UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PLANTAS UTILIZADAS EN EL CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE GLUCOSA-6-FOSFATASA DE LOS METABOLITOS AISLADOS Y PRODUCTOS SINTETIZADOS

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por el Lic. Jairo José Bermúdez León, para optar al título de Doctor en Ciencias, Mención Química.

Caracas, Mayo de 2015.

Resumen

La diabetes mellitus afecta a muchas personas alrededor del mundo, por lo que la comunidad científica está interesada en la búsqueda de nuevas drogas de origen sintético o natural para el tratamiento de la misma. En el presente trabajo se utilizaron cuatro plantas empleadas tradicionalmente en el tratamiento empírico de la diabetes y se realizó la síntesis total de los productos naturales α- y β-pentagaloilglucosa, ácido elágico y sus análogos. Las plantas estudiadas provienen de los géneros: *Ouratea polyantha* Engl. (Ochnaceae), *Capraria biflora* L. (Schrophulariaceae), *Cassia fruticosa* Mill. (Fabaceae) y *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae).

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-FrCHCl$_3$), 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-M$_{ac}$, RtR-N$_{ac}$) y terpenos aromáticos (RtQ$_{org}$, RtS$_{org}$, RtR-M$_{org}$, RtR-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.

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.

Publicaciones, Carteles en Congresos, Convenciones, Jornadas de Investigación, Pasantía de Investigación y Desarrollo de Tesis de Pregrado:

- Publicaciones en Revistas Arbitradas
  - ✓ J. Bermúdez, M. Rodríguez, M. Hasegawa, F. González-Mujica, S. Duque y Y. Ito (**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.
  - ✓ Quantification of β-sitosterol, lupeol and betulin in *Ruellia tuberosa* L. In preparation.
  - ✓ Chemical composition of *Cassia fruticosa* Mill. In preparations.
  - ✓ Total synthesis of PGG and its analogues: Its effect on hepatic glucose-6-phosphatase, In preparation.
  - ✓ Total synthesis of Ellagic Acid and its analogues: Its effect on hepatic glucose-6-phosphatase, In preparation.

- Carteles en Congresos, Convenciones, Jornadas de Investigación, Pasantía de Investigación:
  - ✓ R. Mendoza, J. Bermúdez, M. Rodríguez, M. Hasegawa. Estudio fitoquímico de *Cassia fruticosa* Mill., Separación e identificación de un ester de ácido graso de β-sitosterol y dos flavonoides mediante cromatografía líquida de ultra eficacia (UPLC). **XI Congreso Venezolano de Química**: Universidad Metropolitana, Caracas, 16 al 20 de Junio del 2013.
  - ✓ J. Bermúdez, M. Rodríguez, M. Hasegawa, F. González-Mujica y S. Duque. Aislamiento y caracterización del (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido a partir de *Ouratea polyantha* Engl. (Ochnaceae) y su efecto sobre la glucosa 6-fosfatasa**. XXI Jornadas Científicas "Dr. Francisco De Venanzi"**: Universidad Central de Venezuela, Caracas, 26 al 30 de Noviembre de 2012.
  - ✓ J. Bermúdez, M. Rodríguez, M. Hasegawa, F. González-Mujica y S. Duque. Aislamiento y caracterización del (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido a partir de *Ouratea polyantha* Engl. (Ochnaceae) y su efecto sobre la glucosa 6-fosfatasa. **LIX Convención Anual Asociación para el Avance de la Ciencia (ASOVAC)**: Universidad Central de Venezuela, Maracay, 13 al 18 Noviembre del 2011.
  - ✓ J. Bermúdez, M. Rodríguez, M. Hasegawa, 6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido, un nuevo megastigmano aislado de *Ouratea polyantha* Engl. (Ochnaceae). **X Congreso Venezolano de Química**: Universidad Simón Bolívar, Naiguatá, 11 al 14 de Abril del 2011.

- ✓ J. Bermudez, Cromatografía contracorriente a alta velocidad: Fundamentos y algunas aplicaciones en productos naturales. **Pasatía de Investigación**, National Institutes of Health, Bethesda, United States of America, del 09 Febrero 2009 al 06 Agosto 2009.

- Desarrollo de Tesis de Pregrado:
  - ✓ N. Rodríguez, (**2014**), "Cuantificación de β-sitosterol, lupeol y rutina por densitometría óptica en fracciones de *Ruellia tuberosa* L. y su evaluación de la inhibición sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa", **Tesis de Pregrado**, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (en desarrollo).
  - ✓ R. Mendoza, (**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.

Resumen iii
Publicaciones, Carteles en Congresos, Convenciones, Jornadas de Investigación, Pasantía de Investigación y Desarrollo de Tesis de Pregrado: v
Abreviaturas xiii
Lista de Esquemas xvii
Lista de Figuras xix
Lista de Tablas xxii
Lista de Espectros xxiv
INTRODUCCIÓN GENERAL 1
OBJETIVOS 3
Objetivos Generales 3
Objetivos Específicos 3
Sección I 5
Revisión Bibliográfica 5
Capítulo 1 7
ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE PLANTAS SUPERIORES CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA 7
Capítulo 2 11
***Ouratea polyantha* Engl.** 11
2.1. Clasificación taxonómica: Descripción botánica. 11
2.2. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Ouratea* 14
2.2.1. Flavonoides 14
2.2.2. Biflavonoides 16
2.2.3. Terpenos y Esteroides 19
2.2.4. Misceláneos 20
***Capraria biflora* L.** 23
2.4. Clasificación taxonómica: Descripción botánica. 23
2.5. Familia Scrophulariaceae: Antecedentes fitoquímicos. 26
2.6. *Capraria biflora* L.: Antecedentes Fitoquímicos y Biológicos 27
2.6.1. *o*-Naftoquinonas 27
2.6.2. Sesquiterpenos 29
2.6.3. Flavonoides 30
2.6.4. Iridoides 31
2.6.5. Misceláneos 31
***Cassia fruticosa* Mill.** 33
2.7. Clasificación taxonómica: Descripción botánica 33
2.8. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Cassia* 36
2.8.1. Antraquinonas 36
2.8.2. Antronas y oxantronas 37
2.8.3. Bisantraquinonas 38
2.8.4. Estilbenoides 39
2.8.5. Flavonoides 41
2.8.6. Taninos 42
2.8.7. Alcaloides 44
2.8.8. Misceláneos 46
2.9. Antecedentes Biológicos del Género *Cassia* 49
***Ruellia tuberosa* L.** 53

2.10. Clasificación taxonómica: Descripción botánica 53
2.11. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Ruellia* 56
2.12. *Ruellia tuberosa* L. 59
2.12.1. Flavonoides 59
2.12.2. Feniletanoides 61
2.12.3. Quinonas 62
2.12.4. Alcaloides 63
2.12.5. Terpenos e hidrocarburos lineales 64
Capítulo 3 65
TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA 65
3.1. Cromatografía. 65
3.2. Cromatografía en Columna, CC. 66
3.3. Cromatografía Contracorriente, CCC 68
3.4. Cromatografía Contracorriente a Alta Velocidad, HSCCC 71
3.4.1. Descripción de la técnica 71
3.4.2. Inyección de muestra 73
3.4.3. Determinación de los Coeficientes de Distribución, K_C 74
3.5. Refinamiento de la Zona de pH en Cromatografía Contracorriente 76
3.5.1. Descripción de la técnica 76
3.5.2. Selección-optimización del sistema de solventes para la técnica de refinamiento de la zona de pH 81
Capítulo 4 83
DIABETES MELLITUS 83
4.1. Metabolismo de la Glucosa 83
4.2. Diabetes Mellitus, DM 87
4.2.1. Glucosa-6-Fosfatasa (G-6-Pasa) 90
4.3. Absorción Intestinal de Glucosa 92
Capítulo 5 93
SINTESIS DE PRODUCTOS NATURALES 93
5.1. Pentagaloilglucosa: síntesis total 94
5.1.1. Pentagaloilglucosa: análisis retrosintético 96
5.2. Ácido Elágico y derivados alquílicos: síntesis total 98
5.2.1. Ácido Elágico derivados alquílicos: análisis retrosintético 101
Capítulo 6 107
MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS: BIOLÓGICOS-CROMATOGRÁFICOS-QUÍMICOS 107
6.1. Materiales 107
6.1.1. Material vegetal 107
6.1.2. Solventes y reactivos cromatográficos 108
6.1.3. Reactivos para bioensayos 109
6.2. Instrumentación 111
6.2.1. Instrumental Bioquímico 111
6.2.2. Instrumental cromatográfico 111
6.3. Métodos biológicos 112
6.3.1. Bioensayos sobre la enzima G-6-Pasa 112
6.3.1.1. Preparación de los microsomas 113

6.3.1.2. Ensayo general sobre la G-6-Pasa..... 114
6.3.1.3. Determinación de proteínas. 116
6.3.2. Bioensayo general sobre la Absorción Intestinal de Glucosa.117
6.3.2.1. Método enzimático GOD/POD 118
6.3.2.2. Ensayo del método enzimático GOD/POD 119
6.4. Método de Fraccionamiento Inicial..... 120
6.4.1. Fraccionamiento del material vegetal..... 120
6.5. Métodos Cromatográficos 121
6.5.1. Cromatografía de capa fina, CCF 121
6.5.1.1. Sistemas de desarrollo para CCF..... 121
6.5.1.2. Reveladores 122
6.5.2. Cromatografía en Columna. 122
6.5.2.1. Sistemas de Desarrollo para CC 123
6.5.3. Cromatografía contracorriente..... 123
6.5.3.1. Procedimiento de separación con la técnica estándar de HSCCC 123
6.5.3.2. Procedimiento de separación con la técnica de refinamiento de la zona de pH de CCC 123
6.5.4. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, HPLC. 124
6.6. Métodos Sintéticos 124
6.6.1. Procedimiento general para la síntesis del éster metílico de ácido gálico. 125
6.6.2. Procedimiento General para la Síntesis de *tri-O*-Alquilgalato de metilo. 125
6.6.3 Procedimiento General para la Síntesis del Ácido *tri-O*-Alquilgálico. 126
6.6.4. Procedimiento General para la Síntesis de Cloruro de *tri-O*-bencilgálico. 127
6.6.5. Procedimiento General para la Síntesis de 4-aminoalquilpiridina. 128
6.6.6. Procedimiento general para la síntesis de Penta-(3,4,5-*tri-O*-alquilgaloil)-glucosa. 129
6.6.7. Procedimiento general para la síntesis de Pentagaloilglucosa, PGG. 133
6.7. Métodos de Cuantificación de Flavonoides Totales. 133
Sección III 135
Resultados-Discusión 135
Capítulo 7 137
RESULTADOS-DISCUSIÓN: BIOLÓGICOS, CROMATOGRÁFICOS, FITOQUÍMICOS Y SINTÉTICOS..... 137
7.1. Preparación de las muestras fitoquímicas..... 137
7.2. Resultados cromatográficos fitoquímicos..... 140
7.3.1. *Ouratea polyantha* Engl. (Partes aéreas)..... 142
7.3.1.1. OpA (Insoluble en MeOH-H2O; 1:1, soluble en acetona)..... 145
7.3.1.2. OpB (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)..... 147
7.3.1.3. OpC (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona)..... 151
7.3.1.4. OpD (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona)..... 154
7.3.2. *Capraria biflora* L. (toda la planta)..... 156

7.3.2.1. CbA (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona) ... 157
7.3.2.2. CbB (Insoluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona) 157
7.3.2.3. CbC (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, insoluble en acetona)..... 163
7.3.2.4. CbD (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, soluble en acetona) 163
7.3.2.5. CbH (Soluble en MeOH-H_2O; 1:1, extraida con n-BuOH)..... 165
7.3.2.6. CbM (Soluble en MeOH-H_2O; extraida con n-BuOH; insoluble en MeOH) 166
7.3.3. *Cassia fruticosa* Mill. (Ramas y Hojas)..... 168
7.3.3.1. CfR-A y CfA (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona) ... 170
7.3.3.2. CfR-B y CfB (insoluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona)..... 171
7.3.3.3. CfR-C y CfC (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona) 171
7.3.3.4. CfR-D y CfD (soluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona) 172
7.3.3.5. CfR-E y CfE (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona y MeOH) 173
7.3.3.6. CfR-F y CfF (soluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona; soluble en MeOH) 174
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)..... 176
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) 178
7.3.3.9. Hidrólisis y fraccionamiento del extracto metanólico de *Cassia fruticosa* Mill., colectada en un período de sequía. 179
7.3.5. *Ruellia tuberosa* L. (raíces y partes aéreas) 184
7.3.5.1. RtB (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona)..... 186
7.3.5.2. RtR-C y RtC (insoluble en MeOH-H_2O; insoluble en acetona) 186
7.3.5.3. RtR-D y RtD (insoluble en MeOH-H_2O; soluble en acetona) 188
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)) ... 190
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) 191
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) 192

7.4. Resultados fitoquímicos: Caracterización de los metabolitos aislados 195
7.4.1. *Ouratea polyantha* Engl. 195
7.4.1.1. Caracterización de OpA-3: Quercetin 3-*O*-rutinósido (Rutina)... 195

7.4.1.2. Caracterización de OpB-FrCHCl$_3$: Lupeol, β-sitosterol 196
7.4.1.3. Caracterización de OpB-1=OpB-M1=OpD-5: 6→8″-biapigenina (Agathisflavona) 196
7.4.1.4. Caracterización de OpD-10: Ácido 4-hidroxibenzóico 197
7.4.1.5. Caracterización de OpD-9: (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-Roseosido 198
7.4.2. Capraria biflora *L.* 207
7.4.2.1. Caracterización de CbI-FrCHCl$_3$: β-sitosterol, lupeol y betulina 207
7.4.2.2. Caracterización de CbE=CbM-2: manitol 208
7.4.2.2.1. Semisíntesis y caracterización de hexaacetilmanitol 208
7.4.3. *Cassia fruticosa* Mill. 209
7.4.3.1. Caracterización de CfRS-1 y CfRS-2 209
7.4.3.2. Caracterización de CfRS-3, (β-sitosterol palmitato•$^1/_2$•H_2O). 209
7.4.3.3. Caracterización de CfH-1: Kaempferol 3-*O*-rutinósido, (Nicotiflorin) 217
7.4.3.3. Caracterización de CfH-2: Kaempferol-3-*O*-(2″-ramnosil)rutinósido, Clitorin 224
7.4.4. *Ruellia tuberosa* L. 231
7.4.4.1. Caracterización de RtB: β-sitosterol, lupeol y betulina 231
7.4.4.3. Caracterización de RtE: compuesto polihidroxilado 231
7.4.4.5. Caracterización de RtB, RtR-1 y RtR-K: β-sitosterol, lupeol y betulina 232
7.5. Resultados sintéticos 233
7.5.1. Derivados de ácido gálico. 235
7.5.1.1. Síntesis de Galato de metilo, GM. 235
7.5.1.2. Síntesis de *tri-O*-Bencilgalato de metilo, BnGM. 236
7.5.1.3. Síntesis de *tri-O*-Metilgalato de metilo, MeGM. 237
7.5.1.4. Síntesis del Ácido *tri-O*-Bencilgálico, ABnG. 238
7.5.1.5. Síntesis del Ácido *tri-O*-Metilgálico, AMeG. 239
7.5.1.6. Síntesis de Cloruro de 3,4,5-tri-*O*-Bencilgaloilo, BnGCl. 240
7.5.2. Derivados de 4-aminoalquilpiridina 241
7.5.2.1. Síntesis de 4-dimetilaminopiridina, DMAP. 242
7.5.2.2 Síntesis de 4-dietilaminopiridina, DEAP. 243
7.5.2.3. Síntesis de 4-pirrolidilaminopiridina, PPY. 243
7.5.3. Derivados de penta-*O*-Acil-D-glucosa 244
7.5.3.1. Síntesis de Penta-*O*-Acetil-β-D-glucosa, β-PAG. 244
7.5.3.2. Síntesis de Penta-*O*-Acetil-α-D-glucosa, α-PAG. 245
7.5.3.3. Síntesis de Penta-*O*-Benzoil-β-D-glucosa, β-PBG. 246
7.5.3.4. Síntesis de Penta-*O*-Benzoil-α-D-glucosa, α-PBG. 247
7.5.3.5. Síntesis de Penta-(3,4,5-tri-O-Metilgaloil)-D-glucosa, PGG-Me. 248
7.5.3.6. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri-O*-Bencilgaloil)-D-glucosa, PGG-Bn. 248
7.5.3.6.1. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri-O*-Bencilgaloil)-α-D-glucosa, α-PGG-Bn. 251

7.5.3.6.2. Síntesis de Penta-(3,4,5-*tri-O*-Bencilgaloil)-β-D-glucosa, β-PGG-Bn. 253
7.5.3.7. α-Pentagaloilglucosa, α-PGG. 255
7.5.3.8. β-Pentagaloilglucosa, β-PGG. 256
7.5.4. Síntesis de Ácido Elágico. 257
7.5.4.1. Ácido Tetraacetil-Elágico 258
7.5.4.2. Ácido Tetrametil-Elágico 259
7.5.4.3. Ácido Tetrabencil-Elágico 259
7.6. Resultados biológicos 261
Sección IV 267
Conclusiones 267
Capítulo 8 269
CONCLUSIONES 269
8.1. Conclusiones fitoquímicas 269
8.2. Conclusiones Sintéticas 270
8.3. Conclusiones Biológicas 271
REFERENCIAS 273
Anexos A1
Espectros E1

Abreviaturas

Siglas	Significado
Abs	Absorbancia.
ACN	Acetonitrilo.
AcOEt	Acetato de etilo.
AcOH	Ácido acético.
AGEs	Glicación avanzada de los productos finales.
ATP	Adenosin trifosfato.
n-BuOH	1-butanol.
t-BuOMe	*tert*-Butilmetiléter.
°C	Grados centígrados.
CC	Cromatografía en columna.
CCC	Cromatografía contracorriente.
$CHCl_3$	Cloroformo.
CD	Dienos conjugados, por sus siglas en inglés, Conjugate Dienes.
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado.
Cf	*Cassia fruticosa* Mill. Hojas.
CfX	Fracciones de las hojas de *Cassia fruticosa* Mill.; X= A, B, C, D, etc.
CfR	*Cassia fruticosa* Mill. Tallos.
CfR-X	Fracciones de los tallos de *Cassia fruticosa* Mill.; X= A, B, C, D, etc.
CBI	Concentración bactericida mínima.
CIM	Concentración inhibitoria mínima.
cm	Centímetros.
COSY	Correlación homonuclear de hidrógenos a través de átomos de carbono vecinos, por sus siglas en inglés, Correlation Spectroscopy.
d	Doblete.
DCCC	Cromatografía contracorriente por goteo, por sus siglas en inglés, Droplet, Counter-Current Chromatography.
dd	Doblete de doblete.
dq	Doblete de cuarteto.
dt	Doblete de triplete.
DEPT	Correlación heteronuclear H-C, por sus siglas en inglés, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
DE_{50}	Dosis efectiva para la mitad de la población estudiada.
DL_{50}	Dosis letal para la mitad de la población estudiada.
DM	Diabetes mellitus.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado.
DT_{50}	Dosis tóxica para la mitad de la población estudiada.
EDTA	Etilendiamintetraacetato.
EtOH	Etanol.

Siglas	Significado
F	Flujo, caudal.
FE	Fase estacionaria.
FI	Fase inferior de un sistema de solventes inmiscibles entre sí.
FS	Fase superior de un sistema de solventes inmiscibles entre sí.
g	Gramos.
G	Glucosa.
GLB	Glibencamida.
Gli	Glicósido.
Glu	Glucopiranosa.
GLUT2	Proteína que transporta glucosa-T2, por sus siglas en inglés, Glucose transport-T2.
GLUT4	Proteína que transporta glucosa-T4 desde la sangre al interior de la célula, por sus siglas en inglés, Glucose transport-T4.
GHS	Glutationa.
GOD	Enzima glucosa oxidasa.
GOD/POD	Método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa.
G-6-P	Glucosa-6-fosfato.
G-6-Pasa	Glusosa-6-Fosfatasa.
h	Horas.
Hex	1-hexano.
HCl	Ácido clorhídrico
HCO_2H	Ácido fórmico.
H_2SO_4	Ácido sulfúrico.
+H	Con histonas.
-H	Sin histonas.
IC_{50}	Concentración inhibitoria para la mitad de población estudiada, por sus siglas en inglés, Inhibitory Concentration.
IDDM	Diabetes tipo-1.
IR	Infrarrojo.
HEPES	Ácido [N-(2-hidroxietil)-piperazin-*N*′-2(2-etil)]-sulfónico, por sus siglas en inglés, 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic Acid.
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples enlaces, por sus siglas en inglés, Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HMQC	Correlación heteronuclear de enlaces C-H, por sus siglas en inglés, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence.
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno, agua oxigenada.
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento, por sus siglas en inglés, High-Performace Liquid Chromatography.
HSCCC	Cromatografía contracorriente a alta velocidad, por sus siglas en inglés, High-Speed Counter-Current Chromatography.
HP	Hidroperóxidos.
Hz	Hertz.
J	Constante de acoplamiento medida en Hz.

Siglas	Significado
K_C	Coeficiente de distribución.
Kg	Kilogramo.
m	Multiplete.
M	Molar.
MeOH	Metanol.
MeOD-d_4	Metanol deuterado.
mg	Miligramos.
MHz	Megahertz.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mL/min	Mililitros por minutos.
mM	Milimolar.
NA	No-asignado.
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
ND	No-determinado.
NH_4OH	Hidróxido de amonio.
NIDDM	Diabetes tipo-2.
nm	Nanometros.
NOESY	Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser, por sus siglas en inglés, Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy.
Op	*Ouratea polyantha* Engl., partes aéreas.
OpX	Fracciones de las partes aéreas de *O. polyantha* Engl., X = A, B, C, D, etc.
P_{eb}	Punto de ebullición.
PGG	Pentagaloilglucosa.
Pi	Fosfato inorgánico.
POD	Enzima peroxidada.
PP	Células que secretan al polipéptido pancreático.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
ppm	Partes por millón.
RE	Retículo endoplasmático.
Rf	Factor de retención.
RLAR	Aldosa reductasa de la lente de ratas.
RMN-^{13}C	Resonancia magnética nuclear del isótopo de carbono-trece.
RMN-^{1}H	Resonancia magnética nuclear del isótopo de hidrógeno-uno.
rpm	Revoluciones por minuto.
Rs	Resolución cromatográfica.
Rt	*Ruellia tuberosa* L., partes aéreas.
RtX	Fracciones de las partes aéreas de *R. tuberosa* L., X = A, B, C, D, etc.
RtR	*Ruellia tuberosa* L., raíces.

Siglas	Significado
RtR-X	Fracciones de las raíces de *R. tuberosa* L., X = A, B, C, D, etc.
s	Segundos.
s	Singlete.
SDS	Dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés, Dodecyl Sulfate, Sodium salt.
SGLT1	Co-transportador de Na^+-glucosa, por sus siglas en inglés, Sodium Glucose Transport-1.
SP	Proteína estabilizadora, por sus siglas en inglés, Stability Protein.
STZ	Estreptozotocina, por sus siglas en inglés, Streptozotocin.
SUC	Sub-unidad catalítica del sistema enzimático G-6-Pasa.
T	Temperatura.
t	Tiempo.
t	Triplete.
t_M	Tiempo muerto.
T1	Transportador de G-6-P hacia el lúmen del RE.
T2	Transportador de G fuera del lúmen del RE.
T3	Transportador de Pi fuera del lúmen del RE.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbutírico, por sus siglas en inglés, Thiobarbutiric Acid Reactive Substances.
TFA	Ácido trifluoroacético, por sus siglas en inglés, Trifluoroacetic Acid.
THF	Tetrahidrofurano.
V_{FSte}	Volumen del frente del solvente en CCC, igual a V_M.
V_M	Volumen del tiempo muerto.
V_t	Volumen total de la columna de CCC.
W	Ancho de pico cromatográfico.
UV	Ultravioleta.
UV-Vis.	Detector de ultravioleta en el visible.
α	- En términos biológicos: Células que secretan glucagon. - En términos cromatográficos: Factor de selectividad. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
β	- En términos biológicos: Células que secretan insulina. - En términos cromatográficos: Relación entre los radios de revolución y radio de la bobina. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
δ	Células que secretan somastatina.
μ	Micro.
ω	Velocidad de rotación de la columna o velocidad angular.
γ	Distancia entre un grupo funcional y un átomo en una molécula.
λ	Longitud de onda.
%	Porcentaje.
%FE	Porcentaje de retención de fase estacionaria.

Lista de Esquemas

N°	Título de esquema	Pág.
5.1	Ruta sintética comúnmente reportada para la obtención de los anómeros α- y β- de pentagaloilglucosa a partir del ácido tri-*O*-Bencilgálico.	94
5.2	Ruta sintética comúnmente reportada para la obtención estereoselectiva de los anómeros α- y β- de pentagaloilglucosa a partir del cloruro de acilo del ácido *tri-O*-Bencilgálico.	95
5.3	Reacciones comúnmente reportadas para la obtención del ácido *tri-O*-bencilgálico (ABnG) y su derivado acílico (BnGCl).	95
5.4	Reacciones reportadas para la obtención de β-pentagaloilglucosa y ácido elágico a partir de ácido tánico: a) MeOH/Bufer AcONa/AcOH, pH 5; b) $H_2SO_{4(ac)}$.	96
5.5	Análisis retrosintético propuesto para los anoméros α- y β-PGG.	97
5.6	Rutas de síntesis total reportadas para ácido elágico (AE): **a**) a partir de ácido gálico (AG) y; **b**) a partir de galato de metilo (GM).	98
5.7	Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados ácido 3,3′-di-*O*-alquilelágico a través del 4-*O*-alquigalato de metilo.	99
5.8	Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados ácido 4,4′-di-*O*-alquilelágico a través del 3-*O*-alquigalato de metilo.	99
5.9	Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados del ácido elágico con sustituyentes monodentados a través de la formación de bifenilos a partir de galato de metilo.	100
5.10	Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados del ácido elágico con sustituyentes bidentados a través de la formación de bifenilos a partir de galato de metilo.	101
5.11	Análisis retrosintético propuesto para la formación del ácido elágico.	102
5.12	Análisis retrosintético propuesto para la formación del ácido elágico tetra-*O*-alquilsustituido.	103
6.1	Procedimiento para el aislamiento de los Microsomas.	113
6.2	Ensayo general de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa.	115
6.3	Procedimiento para la cuantificación de proteínas.	116
6.4	Medición de la absorción de glucosa intestinal.	118
6.5	Esquema de fraccionamiento general propuesto previo a los ensayos biológicos y a la purificación de los compuestos.	121
7.1	Resumen general de la separación de los metabolitos secundarios identificados en *O. polyantha* Engl.	140
7.2	Esquema de fraccionamiento óptimo para *Ouratea polyantha* Engl.	141
7.3	Fraccionamiento de OpB proveniente de *O. polyantha* Engl.: Separación de β-sitosterol y agathisflavona.	147
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.	152
7.5	Resumen general de la separación de los metabolitos secundarios identificados en *C. biflora* L.	153
7.6	Fraccionamiento de CbB proveniente de *C. biflora* L.: Separación de β-sitosterol y betulina o lupeol.	156
7.7	Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. biflora* L., para la obtención de manitol.	161
7.8	Resumen general de la separación de los compuestos en las hojas de *C. fruticosa*	162

N°	Título de esquema	Pág.
	Mill., colectada en un período lluvioso.	
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. ...	163
7.10	Fraccionamiento del extracto metanólico de las ramas de *C. fruticosa* Mill., para obtener los metabolitos secundarios polares.	168
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.	175
7.12	Resumen general del fraccionamiento realizado para las partes aéreas de *R. tuberosa* L.	178
7.13	Resumen general del fraccionamiento realizado para las raíces de *R. tuberosa* L.	179
7.14	Fraccionamiento de RtR-L proveniente de las raices de *R. tuberosa* L., para obtener fracciones enriquecidas en metabolitos polares (lignanos y flavonoides).	185
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, 2h; v) $SOCl_2$, benceno, piridina, reflujo, 2h.	229
7.16	Síntesis de 4-aminoalquilpiridina a partir d piridina o de 4-cianopiridina: i) $Br_{2(l)}$, DEA, NaOH; ii) $Br_{2(l)}$, pirrolidina, NaOH; iii) acrilamida (AAm), $HCl_{(c)}$, DMA, NaOH.	230
7.17	Síntesis estereoselectiva de a- y b-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.	230
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.	231

Lista de Figuras

N°	Título de figura	Pág.
2.1	Dibujo esquemático de la planta *Ouratea polyantha* Engl.	13
2.2	*Ouratea polyantha* Engl. especímenes almacenados en: a) Jardín Botánico de New York; b) Jardín Botánico de Caracas.	13
2.3	Dibujo esquemático de la planta *Capraria biflora* L.	25
2.4	*Capraria biflora* L. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26391; b) foto de una de las ramas depositadas en el Herbario Ovalles.	25
2.5	Dibujo esquemático de la planta *Cassia fruticosa* Mill.	35
2.6	*Cassia fruticosa* Mill. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26392; b) foto de las flores de la especie.	35
2.7	Dibujo esquemático de la planta *Ruellia tuberosa* L.	55
2.8	*Ruellia tuberosa* L. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26390; b) foto de las flores y frutos de la planta depositadas en el Herbario Ovalles.	55
3.1	a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de componentes A y B, por elución en una columna cromatográfica y b) señal del detector en varios momentos de la elución mostradas en a).	67
3.2	Diferentes arreglos de la columna de cromatografía contracorriente para lograr la retención de FE por fuerzas centrífugas contra un *F* contínuo de FM, denotando el eje de revolución.	69
3.3	Columna de separación de múltiples capas con movimiento planetario tipo-J (ver fig. 3.2b).	69
3.4	Mecanismo de la cromatografía contracorriente en sistemas planetarios tipo-J.	72
3.5	Determinación del coeficiente de distribución a partir del cromatograma con la técnica estándar.	75
3.6	Mecanismo de la formación del pico rectangular en la separación de analitos ácidos empleando la técnica de refinamiento de la zona de pH.	77
3.7	Experimento modelo para demostrar el mecanismo de la técnica de Refinamiento de la Zona de pH en CCC.	79
4.1	Principales vías para la producción de glucosa en ayunas.	85
4.2	Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo.	85
4.3	Metabolismo de glucosa a nivel hepático.	89
4.4	Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática.	91
4.5	Transporte de glucosa en células epiteliales del intestino (SGLT1).	92
6.1	Método enzimático GOD/POD.	119
7.1	Metabolitos identificados en la especie *O. polyantha* Engl.	142
7.2	Cromatograma de OpA por HSCCC y HPLC proveniente de *O. polyantha* Engl.	146
7.3	Cromatograma a escala analítica de OpB proveniente de *O. polyantha* Engl.	148
7.4	Cromatografía de capa fina comparativa de la fracción OpB_{Hex}-$FrCHCl_3$ (1), β-siotsterol (2) y lupeol (3).	150
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).	151
7.6	Cromatograma HPLC de la fracción OpB-M1 identificada como agthisflavona.	151
7.7	Cromatograma a escala semi-preparativa de OpC proveniente de *O. polyantha* Engl.	153
7.8	Metabolitos identificados en la especie *C. biflora* L.	157

N°	Título de figura	Pág.
7.9	Cromatografía de capa fina comparativa de CbI (1), CbI-FrCHCl$_3$ (2), CbK (3), CbL (4) y β-sitosterol (5).	159
7.10	Cromatografía de capa fina comparativa de las fracciones CbI (1), CbI-FrCHCl$_3$ (2), CbK (3) y CbL (4).	160
7.11	Cromatograma por HPLC-sistema-2 de las fracciones CbL y CbK provenientes de *C. biflora* L.	161
7.12	Cromatograma por HPLC-sistema-1 de las fracciones CbP, CbL, CbK y CbN provenientes de *C. biflora* L.	162
7.13	Cromatogramas a escala analítica de: **a**) -- CbF y **b**) —CbD provenientes de *C. biflora*	164
7.14	Metabolitos identificados en la especie *C. fruticosa* Mill.	170
7.15	Cromatogramas a escala analítica de fracciones proveniente de *C. fruticosa* Mill., ramas (CfR-C) y hojas (CfC), colectadas en período lluvioso.	171
7.16	Cromatograma a escala analítica de **CfR-C** proveniente de las ramas de *C. fruticosa* Mill., colectadas en período lluvioso.	172
7.17	Cromatogramas a escala analítica de Cf proveniente de *C. fruticosa* Mill., provniente de las hojas recolectadas en período lluvioso.	175
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.	176
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).	177
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.	177
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).	178
7.22	Metabolitos identificados en la especie *R. tuberosa* L.	186
7.23	Cromatogramas a escala analítica de las fracciones C y D provenientes de las raíces y partes aéreas de *R. tuberosa* L.	187
7.24	Cromatograma HPLC de las fracciones Rt y RtJ (esquema 7.12, pág., 184): HPLC-Sistema-1, λ = 330 nm.	188
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}.	190
7.26	Cromatograma HPLC de las fracciones RtR-J y RtR-L (esquema 7.13, pág., 185): HPLC-Sistema-1, λ = 330 nm.	192
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-M, RtR-N; b) $RtR\text{-}N_{ac}$, $RtR\text{-}N_{org}$; c) $RtR\text{-}M_{ac}$, $RtR\text{-}N_{ac}$.	194
7.28	Estructuras de vomifoliol, roseósido y (6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido.	199
7.29	Correlaciones homonucleares (**COSY**) y heteronucleares (**HMBC**) para el compuesto OpD-9.	202
7.30	Correlaciones homonucleares (**NOESY**) para el compuesto OpD-9.	202
7.31	Fragmentación propuesta para el compuesto OpD-9, (6*R*, 9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido.	204
7.32	Fragmentación propuesta para el compuesto CfR3, (b-sitosterol palmitato•$^1/_2$•H_2O).	215
7.33	Correlaciones **HMBC** y **COSY** para el compuesto CfH-1 (Kaempferol 3-*O*-rutinosido).	221

N°	Título de figura	Pág.
7.34	Fragmentación propuesta para el compuesto CfH-1, (Kaempferol 3-*O*-rutinósido).	221
7.35	Correlaciones **HMBC** y **COSY** para el compuesto CfH-2 (Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinosido).	228
7.36	Fragmentación propuesta para el compuesto CfH-2, (Kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	229
7.37	Determinación del porcentaje de pureza de BnGM.	236
7.38	Determinación del porcentaje de pureza de ABnG.	238
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.	249
7.40	Purificación por cromatografía en columna de a-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.	252
7.41	Determinación del porcentaje de pureza de α-PGG-Bn y de β-PGG-Bn.	252
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.	254
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.	254
7.44	Determinación del porcentaje de pureza de α-PGG y de β-PGG.	256

Lista de Tablas

N°	Título de tabla	Pág.
1.1	Plantas potencialmente antidiabéticas en Venezuela.	9
1.2	Porcentajes de inhibición sobre el sistema enzimático G-6-Pasa del extracto metanólico y/o subfracciones del material vegetal disponible descrito en la tabla 1.1.	10
2.1	Condiciones HPLC de metabolitos comunes en el género Ouratea.	22
2.2	Condiciones HPLC de metabolitos aislados e identificados de especies del género *Cassia*.	48
6.1	Preparación de los sustratos.	114
7.1	Porcentaje de rendimiento del extracto metanólico de *O. polyantha* Engl., *C. biflora* L., *C. fruticosa* Mill., y *R. tuberosa* L.	138
7.2	Fracciones provenientes del extracto metanólico de *O. polyantha* Engl., *C. biflora* L., *C. fruticosa* Mill., y *R. tuberosa* L.	138
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.	139
7.4	Sistemas de solventes óptimos para ser separadas por HSCCC fracciones provenientes de las diferentes plantas objeto de estudios de ésta investigación.	141
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.	141
7.6	Coeficientes de distribución de la fracción Cb-B en sistemas de solventes hidrofóbicos.	158
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.	179
7.8	Desplazamientos químicos para agathisflavona en DMSO-d_6.	197
7.9	Desplazamientos químicos observados en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C (CD_3OD) para OpD-10 (ácido 4-hidroxibenzóico).	198
7.10	Desplazamientos químicos de protones para los megastigmanos vomifoliol, roseósido y OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido].	200
7.11	Desplazamientos químicos de protones y carbono y correlaciones H-H y H-C para OpD-9.	201
7.12	Desplazamientos químicos de protones para el β-sitosterol, β-sitosterol miristato, β-sitosterol palmitato y compuesto **CfRS-3**, reportados en $CDCl_3$.	211
7.13	Desplazamientos químicos de carbono para el β-sitosterol, β-sitosterol miristato, β-sitosterol palmitato y el compuesto **CfRS-3**, reportados en $CDCl_3$.	212
7.14	Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto kaempferol 3-*O*-rutinósido y **CfH-1**.	219
7.15	Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto **CfH-1** (kaempferol 3-*O*-rutinósido).	220
7.16	Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto Kaempferol 3-*O*-(2”-ramnosil)rutinósido y CfH-2.	226
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)).	227
7.18	Condiciones estereoselectivas para la síntesis de los anómeros α- y β-PGG-Bn.	250
7.19	Inhibición de G-6-Pasa de las fracciones, metabolitos aislados y productos sintetizados.	261

N°	Título de tabla	Pág.
7.20	Determinación del IC_{50} para aquellos compuestos que mostraron una inhibición igual o superior al 35 %.	262
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 %.	262

Lista de Espectros

N°	Título del espectro	Pág.
1	Espectro de masas de alta resolución de OpB-1, (agathisflavona).	E3
2	Espectro de masas de alta resolución de OpC-2.	E3
3	Espectro de masas de alta resolución de OpC-3.	E4
4	Espectro de masas de alta resolución de OpC-4 (rutina).	E4
5	Espectro de masas de alta resolución de OpC-5.	E5
6	Espectro 6. RMN-1H del compuesto OpD-5 = OpB-1 (agathisflavona).	E6
7	Ampliación entre 6,3-8,1 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-5 = OpB-1 (agathisflavona).	E7
8	RMN-^{1}H del compuesto OpD-10 (ácido 4-hidroxibenzóico).	E8
9	Ampliación entre 6,7-8,2 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-10 (ácido 4-hidroxibenzóico).	E9
10	RMN-^{13}C del compuesto OpD-10 (ácido 4-hidroxibenzóico).	E10
11	UV-Vis del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E11
12	IR del compuesto OpD-9 [(6R,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseó sido].	E12
13	EM del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E13
14	EM-EM del ión 506,88 uma del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E13
15	RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E14
16	Ampliación entre 5,2-8,0 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E15
17	Ampliación entre 5,6-5,9 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E16
18	Ampliación entre 0,5-4,7 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E17
19	Ampliación entre 4,2-4,4 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E18
20	Ampliación entre 3,2-3,5 ppm del RMN-^{1}H del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E19
21	RMN-^{13}C del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido]. Bruker de 125 MHz.	E20
22	RMN-^{13}C del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido]. JEOL de 67,5 MHz.	E21
23	DEPT-135° del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E22
24	HMQC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido.	E23
25	Ampliación entre 5,6-8,0 ppm en F2 del HMQC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E24
26	Ampliación entre 3,0-4,9 ppm en F2 del HMQC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E25
27	Ampliación entre 0,8-3,6 ppm en F2 del HMQC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E26
28	HMBC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E27
29	Ampliación entre 1,0-8,0 ppm del HMBC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E28
30	Ampliación entre 0,5-5,0 ppm del HMBC del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E29
31	COSY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E30
32	Ampliación entre 6,5-8,1 ppm en F2 del COSY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E31
33	Ampliación entre 3,2-6,0 ppm en F2 del COSY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E32
34	Ampliación entre 0,7-2,8 ppm en F2 del COSY del compuesto OpD-9 (6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido.	E33
35	NOESY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E34

N°	Título del espectro	Pág.
36	Ampliación entre 3,1-4,9 ppm en F2 del NOESY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E35
37	Ampliación entre 0,7-2,7 ppm en F2 del NOESY del compuesto OpD-9 [(6*R*,9*S*)-6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido].	E36
38	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto CfRS-1.	E37
39	Espectro de RMN-^{1}H del compuesto CfRS-2.	E37
40	Espectro de RMN-^{13}C del compuesto CfRS-1.	E38
41	IR del compuesto CfR-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E39
42	EM del compuesto CfR-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E40
43	EM-EM del ión 663 uma del compuesto CfR-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E40
44	RMN-^{1}H del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E41
45	Ampliación entre 2,2 y 5,6 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E42
46	Ampliación entre 0,3 y 2,4 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E43
47	RMN-^{13}C del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E44
48	DEPT-135 del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E45
49	Ampliación entre 21 y 51 ppm del espectro DEPT-135 del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E46
50	Ampliación entre 0 y 22 ppm del espectro DEPT-135 del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E47
51	Correlación Heteronuclear (HetCor) del compuesto CfRS-3 (β-sitosterol palmitato•$^{1}/_{2}$•H_2O).	E48
52	EM del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E49
53	EM-EM del ión uma del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E49
54	Espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E50
55	Ampliación entre 6,8-8,2 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E51
56	Ampliación entre 4,6-6,5 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E52
57	Ampliación entre 3,1-3,9 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E53
58	Espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E54
59	Ampliación entre 158-180 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E55
60	Ampliación entre 116-136 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E56
61	Ampliación entre 94-107 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E57
62	Ampliación entre 67-79 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E58
63	Espectro DEPT-135 del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E59
64	Ampliación entre 66-81 ppm del espectro DEPT-135 del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E60
65	Espectro HMQC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E61
66	Ampliación entre 3,1 y 3,9 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E62
67	Espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E63
68	Ampliación entre 6,1-6,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E64
69	Ampliación entre 4,0-5,2 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E65
70	Ampliación entre 4,4-4,6 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E66

N°	Título del espectro	Pág.
71	Ampliación entre 3,3-3,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E67
72	Ampliación entre 3,3-3,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E68
73	Espectro COSY del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E69
74	Ampliación entre 3,1-3,5ppm del espectro COSY del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E70
75	Ampliación entre 3,2-3,9 ppm del espectro COSY del compuesto CfH-1 (Kaempferol-3-*O*-rutinósido).	E71
76	EM del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)-rutinósido).	E72
77	EM-EM del ión 741 uma del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)-rutinósido).	E72
78	Espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)...	E73
79	Ampliación entre 5,5-8,2 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E74
80	Ampliación entre 2,9-4,2 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E75
81	Ampliación entre 0,8-1,5 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E76
82	Espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E77
83	Ampliación entre 158-180 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E78
84	Ampliación entre 116-136 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E79
85	Ampliación entre 94-107 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E80
86	Ampliación entre 67-79 ppm del espectro RMN-^{13}C del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E81
87	Espectro DEPT-135 del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)	E82
88	Ampliación entre 66-81 ppm del espectro DEPT-135 del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E83
89	Espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido).	E84
90	Ampliación entre 6,05-6,45 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E85
91	Ampliación entre 4,3-5,7 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E86
92	Ampliación entre 3,0-4,2 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E87
93	Ampliación entre 3,7-4,2 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E88
94	Ampliación entre 3,1-3,7 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E89
95	Ampliación entre 0,8-1,3 ppm en F2 del espectro HMQC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E90
96	Espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)). ...	E91
97	Ampliación entre 6,7-8,3 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E92
98	Ampliación entre 6,1-6,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E93
99	Ampliación entre 4,3-5,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E94
100	Ampliación entre 5,0-5,4 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E95
101	Ampliación entre 4,3-4,6 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E96

N°	Título del espectro	Pág.
102	Ampliación entre 3,5-3,7 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E97
E103	Ampliación entre 3,5-4,1 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E98
104	Ampliación entre 3,1-3,5 ppm en F2 del espectro HMBC del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E99
105	Espectro COSY del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E100
106	Ampliación entre 3,2-5,8 ppm del espectro COSY del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E101
107	Ampliación entre 3,2-4,1 ppm del espectro COSY del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E102
108	Ampliación entre 2,8-4,3 ppm del espectro COSY del compuesto CfH-2 (Kaempferol-3-*O*-(2''-ramnosil)rutinósido)).	E103
109	Espectro RMN-^{1}H del compuesto RtE.	E104
110	Ampliación entre 2,2 y 5,0 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto RtE.	E104
111	Espectro RMN-^{1}H del compuesto BnGM.	E105
112	Espectro RMN-^{13}C del compuesto BnGM.	E106
113	Espectro RMN-^{1}H del compuesto ABnG.	E107
114	Espectro RMN-^{13}C del compuesto ABnG.	E108
115	Espectro RMN-^{1}H del compuesto β-PAG.	E109
116	Espectro RMN-^{13}C del compuesto β-PAG.	E110
117	Espectro RMN-^{1}H del compuesto β-PBG.	E111
118	Espectro RMN-^{13}C del compuesto β-PBG.	E112
119	EM-EM del compuesto NBnGAU.	E113
120	EM del compuesto BnGOBt.	E114
121	Espectro RMN-^{1}H del compuesto BnGOBt.	E115
122	Espectro RMN-^{13}C del compuesto BnGOBt.	E116
123	Espectro RMN-^{1}H del compuesto α-PGG-Bn.	E117
124	Ampliación entre 5,5 y 7,0 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto α-PGG-Bn.	E118
125	Espectro RMN-^{1}H del compuesto α-PGG.	E119
126	Ampliación entre 6,6 y 7,3 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto α-PGG.	E120
127	Ampliación entre 4,3 y 6,8 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto α-PGG.	E121
128	Espectro RMN-^{13}C del compuesto α-PGG.	E122
129	Espectro DEPT-135° del compuesto α-PGG.	E123
130	Espectro RMN-^{1}H del compuesto β-PGG.	E124
131	Ampliación entre 6,2 y 7,3 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto β-PGG.	E125
132	Ampliación entre 2,7 y 6,4 ppm del espectro RMN-^{1}H del compuesto β-PGG.	E126
133	Espectro RMN-^{13}C del compuesto β-PGG.	E127
134	Espectro DEPT-135° del compuesto β-PGG.	E128
135	EM del compuesto AE.	E129
136	EM-EM del compuesto AE.	E130

INTRODUCCIÓN GENERAL

La diabetes mellitus (DM), es el desorden endocrino mas común, caracterizado por una hiperglucemia como resultado de una insuficiencia en la producción de insulina y/o a una resistencia a la misma.[1] En Venezuela, además del uso de los medicamentos convencionales, se utilizan extractos vegetales en el tratamiento de la diabetes. Aunque la utilidad de las plantas es bien conocida en la medicina folklórica, la misma se basa en conocimientos empíricos, por lo que es necesaria su confirmación científica.[2]

La enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa; EC 3.1.3.9, por sus siglas en inglés, Glucose-6-Phosphatase), es un sistema multicomponente constituido por una subunidad catalítica (SUC) y tres transportadores: T1 para glucosa-6-fosfato (G-6-P, por sus siglas en inglés, Glucose-6-Phosphate), T2 para fosfato/pirofosfato y T3 para glucosa,[3] de modo que la enzima y sus transportadores son blancos potenciales para terapias antidiabéticas.[4] Fracciones provenientes del extracto metanólico de *Ouratea polyantha* Engl. (**Op**, partes aéreas), *Capraria biflora* L. (**Cb**, toda la planta), *Cassia fruticosa* Mill. (**Cf**, hojas y **CfR**, tallos) y *Ruellia tuberosa* L. (**RtR**, raices y **Rt**, partes aéreas) presentaron efectos inhibitorios sobre el sistema enzimático G-6-Pasa, por lo que se aplicó una técnica de separación cromatográfica por HSCCC para el estudio de las mismas.

La cromatografía contracorriente (CCC), es una técnica usada para separar mezclas complejas de manera eficiente desarrollada a finales de los años 70 y refinada a cromatografía contracorriente a alta velocidad (HSCCC, por siglas en inglés High-Speed Counter-Current Chromatography), en los años de 1980. Desde

entonces ha solapado otros métodos cromatográficos debido a su mayor capacidad de carga con separaciones rápidas y eficientes. Este método cromatográfico es actualmente utilizado en una variedad de aplicaciones, y con mayor énfasis en la extracción de drogas bioactivas provenientes de plantas medicinales.[5]

En el presente trabajo fueron empleadas plantas medicinales utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de la DM. Se realizó la separación fitoquímica preliminar, basada en los efectos inhibitorios sobre la G-6-Pasa de la fracción microsomal-hepática.[6] Se utilizaron diferentes técnicas cromatográficas para la purificación de las muestras bioactivas, entre ellas se destaca la distribución líquido-líquido, conformada básicamente por la cromatografía contracorriente a alta velocidad (HSCCC). Adicionalmente, se utilizó la distribución sólido-líquido conformada por las técnicas de cromatografía en columna por gravedad (CC), cromatografía "flash" y cromatografía liquida al vacío (CLV).

Para cada fracción bioactiva se determinó un sistema de solventes óptimo por HSCCC, el cual fue desarrollado a través de una pasantía de investigación en el "National Institutes of Health" (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bajo la supervisión de Dr. Yoichiro Ito en el año 2009. Dicho trabajo conllevo a la separación y caracterización de nuevo componente denominado 6′-(4″-hidroxibenzoil)-roseósido aislado de *Ouratea polyantha* Engl., Por otra parte, se aisló por cromatografía "flash" 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), los cuales fueron obtenidos de la planta *Cassia fruticosa* Mill.

Adicionalmente, se sintetizó los productos naturales α- y β-pentagaloilglucosa, ácido elágico y sus análogos, los cuales presentaron actividad sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- ✓ Realizar el estudio fitoquímico y evaluar la actividad sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa de los extractos, fracciones y/o metabolitos secundarios mayoritarios de las especies *Ouratea polyantha* Engl., *Capraria biflora* L., *Cassia fruticosa* Mill. y *Ruellia tuberosa* L.
- ✓ Sintetizar los anómeros α- y β-penta-*O*-D-galoilglucosa, ácido elágico y sus análogos y evaluar su actividad sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa.

Objetivos Específicos

- ✓ Obtener por extracción con solventes orgánicos, fracciones de distintas polaridades de las plantas *Ouratea polyantha* Engl., *Capraria biflora* L., *Cassia fruticosa* Mill. y *Ruellia tuberosa* L.
- ✓ Aislar los metabolitos secundarios de las fracciones más activas sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa por métodos cromatográficos y caracterizar los mismos por métodos espectroscópicos.
- ✓ Determinar la actividad sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa de los metabolitos aislados y productos sintetizados así como de las fracciones enriquecidas en los metabolitos aislados.
- ✓ Medir los efectos sobre la absorción intestinal de glucosa de los metabolitos aislados y productos sintetizados que presenten actividad sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa mayor que el control positivo.

Sección I

Revisión Bibliográfica

Resumen

1.- Antecedentes Fitoquímicos y Etnobotánicos de Plantas Superiores con Posible Actividad Antidiabética.

2.- Antecedentes Botánicos y Fitoquímicos

Ouratea polyantha Engl.

Capraria biflora L.

Cassia fruticosa Mill.

Ruellia tuberosa L.

3.- Técnicas de Separación Cromatográfica

Cromatografía en Columna

Cromatografía Contracorriente

4.- Diabetes Mellitus.

En la SECCIÓN I se presenta una revisión bibliográfica de los temas relacionados al presente trabajo. El **Capítulo 1** es un breve repaso sobre la importancia de la fitoquímica y de cómo se puede integrar la información etnobotánica en la validación del uso de las plantas en el control de las enfermedades, específicamente sobre la Diabetes Mellitus. El **Capítulo 2** comprende la revisión bibliográfica de las plantas de interés del presente trabajo de la siguiente manera: ***Ouratea polyantha* Engl.,** es una revisión bibliográfica exclusivamente del género *Ouratea* cuyo marcador quimiotaxonómico es la biflavona amentoflavona, también se describe los metabolitos secundarios más comunes en el género. En ***Capraria biflora* L.,** se describe el marcador quimiotaxonómico de la familia Schrophulariaceae y el tipo de metabolitos aislados

de ésta familia, también se presenta la revisión fitoquímica-farmacológica actual para la especie *Capraria biflora* L. que aunque ha sido estudiada por varios grupos de investigación son pocos los compuestos aislados hasta ahora. ***Cassia fruticosa* Mill.,** consta principalmente de los estudios fitoquímicos sobre el género *Cassia*, y su relación con las propiedades antioxidantes-antidiabéticas asociadas al género *Cassia*. ***Ruellia tuberosa* L.,** hace referencia a la diversidad estructural aislada del género *Ruellia* y a la potencialidad terapéutica asociada a la especie *R. tuberosa* L., la misma ha sido ampliamente estudiada y en muchos casos las actividades biológicas reportadas no han podido ser relacionadas con los componentes aislados. El **Capítulo 3** está estrechamente relacionado con los inicios de la cromatografía y su desarrollo hasta la CCC, ésta última es descrita en detalle. El **Capítulo 4** consta de una revisión bibliográfica de la DM enfocada básicamente en blancos terapéuticos que involucran el sistema enzimático G-6-Pasa, también se mencionan diferentes drogas antidiabéticas comerciales y experimentales para el tratamiento de los 2 tipos de DM. En el **Capítulo 5** se describe la importancia de los métodos sintéticos para obtener productos naturales.

Capítulo 1

ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE PLANTAS SUPERIORES CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA.

El descubrimiento de drogas, la etnobotánica y la medicina tradicional e indígena son los pilares para desarrollar la investigación fitoquímica en plantas medicinales, sin embargo, el uso tradicional de plantas para beneficio del hombre está basado en experiencias propias o en conocimientos empíricos, por lo que deben ser confirmados científicamente debido a los riesgos que se toman al ingerir una planta como alimento o medicamento.[2] Por lo que los estudios fitoquímicos y biológicos son indispensables para realizar investigaciones en ésta área.

La etnobotánica estudia las relaciones entre las plantas y el ser humano, incluyendo sus aplicaciones y usos tradicionales, por otra parte, la fitoquímica usa los resultados etnobotánicos para realizar la separación e identificación de (los) agentes responsables de las actividades biológicas observadas o asociadas a las plantas.

Basados en la información popular y respaldados por antecedentes botánicos[7] los profesores Dr. Masahisa Hasegawa y Dr. Stephen Tillet, adscritos a la Universidad Central de Venezuela, recopilaron numerosos reportes de plantas Venezolanas descritas tradicionalmente como antidiabéticas, algunas de ellas se muestran en la tabla 1.1.[8] Los extractos metanólicos y/o subfracciones de los especímenes disponibles fueron sometidos a ensayos de inhibición sobre el

sistema enzimático G-6-Pasa (tabla 1.2), los mismos se realizaron en días diferentes no consecutivos en los cuales el control positivo (floricina) mostró diferentes valores entre sí, de modo que los valores de inhibición pueden variar entre las diferentes especies. Sin embargo, los ensayos con las plantas utilizadas en esta investigación se realizaron en conjunto, con un mismo valor de control positivo. En el presente trabajo se utilizaron las plantas que presentaron el mayor porcentaje de inhibición junto con el menor número de reportes fitoquímicos (resaltadas en negrillas, tabla 1.2). Adicionalmente, se usó la planta amazónica *O. polyantha* Engl., porque presentó resultados biológicos interesantes en un estudio previo.[9] La revisión bibliográfica y posterior fraccionamiento de las plantas seleccionadas será descrita más adelante.

Tabla 1.1. Plantas potencialmente antidiabéticas en Venezuela.

Familia	Nombre común	Nombre científico	Parte usada
Acanthaceae	Plota-plota (yuquilla)	*Ruellia tuberosa*	
Bignoniaceae	Totumo	*Crescentia cujete*	
Bignoniaceae	Fresnillo	*Tecoma stans*	
Bombacaceae	Palo de boya tetón	*Pachira acuatica*	
Boraginaceae	Nigua	*Tuornefortia hirsutissima*	
Commelinaceae	Suelda con suelda	*Zebrina pendula*	
Caesalpinaceae	Casco de vaca	*Bauhinia megalandra*	Hojas-ramas[d]
Caesalpinaceae	Urape morado	*Bauhinia variegata*	Hojas[d]
Caesalpinaceae		*Caesalphinia bondoc*	
Fabaceae	Cañafistolo	*Cassia fistula*	
Fabaceae	Platanico	*Cassia fruticosa*	
Curcubitaceae	Cundeamor	*Momordica charanthia*	Hojas[i]
Euphorbiaceae	Tua tua	*Jatroplha gossypiifolia*	Hojas[d]
Euphorbiaceae		*Phyllanthus amarus*	Planta[I]
Euphorbiaceae	Flor escondida	*Phyllanthus niruri*	
Euphorbiaceae		*Phyllanthus tenellus*	
Euphorbiaceae		*Phyllanthus urinaria*	
Hippocastanaceae	Cobalonga	*Billia rosea*	Semillas[d]
Rubiaceae	Francisco	*Borreria verticilata*	
Rutaceae	Cuspa	*Cusparia trifoliata*	Corteza[d]
Schrophulariaceae	Fregosa	*Capraria biflora*	Hojas[d]
Schrophulariaceae	Escoba	*Scoparia dulcis*	Hojas[d]
Turnareaceae		*Turnera diffusa*	
Umbelliferae	Culantro	*Eryngium foetidum*	Planta[d]
Zingiberaceae	Caña de la India	*Costus villosissimus*	Tallos[d]

[d] decocción. [I] infusión

Tabla 1.2. Porcentajes de inhibición sobre el sistema enzimático G-6-Pasa del extracto metanólico y/o subfracciones del material vegetal disponible descrito en la tabla 1.1

Familia	Planta			% Inh. G-6-Pasa (%) ± 2%[a]	
		Parte usada	Fracción[b]	-H	+H
Acanthaceae	***Ruellia tuberosa***	Raíces	C	62,19	28,67
			D	68,03	24,20
		Parte aérea[c]	B	11,00	7,50
			C	65,83	42,36
			D	71,03	52,71
Bignoniaceae	*Crescentia cujete*	Hojas	MeOH	36,30	32,00
		Tallos	MeOH	22,73	46,00
Bignoniaceae	*Tecoma stans*	Frutos	MeOH	23,55	10,68
		Hojas	MeOH	27,45	42,53
		Tallos	MeOH	24,74	44,6
Caesalpinaceae	*Bauhinia megalandra*	Hojas	MeOH		
Caesalpinaceae	*Bauhinia variegata*	Hojas	MeOH	84,0	87,0
		Tallos	MeOH	68,0	34,0
Caesalpinaceae	***Cassia fruticosa***	Hojas	A	72,49	71,32
			B	79,82	12,45
			C	77,76	22,45
			D	88,25	86,49
		Ramas	B	53,42	62,47
			C	84,17	27,92
			D	66,08	9,70
Euphorbiaceae	*Phyllanthus tenellus*	Toda	MeOH[d]	26,92	18,18
			MeOH[e]	59,23	9,95
Hippocastanaceae	*Billia rosea*	Semillas	MeOH[d]	33,45	12,78
			MeOH[e]	7,48	37,93
Ochnaceae	***Ouratea polyantha***	Parte Aérea[f]	MeOH[d]	67,5	16,3
			MeOH[e]	38,6	6,7
Rutaceae	*Cusparia trifoliata*	Corteza	MeOH	16,03	22,79
Schrophulariaceae	***Capraria biflora***	Toda[g]	B	92,50	84,97
			C	48,74	2,99
			D	47,84	9,50
Umbelliferae	*Eryngium foetidum*	Parte Aérea[c]	MeOH	26,25	9,81

[a] Los resultados pueden variar entre especies ya que se realizaron en días diferentes con distintos valores del blanco y control positivo. [b] Las fracciones A-D corresponden con esquema 5.5 (Pág., 102). [c] Hojas, flores, frutos. [d] 25°C. [e] Δ. [f] Ramas y hojas. [g] Raíces, tallos, hojas, flores.

Capítulo 2

Ouratea polyantha Engl.

2.1. Clasificación taxonómica: Descripción botánica.

La especie *Ouratea polyantha* Engl., presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Theales
Familia: Ochnaceae
Género: *Ouratea*
Especie: *Ouratea polyantha* Engl.

La familia Ochnaceae, comúnmente conformada por arboles y arbustos, raramente por hierbas,[10] está ampliamente representada en las áreas tropicales y comprende aproximadamente 35 géneros y 600 especies. Cerca de 300 especies están distribuidas en Sur América.[11] Entre ellas se encuentra la planta *Ouratea polyantha* Engl. (Figs. 2.1 y 2.2), la cual fue reportada por primera vez por Adolphus Engler.[12] Esta especie es tambien conocida como *Gomphia polyantha* Tr. & Planch., y fué recolectada en 2003 por el Botánico Dr. Anibal Castillo y

reportada en el Catálogo de Espermatofitas del bosque estacionalmente inundable del Río Sipapo, Estado Amazonas, Venezuela.[13]

La especie *Ouratea polyantha* Engl., es un árbol de ramas grises, hojas subcoriaceas (muy brillantes en la parte superior), flores amarillas dispuestas en racimos con capullos y frutos oblongos. Las hojas, usualmente de ¼ -1 dm de longitud, tienen un peciolo de 4-5 mm de largo, son de borde aserrado, observable a 1 cm de distancia, posee numerosos nervios laterales ascendentes y son de ápice agudo (5 mm de longitud y 3 mm de ancho). Los racimos son de 1-1½ dm de longitud con pedícelos delgados (4-6 mm de largo) y capullos oblongos de 5-6 mm de largo y 3 mm de ancho. Las flores son de cinco pétalos obovados de 7 ½ mm de longitud por 5 mm de ancho.[12]

Ésta planta se encuentra distribuida geográficamente[14] en Perú, Colombia, Brasil y Venezuela (Amazonas, Apure, Bolivar). En Bolivar, está a lo largo de los ríos Ventuari, Casiquiari,[13] mientras que en Amazonas se encuentra en las riveras del río Sipapo. Aunque no es de uso tradicional para el tratamiento de la diabetes, estudios previos, dirigidos por el Dr. Masahisa Hasegawa y el Dr. Freddy González-Mujica, han mostrado que el extracto metanólico presentó una elevada actividad inhibitoria de la enzima G-6-Pasa.[9]

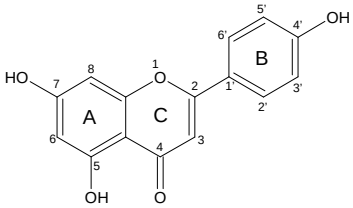
Figura 2.1. Dibujo esquemático de la planta *Ouratea polyantha* Engl.[15]

a) b)

Figura 2.2. *Ouratea polyantha* Engl., especímenes almacenados en: a) Jardín Botánico de New York;[16a] b) Jardín Botánico de Caracas.[16b]

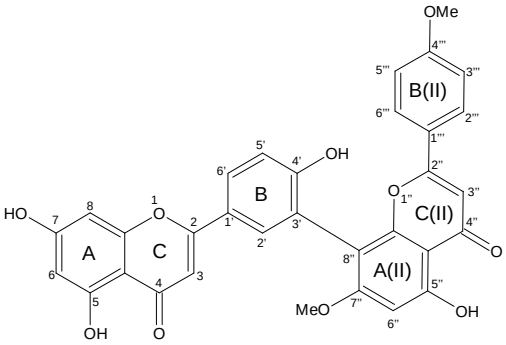
2.2. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Ouratea*

El género *Ouratea* se caracteriza por presentar biflavonoides, y como marcador quimiotaxonómico, la amentoflavona, dímero de apigenina.[17] Adicionalmente, muchas especies de éste género han sido estudiadas fitoquímicamente y de ellas se han aislado, azúcares, terpenos, lignanos, saponinas, dépsidos, flavonoides, biflavonoides y cloroisoflavonas, entre otros.



Apigenina

(5,7,4'-trihidoxiflavona)

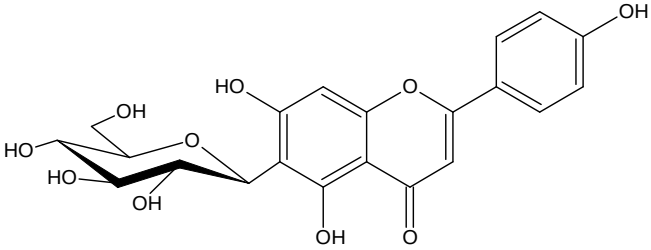


Amentoflavona

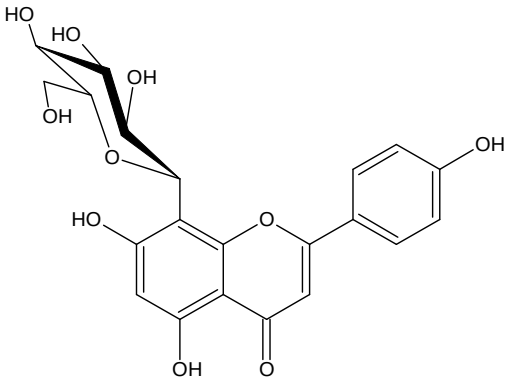
(3'→ 8''-biapigenina)

2.2.1. Flavonoides

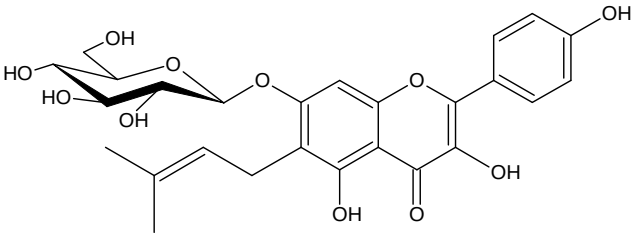
Los flavonoides con acoplamientos oxidativos carbono-oxígeno y carbono-carbono en los átomos de carbono C_6 y C_8, son frecuentes en el género *Ouratea*, tal es el caso de: vitexina (apigenin 6-*C*-β-glucopiranosa), swertiajaponina (apigenin 8-*C*-β-glucopiranosa), kaempferol-6-*C*-prenil-7-*O*-β-glucopiranosa, y gossipetin-3-*O*-β-galactosa, entre otros.[18,19]



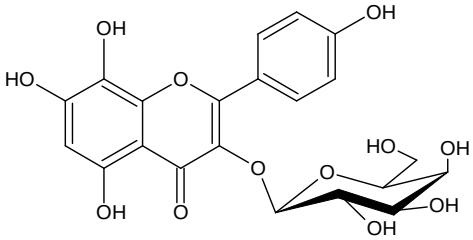
vitexina



swertiajaponina

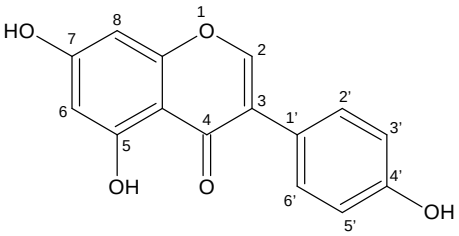


kaempferol-6-*C*-prenil-7-*O*-β-glucopiranosa

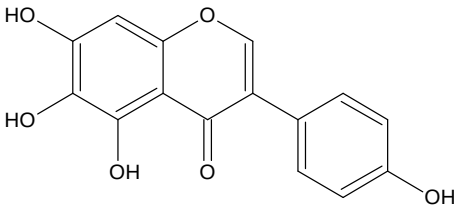


gossipetin-3-*O*-β-galactosa

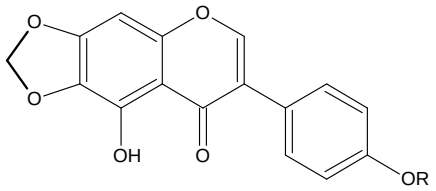
Aunque los isoflavonoides no son comunes en éste género, han sido reportados isoflavonas derivadas de genisteína con sustituyentes tan singulares como metilendioxi[20] y halógenos.[21]



genisteina



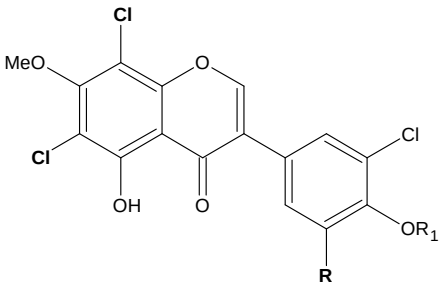
6-hidroxi-genisteina



R

H irilona (6,7-metilendioxi-6-hidroxigenesteina)

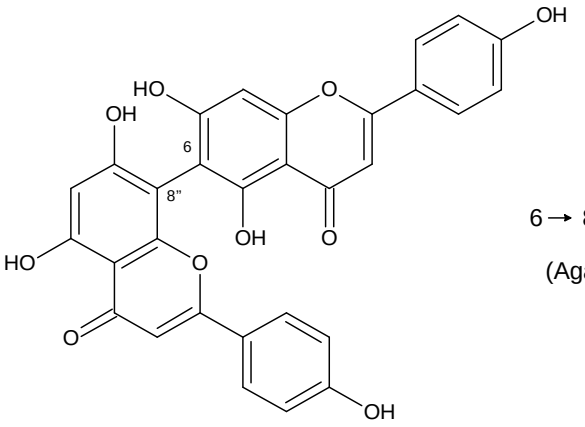
Me 4'-metoxiirilona



R	R_1	
H	H	3',6,8-tricloro-7-metoxigenisteina
Cl	H	3',5',6,8-tetracloro-7-metoxigenesteina

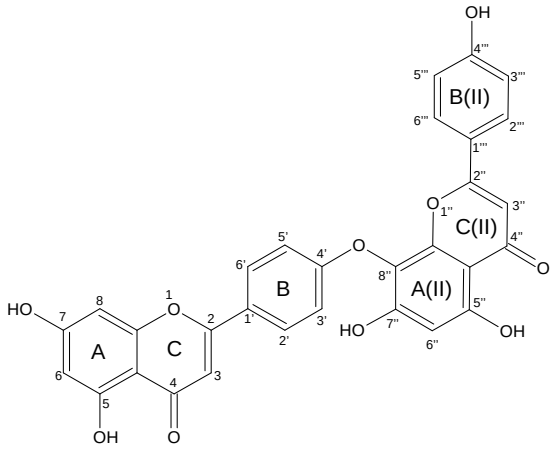
2.2.2. Biflavonoides

Aun cuando se ha reportado que la amentoflavona, dímero de apigenina 3′→8″, es el marcador quimiotaxonómico de éste género.[17] Se ha reportado con relativa frecuencia otro dímero de apigenina, 6→8″ nombrado como agathisflavona. Estudios realizados sobre el sistema enzimático G-6-Pasa para éste compuesto mostraron que es un inhibidor de la SUC, ya que presentó 63% de inhibición en microsomas intactos y rotos.[9]



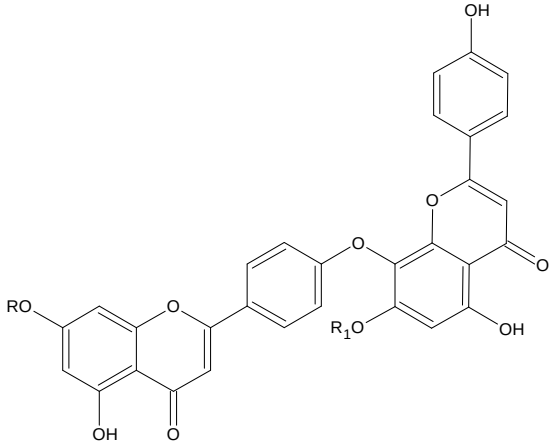
6→ 8"-biapigenina

(Agathisflavona)



lanaraflavona

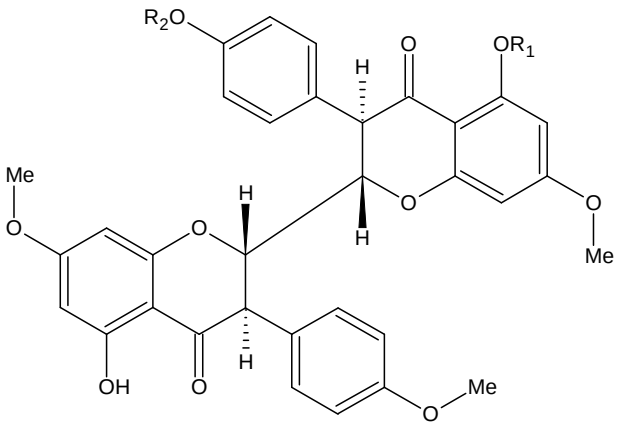
(4'-*O*→8"-biapigenina)



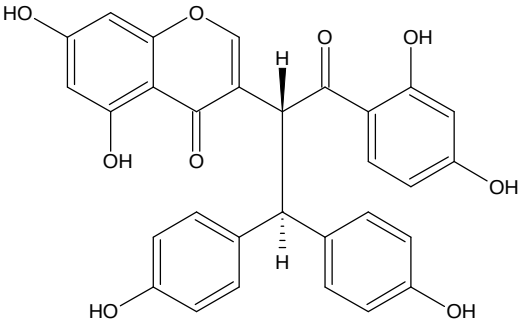
R	R_1	
H	H	Lanaraflavona
H	Me	7"-metillanaraflavona
Me	Me	7,7"-dimetillanaraflavona

La biflavona, agathisflavona, aislada de *O. hexasperma* fue citotóxico para diferentes células cancerosas siendo más relevante el efecto sobre *RXF*-393 (cáncer de riñón) con un IC_{50} de 44,89 μg/mL, éste valor disminuyó significativamente para 7″-metillaranaflavona, IC_{50}= 3,86 μg/mL, un dímero 4′-*O*→8″-apigenina. Al evaluar este último en *NCI-H*460 (cáncer de pulmón) se obtuvo un IC_{50}= 4,36 μg/mL. Sin embargo, 7,7″-dimetillanaraflavona resultó ser más potente que su derivado monometílico, ya que su IC_{50} fue de 0,77 μg/mL, mientras que para agathisflavona éste valor fue mayor a 50 μg/mL.[22,23]

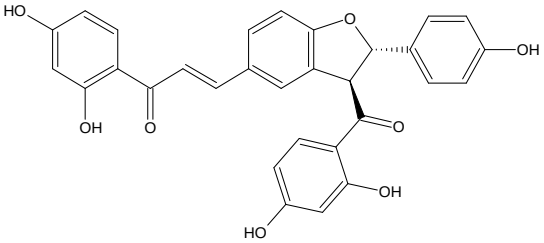
Otra variedad de biflavonoides reportados en éste género lo conforman: hexaspermona A,[24] lophirona A,[25,26] flavumona A[27] y sus derivados.



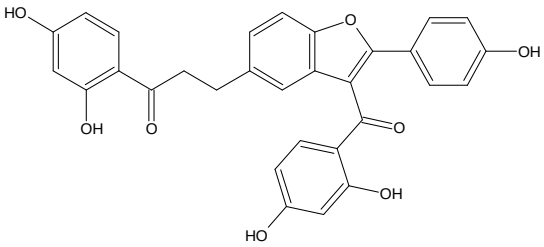
R_1	R_2	
H	Me	Hexaspermona **A**
Me	H	Hexaspermona **B**
H	H	Hexaspermona **C**



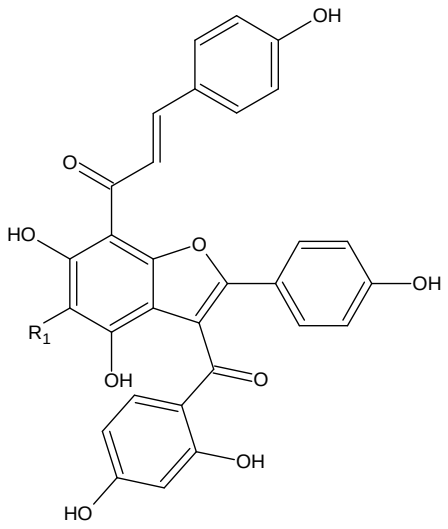
Iophirona A

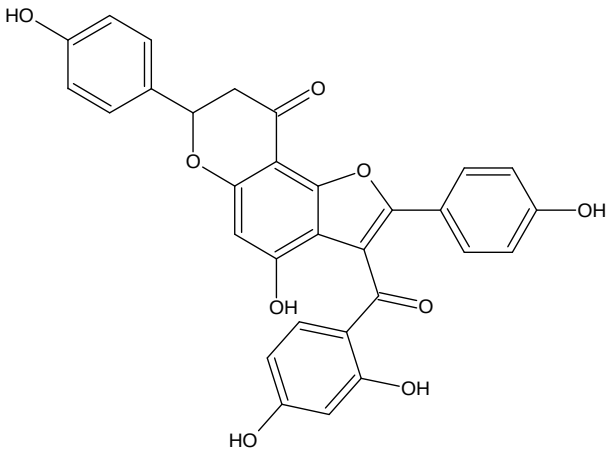


Iophirona C



Isolophirona C





R_1

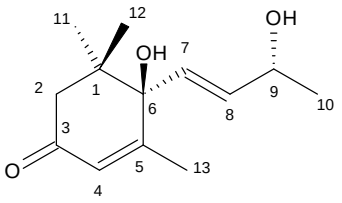
H calodenina B

OH flavumona A

flavumona B

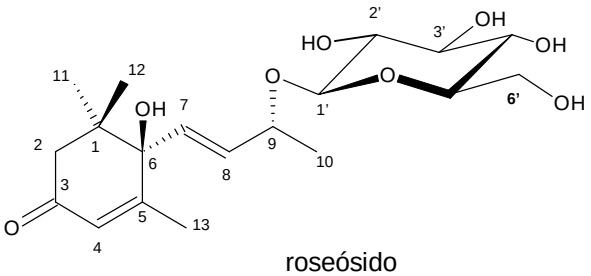
2.2.3. Terpenos y Esteroides

Terpenos del tipo megaestigmanos,[19,28] kaurano,[29] lupanos, ursanos, oleananos y friedelanos[30] con o sin sustituyentes glicosídicos[18] han sido aislados de varias especies del género *Ouratea*.



vomifoliol

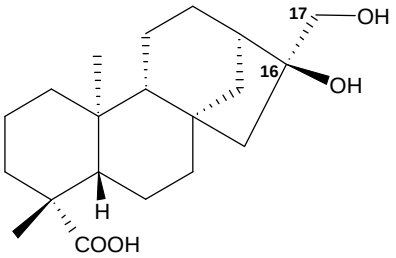
(megaestigmano)



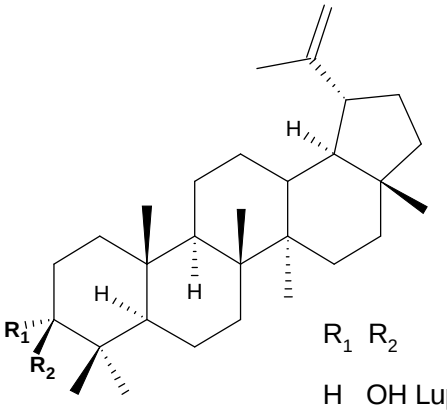
roseósido

(vomifoliol 9-*O*-glucopiranosido)

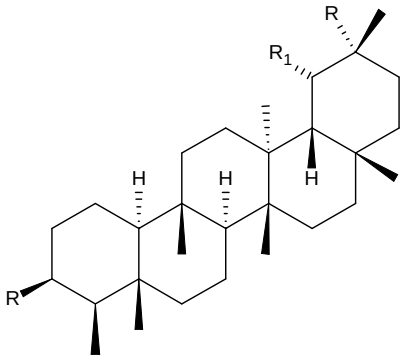
(megaestigmano)



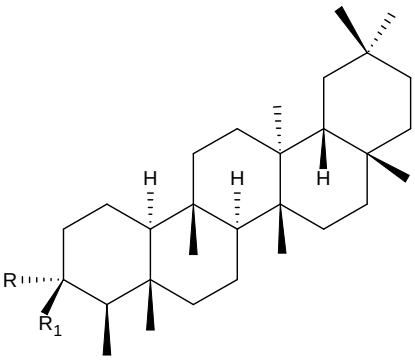
Ácido *ent*-16α,17-dihidroxikauran-19-oico



R_1	R_2	
H	OH	Lupeol
=O		Lupeona



R	R_1	
OH	H	β-amirina (oleanano)
OH	Me	α-amirina (ursano)

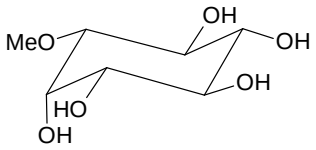


R	R_1	
H	OH	friedelanol
=O		Friedelina

(Friedelanos)

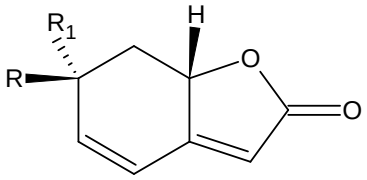
2.2.4. Misceláneos

La diversidad estructural de los metabolitos polares aislados de éste género, no se limita a los flavonoides, pues varios investigadores han reportado derivados oxigenados del tipo **ciclohexanos**:[31,32] metilmyoinositol, aquilegiolido y menisdaurilido; **Lignanos**: eudesmina y epieudesmina;[28] **Dépsidos**: atranorina;[30] y **Alcaloides**: serotobenina,[25] entre otros.



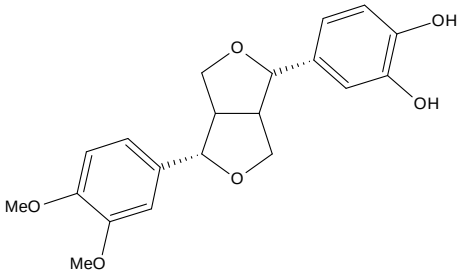
Metilmyoinisitol

(ciclohexano)



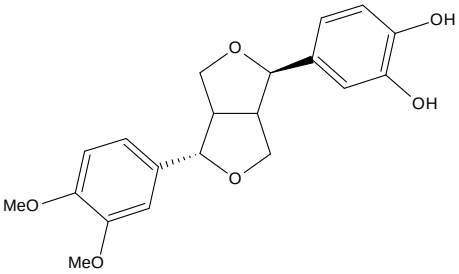
R	R_1	
OH	H	aquilegiolido
H	OH	menisdaurilido

(ciclohexanos)



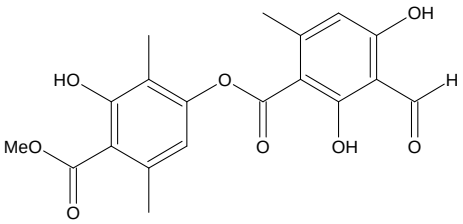
eudesmina

(lignano)



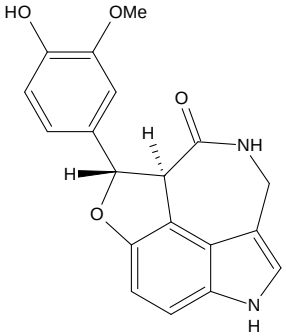
epi-eudesmina

(lignano)



atranorina

(dépsido)



(±)-serotobenina

(alcaloide)

De acuerdo con la literatura revisada (sección 2.2), los metabolitos frecuentemente reportados en el género *Ouratea* están mayormente conformados por dímeros flavonoidales (agliconas y glicósidos). En los estudios por RP-HPLC (tabla 2.1) las condiciones comunmente utilizadas en la separación flavonoides (dímeros y monomeros) son gradientes conformados mayormente por H_2O-ACN de pH neutro o acídico (H_3PO_4, HCO_2H, CH_3CO_2H).

Tabla 2.1. Condiciones HPLC de metabolitos comunes en el género *Ouratea*.

Sustancia esperada	Columna	Dimensiones (mm)	Fase móvil	isocratico	gradiente	λ (nm)	Ref.
Flavonoides							
	LiChrospher 100 RP-18	250x4; 5μm	H_2O-ACN (95:5 → 5:95) en 60min		x	**PDA**	33
	ODS	150x4,6; 5μm	H_2O-ACN		x	**220**	34
Flavo-Glicoslados							
	RP-C18 Luna	250x4; 5μm	ACN-(H_2O-HCO_2H; 99,9:0,1)		x	**270,330**	35
	Minibore Phenomenex Luna	250x2; 5μm	ACN-0,3%HCO_2H		x	**350**	36
Biflavonoides							
	Phenomenex, Torrance, RP18	150x3,9; 4 μm	0,1%HCO_2H en H_2O-ACN		x	**PDA$^+$**	37
	Waters Sunfire C18	150x4,6; 5 μm	MeOH-(0,1%HCO_2H en H_2O)		x	**PDA**	38
	Microsorb C18	250x10	ACN-MeOH-H_2O (50:20:30)	x			39
	Gemini C18	250x4,6; 5μm	H_2O-MeOH-ACN; 24:40:36	x		**330**	40
	μBondasphere C18	preparativo	H_2O-ACN (40%)	x			41
	Novapak C18	preparativo	H_2O-ACN (23%)	x			41a
	Phenomenex Prodigy-ODS(3)	250x4,6 (100A, 5 μm)	H_2O-ACN (0,1%H_3PO_4 en c/u)		x	**280**	42
	C18 (Waters radial compressed model 25mm)	Analítico y semi-preparativo	H_2O-ACN (45:55)	x		**PDA**	43
	Spherisorb ODS II	250x4; 5μm	THF- H_2O-H_3PO_4; 40:60:1	x		**330**	44
	Phenomenex ODS	250x21,2; 10μm	MeOH-H_2O (2:3)	x		**280**	45
	Phenomenex Luna	250x4,6; 5μm	ACN-H_2O (10→100 de ACN en 30 min)		x	**254**	46
	ODS	250x10	ACN-H_2O (70:30)	x		**254**	47
	pegasil	250x4,6	MeOH-10mM H_3PO_4		x	**254**	48
Proantocoaninas							
	ODS	250x4; 5μm	MeOH-H_2O		x	**PDA**	49
	ODS	150x4,6; 5μm	H_2O-ACN		x	**220**	34
Triterpenos y esteroides							
	Kromasil 100 C18	250x4,6; 5μm	MeOH-0,5%H_3PO_4; 88:12	x		**210**	50
	Kromasil Sil 100	250x8; 5μm	CyHex-AcOEt (80:20)	x		**IRefr**	51

Capraria biflora L.

2.4. Clasificación taxonómica: Descripción botánica.

La especie *Capraria biflora* L., presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Scrophulauriales
Familia: Scrophulariaceae
Género: *Capraria*
Especie; *Capraria biflora* L.

La familia Scrophulariaceae ha sido objeto de diferentes reclasificaciones en los últimos años, reubicando en otras familias varios géneros que la integraban. Actualmente, comprende 65 géneros con 1700 familias; entre los géneros más representativos se encuentran *Verbascum*, *Alonsoa*, *Buddleja*, *Capraria*, *Diascia*, *Eremophila*, *Manulea*, *Nemesia*, *Selago*, *Sutera* y *Zaluzianskya*.[52,53]

El género *Capraria* se caracteriza por ser subarbustos o hierbas perennes, erectas, con uno a muchos tallos desarrollándose del tallo basal, hojas alternas, lanceolada a ovadas, con el margen serrado a lo largo de la sección media superior. Tiene de 1-5 flores pediceladas perfectas de cáliz regular, 5-lobulado con

4-5 estambres de ovario súpero-bilocular. El fruto es capsular elíptico con numerosas semillas pequeñas. Es un género que comprende 4 especies: *C. frutescens* endémica de México; *C. mexicana* que se distribuye al norte y sur de México, con una población disyunta al sur de Belice y sur de Texas; *C. biflora* que se distribuye ampliamente en México, Centro y Sudamérica y Florida y *C. peruviana* que crece al noroeste de Sudamérica y en las islas Galápagos.[54]

Capraria biflora L. (Figs., 2.3 y 2.4), es un subarbusto o hierba perenne de 0,4-2 m de alto, con muchas ramificaciones a lo largo de la raíz, los tallos hirsutos, ocasionalmente glabros pero siempre con pelos escasos en las ramas jovenes, de 3-5 mm de diámetro en la sección media. **Hojas** alternas, espatuladas a lanceoladas, de 1,4-10 cm de largo, 0,3-3,2 cm de ancho, el margen serrado a lo largo de la sección media superior, con 3 nervios principales emergiendo cerca de la base, sumergidos en el haz, resaltados en el envés, la base cuneada, el ápice acuminado, glabras o moderadamente hirsutas, sésiles. **Inflorescencias** axilares, de 1-3 flores por axila; **flores** blancas, perfectas, zigomórficas a ligeramente regulares, de 10-13 mm de largo en antesis, los pedicelos de 5-17 mm de largo, 0,3-0,4 mm de ancho, glabros o glandular-pubescentes; **cáliz** 5-lobulado, los lóbulos lanceolados, de 3-5,3 mm de largo, 0,7-0,8 mm de ancho, el ápice acuminado, glabros a pubescentes; **corola** bilabiada, tubularcampanulada, el tubo de la corola blanco, el ápice con manchas púrpura en la sección ventral interna, con tricomas vilosos a lo largo de la sección ventral de la garganta, de 5-10 mm de largo; **pétalos** 5, extendidos, ovados; **estambres** 4-5, didínamos; **ovario** súpero, ovoide, de 1,8-3 mm de largo, 1-1,5 mm de ancho; **Fruto** capsular, elíptico, verde, de 4,5-5 mm de largo, 3-4 mm de ancho; **semillas** numerosas, pardas, de 0,5-0,8 mm de largo, 0,3-0,4 mm de ancho.

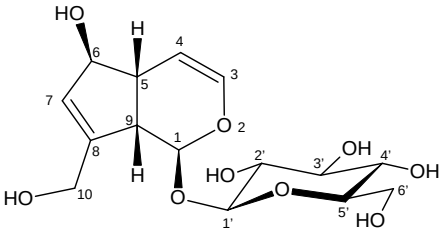
Figura 2.3. Dibujo esquemático de la planta *Capraria biflora* L.[55]

a) b)

Figura 2.4. *Capraria biflora* L. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26391;[56a] b) foto de una de las ramas depositadas en el Herbario Ovalles.[56b]

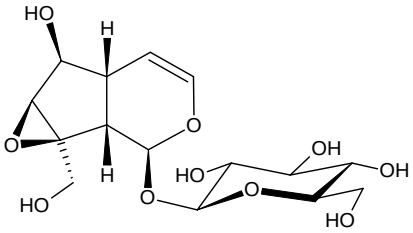
2.5. Familia Scrophulariaceae: Antecedentes fitoquímicos.

Los iridoides glicosilados[57] son los marcadores quimiotaxonómicos de la familia Scrophulariaceae, sus principales metabolitos son particularmente iridoides-C_9 (aucubin, catalpol). Aucubin incrementa la sensibilidad a la insulina o regenera las células β de la insulina en ratas diabéticamente inducidas con estreptozotocina (STZ).[58]



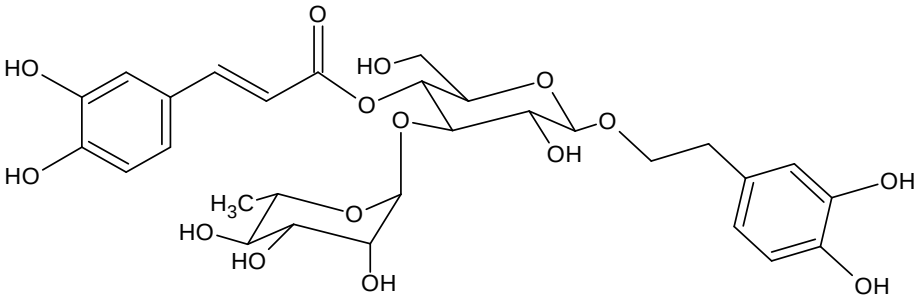
aucubin

(iridoide-C_9)

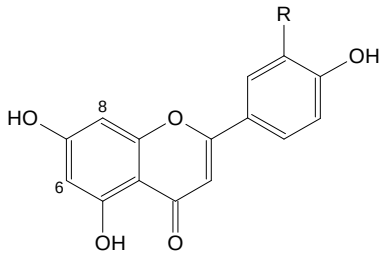


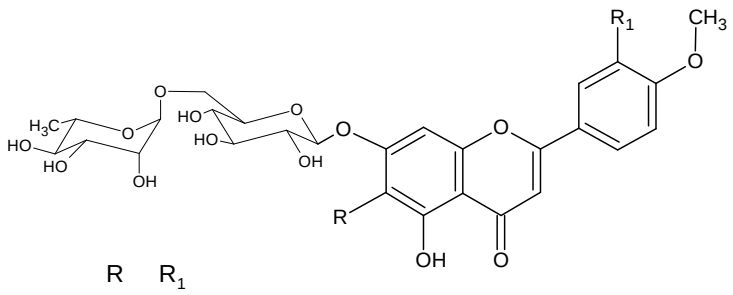
catalpol

Es frecuente en esta familia la presencia de compuestos aromáticos como ácidos y sus ésteres glicosilados (verbascósido), los flavonoides glicosilados como 7-*O*-Gli-luteolina y 7-*O*-Gli-apigenina, sus derivados 6-OH, 6-OMe, 8-OH, como 7-*O*-glicósidos (diosmina, linarina, pectolinarina) y 7-*O*-glucoronidos.[59] Las saponinas son menos comunes que los alcaloides y se han encontrado quinonas diterpenoidales en *Capraria biflora* L.



verbascósido





R	R$_1$	
H	OH	diosmina
H	H	linarina
OMe	H	pectolinarina

R	
H	apigenina
OH	luteolina

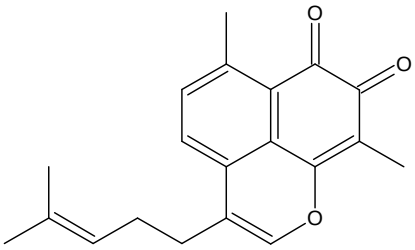
2.6. *Capraria biflora* L.: Antecedentes Fitoquímicos y Biológicos

Aún cuando existen reportes de que ésta planta presenta alcaloides, flavonoides y taninos[60] sólo se ha aislado e identificado cuatro flavonoides (naringenina, luteolina, apigenina y apigenina 7-*O*-β-glucoronido),[61] un esteroide (β-sitosterol),[62] un triterpeno (β-amirina),[63] un monosacárido (manitol),[63,64] dos *o*-naftoquinonas,[65,66] seis sesquiterpenoides,[67,68] y tres iridoides-C_9.[62,69]

2.6.1. *o*-Naftoquinonas

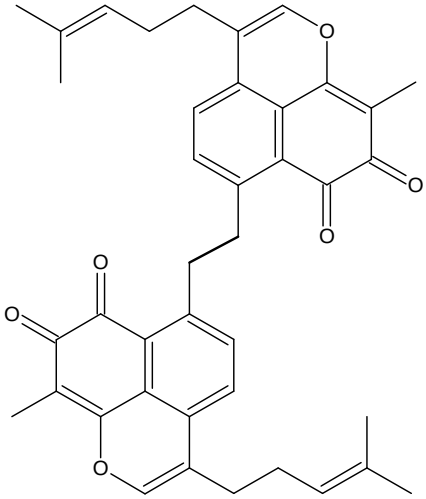
El extracto hidroalcohólico de las raíces de *C. biflora* L., fue tratado en una columna empacada con sílica gel (230-400 mesh) para obtener biflorina como cristales violetas.[65] Al igual que su monómero, bis-biflorina[66] ha sido aislado de las raíces de *C. biflora* L.

Biflorina también ha sido aislada del extracto de éter de petróleo por CC de sílica gel. En los diferentes procesos de purificación ha sido recristalizada de diferentes solventes como: di-*iso*-propiléter,[63] éter de petróleo ligero,[70] benceno-éter de petróleo[71] y de benceno-hexano.[72] Adicionalmente, ha sido purificada y cuantificada en diferentes partes de la planta por HPLC y métodos de estándar interno, utilizando una columna C-18 (Novapack 39x300; 10 μm) con elución isocrática de MeOH-H_2O (90:10; v/v) a 1 mLmin^{-1} a temperatura ambiente.



biflorina

(quinona diterpenoidal)



bis-biflorina

Diferentes grupos de investigación han demostrado que biflorina presenta actividad antitumoral,[73] antioxidante,[66] antimicrobiana[66] y citotóxica.[66]

La actividad antitumoral de biflorina se realizó *in vivo* determinando la inhibición del crecimiento del sarcoma 180 y el carcinoma Ehrlich implantados en diferentes órganos de ratones hembras Swiss (20-30 g). Por si sola biflorina tiene pocos efectos antitumorales en comparación con 5-Fluorouracil (5-FU)[*] pero en pequeñas dosis incrementa la efectividad de 5-FU.

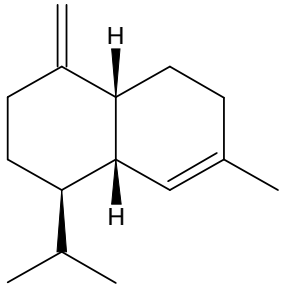
La actividad antimicrobiana de biflorina se determinó empleando las bacterias gram-positivas y gram-negativas usando como control positivo para cada grupo de microorganismos vancomicina y gentamicina, respectivamente. Se observó que biflorina sólo actuó en las bacterias gram-positivas con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) entre 6,5 y 101,6 μM. Además, presentó concentraciones bactericidas mínimas (CBI) entre 12,7 y 202,9 μM. Por otra parte, la actividad citotóxica de biflorina fue evaluada contra células tumorales de piel B16 (IC_{50}= 0,40 μM), mama MCF-7 (IC_{50}= 0,43 μM), colon HCT-8 (IC_{50}=

[*] Droga comercial antitumoral.

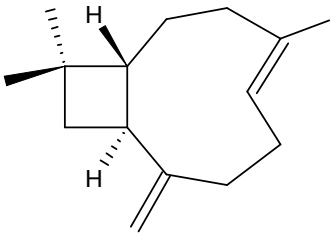
0,88 μM), leucemia HL-60 (IC_{50}= 1,95 μM) y sangre CEM (IC_{50}= 1,02 μM). Dichos resultados sugieren que biflorina puede ser un potencial agente antitumoral.

2.6.2. Sesquiterpenos

Por cromatografía de gases-masas se determinó que el aceite de las hojas frescas de *C. biflora* L., obtenido por destilación por arrastre con vapor, estaba conformado mayormente por γ-muuroleno (32,6%) y β-cariofileno (29,6%).[68]

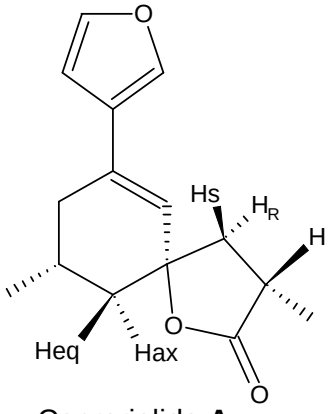


γ-muuroleno

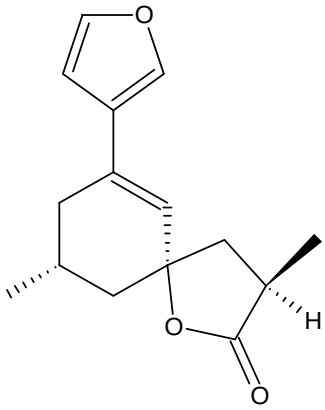


β-caryofileno

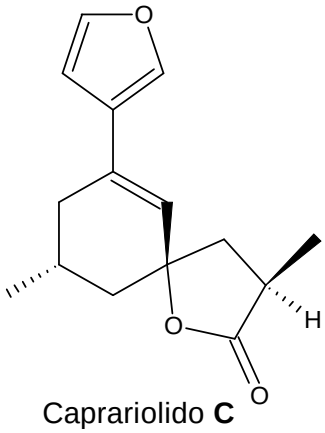
Cuatro sesquiterpenoides,[67] denominados caprariolidos A-D, fueron aislados del extracto de *n*-hexano de las partes aéreas de la planta y sólo se evaluaron dos de ellos como insecticidas por limitaciones en las cantidades obtenidas, dicha actividad se realizó contra los insectos adultos de *Cylas formicarius elegantulus*, los cuales son encontrados comúnmente en los sembradíos de papa. Los sesquiterpenos, Caprariolido A y Caprariolido B, presentaron como dosis letal (DL_{50}) alrededor de 1 mg/insecto pero la mezcla en iguales proporciones de éstos sesquiterpenos incrementa su efectividad a DL_{50}= 0,508 mg/insecto, haciéndolo equitóxico con eugenol, fenilpropanoide que posee un potente efecto repelente para varias especies de insectos.



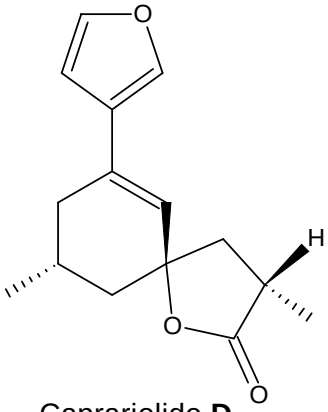
Caprariolido **A**



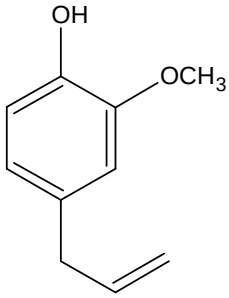
Caprariolido **B**



Caprariolido **C**



Caprariolido **D**

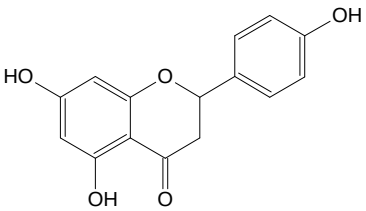


Eugenol

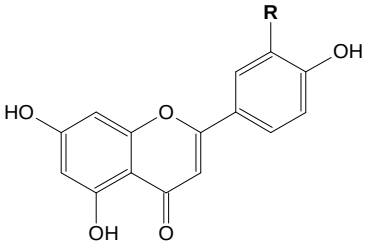
(fenilpropanoide)

2.6.3. Flavonoides

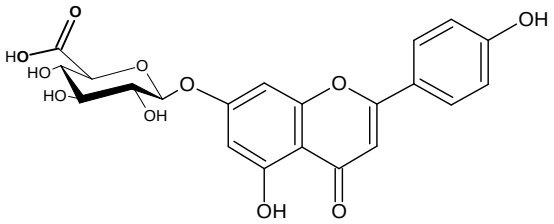
Los flavonoides naringenina, luteolina, apigenina y apigenina 7-*O*-β-glucoronido[61] fueron obtenidos a partir de la fracción butanólica del extracto acuoso de las hojas secas de la planta *C. biflora* L.



Naringenina



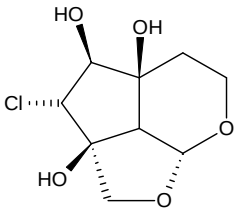
R
H apigenina
OH luteolina



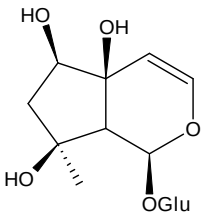
Apigenina 7-*O*-β-glucorónido

2.6.4. Iridoides

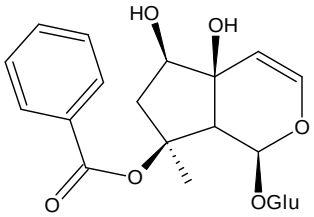
De la parte aérea de *C. biflora* L. han aislado los iridoides-C_9 harpagido, caprariosido (8-*O*-Benzoilharpagido)[69] y miopoclorina.[62] Harpagido mostró propiedades analgésicas.



Miopoclorina



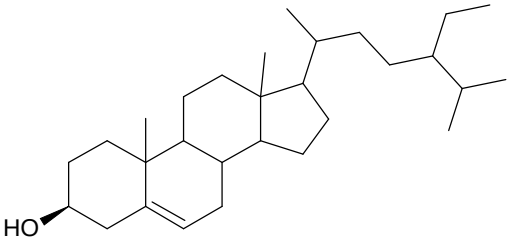
Harpagido



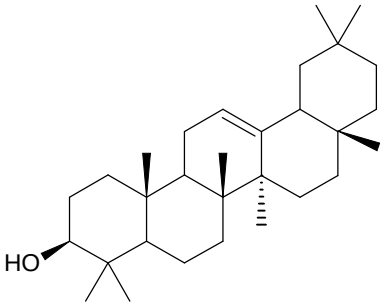
Caprariosido
(8-*O*-benzoilharpagido)

2.6.5. Misceláneos

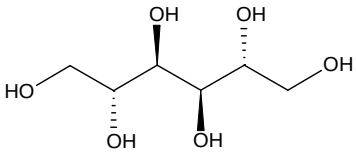
Del extracto metanólico de las hojas de *C. biflora* L., se ha reportado la purificación del triterpeno β-amirina,[63] el esteroide β-sitosterol y el monosacárido manitol.[63,64] Adicionalmente, del extracto de cloroformo de las hojas se ha aislado los ácidos grasos (undecanóico, láurico y palmítico) y la porfirina feofórbido[61]



β-sitosterol
(estroide)

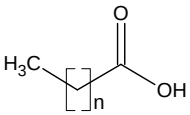


β-amirina
(triterpeno)

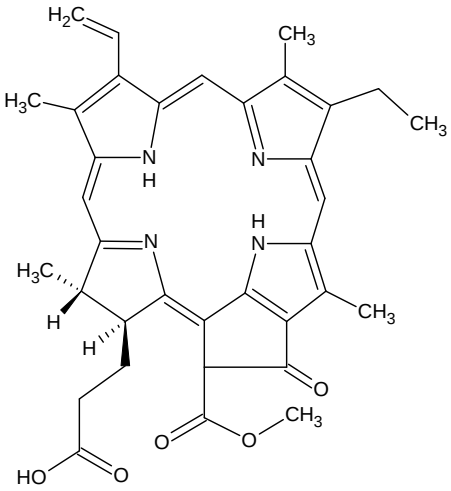


manitol

(monosacarido)



n	
9	Ácido undecanóico
10	Ácido láurico
16	Ácido palmítico



Feoforbido

(derivado clorofílico)

Cassia fruticosa Mill.

2.7. Clasificación taxonómica: Descripción botánica

La planta *Cassia fruticosa* Mill., presenta La siguiente clasificación taxonómica:

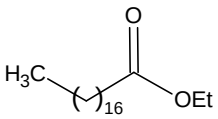
Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Género: Cassia
Especie: *Cassia fruticosa* Mill.

La familia Fabaceae (Leguminosae, *nomen conservandum*) está dividida en tres subfamilias, Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae e incluye unos 686 géneros y más de 18.000 especies distribuidas en todo el mundo. El género *Cassia* pertenece a la primera de las subfamilias nombradas y contiene alrededor de 100 especies.[74]

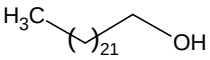
Del género *Cassia* se han reportado antraquinonas, bisantraquinonas, estilbenoides, flavonoides, taninos, terpenos, lignanos, xantonas, y aminoácidos, entre otros. Además, se ha evaluado su actividad antifúngica, antibacterial, antioxidante, y antidiabética, entre otras.

La especie *Cassia fruticosa* Mill. (Figs., 2.5 y 2.6), es un árbol o arbusto de talla mediana de hasta 10 m de altura, de ramas generalmente glabras. [75] Sus hojas son anchas en dos pares, con pecíolos largos (4-6 cm), son ovadas a elípticas-lanceoladas, de hasta 18 cm. de largo y 9 cm. de ancho, oblicuamente redondeada a basalmente obtuso. Posee flores amarillas en panículas anchas, terminales de 20-25 cm de largo y ancho, es de sépalos verdes amplios, más o menos oblongas, de hasta 13 mm de largo y 7 mm de ancho cuyos pétalos son oblongos a obovados-circular, de hasta 3 cm de largo y 2 cm de ancho con semillas muy numerosas de 4-5 mm de largo.[76]

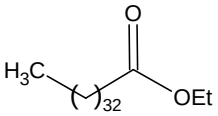
De la planta *C. fruticosa* Mill., sólo se ha reportado el aislamiento de estereato de etilo, 1-docosanol, tetratriacontanoato de etilo y didecilftalato provenientes de las flores;[77] un glicósido de kaempferol y una mezcla de antraquinonas glicosídicas provenientes de las hojas.[78] Éstos glicósidos fueron parcialmente elucidados por sus datos de RMN-^{1}H pero sus estructuras no fueron determinadas completamente.



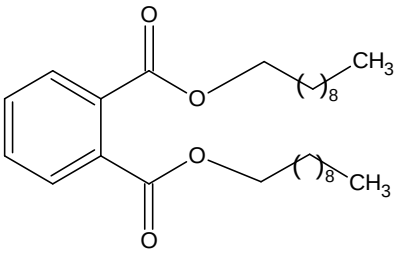
Estereato de etilo



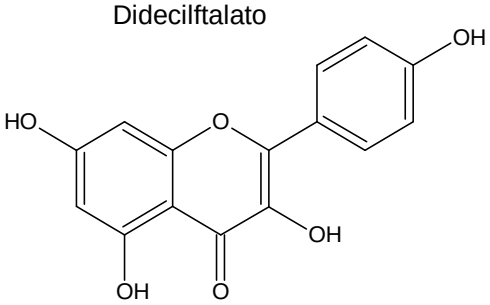
1-Docosanol



Tetratriacontanoato de etilo



Didecilftalato



Kaempferol

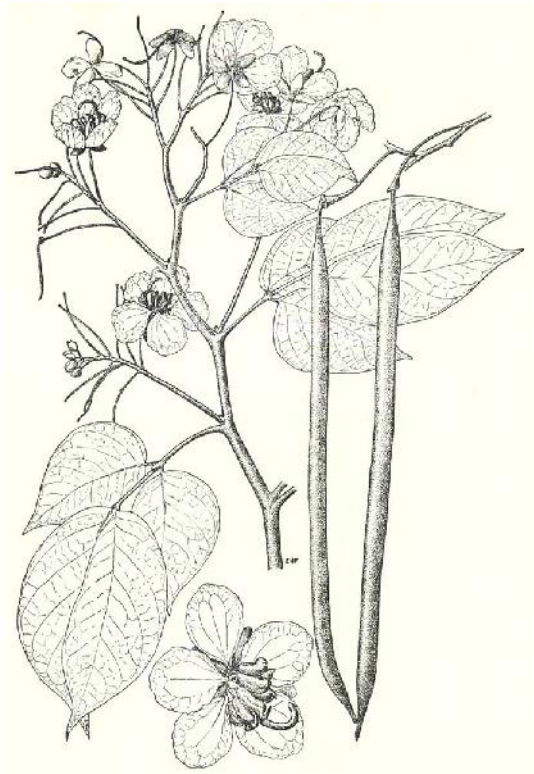


Figura 2.5. Dibujo esquemático de la planta *Cassia fruticosa* Mill.[75]

a) b)

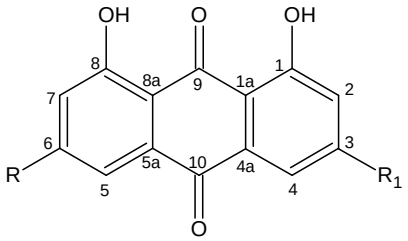
Figura 2.6. *Cassia fruticosa* Mill. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26392;[79a] b) foto de las flores de la especie.[79b]

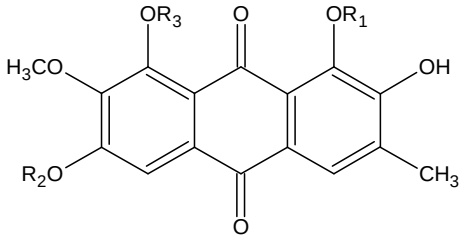
2.8. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Cassia*

La enorme cantidad de géneros que pertenecen a la familia fabaceae dificulta la posibilidad de buscar un marcador quimiotaxonómico para la misma, debido a esto, la revisión bibliográfica está enfocada sólo en especies del género *Cassia* ya que muchas especies están fitoquímicamente estudiadas y la característica común es la presencia de antraquinonas y flavonoides.

2.8.1. Antraquinonas

La característica estructural de las antraquinonas es la presencia de grupos carbonilos en los átomos C_9 y C_{10}. En el género *Cassia* las antraquinonas se caracterizan por presentar un alto grado de oxigenación (generalmente hidroxiladas) y con relativa frecuencia se encuentran glicosiladas. Un gran número de antraquinonas han sido reportadas en éste género, entre ellas: rheína, aloe-emodina, emodina, crisofanol, physcion, 1-demetilaurantio-obtusin, 1-demetilcriso-obtusin, aurantio-obtusin, criso-obtusin y obtusin entre otros.[80,81]



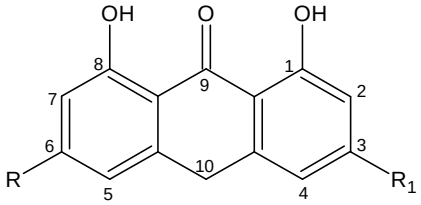


R	R_1	
H	CO_2H	rheina
H	CH_2OH	aloe-emodina
OH	CH_3	emodina
H	CH_3	crisofanol
OCH_3	CH_3	physcion

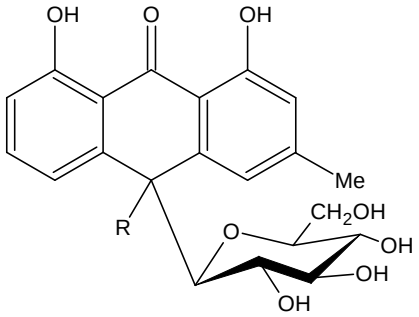
R_1	R_2	R_3	
H	H	H	1-demetilaurantio-obtusin
H	CH_3	CH_3	1-demetilcriso-obtusin
CH_3	H	H	aurantio-obtusin
CH_3	CH_3	CH_3	criso-obtusin
CH_3	CH_3	H	obtusin

2.8.2. Antronas y oxantronas

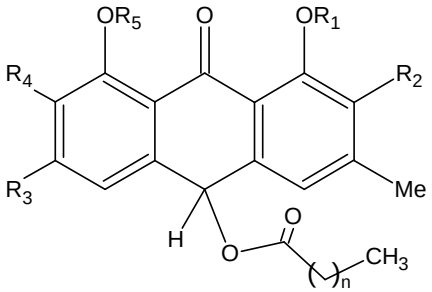
Crisofanol antrona ha sido el componente antrónico mas común en el género *Cassia*.[82,83] Aparte de (–)-deoxialoina, única antrona glicosilada reportada para el género *Cassia*, también se han identificado las antronas de rheina, aloe-emodina, emodina, physcion. (–)-Deoxialoina fue caracterizada por degradación química y por comparación con una muestra semisintética obtenida a partir de la oxantrona *C*-glicosilada cassialoina, aislada de *C. garretianna*.[84] Las kleinioxantronas 1-4, son oxantronas con características lipídicas aisladas de las fracciones de *n*-hexano y $CHCl_3$ de las partes aéreas y raíces de *C. kleinii*.[85,86]



R	R_1	
H	CO_2H	rheina antrona
H	CH_2OH	aloe-emodina antrona
OH	CH_3	emodina antrona
H	CH_3	crisofanol antrona
OCH_3	CH_3	physcion antrona



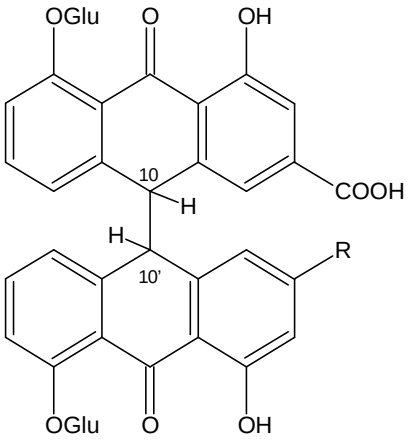
R	
H	(-)-deoxialoina
OH	cassialoina



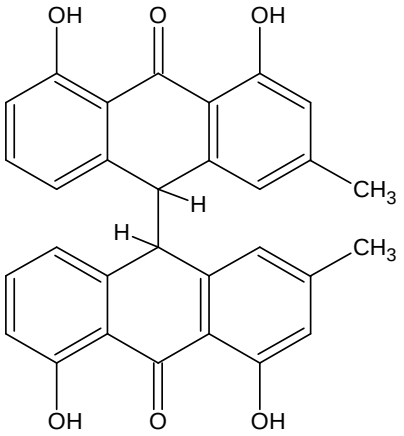
R_1	R_2	n	R_3	R_4	R_5	
H	H	8	H	H	H	kleinioxantrona-1
H	H	12	H	H	H	kleinioxantrona-2
H	H	14	H	H	H	kleinioxantrona-3
Me	OH	8	OH	OH	Me	kleinioxantrona-4

2.8.3. Bisantraquinonas

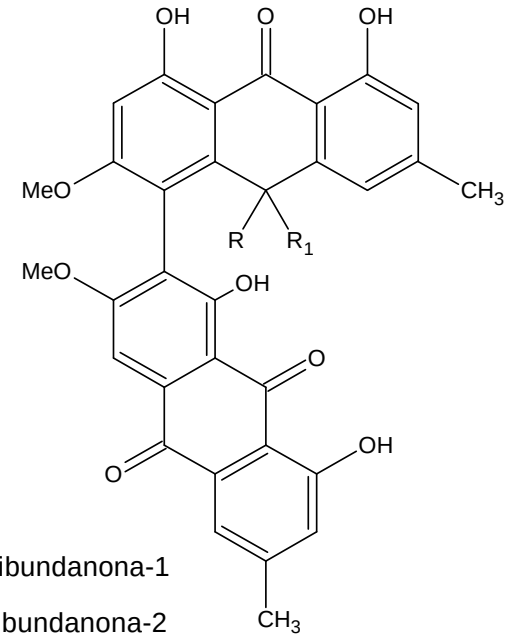
Las fuentes más abundantes para los dímeros de las antraquinonas son los hongos del género *Penicillium*.[87] Las bisantraquinonas han sido reportadas en varias especies de plantas del género *Cassia*, ejemplo de ellos son los sennosidos A-G obtenidos de *C. angustifolia*;[88] crisofanol biantrona, floribundanona 1 y 2 de *C. floribunda*,[89] singuelanol-I, occidentalol I-II aislados de *C. occidentalis*[90] y cassiamina A, 5-clorocassiamina A y 7-clorocassiamina A de *C. siamea*.[91]



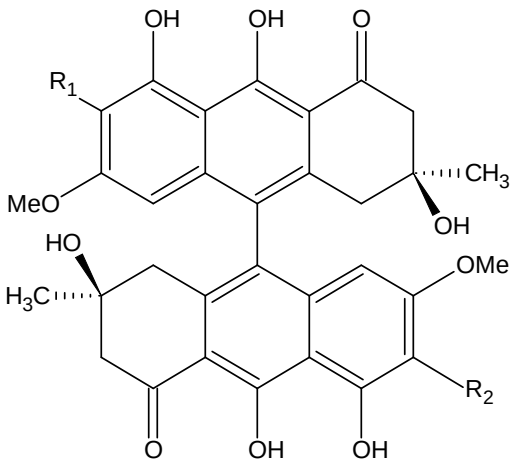
sennosido	R	isómero en C_{10}-$C_{10'}$
A	COOH	*trans*
B	COOH	*meso*
C	CH_2OH	*trans*
D	CH_2OH	*meso*
G	COOH	diasteroisómero de A



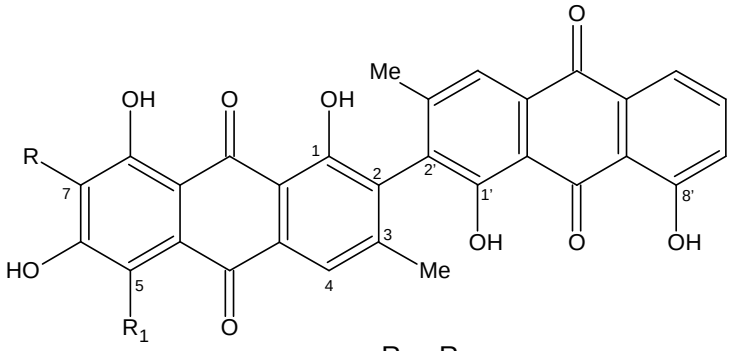
crisofanol biantrona



R	R_1	
=O		floribundanona-1
H	H	floribundanona-2



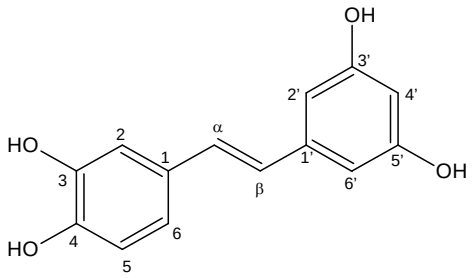
R_1	R_2	
Me	Me	singuelanol-I
Me	H	occidentalol-I
H	H	occidentalol-II



R	R_1	
H	H	cassiamina A
H	Cl	5-clorocassiamina A
Cl	H	7-clorocassiamina A

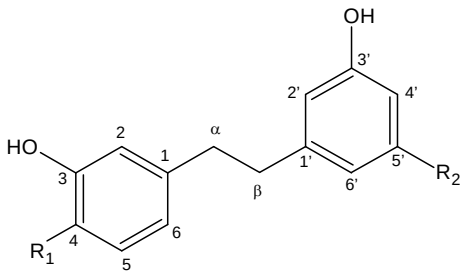
2.8.4. Estilbenoides

Éstos son menos frecuentes que las antraquinonas y flavonoides en el género *Cassia*. Sin embargo, de la especie *C. garretiana* han sido reportados varios estilbenos (piacetannol),[92] dihidroestilbenos (polihidroxibisbencilos) y unos pocos dímeros (cassigarol A-D)[93,94] aislados de la madera de la misma. Por otra parte, éste tipo de componentes han sido detectados en los tallos de la especie *C. fruticosa* Mill.



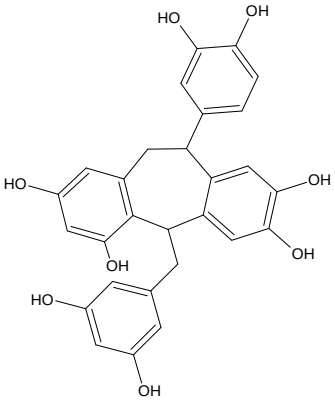
piacetannol

(estilbeno)

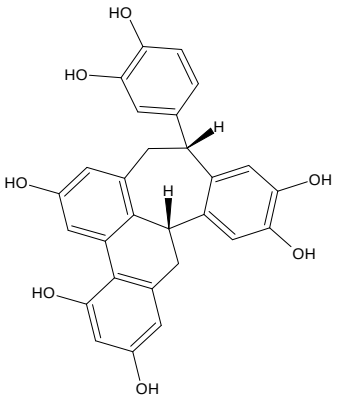


R_1	R_2	
H	H	3,3'-dihidroxibisbencilo
OH	H	3,3',4-trihidroxibisbencilo
OH	OH	3,3',4,5'-tetrahidroxibisbencilo

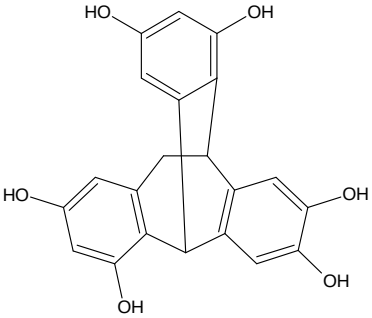
(bis-bencilos)



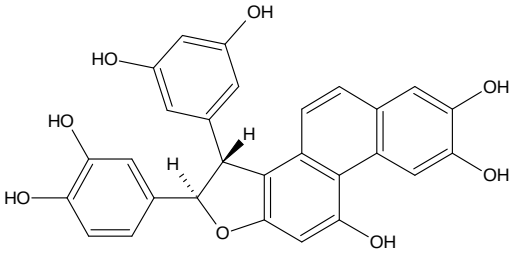
cassigarol A



cassigarol B



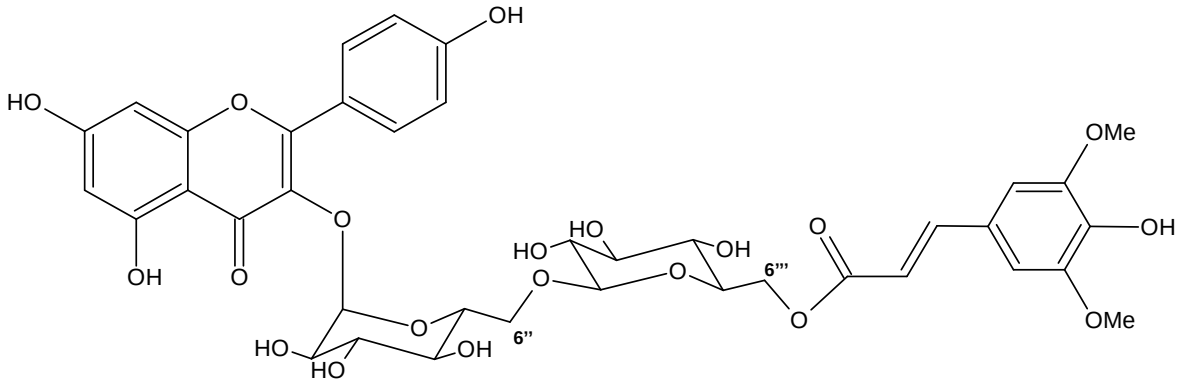
cassigarol C



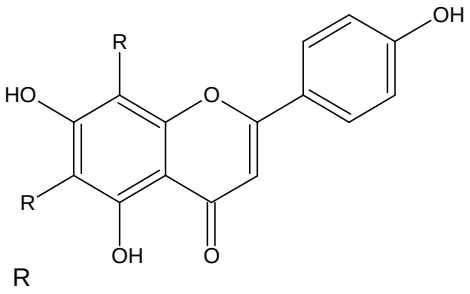
cassigarol D

2.8.5. Flavonoides

La característica en común para los flavonoides reportados en éste género es la presencia de componentes glicosilados. En algunos casos los restos glicosídicos se encuentran esterificados, por ejemplo: kaempferol-3-*O*-[6‴-*O*-*trans*-sinnapoil)-β-D-glucopiranosil-(1→6)]-β-D-glucopiranosa.[95] También son frecuentes los sustituyentes acoplados oxidativamente al núcleo flavonoidal, a través de enlaces C-C: matteucinol,[96] apigenin 6,8-*C*-diglucopiranosa,[95] torosoflavona B 3′-*O*-β-D-glucopiranosa,[97] demetiltorosaflavona C-D[98] y cassiaoccidentalinas A-C.[99]



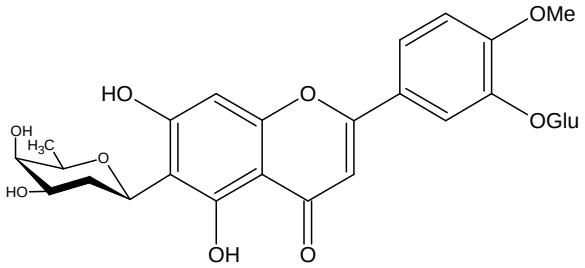
kaempferol-3-*O*-[(6'''-*O*-*trans*-sinnapoil)-β-D-glucopiranosil(1→6)]-β-D-glucopiranosa



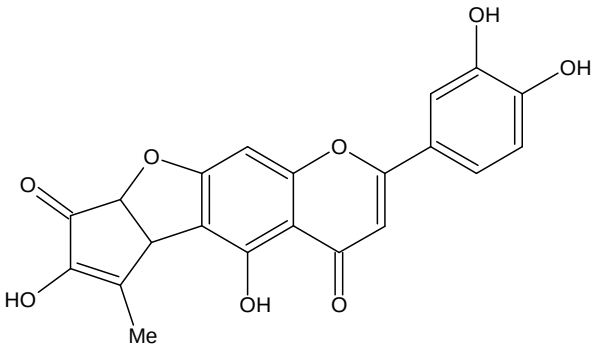
R

Me matteucinol

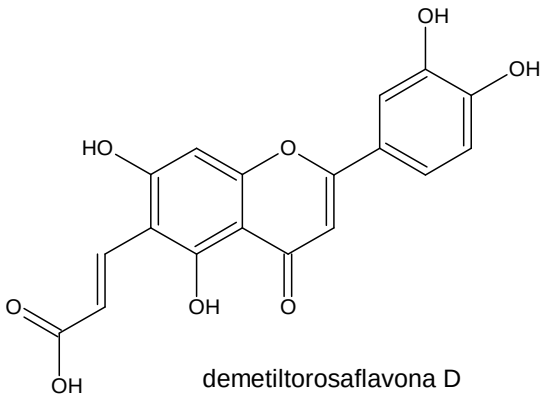
C-Glu apigenin-6,8-*C*-glucopiranosa



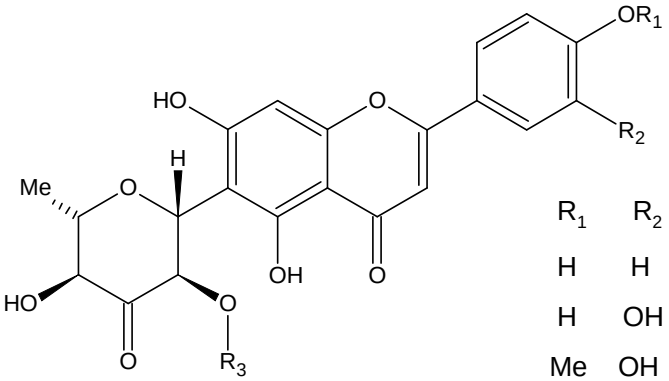
torosaflavona B 3'-*O*-β-D-glucopiranosa



demetiltorosaflavona C



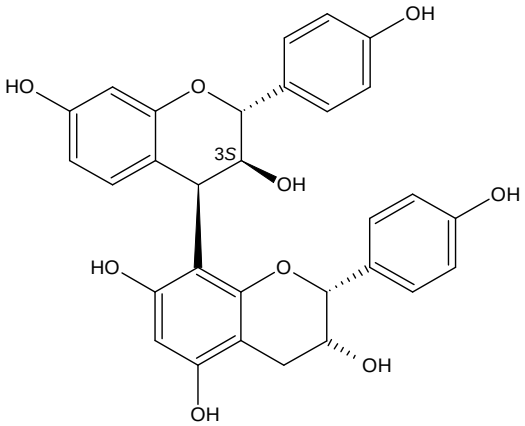
demetiltorosaflavona D



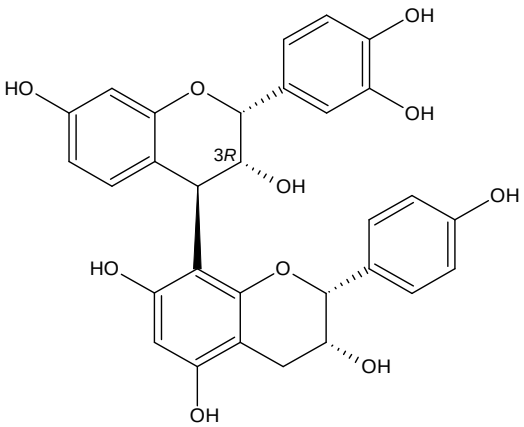
R_1	R_2	R_3	
H	H	Rha	cassiaoccidentalina A
H	OH	Rha	cassiaoccidentalina B
Me	OH	Rha	cassiaoccidentalina C

2.8.6. Taninos

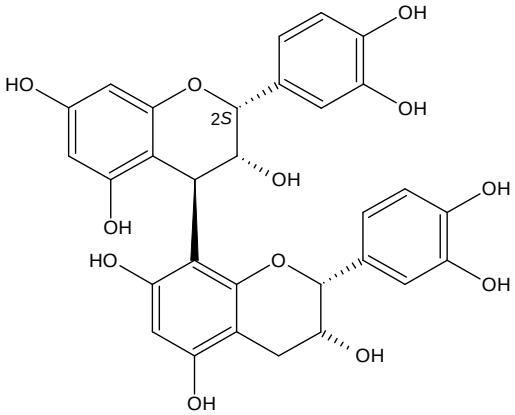
Los taninos aislados de varias especies del género *Cassia* corresponden al grupo de taninos no-hidrolizables. Los dímeros guibourtinidiol-(4β→8)-*epi*-afzelequina y *ent*-guinbourtinidol-(4β→8)-*epi*-catequina han sido reportados de *C. abbreviatta*,[100] mientras que procianindina B y procianidina B-2 fueron aislados de la especies *C. fistula* y *C. javanica*.[101] Por otra parte, los trimeros *epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequina y (2*S*)-7,4′-dihidroxiflavan-(4β→8)-*epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequina han sido aislados de *C. fistula*.[102] Ninguno de estos taninos fue evaluado biológicamente al ser aislado o sintetizado.



guibourtinidol-(4β➔8)-*epi*-afzelequina

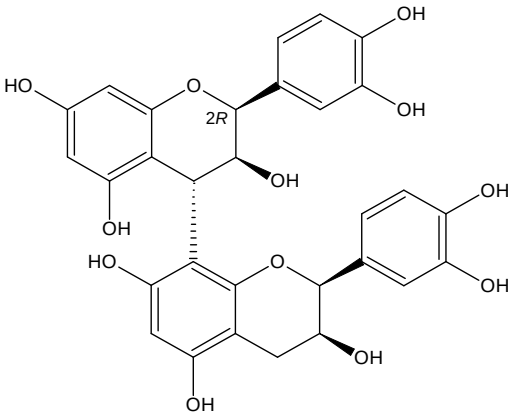


ent-guibourtinidol-(4β➔8)-*epi*-catequina

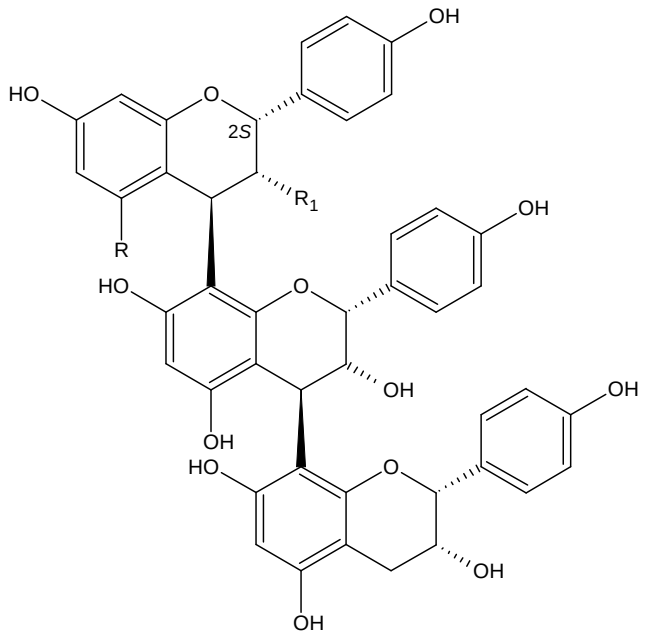


procianidina B

[(-)-*epi*-catequina-(4β➔8)-*epi*-catequina]



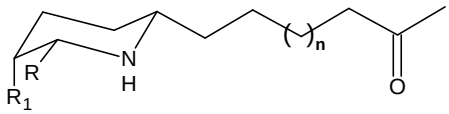
procianidina B-2

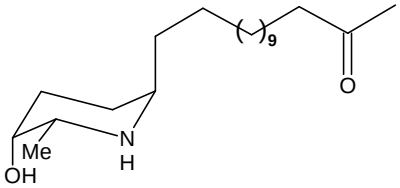


R	R_1	
OH	OH	*epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequina
H	H	(2*S*)-7,4'-dihidroxiflavan-(4β→8)-*epi*-afzelequin-(4β→8)-*epi*-afzelequina

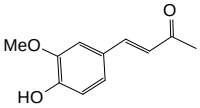
2.8.7. Alcaloides

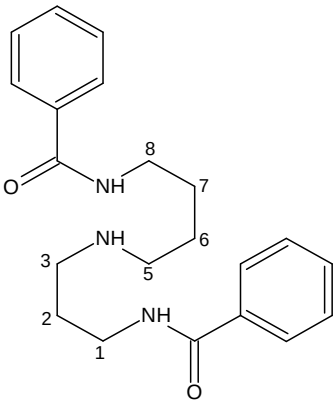
Aunque los reportes de alcaloides para el género *Cassia* son poco frecuentes, se han aislado alcaloides alifáticos y aromáticos. Los alcaloides alifáticos del tipo piperidinicos han sido reportados de la especie *C. spectabilis*[103,104] mientras que N^1,N^8-dibenzoilespermidína (alcaloide alifático lineal) fue aislado de *C. floribunda*.[89] Por otra parte todos los alcaloides aromáticos reportados para el género *Cassia* han sido aislados de la especie *C. siemea*[105,106] y corresponden a núcleos cromanoides y a núcleos tricíclicos que contienen una fracción isoquinolínica. Las cassiarinas A-B (núcleos tricíclicos con restos isoquinolínicos) fueron potentes antimaláricos al ser evaluadas contra *Plasmodium falciparum*: cassiarina A (IC_{50} = 0,005 μg/mL), cassiarina B (IC_{50} = 6,9 μg/mL), dicha actividad motivó a un grupo de científicos Chinos a realizar la síntesis total de las cassiarinas A-B.[107] Cassianidina (alcaloide cromónico), fue obtenido de la fracción de $CHCl_3$ de las flores secas de *C. siamea*, sin embargo, no se le determinó ninguna actividad biológica.



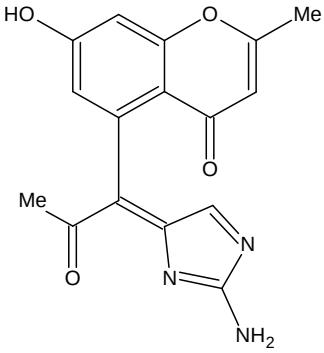


(-)-isoespectalina

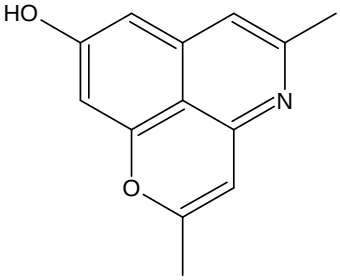
R_1	R_2	n	
OH	Me	9	(-)-espectalina
OH	CH_2OH	9	(-)-7-hidroxiespectalina
OAc	Me	9	(-)-3-*O*-acetilespectalina
	OH	7	(+)-3-*O*-feruloilcassina



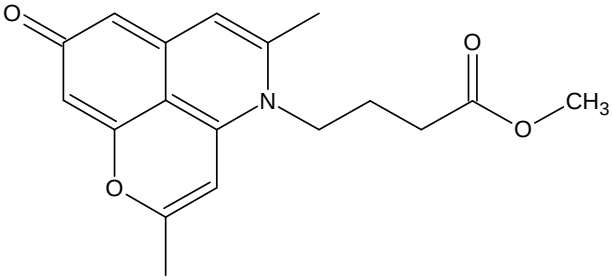
N^1,N^8-dibenzoilespermidina



cassiadinina
(alcaloide cromónico)



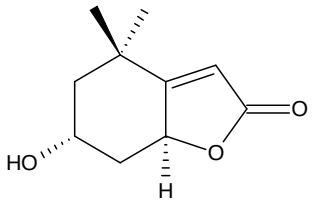
cassiarina A



cassiarina B

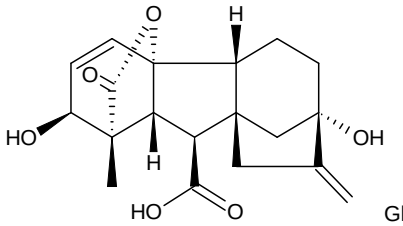
2.8.8. Misceláneos

El alto grado de oxigenación observado en las antraquinonas, estilbenos y flavonoides aislados del género *Cassia*, se hace presente también en una variedad de sus componentes, (**terpenos**): calendin, ácido gibberélico;[108,109] (**lignanos**): syringaresinol-4′-*O*-glucopiranósido;[110] (**xantonas**): pinselina;[111] (**cromonas**): (2′*S*)-7-hidroxi-2-(2′-hidroxipropil)-5-metilcromona, (2′*S*)-7-hidroxi-5-hidroximetil2-(2′-hidroxipropil)-cromona y crobisiamona A;[112,113] (**cumarinas**): dalberguina;[114] (**naftopironas):** quinquangulona y rubrofusarina;[115] (**ácidos carboxílcos**): ácidos cinámico, siríngico y vanílico;[108] y **aminoácidos**,[116] entre otros.



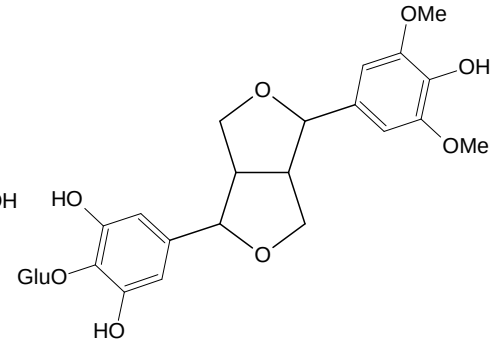
calendin

(monoterpeno)



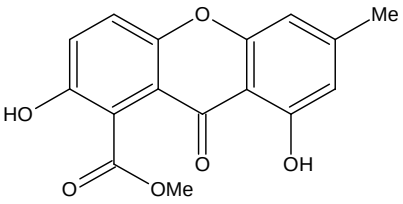
ácido gibberélico

(nor-diterpeno)



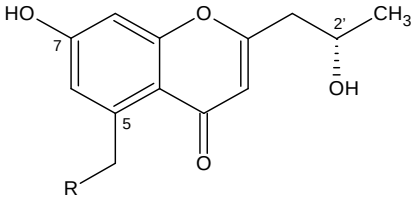
syringaresinol-4'-*O*-glucopiranosido

(lignano)



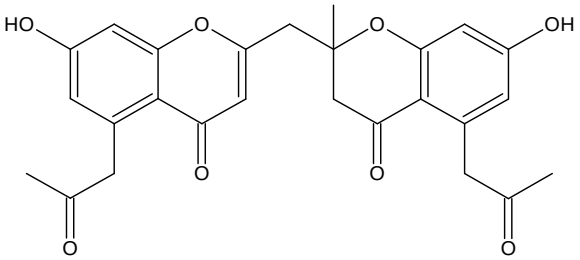
pinselina

(xantona)

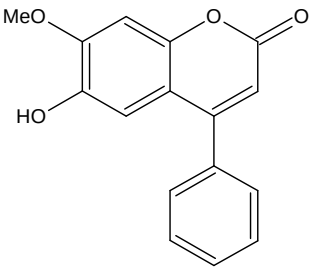


R	
H	(2'*S*)-7-hidroxi-2-(2'hidroxipropil)-5-metilcromona
OH	(2'*S*)-7-hidroxi-5-hidroximetil-2-(2'hidroxipropil)-cromona

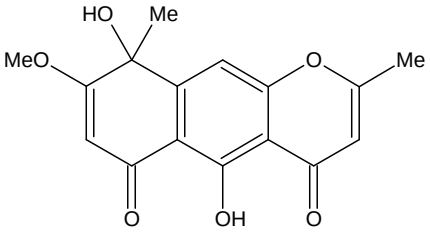
(cromonas)



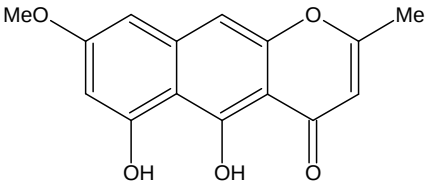
crobisiamona A
(bis-cromona)



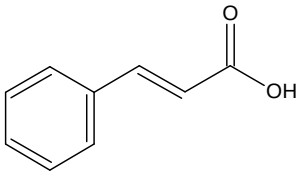
dalberguina
(cumarina)



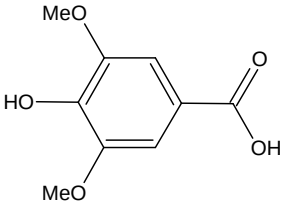
quinquangulona
(naftopirona)



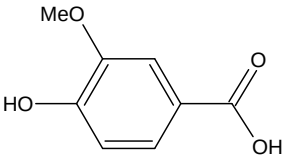
rubrofusarina
(naftopirona)



ácido cinámico



ácido siríngico



ácido vanílico

De acuerdo con la literatura revisada (sección 2.8), los metabolitos frecuentemente reportados en el género *Cassia* están mayormente conformados por polifenoles con características acídicas (antraquinonas, sennosidos, estilbenos). La tabla 2.2 muestra la revisión de las condicones utilizadas en la separación por HPLC de los diferentes tipos de matabolitos secundarios aislados del género *Cassia*. Las características mas relevantes de dichos sistemas de elución estan determinadas por el pH de las soluciones utilizadas como eluentes, ésto es debido a las características acídicas de los metabolitos mayoritarios del género.

Tabla 2.2. Condiciones HPLC de metabolitos aislados e identificados de especies del genero *Cassia*.

Sustancia esperada (especie)	Columna	Dimensiones (mm)	Fase móvil	isocratico	gradiente	λ (nm)	Ref.
Antraquinonas							
C. alata	PhenomenexLuna C-18	250x4,6 (5 μm)	ACN-MeOH-NH_4Ac, pH6,8 (25:35:20)	x		**260**	117
C. alata	TSK-gel ODS-80T	150x4,6	MeOH-2%AcOH (55→100%)		x	**PDA**	118
C. garretiana	Apollo C18	250x22 (5 μm)	Metanol	x			119
C. grandis							
C. obtusifolia	Nova-Pak Cartridge C-18	100x5	ACN-H_2O		x		120
	GS-310	500x20	ACN-H_2O		x		
C. podocarpa	Apex	300x4	MeOH-H_2O (60→86%)		x		121
C. seeds	PhenomenexODS3	250x4,6 (5 μm)	MeOH-0,4%AcOH (70:30)	x		**254**	122
C. tora	Shim-Pack C_{18}	150x4,6 (5 μm)	MeOH-1%AcOH (60:40)	x		**280**	123
Naftopironas							
C. quinquangulata	Prodigy	250x10 (10 μm)	MeOH-H_2O (65:35)[a]	x		**254**	124
			MeOH-H_2O (70:30)[b]	x			
C. obtusifolia	Pegasil		MeOH	x			125
Flavonoides							
C. sieberiana.	Lichrospher100RP-18e	250x4,6 (5 μm)	MeOH-H_2O-AcOH (18:1:1) y H_2O-AcOH (49:1)		x	**PDA**	126
C. alata	YMC-Pack ODS-A	150x4,6 (5 μm)	ACN-0,01%AcOH (1:4)	x		**340**	127
Sennosidos							
C. angustifolia	Phermaphase ODS	500x3	2%Dioxano-(Britton-Robinson búfer de pH 2)	x		**254**	128,129
	Lichrosorb RP-18	150x4	30%MeOH-(succinato borato búfer de pH 3,4)	x		**254**	
Estilbenos							
C. garretiana	Apollo C18	250x22 (5 μm)	Metanol[a]	x			119
			ACN-0,2%TFA[b] (45:55)	x			
Ácidos							
C. mimosoides	Develosil ODS HG5	250x20	MeOH-H_2O (40:60)	x			130
		250x4,6	ACN-H_2O (30:70)	x			

2.9. Antecedentes Biológicos del Género *Cassia*

Muchas especies del género *Cassia* han sido estudiadas química y biológicamente. Los estudios fitoquímicos fueron descritos previamente en este trabajo (sección 2.8), mientras que las actividades biológicas reportadas para éste género son:

- ✓ **Analgésica**: *C. alata*[131] y *C. italica*;[132]
- ✓ **Antibacterial**: *C. fistula*, [133,134] *C. garrettiana*[135] y *C. tora*;[136]
- ✓ **Antidiabética**: *C. alata*,[137] *C. auriculata*,[138,139] *C. fistula*,[140,141] *C. kleinii*[142,143] y *C. tora*;[144]
- ✓ **Antifúngica**: *C. alata*,[145] *C. fistula*,[133,134] *C. garretiana*[135] y *C. tora*;[146]
- ✓ **Antiinflamatoria**: *C. italica*,[132] *C. nigricans*[147] y *C. occidentalis*;[148]
- ✓ **Antimalárica**: *C. nigricans*[149] y *C. singueana*;[150]
- ✓ **Antimicótica**: *C. alata*;[151]
- ✓ **Antimicrobiana**: *C. alata*[152] y *C. quinquangulata*;[115]
- ✓ **Antioxidante**: *C. auriculata*,[153] *C. fistula*[154,155] y *C. siamea*;[156]
- ✓ **Antiviral**: *C. angustifolia*[157] y *C. garrettiana*;[158]

Sin embargo, sólo se describen los reportes biológicos relacionados a actividades hipoglicemiantes y/o antidiabéticas, ya que están estrechamente relacionadas con los objetivos de ésta investigación.

El efecto del extracto de $EtOH_{85\%}$ de las hojas de *C. alata* en ratas, con hiperglicemia inducida con STZ, fue comparable al de glibencamida (GLB).[†] Después de 20 días de la inducción diabética en las ratas, tanto el extracto de $EtOH_{85\%}$ como la GLB mostraron una reducción significativa de los niveles de glucosa sanguínea en las ratas, de (277,1 ± 0,8); (267,7 ± 0,9) y (259,1 ± 2,7) mg% después de la administración de dosis de 100, 200 y 400 mg/Kg del extracto

[†] (GLB, compuesto tipo sulfonilurea, droga estándar antidiabética oralmente efectiva).

de $EtOH_{85\%}$, respectivamente. Por otro lado, GLB a una dosis de 0,025 mg/Kg produjo un descenso hasta 228,3 ± 2,6 mg%.[137]

El extracto acuoso de las hojas de *C. auriculata* disminuyó los niveles de glucosa sérica en ratas normales, observándose un máximo de reducción luego de cuatro horas de la administración intragástrica del extracto acuoso de *C. auriculata*, en dosis de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg. En ratas normales la reducción de la glucosa sérica a las 4 h, fue de 23 % a dosis de 100 mg/Kg y 31 % a 200 mg/Kg. En ratas "diabéticamente inducidas" con alloxan, la administración de 200 mg/Kg del extracto acuoso de las hojas de *C. auriculata* disminuyó moderadamente los niveles de glucosa sérica a partir del tercer día de tratamiento de diez en total, mientras que GLB lo hizo significativamente a una dosis de 10 mg/Kg/día administrada oralmente. La dosis de 200 mg/Kg de *C. auriculata* inhibió la pérdida de peso de las ratas, causada por la inducción diabética con alloxan. La determinación de glucosa se realizó a través del método enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD/POD). Por otra parte, el extracto acuoso de las hojas de *C. auriculata* presentó una DL_{50} mayor a la máxima dosis considerada no toxica[‡] (DL_{50} > 5 g/Kg).[138]

El extracto de $MeOH-H_2O$ (1:1; v/v) proveniente de las flores de *C. auriculata* y sus subfracciones consecutivas de AcOEt y *n*-BuOH, presentaron efectos antihiperglicémicos en ratas diabéticamente inducidas con alloxan. La fracción de *n*-BuOH mostró una reducción significativa de los niveles de glucosa sanguínea a una dosis de 0,20 g/Kg, con una actividad comparable a phenformin, droga comercial que reduce los niveles de glucosa sanguínea, a una dosis de 0,04 g/Kg. La actividad antihiperglicémica de la fracción de *n*-BuOH a la dosis estudiada no produjo la pérdida de peso de las ratas diabéticamente inducidas con alloxan, con un comportamiento similar a phenformin.[139]

[‡] Dosis relativamente no tóxica DL_{50} 3-5 g/Kg

La Diabetes Mellitus está asociada con un estrés oxidativo significativo. El deterioro oxidativo de los tejidos es considerado un factor que puede contribuir a varias complicaciones diabéticas, de modo que la actividad antioxidante y antidiabética están estrechamente relacionadas, lo cual hace interesante y relevante el estudio de las propiedades antioxidantes en ratas "diabéticamente inducidas". Durante la DM, los productos de la peroxidación lipídica conocidos como sustancias reactivas al ácido tiobarbutírico (TBARS), dienos conjugados (CD) e hidroperóxidos (HP) incrementan sustancialmente sus niveles normales a expensas de la glutationa (GSH) debido a que ésta disminuye sus valores normales. El extracto acuoso de las flores de *C. fistula* presentó efectos antioxidantes en ratas "diabéticamente inducidas" con alloxan, éstos efectos fueron comparables con los producidos por insulina a dosis de 3 g/Kg. La actividad antioxidante fue determinada midiendo los valores de los productos de la peroxidación lipídica TBARS, CD, HP y de GSH.[140]

La administración del extracto de hexano de la corteza de *C. fistula* reestableció los valores de glucosa sanguínea y peso corporal de las ratas, dependiente de la dosis y es comparable con los efectos ejercidos por GLB. Además, disminuyó significativamente los niveles de glucosa en orina de ratas "diabéticamente inducidas" con STZ y contrarrestó los defectos producidos por la inducción diabética con STZ.[141]

Por su parte, estudios sobre *C. kleinii* mostraron que el extracto de EtOH de las hojas mantuvo el peso corporal de ratas diabéticamente inducidas con STZ, y produjo efectos comparables con GLB sobre los niveles de glucosa sérica, durante los 15 días de estudio.[142] Por otra parte, el extracto acuoso de las raíces y hojas a dosis de 500 mg/Kg incrementó significativamente la tolerancia a la glucosa de ratas en ayuna.[143]

La hiperglicemia ha sido identificada como el factor de mayor riesgo en el desarrollo de complicaciones diabéticas. La persistencia de la hiperglicemia induce

cambios anormales como: formación de productos avanzados de glicación (AGE, por sus siglas en inglés, Age Glication End), incremento del sorbitol a través de la vía de los polioles, entre otros. La evidencia directa que indica la contribución de los AGEs en la progresión de las complicaciones diabéticas en diferentes lesiones del riñón, la lente de la rata (RL), y la aterosclerosis ha sido publicada recientemente. Se ha demostrado que la aldosa reductasa (AR), enzima clave en la vía de los polioles, desempeña un papel importante en la patogénesis de las complicaciones diabéticas y la formación de cataratas. La fracción de AcOEt de las semillas de *C. tora* presentó un IC_{50} = 30,8 μg/mL contra la formación de AGEs. De *C. tora* se aislaron e identificaron nueve antraquinonas: aurantio-obtusin, criso-obtusin, obtusin, criso-obtusin-2-*O*-β-D-glucopiranosa, physcion, emodina, crisofanol, obtusifolin y obtusifolin-2-*O*-β-D-glucopiranosa. Todos los componentes fueron evaluados por cuadruplicado contra la formación de los AGEs y la RLAR. El control positivo para la formación de los AGEs fue aminoguanidina (AG) cuyo IC_{50} fue de 961 μM y para la RLAR fue el ácido 3,3-tetrametilenglutárico (TMG) con IC_{50} de 24,1 μM. Emodina y obtusifolin fueron mas potentes que AG contra la formación de los AGEs, ya que presentaron valores de IC_{50} de 118 y 28,9 μM, respectivamente. Mientras que, aurantio-obtusin, criso-obtusin-2-*O*-β-D-glucopiranosa y emodina fueron más potentes que TMG ya que sus valores de IC_{50} fueron 13,6; 8,8 y 15,9 μM, respectivamente.[144]

Ruellia tuberosa L.

2.10. Clasificación taxonómica: Descripción botánica

La especie *Ruellia tuberosa* L., presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Acanthaceae
Genero: *Ruellia*
Especie: *Ruellia tuberosa* L.

La familia Acanthaceae se caracteriza por estar compuesta de hierbas o sufruticosas, generalmente erectas raramente arbustos o árboles pequeños. Son de hojas opuestas, de inflorescencias axilares o terminales, de flores solitarias y llamativas, por lo que muchas especies de ésta familia sean cultivadas con propósitos ornamentales. Comprende unos 240 géneros y alrededor de 4000 especies, distribuidas mayormente por los trópicos y subtrópicos de ambos hemisferios, con pocos representantes en las zonas templadas del globo. Muchas habitan en el sotobosque de selvas y bosques húmedos, pero algunas en lugares abiertos o son plantas ruderales características de suelos alterados.[159,160]

Las especies del género *Ruellia* se caracterizan por ser de hojas opuestas, enteras, raramente crenadas o dentadas con flores pequeñas y tubulosas cuyo cáliz es profundamente pentapartido, con los segmentos lanceolados, agudos, subiguales. Es de corola con tubo basal ensanchado en una garganta cilíndrica o infundibuliforme. Poseen 4 estambres, generalmente didínamos, insertos en la base de la garganta, inclusos o exsertos. Son de fruto cápsular claviforme de contorno angostamente obovado, oblongo o elíptico, con la base sólido-estipitada. Cada fruto tiene de 4-24 semillas, a veces menos por aborto, lenticulares, con pubescencia higroscópica en toda su superficie o en el margen.[159] *Ruellia* es el segundo género de la familia Acanthaceae, con aproximadamente 250 especies, en Venezuela está representado por unas 30 especies.[161]

La especie *Ruellia tuberosa* L. (Figs 2.7 y 2.8), fue reportada por primera vez por Carlos Linneo en 1753, es una planta arvense perteneciente a la familia Acanthaceae, también es conocida como *Ruellia picta, Ruellia clandestina*.[162] En adelante se usará como *Ruellia tuberosa* L., ésta es originaria de centro América y distribuida en lugares como: La India, América del Sur, Sureste de África y Sureste de Asia.

Es una planta herbácea, dicotiledónea, ruderal de 30-60 cm de altura, de tallo cilindrico, erecto con hojas opuestas, descusadas, elípticas, perinnervias de 6-8 cm de largo y 4,2 cm de ancho, cuyo peciolo es de 2 cm. Es de raices tuberosas y fusiformes. Su flor es de color púrpura a morado claro, con cinco lóbulos subiguales de 12-14 mm, pedúnculo verde glabro o pubéluro, cáliz verde, tiene 4 estambres y un pistilo. Su fruto es una cápsula dehiscente de 20 mm de longitud, con una forma oblonga-elíptica con más de 20 semillas circulares, de color marron.[162]

Figura 2.7. Dibujo esquemático de la planta *Ruellia tuberosa* L.[163]

a) b)

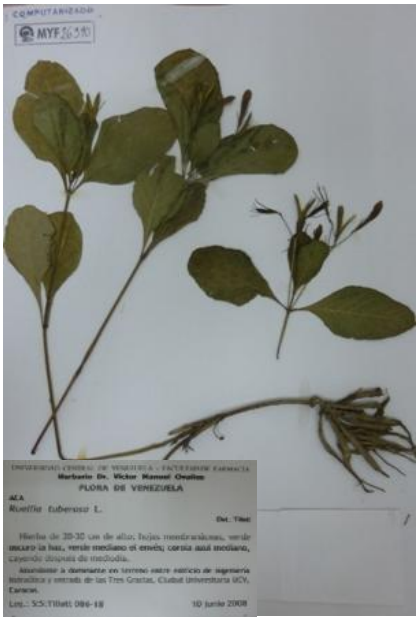
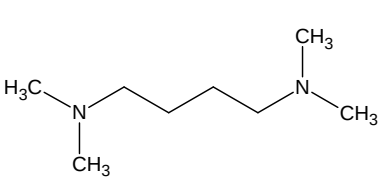


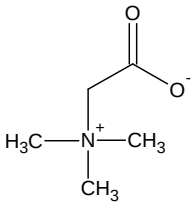
Figura 2.8. *Ruellia tuberosa* L. a) espécimen almacenado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Código MYF 26390;[164a] b) foto de las flores y frutos de la planta depositadas en el Herbario Ovalles.[164b]

2.11. Antecedentes Fitoquímicos del Género *Ruellia*

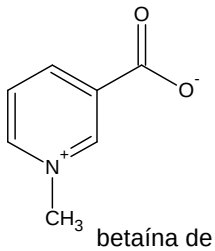
Éste género se caracteriza por presentar una gama muy variada de metabolitos (azúcares, betaínas, glucósidos cianogénicos, iridoides, alcaloides, flavonoides, lignanos, terpenos, etc.), por lo que es complicado identificar un marcador quimiotaxonómico del mismo. Por ejemplo, la betaína *N*-metilnicotinoato (betaína del ácido *N*-metilnicotínico) y el glicósido cianogénico taxifilina han sido detectadas en cinco especies del género *Ruellia*: *R. dipteracanthus*, *R. graecizans*, *R. portellae*, *R, rosea*, y *R. tweediana*.[165] De la especie *R. rosea* se ha reportado la presencia de la betaína *N,N,N*-trimetilalanoato y el alcaloide *N,N,N',N'*-tetrametilputrescina.[166] En ninguna de las cinco especies mencionadas anteriormente han sido detectados iridoides ni la dhurrina (diasteroisómero de taxifilina).



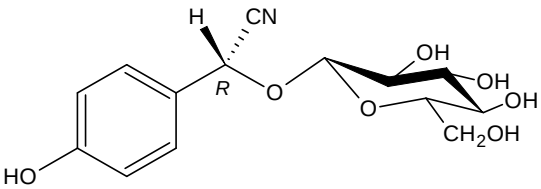
N,N,N',N'-tetrametilputrescina
(alcaloide alifático)

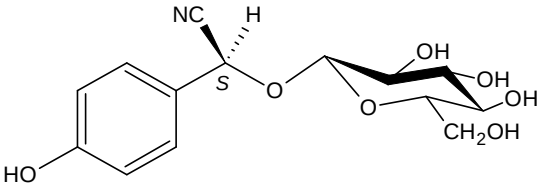


betaína de
N,N,N-trimetilalanoato



betaína de
N-metilnicotinoato



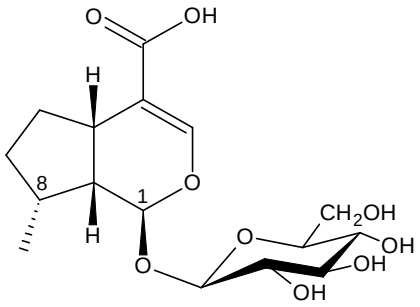


taxifilina
(configuración *R*)

diasteroisómeros

dhurrina
(configuración *S*)

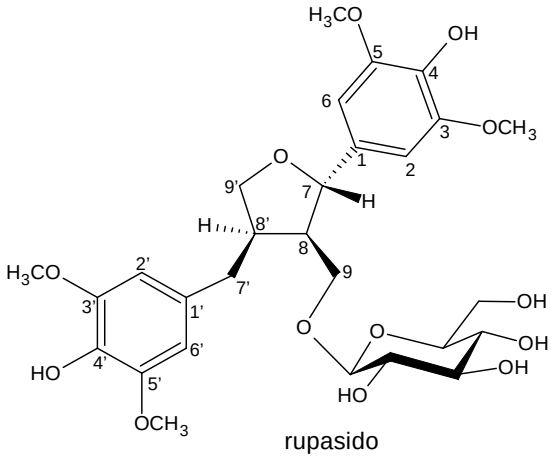
Del extracto de MeOH de la especie *R. praeterminsa* se ha reportado el iridoide ácido 8-*epi*-deoxilogánico junto con taxifilina.[167] Por otra parte, las propiedades estrogénicas y colinérgicas del extracto metanólico fueron asociadas a la presencia de esteroles (β-sitosterol, estigmasterol) e iridoides (ácido 8-*epi*-deoxilogánico), respectivamente.[168]



ácido 8-*epi*-deoxilogánico

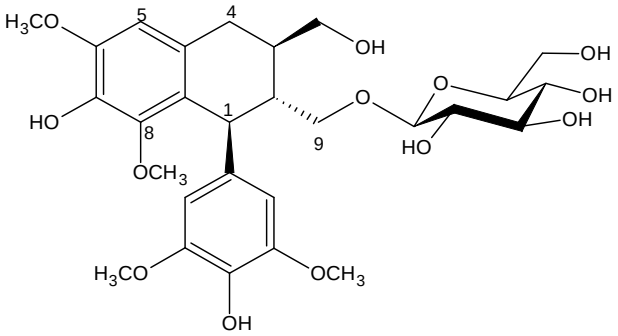
Los lignanos, lyoniresinol-9-*O*-β-glucopiranósido y rupasido han sido aislados y caracterizados de la fracción de *n*-BuOH de la especie *R. patula*. Lyoniresinol-9-*O*-β-glucopiranósido fue aislado de igual forma de la especie *R. brittoniana*. De ésta última especie se aisló ácido *p*-metoxibenzóico y el dímero de 2,4-dienhexanoato de dimetilo, ambos provenientes de la fracción de AcOEt. [169]

Galactosa y α-etilgalactosa fueron aislados de la fracción de *n*-BuOH de la especie *R. patula*. Éstos compuestos incrementaron la presión sanguínea en ratas anestesiadas dependiente de la dosis. Fue otro derivado de galactosa, 2-*O*-α-galactopiranosilglicerol hexaacetato aislado, de la especie *R. brittoniana*, el que disminuyó la presión sanguínea (-13,6% ± 3,5), en ratas anestesiadas, a 50 μg/Kg.



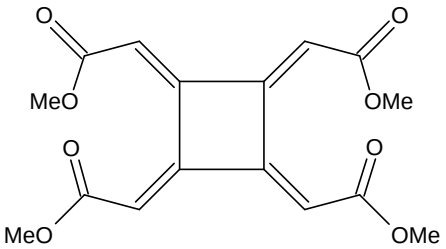
rupasido

(lignano)

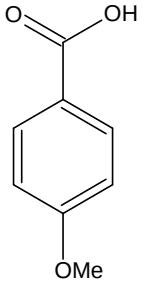


lyoniresinol-9-*O*-β-D-glucopiranósido

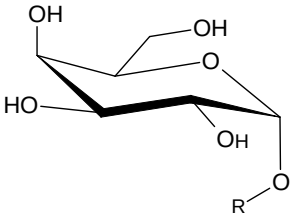
(lignano)



dímero de 2,4-diene hexanoato de dimetilo



ácido *p*-metoxibenzoico

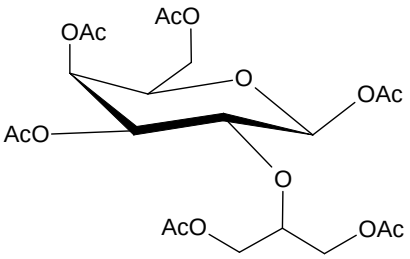


R

H α-galactosa

Et α-etilgalactosa

(azúcares)



2-*O*-α-D-galactopiranoslglicerol hexacetato

(azúcar)

2.12. *Ruellia tuberosa* L.

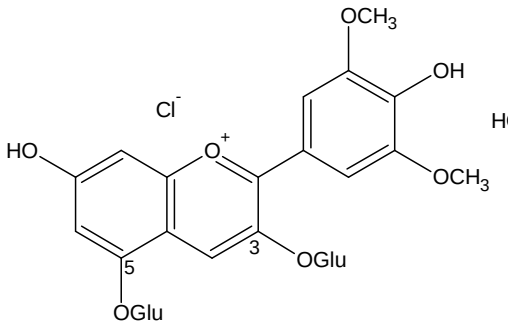
La potencialidad terapéutica de *Ruellia tuberosa* L. ha sido explorada,[170,171,172] y varios grupos de Investigación han realizado estudios fitoquímicos[173] de la misma reportando el aislamiento e identificación de metabolitos del tipo flavonoidal, alcaloidal, y terpenoidal (descritos más adelante). Las actividades biológicas reportadas para *R. tuberosa* L., son: antioxidante,[174] antiplasmódica,[175] anticancerígenas,[176,177,178] analgésica,[172] antiinflamatoria,[172,178] diurética,[172] antihipertensiva[172] y antidiabética.

En varios de los reportes asociados a *Ruellia tuberosa* L. no se determinó si un metabolito en particular, o un conjunto de ellos, fueron responsables de las actividades asociadas. Debido a que *R. tuberosa* L. es de fácil acceso en Venezuela, el presente trabajo pretende encontrar qué tipo de metabolitos está relacionado con la actividad hipoglicemiante asociada a *R. tuberosa* L.

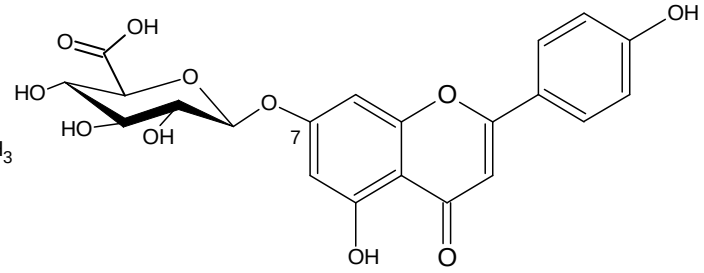
2.12.1. Flavonoides

Se ha reportado la presencia de la antocianina malvidin-3,5-diglucósido en las flores (color violeta oscuro) de *R. tuberosa*; de los capullos de las flores se han aislado apigenin-7-*O*-glucorónido como flavonoide mayoritario (máximo 3%), apigenin-7-*O*-glucopiranósido, apigenin-7-*O*-rutinósido y luteolin-7-*O*-glucopiranósido, mientras que de las hojas se han aislado apigenina y luteolina. [179] Por otra parte, acacetina fue obtenido a partir las raíces de *R. tuberosa* L.[181]

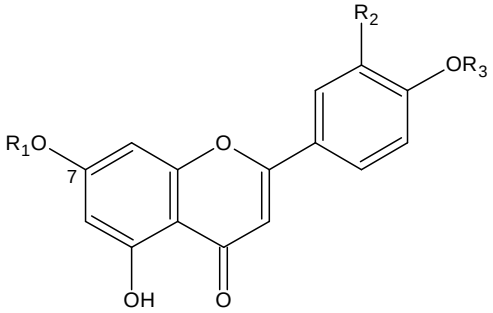
El extracto metanólico de la parte aérea seca de *R. tuberosa* fue sometido a una distribución entre AcOEt y agua. De la fracción de AcOEt se aislaron los flavonoides cirsimaritin, circimarin, circiliol 4′-*O*-glucopiranósido, sorbifolin y pedalatin junto con el triterpeno betulina, el alcaloide indol-3-carboxaldehído y el ácido vaníllico. Los flavonoides aislados fueron citotóxicos sobre las células cancerosas de KB (cáncer de piel) y HepG2 (cáncer de hígado)



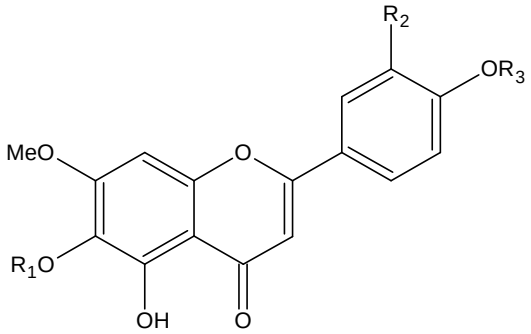
malvidin-3,5-diglucopiranosido
(antocianina)



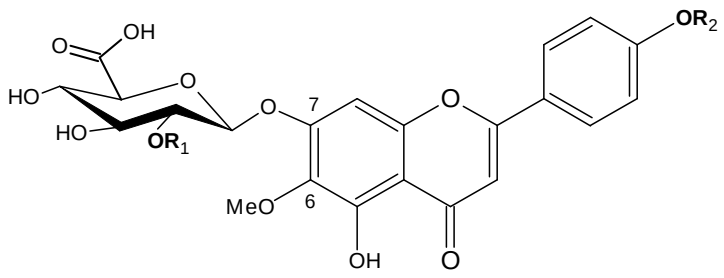
apigenina-7-*O*-β-D-glucuronido



R_1	R_2	R_3	
H	H	H	apigenina
H	OH	H	luteolina
Glu	H	H	apigenin-7-*O*-glucopiranosido
Rut	H	H	apigenin-7-*O*-rutinosido
Glu	OH	H	luteolin-7-*O*-glucopiranosido
H	H	Me	acacetina



R_1	R_2	R_3	
CH_3	H	H	circimaritin
CH_3	H	Glu	circimarin
CH_3	OH	Glu	circilol 4'-*O*-Glu
H	H	H	sorbifolin
H	OH	H	pedalatin

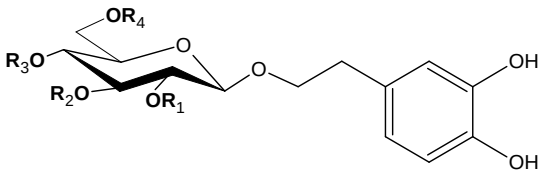


R_1	R_2	
H	H	Hispidulin 7-*O*-β-D-glucoropiranósido (6-*O*-metil-scutelarin)
H	Me	Pectolinangerin 7-*O*-β-D-glucoropiranósido (Comantósido B)
Rha	H	Hispidulin 7-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1´´´→ 2´´)-*O*-β-D-glucoropiranósido
Rha	Me	Pectolinangerin 7-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1´´´ → 2´´)-*O*-β-D-glucoropiranósido

En células KB, Cirsimaritin presentó un IC_{50}= 30,05 μg/mL y circiliol 4′-*O*-glucopiranósido un IC_{50} 17,91 μg/mL. Así mismo, circimarin fue citotóxico contra las células HepG2 con un IC_{50}= 38,83 μg/mL.[177] Por otra parte, también se han aislado y reportado derivados glicosídicos con núcleos flavonoidades del tipo 7-demetilsorbifolin de la parte aérea de *R. tuberosa*.[180]

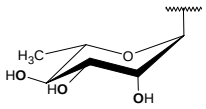
2.12.2. Feniletanoides

El extracto metanólico de las partes aéreas de *R. tuberosa* fue suspendido en agua y desgrasado con dietiléter, donde la fracción acuosa fue particionada en una columna empacada con Danion HP-20 empleando los eluentes H_2O, MeOH y Acetona sucesivamente. De la fracción metanólica se aislo e identificó la siguiente serie de feniletanóides.[180]

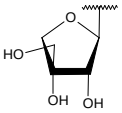


R_1	R_2	R_3	R_4	
H	Rha	Caff	H	Verbascósido
H	Rha	H	Caff	Isovervascósido
H	Api	Caff	H	Nuomibiósido
H	Api	H	Caff	Isonumobiósido
H	Rha	Caff	Api	Forsitósido B
H	Api	Caff	Api	Pauciflósido
Rha	Rha	Caff	H	Cassifoliósido
Rha	Rha	H	Caff	Isocassifoliósido

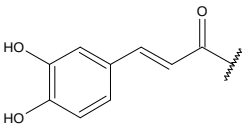
Rha:



Api:

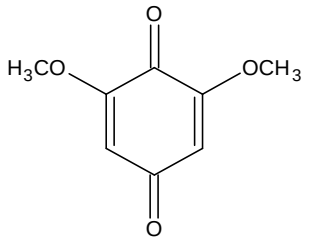


Caff:

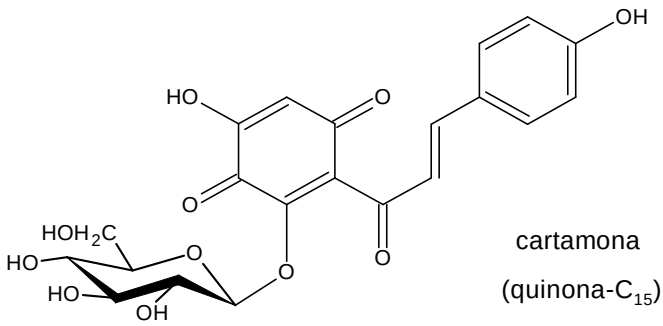


2.12.3. Quinonas

El extracto de éter de petróleo (P_{eb}= 60-80 °C) de las raíces de *R. tuberosa* fue tratado con carbonato de sodio acuoso al 1%, luego fue acidificado y tratado con $CHCl_3$, de ésta fracción clorofórmica se aisló 2,6-dimetoxiquinona, acacetina (flavonoide) y una quinona-C_{16}, con características muy similares a cartamona una quinona-C_{15}. El exudado de las raíces, obtenido por maceración de las raíces en agua durante 12 horas, también presentó los mismos componentes que la fracción de $CHCl_3$ antes descrita. Éstas tres sustancias mostraron una acción curativa y protectiva significativa contra las sustancias tóxicas emitidas por *Fusarium oxysporum* en el crecimiento y desarrollo de las semillas del falso azafrán (safflower, *Carthamus tinctorius* L.). Éstos resultados revelaron las propiedades fungicidas de *R. tuberosa*.[181]



2,6-dimetoxiquinona

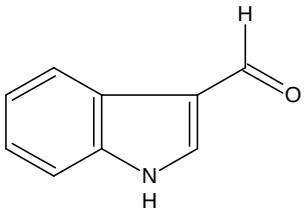


cartamona

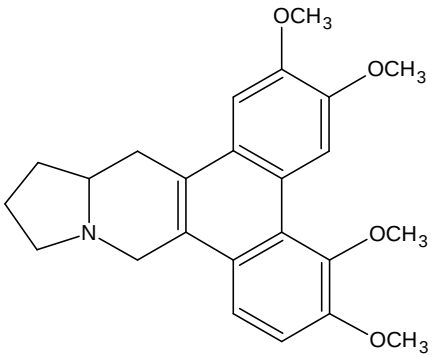
(quinona-C_{15})

2.12.4. Alcaloides

Indol-3-carboxaldehído[177] y tylocrebrina,[178] obtenidos de la parte aérea seca y fresca respectivamente, han sido los únicos alcaloides reportados para *R. tuberosa*. Indol-3-carboxaldehído fue aislado de la fracción de AcOEt proveniente del extracto metanólico, mientras que tylocrebrina, se obtuvo del extracto metanólico, con valores de IC_{50} 3,5 y 1,9 µg/mL en las células cancerosas H460 (cáncer de pulmón) y MDA-MB231 (cáncer de mama), respectivamente. Tylocrebrina mostró un IC_{50} que varió entre 0,35-1 µM para diferentes células cancerosas, resultando ser menos tóxica para las células normales de pulmón WI-38. Además, tylocrebrina resultó ser un potente agente antiinflamatorio en células monocíticas THP-1.[178]



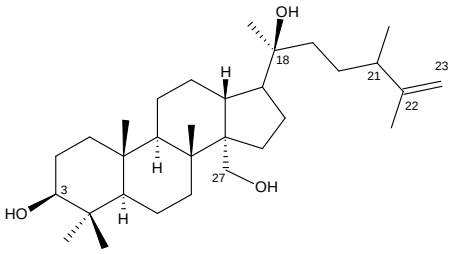
Indol-3-carboxaldehído



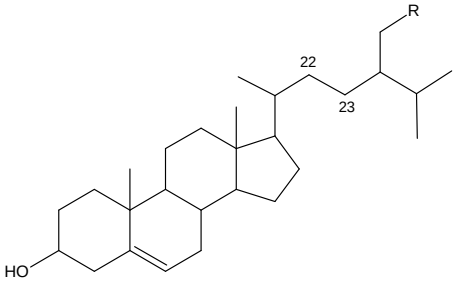
Tylocebrina

2.12.5. Terpenos e hidrocarburos lineales

21-metildammaran-22-en-3β,18,27-triol,[182] se obtuvo de la parte aérea de *R. tuberosa*, mientras que, betulina[177] ha sido reportada de la fracción de AcOEt proveniente del extracto metanólico de la parte aérea seca. Estigmasterol, β-sitosterol, lupeol y campesterol han sido obtenidos de diferentes partes de la planta.[169] Los hidrocarburos lineales *n*-triacontano, *n*-triacontan-6-ona y 5-hidroxitetratriacontan-9-ona también han sido aislados tambien de *R. tuberosa*.[183]

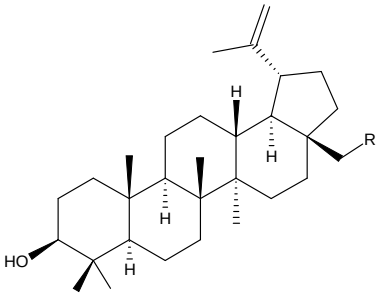


21-metildammaran-22-en-3β,18,27-triol



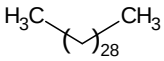
R	Δ^{22-23}	
H	dihidro	campesterol
Me	dihidro	β-sitosterol
Me	=	estigmasterol

(esteriodes)

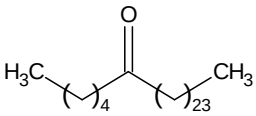


R	
H	lupeol
OH	betulina

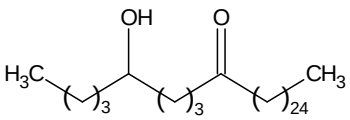
(triterpenos)



n-triacontano



triacontan-6-ona



5-hidroxitetratriacontan-9-ona

Capítulo 3

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

3.1. Cromatografía.

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y se basa en la separación de los constituyentes de una mezcla, debido a su adsorción selectiva sobre sólidos finamente divididos o en su distribución entre dos disolventes, determinados por su *coeficiente de distribución* (K_C).[184]

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil* (FM), que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Ésta FM se hace pasar a través de una *fase estacionaria* (FE), con la que es inmiscible y que es sólido o líquido con o sin soporte sólido. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyan entre la FM y la FE. Las distintas interacciones entre las fases estacionaria y móvil dan origen a diferentes técnicas cromatográficas denominadas: *cromatografía de líquidos, cromatografía de gases* y *cromatografía de fluidos supercríticos* caracterizadas básicamente por una FM líquida, gaseosa o de fluidos supercríticos, respectivamente.

3.2. Cromatografía en Columna, CC.

La *cromatografía en columna* (CC), fue creada y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Twestt empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales (clorofilas, carotenoides y xantofilas), haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio finamente dividido. Los pigmentos aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego **chroma** que significa "color" y **graphein** que significa "escribir"). En la figura 3.1 se muestra un esquema clásico de CC donde la respuesta del detector se corresponde con los diferentes colores observados por Twestt, por lo que sus orígenes están muy ligados con el estudio de los productos naturales.[185,186] La técnica fue publicada en 1910 y hoy día es usada esencialmente de la misma forma.

Las desventajas fundamentales de la CC son: 1) la adsorción irreversible de los constituyentes en los soportes sólidos; 2) los tiempos prolongados de separación a escala preparativa y 3) desnaturalización de los componentes de la mezcla por interacción con el soporte sólido. Sin embargo, las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en los últimos 50 años debido no sólo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes, por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas.[184]

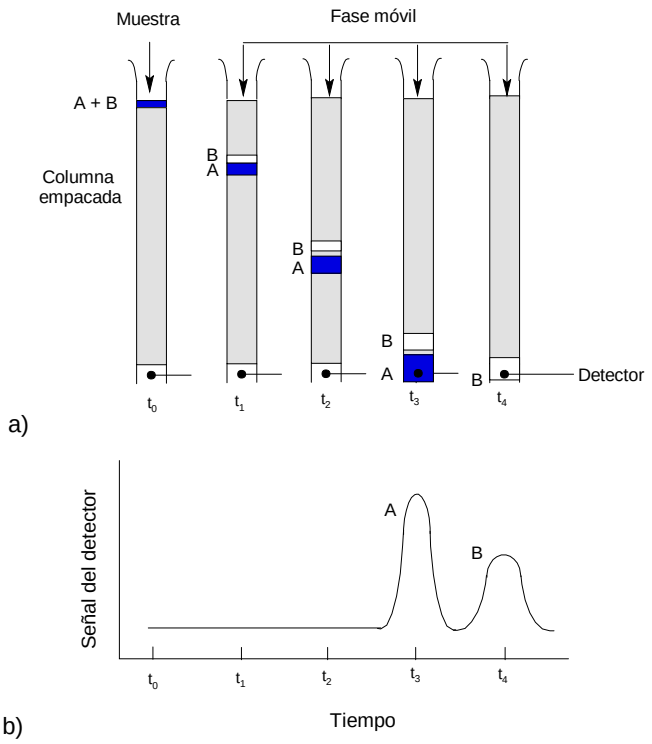


Figura 3.1. a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de componentes A y B, por elución en una columna cromatográfica y b) señal del detector en varios momentos de la elución mostradas en a).[184]

La interacción del soporte sólido con los analitos en la cromatografía convencional líquido-líquido[§] frecuentemente causa “colas” o desnaturalizaciones del soluto; para solucionar éstos inconvenientes se han utilizado fuerzas centrífugas, sobre tubos helicoidales,[**] con movimientos sincronizados o no, de modo que sea posible la cromatografía con sistemas de solventes bifásicos que no requieren soportes sólidos.[187]

La técnica de cromatografía contracorriente (CCC), es una aplicación de la cromatografía líquida donde la FE es otro líquido sin soporte sólido y la misma presenta numerosas ventajas sobre la cromatografía líquido-sólido clásica.

[§] Líquidos adsorbidos sobre soportes sólidos
[**] Tubos de teflón enrollados sobre soportes cilíndricos, formando carretes u ovillos de múltiples capas.

3.3. Cromatografía Contracorriente, CCC

La CCC es una técnica que se basa en los K_C de los constituyentes de una muestra entre dos solventes inmiscibles, las proporciones relativas del soluto que pasan a cada uno de las dos fases se determinan por los respectivos valores de K_C.

A diferencia de las columnas estáticas, utilizadas en la CC, las columnas para CCC están compuestas clásicamente por tubos de teflón enrollados sobre soportes cilíndricos en forma de carretes u ovillos de múltiples capas sujetas a movimientos sincronizados o no. En éste estudio se utilizaron equipos de HSCCC con movimiento planetario sincronizado tipo-J y columnas de múltiples capas representadas en la figura 3.2b (detalle Fig. 3.3)

Debido a que la CCC es una técnica totalmente líquida, se tiene las siguientes ventajas sobre otras técnicas cromatográficas líquido-sólido y líquido-líquido[††]

- ✓ No hay adsorción irreversible de la muestra
- ✓ Recuperación cuantitativa de la muestra introducida
- ✓ Se reduce el riesgo de desnaturalización de la muestra
- ✓ Bajo consumo de disolventes
- ✓ Económicamente favorable

[††] Líquido químicamente unido al soporte sólido.

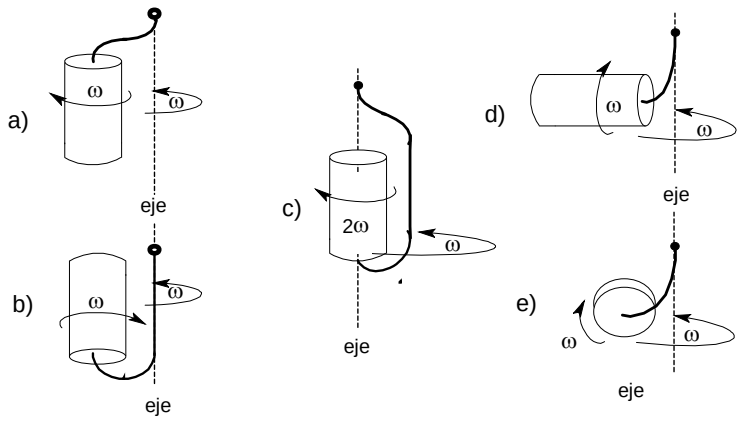


Figura 3.2. Diferentes arreglos de la columna de cromatografía contracorriente para lograr la retención de FE por fuerzas centrífugas contra un *F* contínuo de FM, denotando el eje de revolución.[186]

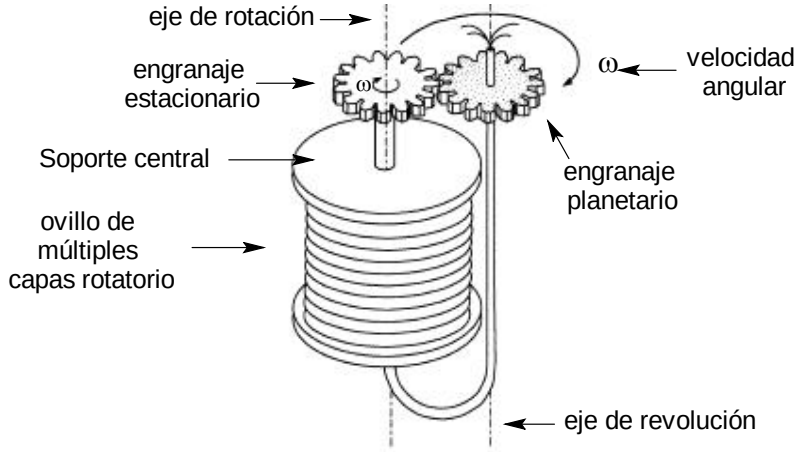


Figura 3.3. Columna de separación de múltiples capas con movimiento planetario tipo-J (ver Fig. 3.2b).[5]

Sin embargo, la eliminación del soporte sólido requiere el uso combinado de una columna con geometría definida (frecuentemente espiral) y una fuerza centrífuga para retener la FE contra un *F* continuo de FM que al mismo tiempo provea una mezcla eficiente de fases de modo que facilite la distribución del analito.[188] Desde su introducción en el mercado en 1970,[187] los instrumentos de CCC han tomado diversas formas durante su desarrollo, mejorando su eficiencia de distribución, disminuyendo significativamente el tiempo de separación de días en la CCC de goteo (DCCC por sus siglas en inglés, Droplet Counter-Current

Chromatography),[189] a unas pocas horas en HSCCC.[190] Para éstos últimos se han descrito una serie de pasos a seguir[191] en el desarrollo de un experimento, también se han desarrollado nuevas columnas[192-193] y todas incrementan su eficiencia al disminuir *F* y el diámetro interno del tubo junto con una mayor longitud del mismo[187] y un incremento en la velocidad de rotación de la columna, ω.

La CCC con movimiento planetario sincronizado tipo-J, presenta dos técnicas, una estándar a alta velocidad (HSCCC)[191] y la otra llamada refinamiento de la zona de pH (pH-Zone Refining CCC).[194] En condiciones de elución isocrática, HSCCC produce picos uniformemente distribuidos[‡‡] que incrementan gradualmente su ancho de pico (W) a medida que eluyen los componentes debido a la dilución del analito; en la segunda se obtienen picos cromatográficos rectangulares-fusionados con un mínimo de superposición entre los componentes, al mismo tiempo que se concentran y eluyen las impurezas en los bordes de cada pico cromatográfico mayoritario de acuerdo con sus valores de pK_a e hidrofobicidad, produce fracciones altamente concentradas y es básicamente una técnica de separación a escala preparativa de analitos orgánicos ionizables, tales como ácidos y bases.

[‡‡] Distribución gaussiana

3.4. Cromatografía Contracorriente a Alta Velocidad, HSCCC

3.4.1. Descripción de la técnica

Debido a que en el presente trabajo se utilizaron columnas de múltiples capas y movimientos planetarios tipo-J, en la figura 3.4 se ilustra el movimiento y la distribución de fases observados en estas columnas con iluminación estroboscópica.[186,191] En la misma se han observado claramente dos zonas: la primera está definida por una separación de fases claramente visibles, mientras que la otra zona ocupa ¼ del área del espiral de la columna, se ubica próxima al eje de revolución y es denominada zona de mezcla. La representación en forma lineal de las posiciones I-IV, mostradas en la figura 3.4a, se observa como avanza la zona de mezcla a lo largo de la columna Fig. 3.4b. La zona de mezcla forma pequeñas gotas (Fig. 3.4c), en condiciones ideales, cada gota podría llegar a ser un “plato teórico” si se mantiene mas o menos discreta a través de todo el sistema. La separación de un soluto se alcanza por el reparto del mismo entre la FE y las gotas, dicha interacción explica la elevada eficacia de distribución con pequeños volúmenes de solventes, con aproximadamente 600-900 platos teóricos.

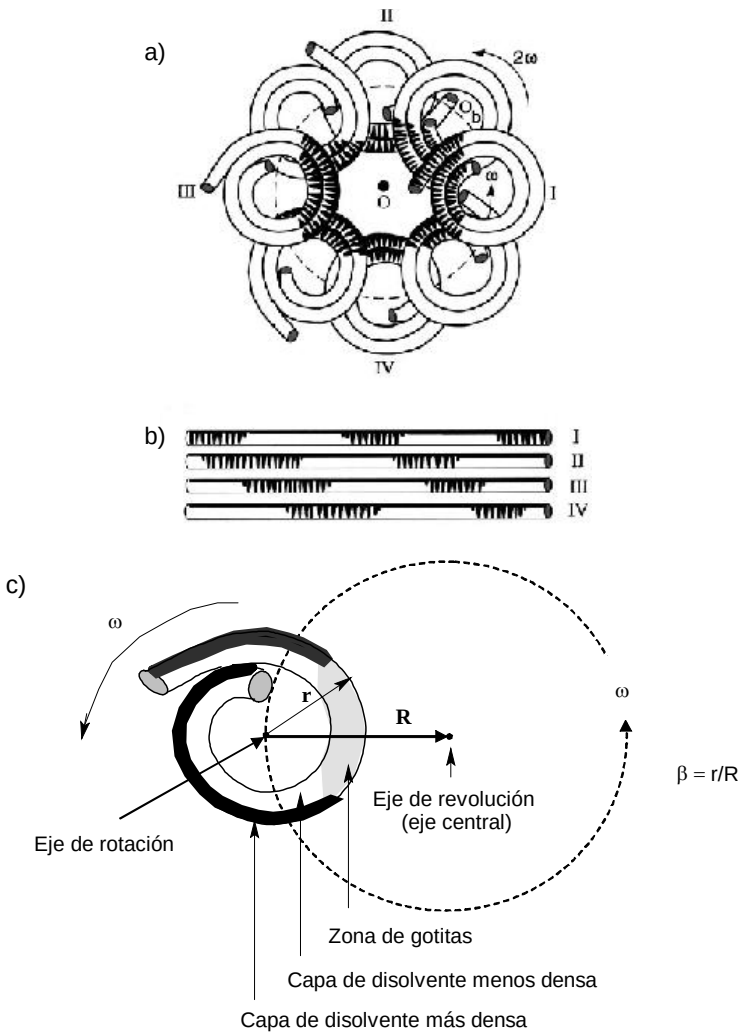


Figura 3.4. Mecanismo de la cromatografía contracorriente en sistemas planetarios tipo-J. ***a***) movimiento de la columna y distribución de las fases, ***b***) movimientos de la zona de mezclas a través de la columna y ***c***) detalles y definiciones de la distribución de fases.[5,186]

3.4.2. Inyección de muestra

La inyección de muestra se puede llevar a cabo de varias formas:

- **Estática o Tipo Sándwich**: la columna es completamente llenada con la FE seguida de la inyección de muestra disuelta en el sistema de solventes, y finalmente por la rotación de la columna a una ω determinada al mismo tiempo que se introduce la FM a un *F* adecuado§§. Los cromatogramas obtenidos por ésta técnica de inyección generalmente presentan mayor relación señal/ruido en los primeros minutos luego de emerger el frente del solvente, debido a la estabilización del equilibrio hidrodinámico de las dos fases o pérdida de FE.
- **Dinámica**: primero se debe llenar la columna completamente con la FE seguido por la rotación de la columna e introducción de FM. Luego de establecerse el equilibrio hidrodinámico se inyecta la muestra disuelta en el sistema de solventes a través de una válvula de inyección, como consecuencia, los cromatogramas presentan una línea base más clara, es decir, menor relación señal/ruido. Ésta forma consume más tiempo en la separación porque se requiere la formación del equilibrio hidrodinámico. Sin embargo, existen dos maneras de inyección dinámica para disminuir el tiempo de espera:
  I. La primera variación de ésta técnica consiste en inyectar la muestra antes de alcanzarse el equilibrio hidrodinámico, usualmente luego de haber ocupado 5-10 % del volumen total de la columna, V_t, con FM.
  II. Otra forma de inyección dinámica consiste en llenar la columna con proporciones determinadas de FE y FM preestableciendo el equilibrio hidrodinámico, para luego hacer rotar la columna e introducir la muestra, ésta operación requiere dos bombas, además de una válvula de inyección.

§§ Usualmente 800 rpm ó 1200 rpm para propósitos preparativos y analíticos, respectivamente.

3.4.3. Determinación de los Coeficientes de Distribución, K_C

Los valores de K_C pueden ser determinados por diferentes métodos, incluso directamente del cromatograma. Los valores de K_C están definidos como la relación de concentración entre FE y FM de acuerdo con la ecuación [3.1].[195]

$$K_C = \frac{[C_{fase\ estacionaria}]}{[C_{fase\ móvil}]} \qquad [3.1]$$

Donde $[C_{FE}]$ y $[C_{FM}]$ son las concentraciones de la muestra en las fases estacionaria y móvil respectivamente.

Empleando modos de elución isocráticos o con gradientes, la determinación de K_C, a partir del cromatograma, está determinada por el *F* y el V_t de modo que el coeficiente de distribución igual a la unidad (K_C= 1) corresponde al tiempo que tarda la FM en eluir exactamente V_t, mientras que K_C= 2 está determinado por el tiempo que tarda en eluir un volumen igual a la diferencia entre V_t y el volumen del frente del solvente (V_{FSte}= V_M determinado por el tiempo muerto, t_M), mas el tiempo que tardó en eluir V_t, Fig. 3.5. Por otra parte, los cromatogramas brindan otro tipo de información como lo son los factores de selectividad (α) [3.2], y la resolución de picos cromatográficos (R_s) [3.3]. R_s y α fueron utilizados como parámetros fundamentales en la optimización de los sistemas de solventes utilizados en el presente trabajo.

$$\sim = \frac{K_{C_b}}{K_{C_a}} = \frac{(t_R)_b - t_M}{(t_R)_a - t_M} \qquad [3.2] \qquad\qquad R_S = \frac{2[(t_R)_b - (t_R)_a]}{W_a + W_b} \qquad [3.3]$$

Donde a y b representan a los analitos con coeficientes de distribución K_{Ca} y K_{Cb}, t_R es el tiempo de retención del analito, t_M el tiempo muerto que corresponde

al frente del solvente, mientras que W_a y W_b representan el ancho del pico cromatográfico.

Las condiciones de trabajo ideales para HSCCC están determinadas por la retención de FE (mayor a 50%), los valores de K_C ($0,5 \leq K_C \leq 2,0$) junto con $\alpha \geq 1,5$ y $R_s \geq 1,5$ de picos cromatográficos consecutivos. Por otra parte, retenciones de FE de 30 % o menos, son útiles para analitos con elevados valores de K_C ($2,0 \leq K_C \leq 5,0$) que cumplan con α y R_s descritos anteriormente.[191]

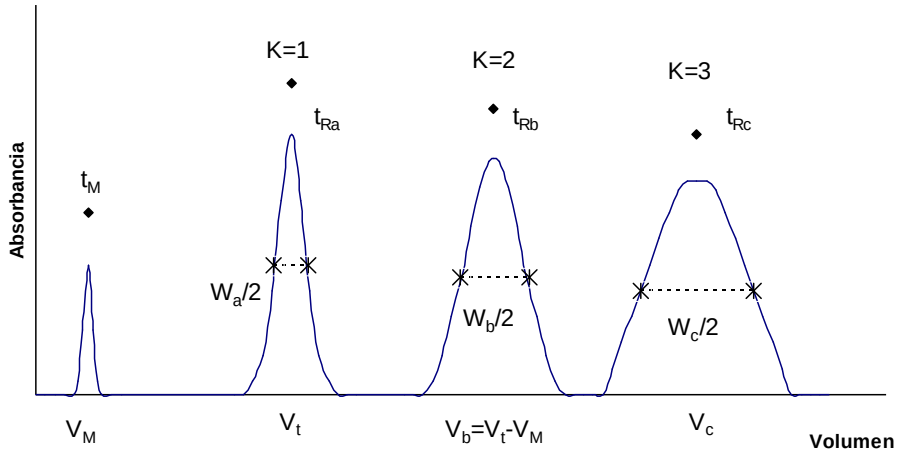


Figura 3.5. Determinación del coeficiente de distribución a partir del cromatograma con la técnica estándar.[195]

3.5. Refinamiento de la Zona de pH en Cromatografía Contracorriente

Ésta técnica preparativa fue originada incidentalmente en la purificación de N-bromoacetil-3,3′,5-triiodo-L-tironina-T3, al observar una distribución anómala (no-gaussiana y más de 2000 platos teóricos) en la elución isocrática del analito, determinada por el pH. La misma involucra reacciones ácido-base por lo que es necesario que los sistemas de solventes sean acuosos, lo cual proporciona dos modos de elución: reverso y normal, éstos son caracterizados por la FM acuosa u orgánica junto con un aumento o descenso del pH en el eluyente, respectivamente. Como en otros sistemas cromatográficos que emplean elución isocrática, el W se incrementa con el t_R del analito debido a su distribución y difusión, o cuando eluye más de una especie, éste último es el caso en la ionización de los ácidos carboxílicos.[196] Por ello los picos cromatográficos de ésta técnica no presentan una distribución gaussiana, en vez de ello son picos rectangulares.

3.5.1. Descripción de la técnica

El mecanismo para la formación de picos rectangulares con analitos ácidos e inyecciones de muestra tipo “sándwich”[***] en modo reverso con sistemas de solventes cuya fase orgánica es la de menor densidad, es mostrado en la figura 3.6. En la misma se observa una porción del tubo de teflón con el cual está hecho la columna, donde la mitad superior corresponde a la fase orgánica y la mitad inferior a la capa acuosa. Debido a su distribución isotérmica no-lineal, las diferentes formas del ácido retenedor (RCO_2^- y RCO_2H) delimitan nítidamente un borde ácido que viaja a través de la columna a un *F* menor que el de la *FM*. Para éste tipo de muestras (analitos ácidos), la *FE* tiene un pH ácido, debido al retenedor, ésto hace que el analito en posición 1 se distribuya mayoritariamente en la fase orgánica, y que exista en su forma protonada (RCO_2H) o posición 2.

[***] Para analitos ácidos, la solución de la muestra debe tener *FE* con retenedor (ácido) y *FM* sin eluyente (base), de modo que el pH de la muestra sea ácido y viceversa para analitos básicos.

Como la *FM* (acuosa-básica) se mueve hacia la derecha (Fig. 3.6) y tiene un pH mayor respecto a la *FE*, el analito queda en posición 3 expuesto a un pH básico, por lo que es transferido por reacción ácido-base hacia la *FM* (posición 4), una vez en la fase acuosa (posición 4), el analito migra rápidamente a la posición 1 motivado por el borde ácido definido por el retenedor y debido a que la *FM* sigue avanzando, se repite nuevamente el ciclo. Consecuentemente, el analito está confinado a la región cercana del borde del ácido y finalmente eluye como un pico agudo (más de 2000 platos teóricos) detrás de la frontera del ácido retenedor, el mismo se convierte en rectangular al incrementar la cantidad de muestra, ésto puede ser explicado de la siguiente manera:

Cuando la cantidad del analito ácido es incrementada, éste se acumula detrás del borde del ácido retenedor (se mantiene en la *FE* en posición 3), reduciendo localmente el pH, formando una segunda frontera ácida que elimina los otros componentes acídicos con mayores valores de pKa e hidrofobicidad, el mismo proceso toma lugar para un tercer analito ácido con valores mayores de pKa e hidrofobicidad, éste proceso es demostrado en modelo experimental ilustrado en la figura 3.7.

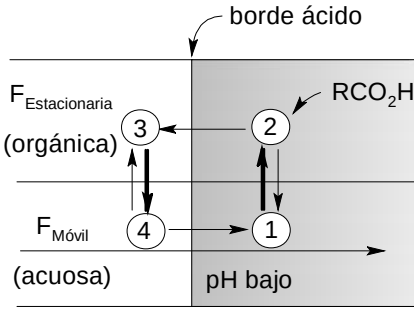


Figura 3.6. Mecanismo de la formación del pico rectangular en la separación de analitos ácidos empleando la técnica de refinamiento de la zona de pH.[191]

En la figura 2.7a, se empleó un sistema solvente bifásico integrado por éter y agua. Para analitos ácidos, se agregó un retenedor, TFA, a la *FE* (orgánica) y luego de separar una porción de la fase acuosa (para la disolución de la muestra),

se agregó el eluyente, NH_4OH, a la otra porción de la fase inferior (móvil). Luego de llenar la columna con la *FE* acidificada, se introdujo la disolución de la muestra que contiene tres analitos ácidos S_1, S_2 y S_3, donde $pK_aS_1 < pK_aS_2 < pK_aS_3$, preferentemente en una mezcla en proporciones iguales de las dos fases, donde la fase acuosa careció de NH_4OH. Después se bombeó la *FM* hacia la columna mientras que la misma está rotando a una ω óptima para producir la separación de la muestra indicada en la figura 3.7b, la misma ilustra una porción de la columna de separación distribuida de igual que en la figura 3.6.

Los tres analitos ácidos S_1, S_2 y S_3,[†††] forman competitivamente zonas de solutos detrás de la frontera ácida del TFA, tal como se describió anteriormente en la figura 3.6, según su pK_a e hidrofobicidad. Entre éstos, S_1, de menor pK_a e hidrofobicidad, está situado inmediatamente detrás de la frontera del TFA, mientras que S_3, con el mayor pK_a e hidrofobicidad está situado en el final de la zona S_2. Lo anterior se debe a que la transferencia de protones tiene lugar en los bordes de las fronteras ácidas de los diferentes analitos gobernadas por las diferencias de pH de las zonas vecinas e indicadas por las flechas curvas de la figura 3.7b. Luego de establecido el equilibrio hidrodinámico, todos los analitos avanzan de acuerdo al *F* establecido por la frontera ácida del retenedor, y mantienen su separación y pH entre sí, Fig. 3.7c.

[†††] S_1, S_2 y S_3 tienen mayor pK_a e hidrofobicidad que el TFA.

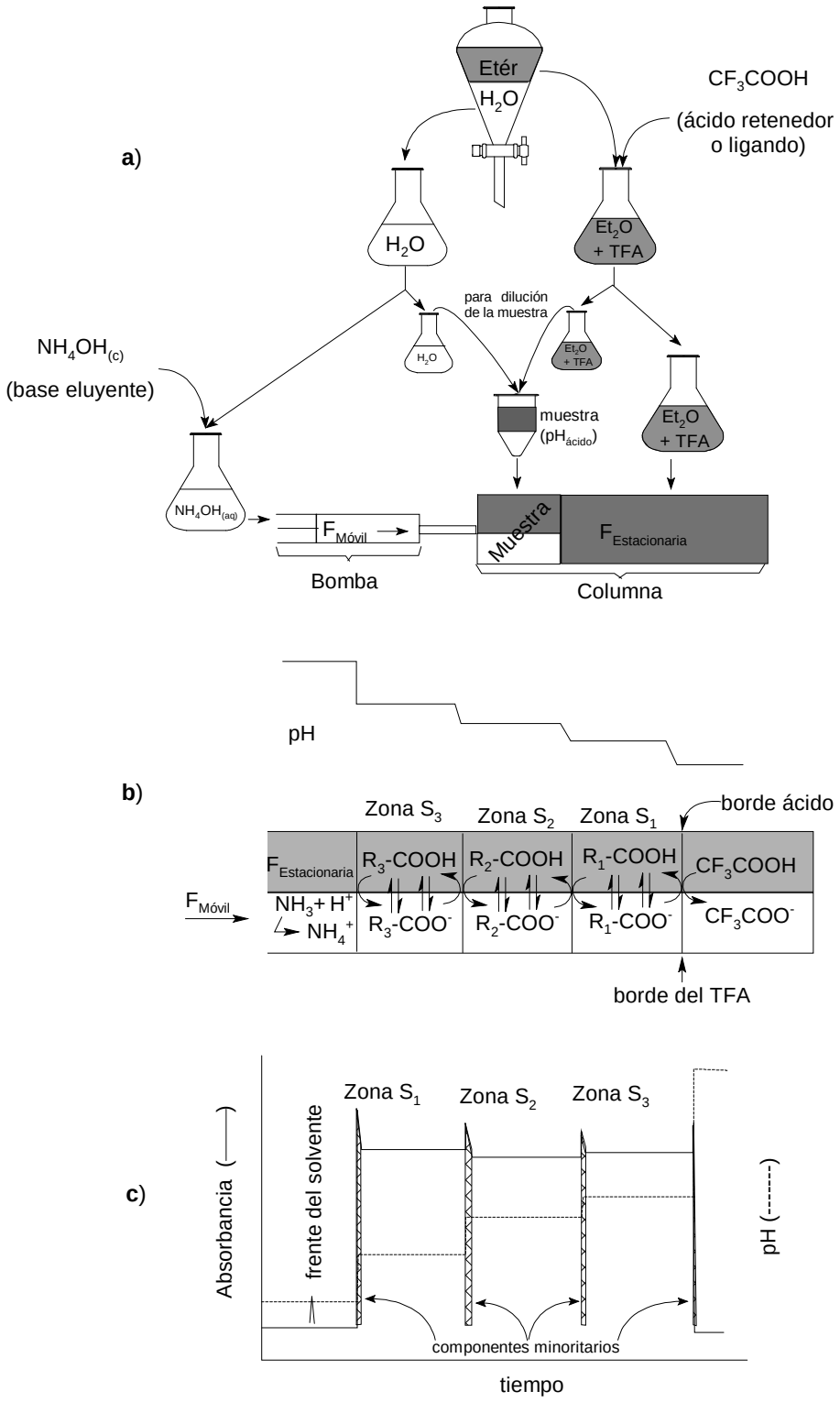


Figura 3.7. Experimento modelo para demostrar el mecanismo de la técnica de Refinamiento de la Zona de pH en CCC; ***a***) preparación del sistema de solventes y disolución de la muestra para la separación de analitos ácidos, ***b***) formación de la zona de pH de tres analitos en la columna y ***c***) perfil de elución de los analitos.[5]

Considerando al TFA como un soluto (o analito) en la *FE*, cuyo pK_a es menor que los respectivos pK_a de los analitos S_1, S_2 y S_3, el mismo convierte totalmente a los ácidos S_1, S_2 y S_3 en su forma protonada (RCOOH) y cuando la *FE* hace contacto con la *FM*, que contiene NH_4OH, ocurre la siguiente reacción ácido-base:

$$CF_3COOH + NH_4OH \rightarrow CF_3COO^- + NH_4^+ + H_2O$$

Es decir, el TFA se convierte en el anión trifluoroacetato (CF_3COO^-) que pasa a la FM y avanza en su separación. De modo que, el ácido S_1 (R_1COOH) en la *FE* se convierte en la sal ($R_1COO^-NH_4^+$) y es transferido a la *FM* siguiendo la frontera ácida del TFA. Éste hecho se repite para los ácidos S_2 y S_3 detrás de los bordes S_1 y S_2 respectivamente, y así forman las zonas S_1, S_2 y S_3.

Los componentes minoritarios cargados presentes en cada zona son eficientemente eliminados, hacia adelante o hacia atrás, según pK_a e hidrofobicidad y eventualmente se acumulan en los límites de la zona (haciendo posible su detección). Por lo tanto, los tres analitos eluyen como tres picos rectangulares con picos de impurezas (componentes minoritarios) en sus estrechos límites según lo ilustrado en figura 3.7c.

3.5.2. Selección-optimización del sistema de solventes para la técnica de refinamiento de la zona de pH

La selección del sistema de solventes y la preparación de la muestra es diferente de la técnica estándar HSCCC, ya que en esta técnica de refinamiento de zona de pH, la selección del sistema de solventes para analitos ácidos, se diferencia de la siguiente manera:

1) Basificar con la base eluyente[‡‡‡] (pH ≥ 10) una mezcla de 2 mL de cada fase del sistema de solventes; luego agregar la muestra, agitar y llevar a equilibrio de fases, verificar pH básico.
2) Tomar una porción de cada fase (100 μL) y determinar $K_{C(FS/FI)}$ denominado $K_{C(base)}$.
3) Sí $K_{C(base)}$ « 1, agregar retenedor ácido[§§§] y llevar a pH < 2, reequilibrar y tomar una porción para determinar $K_{C(FS/FI)}$ denominado $K_{C(ácido)}$.
4) Sí $K_{C(ácido)}$ » 1, el sistema de solventes es adecuado para la separación.
5) Sí $K_{C(base)}$ no es lo suficientemente menor que uno, se debe repetir todo el procedimiento con un sistema de solventes más hidrofóbico.
6) Sí $K_{C(ácido)}$ no es lo suficientemente mayor a uno, se debe repetir todo el procedimiento con un sistema de solventes más hidrofílico.

Para analitos básicos el primer paso, descrito para analitos ácidos, debe ser la acidificación del sistema de solventes para determinar $K_{C(ácido)}$ « 1 (pH ≤ 2) y, en el cuarto paso el pH debe ser básico de modo que $K_{C(base)}$ » 1 (pH ≥ 10).

Las concentraciones típicas de retenedor y eluyente son de 10-20 mM. La concentración del eluyente determina la concentración de las fracciones recolectadas. Es decir, sí la concentración del eluyente es mayor a la concentración del retenedor las fracciones colectadas serán mas concentradas

[‡‡‡] Típicamente NH_4OH, $NaHCO_3$, Na_2CO_3, NaOH ó TEA.
[§§§] Típicamente TFA, RCO_2H (R= H, Me, Et, *n*-Pr), HCl.

que las obtenidas con concentraciones equimolares de retenedor y eluyente, dando por resultados tiempos de análisis más cortos que los tiempos requeridos con concentraciones iguales de eluyente y retenedor. Por otra parte, sí la concentración del eluyente es menor que la del retenedor, el tiempo de análisis será mayor que cuando ambas concentraciones son iguales. Concentraciones mayores de eluyente y retenedor (40 mM) pueden inducir la pérdida FE causada por la precipitación del analito debido a su elevada concentración o a su escasa solubilidad en la FE. De modo que, en la optimización del sistema de solventes es recomendable iniciar con concentraciones equimolares de retenedor y eluyente ≤ 20 mM, a menos que la revisión bibliográfica indique la utilidad de concentraciones mayores en la separación de componentes similares en estructura a los metabolitos objeto de estudio.

Capítulo 4

DIABETES MELLITUS

4.1. Metabolismo de la Glucosa

La suma de todas las reacciones químicas necesarias para mantener la vida se denomina metabolismo, éstas reacciones se llevan a cabo en el interior de la célula. La glucosa se transforma (cataboliza) en compuestos más sencillos liberando energía en forma de ATP. Una de las vías de degradación de glucosa es la glucólisis, en la que la molécula de glucosa por la acción de diferentes enzimas se convierte en dos moléculas de piruvato en presencia de oxígeno, o en dos de lactato en ausencia de éste.

Las células pueden obtener energía de otras moléculas distintas de la glucosa, por ejemplo otros monosacáridos, grasas y proteínas. El proceso de captación de glucosa por las células es regulado por las hormonas secretadas por el páncreas, el cual posee tanto una función endocrina como exocrina. Exocrinamente libera enzimas al tracto digestivo, mientras que endocrinamente se secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo para coordinar y regular el metabolismo intermediario.

Las células endocrinas están agrupadas dentro de los islotes de Langerhans, que son pequeños grupos celulares esferoidales compactos entre el tejido exocrino. Existen cuatro tipos principales de células endocrinas. Las α (o A o A2) que secretan glucagon, las β (o B) que secretan insulina y también un antagonista de la insulina denominado amilina, y constituyen la mayoría de células

en el islote, las δ (o D o A1) que secretan somatostatina y las PP (o F) que secretan el polipéptido pancreático.

La insulina y el glucagon son las hormonas más importantes en el control de los niveles de glucosa en sangre, juntas ayudan a mantener casi constante éste nivel. Cuando el nivel de glucosa en sangre se eleva, (debido por ejemplo a la ingesta de alimento), se libera la insulina, que es la responsable de que las células del cuerpo absorban la glucosa, es decir, facilita el paso de la glucosa desde la sangre a las células musculares y adiposas, por medio de la proteína trasportadora GLUT4, la glucosa después de entrar a la célula, se convierte en glucosa-6-fosfato por medio de la acción de una enzima que dependiendo del tejido puede ser la hexoquinasa (todos los tejidos menos hígado) o la glucoquinasa (hígado), la G-6-P después de múltiples reacciones, es convertida en dióxido de carbono y agua (CO_2 y H_2O), obteniéndose energía química en el proceso (catabolismo). La insulina incrementa la velocidad de las vías metabólicas que utilizan glucosa, tales como la glicólisis y la gluconeogénesis. La glucosa desaparece rápidamente hacia el interior de la célula, y es necesario que nuevas moléculas de glucosa difundan hacia la sangre a la misma velocidad. O bien activa el proceso de gluconeogénesis de manera de almacenar glucosa en forma de glucógeno para su uso en ayuna. Si los niveles de glucosa en sangre son bajos se libera el glucagon, una hormona que estimula al hígado para que éste libere glucosa al torrente sanguíneo sea por vía gluconeogénesis o vía glucogenólisis,[197-198] ambos caminos en su fase final están catalizados por la acción de la enzima G-6-Pasa que se encarga de degradar a la G-6-P proveniente de ambas vías a glucosa y Pi (ver figura 4.1).

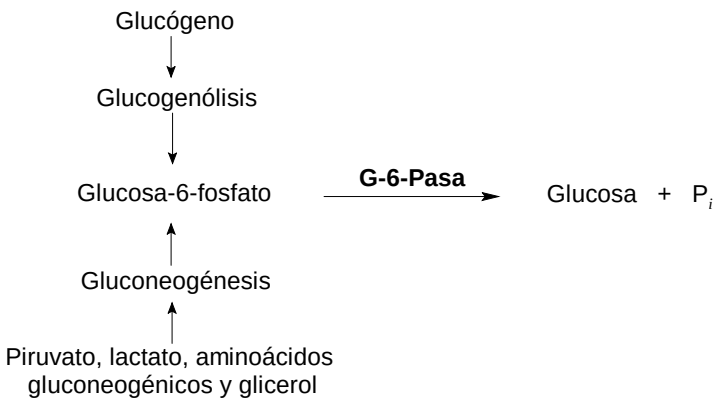


Figura 4.1.- Principales vías para la producción de glucosa en ayunas.[197,198]

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

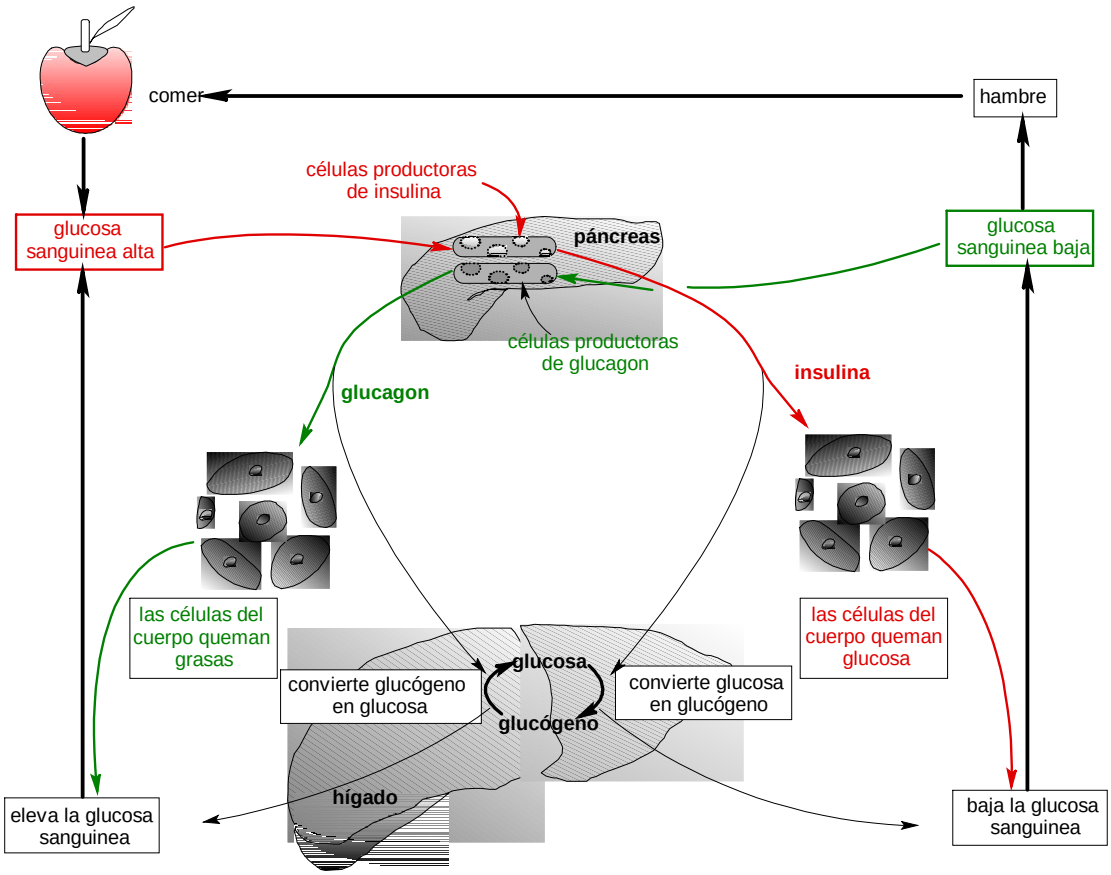


Figura 4.2.- Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo.[199]

Los defectos en la producción, liberación o recepción de la insulina, desfavorecen la entrada de glucosa a la célula, la respuesta del organismo ante ésta condición es incrementar la secreción de glucagon y en consecuencia se activan los mecanismos de glucogenolísis y gluconeogénesis. En ambos, la reacción final es catalizada por la enzima G-6-Pasa, la cual hidroliza la G-6-P a glucosa y Pi como consecuencia de la falta de utilización y del incremento en la producción de glucosa, la glicemia se eleva y se hacen evidentes los síntomas y signos de la diabetes (es decir, el organismo no responde a éste defecto como una concentración de glucosa en la sangre que no logra entrar a la célula, sino que responde como si en realidad los niveles de azúcar en la sangre sean bajos por lo que se activan los mecanismos productores de glucosa en el organismo y se produce el alza de los niveles de glucosa en sangre).

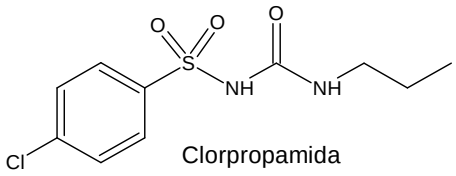
En términos más concretos, la diabetes o DM (derivado del Latín *diabētes* que significa 'correr a través' y mellitus que significa miel) es una enfermedad crónica debida a que el páncreas no produce insulina suficiente o a que el organismo no la puede utilizar eficazmente. Como consecuencia se producen alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, se presentan complicaciones renales y oculares, así como afección de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía.[199]

4.2. Diabetes Mellitus, DM

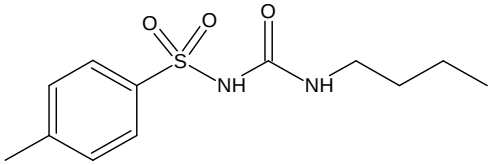
La DM está caracterizada por una elevada concentración de glucosa (hiperglicémia) en el plasma como resultado de una insuficiencia en la producción de insulina, a una acción ineficaz de la misma o ambas.[1,200] Existen tres tipos de diabetes:[1]

- **Diabetes tipo-1**: Conocida como diabetes insulino-dependiente (IDDM) o de inicio en la juventud. En este tipo de diabetes el páncreas produce poca o ninguna insulina.
- **Diabetes tipo-2**: También conocida como diabetes no-insulino dependiente (NIDDM) o de inicio en la edad adulta (usualmente a partir de los 45 años). Las personas con este tipo de diabetes presentan una combinación de resistencia a la insulina y a un defecto en su producción.
- **Diabetes Gestacional**: Este tipo de diabetes sólo afecta a mujeres embarazadas y generalmente desaparece al finalizar el embarazo. Sin embargo, las mujeres que presentan este tipo de diabetes tienen una elevada probabilidad de desarrollar diabetes tipo-2.

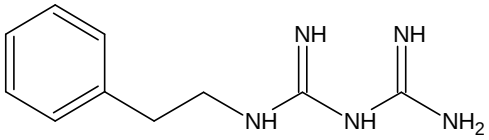
El tratamiento para la diabetes tipo I es la administración exógena de la hormona insulina, mientras que en el tratamiento de la diabetes tipo II se utilizan drogas que estimulan la producción de insulina en el páncreas, como las sulfonilúreas (Clorpropamida, Tolbutamida), las que disminuyen la producción de glucosa como las biguanidinas (Metformin, Phenformin)[4] o las que inhiben la absorción intestinal de los carbohidratos como la acarbosa.[201]



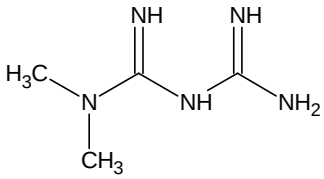
Clorpropamida
(sulfonilurea)



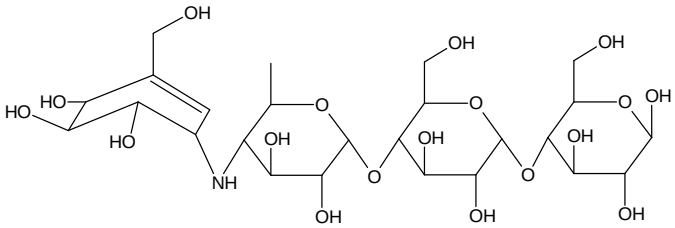
Tolbutamida



Phenformin
(biguanidina)

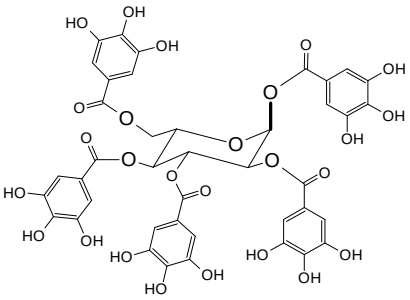


Metformin

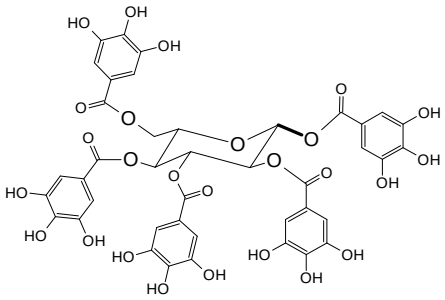


Acarbosa

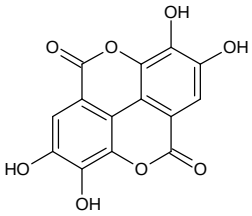
Los anómeros α- y β- del producto natural 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil-D-glucopiranosa (PGG) presentan actividad hipoglicemiante debido a que se une a los receptores de insulina y activa los transportadores mediadores de glucosa.[202] Dichos anómeros corresponden al grupo de taninos frecuentemente presentes en plantas,[203] al igual que el ácido elagico, dímero del ácido gálico, tienen propiedades antidiabéticas.[202,204]



α -pentagaloilglucosa (~**-PGG**)



β -pentagaloilglucosa (**-PGG**)



Ácido Elágico (**AE**)

Numerosos estudios muestran que la producción de glucosa hepática en pacientes diabéticos tipo-2 está incrementada en estados post-absortivos, y está directamente relacionado con una hiperglicémia rápida. Por otra parte, se ha reconocido que un incremento gradual de la supresión impartida en estados post-prandiales es el principal contribuyente de la producción de glucosa hepática y quizás el mayor mecanismo responsable del incremento de la hiperglicémia en estados diabéticos. El incremento de la producción de glucosa hepática tiene la función de estabilizar la hiperglicémia en pacientes diabéticos tipo-2 en ambos estados, post-absortivos y post-prandiales, de modo que, el desarrollo de nuevas drogas para evitar éste incremento ofrece una esperanza en el tratamiento de la diabetes. Las dos vías más importantes en la producción de glucosa hepática son la glucogenolísis (degradación del polímero glucógeno) y la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de precursores con 3 átomos de carbono). En la figura 4.3 se presentan algunos aspectos del metabolismo de la glucosa a nivel hepático.[4]

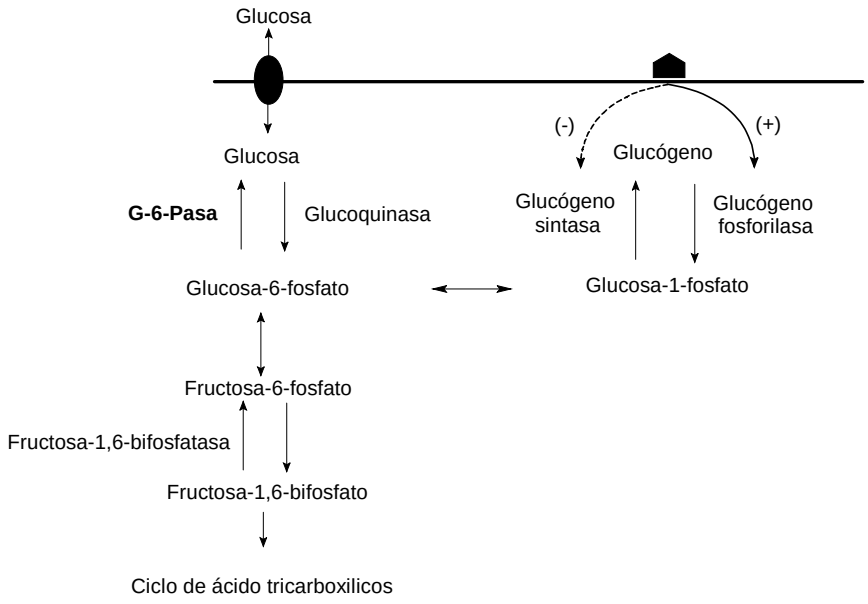


Figura 4.3.- Metabolismo de glucosa a nivel hepático.[4]

4.2.1. Glucosa-6-Fosfatasa (G-6-Pasa)

La G-6-Pasa es la enzima (EC 3.1.3.9) que cataliza el paso final tanto para neoglucogénesis como de la glucogenolísis, ya que ambas rutas metabólicas tienen en común la formación de G-6-P, por lo que sus productos de hidrólisis son glucosa y Pi.

$$\text{G-6-P} \xrightarrow{\textbf{G-6-Pasa}} \text{Glucosa} + P_i$$

La enzima G-6-Pasa, esta localizada en el retículo endoplasmático (RE) y en la envoltura nuclear del hígado, riñón y en los islotes de células pancreáticas.[205] Ha sido descrita por Burchell y Waddell[3] como un sistema multicomponente formado por cinco polipéptidos: la subunidad catalítica (SUC), una proteína estabilizadora (SP, por sus siglas en inglés, Stability Protein) y tres transportadores T1, T2 y T3 (Fig. 4.4). T1 trasporta G-6-P hacia el lumen del RE, mientras que los productos de la reacción enzimática, Pi y glucosa, salen del lumen del RE mediados por T2 y T3 respectivamente. T2 también es capaz de trasportar pirofosfato (PPi) y carbamoilfosfato.[206] La enzima y sus trasportadores son blancos potenciales para terapias antidiabéticas.[4] El ácido clorogénico[4] es un inhibidor específico de T1 (IC_{50}= 226 μM en microsomas de hígado de ratas), floricina también es un inhibidor de T1 (IC_{50}= 466 ± 19 μM) al igual que los flavonoides aislados de *Bauhinia megalandra* quercetin-3-*O*-α-(2″-galoil)-ramnosa (IC_{50}= 27 ± 1 μM) y kaempferol-3-*O*-α-(2″-galoil)-ramnosa (IC_{50}= 31 ± 2 μM).[206]

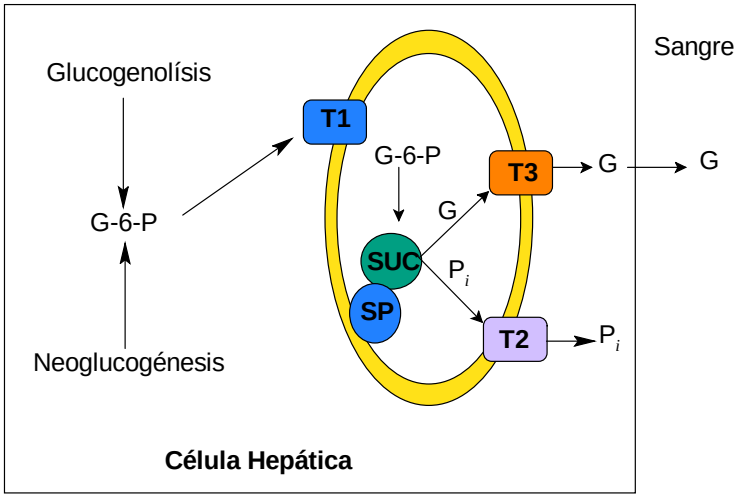
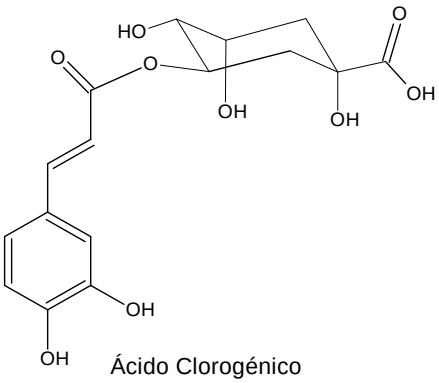
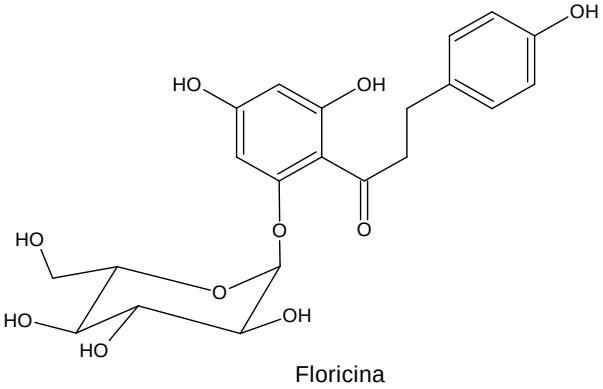


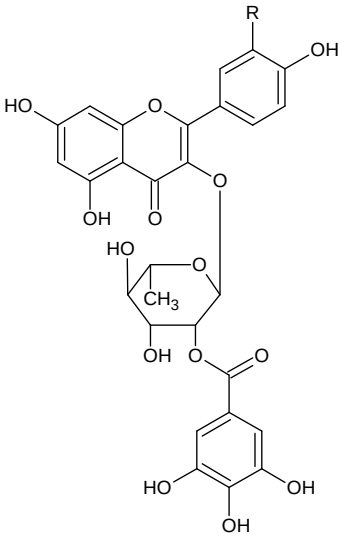
Figura 4.4.- Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática.[3]



Ácido Clorogénico



Floricina



R

OH Quercetin-3-*O*-α-(2”-galoil)-ramnosa

H Kaempferol-3-*O*-α-(2”-galoil)-ramnosa

4.3. Absorción Intestinal de Glucosa

La absorción intestinal de glucosa requiere la participación del co-transportador Na^+-glucosa (SGLT1) presente en la membrana apical del enterocito, y del transportador de glucosa GLUT2 en la membrana basal de la misma célula (Fig. 4.5). La reducción de la absorción de glucosa puede ser útil en el control de la hiperglicémia en pacientes diabéticos. Actualmente se utiliza acarbosa (pág. 90), debido a que inhibe la digestión de carbohidratos, y por lo tanto su absorción. La acción de SGLT1 es inhibida por polifenoles, flavonoides e isoflavonoides.[201]

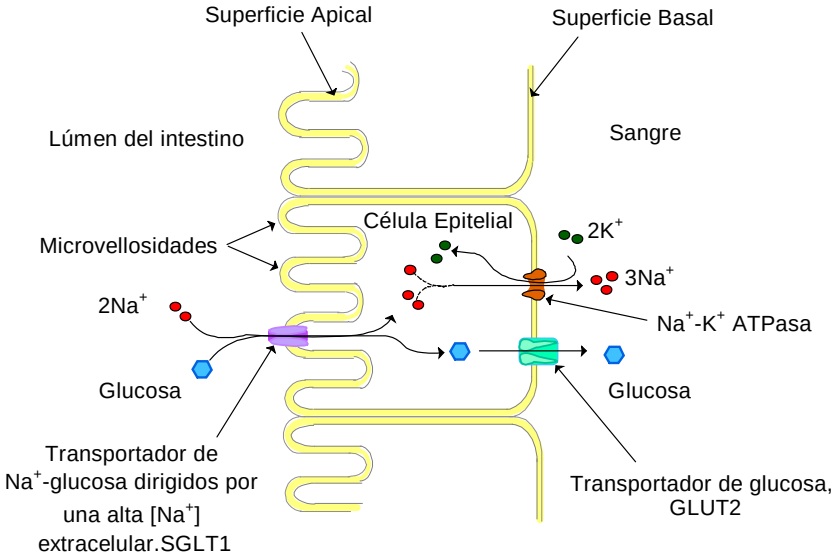


Figura 4.5.- Transporte de glucosa en células epiteliales del intestino (SGLT1). La glucosa es cotransportada con Na^+ a través de la membrana plasmática apical hacia el interior de la célula epitelial. Se mueve a través de la célula hasta la superficie basal de la misma, en donde pasa a la sangre vía GLUT2, un transportador pasivo de glucosa. La Na^+-K^+ ATPasa continúa bombeando Na^+ hacia fuera de la célula para mantener el gradiente de Na^+ que dirige la incorporación de glucosa.

Capítulo 5

SINTESIS DE PRODUCTOS NATURALES

El campo de la síntesis total de productos naturales ha evolucionado dramáticamente en los últimos 60 años, debido sustancialmente a los esfuerzos de estrategia basados en química orgánica, junto con mejoras notables en formación de nuevos enlaces.[207] Adicionalmente, el interés en la síntesis de productos naturales también ha sido impulsado por el reconocimiento de que muchas clases de agentes farmacéuticos importantes derivan de productos naturales.[208] Por ello, la comunidad científica está interesada en la búsqueda de nuevas drogas de origen sintético o natural para el tratamiento de diversas enfermedades que aquejan al hombre. Entre ellas destaca la diabetes mellitus la cual afecta a muchas personas alrededor del mundo (sección 4.2). Aún cuando existen diversos blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes, la presente investigación está enfocada en la inhibición de la enzima G-6-Pasa (sección 4.2.1).

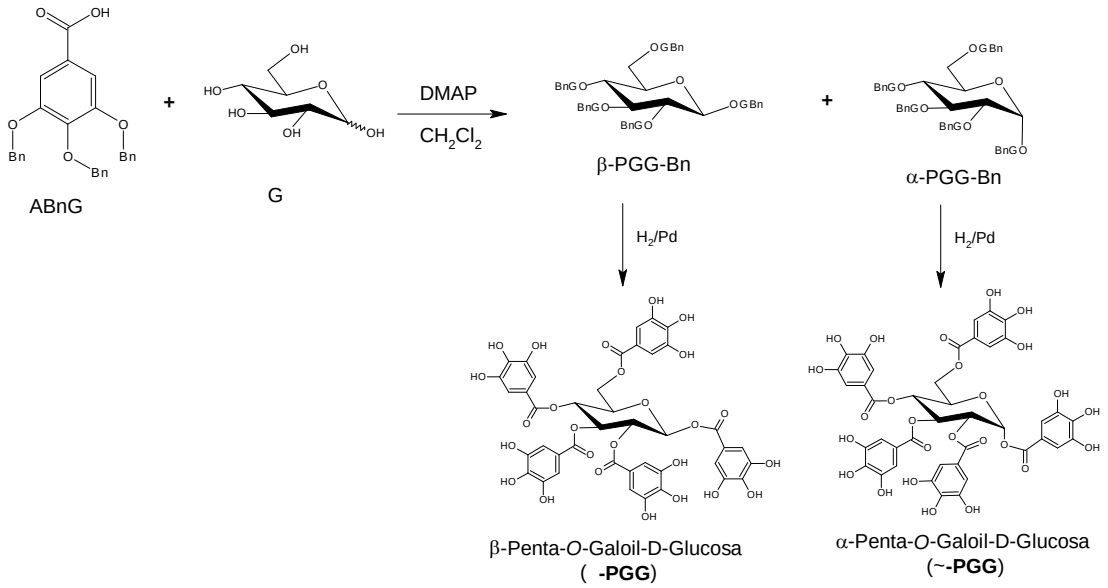
Algunos extractos de plantas han sido utilizadas satisfactoriamente por la medicina tradicional para el control de la diabetes, hecho por el cual los productos naturales han sido considerados como posibles drogas antidiabéticas.[209,210]

Las propiedades antidiabéticas reportadas para los productos naturales α- y β-pentagaloilglucosa[211] no estan asociadas a ensayos de inhibición de la G-6-Pasa pero si lo están para el ácido elágico.[204] Estas observaciones motivaron la

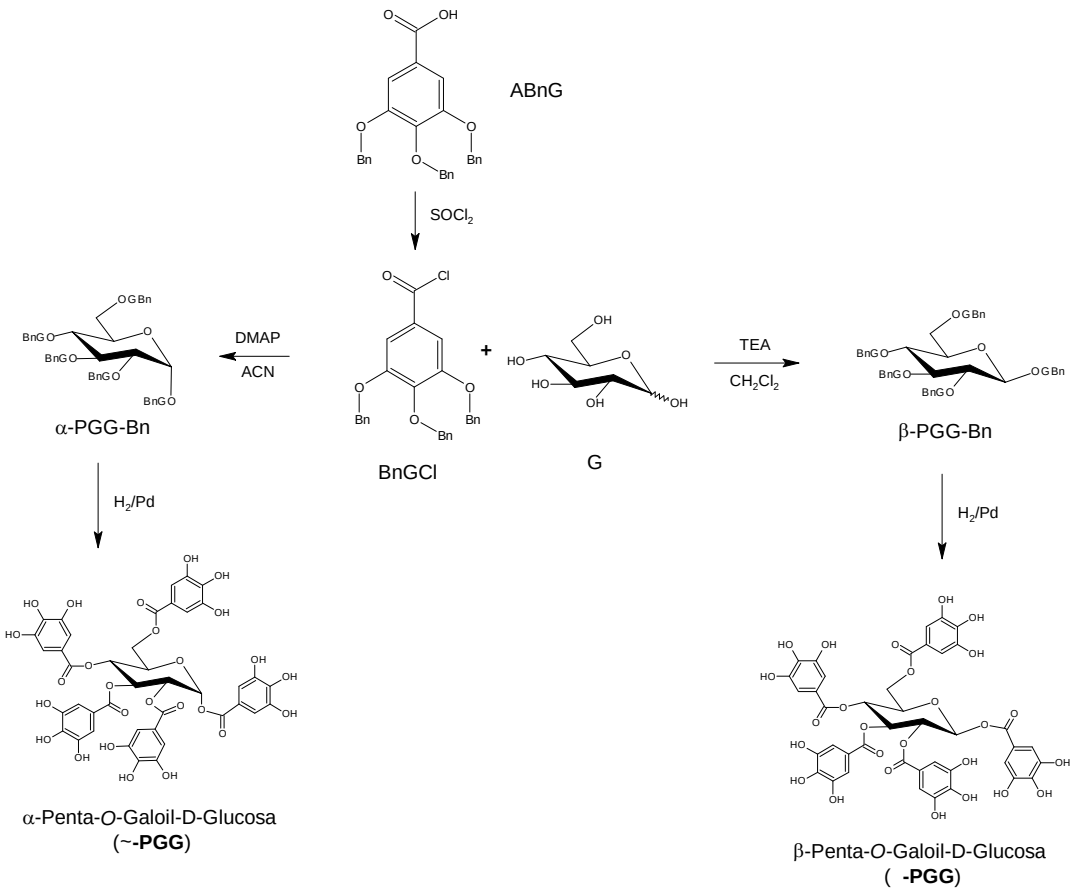
realización de la síntesis total de estos compuestos y su evaluación biológica sobre el sistema enzimático objeto de estudio. Para ello, fue necesario la revisión bibliográfica relacionada a los diferentes métodos sintéticos para la obtención de los mismos, la cual esta descrita en las siguientes secciones.

5.1. Pentagaloilglucosa: síntesis total

La síntesis total de los anómeros α- y β-pentagaloilglucosa ha sido reportada por varios grupos de investigación y la ruta sintética mas empleada (esquemas 5.1 y 5.2) involucra, entre otros reactivos, derivados de ácido gálico y catalizadores básicos como: piridina (py),[212] trietilamina (TEA),[213] tetrametiletilendiamina (TMEDA)[212] y dimetilaminopiridina (DMAP).[214]

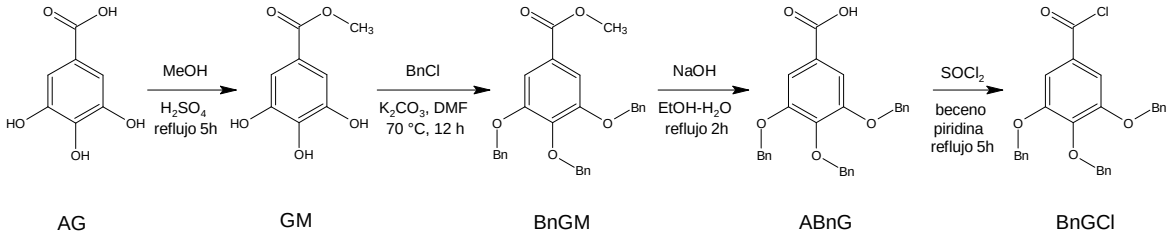


Esquema 5.1.- Ruta sintética comúnmente reportada para la obtención de los anómeros α- y β-pentagaloilglucosa a partir del ácido *tri-O*-Bencilgálico.

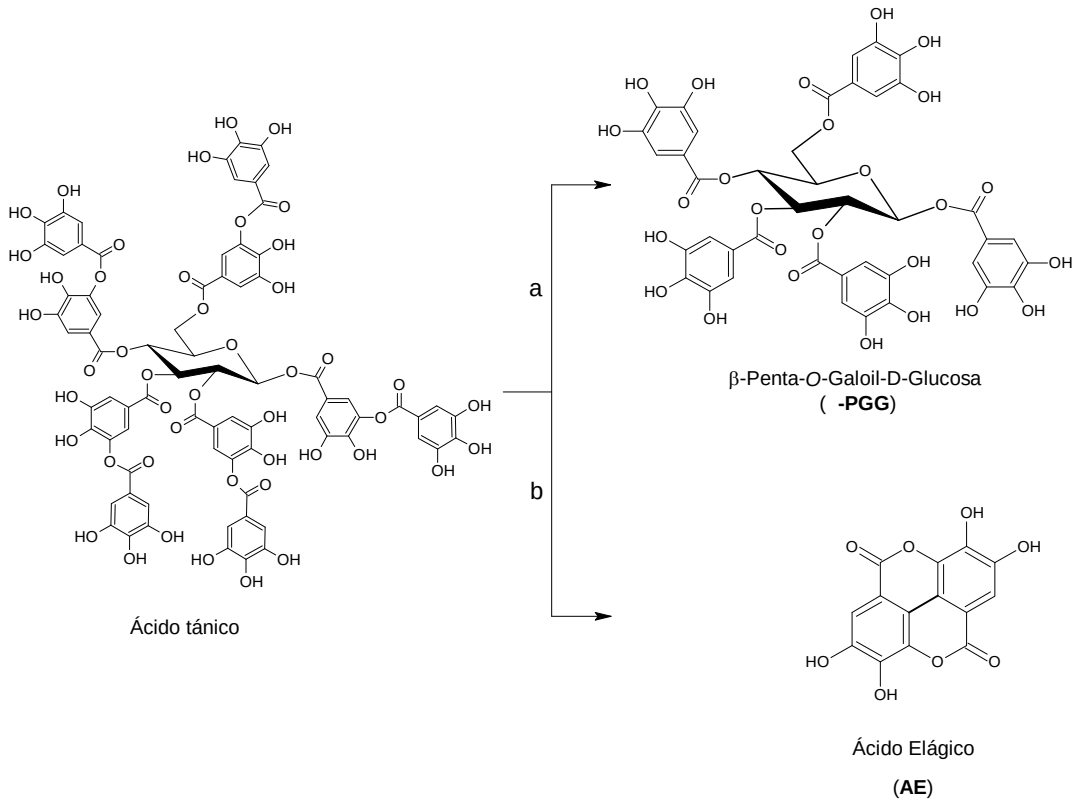


Esquema 5.2.- Ruta sintética comúnmente reportada para la obtención estereoselectiva de los anómeros α y β de pentagaloilglucosa a partir del cloruro de acilo del ácido *tri-O*-Bencilgálico.

Los derivados de ácido gálico empleados en las rutas sintéticas reportadas (esquemas 5.1 y 5.2) se han producido por diferentes metodologías, siendo la más común la representada en el esquema 5.3.



Esquema 5.3.- Reacciones comúnmente reportadas para la obtención del ácido *tri-O*-bencilgálico (ABnG) y su derivado acílico (BnGCl).



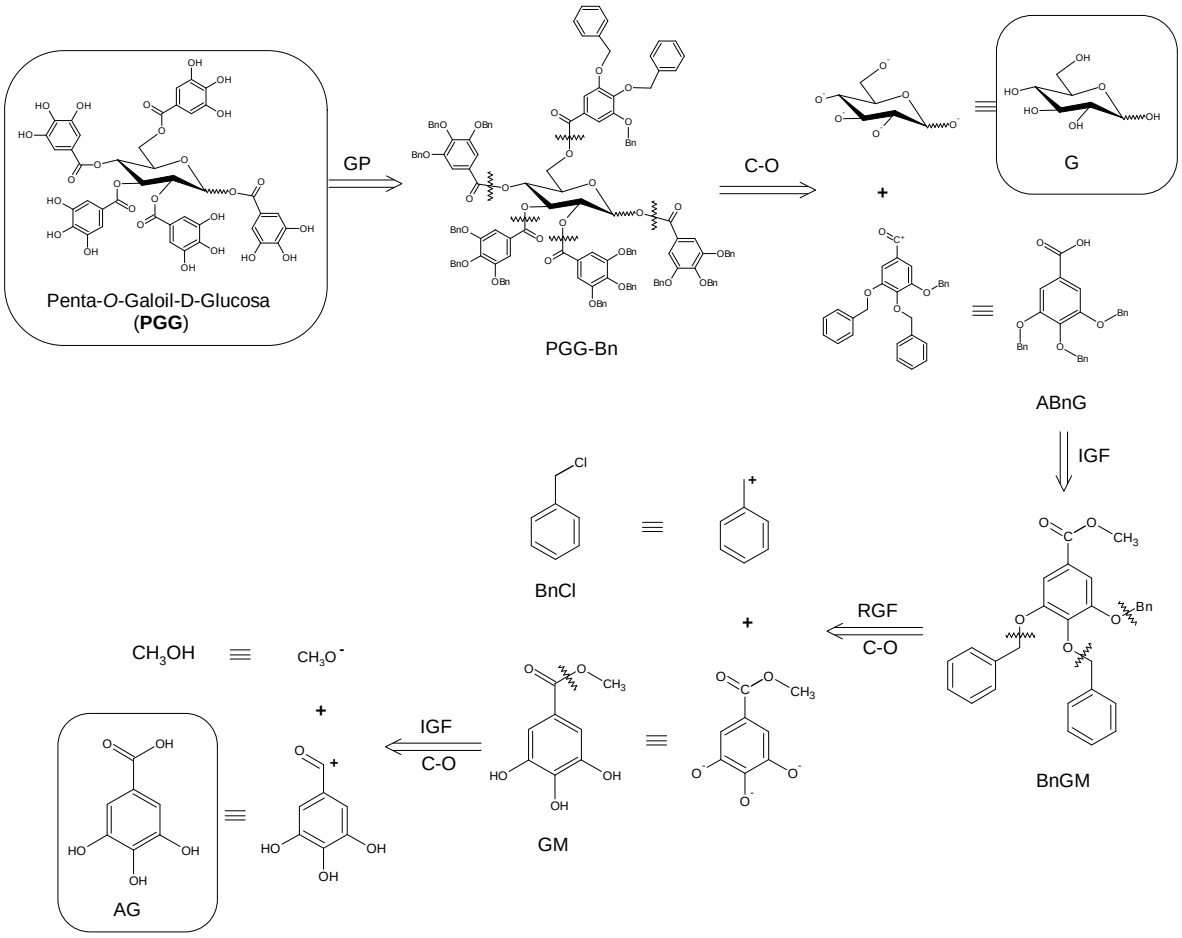
Esquema 5.4.- Reacciones reportadas para la obtención de β-pentagaloilglucosa y ácido elágico a partir de ácido tánico: a) MeOH/Bufer AcONa/AcOH, pH 5; b) $H_2SO_{4(ac)}$.

Por otra parte, la producción industrial del anómero β-PGG se realiza por procesos semisintéticos a través de la metanólisis del ácido tánico,[215] éste último también es la materia prima para la producción de ácido elágico (AE),[216] el cual es un dímero del ácido gálico cuya unidad es la base de los anómeros α- y β-PGG, esquema 5.4.

5.1.1. Pentagaloilglucosa: análisis retrosintético

Conociendo que en la síntesis total reportada para los anómeros α- y β-PGG (esquemas 5.1 y 5.2) se utilizaron derivados de ácido gálico (AG) y glucosa (G) se realizó un análisis retrosintético de los anómeros PGG hasta la obtención de AG y G como materiales de partida (esquema 5.5). Por lo que, se propone como primer paso de retrosíntesis la protección de los grupos funcionales (PGF)

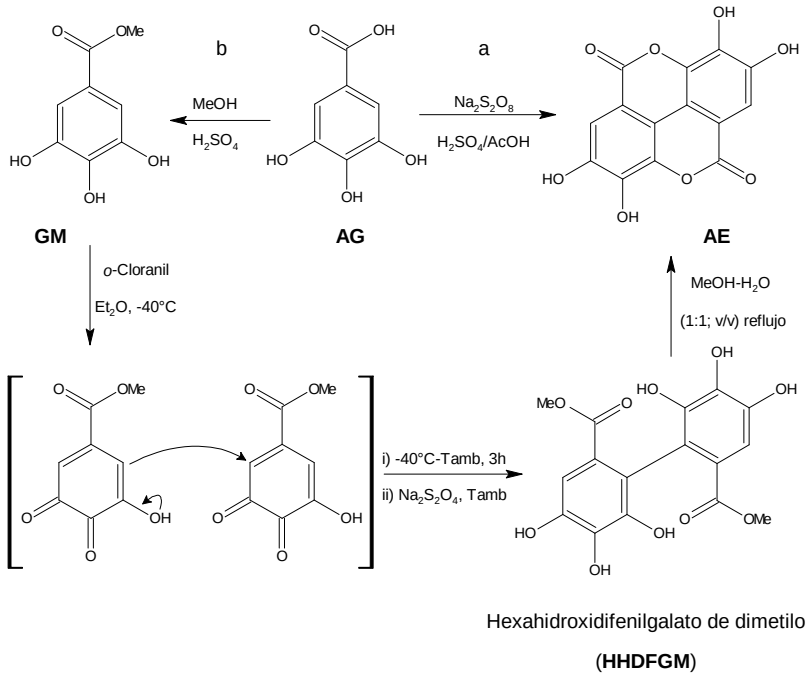
del tipo fenólico con grupos protectores (GP) de fácil remoción, como el bencilo (Bn-) lo que da origen a los anómeros protegidos, denominados PGG-Bn, sobre los cuales se puede realizar una desconexión carbono-oxígeno (C-O) dando origen a sintones que pueden ser fácilmente asociados a glucosa (G) y al ácido 3,4,5- *tri*-Bencilgálico (ABnG). Sobre éste último se realiza una interconversión de grupo funcional (IGF) del ácido a su ester metílico, denominado BnGM. La remoción de grupo funcional (RGF) realizada a través de la desconexión C-O sobre los éteres bencilicos proporciona sintones que pueden ser asociados a un haluro de bencilo y al galato de metilo (GM), éste a su vez sometido a una nueva IGF se obtiene como resultado al metanol y al AG como materiales de partida (esquema 5.5).



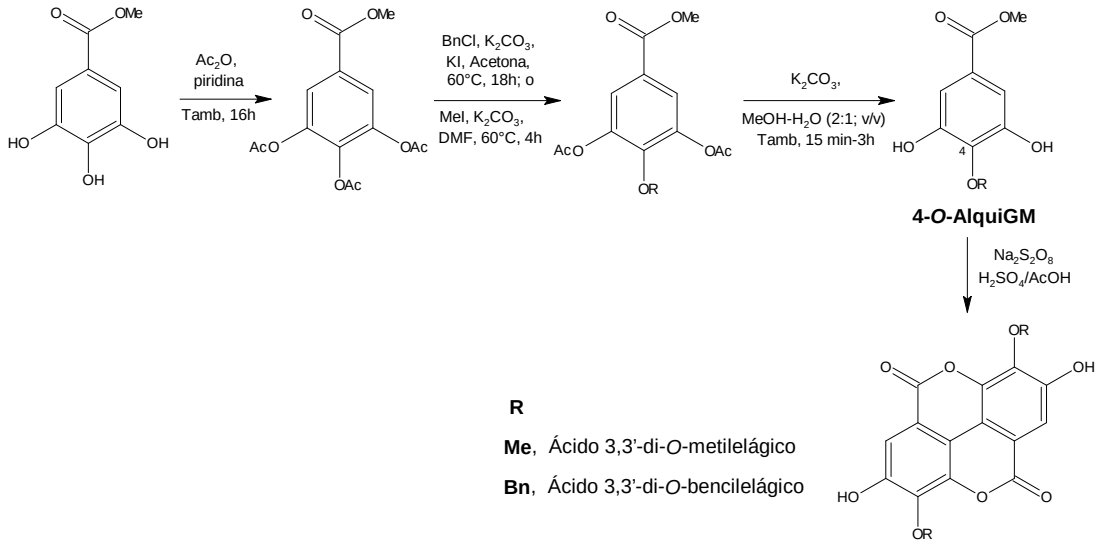
Esquema 5.5.- Análisis retrosintético propuesto para los anoméros α- y β-PGG.

5.2. Ácido Elágico y derivados alquílicos: síntesis total

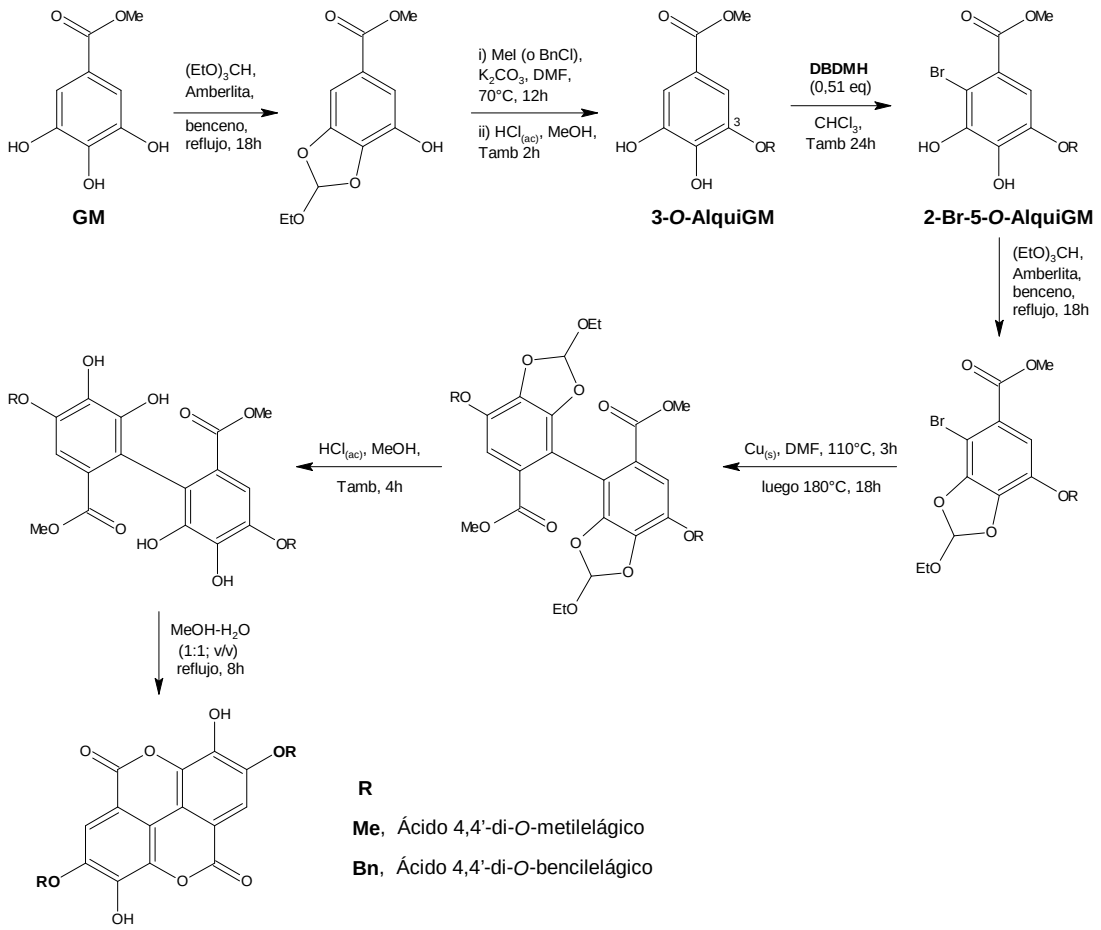
El ácido elágico es un dímero del ácido gálico, cuya síntesis total ha sido abordada eficientemente por diversos grupos de investigación.[216-221] Aun cuando la obtención de éste compuesto se puede realizar a nivel industrial partiendo de ácido tánico,[216] la preparación sintética mas reciente de este metabolito fue realizada a partir del anómero α-pentagaloilglucosa[214] con un 50% de rendimiento, sin embargo, la ruta sintética a partir de ácido gálico, para la obtención de α-PGG involucra multiples pasos sintéticos (esquema 5.2) que a menudo disminuyen el rendimiento total en la producción del compuesto de interés. Por otra parte, la síntesis de ácido elágico ha sido reportada a partir de ácido gálico,[217] (esquema 5.6) galato de metilo[218,219] (esquemas 5.6 y 5.7) y derivados alquílicos de galato de metilo (esquemas 5.7 y 5.8).[218,220] También ha sido realizada a través de la formación de bifenilos de galato de metilo no-sustituido[218,219] (esquema 5.6) y sustituido simétricos[218,] (esquema 5.9 y 5.10) y no-simétricos.[221]



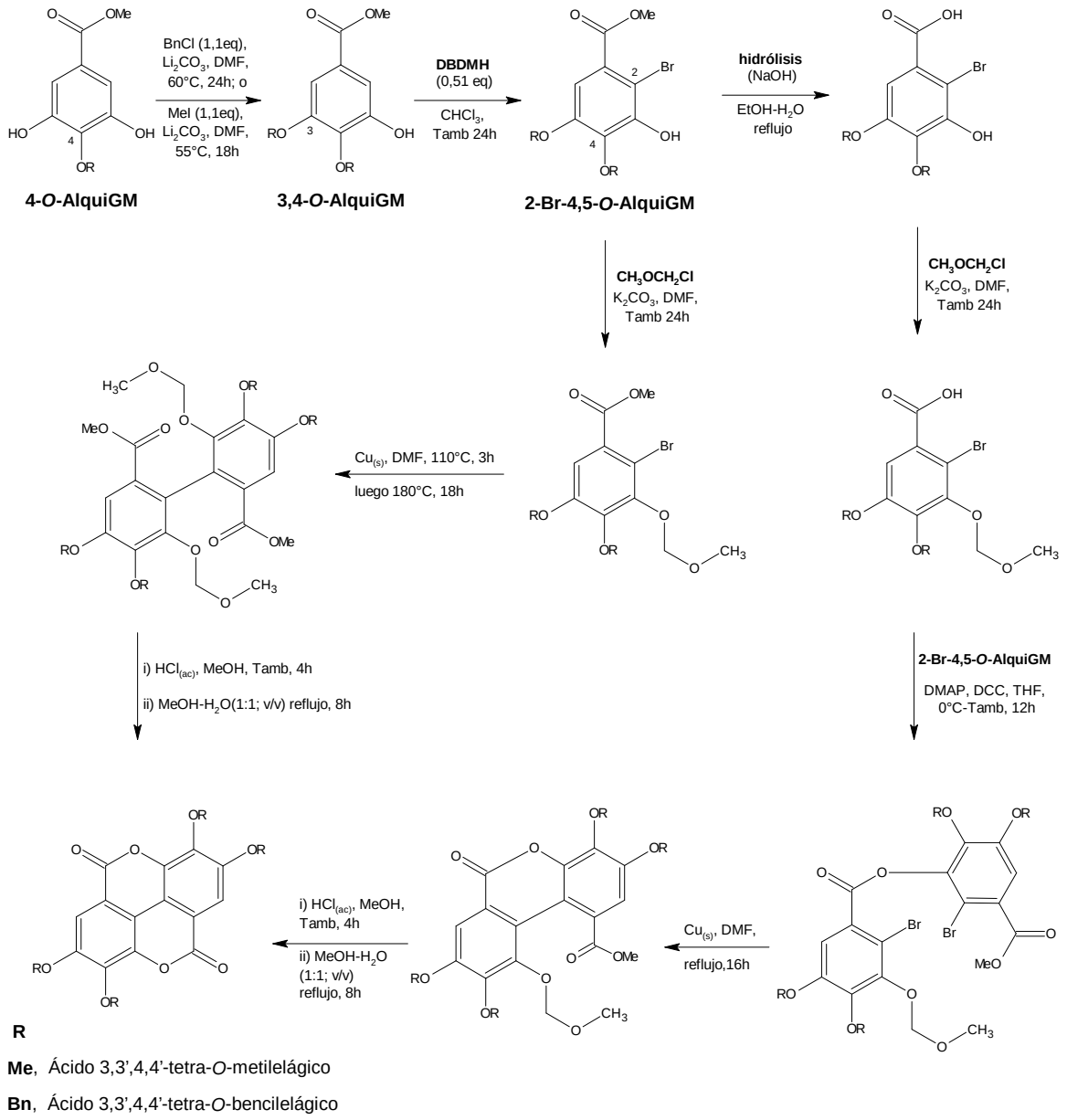
Esquema 5.6.- Rutas de síntesis total reportadas para ácido elágico (AE): **a**) a partir de ácido gálico (AG) y; **b**) a partir de galato de metilo (GM).



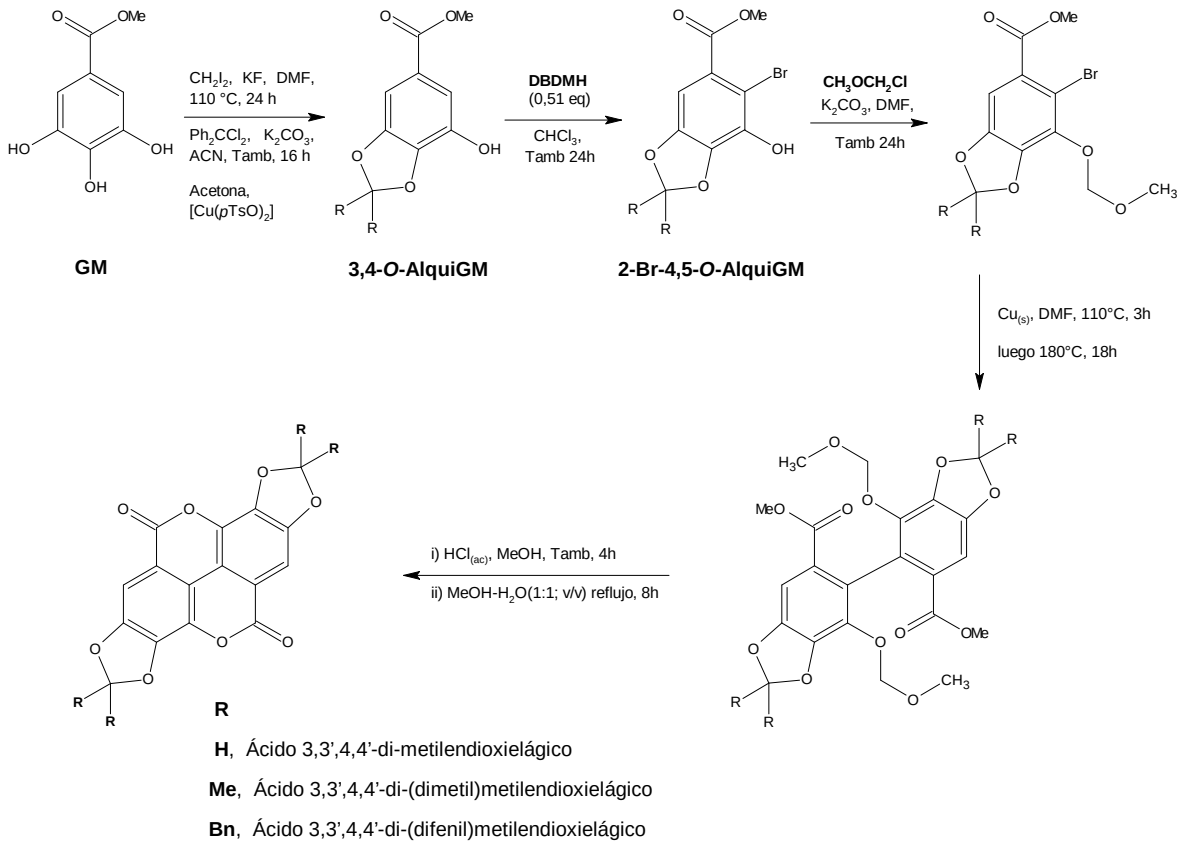
Esquema 5.7.- Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados ácido 3,3′-di-*O*-alquilelágico a través del 4-*O*-alquigalato de metilo.



Esquema 5.8.- Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados ácido 4,4′-di-*O*-alquilelágico a través del 3-*O*-alquigalato de metilo.



Esquema 5.9.- Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados del ácido elágico con sustituyentes monodentados a través de la formación de bifenilos a partir de galato de metilo.



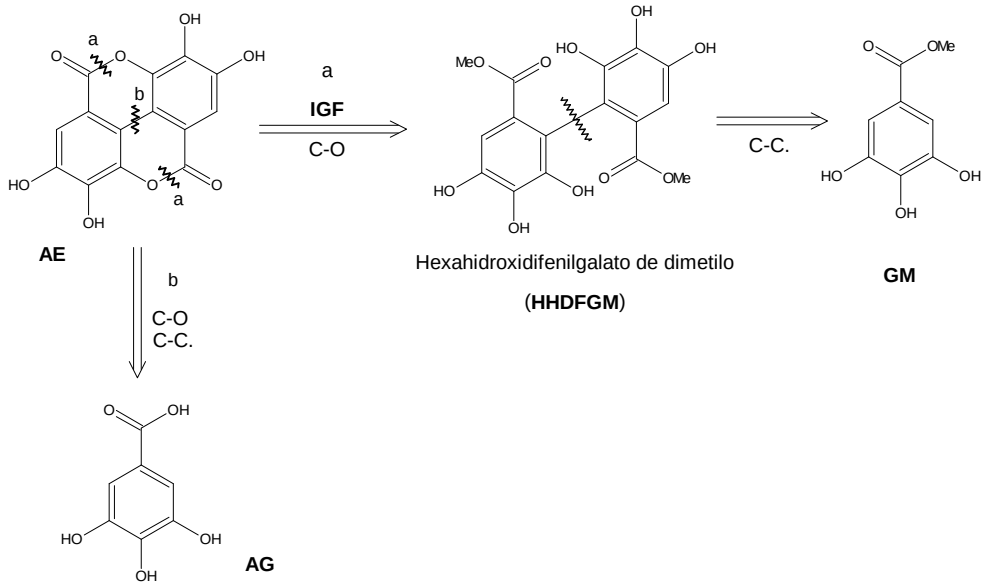
Esquema 5.10.- Rutas de síntesis total reportadas para la formación de derivados del ácido elágico con sustituyentes bidentados a través de la formación de bifenilos a partir de galato de metilo.

5.2.1. Ácido Elágico derivados alquílicos: análisis retrosintético

La mayoría de los procesos reportados para la síntesis total del ácido elágico ha sido efectuada a partir de AG o de su ester metílico GM; sabiendo que es una molécula con grupos fenólicos simétricos, se realizó un análisis retrosintético sin sustituyentes (esquema 5.11) y con sustituyentes bidentados (esquema 5.12) y monodentados (esquema 5.13).

Análisis sin sustituyentes (esquema 5.11): se propone como primer paso de retrosíntesis la IGF de la dilactona (AE) a ester dimetílico tipo bifenilo, denominado HHDFGM, seguido de la desconexión carbono-carbono (C-C) dando origen a

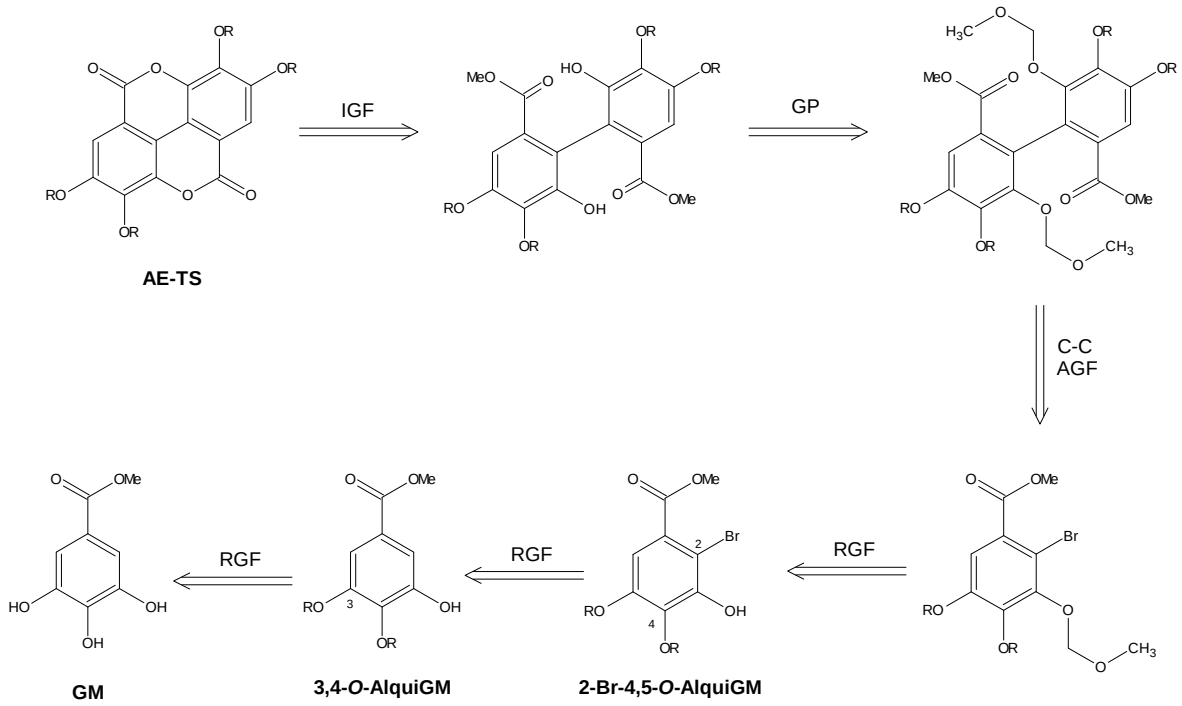
sintones simétricos asociados al GM; éste análisis esta soportado por la reacción de oxidación del GM en presencia de los agentes oxidantes *o*-cloranil e hidrosulfito de sodio ($Na_2S_2O_4$) mostrados anteriormente (esquema 5.6). Por otra parte, la desconexión simultanea de los enlaces C-O y C-C produce directamente un sintón relacionado a AG, la reacción de formación esta dirigida por el peroxidisulfato de sodio en medio ácido (esquema 5.6).



Esquema 5.11.- Análisis retrosintético propuesto para la formación del ácido elágico.

Analisis con sustituyentes dialquílicos o alquílico-bidentado (esquema 5.12): el primer paso es la IGF de la dilactona tetrasustituida (AE-TS) a su ester dimetílico tipo bifenilo fenólico tetrasustituido. La incorporación sobre el fenol, de un GP de fácil remoción en presencia de éteres fenílicos, permite la desconexión carbono-carbono (C-C) junto con la halogenación a través de la AGF, dando origen a sintones simétricos asociados al galato de metilo *tri*-*O*-sustituido *C*-halogenado. La remoción del grupo protector (RGP) fenolico produce un sinton relacionado a derivados 2-halogenado-4,5-di-*O*-alquil del galato de metilo (2-X-4,5-*O*-AlquilGM), cuya desconexión carbono-halogeno (C-X), esta asociada a reactivos de halogenación estereoselectiva *orto* a fenoles y derivados 3,4-di-*O*-alquilgalato de metilo (3,4-*O*-AlquilGM). Este último permite la obtención de un

sinton relacionado al GM a través de una RGF (análisis basado en las reacciones mostradas en los esquemas 5.9 y 5.10).



Esquema 5.12.- Análisis retrosintético propuesto para la formación del ácido elágico tetra-*O*-alquilsustituido.

Sección II

Desarrollo Experimental

Resumen

6.- Materiales, Instrumentación y Métodos: Biológicos y Químicos

Capítulo 6

MATERIALES, INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS: BIOLÓGICOS-CROMATOGRÁFICOS-QUÍMICOS

6.1. Materiales

6.1.1. Material vegetal

Para éste trabajo se seleccionaron cuatro plantas, pertenecientes a diferentes familias, que son usadas por la medicina tradicional como antidiabéticas: *O. polyantha* Engl. (Ochnaceae), *C. biflora* L. (Schrophulariaceae), *C. fruticosa* Mill. (Fabaceae) y *R. tuberosa* L. (Acanthaceae)

***O. polyantha* Engl.** (3308AC), fue recolectada en el Río Sipapo: cerca de Cerro Pelota; al sur de Laja de Garza, entre boca del Río Autana y boca del Río Guayapola, en la selva del Amazonas, Estado Amazonas, Venezuela, en 1992. La identificación del material vegetal fue realizada por el botánico Dr. Aníbal Castillo, de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. El espécimen (3308AC) fue depositado en el Herbario Nacional de Venezuela (Jardín Botánico de la Ciudad Universitaria de Caracas).

***C. biflora* L.** (MYF 26391), fue recolectada en Tucupita, Estado Delta Amacuro en Febrero de 2007, en la localidad de San Rafael, cerca del río Orinoco en el Estado Delta Amacuro, Venezuela. Mientras que, ***R. tuberosa* L.** (MYF 26390), fue colectada en la Ciudad Universitaria, al lado de la biblioteca de

Ingeniería Ambiental de la Universidad Central de Venezuela, en Junio de 2008, Caracas, Distrito Capital y ***C. fruticosa* Mill.** (MYF 26392), fue colectada, en Junio de 2008, en San Antonio de Los Altos, Estado Miranda, un espécimen de cada planta fue depositado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. La identificación y almacenamiento, de muestras testigos, fue realizada por el Dr. Stephen Tillett del Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

6.1.2. Solventes y reactivos cromatográficos

Solventes

- Acetato de etilo P.A.
- Acetona P.A.
- Acetonitrilo P.A.
- Ácido acético P.A.
- Ácido clorhídrico P.A.
- Ácido fórmico P.A.
- Ácido sulfúrico P.A.
- Ácido trifluoroacético.
- Butanol P.A.
- *tert*-Butilmetiléter P.A.
- Cloroformo P.A
- Diclorometano (P.A. y destilado)
- Dimetilsulfóxido P.A.
- Etanol P.A.
- Hexano P.A.
- Metanol (P.A. y destilado).
- Tetrahidrofurano P.A.
- Tolueno P.A.

Reactivos

- Anisaldehído.
- Hidróxido de potasio.
- Hidróxido de sodio.
- Silica gel.
- Sulfato cérico.
- Yodo.
- Vainillina.

6.1.3. Reactivos para bioensayos

- Ácido ascórbico.
- Ácido sulfúrico.
- Albúmina bovina.
- Carbonato de sodio.
- Cloruro de sodio.
- Cloruro de magnesio.
- Dimetilsulfóxido.
- Dodecilsulfato de sodio.
- EDTA.
- Floricina.
- Folin Ciocalteus.
- Fosfato diácido de potasio.
- Glucosa-6-fosfato.
- HEPES.
- Heptamolibdato de amonio.
- Hidróxido de sodio.
- Histona II-A.
- Kit para la determinación enzimática de glucosa (Glucosa oxidasa, Peroxidasa, Antipirina y Fenol).
- Sacarosa.
- Sulfato Cúprico.
- Tartrato de sodio y potasio.

6.1.4. Solventes y reactivos para síntesis

- Acetato de etilo
- Acetato de sodio
- Acetofenona
- Acetona
- Acetonitrilo
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico
- Ácido gálico
- Ácido sulfúrico
- Acrilamida
- Anhídrido acético
- Benceno
- Bicarbonato de sodio
- Bromo molecular
- *tert*-Butilmetiléter
- Carbonato de potasio
- Carbonato de sodio
- 4-Cianopiridina
- Ciclohexano
- Cloroformo
- Cloruro de acetilo
- Cloruro de bencilo
- Cloruro de benzoilo
- Cloruro de sodio
- Cloruro de tionilo
- 1,2-Dicloroetano
- Diclorometano
- Diciclohexilcarbodiimida
- Dimetilformamida
- Dietilamina
- Dimetilamina
- 4-Dimetilaminopiridina
- Dimetilsulfato
- Dimetilsulfóxido
- Etanol
- Éter etílico
- Éter de petróleo ligero
- D-(+)-Glucosa
- *n*-Hexano
- Hidrógeno gasesoso
- Hidróxibenzotriazol
- Hidróxido de litio
- Hidróxido de potasio
- Hidróxido de sodio
- Metanol
- Nitrógeno gaseoso
- Nitrógeno líquido
- Paladio 10% sobre carbono
- Piridna
- Pirrolidina
- Sulfato de sodio
- Tetrahidrofurano
- Tolueno
- Trietilamina
- Yoduro de metilo
- Yoduro de potasio.

6.2. Instrumentación

6.2.1. Instrumental Bioquímico

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

6.2.2. Instrumental cromatográfico

- Cromatógrafos contracorriente.
  - ✓ Cromatógrafo contracorriente de alta velocidad, marca P. C. Inc., modelo HSCCC serie #400.
  - ✓ Ito multilayer coil extractor-separator, marca P. C. Inc., modelo 1, serie #28.
  - ✓ Cromatógrafo contracorriente de alta velocidad, HSCCC-1000, Pharmatech-Research, Baltimore, Maryland, USA.
- Cromatógrafo HPLC-Dionex
  - ✓ Columna: Acclaim 120 C18 (100x2,1; 3 μm)
  - ✓ Columna NovaPak C18 (150x3,9; 5 μm)
  - ✓ Columna: Symmetry C18 (150x3,9; 5 μm)
  - ✓ Columna: Supelcosil™ LC-18-S (150x4,6; 5 μm)
- Cromatógrafo Flash-Biotage
  - ✓ Cartucho de sílica gel: SNAP 25 g (72x30; 50 μm).

6.3. Métodos biológicos

6.3.1. Bioensayos sobre la enzima G-6-Pasa

Como la enzima G-6-Pasa cataliza el paso final de los procesos de neoglucogénesis y glucogenolísis, produciendo glucosa y fosfato inorgánico; la reacción se puede medir mediante la desaparición del sustrato (Glucosa-6-fosfato) o la aparición de los productos (Glucosa o Pi).

$$\text{G-6-P} \xrightarrow{\textbf{G-6-Pasa}} \text{Glucosa} + P_i$$

La actividad de la G-6-Pasa se determinó siguiendo la formación de fosfato (Pi), en medio ácido y heptamolibdato de amonio, para formar un complejo azul, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 820 nm.

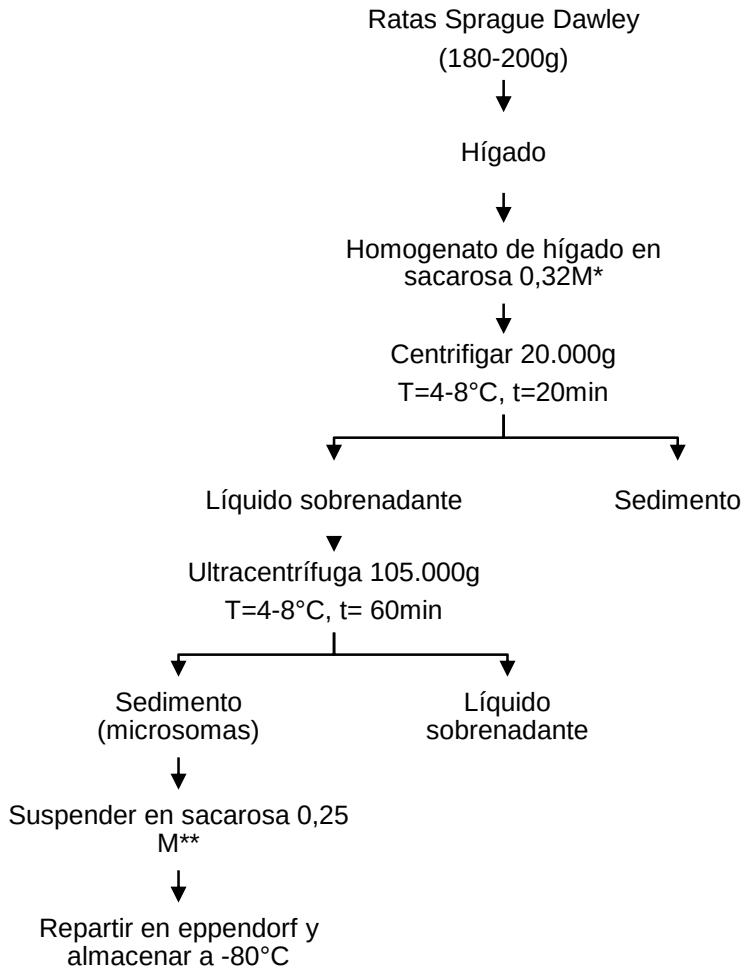
$$12(NH_2)_2Mo_7O_4 + 27H^+ + 12SO_4^= + PO_4^= \rightarrow [H_3PO_4(MoO_3)_{12}] + 12H_2O + 12(NH_4)_2SO_4$$

La ventaja del uso este método es que, además de ser económico y rápido, el reactivo que se usa para formar el complejo coloreado también detiene la reacción.

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

6.3.1.1. Preparación de los microsomas.

La preparación de los microsomas, fuente de la enzima, se utilizó el procedimiento descrito por Marcucci *et al*.,[222] esquema 6.1.



*Sacarosa 0,32 M; $MgCl_2$ 3 Mm.

**Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 Mm; $MgCl_2$ 1 Mm pH 6,5

Esquema 6.1. Procedimiento para el aislamiento de los Microsomas.[222]

6.3.1.2. Ensayo general sobre la G-6-Pasa.

Se utilizó como sustrato G-6-P 5 mM, tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H). En la tabla 6.1 se muestran los reactivos y cantidades necesarias para prepararlos.

Tabla 6.1. Preparación de los sustratos**.**

Sustrato	G-6-P 100 Mm (µL) pH 6,5	EDTA 0,1 M (µL) pH 6,5	HEPES 1 M (µL) pH 6,5	H_2O (µL)	Histonas* (tipo II AS) (µL)	V_t (mL)
-H	**250**	**100**	**80**	**1570**	**-**	**2**
+H	**250**	**100**	**80**	**1370**	**200**	**2**

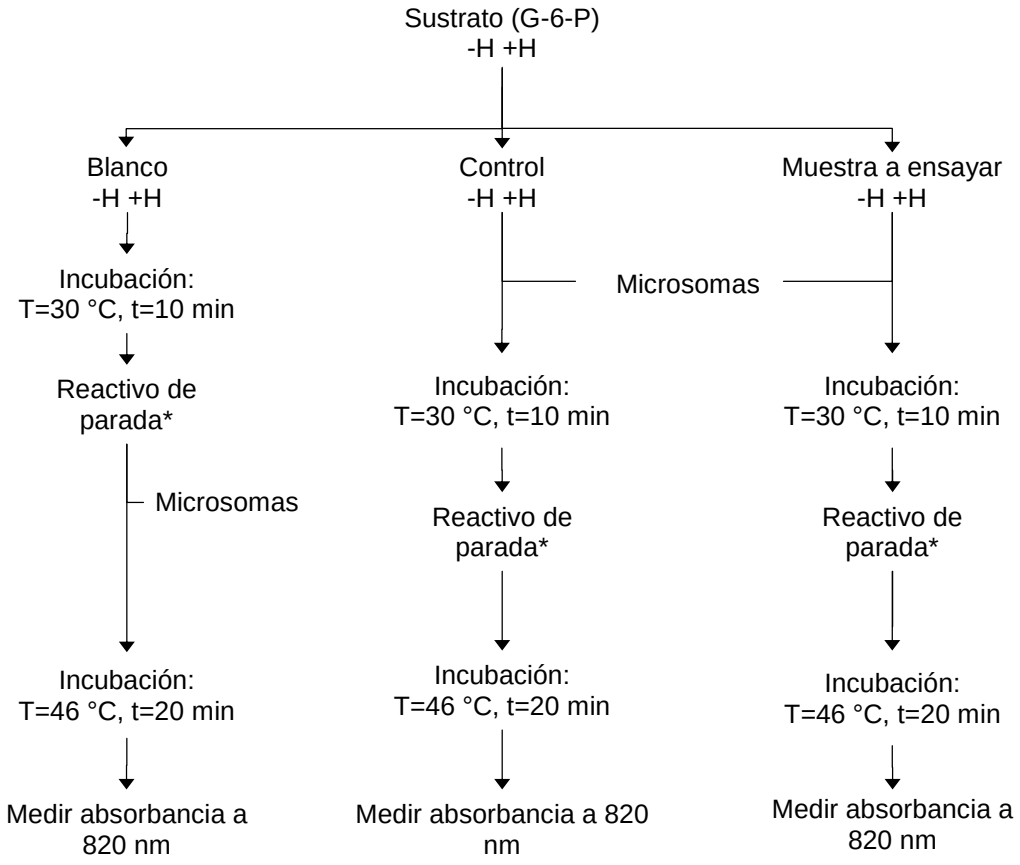
Para determinar la actividad de los extractos y compuestos purificados sobre la enzima G-6-Pasa se empleó la metodología descrita por Burchell y col.,[3] esquema 6.2. A continuación se describe brevemente la metodología seguida para el ensayo de G-6-Pasa:

- Se utilizaron cuatro tubos de ensayo para cada compuesto a probar (blanco y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H).
- Para los ensayos *Control* se colocó en cada tubo 40 µL de sustrato más 40 µL de agua (o del solvente en que fue disuelto el compuesto a probar). Para los ensayos con la fracción o el compuesto a analizar, se añadió 40 µL de la solución problema o del compuesto a probar a la concentración deseada en lugar de agua.
- Los microsomas fueron diluidos hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa 0,25 M; 5 Mm HEPES y 1 mM de $MgCl_2$ (pH =6,5).
- Se colocaron los tubos en un baño de temperatura controlada a 30 °C.
- Se adicionaron 20 µL de los microsomas a los triplicados y se incubó por 10 min.
- La reacción se detuvo tubo por tubo, en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de

parada, incluyendo a los blancos. Por último, se añadió 20 µL de los microsomas a los blancos.

- Se incubaron por 20 min., en un baño de temperatura controlada a 46 °C.
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- La actividad enzimática se expresó en µmoles de P_i/min./mg de proteína.

Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción se realizó una curva de calibración con un rango de concentración de 0 a 75 nmol de P_i tomando alícuotas correspondientes de una solución madre de KH_2PO_4 1 mM en un volumen final de 100 µL.



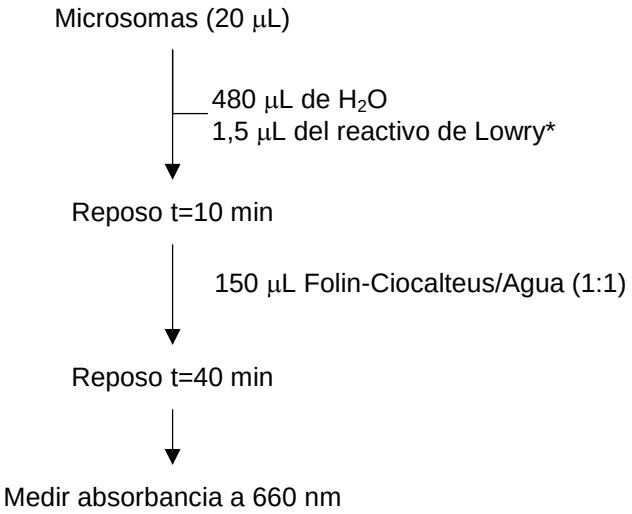
-H: sin histonas
+H: con histonas
*Reactivo de parada: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0,42% en H_2SO_4 0,5M: SDS 5%: Acido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

Esquema 6.2. Ensayo general de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa.[3]

6.3.1.3. Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas se determinó siguiendo el procedimiento de Lowry *et al*.,[223] modificado por Markwell *et al*.,[224] que combina la reacción de Biuret basada en la unión de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la reducción de el reactivo de Folin-Ciocalteus por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, ésta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína.[225]

En la determinación de la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elaboró una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 µg/mL en un volumen final de 500 µL. La cantidad de proteínas se estimó en base a una curva de calibración usando albúmina como proteína patrón de acuerdo con el esquema 6.3.



*Reactivo de Lowry: A+B (100:1)
A = Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, $KNaC_4H_4O_6$ 0,16%, SDS 1%.
B = $CuSO_4.5H_2O$ 4%.

Esquema 6.3. Procedimiento para la cuantificación de proteínas.[224]

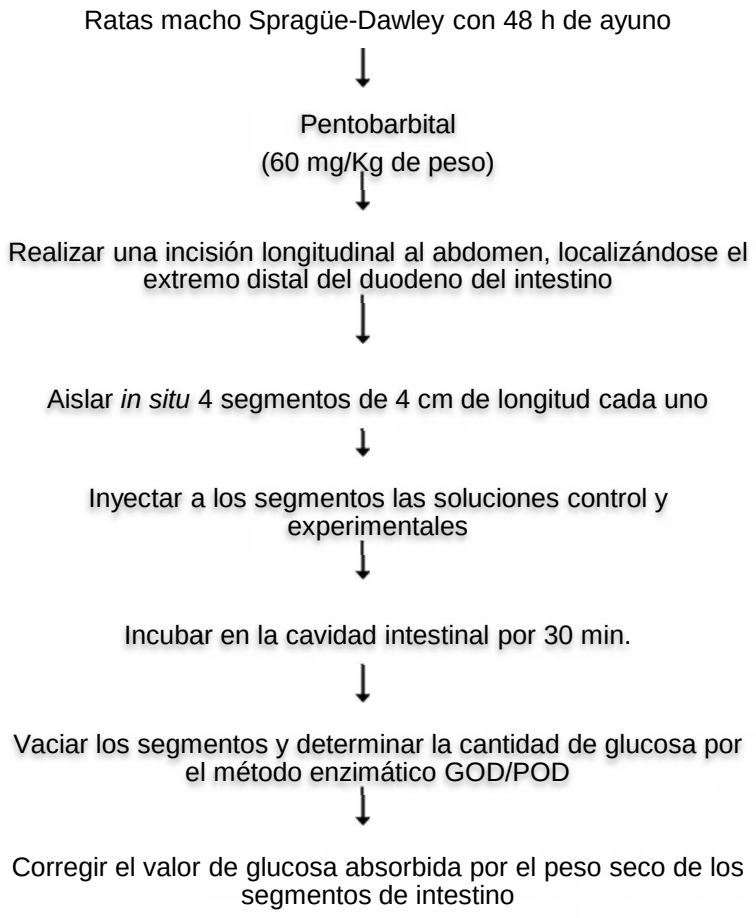
6.3.2. Bioensayo general sobre la Absorción Intestinal de Glucosa.

La determinación de la cantidad de glucosa absorbida por el intestino se realizó siguiendo la metodología descrita por González-Mujica y col.,[201] esquema 6.4. Donde se utilizó ratas macho con un ayuno de 48 horas, con la finalidad de no encontrar heces en el intestino, dichas ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso) administrado intraperitonealmente.

A éstas ratas se les practicó una incisión media desde el apéndice xifoides hasta el pubis, luego se procedió a localizar el extremo distal del duodeno del intestino y a partir de aquí, se aislará *in situ* cuatro segmentos de 4 cm de longitud cada uno, realizando ligaduras con hilo de coser a través del mesenterio y tratando de no lesionar vaso alguno.

A cada segmento se le introdujo, con una inyectadora para insulina, 1 mL de una solución acuosa de: para los controles, 10 mM de glucosa, 0,145 M NaCl y 2% de DMSO y a los experimentales, 0,1 mL de glucosa 100 mM, 0,145 M NaCl y 0,1 mL de los extractos vegetales, a la concentración deseada, disueltos en DMSO al 20%. El momento en que se introduce la solución al primer segmento se determina como tiempo cero y a partir de entonces se dejó los segmentos en incubación dentro de la cavidad intestinal por media hora. Al término de dicho tiempo se vaciaron completamente los segmentos con una inyectadora de tuberculina y se determinó la cantidad de glucosa remanente utilizando la metodología para GOD/POD.

Posteriormente los segmentos de intestino fueron cortados, retirados de la cavidad intestinal y lavados con agua destilada. Luego, se colocaron en tubos de ensayo previamente pesados para ser desecados en una estufa a 65 °C por un período de 24 h, después del cual los tubos serán nuevamente pesados con la finalidad de obtener el peso seco de los segmentos de intestino, para corregir la cantidad de glucosa absorbida.



Esquema 6.4. Medición de la absorción de glucosa intestinal.[201]

6.3.2.1. Método enzimático GOD/POD

El método está basado en la detección por colorimetría de un compuesto de color rosado que se hace presente luego de que la glucosa, en presencia de agua y oxígeno por acción de la glucosa oxidasa (GOD), se transforma en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Fig. 6.1a). Éste último se reduce, mientras que el fenol y la 4-aminoantipirina se oxidan en presencia de la enzima peroxidasa (POD), para generar agua y un cromóforo, de estructura tipo quinoimina (Fig. 6.1b), que presenta un máximo de absorción a 510 nm. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de glucosa inicial.

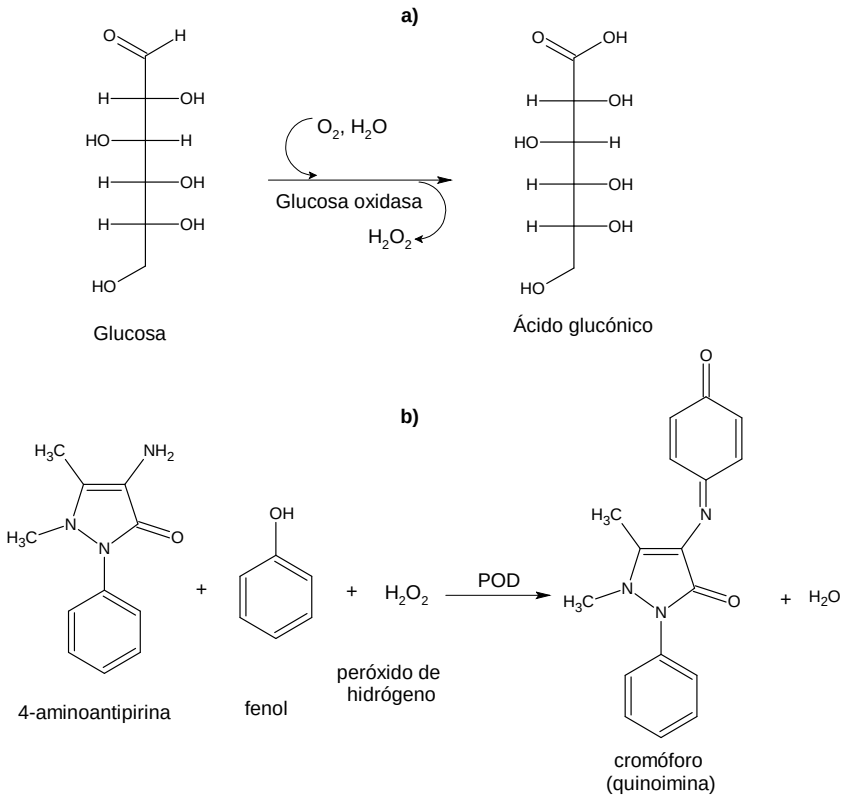


Figura 6.1.- Método enzimático GOD/POD. **a**) La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico con la formación de peróxido de hidrógeno. **b**) Éste es utilizado por la peroxidada para oxidar a la 4-aminoantipirina y al fenol, dando lugar a una quinoimina coloreada. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de glucosa inicial.

6.3.2.2. Ensayo del método enzimático GOD/POD

Se toman 10 μL de la solución, experimental o control antes y después del período de incubación, se colocará 1 mL del reactivo de trabajo[****] de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente dichos tubos serán incubados en un baño por 10 min. a 37 °C, para luego, leer la absorbancia de cada tubo a 510 nm. Por último, la cantidad de glucosa, en nmoles, presente en cada una de las soluciones se estima con la fórmula [5.1].

[****] Kit para la determinación enzimática de glucosa.

$$\text{Glucosa(nm ol)} = \left[10\text{nmol} - \frac{\text{Absorción Final} \times 10\text{nmol}}{\text{Absorción Inicial}} \right] \quad [5.1]$$

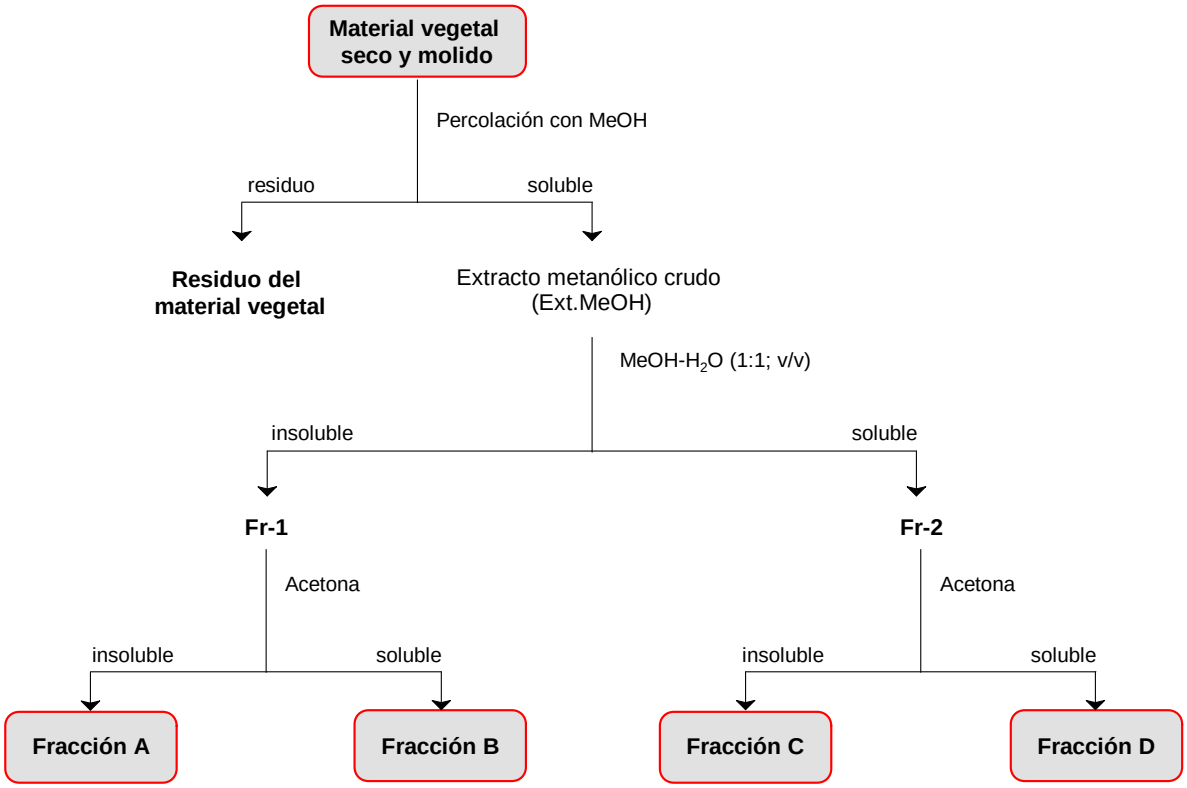
Este valor de glucosa, se corregirá con el peso seco de los segmentos de intestino, con la fórmula [5.2]

$$\text{Glucosa}\left(\frac{\text{nmol}}{\text{g}}\right) = \frac{\text{Glucosa (nmol)}}{\text{peso seco(g)}} \qquad [5.2]$$

6.4. Método de Fraccionamiento Inicial

6.4.1. Fraccionamiento del material vegetal

El fraccionamiento mostrado en el Esquema 6.5, ha sido empleado exitosamente en nuestro laboratorio en la obtención de los metabolitos secundarios de diferentes polaridades que inhiben el sistema enzimático G-6-Pasa, por lo que se aplicó dicho esquema previo a la separación y el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las plantas objeto de estudio.



Esquema 6.5. Esquema de fraccionamiento general propuesto previo a los ensayos biológicos y a la purificación de los compuestos.[6]

6.5. Métodos Cromatográficos

6.5.1. Cromatografía de capa fina, CCF

- ✓ Placas analíticas de sílica gel 60; 0,25mm con indicador de fluorescencia UV_{254}.

6.5.1.1. Sistemas de desarrollo para CCF

- ✓ **A-1**: Tolueno-AcOEt (93:7; v/v)
- ✓ **A-2**: Tolueno-AcOEt (95:5; v/v)
- ✓ **V-1**: Tolueno-AcOEt (70:30; v/v)

- ✓ **Z-1**: CH_2Cl_2-MeOH (98:2; v/v)
- ✓ **AN-2**: AcOEt-MeOH-H_2O (100:13,5:10; v/v)
- ✓ **AN-6**: Hexano-AcOEt-HCO_2H (75:25:1, ; v/v)
- ✓ **F-1**: AcOEt-AcOH-HCO_2H-H_2O (100:11:11:27; v/v)
- ✓ **L-1**: AcOEt-AcOH-HCO_2H-H_2O (100:10:10:10; v/v)
- ✓ **SP-1**: *n*-BuOH-AcOH-H_2O (4:1:4; v/v; fase orgánica)

6.5.1.2. Reveladores

- ✓ **AS**: Anisaldehido-Ácido sulfúrico.
- ✓ **AcOH-HCl (8:2; v/v):** para iridoides.
- ✓ **H_2SO_4-EtOH (1:1; v/v):** revelador universal
- ✓ **KOH-EtOH**: Hidróxido de potasio al 10% en etanol.
- ✓ **NaOH-EtOH**: Hidróxido de sodio al 10% en etanol.
- ✓ **Yodo**, $I_{2(s)}$.
- ✓ **NPR**, Reactivo para productos Naturales, Naturstoff.
- ✓ **SC**: Sulfato cérico, $Ce(SO_4)_2$
- ✓ **VS**: Vainillina-Ácido sulfúrico.

6.5.2. Cromatografía en Columna.

Para la purificación de los productos naturales, se utilizó gel de sílice Merck 60 (0,63 -0,2 nm) en una proporción de 100:1 (gel sílice-muestra), donde las columnas empleadas se prepararon vía húmeda. Mientras que para la los productos sintéticos se empleó el método seco.

6.5.2.1. Sistemas de Desarrollo para CC

- ✓ CH_2Cl_2-MeOH (94:6; v/v) utilizada en la purificación de OpD-10.
- ✓ CH_2Cl_2-MeOH-*n*-BuOH-H_2O (4:1,5:0,1:2; v/v; fase orgánica) utilizada en la purificación de OpD-9.
- ✓ CH_2Cl_2-Acetona (100:0→0:100; v/v) utilizada para la prificación de agathisflavona en OpB-MAS-PI.
- ✓ *n*-Hexano-CH_2Cl_2 (50:50→0:100; v/v) utilizada para la prificación de α y β-PGG-Bn.

6.5.3. Cromatografía contracorriente

6.5.3.1. Procedimiento de separación con la técnica estándar de HSCCC

La separación por esta técnica se realizó utilizando la inyección estática o tipo sándwich (sección 3.4.2, pag 73) y la detección se siguió a 280 y/o a 360 nm, excepto para el sistema de solventes de $CHCl_3$-MeOH-H_2O (4:3,5:2; v/v) utilizado para una porción de OpD, cuya monitorización se realizó por CCF y no por UV-Vis.

6.5.3.2. Procedimiento de separación con la técnica de refinamiento de la zona de pH de CCC

La separación por ésta técnica se llevó a cabo principalmente con sistemas de solventes reportados en la literatura referente a los metabolitos de interés, al mismo tiempo que se comprobaron los requerimientos descritos en la sección 3.5 (pág 102).

6.5.4. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, HPLC.

Los cromatogramas de HPLC fueron obtenidos empleando software Chromeleon® 6.80 en un equipo Dionex UltiMate® 3000 que consta de una bomba cuaternaria modelo LPG-3400SD, una válvula de inyección manual Rheodyne modelo 8125 y un detector de rearreglo de diodos de cuatro canales modelo DAD-3000. Los diferentes sistemas de elución se describen a continuación:

HPLC-Sistema 1: Columna Acclaim 120 C18 (2,1x100 mm; 3 μm); flujo: 0,450 $mLmin^{-1}$; Solvente A: H_2O-$AcOH_{glacial}$ (991,7:8,3; v/v); Solvente B: ACN-$AcOH_{glacial}$ (992:8; v/v); gradiente: 0-5,3 min 88%A, 5,3-10 min 79,5%A, 10-21,3 min 56%A, 21,3-22 min 0 %A; detección: 360, 280, 330 y 260 nm; espectro UV: 200-800 nm.

HPLC-Sistema 2: Columna NovaPak® (3,9x150 mm; 5 μm); flujo: 1,00 $mLmin^{-1}$; Solvente A: H_2O; Solvente B: MeOH; gradiente: 0-5 min 30%A, 5-15 min 10%A, 15-22 min 10%A; detección: 407, 666, 435 y 510 nm; espectro UV: 200-800 nm.

HPLC-Sistema 3: Columna Acclaim 120 C18 (2,1x100 mm; 3 μm); flujo: 0,310 $mLmin^{-1}$; Solvente A: ACN; gradiente: 0-30 min 100% A; detección: 217, 220, 254 y 280 nm; espectro UV: 200-800 nm.

6.6. Métodos Sintéticos

Los procedimientos descritos en ésta sección, corresponden a adaptaciones de los métodos reportados en la literatura para la síntesis de un determinado intermediario. En varias ocaciones fue necesario desarrollar nuevas metodologías sintéticas para la obtención de un producto con buen porcentaje de rendimiento.

6.6.1. Procedimiento general para la síntesis del éster metílico de ácido gálico.

Un equivalente del ácido gálico (AG), se disolvió en MeOH anhidro (1-3 mL/mmol), posteriormente se agregó ácido sulfúrico concentrado ($H_2SO_{4(c)}$; 2-4 mL/100 mmol AG) y la mezcla se sometió a reflujo, con agitación constante, por un tiempo de 3-6 horas. Seguidamente el solvente orgánico fue evaporado a temperatura ambiente (T_{amb}), y el residuo disuelto en AcOEt y lavado con una solución saturada de bicarbonato de sodio ($NaHCO_{3(ac,\ sat)}$) hasta llegar a pH neutro. La fase orgánica fue tratada con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y posteriormente evaporada. El crudo de reacción obtenido fue recristalizado de H_2O o de la mezcla MeOH-H_2O y el porcentaje de rendimiento de la reacción fue satisfactorio (53-84%).

6.6.2. Procedimiento General para la Síntesis de *tri-O*-Alquilgalato de metilo.

Método A: Un equivalente de compuesto fenólico (AG o GM) y entre 4,5-6 equivalentes de carbonato de potasio anhidro (K_2CO_3), fueron agregados sobre dimetilformamida (DMF; 25 mL/10 mmol) con agitación constante bajo atmósfera inerte de nitrógeno gas ($N_{2(g)}$). Posteriormente, se adicionó el agente alquilante, cloruro de bencilo (BnCl; 3,2 eq) o yoduro de metilo (MeI; 4,5-5,1 eq), la mezcla se sometió a las condiciones de temperatura (T) y tiempo (t) deseados. El tratamiento del crudo de reacción fue realizado de tres maneras diferentes para precipitar y filtrar el producto:

- **Método A-I**: a la mezcla de reacción se le agregó suficiente agua destilada a temperatura ambiente.

- **Método A-II**: la mezcla de reacción fue agregada sobre agua destilada caliente (50-60°C), posteriormente se llevo a ebullición entre 5-10 min.
- **Método A-III**: la mezcla de reacción fue agregada sobre solución diluida de ácido clorhídrico.

Método B:[226] mediante agitación constante, GM (1 eq), yoduro de potasio (KI; 0,44 eq) y K_2CO_3 (5,9 eq) fueron suspendidos en acetona (10 mL/mmol GM). Luego de 20 minutos, se adicionó BnCl (3,2 eq) disuelto en acetona (5 mL/10 mmol BnCl) y, la mezcla se sometió a reflujo por 18 horas. El crudo de reacción fue filtrado por succión y evaporado a sequedad, a temperatura ambiente. Seguidamente, fue suspendido en CH_2Cl_2 y flitrado sobre celita 545, y nuevamente evaporado a sequedad para obtener el *tri-O*-bencilgalato de metilo (BnGM), de alta pureza.

6.6.3 Procedimiento General para la Síntesis del Ácido *tri-O*-Alquilgálico.

Un equivalente de éster metílico (MeGM o BnGM) fue suspendido, mediante agitación contínua, en una mezcla de ROH-H_2O (R= Me o Et) de proporciones conocidas, a la cual se le agregó entre 1,7 y 22,5 equivalentes del hidróxido alcalino (LiOH, NaOH o KOH). La mezcla de reacción se sometió a las condiciones de temperatura y tiempo deseados. Posteriormente, el crudo de reacción fue tratado de diferentes maneras:

- **Método C-I**: el solvente orgánico fue evaporado a presión reducida y el resto acuoso fue agregado sobre $HCl_{(ac)}$ para precipitar el producto, éste fue extraído con AcOEt y la fase orgánica fue lavada con porciones sucesivas de H_2O y $NaCl_{(sat)}$ y secada sobre Na_2SO_4. El producto fue recristalizado usando los solventes adecuados.

- **Método C-II**: el solvente orgánico fue evaporado a presión reducida y el residuo fue suspendido en H_2O y la cual fue acidificada con $H_2SO_{4(c)}$ y tratada con varias porciones de CH_2Cl_2. La fase orgánica fue lavada con porciones sucesivas de $HCl_{(ac)}$ y secada sobre Na_2SO_4. El producto fue recristalizado usando los solventes adecuados.
- **Método C-III**: la mezcla de reacción, aún caliente, fue agregada sobre solución diluida de ácido clorhídrico, y transcurridos 10 minutos en ebullición se filtró. El sólido formado fue lavado con porciones sucesivas de EtOH-H_2O (1:1; v/v), H_2O, $EtOH_{(95\%)}$, MeOH y *t*-BuOMe. El producto fue de alta pureza.

6.6.4. Procedimiento General para la Síntesis de Cloruro de *tri-O*-bencilgálico.

De acuerdo al procedimiento descrito en la literatura,[227] se disuelve un equivalente del ácido *O*-alquilbenzóico, ABnG, en benceno (C_6H_6) anhidro (7 mL/mmol), y se agrega cloruro de tionilo ($SOCl_2$, 6-12 eq) seguido de piridina (0,2 eq), la mezcla de reacción se sometió a reflujo por un tiempo de 1 ½-2 horas en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$ en agitación contínua. A la solución resultante se le agregó éter de petróleo ligero (P_{eb} 40-60°C) y se enfrió en una mezcla agua-hielo-sal. El precipitado, filtrado por succión, fue bastante puro y se usó en el siguiente paso de reacción sin realizar otro procedimiento de purificación. El porcentaje de rendimiento de la reacción fue satisfactorio (61-94%).

6.6.5. Procedimiento General para la Síntesis de 4-aminoalquilpiridina

Método D. En un balón de tres bocas, se diluyo piridina (py; 1 eq) en cloroformo ($CHCl_3$; 5 eq). Seguidamente, con agitación constante y manteniendo la temperatura entre 0-5 °C (mezcla de agua-hielo-sal) se agregó lentamente bromo molecular (Br_2; 1,05 eq). En este punto se trató la solución de dos maneras diferentes:

D-I. Quince minutos (15 min) después de la adición de Br_2 y aún con T 0-5°C, a la mezcla preparada en el método D, se agregó 1,2 equivalentes de la mezcla equimolar entre ($NaOH_{40\text{-}50\%(ac)}$) y la amina secundaria (dimetilamiana, dietilamina o pirrolidina), NaOH-R_2NH (1:1; mol/mol; R= Me-, Et-, -$(CH_2)_4$-).

D-II. La solución preparada en el método D, se agregó sobre una solución fría (T 0-5°) de 1,2 equivalentes de la mezcla equimolar entre NaOH-R_2NH (R= Me-, Et-, -$(CH_2)_4$-).

Para los métodos D-I y D-II, luego de 30 min de reacción, se ajusto el pH entre 12 y 13, usando $NaOH_{40\text{-}50\%}$, y se procedió a separar la fase orgánica, a la cual se le agregó *n*-hexano (10-20 mL) y se filtró, el sólido remanente corresponde al derivado 4-aminoalquilpiridina, la evaporación del filtrado proporcionó una segunda fracción de producto de menor pureza.

Método E.[228] En un balón de tres bocas, equipado con un termómetro, un embudo de adición, un condensador y un agitador magnético se colocó 4-cianopiridna (4-CNPy, 1 eq), lentamente se agregó un equivalente una solución acuosa de acrilamida al 50% (AAm, 1 eq), y mediante agitación contínua se adicionó $HCl_{(c)}$ (2,7 eq). La solución resultante que corresponde al cloruro de N-(2-carbamoiletil)-4-cianopiridina (NCME-CNPy), se dejó en reposo a temperatura

ambiente por 2 h. Posteriormente, ésta solución se enfrío a 0°C se agregó sobre 1,2 equivalentes, respecto a la amina, de la mezcla NaOH-R_2NH (1:1,48; mol/mol; R=Me, Et, -$(CH_2)_4$-). Luego de la adición de NCME-CNPy la mezcla de reacción se dejó en reposo por 1 h (T <10 °C). Seguidamente y manteniendo la temperatura, se agregó ($NaOH_{40\text{-}50\%(ac)}$, 0,9 eq) se agitó durante 5 minutos y se sometió a reflujo por 2 h. La mezcla de reacción fue extraida con tolueno y tratada con Na_2SO_4 antes de ser evaporada, y recristalizada en el solvente apropiado.

6.6.6. Procedimiento general para la síntesis de Penta-(3,4,5-*tri-O*-alquilgaloil)-glucosa.

Método F-Ia (Esterificación de Steglich). De acuerdo con el procedimiento reportado en la literatura[229] la solución en CH_2Cl_2 (volumen, V) conformada por glucosa (G; 8-10 mM en V; 1 eq), ácido carboxílico (ABnG o AMeG; 7,5 eq), diciclohexilcarbodiimida (DCC; 8 eq) y DMAP, DEAP o PPY (8 eq) se sometió a reflujo por 15-36 horas en atmósfera inerte. Seguidamente, la mezcla de reacción se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente y se filtró el sólido blanco formado correspondiente a diciclohexylurea (DCHU). Posteriormente, el filtrado orgánico fue lavado con H_2O (2xV), secado con Na_2SO_4 y evaporado a temperatura ambiente para asi obtener el crudo de reacción el cual fue purificado por cromatografía en columna por gravedad o al vacío.

Método F-Ib.[230] En este método se sustituyó el CH_2Cl_2, del método anterior, por 1,2-dicloroetano (1,2-DE; volumen V) y se disminuyó el tiempo de reacción de 36 a sólo 6 horas. Luego de 6 horas de reflujo, la mezcla de reacción se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se agregó éter etílico (Et_2O) y se enfrió en una mezcla agua-hielo-sal por 1 hora antes de filtrar la DCHU, luego la

fase orgánica fue lavada sucesivamente con H_2O (2xV), $NaHCO_{3(sat)}$ (3xV) y $NaCl_{(sat)}$ (1xV) y posteriormente deshidratada con Na_2SO_4 y evaporada a temperatura ambiente para obtener el crudo de reacción el cual fue purificado por cromatografía en columna.

Método F-Ic. Éste método fue desarrollado como una ligera modificación en cuanto a la adición de los reactivos del método F-Ia utilizando la sustitución incorporada en el método F-Ib. Así, la glucosa (G; 1 eq) y el ácido carboxílico (ABnG o AMeG; 7,5 eq) se suspendieron en 1,2-DE y se enfrió dicha suspensión (T<10°C) en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$, seguidamente se adicionó el sólido DCC (8eq) y por último se agregó 0,21-8,0 equivalentes del catalizador básico (DMAP o PPY) disuelto en 1,2-DE, el volumen final V de 1,2-DE permitió obtener 20-30 mM de G, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente y posteriormente se somete a reflujo por 6 horas en atmósfera inerte. El crudo de reacción fue tratado de igual manera que en el método F-Ib.

Método G.[231] El cloruro de acilo (BnGCl, 4,9-5 eq) se suspendió en ACN anhidro, en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$. Seguidamente y mediante agitación constante, se adicionó glucosa sólida (1 eq). Al obtener una suspensión homogénea, se agregó (5,2-6 eq) de DMAP sólida o disuelta en ACN, el volumen final de reacción permitió obtener 25-30 mM de G. Luego de 48 horas en agitación constante a temperatura ambiente y atmósfera inerte, se evaporó el solvente y el residuo fue redisuelto en la minima cantidad de CH_2Cl_2 y se agregó 1 g de silica gel, luego de evaporar el solvente, el sólido fue agregado sobre un embudo de placa porosa de vidrio y fue tratado de varias formas:

Ia. El producto crudo fue eluido con la mezcla tolueno-AcOEt (5:0,2; v/v), y posteriormente fue purificado por cromatografía en columna.

Ib. El producto crudo fue eluido con CH_2Cl_2, posteriormente la fase orgánica fue lavada con $NaHCO_{3(sat)}$ (3xV) y tratada con Na_2SO_4. El crudo de reacción obtenido por evaporación del solvente se purifico por cromatografía en columna.

Método G-Ic. En este método se sustituyó el solvente de reacción y el catalizador, así se obtuvo un volumen V de CH_2Cl_2 en lugar de ACN y TEA (6-10 eq) por DMAP. Luego de 48-60 horas, la mezcla de reacción fue lavada $NaHCO_{3(sat)}$ (3xV) y tratada con Na_2SO_4. El crudo de reacción, obtenido por evaporación del solvente, se purifico por cromatografía en columna.

Método H. Éste método fue desarrollado como una ligera modificación en cuanto a la adición de los reactivos del método G y es una adaptación a lo reportado en la literatura.[232] Así, la glucosa (G; 1 eq) se agregó sobre una solución, en CH_2Cl_2, de TEA (8 eq) seguidamente se adicionó BnGCl (8 eq) disuelto CH_2Cl_2 anhidro y se realizó a través de un embudo de adición por un espacio de 2 h. La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante 45 h a temperatura ambiente y posteriormente en reflujo por 20 h bajo atmósfera inerte de $N_{2(g)}$, transcurrido este tiempo se agregó TEA (30 eq) y se continuó el reflujo por 55 h. El volumen final V de CH_2Cl_2 permitió obtener 20-25 mM de G. La mezcla de reacción resultante, fue lavada $NaHCO_{3(sat)}$ (3xV), H_2O (1xV) y tratada con Na_2SO_4. El crudo de reacción, obtenido por evaporación del solvente, fue redisuelto en la minima cantidad de CH_2Cl_2 y adsorbido en 10 g de silica gel. Posteriormente, fue agregado sobre un embudo de placa porosa de vidrio y se eluyo sucesivamente con CH_2Cl_2 y MeOH. La fracción de CH_2Cl_2, rica en el producto deseado, se purifico por cromatografía en columna.

Método I. El anhídrido del ABnG (AABnG; 5,1 eq) se suspendió en CH_2Cl_2 anhidro, en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$. Seguidamente y mediante agitación constante, se adicionó glucosa sólida (1 eq). Al obtener una suspensión homogénea, se agregó DMAP sólida (8 eq) y TEA (11 eq) diluida en CH_2Cl_2, el volumen final de reacción permitió obtener 10-12 mM de G. Despues de 2 horas, en reflujo vigoroso y agitación constante bajo atmósfera inerte, la mezcla de reacción fue lavada con $NaHCO_{3(sat)}$ (3xV) y tratada con Na_2SO_4. Seguidamente se evaporó el solvente y el residuo fue redisuelto en la minima cantidad de Et_2O y se agregó silica gel (1 g). Luego de evaporar el solvente, el sólido fue agregado sobre un embudo de placa porosa de vidrio y fue eluido con CH_2Cl_2. Así el crudo de reacción, obtenido por evaporación del solvente, se purifico por cromatografía en columna.

Método J. De acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura,[233] se disolvió ABnG (7,5 eq) en CH_2Cl_2-DMF (30:2; v/v) y se agregó HOBt•H_2O (7,5 eq) mediante agitación contínua manteniendo todo bajo atmósfera de $N_{2(g)}$, Transcurridos 20 min, se adicionó DCC (7,5 eq), seguidamente se agregó glucosa (1 eq) y al obtener una suspensión homogénea se agregó DMAP (0,71 eq), la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 18 h, en atmósfera de $N_{2(g)}$. La mezcla de reacción fue acidificada con $AcOH_{(ac,\ 10\%)}$, el producto fue filtrado al vacío y se concentró a temperatura ambiente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna.

Método K. Éste método fue desarrollado como adaptación a lo descrito en el método H, se sustituyo el CH_2Cl_2 por 1,2-DE y el grupo acilante usado fue el BnGOBt. Así, la glucosa (G; 1 eq) se agregó sobre una solución, en CH_2Cl_2, de TEA (20 eq) seguidamente se adicionó BnGOBt (7 eq) disuelto CH_2Cl_2 anhidro y se mantuvo en agitación constante durante 20 horas en atmósfera inerte de $N_{2(g)}$. El volumen final de 1,2-DE permitió obtener 12-15 mM de G.

6.6.7. Procedimiento general para la síntesis de Pentagaloilglucosa, PGG.

Método L. De acuerdo con el procedimiento reportado en la literatura,[229] a la solución de PGG-Bn (10-20 mM; 1 eq) en THF (volumen, V), se le agregó $Pd_{10\%}$/C (0,5 eq). A través de un globo de reacción, la suspensión resultante fue degasificada y tratada con $H_{2(g)}$, a 40°C. Luego de 24 horas de reacción, la mezcla fue llevada a temperatura ambiente, filtrada a través de celita 545 y lavada con acetona; el filtrado fue evaporado a sequedad a temperatura ambiente. Éste crudo de reacción fue tratado de diferentes maneras para obtener el producto purificado:

L-I: el crudo de reacción fue disuelto en la minima cantidad de agua desionizada a una temperatura menor a 60 °C,[226] filtrado a través de una membrana de 20 μm y dejado en reposo hasta la formación del cristal, repitiendo el proceso dos o tres veces para la obtención de un producto de elevada pureza.

L-II: el crudo de reacción fue recristalizado de AcOEt.[234]

L-III: el crudo de reacción fue recristalizado con una solución acuosa de metanol.[215]

L-IV: el crudo de reacción fue disuelto en acetona y adsorbido en silica gel. Posteriormente, fue sembrado en una pequeña columna de silica gel y eluido con solventes de polaridad creciente.

6.7. Métodos de Cuantificación de Flavonoides Totales.

El contenido de flavonoides totales en fracciones de origen vegetal, fue determinado a través del ensayo colorimétrico de $AlCl_3$ reportado en la literatura.[235-236] Así, a 1000 μL de la fracción de origen vegetal se le agregó 1000 μL de una solución de $AlCl_3$ al 2% en metanol, luego de homogenizar, la mezcla se dejó en reposo con agitación ocasional a temperatura ambiente en ausencia de luz por 30 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia a 410 nm. Se realizó la curva de calibración con rutina como patrón (6; 12; 25 y 50 mg/L). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.