Sección III

Resultados-Discusión

Resumen

7.- Resultados-Discusión. Biológicos, Cromatográficos, Fitoquímicos y sintéticos

Capítulo 7

RESULTADOS-DISCUSIÓN: BIOLÓGICOS, CROMATOGRÁFICOS, FITOQUÍMICOS Y SINTÉTICOS

7.1. Preparación de las muestras fitoquímicas

De acuedo con lo descrito en la sección 6.4 (pág., 120), el material vegetal fue secado al aire y molido antes de ser sometido a extracción por percolación con metanol durante tres días, repitiendo el proceso dos veces. Los extractos combinados de cada planta fueron concentrados a presión reducida para obtener el extracto metanólico, con el cual se calculó el porcentaje de extracción reflejado en la tabla 7.1. Una porción del extracto metanólico fue suspendido en la mezcla MeOH-H_2O (1:1; v/v), luego de filtrado, la fracción no-soluble **1** fue secada al aire, mientras que la fracción soluble **2** fue concentrada al vacío. Las fracciones secas **1** y **2**, fueron tratadas por separado con acetona para producir las fracciones **A**-**D**, ver esquema 6.5 (Pág. 121) y tabla 7.2. Éste protocolo produjo cuatro fracciones de diferentes polaridades para cada extracto metanólico. Utilizando el procedimiento descrito en la sección 6.3.1 (pag 112), cada fracción fue sometida a bioensayos inhibitorios sobre la G-6-Pasa, (tabla 7.3).

Tabla 7.1. Porcentaje de rendimiento del extracto metanólico de *O. polyantha* Engl., *C. biflora* L., *C. fruticosa* Mill., y *R. tuberosa* L.

Planta	Símbolos	Material vegetal (g)	Extracción con MeOH (g)	% Ext., MeOH (%)
Ouratea polyantha Engl.				
Parte Aérea	Op	944,04	174,82	18,52
Capraria biflora L.				
Toda la planta[a]	Cb	432,45	63,37	14,65
Cassia fruticosa Mill.				
Ramas	CfR	454,35	28,24	6,21
	CfRS	2120,70	87,94	4,16
Hojas	Cf	351,28	66,93	19,05
	CfS	984,82	140,03	14,23
Ruellia tuberosa L.				
Raíces	RtR	297,00	83,70	29,53
Parte Aérea	Rt	150,69	27,41	18,19

a) Raíces y parte aérea

Tabla 7.2. Fracciones provenientes del extracto metanólico de *O. polyantha* Engl., *C. biflora* L., *C. fruticosa* Mill., y *R. tuberosa* L.

Planta	Extracto MeOH (± 0,01g)	Fracciones (± 0,01g)			
		A	**B**	**C**[a]	**D**
Op	20,00	5,19	1,36	5,96	1,72
Op	16,02	3,51	2,66	3,53	1,33
Op	7,00	1,09	0,71	2,16	0,99
Cb	25,34	1,34	2,61	17,52	1,86
CfR	20,09	2,82	3,27	14,20[b]	1,25
Cf	25,00	1,48	5,73	13,50	1,66
RtR	26,36	0,29[c]		21,40	0,12
Rt	22,15	1,01	2,04	16,40	0,08

a) Mayormente azúcares (excepto OpC); b) Pasta higroscópica; c) Corresponde a la fracción **1** en el esquema 6.5 de la página 121.

Cada una de las fracciones mostradas en la tabla 7.2, presentaron efectos inhibitorios sobre el sistema enzimático G-6-Pasa (tabla 7.3), de modo que se realizó la separación fitoquímica preliminar basada en estos resultados. En resumen, los resultados indican que los componentes polares (fracciones **C** y **D**), son las que presentan mayor porcentaje de inhibición con respecto a los componentes de menor polaridad (fracciones **A** y **B**) del mismo material de partida, excepto para la *Capraria biflora* L., donde la fracción CbB presenta mayor efecto inhibitorio que CbC y CbD, esto puede ser debido a la presencia de terpenos altamente oxigenados en la familia Scrophulariaceae.[237]

Tabla 7.3. Ensayos preliminares para las fracciones A-D provenientes de los extractos metanólicos de *O. polyantha* Engl., *C. biflora* L., *C. fruticosa* Mill., y *R. tuberosa* L. como inhibidores de la G-6-Pasa.

Plantas	**Porcentaje de inhibición sobre la G-6-Pasa microsomal (%Inh. ± 2%)[a]**							
	A		**B**		**C**		**D**	
	Microsomas		**Microsomas**		**Microsomas**		**Microsomas**	
	Intactos[b]	Rotos[c]	Intactos[b]	Rotos[c]	Intactos[b]	Rotos[c]	Intactos[b]	Rotos[c]
Op	90,58	94,25	67,89	42,83	87,58	71,16	92,54	45,22
Cb	ND	ND	92,50	84,77	48,74	2,99	47,84	9,5
CfR	ND	ND	53,42	62,47	84,17	27,92	66,08	9,7
Cf	72,49	71,32	79,82	12,45	77,76	22,45	88,25	86,49
RtR	ND[d]	ND[d]	ND[d]	ND[d]	62,19	28,67	68,03	24,20
Rt	8,26	64,13	11,00	7,50	65,83	42,36	71,03	52,71

a) Todos los experimentos se realizaron por triplicados (n=3); b) Ensayos sin histonas (microsomas intactos); c) Ensayos con histonas (microsomas rotos); d) ND: no determinado.

7.2. Resultados cromatográficos fitoquímicos

Como se muestra en la tabla 7.1, se partió de seis materiales vegetales diferentes entre sí, denominados Op, Cb, CfR, Cf, RtR y Rt y se obtuvieron 24 fracciones diferentes (tabla 7.2) las cuales fueron analizadas como posibles o potenciales inhibidores de la G-6-Pasa microsomal, tabla 7.3. La prioridad en ésta parte de la investigación fue establecer un sistema de solventes óptimo por HSCCC para cada fracción bioactiva, lo cual se realizó durante una pasantía de investigación en el laboratrio del Dr. Yoichiro Ito en el Instituto Nacional de Salud, Bethesda, USA.

Aún cuando la optimización de los sistemas de solventes para cada fracción fue llevada a cabo exitosamente por HSCCC, la misma no pudo ser reproducida en nuestro laboratorio (UCV) debido a problemas mecánicos en la unidad de HSCCC. Por ello sólo se muestran los sistemas de solventes resumidos en las tablas 7.4 y 7.5, cuyos cromatogramas son mostrados en el anexo.

Vale la pena destacar que éstos resultados fueron utilizados para mejorar el fraccionamiento de los metabolitos que corresponden a los diferentes picos cromatográficos en cada fracción; como consecuencia, la mayoría de los metabolitos fueron identificados por CCF o HPLC comparativo con muestras auténticas y se describen a continuación:

Tabla 7.4. Sistemas de solventes óptimos para ser separadas por HSCCC fracciones provenientes de las diferentes plantas objeto de estudios de ésta investigación.

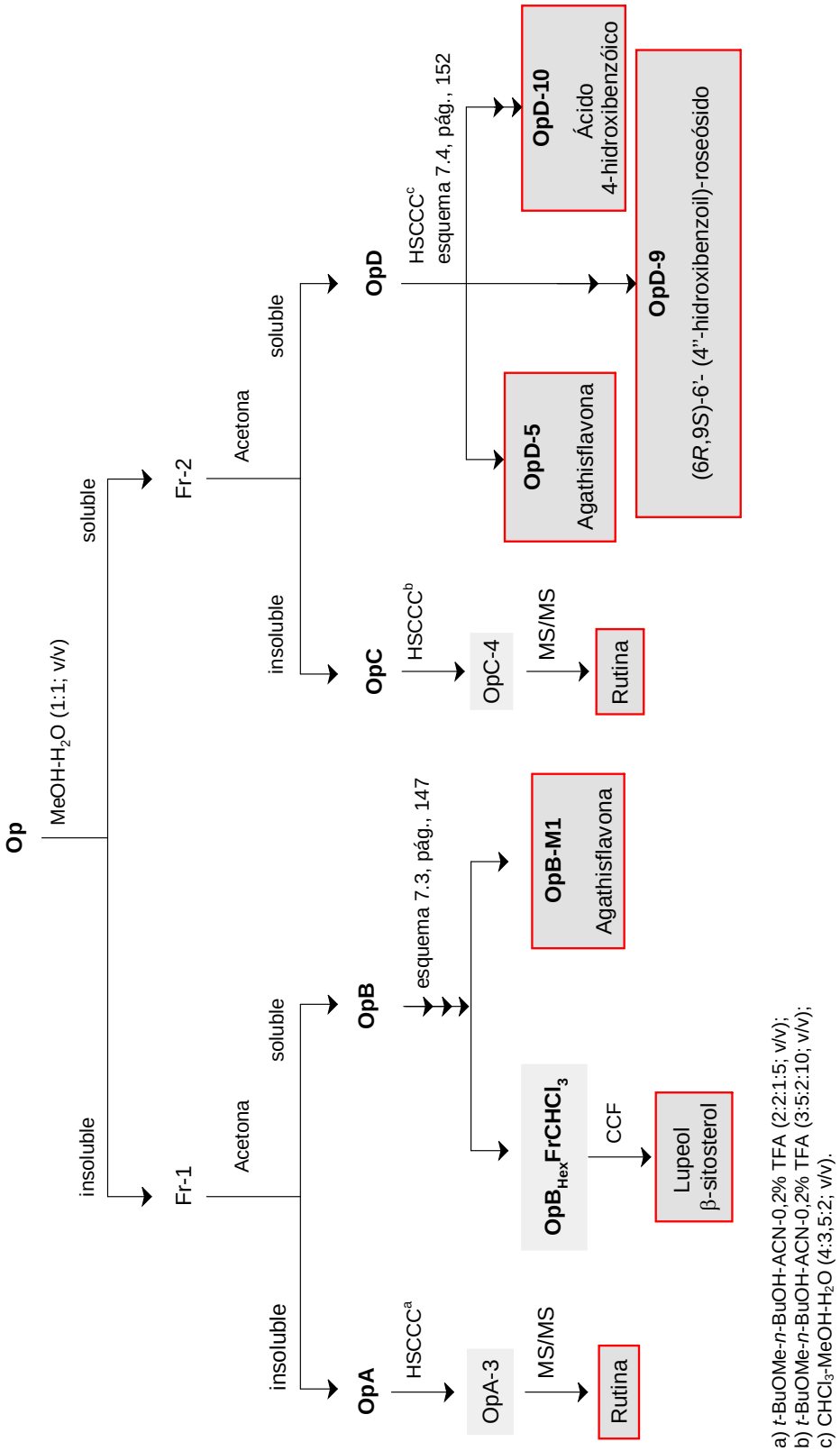
Planta	Fracción	Sistema de solventes										**Figura**
		t-BuOMe	*n*-Hex	AcOEt	MeOH	EtOH	*n*-BuOH	THF	ACN	H_2O	$TFA_{(ac;\ 0,2\%)}$	
Ouratea	**OpA**	2					2		1		5	7.2a
polyantha	**OpB**		3	5	3					5		7.3
	OpC	3					5		2		10	7.7
Capraria	**CbB**		2	3	2,5						1,7	A-4
biflora	**CbC**			2			3			5		7.13a
	CbD			2			3			5		7.13b
Cassia fruticosa												
Ramas	**CfR-C**	1					3	1			5	7.15a
	CfR-D			5		1					5	7.16
Hojas	**CfC**	2		4,5		1	2,5	1			10	7.15b
	CfD			4,5	1		0,5				5	7.17
Ruellia tuberosa												
Raíz	**RtR-C**			5		1					5	7.23b
	RtR-D			5		1					5	7.23d
Parte aérea	**RtC**			5		1					5	7.23a
	RtD			5		1					5	7.23c

[+] Corresponde al sistema de solventes CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (4:2,5:2)

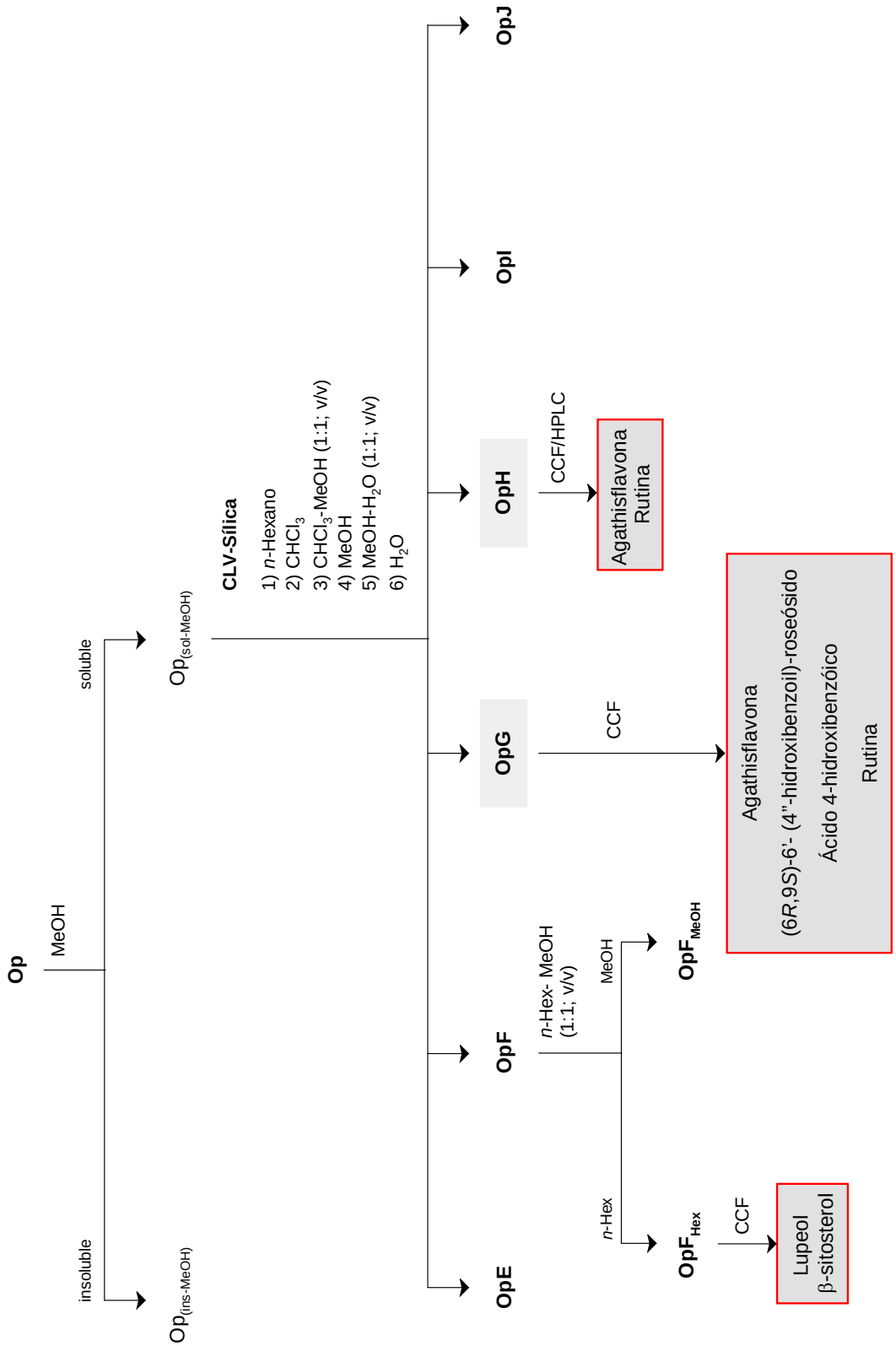
Tabla 7.5. Sistemas de solventes óptimos para ser separadas por refinamiento de la zona de pH en CCC fracciones provenientes de las diferentes plantas objeto de estudio de ésta investigación.

Fracción	Masa (mg)	Sistema de solventes					Retenedor en FE_{org} [mM]		Eluente básico en F_{ac} [mM]		%FE (%)	Figura
		t-BuOMe	*n*-BuOH	THF	ACN	H_2O						
OpA	700	3	5		2	10	HCl	20	NaOH	20	<10	A-1
OpD	1430	2			2	3	TFA	20	NaOH	20	69	A-10
CfR-B	531	2		2		3	TFA	10	NaOH	15	49	A-11
CfR-B	2387	2		2		3	TFA	10	NaOH	15	45	A-12
CfA	1220	4		1		5	TFA	10	NaOH	15	42	A-13
CfB	504	2		2		3	TFA	10	NaOH	15	37	A-14
CfB	3462	2		2		3	TFA	10	NaOH	15	25	A-15

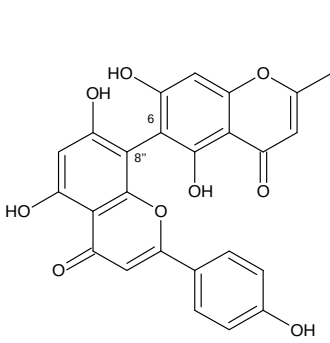
7.3.1. *Ouratea polyantha* Engl. (Partes aéreas)



Esquema 7.1. Resumen general de la separación de los metabolitos secundarios identificados en *O. polyantha* Engl.



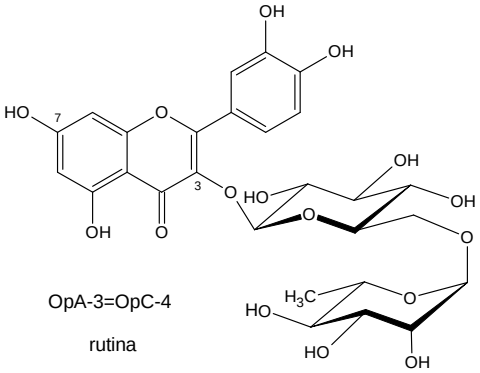
Esquema 7.2. Esquema de fraccionamiento óptimo para *Ouratea polyantha* Engl.



OpB-1=OpB-MAS-1=OpD-5

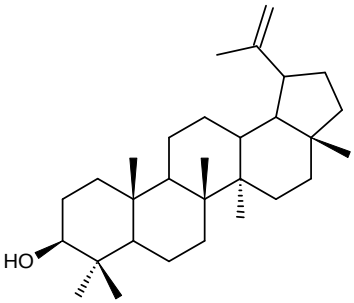
6 → 8''-biapigenina

(Agathisflavona)

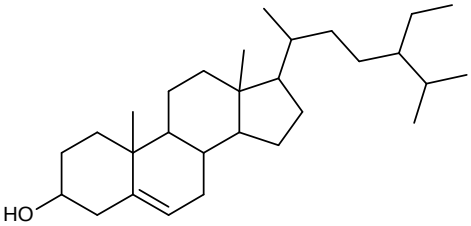


OpA-3=OpC-4

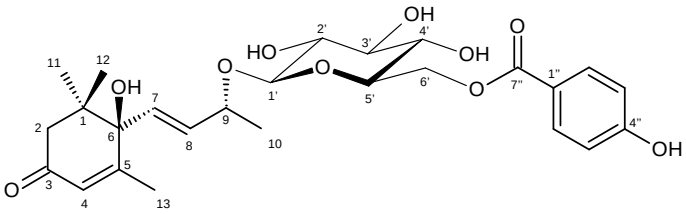
rutina



Lupeol

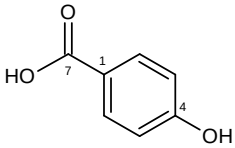


β-Sitosterol



OpD-9

(6*R*,9*S*)-6'-(4-hidroxibenzoil)-roseósido



OpD-10

Ácido 4-hidroxibenzóico

Figura 7.1. Metabolitos identificados en la especie *O. polyantha* Engl.

7.3.1.1. OpA (Insoluble en MeOH-H2O; 1:1, soluble en acetona)

Durante la optimización de la separación cromatográfica, se utilizó el sistema de solventes hidrofílico conformado por *t*-BuOMe-*n*-BuOH-ACN-0,2% TFA en diferente proporciones obteniendo el mejor resultado con una relación de volumen 2:2:1:5; respectivamente. Debido a la escasa solubilidad de la muestra en todos los sitemas ensayados, se empleó DMSO como solvente auxiliar en la disolución de ésta. Sin embargo, el tiempo de separación de las fases se incrementó considerablemente. Por lo que, para evitar perdidas excesivas de la FE debido a la lenta formación del equilibrio de fases, se decidió utilizar una *F* creciente comenzando en 0,5 mL/min hasta 2 mL/min durante la primera hora de elución.

A escala analítica (74 mg), se observó una retención de FE de 54% y tres picos cromatográficos denominados OpA-1, OpA-2 y OpA-3 con K_C de 0,8; 1,2 y 2, calculados del cromatograma, $\sim_{OpA\text{-}1–OpA\text{-}2}$= 1,50; $\sim_{OpA\text{-}2–OpA\text{-}3}$= 1,67 (Fig. 7.2a). Estos componentes presentaron un comportamiento idéntico a los observados para la muestra OpC (descrita más adelante). Ésta similitud fue comprobada por CCF comparativa de los componentes de OpA y OpC, desarrollada con la mezcla **AN-2**, AcOEt-MeOH-H_2O (100:13,5:10; v/v). Éste hecho puede explicar los elevados porcentajes de inhibición de estas dos muestras (tabla 7.3).

Vale la pena destacar que todos los componentes de ésta fracción se tornaron amarillos al disolverlos en $NaOH_{(ac)}$ y al ser revelados con el reactivo de sulfato cérico, **SC**, indicando la presencia de flavonoides. La fracción OpA-3 fue sometida a espectrometría de masas de alta resolución y se comprobó la presencia de un componente con peso molecular de 609,3572 uma que corresponde a [M-1] (espectro 4) el cual fue identificado como rutina (OpA-3=OpC-4). Por otra parte, se comparó por HPLC la fracción OpA con un patrón de rutina (Fig., 7.2b) y adicionalmente se determinó la presencia de agathisflavona.

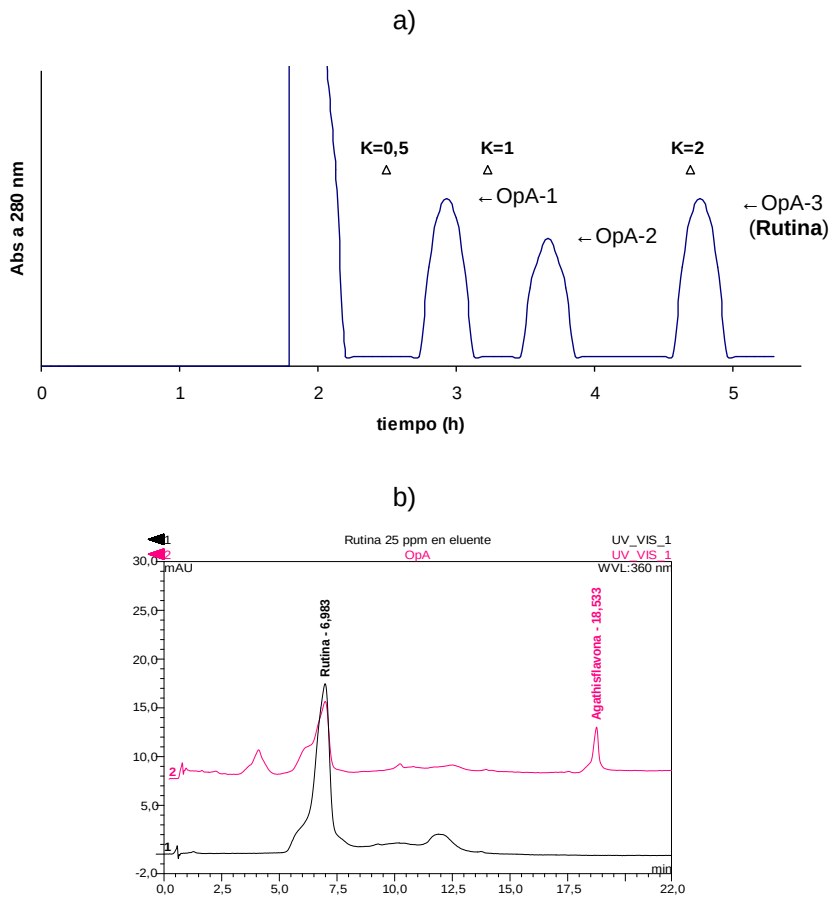


Figura 7.2. Cromatograma de OpA por HSCCC y HPLC: a) HSCCC a escala analítica de OpA proveniente de *O. polyantha* Engl. Condiciones experimentales: Sistema de solventes: *t*-BuOMe-*n*-BuOH-ACN-0,2% TFA (2:2:1:5); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; *F*: gradualmente incrementada de 0,5 mL/min hasta 2 mL/min durante 1h y 2 mL/min después; revolución 850 rpm; muestra: 74 mg disuelta en 0,5 mL de DMSO y 4 mL de cada fase del sistema de solventes; %FE=: 54% y detección a 280 nm; b) HPLC-Sistema 1, detector UV-Vis: λ= 360 nm.

Debido a que el DMSO y el NaOH incrementaban la solubilidad de la muestra, se intentó utilizar una técnica de mayor capacidad de carga para analitos ionizables, como lo es la técnica de refinamiento de la zona de pH en cromatografía contracorriente. Ésta técnica de CCC requiere un retenedor en la FE y un eluyente en la FM para formar picos cromatográficos rectangulares y fusionados (sección 3.5, Pág., 70), de modo que se utilizó varios sistemas de solventes con diferentes retenedores ácidos (TFA y HCl) y NaOH como eluente.

OpA mostró excelentes valores de K_C para la técnica de refinamiento de la zona de pH en CCC, al usar *t*-BuOMe-*n*-BuOH-ACN-H_2O (3:5:2:10; v/v), con 20 mM de HCl en la FE (fase orgánica) y 20 mM de NaOH como eluyente, además de DMSO como solvente auxiliar en la disolución de la muestra. Sin embargo, la separación a escala preparativa no produjo buenos resultados, principalmente por la retención de FE (<10%) y a la escasa solubilidad de la muestra acidificada con HCl (700 mg en 80 mL), aún en presencia de DMSO (Fig., A-1). También se ensayó esta técnica con otro sistema de solventes, "tipo 0" DMSO-THF-H_2O. A pesar de que estos tres solventes son miscibles en todas las proporciones al ser mezclados en pares (DMSO y THF, DMSO y H_2O, THF y H_2O), existe una zona en el equilibrio ternario que forman dos fases en las proporciones adecuadas de cada solvente. Este tipo de sistemas ha sido aplicado satisfactoriamente en la purificación de antibióticos escasamente solubles en otros sistemas de solventes.[238]

7.3.1.2. OpB (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)

La CCF desarrollada con la fase inferior (fase orgánica) del sistema de solventes CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (4:2,5:2; v/v), produjo varias manchas con Rf entre 0,2 y 0,8. Sin embargo, la mancha con Rf= 0,5, presentó igual distribución entre las fases al ser revelado con yodo. Basados en reportes previos,[9] se sabe que este componente principal es una biflavona (agathisflavona), la cual fue aislada y caracterizada a partir de la fracción OpD descrita en la sección 7.3.1.4. Según los datos cualitativos de K_C (obtenidos por CCF), se pudiese usar ambas fases como FM. Se decidió utilizar la fase orgánica debido a que el solvente es fácil de evaporar para analizar las fracciones por CCF luego del fraccionamiento.

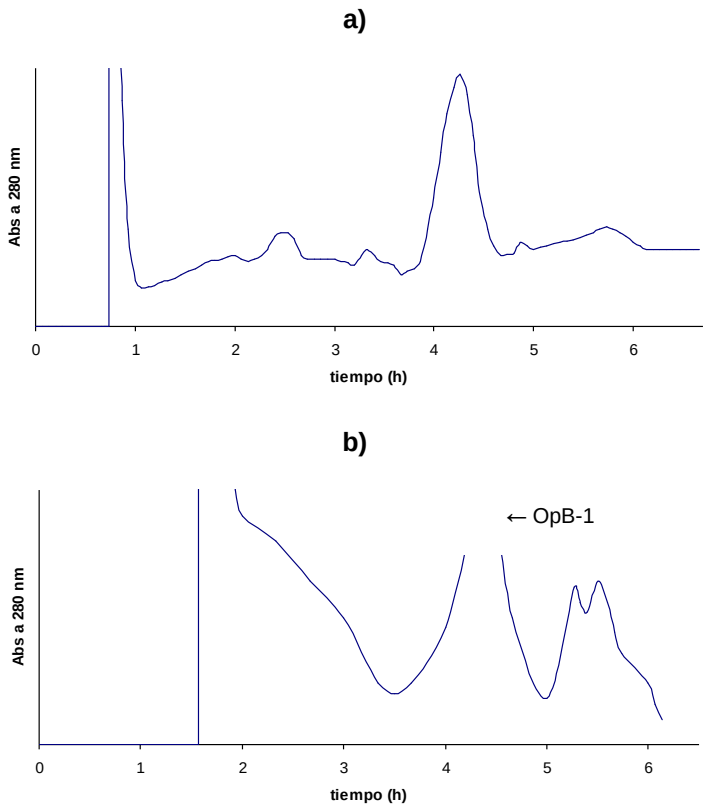


Figura 7.3. Cromatograma a escala analítica de OpB proveniente de *O. polyantha* Engl. Condiciones experimentales: **a**) Sistema de solventes: CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (4:2,5:2); FE: fase acuosa; FM: fase orgánica; F= 2 mL/min; muestra: 20 mg disuelta en 2 mL de fase orgánica; %FE= 84%; revolución 800 rpm. **b**) Sistema de solventes: Hex-AcOEt-MeOH-H_2O (3:5:3:5); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; F= 1,8 mL/min; muestra: 44 mg disuelta en 5 mL (1:1; fase orgánica: fase acuosa); %FE= 49%; velocidad de revolución 850 rpm. Detección a 280 nm.

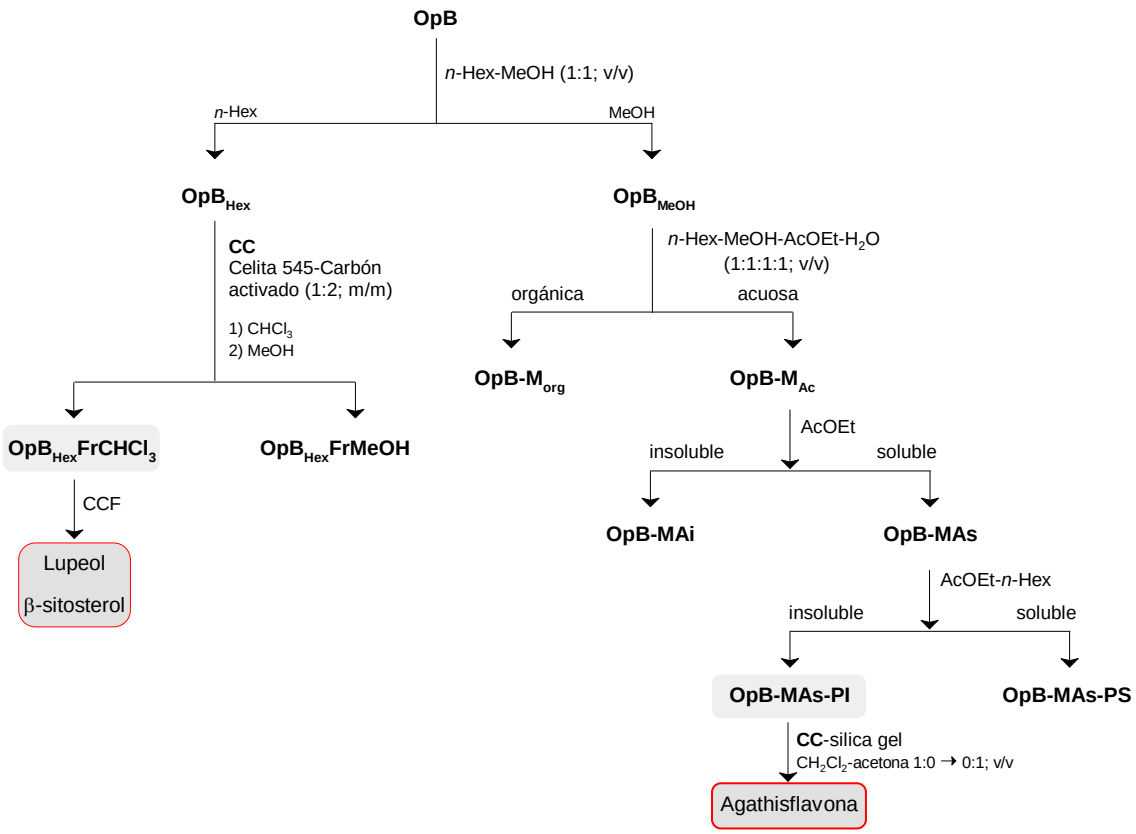
A escala analítica (20 mg) se produjo una retención de FE de 84% y un solo pico cromatográfico con un K_C ligeramente menor a la unidad (Fig., 7.3a), pero al realizar el experimento a escala preparativa (946 mg), la resolución del pico cromatográfico no fue óptima, principalmente debido a que la retención de FE disminuyo a 34%. Sin embargo, las fracciones 14-31, de 5 mL cada una, contenían el metabolito de interés en forma de un sólido amarillo opaco, por lo que se unieron estas fracciones para intentar purificar la biflavona, que fue escasamente soluble en el mismo sistema de solventes utilizado para su separación. Debido a esto, se utilizó el sistema *n*-Hex-AcOEt-MeOH-H_2O (3:5:3:5; v/v) para la fracción OpB (Fig., 7.3b) previamente reportado para agliconas de

biflavonoides.[239] Con el nuevo sistema se obtuvieron tres picos cromatográficos en un solo experimento. Sin embargo, dos de ellos se obtuvieron parcialmente solapados aunque el metabolito mayoritario presentó un $K_C \approx$ 1,5 con buena resolución de pico. Este compuesto fue sometido a espectrometría de masas de alta resolución y se comprobó la presencia de un componente con peso molecular de 537,2813 uma que corresponde a [M-1] (espectro 1) e identificado como agathisflavona (OpB-1).

Sabiendo que OpB contiene mayormente clorofila, terpenos y el biflavonoide agathisflavona, se sometió a una partición en la mezcla *n*-Hex-MeOH (1:1; v/v). Así, la fracción de hexano (OpB_{Hex}) fue un sólido de color verde oscuro, rica en clorofilas y terpenos, mientras que la fracción de metanol (OpB_{MeOH}) era una pasta de color verde claro, que estaba formada mayoritariamente por la agathisflavona y restos de clorofila (esquema 7.3).

La clorofila presente en OpB_{Hex} fue eliminada utilizando el método descrito en la literatura,[240] para ello se utilizó una CC rellena de celita 454-carbón activado (1:2; m/m) la cual fue eluida con $CHCl_3$ y posteriormente MeOH. La fracción de $CHCl_3$ (OpB_{Hex}-$FrCHCl_3$) fue un sólido amarillo que estaba conformada mayoritariamente por el triterpeno lupeol y el esteroide β-sitosterol, los cuales fueron identificados por CCF comparativa con muestras auténticas, figura 7.4.

La fracción OpB_{MeOH} fue particionada en el sistema de solventes *n*-Hex-AcOEt-MeOH-H_2O (1:1:1:1; v/v/v/v), donde la fase orgánica (OpB-MOrg, enriquecida en agathisflavona) se sometió a solubilidad en AcOEt. Luego de evaporar el solvente a temperatura ambiente, se obtuvo un sólido verde oscuro (OpB-MOrg) el cual se recristalizó con la mezcla *n*-Hex-AcOEt, produciendo un sólido verde claro (OpB-MAS-PI), el cual fue purificado por CC de silica gel con la mezcla de solventes de polaridad creciente CH_2Cl_2-Acetona e identificado comparativamente por CCF y HPLC con una muestra autentica de agathisflavona (Figs. 7.5, 7.6), previamente purificada por HSCCC descrita en la sección 7.3.1.4.



Esquema 7.3. Fraccionamiento de OpB proveniente de *O. polyantha* Engl.: Separación e identifiación de lupeol, β-sitosterol y agathisflavona.

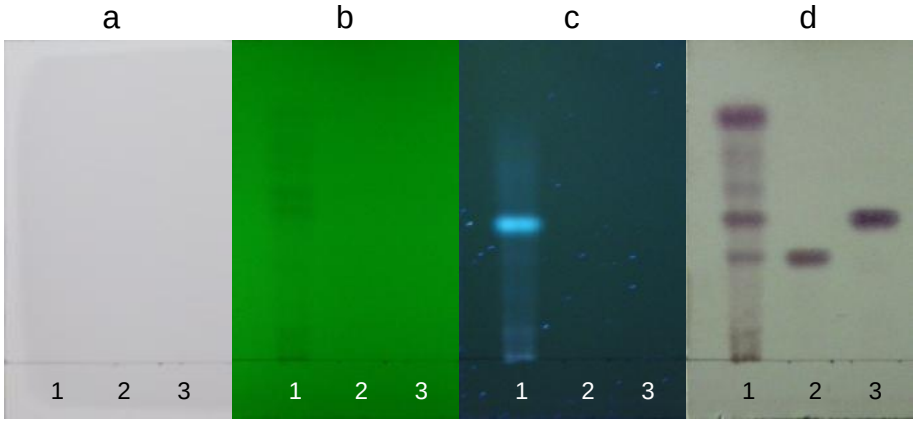


Figura 7.4. Cromatografía de capa fina comparativa de la fracción OpB_{Hex}-$FrCHCl_3$ (1), β-sitosterol (2) y lupeol (3). Esquema 7.3 (pag 147). Sistema de desarrollo, AN-6: a) visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) revelado AS, visible.

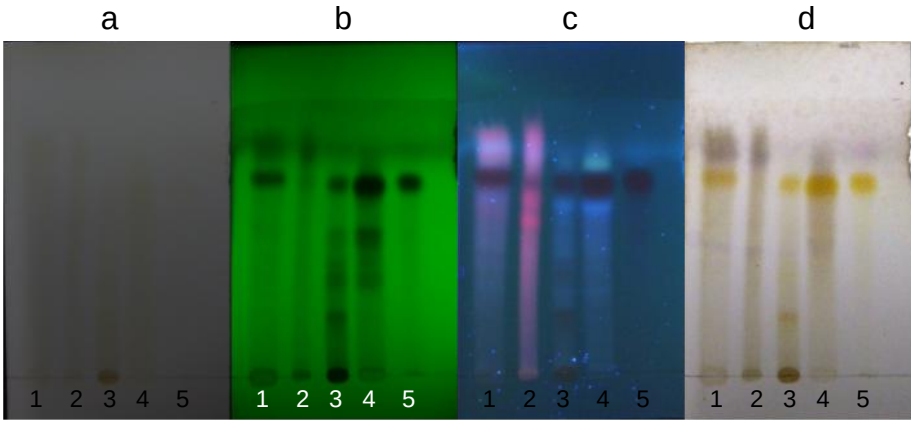


Figura 7.5. Cromatografía de capa fina comparativa de las fracciones de OpB (1), OpB-Morg (2), OpB-Mai (3), OpB-MAS-PI (4) y Agathisflavona patron (5). Esquema 7.3 (pág., 147). Sistema de desarrollo, AN-2: a) visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) revelado AS, visible.

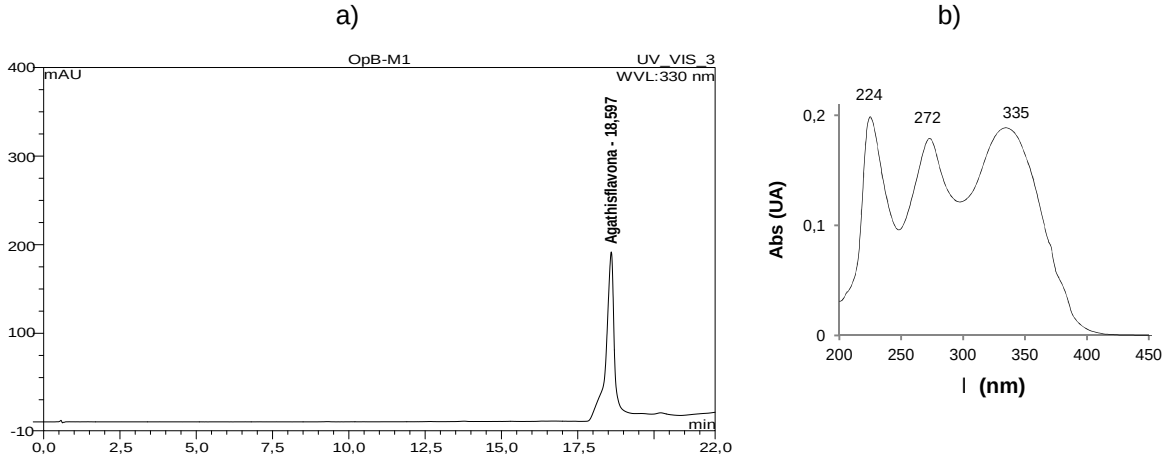


Figura 7.6. Cromatograma HPLC de la fracción OpB-M1 identificada como agthisflavona: a) HPLC-sistema 1, λ = 330 nm, %pureza > 98%; b) espectro UV en eluente.

7.3.1.3. OpC (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona)

Se ensayaron un total de nueve sistemas de solventes hidrofílicos a escala semi-preparativa para optimizar el sistema que permitió la separación de los cuatro metabolitos mayoritarios de ésta muestra. Los sistemas de solventes presentaban diferentes relaciones de *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-ACN-0,2% TFA.

Cada uno de los experimentos produjo buena resolución de picos cromatográficos con valores de K_C entre 0,5 y 2, pero diferían enormemente en la solubilidad de la muestra, los sistemas que contenían THF fueron los que mostraron la mejor separación a expensas de la solubilidad de la muestra, al eliminar el THF y/o sustituirlo por ACN, la solubilidad incrementaba. El sistema de solventes que presento mejor disolución de la muestra fue el conformado por *t*-BuOMe-*n*-BuOH-ACN-0,2% TFA (3:5:2:10; v/v/v/v). Sin embargo, a pequeña escala o escala semi-preparativa (135 mg) la solución de la muestra debió ser filtrada antes de analizar la muestra, como resultado se obtuvo una retención de 51% y cuatro picos cromatográficos (I-IV) con buena Rs (Fig. 7.7). Cada una de estas fracciones fue analizada por espectrometría de masas de alta resolución y se encontró que los pesos moleculares de las fracciones correspondían a 593,3762; 577,3768; 609,3572 y 447,2834 y fueron denominadas OpC-2, OpC-3, OpC-4 y OpC-5 respectivamente, espectros 2-5.

La fracción OpC-4 de peso molecular 609,3572 uma (espectro 4) se identificó como el flavonoide glicosilado rutina. Adicionalmente, se cuantificó el contenido de flavonoides totales como miliequivalentes de rutina en Op y en la fracción OpC (anexo, sección A-1.2, pág., A-1). Como resultado el contenido de flavonoides totales fue mayor en el extracto metanólico Op (22,5 ± 0,4)% que en la sub fracción OpC (7,08 ± 0,04)%, lo cual indica claramente que el contenido de flavonoides totales expresado como miliequivalentes de rutina fue divido en las distintas fracciones durante el tratamietno de Op de acuerdo con el esquema 6.5 (pág., 121), lo cual es lógico ya que rutina no es completamente soluble el la mezcla MeOH-H_2O (1:1; v/v)[241] o en acetona,[242] y fue efectivamente detectado por HPLC en las fracciones OpA y OpD. Para minimizar este fraccionamiento de los flavonoides totales se realizó la cromatografía líquida al vacío (CLV) del extracto metanólico soluble en metanol, (esquema 7.1; pág., 141), donde las fracciones consecutivas OpG y OpH son enriquecidas en flavonoides totales (31,9 ± 1,0) % y (12,4 ± 0,3) % respectivamente.

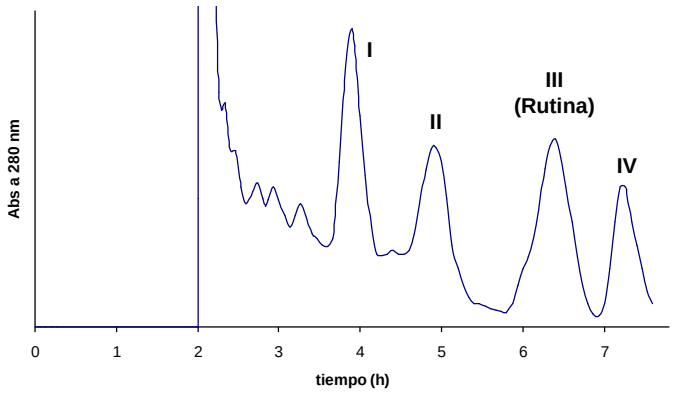


Figura 7.7. Cromatograma a escala semi-preparativa de OpC proveniente de *O. polyantha* Engl. Condiciones experimentales: Sistema de solventes: *t*-BuOMe-*n*-BuOH-ACN-0,2% TFA (3:5:2:10); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; F= 1,3 mL/min; muestra: 135 mg disuelta en 18 mL (15:3; orgánica/acuosa); %FE= 51%; velocidad de revolución 800 rpm; detección 280 nm. **I** = (OpC-2 = OpA-1); **II** = (OpC-3 = OpA-2); **III** = (OpC-4 = OpA-3= Rutina); **IV** = OpC-5.

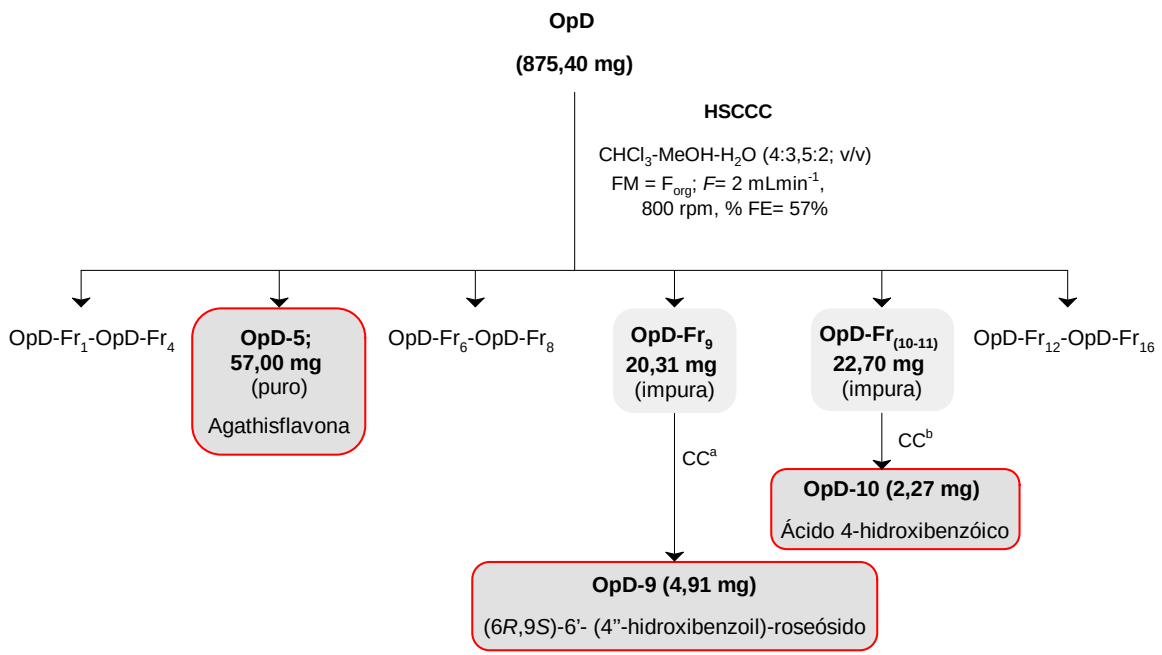
Al incrementar la cantidad de muestra OpC a escala preparativa (935 mg) la FE decayó hasta 34%, causando la fusión de los picos cromatográficos. Para mantener la retención de FE se incrementó gradualmente el *F* desde 0,2 mL/min hasta 2 mL/min durante los primeros 160 min y luego se apagó la bomba por espacio de 1 h, mientras que la rotación continuó encendida a 800 rpm, de esta manera se mantuvo la misma retención de FE que a escala semi-preparativa. Hasta este punto se habían realizado un total de once experimentos para esta muestra, nueve a escala semi-preparativa (100-150 mg) y dos a escala preparativa (590 mg y 935 mg). Se unieron las fracciones comunes de los 11 experimentos previos y se denominaron OpC-Fr_2—OpC-Fr_5; éstas fueron purificadas, e identificadas como OpC-2—OpC-5, empleando diferentes sistemas de solventes para cada una tal como se ve en el anexo (Fig., A-4).

7.3.1.4. OpD (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)

La comparación de las CCF de OpD, OpB y la sub-fracción OpB-Fr_{14-31} mostró la presencia de la misma aglicona (agathisflavona), comprobando así que éste biflavonoide es el componente mayoritario de las fracciones OpB y OpD. Sabiendo que el sistema de solventes CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (4:2,5:2; v/v) produjo un K_C ligeramente menor a la unidad para agathisflavona (Fig., 7.3), se decidió cambiar el CH_2Cl_2 por $CHCl_3$, ya que este último produce sistemas de solventes más estables que los de CH_2Cl_2, y aumentar la proporción de MeOH con la finalidad de incrementar el valor de K_C de agathisflavona y diluir las fracciones correspondientes al frente del solvente para tener mejor retención de FE y purificar la biflavona en un solo paso cromatográfico.

Con el nuevo sistema de solventes, $CHCl_3$-MeOH-H_2O (4:3,5:2; v/v/v) a escala preparativa (875,40 mg), se produjo un total de 16 fracciones colectivas analizadas por CCF (esquema 7.3). La fracción OpD-5, resultó ser agathisflavona pura (57,00 mg) la cual se obtuvo en un solo paso cromatográfico. Adicionalmente, se obtuvieron dos fracciones impuras con un componente mayoritario cada una, OpD-Fr_9 (20,31 mg) y OpD-Fr_{10-11} (22,70 mg) las cuales fueron purificadas por CC con sílica gel, desarrolladas con mezclas de CH_2Cl_2-MeOH y CH_2Cl_2-*n*-BuOH-MeOH-H_2O (fase orgánica) produciendo OpD-9 (4,91 mg) y OpD-10 (2,27 mg), respectivamente. Esquema 7.4.

Sabiendo que la agathisflavona es el componente mayoritario de la fracción OpD, se utilizó la técnica de refinamiento de la zona de pH en CCC para intentar purificar este componente más eficientemente. Sin embargo, no se logro una separación satisfactoria (tabla A-10, Fig., A-5).



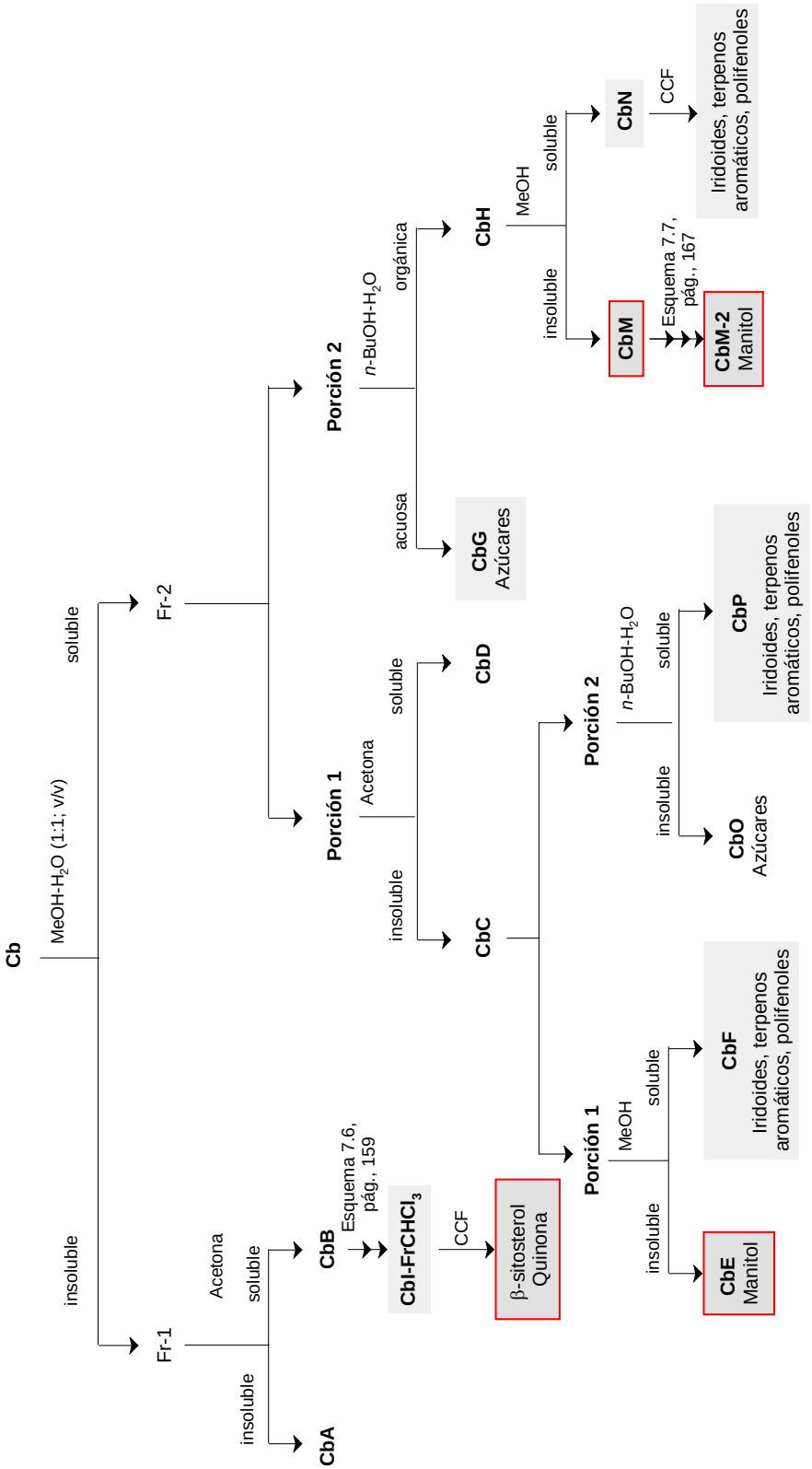
a) CH_2Cl_2-MeOH-*n*-BuOH-H_2O (4:1,5:0,1:2; v/v; fase orgánica)

b) CH_2Cl_2-MeOH (96:4; v/v)

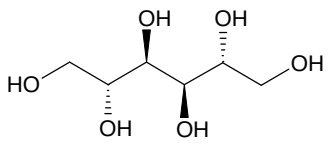
Esquema 7.4. Purificación de agathisflavona, (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido y ácido 4-hidroxibenzóico, provenientes de la fracción OpD de *O. polyantha* Engl.[243]

Agathisflavona (OpD-5), fue caracterizada por su espectro de resonancia magnética nuclear de protones, RMN-^{1}H (espectros 6-7). OpD-10 fue identificado como ácido 4-hidroxibenzóico por sus espectros de RMN-^{1}H (espectros 8-9) y RMN-^{13}C (espectro 10). OpD-9 fue identificado como (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido a través de sus espectros de UV-Vis (espectro 11), IR (espectro 12), MS y MS/MS (espectros 13-14), RMN-^{1}H (espectros 15-20), RMN-^{13}C (espectros 21-22), DEPT-135 (espectro 23), HMQC (espectros 24-27), HMBC (espectros 28-30), COSY (espectros 31-34) y NOESY (espectros 35-37), todos estos espectros son discutidos en los resultados fitoquímicos, sección 7.4, Pág., 195.

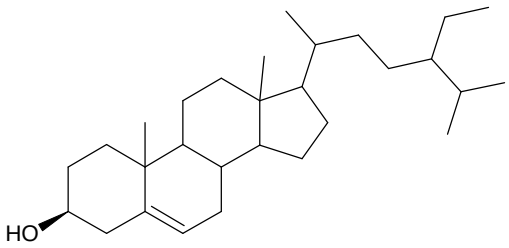
7.3.2. *Capraria biflora* L. (toda la planta)



Esquema 7.5. Resumen general de la separación de los metabolitos secundarios identificados en *C. biflora* L.



mannitol



β-sitosterol

Figura 7.8. Metabolitos identificados en la especie *C. biflora* L.

7.3.2.1. CbA (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona)

Ésta fracción no presentó ningún efecto de inhibición sobre la G-6-Pasa microsomal, sin embargo mostró un efecto sinérgico con el sistema enzimático, (ésta fracción no fue purificada en el presente trabajo).

7.3.2.2. CbB (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)

La revisión bibliográfica indica que ésta planta presenta quinonas terpenoidales,[244-245] las mismas han sido aisladas de extractos de éter de petróleo y hexano, por lo que se enfocó el interés en la optimización del sistema de solventes empleando algunos sistemas ya reportados para este tipo de metabolitos como *n*-Hex-AcOEt-ROH-H_2O; (R= Et ó Me).[246-247] Por ello, se determinaron los K_C, por métodos espectrofotométricos, empleando varios sistemas de solventes (tabla 7.6).

Aún cuando en los ensayos a escala analítica se obtuvo buena separación de picos cromatográficos (Fig., A-6, pág., A17), en la extrapolación a escala preparativa se evidenció la fusión de picos cromatográficos de interés, básicamente debido a la disminución del %FE.

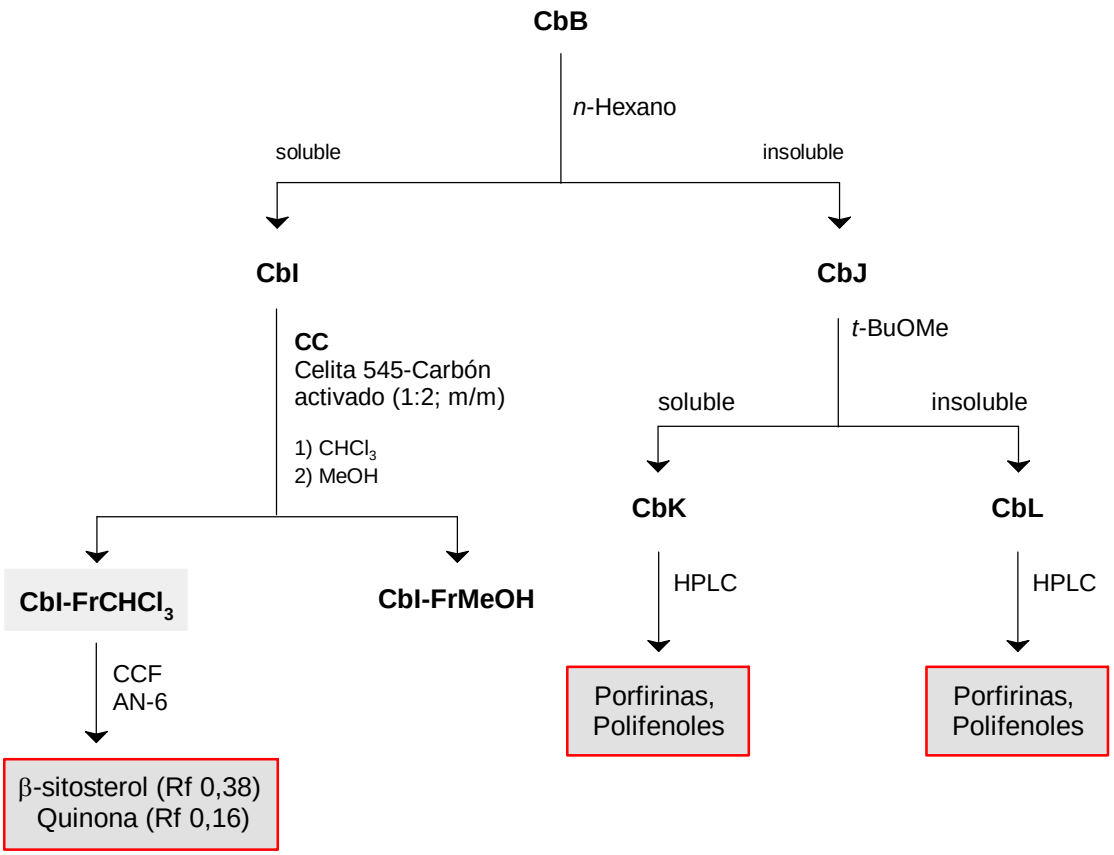
Tabla 7.6. Coeficientes de distribución de la fracción Cb-B en sistemas de solventes hidrofóbicos.

Sistema de solventes							$K_{C(FS/FI)}$ a 280 nm
ACN	*n*-Hex	AcOEt	MeOH	EtOH	H_2O	0,2% TFA_{H2O}	
1	1[+]	0	0	0	0	0	0,454
0	1	0	1	0	0	0	0,490
0	2	3	2,5	0	0	1,7	1,974
0	3,2	2,8	0	2,8	1	0	0,425
0	3,2	2,8	0	2,8		1	0,422
0	2,8	3,2	0	2,8	1	0	0,543
0	2,8	3,2	0	2,2	1,6	0	1,802
0	2,8	3,2	0	2,5	1,3	0	0,990
0	2,8	3,2	0	2,5	0	1,3	1,308

[+] Contiene 0,2% TFA en todo el sistema de solventes.

Sabiendo que las naftoquinonas y los sesquiterpenos reportados para *C. biflora* L., han sido recristalizados de éter de petróleo y de di-*iso*-propiléter (secciones 2.6.1 y 2.6.2) y haciendo uso de los resultados expresados en la tabla 7.6 se aplico el fraccionamiento para CbB (esquema 7.6) con la finalidad de determinar nucleos terpenoidales del tipo naftoquinona. Así, el tratamiento con *n*-hexano de la fracción CbB produjo una parte soluble y otra insoluble, denominadas CbI y CbJ, respectivamente (esquema 7.6). CbI se obtuvo como una pasta higroscópica de color verde oscuro, rica en clorofila, la cual fue eliminada utilizando el método reportado en la literatura,[240] aplicado anteriormente para OpB_{Hex}. Así, se utilizó una CC rellena de celita 545-carbón activado (2:1; p/p) la cual fue eluida con $CHCl_3$ y posteriormente con MeOH. La fracción de $CHCl_3$ (CbI-$FrCHCl_3$) produjo un sólido amarillo claro que contiene el esteroide β-sitosterol, determinados por CCF comparativa (Fig. 7.9).

El espectro de UV de la fracción CbI-$FrCHCl_3$ presentó una banda débil de aborción con máximo 555 nm, la cual esta asociada a las quinonas terpenoidales previamente reportadas en la especie *C. biflora* L. Adicionalmente, coincide con el espectro de UV del extracto de éter de petróleo de las raíces de *Capraria biflora* L. (CbR-EP).



Esquema 7.6. Fraccionamiento de CbB proveniente de *C. biflora* L.: Separación de β-sitosterol y derivados clorofílicos tipo feoforbido-a.

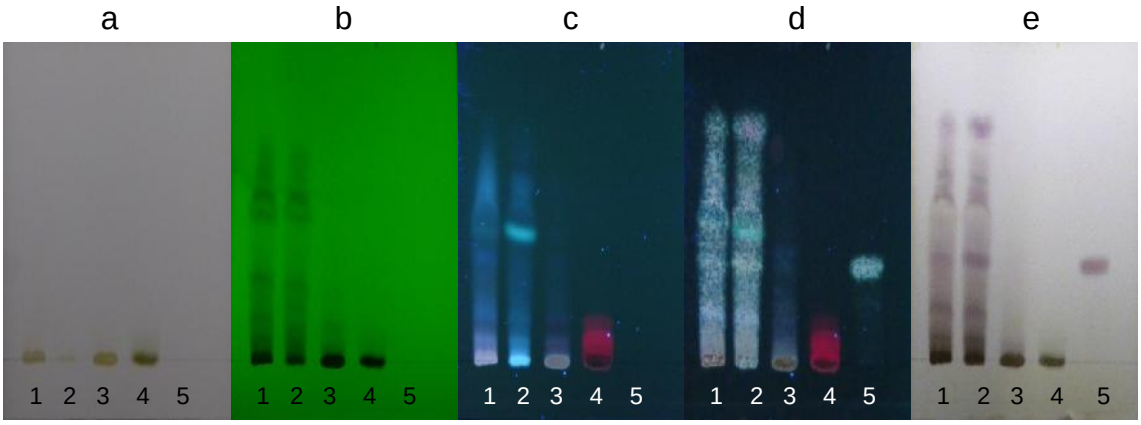


Figura 7.9. Cromatografía de capa fina comparativa de CbI (1), CbI-FrCHCl$_3$ (2), CbK (3), CbL (4) y β-sitosterol (5). Sistema de desarrollo; AN-6: a) Visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) Revelado AS, 365 nm, calentamiento suave; e) Revelado AS, visible calentamiento prolongado.

Por otra parte, la fracción CbJ fue tratada con *t*-BuOMe con lo cual se obtuvieron dos fracciones denominadas CbK y CbL las cuales corresponden a la parte soluble e insoluble, respectivamente (esquema 7.5).

Sabiendo que las porfirinas presentan máximos de absorción caráterísticos entre 400-435 nm y 666 nm, los compuestos aromáticos conjugados del tipo ácido cinámico, cumárico o caféico tienen máximos de absorción entre 300-330 nm y los núcleos tipo flavona presentan máximo entre 330-340 nm, se realizó el análisis cromatográfico de las fracciones CbK y CbL por CCF (Fig., 7.10) y por HPLC y se presume que contienen derivados de clorofila del tipo porfirina (Fig., 7.11) y compuestos aromáticos derivados de los ácidos fenilpropanoides antes mencionados (Fig., 7.12).

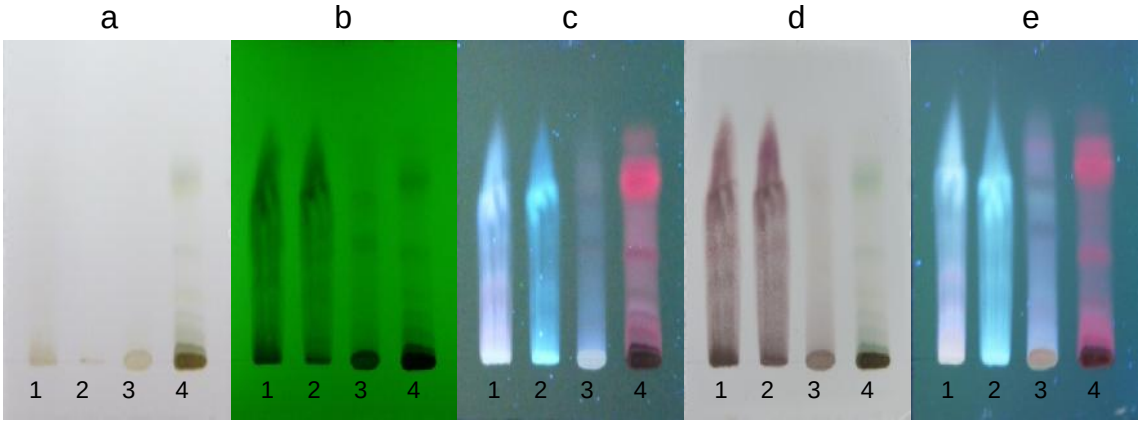


Figura 7.10. Cromatografía de capa fina comparativa de las fracciones CbI (1), CbI-Fr$CHCl_3$ (2), CbK (3) y CbL (4) obtenidas en el esquema 7.6 (pag 156). Sistema de desarrollo; AN-2: a) Visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) Revelado AS, visible; e) Revelado KOH/EtOH, 365 nm.

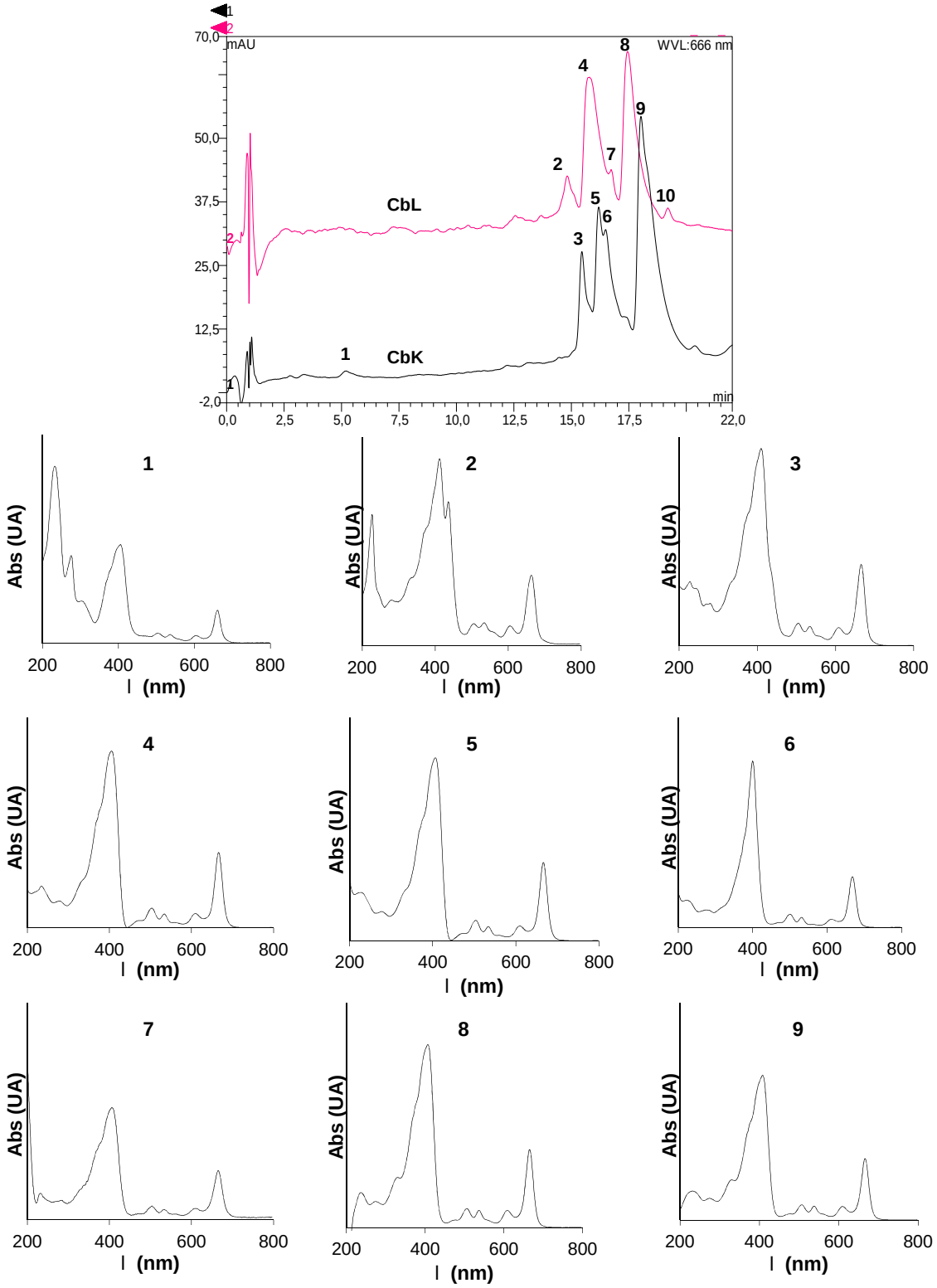


Figura 7.11.- Cromatograma por HPLC-sistema-2 de las fracciones CbL y CbK provenientes de *C. biflora* L., (esquema 7.4, pág., 153).

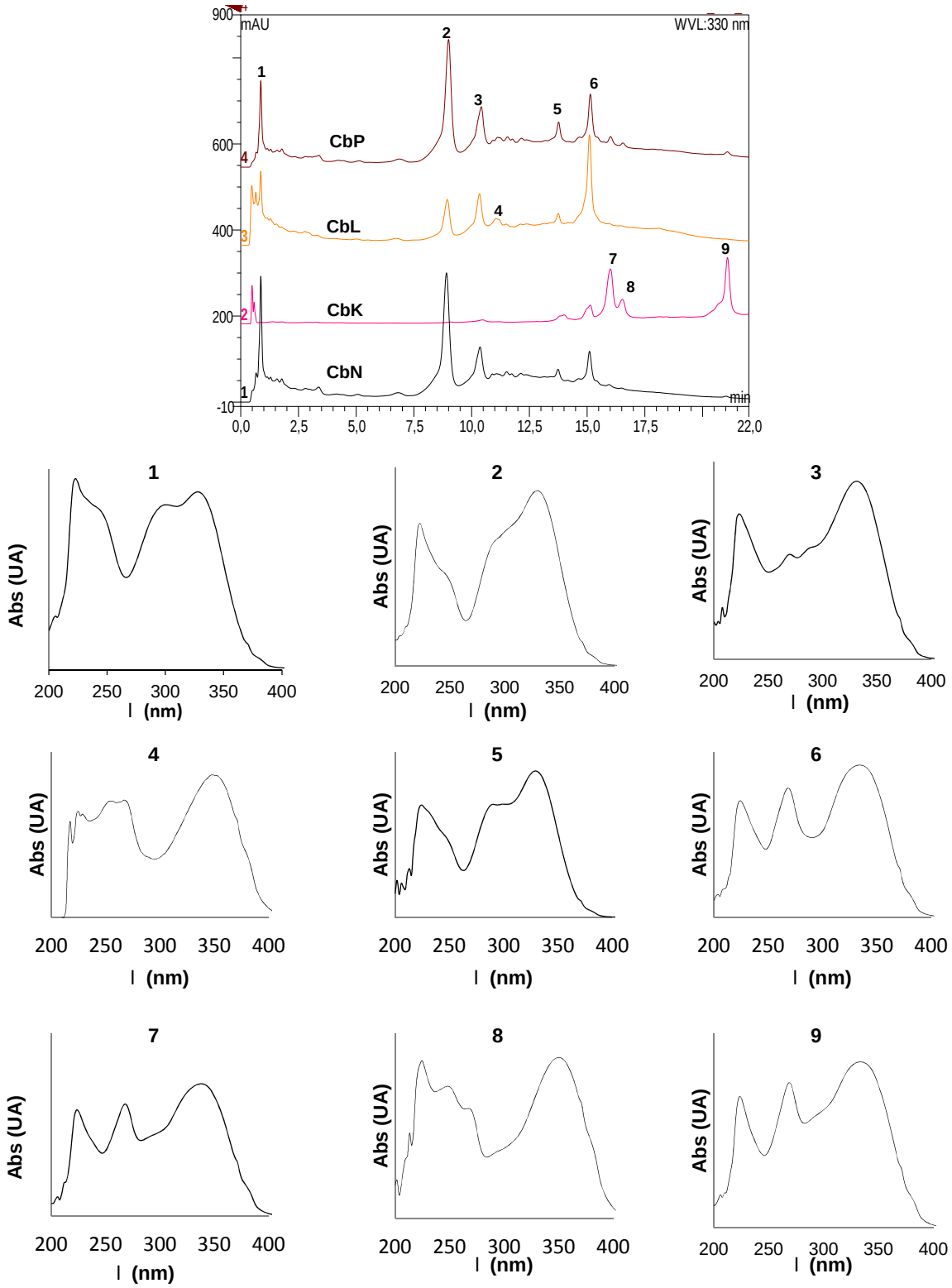


Figura 7.12.- Cromatograma por HPLC-sistema-1 de las fracciones CbP, CbL, CbK y CbN provenientes de *C. biflora* L., (esquema 7.4, pág., 153).

7.3.2.3. CbC (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona)

Antes de realizar el experimento de CCC se notó que la muestra presentaba un sólido blanco insoluble en MeOH, por lo que se procedió a lavar una porción de la muestra (2648 mg) con éste solvente. La fracción insoluble (513 mg), fue un sólido blanco-opaco soluble en agua, el cual fue denominado CbE e identificado como manitol, mientras que la fracción soluble fue una pasta higroscópica denominada CbF (~1800 mg). Ésta última fracción fue analizada por HSCCC a escala analítica (74 mg) empleando un sistema de solventes hidrofílico compuesto por AcOEt-*n*-BuOH-H_2O (2:3:5; v/v) el cual produjo una retención de 65% y cuatro picos cromatográficos con buena resolución (Figs., 7.13a y A-7). Con el objetivo de purificar el componente mayoritario con $K_C \approx 2$, se utilizó toda la muestra CbF (~1800 mg) pero la retención de FE disminuyó hasta 41% y la purificación del componente fue insuficiente. Sin embargo, la utilidad de éste experimento fue evidente al obtener dos picos cromatográficos bien resueltos con K_C mayor a 2 y menor a 4, correspondientes a dos sólidos blancos-opacos, denominados CbF-5 y CbF-6 respectivamente. CbF-5 fue idéntico en comportamiento por CCF a CbD-5 (Fig., 7.13).

7.3.2.4. CbD (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)

Debido a la similitud en la inhibición sobre el sistema de la G-6-Pasa microsomal, entre las fracciones CbC y CbD, (tabla 7.3), se decidió comparar cromatográficamente las dos fracciones; para ello, se aplicó el mismo sistema de solventes en ambas y se encontró que, básicamente, tienen la misma composición pero en diferentes proporciones (Fig., 7.13).

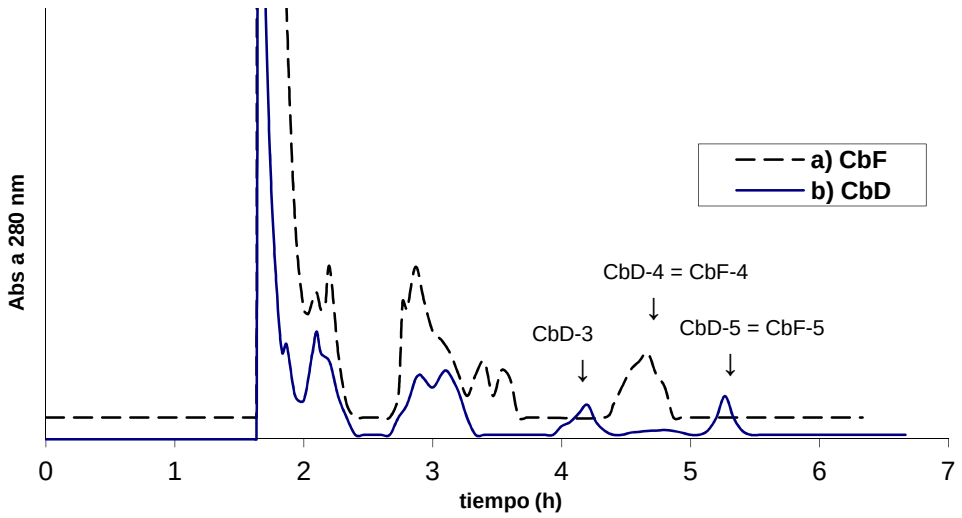


Figura 7.13. Cromatogramas a escala analítica de: **a**) -- CbF y **b**) —CbD provenientes de *C. biflora* L., Condiciones experimentales: Sistema de solventes: AcOEt-*n*-BuOH-H_2O (2:3:5); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; *F*: 1,5 mL/min: Muestra: a) 74 mg en 6 mL (3:3; orgánica/acuosa), b) 50 mg en 7 mL (4:3; orgánica acuosa); %FE= **a**) 65% y **b**) 66%; revolución 850 rpm; detección 280 nm.

Adicionalmente a la comparación por HSCCC, se realizó una CCF comparativa de CbC y CbD, revelada con $HCl_{(c)}$-AcOH (8:2; v/v). El resultado mostró que los componentes mayoritarios de estas fracciones son iridoides, considerados marcadores quimiotaxonómicos de la familia Schrophulariaceae,[248] mientras que al ser reveladas con AS se observan coloraciones moradas y amarillas. El color morado corresponde a terpenos altamente oxigenados corroborando la presencia de iridoides, mientras que las manchas amarillas indican la presencia de polifenoles o flavonoides. Sin embargo, por CCF y HPLC no se corresponden con los flavonoides naringenina y niringina los cuales han sido previamente reportados en la especie *C. biflora* L.

7.3.2.5. CbH (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, extraida con n-BuOH)

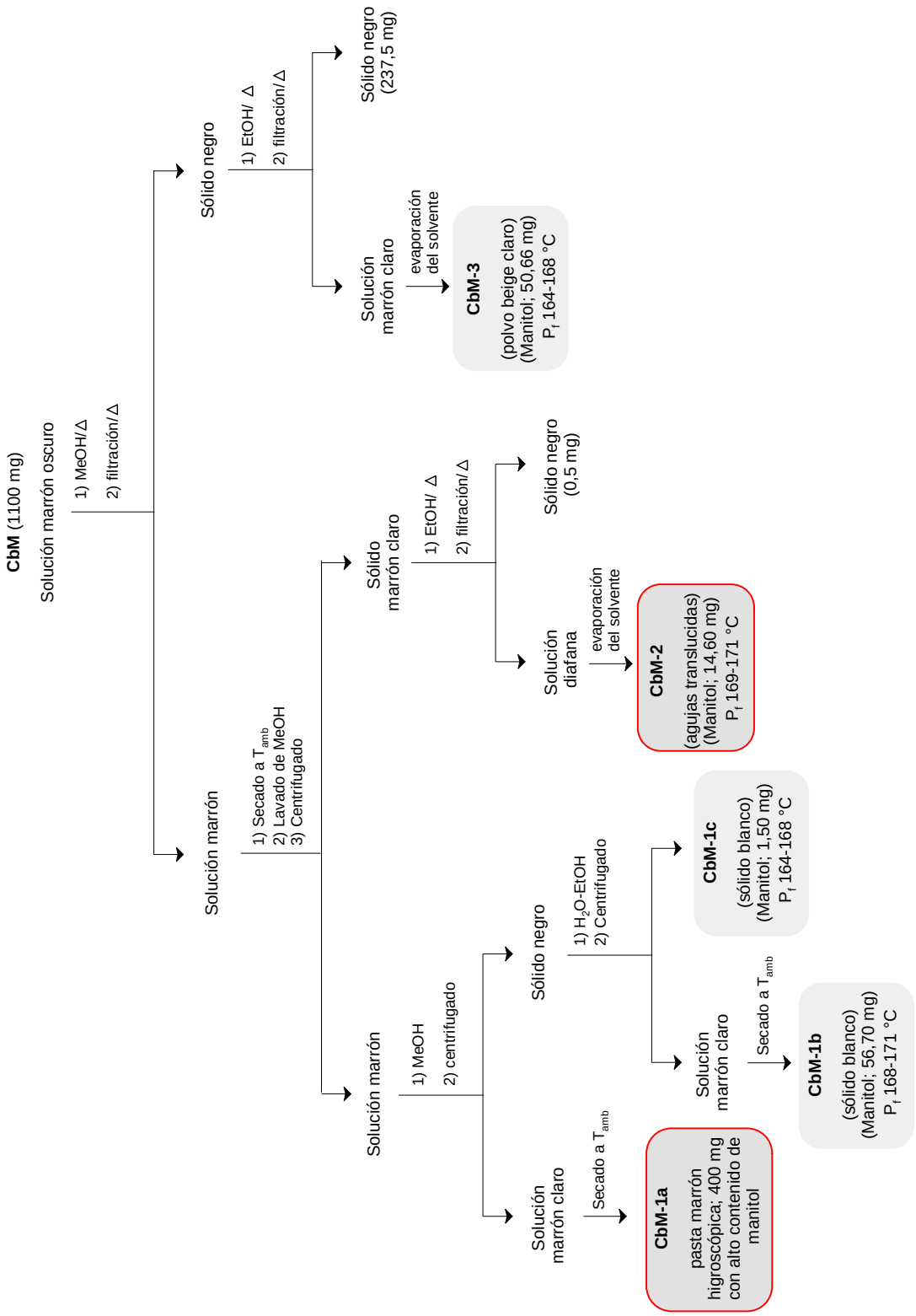
Con el análisis anteriormente descrito para las fracciones CbC y CbD se creó un nuevo esquema de fraccionamiento para la fracción soluble en MeOH-H_2O (1:1; v/v), descrita en el esquema 6.5 (pág 121), el cual consistió en particionar con *n*-BuOH-H_2O, en lugar del tratamiento con acetona. Dicha partición está basada en la revisión bibliográfica para los procedimientos de extracción y análisis de iridoides.[249]

El extracto metanólico de *C. biflora* L. fue tratado por solubilidad con MeOH-H_2O (1:1; v/v), la fracción soluble fue concentrada a presión reducida hasta obtener una pasta higroscópica, la cual fue suspendida en H_2O y extraida sucesivamente con varias porciones de *n*-BuOH saturado de H_2O. Tanto la fase acuosa como la orgánica fueron concentradas a presión reducida separadamente, y fueron denominadas CbG y CbH, respectivamente (esquema 7.4). La fracción acuosa (CbG), presentó mayormente un contenido glicosídico, mientras que la fracción CbH fue una pasta higroscópica la cual fue tratada con MeOH para tener dos nuevas fracciones una insoluble (CbM) y otra soluble (CbN). Ésta última presentó un alto contenido de iridoides y ausencia total de los flavonoides naringina y naringenina los cuales han sido reportados previamente en la literatura.[60,61]

Adicionalmente, el tratamiento con *n*-BuOH también fue aplicado sobre una porción de la fracción CbC, donde se obtuvo la fracción CbO (fase acuosa: azúcares) y CbP (fase *n*-BuOH: Iridoides y polifenoles). Debido a que esta última fracción (CbP) resultó ser idéntica en comportamiento cromatográfico por HPLC que la fracción CbN (Fig., 7.9y), se tiene que el procedimiento fue satisfactorio para extraer los metabolitos secundarios polares presentes en *C. biflora* L.

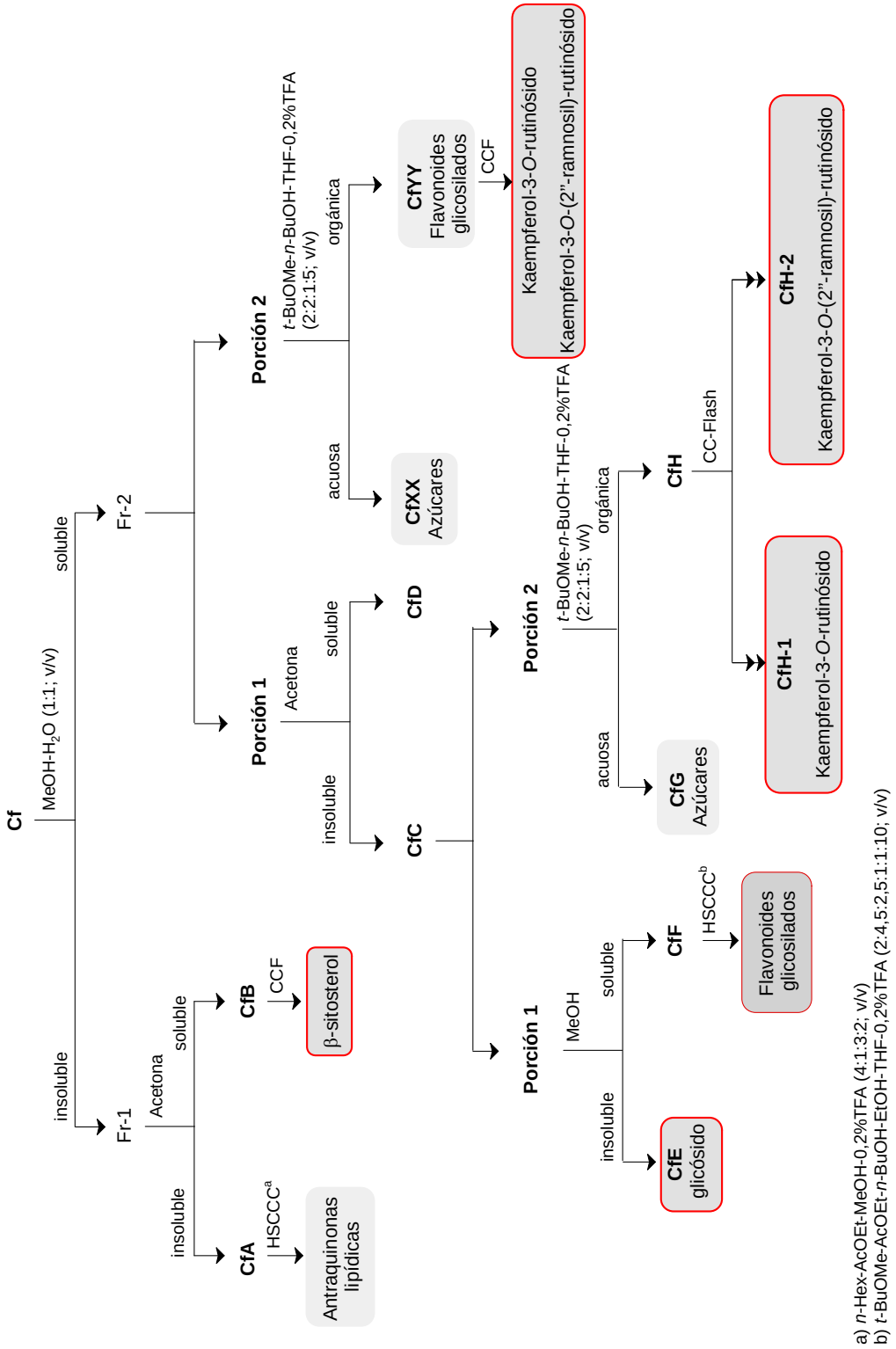
7.3.2.6. CbM (Soluble en MeOH-H_2O; extraida con n-BuOH; insoluble en MeOH)

La fracción CbM fue recristalizada varias veces de EtOH (esquema 7.7), lo que produjo un sólido blanco en forma de agujas, denominado CbM-2 de Pf_{exp} 169-171 °C, éste presentó las mismas características observadas para el sólido CbE (sección 7.3.2.2, pág., 156) por lo que se realizó un derivado semisintético con py/Ac_2O denominado CbM-2Ac, el cual se obtuvo con 95% de rendimiento, y se recristalizó de Et_2O y presentó un Pf_{exp} 129-130 °C, dicha información confirmó la identidad de CbM-2 como manitol, el cual ha sido previamente reportado para la planta *C. biflora* L.[64]

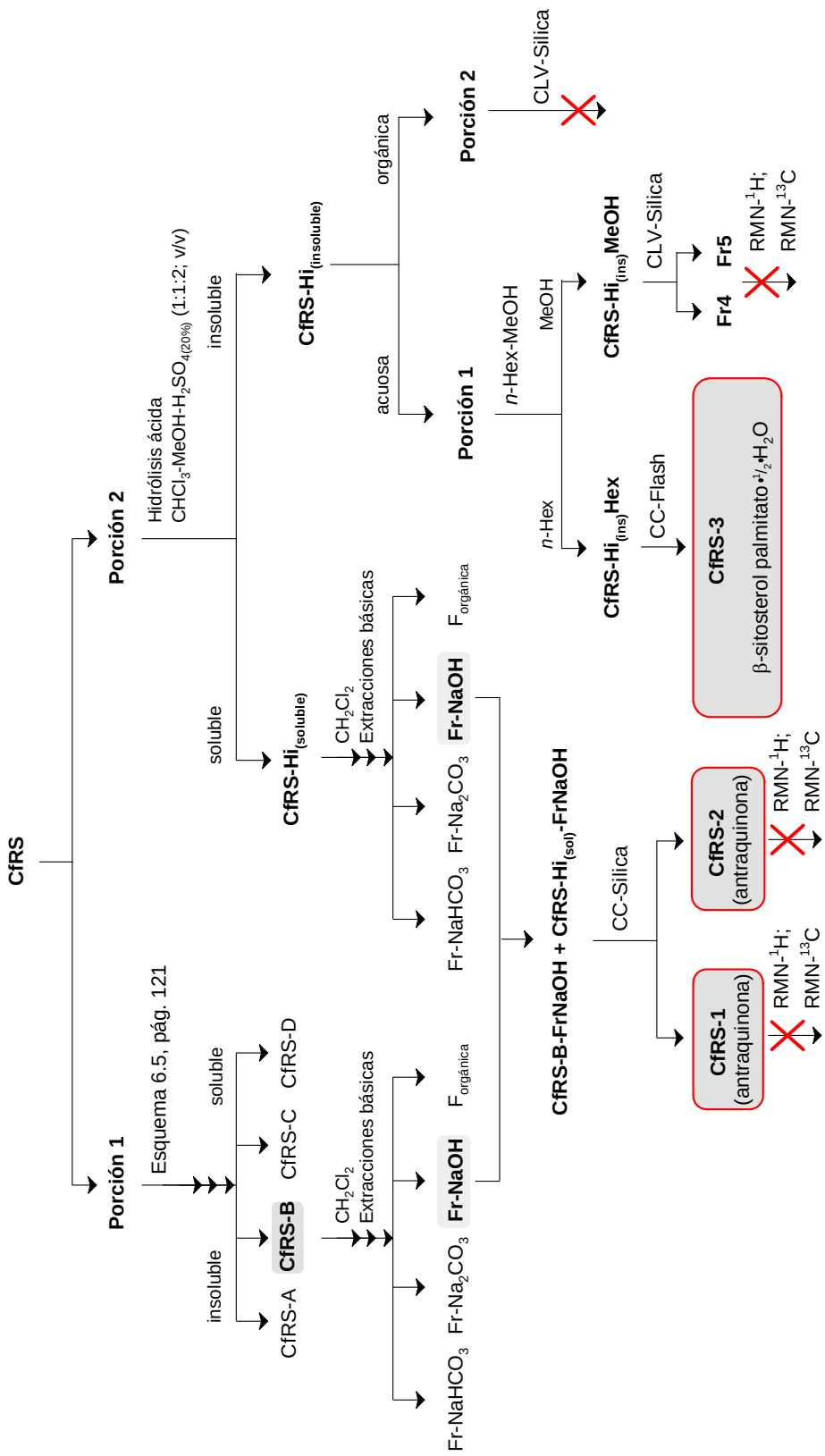


Esquema 7.7. Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. biflora* L., para la obtención de manitol.

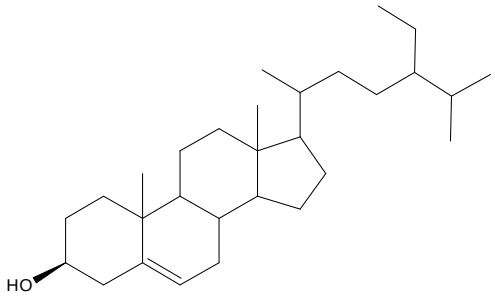
7.3.3. *Cassia fruticosa* Mill. (Ramas y Hojas)



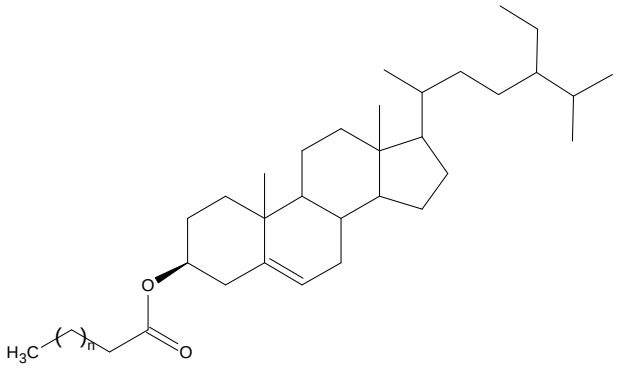
Esquema 7.8. Resumen general de la separación de los compuestos en las hojas de *C. fruticosa* Mill., colectada en un período lluvioso.



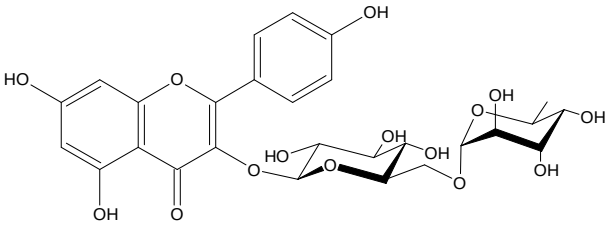
Esquema 7.9. Resumen general de la separación del β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O y β-sitosterol identificados en las ramas de *C. fruticosa* Mill., colectada en un período de sequía.



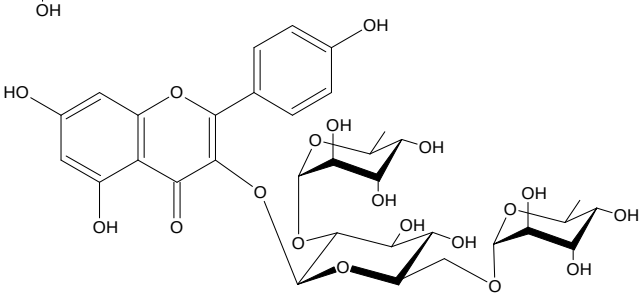
β-sitosterol



Ester de ácido graso de β-sitosterol



Kaempferol 3-*O*-rutinosido



Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinosido

Figura 7.14. Metabolitos identificados en la especie *C. fruticosa* Mill.

7.3.3.1. CfR-A y CfA (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona)

Las fracciones CfR-A y CfA, provenienes de las ramas y partes aéreas respectivamente colectadas en un período lluvioso, estuvieron constiuidas por antraquinonas fenólicas de carácter lipofílico (ver anexo, sección A-3.1), éste tipo de metabolitos ha sido previamente reportado para la especie *C. kleinii*.[85,86]

7.3.3.2. CfR-B y CfB (insoluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona)

Las fracciones CfR-B y CfB, presentaron básicamente compuestos fenólicos del tipo estilbenoides y antraquinonas (ver anexo, sección A-3.2), y fueron analizadas por fraccionamiento ácido-base (ver anexo, esquema A1), refinamiento de la zona de pH en HSCCC (Fig. A10), así como por hidrólisis del extracto metanólico de ramas y partes aéreas (esquema A2).

7.3.3.3. CfR-C y CfC (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona)

Las fracciones CfR-C y CfC, presentaron básicamente compuestos fenólicos del tipo flavonoidal (ver anexo, sección A-3.3) pero la comparación cromatográfica por HSCCC utilizando el sistema de solventes hidrofílicos (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5 v/v/v/v) indica que son compuestos diferentes entre sí (Fig., 7.15).

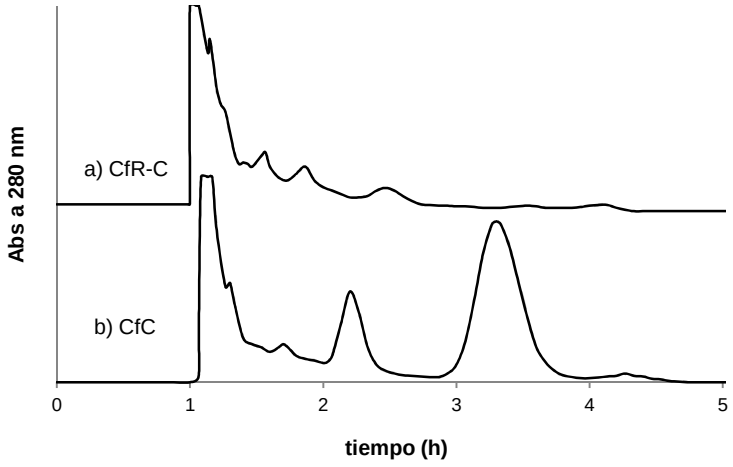


Figura 7.15. Cromatogramas a escala analítica de fracciones proveniente de *C. fruticosa* Mill., ramas (CfR-C) y hojas (CfC), colectadas en período lluvioso. Condiciones experimentales: Sistema de solventes: *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2% TFA (2:2:1:5); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; *F*= 2 mL/min; velocidad de revolución 800 rpm; detección a 280 nm; muestra disuelta en 10 mL (5:5; orgánica/acuosa); **a**) muestra **CfR-C**: 135 mg; %FE= 63%; **b**) muestra **CfC**: 113 mg; %FE= 59%.

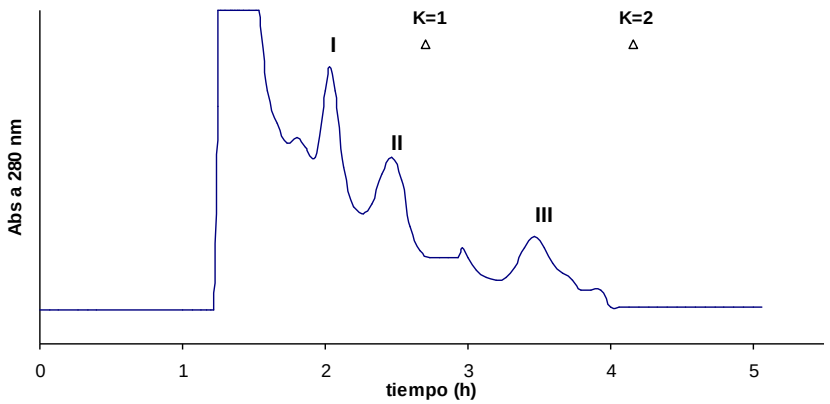


Figura 7.16. Cromatograma a escala analítica de **CfR-C** proveniente de las ramas de *C. fruticosa* Mill., colectadas en período lluvioso. Condiciones experimentales: Sistema de solventes: *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2% TFA (1:3:1:5); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; *F*= 2 mL/min; velocidad de revolución 800 rpm; muestra: 200 mg disuelta en 10 mL (1:1; orgánica/acuosa); %FE= 54% y detección a 280 nm. **I** = **CfR-C1**; **II** = **CfR-C2**; **III** = **CfR-C3**.

El sistema de solventes óptimo para la separación de los metabolitos flavonoidales provenientes de las ramas de *C. fruticosa* Mill., estuvo conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v) (Fig., 7.16, sección A-3.3), el mismo es más hidrofílico que los utilizados para la fracción CfC (Fig., 7.15b), por tanto los flavonoides de las ramas son mas polares que los provenientes de las hojas.

7.3.3.4. CfR-D y CfD (soluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona)

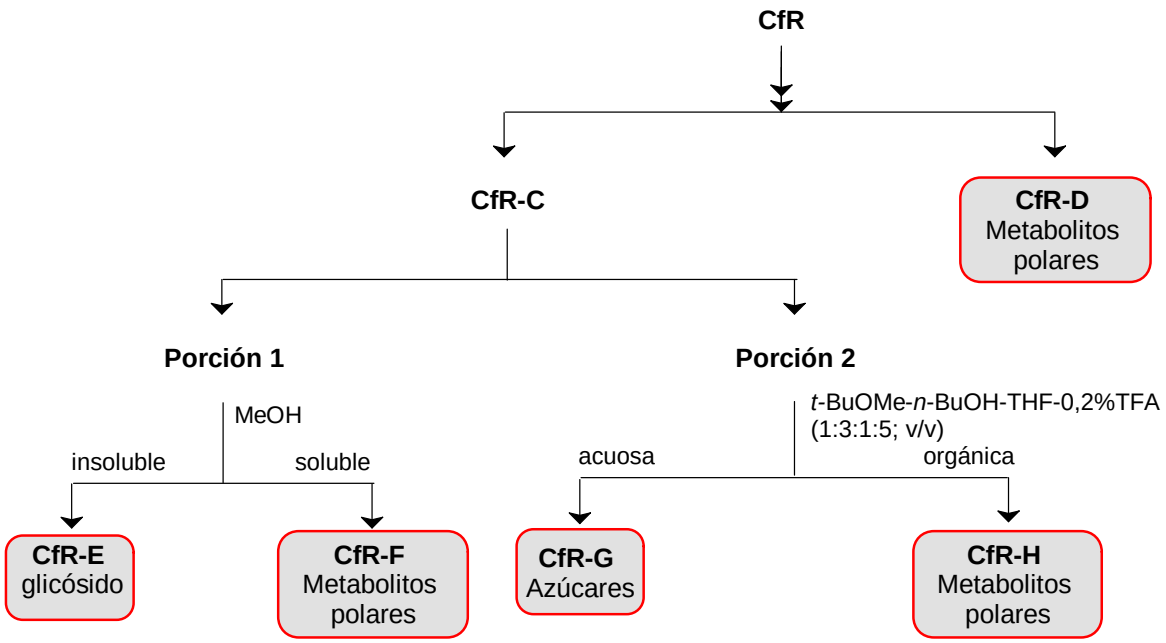
Las fracciones CfC y CfD contienen básicamente la misma composición referente a los metabolitos secundarios (Sección A-3.3), pero difieren enormemente en el contenido glicosídico siendo éste mucho mayor en la fracción insoluble en acetona (CfC, esquema 6.5, pág 121), lo cual explica las diferencias encontradas en los porcentajes de inhibición sobre la G-6-Pasa (tabla 7.3). Por lo tanto, el tratamiento con acetona de la fracción **2** (esquema 6.5, pág., 121) fue útil para estudiar los metabolitos secundarios presentes en las hojas y ramas de *C.*

fruticosa Mill. Éste comportamiento también fue encontrado para las fracciones CfR-C y CfR-D provenientes de las ramas de *C. fruticosa* Mill. Como consecuencia, el contenido de metabolitos secundarios polares fue estudiado sólo con las fracciones (CfR-C y CfC). Así, éstas fracciones fueron tratadas con MeOH o particionadas con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v).

7.3.3.5. CfR-E y CfE (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona y MeOH)

Para las ramas de *C. fruticosa* Mill., el contenido glicosídico fue obtenido de dos maneras a partir de la fracción CfR-C. En la primera, la fracción fué lavada con MeOH, donde el resto insoluble fue un sólido blanco-opaco infinitamente soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos como: *n*-Hexano, CH_2Cl_2, $CHCl_3$, AcOEt, Acetona, MeOH, EtOH. Dichas características confirmaron la presencia de componentes glicosidicos y se identificó como CfR-E, por otra parte, la porción soluble en metanol fue rotulada como CfR-F. La segunda forma de obtención de éstos comoponetes se realizó por partición de la fracción CfR-C con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v), donde la fase acuosa fue una pasta higroscópica de características similares a CfR-E y fue rotulada como CfR-G, mientras que la fase orgánica fue rotulada como CfR-H. Las fracciones CfR-F y CfR-H fueron ricas en metabolitos secundarios polares cuyo comportamiento por CCF fue comparable al obtenido con CfR-D (tabla A-3, esquema 7.10).

Al usar las hojas y realizar el tratamiento de igual manera que el utilizado con las ramas, se obtuvo las fracciones CfE (sólido blanco) y CfG (pasta higroscópica) que presentaron características glicosídicas similares a CfR-E y CfR-G respectivamente las cuales fueron descritas anteriormente. Adicinalmente, se obtuvo las fracciones CfF y CfH las cuales presentaron características similares a las observadas por CCF en CfD.



Esquema 7.10. Fraccionamiento del extracto metanólico de las ramas de *C. fruticosa* Mill., para obtener los metabolitos secundarios polares

7.3.3.6. CfR-F y CfF (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona; soluble en MeOH)

Las fracciones CfR-E y CfE (esquema 7.10), corresponden a la parte insoluble en MeOH proveniente de las fracciones CfR-C y CfC respectivamente (sección 7.3.3.5). Mientras que, la parte soluble (denominadas CfR-F y CfF) fueron fracciones ricas en metabolitos secundarios polares. Por HSCCC, se confirmó que CfF y CfD contienen los mismos metabolitos secundarios (sección A-3.3, Fig. 7.17)

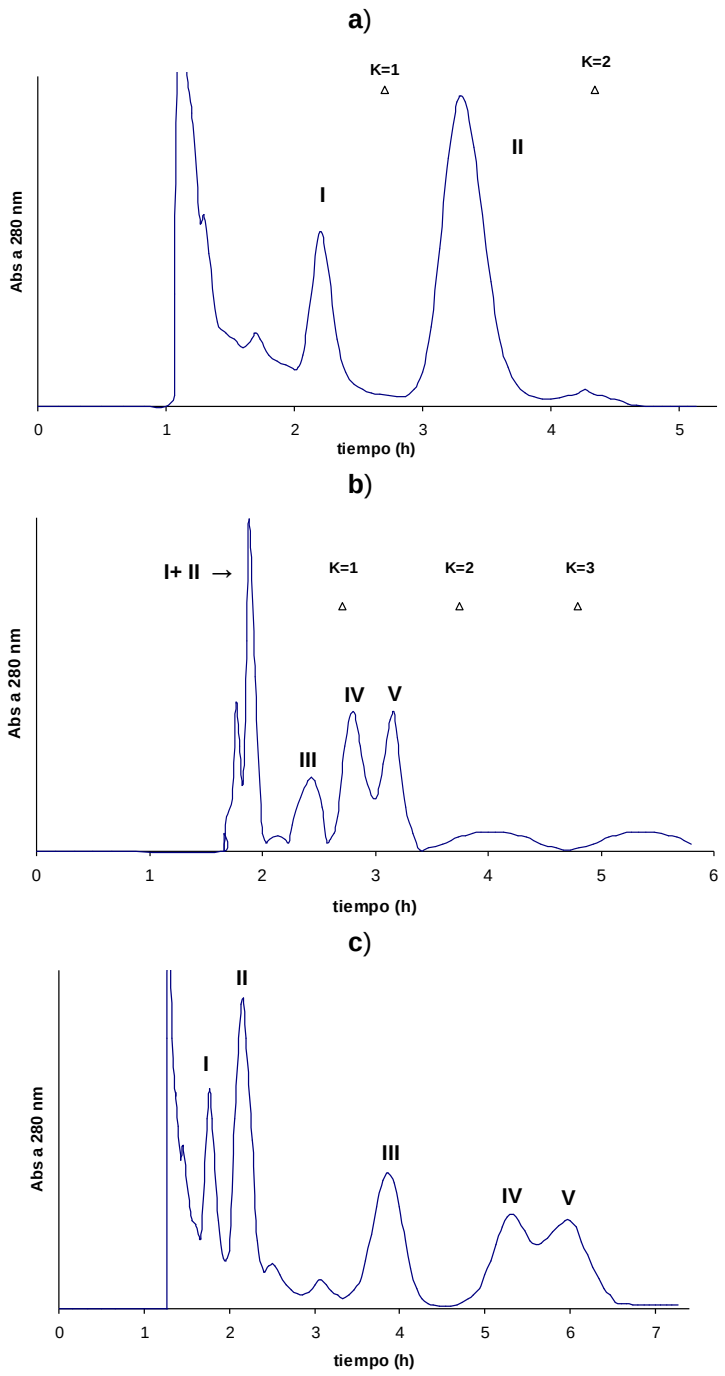


Figura 7.17. Cromatogramas a escala analítica de Cf proveniente de *C. fruticosa* Mill., provniente de las hojas recolectadas en período lluvioso. Condiciones experimentales: FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; *F*= 2 mL/min; velocidad de revolución 800 rpm; detección a 280 nm; muestra disuelta en 10 mL (5:5; orgánica/acuosa); **a**) muestra **CfC**: 113 mg; Sistema de solventes: *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2% TFA (2:2:1:5); %FE= 59%; **b**) muestra **CfD**: 37 mg; Sistema de solventes: AcOEt-*n*-BuOH-MeOH-0,2% TFA (4,5:0,5:1:5); %FE= 37%; **c**) muestra **CfF** (**$CfC_{sol\text{-}MeOH}$**): 170 mg; Sistema de solventes: *t*-BuOMe-AcOEt-*n*-BuOH-EtOH-THF:0,2% TFA (2:4,5:2,5:1:1:10); %FE= 55%. **I** = CfD-1 = CfC-1; **II** = CfD-2 = CfC-2; **III** = CfD-3 = CfC-3; **IV** = CfD-4 = CfC-4; **V** = CfD-5 = CfC-5.

7.3.3.7. CfR-H; soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona; Fase orgánica del sistema de solventes (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v)

Sabiendo que CfR-D y CfR-C tiene la misma composición de metabolitos secundarios polares, se realizó la partición de CfR-C con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v) donde la fase orgánica se rotuló como CfR-H (esquema 7.10) y se utilizó para construir dos columnas para cromatografía contracorriente, una analítica y otra preparativa de 54 mL y 310 mL de volumen total respectivamente (ver anexo, sección A-4).

Con la columna analítica para CCC, se utilizó el sistema de solventes AcOEt-EtOH-0,2%TFA (5:1:5; v/v/v) y se comparó con el resultado previamente obtenido para CfR-D con una columna comercial de 325 mL de capacidad (Fig., 7.18). Adicionalmente, se utilizó dos longitudes de onda (280 y 360 nm) para la detección de los componentes (Fig., 7.19).

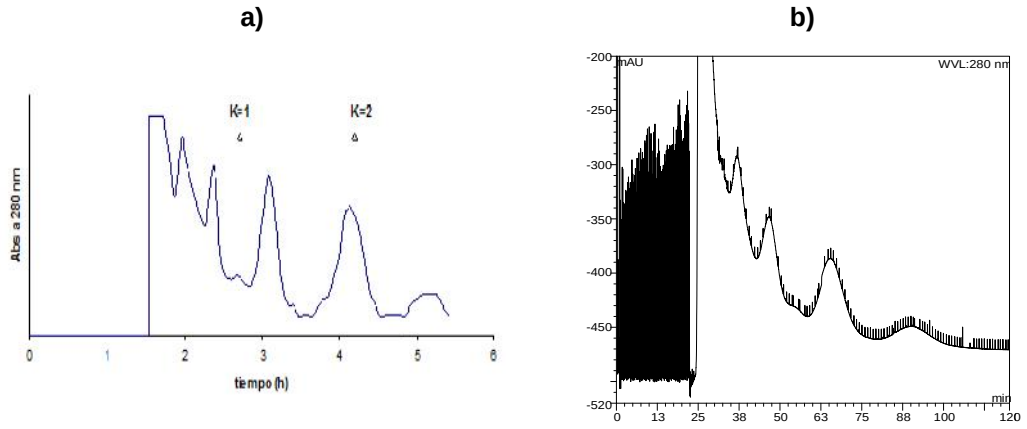


Figura 7.18.- Cromatogramas de HSCCC para fracciones de *C. fruticosa* Mill., detección a 280 nm: **a)** CfR-D, columna comercial (325 mL); **b)** CfR-H, columna analítica (54 mL) fabricada en el Laboratorio de Productos Naturales, UCV.

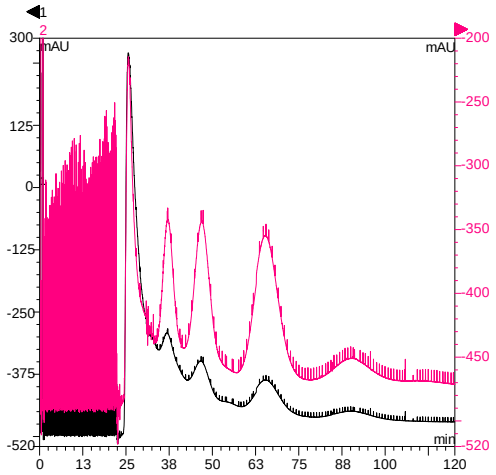


Figura 7.19.- Cromatogramas comparativos de HSCCC para la muestra CfR-H utilizando una columna anlítica de 54 mL a: 280 nm (línea negra) y 360 nm (línea rosada).

Por otra parte, también se realizó la comparación preparativa utilizando las columnas de 325 mL (comercial) y 310 mL (fabricada), al utilizar la cloumna fabricada se empleó la detección a 360 nm (Fig., 7.20)

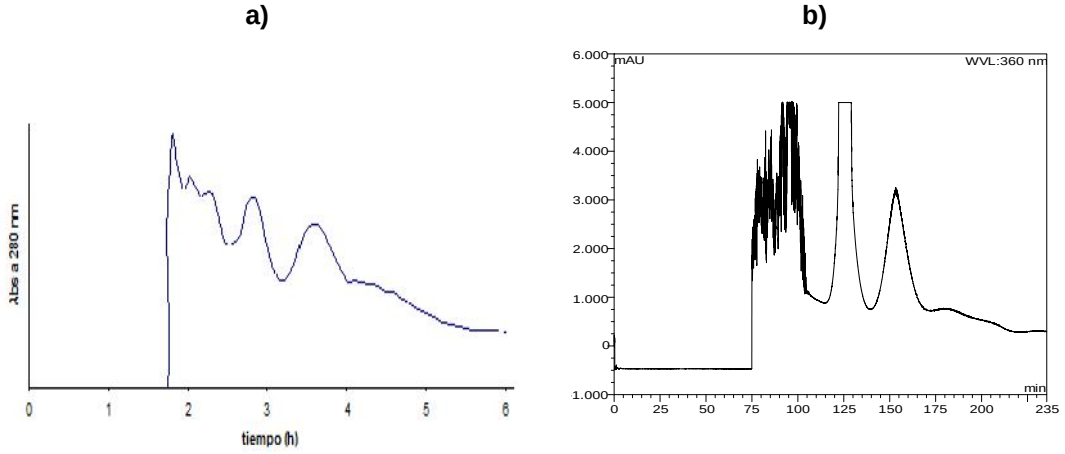


Figura 7.20.- Cromatogramas para la muestra fitoquímica CfR-D, **a)** 603 mg de muestra, columna comercial (325 mL), 280 nm; **b)** 1500 mg de muestra, columna preparativa (310 mL) a 360 nm.

7.3.3.8. CfH (insoluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona; Fase orgánica del sistema de solventes (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 1:3:1:5 v/v/v/v)

La fracción CfH, fue estudiada por cromatografía flash,[250] para ello se realizó el análisis por CCF empleando el sistema de solventes conformado por CH_2Cl_2-MeOH donde se determinó que la relación de volúmenes de (8:2; v/v) representó la mejor separación de los componente de interés, ya que los mismos presentaron Rf de 0,1 y 0,2 lo que implica un ΔCV=5 que en cromatografía flash es útil para la separación de los componentes involucrados. Así, se sembró 550,8 mg de la fracción en un cartucho de silica gel y utilizó una elución por gradiente, de acuerdo a la siguiente: 5% de CH_2Cl_2 (1 CV); de 5→30% de CH_2Cl_2 (10 CV), manteniéndose de manera isocrática en 30% por 5,2 CV. El flujo de la fase móvil fue de 25 mL/min y se obtuvieron 82 fracciones (7 mL; c/u); mientras que la detección fue a 280 y 360 nm (Fig., 7.21).

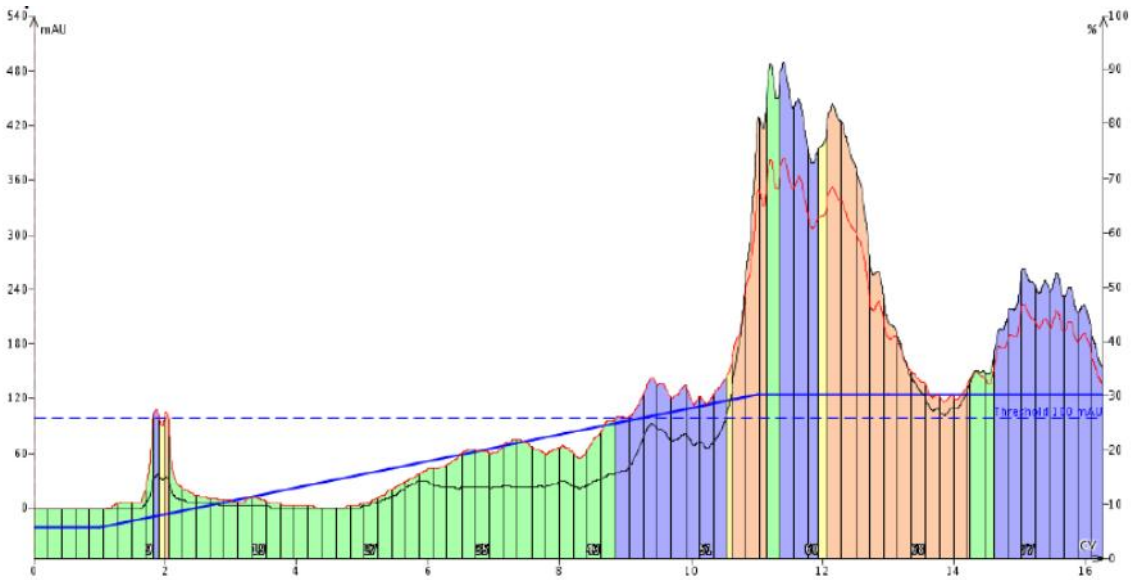


Figura 7.21. Cromatograma de la elución de la fracción **CfH**, con el sistema de solventes CH_2Cl_2-MeOH (5:95 → 30:70; v/v).

Las primeras 30 fracciones fueron analizadas por CCF utilizando el sistema de solventes AN-6, y las fracciones restantes con AN-2. Cada una de las placas cromatográficas fue revelada con AS y fueron agrupadas de acuerdo al perfil

cromatográfico común. Las fracciones más representativas fueron las uniones 55-58 y 72-82, dichas uniones presentaron restos terpenoidales por lo que fueron lavadas con Et_2O, demonimadas CfH-1 y CfH-2 respectivamente.

7.3.3.9. Hidrólisis y fraccionamiento del extracto metanólico de *Cassia fruticosa* Mill., colectada en un período de sequía.

Con la hidrólisis ácida de los extractos metanólicos (provenientes de ramas (CfRS) y hojas (CfS) colectadas en un período de sequía) se obtuvo el mismo perfil cromatográfico de las fracciones CfRS-B y CfSB obtenidas por solubilidad en MeOH-H_2O y acetona (esquema 6.5, pág., 121). Sin embargo, no se incrementó la cantidad de agliconas presente en CfR-B y CfB (tabla 7.7), colectadas en período lluvioso, donde la fase orgánica remanente de las extracciones básicas correspondió a un alto porcentaje del extracto original.

Tabla 7.7. Extracciones ácido-base de *C. fruticosa* Mill., colectada en un período de sequía, de la fracción B (insoluble en MeOH-H_2O (1:1; v/v); soluble en acetona) y de la hidrólisis del extracto metanólico.

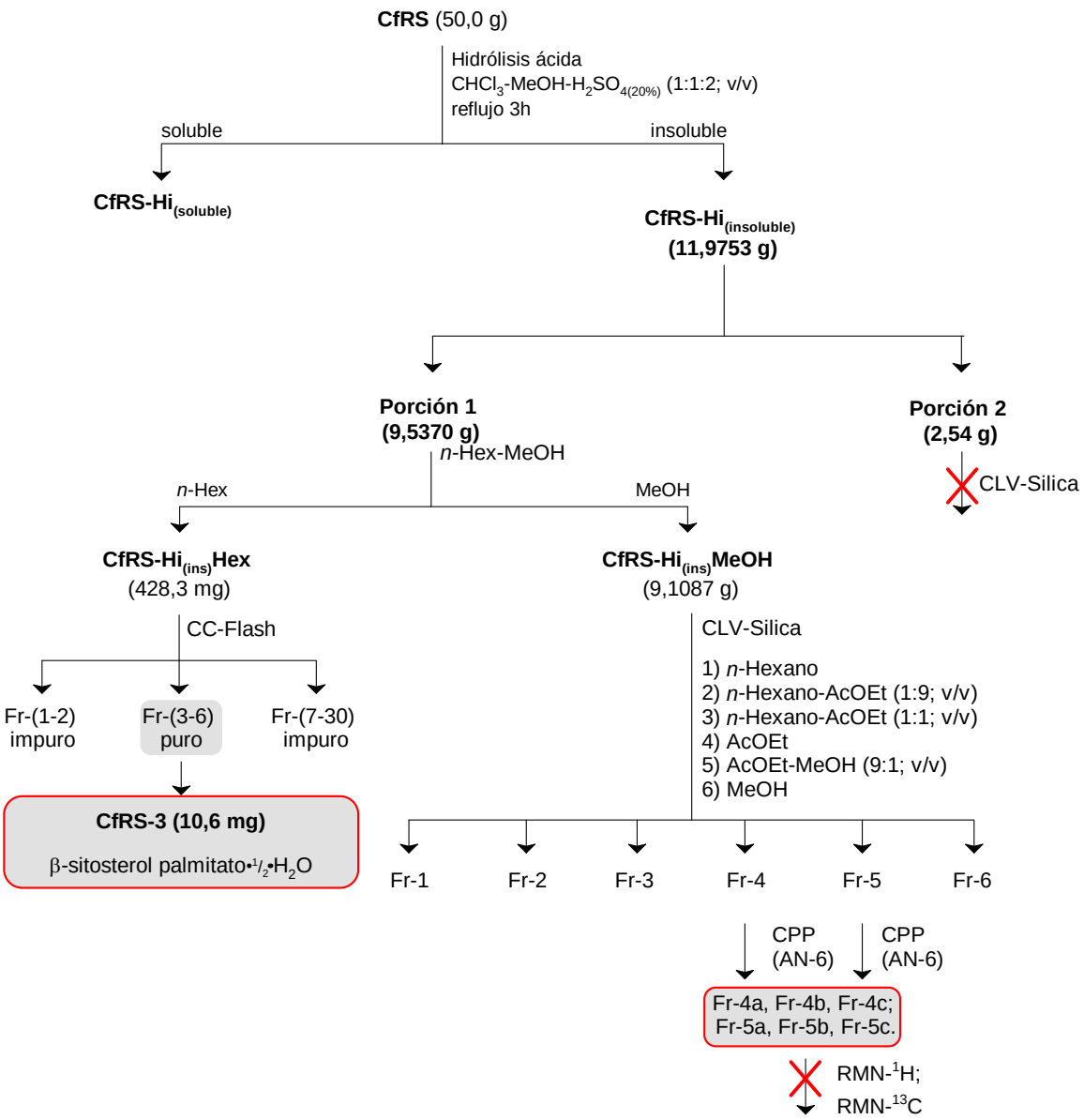
Fracción	Peso (g)	Precipitado (g)	Extracciones con soluciones básicas al 5%			$F_{Org.}$ (g)
			$NaHCO_3$ (g)	Na_2CO_3 (g)	NaOH (g)	
CfSB	39,78	NA	0,3830	0,2928	0,2395	>25
$CfS_{(hidólisis)}$	39,61	NA	0,1790	0,0412	0,0524	>30
CfRS-B	5,39	NA	0,0889	0,3268	0,3607	1,25
$CfRS_{(hidólisis)}$	50,0[a]	11,9753	0,2347[b] +0,0636[c]	0,5737[b] +0,1854[c,d]	0,3624[b] +0,1884[e]	10,18

a) pasta higroscópica; b) sólido obtenido al acidificar (pH 2-3) la fase acuosa de la extracción básica correspondiente; c) sólido aceitoso obtenido por extracción con CH_2Cl_2 de la fase acuosa acidificada a pH 2-3; d) el tratamiento con MeOH produjo un sólido blanco en forma de agujas (85,5 mg) y un aceite amarillo (17,8 mg); e) sólido blanco en forma de agujas, insoluble en MeOH.

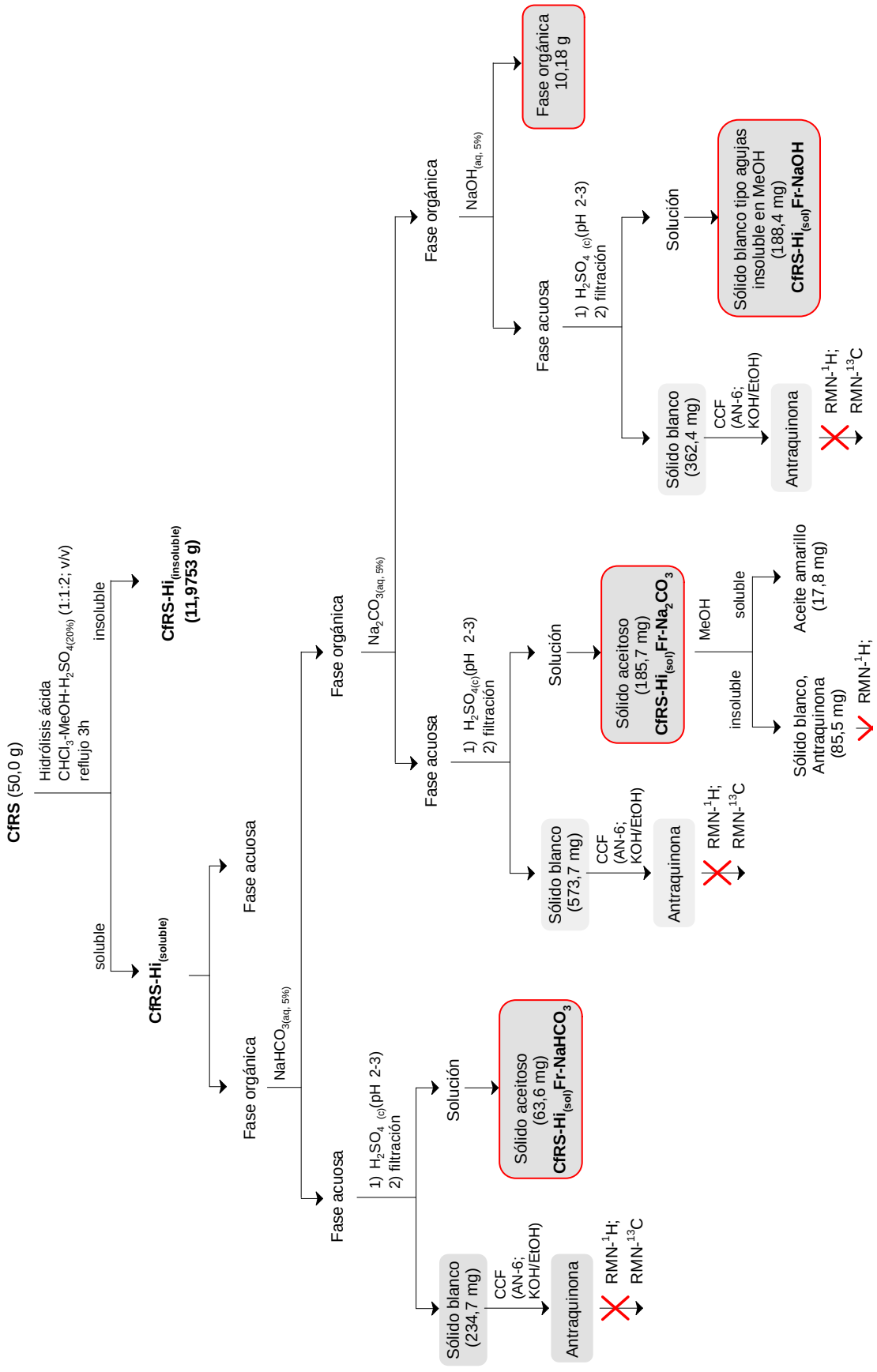
Por otra parte, las hidrólisis de los extractos metanólicos de las ramas recolectadas en un período de sequía (noviembre, CfRS) o en un período lluvioso (junio, CfR) presentaron un comportamiento similar, es decir, tampoco se obtuvo

un incremento en la cantidad de agliconas extraíbles por bases inorgánicas. Sin embargo, durante la hidrólisis ácida del extracto metanólico de CfRS se obtuvo un precipitado abundante (CfRS-$Hi_{insoluble}$) y una solución clorofórmica (CfRS-$Hi_{soluble}$) que fue sometida a extracciones sucesivas con soluciones acuosas al 5% de $NaHCO_{3(ac)}$, $Na_2CO_{3(ac)}$ y $NaOH_{(ac)}$ quedando una fase orgánica remanente (CfRS-$Hi_{(sol)}$-F_{Org}) que, al igual que el precipitado, representó un alto porcentaje del extracto metanólico inicial (tabla 7.7, esquema 7,11).

La fracción CfRS-NaOH (362,4 mg) se sometió a purificación por CC^{250} y se aislaron dos sólidos amarillos denominados CfRS-1 y CfRS-2 de características antraquinónicas cuyos valores de Rf en AN-6 son: 0,75 y 0,79 respectivamente. Sin embargo, por RMN-^{1}H se observaron sólo tres señales y en RMN-^{13}C no se observó señal alguna aun cuando se utilizó 25 mg de muestra y un tiempo de acumulación de señales de 24 a 48 h, por lo que dichos componentes no fueron identificados estructuralmente.



Esquema 7.11. Hidrólisis ácida del extracto metanólico de las ramas de *C. fruticosa* Mill., colectadas en un período seco: Aislamiento de CfRS-3, β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O. [250] (*continúa*)



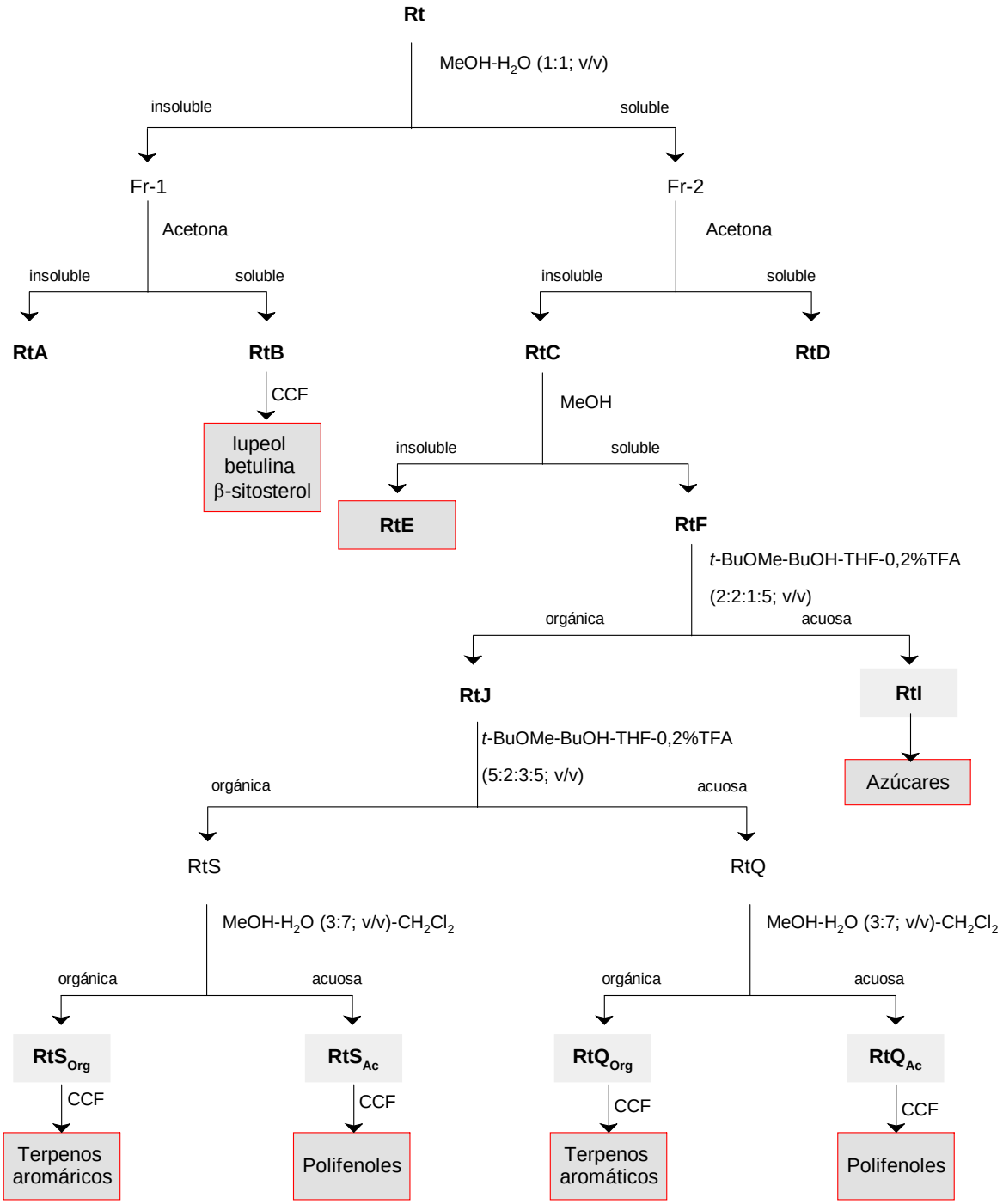
Esquema 7.11. *continuación*

Una porción (2,54 g) de la fracción CfRS-Hi fue tratada por CC-silica eluida con mezclas de polaridad creciente de CH_2Cl_2-MeOH y se observó que la muestra contenía metabolitos poco polares como componentes minoritarios. De modo que, la segunda porción de CfRS-Hi (9,5370 g) fue particionada con MeOH-Hex, para ello se disolvió en MeOH (50 mL) y se extrajo repetidamente con *n*-hexano (5x 25 mL). Asi se obtuvo las fracciones de *n*-hexano (CfRS-Hi-Hex; 428,3 mg) y MeOH (CfRS-Hi-MeOH; 9,1087 g).

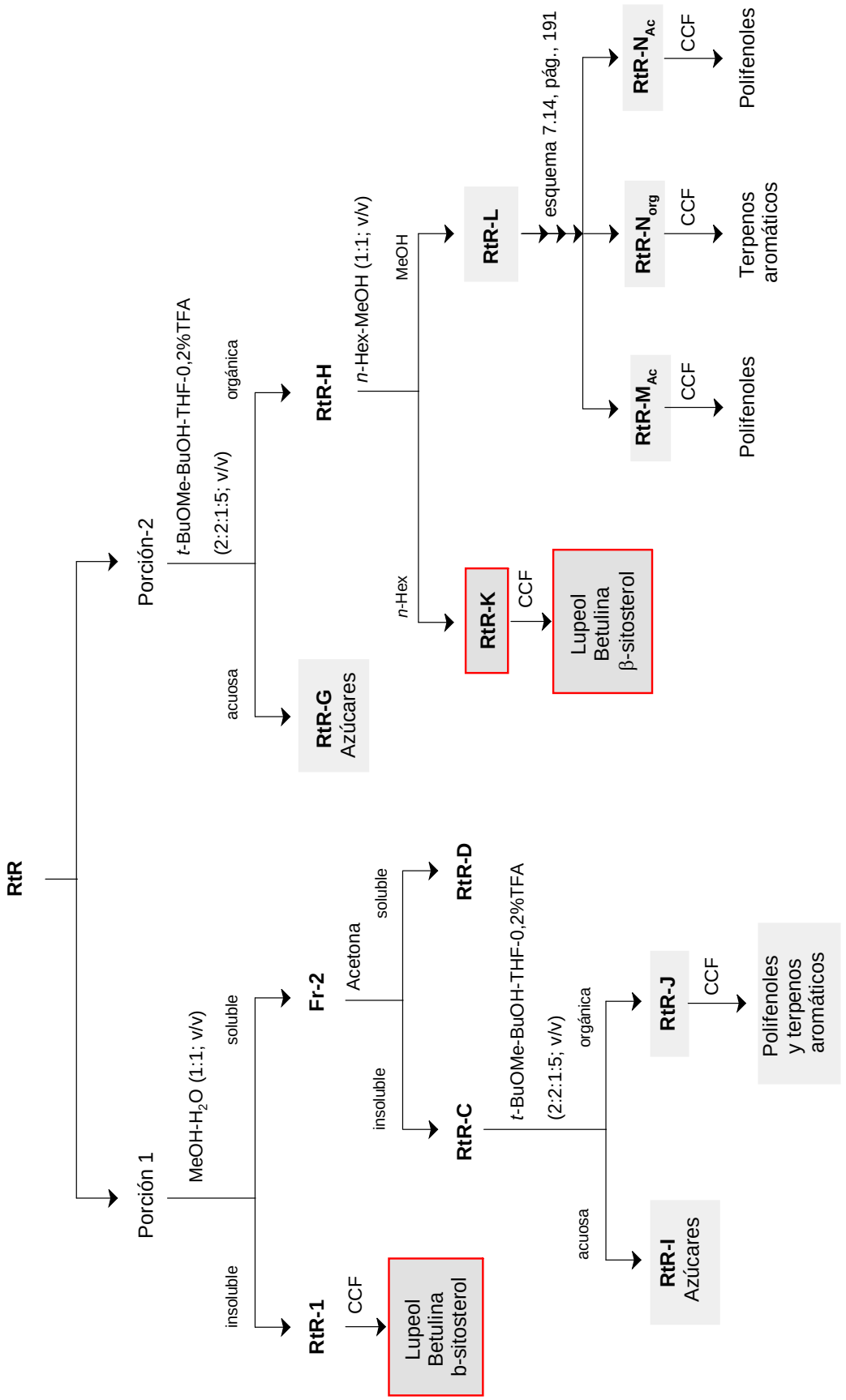
La fracción CfRS-$Hi_{(ins)}$-Hex (428,3 mg) fue estudiada por cromatografía flash[250] utilizando el equipo Isolera One®, para ello se realizó el análisis por CCF empleando el sistema de elución conformado por tolueno-AcOEt, y se determinó el gradiente óptimo fue el siguiente: 1% tolueno (1 VC); de 1→14% de tolueno (10 CV), manteniéndose de manera isocrática en 14% por 2 CV. El flujo de la fase móvil fue de 25 mL/min y se obtuvieron 66 fracciones (7 mL; c/u); mientras que la detección fue a 254 y 280 nm. Las fracciones 3-6 contuvieron un solo componente de Rf 0,79 con A-1, el cual presentó una coloración morada al ser revelado con AS y fue denominado CfRS-3, inicialmente fue identificado como un ester de ácido graso de β-sitosterol,[250] y en la presente investigación se estableció su identidad como β-sitosterol palmitato•$^1/_2$•H_2O.

Por otra parte, la fracción (CfRS-$Hi_{(ins)}$-MeOH) fue fraccionada por CLV con mezclas de *n*-Hex-AcOEt-MeOH de polaridad creciente y se obtuvieron 6 fracciones, donde las fracciones 4 y la 5 presentaron al menos tres manchas comunes de características antraquinónicas, las cuales se purificaron por separado empleando placas preparativas. Sin embargo, por RMH-^{1}H se obtuvieron señales en común con los sólidos CfRS-1 y CfRS-2, mientras que, por RMN-^{13}C no se obtuvo señal alguna para caracterizar dichos componentes.

7.3.5. *Ruellia tuberosa* L. (raíces y partes aéreas)



Esquema 7.12. Resumen general del fraccionamiento realizado para las partes aéreas de *R. tuberosa* L.



Esquema 7.13. Resumen general del fraccionamiento realizado para las raíces de *R. tuberosa* L.

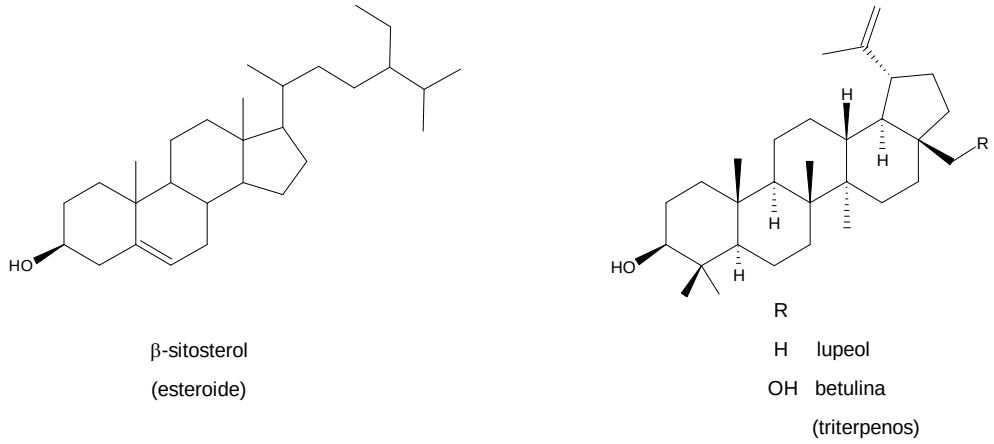


Figura 7.22. Metabolitos identificados en la especie *R. tuberosa* L.

Utilizando los resultados cromatográficos por HSCCC para RtR-C y RtC (Figs., 7.23, A-19 y A-20), se desarrollo un esquema de fraccionamiento para cada parte de la planta (esquemas 7.12 y 7.13), logrando separar fracciones de composición terpenoidal alifática, terpenoidal aromática, polifenoles y glicósidos. La composición terpenoidal alifática estuvo conformada por: lupeol, betulina y β-sitosterol.

7.3.5.1. RtB (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona)

La fracción RtB, fue una pasta de color verde oscuro (rica en clorofilas) que presentó un comportamiento por CCF similar a RtR-1 y RtR-K (esquema 7.12), donde los componentes mayoritarios fueron lupeol, β-sitosterol y betulina, respectivamente.

7.3.5.2. RtR-C y RtC (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona)

Sabiendo que las fracciones RtR-C y RtC, estaban conformadas básicamente por los mismos metabolitos azúcares, terpenos aromáticos y

polifenoles en diferentes proporciones (Fig., 7.23; Anexo; secciones A-5.1 y A-5.3), se desarrollo un esquema de fraccionamiento para cada parte una de ellas (esquemas 7.12 y 7.13).

Inicialmente, el contenido glicosídico fue eliminado con la partición en el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA (2:2:1:5; v/v/v/v) ya que todos los metabolitos secundarios presente en la planta *R. tuberosa* L., tanto en el extracto metanólico como en las fracciones C, poseen un coeficiente de distribución favorecido hacia la fase orgánica, mientras que el contenido glicosídico permaneció en la fase acuosa. Otra forma en que se eliminó el contenido glicosídico fue por tratamiento con MeOH de la fracción RtC, donde se produjo un sólido y una pasta higroscópica demoninados RtE y RtF, respectivamente (esquema 7.12).

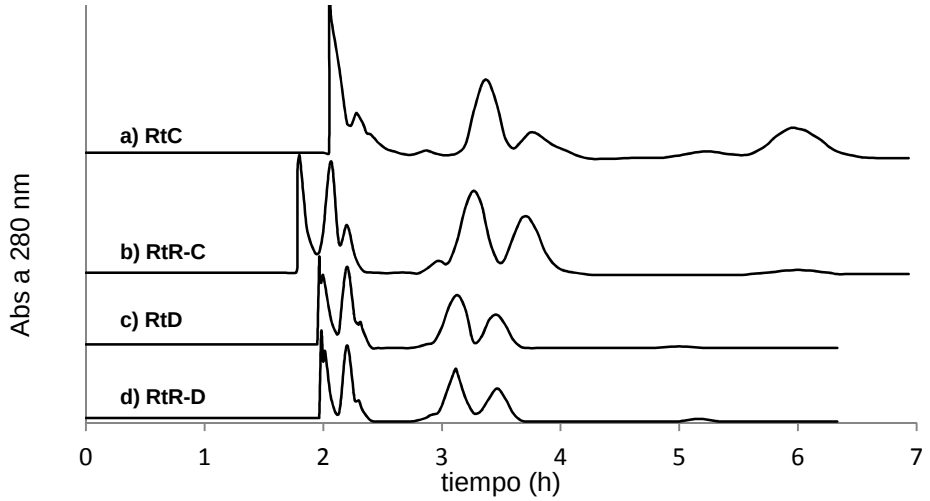


Figura 7.23. Cromatogramas a escala analítica de las fracciones C y D provenientes de las raíces y partes aéreas de *R. tuberosa* L. Condiciones experimentales: Sistema de solventes: AcOEt-EtOH-0,2% TFA (5:1:5; v/v/v); FE: fase orgánica; FM: fase acuosa; velocidad de revolución 800 rpm; detección a 280 nm; **a**) RtC: 70 mg; *F*= 1,3 mL/min; %FE= 52%; **b**) RtR-C: 165 mg; *F*= 1,2 mL/min; %FE= 59%; **c**) RtD: 70 mg; *F*= 1,7 mL/min; %FE= 50%; **d**) RtR-D: 47 mg; *F*= 1,5 mL/min; %FE= 47%.

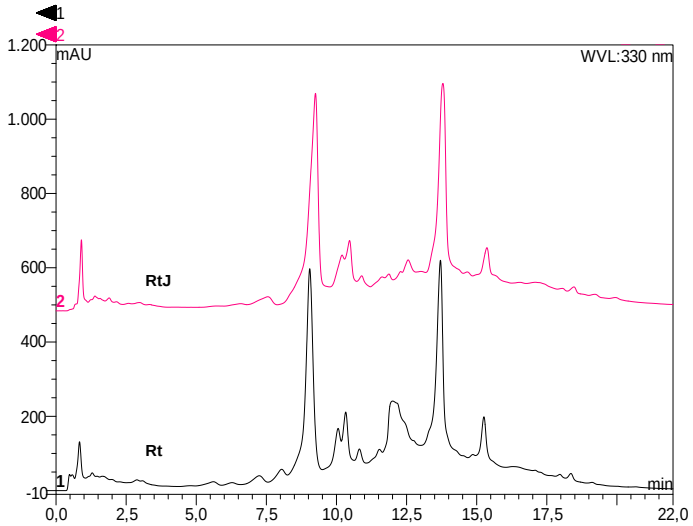


Figura 7.24. Cromatograma HPLC de las fracciones Rt y RtJ (esquema 7.12, pág., 184): HPLC-Sistema-1, λ = 330 nm.

La fracción RtF (esquema 7.12, pág., 184) fue particionada con el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA (2:2:1:5; v/v/v/v) donde la fase orgánica denominada RtJ presentó el mismo patrón cromatográfico por HPLC que el extracto metanólico Rt (Fig., 7.24), es decir el fraccionamiento de Rt hasta la obtención de RtJ fue eficiente para obtener una fracción enriquecida en los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico Rt. Además, se eliminó el contenido glicosídico presente en Rt.

7.3.5.3. RtR-D y RtD (insoluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona)

Se determinó por HSCCC que el contenido de metabolitos secundarios presente en las fracciones RtR-D y RtD son prácticamente idénticos con las fracciones RtR-C y RtC respectivamente (Figura 7.23). Por lo que, se estudió el fraccionamiento de las mismas a partir de las fracciones RtR-C y RtC debido a que se contó con mayor cantidad de material para realizar el fraccionamiento mostrado en los esquemas 7.12 y 7.13.

En el estudio de las partes aéreas de *R. tuberosa* L., el contenido glicosídico fue eliminado en dos pasos consecutivos a partir de la fracción RtC. En el primero, la fracción fue lavada con MeOH, donde el resto insoluble fue un sólido blanco-opaco soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos como: *n*-Hexano, CH_2Cl_2, $CHCl_3$, AcOEt, Acetona, MeOH, EtOH. Dichas características confirmaron la presencia de componentes glicosidicos y se identificó como RtE. Por otra parte, la porción soluble en metanol fue rotulada como RtF. El segundo procedimiento, se realizó por partición de la fracción RtF con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5 v/v/v/v), donde la fase acuosa fue una pasta higroscópica rica en azúcares la cual fue rotulada como RtI, mientras que la fase orgánica fue rotulada como RtJ, esquema 7.12. La fracción RtJ fue rica en metabolitos secundarios polares cuyo comportamiento por CCF fue comparable al obtenido con RtD (esquema 7.12). Adicionalmente, presentó un comportamiento cromatográfico similar por HPLC al extracto metanólico Rt como se discutio anteriormente, figura 7.24.

Por otra parte, el fraccionamiento de RtJ fue monitoreado por CCF y HPLC. Inicialmente, las fracciones RtS y RtQ presentan ligeras diferencias en cuanto al numero de picos obtenidos por HPLC (Fig., 7.25), mientras que por CCF se observó que la fracción RtS presentó mayor porcentaje de manchas terpenoidales que RtQ. El tratamiento de partición en el sistema MeOH-H_2O-CH_2Cl_2 (3:7:10; v/v/v) de ambas fracciones fue útil para obtener fracciones enriquecidas en: terpenos aromáticos (RtS_{org}, RtQ_{org}) y polifenoles (RtS_{ac}, RtQ_{ac}). las características terpenoidales y polifenólicas fueron determinadas por CCF usando el reactivo de anisaldehido.

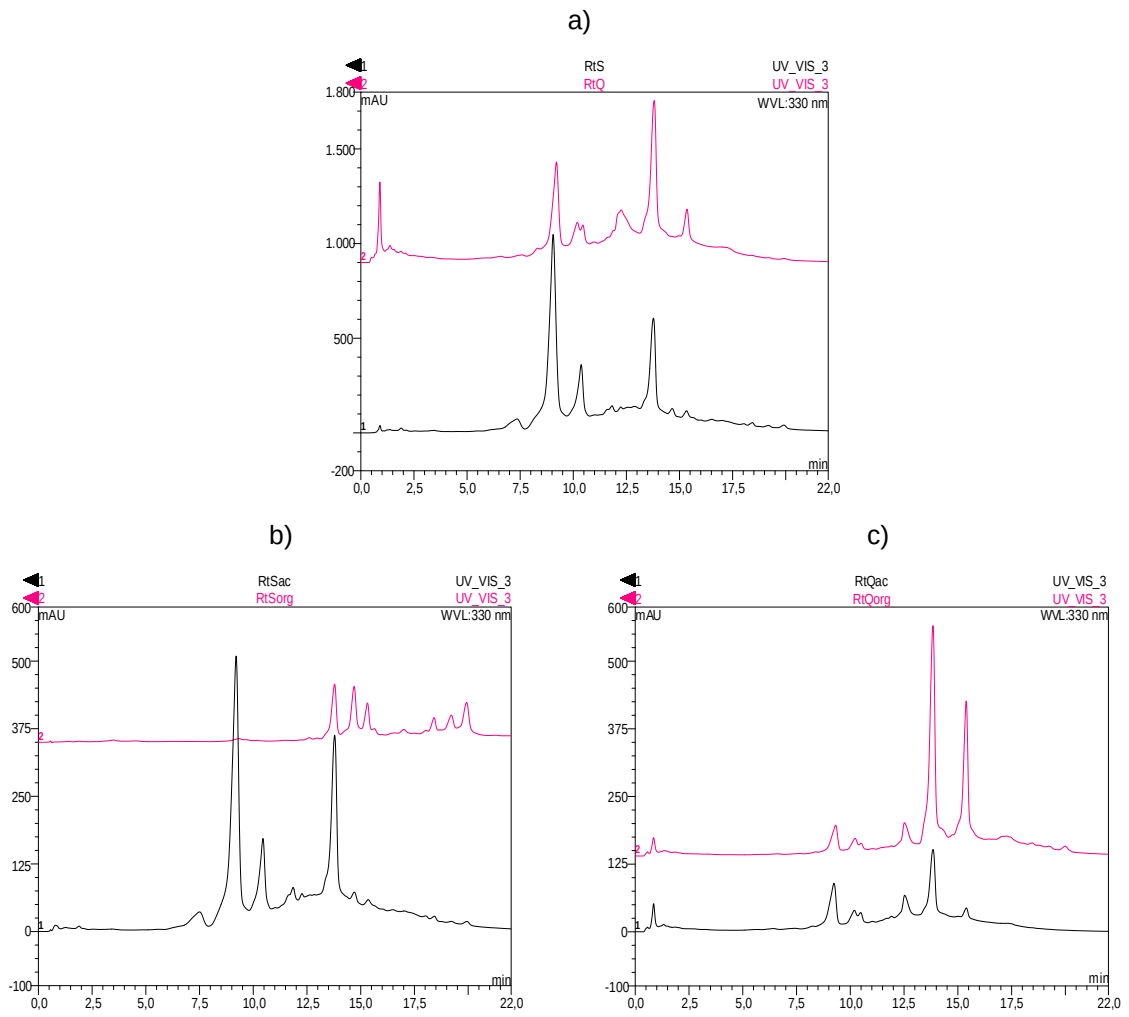


Figura 7.25. Cromatograma por HPLC-sistema-1 de fracciones provenientes de las partes aéreas de *R. tuberosa* L. (esquema 7.12, pág., 184), λ= 330 nm: a) RtS, RtQ; b) RtS_{ac}, RtS_{org}; c) RtQ_{ac}, RtQ_{org}.

7.3.5.4. RtR-J (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona; *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5 v/v/v/v, (fase orgánica))

Analogamente al fraccionamiento de RtJ (parte aérea) a partir de RtF se realizó la partición de la fracción RtR-C (raices) con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5 v/v/v/v), donde la fase acuosa fue una pasta higroscópica rica en azúcares la cual fue rotulada como RtR-I, mientras que la fase orgánica fue rotulada como RtRJ, esquema 7.13. La

fracción RtR-J fue rica en metabolitos secundarios polares cuyo comportamiento por CCF fue comparable al obtenido con RtR-D (esquema 7.13).

La obtención de la fracción RtR-J (sección 7.3.5.5, pág. 190) condujo al fraccionamiento directo del extracto metanólico de las raíces (RtR), con lo cual se obtuvo la eliminación del contenido glicosídico en un sólo procedimiento a través de la partición con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5 v/v/v/v), donde la fase acuosa fue una pasta higroscópica rica en azúcares la cual fue rotulada como RtR-G, mientras que la fase orgánica fue rotulada como RtR-H, enriquecida en metabolitos secundarios polares y no polares, esquema 7.13.

7.3.5.5. RtR-K (Ext.$_{MeOH}$ RtR; *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA; 2:2:1:5 v/v/v/v (fase orgánica); *n*-Hex-MeOH, 1:1; v/v (fase *n*-hexano)

El fraccionamiento de RtR-H en metabolitos polares y no polares se realizó de acuerdo al procedimiento previamente aplicado para OpB (sección 7.3.1.2, págs., 146-148). Así, la fase de *n*-hexano produjo una fraccción rica en metabolitos no polares, rotulada como RtR-K, la cual estuvo conformada principalmente por lupeol, β-sitosterol y betulina, esquema 7.13. Por otra parte, la fase metanólica fue rotulada como RtR-L y fue rica en metabolitos polares (mayormente terpenos aromáticos y polifenoles).

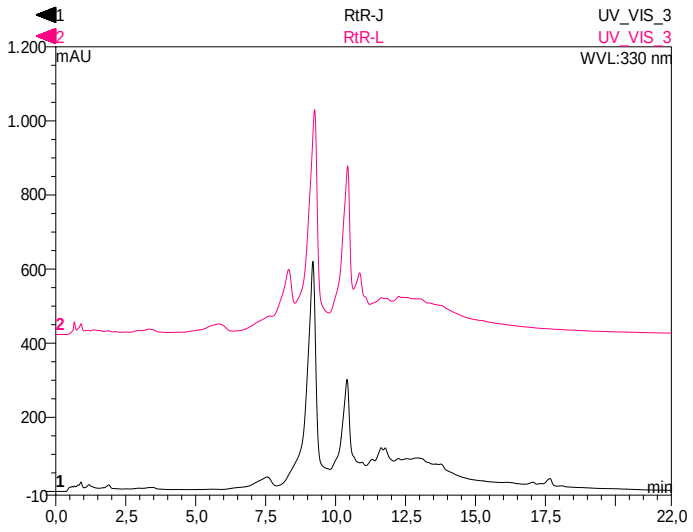
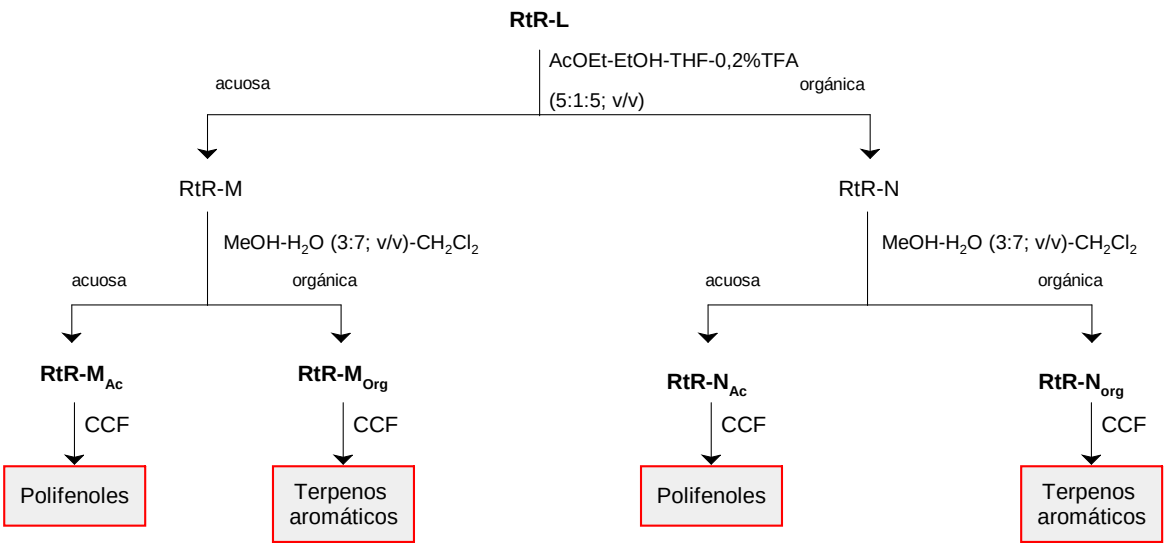


Figura 7.26. Cromatograma HPLC de las fracciones RtR-J y RtR-L (esquema 7.13, pág., 185): HPLC-Sistema-1, λ = 330 nm

7.3.5.6. RtR-L (Ext.$_{MeOH}$ RtR; *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA, 2:2:1:5 v/v/v/v (fase orgánica); *n*-Hex-MeOH, 1:1; v/v (fase metanol)

La fracción RtR-L (esquemas 7.13 y 7.14) presentó básicamente la misma composición que la fracción RtR-J (sección 7.3.5.4, esquema 7.13, Fig., 7.26) por lo que se utilizó para obtener una separación preliminar entre los metabolitos terpenoidales aromáticos y los polifenoles (esquema 7.14), se realizó de forma análoga al fraccionamiento de RtJ anteriormente descrito. Lo cual produjo fracciones enriquecidas en: terpenos aromáticos (RtR-M_{org}, RtR-N_{org}) y polifenoles (RtR-M_{ac}, RtR-N_{ac}). Las fracciones terpenoidales aromáticas representaron el 1,4 y 6,8 % respecto de las fracciones RtR-M y RtR-N respectivamente. Mientras que, las fracciones polifenólicas (RtR-M_{ac}, RtR-N_{ac}) representaron el 91,3 y 93,2 % respecto de sus fracciones de origen. Adicionalmente, presentaron ligeras diferencias por HPLC (Fig., 7.27).



Esquema 7.14. Fraccionamiento de RtR-L proveniente de las raices de *R. tuberosa* L., para obtener fracciones enriquecidas en metabolitos polares (terpenos aromáticos y flavonoides).

Durante el fraccionamiento para las partes aéreas de *R. tuberosa* L., se obtuvieron fracciones conformadas por: clorofila y terpenoides alifáticos (RtB); terpenoides aromáticos (RtQ_{org}, RtS_{org}), polifenoles (RtQ_{ac}, RtS_{ac}) y glicosidos (RtE, RtI).

Mientras que en el fraccionamiento de las raíces de *R. tuberosa* L., se obtuvieron fracciones conformadas por: terpenoides alifáticos (RtR-1, RtR-K); terpenoides aromáticos y polifenoles (RtR-J); terpenoides aromáticos ($RtR\text{-}M_{org}$, $RtR\text{-}N_{org}$), polifenoles ($RtR\text{-}M_{ac}$, $RtR\text{-}N_{ac}$) y glicosidos (RtR-I, RtR-G).

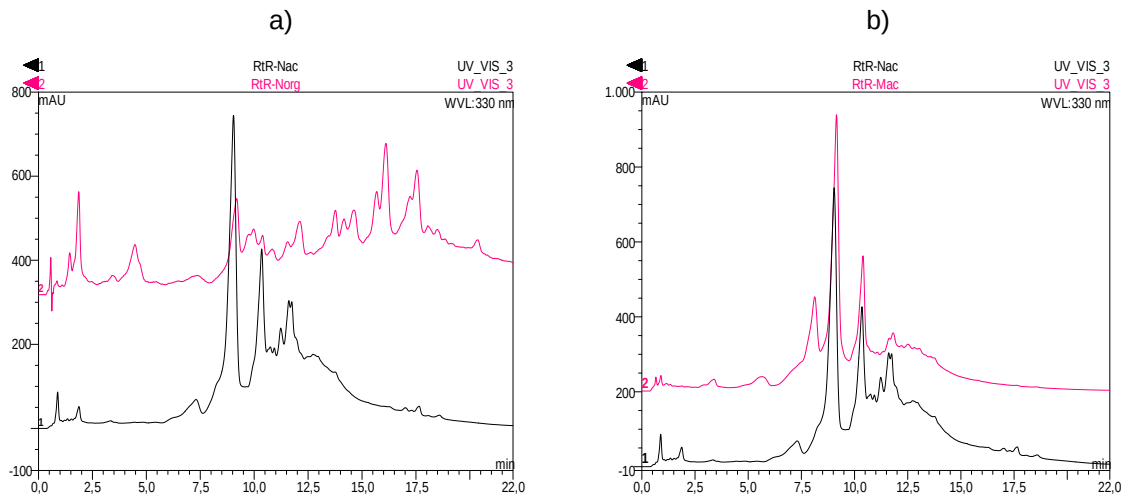


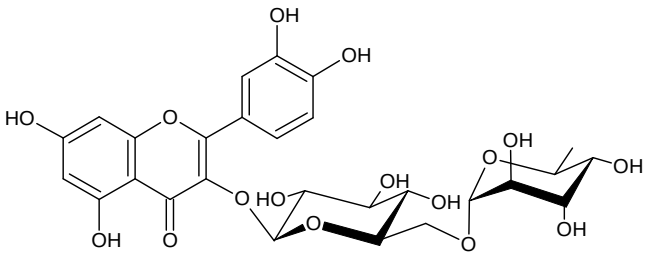
Figura 7.27. Cromatograma por HPLC-sistema-1 de fracciones provenientes de las raices de *R. tuberosa* L. (esquema 7.13, pág., 185), λ= 330 nm:a) RtR-N_{ac}, RtR-N_{org}; b) RtR-M_{ac}, RtR-N_{ac}.

7.4. Resultados fitoquímicos: Caracterización de los metabolitos aislados

En la presente investigación, los productos aislados son presentados con las enumeraciones relacionadas a sus datos espectroscópicos, el porcentaje de extracción (%Ext) referente al material vegetal. Adicionalmente, se muestran las siglas con las cuales son identificados, la fórmula molecular condensada, el peso molecular asociado a la misma, el punto de fusión experimental y/o el número de registro CAS (por sus siglas en Inglés, "*Chemical Abstracts Service*"). Mientras que, las fracciones enriquecidas con algún metabolito, se muestra la masa obtenida, el factor de retención del metabolito mayoritario, el solvente de elución y el %Ext respecto del material vegetal.

7.4.1. *Ouratea polyantha* Engl.

7.4.1.1. Caracterización de OpA-3: Quercetin 3-*O*-rutinósido (Rutina)



OpA-3

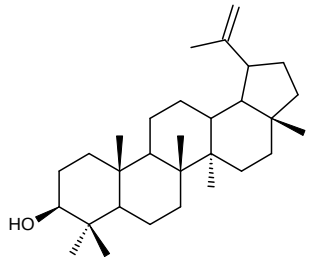
$C_{27}H_{30}O_{16}$: 610,40 g/mol

Rf: 0,38 (L-1); 0,40 (F-1)

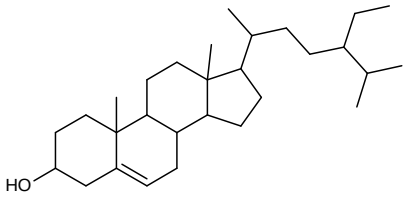
[CAS] 153-18-4

OpA-3 fue aislado como un sólido amarillo el cual fue identificado como rutina por su espectro de masas (espectro 4) y por CCF comparativo, utilizando un patrón puro, con los sistemas de elución L-1 y F-1. Para los ensayos biológicos, se purificó una muestra comercial de rutina por recristalización en MeOH-H_2O.[251]

7.4.1.2. Caracterización de OpB-FrCHCl$_3$: Lupeol, -sitosterol



Lupeol



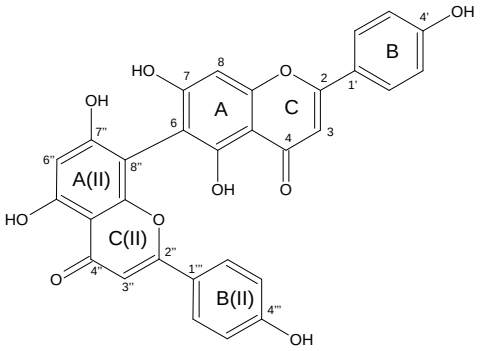
β-Sitosterol

OpB-FrCHCl$_3$

237,33 mg (**0,014 %**)

La fracción OpB-FrCHCl$_3$ fue obtenida como un sólido amarillo enriquecido con el triterpeno lupeol y el esteroide β-sitosterol, los cuales fueron identificados por CCF comparativo con muestras auténticas, utilizando la mezcla AN-6. Para los ensayos biológicos, se purificó una muestra comercial del esteroide antes mencionado por recristalización de acetona.[252]

7.4.1.3. Caracterización de OpB-1=OpB-M1=OpD-5: 6→8″-biapigenina (Agathisflavona)



OpB-M1=OpD-5

$C_{30}H_{18}O_{10}$: 538,46 g/mol

57,00 mg (**0,0012 %**)

100,12 mg (**0,0075 %**)

Rf: 0,68 (AN-2)

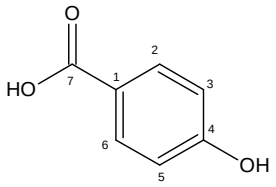
[CAS] 28441-98-7

OpD-5 (57,00 mg) y OpB-M1 (100,12 mg) fueron obtenidos como un sólido amarillo e identificado como la biflavona 6→8″-biapigenina, también conocida como agathisflavona,[9,253] para ello se analizarón los espectros de masas (espectro 1) y protones (tabla 7.8 y espectros 6-7). La fórmula molecular fue establecida como $C_{30}H_{18}O_{10}$ a través de su espectro de masas de alta resolución (*m/z* 537,2813 $[M-H]^+$ y 1075,5173 $[2M-H]^+$).

Tabla 7.8. Desplazamientos químicos para agathisflavona en DMSO-d_6.

H	RMN-^{1}H δ (ppm)[9]	RMN-^{1}H δ (ppm)[253]	RMN-^{1}H experimental		
			δ (ppm)	multiplicidad	*J* (Hz)
3	6,88 (*s*)	6,86 (*s*)	6,86	*s*	---
3-CII	6,79 (*s*)	6,78 (*s*)	6,77	*s*	---
5	13,32 (*s*)	-	13,31	*s*	---
5-AII	13,06 (*s*)	-	13,05	*s*	---
6″-AII	6,38 (*s*)	6,37 (*s*)	6,35	*s*	---
8	6,70 (*s*)	6,72 (*s*)	6,70	*s*	---
2′	8,01 (*d*)	8,00 (*d*)	7,99	*d*	8,85
2′-BII	7,58 (*d*)	7,56 (*d*)	7,56	*d*	8,85
3′	6,97 (*d*)	6,97 (*d*)	6,95	*d*	8,8
3′-BII	6,77 (*d*)	6,76 (*d*)	6,75	*d*	8,85
5′	6,97 (*d*)	6,97 (*d*)	6,95	*d*	8,8
5′-BII	6,77 (*d*)	6,76 (*d*)	6,75	*d*	8,85
6′	8,01 (*d*)	8,00 (*d*)	7,99	*d*	8,85
6′-BII	7,58 (*d*)	7,56 (*d*)	7,56	*d*	8,85

7.4.1.4. Caracterización de OpD-10: Ácido 4-hidroxibenzóico



OpD-10

$C_7H_6O_3$: 138,12 g/mol

2,21 mg (**0,00046 %**)

[CAS] 99-96-7

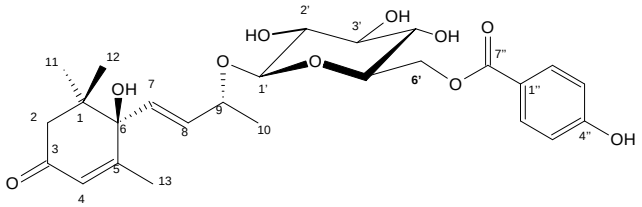
El compuesto denominado OpD-10 fue aislado como un sólido blanco e identificado como el ácido 4-hidroxibenzóico, (tabla 7.9, espectro 9). El espectro de RMN-^{1}H (espectro 8), presentó señales correspondientes a un núcleo aromático con patrón de sustitución 1,4-. A 7,86 ppm se observa un doblete con una constante de acoplamiento de 9,23 Hz, que integra para dos protones asignados a H-2 y H-6, mientras que en 6,81 ppm se observa un doblete con una constante de 9,23 Hz asignado a los protones H-3 y H-5.

Tabla 7.9. Desplazamientos químicos observados en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C (CD_3OD) para OpD-10 (ácido 4-hidroxibenzóico).

Átomo C/H N°	RMN-^{13}C[a]		RMN-^{1}H		
	δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	multiplicidad	*J* (Hz)
1	121,22	C			
2	114,69	CH	7,86	*d*	9,23
3	131,66	CH	6,81	*d*	9,23
4	161,58	C			
5	131,66	CH	6,81	*d*	9,23
6	114,69	CH	7,86	*d*	9,23

[a] El carbono C-7 no se observó en el espectro 10.

7.4.1.5. Caracterización de OpD-9: (6*R*,9*S*)-6′-(4′′-hidroxibenzoil)-Roseosido



OpD-9

$C_{26}H_{34}O_{10}$: 506,88 g/mol

4,91 mg (**0,0010 %**)

[CAS] **Compuesto nuevo**

El compuesto denominado OpD-9, fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo oscuro (soluble en Acetona, MeOH, DMSO), que al ser revelado en CCF con SC mostró una coloración violeta, característica de un núcleo terpenoidal.

Las bandas de absorción en los espectros de UV-Vis ($\lambda_{máx}$= 229 nm) e IR ($\upsilon_{máx}$= 1652,6 cm^{-1}) indican la presencia de una cetona α,β-insaturada (espectros 11 y 12, respectivamente). La fórmula molecular fue establecida como $C_{26}H_{34}O_{10}$ a partir de su espectro de masas de baja resolución con la técnica de “turbo-spray ionization” (*m/z* 529,40 $[M+Na]^+$ y 1035,40 $[2M-H+Na]^+$), (espectros 13 y 14). El espectro de RMN-^{1}H (espectro 15) presenta el mismo patrón de sustitución observado para el compuesto OpD-10. Adicionalmente, se observan señales a

campo medio y alto que confirman el núcleo terpenoidal. En el espectro de RMN-^{13}C se observan señales típicas de compuestos hidroxilados (características de restos glicosídicos), además de las señales atribuibles al resto del ácido 4-hidroxibenzóico. Debido a los antecedentes fitoquímicos del género *Ouratea*, se limitó la búsqueda a esqueletos del tipo norsesquiterpenos.

Los norsesquiterpenos, tipo megasestigmano (vomifoliol[19, 28, 254] y roseósido[6e, 28, 254], figura 7.28), han sido previamente aislados del género *Ouratea*. La comparación de los espectros de RMN-^{1}H de vomifoliol, roseósido y el compuesto OpD-9 se presenta en la tabla 7.8, mientras que, los desplazamientos químicos en una dimensión (RMN-^{1}H y RMN-^{13}C, espectros 15-21) y sus correlaciones en dos dimensiones (COSY, HMQC, HMBC y NOESY, espectros 24-37) se muestran en la tabla 7.10 y serán discutidos con detalle más adelante.

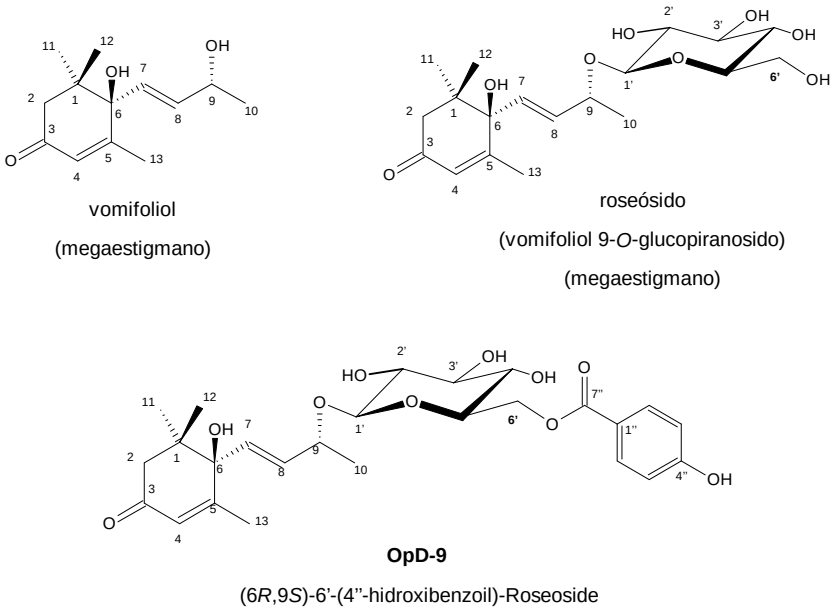


Figura 7.28. Estructuras de vomifoliol,[19,28,254] roseósido[6e,28,254] y (6*R*,9*S*)-6′-(4′′-hidroxibenzoil)-roseósido.

Tabla 7.10. Desplazamientos químicos de protones para los megastigmanos vomifoliol, roseósido y OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido].

N°	Vomifoliol δ_H (ppm),	Roseosido δ_H (ppm), *J* (Hz)		OpD-9, δ_H (ppm), *J* (Hz).	
	J (Hz) en $CDCl_3$[a]	DMSO-d_6[a]	CD_3OD[b]	CD_3OD (270 MHz)	CD_3OD (500 MHz)
2	2,45 *d*(17,0)	2,54 *d*(16,6)	2,63 *d*(16,8)	2,45 *d*(16,8)	2,44 *d*(16,9)
	2,24 *d*(17,0)	2,05 *d*(16,6)	2,19 *d*(17,2)	2,15 *d*(16,8)	2,15 *d*(16,9)
4	5,90 *s*	5,76 s_{ancho}	5,68 *s*	5,85 *s*	5,85 *s*
7	5,79 *d*	5,94 *d*(15,5)	6,00 *d*(15,8)	5,74 *d*(16,1)	5,76 *d*(15,6)
8	5,88 *dd*(15,7; 5,8)	5,64 *dd*(15,5; 6,4)	5,76 *dd*(15,9; 7,3)		5,69 *dd*(15,6; 6,8)
9	4,41 *dq* (6,4; 5,8)	4,43 *dq*(6,4; 6,5)	4,56 *dd*(6,6; 4,3)	4,33-4,41 *m*	4,39 *dq*(14,9; 6,7)
10	1,30 *d*(6,4)	1,19 *d*(6,5)	1,29 *d*(6,26)	1,25 *d*(6,3)	1,25 *d*(6,4)
11	1,08	0,93 *s*	1,04 *s*	0,94 *s*	0,94 *s*
12	1,00	0,92 *s*	1,01 *s*	1,00 *s*	1,00 *s*
13	1,90 *d*(1,3)	1,82 *d*(1,1)	1,93 *d*(1,0)	1,91 *d*(1,3)	1,91 *d*(0,95)
6-OH		4,80 *s*	4,90 *s*		
1′		4,09 *d*(7,8)	4,27 *d*(7,6)	4,28 *d*(7,6)	4,29 *d*(7,8)
2′		2,95	NA[c]	3,20-3,26 *m*	3,22 *dd*(16,6;8,05)
3′		3,04	NA	3,28-3,34 *m*	3,29-3,32 *m*
4′		3,01	NA	3,34-3,38 *m*	3,36 *dd*(9,5;8,75)
5′		2,93	NA	3,40-3,46 *m*	3,40-3,47 *m*
6′		3,64 *m*	3,87 *m*	4,61 s_{ancho}	4,61 s_{ancho}
		3,41 *m*	3,67 *m*	4,33-4,39 *m*	4,37 *dd*(13,35; 6,7)
2″				7,87 *d*(8,91)	7,87 *d*(8,75)
3″				6,81 *d*(8,91)	6,82 *d*(8,75)
5″				6,81 *d*(8,91)	6,82 *d*(8,75)
6″				7,87 *d*(8,91)	7,87 *d*(8,75)

[a] 600 MHz referencia 254; [b] 270 MHz referencia 6e; [c] NA no asignadas.

Tabla 7.11. Desplazamientos químicos de protones y carbono y correlaciones H-H y H-C para OpD-9.

H/C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	DEPT[a]	HMQC	HMBC	COSY	NOESY
1		40,93	C		H-11; H-12		
2	2,44	49,28	CH_2	H-2	H-11; H-12	H′-2	H′-2;H-11;H-7
	2,15			H′-2		H-2	H-2;H-11;H-12
3		199,93	C				
4	5,85	125,70	CH	H-4	H-10	H-13	H-13
5		165,53	C		H-10		
6		78,46	C		H-10;H-11;H-12;H-13		
7	5,76	132,44	CH	H-7			H-2; H-12
8	5,69	132,25	CH	H-8	H-10	H-9	H-2; H-10
9	4,39	73,49	CH	H-9	H-10; H-1′	H-8; H-10	H-10; H-2′
10	1,25	20,78	CH_3	H-10	H-8	H-9	H-8; H-9
11	0,94	23,31	CH_3	H-11	C-1; C-2; C-6; C-12		H-2; H′-2
12	1,00	22,03	CH_3	H-12	C-1; C-2; C-6; C-11		H′-2; H-7
13	1,91	18,21	CH_3	H-13	C-4; C-5; C-6	H-4	H-4
1′	4,29	99,79	CH	H-1′	C-9; H-10	H-2′	H-5′
2′	3,22	73,49	CH	H-2′	C-4′	H-1′; H-3′	H-9; H-10
3′	3,29-3,32	76,81	CH	H-3′		H-2′	H-5′;H-3″;H-5″
4′	3,36	70,59	CH	H-4′	H-2′	H-5′	
5′	3,40-3,47	74,18	CH	H-5′	H′-6′	H-3′;H-6′; H′-6′	H-3′
6′	4,61	63,53	CH_2	H-6′	C-5′; C7″	H′-6′	H′-6′;H-5′
	4,37			H′-6′		H-5′; H-6′	H-6′
1″		120,73	C		H-3″; H-5″		
2″	7,87	114,88	CH	H-2″	C-7″	H-3″	H-3″
3″	6,81	131,42	CH	H-3″	C-1′	H-2″	H-3′;H-2″
4″		162,22	C				
5″	6,81	131,42	CH	H-5″	C-7″	H-6″	H-3′;H-6″
6″	7,87	114,88	CH	H-6″	C-1′	H-5″	H-5″
7″		166,58	C		H-2″; H-6′; H-6″		

[a] tomado a 270 MHz, todos los demás a 500 MHz.

En las figuras 7.29 y 7.30 se muestran las correlaciones más importantes observadas en los espectros de dos dimensiones homo y heteronucleares para el compuesto OpD-9.

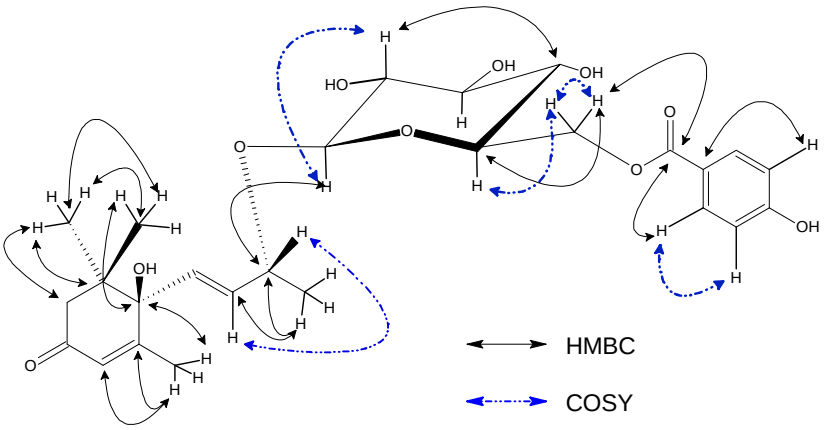


Figura 7.29. Correlaciones homonucleares (**COSY**) y heteronucleares (**HMBC**) para el compuesto OpD-9.

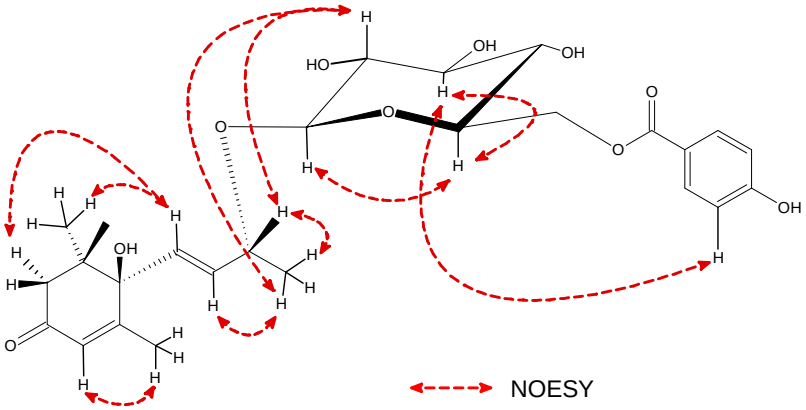


Figura 7.30. Correlaciones homonucleares (**NOESY**) para el compuesto OpD-9.

El espectro de UV-Vis presentó dos máximos de absorción, uno en 229 nm y otro en 298 nm que indican la presencia de un carbonilo α,β-insaturado y un anillo aromático, espectro 11. Con el espectro al IR (espectro 12), las bandas observadas sugieren la presencia de grupos hidroxílos (banda ancha en 3410,5 cm^{-1}); éster conjugado (bandas agudas en 1692; 1277,5 y 1067,6 cm^{-1}); carbonilo α,β-insaturado (banda aguda en 1652,6 cm^{-1}) y una olefina *trans* (banda aguda en 1589,2 cm^{-1}).

En el espectro de masas se observa una señal en 529,40 uma, correspondiente al ión molecular más sodio $[M+Na]^+$ además del ión en1035,40 uma, correspondiente al doble de la masa del ión molecular menos hidrógeno más sodio, $[2M+Na]^+$, y su respectiva fragmentación en 779,50 uma. Éste hecho, indica que la masa molecular del componente OpD-9 es 506,88, calculada para $C_{26}H_{34}O_{10}$ $[M]^+$ en 506,542 (espectros 13-14 y figura 7.31).

La figura 7.24 se muestran los procesos de fragmentación para el compuesto OpD-9. Adicionalmente, se resaltan los fragmentos que corresponden a los picos más abundantes observados en el espectro de masas, obtenidos a través de diversos procesos de deshidratación, fragmentación de azúcares, fragmentación de alquenos y rearreglos de McLafferty para ésteres (espectro 14).

El espectro de RMN-^{1}H mostró señales típicas para 2 subunidades; el megastigmano, roseósido y la subunidad 4-hidroxibenzoil.

La subunidad 4-hidroxibenzoil se compone de dos dobletes a 7,87 y 6,81 ppm que integran para dos protones c/u con una constante de acoplamiento orto (*J*= 8,75 Hz) asignada al patrón AA′BB′ formado por los protones H-2″ y H-6″ y H3″, H5″ de la subunidad antes mencionada (tabla 7.10 espectros 12 y 28). Dicho acoplamiento también fue observado en el espectro de COSY (espectro 28).

La presencia del carbonilo bencílico tipo ester fue observada como una señal en RMN-^{13}C a 165,58 ppm (C-7″), la cual mostró interacción por HMBC con las señales en 7,87 ppm (H-2″) y 4,37 ppm (H′-6′), (tabla 7.10, espectros 24 y 25) indicando que la unión del resto carboxílico con el glicósido es a través de un enlace tipo éster con el oxígeno sobre el metileno (C-6′) de la piranosa. Por NOESY se observó la interacción espacial de los protones con desplazamientos químicos en 6,81 y 3,29-3,32 ppm asignadas a H-5″ y H-3′, respectivamente (tabla 7.10 espectro 31).

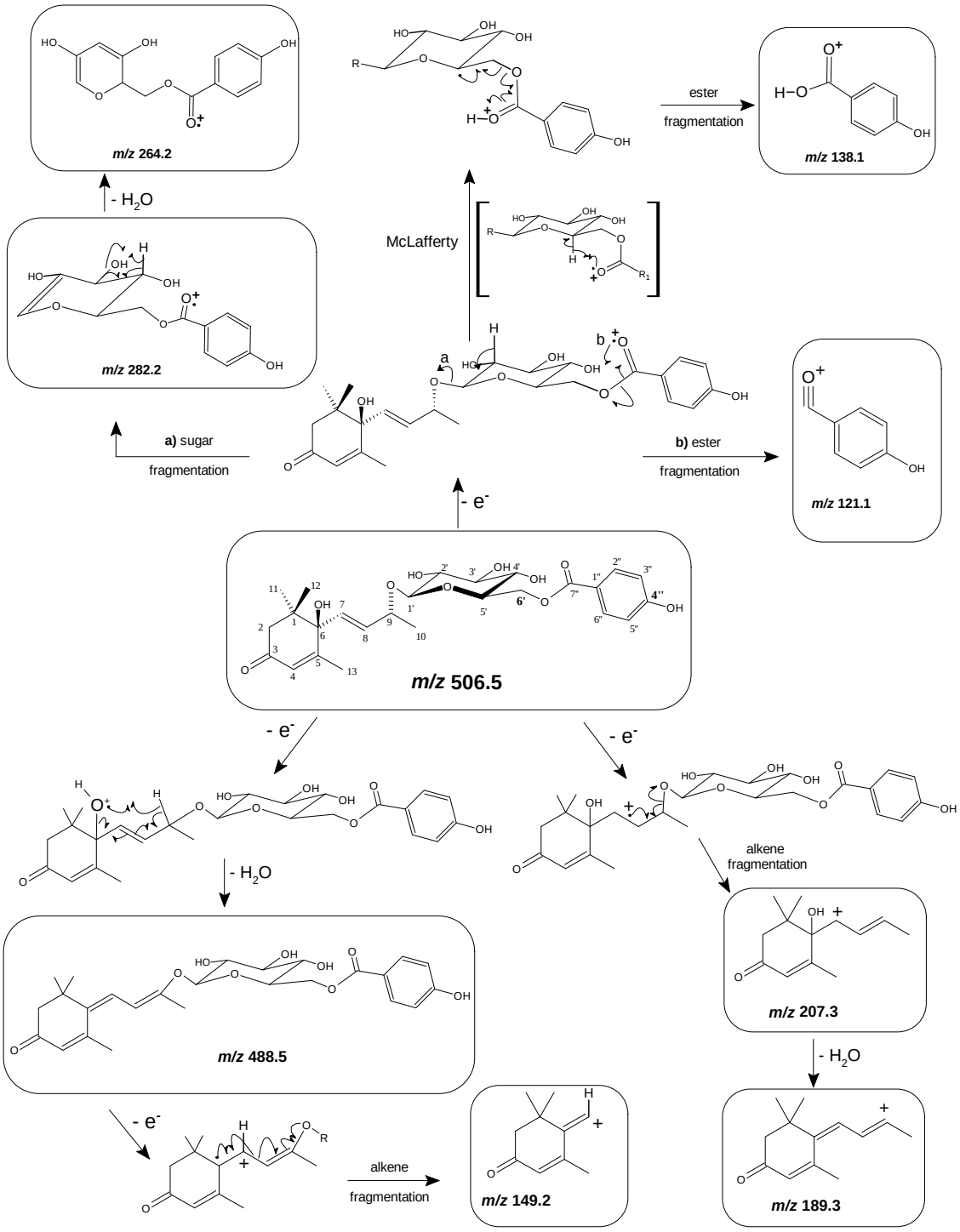


Figura 7.31. Fragmentación propuesta para el compuesto OpD-9, (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido.

La subunidad roseósido fue asignada analizando el siguiente grupo de señales: a 2,15 y 2,44 ppm se observan dos dobletes con constantes de acoplamiento de 16,9 Hz asignados a los protones metilenicos alfa al grupo carbonilo (H-2 y H′-2). Se observa también a 5,85 ppm un singlete asignado al protón H-4, perteneciente al metino alfa al carbono cetónico α,β-insaturado.

A campo medio se observan tres juegos de señales, acopladas entre si, que completan al sistema correspondiente a la subunidad de roseósido. Es así como a 5,76 ppm se observa un doblete con constante de 15,6 Hz que se encuentra acoplado con un doblete de dobletes en 5,69 ppm asignados a los protones H-7 y H-8, respectivamente. La señal correspondiente a H-8 se encuentra acoplada también con un doblete de cuartetos en 4,39 ppm asignado al protón en H-9 (tabla 7,12, espectros 13 y 15).

La presencia de metilos geminales con desplazamientos químicos en RMN-^{1}H de 0,94 y 1,00 ppm, fue determinada por HMBC ya que produjeron las mismas correlaciones, además de correlacionarse entre sí (espectros 24 y 26). La diferencia en los desplazamientos químicos de los protones en los metilos geminales, está fundamentada en el efecto anisotrópico ejercido por la olefina de los carbonos 7 y 8, sobre H-11. Éste hecho también puede ser utilizado para explicar el por qué, en NOESY, el protón H-7 presenta interacciones homonucleares con H-2 y H-12 (tabla 7.11, espectro 33).

Los protones de los metilos 10 y 13 se observaron, también a campo alto, como un doblete, en 1,30 ppm, que integra para 3 protones con una constante de acoplamiento de 6,4 Hz asignado al metilo en 10 y un doblete, en 1,91 ppm, con una constante de 1,3 Hz, que integra para 3 protones asignado al metilo en 13 (tabla 7.10, espectro 14).

Es importante resaltar que por NOESY, la señal correspondiente a H-13 presentó una correlación con la señal en 5,85 ppm atribuida a H-4 (espectro 31),

indicando la presencia de una olefina trisustituida que en HMQC H-4 mostró correlación con C-4 en 125,70 ppm (espectro 21). Por último la señal en 199,93 ppm del espectro de C-13 es característica del carbonilo conjugado en 3, (espectros 17 y 18).

Las señales correspondientes a la unidad de glucosa fueron asignadas a través de las interacciones observadas en COSY y NOESY. El espectro de COSY mostró que H′-6′ (4,37 ppm, *dd*; 13,35; 6,7 Hz) está acoplado con las señales en 4,61 ppm (s_{ancho}) y 3,40-3,47 ppm (*m*), correspondientes a H-6′ y H-5′ respectivamente (tablas 7.10 y 7.11, espectro 29). El protón H-5′ muestra interacción, por NOESY, con H-3′ (3,29-3,32 ppm, *m*), (espectro 32). Adicionalmente, la señal en 4,29 ppm que corresponde al protón anomérico H-1′ (*d*, *J*=7,8 Hz) se acopla con H-5′ (espectro 32). La constante de acoplamiento de H-1′ indica que la configuración del azúcar es β-[255] y la interacción por NOESY de H-1′ con H-5′ y de H-5′ con H-3′ muestra que los sustituyentes de la piranosa son todos ecuatoriales, determinando así que el resto glicosídico al cual se hace referencia es β-glucosa.

La unión entre la subunidades roseósido y 4-hidroxibenzoil fue determinada de la siguiente manera:

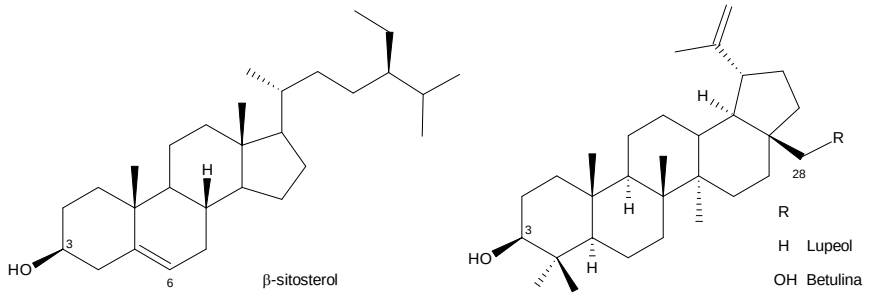
El singlete ancho en 4,61 correspondiente a uno de los protones metilénicos H-6 de la unidad de glucosa, mostraba correlación con el carbono C-5′ y con el carbonilo C-7″ del grupo 4-hidroxibenzoil por HMBC (tabla 7.10, espectros 28 y 29). Adicionalmente, el protón correspondiente al carbono anomérico H-1′ mostró correlación por HMBC con C-9, indicando que la unión del resto glicosídico al núcleo terpenoidal es a través del metino denominado C-9 (espectro 26). Se observó también, la interacción entre el protón H-2′ del glúcido con los protones H-9 y el metilo en 10. Adicionalmente, se observa la correlación espacial entre los protones H-1′—H-5′ y entre H-5′—H-3′ de la glucosa.

Todas las asignaciones fueron corroboradas por los espectros de HMBC, HMQC y NOESY (tabla 7.11; espectros 20-26, 31-33).

La Figura 7.28 muestra un resumen de las diferentes correlaciones homonucleares (COSY) y heteronucleares (HMBC) que permitieron corroborar la presencia de las dos subunidades antes mencionadas y su conexión estructural. La Figura 7.29 muestra el resumen de las diferentes interacciones encontradas, se observa con la interacción espacial entre el protón H-7 y los protones del metilo H-12 y uno de los protones del metileno H-2 (Fig. 7.29, espectro 33).

7.4.2. Capraria biflora *L.*

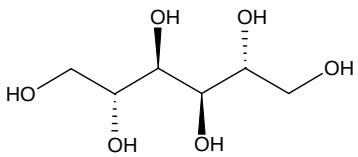
7.4.2.1. Caracterización de CbI-FrCHCl$_3$: -sitosterol, lupeol y betulina



CbI-FrCHCl$_3$
1385,22 mg
(**0,53 %**)

La fracción CbI-FrCHCl$_3$ fue aislada como un sólido amarillo enriquecido en el esteroide β-sitosterol y los triterpenos lupeol y betulina. Los tres compuestos fueron identificados por CCF comparativo con muestras auténticas con Rf de 0,38; 0,53 y 0,31 respectivamente, utilizando la mezcla AN-6. Para los ensayos biológicos, el lupeol y el β-sitosterol se purificaron a partir de muestras comerciales por recristalización en etanol[256] y acetona,[252] respectivamente. Mientras que betulina fue utilizada de un patrón comercial de 98% de pureza.

7.4.2.2. Caracterización de CbE=CbM-2: manitol



CbE=CbM-2

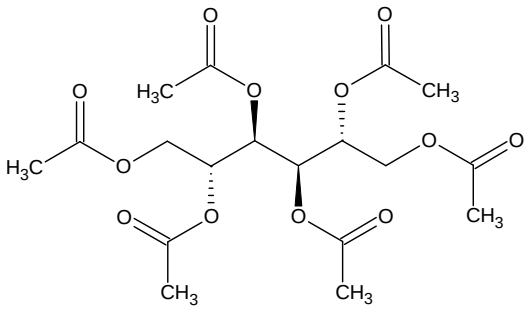
$C_6H_{14}O_8$: 182,17 g/mol

Pf_{exp}: 169-171 °C

[CAS] 69-65-8

El compuesto denominado CbM-2, fue aislado como un sólido blanco, soluble en H_2O e insoluble en los solventes orgánicos: *n*-hexano, CH_2Cl_2, $CHCl_3$, Et_2O, AcOEt, Acetona, MeOH, EtOH. Por recristalización en MeOH se obtuvieron agujas translucidas de Pf_{exp} 169-171 °C (Pf_{rep} 169-171 °C).[257] Se caracterizó a través de la formación del derivado poliacetilado denominado CbM-2Ac y ambos fueron sometidos a bioensayos.

7.4.2.2.1. Semisíntesis y caracterización de hexaacetilmanitol



CbM-2Ac

$C_{18}H_{26}O_{12}$: 434,39 g/mol

Pf_{exp}: 129-130 °C

%Rend: 95 %

[CAS] 5346-76-9

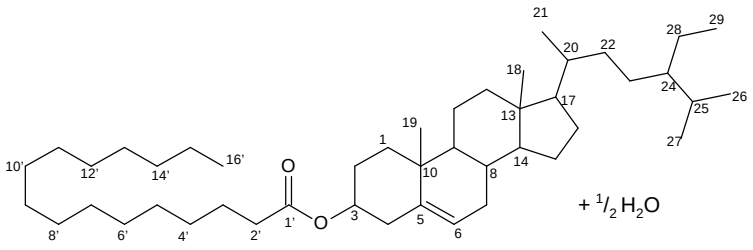
De acuerdo con la metodología reportada en la literatura[258] se utilizó CbM-2 (56,7 mg; 31,6 mmol; 1 eq), py (2 mL; 24,8 mmol; 0,8 eq) y Ac_2O (3 mL; 31,7 mmol; 1 eq). El crudo de reacción se obtuvo por evaporación del solvente y se recristalizó de Et_2O, lo cual produjo 128,8 mg de un sólido translucido tipo agujas de Pf_{exp} de 129-130 °C (Pf_{rep} 129-130 °C)[258,259] que representa un 95% de rendimiento.

7.4.3. *Cassia fruticosa* Mill.

7.4.3.1. Caracterización de CfRS-1 y CfRS-2

Los compuestos CfRS-1 y CfRS-2 fueron aislados como sólidos amarillos cuyos espectros de RMN-^{1}H (espectros 38 y 39, respectivamente) sólo difieren en las señales en 4,38 ppm y presentan en común las señales en 8,53; 3,34; 1,88 y 1,27 ppm adicionalmente tambien se observan las señales correspondientes al solvente de análisis MeOD-d_4 (3,30 ppm) y HOD (4,87 ppm). Los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C fueron obtenidos a 270 MHz (Espectrometro Jeol) y a 500 MHz (Espectrómetro Bruker). Sin embargo, en RMN-^{13}C no se observaron señales distintas a las asignadas al solvente de análisis en 47ppm (espectro 40). Por lo que dichos compuestos no fueron identificados.

7.4.3.2. Caracterización de CfRS-3, (-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).



CfRS-3

10,6 mg (**0,0021%**)

Pf_{exp}: 75-77 °C

Rf: 0,79 (A-1)

[CAS] ND

El compuesto denominado CfRS-3 se aisló como un sólido amorfo de color amarillo claro de Pf_{exp} 75-77 °C (Pf_{rep} 75-77 °C)[260] soluble en CH_2Cl_2 y $CHCl_3$. Al ser desarrollado por CCF con el sistema de solventes A-1 y revelado con AS se obtuvo una mancha morada (Rf 0,79), característica de núcleos terpenoidales. Adicionalmente, se observó que la mancha morada mostró una coloración azul a

365 nm, la cual es frecuentemente producida por componentes del tipo ácidos grasos.

Los ésteres de ácidos grasos con restos alquílicos del tipo esteroidal, oxantrónico y etanólico han sido previamente reportados en las especies *Cassia javanica*,[261] *C. kleinii*[85,86] y *C. fruticosa*,[77,78] respectivamente. En todos los casos reportados se utilizó la CC sobre silica gel o alumina para el aislamiento de los esteres antes mencionado. Mientras que, en la presente investigación se utilizó cromatografía flash, tal como se describió en la sección 7.3.3.9 (pág., 172).

De la especie *C. javanica*[261] se ha aislado los ésteres β-sitosterol palmitato, β-sitosterol behenato y β-sitosterol araquidato, el resto alquílico (β-sitosterol) ha sido aislado de las hojas de: *C. italica*,[262] *C. jahnii*,[263] flores de *C. nodosa*,[264] y de las semillas de *C. absus*,[265] *C. occidentalis*,[266] y *C. torosa*.[267]

En la caracterización de CfR-3 se analizaron los datos espectroscópicos de IR (espectro 41), EM (espectros 42-43), RMN-^{1}H (espectros 44-46), RMN-^{13}C (espectro 47), DEPT-135 (espectros 48-50) y HetCor (espectro 51). La comparación de los datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C para β-sitosterol, β-sitosterol miristato, β-sitosterol palmitato y el compuesto CfRS-3 se presentan en las tablas 7.12 y 7.13.

Las bandas de absorbancia observadas en el espectro de IR (espectro 41) sugieren la presencia de: grupos alifáticos (bandas intensas en 2919 y 2850 cm^{-1}); éster no conjugado (1736; 1260 y 1083 cm^{-1}), característica en esteres unidos a centros esteroidales;[268] olefina endociclica (banda ancha de poca intensidad, en 3442 cm^{-1}); grupos metílicos y metilénicos[269] (banda aguda intensa en 1463 cm^{-1}) y finalmente un grupo *iso*-propilo (–CH(CH$_3$)$_2$) (banda aguda de intensidad media en 1377cm^{-1}.

Tabla 7.12.- Desplazamientos químicos de protones para el β-sitosterol, β-sitosterol miristato, β-sitosterol palmitato y compuesto **CfRS-3**, reportados en $CDCl_3$.

H	β-sitosterol[270]		β-sitosterol miristato (DMSO-d_6) 400 MHz[271]	β-sitosterol palmitato		CfRS-3
	400 MHz	Calculado[a]		400 MHz[272] [250 MHz[273]]	Calculado[c]	δ_H (ppm)/*m*/*J*(Hz) 270 MHz
1	1,15/1,89	1,38/1,13	1,35/2,27		1,38/1,13	
2	1,85/1,56	1,56/1,31	1,95/1,78		1,66/1,41	
3	3,53	3,25	4,01	4,62[4,61]	3,99	4,57/*m*
4	2,28	2,23/1,98	1,78/1,71		2,33/2,08	
6	5,36	5,37	5,26	5,38[5,37]	5,37	5,33/s_a
7	1,53	2,04/1,79	2,14/2,18		2,04/1,79	
8	1,93	1,45	1,19		1,45	
9	0,98	1,44	1,47		1,44	
11	1,51	1,52/1,27	2,03/1,47		1,52/1,27	
12	1,19/2,03	1,56/1,31	1,21/1,95		1,56/1,31	
14	1,00	1,40	1,52		1,40	
15	1,13/1,61	1,60/1,35	1,17/1,70		1,60/1,35	
16	1,35/1,86	1,60/1,35	1,70/1,47		1,60/1,35	
17	1,10	1,47	1,43		1,47	
18	0,68	1,04	0,67	0,69	1,04	0,66/*s*
19	1,01	1,30	1,04	1,04	1,30	1,00/*s*
20	1,37	1,64	2,03		1,64	
21	0,92	0,96	0,93		0,96	
22	1,04/1,35	1,25	1,52/1,19		1,25	
23	1,20	1,25	1,27/1,78		1,25	
24	0,97	1,46	1,69		1,46	
25	1,70	1,82	1,50		1,82	
26	0,84	0,91	0,87		0,91	0,79/*d*/6,4
27	0,81	0,91	0,80		0,91	0,81/*d*/6,2
28	1,27	1,55	1,54/1,63		1,55	
29	0,85	0,90	0,82		0,90	0,91/*t*/7,7
2’			2,50/2,48	[2,26]	2,35	2,27/*d*/8,4; 2,21/*d*/9,1
3’			2,27/2,25		1,64	
4’			2,14/2,03		1,29	
5’			1,25/1,25		1,26	
6’			1,25/1,25		1,26	
7’			1,25/1,25		1,26	
8’			1,25/1,25		1,26	
9’			1,25/1,25		1,26	
10’			1,25/1,25		1,26	
11’			1,25/1,25		1,26	
12’			1,25/1,25		1,26	
13’			1,25/1,25		1,29	
14’			0,84		1,29	
15’					1,31	
16’					0,88	0,88/*m*

a) www.molbase.com, predicción calculada para el N° CAS 83-46-5 (β-sitosterol); b) en DMSO-d_6; c) www.molbase.com, predicción calculada para el N° CAS 2308-85-2 (β-sitosterol palmitato).

Tabla 7.13. Desplazamientos químicos de carbono para el β-sitosterol, β-sitosterol miristato, β-sitosterol palmitato y el compuesto **CfRS-3**, reportados en $CDCl_3$.

C	β-sitosterol		β-sitosterol miristato (DMSOd_6) 75 MHz[271]	β-sitosterol palmitato		CfRS-3	
	62,5 MHz[270]	125 MHz[274]		calculado[a]	100 MHz[272]	75MHz	DEPT
1	37,2	37,27	37,0	37,4	37,0	37,09	CH_2
2	31,6	31,62	29,70	28,4	27,8	27,90	CH_2
3	71,8	71,68	73,7	74,1	73,7	73,73	CH
4	42,5	42,29	42,2	38,5	38,2	38,25	CH_2
5	140,0	140,67	139,7	140,8	139,7	139,87	C
6	121,7	121,58	122,6	121,8	122,6	122,62	CH
7	31,8	31,86	31,9	32,0	31,9	31,98	CH_2
8	31,9	31,86	31,9	31,8	31,9	31,98	CH
9	50,1	50,14	50,0	50,8	50,0	50,15	CH
10	36,5	36,49	36,2	37,4	36,6	36,74	C
11	21,1	21,10	21,0	21,1	21,0	21,10	CH_2
12	39,7	39,76	39,7	39,8	39,8	39,70	CH_2
13	42,3	42,39	42,3	42,7	42,3	42,35	C
14	56,7	56,72	56,7	56,5	56,4	56,79	CH
15	24,3	24,26	24,3	26,3	25,3	25,14[c]	CH_2
16	28,2	28,21	28,2	25,9	28,2	28,29	CH_2
17	56,0	56,03	56,0	56,2	56,1	56,15	CH
18	11,9	11,98	12,0	12,0	11,8	11,90	CH_3
19	19,4	19,34	19,3	19,3	19,3	19,38	CH_3
20	36,1	36,10	36,6	36,1	36,2	36,22	CH
21	18,8	18,76	18,8	19,4	18,8	18,85	CH_3
22	33,9	33,91	33,9	33,9	34,0	34,05	CH_2
23	26,0	26,11	26,1	26,4	26,2	26,18	CH_2
24	45,8	45,80	45,9	46,1	45,9	45,96	CH
25	29,1	29,18	29,2	30,4	29,1	31,40	CH
26	19,8	19,78	19,8	21,0	19,8	19,85	CH_3
27	19,1	19,14	19,0	21,0	19,0	19,12	CH_3
28	23,0	23,04	23,1	23,2	23,1	23,18	CH_2
29	12,0	11,84	11,9	12,2	12,0	12,06	CH_3
1’			173,3	173,1	173,3	173,24	C
2’			38,2	34,2	34,7	34,80	CH_2
3’			34,7	25,0	25,1	24,48[c]	CH_2
4’			29,6	29,0	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
5’			29,5	29,3	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
6’			29,4	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
7’			29,3	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
8’			29,2	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
9’			29,1	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
10’			27,8	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
11’			25,1	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
12’			22,7	29,6	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
13’			21,0	29,3	29,2-29,7[b]	29,2-29,7[b]	CH_2
14’			14,1	31,9	31,9	31,98	CH_2
15’				22,7	22,7	22,74	CH_2
16’				14,1	14,1	14,14	CH_3

a) www.molbase.com, predicción calculada para el N° CAS 2308-85-2 (β-sitosterol palmitato); b) señales no asignadas; c) intercambiables entre sí.

En el espectro de masas (espectro 42) se observan señales en: 663,56 uma correspondiente al ión molecular más hidrógeno $[M+H]^+$; 685,55 uma asignada al ión molecular más sodio $[M+Na]^+$ y 413,31 uma, asociada a la fragmentación característica de núcleos correspondientes al éster esteroidal de β-sitosterol,[271] de baja intensidad (10%) debido a que proviene de la ruptura homolítica del enlace $C_{1'}$-O vecino al carbonilo del éster.

La ruptura homolítica del enlace C_3-O (anillo A) del ión radical en 663,56 uma $[M+1]^{+\bullet}$ produce una señal en 397,48 uma $[M-266]^{+\bullet}$ (espectro 42) que permite explicar el origen de la señal en 383,17 uma $[M-280]^{+\bullet}$ (espectro 43). Así, éste ión radical $[M-266]^{+\bullet}$, presenta una estructura de resonancia que facilita la pérdida del grupo metilo sobre C_{10} y de un electron para generar la señal en 383,17 uma $[M-280]^{+\bullet}$. Por otra parte, el fragmento de *m/z* 266 uma corresponde al ácido graso que contiene el compuesto CfRS-3. Sin embargo, la relación *m/z* 266 uma no se corresponde con algún ácido graso lineal saturado o insaturado producido en la naturaleza. En RMN-^{1}H (espectros 44-45) y en RMN-^{13}C (espectro 47) no se observa señal alguna para insaturaciones (olefinas o alquinos) distintas a la formada en el anillo B (C_5-C_6), por lo tanto se concluye que el resto de ácido graso es saturado lineal. En la naturaleza sólo se obtienen ácidos grasos saturados o insaturados con número par de átomos de carbono ya que biosintéticamente provienen de condensaciones sucesivas de acetato-malonato.[275]

Los ácidos grasos naturales palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) y esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$) y el compuesto sintético ácido margárico ($C_{17}H_{34}O_2$) tiene pesos moleculares 256; 284 y 270 g/mol, respectivamente. Por lo que, no se corresponden con el fragmento molecular observado de *m/z* 266 uma. Se propone así que el fragmento molecular se corresponde al ácido palmítico parcialmente hidratado ($C_{16}H_{32}O_2 \bullet {}^1/_2 \bullet H_2O$). La confirmación de que el compuesto CfRS-3 corresponde a un éster de ácido palmítico parcialmente hidratado es determinada a través del espectro de masas (espectro 42), en donde se observa las señales en 1325,90 uma $[2M+H]^{+\bullet}$ y en

1343,01 uma $[2(M-2)+Na]^{+\bullet}$. Así, la señal observada en 663,56 uma $[M+H]^{+\bullet}$ (espectro 42) corresponde entonces al β-sitosterol palmitato parcialmente hidratado cuya formula molecular es $C_{45}H_{80}O_2\bullet{}^1/_2\bullet H_2O$, dicho componente ha sido previamente aislado de la planta *Lobelia davidii* Franch.[260]

Por otra parte, la fragmentación del ión $[M+H]^+$ (espectro 43) produjo fragmentos moleculares múltiplos de 56 uma, para los cuales se propone el proceso de fragmentación descrito en la figura 7.32, en la cual se resaltan los fragmentos que corresponden a los picos más abundantes observados en el espectro de masas. El pico en 495,08 uma proviene de la fragmentación clásica para estructuras cíclicas[276a] (anillo D), en la cual inicialmente existe la pérdida de un electron ($-e^-$) seguido de una ruptura homolítica de un enlace C_{13}-C_{17} (anillo D), para generar el cation radical correspondiente a $[M-168]^{+\bullet}$. Así mismo, el pico en 551,25 uma involucra la apertura del anillo D, seguido de una ruptura homolítica de un enlace C_{20}-C_{22} de la cadena lateral para generar el catión radical correspondiente a $[M-112]^{+\bullet}$. La señal en 439,23 uma, ocurre por la apertura del anillo C, seguido de una ruptura homolítica del anillo a través de C_{12}-C_{13} para generar un catión radical, que contiene a los anillos A y B y una olefina que contiene al anillo D, éstos dos fragmentos se mantienen unidos a través de la interacción ión-dipolo inducido y forman un complejo intermediario[276b] que promueve la reducción del anillo C y por tanto la formación del catión radical triciclico $[M-224]^{+\bullet}$. La señal en 327,06 uma proviene inicialmente del rearreglo de McLafferty del éster $[M]^+$ que produce la deshidratación del β-sitosterol la cual promueve a su vez la pérdida del metilo C_{19} y finalmente a través de una reacción de retro-Diels-Alder se obtiene el fragmento molecular con 327,06 uma.

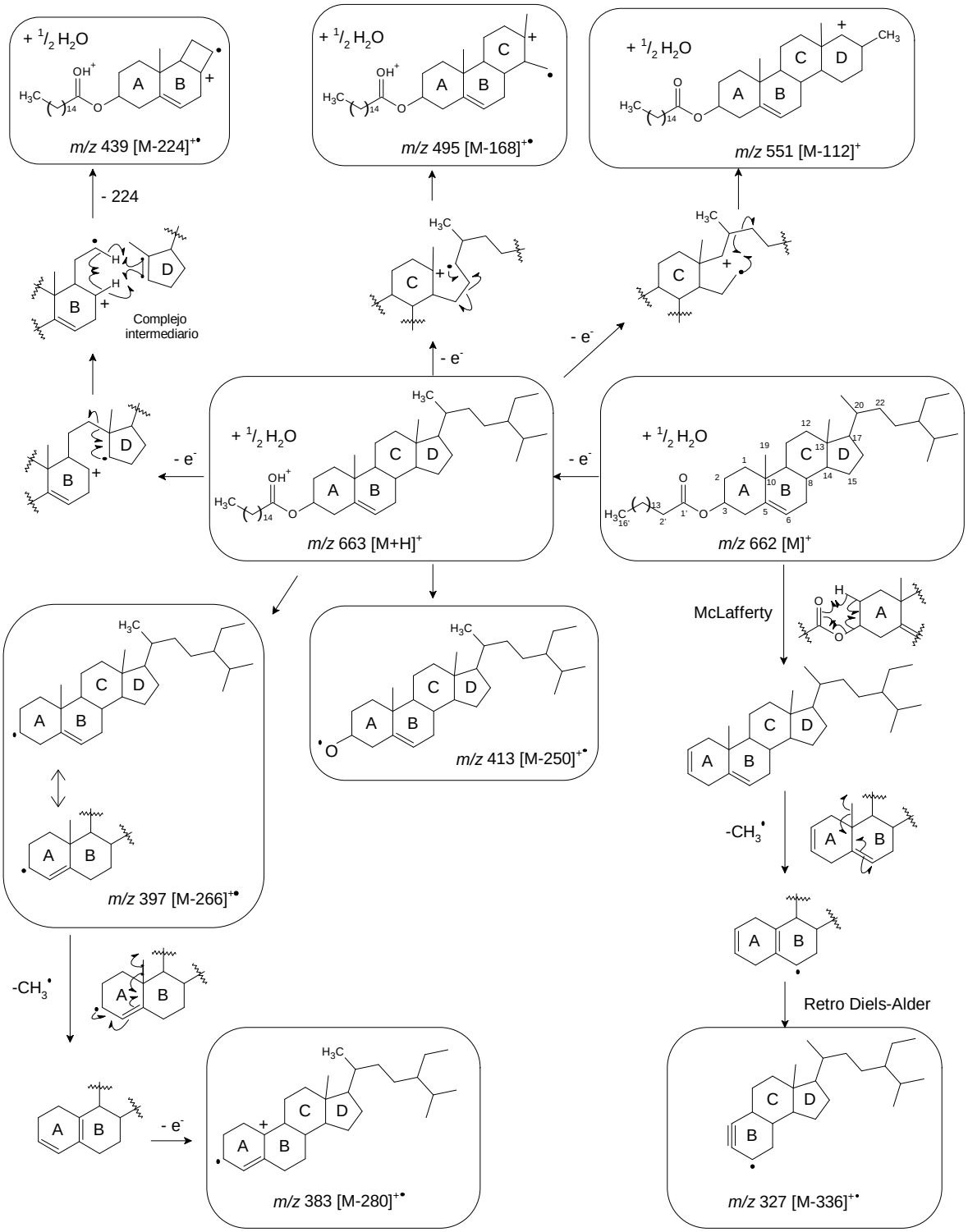


Figura 7.32.- Fragmentación propuesta para el compuesto CfR3, (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).

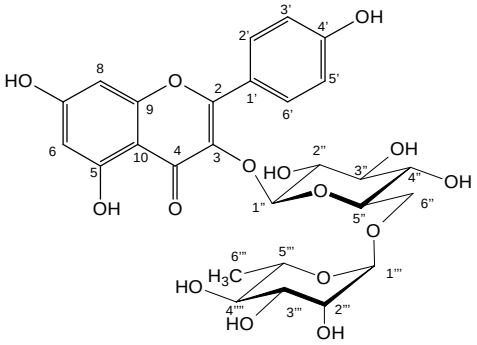
El espectro de RMN-^{1}H tomado en $CDCl_3$ (espectro 44), presenta desplazamientos químicos característicos de un núcleo esteroidal tipo β-sitosterol. En el espectro 45 se observa un singlete ancho centrado en 5,33 ppm característico de un metino, asignado a H-6, correspondiente al enlace olefínico del anillo B del núcleo esteroidal. Adicionalmente, se observa un multiplete centrado en 4,57 ppm, asignado a H-3 y dos dobletes que pertenecen al metileno del carbono C-2'. En el espectro 43 se observa nuevamente la señal del metileno en C-2' y dos singletes en 0,66 y 0,99 ppm, correspondientes a grupos metilos unidos a un ciclo asignados a H-18 y H-19, respectivamente. Asimismo, centrados en 0,79 y 0,81 ppm, se aprecian 2 dobletes con constantes de acoplamiento de *J*= 6,2 y 6,4 Hz respectivamente, característicos de los protones H-26 y H-27 (grupos metilo de un *iso*-propilo); un triplete centrado en 0,91 ppm con acoplamiento de *J*= 7,7 Hz asignado a H-29 y finalmente, un multiplete centrado en 0,88 ppm asignado al metilo terminal del sustituyente (C-16').

Es importante hacer notar que los compuestos tipo β-sitosterol presentan un multiplete centrado en 3,52 ppm asignado a H-3, cuando el sustituyente ubicado en el C-3 es un grupo hidroxilo (OH).[277] Sin embargo, en el espectro de protones esta señal está ausente y se observa un multiplete a campo bajo, centrado en 4,57 ppm que puede ser asignado a H-3, cuando el sustituyente enlazado en esta posición es el oxigeno enlazado al carbonilo de un éster alifático.[273] Adicionalmente, para este tipo de derivados de ácidos grasos, se observa un triplete centrado en 2,26 ppm con un acoplamiento de *J*= 8,4Hz asignado al α-CH_2 (H-2') enlazado directamente al grupo carbonilo.

El espectro de carbono (espectro 47) muestra señales coincidentes con las reportadas para el β-sitosterol palmitato. En 173,24 ppm se observa una señal característica de un grupo carbonilo, asignada a C-1'. Asimismo, se observan las señales asignadas a C-5 , C-6, C-3 con desplazamientos químicos de 139,86; 122,63 y 73,73 ppm, respectivamente. Adicionalmente, se observan señales entre

11 y 56 ppm asignadas a través del espectro DEPT-135 (espectros 48-50) por comparación con la data reportada para β-sitosterol palmitato.[272] Por otra parte, las señales de protones de los grupos metilos se asignaron por medio del espectro de HetCOR (espectro 51).

7.4.3.3. Caracterización de CfH-1: Kaempferol 3-*O*-rutinósido, (Nicotiflorin)



CfH-1

$C_{27}H_{30}O_{15}$: 594,40 g/mol

20,76 mg (**0,037%**)

Pf_{exp}: (165-167) °C

Rf: 0,26 (AN-2)

[CAS] 17650-84-9

El compuesto denominado CfH-1 fue aislado como un sólido de color marrón de Pf_{exp} (165-167) °C (Pf_{rep} 168-170; 190-192 °C),[278a-c] soluble en MeOH e insoluble en Et_2O. Al ser desarrollado por CCF con el sistema de solventes AN-2 y revelado con AS, se obtuvo una mancha amarilla en el visible y verde brillante bajo la luz de 365 nm. Dichas caraterísticas se corresponden con un núcleo flavonoidal.[279]

En la caracterización de CfH-1 se analizaron los datos espectroscópicos de EM (espectros 52-53), RMN-^{1}H (espectros 54-57), RMN-^{13}C (espectro 58-62), DEPT-135 (espectros 63-64), HMQC (espectros 65-66), HMBC (espectros 67-72) y COSY (espectros 73-75). En el espectro de RMN-^{1}H se observan señales atribuibles a núcleos aromáticos (espectros 55, 56) y restos hidroxilados (espectro 57). Adicionalmente, en el espectro de RMN-^{13}C se observan múltiples señales entre 60 y 80 ppm (espectro 62) típicas de compuestos hidroxilados (características de restos glicosídicos). Debido a las características

cromatográficas, espectroscópicas y a los antecedentes fitoquímicos del género *Cassia*, la búsqueda se limitó a esqueletos del tipo flavonoides glicosilados.

En el espectro de masas de baja resolución obtenido con la técnica "electro-spray ionization" (espectro 52), se observa una señal en (*m/z* 593,17 $[M-H]^+$) que corresponde al ión molecular cuya fórmula condensada fue establecida como $C_{27}H_{30}O_{15}$ y se corresponde con los datos reportados para el kaempferol 3-*O*-rutinósido,[280] el cual ha sido aislado previamente de las flores y hojas de las especies *Cassia hirsuta*[281] y *Cassia italica*.[282] Por esta razón, se realizó la comparación de los datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C para kaempferol 3-*O*-rutinósido y el compuesto CfH-1 los cuales son presentados en la tabla 7.14. Asímismo, en la tabla 7.15 se muestran las correlaciones más importantes observadas en los espectros de dos dimensiones homo y heteronucleares para el compuesto CfH-1 (kaempferol 3 *O*-rutinósido), figura 7.33.

En el espectro de masas de CfH-1 (espectro 52) se observa una señal en *m/z* 285,05 correspondiente a la pérdida de los dos glicósidos (rutinosa) $[M-rutinosa]^+$. Además, se observa una señal de baja intensidad en *m/z* 162,96 que corresponde al fragmento de ramnosa. Por otra parte, la fragmentación del pico base en *m/z* 593,03 confirma la perdida de rutinosa, ya que sólo se observa un pico en *m/z* 284,88 identificado como $[M-H-rutinosa]^+$ (figura 7.34). Adicionalmente, se resaltan los fragmentos que corresponden a los picos más abundantes observados en el espectro de masas (espectros 52-53).

Tabla 7.14. Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto kaempferol 3-*O*-rutinósido y **CfH-1**.

H/C	kaempferol 3-*O*-rutinósido (CD_3OD) [283]				Experimental tomado en CD_3OD[a]			
	a 400MHz			δ_C (ppm) a 100MHz	a 500MHz			δ_C (ppm) a 125MHz
	δ_H (ppm)	*m*	*J*(Hz)		δ_H (ppm)	*m*	*J*(Hz)	
2				161,49				159,45
3				135,51				135,50
4				179,43				179,42
5				163,01				162,98
6	6,21	*d*	1,8	99,96	6,21	*d*	2,0	99,99
7				166,02				166,02
8	6,40	*d*	1,8	94,91	6,40	*sa*		94,94
9				158,56				158,55
10				105,68				105,67
1’				122,76				122,75
2’,6’	8,05	*d*	9,0	132,37	8,05	*d*	9,0	133,37
3’,5’	6,89	*d*	9,0	116,13	6,89	*d*	9,0	116,15
4’				159,44				161,48
1”	5,12	*d*	7,3	104,58	5,11	*d*	7,5	104,58
2”	3,43	*dd*	7,3/8,8	75,76	3,42	*t*	7,5	75,75
3”	3,40	*t*	8,8	78,15	3,42	*t*	7,5	78,13
4”	3,24	*t*	8,8	71,46	3,25	*t*	9,5	71,45
5”	3,32	*ddd*	1,0/6,1/8,8	77,22	3,32	*m*		77,20
6”	3,80	*dd*	1,0/12,5	68,57	3,80	*dd*	11/1,5	68,57
	3,37	*dd*	6,1/12,5		3,38	*dd*	4,5/11	
1’”	4,51	*d*	1,5	102,42	4,51	*s*		102,40
2’”	3,62	*dd*	1,5/3,2	72,09	3,63	*dd*	3,5/2,0	72,07
3’”	3,51	*dd*	3,2/9,5	72,30	3,52	*dd*	9,5/3,5	72,30
4’”	3,27	*t*	9,5	73,89	3,25	*d*	9,0	73,89
5’”	3,44	*dq*	6,1/9,5	69,73	3,44	*m*		69,73
6’”	1,11	*d*	6,1	17,91	1,11	*d*	6,0	17,90

a) Los datos de RMN-^{13}C son reportados con dos cifras decimales, a fines de comparación con la bibliografía.

Tabla 7.15. Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto **CfH-1** (kaempferol 3-*O*-rutinósido).

H/C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)*	DEPT	HMQC	HMBC	COSY
2		159,45	C			
3		135,50	C			
4		179,42	C			
5		162,98	C			
6	6,21	99,99	CH	H-6	C-5; C-7; C-8; C-10	
7		166,02	C			
8	6,40	94,94	CH	H-8	C-6; C-7; C-9; C-10; C-4	
9		158,55	C			
10		105,67	C			
1’		122,75	C			
2’,6’	8,05	133,37	CH	H-2’ H-6’	C-2; C-1’; C-3’; C-4’	H-3’; H-5’
3’,5’	6,89	116,15	CH	H-3’ H-5’	C-3; C-1’; C-4’	H-2’; H-6’
4’		161,48	C			
1”	5,11	104,58	CH	H-1”	C-3; C-2”	H-2”
2”	3,42	75,75	CH	H-2”	C-1”; C-4”	H-1”;H-3”
3”	3,42	78,13	CH	H-3”	C-1”; C-4”; C-5”	H-2”
4”	3,25	71,45	CH	H-4”		
5”	3,32	77,20	CH	H-5”	C-1”	H-6”
6_a”	3,80	68,57	CH_2	H-6_a”	C-4”; C-1’”	H-6_b”
6_b”	3,38			H-6_b”	C-4”; C-5”; C-1’”	H-6_a”
1’”	4,51	102,40	CH	H-1’”	C-6”; C-2’”; C-3’”; C-5’”	
2’”	3,63	72,07	CH	H-2’”	C-3’”; C-4’”	H-3’”
3’”	3,52	72,30	CH	H-3’”	C-4’”; C-5’”	H-2’”; H-3’”
4’”	3,25	73,89	CH	H-4’”	C-2’”; C-3’”; C-5’”	H-3’”; H-5’”
5’”	3,44	69,73	CH	H-5’”	C-6’”	H-4’”; H-6’”
6’”	1,11	17,90	CH_3	H-6’”		H-5’”

* Los datos de RMN-^{13}C son reportados con dos cifras decimales, a fines de comparación con la bibliografía.

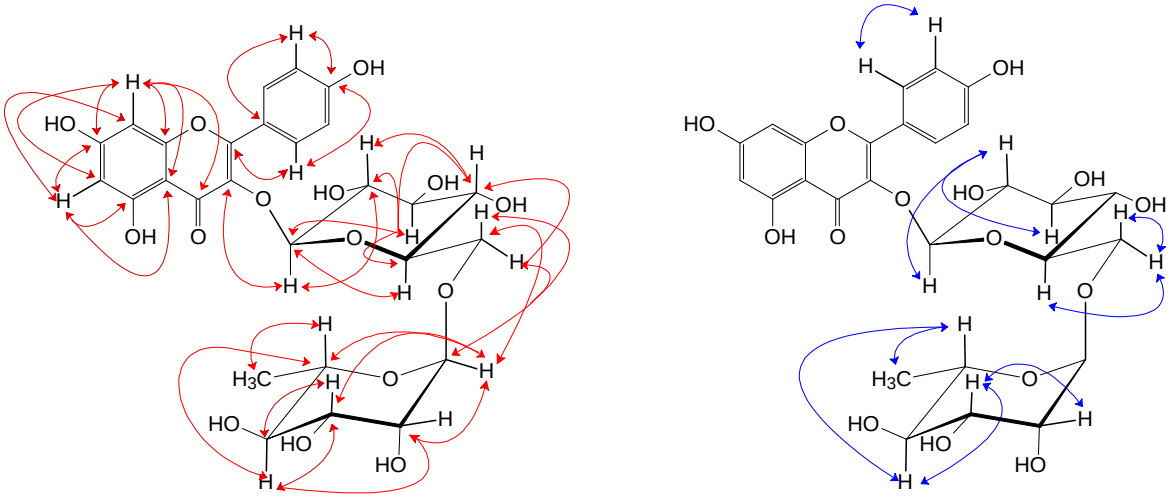


Figura 7.26.- Correlaciones HMBC (↔) y COSY (↔) para el compuesto CfH-1 (Kaempferol 3-*O*-rutinosido).

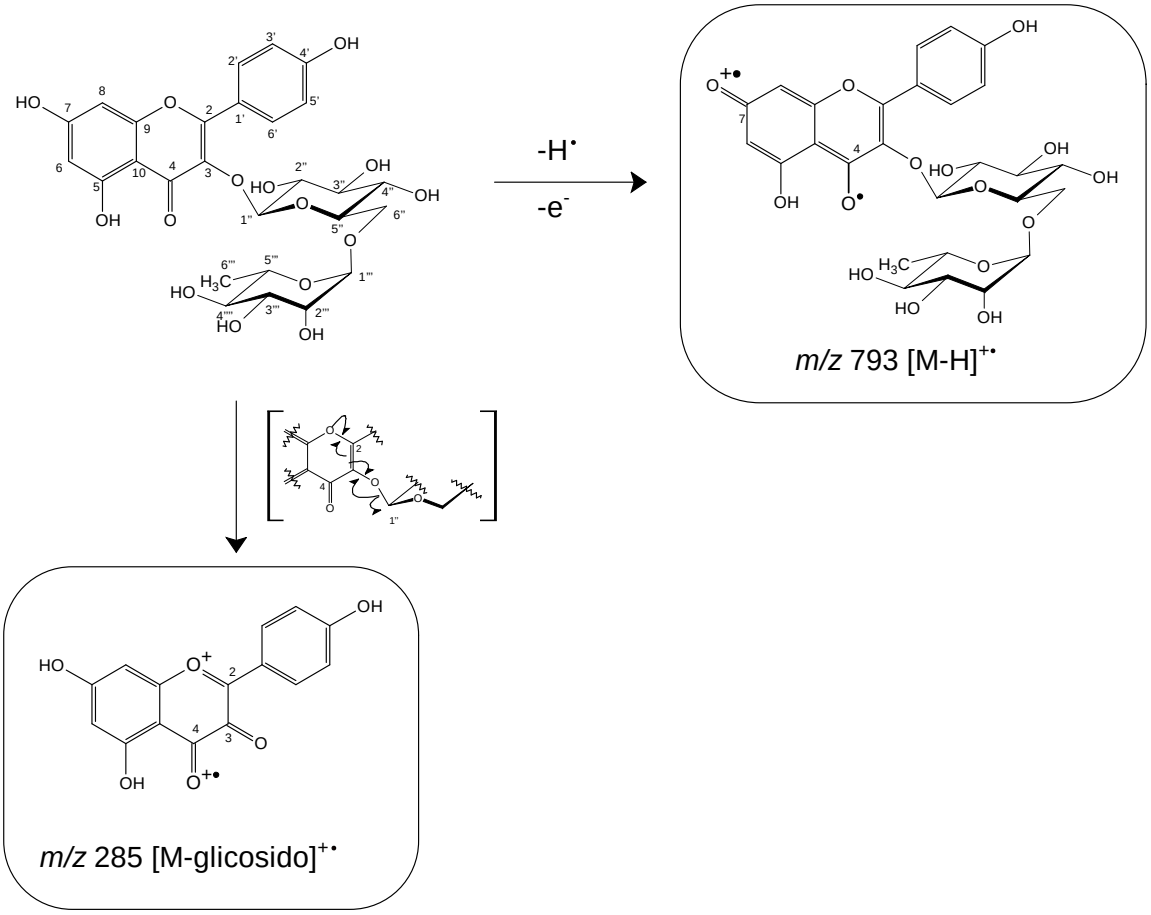


Figura 7.34.- Fragmentación propuesta para el compuesto CfH-1, (Kaempferol 3-*O*-rutinósido).

En el espectro de RMN-^{1}H (espectro 54), tomado en CD_3OD, se distinguen 4 señales de protones pertenecientes a dos sistemas aromáticos (espectro 55), que a través de las interacciones homo- y heteronucleares se estableció como un flavonol tipo kaempferol. Así, el anillo B se compone de dos dobletes cuyos desplazamientos estan centrado en 8,05 y 6,89 ppm, e integran para dos protones c/u con una constante de acoplamiento *orto* (*J*= 9 Hz), los cuales fueron asignados al patrón de acoplamiento AA′BB′[284] formado por los protones H-2″, H-6″ y H3″, H5″, respectivamente (tabla 7.15, espectro 55). Dicho acoplamiento también fue observado en el espectro de COSY (espectro 73). Por otro lado, el anillo A esta conformado por un singlete ancho, centrado en 6,40 ppm que integra para un protón que fue asignado a H-8: [6,40 ppm; s_{ancho}; 1H; H-8]. Adicionalmente, el anillo A presenta un doblete cuyo desplazamiento químico esta centrado en 6,21 ppm e integra para un proton asignada al protón H-6. Por HMQC (espectro 65) y HMBC (espectros 67 y 68), se estableció la identidad de la aglicona como kaempferol.

En el espectro de masas (espectro 52) se tiene una señal en *m/z* 593,17 uma $[M-1]^+$. Adicionalmente, se observa una señal en *m/z* 285,05 uma que representa la pérdida de dos unidades de glicosidos. En la ampliación del espectro de RMN-^{1}H (espectro 56), los desplazamientos químicos y multiplicidad de los protones anoméricos centrados en 5,11 ppm [*d*(7,5 Hz); 1H; H-1”] y 4,51 ppm (s_{ancho}; 1H; H-1’”) indican que la glucosa esta unida a través de un enlace ecuatorial (β-), mientras que la ramnosa lo hace a través de un enlace axial (α-).[255] Por HMQC (espectro 65), estas dos señales estan asociadas a los carbonos con desplazamientos químicos en 104,6 y 102,4ppm que corresponden a C-1” y C-1’”, respectivamente.

La unidad de glucosa fue identificada debido a la presencia de un metileno en 68,57 ppm (C-6″) que por HMQC (espectro 66) se correlaciona con las señales

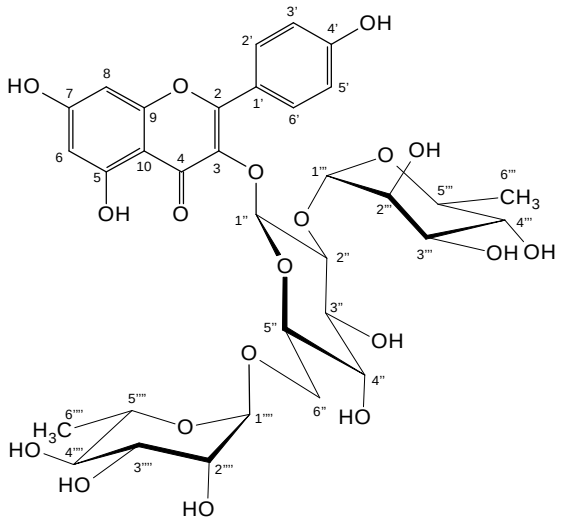
en 3,80 ppm [*dd*(11;1,5 Hz); 1H; H-6_a”] y 3,36 ppm [*dd*(4,5;11 Hz); 1H; H-6_b”]. En COSY (espectro 75), se puede apreciar la correlación entre ambos protones, confirmando asi su ubicación sobre el C-6″ de la glucosa. Adicionalmente, H-6_a” (espectro 75) mostró correlación con el protón en 3,32 ppm (*m*; H-5”).

La presencia de la ramnosa se confirmó a traves del doblete centrado en 1,11 ppm que integra para tres protones con acoplamiento de 6 Hz, el cual corresponde con un sistema AB, es decir, 1,11 ppm [*d*(6 Hz); 3H; H-6’”]. Adicionalmente, la configuración del carbono anomérico de la L-ramnosa se determinó como α- debido al desplazamiento de H-1’” (4,51 ppm) junto con las señales en 72,30 ppm (C-3’”) y 69,73 ppm (C-5’”).[255]

La unión de las subunidades kaempferol, glucosa y ramnosa se estableció inequívocamente a través del espectro de HMBC (espectros 67-72). Así, H-1” (5,11 ppm), se correlaciona con C-3 (135,50 ppm, espectro 69), lo cual confirma la la unión de la subunidad de glucosa directamente al núcleo de kaempferol a través de C-3. Mientras que, el protón H-6_b” (3,36 ppm) interacciona con el carbono anomérico de la ramnosa C-1’” (102,40 ppm, espectro 72). De modo que, la unión de la ramnosa es a través del metileno de la glucosa (C-1’”→C-6”), éste disacarido es conocido como rutinósido.

Conociendo que todas las asignaciones espectroscópicas realizadas para el cumpuesto CfH-1 fueron corroboradas con los espectros de COSY, HMQC y HMBC (tabla 7.15), se estableció la identidad de CfH-1 como: kaempferol 3-*O*-rutinósido tambien conocido como nicotiflorin o kaempferol 3-*O*-β-D-(6-α-L-ramnopiranosil)glucopiranósido.

7.4.3.3. Caracterización de CfH-2: Kaempferol-3-*O*-(2″-ramnosil)rutinósido, Clitorin



CfH-2

$C_{33}H_{40}O_{19}$: 740,49 g/mol

37,20 mg (**0,066%**)

Pf_{exp}: 195-197 °C

Rf: 0,17 (AN-2)

[CAS] 55804-74-5

El compuesto denominado CfH-2 fue aislado como un sólido de color marrón de Pf_{exp} 195-197 °C (Pf_{rep} 190-194 °C);[285] soluble en MeOH e insoluble en Et_2O. Al ser desarrollado por CCF con el sistema de solventes AN-2 y revelado con AS, se obtuvo una mancha amarilla en el visible y verde brillante bajo la luz de 365 nm. Dichas caraterísticas se corresponden con un núcleo flavonoidal.

En la caracterización de CfH-2 se analizaron los datos espectroscópicos de EM (espectros 76-77), RMN-^{1}H (espectros 78-81), RMN-^{13}C (espectro 82-86), DEPT-135 (espectros 87-88), HMQC (espectros 89-95), HMBC (espectros 96-104) y COSY (espectros 105-108). En el espectro de RMN-^{1}H se observan señales atribuibles a núcleos aromáticos (espectros 78-79) y restos hidroxilados (espectro 80). Además, en el espectro de RMN-^{13}C se observan multiples señales entre 60 y 80 ppm (espectros 82, 86) típicas de compuestos hidroxilados (características de restos glicosídicos). Debido a las características cromatográficas, espectroscópicas y a los antecedentes fitoquímicos del género *Cassia*, se limitó la búsqueda a esqueletos tipo flavonoides glicosilados.

En el espectro de masas de baja resolución obtenido con la técnica ESI (espectro 76) se observa una señal en (*m/z* 741,31 $[M+H]^+$) para una fórmula condensada de $C_{33}H_{40}O_{19}$ y que se corresponde con los datos reportados para el kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido,[283] el cual ha sido reportado previamente en las hojas de especie *Cassia fistula*,[286] y fue aislado por primera vez con el nombre de clitorin de *Clitoria ternatea*.[287] Por lo tanto, se realizó la comparación de los datos espectroscópicos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C para kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido y el compuesto CfH-2 los cuales son presentados en la tabla 7.16. Asímismo, en la tabla 7.17 se muestran las correlaciones más importantes observadas en los espectros de dos dimensiones homo y heteronucleares para el compuesto CfH-2 (kaempferol 3 *O*-(2''-ramnosil)rutinósido), figura 7.35.

Por otra parte, la fragmentación del ión molecular en *m/z* 741,02 (espectro 77) produjo dos señales características de la fragmentación de azúcares: una en *m/z* 285,82 correspondiente a la pérdida de los 3 glicósidos (2-ramnosilrutinosa) $[M\text{-glicosido}]^+$, y la otra en *m/z* 577,05 aociada a la pérdida de ramnosa $[M\text{-ramnosa}]^+$. Además, se tiene una fragmentación en *m/z* 256,12 que corresponde a la pérdida del carbonilo de la aglicona (figura 7.35), dichas fragmentaciones han sido previamente reportadas para kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido.[288] Adicionalmente, se resaltan los fragmentos que corresponden a los picos más abundantes observados en el espectro de masas (figura 7.36, espectro 77).

Tabla 7.16. Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido y CfH-2.

H/C	Reportado en CD_3OD[283]					Experimental tomado en CD_3OD			
	a 400MHz			δ_C (ppm)	δ_C (ppm)[a]	a 500MHz			δ_C (ppm)[b]
	δ_H (ppm)	*m*	*J* (Hz)	100MHz	75MHz[289]	δ_H (ppm)	*m*	*J* (Hz)	a 125MHz
2				161,22	156,82				159,01
3				134,34	132,90				134,28
4				179,30	177,52				179,23
5				163,16	161,56				162,93
6	6,18	*d*	2,1	99,77	98,97	6,18	*d*	2,0	99,86
7				165,60	164,81				165,66
8	6,37	*d*	2,1	94,75	94,13	6,38	*sa*		94,82
9				158,49	157,15				158,41
10				105,96	104,23				105,86
1'				123,17	121,33				123,12
2',6'	8,01	*d*	8,9	132,13	131,04	8,01	*d*	9,0	132,11
3',5'	6,89	*d*	8,9	116,14	115,42	6,90	*d*	9,0	116,17
4'				159,03	160,12				161,16
1''	5,59	*d*	7,6	100,46	101,12	5,59	*d*	7,5	100,43
2''	3,59	*dd*	7,6/8,9	79,90	77,69	3,63	*m*		79,87
3''	3,53	*t*	8,9	78,94	75,93	3,55	*t*	9,0	78,84
4''	3,23	*t*	8,9	71,97	70,94	3,24	*t*	9,0	71,86
5''	3,33	*ddd*	1,0/6,1/8,9	77,10	77,42	3,33	*m*		76,99
6''	3,81	*dd*	1,0/12,5	68,32	67,21	3,81	*dd*	5,0/9,5	68,26
	3,37	*dd*	6,1/12,5			3,38	*m*		
1'''	5,22	*d*	1,5	102,59	100,93	5,22	*d*	3,0	102,53
2'''	3,99	*dd*	1,5/3,4	72,41	70,67	4,01	*sa*		72,33
3'''	3,78	*dd*	3,4/9,7	72,33	70,94	3,79	*dd*	4,5/8,5	72,25
4'''	3,33	*t*	9,7	74,06	72,16	3,33	*m*		73,78
5'''	4,05	*dq*	6,1/9,7	69,91	68,59	4,06	*dq*	6,5/9,5	69,70
6'''	0,98	*d*	6,1	17,56	18,03	0,98	*d*	6,5	17,52
1''''	4,49	*d*	1,5	102,29	98,97	4,50	*s*		102,21
2''''	3,57	*dd*	1,5/3,4	72,12	70,67	3,61	*m*		72,04
3''''	3,47	*dd*	3,4/9,5	72,33	70,94	3,48	*dd*	3,5/9,5	72,25
4''''	3,23	*t*	9,5	73,83	72,16	3,27	*t*	9,5	73,99
5''''	3,41	*dq*	6,2/9,5	69,75	68,59	3,40	*dq*	6,5/9,5	69,88
6''''	1,07	*d*	6,2	17,84	17,62	1,07	*d*	6,5	17,81

a) DMSO-*d6*; b) Los datos de RMN-^{13}C son reportados con dos cifras decimales, a fines de comparación con la bibliografía.

Tabla 7.17. Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto **CfH-2** (Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).

H/C	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	DEPT	HMQC	HMBC	COSY
2		159,01	C			
3		134,28	C			
4		179,23	C			
5		162,93	C			
6	6,18	99,86	CH	C-6	C-5; C-7;C-8;C10	
7		165,66	C			
8	6,38	94,82	CH	C-8	C-6;C-7;C-9;C-10	
9		158,41	C			
10		105,86	C			
1'		123,12	C			
2',6'	8,01	132,11	CH	C-2',C-6'	C-2;C-4'	H-3';H-5'
3',5'	6,90	116,17	CH	C-3',C-5'	C-1';C-4'	H-2';H-6'
4'		161,16	C			
1''	5,59	100,43	CH	C-1''	H-2''	H-2''
2''	3,63	79,87	CH	C-2''	H-1'''	H-1''
3''	3,55	78,84	CH	C-3''		H-4''
4''	3,24	71,86	CH	C-4''	H-5''	H-3'';H-5''
5''	3,33	76,99	CH	C-5''		H-4'';H-6_a''
6_a''	3,81	68,26	CH_2	C-6''		H-5''
6_b''	3,38					
1'''	5,22	102,53	CH	C-1'''	C-2'';C-3''';C-5'''	
2'''	4,01	72,33	CH	C-2'''	C-3''';C-4'''	H-3'''
3'''	3,79	72,25	CH	C-3'''	C-4'''	H-2''';H-4'''
4'''	3,33	73,78	CH	C-4'''	C-2''';C-3'''	H-3''';H-5'''
5'''	4,06	69,70	CH	C-5'''		H-4''';H-6'''
6'''	0,98	17,52	CH_3	C-6'''		H-5'''
1''''	4,50	102,21	CH	C-1''''	C-6'';C-2'''';C-3'''';C-5''''	
2''''	3,61	72,04	CH	C-2''''		H-3''''
3''''	3,48	72,25	CH	C-3''''	C-4''''	H-2'''';H-4''''
4''''	3,27	73,99	CH	C-4''''	C-3''''	H-3'''';H-5'''
5''''	3,40	69,88	CH	C-5''''		H-4''';H-6''''
6''''	1,07	17,81	CH_3	C-6''''		H-5''''

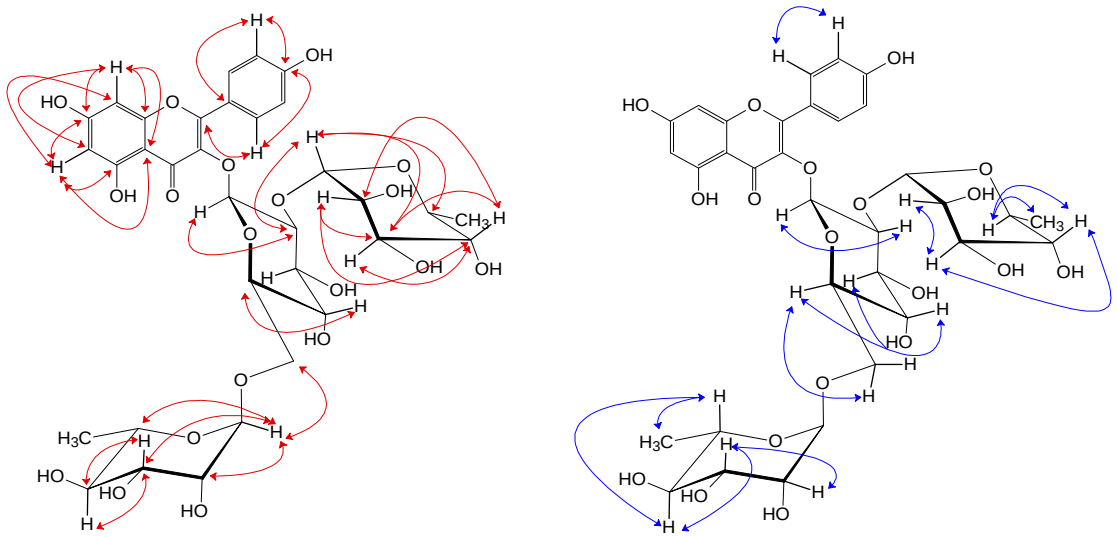


Figura 7.35.- Correlaciones HMBC (↔) y COSY (↔) para el compuesto CfH-2 (Kaempferol 3 *O*-(2''-ramnosil)rutinosido).

El patrón de sustitución AA′BB′ elucidado en el compuesto CfH-1 (nicotiflorin), también fue observado en el espectro de RMN-^{1}H (CD_3OD) del compuesto CfH-2 (clitorin), es decir, 8,01 ppm [*d*(9 Hz); 2H; H-2'', H-6''] y 6,90 ppm [*d*(9 Hz); 2H; H-3'', H-5''] (tabla 7.16, espectro 79). Adicionalmente, se observó un singlete ancho centrado en 6,38 ppm, asignado a H-8 y un doblete de acoplamiento AB[284] en 6,18 ppm [*d*(2Hz); 1H; H-6]. Este conjunto de protones aromaticos fue comparable a los obtenidos en CfH-1, por lo tanto, el compuesto CfH-2 es un glicósido de kaempferol.

En el espectro de masas (espectro 77) se observó un pico en *m/z* 741,02 uma $[M+H]^+$. Adicionalmente, se observa una señal en *m/z* 285,82 uma que representa la pérdida de tres glicosidos. El triosido fue confirmado a través del espectro de RMN-^{1}H para CfH-2 (espectro 78) debido a que las señales centradas en 5,59 ppm [*d*(7,5 Hz); 1H; H-1''], 5,22 ppm [*d*(3 Hz); 1H; H-1'''] y 4,50 ppm (*s*; 1H; H-1'''') presentaron correlaciones por HMQC (espectro 91) con los desplazamientos químicos en 100,43; 102,53 y 102,21 ppm y fueron asignados a C-1'', C-1''' y C-1'''', respectivamente.[255]

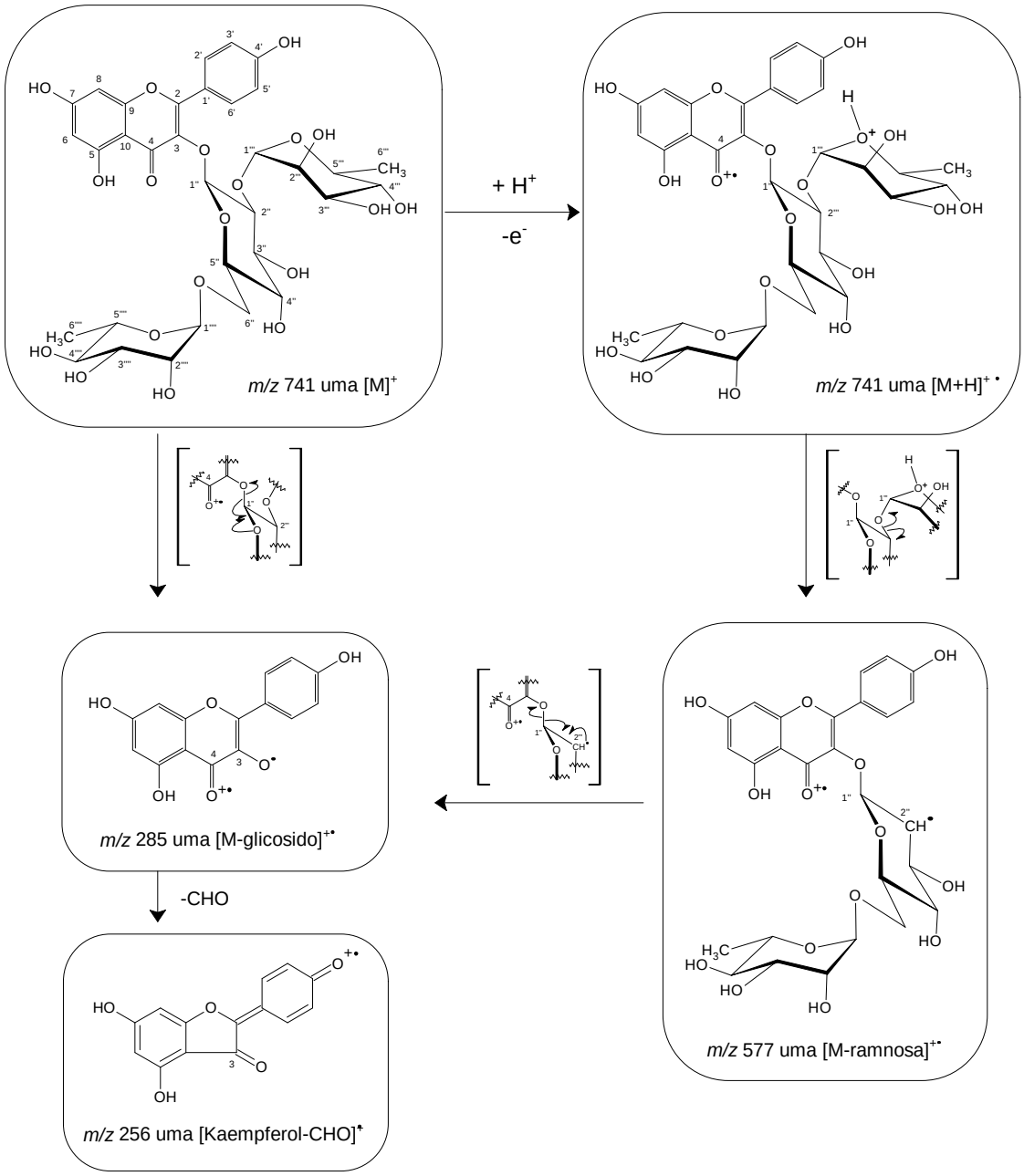


Figura 7.36.- Fragmentación propuesta para el compuesto CfH-2, (Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).

Dos de estos glicósidos fueron identificados como ramnosa debido a la presencia de 2 dobletes centrados en 1,07 ppm [*d*(6,5 Hz); 3H; H-6''''] y 0,98 ppm [*d*(6,5 Hz); 3H; H-6'''] los cuales presentaron correlaciones por HMQC (espectro 93) con las señales en 17,52 ppm [C-6''''] y 17,81 ppm [C-6'''], respectivamente, características de los grupos metilos en ramnosas.[283] Adicionalmente, las señales

asignadas a H-6’’’’ y H-6’’’ están acopladas por COSY (espectro 103), con las señales en 3,40 ppm [*dq*(6,5/9,5 Hz); 1H; H-5’’’’] y 4,06 ppm [*dq*(6,5/9,5 Hz); 1H; H-5’’’], respectivamente.

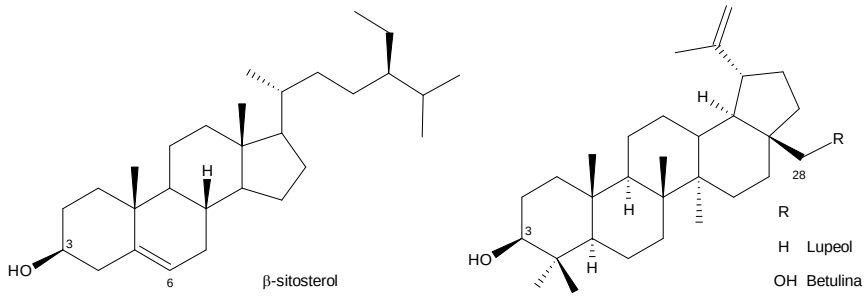
La tercera unidad glicosídica se identifico como β-glucosa debido a la constante de acoplamiento del protón anomérico en 5,59 ppm [*d*(7,5 Hz); 1H; H-1’’] y a la presencia del metileno en 68,26 ppm (C-6’’) el cual mostró acoplamientos de baja intensidad con los protones centrados en 3,81 ppm [*dd*(9,5/5 Hz); 1H; H-6_a’’] y 3,38 ppm [*m*; 1H; H-6_b’’], (espectros 92 y 93). A pesar de que en el DEPT (espectro 88) no se observa un carbono tipo –CH_2–, existe un carbono ubicado en 68,26 ppm, que mostró una menor intensidad en el DEPT con respecto a la observada en el espectro de RMN-^{13}C por lo cual fue asignado a un metileno.

El metileno de la glucosa para el compuesto CfH-1 (nicotiflorin) presentó un desplazamiento químico en 68,57 ppm (espectro 64) similar al observado para CfH-2 (clitorin) por lo que se concluye que la unidad de glucosa esta sustituida en el metileno.[255] La sustitución sobre la glucosa se confirmo por HMBC (espectro 99), pues los protones anoméricos de las unidades de ramnosa centrados en 5,22 ppm [*d*(3 Hz); 1H; H-1’’’] y 4,50 ppm [*s*; 1H; H-1’’’’], presentaron correlaciones con los carbonos en 79,87 (C-2’’) y 68,26 (C-6’’) ppm, estableciendo asi las uniones (1’’’→2’’) y (1’’’’→6’’), respectivamente.

Las constantes de acoplamiento observadas para los protones anoméricos, indican que la glucosa esta unida a través de un enlace ecuatorial (β-), mientras que las unidades de ramnosa lo hace a través de enlaces axiales (α-).

7.4.4. *Ruellia tuberosa* L.

7.4.4.1. Caracterización de RtB: -sitosterol, lupeol y betulina



RtB

2036,29 mg

(**1,68 %**)

La fracción RtB fue aislada como una pasta verde, represento el 1,68% respecto al material vegetal y estuvo enriquecida en clorofilas, el esteroide β-sitosterol y los triterpenos lupeol y betulina. Los tres últimos fueron identificados por CCF comparativo con muestras auténticas con valores de Rf de 0,38; 0,53 y 0,31 respectivamente, desarrollados con la mezcla AN-6.

7.4.4.3. Caracterización de RtE: compuesto polihidroxilado

RtE

1699,3 mg (**1,13 %**)

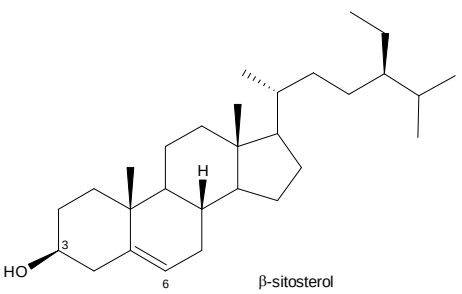
Rf: 0,78 (AN-6)

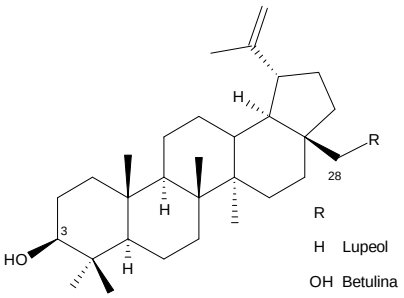
El compuesto denominado RtE se aisló como un sólido amorfo de color blanco opaco de Pf_{exp} > 300 °C soluble en H_2O e insoluble en los solventes orgánicos *n*-hexano, CH_2Cl_2, $CHCl_3$, acetona, AcOEt, MeOH, EtOH. Al ser desarrollado por CCF con el sistema de solventes AN-6, se observó una mancha

rosada a 365 nm de Rf 0,78, cuya coloracion e intensidad no fue alterada por el revelado con AS, característica de núcleos polihidroxilados.

Por RMN-^{1}H (espectros 109-110), sólo se observaron tres señales correspondientes a singletes centrados en 3,352; 3,350 y 3,328 ppm respectivamente. Dichas señales son características de metilenos hidroxilados, y debido a la poca cantidad de señales detectadas, se presume que el compuesto RtE es altamente simétrico. Sin embargo, no pudo elucidarse la estructura de dicho compuesto.

7.4.4.5. Caracterización de RtB, RtR-1 y RtR-K: -sitosterol, lupeol y betulina





RtB

2039,39 mg (**1,35 %**)

RtR-1

291,15 mg (**0,10 %**)

RtR-K

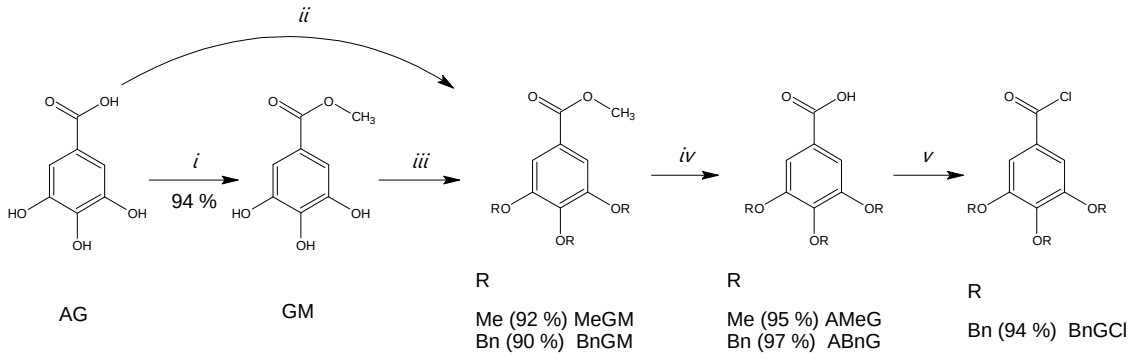
520,6 mg (**0,18 %**)

La fracción RtB, fue obtenida como una pasta higroscópica de color verde y las fracciones RtR-1 y RtR-K fueron aisladas como pastas higroscópicas rojizas enriquecidas con el esteroide β-sitosterol y los triterpenos lupeol y betulina, los cuales fueron identificados por CCF comparativo con muestras auténticas con valores de Rf son 0,38; 0,53 y 0,31 respectivamente, desarrollado con la mezcla AN-6. Adicionalmente, en la fracción RtR-K, se cuantificó por densitometría óptica el contenido de lupeol, β-sitosterol y betulina como (37,3 ± 0,8); (15,6 ± 0,6) y (4,3 ± 0,3) %, respectivamente.

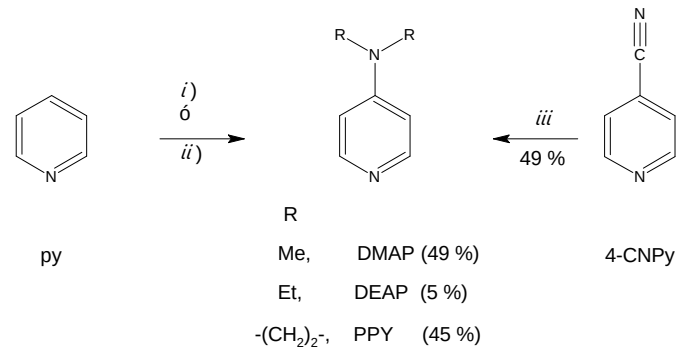
7.5. Resultados sintéticos

En la presente investigación, los productos sintetizados son presentados con las enumeraciones relacionadas a sus datos espectroscópicos. Adicionalmente, se muestran las siglas con las cuales son identificados, la fórmula molecular condensada, el peso molecular asociado a la misma, el punto de fusión experimental, el porcentaje de rendimiento obtenido, el porcentaje de pureza determinado por HPLC y el número de registro CAS (por sus siglas en Inglés, "*Chemical Abstracts Service*").

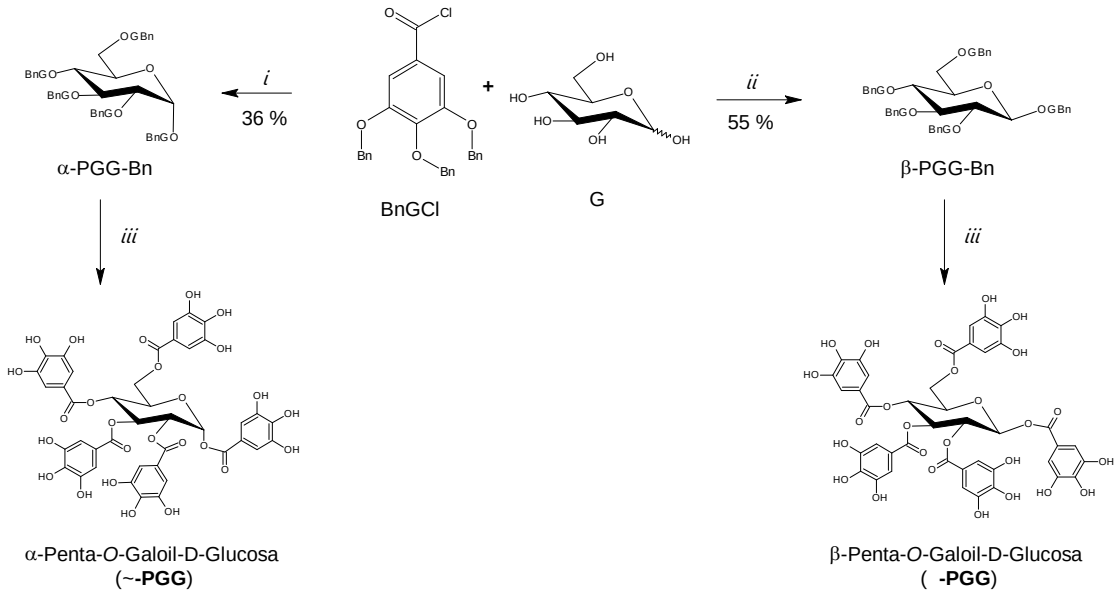
A continuación se presenta un resumen, donde se observa los porcentajes de rendimientos obtenidos, para la síntesis del cloruro del ácido *tri*-O-alquilgálico (esquema 7.15), 4-aminoalquilpiridina (esquema 7.16), α- y β-Pentagaloilglucosa (esquema 7.17) y del ácido tetraacetilelágico (esquema 7.18):



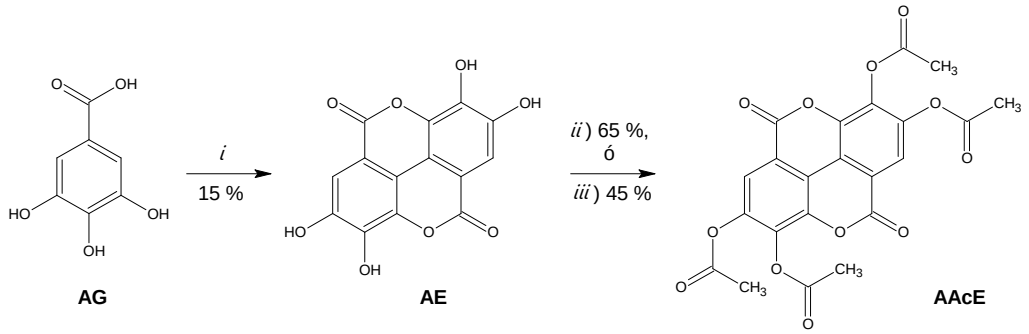
Esquema 7.15. Síntesis del cloruro de acilo del ácido *tri-O*-alquilgálico: i) MeOH/$H_2SO_{4(c)}$ reflujo 5h; ii) MeI, K_2CO_3, DMF, 50 °C, 12 h; iii) BnCl, K_2CO_3, DMF, 70 °C, 12 h; iv) R= Bn: NaOH, (R=Me: KOH), EtOH, H_2O, reflujo, 2 h; v) $SOCl_2$, benceno, piridina, reflujo, 2 h.



Esquema 7.16. Síntesis de 4-aminoalquilpiridina a partir de piridina o de 4-cianopiridina: i) $Br_{2(l)}$, DEA, NaOH; ii) $Br_{2(l)}$, pirrolidina, NaOH; iii) acrilamida (AAm), $HCl_{(c)}$, DMA, NaOH.



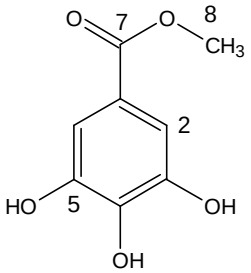
Esquema 7.17. Síntesis estereoselectiva de α- y β-PGG a partir de BnGCl y D-(+)-glucosa (G): i) DMAP, ACN, atmósfera inerte, 60 h; ii) TEA, CH_2Cl_2, atmósfera inerte, 120 h; iii) H_2, Pd/C.



Esquema 7.18. Síntesis del ácido tetraacetil elágico (AAcE) a partir de ácido gálico (AG): i) $Na_2S_2O_8$, AcOH, H_2SO_4, 1 h; ii) Ac_2O, reflujo 2h; iii) Ac_2O, piridina, reflujo, 2h.

7.5.1. Derivados de ácido gálico.

7.5.1.1. Síntesis de Galato de metilo, GM.



GM

$C_8H_8O_2$: 184,14 g/mol

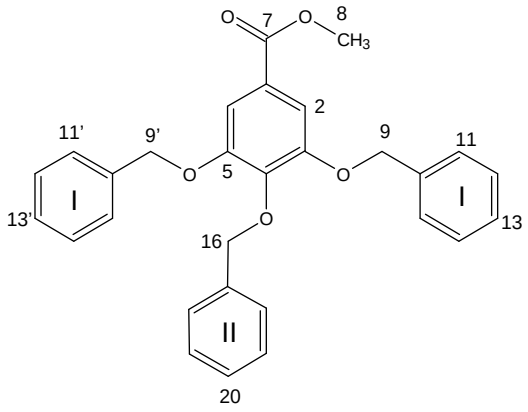
Pf_{exp}: 201-202 °C

%Rend: 53-94%

[CAS] 99-24-1

De acuerdo con el procedimento descrito en la sección 6.6.1 (pág., 126), se utilizó AG (20,00 g; 117 mmol), MeOH (200 mL) y $H_2SO_{4(C)}$ (5 mL), la mezcla resultante fue sometida a reflujo por 6 h con agitación constante. El producto de reacción fue recristalizado con una mezcla de MeOH-H_2O. Así, el galato de metilo (GM) se obtuvo (18,18 g; 84%) como un sólido blanco de punto de fusión (Pf_{exp}) 201-202°C (Pf_{rep} 201-203°C).[290] Adicionalmente, empleando este método de reacción, el GM fue obtenido usando diferentes condiciones de reacción con rendimientos de que oscilaron entre 53 y 94%, tabla S1.

7.5.1.2. Síntesis de *tri-O*-Bencilgalato de metilo, BnGM.



BnGM

$C_{29}H_{26}O_5$: 454,51 g/mol

Pf_{exp}: 97-99 °C

%Rend: 69-90%

[CAS] 70424-94-1

De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (sección 6.6.2, método A-I, pág127), se usó GM (4,43 g; 24 mmol; 1 eq), K_2CO_3 (19,84 g; 144 mmol; 6 eq), DMF (40 mL), BnCl (8,7 mL; 76 mmol; 3,2 eq), la mezcla se mantuvo entre 70 y 80 °C durante cinco horas. El producto de reacción fue recristalizado de CH_2Cl_2, donde se obtuvo el BnGM como un sólido beige (8,93 g; 90%), Pf_{exp} 97-99 °C (Pf_{rep} 97-98 °C),[291] con un porcentaje de pureza > 98% (Fig., 7.37).

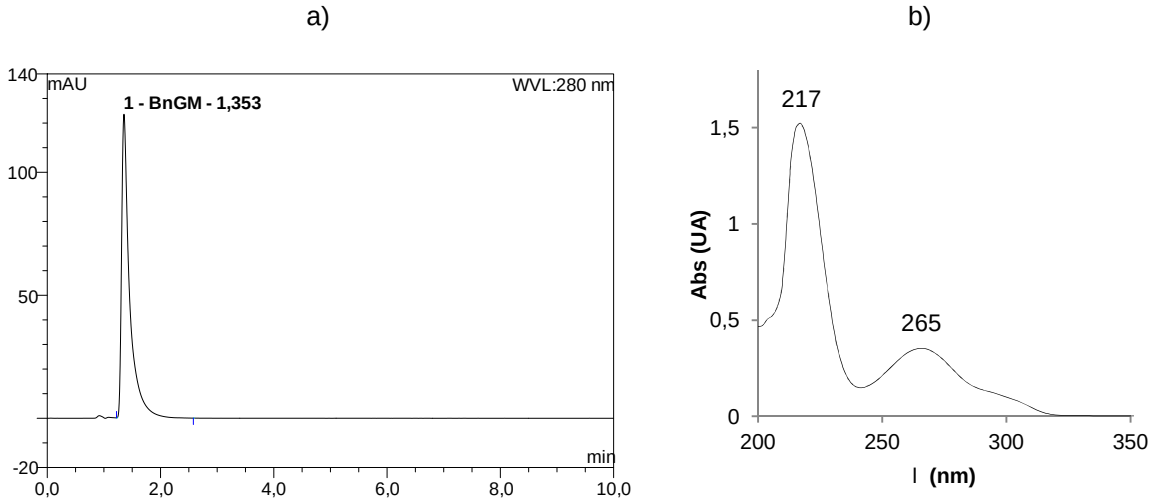
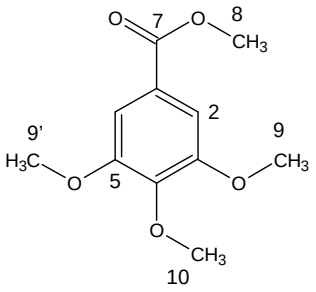


Figura 7.37. Determinación del porcentaje de pureza de BnGM: a) HPLC-sistema-3, λ= 280 nm, pureza > 98%; b) Espectro UV en eluente.

Adicionalmente, el BnGM también fue sintetizado empleando los métodos A o B (sección 7.5.2) con porcentajes de rendimiento entre 69 y 90%. Los resultados son resumidos en la tabla S2, RMN-^{1}H (espectro 111), RMN-^{13}C (espectro 112).

UV-Vis (ACN): 217 y 266 nm; RMN-^{1}H (270MHz; $CDCl_3$): 3,89 (*s*; 3H; OC$\underline{H_3}$); 5,13 (*s*; 2H; OC$\underline{H_2}$Ph; H-16); 5,14 (*s*; 4H; OC$\underline{H_2}$Ph; H-9, H-9'); 7,23-7,51 (*m*; 17H; 3xR$C_6\underline{H_5}$, H-2, H-6). RMN-^{13}C (75MHz; $CDCl_3$): 52,19 (O$\underline{C}H_3$; C-8); 71,47 (2xO$\underline{C}H_2$Ph; C-9, C-9'); 75,23 (O$\underline{C}H_2$Ph; C-16); 109,47 (C-2, C-6); 125,37 (C-1); 127,63/127,97/128,07/128,24/ 128,59 (C-11–C-13, C-11'–C-13', C-18–C-20); 2x136,82 (C-10, C-10'); 137,61 (C-17); 142,78 (C-4); 152,71 (C-3, C-5); 166,66 (C-7).

7.5.1.3. Síntesis de *tri-O*-Metilgalato de metilo, MeGM.



MeGM

$C_{11}H_{14}O_5$: 226,23 g/mol

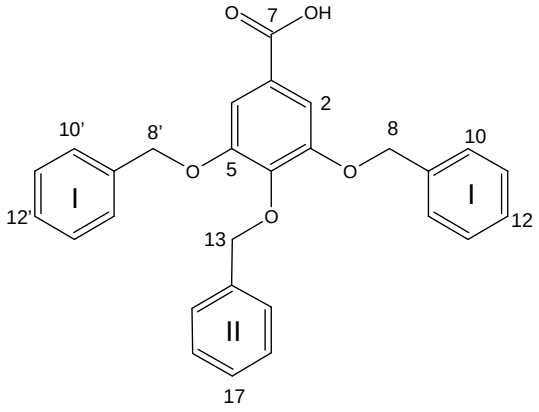
Pf_{exp}: 83-85 °C

%Rend: 76-92%

[CAS] 1916-07-0

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.6.2 (método A-I, pág 127), mediante agitación constante se utilizó GM (4,99 g; 29,3 mmol; 1 eq), K_2CO_3 (18,34 g; 133 mmol; 4,5 eq), DMF (40 mL), MeI (8,5 mL; 136 mmol; 4,6 eq) y la mezcla se mantuvo entre 70 y 80 °C por cinco horas. El producto de reacción fue recristalizado de la mezcla MeOH-H_2O donde se obtuvo como un sólido beige (5,03 g; 76%), Pf_{exp} 80-84 (Pf_{rep} 82-84).[292] Adicionalmente, el MeGM también fue sintetizado empleando el método A-III (sección 6.6.2, pág 127) y los resultados obtenidos son resumidos en la tabla S3.

7.5.1.4. Síntesis del Ácido *tri-O*-Bencilgálico, ABnG.



ABnG

$C_{28}H_{24}O_5$: 440,51 g/mol

Pf_{exp}: 201-202 °C

%Rend: 83-97%

[CAS] 70424-94-1

Empleando el método C-III (sección 6.6.3, pag 127), se suspendió el BnGM (8,88 g; 19,53 mmol; 1 eq) en una mezcla de EtOH-H_2O (170 mL) y se agregó NaOH (1,33 g; 33,23 mmol; 1,7 eq). Luego de 2h en reflujo, la mezcla de reacción, aún caliente, fue agregada sobre $HCl_{(0,5\ M)}$ (240 mL), transcurridos 10 minutos en ebullición se filtró. El sólido formado fue lavado con porciones sucesivas de EtOH-$H_2O_{(1:1;\ v/v)}$ (40 mL); H_2O (40 mL), $EtOH_{(95\%)}$ (30 mL), MeOH (2x12 mL) y *t*-BuOMe (2x12 mL). Así se obtuvo 8,35 g (97%) cuyo Pf_{exp} 201-202 °C (Pf_{rep} 195-196 °C), dicho resultado fue reproducible al utilizar entre 1,5 y 1,9 eq de NaOH. El porcentaje de pureza ABnG fue determinado por HPLC, > 98% (Fig., 7.38).

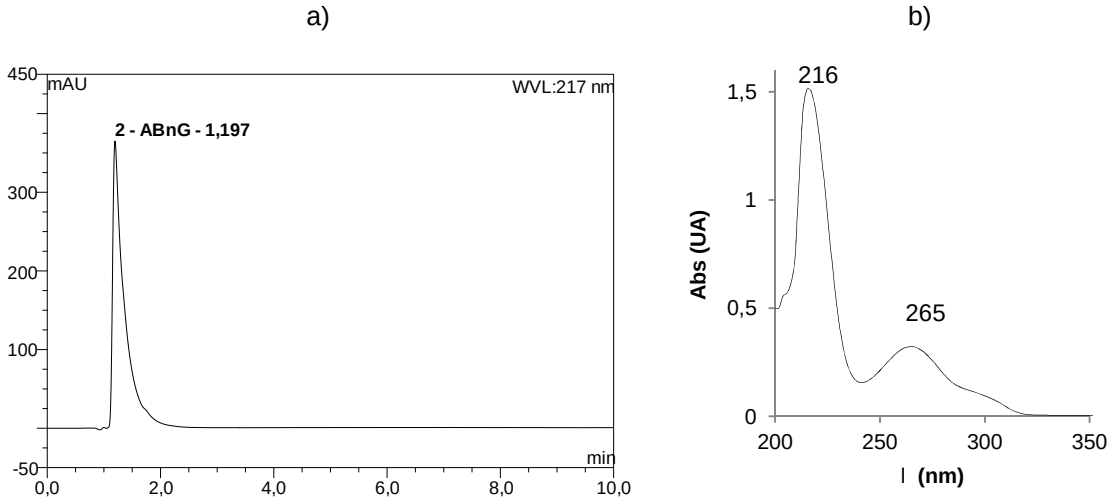
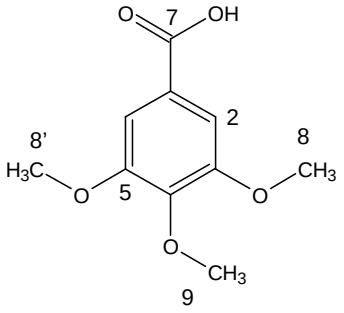


Figura 7.38. Determinación del porcentaje de pureza de ABnG: a) HPLC-sistema-3, λ= 217 nm, pureza > 98%; b) Espectro UV en eluente.

Por otra parte, al utilizar el método C-II empleando KOH (22,5 eq) se obtuvo un porcentaje de rendimiento similar (95 %), sin embargo al utilizar LiOH (1,7 eq) en MeOH-H_2O (1:1; v/v) como solvente de hidrólisis, el rendimiento disminuyo hasta 83 % con un Pf_{exp} 191-195 °C, tabla S4, RMN-^{1}H (espectro 113), RMN-^{13}C (espectro 114)

UV-Vis (ACN): 217 y 266 nm; RMN-^{1}H (270MHz; DMSO-d_6): 3,40 (s_a; 1H; COO<u>H</u>); 5,05 (*s*; 2H; OC<u>H$_2$</u>Ph); 5,18 (*s*; 4H; 2xOC<u>H$_2$</u>Ph; H-8, H-8'); 7,27-7,48 (*m*; 17H; 3xRC$_6$<u>H$_5$</u>, H-2, H-6). RMN-^{13}C (75MHz; DMSO-d_6): 70,98 (2xO<u>C</u>H$_2$Ph; C-8, C-8'); 74,85 (O<u>C</u>H$_2$Ph; C-9); 109,10 (C-2, C-6); 126,67 (C-1); 128,12/128,43/128,63/128,71/128,96 (C-10–C-12, C-10'–C-12', C-14–C-17); 137,44 (C-14); 137,99 (C-7, C-7'); 141,81 (C-4); 152,61 (C-3, C-5); 167,35 (C-7).

7.5.1.5. Síntesis del Ácido *tri-O*-Metilgálico, AMeG.



AMeG

$C_{10}H_{12}O_5$: 212,20 g/mol

Pf_{exp}: 175-176 °C

%Rend: 15-95%

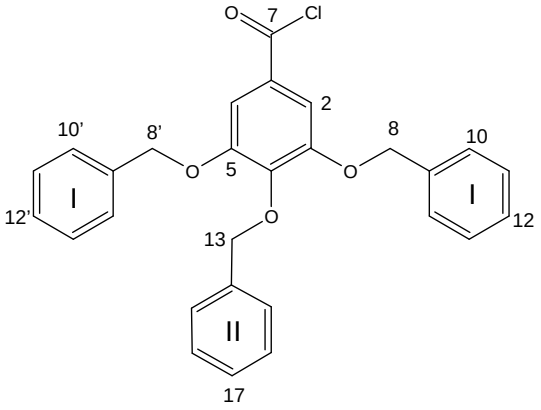
[CAS] 118-41-2

De acuerdo con lo descrito en el método C-II (sección 6.6.3, pag 128), se suspendió el MeGM (2,51 g; 11,12 mmol; 1 eq) en una mezcla de EtOH-H_2O (7:3; v/v) (100 mL) y se agregó KOH (6,15 g; 109,6 mmol; 10 eq). Luego de 2h en reflujo, el solvente orgánico fue evaporado a presión reducida y el residuo fue suspendido en H_2O (50 mL), acidificado con $H_2SO_{4(c)}$ (pH 3) y extraido con CH_2Cl_2 (4x15 mL). Las fracciones orgánicas fueron combinadas, lavadas con $HCl_{(ac)}$ (2x20 mL) y posteriormente secada sobre Na_2SO_4. El crudo de reacción obtenido, fue

recristalizado con la mezcla MeOH-H_2O. Así, se obtuvo 2,25 g (95 %) de un sólido tipo agujas de color beige con un Pf_{exp} 168-171 °C (Pf_{rep} 168-171 °C).

Al cambiar el solvente de hidrólisis a MeOH-H_2O (1:1; v/v) y utilizar KOH (10 eq), mediante reflujo con método C-I, el rendimiento disminuyó drásticamente hasta 15 %. Sin embargo, éste método (C-I) fue reproducible al utilizar LiOH (3 eq) a temperatura ambiente en la mezcla MeOH-H_2O (1:1; v/v) durante 2 h (73-77 %, Pf_{exp} 176-177 °C), tabla S5.

7.5.1.6. Síntesis de Cloruro de 3,4,5-tri-*O*-Bencilgaloilo, BnGCl.



BnGCl

$C_{28}H_{23}ClO_4$: 458,93 g/mol

Pf_{exp}: 119-121 °C

%Rend: 24-94%

[CAS] 1486-47-1

Al realizar exactamente procedimiento descrito en la sección 6.6.4 (pág 128), se obtiene el producto BnGCl con un porcentaje de rendimiento reproducible entre 61 y 65%; al modificar ligeramente el procedimiento de enfriamiento, mediante la aplicación de vacío, luego de la adición de éter de petróleo, el rendimiento de la reacción fue de 24 %, tabla S6.

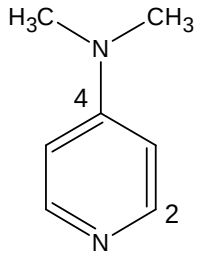
BnGCl fue sintetizado manteniendo el orden de adición de los reacitvos descrito en el procedimiento de la sección 6.6.4, pero realizando una ligera modificación con respecto a la dilución de los reactivos en el solvente antes de ser adicionados al medio de reacción. Así, mediante agitación constante y en atmósfera de $N_{2(g)}$, se suspendió 2,53 g (5,73 mmol; 1 eq) de ABnG en 30 mL de

C_6H_6 y se agregó 57,9 mmol (10 eq) de $SOCl_2$ (4,2 mL disuelto en 10 mL de C_6H_6). Seguidamente, se adicionó 1,32 mmol (0,23 eq) de piridina (106 μL disuelto en 5 mL de C_6H_6), manteniendo la mezcla de reacción en reflujo por 2 horas bajo atmósfera inerte. Luego, se agregó 40 mL de éter de petróleo y aún en atmósfera inerte se llevó el balón de reacción a temperatura ambiente; posteriormente, se enfrió en una mezcla de agua-hielo-sal, para obtener el producto en forma de agujas, el cual fue utilizado en el próximo paso de reacción sin mayor tratamiento de purificación. El precipitado presentó un Pf_{exp} 119-121 °C (Pf_{rep} 116,5-117 °C)[293]. Una pequeña porción del precipitado fue recristalizado de *n*-hexano y se obtuvo el mismo punto de fusión del producto precipitado. Así, se produjo 2,47 g producto BnGCl lo que representa un 94% de rendimiento. Rf: 0,81 (V-1); UV-Vis (ACN): 217 y 289 nm.

7.5.2. Derivados de 4-aminoalquilpiridina

El método D fue definido luego de varios intentos de síntesis utilizando relaciones molares de piridina (py) y bromo molecular ($Br_{2(l)}$) de tres a uno (3:1; py-Br_2),[294,295] y aunque dieron lugar al producto deseado, el rendimiento fue poco satisfactorio, principalmente debido a la reacción de polimerización causada por el exceso de piridina en presencia del perbromuro de piridina (py•Br_2 ó py•Br_4),[294,296,297], el cual es formado en $CHCl_3$ por una relación equimolar (1:1; py-Br_2), tabla S7.

7.5.2.1. Síntesis de 4-dimetilaminopiridina, DMAP.



DMAP

$C_7H_{10}N_2$: 122,18 g/mol

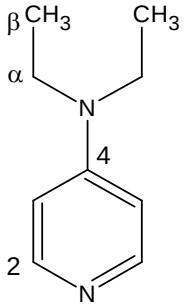
Pf_{exp}: 110-114 °C

%Rend: 49%

[CAS] 1122-58-3

DMAP fue sintetizado satisfactoriamente siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el método E (sección 6.6.5, pág 129). Para la formación del intermediario cloruro de N-(2-carbamoiletil)-4-cianopiridina (NCME-CNPy), se utilizó 4-CNPy al 98% de pureza (2,13 g; 20,09 mmol; 1 eq), AAm al 50% en agua (2,91 g; 20,40 mmol, 1,01 eq) y $HCl_{(c)}$ (1,6 mL; 52,18 mmol; 2,6 eq). Mientras que el nucleófilo se preparó a través de una mezcla de DMA al 40% en agua (3,2 mL; 28,39 mmol; 1,4 eq) en NaOH de concentración 11,16 M (1,5 mL; 16,74 mmol; 0,8 eq). El producto crudo luego de ser solubilizado en caliente con AcOEt y precipitado de *n*-hexano presentó un Pf_{exp} 110-114 °C (Pf_{rep} 112-114 °C). Así, se produjo 1,22 g de producto DMAP lo que significa un 49 % de rendimiento. Al emplear los métodos D-I y D-II el rendimiento de la reacción disminuyo significativamente (< 5 %), tabla S7. Sin embargo, estos métodos fueron útiles para la síntesis de los análogos DEAP y PPY descritos en las siguientes secciones.

7.5.2.2 Síntesis de 4-dietilaminopiridina, DEAP.



DEAP

$C_9H_{14}N_2$: 150,22 g/mol

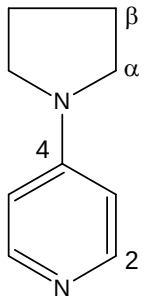
Pf_{exp}: 72-76 °C

%Rend: 5%

[CAS] ND

De acuerdo con el procedimiento descrito en el método D-I (pág. 129), para el obtener el perbromuro de piridina, se utilizó py (10,1 mL; 124 mmol; 1 eq), $Br_{2(l)}$ (7,1 mL; 139 mmol; 1,1 eq), $CHCl_3$ (100 mL). El nucleófilo se preparó con la mezcla de DEA (14,2 mL; 137 mmol; 1,1 eq) y $NaOH_{(11,16\ M)}$ (12,4 mL; 138 mmol; 1,1 eq). Al basificar (pH < 10) el medio de reacción con $NaOH_{(11,16\ M)}$ se formó un precipitado, soluble en metanol, el cual fue filtrado. A éste último se le ajusto pH 12, donde la fase orgánica fue extraida y evaporada a sequedad a temperatura ambiente. La unión del precipitado y el filtrado fue lavada con *n*-hexano en caliente. Así, se produjo la DEAP (1,00 g; 5 %) con un Pf_{exp} 72-76 °C (Pf_{rep} 81-82 °C), tabla S7.

7.5.2.3. Síntesis de 4-pirrolidilaminopiridina, PPY.



PPY

$C_9H_{12}N_2$: 148,21 g/mol

Pf_{exp}: 55-57 °C

%Rend: 45%

[CAS] 2456-81-7

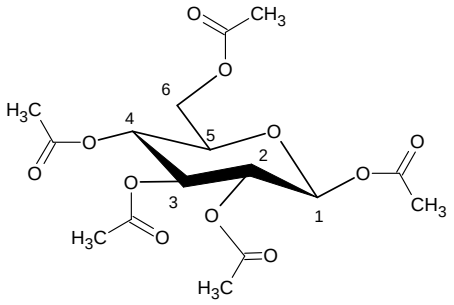
Al utilizar el método D-II (pág. 129), se preparó el perbromuro de piridina a partir de py (10 mL; 124 mmol; 1 eq), $Br_{2(l)}$ (7 mL; 137 mmol; 1,1 eq), $CHCl_3$ (50

mL). El nucleófilo se preparó con la mezcla de pirrolidina (12,3 mL; 150 mmol; 1,2 eq) y $NaOH_{(11,16\ M)}$ (13,5 mL; 151 mmol; 1,2 eq). Al basificar el medio de reacción (pH > 12), con $NaOH_{(11,16\ M)}$, la fase orgánica fue extraida con un embudo de separación a la cual se le agregó *n*-hexano para precipitar el producto. Luego de filtrado fue lavado con *n*-hexano en caliente. Así, se produjo la PPY (8,30 g; 45 %) presentó un Pf_{exp} 55-57 °C (Pf_{rep} 57-58 °C), tabla S7.

7.5.3. Derivados de penta-*O*-Acil-D-glucosa

Los derivados glucosídicos acetilados y benzoilados fueron sintetizados usando métodos reportados en la literatura, sin realizar modificaciones en los procedimientos. Mientras que, los glucósidos bencilgaloilados se obtuvieron por modificación de los métodos reportados. Los rendimientos de reacción fueron determinados por HPLC usando ACN como eluente, una columna Acclaim 120-C18 (100x2,1 mm; 3 μm), un flujo de 0,310 mL/min y un detector UV-Vis de cuatro canales (λ= 217, 220, 254 y 280 nm). Por otra parte, la purificación de los compuestos bencilgaloilados fue realizada por cromatografía en columna, y las condicones de cada purificación son presentadas en la tabla S8.

7.5.3.1. Síntesis de Penta-*O*-Acetil- -D-glucosa, -PAG.



-PAG

$C_{16}H_{22}O_{11}$: 390,40 g/mol

Pf_{exp}: 135-136 °C

%Rend: 20-46 %

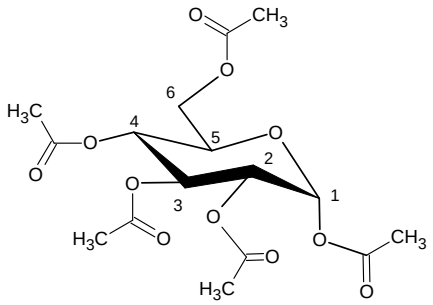
[CAS] 604-69-3

Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,[298] mediante agitación constante, se sometió a reflujo por 1 ½ h, la mezcla de glucosa (101,6 mg; 0,56

mmol; 1 eq), Ac_2O (0,5 mL; 5,29 mmol; 9,4 eq), AcONa (8,2 mg; 0,10 mmol; 0,2 eq) y benceno (0,9 mL). Seguidamente, a la mezcla de reacción se le agregó agua (0,3 mL), se neutralizó con solución diluida (3-5%) de NaOH y se trató con varias porciones de benceno. Posteriormente, la fase orgánica fue evaporada a sequedad y el producto crudo fue recristalizado de EtOH. β-PAG también fue sintetizado empleando éste mismo procedimiento con diferentes solventes y equivalentes de reactivos, tabla S9, RMN-^{1}H (espectro 115), RMN-^{13}C (espectro 116).

RMN-^{1}H (270MHz; $CDCl_3$): 3,78-3,82 (*m*; 1H; H-5); 4,07 (*d*; 12,4 Hz; 1H; H-6a); 4,23-4,27 (*m*; 1H; H-6b); 5,08 (*t*; 9,2 Hz; 1H; H-4); 5,09 (*t*; 9,2 Hz; 1H; H-2); 5,22 (*t*; 9,2 Hz; 1H; H-3); 5,67 (*d*; 1H; H-1). RMN-^{13}C (75MHz; $CDCl_3$): 20,48 (3x$\underline{C}H_3$); 20,61 ($\underline{C}H_3$); 20,71 ($\underline{C}H_3$); 61,62 (C-6); 68,02 (C-4); 70,46 (C-2); 72,86 (C-3); 72,90 (C-5); 91,83 (C-1); 168, 84/169,14/169,32/169,98/170,48 (R$\underline{C}$OOR').

7.5.3.2. Síntesis de Penta-*O*-Acetil-~-D-glucosa, ~-PAG.



~-PAG

$C_{16}H_{22}O_{11}$: 390,40 g/mol

Pf_{exp}: 116-117 °C

%Rend: 28-38 %

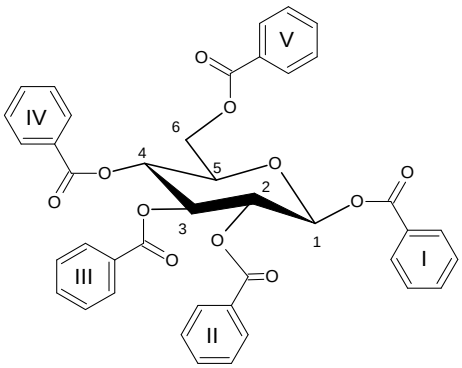
[CAS] 604-68-2

Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,[299] en una mezcla agua-hielo-sal, se suspendió G (2004,7 mg; 11,13 mmol; 1 eq) en Ac_2O (10,5 mL; 111,1 mmol; 10 eq). Manteniendo la temperatura (T<0 °C), se agregó $H_2SO_{4(c)}$ (1 gota) y la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente con agitación constante por 24 horas. Seguidamente, se agregó EtOH (10 mL) para remover el anhídrido acético que no reaccionó. Luego se concentró la solución a temperatura ambiente y se añadío una nueva porción de EtOH (50 mL) y se enfrió a 0 °C por 2 h, para

precipitar un sólido blanco (Pf_{exp} 111-115 °C), Pf_{rep}[300] 109-111; 112 °C. Dicho sólido fue recristalizado de EtOH (Pf_{exp} 116-117 °C) y corresponde al producto esperado α-PAG (1230,4 mg, 28%),

Al realizar todo el procedimiento a 0 °C por 24 h, el porcentaje de rendimiento de la reacción fue de 38%, el cual es mayor al obtenido previamente.

7.5.3.3. Síntesis de Penta-*O*-Benzoil- -D-glucosa, -PBG.



-PBG

$C_{41}H_{32}O_{11}$: 700,69 g/mol

Pf_{exp}: 194-197 °C

%Rend: 99 %

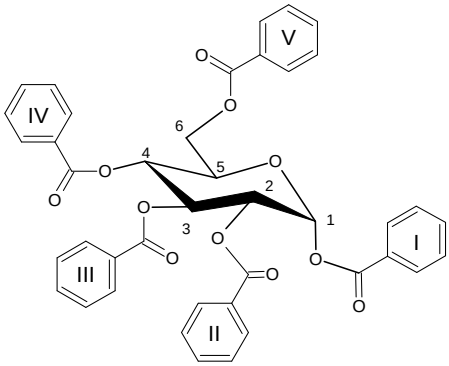
[CAS] 14679-57-3

Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,[301] se disolvió la glucosa (605,81 mg; 3,36 mmol; 1 eq) en piridina anhidra (3 mL) y se agregó cloruro de benzoílo (BzCl, 2,4 mL; 20,66 mmol; 6,1 eq). Después que finalizó la reacción inicial, y mediante agitación constante, se calentó suavemente la mezcla de reacción y se agregó en 10 mL de agua destilada para precipitar el producto, el cual se decanto y se lavó con 5 mL de $Na_2CO_{3(ac,\ 5\%)}$ se filtró por succión y se recristalizó de EtOH (2332,38 mg; 99%), Pf_{exp} 194-197 (EtOH), Pf_{rep}[302] 170-180 (EtOH), y posteriormente se recristalizó de AcOEt, Pf_{exp} 157-159°C (AcOEt) Pf_{rep}[302] 156-157°C (AcOEt), RMN-^{1}H (espectro 117), RMN-^{13}C (espectro 118).

UV-Vis (ACN): 230 y nm; RMN-^{1}H (270MHz; $CDCl_3$): 4,38-4,44 (*m*; 1H; H-6a); 4,51 (*dd*; 12,15/4,59 Hz; 1H; H-6b); 4,65 (*ddd*; 12,15/9,45/2,70 Hz; 1H; H-5); 5,83 (*t*; 9,45 Hz; 1H; H-4); 5,87 (*dd*; 9,45/8,1 Hz; 1H; H-2); 6,05 (*t*; 9,45 Hz; 1H; H-3); 6,30 (*d*; 8,1 Hz; 1H; H-1); 7,24-7,57 (*m*; 15H; I-V: H-3', H-4', H-5'); 7,84-8,05 (*m*;

10H; H-2', H-6'). RMN-^{13}C (75MHz; $CDCl_3$): 62,85 (C-6); 69,31 (C-4); 71,05 (C-2); 72,99 (C-3); 73,33 (C-5); 92,84 (C-1); 128,38/128,45/128,65/128,87 (I-V: C-3', C-5'); 129,70/129,88 (I-V: C-2', C-6'); 130,25 (I-V: C-1'); 133,09/133,35/133,45/ 133,52/133,82 (I-V: C-4'); 164,64/2x165,20/165,73/166,14 (I-V: RCOOR', C-7').

7.5.3.4. Síntesis de Penta-*O*-Benzoil-~-D-glucosa, ~-PBG.



~-PBG

$C_{41}H_{32}O_{11}$: 700,69 g/mol

Pf_{exp}: °C

%Rend: %

[CAS] 22415-91-4

Inicialmente se intentó sintetizar α-PBG de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura[303] usando BzCl, py y $CHCl_3$. Sin embargo, sólo se obtuvo el 4-clorobenzaldehído (8,67 g; 51%; Pf_{exp} 43-44 °C), el cual es un producto de isomerización del reactivo cloruro de benzoílo.

De acuerdo con el procedimiento G-Ib, se utilizó BzCl (392 μL; 3,39 mmol; 6 eq), G (101,53 mg; 0,56 mmol; 1 eq) y DMAP (537,00 mg; 4,40 mmol; 7,8 eq) en ACN (30 mL) a 0 °C por 2 h. Luego, el crudo de reacción se agregó sobre agua destilada para precipitar el producto, el cual fue decantado y lavado con agua destilada, posteriormente se recristalizó de EtOH. Así, se obtuvo el producto α-PBG. Los puntos de fusión reportados para las recristalizaciones de EtOH y Acetona-H_2O son 187 °C[302] y 185-186, respectivamente.

Al realizar el procedimiento G-Ib a temperatura ambiente se obtiene el anómero β-PBG en 43% Pf_{exp} 196-197 °C.

7.5.3.5. Síntesis de Penta-(3,4,5-tri-O-Metilgaloil)-D-glucosa, PGG-Me.

Se intentó sintetizar el producto denominado PGG-Me usando el derivado del ácido gálico, AMeG, y DCC como agente acoplante a través de las condiciones de esterificación de Steglich descritas en los métodos F-Ia, F-Ib y F-Ic (sección 6.6.6, págs., 130-131). Sin embargo, no fue posible obtener el producto deseado por dichos métodos, todos los intentos de síntesis de PGG-Me mostraron la formación de un producto desconocido con P_{subl} 213-218°C, tabla S10.

7.5.3.6. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri*-*O*-Bencilgaloil)-D-glucosa, PGG-Bn.

Se intentó sintetizar el producto denominado PGG-Bn usando el derivado del ácido gálico, ABnG, y DCC como agente acoplante a través de las condiciones de esterificación de Steglich descritas en los métodos F-Ia, F-Ib y F-Ic (sección 6.6.6, págs., 130-131). Los resultados mostraron la formación del producto deseado al utilizar como catalizador nucleofílico la DMAP o sus análogos de mayor capacidad nucleofílica denominados DEAP y PPY. Sin embargo, el rendimiento de la reacción fue muy bajo (≤ 1%); entre los productos colaterales, se encontró el éster metílico del ácido (BnGM), el anhídrio del ácido (AABnG) e incluso la N-acilurea del ácido denominada NBnGAU (espectro 119), tabla S11.

Al utilizar HOBt•H_2O como agente acoplante, se desarrollo otro método de síntesis (método J, pág., 133). Para ello se utilizó ABnG (1,85 g; 4,21 mmol; 7,5 eq), CH_2Cl_2-DMF (30:2; v/v), HOBt•H_2O (644,50 mg; 4,21 mmol; 7,5 eq), DCC (873,19 mg; 4,23 mmol; 7,5 eq), G (102,40 mg; 0,56 mmol; 1 eq) y DMAP (48,83 mg; 0,40 mmol; 0,71 eq). Luego de 18 horas, se agregó 1 mL de $AcOH_{(ac,\ 10\%)}$ a la mezcla de reacción y el producto fue filtrado al vacío, se concentró a temperatura ambiente y posteriormente en desecador al vacío. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de silica gel usando como eluente la mezcla *n*-Hex-CH_2Cl_2 (1:1; v/v). Sin embargo, no se logro incrementar el rendimiento (≤ 1 %) del

producto deseado. Donde, el producto mayoritario (70 %) correspondió al acoplamiento entre el ABnG y HOBt•H_2O el cual es denominado “éster activo” o BnGOBt (espectros 120-123).

Al utilizar el BnOGBt (método K, pág., 133) como material de partida para la obtención de PGG-Bn el rendimiento fue de 3 %. Sin embargo, al usar AABnG (método I, pág 133) como agente acilante se encontró que el rendimiento de la reacción fue de 55% (determinado por HPLC), y correspondió a la mezcla (39:61) de los anómeros α- y β-PGG-Bn, cuya separación por cromatografía en columna fue compleja (figura 7.39).

Dichos resultados promovieron la creación de nuevos métodos de síntesis estereoselectivos para la obtención de los anómeros utilizando al cloruro de acilo, BnGCl, como agente acilante, basados en el esquema 5.2 (pág., 98), cuyos resultados son presentados en la tabla 7.18 y descrito en las secciones siguientes.

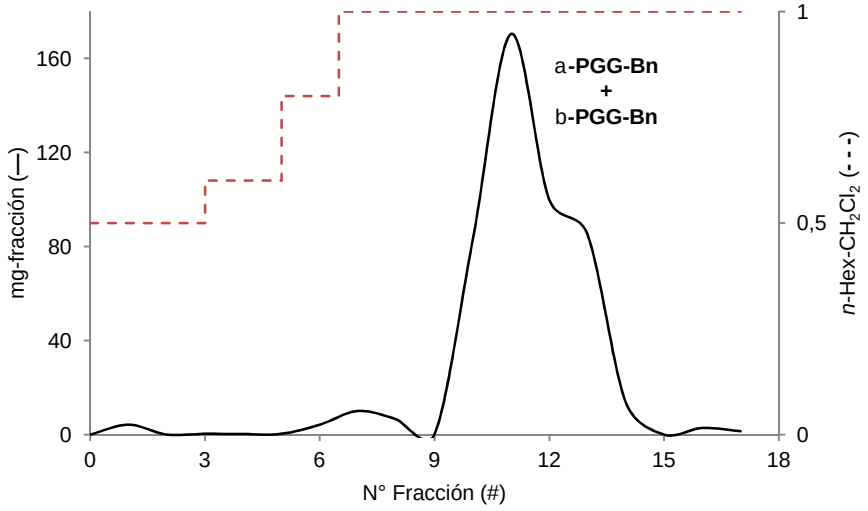


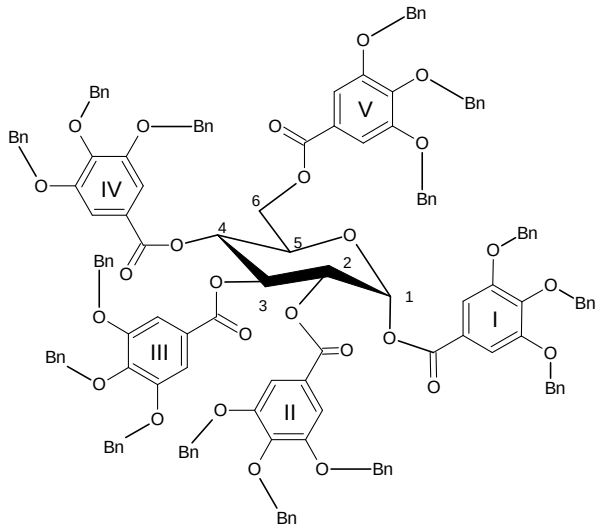
Figura 7.39. Purificación por cromatografía en columna de la mezcla (39:61) de los anómeros α- y β-PGG-Bn, obtenidos por el método I usando AABnG como agente acilante.

Tabla 7.18. Condiciones estereoselectivas para la síntesis de los anómeros α- y β-PGG-Bn.

G (mg)	BnGCl		Método	Solvente	Catalizador		Tiempo	α/β[a]	%Rend
[1 eq]	mg	eq			Base	eq	(h)		(%)
85,58	1096,9	5,0	G-Ib	CH_2Cl_2	DMAP	5,6	48	0:100	<1[b]
18,97	228,6	5,0	G-Ia	ACN	DMAP	5,6	20	59:41	59[c]
81,20	1042,0	5,0	G-Ib	ACN	DMAP	6,0	60	95:5	36[d]
65,00	832,0	5,0	G-Ic	CH_2Cl_2	TEA	6,1	60	---	(---)[e]
400,88	5000,0	4,9	G-Ib	ACN	DMAP	5,2	48	96:4	11[f]
30,77	336,0	4,3	G-Ic	CH_2Cl_2	TEA	10,0	48	0:100	8[g]
65,61	834,7	5,1	G-Ic	CH_2Cl_2	TEA	6,0	60	0:100	<1[g]
223,50	4476,4	7,9	H	CH_2Cl_2	TEA	8,7	45	0:100	6[l,a]
						8,7	45[i]+20[j]	0:100	9[m,a]
						8,7+29,1[h]	65[i,j]+55[k]	0:100	55[n,a]
58,10	1400,4[o]	5,1	I	CH_2Cl_2	DMAP-TEA	7,7:11,3	2[i]	39:61	55[p]
56,00	1157,7[q]	6,7	K	1,2-DE	TEA	23	19	100:0	3

a) relación α/β determinada por HPLC-Sistema-3: (Acclaim 120-C18; 100x2,1 mm; 3 μm; ACN; 0,310 mL/min; λ= 217 y 220 nm); b) AABnG; c) hubo formación de BnGM como producto colateral en un 17%; d), hubo formación de BnGM; e) sólo se obtuvo el AABnG (90%) de Pf 173-175°C (usado en el método I); f) α-PGG-Bn (550,5 mg), adicionalmente se obtuvo un compuesto 2015,4 mg, que recristalizado de acetona presenta un Pf 65°C (puede ser 1,2,3,6-tetra-GG-Bn); g) mayormente producto colateral AABnG (90-94%) Pf_{exp} 172-174 °C (usado en el método I); h) se adiciono luego de 65 h de reaccón; i) agitación a temperatura ambiente; j) reflujo vigoroso; k) reflujo; l) AABnG (80%); m) AABnG (76%); n) AABnG (3%); o) AABnG, obtenido como producto colateral de reacciones previas; p) α-PGG-Bn (25%), β-PGG-Bn (30%); q) BnGOBt, obtenido como producto colateral en reacciones previas.

7.5.3.6.1. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri*-*O*-Bencilgaloil)-~-D-glucosa, ~-PGG-Bn.



~-PGG-Bn

$C_{146}H_{122}O_{26}$: 2292,52 g/mol

Pf_{exp}: 65-69 °C

%Rend: 36 %

[CAS] 70424-95-2

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.6.2 (método G-Ib, pág 132), en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$, se utilizó BnGCl (1042,0 mg; mmol; 5,0 eq), G (81,20 mg; mmol; 1 eq), DMAP (mg; mmol; 6 eq) y ACN (mL) durante 60 horas. El crudo de reacción obtenido por evaporación del solvente fue lavado con acetona, donde el filtrado fue evaporado y tratado con éter de petróleo. Tanto el residuo como las aguas madres del éter de petróleo fueron purificadas por cromatografía en columna, lo cual produjo un total de 550 mg (36 % rend) de α-PGG-Bn de pureza ≥ 97% (Figs., 7.40 y 7,41). RMN-^{1}H (espectros 123, 124).

UV-Vis (ACN): 217 y 272 nm; RMN-^{1}H (270MHz; $CDCl_3$): 4,34 (*dd*; 12/5; 1H-6); 4,57-4,64 (*m*; 1H; H-5); 4,87 (*d*; 8,6 Hz; OC$\underline{H_2}$Ph); 5,00 (*d*; 9,2 Hz; OC$\underline{H_2}$Ph); 5,11 (*d*; 8,1 Hz; OC$\underline{H_2}$Ph); 5,63 (*dd*; 10,4/3,6; 1H; H-2); 5,79 (*t*; 10 Hz; 1H; H-4); 6,38 (*t*; 10 Hz; 1H; H-3); 6,85 (*d*; 3 Hz; 1H; H-1); 7,17-7,50 (*m*; 85H; 15xRC$_6\underline{H}_5$, 5x(H-2', H-6')).

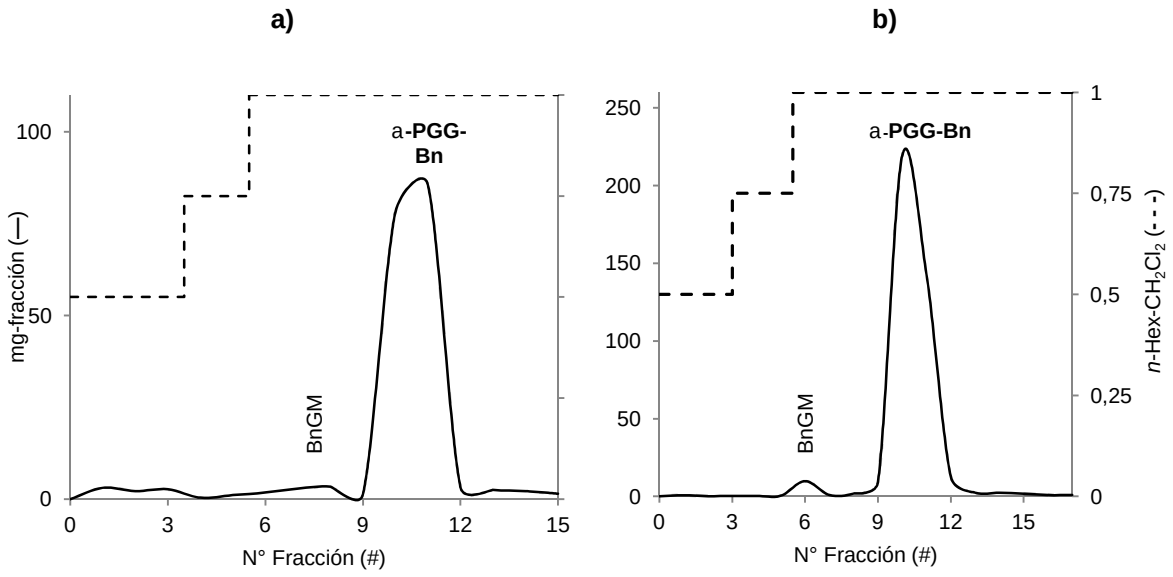


Figura 7.40. Purificación por cromatografía en columna de α-PGG-Bn, obtenido por el método G-Ib: a) fracción correspondiente al residuo de éter de petróleo; b) fracción correspondiente a las aguas madres del lavado con éter de petróleo.

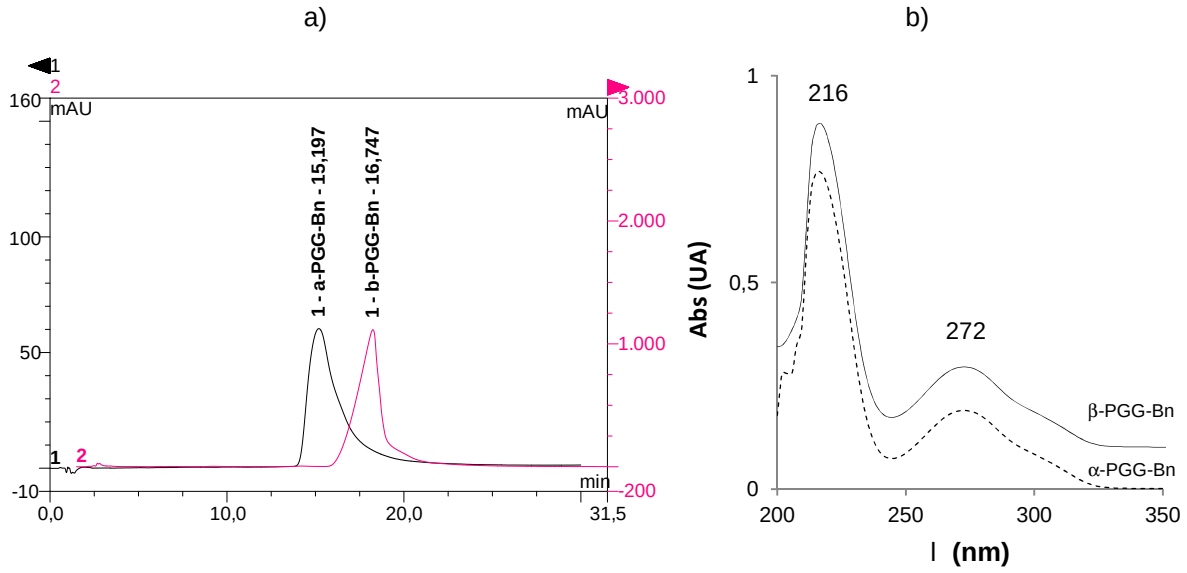
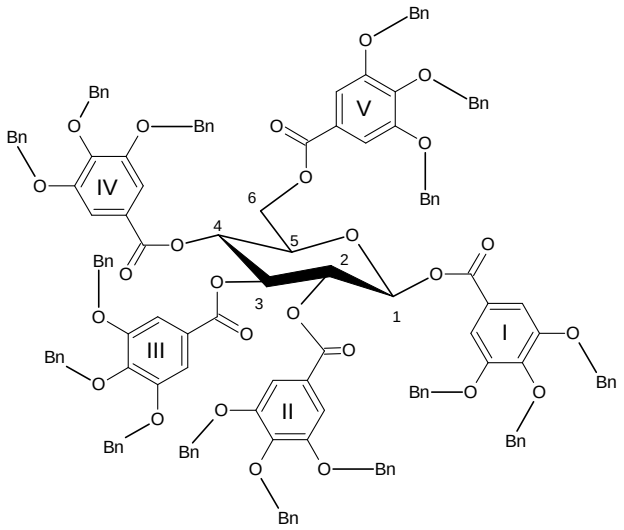


Figura 7.41. Determinación del porcentaje de pureza de α-PGG-Bn (15,197 min) y de β-PGG-Bn (16,747 min): a) HPLC-sistema-3, λ= 217 nm, pureza > 97%; b) Espectro UV en eluente.

7.5.3.6.2. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri*-*O*-Bencilgaloil)- -D-glucosa, -PGG-Bn.



-PGG-Bn

$C_{146}H_{122}O_{26}$: 2292,52 g/mol

Pf_{exp}: 69-72 °C

%Rend: 55 %

[CAS] 122625-60-9

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.6.2 (método H, pág 132), se utilizó BnGCl (4476,4 mg; 9,75 mmol; 7,9 eq), G (223,5 mg; 1,24 mmol; 1 eq), TEA (6,5 mL; 46,89 mmol; 38 eq) y CH_2Cl_2 (60 mL) durante 120 horas en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$. La formación del producto de interés (β-PGG-Bn) fue monitoreada por HPLC. Durante las primeras 45 h de reacción, se utilizó TEA (8,7 eq) a temperatura ambiente, sin embargo el producto mayoritario en ese momento fue el AABnG (80 %) mientras que el material de partida BnGCl se había consumido en su totalidad, esto también fue observado repetidamente al utilizar el método G-Ic (tabla 7.16). Sabiendo que AABnG es también un agente acilante, se decidió incrementar la temperatura hasta obtener un reflujo vigoroso, el cual se mantuvo por 20 h, como consecuencia, se incremento la presencia de β-PGG-Bn (9 %) y el AABnG disminuyo ligeramente (76 %), hecho por el cual se decidió agregar más TEA (29,1 eq), al mismo tiempo se disminuyo el calentamiento manteniendo la reacción en reflujo suave durante 55 h, tiempo en el cual la presencia del AABnG fue de 2 % (figura 7.42).

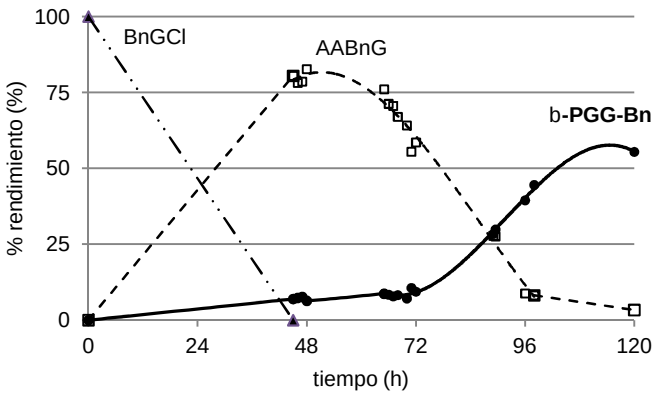


Figura 7.42. Seguimiento por HPLC de la síntesis de β-PGG-Bn, a través de AABnG formado *in situ* a partir del BnGCl, utilizando TEA como catalizador.

Siguiendo con las especificaciones del método H, el crudo de reacción obtenido fue solubilizado en CH_2Cl_2 y se agregó silica gel (2 g), posteriormente fue secada y agregada sobre una columna de placa porosa rellena de sílica (10 g; 50x18 mm) la cual fue eluida con CH_2Cl_2 (150 mL) y MeOH (100 mL). La fracción de CH_2Cl_2 (2,64 g) fue purificada por cromatografía en columna y se obtuvo un total de 1550 mg (55 % rend) de β-PGG-Bn de pureza ≥ 98% (figura 7.43).

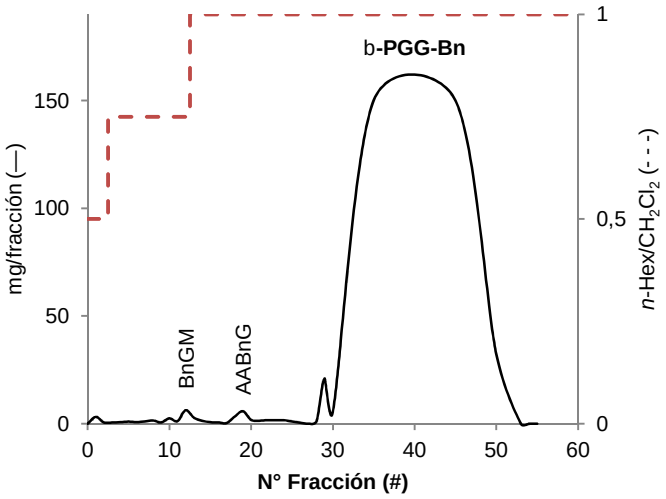
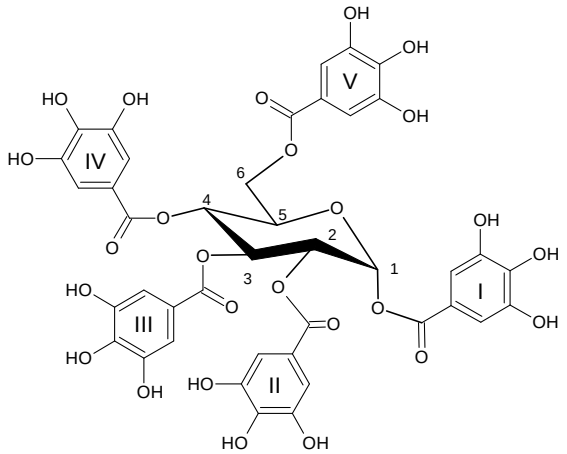


Figura 7.43. Purificación por cromatografía en columna de β-PGG-Bn, obtenido por el método H, fracción de CH_2Cl_2 proveniente del crudo de reacción.

7.5.3.7. ~-Pentagaloilglucosa, ~-PGG.



~-PGG

$C_{41}H_{32}O_{26}$: 940,68 g/mol

Pf_{exp}: > 230 °C

%Rend: 62 %

[CAS] 70470-10-9

De acuerdo con el procedimiento reportado en la literatura y descrito en el método L (pág. 134), se utilizó α-PGG-Bn (243,78 mg; 96%; 0,102 mmol; 1 eq), THF (20 mL), $Pd_{10\%}$/C (57,12 mg; 0,054 mmol; 0,5 eq) bajo atmósfera de $H_{2(g)}$. La temperatura osciló entre 37 y 44 °C durante 24 horas. La mezcla de reacción fue filtrada, a temperatura ambiente, a través de celita 545 y lavada con acetona, el filtrado fue evaporado a sequedad a temperatura ambiente. El crudo de reacción fue recristalizado de agua desionizada, sin embargo la formación del cristal fue extremadamente lenta (7 días), por lo que se utilizó una columna cromatográfica eluida con CH_2Cl_2-Acetona (1:0→0:1; v/v) para la purificación de α-PGG, tabla S12. Luego se determinó el porcentaje de pureza por HPLC (Fig., 7.44), RMN-^{1}H (espectros 125-127), RMN-^{13}C (espectro 128), DEPT-135° (espectro 129).

RMN-^{1}H (270MHz; Acetona-d_6): 3,21 (s_a; 15H; O<u>H</u>); 4,37 (*dd*; 12,8/4,2 Hz; 1H; H-6a); 4,55 (*dd*; 12,7/2,0 Hz; 1H; H-6b); 4,67-4,71 (*m*; 1H; H-5); 5,48 (*dd*; 10/3,5; 1H; H-2); 5,79 (*t*; 10 Hz; 1H; H-4); 6,19 (*t*; 10 Hz; 1H; H-3); 6,73 (*d*; 3,51 Hz; 1H; H-1); 7,00; 7,01; 7,08; 7,19; 7,27 (*s*; 10H; Gal: H-2', H-6'). RMN-^{13}C (75 MHz; Acetona-d_6): 61,88 (C-6); 68, 34 (C-4); 70,18 (C-5); 70,69 (C-2); 70,84 (C-3); 89,60 (C-1); 109,37/109,44/109,54/109,60 (Gal: C-2', C-6'); 119,47/119,70/119,94/120,73 (Gal: C-1'); 138,13/138,35/138,54/138,58/138,94 (Gal: C-4'); 145,08/145,14/145,20/ 145,47 (Gal: C-3', C-5'); 164,19/164,95/165,26/165,54/165,64 (R<u>C</u>OOR'; Gal C-7').

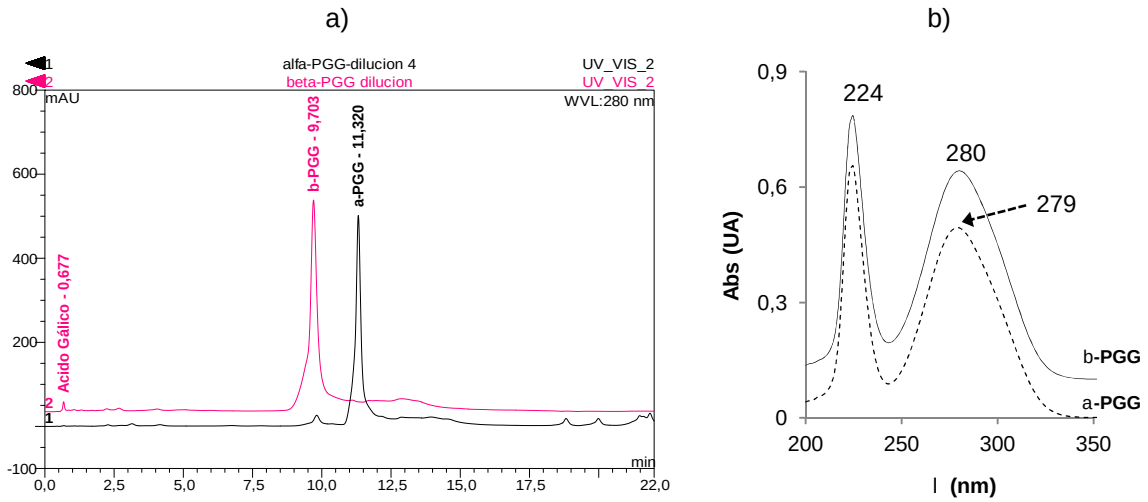
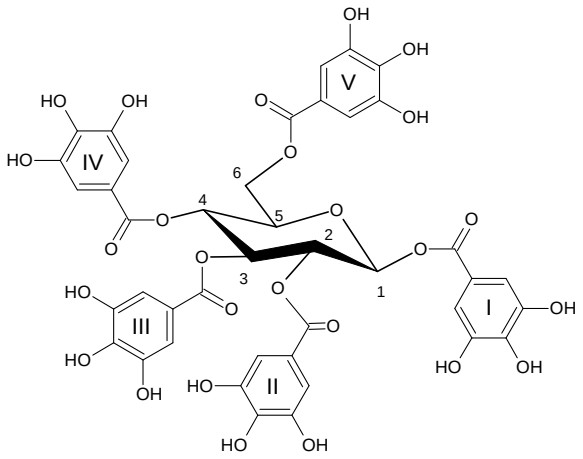


Figura 7.44. Determinación del porcentaje de pureza de α-PGG (11,320 min) y de β-PGG (9,707 min): a) HPLC-sistema-1, λ= 280 nm, pureza > 95%; b) Espectro UV en eluente.

7.5.3.8. -Pentagaloilglucosa, -PGG.



-PGG

$C_{41}H_{32}O_{26}$: 940,68 g/mol

Pf_{exp}: > 240 °C

%Rend: 49 %

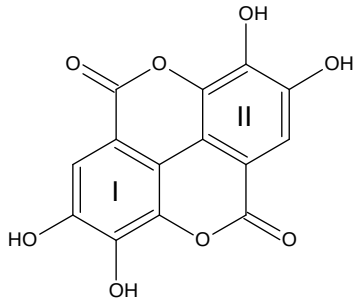
[CAS] 14937-32-7

Se realizó un procedimiento similar al de la obtención de α-PGG, sólo que en éste caso se utilizó β-PGG-Bn (234,53 mg; 0,102 mmol; 1 eq), THF (50 mL), $Pd_{10\%}$/C (53,04 mg; 0,050 mmol; 0,5 eq), T (38-44 °C) y t 24 h. La mezcla de reacción fue filtrada, a temperatura ambiente, a través de celita 545 adicionalmente se utilizó una membrana de 20 μm y lavada con acetona, el filtrado fue evaporado a sequedad a temperatura ambiente. El crudo de reacción fue recristalizado de agua desionizada y centrifugado y posteriormente lavado con

varias porciones de agua desionizada, el porcentaje de pureza fue determinado por HPLC, Fig., 7.43. RMN-^{1}H (espectros 130-132), RMN-^{13}C (espectro 133), DEPT-135° (espectro 134).

RMN-^{1}H (270MHz; Acetona-d_6): 3,14 (s_a; 15H; OH); 4,36 (*dd*; 13/5 Hz; 1H; H-6a); 4,54-4,58 (*m*; 1H; H-5); 4,56 (*d*; 11,07 Hz; 1H; H-6b); 5,61 (*m*; 1H; H-2); 5,64 (*m*; 1H; H-4); 6,01 (*t*; 9,72 Hz; 1H; H-3); 6,31 (*d*; 8,37 Hz; 1H; H-1); 6,97; 7,01; 7,05; 7,09; 7,16 (*s*; 10H; Gal: H-2', H-6'). RMN-^{13}C (75 MHz; Acetona-d_6): 62,14 (C-6); 68, 71 (C-4); 71,08 (C-2); 72,66 (C-3); 73,28 (C-5); 92,63 (C-1); 109,34/109,50/109,59 (Gal: C-2', C-6'); 119,20/119,79/119,89/120,70 (Gal: C-1'); 138,28/138,43/138,48/138,90 (Gal: C-4'); 145,01/145,09/145,14/145,27 (Gal: C-3', C-5'); 164,24/164,99/165,04/165,25/165,65 (RCOOR'; Gal C-7').

7.5.4. Síntesis de Ácido Elágico.



AE

$C_{14}H_6O_8$: 302,19 g/mol

Pf_{exp}: >360 °C

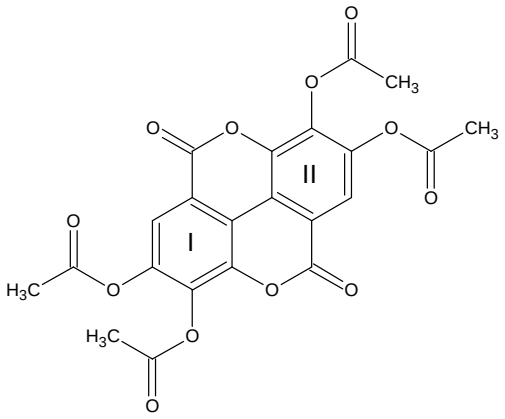
%Rend: 15 %

[CAS] 476-66-4

Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,[217] a la solución en ebullición de AG (9,99 g; 58,74 mmol; 1 eq), en AcOH (100 mL) se le agregó $H_2SO_{4(c)}$ (5 mL). Posteriormente y en pequeñas porciones, se agregó $K_2S_2O_8$ (10,00 g; 37,01 mmol; 1,3 eq). Durante la adición del agente oxidante la ebullición fue moderada, al completar la adición se retiro la fuente de calor y la mezcla de reacción se dejó en reposo durante ½ h. Seguidamente, se agregó sobre H_2O (200 mL), donde se formó un precipitado verde que luego de filtrado fue lavado con varias porciones de H_2O. Posteriormente, fue recristalizado con la mezcla

DMSO-$CHCl_3$ (1:1; v/v) lo cual produjo 1,46 g (14 %) de un sólido beige cuyo Pf_{exp} > 360 °C (Pf_{rep} > 360 °C),[304] caracterizado e identificado por espectrometría de masas (espectros 135-136).

7.5.4.1. Ácido Tetraacetil-Elágico



AAcE

$C_{22}H_{14}O_{12}$: 470,34 g/mol

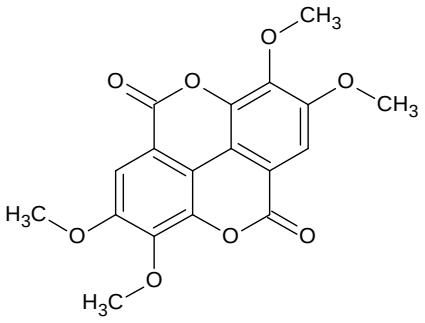
Pf_{exp}: >340 °C

%Rend: 65 %

[CAS] 4274-26-4

Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,[217] la suspensión de AE (198,81 mg; 0,66 mmol; 1 eq) en un gran exceso de Ac_2O (10 mL; 106 mmol; 160 eq) se sometió a reflujo durante 2 h. Seguidamente, se agregó sobre H_2O fría (10 mL), donde el precipitado formado, fue filtrado y lavado con varias porciones de H_2O, secado y posteriormente recristalizado de AcOEt. Así se obtuvo 201,8 mg (65 %) de un sólido beige cuyo Pf_{exp} 345-350 °C (Pf_{rep} 343-346 °C), el cual fue identificado como AAcE. Éste compuesto, también fue obtenido empleando otro método, en el que se utiliza piridina como solvente. Sin embargo, el producto de reacción aún recristalizado, en dos o tres oportunidades consecutivas, de diferentes solventes quedaba impregnado de piridina. Los solventes utilizados en la recristalización fueron: MeOH,[305] AcOEt[305] y Ac_2O.[217]

7.5.4.2. Ácido Tetrametil-Elágico



AMeE

$C_{18}H_{14}O_8$: 358,30 g/mol

Pf_{exp}: >340 °C

%Rend: 62 %

[CAS]

Utilizando el procedimiento reportado en la literatura,[305] se suspendió el AE (36,18 mg; 0,120 mmol; 1 eq) en acetona anhidra (25 mL) y se agregó un gran exceso del agente alquilante dimetilsulfato (DMS: 2,0 mL; 21,13 mmol; 176 eq) seguido de K_2CO_3 anhidro (1,81 g; 13,13 mmol; 109 eq). Luego de 36 horas en reflujo, la mezcla de reacción se filtró a temperatura ambiente y se lavó el residuo con acetona. Por otra parte, el filtrado se agregó sobre agua fría para precipitar el producto crudo, el cual fue filtrado, lavado con agua. Posteriormente fue recristalizado de MeOH lo cual produjo 26,90 mg (62 %) de un sólido beige claro cuyo Pf_{exp} > 340 °C (Pf_{rep} 350 °C con descomposición)

7.5.4.3. Ácido Tetrabencil-Elágico

Se intento sintetizar el derivado bencilado del ácido elágico utilizando dos procedimientos que difieren fundamentalmente en el solvente de reacción, los cuales son DMF (método A, pág 126) y acetofenona[306] cuyo procedimiento esta reportado en la literatura:

DMF: a través del método A se utilizó AE (199,22 mg; 0,66 mmol; 1 eq), BnCl (0,5 mL; 4,34 mmol; 6,6 eq), K_2CO_3 (736,82 mg; 5,33 mmol; 8,1 eq), DMF (10 mL), T (76-78 °C), durante 24 h en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$.

Acetofenona: usando el procedimiento reportado en la literatura, se agregó 0,4 mL de BnCl (3,48 mmol; 5,3 eq) a la mezcla de AE (201,10 mg; 0,66 mmol; 1 eq), 48,62 mg KI (0,29 mmol; 0,44 eq), 767,06 mg K_2CO_3 (5,55 mmol; 8,4 eq) en

2,60 mL de Acetofenona. Luego de 18 h a T 140°C, la solución fue filtrada en caliente y lavada con varias porciones de acetofenona caliente.

Sin embargo, en ninguno de los dos casos se logro aíslar el producto bencilado (ABnE), principalmente debido al gran número de manchas observadas por CCF, esto puede ser debido a que el calentamiento prolongado del AE en presencia de K_2CO_3 (pH > 10) sufre un proceso de descarboxilación,[307] por tanto el producto formado o sus intermediarios pueden descomponerse dando origen a numerosos productos colateales. Por otra parte el derivado tetrametílico tampoco se logro obtener utilizando las condiciones descritas en el método A, el mismo fue obtenido utilizando el agente alquilante DMS como se describió anteriormente en la sección anterior.

7.6. Resultados biológicos

Tabla 7.19.- Inhibición de G-6-Pasa de los metabolitos aislados y productos sintetizados

Procedencia	Fracción	Esquema /página	Tipo de compuesto	[μM]	% Inh			
					-H	Act	+H	Act
Control						4,86		8,48
Ouratea	OpB		Biflavona/terpenos		68	1,40	43	4,83
	OpB-M1		Biflavona		64	1,57	63	3,14
	OpC		Flavonoides		88	0,52	71	2,46
	OpC-4		Flavonoide		21	3,44	61	3,31
	OpD		Terpenos/flavonoides		92	0,35	45	4,66
	OpD-5		Biflavonoide		64	1,57	63	3,14
	OpD-9		Nor-sesquiterpeno		14	3,75	+[b]	9,41
	OpD-10		Acido carboxilico		ND	ND	ND	ND
Cassia	CfC		Flavonoides		78	0,96	22	6,61
	CfH-1		Flavonoide		60	1,74	64	3,05
	CfH-2		Flavonoide		46	2,35	63	3,14
Capraria	CbB		Porfirinas/terpenos		93	0,31	85	1,27
	CbK		Porfirinas/terpenos		25	3,27	52	4,07
	CbL		Porfirinas/terpenos		27	3,18	56	3,73
	CbN		Polifenoles/terpenos		42	2,53	7	7,89
	CbC		Iridoides/glicosidos		49	2,22	3	8,23
	CbM-2		Glicósido	400	+[b]	5,23	15	7,24
	CbM-2Ac[a]		Acetilglicósido	400	+[b]	5,01	34	5,58
Ruellia	RtB		Clorofilas/Terpenos		11	3,88	8	7,80
	RtC		Flavonoides		66	1,48	42	4,92
	RtD		Flavonoides		71	1,26	53	3,99
	RtS				50	2,18	43	4,83
	RtS_{ac}				58	1,83	40	5,09
	RtR-K		Terpenos/esteroides	400	45	2,40	24	6,44
	RtR-C				62	1,66	29	6,02
	RtR-N				22	3,40	31	5,85
	$RtR\text{-}N_{ac}$				52	2,09	42	4,92
	$RtR\text{-}N_{org}$				57	1,87	42	4,92
Síntesis	α-PAG		Acetilglucosido	400	11	3,88	20	6,76
	β-PAG		Acetilglucosido	400	+[b]	4,86	27	6,19
	α-PBG		Benzoilglucosido	400	+[b]	4,84	26	6,28
	β-PBG		Benzoilglucosido	400	+[b]	4,82	27	6,22
	α-PGG-Bn		Bencilgaloilglucosido	200	+[b]	5,42	15	7,22
	β-PGG-Bn		Bencilgaloilglucosido	200	+[b]	5,42	12	7,44
	α-PGG		Tanino hidrolisable	50	77	0,84	46	2,37
	β-PGG		Tanino hidrolisable	50	79	0,89	72	1,24
	AE		Tanino no-hidrolisable	200	63[c]	1,60	33	5,72
	AAcE		Tanino no-hidrolisable	200	35[c]	2,84	30	5,93
	AMeE		Tanino no-hidrolisable	200	34	2,89	14	7,31

a) compuesto sintético; b) porcentaje de activación; c) $p \leq 0{,}069$.

Tabla 7.20.- Determinación del IC_{50} para aquellos compuestos que mostraron una inhibición igual o superior al 35 %.

Compuesto	- H			+ H		
	IC $_{50}$ µM	± SD	± SEM	IC $_{50}$ µM	± SD	± SEM
OpB-M1	187,90	52,06	26,03			
Rutina						
CfH-1						
CfH-2						
α-PGG	8,48	2,32	1,34			
β-PGG	6,83	2,12	1,22			
AE	76,0	2,16	1,08	ND	ND	ND
AAcE	73,5	13,53	6,76	ND	ND	ND

Tabla 7.21.- Absorción intestinal de glucosa de los metabolitos aislados y productos sintetizados que mostraron una inhibición de la G-6-Pasa superior al 35 %.

Compuesto	µmol absorbidos	± SD	± SEM
Control	8,86	0,47	0,23
AE	9,43	0,30	0,22
AAcE	9,45	0,05	0,03

La concentración final de las muestras fue de 100 µM. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas

Rutina (OpA-3, OpC-4) inhibió la actividad de la G-6-Pasa en presencia de histonas (+H: 61%; microsomas rotos) tres veces más intensamente que la inhibición de la enzima en microsomas intactos (-H: 21%), (Tabla 7.19) por lo cual se puede sugerir fuertemente que este flavonoide inhibe la subunidad catalítica (SUC) de la G-6-Pasa en el sistema roto y probablemente también en microsomas intactos, aun cuando no se puede descartar un posible efecto sobre el transportador T1

Por otra parte, agathisflavona (OpB-M1, OpD-5) mostró un elevado porcentaje de inhibición sobre el sistema enzimático G-6-Pasa, siendo muy similar en microsomas intactos (-H: 64%) y rotos (+H: 63%), (Tabla 7.19), resultado que

hace presumir que esta biflavona actúa directamente sobre la subunidad catalítica (SUC) y no sobre los transportadores T1, T2 o T3. Es poco probable que un mismo compuesto sea capaz de inhibir de una manera tan cercana dos o más proteínas por lo cual lo más factible es que la biflavona esté actuando sobre la SUC. Dicha observación está fundamentada en el hecho de que la SUC es una proteína transmembrana, lo cual la hace accesible al inhibidor en presencia o ausencia de histonas. Sin embargo, esta observación debe ser comprobada a través de ensayos donde el sustrato sea pirofosfato en lugar de glucosa 6-fosfato.

Las fracciones OpA, OpB-MAi, OpC y OpD contienen rutina y agathisflavona, de modo que el elevado porcentaje de inhibición, tanto en microsomas intactos como en microsomas rotos determinado inicialmente (Tabla 7.3, pag., 137), puede ser atribuido en parte a la presencia de estos flavonoides.

El kaempferol-3-*O*-rutinósido (CfH-1; -H: 60%; +H 64%) tiene un comportamiento similar al observado para la agathisflavona, es decir actúa directamente sobre la SUC y no sobre T1. Dicho comportamiento se ve ligeramente afectado por la presencia de un sustituyente adicional sobre la unidad de glucosa de CfH-1. Esta observación se hace evidente con el kaempferol-3-*O*-(2”-ramnosil)-rutinósido (CfH-2) ya que el mismo presenta una inhibición menor en microsomas intactos (-H: 46%), sin embargo mantiene una inhibición significativa sobre la SUC (+H: 63%) al igual que CfH-1. Es decir, el sustituyente adicional en CfH-2 respecto de CfH-1 hace que disminuya la especificidad sobre la inhibición de la SUC.

Los flavonoides CfH-1 y CfH-2 provienen de la fracción CfC (esquema 7.7, pág, 162). También fueron detectados en la fracción CfD, por lo que se puede atribuir en parte la actividad biológica observada en CfD y CfC (tabla 7.3, pág., 137) a la presencia de dichos compuestos. Por otra parte, las fracciones CfB y CfR-B presentaron una inhibición significativa sobre el sistema enzimático G-6-Pasa (tabla 7.3, pág., 137) la cual puede estar asociada a la presencia de las

antraquinonas detectadas que no se lograron identificar efectivamente, esquema 7.8 pág. 163).

La fracción RtR-K está conformada mayoritariamente por triterpenos (lupeol, betulina) y esteroides (β-sitosterol) presento una inhibición moderada (-H: 45%; +H: 24%) sobre el sistema enzimático objeto de estudio. Por otra parte, la fracción RtB también contiene la misma composición triterpénica y esteroidal que RtR-K, además contiene clorofila. Sin embargo, la inhibición observada para RtB (-H: 11%; +H: 2%) con lo cual se puede concluir que la clorofila es la composición mayoritaria y no es activa frente a la G-6-Pasa. Es decir, la actividad observada para RtR-K es debida a la combinación de los triterpenos y esteroides antes mencionados. Por otra parte, la actividad biológica de cada compuesto puro no se logró determinar básicamente porque los compuestos (lupeol, betulina y β-sitosterol) no son solubles en el medio de reacción el cual consiste en soluciones acuosas.

La fracción RtR-C presentó una inhibición importante del sistema enzimático G-6-Pasa (-H: 62%; +H: 29%), los metabolitos secundarios en dicha fracción fueron concentrados en la fracción RtR-J (esquema 7.13 pág., 183) la cual presentó el mismo comportamiento por HPLC que la fracción RtR-L, esta a su vez fue fraccionada hasta obtener las fracciones RtR-Nac (-H: 52 %; +H: 42 %) y RtR-Norg (-H: 57 %; +H: 42 %), las cuales presentaron una inhibición similar entre sí y ligeramente menor que RtR-C. La actividad asociada a las fracciones RtR-Nac y RtR-Norg está ligada a la composición en común entre ambas los cuales son compuestos del tipo terpenos aromáticos.

La fracción RtS_{ac} contiene básicamente la misma composición polifenólica que RtS, sin embargo difieren en el contenido terpenoidal aromático, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de inhibición determinado para cada una. Siendo 1,2 veces más selectivo RtSac (-H: 58 %) para la inhibición de T1 que RtS (-H: 50%).

La fracción CbB (-H: 93%; +H: 85 %) mostró una elevada inhibición sobre el sistema enzimático, la misma fue fraccionada en una composición polifenólica-porfirínica (fracciones CbK y CbL, esquema 7.6, pág., 157) y una composición terpenoidal-quinónica (CbI-Fr$CHCl_3$). Las fracciones CbK (-H: 25%; +H: 52 %) y CbL (-H: 27 %; +H: 56 %) tienen afinidad por la inhibición del transportador T2, por tanto la inhibición de T1 observada para CbB está asociada a la composición terpenoidal-quinónica. Por otra parte, el glicósido manitol (CbM-2) y su derivado acetilado (CbM-2Ac) no tienen efecto inhibitorio del sistema enzimático G-6-Pasa.

Entre los productos sintetizados, los anómeros α- y β-pentaacilglucosa (PAG, PBG y PGG-Bn) no presentaron actividad biológica significativa (<10%), lo cual indica claramente que el grupo galoilo es fundamental para la actividad biológica asociada a los taninos hidrolizables α-PGG y β-PGG. A concentraciones finales de 50 μM, estos compuestos presentaron un porcentaje de inhibición de 77 y 79 % respectivamente con una significancia estadística importante ($p<0,00006$).

Por otra parte, el ácido elágico (AE) sintetizado presentó un porcentaje de inhibición de 63% cuyo IC_{50} fue 76,50 μM, su derivado acetilado (AAcE) mostro un IC_{50} 73,5 μM, mientras que, el derivado alquilico (AMeE) fue inactivo frente a la G-6-Pasa. Adicionalmente, AE y AAcE no mostraron actividad inhibitoria de la absorción intestinal de glucosa.

Sección IV

Conclusiones

Resumen

8. Conclusiones

- Referencias

- Anexos

- Espectros

Capítulo 8

CONCLUSIONES

8.1. Conclusiones Fitoquímicas

- De la planta *O. polyantha* Engl., se aisló por HSCCC, e identificó por técnicas espectroscópicas el flavonoide rutina (OpC-4), la biflavona agathisflavona (OpD-5, OpB-M1), el ácido 4-hidroxibenzóico (OpD-10) y un nuevo megastigmano identificado como (6*R*,9*S*)-6′-(4”-hidroxibenzoil)-roseósido (OpD-9). Adicionalmente, se obtuvieron fracciones enriquecidas en lupeol y β-sitosterol (OpB_{Hex}-$FrCHCl_3$), agathisflavona (OpA, OpG) y rutina (OpA, OpC, OpG, OpH) las cuales fueron identificadas por CCF y HPLC comparando con muestras auténticas. Se evaluó el contenido de flavonoides totales como % de rutina en las fracciones OpC, OpG y OpH, por ensayos colorimétricos con $AlCl_3$, obteniendo valores de: 7,08 ± 0,04; 31,9 ± 1,0; y 12,4 ± 0,3 %, respectivamente.

- De la planta *C. fruticosa* Mill., se aisló e identificó, por cromatografía flash y técnicas espectroscópicas el ester esteriodal β-sitosterol palmitato•$^1/_2$•H_2O (CfRS-3) y los flavonoides glicosilados kaempferol 3-*O*-rutinósido (nicotiflorin, CfH-1) y kaempferol 3-*O*-(2”-ramnosil)rutinósido (clitorin, CfH-2). Adicionalmente, se obtuvieron fracciones enriquecidas en β-sitosterol (CfB), y en los flavonoides nicotiflorin y clitorin (CfF, CfYY).

- De la planta *C. biflora* L., se aisló e identificó el glicosido manitol (CbE), el cual fue purificado por múltiples procesos de recristalización (CbM-2) y caracterizado por sus propiedades físicas y por la obtención de su derivado semisintético hexaacetilmanitol (CbM-2Ac). Adicionalmente, se obtuvieron fracciones enriquecidas en β-sitosterol (CbI-Fr$CHCl_3$), azúcares (CbG, CbO), porfirinas tipo feoforbido-a (CbK y CbL) y terpenos aromáticos (CbK, CbF, CbN, CbP).

- De la planta *R. tuberosa* L., se obtuvieron fracciones enriquecidas en lupeol, betulina y β-sitosterol (RtB, RtR-1, RtR-K), azúcares (RtI, RtR-G) polifenoles (RtJ, RtQ_{ac}, RtS_{ac}, $RtR\text{-}M_{ac}$, $RtR\text{-}N_{ac}$) y terpenos aromáticos (RtQ_{org}, RtS_{org}, $RtR\text{-}M_{org}$, $RtR\text{-}N_{org}$). En RtR-K se cuantificó por densitometría óptica el contenido porcentual de: lupeol 37,3 ± 0,8; β-sitosterol 15,6 ± 0,6 y betulina (4,3 ± 0,3) % respectivamente.

8.2. Conclusiones Sintéticas

- Durante el proceso sintético se realizaron adaptaciones de los métodos reportados para la síntesis de un producto en particular y adicionalmente, se desarrollaron nuevas metodologias de síntesis para un metabolito particular.
- El progreso de la reacción para la obtención de α-PGG-Bn y β-PGG-Bn se realizó por HPLC.
- La síntesis de α-PGG-Bn y β-PGG-Bn se realizó en condiciones estereoselectivas.

8.3. Conclusiones Biológicas

- Los metabolitos aislados y sus derivados semisintéticos presentaron mayor porcentaje de inhibición del sistema enzimático G-6-Pasa microsomal dependiendo de la polaridad y del grado de oxigenación del metabolito ensayado. Así, los terpenos y esteroides no fueron activos mientras que la actividad de los flavonoides glicosilados fue moderada, la cual se incrementó hasta un 63 % de inhibición para la biflavona agathisflavona.
- Los flavonoides aislados agathisflavona, nicotiflorin y clitorin mostraron inhibición significativa sobre el sistema enzimático G-6-Pasa microsomal cuyos valores fueron 63, 60 y 46 % respectivamente. Por otra parte, las fracciones terpenoidal (RtR-K) y porfirínicas (CbK y CbL) presentaron una inhibición moderada sobre la G-6-Pasa con 45, 25 y 27% respectivamente.
- Entre los productos sintetizados, los anómeros α- y β-pentaacilglucosa (PAG, PBG y PGG-Bn) no presentaron actividad biológica significativa (<10%), lo cual indica claramente que el grupo galoilo es fundamental para la actividad biológica asociada a los taninos hidrolizables α-PGG y β-PGG. A concentraciones finales de 50 μM, estos compuestos presentaron un porcentaje de inhibición de 77 y 79 % respectivamente con una significancia estadística importante ($p<0,00006$).
- Por otra parte, el ácido elágico (AE) sintetizado presentó un porcentaje de inhibición de 63% cuyo IC_{50} fue 76,50 μM, su derivado acetilado (AAcE) mostro un IC_{50} 73,5 μM, mientras que, el derivado alquilico (AMeE) fue inactivo frente a la G-6-Pasa. Adicionalmente, AE y AAcE no mostraron actividad inhibitoria de la absorción intestinal de glucosa.

REFERENCIAS

[1] Kuo-Chen C. (**2004**), *"Molecular Threrapeutic Target for Type-2 Diabetes", J. Proteome Res.* 3(6), 1284-1288.

[2] Bruneton J. (**2001**), "Plantas tóxicas: Vegetales peligrosos para el hombre y los animales", Editorial Acribia S. A.

[3] Burchell A. and Waddell I.D. (**1991**), "The Molecular Basis of the Hepatic Microsomal Glucose-6-Phosphatase", *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, 1092(2), 129-137.

[4] McCormack J. G., Westergaard N., Kristiansen M., Brand C. L. and Lau J., (**2001**) "*Pharmacological Aproaches to Inhibit Endogenous Glucose Production as a Mean of Anti-Diabetic Therapy"*, *Curr. Pharm. Design*, 7(14), 1451-1474.

[5] Ito Y., y Conway W., (**1996**), High-Speed Countercurrent Chromatography, Wiley-Interscience. New York.

[6] ***a***) Zea E. (**2004**), "Estudio fitoquímico de *Phyllanthus tenellus* (Roxb) guiado por bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-Fosfatasa", Tesis de Pre-Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

b) Díaz Y. (**2005**), "Estudio de metabolitos secundarios de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Euphorbiaceae) y su actividad biológica", Tesis de Pre-Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

c) Mora K. (**2005**), "Aislamiento de los metabolitos secundarios de la especie *Pterocarpus santalinus*. Evaluación de la inhibición sobre la Glucosa-6-Fosfatasa", Tesis de Pre-Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

d) García W. (**2007**), "Aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Pterocarpus santalinus*. Estudio de la actividad antioxidante y evaluación de la inhibición sobre la Glucosa-6-Fosfatasa", Tesis de Pre-Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

e) Ávila L. (**2009**), "Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Bauhinia variegata* L. biodirigido por ensayos de inhibición sobre la enzima Glucosa-6-Fosfatasa", Tesis de Pre-Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

[7] ***a***) H. Pittier (**1978**), "Manual de las plantas usuales de Venezuela", Fundación Eugenio Mendoza, Caracas-Venezuela.

b) P. Rodríguez (**1983**), "Plantas de la medicina popular venezolana de venta en herbolarios", Sociedad venezolana de Ciencias Naturales, Caracas- Venezuela.

c) F. Delascio Chitty, "Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana", Jardín Botánico, INPARQUES, Caracas-Venezuela (1985)

d) (**1988**) "273 Plantas medicinales de Venezuela", Editorial PANAPO, Caracas – Venezuela.

e) P. Font Quer (**1983**), "Plantas medicinales. El Dioscórides renovado", 8va Edición, Editorial Labor, Barcelona España.

f) E. Arias Alzate (**1971**), "Plantas medicinales", 8va Edición, Editorial Salesiana, Medellín – Colombia.

g) H. García Barriga (**1974**, **1975**), "Flora medicinal de Colombia", Tomos I y II, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Bogota – Colombia.

h) Morton J.F. (**1981**), "Atlas of medicinal plants of middle America", Thomas, Illinois.

[8] Hasegawa M. (**2010**), "Notas sobre la química de productos naturales", Trabajo de Ascenso a Profesor Titular, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela (manuscrito en preparación).

[9] Rodríguez D. (**2006**), "Metabolitos secundarios de *Ouratea polyantha* (Ochnaceae) con posible actividad biológica sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa", Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.

[10] Stein B., (**1961**), "Ochnaceae DC", *Flora of Guatemala*, 24(7), 10-17.

[11] Araújo M., Aragão F., Alvarez M., Durantini E., Carvalho M., (**2013**), "Antifungal activity of extracts from two *Ouratea* species on *Candida albicans*", *J. Applied Pharmaceutical Sci.,* 3(6) 152-155.

[12] Engler A., (**1876**), *Ouratea polyantha* (Trianna & Planchon) Engl., *Flora Brasiliensis*, 12(2), 317.

[13] Camaripano B. y Castillo A., (**2003**), "Catálogo de espermatofitas del bosque estacionalmente inundable del río Sipapo, Estado Amazonas, Venezuela", *Acta Bot. Venez.*, 26(2), 125-230.

[14] http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/16761962.

[15] http://plantillustrations.org/species.php?id_species=731146.

[16] **a**) Triana J.J. (**1851**), "Isotype of Gomphia polyantha Triana & Planch. [family OCHNACEAE]",The William and Lynda Steere Herbarium of the New York Botanical Garden (NYBG), NY00428933. (disponible en: http://plants.jstor.org/specimen/ny00428933).

b) Castillo A. (**1992**), "UCV-Plantas de Venezuela", Jardín Botánico de Caracas, Proyecto CONICIT S1-95-001697.

[17] Zintchem A., Atchadé A., Tih R., Mbafor J., Blond A., Pegnyemb D. y Bodo B. (**2007**), "Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tieggh. (ex Keay) (Ochnaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(4), 255-256.

[18] Ramos L. (**2007**), “Considerações sobre oe gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, estudo químico de duas espécies de ochnaceae: *Ouratea hexasperma* St Hil e *Ouratea cuspidata* St. Hil e Actividades Biologicas”, Tesis Doctoral, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. (artículo en Portugues)

[19] Felicio J., Rossi M., Braggio M., Gonçalez E., Pak A., Cordeiro I. y Felicio R. (**2004**), “Chemical constituents from *Ouratea parviflora*”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(1), 79-81.

[20] Mbing J., Pegnyemb D., Tih R., Sondengam B., Blond A. y Bodo B. (**2003**), “Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark”, *Phytochemistry*, 63(4), 427-431.

[21] Velandia J., Carvalho M. y Braz-Filho R. (**1998**), “Novel trichloro- and tetrachloroisoflavones isolated from *Ouratea semiserrata*”, *Nat. Prod. Res.*, 12(3), 191-198.

[22] Daniel J., de Carvalho M., Cardoso R., Agra M. y Eberlin M. (**2005**), “Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae)”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(3B), 634-638.

[23] De Souza J., Fernandes C., Grivicich I., Da Rocha A. y De Carvalho M. (**2007**), “Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cells lines”, *Indian J. Ethnopharm.*, 39(4), 184-189.

[24] Moreira I., Sobrinho D., De Carvalho M. y Braz-Filho R. (**1994**), “Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*, *Phytochemistry*, 35(6), 1567-1572.

[25] Zintchem A., Bikobo D., Atchadé A., Mbing J., Gangoue-Pieboji J., Tih R., Blond A., Pegnyemb D. y Bodo B. (**2008**), “Nitrile glucosides and serotobenine from *Campylospermum glaucum* and *Ouratea turnarea*”, *Phytochemistry*, 69(11), 2209-2213.

[26] Tih R.G., Sondengam B.L., Martin M.T. y Bodo B. (**1989**), “Structure of lophirones B and C, biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*”, *Phytochemistry*, 28(5), 1557-1559.

[27] Mbing J., Bassomo M., Pengyemb D., Tih R., Sondermgam B., Blond A. y Bodo B. (**2003**), “Constituents of *Ouratea flava*”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(2), 215-217.

[28] Velandia J., De Carvalho M., Braz-Filho R. y Werle A. (**2002**), “Biflavonoids and glucopyranoside derivate from *Ouratea semiserrata”. Phytochem. Anal*., 13(5), 283-292.

[29] Velandia J., Carvalho M. and Braz-Filho R. (**1998**), “Ácido ent-16α,17-diidroxicauran-19-oico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquimicos dos carbonos quirais C-4 e C-16”. *Química Nova*, 21(4), 397-404.

[30] Carvalho M., Carvalho, G. y Braz-Filho R. (**2000**), “Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of Atranorin and its new acetyl derivate”. *Journal Brazilian Chemical Society*, 11(2), 143-147.

[31] Moreira I., de Carvalho M., Bastos A. y Braz-Filho R. (**1999**), “A Flavone dimer from *Ouratea hexasperma*”, *Phytochemistry*, 51(6), 833-838.

[32] Manga, S., Messanga B. y Sondengam B. (**2001**), “7,8-Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*”, *Fitoterapia*, 72(6), 706-708.

[33] Brandao, G., *et al.*, (**2011**), “Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III”, *J. Chem. Pharm. Res.*, 3(4), 223-236.

a) Flavonoides y proantocianidinas.

[34] Valadares, Y., *et al.*, (**2003**), "Actividade vasodilataroa *in vitro* de species de *Ouratea* (Ochnaceae) e de fracoes de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl.", *Brazilian J. Pharmaceutical Sci.*, 39(1), 83-91.

[35] Luthria D., *et al*., (**2005**), "A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (Petroselium crispum) flakes as a model substrate", *J.Sci. Food Agric*., 86(), 1350-1358.

a) Apigenina-glicosido, apigenina, diosmetina-glicosido.

[36] Dubber M-J., y Kanfer, I., *et al.*, (**2004**), "High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in Ginkgo biloba solid oral dosage forms", *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 7(3), 303-309.

a) Rutina, quercitrina, quercetina, kaempferol, isoramnetina.

[37] Innocenti, M., *et al*., (**2007**), "Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: Detection and quantification by HPLC/DAD/ESI/MS", *JAFC*, 55(), 6596-6602.

a) PDA (240, 280, 330 y 350), apigenina-gli, luteolina-gli, cupressoflavona, amentoflavona, metilbiflavonas.

[38] Yuan Y., *et al.*, (**2008**), "How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high performance counter-current chromatography", *JCA*, 1194(), 192-198.

a) Amentoflavona, robustaflavona, hinokiflavona, bilobetina, isocriptomerina.

[39] Lee, M-K., *et al*., (**2006**), "Osteoblast differentiation stimulating activity of biflavonoids from *Cephalotaxus koreana*", *Bioorganic Med. Chem. Lett.,* 16(), 2850-2854.

a) Amentoflavonas.

[40] do Nascimento, L., *et al.*, (**2008**), " Biflavones and triterenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC) Engl., Ochnaceae", *Brazilian J. of Pharmacognosy*, 19(4), 823-827.

a) 7,7''-di-*O*-metilamentoflavona, 4''',7,7''-tri-*O*-metilamentoflavona, 4',4''',7,7''-tetra-*O*-metilamentoflavona, amentoflavona.

[41] Murakami, A., *et al.*, (**1991**), "Possible inhibitor of tumor promotion and related polyphenol from *Lophira alata*, a medicnal plant in tropical west Africa", *Agric. Biol. Chem.*, 55(4), 1151-1153.

a) Lophirona A; b) Lophiaric acid

[42] Ariyasena, J., *et al.*, (**2004**), "Ether-linked biflavonoids from *Quintinia acutifolia*", *JNP*, 67(), 693-696.

a) ochnaflavonas

[43] Tang, S., (**2003**), "Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activity from *Ochna macrocalyx*", *Planta Med.*, 69(3), 247-253.

a) Hexaspermonas y calodenina.

[44] Krauze-Baranowska, M., *et al*, (**2002**)*, "*The Chemical Composition of *Microbiota decussate*", *Z. Naturforsch*., 57c, 998-1003.

a) Cuppresuflavone, 7-*O*-metilamentoflavona, amentoflavona.

[45] Cardoso, C., *et al.*, (**2005**), " New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinate* and their antioxidant activities", *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6B), 1353-1359.

[46] Sannomiya M., *et al*., (**2004**), "Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK)", *JCA*, 1035(), 47-51.

a) Amentoflavona, quercetin-3-*O*-α-L-arabinosa, quercetin-3-*O*-β-galactosa.

[47] Chen, L-Y., *et al*., (**2012**), "Structutal elucidation and bioactivity of biflavonoids from the stems of *Wikstroemia taiwanensis*" *Int. J. Mol. Sci.*, 13(), 1029-1038.

a) Wikstaiwanones (dìmeros 3→6'' y 3→3'' de flavonas con flavonoles)

[48] Ichino, C., *et al*., (**2006**), "Antimalarial activity of biflavonoids from *Ochno integerrima*", *Planta Med.*, 72(), 611-614.

[49] Côrtes, S.F., *et al*., (**2002**), "Mechanism of endothelium-dependant vasodilatation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata*" *Planta Med*., 68(5), 412-415.

a) PDA (220, 280 y 320), Cianidina, pro-antocinidina.

[50] Zuo, S., y Chen W., (**2008**), "Determination of oleanolic and ursolic acids in different parts of *Perilla frutescens* by high performance liquid chromatography", *J. Braz. Chem. Soc.*, 19(7), 1429-1432.

a) Ácido ursólico, ácido oleanólico.

[51] Mutai, C., *et al.,* (**2007**), "Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activiity" *Molecules*, 12(), 1035-1044.

a) Atranorina, lupanos.

[52] Durán-Espinosa C. (**2006**), "Flora de Veracruz", Centro de Investigaciones Tropicales, Fascículo 139, 1-3.

[53] Stevens, P. (**2001**), "Angiosperm phylogeny". (Website. Version 7, Mayo 2006. http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/)

[54] Durán-Espinosa C. (**2006**), "Flora de Veracruz", Centro de Investigaciones Tropicales, Fascículo 139, 32-44.

[55] Descourtilz M.E. (**1827**), "Flore pittoresque et médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles", Tomo 4, 313-316.

[56] **a**) Espécimen identificado por Dr. Stephen Tillett del Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26391.

b) Fotografía de una porción del espécimen de *Capraria biflora* L. antes de ser almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

[57] Tundis R., Deguin B., Dadoro D., Statti G., Tillequin F. y Menichini F. (**2008**), "Iridoid glycosides from Linaria multicaulis (L.) Miller subsp. multicaulis (Scrophulariaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(2), 142-145.

[58] Jin L., Xue H-Y., Jin L-J., Li S-Y. y Xu Y-P. (**2008**), "Antioxidant and 26áncreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes", *Eur., J., Pharmacology*, 582(1-3), 162-167.

[59] Cogne A-L. (**2002**), "Phytochemical investigation of plants used in Africa traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae)", Tesis Doctoral, Universite de Lausanne, Laussane, Switzerland.

[60] Acosta S. L., Muro L. V., Sacerio A. L., Peña A. R. y Okwei S. N. (**2003**), "Analgesic properties of *Capraria biflora* leaves aqueous extract", *Fitoterapia*, 74(7), 686-688.

[61] Muro L.V., (**2009**), "Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L.", Tesis Doctoral, Instituto Superior de Ciencias Médicas Victoria de Girón, Universidad Central Marta Abreu de las Villas, La Habana, Cuba.

[62] Souza L.G., Almeida M.C., Monte F.J., Santiago G.M., Braz-Filho R., Lemos T.L., (**2012**), "Constituintes químicos de *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) e atividade larvicida de seu óleo essencial", *Quim. Nova*, 35(11), 2258-2262.

[63] Fonseca A.M. (**2002**), "Estudo fitoquimico dos constitutes fixos e volátiles de *Capraria biflora*", Tesis de maestría, UFC, Fortaleza-Ceará (artículo en portugues).

[64] Franco M., (**2012**), "Evaluación fitoquímica, actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *Capraria biflora* L. (Schrophulariaceae) de la localidad de Guaranache, Cumaná, Estado Sucre", Tesis de Pre-Grado, Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente.

[65] Aquino T., Amorin E., Feliciano G., Lima E., Gomes M., Lima C., Albuquerque U. y Bernardo-Filho M. (**2007**), "Influence of biflorin on the labelling of red blood cells, plasma protein, cell protein, and lymphocytes with technetium-99m: *in vitro* study", *Bazilian J. of Pharmacognosy*, 17(2), 181-185.

[66] Lemos T., Monte F., Santos A., Fonseca A., Santos H., Oliveira M., Costa S., Pessoa O. y Braz-Filho R. (**2007**), "Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities", *Nat. Prod. Res.*, 21(6), 529-550.

[67] Collins D., Gallimore W., Reynolds W., Williams L. y Resse P. (**2000**), "New Skeletal Sesquiterpenoids, Caprariolides A-D, from *Capraria biflora* and Their Insecticidal Activity", *J. Nat. Prod.*, 63(11),1515-1518.

[68] Fonseca A.M., Pessoa O.D.L, Lemos T.L.G. y Nascimentos R.F. (**2006**), "Constituents of the essential oil of *Capraria biflora* from northeast Brazil", Journal of Essential Oil Research, 18(2), 158-159.

[69] Heinrich M. y Rimpler H. (**1989**), "Harpagide and 8-*O*-Benzoylharpagide from the mixe medicinal plant *Capraria biflora*", *Planta Medica*, 55(8), 626.

[70] Fonseca A., Pessoa O., Silveira E., Monte F., Braz-Filho R. y Lemos T., (**2003**), "Total assignments of ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*", *Magn. Reson. Chem.,* 41(12), 1038-1040.

[71] Gonçalves de Lima O., Keller-Schierlein W. y Prelog V., (**1958**), "Über das biflorin", *Helv. Chim. Acta*, 41(5), 1386-1390.

[72] Comin J., Gonçalves de Lima O., Grant H., Jackman L.M., Keller-Schierlein W. y Prelog V., (**1963**), "Über die constitution des biflorins, eines *o*-chinons de diterpen.reihe", *Helv. Chim. Acta*, 46(1), 409-415.

[73] Carvallo M., Pereira D., Marques A., Pinho M., Gomes T., Loyola O., Pessoa C., Odorico M., Negreiros A., Alves N. Y Costa-Lotufo L. (**2007**), "Antitumor activity of Biflorin, an *o*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*", *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8), 1416-1421.

[74] Anzoategui L., Garralla S. y Herbst R. (**2007**), "Fabaceae from the El Morterito Formation (Upper Miocene), valle del Cajón, Catamarca province, Argentina", *Amerghiniana*, 44(1), 183-196.

[75] Woodson R. y Scery R., (**1951**), "Flora of Panama", Annals of the Missouri Botanical Garden, 5(3), 80-82.

[76] Schnee L., (**1984**), "Plantas comunes de Venezuela", Ediciones de la biblioteca de la UCV, 596.

[77] Meena R. y Kalidhar S. (**1998**), "Phytochemical sutdy of *Cassia fruticosa* flowers", *Journal of Medicinal Aromatic and Aromatic Plant Science*, 20(1), 3-4.

[78] Watson-Samudio H. (**1991**), "Evaluación Fitoquímica de las hojas de *Senna alata* y *Cassia fruticosa*", Tesis de Maestria, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

[79] **a**) Espécimen de *Cassia fruticosa* Mill., colectado e identificado por Dr. Stephen Tillett del Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26392.

b) Fotografía de las flores de un espécimen de *Cassia fruticosa* Mill.

[80] Fernand V., Dinh D., Washington S., Fakayode S., Losso J., Ravenswaay R. y Warner I. (**2008**), "Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of high performance liquid chromatography", *Talanta*, 74(4), 896-902.

[81] Zhu L., Yu S., Zeng X., Fu X. y Zhao M. (**2008**), "Preparative separation and purification of five anthraquinones from *Cassia tora* L. by high-speed counter-current chromatography", *Separation and Purification Technology*, 63(3), 665-669.

[82] Friedrich H. y Baier S. (**1973**), "Antracen-derivative in kalluskulturen aus *Cassia angustifolia*", *Phytochemistry*, 12(6), 1459-1462.

[83] Lemli J. y Cuveele J. (**1975**), "Les hétérodides anthoniques de *Cassia angustifolia* pendant le développement de la plante", *Phytochemistry*, 14(5), 1397-1401.

[84] Hata K., Baba K. y Kozawa M. (**1978**), "Chemical Studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. I. Anthraquinones including cassialoin, a new anthrone *C*-glycoside", *Chem. Pharm. Bull.,* 26(12), 3792-3797.

[85] Anu S. y Rao J. (**2001**), "Oxantrone esters from the aerial parts of *Cassia kleinii*", *Phytochemistry* 57(4), 583-585.

[86] Anu S. y Rao J. (**2002**), "Oxantrone esters from the roots of *Cassia kleinii*", *Phytochemistry* 59(4), 425-429.

[87] Marcano D. y Hasegawa M. (**2002**), "Fitoquímica Orgánica", CDCH-UCV, Caracas, Venezuela. Cap. 3, 213-216.

[88] Hayashi S., Yoshida A., Tanaka H., Mitani Y. y Yoshizawa K. (**1980**), "Analytical Studies on the active constituents in crude drugs. IV. Determination of sennosides in Senna and formulations by high-performance liquid chromatography", *Chem. Pharm. Bull*., 28(2), 406-412.

[89] Alemayehu G., Abegaz B., Snatzke G. y Duddeck H. (**1988**), "Bianthraquinones and a spermidine alcaloide from *Cassia floribunda*", *Phytochemistry*, 27(10), 3255-3258.

[90] Kitanaka S. y Takido M. (**1989**), "Two new bitetrahydroanthracenes from *Cassia occidentalis* L.", Chem., *Pharm., Bull.,* Vol., 37(2), 511-512.

[91] Koyama J., Morita I., Tagahara K. y Aqil M. (**2001**), "Bianthraquinones from *Cassia siamea*", *Phytochemistry*, 56(8), 849-851.

[92] Hata K., Baba K. y Kozawa M. (**1979**), "Chemical Studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. II. Nonanthraquinoic constituents, *Chem. Pharm. Bull.,* 27(4), Págs., 984-989.

[93] Baba K., Kido T., Maeda K., Taniguchi M. y Kozawa M. (**1992**), "Two stilbenoids from *Cassia garrettiana*", *Phytochemistry*, 31(9), 3215-3218.

[94] Baba K., Kido T., Taniguchi M. y Kozawa M. (**1994**), "Stilbenoids from *Cassia garrettiana*", *Phytochemistry*, 36(6), 1509-1513.

[95] Wu Q., Wang Z., Tang L., Fu M. y He Y. (**2009**), "A new flavonoid glucoside from *Cassia angustifolia*", *Chinese Chemical Letters*, 20(3), 320-321.

[96] Tiwari R.D. y Singh J. (**1977**), "Flavonoids from the leaves of *Cassia occidentalis*", *Phytochemistry,* 16(7), 1107-1108.

[97] Kitanaka S. y Takido M. (**1992**), "Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* CAV. III. The structures of two new flavone glycosides", Chem., *Pharm., Bull.,* 40(1), 249-251.

[98] Kitanaka S. y Takido M. (1992), "Demethyltorosaflavones C and D from *Cassia nomame*", *Phytochemistry*, 31(8), 2927-2929.

[99] Hatano T., Mizuta S., Ito H. y Yoshida T. (**1999**), "*C*-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*", *Phytochemistry,* 52(7), 1379-1383.

[100] Malan E., Swinny E., Ferreira D. y Steynberg P. (**1996**), "The structure and synthesis of proguibourtinidins from *Cassia abbreviata*", *Phytochemistry*, 41(4), 1209-1213.

[101] Morimoto S., Nonaka G-I., Chen R-F. y Nishioka I. (**1988**), "Tannins and related compounds-LXI. Isolation and structures of novel bi- and triflavonoids from leaves of *Cassia fistula* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, 36(1), 39-47.

[102] Kashiwada Y., Itzuka H., Yoshioka K., Chen R-F., Nonaka G-I. y Nishioka I. (**1990**), "Tannins and related compounds. XCIII. Ocurrence of enantiomeric proanthocyanidins in the Leguminosae plants, *Cassia fistula* L. and *C. javanica* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, 38(4), 888-893.

[103] Viegas C. *Jr*., Bolzani V., Furlan M., Barreiro E., Young M., Tomazela D. y Eberlin M. (**2004**), "Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*", *J., Nat., Prod.,* 67(5), 908-910.

[104] Viegas C. *Jr*., Silva D., Pivatto M., Rezende A., Castro-Gambôa I., Bolzani V. y Nair M. (**2007**), "Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits", *J., Nat., Prod.,* 70(12), 2026-2028.

[105] Morita H., Oshimi S., Hirasawa Y., Koyama K., Honda T., Ekasari W., Indrayanto G. y Zaini N.C. (**2007**), "Cassiarins A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*", *Organic Letters*, 9(18), 3691-3693.

[106] Biwas K.M. y Mallik H. (**1986**), "Cassiadinina, a chromone alkaloid and (+)-6-hydroxy-mellein, a dihydroisocoumarin from *Cassia siamea*", *Phytochemistry*, 25(7), 1727-1730.

[107] Yao Y-S. y Yao Z-J. (**2008**), "Biomimetic total synthesis of cassiarins A and B", *J. Org. Chem.,* 73(14), 5221-5225.

[108] Jones L., Bartholomew B., Latif Z., Sarker S.D. y Nash R.J. (**2000**), "Constituents of *Cassia laevigata*", *Fitoterapia*, 71(5), 580-583.

[109] Sircar P., Dey B., Sanyal T., Ganguly S. y Sircar S. (**1970**), "Gibberellic acid in the floral parts of *Cassia fistula*", *Phytochemistry*, 9(4), 735-736.

[110] Kinjo J., Ikeda T., Watanabe K. y Nohara T. (**1994**), "An anthraquinone glicoside from *Cassia angustifolia* leaves", *Phytochemistry*, 37(6), 1685-1687.

[111] Kitanaka S., Igarashi H. y Takido M. (**1985**), "Formation of pigments by the tissue culture of *Cassia occidentalis*", *Chem*., *Pharm., Bull.,* 33(3), 971-974.

[112] Kuo Y-H., Lee P-H. y Wein Y-S. (**2002**), "Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*", *J. Nat. Prod.*, 65(8), 1165-1167.

[113] Oshimi S., Tomizawa Y., Hirasawa Y., Honda T., Ekasari W., Widyawaruyanti A., Rudyanto M., Indrayanto G., Zaini N.C. y Morita H., (**2008**), "Chrobissiamone A, a new bischromone from *Cassia siamea* and a biomimetic transformation of 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone", *Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(13), 3761-3763.

[114] Kalidhar H. y Kalidhar S. (**1993**), "Alatinona, an anthraquinone from *Cassia alata*", *Phytochemistry*, 32(6), 1616-1617.

[115] Li X-C., Dunbar D.C., Elsohly H.N., Jacob M.R., Nimrod A.C., Walker L.A. y Clark A.M. (**2009**), A new naphthopyrone derivative from *Cassia quinquangulata* and structural revision of quinquangulin and its glycosides", *J. Nat. Prod.*, 64 (9), 1153-1156.

[116] Dale T. y Court W.E. (**1981**), "Amino acid of *Cassia* seeds", *Pharmaceutical Biology*, 19(1), 25-29.

[117] Fernand, V., *et al.,* (**2008**), "Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of HPLC", *Talanta*, 74(4); 896-902.

a) (Rheina, Kaempferol, Aloe-Emodina, Emodina, Crisofanol, Physcion).

[118] Chadsiriwej, N., *et al.,* (**2006**), "Anthraquinone Production in *Senna alata* Root Cultures", *Pharmaceutical Biology*, 44(6); 416-420.

a) (Aloe-emodina, Rheina, Emodina, Crisofanol).

[119] Tewtrakul, S., *et al*., (**2007**), "HIV-1 protease inhibitiry subtances from *Cassia garrettiana*", *J. Sci. Technol*., 29(1); 145-149.

a) Piacetannol, crhysophanol; b) Piacetannol.

[120] Sob S.V.T., *et al*., (**2008**), "A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae)", *Tet*., 64(); 7999-8002.

a) Chrysophanol, physcion, 1-hidróxi-7-metoxi-3-metilantraquinona, 1,8-dihidróxi-3-metoxi-6-metilxantona.

[121] Rai P.P., (**1988**), "Anthraquinone formation in callus cultures of *Cassia podocarpa*", *JNP*, 51(3); 492-495.

a) chrysophanol, emodina, rheina. Extracción con par iónico.

[122] Xie, Y., et al., (**2007**) "Preparative Isolation and Purification of Anthraquinones from Cassia Seed by High-Speed Countercurrent Chromatography", ***JLCRT***, 30(9), 1475-1488.

[123] Zhu L., *et al*., (**2008**), "Preparative separation and purification of five anthraquinones from Cassia tora L. by high-speed counter-current chromatography", *Separation and purification Technology*, 63(), 665-669.

a) aurantio-obtusin, 1-desmetilaurantio-obtusin, criso-obtusin, obtusin, 1-desmetilcriso-obtusin.

[124] Li, X-C., *et al*., (**2001**), "A New Naphthopyrone Derivative from Cassia quinquangulata and Structural Revision of Quinquangulin and Its Glycosides" *JNP*, 64(9), 1153-1156.

a) quinquangulona.

b) Quinquangulin-6-*O*-β-glucopiranosa, Quinquangulin-6-*O*-β-apiofuranosil-(1→6)-*O*-β-glucopiranosa

[125] Kitanaka S., *et al.,* (**1998**), "Antiallergic Agent from Natural Sources. Structure and inhibitory effect of histamine release of Naphthopyrone Glycosides from Seeds of *Cassia obtusifolia*", *Chem. Pharm. Bull.*, 46(10); 1650-1652.

a) naftopironas (cassiasides B_2 y C_2, naftopironas glicosidicas de rubrofurasin y toralactona).

[126] Asase, A., et al., (**2008**) "Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Medicinal Plants from Ghana: *Cassia Sieberiana*, *Haematostaphis barteri*, *Mitragyna inermis*, *Pseudocedrela kotschyi*", *Phytother. Res*. 22, 1013-1016.

[127] Moriyama, H., *et. al*., (**2001**), "A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation", *Yakugaku Zasshi,* 121(11); 817-820.

a) kaempferol-3-gentibiosido.

[128] Tanaka, H., *et al*., (**1982**), "Analytical Studies on the Active Constituents in Crude Drugs. V. The Structure of Sennoside G, a New Glucoside from Senna", *Chem. Pharm. Bull.*, 30(5); 1550-1556.

a) sennosidos A-G.

[129] Hayashi, S-C., *et al.*, (**1980**), "Analytical Studies on the Active Constituents in Crude Drugs. IV. Determination of Sennosides in Senna and Formulations by HPLC", *Chem. Pharm. Bull.*, 28(5); 406-412.

[130] Ueda M., *et al*., (**1998**), "Leaf-opening substance of a nyctinastic plant, *Cassia mimosoides*", *Phytochemistry*, 49(3), 633-635.

[131] Palanichamy S. y Nagarajan S. (**1990**), "Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempherol 3-*O*-sophoroside", *J. Ethnopharm.*, 29(1), 73-78.

[132] Jain S.C., Jain R., Sharma R.A. y Capasso F. (**1997**), "Pharmacological investigation of *Cassia italica*", *J. Ethnopharm.*, 58(2), 135-142.

[133] Prashanth V., Chauhan N., Padh H. y Rajani M. (**2006**), "Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants", *J. Ethnopharm*., 107(2), 182-188.

[134] Duraipandiyan V. y Ignacimuthu S. (**2007**), "Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant", *J. Etnopharm*., 112(3), 590-594.

[135] Inamori Y., Kato Y., Kubo M., Yasuda M., Baba K. y Kozawa M. (**1984**), "Physiologicla activities of 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene isolated from the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib.", *Chem. Pharm. Bull*., 32(1), 213-218.

[136] Hatano T., Uebayashi H., Ito H., Shiota S., Tsuchiya T. y Yoshida T. (**1999**), "Phenolic constituents of *Cassia* seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", *Chem. Pharm. Bull.*, 47(8), 1121-1127.

[137] Palanichamy S., Nagarajan S. y Devasagayam M. (**1988**), "Effect of *Cassia alata* leaf extract on hyperglycemic rats", *J. Ethnopharm.*, 22(1), 81-90.

[138] Sabu M. y Subburaju T. (**2002**), "Effect of *Cassia auriculata* Linn. on serum glucose level, glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm", *J. Ethnopharm.*, 80(2-3), 203-206.

[139] Surana S., Gokhale S., Jadhav R., Swant R. y Wadekar J. (**2008**), "Antihyperglycemic activity of various fractions of *Cassia auriculata* Linn. in alloxan diabetic rats", *Indian J., Pharmaceutical Sciences*, 70 (2), 227-229.

[140] Manonmani G., Bhavapriya V., Kalpana S., Govindasamy S. y Apparanantham T. (**2005**), "Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats", *J. Ethnopharm.*, 97(1), 39-42.

[141] Nirmala A., Eliza J., Rajalakshmi M., Priya E. y Daisy P. (**2008**), "Effect of hexane extract of *Cassia fistula* barks on blood glucose and lipid profile in streptozotocin diabetic rats", *International J. of Pharmacology*, 4(4), 292-296

[142] Babu L., Gangadevi T. y Subramoniam A. (**2003**), "Antidiabetic activity of ethanol extract of *Cassia kleinii* leaf in streptozotocin-induced diabetic rats and isolation of an active fraction and toxicity evaluation of the extract", *Indian J., Pharmacology*, 35(5), 290-296.

[143] Babu L., Gangadevi T. y Subramoniam A. (**2002**), "Anti-hyperglycaemic activity of *Cassia kleinii* leaf extract in glucose fed normal rats and alloxan-induced diabetic rats", *Indian J., Pharmacology*, 34(6), 409-415.

[144] Jang D., Lee G., Kim Y., Lee Y., Kim C-H., Yoo J. y Kim J. (**2007**), " Anthraquinones from the Seeds of *Cassia tora* with Inhibitory Activity on Protein Glycation and Aldose Reductase", *Biol. Pharm. Bull.*, 30(11), 2207-2210.

[145] Palanichamy S. y Nagarajan S. (**1990**), "Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract", *J. Ethnopharm.*, 29(3), 337-340.

[146] Kim Y-M., Lee C-H., Kim H-G. y Lee H-S. (**2004**), "Anthraquinones isolated from *Cassia tota* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi", *J. Agic. Food Chem.*, 52(20), 6096-6100.

[147] Chidume F.C., Gamaniel K., Amos S., Akah P., Obodozie O. y Wambebe C. (**2001**), "Pharmacological activity of the methanolic estract of *Cassia nigricans* leaves", *Indian J. Pharmacol.*, 33(5), 350-356.

[148] Sadique J., Chandra T., Thenmozhi V. y Elango V. (**1987**), "Biochemical modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicacabum* in inflammation", *J. Ethnopharm*., 19(2), 201-212.

[149] Obodozie O.O., Okpako L.C., Tarfa F.D., Orisadipe A.T., Okugun J.I., Inyang U.S., Ajaiyeoba E.O. y Wright C.W. (**2004**), "Antiplasmodial principles from *Cassia nigricans*", *Pharmaceutical Biology*, 42(8), 626-628.

[150] Adzu B., Abbah J., Vongtau H. y Gamaniel K. (**2003**), "Studies on the use of *Cassia singueana* in malaria ethnopharmacy", *J. Ethnopharm.*, 88(2-3), 261-267.

[151] Damodaran S. y Venkataraman S. (**1994**), "A study on the therapeutic efficaccy of *Cassia alata*, Linn. Leaf extract against *Pityriasis versicolor*", *J. Ethnopharm.*, 42(1), 19-23.

[152] Khan M.R., Kihara M. y Omoloso A.D. (**2001**), "Antimicrobial activity of *Cassia alata*", *Fitoterapia*, 72(5), 561-564.

[153] Kumaran A. y Karunakaran R.J. (**2007**), "Anioxidant activity of *Cassia auriculata* flowers", *Fitoterapia*, 78(1), 46-47.

[154] Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee M. A. y Aruoma O.I. (**2002**), "Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoids components in extracts of *Cassia fistula*", *J. Agric. and Food Chem.*, 50(18), 5042-5047.

[155] Siddhuraju P., Mohan P.S. y Becker K. (**2002**), "Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp", *Food Chemistry*, 79(1), 61-67.

[156] Kaur G., Alam M.S., Jabbar Z., Javed K. y Athar M. (**2006**), "Evaluation of antoxidant activity of *Cassia siamea* flowers", *J. Ethnopharm.*, 108(3), 340-348.

[157] Sydiskis R.J., Owen D.G., Lhor J.L., Rosler K-H.A. y Blomster R.N. (**1991**), "Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12), 2463-2466.

[158] Tewtrakul S., Subhadhirasakul S., Rattanasuwan P. y Puripattanvong J. (**2007**), "HIV-1 protease inhibitory substances from *Cassia garrettiana*", *Songklanakarin J. Sci. Technol*., 29(1), 145-149.

[159] Ezcurra C., (**1999**), "Acanthaceae Juss." *Aportes Botánicos de Salta-ser. Flora*, 6(4), 1-45. (disponible en: http://www.unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora/vol6/pdf/4.%20ACANTHACEAE.pdf, consultada el 22-Abril-2014)

[160] Sanchez J., (**2012**), "Familia Acanthaceae" Plantas ornamentales de los Jardines de Murcia. Familia Acantaceae, 1-3.(disponible en: http://www.arbolesornamentales.es/FLORA%20ORNAMENTAL%20DE%20MURCIA.%20FAMILIA%20ACANTHACEAE.pdf, consultada el 22-Abril-2014)

[161] Llamozas S. (**2000**), "Tres nuevas especies de *Ruellia* L. (Acanthaceae) de venezuela", *Acta Bot. Venez.*, 24(2), 75-83.

[162] Hernández C., (**2012**), "*Ruellia tuberosa*: Aspectos morfológicos, anatómicos y ecológicos", Botánica, Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
(disponible en http://prezi.com/au6nubsjsop3/ruellia-tuberosa/, consultada el 22-Abril 2014)

[163] Descourtilz M.E. (**1822**), "Flore médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles", Tomo 2, 180-184.

[164] **a**) Espécimen de *Ruellia tuberosa* L. identificado por Dr. Stephen Tillett del Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26390.
b) Fotografía de las flores y frutos de espécimen de *Ruellia tuberosa* L. antes de ser almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

[165] Jensen H., Jensen S. y Nielsen B. (**1988**), "Chemotaxonomy of the Acanthaceae. Iridoids and quaternary amines", *Phytochemistry*, 27(8), 2581-2589

[166] Johne S., Gröger D. y Radeglia R. (**1975**), "Tetramethylputrescine from young plants of *Ruellia rosea*", *Phytochemistry*, 14(12), 2635-2636.

[167] Salah A., Dongmo A., Kamanyi A., Bopelet m., Vierling W. y Wagner H. (**2000**), "In vitro purgative effect of *Ruellia praetermissa*. Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae)", *J. Ethnopharm.*, 72(1-2), 269-272.

[168] Salah A., Gathumbi J., Vierling W. y Wagner H. (**2002**), "Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermissa*. Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae) in female rats", *Phytomedicine*, 9(1), 52-55.

[169] Farid M. (**1993**), "Chemical and biological investigation of medicinal herbs*, Phyla nodielora, Ruellia patula* and *Ruellia brittioniana*", Tesis Doctoral, Universidad de Karachi, Karachi, Pakistan.

[170] Gil R. y Carmona J. (**2001**), "23 especies botánicas con potencialidad terapéutica", *Revista de la facultad de Farmacia*, 42(2), 37-39.

[171] Lans C. (**2006**), "Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus", *J. Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 45-55.

[172] Cianguerotti C., Pastorello M., Valera M., López-Gramcko J., Orsini G., Salazar-Bookman M. e Israel A. (**2007**), "Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L.", LVII Convención Anual de la AsoVAC.

[173] Daya L. D., Patel M. B., Mishra S. H. y Vaghasiya H.U., (**2010**), "Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker plant)", *Pharmacognosy J.*, 2(12), 506-512.

[174] Chen F-A., Wu A-B., Shieh P., Kuo D-H. y Hsieh C-Y. (**2006**), "Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*", *Food Chem.*, 94(1), 14-18.

[175] Hout S., Chea A., Bun S-S., Elias R., Gasquet M., Timon-David P., Balansard G. y Azas N. (**2006**), "Screening of selected indigenous plant of Cambodia for antiplasmodial activity", *J. Ethnopharm*., 107(1), 12-18.

[176] Graham J. G., Quinn M. L., Fabricant D.S. y Farnsworth N. R. (**2000**), "Plant used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell", *J. Ethnopharm*., 73(3), 347-377.

[177] Chwan-Fwu L., Yu-Ling H., Lee-Ying C., Shuenn-Jyi S. y Chien-Chih C. (**2006**), "Bioactive Flavonoids from *Ruellia tuberosa*", *J. Chin. Med.*, 17(3), 103-109.

[178] Arun S., Giridharan P., Suthar A., Kulkarni-Almeida A., Naik V., Velmurugan R., Ram V., Arun B., Vijay C. y Somesh S. (**2008**), "Isolation of Tylocrebrine from *Ruellia tuberosa* through bioassay directed column chromatography and elucidating its anti-cancer and anti-inflammatory potential", 7mo Encuentro de AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Atenas, Grecia.

[179] Subramanian S. y Nair A.G.R. (**1974**), "Apigenin glucosides from *Thunbergia fragrans* and *Ruellia tuberosa*", *Curr*. *Sc*., 43(15), 480.

[180] Phakeovilay C., Disadee W., Sahakitpichan P., Sitthimonchai S., Kittakoop P., Ruchirawat S. y Kanchanapoom T., (**2013**), "Phenylethanoid and flavones glycosides from *Ruellia tuberose* L." *J. Nat. Med*., 67 (1), 228-233.

[181] Ghosal S., Banerjee S., Chattopadhyay B. K., Srivastava R. S. y Chakrabarti D. K. (**1974**), "Toxic substances produced by *Fusarium.* VII. Control of fusarial wilt of safflower by root exudates and extractives of *Ruellia tuberosa*", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 34(8), 1057-1058.

[182] Singh R., Pandey H. y Singh B. (**2002**), "A new triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn.", *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 41B(8), 1754-1756.

[183] Misra T., Singh R., Pandey H., Pandey R. y Singh B. (**1997**), "Two new aliphatic compounds from *Ruellia tuberosa* Linn.", *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 36B(12), 1194-1197.

[184] Skoog D.A., Holler J.A. y Nieman T.A. (**2001**), Principios de Análisis Instrumental, McGraw Hill, 5ta Edición, Cap., 26.

[185] Safra J.E. y Yeshua I. (**2002**), The New Encyclopædia Britannica, 13, 523-602.

[186] Hostettmann K., Marston A. y Hostettmann M. (**2001**), Técnicas de Cromatografía Preparativa: Aplicaciones en el aislamiento de productos naturales. Springer-Velarg Ibérica, Barcelona.

[187] Ito Y. y Bowman R.L. (**1970**), "Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support", *Science*, 167 (3916), 281-283.

[188] Ito Y. (**1970**), "High-speed countercurrent chromatography", Nature, 326, 419-420.

[189] Tanimura T., Pisano J.J., Ito Y. y Bowman R.L., (**1970**), "Droplet countercurrent chromatography", *Science*, 169 (3940), 54-56.

[190] Ito Y., (**1986**), "High-speed countercurrent chromatography", *CRC crit. Rev. Analyt. Chem.,* 17(1), 65-143.

[191] Ito Y., (**2005**), "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatogrphy", *J. Chromatography A*, 1065 (2), 145-168.

[192] Degenhardt A., Schwarz M., Winterhalter P. e Ito Y., (**2001**), "Evaluation of different tubing geometries for high-speed countercurrent chromatography", *J. Chromatography A*, 922(1-2), 355-358.

[193] Yang Y., Aisa H.A., e Ito Y., (**2009**), "Flat-twisted tubing: novel design for high-speed counter-current chromatography", *J. Chromatography A*, 1216(27), 5265-5271.

[194] Ito Y., and Ma Y., (**1996**), "pH-Zone-refining countercurrent chromatography", *J. Chromatography A*, 753(1), 1-36.

[195] Conway W.D. (**1990**), "Countercurrent chromatography: Apparatus theory and applications", Wiley-VHC, New York.

[196] Ito Y., Shibusawa Y., Fales H.M y Cahnmann H.J. (**1992**), "Studies on abnormally sharpened elution peak observed in counter-current chromatography", *J. Chromatography A*, 625(2), 177-181.

[197] Smith C., Marks A. y Lieberman M. (**2005**), *"Marks' Basic Medical Biochemistry: a clinical approach"* Second Edition. Leppincott Williams & Wilkins Editions. Cáp. 31, 557-578.

[198] Nelson D. y Cox M. (**2004**), "*Lehninger Principles of Biochemistry"* Fourth Edition.W.H. Cáps. 14-15, 521-596.

[199] Garibay M. (**2005**), "Metabolismo de La Glucosa" Fisiología, Centro Médico Nacional de México (disponible en: http://201.116.18.153/laciencia/biologia/fisiologia/be3.htm.).

[200] McCormack J. G., Westergaard N., Kristiansen M., Brand C. L. y Lau J. (**2001**), "*Pharmacological Aproaches to Inhibit Endogenous Glucose Production as a Mean of Anti-Diabetic Therapy"*, *Curr. Pharm. Design*, 7(14), 1451-1474.

[201] González-Mujica F., Motta N., Márquez A. y Capote-Zuleta J. (**2003**), “Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucosa absorption and uptake by enterocyte brush border membrana vesicles”, *Fitoterapia*, 74(1-2), 84-90.

[202] Li Y., Kim J., Li J., Liu F., Liu X., Himmeldirk K., Ren Y., Wagner T., Chen X. (**2005**), “Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway”, *Biochem. Biophys. Res. Comms*., 336(2), 430-437.

[203] Kraus, T., Dahlgren R. y Zasoski R., (**2003**), "Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems-a review" *Plant and Soils*, 246(1), 41-66.

[204] Malini P., Kanchana G. y Rajadurai M., (**2011**), "Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino wistar rats", *Asian J., Pharm. Clin. Res.*, 4(3), 124-128.

[205] González-Mujica F., Motta N. y Becerra A. (**1998**), “Inhibition of Hepatic Neoglucogenesis and Glucose-6-Phosphatase by Aqueous Extract of *Bauhinia megalandra* Leaves”, *Phytother. Res.*, 12(4), 291-293.

[206] Estrada O., Hasegawa M., González-Mujica F., Motta N., Perdomo E., Solórzano A., Méndez J., Méndez B. y Zea E. (**2006**), “*Evaluation of Flavonoids from Bauhinia megalandra Leaves as Inhibitor of Glucose-6-Phosphatase System*”, *Phytother. Res.*, 19(10), 859-863.

[207] Jones S., Simmons B., Mastracchio A. y McMillan D., (**2011**), "Collective synthesis of natural products by means of organocascade catalysis", *Nature*, 475(7355), 183-188.

[208] Roush W., (**2008**), "Total synthesis of biologically active natural products", *J. Am. Chem. Soc.*, 130(21), 6654-6656.

[209] Jung M.,Park M., Lee H., Kang Y-H., Kang E. y Kim S., (**2006**), "Antidiabetic agents from medicinal plants", *Curr. Med. Chem.*, 13(10), 1203-1218.

[210] Ivorra M., Payá M. y Villar A., (**1989**), "A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs", *J. Etnhopharmacology*, 27(3), 243-275.

[211] Zhang J., Kim S-H., Hagerman A. y Lü J., (**2009**), "Anti-Cancer, Anti-Diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose", *Pharm. Res.*, 26(9), 2066-2080.

[212] Barros M. T., Maycock C. D., Rodrigues P. y Thomassigny C., (**2004**), “Improved anomeric selectivity for the aroylation of sugars” *Carbohydrate Research*, 339(7), 1373-1376.

[213] Binkley R. C., Ziepfel J. C., y Himmeldirk K. B., (**2009**), “Anomeric selectivity in the synthesis of galloyl esters of D-glucose”, *Carbohydrate Research*, 344(2), 237-239.

[214] Ren Y., Wei M., Still P. C., Yuan S., Deng Y., Chen X., Himmeldirk K., Kinghorn A. D., y Yu J., (**2012**), “Synthesis and antitumor activity of ellagic acid peracetate”, *ACS Med. Chem. Lett.* 3(8), 631-636.

[215] Li L., Shaik A., Zhang J., Nhkata K., Wang L., Zhang Y., Xing C., Kim S-H. y Lü J., (**2011**), "Preparation of penta-*O*-galloyl-b-D-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analysis by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC", *J. Pharm., Biomed., Anal.*, 54(3), 545-550.

[216] Lu J. y Yuan Q., (**2008**), "A new method for ellagic acid production from pomegranate husk", *J. Food Process Engineering*, 31(4), 443-454.

[217] Perkin A.G., y Nierenstein M., "Some oxidation products of the hydroxybenzoic acids and the constitution of ellagic acid. Part I", *J. Chem. Soc. Trans*., 87(0), 1412-1430.

[218] Alam A., Takaguchi Y., y Tsuboi S., (**2005**), "Synthesis of ellagic acid and its 4,4´-di-*O*-alkyl derivatives from gallic acid", *J. Fac. Environ. Sci. and Tech., Okayama Univ.*, 10(1), 111-117

[219] Quiedeau S., y Feldman K., (**1997**), "Ellagitannin chemisry. The first synthesis of dehydrohexahydroxydiphenoate esters from oxidative coupling of unetherified methyl gallate", *J. Org. Chem.*, 62(25), 8809-8813.

[220] Jurd L., (**1959**), "Plant polyphenol. VI. Experiments on the synthesis of 3,3′- and 4,4′-di-*O*-methylellagic acid", *J. Am. Chem. Soc.,* 81(17), 4606-4610.

[221] Alam A., y Tsuboi S., (**2007**), "Total synthesis of 3,3´,4-tri-*O*-methylellagic acid from gallic acid", *Tet.*, 63(12), 10454-10465.

[222] Marcucci O., González-Mujica F. y Pérez-Ayuso E., (**1983**), "Alterations of Liver nuclear envelopes accompanying thioacetamide administration in rats", *Acta Cient. Venezolana*, 34(2), 109-117.

[223] Lowry O., Rosebrough H., Farr A. y Randall R., (**1951**), "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J. Biol. Chem*., 193(1), 209-220.

[224] Markwell M., Hass S., Bieber L. y Tolbert N., (**1978**), "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample", *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206-210.

[225] William B., Wilson K. (**1981**), "Principios y técnicas de Bioquímica" Editorial Omega, Barcelona.

[226] Ren Y., Himmeldirk K. y Chen X., (**2006**), "Synthesis and structure-activity relationship study of antidiabetic penta-*O*-galloyl-D-glucopyranose and its analogues", *J. Med. Chem.*, 49(9), 2829-2837.

[227] Lee Y-G., Song J-H., Lee E-J., Lee D-H., Jung D-I., Hahn J-T., (**2012**), "Synthesis of poly(3,4,5-trihydroxybenzoate amide) and poly(3,4,5-trihydroxybenzoate ester) dendrimers from polyphenols and their chemiluminescence", *Bull., Korean Chem. Soc.*, 33(6), 2051-2054.

[228] Nummy L. J., (**1988**), "Quaternary pyridine salts usefuel for preparation of 4-substituted pyridines", United States Patent 4772713.

[229] Khanbabaee K. y Lötzerich K., (**1997**), "Efficient total synthesis of the natural products 2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucopyranose and the unnatural 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-α-D-glucopyranose", *Tet*. 53(31), 10725-10732.

[230] Chen Y., Hangerman A., Minto R., (**2003**), "Preparation of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-[U-^{14}C]-D-glucopyranose", *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 46(1), 99-105.

[231] Binkley R., Ziepfel J. y Himmeldrik K., (**2009**), “Anomeric selectivity in the synthesis of galloyl esters of D-glucose” *Carbohyate Research*, 344(2), 237-239.

[232] Bols M. y Hansen H., (**1993**), “Simple synthesis of β-D-glucosyl esters” *Acta Chemica Scandinavica*, 47(8), 818-822.

[233] Sheikh Md. C., Takagi S., Yoshimura T. y Morita H., (**2010**), “Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of ‘active ester’ and the related derivatives with nucleophiles”, *Tet*., 66(36), 7272-7278.

[234] Sanders K., (**2010**), "Structure-activity relationships of PAI-1 inhibitors", Tesis de Maestría, Eastern Michigan University, Ypsilanti, Michigan, Estados Unidos.

[235] Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C., y Carnat A., (**1990**), "Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Borrabinacées et les Lamiacées médicinales", *Ann. Pharm. Fr.* 48(2), 103-108.

[236] a) Stanković M., (**2011**), "Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts", *Kragujevac J. Sci.*, 33, 63-72; b) Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J-C., Bailleul F. y Trotin F., (**2000**), "Phenolic compounds and antioxydant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour" *J. Ethnopharmacology*, 72(1-2) 35-42.

[237] Fox M., Li C., Marino J. and Overman L. (**2009**), “Enantiodivergent total syntheses of (+)- and (–)-Scopadulcic acid A”, *J. Am. Chem. Soc.,* 121(23), 5467-5480.

[238] Foulcault A., Durand P., Camacho Frías E., and Le Goffic F., (**1993**), “Biphasic mixture of water, dimethyl sulfoxide, and tetrahydrofuran for use in centrifugal partition chromatography”, *Anal. Chem.,* 65(15), 2150-2154.

[239] Okunji C., Komarnytsky S., Fear G., Poulev A., Ribnicky D. M., Awachie P. I., Ito Y. y Raskin I., (**2007**), “Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garcinia kola* by high-speed counter-current chromatography”, *J. Chromatography A.,* 1151(1-2), 45-50.

[240] Khor T.H., (**1979**), “Removal of chlorophyll pigments from plan neutral lipids”, *J. Chromatography*, 179(1), 225-226.

[241] Peng B., Li R. y Yan W., (**2009**), "Solubility of rutin in ethanol + water at (273.15 to 323.15) K", *J. Chem. Eng. Data*, 54(4), 1378-1381.

[242] Zi J., Peng B. y Yan W., (**2007**), "Solubilities of rutin in eight solvents at *T*=283.15, 313.15, 323.15, and 333.15 K", *Fluid Phase Equilibria*, 261(1-2), 111-114.

[243] Bermúdez J., Rodríguez M., Hasegawa M., González-Mujica F., Duque S. e Ito Y., (**2012**), (6*R*,9*S*)-6′-(4″-Hydroxybenzoyl)-Roseoside, a new megastigmane derivative from *Ouratea polyantha* and its effect on hepatic glucose-6-phosphatase, *Natural Product Communications,* 7(8), 973-976.

[244] Aquino T., Amorin E., Feliciano G., Lima E., Gomes M., Lima C., Albuquerque U. y Bernardo-Filho M. (**2007**), “Influence of biflorin on the labelling of red blood cells, plasma protein, cell protein,

and lymphocytes with technetium-99m: *in vitro* study", *Bazilian J. of Pharmacognosy*, 17(2), 181-185.

[245] Carvallo M., Pereira D., Marques A., Pinho M., Gomes T., Loyola O., Pessoa C., Odorico M., Negreiros A., Alves N. Y Costa-Lotufo L. (**2007**), "Antitumor activity of Biflorin, an *o*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*", *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8), 1416-1421.

[246] Lu H-T., Jiang Y. y Chen F. (**2004**), "Preparative high-speed counter-current chromatography for purification of shikonin from the Chinese medicinal plant *Lithospermum erythrorhizon*", *J. Chromatography A*, 1023(1), 159-163.

[247] Tian G., Zhang T., Zhang Y. e Ito Y., (**2002**), "Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimentional counter-current chromatography", *J. Chromatography A*, 945(1-2), 281-285.

[248] Tundis R., Deguin B., Dadoro D., Statti G., Tillequin F. y Menichini F., (**2008**) "Iridoid glycosides from Linaria multicaulis (L.) Miller subsp. multicaulis (Scrophulariaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(2) 142-145.

[249] Qi J., Chen J-J., Cheng Z-H., Zhou J-H., Yu B-Y. y Qiu S.X., (**2006**), "Iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw)", Phytochemistry 67(13), 1372-1377.

[250] Mendoza R., (**2013**), "Aislamiento y caracterización de los principios activos presentes en las ramas y hojas de la especie *Cassia fruticosa* Mill.", Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

[251] **a**) Zi J., Peng B. y Yan W., (**2007**), "Solubilities of rutin in eigth solvents at T=283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15", *Fluid Phase Equilibria*, 261(1-2), 111-114; **b**) Kim K., Lee K, Kim D., Park H., Kwon I. y Lee H., (**2005**), "Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization", *Bioresourse Technology*, 96(15), 1709-1712.

[252] Wei D., Wang L., Liu C. y Wang B., (**2010**), "β-sitosterol solubility in selected organic solvents", *J. Chem. Eng. Data*, 55(8), 2917-2919.

[253] Svenningsen A., Madsen K., Liljefors T., Stafford G., van Steden J. y Jäger A. (**2006**), "Biflavones from *Rhus* species with affinity for the $GABA_A$/benzodiazepine receptor". *J. Ethnopharmacology* 103(2), 276-280.

[254] Çaliş İ., Kuruüzüm-Uz A., Lorenzetto P.A. y Rüedi P. (**2002**), "(6*S*)-Hydroxy-3-oxo-α-ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits", *Phytochemistry*, 59(4), 451-457.

[255] Agrawal P., (**1992**), "NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides", *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330.

[256] www.caymanchem.com/catalog/11215

[257] Sigma-Aldrich, número CAS 69-65-8, P_f 169-171 °C.

[258] Baer E. y Fischer H., (**1939**), "Studies on the acetone-glyceraldehyde. VII. Preparation of *l*-glyceraldehyde and *l* (–) acetone glycerol", *J. Am. Chem. Soc.*, 61(4), 761-765.

[259] Sigma-Aldrich, número CAS 5346-76-9, P_f 129-130 °C.

[260] Zhang M-Z. y Wang J-C., (**1992**), "The chemical components of *Lobelia davidii* Franch.", *Acta Botanica Sinica*, 34(1), 58-61.

[261] Chaudhuri K. y Chawla H.H., (**1987**), "Anthraquinones and terpenoids from *Cassia javanica* leaves", *J. Nat. Prod.*, 50(6), 1183-1189.

[262] Kazmi M., Malik A., Hameed S., Akhtar N. y Noor S., (**1994**), "An anthraquinone derivative from *Cassia italica*", *Phytochemistry*, 36(3), 761-763.

[263] Morales A., (**1971**), "Aliphatic alcohols, β-sitosterols and alkaloids in *Cassia jahnii*", *Phytochemistry*, 10(2), 2255-2256.

[264] Rizvi S., Lal J. y Gupta P., (**1971**), "Examination of a phytosteolin and a sterol from *Cassia* plants", *Phytochemistry*, 10(3), 670.

[265] Jhonson A.W., (**1958**), "Isolation of β-sitosterol from *Cassia absus* Linn.", *J. Org. Chem*., 23(11), 1814-1815.

[266] Lal J. y Gupta P.C., (**1973**), "Physcion and phytosterol from the roots of *Cassia occidentalis*", *Phytochemistry*, 12(5), 1186.

[267] Kitanaka S. y Takido M., (**1982**), "Dimeric hydroanthracenes from the unripe seeds of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, 21(8), 2103-2106.

[[268]] Boul A.D., Blunt J.W., Browne J.W., Kumar V., Meakins G.D., Pinhey J.T. y Thomas V.E.M., (**1971**), "Microbial hydroxylation of steroids. Part II. Structural information and infrared spectrometry: carbonyl, perturbed methylene, and hydroxyl vibrations of steroidal ketones and alcohols", *J. Chem. Soc. Chem. Commun*., 1130–1136.

[[269]] Pretsch E., Bühlmann P. y Affolter C., (**2000**), "Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data", Springer, 3^{era} edición, 245-292.

[270] Nes W.D., Norton R. y Benson M., (**1992**), "Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [^{13}C] mevalonates", *Phytochemistry*, 31(3), 805-811.

[271] Bagri P., Ali M., Sultana S. y Acri V., (**2009**), "New sterol esters from the flowers of *Panica granatum* Linn.", *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 11(8), 710-715.

[272] Su K., Gong M., Zhou J. y Deng S., (**2009**), "Study on chemical composition of *Nauclea officinalis* leaves", *International J. Chem.*, 1(2), 77-81.

[[273]] Parmar V.S., Jain S.C., Gupta S., Talwar S., Rajwanshi V.E., Kumar R., Azim A., Malhotra S., Kumar N., Jain R., Sharma N.K., Tyagi O.D., Lawrie S.J., Errington W., Howarth O.W., Olsen C.E., Singh S.K. y Wengel J., (**1998**), "Polyphenols and alkaloids from *piper* species", *Phytochemistry*, **49**(4), 1069-1078.

[274] a) Kitajima J., Kimizuka K. y Tanaka Y., (**1998**), "New sterols and triterpenoids of *Ficus pumila* fruit", *Chem. Pharm. Bull.*, 46(9),1408-1411;

b) http://c13.usal.es/c13/usuario/views/inicio.jsp?lang=es&country=ES

[275] Ver referencia 87, Cap. 2, pág., 89-90.

[276] McLafferty F.W. y Tureček F., (**1993**), Interpretation of mass spectra, 4th Edition. págs., a) 235; b) 150.

[[277]] Pateh U.U., Haruna A.K., Garba M., Iliya I., Sule I.M., Abukabar M.S. y Ambi A.A., (**2009**), "Isolation of stigmasterol, β-sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* pyer and kotchy (Araceae)", *Nig. J. Pharm Sci.*, 8(1), 19-25.

[278] a) Sigma-Aldrich, número CAS 17650-84-9, P_f 190-192°C; Agujas amarillas de MeOH-H_2O; b) http://ccd.chemnetbase.com/AAA00.entry?parentCHNumber=ODZ15&exno=OYT46; c) http://www.herbdb.co.kr/herb/dbsearch3/separation_view.asp?key=488.

[279] Wagner H. y Bladt S., (**2001**), "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Cromatography Atlas". Springer, 2da edición, 195-197, 359.

[280] Stobiecki M., (**2000**), "Application of mass spectrometry for identifcation and structural studies of flavonoid glycosides", *Phytrochemistry*, **54**(3), 237-256.

[281] Rao K.V., Damu A.G., Jayaprakasam B. y Gunasekar D., (**1999**), "Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*", *J. Nat. Prod.*, **62**(2), 305-306.

[282] El-Sayed N., Abu A.M., El-Khrisy E.A. y Mabry T., (**1992**), "Flavonoids of *Cassia italica*", *Phytochemistry*, **31**(6), 2187.

[283] Kazuma K., Noda N. y Suzuki M., (**2003**), "Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*", *Phytochemistry*, **62**(2), 229-237.

[284] Pizzolatti, M.G., Cunha A., Szpoganicz B. y De Sousa E., (**2003**), "Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (leguminosae)", *Quim. Nova*, 26(4), 466-469.

[285] Sakushima A., Hisada S., Ogihara Y. y Nishibe S., (**1980**), "Studies on the consttuents of Apocynaceae plants. Gas chromatography-Mass spectrometry determination of new flavonoid triglycosides from the leaves of *Cerbera manghas* L. (2)", *Chem. Pharm. Bull.*, 28(4), 1219-1223.

[286] a) Morita N., Arisawa M., Nagaes M., Hsu H-Y. y Chen Y-P., (**1977**), "Studies on the constituents of formosan Leguminosae. III. Onthe flavonoids from *Leucaena glaca* (L.) Benth, *Cassia fistula* L., and other 8 varieties, *Syôyakugaku Zasshi*, 31(2); 172-174; b) Ling K-H., Kian C-T. y Hoon T-C., (**2009**), "A guide to medicinal plants: An ilustrated, scientific and medicinal approach", World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., *Cassia fistula*, 38-39; c) Bisby F., (**1994**), Phytochemical dictionary of the Leguminosae, Volume 2, Plants and their constituents, 155.

[287] Morita N., Arisawa M., Nagase M., Hsu H. y Chen Y., (**1977**), "Studies on the constituents of formosan Leguminosae. I.: The constituents in the leaves of *Clitoria ternatea* L.", *Yakugaku Zasshi*, 97(6), 649-653.

[288] Luo J.-L., Lu F.-L., Liu Y.-C., Shih Y.-C. y Lo C.-F., (**2013**), "Fingerprint analysis of *Ginkgo biloba* extract and ginkgo semen in preparations by LC-Q-TOF/MS", *J. Food Drug Anal.*, **21**(1), 27-39.

[289] Lu Y., Sun Y., Foo L-Y., McNabb W.C., Molan A.L., (**2000**), "Phenolic glycosides from forage *Onobrychis viciifolia*" *Phytochemistry*, 55(1), 67-75.

[290] Sigma-Aldrich, número CAS 99-24-1, P_f 201-203 °C.

Krisnamoorthy K., Ambade A.V., Mishra S.P., Kanungo M., Contractor A.Q. y Kumar A., (**2002**), "Dendronized electrochromic polymer based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)", *Polymer*, 43(24), 6465-6470.

[291] Sigma-Aldrich, número CAS 70424-94-1, P_f 99-100°C.

[292] Sigma-Aldrich, número CAS 1916-07-0, P_f 80-84°C.

[293] Morris S. y Riemenschneider R., (**1946**), "The higher fatty acid alcohol esters of gallic acid", *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (3), 500-501.

[294] Lin J. (**2007**), "Method for preparation of 4-dimethylaminopyridine", Chinese Patent, cn200710021219A.

[295] McElvain S.M. y Goese M.A., (**1943**), "The halogenations of pyridine", *J. Am. Chem. Soc.*, 65(11), 2227-2233.

[296] Englert S.M. y McElvain S.M., (**1929**), "The bromination of pyridine", *J. Am. Chem. Soc*., 51(3), 863-866.

[297] Trowbridge P.F. y Diehl O.C., (**1897**), "Halides and perhalides of pyridine", *J. Am. Chem. Soc*., 19(7), 558-574.

[298] Masahiro T. y Hiroyuki Y., (**2000**), "Process for the preparation of pentaacetyl-beta-D-glucopyranose", European Patent EP1041080B1.

[299] Pearlson S., Scarano W., Stenzel M., (**2012**), "Micelles based on gold-glycopolymer complexes as new drug delivery agents", *Chem., Comm*., 48, 4695-4697.

[300] a) Sigma-Aldrich, número CAS 604-68-2, P_f 109-111°C. b) Shriner R., Fuson R. y Curtin D., (**2004**), "Identificación sistemática de compuestos orgánicos", Editorial Limusa S.A., Cap. 11 Tabla de derivados, Pag. 364.

[301] Shriner R., Fuson R. y Curtin D., (**2004**), "Identificación sistemática de compuestos orgánicos", Editorial Limusa S.A., Cap. 10 Preparación de derivados, Pag. 268-269 y 289-290.

[302] Levene P. A., Meyer G. M., (**1928**), "On the pentabenzoates of glucose", *J. Biol. Chem.*, 76, 513-520.

[303] Arun S., (**20**), "Systematic Lab Experiment in Organic Chemistry", *Section II, Sistematic organic preparation: esterification; benzoylation*, 620.

[304] Mathieson A., Popleton B.J., (**1968**), "The crystal structure of ellagic acid", *Acta Cryst. B*, 24(11), 1456-1461.

[305] Jayaprakasam M., (**1993**), "Chemical examination of polyphenolics from *Helichrysum bracteatum* var. bracteatum", cap., II, 59-141. En tesis doctoral titulada: "Chemical and biological studies on certain selected plants". disponible en: http://hdl.handle.net/10603/961

[306] Malik, G., (**2009**), "Vers la synthése totale d'ellagitannins *C*-arylglucosidiques une approache biomimétique visant la vescaline", Tesis Doctoral, L'Université Bordeaux 1. (artículo en francés)

[307] Hemingway R.W. y Hillis W.E., (**1971**), "Behavior of ellagitannins, gallic acid, and ellagic acid under alkaline conditions", *TAPPI*, 54(6), 933-936.