



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DEPARTAMENTO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTOS**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL  
EXTRACTO DE CLOROFORMO DE LA ORQUÍDEA  
COMESTIBLE *Prosthechea michuacana*.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Q. A. Adriana María Neira González**

**DIRECTORES DE TESIS**

**Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez.  
M. en C. Yoja Gallardo Navarro.**



**MÉXICO, D.F.**

**Junio 2009**

El Proyecto fue realizado en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales, ESIQIE – IPN. Durante el desarrollo de la Tesis se tuvo apoyo económico como becario de CONACYT y PIFI - IPN

El nombre del proyecto es: Estudio químico y farmacológico de algunas cianobacterias y microhongos. SIP N° 2009514.

## *DEDICADO A*

*Agradezco especialmente a Dios por su sabiduría y guía espiritual en este camino.*

*A mis padres María Luisa González y Pedro Antonio Neira por su amor, comprensión, apoyo, por ser mi inspiración y a quienes les debo lo que soy.*

*A mis hermanos Laura, David y Mauricio por su cariño, apoyo y ayuda incondicional.*

*Con amor a Rogelio Mendoza Torres quien con su comprensión, apoyo y buen consejo hizo mi instancia agradable en este bello país.*

*A mis familiares mis tíos Vicente, Jesús, Joaquín, Rosario, Flor, mis abuelitos por su amor y ayuda incondicional.*

*La Doctora Rosa Martha Pérez por su apoyo y dedicación.*

*A mis amigos Andrea, Mirna, Yuli y Raúl todos aquellos que a través de su colaboración y voz de aliento hicieron de este proyecto y de esta etapa de mi vida una experiencia fructífera*

**ADRIANA**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Deseo expresar mi agradecimiento a todos a aquellos que estuvieron involucrados directa e indirecta en el desarrollo de esta investigación.*

- *A DIOS, por habernos dado fortaleza para seguir adelante para ver plasmado hoy y hecho realidad esta Investigación.*
- *A la directora de la Tesis, Doctora. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, por sus valiosos consejos, por la confianza brindada, por compartir sus conocimientos, que han sido imprescindibles para la realización y su culminación exitosa de este trabajo.*
- *Al INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias y a profesores de la Maestría en Ciencias Especialidad Alimentos y a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas – Laboratorio de Investigación de Productos Naturales; que me brindaron la oportunidad de formarme y llegar a la culminación del presente trabajo.*
- *Así mismo deseo agradecer a la M. en C Yoja Gallardo Navarro, por su apoyo, paciencia y dedicación para la corrección del trabajo*
- *Del mismo modo quería agradecer A la M. en C. María Teresa Cruz y Victoria por su valiosa dedicación y apoyo en la corrección del trabajo, quien con sus consejos me ayudo mi formación personal.*
- *A la Doctora, Irasema Anaya Sosa por su paciencia, Accesoria y apoyo para la corrección del trabajo, así como por la buena predisposición que siempre ha tenido hacia mi trabajo.*
- *A la Doctora Yadira Rivera Espinosa, por su apoyo para la corrección del presente trabajo.*
- *Al Doctor Efrén García Báez, por su orientación y apoyo para la corrección y Accesoria del trabajo como también en la toma de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .*
- *Al Doctor Ivan, por su orientación y apoyo para la corrección y Accesoria del trabajo como también en la toma de los espectros de IR.*
- *A Lety y Aida, secretarias de la escuela, por su colaboración.*
- *A los Maestros Sergio Hernández Garrido y Heliodoro Hernández Luna, del laboratorio de Polímeros de ESQIE por su colaboración en el préstamo de equipos.*

- *A CONACYT por el apoyo económico.*
- *A PIFI por el apoyo económico.*
- *Al M. en C Miguel Cervantes por su colaboración en la recolección de la muestra orquídea y apoyo en la bibliografía.*
- *A Pedro por su ayuda en la explicación del programa de ChemOffice.*
- *A mis compañeras del laboratorio de investigación de Productos naturales Sandra y Nancy por su colaboración.*
- *A mis amigos Andrea, Yuli, Mirna, Ximena, Sofía, Raúl, Dr. Martha, M.en C. Sandra por su amistad y colaboración.*
- *A Mis padres, mis tíos, primos por su apoyo incondicional, y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la culminación de este trabajo.*

**Luchemos contra los escépticos que creen que todo está descubierto, que muy poco puede ya obtenerse de las plantas, o contra los que creen que una investigación de esta naturaleza es dependiente de la disponibilidad de instrumentos sofisticados y enormes edificios; recordemos estas palabras: “grandes edificios y pequeños personajes nunca harán grandes instituciones; personas e imaginación son las mejores fuentes”.**

*Lock de Ugaz. OI*

***Que tu alimento sea tu medicina y tu medicina tu alimento  
(Hipócrates)***

por cultivo *in vitro*

	Pág.
INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	1
ABSTRAC	2
I. ANTECEDENTES	3
1.1 ORQUIDEAS	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.2 Historia	4
1.1.3 Botánica	4
1.1.4 Etnobotánica	5
1.1.5 Estudios fitoquímicos	6
1.1.6 Estudios farmacológicos	7
1.1.7 <i>Prosthechea michuacana</i>	7
1.1.7.1 Clasificación Taxonómica	7
1.1.7.2 Generalidades	8
1.2 ANTIOXIDANTES	10
1.2.1 Radicales libres	10
1.2.2 Antioxidantes naturales	11
a) Compuestos fenólicos	11
b) Clasificación de los compuestos fenólicos	13
c) Flavonoides	14
d) Funciones de los flavonoides en las plantas	16
e) Clasificación química de los flavonoides	16
f) Fuentes de los flavonoides	17
1.2.3 Actividad antioxidante	17
1.3 Obtención de los extractos vegetales	20
1.4 Técnicas de purificación	22
1.4.1 Cromatografía	22

1.5	Técnicas instrumentales para la elucidación estructural e identificación de los compuestos	27
1.5.1	Espectroscopía infrarroja IR	27
1.5.2	Resonancia Magnética Nuclear RMN	30
1.5.2.1	Principio físico	32
1.5.2.2	Aplicaciones más comunes	33
1.5.2.3	RMN Multidimensional	33
1.5.2.4	Información obtenida mediante RMN	35
1.5.2.5	Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H. Apantallamiento o protección magnética por los electrones	37
1.5.2.6	Interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H	39
II.	JUSTIFICACIÓN	41
III	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo general	43
3.2	Objetivos específicos	43
IX	MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1	Desarrollo experimental	44
4.2	Materiales	44
4.2.1	Materias primas	44
4.3	Reactivos y material de laboratorio	44
4.3.1	Reactivos	44
4.3.2	Material de laboratorio	45
4.3.3	Equipos	45
4.4	Métodos	46
4.4.1	Ensayos preliminares	46
4.4.2	Obtención del extracto crudo de cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	50
4.4.3	Determinación de fenoles totales	50
4.4.4	Análisis fitoquímico cualitativo	51
4.4.5	Determinación de sustancias captadoras de radicales libres	54
4.4.5.1	Actividad antioxidante por decoloración de β-caroteno	54



4.4.5.2	Actividad de barrido de los radicales libres DPPH	54
4.4.6	Aislamiento y purificación de los compuestos con actividad antioxidante	55
4.4.6.1	Selección de sorbente y disolvente.	55
4.4.6.2	Cromatografía en capa fina (CCF)	56
4.4.6.3	Cromatografía de columna	57
4.4.6.4	Sephadex LH20 -100	58
4.4.6.5	Cromatografía preparativa en capa fina	59
		60
4.4.7	Identificación o elucidación estructural de los compuestos con actividad antioxidante	60
4.4.7.1	Método de la espectroscopia infrarroja (IR)	60
4.4.7.2	Método de Resonancia Magnética Nuclear RMN- 1H y 13C	61
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1	Obtención de los extractos crudos, porcentaje de rendimiento y actividad antioxidante.	63
5.1.1	Porcentaje de rendimiento del extracto de cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	65
		65
5.2	Determinación de actividad antioxidante por el ensayo DPPH	
5.3	Compuestos fenólicos totales	66
5.4	Análisis fitoquímico cualitativo	68
5.5	Fraccionamiento del extracto de cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	69
5.6	Purificación de la fracción PmBCI -2 del extracto cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	71
5.7	Elucidación estructural del compuesto 1 ( PmBCI – 2-4-1-2)	74
5.8	Purificación de la fracción PmBCI – 9 del extracto cloroformo de bulbo	83
5.9	Elucidación estructural de los compuestos 2 y 3 (mezcla).	86
5.10	Relación actividad antioxidante y estructura	
VI.	CONCLUSIONES	100
VII.	BIBLIOGRAFÍA	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Estructura compuesto vanillina	7
Figura 2	Estructura compuesto ácido vanílico	7
Figura 3	Planta <i>Prosthechea michuacana</i>	8
Figura 4	Quercetina	14
Figura 5	Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.	19
Figura 6	Frecuencias vibracionales ( estiramientos y flexiones ) comunes en IR	28
Figura 7	Ejemplo de un espectro $^1\text{H}$ de RMN	35
Figura 8	Ejemplo de un espectro DEPT, un tipo de experimento de $^{13}\text{C}$	36
Figura 9	Ejemplo de un espectro COSY correlation spectroscopy homonuclear	36
Figura 10	Desprotección o protección del campo magnético de la molécula de $\text{CH}_3\text{OH}$	38
Figura 11	Bulbo y raíz de <i>Prosthechea michuacana</i>	44
Figura 12	Obtención de los extractos de bulbo y raíz de la orquídea <i>P. michuacana</i> .	48
Figura 13	Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante.	49
Figura 14	Equipo de reflujo para la obtención del extracto de cloroformo de bulbo de <i>P. michuacana</i>	50

Figura 15	Esquema de cómo determinar los Rf de las manchas en CCF	57
Figura 16	Esquema de la cromatografía de columna CC	58
Figura 17	Columna de purificación Sephadex LH 20	58
Figura 18	Cromatografía preparativa en capa fina CCFP	59
Figura 19	Compuestos aislados desarrollados en CCF del extracto de cloroformo de bulbo de <i>P. michuacana</i> y revelados por UV.	60
Figura 20	Identificación de Actividad antioxidante de los extractos de Hex, CHCl <sub>3</sub> , MeOH de raíz, bulbo y hojas de <i>P. michuacana</i> .	64
Figura 21	Curva tipo para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) equivalentes de ácido gálico (EAG) mg/ ml.	67
Figura 22	Fraccionamiento por cromatografía en columna CC y CCF del extracto cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	70
Figura 23	Fraccionamiento del extracto de cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i>	71
Figura 24	Purificación de la fracción PmBCI – 2 y Aislamiento del compuesto 1 del extracto cloroformo de bulbos de <i>P. michuacana</i> .	73
Figura 25	Espectro IR del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i>	75
Figura 26a	Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	76
Figura 26b	Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	77

Figura 27a	Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	79
Figura 27b	Experimento DEPT del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	80
Figura 27c	Espectro COSY del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	81
Figura 27b	Espectro HMBC del compuesto 1 gigantol obtenido de <i>P. michuacana</i> en CDCl <sub>3</sub>	82
Figura 28	Estructura compuesto 1 (gigantol)	83
Figura 29	Aislamiento y purificación de los compuestos 2 y 3 de la fracción PmBCI9p – 2	85 93
Figura 30a	Espectro RMN <sup>1</sup> H de los compuestos 2 y 3 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	87
Figura 30b	Espectro RMN <sup>1</sup> H ( ampliación) de los compuestos 2 y 3 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	88
Figura 30c	Continuación del espectro RMN <sup>1</sup> H ( ampliación) de los compuestos 2 y 3 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	89
Figura 31a	Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 2 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	90
Figura 32	Espectro COSY del compuesto 2 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	91
Figura 33	Conectividades HMBC H-C correlaciones de largo alcance	92
Figura 34	Estructura del compuesto 2 (7,Methoxy-scutillareina)	92
Figura 35a	Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	94

Figura 35b	Espectro COSY del compuesto 3 de <i>P. michuacana</i> en DMSO-d <sub>6</sub>	95
Figura 36	Dihidroquercetina o taxifolin	96
Figura 37	Reacción del radical DPPH y la relación de la actividad antioxidante de las estructuras de los compuestos <b>1, 2 y 3</b>	99

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Serie eluotrópica de los disolventes empleados como fase móvil en la cromatografía de adsorción sobre gel de sílice CCF, CCFP, CC, Sephadex LH 20	25
Cuadro 2 Frecuencias de vibración de algunos grupos funcionales en IR	31
Cuadro 3 Extractos crudos de bulbos, raíz y hojas <i>Prosthechea michuacana</i>	47
Cuadro 4 Análisis fitoquímico por coloración y precipitación a los extractos de metanol de bulbo y raíz de <i>P. michuacana</i>	52
Cuadro 5 Porcentaje de rendimiento de los extractos de cloroformo, metanol y agua de bulbo, raíz y hojas de <i>P. michuacana</i> .	63
Cuadro 6 Efecto de la actividad captadora radical libre de los extractos metanol de bulbo y raíz <i>P. michuacana</i> en DPPH EC <sub>50</sub>	66
Cuadro 7 Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de metanol de bulbos ( PmBMe) y raíz ( PmRMe) de <i>P.michuacana</i>	68
Cuadro 8 Compuestos fenólicos totales en los extractos metanólicos de bulbo y raíz de <i>P. michuacana</i>	69

## ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Flavonoides. Estructura básica y tipos, características estructurales de los principales tipos de flavonoides	113
Anexo 2	Biosíntesis de los flavonoides.	115
Anexo 3	Eluyentes y los soportes utilizados para desarrollar los cromatogramas unidimensionales CCF, CC, CCFP y Sephadex LH20	116
Anexo 4	Espectrofotometro IR y obtención de un espectro IR	118
Anexo 5	Espectrómetro de resonancia magnética nuclear RMN	121
Anexo 6	Glosario	122

## ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
AcOEt	acetato de etilo
Aq	acuoso
CC	cromatografía de columna
CCF	cromatografía en capa fina
CCFP	cromatografía de capa fina preparativa
CCl <sub>4</sub>	tetracloruro de carbono
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	metanol deuterado
CTRA	captura total de radical antioxidante
d	doblete
dd	doble doblete
DMSO	dimetilsulfoxido
DMSO-d <sub>6</sub>	dimentilsulfoxido hexadeuterado
DM	diclorometano
DPPH	radical 1,1difeníl-2-picrilhidrazil
EP	éter de petrolero
ET	transferencia de electrones
Et <sub>2</sub> O	éter etílico
EtOH	etanol
g	gramo
gt (s)	gotas
HAT	transferencia de átomo de hidrogeno
Hex	hexano
Hz	Hertz
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
K <sub>d</sub>	constante de distribución
lt	litros
m	multiplete
Ms	muestra
Me	metilo
Mc <sub>2</sub> CO	acetona
MeOH	metanol
ppm	partes por millón; de desplazamiento químico (δ)
R	reactivo
Rf	movilidad relativa al frente del solvente
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono
s	singulete
sol	solución
sp	especie
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta



## Resumen

La orquídea *Prosthechea michuacana* se ha usado en el estado de Oaxaca, como alimento, los bulbos se mastican crudos para mitigar la sed, también como medicinal: anti-inflamatorio (riñón), depurativo del sistema circulatorio (diurético) y en el tratamiento de la diabetes. Tradicionalmente es empleada como adorno en el "nacimiento" en los meses de Noviembre y Diciembre. Para este estudio los bulbos, raíz y las hojas de *P.michuacana* se secaron y molieron, fueron sometidas a extracción a temperatura de reflujo con hexano, cloroformo y metanol consecutivamente durante 4 horas. A cada extracto se le determinó la actividad antioxidante usando el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno y la decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Los extractos más activos fueron cloroformo de raíz y bulbo con un valor de  $EC_{50}$   $174.68 \pm 3.72 \mu\text{g/ml}$ ,  $310.96 \pm 4.17 \mu\text{g/ml}$  respectivamente, usando como control positivo el ácido ascórbico con un  $EC_{50}$   $122,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Se determinó el contenido total de fenoles por el método de Folin – Ciocalteau, se obtuvo para los extractos de metanol de bulbo ( $0.55 \pm 0.009 \text{ g EGA } 100 \text{ g}^{-1} \text{ B.S}$ ) y para raíz ( $1.27 \pm 0.02 \text{ g EGA } 100 \text{ g}^{-1} \text{ B.S}$ ). El Bio-fraccionamiento de los compuestos con efecto antioxidante a partir de los extractos de cloroformo de bulbos de *P.michuacana*, condujeron a la obtención de un estilbeno **compuesto 1** reportado con anterioridad denominado gigantol (30 mg). La identificación se llevo a cabo por medio de técnicas espectroscópicas IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y 2D en comparación con los datos reportados en la literatura. El **compuesto 1** presentó actividad antioxidante por la decoloración del  $\beta$ -caroteno y por el ensayo de DPPH el gigantol resultó ser moderadamente activo con valor de ( $45,69 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). De la fracción 9p del extracto de cloroformo de bulbos de *P. michuacana* se aislaron e identificaron los flavonoides en una mezcla (10mg), el nuevo **compuesto 2**: 7, metoxi-scutillarein y el **compuesto 3** dihidroquercetina (taxifolin), se determino la reducción del radical DPPH por medio de  $EC_{50}$  a la mezcla presentando un valor de de  $2.0 \mu\text{g/ml}$

## Abstract

*Prosthechea michuacana* the orchid has been used in the state of Oaxaca, such as food, raw bulbs are chewed to alleviate thirst, as well as medicinal anti-inflammatory (kidney), circulatory system depurative (diuretic) and treatment of diabetes. Traditionally it is used as an ornament in the "birth" in the months of November and December. For this study, bulbs, root and leaves were dried at room temperature *P.michuacana* and ground into a fine powder 100 g of powder each was heated to reflux temperature extraction with hexane, chloroform, methanol and water for 4 hours consecutively. The solvents were removed under reduced pressure using a rotatory evaporator to constant weight. For each extract was determined the antioxidant activity using the method of bleaching of  $\beta$ -carotene and bleaching of the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH). The chloroform extracts were most active in root and bulb with an  $EC_{50}$  value of  $174.68 \pm 3.72 \mu\text{g/ml}$ ,  $310.96 \pm 4.17 \mu\text{g/ml}$  respectively, using as a positive control ascorbic acid with an  $EC_{50}$   $122.25 \text{ mg / ml}$ . We determined the total content of phenols by the method of Folin - Ciocalteu, was obtained for the methanol extracts of bulb ( $0.55 \pm 0.009 \text{ g EGA } 100 \text{ g}^{-1} \text{ DW}$ ) and root ( $1.27 \pm 0.02 \text{ g EGA } 100 \text{ g}^{-1} \text{ BS}$ ). Bio-splitting effect of antioxidant compounds from the chloroform extracts of bulbs *P.michuacana* led to obtaining a stilbene compound **1** reported previously called gigantol (30 mg). The identification was carried out by means of spectroscopic techniques IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and 2D compared with the data reported in the literature. Compound **1** presented in the antioxidant activity of  $\beta$ -carotene bleaching and by the DPPH test gigantol was moderately active with value ( $45.69 \mu\text{g/ml}$ ). 9p fraction of the chloroform extract of bulbs of *P. michuacana* were isolated and identified flavonoids in a mixture (10mg), the new compound **2**: 7-methoxy scutillarein and the compound **3** dihydroquercetina (taxifolin), is the reduction of DPPH radical by the  $EC_{50}$  value of presenting a mix of  $2.0 \text{ mg / ml}$

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 ORQUIDEAS

#### 1.1.1 Generalidades.

México es un país de enorme riqueza, tanto natural como cultural, se encuentra entre los siete primeros países por su variedad de seres vivos, representa entre el 10 y 12 % de biodiversidad a nivel mundial (Villaseñor, 2003). Se han registrado más de 2000 especies de plantas que se utilizan como medicinales en distintas regiones del país (Torres, 1999). Por otra parte, la familia de orquídeas (Orchidaceae) es la segunda mayor familia de plantas con flores. Está compuesta de 20.000 a 25.000 especies, con más de 850 géneros, el 73 % son epífitas (Atwood, 1986), siendo las familias con mas elementos epífitos: Orchidaceae y Bromeliácea (Aguirre – León, 1992).

México cuenta con unas 1,106 especies de orquídeas, distribuidas en 159 géneros (Soto – Arenas, 1996). Colombia es el país con mayor número de especies en América (3000 spp.) seguido de Ecuador y Brasil (2500 spp. Cada uno) (Dressler, 1981). La germinación de semillas de orquídeas depende totalmente de una asociación simbiótica con hongos del suelo, por lo general *Rhizoctonia spp.* Los hongos siempre tratan de invadir el citoplasma de las células de orquídeas para obtener compuestos nutricionales (Shimura *et al.*, 2007).

Existen numerosas variedades de orquídeas de importancia económica por su uso ornamental, como tambien el delicioso sabor de vainilla. La vainilla proviene de varias especies perennes de la vid del género vainilla nativas de México y América tropical. Los aztecas originalmente utilizaron la esencia de vainilla para adicionarlo al chocolate, y los conquistadores españoles lo llevaron a Europa, donde fue utilizado para esta misma finalidad (Dressler, 1981).

Esto convierte a las orquídeas mexicanas en un patrimonio viviente de enorme importancia. Desafortunadamente, se cortan miles de plantas para su distribución en el comercio, lo que contribuye a su extinción (Manzanero, 1995). Las orquídeas habitan casi todo el planeta. Además de las especies naturales, existe un enorme grupo, de más de 100,000 variedades, denominadas orquídeas híbridas, resultado de cruza hechas por el hombre. De esta forma, se han

producido innumerables variedades que intentan superar la belleza de sus flores (Atwood, 1986).

### 1.1.2 Historia

Los chinos también fueron los primeros en escribir libros dedicados a las orquídeas. En 1233, Chao Shih-Keng escribió *Chin Chan Lan P'u*, describió 20 especies y la manera como crecen (Berliocchi, 2004). En 1247, Wang Kuei-Hsueh escribió su tratado chino sobre orquídeas y describió 37 especies. El primer volumen occidental dedicado a las orquídeas no se había publicado hasta que Georg Eberhard Rumphius (1628-1702) y el Herbario Amboinense publicaron en 1741-1755, dos de los 12 volúmenes dedicados a las orquídeas, los chinos fueron casi con toda seguridad los primeros en describir las orquídeas para uso medicinal. Reinikka en 1995 reporta una leyenda china que Shen-nung describió *Bletilla striata* y una especie *Dendrobium* en su materia médica en el siglo 28 a.C. El primer informe de Oriente Medio de remedios de plantas hace 4000-años, reporta que utilizaron una tableta de arcilla adicionada con algunas orquídeas (Kong *et al.*, 2003). Dioscórides (griego), médico militar romano, escribió *Materia Médica*, incluyendo dos orquídeas (Dioscórides, 1543 citado por Bulpitt C.J. 2005). El aprobó y promovió la "Doctrina de Firmas" en la cual consiste en relacionar las plantas que se utilizaban con fines medicinales en función de su semejanza con las partes de la anatomía humana, por ejemplo la forma o el color de los tubérculos de orquídeas llevó a hacer utilizados para curar enfermedades de los testículos y estimular la lujuria. (William Turner, 1568 citado por Bulpitt C.J. 2005) escribió el primer libro en Inglés a base de hierbas y presentó cuatro usos principales, como el tratamiento de la gastritis alcohólica. Once años más tarde, Williams Langham describió como antipirético y los efectos anti-diarreicos (Langham, 1579). John Parkinson en 1640 todavía pensaba que el aumento de la fertilidad en hombres se debía a los tubérculos.

### 1.1.3 Botánica

Los géneros más representativos de la familia Orchidaceae son: *Dendrobium* (183 especies), *Bulbophyllum* (62 especies), *Eria* (53 especies), *Coelogyne* (43 especies), *Vanda* (31 especies), *Habenaria* (30 especies), *Haemaria* (20 especies), *Liparis* (20 especies) y *Paphiopedilum* (19 especies) (Dressler, 1960).

Los medicamentos de orquídeas pertenecen principalmente a los géneros: Calanthe, Coelogyne, Cymbidium, Cypripedium, Dendrobium, Ephemera, Eria, Galeola, Gastrodia, Gymnadenia, Habenaria, Ludisia, Luisia, Nevelia y Thunia (Szlachetko, 2001).

Especies de *Dendrobium* (Orchidaceae), conocidas localmente como "Shihu" o "Huangcao" en China se distribuyen ampliamente en toda Asia, Europa y Australia por más de 1100 especies. Existen 74 especies y 2 variaciones de *Dendrobium* y alrededor de 30 especies se utilizan en la medicina popular o tradicional como antipirético, los efectos inmunorreguladores, etc. La parte aérea de estas plantas suelen ser recogidos, cortados en piezas, secados para usos medicinales. Además, en los últimos años, debido al daño del medio ambiente y al consumo excesivo de medicamentos de *Dendrobium*, esta se ha reducido, los principales componentes activos en *Dendrobium* son fenoles como: bibenzil, fenantreno y fluorenona con más de 60 estructuras identificadas, estudios farmacológicos han demostrado que los compuestos erianina, moscatilina presentan las siguientes actividades antitumorales, anti-angiogénicos, anti-agregación plaquetaria, anti-inflamatorio y inmunorreguladora. Por otra parte, bibenzil y fenantreno son los más característicos productos químicos y son considerados como marcadores del género *Dendrobium*.

#### **1.1.4. Etnobotánica.**

Los recientes estudios muestran que las orquídeas se utilizan en muchas partes del mundo y en el tratamiento de una serie de enfermedades infecciosas, problemas relacionados con el aparato digestivo, órganos respiratorios reproducción, la circulación, en contra de los tumores, para el alivio del dolor y para reducir la fiebre. En México desde épocas prehispánicas a la actualidad, se ha utilizado la familia Orchidaceae como medicinal, artesanal, el bulbo es comestible, narcótico, saborizante, aromatizante, alimenticio con fines ceremoniales, mágico – religiosos, talismanes y afrodisíacos (Téllez, 2001). Las orquídeas no son tan ampliamente utilizadas en la medicina tradicional como otras plantas, su principal interés es de uso ornamental, distinguiéndose por la belleza de sus flores (Baró *et al.*, 2003). Según un estudio realizado en Veracruz se encontró que la *Oncidium cavendishianum* (orejas de burro) es utilizada como antihistamínico (Del Amo, 1979). En el estado de Yucatán, *Brassavola digbyana*

(Munida de chicote) se utiliza para el dolor de cabeza, *Catasetum maculatum* (zapatito) para abscesos e hinchazón, *Epidendrum xipheres* para inflamaciones y *Vanilla fragrans* (Vainilla, como afrodisíaco estimula o aumenta el deseo sexual) y es también consumido como tónico (Mendieta y Del amo, 1981). En una revisión etnobotánica realizada por el IMSS, menciona que *Catasetum sp* de nombre común cebolleta, es utilizada como anticonceptivo, antiinflamatorio, *Laelia speciosa* (flor de mayo) para controlar la tos, *Oncidium sp* (dama danzante) para el dolor de pie, *Vanilla planifolia* (bejuquillo, vainillero) para el dolor de vientre (Aguilar *et al.*, 1994). Así también en otro estudio de la Sierra de Puebla se encontró que la *Vanilla planifolia* la utilizan como medicinal (Martínez- Alfaro *et al.*, 1995). También se menciona los usos medicinales de especies como *Isochilus sp*, *Arpophyllum spicatum* y *Prosthechea citrina* como cataplasma, para el caso de *Catasetum integerrimum* los bulbos son pelados, salados y asados para aplicarlos a forúnculos y heridas (Hágsater *et al.*, 2005).

#### 1.1.5 Estudios fitoquímicos.

Las orquídeas presentan grandes cantidades de flavonas C- glicosiladas y flavonoles en sus hojas (Williams, 1979). En especies Brasileñas se identificaron unas glicosiflavonas metiladas (Williams *et al.*, 1994). Son pocos los estudios fitoquímicos realizados en orquídeas.

Las especies *Vanilla fragrans* y *V. planifolia* son las más estudiadas para obtener vainilla, producto comercial de consumo humano, donde se determinaron cumarinas y el principal principio activo vanillina (Figura 1). También a partir de la *V. planifolia* se aisló el ácido vanílico con actividad antimicrobiana (Figura 2). Se identificó el glucósido vainilla  $\beta$ - glucosidasa (Dignium *et al.*, 2004). En la fragancia floral de *Catasetum maculatum*, se aisló el oxido trans- carvona, el cual es epóxido de monoterpénico (Lindquist *et al.*, 1985) y en el caso de la *Phalaenopsis ssp* orquídea mariposa, se identificó el alcaloide derivado de la pirrolizidina, la phanaelopsina T (Fujiedaa *et al.*, 1988).

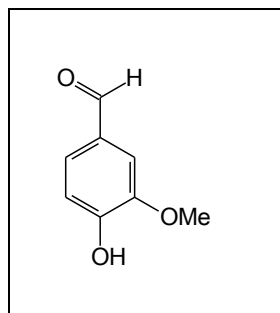


Figura 1 Estructura compuesto vanillina

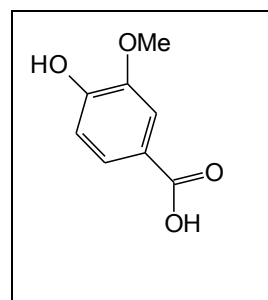


Figura 2 Estructura compuesto ácido vanílico

### 1.1.6 Estudios Farmacológicos:

- Zenteno *et al.* (1995) encontró que la lectina (glicoproteína dimérica) de bulbos de *Laelia autumnalis* presenta actividad hemaglutinante a eritrocitos en humanos.
- Estrada- Soto *et al.* (2006) investigaron el efecto de dos estilbenoides de *Scaphyglottis lividia* sobre el endotelio de la aorta.
- En otro reporte realizado por Suresh *et al.* (2000) del extracto etanólico de flores de *Vanda tessellata*, sobre la conducta sexual de ratones machos.
- Iwata *et al.* (2006) realizaron el estudio con tallos de las orquídeas *Cymbidium* y *Oncidium dermatitis* en forma de parche para controlar lesiones eritematosas en la piel, mostró reacciones positivas.
- Pinherio *et al.* (2006) estudiaron los extractos de las hojas medicinales de *Bauhinia forticata* conocido como pezuña de vaca que es ampliamente utilizados en medicina popular como antidiabéticas. Se identificó el compuesto kaempferitri.

### 1.1.7 *Prosthechea michuacana*

#### 1.1.7.1 Clasificación Taxonómica de *Prosthechea michuacana*

Reino:	Vegetal
División:	Magnoliofita
Clase:	Angiosperma
Subclase:	Monocotiledónea
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendrae
Género:	<i>Prosthechea</i>
Especie:	<i>michuacana</i>
Nombre científico	<i>Prosthechea michuacana</i>

### 1.1.7.2 Generalidades

Nombres comunes empleados por el grupo étnico zapoteca: aguanos, bolas de viejo y el grupo misteco tin-duteé: azucena de agua (Figura 3).

El género *Prosthechea* fue recientemente restablecido en 1998 por Higgins, W.E., en donde la especie *P. michuacana* había sido incluida en diversos géneros: *Anacheilium*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Euchile*, *Hormidium* y *Pollardia*. El género *Prosthechea* fue confirmado por estudios, basados en la evidencia molecular nuclear (nrITS) y la secuencia de la DNA del plastid (matK y trnL-F) (Van der Berg, 2001).



Figura 3 *Prosthechea michuacana*

La especie *Prosthechea michuacana* planta herbácea terrestre, es erecta de 50 a 100 cm de largo; bulbos agrupados, ovados o subglobosos a piriformes, de 5 a 8 cm de largo, de 1.6 a 2.7 cm de ancho, cubiertos en su tercio basal por 2 brácteas papiráceas de 4 a 6.5 cm de largo, pardas, agudas; hojas 2 ó 3, elípticas a angostamente elípticas, de 10 a 30 cm de largo, de 2 a 5 cm de ancho, agudas, coriáceas; inflorescencia erecta, de 45 a 90 cm de largo, paniculada, espata papirácea, de 3 a 7 cm de largo, conduplicada, aguda, pedúnculo largo, de 30 a 40 cm de largo, rollizo, ligeramente rugoso, con 3 a 5 brácteas abrazadoras, ovadas, de 4 a 7 mm de largo, agudas, papiráceas, blanquecinas, brácteas florales mucho más pequeñas que el ovario, abrazadoras, papiráceas, triangulares, de 2 a 4 mm de largo, de 0.8 a 1 mm de ancho, cortamente atenuadas, pardas; ovario ligeramente rugoso, triquetro, de 10 a 14 cm de largo, de 5 a 6 mm de grosor, ligeramente ensanchado hacia el ápice; flores numerosas, más de 30, simultáneas, con sépalos y pétalos pardos oscuros o pardos-rojizos, labelo blancocrema a amarillento con escasos puntos rojos; sépalos elípticos a



oblanceolados, de 11 a 12 mm de largo, de 3 a 4 mm de ancho, agudos; pétalos espatulados, de 10 a 11 mm de largo, de 2.5 a 3.5 mm de ancho, obtusos; labelo trilobado, de 10 a 11.5 mm de largo, de 7 a 8 mm de ancho, lóbulos laterales angostamente oblongos, obtusos, lóbulo medio unguiculado, con un seno amplio, transversalmente oblongo, ápice entero a ligeramente retuso, callo suborbicular, carnoso, resolviéndose en tres venas gruesas, las laterales muy cortas, la central llega hasta la mitad del labelo; columna corta, rolliza, de 5.5 a 6.5 mm de largo, con 3 dientes carnosos, subiguales, el medio sobrepasando los laterales, subcuadrado, truncado, los laterales redondeados; cápsula trígona, rugosa, de 1.8 a 2.5 cm de largo, de 6.5 a 8.5 mm de ancho (Higgins, 1997).

Las raíces de todas las especies del género *Prosthechea* poseen un velamen (una esponja gruesa que la cubre) diferenciadas en epivelamen y endovelamen, fueron observados cristales (flavonoides) en las raíces y las hojas. Los tallos erguidos presentan forma aplanada, engrosamiento del bulbo, tiene 1 a 3 hojas terminales y sésiles. Las flores forman una inflorescencia apical, paniculada en racimo con una espata en la base. Hay una gran variedad en las flores de este género que pueden asociarse a la raíz de un pedúnculo o pueden ser sésiles. Pueden florecer en el racimo al mismo tiempo o sucesivamente. Los sépalos son casi iguales en longitud, mientras que los pétalos pueden ser mucho más delgados. El labio se une a la mitad de la columna y muestra un callo (una rígida protuberancia). La columna es 3 - 5 dentado en su parte superior (Higgins, 1997).

La orquídea *P. michuacana* se encuentra por debajo de los 2100 - 1900 metros sobre el nivel del mar, florece de Abril a Septiembre en las serranías del centro y sur del país, en diversos tipos de bosques tropicales, templados y encinares húmedos. Se localiza en México desde el norte de Michoacán hasta Chiapas, como también a lo largo de la vertiente de la costa pacífica, Centro América, Guatemala y Honduras (Atwood, 1986).

Los habitantes del municipio de Santa Catarina Ixtepeji, distrito de Ixtlán, estado de Oaxaca utilizan la orquídea como: ornamento, (los bulbos) comestible – hidratante, diurético, antiinflamatorio, alivia los efectos de intoxicación alcohólica.

En un estudio realizado previamente sobre la orquídea *P. michuacana* se identificó una nueva C- glicosil flavona, gigantol y ácido málico (Tovar- Gijón *et al.*, 2006).

En el año 2007 se realizó un estudio farmacológico a los extractos de hexano, cloroformo y metanol de bulbo de *Prosthechea michuacana*, en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas ESIQIE – IPN y el laboratorio de Fito farmacología de la UAM- Xochimilco.

Se determinaron los siguientes efectos: antiespasmódico del extracto de cloroformo de bulbos, en el cual el extracto y el compuesto aislado (gigantol) provocó una inhibición de las contracciones espontáneas de conejillo de indias ileon comparables a los de la papaverina (Pérez R y Vargas R 2009a), hepatoprotector del extracto metanólico de bulbos en el cual redujo los marcadores bioquímicos de la lesión hepática como la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) y también los niveles en la peroxidación in vivo inducida por CCl<sub>4</sub> (Pérez, R y Vargas R 2009b), antiinflamatorio (Pérez R y Vargas R. 2009c), cicatrizante, antidiabético (Pérez R., Vargas R. 2009d), nefroprotector, antimicrobiano, y antioxidante.

(Pérez, 2009a)

Después de evaluar los resultados se decidió aislar e identificar los compuestos con actividad antioxidante.

## **1.2 ANTIOXIDANTES**

### **1.2.1 Radicales libres**

La oxidación es la transferencia de electrones de un átomo a otro y representa una parte esencial de la vida aeróbica y de nuestro metabolismo, el oxígeno es el último aceptador de electrón en el sistema de flujo de electrones que produce energía en forma de ATP. Sin embargo, cuando el flujo de electrones es incompleto (transferencia de un electrón no apareado) se generan radicales libres (EOR) especies con uno o más electrones desapareados y que son altamente inestables, esa inestabilidad hace que reaccione con otras moléculas generando nuevos radicales libres que pueden ser superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>\*</sup>, hidroxil (OH)<sup>\*</sup>,

orgánicos: peroxil (ROO)<sup>•</sup> y alcoholil (RO)<sup>•</sup>. Otros no son radicales libres pero tienen el mismo efecto como el óxido nítrico (NO)<sup>•</sup>, alquil (R)<sup>•</sup>, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>•</sup> (Duarte. –Castañeda 2003; Halliwell *et al.*, 1995).

El interés por el estrés oxidativo y las sustancias antioxidantes se ha intensificado en la última década, por la posible relación etiológica con diversas patologías cardiovasculares, cáncer, artritis y entre otras (Martínez *et al.*, 1998). El estrés oxidativo es decir producción de radicales libres en cual ocurre entre otras causas, cuando el sistema antioxidante no es capaz de neutralizar la acción de los radicales libres, bien sea por deficiencia del sistema antioxidante o por producción excesiva de radicales libres.

Mecanismos para la producción de radicales libres: (Turrens, 1994; Pérez, 2006).

- Autooxidación de Moléculas Pequeñas
- Oxidación de Mioglobina y Hemoglobina
- Actividades Enzimáticas
- Peroxisomas
- Transporte electrónico mitocondrial
- Transporte electrónico microsomial
- Fuentes Exógenas
- Oxidación de Proteínas
- Oxidación de Lípidos
- Oxidación de Hidratos de Carbono
- Oxidación de Ácidos Nucleicos

### 1.2.2 Antioxidantes Naturales

#### a. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que ocurren frecuentemente como glucósidos. Son polares y tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Dada la naturaleza aromática muestran una intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral muy utilizado para el análisis

cuantitativo (Lok de Ugaz, 1988; Geissman, 1969; Domínguez, 1973; Harbone, 1975; Harbone 1973).

- Estilbenos: (Rodríguez, 2008; Geissman 1969; Gorham 1995).

Se conocen hasta 300 estilbenoides y estilben-glucósidos, que se encuentran naturalmente en diversas especies del reino vegetal, dentro de las espermatofitas. Como su propio nombre indica, el esqueleto estructural de todos ellos consta de un puente vinílico, que sirve de unión a dos anillos aromáticos (esqueleto estilbenoide). A partir de esta estructura química, relativamente sencilla, la naturaleza ha sido capaz de crear una gran variedad de compuestos, variando entre ellos tanto el número como la posición de grupos hidroxilos, la extensión en que dichos grupos hidroxilos se encuentran a su vez sustituidos por azúcares, por grupos metilo, metoxi u otros residuos y la configuración estérica de moléculas químicamente idénticas. Otra causa de variación que aumenta mucho más el número de sustancias integrantes de esta familia es su habilidad para existir como dímeros, trímeros o polímeros mayores.

Los estilbenoides son compuestos fenólicos, derivados del ácido cinámico (vía ácido shikímico) y de tres unidades de acetato. Son biológicamente activos con amplio espectro de actividad antibiótica y farmacológica (Rodríguez, 2008). Son sintetizados por ciertas plantas como un mecanismo adaptativo frente al estrés (irradiación de rayos ultravioleta, infección microbiana, exposición de metales pesados, etc.). Dentro de este grupo de compuestos, cabe destacar el trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). El resveratrol se le ha atribuido como una vía para reducir la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares en humanos. También se muestra muy efectivo en la prevención y terapia de la aterosclerosis. Es un interesante agente antiinflamatorio, antihiperoxidativo, vasodilatador y actúa como antiagregante plaquetario.

[http://www.ua.es/va/otri/areas/ttot/docs/Metiljasmonato\\_ciclodextrinas\\_espaf10l.pdf](http://www.ua.es/va/otri/areas/ttot/docs/Metiljasmonato_ciclodextrinas_espaf10l.pdf)

Majumder *et al.* (1995) estudiaron una serie de orquídeas indias donde encontraron varios estilbenoides y triterpenoides, en el cual aislaron dos nuevos estilbenoides, designados como callosin y callosinina, de la orquídea *Agrostophyllum calloso*, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico ácido, orchinol, 6-metoxi

coelonin, imbricatin y callosin estos compuestos también se aislaron de la orquídea *Coelogyneflaccida*.

Según Deciga *et al.* (2007) en la orquídea *Scaphyglottis livida* (Lindley) distribuida en regiones tropicales del Estado de Veracruz, México, se utiliza la cocción de la planta para el tratamiento de dolores de estómago. Se determinaron los efectos anticonceptivo y anti-inflamatorio del compuesto gigantol. Investigaciones anteriores demostraron que el extracto de *Scaphyglottis livida* presentaba los compuestos: (gigantol), batatacin III, coelonin, 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno y 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (Estrada *et al.* 1999). Según Hernández *et al.* (2004) identificaron el compuesto gigantol de *Nidema boothii*, se comprobó el efecto relajante del gigantol en el músculo liso por la mediación por el óxido nítrico (NO) / sistema cíclico CMPC, como también la actividad herbicida del gigantol.

**b. Clasificación de los compuestos fenóles** (Harbone *et al.*, 1975; Mabry, *et al.*, 1970) (Anexo 1).

A) Compuestos Fenólicos Simples: C6C1, C6C2, C6C3.

B) Flavonoides:        chalconas y auronas  
                              flavonoles y flavona  
                              antocianinas  
                              flavanonas  
                              flavonoles

C) Isoflavonoides isoflavonas: isoflavanonas, rotenoides, isoflavanos e isoflavenos

D) Quinonas benzoquinona, naftoquinona, antraquinona, bis-antraquinona

E) -Pironas cumarinas, isocumarinas, aflatoxinas

F) -Pironas cromanos y cromonas, cannabinoides

G) Xantonas

H) Lignoides

I) Dépsidos

J) Otros policétidos aromáticos

**c. Flavonoides.** (Lok de Ugaz, 1988; Geissman y Crout 1969; Domínguez, 1973; Harbone et al., 1975; Florez *et al.*, 2002).

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en los vegetales, como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta polímeros con pesos moleculares superiores a los 30000 Da. Son responsables de las coloraciones de las plantas, la mayoría de ellos presentan actividades biológicas muy importantes existen 13 subclases de flavonoides, con un total de más de 5000 compuestos. Todos tienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico presentando un esqueleto hidrocarbonado bajo un sistema arreglado de C6-C3-C6 (difencilpropano), es decir, 2 anillos de benceno unidos por una cadena de 3 átomos de carbono derivado del ácido shiquímico ( Marcano, 1991; Lok de Ugaz, 1988 ) (Figura 4 ).

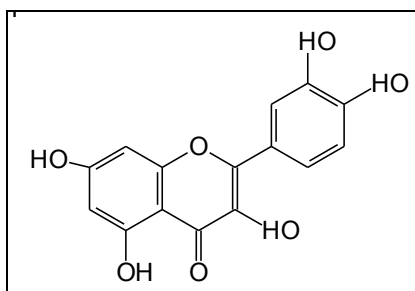


Figura 4. Quercetina Fuente (Ugaz, 1998)

Los pigmentos flavonoides, es uno de los grupos de compuestos ampliamente distribuidos en las especies (Lok de Ugaz, 1988). Los métodos de detección, aislamiento e identificación de compuestos fenólicos se fundamentan en sus propiedades ácidas y su polaridad. La mayoría de los fenoles son sólidos y su color varía desde incoloro hasta fuertemente coloreado, dependiendo de la conjugación de las estructuras. Su solubilidad en solventes polares (metanol, butanol) permite diferenciarlos de otros pigmentos liposolubles igualmente coloreados, los carotenoides, su acidez los hace solubles en bases.

Los flavonoides se forman biogénicamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a

partir del cual se derivan las otras clases de modificaciones que ocurren en varias etapas. Así mismo cada una de estas clases puede sufrir posteriores metilaciones, isoprenilaciones o glicosidaciones de los grupos hidroxilos, metilaciones de grupos o – hidroxilos, dimerizaciones como se observa en el Anexo 2.

Los flavonoides, que se encuentran tanto en estado libre como glicosidado, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales. Son sustancias de origen vegetal y le dan los colores (rojos, azules, amarillo) a las flores y las hojas de otoño (del latín *flavus*, amarillo). Son abundantes en las Poligonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Umbelliferae y Compositae. Los flavonoides se encuentran sobre todo en los órganos aéreos amarillos (hojas y botones florales) localizados en tejidos superficiales. Están disueltos como glicósidos en el jugo vacuolar, cloroplastos y membranas. La luz no es esencial para su formación, pero incluye cuantitativamente. La intensidad de color amarillo aumenta con el aumento de pH, es decir de ser incoloros o blancos a pH ácido, pasan a ser fuertemente amarillos a pH básicos (Harbone *et al.*, 1975).

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones, mencionaremos la de los glucósidos de dihidrochalconas como edulcorantes y de la rotenona como insecticida, etc. La actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas (Florez *et al.*, 2002 ; Yizhong Cai *et al.*, 2004).

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas, e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II.

Entre todas las propiedades biológicas de mayor interés son sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en

el anillo C, teniendo en cuenta que a menudo una dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos han sido ampliamente recomendados, algunos otros investigadores recomiendan incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos para lograr una mejor acción antioxidante (Pérez, 2003).

**d. Funciones de los flavonoides en las plantas:**

- a) Su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta que los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis.
- b) Diferentes actividades biológicas.
- c) Sus variados colores y su presencia en los tejidos de las flores, sugieren que participan en procesos de la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores.
- d) La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal.

**e. Clasificación química de los flavonoides:** (Florez *et al.*, 2002) (Anexo 1)

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 (Geissman y Crout 1969). Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la prímula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas. Son las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus* spp.); apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos, para lo cual se ha empleado la Retama de los tintoreros (*Genista tinctoria*).

Los alimentos ricos en flavonas, como las manzanas y las peras, hasta el chocolate oscuro y el vino tinto, pueden ayudar a proteger a las mujeres durante la menopausia a prevenir las enfermedades cardiovasculares y las embolias. Las



flavonas son componentes antioxidantes que se pueden encontrar en muchos alimentos de origen vegetal que protegen el corazón.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, la D-glucosa es el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico.

La parte sin azúcares de la molécula flavonoides se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo.

#### **f. Fuentes de los flavonoides (Flórez 2002).**

1. Citroflavonoides: quercetina, hesperidina, rutina, narangina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La narangina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la *genisteína* y la *daidzeina*.

3. Proantocianidinas: se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.

4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.

5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.

6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

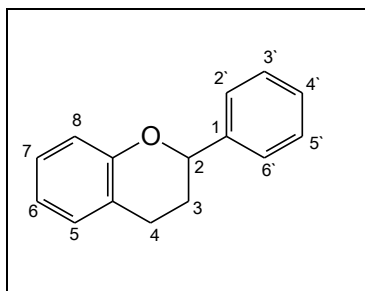
7. Kaemferol: se encuentra en puerros, brócolis, rábano, endibias y remolacha roja.

#### **1.2.3 Actividad antioxidante**

Los antioxidantes utilizados en alimentos son compuestos que retardan o inhiben la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, ayudan a prevenir la formación de colores y olores desagradables, se han obtenido diferentes tipos de compuestos a partir de rutas sintéticas o fuentes naturales. Así por ejemplo, entre los compuestos de origen natural se encuentran: carotenoides, vitaminas C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros (Pokorny *et al.*, 2001) (Vázquez, 2007). Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, narangina y limoneno e Isoflavonoides: genisteína y la daidzeina (Martinez *et al.*, 2002).

Lo relacionado a la actividad antioxidante sugiere que tanto el tipo de moléculas con actividad antioxidante, como la solubilidad de éstas son determinantes en la reacción. Infiriendo que la actividad mostrada se da por la presencia de flavonoides y otro tipo de polifenoles. Se ha reportado ampliamente en la literatura la relación estructura – actividad de los flavonoides por ejemplo: En los flavonoides existen tres características estructurales importantes para la actividad antioxidante: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Figura 5).

los flavonoides que no contienen grupos hidroxilo en el anillo B, así como compuestos que contengan ácidos aromáticos con 1 sólo grupo hidroxilo, no reaccionarían con el radical 2, 2 Difenil -1 picril hidracil DPPH, pero sí lo harían con el radical ABTS ( ácido ferrimioglobino/2,2'- acino-bis-(3-etilbenztiazolino-6-sulfónico) ( Roginsky y Lissi, 2005). Adicionalmente, el DPPH es más selectivo que el método ABTS y se ha visto que en el caso de los polifenoles la capacidad antioxidante cambia significativamente entre un método y otro (Roginsky y Lissi 2005).



Fuente (Perez, 2003)

Figura 5. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

En la literatura se encuentra referenciada la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes, dependiendo del sistema de reacción o la fuente de radicales (Sacchetti *et al.*, 2005).

Huang, (2005) demostró la relación de los aspectos multifacéticos de los antioxidantes y los modelos básicos de cinética de autooxidación y analizó los principios químicos de la determinación de capacidad antioxidante. Dependiendo de las reacciones implicadas, estos ensayos pueden ser más o menos clasificados en dos tipos: ensayos sobre la base de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y los ensayos sobre la base de transferencia de electrones (ET). La mayoría de los ensayos HAT se basan en un régimen competitivo de reacción, en la que el antioxidante y sustrato compiten térmicamente por los radicales peroxil generados a través de la descomposición de compuestos azoicos. La evaluación del parámetro Captura Total de Radical Antioxidante (CTRA) y la de Ensayos de Decoloración ET consisten en medir la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color se correlaciona con la muestra de las concentraciones de antioxidantes. Se debe incluir también la determinación de fenoles totales por el reactivo Folin-Ciocalteu (FCR), Trolox, la equivalencia de capacidad antioxidante (CTRA), el Poder Antioxidante por Reducción de Ion Férrico (FRAP), el potencial total de antioxidante utilizando el método de Cu (II) como un complejo oxidante y método DPPH radical 2,2 Difetil -1 picril hidracil. Además, existen otros ensayos destinados a medir la capacidad biológica de oxidantes tales como, anión superóxido, peroxinitrito, y el radical hidroxilo.

### 1.3 Obtención de los extractos vegetales:

La extracción es un proceso por el cual podemos aislar una sustancia o grupos de sustancias basándonos en la diferencia de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente (Jiménez G. 2002)

La extracción puede realizarse a partir de mezclas sólidas o de soluciones de la sustancia deseada en un dado disolvente. En ambos casos debe observarse la formación de dos fases para que el proceso pueda realizarse: en el primer caso una fase sólida y una líquida, mientras que en el segundo caso deben presentarse dos fases líquidas inmiscibles (González, 2001).

Si se tienen dos líquidos inmiscibles entre sí formando dos fases líquidas y se agrega una tercera sustancia, dicha sustancia se distribuirá entre las dos fases de una manera definida dependiendo de su afinidad hacia los diferentes disolventes. Este equilibrio es independiente de la cantidad en que se agrega dicha sustancia, pero es dependiente de la temperatura (Domínguez, 1973). Los agentes de disolución el agua se emplea únicamente en casos determinados, pues puede llegar a alterar el contenido de principios activos y por consiguiente el contenido del producto. El alcohol es el disolvente por excelencia, pues evita la disolución de las materias gomosas y pectinas y facilita la disolución de alcaloides y de las esencias (Sora *et al.*, 1998).

- **Método de disolución:** Son varios los métodos que pueden ser empleados. Si el compuesto a extraer se encuentra en una solución acuosa, se introduce la misma dentro de una ampolla de decantación y se agrega el disolvente orgánico seleccionado para la extracción. El disolvente elegido debe ser inerte, inmiscible con agua y presentar el mayor valor de  $K_d$  (La constante  $K_d$  es llamada *constante de distribución o partición*) (Galagovsky, 1995).

Entre los disolventes más utilizados para estos procesos podemos mencionar: Hexano, cloroformo, éter etílico (dietiléter), diclorometano, éter de petróleo, acetato de etilo, metanol. Tanto el metanol como el acetato de etilo tienen mayor polaridad que los dos restantes. Por lo tanto, cuando se desea obtener una sustancia orgánica polar debe utilizar alguno de estos dos solventes. Recordar que cuando se extrae un pigmento vegetal se utilizaba etanol para extraer

clorofilas, mientras que los carotenos –menos polares– pueden extraerse con cualquier disolvente mencionado antes (Vogel, 1991).

- **Método de maceración** (Vogel, 1991) Consiste en mantener el material vegetal en contacto con un líquido (disolvente) frío, en recipientes de vidrio o de acero inoxidable. Esta operación requiere un tiempo más o menos largo (96 horas como mínimo y un tiempo ideal de 8 días), y generalmente va acompañada de la trituración mecánica del material. Es el método más recomendable para extraer sustancias termolábiles (Sora *et al.*, 1998)

Otro tipo es la extracción *sólido-líquido*. En este caso, el líquido se pone en contacto con un sólido durante un lapso de tiempo determinado y luego se filtra, quedando disuelta en el disolvente la sustancia buscada. Este tipo de extracción se realiza habitualmente en un aparato denominado reflujo.

Si el proceso se hace a una temperatura superior a la del ambiente pero inferior a la del punto de ebullición del disolvente, se llama digestión, mientras que si la temperatura se encuentra por encima del punto de ebullición del disolvente se le conoce como decocción o reflujo, si se utiliza un refrigerante para reciclar el disolvente, la sustancia sólida se introduce a un balón de 60 lt a dicho recipiente donde se coloca el volumen del disolvente que se utilizará en la extracción para extraer los compuestos de la muestra vegetal, por el extremo superior del recipiente, se coloca un condensador (Lok de Ugaz 1988), el disolvente se calienta; los vapores ascienden por el refrigerante luego se condensan y vuelven al recipiente impregnando al sólido por efecto de sifón. En donde el disolvente extrae las sustancias deseadas. El proceso se repite automáticamente hasta que la extracción se completa, el disolvente de extracción se evapora, recuperando así a la sustancia deseada (Harbone, 1973).

#### **Características de los extractos vegetales:**

- Los extractos bien preparados son de color mas o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- Unos son de color café amarillentos, otros de color rojizo, los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila. Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.

- Su olor y su sabor son propiamente característicos de la materia prima que ha dado su origen. Mal preparados, adquieren olor a caramelo o de confitura poco cocida.
- Algunos extractos tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual ha sido preparado (González, 2001).

## **1.4 Técnicas de Purificación**

### **1.4.1 Cromatografía** (Torres, 1994; Lok de Ugaz 1988)

#### Historia

El botánico ruso Mikhail Tswett estableció las ventajas de la cromatografía y fue el primero en utilizar este término. Es recordado como el Padre de la Cromatografía. Ismailov y Scraiber utilizaron láminas de vidrio para colocar capas muy delgadas de alúmina y luego aplicaron extractos vegetales, dando así la primera forma de Cromatografía de Capa Fina. Egon Stahl (1956) dió el nombre de Cromatografía de Capa Fina. Estandarizó los procedimientos, equipos y adsorbentes dando un auge a la técnica simple, a bajo costo y eficiente.

La absorción es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

#### Proceso de adsorción

La cromatografía (del griego chroma=color, graphos= escritura) es un procedimiento fisicoquímico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación de diferencias de estos componentes sobre una superficie estacionaria o inmóvil.

En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los responsables para que ocurra la separación: la *adsorción* y la *absorción*.

Se llama adsorción al depósito y retención selectiva de sustancias sobre la superficie de sólidos finamente divididos por efecto de fuerzas fisicoquímicas es decir la muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por

la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc). Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia con el solvente.

### Adsorbentes

Los adsorbentes más utilizados en la Cromatografía de Capa Fina son:

- Sílica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- Tierra Silíceo ó Kieselguhr
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- Poliamidas

Estos adsorbentes deber tener las siguientes características:

- Tamaño de Partícula
  - Volúmen de Poro
  - Diámetro de Poro
  - Área Superficial
- Homogeneidad
- Pureza

### Preparación de la Placa Cromatográfica ( Domínguez, 1973; Torres, 1994)

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes.

En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase móvil los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que si se

encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es mucho más lenta.

Se usan como soporte del adsorbente láminas de: Vidrio, Plástico ó Metálicos (ej: Aluminio) Los tamaños de la placa para CCF convencional son : 20 cm x 20 cm; 10 cm x 20 cm y 5 cm x 2 cm. Hay placas que contienen un indicador de Fluorescencia:  $F_{254}$  ó  $F_{366}$ . El número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado.

#### Aplicación de la muestra

La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítico ó Preparativa en:

- Banda e
- Punto ó Mancha

#### Desarrollo de la placa

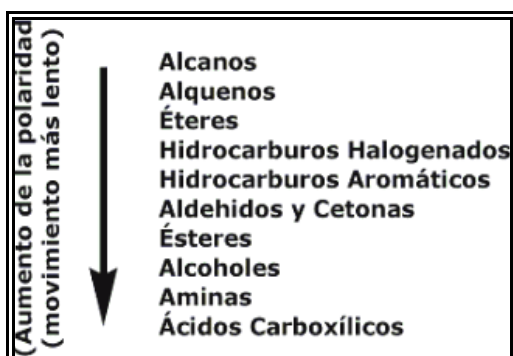
Es un proceso mediante el cual son transportados a través de la fase estacionaria por la fase móvil.

#### Elección del disolvente

Los disolventes orgánicos de polaridad creciente utilizados para realizar las diferentes mezclas para la separación según la serie eluotrópica se puede observa en el Cuadro 1.



Cuadro 1. Serie eluotrópica de los disolventes empleados como fase móvil en la cromatografía de adsorción sobre gel de sílice CCF, CCFP, CC, Sephadex LH 20.



Disolvente	Fuerza eluyente
Pentano	0,00
Hexano	0,01
Heptano	0,01
Triclorotrifluoroetano	0,02
Tolueno	0,22
Cloroformo	0,26
Diclorometano	0,3
Éter dietílico	0,43
Acetato de etilo	0,48
Éter metil <i>t</i> -butílico	0,48
Dioxano	0,51
Acetonitrilo	0,52
Acetona	0,53
Tetrahidrofurano	0,53
2-Propanol	0,60
Metanol	0,70

Fuente: Snyder L. R. 1983

### Cámaras para el desarrollo

Existen varios tipos de cámaras:

- Normal
- Doble Compartimiento
- Sandwich
- Horizontal
- Vario KS
- U

### Detección ó visualización

Si la muestra (mancha) no es coloreada se requiere de métodos que nos permitan visualizar el(los) componente(s) presentes. También se conoce este procedimiento como Revelado.

Estos métodos son:

- Químicos (por inmersión o rociado). Se obtienen derivados coloreados o fluorescentes
- Físicos (ópticos). Generalmente se utiliza radiación UV

### Evaluación de un cromatograma de capa fina

#### Análisis cualitativo

- Medida de Rf
- Comparación Visual de Color/Intensidad
- Propiedades UV/IR/MS/NMR

#### Análisis Cuantitativo

- Semi-cuantitativo
  - Comparación visual del diámetro y la intensidad del color de la mancha contra una serie de manchas patrones de concentración conocida
- Cuantitativo
  - Indirecta
  - Directa
    - Densitometría
      - Medida de Transmisión. Medida de luz transmitida a través de la substancia.
      - Medida de Emisión. Medida de luz reflejada desde la substancia
    - Espectrofotometría
      - Fluorescencia  
Fluorescencia con "quenching"

### **Sephadex LH 20**

Gel de Filtración molecular, separación de compuestos de tipo polifenólico es una red tridimensional de cadenas de polisacárido de dextran modificado mediante

hidroxipropilación que posee propiedades lipoflicas e hidroflicas lo que es posible su solvatación en agua, disolventes orgánicos polares y mezclas de solventes orgánicos polares y no polares, permitiendo la separación de moléculas de acuerdo a su tamaño.

## **1.5 Técnicas Instrumentales para la elucidación estructural e identificación de los compuestos.**

### **1.5.1 Espectroscopía infrarroja IR (Skoog, 1989).**

(Espectroscopía IR) es la rama de la espectroscopía que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común una forma de espectroscopía de absorción. Así como otras técnicas espectroscópicas, puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra.

La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones; el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano (aproximadamente  $400-10\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ( $14000-4000\text{ cm}^{-1}$ ) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas (Conley, 1979).

Los enlaces químicos tienen frecuencias específicas a las cuales vibran a diferentes niveles de energía. Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinados por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y eventualmente por el acoplamiento vibrónico asociado. Para que un modo vibracional en una molécula sea activa al IR, debe estar asociada con cambios en el dipolo permanente.

En particular, en las aproximaciones de Born-Oppenheimer y armónicas, i.e. cuando el Hamiltoniano molecular correspondiente al estado electrónico basal puede ser aproximado por un oscilador armónico en la vecindad de la geometría molecular de equilibrio, las frecuencias resonantes son determinadas por los

modos normales correspondientes a la superficie de energía potencial del estado basal electrónico de la molécula. Sin embargo, las frecuencias resonantes pueden estar en una primera aproximación relacionadas con la fuerza del enlace y la masa de los átomos a cada lado del mismo. Así, la frecuencia de las vibraciones pueden ser asociadas con un tipo particular de enlace (Creswell, 1979).

Las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Las moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos químicos. Los átomos en un grupo  $\text{CH}_2$ , encontrado comúnmente en compuestos orgánicos pueden vibrar de seis formas distintas, estiramientos simétricos y asimétricos, flexiones simétricas y asimétricas en el plano (**scissoring** y **rocking**, respectivamente), y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (**wagging** y **twisting**, respectivamente); como se muestra a continuación en la Figura 6.

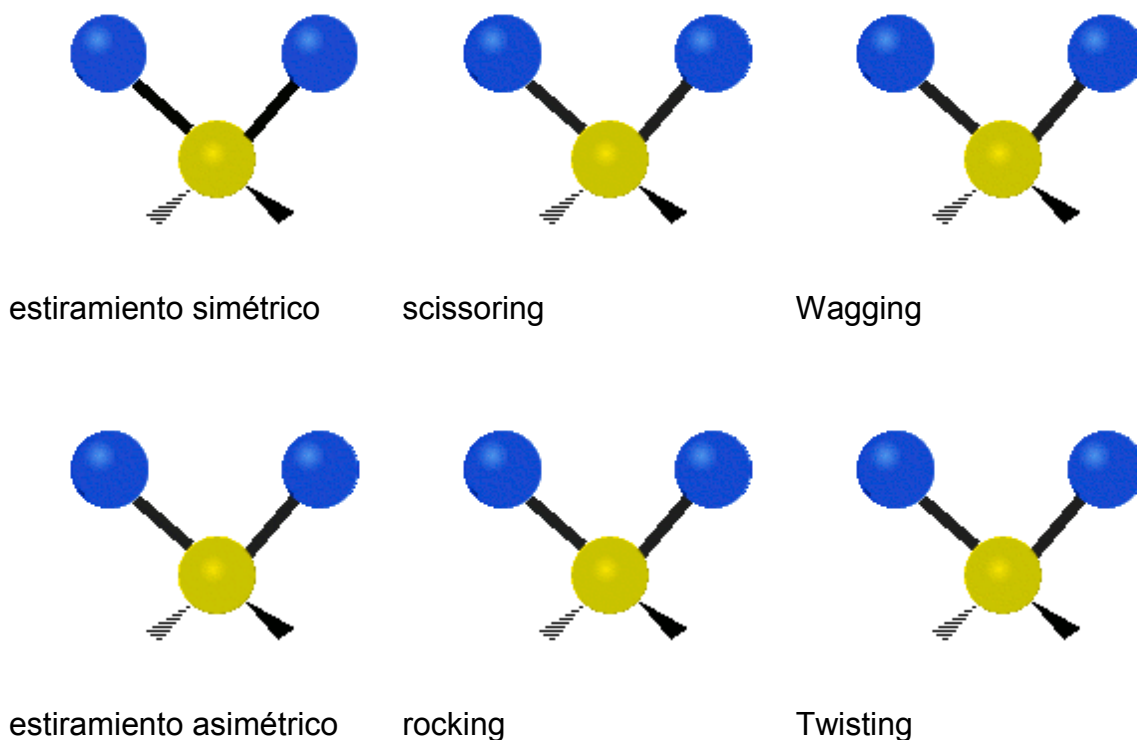


Figura 6. Frecuencias vibracionales (estiramientos y flexiones ) comunes en IR

Para medir una muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra y se registra la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de cuales enlaces están presentes.

Esta técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica. Espectros nítidos se obtienen de muestras con pocos enlaces activos al IR y altos niveles de pureza. Estructuras moleculares más complejas llevan a más bandas de absorción y a un espectro más complejo. Sin embargo, esta técnica se ha podido utilizar para la caracterización de mezclas muy complejas (Olsen 1990)

### **Usos y aplicaciones**

La espectroscopía infrarroja es ampliamente usada en investigación y en la industria como una simple y confiable para realizar mediciones, control de calidad y mediciones dinámicas. Los instrumentos son en la actualidad pequeños y pueden transportarse fácilmente. Con una tecnología de filtración y manipulación de resultados en auge, las muestras en solución pueden ser medidas con precisión

El agua produce una absorbancia amplia a lo largo del rango de interés, volviendo al espectro ilegible sin este tratamiento computacional. Algunas máquinas indican automáticamente cuál es la sustancia que está siendo medida a partir de mieles de espectros de referencia almacenados.

Se pueden medir cambios en el carácter o la cantidad de un enlace particular. Esto es especialmente útil para medir el grado de polimerización en la manufactura de polímeros.

También es usado en aplicaciones cualitativas análisis por comparación con espectros conocidos y aplicaciones cuantitativas mezcla de compuestos, contaminantes atmosféricos.

La industria farmacéutica necesita disponer de métodos analíticos rápidos y fiables para poder controlar de forma eficiente tanto las materias primas como los productos intermedios o finales y, en un sentido amplio, el proceso de fabricación. El espectro puede detectar pequeñas desviaciones en el nivel de concentración de alguno de los componentes, así como la capacidad de éste de detectar contaminaciones.

Para la interpretación de los espectros de IR se analiza el espectro en base de la división de las señales en IR:

De 4000 a 2900  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión de CH, O-H y N-H

De 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión de triples enlaces y dobles enlaces acumulados.

De 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión de C=O, C=N y C=C

De 1500 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Zona de la huella dactilar ( Flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc. ). De acuerdo con dicha división se podrán identificar diversos grupos funcionales, tal y como se indica en el Cuadro 2.

**1.5.2 Resonancia Magnética Nuclear** (Creswell, 1979; Skoog, 1989; Olsen 1990; Silverstein *et al.*, 1991).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos. La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos en la dirección de un campo magnético externo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos, por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra.

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del

entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos.

Cuadro 2. Frecuencias de vibración de algunos grupos funcionales en IR

Grupo Funcional	Numero de onda ( cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional	Numero de onda ( cm <sup>-1</sup> )
OH (enlace de hidrogeno)	3100 - 3200	- C= C-	2300 - 2100
OH (sin enlace de hidrogeno)	3600	- C = N	2250
Cetonas	1725 – 1700	-N=C=O	2270
Aldehídos	1740 – 1720	-N=C=S	2150
Aldehidos y cetonas β alfa insaturados	1715 - 1660	C=C=C	1950
Ciclopentanonas	1750 – 1740	NH	3500 – 3300
Ciclobutanonas	1780 – 1760	C=N-	1690 – 1480
Ácidos carboxílicos	1725 - 1700	NO <sub>2</sub>	1650 – 1500
Esteres	1750 – 1735	S=O	1070 – 1010
Esteres alfa – β insaturados	1750 – 1715	Sulfonas	1350 – 1300
Delta – lactonas	1750 – 1735	Sulfonamidas y sulfonatos	1370 – 1300
Gama – lactonas	1780 - 1760	C- F	1180 – 1140
Amidas	1690 – 1630	C-Cl	780 – 580
		C-Br	800 – 560
Anhídridos	1850 – 1740	C- I	600 – 500

( Silverstein *et al.*, 1991)

Para que se pueda emplear la técnica los núcleos deben tener un momento magnético distinto de cero. Esta condición no la cumplen los núcleos con número másico y número atómico par (como el <sup>12</sup>C, <sup>16</sup>O, <sup>32</sup>S). Los núcleos más importantes en química orgánica son: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F y <sup>15</sup>N. Otros núcleos importantes: <sup>7</sup>Li, <sup>11</sup>B, <sup>27</sup>Al, <sup>29</sup>Si, <sup>77</sup>Se, <sup>117</sup>Sn, <sup>195</sup>Pt, <sup>199</sup>Hg, <sup>203</sup>Tl, <sup>205</sup>Tl, <sup>207</sup>Pb.

Se prefieren los núcleos de número cuántico de espín nuclear igual a 1/2, ya que carecen de un momento magnético cuadrupolar que produce un ensanchamiento de las señales de RMN. También es mejor que el isótopo sea abundante en la naturaleza, ya que la intensidad de la señal dependerá de la concentración de esos núcleos activos. Por eso, uno de los más útiles en la elucidación de estructuras es el  $^1\text{H}$ , dando lugar a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón. También es importante en química orgánica el  $^{13}\text{C}$ , aunque se trata de un núcleo poco abundante y poco sensible (Olsen 1990).

La técnica se ha empleado en química orgánica, química inorgánica y bioquímica. La misma tecnología también ha terminado por extenderse a otros campos, por ejemplo en medicina, en donde se obtienen imágenes por resonancia magnética.

#### 1.5.2.1 Principio físico (Silverstein, 1991)

Todos los núcleos que contienen un número impar de protones (número atómico) o un número másico impar tienen un momento magnético intrínseco y un momento angular. Si un núcleo con estas características se somete a un campo magnético constante, percibirá un par de fuerzas que lo harán girar sobre sí mismo hasta que el momento magnético y el campo magnético se encuentren alineados.

Dos alineamientos serán posibles. Por una parte, el campo magnético y el momento magnético pueden apuntar en la misma dirección, configuración que tendrá una energía mínima y será la más probable. Por la otra, ambos vectores pueden apuntar en direcciones opuestas, caso en el que la energía será ligeramente superior. La diferencia de energía entre ambos estados se expresa según la ecuación siguiente:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0$$

Donde  $\gamma$  es la constante giromagnética o factor giromagnético, que depende del núcleo que observemos.

Ambos niveles estarán poblados según las leyes del equilibrio térmico. Como se puede observar, la diferencia de energía es proporcional a la magnitud del campo magnético y está directamente relacionada con la frecuencia de Larmor.



Debido a esta diferencia de energía, si un núcleo es perturbado por un campo electromagnético de la frecuencia apropiada, se producirá un fenómeno de resonancia; los núcleos del estado de energía inferior se excitarán al estado de energía superior. Cuando el estímulo cese, los núcleos emitirán, en forma de fotones, la energía que habían absorbido. Fotones que podrán detectarse utilizando el equipamiento adecuado.

Los equipos médicos de resonancia magnética nuclear suelen trabajar a una frecuencia de 300 MHz para la resonancia de  $H^1$ , y entre 20 MHz y 100 MHz para otros átomos (Silverstein, 1991).

#### **1.5.2.2 Aplicaciones más comunes** (Silverstein *et al.*, 1991)

La resonancia magnética hace uso de las propiedades de resonancia aplicando radiofrecuencias a los átomos o dipolos entre los campos alineados de la muestra, y permite estudiar la información estructural o química de una muestra. La *espectroscopía de resonancia magnética nuclear* (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos.

La RMN se utiliza también en el campo de la investigación de ordenadores cuánticos. Sus aplicaciones más frecuentes se encuentran ligadas al campo de la medicina, la bioquímica y la química orgánica. Es común denominar "resonancia magnética" al aparato que obtiene imágenes por resonancia magnética (MRI, por las siglas en inglés de "Magnetic Resonance Imaging").

#### **1.5.2.3 RMN Multidimensional** (Creswell, 1979).

La posibilidad de excitar la muestra con uno o más pulsos de radiofrecuencia (RF), cada uno de ellos aplicado con una potencia, duración, frecuencia, forma y fase particulares, e introducirlos en momentos específicos de tiempo durante el experimento de RMN, generalmente antes de que el sistema haya regresado al equilibrio por relajación, permite diseñar toda una gama de *secuencias de pulsos* de las que se puede extraer información molecular muy variada.

Una secuencia de pulsos es una distribución en el tiempo de alguno o varios de los siguientes elementos: i) un cierto número de pulsos de RF que afecté a uno o

más tipos de núcleos, ii) tiempos de espera en los que no se hace nada sino esperar a que el sistema evolucione de una determinada forma. Estos tiempos de espera pueden ser fijos o bien incrementables si su duración se va aumentando a medida que se repite el experimento, iii) gradientes de campo magnético y iv) una etapa final en la que se adquiere la FID.

En un experimento de RMN multidimensional la secuencia de pulsos debe constar de al menos dos pulsos y éstos deben separarse por un periodo de espera incrementable. La secuencia de pulsos se repite un número de veces adquiriéndose una FID en cada ocasión. La fase de alguno de los pulsos puede alterarse en cada repetición así como incrementarse la duración de uno o más tiempos de espera variables. Si la secuencia de pulsos tiene un tiempo de espera incrementable el experimento tendrá dos dimensiones, si tiene dos será de tres dimensiones, si tiene tres el experimento será de cuatro dimensiones.

Aunque en teoría no existe límite en el número de dimensiones de un experimento, experimentalmente hay limitaciones impuestas por la consiguiente pérdida de señal por relajación que conlleva la detección de las distintas dimensiones. Los tiempos de registro de los experimentos de RMN multidimensional se pueden acortar drásticamente con las técnicas rápidas de RMN desarrolladas en la presente década.

Los experimentos multidimensionales se pueden clasificar en dos tipos principales:

Experimentos de correlación homonuclear: Son aquellos en los que todas las dimensiones corresponden al mismo núcleo. Ejemplos: COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

Experimentos de correlación heteronuclear: En este experimentos se obtienen espectros cuyas dimensiones pertenecen a diferentes núcleos. Ejemplos: HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

Las interacciones que pueden detectarse por RMN se pueden clasificar en dos tipos:

1. Las interacciones *a través de enlaces* se basan en el acoplamiento escalar
2. Las interacciones *a través del espacio* se basan en el acoplamiento dipolar.

En el caso de muestras en disolución, el acoplamiento dipolar se manifiesta como efecto Overhauser nuclear que permite determinar la distancia entre los átomos.

Richard Ernst en 1991 y Kurt Wüthrich en el 2002 fueron galardonados con el premio Nobel de Química por sus contribuciones al desarrollo de la RMN de 2-dimensiones y multidimensional con transformada de Fourier. Los avances conseguidos por ellos y por otros grupos de investigadores han expandido la RMN a la bioquímica, y en particular a la determinación de la estructura en disolución de biopolímeros como proteínas o incluso ácidos nucleicos de tamaño pequeño.

#### 1.5.2.4 Información obtenida mediante RMN (Creswell, 1979; Silverstein *et al.*, 1991).

La aplicación fundamental de la espectroscopía de RMN es la determinación estructural, ya sea de moléculas orgánicas, organometálicas o biológicas. Para ello es necesaria la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información.

Para la elucidación estructural de moléculas orgánicas y organometálicas los experimentos más utilizados son los siguientes:

Espectro monodimensional de  $^1\text{H}$ : da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmemente (Ver Figura 7).

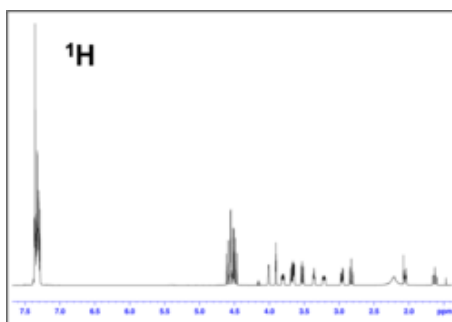


Figura 7 Ejemplo de un espectro de protón  $^1\text{H}$  de Resonancia Magnética Nuclear RMN.

- Espectro monodimensional de  $^{13}\text{C}$ : Al igual que en  $^1\text{H}$  el desplazamiento químico da información de los grupos funcionales. Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de carbonos que conforman la estructura ver Figura 8.

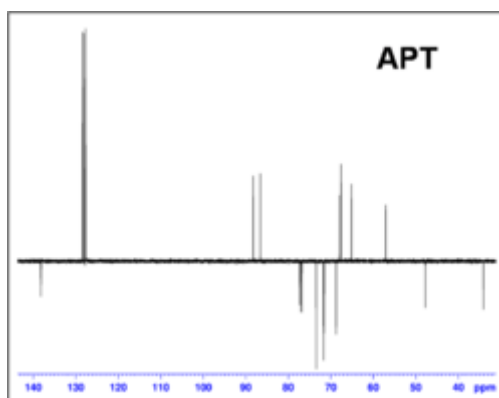


Figura 8 Ejemplo de un espectro DEPT, un tipo de experimento de  $^{13}\text{C}$ .

- Espectros bidimensionales homonucleares: Los experimentos COSY (Figura 9) y TOCSY dan información de las relaciones entre los protones de la molécula, por acoplamiento escalar o dipolar (NOESY)

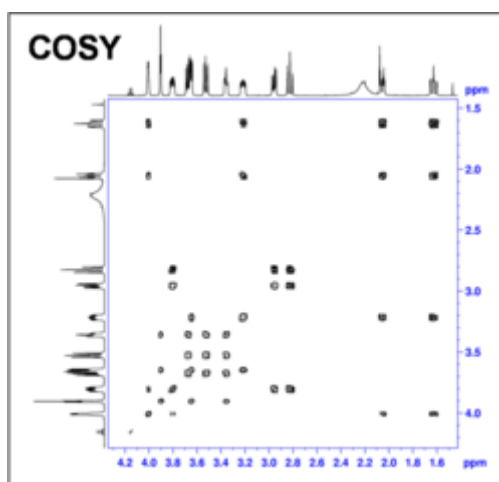


Figura 9 Ejemplo de un espectro COSY correlation spectroscopy homonuclear

- Espectros bidimensionales heteronucleares: Los experimentos HMQC y HSQC indican qué hidrógenos están unidos a qué carbonos. El experimento HMBC permite determinar relaciones entre protones y carbonos a mayor distancia (2 o 3 enlaces)
- Experimentos con otros núcleos: Si la molécula posee otros núcleos activos en RMN es posible su medida a través de experimentos monodimensionales o bidimensionales (por detección indirecta).

#### 1.5.2.5 Resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ . Apantallamiento o protección magnética por los electrones (Silverstein *et al.*, 1991).

Hasta ahora se ha descrito el concepto de resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético, pero en realidad los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Los electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo.

En cualquier molécula la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo ( $H_{\text{ef}}$ ) que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor.

$$H_{\text{ef}} = H_0 - H_{\text{loc}}$$

Si todos los protones ( $^1\text{H}$ ) de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de

entornos electrónicos diferentes y, por tanto, se encuentran diferentemente protegidos o apantallados.

Por ejemplo, en el metanol el átomo de oxígeno retira densidad electrónica del entorno electrónico que rodea al protón del grupo hidroxilo, quedando este átomo de hidrógeno menos protegido que los protones del grupo metilo. La consecuencia es que el protón del grupo hidroxilo resuena a un campo magnético menor que los protones del grupo metilo ( Figura 10). (Skoog, 1989)

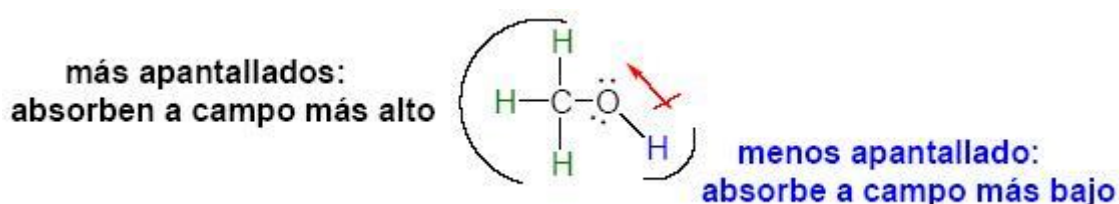


Figura 10 Desprotección o protección del campo magnético de la molécula de CH<sub>3</sub>OH

Por lo general, los efectos de protección, o apantallamiento, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra (Skoog, 1989).

Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades delta ó ppm). En la práctica es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe con suficiente exactitud para distinguir protones individuales ya que las absorciones sólo varían en unas pocas milésimas. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra. La diferencia en la intensidad del campo magnético necesario

para la resonancia de los protones de la muestra y de los protones de referencia se puede medir, ahora sí, con mucha exactitud.

$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{\nu_{\text{muestra}} - \nu_{\text{referencia}}}{\nu_{\text{referencia}}} \times 10^6$$

El compuesto de referencia más común en resonancia magnética nuclear es el tetrametilsilano (TMS,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ). Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados.

Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de resonancia magnética nuclear aparecen a campos más bajos (hacia la izquierda de la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo desplazamiento químico dando una única absorción intensa (Skoog, 1989).

La escala más común de desplazamiento químico es la escala delta en la que la absorción del tetrametilsilano (TMS) se define como 0.00 delta. La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala delta aumenta hacia los campos menores. La mayoría de las señales de protones ( $^1\text{H}$ ) varían entre 0 y 12 delta, mientras que las señales del C-13 varían del 0 a 250 delta.

Como el desplazamiento químico de un protón está determinado por su entorno se han construido tablas con valores representativos.

#### **1.5.2.6 Interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ (Skoog, 1989 ; Silverstein *et al.*, 1991)**

La rápida y correcta interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de protones requiere de mucha práctica. A continuación se citan los pasos a seguir para llevar a cabo el análisis espectral de forma correcta:

1. A partir de la fórmula molecular

a. Calcular el número de insaturaciones que posee el compuesto cuya estructura se quiere elucidar. Este número de insaturaciones puede indicar la presencia de anillos, dobles o triples enlaces. El número de insaturaciones se calcula según la siguiente expresión:

$$g = N^{\circ} \text{ átomos de C} + 1 - 2$$

$$n^{\circ} \text{ átomos H} + n^{\circ} \text{ átomos halógeno} - n^{\circ} \text{ átomos N}$$

b. Relacionar las áreas de integración de los picos con el número de protones totales de la estructura para obtener el número de protones que representa cada pico individual.

2. La presencia de un singulete ancho en el espectro podría deberse a protones de –NH o –OH. Si el singulete ancho se encuentra más allá de 10 ppm probable que se trate de un –OH de ácido.

3. Las señales entre 10 y 9 <sup>TM</sup> son indicativas de la presencia de un aldehído.

4. Las señales que aparecen entre 8 y 7 <sup>TM</sup> indican la presencia de un anillo aromático.

5. Las señales entre 6 y 5 <sup>TM</sup> indican la presencia de protones olefinicos. Mediante el valor de la constante de acoplamiento se puede deducir si la olefina es *cis* o *trans*

6. Las señales entre 4 y 3 <sup>TM</sup> indican que hay protones en un carbono unido a un grupo electronegativo como es el oxígeno o un halógeno.

7. La presencia de una señal alrededor de 2.5 <sup>TM</sup> se debe al protón de un alquino terminal

8. Las señales que aparecen entre 2.5 y 2.1 <sup>TM</sup> puede indicar la presencia de protones adyacentes a un grupo carbonilo.



## II. JUSTIFICACION

El conocimiento y aprovechamiento científico y tecnológico de la diversidad de la naturaleza conduce a mejorar la calidad de vida, valorar el patrimonio natural y cultural.

La química de alimentos es parte fundamental de la Ciencia de los alimentos que estudia la composición, estructura y propiedades de los componentes químicos bioactivos individuales dentro de la matriz, es por esto que es inaplazable la necesidad de investigar las especies nativas con potencial actividad antioxidante para su aplicación en el cuidado de la salud, como base de nuevos fármacos y en la formulación y conservación de alimentos, así reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las restricciones de carcinogenicidad que éstos presentan.

Por otro lado, el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura de los compuestos podría dar lugar a diseñar reacciones para producir derivados con mayor potencial antioxidante. Es entonces de gran importancia, aislar los principios activos de los alimentos, y su localización en las diferentes partes de la planta o en los diferentes extractos. Un gran porcentaje de los principios activos de las frutas, vegetales, hierbas medicinales están comprendidos en los llamados metabolitos secundarios que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida como los flavonoides, fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, cumarinas, estilbenos, taninos y lignanos, los cuales se les han atribuido las actividades antimutagénicas, antibacteriales, antivirales, anticarcinogénicas. Los flavonoides se han estudiado por el importante potencial antioxidante que poseen, estas moléculas inhiben la acción de los radicales libres y las moléculas de oxígeno reactivo que juegan un rol en el estrés oxidativo la patogénesis de las enfermedades como la diabetes, cataratas, cáncer, hipertensión, obesidad y arteriosclerosis por los radicales libres que afectan el proceso de glicosilación, auto-oxidación de la glucosa, ambos alteran el metabolismo glutatión, enzimas antioxidantes y la formación de peróxidos, los antioxidantes naturales actúan cediendo un electrón y el radical libre se estabiliza y se detiene la reacción en cadena por lo tanto el antioxidante se oxida y se convierte en una sustancia inocua protegiendo las células del organismo de las enfermedades degenerativas (cardiovasculares, diabetes).

La orquídea *Prosthechea michuacana* conocida como azucena de agua, es originaria de México en donde no presenta un cultivo tecnificado y actualmente no

hay reportes que el material vegetal de estudio posea la actividad antioxidante y solo se conoce algunas de sus propiedades como hidratantes – comestibles, antiinflamatorio, depurativo y calmante del dolor, los primeros estudios fitoquímicos en *P. michuacana* muestran la presencia de flavonas, flavonoides antocianinas y estíbenos. Los primeros ensayos farmacológicos del extracto clorofórmico presentaron actividad anticolinérgicas y antihistamínicas. Por lo tanto, el propósito del presente trabajo es aislar e identificar los compuestos con actividad antioxidante en el extracto de cloroformo de bulbos de *P. michuacana* y con la información obtenida de la investigación nos ayuda comprender la composición química de la orquídea que produce los compuestos con actividad antioxidante y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos además de su uso ornamental.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Aislar e identificar compuestos con actividad antioxidante de bulbo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos crudos con los disolventes cloroformo, metanol y hexano a partir de bulbos, raíz y hojas para determinar la actividad antioxidante por decoloración de  $\beta$ - caroteno y DPPH.
- Determinar el contenido total de fenoles al extracto metanólico de bulbo y realizar una análisis preliminar fitoquímico.
- Aislar los compuestos químicos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de los bulbos de la orquídea comestible *P. michuacana* por métodos cromatográficos, cromatografía en columna CC, cromatografía en placa fina CCD, cromatografía en placa preparativa CCDP.
- Identificar los compuestos químicos con actividad antioxidante aislados de la orquídea comestible *P. michuacana* por técnicas instrumentales IR, RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ .
- Evaluar la actividad antioxidante a los compuestos aislados de la orquídea comestible *P. michuacana*.

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

El desarrollo de la investigación se llevo a cabo en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales, ESIQIE, Instituto Politécnico Nacional.

### **4.2 MATERIALES**

#### **4.2.1 Materias primas**

Material vegetal: (hojas, bulbos y raíz) de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana* (Figura 13), se colectó en el Municipio de Santa Catarina Ixtepeji, distrito de Ixtlán, estado de Oaxaca, México, en mayo de 2007 (categorizada de la siguiente forma: adulto no reproductivo, bulbos con una altura de 4.6 a 5.5 cm y diametro de 3 a 3.4 cm, presencia de 2 o 3 hojas bien desarrolladas). Fue identificada taxonómicamente en el herbario de OAX y Jardín Botánico de Cassino Conzatti del Instituto Politécnico Nacional y el número de referencia No. 6478.



Figura 11. Bulbo y raíz de *Prosthechea michuacana*

### **4.3 REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **4.3.1 Reactivos**

- Los disolventes empleados fueron: n-hexano (n-Hex), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), metanol (MeOH). Para la obtención de los extractos crudos y para los fraccionamientos iniciales se utilizaron disolventes grado comercial. Para las purificaciones finales se emplearon disolventes de grado analítico.
- DMSO(Dimetil Sulfóxido) de Merck (Darmstadt, Germany).
- Se emplearon vapores de yodo como reveladores cromatográficos
- Reactivo para la prueba de actividad antioxidante DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl),  $\beta$  – caroteno, ácido linoleico
- Tocoferol (patron Sigma)

- Gel de sílice 60 HF<sub>254</sub> ( 0.063– 0.200) ( 230 – 400 ) marca Merck para cromatografía en columna CC
- Cromatoplasmas TLC de sílica gel 60 HF<sub>254</sub>
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 HF<sub>254</sub> de 1 mm de la casa comercial Merck para la cromatografía de capa delgada preparativa ( CCDP)
- Alcohol
- Agua destilada
- CDCl<sub>3</sub> cloroformo deuterado
- MeOD metanol deuterado
- DMSO – d<sub>6</sub> dimetilsulfoxido deuterado.
- Tetrametilsilano (TMS)
- Reactivos HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AcOH, CHCl<sub>3</sub>
- R. dragendorff ( Nitrato Básico de Bismuto, yoduro de Potasio).

#### **4.3.2 Material de laboratorio**

- vasos precipitados 50 ml para la recolección de las fracciones
- balones de vidrio aforados de 10 ml, 25 ml y 100 ml
- columnas de vidrio de largo y diámetro de 10 cm para el Sephadex LH20
- botellones de vidrio pyrex de 25 Lt de capacidad para la obtención de los extractos.
- Plástico polivinílico para las columnas de separación
- soportes
- tubos pvc

#### **4.3.3 Equipos**

- Rotavapor Yamato water BM 100
- Balanza electrónica Shimadzu Aux220 UNIBLOC
- Mufla – 4800 Funace BI
- Estufa lab line Imperial II
- Estufa de vacío Napco 58-31
- Equipo para RMN VARIANT Mercury DPX – 300 MHz
- Luz UV (lámpara de UV, VL- 6C 6w 259 nm Tube power – 12w
- Equipo Infrarrojo Nicolet- Nexus 470 ft-IR
- Espectrofotómetro BOECO S-20 Germany

- UV: espectrofotómetro Beckman DU640 con longitud de onda variable ( 515 nm )

#### 4. 4 METODOS

##### 4.4.1 Ensayos preliminares:

##### **Obtención de los extractos crudos.**

Fueron separados manualmente los bulbos, raíz y hojas de *Prosthechea michuacana*, se colocaron en papel estrasa y se secaron a temperatura ambiente en condiciones de sombra con movimiento constante, una vez secos se molieron. Para los ensayos preliminares se usaron 100 g de bulbos, raíz y hojas de *P. michuacana*, cada uno por separado se sometieron a temperatura de reflujo en un soxhlet durante 3 horas, con 1.5 L de hexano (n-hex), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), metanol (MeOH) y agua, consecutivamente, se filtraron en papel filtro Whitman número 40 y se evaporaron a sequedad en un rotavapor al vacío a peso constante a una temperatura de 40 °C. Se determinó el porcentaje de rendimiento del extracto sólido:

$$\% \text{ Rendimiento (p/p)} = \frac{\text{Peso de la muestra obtenida}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

Se evaluó los extractos hexano, cloroformo, metanol y agua.

**Bulbo**  
**Raíz**  
**Hojas**

A los extractos obtenidos se les realizó la prueba de actividad antioxidante por decoloración del β- caroteno en placa (Cuadro 3),

El esquema general del desarrollo experimental se muestra en las Figuras 12 y 13.

Cuadro 3 Extractos crudos de bulbos, raíz y hojas de *Prosthechea michuacana*

<b>CODIGO</b>	<b>SIGLAS</b>	<b>EXTRACTOS DE <i>Prosthechea michuacana</i></b>
M1	<b>PmBHe</b>	<i>bulbo hexano</i>
M2	<b>PmBCI</b>	<i>bulbo cloroformo</i>
M3	<b>PmBMe</b>	<i>bulbo metanol</i>
M4	<b>PmBH<sub>2</sub>O</b>	<i>bulbo agua</i>
M5	<b>PmRHe</b>	<i>raíz hexano</i>
M6	<b>PmRCI</b>	<i>raíz cloroformo</i>
M7	<b>PmRMe</b>	<i>raíz metanol</i>
M8	<b>PmRH<sub>2</sub>O</b>	<i>raíz agua</i>
M9	<b>PmHHe</b>	<i>hojas hexano</i>
M10	<b>PmHCl</b>	<i>hojas cloroformo</i>
M11	<b>PmHMe</b>	<i>hojas metanol</i>
M12	<b>PmRH<sub>2</sub>O</b>	<i>hojas agua</i>

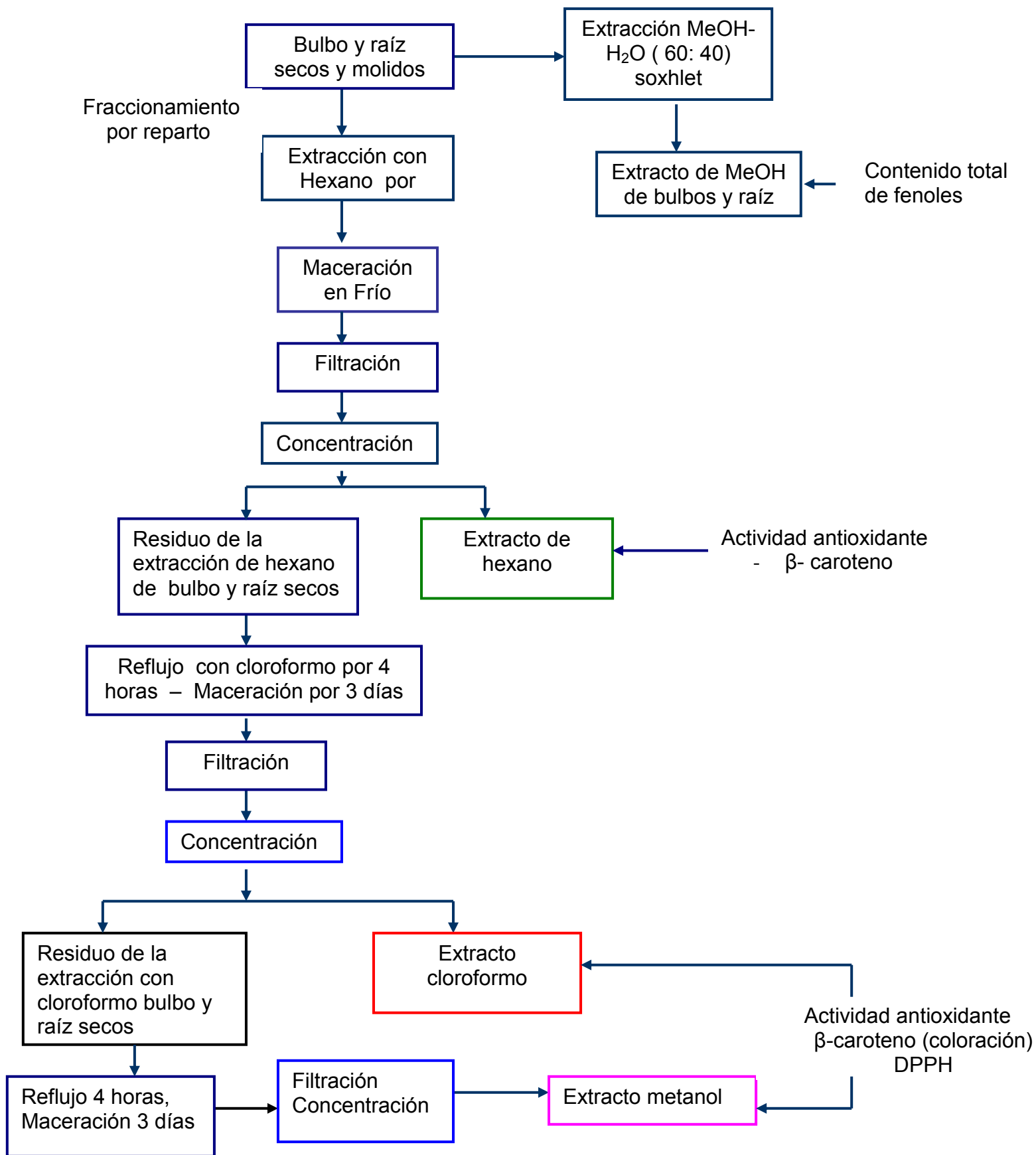


Figura 12. Obtención de los extractos de bulbo y raíz de la orquídea *P. michuacana*



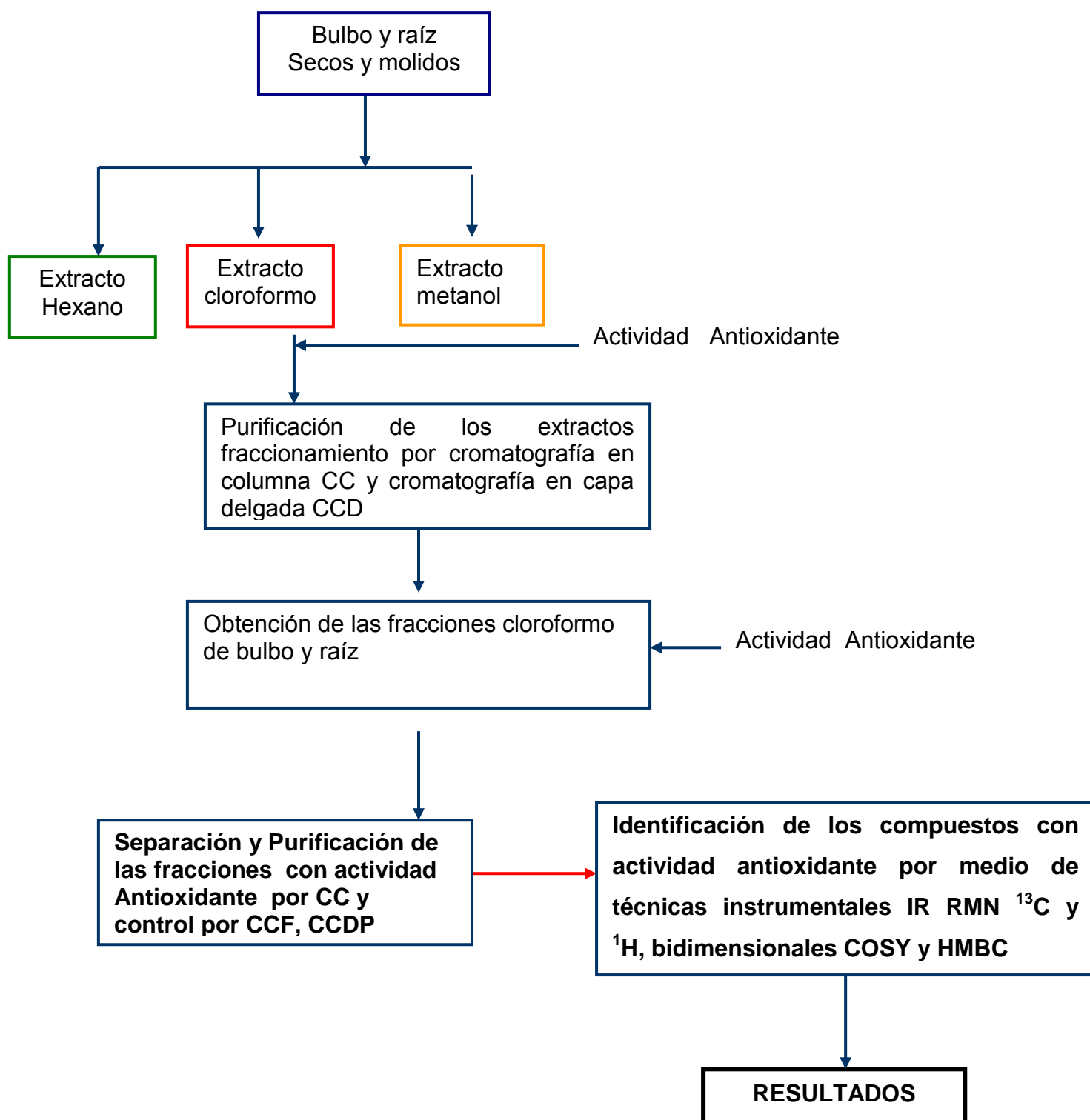


Figura 13. Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de bulbo de la orquídea *P. michuacana*

#### **4.4.2 Obtención del extracto crudo de cloroformo de bulbos de *P. michuacana*.**

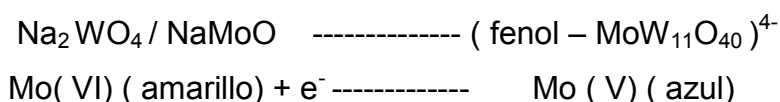
A partir de 3213 g de bulbos, secos y molidos de *P. michuacana*, se sometió a reflujo de la siguiente manera: se emplearon garrafrones (Pyrex) de vidrio de 25 L de capacidad (Figura 14). Se colocó la muestra de bulbo con 21 L de hexano, para desengrasar, cloroformo consecutivamente durante 4 horas. Posteriormente se maceró durante 3 días, con agitación diaria, al cabo de los cuales se retiró el extracto hexanoico por filtración y se dejó secar el residuo de bulbo, reemplazándose por cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) repitiendo el proceso de manera consecutiva, Cada extracto se concentró hasta sequedad por medio de rotavapor procurando temperaturas inferiores a  $40^\circ\text{C}$ , para evitar la descomposición térmica.



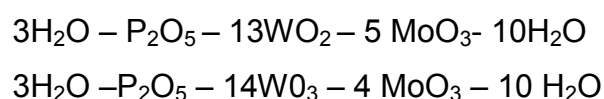
Figura 14 Equipo de reflujo para la obtención del extracto de cloroformo de bulbo de *P. michuacana*

#### **4.4.3 Determinación de fenoles totales** (Singleton y Rossi, 1965), (según modificación realizada al procedimiento descrito por (Dastmalchi, *et al.* 2005).

El método original de Folin – Ciocalteu se desarrolló en 1927, en el cuál la oxidación de los fenoles con los reactivos de molibdotungstanato permite una reacción coloreada a  $\lambda$  max a 745 – 750 nm.



Este método es simple, sensible y preciso. Sin embargo, la reacción es lenta a pH ácido, por lo que se pierde especificidad. Singleton y Rossi (1965) mejoraron el método con un reactivo heteropoliniónico molibdotungstosfosforico. La  $\lambda$  max para el producto es 765 nm.



Procedimiento:

Se obtuvieron los extractos metanólicos a partir de 15 g de bulbos y 8 g de raíz secos y molidos, los cuales se llevaron a extracción a reflujo durante 12 horas con una mezcla de 100 ml de metanol/ agua a una relación de 60:40, 0.3 ml de HCl medio ácido. El contenido total de fenoles fue estimado como equivalentes a ácido gálico.

- Una alícuota de 1 ml de extracto fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 6 ml de agua destilada y luego se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin- Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 1.5 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % y agua hasta completar 10 ml. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 765 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con la absorbancia del estándar de ácido gálico.
- A partir de una solución de 5 mg/ml de ácido gálico, se prepararon los estándares de calibración de 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.25 y 0.5 mg/ml ácido gálico. Se adiciono lo mismo los reactivos como se mostró en el procedimiento anterior.
- Se construyó una curva tipo con los valores de absorbancia y concentración de ácido gálico, después se interpoló el valor de absorbancia de las muestras evaluadas para así determinar la concentración de fenoles totales.

#### **4.4.4 Análisis fitoquímico cualitativo.**

La caracterización fitoquímica se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico

frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración a los extractos crudos de bulbos y raíz de *P. michuacana* que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas (Marcano,1991 ; Lok de Ugaz, 1988).

Los extractos metanólicos de bulbos y raíz de *P. michuacana* (concentrados a sequedad) aproximadamente 2 g de cada extracto crudo fueron diluidos en 20 ml de etanol al 96 % esta solución se dividió en 4 partes para las siguientes pruebas como se puede ver en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis fitoquímico por coloración y precipitación a los extractos de metanol de bulbo y raíz de *P. michuacana*

Técnica	Procedimiento	Coloración Prueba positiva	Identificación
FENOLES (Cloruro férrico)	R= FeCl <sub>3</sub> 1 % H <sub>2</sub> O 1 ml Ms / 2ml H <sub>2</sub> O o MeOH + 1 ml R	Colores intensos Verde a azul oscuro	Fenoles
FLAVONOIDES (Shinoda)	1 ml Ms / limadura Mg + 1 ml HCl	Coloración roja	Nucleo de - benzopirona Excepto chalconas
ALCALOIDES (Dragendorff)	1ml Ms + 1ml R. dragendorff a= nitrato básico de bismuto, ácido tartarico, H <sub>2</sub> O, b= yoduro de potasio, H <sub>2</sub> O.	Precipitado naranja	Alcaloides
Alcaloides (Mayer)	1 ml Ms + 0.5 ml R1, R2, R3 R = cloruro de Mercurio II,yoduro de potasio, H <sub>2</sub> O, HCl 17 %. R2= cloruro de zinc II, HCl 37%. R3 = c: Sol amoniacal al 15 %	marrón	Alcaloides

(Lok de Ugaz, 1988), FeCl<sub>3</sub> = cloruro ferrico, Ms = muestra , MeOH = metanol, Mg= magnesio, R = reactivo, gts = gotas.

✧ Determinación de fenoles.

Cloruro férrico: a los extractos metanolicos disueltos en etanol se evaluó por la formación de colores para identificar compuestos fenólicos en general. Reactivo: 1 gramo de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) / 100 mililitros de agua (1 o 2%). Procedimiento: muestra 1 ml +1 ml de reactivo produce una intensa coloración verde, marrón o azul (Lok de Ugaz, 1988; Marcano y Hasegawa, 1991).

✕ Determinación de Flavonoides.

Reacción de Shinoda: al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavonas, chalconas y auronas no dan coloración. (Lok de Ugaz, 1988; Marcano y Hasegawa, 1991).

✕ Determinación de Alcaloides.

**A.** Reactivo de Dragendorff según Munier:

Solución a: Se disolvieron 1.7 g de nitrato básico de bismuto en 20 g de ácido tartárico en 80 ml de agua.

Solución b: Se disolvieron 16 g de yoduro de potasio en 40 ml de agua.

Se mezclaron los volúmenes iguales de las soluciones a y b, se conservaron en refrigeración.

Detección de: Alcaloides y otros compuestos nitrogenados, coloración precipitado naranja.

**B.** Reactivo de Mayer:

Solución a: Se disolvieron 3.5 g de cloruro de Mercurio (II) y 49.8 g de yoduro de potasio cada uno en 20 ml de agua, se mezclaron y se aforó a 100 ml. A continuación se agrega a la mezcla 15 ml de ácido clorhídrico al 17%.

Solución b: Se disolvieron 5 g de cloruro de zinc (II) en 80 ml de ácido clorhídrico al 37%.

Solución c: Solución amoniacal al 15 %.

Detección: alcaloides, coloración marrón (Lok de Ugaz, 1988).

#### **4.4.5 Determinación de sustancias captadoras de radicales libres**

##### **4.4.5.1 Actividad antioxidante por decoloración de $\beta$ caroteno.**

Los compuestos o las fracciones obtenidas (0.5  $\mu$ L, 1: 10 en metanol) se aplicaron en placas de gel de sílice, posteriormente se rociaron con una mezcla de 1 ml de ácido linoleico y 0.02 g  $\beta$ -caroteno disuelto en 10 ml de cloroformo, después de 30 min se rociaron con una solución al 0.2 % del radical estable difenilpicrihidrazil DPPH el cual produce una coloración violeta. El cromatograma se expuso a la luz hasta que los colores de fondo se convierten en zonas decoloradas la coloración amarilla indica una prueba positiva de actividad antioxidante (Burits y Burcar 2000; Cuendet *et al.*, 1997).

##### **4.4.5.2 Actividad de barrido de los radicales libres DPPH.**

Se empleó el método según Brand-Williams *et al.*, 1995 con algunas modificaciones. Se midió la capacidad de los extractos, fracciones y compuestos puros para atrapar el radical 1, 1 difenil -2- picrilhidracril ( DPPH) (Prior *et al.*, 2005).

Para el ensayo se usaron 0.1 ml de varias concentraciones de los extractos metabólicos (31, 100, 310, 1000  $\mu$ g/ml) y 0.1 ml de varias concentraciones de los compuestos puros (200, 100, 50, 10  $\mu$ g/ml) disueltas en dimetilsulfoxido (DMSO) y se adicionaron 3.9 ml de la solución DPPH en metanol 0.1 mM. Se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos de reacción. Se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 517nm, a los 0, 1 y 15 min, hasta que la reacción alcanzó su estado estacionario. Se utilizó como blanco DMSO.

Para el control positivo de DPPH (1ml solución DPPH 0.1 mM + 1 ml de metanol).

Para cada extracto se calculó el porcentaje de inhibición del radical y a los más promisorios se les determinó la concentración inhibitoria del 50% (EC<sub>50</sub>). Las pruebas y análisis se realizaron por triplicado y se calcularon los valores medios, como estándar de comparación se utilizó ácido ascórbico.

La capacidad de atrapar radicales se expresó como los  $\mu$ g/ml de sustancia antioxidante necesarios para disminuir la concentración inicial del radical DPPH' en un 50% (EC<sub>50</sub>) (García *et al* 2007). El porcentaje de inhibición del DPPH' se calculó mediante la ecuación siguiente: (Pérez, 2003).

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia ( control )} - \text{absorbancia ( muestra)}}{\text{absorbancia ( control )}} \times 100$$

Para determinar ( $EC_{50}$ ), se construyó una curva tipo con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de las muestras evaluadas y se interpola el valor 50 % de inhibición donde se determinó la concentración.

#### **4.4.6 Aislamiento y purificación de los compuestos con actividad antioxidante**

- El aislamiento y purificación del extracto de cloroformo se realizó por las siguientes técnicas:

CCF cromatografía en capa fina sílica gel 60 HF<sub>254</sub>, CC cromatografía de columna gel de sílice 60 HF<sub>254</sub> (0.063– 0.200) (230 – 400) marca Merck, CCFP cromatografía en capa fina preparativa cromatoplasmas de sílica gel 60 HF<sub>254</sub> de 1 mm de espesor y Cromatografía en Sephadex LH20. Las cuales se explicara cada una como sigue:

##### **4.4.6.1 Selección de sorbente y disolvente.**

En primer lugar, se deben tener en cuenta algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos que constituyen la mezcla, ya que éstos, el sorbente y el eluyente, actúan recíprocamente. Las propiedades de la muestra que conviene determinar, si se dispone de cantidad suficiente, son: su solubilidad, el carácter ácido, básico, neutro, anfótero o iónico, y la capacidad de reaccionar con el sorbente o con el eluyente.

Para la separación de mezclas hidrofílicas se obtienen buenos resultados en celulosa, gel de sílice, intercambiadores de iones y disolvente polares.

Para seleccionar la fase móvil utilizada en las técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC) para el fraccionamiento del extracto de cloroformo de *P. michuacana*. Se realizó por el método rutinario de prueba y

error observando las series eluotrópicas de los disolventes, se ensayó con varios disolventes comenzando por los menos polares (cloroformo, éter etílico, éter de petróleo, hexano) a los más polares (acetato de etilo, acetona, metanol) y luego se realizó mezclas con los anteriores disolventes mencionados como se indica en el Anexo 3.

Cuando se desarrollo la cromatografía en capa fina (CCF) del compuesto o mezcla presentó varios valores de Rf, cuando es demasiado bajo el Rf en la placa fue necesario aumentar gradualmente la polaridad del disolvente empleado, consultando la serie eluotrópica (Cuadro 1); por el contrario, si se obtiene un valor de Rf demasiado alto, se disminuyó gradualmente la polaridad del disolvente. Se consideran adecuados los valores de Rf comprendidos entre 0.20 y 0.80.

#### **4.4.6.2 Cromatografía en capa fina (CCF)**

- Al extracto crudo de cloroformo se le realizó un estudio de CCF de la siguiente forma:
- Se disolvió una pequeña cantidad de muestra en 0.5 ml de disolvente y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa a cierta distancia del borde, cada una de ellas en una placa de CCF (fase estacionaria) se dejaron secar al aire libre.
- Se preparo la cámara donde esta la mezcla de los disolventes necesarios para la separación (fase móvil) es decir se agregó una cantidad de 1 ml, se dejó 5 minutos para saturar la cámara.
- Se colocó la placa CCF en la cámara que no sobrepase a la muestra aplicada, se cerró el recipiente y se dejó que el líquido ascienda por capilaridad.
- Se saco la placa de CCF de la cámara de cromatografía cuando el eluyente llegó a un cm de la parte superior de la placa (frente del solvente).
- Se dejó secar la placa CCF desarrollada al aire libre
- Se reveló en una cámara de yodo
- Se observó en la lámpara UV
- Se leyó la presencia de las manchas y se midió las distancias de las manchas y la distancia recorrida por el disolvente a esta relación se le denomina Rf como se puede ver en la Figura 15.



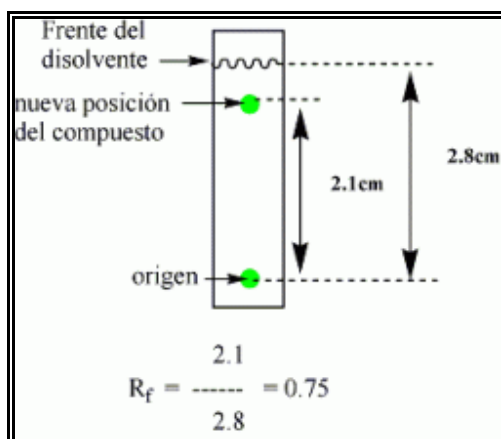


Figura 15. Esquema de cómo determinar los  $R_f$  de las manchas en CCF

#### 4.4.6.3 Cromatografía de columna

- Ya que se encontró la mejor mezcla de disolventes para la separación de los compuestos se sigue con la cromatografía de columna CC con la fase estacionaria de gel de sílice 60 HF254 (0.063– 0.200) ( 230 – 400 ), ver de la siguiente forma en la Figura 16.
- Dependiendo de la cantidad de muestra a separar se mide una columna de plástico polivinílico resistente a los disolventes, luego en un extremo se coloca algodón y se cierra con grapas.
- Posteriormente se colocó un tubo PVC en el otro extremo, se sella con cinta.
- Se coloca en un soporte, se agrega la sílica gel para columna a la altura de acuerdo a la muestra que se vaya a cromatografiar, luego se empaca hasta que quede compacta.
- Se agrega la muestra previamente mezclada con sílica gel para columna y seca
- Luego se agrega la mezcla de disolventes y se deja correr la fase móvil.
- Posteriormente se van recolectando las fracciones en vasos de 100 ml para las primeras columnas y las de la purificación en vasos de 50 ml.
- A las fracciones obtenidas se les realizó cromatografía en capa fina CCF con el mismo disolvente que se corrió la CC.
- En seguida de obtener las fracciones se recupera la sílica gel de la siguiente forma se lava con agua destilada, luego se llevo a la mufla a 900 °C por 3 horas y así se puede volver a utilizar.



Figura 16 Esquema de la cromatografía de columna CC

#### 4.4.6.4 Sephadex LH20 -100

- Así mismo se utilizó la columna de Sephadex LH20-100 (Figura 17) con un poro de 25 a 100  $\mu$  para la purificación de los compuestos por la diferencia de los pesos moleculares, ya que las más grandes migran primero con el disolvente, se utilizó cloroformo y luego se aumentó la polaridad con metanol.



Figura 17 Columna de purificación Sephadex LH 20

#### **4.4.6.5 Cromatografía preparativa en capa fina**

- Es una técnica que complementa el sistema de purificación de los compuestos y se caracteriza porque el espesor de estas cromatoplasas es de 1mm, por lo que se puede colocar una cantidad considerable de muestra.
- El procedimiento para obtenerlas es el siguiente:
- Se realiza la mezcla de sílica gel HF<sub>254</sub> para placas con agua hasta obtener una mezcla suave.
- Se colocó en orden los vidrios 20 x 20 cm y luego se agregó la sílica gel en el aplicador y luego se corrió hasta cubrir las placas.
- Se dejó secar las placas al aire libre por un día, luego se llevan a la estufa activar por 120 °C por 2 horas.
- A las placas activadas se aplicó la muestra, luego se introdujo la placa en una cámara con el disolvente adecuado. Dicha cámara debe presentar una atmósfera saturada en el vapor del disolvente por lo que se pone trozo de papel de filtro en la parte posterior y disponer de un sistema de cierre, se dejó que el líquido ascienda por capilaridad.
- Luego que ya haya desplazado el eluyente se reveló la placa. Se marcan las bandas en la placa de cromatografía preparativa y luego se raspan. Cada una de las fracciones se extrae con metanol (Figura 18).

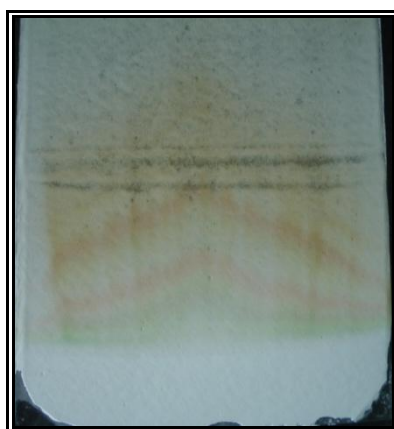


Figura 18 Cromatografía preparativa en capa fina CCFP

#### **4.4.7 Identificación o elucidación estructural de los compuestos con actividad antioxidante.**

A las sustancias aisladas se les determinó lo siguiente:

- a) Se estableció la pureza de los compuestos aislados por CCF, desarrollada está en diversos sistemas de eluyentes (Figura 19, Anexo 3)
- b) Las características de los espectros de IR, RMN-  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de cada sustancia.
- c) Los puntos de fusión fueron tomados utilizando el método de Fisher – Yohns.

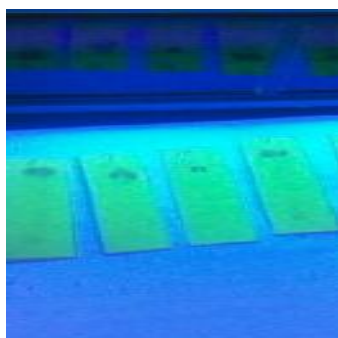


Figura 19. Compuestos aislados desarrollados en CCF del extracto de cloroformo de bulbo de *P. michuacana* y revelados por UV.

##### **4.4.7.1 Método de la espectroscopia infrarroja (IR)**

- Los espectros de infrarrojo (IR) fueron tomados en película de Bromuro de potasio en un equipo Nicolet- Nexus 470 ft-IR. En el Anexo 4 se presenta el esquema del equipo de IR.
- Los análisis a ser realizados en el laboratorio de Instrumental mediante Espectrometría Infrarroja son de tipo cualitativo. Para hacer este tipo de análisis es necesario obtener el espectro más adecuado de la muestra. Para ello deben ajustarse las variables instrumentales como velocidad, ganancia y posición del peine, así como otras relacionadas con la preparación de la muestra. A continuación se presentan las indicaciones de cómo se prepararon las muestras para la obtención del espectro.
- Lo primero que se aconseja es limpiar todo el material a utilizar con acetona.
- La muestra sólida se mezcló con KBr puro y seco en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Las proporciones de muestra a KBr pueden variar y ello constituye uno de los pasos para optimizar en el

procedimiento. Se sugiere comenzar en valores intermedios como una relación en peso de 1: 100 muestra/ KBr.

- Una pequeña porción del polvo obtenido, se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas empleando para ello una prensa. La pastilla, que debe ser homogénea y finísima, se colocó en una placa para muestras. Es importante evitar la contaminación de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla.
- Una vez que la muestra sólida se ha preparado y colocado apropiadamente en la portamuestra se inserto en el espectrómetro.
- El espectro de cada muestra se corre bajo diferentes condiciones hasta la obtención del mejor espectro el cual debe presentar en lo posible bandas finas e intensas.

#### **4.4.7.2 Método de Resonancia Magnética Nuclear RMN- $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$**

- Los espectros de de protón y carbono 13 (RMN-  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  300 y 100 MHz) fueron hechos en un equipo VARIANT Mercury DPX-300 MHz. Los disolventes empleados fueron cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), como referencia interna se uso tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se reportan en escala delta ( $\delta$ ) en unidades partes por millón (ppm) en el Anexo 5 se indica el esquema del equipo de RMN.
- Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente en un tubo de vidrio largo (especifico para RMN) que se coloca dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical.
- En los equipos modernos el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente.
- Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencias necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten

una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín.

- La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT- RMN).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de los extractos crudos, porcentaje de rendimiento y actividad antioxidante.

Los extractos de hexano, cloroformo, metanol y agua de bulbo, raíz y hojas presentaron una consistencia semisólida, color café claro y olor característico, los extractos de bulbo (color marrón, rojo oscuro), raíz (color verde negruzco). En el Cuadro 5, se puede observar el porcentaje obtenido de estos extractos. A cada uno se les realizó la prueba de actividad antioxidante por decoloración  $\beta$ -caroteno, los cuales presentaron coloración amarilla indicando prueba positiva los extractos de cloroformo y metanol de bulbos y raíz de *Prosthechea michuacana*. Los extractos de hexano y agua de bulbo, raíz y hojas no presentaron actividad antioxidante (Figura 22).

Cuadro 5. Porcentaje de rendimiento de los extractos de cloroformo, metanol y agua de bulbo, raíz y hojas de *P. michuacana*.

Material vegetal / 100 g	Extracto	% rendimiento
Bulbos	CHCl <sub>3</sub>	5.11
	MeOH	6.1
	H <sub>2</sub> O	4.5
Raíz	CHCl <sub>3</sub>	5.5
	MeOH	3.21
	H <sub>2</sub> O	9.5
Hojas	Hex	15.6
	CHCl <sub>3</sub>	5.6
	MeOH	6
	H <sub>2</sub> O	7.71

El proceso de extracción consiste en un fraccionamiento inicial basándose en la diferencia de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. La extracción se realizó a partir de la muestra sólida, se observó coloración del disolvente y formación de dos fases, una sólida y una líquida.







PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DECOLORACIÓN B- CAROTENO.		
Bulbo cloroformo	bulbo metanol	Resultado
		++
Raíz cloroformo	Raíz metanol	
		++
Hojas cloroformo	Hojas metanol	
		--

Figura 20. Identificación de Actividad antioxidante de los extractos de Hex,  $\text{CHCl}_3$ , MeOH de raíz, bulbo y hojas de *P. michuacana*.



### 5.1.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos de cloroformo de bulbos de *P. michuacana*

De acuerdo a los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por decoloración del  $\beta$ -caroteno, se tomó la decisión de obtener el extracto de cloroformo de bulbos respectivamente para continuar el procedimiento de aislamiento y purificación.

El porcentaje de rendimiento del extracto de cloroformo de bulbo, se encuentra entre el porcentaje de rendimiento de 8.6 % - 12.1 % p/p, en el cuál es un porcentaje representativo para seguir el fraccionamiento.

### 5.2 Determinación de actividad antioxidante por el ensayo DPPH

El método del DPPH se considera un modelo de radical lipofílico. La autooxidación inicia una reacción en cadena en el radical lipofílico 2,2 difenilpicrihidrazil, es decir la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH.

El DPPH es un radical estable, oxidante y comercialmente disponible que extrae un electrón del antioxidante, es decir como es estable el radical puede atrapar los radicales causando un cambio de color, la degradación del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante. El punto final de la reacción se alcanza cuando el cambio de color se detiene. El cambio de absorbancia se traza contra la concentración del antioxidante para dar una curva lineal y la concentración que causa la reducción del DPPH al 50 % de inhibición es definida como  $EC_{50}$ .

El radical tiene un color violeta, debido a los electrones libres del nitrógeno y de después de la reacción con el átomo de hidrogeno del compuesto 1 presenta un cambio de color a amarillo. El cambio de color puede ser seguido por espectrofotometría a 517nm y de esta manera el potencial antioxidante de una sustancia o un extracto de planta puede ser determinado.

Los efectos de barrido de los extractos en el radical DPPH se muestran en el Cuadro 6. Los extractos mostraron efecto de barrido con un valor de EC<sub>50</sub> entre 555.89 µg/ml a 174.686 ± 3.72. Los extractos de cloroformo de raíz y bulbo son los que presentan mayor actividad antioxidante que los extractos metanólicos de bulbos y raíz, los resultados fueron comparados con el EC<sub>50</sub> del ácido ascórbico de 122.25 µg/ml experimental y el EC<sub>50</sub> del ácido ascórbico de 132 µg/ml (Avijett J *et al.*, 2008).

Se compararon los resultados con los reportados por Yizhong Cai *et al.*, (2004), donde determinó la capacidad antioxidante equivalente trolox TEAC expresada como micromoles de trolox equivalente a 100 g de peso seco en el extracto metanólico de raíz de la orquídea de china *Dendrobium nobile* con un valor de 490.2 µmol / 100 g de peso seco, se puede decir que los extractos de cloroformo de bulbo y raíz presentaron mayor actividad antioxidante.

Por lo anterior se siguió el fraccionamiento del extracto de cloroformo obtenido de los bulbos de la orquídea *P. michuacana*.

Cuadro 6. Efecto de la actividad antioxidante en DPPH <sup>a</sup> de los extractos metanolicos de bulbo y raíz de *P. michuacana*

Extracto ( Muestra ) <sup>b</sup>	DPPH (EC <sub>50</sub> ) µg/ml <sup>c</sup>
Metanol Bulbo	437.25± 13.22
CHCl <sub>3</sub> Bulbo	<b>310.96 ± 4.17</b>
Metanol Raíz	555.89 ± 11.62
CHCl <sub>3</sub> Raíz	<b>174.69 ± 3.72</b>
Acido ascórbico	122.25 ± 5.40

<sup>a</sup>n = los valores fueron medidos por triplicado, <sup>b</sup> B.S = base Seca, <sup>c</sup> valores EC<sub>50</sub> µg/ml, se muestra la media y la desviación estándar

### 5. 3 Compuestos fenólicos totales

Se realizó la curva tipo a partir de soluciones de diferente concentración de ácido gálico, para la determinación de los compuestos fenólicos totales (Figura 21).

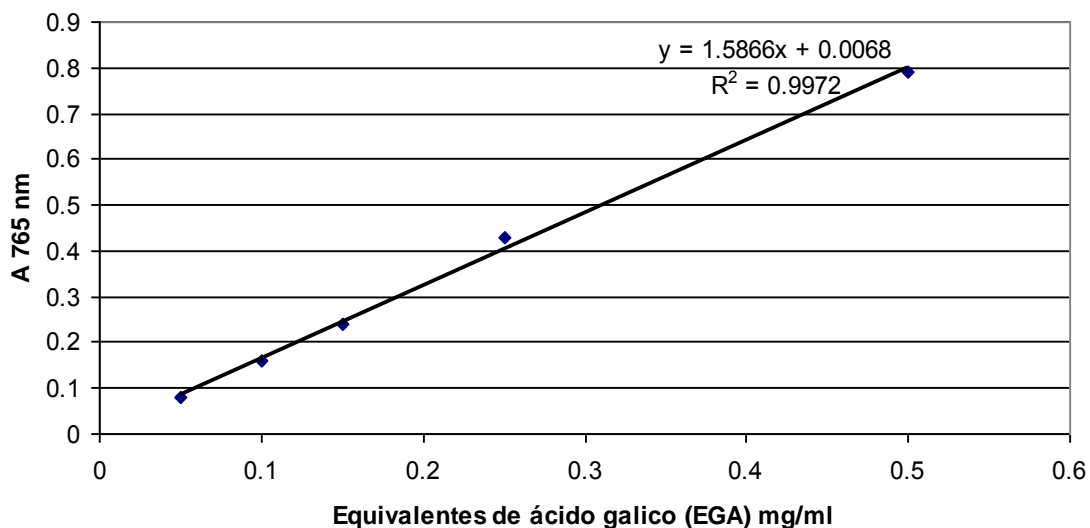


Figura 21. Curva tipo para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) equivalentes de ácido gálico (EGA) mg/ ml.

Se utilizó la curva tipo en la cual se encontró que los extractos metanólicos de raíz y bulbo de la orquídea *P. michuacana* presentan un contenido total de fenoles de 1.27 g EGA /100 g B.S y 0.55 g EGA /100 g B.S respectivamente, La mayor cantidad de compuestos fenólicos se encuentra en el extracto metanólico de raíz comparado con el valor obtenido del extracto de metanol de bulbo como indica en el Cuadro 7.

Se determinó el contenido total de fenoles a partir de las muestras frescas de bulbo y raíz de *P. michuacana*, la raíz presentó un valor de 0.25 g EGA /100 g B.H y para bulbo de 0.10 g EGA /100 g B.H (Cuadro 8) como se puede observar el contenido total de fenoles en las muestras secas es mayor comparado a las muestras frescas.

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos de cloroformo de bulbo y raíz en base seca se encuentran en relación del 50 % comparados con los resultados reportados por Yizhong Cai *et al.*, (2004), donde encontraron compuestos fenólicos (fenantroquinonas) en la raíz de la orquídea de china *Dendrobium nobile* esta es la más estudiada a nivel mundial con un valor de 2.22 g EGA / 100 g en base seca

Cuadro 7. Compuestos fenólicos totales en los extractos metanólicos de bulbo y raíz de *P. michuacana*

Extracto MeOH <sup>a</sup>	Concentración ( g EGA /100 g BH <sup>b</sup>	Concentración ( g EGA /100 g B.S <sup>c</sup>
Bulbo	0.10 ± 0.03	0.55 ± 0.009
Raíz	0.25 ± 0.07	1.27 ± 0.02

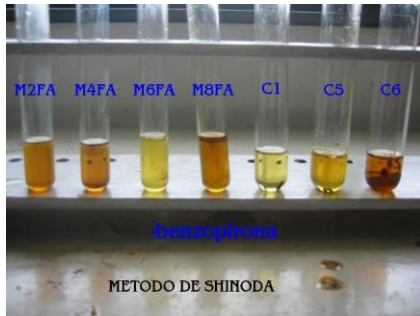
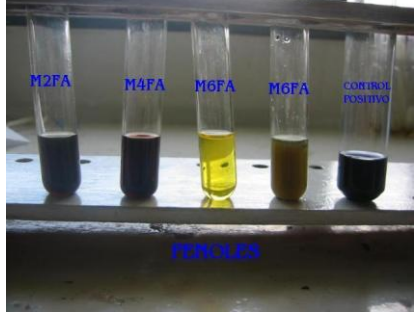

<sup>a</sup>n =3, valores en g EAG ( equivalentes de ácido gálico); se muestra la media y la desviación estándar, <sup>b</sup> B.H = base húmeda, <sup>c</sup> B.S = base seca.

#### 5.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo.

El análisis orgánico funcional cualitativo se muestra en el Cuadro 7, los extractos de metanol de bulbos y raíz nos indica la presencia de fenoles por coloración azul verdosa comparado con el control positivo de fenol por coloración azul oscuro y la presencia de flavonoides por coloración roja, comparado con el control positivo quercetina de coloración roja.

Los extractos de metanol de bulbos y raíz presentaron prueba negativa para la detección de alcaloides en la prueba de Drangendorff no se obtuvo precipitado naranja comparado con el control positivo del alcaloide colchicina. En la prueba de Mayer no presentó coloración marrón.

Cuadro 8. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de metanol de bulbo (PmBMe) y raíz (PmRMe) de *P.michuacana*

METABOLITOS	PATRON	RESULTADO	PmbMe <sup>b</sup> B.S	PmrMe <sup>b</sup> B.S
Flavonoides	Quercetina		++	+
Fenoles	Fenol		+	++
Alcaloides Dragendorff	Colchicina		-	-

Los símbolos - y ++ se refieren a la intensidad de los resultados obtenidos, - es negativo y ++ es positivo, <sup>b</sup> B.S = base seca.

### 5.5 Fraccionamiento del extracto de cloroformo de bulbos de *P. michuacana*.

Al extracto cloroformo de bulbos de *P. michuacana* (PmBCI) se le realizó un estudio por cromatografía en capa fina CCF con varios sistemas de eluyentes, resultando el mejor perfil de separación CHCl<sub>3</sub> : MeOH 8:2, con este sistema se

hizo un fraccionamiento inicial al PmBCI y se desarrolló en una columna empacada de gel de sílice (Figura 22), se recolectaron 25 fracciones de 100 ml cada una, a las cuales se les realizó un estudio por CCF, utilizando el mismo eluyente de la CC, dependiendo de los R<sub>f</sub> de las manchas de las 25 fracciones se reunieron en 10 fracciones denominadas PmBCI-1 a 10, las fracciones que presentaron actividad antioxidante por decoloración del reactivo β-caroteno fueron PmBCI- 2 a la 9 como se muestra en la Figura 25.

Por la intensidad en el resultado de la actividad antioxidante y la cantidad obtenida se siguió purificando la fracciones **PmBCI – 2** y **PmBCI – 9** (Figura 23).



Figura 22. Fraccionamiento por cromatografía en columna CC y CCF del extracto cloroformo de bulbos de *P. michuacana*

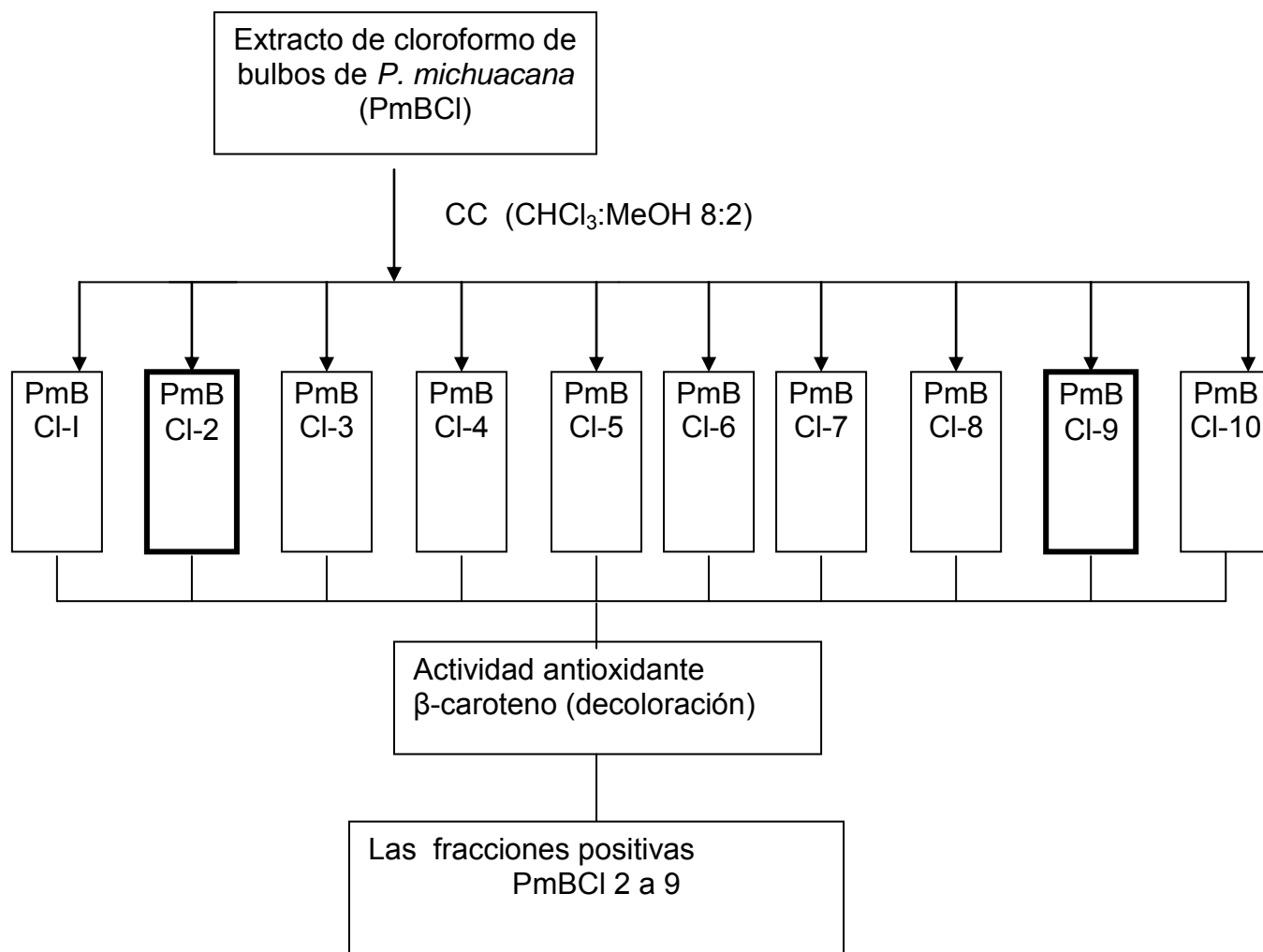


Figura 23. Fraccionamiento del extracto de cloroformo de bulbo de *P. michuacana*

### 5.6 Purificación de la fracción PmBCI -2 del extracto cloroformo de bulbo de *P. michuacana*

La fracción de bulbo de cloroformo **PmBCI -2** (Figura 24) se sometió a cromatografía en columna (CC) en gel de sílice mediante el sistema de elución ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH: AcOEt 8:2:1), obteniéndose 6 fracciones de 20 ml cada una de las cuales luego del estudio por CCF usando el mismo eluyente de la CC, dependiendo de los  $R_f$  de las manchas se obtuvieron las 6 fracciones denominadas PmBCI -2 1 a 6. A cada una se les realizó la pruebas de actividad antioxidante por decoloración del reactivo  $\beta$ -caroteno, de las cuales la fracción más activa fue **PmBCI -2 -4**.

Se siguió purificando la fracción de color rojo PmBCI -2 -4 se le realizó un estudio por cromatografía en capa fina (CCF) con varios sistemas de eluyentes, resultando el sistema con el mejor perfil de separación acetona: CHCl<sub>3</sub> 2:1 que se utilizó para purificar la fracción PmBCI -2 -4 por medio de cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) produciendo 6 fracciones denominadas PmRCI -2 -4-1 a 6.

A cada una se les realizó la prueba de actividad antioxidante por decoloración del reactivo β-caroteno, de la cual se obtuvo la fracción activa PmRCI-2 -4 -1. Finalmente la fracción **PmRCI-2 -4 -1** se purificó en una columna de Sephadex LH- 20 eluyendo con cloroformo CHCl<sub>3</sub> incrementando la polaridad con metanol. Se obtuvieron 4 fracciones denominadas **PmRCI-2 -4 -1 – 1 a 4**, de la cual la fracción **PmRCI-2 -4 -1 – 2** presentó efecto antioxidante, la pureza se determinó en CCF con varios sistemas de eluyentes, de esta forma se obtuvo 30 mg del compuesto **1** (Figura 24).



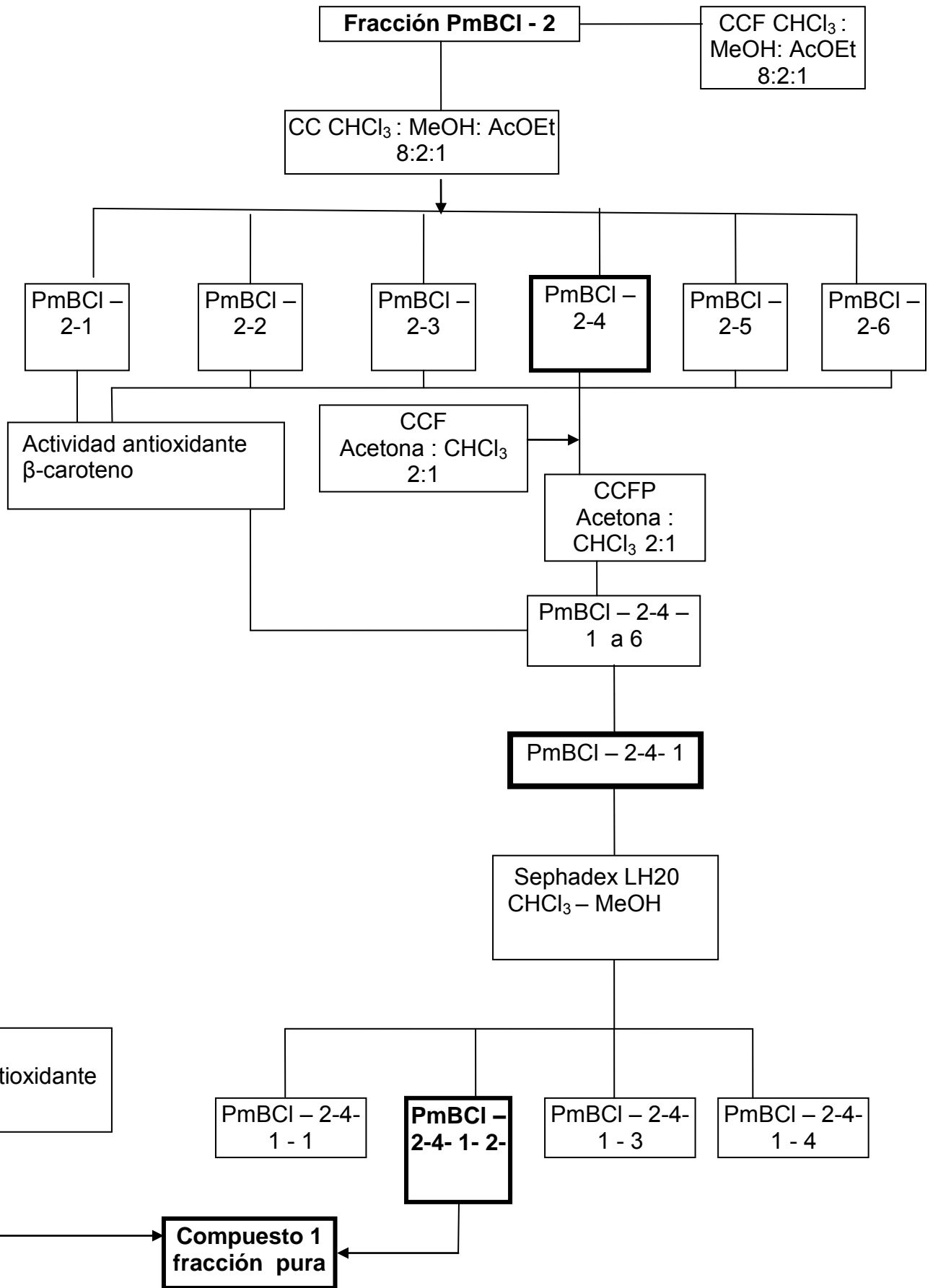


Figura 24. Purificación de la fracción PmBCI - 2 y Aislamiento del compuesto 1 del extracto cloroformo de bulbos de *P. michuacana*

### 5. 7 Elucidación estructural del Compuesto 1 (PmBCI – 2-4-1-2)

Del extracto de cloroformo de bulbos, fracción purificada (PmBCI- 2-4-1-2) de la *P. michuacana* fue aislado e identificado el **Compuesto 1**

El **compuesto 1** presentó características de aceite rojo, HREIMS  $([M+H])^+$  274.316 calculado para 274.121, deduciendo la fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_4$ .

Los resultados del espectro de infrarrojo IR  $\nu_{max}$  se pueden observar en el espectro IR (Figura 25), las bandas en 1435, 1597 que son características de anillos aromáticos, además de la banda ancha a  $3404\text{ cm}^{-1}$ ; característica de la tensión O-H típica de grupo hidroxilo fenólico.

En el espectro de RMN  $^1H$  (300MHz,  $CDCl_3$ ) (Figura 26a) se muestran las señales:  $\delta$  6.82 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-3'), 6.70 (1H, dd,  $J=8.0, 1.8$  Hz, H-2'), 6.61 (1H,d,  $J=1.8$  Hz, H-6'), 6.41 (1H, dd,  $J=1.7, 1.7$  Hz, H-4''), 6.29 (1H, m, H-2'), 6.27 (1H, m, H-6'), 3.88 (3H, s, O-Me-5''), 3.79 (3H, s, O-Me-3'), 2.84 (2H, m,H-1), 2.83 (2H, m, H-2).

La ampliación de la multiplicidad de las señales del espectro de RMN  $^1H$  para el compuesto **1** (Figura 26b) indica la presencia de dos señales de grupos de metoxilo a  $\delta$  3.88 (3H, s, O-Me-5'') y  $\delta$  3.79 (3H, s, O-Me-5'), una señal para cuatro protones alifáticos equivalentes a  $\delta$  2.84 (2H, m,H-1), 2.83 (2H, m, H-2) característicos de los protones metileno que unen a los anillos bibencil.

Los 6 protones aromáticos aparecen a  $\delta$  6.82 (1H, doblete,  $J=7.5$  Hz, H-3'), 6.70 (1H, dd,  $J=8.0, 1.8$  Hz, H-2'), 6.61 (1H,d,  $J=1.8$  Hz, H-6'), 6.41 (1H, dd,  $J=1.7, 1.7$  Hz, H-4'), 6.29 (1H, m, H-2'), 6.27 (1H, m, H-6').

El espectro también presenta en uno de los 2 anillos una sustitución simétrica en los carbonos C-3' y C- 5 con respecto al enlace bencílico observada por el singulete para tres protones y una señal en  $\delta$ : 5.6 (2H, s), que corresponde a los hidrógenos de dos grupos hidroxilo.

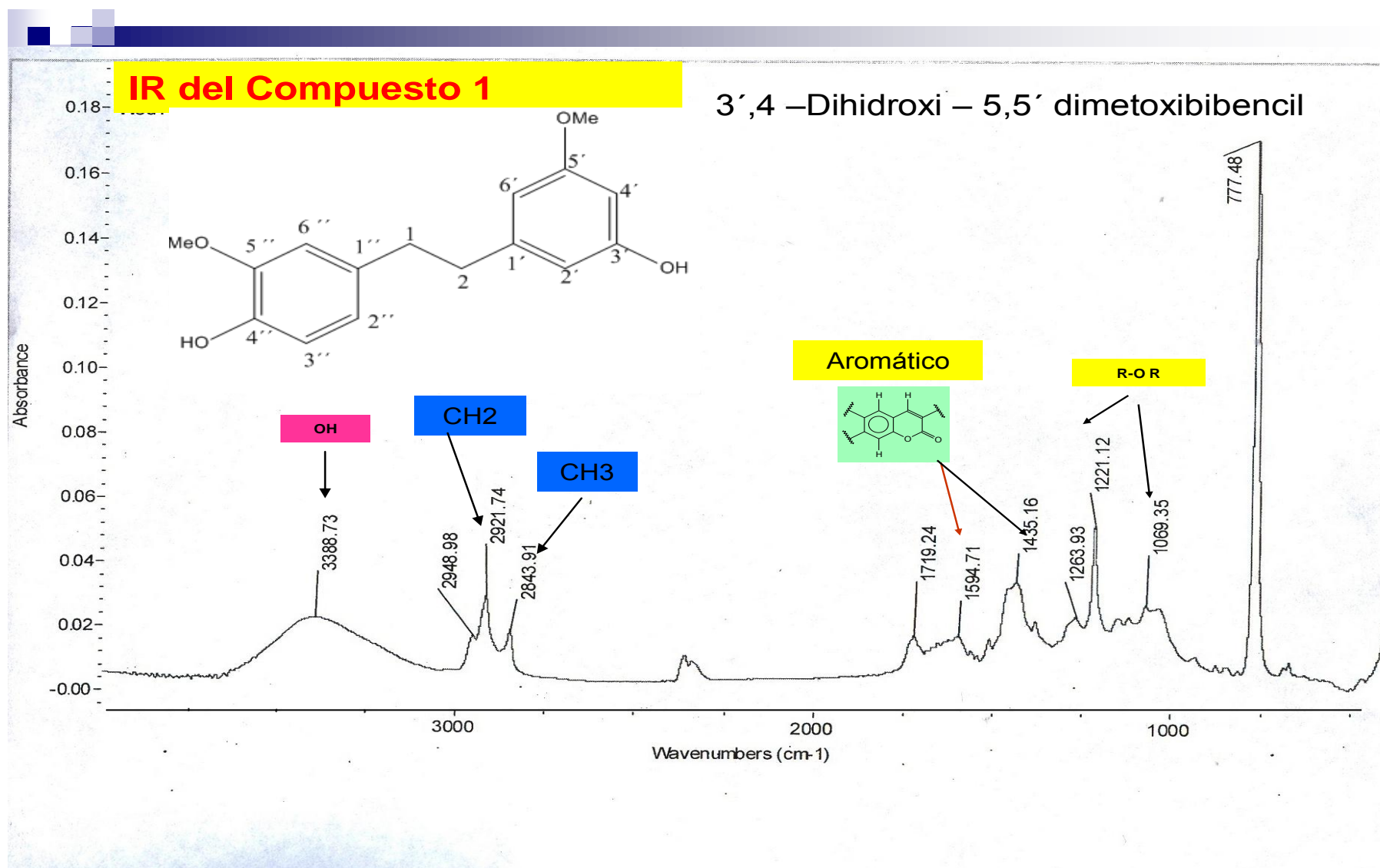


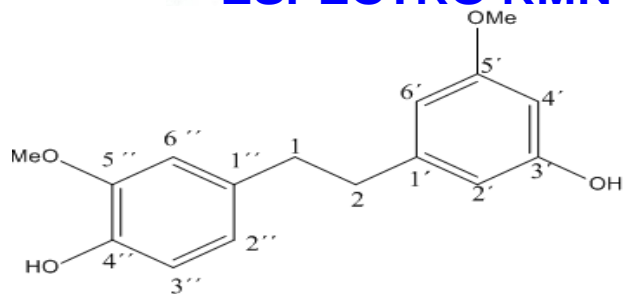
Figura 25. Espectro IR del compuesto 1 (gigantol) obtenido de *P. michuacana*



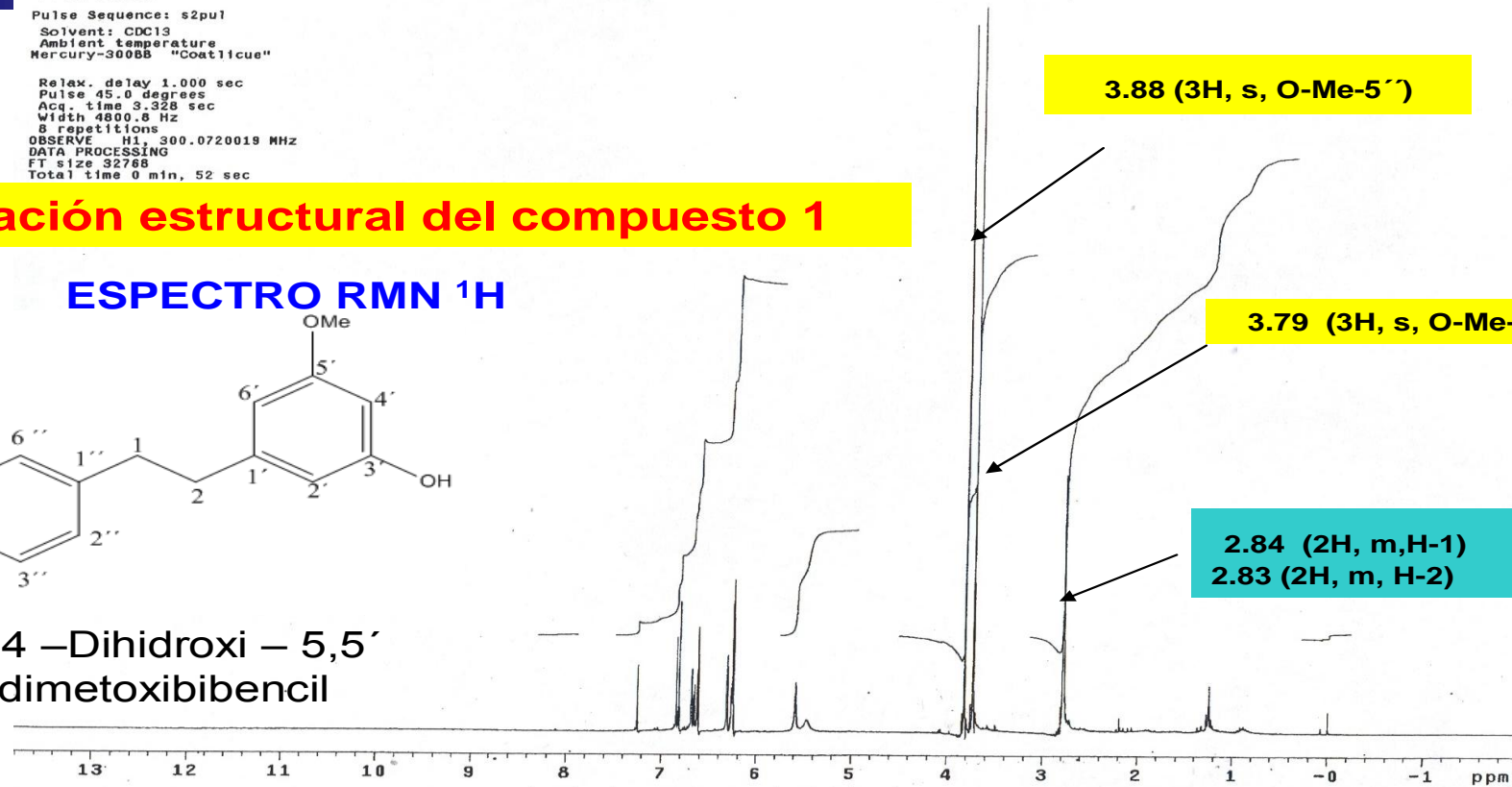
Archive directory: /export/home/vnmr3/vnmrsys/data  
 Sample directory:  
 File: PROTON  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: CDCl3  
 Ambient temperature  
 Mercury-300BB "Coatlilcue"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 3.328 sec  
 Width 4800.8 Hz  
 8 repetitions  
 OBSERVE H1, 300.0720019 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 0 min, 52 sec

**Elucidación estructural del compuesto 1**

**ESPECTRO RMN <sup>1</sup>H**



3',4 -Dihidroxi - 5,5'  
 dimetoxibibencil



3.88 (3H, s, O-Me-5')

3.79 (3H, s, O-Me-5'),

2.84 (2H, m, H-1)  
 2.83 (2H, m, H-2)

← Campo bajo Campo alto →

Baja densidad electrónica

Alta densidad electrónica

**Desprotección**

**Protección**

Figura 26a. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1 (gigantol) obtenido de *P. michuacana* en CDCl<sub>3</sub>

**Elucidación estructural del compuesto 1**



3',4 -Dihidroxi - 5,5' dimetoxibibencil

**ESPECTRO RMN  $^1H$**

2	2053.872	6.845	83.0
3	2045.960	6.818	120.1
4	2006.987	6.688	48.0
5	2005.228	6.682	56.4
6	1999.075	6.662	31.3
7	1997.023	6.655	43.4
8	1994.386	6.646	8.6
9	1987.939	6.625	92.4
10	1985.888	6.618	74.0
11	1895.634	6.317	42.4
12	1893.876	6.311	68.5
13	1892.117	6.306	59.5
14	1880.689	6.267	29.0
15	1878.638	6.261	111.5
16	1876.294	6.253	141.3
17	1676.152	5.586	44.7
18	1640.402	5.467	10.8

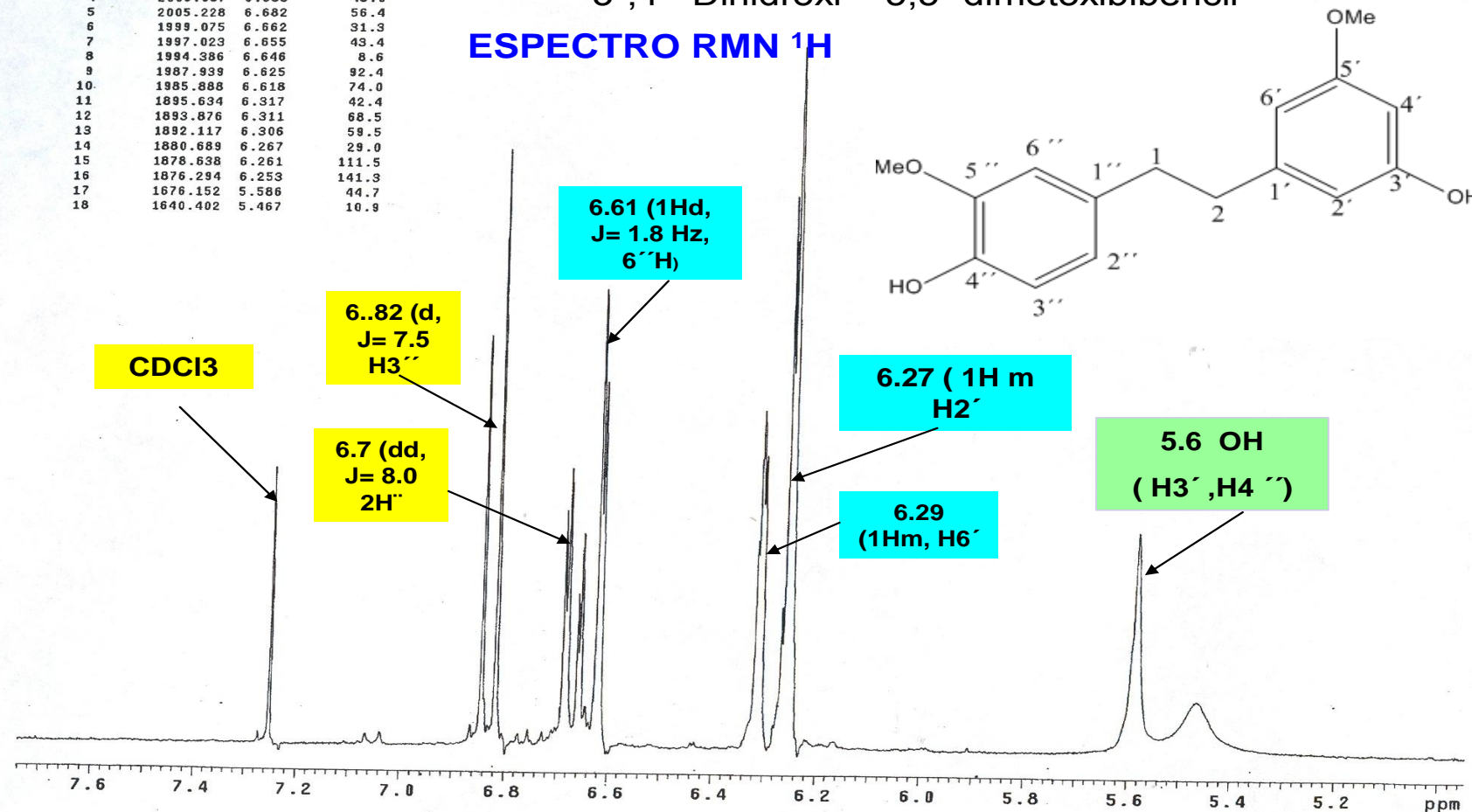


Figura 26b Ampliación del espectro RMN  $^1H$  del compuesto 1 (gigantol) obtenido de *P. michuacana* en  $CDCl_3$

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 27a) se indica la presencia de 12 señales correspondientes a los carbonos aromáticos  $\delta$  161.7 (C-5'), 154.4 (C-3'), 149.1 (C-5''), 141.9 (C-1'), 144.3 (C-4''), 135.5 (C-1''), 121.4 (C-2''), 115.6 (C-3''), 112.2 (C-6''), 108.7 (C-6'), 107.6 (C-4'), 97.8 (C-2'), las señales a 36.4 para el carbono (C-1) y 39.1 (C-2) carbonos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) y las señales a 55.9 (C-5') y 56.7 (5'') correspondientes a los carbonos metoxilos sustituyentes en la estructura.

El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 27b) puso de manifiesto un total de 16 carbonos. El análisis de los espectros  $^{13}\text{C}$  y experimento DEPT reveló que posee dos metilos ( $\text{CH}_3$ ), dos metilenos ( $\text{CH}_2$ ), seis metinos ( $\text{CH}$ ), seis carbonos cuaternarios (C) de lo anterior se deduce la fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$  para el compuesto 1.

La asignación de todos los carbonos y la colocación del grupo metoxilo dentro de la molécula fueron determinados por los experimentos 2D (COSY, HMBC).

El espectro COSY (Figura 27c) muestra la relación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  en un plano bidimensional donde se relaciona los protones de la molécula. Estos experimentos son necesarios para observar multiplicidad y la posición de los protones en la molécula.

El experimento HMBC (Figura 27d) muestra la relación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en función de las señales en un plano bidimensional donde se relaciona los protones de la molécula y los carbonos, estos experimentos son necesarios para identificar posición de los carbonos con los protones en dicha molécula.

## Elucidación estructural del compuesto 1

13C OBSERVE  
 Pulse Sequence: s2pu1  
 Solvent: CDCl3  
 Ambient temperature  
 Mercury-300BB "Coatlilcue"  
 Relax. delay 1.617 sec  
 Pulse 30.0 degrees  
 Acq. time 0.883 sec  
 Width 18181.8 Hz  
 2803 repetitions  
 OBSERVE C13, 75.4531465 MHz  
 DECOUPLE H1, 300.0734551 MHz  
 Power 39 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.1 Hz  
 FT size 32768  
 Total time 27 hr, 13 min, 46 sec

### ESPECTRO RMN <sup>13</sup>C

### 3',4 -Dihidroxi - 5,5' dimetoxibibencil

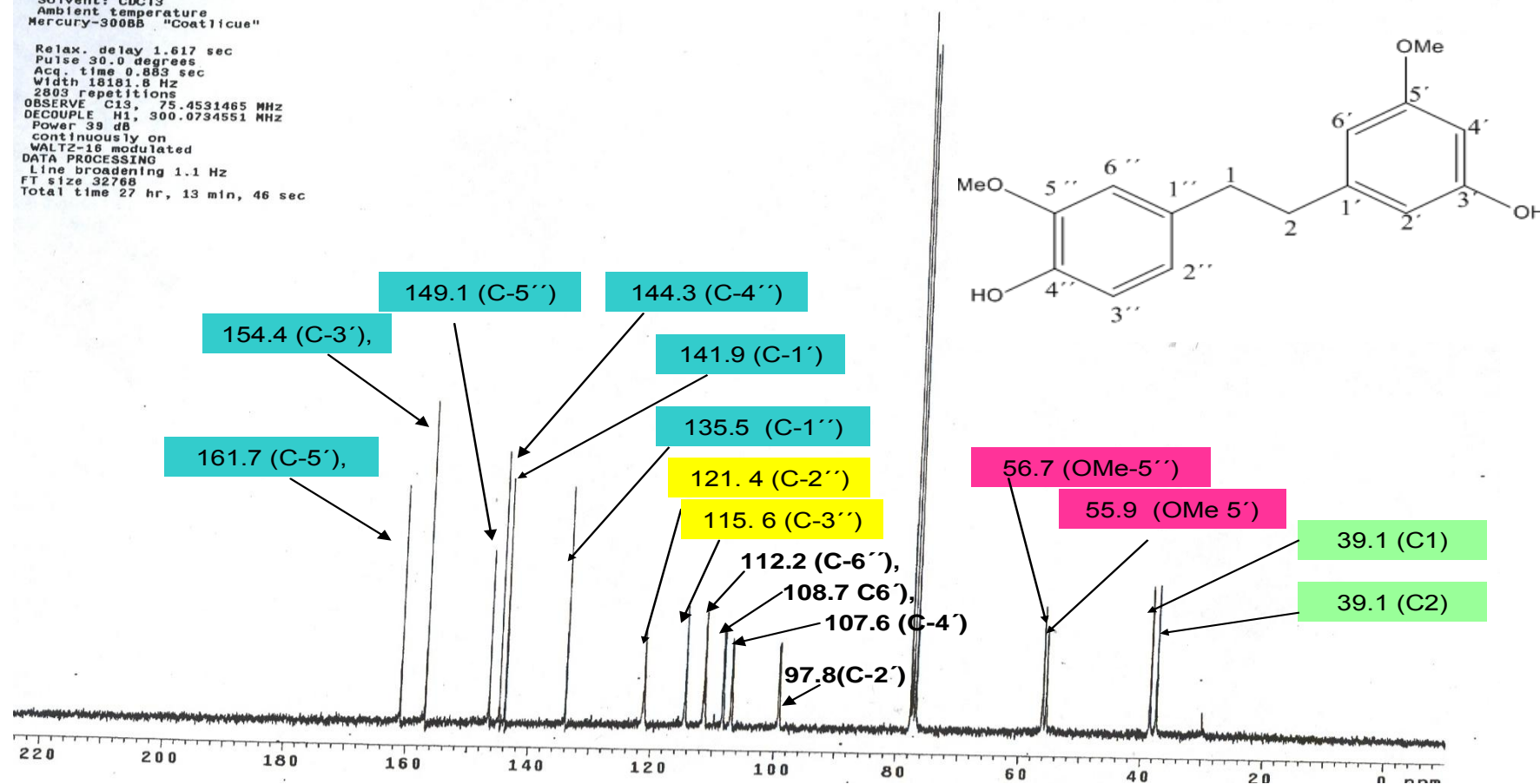


Figura 27a Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 1 (gigantol) de *P. michuacana* en CDCl<sub>3</sub>

Elucidación estructural del compuesto 1

ESPECTRO RMN <sup>13</sup>C  
EXPERIMENTO DEPT

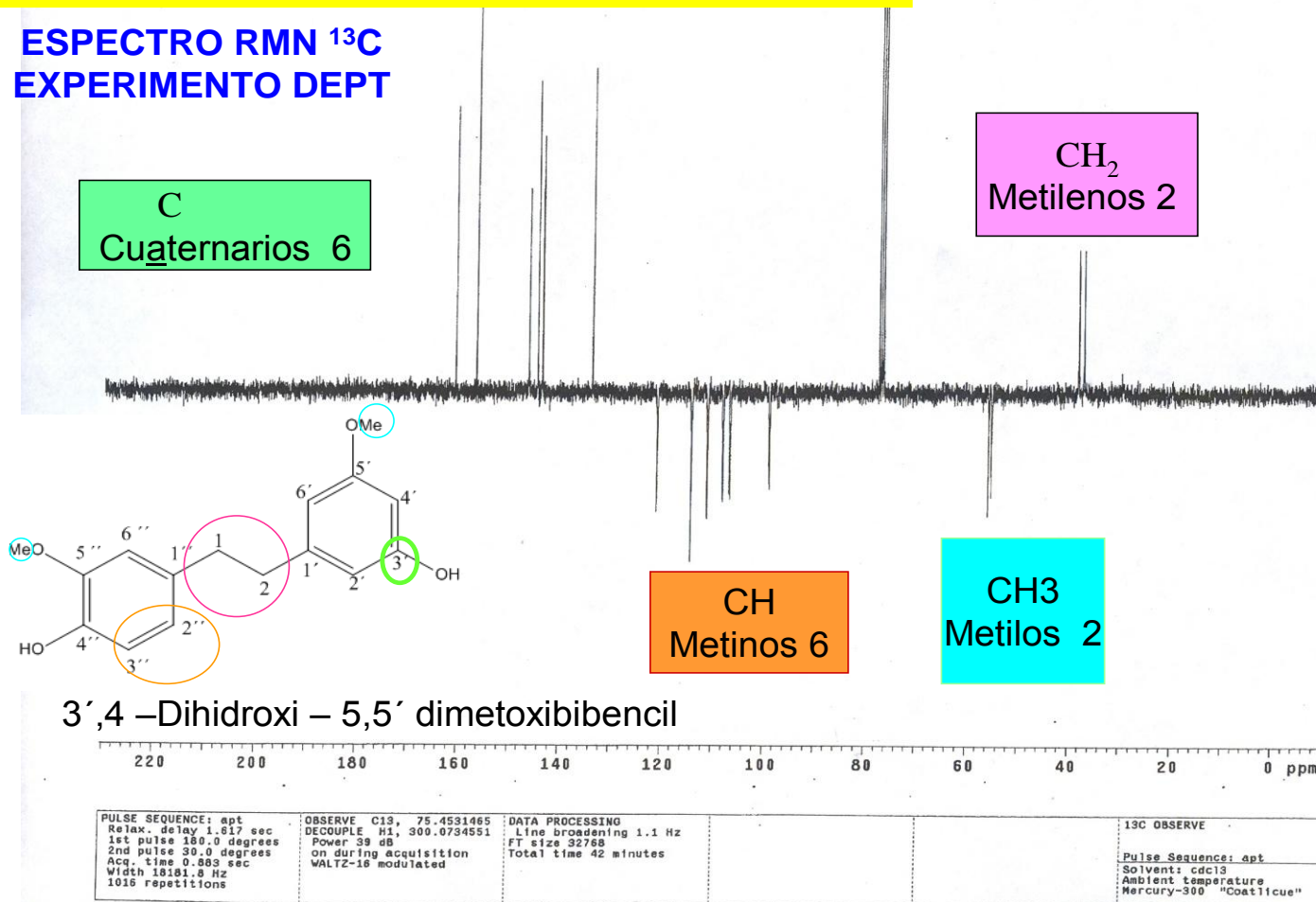


Figura 27 b Experimento DEPT del compuesto 1 (gigantol) de *P. michuacana* en CDCl<sub>3</sub>



Elucidación estructural del compuesto 1

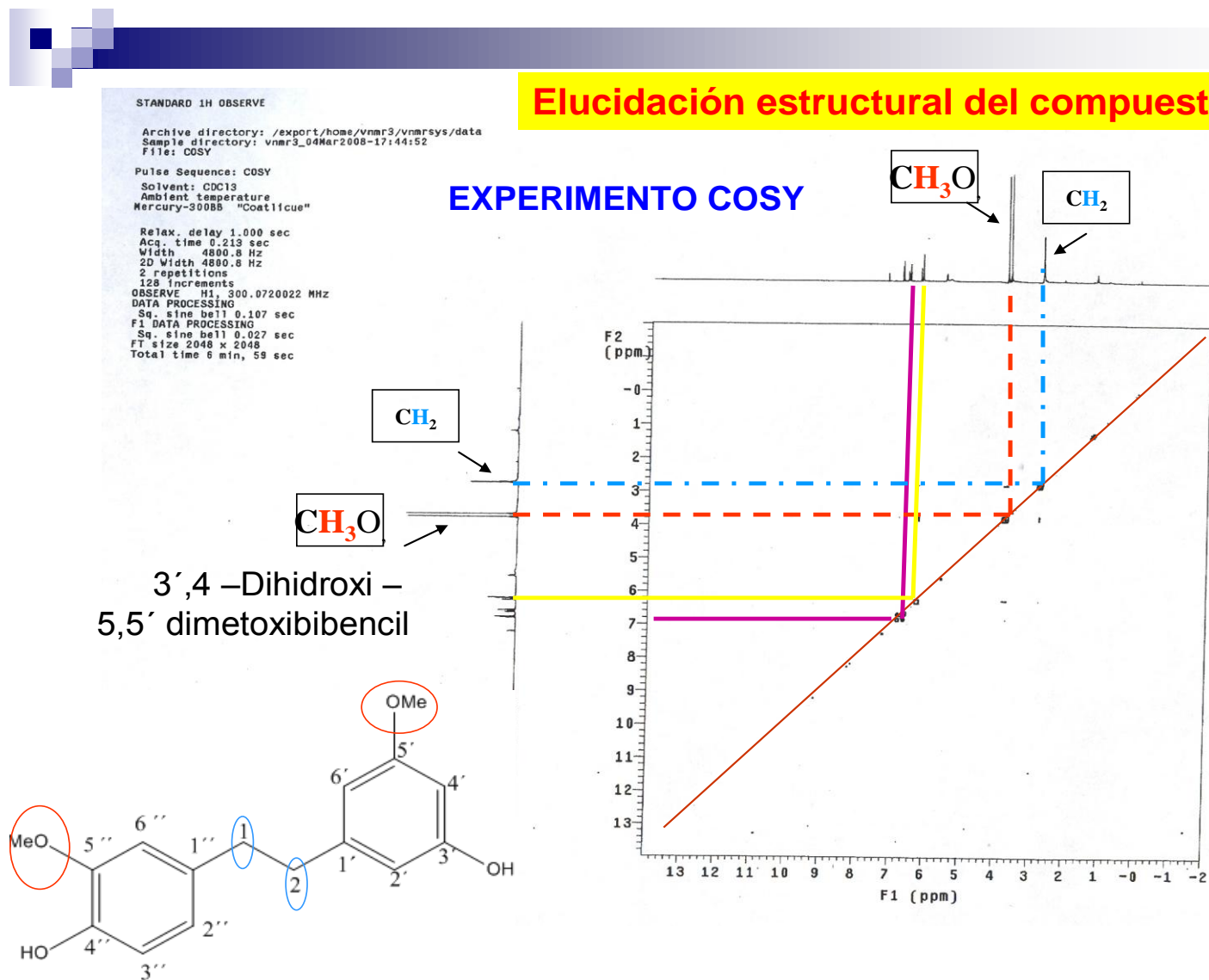


Figura 27c Espectro COSY del compuesto 1 (gigantol) de *P. michuacana* en  $CDCl_3$

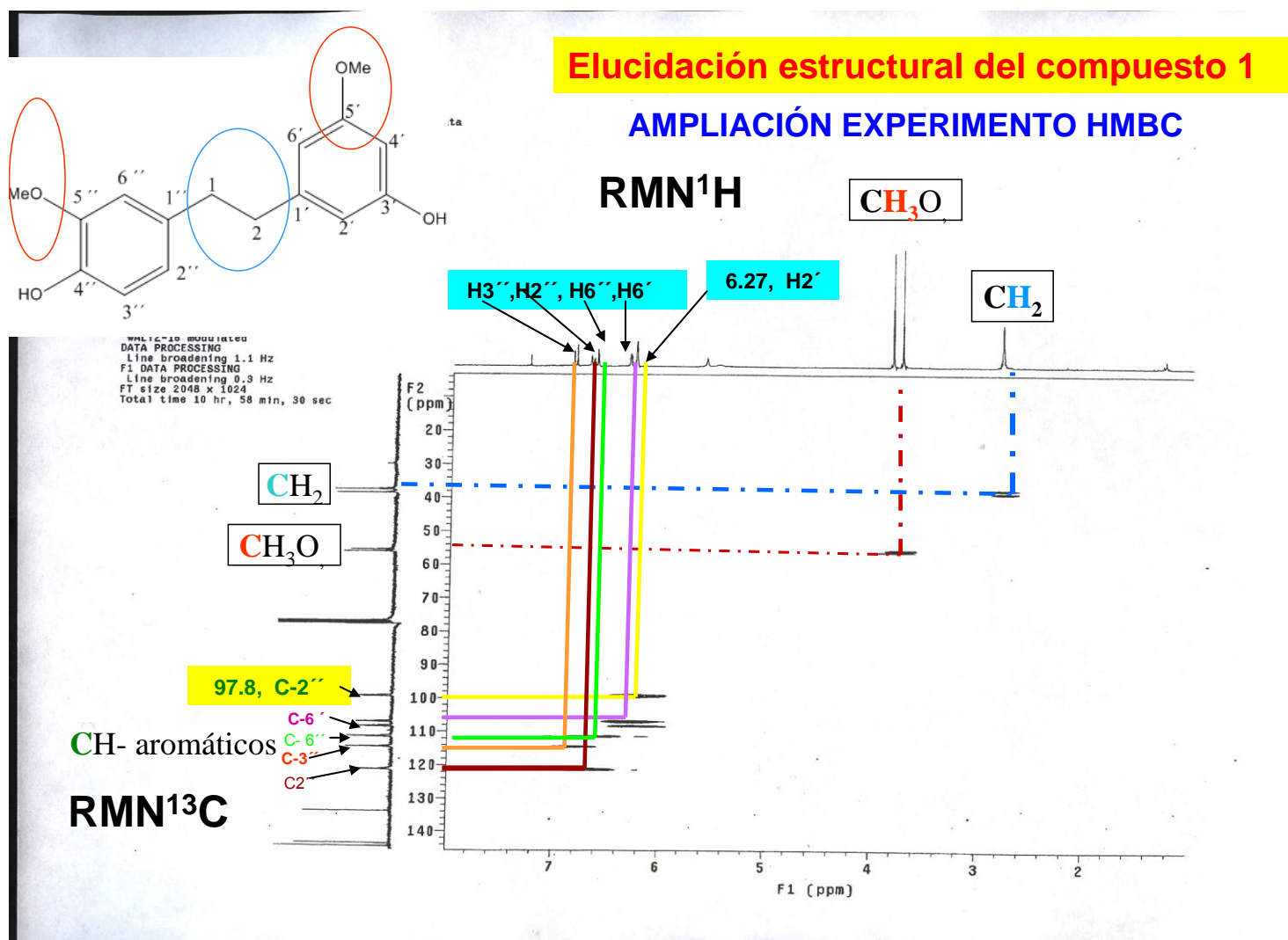


Figura 27d Espectro HMBC del compuesto 1 (gigantol) de *P. michuacana* en CDCl<sub>3</sub>

Estos resultados fueron comparados con los reportados en la literatura para el compuesto gigantol (3',4 -Dihidroxi - 3,5'-dimetoxibibencil) la estructura de este compuesto se presenta en la Figura 28.

Fue descrito por primera vez como constituyente minoritario en *Cannabis sativa* (Crombie, 1978). El gigantol ha sido reportado en otras orquídeas como *Bulbophyllum vaginatum* (Leong, 1991), *Cymbidium giganteum* ( Juneja, 1985) y *Cymbidium aloifolium* (Juneja, 1986), Orquídea *E. michuacana* (Tovar, 2006) y en la orquídea *Dendrobium cariniferum* por (Yegao Chen, 2008).

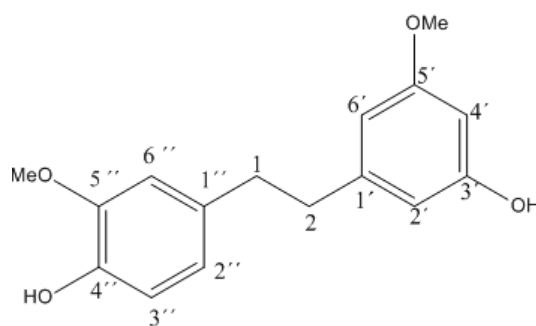


Figura 28. Estructura Compuesto 1 (gigantol)

### 5.8 Purificación de la fracción PmBCI9p – 2 y aislamiento de los compuestos 2 y 3 del extracto cloroformo de bulbos de *P. michuacana*.

La fracción **PmBCI –9** se fraccionó con metanol y se formaron 2 fases: precipitado y solución denominadas PmBCI – 9p, PmBCI – 9ss, respectivamente como se puede observar en la Figura 29.

La fracción **PmBCI-9p** presentó actividad antioxidante y por esto se realizó un estudio de CCF con varias mezclas de disolventes como (acetona: CHCl<sub>3</sub> 9:1, CHCl<sub>3</sub> : eter etílico 2:1, 1: 3,3 :1, 1: 4, CHCl<sub>3</sub> : MeOH 7:2) y el mejor eluyente fué CHCl<sub>3</sub> : MeOH: Hex 7:2: 3.5.

La fracción **PmBCI-9p** se siguió purificando por medio de cromatografía en columna CC en gel de sílice mediante el sistema de elución CHCl<sub>3</sub> : MeOH: Hex 7:2: 3.5, se obtuvieron 4 fracciones denominadas PmBCI-9p 1 a 4.

Las fracciones PmBCI-9p 1 a 3 presentaron actividad antioxidante por decoloración de β-caroteno y la fracción más activa fué **PmBCI-9p2** por consiguiente se siguió

purificando, por cromatografía en CC con en el eluyente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:Hex 7:2:3.5 se obtuvieron 6 fracciones de 20 ml cada una denominadas **PmBCI-9p-2- 1 a 6**.

La fracción **PmBCI-9p-2- 5** presentó actividad antioxidante por decoloración de  $\beta$ -caroteno, la cual se siguió purificando con el eluyente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:Hex 7:2:3.5, se obtuvieron 5 fracciones denominadas **PmBCI-9p-2- 5 –1 a 5**.

La fracción **PmBCI-9p-2- 5 – 5** presentó actividad antioxidante por lo tanto se siguió purificando en CC con la elución  $\text{CHCl}_3$  : MeOH: Hex 7:2:3.5, alternando con  $\text{CHCl}_3$  : MeOH: Hex 8:3.5: 2,  $\text{CHCl}_3$  : MeOH: Hex 8:4:2 y finalmente acetona. Se obtuvieron 8 fracciones denominadas **PmBCI-9p-2- 5 – 5 -1 a 8**.

La fracción amarilla **PmBCI-9p-2-5–5-3** sólo presentó actividad antioxidante, está se siguió purificando en una columna de Sephadex LH- 20 con  $\text{CHCl}_3$  incrementando la polaridad con metanol. Se obtuvieron 6 fracciones de 10 ml c/u denominadas **PmBCI-9p-2-5–5-3-1 a 6**, la fracción **PmBCI-9p-2-5–5-3-6** solo presentó actividad antioxidante, se recromatografió con  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 9:1,  $\text{CHCl}_3$  : MeOH: Hex 6:1:1,  $\text{CHCl}_3$  : Éter etílico : Acetona 7: 1:0.5 se obtuvieron 7 subfracciones. La fracción **PmBCI-9p-2-5–5-3-6-6** solo presentó actividad antioxidante y finalmente se volvió a recromatografiar la fracción **PmBCI-9p-2-5–5-3-6-6** en CC con  $\text{CHCl}_3$  : acetona: eter etilico 3: 1.5 : 0.5 donde se obtuvieron 3 fracciones **PmBCI-9p-2-5–5-3-6-6 1 a 3**.

La fracción **PmBCI-9p-2-5–5-3-6-6-1** (Figura 29) presentó actividad antioxidante, esta se cristalizó con metanol, disuelto en caliente, luego se llevó a refrigeración por un periodo de 4 días, cumplido el tiempo se obtuvo un polvo de coloración amarilla la cual fue denominada **PmBCI-9p-2-5–5-3-6-6-1p**, está presento actividad antioxidante y se le realizó un estudio de CCF con varias mezclas para determinar la pureza, la cual se utilizo para las determinar los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para la elucidación estructural del compuesto.

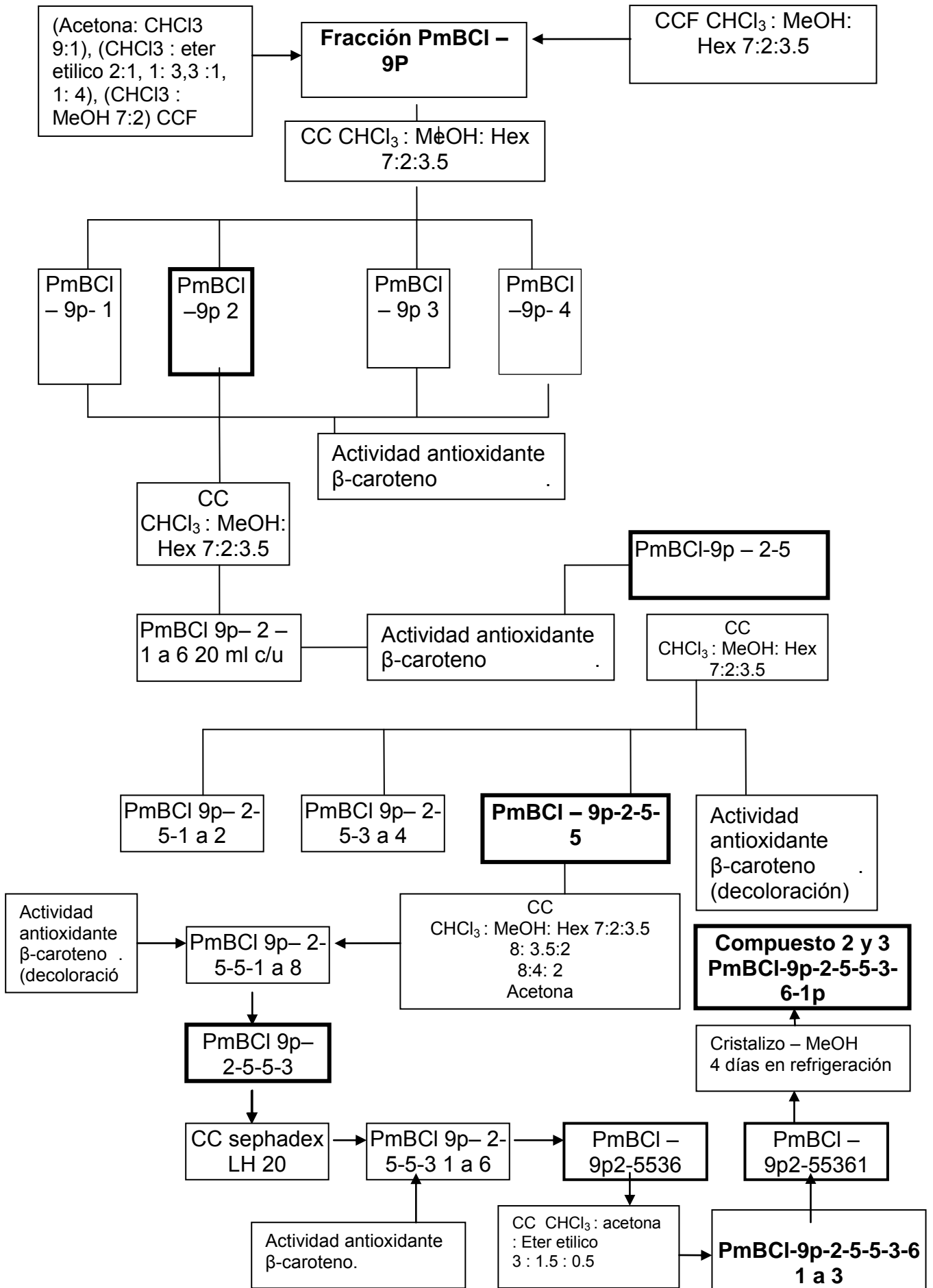


Figura 29. Aislamiento y Purificación de los compuestos 2 y 3 de la fracción PmBCI9p - 2

## 5.9 Elucidación estructural de los compuestos 2 y 3 (mezcla).

Del extracto de cloroformo de bulbos de la especie *P. michuacana* fueron aislados e identificados los **Compuesto 2 y 3 de la fracción purificada PmPCI-9p-2-5-5-3-6-1p**

**Compuesto 2:** presentó características de polvo amorfo amarillento.

Las señales en los espectros indican que el compuesto **2** se encuentra conformando por una mezcla.

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) (Figura 30a) se muestra el espectro completo de y la ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30b) indicando las señales de la región aromática:  $\delta$ : 7.92 [d, (AA'), H-2'/H6',  $J_{2',3'} + J_{2',5'} = 8.7$  Hz, H-2' y H-6'], 7.06 (1H, s, H-8), 6.98 [d, (BB'),  $J_{3',5'} = 8.7$  Hz, H-3' y H-5'], 6.28 (1H, s, H-3);

El espectro RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30c) muestra cinco señales aromáticas derivadas de dos diferentes anillos aromáticos. Las señales en  $\delta$  7,92 y  $\delta$  6,98 se originan a partir de los protones 2', 5' y 6' del anillo B de los flavonoides. También presenta una señal, correspondiente al protón H-8 del anillo a  $\delta$  7,06. Indicando la presencia de un anillo aromático monosustituido.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) (Figura 31) se indican las señales de los carbonos a  $\delta$ : 164.32 (C-2), 103.16 (C-3), 182.78 (C-4), 142.93 (C-5), 130.91 (C-6), 155.78 (C-7), 94.67 (C-8), 161.88 (C-9), 105.25 (C-10), 122.52 (C-1'), 128.36 (C-2', C-6'), 161.05 (C-4'), 116.47 (C-3', C-5'), 62.64 (OMe-7).

El compuesto **2** presento reacción con  $\text{FeCl}_3$  (índice azul oscuro) reacción característica para este tipo de compuestos (flavonas).

El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $D_6$ ) puso de manifiesto un total de 16 carbonos incluyendo un grupo carbonilo. El análisis de los espectros  $^{13}\text{C}$  y experimento DEPT reveló que posee un metilo ( $\text{CH}_3$ ), seis metinos (CH), nueve carbonos cuaternarios (C). de lo anterior se deduce la fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$  para el compuesto 2.

La asignación de todos los carbón y la colocación del grupo metoxilo dentro de la molécula fueron determinados por los experimentos 2D (COSY, HMBC).

El experimento COSY (Figura 32) muestra la relación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  en un plano bidimensional donde se relaciona los protones de la molécula.

## Espectro RMN $^1\text{H}$ de los compuestos 2 y 3

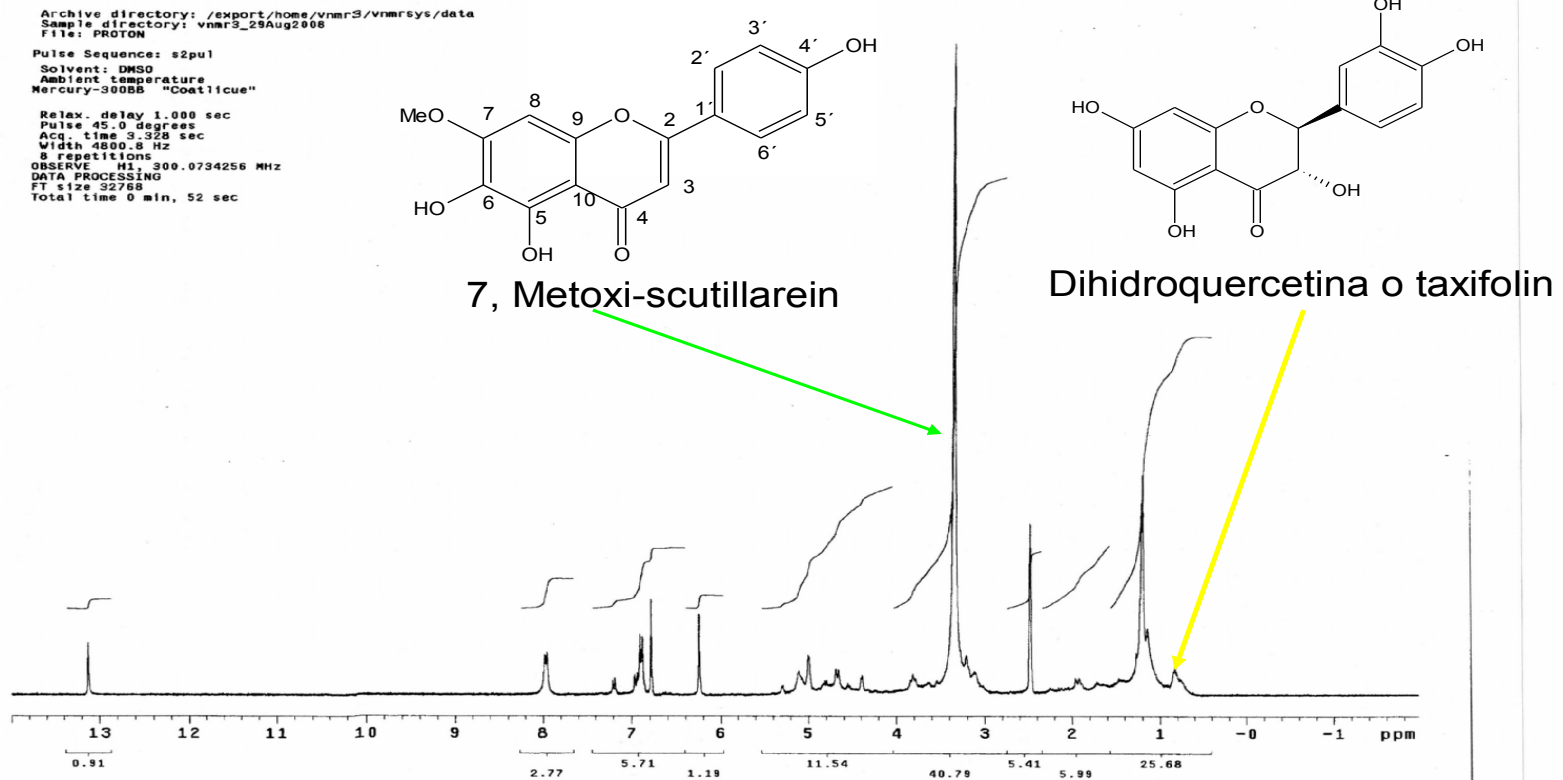


Figura 30a Espectro RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos 2 y 3 de *P. michuacana* en DMSO- $\text{d}_6$

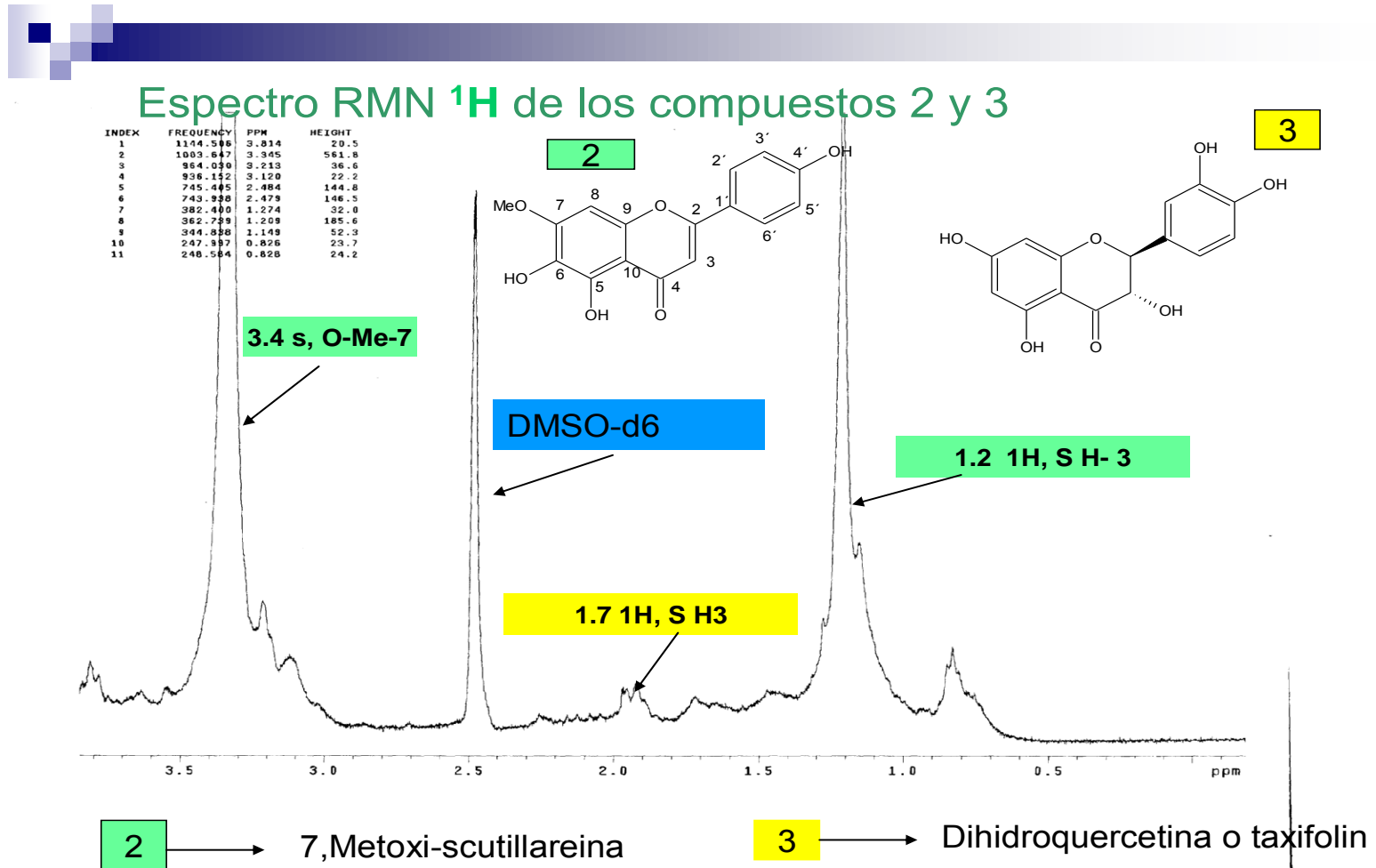


Figura 30b Espectro RMN <sup>1</sup>H ( ampliación) de los compuestos 2 y 3 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>



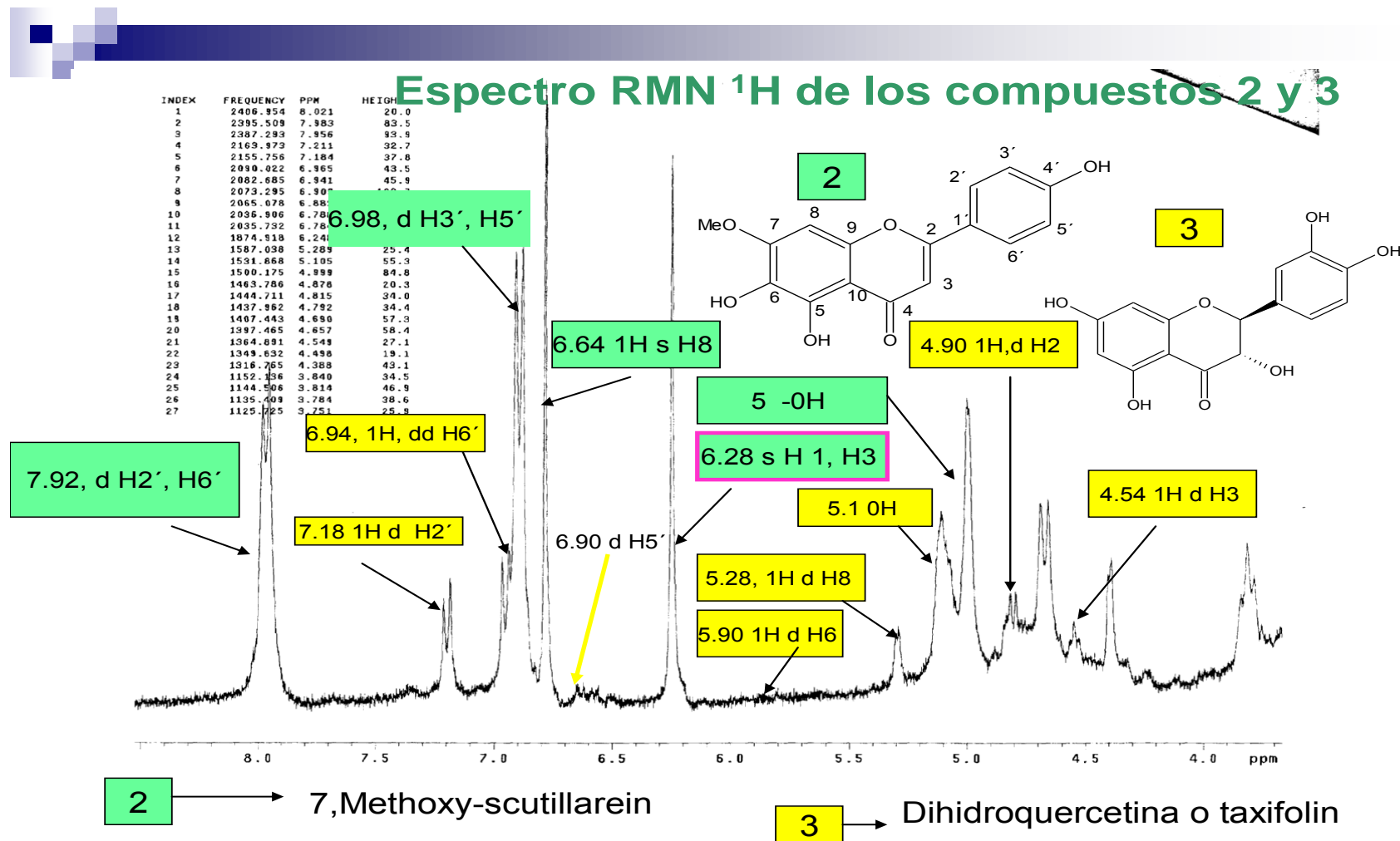


Figura 30c Continuación del espectro RMN <sup>1</sup>H ( ampliación) de los compuestos 2 y 3 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>

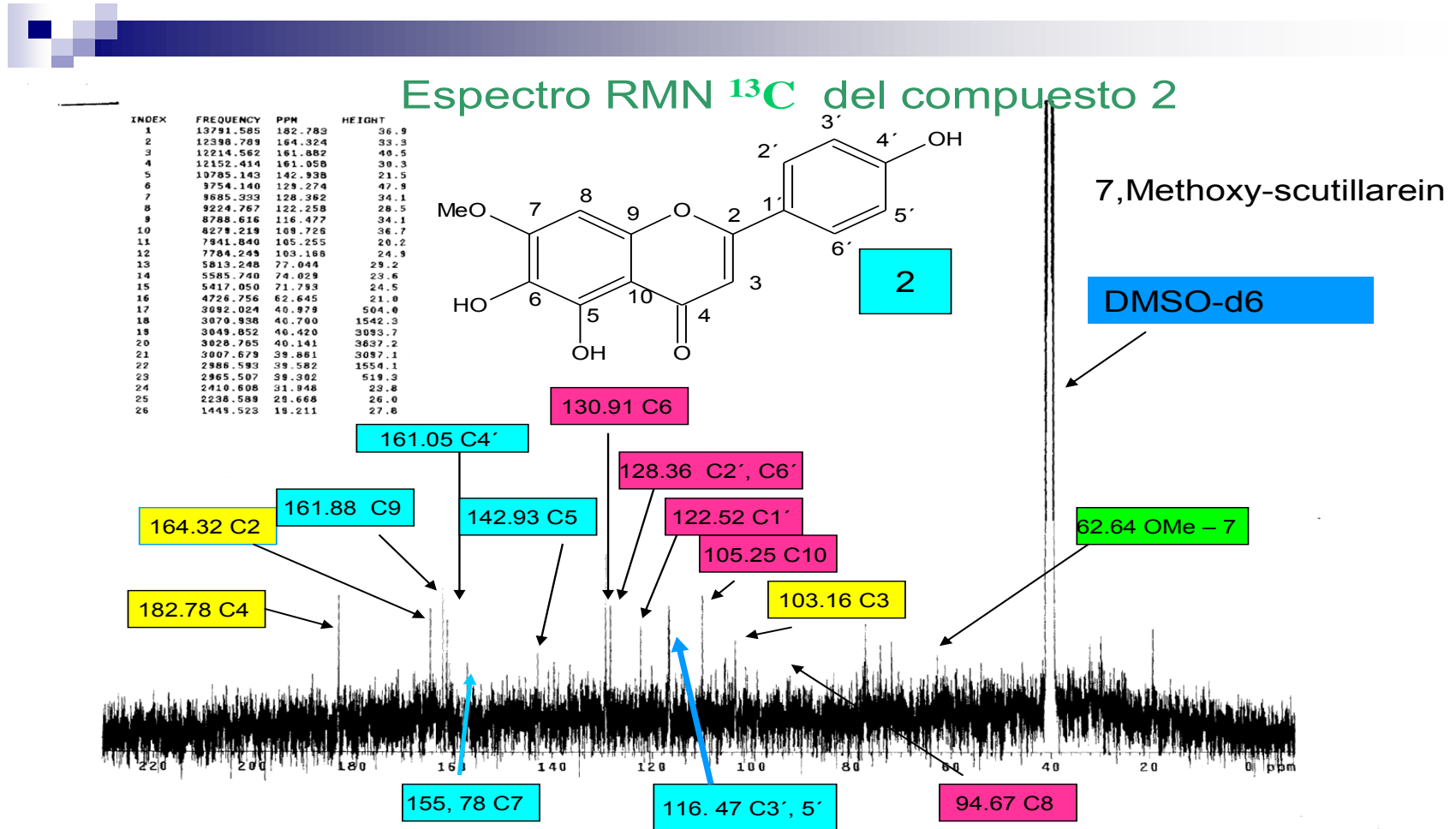
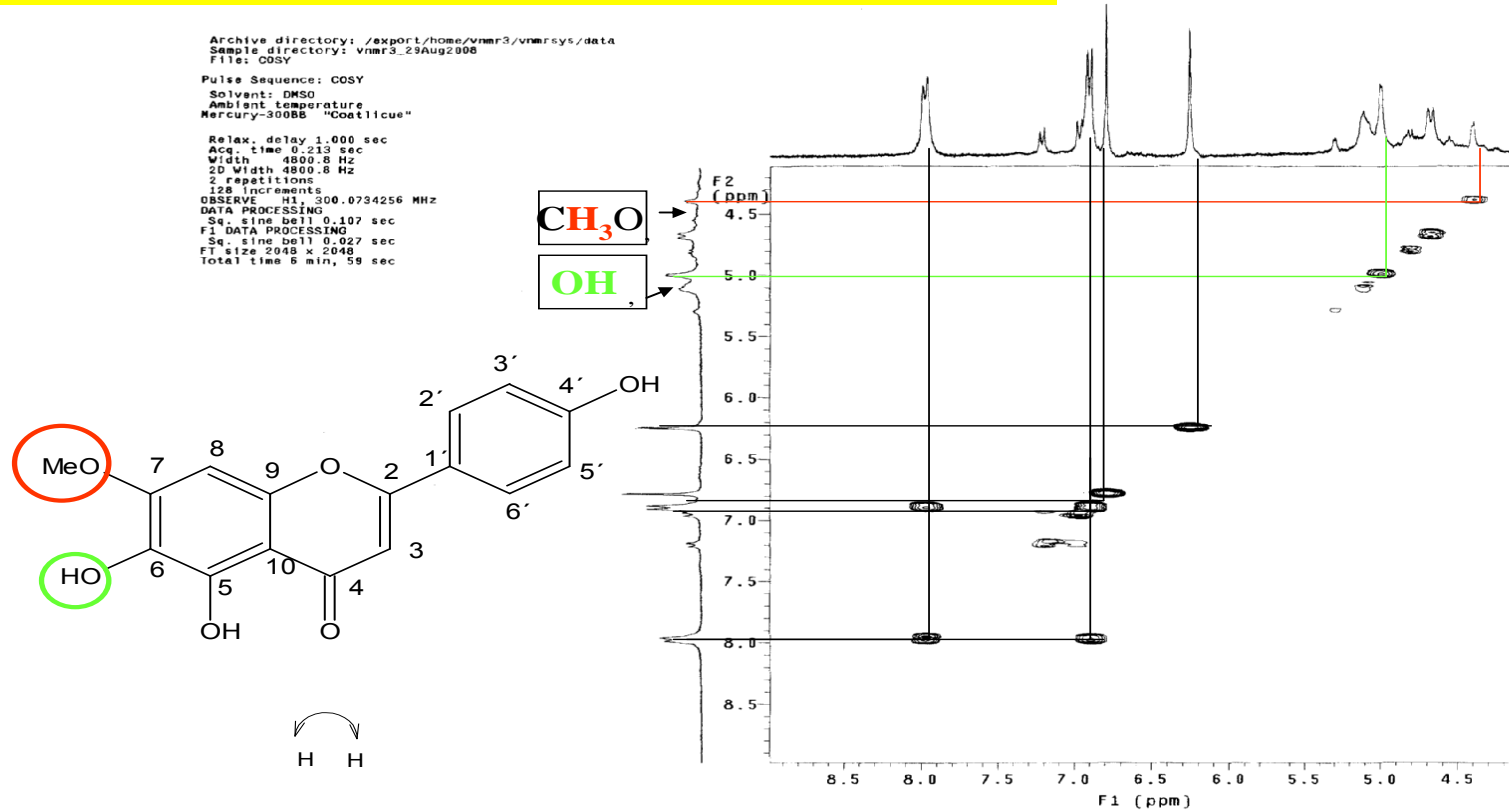


Figura 31 Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 2 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>

Elucidación estructural del compuesto 2

EXPERIMENTO COSY



Conectividades observadas para el compuesto 2 COSY.

Figura 32 Espectro COSY del compuesto 2 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>

El experimento HMBC (Figura 33) muestra la relación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en función de las señales en un plano bidimensional donde se relaciona los protones de la molécula y los carbonos, estos experimentos son necesarios para identificar posición de los carbonos con los protones en dicha molécula.

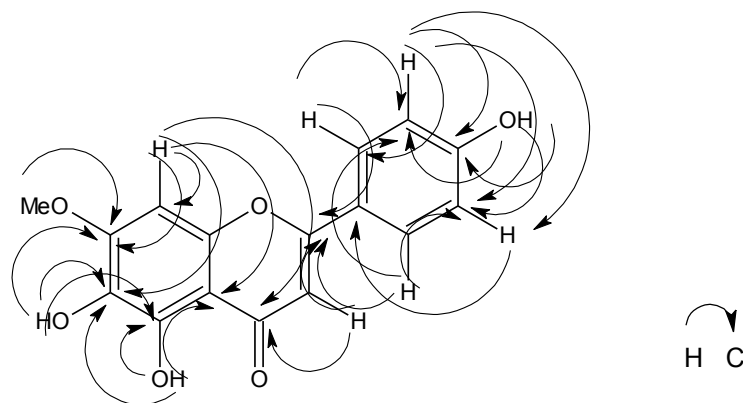


Figura 33. Conectividades HMBC H-C correlaciones de largo alcance.

Estos resultados del compuesto **2** fueron comparados con los reportados en la literatura el cual se identificó como **7**, metoxi-scutillareina, la estructura coincide con los datos reportados por Peng *et al.*, (2003), con la diferencia de que el grupo hidroxilo de carbono **7** (scutillareina), está substituido por un grupo metoxilo como se observa en el espectro RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30a) y en la Figura 34. Basándonos en la revisión bibliográfica el compuesto **2** es considerado un nuevo compuesto.

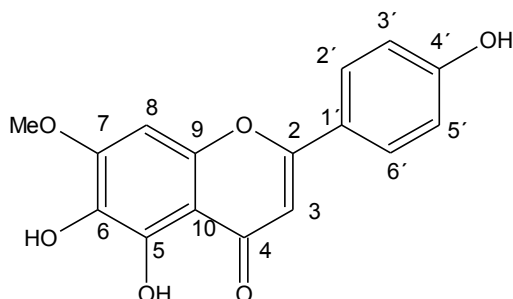


Figura 34. Estructura del compuesto **2** (7,Methoxy-scutillareina)

### Compuesto 3.

El compuesto 3 presentó la característica de polvo amorfo amarillento;

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) (Figuras 30a y 30b ) se puede observar las señales pequeñas  $\delta$ : 4.54 (1H, d, J = 11.5 Hz, H3), 4.90 (1H, d, J = 11.5 Hz, H2), 5.28 (1H, d, J = 2 Hz, H8), 6.24 (1H, d, J = 2 Hz, H6), 6.90 (1H, d, J= 8 Hz, H5'), 6.94 (1H, dd, J = 8,2 Hz, H6'), 7.18 (1H, d, J = 2 Hz, H2').

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 35a) muestra las señales características de los carbonos a 198.4 (C-4), 170 (C-5), 165.3 (C-7), 158(C-9), 148 (C-3'), 146 (C-4'), 134 (C-1'), 120.9 (C-6'), 118.1 (C-5'), 115.9 (C-2'), 101.8 (C-10), 97.3(C-6), 95.3 (C-8), 85.1 (C-2), 73.7 (C-3).

Experimento COSY (Figura 35b) muestra la relación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  en un plano bidimensional donde se relaciona los protones de la molécula.

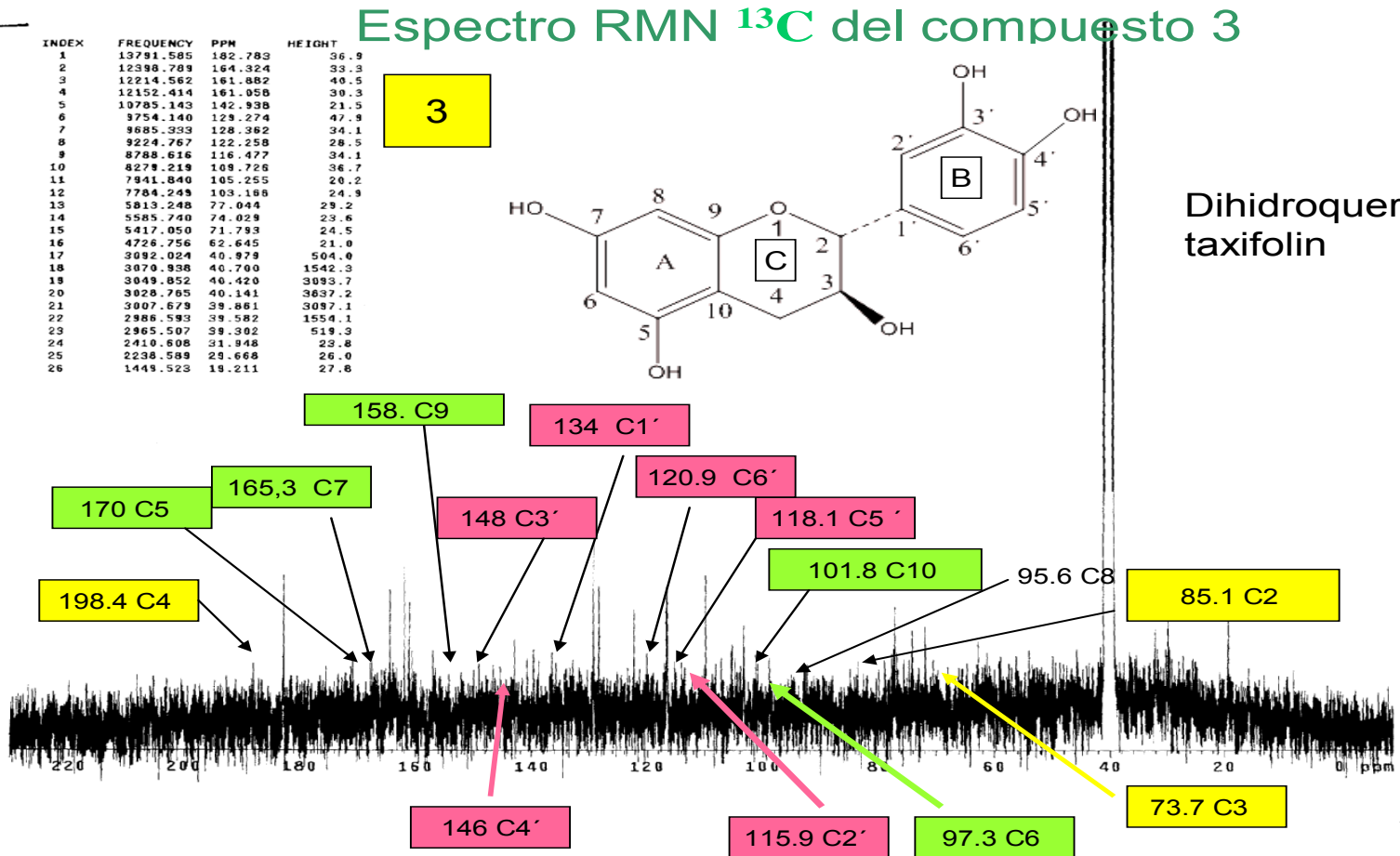
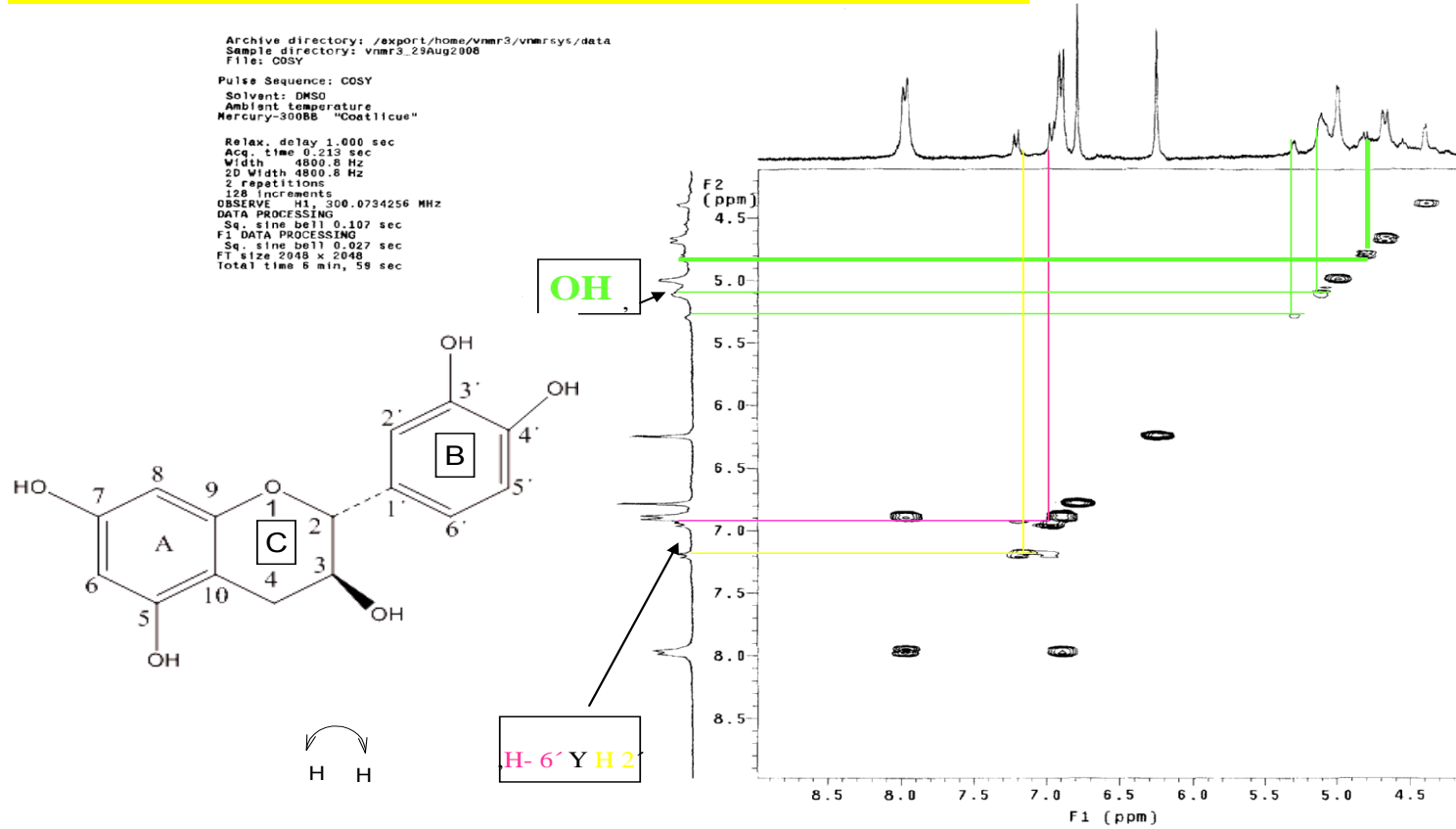


Figura 35a Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 3 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>

Elucidación estructural del compuesto 3

EXPERIMENTO COSY



Conectividades observadas para el compuesto 3 COSY.

Figura 35b Espectro COSY del compuesto 3 de *P. michuacana* en DMSO-d<sub>6</sub>

Como se observa en la Figura 36 el compuesto **3**, se encuentra mezclado con la flavona 7, methoxy-scutillareina. Estos resultados del compuesto **3** fueron comparados con los reportados en la literatura el cual se identifico como Dihidroquercetina o taxifolin (Kolhir *et al.*, 1996). La estructura fue establecida como dihidroquercetina también llamado taxifolin. Se trata de un bioflavonoide que presenta propiedades antiinflamatorias. Actúa como un antihistamínico, y protege de la radiación (Iliyuchenok *et al.*, 1975). También inhibe el proceso espontáneo de la peroxidación lipídica en el hígado (Siegers y Younes, 1981; Tjukavkina *et al.*, 1993). El dihidroquercetina es un antioxidante y posee las propiedades de la protección de los capilares, lo cual es coherente con su participación como un agente antiinflamatorio (Gupta *et al.*, 1971) y agente gastro-hepatoprotector, y su diurético y actividad hipolipidaemica (Kolhir *et al.*, 1996). Según (Lantto, 2009) este tipo de compuestos tienen actividad antioxidante.

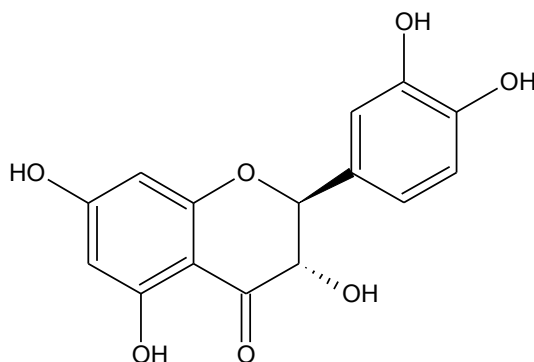


Figura 36 Dihidroquercetina o taxifolin



### 5.3 Relación actividad antioxidante y estructura

El método de DPPH para evaluar la actividad antioxidante involucra dos componentes en la reacción de la mezcla, el antioxidante y el oxidante (DPPH) esto se basa la transferencia de electrón en la reacción.

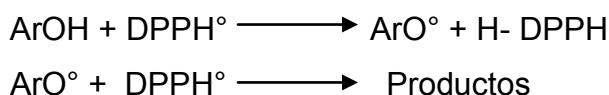
(oxidante) + e ( antioxidante – muestra analizada compuesto 1)  $\longrightarrow$  se reduce (DPPH) + se oxida el antioxidante.

El DPPH es un radical estable, oxidante y comercialmente disponible que extrae un electrón del antioxidante, es decir como es estable el radical puede atrapar los radicales causando un cambio de color, la degradación del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante (Figura 37). El punto final de la reacción se alcanza cuando el cambio de color se detiene. El cambio de absorbancia se traza contra la concentración del antioxidante para dar una curva lineal y la concentración que causa la reducción del DPPH al 50 % de inhibición es definida como EC<sub>50</sub>.

El radical tiene un color violeta, debido a los electrones libres del nitrógeno y de después de la reacción con el átomo de hidrogeno del compuesto 1 presenta un cambio de color a amarillo. El cambio de color puede ser seguido por espectrofotometría a 517nm y de esta manera el potencial antioxidante de una sustancia o un extracto de planta puede ser determinado.

Se determinó la actividad antioxidante del compuesto **1** (gigantol) por reducción del radical 2,2 difenilpicrihidrazil DPPH, presentando el **EC<sub>50</sub>** de 45.69 µg/ml comparado con el **EC<sub>50</sub>** del acido ascórbico de 122.25 µg/ml el compuesto **1** tiene más efecto antioxidante. En relación a la actividad antioxidante y la estructura del compuesto **1** (gigantol), como se puede observar en la Figura 39, el compuesto **1** (estilbeno) presenta grupos hidroxil (OH) en la posición 3 y metoxilo que reaccionan con el radical DPPH por el mecanismo de la transferencia de electrones de OH y MeO para reducir el radical y luego estabilizar la reacción, según la literatura es activo el compuesto **1** porque hay la presencia de los grupos en la posición orto- y para difenoles.

Mecanismo de reacción con el radical DPPH

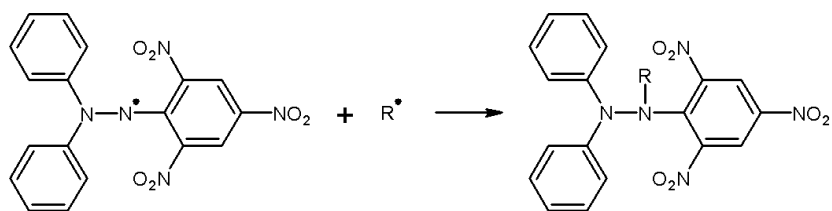


La mezcla de la fracción PmBCI-9p-2-5-5-3-6-1p (compuestos **2** flavona y **3** flavanonol) presentó actividad antioxidante al reducir el 50 % al radical DPPH expresada como EC<sub>50</sub> 2 µg/ml esta actividad es significativa comparada a los flavonoides quercetina de 4.7 mM, según Yokosawa et al. (1997), determinó el EC<sub>50</sub> de scutillareina (2.80 µg/ml), baicalina (100 µg/ml), apigenina (68.58 µg/ml).

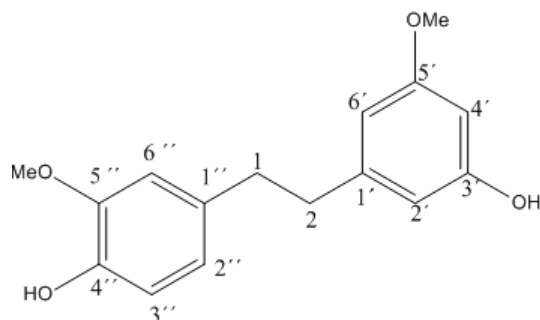
La actividad antioxidante de los flavonoides según Rice Evans *et. al.* (1996); Flórez *et al.*, ( 2002 ); Pietta P. (2000); Huang et al., (2005) depende de los siguientes factores relacionados a las estructuras en la Figura 39 se muestran los compuestos **2** (7,Methoxy scutillareina) y **3** (Dihydroquercetina o taxifolin) la actividad se explica de la siguiente manera:

La existencia de grupos O- dihidroxi en el anillo B de la estructura que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones, esto los presenta el compuesto 3.

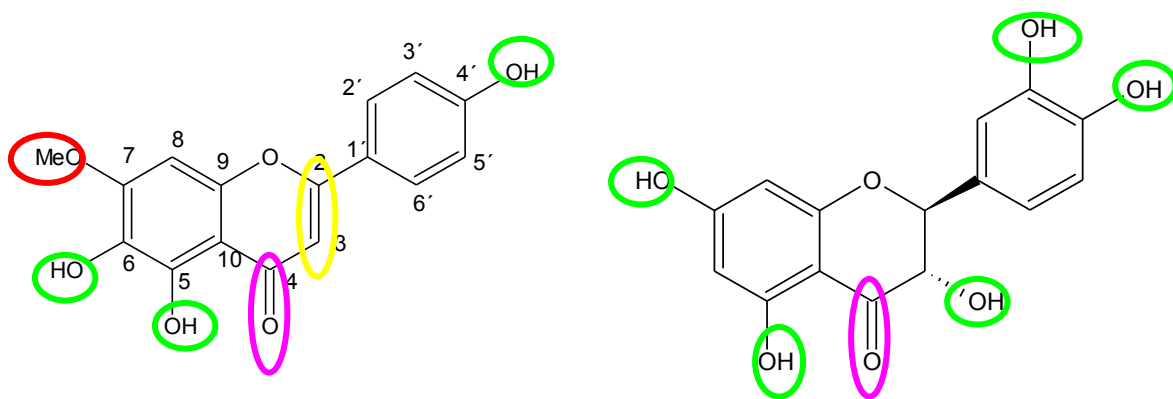
- El doble enlace en las posiciones 2 y 3 del anillo C de la estructura del compuesto 2
- La existencia de la función 4-oxo en el anillo C participa en la deslocalización de electrones en las dos estructuras de los compuestos 2 y 3,
- La presencia de grupos hidroxilos en la posición 3' y 5 de los anillos B y A en la estructura del compuesto 3 y la posición del hidroxilo en 5 y 6 del anillo A en la estructura del compuesto 2 incrementan la actividad de atrapamiento del radical DPPH.
- La actividad antioxidante de la mezcla de los flavonoides 2 y 3 es posible que tengan una relación sinergista, también pueden tener la capacidad de quelar metales, Inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres.



Reacción del radical DPPH con el antioxidante (Compuestos)



Estructura Compuesto 1 (gigantol) obtenido del extracto de cloroformo de bulbo de *P. michuacana*



Compuesto 2 (7,Methoxy-scutillareina)

Compuesto 3 Dihidroquercetina o taxifolin

Figura 37 Reacción del radical DPPH y la relación de la actividad antioxidante de las estructuras de los compuestos 1, 2 y 3

## CONCLUSIONES

- ❖ El porcentaje de rendimiento de los extractos de cloroformo, metanol de bulbo y raíz respectivamente presentaron un entre 8.6 % - 12.1 % p/p; El de mayor rendimiento fue el extracto de cloroformo de bulbo.
- ❖ Los extractos crudos de cloroformo, metanol de bulbo y raíz de *P. michuacana* mostraron actividad antioxidante barrido en placa por decoloración de  $\beta$ -caroteno.
- ❖ No presentaron actividad antioxidante los extractos de hexano, cloroformo, metanol de hoja y los extractos de bulbo y raíz de hexano.
- ❖ Los análisis fitoquímicos cualitativos de los extractos de metanol de bulbo y raíz presentaron prueba positiva de coloración para fenoles, flavonoides y negativo para alcaloides.
- ❖ La cantidad de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de bulbo es de 0.55 g EGA 100 g -1 B.S) y de raíz de 1.27 g EGA 100 g -1 B.S.
- ❖ Los extractos de cloroformo de raíz y bulbo de *P. michuacana* presentaron actividad antioxidante con un valor de  $EC_{50}$  de 174.68  $\mu$ g/ml y 310.96  $\mu$ g/ml comparado el  $EC_{50}$  del ácido ascórbico de 122.25  $\mu$ g/ml
- ❖ Del extracto de cloroformo de bulbos de *Prosthechea michuacana* se identificó el compuesto conocido dentro de la familia Orchidaceae como gigantol 3',4 - Dihidroxi - 5,5'-dimetoxibibencil el cuál es un estilbeno, según los análisis de los espectros IR, RMN  $^{13}C$  y  $^1H$ , presentando prueba positiva de actividad antioxidante barrido en placa y con un valor del  $EC_{50}$  de 45.69  $\mu$ g/ml.
- ❖ Del extracto de cloroformo de bulbos de *Prosthechea michuacana* se aislaron e identificaron de la mezcla PmBCI - 9p- 255361p los siguientes compuestos: por medio de la información de los espectros IR, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ , son compuestos tipo flavonoides.
  - **Compuesto 2:** 7, metoxi-scutillarein, compuesto nuevo.
  - **Compuesto 3:** dihidroquercetina también llamado taxifolin
- ❖ La actividad antioxidante de la mezcla PmBCI - 9p- 255361p por reducción del radical DPPH mostraron una representativa actividad de  $EC_{50}$  de 2  $\mu$ g/ml.
- ❖ La actividad antioxidante de los compuestos 1, 2, 3 esta relacionada con la estructura por la presencia de grupos OH y MeO que reaccionan con el radical DPPH por el mecanismo de transferencia de electrones.

- ❖ La mezcla de los flavonoides 2 y 3 mejora significativamente el potencial antioxidante y esto es posible por la acción sinergista, como también por cumplir las tres reglas generales de actividad antioxidante para los flavonoides.
- ❖ El compuesto 7, metoxi-scutillarein se considero como un nuevo reporte para las ciencias básicas es un aporte muy importante para México por encontrar nuevas moléculas para ampliar el conocimiento en la familia de compuestos de flavonoides y además con actividad antioxidante representativa.
- ❖ **El estudio de la identificación de los compuestos con actividad antioxidante de la especie *P. michuacana* confirman el uso medicinal de la planta y además contribuye a su estudio ya que esta especie no presentaba reportes de actividad antioxidante.**

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar A., Camacho J., Chino S., Jácquez P., Lopez M. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. México.
- Aguirre – León E. 1992. Vascular epiphytes of México: a preliminary inventory. *Selbyana* 13: 72 – 76.
- Akerele. O. 1991 WH'Os tradicional medicine programme: tradicional herbal medicines around the glob: modern perspectives. *Swiss. Pharma*, 13,57- 62 p.
- Atwood, J. T. 1986. The size of the Orchidaceae and systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171- 186.
- Avijeet J., Manens S., Deb L., Jain A., Rout SP., Gupta VB., Krishna KL. 2008. Antioxidant and hepato protective activity ethanolic and aqueous extracts of *Marmordica dioca* roxb leaves. *Scient direct Journal of ethnopharmacology*, 115 p 61-66.
- Baró, I., Cejas R., Fernández Z., Martínez C., Pérez C., Vázquez D. 2003. Algunos ejemplos de plantas útiles. In: *Sociedad y Naturaleza, Cuba 1: plantas útiles*. Editor Marco A., Vásquez D. Oaxaca, México, pp. 15 -32.
- Berliocchi, L. 2004. In: Griffiths M, ed. *The Orchid in Lore and Legend*. Portland OR, Timber Press. pp. 128-132.
- Brand-Williams, W.; cuvelier, M.E y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. 2000, *Phytother Res* 14: 323 – 328.
- Bulpitt C.J. 2005. The uses and misuses of orchids in medicine. *QJM* 98(9):625-631;doi:10.1093/qjmed/hci094.  
<http://qjmed.oxfordjournals.org/cgi/reprint/98/9/625.pdf>
- Cedillo., L. 2006. Identificación de los compuestos fenólicos en *Capulin, Prunus serotina*. Evaluación de la capacidad antioxidante y la estabilidad de la mermelada. Tesis para obtener el Grado para de Maestría en Ciencias Especialidad Alimentos. ENCB, IPN. Pag 8-16,27
- Crewswell, C.J., Runquist, O.A. y Campbell, M.M 1979 *Análisis espectral de compuestos orgánicos*. Ed. Diana México. Pag 134- 136.
- Crews., P; Rodríguez J; Jaspars, M. 1988. *Organic structure analysis* New York Oxford. Pp. 317 – 348.

- Criollo. L; Zapata. M., 1995. Pautas para la elaboración de un producto fitoterapéutico con base a *Bidens L.* Tesis para obtener el Grado para de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Pag
- Crombie L., Crombie W.M.L . 1978, "Dihydrostilbenes of Thailand *Cannabis*", Tetrahedron Letters, No 47, 4711 - 4714.
- Conley, R.T. "Espectroscopía infrarroja " 1979. Ed. Alhambra, Madrid.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. 1997 Iridoid glucoosides with free radical scavenging properties from *Fragrae blumei*. Helv Chim Acta; 80: 1144 – 1152.
- Danot, M., Nahmias, S., and Zoller U. 1984 An Undergraduate column chromatography experiment, Journal of Chemical Education. Volumen 61, Number 11, pp 1019.
- Dastmalchi, K. Dorman, D. Kosarb, M. Hiltunen, R. 2007 Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica L.*) extract, LWT 40, 239–248.
- Del Amo R. 1979. Plantas medicinales del Estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, Veracruz. Pág 279.
- Dyeing reagents, Foithin Layer and Paper Chromatography, Editorial Merck.
- Dekkers C, van Doornen LJP, Kemper HCG. 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports-Medicine-(Auckland, N.Z.)* 21(3), Mar, 213-238 Refs: 62 1996.
- Dressler, R. L. 1960. Classification and phylogeny in the orchidaceae. Ann. Miss. Bot. Gard. 47.
- Dressler, R. 1981. The Orchids: Natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Dioscorides Pedanius. De Materia Medica Frankfurt edition 1543 or De Materia Medica libra quinque 572 (In Imperial Library at Vienna).
- Dignum M., Van der Heijden. R., Kerler.J., Winkel.C., and Verpoote. R. 2004. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrewus and Kinetics of vanilla  $\beta$ - glucosidase. Food Chemistry 85: 199 -205.
- Dominguez, J, 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1ª edición. Editorial Limusa S.A. México. Págs 23-34, 39- 43, 81 -92, 243.
- Duarte, Elfreide A, Castañeda J. Estudio Fitoquímico y de la Actividad inmunomoduladora de las fracciones activas obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Curetella americana*. Tesis de Grado, 2003, Universidad Nacional Departamento de Farmacia. Págs 15, 20, 41,

- Espejo, A & A.R. López-Ferrari. 1998. Las Monocotiledóneas Mexicanas una sinopsis Florística 1. lista de referencia parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C., Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México, D.F pp 90.
- Estrada- Soto S., López G J., Villalobos M.R., Mata R. 2006 Endothelium – independent relaxation of aorta rings by two stilbenoids from the orchids *Scaphyglottis livida*. Fitoterapia volumen 77, Issue 3: 236-239.
- Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A., Mata, R., 1999. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4\_-dihydroxy-5,5\_-dimethoxybibenzyls from *Scaphyglottis livida*. Planta Medica 65, 109– 114.
- Flórez S, Gallego J, Culebras J, Tuñón M, 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria XVII (6) 271 – 278. ISSN 0212-1611-CODEN NUHOEQ, S.V.R.318
- Fujieda K., Shoyama Y., Matsunaka H. and I. Nishioka. 1988. Plant growth inhibiting properties of phalaenopsine T from *Phalaenopsis* Spp. Phytochemistry, 27, 5: 1564 - 1566.
- García, A, 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum* kunth (piperaceae) difundida en la costa Colombiana Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo. UTP. ISSN 0122-1701 439
- García JC, García B, Morin MA, Céspedes EM, Clapes S, Etienne O. 1993. Radicales libres: impacto médico. BEB (México);13(3):75-83.
- Gaviria. C, 2007. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Attalea butyracea* Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo. UTP.
- Galagovsky K,. (1995) Química Orgánica. Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio. EUDEBA.
- Geissman T.A and Crout D.H.G 1969, Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism, Freeman , Cooper & Company 1736 Stockton Street, San Francisco, California 94133. pp. 179 – 181, 183-185, 191-200.
- González, C., Ramírez, J. 2001. Evaluación de seis formas de extractos de tres plantas nativas para el control del *Botrytis cinerea* pers. ex. fr. del cultivo de la mora de castilla (*Rubus glaucus*) en condiciones de laboratorio. Especialización en Manejo Biológico de Cultivos. U.P.T.C. Postgrado. Tunja. Pág.
- Gorham J., Tori M., Asakawa Y., 1995. The Biochemistry of the Stilbenoids Publicado por Springer ISBN 0412550709, 9780412550706, pág. 262.



- Gupta, M. B., Bhalla, T. N., Gupta, G. P., Mitra, C. R., Bhargava, K. P. (1971). Antiinflammatory activity of taxifolin. *Jpn J Pharmacol.* 21, 377-382.
- Hágater. E., Soto A., Salazar A., Jimenez. M., López. A y Dressler.R. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México, D.F. Pág
- Harborne, J.B. ; Mabry, T.J. ; Mabry, H. 1975 "The Flavonoids", Chapman and Hall, London.
- Harbone, J.B. 1973. " Phytochemical Methods, Chapman and Hall, London New York, ISBN 0 412 23050 x. pp. 33- 52.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989 Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon,;1:142.
- Halliwell, B.; Aeschbacht, R.; Loligert, J.; Aruoma, O.I. 1995. The characterization of Antioxidants. *Food Chem. Toxic.*, v.33, n. 7, p. 601-617.
- Hassid W. Abraham S. 1957. Chemical procederes for analisis of Polysachharides, In: Methods in Enzymology, volume 3, New York: Academic press, 34-37.
- Hernandez Y., Rojas, J.I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R., 2004. Spasmolytic effects, mode of action and structure–activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products* 67, 160–167.
- Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A. 2005. Análisis of natural antioxidants by capillary electromigration methods; Institute of industrial fermentations; *J. Sep. Sci.*, 28, 883 – 897.
- Higgins, W. E.1998. "A reconsideration of the genus Prosthechea (Orchidaceae)". *Phytologia* 82: 370–383
- Horng-Huey Ko, Jing-Ru Weng, Lo-Ti Tsao, Ming-Hong Yen,Jih-Pyang Wangc and Chun-Nan Linb, 2004. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14,1011–1014
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
- Hunt J., Dean R, Wolff S. ( 1988) : Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes and aging. *Biochem J.* 256 : 205- 212.
- Iwata M., Kanekura T., Gushi A., and T. Kanzaki. 2006. Contact dermatitis due to orchids ( *Cymbidium and Oncidium*)*Journal of Dermatology* 2: 115- 117.

- Jaramillo, B. 2004. Estudio de la actividad antioxidante in vitro de aceites esenciales de plantas tropicales y compuestos nitrogenados sintéticos; Tesis de grado (Doctorado en química); Pág 147-169.
- Jiménez G. 2002 Separación e Identificación fitoquímica de los metabolitos activos de las especies de *Allium sativum* ( ajo ), *Cinamoum zeylanicum* (canela) y *Brassica oleraceae capitata* ( repollo) para el control del hongo *Botrytis cinerea* en *Rubus glaucus* ( mora castilla). Químico de Alimentos. UPTC. Tunja. Pag 22-24.
- Juneja. R., Sharma S., and Tandon J. 1984. A substituted 1,2 diarylethane from *Cymbidium giganteum*. *Phytochemistry*, vol 24, N° 2, pp. 321 – 324.
- Juneja. R., Sharma S., and Tandon J. 1986. Two substituted bibenzys and dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifollum* . *Phytochemistry*, vol 26, N° 4, pp. 1123 – 112.
- Kolhir, v. K., Bykov, V.A., Baginskaja, A.I., Sokolov, S. Y., Glazova, N.G., Leskova, T. E., Sakolich, G. S. 1996. Antioxidant activity of a dihydroquercetin isolated from *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. *Wood. Phytother. Res.* 10:478-482.
- Kong, J.M., Goh, N.K, Chia, L.S., Chia, T.F. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and Orchids. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 7–21.
- Lachance, P., Nakat, Z., y Jeong, W., 2001. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 17: 835–838.
- Langham, W. 1579. *The garden of health*. London, 123-126
- Lantto T , Dorman, H., Shikov A, Pozharitskaya O., Makarov V, Vladimir P. Hiltunen R. Raasmaja A. 2009 Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry* 112 936–943.
- Leong. Y., Kang C., Harrison L., Powell. A. 1996. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and Bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*, *Phytochemistry*, vol 44, N° 1, pp.157- 165.
- Lehninger 2002 *Principles of Biochemistry*. (3° Ed.). D.L. Nelson and M.M. Cox. Worth Pub.. New York. (2000). Edición en castellano. *Principios de Bioquímica*.
- Lindquist. N., Battiste. M., Whiten W., Williams N. and L. Strekowski. 1985. Trans carvone oxide, a monoterpene epoxide from the fragrance of *Catasetum*. *Phytochemistry*, 24, 4: 863 – 865.
- Iliyuchenok, T. Vu., Khomenko, A. I., Frigidova, L. M. (1975). Pharmacological and radio-protective properties of some  $\gamma$ -pyron derivatives (flavanones and flavanols). *Pharmacol Toxicol.* 38, 607-612

- Lock de Ugaz. OI. (1988). Investigación Fitoquímica. Métodos en estudio de productos naturales”. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial ISBN 84-89292-88-4, pp. 161-163, 183-213.
- López P., Rojano B., Echeverri T., 2007. Actividad antioxidante en musgos. Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo. UTP. ISSN 0122-1701
- Luscesoli F, Fraga CG. 1995. Evaluación del estrés oxidativo. Antioxidante y calidad de vida, 1:8-13
- Mabry, T.J. ; Markham, K.R.y Thomas, M.B. 1970. “The Systematic Identification of Flavonoids” Springer-Verlag, New York.
- Majumder P. I., Banerjee S., maiti. D ., and sen, S. 1995 Stilbenoids from the orchids *agrostophyllum callosum* and *coelogyne flaccida*, Phytochemistry, Vol. 39, No. 3, pp. 649-653.
- Manzanero M, G. I 1995. Estudio de siete raíces medicinales frescas del mercado de Sonora In : Tesis de Maestría en Ciencias Facultad de Ciencias, UNAM. Distrito Federal, México. pág
- Marcano, D; Hasegawa, M. 1991. Fitoquímica Orgánica. Universidad central de Venezuela.
- Martínez C, Galán P , Preziosi P, Ribas L, Serra LL, Hercberg Serge. 1998. Estudio suvimax (francia): El papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer y la enfermedad cardiovascular. Rev. Esp. Salud Publica, 72, 3 Madrid Mayo/Jun. . ISSN 1135-5727.
- Martín, G. J 2001. Etnobotánica : manual de métodos. WWF- UK, UNESCO, Royal Botanic Gardens, Kew and Nacional, Lottery Charities Borrada.
- Martínez – Alfaro M., Evangelista O., Mendoza C., Morales G., Toledo. O., y Wong L. 1995. Catalogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Cuadernos 27. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. D.F.
- Mendieta R., S. Del Amo R. 1981. Plantas medicinales del estado de Yucatán. Compañía Editorial Continental S. A. de C.V de México.
- Metz.S. 1984. Oxygenation products of arachidonic acid. Third messengers for insulin release. Prostaglandins 27: 147-151.
- Muñoz, A. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo de 2007. UTP. ISSN 0122-1701 125.
- Olsen, E.O 1990. “Metodos ópticos de análisis ”Ed. Reverte, Barcelona Pag 163 - 213.
- Pedrozo, J. 1999. Métodos de uso común en fotoquímica. Grupo de investigación Fitoquímica Universidad Javeriana. Pág 1-31.

- Peng Z.F., Strack D., Baumert A., Subramaniam R., Goh N.K., Chia T.F., Tan S.N., Chia L.S. 2003. antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*. 62: 219-228
- Pérez. G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*; 22(1).
- Pérez A. 2006. Importancia del efecto antioxidante en determinados deportes *Revista Digital - Buenos Aires - Año 11 - N° 96*.
- Pérez, R., Vargas S R. 2009a. Relaxant and antispasmodic effect in isolated guinea pig ileum treated with extracts of orchid *Prosthechea michuacana* . *Journal of Natural Medicines*, 63: 65- 68.
- Pérez, R., Vargas S R. 2009b. Hepatoprotective and inhibition of oxidative stress in liver of *Encyclia michuacana*. *Records of natural products* 3: 46 – 5.
- Pérez G. R., Vargas S. R. 2009c. Anti – inflammatory and wound healing potential of *Prosthechea michuacana* in rats. *Pharmacognosy magazine* se encuentra en prensa.
- Pérez G. R., Vargas S. R. 2009d. Antidiabetic activity of orchid *Prosthechea michuacana* in diabetic rats induced by streptozocin. *Journal Natural Remedies* se encuentra en revisión.
- Pérez G. R., Vargas S. R. 2009e. Studies on the constituents of the orchid *Prosthechea michuacana* bulbs and antioxidant activity. *Chemistry of natural compounds* se encuentra en revisión.
- Pinherio T.S., Johansson L., Pizzolatti M.G., and Biavatti M.W 2006. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forticata* Link. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volumen 41, Issue 2, 3: 431 – 436.
- Piñeros,J. 1988. Extractos Naturales de plantas medicinales. Fondo educativo universitario. Escuela de medicina Juan M Corpas. Bogotá, Orión Editores
- Pokorny, J. Janishlieva, N. Gordon, M. 2001. *Antioxidants in Food: Practical Applications*; CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Powers S, Lennon S. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceed Nutr Soc*; 58:1025-1033
- Prior, R., Wu, x., y Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 4290-4302.

- Puertas, M; Hillebrand, S; Stashenko, E; Winterhalter, P. 2002. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil; *Flavour Fragr. J.*; 17: pp 380-384.
- Reinikka, M.A. 1995. A history of the Orchid. Portland OR, Timber Press, pp. 246-249.
- Roginsky, V. and Lissi, E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235–254.
- Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S.; Radice, M. y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- Sánchez C., Larrauri, J y Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270-276.
- Snyder L. R. 1983 *High-Performance Liquid Chromatography C*. New York: Academic Press ed Horváth, Vol. 3.
- Shimura, H., Matsuura, M., Takada, N., Koda, Y. 2007. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry* 68, 1442-1447.
- Siegers, C.P., and Vounes, M. (1981). Effects of bioflavonoids on lipid peroxidation induced by glutathione depletion. *Proc Int. Bioflavonoid Symp.* 403-409. Akademia Kiado, Budapest.
- Silverstein, R.M., Bassier G.C., Morrill, C. Terence. 1991 "Spectrometric Identification of Organic Compounds. Fifth Edition. John Wiley & Sons, INC ISBN 0-47163404-2 pp. 91 -142, 165 -169, 227- 248.
- Singleton VL and Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Skoog, D.A. y West, D.M. 1989. "Análisis Instrumental" Ed. Mc Graw Hill, México.
- Soto- Arenas, M.A 1996. Mexico (Regional account). In: IUCN /SSC Orchid Specialist Group. Orchid. Status Survey and Conservation. Action Plan, IUCN. pp. 53 – 58.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M., 2006; Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants; *Food Chem*; 45; pp.1- 16.

- Suresh. K., Subramoniam A., Pushpangadan P. 2000. Aphrodisiac activity of *Vanda tessellata*. Hook. Ex. Don extract in male mice. *Indian Journal of Pharmacology* 32, 300- 304.
- Szlachetko, D. 2001. Genera et species *Orchidalium*. 1. *Polish Botanical Journal* 46: 11-26
- Téllez – Velasco, M. 2001. La etnobotánica de la familia Orchidaceae en México. Libro de resúmenes del IV Congreso Mexicano de etnobiología. Huejutla. Hidalgo.
- Tjukavkina, N. A., Rulenko, I. A., Kolesnik, Vu. A (1993). Confection of food stuffs with biologically active additives. Confection stuffs with dihydroquercetin as curative and prophylactic remedies. *Biotechnology and Management* 3-4, 36-39.
- Tovar – Gijón C. E, Hernández – Carlos B. , Bargeño – Tapia E., Cedillo – Portugal E. and P. Joseph- Nathan. 2006. A new C- Glycosylflavone from *Encyclia michuacana*. *Journal of Molecular Structure* 783, 26- 100.
- Torres de Young S. 1994. Introducción a la cromatografía, Editorial Universidad Nacional ISBN: 958-17-0119-2. pp 19-25, 69-93, 101-105.
- Torres. L, 1999. Plantas, curanderos y prospección biológica. *Ciencias*. 55-56: 54-60.
- Trease y Evans (1989) "Farmacognosia", 13ª edición, Interamericana-McGraw Hill.
- Turner, W. The first and seconde partes of the Herbal of William Turner, doctor in Phisick, lately oversene, corrected and enlarged with the Third Parte. Cologne, 1568 (original publication 1551).
- Turrens J. 1994. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidante y Calidad de Vida*; 1: 16-9.
- Van der Berg, C. (2001). "Nomenclatural notes on Laeliinae--III. Notes on *Cattleya* and *Quisqueya*, and a new combination in *Prosthechea*". *Lindleyana* 16 (3): 142, 143
- Vogel, A. 1991 Textbook of practical organic chemistry. Gran Bretaña, 5ª Edición.
- Vásquez, A 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia* *Scientia et Technica* Año XIII, ( 33).
- Vázquez. R., Ramón S., Concepción Á., Barreto E., Gerardo. J., Araújo. 2006. Dieta afro-bahiana, estrés oxidativa y ejercicio físico ISSN 1415-5273, *Rev. Nutr.* 19, (6), Campinas Nov./Dec.
- Whitton PD, Hems DA. 1975. Glycogen síntesis in perfused liver of streptozocin diabetic rats *Biochem J.* 150: 13-16.

- Villaseñor. J, 2003. Diversidad y distribución de las magnoliophyta de México. INCI, mar, 28, (3) : 160 – 167.
- Wiseman, A. 2005. Functional-food protected by biomonitoring of reactive oxygen species (ROS) *Trends in Food Science & Technology*. 16: 166-168.
- Williams A., Toscano B., Harbone A., Eaglesa J. and Watermand P. 1994 Methylated C- glycosylflavones as taxonomic markers in orchids of the subtribe ornithocephalinae. *Phytochemistry Volumen 37. Issue 4*: 1045 – 1053.
- Williams C. 1979. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry* 18, ( 5): 803 -813.
- Wohaieb S, Goldin D. 1987. Alteration in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin – induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 36: 1014- 1018.
- Yang, L., Wang, Z., Xu, L. 2006. Simultaneous determination of phenols (Bibenzyl, phenanthrene, and fluorene) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A* 1104, 230-237.
- Yegao. C., Yingliu 2008. Dendrone a new phenanthrene quinone from *Dendrobium cariniferum*, *Food chemistry*, 111 (1) p 11-12.
- Yizhong Cai, Qiong Luo, Mei Sun, Harold Corke 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74 , 2154 – 2184.
- Yokosawa T., Dong E., Wu Liu Z and Shimizu M. 1997. Antioxidant activity of flavones and Flavonols *In vitro*. *Phytotherapy Research*, Vol 11, 446-449.
- Zenteno R., Chávez R., Portugal D., Paez A., Lascurain R, and E. Zenteno. 1995. Purification of a specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Phytochemistry*, 40, (3): 651- 655.
- Zheng, W., Wang, S. 2001 Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp. 5165-5170.
- <http://www.answers.com/topic/bibenzyl>.
- [www.QuioRed.com.co](http://www.QuioRed.com.co)
- Victoria Kennedy. RN, A.D.A.M editorial. Definición de cromatografía [En línea] Actualizado 13 agosto 2003. >[Consulta: 25 Mayo 2009 <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002325.htm>> <<http://www.ub.es/biodel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>>
- Ruben Dario Cortez. Técnicas de separación, cromatografía. [En línea] Sección de La Red Latinoamericana de Química. Barquisimeto Lara 301. Última versión

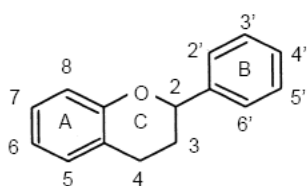
21 de enero de 1998.<<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.>>[Consulta: 25 de Mayo 2009).

- Álvaro Berenguer Berenguer Uso combinado de metiljasmonato y ciclodextrinas para aumentar la producción de resveratrol SGITT-OTRI (Universidad de Alicante) [http://www.ua.es/va/otri/areas/ttot/docs/Metiljasmonato\\_ciclodextrinas\\_espa%F1ol.pdf](http://www.ua.es/va/otri/areas/ttot/docs/Metiljasmonato_ciclodextrinas_espa%F1ol.pdf)
- Rodríguez D. 2008. Utilización de señales fluorescentes para el análisis y caracterización de vinos. mejora de la sensibilidad y selectividad mediante derivatización fotoquímica, Doctorado Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Universidad de Extremadura. España. 3 p. Consultado 30 de mayo de 2009 en la pagina [dialnet.unirioja.es/servlet/dfichero\\_articulo?codigo=2925911&orden](http://dialnet.unirioja.es/servlet/dfichero_articulo?codigo=2925911&orden)

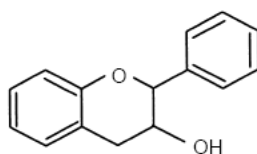


Anexo 1

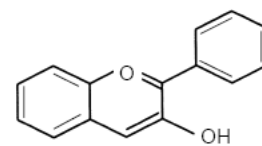
Flavonoides. Estructura básica y tipos.



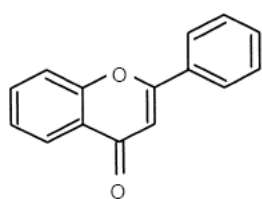
Flavonoide



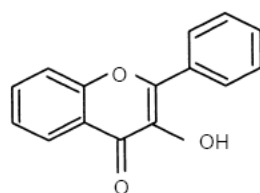
Flavanol



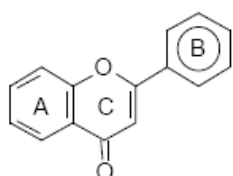
Antocianidina



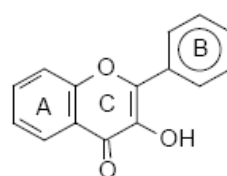
Flavona



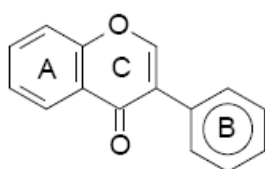
Flavonol



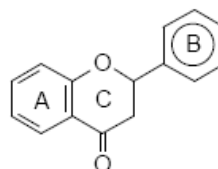
Flavonas



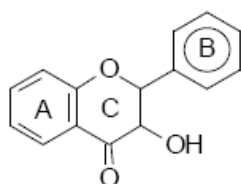
Flavonoles



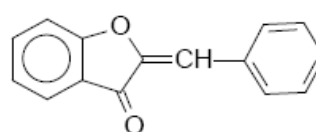
Isoflavonas



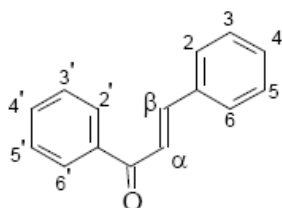
Flavanonas



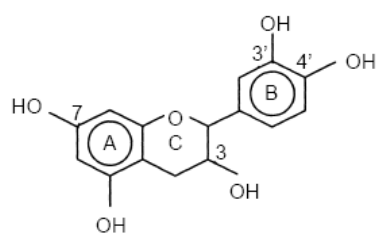
Dihidroflavonoles



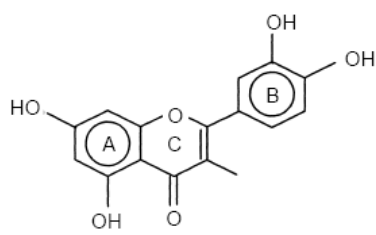
Auronas



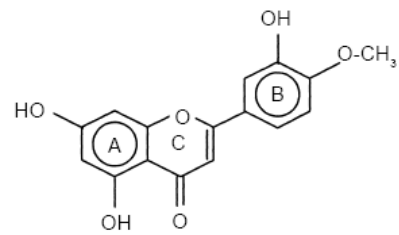
Chalconas



Catequina



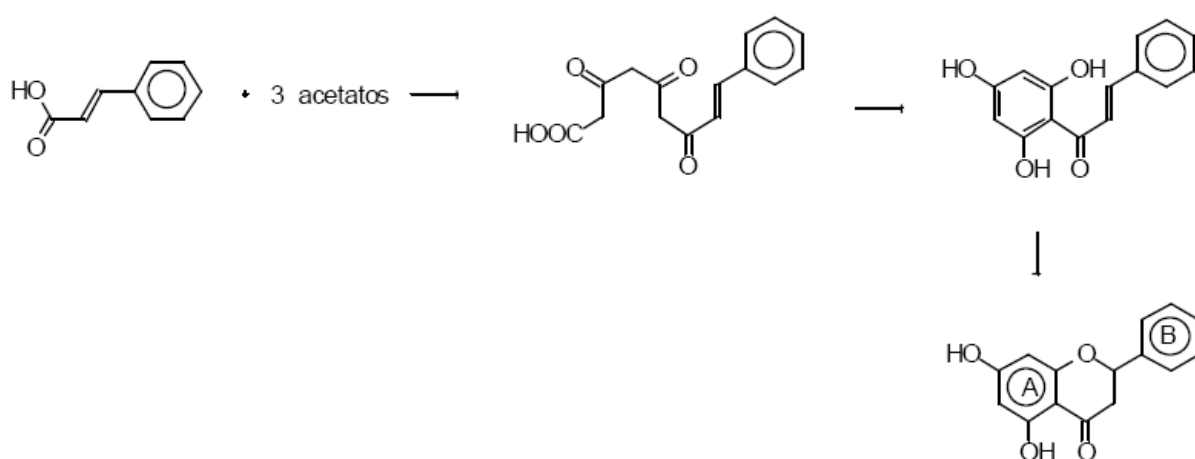
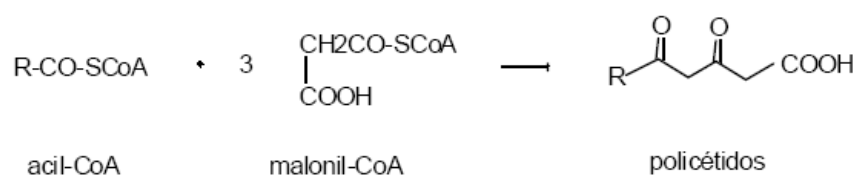
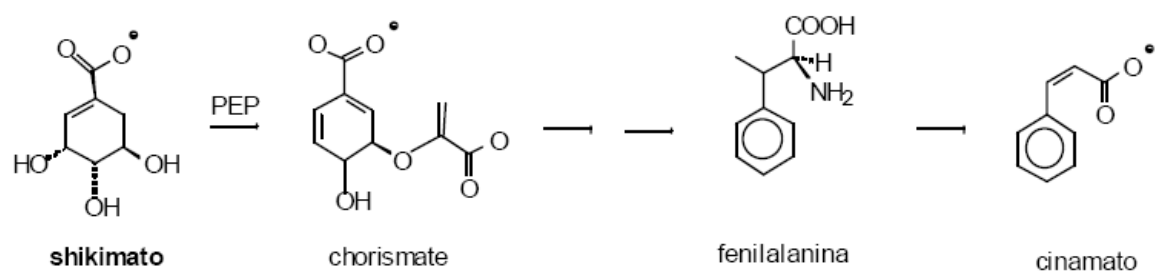
Quercitina



Diosmetina

*Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.*

## Anexo 2 Biosíntesis de los flavonoides



## Anexo 3

Eluyentes y los soportes utilizados para desarrollar los cromatogramas unidimensionales CCF, CC, CCFP y Sephadex LH20

ELUENTE	RELACIÓN V/V	SOPORTE	ELUENTE	RELACIÓN V/V	SOPORTE
CHCl <sub>3</sub>		Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : MeOH	10: 0.5, 8:2, 8: 1, 10: 0.3, 10: 1, 9.5 : 0.5, 9: 1, 7: 1	Silica gel
AcOEt		Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : MeOH: Mc <sub>2</sub> CO	7: 1: 3, 4: 1: 0.5, 6: 1:1, 8:2:2, 1:1:5, 9.5:0.5:0.5,	Silica gel
Et <sub>2</sub> O		Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O	7: 1, 3: 1, 8:1, 2:1	Silica gel
Hex		Silica gel	MeOH: Mc <sub>2</sub> CO	4: 1	Silica gel
Mc <sub>2</sub> CO		Silica gel °	EtOH: Hex: CHCl <sub>3</sub>	0.5: 3: 9, 1:6:18	Silica gel °
EtOH		Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : MeOH: Et <sub>2</sub> O	8: 2:0.5., 8:1:0.5, 8: 0.5: 0.5, 9:1:0.5, 6:1:0.5, 8:1.5:0.5, 7:0.5:1	Silica gel
MeOH		Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O : Mc <sub>2</sub> CO	7:1:0.5, 3:1:0.5	Silica gel
CHCl <sub>3</sub> : Mc <sub>2</sub> CO	7: 1, 8:1, 8:2, 7:0.5, 7:2	Silica gel	AcOET: Et <sub>2</sub> O	7: 1, 8:1, 1:1	Silica gel
CHCl <sub>3</sub> : AcOET	7: 1, 12: 2, 3:1	Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : AcOET: Mc <sub>2</sub> CO	7: 1:0.5	Silica gel
AcOET: TO	7: 3	Silica gel	Hex: Mc <sub>2</sub> CO	1.3, 5:1, 5:2, 1:1	Silica gel

ELUENTE	RELACIÓN V/V	SOPORTE	ELUENTE	RELACIÓ N V/V	SOPORTE
CHCl <sub>3</sub> : AcOEt: Et <sub>2</sub> O	1:1:0.5	Silica gel	Hex : MeOH	8:1, 2:1	Silica gel
CHCl <sub>3</sub> : MeOH: Hex	7: 1:1, 7:1:2, 7:1: 2.5, 7.5:1:2, 7.5:1:2.5, 7:1:3, 8:1:1, 8:1:2, 8:1:1.5, 8:1:0.5, 6.1:0.5, 6:1:1	Silica gel	Eter isopropilico: CHCl <sub>3</sub>	7: 1, 7:3	Silica gel
Mc <sub>2</sub> CO: MeOH: Hex	1:1:6, 1:1:4	Silica gel	Eter isopropilico: CHCl <sub>3</sub> : Mc <sub>2</sub> CO	7: 1:1, 7:1:2	Silica gel
AcOET: Hex	125: 25	Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O	6:7	Silica gel
CHCl <sub>3</sub> : Mc <sub>2</sub> CO: Hex	7: 1:1.5, 7:1:1, 7:2:1	Silica gel <sup>o</sup>	MeOH		Sephadex
Hex: MeOH	7: 1, 8:3	Silica gel	CHCl <sub>3</sub>		Sephadex
1.2 dicloroetano	7: 3	Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O: Hex	4:1:1	Silica gel
Eter isopropilico	7: 3	Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : MeOH: Hex	7: 2:5	Silica gel
CHCl <sub>3</sub> : Mc <sub>2</sub> CO	1:8, 1.5:9, 4:9, 6:9,	Silica gel	Mc <sub>2</sub> CO: Et <sub>2</sub> O : Hex	3:1:0.5, 7:1:0.5	Silica gel
Mc <sub>2</sub> CO: CHCl <sub>3</sub> : Hex	9:1:3, 2:1:7	Silica gel	CHCl <sub>3</sub> : MeOH: Hex: Mc <sub>2</sub> CO	7: 2:3:0.5	Silica gel

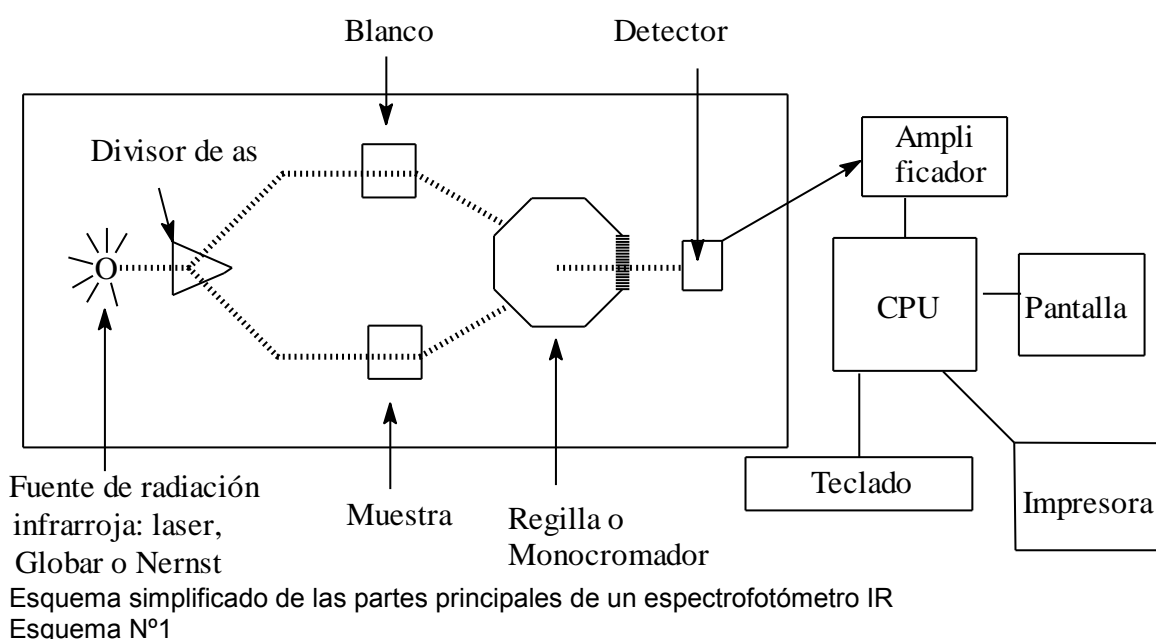
## Anexo 4

## EL ESPECTROFOTÓMETRO IR.

Un espectrofotómetro clásico y ampliamente difundido, son los de “**doblo as**”. Ellos están configurados con los siguientes componentes:

- 1.-Una fuente de radiación.
- 2.-Un portamuestra y blanco.
- 3.-Una rejilla o monocromador.
- 4.-Un detector.
- 5.-Un CPU con pantalla, impresora y teclado lo que permite fácilmente ampliar o reducir zonas específicas del espectro.

El diagrama de un instrumento IR clásico puede verse más abajo.



1.-La fuente de radiación IR puede contener un láser (He-Ne) en los equipos modernos, o una cerámica contaminada con óxidos de Zirconio, Torio y Cesio, conocida como filamento de Nernst. Esta cerámica es calentada eléctricamente hasta 1000-1800 °C. Otra fuente de radiación es el Globar, que es una pequeña esfera de carburo de silicio, que al ser calentada al igual que la anterior, emite una radiación de amplio espectro que va desde los 5500  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 600  $\text{cm}^{-1}$ . El Nernst en cambio, muestra un espectro de energía o frecuencia que va desde 7100  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 550  $\text{cm}^{-1}$ . Estos rangos de frecuencia son más que suficiente para los espectroscopistas orgánicos. Ellos

necesitan el rango que va desde los  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta los  $650\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente.

2.- El porta-muestra, puede ser según el propósito, para aceptar gases, líquidos y sólidos. En gases, las celdas disponibles tienen entre 10 y 40 cm de longitud y los espectros en estos casos son el resultado del paso, a través de la celda con múltiples reflexiones, de manera que, en realidad la luz ha recorrido muchas veces la longitud de la celda antes de llegar al detector. De los líquidos pueden ser obtenidos los espectros en ya sea compuestos puros o en soluciones diluidas de aquellos. Los líquidos puros se colocan entre dos placas de bromuro de sodio (se pueden lograr espesores de hasta 0,01 mm o menores) Las soluciones diluidas son colocadas entre dos ventanas de cloruro de sodio o bromuro de sodio, rodeadas de anillos espaciadores que delimitan las celdas espectroscópicas a algunas fracciones de milímetro de espesor. En estos casos deben ser muy bien seleccionados los solventes a utilizar. El  $\text{CCl}_4$  y el  $\text{CS}_2$  son complementarios en estas tareas. Ambos solventes son invisibles en regiones sobre los  $1333\text{ cm}^{-1}$  para el  $\text{CCl}_4$  y bajo los  $1333\text{ cm}^{-1}$  para el  $\text{CS}_2$ . Pueden hacerse muchas combinaciones de solventes que cubran diferentes ventanas entre los  $4000\text{ cm}^{-1}$  y los  $600\text{ cm}^{-1}$ . (Ventana es aquella porción del espectro IR, en el cual el solvente tiene una muy baja absorción de radiación, es decir, es transparente a la radiación infrarroja).

<b>SOLVENTE</b>	<b>Región no útil <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Región no útil <math>\text{cm}^{-1}</math></b>
$\text{CHCl}_3$	600-820	1175-1250
$\text{C}_2\text{Cl}_4$	750-950	
$\text{C}_6\text{H}_6$ benceno	600-750	3000-3100
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	600-820	1200-1300
ACETONA	1100-1850	2800-3000
DMSO	900-1100	
TOLUENO	600-750	2800-3200

En todos los casos las paredes del contenedor de la muestra deben ser transparentes a todo el rango de la radiación ( $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ). Esto se consigue con ventanas hechas de cristales de Bromuro o Cloruro de sodio.

3.- La rejilla o monocromador es un espejo reticulado que equivale a un prisma capaz de descomponer el espectro de la radiación en sus diferentes longitudes de onda. Este dispositivo junto a otros dispositivos conocidos como eslits (ventanas de abertura variable) permiten seleccionar y examinar la energía radiante de diferentes longitudes de onda que ha pasado por la muestra.

4.-El detector. Es otro componente importante en la configuración de un espectrofotómetro IR. Mide la energía radiante residual que emerge de la muestra y la compara con aquella que proviene de la celda llamada blanco (que no contiene sustancia problema, solo contiene el solvente en el caso de una muestra en solución, o bien, bromuro o cloruro de sodio como blanco para las muestras de líquidos puros o sólidas) Esta diferencia de energía se mide

con una termocupla que tiene la propiedad de traducir las diferencias de intensidad de la radiación que sale de la muestra en impulsos eléctricos.

5.- El graficador o impresora traduce a un gráfico las diferencias encontradas por el detector, colocando en la absisa el rango de longitudes de onda barrido por el instrumento y en la ordenada la intensidad de la absorción del as emergente de la muestra problema.

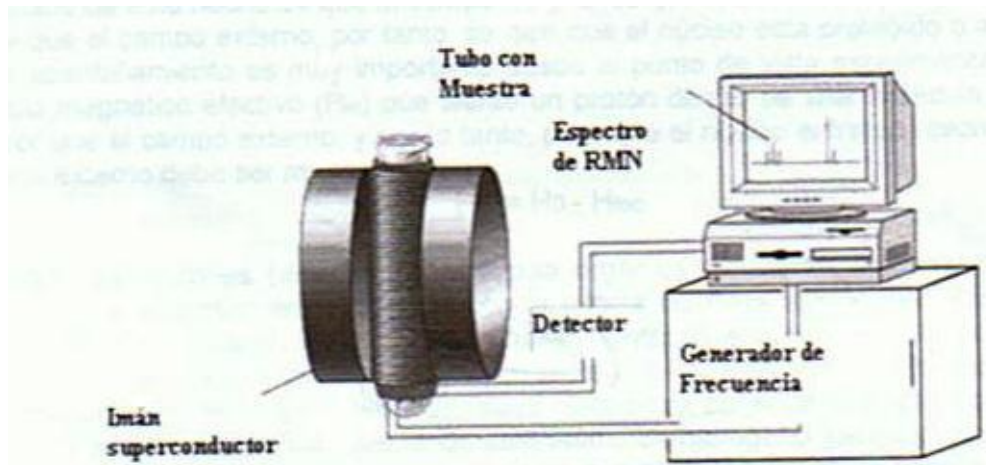
El equipo utilizado en la actualidad, no posee red de difracción o de primas, utilizan un interferómetro que produce el fenómeno de la interferencia de la luz. En estos instrumentos la luz proveniente de la fuente llega a un interferometro que genera el interferograma de la fuente, el cual al incidir sobre la muestra y producirse absorción de radiación por parte de esta, permite obtener el interferograma de la muestra, esta señal analítica es detectada y amplificada. El interferograma corresponde a la medida de la intensidad de la luz transmitida en función del tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a la frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT – IR).



## Anexo 5.

### Espectrómetro de resonancia magnética nuclear

A continuación, se muestra de forma esquemática los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear.



Como se observa, el espectrofotómetro de RMN consta de cuatro partes:

1. Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso
2. Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
3. Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencias de la muestra.
4. Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

## Anexo 6

## Glosario

- ❖ *Cromatografía*. La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.
- ❖ *Cromatógrafo*. El instrumento empleado para realizar una separación cromatográfica.
- ❖ *Cromatógrama*. Una gráfica u otro tipo de presentación de la respuesta de un detector, la concentración de un analito en el efluente u otra magnitud usada como medida de la concentración en el efluente, frente al volumen de efluente o al tiempo. En la cromatografía plana, "cromatógrama" puede referirse al papel o capa con las zonas separadas.
- ❖ *Cromatografía Frontal*: Procedimiento en el que la muestra (líquida o gaseosa) se alimenta de forma continua al lecho cromatográfico. No se utiliza ninguna fase móvil adicional
- ❖ *Cromatografía de Desplazamiento*: Procedimiento en el cual la fase móvil contiene un compuesto (el desplazante) que es retenido más fuertemente que los componentes de la muestra analizada. La muestra se alimenta al sistema en forma discreta, como una pequeña cantidad en un intervalo breve.
- ❖ *Cromatografía de Elución*: Procedimiento en el que la fase móvil se pasa de forma continua a través o a lo largo del lecho cromatográfico y la muestra se suministra al sistema de forma discreta, como una pequeña cantidad en un tiempo breve.
- ❖ *Cromatografía en Columna*: Técnica de separación en la que el lecho estacionario está contenido dentro de un tubo. Las partículas de fase estacionaria sólida, o de soporte recubierto con una fase estacionaria líquida, pueden llenar por completo el tubo (Columna Empaquetada) o estar concentradas sobre o a lo largo de su pared interna, dejando una ruta abierta, no restringida, para el paso de la fase móvil por el centro del tubo (Columna Tubular Abierta).
- ❖ *Fase Ligada*. Una fase estacionaria que está unida de forma covalente a las partículas de soporte o a la pared interior de la columna.
- ❖ *Fase Inmovilizada*. Una fase estacionaria que está inmovilizada sobre las partículas del soporte o sobre la pared interior de la columna, por ejemplo por polimerización in situ (entrecruzamiento químico) tras un recubrimiento
- ❖ *Fase Móvil*. Fluido que se filtra a través o a lo largo del lecho estacionario, en una dirección definida. Puede ser un líquido (Cromatografía Líquida), un gas (Cromatografía de Gases) o un fluido supercrítico (Cromatografía con Fluido Supercrítico). En la cromatografía de gases se puede usar la expresión Gas Portador para la fase móvil. En la cromatografía de elución se usa también para la fase móvil la expresión Eluyente.
- ❖ *Eluir*. Aplicar la cromatografía de elución. El proceso de elución se puede detener mientras todos los componentes de la muestra están aún

en el lecho cromatográfico, o continuarse hasta que lo hayan abandonado. Nota: Se prefiere el término "Eluir" a "Desarrollar", término usado en nomenclaturas anteriores de cromatografía plana.

- ❖ *Efluente*. La fase móvil que abandona la columna.
- ❖ *Muestra*. Mezcla consistente en cierto número de componentes, cuya separación se pretende en el lecho cromatográfico al ser arrastrados o eluidos por la fase móvil.
- ❖ *Componentes de la Muestra*. Los constituyentes químicamente puros de la muestra. Pueden no ser retenidos por la fase estacionaria (es decir, no retardados), retenidos parcialmente (es decir, eluidos a tiempos diferentes) o retenidos permanentemente. Se aceptan también los términos Eluito y Analito para un componente de la muestra

De: Valentina I. Vinogradova  
Para: mmpg  
Fecha: 29/03/2009 23:40  
Asunto: Re: article

---

Texto:

Dear Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez ,

Your article has been received by the editor of the journal "Khimiya Prirodnikh Soedinenii".  
Registration number is 104.09.

The decision about publishing your article will be made after the review in the meeting of  
Editorial Board.

Please, specify further registration number of your article.

Any contribution submitted to "Khimiya Prirodnikh Soedinenii" ("Chemistry of Natural  
Compounds") are normally published within 18-24 months. Provided the manuscripts come  
within the scope of the journal.

Kind regards,  
Responsible Secretary  
Dr. V. I. Vinogradova

----- Original Message -----

From: mmpg  
To: cnc  
Sent: Sunday, March 29, 2009 9:38 PM  
Subject: article

Editorial Board of Chemistry of Natural Compounds  
Prospekt Kh. Abdullaeva 77  
Tashkent 700170  
Uzbekistan

I am sending you the article "STUDIES ON THE CONSTITUENTS OF THE  
ORCHID *Prosthechea michuacana* BULBS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY"  
which we would like to publish in your Journal of Chemistry of Natural  
Compounds.

Very truly yours

Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez

---

Documento(s) adjunto(s)