavonoides o interacciones sinérgicas de los mismos con otros compuestos activos.

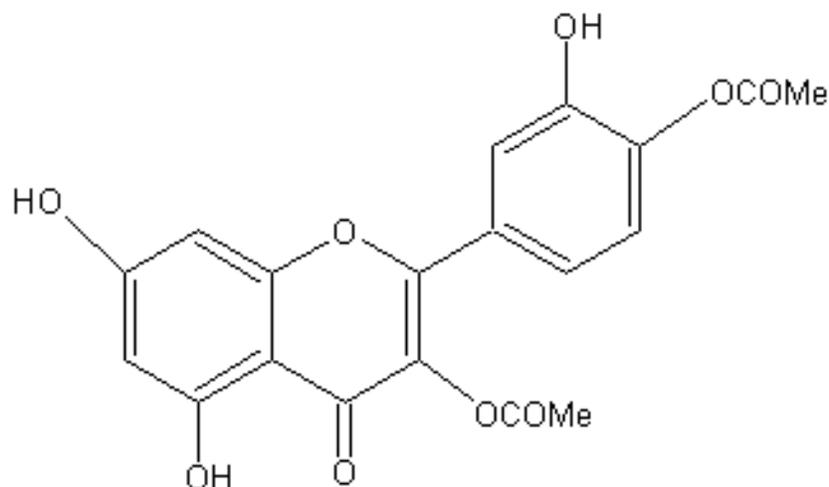


Figura 22. Quercetina-3-4'-di-acetato aislado de *Alchornea laxiflora* (Ogundipe *et al.*, 2001).

Las especies *Alchornea latifolia* y *Alchornea sidifolia* han sido asociadas a actividades anticarcinogénica (Setzer *et al.*, 2000) y antifúngica (Barbo *et al.*, 2002); de donde la actividad de la última especie puede deberse a otro tipo compuestos, descartando los terpenos, donde los flavonoides pueden ser señalados como los responsables de esta actividad observada por parte del extracto MeOH de dicha especie (Barbo *et al.*, 2002).

Igualmente ha sido reportado el aislamiento de compuestos similares al de la Figura 22 para *Alchornea glandulosa*, donde quercetina, quercetina-3-O- α -L-ramnosa y kaempferol-3-O- α -L-ramnosa lograron demostrar moderada actividad citotóxica frente a *Artemia salina* (Urrea-Bulla *et al.*, 2004).

Finalmente la especie que más reportes científicos posee es *Alchornea cordifolia*, de donde basados en la utilización etnofarmacológica de la misma en regiones de África tropical, como el sur de Nigeria, Senegal y Uganda se ha descubierto la abundancia química de flavonoides en su composición, dentro de los que se reporta la quercetina, hiperina y guaijaverina como constituyentes antiinflamatorios (Manga *et al.*, 2004); la atribución de la actividad hepatoprotectiva a el contenido de flavonoides antioxidantes del extracto metanólico de hojas de la especie al inhibir el daño inducido a ratas con tetracloruro de carbono (CCl₄) (Osadebe *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar al menos un flavonoide con actividad antioxidante de la especie *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar un flavonoide del extracto metanólico de la parte aérea de la especie *Alchornea coelophylla*.
2. Establecer la estructura química del flavonoide aislado y purificado del extracto metanólico de la especie *Alchornea coelophylla*, empleando las técnicas espectroscópicas, tales como resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (^1H - NMR y ^{13}C -NMR) en una y dos dimensiones, espectroscopía de ultravioleta – visible (UV-Visible) e infrarroja (IR).
3. Evaluar el contenido fenólico y de flavonoides del extracto metanólico de la especie *Alchornea coelophylla* y de las fracciones obtenidas a través de los métodos de Folin – Ciocalteu y de tricloruro de aluminio, respectivamente.
4. Determinar la actividad antioxidante (A.A.) captadora de radicales libres mediante los métodos de DPPH \cdot y ABTS \cdot^+ del extracto metanólico, de las fracciones cromatográficas obtenidas y del flavonoide aislado, presente en la especie *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae)

4. JUSTIFICACIÓN

Conociendo que los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) cumplen funciones fisiológicas normales de defensa de forma generalizada en todo el organismo, siendo encontrados por ejemplo en la superficie luminal del colon ($O_2\cdot^-$) y las células de las mucosas de las vías respiratorias (H_2O_2), se podría pensar que estos también pueden estar relacionados con el desarrollo de muchos padecimientos en diversos tipos de tejidos cuando las ROS exceden la capacidad antioxidante celular (Wu *et al.*, 2014) generalmente a través de respuestas inflamatorias debido a la liberación de mediadores inflamatorios en situaciones de estrés oxidativo, o su acción directa sobre la activación de factores de transcripción sensibles a cambios redox (Lee *et al.*, 2012), asociándose entonces al desarrollo de diversas enfermedades como el asma, enfermedades crónicas pulmonares, problemas intestinales, artritis (Lambeth *et al.*, 2007) y hasta el desarrollo de procesos tumorigénicos y carcinogénesis por diferentes vías (Surh *et al.*, 2005).

Donde se destaca la atención que recibe el cáncer en los laboratorios del mundo, con el fin de poder minimizar sus consecuencias e identificar sus causas. Debido a que muchos más factores contribuyen a su desarrollo por las vías metabólicas que implican la acción de los radicales libres, tales como las radiaciones ionizantes y ultravioletas (Gruijl *et al.*, 2001) y el estrés oxidativo (Kasai *et al.*, 1997; Nandakumar *et al.*, 2008) al generar daños a las macromoléculas tales como proteínas (Gruijl *et al.*, 2001) y ADN (Hawkins *et al.*, 2009), además de una tendencia mundial a la baja ingesta de frutas y verduras (OMS), y por tanto un bajo consumo de compuestos antioxidantes exógenos. Es por este motivo que las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de mortalidad por cáncer en el año 2008, ascienden a 7,6 millones de personas representando alrededor del 13% de las defunciones totales en el mundo (GLOBOCAN, 2008) y presentándose un valor de 32231 defunciones por cáncer en el país para ese mismo año (Instituto Nacional de Cancerología, INC); y mostrando una tendencia de crecimiento para dichas cifras, esperándose un total de 13,1 millones de defunciones en el mundo en el año 2030 (Organización Mundial de la Salud, OMS).

Generando también la necesidad de obtener un mayor conocimiento de este tipo de compuestos, debiendo entonces recurrir al uso de productos naturales o biopreparados como posibles tratamientos para prevenir la incidencia de estos tipos de afecciones y sumado al hecho de que la biodiversidad de Colombia es un recurso que de forma sostenible puede ser explotado de forma benéfica y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en estudios previos realizados en el laboratorio de Biotecnología – Productos Naturales (GB-PN) sobre la

familia Euphorbiaceae, ampliamente distribuida en nuestro país (Murillo *et al.*, 2004). Se propone realizar una investigación con el extracto metanólico de la especie *Alchornea coelophylla*, queriendo separar e identificar flavonoides responsables de la actividad antioxidante que dicho extracto pueda presentar. Dado que se considera que este tipo de metabolitos secundarios presentan una fuerte y significativa actividad antioxidante, mostrando aplicaciones en posibles tratamientos terapéuticos y homeopáticos contra afecciones neurodegenerativas progresivas (Apak *et al.*, 2007; Hazra *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Pietta *et al.*, 2000; Shanmukha *et al.*, 2011; Singhatong *et al.*, 2010) y para cualquier otra afección ligada a las ROS y/o a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Havsteen *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002).

5. METODOLOGÍA

5.1 LUGAR DONDE SE REALIZARÁ EL TRABAJO

El trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología – Productos Naturales (GB-PN) perteneciente a la Universidad Tecnológica de Pereira (1412 msnm), con una temperatura promedio de 22 °C y una humedad relativa de 85%.

5.2 MATERIALES

5.2.1 Reactivos

Los solventes de extracción fueron grado comercial (Profinas S.A.S, Bogotá, Colombia). Soportes cromatográficos DIAION HP-20 (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japón), Sílica Gel (0.04-0.063) mm (Macherey Nagel, Düren, Alemania). Solventes para Cromatografía de Columna y ensayos antioxidante grado analítico Metanol, Isopropanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri), Acetato de Etilo (Synth, Sao Paulo, Brasil). Cromatofolios Sílica Gel 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Alemania). Solventes para cromatografía grado HPLC Metanol, Acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri), Isopropanol (Honeywell, Morristown, New Jersey).

Ácido 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) ≥ 98%, 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Reactivo TROLOX) 97%, ácido gálico ≥ 97.5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri); Reactivo Folin-Ciocalteu, hidróxido de sodio, hidroquinona ≥ 99% (Merck, Darmstadt, Alemania).

Solventes deuterados: DMSO-*d*₆ ≥ 99.9% (Cambridge Isotope Laboratories Inc, Tewksbury, Massachusetts) y D₂O ≥ 99.9% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri).

5.2.2 Materiales y equipos

- Balanza analítica Ohaus Adventure (Parsippany, New Jersey).
- Baño termostático Memmert GmbH & Co (Schwabach, Alemania).
- Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier Cary 360 FTIR, Agilent (Santa Clara, California).

- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear AVANCE DRX-400, Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts).
- HPLC Analítico Agilent 1100 series (Santa Clara, California).
- Lector de Microplacas Multiskan Go, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts).
- Micropipetas Unicanal Eppendorf de volúmenes de 0,1-10 μL ; 10-100 μL , 100-1000 μL (Hamburgo, Alemania).
- Micropipeta Multicanal FisherBrand Elite 30-300 μL (Waltham, Massachusetts).
- Refrigerador para almacenamiento de productos químicos, Whirlpool (Benton Harbor, Michigan).
- Rotaevaporador Laborota 4003, Heidolph Instruments GmbH & Co (Schwabach, Alemania).

5.2.3 Material Vegetal

La parte aérea de *Alchornea coelophylla* fue recolectada en la Reserva Natural Bremen – La Popa en jurisdicción del municipio de Finlandia, en el departamento de Quindío, en las coordenadas 4° 40' 48.6" Norte y 75° 37' 32.7" Oeste a una altura de 6737 pies sobre el nivel del mar, con ayuda del taxónomo Francisco Javier Roldán.

Muestras fueron depositadas en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) y la colección del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JB-UTP) bajo los Voucher FJR-3969 y UTP 128, respectivamente.

Una vez recolectado, este fue debidamente aireado y secado a 50 °C en una estufa, posteriormente molido en molino de martillos.

5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos vegetales fueron obtenidos mediante maceración pasiva a temperatura ambiente, partiendo del material vegetal molido y seco. Para tal fin, este se dispuso en botellas ámbar y se hizo uso de solventes grado comercial (previamente destilados) en gradiente creciente de polaridad, utilizando *n*-hexano, diclorometano y metanol con el objetivo de optimizar la extracción de la mayor cantidad de metabolitos de diferente naturaleza química, dejando expuesto el material vegetal durante la noche, repitiendo los procesos por triplicado con los solventes recuperados por rotaevaporación, como se muestra en el esquema de la Figura 23.

Posteriormente el extracto vegetal obtenido es secado con el fin de ser almacenado a -4 °C hasta su utilización.

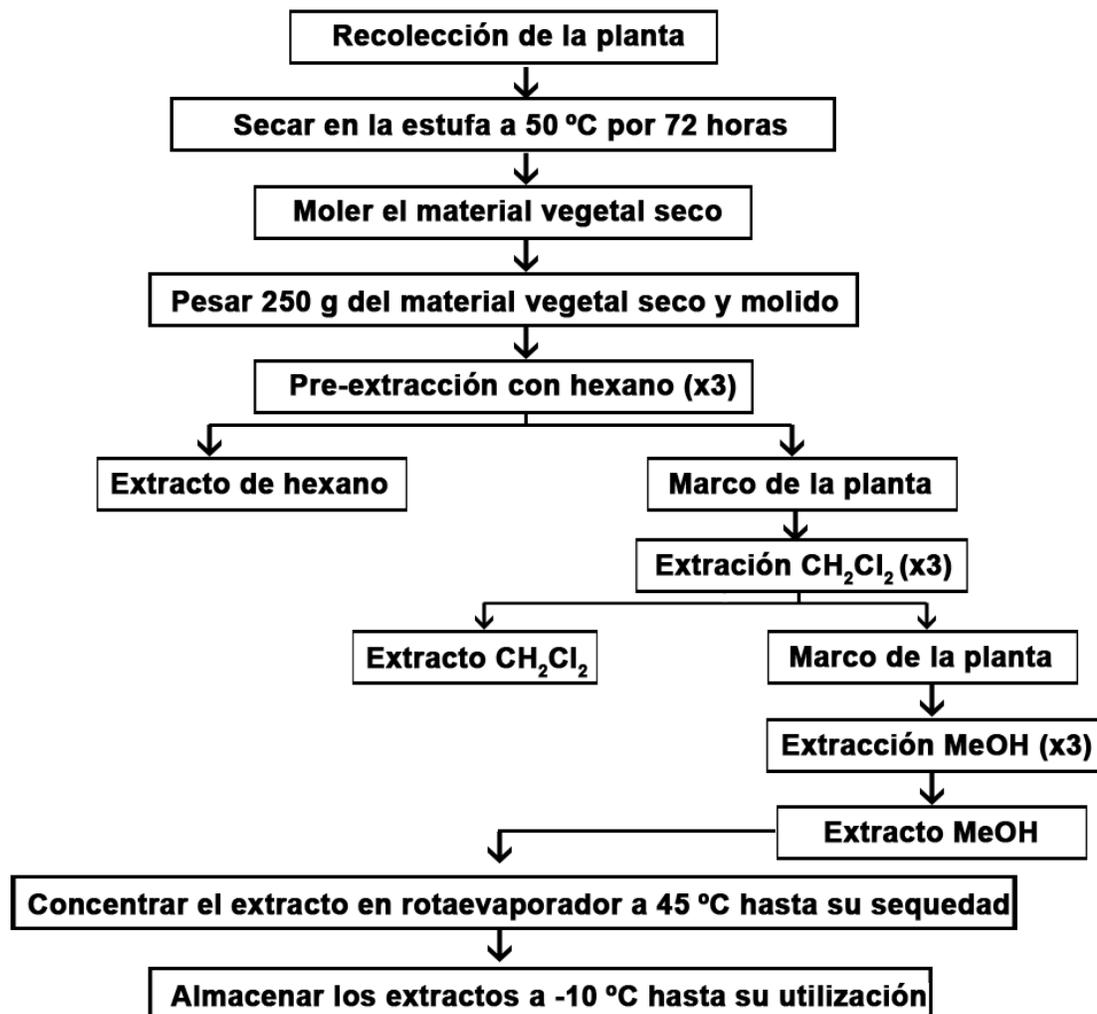


Figura 23. Procedimiento de obtención de los extractos de material vegetal (Niño *et al.*, 2006)

5.4 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y RECONOCIMIENTO DE FLAVONOIDES

Una vez obtenidos los extractos crudos de *Alchornea coelophylla*, se realizó una caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada (CCD) con el fin de poder visualizar la presencia o ausencia de los diferentes núcleos fitoquímicos, utilizando patrones y reveladores propios de cada grupo de compuestos, como se muestra en la siguiente Tabla 10, y un sistema de elusión para el extracto crudo metanólico de AcOEt-*i*-PrOH-H₂O (81:10:9).

Tabla 10. Condiciones para la caracterización fitoquímica del extracto metanólico de *Alchornea coelophylla*.

	Alcaloides	Fenoles y Taninos	Esteroides, Triterpenos, Terpenos y Esteroles		
			Esteroides	Triterpenos	Terpenos y Esteroles
Control (+)	Papaverina	Ácido tánico	Lupeol & Lanosterol		
Revelador	Dragendorff	FeCl ₃ 5% en HCl 0,5 N	Liebermann-Burchard		
	Terpenos	Saponinas	Flavonoides	Lactonas y Sesquiterpenlactonas	Cumarinas
Control (+)	Lupeol	Digitonina	Apigenina	Digitoxina	Hidroxycoumarina
Revelador	Ácido Fosfomolibdico 5% en EtOH	H ₂ SO ₄ 10% en EtOH	AlCl ₃ 1% en EtOH	Kedde	KOH 5% en EtOH

Haciendo especial énfasis en la visualización de flavonoides para de manera general tener una leve idea del grado de presencia de dicho tipo de metabolitos.

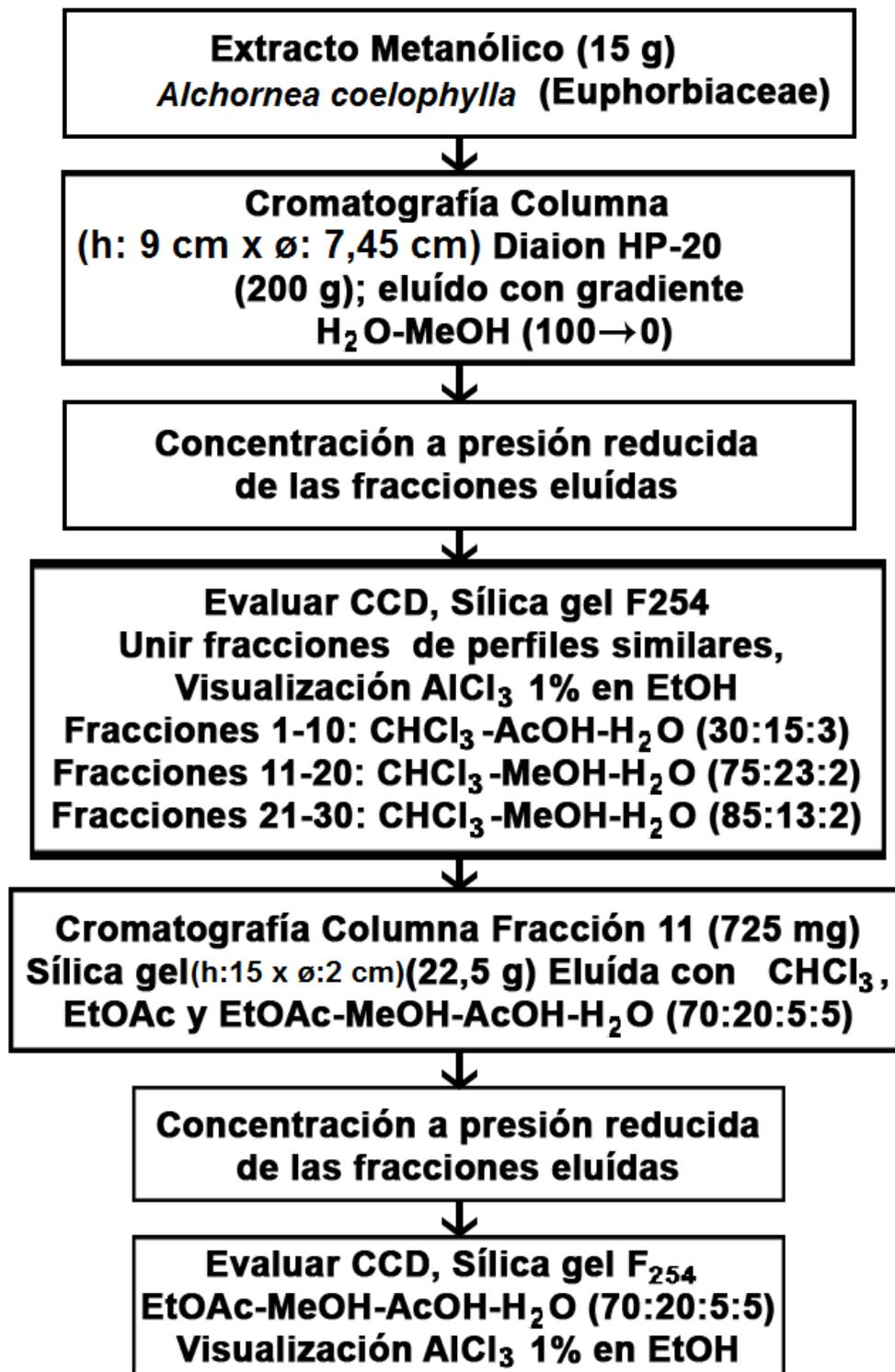


Figura 24. Procedimiento general para la separación de los flavonoides presentes en la especie *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae) adaptado de (Li *et al.*, 2002; Wei-Ku *et al.*, 2012).

Una vez caracterizado el extracto metanólico, se realizó un primer fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico con una columna DIAION HP-20 y un gradiente H₂O-MeOH, colectando volúmenes de 50 mL, con el fin de obtener unas primeras fracciones cromatográficas más enriquecidas y purificadas, donde el perfil cromatográfico de las fracciones eluidas fue evaluado por cromatografía de capa delgada (CCD), con sistemas de elución diferentes. Aquellos colectados que exhibían el mismo comportamiento por CCD fueron unidos, dando lugar a fracciones con mayor masa.

El soporte cromatográfico utilizado fue equilibrado previo a la aplicación de la muestra como lo recomienda el fabricante con un gradiente de metanol a agua utilizando cuatro veces el volumen del lecho (MITSUBISHI CHEMICAL CORP).

Tabla 11. Sistemas de elución de la columna cromatográficas DIAION HP-20.

Sistema de Elución	Volumen [mL]	Fracciones Colectadas
H ₂ O-MeOH (100:0)	1500	F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄ , F ₅
H ₂ O-MeOH (80:20)	1250	F ₆ , F ₇ , F ₈
H ₂ O-MeOH (60:40)	5550	F ₉ , F ₁₀ , F ₁₁ , F ₁₂ , F ₁₃ , F ₁₄ , F ₁₅ , F ₁₆ , F ₁₇
H ₂ O-MeOH (40:60)	4600	F ₁₈ , F ₁₉ , F ₂₀ , F ₂₁ , F ₂₂
H ₂ O-MeOH (20:80)	3700	F ₂₃ , F ₂₄ , F ₂₅ , F ₂₆ , F ₂₇
H ₂ O-MeOH (0:100)	2000	F ₂₈ , F ₂₉ , F ₃₀

Finalmente el perfil cromatográfico de la fracción 11 fue evaluada por HPLC bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Equipo: Agilent 1100 Series
- Columna: RESTEK Ultra AQ C18 3 μm (100 x 3,2) mm
- Fase Móvil: MeOH-HCOOH 1% (25:75)
- Flujo: 0,6 mL. min⁻¹
- Temperatura: 25 °C
- Longitudes de Onda de Detección: 254,4; 280; 330; 350 y 380 nm

Posterior a ello sometida a una segunda columna cromatográfica de Sílica Gel eluído con un sistema AcOEt-MeOH-AcOH-H₂O (70:20:5:5), colectando volúmenes de 10 mL. La evaluación de los perfiles de las fracciones obtenidas se realizó igualmente con el revelador de AlCl₃ al 1% en EtOH para visualizar los compuestos de estudio.

Posteriormente la fracción donde se presumía la presencia del compuesto de interés, fue caracterizada por HPLC, bajo las mismas condiciones anteriores, para continuar con el proceso de elucidación estructural por RMN.

5.5 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la elucidación estructural del flavonoide aislado de *Alchornea coelophylla*, se utilizaron las técnicas de espectroscopía infrarroja de absorción (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Para tal fin, los espectros infrarrojos del compuesto aislado fueron tomados en estado sólido con ayuda de un Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) Agilent Cary 630, cuya información ayuda con la identificación de los grupos funcionales presentes básicos, además de ser otra herramienta a la hora de realizar búsquedas bibliográficas en bases de datos.

Así, la toma de espectros de RMN a la muestra aislada se realizó en el Departamento de Química de la Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil) en un Espectrómetro Bruker AVANCE DRX 400, para lo cual se realizaron los siguientes experimentos utilizando como solvente hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO- d_6) con algunas gotas de D₂O.

- **¹H-RMN**
- **¹³C-RMN**
- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)**
- **HSQC-TOCSY (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy – Total Correlation Spectroscopy)**
- **COSY (Correlation Spectroscopy)**

Finalmente, con la información recopilada en los anteriores espectros, es posible realizar la determinación estructural a través de las correlaciones existentes entre átomos vecinos.

5.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.6.1 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo de ABTS^{•+}

La generación del radical catión debe ser considerada en los momentos previos a la realización de cada ensayo, dado que este no es suficientemente estable como para ser guardado por periodos de almacenamiento superiores a dos días. De esta manera, luego de la preparación de la cantidad necesaria de radical, se debe realizar una dilución del mismo para ajustar la absorbancia del mismo a $0.7 \pm (0,02)$ a una longitud de onda de 732 nm.

El protocolo seguido para la preparación de la solución del radical catión ABTS^{•+} se describe en la Figura 25, conjuntamente, se describe el método por el cual fueron evaluadas el extracto metanólico, las fracciones cromatográficas y el compuesto aislado. Para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo metanólico se preparó una solución a 1000 mg/L, posteriormente, dado que la masa con que se contaba para la determinación de las actividades de las fracciones era menor, se prepararon soluciones a 500 mg/L en metanol y para el compuesto aislado se realizó la determinación de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), concentración a la cual se observa una inhibición del 50% de la carga radicalaria inicial, a concentraciones de 500, 250, 100 y 50 ppm con ayuda de regresiones gráficas en el programa estadístico GraphPad Prism. Todas las determinaciones para este ensayo, fueron realizados por triplicado en dos repeticiones.

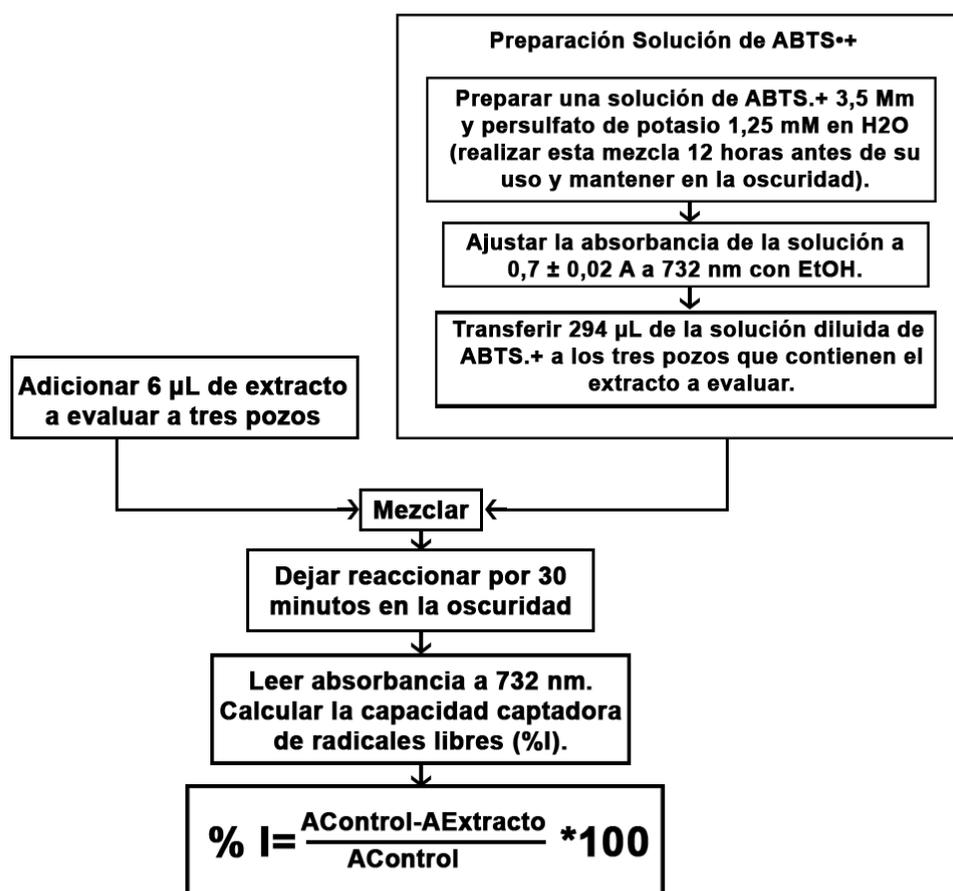


Figura 25. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999).

Para el ensayo, se utilizó hidroquinona a 1000 mg/L en etanol (preparada el mismo día) como control positivo. En la preparación del control negativo en lugar del extracto vegetal se utiliza 6 μ L del solvente en que fue disuelto el mismo para la determinación. El blanco fotométrico está compuesto por la mezcla de solventes respectiva, en este caso la solución de agua – etanol con que fue disuelto ABTS^{•+}. De forma análoga el blanco del extracto vegetal consiste en 6 μ L del extracto vegetal y 294 μ L del sistema en que fue disuelto el radical catión ABTS^{•+}.

5.6.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo de DPPH[•]

Este ensayo fue realizado a través del proceso de aislamiento a las fracciones cromatográficas obtenidas para observar cual era el perfil de actividades de las mismas e identificar cuales podían ser más promisorias para la separación. De esta manera, fueron preparadas soluciones de las fracciones y del compuesto aislado a una concentración de 500 mg/L y de 1000 mg/L del extracto crudo en metanol. Es de destacar que cada determinación se realizó por triplicado en dos repeticiones.

Igualmente debido a la notable inestabilidad del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), este fue preparado en matraces completamente cubiertos con papel aluminio a una concentración de 20 mg/L en metanol analítico.

Como control positivo se utilizó hidroquinona a 1000 mg/L en etanol (preparada el mismo día). En la preparación del control negativo en lugar del extracto vegetal se utiliza 25 μ L del solvente en que fue disuelto el mismo para la determinación. El blanco fotométrico está compuesto por la mezcla de solventes respectiva, en este caso metanol. De forma análoga el blanco del extracto vegetal consiste en 25 μ L del extracto vegetal y 100 μ L de metanol (solvente en que fue disuelto el radical DPPH[•]).

La determinación de la actividad antioxidante por medio de ensayo con DPPH[•] en microplacas, se realizó con base en la metodología propuesta por (Brand-Williams *et al.*, 1997) como se indica en la Figura 26.

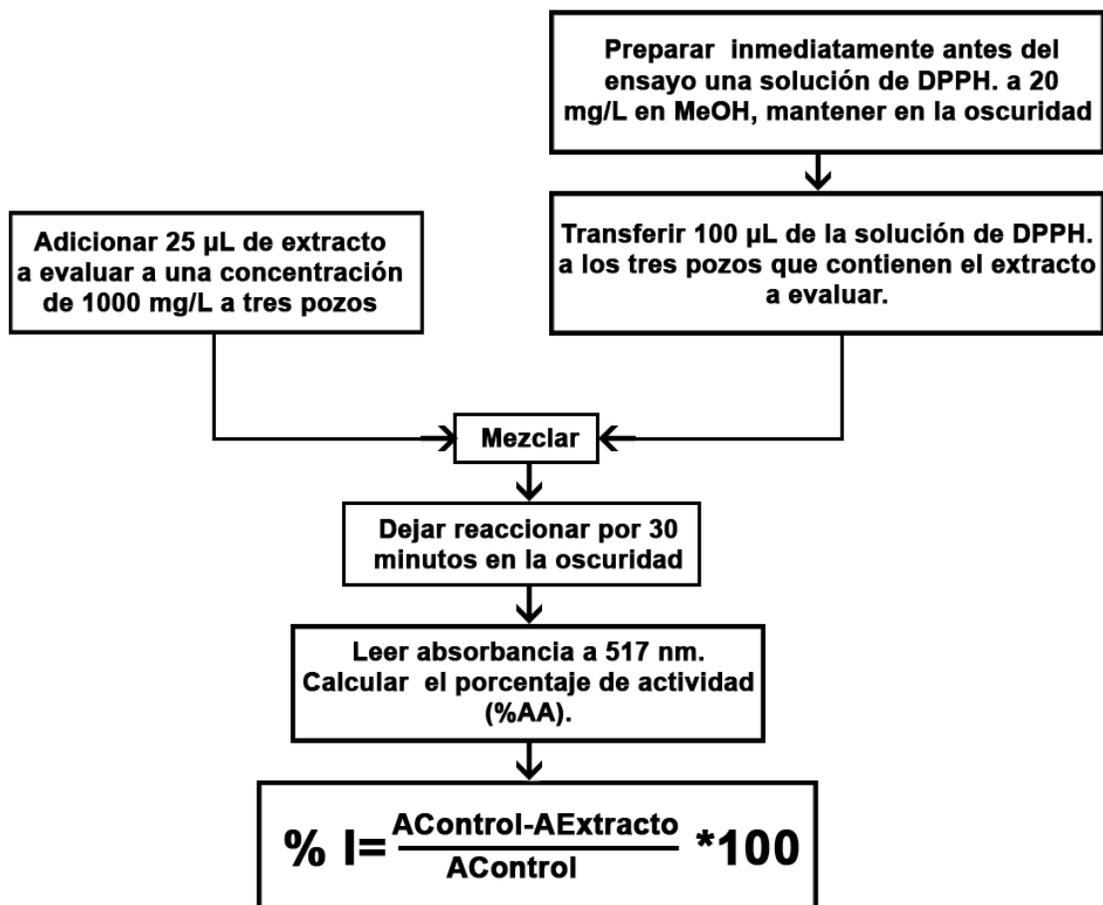


Figura 26. Protocolo para determinar la capacidad captadora de radicales libres por el ensayo DPPH[•] (Brand-Williams *et al.*, 1997).

Para las determinaciones de la capacidad captadora de radicales libres por ABTS^{•+} o DPPH[•], se diseña una distribución de la microplaca tal y como se muestra en la Figura 27.

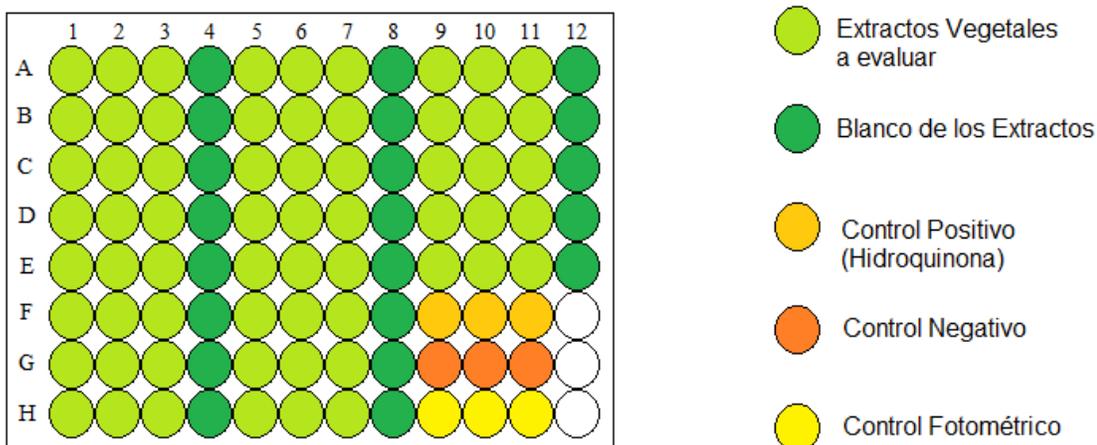


Figura 27. Distribución general de la microplaca para las determinaciones de actividad antioxidante.

5.6.3 Actividad antioxidante (A.A.) como equivalentes TROLOX

Dicha determinación se realiza con el fin de expresar ambas determinaciones como capacidad antioxidante de equivalentes Trolox (TEAC), y finalmente poder comparar resultados de actividad antioxidante medidos por diferentes métodos (ABTS^{•+} y DPPH[•]).

Para dicho ensayo, se construyeron curvas de calibración con concentraciones desde 1 μM hasta 100 μM del antioxidante de referencia Trolox en etanol para hacerlas reaccionar con los radicales correspondientes para cada ensayo, realizándose igualmente por triplicado y de este modo obtener la correlación matemática entre porcentaje de actividad según sea el caso y equivalentes Trolox.

5.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO POR MEDIO DE ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU

Para la realización de dicha cuantificación inicialmente fue elaborada una curva de calibración con referencia de ácido gálico a concentraciones de 0, 2, 4, 8, y 16 partes por millón debido a que las fuertes condiciones alcalinas proporcionadas por la base fuerte utilizada (NaOH) disminuye la sensibilidad de la técnica (Magalhães *et al.*, 2010). Por tal razón, dada la facilidad de formación del complejo coloreado a estas condiciones de pH, los extractos vegetales fueron evaluados posteriormente a una concentración de 50 mg/L en metanol con el fin de que estos se ajustaran a la curva de calibración. Además de ello la proporción de dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu fue de 1:50 con agua para que su absorbancia pudiera entrar en el rango de absorbancia de 0.2 a 0.8.

El ensayo con Folin-Ciocalteu, se realizó como se indica en la siguiente Figura 28. Las determinaciones, para efectuar la cuantificación fueron realizadas por triplicado en dos repeticiones.

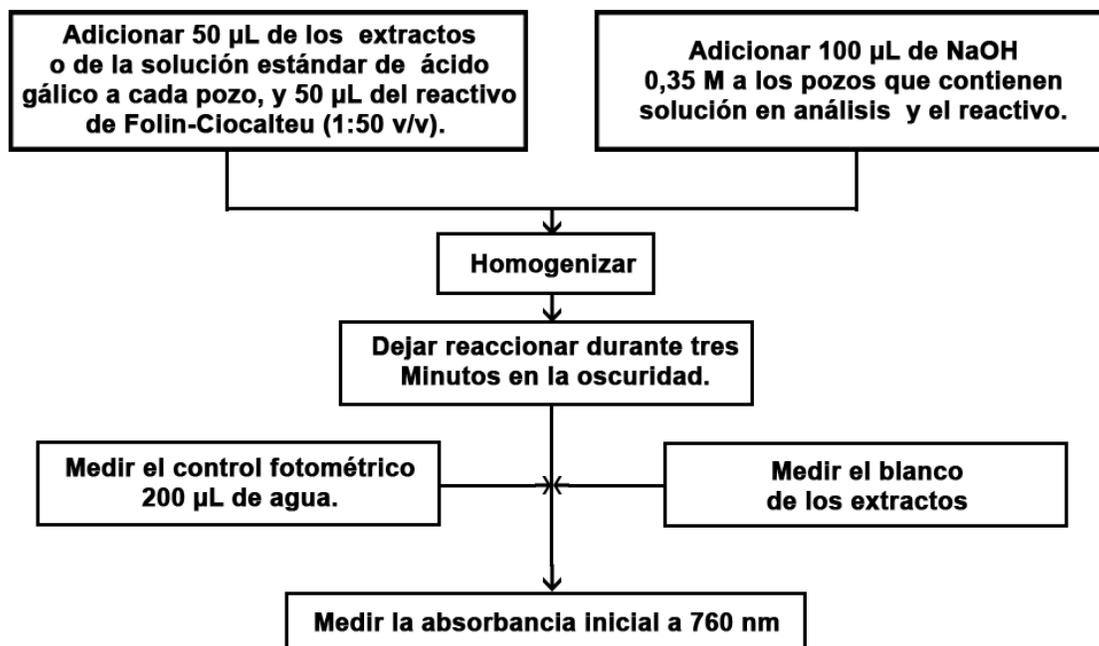


Figura 28. Determinación del contenido fenólico total por medio del ensayo por Folin-Ciocalteu (Magalhães *et al.*, 2010).

Para dicha evaluación el blanco del extracto, consistió en 50 µL de extracto y 150 µL de H₂O. De igual forma el blanco fotométrico se compone de los sistemas de dilución respectivos, en este caso 50 µL de metanol y 150 µL de H₂O.

Obteniendo una distribución de la microplaca, para la distribución y ubicación de todos los reactivos, patrones, blancos y controles, como se ilustra en la Figura 29 optimizando lo mejor posible la placa.

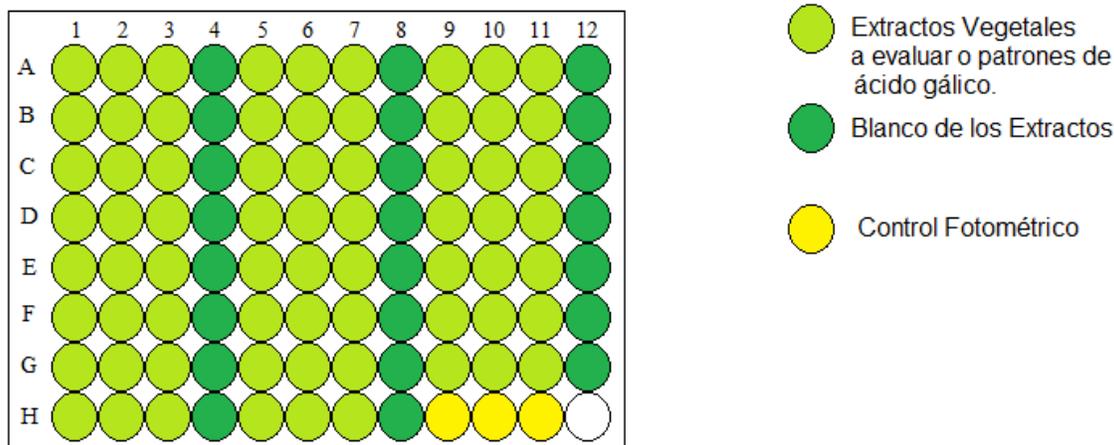


Figura 29. Distribución general de la microplaca para la determinación de actividad antioxidante por medio del ensayo por Folin-Ciocalteu

5.8 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

La determinación de flavonoides en microplacas, mediante el ensayo con $AlCl_3$, se llevará a cabo como se ilustra en la Figura 30.

Para dicho ensayo, el blanco fotométrico consistió en la mezcla correspondiente de solventes; 242 μL de H_2O y 300 μL de EtOH. De igual forma el blanco de cada fracción consistió en 20 μL de la solución de extracto evaluado con 252 μL de blanco fotométrico. Las determinaciones, para efectuar la cuantificación fueron realizadas por triplicado en dos repeticiones.

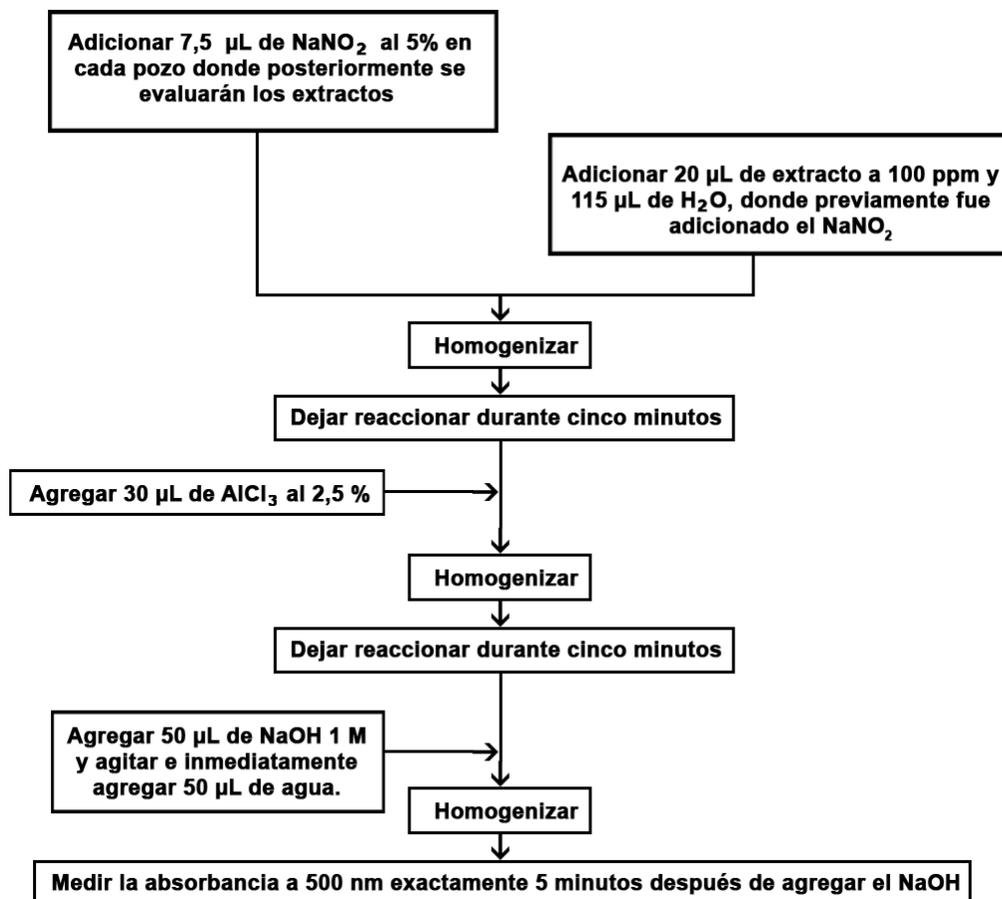


Figura 30. Cuantificación de flavonoides con AlCl_3 (Kim *et al.*, 2003).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES

6.1.1 Obtención y caracterización del extracto metanólico

Una vez recolectados y molidos los 1212 g de la parte aérea de *Alchornea coelophylla*, material recolectado en las coordenadas indicadas, fue obtenido el extracto metanólico por maceración dando lugar a 91.0997 g del mismo por concentración a presión reducida hasta su completa sequedad, reflejando un rendimiento porcentual de 7.52%.

De esta manera con el extracto metanólico obtenido, se realizó una caracterización fitoquímica del extracto, con especial énfasis en la visualización

de flavonoides presentes en el mismo (Véase Figura 31), logrando elucidar la presencia de los núcleos fitoquímicos enlistados en la Tabla 12. Destacando la amplia presencia de flavonoides en el extracto metanólico.

Tabla 12. Núcleos fitoquímicos del extracto metanólico de *Alchornea coelophylla*.

Alcaloides	Fenoles y Taninos	Esteroides, Triterpenos, Terpenos y Esteroles		
		Esteroides	Triterpenos	Terpenos y Esteroles
-	++	-	-	+
Terpenos	Saponinas	Flavonoides	Lactonas y Sesquiterpen-lactonas	Cumarinas
+	-	+++	-	-

(-): Ausencia del núcleo (+): Presencia del núcleo (++): Presencia intermedia (+++): Presencia abundante.

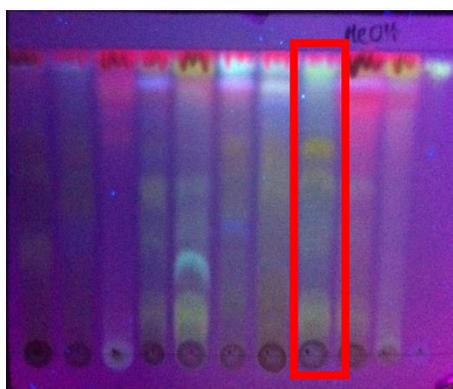


Figura 31. Flavonoides presentes en el extracto metanólico crudo de *Alchornea coelophylla* por CCD visualizados bajo luz ultravioleta de onda corta 254 nm.

6.1.2 Separación cromatográfica

Posterior a la caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada, se realizó una primera etapa de purificación cromatográfica mediante la aplicación de 15.0641 g del extracto metanólico preabsorbido con más soporte cromatográfico cumpliendo una relación de 1:2 en muestra aplicada-soporte, sobre una columna a gravedad empacada con un soporte DIAION HP-20 de interacción hidrofóbica por grupos poliestireno y efecto de exclusión de tamaño a través de la absorción de macromoléculas dado su tamaño de poro de ~260 Å.

De esta manera se eluyeron los compuestos de interés, teniendo en cuenta que fueron retenidos compuestos de gran tamaño como polisacáridos y/o proteínas, al igual que moléculas menos polares por las interacciones mencionadas.

Para tal fin fueron colectadas 399 fracciones de 50 mL que de forma simultánea fueron analizadas por cromatografía de capa delgada (CCD) (Véase Anexo I) fase normal sobre sílica gel 60 F₂₅₄, con un sistema de elución AcOEt-AcOH-H₂O (30:15:2) y reveladas con AlCl₃ 1% en EtOH visualizando bajo luz UV a 254 nm con el fin de observar el perfil cromatográfico de las mismas y poder unir fracciones que mostraron patrones similares con el fin de obtener fracciones más representativas en términos de masa. De esta manera fueron obtenidas 30 fracciones cuyas masas se encuentran reportadas en la Tabla 13.

Tabla 13. Masas y rendimientos porcentuales de las fracciones finales obtenidas luego del proceso de elución de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

Fracción	Colectados	Masa [g]	% de rendimiento
1	F ₁ -F ₇ MeOH-H ₂ O (0:100)	1.4575	9.71
2	F ₈ -F ₁₀ MeOH-H ₂ O (0:100)	0.3108	2.07
3	F ₁₁ -F ₁₄ MeOH-H ₂ O (0:100)	0.1995	1.33
4	F ₁₅ -F ₁₉ MeOH-H ₂ O (0:100)	0.093	0.62
5	F ₂₀ -F ₃₀ MeOH-H ₂ O (0:100)	0.0137	0.09
6	F ₁ -F ₄ MeOH-H ₂ O (20:80)	0.0219	0.15
7	F ₅ -F ₁₆ MeOH-H ₂ O (20:80)	0.3066	2.04
8	F ₁₇ -F ₂₅ MeOH-H ₂ O (20:80)	0.3229	2.15
9	F ₁ -F ₅ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.2471	1.65
10	F ₆ -F ₈ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.7945	5.30
11	F ₉ -F ₁₅ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.9553	6.37
12	F ₁₆ -F ₁₉ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.3628	2.42
13	F ₂₀ -F ₄₂ MeOH-H ₂ O (40:60)	1.0863	7.24
14	F ₄₃ -F ₅₁ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.1552	1.03

15	F ₅₂ -F ₅₇ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.0773	0.52
16	F ₅₈ -F ₆₄ MeOH-H ₂ O (40:60)	0.0694	0.46
17	F ₆₅ -F ₁₁₁ MeOH- H ₂ O (40:60)+ F ₁ -F ₅ MeOH-H ₂ O (60:40)	0.3963	2.64
18	F ₆ -F ₇ MeOH-H ₂ O (60:40)	0.0363	0.24
19	F ₈ -F ₁₇ MeOH-H ₂ O (60:40)	0.8514	5.68
20	F ₁₈ -F ₃₅ MeOH-H ₂ O (60:40)	0.2582	1.72
21	F ₃₆ -F ₇₇ MeOH-H ₂ O (60:40)	0.3408	2.27
22	F ₇₈ -F ₉₂ MeOH-H ₂ O (60:40) + F ₁ -F ₅ MeOH-H ₂ O (80:20)	0.0763	0.51
23	F ₆ -F ₂₁ MeOH-H ₂ O (80:20)	0.6604	4.40
24	F ₂₂ -F ₂₇ MeOH-H ₂ O (80:20)	0.0857	0.57
25	F ₂₈ -F ₃₉ MeOH-H ₂ O (80:20)	0.1348	0.90
26	F ₄₀ -F ₄₉ MeOH-H ₂ O (80:20)	0.0832	0.55
27	F ₅₀ -F ₇₄ MeOH-H ₂ O (80:20) + F ₁ -F ₄ MeOH-H ₂ O (100:0)	0.1998	1.33
28	F ₅ -F ₇ MeOH-H ₂ O (100:0)	0.5339	3.56
29	F ₈ -F ₃₆ MeOH-H ₂ O (100:0)	1.0736	7.16
Porcentaje de Rendimiento Total			74.69

Para obtener una mejor visualización general del contenido de flavonoides en las nuevas fracciones enriquecidas obtenidas, se buscaron sistemas de elución más optimizados. Proceso que dio como resultado la clasificación de las 30 fracciones en tres grupos.

Es así que para las diez primeras fracciones fue necesario un sistema de elución mucho más polar (P': 5.25) debido a que ellas fueron colectadas en los

momentos donde el agua constituía una mayor parte de los sistemas con los cuales se estaba eluyendo la columna de DIAION HP-20. El sistema utilizado para estas fracciones fue $\text{CHCl}_3\text{-AcOH-H}_2\text{O}$ (30:15:3). En la figura 32, se muestra la separación de las diez primeras fracciones.

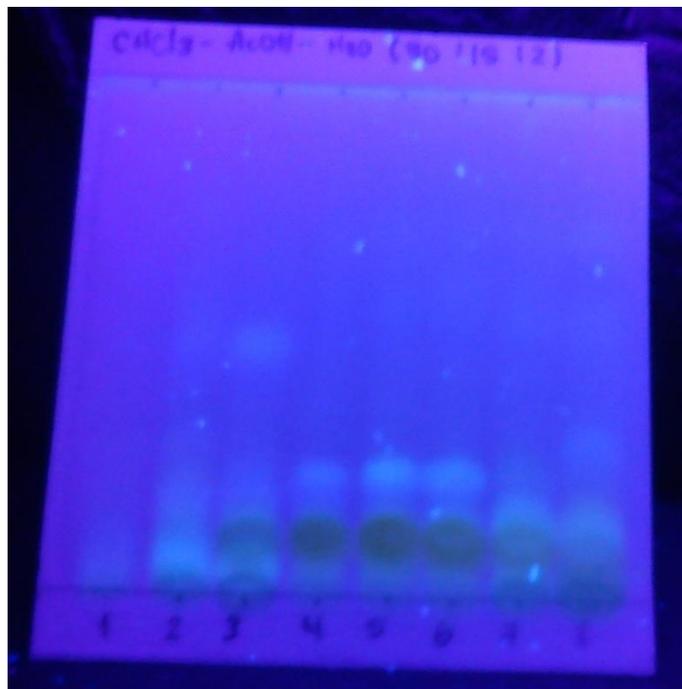


Figura 32. Fracciones de la uno a la diez de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

En la medida en la que la cantidad de metanol aumentaba en los sistemas de elución utilizados, la polaridad de las siguientes diez fracciones (de la 11 a la 20) disminuyó un poco por lo que fue necesario un sistema $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (75:23:2) cuyo P' : 4.77 para lograr una mejor separación de los flavonoides presentes en las mismas, como se ilustra en la Figura 33.

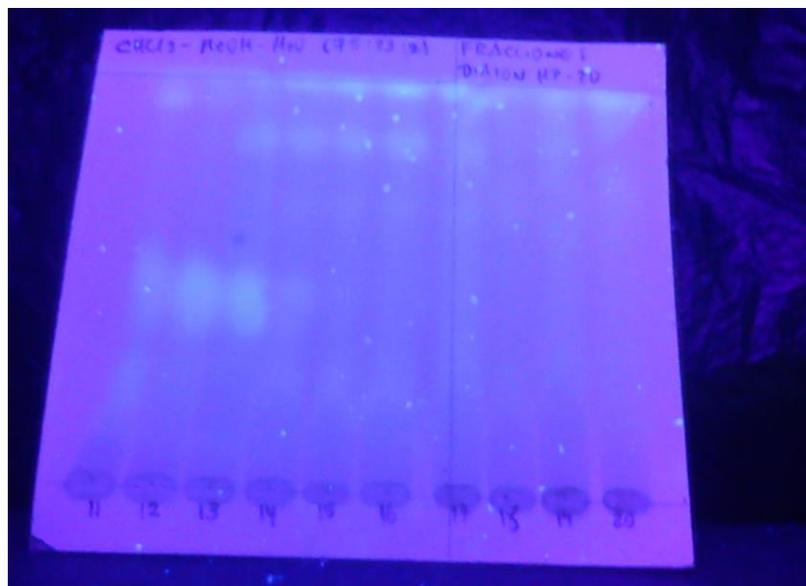


Figura 33. Fracciones de la once a la veinte de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

Finalmente las diez últimas fracciones, de la 21 a la 30, que fueron eluidas con fases móviles donde el metanol constituía la mayor parte, demostraron ser menos polares, razón por la cual para obtener una separación de estas fracciones como se muestra en la Figura 34 se utilizó un sistema $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (85:13:2) menos polar, con un P' de 4.5.

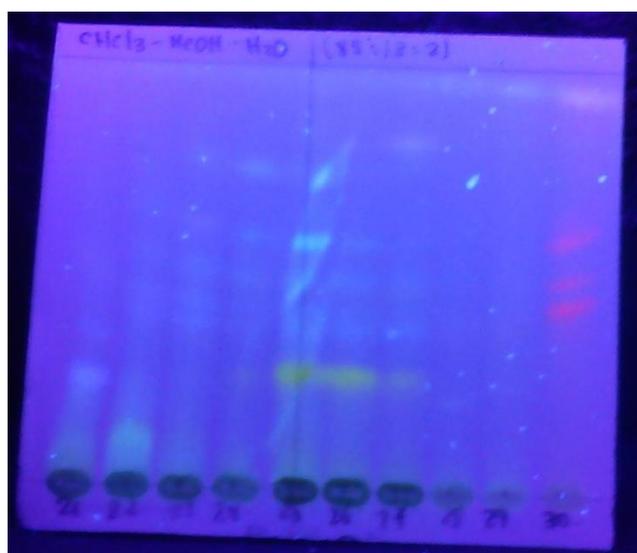


Figura 34. Fracciones de la veintiuno a la veintinueve de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

Cuando fue terminado este primer proceso cromatográfico, una vez se confirmó la presencia de flavonoides en todas las fracciones obtenidas, una selección

primaria de las fracciones más promisorias fue realizado en términos de la masa con que estas contaban. Para lo cual se decidió continuar con las fracciones que presentaban una masa mayor a 300 mg, puesto que considerar fracciones de masas menores no resulta práctico en cuanto a que se corre el riesgo de que la masa del compuesto aislado obtenido al final sea mucho menor a la necesaria para completar la elucidación estructural del mismo por técnicas espectroscópicas.

Cuando fue realizado este primer tamizaje, se realizó la medición de la actividad biológica de las mismas (Actividad Antioxidante por ABTS^{•+} y DPPH[•]), y la cuantificación de fenoles y flavonoides con el fin de identificar finalmente la fracción más promisorias para continuar con el aislamiento de un flavonoide con actividad antioxidante, teniendo con esto un tipo de aislamiento bioguiado (Véase 3. Actividad Antioxidante y Cuantificaciones de Fenoles y Flavonoides).

Con ayuda de todos estos procesos de clasificación, se pudo determinar que la fracción 11 era la fracción más promisorias para continuar con los procesos de separación, para lo cual se le realizó un perfil cromatográfico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Véase Anexo II) con el fin de conocer un poco más de cerca la composición química de la misma, y de igual manera poder obtener el espectro de absorción del compuesto de interés, herramienta que facilitaría su búsqueda a la hora de caracterizar posteriores fracciones cromatográficas.

Conociendo de manera más detallada la composición de la misma, se observó que no correspondía al caso de una mezcla compleja, y se considera la realización de una segunda columna de separación cromatográfica con Sílica gel 0.04-0.063 mm/ 230-400 mesh.

Para tal fin se realizaron diversas placas cromatográficas en las que se observó una considerable separación del componente principal presente en dicha fracción. Esta separación fue obtenida con una fase móvil AcOEt-MeOH-AcOH-H₂O (70:20:5:5), como se ilustra en la siguiente Figura 35. Donde aumentando la polaridad un poco a un P': 4.86, con respecto al sistema utilizado en la visualización general de las fracciones (Véase Figura 33), se logra la visualización clara de dos componentes principales, una mancha a un R_f de 0.425 y otro a un R_f de 0.625.



Figura 35. Cromatoplasmas de la Fracción 11 con el nuevo sistema de elución, visualizado para flavonoides.

Una vez hallado el sistema de elución adecuado donde se logra una buena separación de los componentes flavonólicos presentes en la fracción, se adecuó una columna con Sílica gel cumpliendo una relación soporte-muestra de 1:30. A lo cual fueron necesarios 22.5 g de soporte para los 750 mg de fracción destinados a la misma. Igualmente a la hora de sembrar la muestra en la columna, esta se pre-absorbió con 1.5 g de sílica.

Una vez fue sembrada la muestra, se procedió con la elución de la misma con diversos solventes en orden de polaridad creciente con el fin de optimizar aún más la purificación y ayudar a retirar compuestos con polaridades menores a la hora de utilizar el sistema específico para la separación de los compuestos de interés. Por esta razón se utilizaron aproximadamente 10 veces el volumen del lecho con cloroformo y acetato de etilo, donde con ayuda de cromatografía de capa delgada se corroboró que no existía pérdida por arrastre de los compuestos de carácter flavonólico al revelar con $AlCl_3$.

Finalmente luego fue utilizado el sistema de elución con el cual si se experimentaba elución de los componentes de interés, colectando volúmenes de 10 mL con el fin de optimizar la separación fueron obtenidas las siguientes fracciones.

Tabla 14. Fracciones eluidas de la columna cromatográfica de Sílica gel con el sistema AcOEt-MeOH-AcOH-H₂O (70:20:5:5).

Código	Fracción	Masa [mg]	% de Rendimiento
A	CHCl ₃ + AcOEt 1-12 + Sistema 1-4	283.3	37.7
B	F ₄ -F ₆	181.4	24.2
C	F ₇ -F ₉	114.4	15.2
D	F ₁₀ -F ₁₁	24.3	3.2
E	F ₁₂ -F ₁₅	34.5	4.6
F	F ₁₆ -F ₂₂	34.3	4.6
G	F ₂₃ -F ₂₈	12.8	1.7
Porcentaje de Rendimiento Total			91.2

De manera similar a lo ocurrido con la columna anterior, los colectados que tenían una composición similar por CCD se unieron; de igual forma se logró la colección de uno de los componentes principales en la Fracción C.

Como se ilustra en la siguiente Figura 36, los colectados correspondientes a la fracción C, son los únicos que exhiben un comportamiento mejor en cuanto a su pureza, puesto que fracciones más allá de la misma revelan poseer un alto número de componente, entre ellos el segundo componente de interés.

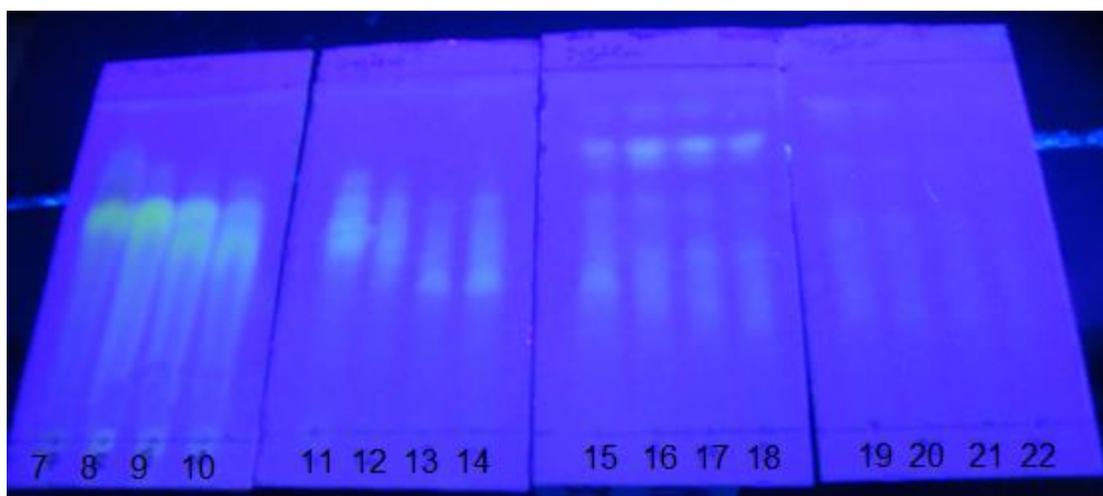


Figura 36. Colectados de la segunda columna cromatográfica.

Luego de que las fracciones finales fueran obtenidas, fue evaluado de nuevo el perfil de las fracciones resultantes por CCD utilizado el mismo sistema de elución, con especial énfasis en la fracción C, dada la presencia de una sola mancha indicativa de la presencia de este tipo de compuestos, hecho que se puede observar en la siguiente Figura 37.

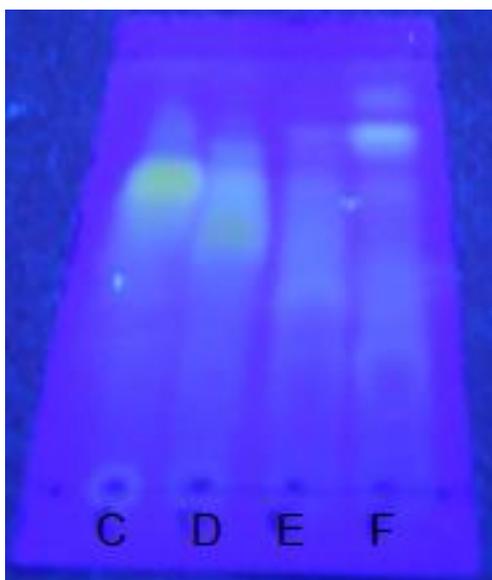


Figura 37. Fracciones resultantes de la segunda columna cromatográfica.

Una vez se tuvo un acercamiento al perfil cromatográfico de la fracción C, fracción donde posiblemente se encontraba alguno de nuestros componentes de interés en un grado considerable de pureza, se decidió realizar una visualización de la misma por HPLC bajo las mismas condiciones cromatográficas utilizadas con la fracción 11 (Véase Anexo III).

Finalmente una vez se tuvieron suficientes herramientas para considerar un grado alto de pureza del componente de interés presente en la fracción C, se decidió realizar la toma de espectros de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la posterior identificación del mismo.

6.2 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

6.2.1 Espectroscopía de absorción ultravioleta (UV) e infrarroja (IR)

Completado el proceso de aislamiento, a partir de la fracción C fueron adquiridos los espectros de absorción ultravioleta e infrarroja para lograr un acercamiento al tipo de núcleo flavonólico al que corresponde el compuesto mayoritario de la fracción C y la identificación de los principales grupos funcionales de este tipo de compuestos flavonólicos, con la respectiva información brindada por cada una de estas técnicas.

El espectro de absorción ultravioleta corresponde al obtenido al realizar la caracterización de la fracción C por HPLC con el detector de arreglo de diodos, presentado en el Anexo III. En dicho espectro, se observa la presencia de dos bandas de fuerte absorción, guardando correlación con el tipo de espectro esperado para los flavonoides (Andersen *et al.*, 2006), ubicadas a unas longitudes de onda de 230 y 290 nm, para las bandas II y I, respectivamente. Comportamiento que se asemeja a las aproximaciones experimentales determinadas por (Mabry *et al.*, 1969) para las flavonas y flavonoles cuya ubicación de las bandas corresponde generalmente en 240-280 nm para la banda II y de 300-380 nm para la banda I.

Igualmente la intensidad de las mismas ofrece información estructural respecto de los patrones de oxidación de los sistemas aromáticos A y B. Es así que compuestos de tipo flavona o flavonol que presentan un mayor grado de oxigenación en el anillo aromático A con respecto al B, mostrarán una banda de absorción II mucho más intensa y una banda I considerablemente más débil, comportamiento muy similar a lo observado en el espectro de absorción para el compuesto presente en la Fracción C, presentado en el Anexo III.

Igualmente para el espectro de absorción infrarroja ilustrado en la Figura 38, se pueden identificar fuertes señales de absorción a diferentes valores de frecuencia (cm^{-1}), señales enlistadas la Tabla 15.

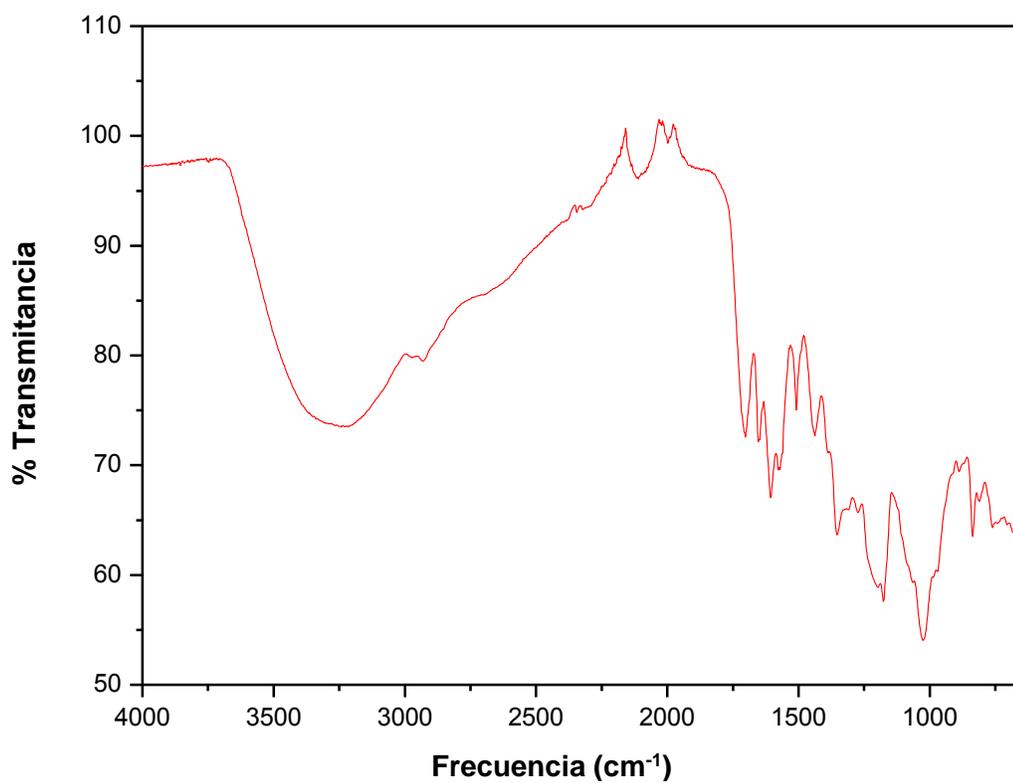


Figura 38. Espectro de absorción infrarroja para el compuesto presente en la fracción C.

Tabla 15. Bandas de absorción infrarroja del compuesto presente en la fracción C (Pavia *et al.*, 2009; Heneczkowski *et al.*, 2001).

Frecuencia (cm ⁻¹)	Descripción	Atribución
3400	Banda muy ancha y fuerte	Tensión enlace O-H
2970	Bandas acopladas a la señal de O-H de intensidad media	Tensiones CH ₃ y CH ₂
2925		
1700	Banda estrecha de intensidad media	Tensión enlace C=O
1650	Banda estrecha de intensidad media	Tensión C=C heterociclo
1600	Doblete de intensidad media, ancho	Vibraciones de esqueleto por tensión de C-C de aromáticos
1560		
1500	Banda estrecha de intensidad media	Vibraciones de esqueleto por tensión de C-C de aromáticos
1430	Banda estrecha débil	Flexión C-H para -CH ₂ - en el plano
1350	Banda estrecha de intensidad media	Flexión C-H para metilos
1300	Banda estrecha de intensidad media	Deformaciones por vibración del enlace C-OH
1260	Banda estrecha de intensidad media	Flexión del enlace Csp ² -H en el plano
1200	Doblete intenso y ancho	Tensión del enlace C-O-C tipo éter
1175		
1025	Banda fuerte y ancha	Tensión del enlace C-O
830	Banda estrecha de intensidad media	Flexión del enlace Csp ² -H fuera del plano
800	Banda estrecha débil	

Finalmente una vez atribuidos los grupos funcionales a las señales de absorción apreciadas, se contempló la posibilidad de poseer un núcleo flavonólico posiblemente glicosidado debido a las evidencias de unión tipo éter, y la notable contribución que estos pueden hacer para la existencia de la fuerte señal a grupos hidroxilo.

6.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Una vez fue aislado el compuesto de interés, se dispuso de 20 mg del mismo en hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) para la adquisición de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear en un espectrómetro BRUKER AVANCE DRX-400 (400 MHz), en las instalaciones del Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução del Departamento de Química de la Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) en Belo Horizonte, Brasil.

Para tal fin fueron adquiridos espectros unidimensionales de protón (¹H-RMN) y de carbono (¹³C-RMN), al igual que espectros bidimensionales homo (COSY) y heteronucleares (HMBC y HSQC-TOCSY).

Cabe mencionar que al momento de tomar los espectros, fueron adicionadas gotas de agua deuterada (D₂O) para intercambiar el agua que había sido absorbida por parte del DMSO-*d*₆ y que pudiera asociarse a los grupos hidroxilo del compuesto.

De esta manera se logró la adquisición de los espectros unidimensionales presentados en el Anexo IX, cuyos desplazamientos químicos son enlistados y caracterizados en las Tablas 16 y 17, teniendo en cuenta las estructuras ilustradas en la Figura 39 y sus respectivos sistemas de nomenclatura.

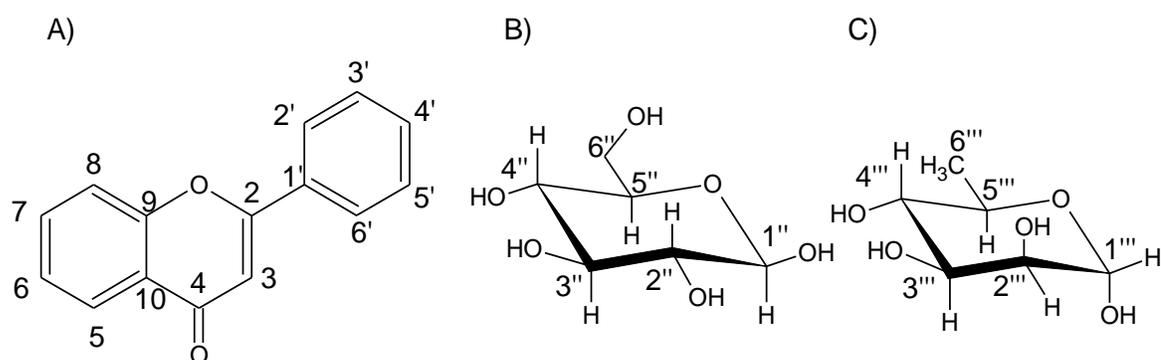


Figura 39. Estructuras químicas de los compuestos con los desplazamientos descritos en las Tablas 16 y 17. A) estructura básica de un flavonoide, B) glucosa, C) ramnosa.

Tabla 16. Desplazamientos químicos para las señales del espectro ¹H-RMN presente en el Anexo IX para la fracción C.

H	δ [ppm]	H	δ [ppm]	H	δ [ppm]
3	7.00 (<i>s</i>)	1''	4.74 (<i>d</i>)	1'''	4.94 (<i>s</i>)
6	6.73 (<i>s</i>)	2''	3.25	2'''	3.92
8	6.27 (<i>s</i>)	3''	3.5	3'''	3.81
2'	8.00 (<i>d</i>)	4''	3.42	4'''	3.45
3'	6.95 (<i>d</i>)	5''	3.46	5'''	3.79
5'	6.95 (<i>d</i>)	6''	3.72	6'''	0.45 (<i>d</i>)
6'	8.00 (<i>d</i>)				

Multiplicidades (*s*): singlete; (*d*): doblete.

Tabla 17. Desplazamientos químicos para las señales del espectro ^{13}C -RMN presente en el Anexo IX para la fracción C.

C	δ [ppm]	C	δ [ppm]	C	δ [ppm]
2	164.00	1'	121.6	4''	70.46
3	104.22	2'	128.99	5''	79.9
4	182.10	3'	115.89	6''	61.17***
5	161.20	4'	160.67	1'''	102.43
6	98.29	5'	115.89	2'''	71.49
7	162.34	6'	128.99	3'''	70.67
8	81.81	1''	100.32	4'''	71.68
9	155.83	2''	68.22	5'''	70.26
10	104.47	3''	75.09	6'''	17.71

***Señal con fase negativa (\downarrow) en el espectro DEPT 135° (Véase Anexo IX)

Al obtener los espectros, las señales más representativas de grupos funcionales y núcleos flavonólicos fueron identificadas, al igual que información importante, que este tipo de experimentos unidimensionales pueden aportar en cuanto a la distribución espacial de los compuestos, como por ejemplo la configuración anomérica de los residuos de carbohidrato presentes en el glicósido.

Es así que se puede distinguir la señal del grupo cetona presente en el anillo del tipo pirano (C_4) (δ : 182.10 ppm), por ser la señal de carbono más desplazado a campo bajo. Igualmente mediante comparaciones con la bibliografía, se pueden descartar algunos grupos flavonólicos que se diferencian principalmente en el patrón de oxidación y/o insaturación del carbono 3 (δ : 104.22 ppm), por las señales ausentes en los espectros obtenidos, como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Señales ausentes de algunos grupos flavonólicos (Ternai *et al.*, 1975; Ternai *et al.*, 1976; Ternai *et al.*, 1977)

	δ [ppm] C_3
Flavonol ($\text{C}_3\text{-OH}$)	138.13
Dihidroflavona ($\text{C}_3\text{-H}_2$)	42
Dihidroflavonol ($\text{C}_3\text{-H,OH}$)	71.7
Flavano ($\text{C}_3\text{-H}_2$) (Ausencia grupo ceto C_4)	65.1
Isoflavona ($\text{C}_3\text{-Anillo B}$)	123.4
Chalcona (Ausencia anillo pirano, $\text{C}_3\text{-Insaturado}$)	117.8

Teniendo toda esta información en cuenta se puede inferir la presencia de un compuesto de tipo flavona como mayor componente de la fracción C. De igual forma, mediante la información brindada, se pueden realizar inferencias acerca de las señales ubicadas a 4.74 y 4.94 ppm ($^1\text{H-RMN}$) y 100.32 y 102.43 ppm ($^{13}\text{C-RMN}$) las cuales hacen referencia a los protones y carbonos anoméricos de los residuos de glucosa y ramnosa, carbohidratos que fueron tenidos en cuenta debido a la presencia de sus dos señales representativas, las cuales corresponden al carbono metilénico de la glucosa (C_6) y el carbono metílico de la ramnosa (C_6).

Además que observando las multiplicidades de ambas señales en el espectro protónico se pueden dilucidar las configuraciones anoméricas de ambos carbohidratos, correspondientes β y α , para la glucosa y la ramnosa, respectivamente, puesto que en la configuración β la constante de acoplamiento con el protón dos de la molécula ($^3J_{1,2}$) es mayor (6-8) Hz por cuenta de la disposición antiperiplanar, situación contraria con la multiplicidad de singlete de la señal correspondiente al protón anomérico α de la Ramnosa puesto que la disposición sinclinal de los dos átomos disminuye la constante de acoplamiento $^3J_{1,2}$ de (1-4) Hz (Agrawal *et al.*, 1992), correlaciones que se muestran en la Figura 40 al interior de ambos carbohidratos.

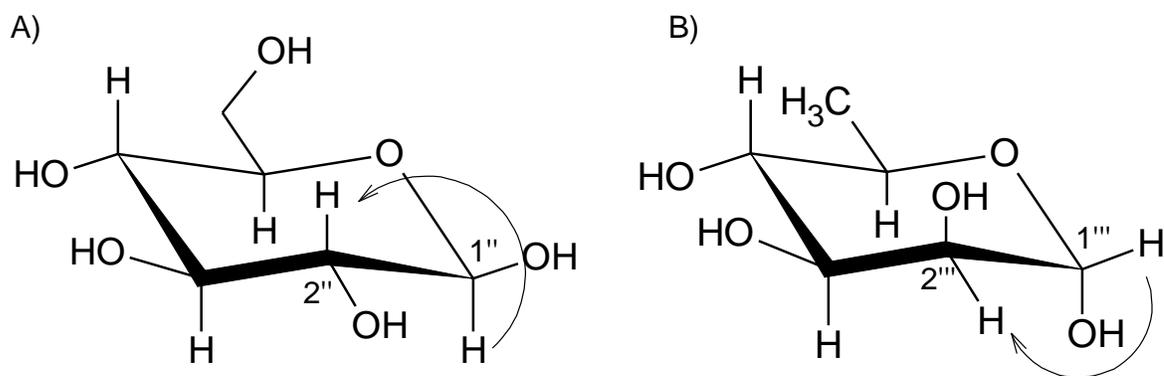


Figura 40. Correlaciones de los protones anoméricos con el protón dos para los carbohidratos A) β -glucosa, B) α -ramnosa.

Igualmente se observan algunas señales de mayor intensidad, correspondientes al $\text{DMSO-}d_6$ ($^1\text{H-RMN}$: 2,5 ppm; $^{13}\text{C-RMN}$: 40 ppm) en el cual fue disuelta la fracción C, y al ácido acético ($^1\text{H-RMN}$: 1.9 ppm; $^{13}\text{C-RMN}$: 21.08 y 172.06 ppm) presente en el sistema de elución de la última columna cromatográfica. Es esta la razón por la cual también se observa un corrimiento significativo por parte de algunas señales, como la de los protones metílicos de la ramnosa que normalmente aparecen a un desplazamiento de 1.28 ppm. Adicional a ello, no

se observa la señal esperada del D₂O en aproximadamente 4.7 ppm, debido a que la secuencia de pulso utilizada ZGCPPR (presaturación de señal de solvente por pulsos compuestos), realiza la supresión de la misma.

Cabe mencionar que una vez teniendo una idea de la composición básica del compuesto en cuanto a los grupos funcionales principales, se procedió con el análisis de las correlaciones principales observadas en los espectros bidimensionales (Anexo IX) por parte de las señales tabuladas.

Es así que en los espectros bidimensionales se evidencian sistemas de correlaciones características para el sistema aromático del anillo B. Lo que indica la presencia o ausencia de los grupos hidroxilo catecólicos. De esta manera, las correlaciones de los núcleos 2' y 6' con la señal correspondiente a los átomos 3' y 5' observadas en las Figuras 42 y 43, indica la existencia de un eje de simetría en dicho sistema aromático lo que sugiere una única sustitución en el carbono 4' como se ilustra en la Figura 41.

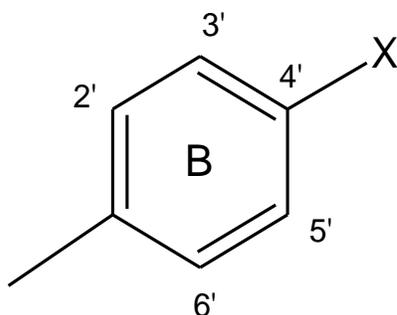


Figura 41. Disposición simétrica del sistema aromático B, reflejando una sustitución *para*.

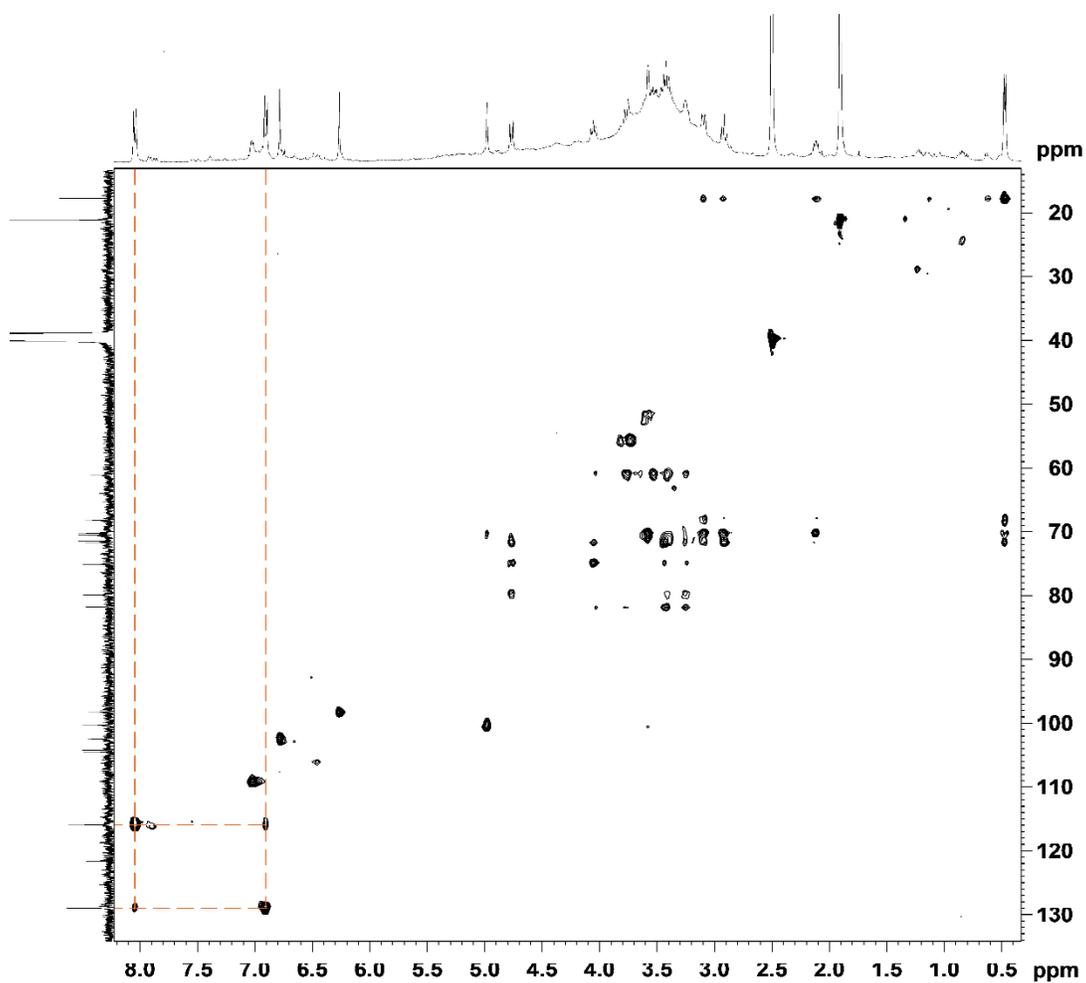


Figura 42. Espectro bidimensional heteronuclear HSQC-TOCSY del compuesto de la Fracción C.

De igual manera dicho perfil de correlaciones se hace evidente por parte de los mismos átomos en el espectro COSY homonuclear.

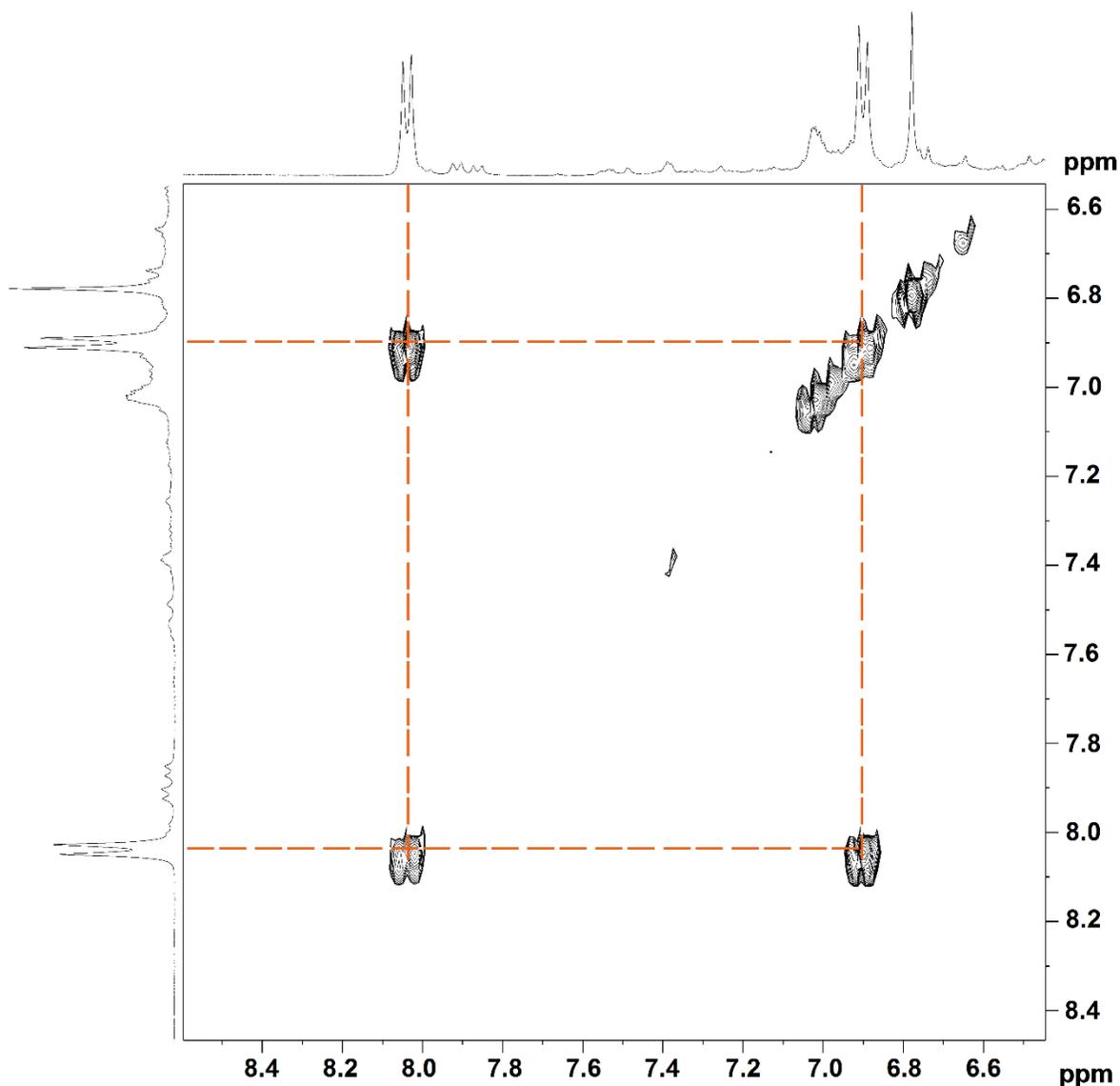


Figura 43. Espectro bidimensional homonuclear COSY del compuesto de la Fracción C.

Otras correlaciones igualmente significativas son las que se observan por parte de los hidrógenos permutables H₆ (6.73 ppm) y H₈ (6.27 ppm) respecto del carbono carbonílico C₄ (182.10 ppm) (Ver Figura 44), al igual que la diferencia en cuanto a la detección de los mismos con el carbono C₅ (161.20 ppm). Igualmente que la interacción del carbono C₂ (164 ppm) con los protones H_{2'} y H_{6'} del sistema aromático del anillo B y el protón H₃ (7 ppm), correlaciones ilustradas en la Figura 45. Correlaciones ilustradas en el espectro HMBC (Figura 46).

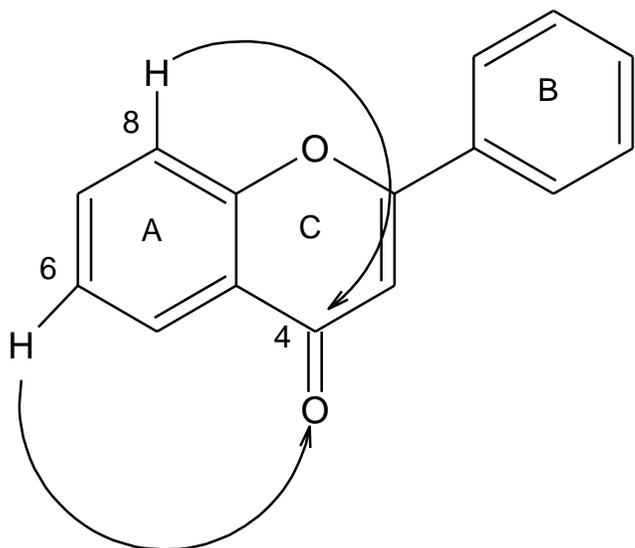


Figura 44. Detección de los hidrógenos permutables H₆ y H₈, respecto del carbono carbonílico C₄.

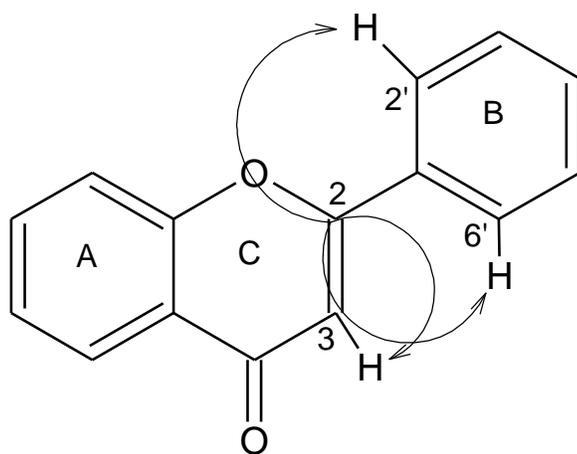


Figura 45. Detección del C₂ con los protones aromáticos H₆ y H₈ y el protón H₃ de la insaturación.

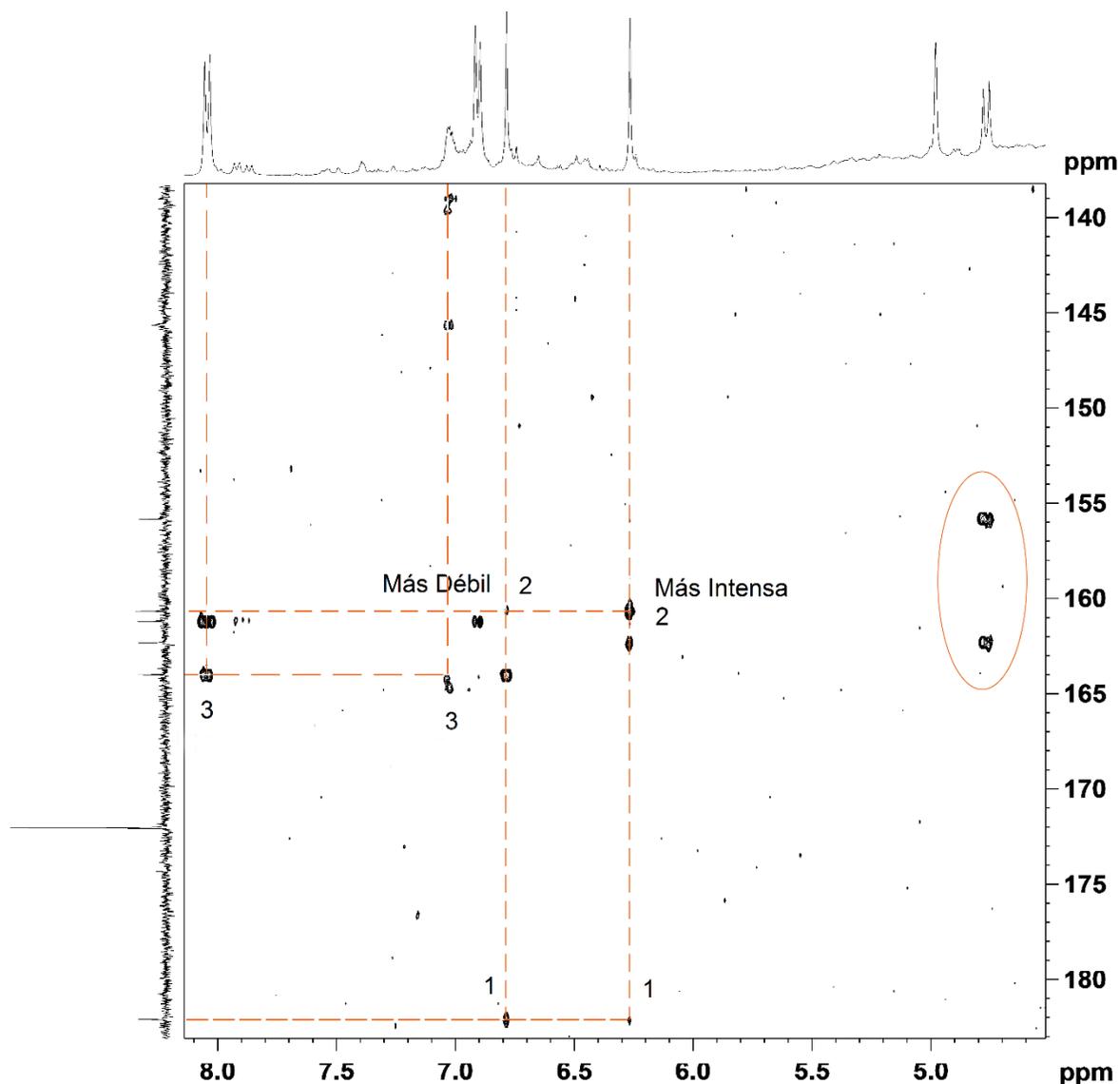


Figura 46. Espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto de la fracción C.

Como es de esperar todas las correlaciones difieren en cuanto a su intensidad, es así por ejemplo que en la correlación 2 hay una interacción más intensa entre la señal del protón H_6 y el carbono C_5 dada su cercanía, exhibiendo una constante de acoplamiento pequeña 2J comparada con la 4J del protón H_8 que se encuentra mucho más alejado.

Terminando de analizar los aspectos referentes a la estructura de la aglicona, podemos pensar que la unión glicosídica está dada por parte de la glucosa al carbono C_7 de la aglicona, observando las correlaciones enmarcadas en la figura 46. Donde el carbono anomérico de la glucosa (4.74 ppm) detecta los carbonos C_9 (155.83 ppm) y C_7 (162.34 ppm), correlaciones ilustradas en la siguiente

Figura 47. Teoría igualmente soportada en la discrepancia observada respecto de la señal dada por el carbono C₆ de un compuesto derivado de la Apigenina, donde el disacárido (3-O- α -L-Ramnopiranosil- β -D-Glucosa) presenta una unión C-glicosídica al carbono 6 de la aglicona, a un desplazamiento de 99.2 (Li *et al.*, 2007); siendo así que para el espectro propio no se observan señales en la región señalada.

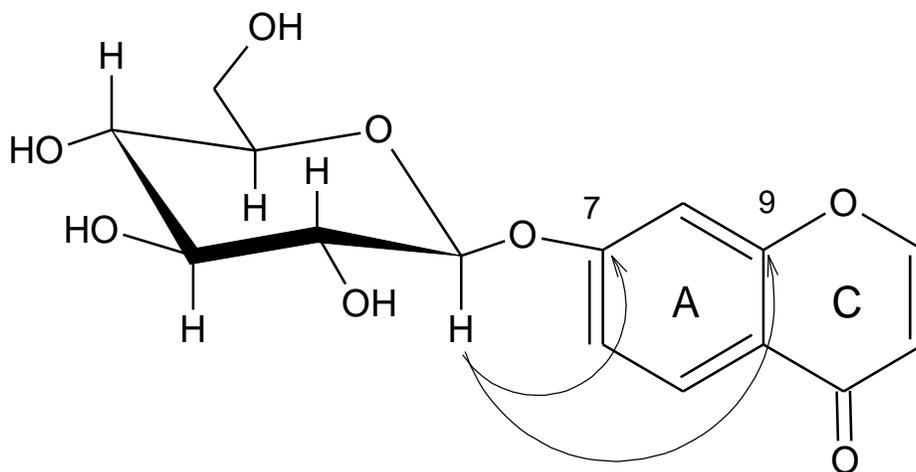


Figura 47. Detección del protón anomérico de la glucosa, con los carbonos C₇ y C₉ del anillo aromático A.

Finalmente, respecto de la disposición de los carbohidratos podemos pensar que la unión del residuo disacárido corresponde una unión del tipo 3 \rightarrow 1 dado que desde esta disposición podemos justificar la detección de ambos carbonos anoméricos (4.74 y 4.94 ppm para la glucosa y ramnosa, respectivamente) por parte del carbono C_{3'} de la glucosa (75.09 ppm), interacción ilustrada en la siguiente expansión del espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto (Figura 49), y en la estructura de la Figura 48.

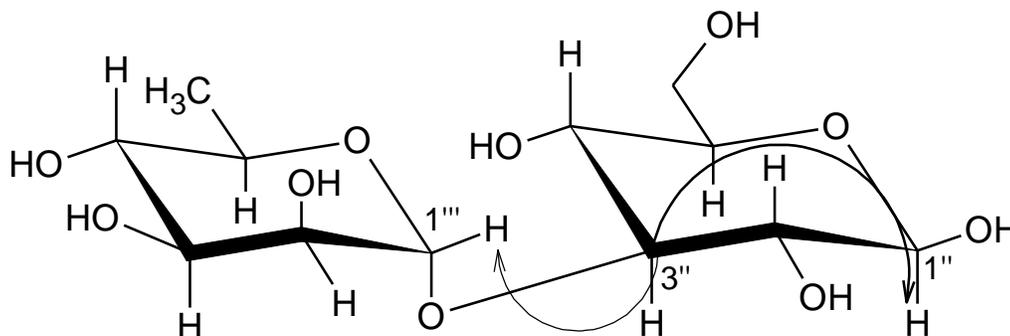


Figura 48. Detección del carbono C₃ de la glucosa, con los protones anoméricos de la glucosa y la ramnosa.

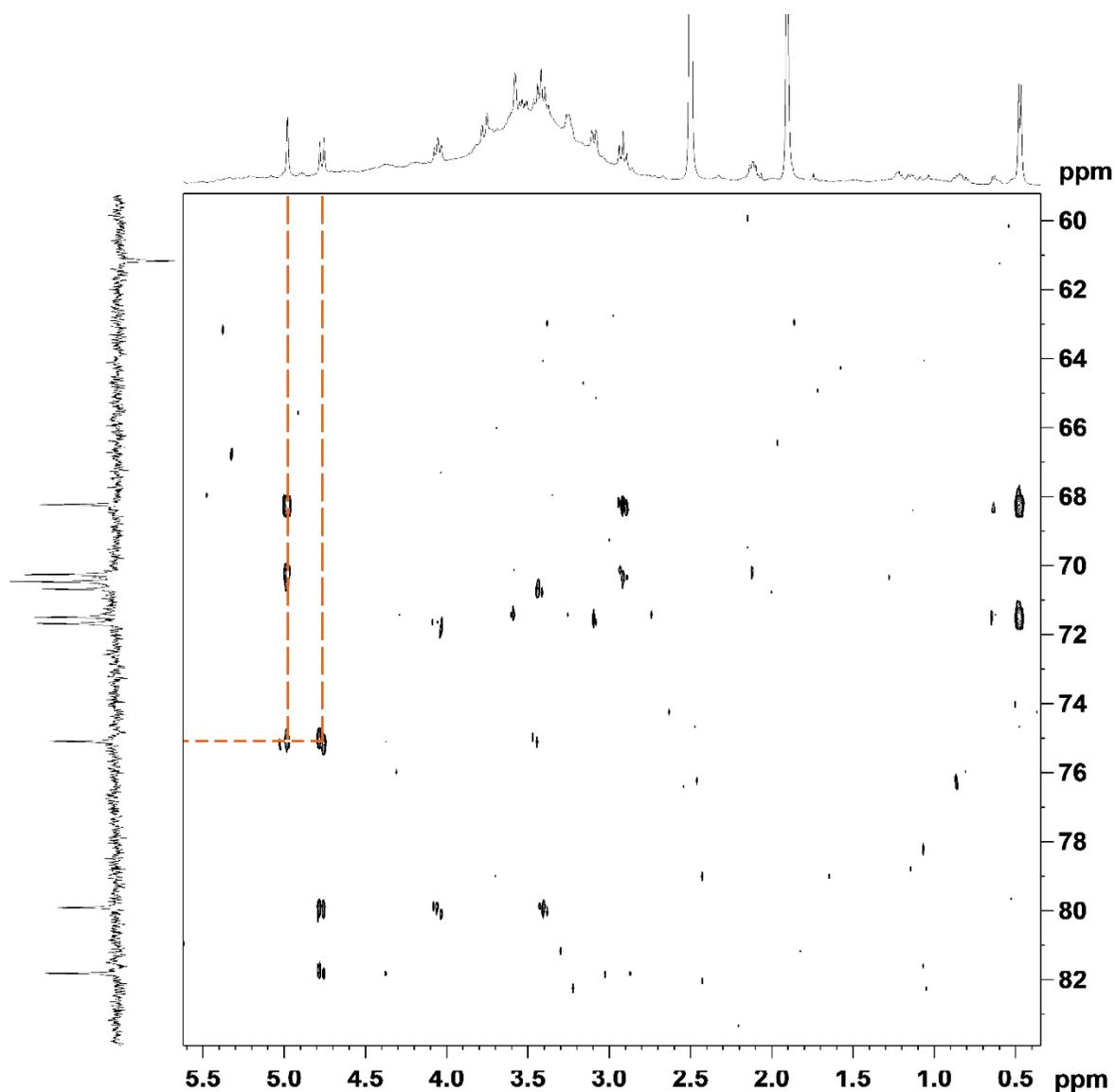


Figura 49. Expansión del espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto de la fracción C.

Vale la pena destacar el hecho de que las asignaciones de los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno y de carbono fueron realizadas y confirmadas tomando como base comparaciones con la literatura referentes a los desplazamientos generales de núcleos flavonólicos típicos (Ternai *et al.*, 1975; Ternai *et al.*, 1976; Ternai *et al.*, 1977) y de estructuras mucho más aproximadas al compuesto en cuestión (Kaneko *et al.*, 1994; Matławska *et al.*,

2001; Xu *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2007). En especial para las señales de carbohidratos (Agrawal *et al.*, 1992) debido a que su cercanía y en el caso de las señales protónicas, su multiplicidad, hace difícil la asignación de señales puntuales.

Una vez consideradas dichas bases teóricas podemos aún más descartar indicios de que la unión entre los carbohidratos sea de tipo 2→1, debido a que en este tipo de disposición también se hubiese permitido la correlación entre el carbono C_{3'} de la glucosa y ambos carbonos anoméricos. Puesto que en las publicaciones anteriores se discute la estructura de un compuesto con las mismas características pero cuya unión interglucosídica si corresponde a una del tipo 2→1. Desplazamientos enlistados en las siguientes Tablas 19 y 20.

Igualmente, se refuerza la teoría de la unión interglucosídica de tipo 3→1, con los datos reportados por la síntesis del disacárido 3-O- α -L-Ramnopiranosil- β -D-Glucosa, en el cual se observa una alta correlación con el dato publicado para el desplazamiento del protón anomérico de la ramnosa en este tipo de unión de 4.92 (Imperato *et al.*, 1975).

Tabla 19. Desplazamientos químicos de protón para compuestos similares al compuesto presente en la Fracción C.

H	δ [ppm] (Matławska <i>et al.</i> , 2001)	δ [ppm] (Yoon <i>et al.</i> , 2001)	δ [ppm] (Xu <i>et al.</i> , 2001)
3	6.67	6.51	---
6	6.37	6.47	6.37
8	6.80	6.58	6.79
2'	7.94	7.84	8.06
3'	6.97	6.91	6.94
5'	6.97	6.91	6.94
6'	7.94	7.84	8.06
1''	5.23	5.37	5.24
2''	---	---	---
3''	---	---	---
4''	---	---	---
5''	---	---	---
6''	---	---	---
1'''	5.13	5.16	5.09
2'''	---	---	---
3'''	---	---	---
4'''	---	---	---
5'''	---	---	---
6'''	1.22	1.02	1.02

Tabla 20. Desplazamientos químicos de carbono para compuestos similares al compuesto presente en la Fracción C.

C	δ [ppm] (Kaneko <i>et al.</i> , 1994)	δ [ppm] (Matławska <i>et al.</i> , 2001)	δ [ppm] (Yoon <i>et al.</i> , 2001)	δ [ppm] (Xu <i>et al.</i> , 2001)
2	164.20	164.18	160.1	147.65
3	103.01	103.4	105.7	136.11
4	181.80	181.86	175.6	176.14
5	161.10	161.39	157	160.42
6	99.6	99.22	99.1	98.63
7	162.6	162.44	162.5	162.47
8	94.7	94.42	96.3	94.16
9	157.9	156.87	158.7	155.82
10	105.6	105.32	107.1	104.82
1'	121.1	120.8	121.3	121.55
2'	128.5	128.44	127.8	129.7
3'	115.9	115.95	115.8	115.56
4'	161.4	160.99	160.5	159.46
5'	115.9	115.95	115.8	115.56
6'	128.5	128.44	127.8	129.7
1''	98.6	97.75	97	98.13
2''	77.1	77.12	76.7	80.21
3''	77	76.9	76.5	77.17
4''	70.6	70.42	69.9	69.28
5''	77.4	76.12	73.3	76.67
6''	61	59.54	62.8	60.51
1'''	100.5	100.33	99.5	100.89
2'''	70.2	69.63	70.4	68.69
3'''	70.6	70.28	70.3	69.74
4'''	72.3	71.79	72.1	71.67
5'''	68.6	68.18	68.6	66.48
6'''	18.1	17.96	17.8	16.52

Es así que el desplazamiento del carbono C_{2'} de la glucosa presenta gran discrepancia con el reportado para el carbono C_{2'} del compuesto de estudio.

Igualmente los desplazamientos propuestos fueron comparados con aproximaciones teóricas realizadas por el simulador de RMN del programa ACD

Labs/ChemSketck. Dando altos indicios de que la estructura del compuesto discutido corresponda con la ilustrada en la Figura 50.

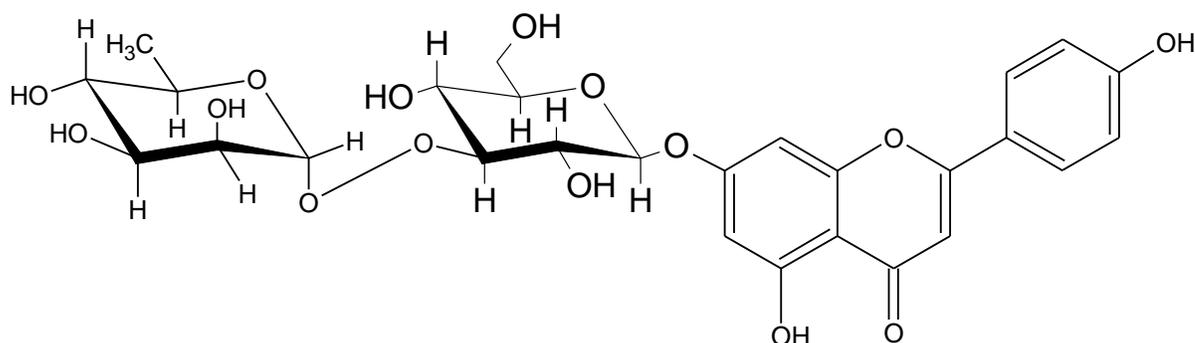


Figura 50. Estructura del compuesto presente en la Fracción C

Compuesto que puede recibir el nombre sistemático de Apigenina 7-O-(α -L-ramnopyranosil (1''' \rightarrow 3'')- β -D-glucopiranósido) y que para la fecha no ha sido reportado en la literatura, obtenida en las bases de datos REAXYS, CHEMSPIDER y una base de datos específica para flavonoides, construida por The Netherlands Metabolomics Centre y Netherlands Bioinformatics Centre, MetIDB.

6.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES

6.3.1 Actividad captadora de radicales libres por el método de DPPH \cdot

6.3.1.1 Consideraciones Iniciales

Atendiendo el notable hecho de la inestabilidad de las soluciones metanólicas del radical DPPH \cdot por efectos de la luz, el oxígeno, temperatura y pH de los medios (Klen *et al.*, 2012), antes de cada determinación fueron preparadas nuevas soluciones del radical en cuestión. Y luego las lecturas fueron realizadas dentro del rango de longitud de onda donde el cromógeno radical demuestra su mayor absorción entre 515 y 520 nm (Jiménez *et al.*, 2014).

6.3.1.2 Método de DPPH \cdot

Partiendo del valor reportado por estudios realizados en el Grupo de Biotecnología – Productos Naturales (GB-PN) sobre la actividad antioxidante del extracto metanólico crudo de *Alchornea coelophylla* descrito en la siguiente Tabla 21, se considera la determinación de la concentración máxima de la media

inhibitoria (IC₅₀) y con ello tener un acercamiento mucho mayor al verdadero poder antioxidante del mismo

Tabla 21. Valores de actividad antioxidantes por los métodos de DPPH[•], ABTS^{•+} y equivalentes Trolox de capacidad antioxidante (TEAC) para el extracto metanólico de *Alchornea coelophylla*.

ESPECIE	DPPH [•]		ABTS ^{•+}	
	% Actividad antioxidante	Equivalentes trolox (µmol trolox/g extracto)	% Actividad antioxidante	Equivalentes trolox (µmol trolox/g extracto)
Extracto	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
<i>Alchornea coelophylla</i>	49.56	51.95	99.8	282.48
Control (+) Hidroquinona	64.02	67.13	99.87	282.67

Para tal fin se evalúan los porcentajes de actividad antioxidante de soluciones de diferentes concentraciones del extracto crudo dando como resultado, los datos de la Tabla 22.

Tabla 22. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH[•] el extracto metanólico evaluado a diferentes concentraciones.

Concentración [ppm]	Porcentaje de Actividad Antioxidante	Desviación Estándar
500	100.00	0.00
250	93.77	0.38
150	91.61	0.40
100	89.22	0.00

Una vez confirmado el alto poder antioxidante del extracto crudo con un valor IC₅₀ de 0,27 µg/mL, aumenta las posibilidades de realmente lograr el aislamiento de un compuesto antioxidante.

La capacidad inhibitoria de radicales libres fue determinado a las fracciones obtenidas de la primera columna cromatográfica, como una herramienta que acompañaba el proceso de aislamiento obteniendo con ello un perfil de actividad de las mismas ayudando en la tarea de discernir cual fracción era la más promisoría para continuar el proceso de separación.

Como se mencionaba anteriormente (Véase 1.2 Separación Cromatográfica) solo se consideró la posterior utilización de fracciones con masas superiores a 300 mg, por lo cual fue determinada la capacidad inhibitoria de radicales libres a 17 de las 30 fracciones originalmente colectadas (Ver Anexo IV). Como se muestra en la Figura 51, todas las fracciones evaluadas pudieron ser consideradas como activas dado que exhibieron porcentajes de actividad antioxidantes muy similares al control positivo Hidroquinona 1000 ppm, considerando que ellas estaban a la mitad de la concentración (500 ppm).

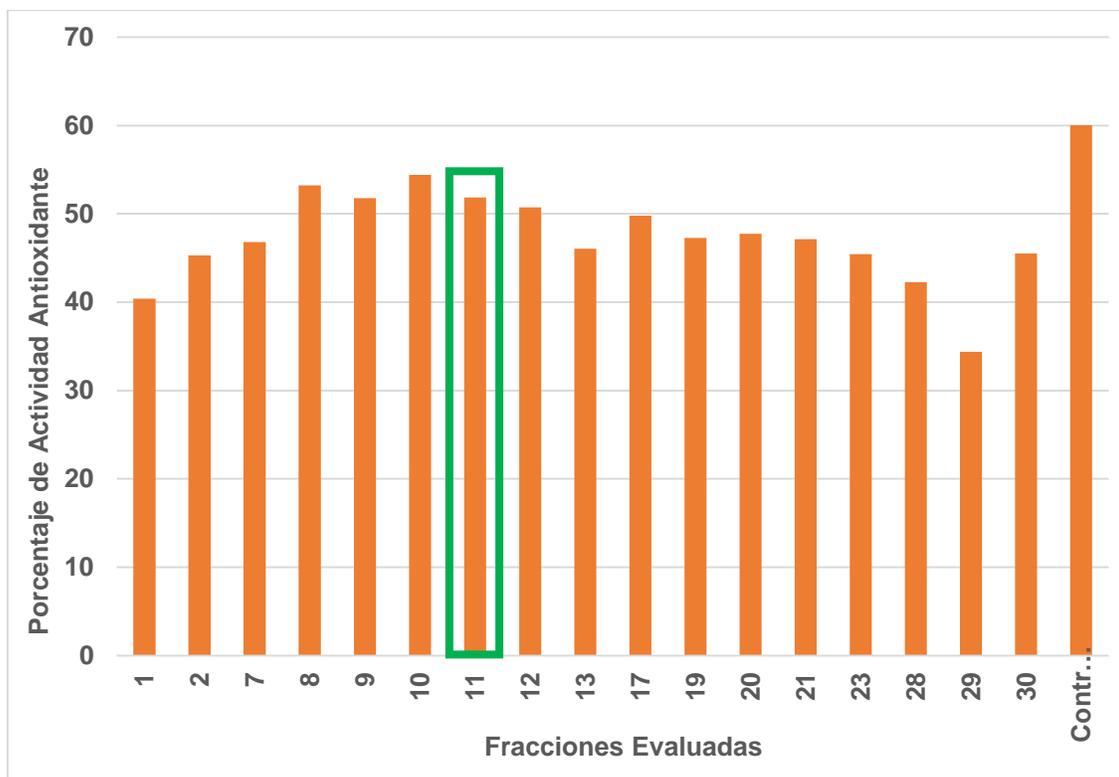


Figura 51. Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones más representativas en masa de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de DPPH:

De esta manera, observando el perfil de actividad de dichas fracciones, la ruta más acertada para la selección de la fracción más promisorio es aquella en la que se considera la relación masa-porcentaje de actividad (Ver Tablas 13 y Anexo IV, respectivamente). Es así como la fracción 11 puede ser considerada como una buena candidata para continuar con el proceso cromatográfico, debido a que es la cuarta más representativa en masa (0.9553 g) y la tercera con mayor actividad (51.8472 %).

Siguiendo este orden de ideas, fue la fracción 11 la cual fue sometida al siguiente proceso cromatográfico de donde fue obtenida una fracción conteniendo uno de

los compuestos de interés en un alto grado de pureza. Así las cosas, se hizo necesaria la determinación del IC₅₀ del compuesto aislado para así tener un referente en cuanto a su poder antioxidante total, obteniéndose un valor de 1.28×10^{-05} µg/mL. Los datos de dicha determinación corresponden a los consignados en la Tabla 23.

Tabla 23. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo DPPH[·] de la Fracción C evaluado a diferentes concentraciones.

Concentración [ppm]	Porcentaje de Actividad Antioxidante	Desviación Estándar
500	96.07	1.61
250	94.65	0.83
100	92.56	0.47
50	90.00	0.98

6.3.2 Actividad captadora de radicales libres por el método de ABTS^{·+}

6.3.2.1 Consideraciones Iniciales

Dada la naturaleza de este ensayo, en el cual se hace uso de un radical cromóforo sintético, el radical a ser evaluado fue preparado mediante la conversión del ABTS a su forma radical mediante la adición de persulfato de potasio como agente oxidante, dejando un tiempo de reacción de 16 horas (Durmaz *et al.*, 2012) y la estabilidad de las soluciones preparadas fue un factor tenido en cuenta, para lo cual durante los ensayos con el radical catión ABTS^{·+} solo se utilizaba la solución concentrada del mismo por un lapso de dos días (Guedes *et al.*, 2013).

Una vez preparada la solución del radical catión antes de cada determinación a una alícuota de la misma se le ajustó su absorbancia a 0.7 ± 0.02 con etanol y las lecturas fueron realizadas a 732 nm (Re *et al.*, 1999).

6.3.2.2 Método ABTS^{·+}

Igualmente partiendo de los datos reportados anteriormente por el GB-PN respecto de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *A. coelophylla*, la determinación del IC₅₀ del mismo fue considerada debido a que con ella terminaríamos de constatar por ambas técnicas el verdadero poder antioxidante de dicho extracto.

Con la determinación del IC₅₀ (Ver Tabla 24) se encontró que para que exista una inhibición del 50% por parte de los radicales prooxidantes en el medio, es necesaria una concentración de 108.2 µg/mL, lo que indica una buena capacidad antioxidante (Ramos *et al.*, 2003).

Tabla 24. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+} el extracto metanólico evaluado a diferentes concentraciones.

Concentración [ppm]	Porcentaje de Actividad Antioxidante	Desviación Estándar
500	100.00	0.00
250	88.56	0.22
150	62.83	0.39
100	43.24	3.26
50	21.76	3.32

Siendo coherentes con la idea de desarrollar un proceso de aislamiento bioguiado, la determinación de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas con la primera columna cromatográfica (Ver Anexo V) también fue realizado por medio de esta técnica, arrojando el siguiente perfil de actividades antioxidantes.

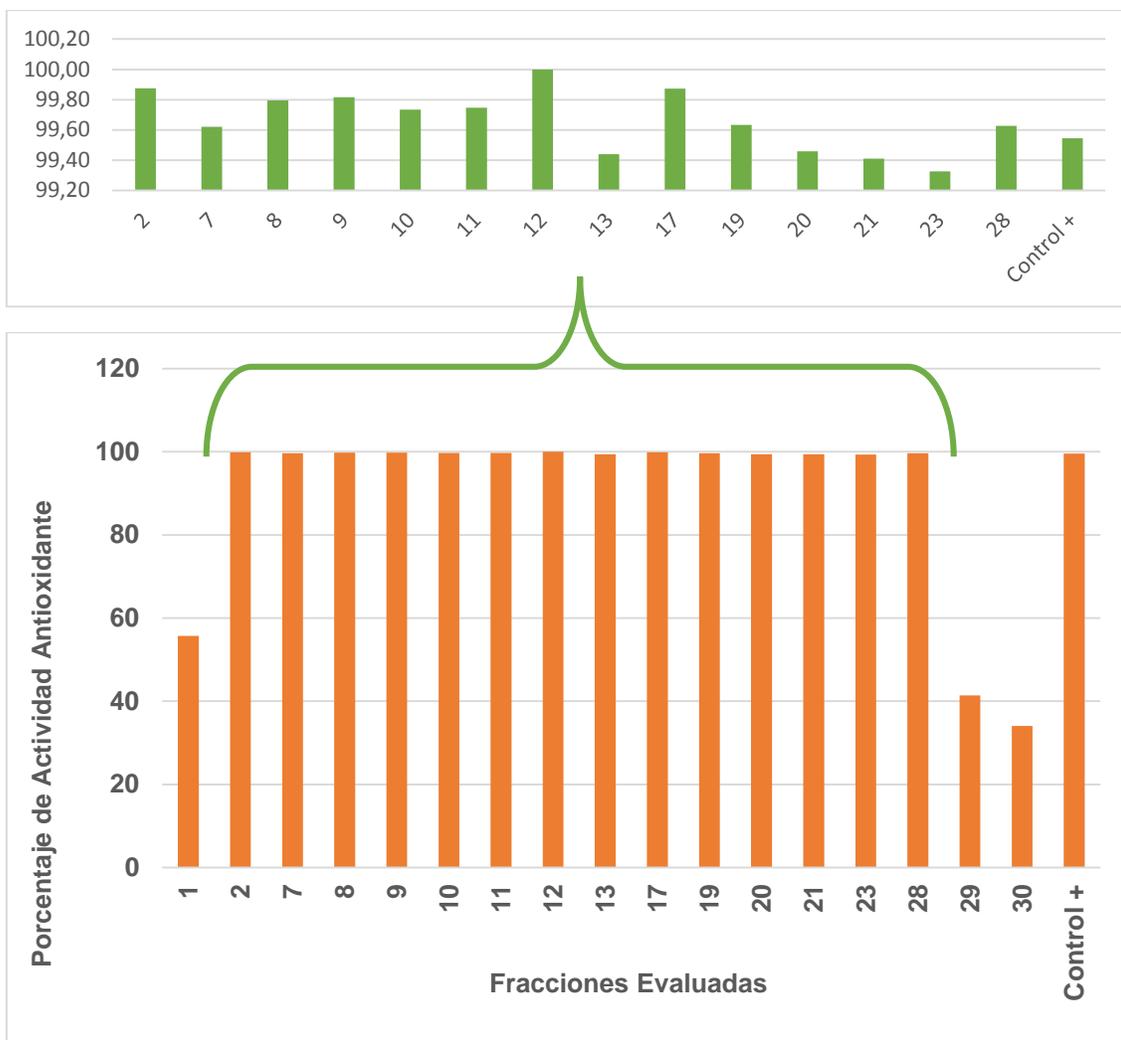


Figura 52. Porcentaje de actividad antioxidante de las fracciones más representativas en masa de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de ABTS^{•+}

Finalmente observando la Figura 52, también podemos concluir que la fracción 11 posee un perfil de actividad antioxidante alto, lo que la convierte en una fracción adecuada y promisoría a la hora de aislar un flavonoide con actividad antioxidante de la misma.

Es así que una vez obtenida la Fracción C, donde presumimos la presencia del compuesto de interés en un nivel considerable de pureza a partir de la segunda columna cromatográfica de Sílica gel de la fracción 11, se realizó la determinación del IC₅₀ a la misma (Ver Tabla 25).

Tabla 25. Actividad antioxidante obtenida mediante el ensayo ABTS^{•+} de la Fracción C a diferentes concentraciones.

Concentración [ppm]	Porcentaje de Actividad Antioxidante	Desviación Estándar
500	100	0.00
250	74.21	5.98
100	27.92	1.64
50	14.71	1.86

Donde finalmente se encontró que la concentración necesaria para una inhibición del 50% por parte de los radicales prooxidantes en el medio, es necesaria una concentración de 141,9 $\mu\text{g/mL}$. Dato que indica fuertemente que el compuesto aislado del extracto metanólico de *Alchornea coelophylla* no es el único responsable de la actividad del mismo y más bien la actividad que dicho extracto exhibe se debe al comportamiento sinérgico de varios compuestos allí presentes, debido al notable descenso por parte del IC_{50} .

6.3.3 Capacidad antioxidante en equivalentes trolox (TEAC)

Adicional a las determinaciones de actividad antioxidante, fueron realizadas curvas de calibración para cada una de las técnicas utilizando Trolox como compuesto antioxidante de referencia con el fin de poder finalmente realizar una comparación entre los valores arrojados por ambas técnicas $\text{ABTS}^{\cdot+}$ y DPPH^{\cdot} (Prakash *et al.*, 2001).

Determinación que se hace necesaria si se quieren comparar resultados debido a la diferencia existente entre las técnicas, referente a los solventes y los medios en los cuales cada una de ellas tiene lugar (Magalhães *et al.*, 2014). Para tal fin fue obtenida la gráfica de la Figura 53 partiendo de los datos reportados en la Tabla 26 en las que se relaciona directamente los porcentajes de actividad antioxidante y la concentración de Trolox para el método de $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

Tabla 26. Porcentajes de actividad antioxidante para diferentes concentraciones de equivalentes Trolox.

Trolox (μM)	% AA
10	2.69
20	6.05
40	11.79
80	26.14
100	35.48

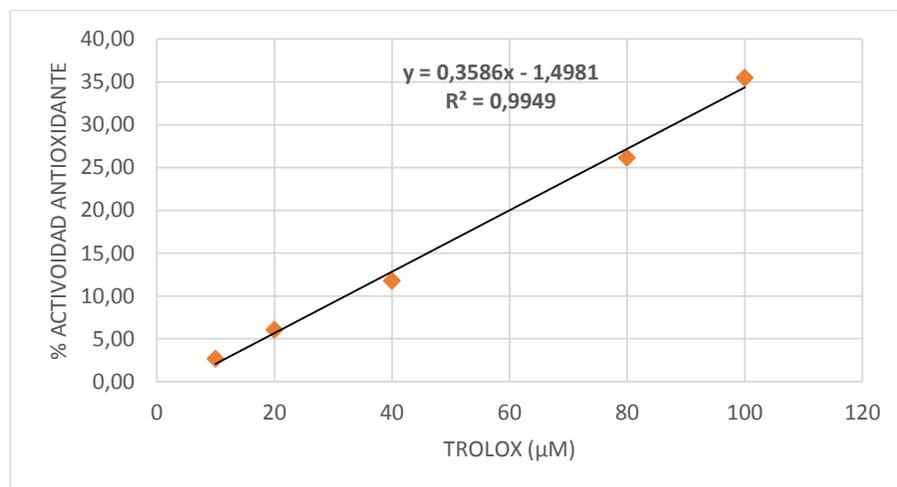


Figura 53. Curva de calibración Trolox para la actividad antioxidante determinado por medio del ensayo de ABTS^{•+}.

Una vez construida la gráfica que correlaciona dichas actividades, los valores reportados de actividad antioxidante en el screening realizado a las fracciones obtenidas con la columna cromatográfica DIAION HP-20, pueden ser convertidas a unidades de equivalentes de dicho compuesto antioxidante de referencia con el fin de poder ser comparados a futuro con los mismos calculados para la técnica de DPPH[•]. De igual forma en la Tabla 27 y la gráfica 54 se muestran los datos de correlación equivalentes Trolox y actividad antioxidante para el método de DPPH[•].

Tabla 27. Porcentajes de actividad antioxidante para diferentes concentraciones de equivalentes Trolox.

Trolox (μM)	% AA
2	2.90
4	3.55
8	8.71
16	14.52
32	29.68
64	60.32
100	96.13

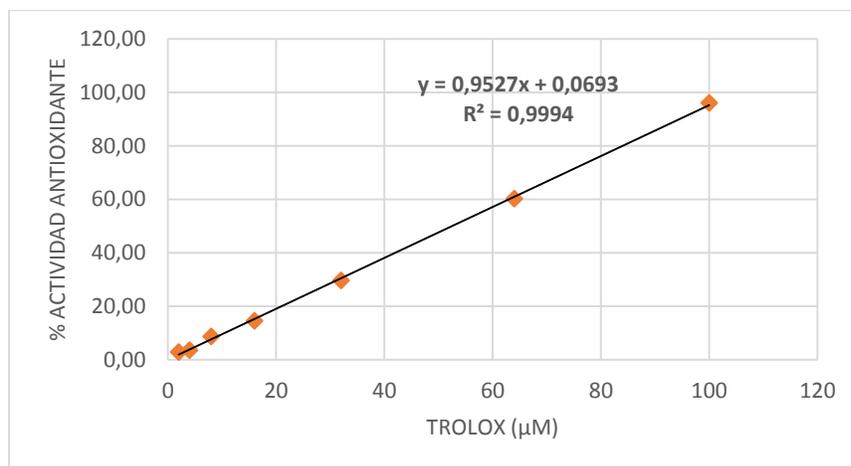


Figura 54. Curva de calibración Trolox para la actividad antioxidante determinado por medio del ensayo de DPPH[·].

Es así como en la siguiente Tabla 28, ambos datos de actividad antioxidante son reportados como equivalentes de Trolox (μmol Trolox/g Extracto).

Tabla 28. Concentración en equivalentes Trolox de las fracciones obtenidas con la columna cromatográfica DIAION HP-20 por los métodos de DPPH[·] y ABTS^{·+}.

Fracción	Equivalentes Trolox (μmol Trolox/mg Extracto)	
	ABTS ^{·+}	DPPH [·]
1	84.69	319.22
2	94.94	565.38
7	98.14	563.96
8	111.57	564.93
9	108.58	565.06
10	114.05	564.60
11	108.70	564.67
12	106.39	566.08
13	96.56	562.96
17	104.41	565.37
19	99.08	564.03
20	100.06	563.06
21	98.77	562.79
23	95.23	562.31
28	88.63	564.00
29	72.06	239.20
30	95.41	198.47
Control +	125.86	563.54

Es notable que a la hora de realizar una comparación rápida de los datos, sea en porcentaje de actividad antioxidante o equivalentes Trolox, los valores obtenidos por medio de la técnica de ABTS^{•+} son significativamente mayores a los obtenidos a la hora de analizar las mismas muestras mediante el ensayo DPPH[•].

Hecho que puede encontrar explicación en factores tales como que en las determinaciones por el método de ABTS^{•+} algunas interferencias por demás tipos de compuestos que absorban en la región UV son minimizadas por la detección en la región del visible a 734 nm (Magalhães *et al.*, 2008), además de los errores que pueden existir de no cuidar la estequiometría de la reacción a la hora de generar el radical catión, o no permitir suficiente tiempo de reacción entre el ABTS y el agente oxidante antes de la determinación experimentales debido a que por la naturaleza antioxidante de los compuestos que se desea evaluar pueden reaccionar con los agentes oxidantes utilizados (por ejemplo, persulfato de potasio) dando lugar a sobre estimaciones en la técnica (Prior *et al.*, 2005).

Además de que termodinámicamente cualquier compuesto que posea un potencial de óxido-reducción menor que el del ABTS (0.68 V) puede actuar reduciendo el radical ABTS^{•+} en cuestión, por lo que gran número de compuestos fenólicos solo por el hecho de exhibir un bajo potencial pueden actuar como antioxidantes sin serlo (Prior *et al.*, 2005).

Además de ello, respecto del método DPPH[•] también algunas imprecisiones de la técnica pueden ser destacadas como que para esta reacción, los perfiles de comportamiento cinético pueden variar desde la composición del medio, dado que el mecanismo de transferencia de hidrógeno (HAT) puede ser muy lento y predominar el de transferencia de electrones (ET) en medios con fuertes aceptores de hidrógeno como solventes, como el metanol y etanol (Magalhães *et al.*, 2008). Factor que igualmente se ve limitado por la poca disponibilidad estérica del radical, siendo así que moléculas más pequeñas pueden exhibir tiempos menores de reacción, contrario a moléculas antioxidantes de tamaño considerable (Huang *et al.*, 2005). Finalmente lecturas erróneas pueden tener lugar con subestimación de los valores de actividad por cuenta de que pueden ocurrir algún tipo de reacciones reversibles, como las observadas con eugenol u otro tipo de compuestos con estructuras similares del tipo *o*-metoxifenol (Huang *et al.*, 2005).

Es esta la razón por la cual en la gráfica e la Figura 55, se observan ciertas discrepancias en cuanto a la correlación por parte de los valores reportados por ambas técnicas en términos de equivalentes Trolox.

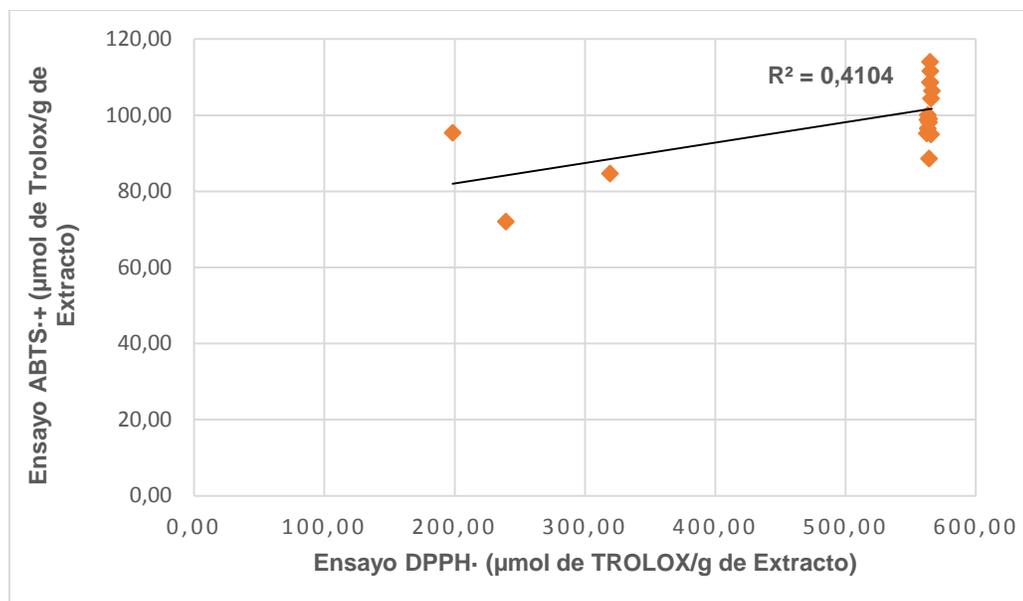


Figura 55. Correlación entre los equivalentes Trolox de los extractos de metanol para los ensayos ABTS^{·+} y DPPH[·]

6.3.4 Cuantificación de fenoles por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de este trabajo era el aislamiento de un compuesto de tipo flavonólico, que de igual manera por su naturaleza exhibe un comportamiento inherente de tipo fenólico. Al igual que las determinaciones de actividades biológicas a lo largo del proceso de aislamiento, también fue considerada la cuantificación de fenoles y flavonoides (Véase 3.5) para contar con una herramienta más para la toma de decisiones en el momento intermedio del proceso cromatográfico.

Razón por la cual se realizó la determinación de fenoles por medio del ensayo propuesto por (Folin *et al.*, 1927), para lo cual se realizó una curva de calibración para finalmente poder expresar las mediciones obtenidas de las fracciones evaluadas como equivalentes de un compuesto de referencia, en este caso, ácido gálico, con un coeficiente de correlación de 0.9956, como se ilustra en la Figura 56.

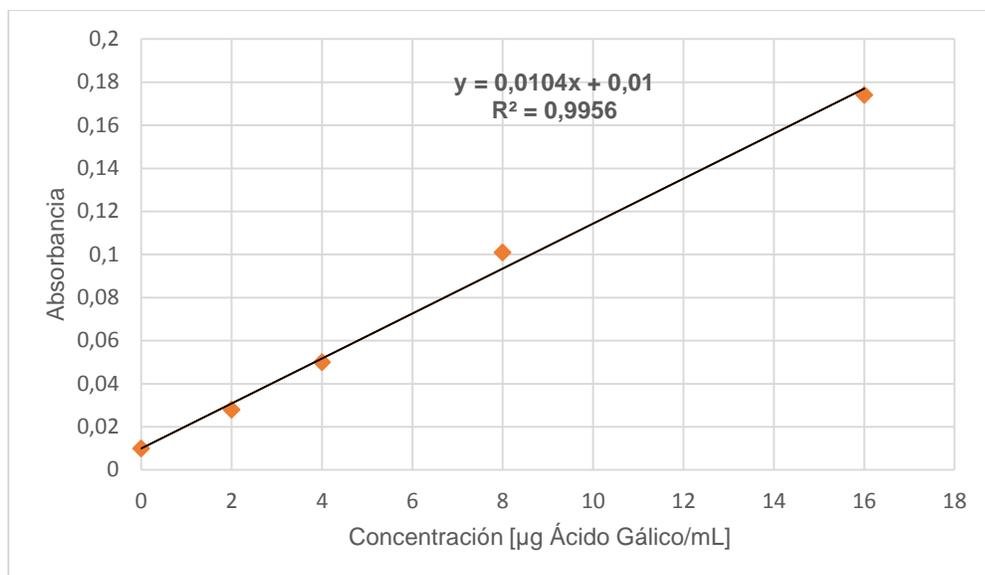


Figura 56. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Una vez construida dicha curva, los resultados de la cuantificación de fenoles (Ver Anexo VI) pueden ser expresados como µg Ácido gálico/mg de Fracción evaluada como se muestra en la Figura 57.

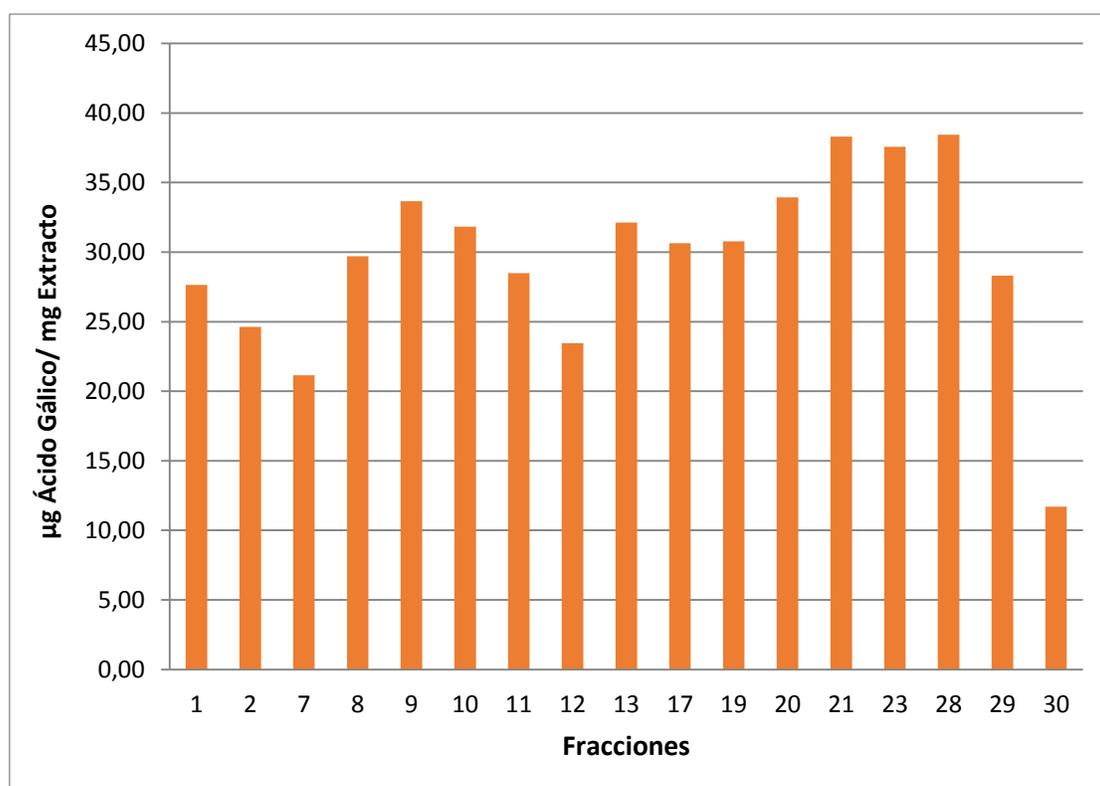


Figura 57. Fenoles totales de las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20 por el método de Folin-Ciocalteu.

Figura de donde podemos destacar fracciones con un contenido fenólico muy alto, mucho más que el obtenido para la fracción 11 (28.49 μg Ácido gálico/mg de Fracción), fracción considerada como promisoría para los demás procesos de aislamiento, pero que a la hora de guardar relaciones con las masas disponibles de las mismas (Véase Tabla 12). Se encuentra que esta puede seguir siendo considerada como una buena candidata para tal fin.

6.3.5 Cuantificación de flavonoides con AlCl_3

Más que el contenido de fenoles, la aproximación al contenido de compuestos flavonólicos en las fracciones sirve como herramienta de juicio para tomar la decisión final sobre qué fracción puede ser la más adecuada para finalizar el proceso de aislamiento cromatográfico de un flavonoide del extracto metanólico de *Alchornea coelophylla*. Puesto que con esta información serán seleccionadas las fracciones que mayor contenido flavonólico presenten.

Para tal fin, se construyó una curva de calibración para finalmente poder expresar las mediciones obtenidas de las fracciones evaluadas como equivalentes de un compuesto de referencia, en este caso, Kaempferol, con un coeficiente de correlación de 0,9986, como se ilustra en la Figura 58.

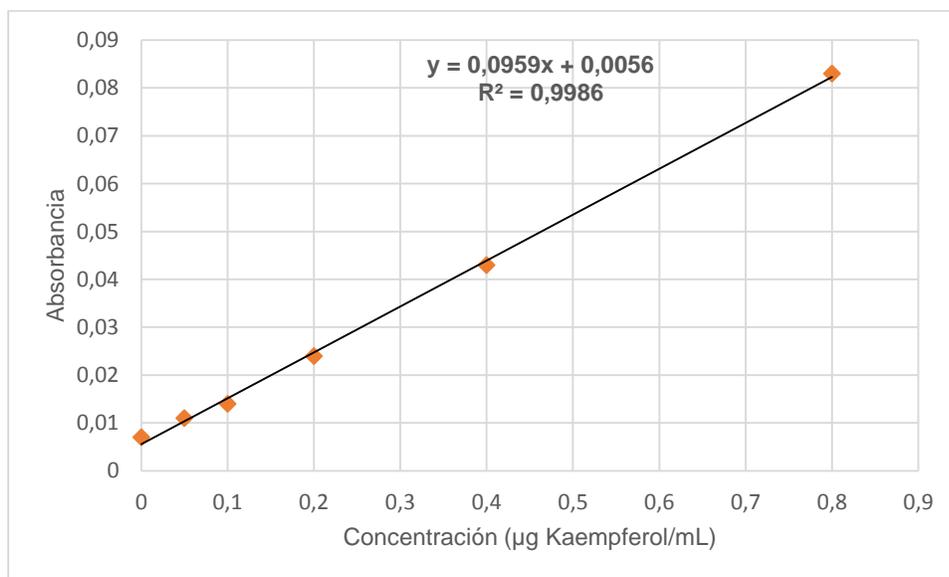


Figura 58. Curva de calibración de kaempferol para la cuantificación de flavonoides.

De esta manera, los datos obtenidos en la cuantificación de flavonoides con AlCl_3 (Véase Anexo VII) pueden finalmente ser expresados como equivalentes de Kaempferol para lograr un perfil real de las fracciones cromatográficas en estudio en cuanto a su contenido de compuestos de tipo flavonólico. Es así que en la

Figura 59, podemos observar la verdadera significancia de la Fracción 11 como la candidata más promisor para obtener el compuesto de interés.

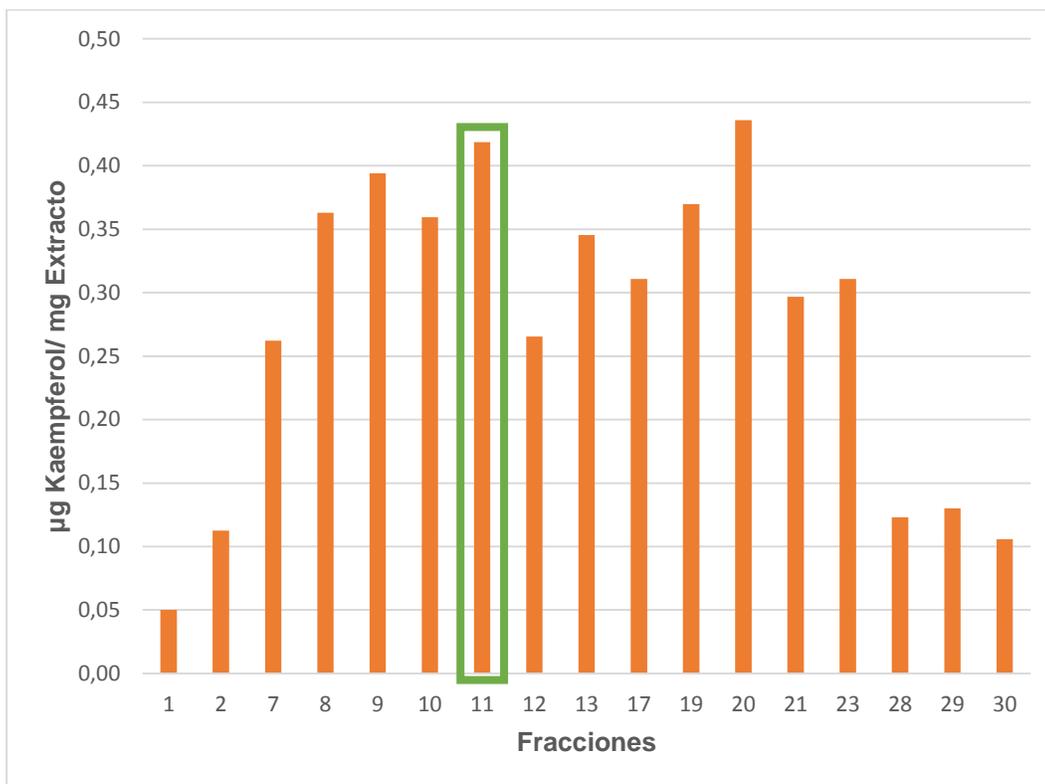


Figura 59. Flavonoides totales de las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20 con AlCl_3 .

Finalmente una vez con todos estos datos recolectados de las fracciones cromatográficas, se pueden realizar ciertos estudios de correlación para lograr tener un acercamiento y poder emitir un juicio inicial respecto de la responsabilidad de las actividades biológicas medidas sobre las mismas, y con ello sumar aún más herramientas de juicio para considerar si son o no los flavonoides quienes más correlación guardan con los perfiles de actividad antioxidante observados.

De esta manera, teniendo en cuenta las gráficas de correlación presentes en el Anexo VIII, por las notables diferencias en los coeficientes de correlación podemos objetar en una primera instancia que las actividades antioxidantes obtenidas por los métodos de DPPH^{\cdot} y $\text{ABTS}^{\cdot+}$ de las fracciones evaluadas se deben mucho más a la acción de los flavonoides allí contenidos que al resto de fenoles presentes en las mismas, lo que convierte a dichas fracciones en blancos promisorios para el aislamiento de compuestos tipo flavonólico que exhiban actividad antioxidante.

7. CONCLUSIONES

- Fue aislado un flavonoide de tipo flavona, derivado de la Apigenina a partir del extracto metanólico de *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae) a través de técnicas cromatográficas, cuya posible estructura se encuentra ilustrada en la Figura 42 y que recibe el nombre sistemático de Apigenina 7-O-(α -L-ramnopiranosil (1'''' \rightarrow 3''))- β -D-glucopiranosido).
- El compuesto aislado muestra un buen perfil de actividad antioxidante, exhibiendo actividades de 96.1% y 100% para las técnicas de DPPH \cdot y ABTS $^{+\cdot}$ y con valores de IC₅₀ de 1.28x10⁻⁵ μ g/mL y 141.9 μ g/mL, respectivamente.
- La Fracción 11 resultó la fracción más promisoría para el aislamiento de flavonoides, por cuenta de los datos obtenidos por las determinaciones a lo largo del aislamiento bioguiado de 51.85% y 99.75% para los ensayos de actividad antioxidante por DPPH \cdot y ABTS $^{+\cdot}$, 28.49 μ g Ácido gálico/mg de Fracción para fenoles totales y 0.42 μ g Kaempferol/mg Extracto para la determinación de flavonoides totales.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* del compuesto aislado con otras técnicas antioxidantes que se acerquen más a los modelos biológicos, puesto que los radicales utilizados para la estimación de las actividades propuestas, corresponden a compuestos sintéticos que no se encuentran presentes de manera natural en matrices biológicas.
- Se recomienda continuar con la investigación del compuesto aislado, haciendo énfasis en la determinación de mayores actividades biológicas que puedan estar relacionadas con mecanismos antioxidantes.
- Continuar con el proceso de elucidación estructural hasta obtener las multiplicidades y las constantes de acoplamiento de las señales registradas en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.
- Realizar alguna derivatización y/o subsecuente hidrólisis del compuesto para la adquisición de más información a través de las técnicas espectroscópicas utilizadas, con el fin de afianzar la información estructural propuesta.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal P. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 31, 3307-3330.
- Andersen Ø, Markham K. (2006). *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik S, Bektaşoğlu B, Işil Berker K, Özyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidan Capacity Assay to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*. 12, 1496-1547.
- Arrigoni O, Tullio M. (2002). Ascorbic acid: mucho more tha justa an antioidant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1569, 1-9.
- Aruoma O. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75, 199-212.
- Barbo F, Meda C, Young C, Cordeiro I, Blatt C. (2002). Pentatronol from *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30, 605-607.
- Bast A, Haenen G, Doelman C. (1991). Oxidants and Antioidants: State of Art. *The American Journal of Medicine*. 91, 3C – 1-12S.
- Bellot G, Liu D, Pervaiz S. (2013). ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master?. *Mitochondrion*. 13, 155-162.
- Bergendi L, Beneš L, Ďuračková Z, Ferencik M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*. 65, 1865–1874.
- Berlett B, Stadtman E. (1997). Protein oxidation in aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 20313-20316.
- Biesaga M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1218, 2505-2512.
- Björkman L, Dahlgren C, Karlsson A, Brown K, Bylund J. (2008). Reactive oxygen species as suppressors of inflammatory. *Arthritis & Rheumatism*. 58, 2931-2935.
- Blainski A, Lopes G, Palazzo de Mello J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 18, 6852-6865.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91, 179-194.

- Braca A, Mendez J, Menichini F, Morelli I. (2002). Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30, 1109-1111.
- Brand-Williams V, Berset C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH· Free Radical Method. *LWT – Food Science and Technology*. 30, 609-615.
- Bohm B. *Introduction to Flavonoids*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. 1998.
- Bouaziz C, Bouslimi A, Kadri R, Zaied C, Bacha H, Abid-Essefi S. (2013). The in vitro effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65, 497-501.
- Bouaziz C, Sharaf el dein O, El Golli E, Abid-Essefi S, Brenner C, Lemaire C, Bacha H. (2008). Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*. 254, 19-28.
- Chiou T, Tzeng W. (2000). The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology*. 154, 75-84.
- Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catagol B, Friguet B, Grune T, Gonos E. (2014). Protein damage, repair and proteolysis. *Molecular Aspects of Medicine*. 35, 1-71.
- Cooke M, Evans M, Dizdaroglu M, Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB Journal*. 17, 1195-1214.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 9, 169-176.
- Davies M. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1703, 93-109.
- Dolatabadi J. (2011). Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48, 227-233.
- Doroshov J. (1995). Glutathione peroxidase and oxidative stress. *Toxicology Letters*. 82/83, 395-398.
- Durmas G. (2012). Freeze-dried ABTS^{•+} method: A ready-to-use radical poder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*. 133, 1658-1663.
- Enciso E, Arroyo J. (2011). Efecto Antiinflamatorio y Antioxidante de los Flavonoides de las Hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puma) en un Modelo Experimental en Ratas. *Revista Anales de la Facultad de Medicina*. 72 (4), 231-237.

Folin O, Denis W. (1912a). On phosphotungstic-Phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12, 239-243.

Folin O, Denis W. (1912b). Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *Journal of Biological Chemistry*. 12, 245-251.

Folin O, Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and Tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 73, 627-650.

GLOBOCAN 2008, World Health Organization. Cancer Incidence, Mortality and prevalence Worldwide in 2008. Fast Stats <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH>.

Grigorov B. (2012). Reactive oxygen species and their relation to carcinogenesis. *Trakia Journal of Sciences*. 10, 83-92.

Gruijl F, Van Kranen H, Mullenders L. (2001) UV-Induced DNA Damage, Repair, Mutations and Oncogenic Pathways in Skin Cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 63, 19-27.

Guedes A, Amaro H, Gião M, Malcata F. (2013). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*. 138, 638-643.

Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chastee N. (2007). Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions*. 43, 4951-4961.

Halliwell B. (2011). Free radicals and antioxidants – *quo vadis?*. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32, 125-130.

Halliwell B. (2006). Phagocyte – derived reactive species: salvation or suicide?. *Trends in Biochemical sciences*. 31, 509-515.

Halliwell B. (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*. 18, 685-716.

Halliwell B, Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57, 715S-25S.

Halliwell B, Gutteridge J. (1990). The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 280, 1-8.

Hartonen K, Parshintsev J, Sandberg K, Bergelin E, Nisula L, Riekkola M. (2007). Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *Talanta*. 74, 32-38.

Havsteen B. (2002). The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96, 67-202.

Hawkins C, Morgan P, Davies M. (2009). Quantification of Protein Modification By Oxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 46, 965-988.

Hazra B, Sarkar R, Biswas S, Mandal N. (2010). Comparative Study of the Antioxidant and Reactive Oxygen Species Scavenging Properties in the Extracts of the Fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Embllica officinalis*. *Biomed Central Complementary and Alternative Medicine*.

Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. (2002). Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*. 13, 572-584.

Heneczowski M, Kopacz M, Nowak D, Kuźniar A. (2001). Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Polish Pharmaceutical Society*. 58, 415-420.

Hiruma-Lima C, Calvo T, Rodrigues C, Andrade F, Vilegas W, Brito A. (2006). Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somastatin, gastrin and prostaglandin. *Journal of Ethnopharmacology*. 104, 215-224.

Hocman G. (1988). Chemoprevention of cancer: Phenolic Antioxidants (BHT, BHA). *International Journal of Biochemistry*. 20, 639-651.

Höhn A, König J, Grune T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*. 92, 132-159.

Huang D, Ou B, Prior R. (2005). The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.

Huma Z, Vian M, Maingonnat J, Chemat F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*. 1216, 7700-7707.

Imperato F. (1975). 3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-D-glucose, a New Disaccharide Synthesized by the Koenigs-Knorr Reaction. *Journal of Organic Chemistry*. 41, 3478-3479.

Instituto Nacional de Cancerología, Distribución de Nuevos Casos de Cáncer por Sexo, Según Localización Primaria 2010; <http://www.cancer.gov.co/documentos/Tablas2010/Tabla%201.pdf>

Jiménez Y, García-Moreno M, Igartuburu J, Barroso C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*. 165, 198-204.

Juránek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayer A, Tsatsakis A. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*.

- Kaneko T, Sakamoto M, Ohtani K, Ito A, Kasai R, Yamasaki K, Padorina W. (1995). Secoiridoid and Flavonoid glycosides from *Gonocaryum calleryanum*. *Phytochemistry*. 39, 115-120.
- Kasai H. (1997). Analysis of a Form of Oxidative DNA Damage, 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, As a Marker of Cellular Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Reviews in Mutation Research*. 387, 147-163.
- Kehrer J P, Robertson J D, Smith C V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In: Charlene A. McQueen, *Comprehensive Toxicology*. 1, 277-308. Oxford: Academic Press.
- Kim B, Rhee J, Soo Park G, Lee J, Lee Y, Lee J. (2011). Cu/Zn – and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. *Chemosphere*. 84, 1467-1475.
- Kim B, Rhee J, Soo Park G, Lee J, Lee Y, Lee J. (2011). Cu/Zn – and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. *Chemosphere*. 84, 1467-1475.
- Kim D, Jeong S, Lee C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81, 321-326.
- Klen T, Vodopivec B. (2012). DPPH Solution (In)stability during kinetic UV/Vis Spectrometry Measurements of Phenols Antioxidant Potential. *Food Analytical Methods*. 5, 781-783.
- Koskenkorva-Frank T, Weiss G, Koppenol W, Burckhardt S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 65, 1174-1194.
- Kouakou K, Schepetkin I, Yapi A, Kirpotina L, Jutila M, Quinn M. (2013). Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Alchornea cordifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 146, 232-242.
- Kowaltowski A, de Souza-Pinto N, Castilho R, Vercesi A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 47, 333-343.
- Kraaij M, van der Kooij S, Reinders M, Koekkoek K, Rabelink T, van Kooten C, Gelderman K. (2011). Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology*. 49, 549-557.

Kryston T, Georgiev A, Pissis P, Georgakilas A. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 711, 193-201.

Kumar S, Pandey A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Volume 2013, 1-16.

Lambeth J. (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy. *Free Radical Biology and Medicine*. 43, 332-347.

Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reproductive Toxicology*. 34, 298-307.

Lee I, Yang C. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology*. 84, 581-590.

Lee D, Kim C, Lee Y. (2010). Astaxanthin Protects Against MPTP/MPP⁺-Induced Mitochondrial Dysfunction and ROS Production *in vivo* and *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*.

Li W, Dai R, Yu Y, Li L, Wu C, Luan W, Meng W, Zhang X, Deng Y. (2007). Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* Leaves and GLUT-4 Translocation Facilitating Activity of Its Flavonoid Constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30, 1123-1129.

López E, Casco S. (2004). Guía de Consulta de Plantas Vasculares: Angiospermas (Magnoliophyta)-Rosides. 3, 61-69. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Cátedra Diversidad Vegetal (Botánica II). Corrientes, Argentina.

Mabry T, Markham K, Thomas M. (1969). The systematic identification of flavonoids. Springer – Verlag. New Yor Inc. USA.

Magalhães L, Barreiros L, Reis S, Segundo M. (2014). Kinetic matching approach applied to ABTS assay or highthroughput determination of total antioxidant capacity of food products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33, 187-194.

Magalhães L, Santos F, Segundo M, Reis S, Lima J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for Assesment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*. 83, 441-447.

Magalhães L, Segundo M, Reis S, Lima J. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidants properties. *Analytica Chimica Acta*. 613, 1-19.

Manga H, Brkic D, Marie D, Quetin-Leclercq J. (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach & Thonn.) Müll Arg. (Euphorbiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 92, 209-214.

Matławska I. (2001). Flavonoid compounds in the flowers of *Kitaibelia vitifolia* WILLD. (Malceaceae). Acta Poloniae Pharmaceutica. 58, 127-131.

Maya C, Agudelo C. (2010). Lista Anotada de las Especies de Euphorbiaceae para el Quindío. Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío. 20, 126-139.

MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION. Separation of Bioactive Natural Products using Synthetic Absorbents. Separation Materials Department. (www.diaion.com)

Murillo J. (2004). Las Euphorbiaceae De Colombia. Biota Colombiana. 5, 183-199.

Muroala S, Miura T. (2003). Inhibition by Uric Acid of Free Radicals that Damage Biological Molecules. Pharmacology & Toxicology. 93, 284-289.

Nagler R, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick A. (2002). Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. Free Radical Biology & Medicine. 32, 268-277.

Nandakumar V, Singh T, Katiyar S. (2008). Multi-Targeted Prevention and Therapy of Cancer by Proanthocyanidins. Cancer Letters. 269, 378-387.

Nicholls P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. Archives of Biochemistry and Biophysics. 525, 95-101.

Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. (2009). Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. Advanced Drug Delivery Reviews. 61, 319-326.

Noundou X, Krause R, Vuuren S, Ndinteh D, Olivier D. (2014). Antibacterial activity of the roots, stems and leaves of *Alchornea floribunda*. Journal of Ethnopharmacology. 151, 1023-1027.

Ogundipe O, Moody J, Houghton P, Odelola H. (2001). Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and Hoffman. Journal of Ethnopharmacology. 74, 275-280.

Osadebe P, Okoye F, Uzor P, Nnamani N, Adiele I, Obiano N. (2012). Phytochemical analysis, hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchornea cordifolia* metanol leaf extract on carbón tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 289-293.

Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. (2009). Introduction to Spectroscopy, Fourth Edition. Cengage Learning. USA.

Pękal A, Pyrzynska K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Analytical Methods.

Pérez G. (2003). Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 22 (1), 48-57.

Pérez G, Martínez G. (2001). Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. Acta Farmacéutica Bonaerense. 20 (4), 297-306.

Pietta P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products. 63, 1035-1042.

Prakash A, Rigelhof F, Miller E. (2001). Antioxidant Activity. Medallion Labs.

Prior R, Wu X, Schaich K. (2005). Standardized Methods for the determination of antioxidants capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 4290-4302.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 82, 513-523.

Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez C, Rivero R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 87, 241-246.

Rao S, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. Free Radicals and Antioxidants. 1, 1-7.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26, 1231-1237.

Reddi A, Jensen L, Naranuntarat A, Rosenfeld L, Leung E, Shah R, Culotta V. (2009). The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. Free Radical Biology & Medicine. 46, 154-162.

Ren J, Meng S, Lekka C, Kaxiras E. (2008). Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. Journal of Physical Chemistry B. 112, 1845-1850.

Rijke E, Out P, Niessen W, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U. (2006). Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. Journal Of Chromatography A. 1112, 31-63.

Robinson J. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. Histochemistry and Cell Biology. 130, 281-297.

- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. (2003). Simultaneous Determination of All Polyphenolic in Vegetables, Fruits, and Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 571-581.
- Sampietro D, Catalan C, Vattuone M, Narwal S. (2009). Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products. Science Publishers. Enfield, New Hampshire. United States of America.
- Sautin Y, Johnson R. (2008). Uric Acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. 27, 608-619.
- Scandalios J. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*. 27, 483-486.
- Schofield P, Mbugua D, Pell A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91, 21-40.
- Schultes R. (1987). Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 94, 79-95.
- Setzer W, Shen X, Bates R, Burns J, McClure K, Zhang P, Moriarity D, Lawton R. (2000). A Phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. *Fitoterapia*. 71, 195-198.
- Sedelnikova O, Redon C, Dickey J, Nakamura A, Georgakilas A, Bonner W. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 704, 152-159.
- Shan B, Hua Xie J, Zhu J, Peng Y. (2012). Ethanol modifies supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing*. 90, 579-587.
- Shanmukha I, Patel H, Patel J, Otto R. (2011). Quantification of Total Phenol and Flavonoid Content of *Delonix regia* Flowers. *International Journal of ChemTech*. 3, 280-283.
- SiB Colombia. Sistema de información sobre Biodiversidad de Colombia. <http://www.sibcolombia.net>
- Simon H, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 5, 415-418.
- Singhatong S, Leelarungrayub D, Chaiyasut C. (2010). Antioxidant and Toxicity Activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb. Heartwood Extract. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4, 947-953.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš R, Simonič M, Knež. (2005). Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities. *Food Chemistry*. 89, 191-198.

Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Surh Y, Kundu J, Na H, Lee J. (2005). Redox-Sensitive transcription factor for chemoprevention with Anti-inflammatory and Antioxidative Phytochemicals. *The Journal of Nutrition*. 135, 2993S-3001S.

Tarahovsky Y, Kim Y, Yagolnik E, Muzafarov E. (2014). Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. xxx, xxx-xxx.

Ternai B, Markham K. (1975). Carbon-13 NMR studies of flavonoids – I: Flavones and flavonols. *Tetrahedron*. 32, 565-569.

Ternai B, Markham K. (1976). Carbon-13 NMR studies of flavonoids – II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*. 32, 2607-2612.

Ternai B, Markham K. (1977). Carbon-13 NMR studies of flavonoids – III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*. 34, 1289-1397.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 17 Feb 2014
<http://www.tropicos.org/Name/12800685>

Ulubelen A, Topcu G, Kolak U. (2005). Labiatae flavonoids and their bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*. 30, 233-302.

Urrea-Bulla A, Suárez M, Moreno B. (2004). Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*. 75, 392-394.

Valdez L, Arnaiz S, Bustamante J, Alvarez S, Costa L, Boveris A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biological Research*. 33, 2.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Milan M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39, 44-84.

Vargas W. (2002). Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales. Universidad de Caldas. Comité Editorial. Pág. 274-275.

Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 13, 71-82.

Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press. 99. Boca Raton. United States of America

Wang X, Zhang W, Chen H, Liao N, Wang Z, Zhang X, Hai C. (2014). High selenium impairs hepatic insulin sensitive through opposite regulation of ROS. *Toxicology Letters*. 224, 16-23.

Webster G. (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 81, 33-144.

Webster G.L., Berry P.E., Armbruster W.S., Esser H.J., Gillespie L.J., Hayden W.J., Levin F.A., Secco R.S., Heald S.V. (1999). *Flora of the Venezuelan Guayana*. 4, 74-228.

Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 65, 402-410.

Williams D, Edwards D, Hamernig I, Jian L, James A, Johnson S, Tapsell L. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*. 52, 323-333.

Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton J, Turner N. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*. 489-492.

Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. (2012). Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging*. 33, 199.e1-199.e12.

Wu Y, Antony S, Meitzler J, Doroshov J. (2014). Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer Letters*. 345, 164-173.

Xu X, Xie H, Hao J, Jiang Y, Wei X. (2011). Flavonoid glycosides from the seeds of *Litchi chinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 1205-1209.

Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*. 53, 260-270.

Yang Y, Wei M, Huang T, Lee S, Lin S. (2013). Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from *Radix Scutellariae*. *Industrial Crops and Products*. 45, 182-190.

Yen G, Duh P, Tsai H. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*. 79, 307-313.

Yoon K, Jeong D, Hwang Y, Ryu J, Kim J. (2007). Inhibitors of Osteoclast Differentiation from *Cephalotaxus koreana*. Journal of Natural Products. 70, 2029-2032.

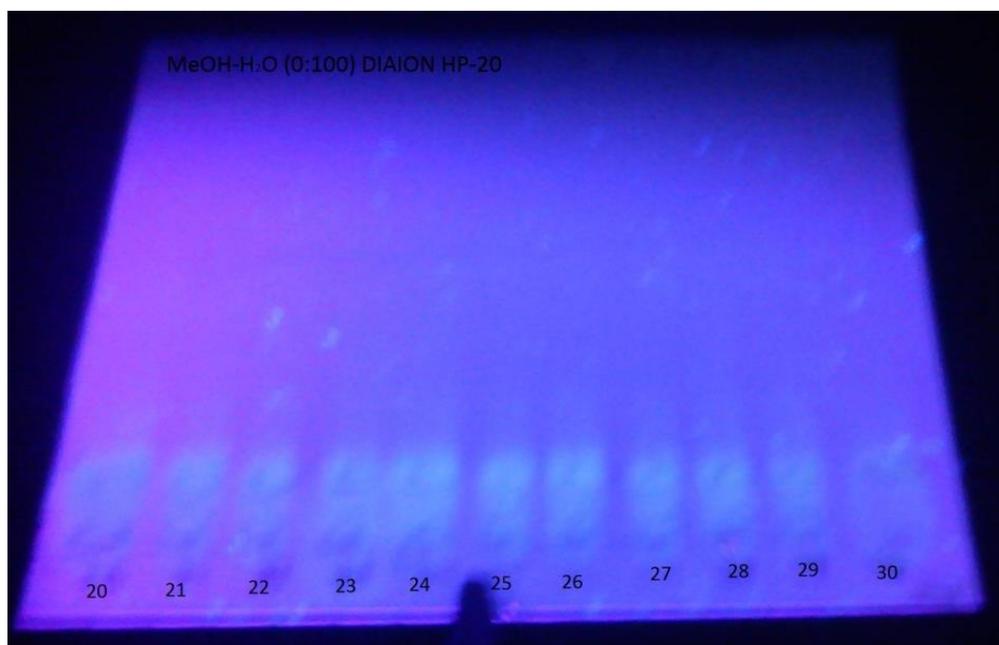
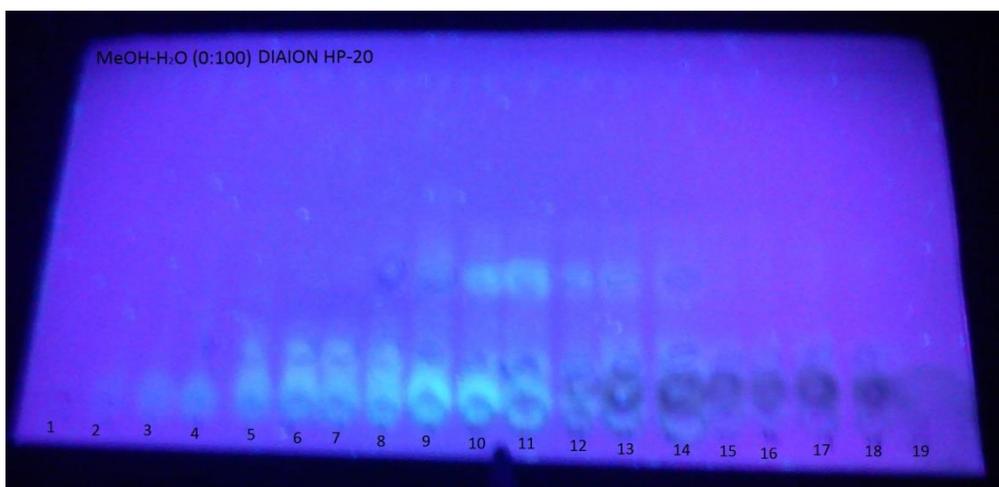
ANEXOS

ANEXO I

Fotografías de las cromatoplasmas realizadas durante la elución de la primera columna cromatográfica donde se evaluaban los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas.

Para tal fin se utilizó una fase móvil AcOEt-AcOH-H₂O (30:15:2) y revelado con AlCl₃ al 1% en EtOH para una posterior visualización con luz ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm).

1.1 Fracciones eluídas con sistema MeOH-H₂O (0:100)



Gracias a lo observado en estas placas, se logró confirmar que los perfiles cromatográficos de las fracciones evaluadas y que posteriormente fueron unidas en fracciones más representativas si guardaban considerable grado de similitud.

Fracción 1: Unión de las fracciones 4, 5, 6 y 7.

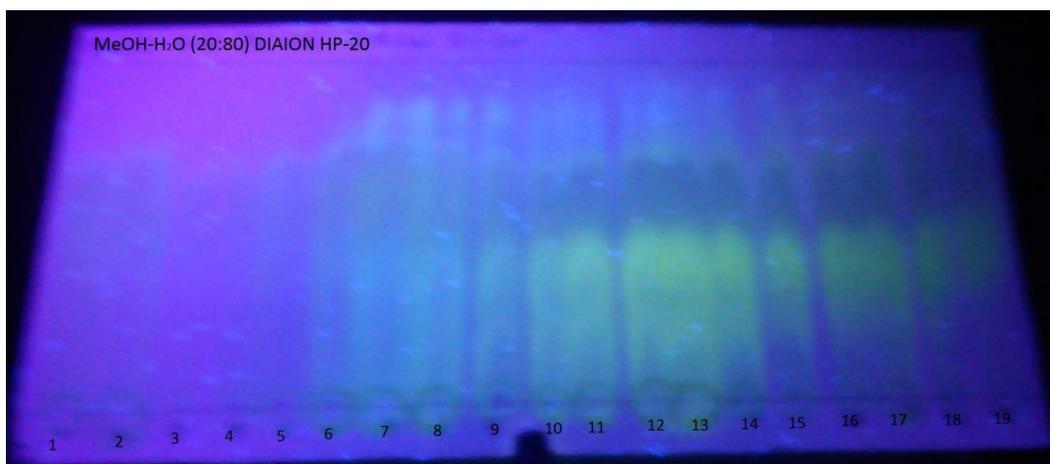
Fracción 2: Unión de las fracciones 8, 9 y 10

Fracción 3: Unión de las fracciones 11, 12, 13 Y 14

Fracción 4: Unión de las fracciones 15, 16, 17, 18 y 19

Fracción 5: Unión de las fracciones de la 20 a la 30

1.2 Fracciones eluidas con el sistema MeOH-H₂O (20:80)

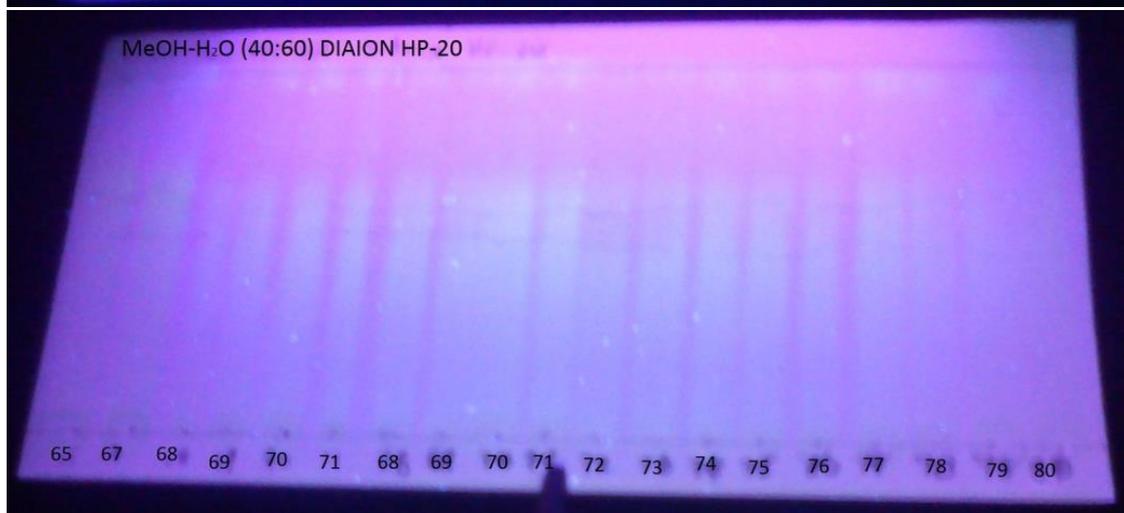
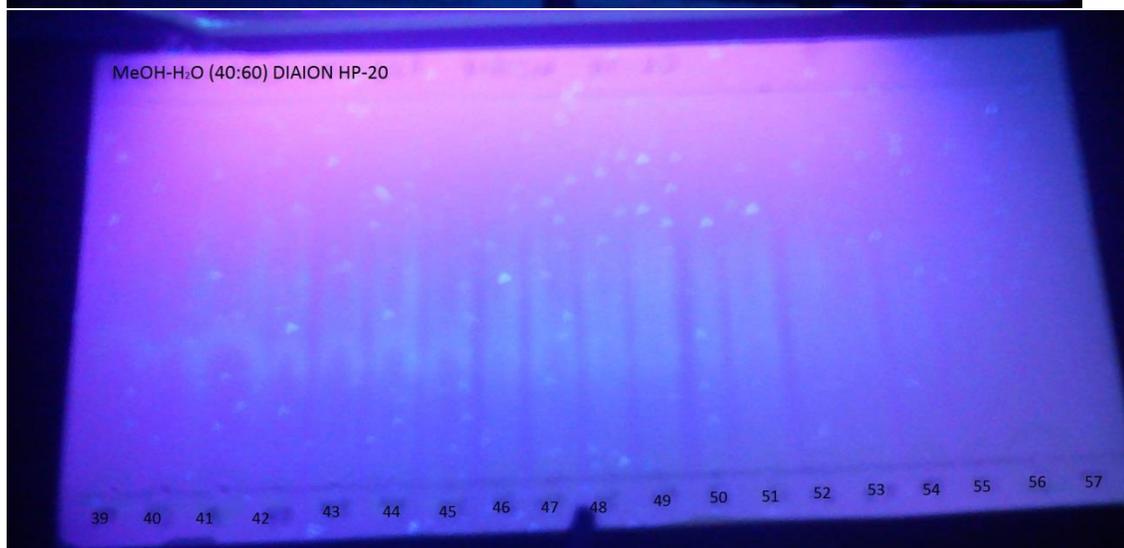
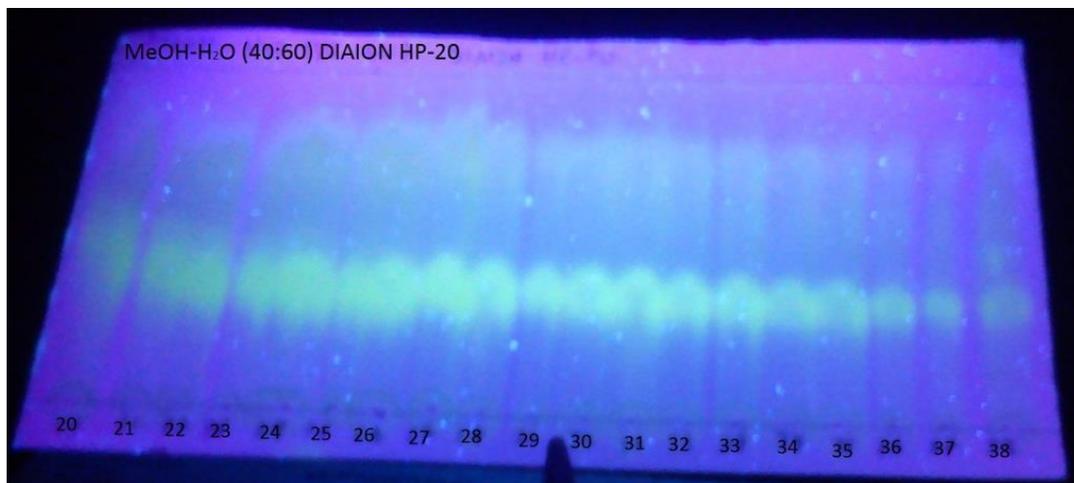


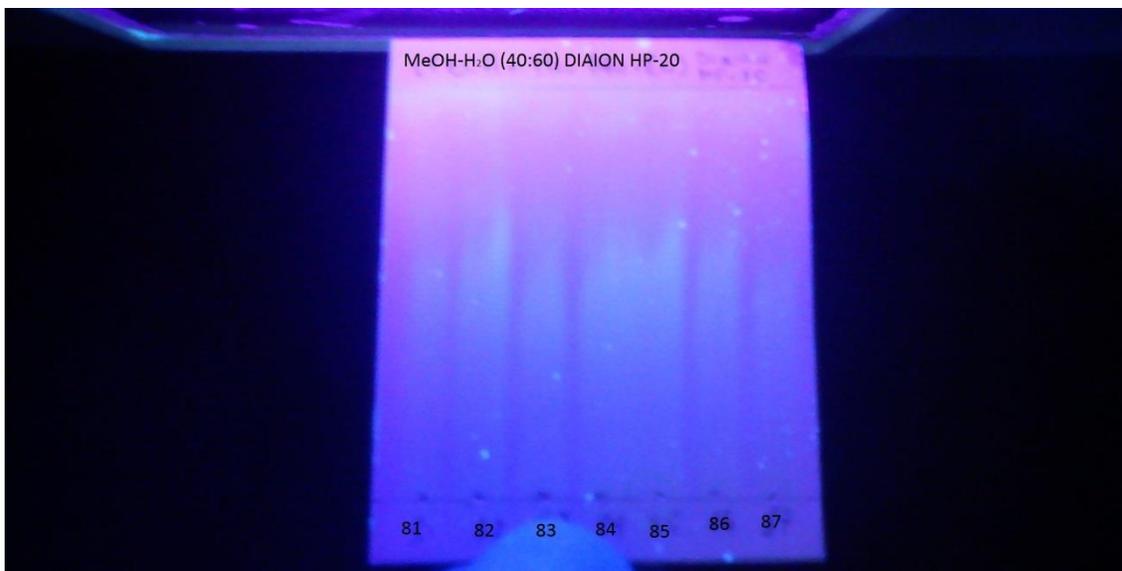
Fracción 6: Unión de las fracciones 1, 2, 3 y 4.

Fracción 7: Unión de las fracciones de la 5 a la 16

Fracción 8: Unión de las fracciones de la 17 a la 25

1.3 Fracciones eluidas con el sistema MeOH-H₂O (40:60)





Fracción 9: Unión de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5

Fracción 10: Unión de las fracciones 6, 7 y 8

Fracción 11: Unión de las fracciones 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15

Fracción 12: Unión de las fracciones 16, 17, 18 y 19

Fracción 13: Unión de las fracciones de la 20 a la 42

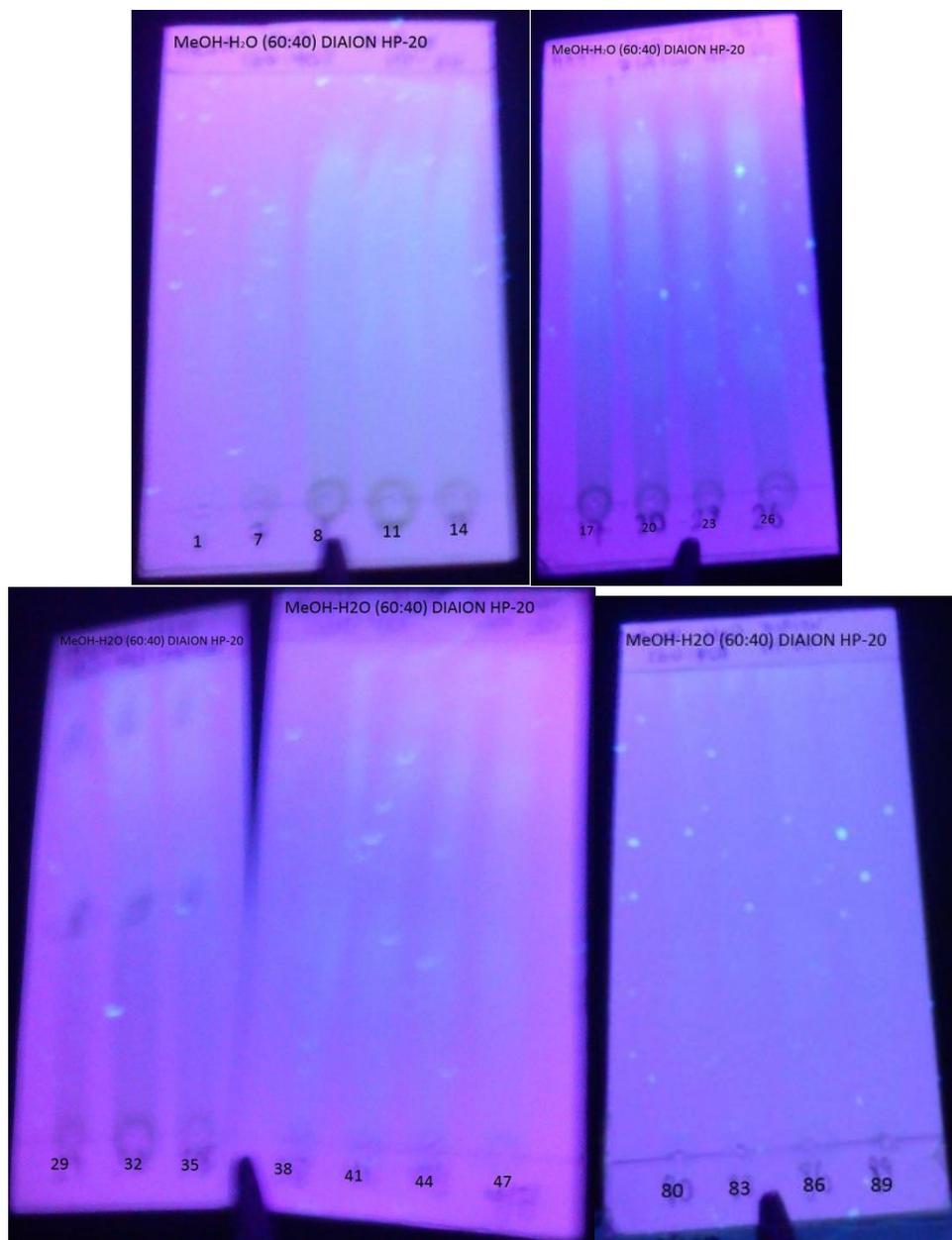
Fracción 14: Unión de las fracciones de la 43 a la 51

Fracción 15: Unión de las fracciones de la 52 a la 57

Fracción 16: Unión de las fracciones 58, 59, 60, 61, 62, 63 y 64

Fracción 17: Unión de las fracciones de la 65 a la 111 + Fracciones del sistema MeOH-H₂O (60:40) 1, 2, 3, 4 y 5.

1.4 Fracciones eluidas con el sistema MeOH-H₂O (60:40)



Fracción 18: Unión de las fracciones 6 y 7

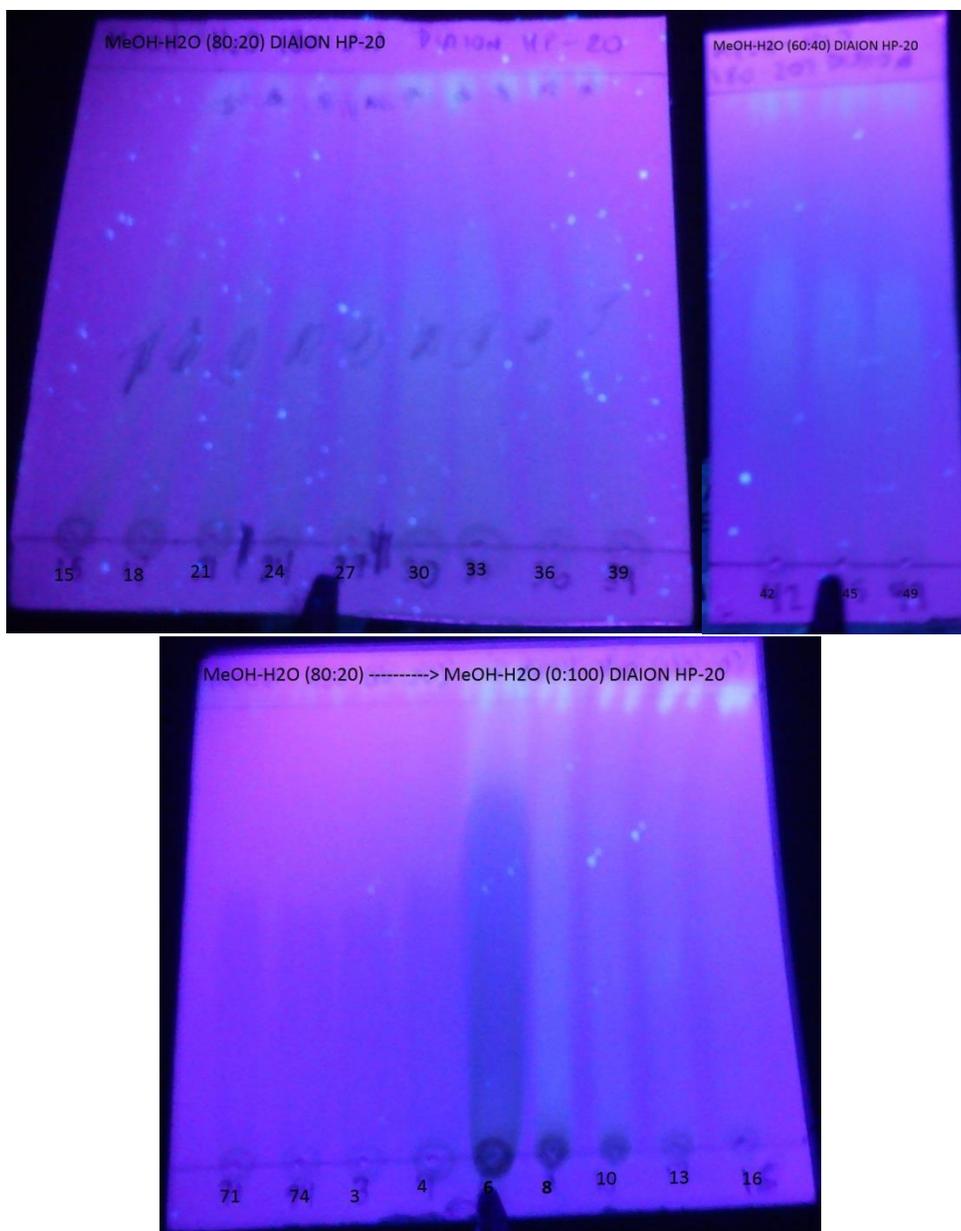
Fracción 19: Unión de las fracciones de la 8 a la 17

Fracción 20: Unión de las fracciones de la 18 a la 35

Fracción 21: Unión de las fracciones de la 36 a la 77

Fracción 22: Unión de las fracciones de la 78 a la 92 + Fracciones del sistema MeOH-H₂O (80:20) 1, 2, 3, 4 y 5.

1.5 Fracciones eluidas con el sistema MeOH-H₂O (80:20)



Fracción 23: Unión de las fracciones de la 6 a la 21

Fracción 24: Unión de las fracciones 22, 23, 24, 25, 26 y 27

Fracción 25: Unión de las fracciones de la 28 a la 39

Fracción 26: Unión de las fracciones de la 40 a la 49

Fracción 27: Unión de las fracciones de la 50 a la 74 + Fracciones del sistema MeOH-H₂O (0:100) 1, 2, 3 y 4.

1.6 Fracciones eluidas con el sistema MeOH-H₂O (0:100)



Fracción 28: Unión de las fracciones 5, 6 y 7

Fracción 29: Unión de las fracciones de la 8 a la 36

ANEXO II

Perfiles cromatográficos de la fracción 11 a diferentes longitudes de onda.

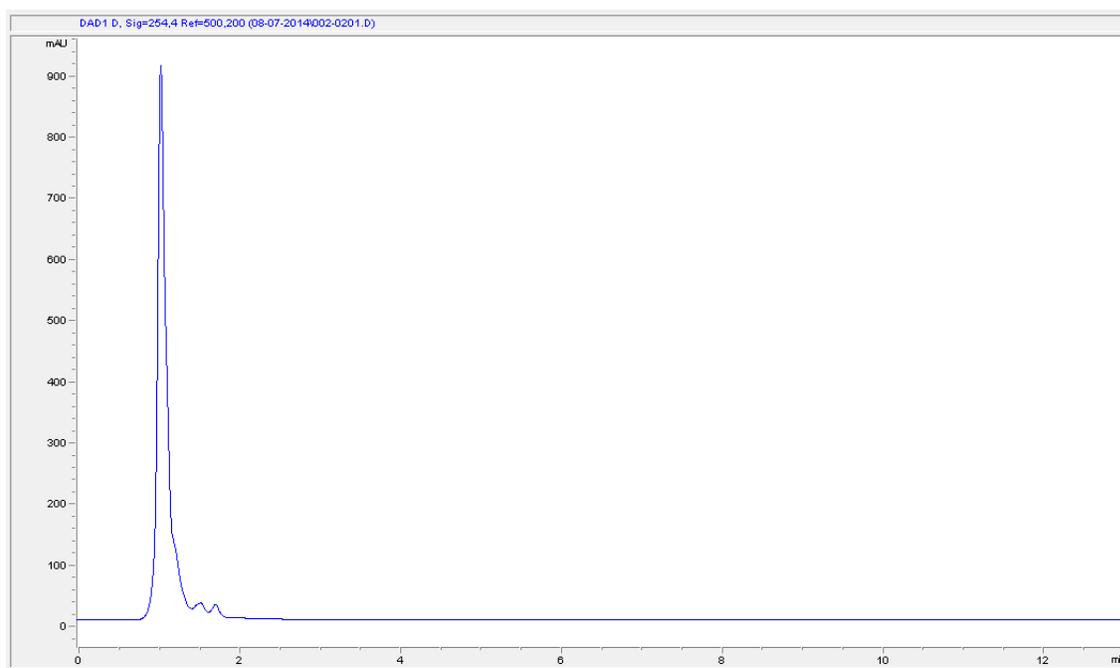


Figura 1. Perfil cromatográfico de la fracción 11 a 254 nm.

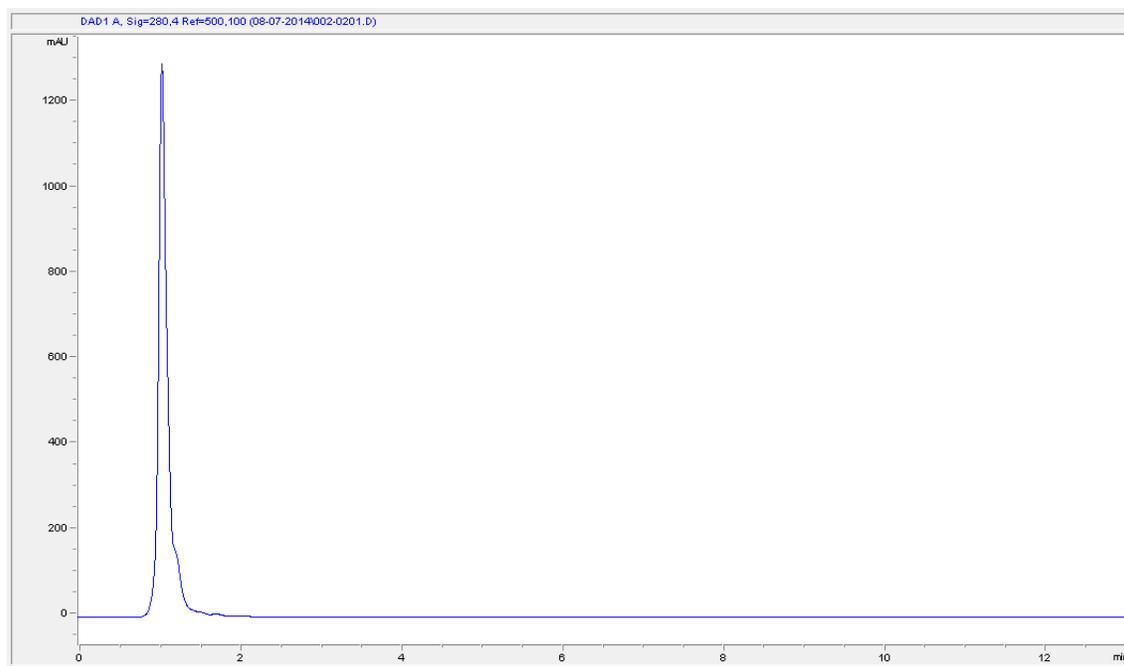


Figura 2. Perfil cromatográfico de la fracción 11 a 280 nm.

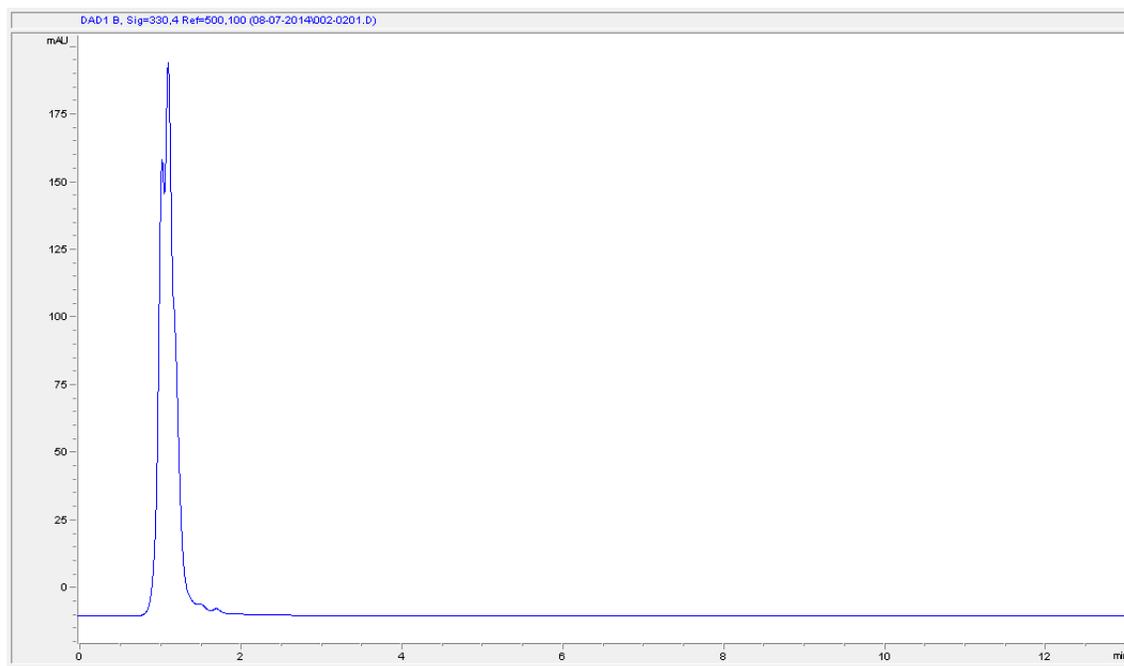


Figura 3. Perfil cromatográfico de la fracción 11 a 330 nm.

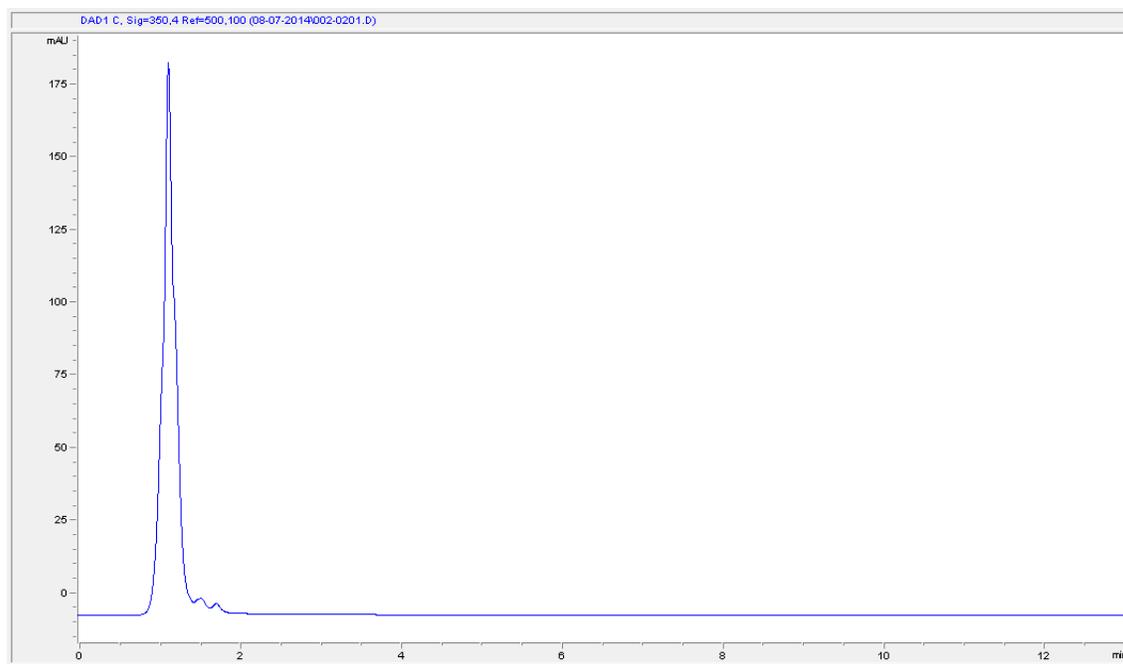


Figura 4. Perfil cromatográfico de la fracción 11 a 350 nm.

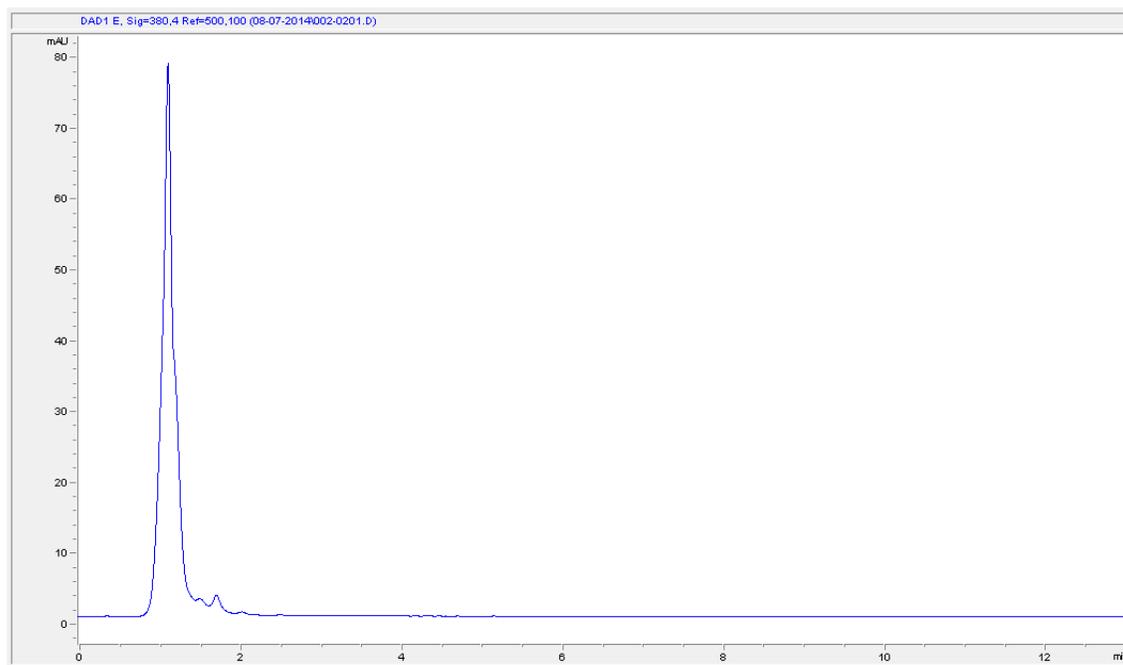


Figura 5. Perfil cromatográfico de la fracción 11 a 380 nm.

Tomando como referencia el cromatograma de 280 nm (Figura 1), dado que es en el que mayor grado de respuesta fue observado por parte de la muestra, y realizando una expansión de la base del pico principal observado en el cromatograma, se hace clara la presencia de un hombro en el pico lo que indica presencia de otro tipo de compuestos (Ver Figura 6).

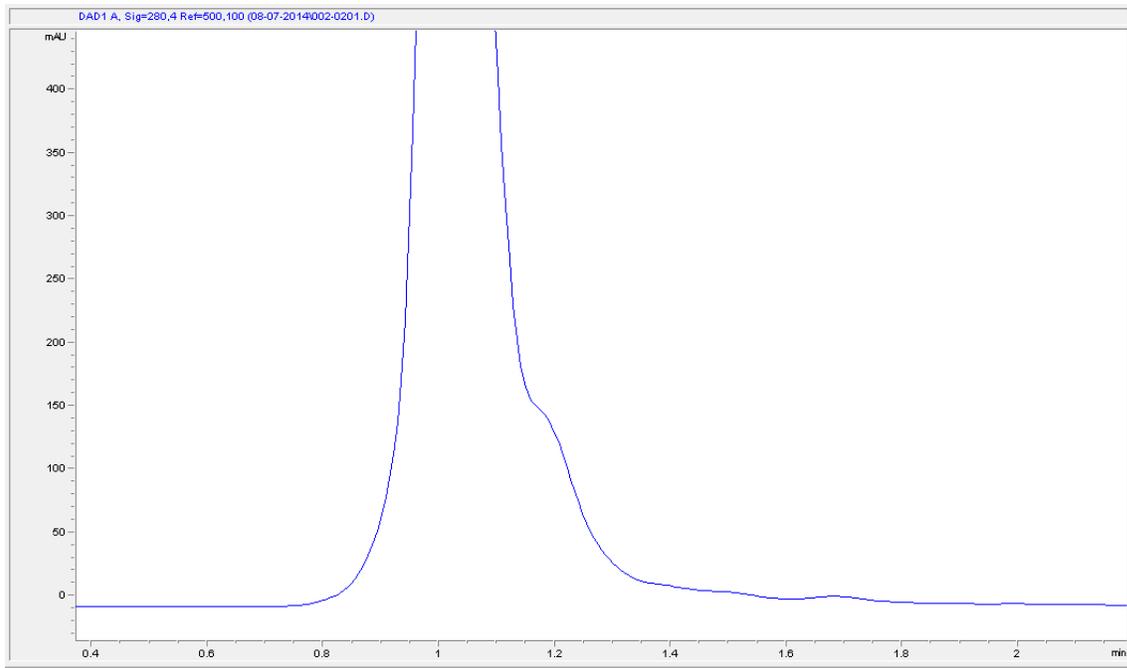
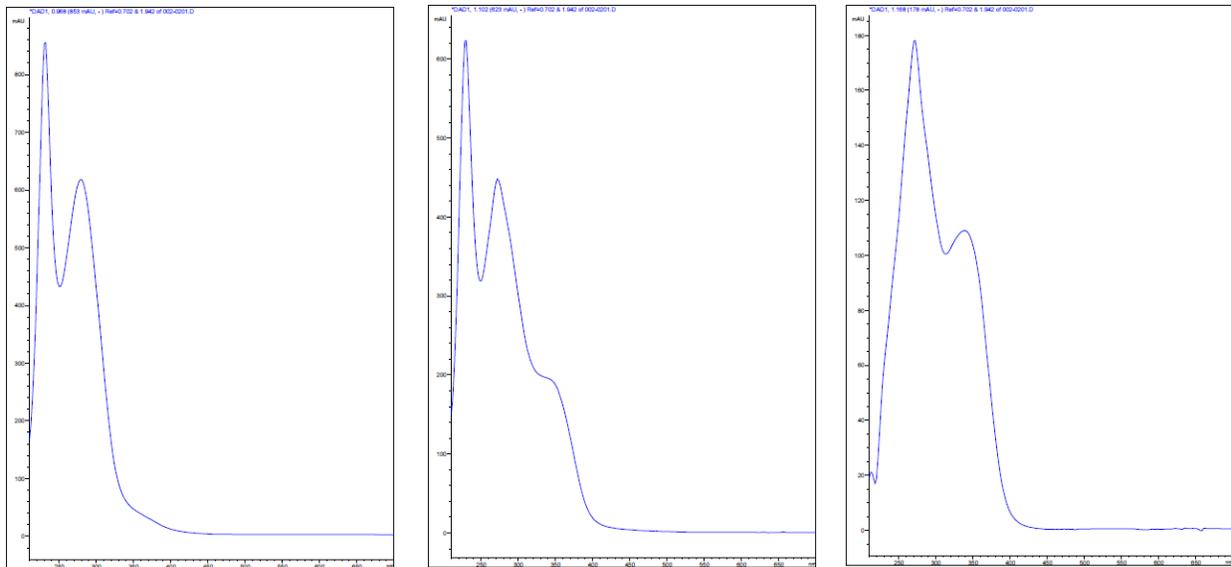


Figura 6. Expansión en la base del pico principal observado en el cromatograma de la fracción 11 a 280 nm.

Teoría igualmente soportada al realizar la toma de espectros de absorción ultravioleta a diferentes tiempos a lo largo de la base de dicho pico, dando como resultado en diversas transformaciones del mismo (Ver Figura 7).



(A)

(B)

(C)

Figura 7. Espectros de absorción ultravioleta tomados a diferentes tiempos a la base del pico principal observado en el cromatograma de la Fracción 11 a 280 nm (A) a 0,968 min (B) a 1,102 min y (C) a 1,168 min.

ANEXO III

Perfil cromatográfico fracción C a diferentes longitudes de onda

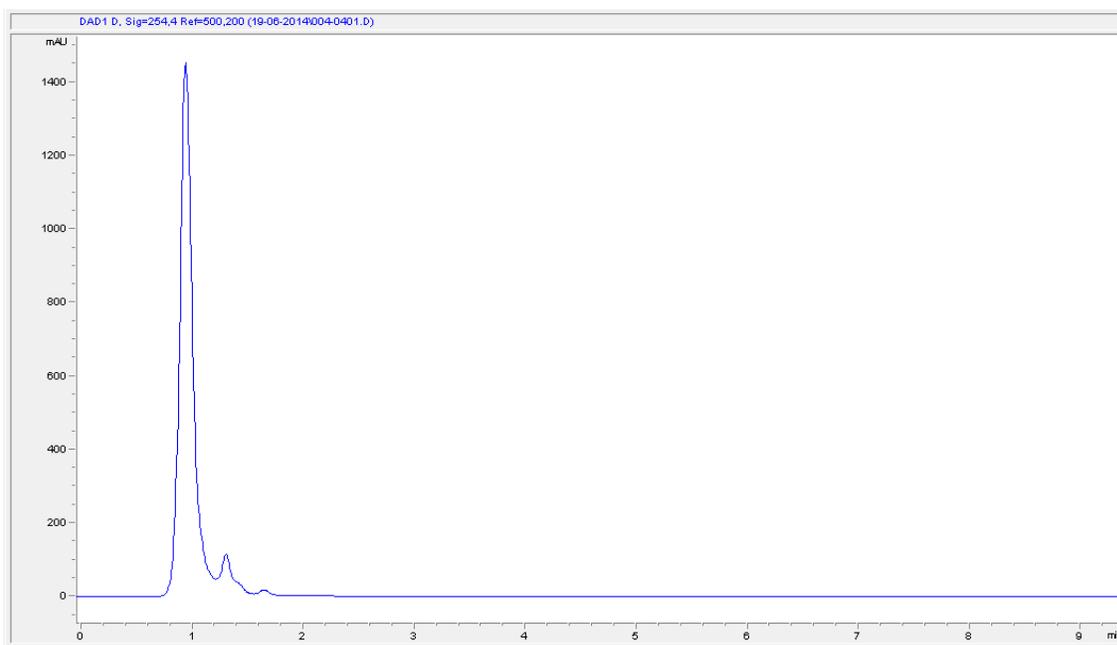


Figura 1. Perfil cromatográfico de la fracción C a 254 nm.

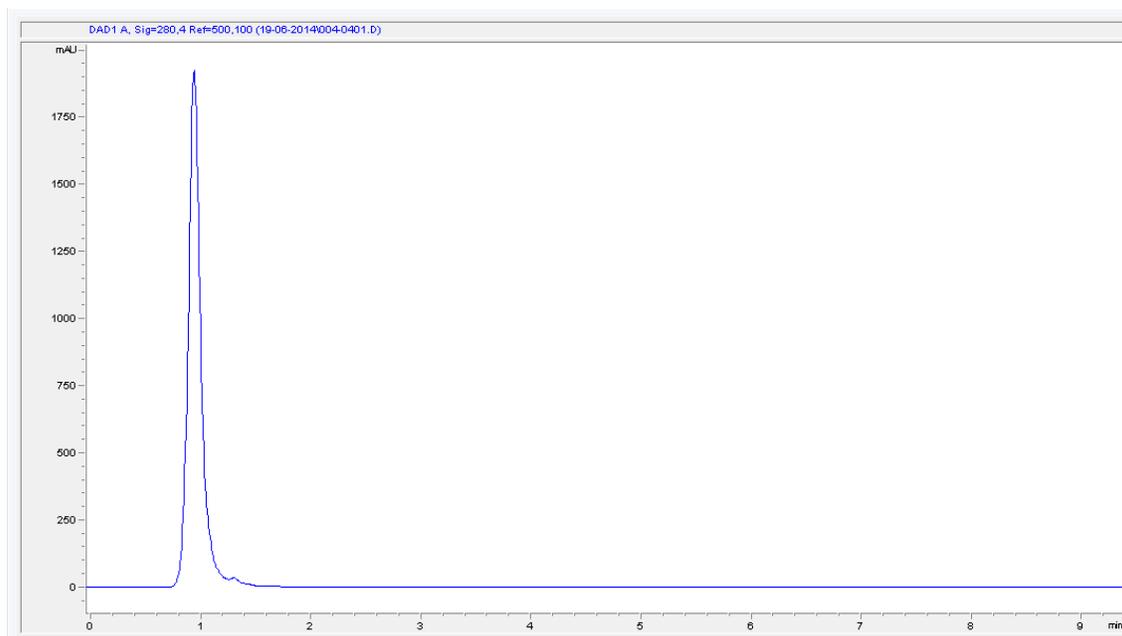


Figura 2. Perfil cromatográfico de la fracción C a 280 nm.

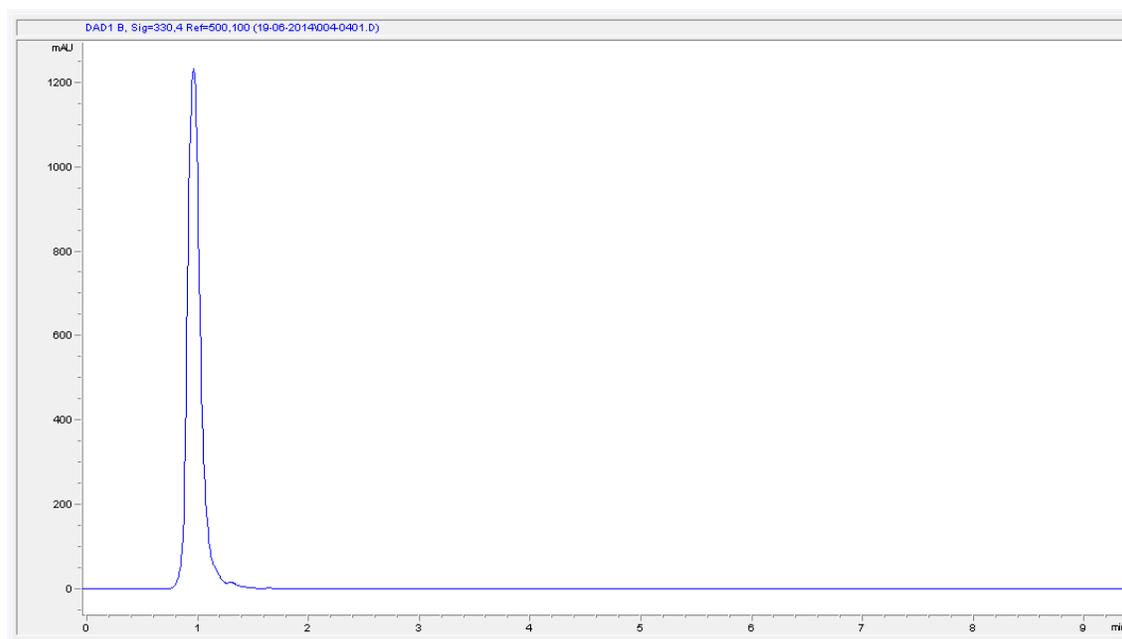


Figura 3. Perfil cromatográfico de la fracción C a 330 nm.

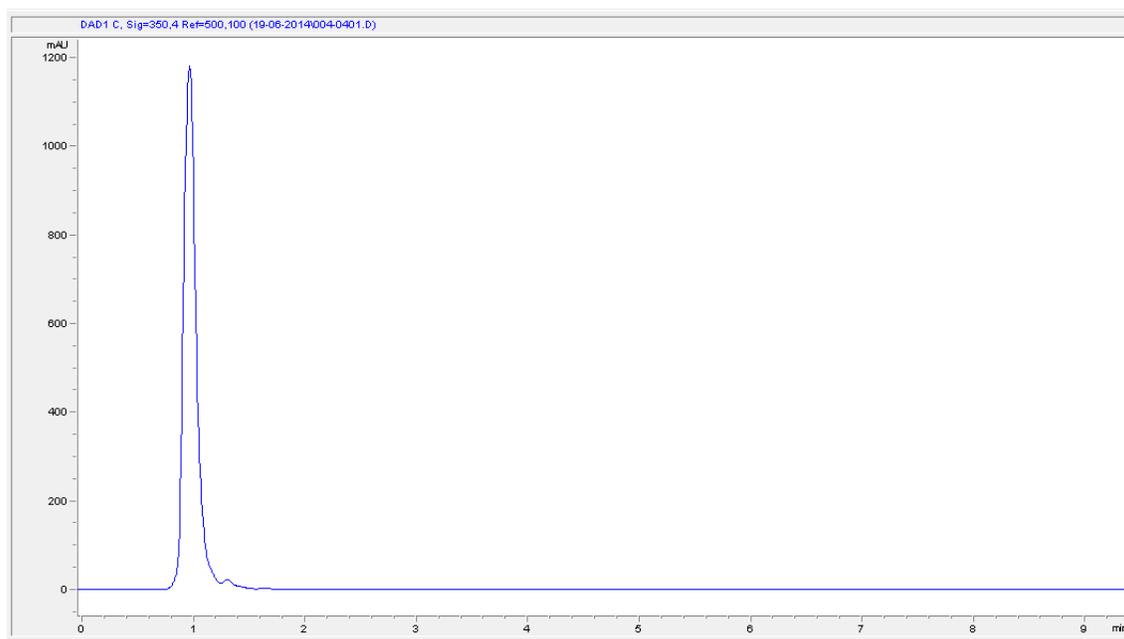


Figura 4. Perfil cromatográfico de la fracción C a 350 nm.

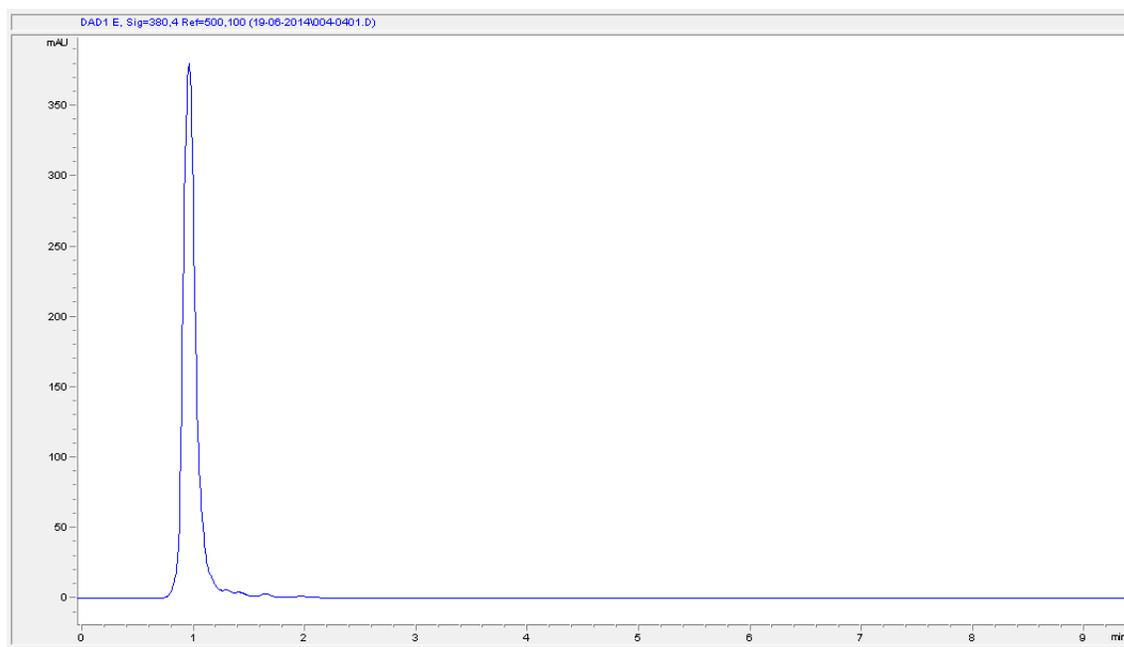


Figura 5. Perfil cromatográfico de la fracción C a 380 nm.

Una vez realizado el último paso de purificación cromatográfica de la fracción 11 a través de la columna de sílica gel, se observa que la contaminación existente ha disminuido significativamente a tal punto que no hay evidencia de solapamientos en el pico del componente principal y que la respuesta por parte del mismo a la detección en la longitud de "referencia" de 280 nm aumentó considerablemente, además que se obtuvo un espectro de absorción ultravioleta constante. Espectro ilustrado en la Figura 6.

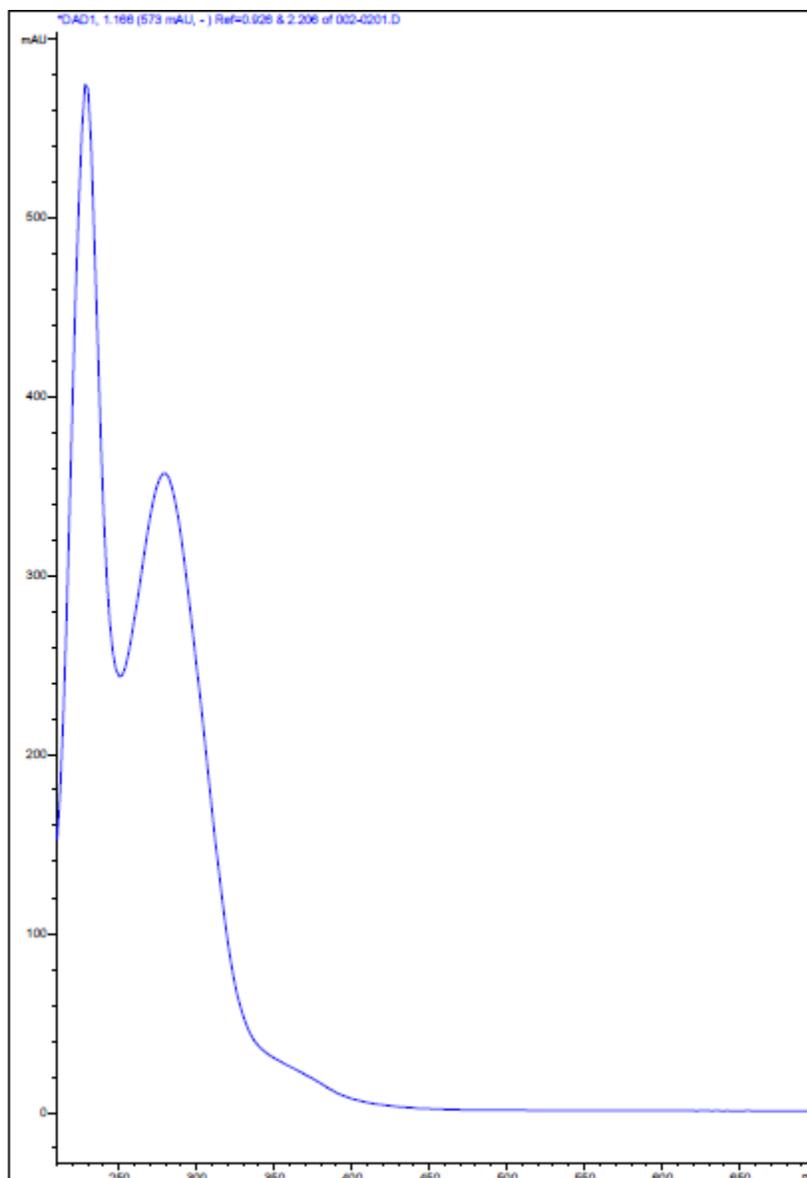


Figura 6. Espectro de absorción ultravioleta del componente principal observado en el cromatograma de la Fracción C.

ANEXO IV

Porcentajes de actividad antioxidante promedio de las fracciones más representativas de la columna cromatográfica DIAION HP-20 con el ensayo DPPH

Fracción	Porcentaje Actividad Antioxidante		Porcentaje Actividad Antioxidante Promedio	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
1	39.53	41.29	40.41	1.24
2	46.59	44.00	45.30	1.83
7	46.97	46.67	46.82	0.21
8	56.5	53.78	53.21	0.80
9	52.84	50.74	51.79	1.49
10	53.49	55.30	54.40	1.28
11	55.6	51.14	51.85	1.01
12	50.76	50.74	50.75	0.01
13	45.12	47.02	46.07	1.34
17	42.4	50.37	49.81	0.80
19	46.05	48.48	47.27	1.72
20	46.98	48.48	47.73	1.07
21	46.51	47.73	47.12	0.86
23	44.65	46.21	45.43	1.10
28	41.40	43.18	42.29	1.26
29	33.94	34.85	34.40	0.64
30	46.59	44.44	45.52	1.52
Control +	58.72	61.33	60.02	1.85

ANEXO V

Porcentajes de actividad antioxidante promedio de las fracciones más representativas de la columna cromatográfica DIAION HP-20 con el ensayo ABTS^{•+}

Fracción	Porcentaje Actividad Antioxidante		Porcentaje Actividad Antioxidante Promedio - ABS	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
1	54.38	57.09	55.74	1.92
2	99.93	99.82	99.87	0.08
7	99.51	99.73	99.62	0.15
8	99.86	99.73	99.79	0.09
9	99.86	99.77	99.82	0.06
10	99.65	99.82	99.73	0.12
11	99.72	99.77	99.75	0.04
12	99.91	100.23	100.00	0.22
13	99.65	99.23	99.44	0.30
17	99.79	99.95	99.87	0.12
19	99.58	99.68	99.63	0.07
20	99.37	99.55	99.46	0.12
21	99.09	99.73	99.41	0.45
23	99.51	99.14	99.32	0.26
28	100.07	99.18	99.63	0.63
29	40.74	42.04	41.39	0.92
30	33.23	34.94	34.09	1.21
Control +	99.81	99.28	99.54	0.37

ANEXO VI

Contenido de fenoles totales como (μg de Ácido Gálico/mg de Extracto) para las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

Fracción	Fenoles Totales [μg Ácido gálico/mg de Fracción]		Fenoles Totales Promedio	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
1	26.15	29.13	27.64	2.11
2	24.81	24.42	24.62	0.27
7	21.09	21.22	21.15	0.09
8	29.68	29.74	29.71	0.05
9	33.59	33.72	33.65	0.09
10	31.79	31.86	31.83	0.05
11	25.90	31.09	28.49	3.67
12	21.54	25.38	23.46	2.72
13	32.50	31.76	32.13	0.52
17	28.65	32.63	30.64	2.81
19	28.53	33.01	30.77	3.17
20	35.38	32.50	33.94	2.04
21	38.33	38.27	38.30	0.05
23	36.67	38.46	37.56	1.27
28	39.74	37.12	38.43	1.86
29	30.58	26.03	28.30	3.22
30	10.38	13.01	11.70	1.86

ANEXO VII

Contenido de flavonoides totales como (μg de Kaempferol/mg de Extracto) para las fracciones de la columna cromatográfica DIAION HP-20.

Fracción	Flavonoides Totales (μg Kaempferol/mg Extracto)		Flavonoides Totales Promedio	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
1	0.04	0.06	0.05	0.01
2	0.11	0.11	0.11	0.00
7	0.27	0.26	0.26	0.00
8	0.37	0.36	0.36	0.01
9	0.40	0.39	0.39	0.00
10	0.36	0.36	0.36	0.00
11	0.43	0.41	0.42	0.01
12	0.27	0.26	0.27	0.01
13	0.38	0.31	0.35	0.05
17	0.31	0.31	0.31	0.00
19	0.38	0.36	0.37	0.01
20	0.43	0.45	0.44	0.01
21	0.31	0.28	0.30	0.02
23	0.30	0.32	0.31	0.01
28	0.14	0.11	0.12	0.02
29	0.15	0.11	0.13	0.02
30	0.08	0.13	0.11	0.03

ANEXO VIII

Diversas correlaciones existentes entre las actividades antioxidantes medidas por ambos métodos (DPPH \cdot y ABTS \cdot^+) y las cuantificaciones de Fenoles y Flavonoides por los métodos de Folin-Ciocalteu y AlCl $_3$, para las fracciones cromatográficas de la columna DIAION HP-20.

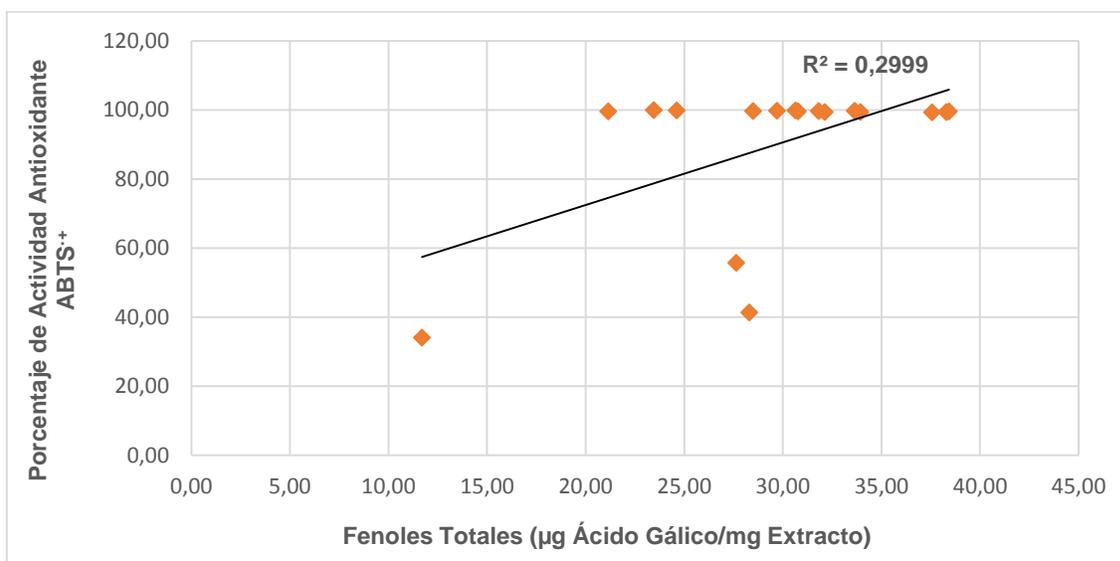


Figura 1. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas de la columna DIAION HP-20 obtenida mediante el ensayo ABTS \cdot^+

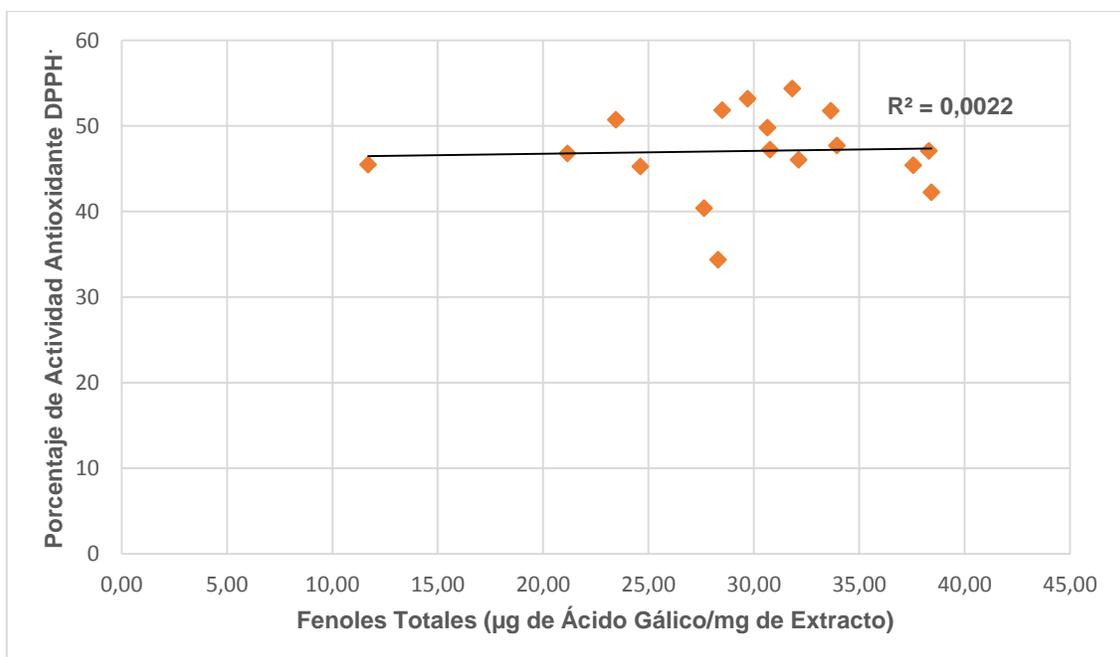


Figura 2. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas de la columna DIAION HP-20 obtenida mediante el ensayo DPPH:

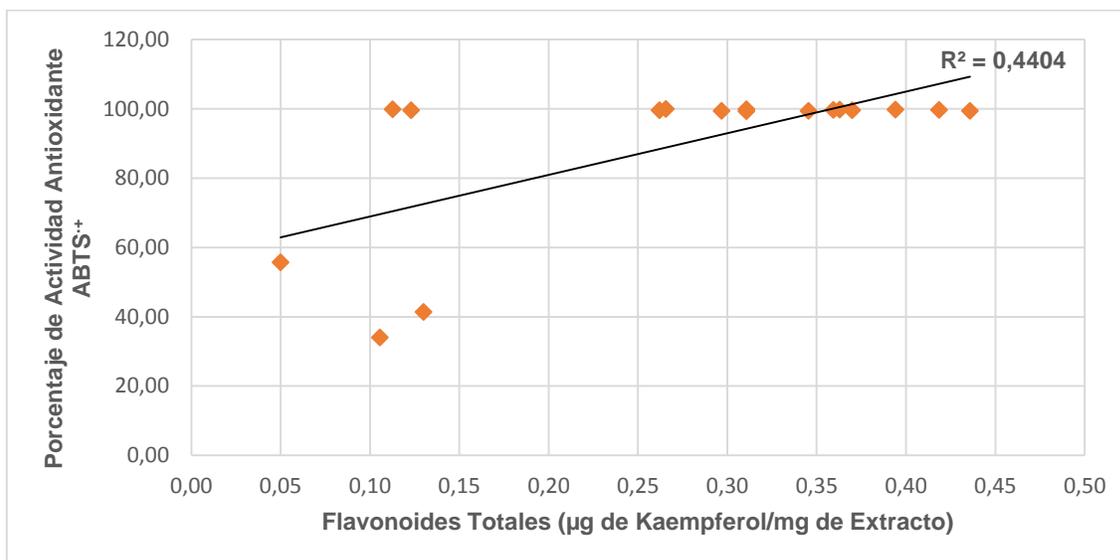


Figura 3. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y la actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas de la columna DIAION HP-20 obtenida mediante el ensayo ABTS+

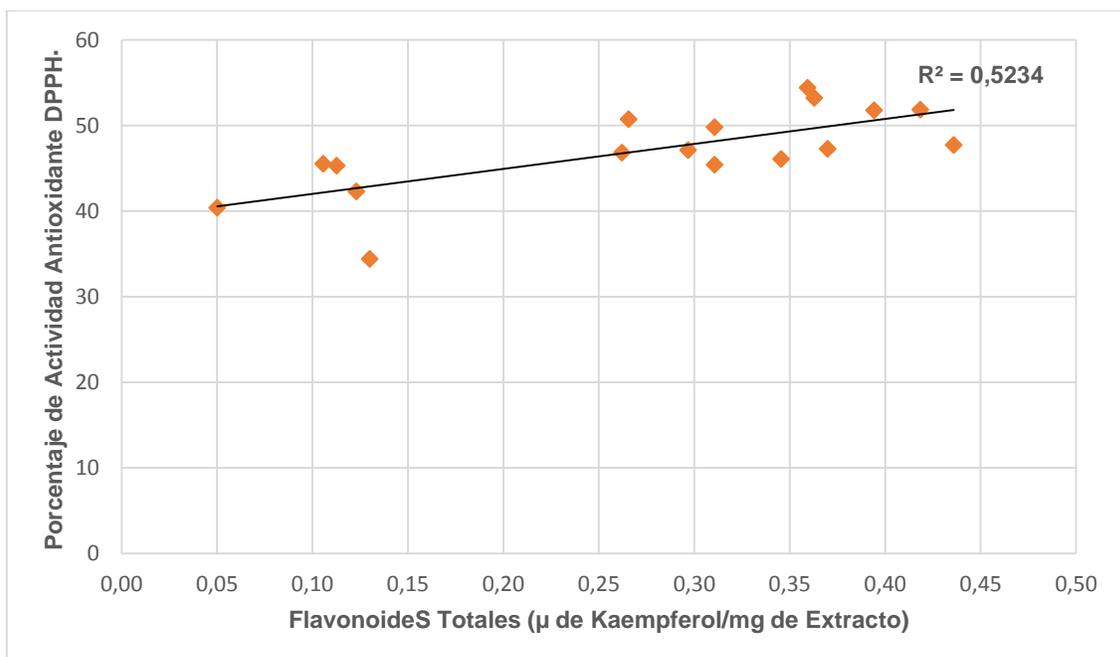


Figura 4. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y la actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas de la columna DIAION HP-20 obtenida mediante el ensayo DPPH·

ANEXO IX

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la Fracción C (400 MHz) tomados en hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆)

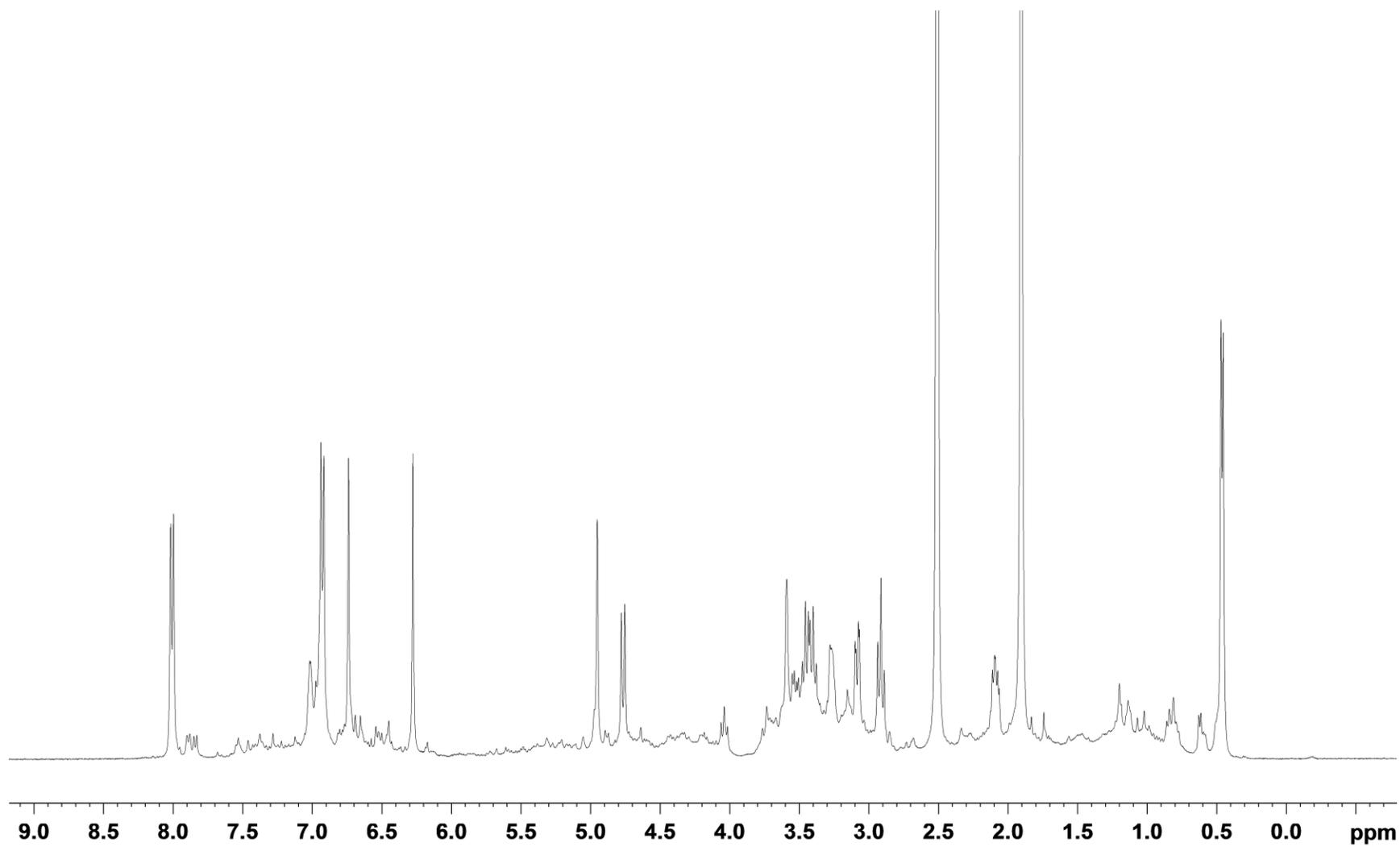


Figura 1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto presente en la Fracción C.

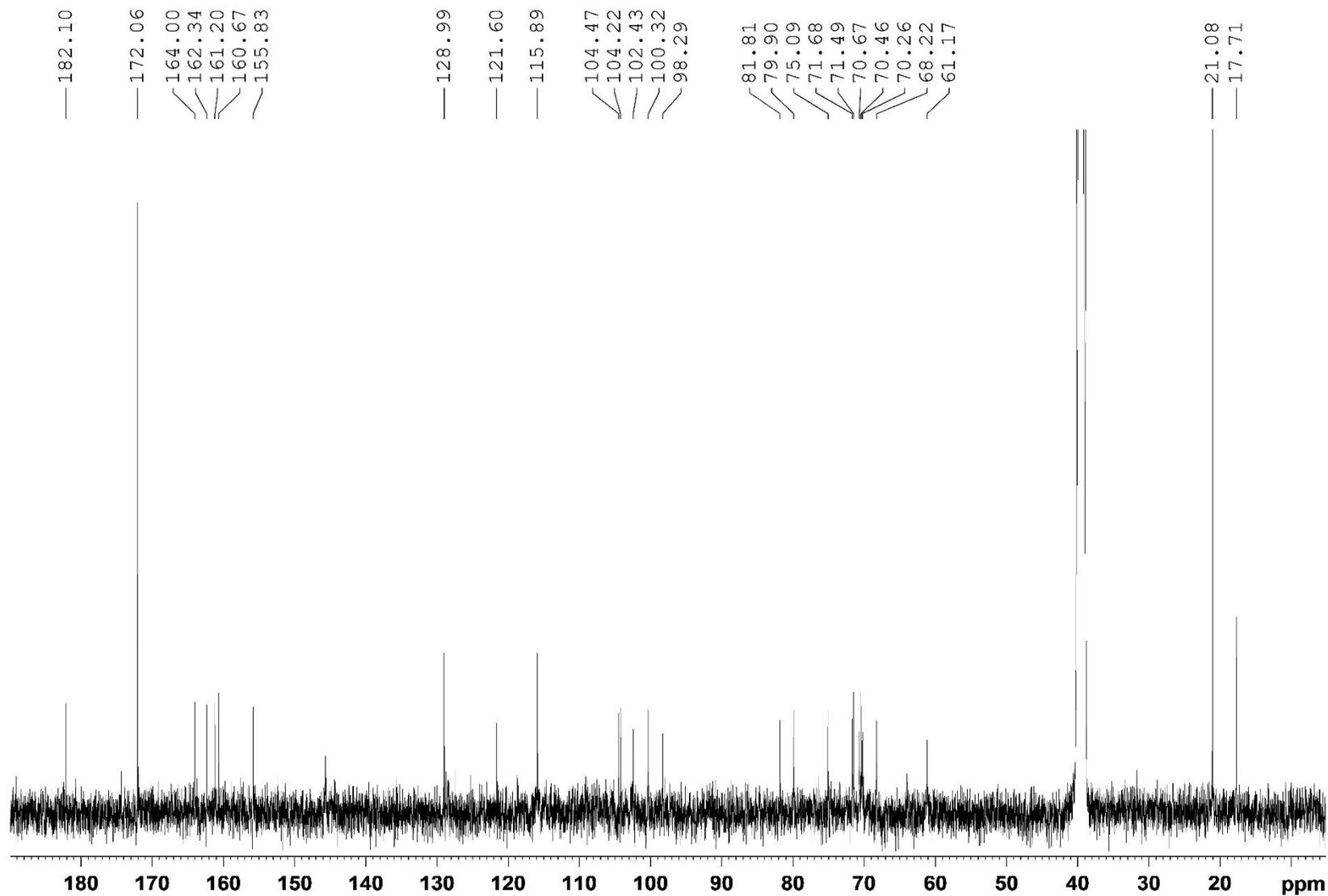


Figura 2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto presente en la Fracción C.

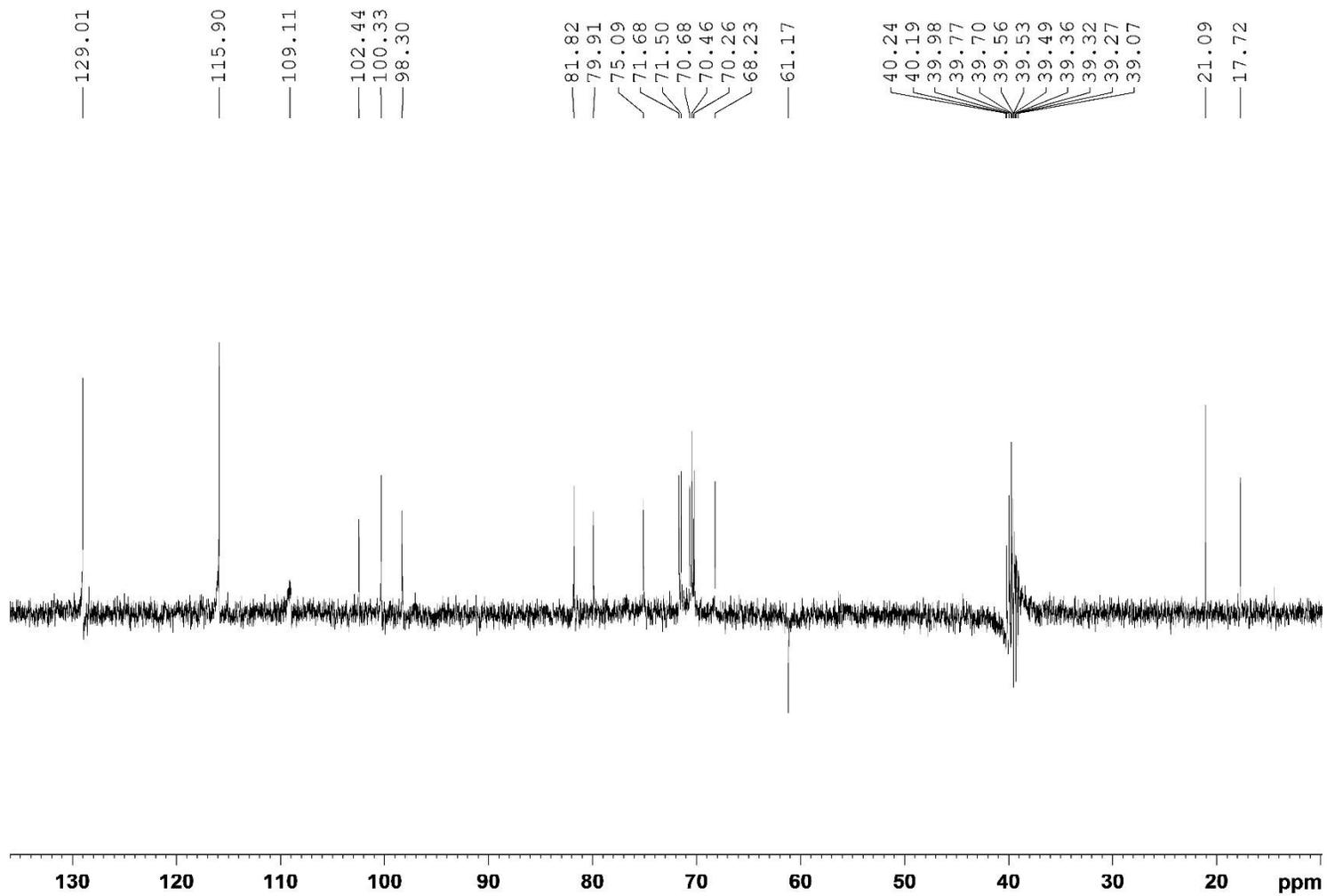


Figura 3. Espectro DEPT 135° del compuesto presente en la Fracción C.

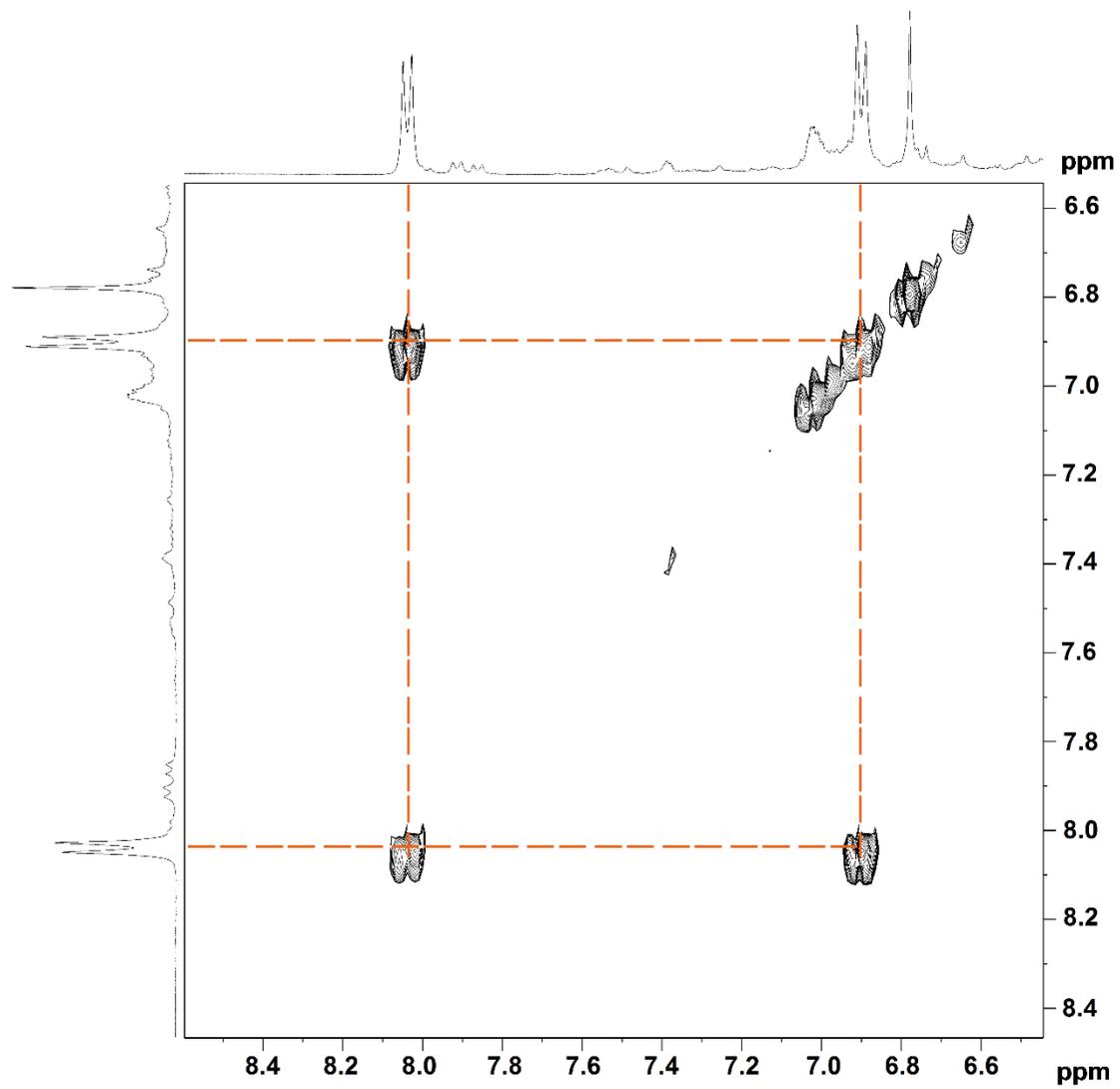


Figura 4. Espectro bidimensional homonuclear COSY del compuesto presente en la Fracción C.

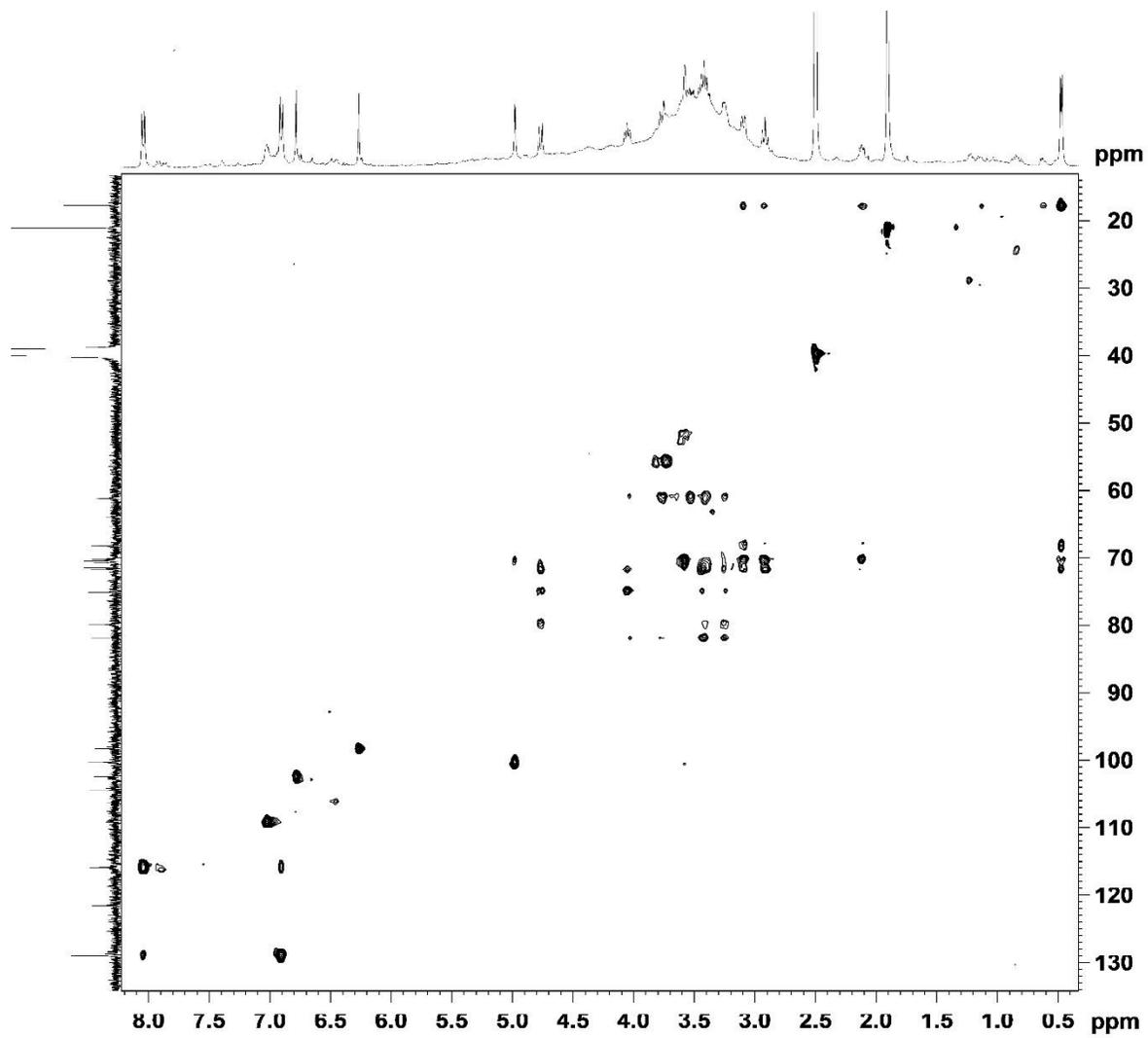


Figura 5. Espectro bidimensional heteronuclear HSQC-TOCSY del compuesto presente en la Fracción C.

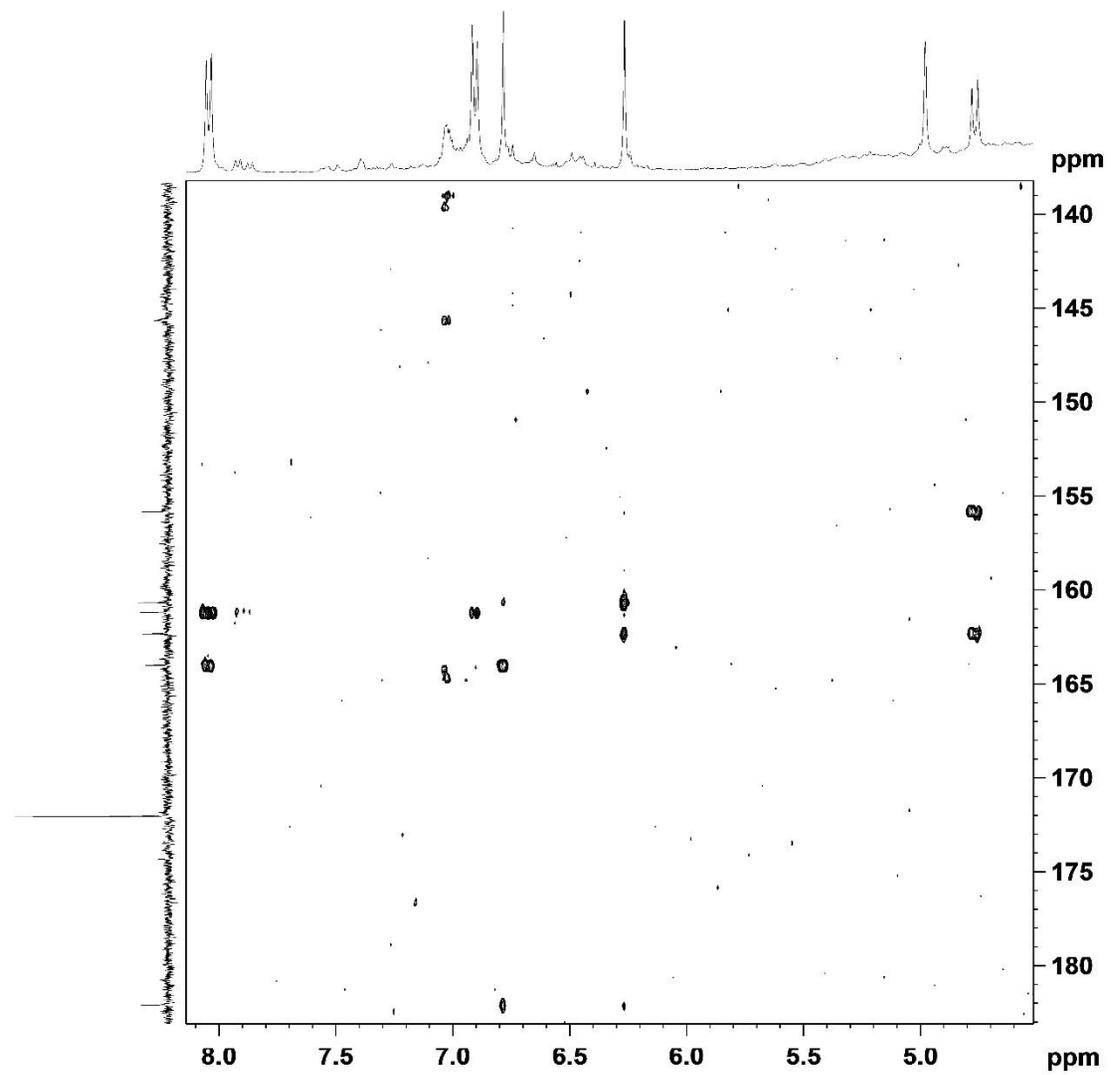


Figura 6. Espectro bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto presente en la Fracción C

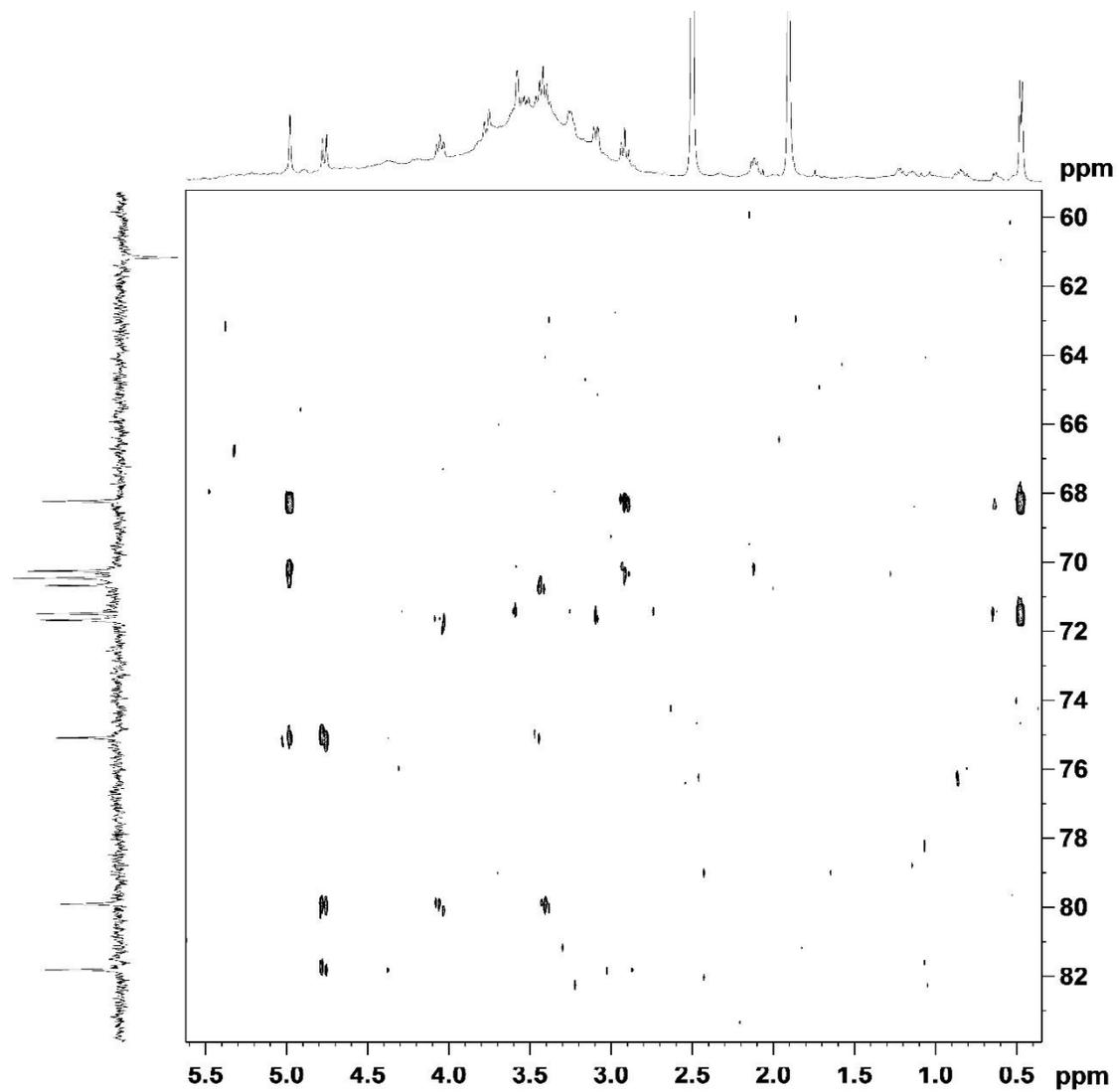


Figura 7. Espectro bidimensional heteronuclear HMBC (Expansión 2) del compuesto presente en la Fracción C.