

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE
Guadua angustifolia Kunth

NATALIA MORALES NOREÑA

LEIDY JOHANNA SANCHEZ VALLEJO

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS

PROGRAMA QUÍMICA

GRUPO POLIFENOLES UTP

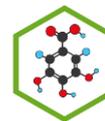
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

Armenia, Quindío

2008



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
GRUPO POLIFENOLES UTP



CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE
***Guadua angustifolia* Kunth**

TRABAJO DE GRADO
Requisito para optar al título de Químico

NATALIA MORALES NOREÑA

LEIDY JOHANNA SANCHEZ VALLEJO

Director: José Hipólito Isaza Martínez

Co-director: Francisco Javier Jiménez G.

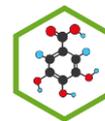
UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA QUÍMICA
GRUPO POLIFENOLES UTP
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
Armenia, Quindío

2008



UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

GRUPO POLIFENOLES UTP



NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

Las estudiantes NATALIA MORALES NOREÑA (código 64787) y LEIDY JOHANNA SANCHEZ VALLEJO (código 64910) de la Universidad del Quindío, realizaron el proyecto de grado: CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE *Guadua angustifolia* Kunth, bajo la dirección del profesor José Hipólito Isaza M. de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de aceptación:

	NUMERO	LETRAS
1. JURADO:	_____	_____
2. JURADO:	_____	_____
PROMEDIO:	_____	_____
FIRMAS:		

Director

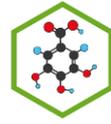
Jurado

Jurado



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

GRUPO POLIFENOLES UTP



Dedicatoria

Las palabras son pocas para expresar la felicidad que inunda nuestra alma cuando logramos cumplir uno de los objetivos planteados en la vida, encontrando en el camino personas que nos brinda ese apoyo incondicional desde el inicio de nuestras vidas como criaturas indefensas en un lugar donde todo es ideal en su vientre; para luego salir a un mundo real donde obtenemos los conocimientos que cada ser humano desea por medio de personas que los comparten de una manera empírica y diversa, sin olvidar la cultura que rodea nuestras vidas.

Leidy Johanna Sanchez.

Son grandes los sueños y las expectativas que germinan cuando cada uno de nosotros nace en el despertar de una nueva vida....

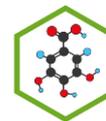
Hoy, agradezco a mis amados padres, porque con su empeño y constancia permitieron que un sueño fuese hecho realidad. Así mismo, agradezco a todos aquellos que de una u otra forma se vincularon en mi formación profesional, a cada uno de mis mentores, que sembraron e inculcaron en mi corazón el deseo de superación, en la búsqueda de un mejor futuro y así plantearme una meta, porque quien no sueña, no vislumbra su objetivo, y mucho menos llega a la meta.

Natalia Morales Noreña.



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

GRUPO POLIFENOLES UTP



Agradecimientos

- Al profesor José Hipólito Isaza por brindarnos la oportunidad de realizar nuestro proyecto de grado en las instalaciones del laboratorio a su cargo, al igual que sus conocimientos, experiencia, paciencia y dedicación. Demostrándonos que la investigación Fitoquímica es un área donde podemos contribuir al desarrollo de nuestro país.
- A Johanna Tapias, Milena Ramírez, Diego A. Rivera y Hugo F. Arias porque desde el primer día nos ofrecieron su compañerismo, el cual fue fortalecido para dar como resultado una gran amistad, además de esto, los conocimientos y aprendizajes que nos regalaron a lo largo del camino.
- A todas las personas de CPN y del Laboratorio de Fitoquímica por su colaboración.
- A nuestros profesores del programa de Química de la Universidad del Quindío por sus enseñanzas y conocimientos.
- A nuestros amigos y compañeros de estudio por todo lo que aprendimos juntos de la vida.
- Y sobretodo, a nuestros padres por darnos la mejor educación y apoyarnos en nuestras decisiones.

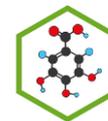
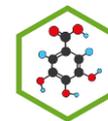


TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Surgimiento del problema.....	2
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Justificación.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Morfología general de las Bambusoideae.....	5
2.2 Taxonomía.....	6
2.3 Compuestos Químicos.....	6
2.3.1 Vitaminas.....	8
2.3.1.1 Vitamina E.....	8
2.3.1.2 Vitamina K.....	9
2.3.2 Silicatos.....	11
2.3.3 Fenoles.....	12
2.3.3.1 Reacciones de reconocimiento de Fenoles.....	13
2.3.4 FLAVONOIDES.....	14
2.3.4.1 Reacción de reconocimiento de flavonoides.....	16
2.3.4.2 Espectroscopia ultravioleta y significado estructural de los desplazamientos para Flavonas y Flavonoles.....	17
2.3.4.3 Cromatografía.....	21
2.3.4.4 Espectrometría de Masas.....	25
2.3.4.6.5 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	25
3 SECCION EXPERIMENTAL.....	27
3.1 Material Vegetal.....	27
3.2 Equipos.....	27
3.3 Reactivos.....	28

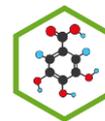


3.4	Análisis preliminar del material vegetal.....	28
3.5	Extracción y aislamiento general.....	29
3.5.1	Fraccionamiento de la Fase Apolar (GACD).....	30
3.5.1.1	Separación cromatográfica de la Fracción GACD 3.....	31
3.5.1.2	Separación cromatográfica de la Fracción GACD 4.....	32
3.5.2	Fraccionamiento de la Fase Polar.....	33
3.5.2.1	Fraccionamiento del Extracto Acuoso (GAAC).....	34
3.5.2.1.1	Separación por HPLC-DAD preparativa de la fracción GAAC 2.....	36
3.5.2.1.2	Separación cromatográfica sobre una columna empacada con MCI Gel de la fracción GAAC 5.....	37
3.6	Reacciones de Reconocimiento.....	38
3.6.1	Reacciones de reconocimiento de Fenoles.....	38
3.6.2	Reacciones de reconocimiento de Flavonoides.....	39
3.7	Resonancia Magnética Nuclear.....	40
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	41
4.1	Análisis Preliminar.....	41
4.2	Extracción Y Aislamiento.....	43
4.2.1	Fraccionamiento De La Fase Apolar (GACD).....	43
4.2.1.1	Separación cromatográfica de la Fracción GACD 3.....	47
4.2.1.2	Separación cromatográfica de la Fracción GACD 4.....	51
4.2.2	Fraccionamiento De La Fase Polar.....	59
4.2.2.1	Fraccionamiento del Extracto Acuoso (GAAC) sobre una columna cromatográfica empacada con DIAION HP-20.....	60
a.	Separación de la fracción GAAC 2 por medio de HPLC-preparativa.....	63
b.	Separación cromatográfica sobre una columna con MCI-Gel de la fracción GAAC 5	66
	• PRUEBAS DESPLAZAMIENTO	68
	• RMN del compuesto GAAC 5-14.....	76

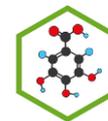


UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

GRUPO POLIFENOLES UTP

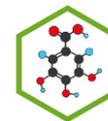


• RMN del compuesto GAAC 5-16.....	88
CONCLUSIONES.....	92
RECOMENDACIONES.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	95
ANEXOS.....	100



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth.....	6
Tabla 2. RMN- ¹ H.....	25
Tabla 3. RMN- ¹³ C.....	26
Tabla 4. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 3-18.....	31
Tabla 5. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 4.....	32
Tabla 6. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD para GAAc.....	36
Tabla 7. Condición del método cromatográfico y espectrométrico GAAc 2- 1.....	37
Tabla 8. Pruebas para fenoles y flavonoides.....	62
Tabla 9 Señales de hidrógenos y correlaciones COSY asignadas al compuesto GAAc 5-14	80
Tabla 10. Correlaciones mostradas por los espectros HSQC y HMBC del compuesto GAAc 5-14.....	86
Tabla 11. Tabla de comparación entre las señales de carbono del compuesto GAAc 5-14 y el Kaempferol 7- <i>o</i> -Neohesperidoside.....	87
Tabla 12. Señales de hidrógenos y correlaciones COSY asignadas al compuesto GAAc 5-16.....	90



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diferentes formas de la Vitamina E.....	8
Figura 2. Diferentes formas de la Vitamina K.....	10
Figura 3. Estructuras Químicas de Fenoles.....	13
Figura 4. Reacción de tricloruro férrico.....	13
Figura 5. Reacción de acetato de plomo.....	14
Figura 6. Reacción de gelatina-sal.....	14
Figura 7. Estructura química de la flavona y el flavonol	15
Figura 8. Reacción de Cianidina.....	16
Figura 9. Reacción de Rosenhein.....	17
Figura 10 a. Estructura de los flavonoides y sus respectivos sistemas	
b. Espectro UV de los 6 flavonoides.....	18
Figura 11. Reacción de desplazamiento con $AlCl_3$ y HCl.....	19
Figura 12. Rompimientos Retro-Diels-Alder.....	25
Figura 13. Diagrama del análisis preliminar del material vegetal.....	29
Figura 14. Diagrama del análisis general.....	29
Figura 15. Separación de la fase Apolar.....	30
Figura 16. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 3-18.....	32
Figura 17. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 4.....	33
Figura 18. Fraccionamiento de la Fase Polar.....	34
Figura 19. Fraccionamiento del extracto Acuoso (GAAC).....	35
Figura 20. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD para GAAC.....	36
Figura 21. Separación cromatográfica sobre una columna empacada con MCI- Gel de la fracción GAAC 5.....	38

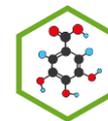


Figura 22. Cromatograma del análisis preliminar del extracto GAAC b. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 14.41 min. c. Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 15.67 min. d. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 19.36 min.....	41
Figura 23 Cromatograma del análisis preliminar del extracto GABut b. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 14.37 min. c. Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 19.19 min. d. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 24.64 min.....	42
Figura 24. Cromatograma del análisis preliminar del extracto GAAE b. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 16.18 min. c. Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 51.49 min. d. Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 54.68 min.....	42
Figura 25. Porcentaje de rendimiento y pesos de las Fases obtenidas.....	43
Figura 26. Porcentaje de rendimiento de la Fase Apolar.....	44
Figura 27. Placa cromatográfica de la fracción GACD 9 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	45
Figura 28. Placa cromatográfica de la fraccion GACD 3 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	46
Figura 29. Placa cromatográfica de la fraccion GACD 4 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	46
Figura 30. Porcentaje de rendimiento de GACD 3.....	47
Figura 31. Placa cromatográfica de GACD 3-18 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	48
Figura 32. Cromatograma de la fracción GACD 3-18.....	49
Figura 33. Espectro de masas por EI del compuesto Tetraetil Silicato.....	49
Figura 34. Fragmentaciones del Tetraetil Silicato.....	50
Figura 35. Porcentaje de rendimiento de GACD 4.....	51
Figura 36. Placa cromatográfica de GACD 4-6 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	52

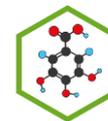


Figura 37. Placa cromatográfica de GACD 4-9 en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).....	52
Figura 38. Cromatograma de la fracción GACD 4-6.....	53
Figura 39. Espectro de masas por EI de la vitamina K ₁	54
Figura 40. Comparación del espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina K ₁ con la librería Wiley.....	54
Figura 41. Fragmentación del compuesto GACD 4-6.....	55
Figura 42. Cromatograma de la fracción GACD 4-9.....	56
Figura 43. Espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina E.....	57
Figura 44. Comparación del espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina E con la librería Wiley.....	57
Figura 45. Fragmentación del compuesto GACD 4-9.....	58
Figura 46. Porcentaje de Rendimiento de los extractos obtenidos de la Fase Polar.....	59
Figura 47. Cromatograma del fraccionamiento del extracto acuoso de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth sobre una columna de DIAION HP 20.....	60
Figura 48. Pesos (mg) y espectros UV de las fracciones de GAAC 1 a GAAC 16.....	61
Figura 49. Espectro de masas de la aglicona de GAAC 2-1.....	64
Figura 50. Estructura de la aglicona del compuesto GAAC 2-1.....	64
Figura 51. Fragmentación del compuesto GDA 2-1.....	65
Figura 52. Cromatograma del fraccionamiento GAAC 5 sobre una columna de MCI-Gel.....	66
Figura 53. Pesos y espectros de las fracciones GAAC 5-1 a GAAC 5-20.....	67
Figura 54. Pruebas de desplazamiento del compuesto GAAC 5-4 con a. AlCl ₃ y HCl b. MeONa c. NaOAc y H ₃ BO ₃	68
Figura 55. Posible estructura del compuesto presente en GAAC 5-4.....	69
Figura 56. Pruebas de desplazamiento del compuesto GAAC 5-10 con a. AlCl ₃ y HCl b. MeONa c. NaOAc y H ₃ BO ₃	70

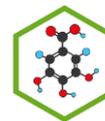


Figura 57. Posible estructura de la aglicona del compuesto presente en GAAc 5-10.....	71
Figura 58. Pruebas de desplazamiento del compuesto GAAc 5-14 con a. AlCl ₃ y HCl b. MeONa c. NaOAc y H ₃ BO ₃	72
Figura 59. Posible estructura de la aglicona del compuesto presente en GAAc 5-14.....	73
Figura 60. Pruebas de desplazamiento del compuesto GAAc 5-16 con a. AlCl ₃ y HCl b. MeONa c. NaOAc y H ₃ BO ₃	74
Figura 61. Posible estructura del compuesto presente en GAAc 5-16.....	75
Figura 62. Espectro RMN ¹ H del compuesto GAAc 5-14.....	76
Figura 63 a. Señales asignadas por medio del espectro ¹ H RMN a la Aglicona presente en GAAc 5-14. b. Señales asignadas por medio del espectro ¹ H RMN a la Ramnosa presente en GAAc 5-14. c. Señales asignadas por medio del espectro ¹ H RMN a la Glucosa presente en GAAc 5-14.....	77
Figura 64 a. Espectro COSY del compuesto GAAc 5-14 b. Espectro COSY de la zona de la aglicona del compuesto GAAc 1-5-14 c. Espectro COSY de la zona de los azúcares del compuesto GAAc 1-5-14.....	79
Figura 65 a. Correlaciones mostradas por el espectro COSY de la aglicona de GAAc 5-14. b. Correlaciones de la Ramnosa. c. Correlaciones de la Glucosa.....	80
Figura 66. Espectro ¹³ C del compuesto GAAc 5-14.....	81
Figura 67. a. Espectro HSQC del compuesto GAAc 5-14. b. Espectro HSQC de la zona de la aglicona c. Espectro HSQC de la zona de los azúcares d. Espectro HSQC de la zona de los azúcares.....	83
Figura 68. Correlaciones mostradas por el espectro HSQC del compuesto GAAc 5-14.....	84
Figura 69. Espectro HMBC del compuesto GAAc 5-14.....	85

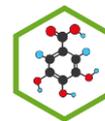
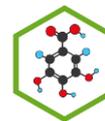


Figura 70. Conectividad entre la ramnosa y la glucosa mostrada por el espectro HMBC.....	86
Figura 71. Estructura del compuesto GAAC 5-14: Kaempferol 7-O-Neohesperidoside.....	87
Figura 72. Espectro RMN ¹ H del compuesto GAAC 5-16.....	88
Figura 73. Espectro RMN COSY del compuesto GAAC 5-16.....	89
Figura 74. a. Posibles estructuras de la aglicona del compuesto presente en GAAC 5-16. b. Posibles glicósidos del compuesto presente en GAAC 5-16.....	91



LISTA DE ABREVIATURAS

AICl₃: Cloruro Férrico

COSY: Correlation Spectroscopy

HAc: Ácido acético

HCl: Ácido Clorhídrico

H₃BO₃: Ácido Bórico

HMBC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

HPLC-DAD: Cromatografía Líquida de alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos.

HSQC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

MeOH: Metanol

MeONa: Metóxido de Sodio

NaOAc: Acetato de Sodio

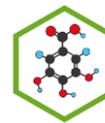
RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RP-18: Cromatografía en Fase Reversa

TLC: Cromatografía en Capa Delgada

t_R: Tiempo de Retención.

UV: Ultra-Violeta



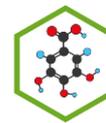
RESUMEN

Con el fin de contribuir al estudio fitoquímico de *Guadua angustifolia* Kunth, por ser una especie característica dentro la familia Poaceae en Colombia y la falta de investigación, se llevó a cabo la identificación de cinco flavonoides, un fenol, vitamina E y K₁, además un compuesto denominado Tetraetil Silicato.

Dentro de los flavonoides, encontramos dos derivados de la quercetina (GAAc 2-1 y GAAc 5-4) y tres derivados del Kamferol (GAAc 5-10, GAAc 5-14 y GAAc 5-16).

La elucidación parcial del compuesto GAAc 2-1 se logró por sililación y análisis en GC-MS. Los derivados del Kamferol (GAAc 5-14 y GAAc 5-16) se identificaron por los desplazamientos químicos en espectrofotometría Uv y los análisis cromatográficos de HPLC.

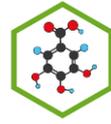
Además, el compuesto GAAc 5-14 se elucidó como Kamferol 7-O-Neohesperidósido y el compuesto GAAc 5-16 se elucidó parcialmente (debido a la falta de definición de las señales de los espectros por RMN) como Kamferol y los azucares como glucosa y ramnosa, sin obtener sus conectividades.



ABSTRACT

In order to contribute to the phytochemical study of *Guadua angustifolia* Kunth, as a characteristic species within the family Poaceae in Colombia and the lack of scientific research was carried out to identify five flavonoids, a phenol, vitamin E and K₁, also a compound known as Tetraethyl silicate. Within the flavonoids, we found a quercetin derivative (GAAc 2-1) and four Kaempferol derivatives (GAAc 5-4, GAAc 5-10, GAAc 5-14 and GAAc 5-16) The partial elucidation of the compound GAAc 2-1 (quercetin derived) was achieved by silylation and GC-MS analysis. Kaempferol derivatives (GAAc 5-14 and GAAc 5-16) were identified by chemical displacement Uv and chromatography analysis HPLC.

In addition, we also elucidated the compound GAAc 5-14 as Kaempferol 7-O-Neohesperidoside and the compound GAAc 5-16 was partially elucidated (due to the lack of definition of signals by NMR spectra) as Kaempferol and sugars such as glucose and rhamnose, without obtaining their connectivities.

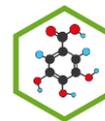


INTRODUCCIÓN

La familia Poaceae es la familia más amplia dentro de las angiospermas, representativa de varias regiones en el mundo por su fitogeografía. Ésta comprende cerca de 10.000 especies de bambúes, agrupados en 651 géneros aproximadamente^[1].

En Colombia, se presenta la *Guadua angustifolia* Kunth como la más característica de los géneros encontrados en América Latina. Por su anatomía y propiedades físico-mecánicas, se ha constituido en una alternativa de construcción. Debido a su similitud con los bambúes asiáticos, se han iniciado procesos de fabricación de papel, carbón activado, fibras termoplásticos y biocombustibles.

Dentro de las investigaciones realizadas a las hojas de bambúes, se han caracterizado compuestos como flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, lactonas, antraquinonas y aminoácidos presentando actividad antitumoral, antioxidante, anti-radicales libres, antifatiga, antibacterial y antiviral; además prevención de enfermedades cardiovasculares^[2].



Con base en lo anterior, en el presente trabajo de grado: CONTRIBUCION AL ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS HOJAS DE *Guadua angustifolia* Kunth, por medio del desarrollo de una metodología experimental se identificaron y se elucidaron ciertos compuestos presentes en el extracto apolar y en el extracto polar.

Este trabajo se efectuó con la colaboración y aporte del Grupo Polifenoles UTP de la Universidad Tecnológica de Pereira, el cual se encuentra adscrito al centro de investigaciones CENVAM.

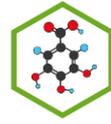
La línea de investigación que permitió nuestro trabajo se enfoca en el aislamiento y elucidación estructural de compuestos polifenólicos y fenólicos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Surgimiento del problema

El Bambú es una de las especies más representativas de la familia Poaceae, a la cual, se le han realizado diversas investigaciones. Esto se debe a sus propiedades físicas, químicas y mecánicas que cada día dan nuevos aportes al conocimiento de esta especie.

En el continente Asiático, es donde se encuentra la mayor cantidad de reportes científicos de las diferentes clases de Bambúes presentes en cada región. Lo cual, ha permitido la certificación de compuestos antioxidantes presentes en hojas de Bambú, además de expresar otras actividades farmacológicas y alimenticias. Estos componentes funcionales se determinaron mediante el empleo de análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), además de métodos donde se emplea columnas en fase reversa C18 (RP) con un sistema de solventes adecuado [3].



La presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoides en la tribu *Bambuseae* dentro de la cual se encuentra el género *Guadua*, ha conducido a la realización de esta investigación debido a la falta de documentación científica a nivel fitoquímico acerca de la especie. Por la relación de géneros y la presencia de estos compuestos, se realizaron pruebas preliminares a extractos polares, los cuales, confirmaron la presencia de compuestos flavonoides en las hojas de la especie *G. angustifolia* Kunth, indicados por cromatografía líquida de alta resolución HPLC con detector de arreglo de diodos.

1.2 Formulación del problema

De acuerdo con la revisión bibliográfica acerca de las investigaciones científicas de la especie *G. angustifolia* Kunth, no se encontró ningún tipo de reportes de ésta a nivel fitoquímico; lo cual, genera una gran inquietud por identificar sus principales metabolitos secundarios de tipo flavonoide y fenólico con posibles actividades farmacológicas o agroquímicas, que den un valor agregado al uso de esta especie.

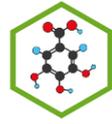
Para dar respuesta parcial a este problema, se proponen los siguientes objetivos:

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

Contribuir al estudio fitoquímico de las hojas de *Guadua angustifolia* Kunth identificando algunos compuestos de tipo flavonoide en los extractos polares y otros compuestos en los extractos apolares.

1.3.2 Objetivos específicos



Identificar la presencia de flavonoides en hojas de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografía líquida de alta resolución

Aislar un compuesto de tipo flavonoide en la fase polar y un compuesto en la fase apolar de extractos de hojas de *G. angustifolia* Kunth en combinación de técnicas de extracción y cromatografía en columna y capa fina.

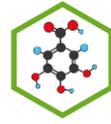
Elucidar la estructura molecular de un compuesto de tipo flavonoide en la fase polar y un compuesto en la fase apolar de extractos de hojas de *G. angustifolia* Kunth utilizando técnicas de análisis instrumental como espectrofotometría ultravioleta, cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

1.4 JUSTIFICACION

En Colombia, *G. angustifolia* Kunth es una especie de bambú que ha estado ligada por años a las comunidades rurales, en donde ha sido utilizada tradicionalmente para la construcción y la artesanía. Este uso artesanal ha conducido a la utilización del culmo, dejando en segundo plano un posible uso de su hoja.

Estudios realizados en diferentes especies de bambúes Asiáticos pertenecientes al género *Guadua*, determinaron que las hojas juegan un papel importante por tener gran trascendencia en usos medicinales como antioxidantes^[1,2], anticáncer^[4], antibacterial, antifúngico, antiúlceras^[5], entre otros; como aditivos evitando la descomposición de alimentos y en la terapéutica como promotor antienvjecimiento.

Los análisis realizados en extractos polares han determinado la presencia de flavonoides glicosilados, ácidos fenólicos, lactonas, cumarinas, antraquinonas y aminoácidos; compuestos que cuentan con reconocida actividad biológica^[6].



Según lo anterior, se espera obtener a partir de las hojas de esta especie compuestos de tipo fenólico como etapa preliminar en la búsqueda posterior de alguna actividad biológica promisorias. A su vez, promover sus hojas como una posible fuente de nuevos compuestos que enriquezcan los estudios fitoquímicos en nuestra región, apoyando y reforzando las investigaciones realizadas por el Grupo Polifenoles UTP, cuya trayectoria se ha ligado al estudio de compuestos de tipo fenólico, polifenólico y su evaluación biológica.

Por lo tanto, se pretende con este proyecto proporcionar mayor conocimiento de *G. angustifolia* en cuanto a su química y así generar valor agregado a esta especie en la industria farmacológica, alimenticia o agroquímica.

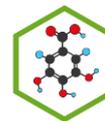
2. MARCO TEÓRICO

La *G. angustifolia* se encuentra en estado natural en Colombia, Ecuador y Venezuela; sin embargo, ha sido introducida a varios países de Centro América y del Caribe. En Colombia presenta un amplio rango de distribución, extendiéndose por las tres cordilleras, entre 0 y 1,500 m de altitud y ubicándose en regiones húmedas como a orillas de ríos y quebradas, principalmente en valles interandinos donde forma grandes sociedades llamadas "guadales" [7].

2.1 Morfología general de la subfamilia Bambusoideae

Los bambúes son plantas con una gran diversidad morfológica; las hay de pocos centímetros y tallos herbáceos hasta bambúes de 30 metros de altura y tallos leñosos. Debido a su naturaleza especializada y a su floración infrecuente, se le ha dado mucha importancia para los estudios taxonómicos a estructuras morfológicas. A continuación se describen algunas de estas estructuras:

Rizoma: es un eje segmentado subterráneo que constituye el soporte de la planta y juega un papel importante en la absorción de nutrientes. Además es un



recurso ideal para la conservación del suelo, estabilización de laderas, y prevención de la erosión producida por escorrentía, vientos fuertes o desmoronamiento.

Culmo: Es el eje aéreo segmentado que emerge del rizoma, consta de cuello, nudos y entrenudos. Es la porción más útil del bambú. De acuerdo a su estado de madurez los culmos tienen diferentes usos, como material de construcción (vivienda, puentes, corrales, cercos, etc.), en la fabricación de pisos, muebles y artesanías, en la producción de carbón vegetal, de textiles y de pulpa para papel y para la elaboración de canastos rústicos y esteras.

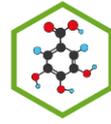
Hojas (o láminas foliares): Las hojas son pecioladas y renovadas cada dos años por la planta. Tiene nervadura paralela a la central, es simple, de forma lanceolada, con ápice acuminado. La margen presenta dientes aserrados, superficie pubescente y coloración verde oscuro o pálido [8].

2.2 Taxonomía

La *Guadua* se puede distinguir de los demás bambúes por los tallos robustos y espinosos, las bandas de pelos blancos en la región del nudo, las hojas caulinares en forma triangular, por tener tres estigmas al final del estilo y seis o más estambres por flor^[9].

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Guadua angustifolia* Kunth^[10].

Reino	PLANTAS	Subfamilia	BAMBUSOIDEAE
División	SPERMATOFITAS	Supertribu	BAMBUSODAE
Subdivisión	ANGIOSPERMAS	Tribu	BAMBUSEAE
Orden	GLUMIFLORALES	Subtribu	GUADINAE
Clase	MONOCOTILEDONIAS	Genero	GUADUA
Familia	POACEAE ó GRAMINEAE	Especie	<i>G. angustifolia</i> Kunth



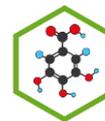
La especie *G. angustifolia* sobresale dentro del género por sus propiedades físico-mecánicas y por el tamaño de sus culmos que alcanzan hasta 30 metros de altura y 25 centímetros de diámetro. Ha sido seleccionada como una de las veinte especies de bambúes mejores del mundo por su capacidad para absorber energía. Reúne dos variedades: *G. angustifolia* var. *bicolor* y *G. angustifolia* var. *nigra*, y varias formas: “cebolla, macana, castilla y cotuda”^[11].

2.3 Compuestos químicos:

En investigaciones realizadas se indica que los extractos de hojas de bambú presentan en altos porcentajes compuestos de diferentes clases como flavonoides glicosilados, terpenoides, ácidos fenólicos, cumarinas, antraquinonas y aminoácidos^[6].

Estos compuestos demuestran múltiples actividades biológicas, entre ellas antioxidante, antibacterial, antifatiga, antiviral y prevención de enfermedades cardiovasculares. Además, pueden ser empleados como un intermedio farmacéutico, suplemento dietético, ingrediente cosmético y aditivo alimenticio. Otros artículos han reportado que extractos metanólicos de bambú ricos en clorofila presentan un potencial antiséptico en alimentos. De igual forma, los extractos ricos en polisacáridos inhiben la presencia de tumores al estimular la actividad fagocitaria de los macrófagos peritoneales^[12].

En tratamientos para arteriosclerosis, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y ciertas formas de cáncer, el uso de hojas de bambú ha sido tradicional en Asia dando resultados favorables^[2]. Confirmando de manera científica su empleo ancestral en la medicina empírica de China para tratar fiebres y desintoxicaciones^[12]. La presencia del ácido benzoico y de 2,6-dimetoxibenzoquinona con potenciales antioxidantes y antimicrobianos en hojas de bambú de *Sasa albomarginata* y *Phyllostachys heterocycla* se emplean en conservantes de alimentos prolongando por un mayor tiempo la vida útil del producto^[2].



La importancia de compuestos de tipo flavonoide presentes en bambú de la especie *Pterocarpus marsupium* son los flavonoides C-glucósidos debido a su variada actividad biológica como se describe a continuación: el homoorietin (luteolin-6-glucósido) ha demostrado su actividad antimicrobiana al igual que el vitexin (apigenin-8-glucósido) contra *staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*; el luteolin-7- glucósido es un protector del hígado de ratas contra el tetracloruro de carbono.

Dentro de la familia poaceae, al obtener un extracto metanólico de la especie *Hyparrhenia hirta*, fueron aislados e identificados ocho flavonoides, los cuales se identificaron como Isoorientín, Isoorientín 7-*o*-ramnosido, vitexin, isovitexin, tricín 5-*o*-glucósido, tricín 7-*o*-glucósido, luteolin 7-*o*-glucósido, chrysoeriol 7-*o*-glucósido, luteolin y tricín^[13].

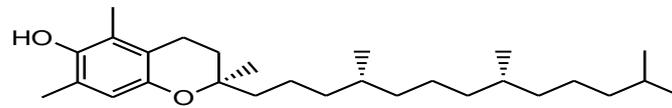
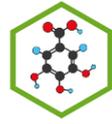
En el análisis químico de bambúes no maderables, se determinó celulosa, hemicelulosa, lignina, carbohidratos, glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa; además, las uniones de tipo éster que se presentan en unidades de hidroxifenol con estructuras de lignina, al igual que los acoplamientos del éster y estructuras de fenoles libres fueron representativas en este análisis^[14].

En este proyecto de grado se evaluaron extractos polares y apolares de *G. angustifolia* Kunth, enfocándonos hacia compuestos de tipo flavonoide en la fase polar y otros compuestos en la fase apolar. Por esta razón, se hace a continuación una breve descripción de estos grupos de metabolitos:

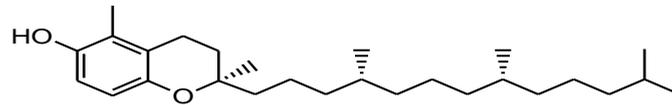
2.3.1 Vitaminas:

2.3.1.1 Vitamina E

En la naturaleza, la vitamina E se encuentra en ocho formas químicamente distintas^[15] (α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol) que varían en su cadena lateral isoprenoide^[16] y en los grupos metilos del anillo cromano siendo el alfa tocoferol la forma mas activa biológicamente^[17]:



α - tocoferol (1)



β - tocoferol (2)

Figura 1 Diferentes formas de la Vitamina E.

Entre las actividades biológicas se encuentra la capacidad de atrapar radicales libres (oxígeno singlete, radical superóxido y radicales hidroxilo, entre otros) y proteger las membranas lipídicas de la peroxidación. Por esto, es un potente antioxidante, que protege las membranas de las plantas durante la latencia de la semilla, germinación y el desarrollo temprano de la plántula, asegurando su longevidad^[18]. Además protege los ácidos nucleicos, enzimas, proteínas estructurales, lípidos, factores de transcripción y otras estructuras moleculares de los efectos perjudiciales de los radicales libres^[19].

En ausencia de aire, los derivados de la vitamina E son completamente estables al calor y a las bases. Sin embargo, en presencia de aire pueden ser rápidamente oxidados por álcalis e iones metálicos; absorben la luz en la región UV (máx. 292-295 nm) y son naturalmente fluorescentes^[16].

Su biosíntesis se lleva a cabo en cloroplastos y cromoplastos, principalmente en hojas y semillas^[20]. En la mayoría de las plantas monocotiledóneas se encuentra disperso homogéneamente en semillas y disminuye gradualmente con el desarrollo de la misma. Durante los estados tempranos de germinación la concentración de tocoferol incrementa con el desarrollo inicial de hojas por esto, en las hojas del bambú es donde se encuentra la mayor concentración de tocoferol, en comparación con el resto de las partes del bambú^[21].

Investigaciones realizadas anteriormente, mostraron que la administración de α -tocoferol ayuda en la prevención de distrofia muscular en animales

modelos^[22], enfermedades hepáticas^[23], enfermedades cardiovasculares^[24] y aterosclerosis^[25]. Aparte de esto, evita el daño enzimático de proteínas y del ADN, que resultan en la malformación genética y provocan la aparición de cáncer^[26].

2.3.1.2 Vitamina K

La vitamina K es el nombre general de un grupo de compuestos relacionados, los cuales son naftoquinonas metiladas que difieren en longitud y grado de insaturación de su cadena alifática lateral^[27]. Existe naturalmente en dos formas: fitoquinona (vitamina K₁) y menaquinona (vitamina K₂). La estructura química de la fitoquinona es 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona, teniendo un doble enlace en la cadena lateral saturada de 20 carbonos derivada de cuatro unidades isoprenoides y existe naturalmente en forma *trans*^[28]. La menaquinona (vitamina K₂) es originaria de las bacterias intestinales y la vitamina K₃ es una variante sintética.

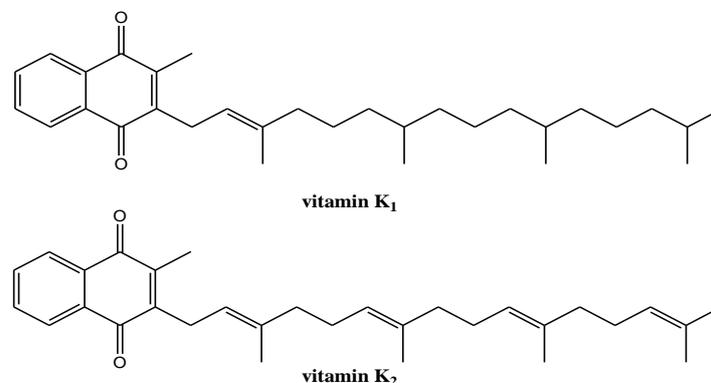
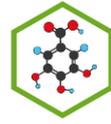


Figura 2. Diferentes formas de la Vitamina K.

La vitamina K es una vitamina liposoluble que funciona como una coenzima y está relacionada en la síntesis de un número de proteínas envueltas en la coagulación de la sangre, el metabolismo de los huesos en mamíferos y actúa como un cofactor esencial en la síntesis pos-traslacional del ácido C-carboxiglutamico en estas proteínas^[29]. También es un importante cofactor en la producción de proteínas que inhiben la calcificación vascular, participa en la



estructura de las membranas, la síntesis de prostaglandina, la resistencia a enfermedades y la regulación de la síntesis de ADN

El bajo consumo de vitamina K₁ ha sido asociado con un elevado riesgo cardiovascular que se asocia a la calcificación de las arterias del pecho.

La fitoquinona es sintetizada por plantas y está presente en grandes cantidades en varios vegetales verdes, ciertos aceites vegetales, alfalfa, tomates, cereales integrales, hígado de cerdo, brócoli, espinaca y ciertas lechugas^[30], los cuales son el mayor recurso en la dieta^[31].

Se encuentra en los cloroplastos de las plantas fotosintéticas, es destruida en medio alcalino y sensible a la luz del día y muestra absorciones características en el UV a 244, 249, 263, 270 y 331 nm (en metanol)^[16].

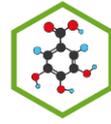
Observaciones epidemiológicas y estudios de laboratorio indican que el consumo de té verde por su alto contenido de antioxidantes (catequinas, vitamina K y minerales) reduce el riesgo de varias enfermedades como cáncer, enfermedades del corazón y alta concentración de colesterol en la sangre y presenta un efecto preventivo para la aterosclerosis. Además los resultados sugieren que está involucrada en la producción de esteroides^[30].

Es conocido que la vitamina K no está solamente distribuida en huesos, bazo, piel e hígado; también esta distribuida abundantemente en cerebro, riñones y tejido gonadal^[28]

2.3.2 Silicatos

El silicio (Si) es considerado un constituyente principal de los tejidos vegetales fácilmente absorbido por plantas, presentando concentraciones relativamente altas en sus tejidos, aunque no es un nutriente esencial^[32].

Un gran número de plantas como bambú, arroz, helechos, gimnospermas y otras especies pertenecientes a la familia Poaceae^[33] acumulan sílice en las hojas; esta concentración aumenta significativamente cada vez que emergen



los brotes durante el desarrollo de la guadua hasta alcanzar su madurez (3 años), continuando con un leve aumento en la senescencia ^[35].

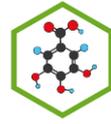
La función principal del Si en plantas, es el potencial para reducir significativamente la susceptibilidad a enfermedades producidas por factores bióticos y abióticos y contribuir en la resistencia, compresión, rigidez de las paredes celulares, que a su vez mejoran la eficiencia fotosintética y captación de luz, y limita la evapotranspiración de agua ^[34].

Los depósitos de sílice en los tejidos son denominados *cuerpos silíceos*, se encuentran en las células de la epidermis como resultado de la absorción de sílice del suelo por medio de la hidratación en forma de ácido silícico, y acumulado en mayor concentración en la parte aérea como sílice hidratada amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). Esta acumulación es controlada por la planta hacia el incremento de la estabilidad mecánica de sus tejidos; estos cuerpos sólidos con formas diversas se depositan en las células silíceas específicas y especializadas en diferentes proporciones.

El silicio nunca se encuentra libre, solo en forma de ácido silícico, sales, óxidos de silicio y **silicatos**, en estrecha proximidad a los conductos de transpiración. Estos se precipitan de dos maneras diferentes: una la pulveriforme pardo y la otra cristalizado gris oscuro, la única diferencia entre estos es el tamaño de partícula y la formación de su superficie.

Para los seres vivos se considera como un elemento esencial. El silicio orgánico estimula el sistema inmunológico, regenera el tejido conectivo que forma parte de la mayoría de los tejidos corporales, y mejora el funcionamiento de las células del organismo, la eliminación de desechos y la transmisión de información entre ellas.

2.3.3 Fenoles^[36].



Los fenoles son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante el desarrollo normal y en respuesta de las condiciones de estrés como infección por agentes patógenos y parásitos, contaminación del aire, exposición a etileno y temperaturas extremas, heridas y radiaciones UV.

Actúan como antioxidantes, fitoalexinas, atractivos para los polinizadores, reguladores en el crecimiento y morfogénesis, contribuyen en la coloración y protegen las plantas contra la luz UV.

Los fenoles son encontrados en las paredes celulares y dentro de las vacuolas celulares, juegan un papel importante en la adhesión celular, sirven como un sitio para la formación de lignina y favorecen la estabilidad térmica de la planta y la textura de los alimentos, ya que contribuyen en la amargura, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa.

El consumo de frutas, hortalizas y cereales en la dieta alimentaria con una alta presencia de compuestos fenólicos, pueden ayudar a la inhibición de la aterosclerosis y cáncer^[37], además de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, por lo tanto se ha demostrado su actividad antioxidante.

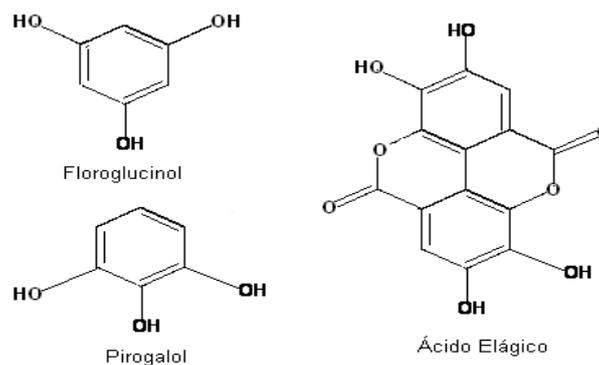


Figura 3. Estructuras Químicas de Fenoles

2.3.3.1 Reacciones de reconocimiento de Fenoles^[38].

- Prueba con tricloruro férrico al 1%:

A un (1) mL de la muestra disuelta en metanol, se añade 0.5 mL de solución tricloruro férrico al 1% en agua (v/v). Si presenta coloración azul intenso, es prueba positiva para fenoles.

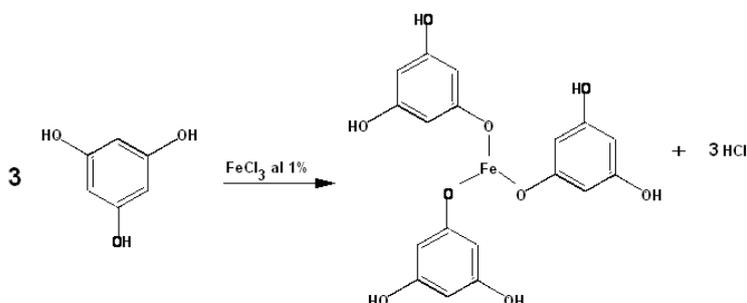


Figura 4. Reacción de tricloruro férrico

- **Prueba con acetato de plomo:**

Los fenoles precipitan con acetato de plomo igual como lo hace el reactivo de tricloruro férrico. A un (1) mL de extracto etanólico se agrega 0.5 mL de acetato de plomo al 10%. Si observa un precipitado de color blanco, es prueba positiva para taninos.

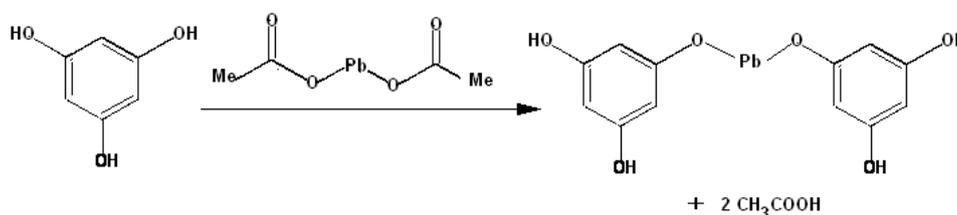


Figura 5. Reacción de acetato de plomo

- **Prueba con Gelatina-Sal:**

La prueba mas conocida y universalmente utilizada para el reconocimiento de fenoles, se basa en la precipitación de una solución de gelatina-sal por los fenoles. A un (1) mL de extracto etanólico se agrega 0.5 mL de reactivo gelatina-sal. Si aparece un precipitado de color blanco, se considera prueba positiva para fenoles.

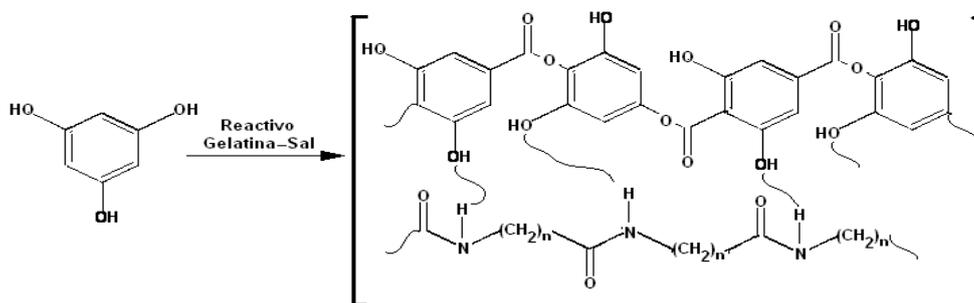


Figura 6. Reacción de gelatina-sal.

2.3.4 FLAVONOIDES ^[39].

Los flavonoides son uno de los grupos más amplios de los productos naturales conocidos, sus propiedades en las plantas incluyen la captación de energía, transferencia electrónica, atracción de polinizadores, diferentes actividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, antimicótica y fitoalexinas) y el uso de la luz solar como fuente de energía y para la regulación de genes en plantas.

Dado que los flavonoides están estrechamente relacionados estructuralmente es difícil separarlos. Su peso molecular relativamente elevado y la complicada estructura, hace que su identificación y síntesis químicas representen un desafío a la química orgánica, incluso con la disponibilidad de equipos modernos. Puesto que los flavonoides en función de su contenido de glucósidos, isoprenoides, éteres y cadenas alifáticas pueden adquirir casi cualquier polaridad, una variedad de disolventes desde agua hasta el éter etílico deben ser utilizados para su extracción a partir de una mezcla compleja.

Se denominan como flavonoides a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos, unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos C₆-C₃-C₆), que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales y son biosintetizadas a partir del ácido shikímico y a partir de la acetilcoenzima A vía malonilCoA (biosíntesis mixta)^[40].

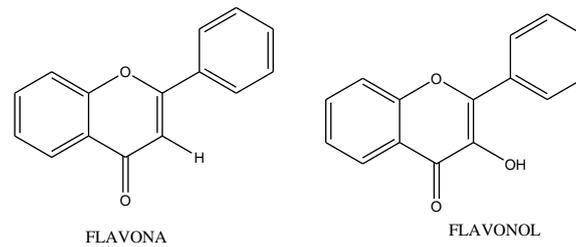


Figura 7. Estructura química de la flavona y el Flavonol.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente en posición C3 y C7, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como *o*-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son las D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y el ácido D-glucorónico. La parte sin azúcares del flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. Las flavonas y flavonoles, debido al sistema conjugado, son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Los glicósidos son en general sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son sólidos cristalinos^[40].

Los glicósidos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural.

2.3.4.1 Reacción de reconocimiento de flavonoides^[41]

- **Prueba de Cianidina** ^[38]

Se conoce también como reacción de Shinoda, consiste en agregar al flavonoide disuelto en metanol, magnesio (Mg) en polvo y después gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl). En estas condiciones, cuando están presentes sustancias que poseen el núcleo de la δ -benzopirona, se desarrollan coloraciones que van del anaranjado al violeta; por tanto, esta prueba será positiva para flavonas y flavonoles.

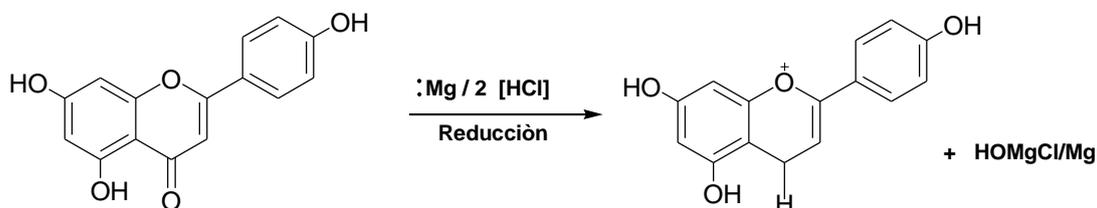


Figura 8. Reacción de Cianidina

- **Prueba de Rosenhein**^[42]

Los flavonoides con esqueleto de ion flavilio, dan positiva la prueba de Rosenhein por tener en su anillo C un sistema dieno conjugado. A un (1) mL de extracto etanólico, se agrega la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado; mezclar y calentar por diez minutos a 90 °C. Se enfría y agita con 0.4 mL de alcohol amílico. Decantar y observar el color de la fase amílica. La prueba se considera positiva si aparece color que va desde rojo hasta rosado.

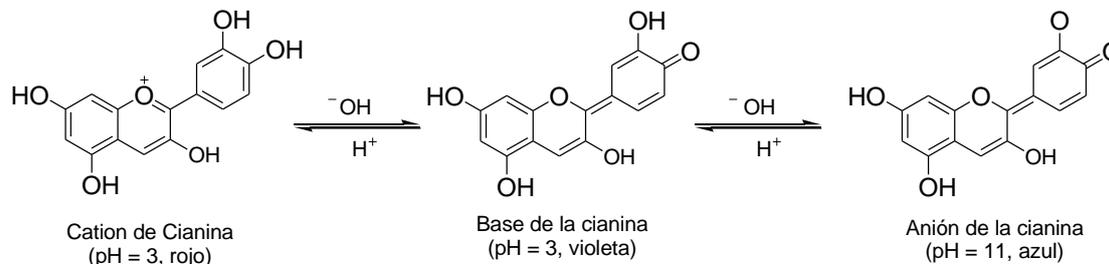


Figura 9. Reacción de Rosenhein

2.3.4.2 Espectroscopia Ultravioleta y significado estructural de los desplazamientos para Flavonas y Flavonoles^[40]

Los espectros ultravioleta de los flavonoides son formados principalmente por dos bandas de absorción máxima, una de las cuales se observa entre 240-285 nm (banda II) y la otra se encuentra en el rango de 300-400 nm (banda I). En términos generales, las señales se originan de acuerdo a dos sistemas presentes en el esqueleto básico de este tipo de compuestos, adquiriendo el nombre de sistema benzoilo el anillo A (banda II) y sistema cinamoilo el anillo B (banda I). Las sustituciones de cualquier anillo (A o B) pueden producir cambios hipsocrómicos o batocrómicos de las absorciones, los cuales resultan ser útiles para clarificar las estructuras.

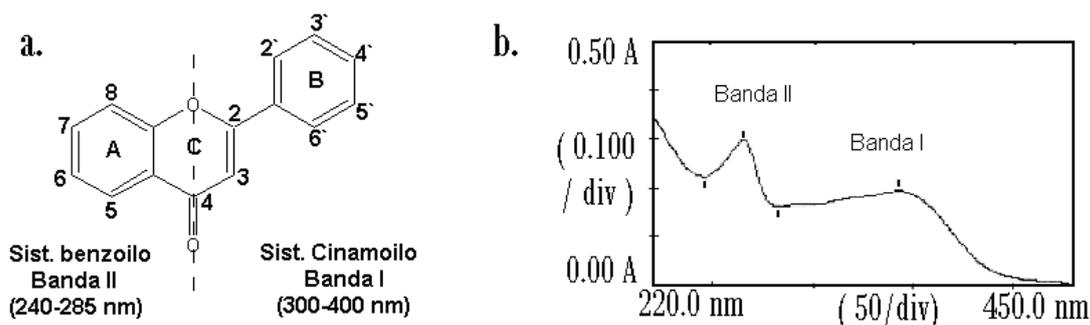
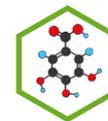


Figura 10 a. Estructura de los flavonoides y sus respectivos sistemas
b. Espectro UV de los flavonoides

La espectroscopia ultravioleta se ha convertido en la mejor técnica para el análisis estructural de flavonoides porque es necesaria una pequeña cantidad del material puro para realizar muchos espectros y la información estructural obtenida del espectro aumenta con el uso de reactivos específicos, los cuales reaccionan con uno o más grupos funcionales en el núcleo de los flavonoides. La adición de cada uno de estos reactivos por separado a una solución alcohólica de flavonoides, induce desplazamientos estructurales significativos en el espectro. Estos reactivos son: metóxido de sodio, acetato de sodio, acetato de sodio / ácido bórico, cloruro de aluminio y cloruro de aluminio / ácido clorhídrico.



En el espectro de flavonas y flavonoles en metanol, la posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas absorben entre 304–350 nm, los flavonoles 3-*o*-sustituídos entre 330-360 nm y los flavonoles entre 352-385 nm. Además, las flavonas y flavonoles altamente oxigenados tienden a absorber a mayores longitudes de onda. La banda II es menos afectada por los cambios de oxigenación en el anillo B, aunque las flavonas 3', 4'- dihidroxiladas muestran generalmente dos picos (o un pico y un hombro) en esta región; mientras las flavonas 4'-hidroxiladas muestran solo uno.

Por otro lado, la banda II es afectada significativamente por los cambios en el anillo A e incrementa de 250 nm a 252 nm en 7-hidroxiflavonas; a 268 en 5-hidroxiflavona y 5,7-dihidroxiflavona; a 274 nm en 5,6,7- trihidroxiflavona y a 281 nm en 5, 7, 8- trihidroxiflavona. La ausencia de grupos hidroxilos en ambos anillos es evidenciada por el pico relativamente intenso de la banda pertinente.

La Metilación o glicosilación de 3, 5 y 4' hidroxilos en los núcleos da como resultado un desplazamiento hipsocrómico en la banda I. Estos desplazamientos son de 3-10 nm (Banda I) en la sustitución del hidroxilo en la posición 4'; de 5-15 nm (Banda I y II) en la sustitución del hidroxilo en la posición 5 y de 12-17 nm en la sustitución del hidroxilo en la posición 3.

La presencia de hidroxilos fenólicos puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: Metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc) y ácido bórico (H_3BO_3), cloruro de aluminio ($AlCl_3$) con y sin HCl.

- **Cloruro de aluminio ($AlCl_3$) y ácido clorhídrico (HCl)**

El $AlCl_3$ anhidro también forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxilados, 3-hidroxilados y 5-hidroxilados. En el caso de los orto-dihidroxilados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los quelatos formados con 3- y/o 5-hidroxilados son estables. Esta reacción es evidenciada por un desplazamiento batocrómico en una o las dos bandas:

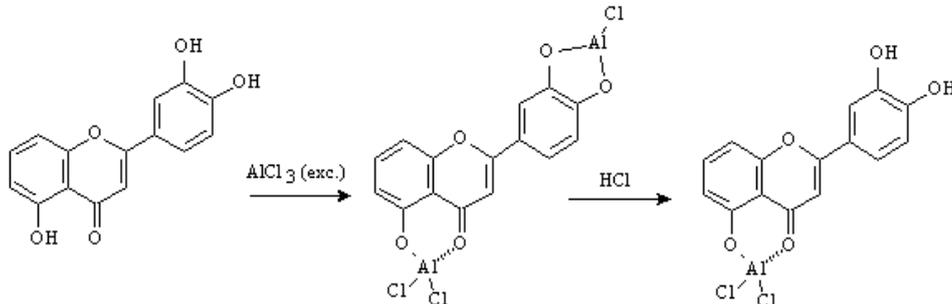


Figura 11. Reacción de desplazamiento con AlCl_3 y HCl

La estabilidad relativa de estos complejos son: flavonol > 5-hidroxiavona > 5-hidroxiavonona > o-dihidroxiación > 3-hidroxiavonol

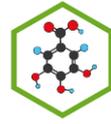
- Si al determinar el espectro con AlCl_3 y HCl se mantiene un desplazamiento batocrómico de 35-55 nm en la banda I (comparando con el espectro metanólico) se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado.
- Si el desplazamiento es de 17-20 nm se trata de una flavona o un flavonol 5-hidroxiado y/o 6-oxigenado.
- Si el desplazamiento es 50-60 nm se trata de un flavonol (con o sin 5-OH).

En el caso de flavonas y flavonoles orto-dihidroxiados en el anillo B (sin 3-OH ni 5-OH) al añadir el cloruro de aluminio se obtiene un desplazamiento batocrómico de la banda I de 30-40 nm, el cual se pierde al añadir el HCl . Los orto-dihidroxiados en A (sin 3-OH ni 5-OH) muestran un desplazamiento de la misma banda de 20-25 nm, el cual se pierde también al añadir el HCl .

Otros flavonoides como las flavanonas, isoflavonas y flavanoles presentan desplazamientos batocrómicos pero en la banda II. Las auronas, chalconas y antocianidinas también presentan desplazamientos batocrómicos en la banda I.

- **Metóxido de sodio (MeONa)**

Todos los grupos hidroxilos presentes en la molécula son ionizados por el NaOMe (base fuerte), observándose un desplazamiento a mayores longitudes de onda en ambas bandas del espectro:



- La presencia de una 4'-hidroxiflavona es evidenciada por un desplazamiento batocrómico de 40 – 65 nm, sin decrecer la intensidad.
- Los flavonoles (ó 3-hidroxiflavonas) sin hidroxilo en 4', también presentan un desplazamiento batocrómico en la banda I de 50-60 nm, pero la intensidad disminuye.
- Las flavonas 7 - glicosiladas son detectadas frecuentemente por la ausencia de absorción de 320-330 nm.

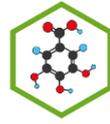
Los flavonoles 3',4'-dihidroxilados y/o 3,3',4'-trihidroxilados, el espectro se descompone en pocos minutos luego de añadir el NaOMe.

- **Acetato de sodio (NaOAc) y ácido Bórico (H₃BO₃)**

El NaOAc es una base más débil que el MeONa y tiende a ionizar solo los hidroxilos fenólicos más ácidos, así:

- Las flavonas y flavonoles 7-hidroxilados exhiben un desplazamiento batocrómico de 5-20 nm en la banda II. La presencia de flavonas (no flavonoles) 6 u 8-oxygenadas reducen marcadamente este desplazamiento.
- J. Meras y T.J. Mabry han notado que al comparar los desplazamientos en la banda I de los espectros tomados con MeONa y NaOAc para flavonas y flavonoles 4'-hidroxilados pueden revelar en la mayoría de los casos si hay o no sustitución en 7, presentándose un desplazamiento en ambos espectros del mismo grosor.
- La presencia de grupos álcali-sensitivos tales como 5,6,7; 5,7,8 y 3,3',4'-trihidroxilados causan la degeneración del espectro con el tiempo.

Una mezcla de NaOAc y H₃BO₃ es usada para detectar grupos orto-dihidroxilo ya que el H₃BO₃ en medio alcalino forma quelatos con hidroxilos fenólicos, la cual, produce desplazamiento batocrómico en la banda I. Si el desplazamiento es de 12-36 nm se trata de un flavonoide (flavona, flavonol, aurona o chalcona) orto-dihidroxilado en el anillo B, pero si el desplazamiento batocrómico es menor es un flavonoide orto-dihidroxilado (en 6,7 y 7,8) en el anillo A.



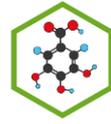
2.3.4.3 Cromatografía^[43]

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil*. Esta fase móvil se hace pasar a través de una *fase estacionaria* con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen levemente a la fase estacionaria se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

- **Cromatografía en capa delgada**

La cromatografía en capa fina se emplea para la identificación de compuestos presentes en una mezcla cuando el R_f del compuesto se compara con el R_f de un compuesto conocido. Los cuales deben presentar una mínima diferencia en la solubilidad y en la fuerza de su adsorción a la del adsorbente lo cual permitirá la ubicación de los compuestos a lo largo de la placa. Si los compuestos son de color, la visualización es sencilla. Pero si los compuestos no son de color, se emplea una lámpara UV para visualizar las placas.

Aunque la mayoría de los flavonoides poseen color, cuando están depositados sobre la capa delgada en microgramos son casi incoloros, particularmente en disolventes ácidos, las chalconas, antocianinas y auronas muestran algo de color. La luz ultravioleta puede mostrar manchas amarillo-verdosas de flavonoles y cafés de flavonas.



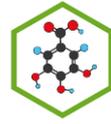
- **Cromatografía Líquida en Columna^[44].**

a. Separaciones sobre Sílica gel: Una columna con este material empacado puede ser recomendada para la separación de flavonoides no-polares y agliconas de flavonoides débilmente polares, una mezcla de heptano-propan-2-ol (60:40) como eluente fue encontrado para ser un método muy eficiente para la separación de la mayoría de flavonas polimetoxiladas presentes en frutas cítricas.

Columnas de Silica gel también han sido utilizada por Ward y Welter (1974) para la separación de: isoflavonas con hexano-tetrahidrofurano (2:1) y biflavonoides con isopropil éter conteniendo 8% de metanol. Recientemente, un rango de acetatos de flavonoides han sido separados y determinados sobre 5- μ m *LiChrosorb Si 60*, usando cuatro sistemas de solventes, Benceno-acetonitrilo fue la fase más conveniente. Con este sistema de solvente, los flavonoides fueron fácilmente detectados por medidas de absorción a 285 nm, y las flavanonas pudieron por lo tanto ser determinadas. La mezcla Benceno-acetonitrilo (85:40) separa muy bien las flavonas glicosiladas.

b. Separaciones sobre columnas de fase reversa: Estas fases estacionarias son químicamente enlazadas, preparadas por enlace de varias moléculas (por ejemplo octadeciltriclorosilano, octiltriclorosilano o feniltriclorosilano) a grupos hidroxilos de un tipo de superficie de silica, comúnmente llamadas columnas C₁₈. Cuando se utilizan estas columnas, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y el procedimiento es llamado cromatografía en fase reversa. De esta manera, solutos de alta polaridad poseen un menor tiempo de retención que solutos de menos polaridad.

Esto es de primordial importancia en la separación de mezclas complejas de flavonoides: los glicosilados eluirán primero, seguidos por las agliconas, generalmente en orden de detrimento en las polaridades. Para agliconas que



poseen solo un poco de grupos hidroxilo libres o agliconas totalmente metoxiladas.

Las mezclas de agua-acetonitrilo o metanol-agua conteniendo pequeñas cantidades de ácido acético son comúnmente utilizadas como sistemas de solventes para flavonoides glicósidos. Estas fases móviles son convenientes para el uso de detección UV y puede ser empleado fácilmente en sistemas de gradientes para separaciones complejas. En muchos casos, el ácido acético en la fase móvil ha sido reemplazado por una pequeña cantidad de ácido fosfórico o ácido fórmico. Dependiendo de los compuestos a ser separados, puede ser ventajoso reemplazar las columnas de fases enlazadas (C₁₈) por materiales de fase reversa con C₈.

- **Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)**

Los espectros característicos UV-VIS de la mayoría de los flavonoides y la disponibilidad muy difundida de los sistemas de HPLC con capacidad multilongitudinal o la habilidad de grabar espectros on-line han significado que el HPLC sea ahora el método de elección para el análisis de flavonoides. La mayoría de las separaciones son ejecutadas usando una columna de fase reversa (RP-18) y un sistema de gradiente de elusión empezando con una fase predominantemente acuosa e incrementando la proporción de un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo. Como la mayoría de los flavonoides son ionizables, algunos ácidos son adicionados a la fase móvil para controlar el pH.

El orden de elusión va desde el más polar hasta el menos polar, lo cual significa que los triglicósidos son eluidos primero al igual que la mayoría de las antocianinas glicósidas, seguidos por di y monoglicósidos y después glicósidos acilados o alquilados y agliconas. Un sistema de gradientes extendido para separar las posibles combinaciones mono y diglicósidos significa que ningún sistema de solventes dará una óptima separación para todos los tipos de

flavonoides. La cuantificación de flavonoides es otro fuerte del HPLC en combinación con detección UV. Un estimado inusual para el nivel de flavonoides puede ser conseguido por comparación de datos de integración con el cromatograma de una inyección de un estándar que tenga cantidades conocidas, corrido bajo las mismas condiciones.

2.3.4.4 Espectrometría de Masas^[45]

Las agliconas flavonoides presentan fragmentos característicos en su espectro de masas IE. Por ejemplo, las flavonas y flavonoles presentan generalmente los fragmentos M^+ , $[M-H]^+$, y $[M-CO]^+$ uno o varios de los fragmentos $A1^+$, $[A1+H]^+$, $B1^+$ y $B2^+$ los que se originan por rompimientos Retro-Diels-Alder:

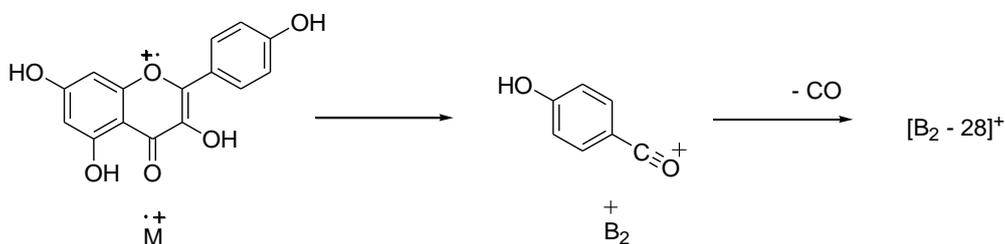


Figura 12. Rompimientos Retro-Diels-Alder

2.3.6 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear^[40].

El espectro de RMN-1H de los flavonoides permite reconocer características estructurales importantes. Un resumen para los tipos de protones más comúnmente hallados se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 2. RMN-¹H

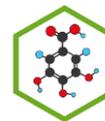
(ppm)	TIPOS DE PROTONES	(ppm)	TIPOS DE PROTONES
-------	-------------------	-------	-------------------

0.0	Tetrametilsilano	3.5	Metileno grupo isopentenilo
0.0-0.5	Trimetilsililo	3.7-4.1	Metoxilos aromáticos
1.0-1.2	Metilo de la ramnosa (doblete ancho)	4.2-6.0	Protón 1 de azúcares, protón 2 de flavanoles y flavonas (doble doblete)
1.7	Metilos del grupo isopentenilo	5.9-6.0	Metiléndioxi
1.9-2.0	Metilos de acetatos alifáticos (de azúcares)	6.0-6.8	Protones 3, 6 y 8 de flavonas
2.2-2.4	Metilos de acetatos aromáticos	6.8-8.0	Protones aromáticos del anillo B
2.7-3.0	H-3 de flavonas (m)	7.5-8.0	Protón 2 de isoflavonas
3.0-4.8	Protones de azúcares	12 - 14	Protón del hidroxilo 5

En el espectro de RMN-¹³C se pueden reconocer los siguientes tipos de carbonos:

Tabla 3. RMN-¹³C

(ppm)	TIPOS DE CARBONOS	(ppm)	TIPOS DE CARBONOS
18	C-6 de ramnosa	150-165	C aromáticos hidroxilados y metoxilados, C-1a de flavonas, C-2 de antocianinas, C-2 de flavonas, C-4' oxigenado, C-9 de flavonas
30	C-4 de flavan-3-oles	175-178	carbonilo C-4 sin OH en C-5 en flavonas, C-4 de flavonoles
60-80	C-OH de carbohidratos	182	carbonilo C-4 con OH en C-5 de flavonas
100-115	C-3 de flavonas, C-1 de carbohidratos, C-10 de flavonas 5-hidroxiladas	190-196	carbonilo C-4 de flavonas
115-128	aromáticos con H	197-200	carbonilo C-4 de flavanoles



145	C-3 de flavonoles, C-5 de flavonas 5-hidroxiadas, C-3 y C-4 de antocianinas		
-----	---	--	--

Es posible también diferenciar entre un C-glicósido flavonoide y un O-glicósido flavonoide. En los O-glicósidos, el C-1 resuena alrededor de 100 ppm para los carbohidratos más comunes, mientras que en los C-glicósidos resuena alrededor de 75 ppm. Por otro lado, en los C-glicósidos el carbono de la aglicona ligado al carbohidrato resuena alrededor de 10 ppm a campo más bajo de su valor normal (sin sustituyente).

3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

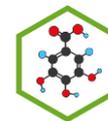
3.1 Material Vegetal

1,2 Kg de hoja fresca de *Guadua angustifolia* Kunth fueron recolectadas en la Hda. La Esmeralda, localizada en el departamento Quindío, municipio Montenegro, 1250 m.

Las hojas se secaron en una estufa BINDER a 40 °C por 24 h. (Laboratorio Calidad de Productos Naturales), se molieron en el molino de aspas (MF 10 basic IKA Werke) y por último, se pasaron por un tamiz de 0,5 mm. Para la extracción se utilizó 500 gr del material vegetal

3.2 Equipos

- Estufa BINDER ED 115.
- Molino de aspas MF 10 basic IKA Werke
- Balanza Analítica OHAUS: analytical plus, 5 cifras decimales.
- Ultra-sonido Fisher Scientific F-S60H.
- Rota evaporador BÜCHI R-205.



- Bomba de vacío TRIVAC D2.5E
- Manta de calentamiento Heidolph MR3001.
- Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu-UV-1700 Pharmaspecies.
- Lámpara de UV modelo UVGL-25, multibanda UV-254/365 nm, 115 V y 60 Hz.
- Jasco HPLC 2000 plus. Sistema equipado con una bomba de gradiente cuaternario PU-2089 Plus, un automuestrador inteligente AS-2059 Plus, un horno para columna CO-2065 Plus, un detector inteligente de arreglo de diodos MD-2015 Plus, y un LC Net II/ADC, controlado por el Software
- EZChrom Elite. Cromatógrafo de baja presión BÜCHI Labortechnik AG.
- GC-MS Shimadzu QP-2010. Sistema equipado con autoinyector AOC-20i / automuestrador con inyección AOC-20s Split/splitless, modo de ionización E/PC/NCI y sistema de inserción directa controlado por software de solución GCMS. Con columna Rtx-CLPesticides Restek de 30 m de largo, 0.25 mm DI, 0.25 µm de partícula.
- Cromatógrafo de baja presión BÜCHI Labortechnik AG.
- RMN: Espectrofotómetro Bruker, avance 400 (400 MHz 9.4 Teslas, imán de superconductor ultraprotectado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

3.3 Reactivos

Los solventes y el soporte cromatográfico DAION HP 20, MCI-Gel (Mitsubishi Chemical Co), Silica-gel y RP-18 pertenecen al laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira adscritos a CENIVAM.

3.4 Análisis preliminar del material vegetal

Para el desarrollo de esta investigación, se realizó un estudio a microescala siguiendo el proceso abajo descrito para determinar metodología experimental a seguir y observar la presencia de los compuestos de interés .

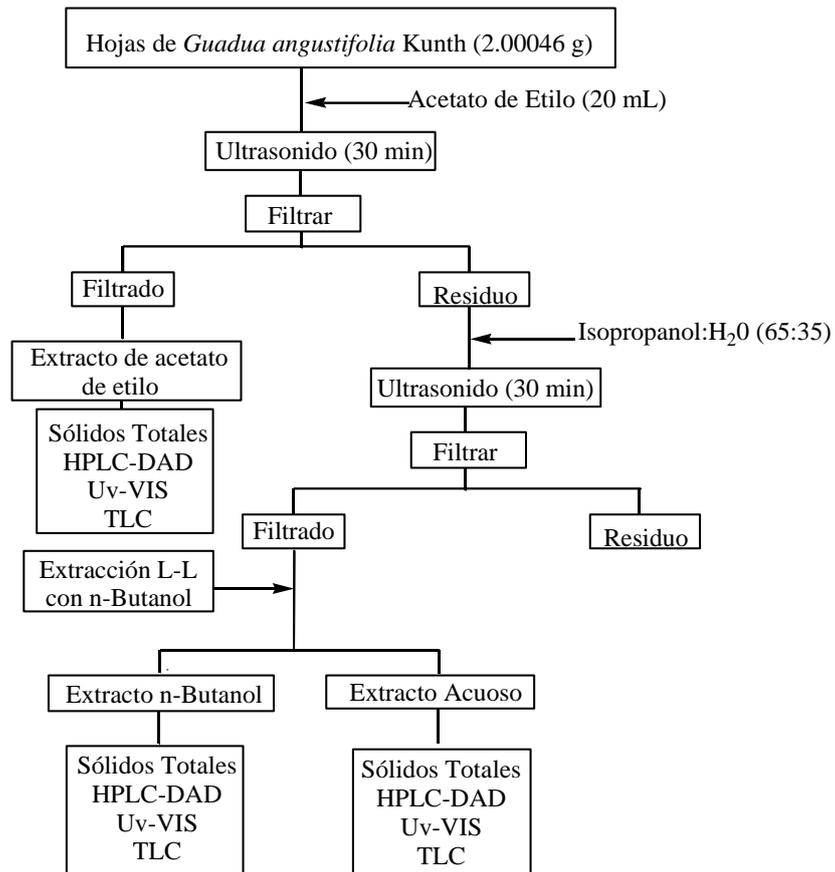


Figura 13. Diagrama del análisis preliminar del material vegetal

3.5 Extracción y aislamiento General:

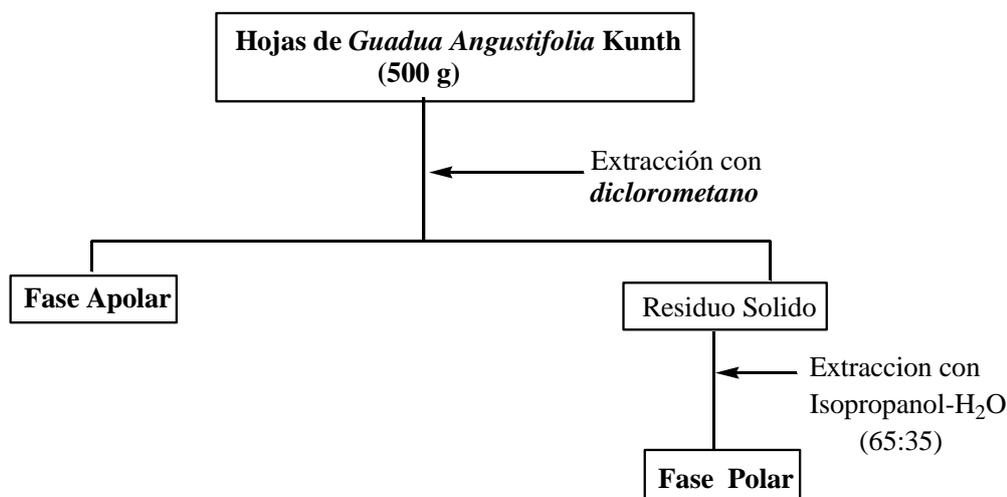


Figura 14. Diagrama del análisis general

A las hojas secas y molidas de *Guadua angustifolia* Kunth (500 g) se les realizó una extracción por cuadruplicado con proporciones de 1,5 L de diclorometano obteniendo la **Fase Apolar**.

Del material vegetal restante, se extrajo la **Fase Polar** con 7 L de la mezcla isopropanol-agua (65:35). Esta Fase fue concentrada al vacío hasta un 30%.

3.5.1 Fraccionamiento de la Fase Apolar (GACD):

La Fase Apolar (17,0 g), se fraccionó en una columna cromatográfica de Silica-gel (3,5 cm de diametro x 22,7 cm de largo), utilizando gradientes *n*-hexano, *n*-hexano-diclorometano (1:1), diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol, obteniendo 30 fracciones; a las cuales se les realizó un seguimiento por TLC en fase normal, empleando como fase estacionar Silica-gel y como eluente Hexano-Acetato de Etilo (9:1) para reunir las y finalmente obtener 16 fracciones, nombradas como GACD 1 a GACD 16. como se observa en la figura siguiente:

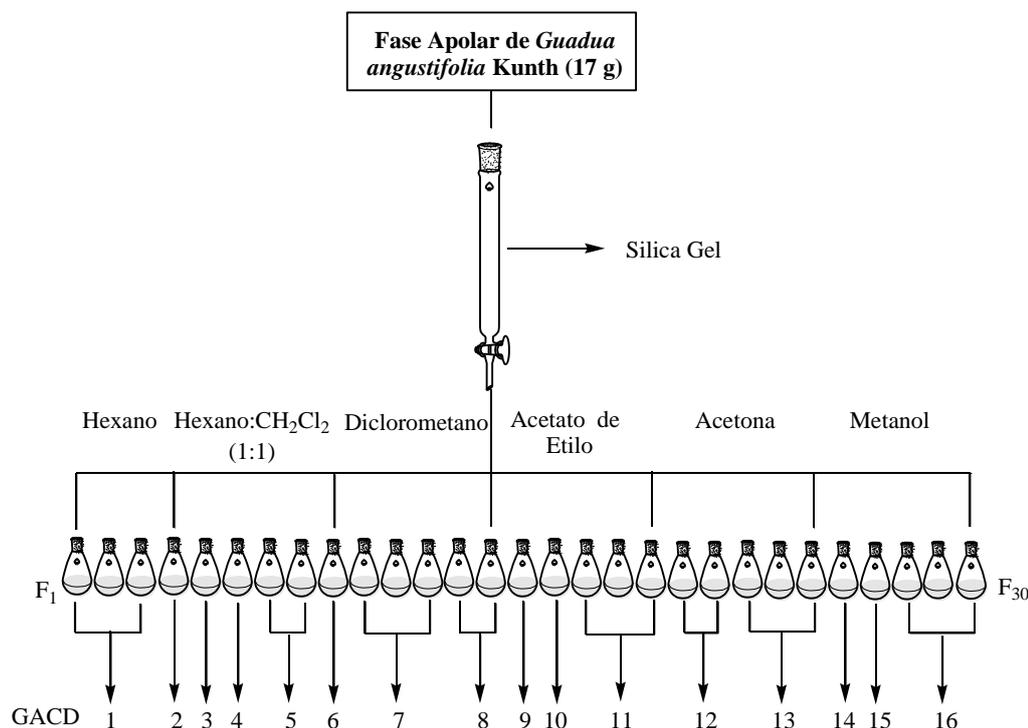


Figura 15. Separación de la fase Apolar

Según el seguimiento por TLC y GC-MS de las fracciones GACD3 y GACD4 exhibieron la presencia de compuestos con buenas condiciones para su separación e identificación.

3.5.1.1 Separación cromatográfica de la Fracción GACD 3

La fracción GACD 3 (2,8 g), se fraccionó en una columna cromatográfica de Sílica-gel (3,5 cm de diametro x 27 cm de largo), eluyendo con un mezcla binaria de *n*-hexano: Diclorometano, partiendo del 100% de Hexano y disminuyendo de a 5% hasta llegar al 100% de Diclorometano, obteniendo 257 fracciones, las cuales se reunieron utilizando como criterio TLC en fase normal. La fase móvil empleada fue *n*-hexano-diclorometano (9:1) para finalmente obtener 18 fracciones, nombrándolas desde **GACD 3-1** hasta **GACD 3-18**.

Las fracciones con mayor porcentaje de rendimiento fueron monitoreadas por TLC en fase normal y la fracción que presentó mas pureza fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) por impacto electrónico, a continuación se muestran las condiciones del método:

Tabla 4. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 3-18

Temperatura del Horno	60 °C
Temperatura de Inyección	300 °C
Modo de Inyección	Split
Modo de Control de Flujo	Velocidad lineal
Flujo de la Columna	1 mL/min.
Velocidad Lineal	36.5 cm/s
Gas de Arrastre	Helio
Temperatura de la fuente de iones	260 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Tiempo de inicio	3 min
Tiempo de finalización	20 min
Intervalo	0.5 s
Rango m/z	35-700

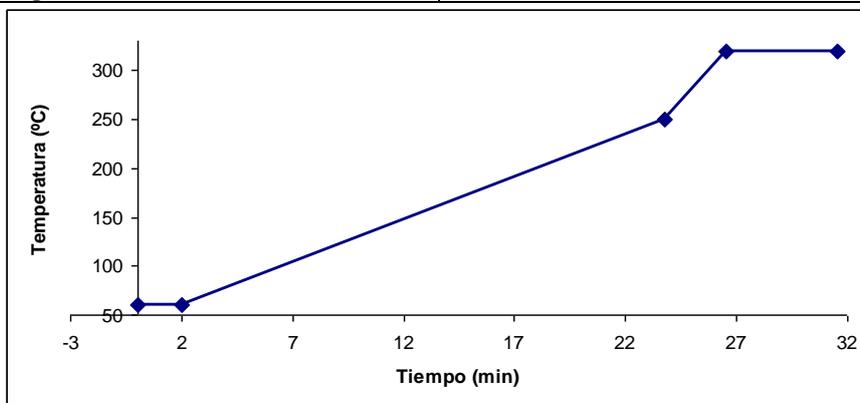
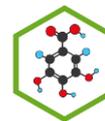


Figura 16. Condición del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 3-18

3.51.2 Separación cromatográfica de la Fracción GACD 4

A esta fracción se le realizó cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria Silica-gel y la fase móvil comenzó en 100% de Hexano, aumentando un 5% la polaridad con diclorometano hasta terminar en un 60%



de Hexano, recolectando 223 fracciones, las cuales se reunieron en 18 fracciones basándonos en la cromatografía en placa fina en fase normal usando como fase estacionaria Silica-gel y como eluyente n-hexano: diclorometano (8:2), enumeradas como **GACD 4-1** hasta **GACD 4-18**, estas fracciones fueron monitoreadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) por impacto, con las siguientes condiciones:

Tabla 5. Condiciones del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 4

Temperatura del Horno	230 °C
Temperatura de Inyección	300 °C
Modo de Inyección	Split
Modo de Control de Flujo	Velocidad lineal
Flujo de la Columna	1 mL/min.
Velocidad Lineal	36.5 cm/s
Gas de Arrastre	Helio
Temperatura de la fuente de iones	260 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Tiempo de inicio	2 min
Tiempo de finalización	15.00 min
Intervalo	0.5 s
Rango m/z	35-700

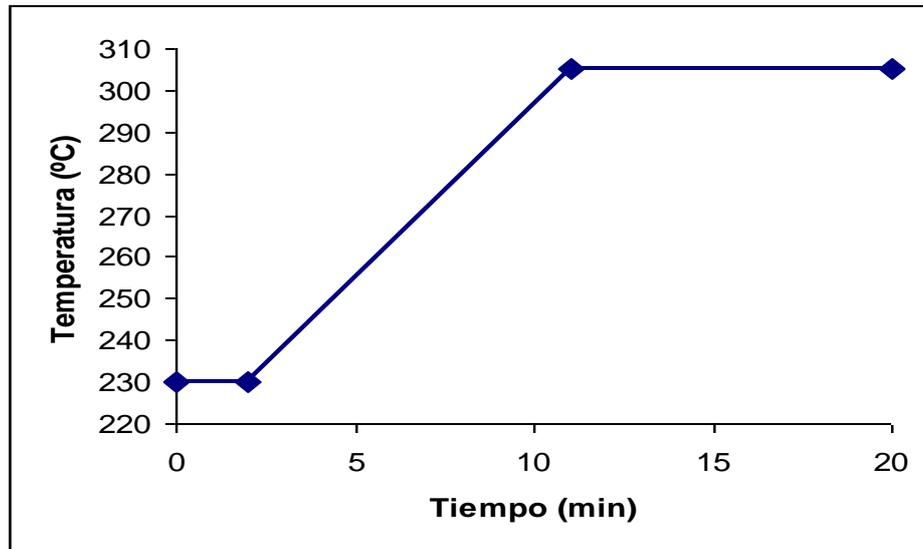
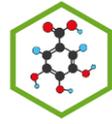
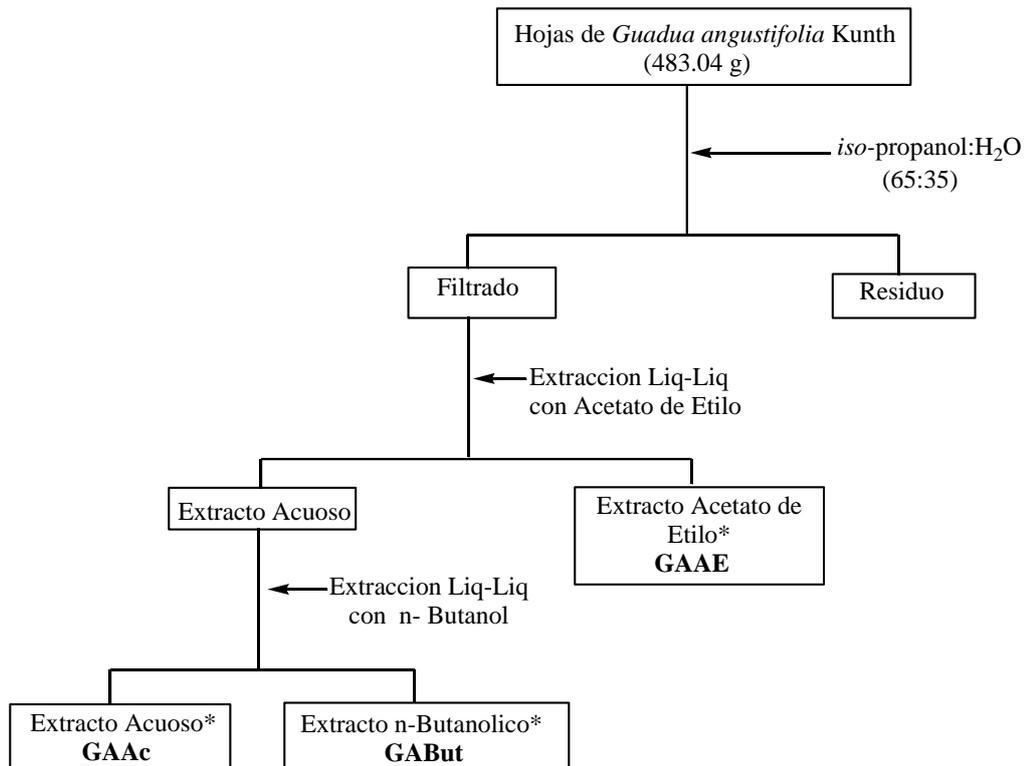


Figura 17. Condición del método cromatográfico y espectrométrico de GACD 4

3.5.2 Fraccionamiento de la Fase Polar:

Al material vegetal restante (483.04g) de la extracción con diclorometano; se le realizó una extracción con la mezcla *iso*-propanol: agua (65:35) para obtener la Fase Polar. Esta fase se concentró hasta llegar a un 30% del volumen inicial para proceder a una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, obteniendo como resultado dos extractos: el extracto de Acetato de etilo (**GAAE**) y el extracto acuoso (**GAAc**).

A GAAc se le realizó una extracción líquido-líquido con n-butanol (saturado) para obtener finalmente dos extractos: el acuoso y el butanólico (**GABut**). Cada uno de los tres extractos obtenidos se concentraron hasta llegar a sequedad.



*seguimiento por TLC RP-18 y sílica

Figura 18. Fraccionamiento de la Fase Polar

3.5.2.1 Fraccionamiento del Extracto Acuoso (GAAc):

El extracto acuoso (33.3g), se fraccionó empleando una columna cromatográfica de DAION HP 20 (5,2 cm de diámetro x 28 cm de largo), el eluyente de acondicionamiento empleado fue agua; el gradiente a continuar una mezcla de agua-isopropanol en proporciones de 95-5, respectivamente. Para seguir con el proceso, el gradiente se modificó aumentando la concentración de isopropanol en proporciones de 5% hasta llegar a una relación del gradiente 70-30 siendo la concentración mayor de isopropanol. Para el cambio de gradiente se tuvo en cuenta el volumen de la columna, realizándolo por triplicado.

Se colectaron 101 fracciones, a estas fracciones se les realizó un seguimiento por TLC en fase reversa, utilizando como fase estacionaria TLC aluminio RP-18 F_{254s} y como eluente H₃PO₄ (0,05%): Acetonitrilo (8:2); y se tomó el espectro ultravioleta a dos longitudes de onda: 270 y 330 nm.

Basándonos en la similitud de los perfiles cromatográficos se unieron las fracciones, obteniendo finalmente 16 fracciones nombradas como GAAC 1 a GAAC 16.

A estas 16 fracciones se les realizó un barrido espectral en el UV desde una longitud de onda de 220 hasta 400 nm.

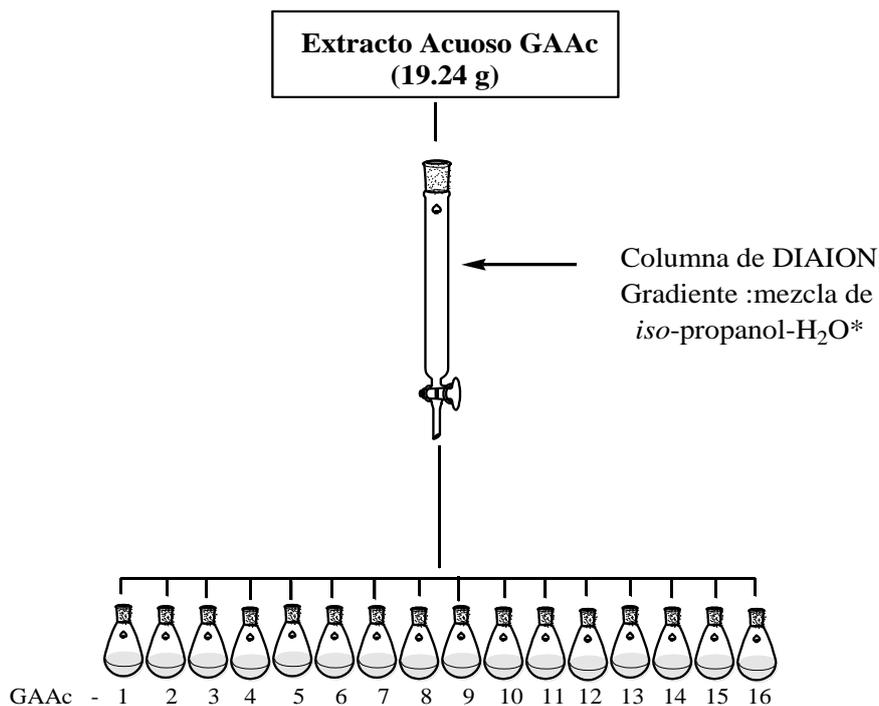


Figura 19. Fraccionamiento del extracto Acuoso (GAAC)

Por último, las fracciones fueron monitoreadas por cromatografía HPLC-DAD, utilizando un gradiente binario A (H₃PO₄ 0.05%): B (Acetonitrilo).

A continuación se muestran las condiciones del método:

Tabla 6. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD para GAAC.

Columna	Ultra Aqueous RP-18 de 3 μ m (100 \times 3.2mm, RESTEK)
Flujo	0.5 μ L/min
Gradiente	Ácido Fosfórico: Acetonitrilo 0-4 min (95-5); 25-30 min (60-40) 31-35 min (95-5.0)
Tiempo de corrida	35 min
Detector	PDA (236-599 nm)
Volumen de Inyección	20 μ L
Temperatura de la columna	40 $^{\circ}$ C

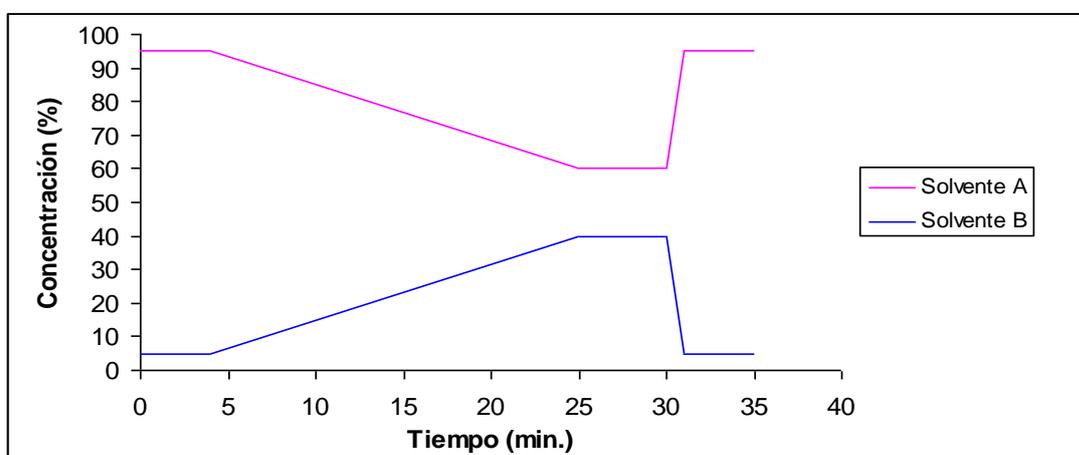
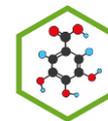


Figura 20. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD para GAAC.

3.5.2.1.1 Separación por HPLC-DAD preparativa de la fracción GAAC 2

La fracción GAAC 2 (0,09 g) se pasó por un cartucho de RP-18, el cual fue acondicionado con metanol y H₃PO₄ 0.05%: Acetonitrilo (70:30). Se retuvo la muestra (solubilizada en H₃PO₄ 0.05%: Acetonitrilo (70:30)) y se pasó H₃PO₄ 0.05%, metanol y acetona (cada uno con 6 mL).

A la fracción obtenida con metanol (1.7 mg), se le realizó HPLC-preparativa. El equipo se mantuvo en una mezcla isocrática de H₃PO₄ 0.05%: Acetonitrilo (70:30) con un volumen de inyección de 50 μ L.



Al compuesto mayoritario recogido se le realizó una siliación y se inyectó en el GC-MS con las siguientes condiciones:

Tabla 7 Condición del método cromatográfico y espectrométrico de GAAC2-1

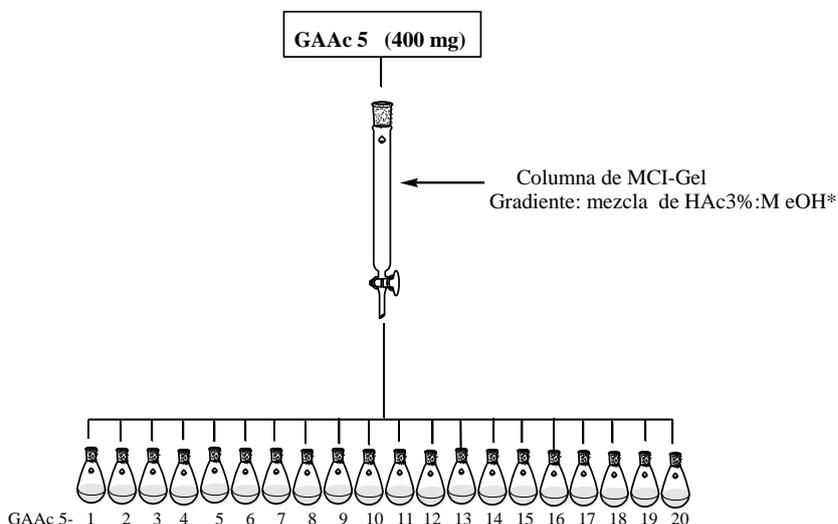
Temperatura del Horno	100 °C
Temperatura de Inyección	280 °C
Modo de Inyección	Split less
Modo de Control de Flujo	Velocidad lineal
Flujo de la Columna	1 mL/min.
Velocidad Lineal	37.2 cm/s
Gas de Arrastre	Helio
Temperatura de la fuente de iones	260 °C
Temperatura de la interfase	100 °C
Tiempo de inicio	1 min
Tiempo de finalización	36 min
Intervalo	0.5 s
Rango m/z	300

3.5.2.1.2 Separación cromatográfica sobre una columna empacada con MCI-Gel de la fracción GAAC 5:

El procesamiento de la fracción GAAC-5 (800 mg) se realizó por cromatografía en columna de MCI-Gel, empleando un equipo de **cromatografía líquida de baja presión**, utilizando solo 400 mg de esta. El acondicionamiento de la resina se efectuó con metanol; para la inyección de la muestra se disolvió en la mínima cantidad de la mezcla de ácido acético al 3%- MeOH en proporción (2:1). El gradiente empleado fue una mezcla de ácido acético al 3%- MeOH en proporción inicial de 90:10, disminuyendo la concentración del ácido de dos en dos para tener proporciones de 88:12; 86:14 hasta llegar a una proporción de 30:70 conservando el volumen de la columna de 300 mL por cada etapa, obteniendo 230 fracciones. Las fracciones recogidas se monitorearon por espectrofotometría ultravioleta a dos longitudes de onda: 270 y 336 nm.

Basándonos en la similitud de los perfiles cromatográficos se unieron las fracciones obteniendo 20, codificándolas desde GAAc 5-1 hasta GAAc 5-20, luego fueron concentradas por rota vaporación al vacío hasta sequedad.

Estas fracciones fueron monitoreadas por TLC en fase reversa utilizando como eluyente HAc 3%-MeOH (85:15 y 70:30) y por HPLC-DAD. Las condiciones para HPLC-DAD son las mismas del método utilizado para GAAc, modificando solo el gradiente, empleando ácido acético y metanol en vez de ácido fosfórico-acetonitrilo.



* Variación del gradiente conservado el volumen de la columna en proporciones de dos en dos, bajando la proporción de Acido Acético y aumentando la concentración de metanol hasta llegar a una concentración final de 70% de metanol.

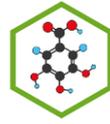
Figura 21. Separación cromatográfica de la fracción GAAc 5

3.6 Reacciones de Reconocimiento

3.6.1 Reacciones de reconocimiento de Fenoles

Estas pruebas se le realizaron a las fracciones GAAc 1 hasta GAAc 16

- **Prueba con tricloruro férrico al 1%:** A un (1) mL de la muestra disuelta en metanol, se añadió 0.5 mL de solución tricloruro férrico al 1% en agua (v/v). Si presenta coloración azul intenso, es prueba positiva para fenoles.



- **Prueba con acetato de plomo:** A un (1) mL de la muestra disuelta en metanol, se agrega 0.5 mL de acetato de plomo al 10%. Si observa un precipitado de color blanco, es prueba positiva para fenoles.
- **Prueba con Gelatina-Sal:** A un (1) mL de la muestra disuelta en metanol se agrega 0.5 mL de reactivo gelatina-sal. Si aparece un precipitado de color blanco, se considera prueba positiva para fenoles.

3.6.2 Reacciones de reconocimiento de Flavonoides: GAAC 1 a GAAC 16

- **Prueba de Cianidina:** A la muestra disuelta en metanol, se le agrega magnesio (Mg) en polvo y después gotas de Ácido Clorhídrico concentrado (HCl), en uno a dos minutos se desarrollan coloraciones que van del anaranjado al violeta (en general, cualquier tonalidad del rojo); si están presentes flavonas, flavonoles se produce un color verde o azul.
- **Prueba de Rosenhein^[42]:** A un (1) mL de la muestra disuelta en metanol, se agrega la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado (HCl); mezclar y calentar por diez (10) minutos a 90C. Se enfría y agita con 0.4 mL de alcohol amílico. Decantar y observar el color de la fase amílica. La prueba se considera positiva si aparece color, que va desde rojo hasta rosado claro.

NOTA: Para la lectura de los resultados de estas pruebas se debe tener en cuenta la siguiente simbología:

Presencia en concentración abundante del metabolito [+++]; Presencia en concentración moderada [++]; Presencia del metabolito en poca concentración, resultado dudoso en la prueba o falso positivo [+] y Ausencia del metabolito [-]

Los reactivos empleados se estandarizaron frente a muestras patrón que garantiza la respuesta de los respectivos reactivos y solventes.



- **Pruebas de desplazamiento:** Se tomaron los espectros en metanol de los compuestos GAAC 5-4, GAAC 5-10, GAAC 5-14 y GAAC 5-16.

Luego se procedió a realizar las reacciones de desplazamiento a cada compuesto, observando los desplazamientos que ocurrían después de agregar los reactivos. El barrido espectral se realizó desde una longitud de onda de 220 a 500 nm así:

a. Prueba con $AlCl_3$ y HCl: se agregó una gota de $AlCl_3$ al 1% al compuesto en metanol y se realizó el barrido espectral, seguido se añadió una gota de HCl al 1% y se volvió a medir el espectro.

b. Prueba con MeONa: se adicionó una gota de MeONa al 1% al compuesto en metanol y luego se realizó el barrido espectral.

c. Prueba con AcONa y H_3BO_3 : se agregó una gota de AcONa al 1%, luego se midió el espectro, seguido se agregó un granito de H_3BO_3 y se volvió a medir el espectro.

3.7 Resonancia Magnética Nuclear

Las cantidades enviadas para el análisis fueron: 10.3 mg de GAAC 13; 8.41 mg de GAAC 5-14 y 2.04 mg de GAAC 5-16, estas se disolvieron en DMSO- d_6 , para la toma de los espectros de RMN 1H y COSY a una frecuencia de 400 MHz.

Adicional a esto, a la muestra GAAC 5-14 se le tomaron los espectros ^{13}C , HSQC y HMBC. Estos espectros fueron realizados en el Laboratorio de RMN de la Universidad Nacional (Bogotá/ Colombia).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS PRELIMINAR:

De este análisis preliminar se obtuvieron tres extractos con su respectivo porcentaje de rendimiento: acetato de etilo (**GAAE; 1.57%**), n-butanólico (**GABut; 12.35%**) y acuoso (**GAAC; 13.85%**). A estos extractos se les realizó TLC en fase normal y fase reversa para determinar el gradiente adecuado a emplear en el HPLC-DAD, y observar la existencia de los compuestos de interés por sus cromatogramas y sus espectros característicos de flavonoides. Obteniendo como resultado que GAAC cumplía con las condiciones necesarias para el desarrollo de la investigación por tener una buena presencia de los compuestos y un rendimiento alto, lo cual garantizaría obtener el tipo de compuesto esperado, al igual se observó que la separación sería complicada debido a la polaridad similar de los compuestos.

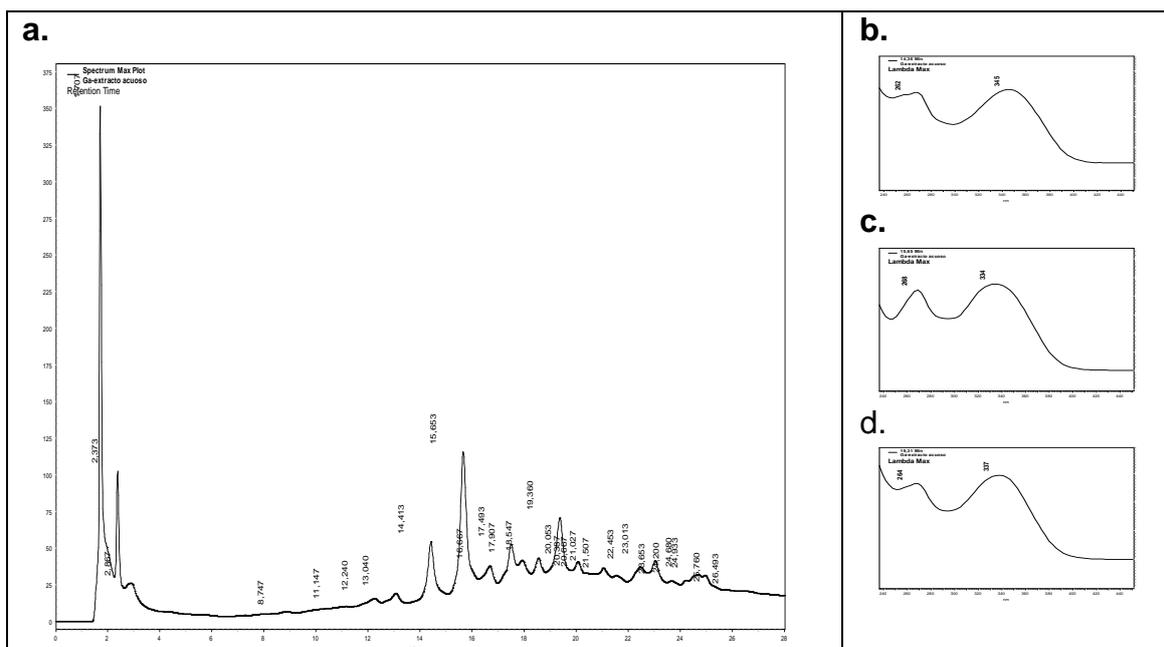


Figura 22. Cromatograma del análisis preliminar del extracto GAAC **b.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 14.41 min. **c.** Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 15.67 min. **d.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 19.36 min.

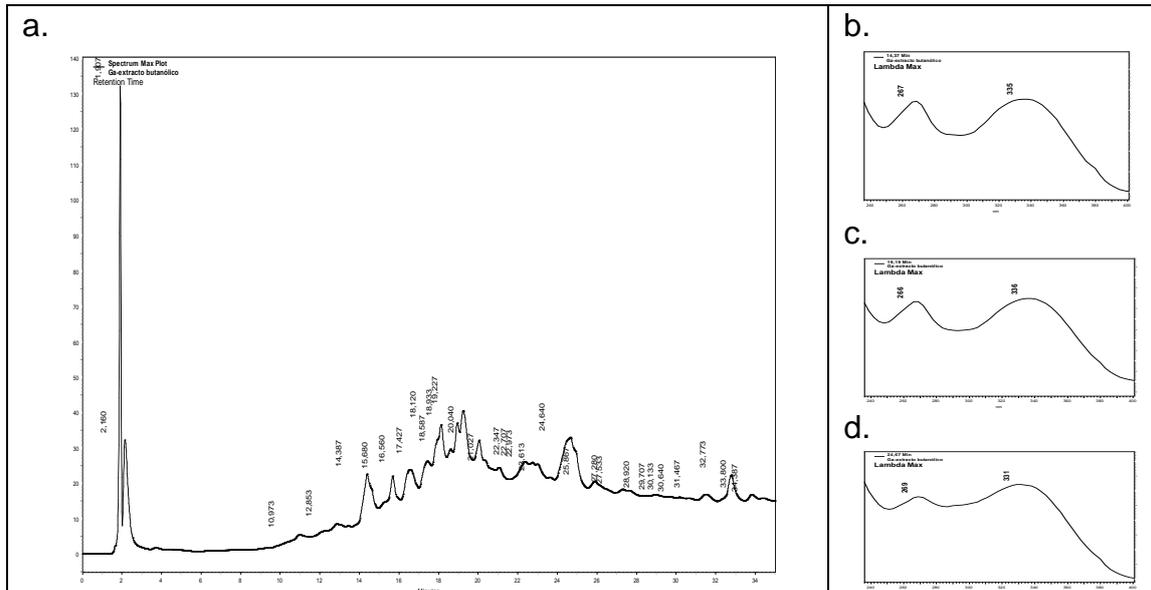


Figura 23 Cromatograma del análisis preliminar del extracto GABut **b.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 14.37 min. **c.** Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 19.19 min. **d.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 24.64 min.

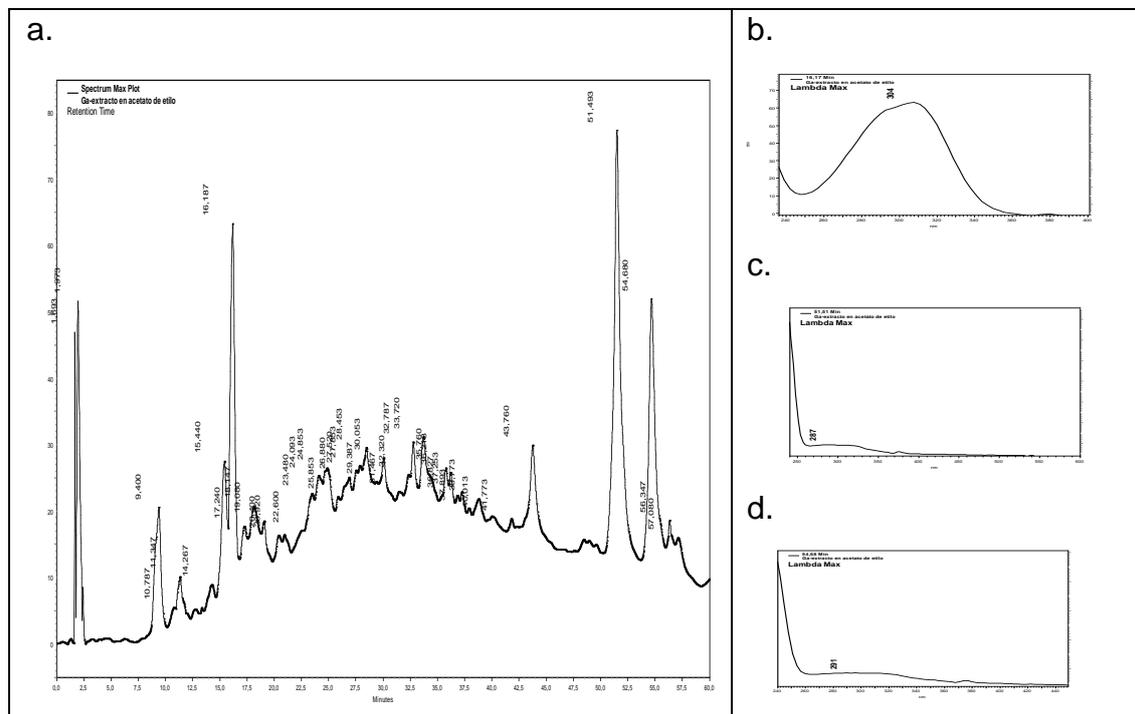
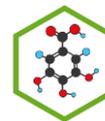


Figura 24. Cromatograma del análisis preliminar del extracto GAE **b.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 16.18 min. **c.** Espectro Uv de el pico con un tiempo de retención de 51.49 min. **d.** Espectro Uv del pico con un tiempo de retención de 54.68 min.



En los cromatogramas anteriores se observa la presencia de varios compuestos, predominando los de tipo flavonoide, concentrándose en el extracto acuoso. Los otros dos extractos varían solo en una mínima cantidad los flavonoides y presentan compuestos aromáticos que no son de nuestro interés.

4.2 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

De las hojas secas y molidas se extrajeron dos fases: la **Fase Apolar (17,0 g)** y la **Fase Polar (42,7 g)**, con un porcentaje de rendimiento de 3,4% y 8,6%, respectivamente.

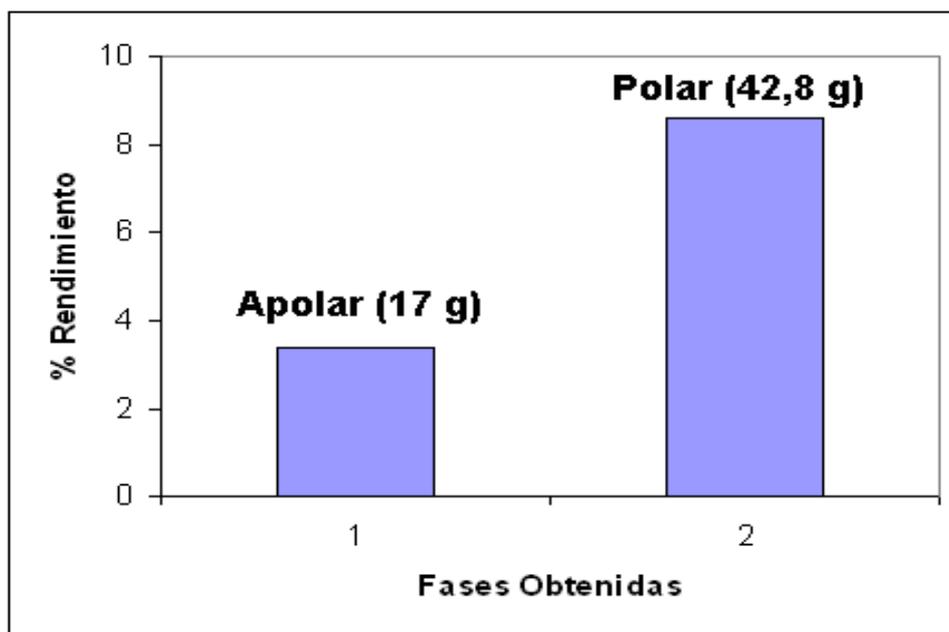


Figura 25. Porcentaje de rendimiento y pesos de las Fases obtenidas.

4.2.1 FRACCIONAMIENTO DE LA FASE APOLAR (GACD):

Las 16 fracciones obtenidas fueron secadas a presión reducida para adquirir su peso y hallar el porcentaje de rendimiento de cada fracción:

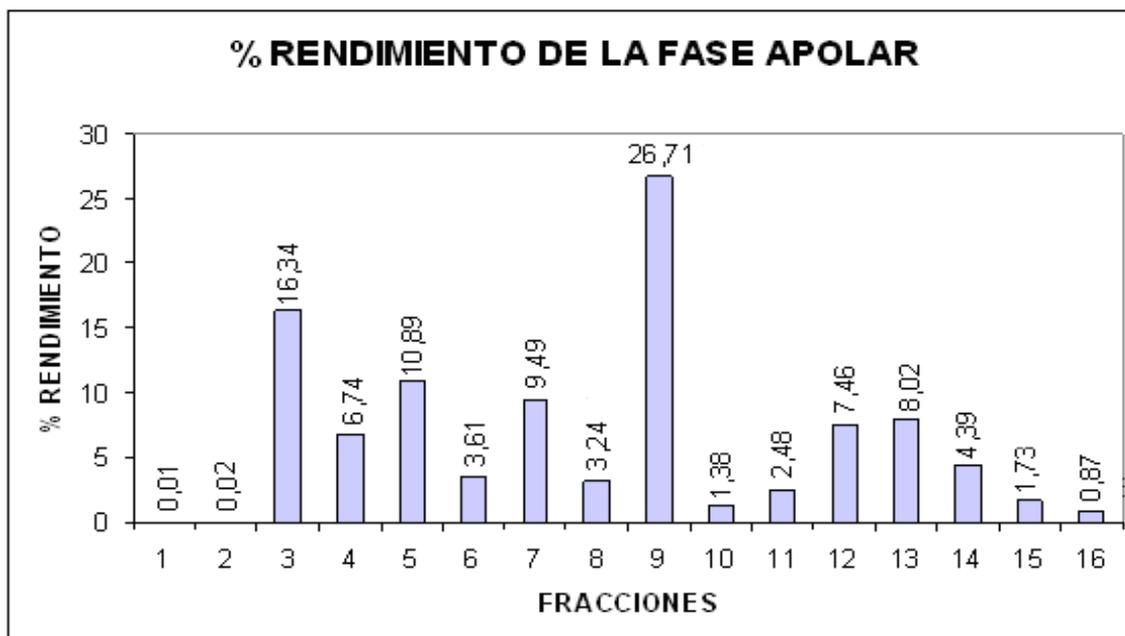


Figura 26. Porcentaje de rendimiento de la Fase Apolar.

De la grafica se puede observar que la fracción GACD 9 posee el mayor porcentaje de rendimiento (26,72 %), con un peso de 4,53 g; seguida por la fracción GACD 3 (16.35 %), GACD 5 (10.89 %) y GACD 4 (6.74 %), con 2,77 g, 1.85 g y 1,14 g., respectivamente.

A estas fracciones se les realizó TLC en fase normal, dando como resultado que la mezcla de solventes con mejor separación de los compuestos presentes en GACD 9 fue hexano: acetona (8:2), indicando gran cantidad de clorofilas, las cuales exhiben una coloración roja fluorescente en onda larga (365 nm) con Rf's de: 0.39, 0.60 y 0.68, que en el presente trabajo carecen de interés y limitan el análisis instrumental por GC-MS. Además, un compuesto de color amarillo fluorescente con Rf de 0.45, el cual se encontró solapado con las clorofilas evitando su posible separación e identificación.

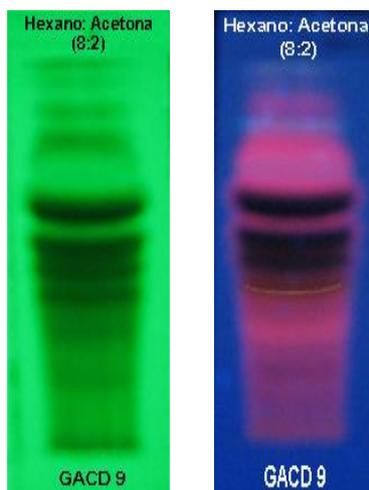


Figura 27. Placa cromatográfica de la fracción GACD 9 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha)

Los compuestos de la fracción GACD 5 presentan similitud en polaridad, al ser analizados por medio de TLC utilizando diferentes fases móviles y variando las proporciones no permiten una separación adecuada, por lo tanto, esta fracción fue descartada para un tratamiento posterior.

Las Fracciones GACD 3 y GACD 4, por ser de un peso considerablemente bueno y la simplicidad de separación observada por medio de TLC, empleando como fase móvil hexano: diclorometano (8:2), permitió determinar el gradiente a emplear para la técnica de cromatografía en columna para el aislamiento de los compuestos presentes, así:

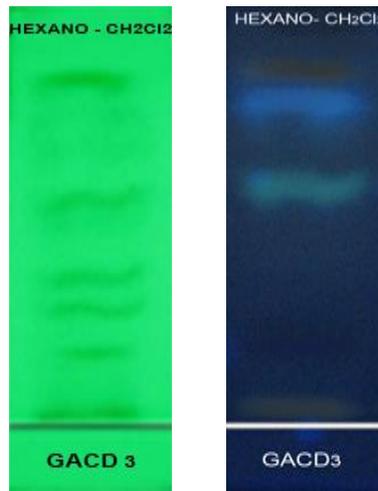


Figura 28. Placa cromatográfica de la fracción GACD 3 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha)

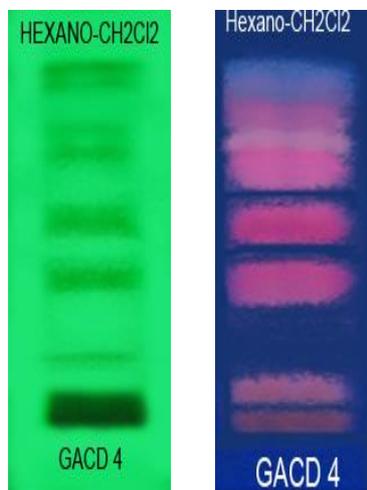


Figura 29. Placa cromatográfica de la fracción GACD 4 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha)

4.2.1.1 Separación cromatográfica de la Fracción GACD 3

La fracción GACD 3 (2,77 g) se separó en columna cromatográfica de Sílica gel; obteniendo 18 fracciones, reunidas de acuerdo con sus perfiles cromatográficos en capa fina. Se pesaron y se obtuvo su respectivo rendimiento:

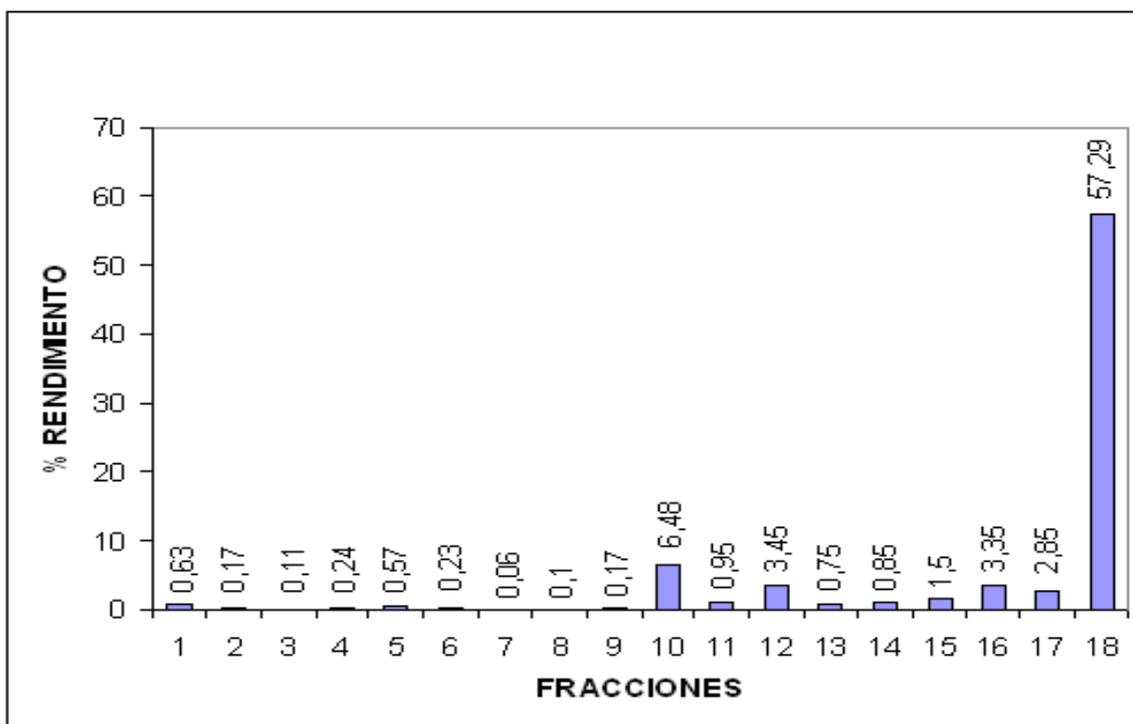


Figura 30. Porcentaje de rendimiento de GACD 3

Las fracciones con mayor porcentaje de rendimiento fueron monitoreadas por TLC, observando que GACD 3-18 presentaba un compuesto de alta pureza, por lo tanto se inyectó por GC-MS.

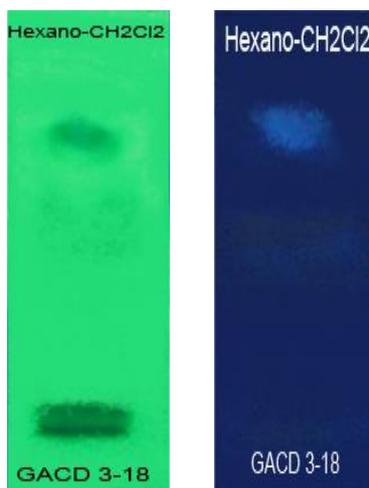


Figura 31. Placa cromatográfica de GACD 3-18 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha).

- **Elucidación estructural del compuesto mayoritario en GACD 3-18**

El espectro de masas por impacto electrónico de la fracción **GACD 3-18**, con un porcentaje de rendimiento del 57,2% (1,15 g), se identificó como **Tetraetil silicato** por comparación con la librería Wiley (séptima edición 2003), con un porcentaje de similaridad del 99%; lo cual es consistente con el pico de ión molecular $[M]^+$ observado a m/z 208. Este pico fue comprobado por pérdidas químicas significativas de 15, 30 y 14 uma, correspondientes al radical libre metilo, una molécula de formaldehído y una molécula neutra de metil, respectivamente, generando los picos a m/z 193 $[M-CH_3]^+$, m/z 163 $[M-CH_3-CH_2O]$ y m/z 149 $[M-CH_2]^+$ como se observa en la **Figura 36**.

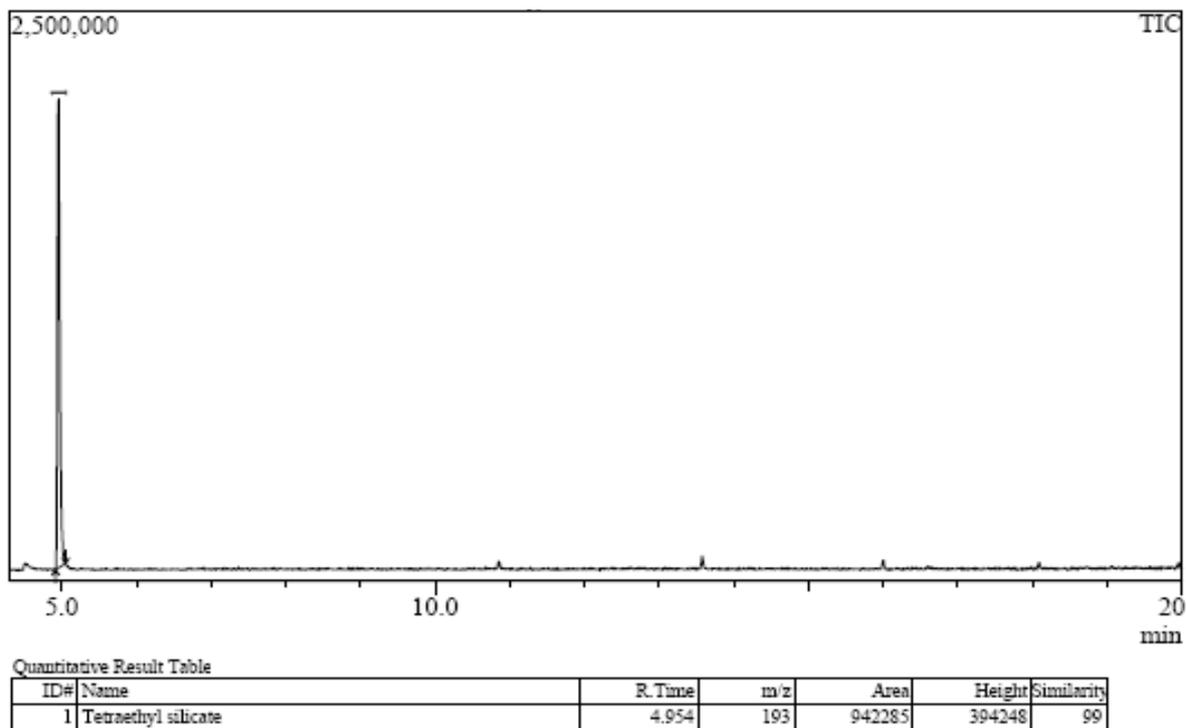


Figura 32. Cromatograma de la fracción GACD 3-18

Peak#: 1 R. Time: 5.0(Scan#: 116)
MassPeaks: 344
RawMode: Averaged 5.0-5.0(115-117)
BG Mode: Calc. from Peak

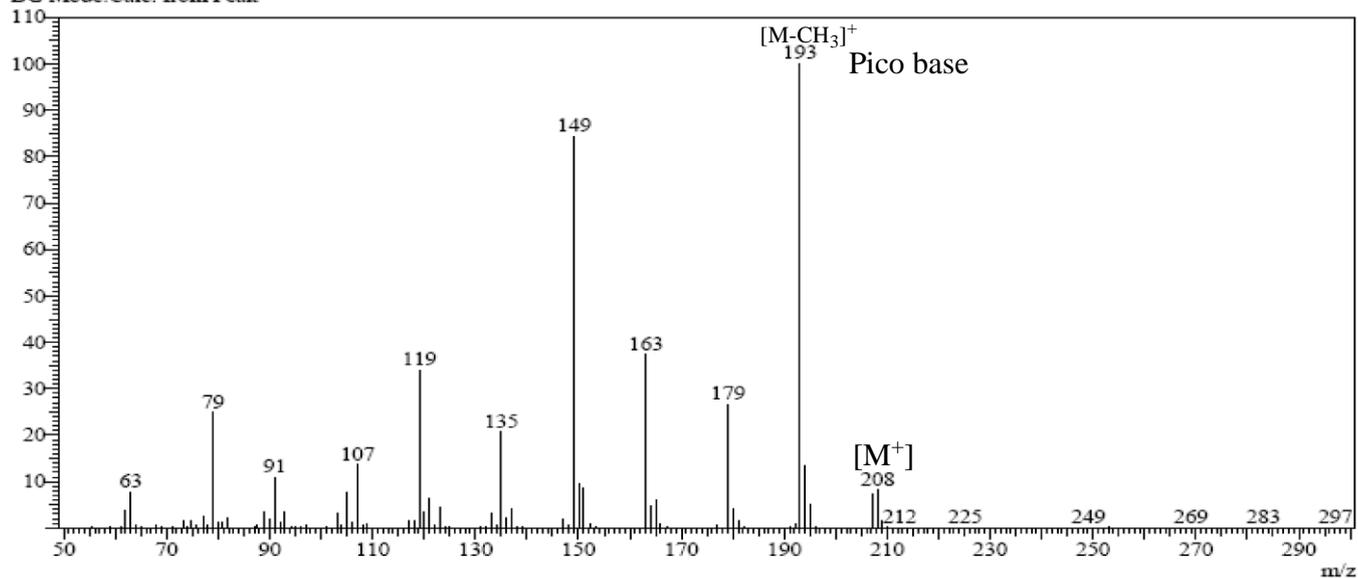


Figura 33. Espectro de masas por EI del compuesto Tetraetil Silicato.

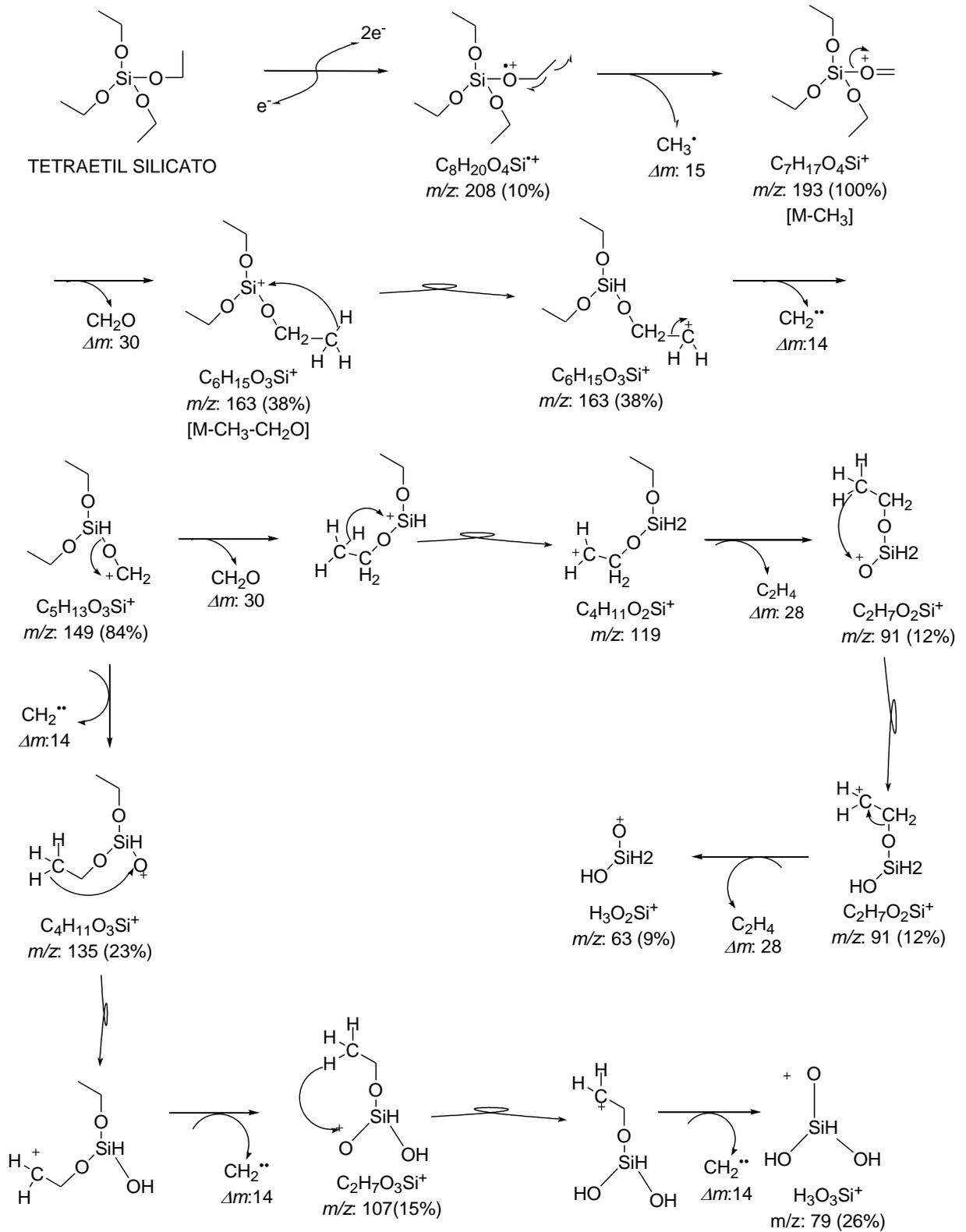
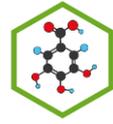
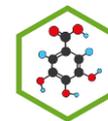


Figura 34. Fragmentaciones del Tetraetil Silicato^[45].



El tetraetil silicato obtenido como sólido de color blanco amorfo soluble en diclorometano, fue identificado por medio de GC-MS, en la fase apolar con un porcentaje de 57.39% característico en Poaceae por su alta acumulación dentro de las monocotiledóneas; se presenta en forma de agregados insolubles (fitolitos) y solubles (en forma de ácido ortosilícico y las sales derivadas de este) entrelazados con la celulosa y componentes de la pared celular, lo cual permite que la especie sea resistente y flexible además de exhibir una buena actividad antioxidante, estimular el sistema inmunológico e inhibe el proceso de envejecimiento en los tejidos [46].

4.2.1.2 Separación cromatográfica de la Fracción GACD 4

Se recolectaron 18 fracciones, de las cuales, las fracciones con mayor porcentaje de rendimiento son GACD 4-4 (0.10 g), GACD 4-6 (0.08 g), GACD 4-11 (0.08 g) y GACD 4-15 (0.29 g), como se observa en la siguiente figura:

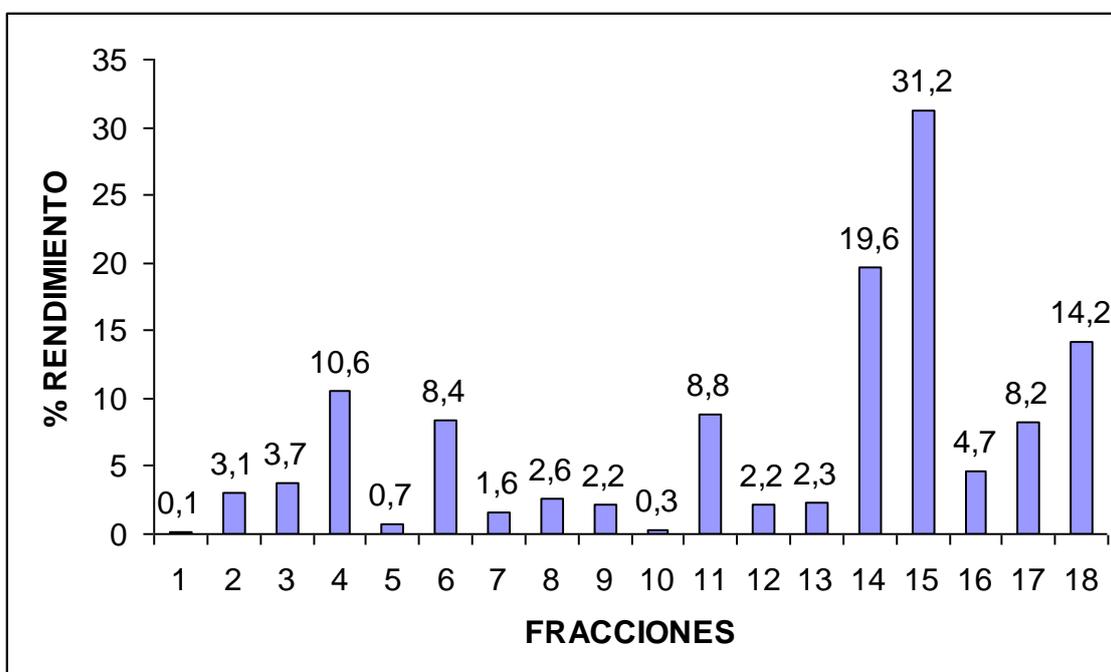
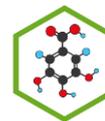


Figura 35. Porcentaje de rendimiento de GACD 4



Por medio del seguimiento de TLC a cada una de las fracciones, se estableció que las fracciones GACD 4-6 y GACD 4-9 presentaban buena separación de sus compuestos. Por esta razón, se inyectaron en GC-MS para una identificación cualitativa, determinando que el compuesto mayoritario en GACD 4-6 era la vitamina K₁ y en GACD 4-9 era la vitamina E.

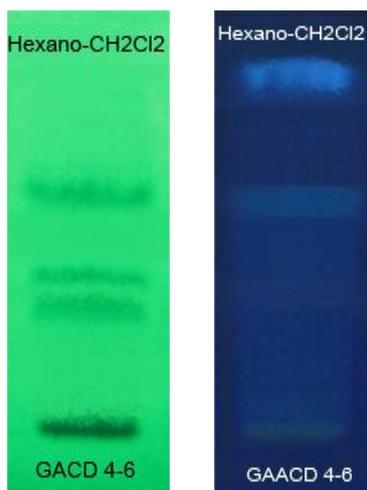


Figura 36. Placa cromatográfica de GACD 4-6 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha)

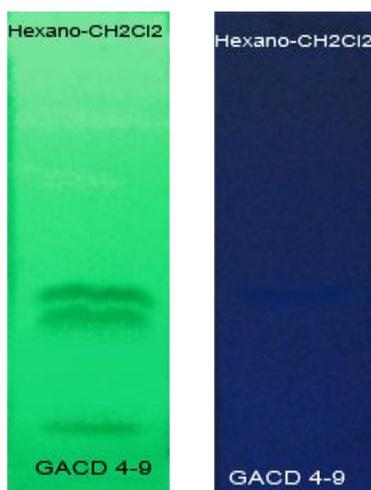
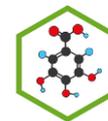


Figura 37. Placa cromatográfica de GACD 4-9 en onda corta (254 nm, izquierda) y onda larga (365 nm, derecha)



- **Elucidación estructural del compuesto mayoritario en GACD 4-6**

En esta fracción se presentó como compuesto mayoritario la vitamina K₁ perteneciente al tipo de compuestos denominados naftoquinonas en las cuales, es característico que la señal del ion molecular sea la más intensa por su estabilidad ^[47], como se observa en el espectro de masas, el ion molecular [M]⁺ es el pico base con *m/z*: 450. El cual, es confirmado por la pérdida de un metilo, dando la señal *m/z*: 435. Las fragmentaciones más significativas debido a la estabilidad de los iones se identificaron por la pérdida de la cadena alifática por diferentes formas; la primera, gracias a la ionización del doble enlace de la cadena y un rompimiento hemolítico, produciendo un *m/z* de 225 de [M-C₁₅H₁₃O₂]⁺ con estabilidad de 60%. La segunda, por la ciclación del heteroátomo con la cadena con un *m/z* de 198 de un [M-C₁₃H₁₂O₂]⁺. Con un 40% y por último, debido a la trasposición de un protón al heteroátomo, permitiendo un rompimiento de la cadena para formar el carbocatión con *m/z* de 186 con una estabilidad de 70%.

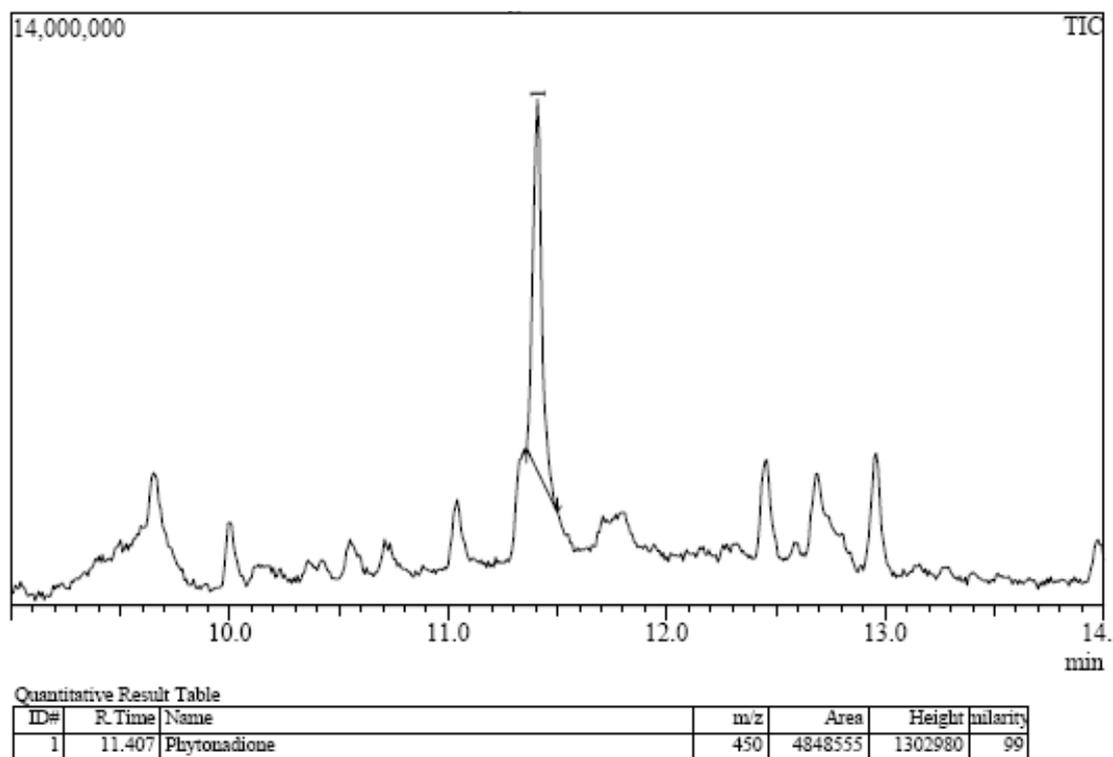


Figura 38. Cromatograma de la fracción GACD 4-6

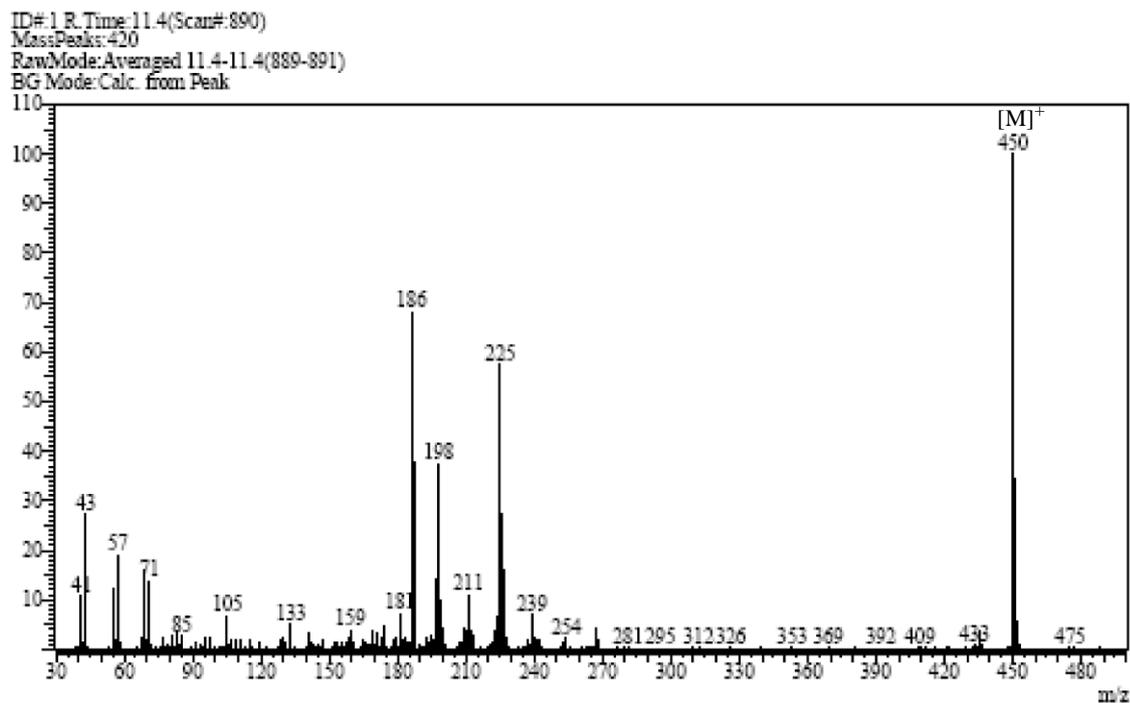


Figura 39. Espectro de masas por EI de la vitamina K₁.

Id: 700477 CASRegNO: 84-80-0 Mw: 450.349780 Formula: C₃₁H₄₆O₂
Vitamin K1 // Phytoquinone

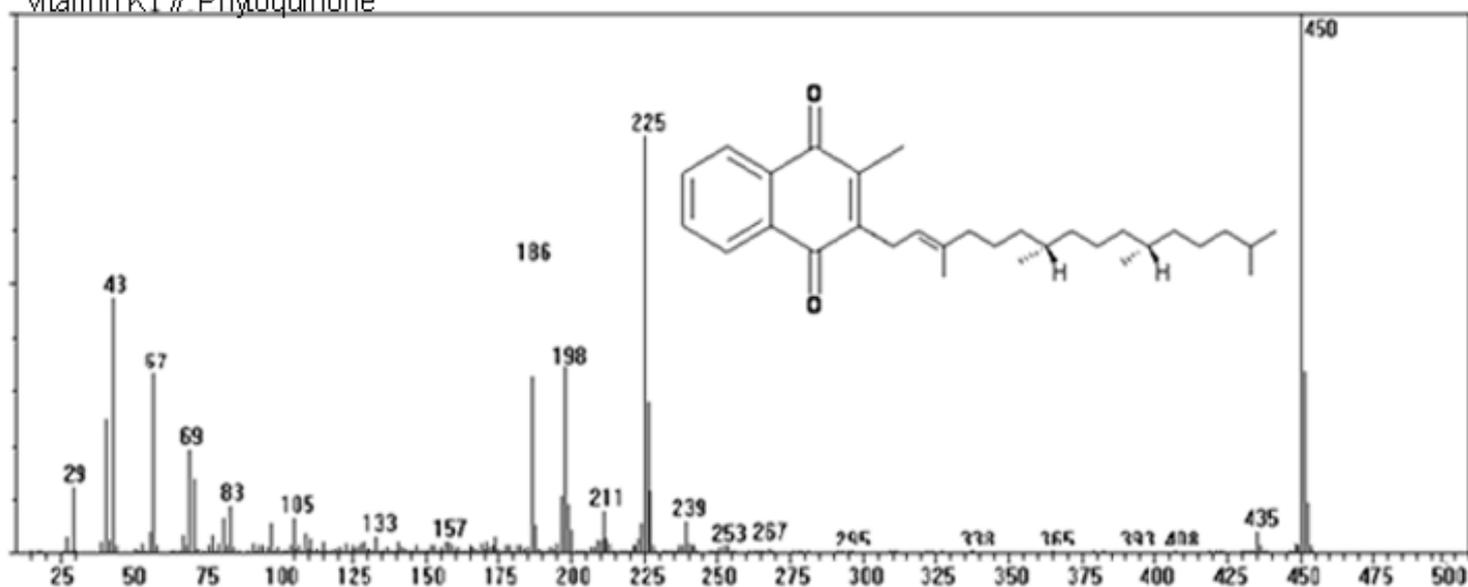


Figura 40. Comparación del espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina K₁ con la librería Wiley

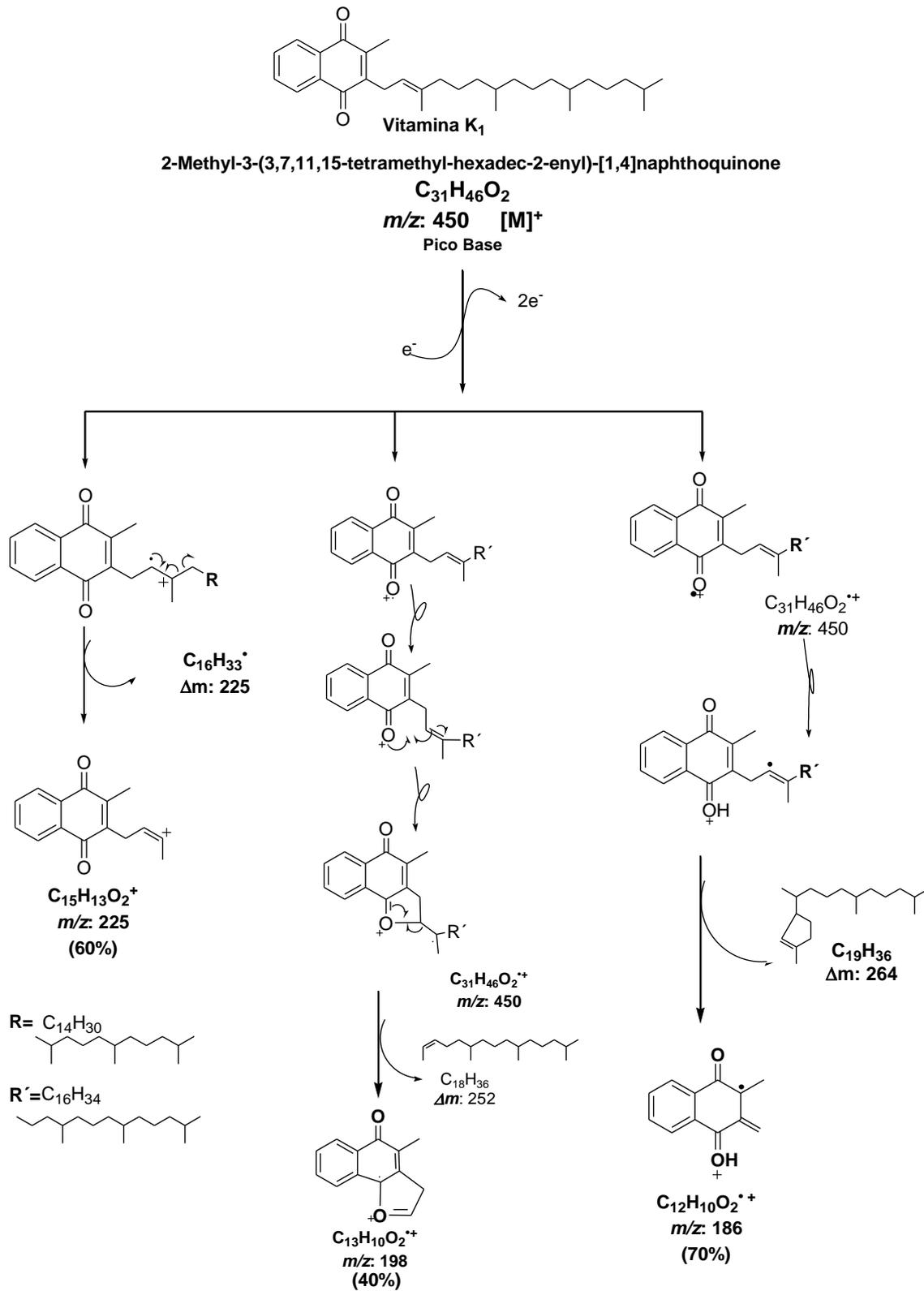
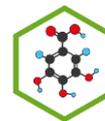
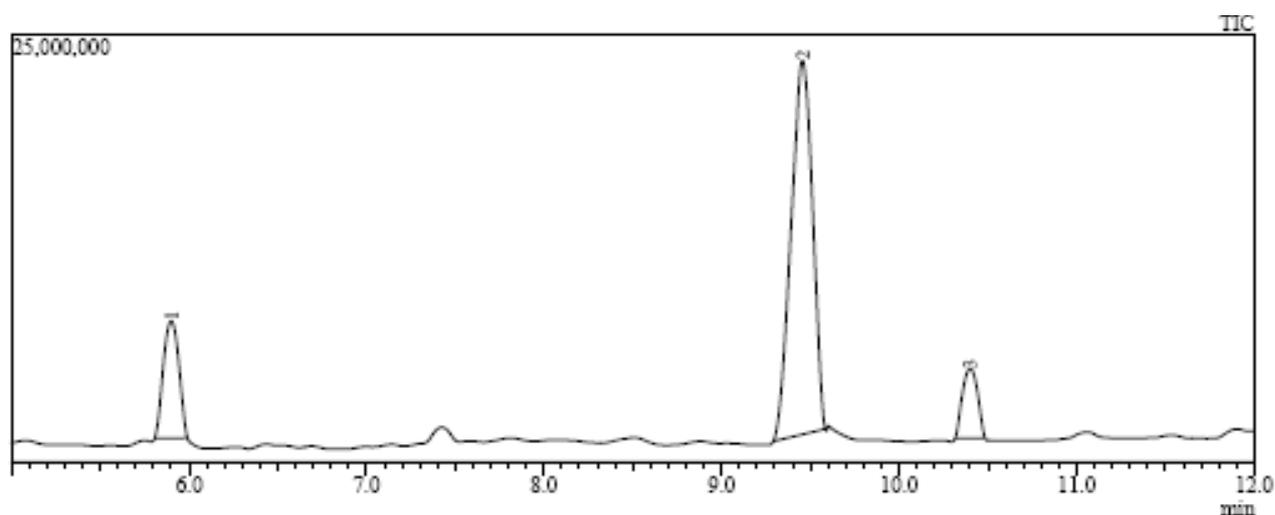


Figura 41. Fragmentación del compuesto GACD 4-6



- **Elucidación estructural del compuesto mayoritario en GACD 4-9**

El espectro de masas del pico 2 (t_R 9.456 min) se identificó por comparación con la librería Wiley como vitamina E, cuya fórmula molecular es $C_{29}H_{50}O_2$ y una similaridad de 97 %. El pico de ión molecular m/z 430 es consistente con su masa molecular relativa (M_r 430):



Quantitative Result Table

ID#	Name	R. Time	m/z	Area	Height	ug/kg
1	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	5.901	TIC	46641320	7224522	18.0
2	Vitamin E	9.456	TIC	186133910	22029530	71.2
3	Vitamin E acetate	10.401	TIC	26262169	4270001	10.0

Figura 42. Cromatograma de la fracción GACD 4-9

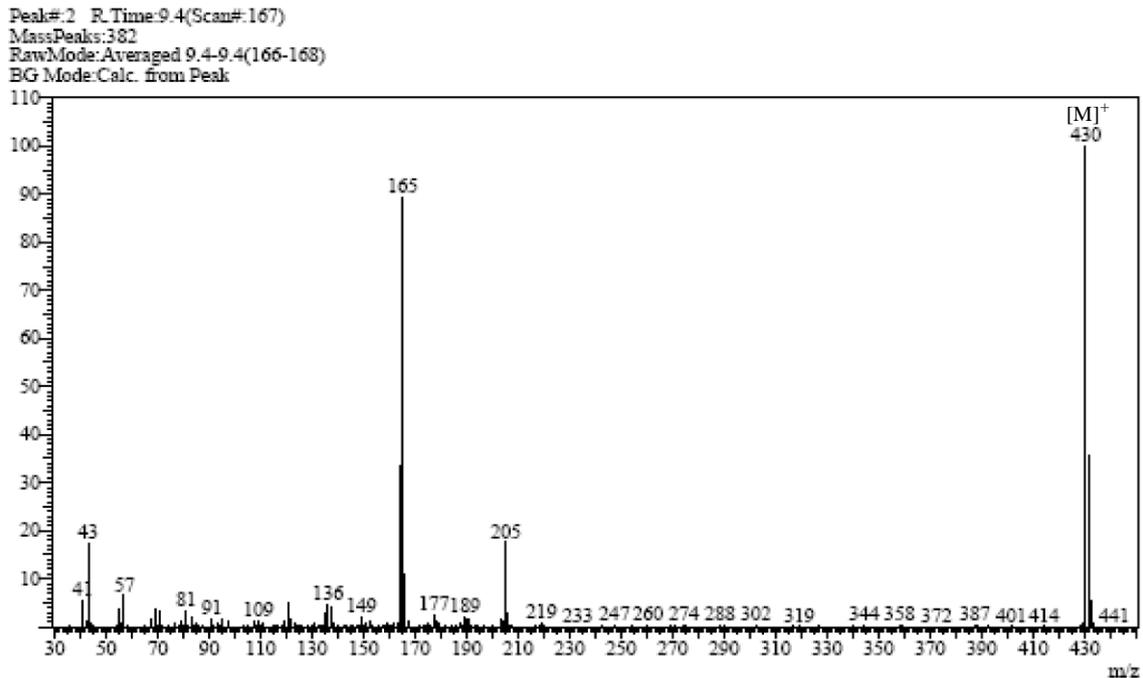


Figura 43. Espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina E.

Id:698177 CAS RegNO:59-02-9 Mw 430.381080 Formula: C₂₉H₅₀O₂
Vitamin E // alpha-Tocopherol

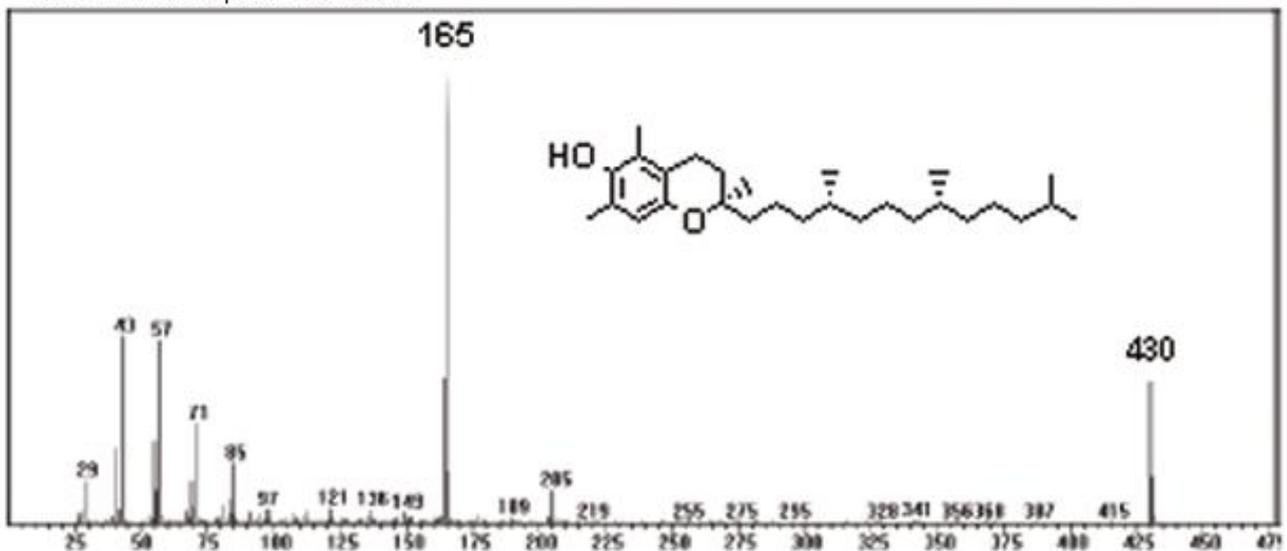


Figura 44. Comparación del espectro de masas por impacto electrónico de la vitamina E con la librería Wiley

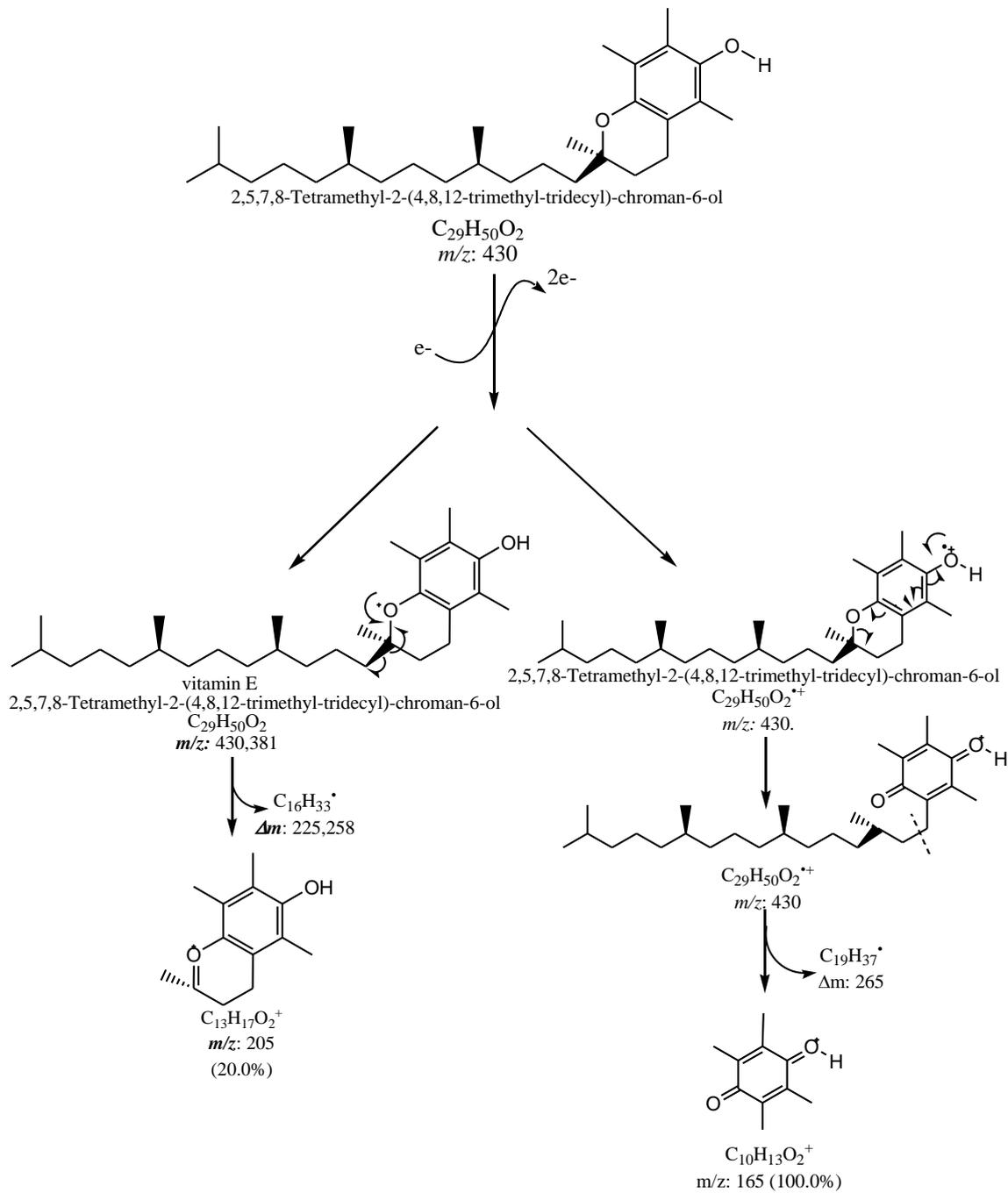
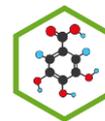


Figura 45. Fragmentación del compuesto GACD 4-9



4.2.2 FRACCIONAMIENTO DE LA FASE POLAR:

De la fase polar se obtuvieron 3 extractos: acetato de etilo, n-Butanólico y acuoso, con un rendimiento de 6.3 % (2,7g); 15.7 % (6,73g) y 77.8 % (33,3 g.), respectivamente:

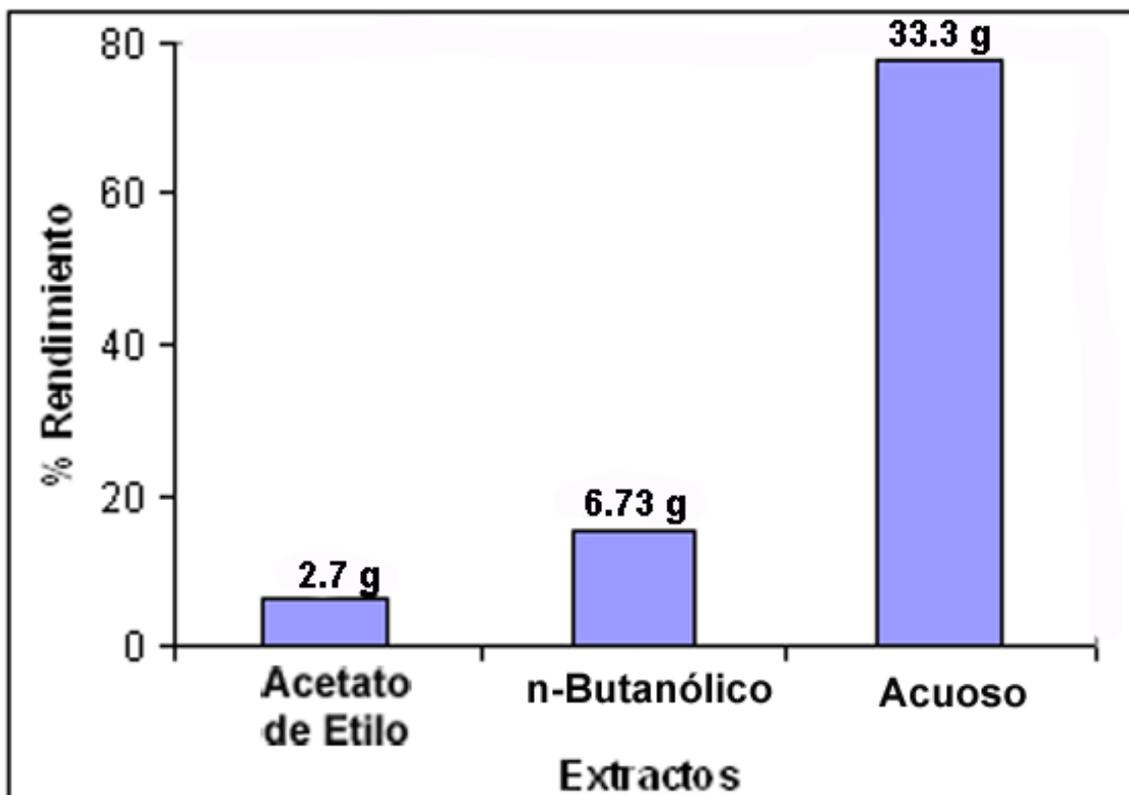


Figura 46. Porcentaje de Rendimiento de los extractos obtenidos de la Fase Polar

El extracto acuoso por tener mayor porcentaje de rendimiento y contenido de flavonoides (como se observó en el análisis preliminar), fue el extracto seleccionado para proceder a fraccionar:

4.2.2.1 Fraccionamiento del Extracto Acuoso (GAAC) sobre una columna cromatográfica empaquetada con DIAION HP-20:

Se obtuvieron 101 fracciones de la columna cromatográfica en DIAION, las cuales se unieron con base en los resultados espectrofotométricos a dos longitudes de onda: 270 y 330 nm:

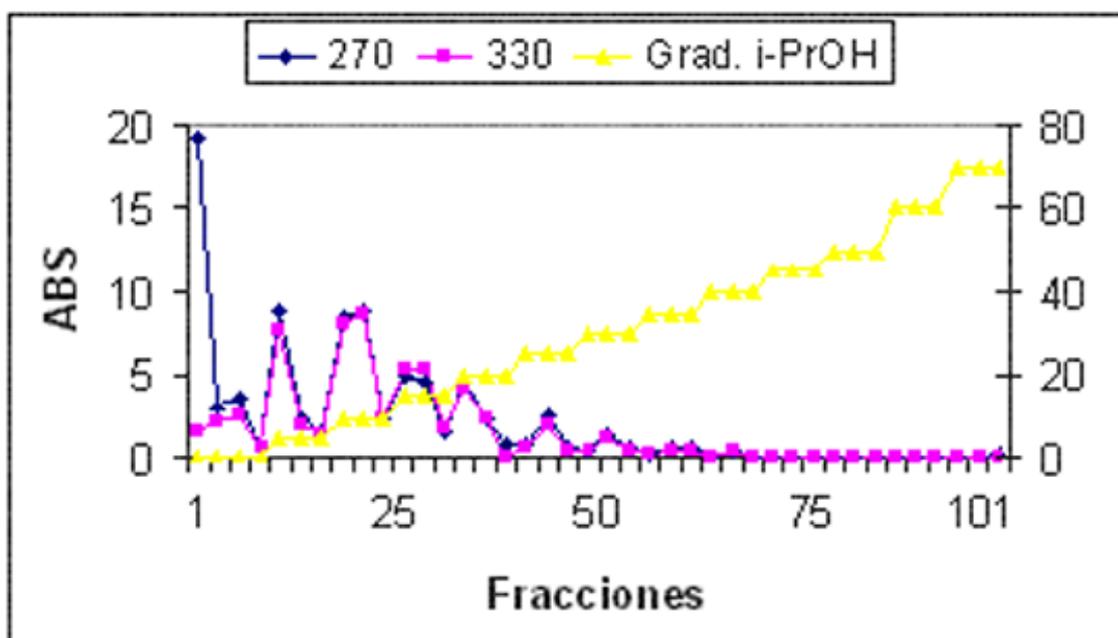


Figura 47. Cromatograma del fraccionamiento del extracto acuoso de *Guadua angustifolia* Kunth sobre una columna de DIAION HP 20.

De acuerdo a los picos observados en el cromatograma, se unieron las fracciones recolectadas hasta obtener 16 nuevas fracciones, codificadas desde GAAC 1 a GAAC 16. A estas 16 fracciones se les realizó un barrido espectral a una longitud de onda de 220 a 400 nm (fig 55), y un monitoreo cromatográfico por HPLC-DAD (Anexo 1):

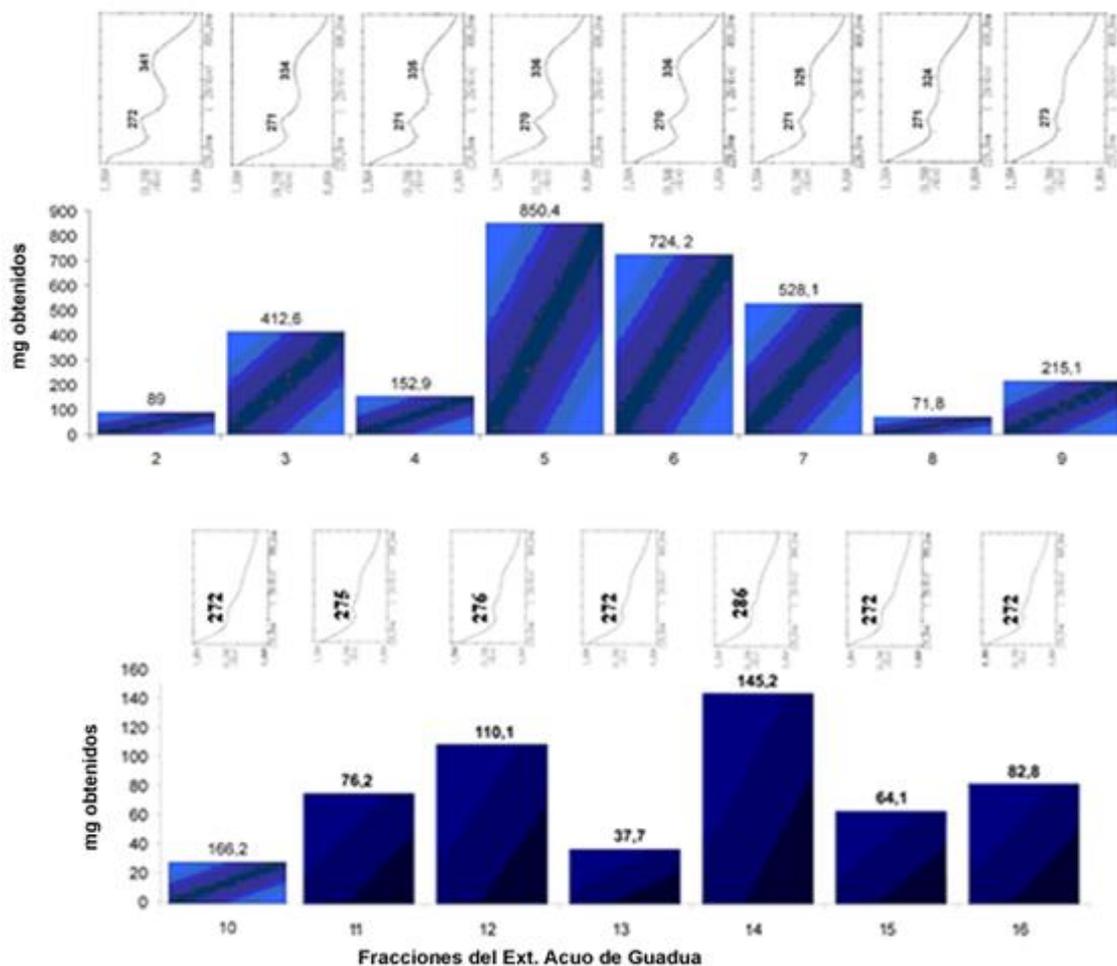


Figura 48. Pesos (mg) y espectros UV de las fracciones de GAAC 1 a GAAC 16.

El barrido espectral de GAAC 1 a GAAC 16 indica que los flavonoides se concentran en las primeras 8 fracciones, ya que es posible observar claramente las dos bandas características de dichos compuestos, que aparecen en este caso alrededor de 270 y 335 nm.

A estas 16 fracciones se les realizó pruebas con tricloruro férrico, acetato de plomo, Gelatina-Sal, Cianidina y Rosenhein, observándose abundancia de compuestos fenólicos y en algunas fracciones compuestos de tipo flavonoide (Ver Tabla 8).

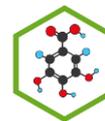
Tabla 8. Pruebas para fenoles y flavonoides

Fracción	Peso (mg)	Prueba Cloruro Férrico	Prueba Acetato de Plomo	Prueba Gelat-Sal	Prueba Cianidina	Prueba Rosenhein
GAAc 1	1720	+++	+++	+++	+++	+++
GAAc 2	89	+++	+++	++	+++	+++
GAAc 3	412.6	+++	++	++	+++	+++
GAAc 4	152.9	++	++	++	+++	+++
GAAc 5	850.4	++	++	+	+++	+++
GAAc 6	724.2	++	++	++	+++	++
GAAc 7	528.1	+++	++	+	+++	+++
GAAc 8	71.8	++	++	++	++	++
GAAc 9	215.1	++	+	++	++	+++
GAAc 10	166.2	++	++	+	+++	++
GAAc 11	76.2	++	++	++	++	++
GAAc 12	110.1	++	+	+	++	++
GAAc 13	37.7	+++	+++	+++	-	+
GAAc 14	145.2	++	++	++	++	++
GAAc 15	64.1	++	+	++	+	++
GAAc 16	82.8	++	+	+	+	++

Debido a la saturación de la columna de DIAION, la primera fracción obtenida (GAAc 1) no presentó separación, obteniéndose una cantidad total de 17.2 g.

Del monitoreo cromatográfico (**ver Anexo 1**) se observó la facilidad para aislar el compuesto mayoritario en la fracción GAAc 2, por esta razón, se decidió realizar HPLC-preparativa.

La fracción GAAc 5 es la de mayor rendimiento en masa con un total de 850.4 mg, por esta razón fue elegida para realizarle una separación en columna sobre MCI-Gel.



Por último, se aprecia que la fracción GAAC 13 es un compuesto de tipo fenólico, presentado una absorbancia a 270 nm detectada por el HPLC con un t_R de 13,96 min.

Teniendo en cuenta su pureza, se determinó enviar a RMN, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, debido a que las señales se encontraban en la señal de ruido, impidiendo la elucidación estructural del compuesto (Anexo 2)

a. Separación de la fracción GAAC 2 por medio de HPLC-preparativa

Teniendo en cuenta el cromatograma de la fracción GAAC 2 se identificaron dos compuestos mayoritarios, con tiempos de retención de 14.6 y 16.1 min.

El compuesto con t_R : 16.1min presento dos longitudes de onda a 268 y 338nm característica para compuestos de tipo flavonoide.

Para garantizar la pureza del compuesto, fue recolectado en un rango de t_R de 15.9 a 16.3, observando el cromatograma mientras se realizaba la corrida del método. Después de reunir el compuesto mayoritario codificado como GAAC 2-1, se procedió a secar, obteniendo una cantidad de 0.8mg.

Al compuesto GAAC 2-1 se le realizó sililación, la cual es empleada para modificar la polaridad del compuesto de tal manera que este se pueda volatilizar y ser detectado por GC-MS.

- **Elucidación estructural de la aglicona del compuesto GAAC 2-1**

El espectro de masas de la aglicona del compuesto GAAC 2-1 sililado, con t_R 34.108 min, pico del ion molecular $[M]^+$ de m/z 662 y formula molecular $C_{30}H_{50}O_7Si_5$ fue identificado como la aglicona de la Quercetina por comparación con la librería Wiley, el cual presento una similaridad del 90%. La confirmación del ion molecular se realiza por la perdida significativa de un radical metilo correspondiente a un m/z de 647 $[M-CH_3]^+$.

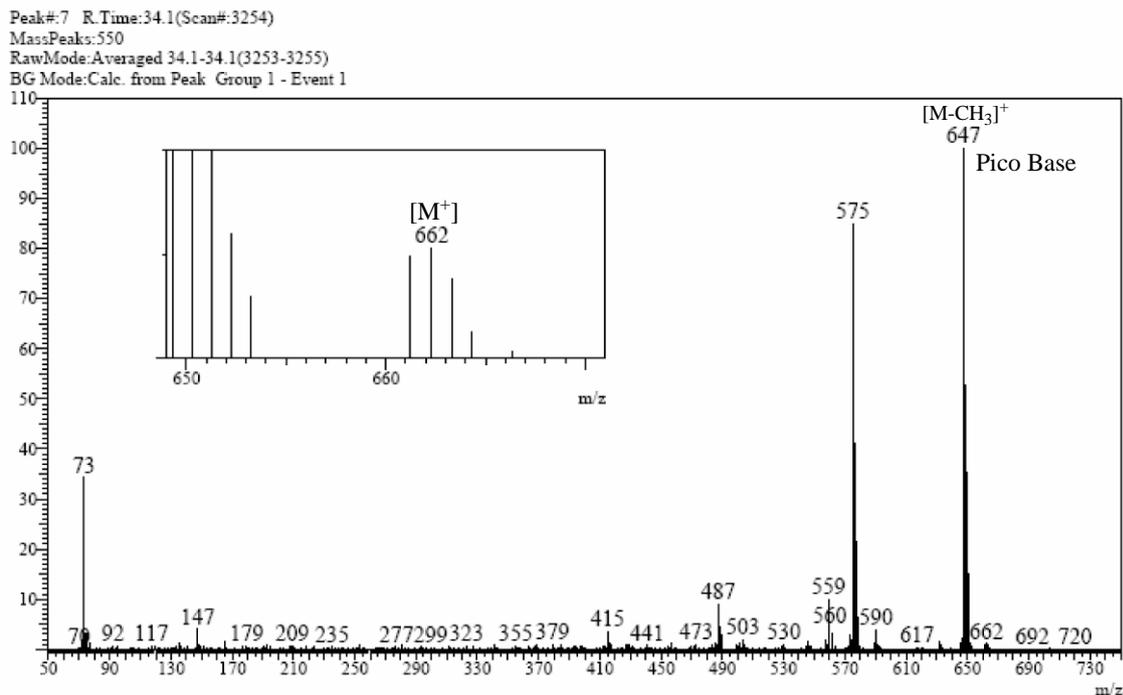
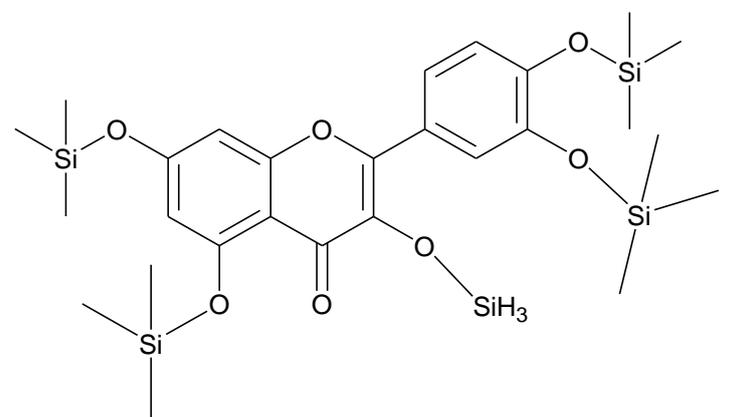


Figura 49. Espectro de masas de la aglicona de GAac 2-1



4H-1-Benzopyran-4-one, 2-[3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]
phenyl]-3,5,7-tris[(trimethylsilyl)oxy]

$C_{30}H_{50}O_7Si_5$
 m/z : 662
GAac 2-1 sililado

Figura 50. Estructura de la aglicona del compuesto GAac 2-1

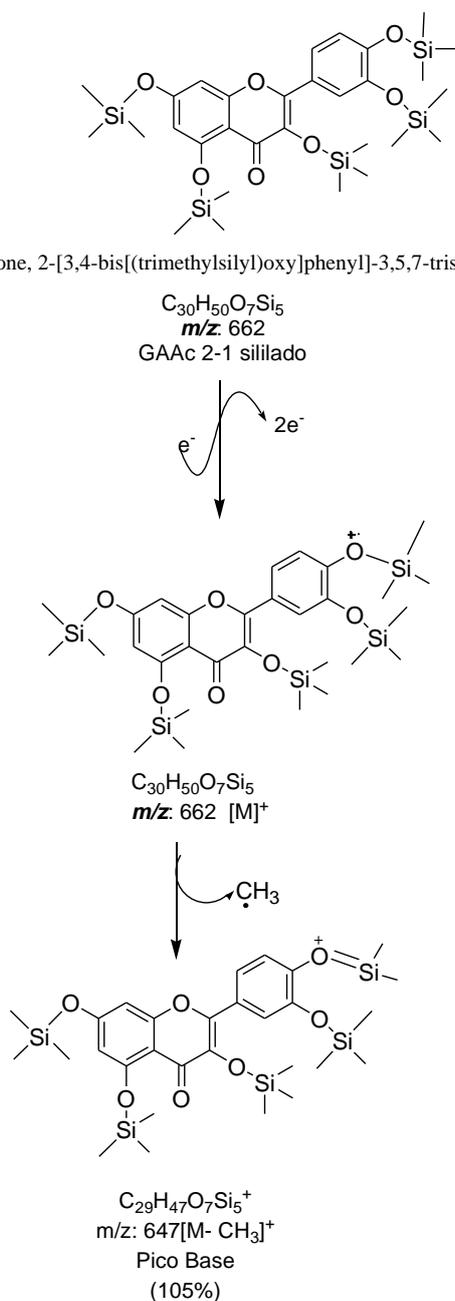


Figura 51. Fragmentación del compuesto GAAc 2-1.

El compuesto GAAc 2-1 se derivó químicamente mediante una sililación de los grupos hidroxilos pertenecientes a la aglicona, lo cual, es una técnica de rutina para el análisis de flavonoides, donde aumenta la volatilidad necesaria del compuesto para su identificación por GC-M.S.^[49].

b. Separación cromatográfica sobre una columna con MCI-Gel de la fracción GAAC 5

De este fraccionamiento se obtuvieron 230 fracciones, las cuales se agruparon por medio de un seguimiento espectrofotométrico, midiendo a dos longitudes de onda: 270 y 336 nm, uniéndose finalmente en 20 fracciones de acuerdo a los picos de absorción:

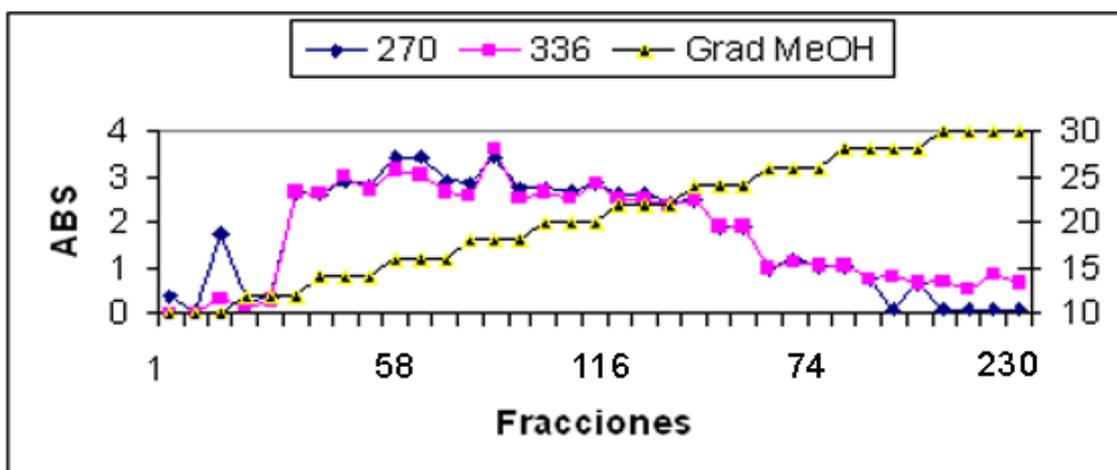


Figura 52. Cromatograma del fraccionamiento GAAC 5 sobre una columna de MCI-Gel.

A estas 20 fracciones reunidas, se les realizó un barrido espectral de 220 a 400 nm, que se presenta a continuación:

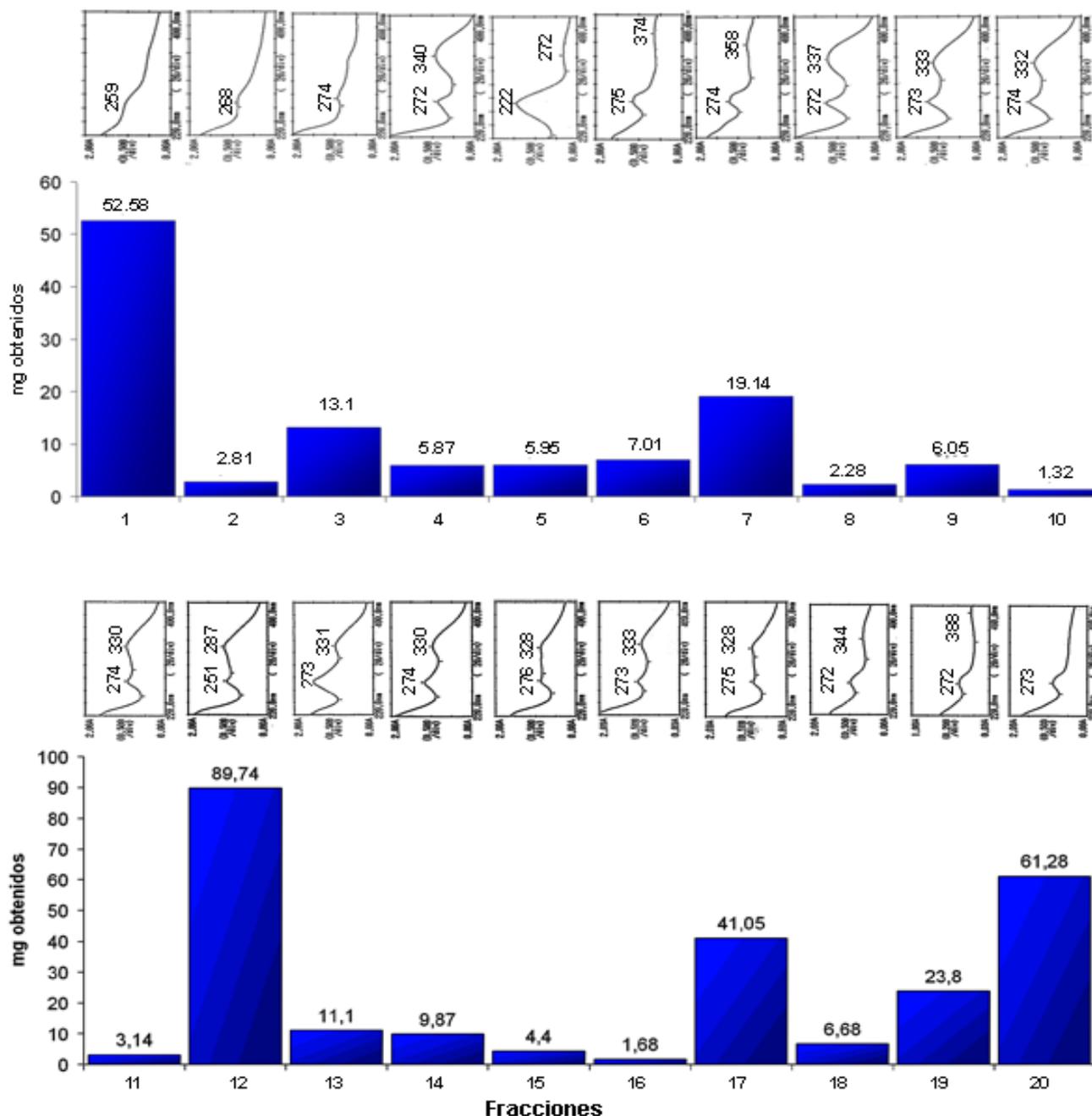
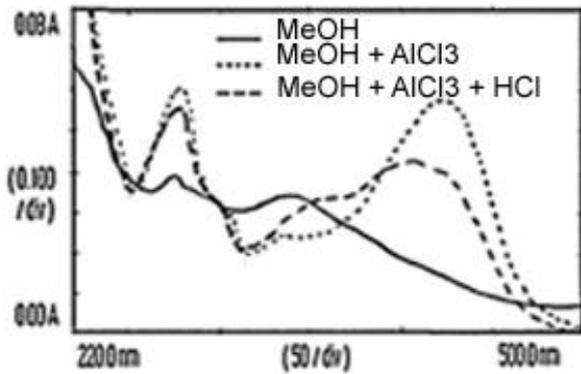


Figura 53. Pesos y espectros de las fracciones GAAC 5-1 a GAAC 5-20.

Estas fracciones fueron monitoreadas por HPLC-DAD (ver Anexo 3). De estos cromatogramas se puede observar que las fracciones GAAC 5-4, GAAC 5-10, GAAC 5-14 y GAAC 5-16, muestran un pico muy limpio, con poca barriga y con una intensidad alta; los cuales tienen espectros característicos de compuestos tipo flavonoide. A estas fracciones se les realizo Pruebas de Desplazamiento

• PRUEBAS DE DESPLAZAMIENTO DE:

1. FRACCION GAAC 5-4:



DATOS DEL ESPECTRO UV (λ max, nm)

MeOH	337, 275
AlCl ₃	423, 278
AlCl ₃ / HCl	405, 279
MeONa	411, 281
NaOAc	342, 275
NaOAc / H ₃ BO ₃	373, 268

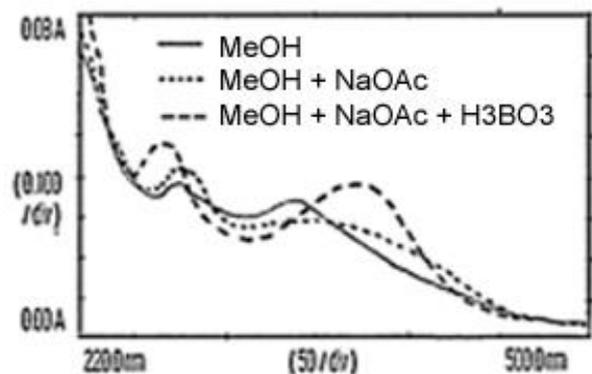
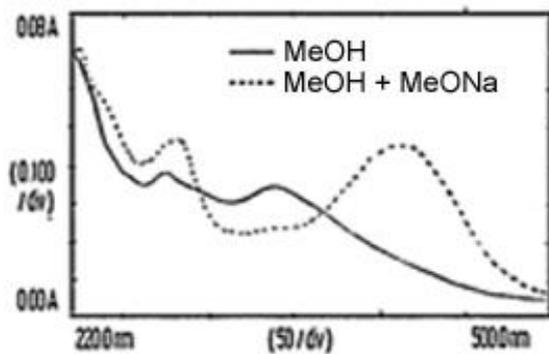


Figura 54. Pruebas de desplazamiento del compuesto **GAAC 5-4** con **a.** AlCl₃ y HCl **b.** MeONa **c.** NaOAc y H₃BO₃.

El compuesto en metanol exhibe absorciones de la Banda I a 337 nm y la Banda II a 275 nm, las cuales son características de compuestos de tipo flavona (304-350 nm) o flavonol glicosilado (330-360 nm).

1.1 Prueba con AlCl₃ y HCl: Al adicionar el AlCl₃ se observó un desplazamiento batocrómico de la banda I de 86 nm, esto nos indica la presencia de un flavonoide orto-dihidroxilado. Al agregarle el HCl, se mantiene este desplazamiento de 68 nm, lo cual sugiere la presencia de un hidroxilo libre en la posición 5 y una o-dihidroxilación en el anillo B.

1.2 Prueba con MeONa: Después de adicionar el MeONa al compuesto en MeOH se observó un desplazamiento batocrómico de 74 nm de la banda I, lo cual indica la presencia de una hidroxilación en la posición 4'.

1.3 Prueba con NaOAc y H₃BO₃: En estos espectros se puede observar que no se presentaron cambios significativos al adicionar el NaOAc, lo que nos sugiere que posiblemente haya hidroxilación en la posición 7 pero se encuentra sustituida; al agregarle el H₃BO₃ se observó la formación del quelato con un desplazamiento batocrómico de 36 nm en la banda I, esto confirma que se trata de un flavonol.

Con estas reacciones se puede proponer la siguiente estructura de la aglicona:

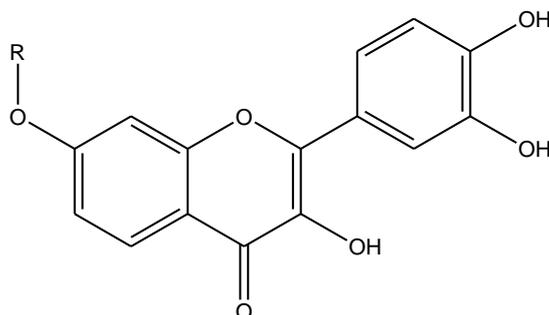
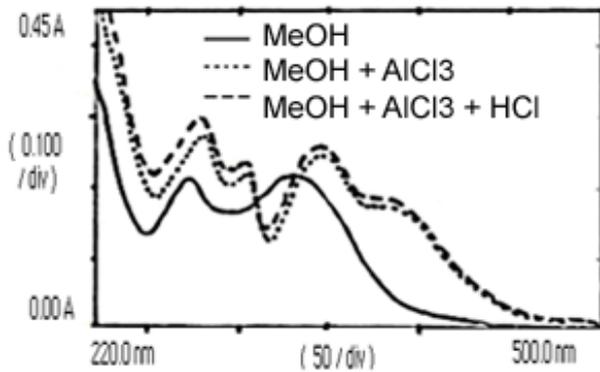


Figura 55. Posible estructura de la aglicona del compuesto presente en GAAC

5-4.

2. FRACCION GAAC 5-10:



DATOS DEL ESPECTRO UV (λ max, nm)

MeOH	332, 274
AlCl ₃	346, 304, 280
AlCl ₃ / HCl	345, 304, 280
MeONa	400, 334, 284
NaOAc	339, 277
NaOAc / H ₃ BO ₃	331, 274

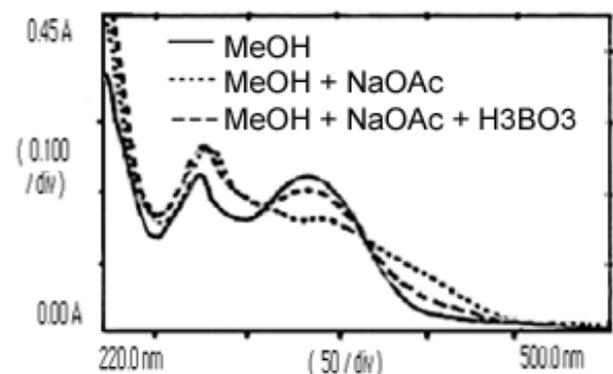
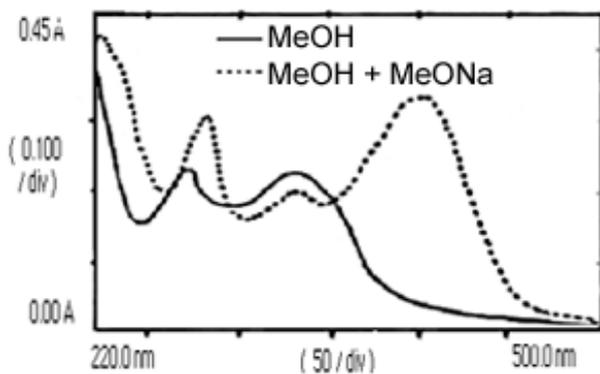
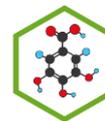


Figura 56. Pruebas de desplazamiento del compuesto **GAAC 5-10** con **a.** AlCl₃ y HCl **b.** MeONa **c.** NaOAc y H₃BO₃.

El compuesto GAAC 5-10 presenta dos bandas en el espectro en MeOH de 274 y 332 nm características de flavonas (304-350 nm) o flavonoles 3-*o*-sustituidos (330-360 nm), los compuestos altamente sustituidos tienden a absorber a mayores longitudes de onda.

2.1 Prueba con AlCl₃ y HCl: Por medio de esta prueba, se observó un desplazamiento batocrómico de la banda I de 14 nm, esto indica la presencia de hidroxilo en la posición 3 y/o 5. Como la formación del quelato es estable a pH ácido, se sugiere que el compuesto posee orto-dihidroxilación en el anillo A, además, por tener una estabilidad alta, proponemos que es un flavonol.



2.2 Prueba con MeONa: Luego de adicionar MeONa al compuesto en MeOH, se observó un desplazamiento batocrómico de 68 nm de la banda I, lo cual indica la presencia de una hidroxilación en la posición 4'. Además aprueba la existencia de una hidroxilación en la posición 7 por la aparición de una tercera banda a 334 nm.

2.3 Prueba con NaOAc y H₃BO₃: Esta prueba confirmar la propuesta de que el compuesto es un flavonol por exhibir un desplazamiento de 5 nm en la banda II. Además propone la existencia de hidroxilación en la posición 7, la cual se encuentra sustituida

Con estas reacciones se puede proponer una estructura donde el Kamferol es la aglicona y la posición 7 se encuentra sustituida:

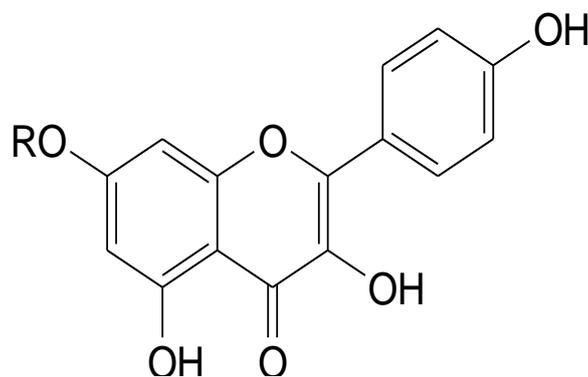


Figura 57. Posible estructura de la aglicona del compuesto presente en GAAC

3 FRACCION GAAC 5-14:

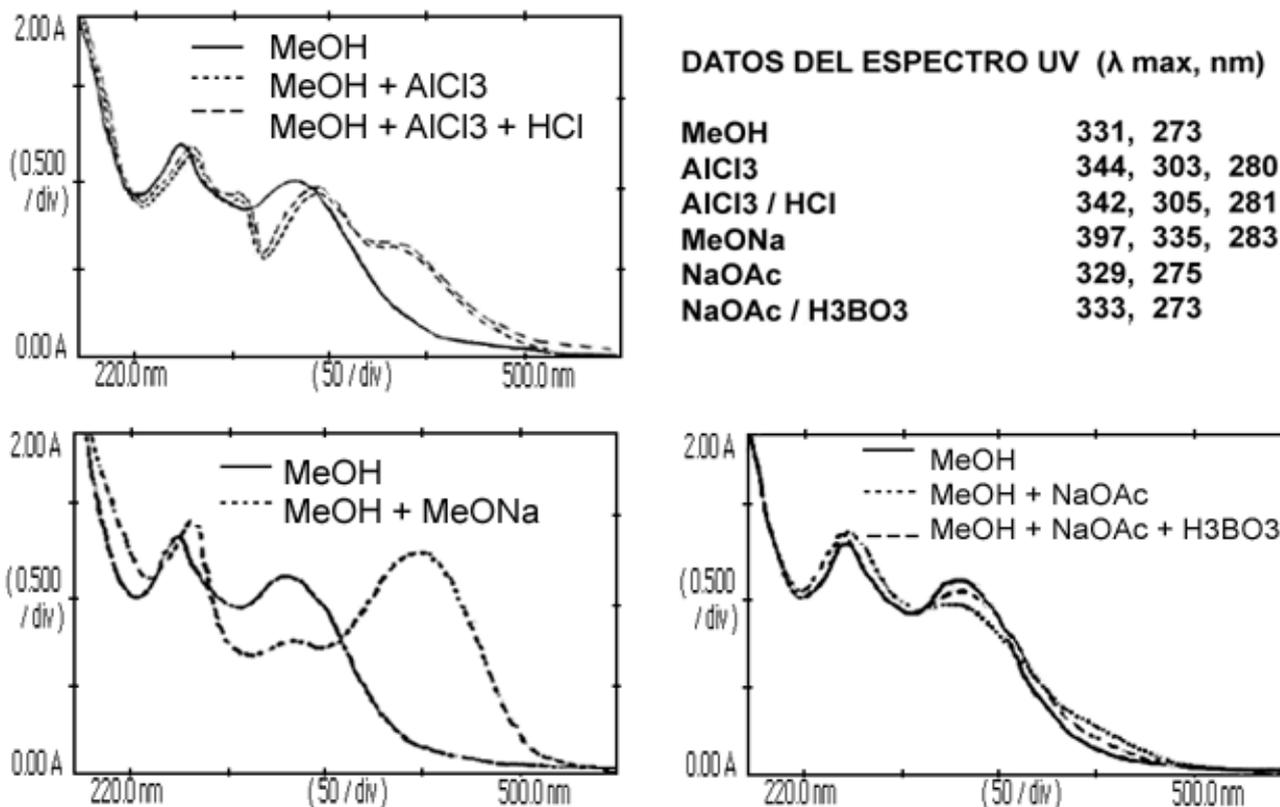
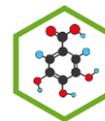


Figura 58. Pruebas de desplazamiento del compuesto **GAAC 5-14** con **a.** AlCl₃ y HCl **b.** MeONa **c.** NaOAc y H₃BO₃.

El espectro en MeOH muestra dos bandas a 273 y 331 nm, las cuales son características de flavonas y flavonoles glicosilados.

3.1 Prueba con AlCl₃ y HCl: Al adicionar el AlCl₃ se observó un desplazamiento batocrómico de la banda I de 13 nm, esto nos indica la presencia de una flavona o un flavonol 5-hidroxilado y/o 6-oxigenado.

Este desplazamiento se mantiene al añadir el HCl, por lo tanto, se plantea la existencia de una orto-dihidroxilación en la posición 3 y/o 5, lo que confirma lo anteriormente mencionado.



3.2 Prueba con MeONa: Al adicionar el MeONa al compuesto en MeOH se observa un desplazamiento batocrómico de 66 nm de la banda I, lo que indica hidroxilación en la posición 4'.

Es posible que haya hidroxilación en la posición 7, debido a la aparición de una tercera banda a 335 nm.

3.3 Prueba con NaOAc y H₃BO₃: En estos espectros se puede observar que no se presentó ningún cambio al adicionar el NaOAc y el H₃BO₃, lo que nos indica que hay hidroxilación en la posición 7 pero se encuentra sustituida esta hidroxilación.

Con estas reacciones se puede proponer la estructura de la aglicona:

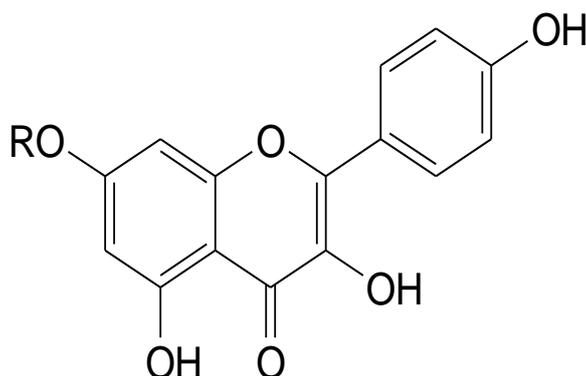


Figura 59. Posible estructura de la aglicona del compuesto presente en GAAC

4 FRACCION GAAC 5-16:

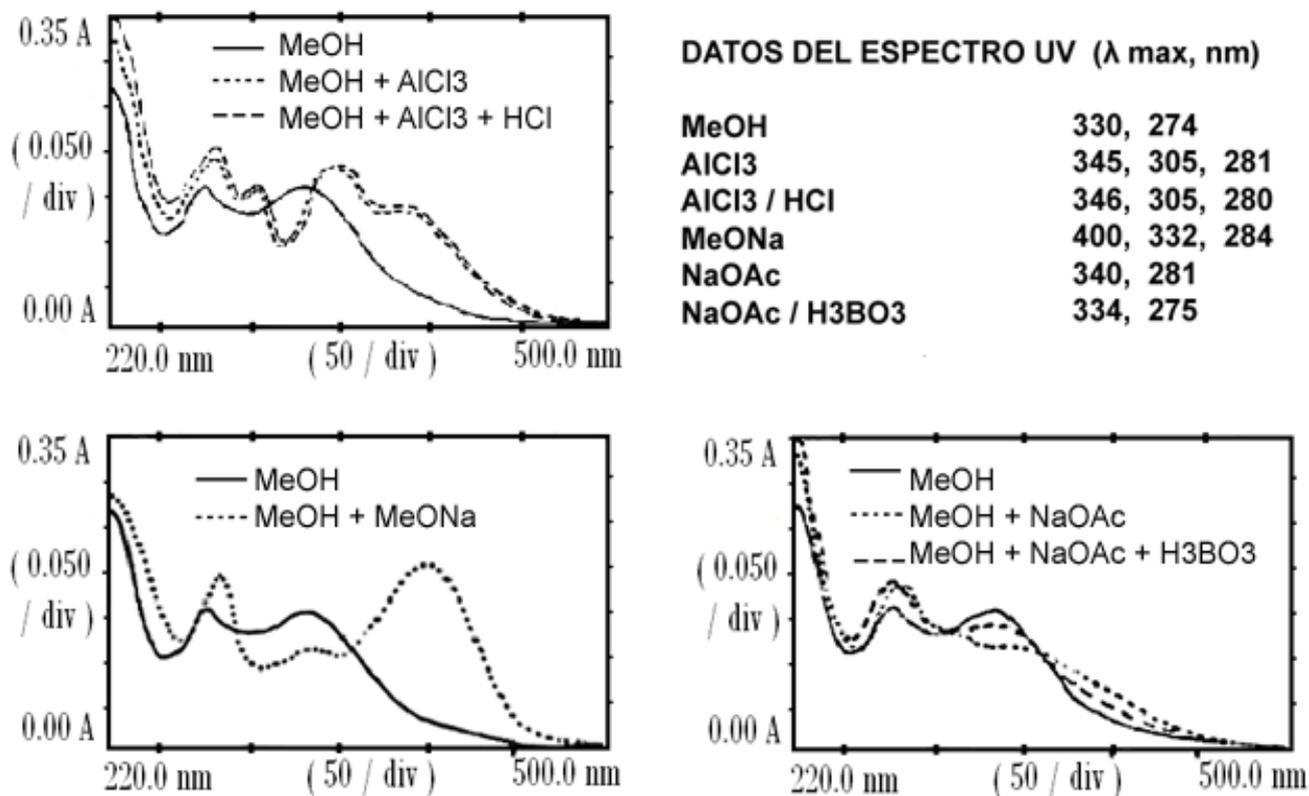
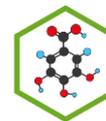


Figura 60. Pruebas de desplazamiento del compuesto **GAAC 5-16** con **a.** AlCl₃ y HCl **b.** MeONa **c.** NaOAc y H₃BO₃.

Este compuesto presenta dos bandas de absorción en el espectro en metanol de 330 y 274 nm. La banda I propone un compuesto de tipo flavona o flavonol glicosilado y la banda II propone un compuesto trihidroxilado en las posiciones 5, 6 y/o 7.

4.1 Prueba con AlCl₃ y HCl: Al adicionar el AlCl₃ se presentó un desplazamiento batocrómico de 15 nm en la banda I y 7 nm en la banda II, esto concluye la presencia de orto-dihidroxilación, la cual, al ser estable en medio ácido, determina la existencia de hidroxilos en las posiciones 3 y/o 5. Además, la estabilidad de los quelatos, indica la posible glicosilación en la posición 7.



4.2 Prueba con MeONa: Al adicionar el MeONa se observó un desplazamiento batocrómico de 70 nm de la banda I, lo que indica una hidroxilación en la posición 4'. También se puede decir que existe una hidroxilación en la posición 7 por la aparición de una tercera banda a 332 nm, lo que confirma lo ocurrido al adicionar el AlCl_3 .

4.3 Prueba con NaOAc y H_3BO_3 : Esta prueba confirma la presencia de una hidroxilación en la posición 7, pues la banda II se desplaza batocrómicamente 7 nm. Al adicionar H_3BO_3 , se observa un desplazamiento batocromico mínimo de la banda I, indicando esto una orto-dihidroxiación en el anillo A, lo que confirma la presencia de un hidroxilo en la posición 5 e indica posible sustitución en 6.

Con estas reacciones se puede proponer la estructura para la aglicona:

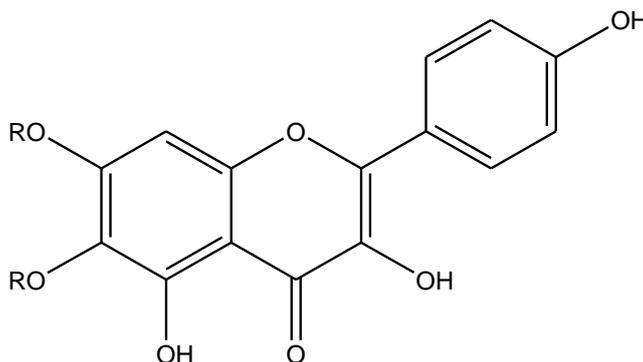


Figura 61. Posible estructura del compuesto presente en GAAC 5-16.

- RMN del compuesto GAAC 5-14

1. ^1H RMN del compuesto GAAC 5-14

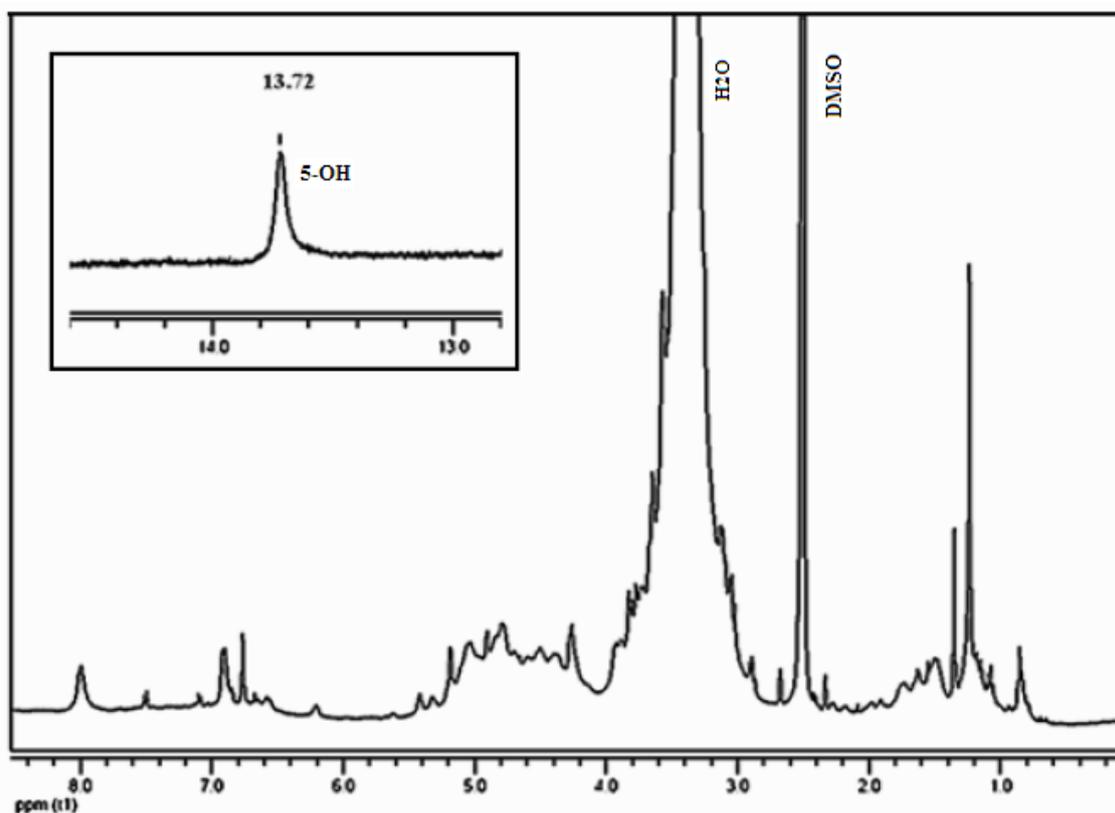


Figura 62. Espectro RMN ^1H del compuesto GAAC 5-14.

En este espectro se puede observar varias señales características de los protones de compuestos tipo flavonoide, las cuales aparecen a δ :7.99, 6.90 ppm (d 7.2 Hz), estas señales pertenecen al anillo B y δ : 6.77, 6.92 ppm pertenecen al anillo A. Otra señal particular es la señal a δ :13.72 ppm, que corresponde al hidroxilo en posición 5 de la aglicona.

Con la aparición de señales características de azúcares a δ :3.03, δ :3.12, δ :3.76, δ :2.39, δ :4.27, δ :1.08, δ :3.26, δ :3.65, δ :3.57, δ :3.90, δ :4.57 y δ :5.18 ppm, se deduce la presencia de dos azúcares en la molécula, de lo cual se puede concluir que se trata de un flavonoide glicosilado.

La señal a δ :1.08 corresponde a los protones del grupo metilo de la ramnosa. Las señales restantes, por comparación bibliográfica^[48, 49, 50] se relacionan con la glucosa:

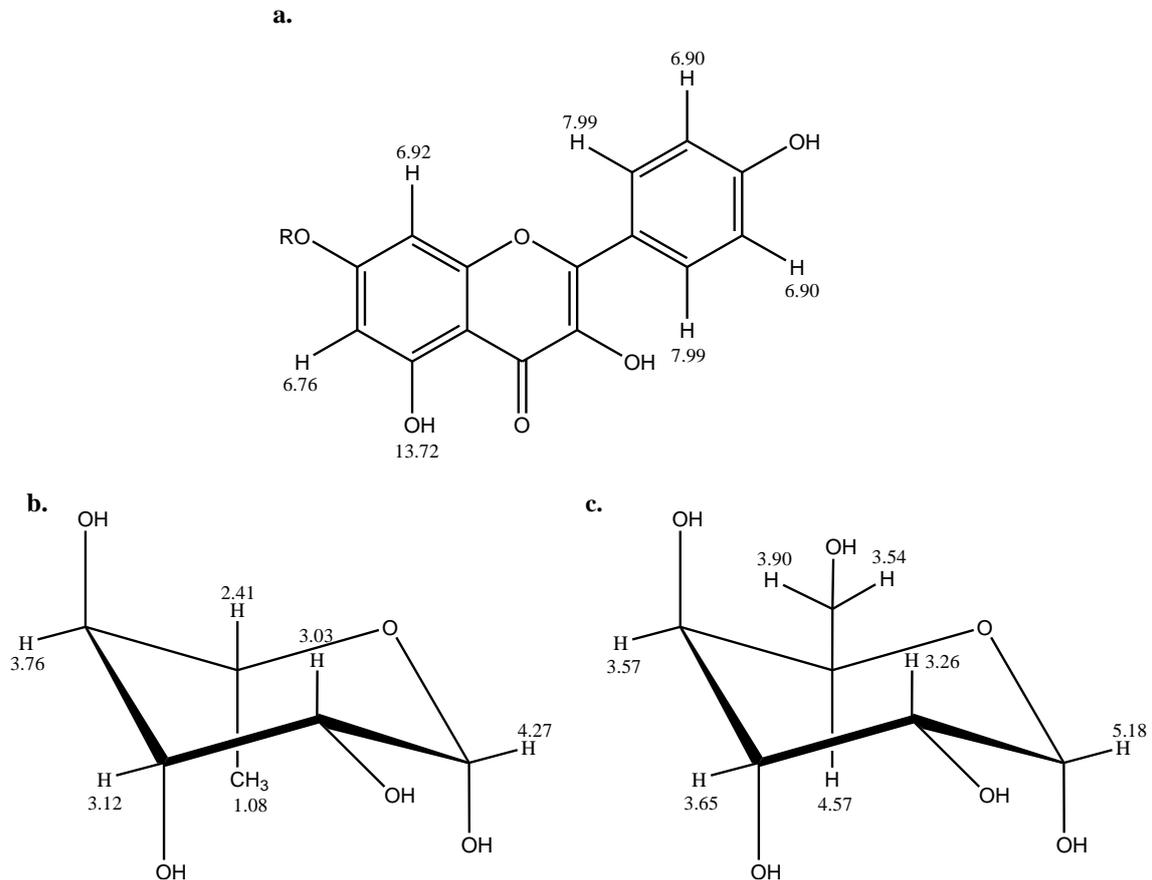
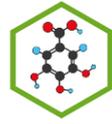


Figura 63 a. Señales asignadas por medio del espectro ^1H RMN a la **Aglicona** presente en GAAc 5-14.

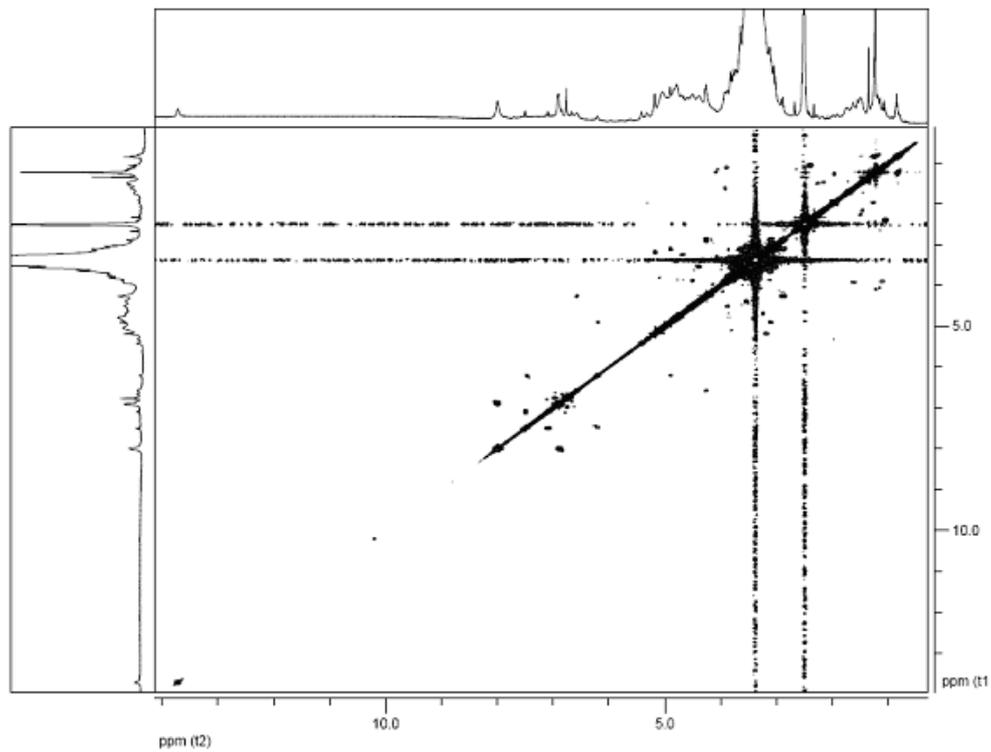
b. Señales asignadas por medio del espectro ^1H RMN a la **Ramnosa**.

c. Señales asignadas por medio del espectro ^1H RMN a la **Glucosa**.

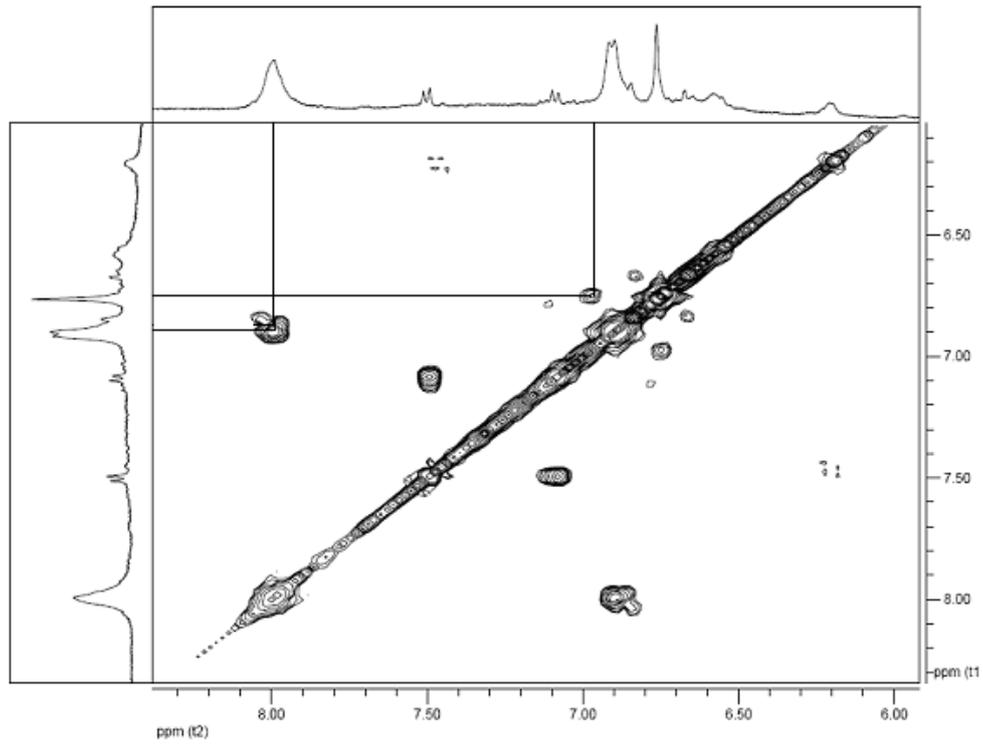
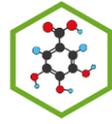


2. ^1H - ^1H COSY del compuesto GAAC 5-14

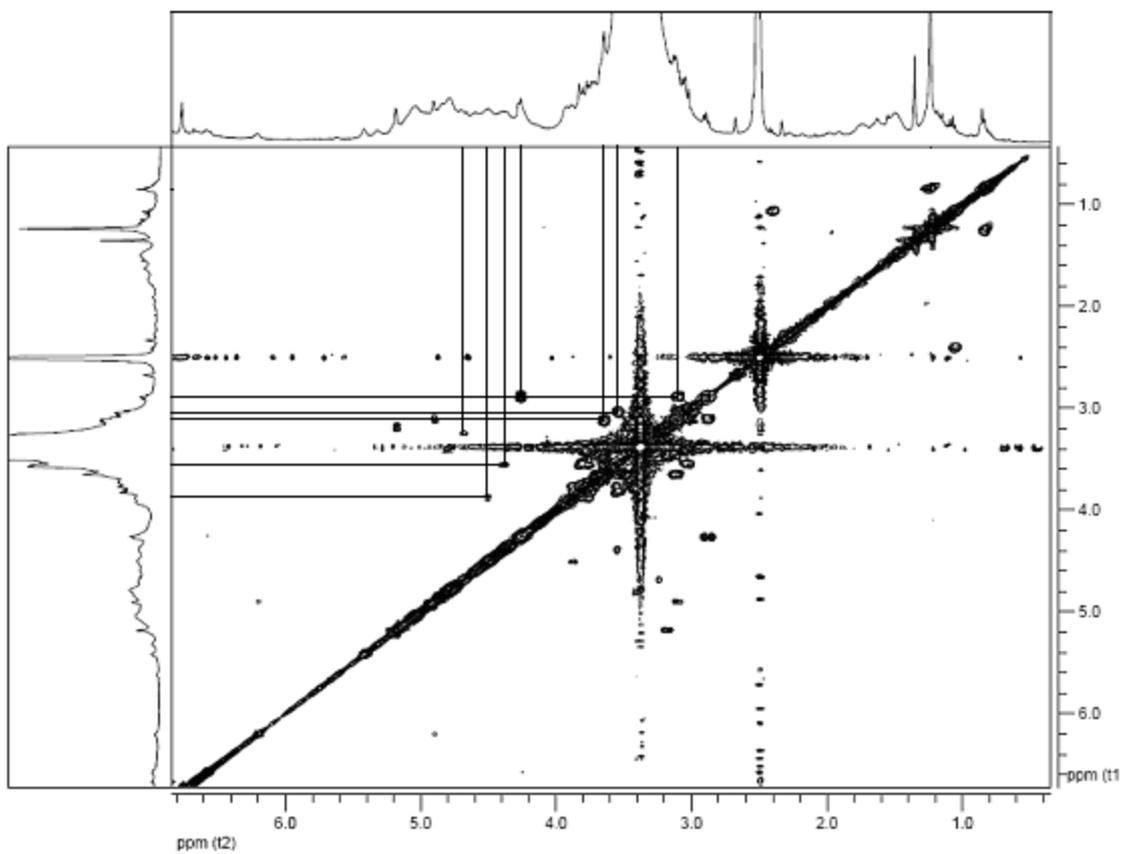
a.



b.



C.



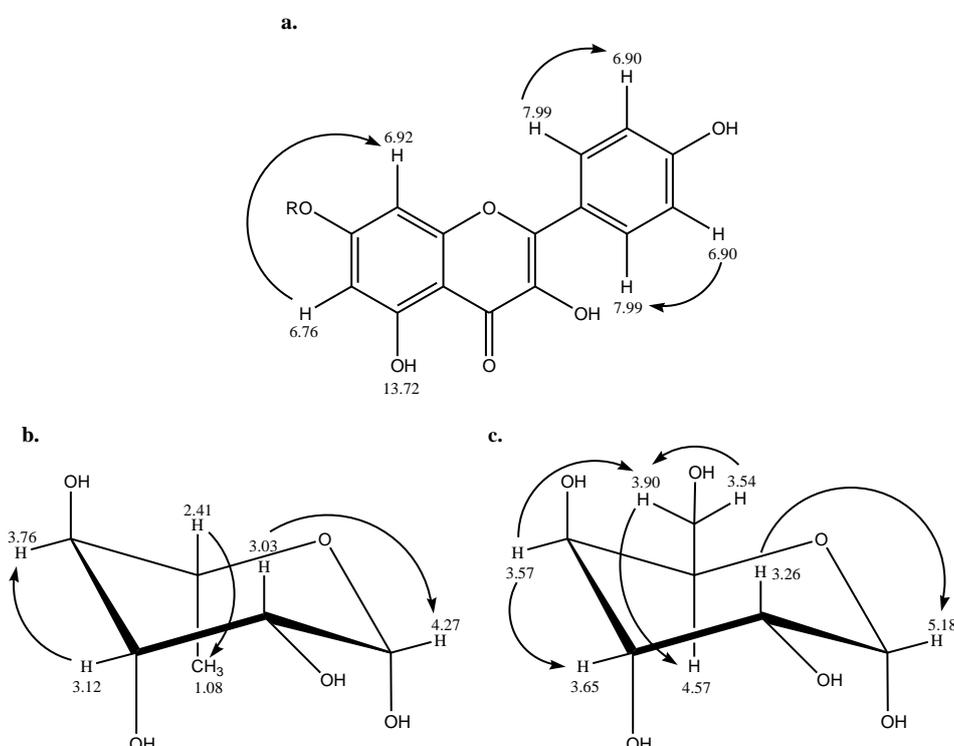
- Figura 64** a. Espectro COSY del compuesto GAAC 5-14
 b. Espectro COSY de la zona de la aglicona del compuesto GAAC 1-5-14
 c. Espectro COSY de la zona de los azucares del compuesto GAAC 1-5-14

Por medio de las correlaciones observadas en el espectro (ver Tabla 9) (Fig. 73), se logró afirmar algunas señales asignadas por RMN ^1H .

La señal a δ : 7.99 ppm correlaciona con la señal a δ : 6.90, esto corrobora los protones en las posiciones 2', 3' y 5', 6'.

La señal a δ : 6.77 ppm presenta una multiplicidad de singlete ancho, indicando esto una constante de acoplamiento muy baja, lo cual da a entender que hay correlación con un hidrógeno ubicado en posición meta. Este protón es el de δ :6.92 ppm; confirmando así la presencia de los protones en posiciones 6 y 8 de la aglicona.

Además, se consiguió confirmar la presencia de la glucosa, gracias a la gran cantidad de correlaciones que existe entre sus señales:



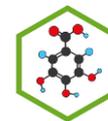


Figura 65 a. Correlaciones mostradas por el espectro COSY de la aglicona de GAAc 5-14. **b.** Correlaciones de la Ramnosa. **c.** Correlaciones de la Glucosa.

Tabla 9. Señales de hidrógenos y correlaciones COSY asignadas al compuesto **GAAc 5-14.**

SEÑAL	δ (ppm)	Multiplicidad	J(Hz)	COSY	UBICACION
1	13.72	s			OH -C5
2	7.99	s		6.90	H- C2' y C6'
3	6.92	sbr		6.76	H-C8
4	6.90	sbr		7.99	H -C3' y C5'
5	6.76	sbr		6.92	H-C6
6	5.18	d	3.2	3.26	<i>H-C1 Glu</i>
7	4.57	m		3.90, 3.54, 3.57	<i>H-C5 Glu</i>
8	4.27	d	7.2	3.03	<i>H-C1 Rha</i>
9	3.90	d		4.57, 3.57, 3.54	<i>Ha-C6 Glu</i>
10	3.76	m		3.12	<i>H-C4 Rha</i>
11	3.65	s		3.57, 3.26	<i>H-C3 Glu</i>
12	3.57	d	4.4	4.57, 3.90, 3.65	<i>H-C4 Glu</i>
13	3.54	s		4.57, 3.90	<i>Hb-C6 Glu</i>
14	3.26	s		5.18, 3.65	<i>H-C2 Glu</i>
15	3.12	m		3.76	<i>H-C3 Rha</i>
16	3.03	m		4.27	<i>H-C2 Rha</i>
17	2.41	m		1.08	<i>H-C5 Rha</i>
18	1.08	d	7.6	2.42	<i>3H-C6 Rha</i>

3. ^{13}C RMN del compuesto GAAc 5-14

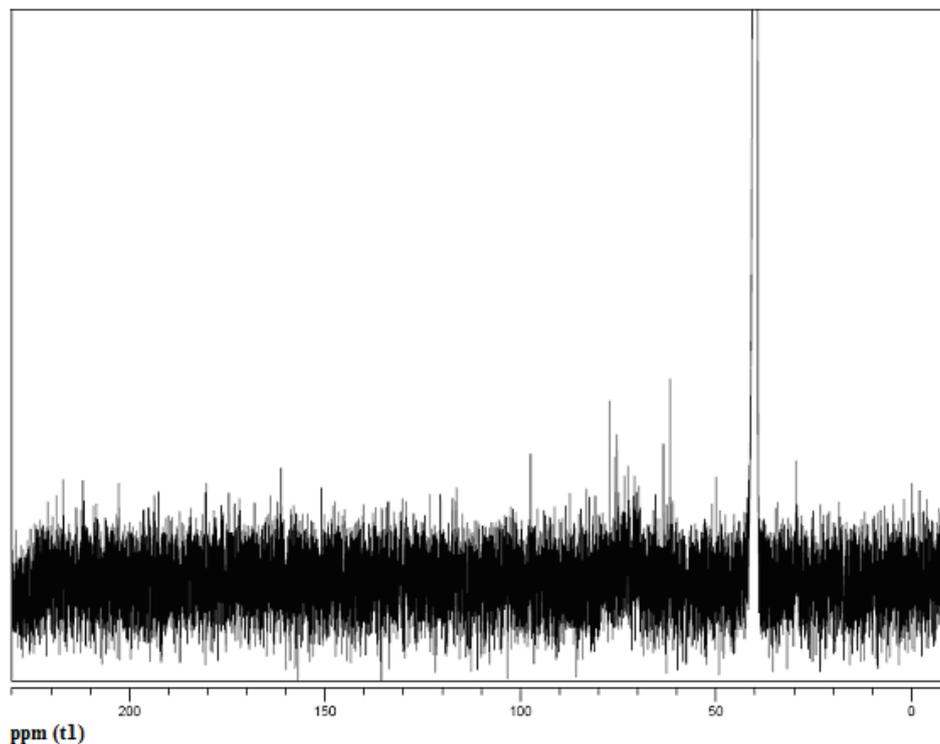
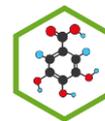
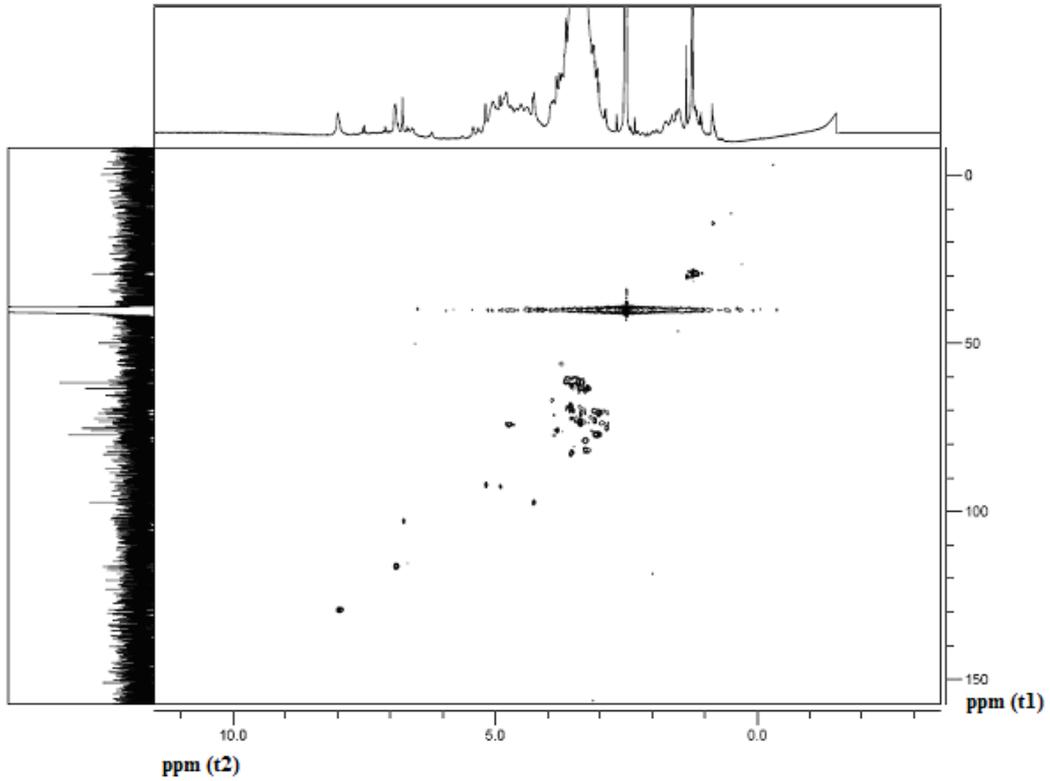
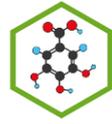


Figura 66. Espectro ^{13}C del compuesto GAAC 5-14.

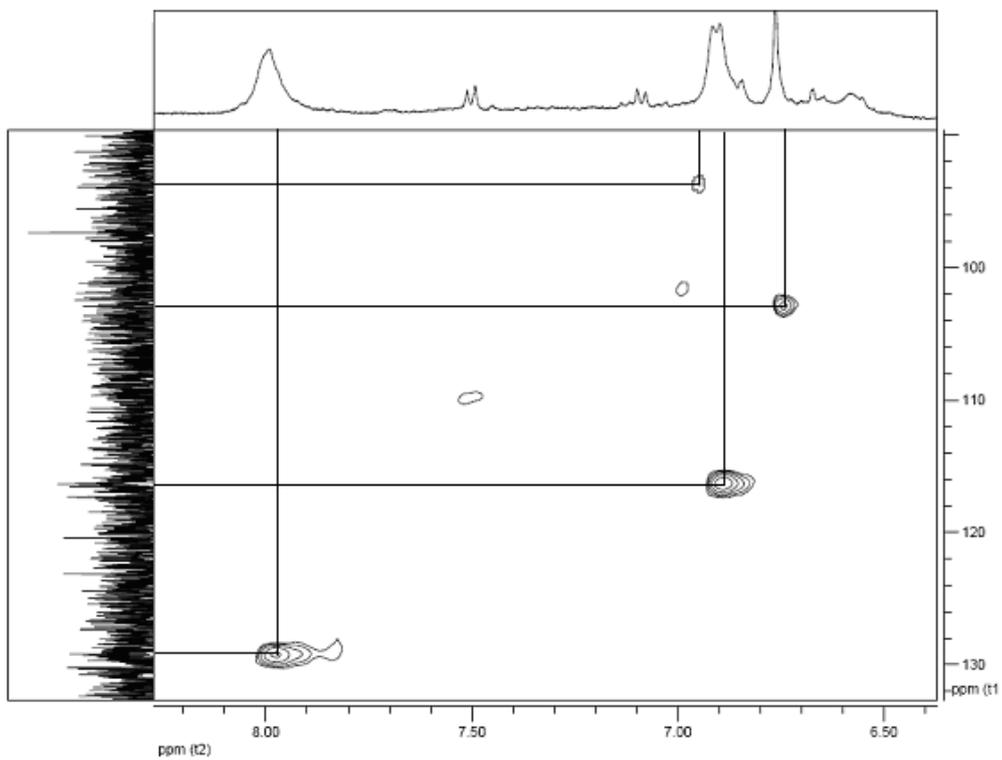
La asignación de las señales de carbono no se pudo realizar debido a la mala definición del espectro RMN ^{13}C , por lo cual, se empleó el espectro de HSQC y HMBC para la determinación de algunas señales de carbono.

4. HSQC del compuesto GAAC 5-14

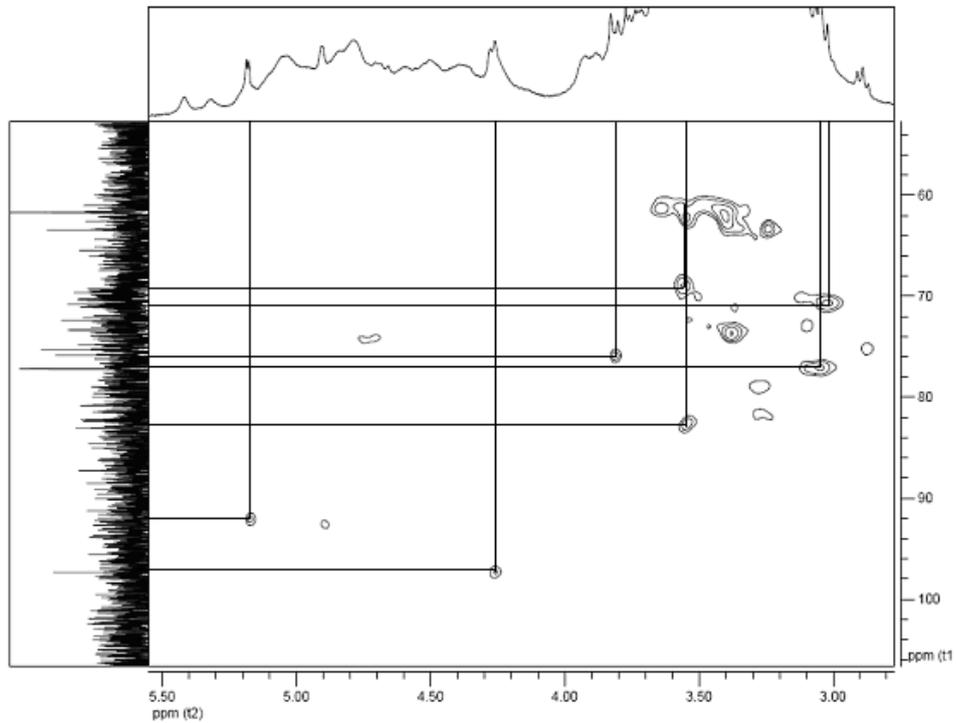
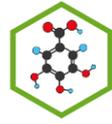
a.



b.



c.



d.

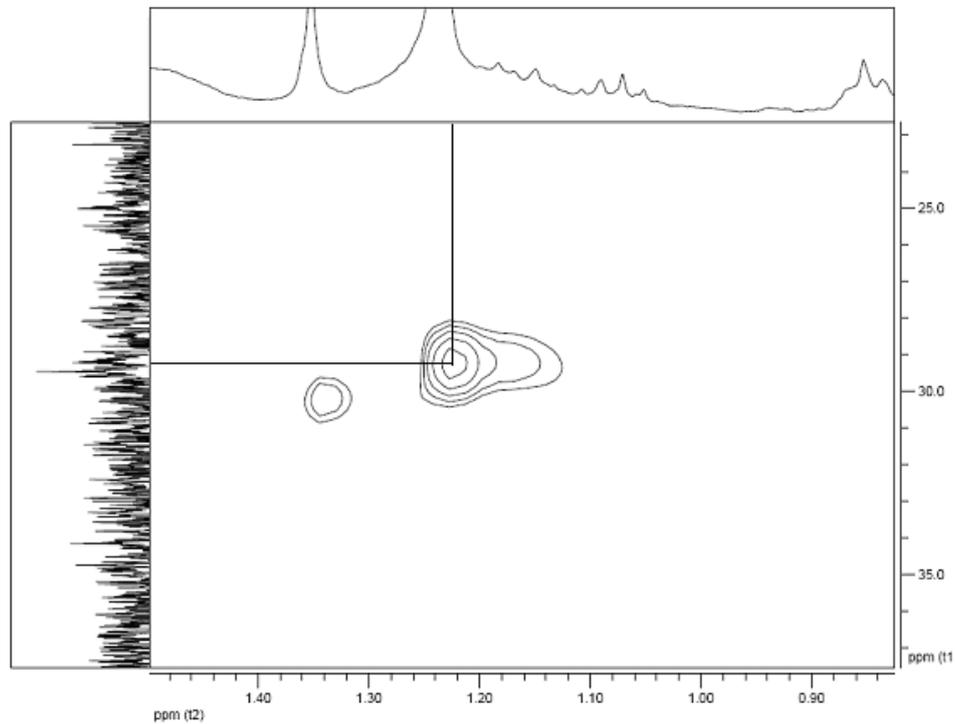


Figura 67. a. Espectro HSQC del compuesto GAAC 5-14. b. Espectro HSQC de la zona de la aglicona c. Espectro HSQC de la zona de los azúcares d. Espectro HSQC de la zona de los azúcares

El análisis del espectro HSQC permitió asignar algunas señales de carbonos, las cuales no son muy claras en el espectro ^{13}C . Con este mismo espectro, se pudo determinar la correlación directa entre carbonos e hidrógenos de la aglicona (Fig. 77b), la ramnosa y la glucosa (Fig. 77c) y la correlación entre el protón y el carbono del metilo correspondiente a la ramnosa, es decir la interacción entre el hidrógeno a $\delta:1.08$ y el carbono a $\delta:29.45$ ppm.

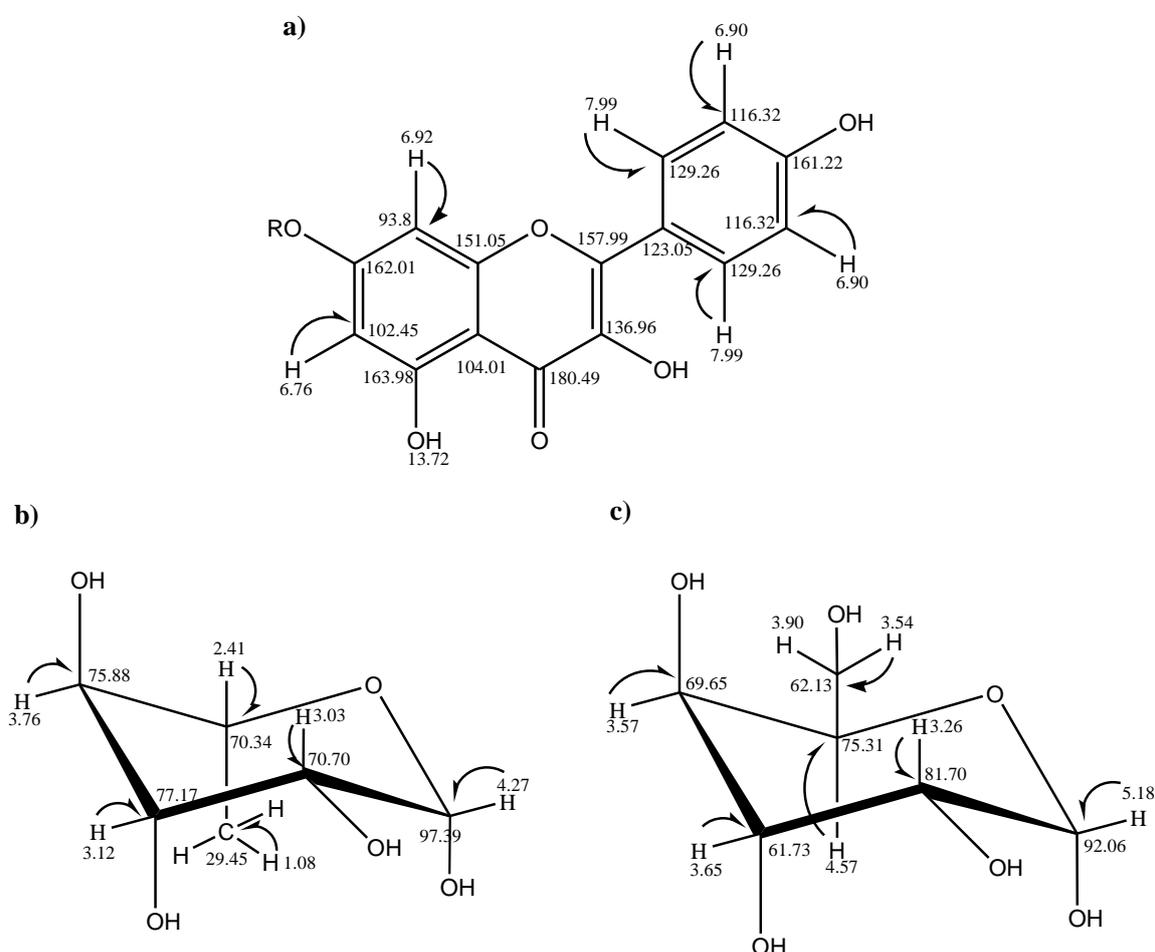


Figura 68. Correlaciones mostradas por el espectro HSQC del compuesto GAAc 5-14.

5. HMBC del compuesto GAAC 5-14

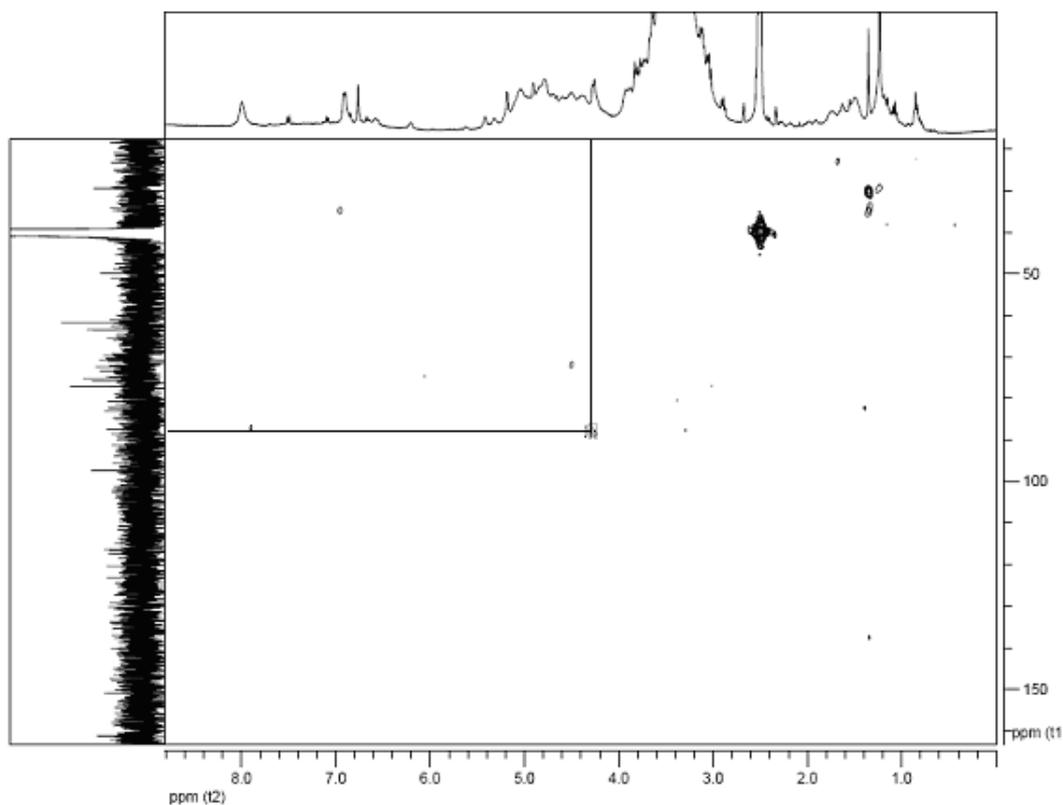


Figura 69. Espectro HMBC del compuesto **GAAC 5-14**.

El espectro HMBC, es quizá uno de los espectros bidimensionales más importantes, ya que muestra las correlaciones existentes entre los protones y los carbonos vecinos, es decir, que mediante este espectro se puede determinar la conectividad entre moléculas de diferentes tipos.

A pesar de que este espectro HMBC no muestra muchas correlaciones significativas (debido a las impurezas), se puede apreciar una correlación de gran importancia, que se da entre el protón a δ :4.27 ppm (protón anomérico de la Ramnosa) y el carbono a δ :81.70 ppm correspondiente al carbono 2 de la glucosa:

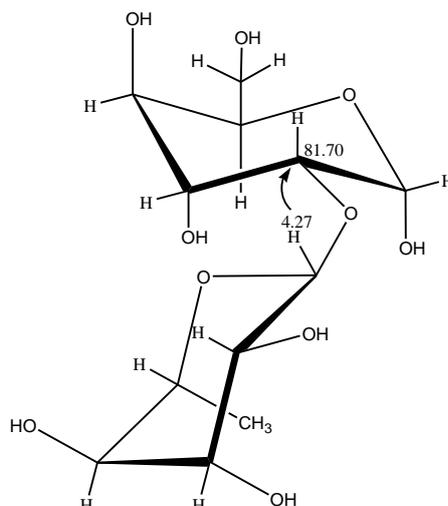


Figura 70. Conectividad entre la ramnosa y la glucosa mostrada por el espectro HMBC

Tabla 10. Correlaciones mostradas por los espectros HSQC y HMBC del compuesto GAAC 5-14.

<i>N</i>	$\delta^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	HSQC $\delta^1\text{H-NMR}$ (ppm)	HMBC (ppm)
1	129.26	7.99 s	
2	116.32	6.90 sbr	
3	102.45	6.76 sbr	
4	97.39	4.27 d (7.2 Hz)	
5	93.8	6.92 sbr	
6	92.54	4.91 sbr	
7	92.06	5.18 d (3.2 Hz)	
8	81.70	3.26 s	4.27
9	77.17	3.12 m	
10	75.88	3.76 m	
11	75.84	3.90 d	
12	75.31	4.57 m	
13	74.10	4.78 s br	
14	70.34	2.41 m	
15	70.70	3.03 m	
16	69.65	3.57 d (4.4 Hz)	
17	62.13	3.54	
18	61.73	3.65	
19	29.45	1.08	

Con la información adquirida por medio de los espectros RMN, las pruebas de desplazamiento y la comparación bibliográfica, se logró elucidar estructuralmente el compuesto GAac 5-14:

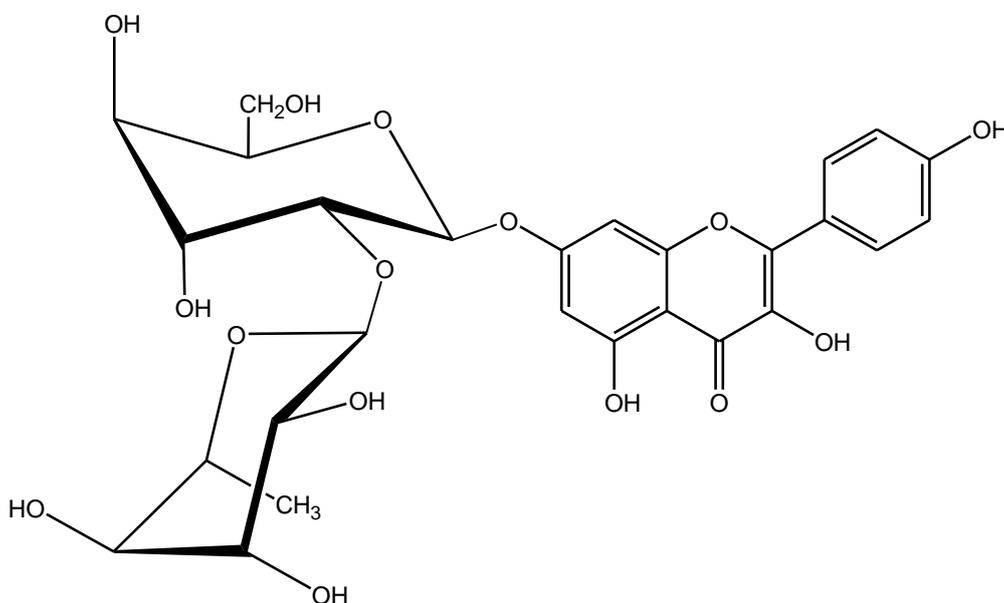
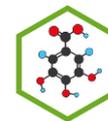


Figura 71. Estructura del compuesto GAac 5-14: Kaempferol 7-O-Neohesperidoside

Este compuesto ha sido aislado y reportado anteriormente de la especie *Morinda morindoides* (Rubiaceae) [51].

Tabla 11. Tabla de comparación entre las señales de carbono del compuesto GAac 5-14 y el Kaempferol 7-o-Neohesperidoside

CARBONO	GAac 1-5-14	KAMFEROL 7-O-NEOHESPERIDOSIDO
2	157.99	147.9
3	136.96	135.9
4	180.49	176.1
5	163.98	160.4
6	102.45	98.8
7	162.01	162.4



8	93.8	96.4
9	151.05	155.9
10	104.01	104.9
1'	123.05	121.6
2'	129.26	129.5
3'	116.32	115.5
4'	161.22	159.4
5'	116.32	115.5
6'	129.26	129.5
1''	92.06	98.4
2''	81.70	77.3
3''	61.73	77.1
4''	69.65	70.8
5''	75.31	76.9
6''	62.13	60.9
1'''	97.39	100.5
2'''	70.70	70.5
3'''	77.17	70.1
4'''	75.88	72.2
5'''	70.34	68.3
6'''	29.45	20.9

En la tabla anterior se puede apreciar la gran similitud que existe entre el compuesto GAAC 5-14 y el KAMFEROL 7-O-NEOHESPERIDOSIDO, lo cual confirma que este es el compuesto.

- **RMN del compuesto GAAC 5-16**

1. **¹H RMN del compuesto GAAC 5-16**

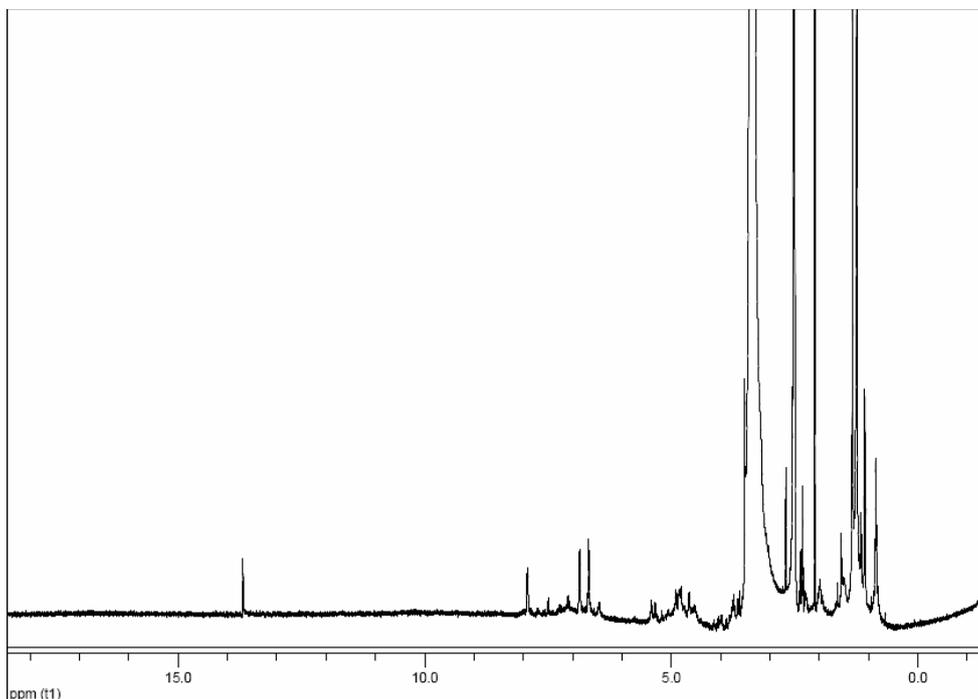
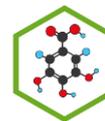


Figura 72. Espectro RMN ^1H del compuesto GAac 5-16.

En este espectro se pudo observar varias señales importantes, lo que nos llevaron a confirmar que la aglicona era el Kaempferol (ver tabla 12) y dentro de las posibilidades de los glicosidos se encuentran la ramnosa y la glucosa.

Las señales de la aglicona asignadas se realizaron por comparación, las demás señales no podían ser asignadas con la información de este espectro.

2. ^1H - ^1H COSY del compuesto GAac 5-16

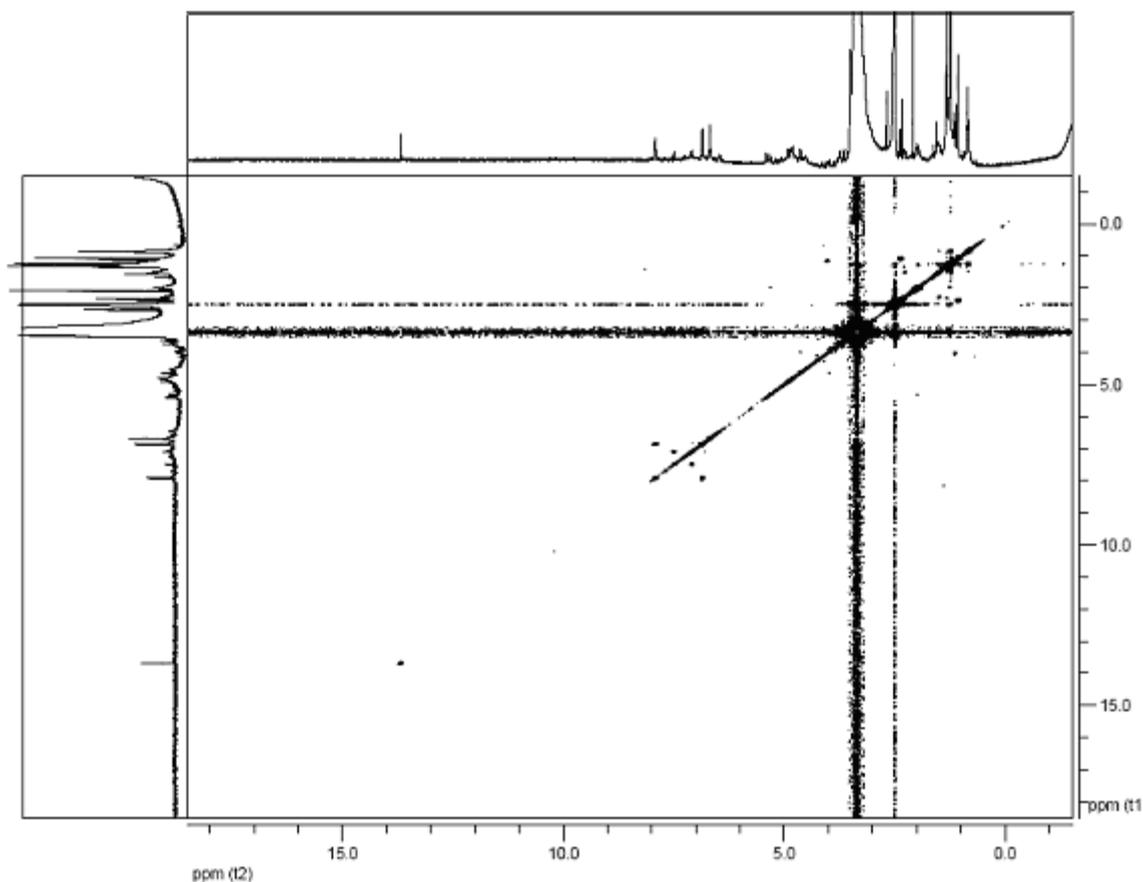
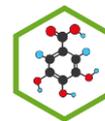


Figura 73. Espectro RMN COSY del compuesto GAAC 5-16.

Tabla 12. Señales de hidrógenos y correlaciones COSY asignadas al compuesto GAAC 5-16.

SEÑAL	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	COSY	UBICACION
1	13.69	s			OH-C5
2	7.92	d	8.4	6.86	H-C2'
3	6.86	d	8.8	7.92	H-C3'



4	6.68	<i>s br</i>			<i>H - C3 ó 6</i>
5	4.64	<i>d</i>	10	3.98	<i>H-C1 Rha</i>
6	4.25			4.10	<i>H-C1 Glu</i>
7	4.10			4.25	<i>H-C2 Glu</i>
8	3.98			4.64	<i>H-C2 Rha</i>
9	3.65	<i>s</i>		3.37	<i>H-C3 Rha</i>
10	3.62	<i>s</i>		3.37	<i>H-C5 Rha</i>
11	3.37	<i>s</i>		3.65, 3.62	<i>H-C4 Rha</i>
12	3.13	<i>s</i>			<i>H-C3 Glu</i>
13	1.07	<i>t</i>	15.2	2.38	<i>3H-C6 Rha</i>

De los espectros y la tabla mostrados anteriormente, se pudo concluir que se trata de una flavona o flavonol glicosilado, donde los glicósidos son la ramnosa y la glucosa. Las conectividades no se pudieron determinar debido a que no se cuenta con el espectro de ^{13}C y los bidimensionales correspondientes.

A continuación se muestran dos posibles estructuras de la aglicona y los correspondientes glicósidos:

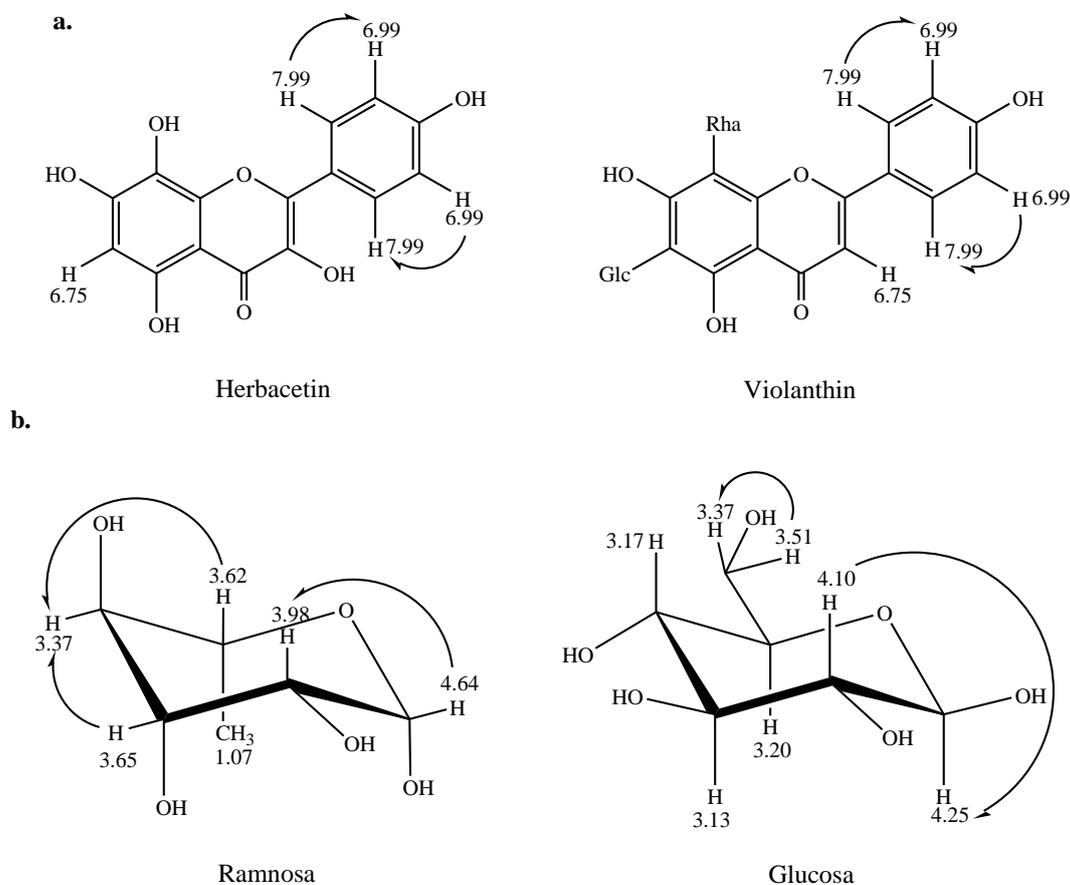
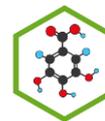


Figura 74. a. Posibles estructuras de la aglicona del compuesto presente en GAAC 5-16. **b.** Posibles glicósidos del compuesto presente en GAAC 5-16.

El herbacetin y violanthin se proponen como agliconas del compuesto GAAC 5-16 debido a la similitud de las señales^[49].

Estas agliconas no han sido reportadas en la especie *Guadua angustifolia* Kunth, pero la flavona violanthin ha sido aislada de *Angiopteris evecta* (Marattiaceae)^[52] y el flavonol herbacetin, ha sido obtenido en *Chenopodium murale* (Chenopodiaceae)^[53].

Se propone como estructura de la aglicona el violanthin por tener mayor similitud en las señales.



CONCLUSIONES

Por medio de esta investigación, se logró identificar la presencia de compuestos de tipo flavonoide en hojas de *Guadua angustifolia* Kunth empleando HPLC-DAD, la cual exhibió la presencia de estos compuestos con similitud alta en polaridad y en su estructura química, indicándonos que el proceso de separación tenía que ser detallado para obtener como resultado la elucidación de un compuesto.

El extracto acuoso exhibió una mayor concentración de compuestos de tipo flavonoide frente a los extractos butanólicos y acetato de etilo.

La siliación permitió la identificación del flavonol de tipo quercetina presente en la fracción GAAC 2-1 por comparación con la librería wiley del GC-MS.

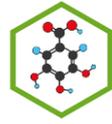
Tres de los cuatro flavonoides aislados de la fracción GAAC 5 presentaron el Kaempferol como aglicona, el cuarto flavonoide presenta la quercetina como aglicona, propuesta por las pruebas de desplazamientos realizadas y confirmada por los espectros de RMN tomados a dos de los flavonoides, los cuales se diferencian solo en el enlace y/o lugar de enlace de los azúcares.

La fracción GAAC 5-14 por monitoreo en HPLC-DAD mostró un compuesto puro y su espectro es de tipo flavonoide. Por pruebas de desplazamiento en el espectro UV se concluyó que posiblemente la aglicona era el Kaempferol y que se encontraba sustituida en la posición 7. Por RMN ^1H , ^{13}C Y ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC se concluyó que el sustituyente es la glucosa unida a la ramosa. Por medio de estos análisis se concluye que el compuesto puro es el Kaempferol 7-*o*-Neohesperidoside.



UNIVERSIDAD DEL QUINDIO

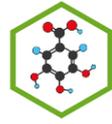
GRUPO POLIFENOLES UTP



La elucidación estructural del compuesto GAAC 5-16 aislado de la fase polar, se realizó parcialmente debido a la mala calidad de los espectros de RMN y la poca información obtenida de ellos. Por lo cual, se propone como posible estructura el Violanthin por tener mayor similaridad con los datos teóricos.

En la fase apolar se determinó la presencia de dos vitaminas liposolubles identificadas como vitamina E (alpha-tocopherol) y vitamina K₁ (phytonadione), las cuales han reportado actividad antioxidante y anticoagulante, además de ser un factor importante en la síntesis de proteínas, prevención de arteriosclerosis y osteoporosis, respectivamente.

Otro compuesto elucidado de la fase apolar es el Tetraetil Silicato, de alto interés a nivel farmacéutico en la línea de cosméticos, debido a su polaridad, la cual restablece la carga electrónica a nivel celular evitando el envejecimiento prematuro y enfermedades como artritis.



RECOMENDACIONES

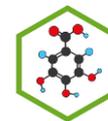
Debido a la alta concentración de azúcares presentes en el extracto acuoso, hace que el trabajo sea dispendioso, las fracciones obtenidas de las diferentes separaciones se deben concentrar de manera rápida para evitar una proliferación de hongos que puedan degradar los compuestos de interés de la investigación.

Se recomienda seguir el análisis del extracto butanólico, debido que la diferencia de los compuestos de tipo flavonoide con respecto al extracto acuoso es mínima; sin embargo, al poseer menor cantidad de los compuestos de interés facilita su separación y aislamiento, siendo mas factible la determinación de alguna actividad.

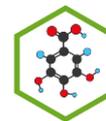
Luego de realizar una amplia búsqueda sobre la *Guadua angustifolia* Kunth a nivel fitoquímico en Cenicafe, CIAT, revistas científicas, CRQ y Sociedad Colombiana del Bambú, notamos la escasa información al respecto, por lo que se hace necesaria la realización de investigaciones a esta especie.

BIBLIOGRAFIA

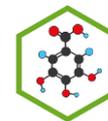
1. Vieira, R.C., et al., Leaf anatomy of three herbaceous bamboo species. *Braz J Biol*, 2002. 62(4B): 907-22
2. Kweon, M.H., H.J. Hwang, and H.C. Sung, Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J Agric Food Chem*, 2001. 49(10): 4646-55
3. Zhang, Y., et al., Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *J Chromatography A*, 2005. 1065(2): 177-185.
4. Osborn, R. W., G. W. De Samblanx, et al. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters* **368**(2): 257-262.
5. Berrougui, H., M. Cloutier, et al. (2006). Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 184(2): 389-396.
6. Lu, B., et al., Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 2005. 43(5): 783-792
7. Cruz R. H. *Nuestro Bambú* Corporación autónoma regional del Quindío. Centro Nacional para el estudio del bambú-guadua. Tudesco. Armenia. 1994.
8. *La guadua angustifolia* Kunth en Colombia. Corporación autónoma regional del Quindío. Centro Nacional para el estudio del bambú-guadua. Tudesco. Nota técnica N° 5. Armenia. 1999.
9. Worobiec, E. and G. Worobiec, Leaves and pollen of bamboos from the Polish Neogene. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2005. 133(1-2): 39-50.



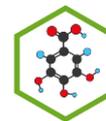
10. Nieto, F.C., Industrialización Sostenible De La Guadua, In Usaid - Fundación Chemonics - Tecniforest. 2001. 2-83.
11. Bambú, S.C. LA CAÑA GUADUA. Volume 3, 2004: 11-13.
12. Lu, B., et al., Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 2: Developmental toxicity test in rats with antioxidant of bamboo leaves. Food and Chemical Toxicology, 2006. 44(10): 1739-43.
13. Bouaziz, M., M. S. J. Simmonds, et al. Flavonoids from *Hyparrhenia hirta* Stapf (Poaceae) growing in Tunisia. Biochemical Systematics and Ecology, 2001. **29**(8): 849-851.
14. Akao, Y., N. Seki, et al. A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004. 12(18): 4791-4801.
15. Falk, J., A. Krahnstover, et al. Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). Phytochemistry, 2004. 65(22): 2977-2985.
16. W. E. Lambert and A. P. De Leenheer. VITAMINS Fat-Soluble: Thin-Layer (Planar) Chromatography. Universiteit Gent. 2000: 4437-43.
17. Horvath, G., L. Wessjohann, et al. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Phytochemistry, 2006. 67(12): 1185-1195.
18. Horvath, G., L. Wessjohann, et al. Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallee). Plant Physiology and Biochemistry, 2006. 44(11-12): 724-731.
19. Oncel, I., E. Yurdakulol, et al. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. Acta Oecológica, 2004. 26(3): 211-218.
20. Sen, C. K., S. Khanna, et al. Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. Molecular Aspects of Medicine, 2007. 28(5-6): 692-728.



21. S. A. Malnka, Li Mao, and Zhao Guanlu. Dietary Vitamin and Mineral Concentrations of two juvenile Female Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Wildlife Diseases*, 1991. 27(3): 509-512
22. Wu, J. H. and K. D. Croft. Vitamin E metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007. 28(5-6): 437-452.
23. Okita, M. Chronic hepatic disease and dietary instruction. *Hepatology Research*, 2004. 30(Supplement 1): 92-95.
24. Berrougui, H., M. Cloutier, et al. Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 2006. 184(2): 389-396.
25. Upston, J. M., L. Kritharides, et al. The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progress in Lipid Research*, 2003. 42(5): 405-422.
26. Nevin, K. G. and T. Rajamohan. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chemistry*, 2006. 99(2): 260-266.
27. Suhara, Y., A. Murakami, et al. Comparative uptake, metabolism, and utilization of menaquinone-4 and phyloquinone in human cultured cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006. 14(19): 6601-6607.
28. Reto, M., M. E. Figueira, et al. Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME-GC-FID. *Food Chemistry*, 2007. 100(1): 405-411.
29. Shirakawa, H., Y. Ohsaki, et al. Vitamin K deficiency reduces testosterone production in the testis through down-regulation of the Cyp11a a cholesterol side chain cleavage enzyme in rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2006. 1760(10): 1482-1488.
30. Damon, M., N. Z. Zhang, et al. Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005. 18(8): 751-758.
31. Perez-Ruiz, T., C. Martinez-Lozano, et al. High-performance liquid chromatography-photochemical reduction in aerobic conditions for



- determination of K vitamins using fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1141(1): 67-72.
32. Chad Husby. The role of silicon in plant Susceptibility to Disease. PPWS 5204 (paper for "Plant Disease Management" course). November 9, 1998.
33. Ding, T. P., G. R. Mac, et al. Silicon isotope study on rice plants from the Zhejiang province, China. *Chemical Geology*, 2005. 218(1-2): 41-50.
34. Hossain, M. T., K. Soga, et al. Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves. *Journal of Plant Physiology*, 2007. 164(4): 385-393.
35. Moturama H. Fujii. T, Suzuki. M. *Annals of Botany* 93: 235-248. 2004.
36. Naczki, M. and F. Shahidi. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006. 41(5): 1523-1542.
37. Yesilyurt, V., B. Halfon, et al. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chemistry In Press, Corrected Proof*.
38. SANABRIA ANTONIO G. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de ciencias, departamento de farmacia. Universidad de Colombia p 27, 31, 51-52, 54 Bogotá D.C. 1983.
39. Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002. 96(2-3): 67-202.
40. Harborne, J.B., T.J. Mabry, and H. Mabry, *The Flavonoids*. 1975, Chapman and Hall. London: 47-61.
41. Tapias. L. J. Actividad antibacterial de las fracciones promisorias obtenidas en columna sobre Toyopearl HW 40 del extracto en acetona acuosa (70%) de *Miconia coronata*. Universidad Tecnológica de Pereira. 2006: 90.
42. Bilbao R. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío 1997. 6,26, 37, 46, 51, 51-59, 61-62, 66-67 74-75, 82.

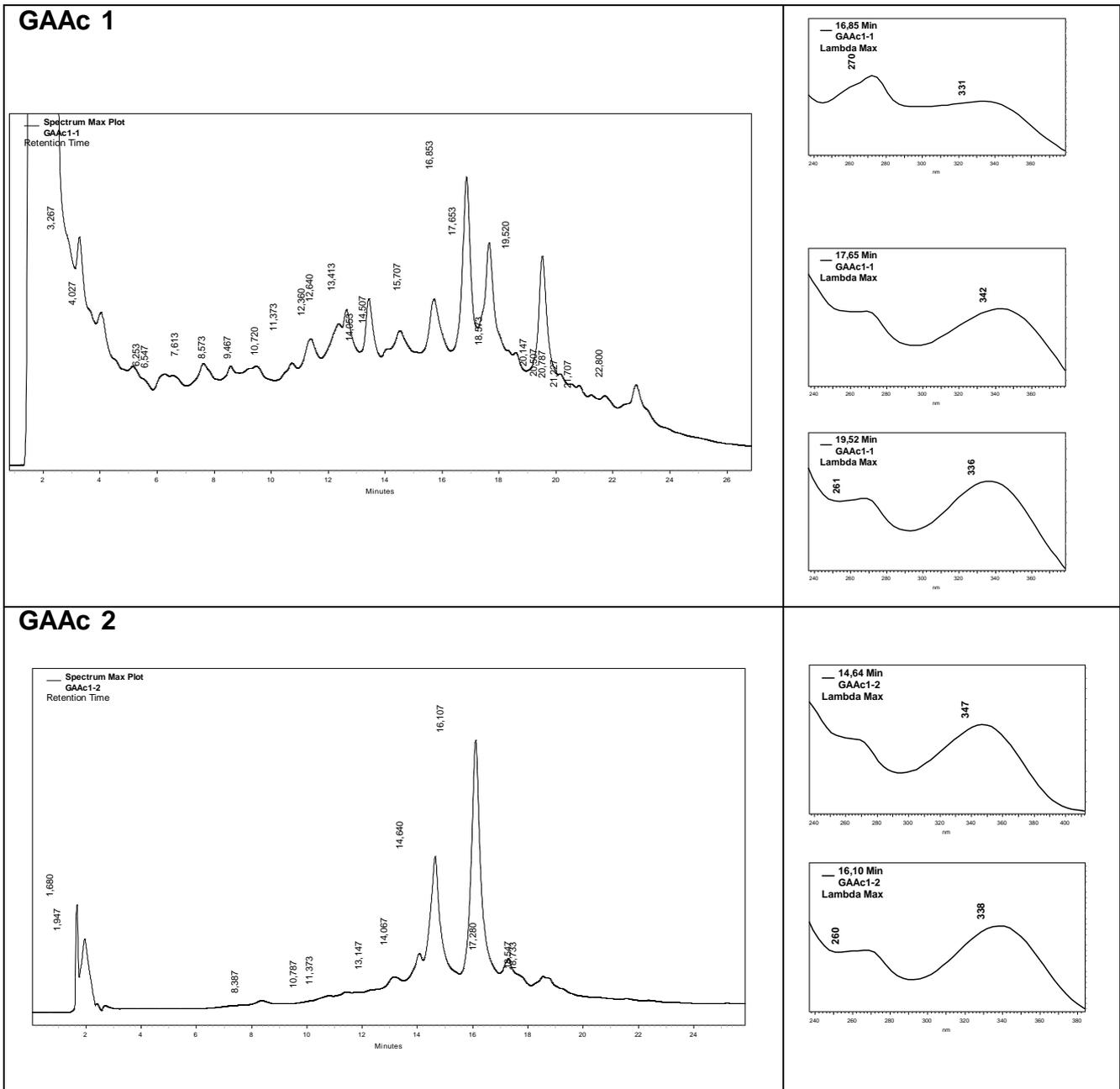


43. Skoog. Principios de análisis instrumental. Capítulo 26. Introducción a las separaciones cromatográficas. Pag 730-750
44. Rijke, E.d., et al., Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of chromatography. 2006. 32
45. Gross, J., Mass Spectrometry. 1 ed. Germany: Springer. 2004, 280-233-235.
46. Aguirre C., Chavez T, et al. El Silicio En Los Organismos Vivos. Asociación Interciencia 32(008), Caracas, 2007: 504-509.
47. Domínguez X. Métodos de investigación Fitoquímica. ed Limusa. México. 1985. 161-174.
48. Harborne, J.B., T.J. Mabry, and H. Mabry, The Flavonoids, ed. C.a. Hall. 1975, London. 1204.
49. Andersen, M. and K. Markham, R., NMR Data on flavonoids classes, in Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and applications. T. Francis, Editor. 2006: New York.
50. Roslund, M., U. , et al., Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J_{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. Carbohydrate Research, 2007. 343: p. 101-112.
51. Cimanga, K., et al., Flavonoid O-Glycosides from the leaves of Morinda morindoides Phytochemistry, 1995. 38(5).
52. Wallacea, W., et al., Violanthin and isoviolanthin from the marattiaceous fern Angiopteris evecta Phytochemistry, 1979. 18(6): p. 1077.
53. El-Sayed, N., H., et al., A flavonol triglycoside from Chenopodium murale Phytochemistry, 1999. 51(4): p. 591-593.

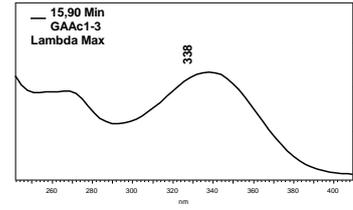
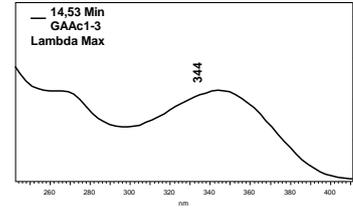
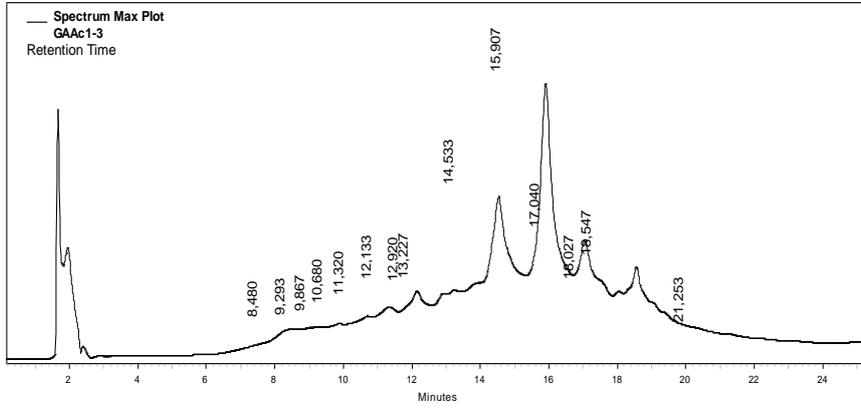
ANEXOS

Anexo 1.

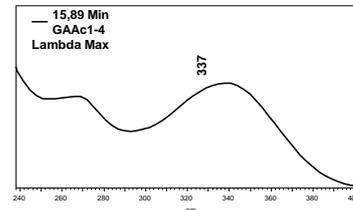
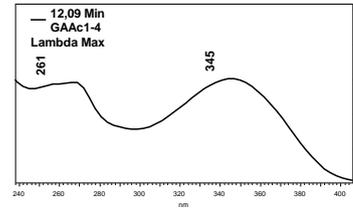
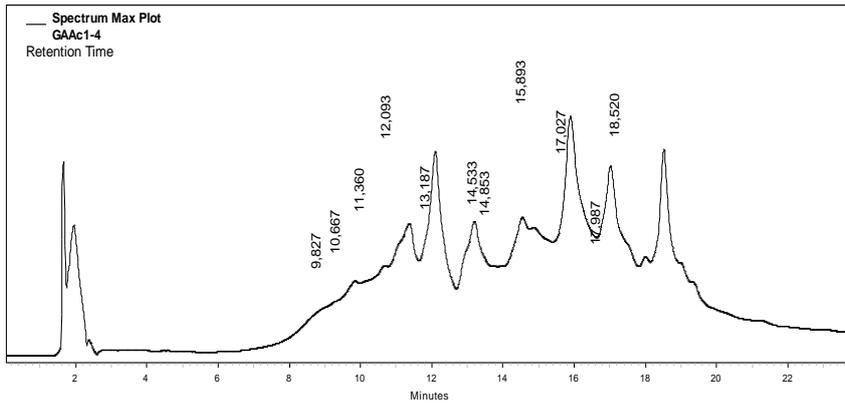
Cromatogramas de HPLC-DAD de las fracciones obtenidas por separación en columna sobre Diaion HP-20 del extracto acuoso de *Guadua angustifolia* Kunth



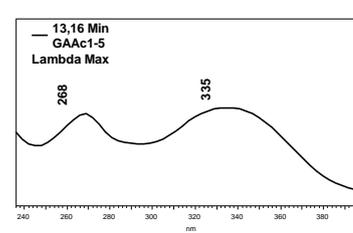
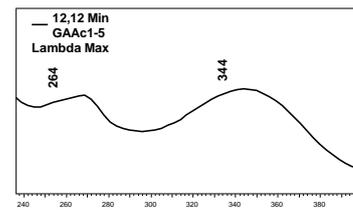
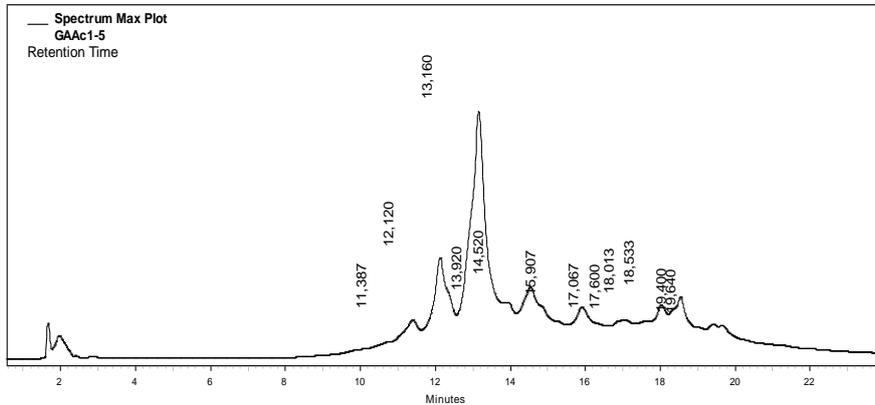
GAAc 3



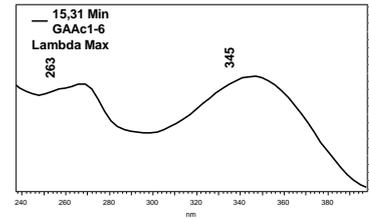
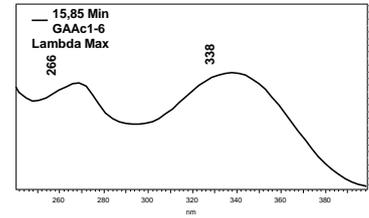
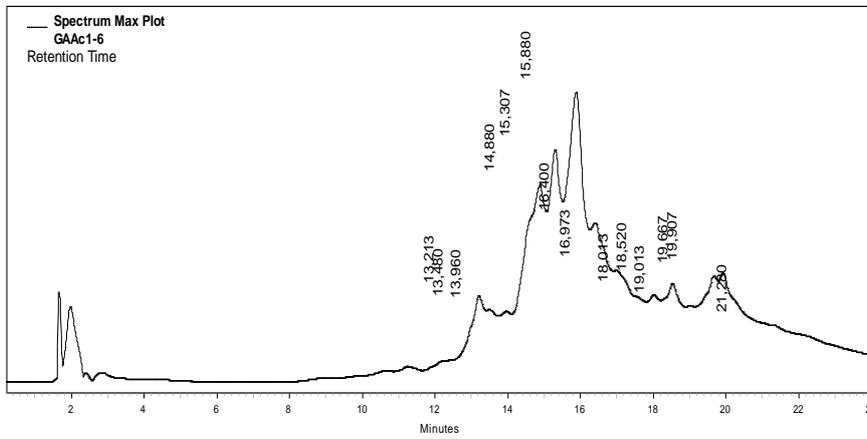
GAAc 4



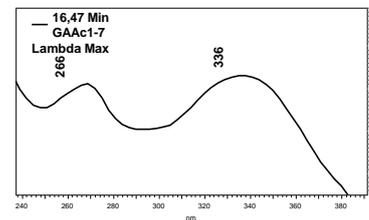
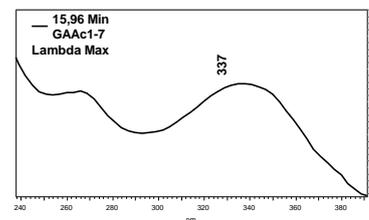
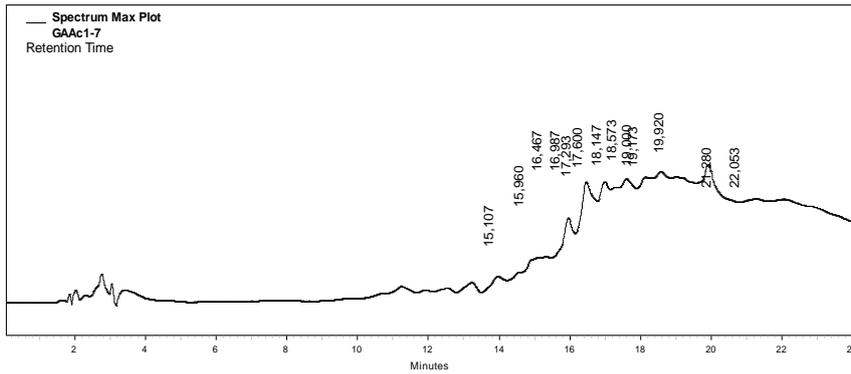
GAAc 5



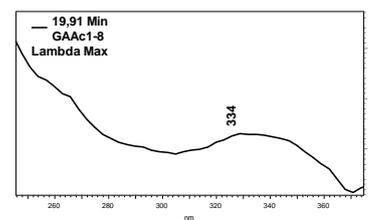
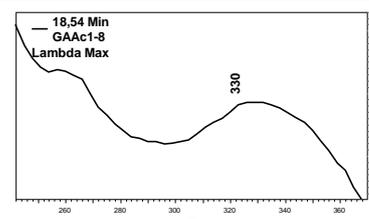
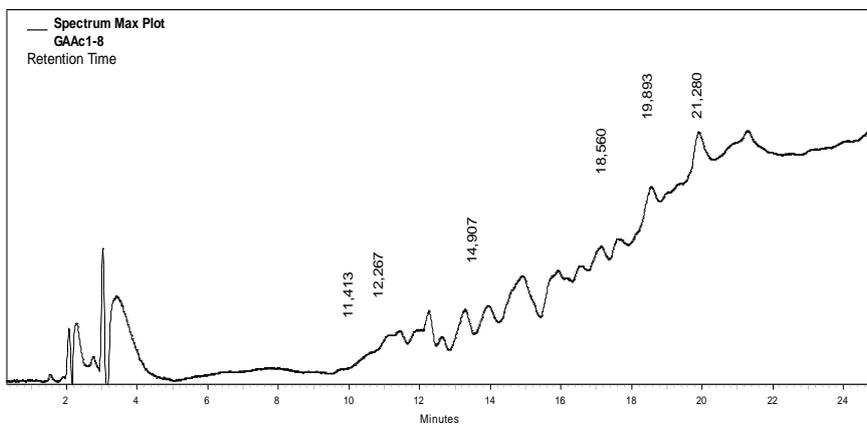
GAAc 6



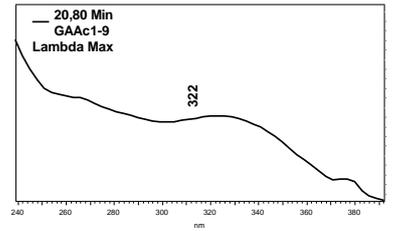
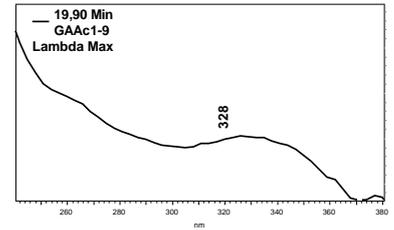
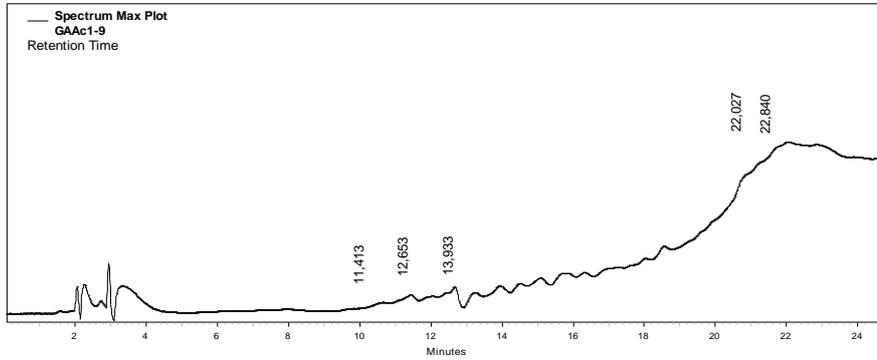
GAAc 7



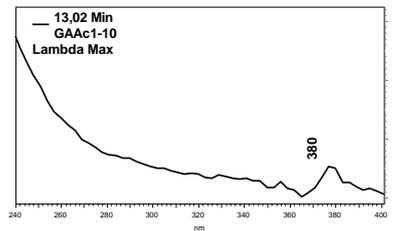
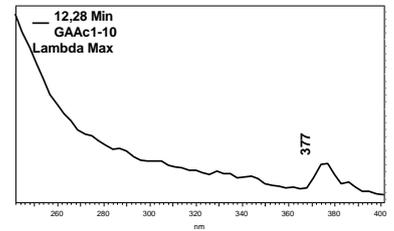
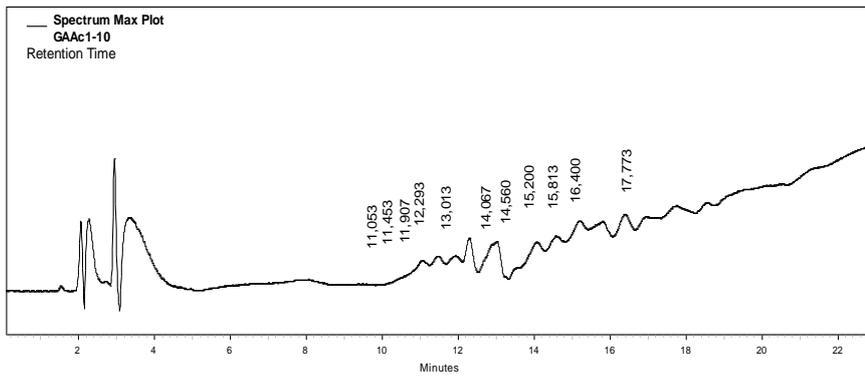
GAAc 8



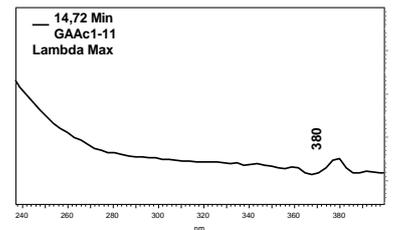
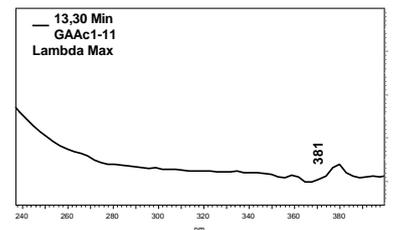
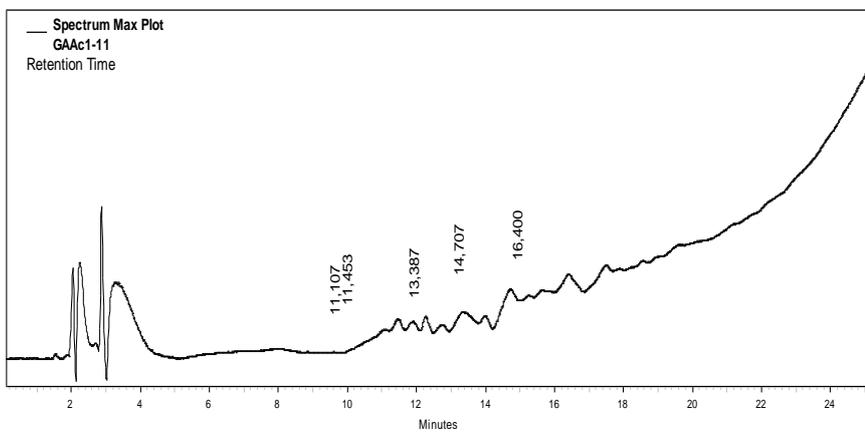
GAAc 9



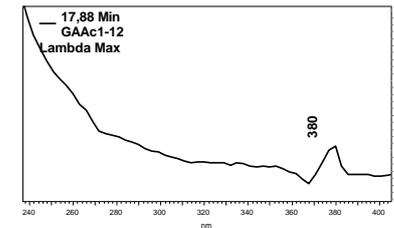
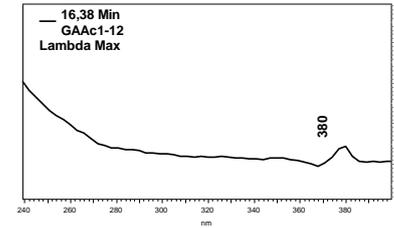
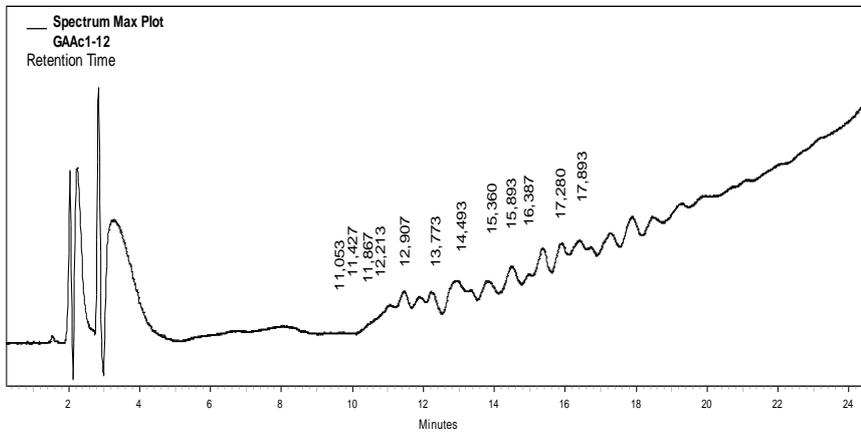
GAAc 10



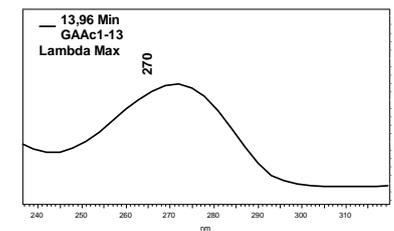
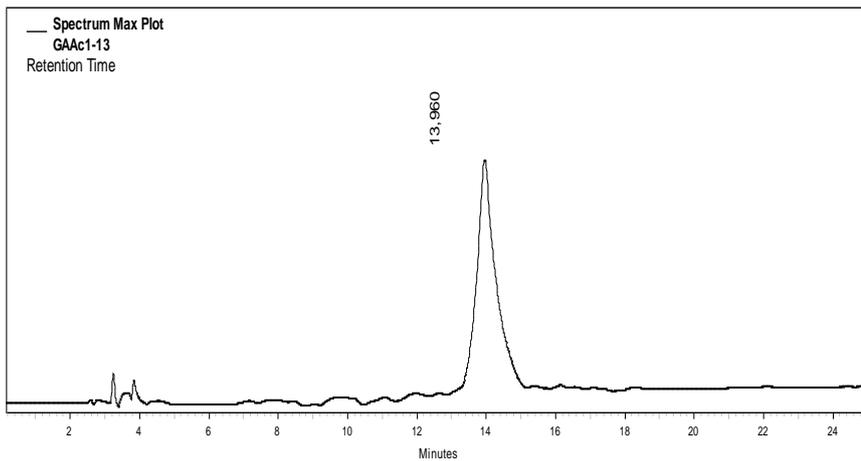
GAAc 11



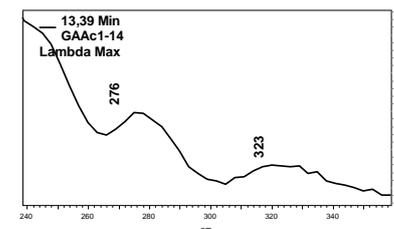
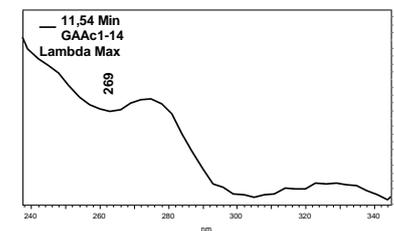
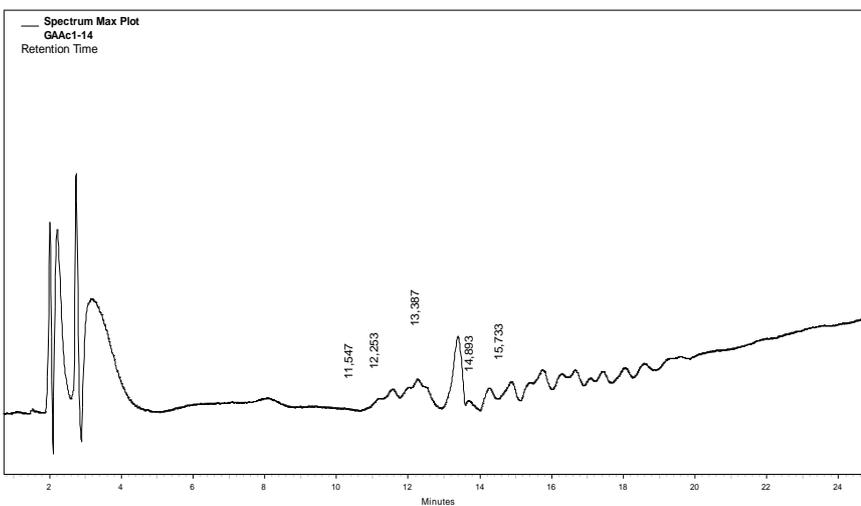
GAAc 12

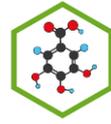


GAAc 13

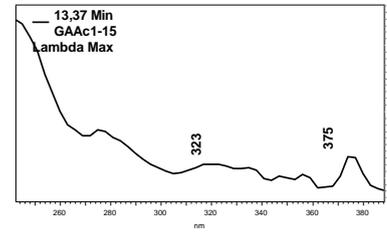
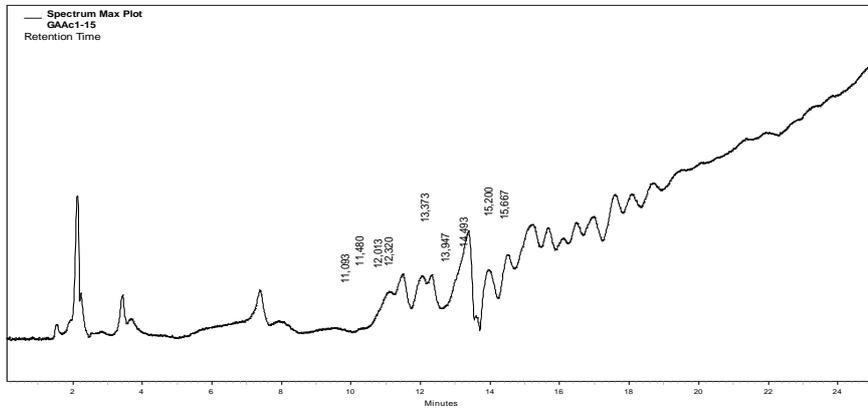


GAAc 14

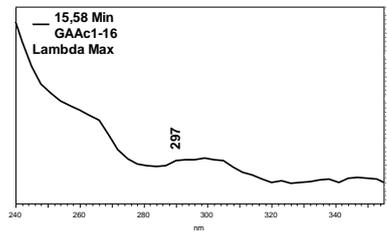
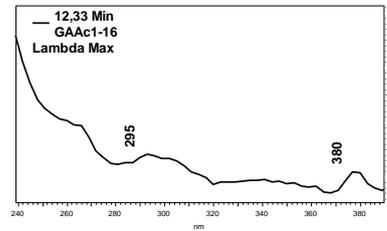
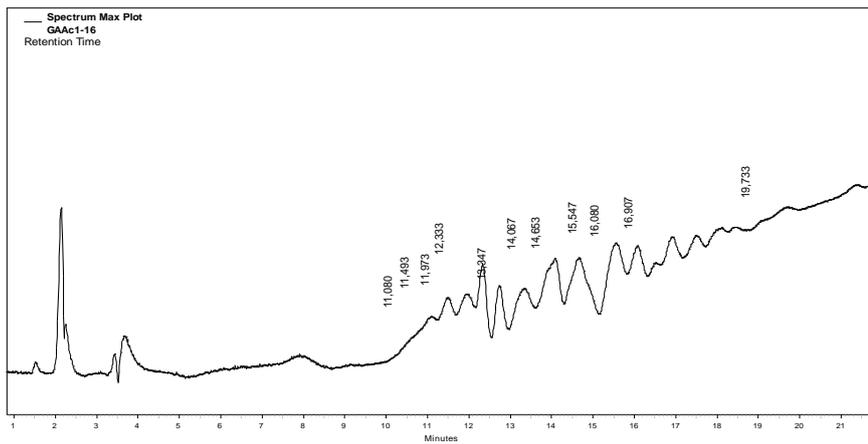


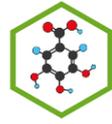


GAAc 15



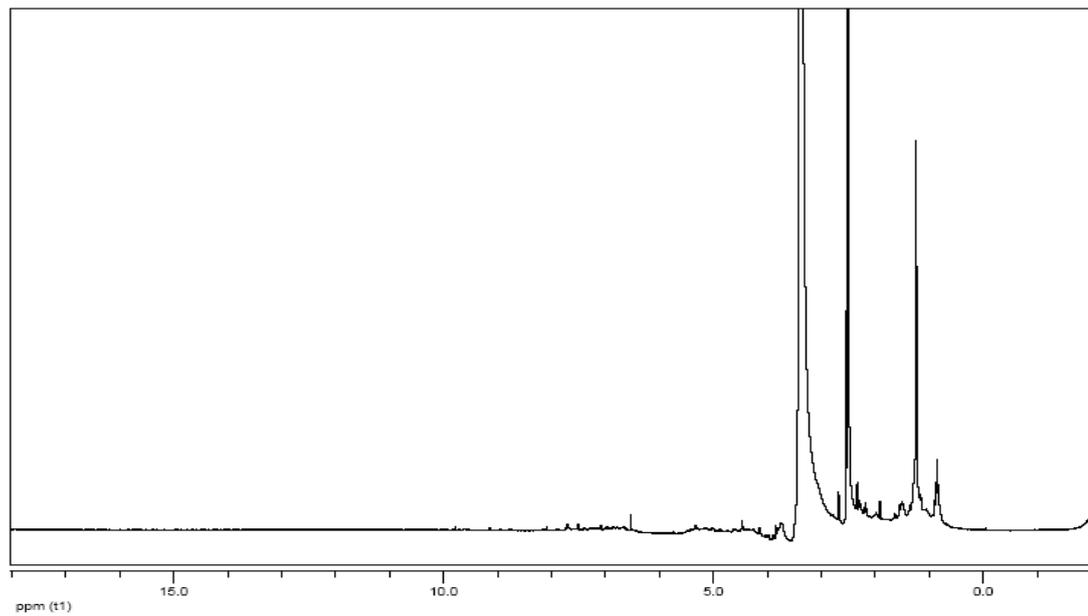
GAAc 16



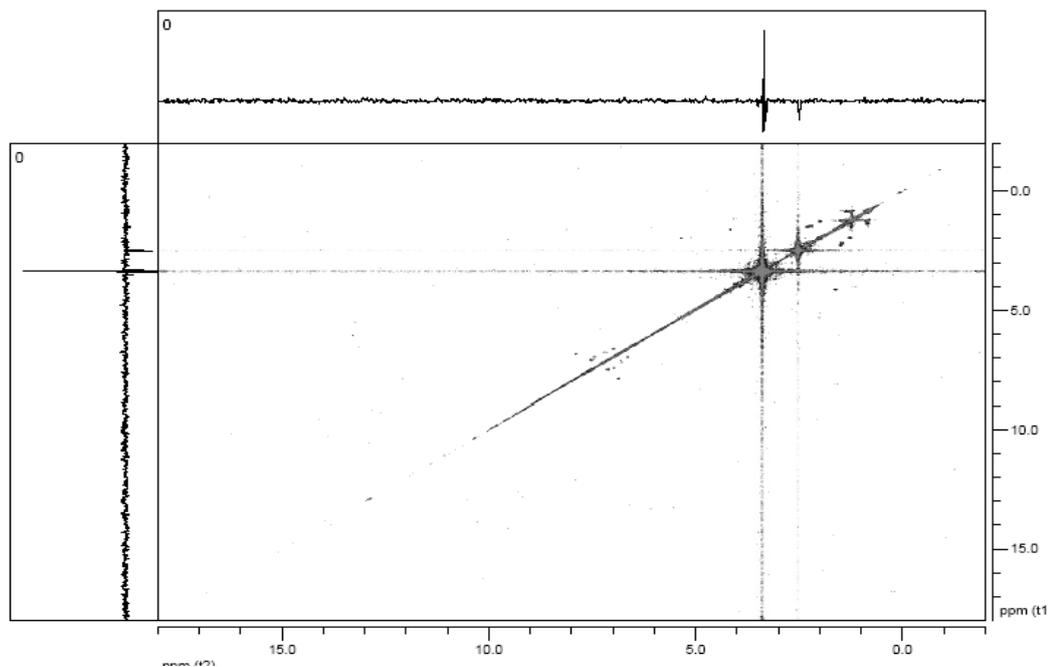


Anexo 2

A. Espectro de RMN ^1H del compuesto fenólico presente en la fracción GAAC 13

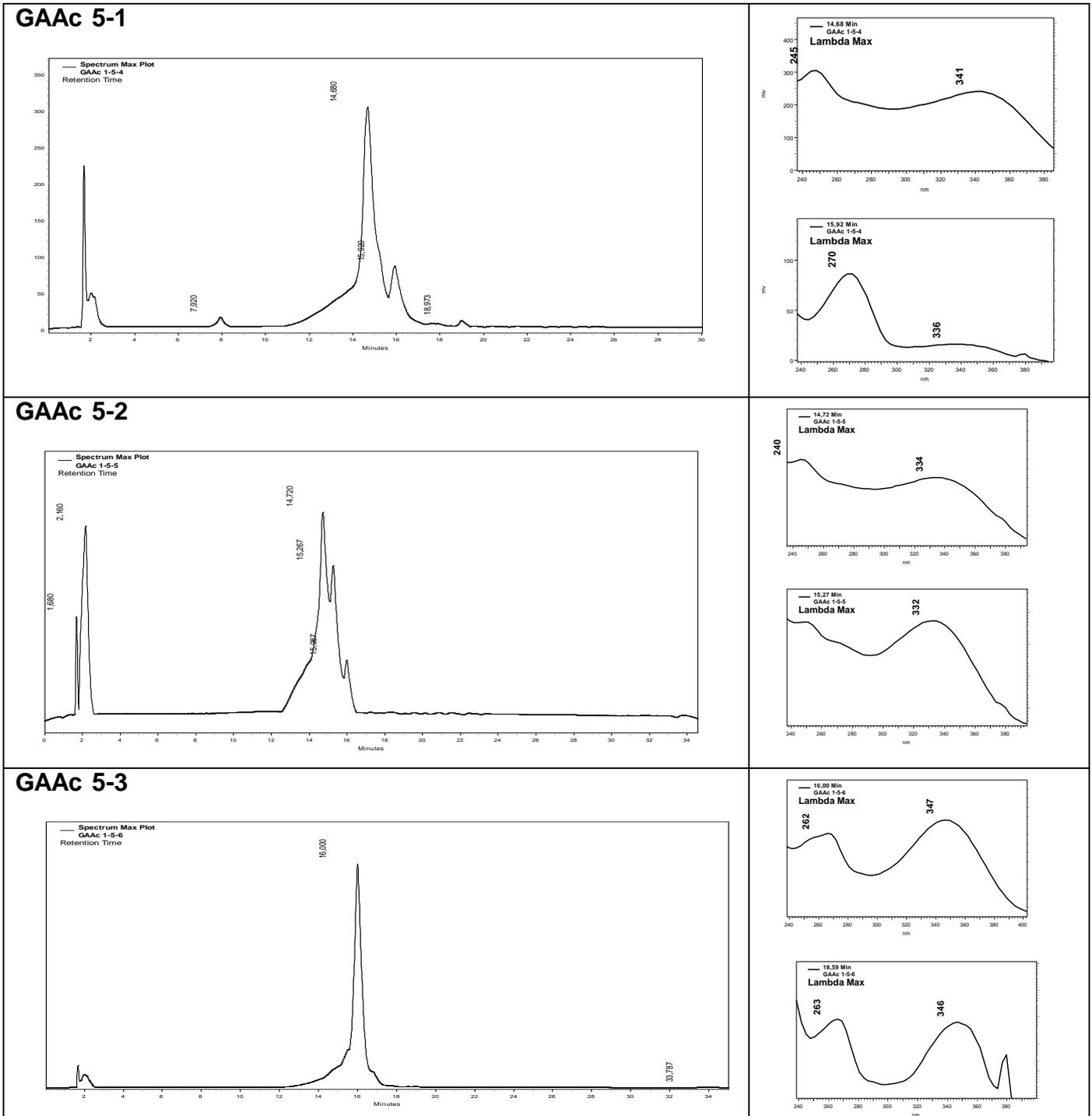


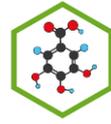
B. Espectro de RMN COSY del compuesto fenólico presente en la fracción GAAC 13



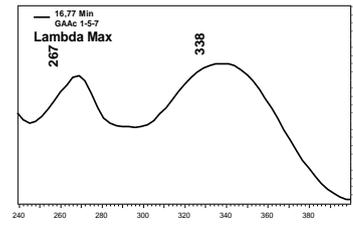
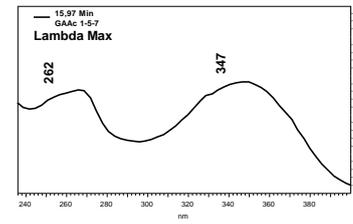
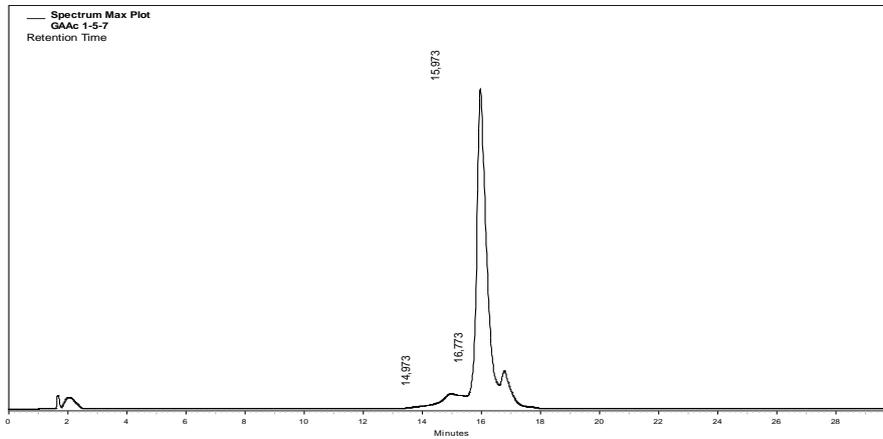
Anexo 3

Cromatogramas de HPLC-DAD de las fracciones obtenidas por separación en columna sobre MCI-Gel de la fracción GAAc 5 de *Guadua angustifolia* Kunth

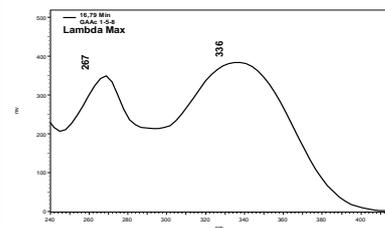
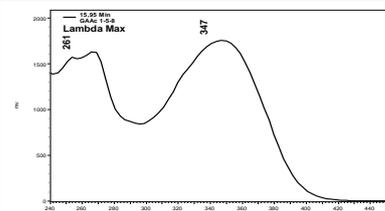
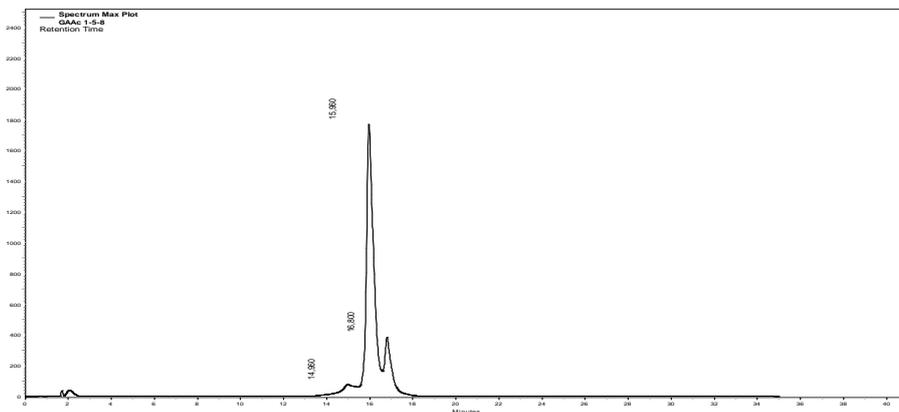




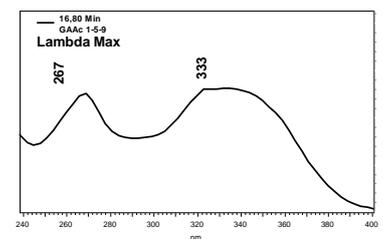
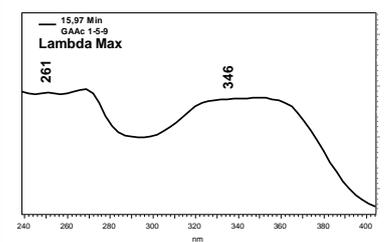
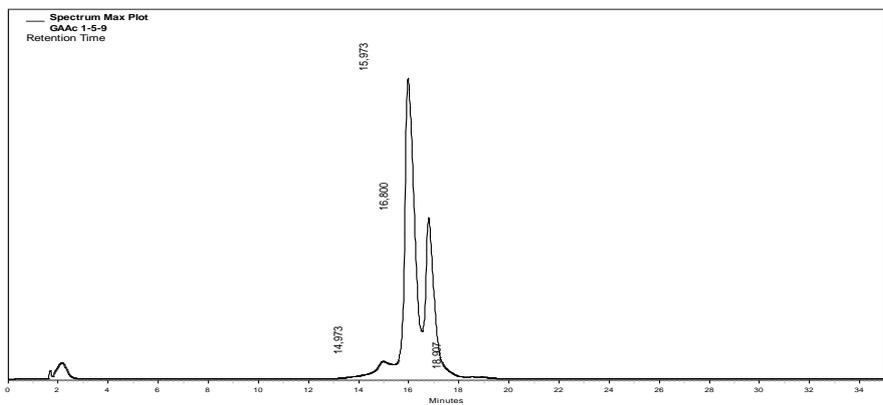
GAAc 5-4



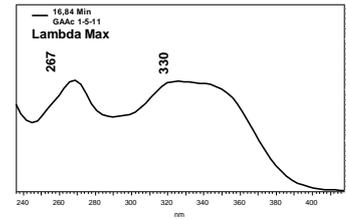
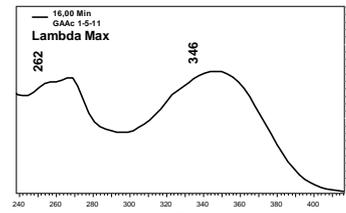
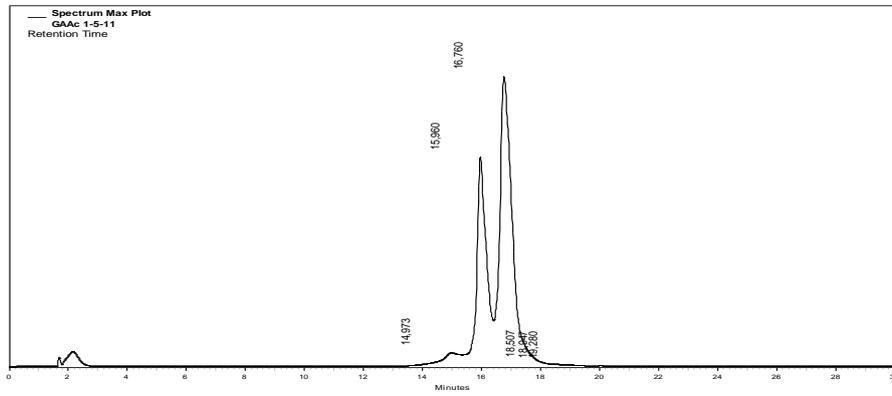
GAAc 5-5



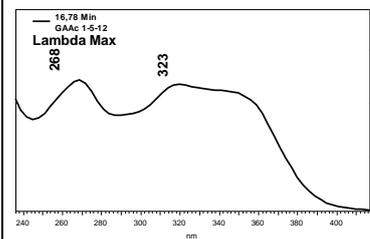
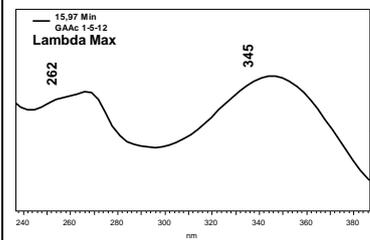
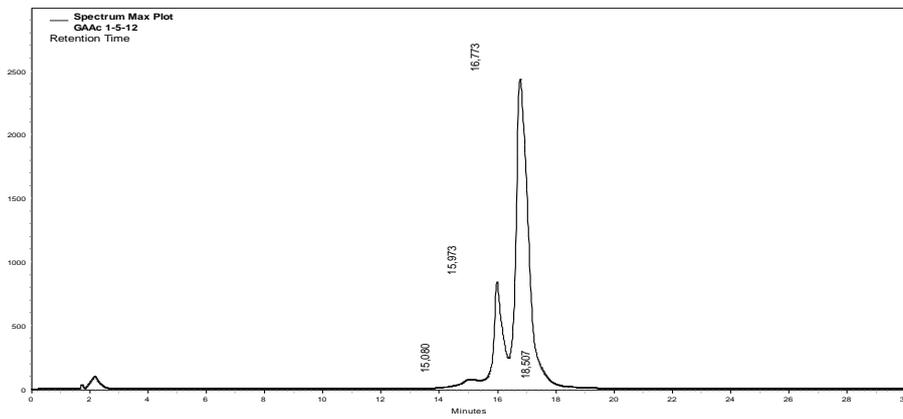
GAAc 5-6



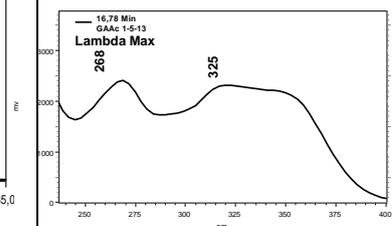
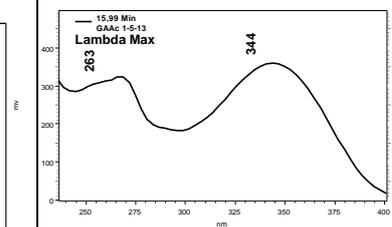
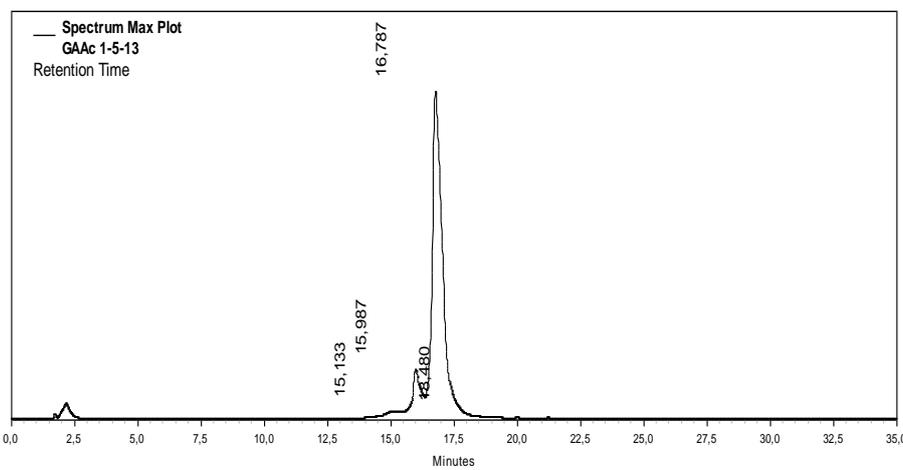
GAAc 5-7



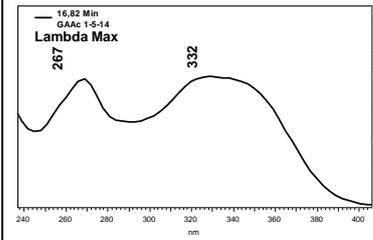
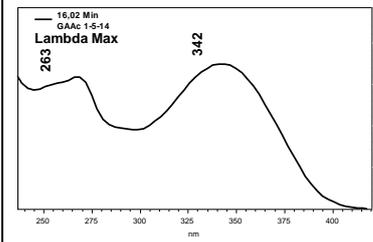
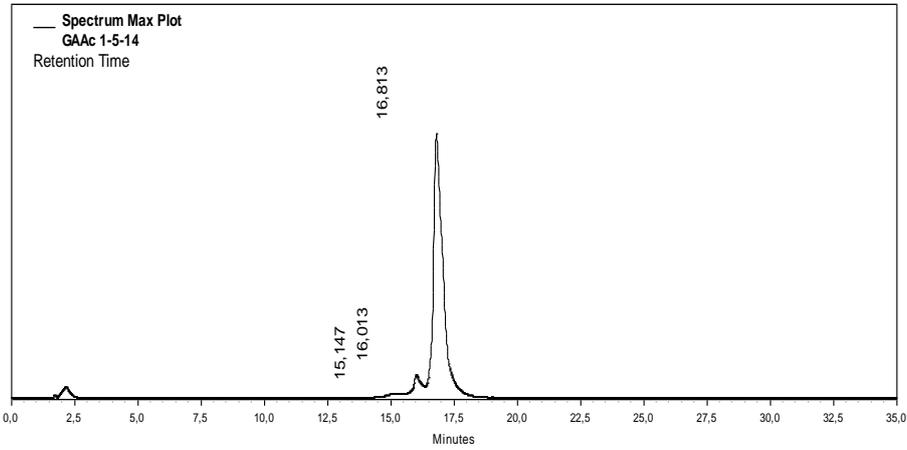
GAAc 5-8



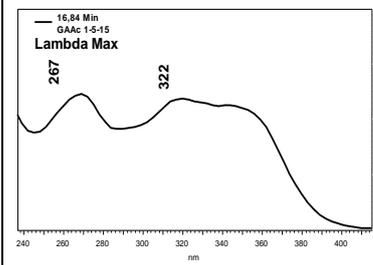
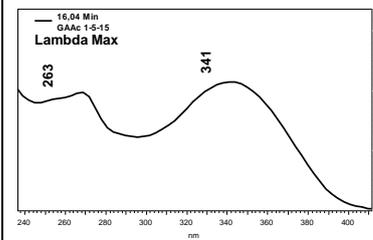
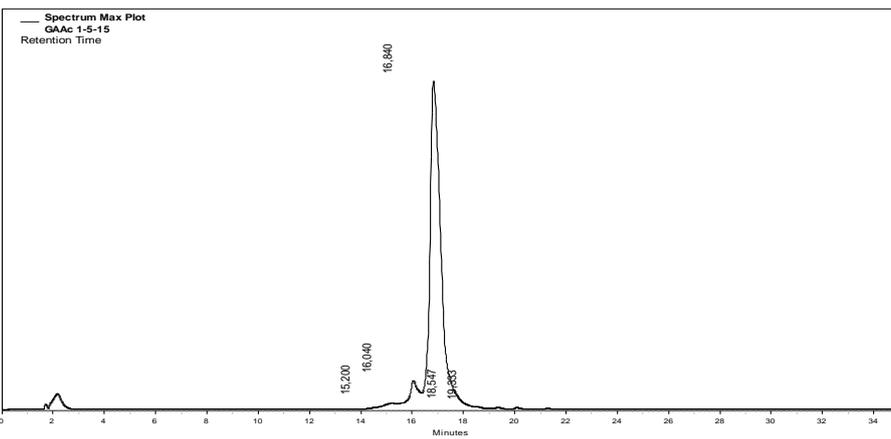
GAAc 5-9



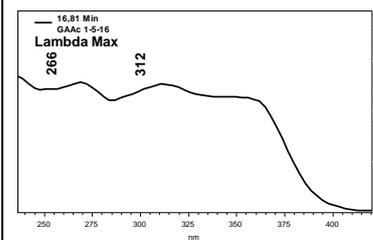
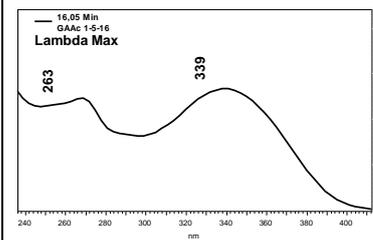
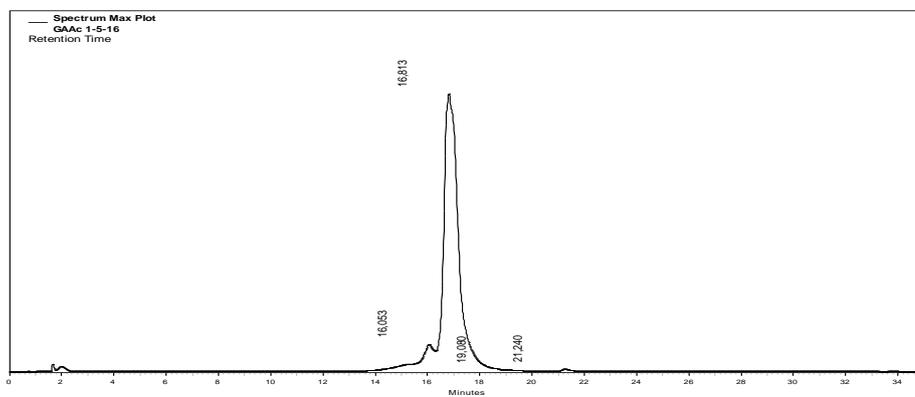
GAAc 5-10



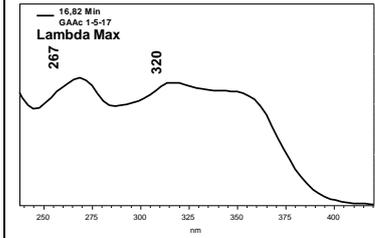
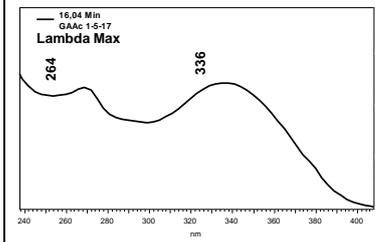
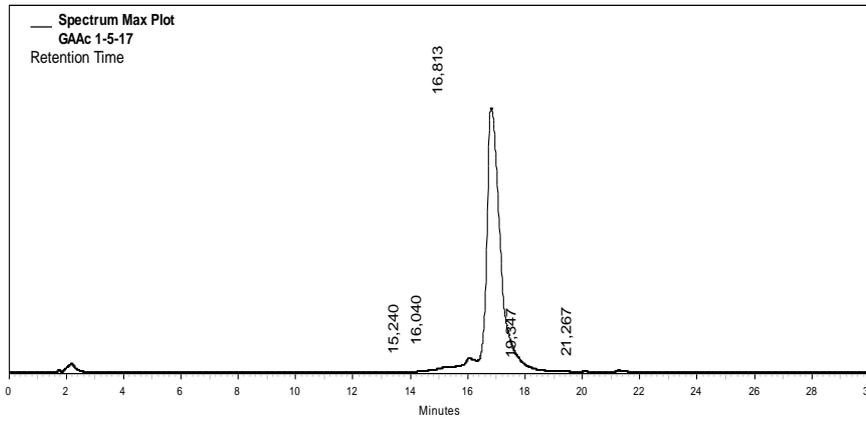
GAAc 5-11



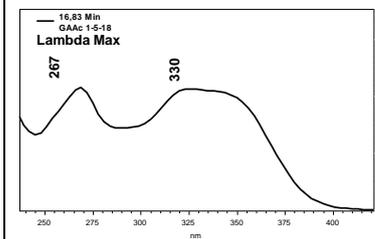
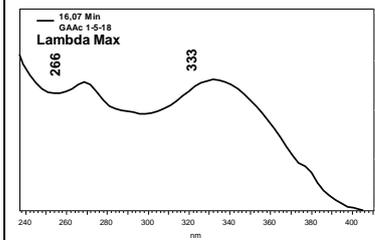
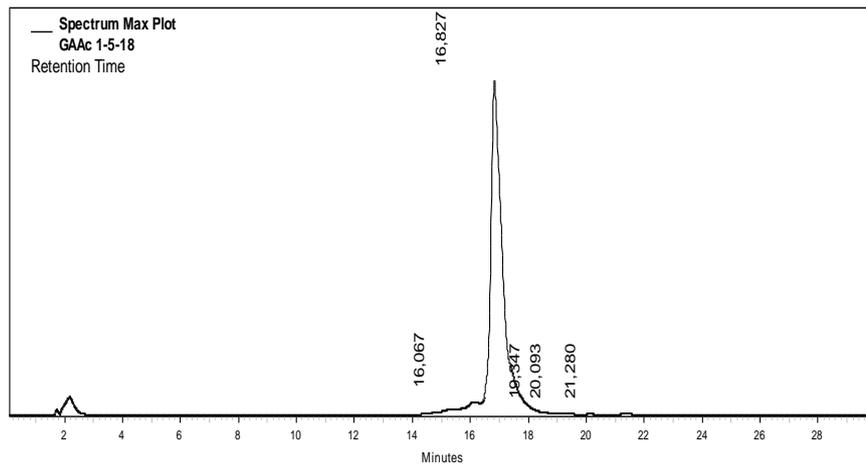
GAAc 5-12



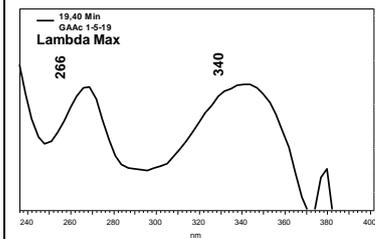
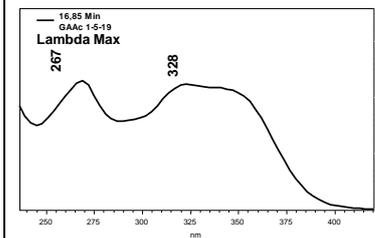
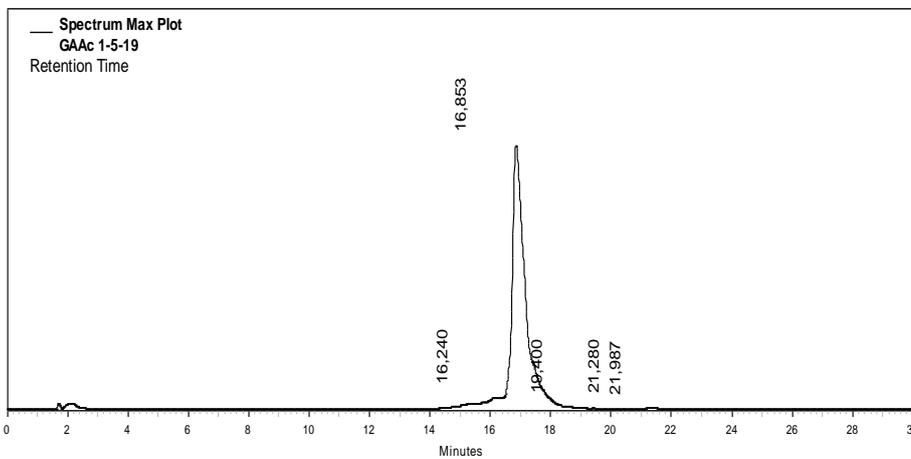
GAAc 5-13

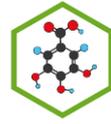


GAAc 5-14

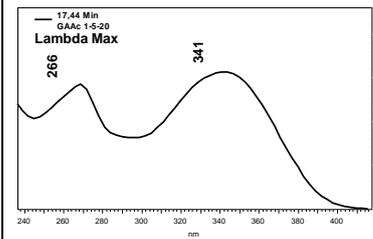
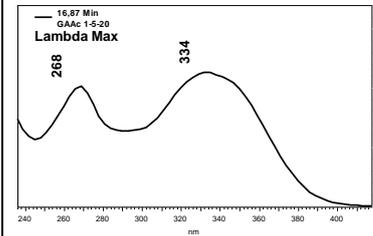
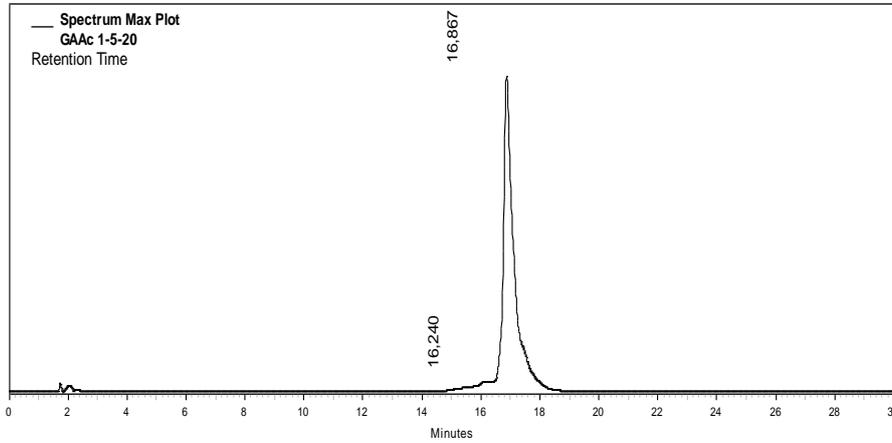


GAAc 5-15

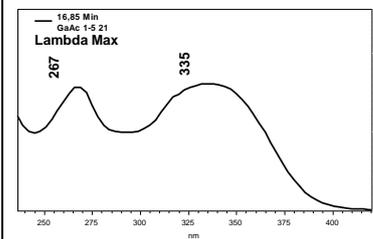
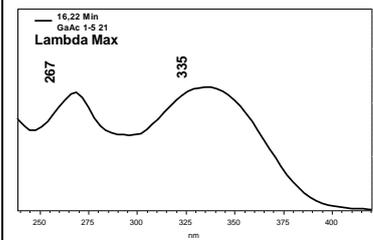
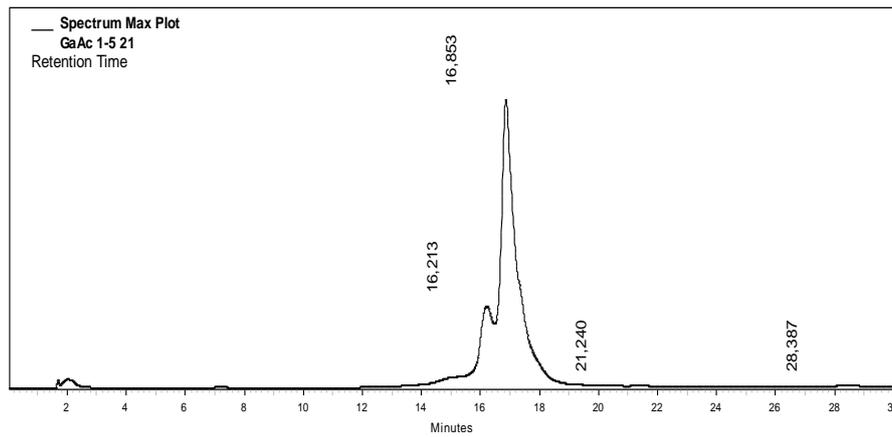




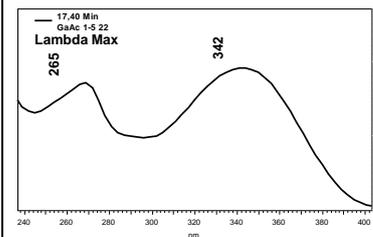
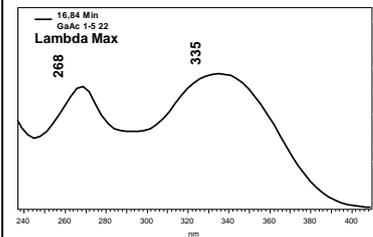
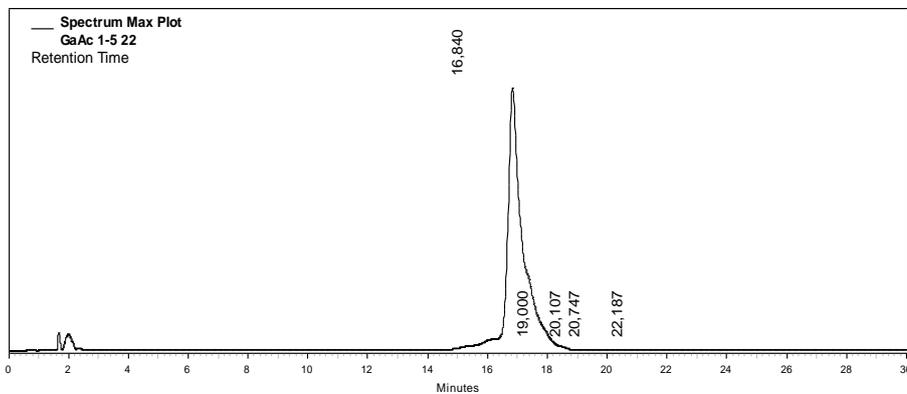
GAAc 5-16



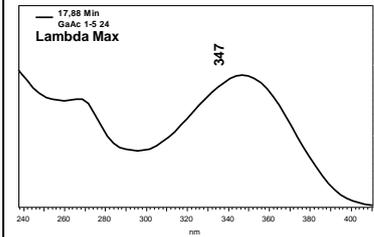
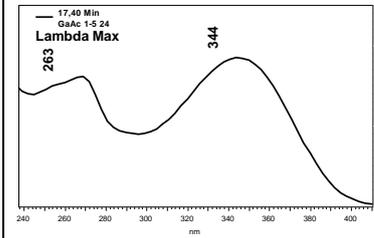
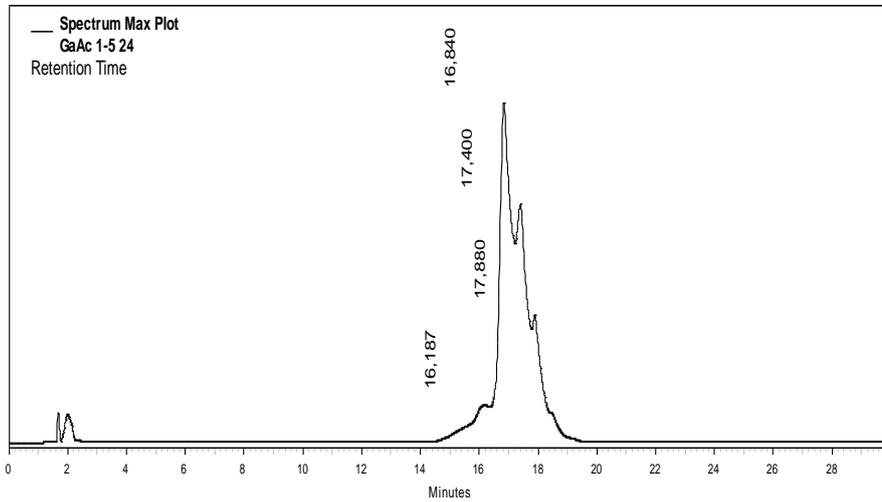
GAAc 5-17



GAAc 5-18



GAAc-1-5-19



GAAc 5-20

