

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO:**

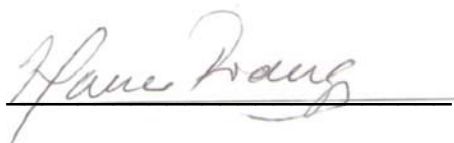
**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES  
 EN LAS RAMAS Y HOJAS DE LA ESPECIE *Cassia fruticosa* Mill.**

Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por la Br. Reine L. Mendoza G., para  
optar al título de Licenciado En  
Química.

Tutor: Dra. Maria Rodríguez.

Caracas, octubre de 2013

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Aislamiento y caracterización de los principios activos presentes en las ramas y hojas de la especie *Cassia fruticosa* Mill., presentado por Br. Reine Lissette Mendoza Guzmán C.I: 18.314.124, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Química.



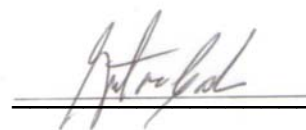
Maria Rodriguez

(Tutor)



Beth Diaz

(Jurado Principal)



Gustavo Cabrera

(Jurado Principal)

## **Agradecimientos**

En primer lugar agradezco a Dios por darme la vida, estar siempre a mi lado guiándome y ponerme en el camino a esta magnífica casa de estudios, mi UCV querida, de la cual me siento orgullosa de egresar como Licenciada.

A mi papa Reinaldo Mendoza, que este donde este se que siempre esta cuidándome, guiándome a cada paso, espero que estés orgulloso de mi; a mi mamá Ynes Guzmán quien ha sido mi apoyo incondicional, mi amiga, mi ejemplo a seguir, gracias por quedarte tantas horas despierta conmigo durante estos años de carrera; me enseñaste que todo en esta vida se gana con esfuerzo y dedicación sin perder de vista tus metas. Mil gracias, los amo.

A mis hermanos, por siempre estar ahí y saber que en cualquier momento puedo contar con ustedes independientemente de la distancia. Los quiero

A mi esposo Francisco López por escucharme, comprenderme, apoyarme y sobre todo no permitirme desistir de mis metas. A mi hija Sofia López por ser mi luz y mi mayor motivación para culminar este gran proyecto en mi vida.

A mis tutores: Jairo Bermúdez, gracias por enseñarme tantas cosas, por tener la paciencia, la constancia, dedicación y estar conmigo en los altibajos de este proyecto, aprendí muchísimo de ti y espero seguir haciéndolo; Maria Rodríguez, por ser como mi segunda mamá, darme los mejores consejos durante estos 4 años, permitirme trabajar con ella en este y muchos otros proyectos, reforzar mi amor por la investigación, aprender aunque sea una pequeña parte de todo lo que sabe y ser un ejemplo de constancia y perseverancia para alcanzar el éxito, no me alcanzan las palabras para agradecerle por todo.

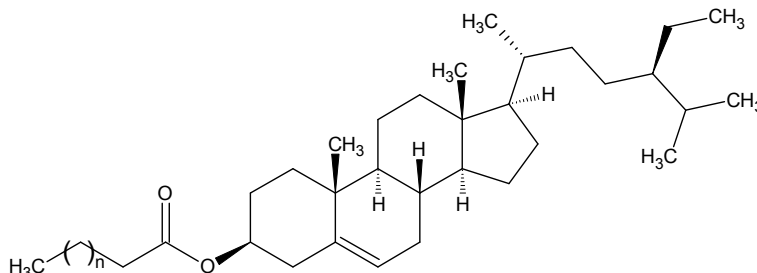
A mis amigos Mauro, Vicmary, Luis, Victor, Yurexi, Meira, Brian, Maria, por estar juntos independientemente de que tomemos caminos diferentes, compartir los mejores momentos durante estos años de carrera los cuales nos permitieron crecer como profesionales y personas, y me hacen falta las palabras para decirles que son inigualables. Gracias.

A mis amigos del laboratorio: Ynes Rojas y Diana Pachón que estuvieron conmigo para enseñarme cosas nuevas y me tendieron su mano durante este proyecto cuando más lo necesite. Mil gracias

Y por último pero no menos importante, a mis profesores por haberme formado como futura profesional, gracias por todos sus conocimientos impartidos los cuales me permitieron culminar con éxito mi carrera.

## Resumen

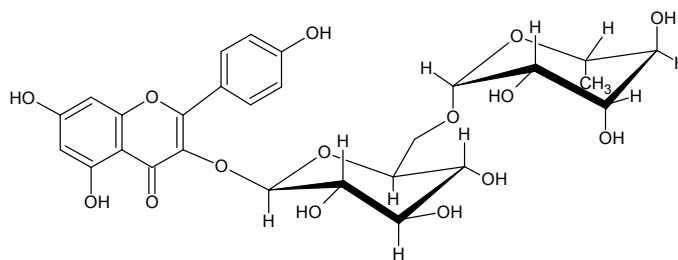
Las ramas y hojas de *C. fruticosa* Mill., fueron colectadas en diferentes épocas del año y los extractos metanólicos fueron sometidos a diferentes procesos de separación. Así, el extracto metanólico de las ramas (colectadas en noviembre) fue sometido a una hidrólisis ácida utilizando la mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{SO}_4$  20% en proporción (1;1;2; v/v), de la cual se obtuvo un fracción soluble y otra insoluble; esta última fue fraccionada por cromatografía flash, empleando un gradiente de tolueno-acetato de etilo, obteniéndose un metabolito denominado **CfR-3**, e identificado como: Ester de ácido graso de  $\beta$ -sitosterol de rango de fusión (75-77) $^\circ\text{C}$ .



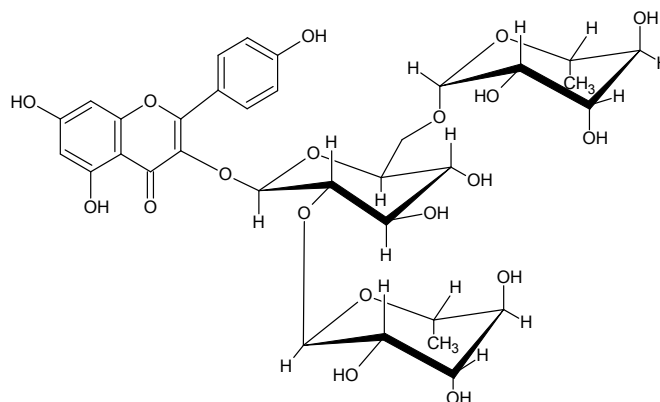
Ester de ácido graso de  $\beta$ -sitosterol

Adicionalmente, el extracto metanólico de las hojas (colectadas en junio), fue tratado con una mezcla  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:1; v/v), obteniéndose 2 fracciones, la fracción soluble fue tratada con acetona produciendo **CfH-C** (insoluble) y **CfH-D** (soluble). La fracción **CfH-C** fue suspendida en agua y extraída con la fase orgánica del sistema de solventes  $\text{t-BuOMe:n-BuOH:THF:0,2\%TFA}$  (1:3:1:5; v/v), obteniéndose dos sub-fracciones: **CfH-C1** y **CfH-C2**; de esta última se toma una porción y fue sometida a elución por gradiente, igualmente por la técnica de cromatografía flash, con el sistema de solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$  en proporción inicial (5; 95; %v/v) hasta (30;70; %v/v). de donde se obtuvo las fracciones denominadas **CfH-55** y **CfH-72**. Las cuales fueron

identificadas respectivamente como: kaempferol 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosido (Pf. 165-167°C) y el kaempferol 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnosil(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosil]- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (Pf 195-197°C).



Kaempferol 3-O-  $\beta$ -D-(6- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)glucopiranosido o  
Kaempferol 3-O-rutinósido



Kaempferol 3-O-  $\beta$ -D-(2,6-di- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)glucopiranosido o  
Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido)

Este es el primer reporte del aislamiento de los compuestos antes mencionados, en la especie *Cassia fruticosa* Mill.

## Índice general

1. Introducción .....	1
2. Revisión bibliográfica .....	3
2.1. Descripción botánica de la especie <i>Cassia fruticosa</i> Mill. ....	3
2.2. Métodos cromatográficos .....	5
3. Antecedentes .....	8
3.1. Antecedentes fitoquímicos de las especies de <i>Cassia</i> .....	9
3.1.1. <i>Cassia abbreviata</i> .....	9
3.1.2. <i>Cassia alata</i> .....	111
3.1.3. <i>Cassia angustifolia</i> .....	13
3.1.4. <i>Cassia fistula</i> .....	177
3.1.5. <i>Cassia floribunda</i> ( <i>C. laevigata</i> ).....	222
3.1.6. <i>Cassia garrettiana</i> .....	25
3.1.7. <i>Cassia torosa</i> .....	28
4. Justificación.....	40
5. Objetivos .....	41
5.1. Objetivo general .....	41
5.2. Objetivos específicos.....	41
6. Metodología experimental .....	422
6.1. Material vegetal .....	422
6.2. Materiales y equipos .....	433
6.2.1. Materiales .....	433
6.2.2. Equipos.....	444
6.3. Extracción y aislamiento de los metabolitos secundarios .....	455
6.3.1. Tratamiento de las ramas de <i>C. fruticosa</i> Mill.....	455
6.3.2. Tratamiento de las hojas de <i>C. fruticosa</i> Mill. ....	51
7. Resultados y discusiones.....	55
7.1. Compuesto CfR-3.....	55
7.2. Compuesto CfH-55.....	60
7.3. Compuesto CfH-72.....	66
8. Conclusiones.....	74
9. Recomendaciones.....	75
10. Referencias.....	766
11. Apéndice.....	90
11.1. Espectros para el compuesto <b>CfR-3</b> .....	90
11.2. Espectros para el compuesto <b>CfH-55</b> .....	100
11.3. Espectros para el compuesto <b>CfH-72</b> .....	118

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Metabolitos secundarios más frecuentes encontrados en las especies del género <i>Cassia</i> .....	37
<b>Tabla 2.</b> Actividad biológica reportada en las especies del género <i>Cassia</i> .....	39
<b>Tabla 3.</b> Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el $\beta$ -sitosterol, $\beta$ -sitosterol palmitato y el compuesto <b>CfR-3</b> .....	57
<b>Tabla 4.</b> Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto Kaempferol 3-O-rutinósido y <b>CfH-55</b> .....	64
<b>Tabla 5.</b> Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto <b>CfH-55</b> (Kaempferol 3-O-rutinósido).....	65
<b>Tabla 6.</b> Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto Kaempferol 3-O-(2"-ramnosilrutinósido) y CfH-72.....	71
<b>Tabla 7.</b> Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto CfH-72 ((Kaempferol 3-O-(2"-ramnosilrutinósido)).....	72



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Cassia fruticosa</i> Mill.....	4
<b>Figura 2.</b> Flores de la especie <i>Cassia fruticosa</i> Mill.....	4
<b>Figura 3.</b> Cromatograma de la elución de la fracción <b>CfR-Hex</b> , con el sistema de solventes tolueno-acetato de etilo (1:99 a 14:86; v/v).....	49
<b>Figura 4.</b> Cromatograma de la elución de la fracción <b>CfH-C2</b> , con el sistema de solventes CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (5:95 a 30:70; v/v).....	52
<b>Figura 5:</b> Compuesto <b>CfR-3</b> , éster de ácido graso de β-sitosterol.....	59
<b>Figura 6.</b> Núcleo de la aglicona tipo kaempferol del compuesto <b>CfH-55</b> .....	61
<b>Figura 7.</b> Compuesto <b>CfH-55</b> , Kaempferol 3-O-β-D-(6-α-L-ramnopiranosil)glucopiranosido o Kaempferol 3-O-rutinósido.....	63
<b>Figura 8.</b> Correlaciones homonucleares ( <b>COSY</b> ) y heteronucleares ( <b>HMBC</b> ) para el compuesto <b>CfH-55</b> , Kaempferol 3-O-rutinósido.....	66
<b>Figura 9.</b> Compuesto <b>CfH-72</b> , Kaempferol 3-O-β-D(2,6-di-α-L-ramnopiranosil)glucopiranosido o Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinósido).....	70
<b>Figura 10.</b> Correlaciones homonucleares ( <b>COSY</b> ) y heteronucleares ( <b>HMBC</b> ) para el compuesto <b>CfH-72</b> , Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinósido).....	73

## 1. Introducción

Las plantas han sido utilizadas tradicionalmente como medicina para el tratamiento de una gran cantidad de afecciones. Desde la prehistoria se conocen plantas cuyos extractos han permitido la elaboración de pócimas o curaciones, y este conocimiento ha sido transmitido de padre a hijo con el paso de los años <sup>[1]</sup>. Sin embargo, sólo un número limitado de ellas ha sido sometido a un riguroso estudio científico, por lo que en 1980 la Organización Mundial de la Salud <sup>[2]</sup> recomendó profundizar los estudios en esta área, pues se desconocen los posibles efectos secundarios que pueda ocasionar el consumo indiscriminado de material vegetal con supuestas propiedades terapéuticas soportadas por información que proviene de fuentes dudosas <sup>[3]</sup>. Estas actividades terapéuticas están relacionadas a la presencia de sustancias formadas a partir de compuestos simples mediante reacciones orgánicas que ocurren en las plantas.

Los seres vivos son capaces de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples o degradar las complejas y obtener las simples a través de un conjunto de reacciones químicas, que realizan sus células, denominado metabolismo <sup>[4]</sup>. Las moléculas producidas por los seres vivos, comunes a todas las células, y esenciales para su correcto funcionamiento, tales como aminoácidos, azúcares, lípidos y nucleótidos se conocen como metabolitos primarios. Por su parte, las plantas sintetizan una amplia variedad de moléculas orgánicas denominadas metabolitos secundarios o productos naturales, las cuales no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos <sup>[5]</sup>.

Los metabolitos secundarios se distribuyen de manera diferente en el reino vegetal, es decir, no todos se encuentran en todos los grupos de plantas, pues su

producción muchas veces se encuentra limitada a un determinado género, familia o incluso especie, de ahí su utilidad como marcadores quimiotaxonómicos.

Algunos productos naturales tienen funciones protectoras frente a predadores, proporcionando a la planta un sabor amargo o incluso haciéndola venenosa luego de su ingesta <sup>[5]</sup>. Por otra parte, algunos de los metabolitos producidos por las plantas son los responsables de las coloraciones observadas en sus flores o frutos, lo cual permite que los insectos polinizadores se acerquen a ella contribuyendo así a su dispersión.

Es importante destacar que son estos metabolitos secundarios los responsables de la propiedad terapéutica asociada a una planta frente a cierta enfermedad o afección del ser humano. En las últimas dos décadas se ha incrementado la investigación fitoquímica y farmacológica de extractos obtenidos de plantas medicinales, utilizadas tradicionalmente. La medicina natural ha tenido un rol importante en la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de ciertas enfermedades, como por ejemplo el descubrimiento de la Vincristina, Vinblastina y Taxol para el tratamiento de varios tipos de cáncer <sup>[6]</sup>, quinina como tratamiento para la malaria <sup>[7]</sup>, entre otras.

En el caso particular de las especies del género *Cassia*, éstas han llamado la atención de los investigadores alrededor del mundo, debido a la gran variedad de actividades farmacológicas que presentan: antimicrobiana <sup>[8]</sup>, antimicótica <sup>[9]</sup> purgativa <sup>[10]</sup>, antiinflamatoria <sup>[11]</sup>, antibacteriana <sup>[12]</sup>, analgésica <sup>[13]</sup>, antioxidante <sup>[14]</sup>, antiviral <sup>[15]</sup>, antidiabética <sup>[16]</sup>, protección hepática <sup>[17]</sup>, anticancerígena <sup>[18]</sup>, antialérgica <sup>[19]</sup>, etc. Muchas especies de éste género han sido estudiadas a lo largo de los años con la finalidad de identificar los metabolitos presentes y asociarlos a las propiedades terapéuticas de este género de plantas.

## 2. Revisión bibliográfica

### 2.1. Descripción botánica de la especie *Cassia fruticosa* Mill.

El género *Cassia* posee alrededor de 500 especies, las cuales se encuentran distribuidas en Asia, India, China, este de África, Sur África, America, México y Brasil [2]. Las especies más importantes, debido a su riqueza fitoquímica y/o actividad biológica presentada son: *Cassia fistula*, *C. grandis*, *C. hirsutica*, *C. sieberiana*, *C. alata*, *C. tora*, *C. occidentalis*, *C. auriculata*, *C. nigricans*. En Venezuela, estas especies se encuentran ampliamente distribuidas por todo el territorio, en particular en los estados Barinas, Lara, Portuguesa, Carabobo, Monagas, Sucre y Amazonas [20].

La especie *Cassia fruticosa* Mill. (Figuras 1 y 2), se encuentra principalmente en los estados Mérida y Guárico [20] y posee la siguiente clasificación taxonómica [2]:

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

Esta especie se caracteriza por ser un arbusto o árbol pequeño, hojuelas en dos pares, ancho-ovadas, muy oblicuas, de 5-15 cm de largo y 2,5-8 cm de ancho, de ápice obtuso o agudo y base redonda, diminutamente pubescentes cuando jóvenes. Posee flores en panículas anchas, terminales de 20-25 cm de largo y de ancho. Sépalos verdes desiguales, 6-11 mm de largo, 6-8 mm de ancho, diminutamente pubescentes. Sus pétalos son de color amarillo pálido, redondeados y desiguales, 23-

30 mm de largo, 16-22 mm de ancho, con semillas muy numerosas de aproximadamente 4-5 mm de largo <sup>[21]</sup>. En Venezuela es conocida como Platanico <sup>[20]</sup>.



**Figura 1.** *Cassia fruticosa* Mill. <sup>[22]</sup>



**Figura 2:** Flores de la especie *Cassia fruticosa* Mill. <sup>[23]</sup>

## 2.2. Métodos cromatográficos.

La revisión bibliográfica del género *Cassia* mostró que el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en sus especies se realizó mayormente por técnicas de cromatografía en columna mediante el uso de diferentes soportes cromatográficos que van desde poliamida, hasta sílica gel en fase normal y fase reversa.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas y tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, la cual puede ser un gas, líquido o fluido supercrítico; la misma se hace pasar a través de una fase estacionaria, con la cual es inmisible y que se fija a una columna o a la superficie de un sólido <sup>[24]</sup>. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan de manera diferente entre ellas.

De acuerdo a los principios responsables de la separación, la cromatografía puede clasificarse en <sup>[24]</sup>:

- Cromatografía de adsorción o Cromatografía líquido-sólido.
- Cromatografía de reparto o partición.
- Cromatografía de intercambio iónico. .
- Cromatografía de permeabilidad de gel o exclusión por tamaño.

La cromatografía de adsorción es la forma clásica de cromatografía de líquidos, en donde la única variable que se puede modificar para alterar el factor de selectividad ( $\alpha$ ) y de retención ( $k'$ ) de la columna, es la composición de la fase móvil, debido a que variaciones en la polaridad de la misma generan grandes cambios en la resolución y el tiempo de retención de los compuestos eluidos <sup>[24]</sup>. Entre este tipo de cromatografía se encuentra la técnica Cromatografía Flash, la cual, permite trabajar con pequeñas

columnas, muy empaquetadas y forzando el paso de la fase móvil mediante elevadas presiones, con lo que se consiguen separaciones muy efectivas en un plazo muy corto de tiempo [25].

Dependiendo de la fase estacionaria, el mecanismo de separación puede ser reparto, adsorción, tamaño molecular (geles) e incluso cambio iónico, aunque los métodos más utilizados están basados en reparto y adsorción [25]. El esquema fundamental de un cromatógrafo de alta resolución está constituido por un depósito y un dispositivo de bombeo de la fase móvil que opera a elevada presión (hasta 500 atm.), un sistema de inyección de la muestra, columnas resistentes, generalmente de acero inoxidable, rellenas de fase estacionaria, un detector y un sistema de registro gráfico.

Esta técnica cromatográfica presenta las siguientes ventajas [25]:

- Posibilidad de desarrollar separaciones cromatográficas en columnas pequeñas con una mayor capacidad de carga.
- Un elevado flujo de fase móvil, sin comprometer la resolución, el ancho de banda ni la eficacia de la separación.
- Menor tiempo de análisis y menor cantidad de solvente utilizado.

El equipo utilizado durante el desarrollo de este trabajo experimental, fue el Isolera One ® de la casa comercial Biotage, el cual trabaja en función de las condiciones cromatográficas obtenidas en cromatografía de capa fina (CCF), ya que el parámetro factor de retención ( $R_f$ ), es inversamente proporcional al del equipo, el cual se denomina volumen de columna (VC) [26].

$$VC = \frac{1}{R_f} \text{ [26]}$$

Por lo que a menor  $R_f$ , mayor volumen de columna (VC), lo cual se traduce en mayor eficiencia durante la separación, debido a que el tiempo de contacto entre el

soporte sólido y el compuesto es mayor, mejorando la separación y evitando el solapamiento de las bandas cromatográficas.

Si se desean separar dos o más compuestos, se debe calcular el  $\Delta VC$ , el cual no es más que la diferencia entre el inverso del factor de retención de cada compuesto

$$\Delta VC = \frac{1}{R_{f1}} - \frac{1}{R_{f2}} \text{ [26]}$$

El término  $\Delta VC$  es el que define la capacidad de carga del cartucho a utilizar, en nuestro caso, el cartucho SNAP 25g tiene una capacidad de carga entre 250mg y 2500mg, dependiendo del valor de este término. El valor óptimo de  $\Delta VC$  oscila entre 3 y 10 unidades, lo cual se traduce en valores de  $R_f$  menores a 0,4.

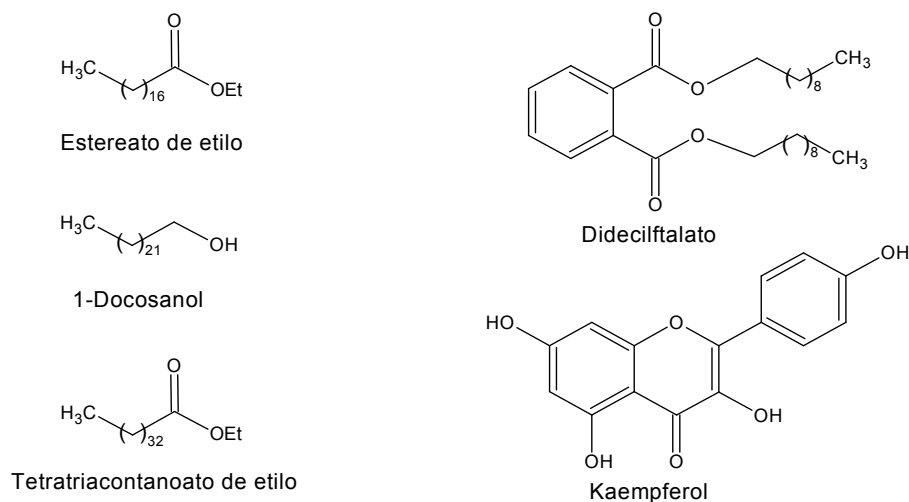
En este equipo la separación se lleva a cabo con presiones de hasta 100psi, utilizando cartuchos rellenos de diferentes soportes sólidos como silica gel, RP-18, amina funcionalizada, etc. El diámetro de partícula es de 50 $\mu$ m, lo cual combinado con la elevada presión, pueden alcanzarse los 3000 platos teóricos por metro de cartucho.



### 3. Antecedentes

El género *Cassia*, se caracteriza por presentar como componentes mayoritarios, estilbenos, antraquinonas y flavonoides [27,28]. A pesar de la gran variedad de especies que posee, son pocas las que han sido estudiadas extensamente a nivel fitoquímico. De modo que, los antecedentes fitoquímicos están orientados sobre las especies en las que ha sido aislado y caracterizado el mayor número de componentes. Por otra parte, las especies con el menor número de estudios fitoquímicos, incluyendo el tipo de metabolitos, son reportados en la tabla 1. Las actividades biológicas observadas por diversos grupos de investigación están resumidas en la tabla 2.

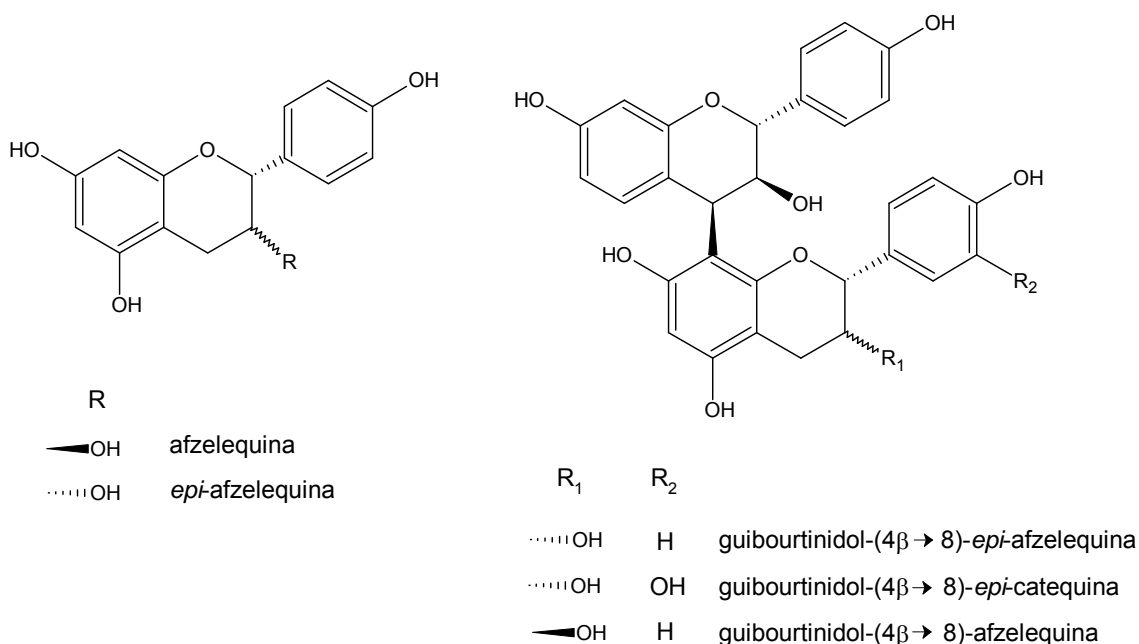
En el caso particular de la especie *Cassia fruticosa*, es poco lo que se ha estudiado de ella. En la literatura se ha reportado el aislamiento de los siguientes compuestos: un flavonoide glicosilado del cual solo se identificó la aglicona (kaempferol) y una mezcla de antraquinonas glicosiladas no identificadas, reportados por Watson H. en 1991<sup>[29]</sup> ; en el caso de las flores se reportó en 1998<sup>[30]</sup> se reportó en 1998 el aislamiento de: dos ésteres (estereato de etilo y tetratriacontanoato de etilo), un alcohol (1-docosanol) y el dideciltalato , de ahí nuestro interés en determinar el tipo y la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios presentes en esta planta.

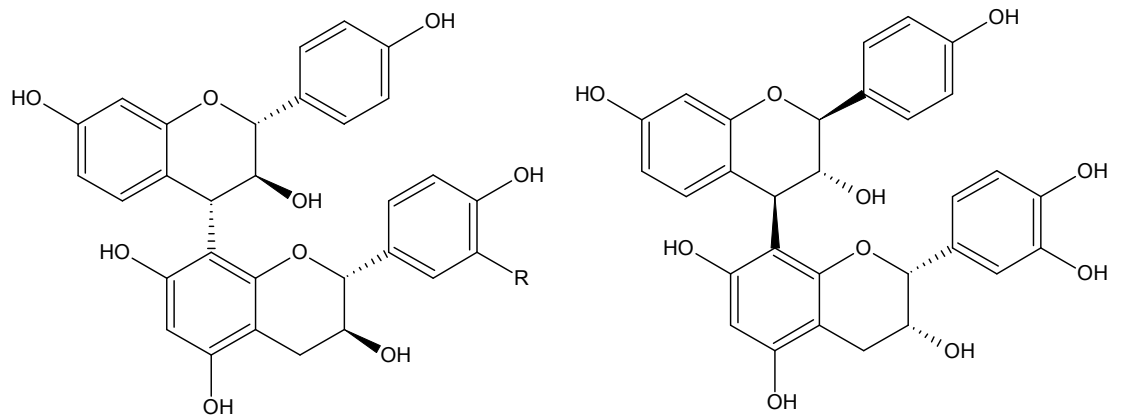


### 3.1. Antecedentes fitoquímicos de las especies de *Cassia*.

#### 3.1.1. *Cassia abbreviata*

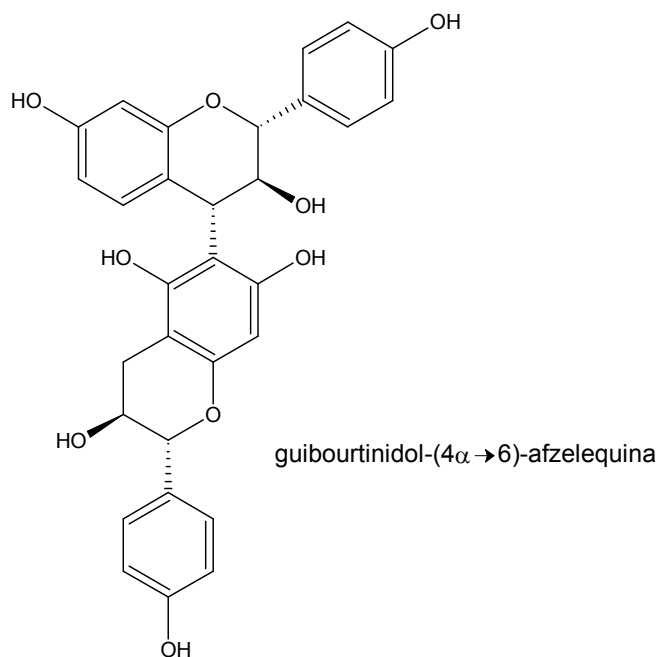
En 1996, Malan y colaboradores <sup>[31]</sup> aislaron, por CC sobre Sephadex LH-20 del extracto de acetona de la corteza de esta especie, afzelequina y *epi*-afzelequina (catequinas) y seis proguibourtinidinos los cuales son dímeros no hidrolizables de catequinas, conocidos como: guibourtinidol-(4 $\beta$ →8)-*epi*-afzelequina, guibourtinidol-(4 $\beta$ →8)-*epi*-catequina, guibourtinidol-(4 $\beta$ →8)-afzelequina, guibourtinidol-(4 $\alpha$ →8)-catequina, guibourtinidol-(4 $\alpha$ →8)-afzelequina, *ent*-guibourtinidol-(4 $\beta$ →8)-*epi*-catequina, guibourtinidol-(4 $\alpha$ →6)-afzelequina,, los cuales fueron identificados por los datos espectroscópicos de sus derivados permetilados 3-*O*-acetil o peracetilados.





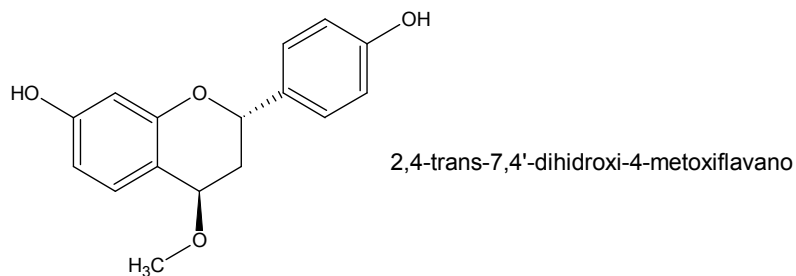
R  
OH guibourtinidol-(4 $\alpha$  → 8)-catequina  
H guibourtinidol-(4 $\alpha$  → 8)-afzelequina

ent-guibourtinidol-(4 $\beta$  → 8)-epi-catequina



guibourtinidol-(4 $\alpha$  → 6)-afzelequina

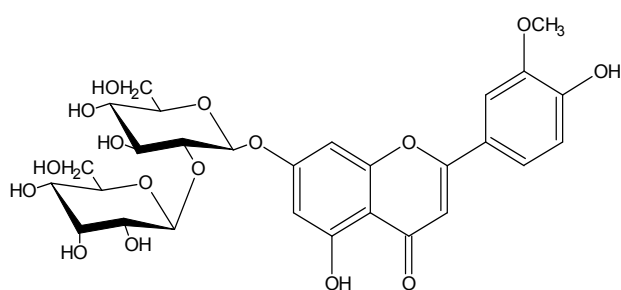
En 1998, Dehmlow y colaboradores <sup>[32]</sup> aislaron por CC (sílica gel) del extracto metanólico de la planta *C. abbreviata*, previamente tratado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, el 2,4-trans-7,4'-dihidroxi-4-metoxiflavano, el cual fue identificado mediante RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de su derivado diacetilado.



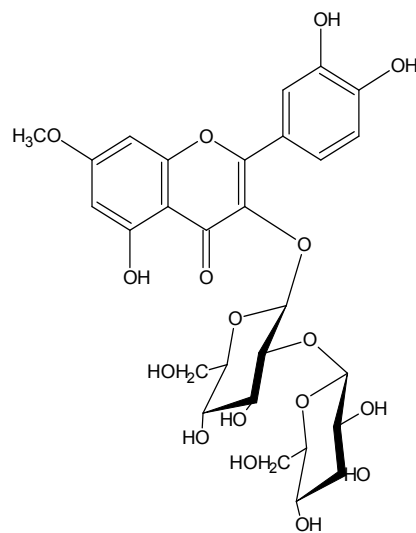
### 3.1.2. *Cassia alata*

Las raíces, tallos, semillas y hojas de esta especie ha mostrado actividad antimicótica <sup>[9a-b]</sup>, antimicrobiana <sup>[8a-e]</sup>, antidiabética <sup>[16b]</sup> y analgésica <sup>[13a]</sup>.

En 1991 Gupta y colaboradores <sup>[33]</sup>, trabajaron con la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto etanólico de las semillas de la planta, y aislaron por CC flash (sílica gel), dos flavonoides glicosilados: crisoeriol-7-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-alopiranosido y ramnetin-3-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-alopiranosido utilizando como eluyente una mezcla de EtOAc-Me<sub>2</sub>CO (9:1) para el primer flavonoide y relación 4:1 para el segundo, ambos fueron identificados por sus datos de UV, IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

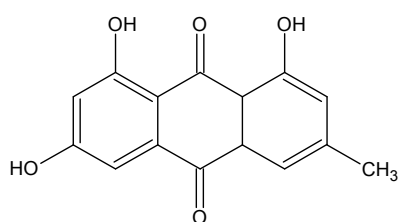


crisoeriol-7-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-alopiranosido

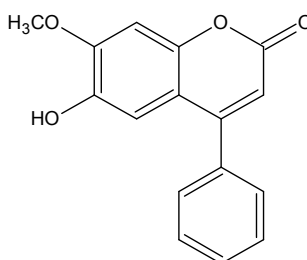


ramnetin-3-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-alopiranosido

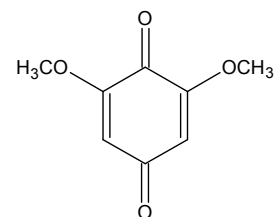
De los tallos de la planta, Kalidhar y Kalidhar aislaron en 1993, mediante CC (sílica gel), un sólido naranja del tipo antraquinónico identificado como alatinona [34]. Estudios posteriores realizados por Kelly y colaboradores demostraron que tal estructura planteada inicialmente como alatinona era en realidad la emodina [35]. Adicionalmente, varios grupos de investigación han aislado diversos compuestos de esta planta: dalbergina, 2,6-dimetoxibenzoquinona, 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiisoflavona, luteolina,  $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -sitosteril- $\beta$ -D-glucosido [34].



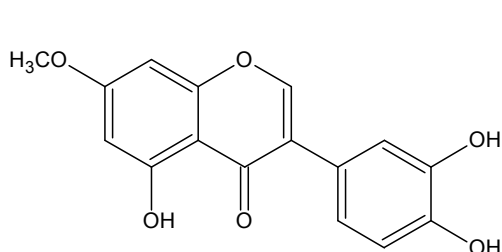
emodina



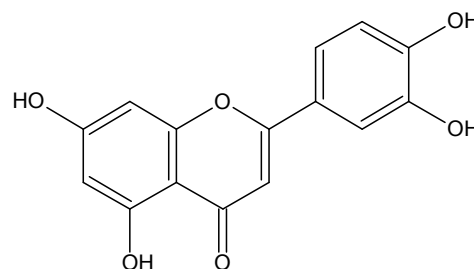
dalbergina



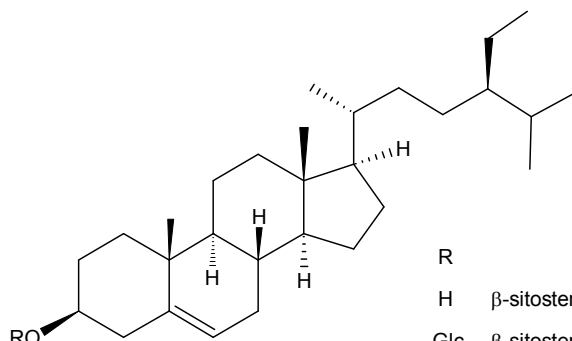
2,6-dimetoxibenzoquinona



5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiisoflavona



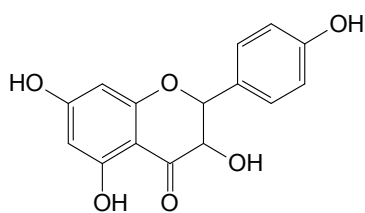
luteolina



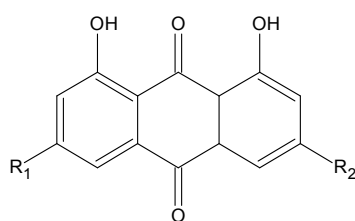
R  
H  $\beta$ -sitosterol  
Glc  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucósido

En el año 2001, Moriyama y colaboradores <sup>[36]</sup> determinaron que, de acuerdo a la manera en que se traten las hojas de la especie *C. alata* (secada al sol o con calentamiento en una estufa), la proporción de flavonoides glicosilados varía, siendo menor en las hojas secadas al sol, debido a una posible actividad enzimática que promueve la degradación del kaempferol-3-O-gentibiosido. Lo anterior fue corroborado dos años después <sup>[37]</sup> al aislar dicho flavonoide de las hojas de la planta pero solo en una proporción de 2-5%. El aislamiento de este compuesto fue realizado por Sephadex LH-20 utilizando MeOH al 80% como eluente.

En el 2008, Fernand y colaboradores <sup>[38]</sup> determinaron la presencia de seis compuestos en las raíces de esta especie: Kaempferol, rheína, aloe-emodina, crisofanol, emodina y physcion. Para ello secaron las raíces a 40°C en una estufa y realizaron tres extracciones con porciones de etanol, luego realizaron la separación e identificación de dichos compuestos mediante la técnica de HPLC, utilizando una columna de Phenomenex Luna C<sub>18</sub> y realizando una elución isocrática con la mezcla ACN-MeOH-NH<sub>4</sub>OH a pH=6,8 (25:55:20; v/v/v).



kaempferol



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	CO <sub>2</sub> H	rheína
H	CH <sub>2</sub> OH	aloe-emodina
H	CH <sub>3</sub>	crisofanol
OH	CH <sub>3</sub>	emodina
OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	physcion

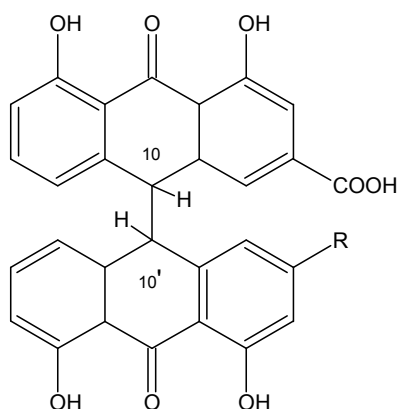
### 3.1.3. *Cassia angustifolia*.

La especie *C. angustifolia* posee una gran cantidad de antraquinonas en sus hojas, a las cuales se le atribuyen sus propiedades antivirales, en particular en contra

del virus del herpes (HSV por sus siglas en inglés) <sup>[15b]</sup>. Igualmente, el elevado contenido de sennósidos tanto en sus semillas como hojas le confiere propiedades purgativas <sup>[10a]</sup>.

En 1974, Lemli y colaboradores <sup>[39]</sup> identificaron 4 sennósidos presentes en hojas de cultivo de esta especie, mediante densitometría sobre cromatografía de capa fina, utilizando el sistema de desarrollo EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:17:13; v/v/v). Posteriormente, Hayashi y colaboradores <sup>[40]</sup>, cuantificaron estos sennósidos mediante la técnica de HPLC utilizando una columna Permaphase ODS. A estos compuestos se les denominó sennósidos A-D.

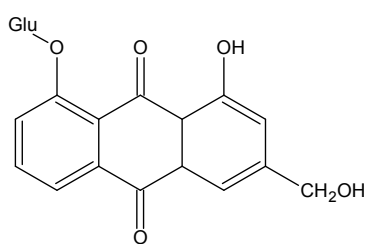
Dos años más tarde <sup>[41]</sup>, un nuevo sennósido fue aislado de las hojas de la especie mediante la extracción ácido-base del extracto metanólico, y posterior separación por CC sobre celulosa, obteniéndose un sólido amarillo el cual fue denominado sennósido G.



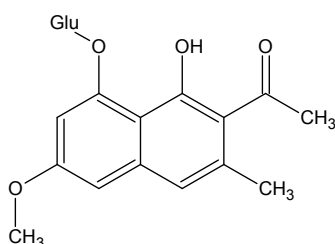
Sennósido	R	isómero en C <sub>10</sub> -C <sub>10'</sub>
A	COOH	<i>trans</i>
B	COOH	<i>meso</i>
C	CH <sub>2</sub> OH	<i>trans</i>
D	CH <sub>2</sub> OH	<i>meso</i>
G	COOH	diastereoisómero de A

En 1994, Kinjo y colaboradores <sup>[42]</sup> aislaron de las hojas de *C. angustifolia* ocho nuevos metabolitos. Para ello, el extracto metanólico de las hojas, fue particionado con AcOEt al 40% en MeOH. La fracción de AcOEt fue sometida a estudio fitoquímico

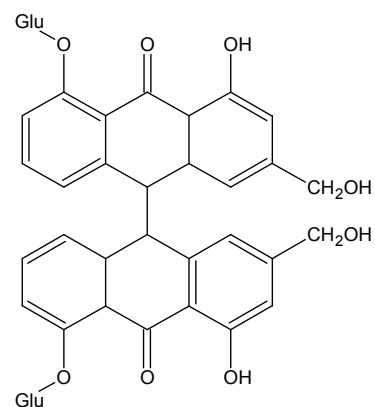
usando CC con una resina de estireno y divinilbenceno como soporte sólido, denominada MCI gel CHP20P. Los compuestos fueron identificados mediante las técnicas de FAB-MS, RMN-<sup>13</sup>C y RMN-<sup>1</sup>H, como: aloe-emodina 8-O-glucósido, toracrisona 8-O-glucósido, aloe-emodina diantrona 8,8'-di-O-glucósido, kaempferol 3-O-gentiobiosido, quercetina 3-O-gentiobiosido, isoramnetina 3-O-gentiobiosido, syringaresinol 4-O-glucósido y emodina 8-O-soforósido.



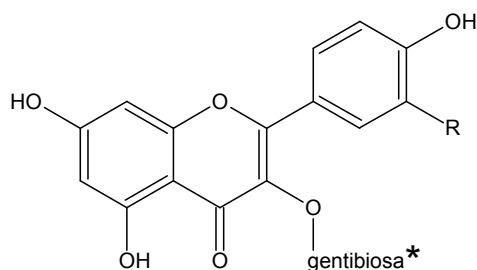
aloe-emodina 8-O-glucósido



toracrisona 8-O-glucósido



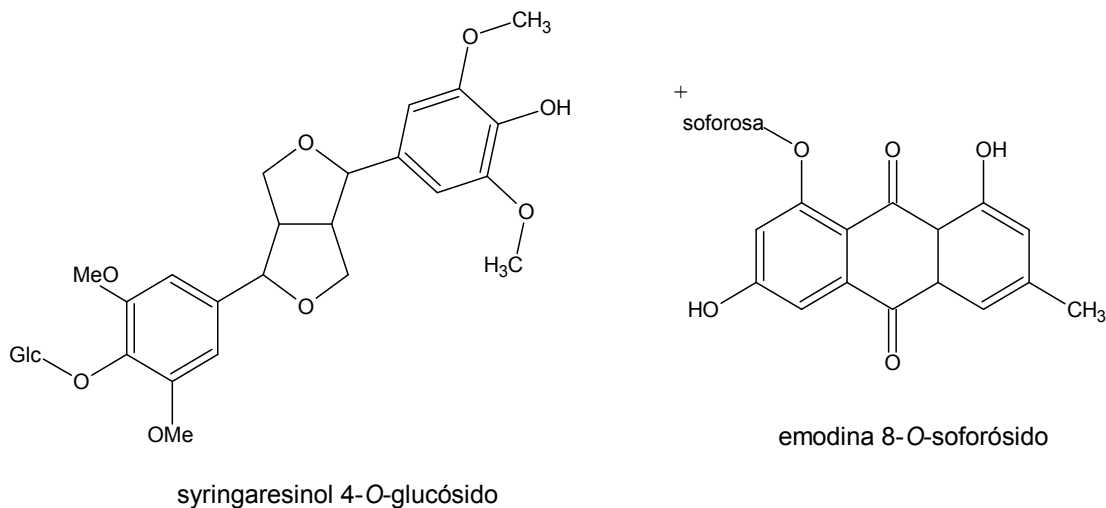
aloe-emodina diantrona 8,8'-di-O-glucósido



- |     |                                |
|-----|--------------------------------|
| R   |                                |
| H   | kaempferol 3-O-gentiobiosido   |
| OH  | quercetina 3-O-gentiobiosido   |
| OMe | isoramnetina 3-O-gentiobiosido |

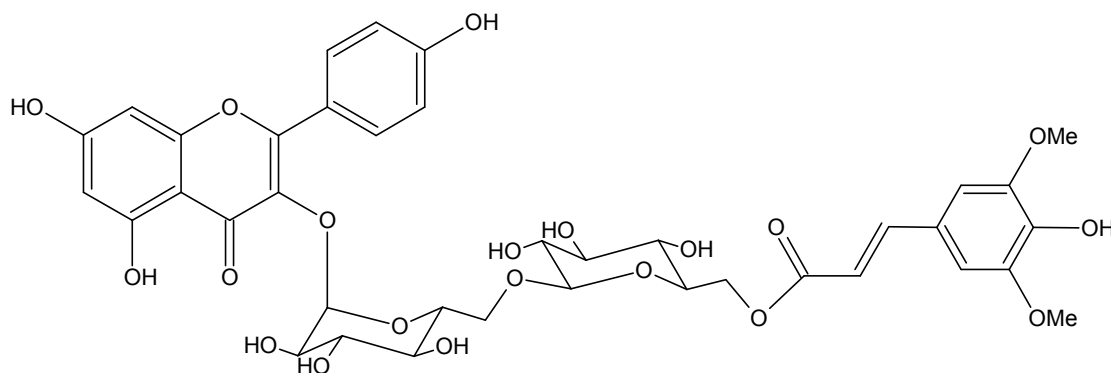
\* dimero de glucosa:  $\beta$ -D-glc(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glc





+ dimero de glucosa:  $\beta$ -D-glc(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glc

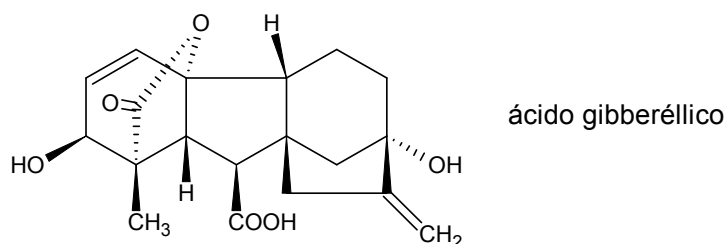
En el 2007, Wang y colaboradores <sup>[43]</sup> aislaron e identificaron de la fracción soluble en clorofomo de las hojas de *C. angustifolia*, una nueva antraquinona glicosilada denominada 2-acetil-3-metil-8-metoxi-1,4-naftoquinona-6-O- $\beta$ -D-glucopiranosido. Un año más tarde Wu y colaboradores <sup>[44]</sup>, aislaron e identificaron de las hojas de esta planta un flavonoide glicosilado, nombrado como kaempferol-3-O-[(6''-O-trans-sinapoyl)- $\beta$ -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosido. Ambos compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, HMBC, NOESY).



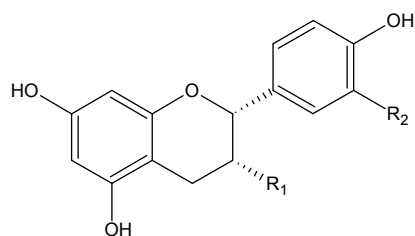
kaempferol-3-O-[(6''-O-trans-sinapoyl)- $\beta$ -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosido

### 3.1.4. *Cassia fistula*

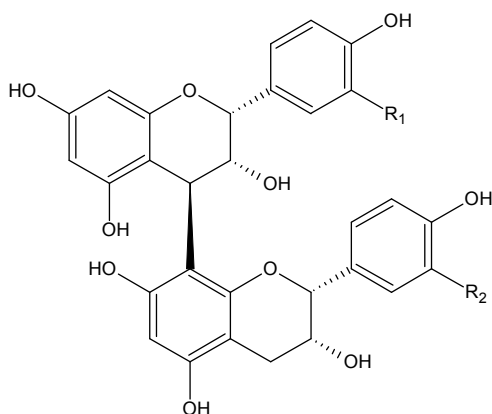
En 1970, Sircar y colaboradores <sup>[45]</sup> aislaron por CC (sílica gel) del extracto de éter de los pétalos y estambres de las flores de esta especie el *nor*-diterpeno ácido gibberélico. Su identificación se realizó mediante comparación directa de los espectros de masas e IR.



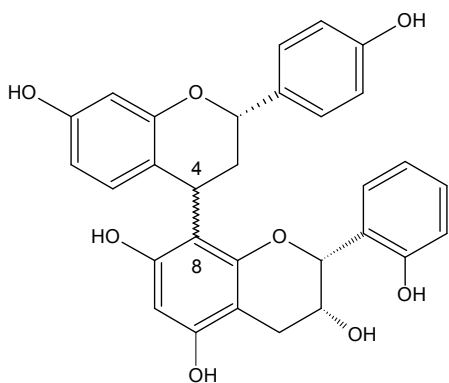
Posteriormente, Morimoto y colaboradores <sup>[46]</sup> aislaron del extracto de acetona de las hojas de *C. fistula*, mediante CC (Sephadex LH-20 y MCI-gel CHP20P), trece compuestos polifenólicos (monómeros, dímeros y trímeros de flavanos), los cuales fueron identificados mediante las técnicas de FAB-MS, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C y confirmados completamente por degradación química, como: (-)-epiafzelequina, (-)-epicatequina, (-)-epiafzelequina 3-O-β-D-glucopiranosido (**monómeros**); procianidina B-2, epiafzelequina-(4β→8)-epiafzelequina, epiafzelequina-(4β→8)-epicatequina, epicatequina-(4β→8)-epiafzelequina, (2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4β→8)-epiafzelequina, (2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4α→8)-epiafzelequina, (2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4β→6)-epiafzelequina, (2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4α→6)-epiafzelequina (**dímeros**); epiafzelequina-(4β→8)-epiafzelequina-(4β→8)-epiafzelequina, (2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4β→8)-epiafzelequina-(4β→8)-epiafzelequina (**trímeros**).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
OH	H	(-)-epiafzelequina
OH	OH	(-)-epicatequina
OGlc	H	(-)-epiafzelequina 3-O-β-D-glucopiranosido

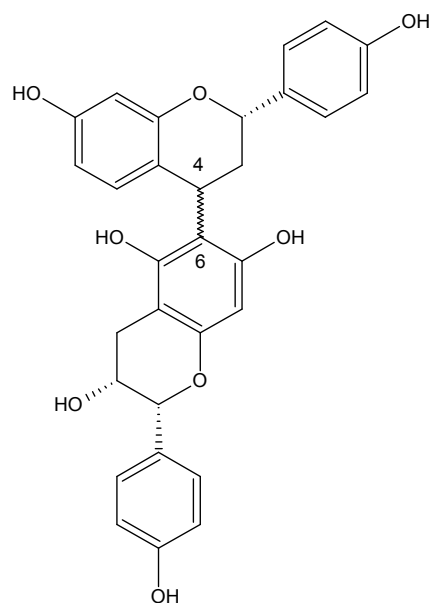


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
OH	OH	procianidina B-2
H	H	epiafzelequina-(4β→8)-epiafzelequina
H	OH	epiafzelequina-(4β→8)-epicatequina
OH	H	epicatequina-(4β→8)-epiafzelequina



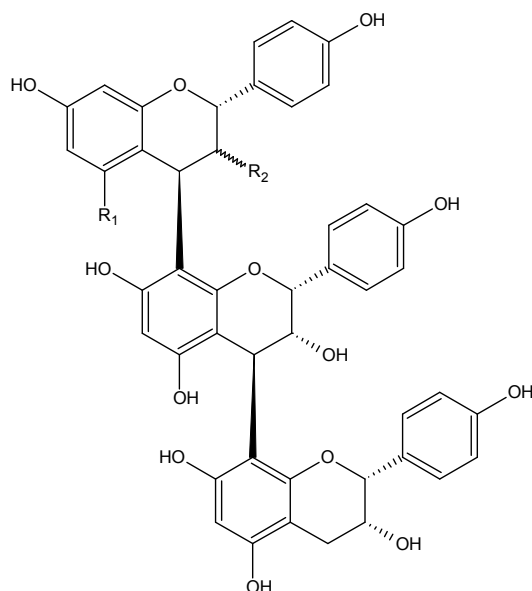
(2S)-7,4'-dihidroxi flavan-(4β → 8)-epiafzelequina

(2S)-7,4'-dihidroxi flavan-(4α → 8)-epiafzelequina



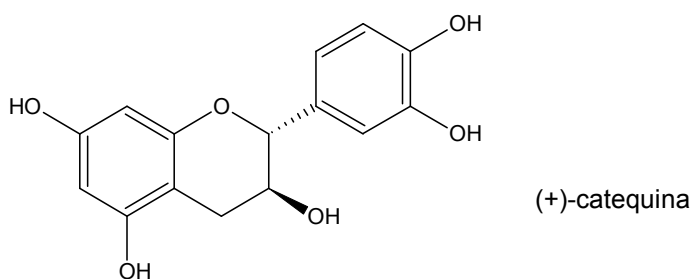
(2S)-7,4'-dihidroxi flavan-(4β → 6)-epiafzelequina

(2S)-7,4'-dihidroxi flavan-(4α → 6)-epiafzelequina

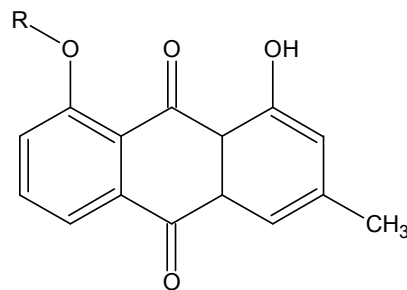


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
OH	·····OH	epiafzelequina-(4β → 8)-epiafzelequina-(4β → 8)-epiafzelequina
H	—H	(2S)-7,4'-dihydroxiflavan-(4β → 8)-epiafzelequina-(4β → 8)-epiafzelequina

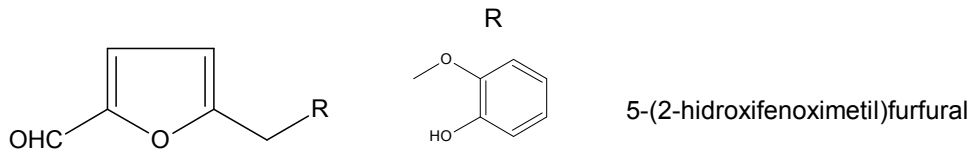
En 1990, Kashiwada y colaboradores <sup>[47]</sup> demostraron que los compuestos aislados anteriormente se encontraban en la especie *C. fistula* como pares enantioméricos en diferentes proporciones, los mismos fueron aislados del extracto de acetona de las hojas por CC (Sephadex LH-20 y MCI-gel CHP20P), mientras que la separación de enantiómeros fue realizada por la técnica de HPLC utilizando para ello una columna de resolución quiral. Adicionalmente se aisló un nuevo compuesto, la (+)-catequina.



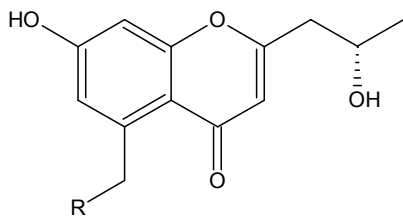
En el 2002, Kuo y colaboradores <sup>[48]</sup> identificaron ocho compuestos presentes en las semillas de esta especie, por partición 1:1 (v/v) en H<sub>2</sub>O-*n*-BuOH del extracto metanólico de las semillas y luego la separación de los mismos mediante la técnica de cromatografía en columna sobre sílica gel. Las estructuras fueron confirmadas por UV, IR y RMN-<sup>13</sup>C como: crisofanol, crisofaneína, 5-(2-hidroxifenoximetil)furfural, 5-hidroximetilfurfural, (2'S)-7-hidroxi-5-hidroximetil-2-(2'-hidroxipropil)cromona, (2'S)-7-hidroxi-2-(2'-hidroxipropil)-5-metilcromona, 2-hidroxi-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo y 2β-O-D-glucopiranosil-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo.



R  
H crisofanol  
Glu crisofaneína

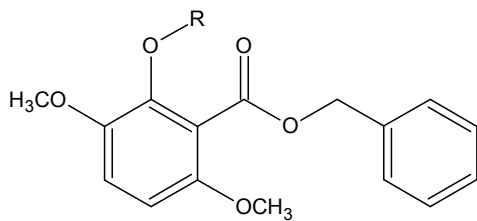


OH 5-hidroxi-metilfurfural



R (2'S)-7-hidroxi-5-hidroxi-metil-2-(2'-hidroxi-propil)cromona

H (2'S)-7-hidroxi-2-(2'-hidroxi-propil)-5-metilcromona



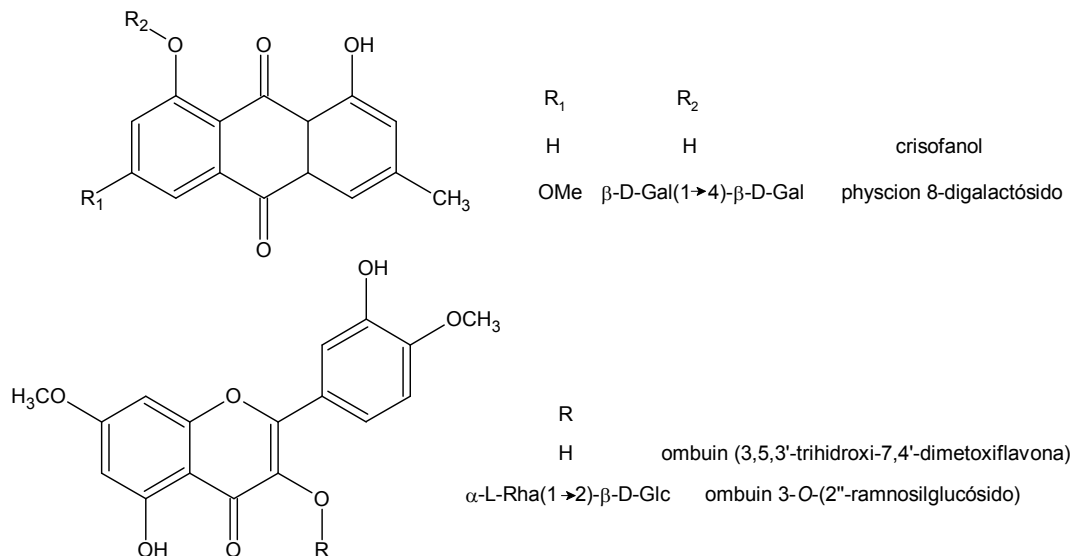
H 2-hidroxi-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo

Glu 2β-O-D-glucopiranosil-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo

*C. fistula* se caracteriza por poseer una elevada actividad antioxidante atribuida a su alto contenido de compuestos polifenólicos (derivados de flavanoles) <sup>[14]</sup>. La proporción de estos compuestos, así como de sennósidos presentes en las hojas, varía de acuerdo a los períodos de lluvia de la región en donde se encuentre la planta, esto fue demostrado por Cano y colaboradores en el año 1990 <sup>[49]</sup> al realizar el estudio fitoquímico comparativo entre varios individuos de la misma especie recolectados en diferentes épocas del año en la ciudad de Tolomé, México. Un grupo fue colectado en el período de sequía (noviembre-abril) y el otro, en el período de lluvia (mayo-agosto) demostrándose que la mayor cantidad de sennósidos presentes en las hojas se encontraba en los individuos de la época lluviosa (0,98%) en comparación con el 0,41% presente en el otro.

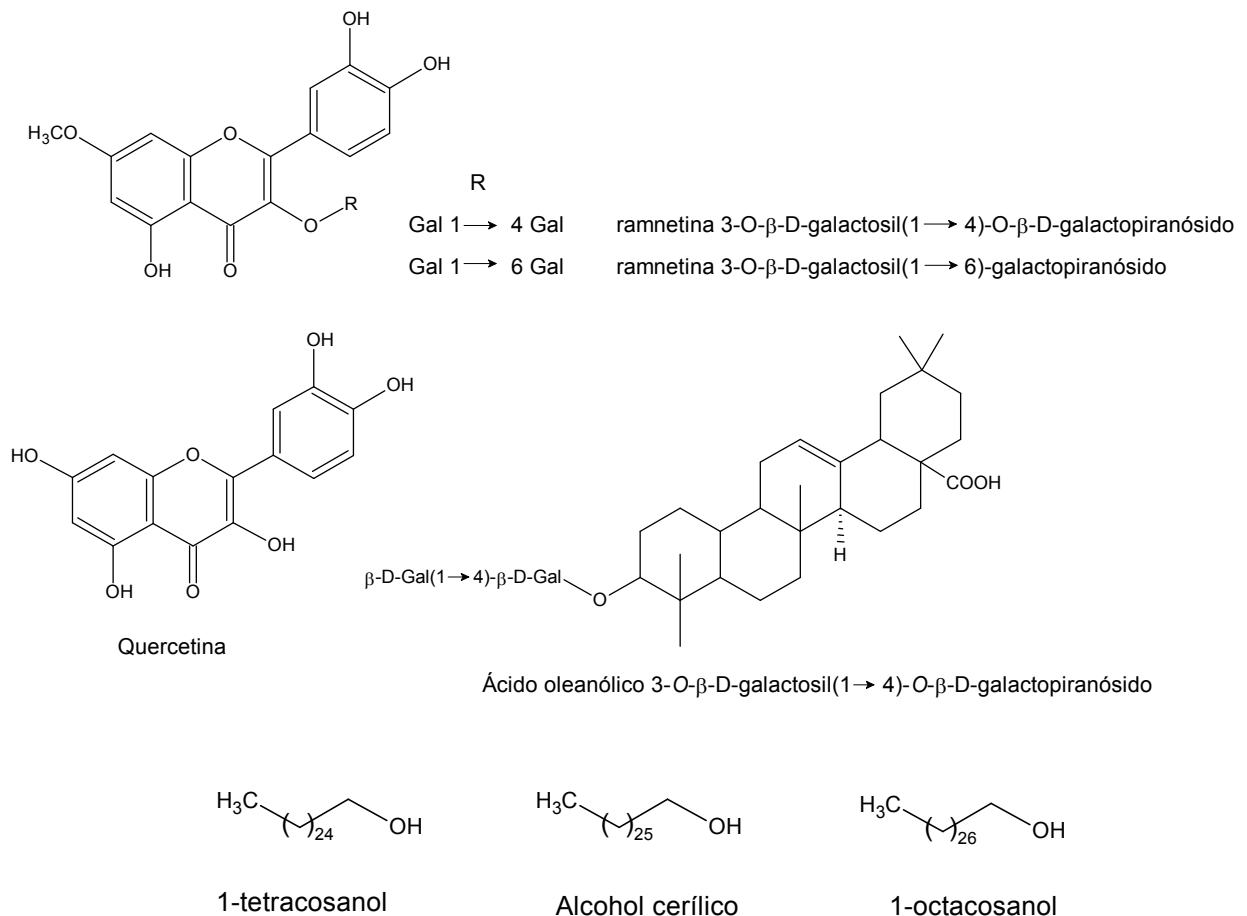
### 3.1.5. *Cassia floribunda* (*C. laevigata*)

Durante los años 1979-1982 diversos grupos de investigación aislaron e identificaron una gran variedad de compuestos presentes en diferentes partes de esta especie. Del extracto metanólico de las vainas tratado con éter de petróleo y benceno, se obtuvieron dos sólidos, crisofanol y physcion 8-O-β-D-galactopiranosido [50]. Por otra parte, del extracto etanólico de las hojas se obtuvieron dos flavonoides los cuales fueron aislados por CC (silica gel) e identificados como ombuin y ombuin 3-O-(2-ramnosilglucósido) [51].



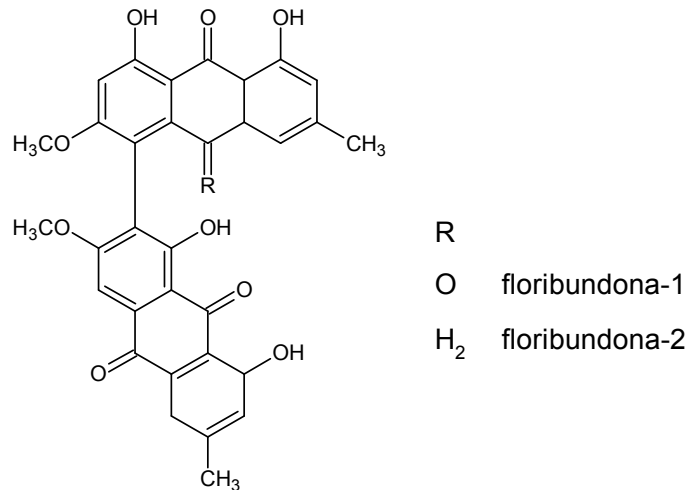
Singh y colaboradores aislaron de las raíces de *C. floribunda*, mediante CC (sílica gel), tres antraquinonas, unas de ellas glicosilada y un flavonol, identificados, por técnicas espectroscópicas como emodina, physcion, physcion 8-O-β-D-galactopiranosido y ombuin, respectivamente [52]. En 1982 Singh [53], aisló de las flores de la especie ocho nuevos compuestos: ramnetina 3-O-β-D-galactosil(1→4)-O-β-D-galactopiranosido, ramnetina 3-O-β-D-galactosil(1→6)-galactopiranosido, quercetina (**flavonoides**); ácido oleanólico 3-O-β-D-galactosil(1→4)-O-β-D-galactopiranosido (**saponina**), 1-docosanol, 1-tetracosanol, alcohol cerílico y 1-octacesanol. Los alcoholes

fueron identificados por su punto de fusión y el resto de los compuestos por técnicas espectroscópicas y MS.

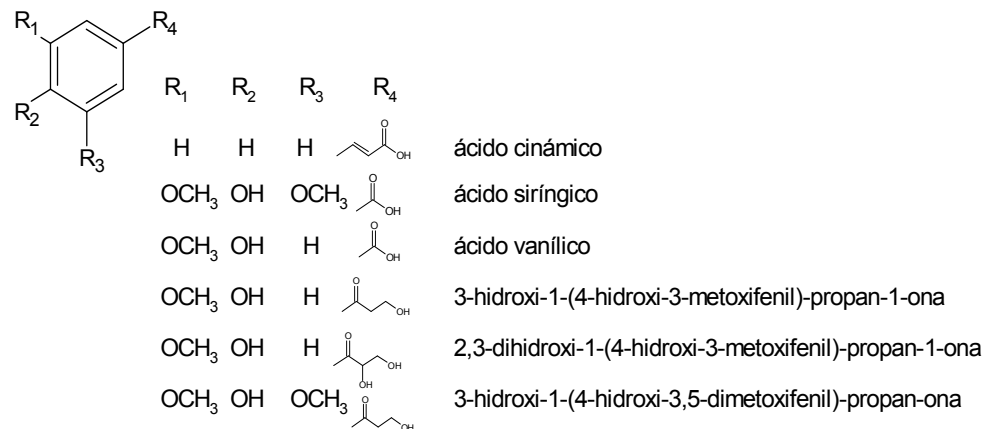
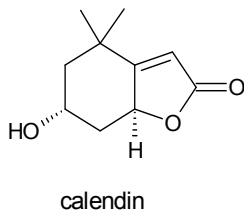


Posteriormente en 1988, Alemayehu y colaboradores <sup>[54]</sup> aislaron por cromatografía en columna sobre sílica gel del extracto de CHCl<sub>3</sub> de las hojas de *C. laevigata*, un sólido naranja que resultó ser una mezcla de dos compuestos; para su separación se trató dicho sólido con NaOH acuoso, acidificación con HCl concentrado y extracción con CHCl<sub>3</sub>, obteniéndose finalmente: floribundona-1 (1,1',8,8'-tetrahidroxi-6,6'-dimetoxi-3,3'-dimetil-(5,7'-biantracen)-9,9',10,10'-tetraona) y floribundona-2 (1,1',8,8'-tetrahidroxi-6,6'-dimetoxi-3,3'-dimetil-(5,7'-biantracen)-(10*H*)-9,9',10'-triona).



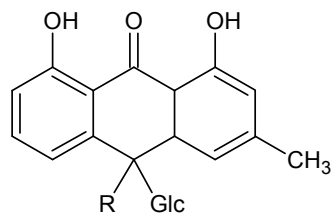


En el año 2000, Jones y colaboradores <sup>[55]</sup> aislaron del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de las hojas y ramas de esta especie el monoterpreno calendin, los ácidos: cinámico, siríngico y vanílico y las cetonas 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-ona, 2,3-dihidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-ona y la 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-propan-1-ona.

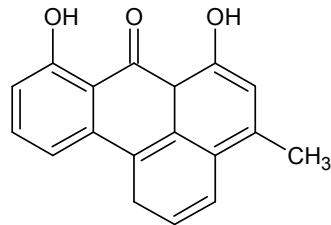


### 3.1.6. *Cassia garretiana*

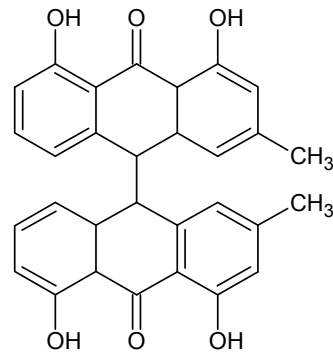
De esta planta se han obtenido una variedad de compuestos como antraquinonas, sennosidos, antronas, flavonoides y estilbenos, principalmente. Los compuestos: crisofanol, (-)-11-deoxialoína, cassialoína, crisofanol bezantrona y crisofanol diantrona, fueron aislados del extracto metanólico de los tallos, por Hata y colaboradores [56].



R  
OH cassialoína  
H (-)-11-deoxialoína

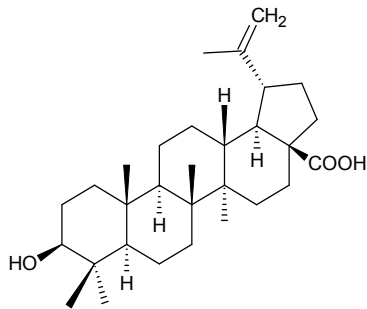


crisofanol bezantrona

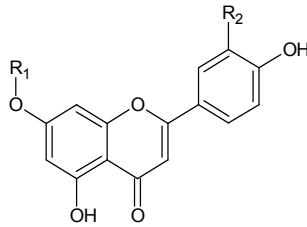


crisofanol diantrona

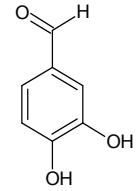
En 1979, Hata y colaboradores [57] aislaron del extracto metanólico de los tallos de esta especie, mediante la técnica cromatográfica anterior, diez nuevos compuestos: ácido betulínico, ramnocitrina, ramnetina, quercetina, aldehído protocatéquico, 3,3'-dihidroxibisbencilo, 3,3',4-trihidroxibisbencilo, 3,3',4,5'-tetrahidroxibisbencilo, piacetanol (3,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno) y 2,3,5,7-tetrahidroxi-9,10-dihidrofenantreno.



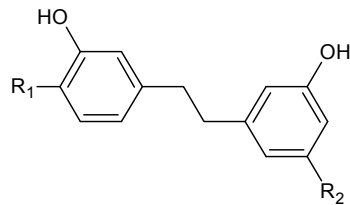
Ácido betulínico



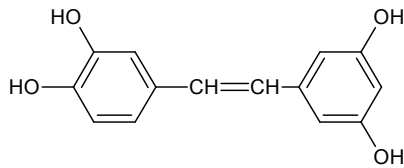
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
Me	H	ramnocitrina
Me	OH	ramnetina
H	OH	quercetina



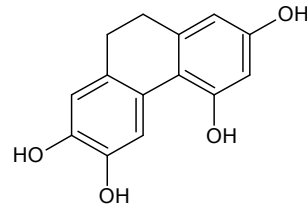
Aldehído protocatéquico



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	H	3,3'-dihidroxibisbencilo
OH	H	3,3',4-trihidroxibisbencilo
OH	OH	3,3',4,5'-tetrahidroxibisbencilo

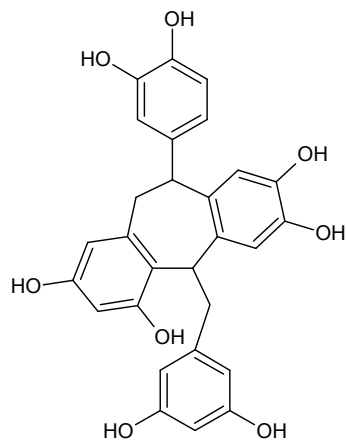


píacetanol (3,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno)

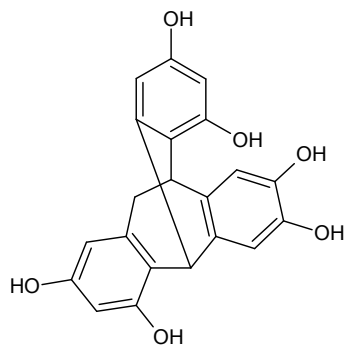


2,3,5,7-tetrahidroxi-9,10-dihidrofenantreno

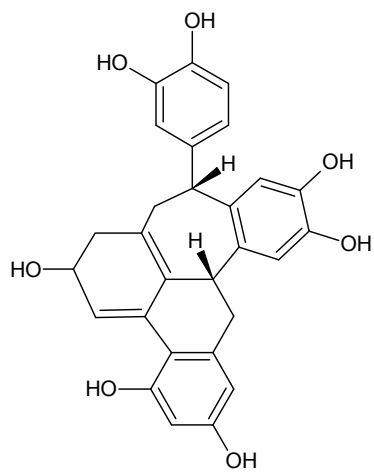
En 1988, Baba y colaboradores <sup>[58]</sup> aislaron de la corteza de la planta dos compuestos polifenólicos denominados cassigarol A y B. Ambos fueron obtenidos a partir del extracto metanólico el cual fue sometido a cromatografía en columna sobre sílica gel y Sephadex LH-20 e identificados mediante UV, IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. Posteriormente, se identificaron cinco nuevos dímeros de piceatannol conocidos como estilbenoides: cassigarol C-G, aislados de igual manera que los dos compuestos anteriores <sup>[59,60]</sup>.



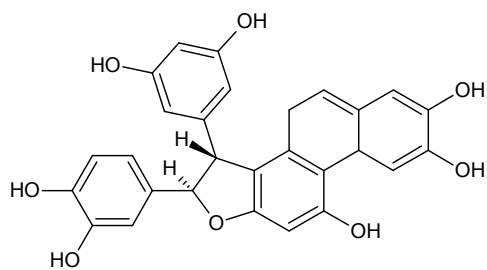
Cassigarol A



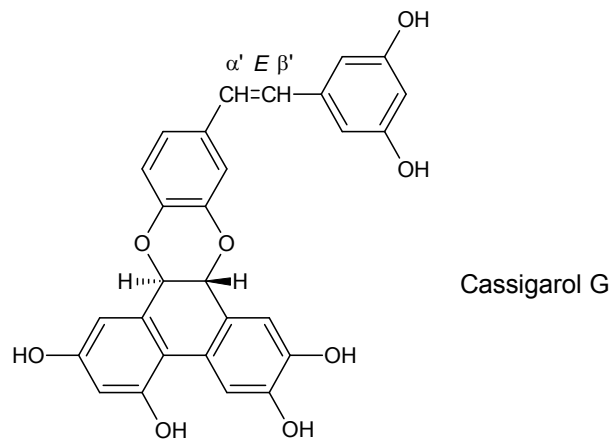
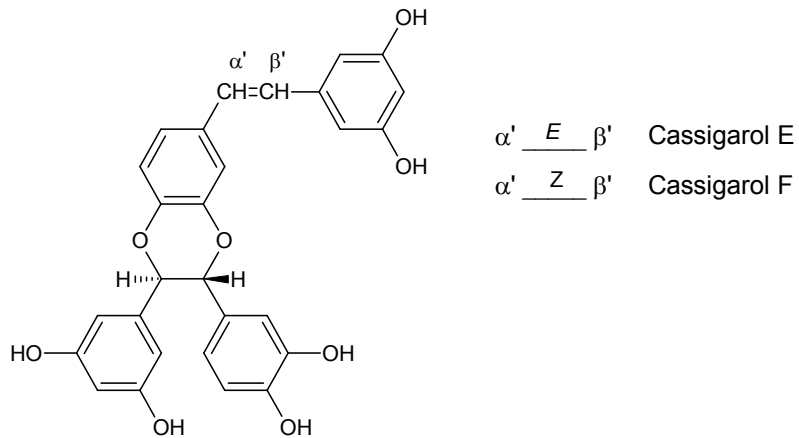
Cassigarol B



Cassigarol C



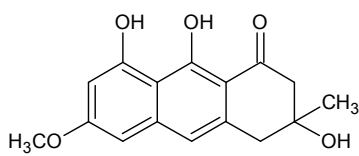
Cassigarol D



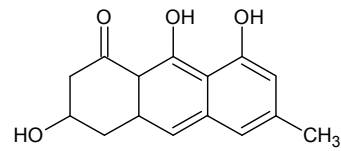
### 3.1.7. *Cassia torosa*

La especie *C. torosa* se caracteriza por presentar un gran número de metabolitos secundarios, en particular derivados de antraceno, flavonoides y antraquinonas. Los primeros compuestos identificados en esta especie fueron aislados del extracto de benceno de sus semillas mediante la técnica de cromatografía en columna sobre sílica gel, durante el período comprendido entre 1976 y 1982. Takahashi y colaboradores en el año 1976 <sup>[61]</sup>, aislaron cinco compuestos: crisofanol, physcion, emodina, germicrisona y torosacrisona. Un año más tarde, este mismo grupo de investigación identificó y aisló de dicho extracto cuatro dímeros de hidroantraceno, los cuales eran atropisómeros

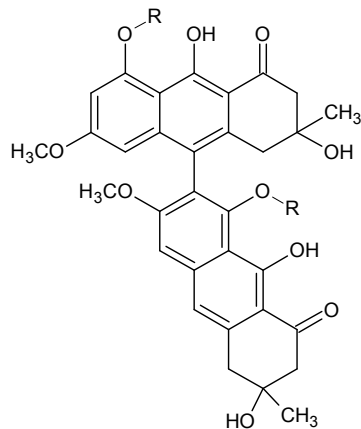
(isómeros de bifenilo con rotación impedida), dos de torosacrisona y los otros dos de torosacrisona y physcion, denominados phlegmacina A<sub>2</sub>, 8,8'-Diacetilphlegmacina A<sub>2</sub>, phlegmacina B<sub>2</sub>, 8,8'-Diacetilphlegmacina B<sub>2</sub> respectivamente [62]. Posteriormente, se identificaron dos nuevos derivados de hidroantraceno, germitorosona y metilgermitorosona [63]. Todos estos compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas (UV, IR y RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C) y MS,



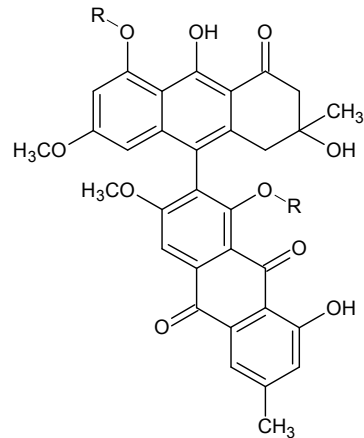
torosacrisona



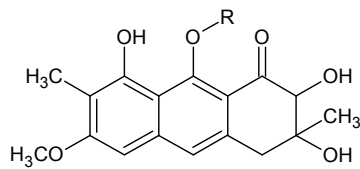
germicrisona



R

H Phlegmacina A<sub>2</sub>Ac 8,8'-Diacetilphlegmacina A<sub>2</sub>

R

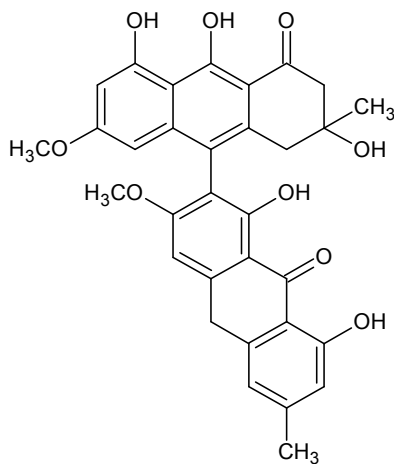
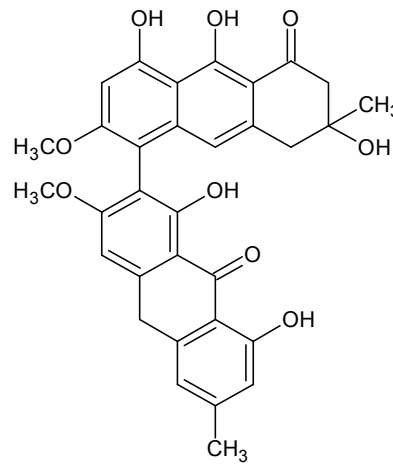
H Phlegmacina B<sub>2</sub>Ac 8,8'-Diacetilphlegmacina B<sub>2</sub>

R

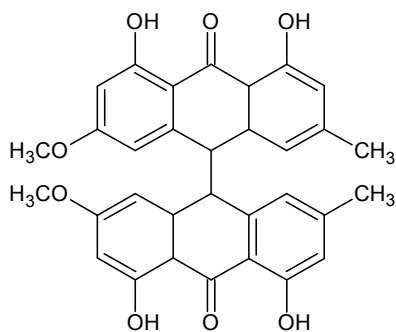
H germitorosona

CH<sub>3</sub> metilgermitorosona

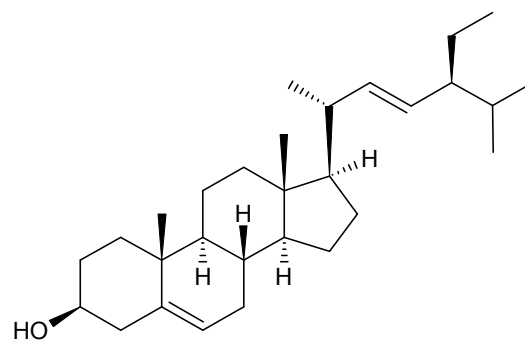
Ese mismo año, Kitanaka y Takido <sup>[64]</sup> aislaron siete nuevos compuestos, una antrona, tres dímeros de hidroantraceno y una mezcla de triterpenos (fitosterol). Los dímeros fueron identificados mediante las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente como: dehidrophlegmancina B<sub>2</sub> y torosanina (dímeros de hidroantraceno), physcion-10,10'-biantrona (dímero de antraquinona). En el caso de la mezcla los terpenos que la constutuan eran: estigmasterol (en mayor proporción), sitosterol y campesterol, identificada por cromatografía gases. El compuesto physcion-9-antrona fue identificado por comparación directa con un patrón.

dehidrophlegmancina B<sub>2</sub>

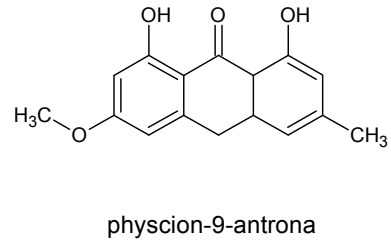
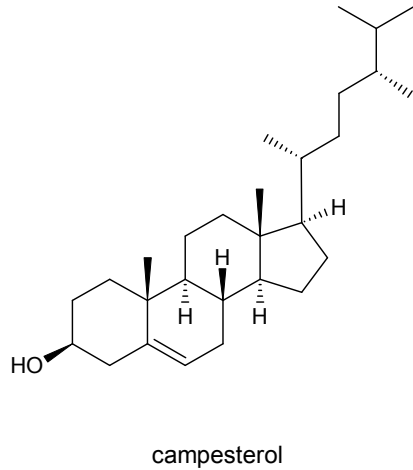
torosanina



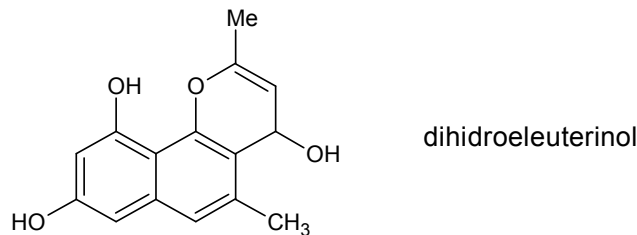
physcion-10,10'-biantrona



estigmasterol

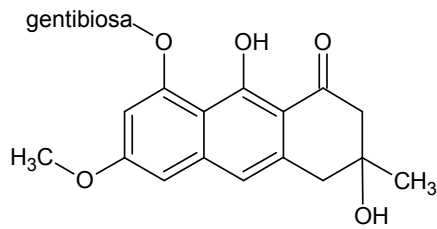


En 1990, Kitanaka y colaboradores utilizaron el extracto de benceno, de las semillas de *C. torosa*, para aislar por cromatografía sobre Sephadex LH-20, el dihidroeleuterinol, derivado de dihidronaftopirano, el cual fue identificado a través de sus espectros de UV, IR, RMN-<sup>1</sup>H y MS [65].

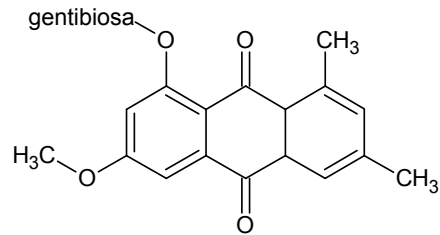


En 1984, Kitanaka y Takido aislaron por cromatografía sobre Sephadex LH-20, dos compuestos glicosilados, torosacrisona 8-β-D-gentibiósido y physcion 8-β-D-gentibiosido, presentes en el extracto metanólico de las semillas [66]. Tiempo después estos investigadores obtuvieron dos nuevos compuestos fenólicos del extracto metanólico, los cuales fueron separados por múltiples pasos cromatográficos (Sephadex LH-20, ODS, CHP20P y sílica gel) e identificados por sus espectros de UV, IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C como torososido B y torosacrisona 8-O-6''-malonil β-gentibiósido [19a].

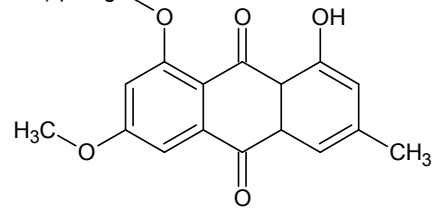
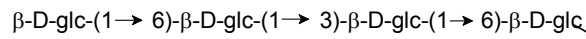




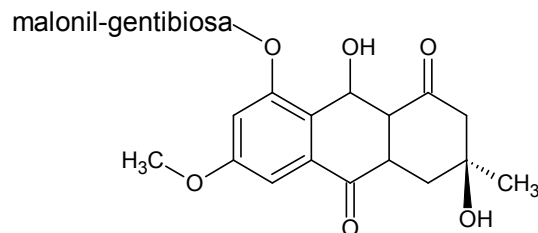
torosacrisona 8-β-D-gentibiosido



physcion 8-β-D-gentibiosido



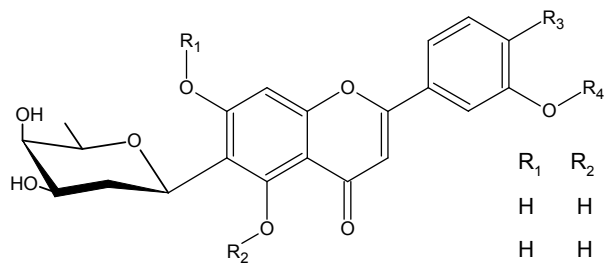
torosido B



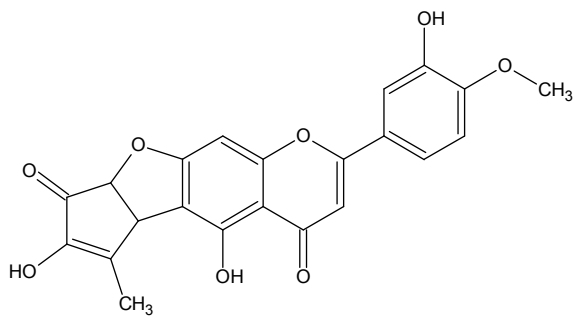
torosacrisona 8-O-6''-malonil β-gentibiosido

De las hojas se han aislado y reportado una gran cantidad de flavonoides, así como también, antraquinonas de su extracto metanólico. Kitanaka y colaboradores [67,68], aislaron cuatro flavonas glicosiladas denominadas torosaflavona A-D las cuales fueron identificadas por sus espectros de UV, IR, RMN-<sup>1</sup>H, COSY y análisis de rayos X. De este mismo extracto metanólico se aislaron una serie de nuevos compuestos por cromatografía en columna sobre sílica gel y Sephadex LH-20, los cuales fueron

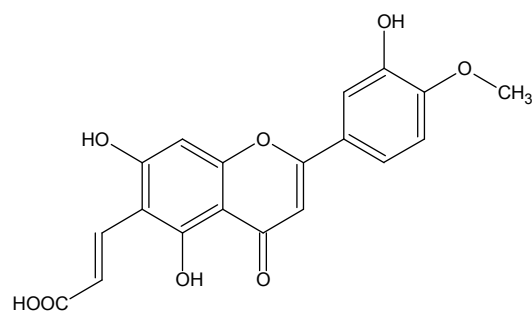
identificados, por las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente, como: torosaflavona B 3'-O-β-D-glucopiranosido, luteolina, luteolina 7-O-glucósido, diosmetina, diosmetina 3'-O-β-D-glucopiranosido, [69]. Finalmente en 1995, se aisló igualmente de las hojas de la especie, una bisantraquinona glicosilada denominada (S)-5,7'-Biphyscion 8-glucósido, mejor conocida como torososida A, la misma fue identificada por sus espectros de IR, MS, UV y RMN-<sup>1</sup>H [70].



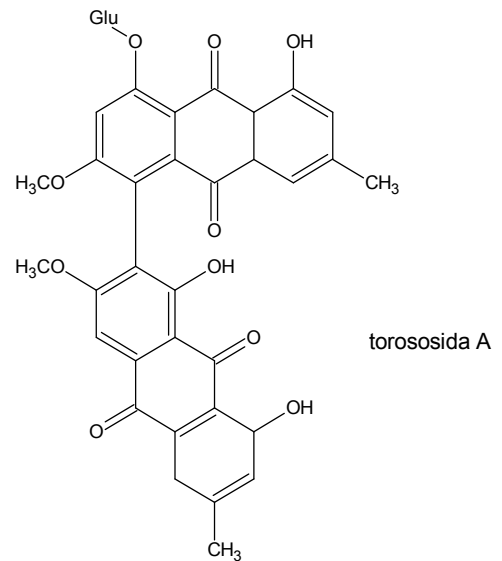
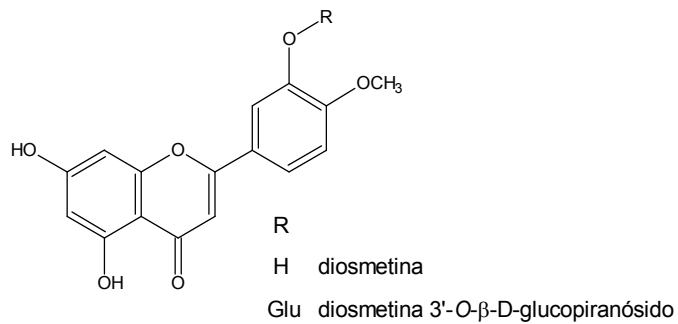
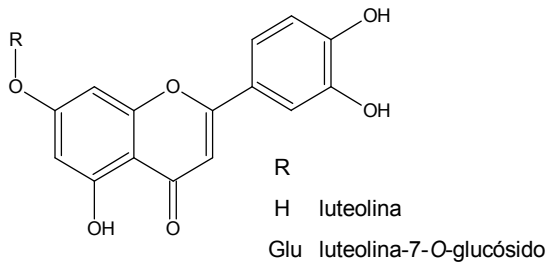
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
H	H	H	H	torosaflavona A
H	H	OH	CH <sub>3</sub>	torosaflavona B
H	H	OCH <sub>3</sub>	Glu	torosaflavona B 3'-O-β-D-glucopiranosido



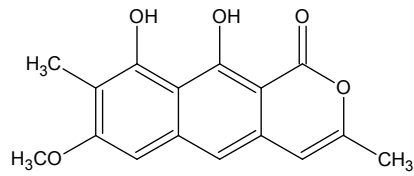
torosaflavona C



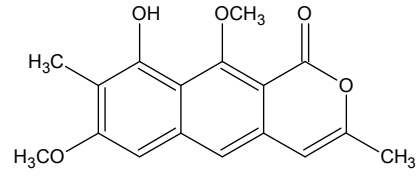
torosaflavona D



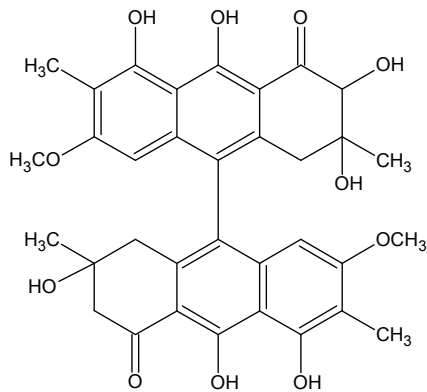
Las raíces y las flores también han sido estudiadas a nivel fitoquímico, encontrándose una gran cantidad de metabolitos secundarios. De las raíces, el primer estudio fue realizado por Kitanaka y Takido en el año 1985 [71], quienes llevaron a cabo la separación del extracto de benceno por cromatografía en columna en sílica gel, obteniendo los siguientes compuestos: crisofanol, physcion-9-antrona, physcion, crisofanol-10,10'-biantrona, emodina, los cuales fueron identificados por comparación directa con patrones; sitosterol, estigmasterol y campesterol identificados por cromatografía de gases; 8-metiltoralactona y 8-metiltoralactona 10-metiléter identificados por técnicas espectroscópicas y MS. Posteriormente, este mismo grupo de investigación aisló dos nuevos dímeros de antraceno denominados torosaol I (3,3',4,4'-tetrahidro-2,3,3',8,8',9,9'-heptahidroxi-6,6'-dimetoxi-3,3',7,7'-tetrametil-10,10'-bi-1(2*H*)-antracenona) y torosaol II (5-[3',4'-dihidro-3',8',9'-trihidroxi-6'-metoxi-3',7'-dimetil-1'(2*H*)-antracenona-10'-il]-3,4-dihidro-9,10-dihidroxi-3-hidroximetil-7-metoxi-3,8-dimetil-1*H*-nafto-[2,3-*c*]piran-1-ona), ambos fueron aislados e identificados de igual manera que las lactonas mencionadas anteriormente [72].



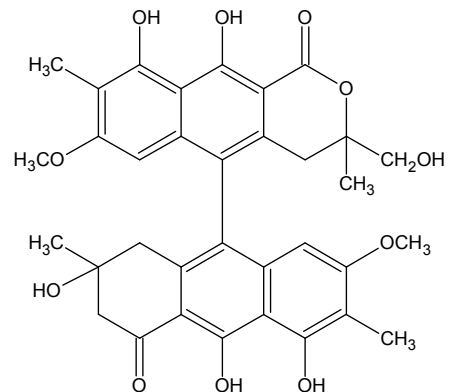
8-metiltoralactona



8-metiltoralactona 10-metiléter

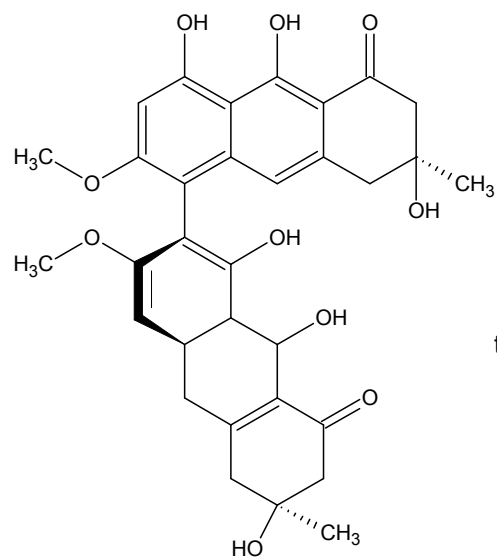


torosaol I



torosaol II

El extracto de benceno de las flores de la especie *C. torosa*, fue sometido a cromatografía en columna sobre sílica gel aislándose un dímero de antraceno denominado torosaol III (3,3',4,4'-tetrahidro-3,3',8,8',9,9'-hexahidroxi-6,6'-dimetoxi-3,3'-dimetil-1(2*H*),1'(2*H*)-5,7'-biantracena) [73].



torosaol III

**Tabla 1:** Metabolitos secundarios más frecuentes encontrados en las especies del genero *Cassia*.

Especies	Alcoholes	Terpenos	Estilbenos	Flavonoides		Antraquinonas		Antronas	Sennosidos
				Agliconas	Glicosilados	Agliconas	Glicosilados		
<i>C. abbreviata</i>				9 (d) <sup>31,32</sup>					
<i>C. absus</i>				2 (b) <sup>74</sup>		2 (e) <sup>74</sup>			
<i>C. alata</i>		1 (d) <sup>34</sup>		3 (e,d) <sup>38,34</sup>	3 (f,b) <sup>33,37</sup>	5 (e,d) <sup>34,38</sup>			
<i>C. angustifolia</i>					4 (b) <sup>42,44</sup>		3 (b) <sup>42,43</sup>		6 (b) <sup>39,41,42</sup>
<i>C. auriculata</i>	1 (b) <sup>75</sup>	1(b) <sup>75</sup>		1(b) <sup>75</sup>	1(b) <sup>75</sup>				
<i>C. didymobotrya</i>			3 (i) <sup>76</sup>	1 (i) <sup>76</sup>		1 (i) <sup>76</sup>			1 (i) <sup>76</sup>
<i>C. fistula</i>		1 (a) <sup>45</sup>		13 (b) <sup>46,47</sup>	1 (b) <sup>46</sup>	2 (f) <sup>48</sup>			
<i>C. floribunda</i>	4 (b) <sup>53,55</sup>	1 (a) <sup>53</sup>		2 (b,e,a) <sup>51,52,53</sup>	3 (b,a) <sup>51,53</sup>	5 (h,e,b) <sup>50,52,54</sup>	2 (h,e) <sup>50,52</sup>		
<b><i>C. fructicosa</i></b>	1 (a) <sup>30</sup>				1 (a) <sup>30</sup>		2 (a) <sup>30</sup>		
<i>C. garrettiana</i>			1 (c) <sup>57</sup>	3 (c) <sup>57</sup>		3 (c) <sup>56</sup>		2 (c) <sup>56</sup>	1 (c) <sup>56</sup>
<i>C. grandis</i>					1 (f) <sup>77</sup>		1 (h) <sup>77</sup>		
<i>C. greggii</i>						7 (e) <sup>78</sup>			
<i>C. hirsuta</i>		1 (f) <sup>79</sup>			3 (a) <sup>80</sup>				1 (f) <sup>79</sup>
<i>C. itálica</i>		2 (b) <sup>81</sup>		3 (b) <sup>82</sup>	7 (b) <sup>82</sup>	2 (b) <sup>81</sup>			
<i>C. jahnii</i>	4 (a) <sup>83</sup>	1 (a,b) <sup>83</sup>							
<i>C. javanica</i>		4 (b) <sup>84</sup>		1 (a) <sup>85</sup>	4 (a) <sup>85</sup>		2 (d) <sup>86</sup>		
<i>C. marginata</i>							2 (e) <sup>87</sup>		
<i>C. nodosa</i>	1 (a) <sup>88</sup>	2 (a) <sup>88</sup>							
<i>C. noname</i>				11 (b,g) <sup>89,90</sup>	2 (b,g) <sup>89,90</sup>	3 (f,b) <sup>91</sup>		2 (f) <sup>91</sup>	1 (f) <sup>91</sup>

<i>C. obtusa</i>				2 (e) <sup>92</sup>			
<i>C. obtusifolia</i>					3 (f) <sup>93</sup>	5 (f) <sup>94,95</sup>	1 (f) <sup>93</sup>
<i>C. occidentalis</i>	2 (e) <sup>96</sup>			6 (a) <sup>97</sup>	4 (e,f) <sup>98,99</sup>	1 (f) <sup>99</sup>	1 (f) <sup>99</sup>
<i>C. pudibunda</i>		2 (e) <sup>100</sup>			3 (e) <sup>100</sup>		
<i>C. quinquangulata</i>		3 (e) <sup>101</sup>					
<i>C. renigera</i>			1 (d) <sup>102</sup>	1 (d) <sup>102</sup>		1 (d) <sup>102</sup>	
<i>C. siamea</i>					6 (e,f) <sup>103,104</sup>		
<i>C. sophera</i>	1 (c) <sub>105</sub>	1 (e) <sup>107</sup>			6 (c,e) <sup>105,106,107</sup>	1 (e) <sup>107</sup>	
<i>C. tora</i>					9 (f) <sup>9e,108</sup>	8 (f) <sup>108,109,110,111</sup>	
<i>C. torosa</i>		3 (f,e) <sup>64,71</sup>	2 (b) <sup>69</sup>	7 (b) <sup>67,68,69</sup>	3 (f,e) <sup>61,71</sup>	3 (f,b) <sup>66,70,19a</sup>	1 (f,e) <sup>64,71</sup> 1 (f,e) <sup>64,71</sup>
<i>C. trachypus</i>			1 (e) <sup>112</sup>				1 (e) <sup>112</sup>

a) flores. b) hojas. c) tallos sin corteza. d) tallos con corteza. e) raíces. f) semillas. g) frutos. h) vainas.

**Tabla 2:** Actividad biológica reportada en las especies del genero *Cassia*.

Especies	Actividad biológica											
	Antidiabética	Antioxidante	Protección hepática	Antibacterial	Antiviral	Antimicótica	Antiinflamatoria	Laxante	Analgésico	Antimicrobiana	Anti cancerígena	Antialérgica
<i>C. alata</i>	X <sup>16b</sup>			X <sup>12a</sup>		X <sup>9a</sup>			X <sup>13a</sup>	X <sup>8a</sup>		
<i>C. angustifolia</i>					X <sup>15a</sup>			X <sup>10b</sup>		X <sup>8b</sup>		
<i>C. auriculata</i>	X <sup>16a</sup>	X <sup>14a</sup>								X <sup>8b</sup>	X <sup>18a</sup>	
<i>C. fistula</i>	X <sup>16c</sup>	X <sup>14b</sup>	X <sup>17a</sup>	X <sup>12c</sup>		X <sup>12c</sup>	X <sup>11a</sup>			X <sup>8b</sup>	X <sup>18b</sup>	
<i>C. garrettiana</i>					X <sup>15b</sup>	X <sup>9b</sup>				X <sup>8c</sup>	X <sup>18c</sup>	
<i>C. itálica</i>					X <sup>11b</sup>		X <sup>11b</sup>		X <sup>11b</sup>			
<i>C. kleinii</i>	X <sup>16d</sup>											
<i>C. nigricans</i>				X <sup>12d</sup>			X <sup>11c</sup>			X <sup>8d</sup>		
<i>C. obtusifolia</i>												X <sup>19b</sup>
<i>C. occidentalis</i>			X <sup>17c</sup>			X <sup>9c</sup>	X <sup>11d</sup>					
<i>C. seed</i>				X <sup>12b</sup>								
<i>C. senna</i>								X <sup>10a</sup>				
<i>C. siamea</i>		X <sup>14c</sup>										
<i>C. singuenea</i>	X <sup>16a</sup>				X <sup>11e</sup>		X <sup>11e</sup>		X <sup>11e</sup>			
<i>C. sophera</i>			X <sup>17b</sup>									
<i>C. spectabilis</i>		X <sup>11f</sup>				X <sup>9d</sup>	X <sup>11f</sup>		X <sup>11f</sup>			
<i>C. tora</i>				X <sup>12b</sup>		X <sup>9e</sup>	X <sup>10c</sup>	X <sup>10c</sup>	X <sup>10c</sup>		X <sup>18d</sup>	
<i>C. torosa</i>												X <sup>19a</sup>



#### 4. Justificación

Información popular y diferentes antecedentes botánicos, <sup>[113]</sup> señalan la posible actividad antidiabética de la especie *Cassia fruticosa* Mill. Adicionalmente, estudios realizados en nuestro laboratorio <sup>[114]</sup> permitieron determinar que tanto las hojas como ramas de esta especie, presentan un elevado porcentaje de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa, enzima asociada al control de la glucosa en sangre.

Debido a los pocos reportes fitoquímicos de la especie *Cassia fruticosa* Mill., y a la importancia del estudio de plantas venezolanas con posible actividad antidiabética se propuso el estudio fitoquímico de la especie *C. fruticosa*.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general.

Identificar los metabolitos secundarios presentes en las ramas y hojas de la especie *Cassia fruticosa* Mill., colectadas en dos épocas diferentes.

### 5.2. Objetivos específicos.

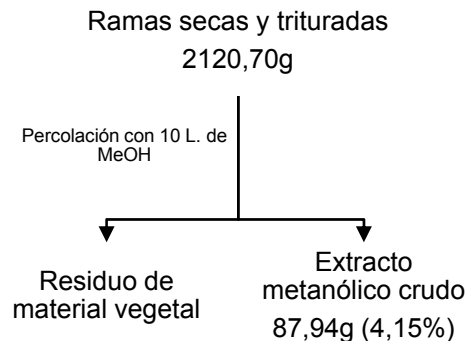
- a) Aislar los metabolitos secundarios presentes en las hojas y ramas de la especie *Cassia fruticosa* Mill.
- b) Caracterizar los metabolitos secundarios aislados de las ramas y hojas de esta especie por técnicas espectroscópicas (IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, HMBC y HMQC) y espectrometría de masas.

## 6. Metodología experimental

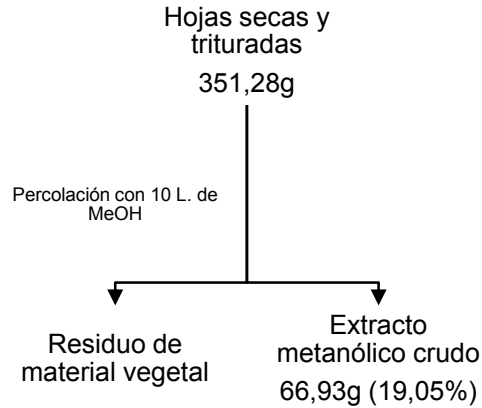
### 6.1. Material vegetal

Se recolectaron muestras de *C. fruticosa* Mill., en dos épocas del año, (junio 2008 y noviembre 2009), en la zona de San Antonio de los Altos del estado Miranda, por el Dr. Stephen Tillet. Una muestra se encuentra depositada en el herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo el código MYF26392. En junio se tomaron las hojas y en noviembre las ramas; ambos materiales vegetales fueron secados a temperatura ambiente, molidos y luego sometidos a percolación con 10 litros de metanol, aproximadamente, por 3 días durante 3 semanas consecutivas. Los extractos obtenidos fueron secados posteriormente a presión reducida.

El método de extracción del material vegetal seguido por Bermúdez <sup>[114]</sup> se muestra en los siguientes esquemas.



**Esquema 1.** Método de extracción realizado para las ramas de *C. fruticosa* Mill.



**Esquema 2.** Método de extracción realizado para las hojas de *C. fruticosa Mill*

## 6.2. Materiales y equipos

### 6.2.1. Materiales

Métodos cromatográficos:

- Capa fina: Placas analíticas de silica gel 60 de 0,25mm de espesor e indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub>; marca Merck
- Adsorción sólido- líquido: Cartuchos de silica gel SNAP 25g, de 50µm de diámetro de partícula, dimensiones 30x72mm y volumen 33mL, marca Biotage.

Solventes utilizados:

- Extracción y obtención de fracciones de interés: Metanol, agua, acetona, hexano grado técnico y destilados.
- Eluyentes: Hexano, diclorometano, mezclas tolueno-acetato de etilo, diclorometano-metanol, hexano-acetato de etilo-ácido fórmico y acetato de etilo-metanol-agua; en diferentes

proporciones para la separación cromatográfica y desarrollo de la cromatografía de capa fina; grado PA, casa comercial Merck.

- Análisis espectroscópico: Metanol y cloroformo deuterado, marca Merck y Aldrich respectivamente.

Agente revelador:

- Anisladehido (AS): 0,5mL de anisaldehido se mezclan con 10mL de ácido acético glacial, seguido de 85mL de metanol y 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se rocía la placa de TLC con el reactivo y se calienta a 100°C durante 5-10min o hasta obtener una máxima intensidad de color. La aparición de manchas amarillas y moradas en el visible, es indicativo de la presencia de compuestos flavonoidales y terpenoidales respectivamente <sup>[115]</sup>.

### 6.2.2. Equipos

- Equipo de purificación flash para Cromatografía Líquida, modelo Isolera One, (Biotage).
- Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo medio (FT-IR) marca Nicolet, modelo 380 operado en modo Transformada de Fourier. Intervalo espectral de 4000-400cm<sup>-1</sup> y resolución de 4cm<sup>-1</sup>.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, JEOL. Campo aplicado para protones 270MHz y 75MHz para carbono.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, BRUKER. Campo aplicado para protones 500MHz y 125MHz para carbono.
- Espectro de masas TSQ QUANTUM (con Triple Cuadrupolo), marca Thermo.

- Fusiómetro Sybron-Thermolyne; modelo MP-12615; 120V-250W; 2,1amp; 50-60 ciclos.
- Lámpara de Xenón de UV; marca UVP, modelo UVGL-25,  $\lambda = 254$  y 365nm.

### **6.3. Extracción y aislamiento de los metabolitos secundarios**

#### **6.3.1. Tratamiento de las ramas de *C. fruticosa* Mill.**

En un principio el extracto metanólico de las ramas, el cual era una pasta higroscópica, fue dividido en dos porciones; una de 50gr la cual fue sometida a hidrólisis ácida en una mezcla MeOH-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% (0,5:0,5:1; v/v) durante 3 horas con agitación continua, con la finalidad de obtener las agliconas presentes en dicho extracto. Una vez finalizada la hidrólisis, se observó la presencia de un sólido insoluble en el medio de reacción, el cual peso 11,9753g; el mismo se reservó y se trabajó con la solución. La misma fue sometida a extracciones básicas con soluciones al 5% de NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaOH.

Una vez realizada las extracciones, cada fase acuosa se acidificó con pequeñas porciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, observándose la presencia de sólido, el cual se filtró y estudio por CCF, utilizando el sistema de solventes hexano-acetato de etilo-ácido formico (75:25:1; v/v/v), obteniendo diferentes manchas de coloraciones intensas en 365nm, y al rociar la placa con una solución de KOH en etanol se observaron coloraciones violetas rojizas, característicos de núcleos antraquinónicos <sup>[115]</sup>.

Los perfiles químicos de cada fracción eran muy parecidos, la diferencia se encontraba en la fracción extraída con NaOH, en el cual se observaron 2 manchas de Rf: 0,75 y 0,79, ambas antraquinonas, por lo que se realizó su estudio con el sistema de solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH en diferentes proporciones y se sembró en cromatografía de columna (0,3624 g), con silica gel como soporte. A pesar de que se obtuvo cierta

cantidad de sólido una vez finalizada la elución; y la placa cromatográfica mostró que se separaron ambos compuestos, al realizar el estudio de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, no se obtuvo ninguna señal, por lo cual se descartaron todas las fracciones.

Posteriormente la otra parte del extracto metanólico (37,94g) se solubilizó en una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1; v/v), obteniéndose una fracción soluble y una insoluble; la fracción insoluble se solubilizó en acetona obteniéndose nuevamente 2 fracciones **CfR-A** (fracción insoluble) y **CfR-B** (fracción soluble); es esta última fracción la que se somete a extracciones básicas, como las mencionadas anteriormente, con la finalidad de obtener los metabolitos ácidos separados por sus valores de pKa. Una vez finalizadas las extracciones, se realiza el estudio por CCF empleando el mismo sistema de solventes hexano-acetato de etilo-ácido fórmico (75:25:1; v/v/v), y se observa que el perfil de cada fracción es muy parecido al obtenido después de la hidrólisis. Adicionalmente la cantidad de compuesto que precipita al acidificar los extractos es mucho menor a la obtenida por la hidrólisis, por lo que se descartan las fracciones.

Luego la fracción soluble en la mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1; v/v), fue tratada con acetona obteniendo igualmente dos subfracciones **CfR-C** (fracción insoluble) y **CfR-D** (fracción soluble); se tomó la fracción **CfR-C** y se sometió a separación con la técnica Cromatografía de contra corriente (CCC), pero desperfectos mecánicos no permitieron continuar su estudio. Por esta razón se retoma el sólido obtenido en la hidrólisis ácida y se separó en 2 porciones. La porción **1** (9,5370g) se solubilizó en 50mL de MeOH para luego realizar 5 extracciones con 25mL de hexano cada una, de manera de separar los metabolitos polares de los poco polares en 2 fracciones **CfR-Me** y **CfR-Hex**, respectivamente.

La fracción de **CfR-Me** y la porción **2**, fue sometida a separación con la técnica de cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando como primer solvente hexano, poco a poco se aumentó la polaridad con diferentes proporciones de acetato de etilo hasta

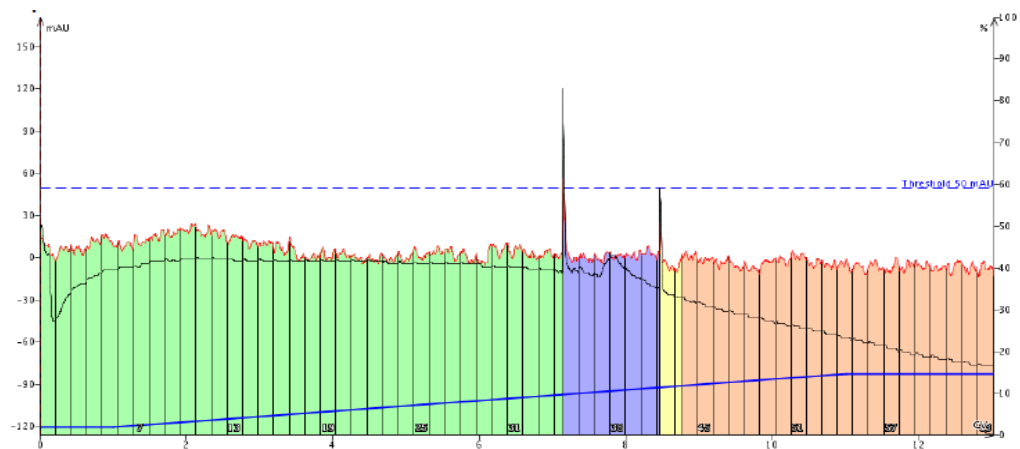
llegar a metanol, obteniéndose que las fracciones 4 y 5, contenían al menos 3 compuestos de Rf diferentes entre sí (Rf: 0,2; 0,6; 0,8), por lo cual se sembraron ambas fracciones en una placa de CCF preparativa y los compuestos obtenidos, los cuales presentaban una fuerte coloración amarilla en 365nm, fueron analizados con RMN-<sup>13</sup>C y RMN-<sup>1</sup>H, pero no se obtuvo ninguna señal. Por lo tanto, las fracciones fueron desechadas. El esquema de estas separaciones se encuentra representado a continuación:





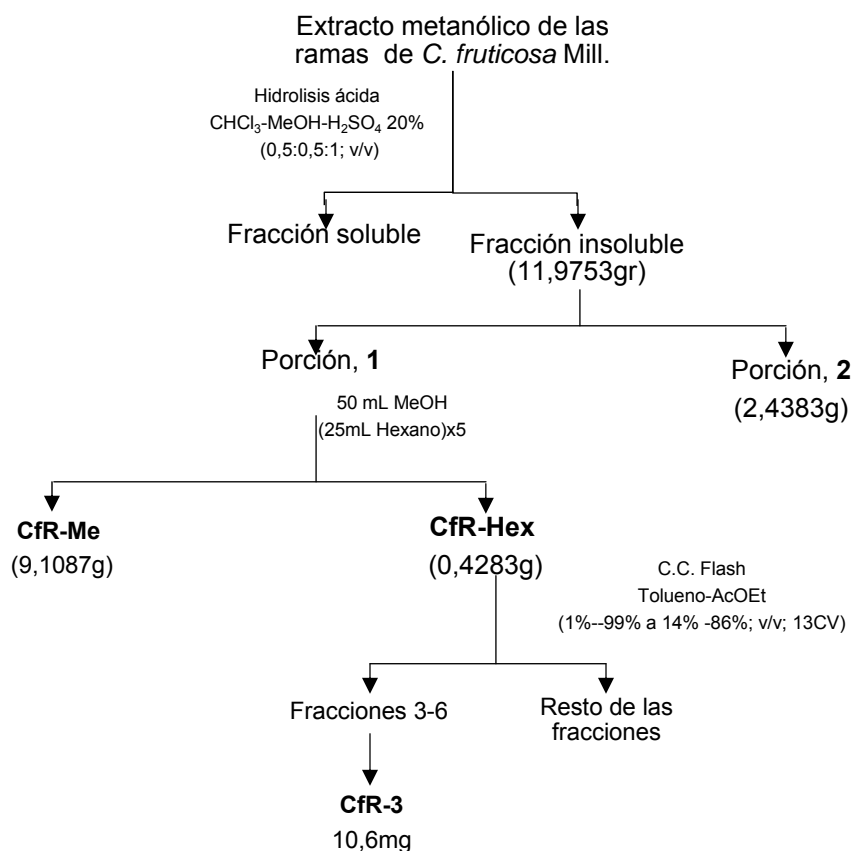
La fracción **CfR-Hex** tuvo una masa de 428,3mg, y fue estudiada mediante la técnica de cromatografía de capa fina (CCF), debido a que se tenía planeado realizar la separación de los metabolitos presentes en ella por la técnica de cromatografía flash, utilizando el equipo Isolera One®, para ello se ensayaron diferentes sistemas de solventes. A pesar de que la matriz era compleja (se observaban al menos 6 manchas diferentes en la placa de cromatografía), se encontró que el sistema compuesto por tolueno y acetato de etilo (93:7; v/v) era el que proveía la mejor separación de los metabolitos de interés ( $R_f$ : 0,23 y 0,35;  $\Delta VC= 1,5$ ), por lo cual se sembró toda la fracción en un cartucho de silica gel y se procedió a realizar la elución por gradiente con el sistema antes mencionado con la siguiente relación: 1% de tolueno durante 1 volumen de columna (VC), luego hasta 14% de tolueno durante 10VC, manteniéndose esta proporción de manera isocrática por 2 VC. Obteniéndose 66 fracciones de 7mL cada una, el flujo de fase móvil durante todo el proceso fue de 25mL/min, y la detección se llevó a cabo a 254 y 280nm.

En la figura 3, se puede observar el cromatograma obtenido una vez finalizada la elución



**Figura 3.** Cromatograma de la elución de la fracción **CfR-Hex**, con el sistema de solventes tolueno-acetato de etilo (1:99 a 14:86; v/v).

Una vez finalizada la elución de **CfR-Hex**, se procedió a verificar cada una de las fracciones obtenidas, mediante la técnica de cromatografía de capa fina, utilizando como sistema de solventes la mezcla tolueno-acetato de etilo (93:7; v/v) y como agente revelador anisaldehído en ácido sulfúrico (AS). Al analizarlas se obtuvo que solo las fracciones 3 a la 6 contenían un compuesto en común de  $R_f = 0,79$  por lo cual se unieron y secaron para evaporar el solvente, obteniendo 10,6mg de un sólido amorfo denominado **CfR-3**; el resto de las fracciones tenían una gran cantidad de metabolitos con poca diferencia en  $R_f$  y poca cantidad en masa, por lo cual no se tomaron en cuenta.

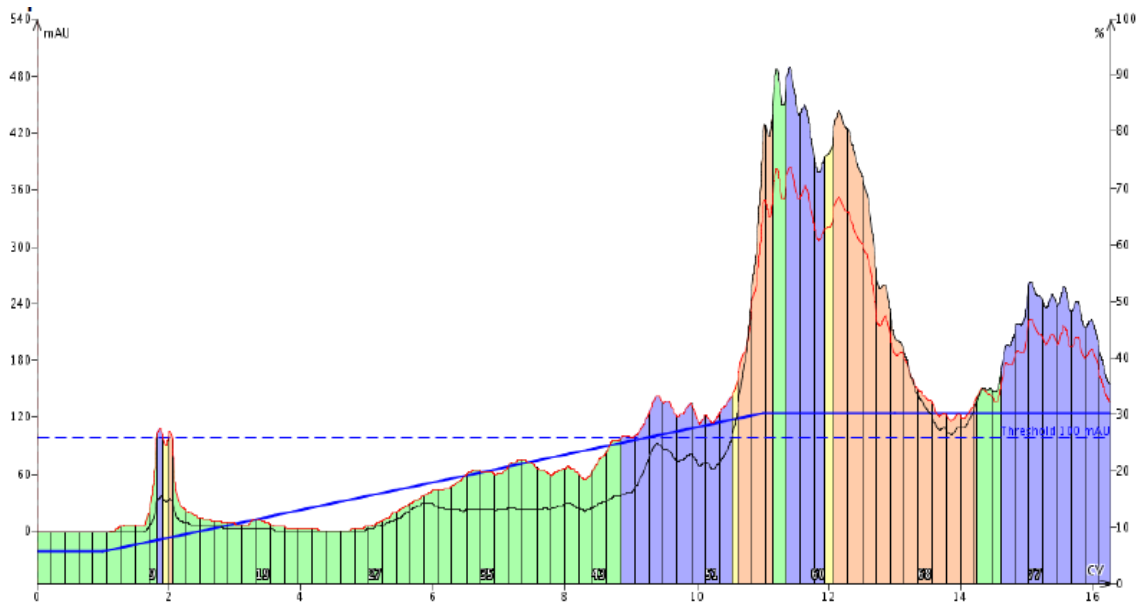


**Esquema 4.** Hidrólisis del extracto metanólico de las ramas de *C. fruticosa* Mill., para la obtención del compuesto **CfR-3**

### 6.3.2. Tratamiento de las hojas de *C. fruticosa* Mill.

Por otra parte, del extracto metanólico de las hojas se tomaron 25,00g los cuales fueron tratados con una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1; v/v), obteniéndose 2 fracciones. La fracción soluble fue tratada posteriormente con acetona produciendo **CfH-C** (insoluble) y **CfH-D** (soluble). De la fracción insoluble se obtuvo 13,50gr de pasta higroscópica; posteriormente se preparó el sistema de solventes t-BuOMe:*n*-BuOH:THF:0,2%TFA (1:3:1:5; v/v), debido a que había sido estudiado previamente por Bermudez <sup>[114]</sup> para la separación de los azúcares en la fase acuosa del resto de los metabolitos secundarios (fase orgánica); por ello una porción de esta fracción (9,3531g), fue suspendida en 100mL de fase acuosa y extraída con 5 porciones de 50mL de fase orgánica cada una, obteniéndose dos sub-fracciones: **CfH-C1** (4,7847g) y **CfH-C2** (2,8636g).

En el análisis por CCF para la fracción orgánica **CfH-C2**, se determinó que la mejor separación por flash sería con el sistema compuesto por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (8:2;v/v), ya que los compuestos de interés presentaban un R<sub>f</sub>: 0,1 y 0,2 ( $\Delta$ CV=5). Así, 550,8 mg de la fracción se sembró en un cartucho de silica gel y utilizó una elución por gradiente, de acuerdo a la siguiente: 5% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por 1 CV, de 5% a 30% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por 10 CV, manteniéndose de manera isocrática en 30% por 5,2 CV. El flujo de la fase móvil fue de 25 mL/min y se obtuvieron 82 fracciones (7 mL; c/u); mientras que la detección fue a 280 y 360 nm. A continuación se encuentra el cromatograma de esta elución.



**Figura 4.** Cromatograma de la elución de la fracción **CfH-C2**, con el sistema de solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (5:95 a 30:70; v/v).

Las primeras 30 fracciones fueron analizadas por CCF utilizando el sistema de solventes hexano-acetato de etilo-ácido fórmico (75:25:1; v/v/v), y las fracciones remanentes con acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10; v/v/v). Cada una de las placas cromatográficas fue revelada con AS y fueron agrupadas de acuerdo al perfil cromatográfico común. Las fracciones más representativas fueron estudiadas y su tratamiento posterior es descrito a continuación:

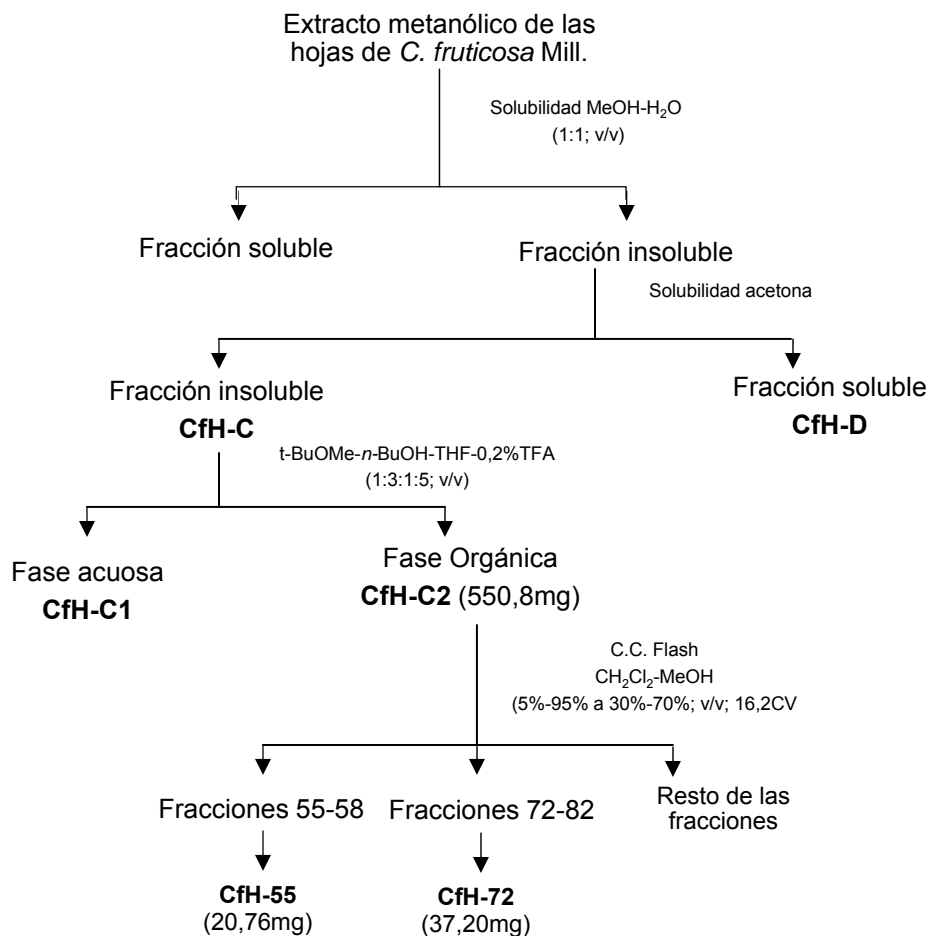
- Fracciones 55 a la 58:

Presentaban un compuesto en común de  $R_f = 0,26$  con una coloración amarilla en el visible y verde a 365 nm después de revelado.  $R_f$  mayor a 0,40 se presentaba una coloración morada, a manera de cola, por lo que se unieron estas fracciones obteniéndose una pasta marrón y se lavó con pequeñas porciones de dietileter, con la finalidad de remover el resto menos polar, obteniéndose un sólido marrón escarchado de 20,76 mg, el cual se denominó **CfH-55**.

- Fracciones 72 a la 82:

Presentaron una mancha en común ( $R_f = 0,17$ ), igualmente de coloración amarilla en el visible y verde en 365 nm, después de revelar con AS. Al igual que en el caso anterior cada una de estas fracciones presentaba un resto menos polar, de  $R_f$  mayor a 0,3, el cual era de coloración morada después de revelado, por lo que todas se unieron y lavaron de la manera descrita anteriormente, obteniéndose un sólido marrón de 37,20 mg, denominado **CfH-72**.

En ambos casos, el resto menos polar tenía más de un compuesto con  $R_f$  muy cercanos entre sí, y masa menor a los 7 mg por lo que no fueron estudiados. El resto de las fracciones obtenidas, no se encontraban puras; pues presentaban más de 3 manchas en CCF y con una cantidad en masa muy pequeña (menor a 10 mg), por lo que su estudio fue descartado.



**Esquema 5.** Tratamiento del extracto metanólico de las hojas de *C. fruticosa* Mill., y obtención de los compuestos **CfH-55** y **CfH-72**.

## 7. Resultados y discusiones.

### 7.1. Compuesto CfR-3.

El compuesto **CfR-3** se aisló como un sólido amorfo amarillo pálido, con rango de fusión de (75-77)°C, soluble en diclorometano y cloroformo. Al ser desarrollado en CCF con el sistema de solventes tolueno-acetato de etilo (93:7; v/v), el mismo presentaba un  $R_f=0,79$ . Este compuesto se observó en la placa cromatográfica después de rociarla con el agente revelador AS, como una mancha morada oscura en el visible, característica de los núcleos terpenoidales. Adicionalmente, en la placa cromatográfica el compuesto mostraba una mancha amorfa visible bajo la luz de 365 nm, después de rociar con AS, característica de los ácidos grasos.

Al observar el espectro de IR (espectro 1), se aprecian las 3 bandas de vibración características de los esteres unidos a centros esteroidales <sup>[116]</sup>, tales como la del carbonilo en  $1736\text{ cm}^{-1}$ , la vibración O=C-O en  $1260\text{ cm}^{-1}$  y la banda correspondiente a la vibración OCO-C en  $1083\text{ cm}^{-1}$ . Igualmente se observa una banda de poca intensidad, correspondiente al estiramiento  $\text{-C=CH-}$  en  $3442\text{ cm}^{-1}$ . En  $2918\text{ cm}^{-1}$  se aprecian las diferentes vibraciones de los estiramientos C-H, en  $1463\text{ cm}^{-1}$  una banda aguda correspondiente a las vibraciones de deformación de los diferentes grupos metilos y  $\text{-CH}_2$  presentes en el núcleo terpenoidal <sup>[117]</sup>. Finalmente se observa una banda en  $1377\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de deformación del grupo *iso*-propilo ( $\text{-CH(CH}_3)_2$ ).

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 2), tomado en  $\text{CDCl}_3$ , presenta diversos desplazamientos químicos característicos de un núcleo terpenoidal tipo  $\beta$ -sitosterol. A campo alto (espectro 3) se observan: dos singletes con desplazamientos de 0,66 y 0,99 ppm, correspondientes a grupos metilos unidos a un ciclo, por lo que fueron asignados a protones H-18 y H-19, respectivamente. Asimismo centrados en 0,80 y 0,81 ppm se aprecian 2 dobletes con constantes de acoplamiento de  $J= 6,4$  y  $6,2$  Hz



respectivamente, característicos de los protones H-26 y H-27 (grupos metilo de un *iso*-propilo); un triplete centrado en 0,86 ppm con acoplamiento de  $J= 7,8\text{Hz}$  asignado a H-29 (grupo metilo de cadena alifática). A campo más bajo (espectro 4) se tiene un singlete ancho centrado en 5,33 ppm característico de un metino de enlace olefínico del anillo B del núcleo, asignado a H-6.

Es importante hacer notar que los compuestos tipo  $\beta$ -sitosterol presentan un multiplete centrado en 3,52 ppm asignado a H-3, cuando el sustituyente ubicado en el C-3 es un grupo hidroxilo (OH) <sup>[118]</sup>. Sin embargo en el espectro de protones esta señal está ausente, y se observa un multiplete a campo bajo, centrado en 4,57 ppm, asignado a H-3, cuando el sustituyente enlazado en esta posición, es el oxígeno enlazado al carbonilo de un éster alifático <sup>[119]</sup>. Adicionalmente para este tipo de derivados de ácidos grasos, se observa un triplete centrado en 2,26 ppm con un acoplamiento de  $J= 8,4\text{Hz}$  asignado al  $\alpha\text{-CH}_2$  (H-2') enlazado directamente al grupo carbonilo <sup>[119]</sup>.

El espectro de carbono (espectro 5) muestra señales coincidentes con las reportadas para el  $\beta$ -sitosterol, con excepción de la reportada para el C-3 ( $\delta= 71,8$  ppm <sup>[118]</sup>) la cual se encuentra desplazada a campo más bajo, 73,7 ppm, característico de sustituciones de grupos esteres <sup>[119]</sup>, debido al desapantallamiento ejercido por el grupo carbonilo, sobre este carbono, generando que se desplace a campo más bajo.

Se observa una señal en 173,24 ppm, característica de un grupo carbonilo, a 38,25 ppm se observa un metileno unido a un grupo carbonilo correspondiente a C-2' <sup>[119]</sup>, 7 señales en la zona de 34-23 ppm asignadas a carbonos tipo  $\text{CH}_2$  (espectro 6) de una cadena alifática y una señal en 14,13 ppm correspondiente a un  $\text{CH}_3$  terminal de una cadena alifática <sup>[119]</sup> (espectro 7), por lo cual se concluye que el compuesto **CfR-3** es un éster de  $\beta$ -sitosterol con una cadena carbonada cuya longitud no pudo ser definida.

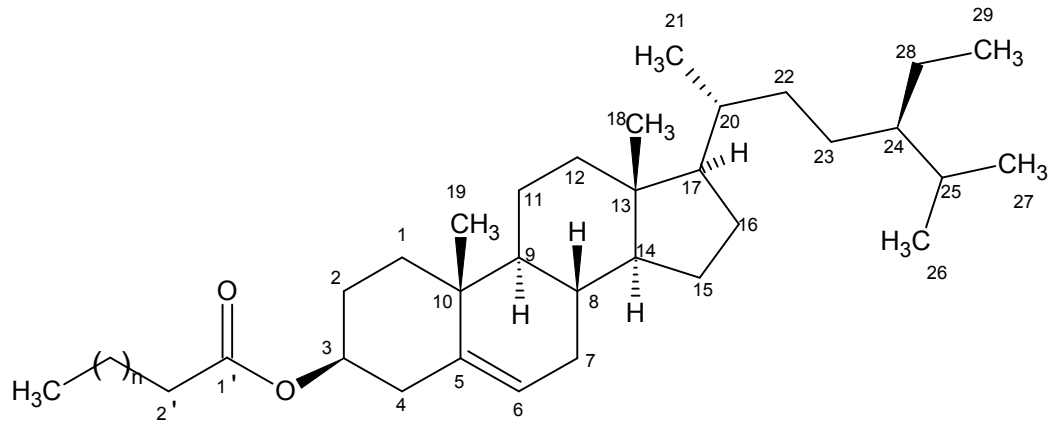
La data espectroscópica correspondiente a **CfR-3** se encuentra reportada en la siguiente tabla.

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol palmitato y compuesto **CfR-3**.

H/C	Reportado en CDCl <sub>3</sub> a 250MHz <sup>[119]</sup>			Experimental tomado en CDCl <sub>3</sub>		
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	DEPT	$\delta_H$ (ppm) a 270MHz	$\delta_C$ (ppm) a 75MHz	DEPT
1		37,0	CH <sub>2</sub>		37,1	CH <sub>2</sub>
2		29,70	CH <sub>2</sub>		30,1	CH <sub>2</sub>
3	3,52 ( <i>m</i> , 1H)	73,7	CH	4,57 ( <i>m</i> )	73,7	CH
4		42,2	CH <sub>2</sub>		*	
5		139,7	C		139,9	C
6	5,36 ( <i>sa</i> , 1H)	122,6	CH	5,33 ( <i>sa</i> )	122,6	CH
7		31,9	CH <sub>2</sub>		31,9	CH <sub>2</sub>
8		31,9	CH		*	
9		50,0	CH		50,2	CH
10		36,2	C		36,7	C
11		21,0	CH <sub>2</sub>		21,2	CH <sub>2</sub>
12		39,7	CH <sub>2</sub>		39,6	CH <sub>2</sub>
13		42,3	C		42,3	C
14		56,7	CH		56,7	CH
15		24,3	CH <sub>2</sub>		24,3	CH <sub>2</sub>
16		28,2	CH <sub>2</sub>		28,3	CH <sub>2</sub>
17		56,0	CH		56,1	CH
18	0,68 ( <i>s</i> , 3H)	12,0	CH <sub>3</sub>	0,66 ( <i>s</i> )	11,9	CH <sub>3</sub>
19	1,01 ( <i>s</i> , 3H)	19,3	CH <sub>3</sub>	0,99 ( <i>s</i> )	19,3	CH <sub>3</sub>
20		36,6	CH		36,1	CH
21	0,92 ( <i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,4Hz)	18,8	CH <sub>3</sub>	*	18,8	CH <sub>3</sub>
22		33,9	CH <sub>2</sub>		33,8	CH <sub>2</sub>
23		26,1	CH <sub>2</sub>		26,4	CH <sub>2</sub>

H/C	Reportado en CDCl <sub>3</sub> a 250MHz <sup>[119]</sup>			Experimental tomado en CDCl <sub>3</sub>		
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	DEPT	$\delta_H$ (ppm) a 270MHz	$\delta_C$ (ppm) a 75MHz	DEPT
24		45,9	CH		46,1	CH
25		29,2	CH		*	
26	0,81 ( <i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,5Hz)	19,8	CH <sub>3</sub>	0,79 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	19,8	CH <sub>3</sub>
27	0,83 ( <i>d</i> , 3H, <i>J</i> = 6,5Hz)	19,0	CH <sub>3</sub>	0,81 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2Hz)	19,2	CH <sub>3</sub>
28		23,1	CH <sub>2</sub>		23,1	CH <sub>2</sub>
29	0,84 ( <i>t</i> , 3H, <i>J</i> = 7,5Hz)	11,9	CH <sub>3</sub>	0,91 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,8Hz)	12,0	CH <sub>3</sub>
1'		173,3	C		173,2	C
2'	2,26 ( <i>t</i> , 2H)	38,2	CH <sub>2</sub>	2,26 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,4Hz)	38,4	CH <sub>2</sub>
3'		34,7	CH <sub>2</sub>		34,6**	CH <sub>2</sub>
4'		29,6	CH <sub>2</sub>			CH <sub>2</sub>
5'		29,5	CH <sub>2</sub>			CH <sub>2</sub>
6'		29,4	CH <sub>2</sub>		29,4**	CH <sub>2</sub>
7'		29,3	CH <sub>2</sub>			CH <sub>2</sub>
8'		29,2	CH <sub>2</sub>		29,2**	CH <sub>2</sub>
9'		29,1	CH <sub>2</sub>		28,3**	CH <sub>2</sub>
10'		27,8	CH <sub>2</sub>		27,9**	CH <sub>2</sub>
11'		25,1	CH <sub>2</sub>		25,1**	CH <sub>2</sub>
12'		22,7	CH <sub>2</sub>		22,7**	CH <sub>2</sub>
13'		21,0	CH <sub>2</sub>			CH <sub>2</sub>
14'		14,1	CH <sub>3</sub>		14,1	CH <sub>3</sub>

\* No se observa señal. \*\* Desplazamientos no asignados.



**Figura 5:** Compuesto **Cfr-3**, éster de ácido graso de  $\beta$ -sitosterol

En el espectro de masas se observan las diferentes fragmentaciones características del núcleo terpenoidal <sup>[120]</sup>, tales como  $m/z$  413,31, correspondiente a la fragmentación entre el oxígeno y el grupo carbonilo del éster  $[M - CO(CH_2)_nCH_3]^+$ , la pérdida de 15 uma, correspondiente a uno de los grupos metilos  $m/z$  398,38  $[413 - Me]^+$ ,  $m/z$  395,45 correspondiente al rearrreglo de McLafferty, gracias a la formación de un anillo de 6 miembros entre el H-2, C-3 y el grupo carbonilo;  $m/z$  369,42  $[413 - CH(CH_3)_2]^+$ ;  $m/z$  271,26 debido a la fragmentación en el C-17 ocasionando pérdida de la cadena lateral.  $[413 - C_{10}H_{21}]^+$ ,  $m/z$  217,19 debido a la pérdida del anillo D  $[271 - \text{Anillo D}]^+$  (espectro 9).

En cuanto a la longitud de la cadena carbonada enlazada al grupo carbonilo del éster de  $\beta$ -sitosterol en el espectro de masa se observa el pico de ión molecular con 663,56 uma  $[M+H]^+$  (espectro 8), lo cual corresponde a un éster de ácido graso de 265 uma  $[M-H-397]^+$ . Este valor no coincide con el peso molecular de ninguno de los ácidos grasos reportados en la naturaleza, los cuales están conformados por cadenas alifáticas (saturadas o insaturadas) de  $2n$  átomos de carbono, pues su biosíntesis involucra condensaciones sucesivas de unidades de acetato-malonato <sup>[1]</sup>, tal como el ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) o el esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ), cuyos pesos moleculares son 256 y 284

g/mol respectivamente. Debido a lo anterior no fue posible definir la identidad del mismo.

Este tipo de ésteres de ácidos grasos enlazados a núcleos triterpénicos ( $\beta$ -sitosterol palmitato,  $\beta$ -sitosterol behenato y  $\beta$ -sitosterol araquidato), ha sido aislado anteriormente de las hojas de la especie *Cassia javanica* [84], mientras que el  $\beta$ -sitosterol ha sido aislado de las hojas de: *C. itálica* [81], *C. jahnii* [83]; flores de *C. nodosa* [88]; y de las semillas de *C. occidentalis* [96] y *C. torosa* [64]. En todos los casos se trabajó con CC sobre sílica gel o alumina.

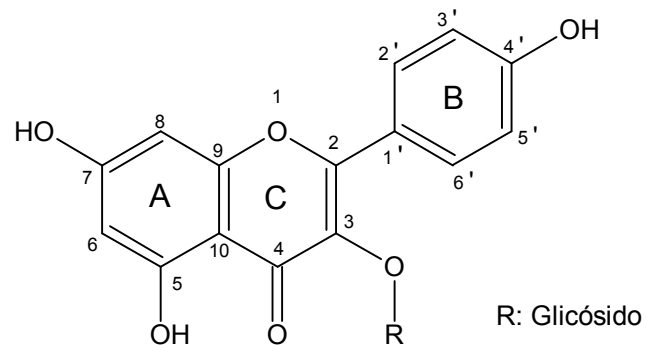
## 7.2. Compuesto CfH-55.

El compuesto **CfH-55** se aisló como un sólido marrón, soluble en MeOH, con un rango de fusión (165-167)°C, y un Rf= 0,26 en el sistema de solventes acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10; v/v/v). La coloración amarilla intensa presentada en el visible y verde brillante bajo la luz de 365 nm, luego de revelar a placa de CCF con AS reveló que el compuesto poseía un núcleo flavonoidal [115].

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 10), tomado en CD<sub>3</sub>OD, se distinguen 4 señales de protones pertenecientes a sistemas aromáticos (espectros 11 y 12), el primer par son dos dobletes con un desplazamiento de 8,05 y 6,89 ppm y acoplamiento de 8,9 Hz cada uno, lo cual indica que se encuentran *orto* entre ellos en el sistema aromático. Por otro lado, se encuentra un segundo par correspondiente a singletes anchos centrados en 6,21 y 6,40 ppm respectivamente, que muestran un acoplamiento *meta* entre ambos protones. El primer par de protones se encuentra a campo bajo, debido a que el efecto de apantallamiento sobre ellos es menor por lo cual ambos pertenecen al anillo B del núcleo flavonoidal, mientras que los otros 2 corresponden al anillo A.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT (espectro 14), tomado igualmente en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , muestra 3 carbonos cuaternarios en 161,48; 162,98 y 166,02ppm correspondientes a carbonos enlazados a grupos hidroxilos. La posición de cada uno de ellos fue asignada a través del espectro de HMBC (espectro 15), y fueron asignados a C-4', C-5 y C-7 respectivamente. Se observan también 6 átomos de carbonos cuaternarios entre la zona de 180 y 105 ppm, asignados por HMBC (espectro 15). Dichos desplazamientos permitieron establecer el núcleo de la aglicona como un flavonol tipo kaempferol.

En el 2003 Pizzolatti, M.G. y colaboradores <sup>[121]</sup> reportaron para el núcleo de kaempferol, los siguientes desplazamientos, medidos en  $\text{DMSO-d}_6$ , de los carbonos C-7 (165,08 ppm), C-2 (147,05 ppm) y C-3 (136,68 ppm), cuando estos se encuentran enlazados únicamente a grupos hidroxilos; en el caso de existir alguna de estas posiciones sustituidas por glicósidos, el C-7 y C-3 presentan un desplazamiento a campo alto (-2 ppm) y el C-2 a campo bajo (+10 ppm). Al observar la data experimental obtenida para **CfH-55** (tabla 4) se infirió que la sustitución se encontraba solo en el C-3 de la aglicona.



**Figura 6.** Núcleo de la aglicona tipo kaempferol del compuesto **CfH-55**

En el espectro de protones se observan 2 señales correspondientes a dos protones anómicos (espectro 12), uno como un doblete centrado en 5,1 ppm y con un

acoplamiento de  $J= 7,4\text{Hz}$  (unión  $\beta$ ) y el otro como un singlete ancho (unión  $\alpha$ ) centrado en 4,51 ppm, enlazados a dos carbonos en 104,6 y 102,4ppm respectivamente (espectro 16). En el espectro de HMBC se observa la correlación del protón centrado en 5,11 ppm con el C-3 del núcleo de la aglicona, por lo cual este fue asignado como H-1'' (espectro 17). A su vez en el espectro de HMBC se observó la relación directa entre el carbono anomérico en 104,58 ppm y un protón centrado en 3,41ppm (espectro 18); el cual a su vez está enlazado a un CH en 75,8 ppm asignado a C-2'' (espectro 19). El resto de las correlaciones entre los C-2'' y C-5'' se establecieron por HMBC.

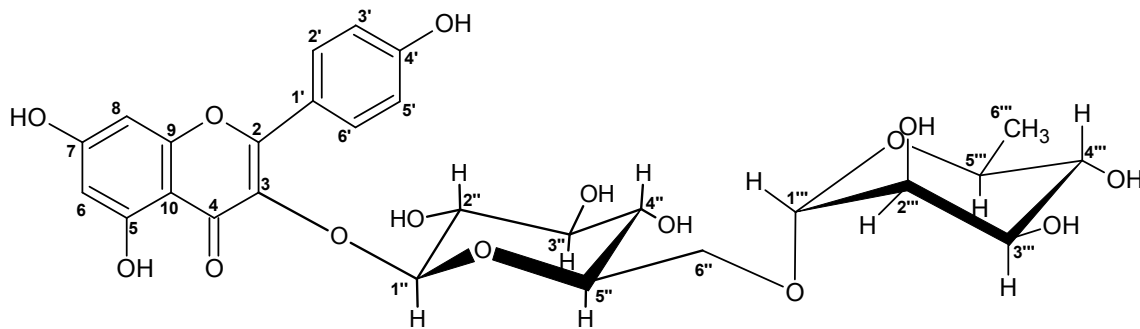
Este primer glicósido fue identificado como glucosa debido a la presencia de un carbono metileno en 68,57 ppm (C-6''), unido a dos protones H-6<sub>a</sub>'' y H-6<sub>b</sub>'' observados en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H como dobletes centrados en 3,80 y 3,36 ppm respectivamente, y con acoplamiento de  $J=11\text{ Hz}$  cada uno, indicando la relación geminal entre ellos (espectro 20). En COSY se puede apreciar la correlación entre ambos protones, confirmando así su ubicación sobre el C-6'' de la glucosa (espectro 21). El desplazamiento de este carbono a campo bajo indica la unión de este a un oxígeno. Al observar el espectro de HMBC se aprecia la correlación entre los protones H-6<sub>a</sub>'' y H-6<sub>b</sub>'' de la glucosa y el C-1''' (102,40 ppm) del otro glicósido, estableciendo así el enlace 1→6 entre ambos sacáridos (espectros 22 y 23).

El siguiente sacárido fue identificado como ramnosa, debido a la presencia de un doblete centrado en 1,11 ppm con acoplamiento de  $J= 6,2\text{Hz}$ , directamente enlazado a un carbono en 17,90 ppm (H-6''' ; C-6'''), característico de grupos metilos unidos a carbonos alifáticos (espectro 24). La posición de este metilo se fijó por las correlaciones observadas en COSY entre H-6''' (1,11ppm) y H-5''' ubicado en 3,42 ppm, el cual está enlazado a un carbono tipo CH con un desplazamiento en 69,73 ppm (espectros 25 y 26 respectivamente), lo cual coincide con la data espectroscópica reportada en el 2007 por Kazuma K. y colaboradores [122].

El espectro de masas (espectro 27) mostró un pico de ión molecular en  $m/z$  593,17 el cual corresponde a la fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{15}$ . Igualmente se observa el ión base en  $m/z$  285,05 correspondiente a la pérdida de los 2 glicósidos  $[M-C_{12}H_{20}O_9]^+$ , lo cual confirma la unión entre ellos. Ambos picos son los de mayor intensidad y coinciden con los reportados para el kaempferol 3-O-rutinósido [123].

Por lo anterior el compuesto **CfH-55** fue identificado como kaempferol 3-O- $\beta$ -D-(6- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)glucopiranosido, conocido también como kaempferol 3-O-rutinósido.

La figura 8, muestra las correlaciones COSY y HMBC observadas para el compuesto **CfH-55**



**Figura 7.** Compuesto **CfH-55**, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-(6- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)glucopiranosido o Kaempferol 3-O-rutinósido.



**Tabla 4.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto kaempferol 3-O-rutinósido y **CfH-55**.

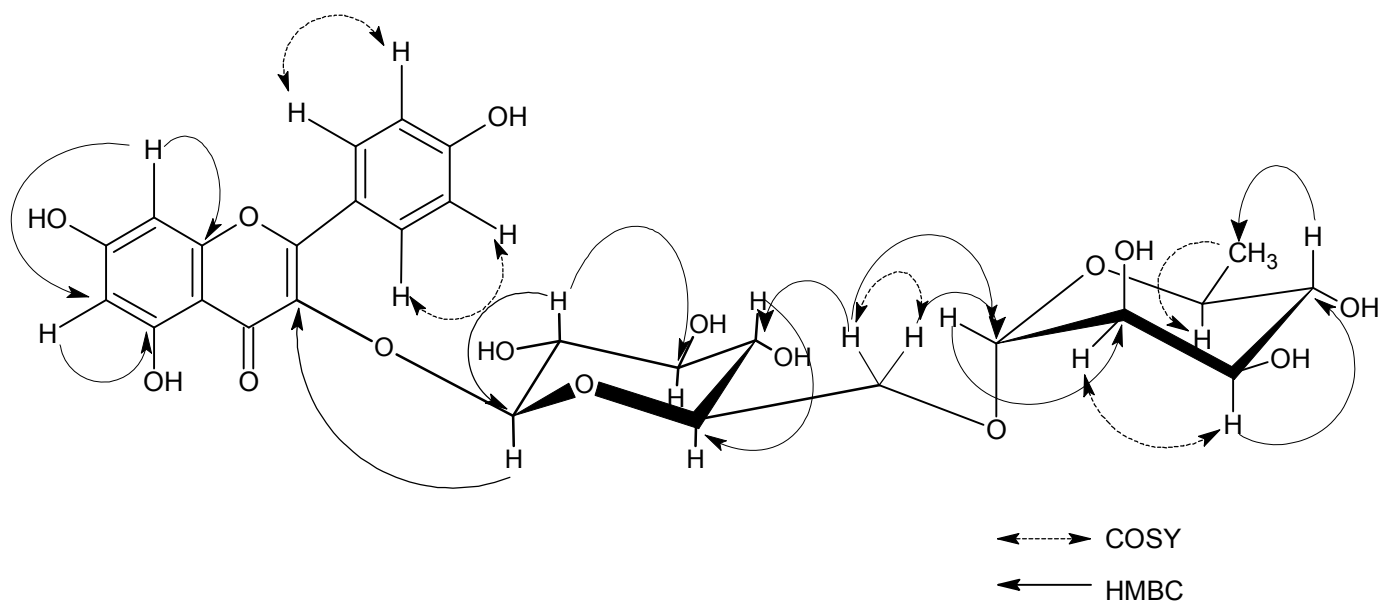
H/C	Reportado en CD <sub>3</sub> OD <sup>[122]</sup>		Experimental tomado en CD <sub>3</sub> OD*	
	$\delta_H$ (ppm) a 400MHz	$\delta_C$ (ppm) a 100MHz	$\delta_H$ (ppm) a 500MHz	$\delta_C$ (ppm) a 125MHz
2		161,49		159,45
3		135,51		135,50
4		179,43		179,42
5		163,01		162,98
6	6,21 ( <i>d</i> , <i>J</i> =1,8Hz)	99,96	6,21 ( <i>sa</i> )	99,99
7		166,02		166,02
8	6,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> =1,8Hz)	94,91	6,40 ( <i>sa</i> )	94,94
9		158,56		158,55
10		105,68		105,67
1'		122,76		122,75
2',6'	8,05 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0Hz)	132,37	8,05 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	133,37
3',5'	6,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0Hz)	116,13	6,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	116,15
4'		159,44		161,48
1''	5,12 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,3Hz)	104,58	5,11 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,4Hz)	104,58
2''	3,43 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =7,3; 8,8Hz)	75,76	3,41 ( <i>m</i> )	75,75
3''	3,40 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,8Hz)	78,15	3,39 ( <i>m</i> )	78,13
4''	3,24 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,8Hz)	71,46	3,26 ( <i>m</i> )	71,45
5''	3,32 ( <i>m</i> )	77,22	3,33 ( <i>m</i> )	77,20
6''	3,80 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,0; 12,5Hz)	68,57	3,80 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 11Hz)	68,57
	3,37 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,1; 12,5Hz)		3,36 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 11Hz)	
1'''	4,51 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5Hz)	102,42	4,51 ( <i>sa</i> )	102,40
2'''	3,62 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 3,2Hz)	72,09	3,63 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0; 3,5Hz)	72,07
3'''	3,51 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2; 9,5Hz)	72,30	3,51 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5; 9,5Hz)	72,30
4'''	3,27 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5Hz)	73,89	3,27 ( <i>m</i> )	73,89
5'''	3,44 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 6,1; 9,5Hz)	69,73	3,42 ( <i>m</i> )	69,73
6'''	1,11 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1Hz)	17,91	1,11 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2Hz)	17,90

\* Los datos de RMN-<sup>13</sup>C son reportados con dos cifras significativas, con fines de comparación con la bibliografía

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto **CfH-55** (kaempferol 3-O-rutinósido).

H/C	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)*	DEPT	HMQC	HMBC	COSY
2		159,45	C			
3		135,50	C			
4		179,42	C			
5		162,98	C			
6	6,21	99,99	CH	H-6	C-5; C-7; C-8; C-10	
7		166,02	C			
8	6,40	94,94	CH	H-8	C-6; C-7; C-9; C-10	
9		158,55	C			
10		105,67	C			
1'		122,75	C			
2',6'	8,05	133,37	CH	H-2' H-6'	C-2; C-1'; C-3'; C-4'	H-3'; H-5'
3',5'	6,89	116,15	CH	H-3' H-5'	C-3; C-1'; C-4'	H-2'; H-6'
4'		161,48	C			
1''	5,11	104,58	CH	H-1''	C-3	
2''	3,42	75,75	CH	H-2''	C-1''; C-3''	
3''	3,71	78,13	CH	H-3''	C-2''	
4''	3,26	71,45	CH	H-4''	C-5''	
5''	3,63	77,20	CH	H-5''	C-4''	
6 <sub>a</sub> ''	3,80	68,57	CH <sub>2</sub>	H-6 <sub>a</sub> ''	C-4''; C-1''	H-6 <sub>b</sub> ''
6 <sub>b</sub> ''	3,36			H-6 <sub>b</sub> ''	C-5''; C-1''	H-6 <sub>a</sub> ''
1'''	4,51	102,4	CH	H-1'''	C-2'''; C-5'''	
2'''	3,51	72,07	CH	H-2'''	C-4'''	H-3'''
3'''	3,63	72,30	CH	H-3'''	C-2'''; C-4'''	H-2'''
4'''	3,23	73,89	CH	H-4'''	C-2'''; C-3'''; C-6'''	
5'''	3,42	69,73	CH	H-5'''	C-2'''; C-6'''	
6'''	1,11	17,90	CH <sub>3</sub>	H-6'''		H-5'''

\* Los datos de RMN-<sup>13</sup>C son reportados con dos cifras significativas, con fines de comparación con la bibliografía.



**Figura 8.** Correlaciones homonucleares (**COSY**) y heteronucleares (**HMBC**) para el compuesto **CfH-55**, Kaempferol 3-O-rutinósido.

Este compuesto ha sido aislado previamente de las flores y hojas de las especies *Cassia hirsuta* [80] y *Cassia itálica* [82], respectivamente.

### 7.3. Compuesto CfH-72.

Este compuesto fue aislado como un sólido marrón, con un rango de fusión (195-197)°C y  $R_f = 0,17$  en el sistema de solventes acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10; v/v/v). Dicho compuesto mostró una coloración marrón oscura a 365 nm y amarilla en el visible. Cuando la placa se reveló con el reactivo AS el compuesto presento la coloración verde en 365 nm, característica de los núcleos flavonoidales descrito anteriormente.

Al igual que para el compuesto **CfH-55**, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD), mostró cuatro desplazamientos característicos de los protones aromáticos del núcleo tipo

kaempferol (espectro 28): Un par de dobletes a campo bajo centrados en 8,01 ppm y 6,90 ppm con constantes de acoplamiento de  $J = 8,85$  y  $8,80$  Hz respectivamente, que indicaban el acoplamiento *orto* entre H-2' y H-3' y H-6' y H-5' del anillo B de la aglicona respectivamente. El siguiente par observado fueron dos singletes anchos centrados en 6,34 ppm y 6,18 ppm, asociados a H-6 y H-8, con un acoplamiento *meta* entre ellos (anillo A).

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mostró las señales características de los 15 carbonos que conforman el núcleo del flavonol, de los cuales según el DEPT, 9 son del tipo cuaternarios (espectro 31). Las correlaciones observadas en los espectros de COSY y HMBC confirmó el núcleo de la aglicona tipo kaempferol; y tal como ocurrió con el compuesto anterior, los desplazamientos observados para el C-7 (165,71 ppm), C-3 (134,28 ppm) y el C-2 (159,01 ppm), corresponden a una sustitución exclusivamente en el C-3 de la aglicona.

El compuesto **CfH-72**, resultó ser un kaempferol triglicosilado, ya que, se observaron 3 protones anoméricos en el RMN- $^1\text{H}$ : Un doblete centrado en 5,59 ppm con un  $J = 7,40$  Hz (unión  $\beta$ ) y dos singletes anchos (unión  $\alpha$ ) centrados en 5,22 y 4,51 ppm (espectro 32). Cada uno de ellos se encuentra enlazado a carbonos metinos con desplazamientos de 100,43; 102,53 y 102,21 ppm respectivamente (espectro 33). Dos de estos glicósidos fueron identificados como ramnosas debido a la presencia de 2 dobletes centrados en 1,07 y 0,98 ppm cada uno con acoplamiento de  $J = 6,2$  Hz (espectro 32), los cuales según el espectro de HMQC se encuentran enlazados a 2 carbonos tipo  $-\text{CH}_3$  con desplazamiento de 17,52 y 17,81 ppm respectivamente (espectro 34). Por HMBC se correlacionaron los metilos con 2 metinos ubicados en 69,88 y 69,67 ppm respectivamente, característicos del carbono unido directamente al grupo metilo de este tipo de glicósido  $^{[122]}$  (espectro 35), igualmente en el espectro de COSY, se observa para cada ramnosa la correlación directa entre el protón del grupo

metilo y el enlazado al carbono metínico, ubicado en la posición 5 del anillo de piranosa (Ver espectro 436).

Por HMQC se observó la correlación entre cada uno de estos carbonos tipo metino y dos protones, uno centrado en 3,42 y el otro en 4,06 ppm respectivamente (espectro 37).

La tercera unidad glicosídica, se determinó que era una glucosa debido a la presencia, en el espectro de HMQC, de un carbono enlazado a dos protones centrados en 4,06 y 3,39 ppm con constante de acoplamiento de  $J=9,5$  Hz cada uno (dobletes), indicando el posicionamiento geminal entre ellos (espectro 38) característico de carbonos metilénicos diasterotópicos. A pesar de que en el DEPT no se observa un carbono tipo  $-CH_2$ , existe un carbono ubicado en 69,70 ppm, que mostró una menor intensidad en el DEPT con respecto a la observada en el espectro de RMN- $^{13}C$  por lo cual fue asignado a un metileno (espectro 39).

Nuevamente, como ocurrió en el caso del compuesto anterior (**CfH-55**), el desplazamiento del carbono metilénico a campo bajo, indica que el mismo se encuentra sustituido; esto se confirmó con el espectro de HMBC, en el cual se observa la correlación entre el protón centrado en 4,51 ppm (102,21 ppm) y el carbono 6 de la glucosa (69,70ppm) estableciéndose la unión (1→6) de la glucosa y una de las ramnosas. Igualmente este protón en 4,51 ppm se correlaciona a su vez con un carbono tipo  $-CH$ , en 72,04 ppm característico del C-2 de la ramnosa (espectro 40) [124]. Por todo esto se estableció el protón en 4,51ppm como H-1”.

El resto de los desplazamientos de los carbonos y protones de los anillos de la ramnosa y glucosa coinciden con los reportados para un rutinósido, excepto el C-2” de la glucosa, el cual se encuentra a campo más bajo del esperado (+3 ppm) [122]; esto

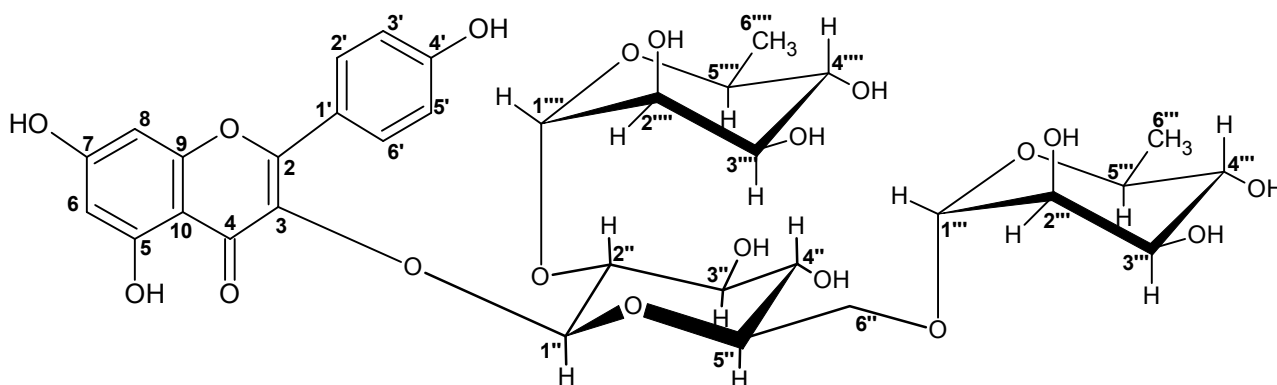
sugiere que el mismo se encuentra sustituido en el grupo hidroxilo, por la segunda unidad de ramnosa, lo cual genera el efecto de desapantallamiento sobre este carbono.

En el espectro de HMBC, se pueden apreciar las correlaciones entre el protón anómérico centrado en 5,22 ppm (102,53 ppm) de la segunda ramnosa, asignado como H-1''', y los carbonos C-2'' (78,84 ppm) de la glucosa y C-2''' (71,86 ppm) de la ramnosa, lo cual establece la unión (1→2) (espectro 41). El C-2'' está enlazado a un protón con un desplazamiento en 3,58 ppm con acoplamiento de  $J = 9$  Hz (tripleto), el cual se correlaciona por HMBC con el carbono anomérico en 100,48 ppm (espectros 42 y 43 respectivamente). El resto de los desplazamientos del anillo de piranosa coinciden con los reportados por Kazum K. y colaboradores <sup>[122]</sup> para el kaempferol 3-O-[2''-ramnosilrutinosido]; y por las correlaciones homonucleares (COSY), se pudo establecer que el metilo perteneciente a esta segunda ramnosa es el que posee el doblete centrado en 0,98 ppm.

La estructura de **CfH-72**, se pudo confirmar por el espectro de masas, realizado mediante la técnica de electro-spray en modo positivo, en donde se observa una señal en  $m/z$  765,26 correspondiente al ión molecular más sodio e hidrógeno  $[M+H+Na]^+$  (espectro 44). Un  $m/z$  741,31 correspondiente a  $[M]^+$  asociada a la fórmula molecular  $C_{33}H_{40}O_{19}$ . Igualmente se aprecia la fragmentación característica del kaempferol 3-O-[2''-ramnosilrutinosido, reportado por Luo J.-L. y colaboradores <sup>[125]</sup> correspondiente a la pérdida de 164 uma ( $m/z$  577,05) asociada a la pérdida de una unidad de ramnosa, en donde el clivaje del enlace ocurrió entre el oxígeno del carbono anomérico y el carbono metilénico de la glucosa  $[M-ORam]$ . Debido a la ausencia de  $m/z$  433, correspondiente a la pérdida de 308 uma (característico de la pérdida de una unidad de rutinosido <sup>[123]</sup>), se confirma que la glucosa se encuentra sustituida por 2 unidades de ramnosa (espectros 45).

Adicionalmente se observa la pérdida 287,13 una generando un pico de  $m/z$  476,94 correspondiente a la pérdida de sodio y la fragmentación entre el C-3 de la aglicona y el oxígeno de la glucosa  $[M-Na-C_{15}H_9O_5]^+$  (espectro 46). En cuanto al núcleo de kaempferol se aprecian los picos característicos:  $m/z$  285,82 asociado a la pérdida de las 3 unidades de azúcares  $[M-C_{18}H_{31}O_{13}]^+$ ;  $m/z$  256,12  $[Aglicona-CO]^+$ ,  $m/z$  154,89 correspondiente a una Retro Diels-Alder entre los anillos A y C de la aglicona <sup>[125]</sup> (espectros 45).

Por lo tanto la estructura del compuesto **CfH-72**, fue establecida como:



**Figura 9.** Compuesto **CfH-72**, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D(2,6-di- $\alpha$ -L-ramnopyranosil)glucopiranosido o Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido)

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos para el compuesto Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido) y **CfH-72**.

H/C	Reportado en CD <sub>3</sub> OD <sup>[122]</sup>		Experimental tomado en CD <sub>3</sub> OD	
	$\delta_H$ (ppm) a 400MHz	$\delta_C$ (ppm) a 100MHz	$\delta_H$ (ppm) a 500MHz	$\delta_C$ (ppm)* a 125MHz
2		161,22		159,01
3		134,34		134,28
4		179,30		179,23
5		163,16		162,93
6	6,18 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1Hz)	99,77	6,18 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1Hz)	99,86
7		165,60		165,71
8	6,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1Hz)	94,75	6,34 ( <i>sa</i> )	94,82
9		158,49		158,41
10		105,96		105,86
1'		123,17		123,13
2',6'	8,01 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	132,13	8,01 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8Hz)	132,11
3',5'	6,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	116,14	6,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8Hz)	116,17
4'		159,03		161,16
1''	5,59 ( <i>d</i> , <i>J</i> =7,6Hz)	100,46	5,59 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,4Hz)	100,43
2''	3,59 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,6; 8,9Hz)	79,90	3,56 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9Hz)	78,84
3''	3,53 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	78,94	**	**
4''	3,23 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 8,9Hz)	71,97	3,24 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5Hz)	71,86
5''	3,33 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 1,0; 6,1; 8,9Hz)	77,10	3,34 ( <i>m</i> )	77,53
6''	3,81 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,0; 12,5Hz) 3,37 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,0; 12,5Hz)	68,32	4,06 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5Hz) 3,39 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 9,5Hz)	69,70
1'''	4,49 ( <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)	102,29	4,51 ( <i>sa</i> )	102,21
2'''	3,57 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 3,4Hz)	72,12	3,56 ( <i>m</i> )	72,04
3'''	3,47 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,4; 9,5Hz)	72,33	3,48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5; 9,5Hz)	72,25
4'''	3,23 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5Hz)	73,83	3,24 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,5Hz)	73,78
5'''	3,41 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 6,2; 9,5Hz)	69,75	3,42 ( <i>m</i> )	69,88
6'''	1,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2Hz)	17,84	1,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2Hz)	17,52
1''''	5,22 ( <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)	102,59	5,22 ( <i>sa</i> )	102,53
2''''	3,99 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 3,4Hz)	72,41	4,01 ( <i>sa</i> )	72,33



H/C	Reportado en CD <sub>3</sub> OD <sup>[122]</sup>		Experimental tomado en CD <sub>3</sub> OD	
	$\delta_H$ (ppm) a 400MHz	$\delta_C$ (ppm) a 100MHz	$\delta_H$ (ppm) a 500MHz	$\delta_C$ (ppm)* a 125MHz
3'''	3,78 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,4; 9,7Hz)	72,33	3,81 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5; 9,5Hz)	72,25
4'''	3,33 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 9,7Hz)	74,06	3,36 ( <i>m</i> )	73,99
5'''	4,05 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 6,1; 9,7Hz)	69,96	4,06 ( <i>m</i> )	69,67
6'''	0,98 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1Hz)	17,51	0,98 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2Hz)	17,81

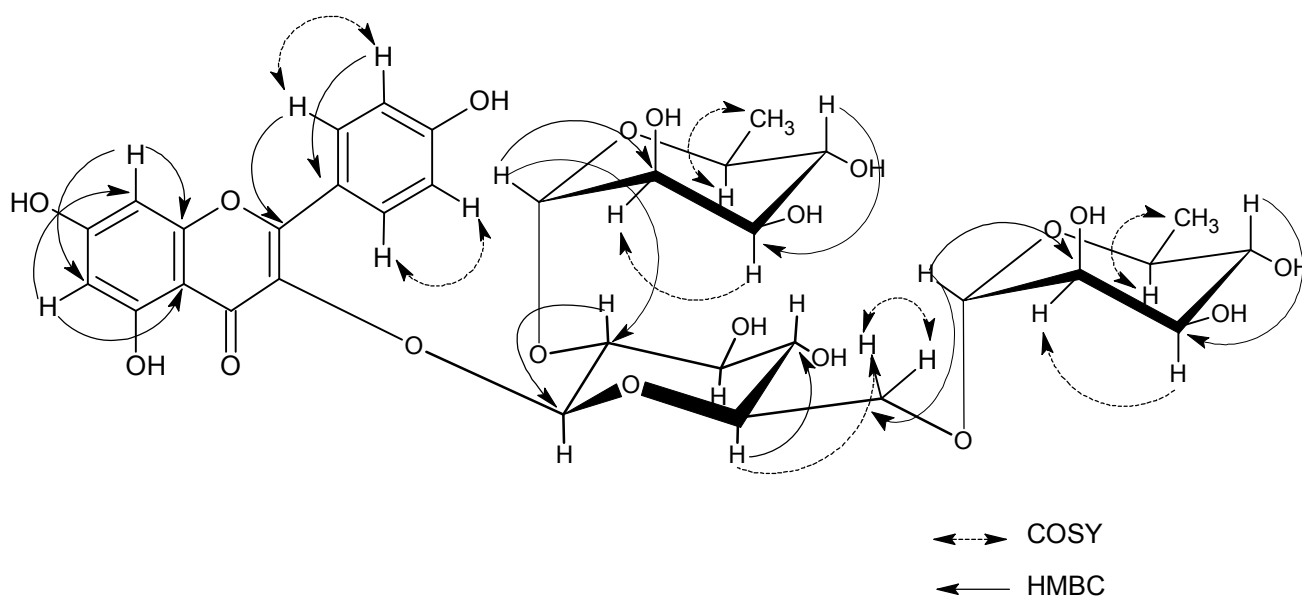
\* Los datos de RMN-<sup>13</sup>C son reportados con dos cifras significativas, con fines de comparación con la bibliografía. \*\* No se observa señal.

**Tabla 7.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos y correlaciones H-H y H-C para el compuesto **CfH-72** (Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido)).

H/C	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)*	DEPT	HMQC	HMBC	COSY
2		159,01	C			
3		134,28	C			
4		179,23	C			
5		162,93	C			
6	6,18	99,86	CH	H-6	C-5; C-8; C-10	
7		165,71	C			
8	6,38	94,82	CH	H-8	C-6; C-7; C-9; C-10	
9		158,41	C			
10		105,86	C			
1'		123,13	C			
2',6'	8,01	132,11	CH	H-2'; H-6'	C-2; C-1'; C-4'	H-3'; H-5'
3',5'	6,89	116,17	CH	H-3'; H-5'	C-1'; C-4'	H-2'; H-6'
4'		161,16	C			
1''	5,59	100,43	CH	H-1''		
2''	3,56	78,84	CH	H-2''	C-1''; C-2''; C-4''	
3''	**	**				
4''	3,24	71,86	CH	H-4''		
5''	3,34	77,53	CH	H-5''	C-4''	H-6 <sub>a</sub> ''

6 <sub>a</sub> ''	4,06	69,70	CH <sub>2</sub>	H-6 <sub>a</sub> ''		H-6 <sub>b</sub> ''
6 <sub>b</sub> ''	3,39			H-6 <sub>b</sub> ''		H-6 <sub>a</sub> ''
1'''	4,51	102,21	CH	H-1'''	C-6'', C-6''	
2'''	3,56	72,04	CH	H-2'''		
3'''	3,48	72,25	CH	H-3'''	C-4'''	H-2'''; H-4'''
4'''	3,24	73,78	CH	H-4'''	C-3'''	H-3'''
5'''	3,42	69,88	CH	H-5'''		H-6'''
6'''	1,07	17,52	CH <sub>3</sub>	H-6'''		H-5'''
1''''	5,22	102,53	CH	H-1''''	C-4'''; C-2'''	
2''''	4,01	72,33	CH	H-2''''	C-4''''	
3''''	3,81	72,25	CH	H-3''''	C-4''''	H-2''''; H-4''''
4''''	3,36	73,99	CH	H-4''''	C-3''''; C-2''''	H-3''''
5''''	4,06	69,67	CH	H-5''''		H-6''''
6''''	0,98	17,81	CH <sub>3</sub>	H-6''''		H-5''''

\* Los datos de RMN-<sup>13</sup>C son reportados con dos cifras significativas, con fines de comparación con la bibliografía. \*\* No se observa señal.



**Figura 10.** Correlaciones homonucleares (**COSY**) y heteronucleares (**HMBC**) para el compuesto **CfH-72**, Kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido).

## 8. Conclusiones

Se realizó el estudio fitoquímico tanto de las ramas del periodo seco y las hojas del período lluvioso, utilizando para ello la técnica de cromatografía flash, con elución en gradiente de dos sistemas de solventes binarios diferentes. De las ramas se aisló un éster de ácido graso de  $\beta$ -sitosterol, con rango de fusión de (75-77) $^{\circ}$ C y un Rf de 0,79 al ser desarrollado en CCF con en el sistema de solventes tolueno-acetato de etilo (93:7; v/v).

En el caso de las hojas, se obtuvieron 2 compuestos flavonoidales, identificados como kaempferol 3-O-rutinósido y kaempferol 3-O-(2''ramnosilrutinósido), de rango de fusión de (167-169) $^{\circ}$ C y (195-197) $^{\circ}$ C, respectivamente. Este es el primer reporte del aislamiento del kaempferol 3-O-(2''ramnosilrutinósido) en el género.

## 9. Recomendaciones

- No realizar la hidrólisis del extracto metanólico, debido a que no se observaron diferencias significativas entre las fracciones sometidas a extracciones básicas después de realizada la hidrólisis, y aquellas extraídas directamente del extracto metanólico.
- Trabajar con las fracciones acuosas, una vez realizadas las extracciones básicas y particiones de solubilidad con diferentes solventes orgánicos.
- Realizar la separación de los metabolitos secundarios de esta especie (independientemente del periodo de recolección), por Cromatografía flash, para minimizar la adsorción al soporte sólido.
- Aislar las antraquinonas presentes en las ramas de esta especie.
- Completar el estudio en los cambios de perfil químico de las ramas y hojas de *Cassia fruticosa* Mill, colectados en periodos seco y lluvioso.

## 10. Referencias.

- 
- [1] Marcano D. y Hasegawa M., (2002), "Fitoquímica Orgánica", CDCH-UCV, 2<sup>da</sup> edición, Caracas - Venezuela, Cap. 1 y 2, 212-214, 228-230.
- [2] Eisenberg D., Kessler R., Foster C., Norlock F., Calkins D. y Delbanco T., (1993), "Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs and patterns of use", *N. Engl. J. Med.*, **328**(4), 246-252.
- [3] Tulp M. y Bohlin L., (2004), "Unconventional natural sources for future drug discovery", *Drug Discov. Today*, **9**(10), 450-458.
- [4] Ávalos A. y Pérez-Urria E., (2009), "Metabolismo secundario de plantas", *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, **2**(3), 119-145.
- [5] Sepúlveda G., Porta H. y Rocha M. (2003). "La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas". *Rev. Mex. Fitopatología*, **21**(3), 355-363.
- [6] Mahidol C., Ruchirawat S., Prawat H., Pisutjaroenpong S., Engprasert S., Chumsri P., Tengchaisri T., Sirisinha S. y Picha P., (1998), "Biodiversity and natural product drug discovery", *Pure & Appl. Chem.*, **70**(11), 2065-2072.
- [7] Geerlings A., Hallard D., Martinez A., Lopes I., Van der Heiden R. y Veerpoorte R., (1999), "Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* Ledgeriana hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*", *Plant Cell Rep.*, **19**(2), 191-196.
- [8] a) Khan M.R., Kihara M. y Omoloso A.D., (2001), "Antimicrobial activity of *Cassia alata*", *Fitoterapia*, **72**(5), 561-564. b) Ali M.S., Azhar I., Amtul Z., Ahmad V.U. y Usmanghani K., (1999), "Antimicrobial screening of some Caesalpiniaceae", *Fitoterapia*, **70**(3), 299-304. c) Inamori Y., Kato Y., Kubo M., Yasuda M., Baba K. y Kozawa M., (1984), "Physiological activities of 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene isolated from the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib", *Chem. Pharm. Bull.* **32**(1), 213-218.

- 
- d)** Ayo R., Amupitan J. y Zhao J., (2007), "Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl.anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl", *Afr. J. Biotechnol.*, **6**(11), 1276-1279.
- [9] **a)** Palanichamy S. y Nagarajan S., (1990), "Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract", *J. of Ethnopharmacol.*, **29**(3), 337-340. **b)** Inamori Y., Kubo M., Kato Y., Yasuda M., Baba K. y Kozawa M. (1984), "The antifungal activity of stilbene derivative", *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(2), 801-804. **c)** Caceres A., Lopez B.R., Giron M.A y Logemann H., (1991), "Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.1. Screening for antimycotic activity of 44 plan extracts", *J. Ethnopharmacol.*, **31**(3), 263-276. **d)** Silva G.H., Tejes H.L, Zanardi L.M., Young M.C., Eberlin M.N., Hadad R., Pfenning L.H., Costa-Neto C.M., Castro-Gamboa I., Bolzani V. y Araújo A., (2006), "Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassia*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae)", *Phytochemistry*, **67**(17), 1964-1969. **e)** Kim Y-M., Lee C-H., Kim H-G. y Lee H-S., (2004), "Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show antifungal property against phytopathogenic fungi", *J. Agric. Food Chem.*, **52**(20), 6096-6100.
- [10] **a)** Morales M. y Bachiller L., (2007), "Revisión de la literatura sobre la toxicidad del sen", *Rev. Fitoterapia*, **7**(1), 31-41. **b)** Srivastava M., Srivastava S., Khatoon S., Rawat A.K.S., Mehrotra S. y Pushpangadan P., (2006), "Pharmacognostical evaluation of *Cassia angustifolia* seeds", *Pharm. Biol.*, **44**(3), 202-207. **c)** Chidume F.C., Kwanashie H.O., Adekeye J.O., Wambebe C. y Gamaniel K.S., (2002), "Antinociceptive and smooth muscle contracting activities of the methanolic extract of *Cassia tora* leaf", *J. Ethnopharmacol.*, **81**(2), 205-209.
- [11] **a)** Rajeswari R., Thejomoorthy P., Mathuram L.N. y Narayan R., (2006), "Anti-inflammatory activity of *Cassia fistula* linn. bark extracts in sub-acute models of inflammation in rats, *Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci.*, **2**(5), 193-199. **b)** Jain S., Jain R., Sharma R. y Capasso F., (1997), "Pharmacological investigation of *Cassia*

- 
- italica*”, *J. Ethnopharmacol.*, **58**(2), 135-142. **c)** Chidume F., Gamaniel K., Amos S., Akah P., Obodozie O. y Wambebe C., (2001), “Pharmacological activity of the methanolic extract of *Cassia nigricans* leaves”, *Indian J. Pharmacol.*, **33**(5), 350-356. **d)** Sadique J., Chandra T., Thenmozhi V. y Elango V., (1987), “Biochemical modes of action of *Cassia occidentalis* and *cardiospermum halicacabum* in inflammation”, *J. Ethnopharmacol.*, **19**(2), 201-212. **e)** Adzu B., Abbah J., Vongtau H. y Gamaniel K., (2003), “Studies on the use of *Cassia singueana* in malaria ethnopharmacy”, *J. Ethnopharmacol.*, **88**(2-3), 261-267. **f)** Viegas C., Alexandre-Moreira M.S., Manssour C.A., Barreiro E.J., Bolzani V. y Palhares A.L., (2008), “Antinociceptive profile of 2,3,6-Trisubstituted piperidine alkaloids: 3-O-Acetyl-spectaline and semi-synthetic derivatives of (-)-spectaline”, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**(4), 407-412.
- [12] **a)** Mahida Y. y Mohan J.S.S., (2006), “Screening of indian plants extracts for antibacterial activity”, *Pharm. Biol.*, **44**(8), 627-631. **b)** Hatano T., Uebayashi H., Ito H., Shiota S., Tsuchiya T. y Yoshida T., (1999), “Phenolic constituents of *Cassia seeds* and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(8), 1121-1127. **c)** Duraipandiyam V. y Ignacimuthu S., (2007), “Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant”, *J. Ethnopharmacol.*, **112**(3), 590-594. **d)** Ayo R.G., Amupitan J.O. y Zhao Y., (2007), “Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl”, *Afr. J. Biotechnol.*, **6**(11), 1276-1279.
- [13] **a)** Palanichamy S. y Nagarajan S., (1990), “Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-O-sophoroside”, *J. Ethnopharmacol.*, **29**(1), 73-78.
- [14] **a)** Kumaran A. y Karunakaran R.J., (2007), “Antioxidant activity of *Cassia auriculata* flowers”, *Fitoterapia*, **78**(1), 46-47. **b)** Luximon A., Bahorun T., Soobrattee M. y Aruoma O., (2002), “Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*”, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(18),

- 
- 5042-5047. **c)** Kaur G., Alam M., Jabbar Z., Javed K. y Athar M., (2006), "Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers", *J. Ethnopharmacol.*, **108**(3), 340-348.
- [15] **a)** Sydiskis R.J., Owen D.G., Lohr J.L., Rosler K.A. y Blomster R.N., (1991), "Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants", *American Society for Microbiology*, **35**(12), 2463-2466. **b)** Tewtrakul S., Subhadhirasakul S., Rattanasuwan P. y Puripattanvong J., (2007), "HIV-1 protease inhibitory substances from *Cassia garrettiana*", *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **29**(1), 145-149.
- [16] **a)** Moshi M.J. y Mbwambo Z.H., (2002), "Experience of Tanzanian traditional healers in the management of non-insulin dependent diabetes mellitus", *Pharm. Biol.*, **40**(7), 552-560. **b)** Palanichamy S., Nagarajan S. y Devasagayam M., (1988), "Effect of *Cassia alata* leaf extract on hyperglycemic rats", *J. Ethnopharmacol.*, **22**(1), 81-90. **c)** Nirmala A., Eliza J., Rajalakshmi M., Priya E. y Daisy P., (2008), "Effect of hexane extract of *Cassia fistula* barks on blood glucose and lipid profile in Streptozotocin diabetic rats", *I. J. Pharmacol.*, **4**(40), 292-296.
- [17] **a)** Bhakta T., Mukherjee P.K., Mukherjee K., Banerjee S., Mandal S.C., Maity T.K., Pal M. y Saha B.P., (1999), "Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extracts", *J. Ethnopharmacol.*, **66**(3), 277-282. **b)** Ahmad B., Khan N.A., Ahmad G. y Inamuddin M., (2005), "Hepatoprotective effect of the seed of *Cassia sophera*, linn. Var. *Purpurea*, roxb. against CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in albino rats", *Pharmacognosy magazine*, **1**(2), 68-70. **c)** Jafri M.A., Subhani M.J., Javed K. y Singh S., (1999), "Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats", *J. Ethnopharmacol.*, **66**(3), 355-361.
- [18] **a)** Prasanna R., Harish C.C., Pichai R., Sakthisekaran D. y Gunasekaran P., (2009), "Anti-cancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract *in vitro* through cell cycle arrest and induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines", *Cell Biol. I.*,



- 
- 33**(2), 127-134. **b)** Gupta M., Mazumder U.K., Rath N. y Mukhopadhyay D.K., (2002), "Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma", *J. Ethnopharmacol.*, **72**(1), 151-156. **c)** Inamori Y., Ogawa M., Tsujibo H., Baba K., Kozawa M. y Nakamura H., (1991), "Inhibitory effects of 3,3',4,5'-tetrahydroxystilbene and 3,3',4,5'-tetrahydroxybibenzyl, the constituents of *Cassia garrettiana* on antigen-induced histamine release in vitro", *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(12), 3353-3354. **d)** Cherng J-M., Chiang W., Wang J-H., Lin C-M., Lee C-Y., Shih C-M. y Chiang L-C., (2008), "Anthraquinones of edible wild vegetable *Cassia tora* stimulate proliferation of human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and secretion of interferon-gamma or interleukin 10", *Food Chem.*, **107**(4), 1576-1580.
- [19] **a)** Kanno M, Shibano T., Takido M. y Kitanaka S., (1999), "Antiallergic agent from natural sources. 2. Structures and leukotriene release-inhibitory effect of toroside B y torosachryson 8-O-6"-malonyl  $\beta$ -gentiobioside from *Cassia torosa* Cav.", *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(7), 915-918.
- b)** Kitanaka S., Nakayama T., Shibano T., Ohkoshi E. y Takido M., (1998), "Antiallergic agent from natural sources. Structures and inhibitory effect of histamine release of naphthopyrone glycosides from seeds of *Cassia obtusifolia* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(10), 1650-1652.
- [20] Casale I., (1997), "La Fitotoponimia de los Pueblos de Venezuela", Ediciones de la biblioteca de la UCV, 200-201, 264, 344.
- [21] Schnee L., "Plantas Comunes de Venezuela". Ediciones de la biblioteca de la UCV, 596.
- [22] Woodson R.E. Jr. y Schery R.W. Jr. (1951), "Annals of the Missouri Botanical Garden", Flora of Panama, Parte V, **38**(3), 80-81.
- [23] Disponible en [www.banana-tree.com/Product/CASSIA-fruticosa-SKU393-375.htm](http://www.banana-tree.com/Product/CASSIA-fruticosa-SKU393-375.htm).
- [24] Skoog D.A, Holler J.A. y Nieman T.A., (2001), "Principios de Análisis Instrumental", McGraw-Hill, 5<sup>ta</sup> edición, Cap. 26, 731-748.

---

[25] Fuente electrónica:

<https://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r49955.PDF>

[26] Biotage, "Flash Purification: Cartridges & Method Development" (manual del equipo).

[27] González A.G., Bermejo J., Barba B., Valencia E. y Dominguez X., (1992), "Anthraquinones from *Cassia greggii*", *Phytochemistry*, **31**(1), 255-258.

[28] Singh J. y Sing J., (1986), "A bianthraquinone and a triterpenoid from the seeds of *Cassia hirsuta*", *Phytochemistry*, **25**(8), 1985-1987.

[29] Watson-Samudio, H., (1998), "Evaluación fitoquímica de las hojas de *Senna alata* y *Cassia fruticosa*", tesis doctoral de Universidad de Costa Rica.

[30] Meena R. y Kalidhar S., (1998), "Phytochemical study of *Cassia fruticosa* flowers", *J. Med. Arom. Pl. Sci.*, **20**(1), 3-4.

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

[32] Dehmlow E., Ree T. y Guntenhöner M., (1998), "2,4-trans-7,4'-dihydroxy-4-methoxyflavan from *Cassia abbreviata*", *Phytochemistry*, **49**(6), 1805-1806.

[33] Gupta D. y Singh J., (1991), "Flavonoid glycosides from *Cassia alata*", *Phytochemistry*, **30**(8), 2761-2763.

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

[35] Kelly T.R., Ma Z. y Xu W., (1994), "Revision of the structure of alatinone to emodin", *Phytochemistry*, **36**(1), 253-254.

[36] Moriyama H., Iizuka T. y Nagai M., (2001), "A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation", *Yakugaku Zasshi*, **121**(11), 817-820.

[37] Moriyama H., Iizuka T., Nagai M. y Murata Y., (2003), "HPLC quantification of kaempferol-3-O-gentibioside in *Cassia alata*", *Fitoterapia*, **74**(5), 425-430.

- 
- [38] Fernand V.E., Dinh D.T., Washington S.J., Fakayode S.O., Losso J.N., van Ravenswaay R.O. y Warner I.M., (2008), "Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of High Performance Liquid Chromatography", *Talanta*, **74**(4), 896-902.
- [39] Lemli J. y Cuveele J., (1975), "Les hétérosides anthroniques de *Cassia angustifolia* pendant le développement de la plante", *Phytochemistry*, **14**(5-6), 1397-1401.
- [40] Hayashi S., Yoshida A., Tanaka H., Mitani Y. y Yoshizawa K., (1980), "Analytical studies on the active constituents in crude drugs IV. Determination of sennosides in senna and formulations by High Performance Liquid Chromatography", *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(2), 406-412.
- [41] Tanaka H., Murata R., Yoshida A. y Hayashi S., (1982), "Analytical studies on the active constituents in crude drugs V. The structure of sennoside G, a new glucoside from senna". *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(5), 1550-1556.
- [42] Kinjo J., Ikeda T., Watanabe K. y Nohara T., (1994), "An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves", *Phytochemistry*, **37**(6), 1685-1687.
- [43] Wang Z., Wu Q., Tang L., Fu M., He Y., Gong Q. y Huang L., (2007), "Two new glycosides from the genus of *Cassia*", *Chinese Chem. Lett.*, **18**(10), 1218-1220.
- [44] Wu Q.P., Wang Z.J., Tang L.Y., Fu M.H. y He Y., (2009), "A new flavonoid glucoside from *Cassia angustifolia*", *Chinese Chem. Lett.*, **20**(3), 320-321.
- [45] Sircar P.K., Dey B., Sanyal T., Ganguly S.N. y Sircar S.M., (1970) "Gibberellic acid in the floral parts of *Cassia fistula*", *Phytochemistry*, **9**(4), 735-736.
- [46] Morimoto S., Nonaka G-I., Chen R-F. y Nishioka I., (1988), "Tannins and related compounds. LXI. Isolation and structures of novel bi and triflavanoids from the leaves of *Cassia fistula* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(1), 39-47.
- [47] Kashiwada Y., Iizuka H., Yoshioka K., Chen R-F., Nonaka G-I. y Nishioka I., (1990), "Tannins and related compounds. XCIII. Occurrence of enantiomeric proanthocyanidins in the leguminosae plants, *Cassia fistula* L. and *C. javanica* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(4), 888-893.

- 
- [48] Kuo Y-H., Lee P-H. y Wein Y-S., (2002), "For new compounds from the seeds of *Cassia fistula*", *J. Nat. Prod.*, **65**(8), 1165-1167,
- [49] Cano L., Hernandez O. y Rangel J., (1990), "Seasonal variations in the content of sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula* populations", *Phytochemistry*, **29**(10), 3095-3099.
- [50] Tiwari R. y Singh J., (1979), "A new anthraquinone digalactoside from *Cassia laevigata* pods", *Phytochemistry*, **18**(2), 347.
- [51] Singh J. y Tiwari R., (1979), "Flavonoids from the leaves of *Cassia laevigata*", *Phytochemistry*, **18**(12), 2060-2061.
- [52] Singh J., Tiwari A. y Tiwari R., (1980), "Anthraquinones and flavonoides of *Cassia laevigata* roots", *Phytochemistry*, **19**(6), 1253-1254.
- [53] Singh J., (1982), "Two rhamnetin digalactosides and an oleanolic acid digalactoside from the flowers of *Cassia laevigata*", *Phytochemistry*, **21**(7), 1832-1833.
- [54] Alemayehu G., Abegaz B., Snatzke G. y Duddeck H., (1988) "Bianthraquinones and a spermidine alkaloid from *Cassia floribunda*", *Phytochemistry*, **27**(10), 3255-3258.
- [55] Jones L., Bartholomew B., Latif Z., Sarker S. y Nash R., (2000), "Constituents of *Cassia laevigata*", *Fitoterapia*, **71**(5), 580-583.
- [56] Hata K., Baba K. y Kozawa M., (1978), "Chemical studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. I. Anthraquinones including cassialoin, a new anthrone C-Glycoside", *Chem. Pharm. Bull.*, **26**(12), 3792-3797.
- [57] Hata K., Baba K. y Kozawa M., (1979), "Chemical studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. II. Nonanthraquinonic constituents", *Chem. Pharm. Bull.*, **27**(4), 984-989.
- [58] Baba K., Maeda K., Tabata Y., Doi M. y Kozawa M., (1988), "Chemical studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. III. Structures of two new polyphenolic compounds", *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(8), 2977-2983.
- [59] Baba K., Kido T., Maeda K., Taniguchi M. y Kozawa M., (1992), "Two stilbenoids from *Cassia garrettiana*", *Phytochemistry*, **31**(9), 3215-3218.

- 
- [60] Baba K., Kido T., Maeda K., Taniguchi M. y Kozawa M., (1994), "Stilbenoids from *Cassia garrettiana*", *Phytochemistry*, **36**(6), 1509-1513.
- [61] Takahashi S., Takido M., Sankawa U. y Shibata S., (1976), "Germichryson, a hydroanthracene derivative from seedlings of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **15**(8), 1295-1296.
- [62] Takahashi S., Kitanaka S., Takido M., Sankawa U. y Shibata S. (1977), "Phlegmacins and anhydrophlegmacinquinones: dimeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **16**(7), 999-1002.
- [63] Takido M., Kitanaka S., Takahashi S. y Tanaka T., (1982) "Germitorosone and methylgermitorosone, two hydroanthracenes derivatives from seedlings of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **21**(2), 425-427.
- [64] Kitanaka S. y Takido M., (1982), "Dimeric hydroanthracenes from the unripe seeds of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **21**(8), 2103-2106.
- [65] Kitanaka S., Takahashi M. y Takido M., (1990), "Dihydroeleutherinol, a dihydronaphthopyran derivative from unripe seeds of *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **29**(1), 350-351.
- [66] Kitanaka S. y Takido M., (1984), "Torosachryson and physcion gentibiosides from the seeds of *Cassia torosa*", *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(9), 3436-3440.
- [67] Kitanaka S., Ogata K. y Takido M., (1989), "Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* Cav. I. The structures of two new C-glycosilflavones", *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(9), 2441-2444.
- [68] Kitanaka S. y Takido M., (1991), "Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* Cav. II. The structures of two novel flavones, torosaflavone C y D", *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(12), 3254-3257.
- [69] Kitanaka S. y Takido M., (1992), "Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* Cav. III. The structures of two new flavones glycosides", *Chem. Pharm. Bull.*, **40**(1), 249-251.

- 
- [70] Kitanaka S. y Takido M., (1995), "(S)-5,7'-Biphyscion 8-glucoside from *Cassia torosa*", *Phytochemistry*, **39**(3), 717-718.,
- [71] Kitanaka S. y Takido M., (1985), "Studies on the constituents of the roots of *Cassia torosa*. I. The structures of two new naphthalenic lactones", *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(11), 4912-4915.
- [72] Kitanaka S. y Takido M., (1990), "Studies on the constituents of the roots of *Cassia torosa*. II. The structures of two dimeric tetrahydroanthracenes", *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(5), 1292-1294.
- [73] Kitanaka S. y Takido M., (1994), "Bitetrahydroanthracenes from flowers of *Cassia torosa* Cav". *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(12), 2588-2590.
- [74] Krishna R., Seshagiri J. y Vimaladevi M., (1979), "Phytochemical investigation of *Cassia absus* (roots and leaves)", *J. Nat. Prod.*, **42**(3), 299-300.
- [75] Rao G., Kumar P., Dhandapani V., Krishna T. y Hayashi T., (2000), "Constituents of *Cassia auriculata*", *Fitoterapia*, **71**(1), 82-83.
- [76] Monache G.D, De Rosa M.C., Scurria R., Monacelli B., Pasqua G., Dall'Olio G. y Botta B., (1991), "Metabolites from in vitro cultures of *Cassia didymobotrya*", *Phytochemistry*, **30**(6), 1849-1854.
- [77] Verma R.P. y Sinha K.S. (1996), "Anthraquinone- $\beta$ -D-glucoside from *Cassia grandis*", *I. J. Pharmacognosy*, **34**(4), 290-294.
- [78] Gonzalez A., Barrero J., Davila B., Valencia E. y Dominguez X., (1992), "Anthraquinones from *Cassia greggii*", *Phytochemistry*, **31**(1), 255-258.
- [79] Singh J. y Sinhg J., (1986), "A bianthraquinone and a triterpenoid from the seeds of *Cassia hirsuta*", *Phytochemistry*, **25**(8), 1985-1987.
- [80] Rao K.V., Damu A.G., Jayaprakasam B. y Gunasekar D., (1999), "Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*", *J. Nat. Prod.*, **62**(2), 305-306.
- [81] Kazmi M., Malik A., Hameed S., Akhtar N. y Noor S., (1994), "An anthraquinone derivative from *Cassia italica*", *Phytochemistry*, **36**(3), 761-763.

- 
- [82] El-Sayed N., Abu A.M., El-Khrisy E.A. y Mabry T., (1992), "Flavonoids of *Cassia italica*", *Phytochemistry*, **31**(6), 2187.
- [83] Morales A., (1971), "Aliphatic alcohols,  $\beta$ -sitosterols and alkaloids in *Cassia jahnii*", *Phytochemistry*, **10**(2), 2255-2256.
- [84] Chaudhuri K. y Chawla H.H., (1987), "Anthraquinones and terpenoids from *Cassia javanica* leaves", *J. Nat. Prod.*, **50**(6), 1183-1189.
- [85] Tiwari R.D. y Yadava O.P., (1971), "The flavonoids of *Cassia javanica* flowers", *Phytochemistry*, **10**(2), 2256-2263.
- [86] Tiwari R.D. y Singh J., (1979), "Anthraquinone rhamnosides from *Cassia javanica* root bark", *Phytochemistry*, **18**(1), 906.
- [87] Singh J. y Sinch J., (1987), "Two anthraquinone glycosides from *Cassia marginata* roots", *Phytochemistry*, **26**(2), 507-508.
- [88] Rizvi S., Lal J. y Gupta P., (1971), "Examination of a phytostein and a sterol from *Cassia* plants", *Phytochemistry*, **10**(3), 670.
- [89] Kitanaka S. y Takido M., (1992), "Demethyltorosaflavones C and D from *Cassia noname*" *Phytochemistry*, **31**(8), 2927-2929.
- [90] Hatano T., Yamashita A., Hashimoto T., Ito H., Kubo N., Yoshiyama M., Shimura s., Itoh Y., Okuda T. y Yoshida T., "Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia noname*", *Phytochemistry*, **46**(5), 893-900.
- [91] Kitanaka S. y Takido M., (1985), "Anthraquinoids from *Cassia noname*", *J. Nat. Prod.*, **48**(5), 849.
- [92] Sekar M., Rajendra K.J., Sidduraju P. y Janardhanan K., (1999), "New anthraquinones from *Cassia obtusa*", *Fitoterapia*, **70**(3), 330-332
- [93] Kitanaka S. y Takido M., (1984), "Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia* Linn. The structures of three new anthraquinones", *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(3), 860-864.
- [94] Tang L., Wang Z., Fu M., He Y., Wu H. y Huang L., (2008), "A new anthraquinone glycoside from seeds of *Cassia obtusifolia*", *Chinese Chem. Lett.*, **19**(9), 1083-1085.

- 
- [95] Yun-Choi H. y Hoon J., (1990), "Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, V. Anthraquinones from the seeds of *Cassia obtusifolia* and related compounds", *J. Nat. Prod.*, **53**(3), 630-633.
- [96] Lal J. y Gupta P.C., (1973), "Physcion and phytosterol from the roots of *Cassia occidentalis*", *Phytochemistry*, **12**(5), 1186.
- [97] Hatano T., Mizuta S., Ito H y Yoshida T., (1999), "C-Glycosidic flavonoids from *Cassia occidentalis*", *Phytochemistry*, **52**(7), 1379-1383.
- [98] Kitanaka S. y Takido M., (1989), "Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(2), 511-512.
- [99] Kitana S., Igarashi H. y Takido M., (1985), "Formation of pigments by the tissue culture of *Cassia occidentalis*", *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(3), 971-974.
- [100] Messana I., Ferrari F., Cavalcanti M. y Morace G., (1991), "An anthraquinone and three naphthopyrone derivatives from *Cassia pudibunda*", *Phytochemistry*, **30**(2), 708-710.
- [101] Li X-C., Dunbar C., ElSohly H., Jacob M., Nimrod A., Walker L. y Clark A., (2001), "A new naphthopyrone derivative from *Cassia quinquangulata* and structural revision of quinquangulin and its glycosides", *J. Nat. Prod.*, **64**(9), 1153-1156.
- [102] Tiwari R.D. y Bajpai M., (1977), "The flavonoids of *Cassia renigera* stem bark", *Phytochemistry*, **16**(6), 798-799.
- [103] Koyama J., Morita I., Tagahara K. y Aqil M., (2001), "Bianthraquinones from *Cassia siamea*", *Phytochemistry*, **56**(8), 849-851.
- [104] Singh Y. y Sharma P., (1992), "Anthraquinones from heartwood of *Cassia siamea*", *Phytochemistry*, **31**(6), 2176-2177.
- [105] Malhotra S. y Misra K., (1982), "Anthraquinones from *Cassia sophera* heartwood", *Phytochemistry*, **21**(1), 197-199.
- [106] Dass A., Joshi T. y Shukla S., (1984), "Anthraquinones from *Cassia sophera* root bark", *Phytochemistry*, **23**(11), 2689-2691.



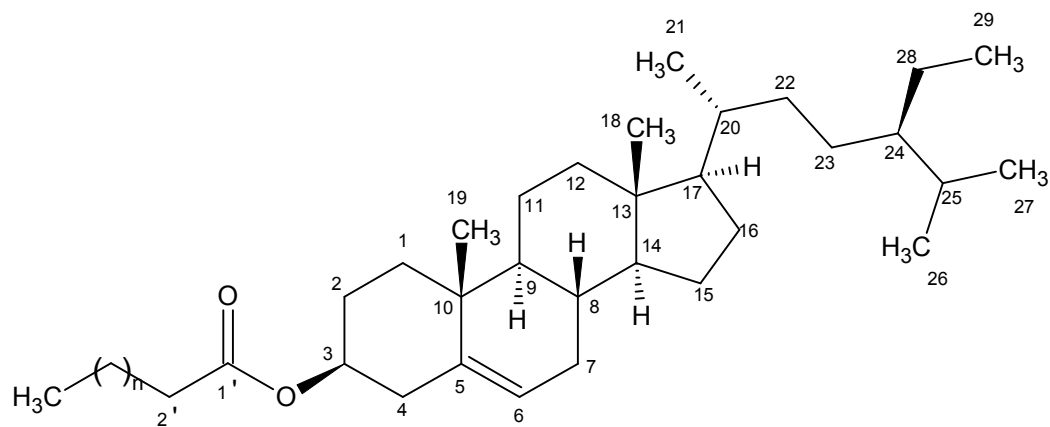
- 
- [107] Joshi T., Dass A., Pandey S. y Shukla S., (1985), "An anthraquinone 3-neohesperidoside from *Cassia sophera* root bark", *Phytochemistry*, **24**(12), 3073-3074.
- [108] Jang D.S, Lee G.Y., Kim Y.S., Lee Y.M., Kim C-S., Yoo J.L. y Kim J.S., (2007), "Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase", *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(11), 2207-2210.
- [109] Wong S-M., Wong M.M., Seligmann O. y Wagner H., (1989), "Anthraquinone glycosides from the seeds of *Cassia tora*", *Phytochemistry*, **28**(1), 211-214.
- [110] Lee H.J., Choi J.S., Jung J.H. y Kang S.S., (1998), "Alaternin glucoside isomer from *Cassia tora*", *Phytochemistry*, **49**(5), 1403-1404.
- [111] Zhu L., Yu S., Zeng X., Fu X. y Zhao M., (2008), "Preparative separation and purification of five anthraquinones from *Cassia tora* L. by high-speed counter-current chromatography", *Sep. Purif. Technol.*, **63**(3), 665-669.
- [112] Monache F.D., D'Albuquerque I.L., Chiappeta A.A. y De Mello J.F., (1991), "A bianthraquinone and 4'-O-methyl-ent-gallocatechin from *Cassia trachypus*", *Phytochemistry*, **31**(1), 259-261.
- [113] Pittier H., (1978), "Manual de las plantas usuales de Venezuela", Fundación Eugenio Mendoza, Caracas-Venezuela.
- [114] Bermúdez, J., (2010), "Estudio fitoquímico de cuatro plantas de uso tradicional en el control de la diabetes mellitus y su posible actividad biológica sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatas", Tesis doctoral Universidad Central de Venezuela (en desarrollo).
- [115] Wagner H. y Blatt S., (2001), "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas". Springer, 2<sup>da</sup> edición, 195-197, 359.
- [116] Boul A.D., Blunt J.W., Browne J.W., Kumar V., Meakins G.D., Pinhey J.T. y Thomas V.E.M., (1971), "Microbial hydroxylation of steroids. Part II. Structural information and infrared spectrometry: carbonyl, perturbed methylene, and hydroxyl vibrations of steroidal ketones and alcohols", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1130-1136.

- 
- [117] Pretsch E., Bühlmann P. y Affolter C., (2000), "Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data", Springer, 3<sup>era</sup> edición, 245-292.
- [118] Pateh U.U., Haruna A.K., Garba M., Iliya I., Sule I.M., Abukabar M.S. y Ambi A.A., (2009), "Isolation of stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* pyer and kotchy (Araceae)", *Nig. J. Pharm Sci.*, **8**(1), 19-25.
- [119] Parmar V.S., Jain S.C., Gupta S., Talwar S., Rajwanshi V.E., Kumar R., Azim A., Malhotra S., Kumar N., Jain R., Sharma N.K., Tyagi O.D., Lawrie S.J., Errington W., Howarth O.W., Olsen C.E., Singh S.K. y Wengel J., (1998), "Polyphenols and alkaloids from *piper* species", *Phytochemistry*, **49**(4), 1069-1078.
- [120] Bagri P., Ali M., Sultana S. y Acri V., (2009), "New sterol esters from the flowers of *Panica granatum* Linn.", *J. of Asian Natural Products Research*, **11**(8), 710-715.
- [121] Pizzolatti, M.G., Cunha A., Szpoganicz B. y De Sousa E., (2003), "Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (leguminosae)", *Quim. Nova*, **26**(4), 466-469.
- [122] Kazuma K., Noda N. y Suzuki M., (2003), "Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*", *Phytochemistry*, **62**(2), 229-237.
- [123] Stobiecki M., (2000), "Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides", *Phytochemistry*, **54**(3), 237-256.
- [124] Song N., Xu W., Guan H., Liu X., Wang Y. y Nie X., (2007), "Several flavonoids from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic.", *Asian J. Tradic. Med.*, **2**(5), 218-222.
- [125] Luo J.-L., Lu F.-L., Liu Y.-C., Shih Y.-C. y Lo C.-F., (2013), "Fingerprint analysis of *Ginkgo biloba* extract and ginkgo semen in preparations by LC-Q-TOF/MS", *J. Food Drug Anal.*, **21**(1), 27-39.

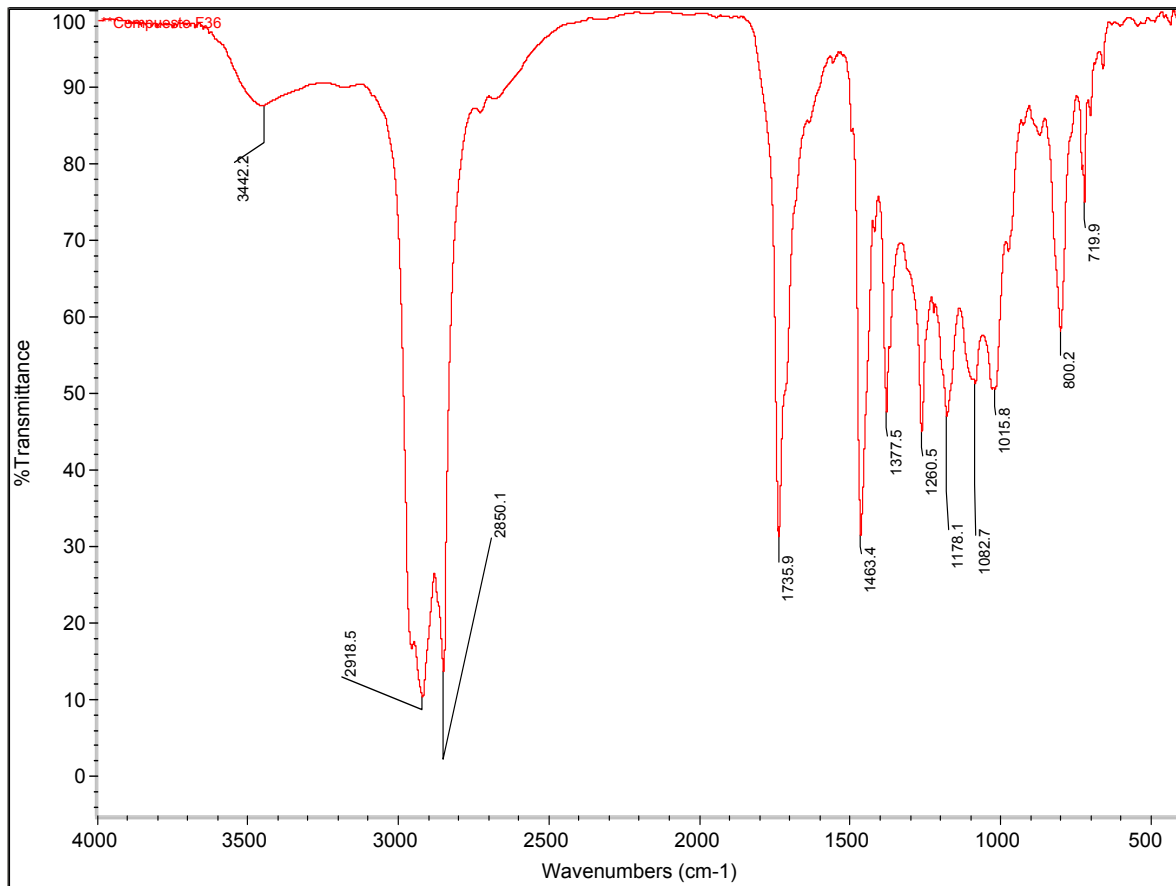
---

## 11. Apéndice

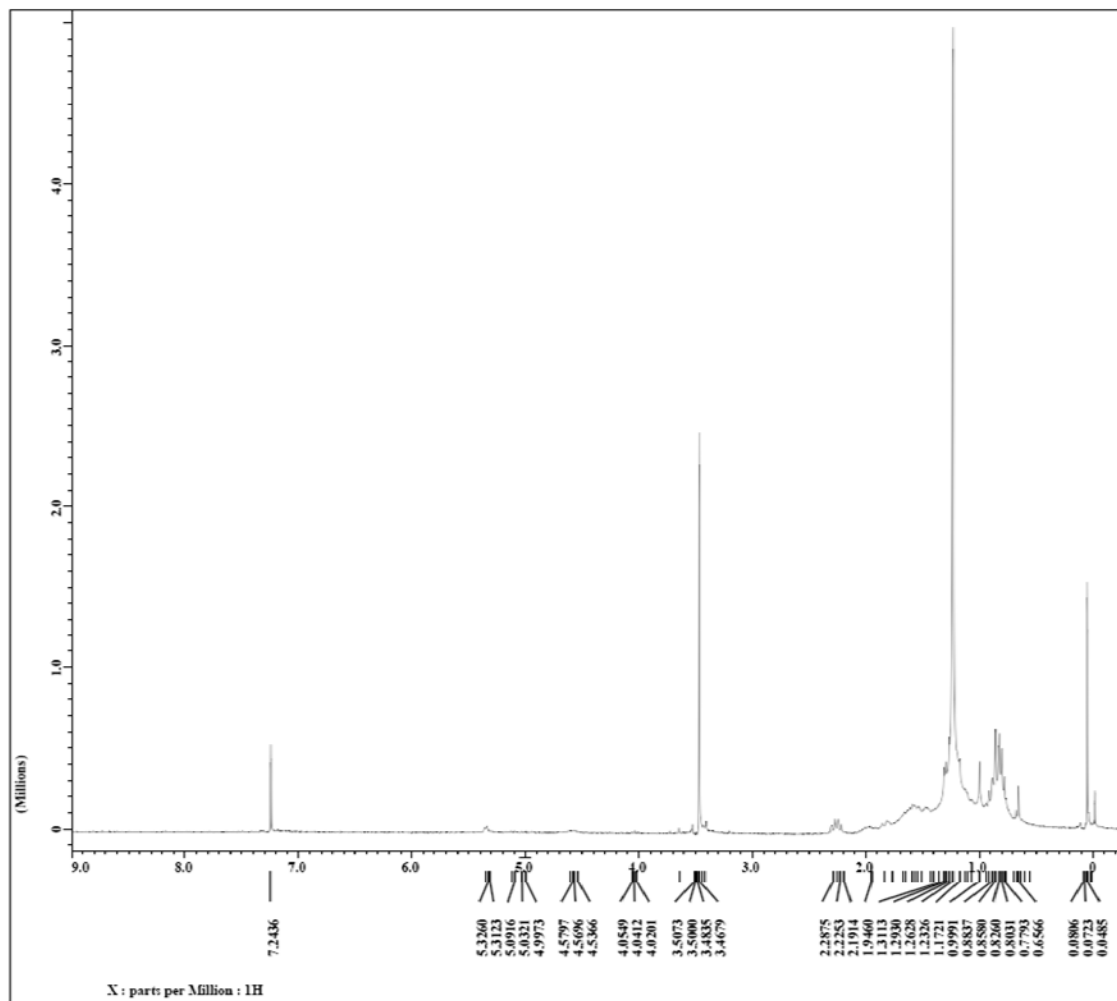
### 11.1. Espectros para el compuesto CfR-3



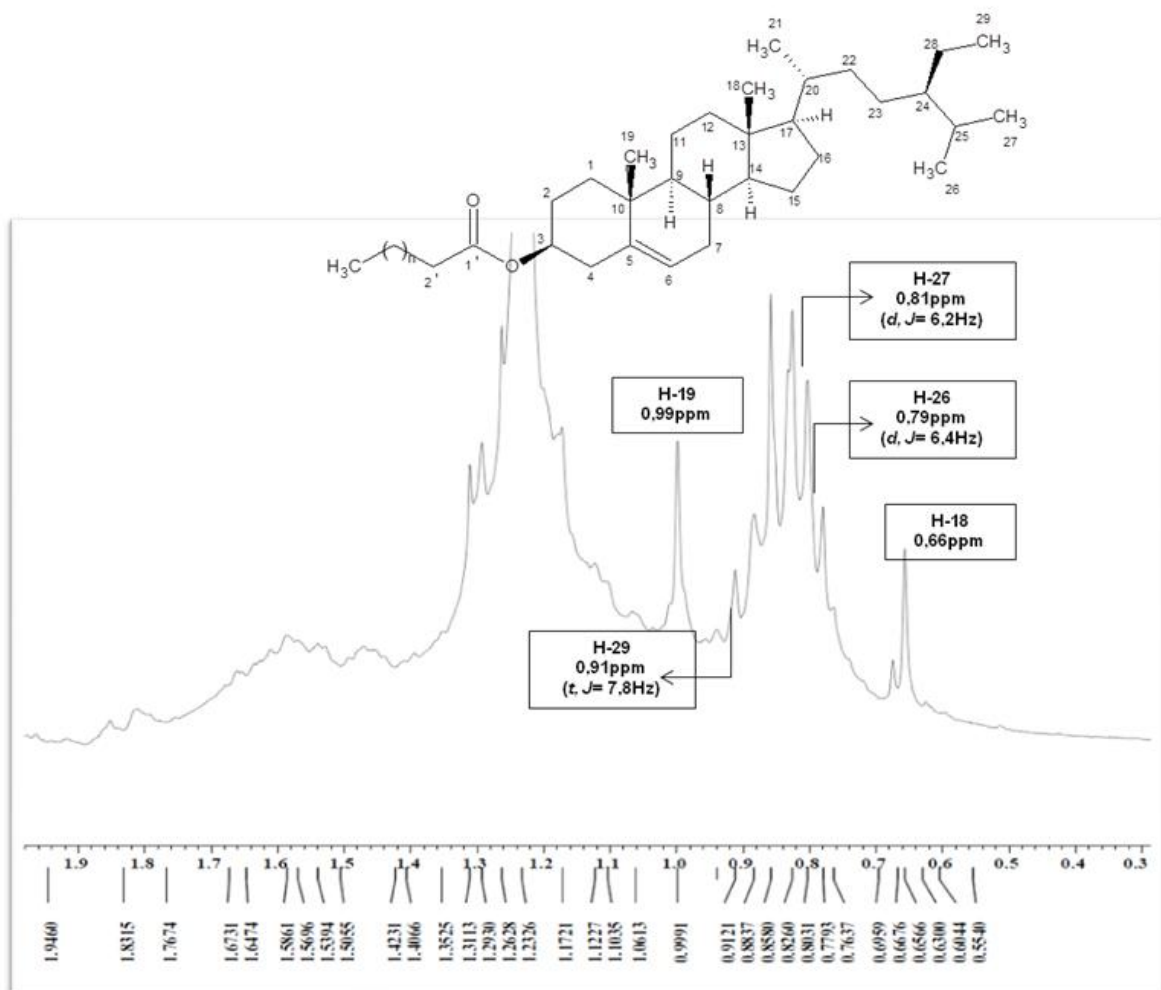
Ester de acido graso de  $\beta$ -sitosterol.



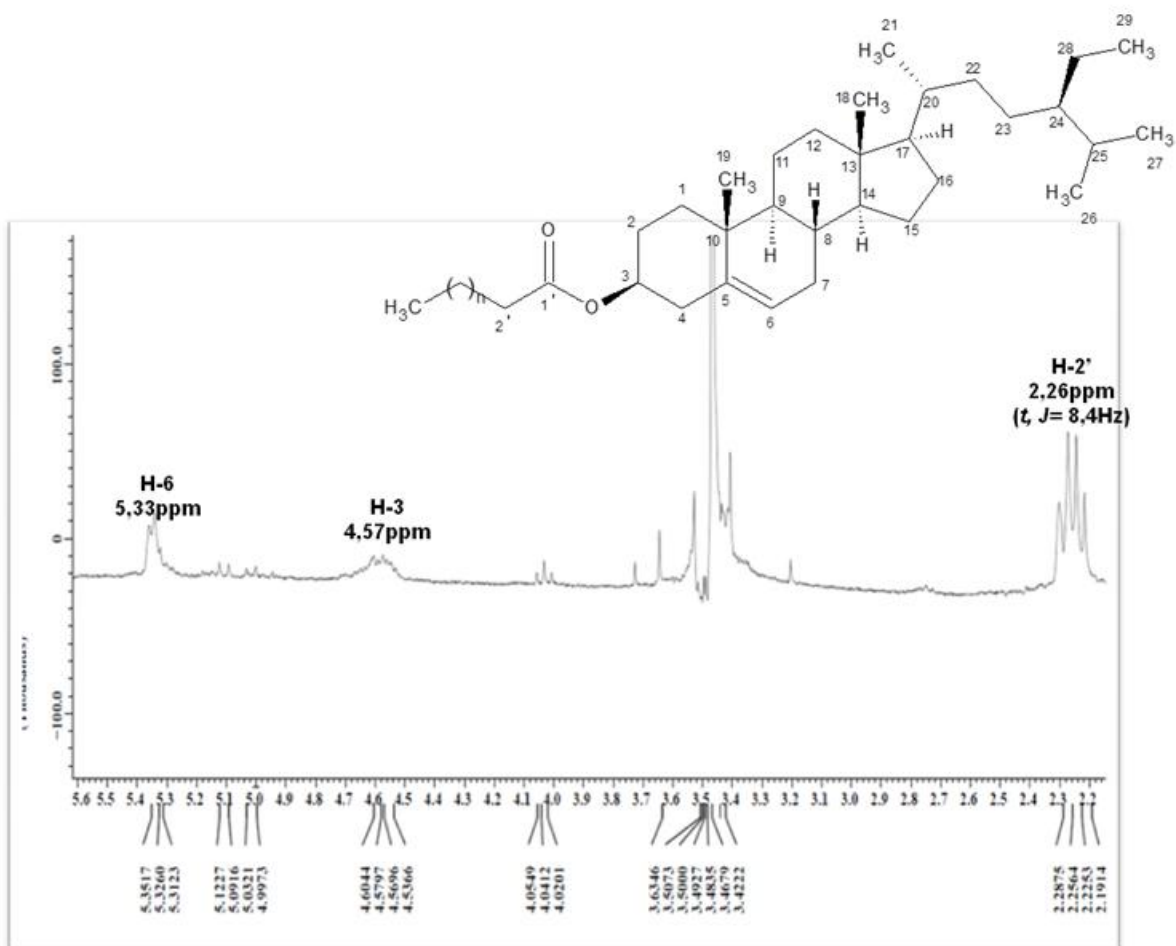
**Espectro 1.** Espectro de IR, tomado como película líquida en  $\text{CHCl}_3$ .



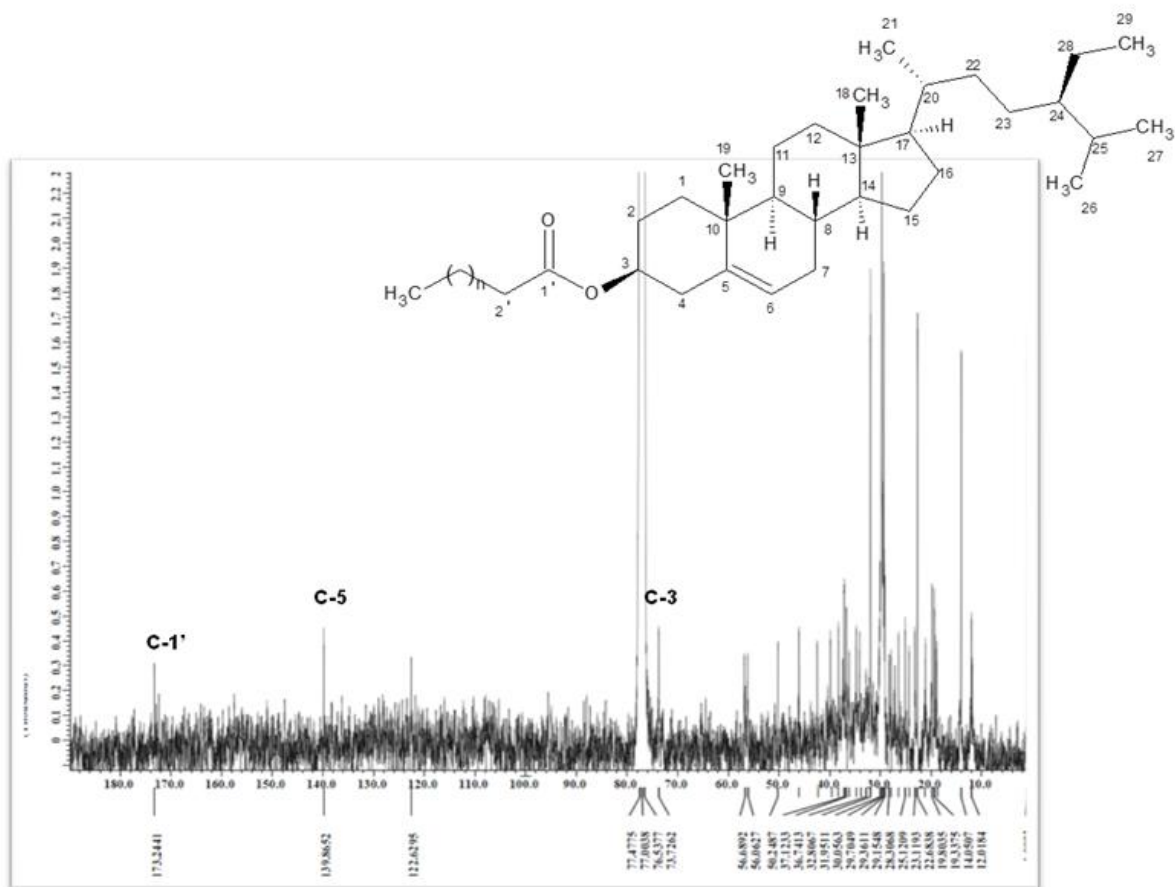
**Espectro 2.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H, tomado en CDCl<sub>3</sub>.



**Espectro 3.** Ampliación campo alto del espectro RMN-<sup>1</sup>H.

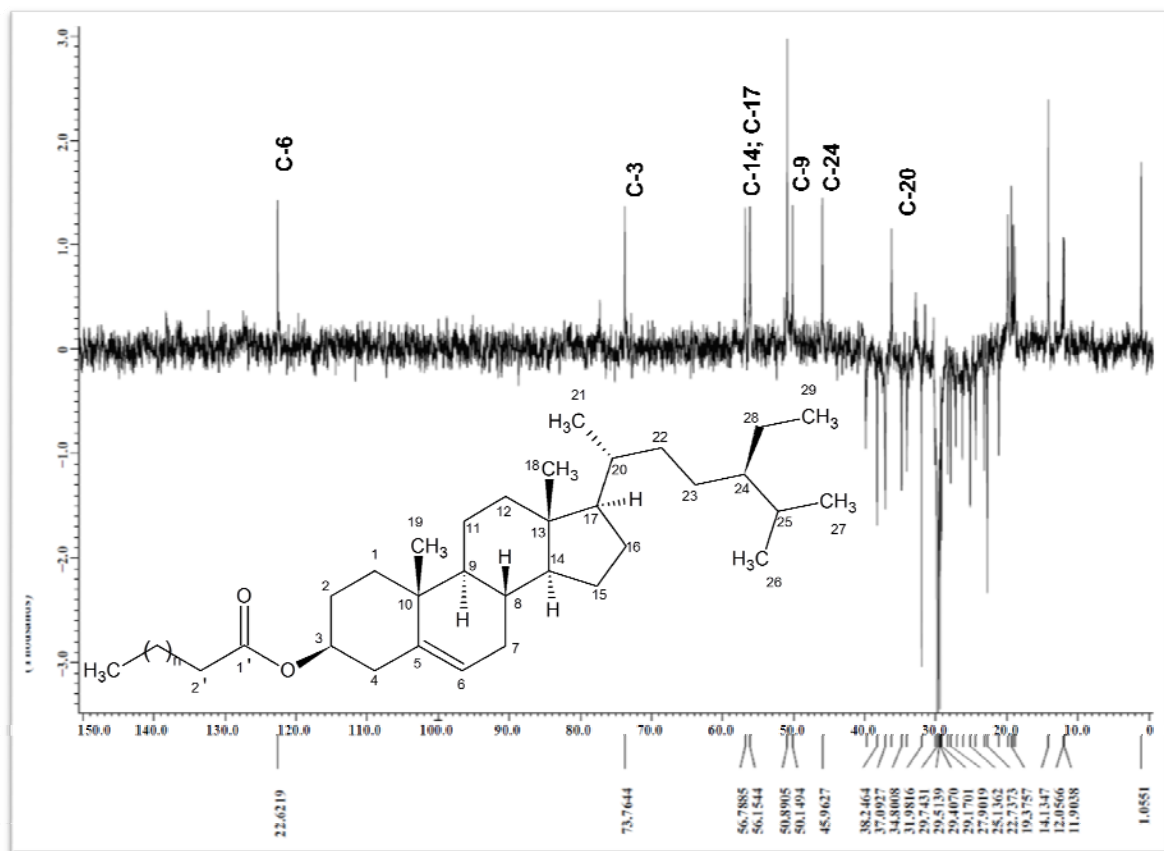


**Espectro 4.** Ampliación campo bajo del espectro RMN- $^1\text{H}$ .

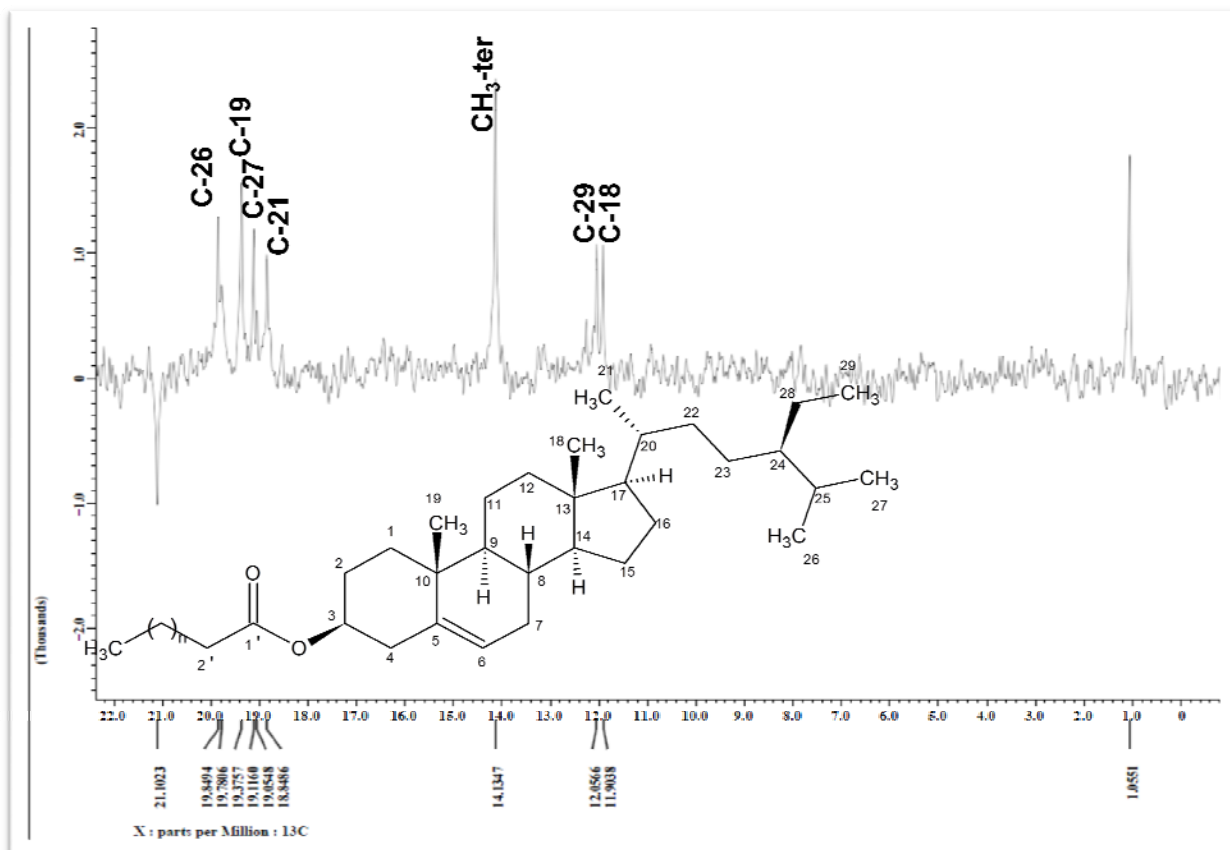


**Espectro 5.** Espectro RMN- $^{13}\text{C}$ , tomado en  $\text{CDCl}_3$ .

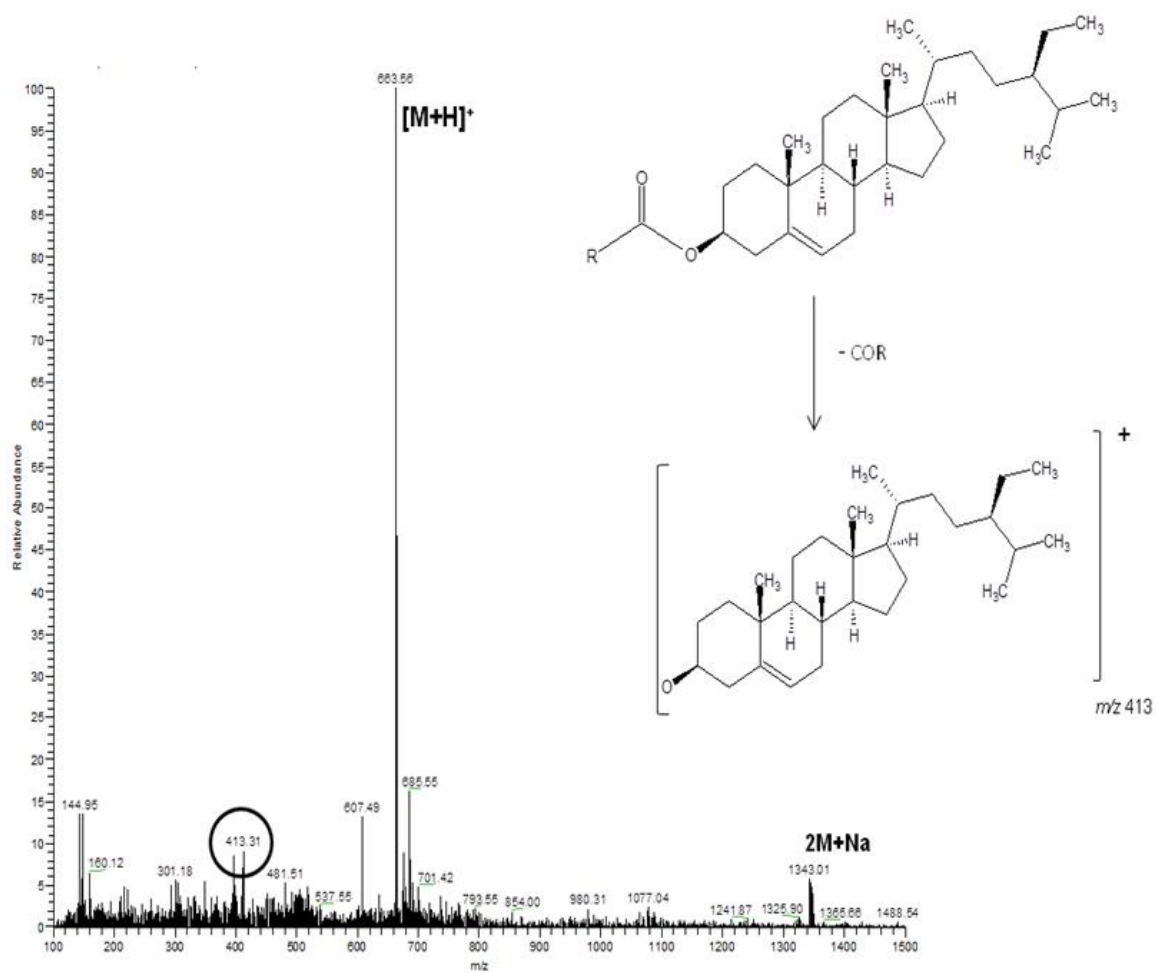




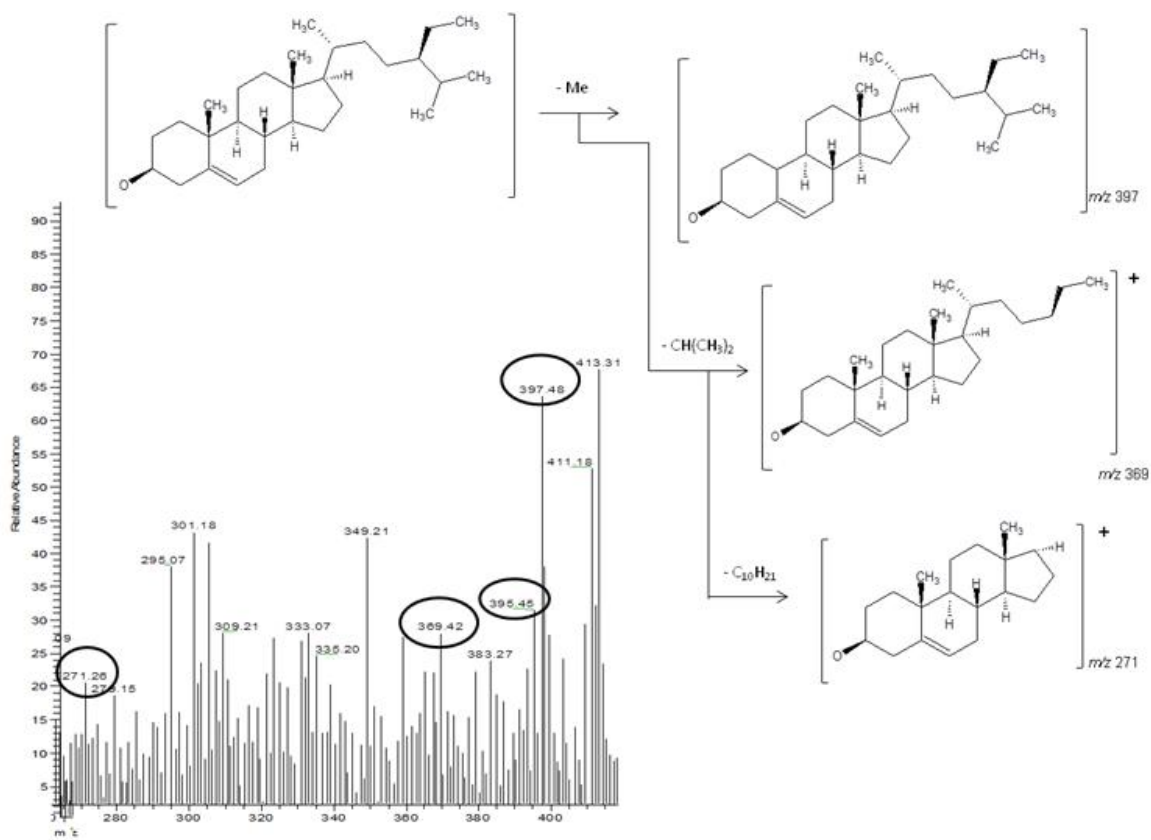
**Espectro 6.** Ampliación del espectro DEPT, zona de 150-11ppm.



**Espectro 7.** Ampliación del espectro DEPT en la zona de 22-0ppm.



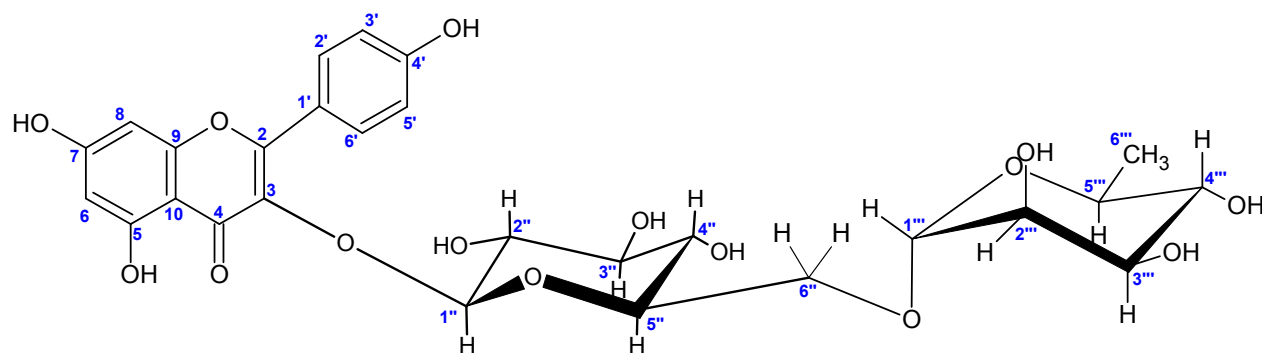
**Espectro 8.** Espectro de masas (ESI).



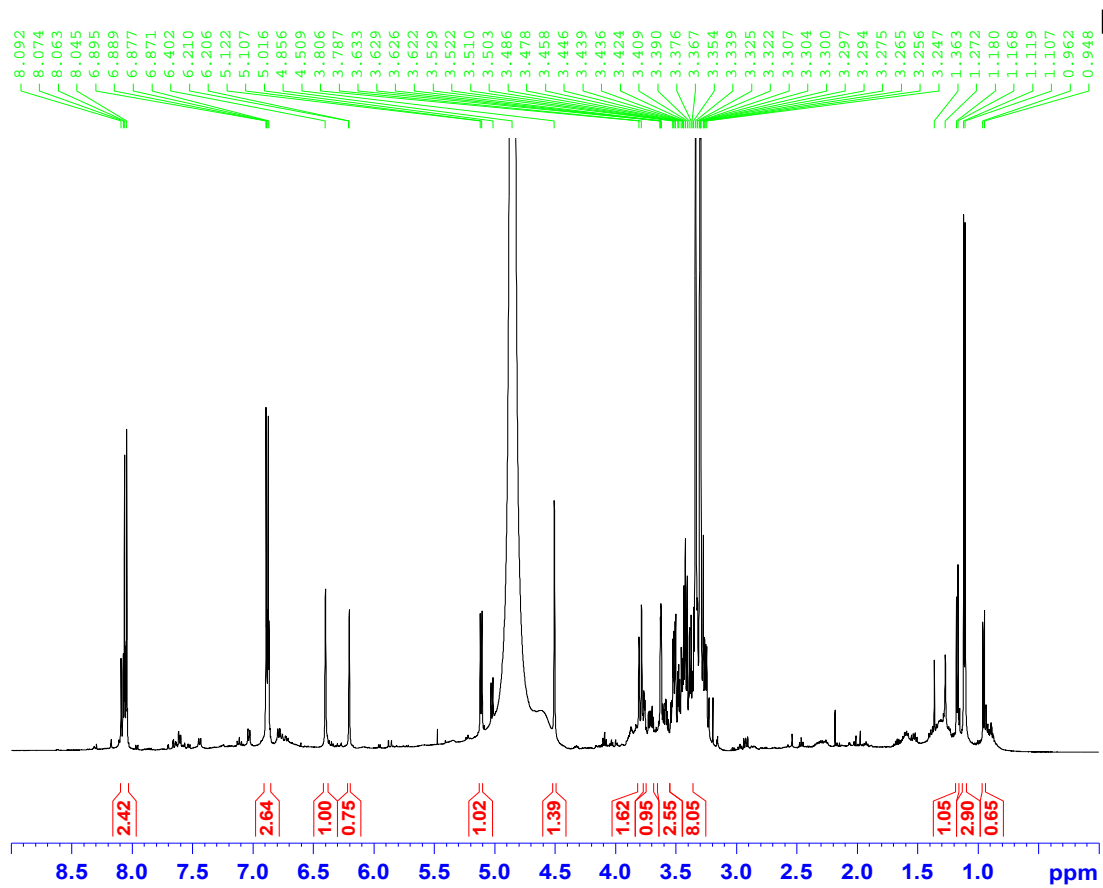
**Espectro 9.** Ampliación zona de 120-400  $m/z$  del espectro de masas (ESI).

---

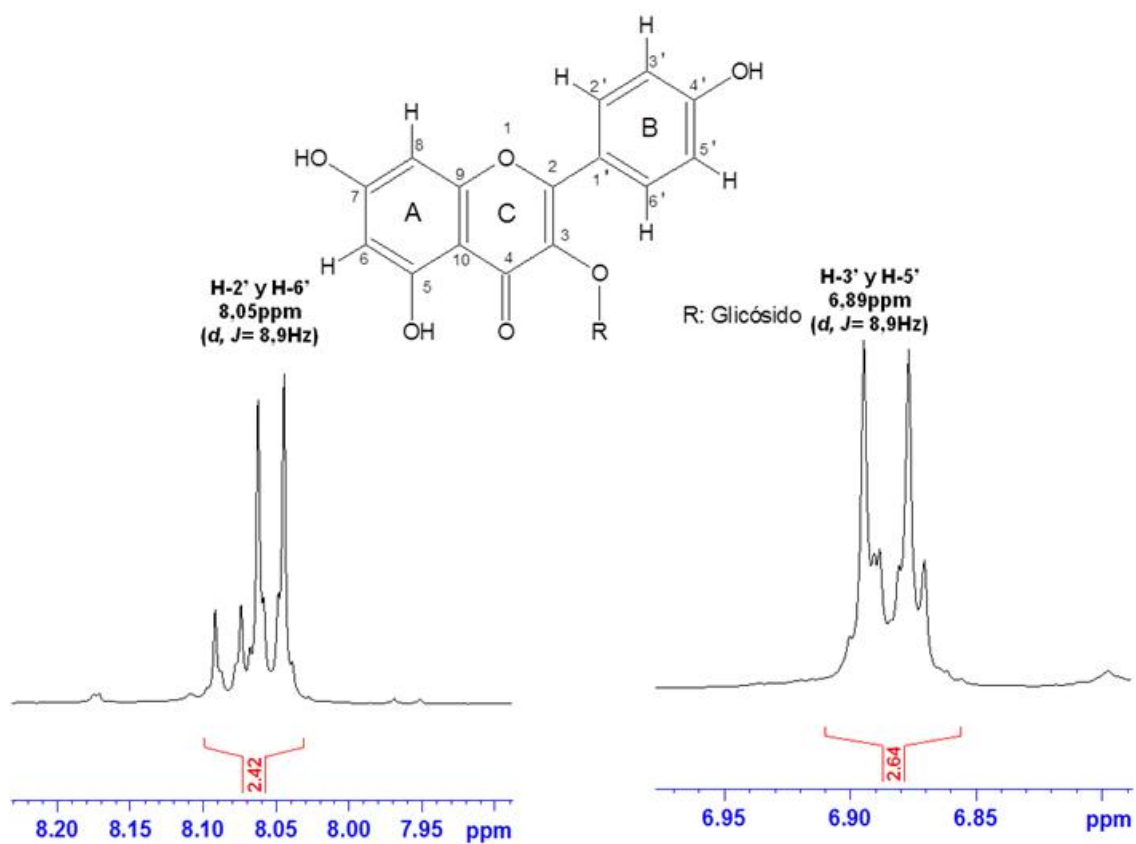
## 11.2. Espectros para el compuesto CfH-55



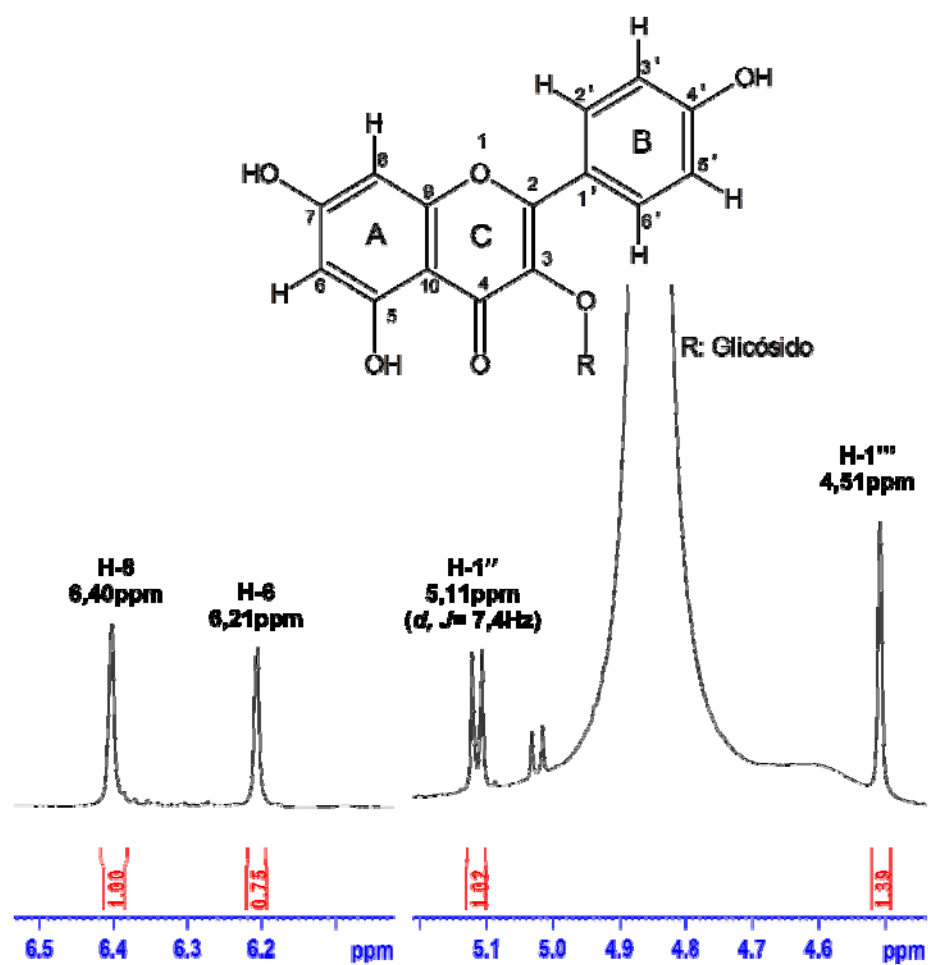
Kaempferol 3-O-β-D-(6-α-L-ramnopiranosil)glucopiranosido



**Espectro 10.** Espectro RMN- $^1\text{H}$ , tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

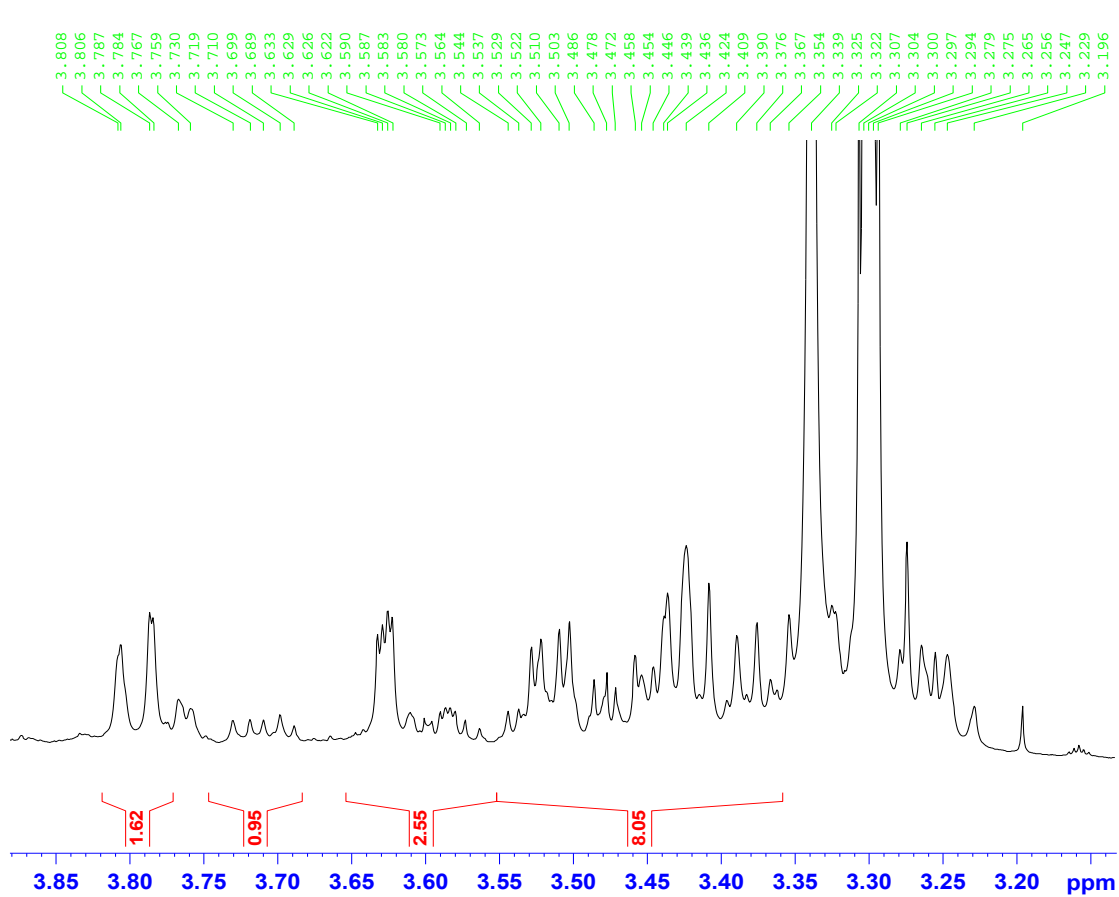


**Espectro 11.** Ampliación campo bajo, espectro RMN- $^1\text{H}$ .

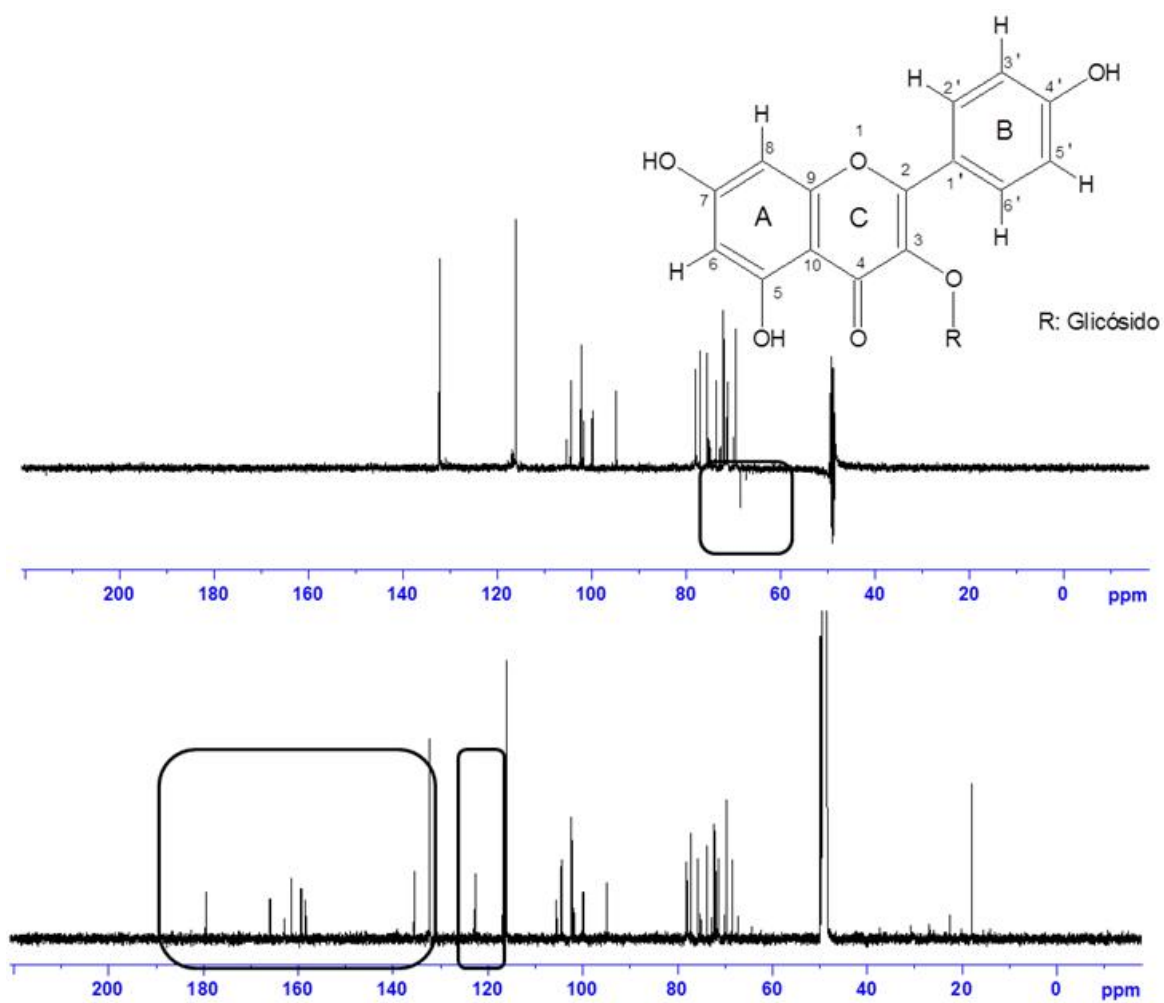


**Espectro 12.** Ampliación campo bajo (zona protones enlazados a carbonos anoméricos), espectro RMN- $^1\text{H}$ .

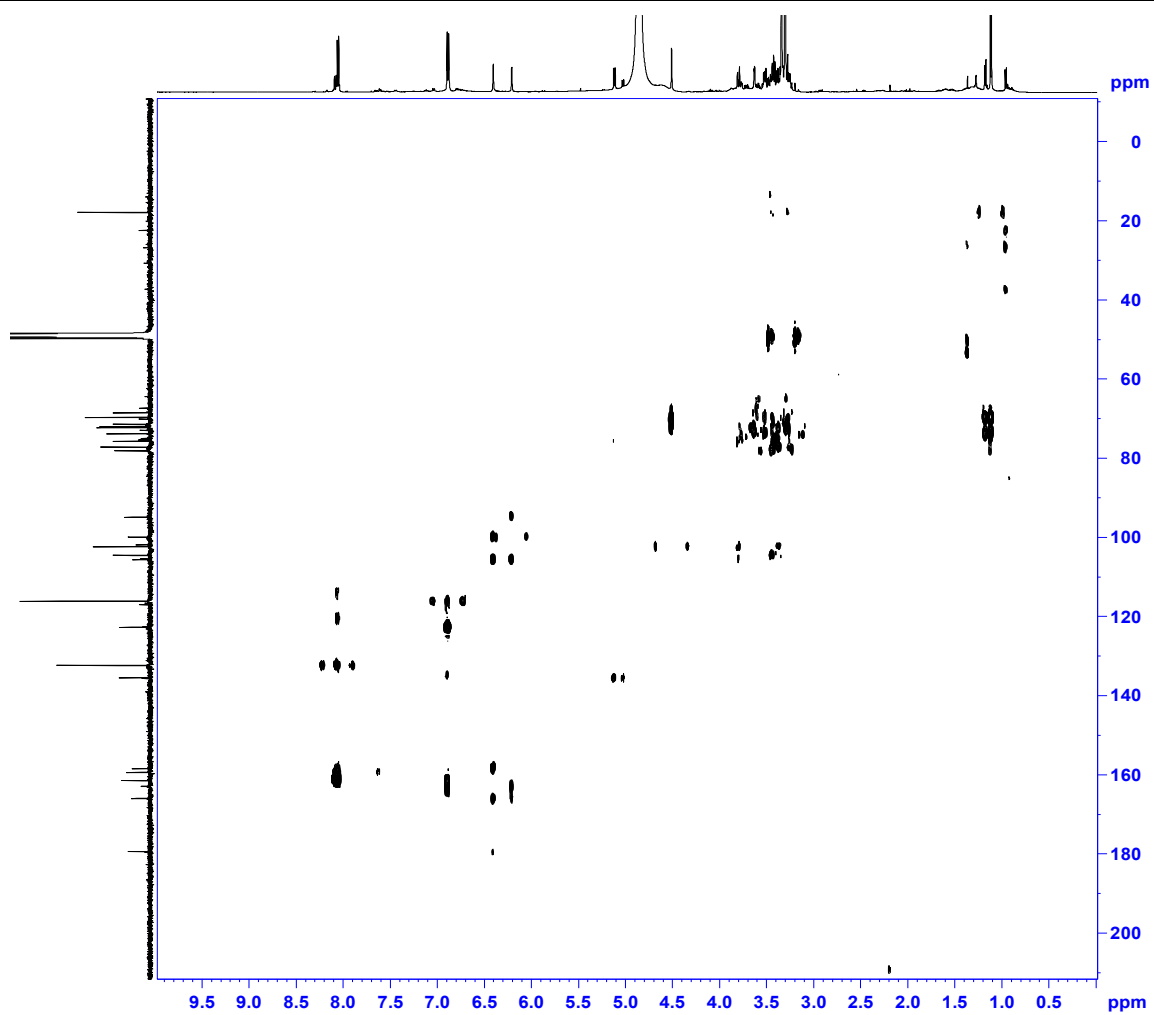




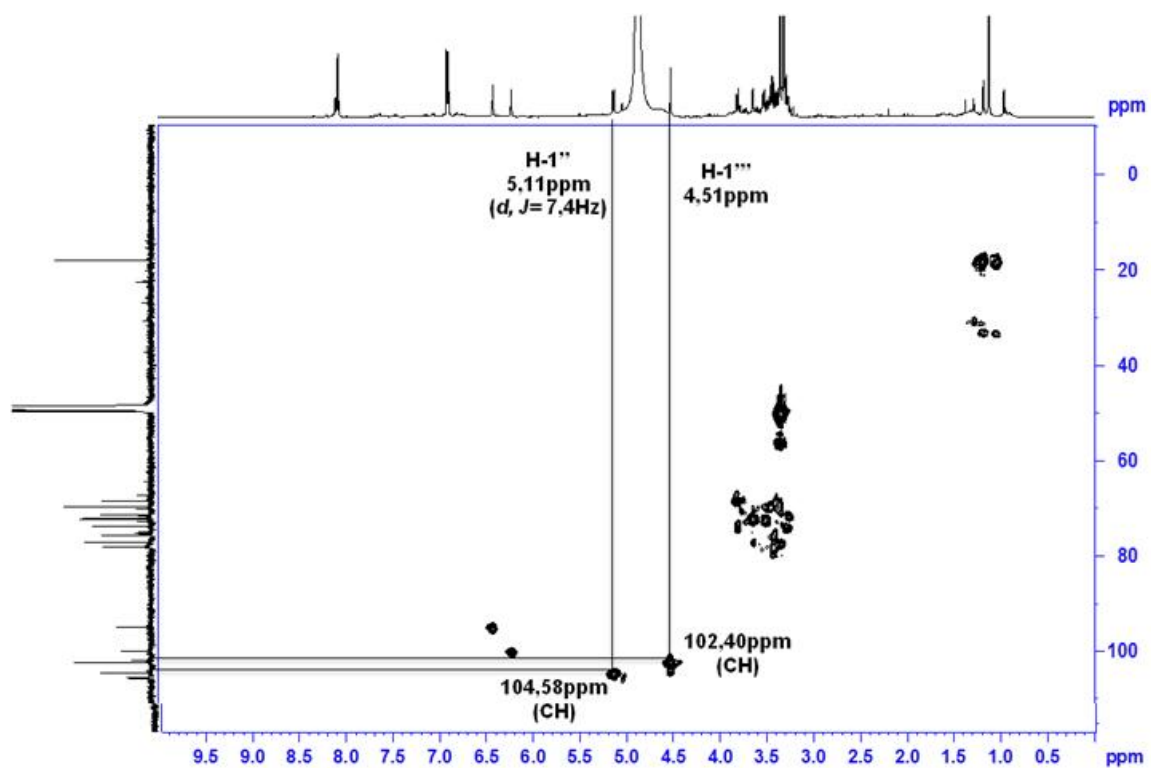
**Espectro 13.** Ampliación campo alto, espectro RMN- $^1\text{H}$ .



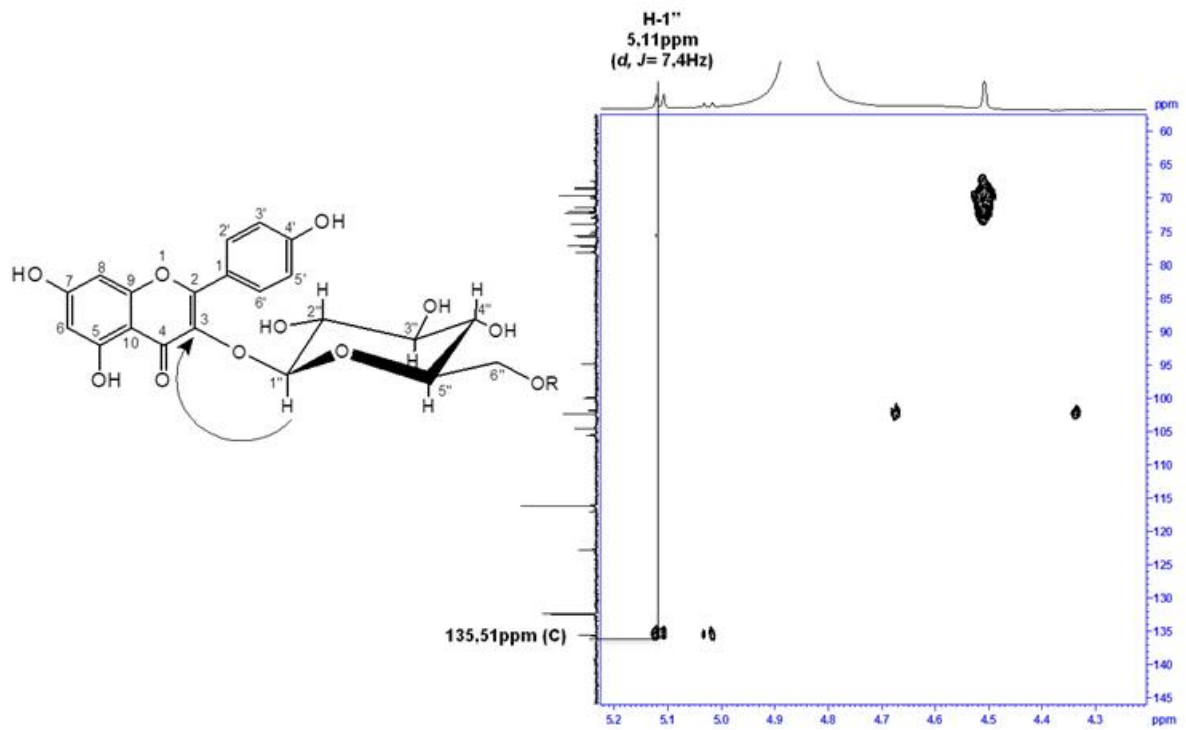
**Espectro 14.** Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT, tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



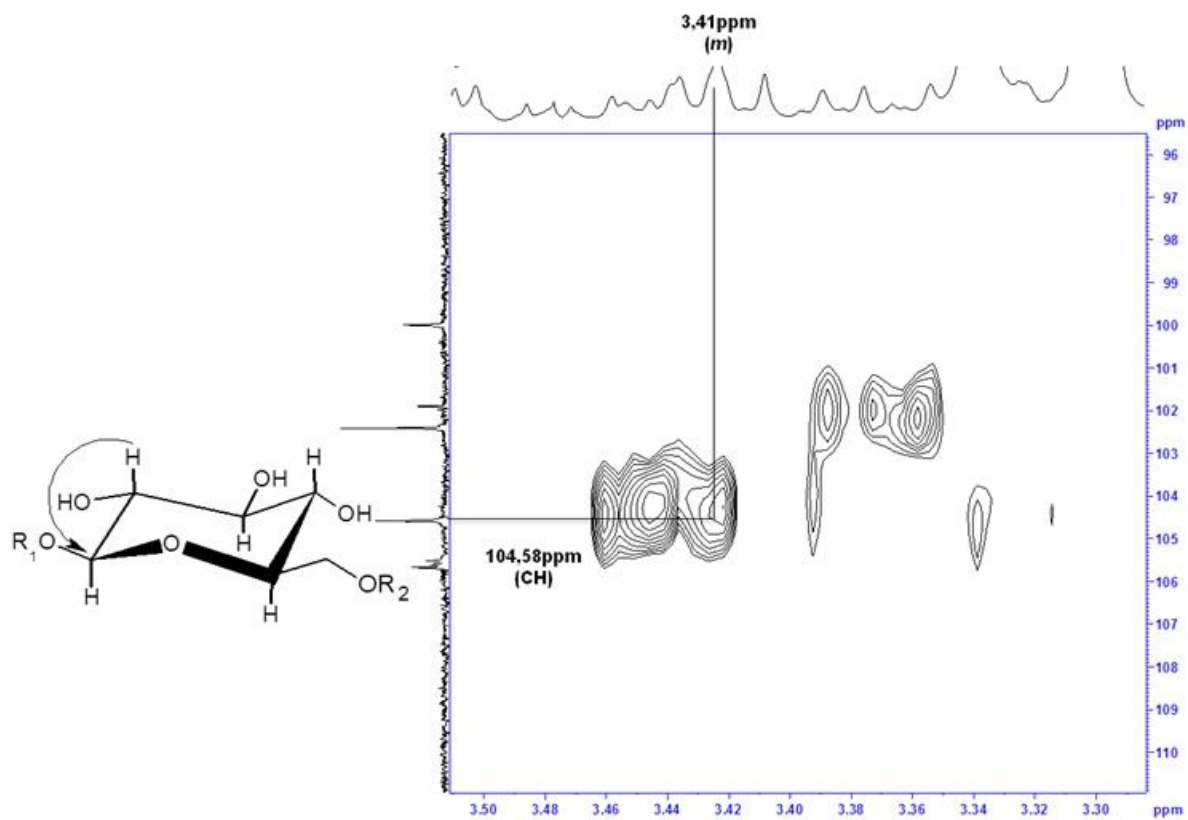
**Espectro 15.** Espectro HMBC, tomado en CD<sub>3</sub>OD.



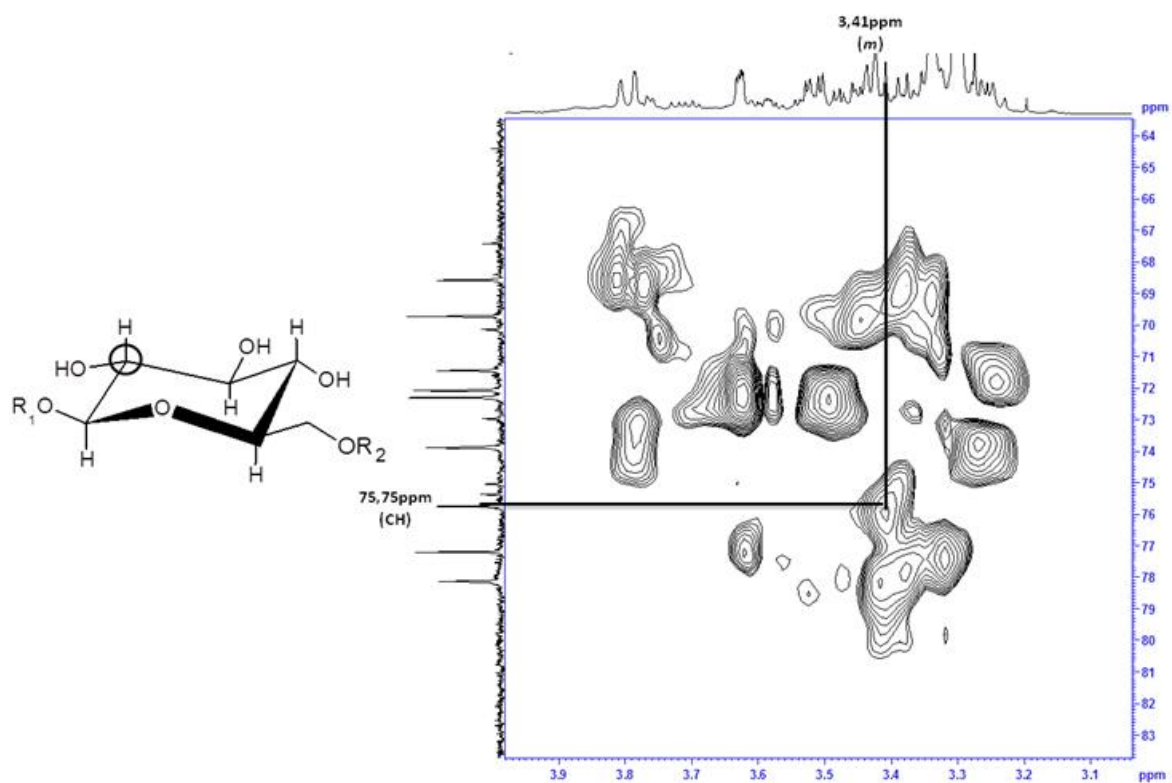
**Espectro 16.** Espectro HMBC, correlaciones entre protones en 5,11 y 4,51ppm con carbonos en la zona de 100ppm.



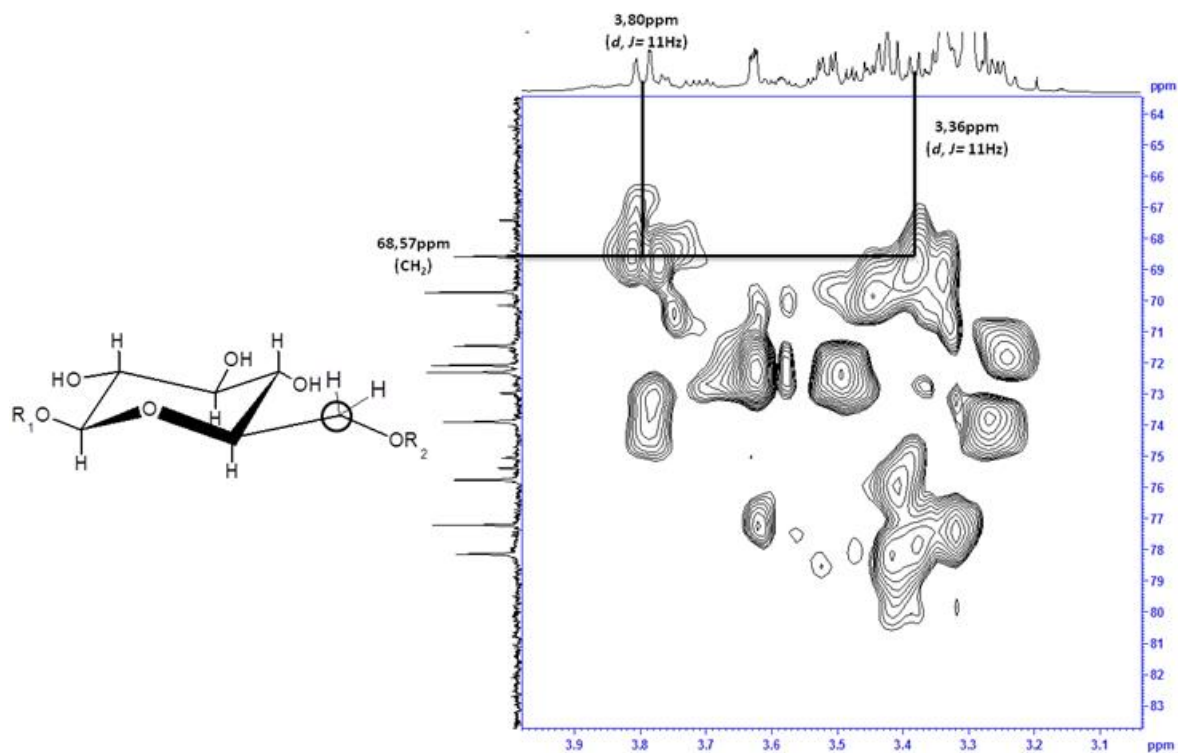
**Espectro 17.** Correlación observada entre el protón de 5,11ppm y carbono cuaternario en 135,51ppm (HMBC).



**Espectro 18.** Correlación entre el protón de 3,41ppm y carbono CH en 104,58 (HMBC).

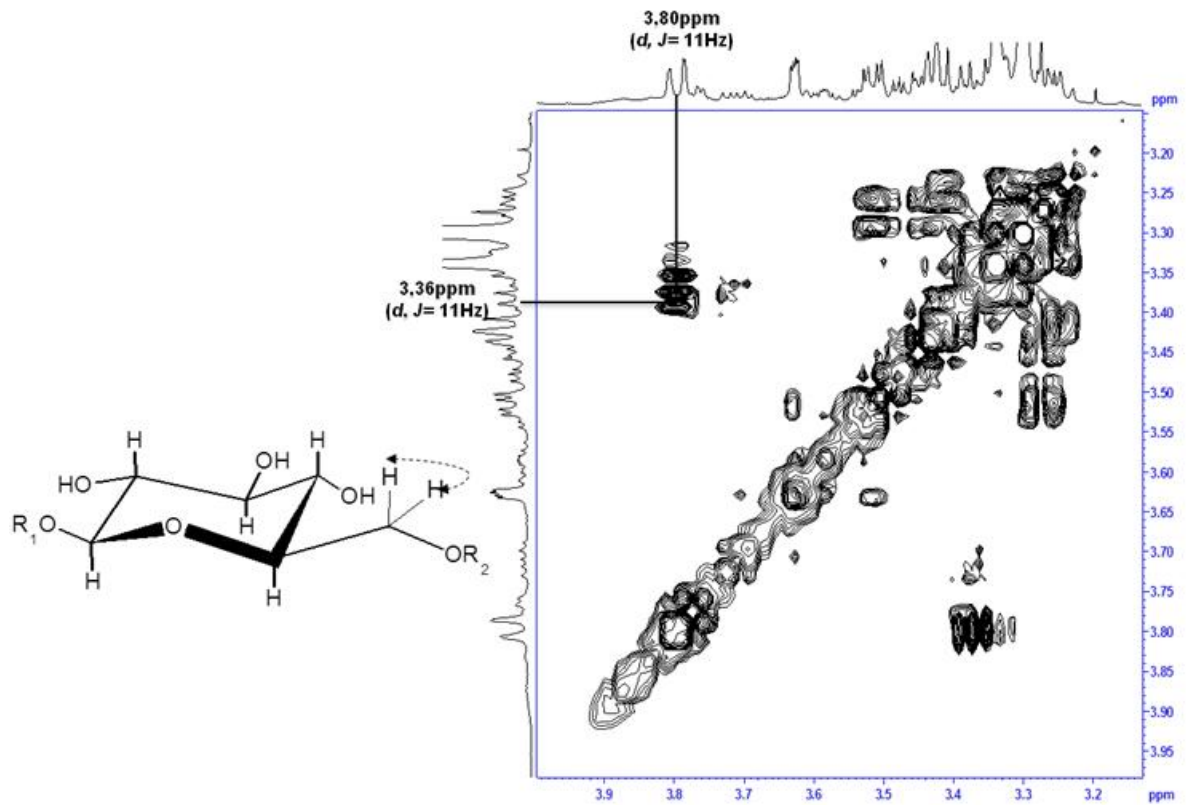


**Espectro 19.** Espectro HMQC correlación entre el protón de 3,41ppm y carbono CH en 75,75ppm.

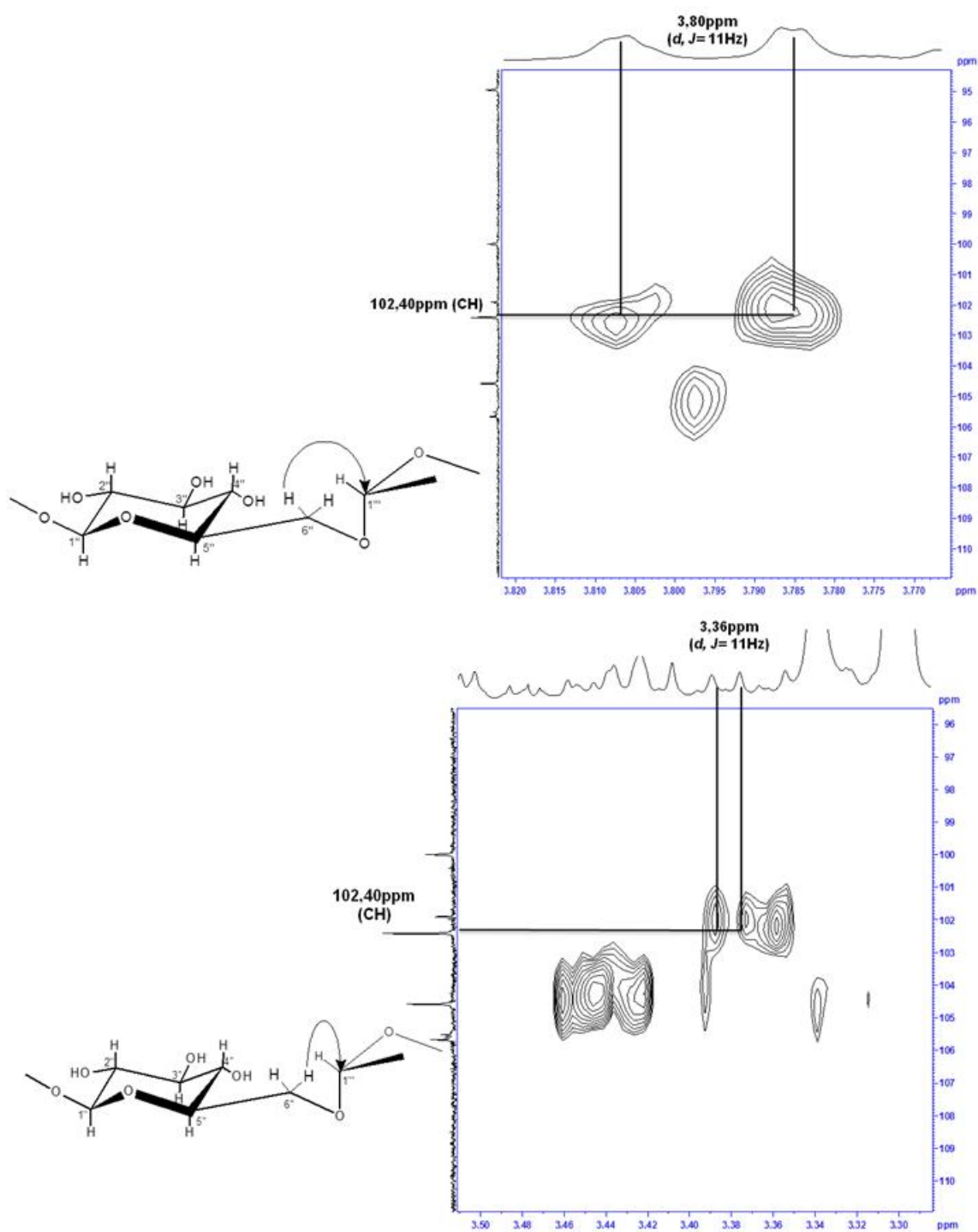


**Espectro 20.** Espectro HMQC, correlación entre protones centrados en 3,80 y 3,36ppm con carbono tipo CH<sub>2</sub> en 68,57ppm (HMQC).

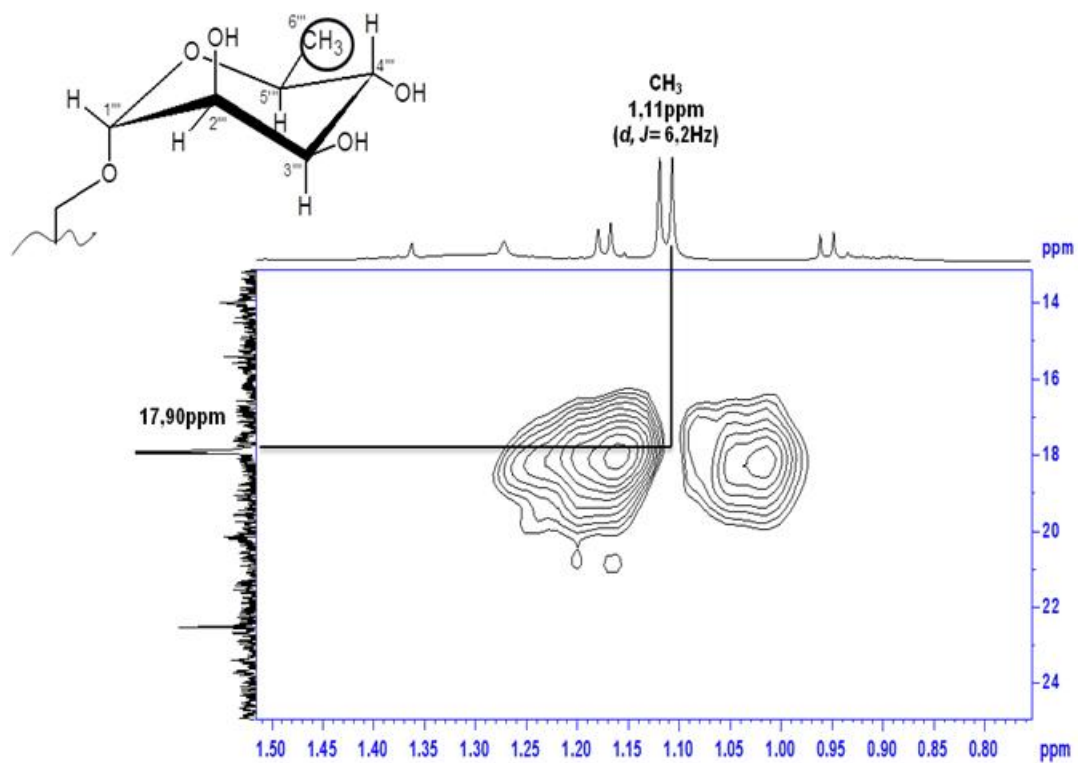




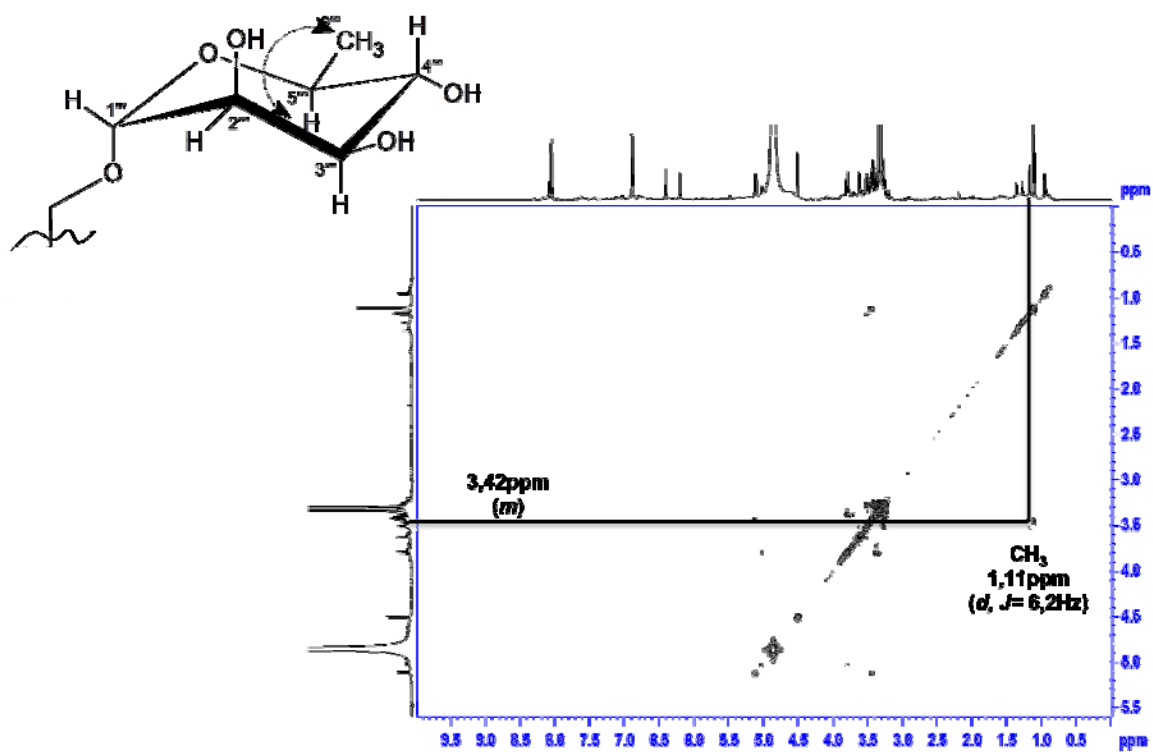
**Espectro 21.** Correlación en COSY entre los protones unidos al carbono tipo  $CH_2$  de la glucosa.



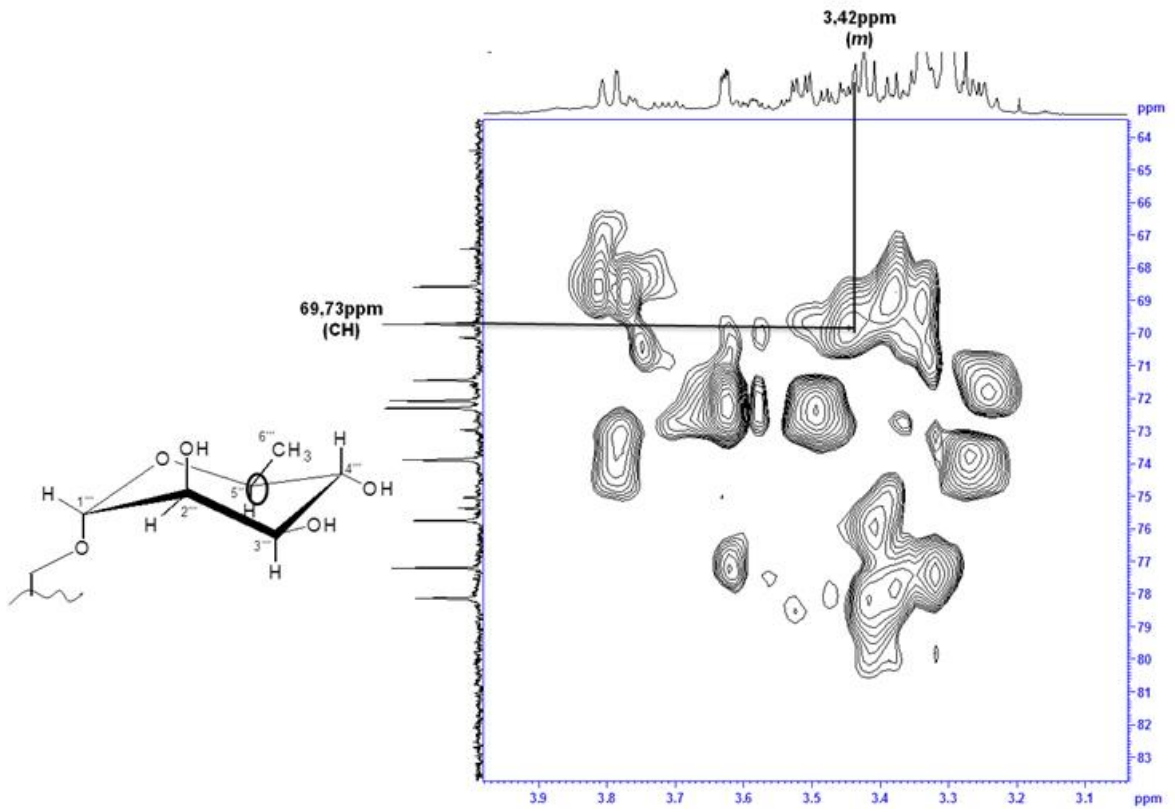
**Espectros 22 y 23.** Correlación en HMBC entre los protones unidos al carbono tipo CH<sub>2</sub> de la glucosa y el siguiente carbono anomérico (102,40ppm).



**Espectro 24.** Espectro HMBC, relación entre doblete en 1,11ppm y carbono tipo CH<sub>3</sub> en 17,90ppm.



**Espectro 25.** Espectro COSY, relación entre doblete en 1,11ppm y multiplete en 3,42ppm.

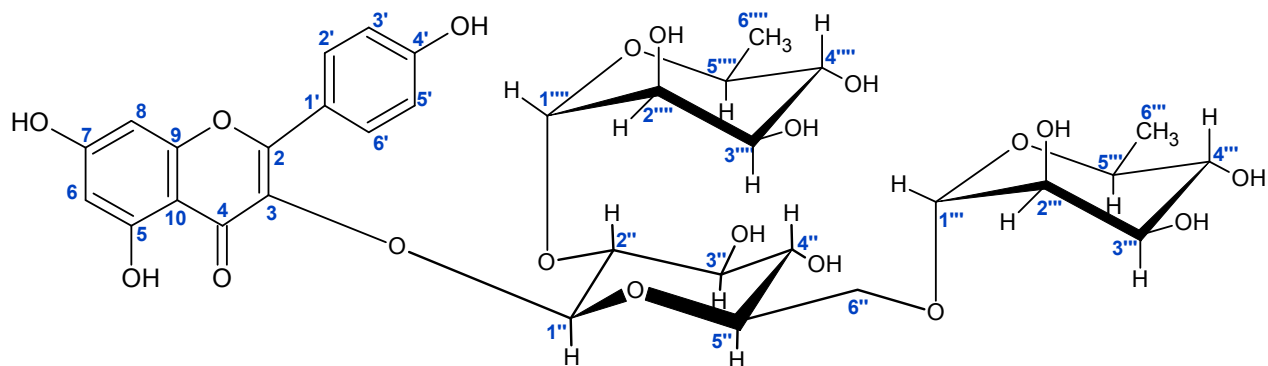


**Espectro 26.** Espectro HMBC, relación entre multiplete en 3,42ppm y carbono tipo CH en 69,73ppm.

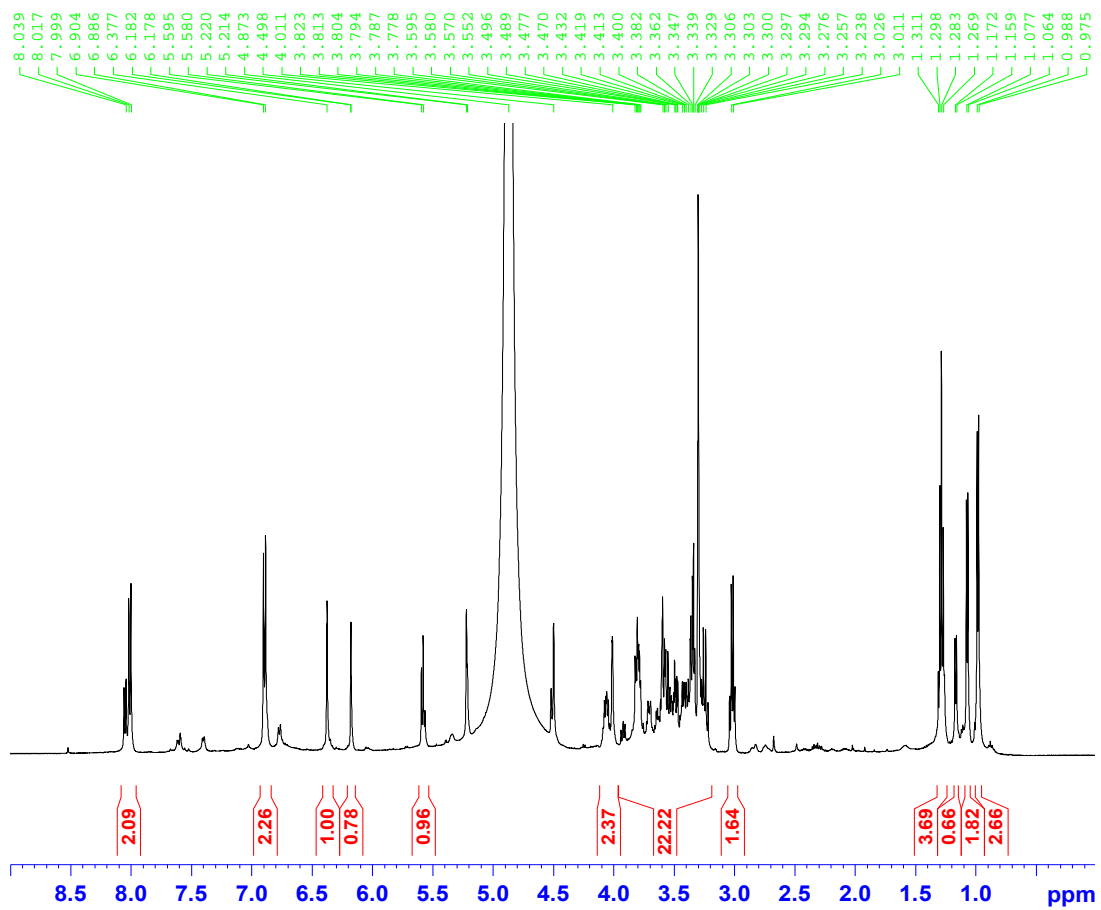


---

### 11.3. Espectros del compuesto CfH-72.

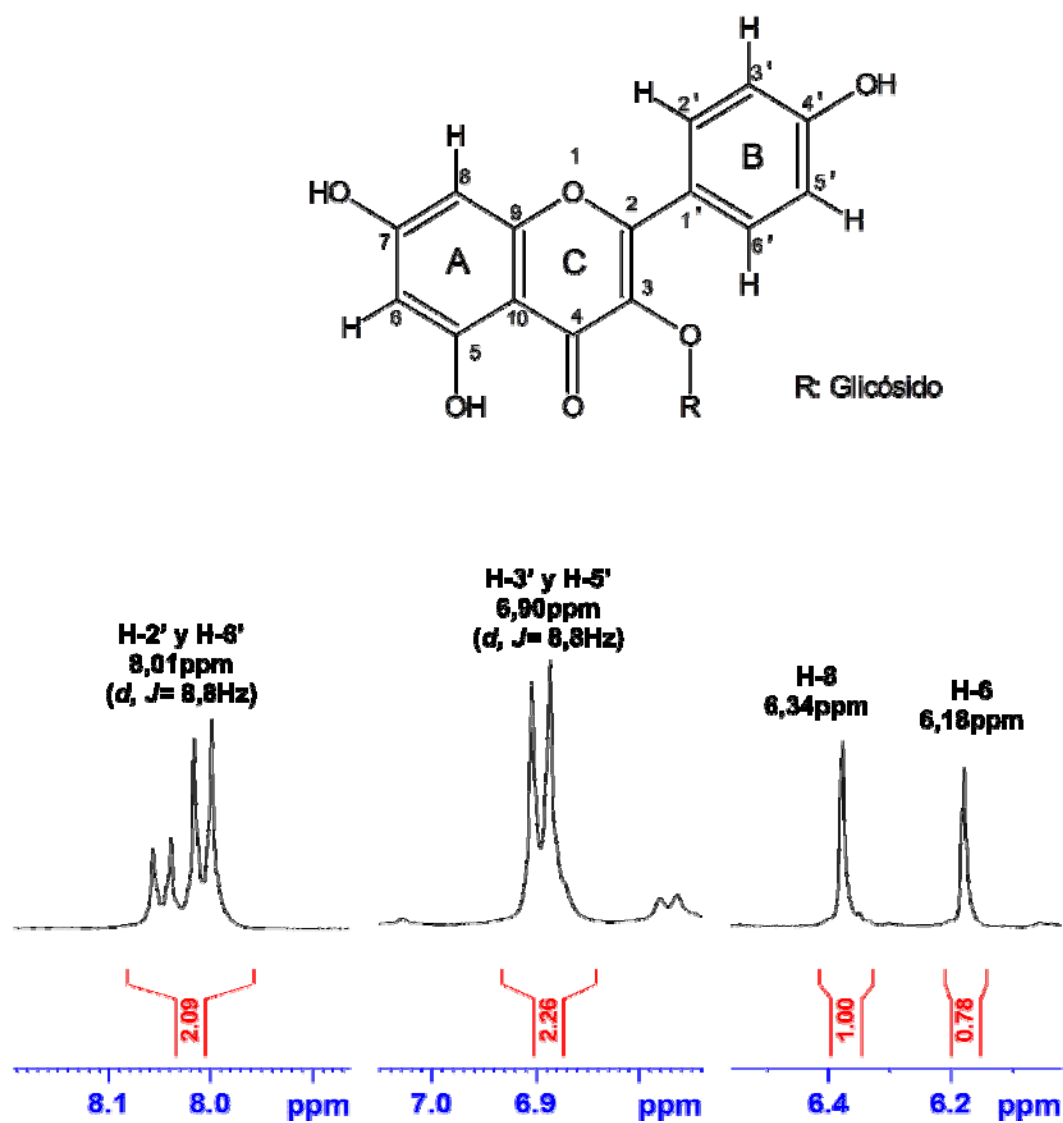


**Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-(2,6-di- $\alpha$ -L-rhamnopyranosil)glucopiranosido**

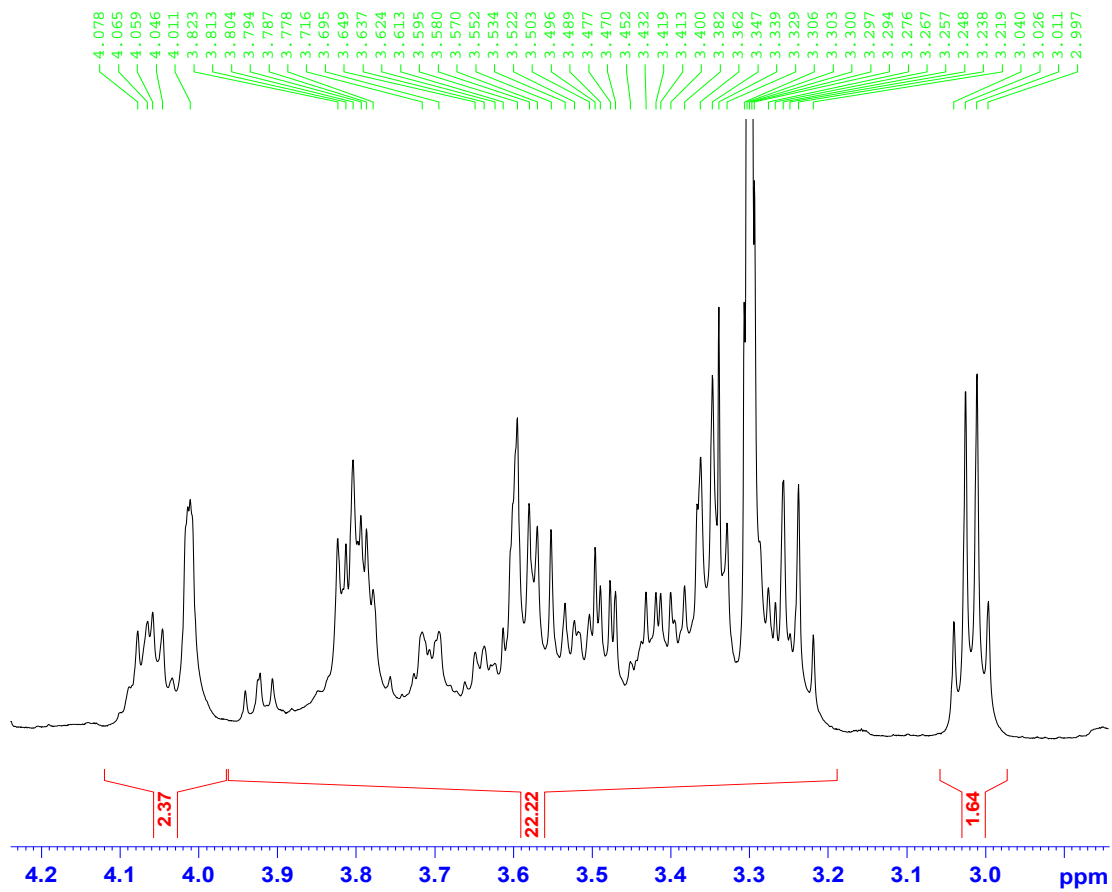


**Espectro 28.** Espectro RMN- $^1\text{H}$ , tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

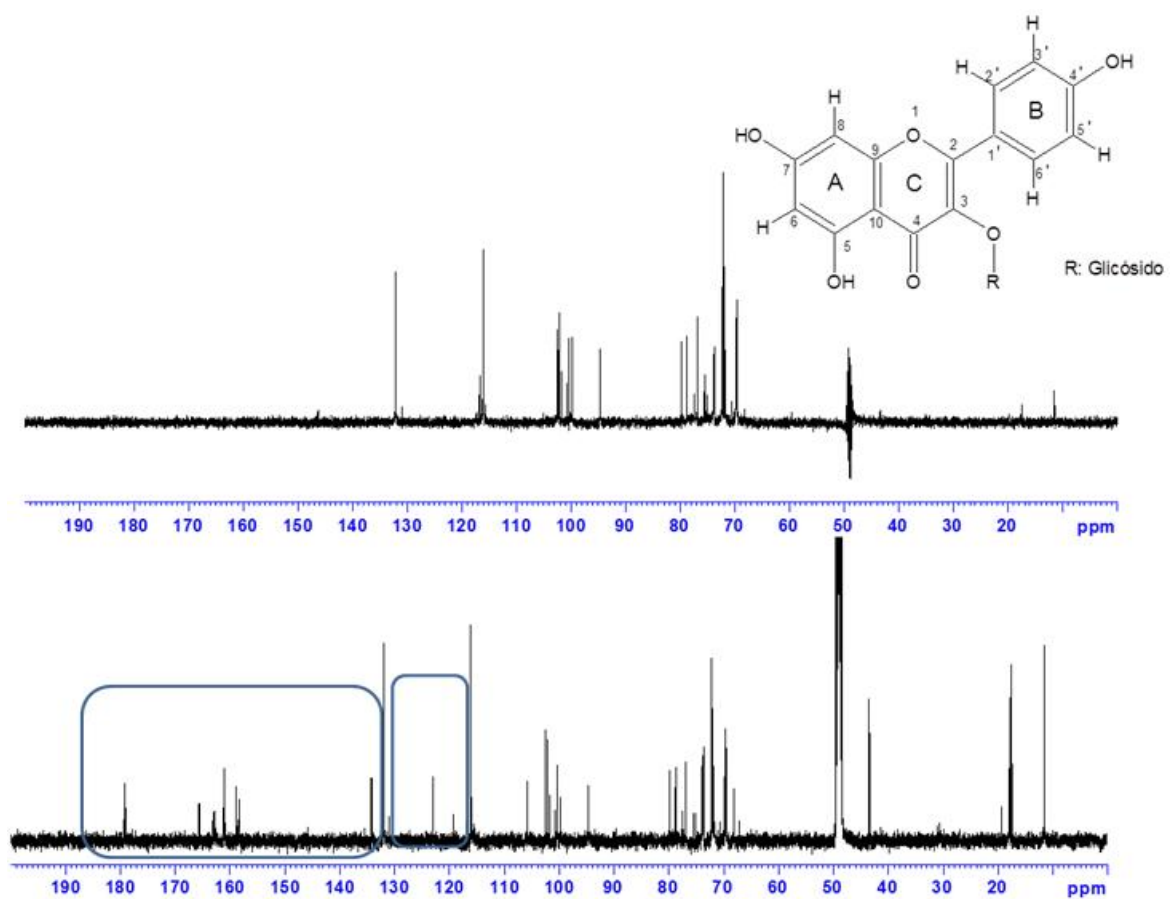




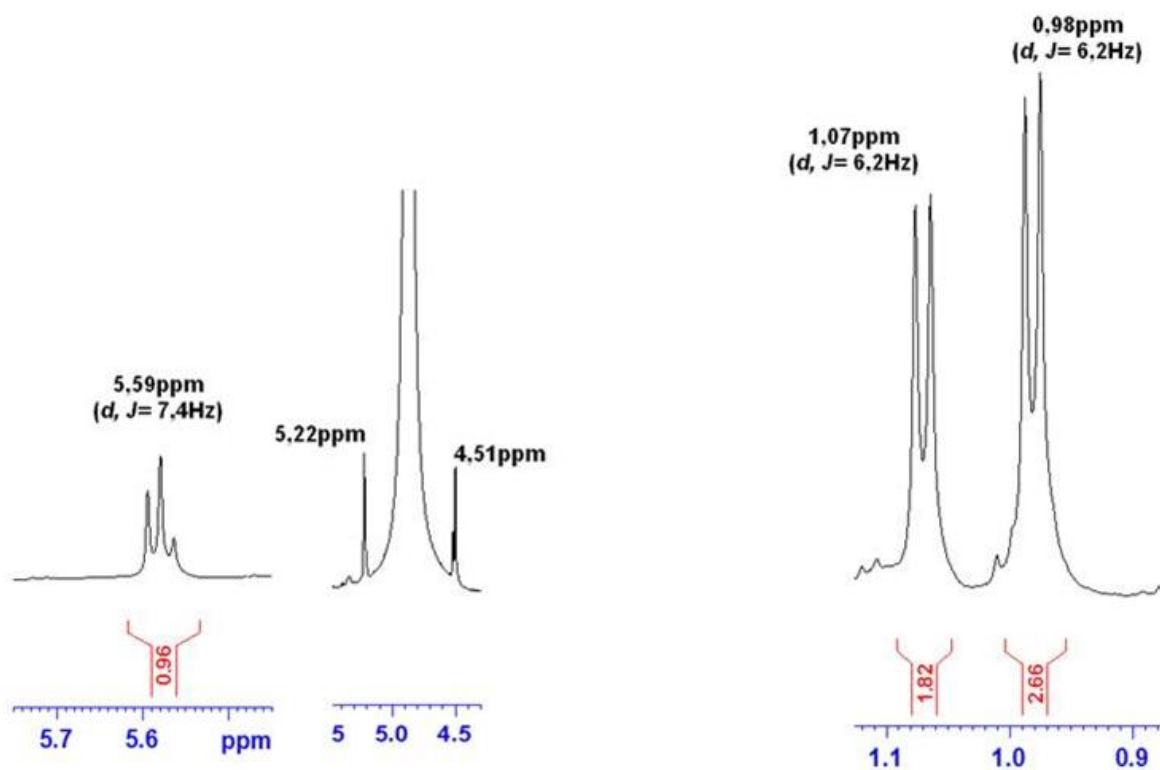
Espectro 29. Ampliación campo bajo del espectro RMN- $^1\text{H}$



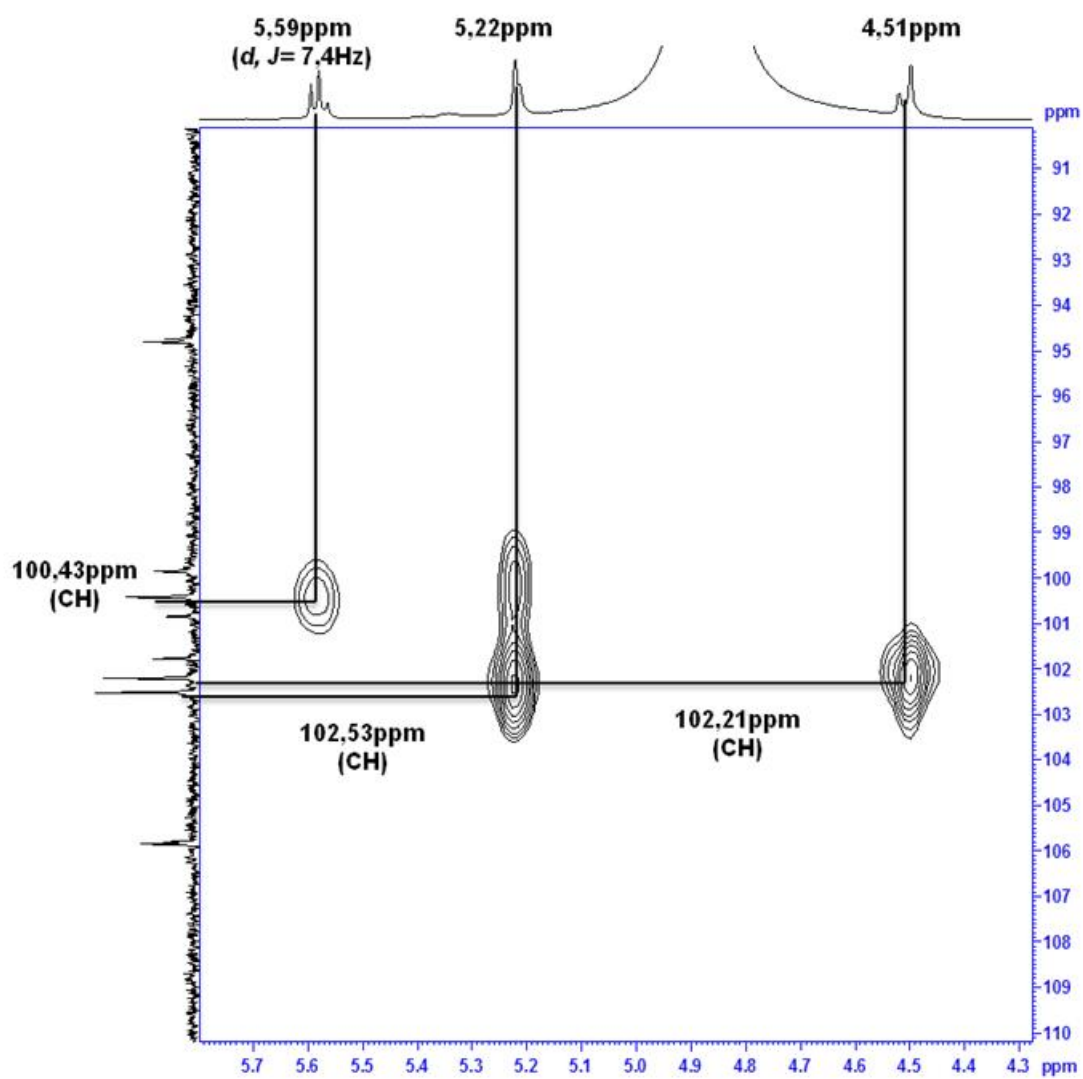
**Espectro 30.** Ampliación campo alto del espectro RMN-<sup>1</sup>H.



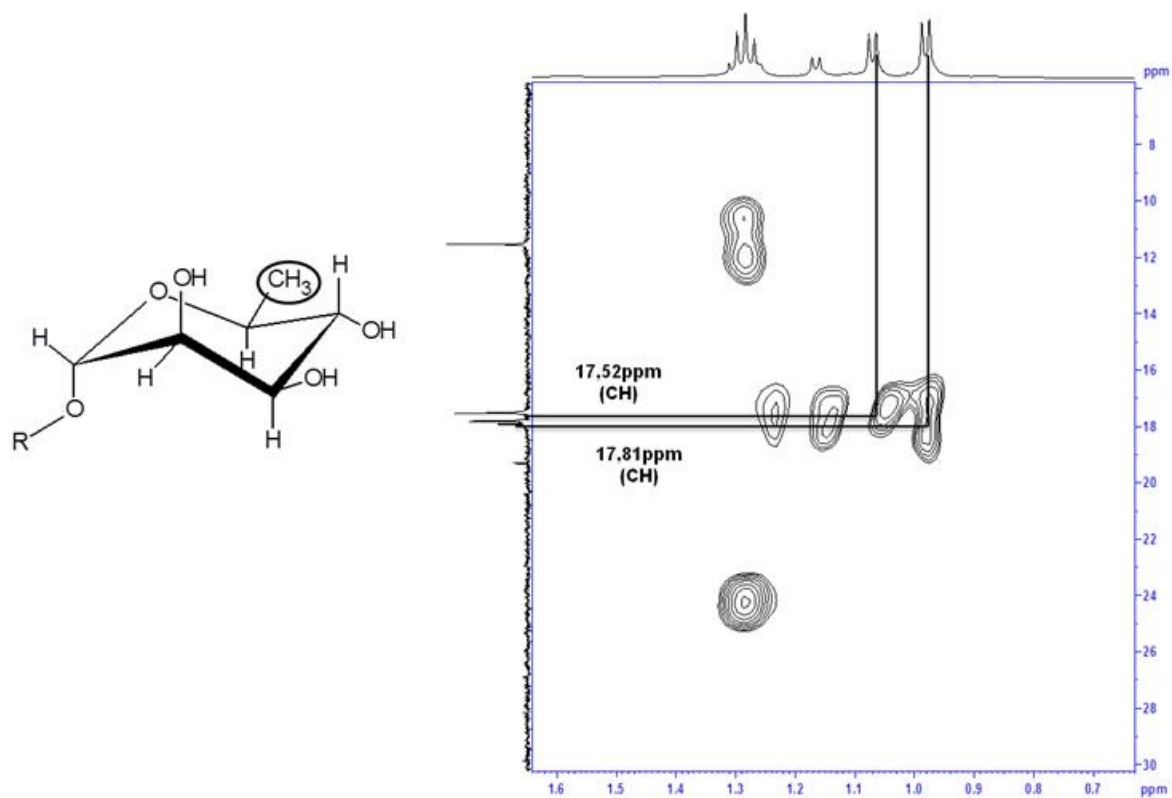
**Espectro 31.** Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT, tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



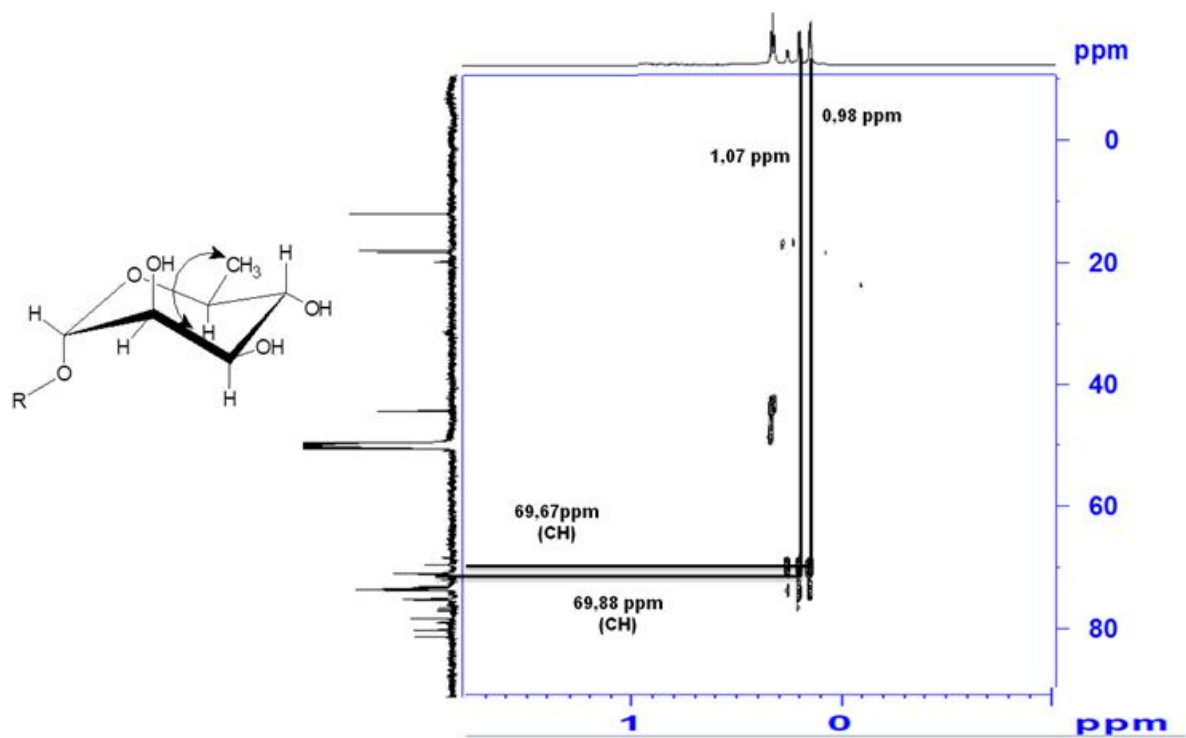
**Espectro 32.** Ampliación del espectro RMN- $^1\text{H}$  en las zonas de 4,5-5,7ppm y 0,9-1,1ppm



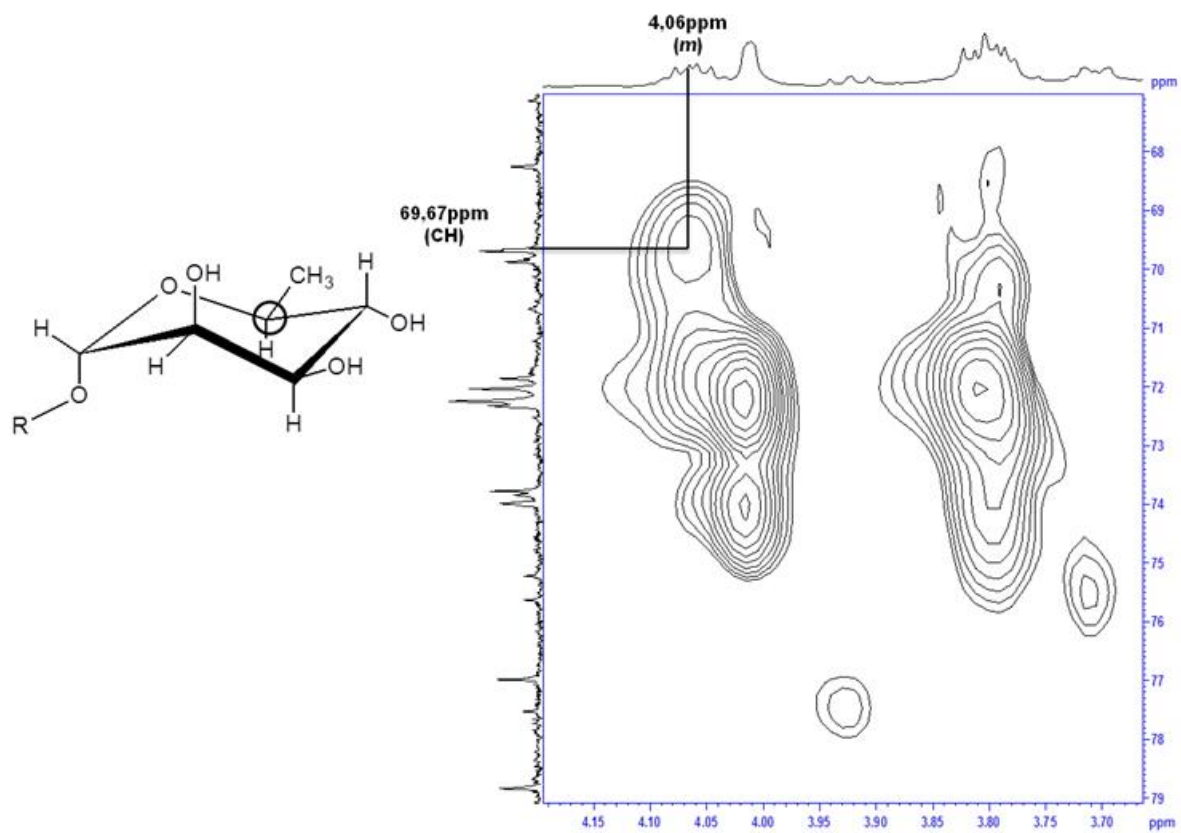
**Espectro 33.** Correlaciones entre protones centrados entre 4,3-5,7ppm y carbonos en la zonad e 100ppm (HMQC).



**Espectro 34.** Espectro de HMQC de los protones centrados en 0,98 y 1,07ppm con carbonos tipo CH en la zona de 17ppm

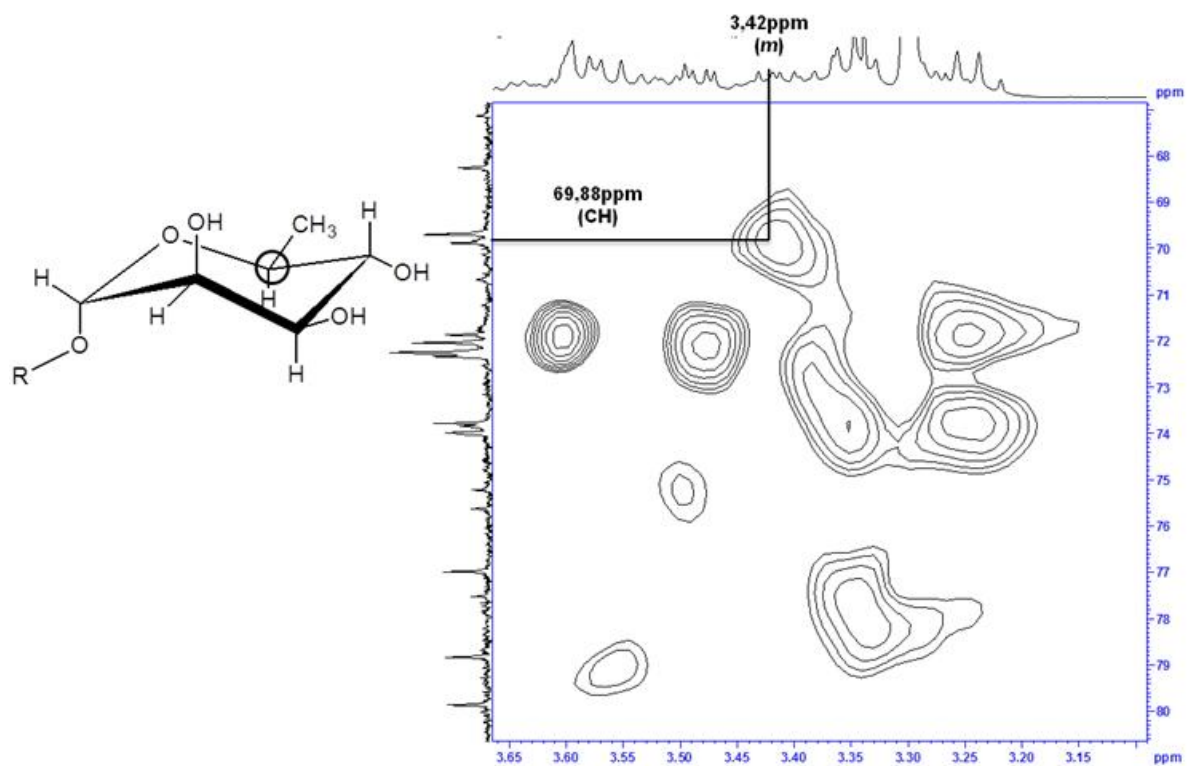


**Espectro 35.** Correlación HMBC de los protones enlazados a carbonos metílicos (1,07 y 0,98ppm) con carbonos tipo CH en la zona de 69ppm.

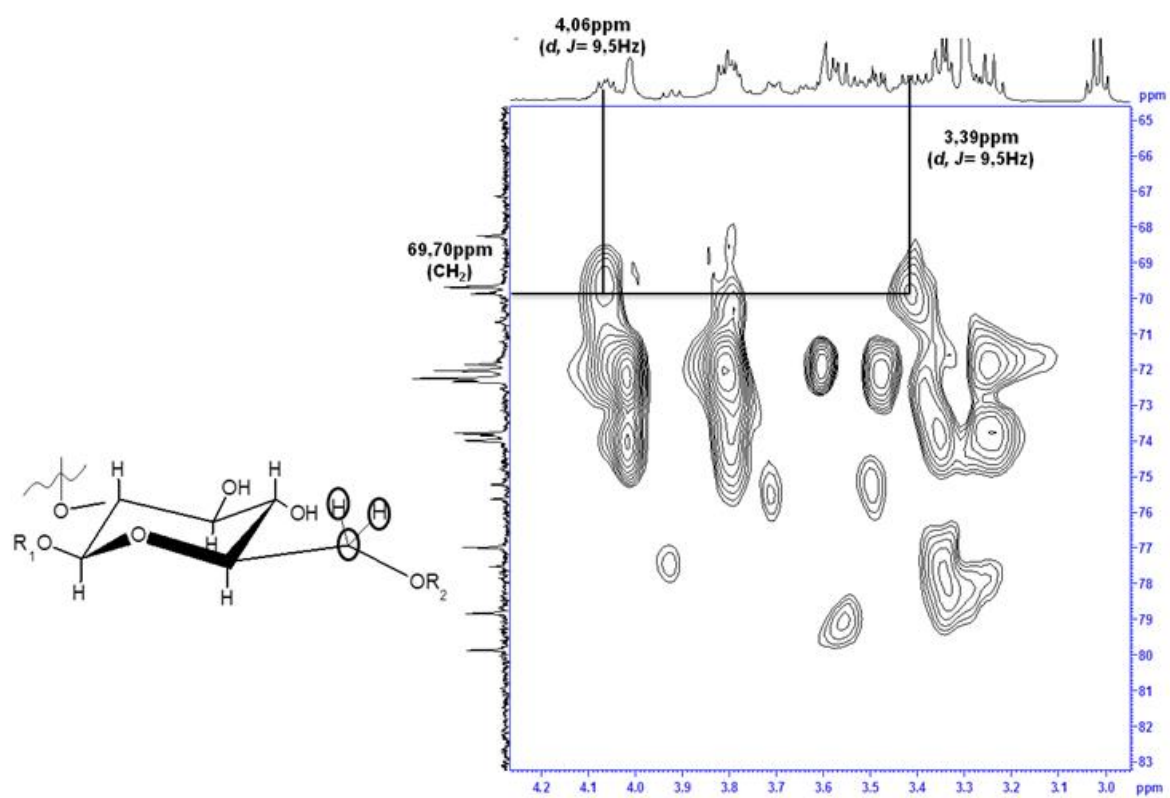


**Espectro 36.** Espectro HMQC, correlación entre carbono tipo CH en 69,67ppm y proton centrado en 4,06ppm.

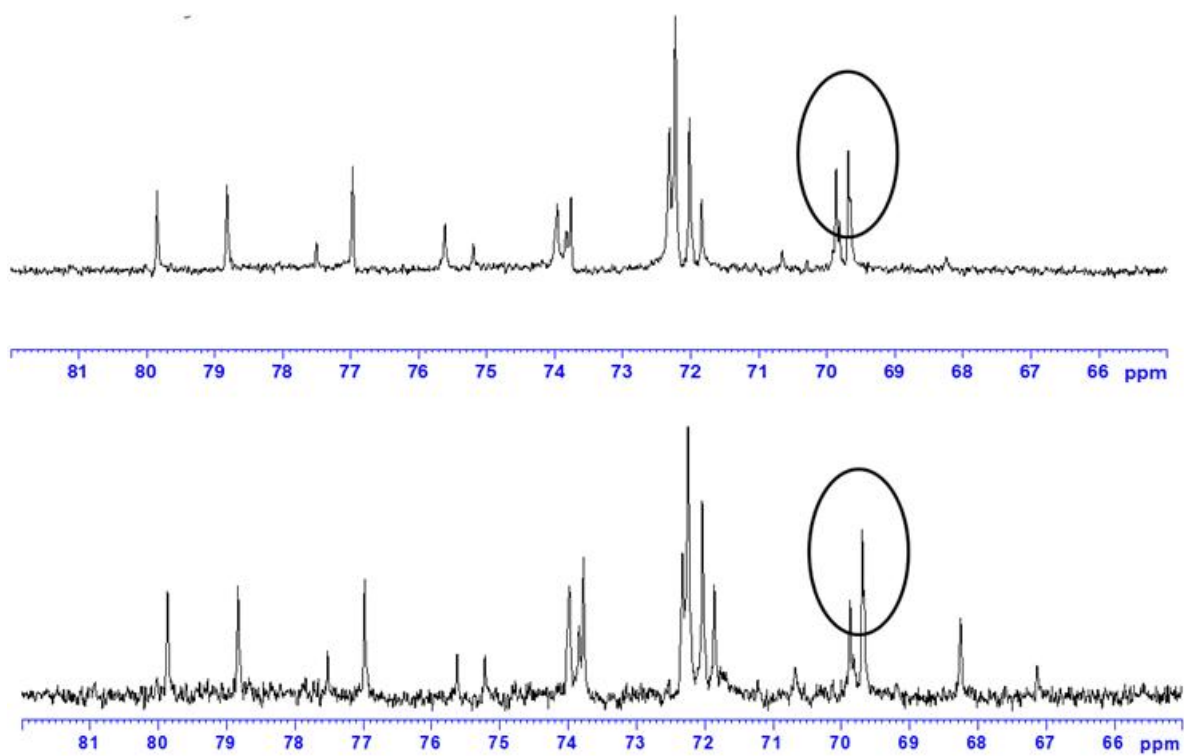




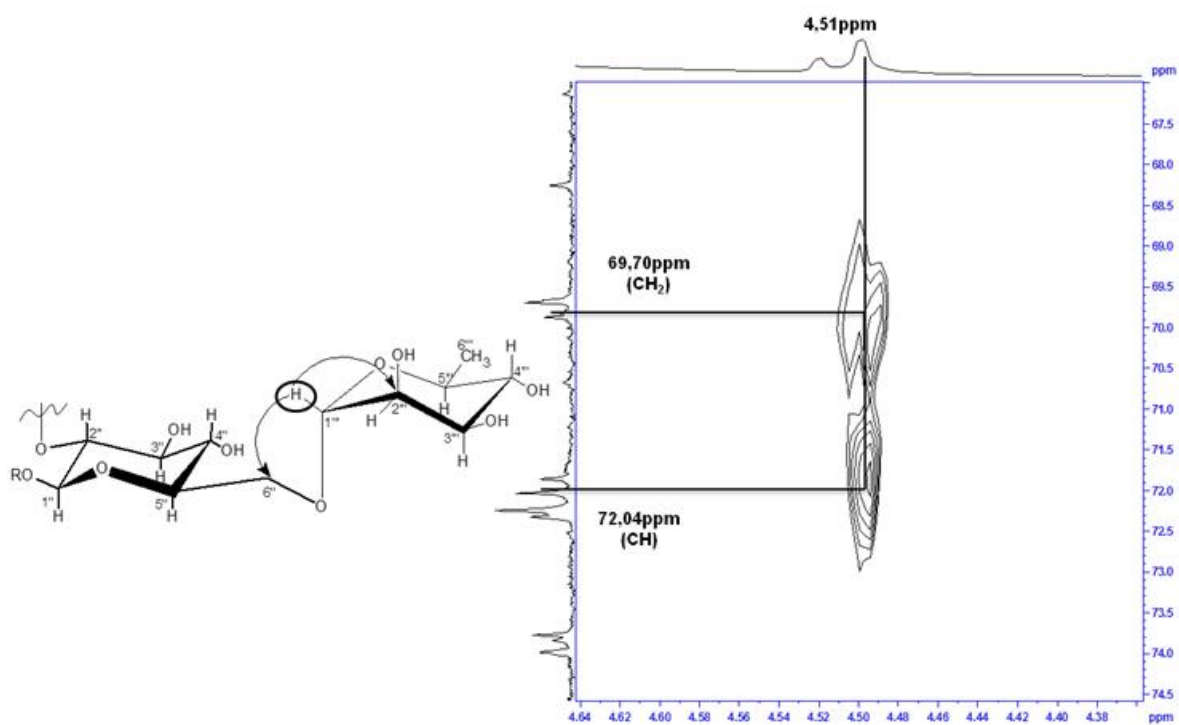
**Espectro 37.** Espectro HMQC, correlación entre carbono tipo CH en 69,88ppm y protón centrado en 3,42ppm.



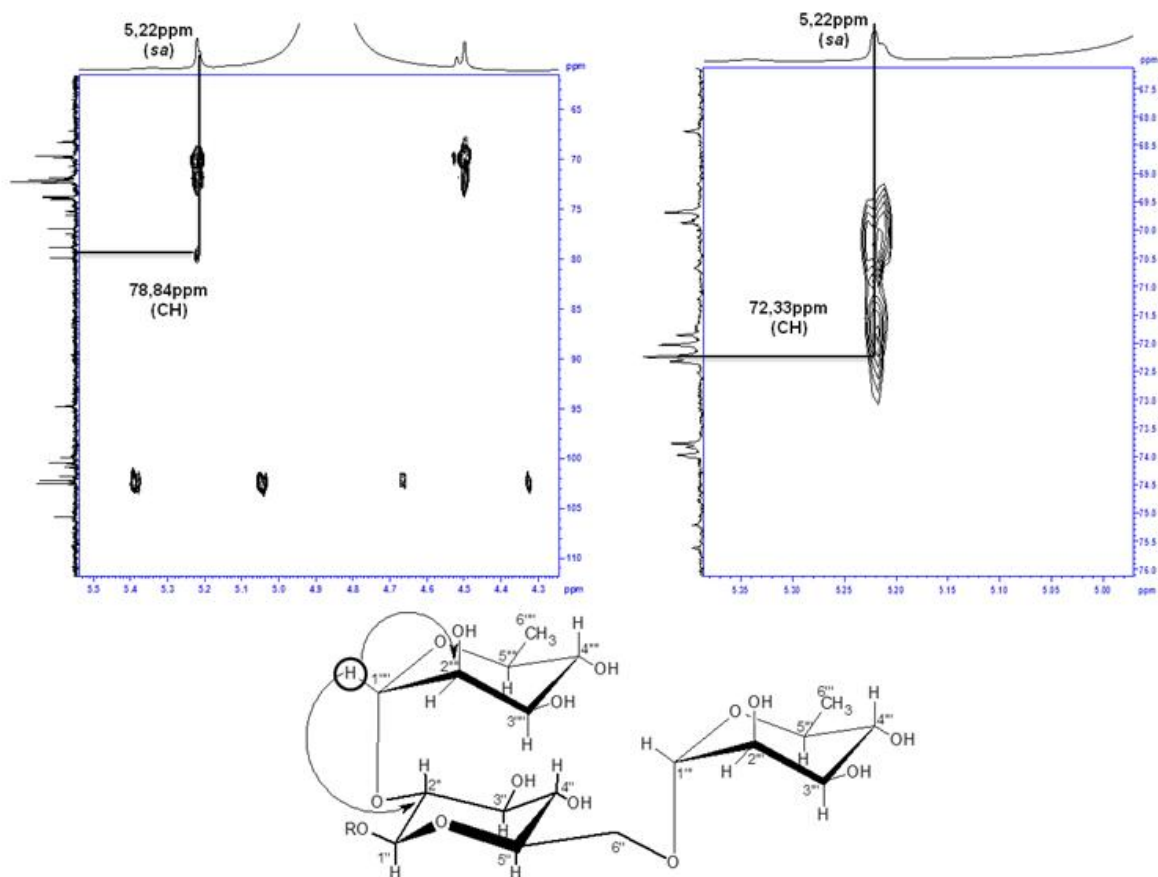
**Espectro 38.** Correlación entre carbono tipo CH<sub>2</sub> en 69,70ppm y protones centrados en 4,06 y 3,39ppm.



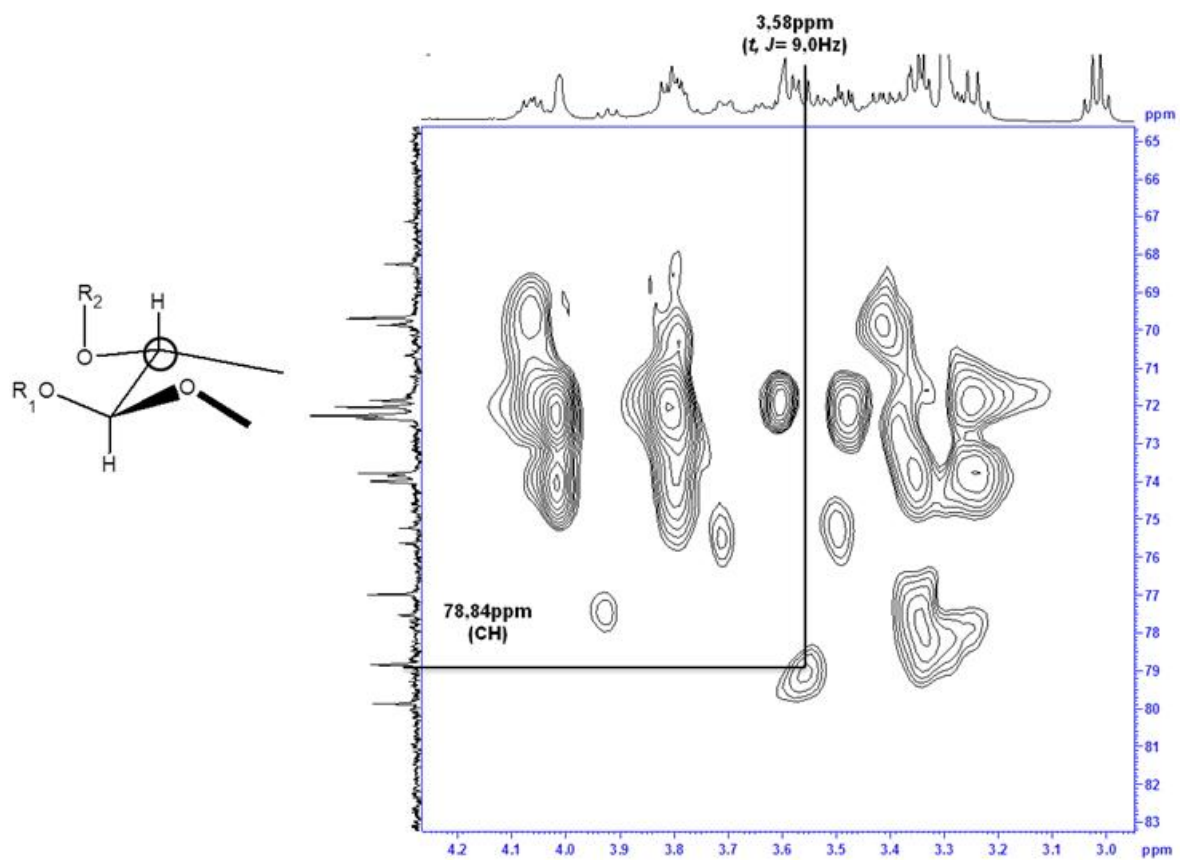
**Espectro 39.** Espectro de DEPT y RMN- $^{13}\text{C}$  en la zona de 66-82ppm.



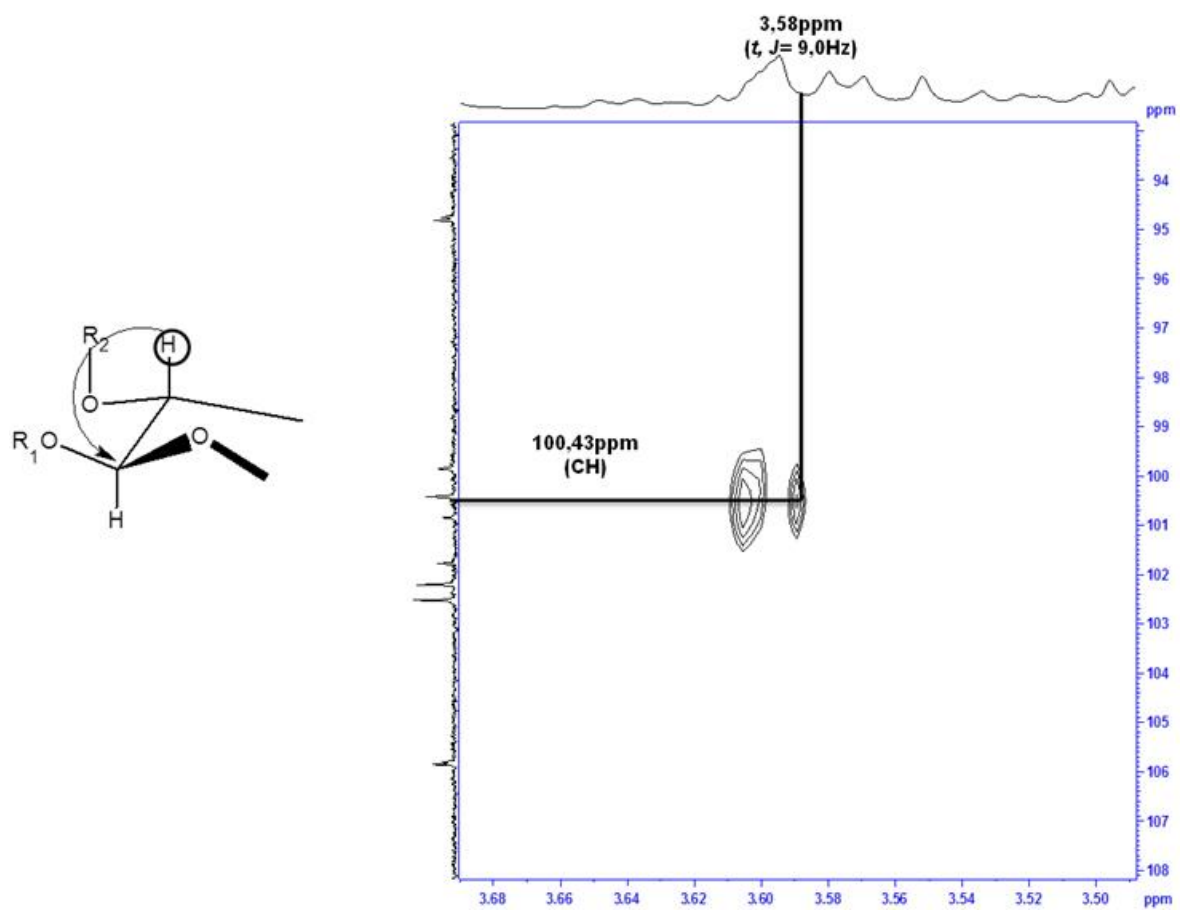
**Espectro 40.** Correlación en HMBC, entre el proton centrado en 4,51ppm y carbonos tipo CH entre 72,1 y 69,70ppm.



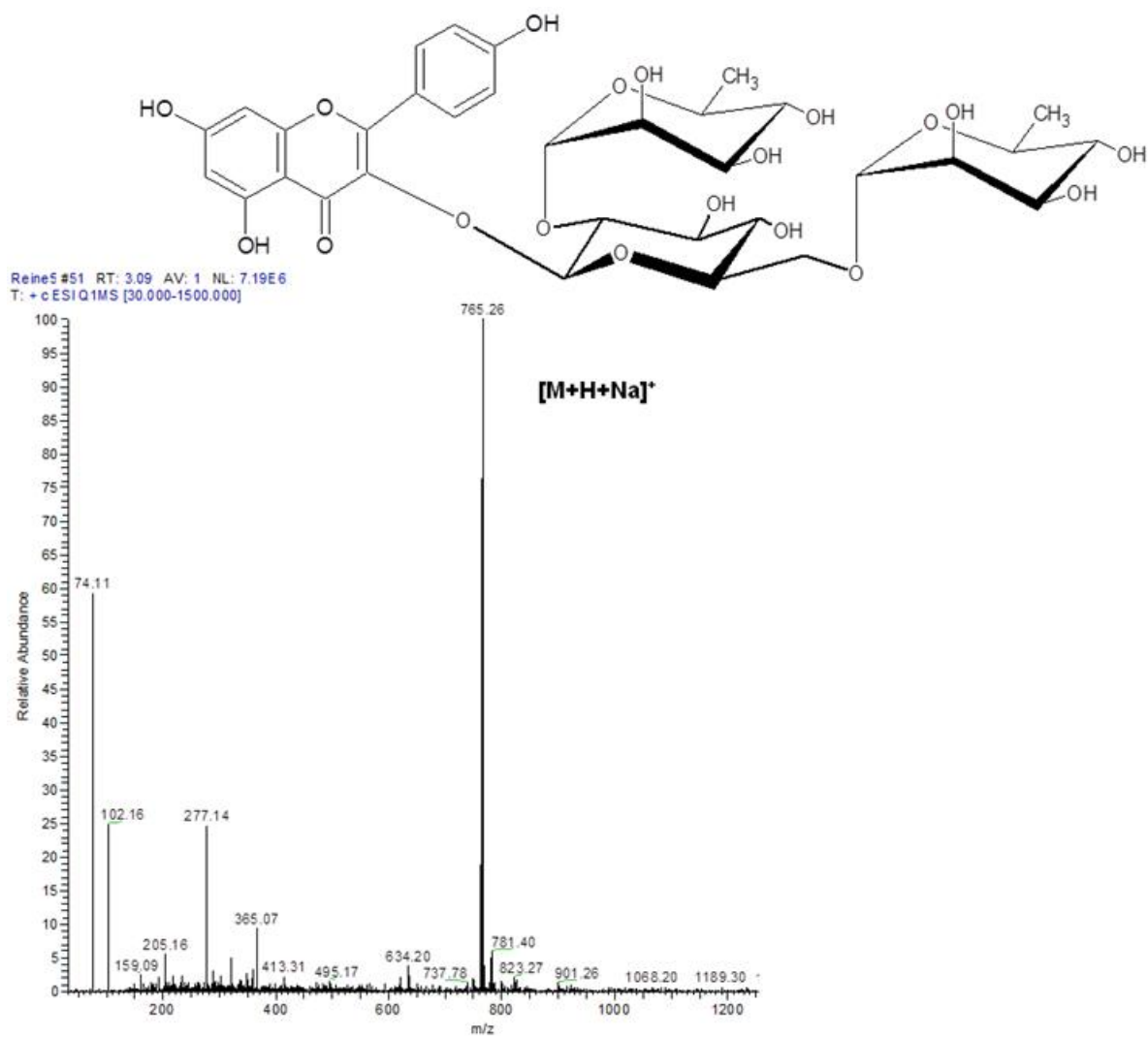
**Espectro 41.** Correlación entre el protón centrado en 5,22ppm y los carbonos entre 78,9 y 72,3ppm (HMBC).



**Espectro 42.** Espectro HMBC, correlación entre carbono en 78,84ppm y protón centrado en 3,58ppm.

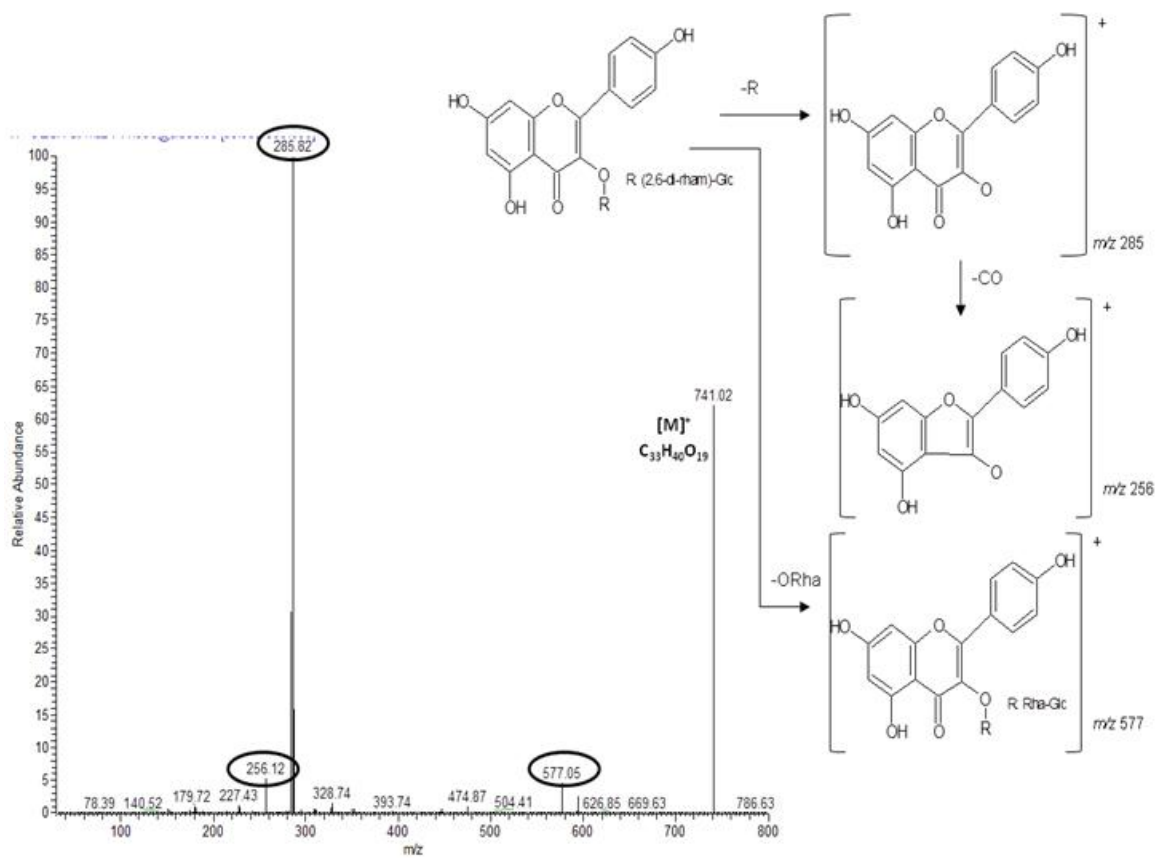


**Espectro 43.** Correlación entre carbono anómico en 100,43ppm y protón centrado en 3,58ppm.

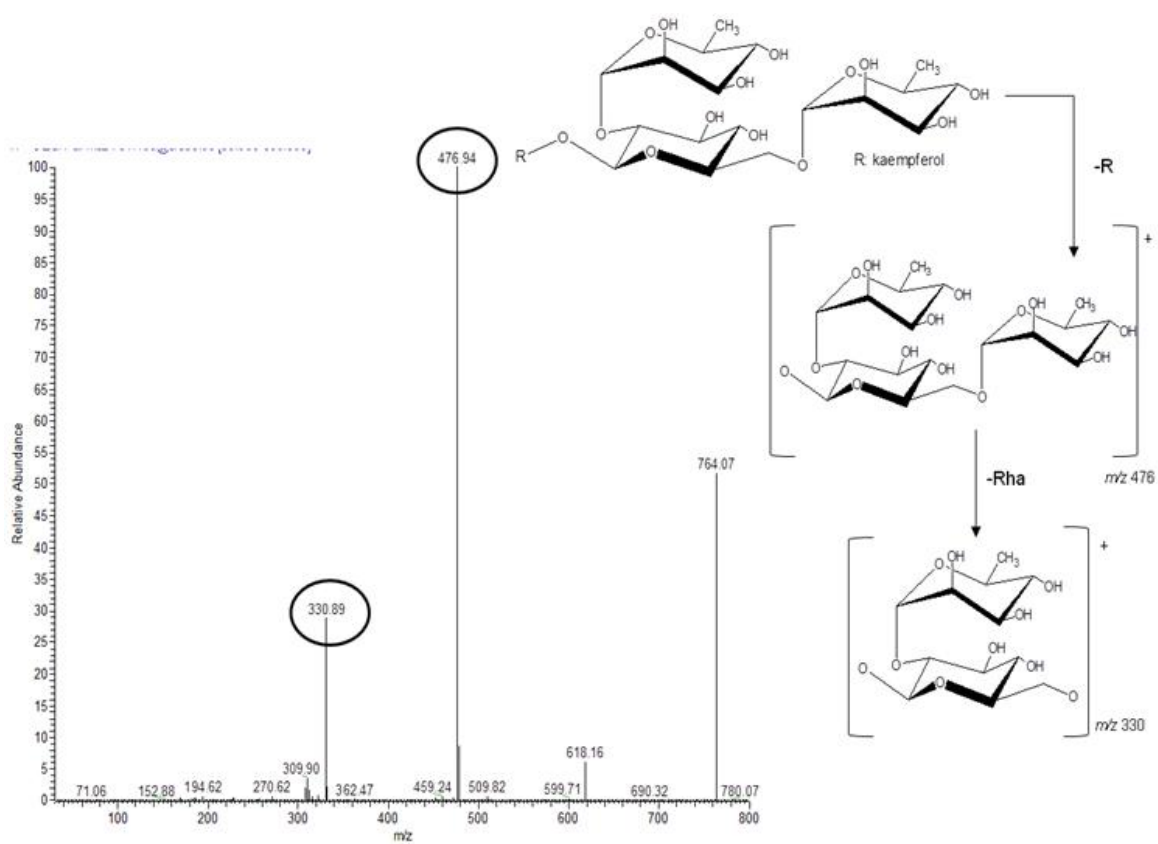


**Espectro 44.** Espectro de masas (ESI), pico de i3n molecular.





**Espectro 45.** Espectro de masas (ESI) entre la zona de  $m/z$  800 y 200.



**Espectro 46.** Espectro de masas (ESI), entre la zona de  $m/z$  800 y 300.