

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
**“AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA
Bauhinia variegata L. BIODIRIGIDO POR ENSAYOS DE INHIBICION SOBRE LA
ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATASA”.**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el Br. Luis
Daniel Ávila Fernández para optar al
título de Licenciado en Química.

Tutores: Dr. Masahisa Hasegawa

Dr. Freddy González-Mujica

Caracas, Octubre de 2008

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la *Bauhinia variegata* L. biodirigido por ensayos de inhibición sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa". Presentado por el Br. Luis Daniel Avila Fernández, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química.

Dr. Masahisa Hasegawa
Tutor

Dr. Freddy González-Mujica
Tutor

Dra. Alírica Suárez
Jurado Principal

Dr. Carlos Márquez
Jurado Principal

Agradecimientos

Primeramente a Dios por permitirme llegar hasta donde hoy en día me encuentro.

Seguidamente a mi madre y a mi tía Ines sin las cuales no habría llegado a ningún lado gracias a su apoyo incondicional, su ayuda e inspiración.

Muy especialmente quisiera dedicar este trabajo a quien en vida fue una excelente persona, buen amigo y ejemplo a seguir.. Tío Francisco este logro va por ti!

A mis tutores Dr. Masahisa Hasegawa y Dr. Freddy González-Mujica por su gran orientación a lo largo del desarrollo de este proyecto, mil gracias.

A todo mi grupo de Trabajo.. Jairo, Luis C., Alba, Diana, Gabriela, Elsy, la Prof. María Rodríguez, y a mi gran amigo Willy, Gracias!!

Creo que colocar a la gran cantidad de personas en este espacio sería olvidar alguna.. sin embargo quiero agradecer a todos y cada uno de mis amigos.. los que me acompañaron en este camino durante este tiempo de carrera y carreras! De verdad no hay palabras para agradecerles por su compañía, apoyo y amistad les quiero.

“AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA *Bauhinia variegata* L. BIODIRIGIDO POR ENSAYOS DE INHIBICION SOBRE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATASA”

Autor: Luis D. Ávila

Resumen

En actualidad continúan siendo numerosos los aportes de compuestos aislados de fuentes naturales para ensayar su actividad sobre enzimas que controlen alguna función en el organismo, por ejemplo la regulación de la liberación de glucosa es importante en el control de la diabetes.

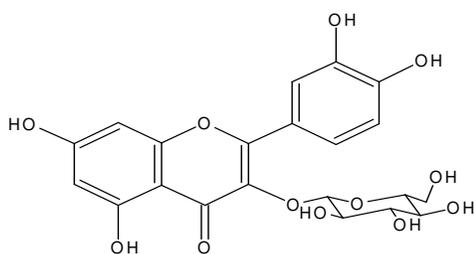
En este trabajo se realizó un estudio fitoquímico y biológico que permitiera separar fracciones y/o compuestos de la especie *Bauhinia variegata* L, para posteriormente ensayar su actividad en la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa, que es la enzima catalizadora del paso final en los mecanismos de glucogenolisis y gluconeogenesis, que se conocen son los responsables de la liberación de glucosa al torrente sanguíneo, en períodos de ayuna.

Para ello se realizó el tratamiento del material vegetal de la *Bauhinia variegata* L. directamente con metanol, y luego éste extracto resultante se sometió a partición con una mezcla metanol-agua 1:1, seguidamente de partición con acetona, tanto para la fracción soluble e insoluble correspondientes a la mezcla de solventes. De esta doble partición se obtienen cuatro fracciones, **A-D** (**A:** i metanol-agua i acetona, **B:** i metanol-agua s acetona, **C:** s metanol-agua i acetona, **D:** s metanol-agua s acetona) a las que se les evaluó la actividad inhibitoria sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa. La fracción que presentó mayor actividad inhibitoria sobre el transportador T1 fue la **D** (79,4 %), por esta razón fue seleccionada para la separación con los métodos cromatográficos disponibles (cromatografía en contracorriente, seguida por

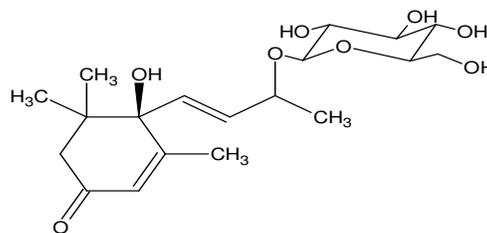
TLC, y cromatografía en columna). A las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía en mayor cantidad se les realizó el análisis químico de sus componentes con las técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , y RMN ^{13}C , con esto se pudo definir la estructura de dos compuestos puros aislados no reportados hasta la fecha en la planta: un flavonoide **1**, isoquercetina y una ionona **2**, [(+)-(6S,9R)-9-O- β -D-glucosido-6-hidroxi-3-oxo- α -ionol].

Adicionalmente, se obtuvieron diversas fracciones cuya composición no se logro definir en su totalidad por la poca separación de sus componentes que se alcanzó, sin embargo se logró detectar la presencia de un compuesto que pudiera ser una estructura tipo flavonoidal, y no se logró la elucidación de la estructura de el porque pertenecía a una mezcla y por la poca cantidad que se obtuvo para realizar otros experimentos adicionales, que permitieran su caracterización.

Es interesante resaltar el hecho de que la mayoría de los compuestos reportados en el genero *Bauhinia* con actividad hipoglicemiante, correspondan a estructuras de tipo flavonoidal, y en este trabajo se logró aislar de la *Bauhinia Variegata* una ionona **2** que presentó mayor actividad inhibitoria sobre la enzima G-6-Pasa, que el otro compuesto aislado de estructura flavonoidal **1**.



(1)



(2)

Índice General

	Pág.
Introducción.....	1
1. Revisión Bibliográfica	
1.1. Metabolismo de la Glucosa y la Diabetes Mellitus.....	3
1.2. Sistema de la Glucosa-6-Fosfatasa.....	9
1.3. Descripción de la Planta <i>Bauhinia variegata</i> L.....	11
1.4. Antecedentes Fitoquímicos y Biológicos en el Género <i>Bauhinia</i>	13
1.4.1. <i>Bauhinia candicans</i>	14
1.4.2. <i>Bauhinia forficata</i>	16
1.4.3. <i>Bauhinia megalandra</i>	17
1.4.4. <i>Bauhinia variegata</i>	19
1.5. Los Flavonoides y sus propiedades.....	21
2. Objetivos	
2.1. General.....	27
2.2. Específicos.....	27
3. Metodología Experimental	
3.1. Material Vegetal.....	28
3.2. Materiales y equipos.....	29
3.2.1. Bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-Fosfatasa.....	29
3.2.2. Métodos Cromatográficos.....	29
3.3. Ensayos de inhibición de la Glucosa-6-Fosfatasa.....	31
3.3.1. Preparación de los microsomas.....	32
3.3.2. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa.....	32
3.3.3. Determinación de proteínas.....	36
4. Resultados y Discusión.....	37
4.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos A, B, C y D.....	37
4.2. Separación de la Fracción D por HSCC.....	38
4.3. Separación de las fracciones FD45-61, FD62-85, FD86-87 y FDFE..	40

4.3.1. Separación de la fracción FD45-61	40
4.3.2. Separación de la fracción FD62-85.....	41
4.3.3. Separación de la fracción FD86-87.....	43
4.3.4. Separación de la fracción FDFE.....	43
4.4. Resultados biológicos de los componentes aislados.....	45
4.5. Resultados Fitoquímicos.....	47
4.5.1. Compuesto A.....	47
4.5.2. Compuesto B.....	50
4.5.3. Compuesto FD86-87Fr5-7.....	55
4.5.4. Compuesto FDFEFr1-7.....	57
5. Conclusiones.....	59
6. Recomendaciones.....	61
7. Bibliografía.....	62
8. Apéndice.....	67

Índice de Espectros

	Pág.
• Espectro 1. Espectro RMN ^1H del compuesto A, tomado MeOH- d_4 ...	67
• Espectro 2. Ampliación de la región de campo alto-intermedio del espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para el compuesto A.....	68
• Espectro 3. Ampliación de campo alto del espectro RMN ^1H , tomado en MeOH- d_4 para el compuesto A.....	69
• Espectro 4. Espectro RMN ^{13}C tomado en MeOH- d_4 para el compuesto A.....	70
• Espectro 5. Espectro ^{13}C -DEPT tomado MeOH- d_4 para el compuesto A.....	71
• Espectro 6. Espectro ^{13}C -DEPT tomado MeOH- d_4 para el compuesto A.....	72
• Espectro 7. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para el compuesto B.....	73
• Espectro 8. Ampliación de la región de campo bajo del espectro de RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para el compuesto B.....	74
• Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C tomado en MeOH- d_4 para el compuesto B.....	75
• Espectro 10. Espectro RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOH- d_4 para el compuesto B.....	76
• Espectro 11. Espectro RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOH- d_4 para el compuesto B.....	77
• Espectro 12. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7.....	78
• Espectro 13. Ampliación del espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7 en la zona de campo bajo.....	79
• Espectro 14 Espectro RMN ^{13}C tomado en MeOH- d_4 para la mezcla	80

FD86-87Fr5-7.....	
• Espectro 15. Espectro RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7.....	81
• Espectro 16. Espectro RMN ^{13}C , ampliación para la zona comprendida entre 50 y 80 ppm, tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7	82
• Espectro 17. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FDFEFr1-7.....	83
• Espectro 18. Ampliación del espectro RMN ^1H en la zona de campo bajo, tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FDFEFr1-7.....	84
• Espectro 19. Ampliación del espectro RMN ^1H en la zona de campo alto, tomado en MeOH- d_4 para la mezcla FDFEFr1-7.....	85

Índice Tablas

	Pág.
• Tabla 1. Preparación de los sustratos.....	34
• Tabla 2. Resultados de actividad de los extractos obtenidos de <i>Bauhinia variegata</i> L. sobre la enzima G-6-Pasa.....	37
• Tabla 3. Resultados de actividad de los compuestos aislados de la fracción D proveniente del extracto metanólico de la <i>Bauhinia variegata</i> L. sobre la enzima G-6-Pasa.....	45
• Tabla 4. Comparación entre la Ionona reportada y el compuesto aislado.....	49
• Tabla 5. Datos comparativos de la Quercetina-3-O- β -glucosido con el compuesto aislado.....	54

Índice de Figuras y Esquemas

	Pág
• Figura 1. Principales vías para la producción de glucosa en ayunas..	5
• Figura 2. Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo.....	6
• Figura 3. Sistema de la glucosa-6-fosfatasa.....	10
• Figura 4. Bandera de Hong Kong, flor de la <i>Bauhinia blakeana</i> estilizada.....	12
• Figura 5. Arbol <i>Bauhinia variegata</i> L. Ciudad Universitaria, Julio 2007	13
• Figura 6. Hoja de <i>Bauhinia</i>	13
• Figura 7. Flor de <i>Bauhinia</i>	13
• Figura 8. Biosíntesis de Flavonoides.....	22
• Figura 9. Carbono carbonílico conjugado.....	48
• Figura 10. Acoplamientos en el anillo B.....	51
• Figura 11. Acoplamientos en el anillo A.....	51
• Figura 12. Estructura preliminar del Flavonoide.....	52
• Figura 13. Quercetina-3-O- β -glucosido.....	53
• Figura 14. Acoplamientos en el anillo A para el Flavonoide propuesto	55
• Figura 15. 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O- α -rhamnosido- β -glucosido....	56
• Figura 16. Naringenina.....	57
• Figura 17. Posible fragmento estructural propuesto para el flavonoide encontrado.....	58
• Esquema 1. Método de extracción sobre hojas de <i>Bauhinia variegata</i> L.....	28
• Esquema 2. Procedimiento para la obtención de microsomas.....	33
• Esquema 3. Esquema general de la enzima G-6-Pasa.....	34
• Esquema 4. Procedimiento para la determinación de proteínas.....	36
• Esquema 5. Separación de la fracción D por HSCCC.....	39
• Esquema 6. Proceso de purificación de la fracción FD45-61.....	41
• Esquema 7. Proceso de separación de la fracción FD62-85.....	42

• Esquema 8. Proceso de purificación de las fracciones FD86-87 y FDFE.....	44
---	----

Introducción

El hombre desde el comienzo de su existencia se ha visto en la necesidad de procurarse alimentos y medicamentos en pro de su bienestar, como consecuencia a eso, surgió el uso de las plantas, unas como alimento y otras como medicina, lo cual hoy en día no ha dejado de ser una realidad siendo esto parte de la cultura popular mundial incluyendo la venezolana.

La búsqueda de fármacos de origen vegetal ha sido el trabajo de miles de personas a lo largo de décadas enfocándose así en la actividad mostrada sobre diversas afecciones tales como trastornos cardíacos, digestivos, cáncer, artritis, diabetes, infecciones entre otras, teniendo muy buenos resultados y logrando grandes avances en el tratamiento de dichas enfermedades muchas de estas consideradas como crónicas.

Organizaciones a nivel mundial se han encargado a través de los años de divulgar información y prestar ayuda en el tratamiento de varias de las enfermedades mencionadas, incluso generan datos estadísticos de las personas afectadas para una determinada fecha y las proyecciones a futuro. Valores que perfilan posibles enfermedades como blancos claves para las investigaciones científicas^[1].

La diabetes es una de estas enfermedades crónicas, la Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que:

- Se calcula que en el mundo existe más de 180 millones de personas con diabetes y es probable que esta cifra aumente a más del doble para el 2030.
- Se calcula que en el 2005 hubo 1,1 millones de muertes debidas a la diabetes, estas sin contar las muertes registradas como cardiopatía o insuficiencia renal como consecuencia de

la diabetes, de contarlas el valor sería aproximado a 2,9 millones de muertes atribuidas a la diabetes.

- . Aproximadamente un 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos o medios.

- . Casi la mitad de las muertes ocurren en pacientes menores a 70 años, 55% de los cuales son mujeres.

- . Se calcula que las muertes por diabetes aumentarían en un 50% en los próximos 10 años de no tomarse medidas urgentes, entre el 2006 y el 2015 aumentarían en más de un 80% en países de ingresos medios-altos^[2].

Estos datos son alarmantes para la comunidad científica por lo cual los investigadores dedican sus esfuerzos en encontrar nuevos y mejores medicamentos para su tratamiento.

En Venezuela por ejemplo se ha realizado el estudio de la *Bauhinia megalandra*, planta de uso popular en el control de esta enfermedad, encontrándose que las partes aéreas (principalmente las Hojas) presentaron efecto hipoglicémico atribuido a la presencia de algunos flavonoides encontrados en esta especie^{[3],[4]}.

Los flavonoides son compuestos de creciente interés debido a su efecto antioxidante, como agentes antimicrobiales, fotoreceptores, agentes quelantes de metales y como ya se mencionó algunos encontrados con efecto hipoglicémico^[5].

El estudio de esta familia de plantas (*Bauhinia*) ha de ser interesante, debido a las propiedades medicinales mostradas en varias de las especies estudiadas hasta el momento, su abundancia en nuestro territorio y los compuestos químicos aislados, lo cual es en efecto el motivo principal de el presente trabajo.

1. Revisión Bibliográfica.

1.1. Metabolismo de la Glucosa y La Diabetes Mellitus

Metabolismo de la glucosa.

La suma de todas las reacciones químicas necesarias para mantener la vida se denomina metabolismo, estas reacciones se llevan a cabo en el interior de la célula. Estas liberan energía aprovechable descomponiendo a la glucosa en compuestos más sencillos y capturando parte de la energía liberada en forma de ATP. Una de las vías de la degradación de glucosa es la glucólisis, en la que la molécula de glucosa con seis átomos de carbono por la acción de diferentes enzimas se convierte en dos moléculas de piruvato en presencia de oxígeno, y en dos de lactato en ausencia de éste.

Las células pueden obtener energía también de otras moléculas distintas de la glucosa, por ejemplo otros monosacáridos, grasas y proteínas.

El proceso de captación de glucosa por las células es regulado por las hormonas secretadas por el páncreas, el cual posee tanto una función endocrina como exocrina. Exocrinamente libera enzimas al tracto digestivo, mientras que endocrinamente se secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo para coordinar y regular el uso de la glucosa.

Las células endocrinas están agrupadas dentro de los islotes de Langerhans, que son pequeños grupos celulares esferoidales compactos entre el tejido exócrino. Existen cuatro tipos principales de células endócrinas. Las α (o A o A2) que secretan glucagon, las β (o B) que secretan insulina y también un antagonista de la insulina denominado amilina, y constituyen la mayoría de células en el islote, las δ (o D o A1) que secretan somatostatina y las PP (o F) que secretan el polipéptido pancreático.

La insulina y el glucagón son las hormonas más responsables en el control de los niveles de glucosa en sangre, juntas ayudan a mantener casi constante este nivel. Cuando el nivel de glucosa en sangre se eleva, (debido por ejemplo a la ingesta de alimento), se libera la insulina, que es la responsable de que las células del cuerpo absorban la glucosa es decir facilita el paso de la glucosa desde la sangre a las células, por medio la proteína transportadora Glut 4, la glucosa después de entrar a la célula, se convierte en un compuesto llamado glucosa -6- fosfato por medio de la acción de una enzima que dependiendo del sitio de absorción puede ser la hexoquinasa o la glucoquinasa, la glucosa-6-fosfato después de varias reacciones, se convierte en bióxido de carbono y agua, obteniéndose energía química en el proceso (reacción de degradación), que representa al combustible requerido por el organismo. La insulina, acelera la reacción de la glucoquinasa, o neutraliza el efecto de otra hormona que esté inhibiendo a la glucoquinasa. La glucosa desaparece rápidamente hacia el interior de la célula, y es necesario que nuevas moléculas de glucosa difundan hacia la sangre a la misma velocidad. O bien activa el proceso de glucogenogénesis de manera de almacenar glucosa en forma de glucógeno para su uso en ayuno. Si los niveles de glucosa en la sangre son bajos se libera el glucagón el cual es una hormona que estimula al hígado, para que éste, libere glucosa al torrente sanguíneo sea por vía gluconeogénesis o vía glucogenólisis^{[6],[7]}, ambos caminos en su fase final están catalizados por la acción de una enzima (glucosa -6- fosfatasa), que se encarga de degradar a la glucosa-6-fosfato proveniente de ambas vías a glucosa y fosfato inorgánico (ver figura 1).

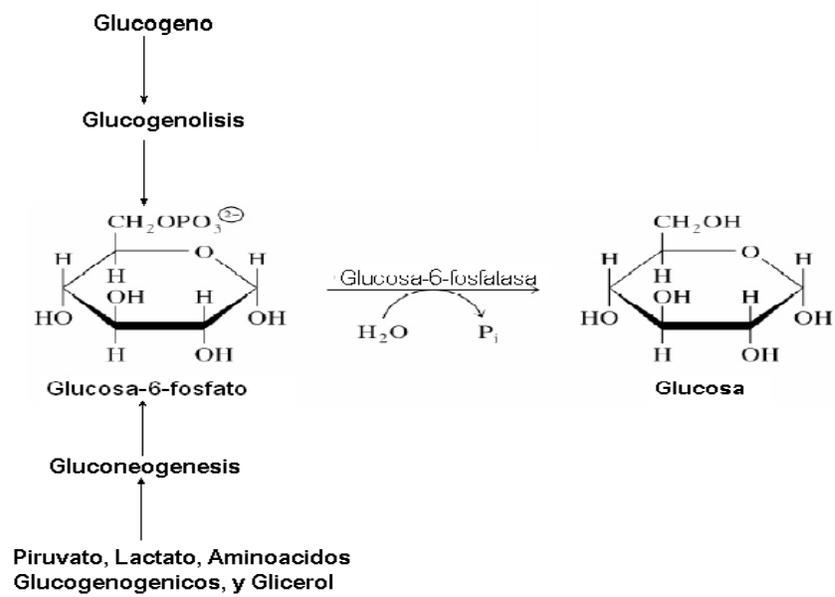


Figura.1. Principales Vías para la producción de glucosa en ayunas.

El proceso regulación de glucosa se puede observar en la siguiente figura.

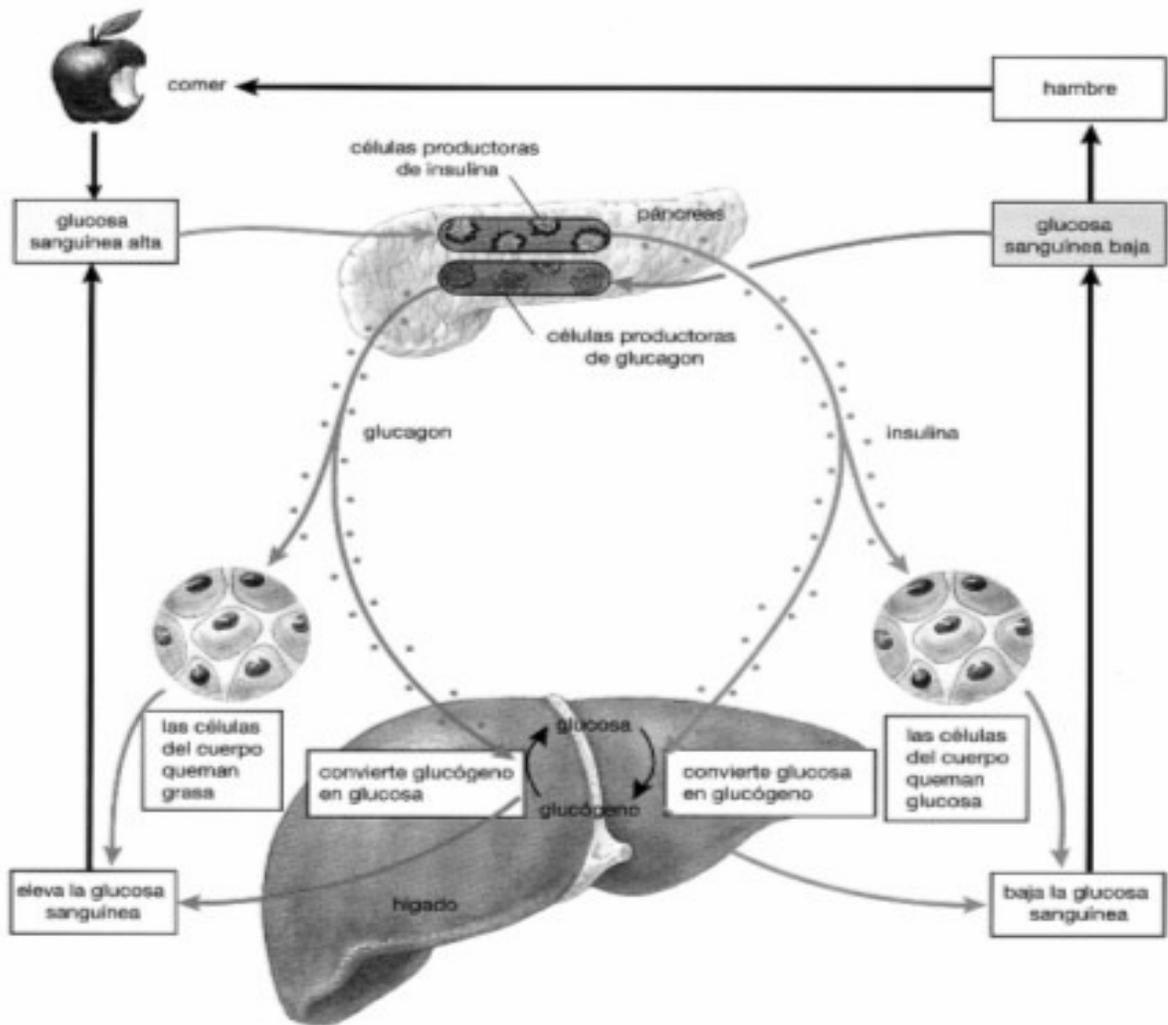


Figura 2. Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo.

Los defectos en la producción, liberación o recepción de la insulina, desfavorece la entrada de glucosa a la célula, la respuesta del organismo ante esta condición es activar los mecanismos de gluconeogénesis y glucogenólisis por medio de la hormona secretada por el páncreas glucagón, en estos dos mecanismos esta involucrada la acción de la enzima glucosa-6-fosfatasa la cual hidroliza la glucosa-6-fosfato a glucosa. En consecuencia a esto

la glucosa se acumula en la sangre por lo que en procesos posteriores no se degrada ni se obtiene la energía necesaria a partir de ella y es en este punto donde aparecen todos los síntomas de la diabetes (es decir, el organismo no responde a este defecto como una concentración de glucosa en la sangre que no logra entrar a la célula, sino que responde como si en realidad los niveles de azúcar en la sangre sean bajos por lo que se activan los mecanismos productores de glucosa en el organismo y se produce el alza de los niveles de azúcar en sangre). Por esta razón, las personas con diabetes presentan características de: sueño, desgano y falta de energía, debido a que no se está llevando a cabo la reacción de degradación, que es precisamente la liberación de energía.

En términos más concretos la diabetes o diabetes mellitus (derivado del Latin *diabētes* que significa 'correr a través' y mellitus que significa miel) es una enfermedad crónica debida a que el páncreas no produce insulina suficiente o a que el organismo no la puede utilizar eficazmente. Esto produce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, se presentan complicaciones renales y oculares, así como afección de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía^[8].

Existen varios tipos de diabetes conocidos, estos son:

➤ Diabetes Mellitus

- La diabetes de tipo 1: (antes conocida como diabetes insulino dependiente o de inicio en la juventud) se caracteriza por una ausencia o poca producción de insulina. Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.
 - Sus síntomas, que pueden aparecer bruscamente, consisten en una producción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, alteraciones visuales, fatiga y cetoacidosis.
- La diabetes de tipo 2 (antes conocida como diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) se debe a que el organismo no utiliza eficazmente la

insulina. El 90% de los diabéticos del mundo padecen diabetes de tipo 2, que se debe en gran parte a la inactividad física y al peso corporal excesivo.

- Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero menos acentuados. En consecuencia, es posible que la enfermedad sólo se diagnostique varios años después de su inicio, una vez que ya han aparecido sus complicaciones.
- Hasta hace poco este tipo de diabetes sólo se observaba en los adultos, pero ahora también empieza a verse en niños obesos.
- La diabetes gestacional es la hiperglucemia que se identifica por vez primera durante el embarazo.
- Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse por las pruebas realizadas durante los exámenes prenatales, más que por la manifestación de síntomas^{[2],[9]}.

➤ Diabetes Insípida

La diabetes mellitus no es el único tipo de diabetes que existe, la diabetes insípida es otro tipo de diabetes que comparte ciertas manifestaciones clínicas como lo son la poliuria y la polidipsia pero no poseen relación patológica alguna, esta es causada por un déficit o mal funcionamiento de la hormona antidiurética (HAD), la cual es responsable de controlar la producción excesiva de orina. Sus tipos son:

- La diabetes insípida central: producción o secreción insuficiente de la HAD; puede ser el resultado de un daño en la glándula pituitaria causado por heridas en la cabeza, trastornos genéticos y otras enfermedades.
- La diabetes insípida nefrogénica: la falta de respuesta de los riñones a los niveles normales de la HAD: su causa puede ser las drogas o las enfermedades crónicas, como la falla del riñón, la enfermedad de las células falciformes o la enfermedad poliquística del riñón.

1.2. Sistema de la Glucosa-6-fosfatasa.

Como se señaló anteriormente durante el periodo de ayunas, en el organismo existen dos mecanismos principales de producción de glucosa con la finalidad de mantener los niveles de azúcar constantes en la sangre, estos son: La gluconeogénesis (a partir de moléculas simples tales como piruvato, lactato, aminoácidos gluconeogénicos y glicerol) y la glucogenólisis (degradación del glucógeno hepático). El paso final de ambas rutas metabólicas involucra la formación de la glucosa-6-fosfato, la cual es degradada por la enzima glucosa-6-fosfatasa.

La glucosa-6-fosfatasa es una enzima gluconeogénica presente en el retículo endoplasmático, en la envoltura nuclear del hígado, riñon y enterocito.

Burchell y Waddel en 1991^[10] describieron la glucosa-6-fosfatasa como un sistema multicomponente, formado por 5 polipéptidos: la subunidad catalítica glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), una proteína estabilizadora (PE). El sitio activo de la G-6-Pasa esta orientado hacia adentro del lumen del retículo endoplasmático (RE), esto hace necesario transportadores de sustratos a través de la membrana del retículo endoplasmático, por lo que existen tres proteínas trasportadoras: T1,T2 y T3 (o GLUT7); las cuales trasportan glucosa-6-fosfato, fosfato y glucosa a través de la membrana del retículo endoplasmático respectivamente. Este sistema puede apreciarse claramente en la siguiente figura:

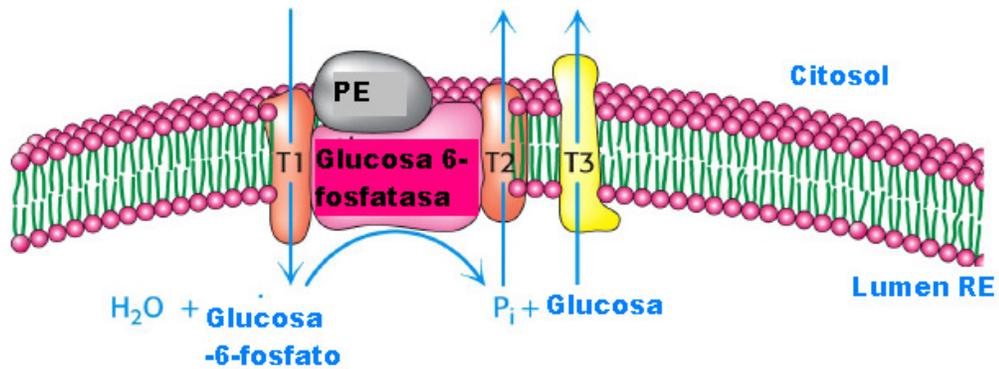
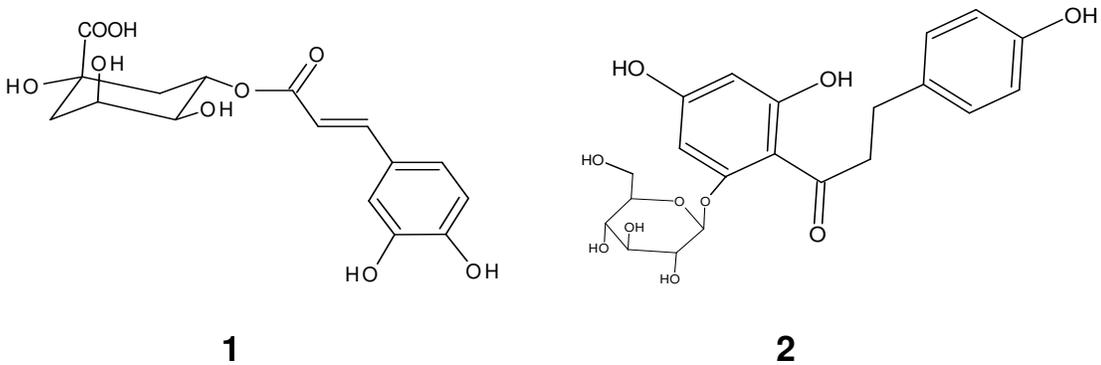


Figura.3. Sistema de la Glucosa-6-fosfatasa.

Este modelo sencillo sugiere que la deficiencia de cualquiera de las proteínas involucradas en el sistema de la G-6-Pasa disminuiría la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato y por ende la producción de glucosa hepática. Existen inhibidores reportados tanto para la enzima G-6-Pasa, como para el transportador T1 de manera de impedir la hidrólisis del sustrato o simplemente su entrada al lumen. Uno de estos inhibidores encontrados es el ácido clorogénico(1) así como varios de sus derivados^[11], otro es la florizina(2) utilizada experimentalmente desde 1980^[12].



Estrada y col. en el 2003^[3],^[4] encontraron que ciertos flavonoides presentes en la *Bauhinia megalandra* presentaron actividad hipoglucémica. Este hecho hace interesante el estudio de otras especies del mismo género también utilizadas popularmente para el tratamiento de pacientes diabéticos.

1.3. Descripción de la planta *Bauhinia variegata* L.

La especie *Bauhinia variegata* L. presenta la siguiente clasificación taxonómica^[13]:

Clasificación Taxonómica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae/leguminosae
Subfamilia:	Caesalpinioideae
Tribu:	Cercideae
Género:	<i>Bauhinia</i>
Especie:	<i>B. variegata</i>
Nombre Binomial: <i>Bauhinia variegata</i> L.	

Bauhinia es un género de más de 200 especies de fanerógamas (espermatofitas, es decir con semillas) en la subfamilia de las Caesalpinioideae de la familia de

leguminosas Fabaceae, con una distribución pantropical. El género se llamó así por los Hnos. Bauhin, botánicos franco suizos. Muchas especies se plantan universalmente en los trópicos como "árboles orquídeos", particularmente en el norte de India, Vietnam y sudeste de China. En EE.UU., el árbol crece en Hawaii, costas de California, sur de Texas y Florida. En Venezuela se encuentra abundantemente en la zona central, aunque se puede conseguir a lo largo y ancho del territorio gracias al clima tropical del país. *Bauhinia blakeana* es el emblema floral de Hong Kong de hecho aparece en su bandera mostrada a continuación:

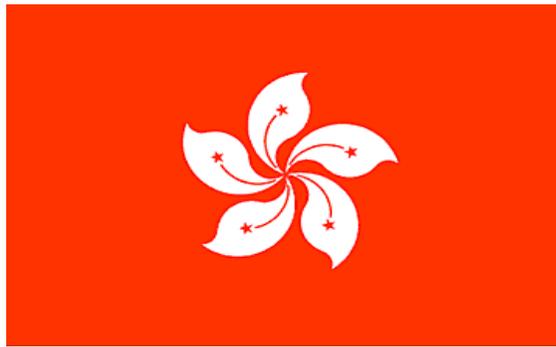


Figura 4. Bandera de Hong Kong, flor de *Bauhinia blakeana* estilizada.

La Bauhinia es un arbusto caducifolio (es decir, que pierde su follaje durante una parte del año) de 5-7 m de altura (ver figura 5), con la corteza más o menos lisa y las ramillas jóvenes cubiertas de pelos finos y suaves. Hojas simples, de anchamente ovadas a suborbiculares o redondo-cuadrangulares, de unos 6-12 cm de diámetro, con nervios patentes, bastante características, de ahí sus nombres populares "casco de vaca" o "pata de vaca" (ver figura 6). Tienen dos lóbulos redondeados y la base cordada. Flores en racimos cortos que nacen principalmente en las ramas viejas, con pocas flores. Cáliz en forma de espata. Pétalos con los bordes rizados, obovados, de 4-5 cm de longitud, de color blanco en el cultivar 'Candida', rosado o púrpura (ver figura 7). Estambres en número de 5 y desiguales. Florece en Abril-Mayo, y en ocasiones produce una segunda floración tardía de menor intensidad. Fruto en legumbre dehiscente de hasta 20 cm de longitud y 2 cm de anchura, con 10-20 semillas achatadas de 10-15 mm de diámetro de color marrón claro^[14].



Figura 5. Árbol *Bauhinia variegata* L. Ciudad Universitaria, Julio 2007



Figura 6. Hoja de *Bauhinia*



Figura 7. Flor de *Bauhinia*

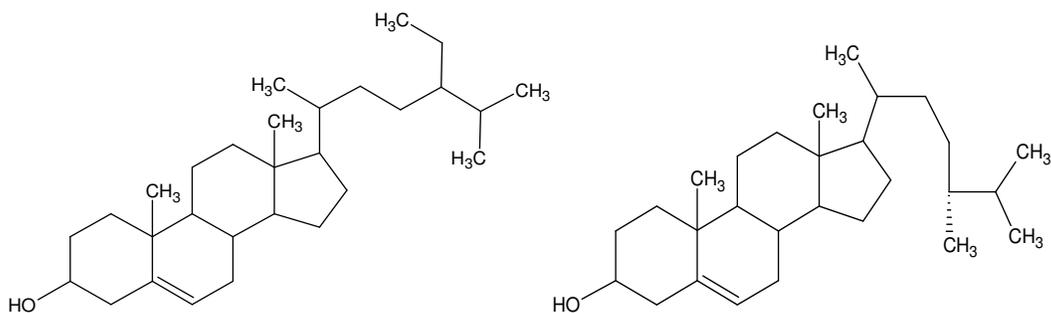
1.4. Antecedentes Fitoquímicos y Biológicos en el Género *Bauhinia*.

Muchas de las especies del género *Bauhinia* son de uso popular y han sido blanco de estudio para los investigadores, gracias a las muchas propiedades atribuidas a esta planta.

A continuación se presentan algunos antecedentes relevantes tanto biológicos como fitoquímicos de algunas especies de *Bauhinia*:

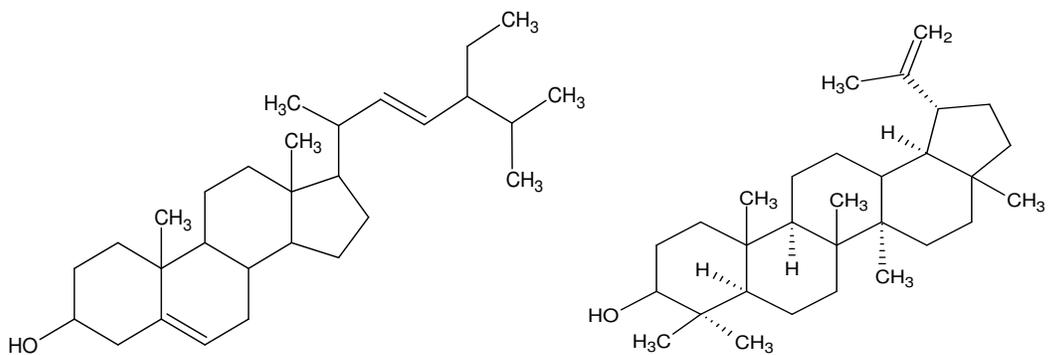
1.4.1. *Bauhinia candicans*^[15]

El efecto de diferentes fracciones del extracto metanólico de las hojas de la *Bauhinia candicans* sobre conejos hiperglicémicamente inducidos ha sido estudiado experimentalmente en Chile, mostrando actividad hipoglicémica y una disminución en los niveles de azúcar excretada vía urinaria. El extracto por la partición con diferentes solventes permitió identificar la existencia de varios compuestos, de la partición con n-hexano se lograron identificar: β -sitosterol(3), campesterol(4), stigmasterol(5) y lupeol(6). De la partición con AcOEt se logró identificar la presencia de los siguientes compuestos: kaempferol(7), quercetina(8) e isoquercetina (quercetina-3-O- β -glucósido)(9), y por último de la partición con n-BuOH el kaempferol-3-O- β -rutinósido(10).



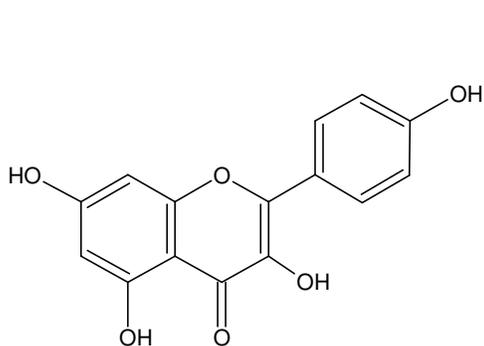
3

4

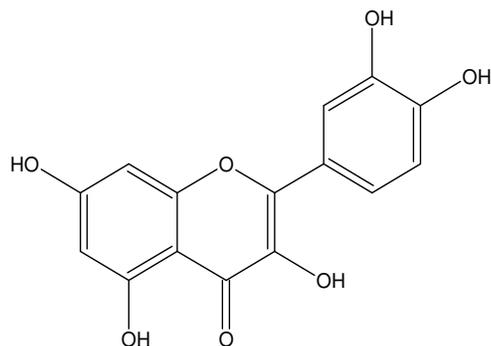


5

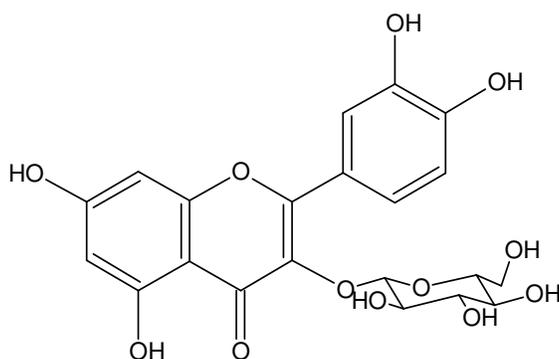
6



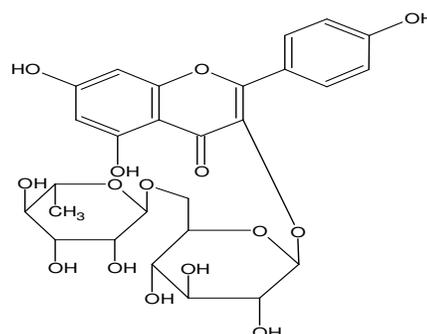
7



8



9



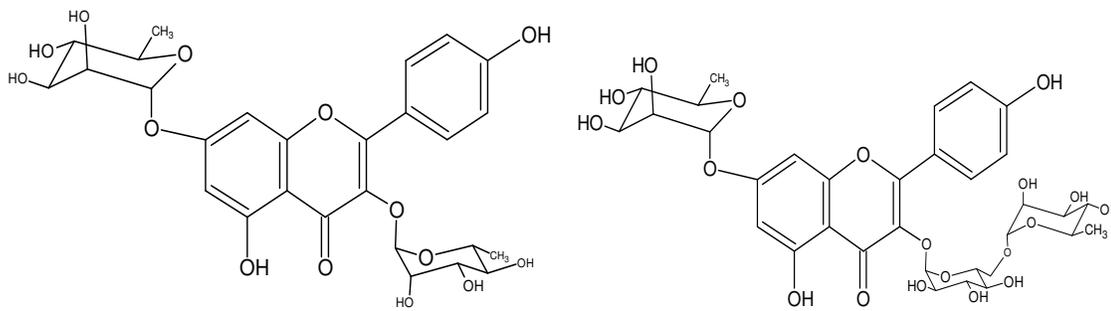
10

Encontrando así que la partición con n-BuOH presentó mayor reducción del contenido de glucosa urinaria durante 24h después del tratamiento, el mismo efecto pero menos pronunciado fue encontrado al tratar a los conejos diabéticos con el extracto metanólico completo.

1.4.2. *Bauhinia forficata*

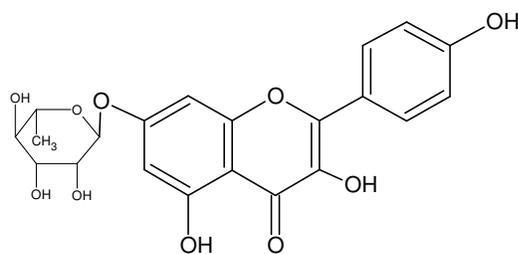
La *Bauhinia forficata* es una de las especies de *Bauhinia* mas utilizada como remedio antidiabético en Brasil. Los primeros reportes de la actividad hipoglicemica de esta especie fueron realizados por Juliani en 1931. Pepato y col. en el 2002, reportaron que el extracto acuoso de la especie como sustituyente del agua por un mes en ratones diabéticamente inducidas con streptozotocina (STZ), lograba disminuir los niveles de glucosa en el plasma

sanguíneo y redujo los niveles de glucosa excretados en la orina, produciendo así un efecto benéfico sobre los ratones diabéticos (STZ)^[16]. Un estudio similar en Brazil fue reportado poco tiempo después pero induciendo esta vez con alloxano, Silva y col. estudiaron el efecto del extracto con n-BuOH sobre ratones albinos inducidos con el fármaco mencionado, además de observar el efecto que el extracto poseía, utilizaron cromatografía para separar los compuestos presentes en el extracto de n-BuOH, encontrando la presencia de 3 flavonoides glicosidos: kaempferol-3,7-O- α -dirhamnosido(11), kaempferol-3-O- α -glucosido-(1'',6'') rhamnosido- 7 - O- α -rhamnosido(12) y kaempferol - 7 -O- α -rhamnosido(13), identificados mediante técnicas espectroscópicas de RMN.



11

12

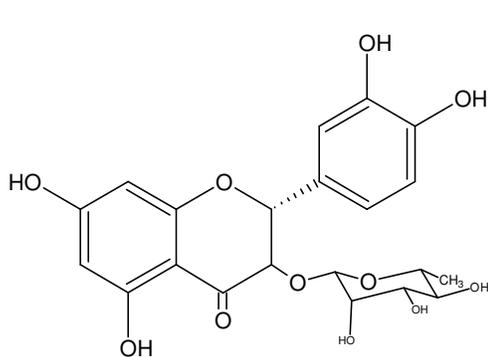


13

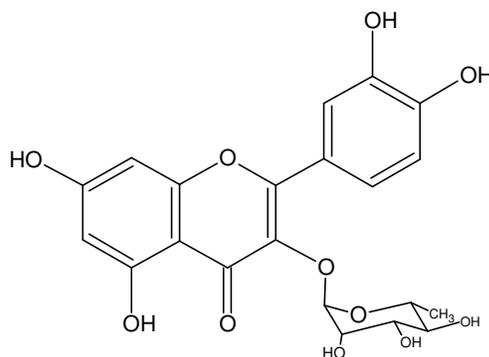
El tratamiento con la fracción de n-BuOH produjo una disminución en los niveles de azúcar en la sangre, sin embargo en el extracto existen al menos 15 compuestos^[17].

1.4.3. *Bauhinia megalandra*

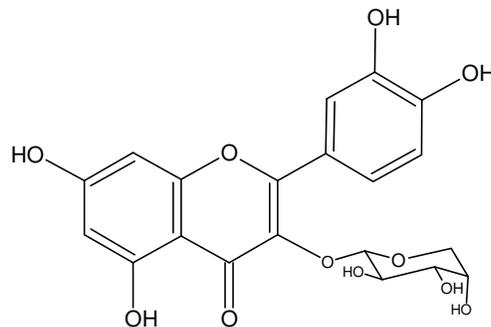
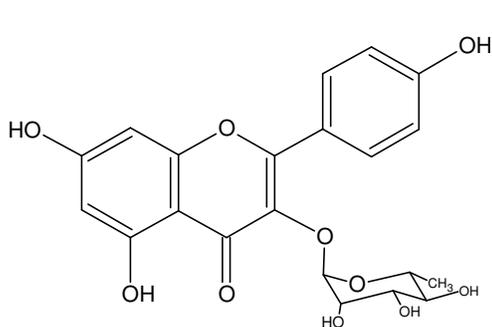
La reducción de la absorción de glucosa a nivel intestinal puede servir como ayuda para controlar la hiperglicemia en pacientes diabéticos. Este ha sido el objeto de estudio de científicos venezolanos. Gonzalez-Mujica y col. estudiaron el extracto acuoso de las hojas de la *B. megalandra* y su efecto inhibitorio de absorción de glucosa a nivel intestinal^[4]. Este estudio sirvió como base para el estudio fitoquímico posterior realizado por Estrada y col. en el 2005^[3]. En esta investigación se logró aislar mediante cromatografía de columna del extracto metanólico 8 flavonoides y evaluar su actividad inhibitoria sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa en tejido hepático de ratones. Todos los flavonoides aislados mostraron efecto inhibitorio sobre microsomas intactos: quercetina(8) y kaempferol(7) mostraron el menor efecto inhibitorio; astilbina(14), quercetina-3-O- α -rhamnosido(15), kaempferol-3-O- α -rhamnosido(16) y quercetina-3-O- α -arabinosido(17). El mayor efecto inhibitorio fue mostrado por la quercetina-3-O- α -(2''-galoil)rhamnosido(18) y kaempferol-3-O- α -(2''-galoil)rhamnosido(19) los cuales mostraron el menor IC₅₀, alrededor de 30 μ M.

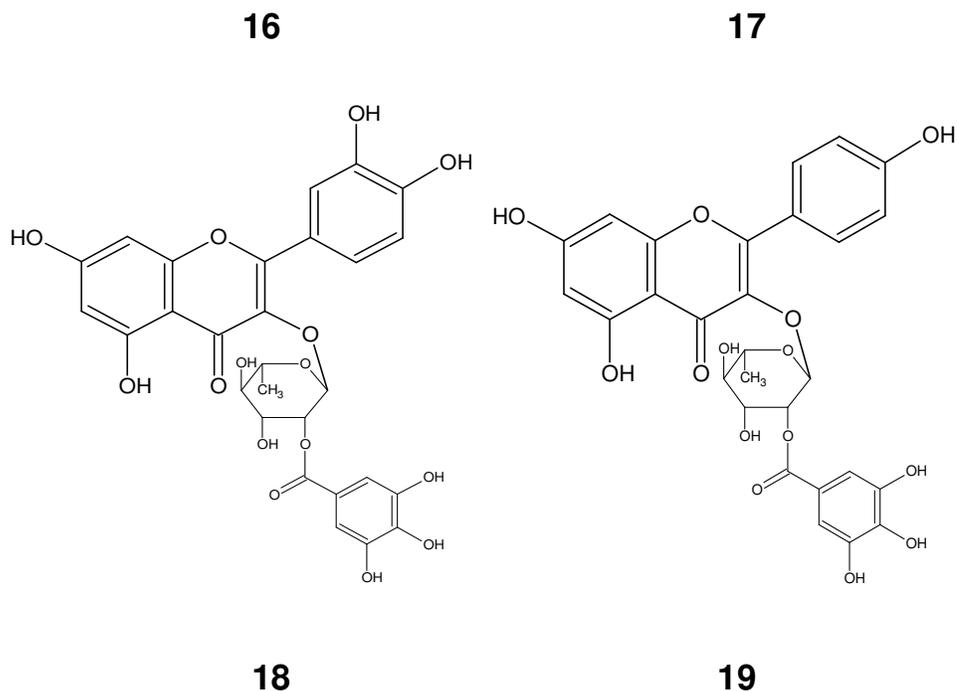


14



15



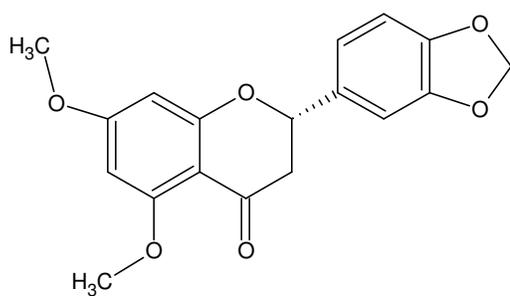


La inhibición de la Glucosa-6-fosfatasa por los flavonoides mostrados sobre microsomas intactos y no en los microsomas rotos, es una indicación de que ellos interactúan con el transportador T1 en el sistema de la glucosa-6-fosfatasa sin efecto en la subunidad catalítica^[18]. Este estudio ha sido el único que ha reportado la actividad hipoglicemiante de cada compuesto aislado, los demás solo reportan el efecto del extracto estudiado.

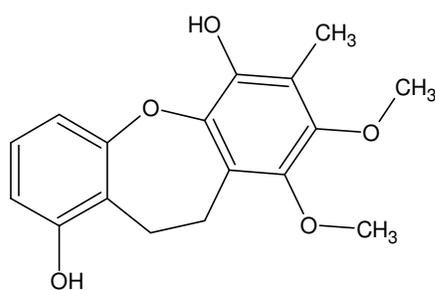
1.4.4. *Bauhinia variegata*

Raj Kapoor y col.^[19] en el 2003, reportaron la actividad antitumoral del extracto metanólico evaluado sobre DAL (Dalton's ascitic lymphoma) en ratones albinos. Encontrando que después de 14 días de inoculación el extracto fue capaz de revertir los cambios en los parámetros hematológicos, proteínas y PCV (patología cardiovascular) consecuencias de la inoculación del tumor, este mismo grupo de investigadores a raíz de los resultados obtenidos, en el 2006^[20] evaluaron el efecto citotóxico y quimiopreventivo sobre tumores inducidos en ratas y células cancerígenas humanas. Además se ha encontrado que sus extractos poseen actividad antifúngica y antibacteriana^[21]. En Venezuela, han estudiado el efecto del extracto acuoso de las hojas de la *B. variegata* sobre la glucación no enzimática

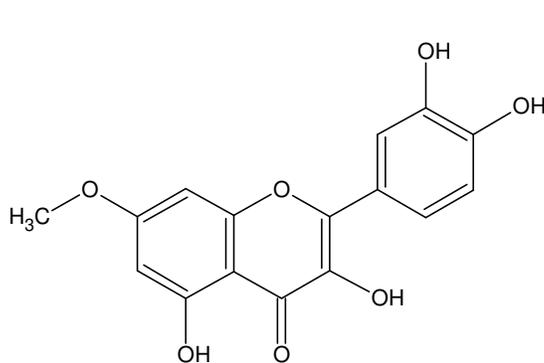
de la hemoglobina^[22], la cual es una propuesta para explicar los daños en los tejidos producidos por el exceso de glucosa en la sangre, estos encontraron un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina, resultados que sugieren a la *Bauhinia variegata* como un potencial antidiabético y para la prevención de las complicaciones causadas por la diabetes. Reddy y col. en el 2003^[23] aislaron de la raíz de la planta dos compuestos nuevos (2S) - 5,7 - dimetoxi - 3',4' - metilendioxf flavanona(20) y 5,6 - dihidro-1,7 - dihidroxi - 3,4 - dimetoxi-2 - metildibenz[b,f]oxepina(21), junto con otros 3 flavonoides conocidos 7-metoxi-quercetina(22), kaempferol-7,4'-dimetoxi-3-O-β-glucósido(23) , kaempferol-3-O-β-glucósido(24). Existen también reportados otros compuestos aislados de la planta^{[24],[25],[26],[27]}, estos son 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-α-rhamnosido-β-glucosido(25), 5,7 - dihidroxi - flavanona - 4' - O - α-rhamnosido-β-glucosido(26), 7,3',4',5'-tetrametoxiflavanona-5-O-β-xilosa-(1→2)-α-rhamnosa (27), lupeol(6), β-sitosterol(3) y quercetina(8).



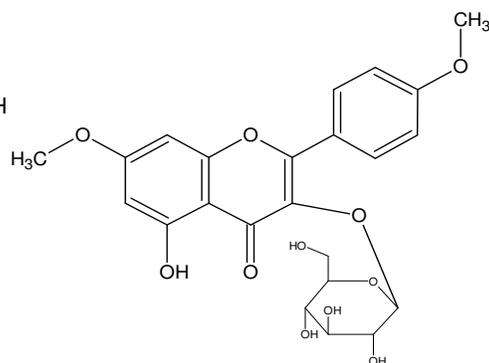
20



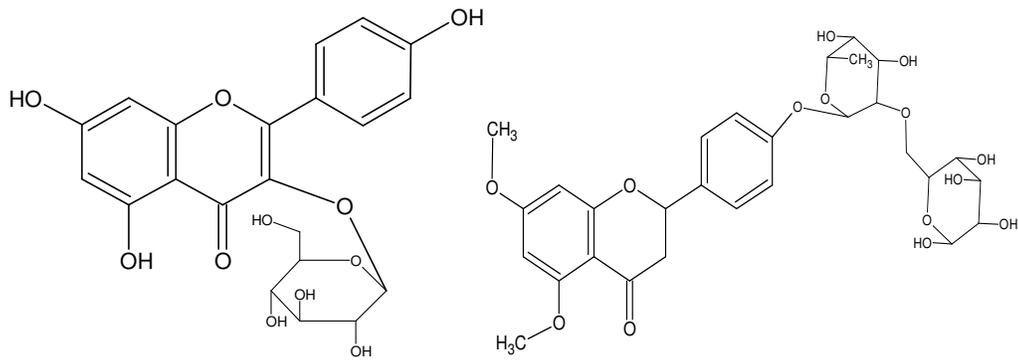
21



22

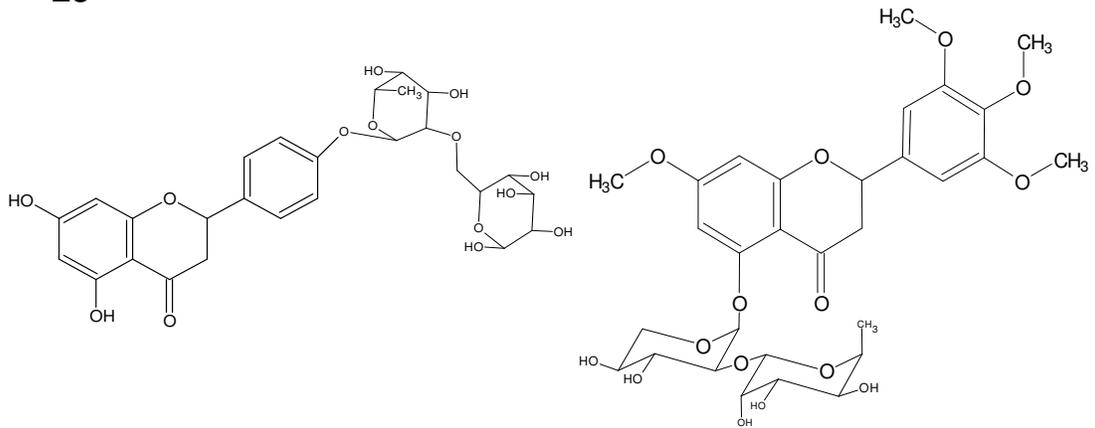


23



24

25



26

27

De lo reportado para esta planta se puede decir que es una especie rica en flavonoides y muchas de las propiedades reportadas para ella pueden ser atribuidas a esta familia de compuestos.

1.5. Los Flavonoides y sus propiedades.

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios que se encuentran muy frecuentemente en las plantas. Son biosintetizados a partir de moléculas derivadas del ácido cinámico y 3 de acetato-malonato que forman tricétidos (ver figura 8). La estructura base(28), un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos. Los flavonoides pueden clasificarse en las siguientes clases principales: las chalconas(29), las flavonas(30), los flavonoles(31), los flavandioles(32), las antocianinas(33), flavanoles(34), flavanonas(35), flavanoles o dihidroflavonoles(36), las auronas(37), isoflavonoides(38), los neoflavonoides(39), y los taninos condensados que son polímeros de los flavonoides. Generalmente se encuentran sustituyentes tipo hidroxí, metoxi y azúcares en las posiciones 3,5,7,3',4' y 5'

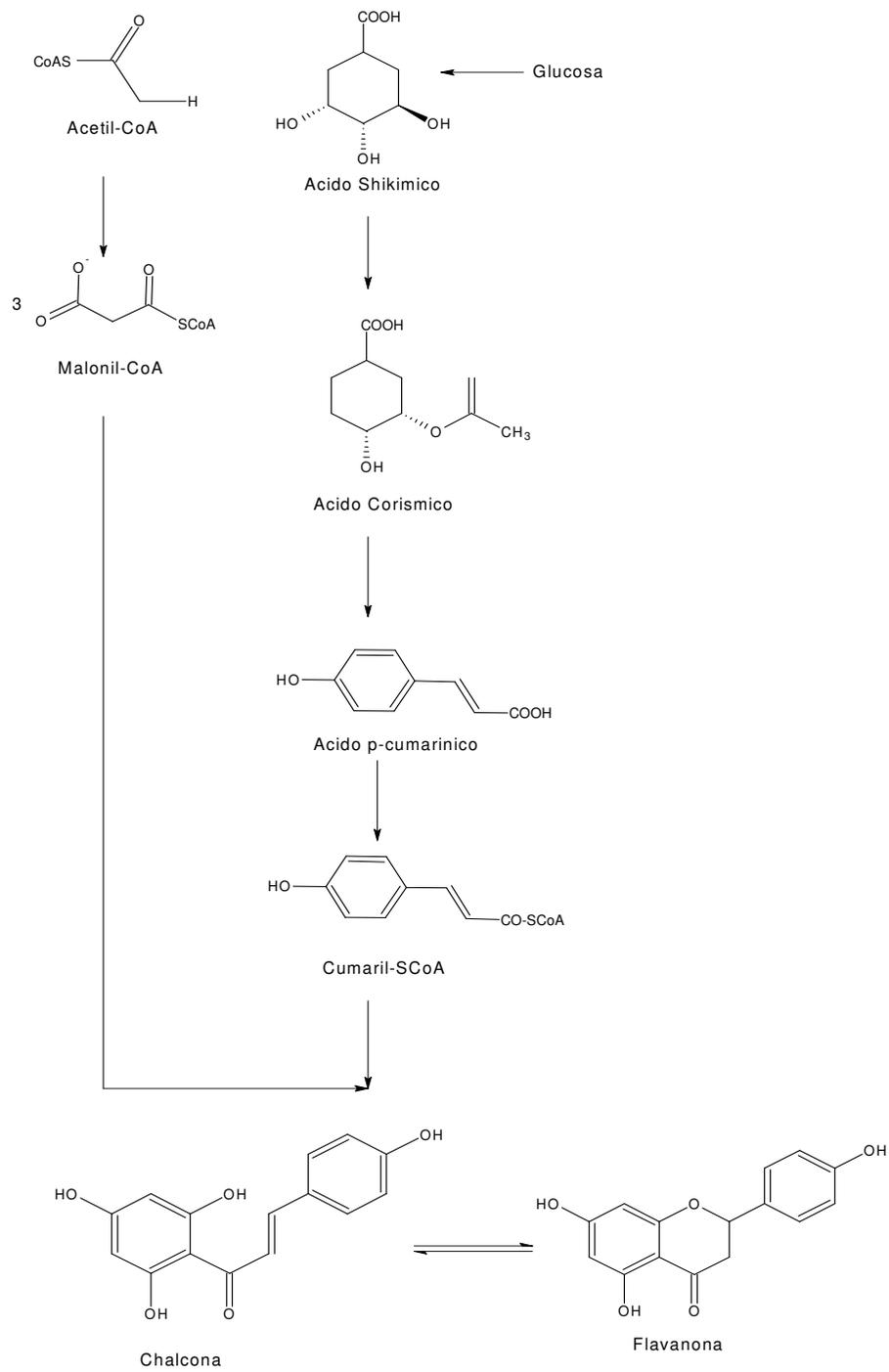
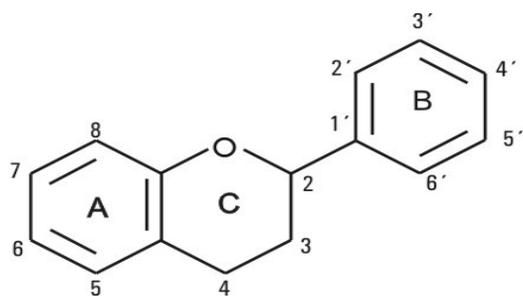
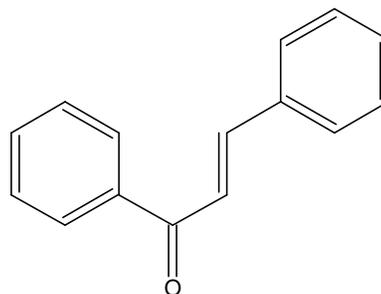


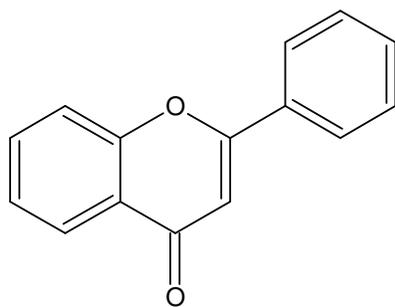
Figura 8. Biosíntesis de Flavonoides



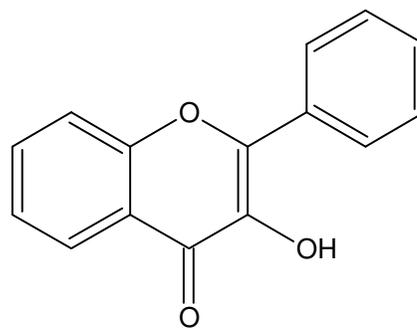
28



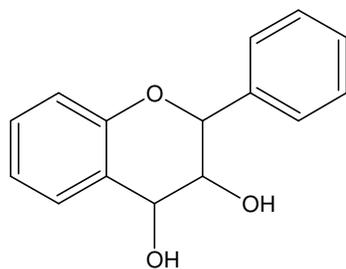
29



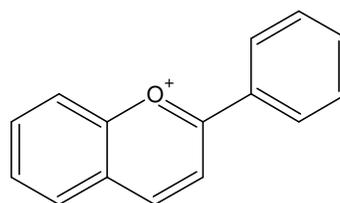
30



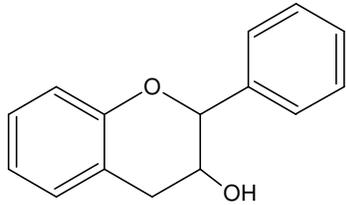
31



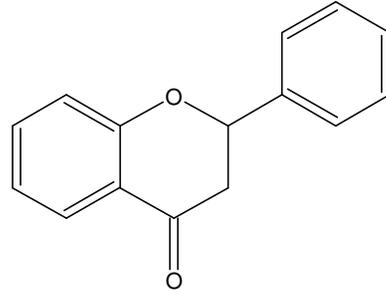
32



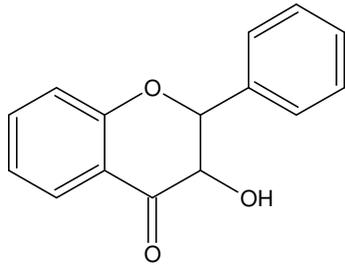
33



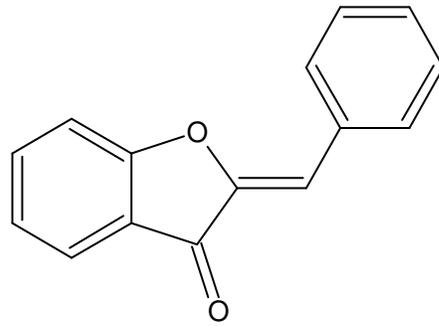
34



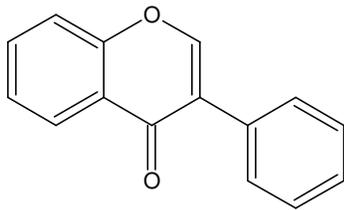
35



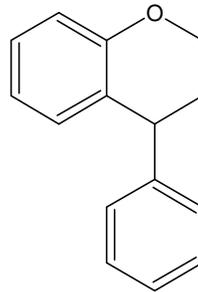
36



37



38



39

Los flavonoides se biosintetizan en todas las plantas (taxón Embryophyta y también en algunas algas Charophyta), que aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es

muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del Sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores.

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre, que los consume con los vegetales. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos. También son conocidos por los cultivadores de plantas ornamentales, que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de flavonoides que dan el color a las hojas y a las flores.

Debido a las importantes funciones metabólicas que los flavonoides tienen en las plantas y los animales, sus vías biosintéticas y mecanismos de regulación están siendo cuidadosamente estudiados. La ciencia aplicada aprovechó este conocimiento en muchos trabajos de ingeniería metabólica, en los que se buscó por ejemplo, aumentar la concentración de flavonoides beneficiosos en las plantas de consumo humano o de uso farmacéutico, modificar su concentración en flores ornamentales para cambiarles el color, e inhibir su producción en el polen para lograr la esterilidad de los híbridos de interés comercial. En lo que respecta a su producción, se ha desarrollado con éxito un cultivo de *Escherichia coli* que sintetiza flavonoides de interés humano como lo son el kaempferol y la quercetina^[28].

Los científicos dieron usos variados a los flavonoides: los genes de la biosíntesis de flavonoides fueron usados como herramienta para analizar los cambios en el ADN, son ejemplos conocidos el descubrimiento de las leyes de Mendel (que pudo rastrear la herencia de los genes de los flavonoides que dan el color a los guisantes), y el descubrimiento de los genes saltarines de Barbara McClintock (que al "saltar" hacia un gen de un flavonoide lo inutilizan y no se expresa el color en el grano de maíz). La extracción e identificación de

flavonoides también fue muy usada por los botánicos sistemáticos para establecer parentescos entre especies de plantas.

Aún queda mucho por investigar de los flavonoides, de su valor medicinal, y de su impacto en la nutrición y la salud humana y de los animales^{[5],[29]}.

2. Objetivos

2.1. General

- Identificar los metabolitos presentes en el extracto metanólico de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* L. biodirigido mediante la inhibición de la enzima glucosa-6- fosfatasa.

2.2. Específicos

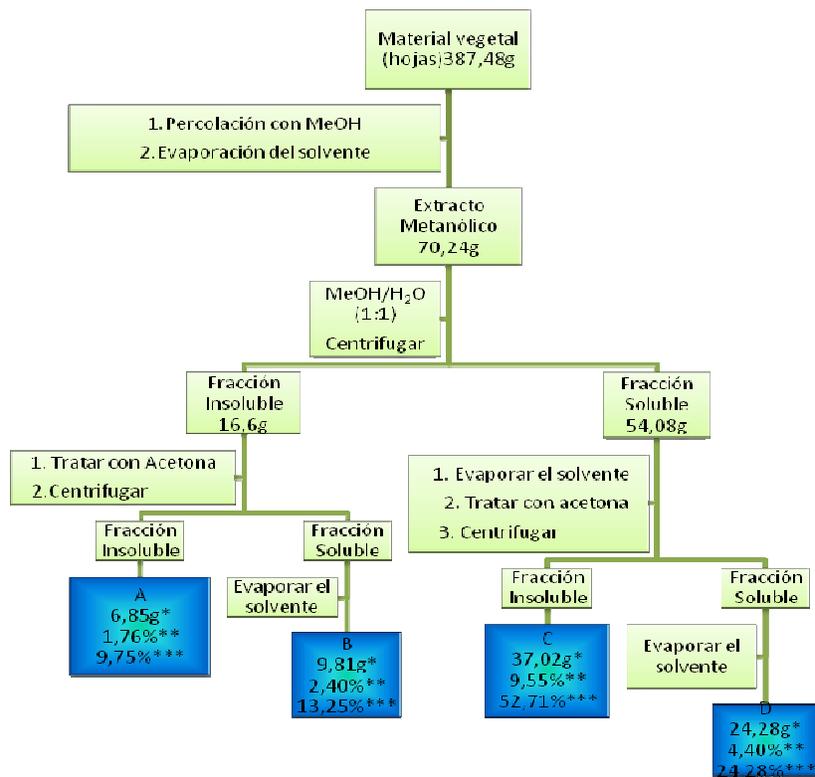
- Fraccionar utilizando diversos solventes al extracto metanólico de las hojas de la planta.
- Evaluar la actividad inhibitoria de las fracciones separadas del extracto metanólico de la planta.
- Aislar por métodos cromatográficos los componentes de la fracción que presente mayor actividad inhibitoria sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos aislados sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa.
- Identificar mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y RMN ^{13}C , los metabolitos aislados.

3. Metodología Experimental

3.1. Material vegetal

Las hojas de *Bauhinia variegata* L. fueron colectadas en la Ciudad Universitaria, en Julio de 2007 e identificadas por el Dr. Stephen Tillett de la Facultad de farmacia, UCV. El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, se trituró y guardó para su posterior tratamiento. El método que se siguió para la extracción del material vegetal fue el mismo utilizado por Estrada y col.^[3] el cual se muestra a continuación:

Esquema 1. Método de extracción sobre hojas de *Bauhinia variegata* L.



*. g obtenidos luego de preparar el extracto. ** Porcentaje respecto al material vegetal. *** Porcentaje respecto al extracto metanólico.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa

Instrumental Bioquímico:

- Centrífuga Sorvall Instruments (Duport). Modelo RC5C. Rotor SS34.
- Ultracentrífuga Beckman; modelo L5-75B; rotor 30 de Titanio.
- Cava Ultra-low regulable.
- pHmetro.
- Espectrofotómetro Pharmacia, modelo Novaspec II.
- Espectrofotómetro Beckman de doble haz DU-640.

Reactivos:

- Glucosa-6-fosfato (SIGMA)
- Histona II-A (SIGMA).
- HEPES.
- EDTA.
- Sacarosa.
- Folin Ciocalteus.
- Sulfato Cúprico.
- Heptamolibdato de aminio.
- Albúmina Bovina.

3.2.2. Métodos cromatográficos

Capa fina (analítica)

- Placas analíticas de sílica gel 60; 0,25mm con indicador de fluorescencia UV₂₅₄; marca POLYGRAM®.

Agente revelador:

- Solución de Sulfato cérico al 10% (solución saturada de sulfato cérico en H₂SO₄ concentrado) en metanol, con esta solución se rocían las placas. Experimentalmente se debe observar los siguientes colores indicativos de diferentes compuestos; amarillo para flavonoides, verde para clorofilas, morado para terpenos, y marrón para taninos.

Cromatografía Contracorriente de alta velocidad (HSCCC)

- Cromatógrafo contracorriente de alta velocidad, marca P. C. Inc., modelo HSCCC serie #400, con un rotor enrollado de tubería de teflón de 1,6 mm de diámetro interno y 320mL de capacidad.

Se utilizó esta técnica gracias a los resultados satisfactorios obtenidos por otros investigadores en la rama de los productos naturales, y por las siguientes ventajas sobre los demás métodos cromatográficos de fase estacionaria sólida:

- ✓ No hay adsorción irreversible de la muestra (los solutos se retienen fácilmente en un soporte sólido; a menudo, los efectos de adsorción se manifiestan por curvas de elución que muestran colas de las sustancias bajo consideración).
- ✓ Recuperación Cuantitativa de la muestra introducida.
- ✓ Reduce el riesgo de desnaturalización de la muestra.
- ✓ Bajo consumo de disolventes económicamente favorable^[30].

Sistemas de Solventes:

- Mezcla de solventes CHCl_3 -nBuOH- MeOH- H_2O (4:0,5:3:2) utilizando la capa superior (acuosa) como la fase estacionaria y la capa inferior como la fase móvil.^[31]

Cromatografía de columna\

En este estudio se emplearon cromatografías de adsorción en fase normal y en fase reversa.

- Fase normal

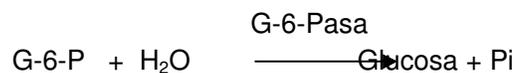
Se empleó sílica gel 40-63 μm Merck, en una proporción 1:40 (peso de la muestra a peso de sílica). Los eluyentes que se utilizaron consistían en gradientes de polaridad desde el CH_2Cl_2 , hasta llegar a MeOH en diferentes relaciones.

- Fase reversa

Son adsorbentes derivados de sílica gel en los cuales los enlaces SiOH han sido transformados a SiOR, siendo R una cadena carbonada de 8 y 18 átomos, RP-8 y RP-18, respectivamente, donde el término RP se refiere a fase reversa (Reversed Phase). Debido a su polaridad revertida, la interacción con los compuestos polares es mucho menor que con los no polares que serán más retenidos. En este trabajo se utilizó como fase estacionaria sílica gel RP-18, 40-63 μm Merck. Como eluyentes se utilizó un gradiente desde MeOH:H₂O (1:1), pasando por MeOH hasta llegar a acetona, según el caso.

3.3. Ensayos de Inhibición de la Glucosa-6-fosfatasa

La enzima Glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) (EC. 3.1.3.9) cataliza el paso final de los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis, produciendo glucosa y fosfato inorgánico; la reacción se puede medir mediante la desaparición de la Glucosa-6-fosfato (G-6-P) o la aparición de los productos (Glucosa o Pi).



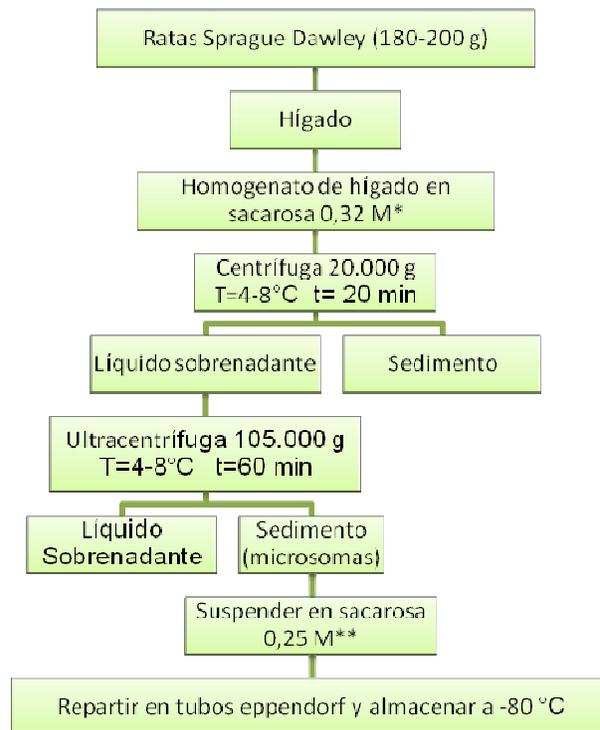
La actividad de la G-6-Pasa se determinará siguiendo la formación de fosfato (Pi), que en medio ácido y en presencia de heptamolibdato de amonio forma un complejo azul, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 820 nm. La ventaja del uso este método es que, además de ser económico y rápido, el reactivo que se usa para formar el complejo también detiene la reacción.

Para diferenciar si el inhibidor actúa sobre el transportador T1 o directamente sobre la subunidad catalítica, se utilizan microsomas intactos y microsomas rotos; los primeros son vesículas en las cuales la membrana limitante actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, mientras que los segundos carecen de dicha selectividad y el sustrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica. Los microsomas rotos se obtienen mediante la incorporación de histonas durante el ensayo; estas son proteínas básicas que rompen la integridad de las estructuras microsomales.

3.3.1. Preparación de microsomas

Para la preparación de los microsomas, fuente de la enzima, se siguió el procedimiento descrito por Marcucci y col.^[32], detallado en el esquema 2.

Esquema 2. Procedimiento para la obtención de Microsomas.



*Sacarosa 0,32 M; MgCl₂ 3 mM. **Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 mM; MgCl₂ 1 mM pH 6,5

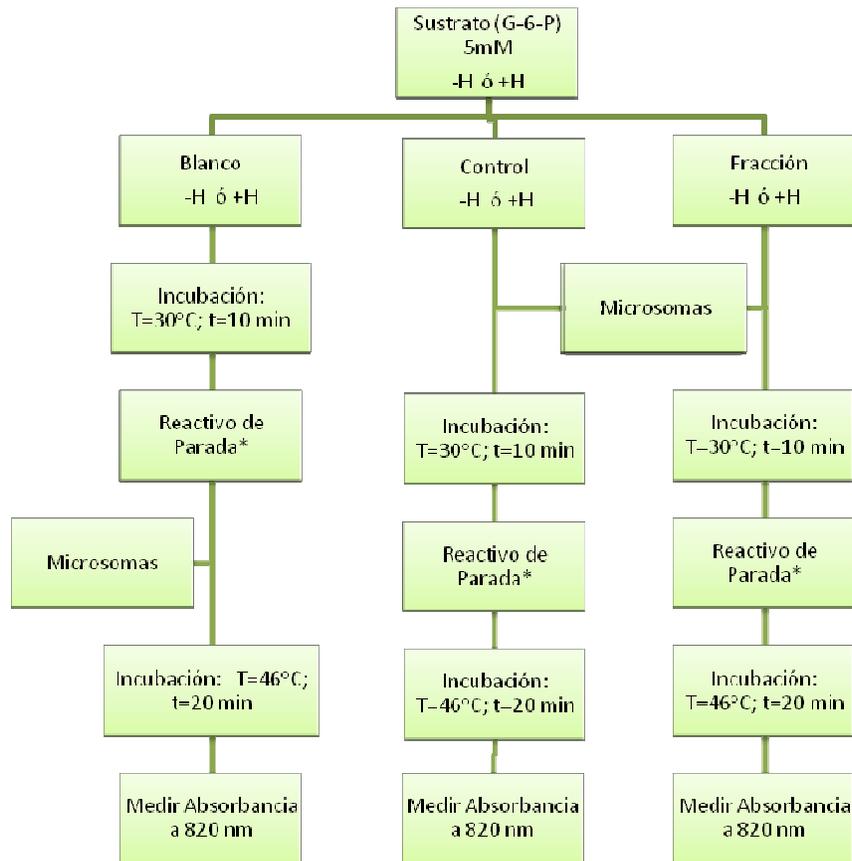
3.3.2. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa

Se utilizó como sustrato G-6-P 5 mM, tanto con histonas (+H) como sin histonas (-H); a continuación se presenta la cantidad de los reactivos necesarios para prepararlos (Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de los sustratos.

	G-6-P 100mM (μL) pH 6.5	EDTA 0,1M (μL) pH 6.5	HEPES 1M (μL) pH 6.5	H ₂ O (μL)	Histonas* (tipo II AS) (μL)	V _t (mL)
-H	250	100	80	1570	-	2
+H	250	100	80	1370	200	2

Para determinar la actividad de los extractos y compuestos purificados sobre la enzima G-6-Pasa se emplea la metodología descrita por Burchell y col.^[10] esquematizada a continuación:



Esquema 3. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa

*Reactivo de parada: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,42% en H_2SO_4 0,5M: SDS 5%: Acido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

A continuación se describe brevemente la metodología seguida para el ensayo:

- Utilizar cuatro tubos de ensayo para cada compuesto a probar (blanco y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H).
- Para los ensayos *Control* colocar en cada tubo 40 μL de sustrato más 40 μL de agua (o del solvente en que fue disuelto el compuesto a probar). Para los ensayos con la fracción o el compuesto a ensayar, se añade 40 μL de la solución correspondiente a la concentración deseada en lugar de agua.

(En general se prepara una solución madre disolviendo la cantidad de compuesto, extracto o fracción a ensayar de manera que la concentración final sea de 5000ppm en una solución al 10% de DMSO, completando así el volumen restante con agua)

- Diluir los microsomas hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa 0,25 M; 5 mM HEPES y 1 mM de $MgCl_2$ (pH = 6.5).
- Colocar los tubos en un baño de temperatura controlada a 30 °C.
- Colocar 20 μ L de los microsomas a el control y a los triplicados e incubar por 10 min.
- Detener la reacción tubo por tubo y en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de parada, incluyendo a los blancos. Por último, añadir 20 μ L de los microsomas a los blancos.
- Incubar por 20 min, en un baño de temperatura controlada a 46 °C.
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- La actividad enzimática se expresa en μ moles de Pi/ 10 min. x mg de proteína.

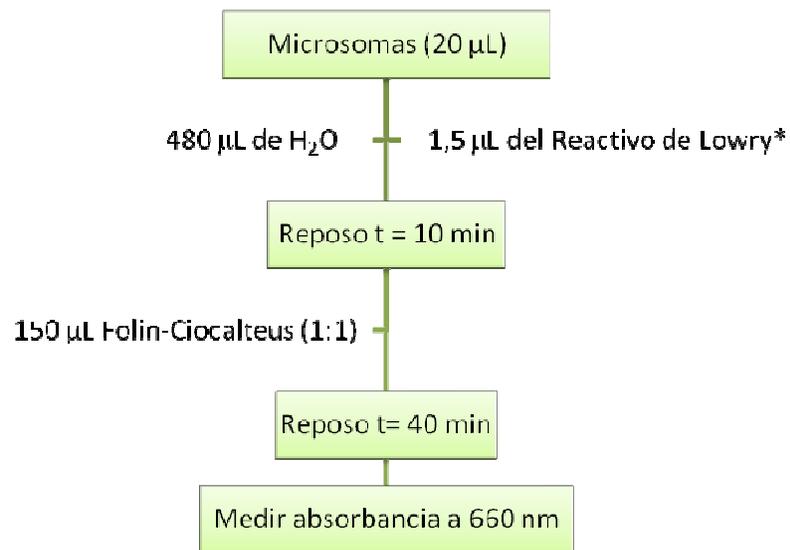
Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción se realiza una curva de calibración con un rango de concentración de 0,1 a 0,75 mM de Pi tomando alícuotas correspondientes de una solución madre de KH_2PO_4 1mM en un volumen final de 100 μ L.

3.3.3. Determinación de proteínas

La cantidad de proteínas presentes en los microsomas se determinó siguiendo el procedimiento de Lowry y col.^[33] modificado por Markwell y col.^[34] que combina la reacción de Biruet basada en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la reducción de el reactivo de Folin-Ciocalteu por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, esta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína^[35].

Para determinar la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elabora una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen final de 500 μL . Este procedimiento se esquematiza a continuación:

Esquema 4 . Procedimiento para la determinación de proteínas.



*Reactivo de Lowry: A+B (100:1). A = Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0,16%, SDS 1%. B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%.

4. Resultados y Discusión.

4.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos A, B, C y D.

Luego de obtener cada uno de los extractos se procedió a evaluar la actividad sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) tal y como se indicó en el capítulo anterior, los resultados se muestran en la tabla a continuación:

Tabla 2. Resultados de actividad de los extractos obtenidos de *Bauhinia variegata* L. sobre la enzima G-6-Pasa.

Extracto	% Microsommas Intactos	% Microsommas rotos
Extracto metanólico (Tallos gruesos)	68.0	34.0
Extracto metanólico (Hojas)	84.0	87.0
Fracción A	45.6	12.4
Fracción B	77.0	16.5
Fracción C	77.7	20.8
Fracción D	79.4	26.9

Los valores en los porcentajes de inhibición mostrados en la tabla anterior indican que el extracto metanólico de las Hojas presentaron mayor actividad inhibitoria que el de los tallos

tanto en microsomas intactos como en los rotos. Estos valores indican que el extracto posee actividad tanto sobre el transportador T1 (microsomas intactos) como sobre la subunidad catalítica (microsomas rotos). Este hecho justifica el trabajo posterior con el extracto metanólico de las hojas.

Una vez obtenidos las fracciones (A, B, C y D) siguiendo la metodología mostrada en el esquema 1 se realizó el ensayo de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa con el fin de encontrar cual de las mismas presentaba mayor actividad y de ella separar sus compuestos mayoritarios, encontrando que la fracción D presentó el mayor porcentaje inhibitorio tanto en microsomas intactos como en los rotos, por lo cual fue la fracción elegida para separar sus compuestos mayoritarios. Las fracciones B y C también presentaron altos porcentajes por lo que pueden ser objeto de investigaciones futuras.

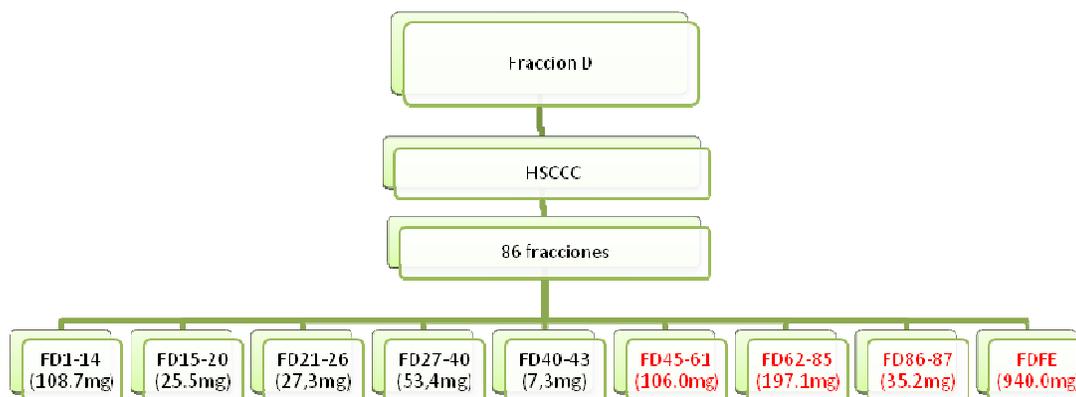
4.2. Separación de la fracción D por HSCCC

El análisis preliminar por cromatografía de capa fina (CCF) de la fracción D, utilizando como solvente una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (9:1), reflejó la existencia de mas de 6 compuestos. Al revelar con sulfato cérico se observó varias manchas amarillas indicativas de compuestos de naturaleza flavonoidal, mientras que con la lámpara UV se observaron manchas de colores rojo, azul, amarillas y negras, la roja atribuida a la presencia de clorofila en el extracto, azul y amarillas a grasas u otro tipo de compuestos, y las negras coincidían con las reveladas amarillas con el sulfato cérico por lo que se fue atribuida a compuestos de naturaleza flavonoidal.

La separación de las fracciones fue realizada por cromatografía en contra corriente de alta velocidad (HSCCC, de sus siglas en inglés High speed counter-current chromatography). La elección del sistema de solventes adecuado para la separación se realizó mediante CCF teniendo como referencia el sistema reportado por Yang y col. CHCl_3 -nBuOH- MeOH- H_2O (4:0,5:3:2)^[31] sin embargo se probó con diferentes sistemas y diferentes relaciones para la mezcla de solventes a utilizar, este estudio en CCF reflejó un mejor reparto entre las fases

de los compuestos con un sistema similar al inicialmente intentado CH_2Cl_2 -nBuOH- MeOH- H_2O (4:0,5:3:2) con el cual se procedió a trabajar. De la fracción D se inyectó en el equipo 1,6559 \pm 0,0005g y su separación por HSCCC dio lugar a 87 fracciones las cuales fueron unidas posteriormente según su similitud mostrada bajo el análisis en CCF dando así lugar a 8 sub-fracciones mas lo restante en la fase estacionaria, tal y como se indica en el siguiente esquema:

Esquema 5. Separación de la fracción D por HSCCC.



Las fracciones colectadas fueron eluyendo en forma creciente de polaridad.

La fracción FD1-14 (108.7 mg) una pasta de color verde oscuro solo reflejaba la existencia de manchas rojas en la luz UV, atribuidos principalmente a las clorofilas existentes en la planta, este tipo de compuestos son pigmentos característicos en el reino vegetal los cuales dan el color verde a los órganos fotosintéticos.

Las fracciones FD15-20 (25.5 mg), FD21-26 (27.3 mg) presentaban manchas de colores azul intenso, amarillo y negro en la luz UV, todas estas presentaron similares Rf (0,3). Intentando con diferentes mezclas de solventes y sobre placas de silica gel y RP-18 no se logró separar los compuestos en estas fracciones, presentando un Rf muy similar.

De igual modo la fracción FD27-40 (53,4 mg) resultó ser la mezcla de compuestos de naturalezas distintas pero con Rf muy similares, observados en la luz UV y revelados con yodo.

La fracción FD40-43 (7,3 mg) a pesar de presentar mayoritariamente un componente que revelaba negro a la luz UV, poseía una mancha azul de Rf cercano. Esta fracción por contener muy poca cantidad no se continuo procesando.

Las tres fracciones siguientes eran mezclas de dos componentes (en cada una diferentes). La última fracción FDFE fue la proveniente de la fase estacionaria constituida por una mezcla compleja de varios compuestos. A continuación se presenta el esquema seguido en la separación de las ultimas 4 fracciones colectadas.

4.3. Separación de las fracciones FD45-61, FD62-85, FD86-87 y FDFE

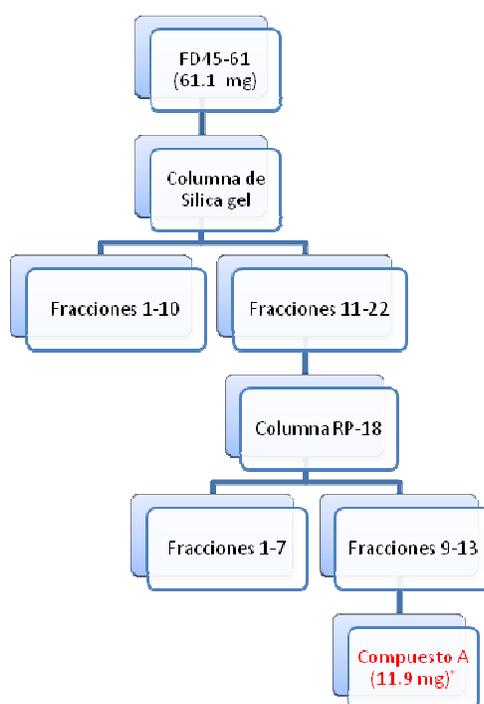
4.3.1. Separación de la fracción FD45-61

La fracción FD45-61 una pasta amarilla resultó ser la mezcla de 2 compuestos. Uno minoritario y el otro mayoritario, lo cual fue evidenciado usando como revelador la cámara de yodo, viendo así una mancha definida marrón y otra que casi no se observaba, la cual bajo la luz UV se observaba como una mancha azul intensa.

La purificación del compuesto mayoritario fue llevada a cabo mediante cromatografía de columna en sílica gel utilizando para la elución una mezcla de solventes CH_2Cl_2 :MeOH en diferentes proporciones, partiendo de una cantidad inicial de 61.1 mg y colectando 22 fracciones las cuales fueron estudiadas por CCF y unidas posteriormente en dos grupos (1-10 y 11-22), el segundo grupo fue sometido a un segundo proceso de purificación mediante el uso de una columna de RP-18, utilizando una mezcla de solventes MeOH:H₂O a diferentes relaciones de manera de eluir mediante un gradiente decreciente de polaridad, por este método cromatográfico se obtuvo 13 fracciones, de las cuales las fracciones de la

9-13 estaban constituidas por un compuesto amarillo oscuro, el cual se denominó A con un peso de 11,9 mg. Este proceso de purificación se muestra en el siguiente esquema:

Esquema 6. Proceso de purificación de la fracción FD45-61

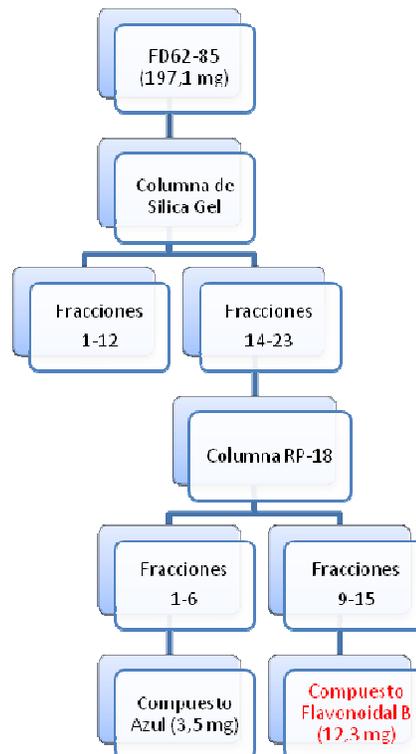


4.3.2. Separación de la fracción FD62-85

Esta fracción era una pasta marrón y al igual que la fracción anterior estaba constituida por dos compuestos de los cuales uno de ellos era mayoritario según lo revelado en la cámara de yodo y además al ser revelado con sulfato cérico mostraba una coloración amarilla lo cual es indicativo de un compuesto de naturaleza flavonoidal.

Su separación se llevó a cabo en 2 etapas: la primera consistió en pasar dicha fracción de 197.1 mg por una columna de sílica gel eluyendo con una mezcla de solventes CH_2Cl_2 -MeOH (8,5:1,5) obteniendo de esta manera 23 fracciones, siendo agrupadas las fracciones 1-12 y 14-23. La segunda etapa de la purificación se logró pasando la mezcla contenida en las fracciones 14-23 por una columna de RP-18 de la cual se colectaron 15 fracciones. Las primeras 6 fracciones estaban constituidas por un compuesto que al ser observado con luz UV mostró un color azul eléctrico intenso. De las fracciones 9-15 se logró aislar un sólido marrón claro, el cual al ser revelado con sulfato cérico mostró una coloración amarilla típica de flavonoides. Este proceso se ilustra a continuación:

Esquema 7. Proceso de separación de la fracción FD62-85.



Es interesante notar de que se sembró una cantidad de 197,1 mg de la fracción inicial que según el estudio realizado sobre CCF solo constaba de dos componentes, y luego de pasar por las dos columnas solo se logró aislar 12,3 mg de un compuesto puro, el cual denominamos B. La pérdida del material puede deberse a la gran polaridad de los compuestos flavonoidales y su afinidad por la silica gel. Como es conocido en este tipo de cromatografías existe el problema de adsorción irreversible de los compuestos más aun cuando los mismos presentan alta polaridad como es el caso de los flavonoides.

4.3.3. Separación de la fracción FD86-87

Esta fracción resultó ser una pasta marrón. Al hacer su estudio mediante CCF se observó la presencia de dos manchas muy cercanas entre sí y al ser revelado con sulfato cérico se

observó una coloración amarilla lo cual sugiere que al menos uno de los compuestos (o los dos) tiene naturaleza flavonoidal.

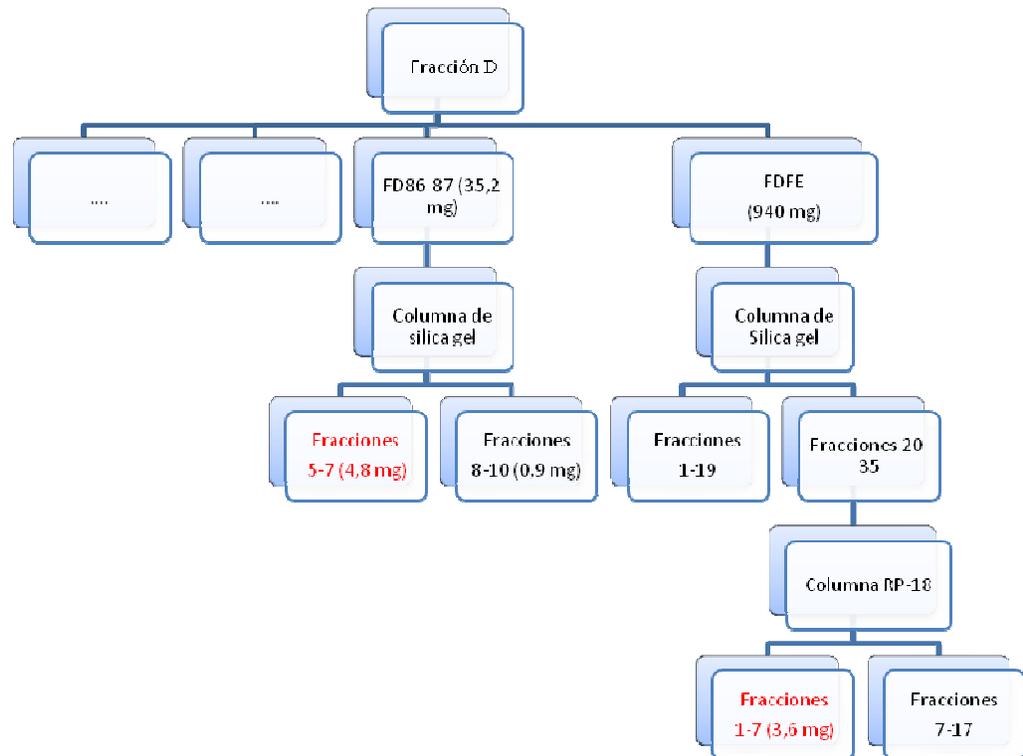
Con la finalidad de purificar el o los compuestos mayoritarios presentes en esta fracción se sembró en una columna de silica gel y se eluyó con una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (8:2), obteniendo 10 fracciones, y posteriormente se unieron las fracciones 5-7 y 8-10, las cuales pesaron 4,8 mg y 0,9 mg respectivamente. Las fracciones de la 5-7 mostraron la presencia de un compuesto contaminado, mientras que las fracciones 8-10 presentaban al compuesto puro pero en muy poca cantidad.

4.3.4. Separación de la fracción FDFE

Esta fracción fue la que quedó en la fase estacionaria (acuosa) de el sistema de CCC, constituida por una mezcla compleja de varios compuestos de mayor polaridad. Esta fracción (940 mg) se sometió a una columna de silica gel, se eluyó con un gradiente de polaridad comenzando con 8:2 hasta llegar a 1:1 de una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH, y se colectaron 40 fracciones.

Por el análisis de CCF fueron unidas las fracciones 20-35 y se sometió a una columna de RP-18, haciendo nuevamente un gradiente de elución MeOH- H_2O , y obteniendo 3,6 mg del compuesto FDFEFr1-7. Este proceso se ilustra en el siguiente esquema:

Esquema 8. Proceso de purificación de las fracciones FD86-87 y FDFE



Este caso fue mas frustrante que el de la purificación de la fracción FD86-87, ya que se aplicó una mayor cantidad de la fracción FDFE en la columna y solo se aisló 3,6 mg del compuesto lo que equivale a el 0,38% de la masa inicial, esto seguramente se debe a la adsorción irreversible que existe en los soportes sólidos y mas aun esta clase de compuestos con alta polaridad y su afinidad con la fase estacionaria de sílica gel.

4.4. Resultados Biológicos de los compuestos aislados

Una vez separado los compuestos presentes en la fracción D, se procedió a evaluar la actividad inhibitoria sobre la G-6-Pasa tal y como se indicó en la metodología experimental, y los resultados obtenidos son los mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de actividad de los compuestos aislados de la fracción D proveniente del extracto metanólico de *Bauhinia variegata L.* sobre la enzima G-6-Pasa.

Extracto o Compuesto	%Microsomas intactos	% Microsomas rotos
Extracto metanólico (Hojas)	84.0	87.0
Fracción D	79.4	26.9
Compuesto A	58.5	12.2**
Compuesto Flavonoidal B	44.2	2.2
Compuesto Azul	33.8	49.6**
FD86-87Fr5-7	31.7	38.4
FDFFr1-7	55.8	17.3**

** Estos valores son de activación en lugar de inhibición.

Los valores observados en la tabla anterior muestran los porcentajes de inhibición para los compuestos aislados tanto en microsomas intactos como en los rotos. El valor mas alto para la inhibición en los microsomas intactos fue el del compuesto A, sin embargo es importante acotar que si bien este resultado indica que este compuesto esta actuando sobre el

transportador T1, también el resultado encontrado para este compuesto en microsomas rotos es importante ya que en lugar de inhibir la subunidad catalítica mas bien activa su función, este efecto activador sobre la subunidad catalítica no tiene sentido fisiológico ya que in vivo no existen condiciones que permeabilicen los microsomas sin embargo la diferencia en los porcentajes permite decir que dicho componente actúa de una manera mas selectiva sobre el transportador T1. Este mismo comportamiento lo presentó el compuesto B encontrando para los microsomas intactos un porcentaje de 44% y en los rotos 2.2% de inhibición. Ambos compuestos limitan el acceso del sustrato (G-6-P) al lumen del retículo endoplasmático y de esta manera se libera menores cantidades de glucosa y de fosfato inorgánico.

Los efectos del compuesto azul son bastante curiosos ya que ejerce una importante inhibición en microsomas intactos pero a su vez posee un mayor efecto activador de la enzima en microsomas rotos, es decir; en comparación con los compuestos anteriores este tiene una mayor acción sobre la subunidad catalítica pero esta acción no es inhibitoria sino que activa la función de la G-6-Pasa.

El compuesto FD86-87Fr5-7 inhibió de una manera similar la actividad de la enzima en microsomas intactos y rotos lo cual sugiere que actúa casi en igual proporción tanto sobre el transportador T1 como sobre la subunidad catalítica de la enzima G-6-Pasa, o lo que es mas probable que el efecto observado sea la consecuencia de la inhibición de la subunidad catalítica tanto en microsomas intactos como en rotos ya que es poco probable que un mismo compuesto inhiba por igual dos proteínas diferentes.

El compuesto FDFEFr1-7 mostró el segundo mas alto porcentaje inhibitorio, con un comportamiento similar al del compuesto A en cuanto al efecto sobre la enzima en microsomas rotos el cual también dio como resultado un porcentaje de activación cuando entró en contacto directo sobre la subunidad catalítica.

Es importante notar que en el presente trabajo tres compuestos (A, Azul y FDFEFr1-7) mostraron una activación de la subunidad catalítica, cosa que dentro de nuestro conocimiento no se ha reportado previamente, además es importante señalar que ninguno de los compuestos aislados presentó una actividad tan elevada como la mostrada por la fracción D completa, esto en partes puede atribuirse a dos posibles factores, uno de ellos puede ser la acción en conjunto de dos o más componentes presentes en el extracto. El otro posible factor puede ser el hecho de no haber podido aislar otro(s) componente(s) de la fracción que pudiera estar ejerciendo un mayor efecto inhibitorio similar al mostrado por la fracción D completa.

Otro punto importante es el alto valor inhibitorio del extracto metanólico original tanto sin histonas como con histonas respecto a la fracción D, lo cual indica la presencia de principios activos en las otras fracciones (A, B y C).

4.5. Resultados Fitoquímicos

4.5.1. Compuesto A.

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color amarillo y se obtuvo 11,9 mg del mismo, su espectro de protones (espectro 1) fue tomado en MeOH-d₄, esto debido a que el compuesto presentaba una alta solubilidad en el en comparación a otros solventes.

Viendo la ampliación del espectro de protones (espectro 2) se pueden observar varias señales en la región comprendida entre 0-2 ppm, encontrando en esta un par de singletes en 1,03 ppm asignados cada uno a un grupo metilo unidos a un carbono cuaternario, un doblete con una constante de acoplamiento de 6,26 Hz en 1,28 ppm asignado a un grupo metilo unido a un CH, y un doblete en 1,93ppm con una constante de acoplamiento de 1,0 Hz, posiblemente un metilo ubicado en un doble enlace.

Más adelante (espectro 3) se pueden observar un par de dobletes en 2,60 y 2,17 con constantes de acoplamiento de 16,8 y 17,1 Hz respectivamente, las cuales son típicas de acoplamientos geminales de protones. Alrededor de 5 y 6 ppm se observan varias señales asignables a protones olefínicos, mientras que las señales entre 3 y 5 ppm son asignables a protones de un azúcar.

En el espectro de carbonos (espectro 4) se observan 19 señales. Una señal en 199,97 ppm asignada a un carbono carbonílico, otra señal en 165,80 ppm la cual es asignada a un carbono olefínico desapantallado posiblemente por conjugación con el grupo carbonílico. Se observan además 4 señales entre 15 y 25 ppm atribuidas a carbonos metílicos. Para observar mejor estos análisis se tomó el espectro DEPT-135 (espectro 5) y haciendo una comparación entre ambos (espectro 6) se obtiene la siguiente información: cuatro carbonos metílicos, dos carbonos metilénicos, nueve carbonos metínicos y cuatro carbonos cuaternarios. La señal asignada a un CH₂ observada en 61,42 ppm es típica del carbono 6 de la glucosa, lo que se complementa con la señal observada en 99,92 ppm el cual es el desplazamiento para el carbono anomérico de dicha azúcar, lo cual además dice cuál anomero de ella está presente según datos reportados por Bock y col en 1984^[36], el carbono 1 del anomero alfa tiene un desplazamiento de 92,9 ppm mientras que el beta se desplaza a 96,8 ppm por lo que se está en presencia del anomero beta de la glucosa.

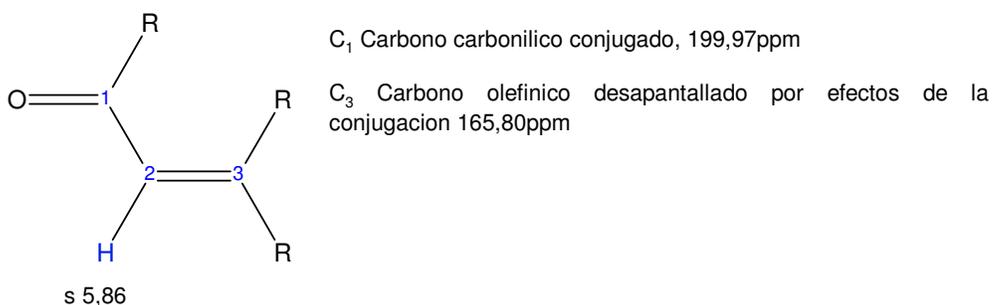
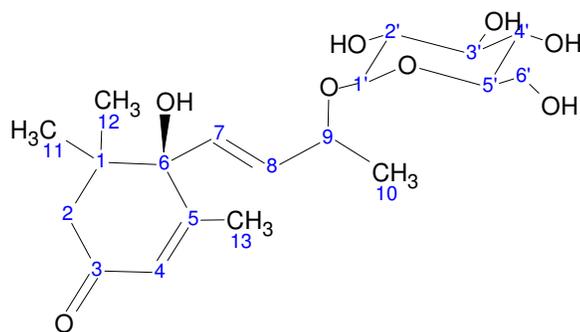


Figura 9. Carbono carbonílico conjugado

Las señales encontradas para este compuesto coinciden con una ionona(40) reportada por Çaliş y col (2002)^[37] aunque no esta reportado para el género *Bauhinia*. A continuación se presenta una tabla comparativa entre la ionona reportada y el compuesto aislado.



40 [(+)-(6S,9R)-9-O-β-D-Glucosido-6-Hidroxi-3-oxo-α-ionol]

Tabla 4. Tabla comparativa de los datos espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C entre la ionona reportada y el compuesto aislado

C/H (átomo)	Reportado ^[37] (DMSO-d ₆)			Experimental (MeOH-d ₄)		
	δC	Dept	δH(ppm), J(HZ)	δC	Dept	δH(ppm), J(HZ)
1	40,9	C	-	41,1	C	-
2	49,3	CH ₂	2,54 d(16,6) 2,05 d(16,6)	49,4	CH ₂	2,63 d(16,8) 2,19 d(17,2)
3	197,2	C	-	199,9	C	-
4	125,2	CH	5,76 br s	125,8	CH	5,86 s
5	163,6	C	-	165,8	C	-

6	77,9	C	-	78,7	C	-
7	131,6	CH	5,94 d(15,5)	132,4	CH	6,00 d(15,8)
8	131,4	CH	5,64 dd(15,5; 6,4)	132,3	CH	5,76 dd(15,9; 7,3)
9	71,9	CH	4,43 dq(6,4; 6,5)	73,3	CH	4,56 dd(6,6; 4,3)
10	22,0	CH ₃	1,19 d(6,5)	20,9	CH ₃	1,29 d(6,26)
11	23,1	CH ₃	0,93 s	22,2	CH ₃	1,04 s
12	24,1	CH ₃	0,92 s	23,4	CH ₃	1,01 s
13	18,6	CH ₃	1,82 d(1,1)	18,3	CH ₃	1,93 d(1,0)
6-OH	-	-	4,98 s	-	-	4,90 s
1'	99,9	CH	4,09 d(7,8)	99,9	CH	4,27 d(7,6)
2'	73,3	CH	2,95	73,6	CH	} 3-5 (sin asignar)
3'	77,0	CH	3,40	77,0*	CH	
4'	70,0	CH	3,01	70,4	CH	
5'	77,1	CH	2,93	76,9*	CH	
6'	61,0	CH ₂	3,64m; 3,41m	61,5	CH ₂	3,87m; 3,67m

*. Los valores marcados son intercambiables.

Como se observa los valores de carbonos tienen una correlación casi perfecta con algunas variaciones debido a que el solvente en el que fue tomado el espectro de los datos reportados fue DMSO-d₆ y el espectro del compuesto aislado fue tomado en MeOH-d₄.

4.5.2. Compuesto B

De la fracción FD62-85 se logró aislar el compuesto B en forma de cristales amorfos amarillos. El cual al ser revelado con sulfato cérico dio una coloración amarilla lo cual es

indicativo de compuestos de tipo flavonoidal. Para determinar su estructura se realizaron análisis de RMN ^1H y ^{13}C .

En el espectro de protones de este compuesto (espectro 7) se observan varias señales características de flavonoides. El anillo B presenta señales alrededor de 7-8 ppm dependiendo de la sustitución del anillo.

En la ampliación del espectro (espectro 8) se observa un doblete en 6,86 con una constante de acoplamiento de 8,24 Hz lo cual indica un acoplamiento orto. Un doblete de doblete (dd) en 7,58 ppm con una constante de acoplamiento de 6,9 lo cual es un acoplamiento orto y la otra constante es bastante pequeña por lo que se asigna a un acoplamiento meta. De la misma manera ocurre con la señal observada en 7,7 ppm el cual es un doblete con una constante pequeña por lo que se puede asignar a un doblete meta. Considerando que los sustituyentes oxigenados en el anillo B de los flavonoides son generalmente ubicados en C-3, 4 y 5' desde el punto de vista biogénico la sustitución del anillo B del compuesto B puede ser como lo indicado a continuación.(Figura 10).

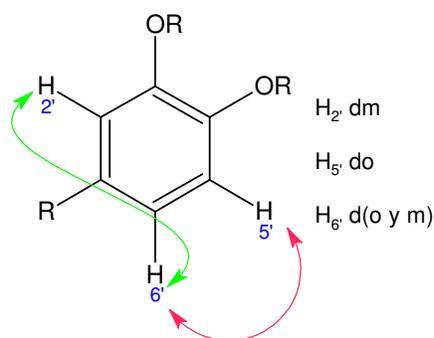


Figura 10. Acoplamientos en el anillo B

La sustitución del anillo A se puede deducir en las señales que se ven en 6,4 y 6,19 ppm las cuales deben ser dobletes con constantes de acoplamiento meta. Tomando en cuenta la señal observada en 12,3 ppm (espectro 7) es típica para el protón OH en C-5 formando

puede de hidrógeno con el C=O en C-4 típico de este tipo de estructuras flavonoidales, el esqueleto del compuesto B sería como el indicado a continuación:

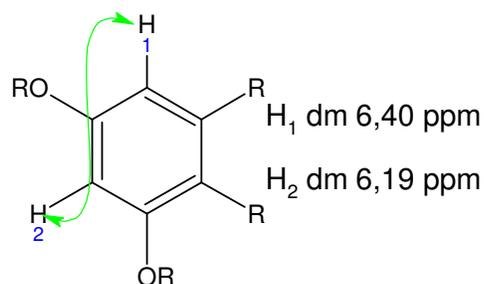


Figura 11. Acoplamiento en el anillo A

De esta manera se tiene una idea de la sustitución tanto del anillo A como del B.

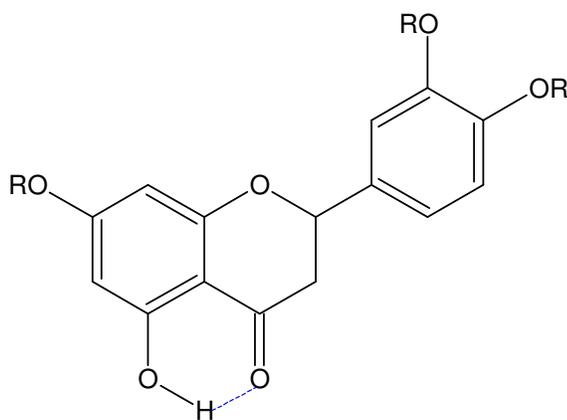


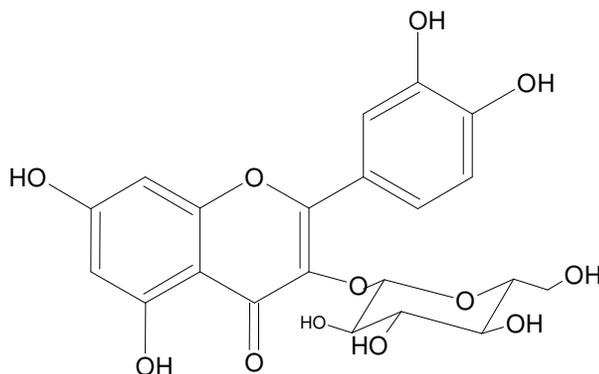
Figura 12. Estructura preliminar del flavonoide

Otra señal encontrada en el espectro de protones de este compuesto es un doblete en 5,26 ppm con una constante de acoplamiento de 7,3 Hz la cual es característica para el protón anomérico de la glucosa. Las demás señales correspondientes a la glucosa no se pueden analizar con claridad por la interferencia de las señales del solvente MeOH-d₄.

El espectro de carbonos (espectro 9) y DEPT (espectro 10) dio como resultado que este flavonoide poseía 21 átomos de carbono de los cuales diez eran cuaternarios, diez metínicos y un carbono metilénico (espectro 11), estos resultados confirman el hecho de la existencia del azúcar, ya que en el núcleo del flavonoide existen 15 átomos de carbono por lo que los otros 6 pueden ser del azúcar.

En el espectro 9 se observa una señal en 177,98 ppm asignada a un carbono carbonílico posiblemente conjugado. En el esqueleto indicado en la figura 12 se cuentan 8 carbonos cuaternarios de los diez presentes. Por lo que la estructura del compuesto tiene la forma de un flavonol derivado de la quercetina, con un azúcar la cual por las señales en 61,2 ppm asignadas a un CH₂ es la glucosa y cuyo carbono anomérico está en 102,93 ppm lo cual indica que es el anómero beta.

En el género *Bauhinia* se ha reportado un compuesto con estas características, la quercetina-3-O-β-glucosido (ver figura 13), este compuesto fue hallado por Fuentes y col en el 2004^[15] de las hojas de *Bauhinia candicans*. En la tabla presentada a continuación se muestran los valores reportados para este compuesto^[38] y el compuesto B aislado ambos tomados en MeOH-d₄.



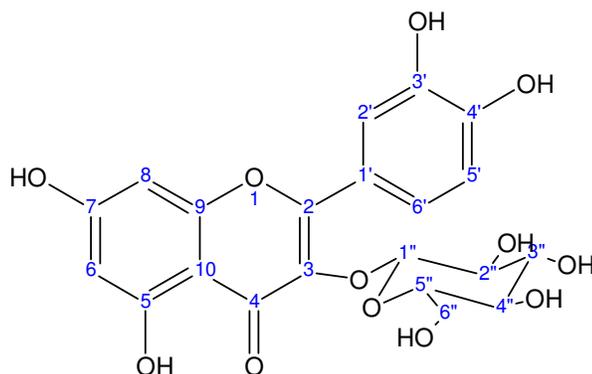


Figura 13. Quercetina-3-O- β -glucosido

Tabla 5. Datos comparativos de RMN de ^1H y ^{13}C de la Quercetina-3-O- β -glucosido con el compuesto aislado

C/H (átomo)	Reportado ^[15] (MeOH-d ₄)			Experimental (MeOH-d ₄)		
	δC	Dept	$\delta\text{H}(\text{ppm}),$ J(HZ)	δC	Dept	$\delta\text{H}(\text{ppm}),$ J(HZ)

2	158,47	C	-	157,64	C	-
3	135,61	C	-	134,26	C	-
4	179,50	C	-	177,98	C	-
5	163,07	C	-	161,69	C	-
6	99,87	CH	6,20 d(2,2)	98,57	CH	6,19 s
7	165,99	C	-	164,73	C	-
8	94,69	CH	6,39 d(2,5)	93,39	CH	6,38 s
9	159,02	C	-	157,13	C	-
10	105,70	C	-	104,35	C	-
1'	123,18	C	-	121,73	C	-
2'	115,99	CH	7,70 d(2,2)	116,22	CH	7,70 s
3'	149,84	C	-	148,44	C	-
4'	145,91	C	-	144,57	C	-
5'	117,54	CH	6,86 d(8,3)	114,64	CH	6,87 d(8,2)
6'	123,08	CH	7,58 dd(2,2; 8,3)	121,86	CH	7,59 sd(7,0)
1''	104,28	CH	5,23 d(7,6)	102,93	CH	5,26 d(7,3)
2''	75,73	CH	3,47 dd(7,3; 9,1)	74,40	CH	} 3-5 (sin asignar)
3''	78,12	CH	3,42 t(9,0)	76,78	CH	
4''	71,22	CH	3,34 t(9,0)	69,86	CH	
5''	78,39	CH	3,21 ddd(2,4; 5,4; 9,0)	77,05	CH	
6''	62,56	CH ₂	3,70 dd(2,4; 12)	61,22	CH ₂	
			3,56 dd(5,2; 12)			

Los resultados mostrados en la tabla anterior concuerdan entre si tanto las señales encontradas en el espectro de carbono como en protones.

4.5.3. Compuesto FD86-87Fr5-7

Esta fracción tenía aspecto amorfo marrón, la cual resultó ser una mezcla de dos componentes de los cuales uno de ellos revelaba coloración amarilla ante el indicador de sulfato cérico, lo que indica la presencia de un compuesto de naturaleza flavonoidal, dada la cantidad tan pequeña de la mezcla no se purificó nuevamente sino que se tomo su espectro de RMN en MeOH-d₄.

El estudio de esta fracción mediante RMN de ¹H (espectro 12) muestra numerosas señales a campo bajo, sin embargo se pueden distinguir varias con bastante claridad. En 7,05 y 6,68 ppm se observan dos dobletes ambos con constantes de acoplamiento 8,6 Hz (espectro 13), los cuales pueden ser asignados a protones sobre el anillo B del núcleo flavonoidal,

Las señales observadas en 6,41 ppm singlete ancho y 6,21 ppm (d, J= 1,97 Hz) son atribuibles a los protones 6 y 8 del anillo A de los flavonoides cuando se tiene sustituciones en las posiciones 5 y 7.

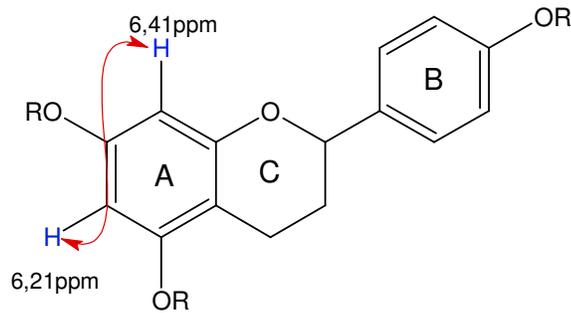


Figura 14. Acoplamiento en el anillo A para el Flavonoide propuesto

En el espectro de carbonos ,(espectro 14 y 15) se observa una señal en 16,63 ppm atribuída a un grupo metilo, este metilo puede pertenecer a la rhamnosa ya que se observan varias señales entre 60-80 ppm que pueden ser asignados a CH presentes en diferentes azúcares, así mismo la señal observada en 61,42 ppm (CH₂) es típica para el carbono C-6 de la molécula de glucosa. Las otras señales que se atribuyen a carbonos metílicos son las dos observadas en 55,40 ppm, que son de grupos metoxi (espectro 16). Uniendo la información del espectro de protones con la obtenida del espectro de carbonos y la revisión de los compuestos aislados para la *Bauhinia variegata* anteriormente, se tiene que existe un compuesto aislado anteriormente el cual tiene una estructura similar a lo que se puede decir de los espectros (figura 15),

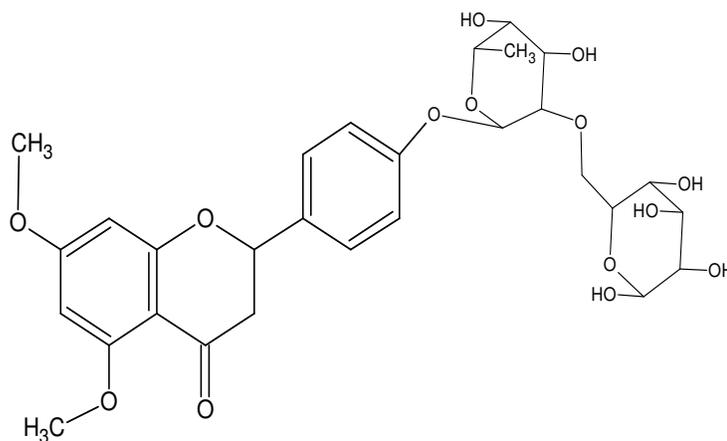


Figura 15. 5,7-Dimetoxi-flavanona-4'-O- α -rhamnosido- β -glucosido

aunque el compuesto reportado 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O- α -rhamnosil- β -glucosido, no tiene la información espectroscópica disponible^{[24],[25],[26]y[27]}. Sin embargo no se ve con claridad en el espectro del compuesto aislado la señal del C=O quizás debido a que se tenía muy poca cantidad del mismo. La otra señal dudosa es la asignada al otro carbono metilénico (68,40 ppm), haciendo una comparación del núcleo principal con una flavanona sencilla como la naringenina^[39](figura 18) se tiene que el carbono C-3 tiene un desplazamiento reportado de 42,0 ppm, por lo que queda la duda respecto al desplazamiento observado para la señal asignada para el CH₂.

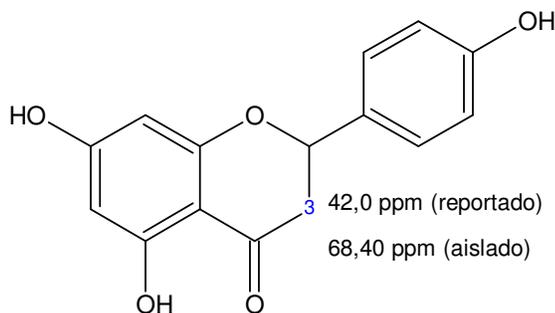


Figura 16. Naringenina

4.5.4. Compuesto FDFEFr1-7

Esta fracción aislada resulto ser una pasta marrón, de la cual se tenía 3,6 mg y al ser estudiada mediante cromatografía de capa fina revelaba la presencia de una mancha con otra pequeña. Esta mancha al ser revelada con sulfato cérico daba una coloración amarilla característica de flavonoides. Dada la cantidad que se tenía de la fracción no se purificó nuevamente y se tomó el espectro de RMN ^1H en MeOH-d_4 .

En el espectro de RMN ^1H (espectros 17 y 18) se observan señales típicas de flavonoides. La sustitución para el anillo B puede ser observada estudiando las señales encontradas en 7,87 ppm d(1,91Hz), 7,63 ppm dd(1,97Hz;8,26 Hz) y 6,87 ppm (8,35 Hz); es decir la primera señal es asignada a un doblete con constante de acoplamiento meta correspondiente al protón en C-2', la segunda señal corresponde a un doblete de doblete con constantes de acoplamiento orto-meta asignada al protón en C-6', la tercera señal corresponde a un doblete con una constante de acoplamiento orto atribuido a el protón en C-5'.

Las señales encontradas en 6,41 y 6,21 ppm cada una con una constante de acoplamiento de 1,9 Hz lo que implica acoplamientos tipo meta entre si, pueden ser atribuidas a los protones en C-8 y C-6 respectivamente (figura 19).

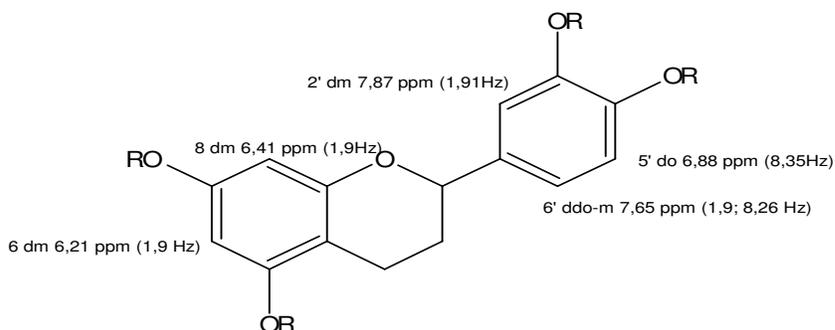


Figura 17. Posible fragmento estructural propuesto para el flavonoide encontrado.

Además de las señales asignadas a los anillos A y B se observan numerosas señales entre 5 y 3 ppm las cuales podrían ser asignadas a azúcares presentes en el compuesto sin embargo esa información la daría mejor un espectro de RMN ^{13}C el cual por razones de cantidad no se logró tomar. No obstante existe una alta posibilidad de que en el compuesto se tengan azúcares ya que el compuesto se aisló de la fase estacionaria acuosa del HSCCC, y a campos altos se observan 2 dobletes en 1,18 y 1,11 ppm con constantes de acoplamiento de 5,94 Hz y 6,26 Hz respectivamente (espectro 19) los cuales son atribuibles a los protones de dos grupos metilo en dos moléculas de rhamnosa^[40].

La estructura parcial del compuesto FDFEFr1-7 esta presentada en la figura 19 sin caracterizar la naturaleza del anillo C.

5. Conclusiones

Al realizar el estudio fitoquímico de *Bauhinia variegata* biodirigido mediante ensayos de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa se logró aislar los siguientes compuestos:

- **Compuesto A:** [(+)-(6S,9R)-9-O-β-D-Glucosido-6-Hidroxi-3-oxo-α-ionol],
El cual fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo e identificado mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H y ¹³C. Este compuesto mostró una actividad inhibitoria del 58% en el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa, este porcentaje fue observado sobre microsomas intactos lo que implica que este compuesto actúa de una manera más efectiva sobre el transportador T1 que sobre la subunidad catalítica. Este compuesto no ha sido reportado anteriormente dentro del género *Bauhinia*.
- **Compuesto B:** Quercetina-3-O-β-glucosido
Este compuesto fue aislado como un sólido amorfo pastoso de color marrón claro y fue identificado mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H y ¹³C. La evaluación de su actividad sobre la enzima G-6-Pasa mostro que el mismo actúa (en un porcentaje del 44%) sobre el transportador T1 siendo muy poco su efecto sobre la subunidad catalítica. Este compuesto ya había sido reportado en plantas del género *Bauhinia* pero no en la especie *B. variegata*.
- **FD85-86Fr5-7 y FDFEFr1-7**

Ambas fracciones resultaron ser mezclas de dos componentes cada una y dadas las cantidades que se logró obtener no se purificaron, sin embargo la primera de ellas posiblemente sea un compuesto aislado con anterioridad de la especie *Bauhinia variegata* el cual resultó ser una flavanona glicosilada. El segundo (proveniente de la fase estacionaria) al parecer es un derivado de la quercetina glicosilado también, sin embargo es necesaria mayor información espectroscópica para poder llegar a sus estructuras con claridad. A ambos compuestos se realizó el ensayo de inhibición

sobre la enzima G-6-Pasa. El compuesto presente en FD86-87Fr5-7 mostró un porcentaje inhibitorio sobre microsomas intactos del 32%, sin embargo mostro un porcentaje de activación de 38% sobre microsomas rotos, lo cual implica que dicho compuesto actúa tanto como el transportador T1 (inhibe) como sobre la subunidad catalítica (activa). El compuesto presente en FDFEFr1-7 presentó una actividad sobre microsomas intactos de 56% y un porcentaje de activación de 17% sobre microsomas rotos lo que implica que tiene una mayor actividad inhibitoria sobre el transportador T1 que su actividad sobre la enzima G-6-Pasa.

A partir del valor de inhibición calculado para la fracción D, constituida por los compuestos A, B, los presentes en las fracciones FD86-87Fr5-7 y FDFEFr1-7, y muchos otros que no se lograron purificar, se debe resaltar que esta presenta mayor porcentaje inhibitorio (79,4%) que los compuestos por separado. Este resultado se puede atribuir a dos factores igualmente probable, uno de ellos es que puede existir un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en el extracto o que el compuesto que presenta la mayor actividad no se haya podido aislar del extracto dada la poca cantidad que se purificó.

Es interesante el hecho de que la mayoría de los compuestos reportados en el genero *Bauhinia* con actividad hipoglicemiante tengan mayoritariamente estructuras de tipo flavonoidal, y en el estudio de la *Bauhinia variegata* se logró aislar una ionona que presentó mayor actividad que los demás compuestos de estructuras flavonoidales.

6. Recomendaciones

- ❖ Al realizar este trabajo de investigación se pretendía utilizar principalmente la cromatografía en contra-corriente de alta velocidad como técnica de separación de los compuestos, sin embargo el equipo presentó problemas en la columna, por lo que se utilizaron otros soportes cromatográficos, como sílica gel y RP18 para tal fin, aún y a expensas de que ocurriera la adsorción de los compuestos sobre las superficies de manera irreversible, este hecho limitó la cantidad obtenida de los mismos. Por esta razón, se sugiere utilizar soportes de menor interacción con los compuestos de esta naturaleza (flavonoidal o altamente polares).
- ✓ Realizar estudios fitoquímicos guiados por la inhibición de la enzima G-6-Pasa de las fracciones B y C además del re-estudio de la fracción D.
- ✓ A los compuestos aislados que presentaron mayor actividad realizar ensayos de absorción intestinal, de manera de complementar este estudio preliminar.
- ✓ Determinar el IC_{50} de los compuestos aislados.
- ✓ Establecer el tipo de inhibición (competitiva o no competitiva) y el KI, que ejercen sobre la G-6-Pasa los compuestos aislados.

7. Bibliografía

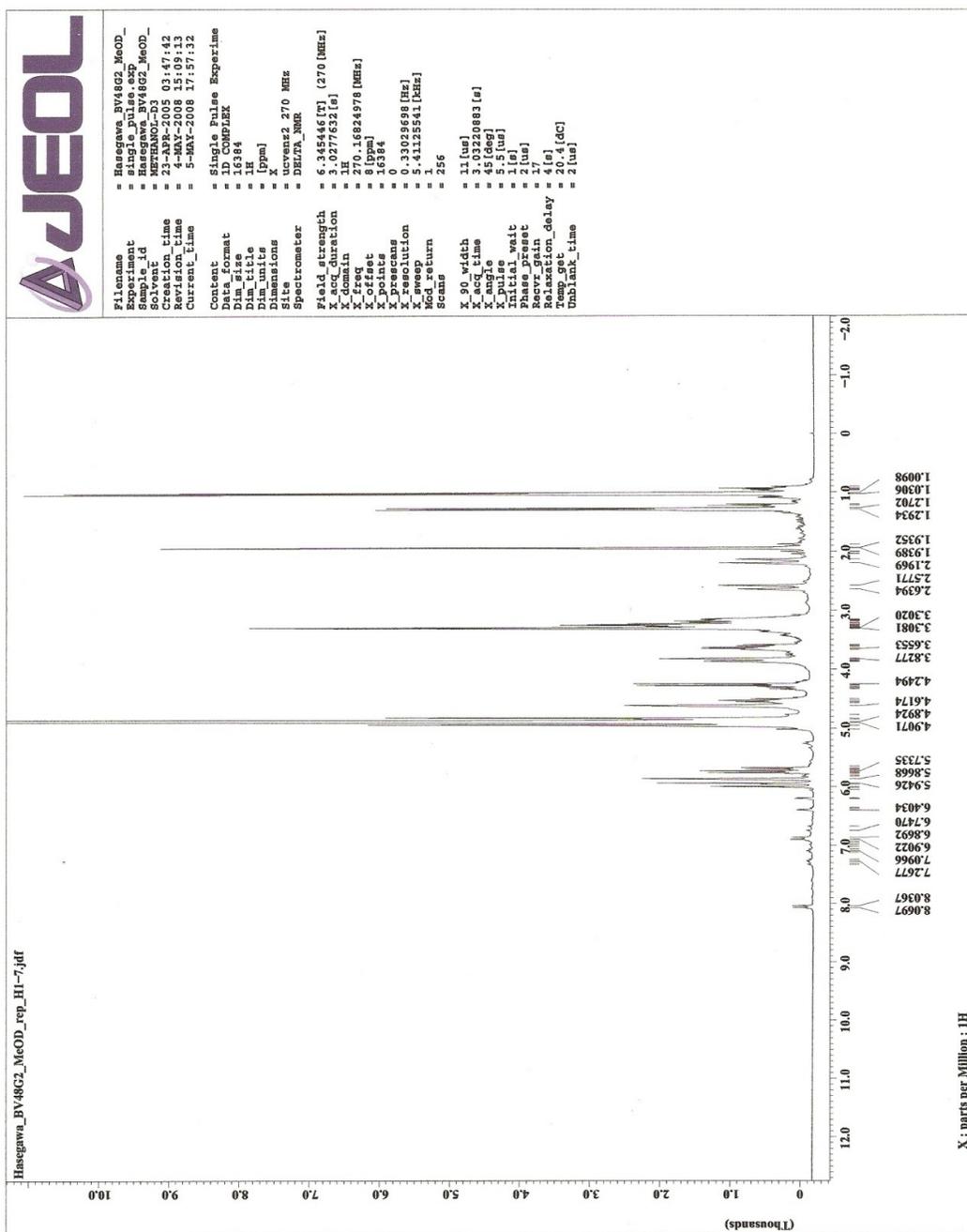
1. Albornoz A. (1980) "**Productos Naturales**" Publicaciones UCV. 36,45.
2. Chan M. (2007, 31 de Octubre) "**¿QUÉ ES LA DIABETES?**" [En Línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
3. Estrada O., Hasegawa M., González F., Motta N., Perdomo E., Solórzano A., Méndez J., Méndez B. (2005) "**Evaluation of Flavonoids from Bauhinia megalandra Leaves as inhibitors of Glucose-6-Phosphatase System**" *Phytother. Res.*, 19: 859-863.
4. a.) González-Mujica F., Motta N., Becerra A. (1998) "**Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by aqueous extract of Bauhinia megalandra leaves**" *Phytother. Res.*, 12: 291-293.
b.) González-Mujica F., Motta N., Márquez J., and Capote-Zulueta J. (2003) "**Effects of Bauhinia megalandra aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles**" *Fitoterapia*, 74: 84-90.
c.) González-Mujica F., Motta N., Estrada O., Perdomo E., Méndez J., Hasegawa M. (2005) "**Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O- α -(2''-galloyl)rhamnoside isolated from Bauhinia megalandra leaves**" *Phytother. Res.*, 19: 624-627.
5. Marcano D., Hasegawa M. (2002) "**Fitoquímica Orgánica**" Segunda Edición. UCV-CDCH. Caracas. 137-201.
6. Smith C., Marks A., Lieberman M. (2005) "**Marks' Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**" Second Edition. Leppincott Williams & Wilkins Editions. Cap. 31: 557-578.
7. Nelson D., Cox M., (2004) "**Lehninger Principles of Biochemistry**" Fourth Edition. W.H. Cap. 14-15: 521-596.
8. Garibay M. (2007, 14 de Noviembre) "Metabolismo de La Glucosa" [En Línea] <http://201.116.18.153/laciencia/biologia/fisiologia/be3.htm>.
9. King H. (1999). "**Definition, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications**" World Health Organization report. 1-59.

10. Burchell A., Waddell I., (1991). “ ***The Molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase***” Biochim. Biophys. Acta, 1092: 129-137.
11. McCormack J., Westergaard N., Kristiansen M., Brand C. L., Lau J. (2001) “***Pharmacological Approaches to inhibit Endogenous Glucose Production as a mean of Anti-Diabetic Therapy***” Current Pharmaceutical Design, 7: 1451-1474.
12. Arion W., Lange A., Walls H. (1980) “ ***Microsomal Membrane Integrity and the Interactions of Phlorizin with the Glucose-6-Phosphatase System***” Journal Biology Chemical, 21:10387-10395.
13. Wales J.(2007, 28 de Septiembre) “***Bauhinia***” [En Línea] <http://es.wikipedia.org/wiki/Bauhinia>.
14. Sánchez J.(2007, 28 de Septiembre) “***Clasificación Y hábitat de la Bauhinia***”[En Línea] <http://www.arbolesornamentales.com/Bauhiniavariegata.htm>
15. Fuentes O., Arancibia P., Alarcon J. (2004) “***Hypoglycemic activity of Bauhinia candicans in diabetic induced rabbits***” Fitoterapia, 75, 6: 527-532.
16. Pepato M., Keller E., Baviera A., Kettelhut I., Vendramini R., Brunetti I. (2002) “***Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin-diabetic rats***” Journal of Ethnopharmacology, 81: 191-197.
17. Silva F., Szpoganicz B., Pizzolatti M., Willrich M., de Sousa E. (2002) “***Acute effect of Bauhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats***” Journal of Ethnopharmacology, 83: 33-37.
18. Arion W., Canfiel W., Callaway E. (1998) “***Direct Evidence for the involvement of two glucose-6-phosphatase binding sites in the glucose-6-phosphatase activity of intact microsomes. Characterization of T1, the microsomal glucose-6-phosphatase transporter protein by direct binding assay***” J. Biol. Chem., 273: 6223-6227.
19. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N.(2003). “ ***Antitumour activity of Bauhinia variegata on Dalton’s ascitic lymphoma***” Journal of Ethnopharmacology, 89: 107-109.
20. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N., Sakthisekaran D.(2006) “***Chemoprevention and cytotoxic effect of Bauhinia variegata against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines***” Journal of Ethnopharmacology, 104: 407-409.

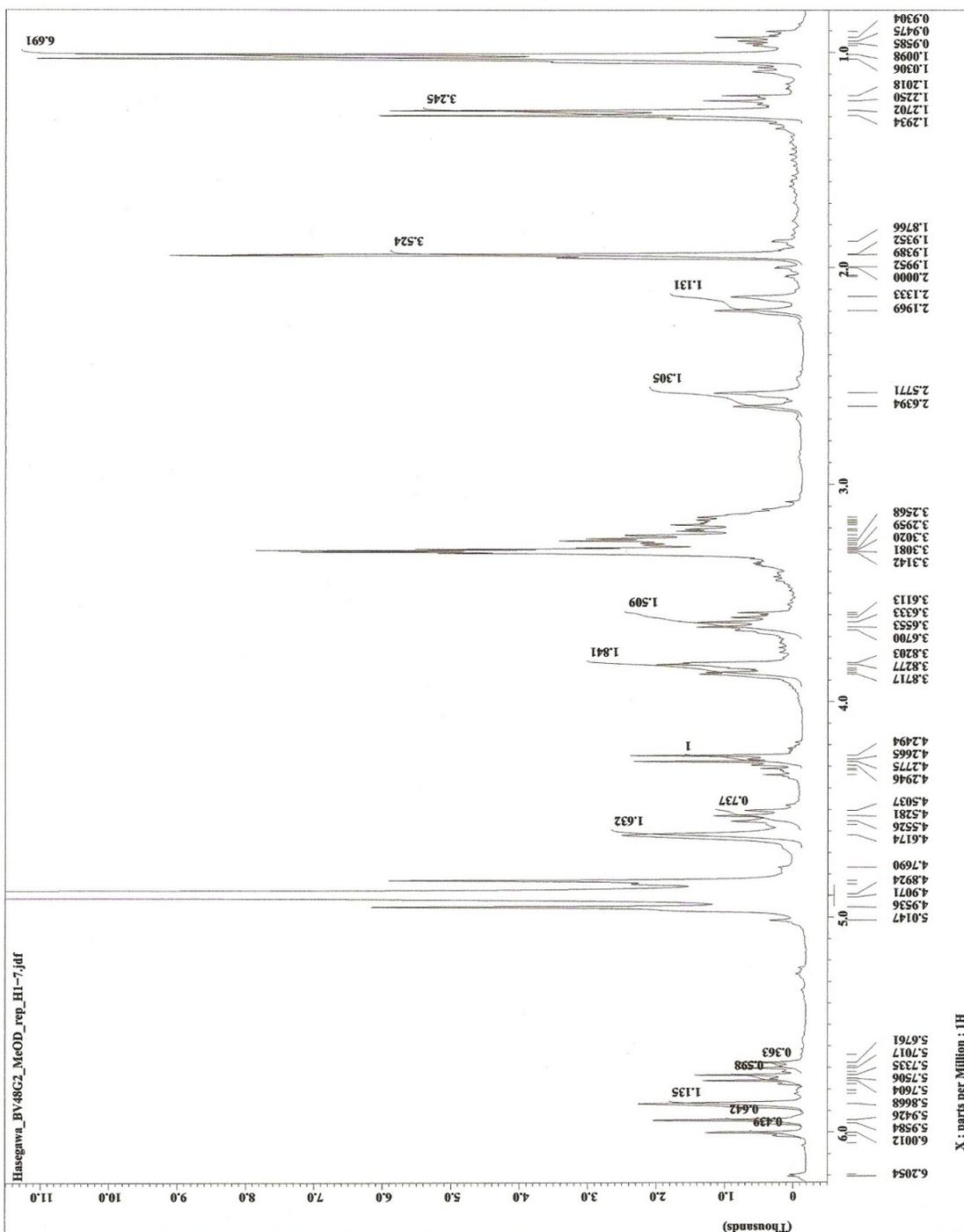
21. Ali M., Azhar I., Amtul Z., Ahmed V., Usmangani K. (1999) "**Antimicrobial screening of Caesalpiniaceae**" *Fitoterapia*, 70: 299-304.
22. De Los Rios C., Gil H., Báez D. (2003) "**Efecto inhibitorio de Bauhinia variegata L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina**" *Revista de la Facultad de Farmacia (ULA)*, 45: 12-16.
23. Reddy M., Reddy M., Gunasekar D., Caux C., Bodo B. (2003) "**A Flavone and a dihidroxidibenzoxepin from Bauhinia variegata**" *Phytochemistry*, 64: 879-882.
24. Gupta, A.K., Vidyapati, T.J., Chauhan, J.S. (1979). "**5,7-dihydroxy flavonone-4-O- α -l-rhamnopyranosyl- β -d-glucopyranosides from the stem of Bauhinia variegata.**" *Indian Journal of Chemistry, Section B*, 18: 85–86.
25. Gupta, A.K., Vidyapati, T.J., Chauhan, J.S. (1980). "**Chemical examination of stem of Bauhinia variegata.**" *Planta Medica*, 38: 174–176.
26. Yadava, R.N., Reddy, V.M.S. (2001). "**A new flavone glycoside 5-hydroxyl 7,3',4',5'-tetramethoxyflavone-5-O- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside from Bauhinia variegata Linn**". *Journal of Asian Natural Product Research*, 3: 341–346.
27. Duret S., Paris R. (1977) "**The Flavonoid of several species of Bauhinia**" *Plant Medicinal Phytotherapy*, 11: 213-216.
28. Effendi L., Yajun Y., Mattheos K. (2006) "**Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in Escherichia coli**" *Metabolic Engineering*, 8: 172-181.
29. Walles J. (2007, 28 de Septiembre). "**Flavonoides**" [En línea] <http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide#Bios.C3.ADntesis>
30. a.) Bermúdez J. (2006) "**Análisis por Cromatografía Contra Corriente a Alta Velocidad de los Metabolitos Secundarios del tipo Alcaloidal de la Planta Argemone mexicana L.**", Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.
- b.) Ito Y. (2005) "**Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography**" *Journal of Chromatography A, Review*, 1065: 145-168.
31. Yang F., Ma Y., Ito Y. (2001). "**Separation and Purification of isoflavones from a crude soybean extract by High-speed counter-current chromatography**" *J. of Chromatography A*, 928: 163-170.

32. Marcucci O., González-Mujica F., Pérez-Ayuso E. (1988) "**Alterations of Liver nuclear envelopes accompanying thiacetamine administration in rats**" Acta Cient. Venezolana, 34: 105-117.
33. Lowry O., Rosebrough H., Farr A., Randall R. (1951) "**Protein measurement with the folin phenol reagent**" J. Biol. Chem., 193:209-220.
34. Markwell M., Hass S., Bieber L., Tolbert N. (1978) "**A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample**" Analytical Biochemistry, 87: 206-210.
35. William B., Wilson K. (1981) "**Principios y técnicas de Bioquímica**" Editorial Omega, Barcelona.
36. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. (1984) "**Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides**" Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry 42: 193-225
- Bock K., Pedersen C., (1983) "**Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides**" Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry 41: 27-66
37. Çaliş I., Kuruüzüm-Uz A., Lorenzetto P., Rüeder P. (2002) "**(6S)-Hydroxy-3-oxo- α -ionol glucosides from Capparis spinosa fruits**". Phytochemistry 59: 451-457.
38. Kazuma K., Noda N., Masahiko S. (2003) "**Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea.**" Phytochemistry 62: 229-237
39. Markham K., Ternai B. (1976) " **^{13}C NMR of flavonoids-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones**". Tetrahedron 32: 2607-2612.
40. Markham K., Geiger H. (1994) " The flavonoids advances in research since 1986". Edited by J.B. Harborne, Pág. 441-495.

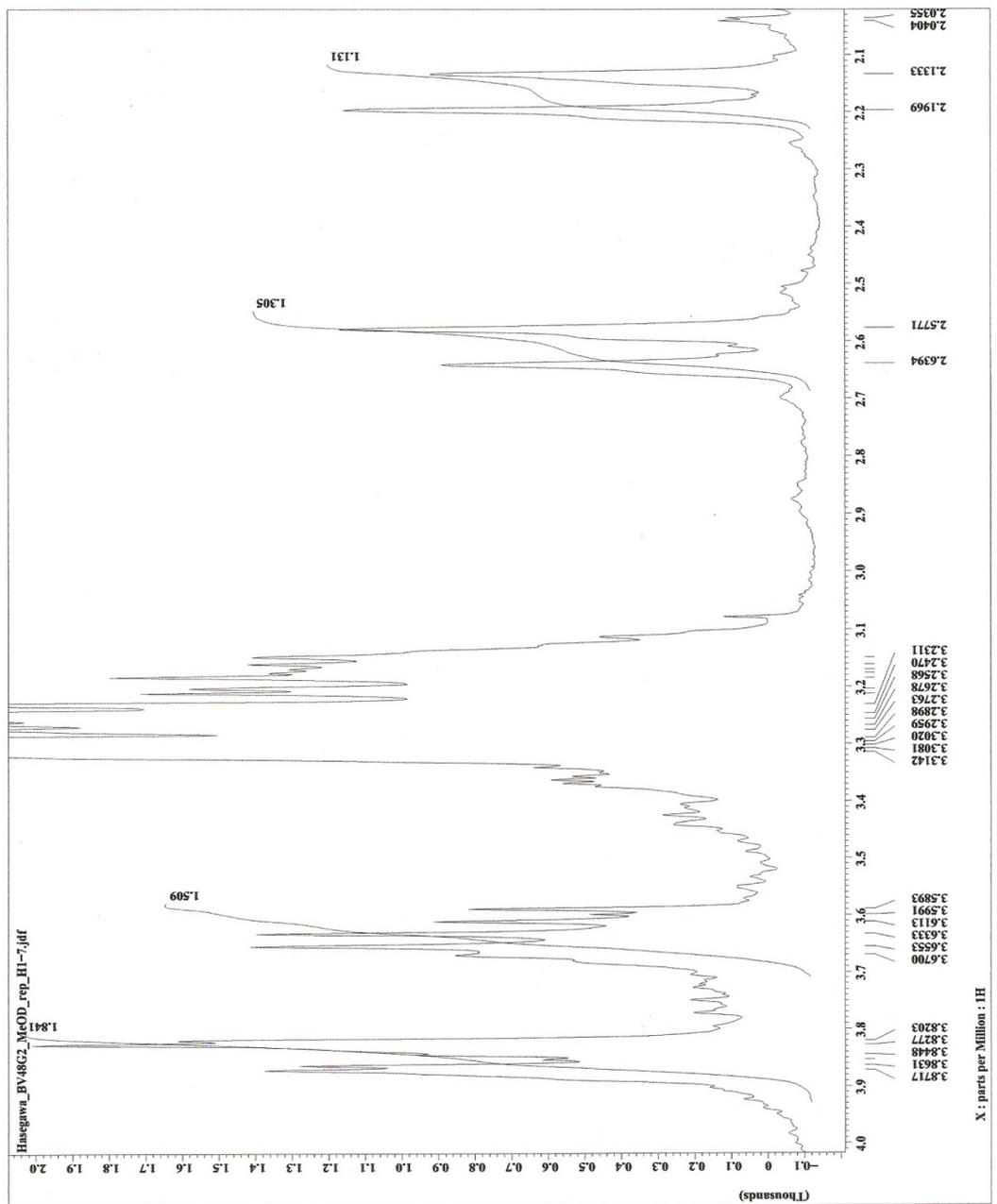
Apendice



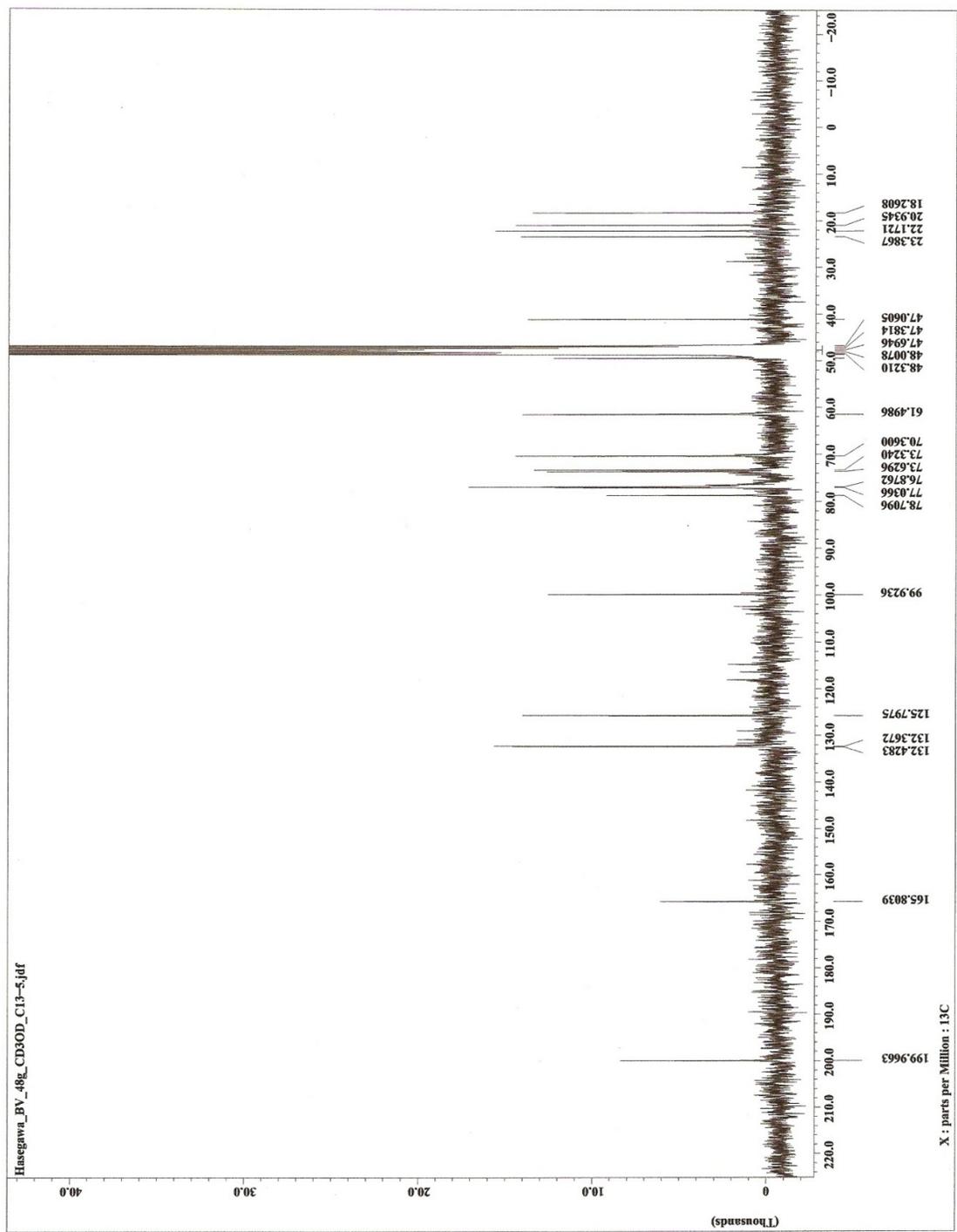
Espectro 1. Espectro RMN ¹H del Compuesto A, tomado en MeOH-d₄.



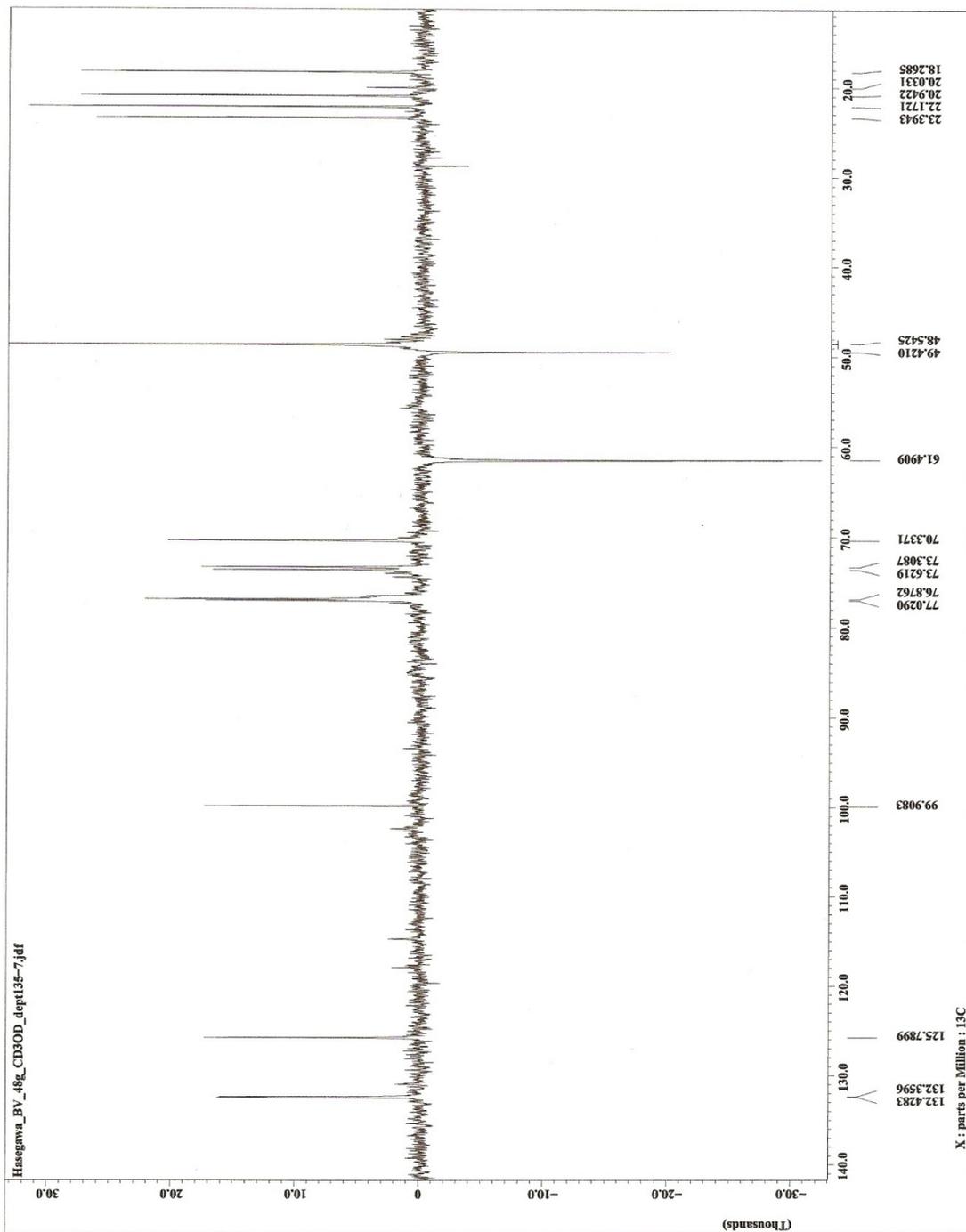
Espectro 2. Ampliación de la región de campo alto-intermedio del espectro RMN ^1H tomado en MeOH- d_4 para el compuesto A.



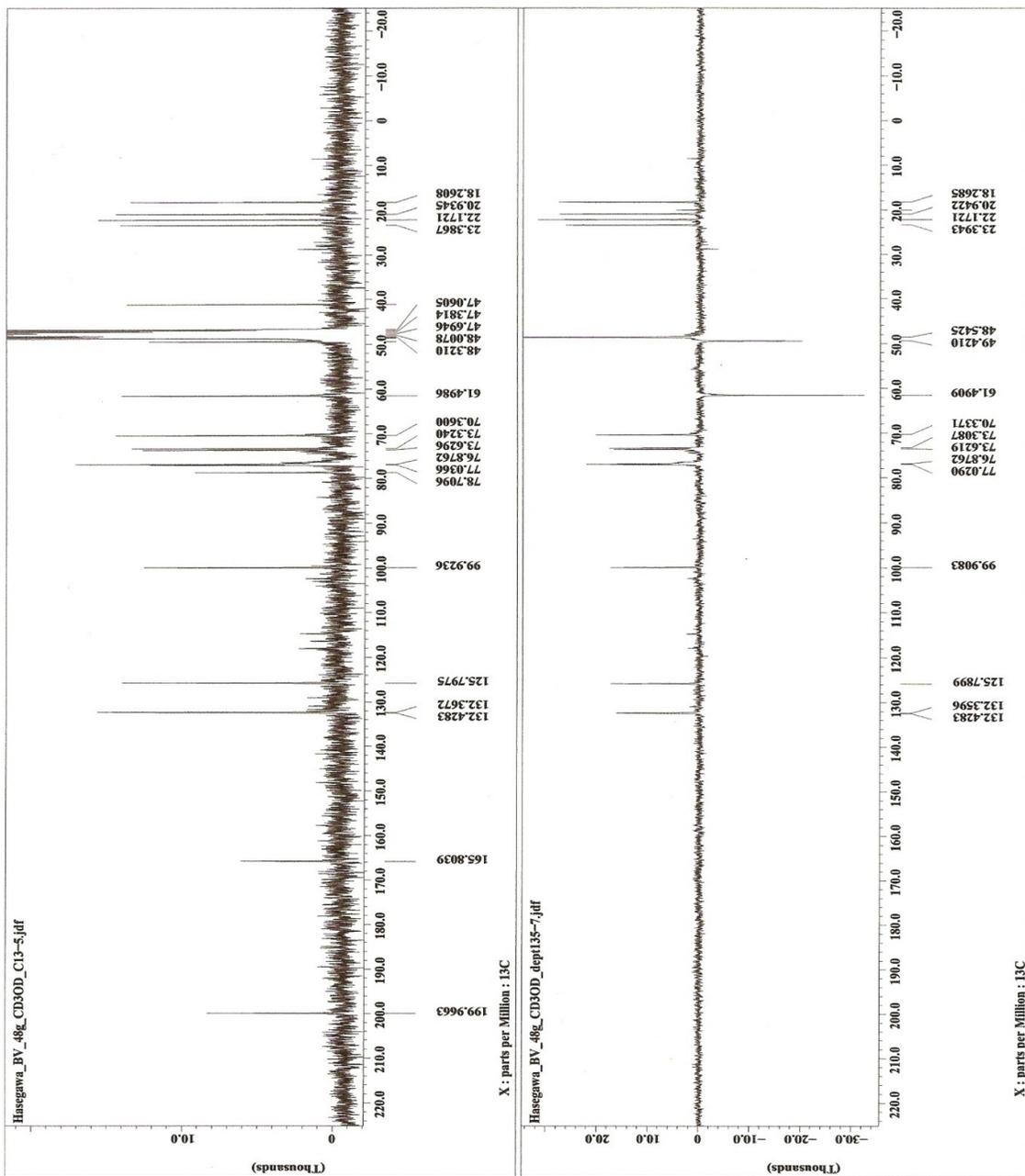
Espectro 3. Ampliación de la región de campo alto del espectro RMN ^1H , tomado en MeOH-d_4 para el compuesto A.



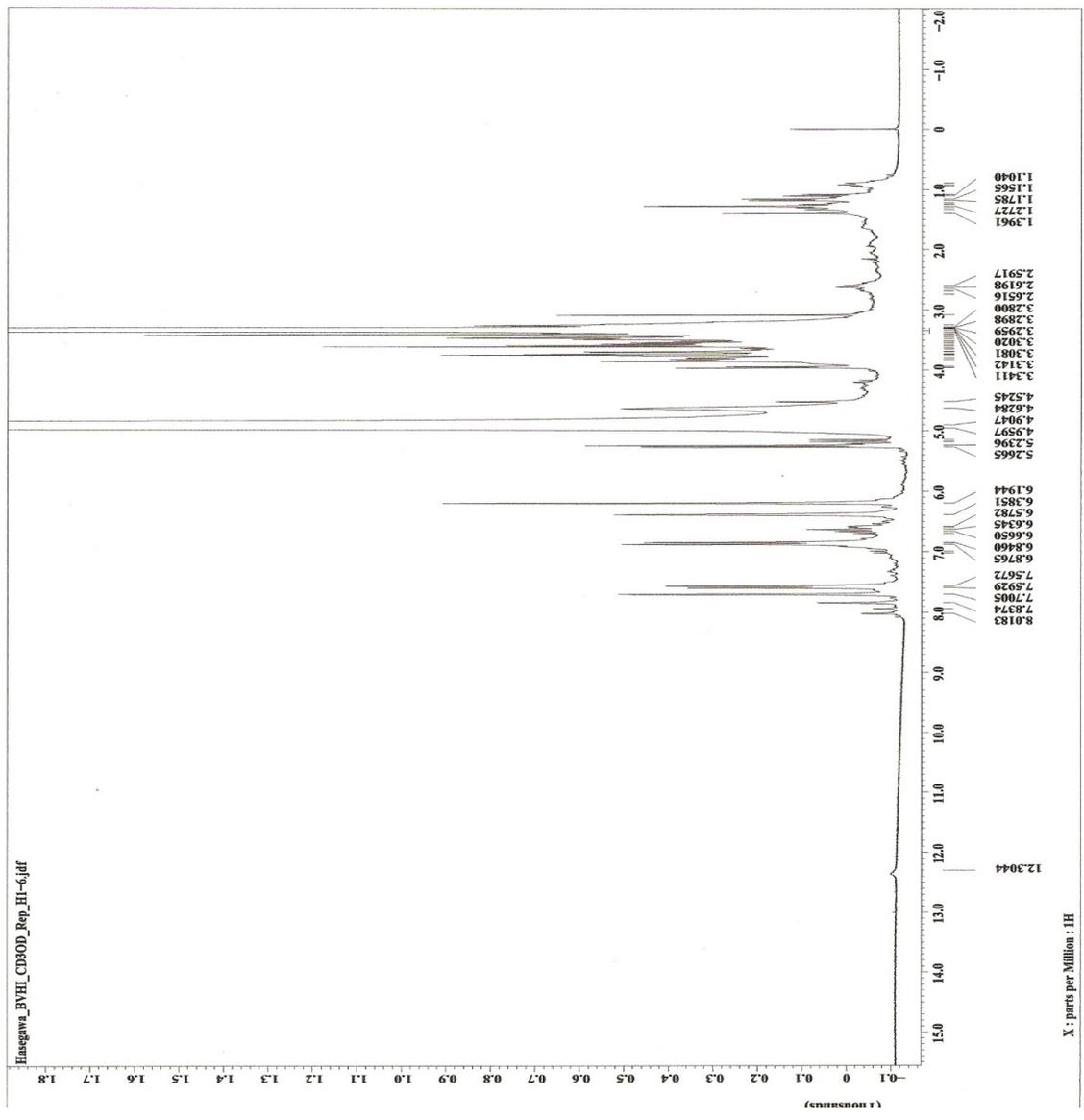
Espectro 4. Espectro RMN ^{13}C tomado en MeOH-d_4 para el compuesto A.



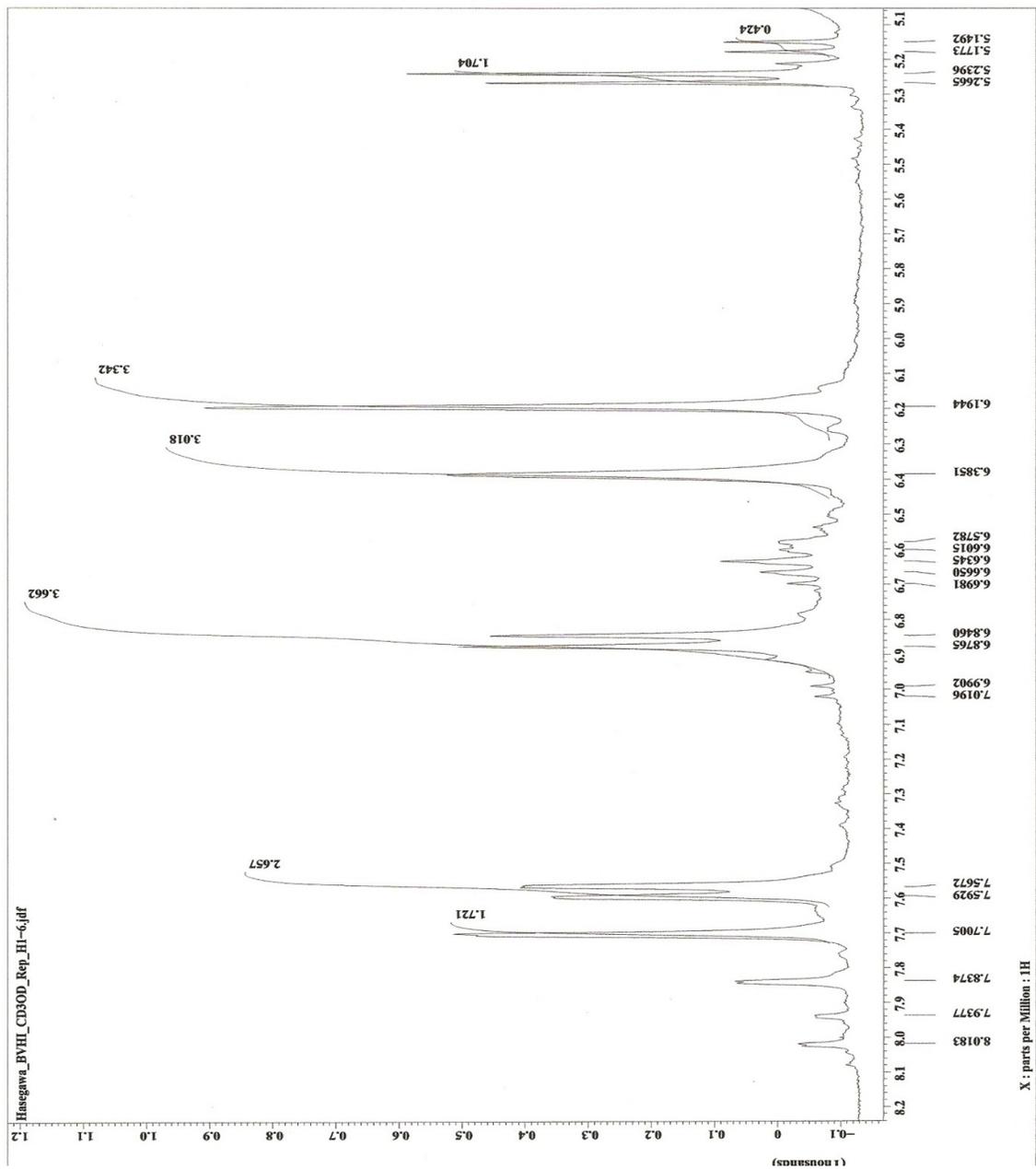
Espectro 5. Espectro ^{13}C -DEPT tomado en MeOH-d_4 para el compuesto A



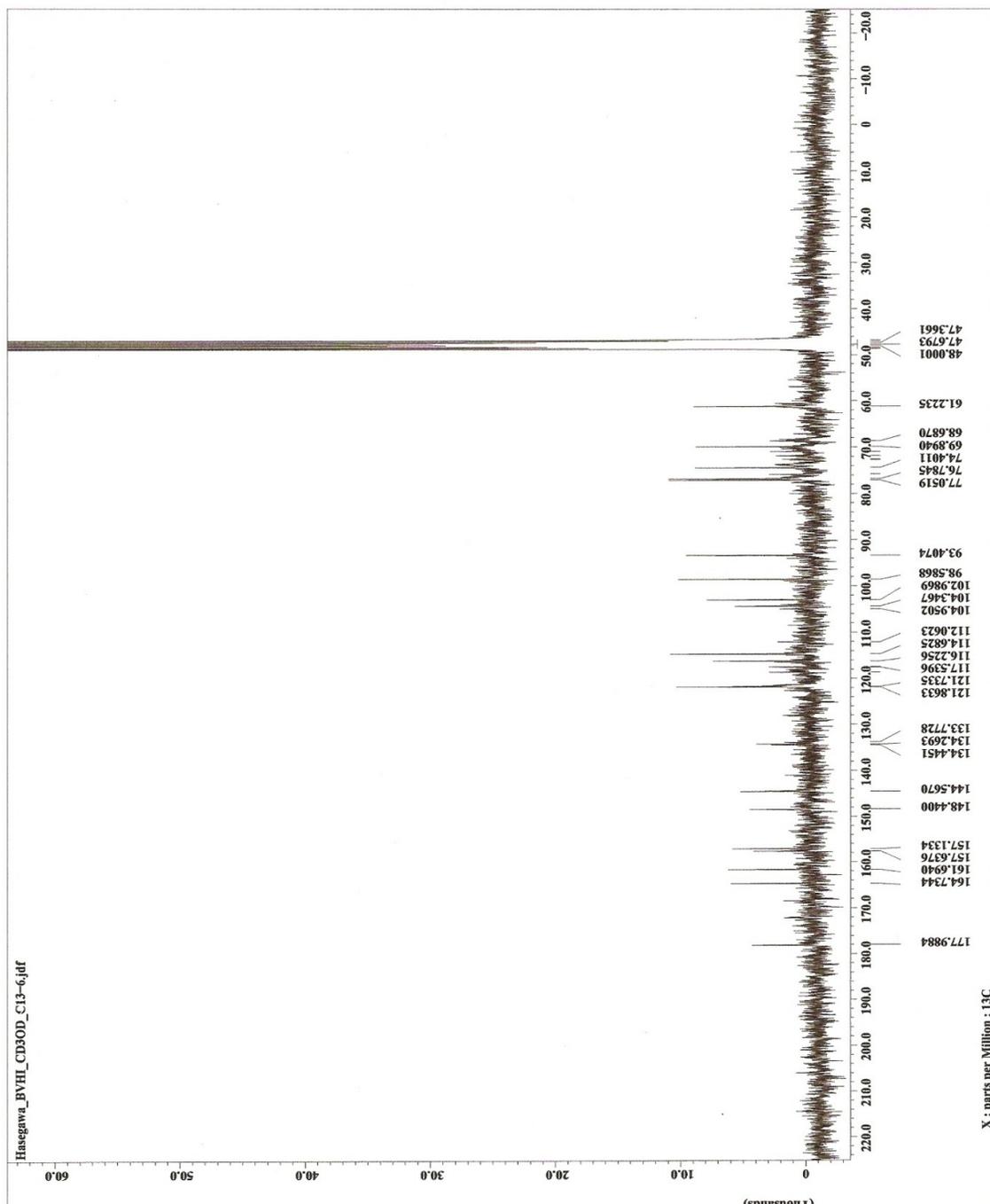
Espectro 6. Espectro ^{13}C -DEPT tomado en MeOH-d_4 para el compuesto A.



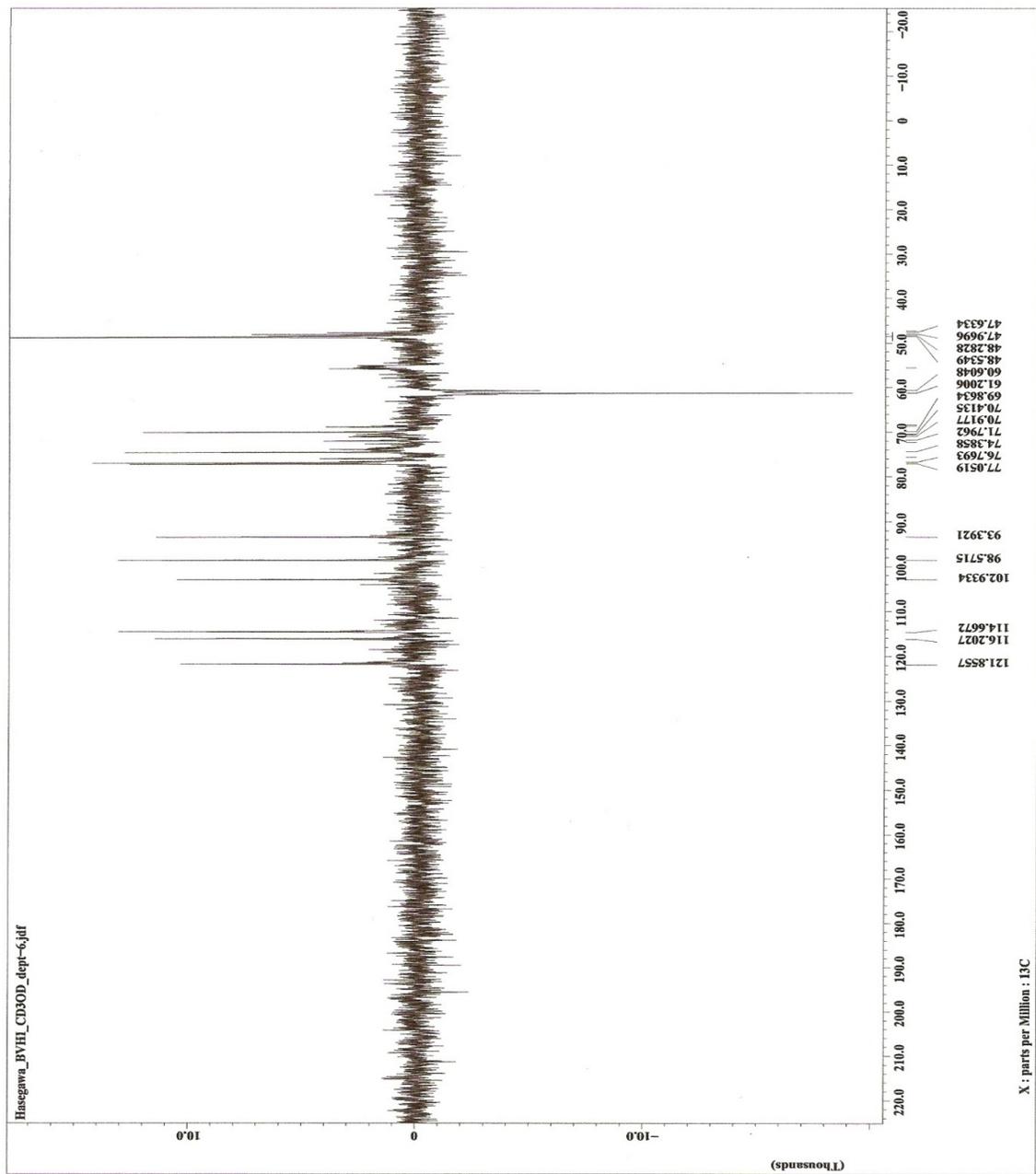
Espectro 7. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH-d_4 para el compuesto B.



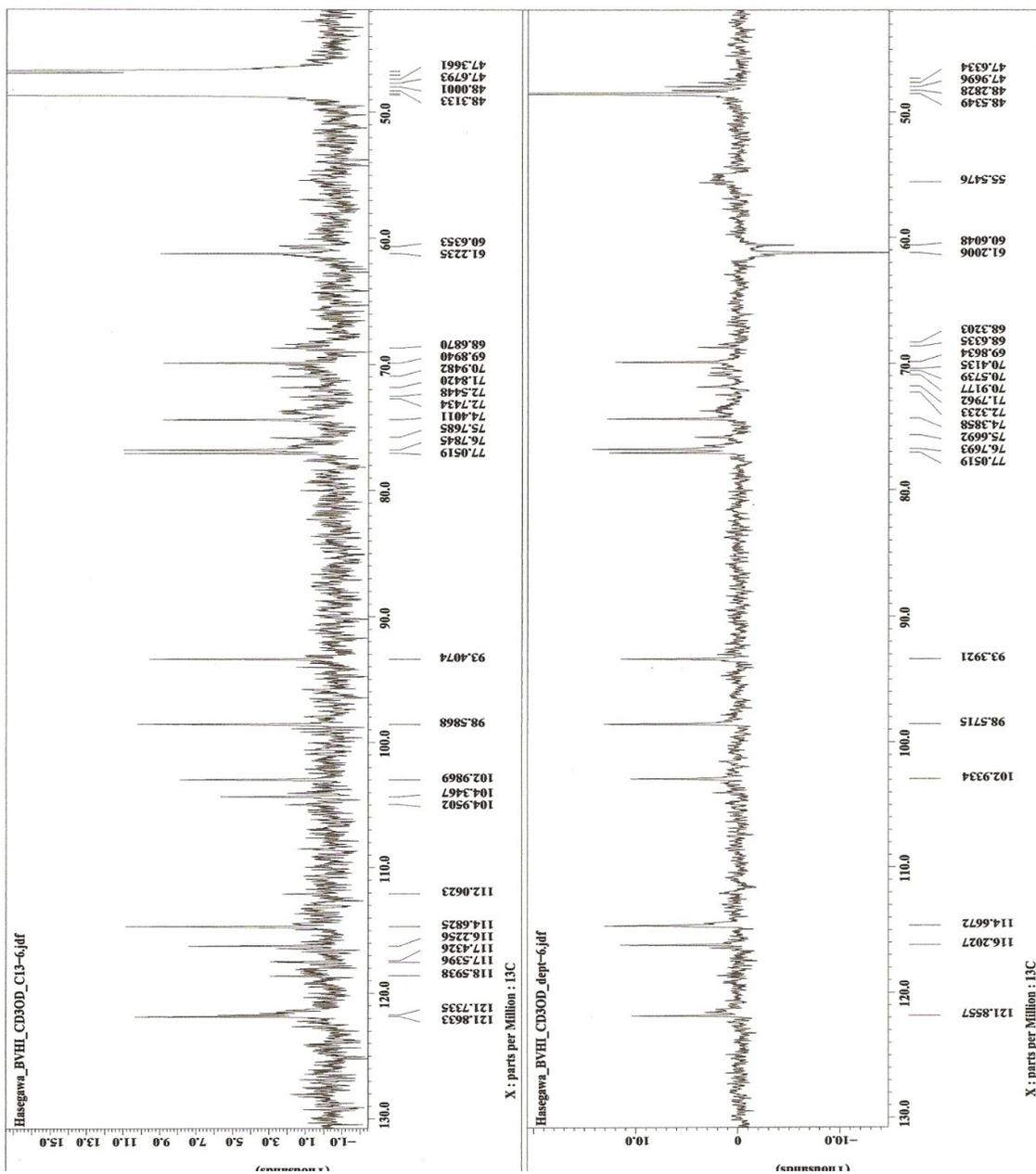
Espectro 8. Ampliación de la región de campo bajo del espectro RMN ^1H tomado en MeOH-d_4 para el compuesto B.



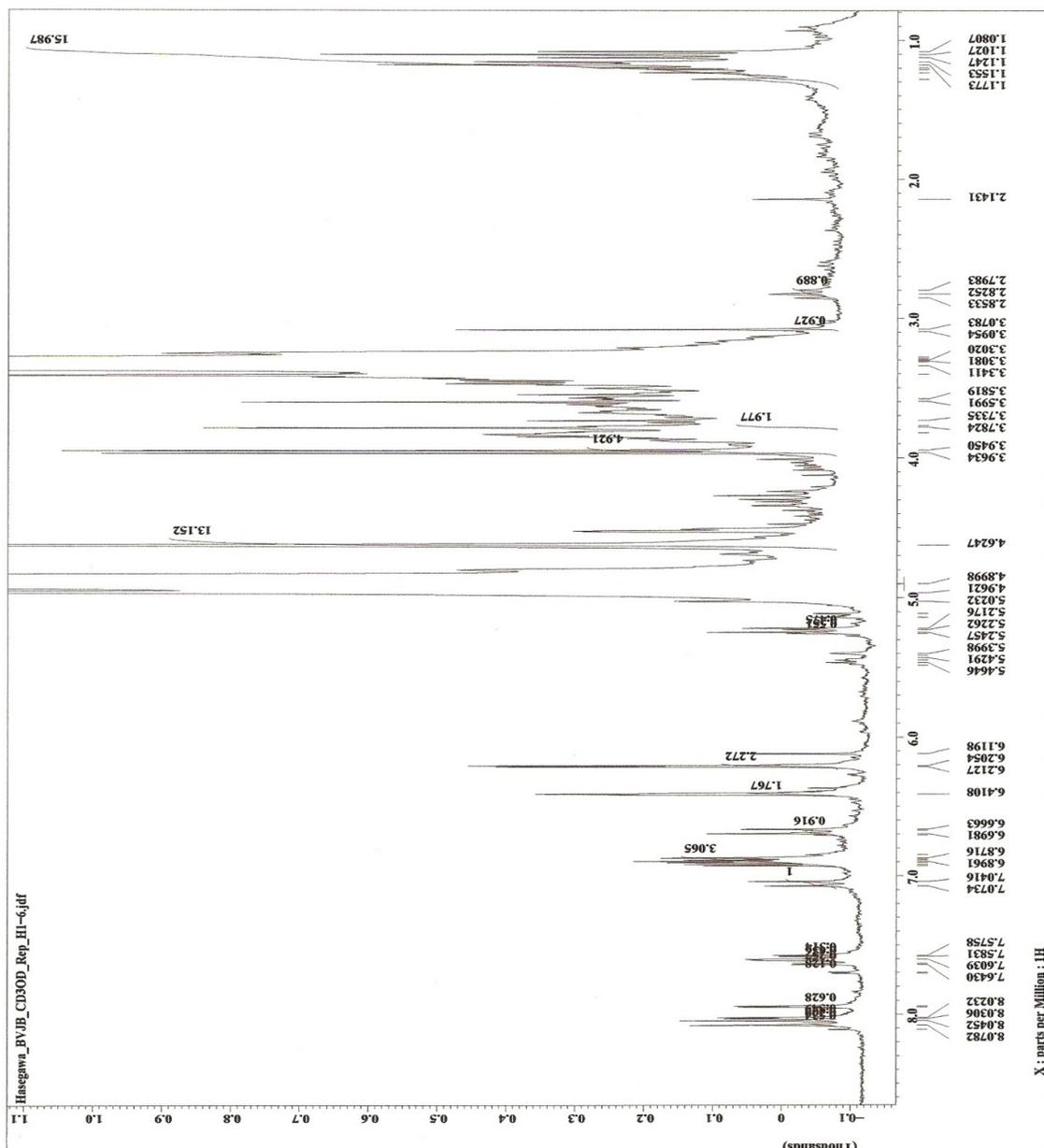
Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C tomado en MeOH-d_4 para el compuesto B.



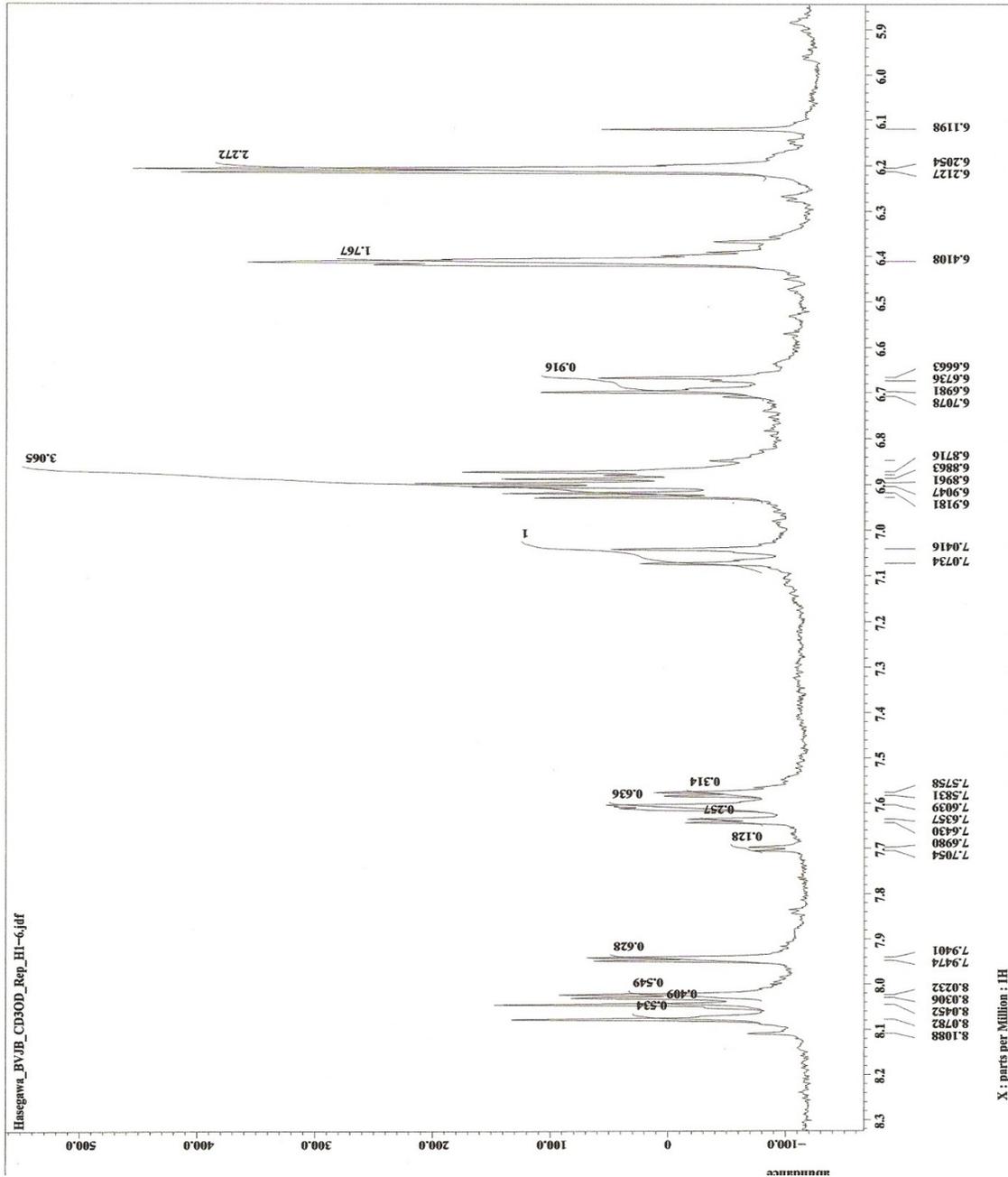
Espectro 10. Espectro RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOH-d_4 para el compuesto B.



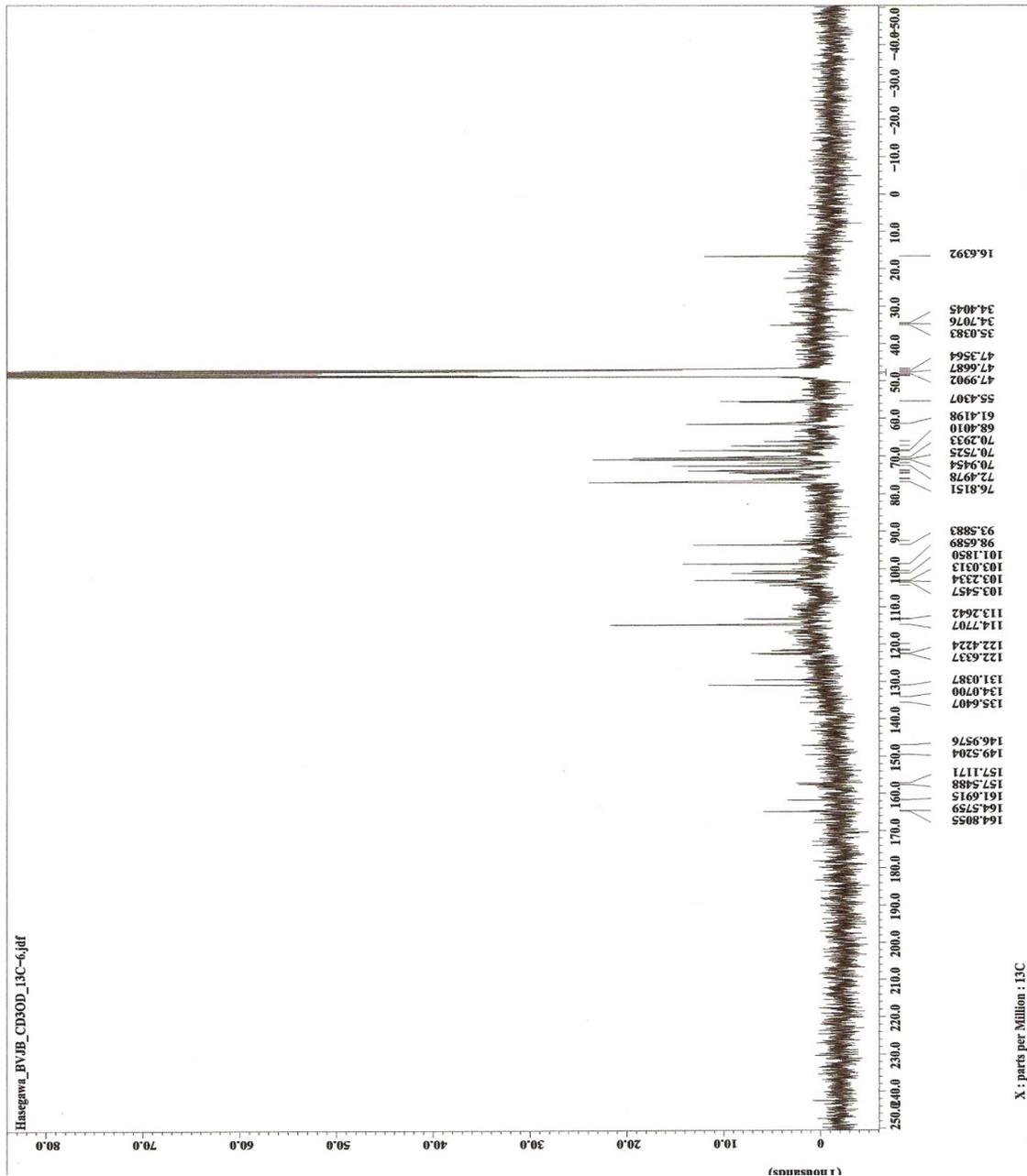
Espectro 11. Espectro RMN ¹³C-DEPT tomado en MeOH-d₄ para el compuesto B.



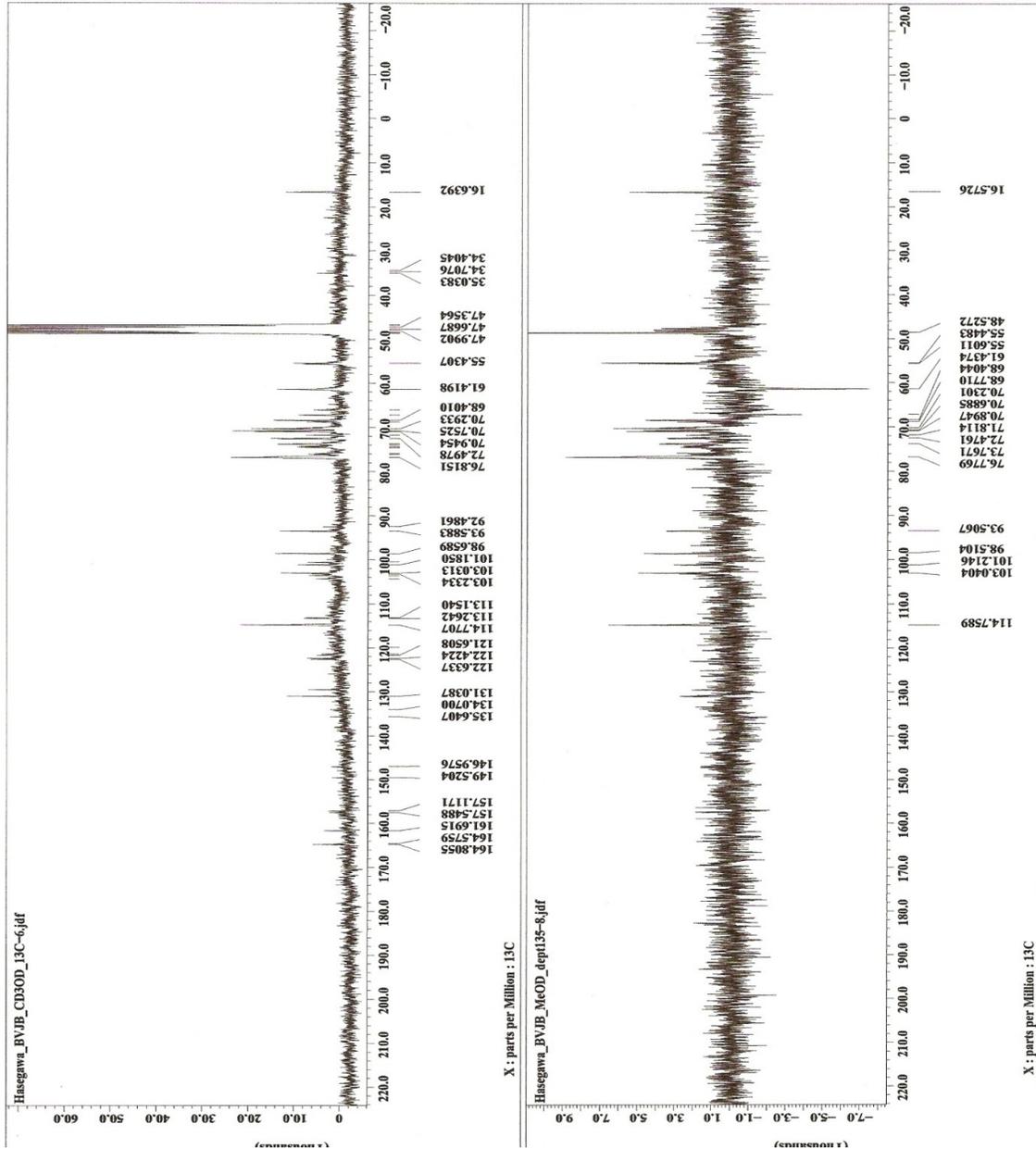
Espectro 12. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7



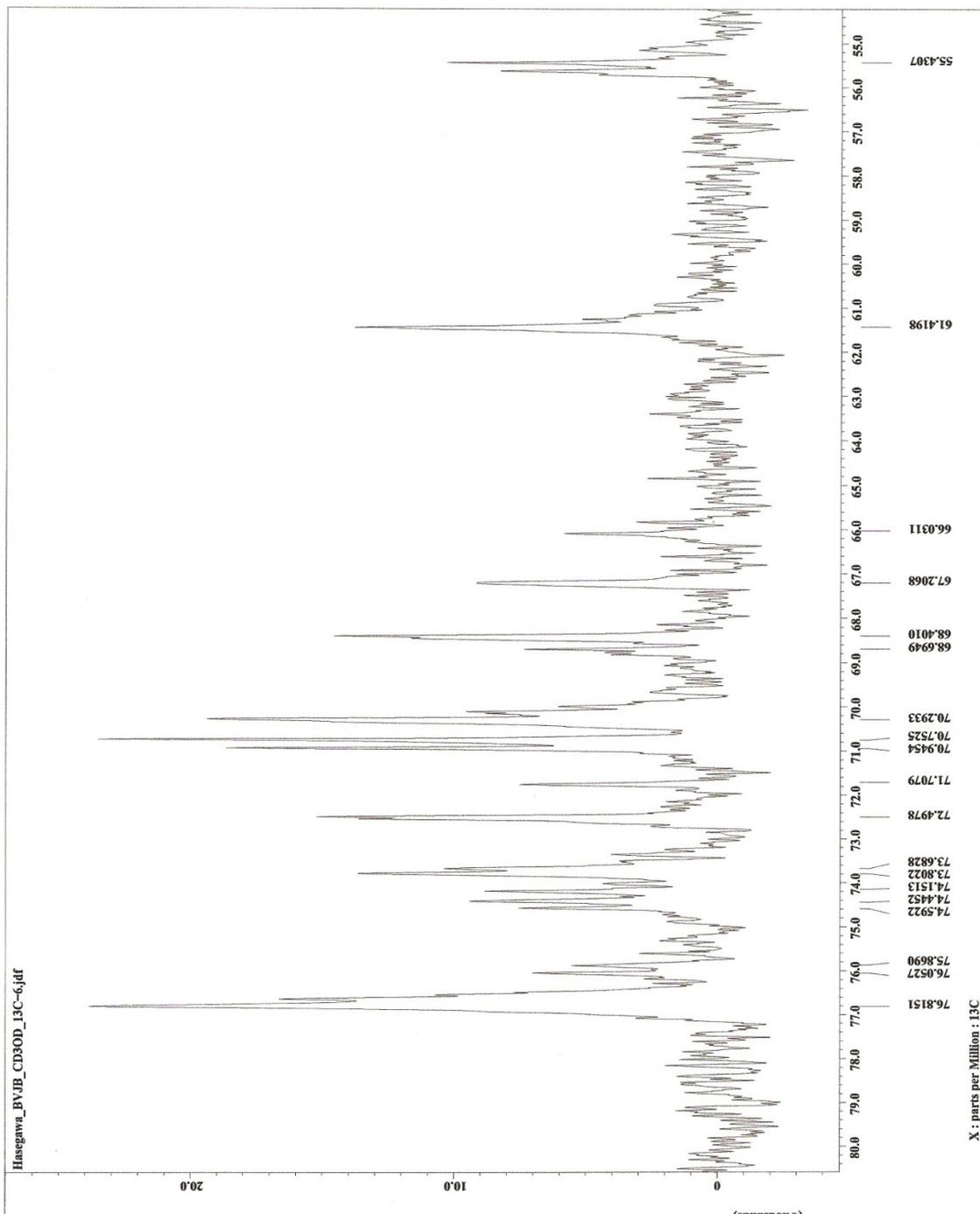
Espectro 13. Ampliación del espectro de RMN ^1H tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7 en la zona de campo bajo.



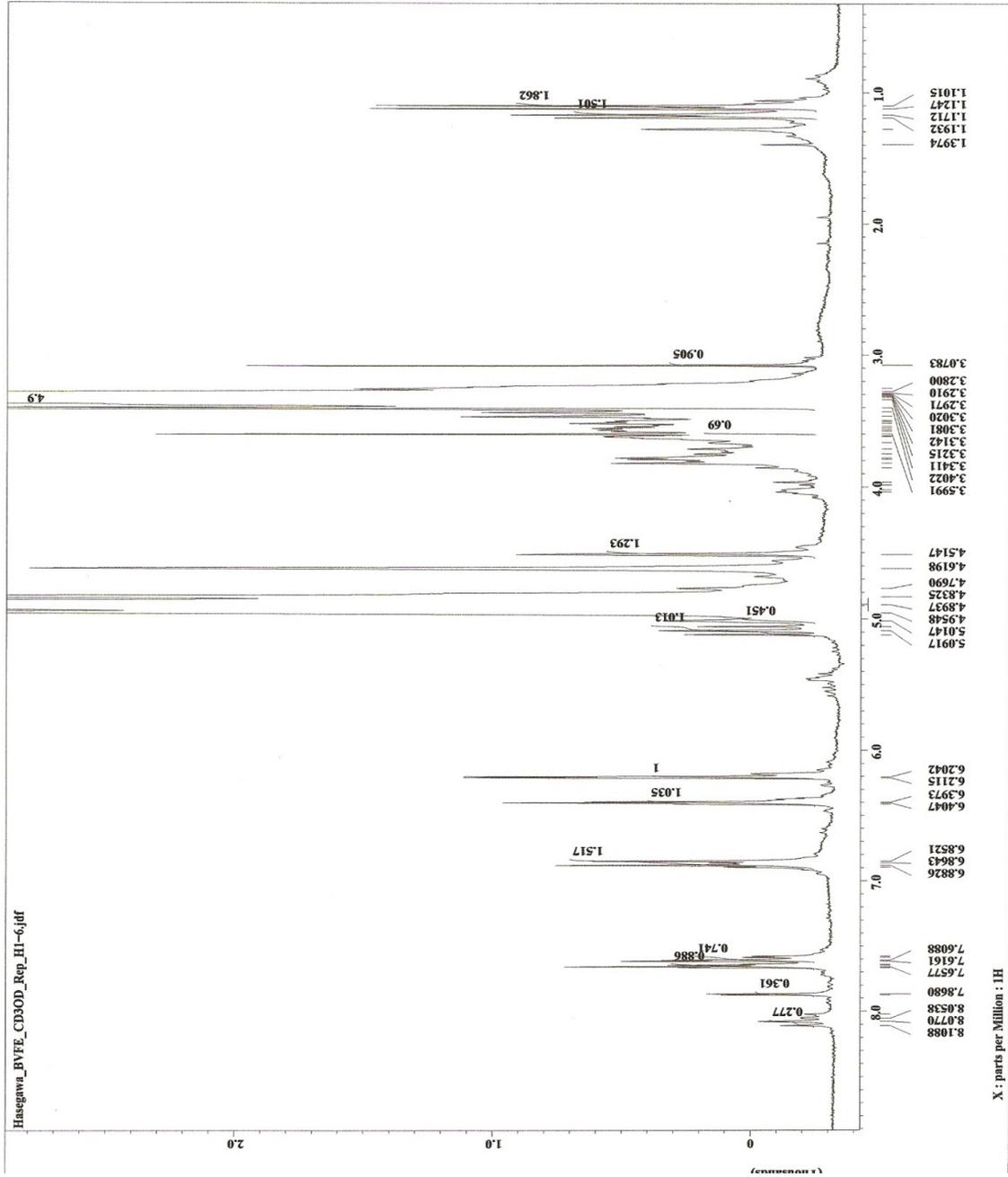
Espectro 14. Espectro RMN ^{13}C tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7



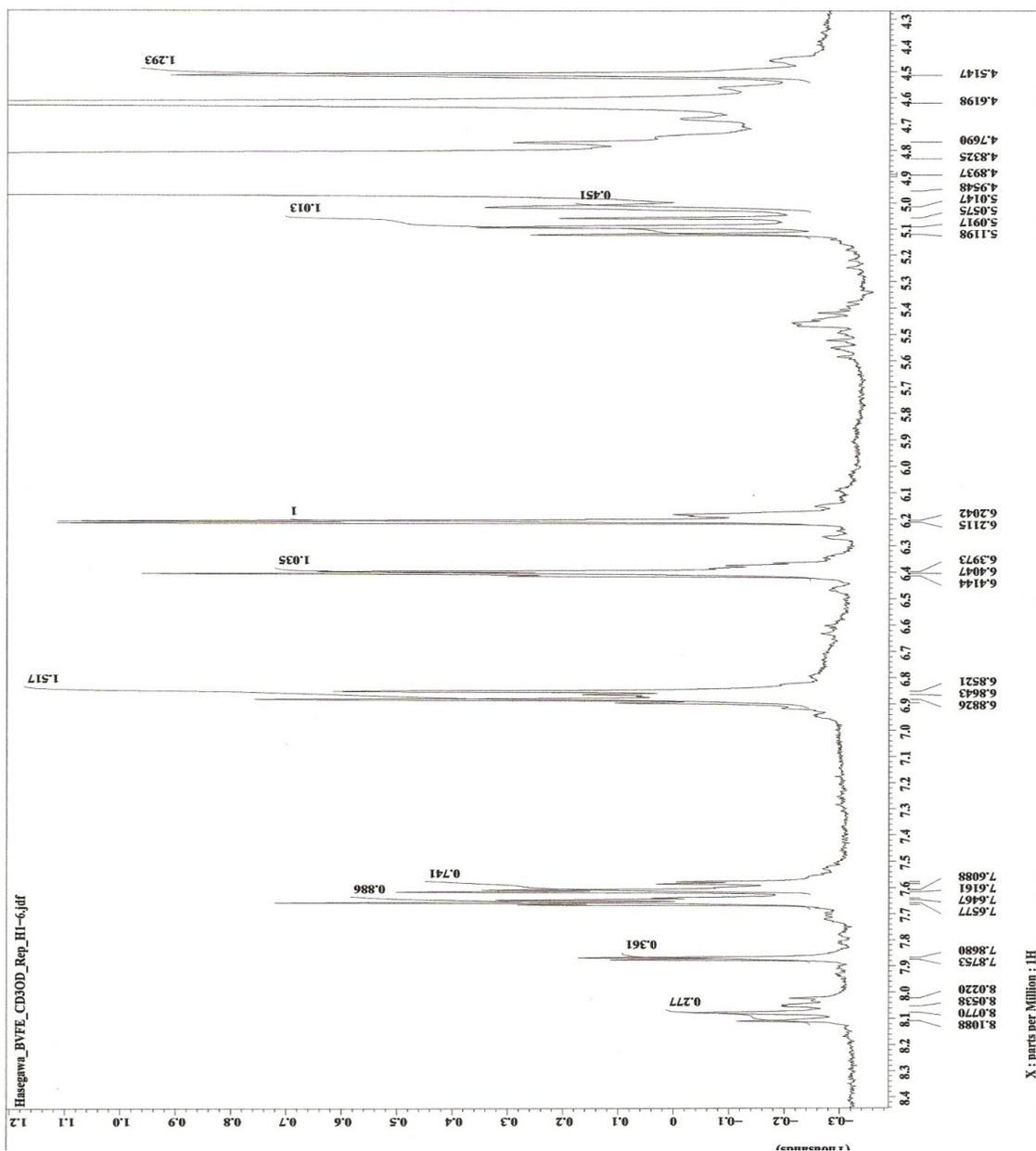
Espectro 15. Espectro RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FD86-87Fr-5-7



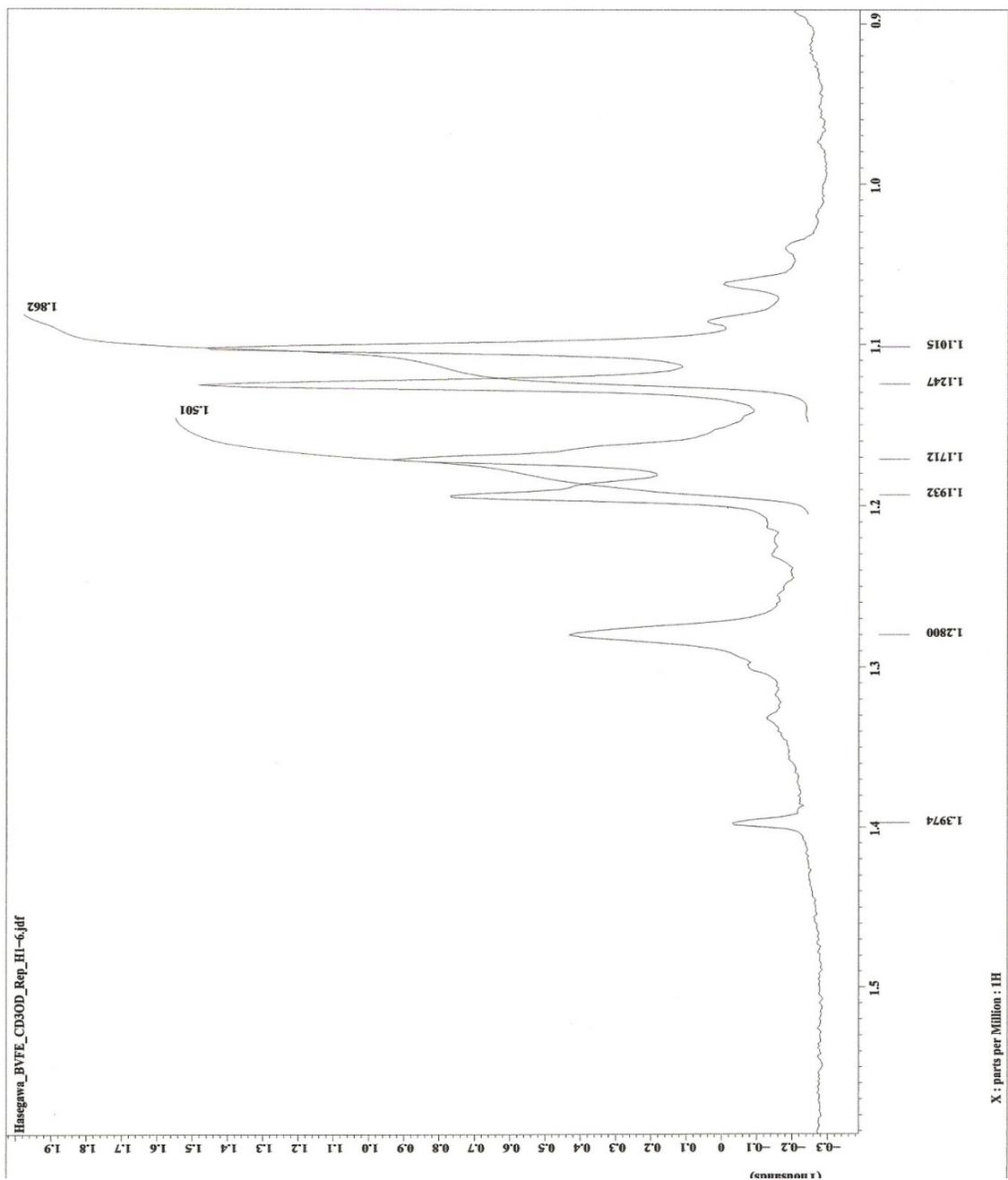
Espectro 16. Espectro RMN ^{13}C ampliación para la zona comprendida entre 50 y 80 ppm, tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FD86-87Fr5-7



Espectro 17. Espectro RMN ^1H tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FDFEFr1-7



Espectro 18. Ampliación del espectro RMN ^1H en la zona de campo bajo, tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FDFEFr1-7.



Espectro 19. Ampliaci3n del espectro RMN ^1H en la zona de campo alto, tomado en MeOH-d_4 para la mezcla FDFEFr1-7.