

HPLC-SPE-NMR

**LABORATORIO DE BUSQUEDA  
DE PRINCIPIOS BIOACTIVOS**

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN FLAVONOIDE  
PRESENTE EN *Brownea ariza B*, Y LA EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA COMO COMPUESTO PURO Y ACOPLADO A COBRE.**



**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
ARMENIA  
2008**

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN FLAVONOIDE  
PRESENTE EN *Brownea ariza B*, Y LA EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA COMO COMPUESTO PURO Y ACOPLADO A COBRE.**

**JUAN FERNANDO GIL ROMERO**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR  
EL TÍTULO DE QUÍMICO**

**DIRECTOR**

**MILTON GÓMEZ BARRERA Q.F.U.N.**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
ARMENIA  
2008**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Armenia, Julio de 2008

*A mi madre;  
Pues, sin el esfuerzo de ella,  
El mío no hubiese existido*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
3. JUSTIFICACIÓN .....	3
4. OBJETIVOS .....	4
4.1 Objetivo general .....	4
4.2 Objetivos específicos.....	4
5. ANTECEDENTES.....	5
6. MARCO TEÓRICO .....	6
6.1 <i>Brownea ariza</i> B (Palo de la Cruz).....	6
6.1.1 Identificación.....	6
6.1.2 Descripción botánica: .....	6
6.1.3 Distribución geográfica:.....	8
6.1.4 Aspectos etnobotánicos:.....	8
6.2 Metabolitos secundarios:.....	9
6.2.1 Metabolitos secundarios con características farmacológicas... 10	
6.2.1.1 2-Fenilbenzopiranos (Esqueleto C6-C3-C6).....	13
6.2.1.2 Isoflavonoides.....	13
6.2.1.3 Neoflavonoides.....	14
6.2.1.4 Flavonoides menores (pseudoflavonoides).....	15
6.3 Complejos organometálicos.....	15
6.3.1 Usos de los complejos organometálicos .....	16
6.3.2 Complejos organometálicos con flavonoides.....	17
6.4 Microorganismos.....	17
6.4.1 Bacterias .....	18
6.4.1.1 Bacterias grampositivas .....	18
6.4.1.2 Bacterias gramnegativas .....	20
6.4.2 Hongos .....	23
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 Reactivos usados.....	27
7.2 Extracción del ligando flavonoide .....	28
7.3 Caracterización del flavonoide.....	32
7.3.1 Reacciones de coloración.....	32
7.3.1.1 Shinoda o Whismaster.....	33
7.3.1.2 Ensayo con Zn/HCl.....	33
7.3.1.3 Ensayo de Pacheco.....	33
7.3.1.4 Ensayo de Tollens.....	33
7.3.1.5 Prueba de Fehling.....	33
7.3.2 Análisis electrónico UV-VIS .....	33
7.3.2.1 Espectro de flavonoide en MetOH.....	34

7.3.2.2	Espectro de flavonoide en MetOH-AcONa.....	34
7.3.2.3	Espectro de flavonoide en MetOH-AcONa-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	34
7.3.2.4	Espectro de flavonoide en NaOH.....	34
7.3.2.5	Espectro de flavonoide en MetOH-AlCl <sub>3</sub> .....	34
7.3.2.6	Espectro de flavonoide en MetOH-AlCl <sub>3</sub> -HCl.....	35
7.3.3	Espectroscopia IR.....	35
7.3.4.	Espectrometría de Masas.....	35
7.3.4.1.	Derivatización Del Flavonoide.....	36
7.3.4.1	Masas Por Inyección Directa.....	36
7.3.5	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN <sup>1</sup> H).....	36
7.4	Actividad biológica del flavonoide.....	36
7.4.1	Actividad antimicrobiana.....	36
7.4.2	Ensayo de citotóxicidad.....	39
7.5	Acople del flavonoide al metal Cobre (II).....	40
7.5.3	Actividad biológica del flavonoide acoplado al cobre.....	41
7.5.3.1	Actividad Antibacteriana y Antifúngica.....	41
7.5.3.2	Ensayo de citotóxicidad y actividad anticancerígena.....	41
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
8.1	Aislamiento, purificación y caracterización del flavonoide de <i>Brownea ariza B</i> .....	42
8.1.1	Aislamiento del flavonoide.....	42
8.1.2	Caracterización del flavonoide.....	45
8.1.2.1	Ensayos de coloración.....	45
8.1.3	Análisis Electrónico UV-VIS.....	48
8.1.4	Análisis Espectroscopia IR.....	57
8.1.5	Espectrometría de masas.....	60
8.1.5.1	Espectrometría de masas de derivado.....	60
8.1.5.2	Espectrometría de masas por Inyección directa.....	65
8.1.6	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	67
8.1.6.1.	Espectros RMN Unidimensionales (1D).....	67
8.1.6.1.1.	Resonancia Magnética Nuclear de protones ( <sup>1</sup> H).....	67
8.1.6.1.2.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN C <sup>13</sup> ).....	67
8.1.6.1.3.	DEPT DISTORTIONLESS ENHANCEMENT BY POLARIZATION TRANSFER.....	68
8.1.6.2.	Espectros RMN Bidimensionales (2D).....	72
8.1.6.2.1	Espectroscopia de Correlación en 2D (COSY).....	72
8.1.6.2.2.	Espectro HBMC y HSQC.....	74
8.2	Acople del flavonoide a metal Cobre.....	76
8.2.1	Espectro UV del compuesto acoplado.....	77
8.2.2	Espectro IR-ATR del compuesto acoplado.....	77
8.3.1	Actividad Antimicrobiana del flavonoide.....	78
8.3.2	Actividad Antimicrobiana de compuesto acoplado.....	80
8.4	Actividad Citotóxica.....	81
8.4.1	Tabulación de datos de células viables por día.....	82

8.4.2 Análisis datos actividad citotóxica flavonol.....	82
8.4.2 Análisis datos actividad citotóxica sistema flavonol-Cu .....	84
8.5 Actividad Anticancerígena. ....	86
8.5.1 Tabulación de datos de células viables por día.....	86
8.5.2 Análisis datos actividad anticancerígena flavonol .....	87
8.5.3 Análisis datos actividad anticancerígena del sistema flavonol-Cu ..	88
CONCLUSIONES .....	90
RECOMENDACIONES.....	92
ANEXOS.....	93
ANEXO 1: Parámetros Análisis GC/MS .....	93
ANEXO 2: Cromatograma HPLC .....	94
BIBLIOGRAFÍA .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características de <i>Brownea ariza B.</i> ....	<b>8</b>
<b>Tabla 2-</b> Solventes y sistemas de solvente para análisis de flavonoides por cromatografía en capa delgada (CCD) .....	<b>30</b>
<b>Tabla 3.</b> Volúmenes usados en el método de microtitulación en placa.....	<b>38</b>
<b>Tabla 4.</b> Asignación de bandas IR <sup>KBr</sup> .....	<b>57</b>
<b>Tabla 5.</b> Asignación de Resonancia de protones presentes en la molécula...	<b>70</b>
<b>Tabla 6.</b> Resultados microtitulación en placa Flavonoide .....	<b>77</b>
<b>Tabla 7.</b> Resultados microtitulación en placa el sistema Flavonoide-Cu .....	<b>81</b>
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de células viables en el día 1. ....	<b>82</b>
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de células viables en el día 2 .....	<b>82</b>
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de células viables en el día 3. ....	<b>85</b>
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de células viables en a las 24h.....	<b>86</b>
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de células viables en a las 48 h.....	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Hojas de <i>Brownea ariza B</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Flores de <i>Brownea ariza B</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Estructura química de un flavonoide, la quercetina .....	11
<b>Figura 4:</b> Flavonoides 2 Fenilbenzopiranos .....	13
<b>Figura 5:</b> Esqueleto funcional del isoflavonoides .....	14
<b>Figura 6:</b> Estructura de Neoflavonoies ó cumarinas. ....	14
<b>Figura 7:</b> Ejemplo de pseudoflavonoides.....	15
<b>Figura 8.</b> Esquema de la pared celular de las grampositivas .....	18
<b>Figura 9.</b> Esquema de la pared celular de las bacterias gramnegativas .....	21
<b>Figura 10.</b> Esquema de la metodología realizada .....	26
<b>Figura 11.</b> Placa de Elisa antes de ser incubada,.....	38
<b>Figura 12.</b> Análisis de Cromatografía en Capa Delgada.....	43
<b>Figura 13.</b> Cromatografía en Columna .....	44
<b>Figura 14.</b> Fracciones obtenidas por Cromatografía en columna 1-9 .....	44
<b>Figura 15.</b> Perfil Cromatográfico De Fracciones Obtenidas En La Columna CHCl <sub>3</sub> -MetOH (95:5).....	44
<b>Figura 16.</b> Reacción de Shinoda Resultado y Blanco .....	46
<b>Figura 17:</b> Ensayo de Zn/HCl .....	46
<b>Figura 18:</b> Ensayo de Pacheco .....	46
<b>Figura 19:</b> Prueba de Azúcares reductores por Tollens .....	47
<b>Figura 20:</b> Prueba de Azúcares reductores por Fehling .....	47
<b>Figura 21.</b> Anillo A y B flavonoide.....	48
<b>Figura 22.</b> Espectro flavonol en MetOH .....	49
<b>Figura 23.</b> Espectro UV-Vis de 3-hidroxiflavona (flavonol).....	49
<b>Figura 24.</b> Complejo Flavonoide hidroxilados con H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	50
<b>Figura 25.</b> Espectro de Flavonoide en MetOH-AcONa .....	51
<b>Figura 26.</b> Espectro de Flavonoide en MetOH-AcONa-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	51
<b>Figura 27</b> Espectro de Flavonoide en NaOH .....	52

<b>Figura 28.</b> Espectro UV-Vis de MetOH, AcoNa, AcoNa+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	<b>52</b>
<b>Figura 29.</b> Espectro de Flavonoide en MetOH-AlCl <sub>3</sub> .....	<b>54</b>
<b>Figura 30.</b> Espectro de Flavonoide en MetOH-AlCl <sub>3</sub> -HCl.....	<b>54</b>
<b>Figura 31.</b> Espectro UV-Vis de MetOH, HCl+AlCl <sub>3</sub> , AlCl <sub>3</sub> .....	<b>55</b>
<b>Figura 32.</b> Complejo Flavonoide hidroxilados con AlCl <sub>3</sub> .....	<b>56</b>
<b>Figura 33.</b> Flavonol propuesto por UV-vis .....	<b>56</b>
<b>Figura 34.</b> Espectro IR del Flavonol .....	<b>57</b>
<b>Figura 35.</b> Picos de IR de flavonoides conocidos .....	<b>59</b>
<b>Figura 36.</b> IR 3-Hodroxilavona .....	<b>60</b>
<b>Figura 37.</b> Cromatograma derivado .....	<b>61</b>
<b>Figura 38.</b> Fragmentograma derivado .....	<b>62</b>
<b>Figura 39.</b> Fragmentos 105 y 77 m/z .....	<b>62</b>
<b>Figura 40.</b> Pico 55 m/z .....	<b>63</b>
<b>Figura 41.</b> Formación ión Tropilio .....	<b>63</b>
<b>Figura 42.</b> Fragmentos 41 y 57 m/z .....	<b>63</b>
<b>Figura 43.</b> Fragmentos 122, 135, 164 y 179 m/z .....	<b>64</b>
<b>Figura 44.</b> Ión molecular y pico base del derivado .....	<b>64</b>
<b>Figura 45:</b> Fragmentograma compuesto puro .....	<b>65</b>
<b>Figura 46</b> Fragmento 134 m/z, (anillo A), Fragmento 171 m/z (anillo b) .....	<b>65</b>
<b>Figura 47:</b> Análisis de Fragmentos .....	<b>66</b>
<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H .....	<b>67</b>
<b>Figura 49:</b> Espectro de RMN C <sup>13</sup> .....	<b>68</b>
<b>Figura 50:</b> DEPT 135.....	<b>69</b>
<b>Figura 51.</b> Molécula deducida por UV-Vis, IR, MS, RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C.....	<b>70</b>
<b>Figura 52:</b> Espectro de COSY. ....	<b>73</b>
<b>Figura 53.</b> Espectro HBMC .....	<b>74</b>
<b>Figura 54.</b> Espectro HSQC .....	<b>74</b>
<b>Figura 55</b> Modelo 3D del 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona .....	<b>75</b>
<b>Figura 56.</b> Montaje Síntesis del sistema Flavonoide-Cu .....	<b>76</b>
<b>Figura 57.</b> Espectro UV de la solución del compuesto acoplado .....	<b>77</b>

<b>Figura 58.</b> IR Compuesto acoplado .....	<b>77</b>
<b>Figura 59.</b> Resultado Microdilusion-titulación en placa .....	<b>79</b>
<b>Figura 60.</b> Gráfica Células viables contra días en las diferentes concentraciones del flavonol.....	<b>83</b>
<b>Figura 61.</b> Gráfica Células viables contra concentración de flavonol diario.....	<b>84</b>
<b>Figura 62.</b> Gráfica Células viables contra días en las diferentes concentraciones del sistema flavonoide-Cu. ....	<b>85</b>
<b>Figura 63.</b> Gráfica Células viables contra concentración de flavonoide-Cu diario. ....	<b>85</b>
<b>Figura 64.</b> Gráfica Células viables de línea celular murina contra horas en las diferentes concentraciones del flavonol. ....	<b>87</b>
<b>Figura 65.</b> Gráfica Células viables de mieloma contra concentración de flavonol diario. ....	<b>88</b>
<b>Figura 66.</b> Gráfica Células viables de mieloma murino contra horas en las diferentes concentraciones del sistema flavonoide-Cu.....	<b>89</b>
<b>Figura 67.</b> Gráfica Células viables de mieloma contra concentración de flavonoide-Cu diario. ....	<b>89</b>

## ANEXOS

ANEXO 1: Parámetros Análisis GC/MS .....	<b>93</b>
ANEXO 2: Cromatograma de HPLC .....	<b>94</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la química de los productos naturales ha tenido un gran auge debido a que cada vez se conocen más las facultades y propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios, y a su vez se ha descubierto ineficacia en muchos de los productos farmacéuticos que se encuentran hoy en el mercado, muchos de los cuales la FDA (Food and Drug Administration) les ha retirado los permisos para su comercialización por tal motivo las mismas casas farmacéuticas han aumentado en un trescientos por ciento su inversión en la investigación de las propiedades de metabolitos secundarios, metabolitos tales como los flavonoides, que presenta un amplio campo de actividad farmacológica pues muestran cualidades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, citotóxicas, antivirales, entre otras. (1; 2; 3)

Colombia posee una de las más grandes reservas de flora de la tierra en la cual se encuentran miles de plantas con propiedades curativas, muchas de las cuales deben sus efectos farmacológicos a taninos, flavonoides, alcaloides, lactonas triterpénicas, entre otros metabolitos secundarios. (4; 5)

Por tal motivo se plantea la extracción, purificación y caracterización de un flavonoide en *Brownea ariza B*, con el fin de determinar su capacidad como: antibacteriano en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, y *Escherichia coli*, antifúngico en *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*, citotóxico en la línea celular Vero (derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano) y anticancerígeno en mieloma murino SP2/0-Ag14 y los posibles cambios de estas actividades cuando se acopla el flavonoide al Cobre.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia existe una gran diversidad de flora gracias a su privilegiada posición ecuatorial, gran parte de esta flora posee cualidades farmacológicas y son usadas como plantas medicinales, estas plantas debido a sus componentes pueden ser usadas para tratar una amplia gama de enfermedades, pero el número de plantas que actualmente se han investigado en este campo no es muy amplio, motivo por el cual muchas universidades y farmacéuticas tienen como campo de investigación la adquisición de metabolitos secundarios de plantas con cualidades farmacológicas (3)

Muchas de las plantas que poseen propiedades medicinales deben estas cualidades a la presencia de flavonoides, los cuales tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas entre otras, por esto las plantas medicinales tienden a convertirse en una fuente de agentes antimicrobianos alternativos pues el aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos convencionales es el principal problema al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas pues aumenta los costos considerablemente (6, 7); este efecto es mayor en los países en vías de desarrollo, en donde por cada habitante se gasta menos de US \$7 en salud, cifra insignificante frente a los US \$1.500 a US \$4.000 que puede costar el tratamiento de una persona que presente alguna enfermedad ocasionada por un agente patógeno resistente (8; 9).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los flavonoides son uno de los productos naturales más ampliamente distribuidos en el mundo vegetal, y es uno de los que posee mayor cantidad de efectos farmacológicos, como lo son actividades inhibitoras de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATP-asas, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidoreductasas y kinasas), propiedades antiinflamatoria, antifúngicas (10), anticancerígena y antibacterial así como propiedades antiprotozoarias (11).

La ciencia se ha volcado de nuevo hacia las plantas con el ánimo de encontrar nuevos compuestos que sirvan como solución a algunas enfermedades contra las cuales ha generado diferentes estrategias de tratamiento desde tiempo atrás y en las cuales se ha presentado efectos de multirresistencia a estos medicamentos.

Algunas de las cualidades de los flavonoides como antibacteriales, antifúngicas, anticancerígenas y antioxidantes se han visto incrementadas a la hora de quelarlos a metales, aumentando su capacidad antioxidante y antimicrobiana, igualmente muestra un fuerte incremento de su actividad anticancerígena.

Por tal motivo es importante no sólo conocer estructural y farmacológicamente los flavonoides, presentes en *Brownea ariza B*, la cual tiene gran cantidad de estos metabolitos secundarios según se reporta (12), sino además determinar su utilidad como antibacteriales, antifúngicos y anticancerígenos y comparar estos resultados a las actividades del compuesto puro y acoplado a cobre, y así dar un valor agregado a la capacidad en flora que posee nuestra región y nuestro país.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Aislar, purificar y caracterizar un flavonoide presente en *Brownea ariza B*, y realizar su estudio antibacteriano, antifúngico, citotóxico y anticancerígeno del compuesto puro y acoplado a cobre.

### 4.2 Objetivos específicos

- Extraer, aislar y purificar un flavonoide presente en *Brownea ariza B*.
- Caracterizar el flavonoide por IR y UV-Vis, Espectrometría de Masas (CG-MS) y Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, DEPT, HMBC, HSQC).
- Determinar la actividad antibacteriana del flavonoide en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, y *Escherichia coli*.
- Identificar la capacidad antifúngica del flavonoide en *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*.
- Determinar actividad citotóxica del flavonoide en línea celular vero.
- Determinar la actividad anticancerígena del flavonoide en Mieloma Murino Sp2/0-Ag14
- Evaluar la capacidad de acoplamiento del flavonoide al metal de coordinación cobre (II)
- Efectuar pruebas biológicas del compuesto acoplado para verificar cambios en sus actividades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas y citotóxicas en relación al flavonoide puro.

## 5. ANTECEDENTES

Los flavonoides son metabolitos secundarios que poseen grandes cualidades anticancerígenos, citotóxicas, antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoarias y antioxidantes (13; 14, 15; 16; 17).

Sus amplias cualidades se deben a que su estructura posee dos sistemas aromáticos, sistema benzoílo y cinamoílo, sitios activos en los cuales se pueden realizar diversos tipos de sustituciones, como hidroxilaciones (OH), metilaciones (OCH<sub>3</sub>), acetilaciones (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), glicosidaciones (O-Gli), entre otras y combinaciones entre éstas, las cuales actúan sinérgicamente atacando la membrana celular, la membrana nuclear y genera acoplamiento con el ADN, entre otras acciones que impiden el crecimiento de agentes microbianos, virales y cancerígenos. (1; 2, 18, 19)

Estos flavonoides han incursionado en el campo de la química bioinorgánica debido a que sus múltiples hidroxilaciones permiten enlaces covalentes con metales de coordinación, formando complejos organometálicos de un tamaño y peso molecular medio, motivo por el cual los complejos formados, principalmente con quercetina, han servido para estudiar las actividades antimicrobianas, citotóxicas, anticancerígenas, antioxidantes de estos complejos, así como sus propiedades fisicoquímicas (11; 20; 21; 22, 23, 24).

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 *Brownea ariza* B (Palo de la Cruz)

#### 6.1.1 Identificación

La caracterización científica del *Brownea ariza* B es:

**Nombre científico:**

*Brownea Ariza Benth*

**Familia:**

*Caesalpiaceae (Leguminosae)*

**Sinónimos:**

*Brownea Princeps/ Lindl. Ex Otto. /Hermesias Ariza/ (Benth.) Kunt*

**Nombre Común:**

Árbol de la Cruz

**Otros nombres comunes:**

Ariza, Arizo, Arizal, Amapolo, Flor de la cruz, Kaki, Palo cruz, Palo de cruz, Palo de Rosa, Rosa de la cruz y Rosa de monte (25).

#### 6.1.2 Descripción botánica:

Árbol muy ramificado, frondoso, de ramas jóvenes de color amarillo - crema y de adultas grisáceas lenticeladas.

Hojas alternas compuestas paripinnadas, pecíolos medianos y abultados en la base, pecioluelos cortos, 8 - 13 folíolos subopuestos y opuestos. Jóvenes de color rosado, los adultos brillantes por el haz, con base inequilatera, apiculados y de

borde entero, catafilos amarillo-ocre, espatulados y ligeramente pubescentes por el haz (figura 1).



**Figura 1.** Hojas de *Brownea ariza B*

*Imagen tomada de:* [http://www.plantsystematics.org/users/dws/4\\_26\\_07/Brownea/Brownea4.JPG](http://www.plantsystematics.org/users/dws/4_26_07/Brownea/Brownea4.JPG)

Glomérulos florales axilares y terminales, eje floral engrosado, cáliz rojo tubular tetrámero, subtendido por dos brácteas, 5 pétalos rojos libres, angulados, 11 estambres, monadelfos amarillo - crema, tecas rojas, estilo anaranjado (figura 2).



**Figura 2.** Flores de *Brownea ariza B*

*Imagen Tomada de* <http://www.conservacion.unalmed.edu.co/sometidos/rodolfo/imagenes/115.jpg>

Fruto en legumbre aplanada tomentosa color marrón oscuro, semillas marrón oscuro.

Además de las anteriores características posee otros caracteres distintivos que permiten identificarla de otras especies (tabla 1)

**Tabla 1: Características de *Brownea ariza* B.**

<b>Hábitos</b>	Árbol menor de 10 m Diámetro el tronco 10-20 cm
<b>Fuste</b>	Retorcido menor de 1 m.
<b>Copa</b>	Arbórea
<b>Hojas</b>	Las hojas jóvenes o retoños son rosados
<b>Flores</b>	Zigomorfas, bisexuales, vistosas en inflorescencias. Flores rojas en grandes macetas.
<b>Frutos</b>	Los frutos son vainas o legumbres largas y planas con grandes semillas cuadradas. Secos, dehiscentes.
<b>Otros caracteres</b>	Ramas jóvenes péndulas.

#### **6.1.3 Distribución geográfica:**

Originario de América tropical, cultivado en zonas tropicales de 0 - 1.600 m.s.n.m. y temperaturas de 19 a 26°C. (25).

#### **6.1.4 Aspectos etnobotánicos:**

Por su ramificación baja y por el follaje tan tupido, este árbol no permite el crecimiento de otra vegetación en la corona o en las áreas anexas. No se recomienda intercalarlo con café, cacao o caucho. (25).

El árbol de la cruz por la figura de sus haces vasculares, empieza a adquirir importancia dentro del simbolismo cristiano del pueblo colombiano, al servir como insignia religiosa en la tradicional semana santa. Las flores tan vistosas del árbol de la cruz, se han utilizado en bebidas para regular las hemorragias femeninas El aserrín o las virutas del tallo se emplean en forma de emplastos para proteger las heridas sangrantes ya que aceleran la coagulación de la sangre y evitan las infecciones. Maderable, ornamental y útil para conservar fuentes de agua. Sus ramas y hojas se usan en medicina casera. Árbol de valor para la protección de nacederos de agua y márgenes hídricas.(25)

Los reportes realizados de esta especie no son muy extensos, pues la pesquisa bibliográfica que se realizó sólo arrojó dos resultados que hablan de la actividad

anticoagulante de *Brownea ariza B*, trabajo adelantado por Márquez (2005) (26, 27), en el departamento de Sucre Colombia. Además del trabajo de grado realizado en la Universidad del Quindío, donde se hace la contribución al estudio fitoquímico preliminar de esta especie (12)

En cuanto a la familia se encuentran dos referencias, las cuales habla de la especie *Brownea rosademonte* (28; 29).

## **6.2 Metabolitos secundarios:**

Las plantas son fuentes de millones de productos fruto de sus rutas metabólicas, sustancias que le permiten desarrollar todas sus actividades para las cuales han evolucionado, éstas se pueden agrupar en dos grupos, metabolitos primarios y secundarios, los primeros hacen parte del paquete de sustancias “primordiales” para que las plantas cumplan sus funciones vitales, como lo son carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas. Igualmente estos procesos metabólicos producen diferentes compuestos que al no ser totalmente primordiales para la planta son llamados “secundarios” (30)

Por muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido, muchas veces fueron considerados como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. Aunque el estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en ellas por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria, aún muchas de las funciones de los metabolitos secundarios son desconocidas. De hecho, su estudio estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopia para dilucidar su estructura, y metodologías de

síntesis que hoy constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea.  
(31)

En estudios biológicos más recientes, se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa (contra predadores de las plantas, como insectos, aves, algunos mamíferos, y otros diferentes patógenos), además actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (32, 33, 34).

El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas medicinas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas.

### **6.2.1 Metabolitos secundarios con características farmacológicas.**

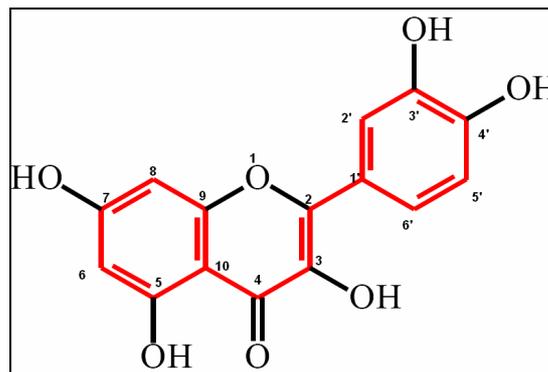
Las plantas producen decenas de miles de metabolitos secundarios, algunos se consideran productos naturales o drogas, con sus derivados y análogos, y representan alrededor de un 25% de los productos de uso medicinal. Su empleo puede ser directo o bien como precursores y modelos para la síntesis o semi-síntesis de drogas.

Los metabolitos que comúnmente presentan actividad farmacológica son los alcaloides (35, 36, 37), Taninos (38) y Lactonas Sesquiterpénicas (39).

Los flavonoides tienen importante y diversos efectos a través del espectro biológico: componentes del néctar en las flores, inhibición del crecimiento larvario, citotóxicidad, efectos sobre los procesos de oxidación ocurridos en las

mitocondrias de las células de la planta, efectos sobre la actividad enzimática, destrucción del ácido de indol-3-acético (auxina) a través “IAA Oxidasa” (40), igualmente muestran una amplia actividad anti-malárica y antiprotozoaria tanto los flavonoides como las isoflavonas (13), así como bactericida y anticancerígeno al ser citotóxica, también tiene influencia directa en el ADN. (41).

En el caso de los flavonoides (figura 3), estos pertenecen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C, o más concretamente, una funcionalidad fenilbenzopirano (3).



**Figura 3.** Estructura química de un flavonoide, la quercetina (3).

Dependiendo de la posición de la vinculación del anillo aromático a la fracción benzopirano (cromano), este grupo de productos naturales pueden dividirse en tres clases: los flavonoides (2-Fenilbenzopiranos), Isoflavonoides (3-benzopiranos) y los neoflavonoides (4-benzopiranos). Estos grupos generalmente comparten unos precursores de chalconas, y por lo tanto son biogenéticamente y estructuralmente relacionados (1)

Se conoce alrededor de 10 clases de flavonoides los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar,

generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa (3).

Es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidas a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos. Es también común, que se encuentren en mezclas como agliconas y/o glicósidos, hasta de las diferentes clases siendo esto último lo más frecuente. (42),

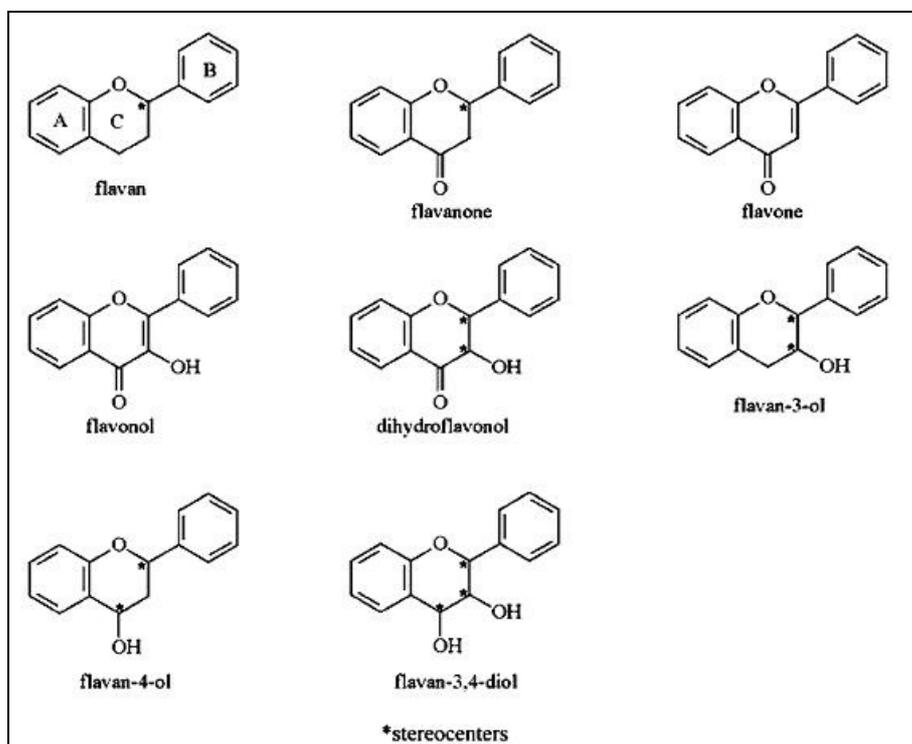
Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes, especialmente las angiospermas, y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas y se les encuentra en forma libre, también llamados agliconas flavonoides, como glicósidos, la mayoría de las veces, como sulfatos y algunas veces como dímeros (43) y polímeros (44).

Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno, enlace hemiacetal, es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar (2).

Las antocianinas, el grupo de pseudoflavonoides, por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul. (2).

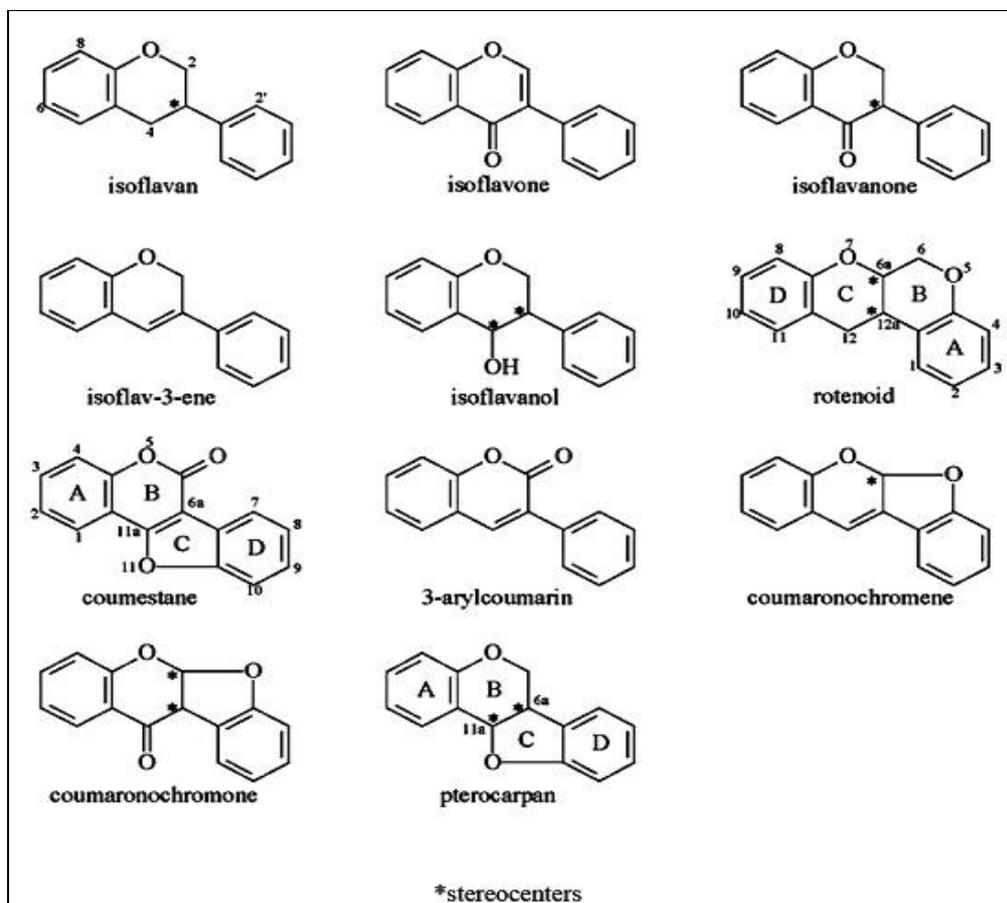
Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal, sin embargo de las raíces de *Lonchocarpus subglauscens* (leguminosas) se aislaron varios tipos tales como: flavonas, flavonoles, isoflavonas, rotenoides, chalconas y flavanoles (45)

**6.2.1.1 2-Fenilbenzopiranos (Esqueleto C6-C3-C6).** Basado en el grado de oxidación y saturaciones presentes en el heterociclo del anillo C, los flavonoides son divididos en los siguientes grupos (figura 4):



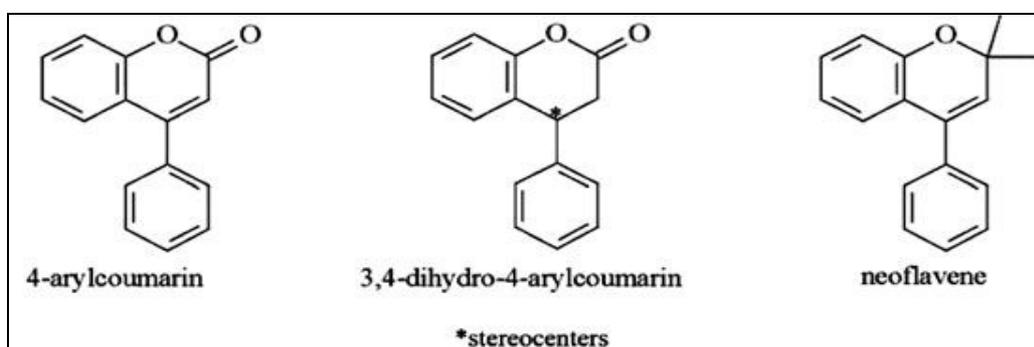
**Figura 4.** Flavonoides 2 Fenilbenzopiranos (2).

**6.2.1.2 Isoflavonoides.** Los isoflavonoides son un distintivo de la subclase de los flavonoides. Estos compuestos poseen un esqueleto de 3 fenilcromano que es biogenéticamente derivados de 1,2-aril, la migración en un precursor 2-fenilcromano. A pesar de su distribución limitada en el reino vegetal, los isoflavonoides son muy diversos en cuanto a las variaciones estructurales se refiere. Esto es consecuencia no sólo de la cantidad y complejidad de sustituyentes sobre la base del sistema 3 fenilcromano, pero también de los diferentes niveles de oxidación y la presencia de más anillos heterocíclicos. (2). Los Isoflavonoides se subdividen en los siguientes grupos (figura 5):



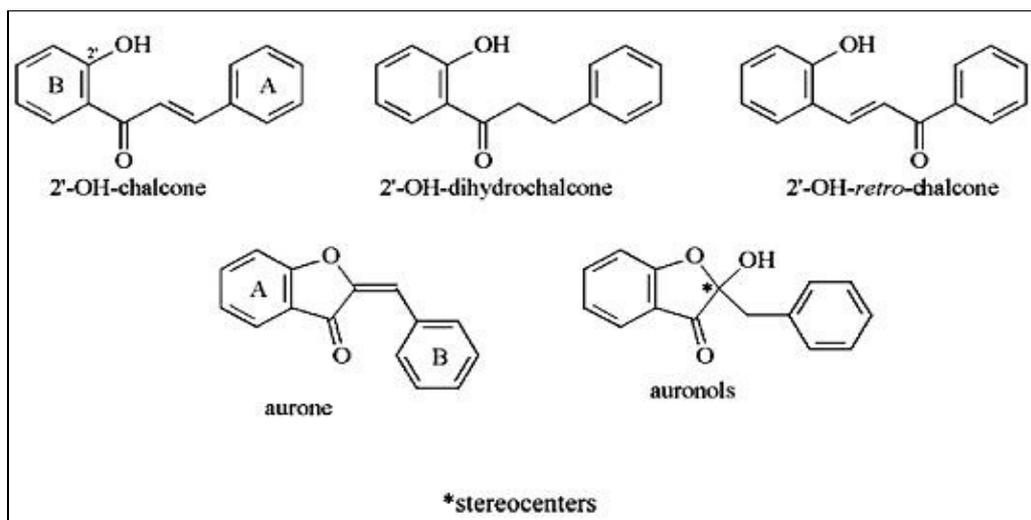
**Figura 5.** Esqueleto funcional del isoflavonoides (2).

**6.2.1.3 Neoflavonoides.** Los neoflavonoides son estructural, biogénica y estrechamente relacionados con los flavonoides y los isoflavonoides y comprenden las 4-aryl coumarinas (4-aryl-2H-1-Benzopirano-2-onas), 3,4-dihidro-4-aryl coumarinas, y neoflavonas (figura 6). (2).



**Figura 6.** Estructura de Neoflavonoides ó cumarinas.

**6.2.1.4 Flavonoides menores (pseudoflavonoides).** Productos naturales, como chalconas y auronas también contienen una columna vertebral C6-C3-C6 y se consideran pseudoflavonoides. Estos grupos compuestos de incluir la 2'-hidroxichalconas 2'-OH-dihidrochalconas 2'-OH-retro-chalcona, auronas (2 - Bencillidenecoumaranona), y auronoles. (2)



**Figura 7.** Ejemplo de pseudoflavonoides. (2).

### 6.3 Complejos organometálicos

La química organometálica con metales de transición es una parte importante del renacimiento de la química inorgánica, desde la década de 1950 a 1960, ha estado formando vínculos con la química orgánica y está empezando a hacerlos con la bioquímica. Los iones de metales de transición son ácidos de Lewis, esto significa que pueden unirse a pares libres de Ligandos L, que son bases de Lewis, para dar forma a un compuesto de coordinación o complejos  $ML_n$ . Estos compuestos de coordinación toman formas geométricas regulares en su estructura dependiendo de la distribución de los ligandos, la más comúnmente adoptada es la Octaédrica que permite a la distribución de los ligandos ocupar los seis vértices del octaedro, lo cual minimiza las distancias de enlace y maximiza las distancias

de antienlace de los ligandos L...L, lo que la hace energéticamente favorable por lo que la entropía es más enfocada al compuesto quelado. (46)

### **6.3.1 Usos de los complejos organometálicos**

Los complejos organometálicos son usados en cientos de actividades que desarrolla la química moderna, como lo es la catálisis de reacciones orgánicas, ésta es una de las aplicaciones más importantes de la química de compuestos organometálicos principalmente en la catálisis heterogénea, en el caso de la catálisis homogénea en la cual tiene lugar cuando los reactivos y el catalizador se encuentran en la misma fase, sea líquida o gaseosa. En la catálisis homogénea se tiene un acceso más fácil al mecanismo de reacción y por consecuencia se puede dominar mejor el proceso catalítico correspondiente. (47).

En el análisis la formación de compuestos de coordinación, y en especial de quelatos, tiene gran aplicación en la determinación cualitativa y cuantitativa de diversos iones metálicos debido a la gran estabilidad que presentan los compuestos formados. (48).

Entre las aplicaciones industriales más sobresalientes los complejos organometálicos tienen aplicaciones industriales en el secuestro de iones metálicos, extracción y separación de metales, entre otros. Como lo son la mayoría de los colorantes, que son compuestos orgánicos que contienen grupos cromóforos. Sin embargo, algunas de sus propiedades pueden mejorarse con iones metálicos. (48).

La gran mayoría de los metales pesados son tóxicos y los mecanismos de toxicidad son diversos, pero todos se basan en la capacidad de coordinación de los iones metálicos a las biomoléculas, a pesar de esta toxicidad, varios iones tienen aplicaciones terapéuticas:

- Tratamiento de la artritis
- Tratamiento de envenenamientos
- Tratamiento del cáncer: El compuesto más ampliamente usado es el cis-platino

### **6.3.2 Complejos organometálicos con flavonoides.**

La química inorgánica en los últimos 50 años ha tenido un nuevo renacer debido a que cada vez forma alianzas con las demás ramas de la química, el principal puente que se utiliza para esto son los complejos organometálicos, (45) que usan metales de coordinación con compuestos orgánicos, estos organometales son de gran uso en la bioinorgánica pues complejos como el cis-platino son utilizados en el tratamiento del cáncer (49).

Los flavonoides acoplados a metales de coordinación en muchos casos muestran cambios en sus cualidades antibacterianas (50), antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas (51), citotóxicas (11) entre otras; (52).

En algunos casos estas actividades aumentan como el Quercetin acoplado a metales de coordinación de valencia (II), el cual aumenta sus cualidades antioxidativas y antitumorales (11) y en otras disminuyen como el mismo Quercetin acoplado a Vanadio, el cual disminuye sus actividades citotóxicas (23).

Estos complejos tienen un amplio campo de estudio pues sus comportamientos fisicoquímicos como conductividad, disociación, entre otras, dependen mucho de las interacciones ligando-ligando y metal ligando, interacciones que se estudian en el campo de la teoría de campo cristalino, ácidos y bases duros y blandos y química cuántica, comprobados por RAMAN. (22; 24; 53)

## **6.4 Microorganismos**

En el amplio espectro de usos de los flavonoides se encuentra su actividad antibacteriana y antifúngica (1).

### 6.4.1 Bacterias

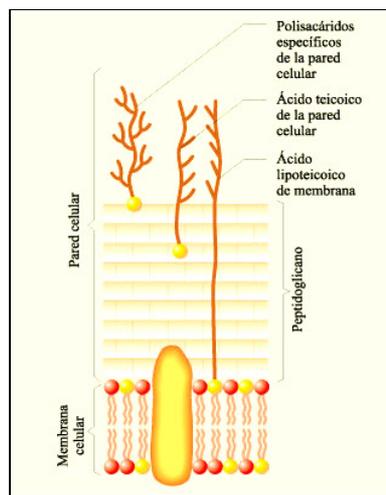
Las bacterias son organismos unicelulares sencillos de vital importancia y útiles para la humanidad, son procariontes, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. Solamente el 1% de ellas producen enfermedades, las cuales son cada vez más difíciles de combatir por el abuso indiscriminado de antibióticos.

(54, 55)

Estos microorganismos poseen una estructura relativamente simple, sin embargo la pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una capa delgada de peptidoglucano, así como una membrana externa. (54; 56)

#### 6.4.1.1 Bacterias grampositivas

La pared celular de las bacterias grampositivas es normalmente gruesa y homogénea, está compuesta principalmente por peptidoglucano, el cual con frecuencia contiene un puente peptídico, sin embargo, la pared celular de las bacterias grampositivas poseen grandes cantidades de ácidos teicoicos, polímeros de glicerol o ribitol unidos por grupos fosfatos (figura 8).



**Figura 8.** Esquema de la pared celular de las grampositivas (57)

Aminoácidos como la D-alanina o azúcares con la glucosa son unidos a los grupos glicerol y ribitol, los ácidos teicoicos son conectados con el peptidoglucano por enlaces covalentes con los seis grupos hidroxilos de el ácido N-acetilmurámico o los lípidos de la membrana plasmática, estos son llamados ácidos lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos se extienden en la superficie del peptidoglucano. Las funciones de estas moléculas no están muy claras pero son importantes en la estructura de la pared celular de estas bacterias, los ácidos teicoicos no están presentes en las bacterias gram negativas. (58)

Entre los géneros más representativos de las grampositivas se encuentra el de los *Staphylococcus*, los cuales son células esféricas, por lo general dispuestas en forma de racimos, al igual que en agrupaciones irregulares. Estas crecen rápidamente en muchos tipos de medios y se activan metabólicamente, fermentando carbohidratos y produciendo pigmentos que varían del blanco al amarillo oscuro. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y las membranas mucosas de los seres humanos, otros causan supuración, formación de absceso, una variedad de infecciones de tipo piógeno, e incluso septicemia mortal. (59).

El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 35 especies. Las tres principales especies de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. (59).

*Staphylococcus aureus* es coagulasa positivo, lo que la diferencia de las otras especies. Por esto es un importante patógeno para los seres humanos. (59).

Los estafilococos patógenos a menudo causan hemólisis de la sangre, coagulación del plasma, y producen una variedad de enzimas extracelulares y toxinas. El tipo más común de intoxicación alimentaria es causada por una enterotoxina estafilocócica estable al calor. Los estafilococos tienden a

desarrollar rápidamente resistencia a muchos agentes antimicrobianos y presentar problemas a la hora de ser tratados. (59).

La mayoría de las personas portan estafilococos en la piel y en la nariz o la garganta. Incluso si la piel puede ser limpiada de estafilococos (por ejemplo, en el eccema), la reinfección por gotitas se producirá casi de inmediato. (59).

Muchos medicamentos antimicrobianos tienen algún efecto en contra de estafilococos *in vitro*. Sin embargo, es difícil de erradicar estafilococos patógenos de las personas infectadas, por la facilidad de estos microorganismos para desarrollar rápidamente resistencia a muchos antibióticos y los fármacos no pueden actuar en la zona central necrótica de una lesión supurativa. También es difícil de erradicar el *S aureus* en estado de resistencia y sólo un pequeño porcentaje de cepas de *S aureus* son sensibles a la penicilina G. (59).

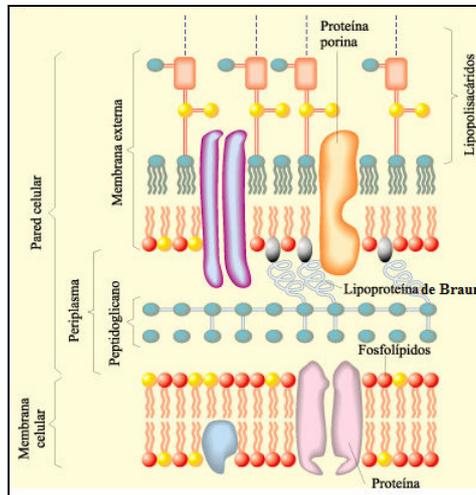
Con el *S epidermidis* las infecciones son difíciles de curar porque se producen en lugares donde las bacterias se pueden secuestrar en un biopelícula. *S epidermidis* es a menudo más resistente a los antimicrobianos, de lo que lo es *S aureus*; aproximadamente el 75% de cepas de *S epidermidis* son resistentes a diferentes tipos de antibióticos. (59).

Muchas de los fármacos usados contra los estafilococos resistentes a antimicrobianos son alérgicos para algunos pacientes, lo que dificulta su tratamiento. (59)

#### **6.4.1.2 Bacterias gramnegativas**

La pared celular de las bacterias gramnegativas es mucho más compleja que la de las grampositivas (figura 9), la delgada capa de peptidoglucano de la membrana plasmática constituye solamente entre el 5-10% de el peso de la pared, la proteína más abundante en la membrana es la lipoproteína de Braun, la cual es una pequeña lipoproteína unida covalentemente al péptidoglucano desde bajo la membrana hasta afuera terminando en un grupo hidrofóbico, el exterior de la

membrana y el peptidoglucano son firmemente unidos por estas lipoproteínas por lo cual se forma una sola unidad (59).



**Figura 9.** Esquema de la pared celular de las bacterias gramnegativas (57)

En la pared de las bacterias gramnegativas se pueden diferenciar tres zonas (figura 9):

1. La membrana citoplasmática.
2. El espacio periplasmático, ubicado entre la membrana citoplasmática y el peptidoglucano, y una fina capa de peptidoglucano.
3. Membrana externa que contiene fosfolípidos, el lipopolisacárido (LPS) característico de estas bacterias y proteínas (proteínas de membrana externa). Esta capa está estrechamente unida al peptidoglucano y se la considera un componente de la pared celular de las bacterias gramnegativas. (58).

En el lipopolisacárido se pueden distinguir tres componentes diferentes bioquímicamente.

- La porción lipídica, (lípidio A), está inmersa en el centro de la membrana externa.
- La porción polisacáridica (antígeno O) en su sector externo.

- En el núcleo se encuentran los lipopolisacáridos entre estos el lípido A y el antígeno O, es también un polisacárido.

El antígeno O es muy variable en su composición entre las diferentes familias y especies de bacterias gramnegativas, en cambio, el polisacárido del núcleo es constante en las diferentes bacterias gramnegativas. (58).

Las enterobacterias son un gran grupo heterogéneo de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el tracto intestinal de los seres humanos y animales. La familia incluye muchos géneros (*Escherichia*, *Shiguella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, y otros). Algunos organismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la flora normal y de paso causa enfermedad, mientras que otros, *salmonella* y *shiguella*, regularmente son patógenas para los seres humanos. Las enterobacterias son aerobios o anaerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja, y producen una variedad de toxinas y otros factores de virulencia.

*E coli* es un bacilo anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas y produce normalmente pruebas positivas para indol, lisina descarboxilasa, fermentación de manitol, glucosa y lactosa. (54)

Existen diferentes clases de *E. coli*, y esta clasificación depende del tipo de patología que generan (59):

- *E. coli* Enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* Enterotoxigénicas (ETEC)
- *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH)
- *E. coli* Enteroinvasivos (EIEC)
- *E. coli* Enteroagregativo (CEEA)

Otro género de importancia clínica en las bacterias gramnegativas es *Klebsiella*, las especies de este género exhiben un crecimiento de mucoide, grandes cápsulas de polisacáridos, y falta de movilidad, suelen dar pruebas positivas de la lisina descarboxilasa y citrato. Muchas especies de enterobacterias dan positivas las pruebas de movilidad, citrato, y ornitina descarboxilasa y producir gas a partir de la glucosa. (59)

Los representantes más importantes son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Otras especies con importancia en clínica son *Klebsiella pneumoniae*, subespecies *ozaenae* y *rhinoscleromatis*. (60)

La mayor parte de las cepas pueden absorber glucosa y citratos como única fuente de carbono. De las cuatro especies de *Klebsiella*, *Klebsiella oxytoca* es la única que produce indol. (60)

Las *Klebsiellas* se detectan en tierra, plantas y agua, además, en alrededor del 30% de la población sana se encuentran en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias superiores. Las enfermedades provocadas por *Klebsiella* son principalmente neumonía (neumonía de Friedländer), sepsis e infección urinaria. No obstante, en ocasiones también pueden provocar endocarditis, meningitis, enteritis o infecciones de partes blandas. (60)

Las *Klebsiellas* presentan resistencia primaria a penicilina G y la ampicilina. La causa de la resistencia natural son las betalactamasas que, en gran medida, son neutralizadas por los inhibidores de betalactamasas. (60)

#### **6.4.2 Hongos**

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza,

contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas. (61)

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. (61)

La estructura de las células de los hongos es muy diferente al de las bacterias que aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las de las plantas en la composición de la pared celular y en que carecen de cloroplastos y clorofila, y de las humanas en que tienen pared celular y en la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica.

Por el exterior de la membrana citoplásmica, presentan una pared celular que está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetilglucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas en medios de cultivo sólidos. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales (3-10 x 5-30  $\mu\text{m}$ ) denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria. Un pequeño grupo de hongos, pero de gran importancia en Micología clínica, presentan tanto un crecimiento levaduriforme como miceliar. Estos hongos se

denominan dimorfos y típicamente presentan un crecimiento filamentosos a 25 °C y un crecimiento levaduriforme a 37°C, por ejemplo, en el interior del cuerpo humano. (61)

Las especies de *Candida* tienen un dimorfismo especial ya que puede presentar un crecimiento levaduriforme y filamentosos simultáneamente (62). Existen más de 150 especies de *Candida*, pero sólo nueve son consideradas como patógenos para el ser humano. Éstas son: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Candida keyfir*, *Candida lusitanae*, *Candida glabrata* y *Candida dubliniensis* .(63)

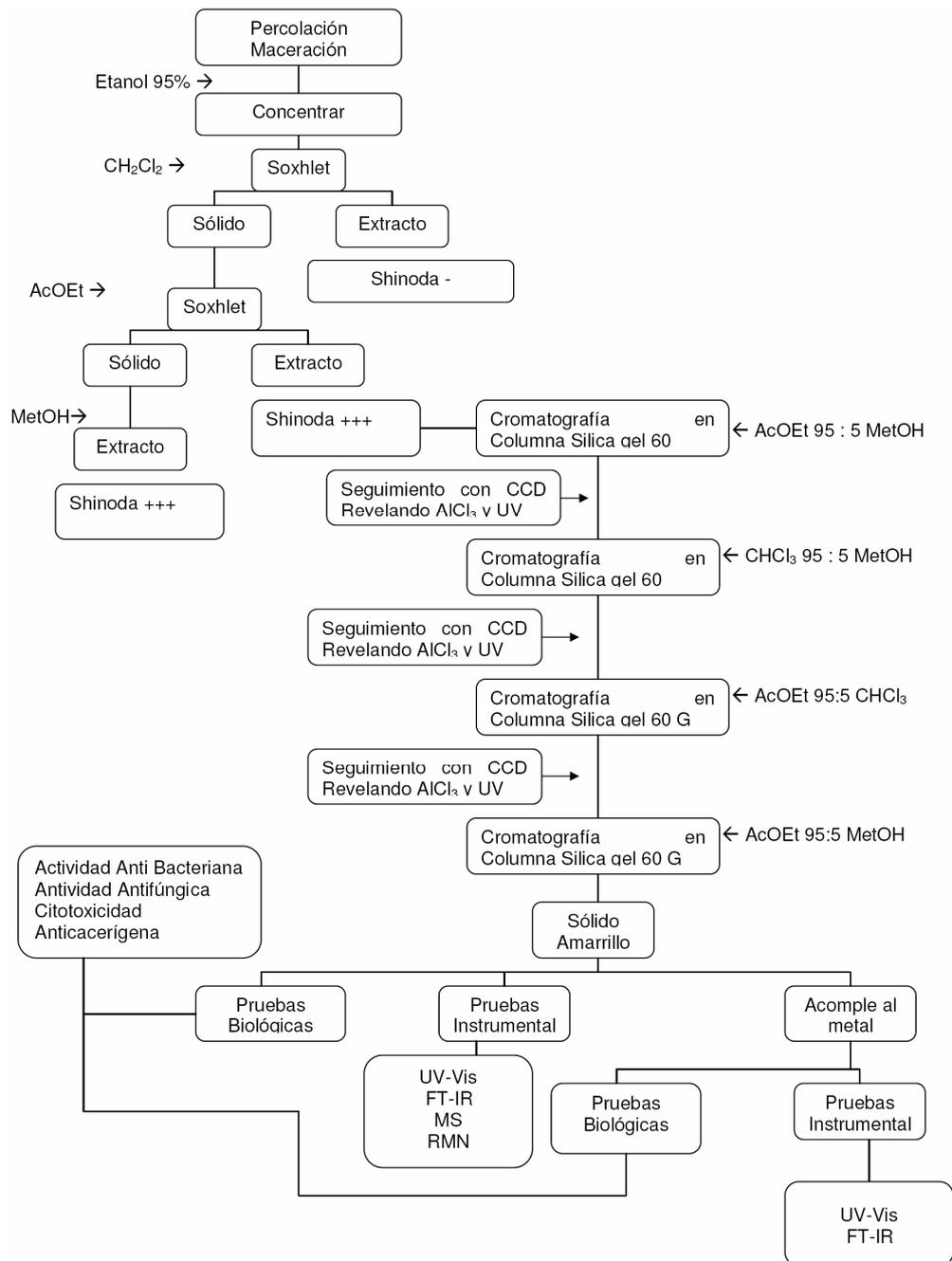
La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. Durante el embarazo, la vejez o la infancia son frecuentes las candidiasis superficiales y lo mismo sucede en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos. (63)

*Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. *C. albicans* puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas y *Candida guilliermondii* endocarditis, enfermedad osteoarticular y vaginitis. (61; 63)

Para el tratamiento correcto de las candidiasis se debe intentar eliminar o controlar las enfermedades subyacentes y erradicar la infección mediante el empleo de antifúngicos apropiados. *C. guilliermondii* se encuentra entre las especies de *Candida* resistentes a la mayoría de los antimicóticos convencionales, (63 64)

## 7. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en la realización de este proyecto fue la siguiente (figura 10).



**Figura 10.** Esquema de la metodología realizada para el aislamiento, purificación y caracterización de un flavonoide presente en *Brownea ariza B*, y la evaluación de su actividad biológica como compuesto puro y acoplado a cobre.

## 7.1 Reactivos usados

La mayoría de los solventes usados para la extracción y purificación fueron grado analítico: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), etanol absoluto ( $\text{EtOH}$ ) y metanol ( $\text{MetOH}$ ) de la casa comercial Merck (Darmstadt, Germany), acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ) de la casa comercial Mallinckrodt (USA) y para la preparación de los extractos se usan etanol, diclorometano y acetato de Etilo de grado comercial suministrado por Profinas, solventes redestilados en un equipo de rectificación con columna vigraux de 31 platos de 100 cm de longitud.

Las cromatoplasmas (20 x 20 cm 0.25 mm) en Sílica gel 60F<sub>254</sub>, la Sílica Gel 60 de tamaño de partícula 0.063-0.200 mm para cromatografía en columna (CC), alúmina estandarizada 90 para cromatografía en columna por adsorción por el método de Brockman, y la Sílica Gel 60G para cromatografía en capa celgada (CCD) fueron de la casa comercial Merck (Darmstadt, Germany).

Los reactivos de desplazamiento para UV-Vis, Acetato de Sodio ( $\text{AcONa}$ ), Ácido Bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) Ácido Clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ) y Cloruro de Aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) fueron adquiridos a la casa comercial Merck (Darmstadt, Germany), al igual que Acetato de Cobre ( $\text{Cu}(\text{AcO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), el Magnesio Metálico ( $\text{Mg}^0$ ), Zinc Metálico ( $\text{Zn}^0$ ) y el Sodio metálico ( $\text{Na}^0$ ).

El anhídrido acético anhidro ( $\text{CH}$ ) y la piridina ( $\text{py}$ ) anhidra para las reacciones de acetilación fueron suministrados por Carlo Erba Reagents (Italy), al igual que el Sulfato de Sodio Anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

Para las pruebas antimicrobianas se usó Agar Mueller Hinton, Agar Sabouraud y Agar Base Sangre fabricados por Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK), el Indicador de Resazurina (Resazurina sal sódica), el antibiótico/antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina g, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 $\mu\text{g}$ /mL de

anfotericina B) para bacterias y levaduras y Dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

## **7.2 Extracción del ligando flavonoide**

Para la extracción del ligando, se busca un flavonoide con sustituyentes hiroxilo (OH), se realizó una revisión bibliográfica de los proyectos de grado realizados en el programa de Química de la Universidad del Quindío con el fin de darle un valor agregado a los descubrimientos y contribuciones fitoquímicas preliminares hechas por anteriores investigadores del programa a una gran variedad del plantas de la región.

Para este fin se escogió el trabajo de Edid, 2003 (12) el cual realizó la contribución fitoquímica preliminar de la especie *Brownea ariza B.* una planta oriunda de las regiones cafeteras y con una amplia difusión en las tierras cálidas del Quindío y Norte del Valle, las razones que determinaron trabajar con dicha especie fueron, los investigadores que realizaron el estudio fitoquímico preliminar encontraron una gran cantidad de flavonoides y avanzaron en la separación de uno de ellos, además el poco estudio que posee esta planta ofrece la posibilidad de lograr grandes avances a la hora de realizar una caracterización e identificación de uno de sus compuestos y determinar su capacidad antimicrobiana en algunas bacterias gramnegativas, grampositivas y en levaduras, igualmente su capacidad citotóxica y anticancerígena en la línea celular de mieloma murina SP2/0-Ag14.

Para tal fin se tomaron 850 g de hojas de *Brownea ariza B.* las cuales se secaron durante 72 horas en estufa de recirculación de aire a 40 °C, (JP Selecta), el material vegetal fue molido en molino marca Corona con motor eléctrico siemens de 0.5 hp, luego se procedió a la preparación de un extracto etanólico utilizando etanol 95% comercial por medio de la técnica maceración-percolación, en un percolador de borosilicato de 3 litros, dejando en maceración durante 3 horas y

luego drenando a un flujo de a 60 gotas/min. Se añadió etanol fresco cada vez, durante 10 días, hasta lograr un arrastre nulo por parte del etanol, este seguimiento se hizo por CCD.

Se retiró el etanol evaporando a presión reducida a una temperatura inferior de 40°C en rotaevaporador (Labconco), todos los procesos que requirieron de refrigeración se hicieron con un baño de recirculación de agua termostataado de 25°C-0°C (JP Selecta).

Se hizo fraccionamiento con distintos solventes con el ánimo de lograr separación de diferentes porciones de compuestos en cada una, primero se empleó un solvente de polaridad baja como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, luego AcOEt de polaridad media, y finalmente MetOH de polaridad alta, así se garantizó que los flavonoides de baja polaridad, como flavonoides metilados, acetilados etc, quedaran en el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, los de polaridad media en AcOEt, como aglicones de flavonoides o glicósidos de flavonoides en los cuales el aglicón esté sustituido, y los más polares en metanol, como los glicósidos de flavonoides altamente hidroxilados. (3). Por la técnica maceración y soxhlet, colocando en un equipo de extracción soxhlet de 500 mL el extracto seco con el solvente respectivo, adicionando el extracto seco, se retiró el solvente a presión reducida y se obtuvieron 10 g de extracto seco con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La fracción de AcOEt se preparó similarmente utilizando Acetato de Etilo Comercial, se retiró igualmente el solvente a presión reducida obteniendo 30 g de extracto seco.

Los restantes 14 g de extracto fueron solubilizados en Metanol, teniendo así el extracto metanólico, el cual dio positivo la reacción de shinoda, la cual consiste en adicionar Mg<sup>0</sup> en polvo seguida de HCl 37%, a una solución alcohólica que

contenga flavonoides, la cual pasa a un color rosado-rojo-violeta si estos están presentes.

Se realizó cromatografía en capa delgada empleado cada uno de los sistemas de elusión una lista de solventes para flavonoides publicada por Andersen y Markham, 2006 (1) con el fin de identificar la presencia de flavonoides, la abundancia, y la factibilidad de separación de estos.

**Tabla 2.** Solventes y sistemas de solvente para análisis de flavonoides por cromatografía en capa delgada (CCD) (1)

<b>Flavonoides aglicones</b>	
EtOAc-i-PrOH-H <sub>2</sub> O	100:17:13
EtOAc-CHCl <sub>3</sub>	60:40
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	96:4
Toluene-CHCl <sub>3</sub> -MeCOMe	8:5:7
Toluene-HCOOEt-HCOOH	5:4:1
Toluene-EtOAc-HCOOH	10:4:1
Toluene-EtOAc-HCOOH	58:33:9
Toluene-EtCOMe-HCOOH	18:5:1
Toluene-dioxano-HOAc	90:25:4
<b>Flavonoides glicósidos</b>	
n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	65:15:25
n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	3:1:1
EtOAc-MeOH-H <sub>2</sub> O	50:3:10
EtOAc-MeOH-HCOOH-H <sub>2</sub> O	50:2:3:6
EtOAc-EtOH-HCOOH-H <sub>2</sub> O	100:11:11:26
EtOAc-HCOOH-H <sub>2</sub> O	9:1:1
EtOAc-HCOOH-H <sub>2</sub> O	6:1:1
EtOAc-HCOOH-H <sub>2</sub> O	50:4:10
EtOAc-HCOOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	100:11:11:26
EtOAc-HCOOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	25:2:2:4
THF-toluene-HCOOH-H <sub>2</sub> O	16:8:2:1
CHCl <sub>3</sub> -MeCOMe-HCOOH	50:33:17
CHCl <sub>3</sub> -EtOAc-MeCOMe	5:1:4
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	65:45:12

(Continuación tabla )	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	40:10:1
MeCOMe-butanone-HCOOH	10:7:1
MeOH-butanone-H <sub>2</sub> O	8:1:1
<b>Flavonoide glucoronidos</b>	
EtOAc-Et <sub>2</sub> O-dioxane-HCOOH-H <sub>2</sub> O	30:50:15:3:2
EtOAc-EtCOMe-HCOOH-H <sub>2</sub> O	60:35:3:2
<b>Flavanona aglicón</b>	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -HOAc-H <sub>2</sub> O	2:1:1
<b>Flavanona glicósidos</b>	
CHCl <sub>3</sub> -HOAc	100:4
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-HOAc	90:5:5
n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	4:1:5 (capa superior)
<b>Chalconas</b>	
EtOAc-hexane	1:1
<b>Isoflavonas</b>	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	92:8
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	3:1
<b>Glicósidos de Isoflavonas</b>	
n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	4:1:5 (capa superior)
<b>Dihidroflavonoles</b>	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-HOAc	7:1:1
<b>Biflavonoides</b>	
CHCl <sub>3</sub> -MeCOMe-HCOOH	75:16.5:8.5
Toluene-HCOOEt-HCOOH	5:4:1
Antoncianidinas y Antocianinas	
EtOAc-HCOOH-2 M HCl	85:6:9
n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	4:1:2

(Continuación tabla...)	
EtCOMe-HCOOEt-HCOOH-H <sub>2</sub> O	4:3:1:2
EtOAc-butanona-HCOOH-H <sub>2</sub> O	6:3:1:1
<b>Proantocianidinas</b>	
EtOAc-MeOH-H <sub>2</sub> O	79:11:10
EtOAc-HCOOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	30:1.2:0.8:8

Se tomaron 30 g de extracto acetanólico y se realizó cromatografía en columna asistida por vacío (CC-Flash), AcOEt-MetOH (95:5) usando como soporte Sílica gel 60, recogiendo 30 fracciones, realizando seguimiento con CCD en cromatoplasmas de Sílica gel 60F<sub>254</sub>, revelando con AlCl<sub>3</sub> 5%/MetOH 100% observando una mancha amarilla a los 366 nm en gabinete UV (Camag), las fracciones de la 5 a la 15 se unieron y se llevaron a CC-Flash usando como soporte Sílica gel 60 y como eluente CHCl<sub>3</sub>-MetOH (95:5) logrando 30 fracciones, a las cuales se les realizó igual seguimiento con CCD.

De las 30 fracciones se tomaron las fracciones 15 a 30 (por su similitud apreciada mediante CCD) y se realizó cromatografía preparativa en columna, usando como soporte sílica gel 60G para CCD y como eluente AcOEt-CHCl<sub>3</sub> (95:5), logrando 15 fracciones, de las cuales se tomaron de la 4 a la 10 para unificarlas y se realizó cromatografía preparativa en columna usando como soporte sílica gel 60G para CCD con eluente AcOEt-MetOH (95:5). Obteniéndose un sólido amarillo amorfo, que mostraba un solo punto a un R<sub>f</sub> de 0.84 en cromatografía de capa fina 2D.

### 7.3 Caracterización del flavonoide

#### 7.3.1 Reacciones de coloración

El sólido amarillo se sometió a las diferentes pruebas cualitativas para lograr una identificación del tipo de compuesto a tratar, y verificar si en realidad se trataba de un flavonoide.

**7.3.1.1 Shinoda o Whismaster.** Al sólido disuelto en Metanol se le adiciona un poco de  $Mg^0$  en polvo, y una gota de HCl 37%, la aparición de una coloración roja, es prueba positiva para el núcleo benzopirona. (30).

**7.3.1.2 Ensayo con Zn/HCl.** Al remplazar el  $Mg^0$  por el  $Zn^0$  en el procedimiento del ensayo de Shinoda, solamente los dihidroflavonoles (o flavononoles) producen coloraciones rojo-violetas. Las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.

**7.3.1.3 Ensayo de Pacheco.** El sólido flavonoide se calienta sobre una llama con unos pocos cristales de AcONa y 0.1 mL de anhídrido acético. Luego con 0.1 mL de HCl 37% Los dihidroflavonoles producen un color rojo característico. Las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavanonas dan una respuesta negativa.

**7.3.1.4 Ensayo de Tollens.** Este ensayo permite determinar la presencia de glicósidos en la molécula de flavonoide, la prueba consiste en la reducción de  $[Ag(NH_3)_2]NO_3$  a  $Ag^0$  la cual se precipita en las paredes del tubo mostrando un espejo de plata

**7.3.1.5 Prueba de Fehling.** Esta prueba permite determinar la presencia de azúcares reductores por medio de la precipitación de CuO de color rojo ladrillo

### **7.3.2 Análisis electrónico UV-VIS**

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

Según el comportamiento de estas bandas con los reactivos de desplazamiento, se dio una idea de la estructura del flavonoide, que tipo de flavonoides, que sustituciones tiene y en que carbono de cada uno de los anillos A ó B. (1; 3; 65)

Los espectros electrónicos fueron tomados en un espectrofotómetro UV-Vis HP 8453, con una celda de cuarzo de un centímetro (1 cm) de camino óptico. perteneciente al Programa de Química de la Universidad del Quindío.

**7.3.2.1 Espectro de flavonoide en MetOH.** Para tomar el espectro UV-Vis del flavonoide en metanol, se preparó una solución al 0.26g/L en metanol anhidro.

**7.3.2.2 Espectro de flavonoide en MetOH-AcONa.** A una solución de 0.26 g/L de flavonoide en metanol, se adicionó un 5% de AcONa previamente seco, la solución se tornó de un color amarillo más intenso que el de la solución original.

**7.3.2.3 Espectro de flavonoide en MetOH-AcONa-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.** A la solución de flavonoide y AcONa se adicionó 5% de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> secado con anterioridad a 110°C, la solución se tornó de un amarillo igual al obtenido con el flavonoide en solución con MetOH.

**7.3.2.4 Espectro de flavonoide en NaOH.** Para este análisis se preparó la solución metanólica del flavonoide a 0.26 g/L y se adicionó una solución de NaOH en metanoles un exceso.

**7.3.2.5 Espectro de flavonoide en MetOH-AlCl<sub>3</sub>.** Para este ensayo se prepararon varias soluciones que contenían 0.26 g/L del flavonoide con diferentes concentraciones de AlCl<sub>3</sub>, corriéndose el espectro a una concentración de 1.5% de AlCl<sub>3</sub>.

**7.3.2.6 Espectro de flavonoide en MetOH-AlCl<sub>3</sub>-HCl.** Se añadió HCl a la solución con la cual se tomó el espectro de MetOH-AlCl<sub>3</sub> con el fin de determinar un cambio en este, para ello se añadió HCl al 5% gota a gota hasta que no se presenten más cambios.

### **7.3.3 Espectroscopia IR**

La espectroscopia IR no es un determinante de interés a la hora de la identificación de flavonoides, pero se emplea ampliamente para la determinación de los grupos funcionales y de sustituciones OH. El espectro de Infrarrojo se tomó en un equipo Thermo Nicolet 380, en pastilla de KBr., perteneciente al Programa de Química de la Universidad del Quindío.

### **7.3.4. Espectrometría de Masas**

La espectrometría de masas es una técnica de gran utilidad a la hora de la elucidación estructural de compuestos orgánicos pues a parte de dar el peso molecular, da sus fragmentos, los cuales son generados por ionización química (CI) positiva o negativa, o por ionización por fuente de electrones (EI), fragmentos que ayudan a determinar cada parte de la molécula. El fragmentograma se obtuvo mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a masas, GC-MS, debido a que la posible presencia de azúcares hace imposible la caracterización de azúcares por GC igualmente se obtuvo un fragmentograma del compuesto puro sin derivatizar por el método de espectrometría de masas por inyección directa, DI-MS. Ambos fueron realizados en un equipos de cromatografía de gases acoplado a masas por ionización de fuente de electrones con analizador de transmisión cuadrupolar (GC-MS-EI-QP) Shimadzu GCMS-QP 2010, perteneciente a el Laboratorio de Calidad de Productos Naturales, Grupo de Polifenoles, Universidad Tecnológica de Pereira (UTP). Parámetros usados se muestran en el Anexo 1.

**7.3.4.1. Derivatización Del Flavonoide:** Se procedió a la preparación de un derivado acetilando el flavonoide en presencia de piridina y anhídrido acético dejando en reflujo con agitación magnética durante 3 horas, se utilizaron solventes secos y redestilados, la piridina se secó con NaOH y el Anhídrido Acético con sulfato de sodio anhidro.

**7.3.4.1 Masas Por Inyección Directa:** Para realizar este procedimiento simplemente se disolvieron .7 mg de flavonoide en CHCl<sub>3</sub>-MetOH (1:1) y se inyectó al Equipo.

### **7.3.5 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN <sup>1</sup>H)**

El espectro de RMN <sup>1</sup>H C<sup>13</sup>, COSY, DEPT, HMBC, HSQC fueron tomados usando 24 mg de muestra disuelta en d<sup>6</sup>-DMSO, en un Equipo de RMN BRUKER AMX-400 MHz perteneciente al Departamento de Química de la Universidad del Valle.

## **7.4 Actividad biológica del flavonoide**

Las actividades biológicas realizadas al flavonoide fueron, antibacterial (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans* y *Candida guilliermondii*), citotóxica (células vero) y anticancerígena (mieloma murino).

### **7.4.1 Actividad antimicrobiana.**

La actividad antimicrobiana del flavonoide se realizó por la técnica de microdilución-titulación en placa, la cual fue postulada para el estudio de actividades biológicas de compuestos fitoquímicos puros, pues este método consume poca cantidad de compuesto debido a que posee una buena sensibilidad, bajo límite de detección y bajo límite de cuantificación. (66; 67; 68).

**7.4.1.1 Obtención de microorganismos.** Se utilizaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto flavonoidal, los siguientes microorganismos:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*

*Klebsiella oxytoca*

*Escherichia coli*

*Candida albicans*

*Candida guilliermondii*

Las bacterias se obtuvieron de aislados clínicos identificados en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío. Se recultivaron en agar sangre, incubadas a 37°C durante 24 horas. En relación a *Candida albicans* se utilizó la cepa de referencia ATCC 90028 y *Candida guilliermondii* la cepa de referencia ATCC 20862 cultivadas en agar Sabouraud a 37°C durante 48 horas.

**7.4.1.2 Método de microtitulación en placa con indicador de Resazurin.** Para evaluar la actividad antimicrobiana del flavonoide y su Mínima Concentración Inhibitoria (IMC) se realizó el método de microtitulación en placa usando indicador de Resazurin (66; 67; 68).

Se realizó cultivo con dos muestras problema las cuales fueron el compuesto flavonol y el antibiótico/antimicótico (10.000 unidades/mL de Penicilina G, 10mg/mL de Sulfato de Estreptomicina y 25µg/mL de Anfotericina B).

Las concentraciones en las que se manejaron las muestras fueron de 1200 µg/mL en DMSO 10% v/v, en dilución seriada hasta 2,34 µg/mL. Se sembró en placas IMMULON 1 estériles de 96 pozos como se indica en la tabla 3, donde C1 fue el Control Positivo, C2 fue el Control Negativo, Bact fueron las diferentes bacterias y Lev fue *C. albicans* y *C. guilliermondii*

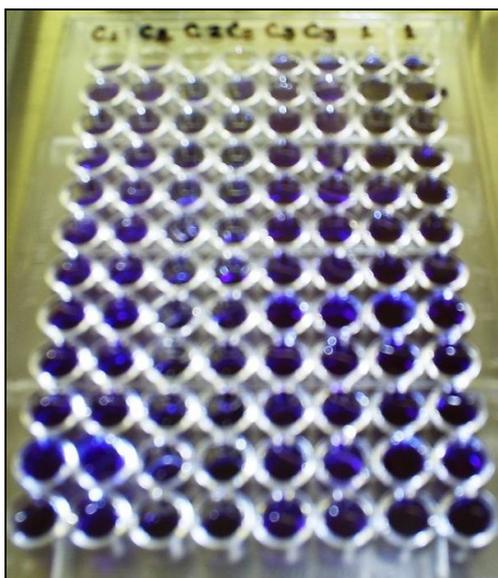
**Tabla 3.** Volúmenes usados en el método de microtitulación en placa.

	C1	C2	Bact		Lev	
FlavonoI <sup>a</sup>	-	-	100 µl	-	100 µl	-
Antibiótico/Antimicótico <sup>a</sup>	-	-	-	100 µl	-	100 µl
Solución Salina 0.9 % p/v	-	100µl	-	-	-	-
Indicador de Resazurin (3mg/mL)	10µl	10µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Medio de Cultivo Mueller Hinton	50µl	50µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Microorganismo	10µl	-	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

a. En las diferentes diluciones

La suspensión utilizada para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. oxytoca* y *E. coli* fue  $5 \times 10^5$  ufc/mL, y para *C. albicans* y *C. guilliermondii* fue de  $5 \times 10^6$  ufc/mL estandarizadas a D.O 0.400 a 620 nm. Cada muestra se realizó por duplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para bacterias y 48 horas para levaduras.

El resazurin es un indicador de oxido-reducción el cual es de color azul en medio estéril (figura 11), y cambia a color rosa cuando es reducido por la oxido-reductasa producidas por las células viables, (68). Debido a que el método es una titulación, donde el indicador es resazurin, el analito, los microorganismos y el valorante, las muestras problemas, se toma como punto final el último pozo que se encuentre de coloración azul, y este será tomado como la IMC (MIC) en µg/mL.



**Figura 11.** Placa de Elisa antes de ser incubada,

#### **7.4.2 Ensayo de citotoxicidad**

La línea celular VERO (células de riñón de mono verde: *Cercopithecus aethiops*) (ATCC:CCL-81) fue donada por el Grupo de Inmunología Molecular -GYMOL- de la Universidad del Quindío, la cual se mantuvo con medio DMEM (Invitrogen, USA), Antibiótico/Antimicótico 1X (Sigma, USA), L-Glutamina 1X (Sigma USA), suero fetal bovino (Invitrogen, USA) al 5% e incubado 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en cajas de cultivo celular Nunc de 25 mL. Se realizó pase a placa de 96 pozos de  $1,2 \times 10^6$  células/pozo y se agregaron 100 µl de las muestras (compuesto en concentraciones de 1200 µg/mL en DMSO 10% v/v, en dilución seriada hasta 37.5 µg/mL) y se mantuvieron en iguales condiciones de suplementos e incubación por 48 horas, al cabo de este tiempo se realizó conteo del número de células viables, por exclusión con azul Tripán. En cada caso se determinó la dosis citotóxica 50% (DC<sub>50</sub>), concentración que reduce el número de células viables al 50%. Como control negativo se utilizó el cultivo celular sin adición de la muestra, al cual también se le realizó conteo celular como punto de comparación del crecimiento logarítmico a las 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### **7.4.3 Ensayo de actividad anticancerígena**

La línea celular de Mieloma Murino SP2/0-Ag14 (ATCC:CRL-1581) fue donada por el Grupo de Inmunología Molecular -GYMOL- de la Universidad del Quindío, la cual se mantuvo con medio DMEM (Invitrogen, USA), Antibiótico/Antimicótico 1X (Sigma, USA), L-Glutamina 1X (Sigma USA), suero fetal bovino (Invitrogen, USA) al 5% e incubado 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en cajas de cultivo celular Nunc de 25 mL. Se realizó pase a placa de 96 pozos de  $1,2 \times 10^6$  células/pozo y se agregaron 100 µl de las muestras (compuesto en concentraciones de 1200 µg/mL en DMSO 10% v/v, en dilución seriada hasta 37.5 µg/mL) y se mantuvieron en iguales condiciones de suplementos e incubación por 24 y 48 horas, al cabo de las cuales se realizó conteo celular de número de células viables, por exclusión con azul Tripán, para determinar la disminución o no del crecimiento celular en presencia del flavonoide. Como control negativo se utilizó el cultivo celular sin adición de la muestra, al cual

también se le realizó conteo celular como punto de comparación del crecimiento logarítmico en los diferentes intervalos de tiempo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### **7.5 Acople del flavonoide al metal Cobre (II)**

El acople del flavonoide al metal se realizó siguiendo la técnica descrita por Bullatov 1986, (69), la cual es la misma que ha sido reportada en varios trabajos con bioinorgánica de flavonoides, (11; 70).

En un balón de tres bocas de 50 mL, se adicionaron 10 mg del flavonoide y 70 mL de EtOH, se llevó a la temperatura de 60°C a la solución amarilla resultante se le agregaron 0.3 mL de Etóxido de sodio, sintetizado agregando 0.23 g de Na sólido a 10 mL de EtOH secado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, formándose una solución de color oscuro, el balón se puso en un reflujo con atmósfera de nitrógeno y a los 5 minutos se adicionaron 5 mg de Cu(AcO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O. El sistema se dejó en reflujo durante 10 horas con agitación continua. Al transcurrir este tiempo, se dejó enfriar la solución y adicionó en un beaker con agua fría y se dejó en reposo durante 48 h con la espera de un precipitado para filtrar, el cual no se encontró sino hasta que se retiró gran parte del agua, pero únicamente como unas partículas en suspensión, se procedió a retirar con CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, Éter Etílico, sin lograr resultado con ninguno de los tres solventes.

Se hicieron modificaciones a este método aumentando la proporción de 2:1 flavonoide:Sal de cobre suponiendo un peso molecular para el flavonoide y adicionando la mitad en milimoles del Cu(AcO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, y adicionando este último en exceso. En ninguno de los tres casos se logró un precipitado. Para realizar las pruebas instrumentales y biológicas se retira el solvente y la pasta se disuelve en agua bidestilada.

### **7.5.3 Actividad biológica del flavonoide acoplado al cobre.**

**7.5.3.1 Actividad Antibacteriana y Antifúngica:** Este ensayo se determinó mediante la microtitulación en placa con indicador de Rezasurin, de forma idéntica que con el flavonoide puro. En los microorganismos:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*

*Klebsiella oxytoca*

*Escherichia coli*

*Candida albicans*

*Candida guilliermondii*

**7.5.3.2 Ensayo de citotoxicidad y actividad anticancerígena:** El ensayo se hizo en línea celular VERO para la citotoxicidad, y la actividad anticancerígena en línea celular de Mieloma Murino SP2/0-Ag14 (ATCC:CRL-1581), ambos en forma idéntica a la realizada para la determinación de la actividad citotóxica y anticancerígena para el flavonoide puro.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

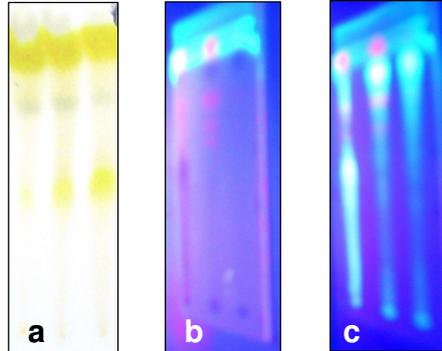
### 8.1 Aislamiento, purificación y caracterización del flavonoide de *Brownea ariza B*

#### 8.1.1 Aislamiento del flavonoide

El extracto etanólico obtenido de la percolación, se particionó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt y MetOH, en un extractor soxhlet, obteniendo 54, 30 y 14 g respectivamente; la fracción de metanol y la de acetato de etilo dieron la prueba de shinoda, la cual comprueba la existencia de flavonoides en ellos (30, 31). Para realizar el trabajo se trabajó con la fracción de acetato de etilo debido a que fue la que mayor cantidad arrojó.

Para individualizar los flavonoides se asperjó AlCl<sub>3</sub> al 5% en Metanol, con el fin de lograr que una mancha amarilla fuera observada en la región visible y en el UV fuera activa a 254 nm, en un gabinete UV para CCD con monocromador a 254 nm y 365 nm.

El mejor sistema mostrado de los analizados fue AcOEt-MetOH (95:5), en el cual se notó una separación de 3 flavonoides con una buena diferencia de R<sub>f</sub> (Coeficiente de retardo), Se logró una buena separación mostrando una mancha verde en el frente del solvente con un R<sub>f</sub> cercano a 1.



**Figura 12.** Análisis de Cromatografía en Capa Delgada

a. Análisis de Cromatografía en Capa Delgada de extracto revelado con  $\text{AlCl}_3$  5%/Metanol, Manchas Amarillas indican flavonoides b. Análisis de Cromatografía en Capa Delgada de extracto revelado bajo luz UV sin asperjar  $\text{AlCl}_3$ . c. Análisis de Cromatografía en Capa Delgada de extracto revelado con  $\text{AlCl}_3$  5%/Metanol, bajo la luz UV Manchas brillantes indican flavonoides

En la figura 12 se muestra una mancha Amarilla con un  $R_f$  de 0.84 seguida de una verde a 0.82 en la placa.

Bajo la luz UV (figura 12 b) la placa mostró que las manchas verdes dieron una coloración roja-púrpura lo cual indicó la posibilidad de que eran clorofilas, las manchas amarillas no mostraron absorción en el UV.

Al asperjar la placa con  $\text{AlCl}_3$ , las manchas amarillas intensificaron su tonalidad, las cuales bajo la luz UV mostraron un cambio con relación a las manchas observadas antes de ser reveladas, dando una absorción de color amarillo (figura 12 c), lo que indicó la presencia de flavonoides en esta mancha. Utilizando la mezcla AcOEt-MetOH (95:5) se mostró una buena separación en los componentes del extracto, por lo cual se realizan las CC con este solvente, utilizando dos soportes diferentes, Sílica gel 60 para cromatografía en columna, y alúmina estandarizada 90, para cromatografía preparativa en columna por el método de Brockman, con el fin de determinar cual de los dos soportes se comportaba mejor

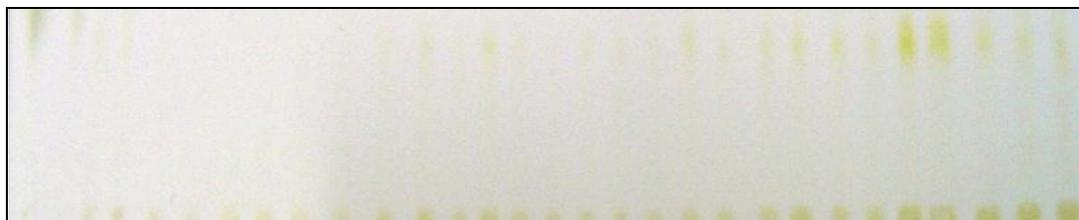
para este tipo de muestras, con este mismo solvente se usó una pequeña cantidad de muestra y 20 mL de solvente AcOEt 95 : 5 MetOH, (figura 13), se recogieron 10 fracciones, a las cuales se les hizo seguimiento con shinoda (figura 14), se hizo un perfil cromatográfico (figura 15) de las fracciones recogidas con el fin de tener criterios de juicios suficientes para determinar que fracciones juntar.



**Figura 13.** Columna de Cromatografía.



**Figura 14.** Fracciones obtenidas por Cromatografía en columna 1-9



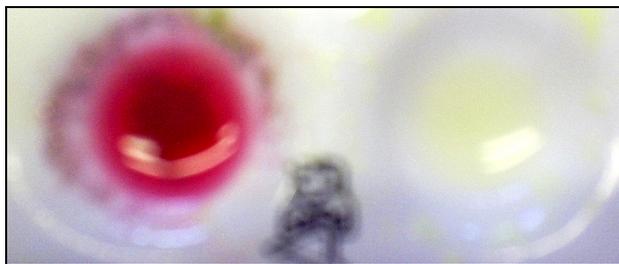
**Figura 15.** Perfil Cromatográfico. Fracciones obtenidas en la Columna  $\text{CHCl}_3$ -MetOH (95:5)

Los resultados arrojaron que se obtuvo el compuesto de interés en las primeras fracciones representado en una mancha amarilla, junto con otros compuestos no deseados, después de algunas fracciones apareció un segundo flavonoide con un Rf de 0.74 con poca abundancia, motivo por el cual se dejó a un lado.

Se hizo cromatografía bidimensional para determinar la pureza de la mancha amarilla, corriendo con AcOEt-MetOH (95:5), seguido de CHCl<sub>3</sub>-MetOH (95:5), al hacer esto la mancha roja observada en el UV mostró ahora 3 manchas, y la amarilla 4 manchas. Lo que mostró que este solvente podría ser una alternativa para purificar, por tal motivo, las fracciones unidas de la primera separación con la columna de Sílica gel corrida con AceOEt-MetOH (95:5), que fue la columna A, fueron sometidas a una nueva separación en la columna B, en la cual se utilizó como soporte Sílica gel pero eluída con CHCl<sub>3</sub>-MetOH (95:5). Se recogieron 20 fracciones, de las cuales según el perfil Cromatográfico el flavonoide, con un Rf 0.87 aparecía entre las fracciones 8 – 17, con un elevado nivel de pureza, pues, al realizarse un análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) a la unión de estas fracciones, se observó una pureza del 91%. Para lograr una purificación final se realizó cromatografía preparativa en columna, usando Sílica gel 60G para CCD. Logrando un 98% de pureza determinada por HPLC con un tiempo de retención de 10.7 min (Anexo 2). Se obtuvieron 80 mg de un amarillo de cristales amorfos, con punto de descomposición a 180°C, óptimamente inactivo.

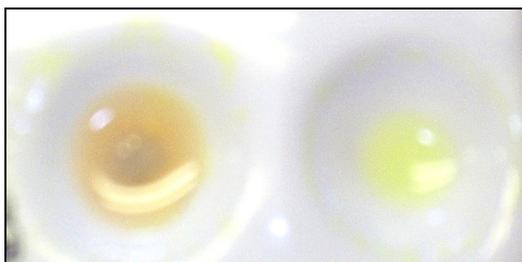
### **8.1.2 Caracterización del flavonoide**

**8.1.2.1 Ensayos de coloración** La prueba de Shinoda al dar un color rojo intenso (figura 16) confirmó que el compuesto es un flavonoide, pues el color no es dado por una simple reducción del Mg<sup>0</sup> a Mg<sup>2+</sup>, sino a una interacción de este con el sistema del flavonoide que crea una difracción de la luz de tal forma que se nota un color rojo en la solución, (31)



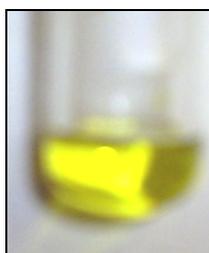
**Figura 16.** Reacción de Shinoda, Resultado y Blanco

Al cambiar el  $Mg^0$  por  $Zn^0$  (figura17), se notó una coloración rosa débil, lo que mostró la posibilidad de que el flavonoide que se trata en este caso sea una flavanona ó flavononol, pero debido a la poca intensidad del color, puede tratarse de una flavona ó flavonol, esta prueba no es concluyente. (3)



**Figura 17.** Ensayo de Zn/HCl

El ensayo de pacheco no presentó la coloración roja-rosa que muestra para los 2,3-dihidroflavonoles, por tal motivo se deduce que el flavonoide asilado es una flavona, o un flavonol. (figura 18).



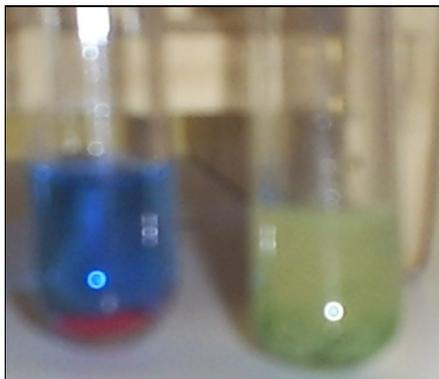
**Figura 18.** Ensayo de Pacheco

El ensayo de tollens mostró una coloración oscura, no por reducción de la plata  $Ag^{+1}$  a plata metálica  $Ag^0$ , sino al medio básico que produce algún intercambio

estructural en la molécula del flavonol que hace cambiar de color a oscuro la solución en medio básico, pero no la aparición del espejo de plata, por lo cual se puede tomar como negativa o positiva la presencia de azúcares en la molécula (figura 19). Esto se confirma con el ensayo de Fehling, el cual no presentó un precipitado de color rojo por lo que se toma como negativa la presencia de azúcares reductores en la molécula del flavonol (figura 20) (70).



**Figura 19.** Prueba de Azúcares reductores por Tollens



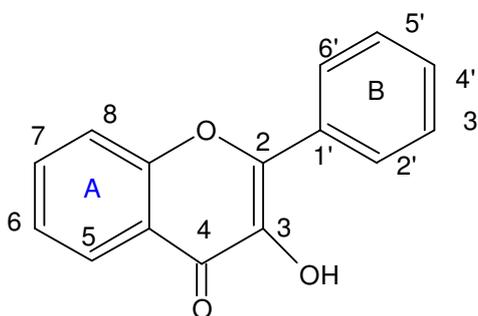
**Figura 20.** Prueba de Azúcares reductores por Fehling, Glucosa (Derecha) y flavonoide (Izquierda)

Se aclara que ninguna de estas pruebas son válidas a la hora de una caracterización estructural, pues la química mojada presta un servicio de cualificación no muy exacto, ya que hay muchos factores que pueden mostrar cambios de coloración y falsos positivos.

### 8.1.3 Análisis Electrónico UV-VIS

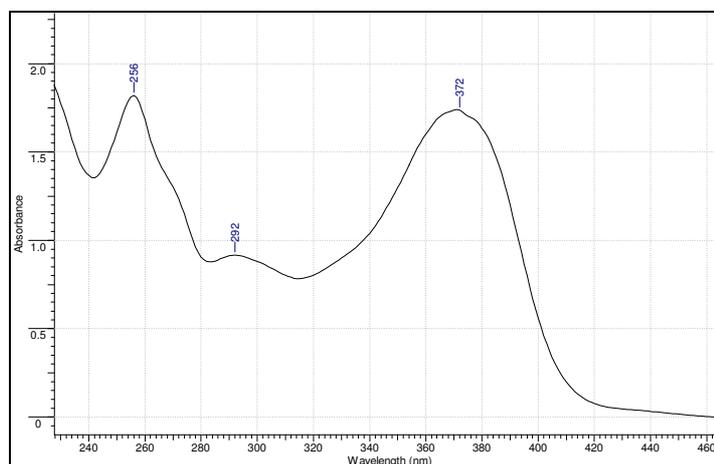
Los análisis de UV-Vis en flavonoides son de gran utilidad a la hora de lograr la elucidación estructural de uno de estos compuestos, pues el uso de los reactivos de desplazamiento en UV como el  $\text{AlCl}_3$  (5% en MetOH)-HCl (20% agua), NaOH (2.5% MetOH) y NaOAc –  $\text{H}_3\text{BO}_3$  proveen una poderosa guía de sustitución de muchos flavonoides que se ve demostrada en el cambio de sus espectros UV-Vis, pero los reactivos de desplazamiento solo pueden ser aplicables a flavonoides puros, debido a que la más pequeña impureza en el flavonoide o en los reactivos puede causar grandes problemas a la hora de tomar el espectro UV, debido a que la aparición de bandas solapadas o el cambio del pH del medio afectan los desplazamientos batocrómicos que deben de ser observados a la hora de la aplicación de los reactivos de desplazamiento. (72)

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330- 360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. (73)



**Figura 21.** Anillo A y B flavonoide

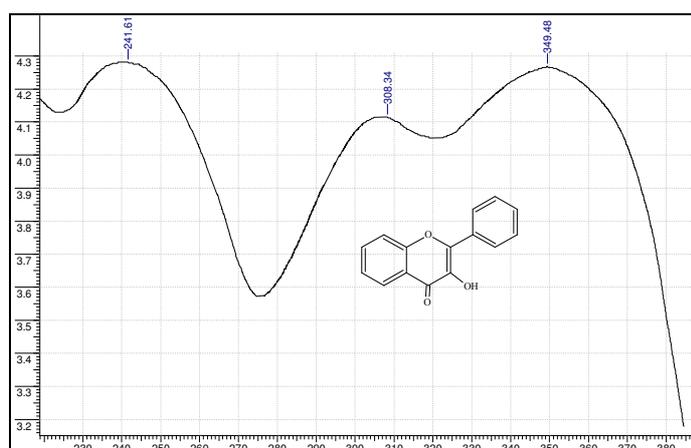
**8.1.3.1 Espectro MetOH.** El espectro del flavonoide corrido en metanol puro como solvente arrojó los siguientes datos, como se puede observar en la figura 22, 256 nm, 274 nm (hombro), 292 nm (hombro), 372 nm



**Figura 22.** Espectro flavonol en MetOH

Este espectro puede corresponder a un flavonol, estos presentan la banda II que es la de mayor longitud de onda entre 350-385 nm, y en este en particular dicha banda se encuentra a la altura de los 372 nm. (3; 73).

El espectro ultravioleta del flavonol (figura 23) muestra similitudes importantes con el obtenido del compuesto, lo que ratifica la idea de el compuesto obtenido sea un miembro de este tipo de flavonoides.

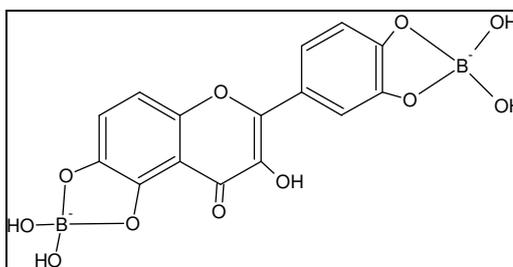


**Figura 23.** Espectro UV-Vis de 3-hidroxiflavona (flavonol)

Se notan las bandas en longitudes de onda cercanas a las obtenidas del compuesto, por lo cual se confirma que este es un flavonol.

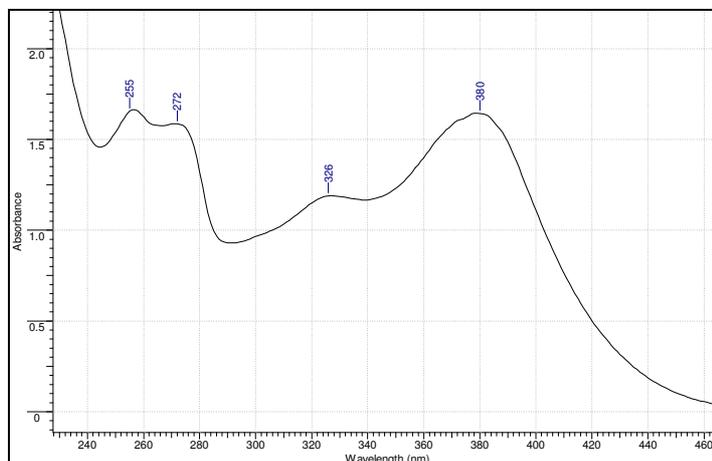
**8.1.3.2 Espectros MetOH-NaOH, MetOH-AcONa, MetOH-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-AcONa.** Los reactivos de desplazamiento básicos como, NaOH, MeONa, AcONa, tienen la función de ionizar los OH ácidos de los anillos fenólicos de los flavonoides, el grado de ionización depende de la fuerza básica de los reactivos, en el caso de NaOH y el MeONa, ionizan todos los OH presentes en la molécula y particularmente permite reconocer la existencia de grupos hidroxilo en 3 y 4', pues son los menos ácidos que no son ionizables con otras bases. Esta ionización es perceptible gracias a desplazamientos batocrómicos de la Banda I, pues esta corresponde al sistema cinamóilo (Anillo B). Las bases menos fuertes como el AcONa ionizan principalmente a los OH más ácidos de la molécula como el 7, el cual se encuentra en el anillo A, sistema benzoilo, por lo cual cualquier interacción con este OH se notará en la banda II, la de menor longitud de onda, en este caso la que se encuentra a 256 nm. (71)

Para el uso de AcONa, se debe de usar un reactivo que se encuentre limpio, sin rastros de AcOH, pues el pH es de gran importancia a la hora de la ionización de los grupos OH presentes en la molécula, y se pueden presentar algunos inconvenientes si esto no se cumple. El H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> produce una quelación en donde se encuentren dos OH seguidos en la molécula, formando un complejo estable (figura 24) en medio medianamente alcalino, por lo cual se utiliza luego de la adición de AcONa.



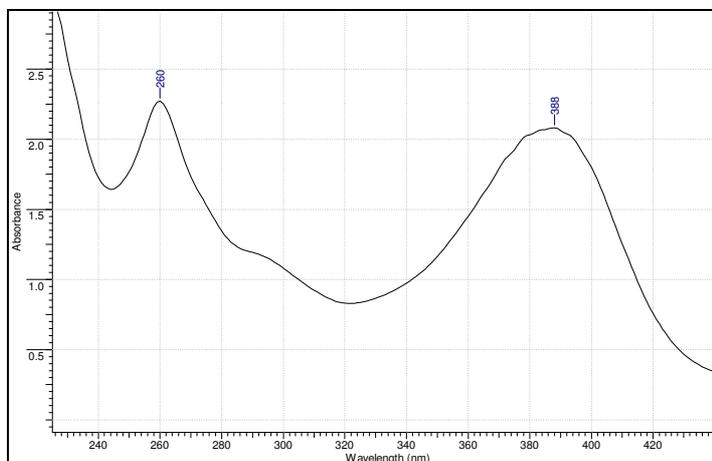
**Figura 24.** Complejo Flavonoide hidroxilado con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

**8.1.3.3 Espectro MetOH-AcONa.**  $\lambda_{\max}$  256 nm, 272 nm, 326 nm (hombro), 380 nm (figura 25).



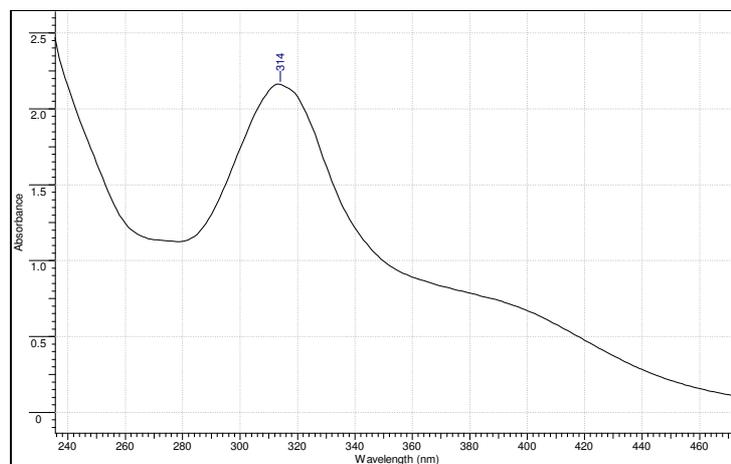
**Figura 25.** Espectro del flavonoide en MetOH-AcONa

**8.1.3.4 Espectro MetOH-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-AcONa**  $\lambda_{\max}$  260 nm (aumento intensidad), 300 nm (hombro), 388 nm (aumento intensidad) (figura 26)



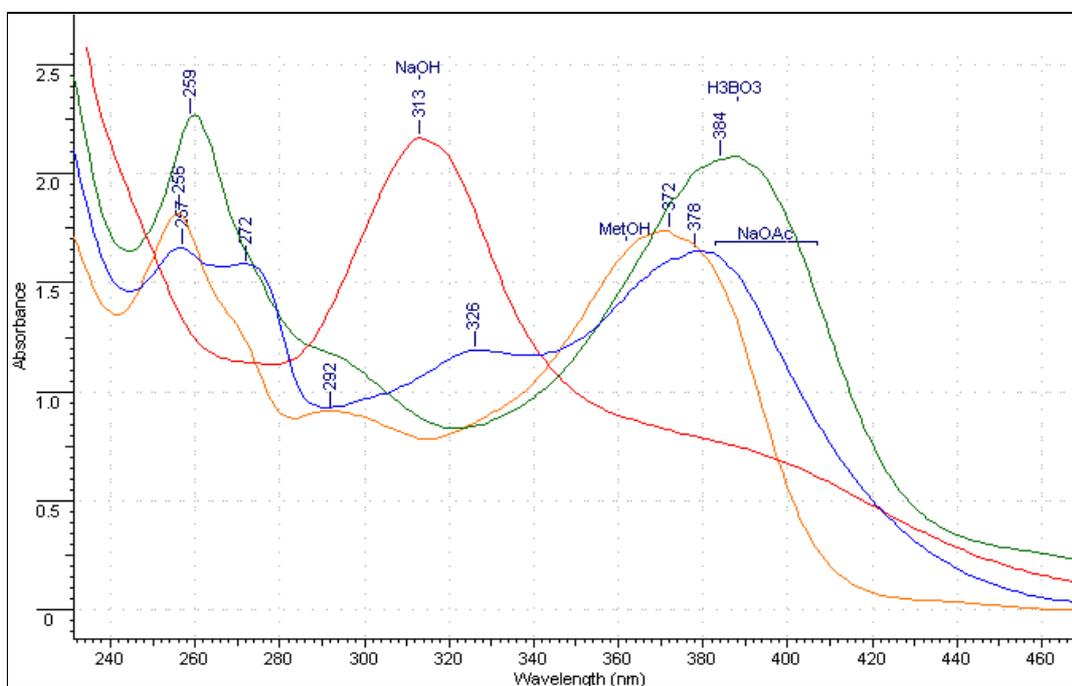
**Figura 26.** Espectro del flavonoide en MetOH-AcONa-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

**8.1.3.5 Espectro MetOH-NaOH.**  $\lambda_{\max}$  314 nm (nueva banda), 395 nm (hombro) (figura 27)



**Figura 27.** Espectro del flavonoide en NaOH

**8.1.3.6 Espectro UV-Vis de MetOH, AcoNa, AcoNa+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.** Como se observa en la figura 28, el espectro electrónico cambia con la adición de cada uno de los reactivos de desplazamiento, en relación al espectro metanólico puro, esto es una clara demostración de que se está produciendo una ionización en los OH de la molécula.



**Figura 28.** Espectro UV-Vis de MetOH, AcoNa, AcoNa+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

En el caso de NaOH la aparición de una banda nueva (Banda III) es garante de la presencia en el flavonoide de un OH en la posición 7 libre, con la adición de este reactivo no se notan corrimientos hacia el visible de la banda I, aunque si un hombro a la altura de 395 nm, el cual puede ser debido a un desplazamiento batocrómico de la banda I que se encuentra a la altura de los 372 nm, pero gracias a la fuerza de la banda III esta es solapada, teniendo en cuenta esto, el desplazamiento puede indicar la presencia de un OH en la posición 4' anillo B, puesto que esta banda se ve afectada por los cambios producidos en la estructura del anillo B. (72).

La adición de AcONa produce un desplazamiento batocrómico en la banda II de 15 nm, que se nota por la aparición de una nueva banda al lado de la antes existente, la aparición de las dos bandas en el espectro se debe a un equilibrio entre molécula ionizada / molécula no ionizada, por lo cual la banda de 256 nm corresponde a la no ionizada y la 272 nm a la ionizada, el desplazamiento de 15 nm indica la presencia de un OH libre en la posición 7, pues es el único OH que puede ser ionizado por este reactivo en el anillo A, que esta siendo demostrado por el cambio de la banda II, (65).

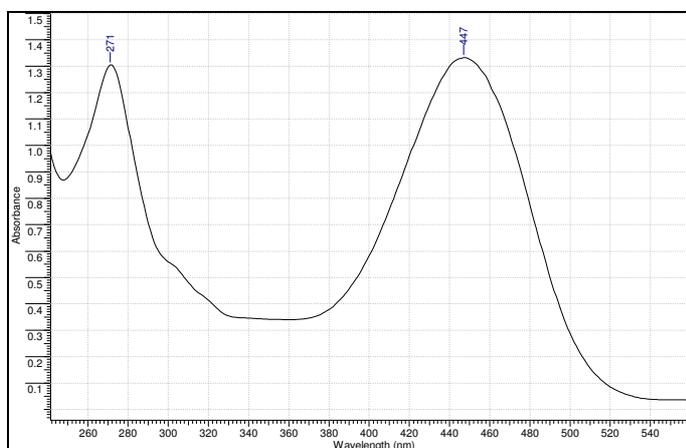
El desplazamiento observado en la banda I con la adición de  $H_3BO_3$  corresponde a una quelación en el anillo B, lo que indica la presencia de un di-OH, en dicho anillo, pues esto es típico cuando se encuentran actividad batocrómica en la banda de mayor longitud de onda mayores a 10 nm, y si se tiene en cuenta la posible estadía de un OH en 4', gracias a los resultados de la prueba con NaOH, se puede postular que el diol se encuentra en 3' y 4'. (1)

#### **8.1.3.7 Espectros MetOH- $AlCl_3$ , MetOH- $AlCl_3$ -HCl.**

El objetivo de la adición de  $AlCl_3$  al igual que la de  $H_3BO_3$ , es la formación de quelatos con los OH seguidos en la molécula, puesto que estos dos elementos, Al y B, pertenecen al grupo IIIA, por lo cual son anfóteros y se comportan como ácidos de lewis que tiene la capacidad de recibir electrones, en este caso de los

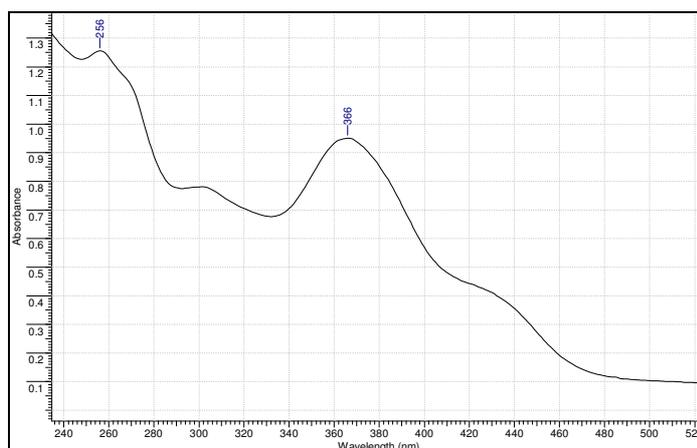
Oxígenos presentes en los OH de la molécula, debido al tamaño del Al con respecto a del B, este es un ácido más fuerte, por lo cual además de la posible complejación con dos OH seguidos de los anillos A ó B, este lo puede hacer con el grupo carbonilo presente en 4 y los OH de 5 y 3 (sistema  $\gamma$ -benzopirona). La formación de este último complejo (C=O, OH) es estable en medio ácido, contrario a lo que ocurre con el complejo formado con los diOH, tanto del anillo A como del anillo B. (74)

- **MetOH-AlCl<sub>3</sub>**  $\lambda_{\text{max}}$ : 271 nm, 447 nm (figura 29).

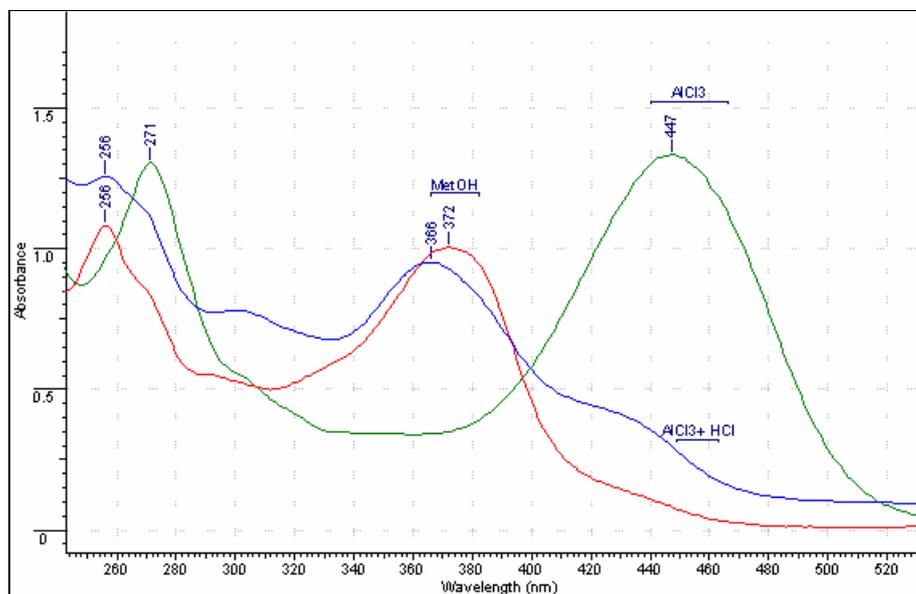


**Figura 29.** Espectro del flavonoide en MetOH-AlCl<sub>3</sub>.

- **MetOH-AlCl<sub>3</sub>-HCl**  $\lambda_{\text{max}}$ : 256 nm, 366 nm (figura 30).



**Figura 30.** Espectro de Flavonoide en MetOH-AlCl<sub>3</sub>-HCl



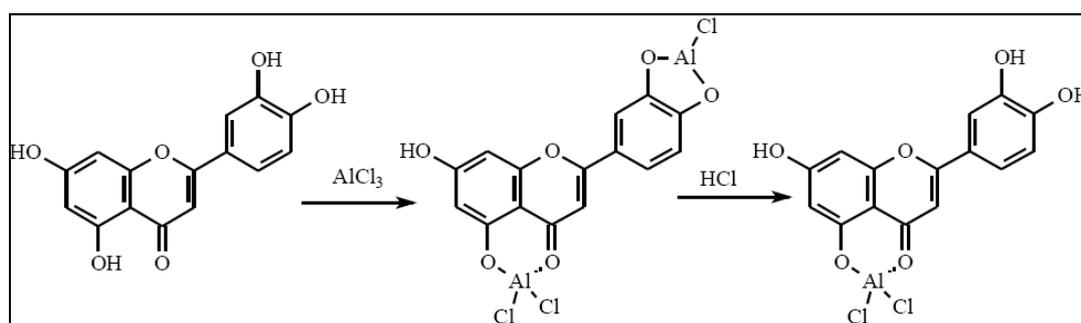
**Figura 31.** Espectro UV-Vis de MetOH, HCl+AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>

El espectro muestra que con la adición de AlCl<sub>3</sub> hay un desplazamiento batocrómico de 50 nm en la banda I, el cual no se mantiene al agregarle HCl, lo cual indica que se formó un complejo inestable el medio ácido, el cual puede corresponder a una quelación en entre un dos OH libres en el anillo B. (75).

El hombro que se mantiene en una longitud de onda de 440 nm después de la adición de HCl indica la presencia del 5-OH, pues este complejo es estable en medio ácido, pero la baja intensidad puede indicar la presencia de un grupo grande que lo solapa. (3, 71)

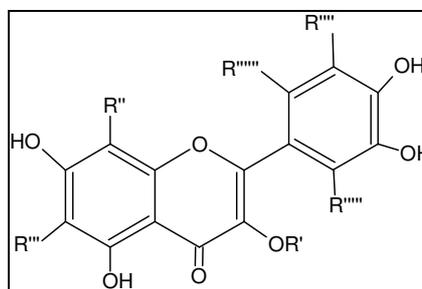
La banda II con la adición del AlCl<sub>3</sub> (figura 31) experimenta un desplazamiento batocrómico igual a 15 nm que desaparece a la hora de la adición de HCl, muestra la formación de un segundo complejo inestable pero en el anillo B; Lo cual confirma lo planteado a la hora de hacer el espectro con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, que predecía la existencia de un di-OH en el anillo B.

El hecho de que la banda con un desplazamiento batocrómico de 55 nm desaparezca no quiere decir que no se forme un complejo entre el carbonilo del sistema  $\gamma$ -benzopirona y un OH en C5 o C3, pues estos desplazamiento batocrómicos son más bajos y pueden quedar solapados bajos los del grupos ortohiroxilados (3)



**Figura 32.** Complejo flavonoide hidroxilados con  $\text{AlCl}_3$

Debido a que el desplazamiento batocrómico comparado con el flavonoide en metanol es de 50 nm, no se puede decir a ciencia cierta si el complejo formado en  $\gamma$ -benzopirona, se formó con el OH 3 o con el 5, e igualmente los 12 nm para el desplazamiento en  $\text{H}_3\text{BO}_3$  no excluyen la posibilidad de un *di*OH en el anillo A. por tal motivo son necesarias la pruebas de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como la espectrometría de masas, para determinar a cabalidad el compuesto, con este resultado se puede pronosticas la presencia de un flavonol con OH en: 3', 4', 5, 7 (figura 33), pero no se puede dar a conocer los sustituyentes de el resto de carbonos, así como la posible presencia de un glucósido en 3.



R	R'	R''	R'''	R''''	R''''
H	R, H, OH, OR				

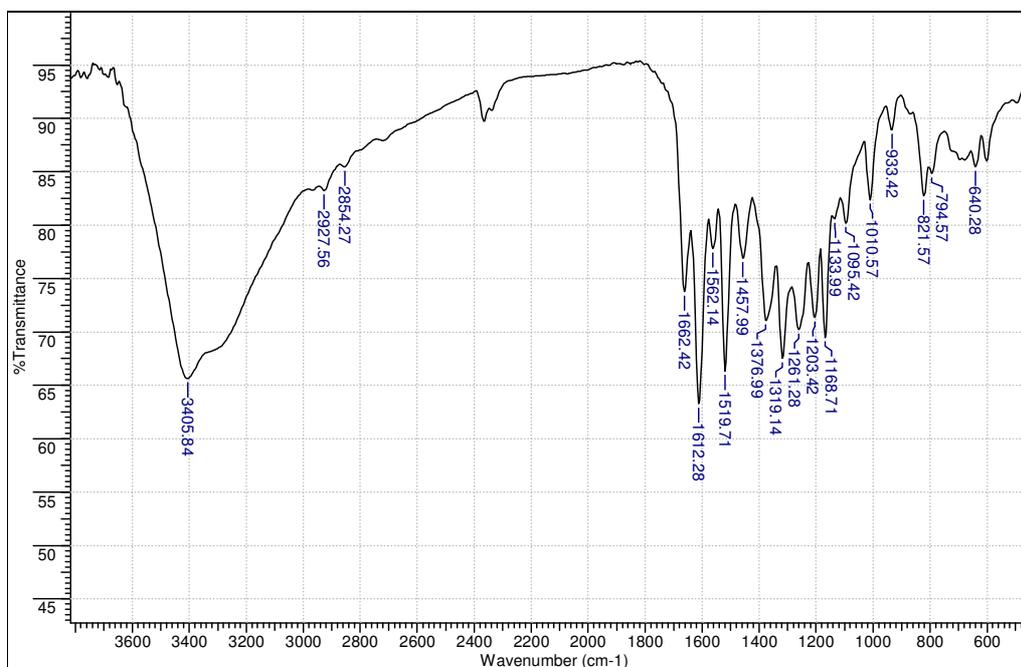
**Figura 33.** Flavonol propuesto por UV-vis

### 8.1.4 Análisis Espectroscopia IR

El espectro IR<sup>KBr</sup> del flavonoide aislado arrojó bandas de absorción de hidroxilos, carbonilos conjugados y grupos aromáticos.. En la tabla 4 se asignan las más importantes de ellas.

**Tabla 4.** Asignación de bandas IR<sup>KBr</sup>

No	cm <sup>-1</sup>	%T	Asignación
1	3405.84	65.638	(Puente H-OH
2	2927.56	83.227	CH
3	2854.27	85.441	CH
4	1662.42	73.737	(Conjugado C=O)
5	1612.28	63.302	(C-O)
6	1562.14	77.795	Ar
7	1519.71	66.334	(C-OH)
8	1457.99	76.901	Ar
9	1376.99	71.048	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido
10	1261.28	70.199	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido
11	1203.42	73.32	Tensión C-O
12	1133.99	80.584	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido
13	1010.57	82.372	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido
14	794.57	84.838	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido
15	694.28	86.143	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Sustituido



**Figura 34.** Espectro IR del flavonol obtenido

Como se puede observar en la figura 34, la banda 1, a la altura de  $3405\text{ cm}^{-1}$ , amplia y fuerte, indica la presencia de puentes de hidrógeno con OH, lo que en indica que existen sustituciones OH en la molécula del flavonoide, pues esta banda es propia de OH libres, si se toma como verdadera la tesis de que éste flavonoide es un flavonol, la banda 1 no corresponde al OH en 3, puesto que éste no se encuentra libre totalmente, debido a una interacción que existe con el carbonilo ubicado en 4 (77)

Aunque las bandas a  $2927\text{ cm}^{-1}$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  son muy débiles o están solapadas por las señales del OH, se pueden asignar a las interacciones C-H, de los anillos aromáticos de los sistemas cinamoilo y benzoilo.

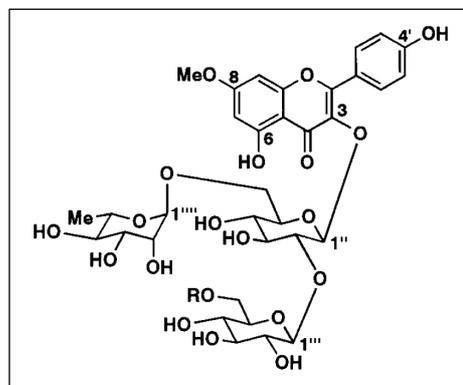
La banda a  $1662\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la función lactona, pero más desplazada hacia longitudes de onda superior debido a que los dos oxígenos se encuentra adjuntos a un anillo aromático, lo cual crea un desplazamiento batocrómico hacia longitudes de onda mayores, por lo tanto la banda que aparecería normalmente a una altura de  $1710\text{ cm}^{-1}$  en los flavonoides aparecerá siempre entre los  $1630$  y  $1680\text{ cm}^{-1}$ .(1)

La banda presente en  $1612\text{ cm}^{-1}$  corresponde a una interacción C-O fuera del plano, propio de grupos carbonilo, la banda siguiente situada a la altura de  $1519$  corresponde a una interacción C-OH, de baja frecuencia, las bandas 6 y 8, corresponde a las interacciones C-C, C=C, de los anillos aromáticos, así como las 9-14, que corresponde a sustituciones en anillos aromáticos (78).

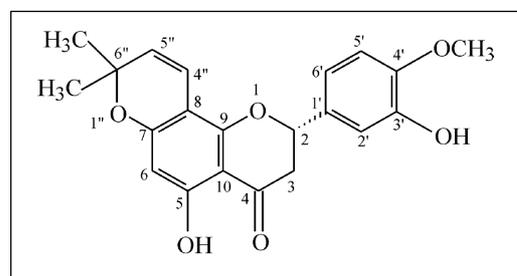
Las bandas de  $1319\text{ cm}^{-1}$ ,  $1203\text{ cm}^{-1}$ ,  $1168\text{ cm}^{-1}$ ,  $1095\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a sobre tonos de OH presentes en la sustituciones de los anillos aromáticos en los flavonoides. Estás bandas en el área del "Finger Print" o huella digital del espectro

infrarrojo dan una claridad acerca de las sustituciones hidroxiladas que posee el compuesto.

3387 (OH), 2934 (CH), 1697 (C=O), 1655 (C=O), 1598, 1515, 1498, and 1454 (aromatic rings), 1345, 1283, 1261, 1214, 1168, 1115, 1080, 984, 914, 887  $\text{cm}^{-1}$ . (16)



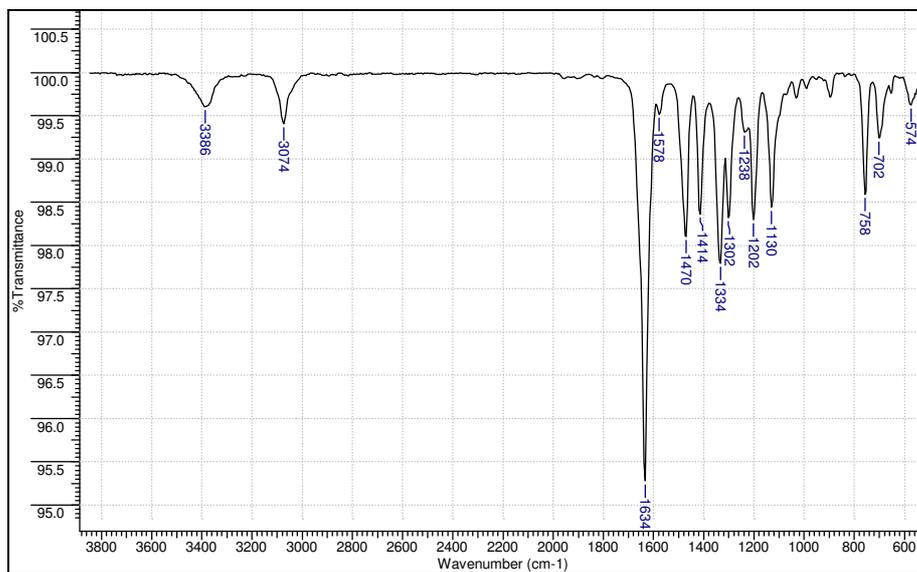
3434, 2975, 2935, 2843, 1640, 1590, 1517, 1439, 1370, 1274, 1160, 1115, 1090, 1070, 1028, 762, 699 (68)



**Figura 35.** Picos de IR de flavonoides conocidos

Los dos flavonoides que se observan en la figura 35 son ejemplos claros del tipo de picos que se deben de observar en un espectro IR, se notan las bandas que surgen en un glicósido de flavonol, y las que se pueden encontrar en una flavonona, por lo cual se puede determinar las bandas características que se encuentran en un compuesto que tenga en núcleo flavon.

Para observar las bandas que pueden surgir con un flavonol observamos el espectro de la 3-hidroxiavonona (figura 36).



No	cm <sup>-1</sup>	%T	FWHH	Asym	Intensity
1	3386.00	99.627	-	-	VW
2	3074.00	99.244	-	-	W
3	1634.00	98.589	-1.00	0.00	W
4	1578.00	98.442	-1.00	0.00	M
5	1470.00	98.297	-1.00	0.00	M
6	1414.00	99.313	-	-	W
7	1334.00	98.321	-	-	M
8	1302.00	97.792	-1.00	0.00	M
9	1238.00	98.360	-1.00	0.00	M
10	1202.00	98.102	-	-	M
11	1130.00	99.517	-	-	W
12	758.00	95.280	-1.00	0.00	VS
13	702.00	99.409	-1.00	0.00	W
14	574.00	99.603	-1.00	0.00	VW

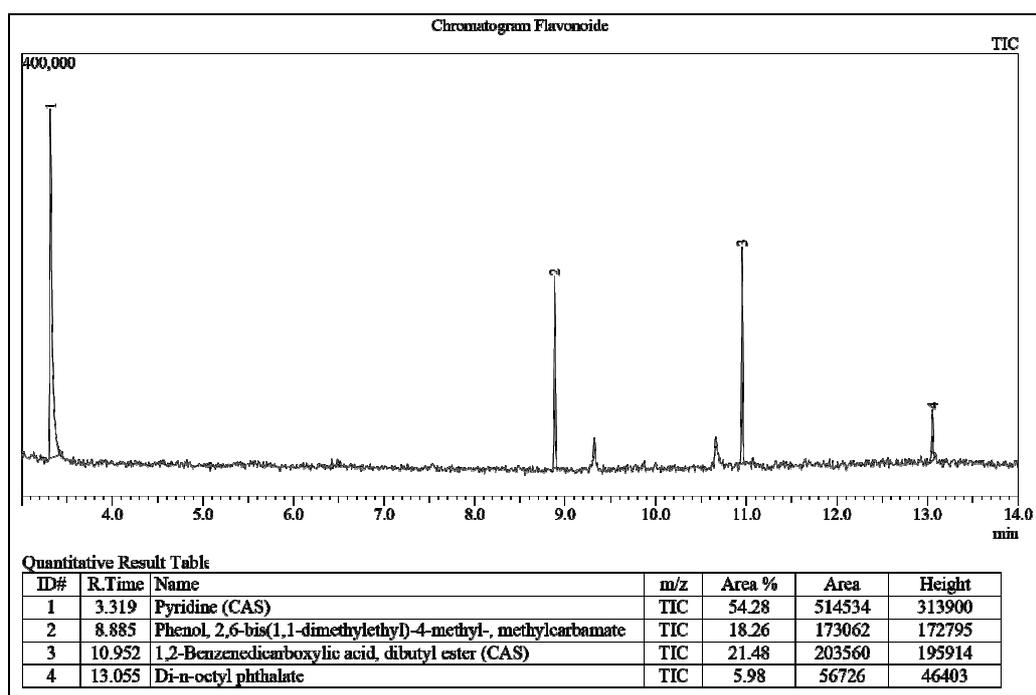
**Figura 36.** Espectro IR 3-Hodroxiflavona

Como se puede observar (figura 35) el conjunto de picos observados en el esqueleto de un flavonol corresponde con los observados en el compuesto aislado, a excepción de la fuerza de la banda a la altura de 3386 cm<sup>-1</sup>, pues es menos intensa debido a que este OH hace parte del sistema  $\gamma$ -benzopirona, tiene imposibilidad de hacer puentes de hidrógeno como un OH libre.

### 8.1.5 Espectrometría de masas

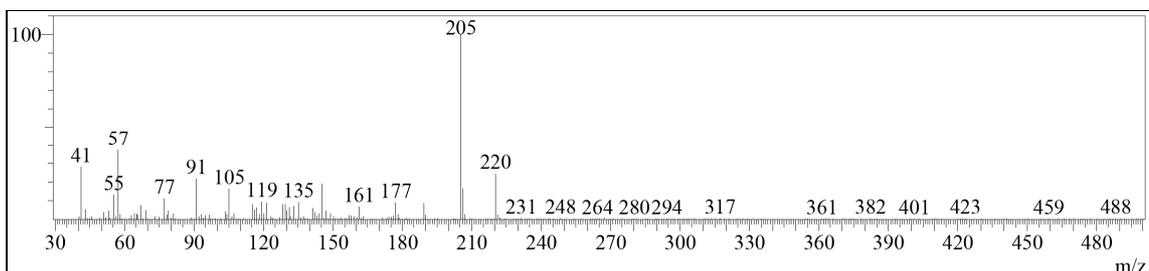
**8.1.5.1 Espectrometría de masas de derivado:** En análisis de la espectrometría de masas del compuesto derivatizado muestra en su cromatograma 5 picos,

correspondientes a: 1, La piridina, restos del proceso de síntesis, 3 y 4, Ftalatos, residuos plásticos procedentes de las tapas de los viales empelados para GC, debido a que la muestra se encontraba disuelto en  $\text{CHCl}_3$  solvente que disuelve este material, y el pico 2 el compuesto de nuestro interés, lo que muestra la pureza del compuesto aislado (figura 37).



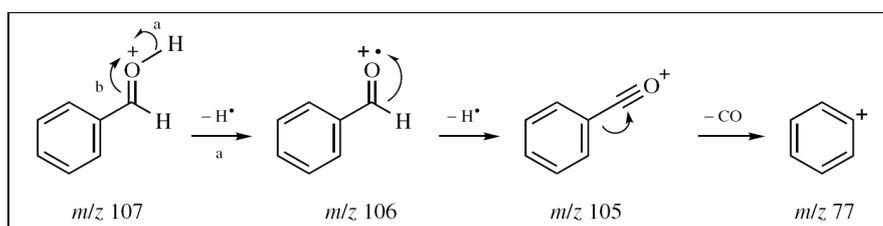
**Figura 37.** Cromatograma derivado.

El fragmentograma del compuesto número dos, el de interés figura 38, muestra fragmentos de 220 m/z, 205 m/z, 177 m/z, 135 m/z, 105 m/z, 91 m/z, 77 m/z, 51 m/z, 41 m/z, con un peso molecular de 220 m/z, fragmentos propios de flavonoides, producidos a partir de la fragmentación y reordenamiento de su anillos aromáticos. (1, 3, 73).



**Figura 38.** Fragmentograma derivado.

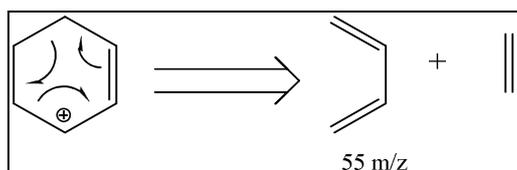
El peso molecular mostrado por el derivado de 220 m/z no puede corresponder a un flavonoide acetilado, pues el sólo hecho de adicionar una mol de grupo acetilo aumenta en 44 u.m.a el peso molecular; La explicación para lo sucedido es que se produjo una fragmentación del flavonoide en el GC o en el proceso de acetilación, dando dos grupos, tendiéndose pérdida de uno de ellos. El grupo estable es detectado por el MS generando una masa molecular de 220 m/z. Los picos 77 hasta 41 m/z corresponden a fragmentaciones del anillo aromático de benceno lo cual no indica claramente a cual de los dos grupos de flavonoide, anillo A ó B, corresponde, pero el fragmento de 105 m/z es característico del anillo A de los flavonoides, pues corresponde al fragmento del sistema hidroxibencilo. El cual posee un peso molecular de 107 u.m.a pero que se reordena a un ión de 105 m/z. (figura 39) (79).



**Figura 39.** Fragmentos 105 y 77 m/z

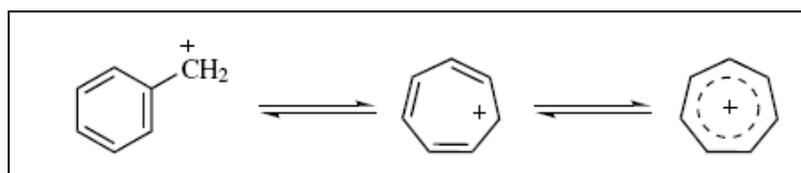
El ión hidroxibencilo puede ser formado por una separación del sistema bencílico luego de una ionización del anillo A del flavonoide, la pérdida de un  $\cdot\text{H}$  produce la formación del radical benzaldehído el cual a su vez pierde otro  $\cdot\text{H}$  para formar el ión benzoílo más estable de 105 m/z. La siguiente formación del ión fenilo de 77

m/z se debe a la pérdida de un CO del ión bezoilo. El siguiente fraccionamiento sufrido por benceno de 77m/z produce fragmentos por retro Diels-Alder lo que genera iones de 55 m/z (figura 40).



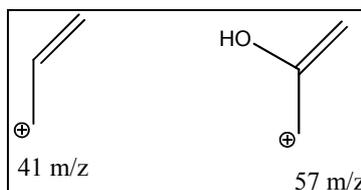
**Figura 40.** Pico 55 m/z

El pico de 91 m/z corresponde a la formación el ión tropilio propio de la funcionalidad benzoílo. (79).



**Figura 41.** Formación ión tropilio

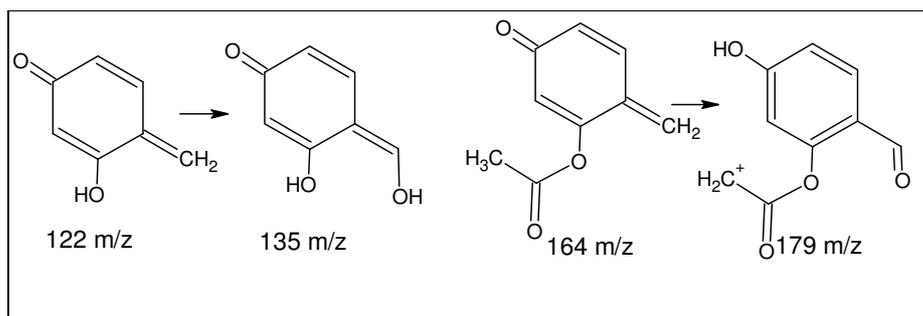
El pico correspondiente a 41 m/z  $C_3H_5$  producto de la desintegración del benceno por otra ruta diferente a la de retro diles-alder, y el pico correspondiente a 57 m/z es el mismo fragmento de 41 m/z pero con un OH como sustituyente,  $C_3H_6O$  (figura 42).



**Figura 42.** Fragmentos 41 y 57 m/z

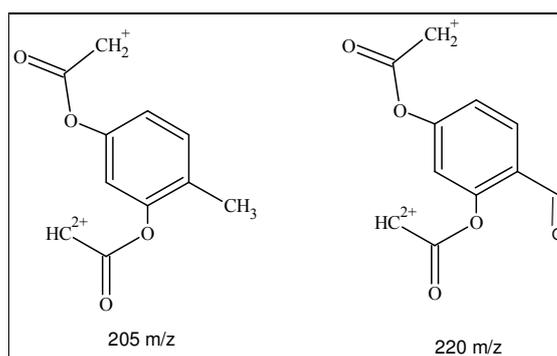
Las pruebas de UV-Vis muestran la existencia de dos OH libres en el anillo A del flavonoide, al igual que el pico de 57 m/z que indica la presencia de un sustituyente hidroxilo en el anillo aromático, esto en un anillo benzoílo produce un pico de m/z entre 118 y 121, el fragmentograma (figura 38) muestra picos en esta

área, lo que confirma la existencia de OH en el anillo, el pico 164 m/z corresponde a un fragmento que contiene un OH acetilado de este mismo sistema, los 135 u.m.a mostrados por este pico corresponde a el mismo sistema anterior pero aumentado por el O del grupo C=O del sistema  $\gamma$ -benzopirona, el derivado de este fragmentos produce el de 179 m/z (figura 43).



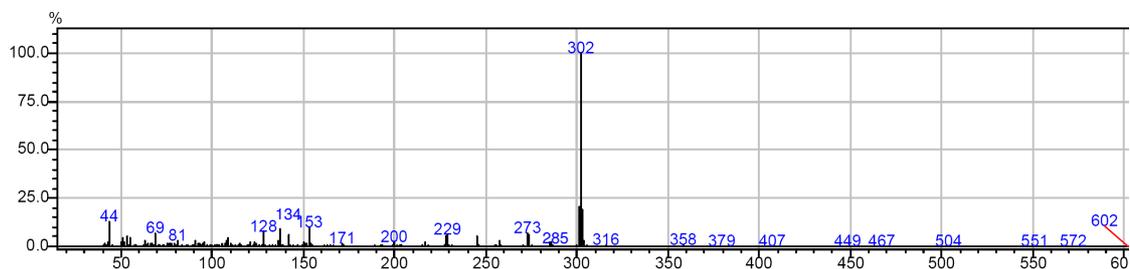
**Figura 43.** Fragmentos 122, 135, 164 y 179 m/z

El pico base de 205 m/z explica su abundancia a que existen dos oxígenos acetilados en la molécula, lo cual hace que exista una posibilidad mayor de encontrarlo presente en el fragmentograma. El pico de 220 m/z es el mismo pico base pero añadiendo el OH del sistema benzopirona siendo este el ión molecular del derivado. El cual corresponde al sistema benzoílo del flavonoide, anillo A y parte del C (figura 44).



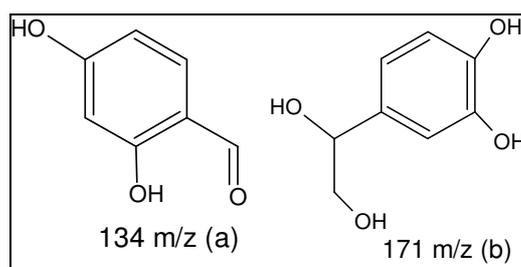
**Figura 44.** Ión molecular y pico base del derivado

### 8.1.5.2 Espectrometría de masas por Inyección directa



**Figura 45:** Fragmentograma compuesto puro

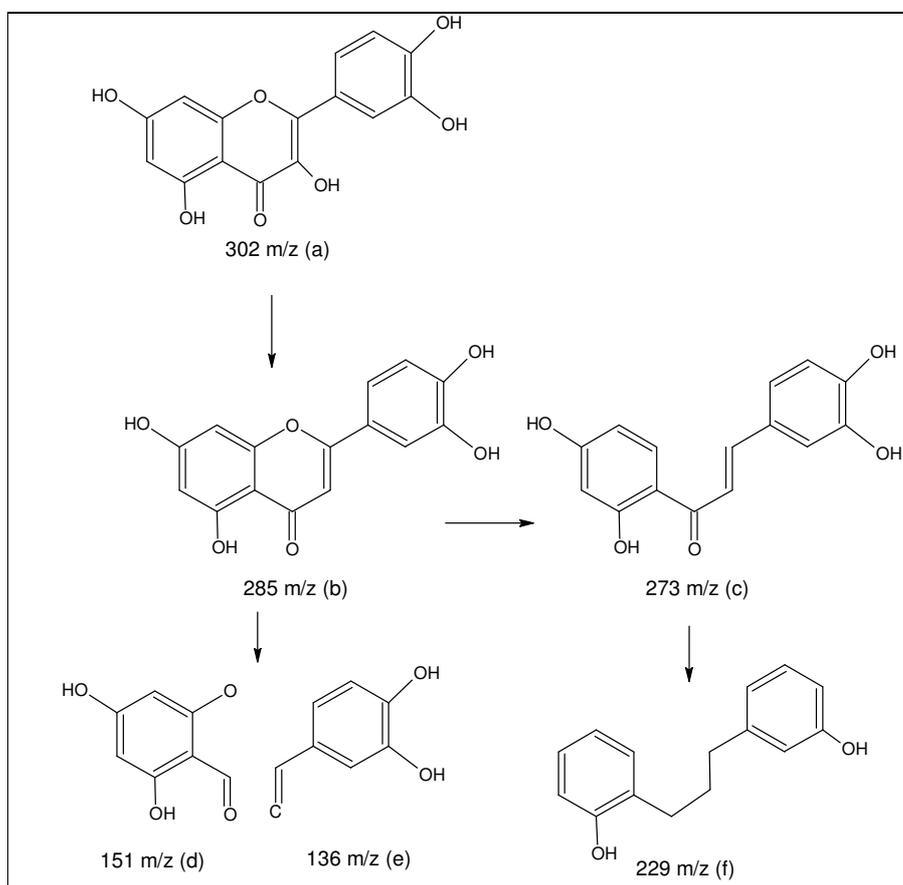
El espectro de masas por inyección directa (IDMS) muestra un compuesto de masa molecular de 302 m/z. y fragmentos característicos de flavonoides con una masa carga de 285 m/z, 273 m/z, 229 m/z, 171 m/z, 153 m/z, 136 m/z, 134 m/z. Figura 45.



**Figura 46** Fragmento 134 m/z, (anillo A), Fragmento 171 m/z (anillo b)

El fragmento a 134 m/z , figura 46 (a), corresponde al anillo A del flavonoide más el sistema  $\gamma$ -benzopirona hidroxilado en para, este ión corresponde al mismo fragmento identificado como ión molecular del compuesto derivatizado, pues en los grupos OH se incorporan los grupos acetil ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ) para dar un producto de masa molecular de 220 m/z, lo que reafirma la estructura del anillo A en este flavonoide. El anillo B del flavonoide aparece como un pico a los 171 m/z, el cual corresponde al fragmento mostrado en la figura 46 (b), estos dos fragmentos unidos forman la molécula del flavonoide puro, con una masa de 302 m/z, figura 47 a, que corresponde al pico base y ión molecular, el cual sufre fragmentaciones que se muestran en los picos siguientes, tal es el caso del fragmento de 285 m/z que corresponde a la flavona, figura 47 b, formada por la pérdida de el OH en posición 3 del flavonol puro, esta flavona pierde el oxígeno de la posición 1 para

formar el fragmento de 273 m/z (figura 47 c), y por otra via produce los dos fragmentos correspondientes a los anillos A (figura 47 d) y B (figura 47 e).



**Figura 47: Análisis de Fragmentos**

Fragmento 285 m/z (a), Fragmento 273 m/z (b), Fragmento 151 m/z anillo A (c), Fragmento 136 m/z Anillo B (d)

Las siguientes fragmentaciones de la molécula cuentan con la pérdida de varios oxígenos de los diferentes grupos OH de molécula para formar el fragmento de 229 m/z. (Figura 47 f)

## 8.1.6 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

### 8.1.6.1. Espectros RMN Unidimensionales (1D)

**8.1.6.1.1. Resonancia Magnética Nuclear de protones ( $^1\text{H}$ ):** Los flavonoides poseen un sistema C6-C3-C6, el cual muestra protones específicos para los grupos Benzoilo, y Cinamoilo, los que se asignan fácilmente según su desplazamiento químico ( $\delta$ ), pues el sistema benzoilo, anillo A, se encuentran antes de los 7 ppm, mientras que los de la funcionalidad cinamoilo lo están después de 7.

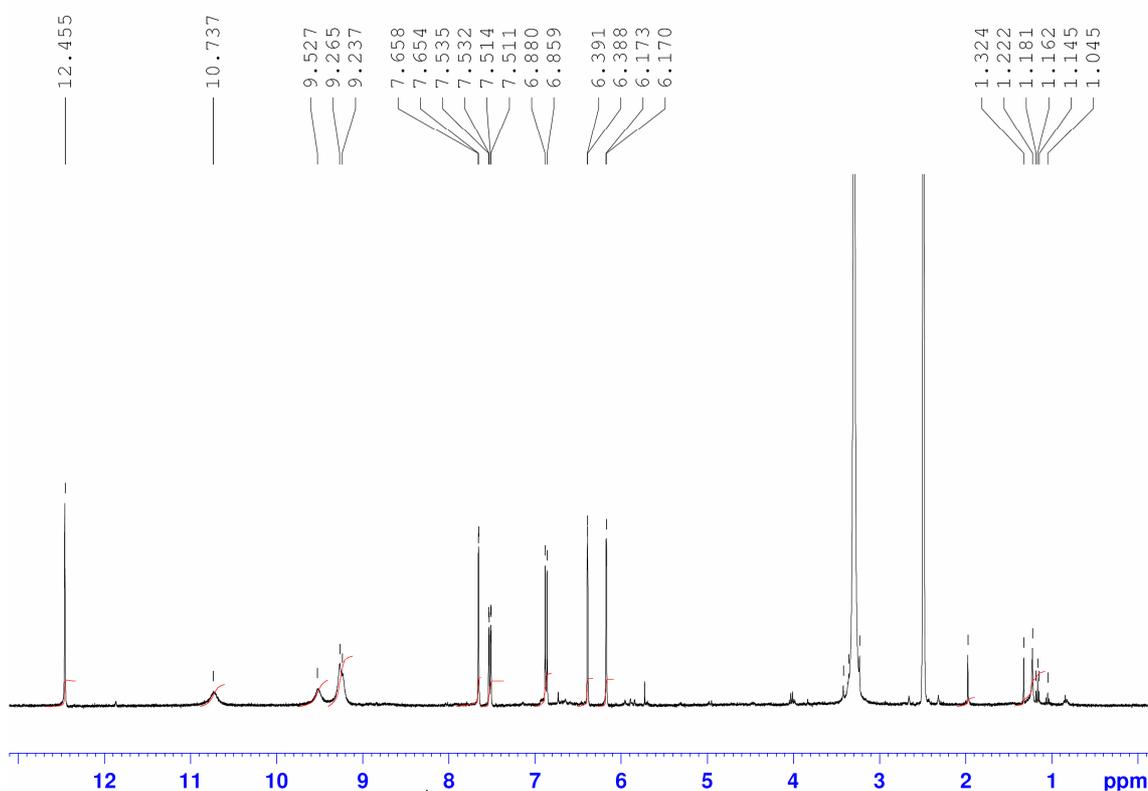


Figura 48. Espectro de RMN  $^1\text{H}$

**8.1.6.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN  $\text{C}^{13}$ ):** En este observamos el número de carbono presentes en la molécula y el grupo funcional al cual sometidos. Para una mejor percepción se muestra el espectro de RMN  $\text{C}^{13}$  desacoplado de hidrógenos.

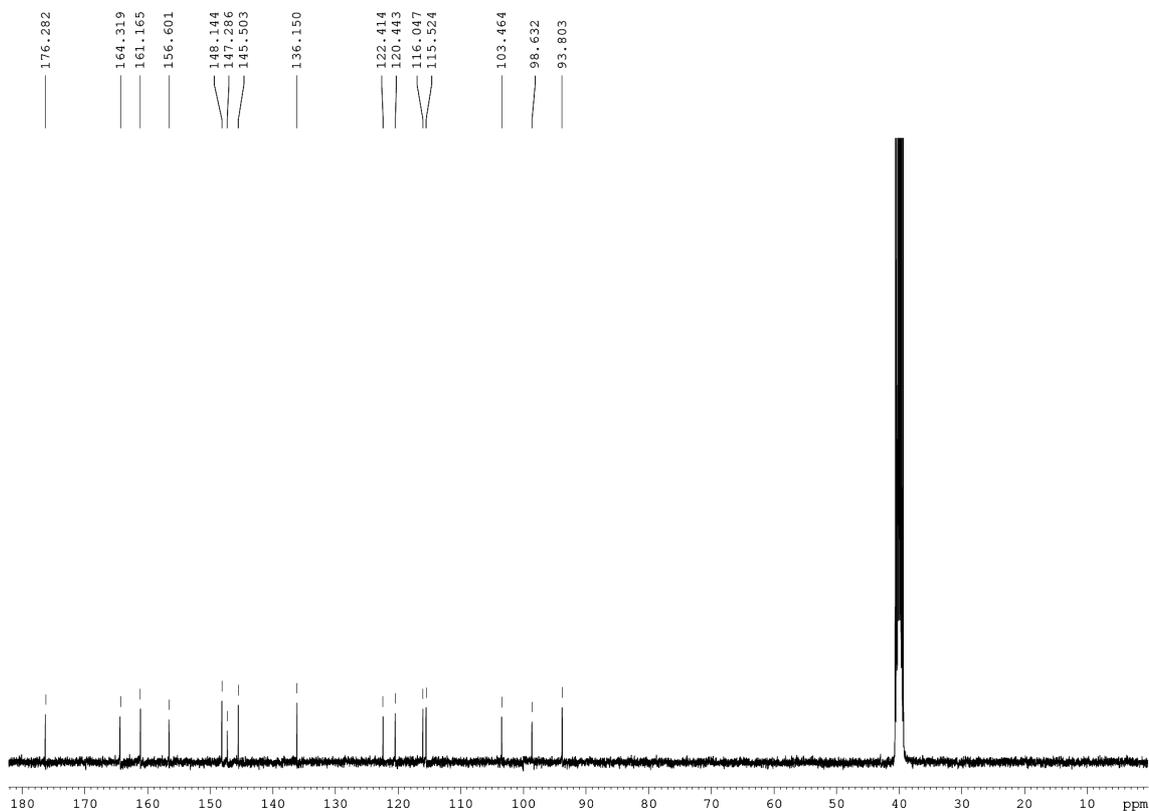
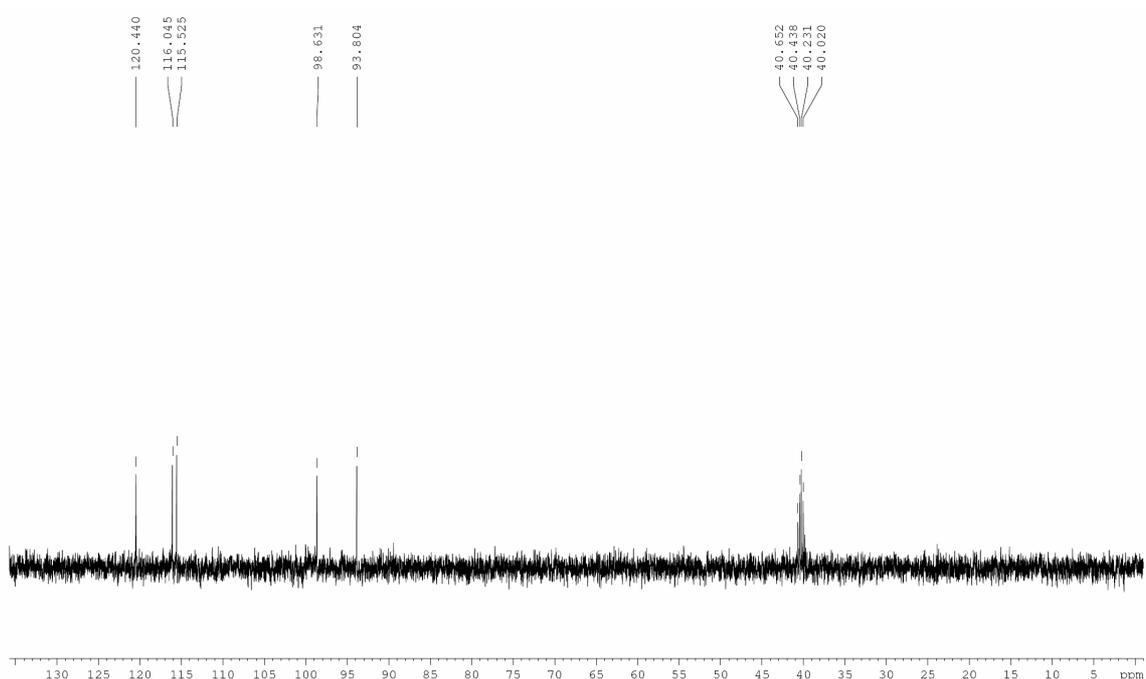


Figura 49: Espectro de RMN C<sup>13</sup>.

### 8.1.6.1.3. DEPT DISTORTIONLESS ENHANCEMENT BY POLARIZATION TRANSFER

El DEPT es un método que permite diferenciar CH, CH<sub>2</sub>, y CH<sub>3</sub> gracias al cambio de polaridad que surge cuando se toma el espectro con diferentes ángulos. Pues, los carbonos metinos (CH) serán positivos en el DEPT-90 y en el DEPT-135; carbonos metilenos (CH<sub>2</sub>) serán negativos en el DEPT-135 y ausentes en el DEPT-90; y carbonos metilos (CH<sub>3</sub>) serán positivos en el DEPT-135 y ausentes en el DEPT-90.

El espectro tomado para este compuesto corresponde a DEPT-135 por lo que aparecen todos los carbonos presentes en la molécula a excepción de los cuaternarios.

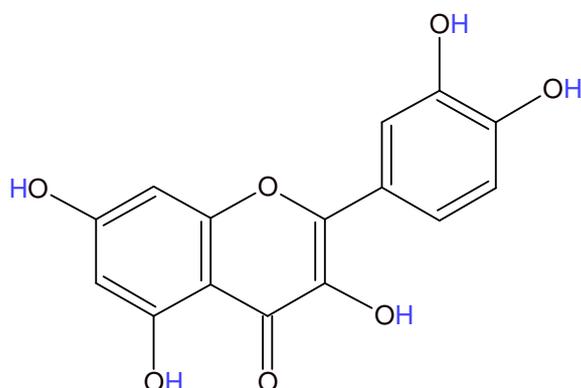


**Figura 50:** DEPT 135.

#### 8.6.1.4. Análisis Resonancia Magnética Nuclear Unidimensional

El espectro de masas determinó un peso molecular de 302 u.m.a, el RMN de  $^{13}\text{C}$  y el DEPT 135 mostraron un total de 15 carbonos, 5 CH aromáticos ( $\delta$  93,8, 98,6, 115,5, 116,04, 120,4). Un grupo carbonilo con  $\delta$  176,28, seis carbonos oxigenados en la región aromática ( $\delta$ , 164,32; 161,16; 156,601; 148,14; 147,29; 145,50), un carbono oxigenado en región no aromática  $\delta$  136,15 y dos carbonos cuaternarios ( $\delta$  103,46 y 122,41). Los que describen la fórmula molecular como  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ .

El espectro RMN  $^1\text{H}$  contiene señales para protones aromáticos *p*-disustituídos ( $\delta$  7,66 y 6,87), protones *m*-acoplados ( $\delta$  6,17 y 6,39), con esto se define al compuesto 1 como 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona comúnmente llamada quercetina, estructura que se confirma mediante la relaciones observadas en HMBC, HSQC y COSY.



**Figura 51.** Molécula deducida por UV-Vis, IR, MS, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ .

**Tabla 5.** Asignación de Resonancia de protones presentes en la molécula.

POSICIÓN	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (multiplicidad, J)	COSY	HMBC	HSQC	DEPT-135
2	147,29					
3	136,15	9,237 (s)				
4	176,28					
5	161,16	12,455 (s)		C 6; 9		
6	98,631	6,170 (d; 1,16 )		C 10; 8		+CH
7	164,32	10,737 (s)		C 6; 8		
8	93,804	6,391 (d; 1,25)		C 6, 4		+CH
9	156,601					
10	103,46					
1'	122,41					
2'	115,525	7,66(d, 1,4)				+CH
3'	145,50	9,53				
4'	148,14	9,27				
5'	120,44	6,87. (d; 8,47)	H 6'	C 1'; 3'	C 6'	+CH
6'	116,045	7,53, 7,51 (d,d; 1,35, 1,41)	H 5'	C 2; 5'	C 5'	+CH

El RMN de  $\text{C}^{13}$  entre más protegido se encuentre el Carbono mayor desplazamiento demuestra, Al igual que con RMN  $^1\text{H}$ , por tal motivo los carbonos que estén unidos a átomos más electronegativos como O, C, S, tendrán un desplazamiento mayor que los que estén unidos a H, igualmente, el orden de enlace desplaza el carbono hacia ppm más altos, por tal motivo el grupo  $\text{C}=\text{O}$  del

flavonol posee desplazamiento superior a 170 ppm, tabla 6, los C-OH de anillos aromáticos del sistema benzoilo tiene desplazamientos superiores a los del anillo cinamoílo, pues la vecindad con el grupo carbonilo, que es un grupo que saca electrones del anillo, hace que aumente la electronegatividad, por esta razón los desplazamientos químicos de los grupos C5 y C7 están en 161.16 y 164.32 ppm respectivamente, mientras que los del anillo B, carbonos 3' y 4' lo poseen en 136.15 y 148.14 ppm, fuera del sistema aromático los desplazamientos son menores para los C, por lo cual el Carbono 3 que posee un OH pero está fuera del anillo se encuentra en 136.15 ppm.  $^1\text{H}$

Los carbonos 9 y 10 tienen desplazamientos en 156.6 ppm y 103.46 ppm, la diferencia radica principalmente en que el carbono 9 está unido a un oxígeno que crea una desprotección mayor en este que en el carbono 10, caso similar al del carbono 2 y carbono 1', en donde el primero está unido al Oxígeno en posición 1, por lo que genera un desplazamiento hasta los 147.29 ppm, y el carbono 1' al no poseer heteroátomo tiene un desplazamiento solamente de 122.41 ppm.

Los grupos CH que se pueden ver en DEPT-135 muestran 5 picos correspondientes a 5 carbonos, dos en el anillo A, y tres en el anillo B; en el primero los dos metinos tienen un desplazamiento similar, la pequeña diferencia que existe se debe a que el grupo carbonilo cercano a 6 crea un ambiente electrónico propicio para que haya una desprotección mayor que en 8. Los metinos en el anillo B poseen dos desplazamientos, el primero corresponde a los carbonos 2' y 6' que se encuentran en 115 y 116 ppm respectivamente, un desplazamiento casi idéntico pues el carbono es similar, diferenciándose del carbono 5' que posee un desplazamiento mayor gracias a su vecino OH. (87).

El análisis de RMN  $^1\text{H}$  (figura 52) muestra con un desplazamiento químico ( $\delta$ ) de 12.455 ppm, un singulete perteneciente al OH-5, pues los protones ( $^1\text{H}$ ) poco protegidos, los cuales están unidos a átomos electronegativos, se encuentran en

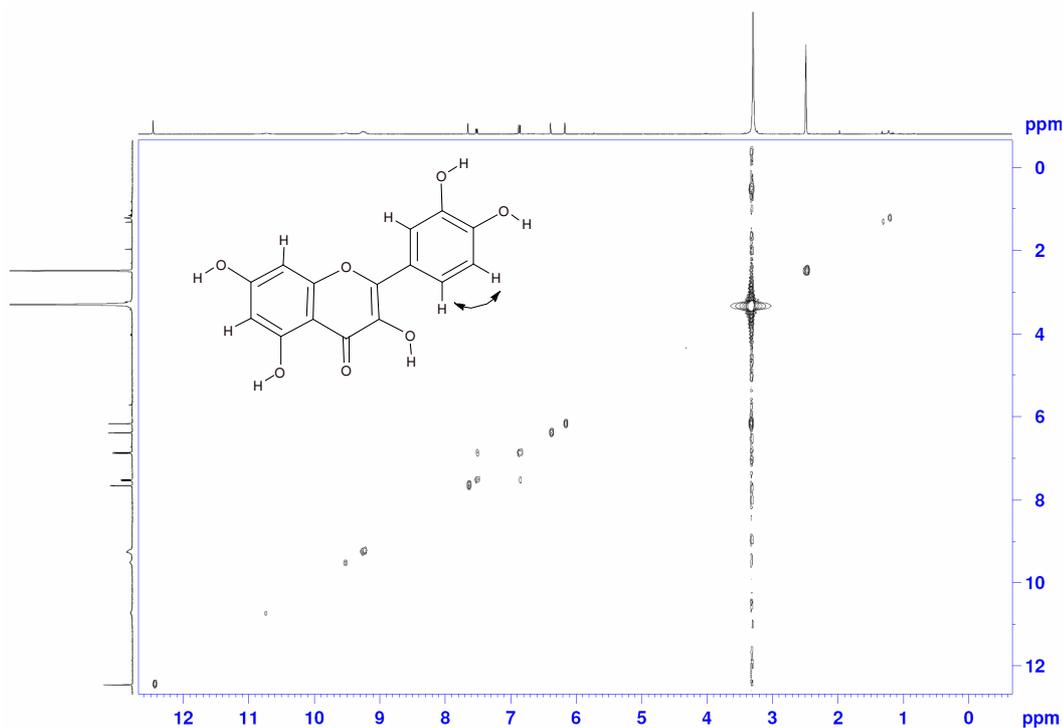
campos bajos, y la existencia de un sistema  $\gamma$ -benzopirona, donde el OH está unido a un anillo aromático se incrementa esta electronegatividad, por tal motivo queda en un campo tan bajo, en el carbono 3 se encuentra un OH que tiene presencia en 9.237 ppm en un campo menos bajo que el del carbono 5, aunque sea igualmente vecino al grupo carbonilo, este no se encuentra en un sistema aromático que lo desproteja. Con un  $\delta$  de 10.737 ppm se encuentra un OH en la posición 7. El cual se identificó con el desplazamiento batocrómico en UV-Vis con la adición de NaOAc. Estos tres protones se ubican siguiendo lo reportado por Martínez 2001 (3), el cual sugiere que entre 12 y 14 ppm se encuentran los protones de hidroxilos en 5, igualmente, Caldwell 2000 (81), indica la presencia de un OH-5 a un  $\delta$  de 12.40 ppm y un OH-7 a un  $\delta$  de 10.8 ppm. Choudhary 2001 (82), muestra un OH-5 a 12.7 ppm, Andrew , 1998 (83), muestra un OH-5 a 12.8 ppm, muestra un OH-7 a 10.72 ppm. En el anillo B según los desplazamientos obtenidos con  $H_3BO_3$  en UV-Vis posee una doble sustitución OH contigua, la cual según indican las señales a la altura de  $\delta$  9.527 un singulete, y el doblete con  $\delta$  igual a 9.265 y 9.237 que integra cada una para un único protón, siendo el singulete el protón de 3' ya que no posee vecinos, lo que indica también que en la posición 2' no existe protón; y la señal de doblete perteneciente al OH de 4', ya que tiene un ambiente eléctrico diferente por la presencia de un protón vecino en C 5'.

Los picos en 2.54 y 2.45 ppm son del DMSO en el cual se solubilizó el compuesto. El espectro de RMN  $^1H$  muestra dos señales una entre 4 – 3 ppm, y otra entre 1.045 y 1.324 al parecer son de residuos de  $CH_3CH_2OH$  que posea el equipo

### **8.1.6.2. Espectros RMN Bidimensionales (2D)**

**8.1.6.2.1 Espectroscopia de Correlación en 2D (COSY):** Gracias al COSY se pueden determinar los protones que tengan carbonos vecinos pues esta técnica actúa mediante las interacciones que se presentan entre un  $^1H_{(a)}$  -  $^1H_{(b)}$  mediante las constantes de acoplamiento. En el espectro de COSY se muestran las correlaciones que se encuentran en la molécula graficando en 2D el espectro

RMN  $^1\text{H}$ , F1 vs el espectro RMN  $^1\text{H}$  F2, por lo cual se presentan interacciones entre los propios H que se sitúan en una diagonal que atraviesa el espectro, y otras que son las que se presentan entre los hidrógenos vecinos. (86)



**Figura 52:** Espectro de COSY.

Se nota en la figura 54 los puntos que son los diagramas de relieve producto de las interacciones hidrógeno-hidrógeno. Casi todos los puntos se encuentran en una diagonal producida por hidrógenos de los mismos carbonos, es decir, el hidrógeno del carbono 5 que se encuentra 12.455 ppm interacciona en la segunda dimensión con el hidrógeno del mismo carbono, ya que no tiene vecinos. Se nota dos puntos por fuera de la diagonal, uno en las coordenadas F1, F2 (6.8, 7.535), y en coordenadas F2, F1 (7.535, 6.8), los cuales corresponden a los hidrógenos 5' y 6' que son los únicos hidrógenos con hidrógenos vecinos.

### 8.1.6.2.2. Espectro HBMC y HSQC.

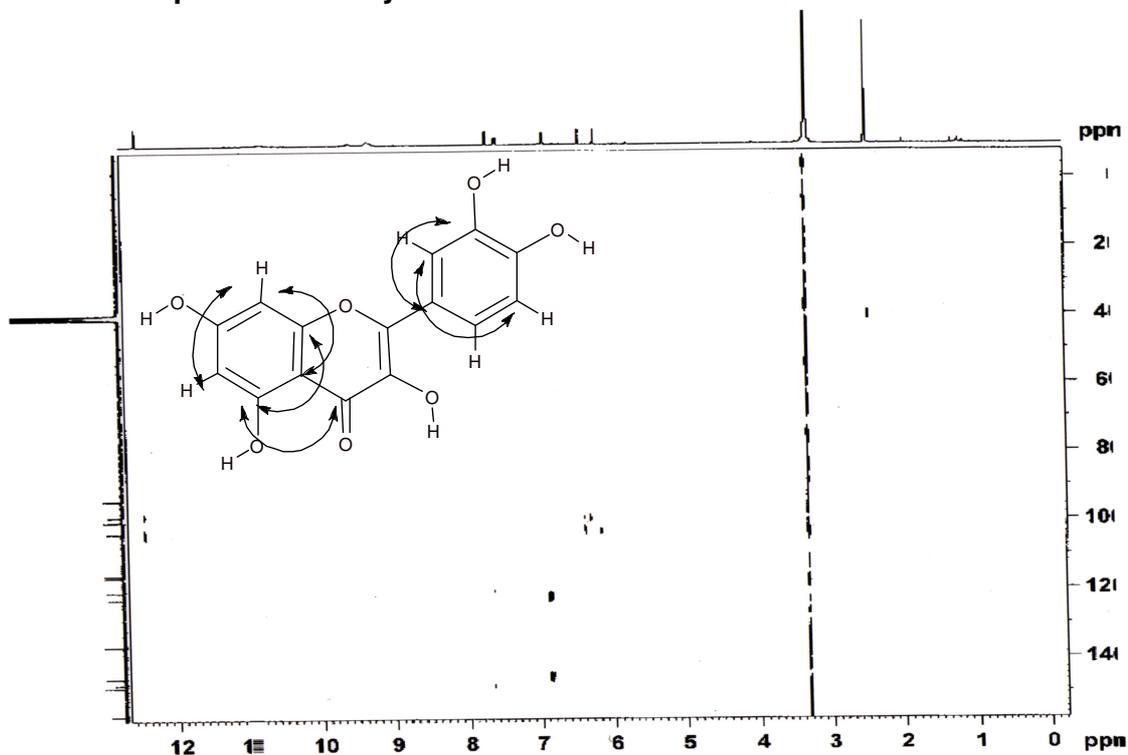


Figura 53. Espectro HBMC

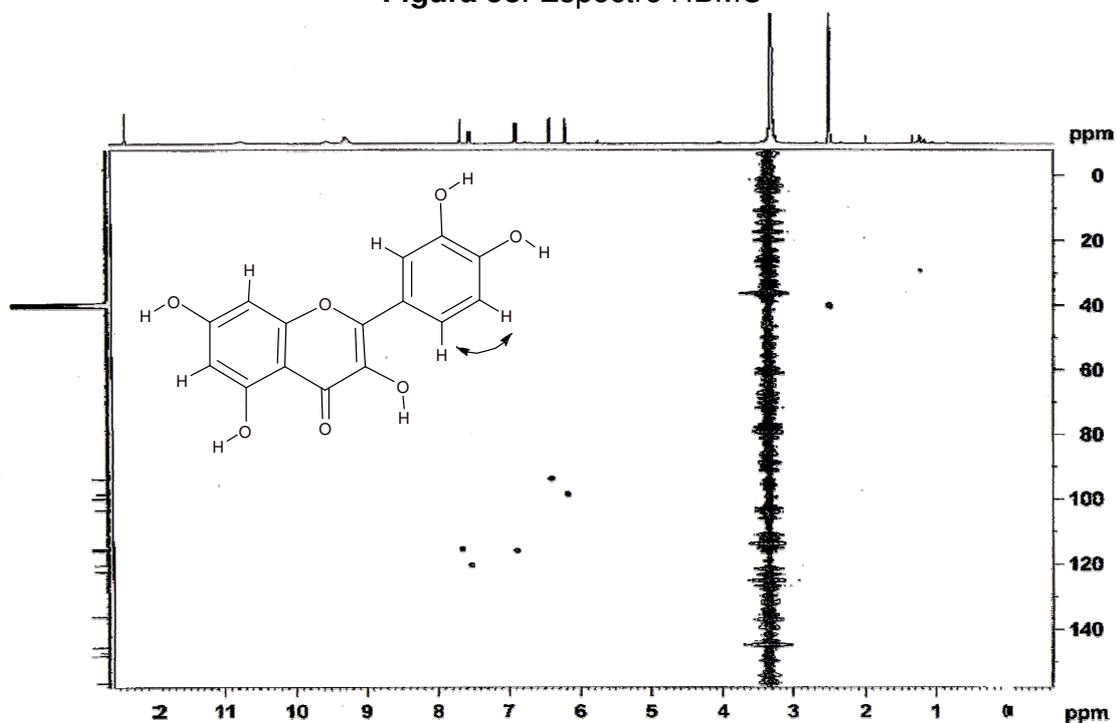
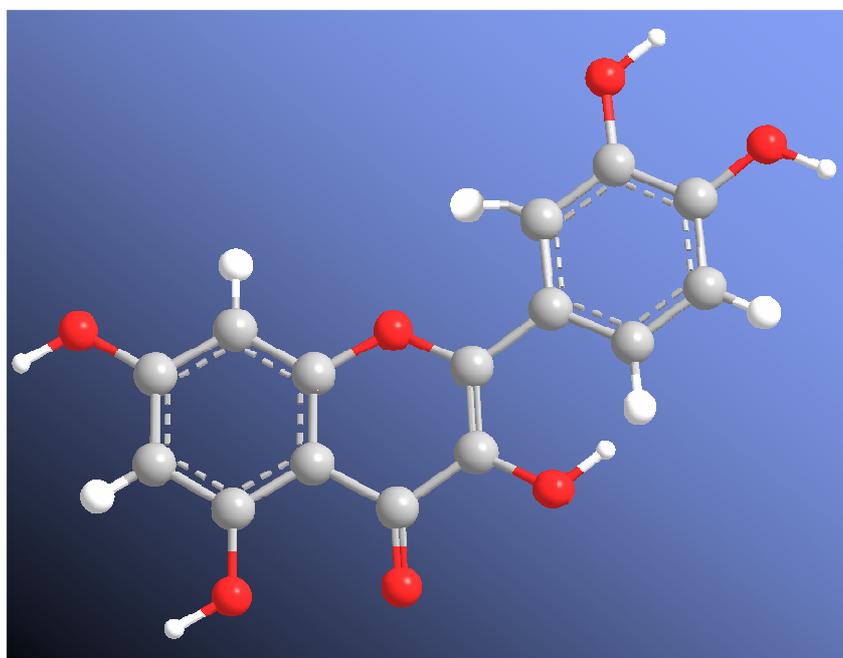


Figura 54. Espectro HSQC

El espectro de HSQC confirma la posición de los Hidrógenos en relación a los Carbonos, así mismo podemos determinar y confirmar que el hidrógeno con un desplazamiento químico de 6.17 ppm está unido a un carbono con un desplazamiento de 98.631 ppm que corresponde al carbono 6.

Así mismo podemos correlacionar el hidrógeno en 6.3 ppm está unido al carbono en 93.804 que es el 8. Los hidrógenos en 6.8 ppm, 7.5 ppm y 7.65 ppm del anillo B corresponden a los carbonos 5', 6' y 2 que tienen un desplazamiento químico de 120 ppm, 116 ppm y 115 ppm respectivamente.



**Figura 55.** Modelo 3D del 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona

En la pesquisa bibliográfica realizada no se encuentran reportes de este flavonoide en el género *Brownea*.

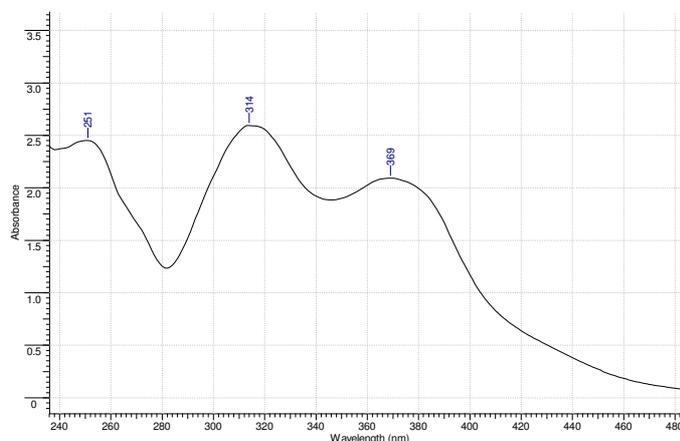
## 8.2 Acople del flavonoide a metal Cobre.

Los diferentes ensayos realizados variando la cantidad de los productos de reacción, y los diferentes procedimientos de separación dieron un resultado negativo para nuestro propósito, ya que no se logró un precipitado que se pudiera recuperar, aunque según pruebas analíticas cualitativas, el metal cobre no se encontraba libre en la solución, sino secuestrado por algún agente quelante, en este caso el flavonol. Para confirmar que si existe una quelación del cobre por parte del flavonoide se adicionó a 0.1 mL de la solución de reacción 2 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  28%, la coloración azul de la solución que indica la presencia de cobre libre tras la formación del complejo  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]$ , coloración que se encuentra ausente. Por lo tanto se puede asegurar que el cobre fue quelado por el flavonoide, aunque no podamos determinar la estructura del complejo se realizaron pruebas espectroscópicas como IR-ATR y UV-Vis, para verificar la presencia del flavonoide y el cobre en la misma molécula.



**Figura 56.** Montaje Síntesis del sistema Flavonoide-Cu

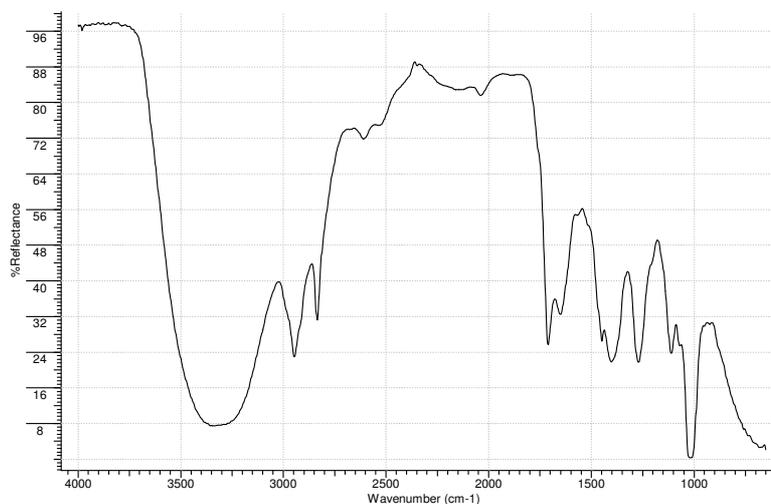
### 8.2.1 Espectro UV del compuesto acoplado.



**Figura 57.** Espectro UV de la solución del compuesto acoplado.

La figura 57 muestra las mandas características del flavonol y una banda nueva en 314 nm debido al efecto metal-ligando.

### 8.2.2 Espectro IR-ATR del compuesto acoplado.



**Figura 58.** IR Compuesto acoplado.

El IR del acomplete se realizó mediante espectroscopia infrarroja de reflectancia (FT-IR/ATR) en solución. La cual mostró disminución de la banda de OH con relación al flavonol puro debido a que en el OH de la posición 3 es dónde se liga el Cobre, el cual muestra absorciones  $\text{Cu}\cdot\cdot\text{O}$ . y  $\text{Cu}\cdot\cdot\text{C}$  en la región comprendida entre 400 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 8.3 Actividad Antimicrobiana

**8.3.1 Actividad Antimicrobiana del flavonoide:** Los resultados de la actividad antimicrobiana por microtitulación en placa utilizando como indicador Rezasurin, muestra las concentraciones mínimas inhibitorias logradas por este flavonol contra una bacteria grampositiva, *Staphylococcus aureus*, y dos levaduras, *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*, y muestra resultados inhibitorios negativos contra dos bacterias gramnegativas, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli*, al igual que para *Staphylococcus epidermidis* bacteria grampositiva.

Los resultados mostrados en la tabla 6 son las mínimas concentraciones a la cuales el indicador mantiene su color inicial, y no es reducido a rosa por las oxido-reductasas de las bacterias, lo que indica una inhibición en el crecimiento.

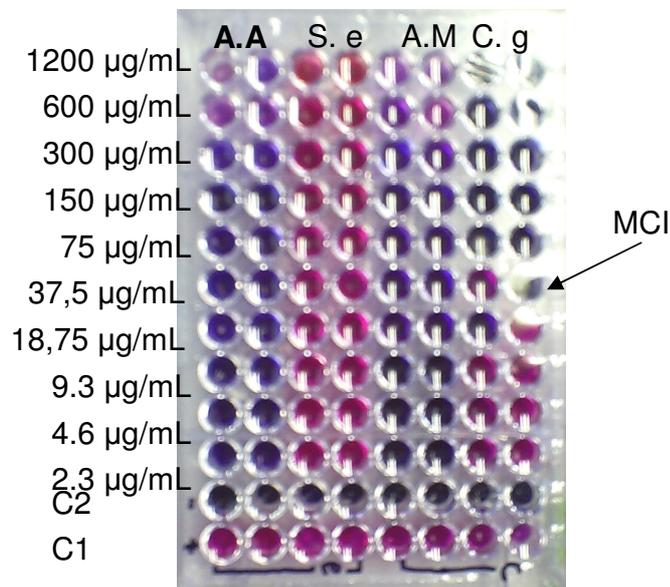
**Tabla 6.** Resultados microtitulación en placa flavonoide.

Material de prueba	S. <i>aureus</i>		S. <i>epidermidis</i>		E. <i>coli</i>		K. <i>oxytoca</i>		C. <i>albicans</i>		C. <i>guilliermondii</i>	
	Flavonoide	18,75	18,75	--	--	--	--	--	--	4.87	2.34	37.5
Antibiótico	37,5	37,5	2.34	2.34	18.75	9.74	9.37	9.37	2.34	2.34	2.34	2.34
C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C2	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+

+, Indica que los controles dieron según lo esperado.

-, Indica que el control dio un resultado no esperado

Estos ensayos muestran una MIC producida por el flavonol contra *S aureus* de 18,75 µg/mL, resultado que indica una actividad antibacterial del flavonol aislado de *Brownea ariza B*, actividad que al ser comparada con la del antibiótico que fue 37,5 µg/mL, resulta se mejor pues se utiliza menor cantidad de compuesto que el antibiótico usado.



**Figura 59.** Resultado Microdilusion-titulación en placa para *S. epidermidis* (*S. e*) y *Candida guilliermondii* siendo AA, (Antibiótico) y AM (Antimicótico).

En la figura 59 se muestra el resultado para *S. epidermidis* (*S. e*) y para *Candida guilliermondii* (*C. a*), dónde se muestra la concentración mínima inhibitoria el cual corresponde al último valor en el cual el indicador permanece azul. Para C.a 37,5 µg/mL mientras que para S.e no presentó inhibición.

La actividad mostrada contra *S. epidermidis* es nula en las concentraciones que se trabajaron, mostrando con esto una vez más la alta resistencia a agentes antimicrobianos que posee esta bacteria.

Los resultados contra *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* muestran que a concentración menores o iguales a 1200 µg/mL no existe inhibición, aunque es posible que a concentraciones mayores si lo tenga, estas inhibiciones ya podrían tratarse de inhibiciones por toxicidad y saturación del medio más que por la acción del flavonoide en si, ya sea atacando la pared celular o el núcleo de la bacteria

En *Candida albicans* se obtuvieron MIC de 4.87 µg/mL concentraciones similares a las necesitadas por el antimicótico para inhibir su crecimiento. Igualmente *C. guilliermondii* se mostró una MIC a la altura de 37.5 µg/mL, estos dos resultados confirman la cualidad antifúngica que poseen los flavonoides (10) y muestra que este flavonol en especial posee una buena actividad contra estas dos levaduras.

El hecho de que este flavonol presente actividad contra bacterias confirma lo enunciado por Cushnie y Lamb (2005) (18) sobre la actividad antimicrobiana de la familia de los flavonoides.

Los flavonoides entre mayores sustituyentes OH posean, mayor actividad biológica muestra, puesto que se ha reportado que las sustituciones de metilos (OMe) o glicósidos (OGlu) disminuyen drásticamente las actividades antibacteriales y antifúngicas en comparación a los respectivos aglicones. Este flavonol aislado posee cinco sustituyentes OH los cuales le permiten incrementar su poder antimicrobiano, lo cual se identifica en la actividad antibacteriana pues de 4 bacterias de prueba solamente se mostró actividad contra *S. aureus*

La diferencia entre la actividad frente a grampositivas y gramnegativas, se debe a que este posiblemente ataca el material genético de la bacteria ya que debido a su estructura poco polar pasa fácilmente por medio de la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, por lo cual puede ingresar directamente a formar puentes de hidrógeno entre los OH del anillo B que tiene sustituciones en el carbono 2', posición bastante favorable para estas reacciones, presentando un efecto bacteriostático. (18; 85)

**8.3.2 Actividad Antimicrobiana de compuesto acoplado:** Esta se realizó preparando una solución en relación a 1200 µg/mL de la cual se realizaron diluciones seriadas por mitad hasta llegar a 2.4 µg/mL. Este ensayo muestra las concentraciones mínimas inhibitorias logradas por el sistema flavonoide-Cu contra

una bacteria grampositiva, *Staphylococcus aureus*, a una concentración superior a la lograda por el flavonol libre y dos levaduras, *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*, con resultados comparables a los obtenidos con el flavonol puro y muestra resultados inhibitorios negativos contra dos bacterias gramnegativas, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli*, al igual que para *Staphylococcus epidermidis* bacteria grampositiva.

**Tabla 7.** Resultados microtitulación en placa el sistema Flavonoide-Cu

Material de prueba	S. aureus		S. Epidermidis		E. coli		K. oxytoca		C. albicans		C. guilliermondii	
	Flavonoide	1200	1200	--	--	--	--	--	--	2.34	2.34	18.75
Antibiótico	37,5	37.5	2.34	2.34	18.75	9.74	9.37	9.37	2.34	2.34	2.34	2.34
C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C2	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+

+, Indica que los controles dieron según lo esperado.

-, Indica que el control dio un resultado no esperado

Estos resultados (Tabla 7) muestran que el acople al flavonoide no aumentó la actividad antimicrobiana del compuesto, en cambio, la disminuyó para todos los microorganismos de prueba, a excepción de *C. guilliermondii* levadura en la cual tiene un efecto un poco mayor que con el flavonoide libre, aunque este aumento no es significativo frente a las disminuciones sufridas por los demás microorganismos. Este comportamiento adverso de puede deber a que el cobre se coordina al flavonol mediante sus grupos OH, lo cual le deja con menos grupos activos para ejercer su efecto contra los microorganismos, pues se reporta que la actividad antimicrobiana de los flavonoides es directamente proporcional a la cantidad de grupos OH que posea la molécula (18, 88).

#### 8.4 Actividad Citotóxica.

La citotóxicidad del flavonol puro y del sistema flavonoide-Cu se realizó mediante el recuento de las células viables a las 24, 48 y 72 horas después de haber adicionado los compuestos en las concentraciones desde 1200 µg/mL hasta 37.5 µg/mL. El porcentaje de células viables se calcula a partir del valor medio del

recuento de los cultivos tratados con cada concentración del flavonol con respecto al control (89, 90)

#### 8.4.1 Tabulación de datos de células viables por día.

**Tabla 8.** Porcentaje de células viables a las 24 h.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN						
	BLANCO <sup>a</sup>	1200	600	300	150	75	37,5
Flavonol	100,00%	97,09%	97,62%	99,47%	95,77%	94,71%	93,92%
Sistema Flavonol-Cu	100,00%	94,74%	93,95%	93,68%	93,42%	92,89%	92,11%

a) El 100% para el día 1 corresponde a 380000 células/mL.

**Tabla 9.** Porcentaje de células viables a las 48 h.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN						
	BLANCO <sup>a</sup>	1200	600	300	150	75	37,5
Flavonol	100,00%	55,42%	57,83%	59,04%	69,88%	79,52%	86,75%
Sistema Flavonol-Cu	100,00%	53,49%	50,00%	53,49%	51,16%	48,84%	58,14%

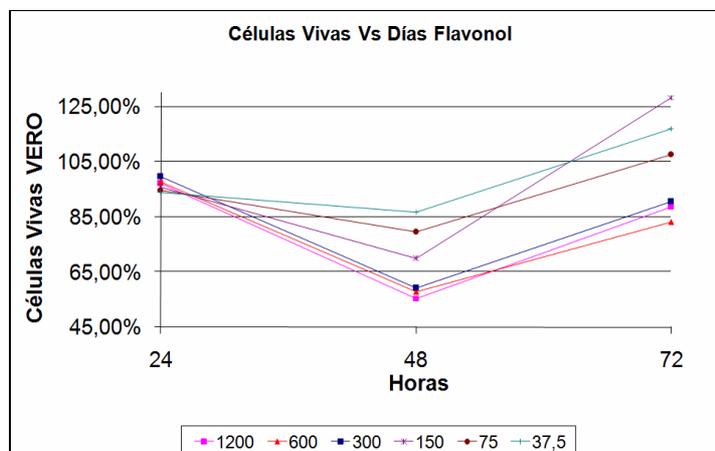
a) El 100% para el día 2 corresponde a 415000 células/mL.

**Tabla 10.** Porcentaje de células viables en a las 72h.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN						
	BLANCO <sup>a</sup>	1200	600	300	150	75	37,5
Flavonol	100,00%	88,68%	83,02%	90,57%	128,30%	107,55%	116,98%
Sistema Flavonol-Cu	100,00%	88,71%	66,13%	75,81%	58,06%	61,29%	51,61%

a) El 100% para el día 2 corresponde a 310000 células/mL.

**8.4.2 Análisis datos actividad citotóxica flavonol:** Los datos recolectados en los 3 días de recuentos muestran que el crecimiento celular en presencia del flavonol tiene un comportamiento errático, el cual decrece en forma constante hasta las 48 horas momento en el cual llega hasta su mínimo, y de ahí en adelante comienza un aumento en el porcentaje de células viables con respecto al control celular (figura 60), esto se nota en todas las diluciones casi que proporcionalmente a la concentración.

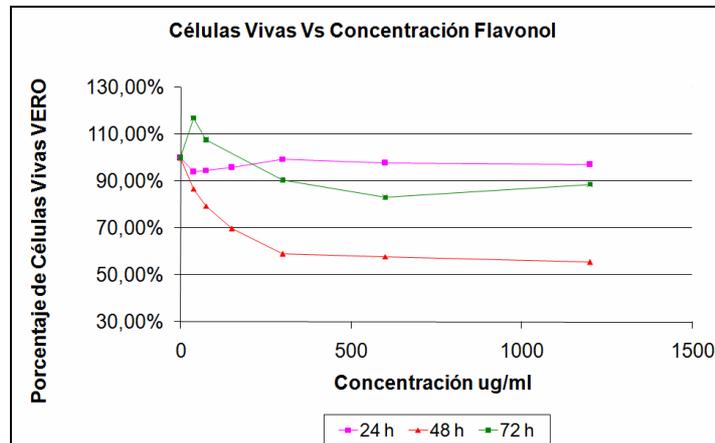


**Figura 60.** Gráfica Células viables contra días en las diferentes concentraciones del flavonol.

Esto se explica debido a que en las primeras 48 horas las células están ingiriendo el compuesto que se adicionó a su medio, el cual está ejerciendo una acción citotóxica que impide el crecimiento normal de la células, lo que se nota con la mayor cantidad de células en el blanco que en las diluciones del compuesto, acción que no llega a la concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ ), que se expresa como la concentración en la cual mueren el 50% de las células con relación al control celular. Después de las 48 horas empieza un proceso de aumento en los porcentajes con relación al control, llegando en algunos casos a sobrepasar este valor, esto se debe a que el flavonol no ejerce efecto alguno sobre las células pasadas más de 48 horas, ya que las células al ir ingiriendo el compuesto disminuyen la concentración de este en el medio lo que la aleja de la concentración terapéutica, que es la concentración en la cual debe de estar un principio activo para que pueda ejercer su función, este mismo efecto se ve en la administración de medicamentos, los cuales tienen una posología que pretende mantener la concentración terapéutica constante en el organismo para que la droga cumpla su objetivo.

Debido a esta circunstancia se toma como medida aceptable para la determinación de la citotoxicidad los datos obtenidos a las 48 horas después de la siembra, pues antes de esta el efecto producido por el flavonol no ha sido lo

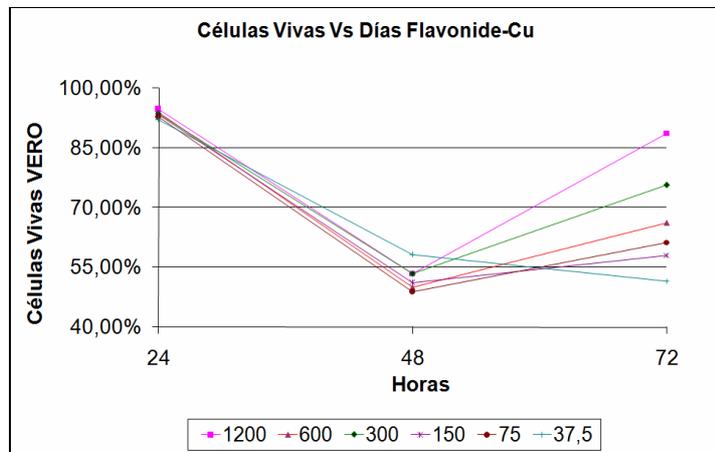
suficientemente acentuado como para que tenga una validez, y después de este tiempo se obtienen valores residuales indeseados y difícilmente atribuibles.



**Figura 61.** Gráfica Células viables contra concentración de flavonol diario.

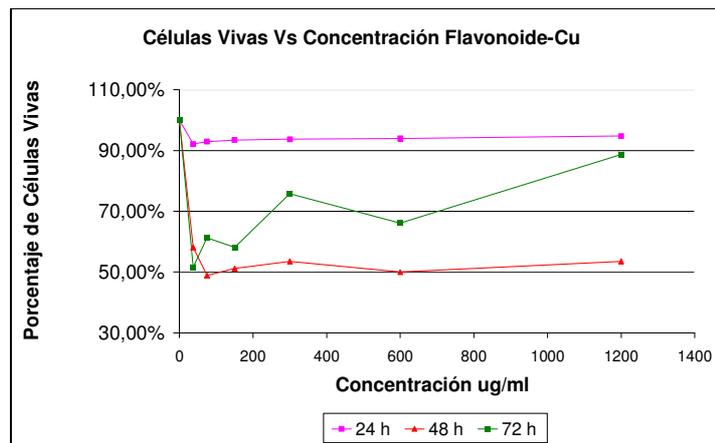
La figura 61 muestra como decrece el número de células en los pozos que contienen el flavonol constantemente en concordancia a la concentración de este a las 48 horas. Se nota la existencia de una acción citotóxica por parte del flavonol contra las células Vero en aumento desde la concentración de 37.5 hasta 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero esta acción no llega hasta la  $\text{CC}_{50}$  al menos en las concentraciones trabajadas, lo que es un buen resultado comparado con las concentraciones en las cuales hay existencia de actividad antimicrobiana.

**8.4.2 Análisis datos actividad citotóxica sistema flavonol-Cu:** Los datos recolectados en los 3 días de recuentos celulares muestran un comportamiento similar a los mostrados por el cultivo al cual fue suministrado el flavonol, pues con las concentraciones del sistema metal-ligando (Cu-Flavonoide) se nota el mismo perfil de decrecimiento en las primeras 48 horas y un aumento en el porcentaje de células en las siguientes 24 horas (figura 64).



**Figura 62.** Gráfica Células viables contra días en las diferentes concentraciones del sistema flavonoide-Cu.

Comportamiento explicado por el mismo fenómeno de la concentración mínima terapéutica discutido anteriormente.



**Figura 63.** Gráfica Células viables contra concentración de flavonoide-Cu diario.

En la figura 62 se muestra igualmente como la cantidad células disminuye a medida que aumenta la concentración, pero tiene un comportamiento poco predecible pues, desde la concentración de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se alcanza el  $\text{CC}_{50}$  y concentraciones como la de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la de 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  está por encima de este valor. Lo que se explica fácilmente por el método de conteo, pues este se realizó por conteo manual usando cámara de neubauer, contando las células presentes en 10  $\mu\text{L}$  de suspensión y extrapoladas con la fórmula propia de la cámara, este método puede tener una desviación estándar de hasta 10 unidades,

por lo cual para poderlo estandarizar se deben de realizar suficientes repeticiones para disminuir este error, procedimiento que es imposible de realizar dadas las condiciones económicas por las cuales pasa la universidad, y además los medios de cultivo celular y el material para este fin es de elevado costo. Para disminuir estos errores se usan técnicas con indicadores que se pueden medir en espectrofotómetros de microelisa disminuyendo el error humano y experimental como el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromido difeniltetrazolium (MTT), descrito por Mosmann (90). Pero este indicador es costoso y no se tenía disponible a la hora de realizar estos ensayos. Igualmente se toma como  $CC_{50}$  la primera concentración en la cual fueron muertas el 50% de las células, la cual se sitúa a los 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Citotóxicidad muy elevada si se compara con el flavonol puro, lo que muestra que el flavonol sin ser acoplado a un metal es menos agresivo contra las células Vero.

### 8.5 Actividad Anticancerígena.

La actividad anticancerígena del flavonol puro y del sistema flavonoide-Cu se realizó mediante el recuento de las células viables a las 24 y 48 horas después de adicionar los compuestos en las concentraciones desde 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El porcentaje de células viables se calcula a partir del valor medio del recuento de los cultivos tratados con cada concentración del extracto con respecto al control celular, que es el 100% de viabilidad (89, 90).

#### 8.5.1 Tabulación de datos de células viables por día.

**Tabla 11.** Porcentaje de células viables en a las 24h.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN						
	BLANCO <sup>a</sup>	1200	600	300	150	75	37,5
Flavonol	100,00%	96,0%	96,0%	92,0%	100,0%	112,0%	100,0%
Sistema Flavonol-Cu	100,00%	66,67%	62,50%	75,00%	75,00%	95,83%	83,33%

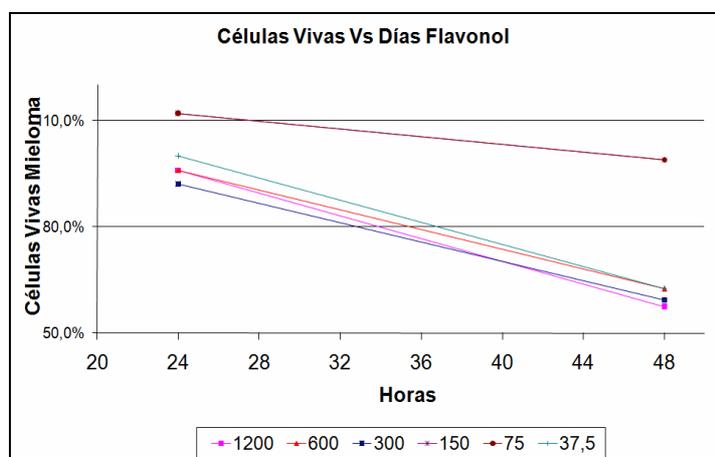
b) El 100% para el día 1 corresponde a 500000 células/mL.

**Tabla 12.** Porcentaje de células viables en a las 48 h.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN						
	BLANCO <sup>a</sup>	1200	600	300	150	75	37,5
Flavonol	100,00%	57,29%	62,50%	59,38%	82,29%	98,96%	62,50%
Sistema Flavonol-Cu	100,00%	31,37%	33,33%	39,22%	53,92%	58,82%	93,14%

b) El 100% para el día 2 corresponde a 510000 células/mL.

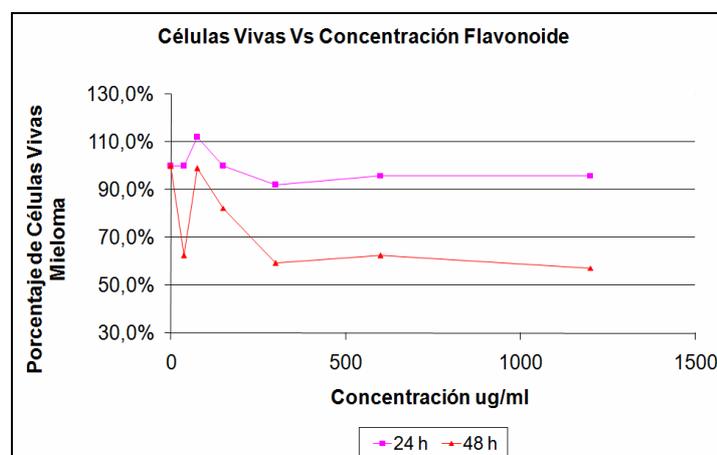
**8.5.2 Análisis datos actividad anticancerígena flavonol:** Se hicieron conteos en cámara de nuebauer a 10 µL de suspensión obtenida de cada pozo multiplicado por su respectivo factor de dilución y el de la cámara. A las 24 horas después de haber agregado la solución del flavonol al cultivo de Mieloma Murino SP2/Ag0-14 se mostró una disminución en el porcentaje de células presentes con relación al control de 100% (figura 64), a las 48 horas el efecto fue más acentuado, pues mientras en el blanco existían más células que las aplicadas originalmente, en los pozos que contenían las diluciones del flavonol se mostraba un viabilidad bastante baja.



**Figura 64.** Gráfica Células viables de línea celular murina contra horas en las diferentes concentraciones del flavonol.

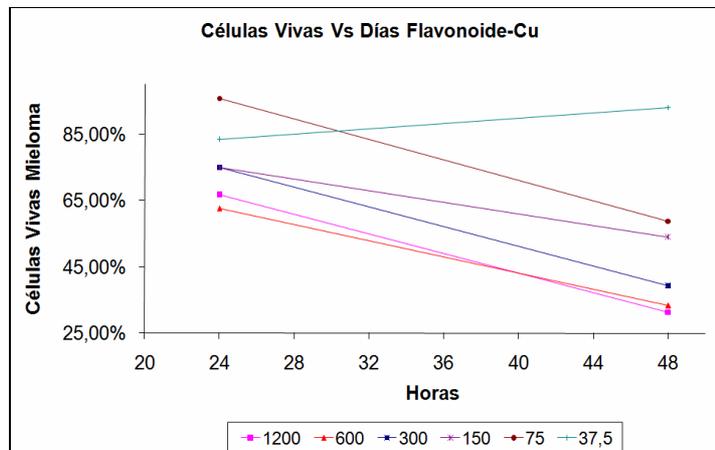
En la figura 64 se grafican los resultados, los cuales muestran como la actividad contra el Mieloma Murino SP2/Ag0-14 va directamente proporcional a la concentración de flavonoide agregado al medio de cultivo celular excepción de dos puntos que tiene una cantidad de células mayor al que se esperaría, esta

incongruencia se nota en las dos mediciones, lo que se muestra que es un error sistemático, ya sea de la concentración agregada, o en la cantidad de células presentes a la hora de iniciar la prueba, factores que no se pueden calcular ni controlar, pues son errores inherentes al método. En ninguna de las concentraciones se llega a una concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), la cual se define como la concentración en la cual el compuesto es capaz de tener una acción toxica contra la mitad de las células del medio. (91)

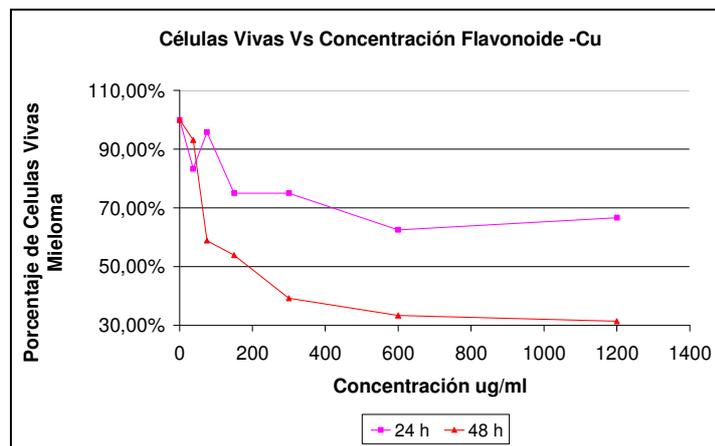


**Figura 65** Gráfica Células viables de mieloma contra concentración de flavonol diario.

**8.5.3 Análisis datos actividad anticancerígena del sistema flavonol-Cu:** Se determina la posible actividad anticancerígena en línea celular de Mieloma Murino del sistema Flavonol-Cu, mediante el conteo del porcentaje de las células viables con relación al blanco, a las 24 y 48 horas de adición del compuesto acoplado a las diferentes concentraciones. En la figura 66 se muestra como decrece la cantidad de células en relación al tiempo mostrando que en las primeras horas se produce un decrecimiento leve del porcentaje celular disminuyendo hasta casi 70%, muy diferente al mostrado en el segundo día de conteo donde el porcentaje de células vivas disminuye casi hasta el 30% (figura 67). La primera concentración que bajó del 50% fue la de 300 $\mu$ g/mL, lo cual indica que esta es la  $CE_{50}$  para la línea celular de Mieloma Murino SP2/Ag0-14 del flavonol acoplado a cobre. (91)



**Figura 66** Gráfica Células viables de mieloma murino contra horas en las diferentes concentraciones del sistema flavonoide-Cu.



**Figura 67.** Gráfica Células viables de mieloma contra concentración de flavonoide-Cu diario.

## CONCLUSIONES

- Se aisló un flavonoide de *Brownea ariza B*, al cual se le realizó la elucidación estructural por métodos analíticos instrumentales como Espectroscopia IR y UV-Vis, Espectrometría de Masas (CG-MS y DIMS) y Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $\text{C}^{13}$ , COSY, DEPT, HMBC, HSQC), determinando el flavonoide como 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona.
- El flavonoide 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona no ha sido reportado el género *Leguminacea*, lo que sugiere que este sea considerado como un flavonoide nuevo para esta familia de vegetales.
- El 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona posee actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*.
- Se logró el acople del flavonoide al metal de coordinación Cobre (II), pero no se logró una caracterización apropiada de su estructura debido a la dificultad de obtenerlo sólido.
- El sistema flavonol-Cu disminuye la actividad antibacteriana del 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona para *Staphylococcus aureus*, y mantiene casi constante la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida guilliermondii*.
- Se determinó la actividad citotóxica del 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona mostrando que a concentraciones inferiores de 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  tiene efectos citotóxicos contra la línea celular VERO, pero no alcanza a tener el  $\text{CC}_{50}$ .

- La complejación al metal no disminuye la citotóxicidad del flavonol, al contrario se ve aumentada por este procedimiento. Determinando una  $CC_{50}$  para una concentración de  $150\mu\text{g/mL}$ .
- Se encontró que el 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona posee cierta actividad anticancerígena, pero en concentraciones inferiores de  $1200\mu\text{g/mL}$  no alcanza el  $CE_{50}$ .
- Se muestra como el acople del flavonoide al metal de coordinación cobre (II) aumenta considerablemente la actividad anticancerígena de este mostrando una  $CE_{50}$  para  $300\mu\text{g/mL}$ .

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda una extracción del flavonoide en una mayor cantidad para intentar una complejación con el metal en diferentes condiciones de reacción.
- En *Brownea ariza B*, se encontraron varios flavonoides, por tal motivo se sugiere seguir extrayendo y elucidando los demás flavonoides presentes en esta especie y determinar su utilidad biológica.
- Se recomienda seguir evaluando el flavonol empleando concentraciones superiores para determinar la concentración a la cual es capaz de producir efecto citotóxico en el 50% de las células. Al igual que para determinar la concentración efectiva media contra Mieloma Murino SP2/Ag0-14.
- Obtener el complejo  $[\text{Cu}(\text{Flavonoide})_2]^{2+}$  en forma sólida, para adelantar las pruebas citotóxicas a unas concentraciones alta que permitan determina la concentración a la cual es capaz de producir efecto citotóxico en el 50% de las células. Al igual que para determinar la concentración efectiva media contra mieloma murino.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Parámetros Análisis GC/MS

#### CERTICADO DE CALIDAD/QUALITY CERTIFICATI

Fecha/Date : 4/30/2008 10:55:42 AM  
Identificación de la muestra/Sample ID : Flavonoide  
Vol. Inyeccion/Injection Volume (uL) : 2  
Archivo/Data File : C:\GCMSsolution\Data\EUNICE\Flavonoide.qgd  
Método/Method File : C:\GCMSsolution\Data\EUNICE\flav.qgm  
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\SEI-2008-04-19rest.qgt  
Descripción muestra/Sample Descr. : Acetilado

#### Method

[Comment]

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp. :125.0 °C  
Injection Temp. :310.00 °C  
Injection Mode :Split  
Flow Control Mode :Linear Velocity  
Pressure :83.4 kPa  
Total Flow :6.0 mL/min  
Column Flow :1.00 mL/min  
Linear Velocity :37.6 cm/sec  
Purge Flow :1.0 mL/min  
Split Ratio :4.0  
High Pressure Injection :OFF  
Carrier Gas Saver :OFF  
Splitter Hold :OFF  
Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	125.0	2.00
25.00	320.0	5.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes  
SPL1 : Yes  
MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes  
SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait :No  
Equilibrium Time :3.0 min

[GCMS-QP2010]

IonSourceTemp :260.00 °C  
Interface Temp. :280.00 °C  
Solvent Cut Time :2.00 min  
Ionization Mode :SEI  
Detector Gain Mode :Relative  
Detector Gain :0.30 kV  
Threshold :5

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :3.00min  
End Time :14.00min  
ACQ Mode :Scan  
Event Time :0.50sec  
Scan Speed :666  
Start m/z :40.00  
End m/z :350.00

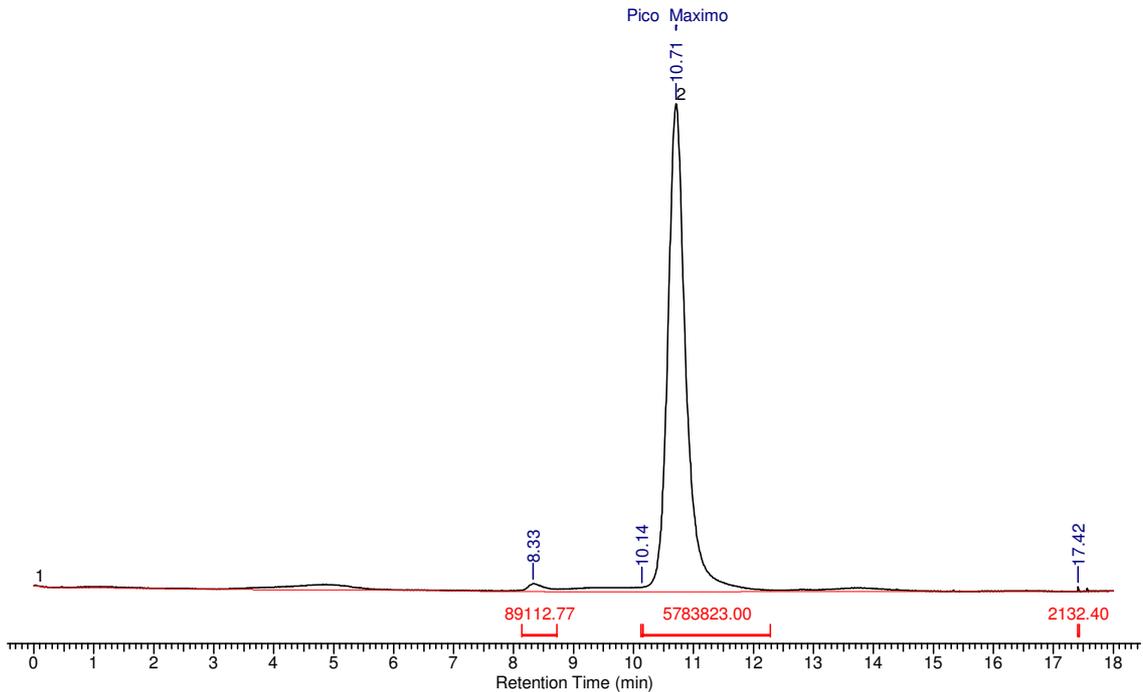
Sample Inlet Unit :GC

## ANEXO 2: Cromatograma HPLC

### FLAVONOIDE JFG UdeQ

HP-SUCROMILES  
Planta Acido Citrico

Type	HPLC
Points Count	5401
Date Stamp	08-Jan-08, 09:19:52
Date	27 Feb 2008 19:54:00
Title	LC DATA FILE
Comment	MCONTROL 0.25
Sample Name	MCONTROL 0.25
Operator ID	ARC
Instrument Name	VWD
Detector	UV (210 nm)
Sensitivity	1
Mobile Phase	MeCN/EtOH/MeOH (40:30:30 v/v);
Temperature	30 °C
Flow Rate	0.6 ml/min
Column Name	HPX-87H
Length	30 cm
Diameter	0.78 cm
Particle Size	9 um
Column Flow Rate	0.6 ml/min
Endcapped	Yes



No.	Name	tR(min)	Peak Area	Area Percent	W(min)
1	unknown	8.328	89112.773	1.515	0.477
2	unknown	10.139	6159.344	0.105	0.013
3	unknown	10.709	5783823.000	98.344	-
4	unknown	17.417	2132.397	0.036	0.020

No.	Annotation	tR(min)
1	Pico Maximo	10.7086

## **BIBLIOGRAFÍA**

01. Andersen Øyvind M., Markham Kenneth R., En: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, 2006. ISBN: 978-0849320217
02. Grotewold E, The Science of Flavonoids, Springer Science-Business Media, Inc. 2006
03. Martínez A., EN: FLAVONOIDES, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, 2005.
04. Lin, Y.M y col .In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. Journal Of Natural Products 60:884-888. 1997
05. Vanden Berghe, D.A y col. Antiviral agents from higher plants and an example of structure-activity relationship of the 3-methoxyflavones. In: Bioactive Natural Products, detection, isolation and structural determination. CRC Press. Boca Ratón. 405-440. 1993. ISBN 978-0849343728
06. Kümmerer K. Resistance in the environment. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54 (2) : 311. 2004
07. Russell, G. Antibiotic-resistant organism infection. The American Surgeon. 66 (2) : 112. 2000
08. Organización Mundial de la Salud (1999) Informe sobre las enfermedades infecciosas. [En línea]. "Actualizada 12 de Junio 2004". [citado 10 de agosto de 2007, 16:25]. Idioma español, formato html. Disponible en internet: <http://www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/>.
09. Smith, R. and Coast, J. Antimicrobial resistance: A global response. Bulletin of the World Health Organization. 80 (2) : 126. 2002.

10. Sharon A, Ghirlando R, and Gressel J. Isolation, Purification, and Identification of 2-(p-Hydroxyphenoxy)-5,7-Dihydroxychromone: A Fungal-induced Phytoalexin from *Cassia obtusifolia*, Plant Physiol. 98, 303-308. 1992
11. Zhou J., Wang L., Wang J, Tang N.. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes Transition Metal Chemistry 26: 57 - 63, 2001
12. Restrepo G y Londoño J. E, Análisis fitoquímica y bioactividad preliminar de la especie *Brownea ariza B*, (caesalpinaceae) empleada como medicina en varias regiones de Colombia, Tesis de Grado, Programa de Química Universidad del Quindío. 2004
13. Salem M M. And Werbovetz K A. Isoflavonoids and Other Compounds from *Psoralea argyrea* with Antiprotozoal Activities. Journal Of Natural Products. 69, 43-49. 2006.
14. Mbaveng A. T, et al, Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology 116, 483–489. 2008
15. Ajali U, Chukwurah B.K.C. Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*, Phytomedicine 11 701–703. 2004
16. Mimaki Y, Watanabe K, Ando Y, Sakuma C, Sashida Y, Shigenori F, And Sakagami H, Flavonol Glycosides and Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum nocturnum* and Their Cytotoxicity, Journal Of Natural Products. 64, 17-22. 2001
17. Canales M., Hernández T, Serrano R., Hernández L.B., Duran A., Ríos V., Sigrist S., Hernández H.L.H., García A.M., Ángeles-López O, Fernández-Araiza, M.A. Avila G. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study, Journal of Ethnopharmacology 110, 343–347. 2007

18. Cushnie T.P. T, Lamb A. J, Antimicrobial activity of flavonoids (Review), *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343–356. 2005
19. Otero R, Nuñez V, Jiménez S. L, Fonnegra R, Osorio R. G, García M. E, Díaz A, Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom, *Journal of Ethnopharmacology* 71 505–511. 2000
20. Le Nest G., Caille O., Woudstra M., S. Roche, Burlat B., Belle V., Guigliarelli B., Lexa D. Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies, *Inorganica Chimica Acta* 357, 2027–2037. 2004
21. Ryan P, Hynes M J. The kinetics and mechanisms of the reactions of iron(III) with quercetin and morin, *Journal of Inorganic Biochemistry* xxx xxx–xxx. (2007)
22. Hynes M J, O’Coinceanainn M, The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin, *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 1457–1464. 2004
23. Ferrer E. G., Salinas M. V., Correa M. J., Naso L., D. A. Barrio, S. B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo, P .A. M. Williams. *Journal of biological inorganic chemistry* 11:791–801. 2006
24. Botelho F V. Alvarez-Leite J I, Lemos V S., Pimenta A M.C., Calado H D.R., Matencio Tulio, Miranda C T. c, Pereira-Maia E C, Physicochemical study of floranol, its copper(II) and iron(III) complexes, and their inhibitory effect on LDL oxidation, *Journal of Inorganic Biochemistry* 101, 935–943. 2007
25. CENICAFE. Árboles Encontrados en Zonas Cafetaleras [en línea]. Centro Nacional de Investigación de Café. Colombia [fecha de consulta: 24 de Febrero del 2008]. Disponible en [http://www.eco-index.org/search/pdfs/299report\\_5.pdf](http://www.eco-index.org/search/pdfs/299report_5.pdf)

26. Márquez R Evaluación De La Actividad Coagulante In Vitro Del Extracto Total En Etanol Y Fracciones De La Corteza De *Brownea Ariza Benth* (CAESALPINIACEAE), Revista Latinoamericana De Química, s No.1, 134-135. 2005
27. Márquez R, Evaluación De La Actividad Coagulante De *Brownea Ariza Benth* (CAESALPINIACEAE), Actualidades Biológicas, 27. 101 – 104. 2005
28. Otero R, Nuñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez S. L, Osorio R. G, Saldarriaga M, García M. E, Díaz A R. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox venom*, Journal of Ethnopharmacology 73 233–241. 2000
30. Bilbao M.R. En: Análisis fitoquímico preliminar. Oficina de publicaciones Universidad del Quindío. Primera edición. Armenia 1997
31. Sanabría, A. Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. (Ed) Universidad Nacional de Colombia. (1983) pp. 95.
32. Swain, T (Editor). Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres. 1973, ISBN: 9780408704915
33. Levin, Da. "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". Ann Annual review of ecology and systematics. 7: 121-159. 1976.
34. Cronquist A. "On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". Plant systematics and evolution., suppl 1: 179-189. 1977
35. Marek, R., Seckarova, P., Hulova, D., Marek, J., Dostal, J., Sklenar, V. Palmatine and Berberine Isolation Artifacts. Journal Of Natural Products. 66: 481-486. 2003.

36. Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. J Nat Prod. 56 (8) : 1331-1338. 1993
37. Osorio D., Edison J., Montoya P., Guillermo L. And Arango A., Gabriel J. Alkaloidal Natural Products With Antiprotozoal Activity. Vitae, vol.13, no.1, p.61-84. 2006.
38. Ferreira D, Gross G.G., Kolodziej H, Yoshida T, Tannins and related polyphenols: Fascinating natural products with diverse implications for biological systems, ecology, industrial applications and health protection, Editorial, Phytochemistry 66, 2238–2247, 2005.
39. Nuñez Mj, Guadaño A, Jiménez Ia, Ravelo Ag, González-Coloma A, And Bazzocchi IL. Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis* Journal Of Natural Products. 67 14-18. 2004.
40. Macias Fa, Molinillo Jmg, Torres A, Varela Rm, Castellano D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus cultivars*. Phytochemistry 45, 683-687. 1997
41. Yamaguchi L. Vassao D., Kato M J., Mascio P, Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation, Phytochemistry 66 2238–2247, 2005
42. Lock O, Cabello I, Doroteo V.H, Analysis Of Flavonoids In Plants, IUPAC Publications, 2006.
43. Kan H., B.N. Timmermann, A.J. Aladesanmi, Lu, Z. A biflavonoid from *Dysoxylum lenticellare gillespie*, Phytochemistry 42 (4) pp. 1199-1201. 1996
44. Pan H. And Lundgren L.. Phenolics from inner bark of *Pinus Sylvestris*. Phytochemistry 42:1185–1189. 1996

45. Magalhaes A.F., Tozzi A.M.G.A., Sales B.H.L.N., Magalhaes E.G., Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*, *Phytochemistry* 42 (5) pp. 1459-1471. 1996
46. Crabtree R. H., *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 2nd. Ed, John Wiley and Sons, 1994. ISBN: 978-0471662563
47. Fuentes S., Díaz G., *Catalizadores. ¿La Piedra Filosofal Del Siglo XX?*, 2ª Ed, Fondo De Cultura Económica, S. A. De C. V., 1997, ISBN: 968-16-5233-9
48. Poveda, A, *Química Inorgánica-Compuestos de Coordinación.* Universidad Nacional de Colombia, disponible en línea en: [www.virtual.unal.edu.co](http://www.virtual.unal.edu.co). 2000.
49. Liang X, , Shen D.W, Gottesman M.M.. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 1599–1606. 2004.
50. Leopoldini M, Russo N,\* Chiodo S, And Toscano Ma. Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 6343-6351, 2006
51. Elo H., Reaction of the antiproliferative and antineoplastic agent trans-bis(salicylaldoximato)copper(II) and related chelates with glutathione and cysteine. Correlation between reactivity and biological activity, *Inorganica chimica acta*, 136, 149. 1987.
52. Bomhoff Greg, Sloan Kirk, Mclain Corey, Gogol Edward P., Fisher Mark T, The effects of the Flavonoid baicalein and osmolytes on the Mg 2+ accelerated aggregation/brillation of carboxymethylated bovine 1SS-lactalbumin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453 75–86. 2006
53. El Amrani F.B, Perelló L, Real J.A, Gonzalez-Alvarez M, Alzuet G, Borrás J, Garcia-Granda S, Montejo, Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of

chlorobis(flavonolato)(methanol) iron(III) complex, Journal of Inorganic Biochemistry 100, 1208–1218, 2006.

54. Murray P.R, Rosenthal K.S., Pfaller M.A, En: Microbiología Médica. Elsevier España, 976 páginas ISBN:8481749273 2006

55. <http://www.biologia-en-internet.com/default.asp?Id=12&Fs=2>

56. Schlegel H. G. En: Microbiología General, Ediciones OMEGA S.A, Barcelona España, pag 95-98.1997. ISBN 84-282-1030-6.

57. Curtis H; Barnes H.S, Schnek, A. En: BIOLOGIA SEXTA EDICION, Editorial: MÉDICA PANAMERICANA SACF, 1810 páginas. ISBN: 950-06-0423

58. Prescott Lansing M., En: Schizanthus, Microbiology 5th Edition, The McGraw–Hill Companies, 2002, ISBN: 978-0072829051

59. Jawetz, Melnick, & Adelberg's, Medical Microbiology, 24th Edition, The McGraw-Hill Companies, 2007. ISBN: 978-0071476669

60. ANTIBIOTICO TERAPIA, Especies de Klebsiella, Disponible en <http://www.antibioticoterapia.com/modules.php?name=News&file=article&sid=565&num=2006-02-01> (Fecha de consulta, 27-04-2008, 6:45 UTC)

61. Bial, Arístegui, El reino de los hongos, Revista iberoamericana de micología 2002.

62. Bial, Aristequi, *Candida albicans* (Robin) Berkhout, Revista iberoamericana de micología 2002.

62. Edwards J. Candida species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. New York: Ed. Panamericana; 2005. Chapter 255. p. 2931–57 ISBN 0-443-06567-5

64. <http://www.entornomedico.org/medicos/especialidades/pediatrica/acta/archivo/27-01-2006/articulos/rev01.html>)
65. Čoleska Z N, Dorevski K, Klisarova L, Milosevic L Identification Of Phenolic Constituents Isolated From *Macedonian propolis*, Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, Vol. 14, No. 1, pp. 13 -17, 1995.
66. Drummond, A.J., Waigh, R.D., En: Pandalai, S.G. (Ed.), Recent Research Developments in Phytochemistry, vol. 4. Research Signpost, India, pp. 143–152. 2000, ISBN: 81-308-0052-7
67. Rahman M, Gray A, A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity, Phytochemistry 66 1601–1606. 2005
68. Sarkera S D., Naharb L, And Kumarasamyc Y, Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in Vitro antibacterial screening of phytochemicals, Methods.; 42(4): 321–324. 2007
69. De Souza R F.V., De Giovani W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids, Spectrochimica Acta Part A, 61, 1985–1990, 2005
70. Shriner, R., Fuson R. Y Curtin, D.; En: Identificación Sistemática de los Compuestos Orgánicos, Limusa, México, 1995. ISBN: 968-18-0920-3
71. Mabry, T.J., Markham, K.R., And Thomas, M.B., The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, New York, 1970.
72. Bullatov M.I., Kalinkin I.P.K, In: Practical Manual of Photometric Analysis, Chemistry, 5th ed., Leningrad, 1986.

73. Markham, K.R., Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, 1982.
74. Cornard J.P., Merlin J.C, Structural And Spectroscopic Investigation Of 5-Hydroxyflavone And Its Complex With Aluminum, Journal Of Molecular Structure 569, 129-138. 2001
75. Cornard J.P. , Boudet A.C., Merlin J.C. Complexes of Al(III) with 3'4'-dihydroxyflavone: characterization, theoretical and spectroscopic study, Spectrochimica Acta Part A 57, 591–602. 2001
76. Bonaccorsi P, Caristi C, Gargiulli C, And Leuzzi U, Flavonol Glucoside Profile of Southern Italian Red Onion (*Allium cepa* L.) Journal of agricultural and food chemistry., 53, 2733-2740. 2005
77. Bhattacharyya J, Majetich G, SPEARING P And REINALDO N. ALMEIDA, Dioclenol, A Minor Flavanonol From The Root-Bark Of *Dioclea grandiflora*, Phytochemistry, Vol 46, No. 2, pp. 385-387, 1997.
78. Silverstein R.M, Spectrometric identification of organic compounds, 6<sup>a</sup> ed., Wiley, 1998, ISBN: 978-0-471-39362-6
79. Rubinson K.A., Rubinson J.F. Análisis Instrumental, Pearson Educations S.A, Pag 510, 2001. ISN: 84-205-2988-5
80. Smith R.M., Understanding Mass Spectra: A Basic Approach, 2<sup>a</sup> Ed, John Wiley & Sons. Pag: 241-250, 2004. ISBN: 0-471-42949-X
81. Caldwell, S. T., Crozier, A., Hartley. R.C. Isotopic Labelling of Quercetin 4'-O- $\beta$ -D-Glucoside, Tetrahedron, 56, 4101-4106, 2000.
82. Choudhary, M. I, Nur-e-Alam, M. Khan, M.A, Faig, I., Akhtar, F., Ndögnii, P.O, Badarchiin T, et al, Four New Flavones and a New Isoflavone from *Iris bungei*, Journal Of Natural Products., **64** (7), 857 -860, 2001.

83. Andrew, P; Robert S.; Whalley, Jacqueline L. A Facile Synthesis of 2-Substituted Isoflavones for Immunoassay: Assembly of the Isoflavonoid Skeleton By Means of a Novel Cyclisation Reaction, *Synthesis*, p.1793, 1998.
84. De Tommasi, N., Piacente, S., and Pizza, C. Flavonol and Chalcone Ester Glycosides from *Bidens andicola* *Journal Of Natural Products.*, 61, 8, 973 - 977, 1998
85. Rahman M, Gray A, Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*, *Phytochemistry* 59 73–77. 2002
86. Jacobsen N. E, NMR SPECTROSCOPY EXPLAINED, Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007
87. Appendino, G., Cravotto, G., Giovenzana, G.B., and Palmisano, G., A Straightforward Entry into Polyketide Monoprenylated Furanocoumarins and Pyranocoumarins: *Journal of Natural Products.*, 62, 12, 1627 - 1631, 1999,
88. Hernández N. Tereschuk M.L., Abdala L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina), *Journal of Ethnopharmacology* 73. 317–322. 2000
89. Echemendía O.A ; Carballo M T; García M T; Borges R M; Bolaños Q, Lago V; Pino S, Estudio antiviral in vitro de un extracto proveniente de la *mangifera indica* l. frente al herpes simple tipo 1. En: *Farmacología experimental, Sociedad Cubana de Farmacología*, 2007.
90. Echemendía O.A ; Carballo M T; García M T; Borges R M; Bolaños Q, Lago V; Pino S, ensayo de la actividad antiviral in vitro de un extracto vegetal del genero *erythrina* contra el herpes simple tipo 1 y herpes simple tipo 2. En: *Farmacología experimental, Sociedad Cubana de Farmacología*, 2007.

91. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays *Journal Immunology. Methods* 65 pp: 55- 63. 1983