



**UNAP**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

**AISLAMIENTO DE KAEMPFEROL DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *Senna reticulata* E IDENTIFICACIÓN POR SU CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCOPIA UV/VISIBLE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**EDILBERTO VERGARA SOUZA  
CARLOS FERNANDO CHUNGA MORENO**

**ASESOR:**

**Ing. JARA HERRERA CLETO, Dr.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2024**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°024-2024-CGT-FFyB-UNAP

En el caserío de Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista, departamento de Loreto, a los 26 días del mes de diciembre del 2024, a horas 9:00, se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "AISLAMIENTO DE KAEMPFEROL DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *Senna reticulata* E IDENTIFICACIÓN POR SU CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCOPIA UV/VISIBLE", aprobada con Resolución Decanal N°311-2024-FFyB-UNAP, presentado por los bachilleres EDILBERTO VERGARA SOUZA Y CARLOS FERNANDO CHUNGA MORENO, para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°253-2024-FFyB-UNAP, está integrada por:

- |  |            |
|--|------------|
| - Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.      | Presidente |
| - Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.            | Miembro    |
| - Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro. | Miembro    |
| - Ing. CLETO JARA HERRERA, Dr.               | Asesor     |

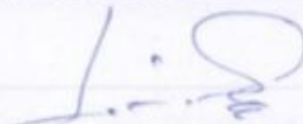
Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: Adecuadamente

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

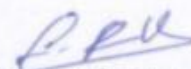
La sustentación pública de la tesis ha sido Aprobado con la calificación Buena

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

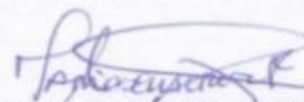
Siendo las 11:00 am se dio por terminado el acto Académico.



Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.  
Presidente



Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.  
Miembro

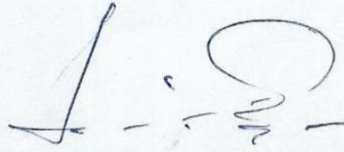


Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mtro.  
Miembro



Ing. CLETO JARA HERRERA, Dr.  
Asesor

Jurados y asesores



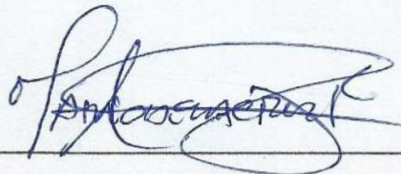
---

Q.F. Luis Domingo Nonato Ramirez, Dr.  
Presidente de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 05652



---

Q.F. Liliana Ruiz Vásquez, Dra.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 12491



---

Q.F. Mario Javier de la Cruz Flores, Mtro.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 13374



---

Ing. Cleto Jara Herrera, Dr.  
Asesor  
CIP:63042




## 10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

### Filtrado desde el informe


- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

### Fuentes principales

- 8%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 5%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**  
10 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Dedico esta tesis con todo mi amor y cariño a mi querida madre, Luz Marina que me ha dado siempre su apoyo para cumplir con éxito mi carrera profesional y gracias a ella soy la persona que soy hoy, que con sus palabras de aliento y motivación me han ayudado a superar obstáculos y que en los peores momentos siempre estuvo a mi lado.

***Carlos Fernando Chunga Moreno***

En reconocimiento a la autora de mis días mi madre Doris, abuela Alicia, hermana Rosa y hermano José por el apoyo constante hacia mi persona para llegar a ser profesional, gracias a todos ellos y a las personas que contribuyeron para poder lograr este objetivo en mi vida.

***Edilberto Vergara Souza***

## AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro profundo agradecimiento y sincero reconocimiento a nuestros queridos maestros ing. Julio Arce e ing. Cleto Jara por darnos la confianza, el apoyo y la paciencia por realizar esta tesis.

Gracias maestros a sus enseñanzas y afectos que nos brindaron en nuestra etapa universitaria que nos enseñaron a ser personas de bien.

Eterno reconocimiento y gratitud

# ÍNDICE

Portada	i
Acta de sustentación	ii
Jurados y asesores	iii
Resultado del informe de similitud	iv
Agradecimiento	vi
Índice	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Bases teóricas</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1. Especie vegetal en estudio</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. Biogénesis del kaempferol</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3. Kaempferol</b>	<b>15</b>
<b>1.2.4. Localización del kaempferol</b>	<b>15</b>
<b>1.2.5. Métodos de aislamiento del kaempferol</b>	<b>16</b>
<b>1.2.6. Medición de parámetros fisicoquímicos</b>	<b>17</b>
<b>1.2.7. Parámetros espectroscópicos: en ultravioleta-visible</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Definición de términos básicos</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Formulación de la hipótesis</b>	<b>26</b>
<b>2.2. Variable de estudio y su operacionalización</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1. Variable de Estudio</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Diseño Metodológico</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Diseño muestral</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1. Población de estudio</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2. Tamaño de la muestra</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3. Criterio de selección</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Procedimiento de recolección de datos y análisis de datos</b>	<b>29</b>
<b>3.3.1. Recolección de datos</b>	<b>29</b>

<b>3.4. Procedimiento de análisis de datos</b>	33
<b>3.5. Aspectos éticos</b>	37
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	38
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b>	40
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</b>	44
<b>CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES</b>	45
<b>CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	46
<b>ANEXOS</b>	56
<b>Anexo 1.</b> Recolección de la muestra vegetal	56
<b>Anexo 2.</b> Certificación de la especie vegetal	57
<b>Anexo 3.</b> Determinación de los valores hRf de kaempferol	58
<b>Anexo 4.</b> Determinación del peso molecular del Kaempferol	60
<b>Anexo 5.</b> Espectros UV-visible de kaempferol en diferentes solventes	61
<b>Anexo 6.</b> Cálculo de rendimiento del Kaempferol en hojas de <i>Senna reticulata</i>	62



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas de kaempferol aislada de <i>Senna reticulata</i> y muestra estándar	38
<b>Tabla 2.</b> Longitudes de onda de absorción de kaempferol aislada de <i>S. reticulata</i> y muestra estándar	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis de kaempferol (55)	14
<b>Figura 2.</b> Molécula de etileno	21
<b>Figura 3.</b> Sistema cinamol y benzoil de la molécula de kaempferol	23
<b>Figura 4.</b> Diagrama de bloque de la obtención e identificación de kaempferol	29

## RESUMEN

*Senna reticulata* es una planta amazónica de la familia Fabáceae ampliamente utilizada en la medicina tradicional. La infusión de sus flores se emplea para tratar inflamaciones y enfermedades hepáticas y dolores de estómago, mientras que las hojas se utilizan en el tratamiento local de micosis cutánea. El estudio tuvo como objetivo aislar el compuesto kaempferol de las hojas de *S. reticulata* e identificarlo mediante la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y análisis espectroscópico. Las muestras fueron recolectadas en el caserío de Ullpa Gallo, Distrito de Belén, provincia de Maynas, Región Loreto, en la Amazonía Peruana. Para aislar el keampferol se usó el procedimiento descrito por Domínguez Sepúlveda Xorge con una pequeña modificación. Se obtuvo cristales amarillos en forma de agujas con un rendimiento de 0,475%, punto de fusión 278°C y peso molecular 286,02 g/mol. Los valores hRf en cromatografía de capa fina (TLC) en diferentes solventes de resolución fueron: 39 en [tolueno: cloroformo: acetona], 20 en [benceno:butanona:metanol] y 8 en [agua-butanona-metanol] respectivamente. Las longitud de onda máxima de absorción en metanol se registraron a 266 y 367nm y en solución de [metanol:ácido acético] a 274, 303, 387nm, valores similares a los reportados en la literatura. *S. reticulata* de la Amazonía peruana podría servir como fuente de materia prima para aislar kaempferol con fines medicinales en fitoterapia y en la industria farmacéutica.

**Palabras clave:** *Senna reticulata*, Kaempferol, Mediciones Fisicoquímicas, Espectrometría, UV-Visible

## ABSTRACT

*Senna reticulata* is an Amazonian plant of the Fabaceae family widely used in traditional medicine. The infusion of its flowers is used to treat inflammations liver diseases and stomach pains, while the leaves are used in the local treatment of cutaneous mycosis. The study aimed to isolate the compound kaempferol from the leaves of *S. reticulata* and to identify it by characterization of its physicochemical properties and spectroscopic analysis. The samples were collected in the hamlet of Ullpa Gallo, District of Belén, province of Maynas, Loreto Region, in the Peruvian Amazon. To isolate kaempferol, the procedure described by Domínguez Sepúlveda Xorge was used with a small modification. Yellow needle-shaped crystals were obtained with a yield of 0.475%, melting point of 278°C, and molecular weight of 286.02 g/mol. The  $R_f$  values in thin layer chromatography (TLC) in different solvents of resolution were: 39 in [toluene: chloroform: acetone], 20 in [benzene:butanone: methanol], and 8 in [water-butanone-methanol] respectively. The maximum absorption wavelengths in methanol were recorded at 266 and 367nm and in [methanol: acetic acid] solution at 274, 303, and 387nm, values similar to those reported in the literature. *S. reticulata* from the Peruvian Amazon could serve as a source of raw material to isolate kaempferol for medicinal purposes in phytotherapy and the pharmaceutical industry.

**Keywords:** *Senna reticulata*, Kaempferol, Physicochemical Measurements, Spectrometry, UV-Visible.

## INTRODUCCIÓN

El género *Senna* pertenece a la familia Fabáceae, se encuentra en diferentes continentes como América, África, Oceanía, Asia e Islas del Pacífico, se desarrolla en diferentes ecosistemas y condiciones climáticas (1,2), y coloniza bosques (húmedos y secos), desiertos (fríos y secos) y afloramientos rocosos (3), la especie *Senna reticulata* es una de la de mayor importancia, materia de nuestro estudio.

*S. reticulata* es originaria de Sudamérica, esparcida desde México pasando por Brasil, Colombia, Perú y Bolivia (4), crece en zonas abiertas de las llanuras aluviales amazónicas a lo largo de los ríos, es uno de los colonizadores más eficientes en estas zonas, porque tiene una tolerancia muy alta a las inundaciones y posee una asimilación fotosintética extremadamente alta, que le permite desarrollarse más rápido que cualquier otra especie de su entorno (5-7).

En la Amazonía peruana es conocido como “retama”, los pobladores amazónicos usan como planta medicinal para variados propósitos (8), para el tratamiento de enfermedades hepáticas, indigestión ácida, dolor de barriga, inflamaciones de riñón, afecciones venéreas, para tratar la micosis de la piel y como repelente de insectos (9). En Brasil es usada para tratar el reumatismo y dolores menstruales y enfermedades hepáticas (10), en Colombia usan las hojas como antirreumático, hipoglucémico y para dermatitis (11). Estudios realizados de esta especie señalan que tiene propiedades antioxidantes (10-15), antiparasitaria, antibacteriana, anti convulsionante (10) y actividad cicatrizante (16).

En todas las especies de *Senna* están presentes antraquinonas y senósidos a, b, c, d. Además, en *Senna velutina* se encontró Kaempferol-O-hexosido-desoxihexosido (17), en *Cassia fistula* (L.) Kaempferol-O-cumaril-O-glucósido, Kaempferol 3-O- [6'-O-(ramnosil) glucósido] 7-O- ramnósido, (18), en flores de *Senna trachypus* Kaempferol-3-O-glucoramnosido y en *Senna* spp se ha encontrado, Kaempferol-3-O-glucoramnosido, Kaempferol-3-O-β-D-Glucuronopiranosido, Kaempferol-3-glucosido-(1→6)-glucosido-7-alfa-L-ramnósido, Kaempferol-3,7-di-O-β-D-glucósido, Kaempferol-7-O-α-L-ramnósido y

Kaempferol (19), en *Cassia acutifolia* (sinónimo de Senna) kaempferol 3-O-β- D-gentiobiosido (20), en *Senna gardneri* y en *S. geórgica* Kaempferol ramnodiglucósido, Kaempferol diglucósido y Kaempferol ramnoglucósido (21), en *Cassia hirsuta* (sinónimo *Senna hirsuta*) kaempferol 3-O-rutinósido y kaempferol 3-O-R-L-ramnopiranosil (1f2)-R-L-ramnopiranosido (22). También, se aisló kaempferol de las hojas de *S. reticulata* que crece en los andes de Colombia (13), en un estudio similar kaempferol fue aislado de las hojas y cáscaras de esta especie que crece en Brasil y elucidado su estructura molecular (10).

Kaempferol es un flavonoide que se encuentra en varias especies de plantas tales como: Té, brócoli, col, col rizada, escarola, puerro, tomate, fresas, uvas (23), *Sophora japónica*, *Tilia spp*, *Equisetum spp*, *Ginkgo biloba*, *Moringa oleifera*, y propóleo (24), en *Equisetum silvaticum* L. (25), en *podophyllin* (26), frutas amarillas (23), en manzana, cereza, mora, arándano, melón cantalupo, ciruela, pasas, naranja, melocotón, limón, albaricoque, espárrago, brócoli, alcaparra, zanahoria, pepino, kiwi, lechuga, cebolla, azafrán, espinaca y Té verde (27).

El kaempferol y algunos de sus glucósidos han demostrado tener una amplia gama de actividades farmacológicas (24,28), como antioxidante (24,28,29), antiinflamatorio (24,30,31), antimicrobiano (24,28), anticancerígeno (23,28,29,32,33), cardioprotector (24,28,34), neuro protector (24,28,35), antidiabético (24,28), antiosteoporótico, estrogénico/antiestrogénico (24), ansiolítico, analgésico, antialérgico (24), efecto antiviral (36,37), diabetes (38), osteoporosis senil (39), enfermedades del sistema nervioso central (40), anti carcinogénesis (41). También, es antidepresivo sirve para tratamientos psiquiátricos sin producir efectos secundarios (42).

Sin embargo, el estudio de kaempferol en *S. reticulata* de la Amazonía peruana es muy limitada, a pesar que el kaempferol es un flavonoide con diversas propiedades farmacológicas entre las que destaca como antioxidante y anticancerígeno, además, este flavonoide ha sido aislado de diferentes especies vegetales como señala la literatura científica. Frente a ello existe la necesidad de abordar su estudio de esta planta amazónica con la finalidad de revalorar los conocimientos ancestrales de esta especie.

En base a la información descrita en los párrafos precedentes, la investigación abordó el estudio de *S. reticulata* que se desarrolla en la Amazonía peruana, cuyo objetivo fue aislar kaempferol y determinar sus propiedades espectroscópicas y fisicoquímicas que le caracterizan como compuesto puro, la información que se muestra en este estudio se adicionará a la literatura científica ya existente, pero al mismo tiempo *S. reticulada* de la Amazonia peruana se constituiría en una fuente valiosa para la obtención del Kaempferol como producto Fitoterapéutico y para la industria farmacéutica Nacional.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En el 2023, se revisó la información científica del Kaempferol como un potencial agente en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El objetivo del trabajo fue proporcionar información teórica para el uso del kaempferol y sus derivados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Para la recopilación de información usó base de datos científicos como el PubMed, Web of Science, and Science Direct. Basados en investigaciones realizados in vitro e in vivo, el autor señala que, el kaempferol y sus derivados ejercen un papel neuro protector, principalmente previniendo la deposición de fibrillas amiloides; inhibe la activación de la microglía, que reduce la liberación de factores inflamatorios, restaurando la membrana mitocondrial y evita el estrés oxidativo, protege la barrera hematoencefálica inhibiendo las actividades enzimáticas específicas como la colinesterasa. El autor concluye que, el kaempferol y sus derivados pueden constituirse en nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (35).

En el 2023, con información científica confiable se ha señalado las propiedades anticancerígena y antioxidante, y las mejoras terapéuticas que puede tratarse con kaempferol. En el artículo se señala que, el kaempferol ha sido encontrado en varias plantas y es usado como alimento para ganado, y en la actualidad está ganando la atención por sus potentes propiedades biológicas diversas y como anticancerígeno. Recientes estudios de investigación sugieren que kaempferol es efectivo en la inhibición y tratamiento de varias formas de cáncer tales como: pulmón, ovario, seno y cáncer de pulmón un probable mecanismo antiinflamatorio y antioxidante permite prevenir el daño del ADN e inhibir la proliferación de células cancerosas, también puede inhibir el crecimiento y relocación de células cancerosas; además, Kaempferol tiene un rango muy amplio de bioactividad como antiinflamatorio y antioxidante, así como el potencial de interacciones con otras medicaciones y la seguridad de utilizar Kaempferol por largo tiempo (29)



En el 2022, fue realizado una revisión de la información bibliográfica científica relacionado al mecanismo del kaempferol en el tratamiento de diabetes, donde se señala que la diabetes es problema global en la salud pública, la prevalencia varia levemente a través de países y regiones. La tasa de incidencia de diabetes en obesos y en individuos con sobre peso se ha incrementado significativamente. Obesidad-insulina resistencia-células beta, apoptosis es una importante trilogía de la patogénesis en la diabetes tipo 2, con la pandemia global de obesidad y diabetes, la búsqueda continua y en la actualidad se orienta al descubrimiento de nuevas drogas para la prevención de esta enfermedad que aún va progresando. Según recientes estudios el producto natural kaempferol tiene un excelente efecto anti diabético. Por lo tanto, la revisión resume las fronteras de estudio y explica los mecanismos farmacológicos del kaempferol en el tratamiento de la diabetes. Las búsquedas sucesivas y aplicación del kaempferol pueden dar un significativo salto en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones (38).

En el 2022, se realizó una revisión de la bibliografía científica, donde se informa la importancia terapéutica del kaempferol en el tratamiento del cáncer y que exhibe un remarcado potencial terapéutico, inhibe la metástasis y la angiogénesis. Las propiedades anticánceres del kaempferol primariamente ocurre vía modulación de la apoptosis MAPK/ERK1/2, P13K/AKT/mTOR, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vías de señalización celular. Esta propiedad fue evaluada en varios estudios *In vivo* e *In vitro*, los cuales incluyeron numerosas líneas de células y de modelos animales. Kaempferol posee acción toxica solamente contra células del cáncer y tienen toxicidad restringida contra células sanas. Las propiedades anticánceres del kaempferol son discutidas por la concentración sobre su capacidad para apuntar en las vías de señalización molecular tales como: VEGF, STAT, p53, NF-κB y PI3K-AKT. La capacidad anticancerígena de kaempferol ha ganado mucha atención, pero sus mecanismos de acción aún no están claros; sin embargo, este compuesto natural tiene una gran actividad y ahora es considerado una alternativa para el tratamiento del cáncer (33).

En el 2022, fue realizada una revisión de la información científica sobre el potencial del kaemperol que puede estar modulado por la vía del factor nuclear eritroide 2-relacionado con el factor 2 (Nrf2-ARE), señala que, kaempferol como

flavonoide natural ha sido ampliamente investigado en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardiovasculares, complicación metabólica y desórdenes neurológicos, Nrf2 (factor nuclear eritroidal 2 - relacionado al factor 2) un factor de transcripción involucrado en la mediación de la carcinogénesis y otras dolencias jugando un rol importante en la regulación del estrés oxidativo. La activación de Nrf2 resulta en la expresión de proteínas y enzimas citoprotectivas que proporcionan protección celular contra el ROS (especies reactivas con el oxígeno). Fitoquímicamente kaempferol ha sido usado solo o en combinación para la modulación Nfr2 en cáncer y otras dolencias; y mostró su eficacia anticancerígena y la terapéutica anti enfermedades, apuntando a la modulación del Nrf2 para el combate de cáncer, complicaciones diabéticas, desordenes metabólicos y desórdenes neurológicos (41).

En el 2022, se investigó el mecanismo del kaempferol para tratar la osteoporosis senil mediante el acoplamiento molecular, el objetivo del estudio fue buscar el mecanismo como actúa el kaempferol sobre la osteoporosis senil. El procedimiento fue recuperar información de KP de la base de datos TCMSP, Pubchem y almacenaron como archivo "SDF" e importaron a la base de datos SwissTargetPrediction donde obtuvieron las dianas asociadas a PK, estas fueron adoptadas la base de datos UniProt estandarizado las proteínas dianas relacionadas con PK. También recabaron información sobre osteoporosis senil, de proteínas dianas solapadas (OTP) y usaron el software R (v3.6.1) para el solapamiento de las proteínas diana relacionadas con KP y SOP, de la base de datos STRING obtuvieron la interacción proteína-proteína (PPI) de las OTPs, esta información fue procesado en el Cytoscape (v3.7.2) para construir la red PPI. La simulación de acoplamiento fue realizada con AutoDock Vina (v1.1.2). El resultado mostró un total de 152 dianas relacionadas con KP y 978 dianas relacionadas con SOP, y 68 dianas de intersección. El análisis de enriquecimiento GO mostró 1529 procesos biológico. En conjunto, varias dianas y vías están implicadas en el proceso del tratamiento con kaempferol contra la SOP mediante la regulación de la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo, la homeostasis ósea, etc. Finalmente señalan que, el kaempferol puede usarse para el tratamiento de osteoporosis senil (39).

En el 2022, se realizó una revisión de la información científica del género *Senna*, relacionado a las propiedades farmacológicas antioxidantes y antiinfecciosos, la información fue recabada en los diferentes bases de datos científicas como PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. La investigación señala que las plantas *Senna* se está perfilando como una de las importantes del reino vegetal que se ha estudiado ampliamente por sus efectos benéficos para la salud. Señala que, varias partes de la planta como las hojas, flores, vainas, tallo y raíz, son muy rico en fitoquímicos. Estudios *In vitro*, *In vivo* y clínicos han demostrado que los extractos de la planta tienen diversos efectos benéficos para la salud al actuar como un potente agente antioxidante y antiinfeccioso. También señala que, en la medicina tradicional se usa para tratar diferentes afecciones y dolencias, las propiedades curativas están relacionado con la presencia de numerosos fitoquímicos que posee el género, como epicatequina, escutelareína, proantocianidinas, rutina, kaempferol y sennoides que son algunas de los componentes bioactivos presentes en este género. Finalmente, el autor señala que, la información presentada en el trabajo abrirá nuevas perspectivas terapéuticas de este género por sus efectos antioxidante y antiinfeccioso (12).

En el año 2022, se optimizó las condiciones de extracción asistida por microondas de flavonoides y antraquinonas de *Senna alata* (L.) Roxb, las hojas fueron recolectadas en Paloh Hinai, Sungai Pahang, Malasia. Estas muestras fueron secados a 40°C y pulverizados, luego mezclados con etanol al 100% y sometidos a una radiación por cinco minutos, el extracto fue separado del material de la planta por centrifugación y analizado por cromatografía líquida de alta resolución. Las condiciones óptimas de extracción fueron: relación sólido solvente 1:2, concentración de etanol 90,5%, potencia de microondas de 18,6W/mL. Los componentes aislados e identificados fueron: kaempferol, kaempferol 3-gentiobiosido y aloe-emodina. El rendimiento óptimo de los componentes separados fue: kaempferol 8,54mg/g, kaempferol 3-gentiobiosido 4,27mg/g y aloe-emodina 0,86mg/g, todas en base a material seco. El autor concluye que la extracción asistida por microondas mostró mayor tasa de extracción respecto a la extracción por maceración y extracción asistida por ultrasonido (43).

En el 2018, se investigó el efecto de la energía adicional empleada en la extracción de kaempferol de *Cassia alata* (*Senna alata* (L) Roxb), la muestra de la especie fue recolectada en Paloh Hinai, Sg. Pahang, Malasia. Las hojas fueron secadas a 40°C por 4 horas y molidas, usaron extracción asistida por microondas (EAM), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y por maceración (EM), en todos ellos usaron como solvente el etanol. La identificación y cuantificación del kaempferol fue mediante análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a una matriz de fotodiodos (UPLC-PDA). Determinaron que el tiempo de retención de la muestra estándar y del extracto fueron iguales, el mayor rendimiento de kaempferol que obtuvieron fue por EAM con 21,55 mg/g, por EAU 18,60 mg/g y por EM 12,01 mg/g, todas en base seca del material procesado. Concluyen señalando que, la extracción asistida por microondas fue el que dio mayor rendimiento, cuyos parámetros óptimos fueron: tiempo 4 minutos, concentración etanol 100%, relación vegetal/disolvente 1:2 y potencia radiactiva 20 w/mL, añaden, el resultado será una guía útil para extraer kaempferol con mejores resultados de rendimiento del material de planta (44).

En el 2017, fue realizado un tamizaje fitoquímico y una evaluación de la actividad antioxidante de *Senna reticulata*, las hojas fueron colectadas en el municipio de Honda Tolima, para la extracción matriz usaron etanol, luego usaron cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP), cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía de columna (CC) para separar los componentes. Para identificar los componentes usó un cromatógrafo de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C) y mediante el método DPPH evaluaron la capacidad antioxidante. Mediante la marcha fitoquímica identificaron flavonoides, quinonas, taninos, alcaloides, terpenos y glucósidos cardiotónicos y por purificación cromatográfica aislaron una mezcla de eritriol, acetato de isoamilo y ácido L-paraglutámico, también aislaron Quercetina, kaempferol y un hiperósido (3-0-galactósido de Quercetina). Las pruebas de la actividad antioxidante mostraron una inhibición superior al 40%. Finalmente, los autores señalan que, *S. reticulata* sería una fuente importante para obtener kaempferol y ser usado como agente antioxidante en tratamiento de diversas enfermedades (13).

En el 2016, se logró extraer y cuantificar kaempferol del extracto de las hojas de *Cassia angustifolia* (*Senna alexandrina* Mill), la muestra de hojas fue comprado en el mercado local de Mumbai, India. Las hojas fueron secadas, pulverizadas y para la extracción usó metanol, la separación de la quercetina fue por cromatografía de capa fina en silicagel y la identificación por comparación de los valores Rf de la muestra estándar, el solvente usado como fase móvil fue tolueno: acetona: ácido fórmico (7:3:0,25), la cuantificación por Cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC). El valor Rf de kaempferol encontrado fue 0,46 y lograron cuantificar como kaempferol libre 2,42 µg/mg y como kaempferol ligada 8,13 µg/mg respectivamente. Finalmente, se señala que la especie tiene buena concentración de kaempferol y el método que usó fue apropiado para identificar y cuantificar este flavonoide (45).

En el 2015, se estudió el efecto antiinflamatorio del kaempferol. El kaempferol con una pureza mayor a 90% fue adquirido en Alemania, el MG-132 en Estados Unidos, El factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) en China y Quanti Blue en Estados Unidos. Las células humanas de leucemia T Jurkat en Alemania. El mensajero NF- $\kappa$ B en Estados Unidos. El cultivo de la célula fue realizado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, asimismo los procedimientos de las pruebas. Evaluaron el efecto del kaempferol sobre la actividad de NF- $\kappa$ B con una línea celular reportera activada por SEAP, la unión de NF- $\kappa$ B al ADN con un ensayo de desplazamiento electromóvil (EMSA) y la translocación de NF- $\kappa$ B-p65 del citosol al núcleo con western blot en células Jurkat. El resultado de los ensayos mostró que el acoplamiento molecular del kaempferol revelaron energías de unión comparables y posturas de acoplamiento similares en proteínas diana como MG-132, un conocido inhibidor de NF- $\kappa$ B. Finalmente el autor señala que el kaempferol posee actividad antiinflamatoria (31).

En el 2011, se realizó un estudio de la toma de huellas dactilares de los fármacos adelgazantes y de las infusiones adelgazantes preparados con hojas de la especie *Senna*. Los preparados farmacéuticos fueron adquiridos en una farmacia y las infusiones adelgazantes en un mercado local. La mezcla de té con *Senna* se extrajo con metanol a reflujo luego concentrado, posteriormente el concentrado se sometió a extracciones con solventes de polaridad creciente, también el

comprimido farmacéutico fue extraído con metanol al 70%. El extracto metanólico fue directamente analizado por HPLC para identificar sus componentes. Las hojas pulverizadas de *Cassia acutifolia* fue extraído con metanol, y el extracto concentrado fue fraccionado con el uso de solventes de polaridad creciente y eluidos en columna cromatográfica de Sephadex con el que obtuvieron ocho fracciones. Los compuestos de estas fracciones fueron sometidos a análisis espectral de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ) con las que identificaron estructuralmente las moléculas. En los laxantes farmacéuticos encontraron senósidos A y B, en los tés adelgazantes no encontraron estos compuestos, pero encontraron aloe-emodina 8-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, isoramnetina 3-O- $\beta$ -D-gentiobiósido, toracrisona 8-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, 3-O- $\beta$ -D-gentiobiósido, rheína-8-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y Kaempferol. Los autores concluyen que, los tés analizados no mostraron el poder laxativo (20).

En el 2008, se realizó un estudio fitoquímico del extracto de la madera de *Senna reticulada*. La muestra fue recolectada en el jardín de plantas medicinales Prof. Francisco de Abreu Matos de la UFC. La madera y la cáscara de la planta fue pulverizado, luego se extrajo con etanol, los extractos fueron sometidos a purificación utilizando solventes de polaridad creciente en columnas cromatográficas, los compuestos purificados fueron identificados por cromatografía de gases-espectrómetro de masas y la elucidación de la estructura de las moléculas aisladas fue mediante el análisis espectral de resonancia magnética nuclear de protones y carbono-13. fueron identificados los triterpenos  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, seis antraquinonas: 3-metoxi-1,6,8-trihidroxiantraquinona, crisofanol-10,10' biantrona, 1,3,8-trihidroxiantraquinona, fisiona, crisofanol, emodina, y aloe-emodina, y un flavonoide kaempferol. La elucidación espectral de las estructuras confirmó la identidad de las moléculas aisladas. Finalmente, los autores señalan que todas las sustancias encontradas en *S. reticulata* son descritas por primera vez para esta especie (46).

En el 2007, se estudió la actividad cicatrizante y antiinflamatorio del extracto etanólico de *Senna reticulata*. Las muestras fueron recolectadas en el departamento de San Martín, Tarapoto. Las hojas fueron sometidas a secado, luego pulverizados, por maceración con etanol obteniéndose el extracto. Para

identificar los tipos de componentes realizó la marcha fitoquímica y para evaluar la actividad cicatrizante y antiinflamatorio preparó cremas a base del extracto a diferentes concentraciones. La marcha fitoquímica mostró una reacción positiva moderada a la presencia de taninos, quinonas, flavonoides, saponinas, alcaloides; pero para taninos mostró reacción alta y para flavonoides una reacción positiva muy alta. Los flavonoides identificados por sus valores Rf fueron: 5,7-dihidroxiisoflavona, 6,7-dihidroxiisoflavona, 3',4',7-trihidroxiisoflavona. El extracto etanólico no presentó actividad antiinflamatoria, pero la crema preparada a una concentración de 20% del extracto mostró actividad cicatrizante. Los autores concluyen que, la presencia de los tres tipos de flavonoides presentes en *S. reticulata* son los responsables de la actividad cicatrizante (16).

## **1.2. Bases teóricas**

### **1.2.1. Especie vegetal en estudio**

Varias especies del género *Senna* anteriormente estaban clasificados dentro del género *Cassia*, pero mediante estudios filogenéticos (47), revisión taxonómica (1), secuenciación genética corresponde a la nomenclatura 18S y a los factores morfológicas *rbcl* y *atpβ* (48), asimismo se ha analizado la diversidad genética a través de marcadores moleculares AFLP (8). se ha logrado reclasificar y en la actualidad pasó de *Cassia reticulata* (Willd) a la denominación de *Senna reticulata* (Willd) H.S. Irwin and Barneby. esto quiere decir que todas las especies incluidas en este género han evolucionado a partir de un antecesor común, como tal todos los descendientes de este ancestro deben estar incluidas en este grupo (2,49).

#### **A. Identificación taxonómica**

Según la clasificación Fitogenética establecido por Arthur Cronquist las angiospermas hoy se denominan Magnoliophytas (50). La planta de estudio responde la clasificación siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolioside

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Senna*

Especie: *Senna reticulata* (Willd) H.S. Irwin y Barneby

Nombre vulgar: Retama, Matapasto, Tarantán, etc.

## **B. Descripción botánica**

*S. reticulata* fue atribuido por primera vez al género *Cassia* L., con los sinónimos *Cassia alata* y *Cassia reticulata*, puede alcanzar una altura de 12m, rara vez se encuentran árboles que superan los 4 a 8 metros, generalmente son arbustos erectos glabros que alcanzan los 3m a 4m de altura. Tienen hojas pinnadas grandes compuestas de 30-90cm de largo con 8-14 pares de foliolos, los foliolos son obovados-oblongos, obtusos, mucronados, glabros por ambas caras y delgados de 5-17cm de largo. Los pecíolos son fuetes rectangulares glandulares, sin glándulas. Las estípulas acuminadas son frecuentemente lanceoladas con bases dilatadas de hasta 2cm de largo. Los cotiledones son elípticos, con un borde entero. Las flores son grandes y amarillas; los frutos son legumbres largas, ensanchadas en cada lado con un ala ancha y crenulada (5) dispuestas en racimos alargados en las axilas superiores o en el ápice de las ramas; sépalos de 1cm, pétalos ovados de 2cm y brácteas de color anaranjado; el fruto es una vaina bivalva, casi negra, coriácea, dehiscente, con una gran ala crenulada y muy prominente en toda su longitud; semillas marrones, comprimidas, aplanadas, dispuestas paralelamente a los septos (51). Las ramas son numerosas, extendidas e irregularmente angulosas, con bifurcaciones que comienzan en la parte baja del tallo. El dosel es muy denso y amplio. Las ramas son numerosas, extendidas, de ángulo irregular, con bifurcación a partir de la parte baja del tallo. La copa es muy densa y ancha. Los árboles de 4-8 m de altura tienen las copas más densas. La especie es rica en metabolitos secundarios (6).



### **C. Distribución ecológico**

Se expande desde México hasta Bolivia, está presente en Brasil y Colombia. En Perú en los departamentos de Loreto, San Martín, Amazonas y Junín. Habita en terrenos inundables y no inundables (4).

### **D. Usos e información etnobotánica**

Se utiliza como antiinflamatorio, contra enfermedades cardiovasculares, en infecciones dermatológicas como la micosis (causada por *Trichophyton rubrum*, *Candida* sp y *Malassezia* sp) (52) y tiña (causadas por *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*) (53), reumatismo, artritis, en problemas gastrointestinales (9), en Brasil la infusión de la raíz usa para irregularidades y obstrucciones menstruales; del hígado, también señalan que es antirreumática, diurética y febrífuga. En India la decocción de toda la planta se usa contra las mordeduras de serpiente y en México utilizan para combatir las afecciones sifilíticas (51). También, las hojas de *S. reticulata* muestran gran capacidad antioxidante evaluado por el método de DPPH, que muestra un porcentaje de inhibición superior al 40% (13).

#### **1.2.2. Biogénesis del kaempferol**

##### **Biosíntesis**

Se realiza por la vía del shikimato, iniciándose en los plastidios por condensación de la eritrosa-4-fosfato con fosfoenolpiruvato que por diversas modificaciones da lugar al ácido shikimico (54,55), cuyo proceso es el siguiente:

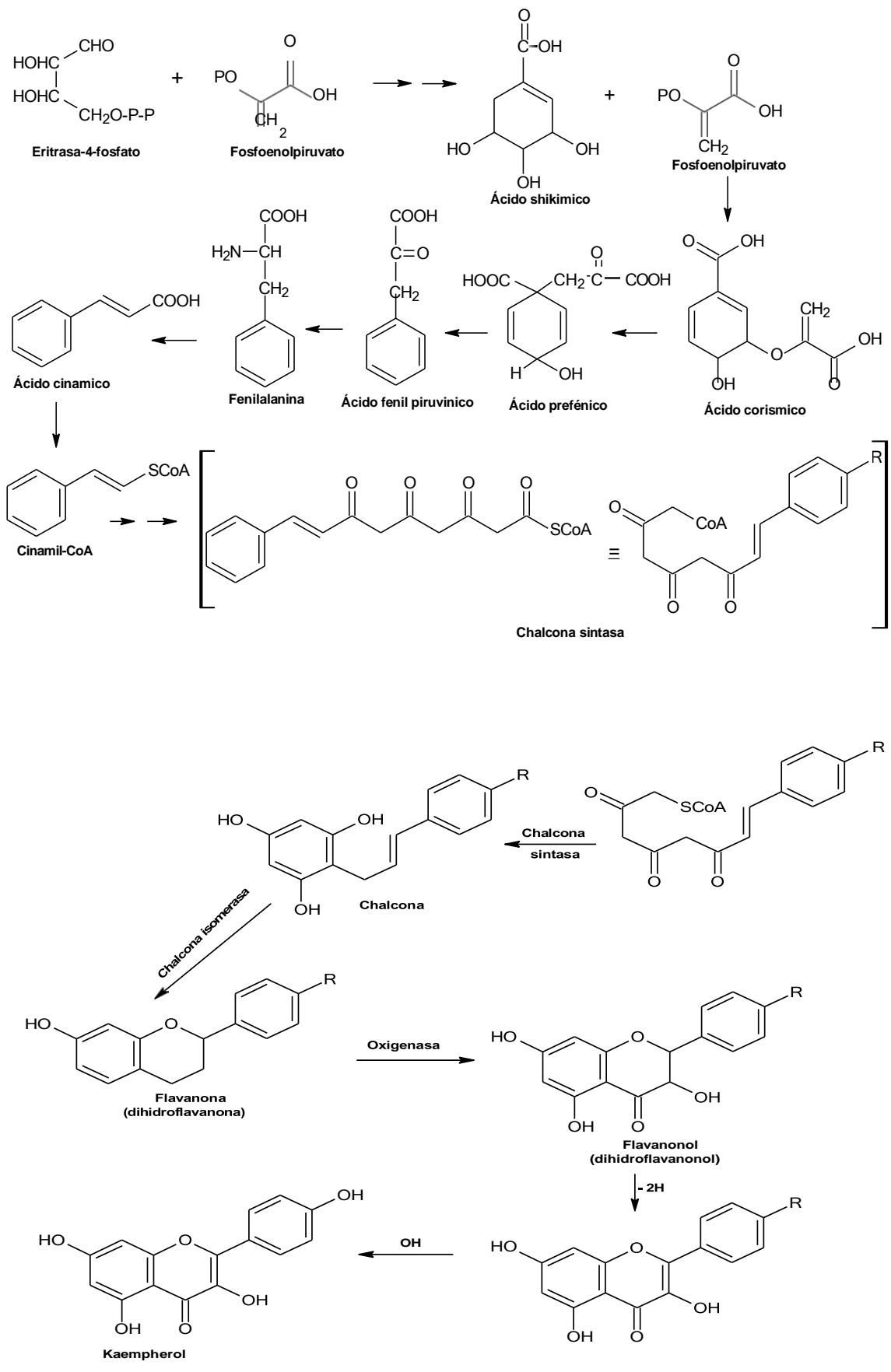


Figura 1. Biosíntesis de kaempferol (55)

### 1.2.3. Kaempferol

Dentro de los denominados pigmentos flavonoidales, el Kaempferol es un flavonol denominado 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona que junto con otras 4 sustancias: apigenina, luteolina, quercetina y miricetina, son separados e identificados fácilmente por cromatografía de papel en el sistema de solventes siguientes: forestal constituido por una mezcla de HCl<sub>Con.</sub>-ácido acético-agua (3:30:10) con un valor hRf=55 en BAW [n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5)] con un valor de hRf=83 y en fenol [Fenol:agua (3:1)] con un valor de hRf=58 (56). Cristaliza en agujas amarillas cuyo punto de fusión se halla entre 276-278 °C (57).

Kaempferol fue aislado de *Delphinium consolida* L (Ranunculaceae) (58), de *Citrus paradisi* Macfaden (pomela) (59) y de *Cuscota reflexa* Roxb. (60). Es insoluble en benceno, débilmente soluble en cloroformo, soluble en ácido acético y álcalis, 440 mg/L de agua a 25°C (débilmente soluble en agua hirviente) (57).

Kaempferol reduce el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, injuria hepática, obesidad y diabetes, exhibe propiedades antiinflamatorias usadas para curar enfermedades agudas y crónicas tales como degeneración del disco intervertebral, colitis, pérdida de masa ósea, postmenopausia. Kaempferol exhibe fuerte actividad antioxidante sobre eritrocitos, así como efectos inhibitorios en el crecimiento de células cancerosas malignas, reduce la presión arterial pulmonar (61), es usado en el tratamiento de la osteoporosis senil (39), tiene evidente potencial antiviral (37), muestra propiedades cardio protectoras (34), es un agente neuro protector en enfermedades neurodegenerativas (35). También, ha demostrado tanto en pruebas *In vitro* (62) e *In silico* (simulación computarizada) que es un inhibidor de la principal proteasa (3CLpro) del SARS-CoV-2. (63).

### 1.2.4. Localización del kaempferol

Se encuentra en abundancia en frutas, verduras, hierbas, hojas y flores de las especies vegetales. Botánicamente se encuentra en Pteridophytas, Pinophytas, Magnoliophytas. En Pteridophytas, el kaempferol y algunos de sus glucósidos se ha identificado en Aspidiaceae, Aspleniaceae, Blechnaceae, Cyatheaceae,

Dennstaedtiaceae, Esquistaceae, Ophioglossaceae, Polypodiceae y Schizaceae; en Pinophytas (gimnospermas = Liliophyta), en Cephalotaxaceae, Ginkgoaceae y Taxaceae. En la división Magnoliophytas (Angiosperma), en Magnoliopsida (Dicotilodonea) y Liliopsida (monocotilodonea), también ha sido identificado en Alliaceae, Araceae, Asphodelaceae, Dioscoreaceae, Hemerocalidaceae, Hostaceae, Iridaceae (24).

### **1.2.5. Métodos de aislamiento del kaempferol**

#### **Por cromatografía de capa fina (TLC)**

El kaempferol fue aislado mediante cromatografía de capa fina (TLC) utilizando celulosa como absorbente y una mezcla de solventes de polaridad media compuesta por: cloroformo, ácido acético, agua, obteniéndose un valor hRf de 71. Mientras que, en silica gel como absorbente y una mezcla de tolueno: cloroformo: acetona como solvente de resolución, el valor de hRf fue de 39. También, el kaempferol fue aislado usando poliamida con dos diferentes tipos de solventes de resolución, en un primer caso fue usado benceno: butanona: metanol resultando un valor hRf de 20; en el segundo caso fue empleado agua: butanona: metanol obteniéndose un valor de hRf de 8 (64,65).

#### **Por cromatografía de papel**

Kaempferol se separó por cromatografía de papel, usando como absorbente papel Whatman y con tres tipos de solventes de resolución que son los siguientes (66):

- a) Forestal: ácido clorhídrico concentrado-ácido acético-agua (3:30:10) con un valor de hRf de 55.
- b) BAW: n-butanol-ácido acético-agua 4:1:5. Top layer es decir separando la capa superior de la capa inferior en embudo de separación, descartando la capa inferior y trabajando con la capa superior dio un valor de hRf de 53
- c) Fenol: Fenol-agua (3:1) dio un valor de hRf de 58.

También, se separó usando como soporte y absorbente papel Whatman N° 1 en tiras de 2,5 x 55cm aplicando como solventes de resolución los siguientes: (67)

- a) Acetato de etilo saturado con agua, obtuvo un valor de hRf de 90.
- b) Fenol saturado con agua, obtuvo un valor de hRf de 74.
- c) Isopropanol 60% y 40% de agua, obtuvo un valor de hRf de 77.

Kaempferol fue aislado de pétalos de rosa en etanol caliente, el extracto fue concentrado en rotavapor, el concentrado desengrasado con éter de petróleo, al residuo añadieron solución etanólica al 7% de ácido sulfúrico e hirvieron por 2 horas. El extracto fue enfriada y extraído varias veces con éter dietílico, al extracto etéreo añadieron solución acuosa de bórax al 10% y ácido clorhídrico, para separar la quercetina del kaempferol porque suele suceder que a veces quercetina y kaempferol están juntos. Finalmente, el extracto etéreo se destiló con las que obtuvieron kaempferol como residuo e identificaron midiendo su punto de fusión cuyo valor es de 275°C (54,65).

Además, kaempferol y sus derivados se puede extraer usando como solventes metanol, etanol y agua; pero también añadiendo energía adicional mediante el ultrasonido, microondas y usando fluidos supercríticos como el CO<sub>2</sub> que se convierte el líquido a altas presiones, que muestra una ventaja sobre los métodos citados porque no es inflamable, no es toxico, no es carcinogénico, no es corrosivo y no genera desechos, y fácilmente se separa el extracto debido a la fácil y alta volatilidad del CO<sub>2</sub> y el proceso se realiza a bajas temperaturas (28).

#### **1.2.6. Medición de parámetros fisicoquímicos**

##### **Características del kaempferol**

Los Parámetros fisicoquímicos característicos del kaempferol y que son de importancia medirlas para su identificación son los siguientes:

- Forma y color del cristal
- Solubilidad
- Punto de fusión
- Valor hRf en cromatografía de capa fina y de papel
- Peso molecular por el método de Rast.

## **Forma y calor**

Después de su aislamiento y purificación se obtiene una sustancia de color amarillo en forma de agujas (57).

## **Solubilidad**

Insoluble en Benceno débilmente soluble en agua, débilmente soluble en cloroformo, soluble en ácido acético y en álcalis, éter dietílico y en dimetilsulfóxido (DMSO) (57).

## **Punto de fusión**

Es la temperatura a la cual una sustancia pasa de su fase sólida a su fase líquida, puede determinarse en un equipo Fisher-Johns con platina de aluminio y calentamiento eléctrico provisto de un termómetro que registra las temperaturas. El compuesto va colocado en un tubo, que se colocan en el equipo, un transformador variable regula la temperatura y el momento de fundición de la sustancia (68,69).

También, se usa el aparato Nalge-Axelrod que posee un microscopio, termómetro que registrar la temperatura, la sustancia de estudio se coloca entre 2 cubre objetos de 18 mm colocados entre la depresión de la platina de aluminio (69). Tiene luz de encendido para enfocar el microscopio a través del cual se observan los cristales, a medida que va aumentando la temperatura y finalmente fundirse el cristal de la sustancia que se mide su punto de fusión, para el caso de identificar si la sustancia es kaempferol, el punto de fusión debe estar entre 276-278°C (68)

Actualmente existen los aparatos Cole-Parmer digital, donde el medidor digital muestra la temperatura de resolución hasta de 0,1 grado y el equipo FISATOM 431D para medir punto de fusión que poseen cuerpo de aluminio acabado en epoxi (poliepóxido) equipo de calentamiento en fibra de vidrio reforzado con tela de acero inoxidable, sistema óptico 4X rango de medida de temperatura 50-300°C medición del punto de fusión de un sólido por métodos instrumentales.

## Valor Rf en cromatografía de capa fina (TLC) y en papel (CP)

### En cromatografía de capa fina (TLC)

Se evalúa en placas absorbentes de sílica gel (cromatoplas) usando como solvente de resolución tolueno: cloroformo: acetona (40:25:35). Se corta cromatofolio de las dimensiones siguiente 2,5 x 20cm, se diluye la muestra de 10mg en 1ml de etanol, se hace el rayado con micropipeta Pasteur a 2cm del extremo inferior de la placa. Se vierte la solución del solvente de resolución en la cámara de vidrio para que sature al medio, luego se introduce la cromatoplas para que corra hasta un valor cercano al borde superior del cual llamamos frente del solvente. El valor de Rf x 100 se determinará mediante la relación siguiente (64):

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto (mancha)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \times 100$$

El valor de Rf x 100 ó hRf del kaempferol en este tipo de cromatografía es de 39 (64),

Si se utiliza cromatoplas de celulosa en cloroformo: ácido acético: agua (50:45:5) siguiendo el procedimiento ya señalado el hRf o Rf x 100 deberá ser 71 indicando que se trata de kaempferol (64).

Si se utiliza cromatoplas de poliamida con 2 sustancias de reactivos de resolución se puede obtener los resultados de Rf x 100 siguientes (64):

- a) Benceno-butanona-metanol (60+20+20) se obtiene un hRf de 20
- b) Agua-butanol-metanol (40+30+30) da un valor de hRf de 8

### En cromatografía de papel

Se corre la muestra en papel Whatman N° 1, en tiras de 2,5 x 50cm. Se aplica el spot a 2 cm del extremo inferior del papel. Se cuelga la tira de la artesa que contiene al solvente de resolución, se procede a realizar una cromatografía de papel descendente puede realizarse con 3 solventes de resolución y son los siguientes (55):

- a) En forestal: HCl<sub>con</sub>: ácido acético: agua (3+30+10) da un valor hRf de 55

- b) En BAW: n-butanol: ácido acético: agua (4+1+5) capa superior da un valor de hRf de 83.
- c) En fenol: fenol-agua (3:1) da un valor hRf de 58.

También, en los siguientes solventes (67):

- a) Con acetato de etilo saturado con agua da un valor de hRf de 90
- b) Fenol saturado con agua da un valor de hRf de 74
- c) Isopropanol 60%, 40% da un valor de hRf de 77

### **Determinación del peso molecular aplicando el método Rast.**

Esta determinación se hace midiendo el decaimiento del punto de fusión del D-Camphor natural, el proceso es como sigue (70):

En un tubo de prueba de 8 x 5mm se coloca 50mg de la muestra en estudio, después se añade 0,5 g de D-Camphor. Luego el contenido del tubo se funde usando mechero Bunsen hasta que se forma un líquido transparente. Se enfría y la muestra fundida se pulveriza en mortero de porcelana y se vuelve a evaluar su punto de fusión por el método del tubo capilar, aunque en la actualidad resulta práctico medirse usando un equipo FISATOM 431D. Se mide el valor de punto de fusión de esta mezcla. También se mide el punto de fusión del D-Camphor puro (180°C). Finalmente se resta estos valores, que el valor que se denomina depresión del punto de fusión del D-Camphor que originó el compuesto materia de estudio.

El peso molecular se calcula con la formula siguiente (70):

$$M = \frac{39.7 \times p \times 1000}{\Delta T \times P} \quad (A)$$

**En donde:**

p = peso del compuesto

P = peso del D-Camphor

$\Delta T$  = depresión en el punto de fusión del D-Camphor

K = 39,7 constante de depresión molar



El peso molecular de Kaempferol es 286,23 g/mol.

### 1.2.7. Parámetros espectroscópicos: en ultravioleta-visible

La espectroscopia ultravioleta está relacionada con la absorción y emisión de energía que da lugar al espectro electromagnético que se producen por los fotones, la relación entre la energía de un fotón y la frecuencia apropiada para su propagación se representa mediante la ecuación:

$$E = hf \quad (\text{I})$$

Donde.

E= energía, h= constante de Planck=  $6,63 \times 10^{-34}$  J.s =  $6,63 \times 10^{-27}$  ergio.sec y f= frecuencia, La frecuencia es la relación entre la velocidad de la luz (C) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) así:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (\text{II})$$

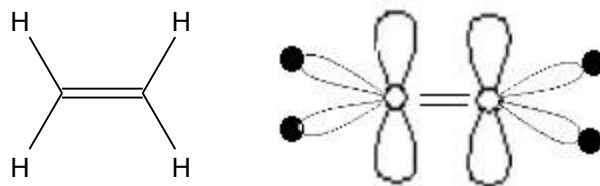
C=  $2,99 \times 10^{10}$  cm/seg y  $\lambda$  es la longitud de onda inversamente proporcional a la energía

Introduciendo II en I

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{III})$$

El cambio de la energía puede ser electrónica, vibracional o rotacional, las transiciones electrónicas necesitan frecuencias relativamente altas, mientras que las vibratorias requieren menor energía y las rotatorias aún mucho menor (71,72). Cuando una molécula conjugada por ejemplo etileno que tiene electrones pi ( $\pi$ ) absorbe radiación ultravioleta, un electrón pasa de un estado fundamental de baja energía a un estado excitado de alta energía; la transición se muestra como el paso de  $\pi$  a  $\pi^*$ .

$\pi \rightarrow \pi^*$  es decir de un estado basal a un estado excitado



**Figura 2.** Molécula de etileno

Electrón p atómico + electrón p atómico = enlace  $\pi$  p-p

Electrón Sp atómico + electrón S atómico = enlace  $\sigma$  sp-s

Las transiciones  $\sigma$  (sigma)  $\rightarrow \sigma^*$  (sigma asterisco) se observan en la región del ultravioleta lejano (73).

Las bandas atribuidas a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  (banda k) aparecen en el espectro de las moléculas que tienen estructura  $\pi \rightarrow \pi^*$  conjugada, los electrones están presentes como pares con spines opuestos (74).

La energía de moléculas heterocíclicas como las de los flavonoides compuestos por varias moléculas de etileno (7 moléculas de etileno) específicamente en flavonoles, caso del kaempferol, se calculan después de obtener el espectro típico de corrida de la muestra en el equipo de espectroscopía UV, el espectro UV consta de picos muy anchos, a pesar de que la energía es cuantizada, solamente una cantidad específica de esta es absorbida, cuando la muestra de 10mg se diluye en metanol y se analiza en el equipo UV UNICO 2800, aparecen 2 picos nítidos a 266 y 367nm con 3 hombros a 253, 294 y 322nm, estos picos representan las longitudes de onda máxima del espectro de la sustancia analizada, el espectro registra en el eje de las ordenadas la absorbancia y en el eje de las abscisas, las longitudes de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ). Los valores energéticos del kaempferol se calculan una vez que se obtiene las longitudes de onda. Si la muestra se analiza con metanol y se obtiene 2 longitudes de onda máxima a 266 y 376nm, como señalamos las transiciones energéticas se calcularán aplicando la ecuación:  $E = \frac{hc}{\lambda}$  (71,75).

$$h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ Joule.seg}$$

$$C = 2,99 \times 10^8 \text{ m/seg}$$

$$\lambda = 266 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$eV = 1,602 \times 10^{-19} \text{ Joule}$$

Entonces; aplicando la ecuación III  $E = \frac{hc}{\lambda}$ , calcularemos la energía a las 2 longitudes de onda que registra el espectro analizado en metanol

Para  $\lambda_{\text{máx}} = 266 \text{ nm}$

$$E = \frac{6,63 \times 10^{-34} \cdot 2,9979 \times 10^8 \text{ Joule.seg.m}}{266 \times 10^{-9} \text{ seg.m}}$$

$$E = 7,468 \times 10^{-19} \text{ Joule} \left| \frac{1 \text{ eV}}{1,6022 \times 10^{-19} \text{ Joule}} \right| = 4,66 \text{ eV}$$

$$E = 4,66 \text{ eV}$$

Para  $\lambda_{\text{máx}} = 367 \text{ nm}$

$$E = \frac{6,63 \times 10^{-34} \cdot 2,9979 \times 10^8 \text{ Joule} \cdot \text{seg} \cdot \text{m}}{367 \times 10^{-9} \text{ seg} \cdot \text{m}}$$

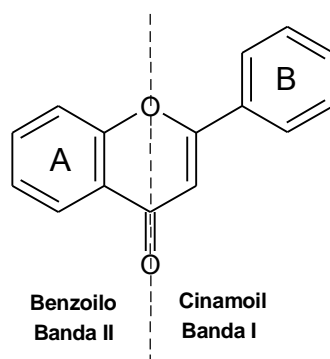
$$E = 5,416 \times 10^{-19} \text{ Joule} \left| \frac{1 \text{ eV}}{1,6022 \times 10^{-19} \text{ Joule}} \right| = 3,38 \text{ eV}$$

$$E = 3,38 \text{ eV}$$

Estos 2 valores de energía a longitudes de onda máxima ( $\lambda$ ) 266 y 267nm evidencian que a mayor longitud de onda la energía es menor.

Si la muestra se disuelve en una mezcla de metanol con metóxido de sodio, se observará 3 longitudes de onda máxima ( $\lambda$ ) de 278, 316, 416nm (decaimiento); en la mezcla Metanol más Acetato de sodio, las longitudes de onda máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) son: 274, 303, 387nm respectivamente (76).

El espectro ultravioleta visible de flavonoles en metanol muestra dos picos de mayor absorción en el ultravioleta 240-400nm, estos 2 picos son comúnmente referidos como la banda I, generalmente entre 300-380nm, el valor es de 367 nm y la banda II generalmente entre 240-280nm, el valor es de 266nm. La banda I es considerada por estar asociada con la adsorción debido al anillo B del sistema cinamoil y la banda II con la adsorción involucrada con el anillo A del sistema benzoil (76).



**Figura 3.** Sistema cinamol y benzoil de la molécula de kaempferol

El incremento de la oxigenación en el anillo B en los flavonoles sucede un desplazamiento batocrómico en la banda I con cada ocupación de oxígeno adicional, por otra parte, mientras se cambian los patrones de oxigenación del anillo B, generalmente se produce un desplazamiento en la banda II.

La banda II puede aparecer como una o dos picos designados IIa y IIb, siendo IIa el pico de más longitud de onda, dependiendo de los patrones de oxidación del anillo B y en menor medida el 3', 4', 5'- flavonoles oxigenados generalmente exhiben 2 picos de absorción (o un máximo con hombro (sh) sobre el largo de la longitud de onda lateral del pico, entre 250-257 nm, mientras los equivalentes 4'-oxigenados tienen solamente uno como corresponde al kaempferol (76).

El espectrofotómetro ultravioleta visible, está diseñado para medir la absorbancia en la región que va del campo ultravioleta al campo visible, por medio de la ley de Lambert-Beer se puede medir la intensidad de la luz que pasa a través de la solución de la muestra y la compara con la intensidad de la luz antes de atravesar la muestra. En la gráfica del espectro ultravioleta visible, aparece una curva o curvas donde las absorbancias está en el eje de las ordenadas y la longitud de onda en el eje de las abscisas (76-78).

### **1.3. Definición de términos básicos**

**Caracterización.** Son los procedimientos analíticos que permiten determinar las propiedades fisicoquímicas que son características del compuesto aislado tales como: color y forma del cristal, solubilidad, punto de fusión, valores de  $R_f$  en TLC, peso molecular y por análisis espectroscópico las longitudes de onda de absorción del compuesto (74).

**Espectroscopía.** En una técnica analítica, estudia la interacción entre la materia y la radiación electromagnética. Se basa en medir la cantidad de luz que una materia absorbe cuando pasa a través de ella, y analiza las longitudes de onda de la luz en la región del espectro visible y no visible (71,75)

**Los flavonoides.** Son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Cumplen un importante papel en la naturaleza, confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores (79).

**Kaempferol.** Es un flavonoide que por su presencia de grupos oxhidrilos en posiciones 3,5,7,4' se conoce como flavonol, es insoluble en agua y posee muchas propiedades biológicas

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis

Las hojas de *S. reticulata* contiene Kaempferol que puede ser aislado e identificado mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

### 2.2. Variable de estudio y su operacionalización

#### 2.2.1. Variable de Estudio

##### Variable Independiente

**Presencia de kaempferol**, compuesto químico aislado de las hojas de *S. reticulata*. (retama).

##### Variable dependiente

**Características fisicoquímicas.** Propiedades que lo identifican al compuesto puro, aislado luego del proceso de extracción tales como: solubilidad, peso molecular, valores Rf, punto de fusión, color formas del cristal y reacciones coloridas.

**Características espectroscópicas.** Determinada por la longitud de onda máxima de las bandas de absorción del producto químicamente puro, medido en un espectrofotómetro UV-visible en diferentes solventes y que manifiesta efectos batocrómicos e hipsocrómicos cuando se añade solventes de desplazamiento (74).

## 2.2.2. Operacionalización de Variables

Variable Independiente	Definición Operacional	Tipo por naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categoría	Escala de categoría	Medio de Verificación
Kaempferol aislada de <i>S. reticulata</i> .	El kaempferol, se aisló de las hojas pulverizadas de <i>S. reticulata</i> , por el método de partición de fases, después del desengrase se extrajo con etanol caliente que se evapora a presión reducida. El residuo se disolvió con una solución etanólica de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 7%. La suspensión se extrajo con éter dietílico, se juntaron los extractos etéricos y se extrajo con solución de tetraborato de sodio al 10%, la fase etérea se destila y se obtiene kaempferol	cuantitativa	Cantidad de sustancia aislada (g)	Razón	Ninguna	Ninguna	Cristales de kaempferol

Variable Dependiente	Definición operacional	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de Medición	Categoría	Escala de categoría	Medio de Verificación
Propiedades fisicoquímicas: Color y forma del cristal, solubilidad, punto de fusión y peso molecular	Se evaluó las características fisicoquímicas tales como: color y forma del cristal, solubilidad, punto de fusión, valores de hRf en TLC y peso molecular por el método de Rast	Cuantitativa	Color amarillo, forma de agujas. Soluble en metanol, etanol, ácido acético. Temperatura de fusión 278°C hRf [tolueno:cloroformo:acetona] 39 hRf [benceno:butanona:metanol] 20 hRf [agua:butanona:metanol] 8 hRf [HClconc.:ácido acético:agua] 55 Peso molecular 286,23 g/mol	Razón	Ninguna	Ninguna	Registro de color y forma Registro de temperatura en el equipo FISATOM 431D Registro valores Rf (anexo 3) Registro valor peso molecular (anexo 4)
Propiedades espectroscópicas: Longitud de máxima de absorción	Para determinar los espectros se usó el espectrómetro UNICO 2800. Los solventes que se usó para el análisis fue el metanol, metanol con metóxido de sodio y finalmente etanol con acetato de sodio.	Cuantitativa	Longitud de onda de absorción (nm): En MeOH (253sh, 266, 294sh, 322sh, 367nm) En MeOH: NaOCH <sub>3</sub> (278, 316, 416nm (dec)) En MeOH: NaOAc (274, 303, 387nm)	Razón	Ninguna	Ninguna	Registro de espectros (anexo 5)

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1. Diseño Metodológico

El estudio es descriptivo de tipo cuantitativo (80) se recolectaron 5kg de hojas de *S. reticulata*, que fueron procesadas para obtener kaempferol, el procedimiento incluyó pruebas preliminares de identificación de flavonoides, para la extracción del compuesto se usó solventes de diferente polaridad que permitió el desengrase, maceración, separación de fases, extracción, purificación y finalmente se identificó por medición de sus características fisicoquímicas y espectroscópicas.

### 3.2. Diseño muestral

El muestreo fue por conveniencia, porque en todas las hojas está presente el kaempferol, por esta razón no se aleatoriza algo “*per se*” presente en todas ellas (81).

#### 3.2.1. Población de estudio

Es una comunidad vegetal de *S. reticulata* a la que se le ha elegido para constituirse en nuestra población de estudio por su exuberancia y verdor de sus hojas. Esta comunidad vegetal está ubicada en el caserío de Ullpa Gallo, Distrito de Belén, Provincia de Maynas, Región Loreto.

#### 3.2.2. Tamaño de la muestra

Se colectó 5kg de hojas frescas que posee la planta arbustiva de *S. reticulata*.

#### 3.2.3. Criterio de selección

##### Criterios de inclusión

Se recogieron las hojas compuestas de varios foliolos escogiéndose los de mayor tamaño y turgencia.



## Criterios de exclusión

No se tomaron hojas atacadas por insectos, tampoco marchitas.

### 3.3. Procedimiento de recolección de datos y análisis de datos

#### 3.3.1. Recolección de datos

La forma de recolección de datos siguió los pasos que diseñamos, este se inició con la recolección de materia prima, pasando por etapas constituidas de operaciones básicas que nos permitió lograr el aislamiento del principio activo deseado, su purificación y la identificación con exactitud y presión por medición de las variables fisicoquímicas y por espectroscopía UV/visible obtener espectros con sus longitudes de onda máxima de absorción que son característicos en el comportamiento de esta molécula. Las etapas seguidas se muestran en el diagrama siguiente: (ver figura 4).

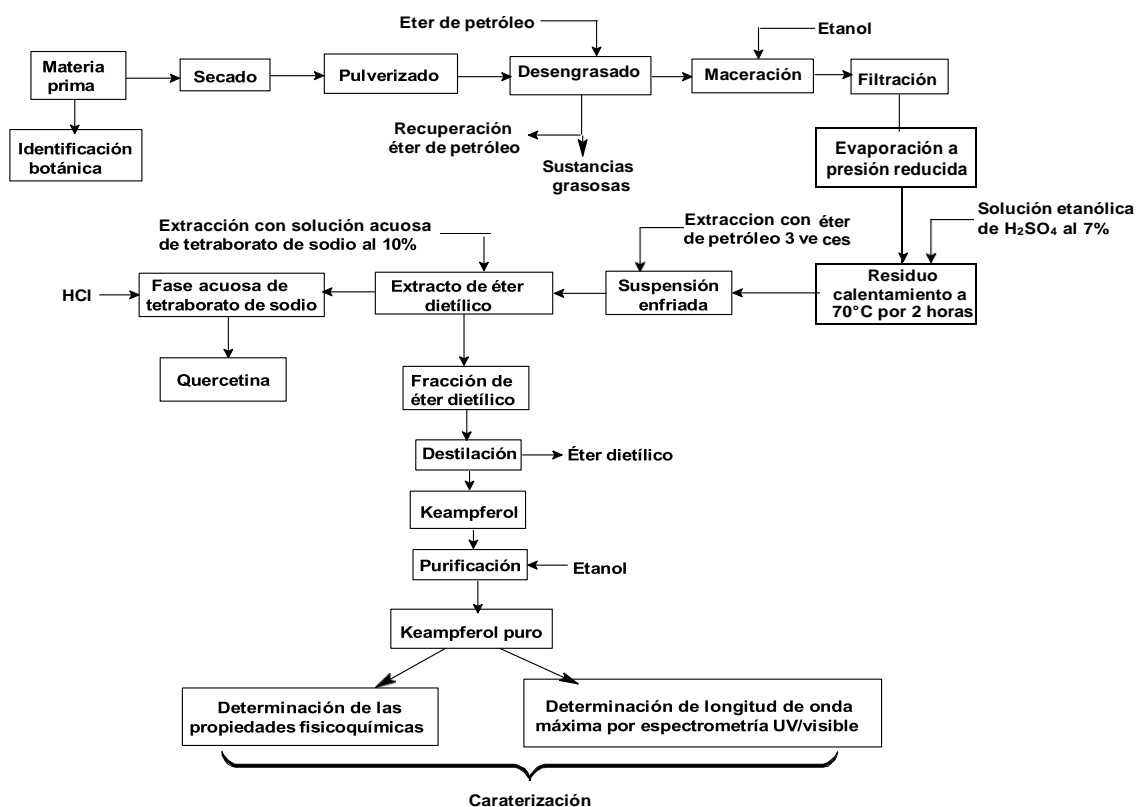


Figura 4. Diagrama de bloque de la obtención e identificación de kaempferol

### **A.1. Colección de la muestra vegetal.**

Se recolectaron 5kg de hojas frescas a las 7pm en el caserío de Ullpa gallo, Distrito de Belén, Maynas, Loreto, ubicado entre las coordenadas georreferenciales 3° 46' 01" S; 73° 14' 48" O; altitud 110 m.s.n.m.

En la recolección de la muestra se tomó fotografías (ver anexo 1), la muestra se llevó al laboratorio de Fitoquímica y Productos Naturales de la Facultad de Ingeniería Química de la UNAP, se realizó pruebas preliminares para identificar la presencia de flavonoides. Una muestra de planta se llevó al Herbarium Amazonense CIRNA-UNAP para su identificación.

### **A.2. Prueba preliminar**

**Primera prueba**, Se tomó un poco del extracto alcohólico de las hojas de *S. reticulata* y se colocó en una placa Petri, se agregó una tira de magnesio metálico y gotas de ácido clorhídrico concentrado, se observó una coloración rojiza (prueba de Shinoda) por esta prueba no es específica para flavonoles como kaempferol, se realizó también para flavononas, flavonoles y xantonas simplemente como paso previo de su identificación general de un flavonoide como kaempferol (54).

**Segunda prueba**, consistió en disolver una pequeña cantidad del extracto etanólico en ácido sulfúrico concentrado y originó una solución fuertemente amarilla que indica la presencia de flavonoles (54).

Estas dos pruebas preliminares nos indican que en las hojas de *S. reticulata* hay presencia de flavonoides.

### **A.3. Certificación de la especie vegetal**

Una rama de la planta con hojas, flores y frutos se llevó al Herbarium Amazonense CIRNA-UNAP, donde el especialista en botánica realizó la identificación taxonómica correspondiente y expidió la constancia correspondiente (ver anexo 2).

#### **A.4. Preparación y limpieza**

Las hojas de *S. reticulata* se secó en atmosfera de aire acondicionado a 18°C con remoción intermitente de las hojuelas o foliolos, el peso inicial de 5kg llevado a la balanza peso 1,62kg, esto quiere decir que perdió 3,38kg que representa una humedad de 67,6%.

#### **A.5. Molienda**

Las hojas secas se llevaron a molienda fina en molino de disco, se tamizó en malla 60 ASTM (0,25mm de diámetro) y se obtuvo 800g polvo fino, 820g quedó retenido en el tamiz, consistente en fibra que se descartó.

#### **A.6. Desengrase.**

Se tomó 200g de materia prima pulverizada se colocó en cuatro cartucho de papel filtro, cada uno de 50g y se llevó al compartimiento de muestra de cada aparato de Soxhlet (4 Soxhlet), armados en serie en el balón de cada equipo de Soxhlet se depositó 250mL de éter de petróleo, se cerró el equipo uniendo extractor con refrigerante de reflujo y balón, se puso a extraer por 8 horas a 70°C en calentador de resistencias sellados y control de temperatura.

Para recuperar el solvente, se juntaron las cuatro porciones y se destiló separando una sustancia grasosa que se descartó, por no ser objeto de nuestro estudio.

#### **A.7. Maceración**

La muestra desengrasada se extrajo con etanol caliente por 4 horas en vaso de precipitado de 2 litros con 1 litro de alcohol.

#### **A.8. Filtración**

El extracto se filtró con bomba de vacío en embudo de Buchner, se descartó el afrecho retenido en el embudo.

### **A.9. Concentración**

El filtrado alcohólico se concentró a presión reducida en rotavapor hasta obtener un residuo.

### **A.10. Acidificación**

El residuo se hirvió con una solución acuosa etanólica de ácido sulfúrico al 7% durante 2 horas.

### **A.11. Extracción de los componentes flavonoidales**

La suspensión enfriada se extrajo varias veces con éter dietílico en pera de decantación de 2L luego se juntaron los 4 extractos etéreos en uno solo balón.

### **A.12. Extracción por reparto de fase**

Al extracto de éter dietílico, se añadió una solución acuosa de tetraborato de sodio al 10% a fin de separar quercetina con el que forma quelato que por lo general acompaña al kaempferol, por lo cual se separa en la fase acuosa de tetraborato de sodio.

### **A.13. Separación de fases**

Se separó la fase acuosa de la fase etérea, abriendo la llave de la pera de decantación y se descargó toda la fase acuosa en la que puede estar presente quercetina porque en la fase de éter dietílico está presente el kaempferol, que es el flavonol objeto de nuestro estudio.

### **A.14. Destilación de la fase de éter dietílico**

La fase éter dietílico se destiló en rotavapor a presión reducida 35°C y se obtuvo un polvo amarillo.

### **A.15. Purificación del kaempferol**

El polvo amarillo se disolvió en etanol, se calentó y se agregó una pequeña cantidad de Norita.

### **A.16. Filtración**

La solución etanólica se filtró para separar la Norita, el filtrado se dejó en reposo y precipitó una sustancia amarilla que cristalizó en forma de agujas. Se separó los cristales.

### **A.17. Pesada**

La sustancia aislada (cristales) se pesó en una balanza analítica OHAUSS, para cuantificar el rendimiento.

## **3.4. Procedimiento de análisis de datos**

### **Medición de las propiedades fisicoquímicas del kaempferol**

#### **Color y forma del cristal obtenido de las hojas *S. reticulata*.**

Los cristales que se obtuvo eran de color amarillo. La forma o hábito del cristal es acicular, cristales delgados y alargados en forma de agujas (55).

#### **Solubilidad del kaempferol**

Se hizo pruebas de solubilidad del kaempferol en varios solventes, en cada una de estas pruebas se usó 1mg del producto y 1mL de solvente, el procedimiento fue el siguiente: en un tubo de prueba se puso 1mg de kaempferol aislado se añadió 1mL de agua destilada, se agitó, no se observó disolución alguna, debe entenderse que si fuera soluble en agua requeriría solamente 0,30mL de agua destilada para disolverse, pero en 1mL de agua no disolvió 1mg de Kaempferol lo que evidenció su insolubilidad, el mismo procedimiento se hizo con etanol caliente

en el que muestra solubilidad, es soluble en hidróxido de sodio y en éter dietílico, débilmente soluble en cloroformo pero insoluble en benceno (70).

### **Punto de fusión**

Se midió en el equipo FISATOM 431D, rango 50-300°C de temperatura del equipo, el producto cristalino se introdujo en un tubo capilar y se colocó horizontalmente en el lugar donde se depositan las muestras, se alumbró con el objetivo y se observó que el cristal funde a 278°C. Este valor de punto de fusión es tan similar al que aparece en la literatura (57).

### **Reacción colorida del kaempferol**

Para las reacciones coloridas de kaempferol se usó los siguientes reactivos, hidróxido de sodio, magnesio, etanol, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, a una pequeña cantidad de muestra se añadió solución de hidróxido de sodio, la reacción se tornó de color amarillo; a una segunda porción de muestra se disolvió en etanol hirviendo se añadió tiras de magnesio y ácido clorhídrico concentrado (reactivo de Shinoda) la reacción se tornó de un color rojizo. Finalmente, se tomó 2mg de muestra se disolvió en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, la reacción se tornó de un color amarillo intenso evidencia la presencia de un flavonol (54).

### **Valores de hRf en cromatografía de capa fina y en cromatografía de papel**

#### **En cromatografía de capa fina (TLC)**

Se preparó placas de silicagel de 20 x 2,5cm, a 2cm de la base inferior de la placa, zona que se conoce como origen del soluto, el soluto se disolvió en éter dietílico, este se aplicó con micropipeta de Pasteur describiendo una línea horizontal (como raya) con un ancho de 3nm, luego se secó con secador de cabello se depositó en la cámara cromatográfica donde previamente se depositó el solvente de resolución consistente en una mezcla Tolueno-Cloroformo-acetona (40+25+35), se dejó correr hasta que el solvente alcanzó 16cm arriba del origen al que se lo conoce como frente del solvente, apareció una sola franja, la revelación

con revelador UV, permitió observar la presencia de una sola franja que demuestra que se trata de una sola sustancia, para determinar los valores hRf de la sustancia se midió con una regla milimétrica la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por el solvente, con los datos de las mediciones se determinó el valor hRF correspondiente aplicando la fórmula siguiente (64) (ver anexo 3):

$$hRf = \frac{\text{Distancia del corrido del soluto en cm}}{\text{Distancia del corrido del solvente en cm}} \times 100$$

### **En poliamida**

Se uso placas de poliamida con dimensiones de 20 x 2,5cm, se marcó con lápiz el punto de origen del soluto a 2cm del borde inferior, se realizó los mismos procedimientos descritas anteriormente, pero como solvente de resolución se usó la mezcla de benceno-butanona-metanol (60+20+20), el valor Rfx100 se determinó con la misma fórmula señalado en el procedimiento anterior. También, se realizó el análisis usando como solvente de resolución una mezcla de agua-butanona-metanol (40+30+30) (64), los cálculos ver (anexo 3).

### **En cromatografía de papel descendente (CP)**

Se tomó una lámina de papel Whatman N°.1 de 50 x 50cm se cortó en tiras de 50 x 2,5cm, a 10cm del extremo superior del papel, se aplicó la muestra en raya luego de secarlo se abrió la cromatocabina y se depositó la tira fijada en la artesa con una varilla de vidrio, se llenó la artesa con el solvente constituido por el sistema Forestal: HCl concentrado-ácido acético-agua (3:30:10), se procedió a la cromatografía descendente teniendo en cuenta que solo 8cm del papel estuviera sumergido en el solvente de la artesa y 2 cm fuera del solvente para una corrida ideal. Cuando el frente del solvente descendió 36 cm, se quitó la tira y se secó, luego se midió las distancias recorridas por le soluto y solvente respectivamente, con estos datos se calculó el valor Rfx100 usando la fórmula anteriormente mencionada (64), los cálculos ver (anexo 3):

## **Determinación del peso molecular por el método de Rast.**

El peso molecular se pudo determinar por medición del decaimiento del punto de fusión del D-Camphor puro. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: en un tubo de 8 x 50mm, se colocó dentro de él 50mg de la sustancia amarilla, seguidamente 0,5 g de D-Camphor y se pesó en balanza analítica OHAUSS, se usó un mechero para calentar hasta fundirse la mezcla. Se enfrió y se pulverizó y se determinó su punto de fusión en el Equipo FISATOM 431D.

También, se determinó el punto de fusión del alcanfor puro, luego se restó estas dos temperaturas del punto de fusión encontrados que se denomina valor de la depresión del D-Camphor, con estos datos se calculó el peso molecular de la sustancia en estudio, aplicando la siguiente fórmula (68).

$$M = \frac{39.7 \times p \times 1000}{\Delta T.P}$$

Donde.

Dónde:

w = peso del compuesto en estudio.

W= peso del D-camphor

$\Delta T$  = depresión en el punto de fusión.

K= 39,7 constante molar de descenso del punto de fusión del D-camphor

M= peso molecular

El procedimiento del cálculo del peso molecular (ver anexo 4)

## **Espectroscopia ultravioleta visible**

Para identificar la muestra aislada se preparó una solución diluyendo 20mg de muestra en 20mL de metanol y se repartió en 3 volúmenes cada una de 6,6mL, las mediciones de los espectros se realizaron en el equipo de espectrofotometría UV/ VIS modelo UNICO 2800



Se realizó la medición en blanco solo con metanol, para calibrar el equipo, luego se realizó la medición de la primera muestra. El registrador del equipo registró el espectro de las longitudes de onda máxima ( $\lambda$  max) (ver anexo 5)

A la segunda muestra se agregó 100mg de Metilato de sodio en polvo se agitó con la que se formó una solución homogénea, se llevó a la cubeta de cuarzo y luego se introdujo en el equipo UV/Visible, el registrador mostró el espectro de los valores de longitud de onda (ver anexo 5).

La tercera muestra se mezcló con 100mg de acetato de sodio, luego se siguió el mismo procedimiento que las anteriores mediciones para el registro del espectro correspondiente (ver anexo 5).

### **3.5. Aspectos éticos**

La recolección de la muestra se hizo de las hojas de la especie en estudio, este órgano de la planta se renueva continuamente, de tal forma que no se amenaza su dinámica de desarrollo y propagación. No se realizó pruebas biológicas en animales y tampoco en seres humanos.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Rendimiento de kaempferol

Se aisló 0,95g de kaempferol de hojas secas de *S. reticulata*, que representó un rendimiento de 0,475% (ver anexo 6).

### 4.2. Características fisicoquímicas

Los parámetros de las propiedades fisicoquímicas de kaempferol aislada de *S. reticulata* y de la muestra estándar, se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de kaempferol aislada de *Senna reticulata* y muestra estándar

Propiedades fisicoquímicas	Kaempferol aislada de <i>S. reticulata</i>	Kaempferol estándar
Color y forma	Amarillo y agujas finas	Amarillo y agujas finas (55)
Solubilidad	Metanol, etanol, ácido acético, soluciones alcalinas.	Metanol, etanol, ácido acético, soluciones alcalinas (70).
Punto de fusión	278°C	278°C (57)
Reacción colorida en: Hidróxido de sodio Etanol + magnesio + HCl conc. Ácido sulfúrico concentrado	Amarillo Rojizo Amarillo intenso	Amarillo Rojizo Amarillo intenso (54)
Valor Rf x100 en silicagel: [tolueno:cloroformo:acetona]	39	39 (64)
Valor Rf x 100 en poliamida: [benceno:butanona:metanol]	20	20 (64)
[agua:butanona:metanol]	8	8 (64)
Valor Rf x 100 en Whatman N° 1: [HCl conc.: ácido acético:agua]	55	55 (64)
Peso molecular (método Rast)	286,02 g/mol	286,23 g/mol IUPAC (68)

### 4.3. Características espectroscópicas

Las longitudes de onda de absorción máxima del kaempferol aislada de *S. reticulata* y de la muestra estándar en diversos solventes se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Longitudes de onda de absorción de kaempferol aislada de *S. reticulata* y muestra estándar

<b>Solventes de resolución</b>	<b>Kaempferol aislada</b> ( $\lambda_{\text{máx}}$ )	<b>Kaempferol estándar</b> ( $\lambda_{\text{máx}}$ )
MeOH	253sh, 266, 294sh, 322sh, 367nm	253sh, 266, 294sh, 322sh, 367nm (76)
MeOH: NaOCH <sub>3</sub>	278, 316, 416nm (dec)	278, 316, 416nm (dec) (76)
MeOH: NaOAc	274, 303, 387nm	274, 303, 387nm (76)

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El kaempferol se puede aislar mediante diversos métodos, destacando partición de fases (54), cromatografía en capa fina (TLC) con adsorbentes como silicagel y poliamida (64), cromatografía de papel (66,67) y métodos más recientes como el ultrasonido y fluidos supercríticos (28). La elección del método depende del objetivo del estudio, ya que algunos son útiles para obtener pequeñas cantidades con fines analíticos, mientras que otros permiten la extracción en mayor volumen con propósitos comerciales.

En las hojas de *S. reticulata* de la amazonia peruana se logró aislar 0,95g de kaempferol, comparado con 86,3mg en las hojas de esta especie en Colombia (13), y 8mg en hojas y 9mg en corteza de ejemplares del noreste de Brasil (10,46). Estos resultados evidencian la variabilidad significativa en el rendimiento de kaempferol en esta especie por factores edáficos del lugar geográfico donde se desarrollan. Siendo la especie de la amazonia peruana la de mayor rendimiento, seguida por la de Colombia y finalmente por las de Brasil, con valores más bajos.

El kaempferol también se ha aislado de otras especies del mismo género. De las hojas de *Cassia alata*, se obtuvieron 21,55mg mediante extracción asistida por microondas, 18,60mg con ultrasonido y 12,01mg por maceración (44), en otro estudio, se obtuvo un rendimiento de 0,854% (8,54mg) de las hojas (43). Por otra parte, en las hojas de *Cassia angustifolia* reportaron 17,54 $\mu$ g de kaempferol libre y 8,13 $\mu$ g en forma ligada, lo que representa 1,754% y 0,813% respectivamente (45). De hojas de *Cassia bakeriana* Craib se aislaron 11mg de kaempferol (82). Comparativamente, el rendimiento de *S. alata* y *S. reticulata* es similar a nuestro estudio, mientras que en *S. angustifolia* es superior. El método de extracción empleado influye notablemente en los rendimientos obtenidos. Estos estudios resaltan que la especie de un mismo género comparten metabolitos comunes por su proximidad filogenética.

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, el kaempferol aislado de *S. reticulata* se presentó como agujas finas amarillas, en concordancia con otros estudios que lo describen como un sólido amorfo o cristalino amarillo (10,13,25,46,83,84). Su punto de fusión se determinó en 278 °C, similar a los otros estudios que reportan entre 276-278 °C (10,46,83,84), valores comprendidos entre 276-278°C (10) y valores entre 278-279°C (84), Este valor puede fluctuar entre dos valores mínimo y máximo (83,84).

El kaempferol aislado mostró solubilidad en metanol, etanol, ácido acético y soluciones alcalinas. Mientras que la forma monohidratada es soluble en solventes puros como el etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, así como en mezclas con agua de estos alcoholes, pero en solventes puros a una temperatura entre 283 a 292 °C es más soluble en etanol, mientras que a temperatura entre 308 a 323 °C es más soluble en 2- propanol(85). Su limitada solubilidad en agua llevó a la síntesis de un complejo soluble en agua con un compuesto sulfonado y galio (Kae-SO<sub>3</sub>-Ga), con potencial farmacológico (86).

Las pruebas de reacción de color en extractos de *S. reticulata*, confirmaron la presencia de flavonoides: amarillo con hidróxido de sodio, rojizo con etanol magnesio y ácido clorhídrico concentrado, y amarillo intenso con ácido sulfúrico. Resultados consistentes con otros estudios (83).

En análisis TLC, los valores R<sub>f</sub> del kaempferol aislado de *S. reticulata* fueron similares a los de una muestra pura, tanto en silicagel con tolueno-cloroformo-acetona como en poliamida con benceno-butanona-metanol (64), Los valores de R<sub>f</sub> varían dependiendo del solvente empleado (45,87,88), pero si se usan los mismos solventes de resolución en cualquiera de los estudios los valores serán exactamente iguales, independiente de que especie vegetal provenga el compuesto aislado.

El análisis espectroscópico UV/visible mostró longitudes de absorción máxima entre 253-367nm en metanol, similar al reportado por la bibliografía para una sustancia pura (76), en solución de metanol: metilato de sodio entre 278 a 416nm y en solución de metanol: acetato de sodio entre 274 a 387nm, también estos

valores son coincidentes con los valores señalados por la bibliografía para el kaempferol puro (76). En una identificación similar a nuestro estudio, los espectros UV en metanol del kaempferol aislado de rosa rugosa mostró una longitud de onda de absorbancia máxima a 266, 322sh, 366nm, pero en solución de metanol: cloruro de aluminio fue 270, 305sh, 350sh, 424nm y en metanol:AlCl<sub>3</sub>/HCl fue 270, 305sh, 347sh, 424nm (84). Los espectros del kaempferol en solución de metanol realizados en ambos estudios muestran valores similares.

Por análisis en cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a un matriz de fotodiodos (UPLC-PDA) kaempferol mostró un pico de absorción máxima a un tiempo de retención de 7,79 minutos (44), asimismo, se encontró una absorbancia máxima a 368nm por análisis UPLC (84), en otro estudio realizado se encontró una absorbancia máxima a una longitud de onda de 265nm y 365nm cuyo tiempo de retención fue 7,75 minutos (43). El kaempferol aislado de las hojas de *Rauwolfia serpentina* mostro dos picos de absorbancia máxima a 266nm y 366,1nm (83), y el kaempferol aislado de las hojas de *Cassia bakeriana* Craib mostró una absorbancia máxima a 264nm y 366nm cuyo tiempo de retención fue 8,8 minutos (82). Además, se encontró una longitud de onda de absorción máxima de kaempferol en solución de etanol a 266 y 369nm respectivamente, pero en solución de etano+hidróxido de sodio fue a 281 y 415nm y en solución de etanol+acetato de sodio fue a 274 y 387nm respectivamente (25), esto significa que el hidroxilo en la posición 7 está libre porque hay un desplazamiento batocrómico de 18nm en la banda I y de 8nm en la banda II.

El peso molecular encontrado en *S. reticulata* por el método de Rast fue 286,02 g/mol, mientras que para la muestra pura la literatura señala el valor de 286,23 g/mol, en otro estudio se determinó el peso molecular de 286 g/mol y un pico de iones moleculares m/z de 285 Dáltones con un error de 1 ppm (43), asimismo, se encontró un pico de iones moleculares m/z de 285,0403 Dáltones con una diferencia de 0,7 ppm (82). En otros estudios similares se encontró un pico de iones moleculares m/z de 286 dáltones (10,25,83). Además, mediante los análisis espectrales de RNM de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se logró elucidar la estructura molecular del kaempferol como C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> (13,46,82,84). Los análisis espectrales identifican con

mayor precisión el tipo de componente mediante la elucidación estructural de la molécula, además, se estima con mayor precisión el peso molecular correspondiente, sin embargo en nuestro estudio se logró identificar el kaempferol mediante análisis fisicoquímicos y espectroscópicos por comparación con los valores reportados por literatura y el peso molecular calculado por el método de Rast nos permitió hallar este valor con un error de 0,075%, probablemente porque la medición del valor de depresión de D-Camphor se midió con el equipo FISATON 431D que mide valores de punto de fusión con mayor precisión.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

De las hojas de *S. reticulata* de la Amazonia peruana se logró aislar kaempferol cuyo rendimiento fue significativo.

Las propiedades fisicoquímicas, como punto de fusión, peso molecular, color, forma, solubilidad y valores Rf, fueron consistentes con las referencias científicas.

El análisis espectroscópico, confirmó la identidad del kaempferol mediante la comparación de las longitudes de onda máxima de absorción de los espectros del compuesto aislado



## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Se sugiere promover el cultivo de *S. reticulata* en la Amazonía para su potencial explotación fitoterapéutica.

Realizar más estudios sobre el uso industrial de este compuesto en el sector farmacéutico.

Realizar análisis por HPLC, RMN y de Carbono para la identificación de la molécula al 100% y seguir estudios exploratorios de su potencial actividad biológica.

## CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Marazzi B, Endress PK, De Queiroz LP, Conti E. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: Patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. *Am J Bot.* 2006;93(2):288-303.
2. Marazzi B, Sanderson MJ. Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectaries. *Evolution (N Y).* 2010;64(12):3570-92.
3. Acharya L, Mukherjee AK, Panda PC. Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. *Acta Bot Brasilica.* 2011;25(1):223-33.
4. Rengifo E, Serruti T. Plantas medicinales de la amazonía peruana estudio de su uso y cultivo. Iquitos Perú: Ediciones IIAP; 1997. p. 322.
5. Parolin P. *Senna reticulata*, a pioneer tree from Amazonian várzea floodplains. *Bot Rev.* 2001;67(2):239-54.
6. Parolin P. *Senna reticulata* (Willd.) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae) "Matapasto", árbol pionero en las planicies inundables amazónicas. *Ecología Apl.* 2005;4(1,2):41-6.
7. Kalliola R, Salo J, Puhakka M, Rajasilta M. New Site Formation and Colonizing Vegetation in Primary Succession on the Western Amazon Floodplains. *J Ecol.* 1991;79(4):877.
8. Alencar de Lima R, Gomes Lopes MT, da Silva Bentes JL, Ferreira Valente MS, Odair Pereira J, Bolzon de Muniz GI. Diversidade e estrutura genética de *Senna reticulata*. *Floresta.* 2015;45(3):507-14.
9. Duke AJ, Vásquez R. Amazonian ethnobotanical dictionary. Raton B, editor. USA; 1994.
10. Nuñez Dos Santos R. Estudio Químico e farmacológico de *Senna reticulata* Willd. (sin. *Cassia reticulata* Willd.). Universidade Federal Do Ceará; 2007.

11. Lizcano LJ, Bakkali F, Begoña Ruiz-Larrea M, Ignacio Ruiz-Sanz J. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. Food Chem [Internet]. 2010;119(4):1566-70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.043>
12. Alshehri MM, Quispe C, Herrera-Bravo J, Sharifi-Rad J, Tutuncu S, Aydar EF, et al. A Review of Recent Studies on the Antioxidant and Anti-Infectious Properties of Senna Plants. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:1-38.
13. Matulevich-peláez JA, Castrillón-cardona WF, Chitiva-chitiva LC. Estudio fitoquímico y evaluación de la capacidad antioxidante de hojas de Senna reticulata obtenidas en la región andina colombiana Phytochemical study and evaluation of antioxidant capacity of leaves of Senna reticulata obtained in the Colombian Andean r. Rev Científica. 2017;29(2):149-63.
14. Moreira-González I, Arnáez-Serrano E, Murillo-Masís R, Quesada-Mora S, Castro-Araya V, Zamora-Ramírez W, et al. Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica. Rev Tecnol en Marcha. 2014;27(4):69-77.
15. Navarro M, Moreira I, Arnaez E, Quesada S, Azofeifa G, Alvarado D, et al. Proanthocyanidin characterization, antioxidant and cytotoxic activities of three plants commonly used in traditional medicine in costa rica: Petiveria alliacea L., Phyllanthus niruri L. and Senna reticulata willd. Plants. 2017;6(4).
16. Vargas Carbajal CJ. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de las hojas de Senna reticulata (Willd.) H. y Irwin Barneby ("retama"). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú; 2007.
17. Ferreira Campos J, Tsuyoshi Hiramatsu de Castro D, Damiaño MJ, Vieira Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, et al. The Chemical Profile of Senna velutina Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016.
18. Thabit S, Handoussa H, Roxo M, El Sayed NS, de Azevedo BC, Wink M.

- Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. *PeerJ*. 2018;2018(7):1-33.
19. Araújo Franca MG. Estudio de espécies de *Senna* da Caatinga e do Cerrado: Documentação química e farmacológica na busca de novos fármacos. Universidade Federal do Ceará; 2021.
  20. Omur Demirezer L, Karahan N, Ucakturk E, Kuruuzum-Uz A, Guvenalp Z, Kazaz C. HPLC fingerprinting of sennosides in laxative drugs with isolation of standard substances from some senna leaves. *Rec Nat Prod*. 2011;5(4):261-70.
  21. Maiaa IRDO, Salles Trevisana MT, Silva MGD V., Breuer A, Owen RW. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in *Senna gardneri* and *S. georgica* from the northeast of Brazil. *Nat Prod Commun*. 2018;13(11):1511-4.
  22. Rao K V., Damu AG, Jayaprakasam B, Gunasekar D. Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*. *J Nat Prod*. 1999;62(2):305-6.
  23. Kim SH, Choi KC. Anti-cancer effect and underlying mechanism(s) of Kaempferol, a phytoestrogen, on the regulation of apoptosis in diverse cancer cell models. *Toxicol Res*. 2013;29(4):229-34.
  24. Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini Rev Med Chem* [Internet]. 2011;11(4):298-344. Available from: <http://www.eurekaselect.com/87782/article%5Cnhttp://personal.us.es/mlopezlazaro/2011>. MRMCMRMC. [Kaempferol.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21428901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21428901)
  25. Bonacheva VM, Botirov EK. Kaempferol and its glycosides from *Equisetum silvaticum* L. from the khanty-mansi autonomous area. *Russ J Bioorganic Chem*. 2014;40(7):777-80.
  26. Petersen CS, Weismann K. Quercetin and kaempferol: An argument against the use of podophyllin? *Genitourin Med*. 1995;71(2):92-3.
  27. Mercader-Ros MT, Lucas-Abellán C, Fortea MI, Serrano-Martínez A,

- Gabaldón JA, Núñez-Delicado E. Biological activities of Kaempferol: Effect of cyclodextrins complexation on the properties of Kaempferol In: Villers G, Fougere Y, editors. Kaempferol: Chemistry, natural occurrences and health benefits. Villers G, Fougere Y, editors. Nova Science Publishers, Inc. New York, NY, USA: Biochemistry Research Trends; 2013. 1-30 p.
28. Cid-Ortega S, Monroy-Rivera JA. Extraction of kaempferol and its glycosides using supercritical fluids from plant sources: A review. *Food Technol Biotechnol.* 2018;56(4):480-93.
  29. Shahbaz M, Imran M, Alsagaby SA, Naeem H, Al Abdulmonem W, Hussain M, et al. Anticancer, antioxidant, ameliorative and therapeutic properties of kaempferol. *Int J Food Prop [Internet].* 2023;26(1):1140-66. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2205040>
  30. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res [Internet].* 2015;99:1-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>
  31. Kadioglu O, Nass J, Saeed MEM, Schuler B, Efferth T. Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF- $\kappa$ B Pathway Proteins. *Anticancer Res.* 2015;35:2645-50.
  32. Sonoki H, Tanimae A, Endo S, Matsunaga T, Furuta T, Ichihara K, et al. Kaempferol and luteolin decrease claudin-2 expression mediated by inhibition of STAT3 in lung adenocarcinoma A549 cells. *Nutrients.* 2017;9(6).
  33. Qattan MY, Khan MI, Alharbi SH, Verma AK, Al-Saeed FA, Abdullah AM, et al. Therapeutic Importance of Kaempferol in the Treatment of Cancer through the Modulation of Cell Signalling Pathways. *Molecules.* 2022;27(24).
  34. Kamisah Y, Jalil J, Yunus NM, Zainalabidin S. Cardioprotective Properties of Kaempferol: A Review. *Plants.* 2023;12(11):1-19.
  35. Jin S, Zhang L, Wang L. Kaempferol, a potential neuroprotective agent in neurodegenerative diseases: From chemistry to medicine. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2023;165(June):115215. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115215>

36. Coelho-dos-Reis JGA, Gomes OA, Bortolini DE, Martins ML, Almeida MR, Martins CS, et al. Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempferol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. *J Virol Methods* [Internet]. 2011;174(1-2):47-52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.019>
37. Periferakis A, Periferakis AT, Troumpata L, Periferakis K, Scheau AE, Savulescu-Fiedler I, et al. Kaempferol: A Review of Current Evidence of Its Antiviral Potential. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22).
38. Yang Y, Chen Z, Zhao X, Xie H, Du L, Gao H, et al. Mechanisms of Kaempferol in the treatment of diabetes: A comprehensive and latest review. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13(September):1-15.
39. Tang F, Zhang P, Zhao W, Zhu G, Shen G, Chen H, et al. Research on the Mechanism of Kaempferol for Treating Senile Osteoporosis by Network Pharmacology and Molecular Docking. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2022;2022.
40. Silva dos Santos J, Gonçalves Cirino JP, de Oliveira Carvalho P, Ortega MM. The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).
41. Hussain Y, Khan H, Alsharif KF, Khan AH, Aschner M, Saso L. The Therapeutic Potential of Kaempferol and Other Naturally Occurring Polyphenols Might Be Modulated by Nrf2-ARE Signaling Pathway: Current Status and Future Direction. *Molecules.* 2022;27(13).
42. Li HY, Wang J, Liang LF, Shen SY, Li W, Chen XR, et al. Sirtuin 3 Plays a Critical Role in the Antidepressant- and Anxiolytic-like Effects of Kaempferol. *Antioxidants.* 2022;11(10).
43. Yeong YL, Pang SF, Putranto A, Gimbut J. Optimisation of microwave-assisted extraction (MAE) of anthraquinone and flavonoids from *Senna alata* (L.) Roxb. *Nat Prod Res* [Internet]. 2022;36(14):3756-60. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1881096>
44. Yeong YL, Fun Pang S, Yee Chong S, Gimbut J. Comparison of Microwave and Ultrasonic Assisted Extraction of Kaempferol from *Cassia Alata*. *Int J*

- Eng Technol. 2018;7(3.13):84.
45. Bhandare SB, Laddha KS. Simultaneous Quantification of Kaempferol and Quercetin in Medicinal Plants Using Hptlc. Int J Pharm Sci Res [Internet]. 2016;7(6):2379-84. Available from: <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7>
  46. Nunes Dos Santos R, Goretti De Vasconcelos Silva M, Braz Filho R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). Quim Nova. 2008;31(8):1979-81.
  47. Marazzi B, Conti E, Sanderson MJ, McMahon MM, Bronstein JL. Diversity and evolution of a trait mediating ant-plant interactions: Insights from extrafloral nectaries in *Senna* (Leguminosae). Ann Bot. 2013;111(6):1263-75.
  48. Savolainen V, Chase MW, Hoot SB, Morton CM, Soltis DE, Bayer C, et al. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcl* gene sequences. Syst Biol. 2000;49(2):306-62.
  49. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach Hardcover. Segunda. 2002.
  50. Cronquist AJ. The Evolution and Classification of Flowering Plants. New York: Garden TNYBU; 1988.
  51. Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil [Internet]. Vol. II. Rio de Janeiro: Empresa Gráfica Gutenberg Ltda- Brasilia DF.; 1931. 882 p. Available from: <http://archive.org/details/dicionriodasplan02corr>
  52. Mestroni SC, Zuliani MV, Bava AJ. Diagnóstico de las micosis de piel, pelos y uñas en el Hospital San Martín de La Plata. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2004;38(1):29-37.
  53. Nistal Nuño B, Del Pozo Lozada J. Dermatofitosis o tiñas. Guías clínicas. 2005;5(35):1-7.
  54. Domínguez Sepúlveda XA. Métodos de investigación fitoquímica. Primera Ed. México: Limusa; 1979. 281 p.

55. Alberto Marco J. Química de los productos naturales. S.A S, editor. Madrid - España; 2006. 288 p.
56. Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem J.* 1958;70(1):22-8.
57. Stecher PG. The Merck Index. Sixth prin. Merck, editor. New York: Merck y CO, Inc, Rahway N.Y USA; 1975.
58. Perkin AGFRS., Wilkinson EJ. Colouring matter from the flowers of *Delphinium consolida*. *J Am Chem Soc.* 1902;81:585-91.
59. Dunlap WJ, Wender SH. Identificación studies on some minor flavonoid constituents of the grapefruit. *Anal Biochem.* 1962;4(2):110-5.
60. Shailajan S, Joshi H. Optimized Separation and Quantification of Pharmacologically active markers Quercetin , Kaempferol ,  $\beta$ -sitosterol and Lupeol from *Cuscuta reflexa* Roxb . *J Pharm Res [Internet].* 2011;4(6):1851-3. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.735.7507&rep=rep1&type=pdf>
61. Kim JK, Park SU, Science C. Recent studies on kaempferol and its biological and pharmacological activities. *EXCLI J [Internet].* 2020;19:627-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2020-2162>
62. Yang C, Yang W, He Z, He H, Yang X, Lu Y, et al. Kaempferol improves lung ischemia-reperfusion injury via antiinflammation and antioxidative stress regulated by SIRT1/HMGB1/NF- $\kappa$ B axis. *Front Pharmacol.* 2020;10(January):1-9.
63. Grottesi A, Bešker N, Emerson A, Manelfi C, Beccari AR, Frigerio F, et al. Computational studies of SARS-CoV-2 3clpro: Insights from md simulations. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1-18.
64. Stahl E. Thin layer chromatografy: A laboratory handbook. Segunda Ed. Verlag S, editor. Berlin: Heidelberg. New York; 1969.
65. García Rengifo K, Marin Chistama JF, Jara Herrera C (asesor). Caracterización fisicoquímico y espectrometría ultravioleta visible de la



- isoflavona aislado de *Swartzia simples* y su similitud filogenética con biochanina A. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2022.
66. Harborne JB. *Phytochemical methods*. Chapman AH, editor. London; 1973.
  67. Ikan R. *Natural Products A Laboratory Guide*. Segunda Ed. Academic Press; 1991. 360 p.
  68. Shriner RL, Fuson R c., Curtin DY. *Identificación sistemática de compuestos orgánicos* [Internet]. Tercera Ed. México: Editorial Limusa; 1977. 440 p. Available from: [https://books.google.com/books/about/Identificación\\_sistemática\\_de\\_compuest.html?hl=es&id=fwoEPQAACAAJ](https://books.google.com/books/about/Identificación_sistemática_de_compuest.html?hl=es&id=fwoEPQAACAAJ)
  69. Tamani Zevallos A, Augusto, Parra Dertiano JA. *Estudio de Pauhinia alaúl (R y P) G. Don (Guaraná de Bajeaí), Como fuente alternativo de cafeína: Mediante métodos fisico-químicos y espectrométricos de la zona de Yarapa*. UNiversidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2013.
  70. Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY. *Systematic identification of organic compounds*. Quinta Edi. New York: Editorial Wiley N.Y; 1965.
  71. Goodwin TW, Mercer EI. *Introduction to plant biochemistry*. Oxford: Pergamon Press; 1972. 359 p.
  72. Cromer AH. *Física para las ciencias de la vida*. Tercera Ed. Barcelona, Bogotá, Buenos Aites, Caracas, México: Editorial Reverté S.A.; 1996.
  73. Rao CNR. *Espectroscopia ultravioleta y visible*. Madrid - España: Alhambra; 1970.
  74. Silverstain RM, Bessler GC, Morrill TC. *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos*. Primera Ed. México: Editorial Diana; 1980.
  75. Merrit LLJ, Willard HH. *Métodos instrumentales de análisis*. Mexico: Editorial Continental México; 1988. 1039 p.
  76. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Primera ed. Spring-Verlag. New York: primg-Verlag; 1970. 320 p.

77. Rubinson KA, Rubinson JF. Análisis instrumental. Primera Ed. Capella I, editor. Madrid - España: PEARSON EDUCACIÓN, S. A; 2001. 872 p.
78. Rocha FS, Gomes AJ, Lunardi CN, Kaliaguine S, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *Can J Chem Eng.* 2018;96(12):2512-7.
79. Estrada R, Ubaldo-Suárez D, Araujo-Escalona AG. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental.* 2012;35(5):375-84.
80. Pino Gotuzzo R. Metodología de la Investigación Científica. Primera Ed. Lima - Perú: Editorial San Marcos E.I.R.L.; 2007. 516 p.
81. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio M del P. Metodología de la investigación. Quinta Ed. Interamericana Editores SADC., editor. México: McGraw Hill; 2010. 656 p.
82. Costa Silva T da, Justino AB, Prado DG, Koch GA, Martins MM, Santos P de S, et al. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019;140(July):111641. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>
83. Gupta J, Gupta A. Isolation and extraction of flavonoid from the leaves of *Rauwolfia serpentina* and evaluation of DPPH-scavenging antioxidant potential. *Orient J Chem.* 2015;31:231-5.
84. Xiao ZP, Wu HK, Wu T, Shi H, Hang B, Aisa HA. Kaempferol and quercetin flavonoids from *Rosa rugosa*. *Chem Nat Compd.* 2006;42(6):736-7.
85. Li M, Liu Y, Li M, Shang Z, Liu M, Han D. Measurement and Correlation of the Solubility of Kaempferol Monohydrate in Pure and Binary Solvents. *Fluid Phase Equilib* [Internet]. 2021;539:113027. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2021.113027>
86. Deng SP, Yang YL, Cheng XX, Li WR, Cai JY. Synthesis, spectroscopic study and radical scavenging activity of Kaempferol derivatives: Enhanced water solubility and antioxidant activity. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).

87. Yuliet, Sukandar EY, Budipramana K, Adnyana IK. Inhibitory activity of the active compound of ethyl acetate fraction of tamoenju (*Hibiscus surattensis* L.) leaves against  $\alpha$ -glucosidase and dipeptidyl peptidase-4 enzymes. *Rasayan J Chem.* 2020;13(2):826-35.
88. Jan R, Asaf S, Paudel S, Lubna, Lee S, Kim KM. Article discovery and validation of a novel step catalyzed by osf3h in the flavonoid biosynthesis pathway. *Biology (Basel).* 2021;10(1):1-13.

## ANEXOS

### Anexo 1. Recolección de la muestra vegetal



## Anexo 2. Certificación de la especie vegetal



**UNAP**

Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense — AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN BOTÁNICA n.º 041-2024 AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

#### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **EDILBERTO VERGARA SOUZA** y **CARLOS FERNANDO CHUNGA MORENO**, bachilleres de la **Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica** de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica** de la **Universidad Nacional de la Amazonia Peruana** pertenece al proyecto de tesis de pre grado titulado **“AISLAMIENTO DE KAEMPFEROL DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *Senna reticulata* E IDENTIFICACIÓN POR CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCOPIA UV/VISIBLE”**; ha sido **DETERMINADA** en este centro de investigación y enseñanza **Herbarium Amazonense-AMAZ-CIRNA-UNAP**, como se indica a continuación:

Nº	FAMILIA	ESPECIE	AUTOR	NOMBRE COMÚN
1	FABACEAE	<i>Senna reticulata</i>	(Willd.) H.S. Irwin & Barneby	“retama”

Determinador: Ing. Darío Dávila Paredes

A los cinco días del mes de abril del año dos mil veinticuatro, se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,

  
**Richard J. Huaranca Acostupa**  
Coordinador Herbarium Amazonense  
CIRNA - UNAP



### Anexo 3. Determinación de los valores hRf de kaempferol

#### Cromatografía de capa fina (TLC)

A. En el absorbente silicagel, se usó una mezcla de solventes de desplazamiento y resolución de: tolueno: cloroformo: acetona (40+25+35). Los valores de las distancias corridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia de recorrido del soluto 6,24cm

Distancia de recorrido del solvente 16,00cm

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrido por el soluto}}{\text{Distancia recorrido por el solvente}} \cdot 100$$

$$hRf = \frac{6,24cm}{16,00cm} \cdot 100 = 39$$

B. En poliamida, se usó una mezcla de solventes de desplazamiento y resolución de: benceno: butanona: metanol (60+20+20) y en otra mezcla de solvente de resolución agua: butanona: metanol (40+30+30), los valores de las distancias corridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia de recorrido del soluto 3,20cm

Distancia de recorrido del solvente 16,00cm

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrido por el soluto}}{\text{Distancia recorrido por el solvente}} \cdot 100$$

$$hRf = \frac{3,20cm}{16,00cm} \cdot 100 = 20$$

Distancia de recorrido del soluto 1,28cm

Distancia de recorrido del solvente 16,00cm

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrido por el soluto}}{\text{Distancia recorrido por el solvente}} \cdot 100$$

$$hRf = \frac{1,28cm}{16,00cm} \cdot 100 = 8$$

## Cromatografía de papel (CP)

Sobre papel Whatman N°.1 en tiras de 50 x 2,5cm como fase estacionaria y como fase móvil el sistema forestal HCl concentrado-ácido acético-agua (3:30:10), los valores de las distancias corridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia de recorrido del soluto	19,80cm
Distancia de recorrido del solvente	36,00cm

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrido por el soluto}}{\text{Distancia recorrido por el solvente}} \cdot 100$$

$$hRf = \frac{19,80cm}{36,00cm} \cdot 100 = 55$$

#### Anexo 4. Determinación del peso molecular del Kaempferol

Punto de fusión de la mezcla D-camphor y muestra de estudio: 166,00°C

Punto de fusión del D-camphor: 180,00°C

Se halla la diferencia del punto de fusión

$$\Delta T = 180,00 - 166,00 = 13,88$$

Aplicando la formula

$$M = \frac{k \cdot p \cdot 1000}{\Delta T \cdot P}$$

Sabiendo que

K= Depresión molar del D-camphor 39,7

w= peso de la muestra 50mg= 0,05g

W= peso del D-camphor 0,5g

$$\Delta T = 13,88$$

$$M = \frac{39,7 \cdot 0,05 \cdot 1000}{13,88 \cdot 0,5} = \frac{1985}{6,94} = 286,023 \frac{g}{mol}$$

$$M = 286,023 \text{ g/mol}$$

El porcentaje de error es la relación entre el peso molecular de kaempferol IUPAC

286,23 g/mol menos el peso molecular experimental 286,023 g/mol

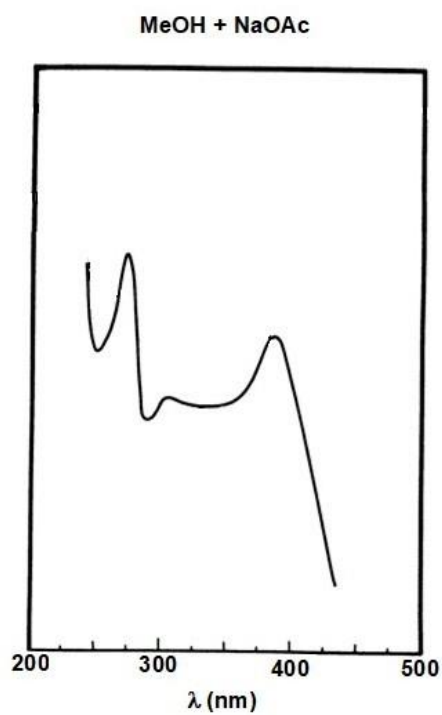
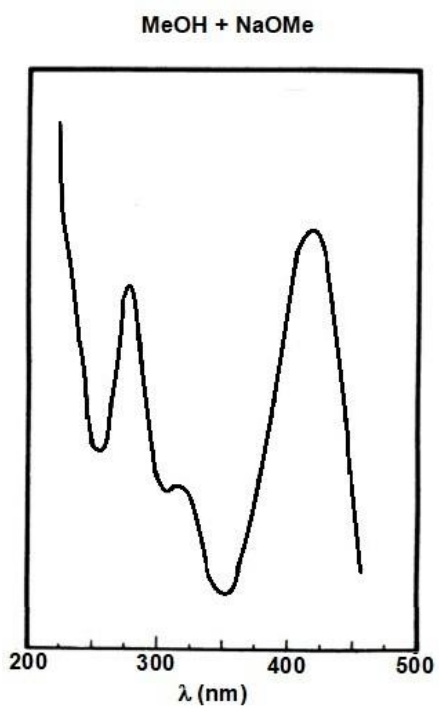
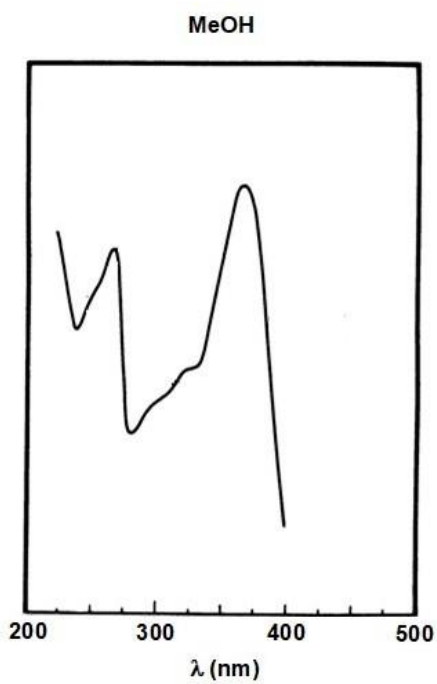
$$\%Error = \left( \frac{\text{Peso molecular IUPAC} - \text{Peso molecular experimental}}{\text{Peso molecular IUPAC}} \right) \cdot 100$$

$$\%Error = \frac{286,23 - 286,02}{286,23} \times 100 = \frac{20,69}{286,23} = 0,072$$

El margen de error es de  $\pm 0,072$  un margen de error relativamente bajo.



**Anexo 5.** Espectros UV-visible de kaempferol en diferentes solventes



**Anexo 6.** Cálculo de rendimiento del Kaempferol en hojas de *Senna reticulata*

Se calcula estableciendo una relación porcentual entre el peso de quercetina obtenida sobre el peso de la materia prima usado. Peso de la materia prima = 200g

Peso del kaempferol aislado = 0,95g

Peso de la muestra procesada = 200g

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso de kaempferol obtenido}}{\text{peso de la muestra procesada}} \cdot 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,95g}{200g} \cdot 100 = 0,475\%$$