

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS FRUTOS DE  
*PROTIUM TOVARENSE* PITTIER (BURSERACEAE)**

Presentado por:

Br. Luimar Del Valle Cassiran Colina

Tutoras:

Dra. Alírica Suárez

Dra. María Lupe Márquez

Caracas, mayo de 2013

Yo Profesora Alírica Suárez, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora María Lupe Márquez, Investigadora del Centro de Síntesis Macromolecular y Organometálica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS FRUTOS DE  
*PROTIUM TOVARENSE* PITTIER (BURSERACEAE)”**

Que presenta la Br. Luimar Cassiran, para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2012 y 2013 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 16 de mayo de 2013

---

Dra. Alírica Suárez

(Tutor)

---

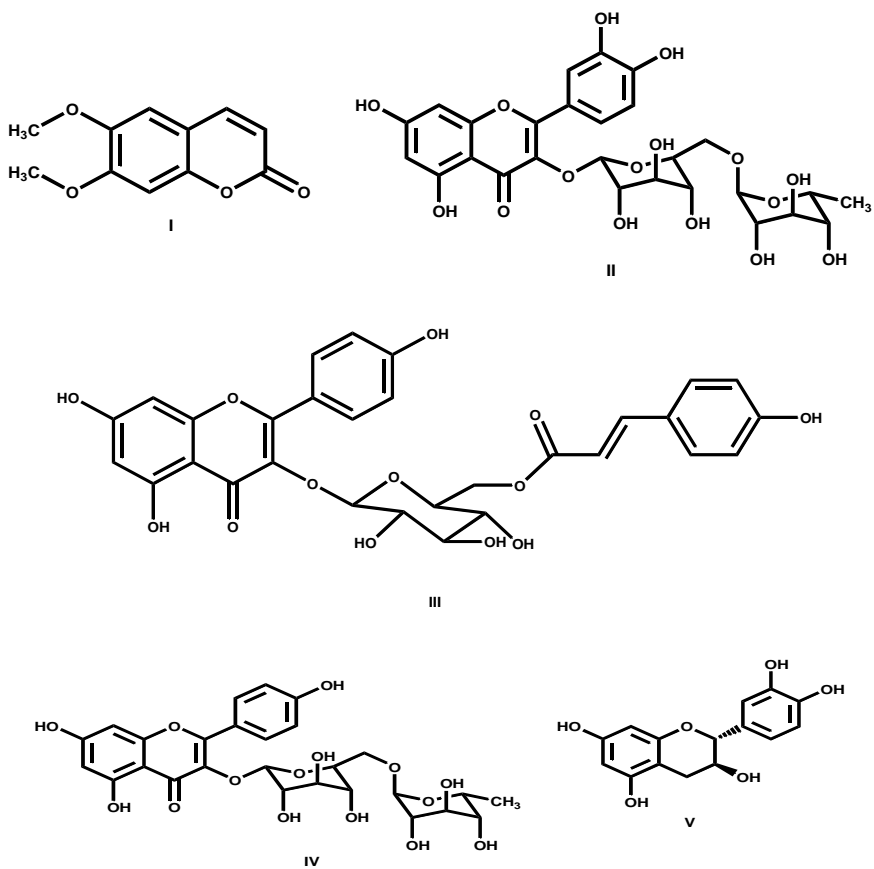
Dra. María Lupe Márquez

(Tutor)

## Resumen

El presente trabajo describe el primer estudio fitoquímico realizado a los frutos de la planta *Protium towarens* Pittier.

A partir del extracto metanólico de las cáscaras de los frutos de esta especie, mediante técnicas cromatográficas, pudieron ser aislados cinco compuestos, los cuales se caracterizaron a través de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una dimensión y son conocidos como: escoparona (**I**), rutina (**II**), tilirósido (**III**), kamferol-3-o-rutinosido (**IV**) y catequina (**V**).



## Dedicatoria

A mi mamá, María

A mi papá, Luis

Los amo profundamente....

## **Agradecimientos**

- Antes que todo, gracias a Dios por acompañarme y guiarme siempre en el proceso de consecución de cada meta, haciéndome brillar bajo su luz divina.
- Gracias a mi mamá por su fiel compañía y apoyo a lo largo de mi vida, ella es la mayor causa de mi lucha día a día.
- A mis hermanos, especialmente Tahiris, gracias por el apoyo brindado.
- A mi papá, gracias por su apoyo y palabras que me motivan cuando más lo necesito.
- A la profesora Alírica Suárez, por su excelente dirección y enseñanza, aprendí mucho de ella; gracias también por su calidad humana que me hizo sentir en un ambiente familiar.
- A la profesora María Lupe Márquez, por su importante aporte en el desarrollo del trabajo.
- Gracias a Katuska Chávez (Katty) por su amistad, atención y sugerencias.
- A la profesora Beth, gracias por su atención, sugerencias y palabras de aliento.

## Índice general

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de esquemas.....	iv
Índice de espectros.....	v
Lista de abreviaturas (acrónimos) y símbolos.....	vii
I.- Introducción.....	1
II.- Productos naturales.....	4
III.- Principios activos de las plantas.....	4
III.1.- Distribución de los principios activos en las plantas.....	5
IV.- Aceites esenciales.....	6
V.- Extractos vegetales.....	7
VI.- Técnicas utilizadas para la preparación de extractos vegetales.....	7
VI.1.- Métodos de extracción discontinua.....	9
VI.1.1.- Infusión.....	9
VI.1.2.- Decocción.....	9
VI.1.3.- Maceración.....	10
VI.1.4.- Digestión.....	10

VI.1.4.- Extracción por reflujo.....	11
VI.2.- Métodos de extracción continua.....	12
VI.2.1.- Percolación.....	12
VI.2.2.- Extracción con Soxhlet.....	13
VII.- Familia Burseraceae.....	14
VII.1.- Generalidades.....	14
VII.2.- Aspectos botánicos.....	15
VII.3.- Distribución geográfica.....	15
VIII.- Género <i>Protium</i> .....	16
VIII.1.- Generalidades.....	16
VIII.2.- Aspectos botánicos.....	16
VIII.3.- Distribución geográfica.....	16
VIII.4.- Química del género <i>Protium</i> .....	17
VIII.4.1.- Terpenos.....	17
VIII.4.1.1.- Monoterpenos y monoterpenoides.....	19
VIII.4.1.2.- Sesquiterpenos y sesquiterpenoides.....	22
VIII.4.1.3.- Triterpenos y triterpenoides.....	24
VIII.4.2.- Compuestos fenólicos.....	25
VIII.4.2.1.- Flavonoides.....	25

VIII.4.2.2.- Cumarinas.....	32
VIII.4.2.3.- Lignanos.....	33
VIII.4.2.4.- Taninos.....	34
VIII.5.- Antecedentes fitoquímicos del género <i>Protium</i> .....	36
VIII.5.1.- Terpenos y terpenoides.....	36
VIII.5.2.- Flavonoides, cumarinas y taninos.....	41
VIII.5.3.- Lignanos.....	44
IX.- Especie <i>Protium towarensense</i> Pittier.....	45
IX.1.- Generalidades.....	45
IX.2.- Aspectos botánicos.....	46
IX.3.- Distribución geográfica.....	46
IX.4.- Antecedentes fitoquímicos de la especie <i>Protium towarensense</i> Pittier.....	46
X.- Justificación.....	48
XI.- Objetivos.....	49
XII.- Materiales y equipos.....	50
XII.1.- Equipo de laboratorio.....	50
XII.2.- Materiales cromatográficos.....	50
XII.3.- Reactivos.....	51
XIII.- Procedimiento experimental.....	52



<b>XIII.1.- Colecta del material vegetal.....</b>	<b>52</b>
<b>XIII.2.- Preparación de la muestra.....</b>	<b>52</b>
<b>XIII.3.- Extracción.....</b>	<b>53</b>
<b>XIII.4.- Fraccionamiento del extracto metanólico.....</b>	<b>53</b>
<b>XIII.5.- Separación de los componentes por fracción.....</b>	<b>55</b>
<b>XIII.5.1- Separación de los componentes en la fracción de hexano.....</b>	<b>56</b>
<b>XIII.5.2- Separación de los componentes en la fracción de cloroformo.....</b>	<b>58</b>
<b>XIII.5.3- Separación de los componentes en la fracción de acetato de etilo....</b>	<b>61</b>
<b>XIII.5.4- Separación de los componentes en la fracción acuosa.....</b>	<b>64</b>
<b>XIV.- Resultados y discusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>XIV.1.- Compuesto I: escoparona (I).....</b>	<b>64</b>
<b>XIV.2.- Compuesto II: rutina (II).....</b>	<b>68</b>
<b>XIV.3.- Compuesto III: tilirósido (III).....</b>	<b>76</b>
<b>XIV.4.- Compuesto IV: kamferol-3-o-rutinosido (IV).....</b>	<b>83</b>
<b>XIV.5.- Compuesto V: catequina (V).....</b>	<b>91</b>
<b>XV.- Conclusiones.....</b>	<b>98</b>
<b>XVI.- Recomendaciones.....</b>	<b>99</b>
<b>XVII.- Referencias bibliográficas.....</b>	<b>100</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla N° 1. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de hexano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla N° 2. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de cloroformo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla N° 3. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de acetato de etilo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla N° 4. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en la escoparona (I).....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla N° 5. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en la rutina (II).....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla N° 6. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en la rutina (II).....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla N° 7. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el tilirósido (III).....</b>	<b>82</b>

<b>Tabla N° 8. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el tilirósido (III).....</b>	<b>82</b>
<b>Tabla N° 9. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el kamferol-3-o-rutinosido (IV)....</b>	<b>90</b>
<b>Tabla N° 10. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el kamferol-3-o-rutinosido (IV)...</b>	<b>90</b>
<b>Tabla N° 11. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el catequina (V).....</b>	<b>97</b>
<b>Tabla N° 12. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el catequina (V).....</b>	<b>97</b>

## Índice de figuras

<b>Figura N° 1. Equipo de reflujo.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura N° 2. Percolador.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura N° 3. Equipo Soxhlet.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura N° 4. Hojas de <i>Protium tovarense</i> Pittier.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura N° 5. Frutos verdes de <i>Protium tovarense</i> Pittier.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura N° 6. Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTCF<sub>1</sub>.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura N° 7. Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>1</sub>.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura N° 8. Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>2</sub>.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura N° 9. Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>3</sub>.....</b>	<b>84</b>

## Índice de esquemas

<b>Esquema N° 1. Fraccionamiento del extracto metanólico de las cáscaras de los frutos secos de <i>Protium tovarense</i> Pittier.....</b>	<b>54</b>
<b>Esquema N° 2. Separación de componentes en la fracción de hexano.....</b>	<b>58</b>
<b>Esquema N° 3. Separación de componentes en la fracción de cloroformo.....</b>	<b>61</b>
<b>Esquema N° 4. Separación de componentes en la fracción de acetato de etilo.....</b>	<b>63</b>

## Índice de espectros

Espectro N°1. RMN <sup>1</sup> H escoparona (I) (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	66
Espectro N°2. RMN <sup>1</sup> H escoparona (I) ampliado (δ: 4,4-2,9 ppm) (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	67
Espectro N°3. RMN <sup>1</sup> H rutina (II) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	72
Espectro N°4: RMN <sup>1</sup> H rutina (II) ampliado (δ: 8,0-5,9 ppm) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	73
Espectro N° 5. RMN <sup>13</sup> C y DEPT 135° rutina (II) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	74
Espectro N° 6. RMN <sup>1</sup> H tilirósido (III) (270 MHz; DMSO-d <sub>6</sub> ).....	79
Espectro N° 7: RMN <sup>1</sup> H tilirósido (III) ampliado (δ: 8,5-5,0 ppm) (270 MHz; DMSO-d <sub>6</sub> ).....	80
Espectro N° 8. RMN <sup>13</sup> C y DEPT 135° tilirósido (III) (270 MHz; DMSO-d <sub>6</sub> ).....	81
Espectro N°9. RMN <sup>1</sup> H kamferol-3-o-rutinosido (IV) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	87
Espectro N°10: RMN <sup>1</sup> H kamferol-3-o-rutinosido (IV) ampliado (δ: 8,2-5,9 ppm) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	88
Espectro N°11. RMN <sup>13</sup> C y DEPT 135° kamferol-3-o-rutinosido (IV) (270 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	89
Espectro N° 12. RMN <sup>1</sup> H catequina (V) (270 MHz; DMSO-d <sub>6</sub> ).....	94

<b>Espectro N° 13: RMN <sup>1</sup>H catequina (V) ampliado (δ: 7,5-4,1 ppm) (270 MHz; DMSO-d6).....</b>	<b>95</b>
<b>Espectro N° 14. RMN <sup>13</sup>C y DEPT 135° catequina (V) (270 MHz; DMSO-d6).....</b>	<b>96</b>

**Lista de abreviaturas (acrónimos) y símbolos**

CC	Cromatografía de Columna
CCF	Cromatografía de Capa Fina
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{CD}_3\text{OD}$	metanol deuterado
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
$\delta$	desplazamiento químico
d	doblete
dd	doblete de doblete
$\text{DMSO-}d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
g	gramo
Hz	Hertz
$J$	constante de acoplamiento
m	multiplicidad
mg	miligramo
mL	mililitro
MHz	megaHertz
mm	milímetro
ppm	partes por millón



Rf	factor de retención
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protones
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
s	singlete
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta
LCPTM	Luimar Cassiran <i>Protium tovarense</i> extracto metanólico
LCPTH	Luimar Cassiran <i>Protium tovarense</i> fracción de hexano
LCPTC	Luimar Cassiran <i>Protium tovarense</i> fracción de cloroformo
LCPTAc	Luimar Cassiran <i>Protium tovarense</i> fracción de acetato de etilo
LCPTH <sub>2</sub> O	Luimar Cassiran <i>Protium tovarense</i> fracción acuosa

## I.- Introducción

Desde los comienzos de la historia humana, las plantas se han usado con fines medicinales. El tratamiento de las enfermedades en la prehistoria se inició a partir de la observación de los efectos resultantes tras el contacto, accidental o provocado, con especies vegetales y con la observación de las costumbres de otras formas de vida. Según la leyenda de la celidonia o “hierba golondrinerá”, algunas golondrinas exprimen en los ojos de sus crías este vegetal, con el fin de destruir la membrana ocular que en sus primeros momentos de vida les impide la visión. Algunas serpientes, a la hora de mudar su piel, aceleran el proceso al frotarse a la corteza rugosa de los árboles y se rehidratan a partir de la humedad del musgo.<sup>1</sup>

Ya en las primitivas comunidades humanas existían sanadores que conocían bien las propiedades medicinales y tóxicas de las plantas que crecían en las adyacencias del espacio geográfico en el cual se ubicaban.<sup>2</sup> Durante muchos años, la medicina natural estuvo relegada debido al auge de los productos de síntesis química de indudable perfección técnica, pero con una gran secuela de efectos secundarios. Decía Paracelso: “La naturaleza es un laboratorio viviente, del que se pueden extraer los principios de la curación, basados en las causas de las enfermedades y no en sus efectos”. En base a esto, durante los últimos años, la medicina natural ha renacido, presentándose alternativas en el tratamiento médico y existiendo una gran disposición de productos elaborados a base de plantas certificadas y avaladas profesionalmente. El presente de las medicinas alternativas complementarias apunta a una nueva era de alternativas naturales.

Las personas que padecen hepatitis viral, cada vez con mayor frecuencia, investigan y utilizan tratamientos naturales, especialmente suplementos a base de hierbas, para ayudar a combatir la enfermedad hepática relacionada. El uso de medicina complementaria se encuentra bastante difundido y la investigación biomédica en medicina complementaria está creciendo. Es de señalar que la investigación científica también está dedicando recursos a la medicina alternativa.

La etnofarmacología es la exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados o conocidos por el hombre. Es de destacar que la consideración interdisciplinaria, se origina en que su investigación está sustentada por la contribución vital de otras ciencias. Dado que más del 90% de los remedios tradicionales están basados en productos vegetales, la etnofarmacología se fundamenta en la botánica, la farmacología y la química, aunque otras disciplinas también pueden realizar contribuciones vitales al progreso en este campo.<sup>3</sup>

Desde la perspectiva práctica, el objetivo general de la etnofarmacología es afianzar la inclusión de los elementos útiles de las tradiciones terapéuticas en los sistemas oficiales de salud. Esto significaría validar el conjunto de creencias populares respecto a las plantas medicinales. Se debe aclarar que al comprobar científicamente la eficacia de algunos componentes de las plantas medicinales y luego de ello usarlas, ya no se estaría haciendo medicina tradicional, sino que la misma se estaría formalizando. El uso tradicional de las plantas sirve como un indicio de eficacia, sugiere una posibilidad terapéutica, más no la valida. Se debe recordar que las pruebas de eficacia no son sólo a nivel bioquímico o fisiológico (es decir, de explicación causal), sino fundamentalmente de orden clínico.<sup>3</sup>

El conocimiento de la medicina tradicional había sido logrado a partir de la experiencia, pero la experiencia no controlada ni medida. Por ello, quizá esta medicina seguía siendo antiquísima, ya que a pesar de aventajar en miles de años a la medicina científica, la medicina tradicional se había mantenido casi estática, sin cambios. Con el desarrollo de los estudios etnofarmacológicos será posible adentrar cada vez más en la nueva era de la medicina natural.<sup>4</sup>

La fitoquímica se ha dedicado al estudio químico de las plantas, a través de la extracción de material que ha sido colectado y procesado. Tiene una gran importancia para la determinación de los componentes activos de las plantas, la cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana.<sup>5</sup>

La especie *Protium towarensense* Pittier, objeto de estudio en este trabajo, pertenece a la familia Burseraceae, la cual comprende alrededor de 18 géneros y 650 especies y es conocida a nivel mundial por sus resinas. La mayoría de estas especies han sido química y farmacológicamente investigadas, habiéndose aislado a partir de ellas diversos compuestos con actividad anticancerígena, antiinflamatoria, hepatoprotectora, entre otras. No se ha encontrado un estudio fitoquímico para la especie *Protium towarensense* Pittier. Por esta razón, es de interés realizar el estudio fitoquímico de esta planta, comenzando por sus frutos.

## **II.- Productos naturales**

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se definen como “productos naturales” o “metabolitos secundarios” aquellos que son propios de una especie y que, en la mayoría de los casos, no tienen utilidad aparente para el ser que los sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, etc.<sup>6</sup>

## **III.- Principios activos de las plantas**

Si se estudia la estructura y composición de una planta, se puede encontrar:

- Principios activos
- Sustancias inertes

Los principios activos son los componentes considerados terapéuticos. Pueden diferir mucho en su número y concentración, según sea la complejidad de la estructura de la planta.<sup>7</sup>

### III.1.- Distribución de los principios activos en las plantas

Los principios activos se distribuyen de manera desigual por las diferentes partes u órganos de la planta. No basta con saber que la valeriana es un buen sedante, hay que saber qué parte de la planta se debe utilizar. En algunos casos, todas las partes de la planta contienen los mismos principios activos, de forma que es indiferente usar unas u otras. Pero también se pueden encontrar los siguientes casos: <sup>8</sup>

- Que los principios activos se concentren en una sola parte de la planta.
- Que cada parte de la planta produzca sustancias diferentes, y por lo tanto tenga distintas propiedades.
- Que unas partes produzcan principios medicinales y, en cambio, otras partes de la misma planta elaboren sustancias tóxicas. Este es el caso de la raíz de la consuelda (*Symphytum asperum* Lepechin; Boraginaceae), un gran cicatrizante debido a la alantoína que contiene; mientras que en su tallo y sus hojas se encuentra un alcaloide, que los hace muy tóxicos.

Conviene, por tanto, conocer y saber identificar cada una de las partes y órganos constituyentes de una planta.

#### **IV.- Aceites esenciales**

Los aceites esenciales de las plantas son una mezcla de sustancias aromáticas concentradas en forma de minúsculas gotas en diferentes partes de la planta: las hojas, la raíz, las flores, el tallo y las semillas. Por ejemplo, cuando al tomar una cáscara de mandarina o naranja y presionarla se ven salir unas minúsculas gotas que dejan en el ambiente un delicioso olor a fruta, esos son los aceites esenciales, lo mismo se puede efectuar con una hoja de albahaca o menta al macerarla entre los dedos. Los aceites esenciales son una mezcla de muchos compuestos; son volátiles, insolubles en agua y poseen muchas propiedades terapéuticas; tienen gran aplicación en aromaterapia, en la industria de los cosméticos, perfumes, el área farmacéutica, entre otras. Dependiendo de la aplicación, la clase de planta y la parte que se utilice para la extracción de los aceites esenciales se tienen varias técnicas de extracción, siendo los obtenidos por arrastre con vapor los de más alta calidad para uso medicinal y terapéutico por no contener residuos.<sup>9</sup>

Entre los componentes de los aceites esenciales, los terpenos, una familia de hidrocarburos, son a menudo mayoritarios, llegando a alcanzar elevadas concentraciones del 75% a 90% del peso total de los aceites esenciales. No es sólo uno de sus componentes lo que le presta su identidad, sino la combinación exquisita y compleja de todos ellos. De este equilibrio dependen el perfume característico y la virtud del aceite. Esa cantidad de elementos integrantes es lo que hace que sea casi imposible imitar un aceite determinado con exactitud en el laboratorio.<sup>10</sup>

## **V.- Extractos vegetales**

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se separan de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.<sup>11</sup>

Los extractos vegetales han sido utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes patologías, tales como micosis, inflamaciones e infecciones. Este potencial ha sido explotado por la industria farmacológica en la producción de nuevos fármacos, entre ellos analgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos.

## **VI.- Técnicas utilizadas para la preparación de extractos vegetales.**

Los extractos vegetales se obtienen por un tipo de extracción llamada "sólido-líquido". Este proceso consta de tres etapas:

- 1) Penetración del disolvente en los tejidos de los vegetales e hinchazón;
- 2) Disolución de las sustancias extraíbles;
- 3) Difusión de las sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal.



En general, se denomina extracción sólido- líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (en el área de productos naturales, el material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el cual son solubles algunas de las sustancias que componen al sólido. Del proceso se obtiene un sólido, de empobrecida composición, y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él.<sup>12</sup>

Los factores más importantes a tener en cuenta en una extracción sólido- líquido son: la elección del disolvente de extracción, el método de contacto y la temperatura a la cual ocurre el proceso.

Existen varios métodos de extracción sólido –líquido, el método a emplear depende fundamentalmente de los objetivos del estudio de la planta. Si se persigue el aislamiento de sustancias sensibles al calor, deberán emplearse métodos de extracción en frío; si por el contrario no se posee información sobre la naturaleza química de las sustancias que se espera aislar, se debe seleccionar la técnica dependiendo de las observaciones sobre la marcha.<sup>6</sup>

Los métodos más comúnmente empleados para preparar extractos vegetales son los siguientes:

## **VI.1.- Métodos de extracción discontinua**

En este tipo de extracción, una sola porción del disolvente entra en contacto con el material vegetal a extraer. La extracción de los principios activos procede hasta la saturación del disolvente, de manera que el proceso culmina en este punto. No se logra una extracción cuantitativa de los principios activos presentes en el material vegetal.<sup>13</sup>

### **VI.1.1.- Infusión**

Una infusión es una solución diluida de los componentes fácilmente solubles de una o varias partes vegetales. Se realiza sumergiendo las partes vegetales, preferiblemente troceadas o molidas, en una cantidad determinada de agua a temperatura de ebullición; se deja reposar normalmente alrededor de 15 minutos, removiendo de vez en cuando, y a continuación se filtra. Las dosis generales son de aproximadamente un gramo de planta por cada diez gramos de agua. Por lo general, los extractos obtenidos mediante este método presentan muy bajas concentraciones de principios activos.<sup>14</sup>

### **VI.1.2.- Decocción**

En este método, las partes vegetales se mantienen en el disolvente (generalmente agua) en ebullición durante 15-30 minutos. Posteriormente se filtra y se recoge el líquido resultante (extracto).<sup>13</sup> Dado que la solubilidad de los principios activos generalmente aumenta con la temperatura, se logra extraer una mayor cantidad de los

mismos en comparación con los métodos que se llevan a cabo a temperatura ambiente; sin embargo, presenta la desventaja de afectar sustancias termolábiles.

### **VI.1.3.- Maceración**

Consiste en dejar las partes vegetales sumergidas en un disolvente, a temperatura ambiente, durante un tiempo relativamente largo.<sup>13</sup> Contrario al caso de la decocción, en este método las sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la solubilidad de los principios es menor a temperaturas más bajas y, así, se extrae una menor cantidad de principios activos en comparación a la que pudiera extraerse a una temperatura superior.

### **VI.1.4.- Digestión**

Se trata de una extracción a temperaturas superiores a la ambiente, entre 35 y 40°, e inferiores a los 50°C. Se introducen las partes vegetales a extraer en un recipiente que contiene el líquido previamente calentado a la temperatura deseada; se mantiene durante un período que puede oscilar entre media hora y veinticuatro horas, agitando regularmente el envase. Se separa finalmente el líquido (extracto). Un moderado aumento de la temperatura, eleva un poco la solubilidad de los principios activos sin recurrir a calentamientos extremos.<sup>13</sup>

#### VI.1.4.- Extracción por reflujo

Consiste en colocar las partes vegetales a extraer en un balón de destilación junto con el disolvente; la boca del balón se ajusta un refrigerante (ver figura N° 10) y se inicia entonces el calentamiento hasta que el disolvente alcanza su temperatura de ebullición. Los vapores generados en el matraz condensan en el refrigerante y caen de nuevo en forma líquida en el matraz. Se mantiene el sistema a reflujo durante algunas (pocas) horas, se deja enfriar el sistema y se separa el líquido resultante.<sup>15</sup> El reflujo evita la pérdida de disolvente en forma de vapor, de manera que el mismo no llega a agotarse y puede mantenerse el calentamiento durante más tiempo; sin embargo, las sustancias termolábiles resultan considerablemente afectadas.

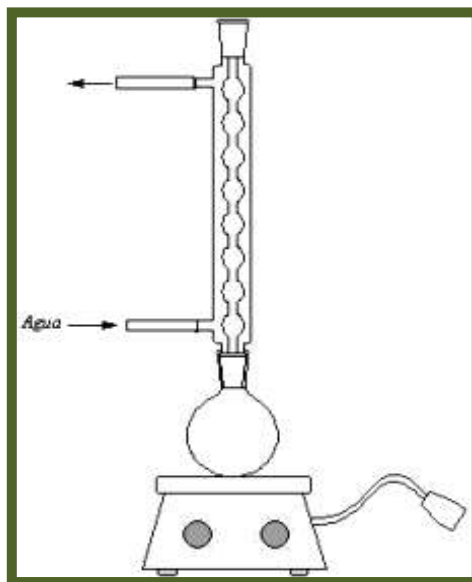


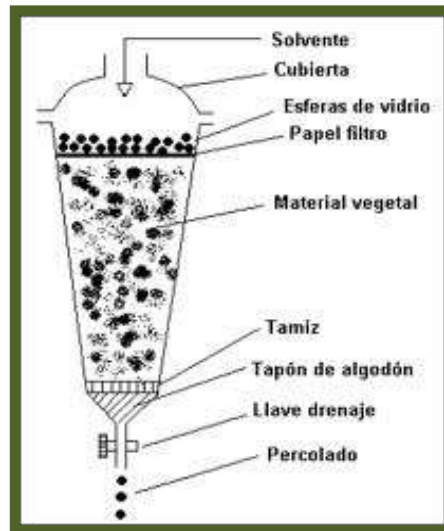
Figura N° 1: Equipo de reflujo

## **VI.2.- Métodos de extracción continua**

En este tipo de extracción, el disolvente se renueva una vez que se ha saturado. En ese momento, el disolvente se cambia añadiendo disolvente puro, el cual extraerá más principios activos hasta saturarse. El proceso se repite hasta conseguir extraer la máxima cantidad de principios activos contenidos en el tejido vegetal. En este tipo de métodos, por tanto, se extrae una mayor cantidad de principios activos que la lograda a partir de métodos discontinuos.<sup>13</sup>

### **VI.2.1.- Percolación**

En este método las partes vegetales, finamente picadas o pulverizadas, se colocan en un recipiente en forma de columna (percolador, ver figura N°11) donde también se añade el disolvente. El disolvente recorre, por gravedad, la columna en sentido descendente, entrando en contacto con el tejido vegetal y arrastrando los principios activos que contiene. El percolador presenta en su parte inferior una apertura controlada por una llave, por donde sale el disolvente con los principios activos disueltos. Por la parte superior se añade disolvente puro, que compensará las salidas inferiores y continuará extrayendo principios activos.<sup>13</sup> Dado que el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la renovación continua del disolvente constituye una desventaja, ya que el volumen final recolectado es generalmente grande, para lo cual, además, se gastan elevadas cantidades del solvente puro.



**Figura N° 2: Percolador**

### **VI.2.2.- Extracción con Soxhlet**

Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido o troceado en una cámara de extracción, la cual se conecta por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante (ver figura N°12). El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material vegetal. Cuando alcanza el nivel conveniente, sifonea por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material.<sup>16</sup> A pesar que el calentamiento se lleva a cabo en la parte baja del balón de destilación, el proceso de extracción ocurre a una temperatura superior a la ambiental, con lo cual aumenta la solubilidad de los principios activos; sin embargo, las sustancias termolábiles se ven considerablemente afectadas durante el proceso. La mayor ventaja de este método, la constituye el hecho de poder efectuar la extracción continua sin añadir nuevas cantidades del solvente puro, de manera que el volumen

final del extracto obtenido, será igual a la cantidad inicial de solvente colocado en el sistema.



Figura N° 3: Equipo Soxhlet

## VII.- Familia Burseraceae

### VII.1.- Generalidades

La familia Burseraceae está conformada por árboles y arbustos; en la actualidad se conocen aproximadamente 20 géneros con 600 especies distribuidas alrededor del mundo.<sup>17</sup> Esta familia es conocida por ser fuente de exudados y resinas con un alto

contenido de compuestos aromáticos con aplicaciones en la medicina tradicional, la perfumería, entre otros.<sup>18</sup>

## VII.2.- Aspectos botánicos

Árboles o arbustos a menudo resinosos. Tienen hojas alternas, sin estípulas, trifoliadas o unifoliadas. Presentan flores pequeñas, bisexuales o polígamo-dioicas, dispuestas en racimos o panículas. Tienen el cáliz con 3-5 lóbulos o sépalos, imbricados o valvados, la corola con 3-5 pétalos generalmente libres. Androceo con estambres en igual número o doble que el de pétalos, con los filamentos libres. Ovario con 2-5 lóculos, trígono, con 2 óvulos en cada lóculo. Fruto drupáceo o seco, dehiscente o indehiscente.<sup>19</sup>

## VII.3.- Distribución geográfica

Las especies pertenecientes a la familia Burseraceae se encuentran principalmente distribuidas en los países pertenecientes a América tropical, Malasia y África.<sup>20</sup>

En Venezuela han sido encontrados 7 géneros pertenecientes a esta familia, distribuidos en 68 especies, incluyendo 2 especies endémicas. Los géneros que han sido encontrados en el territorio venezolano son: *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium*, *Tetragastris* y *Trattinckia*; estos géneros se encuentran distribuidos alrededor de todo el territorio, y la totalidad de las 68 especies pertenecientes a los mismos son especialmente abundantes en la región de Guayana y la región Capital.<sup>21</sup>



## **VIII.- Género *Protium***

### **VIII.1.- Generalidades**

El género *Protium* comprende unas 180 especies. Es el género principal de la familia Burseraceae. La resina de estos árboles ha sido aplicada en diversos países para tratamientos tradicionales a diversas enfermedades; en Venezuela, ha sido aplicada para el tratamiento de dislocaciones, tumores y tiña; y se coloca en las sienas para aliviar dolores de cabeza y de muelas.<sup>22</sup>

### **VIII.2.- Aspectos botánicos**

Árboles, raramente arbustos, con corteza relativamente lisa, de gris a marrón, delgada, quebradiza; albura blanca a roja; resina transparente y líquido restante opaco y lechoso. Hojas compuestas o, menos frecuentemente, unifoliadas, con márgenes enteros (rara vez serrados). Flores unisexuales, pentámeras o tetrámeras; androceo diplostémono. Frutos drupáceos, a veces dehiscentes, cuando maduran son usualmente rojos, pero ocasionalmente verdes o marrones.<sup>23</sup>

### **VIII.3.- Distribución geográfica**

Este género se encuentra ampliamente distribuido en el Neotrópico, principalmente en los bosques húmedos de las tierras ubicadas por debajo de 1000 m de altitud.<sup>23</sup>

Del género *Protium* se han encontrado 41 especies en el territorio venezolano, las cuales son especialmente abundantes en las regiones Guayana, Capital y Central.<sup>21</sup>

#### **VIII.4.- Química del género *Protium***

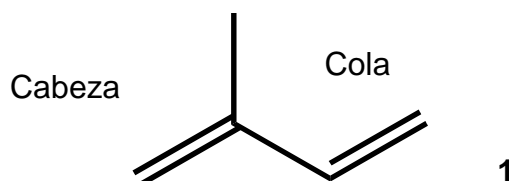
De especies pertenecientes al género *Protium* ha sido posible aislar una gran variedad de compuestos. La resina que exudan estas especies al ser escindida su corteza se compone principalmente de terpenos y terpenoides. Los componentes volátiles son principalmente monoterpenos-monoterpenoides y sesquiterpenos- sesquiterpenoides. Otros metabolitos secundarios que han sido comúnmente identificados en diversas partes de estas especies son algunos compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, lignanos y taninos).

##### **VIII.4.1.- Terpenos**

La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y se le conoce como isopreno **(1)**.<sup>6</sup>

De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como regla del isopreno, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. La unión de las cadenas de isopreno que da lugar a los terpenos, suele ser de la forma cabeza-cola. En ocasiones se dan reacciones de degradación, o bien rearrreglos esqueléticos que conducen a secuencias anormales de la unidad de C<sub>5</sub>. El descubrimiento de un gran número de

compuestos que presentan diferentes grupos funcionales ha generado el uso del término “*terpenoide*” para designarlos en lugar de “*terpeno*”, cuya terminación (-eno) denota más bien hidrocarburos.<sup>6</sup>



La gran diversidad estructural de esta clase de compuestos dificulta el resumen de las características comunes entre ellos, pues no solamente se trata de la variedad de grupos funcionales, sino además del número de átomos de carbono que conforman los esqueletos.<sup>6</sup> De acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen, los compuestos de tipo terpeno y terpenoides, se pueden clasificar en:

Monoterpenos: Contienen dos unidades de isopreno (10 átomos de carbono)

Sesquiterpenos: Contienen tres unidades de isopreno (15 átomos de carbono)

Diterpenos: Contienen cuatro unidades de isopreno (20 átomos de carbono)

Sesterpenos: Contienen cinco unidades de isopreno (25 átomos de carbono)

Triterpenos: Contienen seis unidades de isopreno (30 átomos de carbono)

Tetraterpenos: Contienen ocho unidades de isopreno (40 átomos de carbono)

Politerpenos: Contienen más de 45 átomos de carbono.<sup>24</sup>

Los terpenos son toxinas y repelentes para un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de las plantas, de forma que representan un importante papel defensivo en el reino vegetal.

Los aceites esenciales de las plantas están conformados por mezclas de monoterpenos y sesquiterpenos volátiles que le confieren el aroma característico. Los aceites esenciales son bien conocidos por sus propiedades repelentes de insectos.<sup>25</sup>

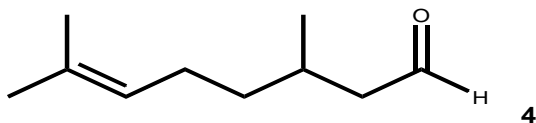
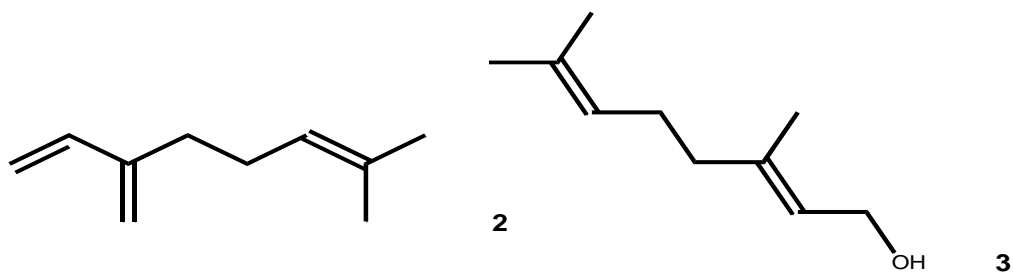
De plantas pertenecientes al género *Protium*, los compuestos de tipo terpeno y terpenoide que más comúnmente han sido encontrados, son los monoterpenos (y monoterpenoides), sesquiterpenos (y sesquiterpenoides) y triterpenos (y triterpenoides). A continuación se ahondará en estos tres últimos grupos de compuestos:

#### **VIII.4.1.1.- Monoterpenos y monoterpenoides**

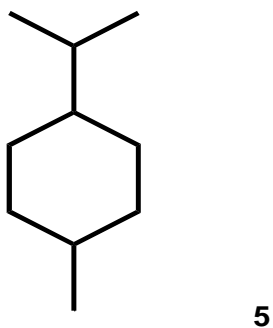
Como se ha mencionado antes, los monoterpenos son compuestos formados por diez átomos de carbono. Su estructura está conformada por dos unidades de isopreno y pueden presentar una forma cíclica o acíclica. Son sustancias lipofílicas, volátiles, responsables de olor característico de muchas plantas, suelen ser los constituyentes principales de los aceites esenciales y resinas de muchas plantas. Muchos de ellos son agentes alelopáticos o sustancias de defensa contra depredadores y parásitos.<sup>26</sup>

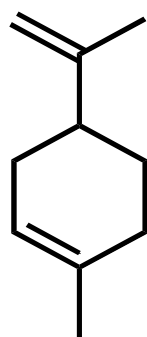
Los monoterpenos (y monoterpenoides) se clasifican según sus esqueletos de carbono como acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.<sup>24</sup>

- Acíclicos: Como el monoterpeno mirceno **(2)**, el monoterpenol geraniol **(3)**, y el monoterpenal citronelal **(4)**.

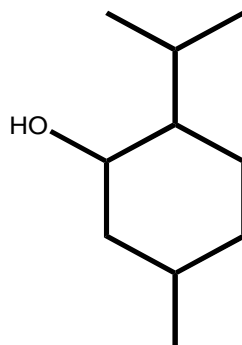


- Monocíclicos: Como los monoterpenos mentano **(5)** y limoneno **(6)**, el monoterpenol mentol **(7)**, y la monoterpenona mentona **(8)**.

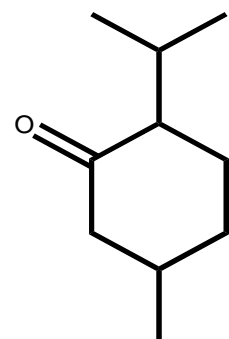




6

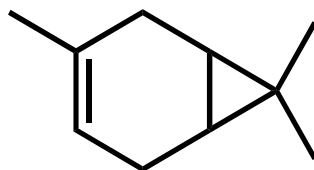


7



8

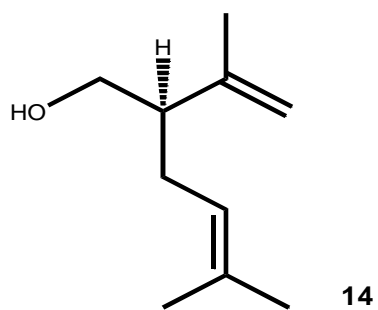
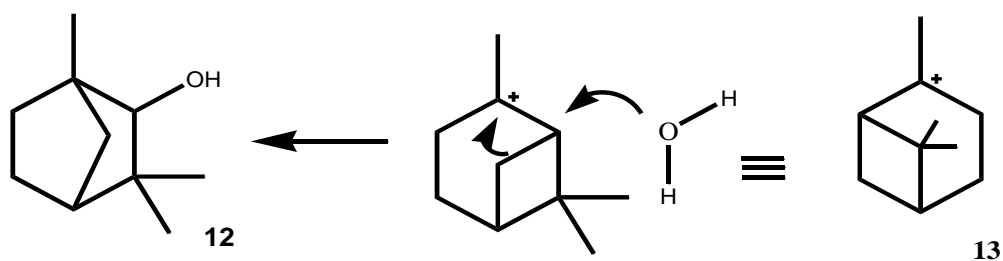
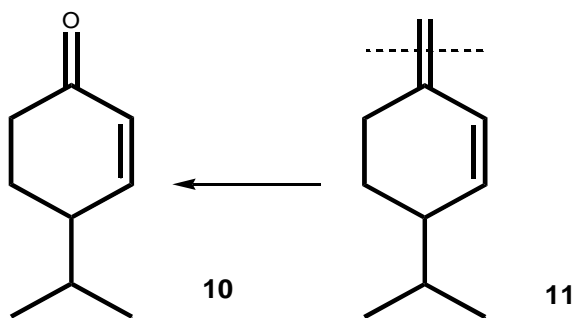
- Bicíclicos: Como el monoterpeno 3-careno (**9**).



9

Los esqueletos irregulares, a los cuales se ha hecho referencia en páginas anteriores, se generan por:

- Pérdida de átomos de carbono: como es el caso de la monoterpenona criptona (**10**), que se forma por oxidación del monoterpeno  $\beta$ -felandreno (**11**).
- Reordenamientos esqueléticos: como es el caso del monoterpenol fenchol (**12**), el cual proviene del rearrreglo esquelético del precursor de pinanos (**13**).
- Unión anormal de las unidades de isopreno (diferente de la unión cabeza-cola): como el monoterpenol R-lavandulol (**14**).

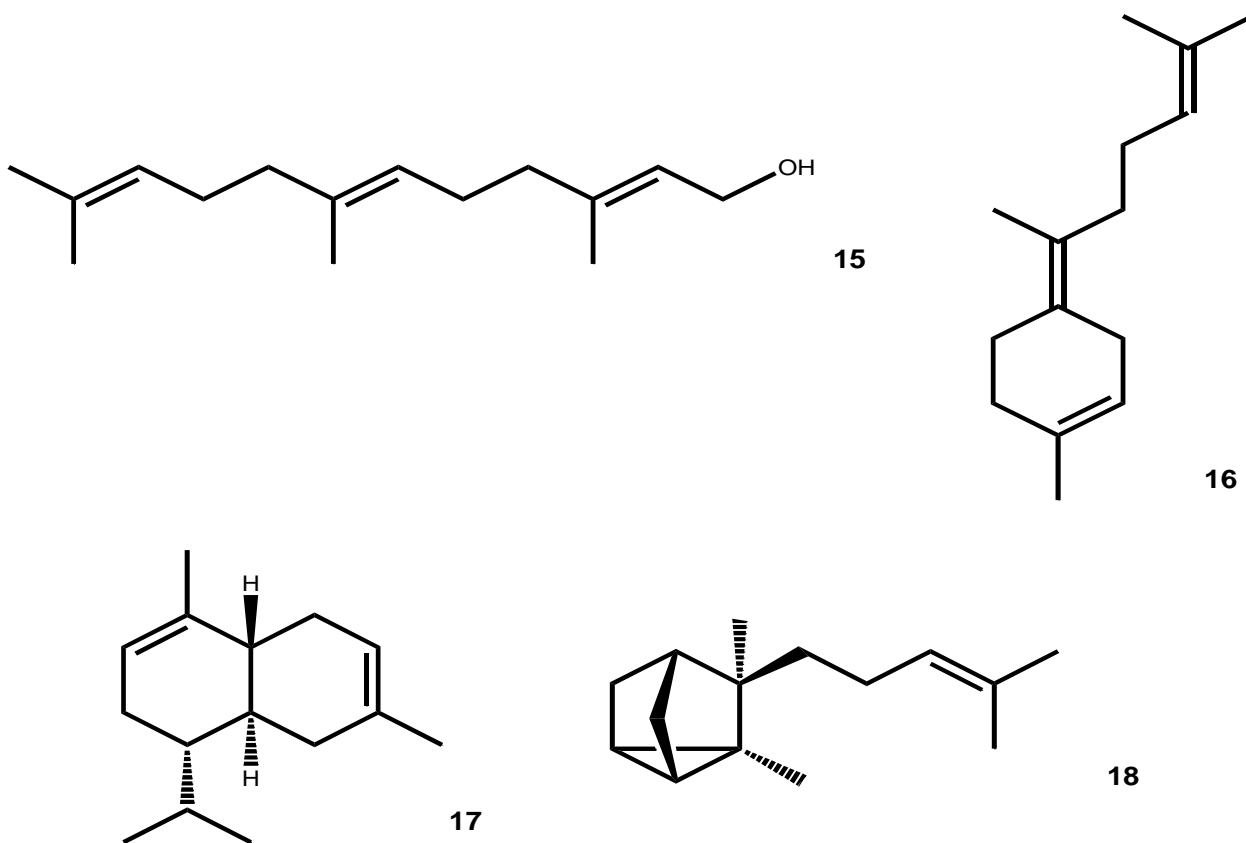


#### VIII.4.1.2.- Sesquiterpenos y sesquiterpenoides

La estructura de los sesquiterpenos se basa en tres unidades de isopreno (**1**), que se pueden unir formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas abiertas o sistemas cíclicos. De manera análoga a la clasificación antes presentada para los monoterpenos, los

sesquiterpenos se pueden clasificar en acíclicos, como el sesquiterpenol farnesol (**15**); monocíclicos, como el sesquiterpeno  $\gamma$ -bisaboleno (**16**); bicíclicos, como el  $\beta$ -cadineno (**17**), y tricíclicos, como el sesquiterpeno  $\alpha$ -santaleno (**18**), según sea la estructura del esqueleto carbonado.<sup>27</sup>

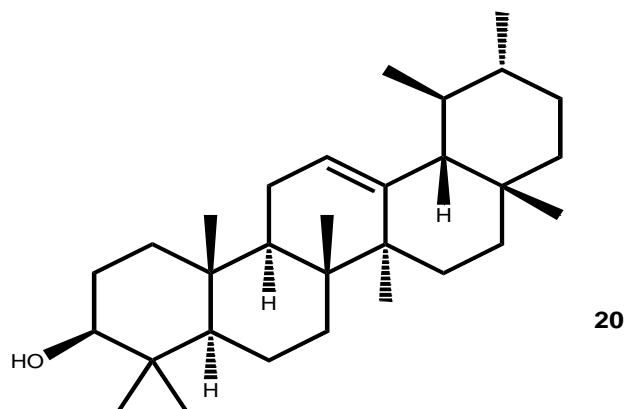
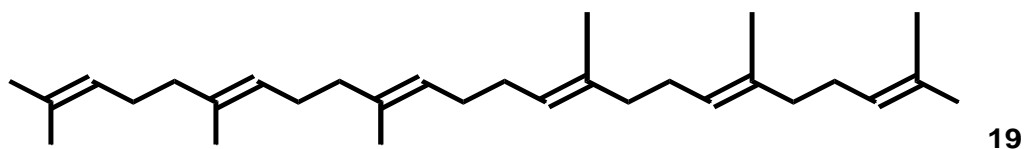
Los sesquiterpenos son constituyentes de las esencias florales y aceites esenciales, algunos son fitoalexinas (compuestos generados por las plantas en respuesta a la aparición de microbios). Las lactonas sesquitérpénicas tienen un especial interés, ya que muchas de ellas poseen potentes propiedades antitumorales.<sup>28</sup>





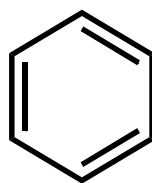
### VIII.4.1.3.- Triterpenos y triterpenoides

Se ha mencionado antes que los triterpenos son terpenos de 30 átomos de carbono cuyo esqueleto está constituido por 6 unidades de isopreno. Existe un triterpeno de cadena abierta muy abundante, el escualeno (**19**), pero la mayor parte son policíclicos, como la  $\alpha$ -amirina (**20**).<sup>24</sup> Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y la investigación de los mismos ha venido indicando el potencial que tienen como drogas, así varios de ellos han presentado actividad antiinflamatoria; otros triterpenos, debido a su sabor amargo, funcionan como antialimentarios para muchos herbívoros e insecticidas.<sup>26</sup>



### VIII.4.2.- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios de las plantas. Se caracterizan por presentar en su estructura un anillo de benceno **(21)** con, al menos, un grupo hidroxilo unido.<sup>29</sup>

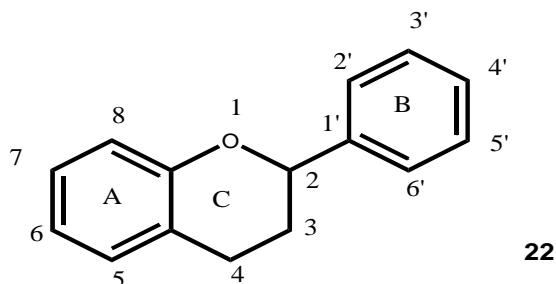


21

Dentro de este gran grupo de compuestos, los flavonoides, cumarinas, lignanos y taninos han sido frecuentemente identificados en diversas partes de especies pertenecientes al género *Protium*.

#### VIII.4.2.1.- Flavonoides

La estructura general de los flavonoides **(22)** consta de dos anillos de fenilos (A y B) comúnmente ligados a través de un anillo C heterocíclico o, pocas veces, a través de una cadena abierta (chalconas).<sup>6</sup> Sin ser metabolitos primarios, se encuentran en casi cualquier especie vegetal superior.



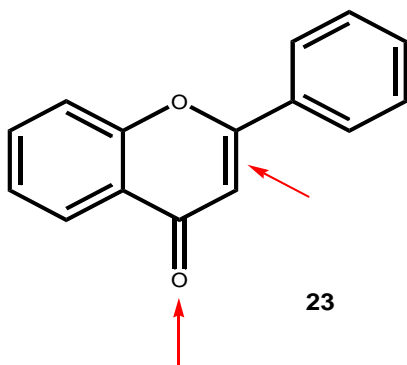
En ocasiones se les encuentra en las plantas en forma de glicósidos de algunos azúcares. La mayor parte de los glicósidos flavonoides son sólidos cristalinos, coloreados. Presentan una intensa absorción en la región ultravioleta y visible, debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Su solubilidad en agua depende de los azúcares que contienen. En general, son solubles en alcoholes de bajo peso molecular.<sup>24</sup>

Los flavonoides desempeñan varias funciones en las plantas. Así, se consideran antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, entre otros.<sup>6</sup> Estos compuestos se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana y en la actualidad se usan en la conservación de grasas y jugos de frutas, debido a sus propiedades antioxidantes. Algunos se emplean como edulcorantes, insecticidas, entre otros.<sup>30</sup>

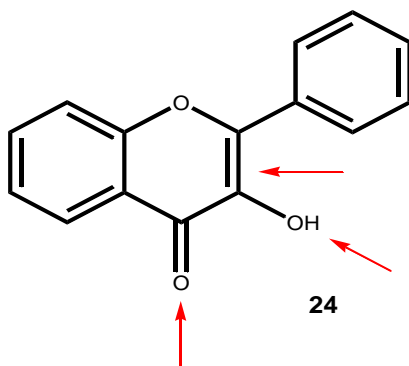
La acción farmacológica es también extensa y variada, muchos de ellos combaten la fragilidad capilar, y otros tantos presentan actividad antihepatotóxica, colerética, estrógena, diurética y antimicrobiana.<sup>30</sup>

La estructura básica de los flavonoides (**22**), puede presentar sustitución por grupos hidroxilo en diferentes posiciones de los anillos A y B (los cuales determinan las propiedades redox de estos compuestos); así como diferentes patrones de sustitución en el anillo C, por lo cual varía el estado de oxidación de este anillo central. La hidroxilación en los anillos aromáticos es muy frecuente en las posiciones 7 y 4', frecuente en 5 y 3', no tan frecuente en 5' y 8, y escasa en 6 y 2'.<sup>6</sup> De acuerdo al patrón de sustitución del anillo C, es decir, haciendo referencia a su estado de oxidación, y en algunos en base a otras variaciones en la unión de los anillos A y B, se pueden distinguir varios grupos estructurales o tipos de flavonoides, los cuales se presentan a continuación:<sup>6</sup>

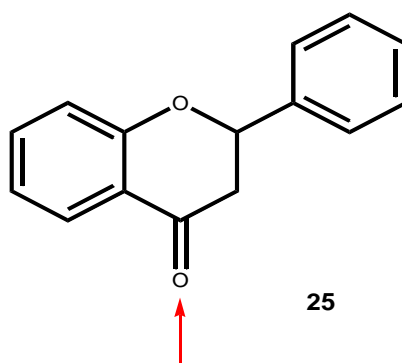
- Flavonas: presentan un grupo carbonilo en la posición 4, así como un doble enlace entre las posiciones 2 y 3. La estructura básica de las flavonas es **23**.



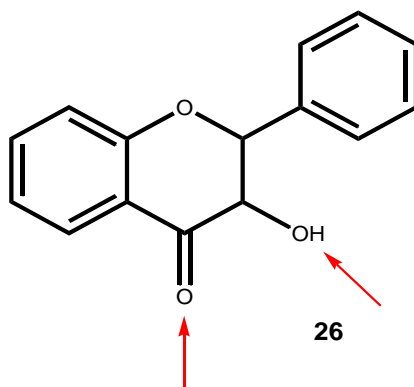
- Flavonoles: al igual que las flavonas, presentan un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre las posiciones 2 y 3; además de esto, presentan un grupo hidroxilo en la posición 3. La estructura básica de los flavonoles es **24**.



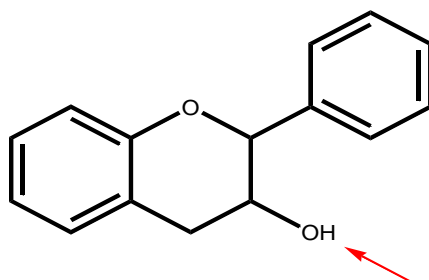
- Flavanonas: la única funcionalidad presente en el anillo C heterocíclico, es un grupo carbonilo en la posición 4. La estructura básica de las flavanonas es **25**.



- Flavanonoles: presentan un grupo carbonilo en la posición 4, al igual que las flavanonas, pero además presentan un grupo hidroxilo en la posición 3. La estructura básica de los flavanonoles es **26**.

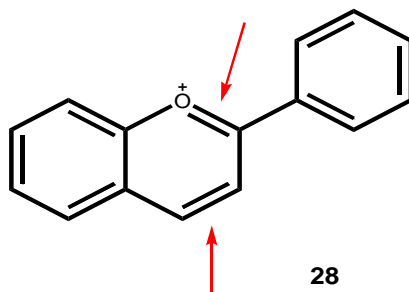


- Flavanoles: la única funcionalidad presente en el anillo C, es un grupo hidroxilo en la posición 3. La estructura básica de los flavanoles es **27**.



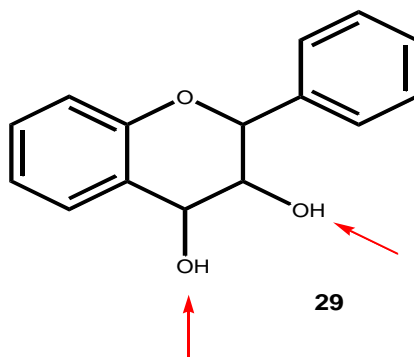
27

- Antocianidinas: presentan dos dobles enlaces en el anillo C, uno entre las posiciones 1 y 2 y otro entre las posiciones 3 y 4. La estructura básica de las antocianidinas es **28**.

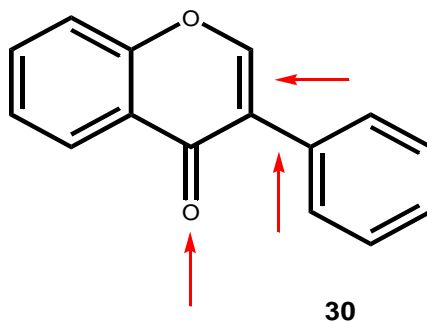


28

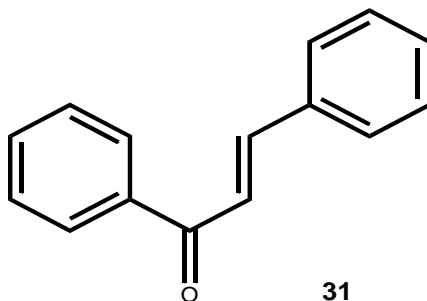
- Leucoantocianidinas: presentan dos grupos hidroxilos como únicas funcionalidades en el anillo C, uno en la posición 3 y otro en la posición 4. La estructura básica de las leucoantocianidinas es **29**.



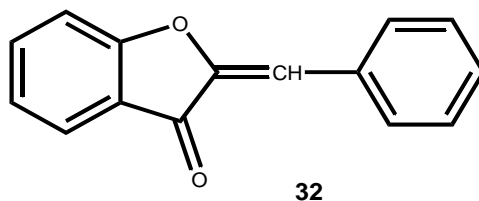
- Isoflavonas: al igual que las flavonas, presentan un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre las posiciones 2 y 3, con la diferencia que el anillo B se encuentra unido al anillo C en la posición 3 en lugar de la posición 2. La estructura básica de las isoflavonas es **30**.



- Chalconas: Los anillos A y B se encuentran unidos por medio de una cadena abierta central, es decir, el anillo C no existe y su lugar lo ocupa la cadena abierta, que contiene un grupo carbonilo y un doble enlace conjugados entre sí. La estructura básica de las chalconas es **31**.



- Auronas: en las cuales el ciclo C posee 5 miembros, con un grupo carbonilo en la posición 3. En la posición 2, además se encuentra unido a través de un doble enlace un átomo de carbono, el cual también se encuentra enlazado al anillo B. La estructura básica de las auronas es **32**.



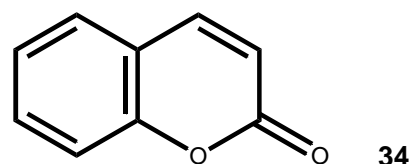
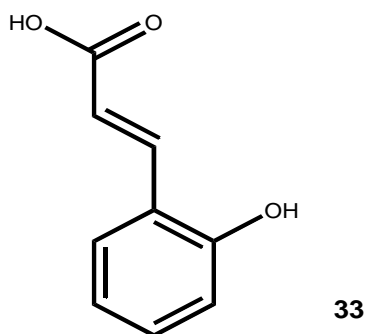
Los compuestos cuyas estructuras presentan un sistema de dobles enlaces conjugados, como las flavonas y los flavonoles, presentan coloración amarilla, mientras que aquellos en los cuales no existe la insaturación entre los carbonos 2 y 3 queda interrumpida la conjugación, y resultan incoloros.<sup>6</sup>



### VIII.4.2.2.- Cumarinas

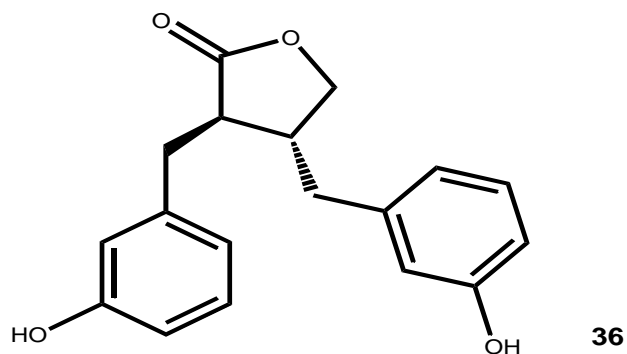
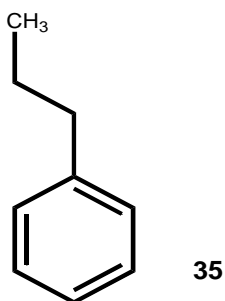
Las cumarinas son compuestos que se generan por lactonización del ácido o-cumárico (**33**). Su estructura general consiste en un anillo bencénico unido a una pirona (un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos  $sp^2$ ).<sup>6</sup> La estructura más sencilla, la cumarina (34), es utilizada como aromatizante en confitería. Se trata de compuestos altamente fluorescentes bajo luz UV y aún en la región del visible, particularmente cuando se rocían con ácido sulfúrico.<sup>6</sup>

Las cumarinas poseen una variada actividad biológica, muchas actúan como anticoagulantes, anticonvulsivos, hipotensores, antibióticos, antibacteriales y sedantes nerviosos.<sup>31</sup>



### VIII.4.2.3.- Lignanos

Los lignanos son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pueden considerarse como dímeros oxigenados del fenilpropano **(35)**. Son sólidos incoloros, algunos se encuentran como glicósidos y otros libres.<sup>32</sup> La enterolactona **(36)** es un lignano.

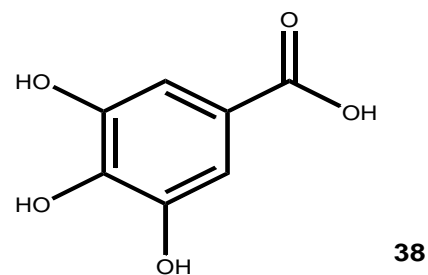
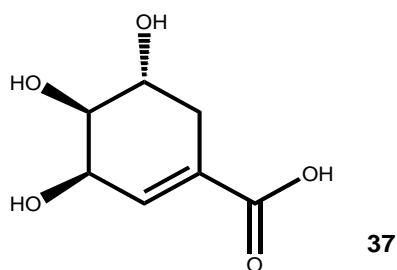


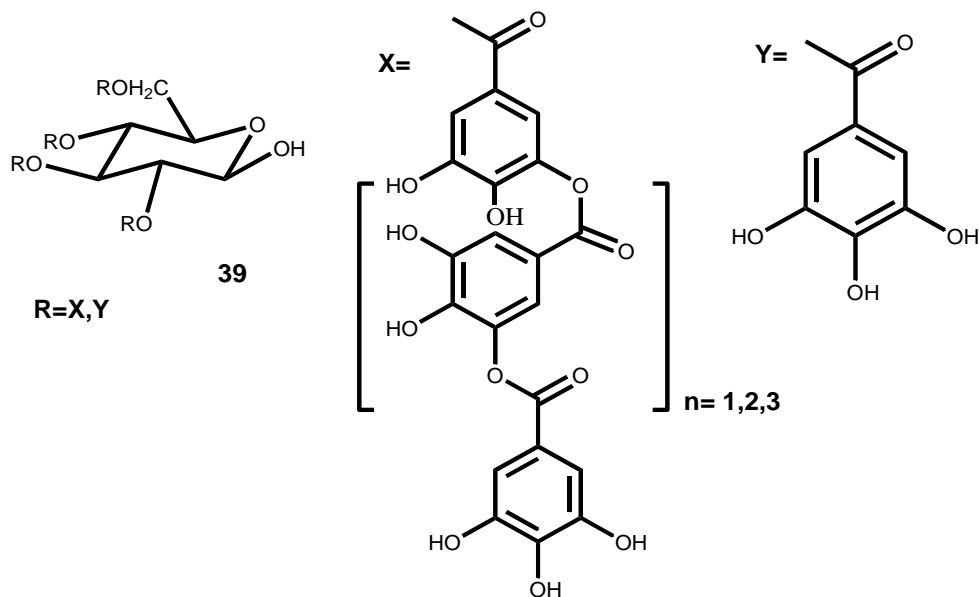
Se cree que los lignanos protegen al cuerpo de las formas más potentes de estrógenos, los cuales pueden promover el cáncer. Hay estudios que demuestran que las poblaciones del planeta con dietas ricas en lignanos, como la japonesa y la china, tienden a una menor incidencia de cáncer de origen hormonal.<sup>33</sup> Además, presentan actividad antioxidativa y actúan como inductores de la resistencia de las plantas hacia los agentes patógenos y animales herbívoros.<sup>6</sup>

#### VIII.4.2.4.- Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos de naturaleza polimérica.<sup>34</sup> Generalmente son incoloros. Pero por reacción con iones metálicos forman una variedad de complejos coloreados oscuros, que pueden ser rojos, marrones, grises o negros.<sup>35</sup> En base a sus propiedades químicas, estos compuestos se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados:

- Taninos hidrolizables: son aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas se separan en la aglicona y los azúcares. Presentan un núcleo central constituido por un azúcar o por un análogo del ácido shikímico (**37**), el cual está esterificado por unidades de ácido gálico (**38**) o compuestos relacionados.<sup>6</sup> A este grupo pertenece el tanino chino (**39**) que tiene el núcleo central de la glucosa.
- Taninos condensados: son aquellos que por tratamiento con ácido no se degradan, sino que polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles. Son polímeros derivados de 3-hidroxi- y 3,4-dihidroxi-flavanos.<sup>6</sup>





Se atribuyen a los taninos diversas actividades biológicas, tales como: antibacterial, molusquicida, antihelmíntica, antihepatotóxica, antiviral, antitumoral y citotóxica, inhibidora enzimática, entre otras. Al menos tres propiedades generales de los taninos son responsables de esos comportamientos:<sup>6</sup>

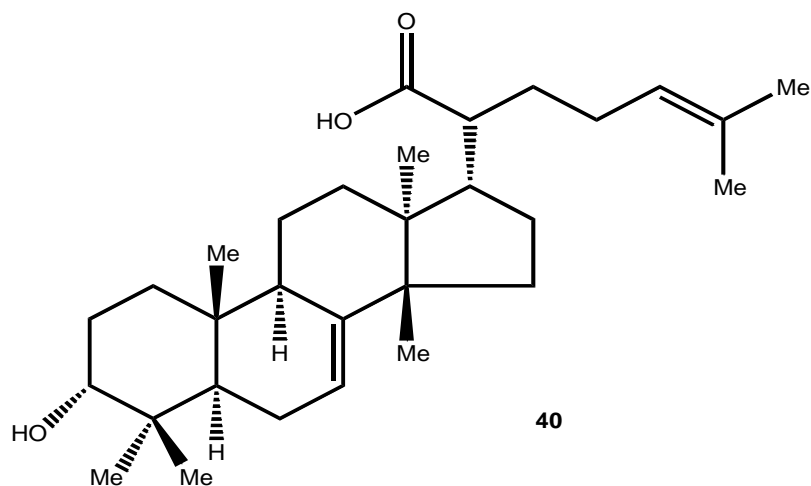
- 1) Habilidad quelante con metales
- 2) Propiedad antioxidante y atrapadora de radicales libres
- 3) Habilidad para formar complejos con macromoléculas como proteínas incluyendo enzimas y polisacáridos (contienen suficientes grupos hidroxilo fenólicos como para formar puentes estables con proteínas).

Para uso terapéutico de estos compuestos, se podría aprovechar su capacidad para inactivar enzimas fisiológicamente importantes.<sup>6</sup>

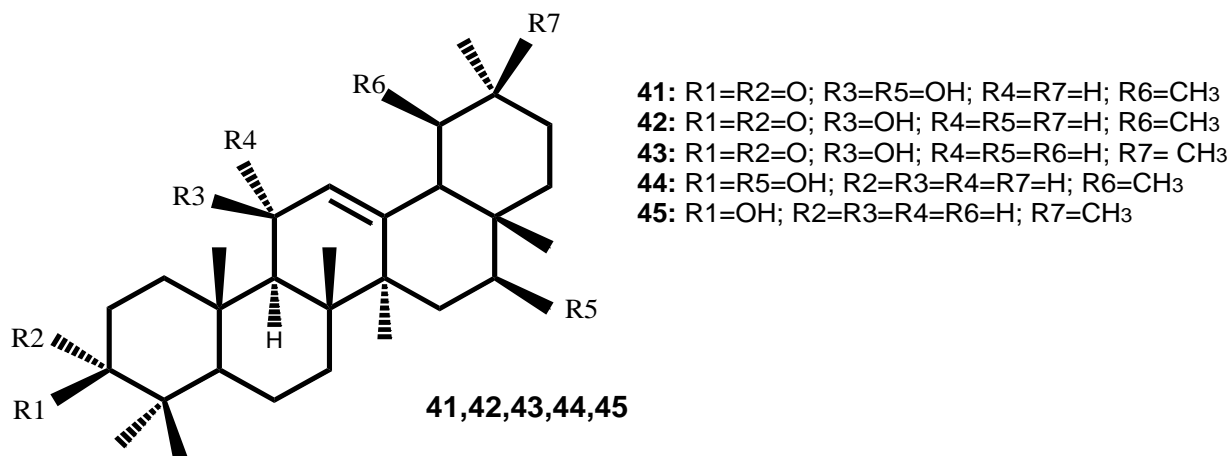
## VIII.5.- Antecedentes fitoquímicos del género *Protium*

### VIII.5.1.- Terpenos y terpenoides

En el año 2001, a partir de la resina de la corteza del tallo de *Protium crenatum* Sandwith, se aisló el triterpeno ácido 3 $\alpha$ -hidroxitirucalla-7,24-dien-21-oico (**40**), cuya estructura fue identificada por métodos espectroscópicos.<sup>36</sup>

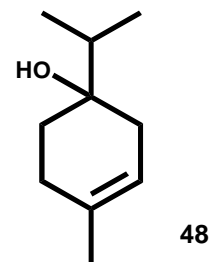
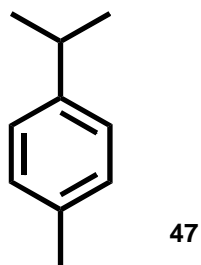
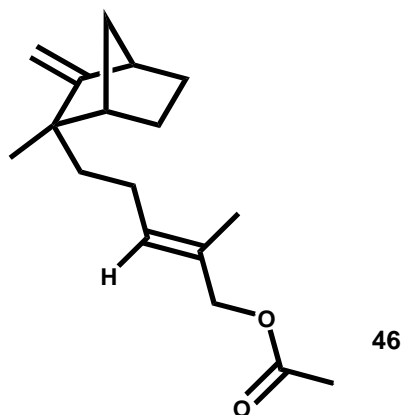


En el año 2005, del extracto de dietil éter de la resina del tallo de *Protium kleinii* Cuatrecasas, se aislaron tres triterpenos pentacíclicos identificados como: 3-oxo-11 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-urs-12-eno (**41**), 3-oxo-11 $\beta$ -hidroxi-urs-12-eno (**42**) y 3-oxo-11 $\beta$ -hidroxi-olean-12-eno (**43**). La administración sistemática de estos compuestos mostró actividad antinociceptiva en ratones. También fueron encontrados los triterpenos conocidos: 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-olean-12-eno (breína) (**44**) y una mezcla de  $\alpha$ -amirina (**20**) y  $\beta$ -amirina (**45**).<sup>37</sup>

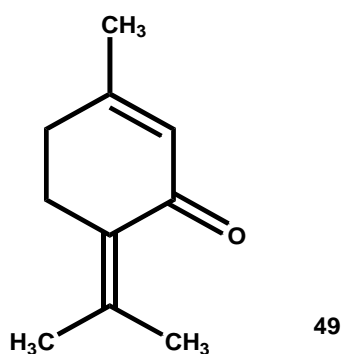


En el 2006, se aisló de la resina de la corteza del tallo de *Protium heptaphyllum* March una mezcla de los triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina (**20** y **45**). Se examinaron los efectos ansiolíticos y antidepresivos de esta mezcla sobre ratones, encontrando que dosis de 10, 25 y 50 mg/Kg tienen un efecto significativamente sedativo.<sup>38</sup>

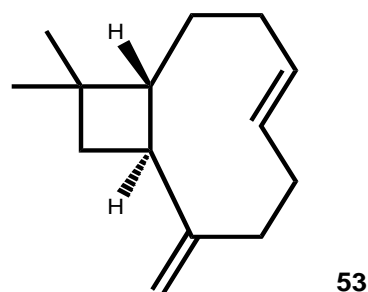
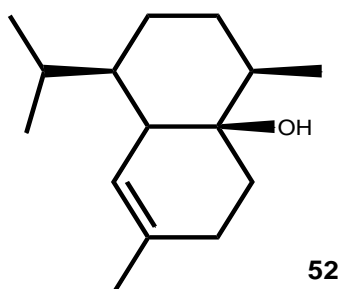
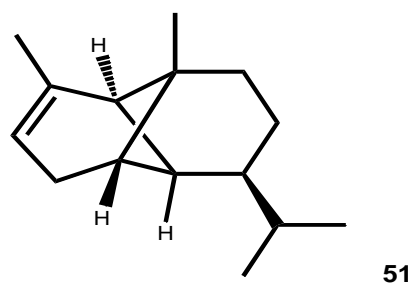
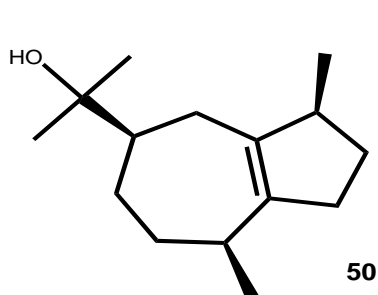
En el año 2007, se obtuvieron los aceites esenciales a partir de dos muestras de resina de la corteza del tallo de diferentes fuentes (fresca y envejecida) de la especie *Protium bahianum* Daly. Fueron identificados 33 compuestos en los aceites esenciales de ambas muestras de resina. Se encontró que el aceite de la resina envejecida contenía un alto porcentaje de sesquiterpenos oxigenados (85,4%) con alta predominancia de acetato de  $\beta$ -(Z)-santalol (**46**) (83,1%); en contraste, los aceites obtenidos a partir de la resina fresca estuvieron constituidos por monoterpenos (42,4%) y monoterpenos oxigenados (27,7%), de los cuales el  $\alpha$ -felandreno (**47**) (13,9%) y el terpinen-4-ol (**48**) (7,4%) fueron los componentes mayoritarios. La actividad acaricida de estos aceites contra *Tetranychus urticae* también fue investigada; los aceites de ambas resinas mostraron toxicidad fumigante, pero sólo los aceites de la resina envejecida indujeron repelencia.<sup>39</sup>



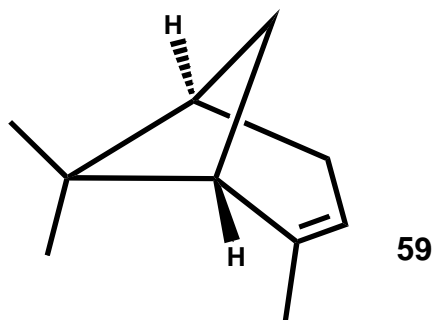
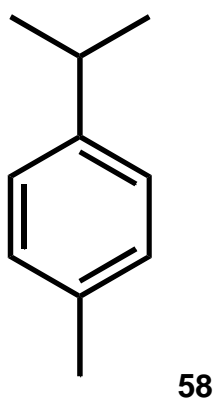
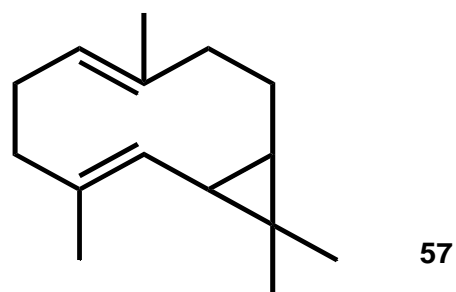
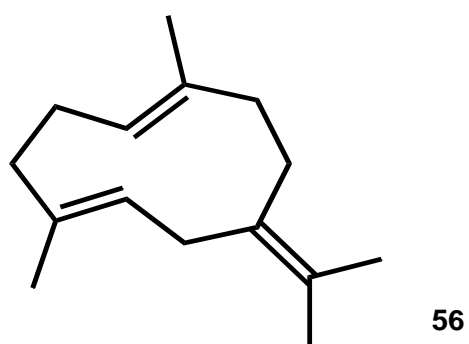
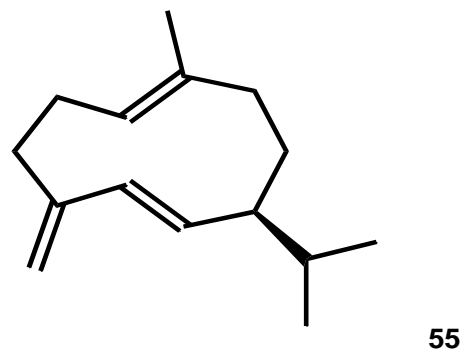
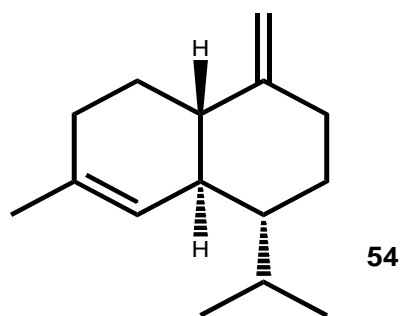
En el año 2007, se reportó el análisis de los aceites esenciales de la resina de la corteza del tallo de la especie *Protium neglectum* Swart, identificándose veintiocho compuestos (99,3% del aceite total). Los compuestos más abundantes fueron los monoterpenos oxigenados (78,4%), con piperitenona (**49**) como el constituyente principal. El aceite esencial exhibió actividad antimicrobiana.<sup>40</sup>



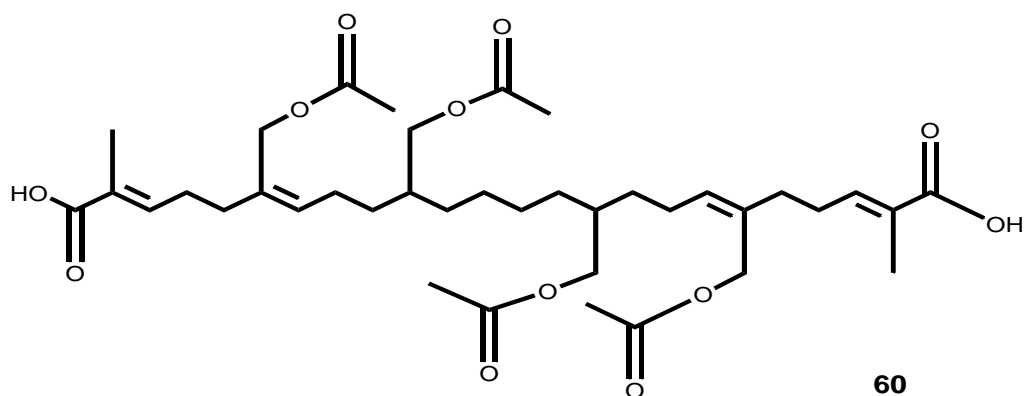
En el 2012, se reportó la identificación de los componentes volátiles de las hojas, flores, resina del tallo y corteza de las ramas de la especie *Protium heptaphyllum* March. En la fracción volátil de las hojas, los componentes mayoritarios fueron guaiol (**50**),  $\alpha$ -copaeno (**51**), 1,10-di-epi-cubenol (**52**), trans- $\beta$ -cariofileno (**53**) y  $\gamma$ -cadineno (**54**); en la fracción volátil de las flores se identificaron germacreno D (**55**), germacreno B (**56**), biciclogermacreno (**57**) y limoneno (**6**); en la resina del tallo se identificaron p-cimeno (**58**),  $\alpha$ -pineno (**59**) y limoneno (**6**); y en la corteza se identificaron: germacreno D (**55**), 1,10-di-epi-cubenol (**52**), guaiol (**50**) y  $\gamma$ -cadineno (**54**). Así, el análisis de la resina mostró un alto porcentaje de monoterpenos (60% aprox.), mientras que las hojas presentaron una alta proporción de sesquiterpenos oxigenados (60% aprox.); las flores y la corteza mostraron una alta composición de sesquiterpenos (40-50%).<sup>18</sup>





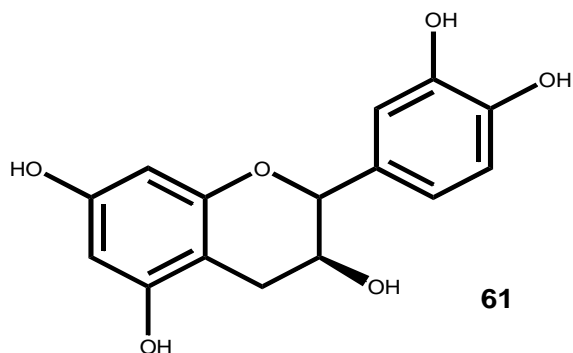


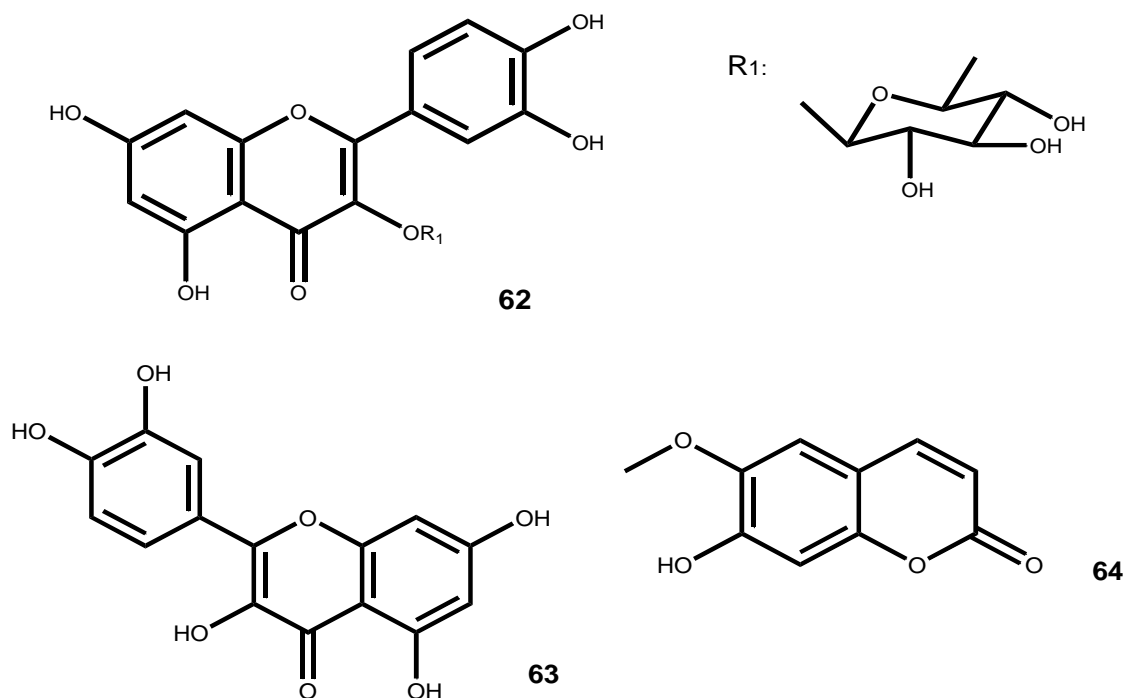
En el año 2012, se aisló del extracto etanólico del tejido de las hojas de *Protium Subseratum* Engler un triterpeno previamente desconocido: 25,30-dicarboxi-26,27,28,29-tetraacetoxi-10,11,14,15-tetrahidrosqualeno (**60**).<sup>41</sup>



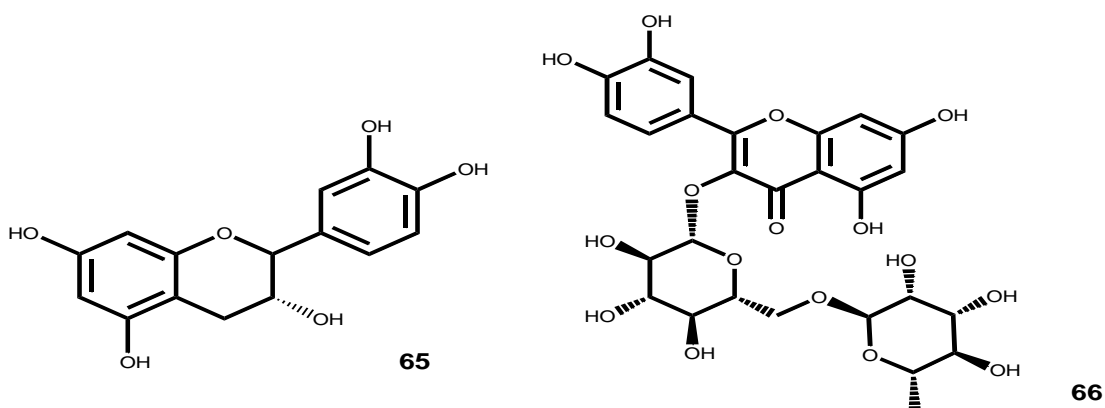
### VIII.5.2.- Flavonoides, cumarinas y taninos

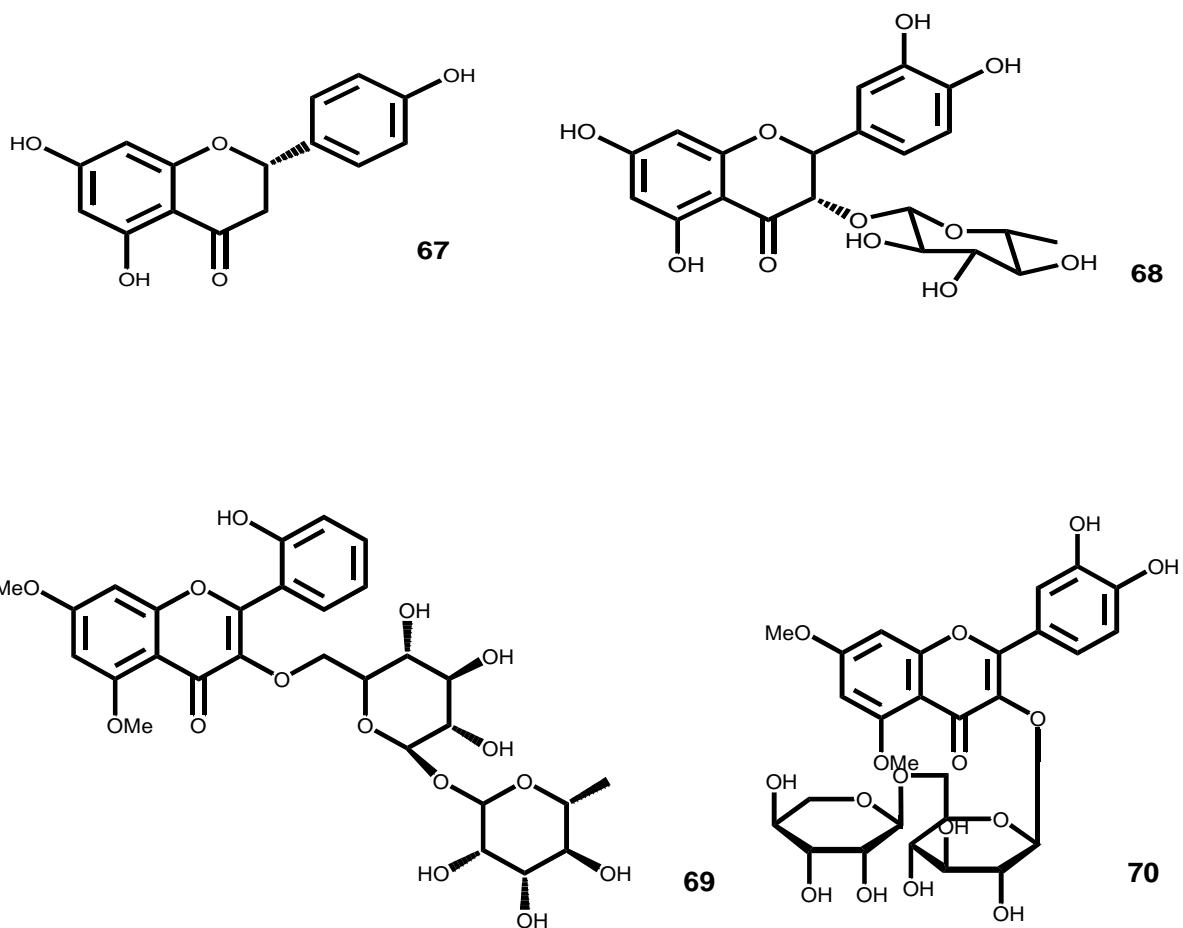
En el año 2002, a partir de los extractos acuosos de los frutos verdes y frutos maduros de la especie *Protium heptaphyllum* March se aislaron la (-) catequina (**61**) y la quercetina-3-o-ramnósida (**62**), respectivamente. En este mismo estudio, se obtuvieron los extractos etanólicos de las hojas y madera de la misma especie; del extracto etanólico de las hojas, se aisló el flavonoide quercetina (**63**) y, del extracto etanólico de la madera, se aisló la cumarina escopoletina (**64**).<sup>42</sup>





En el año 2003, a partir del extracto etanólico de las hojas de *Protium neglectum* Swart se aislaron siete flavonoides: epi-catequina (**65**), rutina (**66**), naringenina (**67**), quercetina-3-o-ramnósida (**62**), taxifolin-3-o-ramnósida (**68**), datisceina (**69**) y 3,7-dimetoxi-rutina (**70**). Además, en los aceites esenciales obtenidos a partir de la resina de la corteza del tallo de esta especie, se logró identificar treinta y tres compuestos tipo terpenoides.<sup>43</sup>

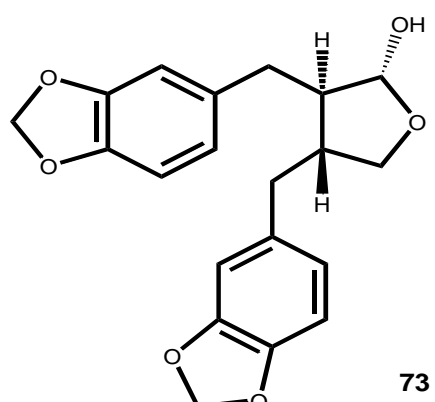
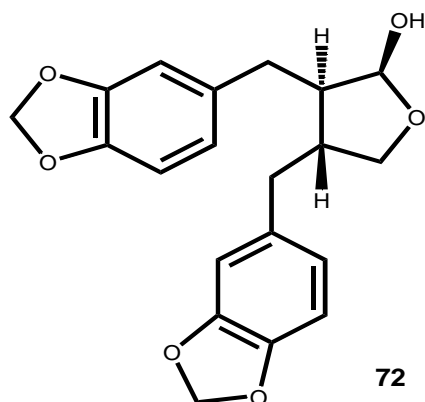
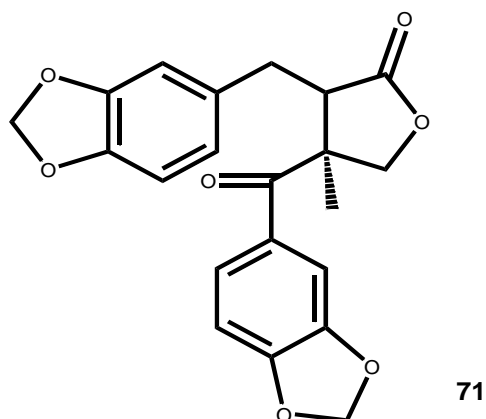




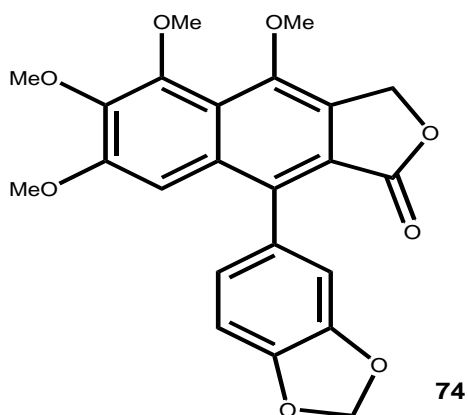
En el año 2008, se evaluó el contenido de polifenoles totales, flavonoides y taninos en muestras de tres especies, de las cuales únicamente *Protium neglectum* Swart pertenecía a la familia Burseraceae. Las plantas estudiadas resultaron ser ricas en los tres tipos de compuestos. Las tres especies presentaron actividad antioxidante.<sup>44</sup>

### VIII.5.3.- Lignan

En el año 1995, a partir del extracto etéreo de la madera de *Protium tenuifolium* Engler, se aislaron dos lignanos caracterizados como (+)-(2S,3S)-2-(3",4"-metilendioxi-bencil)-3-(3'-4'-metilendioxiacetofenona)-butiro-lactona (**71**) y una mezcla de epímeros de (-) cubebina (**72 y 73**).<sup>45</sup>



En el año 1998, a partir del extracto etéreo de la madera de *Protium unifoliolatum* Engler, se aisló el lignano arilnaftaleno 9-(1,3-benzodioxol-5-il)-4,5,6,7-tetrametoxinaftol[2,3-C]-furan-1(3H)-ona (5- metoxijusti-cidina A) (**74**).<sup>46</sup>



## IX.- Especie *Protium tovarense* Pittier

### IX.1.- Generalidades

La especie *Protium tovarense* Pittier es un árbol comúnmente conocido con el nombre de “tacamahaco” y ocasionalmente denominado bajo el nombre sinónimo de *Protium avilense* Pittier.<sup>47</sup> La resina de este árbol, la caraña, es famosa porque se emplea como cicatrizante.<sup>48</sup>

## IX.2.- Aspectos botánicos

Es un árbol de 18-25 m de alto, con hojas coriáceas, imparipinadas, generalmente con 3 hojuelas, a veces con 5. Pecíolo común de 2,5- 3 cm de largo. Hojuelas generalmente obovadas, a veces aovadas, 5-8 cm de largo y 3,5-4,5 cm de ancho, de ápice ancho-redondeado y base aguda. Flores verdosas, en panículas de 2,5-3,5 cm de largo, breve y diminutamente ferrugíneo-pubescentes. Pedicelos de 1,5-2 mm de largo. Cáliz de 2,5 mm de diámetro, cupuliforme, con margen entero o casi así. De 5 pétalos, ancho-aovados, agudos, de 2,7-3 mm de largo y 2-2,4 mm de ancho. Con 8-10 estambres. Disco glabro, cupuliforme, con margen crenulado. Ovario globoso-oviforme, glabro. Estilo más corto que el ovario; estigma –lobulado. El fruto es una drupa.<sup>49</sup>

## IX.3.- Distribución geográfica

Es una especie nativa de las regiones cálidas del norte de Colombia; norte de Venezuela; también Guyana, Surinam, Guayana francesa y Brasil.<sup>22</sup>

En Venezuela, puede ser encontrado en los estados Aragua, Delta Amacuro, Distrito Capital, Guárico, Lara, Miranda, Táchira, Yaracuy y Trujillo.<sup>21</sup>

## IX.4.- Antecedentes fitoquímicos de la especie *Protium towarens* Pittier

No se conocen estudios fitoquímicos de esta especie.



Figura N° 4: Hojas de *Protium tovarense* Pittier

(Tomada de:

<http://www.codigovenezuela.com/2010/05/ciencia/diversidad/tacamahaco-aroma-de-venezuela>)



Figura N° 5: Frutos verdes de *Protium tovarense* Pittier

(Tomada de:

<http://www.codigovenezuela.com/2010/05/ciencia/diversidad/tacamahaco-aroma-de-venezuela>)



## X.- Justificación

Varias especies del género *Protium* han sido fitoquímicamente estudiadas, una de ellas, *Protium neglectum* Swart, en nuestro grupo de investigación, encontrándose la presencia de compuestos químicos con actividad biológica, lo cual ha sido farmacológicamente comprobado. Dado que no se conocen estudios fitoquímicos para la especie *Protium towarensense* Pittier, es de importancia y utilidad emprenderlos. Pocos estudios fitoquímicos de frutos de especies *Protium* han sido reportados; sin embargo en estos pocos estudios se ha logrado aislar importantes compuestos, por esta razón se hace interesante comenzar el estudio con el análisis de los frutos, con la posibilidad de encontrar compuestos similares a los que han sido aislados a partir de otras especies. Los resultados de este trabajo podrían representar una importante contribución en la continuidad de los estudios de especies *Protium*, así como en el desarrollo de la etnofarmacología.

## XI.- Objetivos

### Objetivo general

- Realizar el estudio fitoquímico de los frutos de *Protium tovarense* Pittier.

### Objetivos específicos

- a. Preparar el extracto metanólico de los frutos de *Protium tovarense* Pittier, aplicando el método de extracción continua en caliente (Método del Soxhlet).
- b. Fraccionar el extracto metanólico obtenido, empleando disolventes de baja a mediana polaridad.
- c. Determinar las condiciones apropiadas para la óptima separación de los metabolitos presentes en cada fracción, mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina (CCF).
- d. Separar y purificar los componentes presentes en cada fracción mediante las técnicas cromatográficas apropiadas.
- e. Caracterizar los compuestos aislados y purificados mediante técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (RMN; 1 y 2D), Infrarrojo (IR), Masas (EM), y comparación con datos reportados.

## **XII.- Materiales y equipos**

### **XII.1.- Equipo de laboratorio**

- Balanza analítica digital, marca OHAUS Adventurer
- Secador, modelo HG-751 B.120 V.A.C., 60 Hz, 14,5 AMPS. Rango temp. 750/1000 °F (399/538°C). Master Appliance.
- Estufa Memmert. Modelo 500
- Rotaevaporador, marca Büchi, modelo B-480.
- Lámpara de UV longitud de onda ( $\lambda$ ) 254 y 365 nm, UVP, modelo UVG-11
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, modelo ECLIPSE-JEOL. 270 MHz para los experimentos de  $^1\text{H}$  y 75 MHz para los experimentos de  $^{13}\text{C}$ .

### **XII.2.- Materiales cromatográficos**

- Sílica gel G60 para cromatografía de columna (CC), 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- Placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV254, 20x20 cm. 0,20 mm de espesor.
- Placas preparativas de sílica gel 60. F254, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor. MERK.

### XII.3.- Reactivos

Se emplearon solventes grado p.a. Aldrich:

- Metanol (MeOH)
- Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- n- hexano (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>)

Como desecante se empleó sulfato de magnesio anhidro, ANALAR (BDH).

Para la cromatografía de capa fina (CCF) se emplearon los siguientes reveladores:

- p-anisaldehído (revelador universal): se preparó mezclando 5 mL de p-anisaldehído con 90 mL de EtOH, 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1 mL de CH<sub>3</sub>COOH glacial.

### **XIII.- Procedimiento experimental**

#### **XIII.1.- Colecta del material vegetal**

Los frutos de la especie *Protium towarensense* Pittier, empleados para llevar a cabo el presente trabajo, fueron colectados por Belandria R., Castillo A. y Meier W., en el Parque Nacional “Waraira Repano” (El Ávila), sector el Tigre- 1900 msnm, el 20 de noviembre de 2011, e identificados por Meier W., presentando la especie, al momento de la colección, las siguientes características: árbol de 6-8 m de alto con frutos verdes.

Los frutos colectados se secaron al aire libre y luego se almacenaron hasta la fecha de inicio del trabajo (julio de 2012).

#### **XIII.2.- Preparación de la muestra**

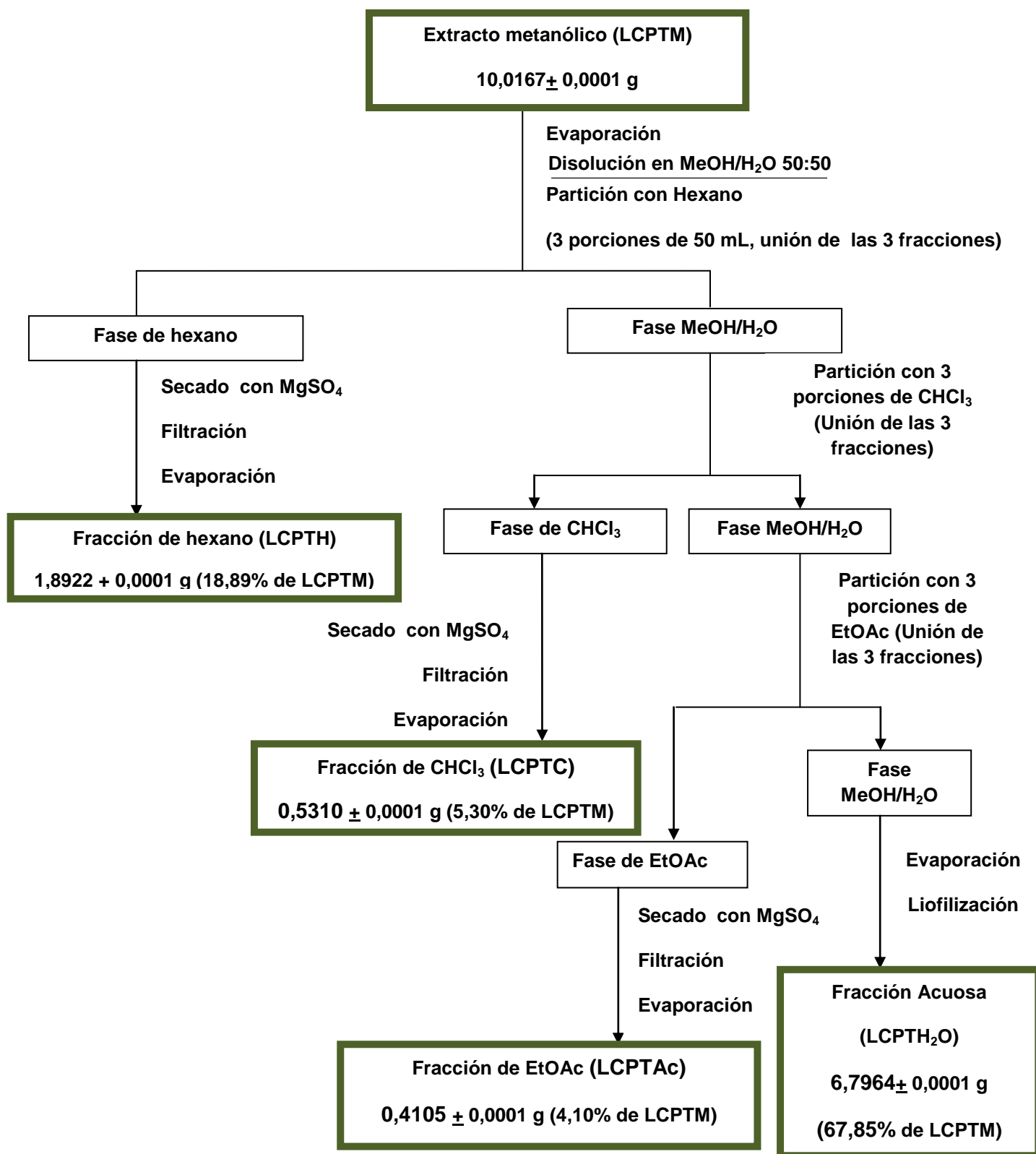
La muestra de frutos secos se dividió en cáscaras y pulpas, cada una de estas partes fue mecánicamente fragmentada en trozos del menor tamaño posible y, por separado, fueron pesadas ( $86,52 \pm 0,01$  g y  $20,51 \pm 0,01$  g, respectivamente). La poca cantidad resultante de pulpas, conllevó a efectuar únicamente el análisis de las cáscaras.

### **XIII.3.- Extracción**

Las cáscaras de los frutos secos fueron sometidas a un procedimiento de extracción continua en caliente, en un equipo Soxhlet, empleando metanol como disolvente. El extracto metanólico así obtenido fue filtrado y concentrado a presión reducida hasta la total eliminación del solvente.

### **XIII.4.- Fraccionamiento del extracto metanólico**

El extracto metanólico resultante fue disuelto en una mezcla 50:50 metanol-agua, la solución se vertió en un embudo de separación y se llevó a cabo el fraccionamiento añadiendo tres porciones de 50 mL de cada uno de los siguientes solventes, en orden creciente de polaridad: n-hexano ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ), obteniéndose así las correspondientes fracciones de hexano (LCPTH), de cloroformo (LCPTC), de acetato de etilo (LCPTAc) y acuosa (LCPTH<sub>2</sub>O). Cada una de estas fracciones fue concentrada, evaporando el disolvente a través de un rotaevaporador y aplicando, posteriormente, vacío hasta la completa sequedad. Este procedimiento aplicado se ilustra y sintetiza a través del siguiente esquema (esquema N°1):



Esquema N° 1. Fraccionamiento del extracto metanólico de las cáscaras de los frutos secos de *Protium tovarense* Pittier

### **XIII.5.- Separación de los componentes por fracción**

A cada una de las fracciones obtenidas (excepto la acuosa) se le aplicó la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) para la determinación y selección de las condiciones de óptima separación de los compuestos constituyentes, visualizando las placas mediante iluminación ultravioleta (254 y 365 nm) seguida de inmersión en solución de p-anisaldehído y posterior calentamiento.

Una vez determinadas las mencionadas condiciones, se aplicó la técnica de cromatografía en columna (CC), en fase normal, sobre sílica gel para llevar a cabo la separación, empleando solventes y mezclas de los mismos con incremento de la polaridad a lo largo de proceso, de acuerdo a las determinaciones efectuadas en la cromatografía de capa fina (CCF). Las fracciones obtenidas fueron concentradas, evaporando el disolvente a través de un rotaevaporador y aplicando, posteriormente, vacío hasta la completa sequedad; luego de lo cual fueron monitoreadas por medio de CCF y se agruparon tomando en consideración el número de compuestos observados sobre la placa, así como los factores de retención (Rf).

Los grupos de fracciones en los cuales se observó una composición relativamente sencilla al realizar el monitoreo por CCF, fueron examinadas por espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), y aquellos en los cuales se observó la presencia de un componente mayoritario de interés químico, se sometieron a un procedimiento de purificación por CC o cromatografía de placa preparativa, de acuerdo a la cantidad obtenida, empleando de nuevo las condiciones de separación determinadas a través de CCF.



Los grupos de fracciones que presentaron una composición relativamente compleja, se sometieron nuevamente a un proceso de separación en CC, en fase normal, sobre sílica gel, empleando solventes y mezclas de acuerdo a lo determinado por CCF. A continuación se presentan los detalles de la separación de componentes en cada fracción.

### **XIII.5.1- Separación de los componentes en la fracción de hexano.**

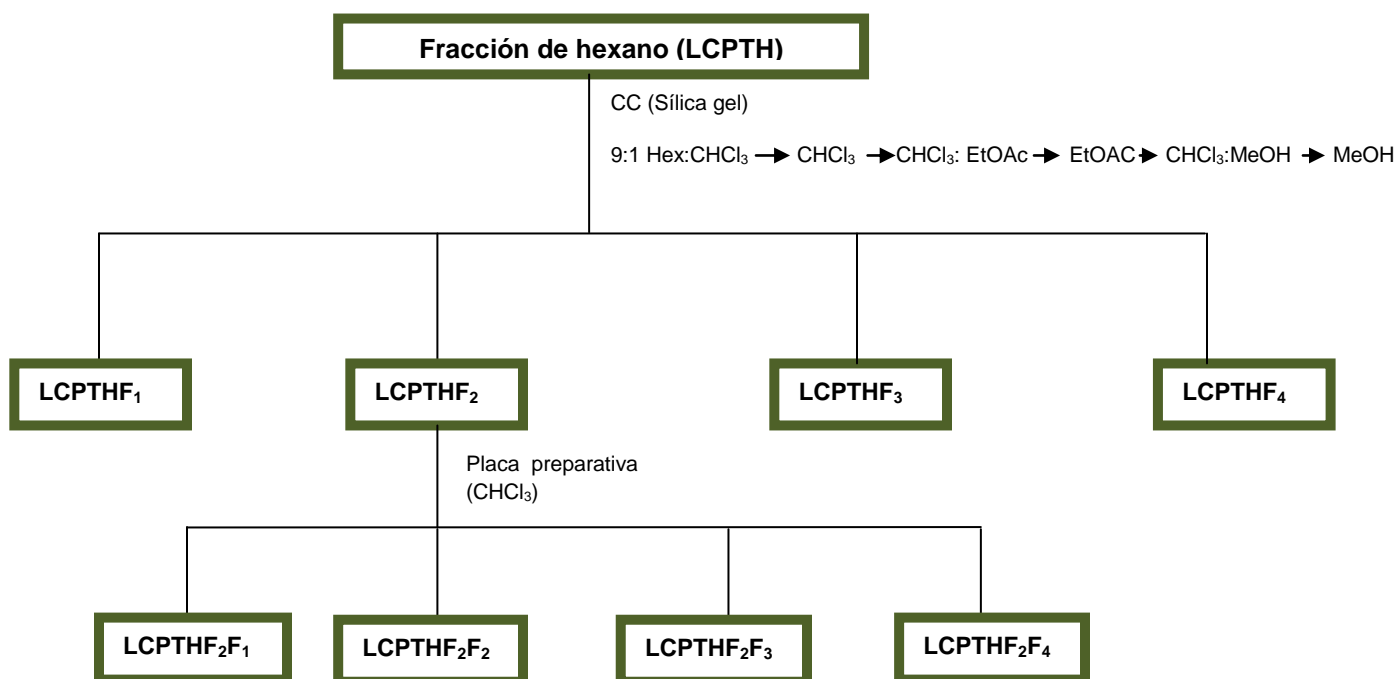
La fracción de hexano obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, 9:1 cloroformo-hexano, se efectuó el procedimiento de separación a través de CC en fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica/muestra 50:1, iniciando la elución con la mezcla 9:1 cloroformo-hexano y aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por cloroformo puro, luego mezclas cloroformo-acetato de etilo, acetato de etilo puro, mezcla 8:2 cloroformo-metanol y finalmente metanol puro. Se obtuvo un total de 30 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y calor. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 4 grupos: LCPTHF<sub>1</sub>, LCPTHF<sub>2</sub>, LCPTHF<sub>3</sub> y LCPTHF<sub>4</sub> (ver tabla N° 1).

**Tabla N° 1. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de hexano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.**

<b>Grupo de fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>	<b>Masa obtenida (<math>\pm</math> 0,0001 g)</b>	<b>Porcentaje (%) respecto a la fracción LCPTH</b>
LCPTHF <sub>1</sub>	1-19	0,9525	50,33
LCPTHF <sub>2</sub>	20-23	0,3159	16,69
LCPTHF <sub>3</sub>	24-27	0,3014	15,93
LCPTHF <sub>4</sub>	28-30	0,0284	1,50

La separación no resultó efectiva, prácticamente todos los componentes permanecieron contenidos en el grupo LCPTHF<sub>2</sub>, por lo cual se intentó la separación de este grupo de fracciones por cromatografía de placa preparativa, empleando cloroformo como fase móvil. A partir de este último procedimiento, se obtuvieron 4 fracciones identificadas sobre la placa: LCPTF<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, LCPTF<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, LCPTF<sub>2</sub>F<sub>3</sub>, LCPTF<sub>2</sub>F<sub>4</sub>. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora empleando una mezcla cloroformo-metanol como solvente. Estas fracciones fueron examinadas por espectroscopia de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C), los espectros obtenidos no arrojaron resultados de nuestro interés químico (este trabajo se orientó a la identificación de compuestos que puedan resultar importantes a nivel farmacológico en posteriores ensayos biológicos, tal como los descritos en la sección VIII.4 de este trabajo, así como los pertenecientes a otras clases para las cuales se conozcan antecedentes farmacológicos o cuyas propiedades de estructura sugieran una posible

aplicación), los compuestos observados en estas fracciones fueron, en su mayoría, ácidos grasos.



**Esquema Nº 2. Separación de componentes en la fracción de hexano**

### **XIII.5.2- Separación de los componentes en la fracción de cloroformo.**

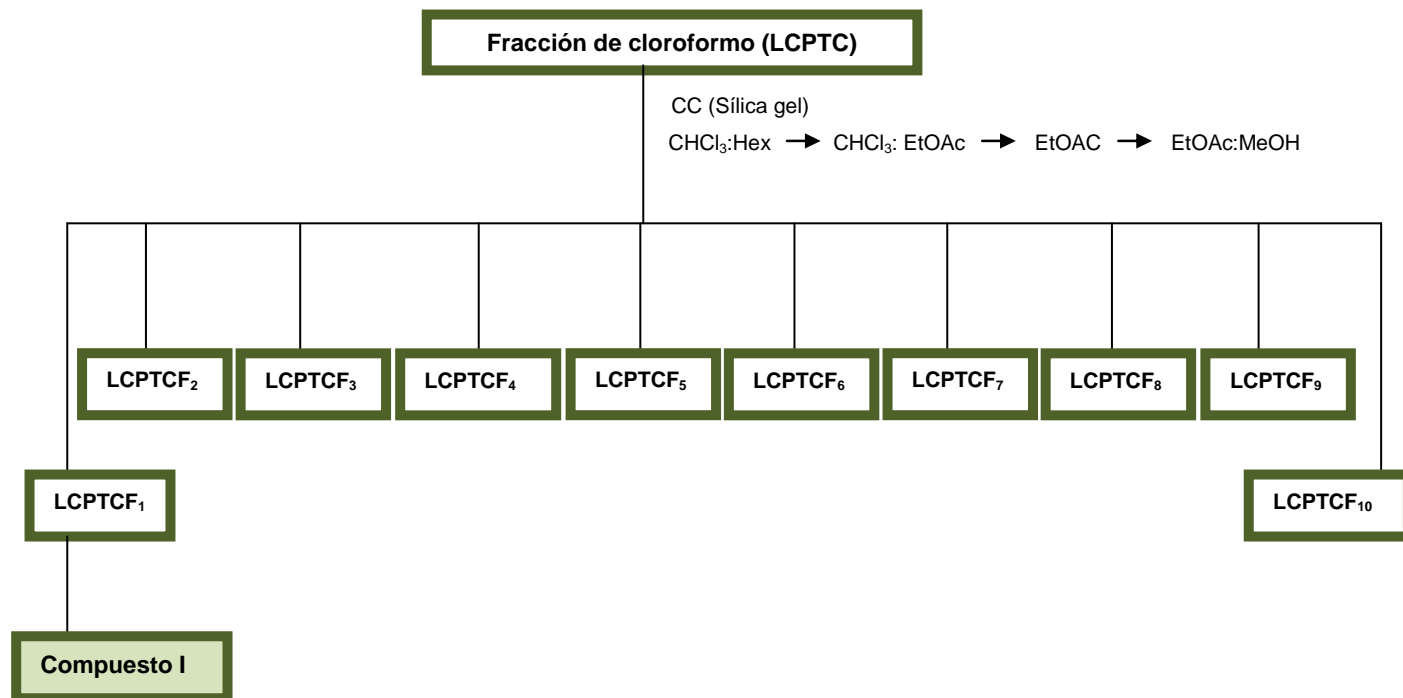
La fracción de cloroformo obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, 7:3 hexano-acetato de etilo, se efectuó el procedimiento de separación a través de CC en fase

normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica/muestra 50:1, iniciando la elución con la mezcla 1:1 Hexano-cloroformo y aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por 7:3 cloroformo- hexano, 9:1 cloroformo-hexano, mezclas cloroformo-acetato de etilo, acetato de etilo puro y finalizando con mezclas acetato de etilo-metanol. Se obtuvo un total de 33 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y calor. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 10 grupos: LCPTCF<sub>1</sub>, LCPTCF<sub>2</sub>, LCPTCF<sub>3</sub>, LCPTCF<sub>4</sub>, LCPTCF<sub>5</sub>, LCPTCF<sub>6</sub>, LCPTCF<sub>7</sub>, LCPTCF<sub>8</sub>, LCPTCF<sub>9</sub>, LCPTCF<sub>10</sub> (ver tabla N° 2). Las fracciones que mostraron composición considerablemente sencilla fueron examinadas por espectroscopia de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C). A partir de LCPTCF<sub>1</sub>, se advirtió la existencia de un primer compuesto de interés (Compuesto I) tipo cumarina que, a pesar de ser el mayoritario, mostraba bastantes impurezas, por lo cual se analizó a través de CCF; la mezcla 6:4 cloroformo-acetato de etilo dio lugar a la mejor separación del compuesto I (identificado sobre la placa por la alta fluorescencia bajo luz UV, 254 nm) del resto de los componentes. Se llevó a cabo el procedimiento separativo a través de cromatografía en placa preparativa, empleando como eluyente la mezcla determinada mediante CCF, y fueron obtenidas 4 fracciones: LCPTCF<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, LCPTCF<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, LCPTCF<sub>1</sub>F<sub>3</sub>, LCPTCF<sub>1</sub>F<sub>4</sub>, cada una de las cuales fue examinada por espectroscopia de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C). El compuesto I no fue encontrado posteriormente en ninguna de estas fracciones; se concluyó que este compuesto debió estar presente en una cantidad en masa pequeña dentro de la fracción, la cual se perdió durante el procedimiento de purificación; sin embargo, a partir de los espectros correspondientes al compuesto impuro, fue posible lograr la identificación del mismo.

**Tabla N° 2. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de cloroformo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.**

<b>Grupo de fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>	<b>Masa obtenida (<math>\pm</math> 0,0001 g)</b>	<b>Porcentaje (%) respecto a la fracción LCPTC</b>
LCPTCF <sub>1</sub>	13-15	0,0301	5,66
LCPTCF <sub>2</sub>	17-18	0,0305	5,74
LCPTCF <sub>3</sub>	19-20	0,0285	5,36
LCPTCF <sub>4</sub>	21-22	0,0603	11,36
LCPTCF <sub>5</sub>	23-24	0,0165	3,10
LCPTCF <sub>6</sub>	25-27	0,0285	5,38
LCPTCF <sub>7</sub>	28-30	0,0541	10,18
LCPTCF <sub>8</sub>	31	0,0680	12,81
LCPTCF <sub>9</sub>	32-33	0,0160	3,01
LCPTCF <sub>10</sub>	1-12	0,0833	15,69

El resto de los grupos de fracciones fueron igualmente analizados por espectroscopia de RMN y no se advirtió la presencia de componentes interesantes desde el punto de vista de químico.



**Esquema N° 3. Separación de componentes en la fracción de cloroformo.**

### XIII.5.3- Separación de los componentes en la fracción de acetato de etilo

La fracción de acetato de etilo obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes, resultando que la mezcla 7:3 acetato de etilo-cloroformo fue la fase móvil que permitió la mejor separación de los compuestos constituyentes. Se llevó a cabo la separación de los componentes mediante CC en fase normal sílica gel, en una proporción sílica/muestra 50:1, iniciando la elución con la mezcla 7:3 acetato de etilo-cloroformo, y aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por 8:2 acetato de etilo-cloroformo, 9:1 acetato de etilo-cloroformo, acetato de etilo puro y mezclas acetato de etilo-metanol. Se obtuvo

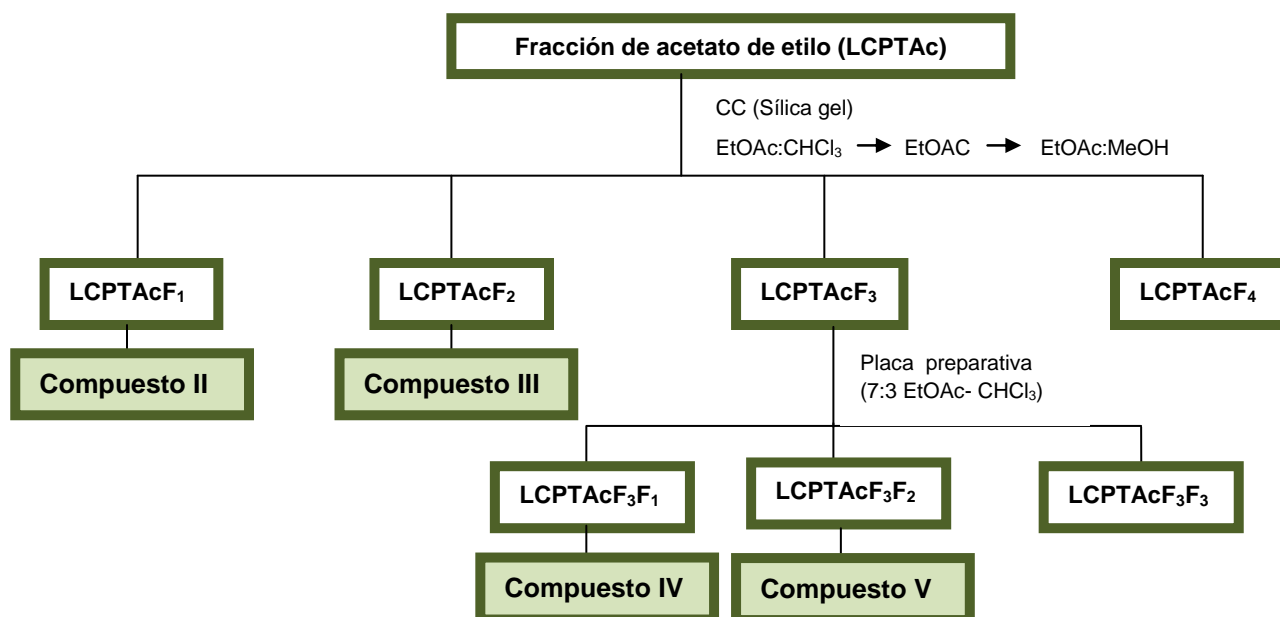
un total de 16 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y continuando con el calentamiento de la placa. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 4 grupos: LCPTAcF<sub>1</sub>, LCPTAcF<sub>2</sub>, LCPTAcF<sub>3</sub>, LCPTAcF<sub>4</sub> (ver tabla N° 3). Estas fracciones fueron examinadas por espectroscopia de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C). Los espectros obtenidos para LCPTAcF<sub>1</sub>, advirtieron la presencia de un segundo compuesto químicamente interesante (Compuesto II), de pureza satisfactoria, de tipo flavonoide, cuya estructura fue elucidada e identificada.

**Tabla N° 3. Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de acetato de etilo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.**

<b>Grupo de fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>	<b>Masa obtenida (± 0,0001 g)</b>	<b>Porcentaje (%) respecto a la fracción LCPTAc</b>
LCPTAcF <sub>1</sub>	15-16	0,0144	3,51
LCPTAcF <sub>2</sub>	6-14	0,0421	10,25
LCPTAcF <sub>3</sub>	1-3	0,0585	14,25
LCPTAcF <sub>4</sub>	4-5	0,0953	23,22

A partir de los espectros de RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) obtenidos para LCPTAcF<sub>2</sub>, se identificó un tercer compuesto de interés químico (compuesto III), de tipo flavonoide, el cual se encontró prácticamente puro en dicha fracción.

En base a los espectros RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) obtenidos para  $\text{LCPTAcF}_3$ , se advirtió la presencia de funcionalidades interesantes desde el punto de vista químico, por lo cual se analizó nuevamente a través de CCF, observando una buena separación con la mezcla 7:3 acetato de etilo-cloroformo. Se llevó a cabo la separación de este grupo de fracciones por cromatografía de placa preparativa, empleando la mezcla determinada por CCF como fase móvil, fueron obtenidas 3 fracciones identificadas sobre la placa:  $\text{LCPTAcF}_3\text{F}_1$ ,  $\text{LCPTAcF}_3\text{F}_2$ ,  $\text{LCPTAcF}_3\text{F}_3$ . Cada zona de la placa que contenía adsorbidas estas fracciones fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora empleando una mezcla cloroformo-metanol como solvente. Las fracciones resultantes fueron analizadas por espectroscopia de RMN; se identificó el compuesto IV y el compuesto V en las fracciones  $\text{LCPTAcF}_3\text{F}_1$  y  $\text{LCPTAcF}_3\text{F}_2$ , respectivamente. El resto de los grupos de fracciones fueron igualmente analizados por espectroscopia de RMN y no se advirtió la presencia de componentes interesantes desde el punto de vista de químico.



**Esquema N° 4. Separación de componentes en la fracción de acetato de etilo**



### XIII.5.4- Separación de los componentes en la fracción acuosa

Esta fracción fue reservada para un análisis futuro.

## XIV.- Resultados y discusiones

Como se ha hecho mención en anteriores oportunidades, los compuestos aislados a partir de los frutos secos de *Protium tovarense* Pittier fueron caracterizados por medio de espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) en una dimensión y comparación con datos reportados a partir de otros estudios.

### XIV.1.- Compuesto I: escoparona (I)

Este compuesto pudo ser identificado como el componente mayoritario de la muestra LCPTCF<sub>1</sub>.

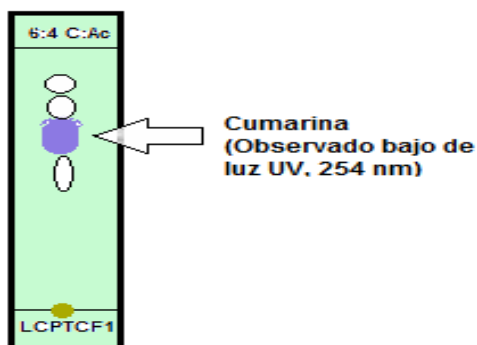
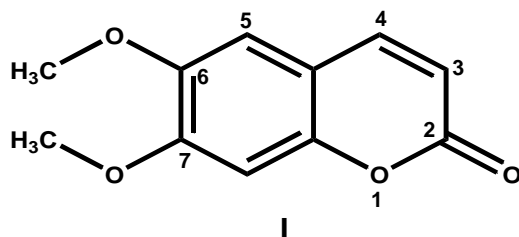


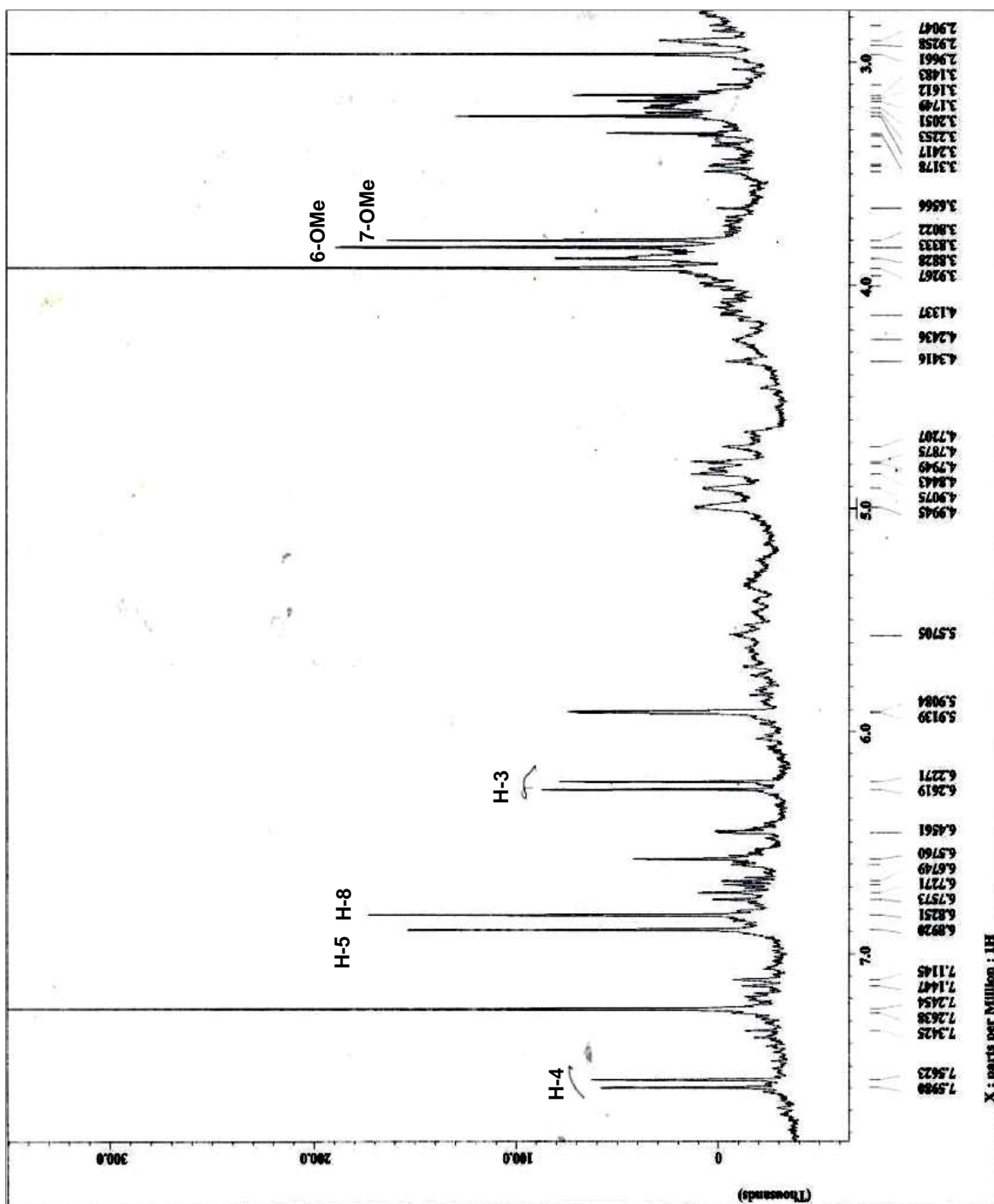
Figura N° 6: Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTCF<sub>1</sub>

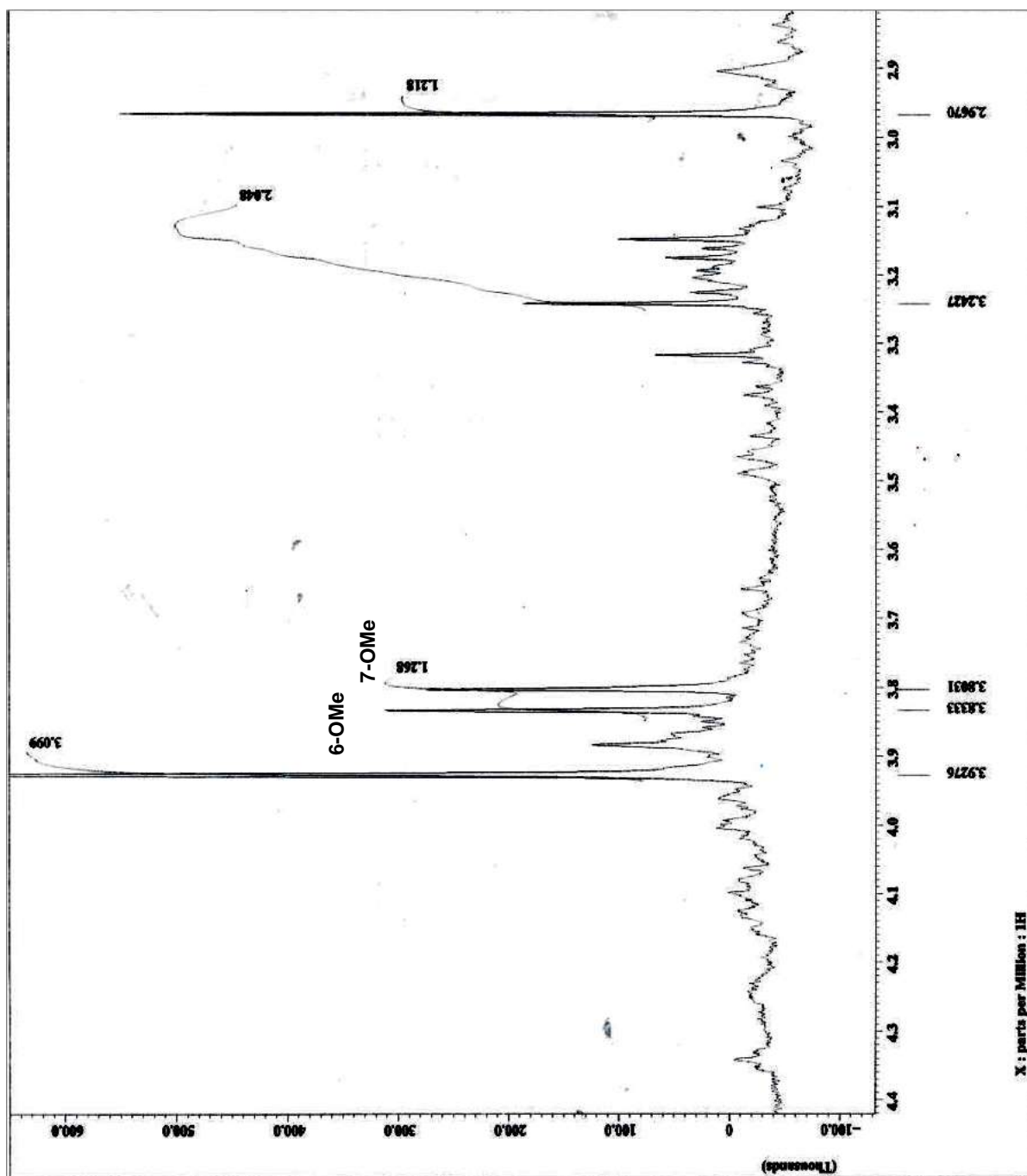
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro N° 1) del compuesto impuro muestra dos singletes a campo alto (3,83 y 3,80 ppm) que se asocian a los protones presentes en los metilos de dos grupos metoxi (ver espectro N° 2). A 6,82 y 6,89 ppm también se observan dos singletes, los cuales constituyen señales características de protones aromáticos; además, se observan dos dobletes a 6,26 y 7,60 ppm con constantes de acoplamiento de 9,4 Hz, típicas los protones presentes en el doble enlace 3,4 de las cumarinas. Estas peculiares señales sugirieron que debía tratarse de un compuesto con una estructura similar a la escoparona (**I**); al comparar los datos espectroscópicos señalados anteriormente con los reportados para la escoparona se observó una notable concordancia, por lo cual se concluyó que se trata del mismo compuesto, estos datos se muestran en la tabla N° 4.

Adicionalmente, un estudio comparativo con una muestra testigo de ese compuesto presente en nuestro laboratorio, permitió confirmar la identidad del mismo. Esto se llevó a cabo a través del método de punto de fusión mixto, así como por comparación entre estas muestras por CCF (empleando varias mezclas de solventes como eluyentes).

La actividad hepatoprotectora de este compuesto ha sido comprobada.<sup>50</sup> También ha sido comprobado su efecto vasodilatador.<sup>51</sup>



Espectro N° 1: RMN  $^1\text{H}$  escoparona (I) (270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

Espectro N° 2: RMN  $^1\text{H}$  escoparona (I) ampliado ( $\delta$ : 4,4-2,9 ppm) (270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

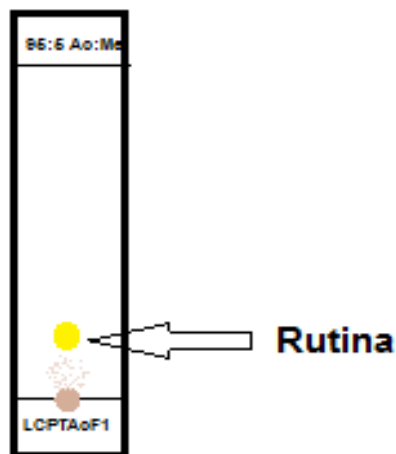
**Tabla N° 4. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en la escoparona (I)**

H/C	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Rep. <sup>52,a</sup>
3	6,26 (d; 9,4)	6,25 (d; 9,6)
4	7,60 (d; 9,4)	7,58 (d; 9,6)
5	6,89; s	6,89; s
8	6,82; s	6,83; s
6-OMe	3,83; s	3,95; s
7-OMe	3,80; s	3,93; s

**a: tomado en CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz**

#### **XIV.2.- Compuesto II: rutina (II)**

Este compuesto se aisló de la muestra LCPTAcF<sub>1</sub> como un sólido color naranja con punto de fusión 190-194 °C. Se obtuvo una cantidad de 14,4 mg, lo cual representa un 3,51% de la fracción sembrada en la columna y un 0,02% del material vegetal inicial. En CCF, mostró una mancha con un Rf= 0,21 al ser eluido con una mezcla 95:5 acetato de etilo- metanol que se tornó de color amarillo al ser revelada con p-anisaldehído.



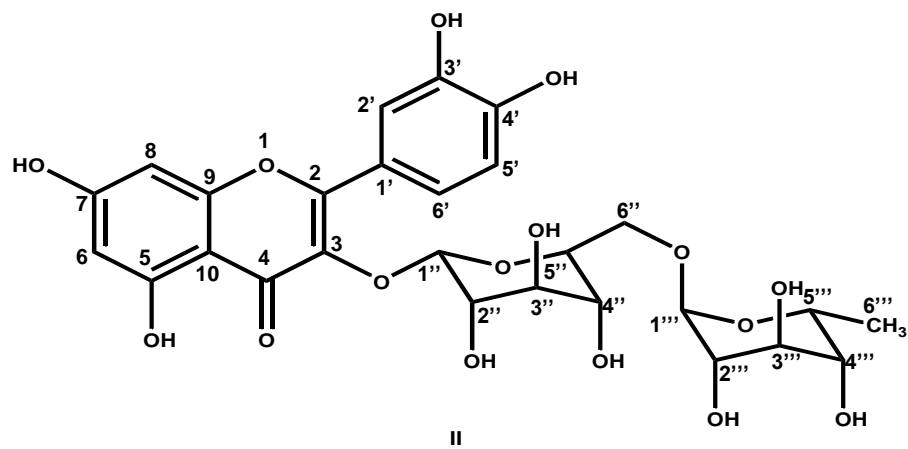
**Figura N° 7: Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>1</sub>**

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros N° 3 y 4), a un desplazamiento químico de 7,66 ppm, se observa un doblete con una constante de acoplamiento de 3,54 Hz, característica de protones aromáticos acoplados en meta, y dos dobletes con constantes de acoplamiento de 8,61 Hz, típica de protones aromáticos acoplados en orto, a 7,65 ppm y 6,89 ppm, lo cual indica la presencia de un sistema aromático tipo ABX, comúnmente presente en el anillo B de esqueletos de tipo flavonoide.

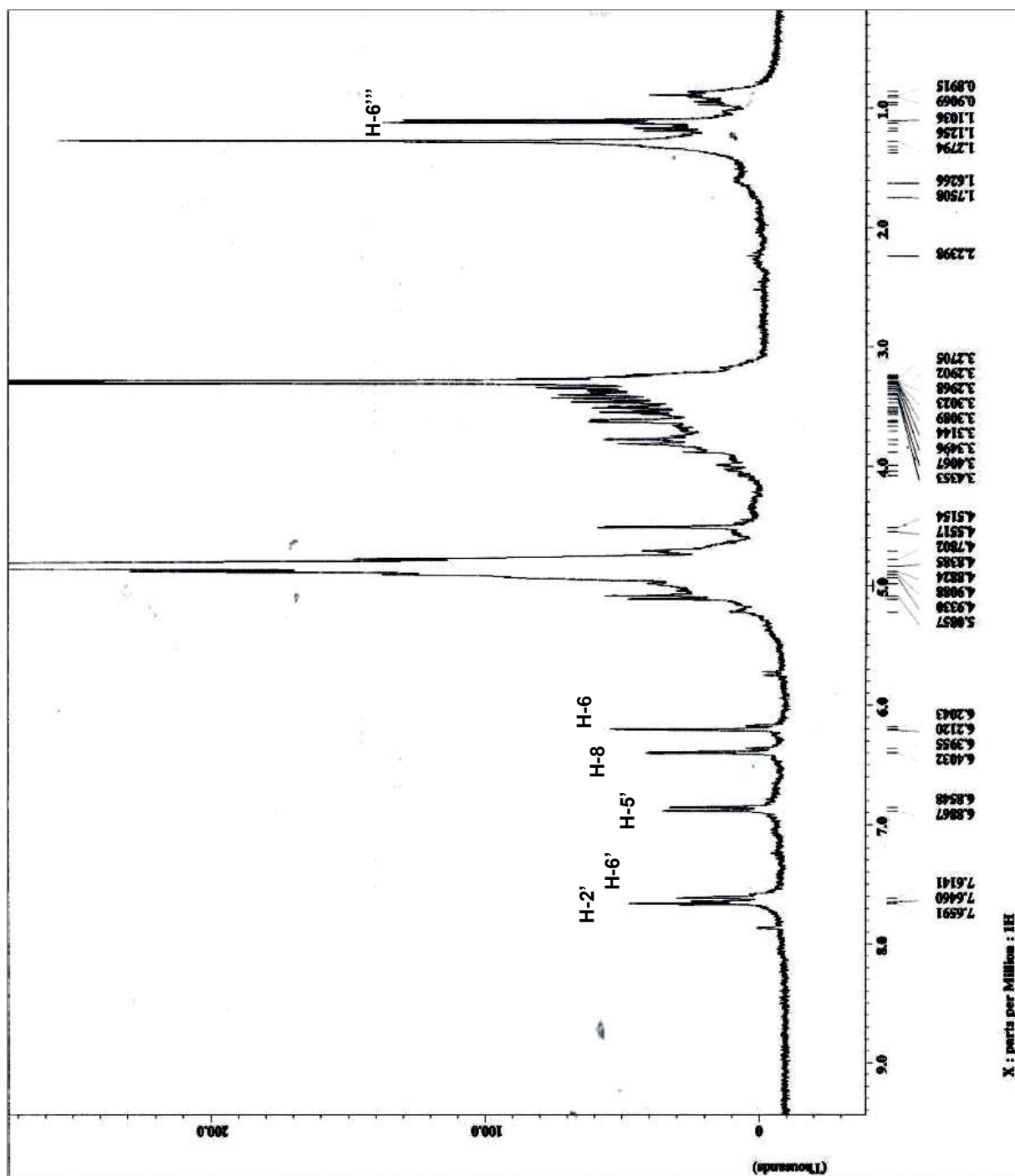
También se observa a campo alto (1,10 ppm) un doblete que integra para tres protones, correspondiente a los tres protones del metilo en posición 6''' de la ramnosa. Entre 3,46 y 3,27 ppm se observa un multiplete que contiene señales de protones correspondientes a los azúcares presentes (glucosa y ramnosa). A 6,40 y 6,21 ppm se observan dos dobletes con constantes de acoplamiento de 2,08 Hz, característica de protones aromáticos acoplados en meta.

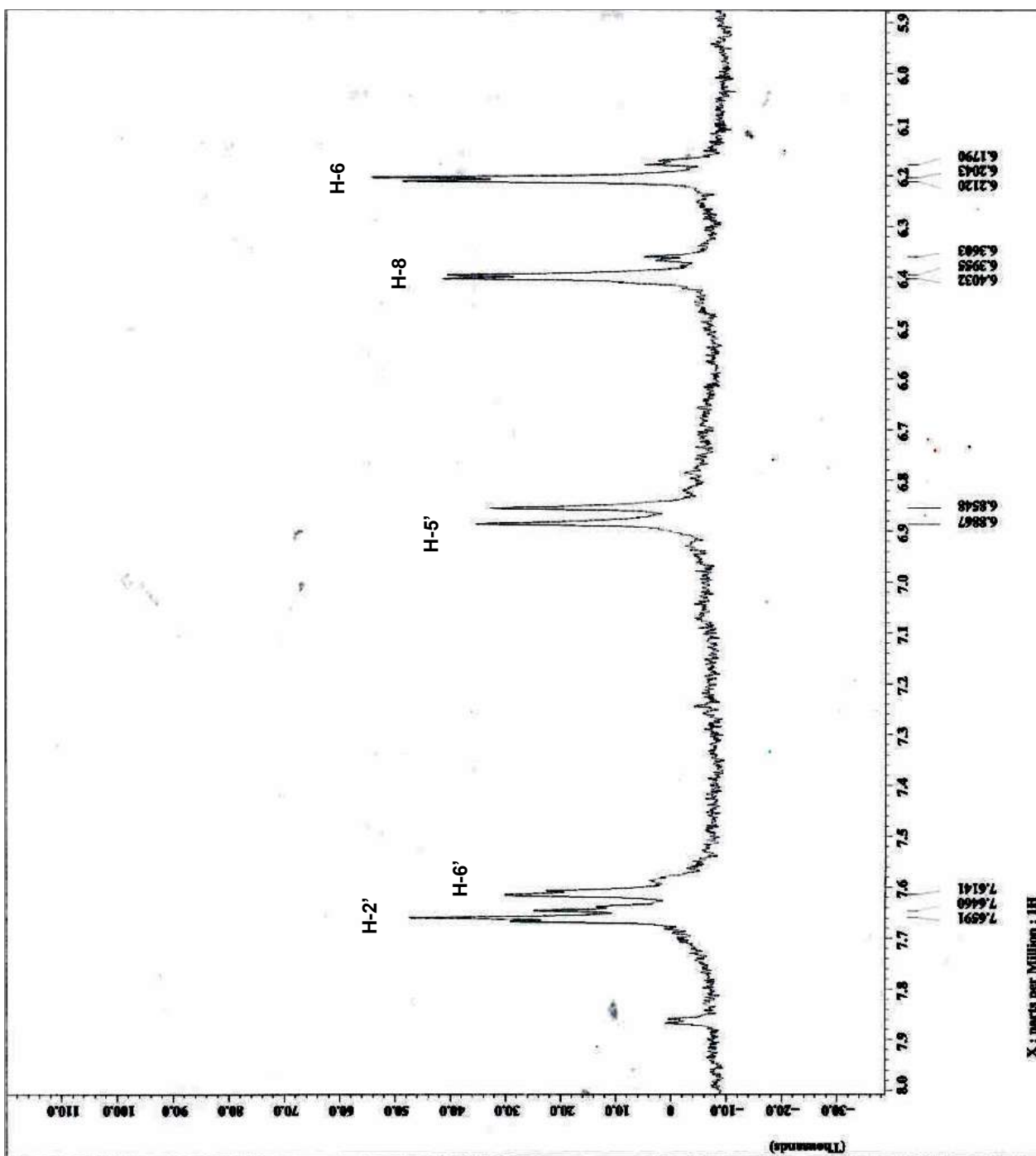
Los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT  $135^\circ$  (Espectro N° 5) indicaron la presencia de un grupo metilo a 16,54 ppm, el cual corresponde al metilo presente en la ramnosa (posición 6''); un grupo metileno a 68,39 ppm que se atribuyó al carbono de la posición 6'' de la glucosa; quince metinos, diez de ellos pertenecientes a los azúcares y cinco aromáticos cuyos desplazamientos químicos se observan a 101,02; 114,74; 121,79; 122,30 y 126,52 ppm, los cuales se asociaron a las posiciones C-6, C-8, C-2', C-5' y C-6', respectivamente. A 98,68 ppm se observa la típica señal del carbono anomérico de un azúcar de tipo glucosa. También se observaron señales correspondientes a nueve carbonos cuaternarios, y asociando la señal que aparece en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a un desplazamiento químico de 178,13 ppm al grupo carbonilo ubicado en posición 4. Pudo deducirse que debía tratarse del flavonoide rutina (**II**). La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura para el flavonoide rutina (**II**), fue efectuada; estos datos se muestran en las tablas N° 2 y 3. Se concluyó entonces que se trata del mismo compuesto. Las diferencias existentes en los desplazamientos químicos se justifican en base al empleo de diferentes solventes al tomar los espectros (polar prótico,  $\text{CD}_3\text{OD}$  vs polar aprótico,  $\text{DMSO-d}_6$ ). Adicionalmente, se llevó a cabo una comparación con muestras de rutina comercial, confirmándose la identidad del compuesto; esto se realizó a través del método de punto de fusión mixto, así como por comparación entre estas muestras por CCF (empleando varias mezclas de solventes como eluyentes).

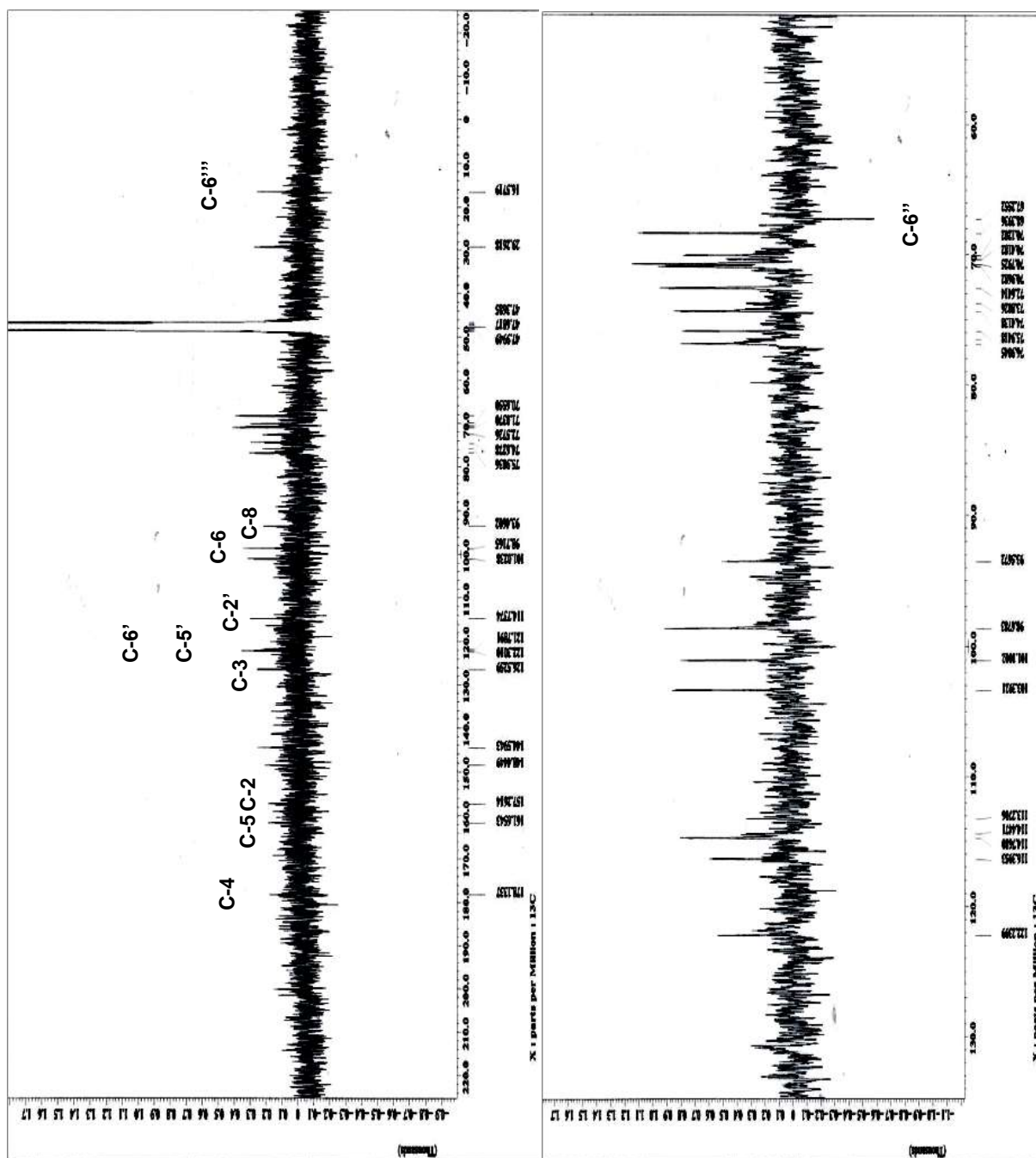
El efecto anti-depresivo de la rutina ha sido farmacológicamente comprobado<sup>53</sup>, así como su efecto beneficioso en el tratamiento de la gastropatía asociada a la diabetes.<sup>54</sup> También ha sido comprobado el potencial efecto de este compuesto en la recuperación de la memoria.<sup>55</sup>





Espectro N° 3: RMN  $^1\text{H}$  rutina (II) (270 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Espectro N° 4: RMN  $^1\text{H}$  rutina (II) ampliado ( $\delta$ : 8,0-5,9 ppm) (270 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Espectro N° 5: RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135° rutina (II) (270 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Tabla N° 5. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^1\text{H}$  a los átomos de H presentes en la rutina (II)**

H/C	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Rep. <sup>56,b</sup>
5-OH	-----	12,59 (s)
6	6,21 (d; 2,1)	6,22 (d; 2,0)
8	6,40 (d; 2,1)	6,44 (d; 2,0)
2'	7,66 (d; 3,54)	7,54 (d; 2,0)
5'	6,89 (d; 8,61)	6,90; (d; 8,7)
6'	7,65 (d; 8,61)	7,90 (d; 8,7)
6'''	1,10 (d; 5,9)	0,98 (d; 4,2)

a: tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 270 MHz, b: tomado en  $\text{DMSO-d}_6$ , 270 MHz

**Tabla N° 6. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  a los átomos de C presentes en la rutina (II)**

C	$\delta$ (ppm) Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) Rep. <sup>56,b</sup>
2	157,2	157,0
3	126,5	133,8
4	178,1	177,9
5	161,7	161,7
6	98,7	99,3
7	161,7	164,9
8	93,5	94,3
9	157,3	160,6
10	101,0	104,5
1'	122,3	122,2
2'	114,7	115,7
3'	144,6	145,0
4'	148,4	149,2
5'	121,8	116,7
6'	121,8	121,6
1''	98,7	101,9
2''	74,6	74,6
3''	75,9	76,5

4''	71,0	70,8
5''	75,9	76,5
6''	68,4	68,8
1'''	98,7	101,3
2'''	70,6	68,8
3'''	72,6	71,1
4'''	74,6	72,4
5'''	71,0	70,4
6'''	16,5	18,3

a: tomado en CD<sub>3</sub>OD, 270 MHz, b: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz

#### XIV.3.- Compuesto III: tilirósido (III)

Este compuesto fue aislado de la muestra LCPTAcF<sub>2</sub> como un sólido de color amarillo con punto de fusión 250-253°C, en una cantidad de 42,1 mg, lo cual representa un 10,25 % de la fracción sembrada en la columna y un 0,05% del material vegetal inicial. En CCF, mostró una mancha con un R<sub>f</sub>= 0,46 al ser eluida con una mezcla 95:5 acetato de etilo-metanol que se tornó de color amarillo al ser revelada con p-anisaldehído.

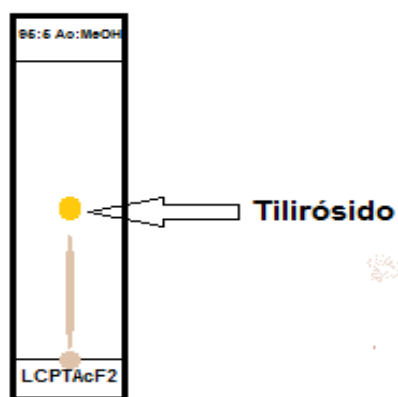


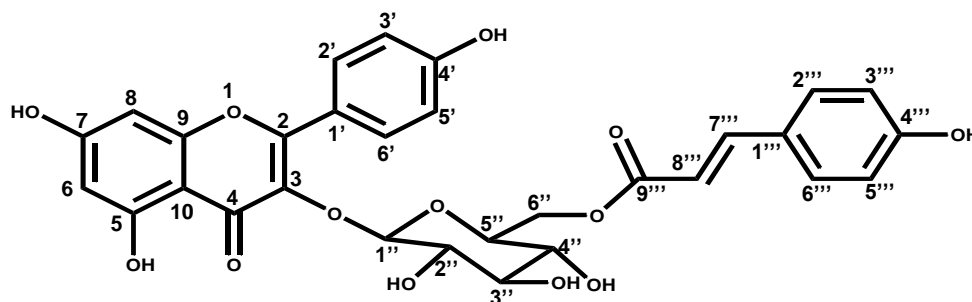
Figura N° 8: Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>2</sub>

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro N° 6) muestra señales múltiples entre 3,25 y 4,32 ppm asociadas a protones de azúcares. Se observan, también, señales correspondientes a protones aromáticos; en este sentido, a 6,14 y 6,38 ppm se distinguen dos dobletes con constantes de acoplamiento de 2,0 Hz, valor característico de protones acoplados en meta. Otras dos señales dobletes se observan a desplazamientos químicos de 6,87 ppm ( $J= 8,9$  Hz) y 7,98 ( $J= 8,9$  Hz) y son atribuibles a protones acoplados en posición orto, al igual que los dobletes que aparecen a 6,81 ppm ( $J= 8,4$  Hz) y 7,35 ppm ( $J= 8,4$  Hz) (ver espectro N° 7). Estas señales permiten considerar una estructura con dos anillos aromáticos p-sustituidos. Adicionalmente, se observa un par de dobletes con constantes de acoplamiento de 15,8 Hz, valor característico de protones olefínicos, a 6,08 ppm y 7,32 ppm.

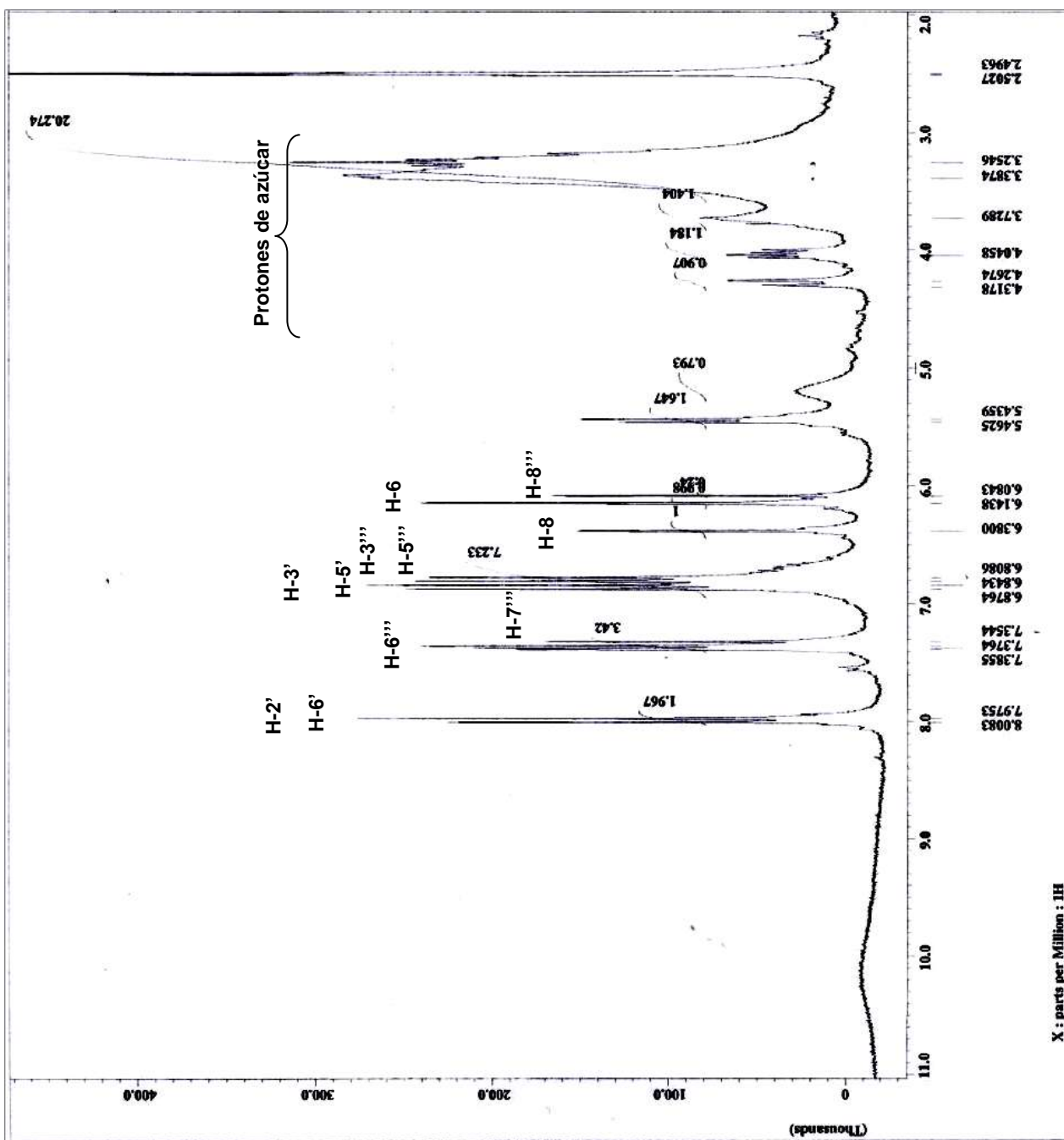
El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro N° 8) indicó la existencia de 30 átomos de carbono en la molécula; a un desplazamiento químico de 177,87 ppm se observa una señal que puede ser atribuida al carbono de un grupo carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado. Otra señal a 166,70 ppm está asociada al carbono de un grupo carboxilo. A desplazamientos de 70,61; 74,73 y 76,81 ppm se observan señales que son características de carbonos hidroxilados, las cuales corresponden a los carbonos del azúcar. El espectro DEPT  $135^\circ$  (Espectro N° 5) indicó que la estructura está constituida por 17 carbonos de naturaleza metínica, 12 carbonos cuaternarios y 1 carbono metilénico. Los metinos de un sistema ABC se observan a desplazamientos de 94,26; 99,40; 116,33 y 130,70 ppm; los carbonos metínicos del azúcar arrojan señales entre 70,54 y 76,80 ppm, excepto el carbono anomérico que se evidencia a 101,61 ppm. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura para el flavonoide tilirósido (**III**) mostró una gran similitud (ver tablas N° 7 y 8), por lo cual se concluyó que se trata del mismo compuesto.

Adicionalmente, un estudio comparativo con una muestra testigo de ese compuesto presente en nuestro laboratorio, permitió confirmar la identidad del mismo. Esto se llevó a cabo a través del método de punto de fusión mixto, así como por comparación entre estas muestras por CCF (empleando varias mezclas de solventes como eluyentes).

La actividad antihiper glucémica, antihiperlipidémica y antioxidante del tilirósido ha sido comprobada.<sup>57</sup>



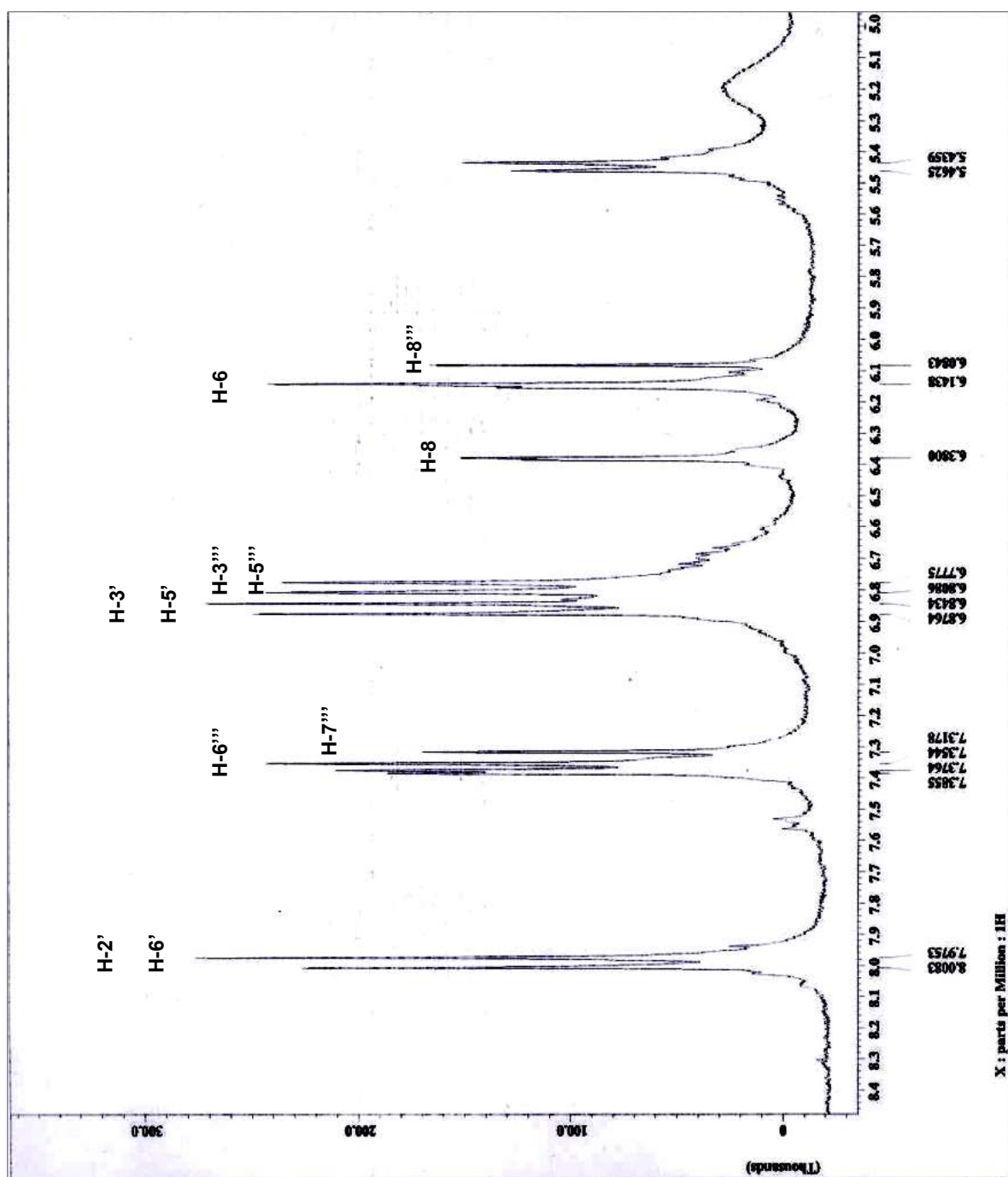
III

Espectro N° 6: RMN  $^1\text{H}$  tilirósido (III) (270 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ )

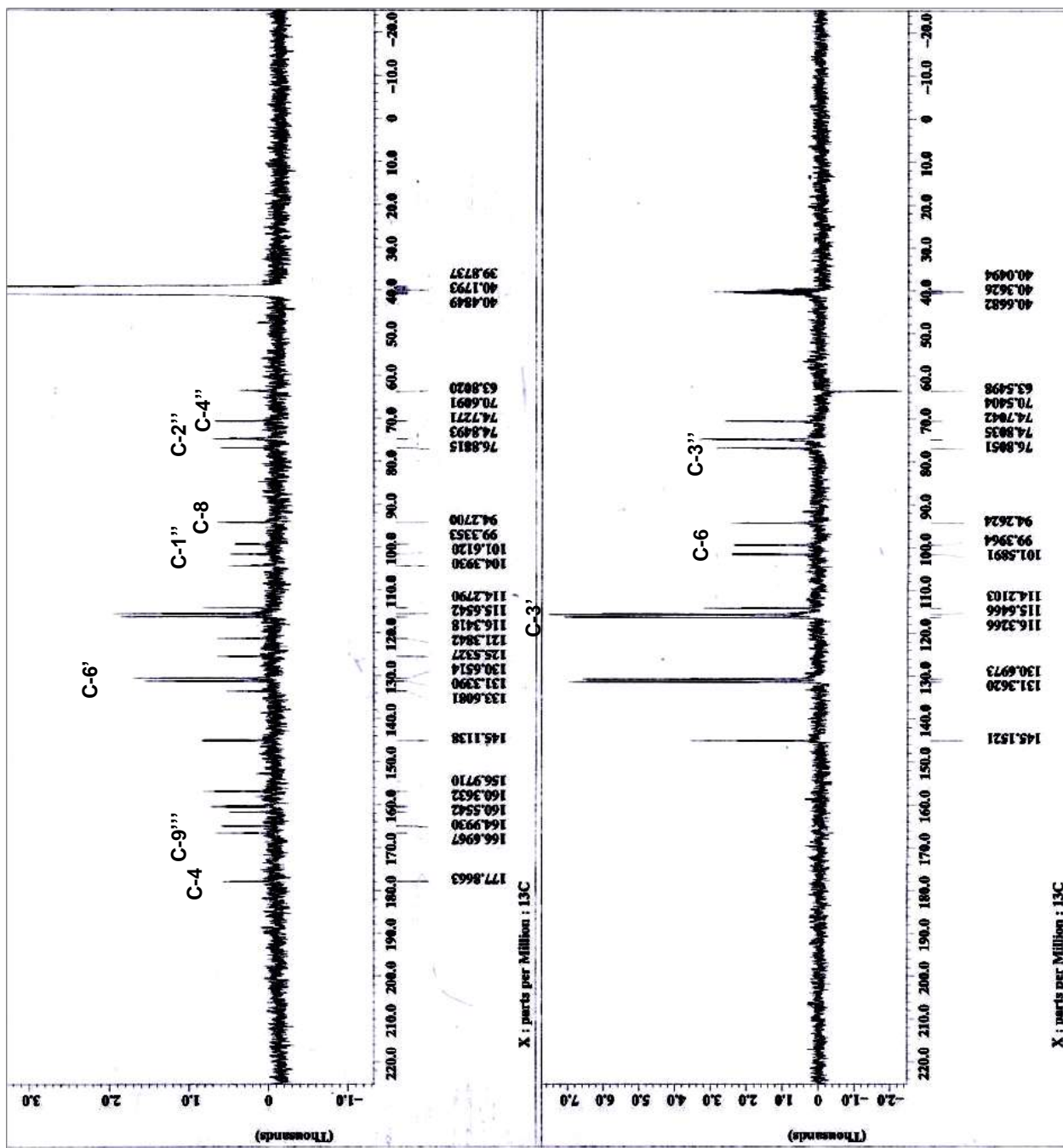
X : parts per Million : III



Espectro N° 7: RMN  $^1\text{H}$  tilorósido (III) ampliado ( $\delta$ : 8,5-5,0 ppm) (270 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ )



Espectro N° 8: RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT  $135^\circ$  tilirósido (III) (270 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )



**Tabla N° 7. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el tilirósido (III)**

H/C	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Rep. <sup>58,b</sup>
5-OH	-----	12,56 (s)
6	6,14 (d; 2,0)	6,14 (d; 2,0)
8	6,38 (d; 2,0)	6,37 (d; 2,0)
2'	7,98 (d; 8,9)	7,98 (d; 8,8)
3'	6,87 (d; 8,9)	6,85 (d; 8,9)
5'	6,87 (d; 8,9)	6,85 (d; 8,9)
6'	7,98 (d; 8,9)	7,98 (d; 8,8)
1''	5,44 (d; 7,2)	5,44 (d; 7,5)
2''	3,25-4,32	3,16-4,27
6''	3,25-4,32	3,16-4,27
2'''	7,35 (d; 8,4)	7,35 (d; 8,9)
3'''	6,81 (d; 8,4)	6,78 (d; 8,6)
5'''	6,81 (d; 8,4)	6,78 (d; 8,6)
6'''	7,35 (d; 8,4)	7,35 (d; 8,9)
7'''	7,32 (d; 15,8)	7,33 (d; 16,4)
8'''	6,08 (d; 15,8)	6,10 (d; 16,0)

a: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz, b: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz

**Tabla N° 8. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el tilirósido (III)**

C	$\delta$ (ppm) Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) Rep. <sup>58,b</sup>
2	157,0	156,9
3	133,6	133,5
4	177,9	177,8
5	160,6	161,6
6	99,4	99,2
7	165,0	164,6
8	94,3	94,1
9	157,0	156,8
10	104,4	104,3

1'	121,4	121,2
2'	130,7	130,6
3'	116,3	116,2
4'	160,4	160,4
5'	116,3	116,2
6'	130,7	130,6
1''	101,6	101,4
2''	74,7	74,6
3''	76,8	76,6
4''	70,5	70,4
5''	74,7	74,5
6''	63,8	63,4
1'''	125,5	125,3
2'''	131,3	131,3
3'''	115,6	115,5
4'''	160,4	160,2
5'''	115,6	115,5
6'''	131,3	131,3
7'''	145,1	145,0
8'''	114,3	114,0
9'''	166,7	166,6

a: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz, b: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz

#### XIV.4.- Compuesto IV: kamferol-3-o-rutinosido (IV)

Este compuesto se aisló de la muestra LCPTAcF<sub>3</sub> como un sólido color amarillo, en una cantidad de 17,5 mg, lo cual representa un 29,91% de la fracción sembrada en la placa preparativa y un 0,02% del material vegetal inicial. En CCF, mostró una mancha con un R<sub>f</sub>= 0,64 al ser eluida con una mezcla 7:3 acetato de etilo-cloroformo que se tornó de color amarillo al ser revelada con p-anisaldehído.



**Figura N° 9: Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones LCPTAcF<sub>3</sub>**

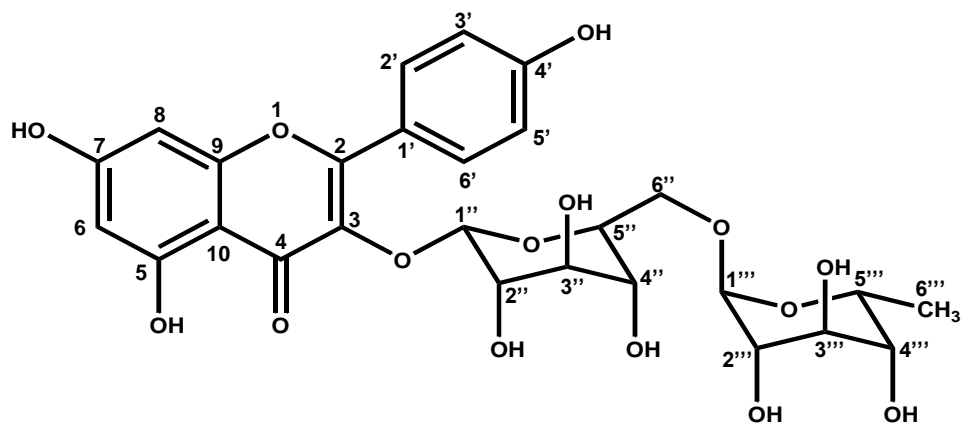
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro N° 9) muestra dos dobletes a 6,20 y 6,40 ppm con constantes de acoplamiento de 2,1 Hz, atribuibles a protones aromáticos acoplados en meta. Por otro lado, se observan dos dobletes con constantes de acoplamiento de 8,91 Hz (valor característico de protones acoplados en orto) a 6,89 y 8,07 ppm, las anteriores señales corresponden a un sistema de tipo AA'BB', comúnmente presente en el anillo B de esqueletos de tipo flavonoide (ver espectro N° 10). También se observa a campo alto (1,10 ppm) un doblete que integra para tres protones, correspondientes a los tres protones del metilo en posición 6''' de la ramnosa. Entre 3,44 y 3,27 ppm se observa un multiplete que contiene señales de los protones correspondientes a los azúcares presentes (glucosa y ramnosa).

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135° (Espectro N° 11) indicaron la presencia de un grupo metilo a 16,54 ppm, el cual corresponde al metilo presente en la ramnosa (posición 6'''); un grupo metileno a 68,41 ppm que se atribuyó al carbono de la posición 6'' de la glucosa; quince metinos, diez de ellos pertenecientes a los azúcares y cinco aromáticos cuyos desplazamientos químicos se observan a 98,70; 93,66; 131,02; 114,86 y 131,1

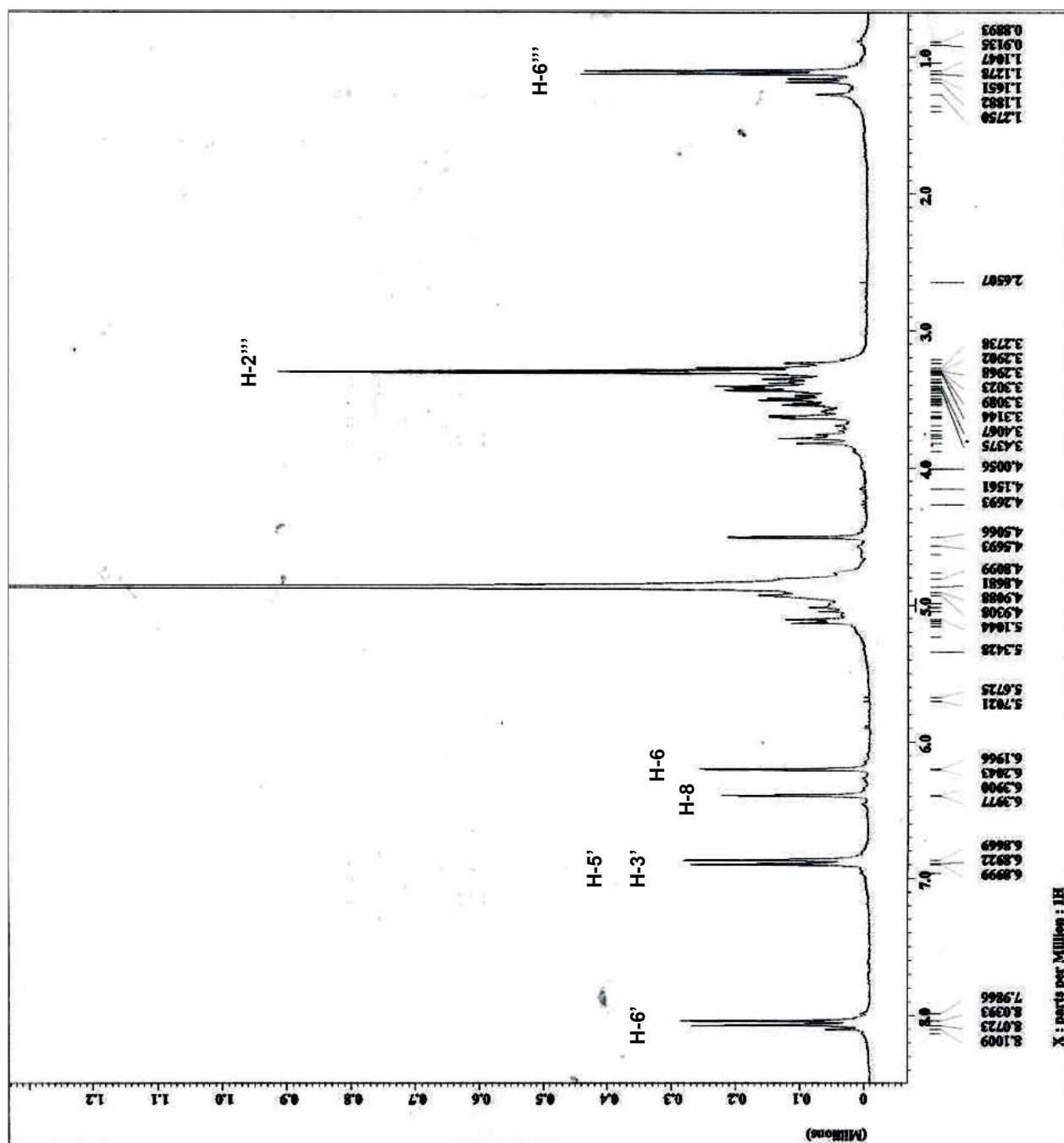
ppm, los cuales se asociaron a las posiciones C-6, C-8, C-2', C-5' y C-6', respectivamente. Se asoció la señal que aparece en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a un desplazamiento químico de 170,96 ppm al grupo carbonilo ubicado en posición 4. A 101,03 ppm se observa la típica señal del protón anomérico de la glucosa. También se observaron señales correspondientes a ocho carbonos cuaternarios. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura para el flavonoide kamferol-3-o-rutinosido (**IV**) mostró una gran similitud (ver tablas N° 9 y 10), por lo cual se concluyó que se trata del mismo compuesto. Las diferencias existentes en los desplazamientos químicos se justifican en base al empleo de diferentes solventes al tomar los espectros (polar prótico vs polar aprótico).

Adicionalmente, un estudio comparativo con una muestra testigo de ese compuesto presente en nuestro laboratorio, permitió confirmar la identidad del mismo. Esto se llevó a cabo a través del método de punto de fusión mixto, así como por comparación entre estas muestras por CCF (empleando varias mezclas de solventes como eluyentes).

La actividad neuroprotectora del kamferol-3-o-rutinosido ha sido comprobada.<sup>59</sup>

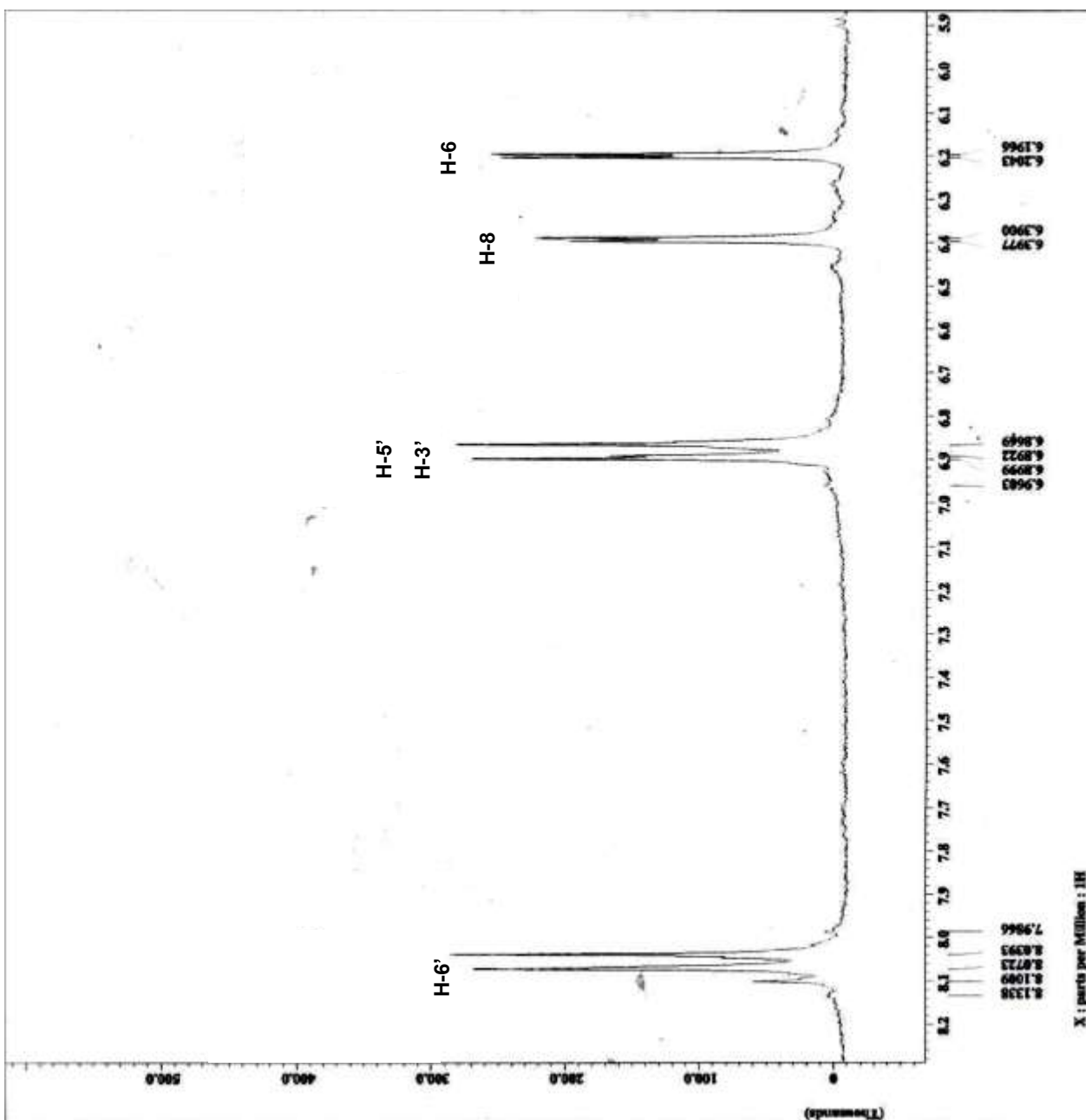


IV

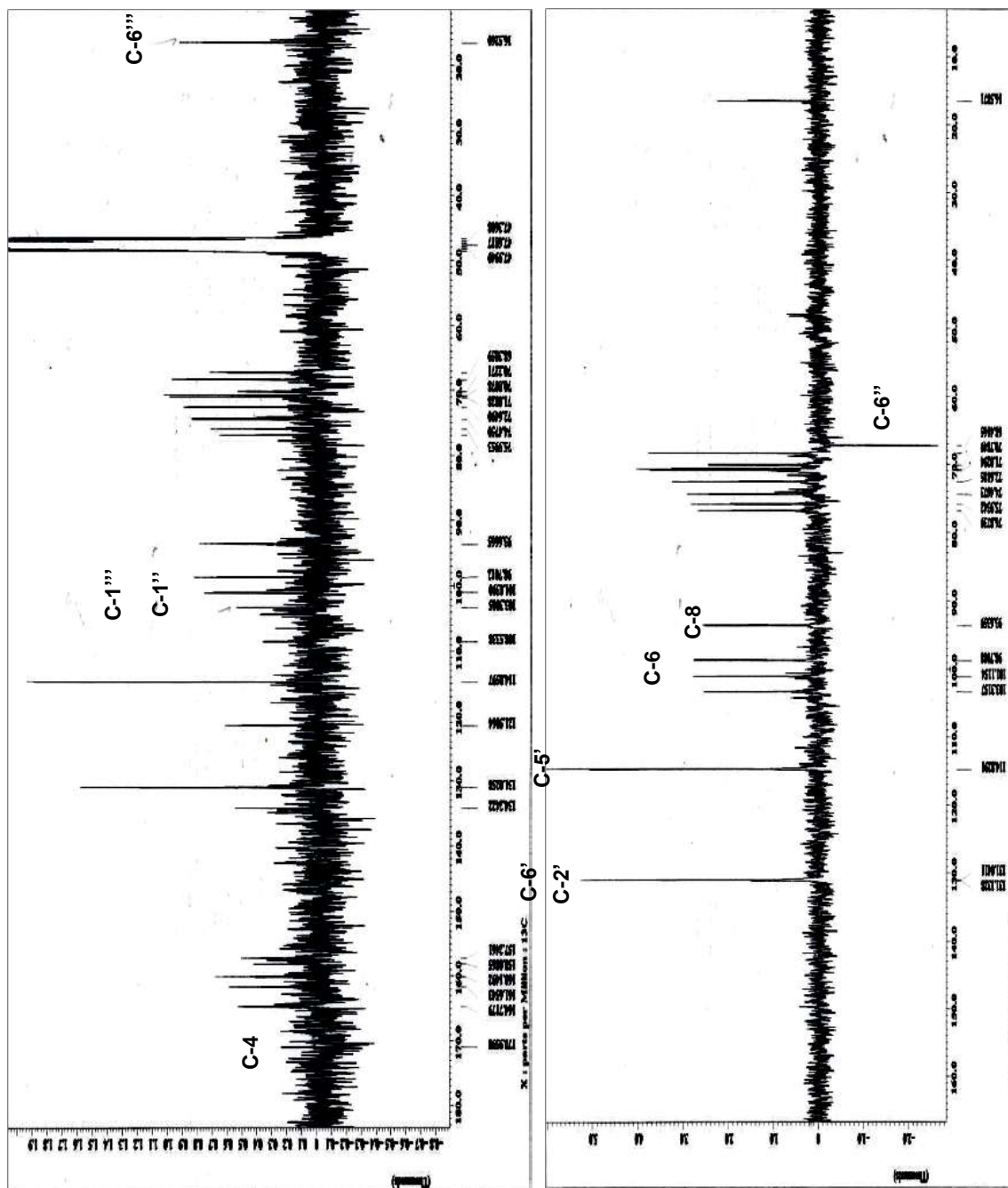
Espectro N°9: RMN  $^1\text{H}$  kamferol-3-o-rutinosido (IV) (270 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Espectro N°10: RMN  $^1\text{H}$  kamferol-3-o-rutinosido (IV) ampliado ( $\delta$ : 8,2-5,9 ppm) (270 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



Espectro N°11: RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135° kamferol-3-o-rutinosido (IV) (270 MHz;  
 $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Tabla N° 9. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el kamferol-3-o-rutinosido (IV)**

H/C	δ (ppm) [m; J (Hz)] Exp. <sup>a</sup>	δ (ppm) [m; J (Hz)] Rep. <sup>56,b</sup>
5-OH	-----	12,56 (s)
6	6,20 (d; 2,1)	6,19 (d; 2,0)
8	6,40 (d; 2,1)	6,41 (d; 2,0)
2'	8,07 (d; 8,9)	7,99 (d; 8,6)
3'	6,89 (d; 8,9)	6,88 (d; 8,6)
5'	6,89 (d; 8,9)	6,88 (d; 8,6)
6'	8,07 (d; 8,9)	7,99 (d; 8,6)
1''	5,70 (s)	5,73 (s)
2''	4,93 (d; 5,9)	5,32 (d; 7,2)
1'''	4,51 (s)	4,36 (s)
2'''	3,27 (m)	3,00 (m)
6'''	1,10 (d; 6,2)	0,98 (d; 5,9)

a: tomado en CD<sub>3</sub>OD, 270 MHz, b: DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz

**Tabla N° 10. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el kamferol-3-o-rutinosido (IV)**

C	δ (ppm) Exp. <sup>a</sup>	δ (ppm) Rep. <sup>56,b</sup>
2	157,2	157,0
3	134,2	133,7
4	171,0	177,9
5	161,7	161,7
6	98,7	99,3
7	164,7	164,7
8	93,6	94,3
9	158,1	157,4
10	103,3	104,5
1'	121,5	121,4
2'	131,0	131,4

3'	114,8	115,6
4'	160,1	160,4
5'	114,8	115,6
6'	131,1	131,4
1''	101,0	101,8
2''	74,4	74,7
3''	76,0	76,6
4''	70,2	70,4
5''	76,0	76,2
6''	68,4	67,4
1'''	101,0	101,2
2'''	70,8	70,9
3'''	71,0	71,1
4'''	72,6	72,3
5'''	68,4	68,7
6'''	16,5	18,3

a: tomado en CD<sub>3</sub>OD, 270 MHz, b: DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz

#### XIV.5.- Compuesto V: catequina (V)

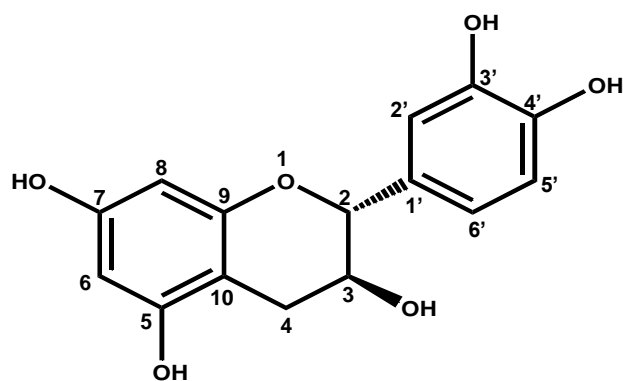
Este compuesto se aisló de la muestra LCPTAcF<sub>3</sub> como un sólido color rojizo, en una cantidad de 14,5 mg, lo cual representa un 24,79% de la fracción sembrada en la placa preparativa y 0,02% del material vegetal inicial. En CCF, mostró una mancha con un R<sub>f</sub>= 0,42 al ser eluido con una mezcla 7:3 acetato de etilo- cloroformo que se tornó de color naranja al ser revelada con p-anisaldehído.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectros N° 12 y 13) se observan señales asociadas a un sistema de tipo ABX; en este sentido, a 6,69 ppm se observa un doblete acoplado a otro ubicado en 6,66 ppm con una constante de acoplamiento de 2,2 Hz (valor típico de protones acoplados en meta), y este último acoplado a su vez a otra señal en 6,71 ppm con una constante de acoplamiento de 8,1 Hz (valor característico de protones acoplados en orto). A campo más alto (4,5 ppm) tres dobletes poco definidos, señales que se asocian a protones presentes en el anillo heterocíclico. Las señales anchas que aparecen a desplazamientos químicos de 9,14; 9,11 y 8,86 ppm corresponden a protones de grupos hidroxilo fenólicos presentes en la molécula.

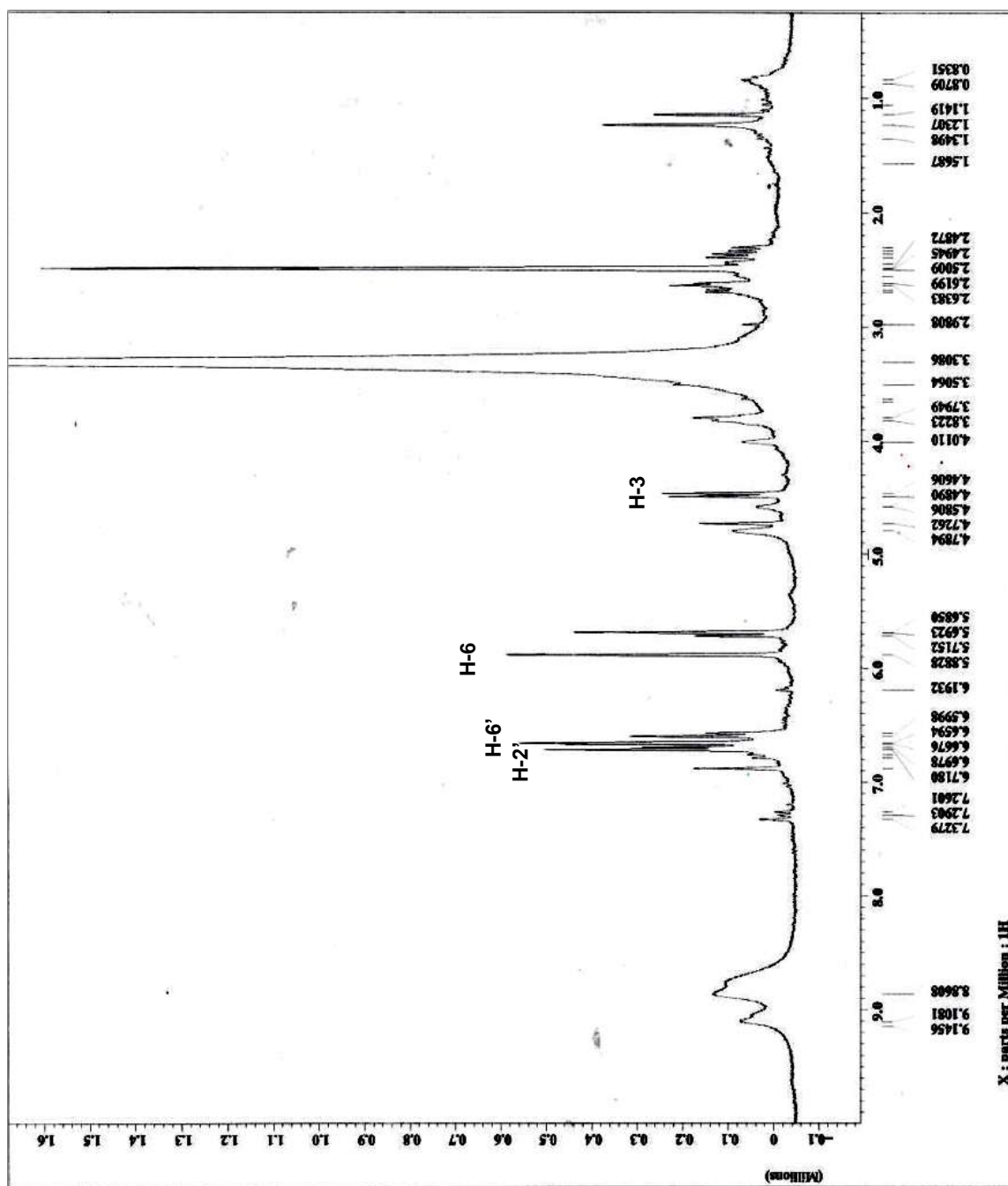
Los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT  $135^\circ$  (Espectro N° 14) muestran señales a 115,16; 115,69 y 118,95 ppm, las cuales confirman la existencia de un sistema ABX. Las señales observadas 95,83 y 94,51 ppm corresponden a carbonos aromáticos. A campo alto (66,95 y 81,60 ppm) se observan señales típicas de metinos sustituidos por anillos aromáticos o grupos hidroxilo.

Los desplazamientos señalados en ambos tipos de espectros son característicos de flavanoles, lo cual hizo pensar que podía tratarse de la catequina o epicatequina, los cuales son diastereoisómeros entre sí; al llevar a cabo la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura para cada uno de los mencionados diastereoisómeros, se encontró una mayor coincidencia con la catequina (**V**) (ver tablas N° 11 y 12). Sin embargo, el empleo de diferentes solventes en la toma de los espectros (polar prótico vs polar aprótico) impide establecer con plena seguridad la identidad de este compuesto.

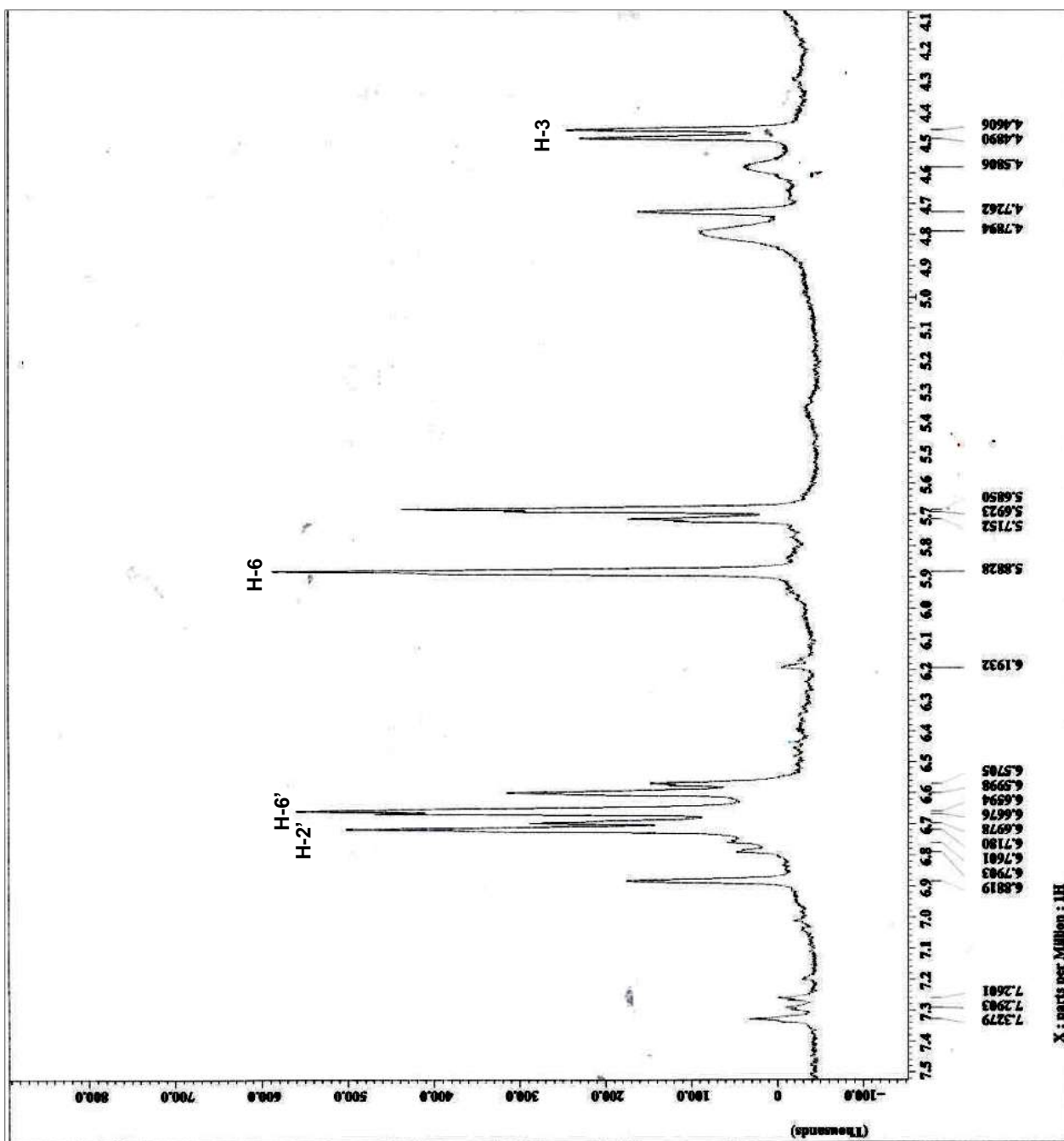
La función protectora de la catequina (conocido antioxidante) sobre la cardiotoxicidad inducida por idarubicina ha sido estudiada.<sup>60</sup> El efecto antiinfeccioso de este compuesto también ha sido comprobado.<sup>61</sup>



V

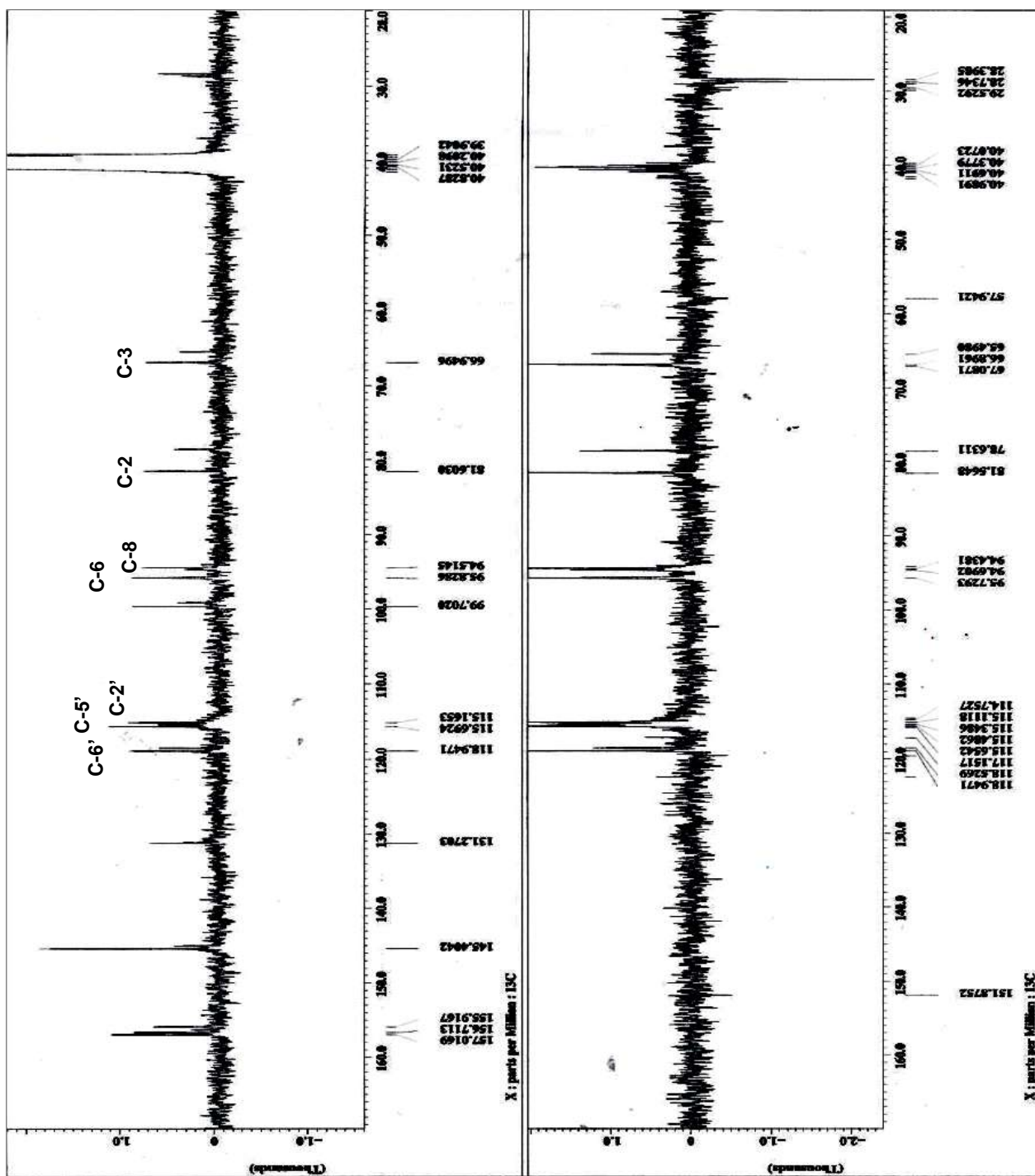
Espectro N° 12: RMN  $^1\text{H}$  catequina (V) (270 MHz; DMSO-d $_6$ )

Espectro N° 13: RMN  $^1\text{H}$  catequina (V) ampliado ( $\delta$ : 7,5-4,1 ppm) (270 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)





Espectro N°14: RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135° catequina (V) (270 MHz; DMSO-d6)



**Tabla N° 11. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>1</sup>H a los átomos de H presentes en el catequina (V)**

H/C	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) [m; J (Hz)] Rep. <sup>62,b</sup>
2	4,49 (d; 7,7)	4,59 (d; 7,4)
3	4,5 (ddd; 7,7; 7,3; 7,7)	4,01 (ddd; 8,0; 7,4; 5,4)
4	2,49 / 2,62 (dd)	2,52/ 2,84 (dd; 16,0; 8,0/ 16,0; 5,0)
6	5,88 (d; 2,0)	5,96 (d; 2,2)
8	5,69 (d; 2,0)	5,89 (d; 2,2)
2'	6,71 (d; 2,2)	6,85 (d; 1,8)
5'	6,69 (d; 8,1)	6,79 (d; 8,1)
6'	6,66 (dd; 2,2; 8,1)	6,72 (dd; 1,8; 8,1)

a: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz, b: tomado en CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz

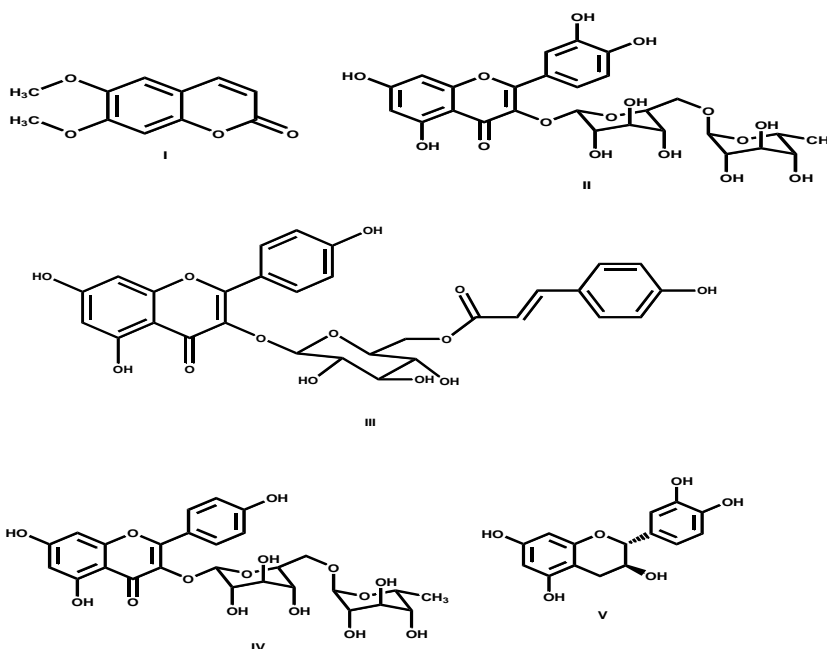
**Tabla N° 12. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN <sup>13</sup>C a los átomos de C presentes en el catequina (V)**

C	$\delta$ (ppm) Exp. <sup>a</sup>	$\delta$ (ppm) Rep. <sup>62,b</sup>
2	81,6	82,6
3	67,0	68,6
4	28,4	28,2
5	156,7	157,3
6	95,8	96,4
7	157,0	157,4
8	94,5	95,4
9	155,9	156,7
10	99,7	100,9
1'	131,3	132,0
2'	115,2	115,2
3'	145,4	146,0
4'	145,4	146,0
5'	115,7	116,2
6'	119,0	120,1

a: tomado en DMSO-d<sub>6</sub>, 270 MHz, b: tomado en CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz

## XV.- Conclusiones

- En el estudio fitoquímico realizado a las cáscaras de los frutos de *Protium tovarense* Pittier se aislaron cinco compuestos conocidos como: escoparona (**I**), rutina (**II**), tilirósido (**III**), kamferol-3-o-rutinosido (**IV**) y catequina (**V**).
- En la fracción de hexano del extracto metanólico de las cáscaras de los frutos de *Protium tovarense* Pittier no se encontró ningún compuesto interesante desde el punto de vista químico.
- En la fracción de cloroformo sólo se encontró la escoparona (**I**).
- De la fracción de acetato de etilo se aisló la mayoría de los compuestos: rutina (**II**), tilirósido (**III**), kamferol-3-o-rutinosido (**IV**) y catequina (**V**).



## XVI.- Recomendaciones

- Realizar el estudio fitoquímico de la pulpa de los frutos de *Protium tovarense* Pittier, partiendo de una mayor cantidad de material vegetal.
- Realizar el estudio fitoquímico de otras partes de la especie *Protium tovarense* Pittier, como hojas y resina, ya que es probable que se encuentren más compuestos interesantes desde el punto de vista químico.
- Estudiar la composición de la fracción acuosa del extracto metanólico de los frutos de *Protium tovarense* Pittier.

## **XVII.- Referencias bibliográficas**

- 1) <http://www.sanaia.es/contenidos%20FITOTERAPIA/fitoterapia%201%20intro.html> (01/03/2013)
- 2) Madaleno I. 2007. Etnofarmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Cuadernos Geográficos 41: 61-95.
- 3) Obón C. 1991. Las plantas medicinales de nuestra región. Editora regional de Murcia.España.11.
- 4) Paco O, Peña A. 2007. Medicina alternativa: intento de análisis. An Fac Med Lima 68: 87-97.
- 5) Ocampo R. 1994. Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. 108.
- 6) Marcano D. 2002. Fitoquímica orgánica. Editorial Torino. Segunda edición. Caracas. 32,60, 138,139, 178, 184, 217, 218, 230, 237, 238.
- 7) Ara A. 2004. 100 plantas medicinales escogidas. Editorial ADAF. España. 27.
- 8) Pamplona J. 1995. Plantas que curan. Editorial Safeliz. España.15-20.
- 9) Olaya J. 2005. Guía de plantas y productos medicinales. 17-18.
- 10) Ryman D. 1995. Aromaterapia. Editorial Kairós. España. 23.
- 11) Pascual M. 2000. Microbiología alimentaria. Editorial Díaz de Santos. España. 236.

- 12) Ortuño M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Editorial Aiyana. España. 223-224.
- 13) Casado E. 2012. Operaciones básicas de laboratorio. Editorial Paraninfo. España.168-169.
- 14) Botella A. 2003. Manual del auxiliar de farmacia, módulo I. Editorial Mad. España. 479.
- 15) Sanz I. 2002. Prácticas de química orgánica: experimentación y desarrollo. Editorial Universidad Politécnica de de Valencia. España. 65
- 16) Lamarque A. 2008. Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Argentina. 51.
- 17) González L. 2011. Flora de Costa Rica I. guía práctica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 99.
- 18) Tarfurt G, Muñoz A. 2012. Metabolitos volátiles presentes en *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. colectado en Tame (Arauca - Colombia). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 11: 223 – 232.
- 19) López A. 2001. Árboles en España: manual de identificación. Ediciones Mundi-Prensa. España. 469.

- 20)** Pontes W, Oliveira J, Camara C, Lopes A. 2007. Composition and Acaricidal Activity of the Resin's Essential Oil of *Protium bahianum* Daly Against Two Spotted Spider Mite (*Tetranychus Urticae*). J Essent Oil Res 19:379-383.
- 21)** Hokche O, Berry P, Huber O. 2008. Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Fundación instituto venezolano Dr. Tobias Lasser. Venezuela. 288-290.
- 22)** Morton J. 1981. Atlas of medicinal plants of Middle America Bahamas to Yucatan. Charles Thomas Publisher. 398-399.
- 23)** Daly D. 1997. Burseraceae in "Flora of the Venezuelan Guayana". Volumen 3. Steyermark J, Berry P, Holst B General editors. 702-703.
- 24)** Primo E. 2007. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, tomo II. Editorial Reverté. España. 851, 854, 863, 915, 916.
- 25)** Taiz L. 2006. Fisiología vegetal, volumen 1. Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I. 539.
- 26)** De Vivar A. 2006. Química de la flora mexicana. UNAM. Mexico. 40, 90.
- 27)** Beyer H. 1987. Manual de química orgánica. Editorial Reverté. España. 724.
- 28)** Anaya A. 2003. Ecología química. Editorial Plaza y Valdés S.A. México. 49
- 29)** Martínez I. 2007. Manual de fitoterapia. España. 33.

- 30)** Sing O. 1997. Colorantes naturales. Universidad Católica de Perú. Perú. 71-72.
- 31)** Romero M. 2004. Plantas aromáticas. Editorial Kier. Argentina. 81.
- 32)** Vanaclocha B. 2003. Fitoterapia: vademécum de prescripción. Editorial Elsevier. España. 33.
- 33)** Firshein R. 2004. La revolución de los farmanutrientes. Editorial Edaf. España. 165.
- 34)** Rodríguez V. 2008. Bases de la alimentación humana. Editorial Netbiblo. España. 259.
- 35)** Ulloa J. 2007. Frutas autoestabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos. Universidad autónoma de Nayarit. México. 24.
- 36)** Mora A, Delgado G, Díaz G, Usubillaga A, Khouri N, Bahsas A. 2001. 3 $\alpha$ -hidroxitirucalla-7,24-dien-21-oico acid: a triterpene from *Protium crenatum* Sandwith. Acta Crystallographica 57:638-640.
- 37)** Lima F, Malheiros A, Otuki M, Calixto J, Yunes R, Cechinel V, Delle F. 2005. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their anticonceptive activity. J Braz Chem Soc 16:578-582.
- 38)** Aragão G, Carneiro L, Junior A, Bandeira P, Lemos T, Viana G. 2006. A posible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-and beta- amyrrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 85:827-834.



- 39)** Wendel Pontes W, Oliveira J, Camara C, Lopes A. 2007. Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* Daly against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). J. Essent. Oil Res 19: 379-383.
- 40)** Suárez A, Compagnone R, Acosta D, Velásquez L, Díaz B, Canelón D. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the oleoresin of *Protium neglectum* S. from Venezuela. J. Essential Oil Bearing Plants 10:70-75.
- 41)** Lokvam J, Fine P. 2012. An oxidized squalene derivative from *Protium subserratum* Engl. (Engl.) growing in Peru. Molecules 17:7451-7457.
- 42)** Nogueira P, Loiola O, Salles M, Gomes T. 2002. Metabólitos secundarios de *Protium heptaphyllum* March. Quím. Nova 25-6b: 1078-1080.
- 43)** Acosta D. 2003. Estudio fitoquímico de las hojas y caracterización de los aceites esenciales en la resina de *Protium neglectum*. Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciado en Química en la Universidad Central de Venezuela.
- 44)** Padilla F, Rincón M, Rached L, Suárez A. 2008. *Protium neglectum*, *Podocalyx loranthoides* and *Brosimum utile* source of flavonoids and other phenolic compounds with antioxidant activity. Revista de la Facultad de Farmacia 71:8-14.
- 45)** Siqueira J, Zoghbi M, Cabral J, Filho W. 1995. Lignans from *Protium tenuifolium*. Journal of Natural Products 58, N°5: 730-732.

- 46) Siani A, Zoghbi M, Wolter E, Vencato I. 1998. 5-Methoxyjusticidin A, a new Arylnaphthalene Lignan from *Protium unifoliolatum*. J. Nat. Prod. 61 (6): 796–797.
- 47) <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&iid=141599> (11/03/2013)
- 48) <http://www.codigovenezuela.com/2010/05/ciencia/diversidad/tacamahaco-aroma-de-venezuela>(12/03/2013)
- 49) Schnee L. 1984. Plantas medicinales de Venezuela. UCV. Colección de Ciencias Biológicas VIII. Caracas. 672.
- 50) Zhang A, Sun H, Wu G, Sun W, Yuan Y, Wang X. 2013. Proteomics analysis of hepatoprotective effects for scoparone using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry with bioinformatics. OMICS 17(4):224-229.
- 51) Huang H, Lee C, Weng Y, Lee M, Lee Y. 1992. Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a chinese herb. European Journal of Pharmacology 218(1): 123-128.
- 52) Canelón D. 2004. Estudio fitoquímico y actividad farmacológica de *Senefelderopsis chiribiquetensis* (Euphorbiaceae). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia UCV. 108.
- 53) Machado D, Bettio L, Cunha M, Santos A, Pizzolatti M, Brighente I, Rodrigues A. 2008. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. European Journal of Pharmacology 587: 163–168.

- 54)** Bais S, Shrirao S, Kochar N, Jiddewar A, Bakal A. 2012. Evaluation of Effect of Rutin in Diabetes Rat Gastropathy. *Int.J.Pharm.Phytopharmacol.* 1(6): 363-366.
- 55)** Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Javadi A. 2011. The effects of rutin on memory retrieval in normal rats. *European Psychiatry* 26: 431.
- 56)** Pernía E. 2005. Compuestos fenólicos en Musáceas y su relación con sigatoka. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias UCV. 79, 93.
- 57)** Wei Q, Chuan Z, Nan Q, Huiyuan Z, Hongquan D. 2010. Identification of trans-tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *Potentilla chinesis*. ([http://www.paper.edu.cn/en\\_releasepaper/content/4399296](http://www.paper.edu.cn/en_releasepaper/content/4399296))
- 58)** Mateu E. 2011. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad farmacológica y citotóxica-antitumoral de los metabolitos secundarios presentes en *Croton micans*. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia UCV. 205.
- 59)** Yu L, Chen C, Wang L, Kuang X, Liu K. 2013. Neuroprotective Effect of Kaempferol Glycosides against Brain Injury and Neuroinflammation by Inhibiting the Activation of NF- $\kappa$ B and STAT3 in Transient Focal Stroke. *PLoS One* 8(2):e55839.
- 60)** Kalender S, Kalender Y, Ates A, Yel M, Olcay E, Candan S. 2002. Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Braz J Med Biol.* 35(11):1379-1387.
- 61)** Shimamura T, Zhao W, Hu Z. 2007. Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6: 57-62.

- 62)** Cruz M, Costa A, Chaves M, Rinaldo D, Vilegas W, Magela G, Vieira J. 2009. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extracto das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Quim. Nova*, 32- 6: 1510.