

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LA
SEMILLA DE *Billia rosea* (HIPPOCASTANACEAE).**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Sherley
Efigenia Pimentel Pereira, para
optar al título de Licenciado En
Química.

Tutor: Dra. María Rodríguez

Caracas, octubre 2011.

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LA SEMILLA DE *Billia rosea* (HIPPOCASTANACEAE)”**. Presentado por la Br. Sherley Efigenia Pimentel Pereira., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al Título de Licenciado en Química.

Dra. María Rodríguez
(Director)

Prof. Alírica Suárez
(Jurado)

Prof. Ivette Piña
(Jurado)

Yo Profesora, María Rodríguez Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LA SEMILLA DE *Billia rosea* (HIPPOCASTANACEAE)”.

Que presenta la Br. Sherley Efigenia Pimentel Pereira, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2010 y 2011, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Octubre de 2011

Dra. María Rodríguez
(Director)

Resumen:

Debido a la escasa información sobre los metabolitos secundarios presentes en la especie, se propone el estudio fitoquímico del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de las semillas de *Billia rosea* perteneciente a la familia Hippocastanaceae. Del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) se aislaron tres compuestos, un derivado del ácido cinámico, un triterpeno del tipo polihidroxioleanano glicosilado, y un triterpeno del tipo polihidroxioleanano glicosilado sustituido con un ácido monoterpenico, este último nuevo en la familia Hippocastanaceae.

Las estructuras elucidadas corresponden a metil 3-(4-fenil-3-hidroximetileno)acrilato o 3-fenil-3-hidroximetileno propeonato de metilo, un monosacárido de la escina 21-(2-metilbutanoil)-22-angeloil-protoaescingenina ó 3β , 16α , 21β , 22α , 24 , 28-hexahidroxiolean-12-eno y la saponina 3-O- α -arabinofuranosil (1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoronopiranosil- 16α , 22α , 24 , 28-pentahidroxi, 21β -((*E*)-2-metil-6-hidroxi-6-metil-2,7-octadienoil)-olean-12-eno.

Agradecimientos:

En primer lugar a le doy gracias a DIOS por darme vida, salud, sabiduría, fortaleza y entendimiento para alcanzar esta meta y por permitirme entender que verdaderamente su tiempo es perfecto.

A la casa que vence la sombra, la maravillosa Universidad Central de Venezuela por darme la oportunidad de formar parte de esa gran ciudad universitaria, por darme las herramientas y la formación necesarias para ser una profesional.

A mis Padres, por ese amor y apoyo incondicional, por su comprensión, sus consejos, por guiarme hacia el camino correcto, por depositar en mi su confianza, por ayudarme a ser una persona mejor cada día, todo lo que soy se lo debo a ustedes, gracias por enseñarme a no rendirme y ser perseverante, este triunfo y todo el esfuerzo para alcanzar la más grande de mis metas es inspirado y es para ustedes.

A mis Hermanos, por su apoyo incondicional por sus buenos consejos y sugerencias en todo momento, por esa comprensión y protección que los hacen ser como mis segundos padres, son y siempre han sido un ejemplo a seguir.

A mis Sobrinos, Gherald y Alessandro por ser la bendición y la alegría de la familia que con solo una sonrisa iluminan la vida de todos y nos hacen seguir adelante.

A mi novio Arturo por caminar junto a mi tomados de la mano durante este largo camino, por ese amor, esa comprensión y apoyo incondicional sin esperar ni pedir nada a cambio, gracias por esos buenos momentos que hicieron más grata mi vida universitaria.

A mis amigos y compañeros, por todo el tiempo compartido a lo largo de la carrera, por los momentos buenos y difíciles así como esas largas horas interminables de estudios que nunca olvidare. Gracias por sus buenos consejos, por su apoyo, y por compartir tantas cosas.

A la Prof. María Rodríguez por permitirme y darme la oportunidad de realizar esta investigación, por ser una gran persona, gracias por su valiosa asesoría, por su ayuda, por guiarme y por enseñarme innumerables cosas.

A los chicos y chicas del laboratorio 321 y 316, así también a todas aquellas personas que de una u otra forma ayudaron hacer esto posible. Muchísimas gracias.

Índice general

	Pag.
Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras	iii
Índice de esquemas	v
Índice de tablas	vi
1. Introducción	1
1.1. Familia Hippocastanaceae	3
1.2. Descripción Taxonómica de la especie <i>Billia rosea</i>	6
1.3. Descripción Botánica de la Especie <i>Billia rosea</i>	7
1.4 Antecedentes Fitoquímicos	10
1.4.1. Antecedentes Fitoquímicos de otros especies	11
1.4.1.1. <i>Aesculus hippocastanum</i> L.	11
1.4.1.2. <i>Aesculus pavia</i> L.	15
1.4.1.3. <i>Aesculus turbinata</i>	17
2. Motivación	18
3. Objetivos.	
3.1. General	19
3.2. Específicos	19
4. Metodología Experimental	
4.1. Diseño Experimental	20
4.2. Material vegetal	20

4.3. Materiales y equipos	23
4.3.1. Métodos cromatográfica	23
4.3.2. Equipos	25
4.4. Análisis fitoquímico preliminar	26
4.5. Separación y purificación del extracto de Acetato de Etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i>	27
4.5.1. Separación y purificación de la fracción F _I .	30
4.5.2. Separación y purificación de la fracción F _{I7} .	31
5. Resultados y discusión:	
5.1. Estudio Fitoquímico	34
5.2. Compuesto F _D	34
5.3. Compuesto F _{I7C}	37
5.4. Compuesto F _{I7E}	43
6. Conclusiones	59
7. Recomendaciones	60
8. Referencias bibliográficas.	61
Apéndice	66

Lista de Abreviaturas

Siglas	Significado
AcOEt	Acetato de etilo.
Ara-f	Arabinofuranosil.
AS	Reactivo de Anisaldehido - Acido Sulfúrico.
C ₆ H ₁₄	Hexano.
°C	Grados centígrados.
CC	Cromatografía de columna.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CHCl ₃	Cloroformo.
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano.
CH ₃ COOH	Acido acético.
cm	Centímetros.
COSY	Correlation Spectroscopy.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
E AcOEt	Extracto de acetato de etilo.
E n-BuOH	Extracto butanólico.
Et ₂ O	Dietiléter.
GlcA-p	Acido glucurónicopiranosil.
Glc-p	Glucopiranosil.
g	Gramos.
HCOOH	Acido fórmico.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence.
H ₂ O	Agua.
IR	Infrarrojo.
KOM	Reactivo de Komarowsky.
MC	Extracto metanólico caliente.

MeOD-d ₄	Metanol deuterado.
MeOH	Metanol.
MF	Extracto metanólico frío.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
n-BuOH	1-butanol.
nm	Nanómetros.
ppm	Partes por millón.
RF	Factor de retención.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protones.
SC	Reactivo de sulfato cerico.
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy.
VS	Reactivo de vainillina / ácido sulfúrico.
UV	Ultravioleta.
δ	Desplazamiento químico.
%	Porcentaje.

Índice de figuras:

Nº	Título	Pág.
1	Cataño de indias. <i>Aesculus Hippocastanum L.</i>	5
2	<i>Billia rosea</i> : Hoja, Flor y Fruto.	8
3	<i>Billia rosea</i> : Semillas.	8
4	<i>Billia rosea</i> : Hojas.	8
5	Distribución de <i>Billia rosea</i> .	9
6	Esqueleto Oleanano.	10
7	Estructuras de los sustituyentes en el grupo hidroxilo de los átomos de C22 y C21 del esqueleto oleanano.	10
8	Escinas aisladas de <i>Aesculus hippocastanum L.</i> con actividad hipoglicemiante.	11
9	Escinas, aisladas de <i>Aesculus hippocastanum L.</i>	12
10	Isoescinas, aisladas de <i>Aesculus hippocastanum L.</i>	13
11	Flavonoides aislados de <i>Aesculus hippocastanum</i> .	14
12	Saponinas triterpenoidales pentacíclicas aisladas de <i>Aesculus pavia L.</i>	15
13	Saponinas triterpenoidales pentacíclicas aisladas de <i>Aesculus pavia L.</i>	16
14	Saponinas triterpénicas aisladas de <i>Aesculus turbinata</i> .	17
15	Placas de CCF del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) en el visible y a 365 nm. reveladas con vainillina / ácido sulfúrico (VS)	26
16	Placas de CCF de la fracción F _D proveniente de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i> en el visible y a 365 nm. reveladas con sulfato cérico en metanol.	29

17	Placas de CCF de la fracción F_I proveniente de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i> en el visible y a 365 nm. reveladas con anisaldehído-ácido sulfúrico	29
18	Placas de CCF de la fracción F_{I7} proveniente de la separación y purificación de la fracción F_I en el visible y a 365 nm reveladas con Komarowky.	31
19	Placas de CCF de la fracción F_{I7C} y la fracción F_{I7E} proveniente de la separación y purificación de la fracción F_{I7} en el visible y a 365 nm. reveladas con Komarowky.	33
20	Posible estructura para el compuesto F_D	37
21	Correlación HMBC y COSY de 21(-2-metilbutanoil)-22-angeloil-protoaescingenina.	43
22	Correlación HMBC para la fracción F_{I7E} en MeOD- d_4	49
23	Correlación HMBC para la fracción F_{I7E} en piridina- d_5	58

Índice de esquemas:

Nº	Título	Pág.
1	Obtención de los extractos metanólicos y acuosos de la semilla de <i>Billia rosea</i> .	21
2	Obtención de los extractos de Acetato de etilo, n-butanol y el crudo de saponinas de la semilla de <i>Billia rosea</i> .	22
3	Separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i> mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.	28
3.1.	Separación y purificación de la fracción F _I del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i> . mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.	30
3.1.1.	Separación y purificación de la fracción F _{I7} del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de <i>Billia rosea</i> mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.	32

Índice de tablas:

Nº	Título	Pág.
1	Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_D en MeOD- d_4 .	35
2	Desplazamiento ^1H (ppm) para F_D en MeOD- d_4 .	35
3	Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), DEPT, HMBC y HMQC para F_D en MeOD- d_4 .	36
4	Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_{17C} en MeOD- d_4 .	38
5	Desplazamiento ^{13}H (ppm) para F_{17C} en MeOD- d_4 .	39
6	Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), HMBC, HMQC y COSY para F_{17C} en MeOD- d_4 .	40
7	Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_{17E} en MeOD- d_4 .	44
8	Desplazamiento ^1H (ppm) para F_{17E} en MeOD- d_4 .	45
9	Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), DEPT, HMBC y HMQC para F_{17E} en MeOD- d_4 .	46
10	Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_{17E} en Piridina- d_5	50
11	Desplazamiento ^{13}C (ppm) para los azúcares de F_{17E} en Piridina- d_5	51
12	Desplazamiento ^1H (ppm) para F_{17E} en Piridina- d_5	52
13	Desplazamiento ^1H (ppm) para los azúcares de F_{17E} en Piridina- d_5	53
14	Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), HMBC y HMQC para F_{17E} en Piridina- d_5	53
15	Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), HMBC y HMQC para los azúcares de F_{17E} en Piridina- d_5	55

1. Introducción.

Las plantas representan unas de las fuentes más antiguas de la medicina natural y sus principios activos (medicinales), contenidos en hojas, raíces, flores, semillas y cortezas, han sido utilizados durante siglos en forma de infusiones, extractos, cápsulas o pócimas para curar o aliviar diversas dolencias en el organismo.¹

El uso de las plantas se ha difundido principalmente por medio de la tradición oral pues representan para muchos una alternativa de salud. La historia etnobotánica es extensa y se han publicados diversos libros que compilan el conocimiento en esta área entre los cuales se puede mencionar: El “Códice Badiano,” escrito por un indio Xocxhimilca y traducido al latín, el cual describe las plantas medicinales mexicanas. El texto clásico “EL Arcano De la Quina y la Flora de Santa Fe,” escrito en Colombia a finales del siglo XVIII y la obra de Henry Pittier, “Manual de las Plantas Usuales en Venezuela,” que describe las plantas de acuerdo a su uso y clasificación botánica, escrito en el año 1926.^{1,2}

En los últimos tiempos ha aumentado el interés científico sobre los componentes y efectos de las plantas que tradicionalmente han mostrado actividades biológicas interesantes, como por ejemplo propiedades antibacterianas, antitumorales, antiespasmódicas e hipoglicemiantes.^{1,3,4,5,6}

Existen numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglicemiante, orientadas al tratamiento etnomédico de la diabetes *Mellitus*. Muchas de éstas han sido ampliamente estudiadas y aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados, los resultados de los trabajos realizados en los últimos años son muy positivos debido a la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían ser utilizados durante largos períodos.⁵

La diabetes *mellitus* es un síndrome endocrino y un problema de salud pública que afecta a una de cada veinte personas en el mundo lo que representa aproximadamente 173 millones de personas. Alrededor de dos terceras partes de estos pacientes viven en países en vía de desarrollo. De acuerdo al envejecimiento de la población y los malos hábitos de vida actual, los expertos suponen que para el año 2025 esa cifra puede llegar a 366 millones de personas.^{7,8}

Esta enfermedad tiene una prevalencia elevada y es una de las primeras causas de mortalidad por sus complicaciones a mediano o largo plazo. El tratamiento farmacológico más común es con agentes hipoglicemiantes orales y/o insulina logrando avances muy importantes en el tratamiento, sin embargo, aproximadamente un tercio de los pacientes siguen empleando plantas como tratamiento alternativo. El estudio de hipoglicemiantes naturales puede llevar al desarrollo de fármacos con utilidad terapéutica potencial y con una baja incidencia de efectos secundarios.^{5,7}

Entre las numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglicemiantes se encuentra las especies pertenecientes a la familia Hippocastanaceae, compuesta por dos géneros, uno de ellos, *Aesculus*, con *Aesculus hippocastanum* (“castaño de indias” o “Horse chestnut”), como la especie más representativa, posee saponinas conocidas como escinas, con propiedades antiinflamatorias, antiedematosas, capilaroprotectivas, y antidiabéticas. El otro género, *Billia rosea*, ha sido poco estudiado y el conocimiento etnobotánico refiere su uso para el control de la diabetes.^{9,10,11}

1.1 Familia Hippocastanaceae

La familia Hippocastanaceae, está conformada por dos géneros: *Aesculus* y *Billia*. El género *Aesculus* está representado por trece especies distribuidas a través del hemisferio norte. Doce de las trece especies se encuentran en Asia oriental y America del Norte y una es nativa de Europa.⁹ El género *Billia* está conformado por dos especies, *Billia hippocastanum*, distribuida en centro America y *Billia rosea* distribuida, en Sur America.^{9,12} Estudios taxonómicos sugieren que ambos géneros tuvieron un ancestro en común similar a *Billia*, pero *Aesculus*, emigró solitariamente a Eurasia a través del Estrecho de Bering.⁹

Son árboles con hojas opuestas, caducas (en *Aesculus*) o persistentes (en *Billia*), palmeado-compuestas. Flores blancas, amarillas, rosadas o rojas, dispuestas en panículas terminales. Tienen el cáliz de 5 sépalos, la corola con 4-5 pétalos y el androceo de 6-8 estambres. El fruto en cápsula coriácea con cubierta espinescente o lisa, abriéndose en tres valvas y conteniendo semillas. En las inflorescencias las flores superiores son funcionalmente masculinas, mientras que las inferiores actúan como hermafroditas.¹³

Las plantas de esta familia se caracterizan principalmente por que producen glucósidos y saponinas glucosídicas, flavonoides glicosilados, principios amargos, aceites grasos, etc.¹⁴

De esta pequeña familia la especie más estudiada es la *Aesculus hippocastanum* L. conocida como castaño de indias (horse chestnut) o falso castaño. Crece en parques, avenidas y en calles de grandes urbes como árbol de sombra ornamental en lugares despejados y terrenos medianamente húmedos y fértiles.¹³

Las castañas no son aptas para el consumo humano, sin embargo, se utilizan en la alimentación animal. No obstante, las semillas tostadas, molidas y preparadas en infusión se usan con fines medicinales.¹⁵

Las partes más estudiadas de *Aesculus hippocastanum* L son las semillas, cortezas y hojas (en ese orden de importancia) y por lo general suelen recogerse del suelo cuando caen tras la maduración.¹⁵ Tradicionalmente, se ha utilizado como analgésico, antiinflamatorio y para fortalecer los vasos sanguíneos en el tratamiento de venas inflamadas o dilatadas.^{16,17}

Los compuestos activos son distintos para las semillas, la corteza o las hojas. En las semillas se encuentran derivados flavónicos y saponinas triterpénicas donde la escina es el principal principio activo. En las hojas y flores, se encuentran los aceites esenciales y la corteza es rica en taninos y derivados cumarínicos presente en forma de heterósidos.^{15,16,18}

La escina es un saponósido con propiedad antiinflamatoria, antiedematosa, vasoconstrictora, protectora de la pared vascular y venotónica, por lo que ésta básicamente se utiliza en trastornos de la circulación venosa.¹⁸

Debido a las propiedades vitamínicas P. (flavonoides glucosilados con propiedades antioxidantes) se ha comenzado a utilizar las escinas al 1-3 % (en forma de extracto glicólico), en preparados cosméticos emulsionados o lociones antisolares de aplicación local.¹⁵



Figura 1. Cataño de indias. *Aesculus Hippocastanum* L.¹⁷

1.2 Descripción Taxonómica de la Especie *Billia rosea*.

La especie *Billia rosea* presenta la siguiente clasificación taxonómica.¹⁹

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Hippocastanaceae

Género: *Billia*

Especie: *rosea, columbiana*.²⁰

1.3. Descripción Botánica de la Especie *Billia rosea*.

Billia rosea, es un árbol que crece hasta aproximadamente 30 metros de altura con un tronco de 1 metro de diámetro y savia amarillenta. Hojas opuestas, trifoliadas de aproximadamente 25 cm de longitud, hojuelas membranáceas y elípticas, inflorescencia en panículas de color blanco o rosa convirtiéndose en rojo con la edad, fruto subgloboso-periforme, capsular, verdoso que contiene 1 a 3 gruesas semilla de color café rojizo de sabor amargo con forma hemisférica o polodonal de tamaño mediano, miden entre 2 y 4 cm. La corteza del árbol se presenta en trozos de 1-2 mm. de espesor, acalanados, tubulares o en forma de virutas. La superficie externa es de color gris pardusco. Se caracteriza por su olor débil, y su sabor astringente y amargo además, por que florece y fructifica a partir de los 15 años.^{16,21,22}

Billia rosea es un árbol notablemente ornamental y contribuyen a ello su porte erguido, su follaje compuesto por hojas grandes, brillantes y sus flores blancas. Una característica notable de *Billia rosea* son sus grandes frutos, como bolas de superficie granulosa que cuando están maduras se abren y liberan unas pocas semillas que son utilizadas con fines medicinales.²³

En Venezuela es conocida por la población local como *cobalonga*, los frutos son vendidos por expendedores de hierbas y son utilizados para aliviar el dolor de estomago y para disminuir el dolor durante la menstruación.^{21,24} En cuanto a su uso no medicinal, el tronco es de excelente calidad y es usado para la ebanistería.²⁵

B. rosea es nativo de las regiones tropicales y de los bosques húmedos y templados (entre 700 y 2400 m de altitud) y se puede localizar en Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá y Venezuela (Barquisimeto, Estado Lara).^{24,2}

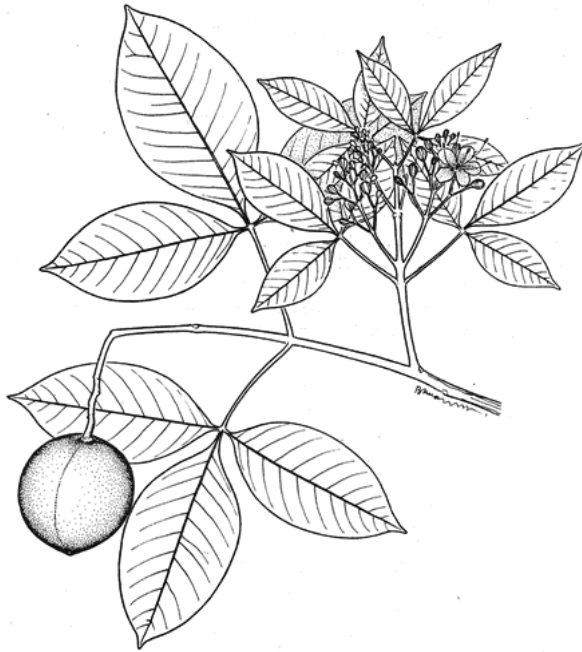


Figura 2. *Billia rosea*: Hoja, Flor y Fruto.²¹



Figura 3. *Billia rosea*: Semillas
Voucher 26389



Figura 4. *Billia rosea*: Hojas
Voucher 2638

Figuras 3 y 4 fueron tomadas en el Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles (MYF), de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.



Figura 5. Distribución de *Billia rosea*.²⁶

1.4. Antecedentes Fitoquímicos.

No existe hasta el momento ningún estudio fitoquímico o biológico sobre el género o la especie. Se han realizado numerosos estudios fitoquímicos sobre *Aesculus*, aislándose saponinas con núcleo terpénico tipo oleanano, y también flavonoides glicosilados en algunas especies. El grupo hidroxilo en átomos de carbono C21 y C22 puede contener varios grupos poco comunes.²⁷

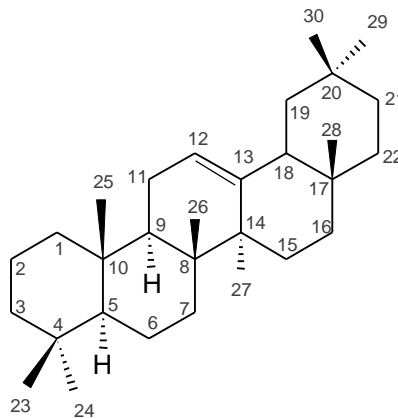


Figura 6. Esqueleto Oleanano.²⁸

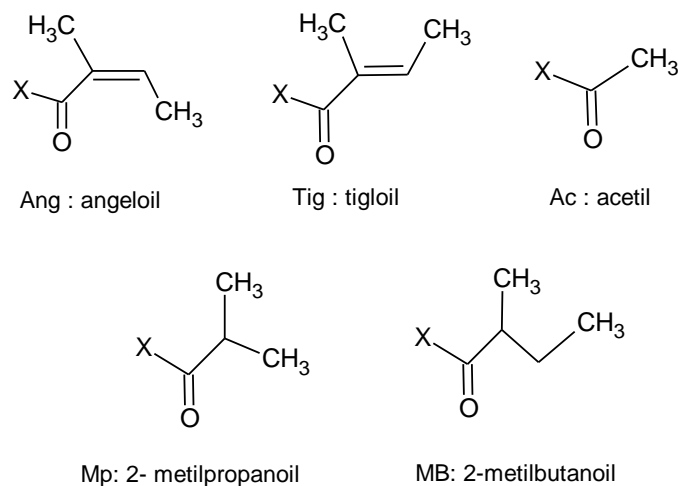


Figura 7. Estructuras de los sustituyentes en el grupo hidroxilo de los átomos de C22 y C21 del esqueleto oleanano.²⁷

1.4.1. Antecedentes Fitoquímicos de otras especies.

Del género *Aesculus* se han aislado un gran número de metabolitos secundarios^{10,11} es por ello que solo se discutirán los trabajos más relevantes según los objetivos propuestos.

1.4.1.1. *Aesculus Hippocastanum L.*

En 1998, Masayuki y colaboradores aislaron de las semillas de *Aesculus Hippocastanum L.*, cinco triterpenos oligoglicosidos acilados de tipo polihidroioleonanos, escinas Ia, Ib, IIa, IIb y IIIa que mostraron un efecto inhibidor sobre la absorción de etanol y actividad hipoglicemiante en la prueba oral de tolerancia a la glucosa en ratas. De igual manera, aislaron otros siete triterpenos, escinas IIIb, IV, V y VI y las isoescinas Ia, Ib, y V y determinaron las estructuras químicas sobre la base de pruebas químicas, físico-químicas y datos espectroscópicos.²⁹

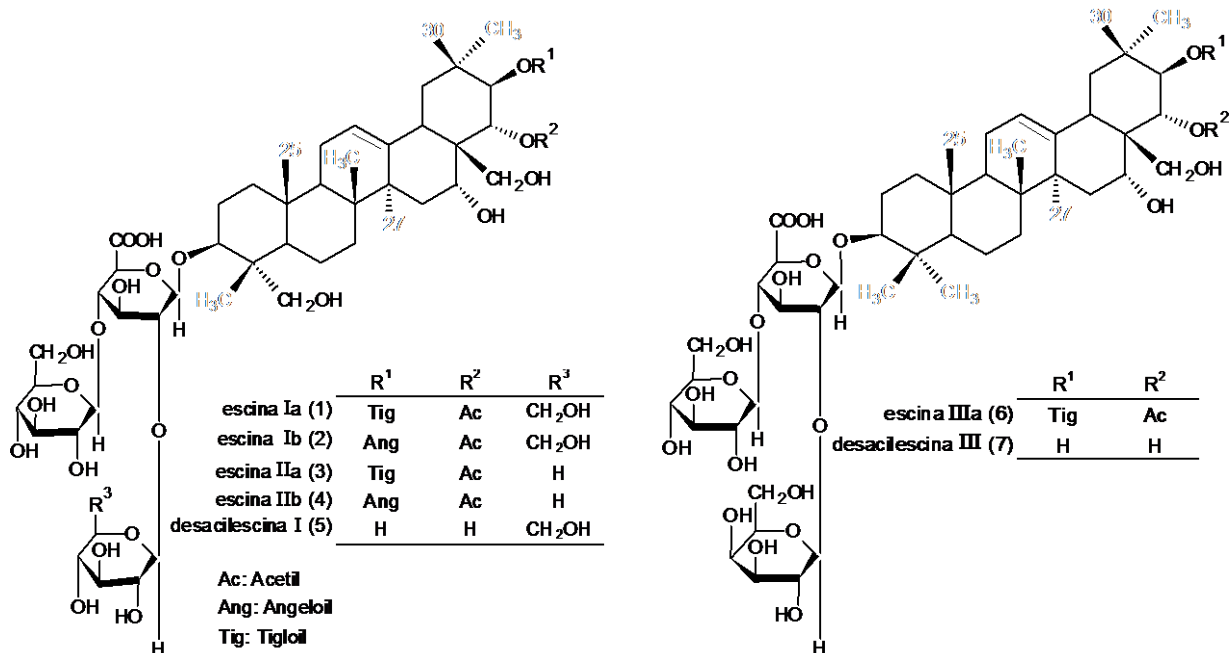


Figura 8. Escinas aisladas de *Aesculus hippocastanum L.* con actividad hipoglicemiante.²⁹

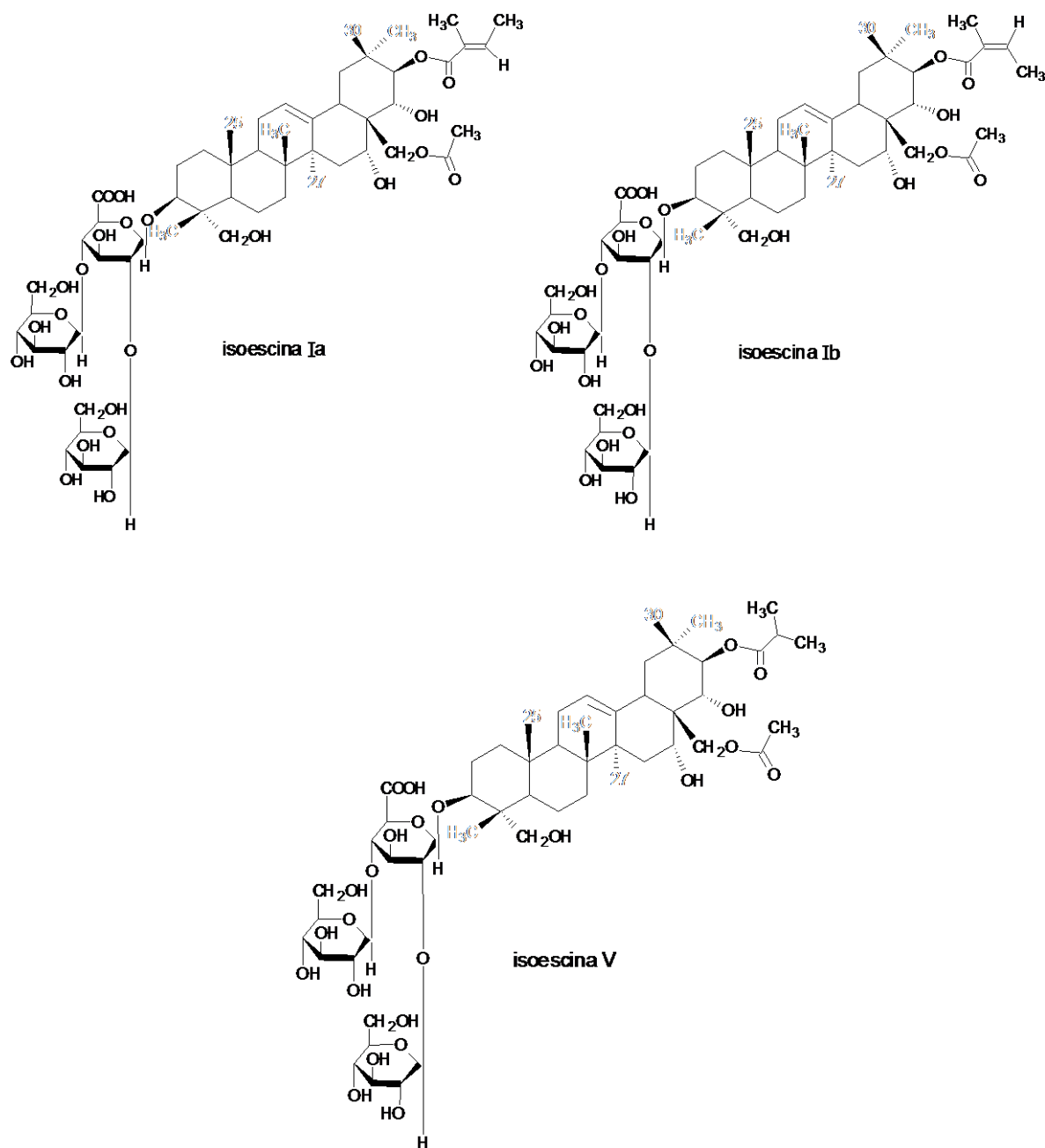
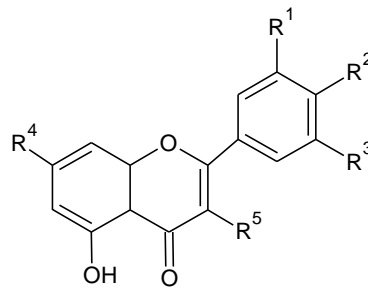


Figura 10. Isoescinas aisladas de *Aesculus hippocastanum* L.²⁹

En 2007, Kapusta y colaboradores aislaron a partir del extracto etanólico de las semillas de *Aesculus hippocastanum* flavonoides glicosilados, por cromatografía en columna de baja presión. Sus estructuras fueron determinadas por métodos espectroscópicos y sus patrones de fragmentación por LC-ES/MS/MS.³⁰



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	OH	Glc	H	OH	Xyl-Rha-Glc
2	OH	Glc	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
3	OH	OH	H	OH	Xyl-(1-2)(Glc (1-3))Glc
4	OH	OH	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
5	OH	Glc-nicotinoil	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
6	OH	Glc-indolin-2-on-3-hidroxi-3-acetil	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
7	H	OH	H	OH	Xyl-(1-2)(Glc (1-3))Glc
8	H	OH	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
9	OCH ₃	OH	H	OH	Xyl-(1-2)(Glc (1-3))Glc
10	OCH ₃	Glc	H	OH	Xyl-(1-2)(Glc (1-3))Glc
11	OH	OH	H	OH	Glc-Rha
12	OH	Glc-indolin-2-on-3-acetil	H	OH	Xyl-(1-2)Glc
13	H	OH	H	OH	Glc-Rha

Glc: β-D-glucopiranosil

Xyl: β-D-xilopyranosyl

Rha: L-ramnosa

Figuras 11. Flavonoides aislados de *Aesculus hippocastanum*.³⁰

1.4.1.2. *Aesculus pavia* L.

En 2007, Zang y colaboradores aislaron de *Aesculus pavia* L., 13 saponinas triterpenoidales pentacíclicas llamadas aesculosidos, junto con 18 compuestos conocidos. Los compuestos fueron evaluados *in vitro* sobre 59 líneas celulares provenientes de 9 humanos. Estos investigadores encontraron que compuestos con dos grupos acilos en C-21 Y C-22 mostraban poca o ninguna toxicidad para todas las líneas celulares estudiadas, sugiriendo que la presencia del grupo acil en estas posiciones es crucial para la actividad.³¹

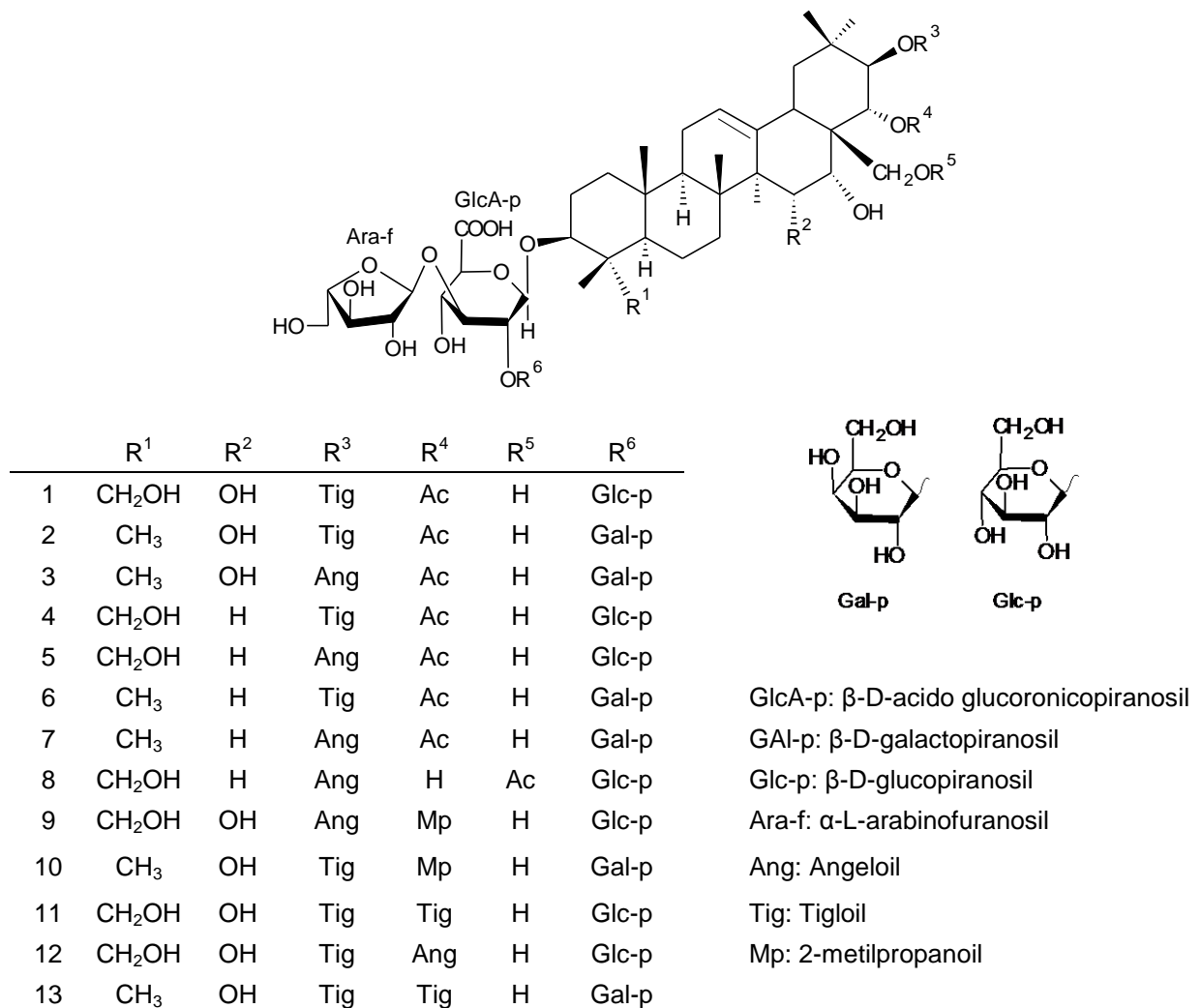
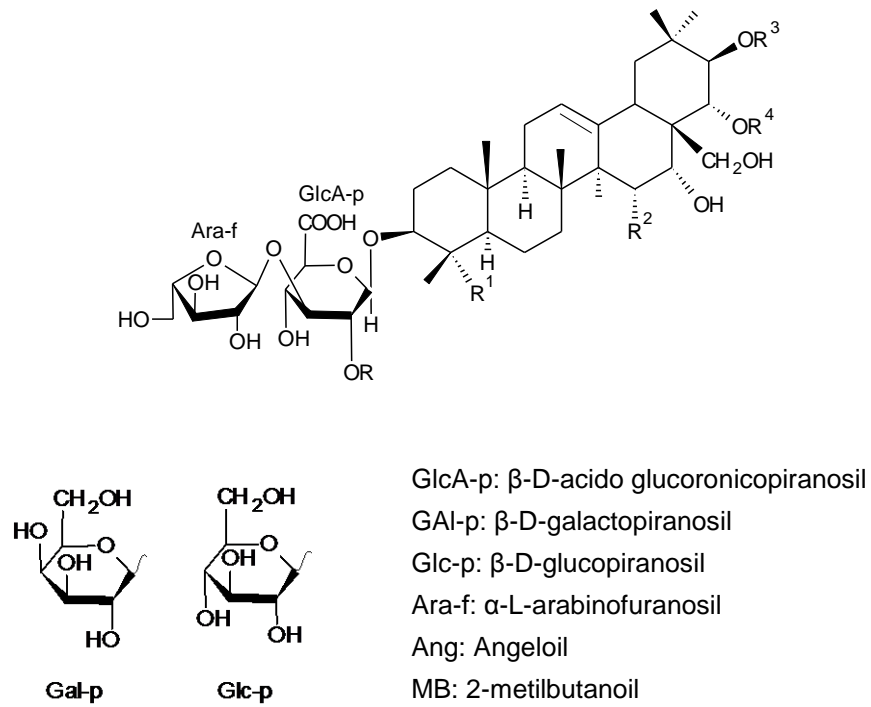


Figura 12. Saponinas triterpenoidales pentacíclicas aisladas de *Aesculus pavia* L.³¹

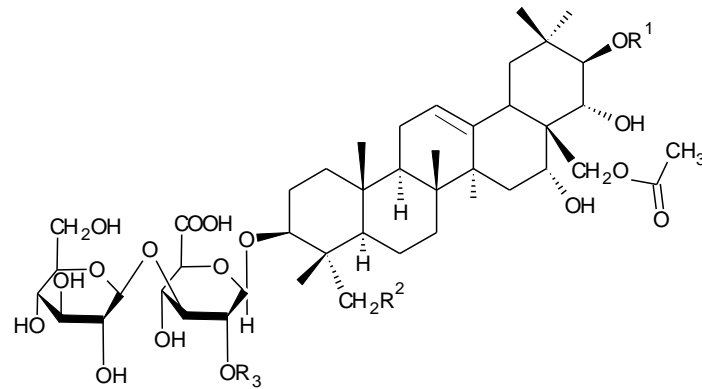


	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
14	Gal-p	CH ₃	OH	H	H
15	Glc-p	CH ₂ OH	OH	H	H
16	Gal-p	CH ₃	H	H	H
17	Glc-p	CH ₂ OH	H	H	H
18	H	CH ₂ OH	H	H	H
19	Gal-p	CH ₃	OH	Ang	H
20	Glc-p	CH ₂ OH	H	Ang	H
21	Gal-p	CH ₃	H	Ang	H
22	H	CH ₂ OH	H	Ang	H
23	Gal-p	CH ₃	OH	Ang	MB
24	Glc-p	CH ₂ OH	H	Ang	Ang
25	Glc-p	CH ₂ OH	H	Ang	MB
26	Gal-p	CH ₃	H	Ang	Ang
27	Gal-p	CH ₄	H	Ang	MB

Figura 13. Saponinas triterpenoidales pentaciclicas aisladas de *Aesculus pavia* L.³²

1.4.1.3. *Aesculus turbinata*.

En 2008, Yang y colaboradores aislaron del extracto etanólico de *Aesculus turbinata* tres nuevas saponinas triterpénicas llamadas isoescinas e identificadas por hidrólisis química y análisis espectroscópico.³³



	R ¹	R ²	R ³	
1	Tig	OH	Gal-p	GAl-p: β-D-galactopiranosil
2	MB	OH	Glc-p	Glc-p: β-D-glucopiranosil
3	Ang	H	Glc-p	Tig: Tigloil
				MB: 2-metilbutanoil
				Ang: Angeloil

Figura 14. Saponinas triterpénicas aisladas de *Aesculus turbinata*.³³

2. Motivación.

En vista del interés químico y biológico en el estudio de plantas pertenecientes a la familia Hippocastanaceae y a la poca o ninguna información de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Billia rosea*, se propone el estudio del extracto de acetato de etilo de *Billia rosea* (Hippocastanaceae) con el fin de aislar los compuestos mayoritarios presentes en dicho extracto, como parte de un proyecto de investigación más extenso que pretende el estudio de los metabolitos secundarios presentes en *Billia rosea*.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo General.

Realizar el estudio fitoquímico del extracto de acetato de etilo de la semilla de *Billia rosea* (Hippocastanaceae).

3.2. Objetivos Específicos:

3.1.1. Aislar, separar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto de acetato de etilo de *Billia rosea* mediante técnicas cromatográficas.

3.1.2. Identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto de acetato de etilo de *Billia rosea* mediante técnicas espectroscópicas de IR, RMN 1D Y 2D y masas.

4. Metodología Experimental:

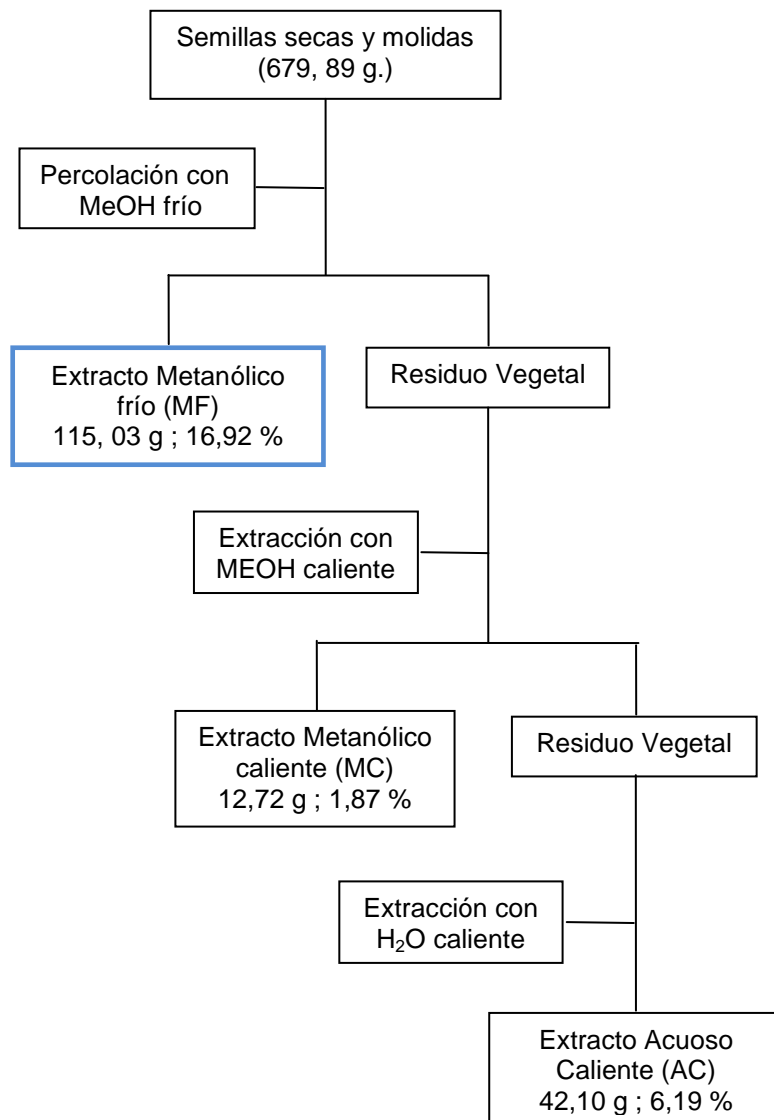
4.1. Diseño experimental

El diseño experimental propuesto se basó en los antecedentes Fitoquímicos y biológicos encontrados para otras especies de la familia; así como también, por información etnobotánica obtenida sobre la especie *Billia rosea* (Hippocastanaceae) en el Archivo Etnobotánico del Herbario “Dr. Víctor Manuel Ovalles (MYF)”, Facultad de Farmacia, de la Universidad Central de Venezuela.

El esquema de separación propuesto forma parte de un estudio fitoquímico más extenso de la especie *Billia rosea*, financiado por el consejo de desarrollo científico y humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela.

4.2. Material vegetal

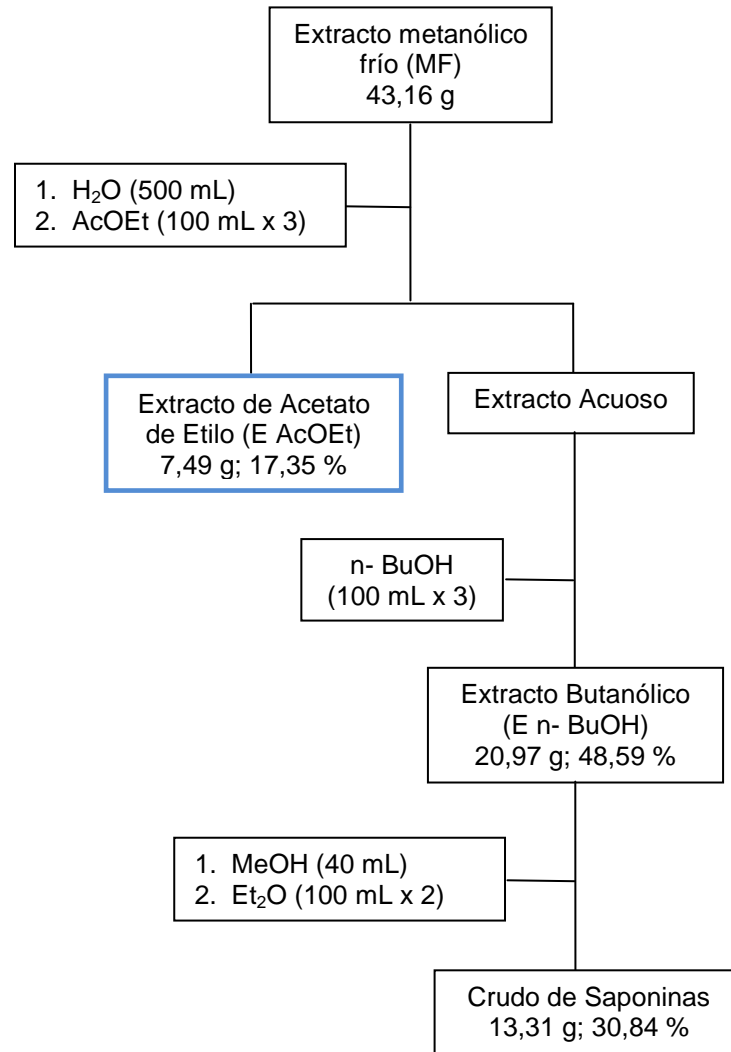
Las semillas secas de *Billia rosea*, fueron colectadas en la localidad de Río Claro Municipio Juárez, Estado Lara, en el mes de junio de 2008. Posteriormente, fueron identificadas por el Dr. Stephen Tillett, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Central de Venezuela, depositándose un espécimen bajo el número **26389** en el Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la mencionada Facultad.



Esquema 1. Obtención de los extractos metanólicos y acuosos de la semilla de *Billia rosea*.

El extracto metanólico frío (MF), fue analizado por cromatografía en capa fina observándose una serie de manchas de color azul y violeta, correspondientes a derivados terpénicos con polaridades diversas.

Por lo mencionado anteriormente el extracto MF fue tratado de la siguiente manera:



Esquema 2. Obtención de los extractos de Acetato de etilo, n-butanol y el crudo de saponinas de la semilla de *Billa rosea*.

4.3. Materiales y Equipos:

4.3.1. Métodos Cromatográficos:

Cromatografía en capa fina (analítica) (CCF):

- ❖ Placas analíticas de sílica gel 60Å; 0,25 mm de espesor con indicador de fluorescencia UV₂₅₄; marca ALUGRAM®.

Cromatografía de columna (CC):

- ❖ Cromatografía en fase normal utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 Å; 0,06 – 0,2 mm (70-230 mesh ASTM), Marca Sharlau®.
- ❖ Cartucho Accu BOND™ SPE de sílica gel 60 con capacidad para 200 mg y 3 mL. Marca Agilent Technologies.

Eluyentes:

- ❖ Hexano (C₆H₁₄), Diclorometano (CH₂Cl₂), Metanol (CH₃OH), Agua (H₂O), Cloroformo (CHCl₃), Acetato de Etilo (AcOEt), Acido Fórmico (HCOOH), Acido Acético (CH₃COOH). En grado técnico y P.A.

Mezcla de eluyentes:

- ❖ Debido a la gran cantidad de mezclas de eluyentes utilizados, sus proporciones serán indicadas durante la discusión de resultados.

Agentes Reveladores:

- ❖ **Reactivo de Anisaldehído-Acido Sulfúrico (AS):**
Se mezclan 0,5 mL de anisaldehído con 10 mL de ácido acético glacial, seguido por 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en ese orden, Se rocía la placa de CCF con el reactivo y se calienta a 100 °C / 5-10 minutos, la aparición de manchas amarillas, moradas-añil y verdes es indicativo de flavonoides, terpenoides, triterpenos y azúcares respectivamente.

- ❖ **Reactivo de Komarowsky (KOM):**
1mL de Acido Sulfúrico etanólico al 50 % con 10 mL de 4-hidroxybenzaldehído metanólico al 2 % son mezclados antes de usar. Se rocía la placa de CCF con el reactivo y se calienta a 100 °C y se evalúa en el visible, la aparición de machas verdes, azules oscuras y amarillas son indicativo de esteroides, triterpenos y/o flavonoides.

- ❖ **Reactivo de Sulfato Cérico en metanol (SC):**
Se preparará una solución saturada de $Ce(SO_4)_2$ en H_2SO_4 concentrado, 2ml de esta solución son diluidos en metanol hasta llegar a un volumen total de 10 ml, se rocía la placa de CCF con el reactivo, si no se observa coloración inmediata, se calienta a 100°C la aparición de manchas amarillas, moradas y marrones es indicativo de flavonoides, terpenoides y taninos, respectivamente.

- ❖ **Reactivo de Vainillina / Acido Sulfúrico (VS) :**
Mezcla (1:1) de vainillina etanólica al 1% y ácido sulfúrico etanólico al 10 %, se rocía La placa de CCF primero con el ácido sulfúrico, luego con la vainillina, y se calienta a 110 °C por 5-10 minutos, se evalúa en el visible y a 365 nm. La aparición de manchas amarillas, moradas y marrones es indicativa de flavonoides, terpenoides respectivamente.

4.3.2. Equipos:

- ❖ Lámpara UV a dos longitudes de onda: 254 y 365 nm. Marca MINERALIGHT[®], modelo UVGL-25.
- ❖ Balanza analítica: Denver Instrument Company AA – 200.
- ❖ Fusiometro Sybron-Thermolyne; modelo MP-12615.
- ❖ Thermo Nicolet. Nexus 470. FT-IR. ESP.
- ❖ QTRAP[™] LC/MS/MS system from applied biosystems MDS sciex.
- ❖ Resonancia Magnética Nuclear: Equipo Bruker 300 MHz y 500 MHz Ultashield. Campo para ¹H y C¹³

4.4. Análisis fitoquímico preliminar:

Se realizó un estudio fitoquímico preliminar del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizándose diferentes sistemas de solventes de acuerdo a los antecedentes encontrados, las placas desarrolladas fueron evaluadas en el visible y a 365 nm, y/o con los agentes reveladores correspondientes.

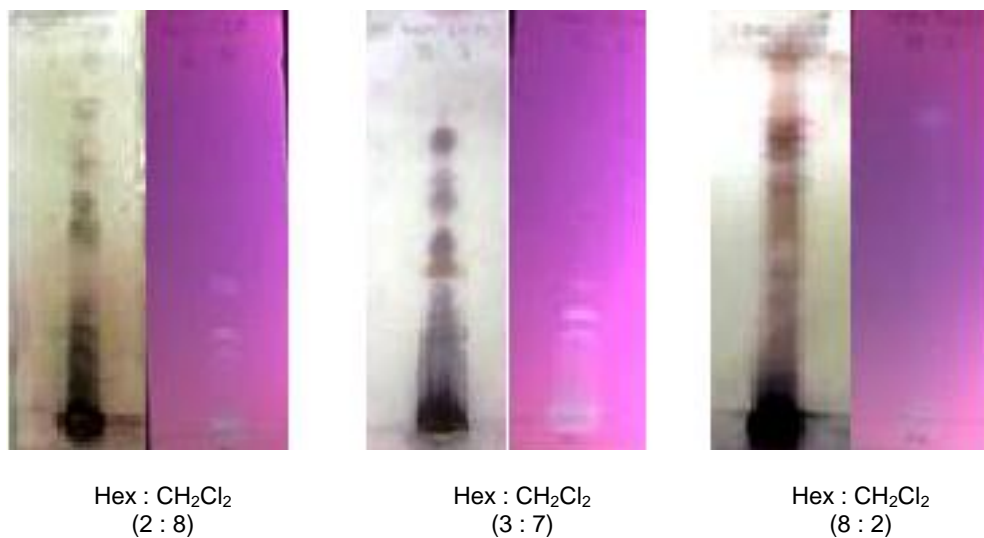


Figura 15. Placas de CCF del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) en el visible y a 365 nm. reveladas con vainillina / ácido sulfúrico (VS).

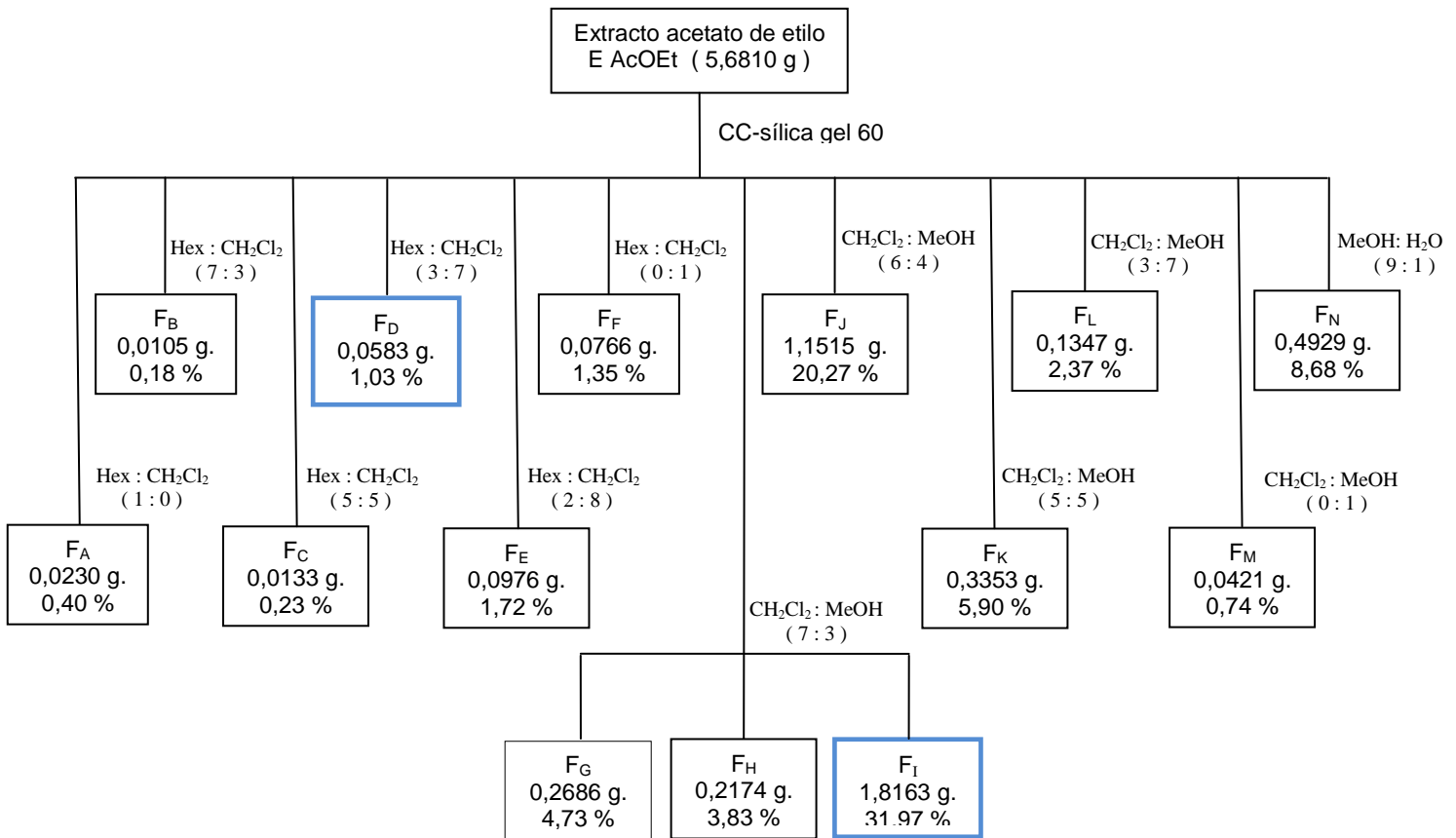
Las mejores CCF obtenidas fueron desarrolladas con los sistemas de solventes Hexano - Diclorometano (2:8)/(3:7) y Diclorometano - Metanol (8:2) presentando en el visible a diferentes factores de retención numerosas manchas de color azules, verdes, moradas y amarillas, a 365 nm presentaron manchas de color azul fluorescentes indicando la posible presencia de compuestos tales como terpenoides, saponinas y flavonoides en dicho extracto, la cual concuerda con los antecedentes fitoquímico encontrados.^{29,30,31,32,33,34}

El estudio fitoquímico preliminar permitió escoger el mejor sistema de solvente y el mejor soporte cromatográfico para separar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de Acetato de Etilo.

4.5. Separación y purificación del extracto de Acetato de Etilo (E AcOEt) de *Billia rosea*:

De acuerdo al estudio fitoquímico preliminar y a los antecedentes encontrados, se procedió a realizar la separación de 5,6810 g del extracto de acetato de etilo (esquema 3), mediante cromatografía en columna en fase normal, utilizando como fase estacionaria 568,1283 g. de sílica gel con una relación muestra:soporte 1:100. Para esta columna cromatográfica se utilizó como eluyentes, Hexano, mezcla de Hexano – Diclorometano, mezcla de Diclorometano - Metanol y mezcla de Metanol - Agua en polaridad creciente con el fin de separar los compuestos de acuerdo a su polaridad.

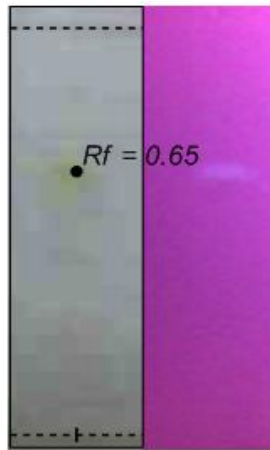
De esta columna se obtuvieron numerosas fracciones las cuales fueron a analizadas mediante cromatografía en capa fina y agentes reveladores. Una vez analizadas las fracciones se realizaron las uniones correspondientes según su comportamiento y se obtuvieron 14 fracciones colectivas ($F_A \dots F_N$).



Esquema 3. Separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de *Billia rosea* mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.

De las 14 fracciones colectivas se escogieron 2 fracciones (F_D y F_I) respectivamente.

La fracción F_D resulto ser un sólido pastoso de color blanco con un peso de 58,3 mg. El análisis por CCF utilizando como agente revelador sulfato cérico en metanol mostró un mancha de color amarillo en el visible y azul fluorescente a 365 nm con un factor de retención de 0,65. Esta fracción fue purificada con un cartucho de sílica gel obteniéndose 48,1 mg de un sólido blanco muy fino la cual fue sometida a análisis espectroscópicos para su identificación.



Hex : CH₂Cl₂
(4 : 6)

Figura 16. Placas de CCF de la fracción F_D proveniente de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de *Billia rosea* en el visible y a 365 nm. reveladas con sulfato cérico en metanol.

La fracción F_I con un peso de 1,8163 g resulto ser una pasta marrón. El análisis por cromatografía en capa fina utilizando como agente revelador anisaldehído-ácido sulfúrico mostro múltiples manchas de color amarillo, azul y verde en el visible por lo que fue escogida para su posterior separación y purificación.



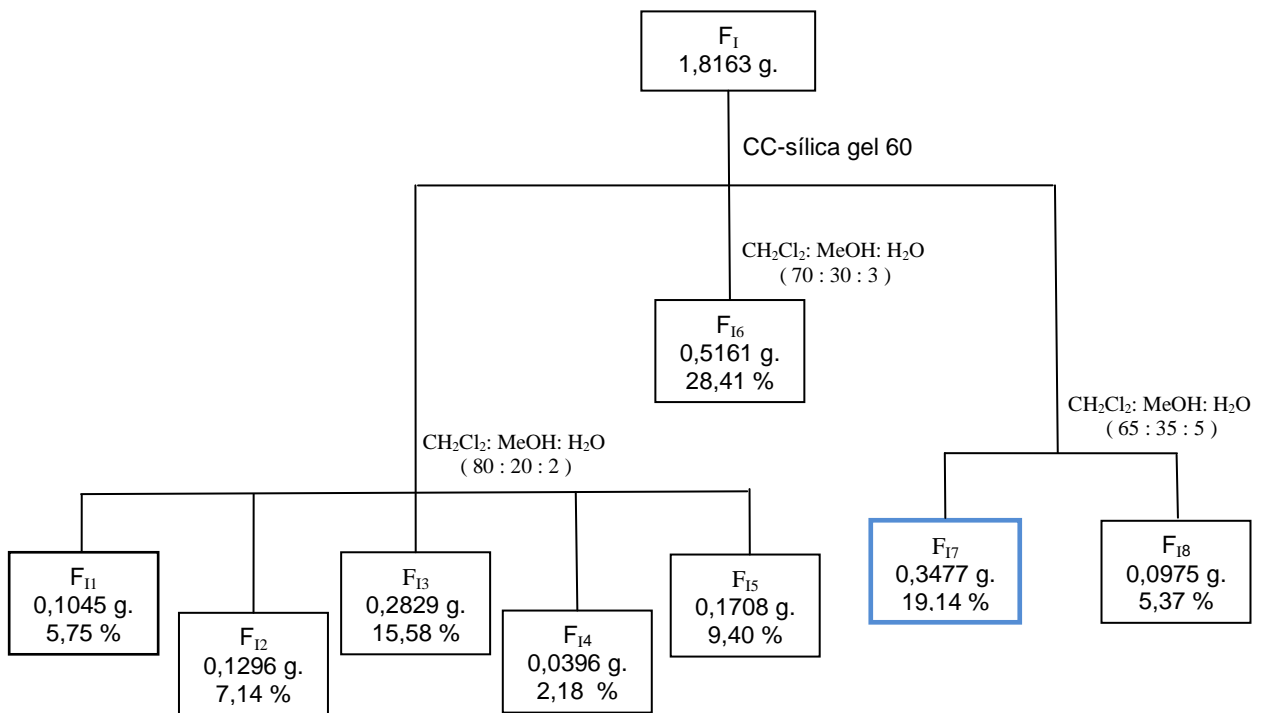
CH₂Cl₂: MeOH: H₂O
(70 : 30 : 3)

Figura 17. Placas de CCF de la fracción F_I proveniente de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de *Billia rosea* en el visible y a 365 nm. reveladas con anisaldehído-ácido sulfúrico.

4.5.1. Separación y purificación de la fracción F_I .

La fracción F_I (1,8163 g.), fue sembrada en una columna cromatográfica con sílica gel en una relación muestra:soporte 1:120, se empleo como eluyentes mezclas de diclorometano - metanol - agua en diferentes proporciones.

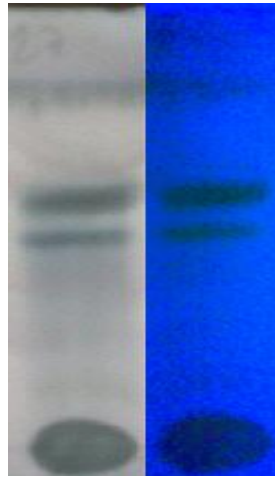
De esta columna cromatográfica se obtuvieron luego del análisis por CCF y agentes reveladores 8 fracciones colectivas (F_{11} F_{18}) (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Separación y purificación de la fracción F_I del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de *Billia rosea*. mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.

La fracción F_{17} resulto ser una pasta marrón con un peso de 347,7 mg; el análisis por cromatografía en capa fina utilizando como revelador Komarowsky

mostró 2 manchas de color azul-violeta en el visible, por lo que esta fracción fue escogida para su posterior separación y purificación.



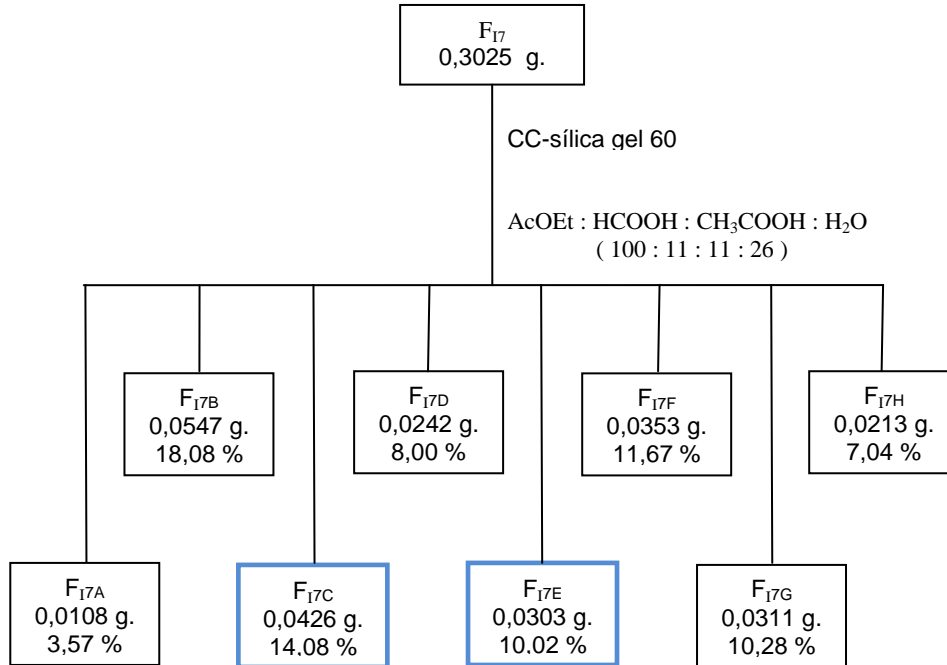
AcOEt : HCOOH : CH₃COOH : H₂O
(100 : 11 : 11 : 26)

Figura 18. Placas de CCF de la fracción F₁₇ proveniente de la separación y purificación de la fracción F₁ en el visible y a 365 nm reveladas con Komarowky.

4.5.2. Separación y purificación de la fracción F₁₇.

302,5 g de la fracción F₁₇ fueron sembrada en una columna con sílica gel en una relación muestra:soporte 1:100, empleándose como eluyente una mezcla de acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético – agua (100 : 11 : 11 : 26) .

De esta columna cromatográfica se obtuvieron, una vez analizadas las fracciones por CCF y agentes reveladores 8 fracciones colectivas (F_{17A}F_{17H}) (Esquema 3.1.1).



Esquema 3.1.1. Separación y purificación de la fracción F₁₇ del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de *Billia rosea* mediante cromatografía en columna con sílica gel 60.

De estas 8 fracciones, la F_{17C} y la F_{17E} resultaron ser sólidos cristalinos amarillentos con un peso de 42,6 mg y 30,3 mg respectivamente. El análisis por CCF mostro una mancha de color azul-violeta en el visible frente al reactivo Komarowsky con un factor de retención de 0,62 y 0,41 respectivamente; indicando la presencia de posibles saponinas, dichas fracciones fueron sometidas a análisis espectroscópicos para su identificación.

F_{17C} F_{17E} $\text{AcOEt} : \text{HCOOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$
(100 : 11 : 11 : 26) $\text{AcOEt} : \text{HCOOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$
(100 : 11 : 11 : 26)

Figura 19. Placas de CCF de la fracción F_{17C} y la fracción F_{17E} proveniente de la separación y purificación de la fracción F_{17} en el visible y a 365 nm. reveladas con Komarowky.

5. Resultados y discusión:

5.1. Estudio Fitoquímico

El extracto de acetato de etilo proveniente de las semillas de *Billia rosea* y sus subfracciones fueron separados mediante sucesivas cromatografías en columna utilizando como soporte sílica gel 60. Los compuestos aislados fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas de IR, RMN 1D y 2D y masas.

Luego de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo, se obtuvieron 3 compuestos, F_D, F_{17C} y F_{17E}. A continuación se presenta el análisis espectroscópico detallado de sus estructuras.

5.2. Compuesto F_D

El compuesto F_D se obtuvo como un sólido pastoso de color blanco, soluble en MeOH, con una fórmula molecular de C₁₁H₁₀O₃, deducida a partir de su ión molecular [M + 2 H]⁺ m/z 192,6. La fragmentación del ión molecular arrojó los siguientes picos 181,5; 149,6; 105,5 y 91,5 características de las fragmentaciones en ésteres aromáticos (espectro 1).

Los espectros de ¹H y ¹³C en MeOD-d₄, (tabla 1 y 2) mostraron señales características de un anillo aromático mono sustituido, un éster metílico y un metileno perteneciente a un doble enlace. Es así como se observaron señales en 110,0 (4,40 ppm, 1H, m), 128,82 (7,24ppm, 1H, m), 129,14 y 129,21 (7,44-7,47m, 2H) correspondientes a metinos de un anillo aromático. Así mismo, se observaron señales en 52,81 (3,87ppm, 3H, s) y 168,14 ppm asignadas a un éster metílico y una señal en 72,20 ppm (5,14 ppm, 1H, s) asignada a un metileno unido a un heteroátomo.

Tabla 1. Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_D en MeOD-d_4

Nº C	Tipo de C	δ ppm (exp) ^a
1	CH_3	52,81
3	C	168,14
4	CH	110,00
5	C	153,90
6	CH_2	72,20
7	C	138,15
8	CH	128,82
9	CH	129,14 ^b
10	CH_2	129,21 ^b
11	CH	129,76
12	CH	129,56

^a Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 125 MHz.

^b Intercambiables

Tabla 2. Desplazamiento ^1H (ppm) para F_D en MeOD-d_4

Protón	δ ppm (exp) ^a
1	3,87 s
4	7,40 s
6	5,14 s
8	7,24 m
9	7,35 – 7,38 m
11	7,32 - 7,35 m
12	7,44 - 7,47 m

^a Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 125 MHz.

Tabla 3. Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), DEPT, HMBC y HMQC para F_D en MeOD-d_4

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	DEPT	HMBC	HMQC
1	52.81	3,87 s	CH_3		H-1
3	168,14		C	H-1, H-4	
4	110,00	7,40 s	CH		H-4
5	153,90		C	H-4, H-6	
6	72,20	5,14 s	CH_2	H-4	H-6
7	138,15		C	H-6, H-8, H-12	
8	128,82	7,24 m	CH		H-8
9	129,14 ^b	7,44 - 7,47 m	CH		H-9
10	129.21 ^b	7,44 - 7,47 m	CH		H-10
11	129,76	7,35 - 7,38 m	CH		H-11
12	129,56	7,32 - 7,35 m	CH	H-11	H-12

^b Intercambiables.

La posición relativa de estos grupos fue clarificada por el espectro de HMBC en MeOD-d_4 (espectro 19 al 22 y tabla 3). Se observó así una correlación a largo alcance entre los siguientes protones y carbonos. Los protones H-1 (3,87 s) y H-4 (7,40 s) con el C-3, los protones H-4 (7,40 s) y H-6 (5,14 s) con el C-5, el protón H-4 (7,40 s) con el C-6 y los protones H-6 (5,14 s), H-8 (7,24 m), H-11 (7,32 - 7,35 m) con el C-7. El resto de las señales fueron asignadas por la data obtenida del espectro de HMQC y por comparación con lo reportado en la bibliografía.

Los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto F_D permiten proponer un derivado de ácido cinámico, el metil 3-(4-fenil-3-hidroximetileno) acrilato o 3-fenil-3-hidroximetileno propeonato de metilo como posible estructura para F_D .

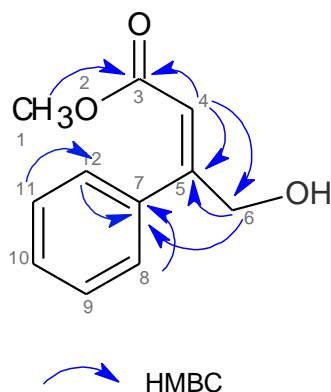


Figura 20. Posible estructura para el compuesto F_D .

Desde el punto de vista biosintético, se puede considerar esta estructura como un monoterpeno irregular derivado de la unión 1-4 de una unidad isopentenil pirofosfato y una de dimetilalilpirofosfato, a través de la vía del ácido mevalónico.

5.3. Compuesto F_{17C}

El compuesto F_{17C} se obtuvo como un sólido muy fino de color amarillento, soluble en mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH, MeOH y piridina. El espectro de IR mostró bandas en 1715 y 1578,9 correspondientes a funciones del tipo ester y olefina y una banda ancha a 3389 cm^{-1} correspondiente a grupos hidroxilos. Se observan también dos bandas de intensidad media a $2921,3$ y $2850,4\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a metilos y metilenos (espectro 23).

Los datos espectroscópicos obtenidos de los análisis por RMN de 1H y ^{13}C en MeOD- d_4 son característicos de un triterpeno del tipo polihidroioleanano glicosilado (tablas 4 y 5). Es así como se observan tres metinos unidos a heteroátomos en 91,7 ppm (3,40 ppm ; m; 1H) asignado a C-3, 74,8 ppm (5,1 ppm; m; 1H) asignado a C-21 y 72,3 ppm (5,37 ppm, d; 11,0 Hz; 1H) correspondiente a C-22. De igual forma se observó un metino de un doble enlace en 125,0 ppm (5,26 ppm, br s, 1 H) asignado al protón H-12 del esqueleto oleanano y 6 singletes en 1,21, 0,88, 0,91, 1,43, 1,08 y 1,11 ppm asignados a C-23, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 y C-30, respectivamente.

Tabla 4. Desplazamiento ^{13}C (ppm) para $F_{17\text{C}}$ en MeOD- d_4

Nº C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(32)}	Nº C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(32)}
1	39,9	38,3	16	70,5	68,0
2	24,9	26,3	17	Bajo solvente	48,1
3	91,7	91,2	18	40,9	40,0
4	44,7	43,5	19	47,9	47,0
5	57,4	55,7	20	37,4 o 37,5	36,4
6	23,0 ^d	18,2	21	74,8	78,5
7	34,2	32,9	22	72,3	73,3
8	41,2 ^e	40,2	23	22,9	22,1
9	47,2	46,6	24	≈ 61,6	63,0
10	37,4 o 37,5	36,5	25	16,3	15,5
11	20,8	23,6	26	16,3	16,7
12	125,0	123,7	27	27,6	27,1
13	143,3	143,2	28	64,3	63,4
14	41,2 ^e	41,7	29	29,7	29,3
15	34,9	34,5	30	19,4	19,9
GlcA-p					
1`	104,9	-	4`	^c	-
2`	73,5	-	5`	^c	-
3`	72,32	-	6`	170,4	-
C21 2-metilbutanoil			C22 Angeloil		
1``	176,6	176,0	1``	172,72	167,9
2``	40,9	41,5	2``	≈ 128,5	129,7
3``	27,0	26,5	3``	15,95	15,7
4``	≈ 11,8	11,6	4``	≈ 139	138,4
5``	17,3	16,9	5``	20,62	20,7

^aEspectro tomado en CD_3OD como solvente a 125 MHz. ^bEspectro tomado en CD_3OD como solvente a 125 MHz. ^cNo se observa. ^dAsignado por comparación con la bibliografía. ^eIntercambiables.

Tabla 5. Desplazamiento ^1H (ppm) para $F_{17\text{C}}$ en MeOD-d_4

Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(32)}	Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(32)}
1	1,64 m ; 1,11 m	0,80 , 1,43	19	1,05 m ; 2,57 m	1,43, 3,11 m
2	1,81 - 1,85 m	1,92 m, 2,40 m	21	5,1 m	6,63 d
3	3,40 m	3,44 m	22	5,37, d, 11,0 Hz	6,286,68 d
5	0,95 m	0,88 m	23	1,21 s	1,36 3 s
6	1,20 m, 1,40 m	153 , 1,63	24	3,76-3,85 m, 4,11 m	3,336,68 d, 10,8 Hz, 4,33
7	1,33 m ; 1,73 m	128 , 1,53	25	0,88 s	0,66 s
9	1,64 m	1,75	26	0,91 s	0,82 s
11	1,98m, 2,04 m	1,74 , 1,89	27	1,43 s	1,85 s
12	5,26 (br s)	5,41 (br s)	28	3,20-3,23 m, 4,09 m	3,42 , 3,67 d 9,6 Hz
15	1,26 m, 1,89 m	1,70 , 1,92	29	1,08	1,11 s
16	3,71 m	4,48 m	30	1,05	1,34 s
18	2,43 m	3,13 m			
GlcA-p					
1`	4,46 m	-	4`	c	-
2`	3,52 – 3-53 m	-	5`	c	-
3`	3,51 m	-	6`	c	
C21	2-metilbutanoil		C22	Angeloil	
2``	2,44 m	2,29 m	3``	1,98	2,10, 7,2 Hz
3``	1,28	1,33, 1,74	4``	6,12	6,10, 7,2 Hz
4``	0,91 m	0,84 m	5``	1,81-1,85	2,07 s
5``	1,1	1,12 d, 7,2 Hz			

^a Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 500 MHz. ^b Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 600 MHz. ^c No se observa.

Tabla 6. Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), HMBC, HMQC y COSY para F_{17C} en MeOD- d_4

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	HMBC	HMQC	COSY
1	39,9	1,64 m , 1,11 m	H-25	H-1	H-2
2	24,9	1,81 - 1,85 m		H-2	H-1, H-3
3	91,7	3,40 dd	H-24, H-1	H-3	H-2
4	44,7		H-23		
5	57,4	0,95	H-23, H-25	H-5	H-6
6	23,0 ^d	1,20 m, 1,40 m		H-6	H-5
7	34,2	1,33 m ; 1,73 m	H-26	H-7	
8	41,2 ^e		H-26		
9	47,2	1,64 m	H-26	c	
10	37,4 o 37,5		H-1, H-25		
11	20,8	1,98m, 2,04 m		H-11	
12	125,0	5,26 d		H-12	
13	143,3		H-27		
14	41,2 ^e		H-27		
15	34,9	1,26 m, 1,89 m		H-15	
16	70,5	3,71 m	H-15	H-16	
17	Bajo solvente		H-16, H-28		
18	40,9	2,43 m		H-18	
19	47,9	1,05 m ; 2,57 m	H-29, H-30	H-19	
20	37,4 o 37,5		H-29, H-30		
21	74,8	5,1 m	5 ^{''} -H ₃	H-21	
22	72,3	5,37, d, 11,0 Hz	H-28	H-22	
23	22,9	1,21 s o 1,20 s		H-23	
24	≈ 61,6	3,76-3,85 m, 4,11 m		H-24	
25	16,3	0,88 s		H-25	
26	16,3	0,91 s		H-26	
27	27,6	1,43 s		H-27	

28	64,3	3,20-3,23 m, 4,09 m		H-28	
29	29,7	1,08	H-30	H-29	
30	19,4	1,05	H-29	H-30	
GlcA-p					
1`	104,9	4,46 m			
2`	73,5	3,52 – 3,53 m			
3`	80,6	3,51 m			
4`	c	c			
5`	c	c			
6`	170,4				
C21 2-metilbutanoil					
1``	176,64		5``-H ₃		
2``	40,90	2,44 m			
3``	27,01	1,28	4``-H ₃ , 5``-H ₃	3``-H	
4``	≈11,8	0,91 m		4``-H	
5``	17,30	1,1		5``-H ₃	
C22 Angeloil					
1````	172,72		3````-H		
2````	≈ 128,5		3````-H, 5````-H ₃		
3````	15,95	1,98	4````-H ₃	3````-H	4````-H ₃
4````	≈ 139	6,12	3````-H, 5````-H ₃	4````-H ₃	3````-H
5````	20,62	1,81-1,85		5````-H ₃	

^cNo se observa. ^dAsignado por comparación con la bibliografía. ^eIntercambiables.

Adicionalmente, el espectro de ¹³C en MeOD-d₄ mostro señales en ≈ 61,60 y 64,26 ppm indicando la posible oxidación de dos metilos del esqueleto oleanano asignados inicialmente a C-24 y C-28 por consideraciones biogénicas. El espectros de HMBC permitió corroborar la asignación inicial observándose las correlaciones a largo alcance entre los protones de H-24 (3,76-3,85 m, 4,11 m) y el C-3 en 91,7 ppm y los protones de H-28 (3,20-3,23 m, 4,09 m) con los carbonos C-17 y C-22 en 72,3 ppm.

Los espectros de ^1H y ^{13}C en MeOD-d_4 mostraron también señales correspondientes a un grupo MB (2-metilbutanoil) y un angeloil observándose as siguiente señales 0,91 (3H, m, $4''$ -H₃), 1,1 (3H, s, $5''$ -H₃), 1,28 (H, $3''$ -H) y un grupo carbonilo en 176,64 ppm correspondiente a C-1'' del grupo MB y 40,90 ppm correspondiente a C-2'', 6,12 (3H, $4'''$ -H₃), 1,81-1,85 (3H, s, $5'''$ -H₃), 1,98 (H, $3'''$ -H), 128,5 ppm correspondiente a C-2''' y 172,72 ppm correspondiente al C-1''' del angeloil.

La posición relativa de los grupos MB y angeloil en F_{17c} fue clarificada por el espectro de HMBC en MeOD-d_4 (espectro 42 al 45 y tabla 6). Se observó así una correlación a largo alcance entre los siguientes protones y carbonos: El protón en H- $5''$ con C-21 en 74,8 ppm y las correlaciones del protón $5''$ -H₃ con el carbono carbonílico $1''$ y los protones $4''$ -H₃ y $5''$ -H₃ con C- $3''$ para el grupo MB, asignando la posición en 22 para el angeloil por consideraciones biosintéticas. Así mismo fue posible observar las correlaciones del grupo angeloil como la del protón $3'''$ -H con el C-1, los protones $3'''$ -H, $5'''$ -H₃, con el C-2, el protón $4'''$ -H₃, con el C-3 y los protones $3'''$ -H, $5'''$ -H₃, con el C-4. Por último, se observó una señal en ^{13}C a 70,50 ppm correspondiente a un metino que fue asignada a la posición 16 al observar la correlación a largo alcance de los protones H-15 (1,25 m y 1,88 m, 2H) con el carbono antes mencionado y la correlación de los protones de H-16 (3,71, m) con el carbono en C-17. El resto de las señales correspondientes a la aglicona fueron asignadas de manera similar y corroboradas por HMBC, HMQC y COSY (tabla 6). La figura 21 muestra las correlaciones HMBC y COSY para la aglicona de F_{17c} .

Vale la pena destacar que se observaron señales correspondientes a un sacárido que junto con el carbono carbonílico en 170,4 pudiesen ser asignados a una unidad glucopiranosil que por consideraciones biosintéticas se unió al oxígeno del C-3.

De esta manera la estructura de la aglicona se asigna a la escina 21-(2-metilbutanoil)-22-angeloil-protoaescingenina ó 3β , 16α , 21β , 22α , 24 , 28 -hexahidroxyolean-12-eno unidad en C-3 a una unidad de monosacárido que pudiese pertenecer a un ácido glucurónico. La figura 21, muestra la posible estructura para la saponina de f_{17C} .

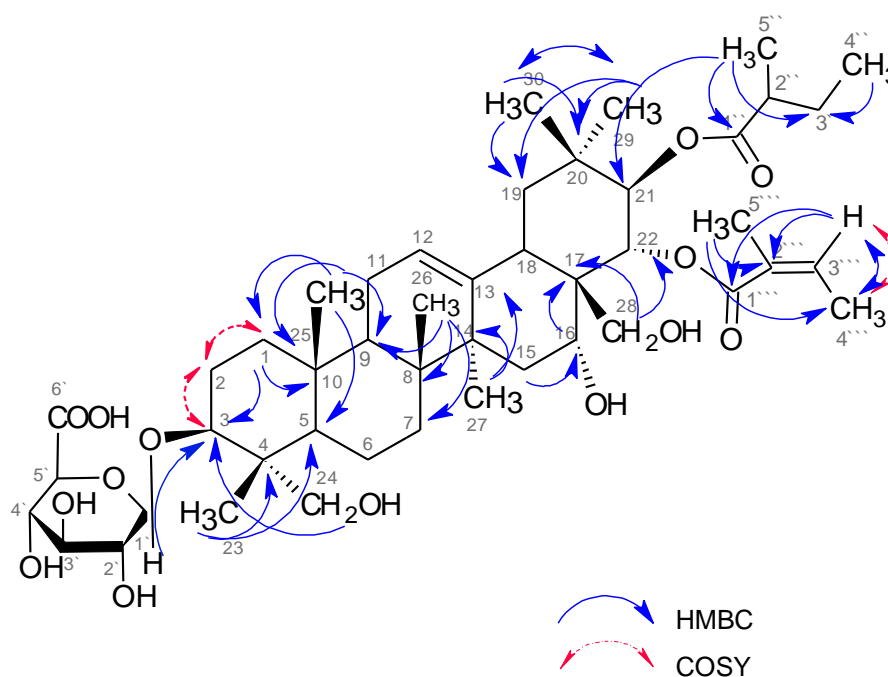


Figura 21. Correlación HMBC y COSY de 21-(2-metilbutanoil)-22-angeloil-proteaescigenina.

5.4. Compuesto F_{17E}

El compuesto F_{17E} se obtuvo como un sólido cristalino amarillento, con un punto de descomposición de $175,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, soluble en CH_2Cl_2 -MeOH, MeOH y piridina. El espectro de IR mostró bandas en 1715 y 1588,6 correspondientes a funciones del tipo ester y olefina y una banda ancha a $3415,5\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a grupos hidroxilos. Se observan también dos bandas de intensidad media a 2958,5 y 2925,2 cm^{-1} correspondientes a metilos y metilenos (espectro 50).

Los desplazamientos obtenidos en ^1H , ^{13}C y DEPT en MeOD- d_4 y piridina- d_5 son característicos de un triterpeno del tipo polihidroxioleanano glicosilado con tres unidades de azúcar (espectros 51 al 56, 57 al 64, 65 al 69 y tabla 7, 8). Vale la pena destacar que debido a la complejidad de la estructura, las señales correspondientes a la aglicona se observan más claramente en MeOD- d_4 mientras que las señales de los sacáridos, posición y relación entre ellos pueden observarse en piridina- d_5 por lo que se utilizaron ambos para la elucidación de F_{17E}.

Tabla 7. Desplazamiento ^{13}C (ppm) para F_{17E} en MeOD- d_4

Nº C	Tipo de C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(35)}	Nº C	Tipo de C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(35)}
1	CH ₂	41,7	-	16	CH	69,9	69,7
2	CH ₂	24,76	-	17	C	43,0	-
3	CH	92,4	92,8	18	CH	43,4	40,8
4	C	44,4	-	19	CH ₂	47,0	47,9
5	CH	57,4	-	20	C	37,1	-
6	CH ₂	19,4	-	21	CH	77,8	79,8
7	CH ₂	34,0	-	22	CH	75,9	74,3
8	C	^c	-	23	CH ₃	22,9	23,1
9	CH	≈ 47(bajo el ste)	-	24	CH ₂	64,2	64,4
10	C	37,1 o 37,5	-	25	CH ₃	15,9	16,3
11	CH ₂	28,33	-	26	CH ₃	17,8	17,2
12	CH	124,5	125,2	27	CH ₃	26,6	27,7
13	C	143,4	143,1	28	CH ₂	67,7	64,5
14	C	^c	-	29	CH ₃	29,5	29,7
15	CH ₂	28,4	34,8	30	CH ₃	22,9	20,3
GlcA-p							
1`	CH	104,7	105,0	4`	CH	^d	73,6
2`	CH	^d	80,6	5`	CH	^d	77,8
3`	CH	^d	78,6	6`	CH	^d	-

C-21 Acido monoterpénico						
1 ^{''''}	C	169,40		6 ^{''''}	C	73,63
2 ^{''''}	C	128,3		7 ^{''''}	CH	145,80
3 ^{''''}	CH	144,87		8 ^{''''}	CH ₂	112,53
4 ^{''''}	CH ₂	24,76		9 ^{''''}	CH ₃	12,38
5 ^{''''}	CH ₂	41,69		10 ^{''''}	CH ₃	27,73

^a Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 125 MHz. ^b Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 125 MHz. ^c No se observa. ^d No asignado.

Tabla 8. Desplazamiento ¹H (ppm) para FI₇E en MeOD-d₄

Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(35)}	Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(35)}
1	0,98 m, 1,57 m	-	19	1,33 m, 2,0 m	1,22 dm, 2,72 t
2	1,83 m, 2,15 m	-	21	4,98	6,02 d (10)
3	3,36 t	3,42 m	22	5,34 d, 10,5 Hz	5,61 d (10)
5	0,92 m	-	23	1,19 s	1,26 s
6	0,91 m, 1,57 m	-	24	3,20 m, 3,83 m	3,36 d, 410 d
7	1,33 m, 1,48 m	-	25	0,86 s	0,95 s
9	Bajo el solvente	-	26	0,78 s	0,95 s
11	1,88 m	-	27	1,18 s	1,52 s
12	5,30 s br	5,41 m	28	3,91 d, 11,5 Hz 4,08 d, 11,5 Hz	2,98 d, 3,29 d
15	1,91 m	1,39 ; 1,71	29	0,84	0,89 s
16	3,82 m	4,01 m	30	1,11	1,11 s
18	3,09 m	2,66 dm			
GlcA-p					
1 [`]	4,48 d, 7,5 Hz.	4,53 d	4 [`]	d	3,50
2 [`]	d	3,34	5 [`]	d	3,89
3 [`]	d	3,58			
C-21 Acido monoterpénico					
3 ^{''''}	6,7, dd, 7 Hz		8 ^{''''}	5,05, d, 11,3 Hz y 5,21, d, 17,5	

				Hz	
4 ^{****}	1,56 m y 2,2 m		9 ^{****}	1,77, s	
5 ^{****}	1,63 m		10 ^{****}	1,26, s	
7 ^{****}	5,88, dd				

^a Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 500 MHz. ^b Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 500 MHz. ^c No se observa. ^d No asignado.

Tabla 9. Desplazamiento de ¹³C (ppm), ¹H (ppm), DEPT, HMBC y HMQC para F_{17E} en MeOD-d₄.

Nº C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	DEPT	HMBC	HMQC
1	41,7	0,98 m, 1,57 m	CH ₂	H-25	H-1
2	24,5 o 24,8	1,83 m, 2,15 m	CH ₂		H-2
3	92,4	3,36 t	CH	H-23, H-24, 1 ⁻ -H	H-3
4	44,4		C	H-23	
5	57,4	0,92 m	CH	H-23, H-25	H-5
6	19,4	0,91 m, 1,57 m	CH ₂		H-6
7	34,0	1,33 m, 1,48 m	CH ₂	H-26	H-7
8	^c		C		
9	≈ 47(bajo el ste)	Bajo el solvente	CH	H-26	^c
10	37,1 o 37,5		C		
11	24,5 o 24,8	1,83 m, 2,15 m	CH ₂		H-11
12	124,5	5,30 s	CH		H-12
13	143,4		C	H-27	H-13
14	^c		C		
15	28,4	1,91 m	CH ₂	H-27	H-15
16	69,9	3,82 m	CH	H-28	H-16
17	43,0		C	H-22	
18	43,4	3,09 m	CH		H-18
19	47,0	1,33 m, 2,0 m	CH ₂	H-29	H-19
20	37,1		C	H-29	

21	77,8	4,98	CH	H-22	H-21
22	75,9	5,34 d, 10,5 Hz	CH		H-22
23	22,9	1,19 (s)	CH ₃		H-23
24	64,2	3,20 m, 3,83 m	CH ₂	H-23	H-24
25	15,9	0,86 s	CH ₃	H-1	H-25
26	17,8	0,78 s	CH ₃		H-26
27	26,6	1,18 s	CH ₃		H-27
28	67,7	3,91 d, 11,5 Hz 4,08 d, 11,5 Hz	CH ₂		H-28
29	29,5	0,84	CH ₃		H-29
30	22,9	1,11	CH ₃		H-30
GlcA-p					
1`	104,7	4,48 d, 7,5 Hz.	CH		
2`	d	d	CH		
3`	d	d	CH		
4`	d	d	CH		
5`	d	d	CH		
6`	170,4		C		
C-21 Acido monoterpénico					
1 ^{****}	169,40		C	3 ^{****} -H, 9 ^{****} -H ₃	
2 ^{****}	128,3		C		
3 ^{****}	144,87	6,7, dd, 7 Hz	CH		3 ^{****} -H
4 ^{****}	24,76	1,56 m y 2,2 m	CH ₂	3 ^{****} -H	4 ^{****} -H ₂
5 ^{****}	41,69	1,63 m	CH ₂	4 ^{****} -H	5 ^{****} -H ₂
6 ^{****}	73,63		C	5 ^{****} -H	
7 ^{****}	145,80	5,88, dd, 18 y 12 Hz	CH	8 ^{****} -H	7 ^{****} -H
8 ^{****}	112,53	5,05,d, 11,3 Hz y 5,21, d, 17,5 Hz	CH ₂	7 ^{****} -H	8 ^{****} -H ₂
9 ^{****}	12,38	1,77, s	CH ₃	3 ^{****} -H	9 ^{****} -H ₃
10 ^{****}	27,73	1,26, s	CH ₃	7 ^{****} -H	10 ^{****} -H ₃

^cNo se observa. ^oNo asignado.

Los espectros de ^1H y ^{13}C de $\text{F}_{17\text{E}}$ en MeOD-d_4 mostraron señales características de un esqueleto oleanano sustituido en los carbonos C-3, C-21 y C-22, respectivamente. Es así como se observan cuatro metinos unidos a heteroátomo: un triplete en 3,36 ppm (92,4 ppm) asignado al metino C-3, un multiplete en 3,82 (69,87 ppm) correspondiente a C-16 y por último, dos metinos en 4,98 ppm (77,8 ppm) y 5,34 ppm (1H, d, 10,05 Hz, 75,9 ppm), correspondientes a C-21 y C-22, respectivamente. En 5,30 ppm se observó un singlete ancho asignado al proton H-12 del esqueleto oleanano. Así mismo, se observaron 6 singletes en (1,19 , 0,86 , 0,78 , 1,18 , 0,84 y 1,11) ppm asignados a C-23, C-25, C-26, C-27, C-29 y C-30, respectivamente.

El espectro de ^{13}C en MeOD-d_4 mostro señales cuyas multiplicidades fueron deducidas a través del espectro DEPT observándose 2 metilenos en 64,2 y 67,7 ppm a asignados inicialmente a las posiciones C-24 y C-28 del esqueleto oleanano por consideraciones biosintéticas.

Adicionalmente, los espectros de ^1H y ^{13}C en MeOD-d_4 mostraron señales correspondientes a un sustituyente del tipo ácido monoterpénico: 1,77 (3H, s, 9''''-H₃), 1,26 (3H, s, 10''''-H₃), 6,7 (H, dd deformado, 7 Hz, 3''''-H) y 1,56 y 2,2 (2H, m, 4''''-H₃), 1,63 (2H, m, 5''''-H₃), 5,88 (H, dd, 6,5 Hz, 7''''-H), 5,05 y 5,21 (2H, d, 11,3 y 17,5 Hz) y un carbonilo en 169,4. La posición del ácido monoterpenico en $\text{F}_{17\text{E}}$ fue clarificada por los espectros de HMBC, en MeOD-d_4 (espectro 74 al 79) y por los espectros HMBC, COSY y TOCSY piridina-d₅ (espectros 95 al 100, 101 al 104 y 105 al 111). Se observo en el HMBC una correlación entre los protones 3''''-H, 9''''-H₃ Y el carbono carbonílico 1'''', así como la correlación entre el metileno 8''''-H₂ y el protón 7''''-H (ver tabla 9, figura 22). Adicionalmente, la correlación observada entre el protón en 3'''' y el carbono carbonílico sugirieron que la estereoquímica del doble enlace entre 2'''' y 3'''' era E. Las posiciones de los grupos metilenos sobre C-24 y C-28 asignadas por consideraciones biosintéticas fueron corroboradas a través de las siguientes correlaciones a largo enlace: el CH₃-23 (1,19 ppm) y el metileno en C-24 (64,2 ppm, 3,20 m y 3,83 m) , el metilo CH₃-24

con el C-3 en 92,4 ppm y el metilo CH₃-28 (3,91, d, 11,5 Hz; 4,08 d, 11,5 Hz) con el C-16 (69,9 ppm). El resto de las señales correspondientes a la aglicona fueron asignadas de manera similar y corroboradas por HMBC y HMQC (tabla 9). La figura 22 muestra las correlación HMBC para la aglicona de F_{17E} en MeOD-d₄.

De esta manera la estructura de la aglicona corresponde a la aglicona 3 β , 16 α , 22 α , 24, 28-pentahidroxi, 21 β -((*E*)-2-metil-6-hidroxi-6-metil-2,7-octadienoil)-olean-12-eno.

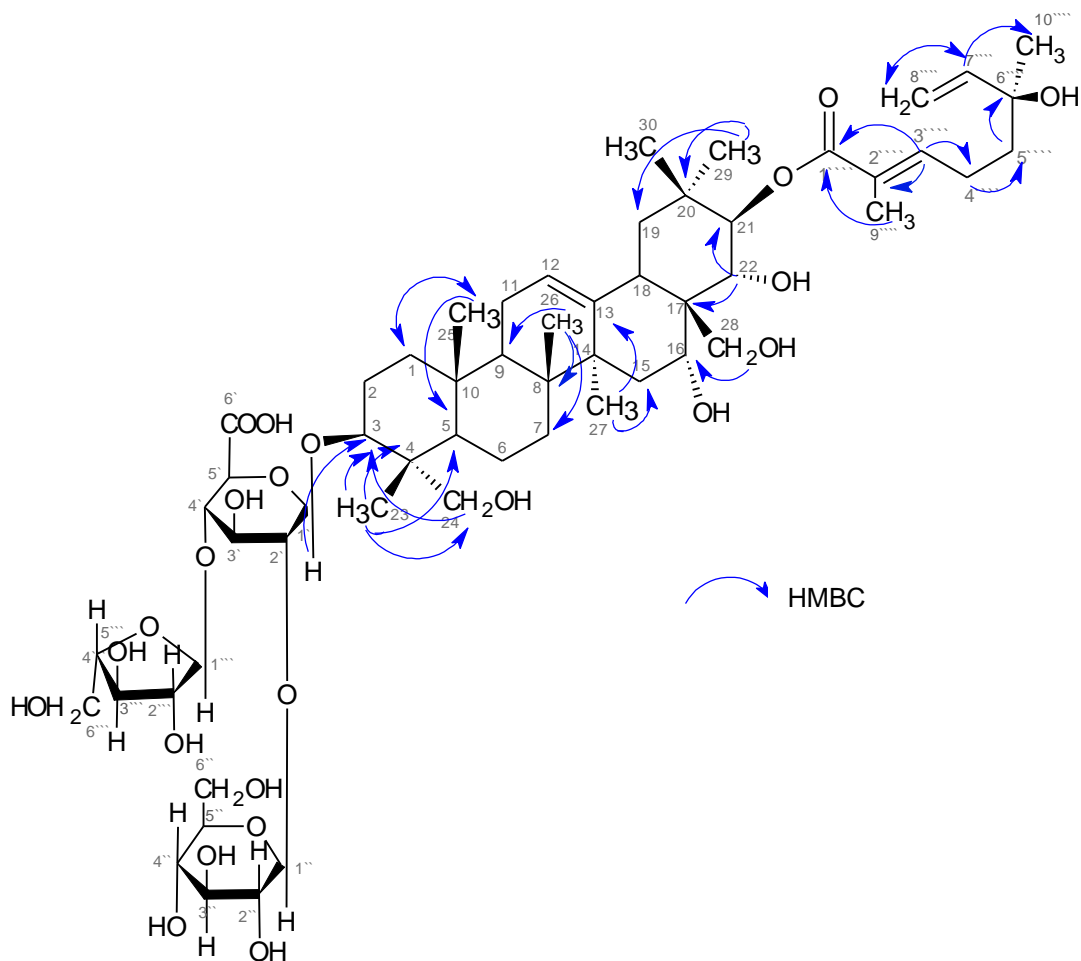


Figura 22. Correlación HMBC para la fracción F_{17E} en MeOD-d₄

Adicionalmente y como se menciona, se obtuvieron señales en los espectro de ^1H y ^{13}C a 104,7 ppm asignadas a al carbono anomérico C-1` por correlación de su protón con el C-3 y dos señales adicionales en 103,8 y 105,1 correspondientes a los carbonos anoméricos de dos unidades glicosidicas adicionales. Así mismo, se observó una señal en 170,4 ppm asignada al carbonilo de un ácido glucurónico.

Los espectros de protones y carbono, así como HMBC y HMQC de $\text{F}_{17\text{E}}$ en piridina- d_5 mostraron señales similares a las observadas en metanol para la aglicona de la escina corroborando la estructura de esta. Así mismo, pudieron observarse con mayor detalle los protones y carbonos correspondientes a las 3 unidades glicosidicas (espectros 80 al 83 y 84 al 88). La asignación de cada protón y carbono de las unidades glucosidicas (un acido glucurónico y una unidad hexosa y una unidad piranosa) así como la unión entre estos se realizó a través de los espectros COSY y TOCSY.

Tabla 10. Desplazamiento ^{13}C (ppm) para $\text{F}_{17\text{E}}$ en Piridina- d_5

Nº C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(31)}	Nº C	δ ppm(exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(31)}
1	38,4	38,4	16	72,1	67,8
2	24,2	26,4	17	52,5	48,1
3	91,0	91,2	18	42,3	40,2
4	43,7	43,6	19	46,5	47,2
5	56,2	55,8	20	36,5 o 36,6	36,3
6	17,4	18,3	21	74,6	79,1
7	33,2	32,9	22	74,6	74,0
8	41,3	40,1	23	22,6	22,0
9	41,7	46,7	24	63,4	63,1
10	36,5 o 36,6	36,5	25	15,3	15,5
11	24,0	23,7	26	17,4	16,5
12	^c	123,6	27	26,3	27,2

13	≈136	143,2	28	67,8	63,5
14	42,3	41,6	29	29,3	29,5
15	^d	34,4	30	19,9	19,9
C-21 Acido monoterpénico					
1 ^{''''}	168,0	170,9	6 ^{''''}	72,5	72,2
2 ^{''''}	127,5	129,0	7 ^{''''}	146,6	146,6
3 ^{''''}	143,9	142,4	8 ^{''''}	111,7	111,7
4 ^{''''}	24,0	23,4	9 ^{''''}	12,6	12,8
5 ^{''''}	41,6	41,8	10 ^{''''}	28,5	28,5

^a Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 125 MHz. ^b Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 150 MHz. ^c No se observa. ^d Asignado por comparación con la bibliografía.

Tabla 11. Desplazamiento ¹³C (ppm) para los azucares de F_{17E} en Piridina-d₅

Nº C	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(36)}	Nº C	δ ppm(exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(36)}
GlcA-p					
1 [`]	104,5	104,5	4 [`]	69,6	71,6
2 [`]	78,4	78,0	5 [`]	76,6	77,1
3 [`]	80,3	86,3	6	68,8	172,0
2[`]- Glc-p					
1 ^{``}	104,3	103,6	4 ^{``}	69,8	69,5
2 ^{``}	74,6	75,2	5 ^{``}	76,7	78,2
3 ^{``}	75,8	78,1	6 ^{``}	61,6	61,2
4[`]- Ara-f					
1 ^{'''}	105,7	110,9	4 ^{'''}	80,2	85,2
2 ^{'''}	81,2	83,4	5 ^{'''}	61,7	62,3
3 ^{'''}	78,4	85,2			

^a Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 125 MHz. ^b Espectro tomado en CD₃OD como solvente a 125 MHz.

Tabla 12. Desplazamiento ^1H (ppm) para F_{17E} en Piridina- d_5

Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(31)}	Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(36)}
1	0,79 m, 1,28 m	0,82, 1,32	19	1,43 m, 2,16 m	1,40, 3,08
2	1,70 m, 1,8 m	2,28 (2H, m)	21	5,57 m	6,59 d, 10,0 Hz
3	3,29 dd	3,44 dd	22	6,0, d, 10,3 Hz	6,26 d, 10,0 Hz
5	0,79 m	0,84	23	1,33 s	1,35 s
6	1,52 m, 1,56 m	1,51, 1,56	24	3,29 m, y 4,16 m	3,31 d, 10,5 Hz, 4,25
7	1,15, 1,28	1,26, 1,53	25	0,59	0,65 s
9	1,52	1,72	26	0,87	0,80 s
11	1,07 m	1,72, 1,90	27	1,25 s	1,83 s
12	5,72 s	5,40 s	28	3,76 m, 4,34 m	3,39 d, 3,65 d, 10,8 Hz
15	^d	1,61, 1,87	29	1,07	1,11 s
16	4,47	4,46	30	1,33	1,34
18	3,6 m	3,07			
C21 Acido monoterpénico					
3 ^{****}	7,15 m	7,20	8 ^{****}	5,14 d, 10,35 Hz. 5,54 d, 16,5 Hz	5,15 d, 10,6 Hz 5,53 d, (17,2 Hz)
4 ^{****}	2,44 m y 2,5 m	2,44, 2,52	9 ^{****}	1,98 s	2,04
5 ^{****}	1,77 m	1,77	10 ^{****}	1,43	1,46
7 ^{****}	6,10 dd, 10,35 Hz.	6,10 dd, 10,6 Hz			

^a Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 500 MHz. ^b Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 600 MHz. ^d No asignado.

Tabla 13. Desplazamiento ^1H (ppm) para los azúcares de F_{17E} en Piridina- d_5

Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(36)}	Protón	δ ppm (exp) ^a	δ ppm (reportado) ^{b(36)}
GlcA-p					
1`	4,73 d, 7,1 Hz	4,90 d, 7,6 Hz	4`	4,25 m	4,48
2`	4,25 m	4,26	5`	4,25 m	4,57
3`	4,25 m	4,27			
2`- Glc-p					
1``	5,65 d, 7 Hz	5,50 d, 7,6 Hz	4``	4,47 m	4,58
2``	4,11 m	4,06	5``	3,77 m	3,65
3``	4,11 m	4,26	6``	4,50 m, 4,52 m	4,29, 4,36
4`- Ara-f					
1````	5,11 d, 7 Hz.	6,08	4````	4,25 m	4,87
2````	4,90	4,99	5````	4,30 m, 4,50 m	4,17, 4,30
3````	^c	4,79			

^a Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 500 MHz. ^b Espectro tomado en CD_3OD como solvente a 500 MHz. ^c No se observa.

Tabla 14. Desplazamiento de ^{13}C (ppm), ^1H (ppm), HMBC y HMQC para F_{17E} en Piridina- d_5

Nº C	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	HMBC	HMQC	COSY	TOCSY
1	38,4	0,79 m, 1,28 m	H-2	H-1	H-2	
2	24,2	1,70 m, 1,8 m		H-2	H-1, H-3	
3	91,0	3,29 dd	H-1´	H-3	H-2	
4	43,7		H-23			
5	56,2	0,79 m	H-25	H-5		
6	17,4	1,52 m, 1,56 m		H-6		
7	33,2	1,15 , 1,28		H-7		
8	41,3					
9	47,7	1,52	H-25	H-9		

10	36,5 o 36,6		H-25			
11	24,0	1,07 m		H-11		
12	^c	5,72 s		^c		
13	≈136					
14	42,3					
15	^d	^d		^c		
16	72,6	4,47		^c		
17	52,5					
18	42,3	3,6 m		H-18		
19	46,5	1,43 m, 2,16 m	H-29	H-19		
20	36,5 o 36,6		H-29			
21	76,7	5,57	H-29, H-30	H-21	H-22	
22	74,6	6,0 m , 10,3 Hz		H-22	H-21	
23	22,6	1,33 s		H-23		
24	63,4	3,29 m, y 4,16 m	H-23	H-24		
25	15,3	0,59		H.25		
26	17,4	0,87		H-26		
27	26,3	1,25 s		H-27		
28	67,8	3,76 m, 4,34 m		H-28		
29	29,3	1,07	H-30	H-29		
30	19,9	1,23	H-29	H-30		
C21 Acido monoterpenico						
1 ^{''''}	168,0		H-21, 3 ^{''''} -H, 9 ^{''''} -H ₃	H-1 ^{''''}		
2 ^{''''}	127,5		9 ^{''''} -H ₃			
3 ^{''''}	143,9	7,15 m	9 ^{''''} -H ₃	H-3 ^{''''}		
4 ^{''''}	24,0	2,44 m y 2,5 m	5 ^{''''} -H ₂	H-4 ^{''''}	5 ^{''''} -H ₂	5 ^{''''} -H ₂
5 ^{''''}	41,6	1,77 m		H-5 ^{''''}	4 ^{''''} -H ₂	4 ^{''''} -H ₂
6 ^{''''}	72,5		8 ^{''''} -H ₂ , 10 ^{''''} -H ₃			
7 ^{''''}	146,6	6,10 dd, 10,35 Hz.	8 ^{''''} -H ₂	H-7 ^{''''}	8 ^{''''} -H ₂	8 ^{''''} -H ₂
8 ^{''''}	111,7	5,14 d, 10,35 Hz. 5,54 d, 16,5 Hz		H-8 ^{''''}	7 ^{''''} -H	7 ^{''''} -H
9 ^{''''}	12,6	1,98 s		H-9 ^{''''}		

10 ^{''''}	28,5	1,43	7 ^{''''} -H	H-10 ^{''''}		
--------------------	------	------	----------------------	----------------------	--	--

^cNo se observa. ^dNo asignado.

Tabla 15. Desplazamiento de ¹³C (ppm), ¹H (ppm), HMBC y HMQC para los azucares de F_{17E} en Piridina-d₅

Nº C	δ ¹³ C(ppm)	δ ¹ H (ppm)	HMBC	HMQC	COSY	TOCSY
GlcA-p						
1 [`]	104,5	4,73 d, 7,1 Hz		H-1	2 [`] -H	2 [`] -H
2 [`]	78,4	4,25 m		H-2	1 [`] H, 3 [`] -H, 1 ^{``} H	1 [`] H, 3 [`] -H, 1 ^{``} H
3 [`]	80,3	4,25 m		H-3	2 [`] -H, 4 [`] -H	2 [`] -H, 4 [`] -H
4 [`]	69,6	4,25 m		H-4	3 ^{``} -H, 1 ^{'''} H	3 ^{``} -H, 1 ^{'''} H
5 [`]	76,6	4,25 m		H-5		
6 [`]	68,8			H-6		
2[`] - Glc-p						
1 ^{``}	104,3	5,65 d, 7 Hz	2 ^{``} -H	H-1 ^{``}	2 ^{``} -H, 2 [`] -H	2 ^{``} -H, 2 [`] -H
2 ^{``}	74,6	4,11 m	3 ^{``} -H	H-2 ^{``}	1 ^{``} H, 3 ^{``} -H	1 ^{``} H, 3 ^{``} -H
3 ^{``}	75,8	4,11 m		H-3 ^{``}	2 ^{``} -H, 4 ^{``} -H	2 ^{``} -H, 4 ^{``} -H
4 ^{``}	69,8	4,47 m		H-4 ^{``}	3 ^{``} -H, 6 ^{``} -H	3 ^{``} -H, 6 ^{``} -H
5 ^{``}	76,7	3,77 m		H-5 ^{``}		
6 ^{``}	61,6	4,50 m, 4,52 m		H-6 ^{``}	4 ^{``} -H	4 ^{``} -H
4[`] - Ara-f						
1 ^{'''}	105,7	5,11 d, 7 Hz.		H-1 ^{'''}	2 ^{'''} -H, 4 [`] -H	2 ^{'''} -H, 4 [`] -H
2 ^{'''}	81,2	4,90		H-2 ^{'''}	1 ^{``} H, 3 ^{``} -H	1 ^{``} H, 3 ^{``} -H
3 ^{'''}	78,4	^c		H-3 ^{'''}	2 ^{``} -H, 4 ^{``} -H	2 ^{``} -H, 4 ^{``} -H
4 ^{'''}	80,2	4,25 m		H-4 ^{'''}	3 ^{``} -H	3 ^{``} -H
5 ^{'''}	61,7	4,30 m, 4,50 m		H-5 ^{'''}		

^cNo se observa.

Los espectros de ^1H y ^{13}C de F_{17E} en piridina- d_5 confirmaron las señales del esqueleto oleanano sustituido en los carbonos C-3, C-21 y C-22, respectivamente. Es así como se observaron los cuatro metinos unidos a heteroátomo: un dd en 3,29 ppm (91,0 ppm) asignado al metino C-3, un multiplete en 4,47 (72,1 ppm) correspondiente a C-16 y por último, dos metinos en 5,6 ppm (76,7 ppm) y 6,0 ppm (1H, d, 10,3 Hz, 74,6 ppm), correspondientes a C-21 y C-22, respectivamente. En 5,42 ppm se observó un singlete ancho asignado al proton H-12 del esqueleto oleanano. Así mismo, se observaron 6 singletes en (1,33, 0,59, 0,87, 1,25, 1,07 y 1,33) ppm asignados a C-23, C-25, C-26, C-27, C-29 y C-30, respectivamente.

El espectro de ^{13}C mostro señales que corroboraron lo obtenido en el espectro realizado en MeOD- d_4 observándose 2 metilenos en 63,4 y 67,8 ppm asignados a las posiciones C-24 y C-28 del esqueleto oleanano.

Las señales correspondientes al sustituyente en C-21, ácido monterpénico mostraron los siguientes desplazamientos: 1,98 (3H, s, $9'''' - \text{H}_3$), 1,43 (3H, s, $10'''' - \text{H}_3$), 7,15 (H, m, $3'''' - \text{H}$) y 2,44 y 2,51 (2H, m, $4'''' - \text{H}_3$), 1,77 (2H, m, $5'''' - \text{H}_3$), 6,10 (H, dd, 10,35 Hz, $7'''' - \text{H}$), 5,14 y 5,54 (2H, d, 10,5 y 16,5 Hz) y un carbonilo en 168,02.

La posición del ácido monoterpenico en F_{17E} en piridina- d_5 fue corroborada por la correlación a largo alcance entre el protón en H-21 en 5,57 ppm (76,72 ppm) y el carbono carbonílico $1''''$ en 168,02 ppm. Así mismo, fue posible observar la correlación entre los protones de los metilos CH_3 -29 y CH_3 -30 con el carbono C-21. Adicionalmente, se observaron las correlaciones entre los protones $3'''' - \text{H}$, $9'''' - \text{H}_3$ con el carbono carbonílico $1''''$, así como la correlación entre el metileno $8'''' - \text{H}_2$ y el protón $7'''' - \text{H}$ (ver tabla 14, figura 23). El resto de las señales correspondientes a la aglicona fueron asignadas de manera similar y corroboradas por HMBC y HMQC, COSY y TOCSY (tabla 14).

Se observaron igualmente las señales correspondientes a tres unidades de sacáridos, uno de ellas perteneciente a un ácido glucurónico determinándose por HMBC que el protón anomérico de este en 4,73 ppm (d, 7,1 Hz, 1'-H) correlacionaba con el C-3 de la aglicona (tabla 14). El espectro TOCSY mostró la posición y correlación entre las dos unidades de sacáridos restantes permitiendo asignar las posiciones de cada carbono con respecto al carbono anomérico de su unidad y la unión de estos a la unidad de ácido glucurónico. En algunos casos, la asignación fue corroborada con datos de la bibliografía. Es así como se observa la correlación entre el protón anomérico en 4,73 ppm (1'-H) y el protón en 4,25 m (78,4 ppm) y la correlación de este último con el protón anomérico en 5,65 (d, 7 Hz) indicando la unión de esta unidad al C-2' del ácido. La posición de la tercera unidad de sacárido fue determinada por la correlación en TOCSY entre el protón 4'-H en 4,25 m y el carbono anomérico en 5,11, d, 7 Hz, 1'''-H, indicando que la posición de la unión de la tercera unidad era en C-4'. Vale la pena acotar que todas las asignaciones fueron corroboradas por HMBC, COSY y TOCSY (tablas 15).

De esta manera, la estructura de F_{17E} correspondería a 3O- α -arabinofuranosil (1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoronopiranosil-16 α , 22 α , 24, 28-pentahidroxi, 21 β -((*E*)-2-metil-6-hidroxi-6-metil-2,7-octadienoil)-olean-12-eno, aislado por vez primera en la familia Hippocastanaceae.

La figura 23 muestra las correlaciones HMBC, COSY y TOCSY para F_{17E} en piridina-d₅.

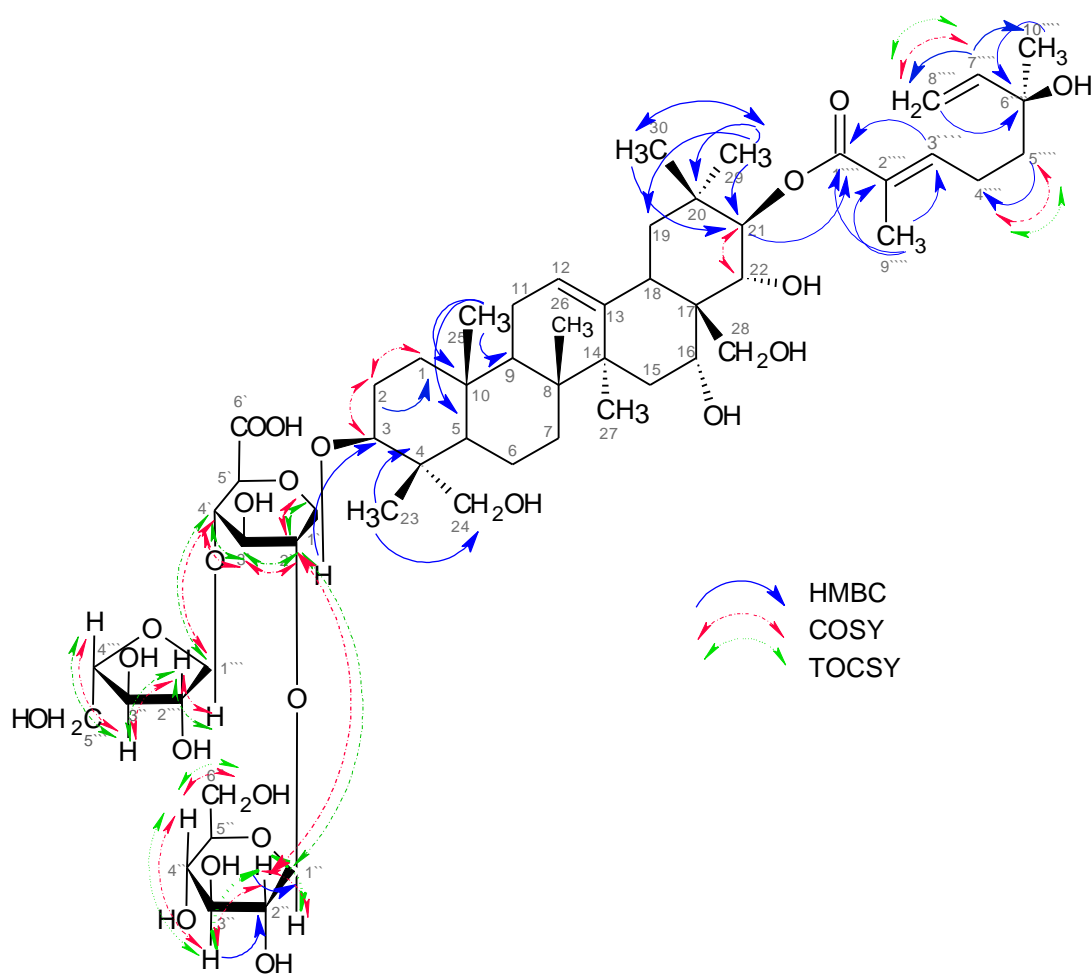


Figura 23. Correlación HMBC para la fracción F_{17E} en piridina-d₅

6. conclusiones:

Se realizó el estudio fitoquímico del extracto de acetato de etilo (E AcOEt) de las semillas de *Billia rosea* utilizando la técnica de cromatografía en columna sobre sílica gel 60 aislándose los siguientes compuestos:

- Compuesto F_D: Metil 3-(4-fenil-3-hidroximetilen) acrilato o 3-fenil- 3-hidroximetilen propeonato de metilo, un derivado del ácido cinámico, aislado como un sólido fino de color blanco, soluble en metanol.
- Compuesto F_{17C}: un monosacárido de la escina 21-(2-metilbutanoil)-22-angeloil-protoaescingenina ó 3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 24, 28-hexahidroxyolean-12-eno, aislado como un sólido cristalino muy fino de color amarillento, soluble en metanol y piridina.
- Compuesto F_{17E}: La escina, 3O- α -arabinofuranosil (1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoronopiranosil-16 α , 22 α , 24, 28-pentahidroxi, 21 β -((E)-2-metil-6-hidroxi-6-metil-2,7-octadienoil)-olean-12-eno, un nuevo triterpeno del tipo polihidroxyoleonano glicosilado con un ácido monoterpenico como sustituyente en C-21, aislado como un sólido cristalino muy fino de color amarillento, soluble en metanol y piridina con un punto de descomposición de 175,0 °C.

El compuesto F_{17E} es un compuesto nuevo en la familia ya que no se tienen reportes del aislamiento de este compuesto en ninguna especie del género *Billia*, ni en ninguna planta de la familia Hipocastanaceae.

7. Recomendaciones:

- Debido a la gran riqueza fitoquímica observada en las fracciones F_K , F_L , F_M , y F_N (saponinas triterpénicas polares), obtenidas luego de la separación y purificación del extracto de acetato de etilo (E AcOEt), se recomienda continuar el estudio fitoquímico de estas con el fin de aislar y purificar los compuestos presentes.

8. Referencias Bibliográficas.

1. Dr. Figueroa Hernández J. L. **“Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina”** Revista digital Universitaria. 10(9),1-11 (2009).
2. Marcano D., Hasegawa M., **“Fitoquímica Orgánica.”** Caracas Venezuela. Universidad Central de Venezuela Concejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 1991. capítulo 1. pp. 1-4
3. Acosta L., Castro R. **“Botánica, biología, composición química y propiedades farmacológicas de *Artemisia annua* L.”** Revista Cubana de Plantas Medicinales 14(4) (2009).
4. Bhuwan B., Mishra A., Raju R., Kale A., Rakesh K., Singh B, Vinod K. **“Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis”** Fitoterapia 80. 81–90 (2009).
5. López Luengo M. **“Plantas medicinales con actividad hipoglucemiantes características, administración y efectos adversos.”** OFFARM. 10(5), 82-88 (2006).
6. Andrade-Cetto A., Heinrich M. **“Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes”** Journal of Ethnopharmacology (99) 325–348 (2005).
7. Marroquín R., Flores M., García M., Mora J. L., Sánchez J.F., Aguilar A. **“Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de colubrina elíptica”** Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. 36(003), 27-32 (2005).
8. Martínez A., Górriz J. L., Moreno F., Navarro J. F. **“Epidemiología de la diabetes mellitus y la nefropatía diabética.”** Repercusiones sociales de la pandemia.” Nefro plus 1(1), 8-15 (2008).

9. Forest F., Drouin J., Charest R., Brouillet L., and Bruneau A. **“A morphological Phylogenetic analysis of Aesculus L. and Billia Peyr.”** Can. J. Bot. (79), 154 -169 (2001).
10. Yoshikawa M., Harada E., Murakami T., Matsuda H., Wariishi N., Yamahara J., Murakami N., and Kitagawa I. **“Escins Ia, Ila, I Ib, and IIIa, Bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of Aesculus hippocastanum L. : Their inhibitory effects on ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test.”** Chem. Pharm. Bull. 42(6), 1357-1359 (1994).
11. Yoshikawa M., Murakami T., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N., and Kitagawa I.” **Bioactive saponins and glycosides. III. Horse Chestnut. (1): The structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ila, I Ib, and Ila from the seeds of Aesculus hippocastanum L.”** Chem. Pharm. Bull. 44(8), 1454 -1464 (1996).
12. Moreno N., **“Flora de Veracruz. Hippocastanaceae”** Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Veracruz México, 1985.
13. López A., Sánchez J.M., Cáceres L. **“Árboles en España, Manual de identificación.”** 2^{da} edición. Barcelona España. Editorial Aedos S.A. 2001. pp. 432 - 435.
14. Font Quer P. **“Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado.”** Barcelona España. Editorial Labor S.A. 1963. pp. 446 - 448.
15. Dr. Alonso J., **“Tratado de fitomedicina, bases clínicas y farmacológicas.”** Buenos Aires Argentina. Ediciones SRL. 1998. pp. 359 - 364.

16. Martínez I., Castillo García E. **“Manual de Fitoterapia.”** Barcelona España. Elsevier Masson. 2007. pp. 131-134.
17. Fonnegra R., Jiménez R., Silvia L., **“Plantas medicinales aprobadas en Colombia.”** 2da Edición. Antioquia Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2007. pp.91-93.
18. López Luengo M. **“Saponósidos.”** OFFARM. 1, 124-128 (2001).
19. Billia colombiana
http://zipcodezoo.com/Plants/B/Billia_columbiana/
20. Ulloa C. and Jørgensen P. **“Billia rosea: The correct name for Billia colombiana (hippocastanaceae).”** Novon. 11(2), 287. 2001.
21. Delascio Chitty F., **“Algunas Plantas Usadas en la Medicina Empírica Venezolana.”** Caracas Venezuela. LITOPAR. 1985. pp.76.
22. Billia columbiana.
<http://www.siac.org.co/sib/catalogoespecies/especie.do;jsessionid=2EBBC492D3648F657E395569F6743A79?idBuscar=995&method=displayAAT>
23. Billia rosea
http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=530&Itemid=30
24. Morton J., Charles T. **“Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatan.”** Illinois U.S.A. 1981. pp. 468.
25. B Vargas W., **“Guía ilustrativa de las plantas de las montañas de Quindío y los Andes Centrales.”** 1^{era} Edición. Manizales Colombia. Editorial Universidad de Caldas. 2002. pp 310-313.

26. Billia rosea.

<http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/18967/?fam=Hippocastanaceae>

27. Vincken J., Heng L., De Groot A., Gruppen H. **“Saponins, classification and occurrence in the plant Kingdom.”** Phytochemistry. 68(3), 275-297 (2007).

28. Marcano D., Hasegawa M., **“Fitoquímica Orgánica.”** Caracas Venezuela. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 1991. Capitulo 4. pp 238.

29. Yoshikawa M., Murakami T., Yamahara J. and Matsuda H. **“Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse chestnut. (2): structures of escins IIIb, IV, V, and VI and isoescins Ia, Ib, and V, acylated polyhydroxyoleanene triterpene oligoglycosides, from the seeds of horse chestnut tree (Aesculus Hippocastanum L., hippocastanaceae).”** Chem. Pharm. Bull. 46(11), 1764-1769 (1998).

30. Kapusta I., Janda B., Szajwaj B., Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Franceschi F., Franz C. and Oleszek W. **“Flavonoids in horse chestnut (Aesculus hippocastanum) seeds and powdered waste water byproducts.”** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55(21), 8485-8490 (2007).

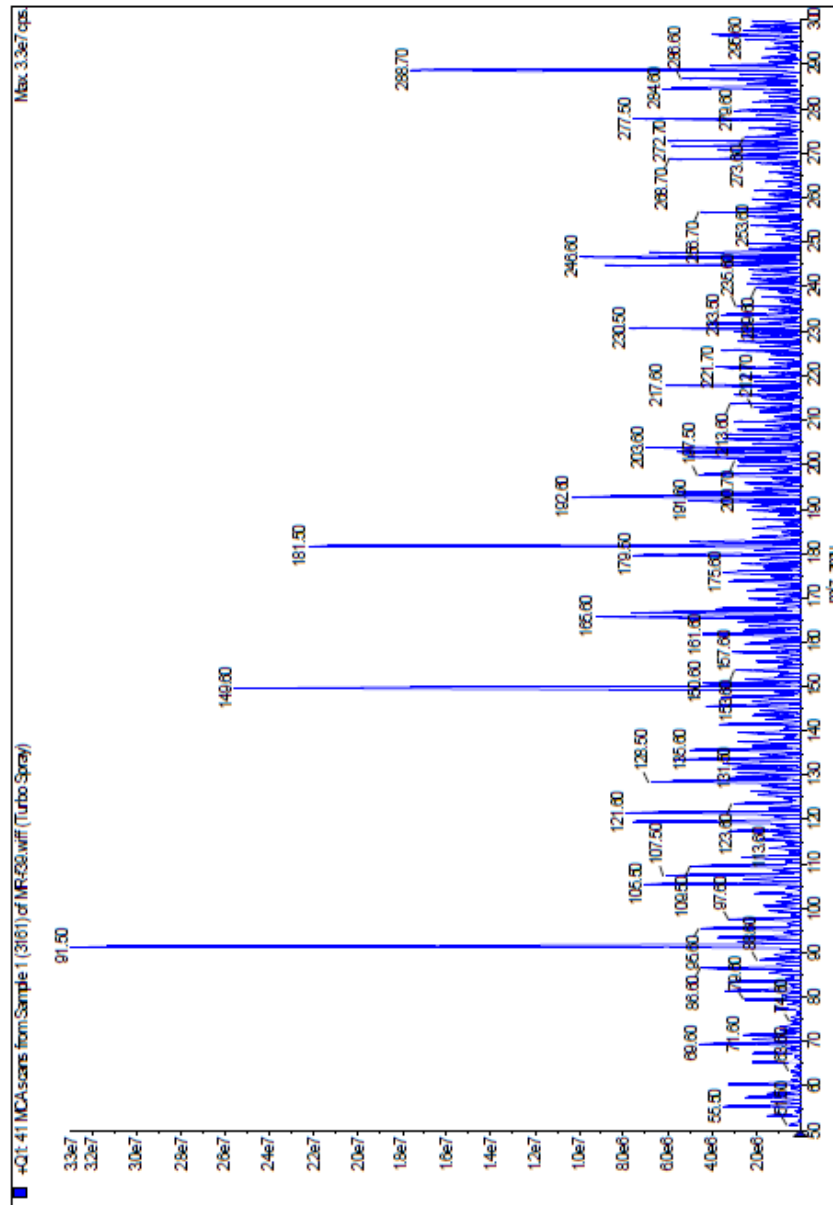
31. Zhang Z., Li S. **“Cytotoxic triterpenoid saponins from the fruits of Aesculus pavia L.”** Phytochemistry 68(15), 2075-2086 (2007).

32. Zhang Z., Li S., Zhang S., Gorenstein D. **“ Triterpenoid saponins from the fruits of Aesculus pavia.”** Phytochemistry 67(8), 784-794 (2006).

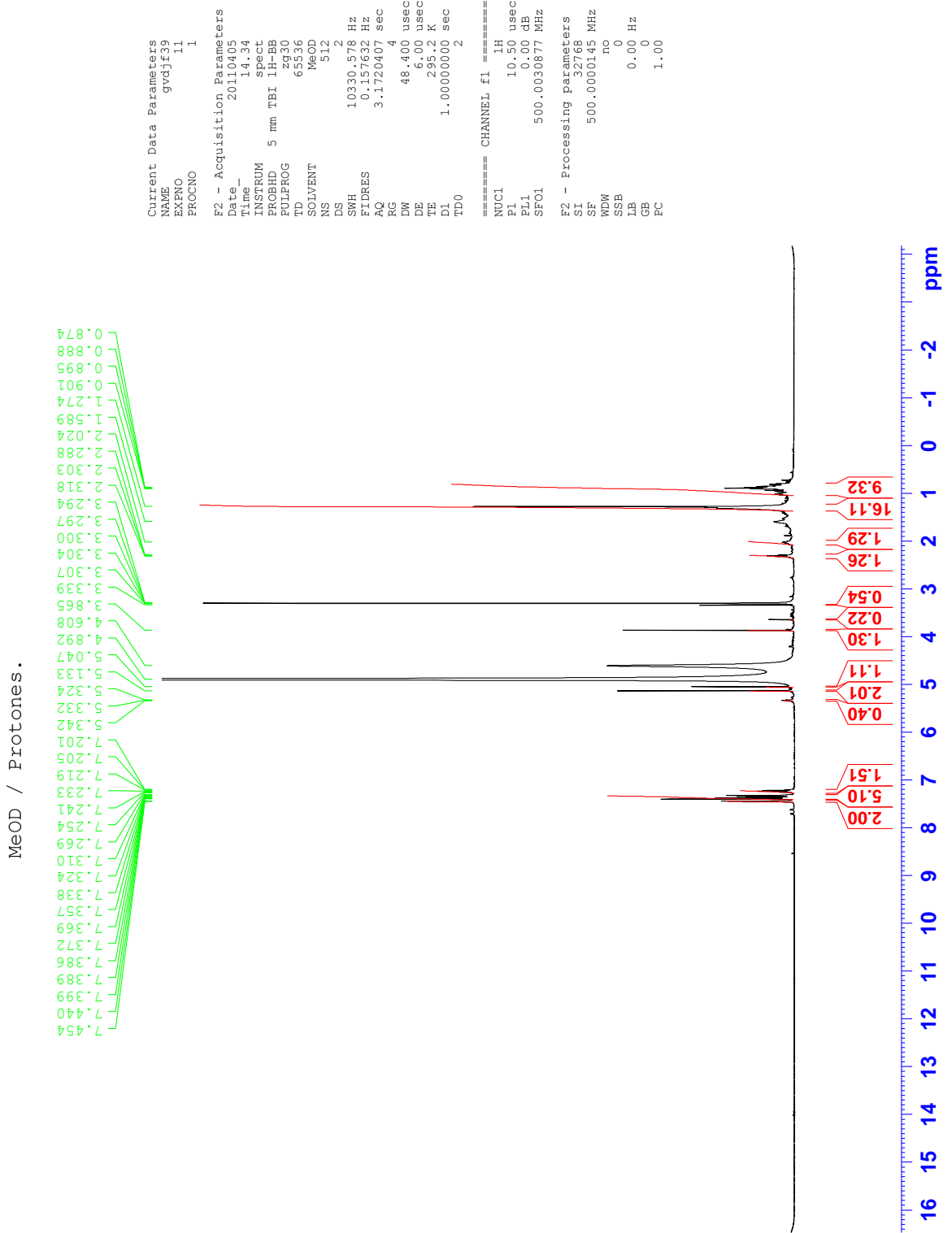
33. Yang X., Zhao J. and Hattori M. **“Three new triterpenoid saponins from the seeds of Aesculus Turbinata.”** Journal of Asian Natural Products Research. 10(3), 243-247 (2008).

34. Wagner H., Bladt S. **“Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas”**
Second Edition. Springer. 1996. Chapter 7,14,15 and 16.
35. Voutquenne L., Guinot P., Froissard C., Thoison O., Litaudon M., Lavaud C.
“Haemolytic acylated triterpenoid saponins from Harpullia austro-caledonica” Phytochemistry 66 (7), 825-835 (2005).
36. Zhang Z., Koike K., Nikaido T., Gou Dean and Zheng J. **“Triterpenoidal saponins acylated with two monoterpenic acids from Gleditsia sinensis”**
Chem. Pharm. Bull. 47 (3), 388-393 (1999).

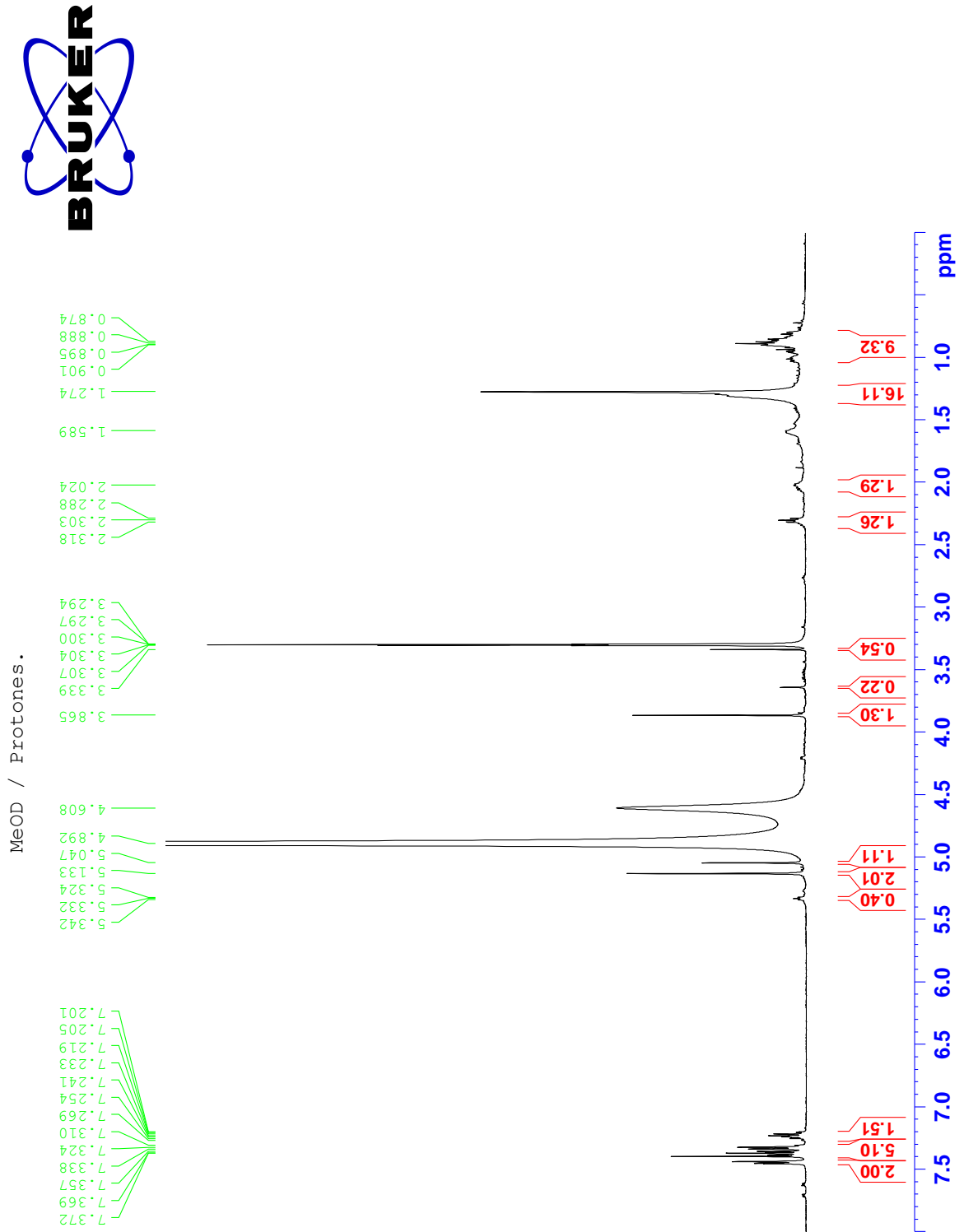
Apendice:



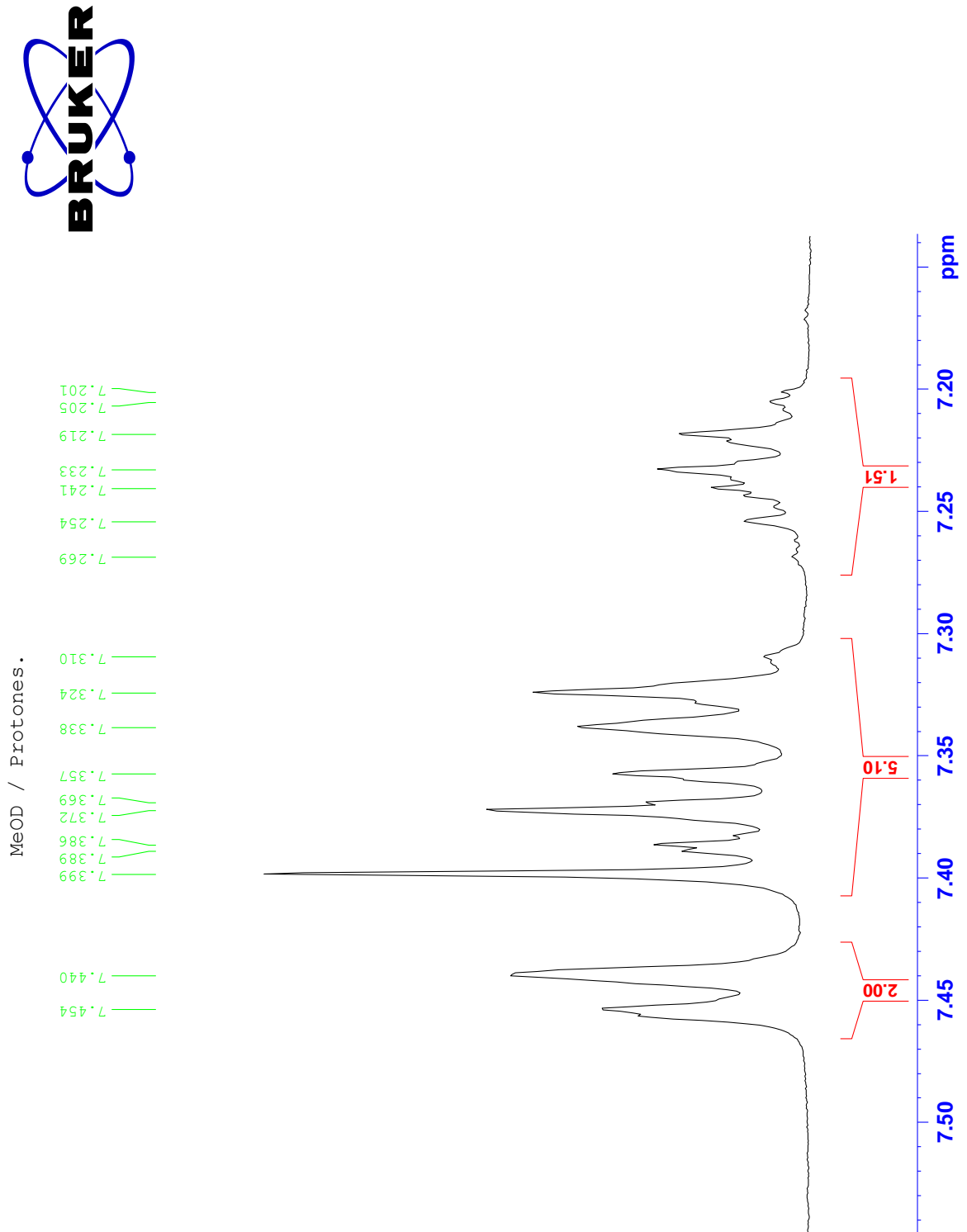
Espectro 1. Masas del compuesto F_D.



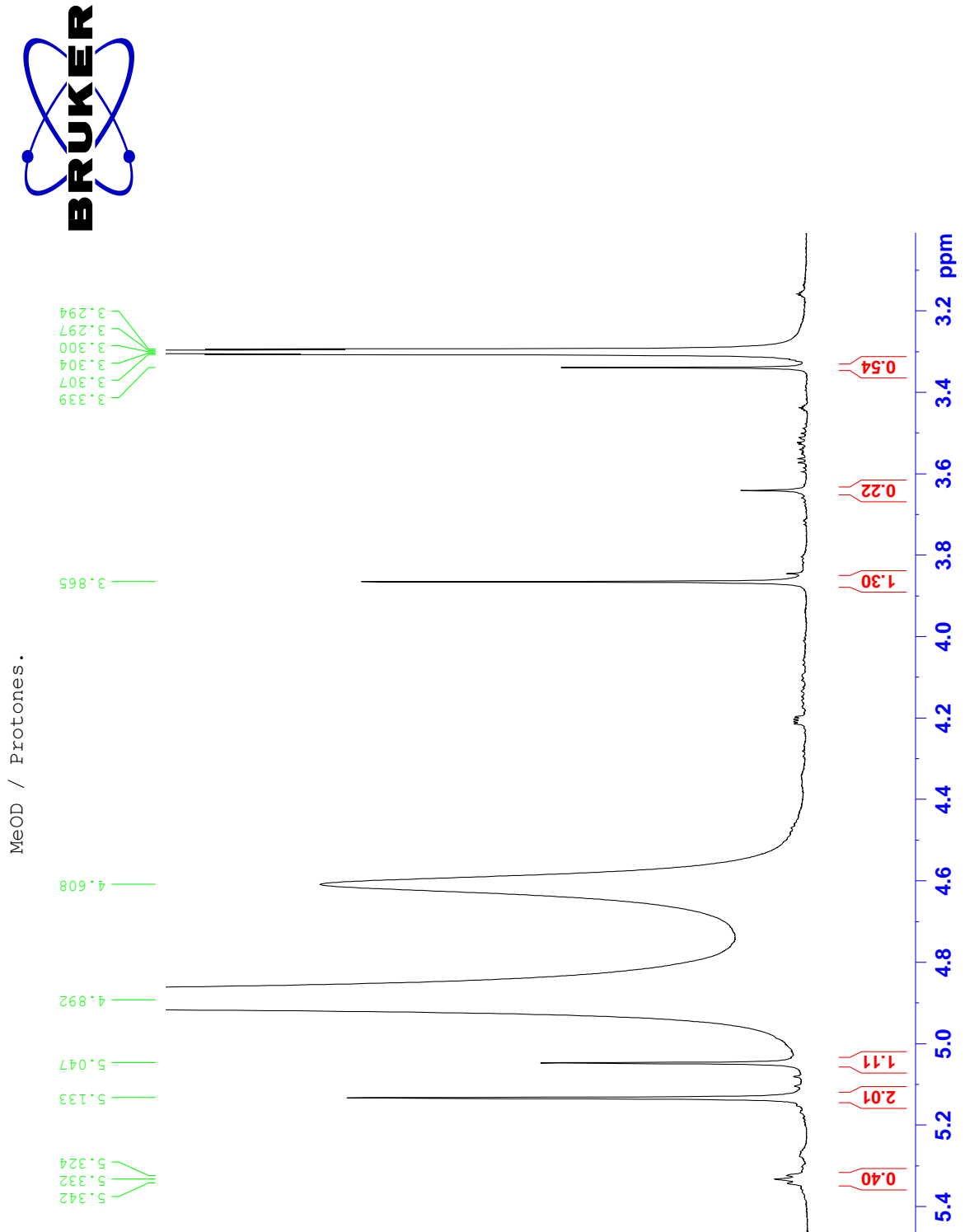
Espectro 2. RMN ¹H tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



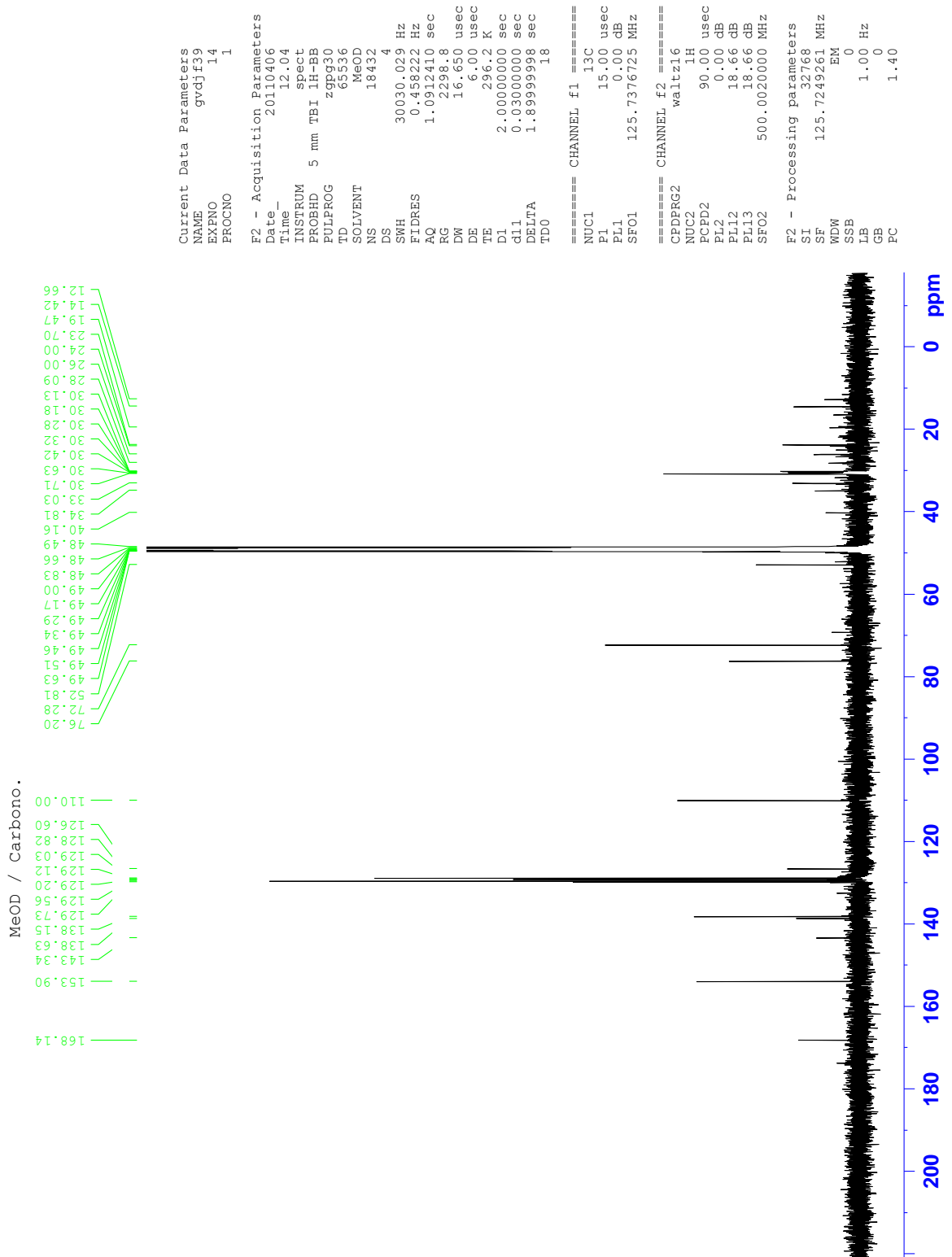
Espectro 3. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



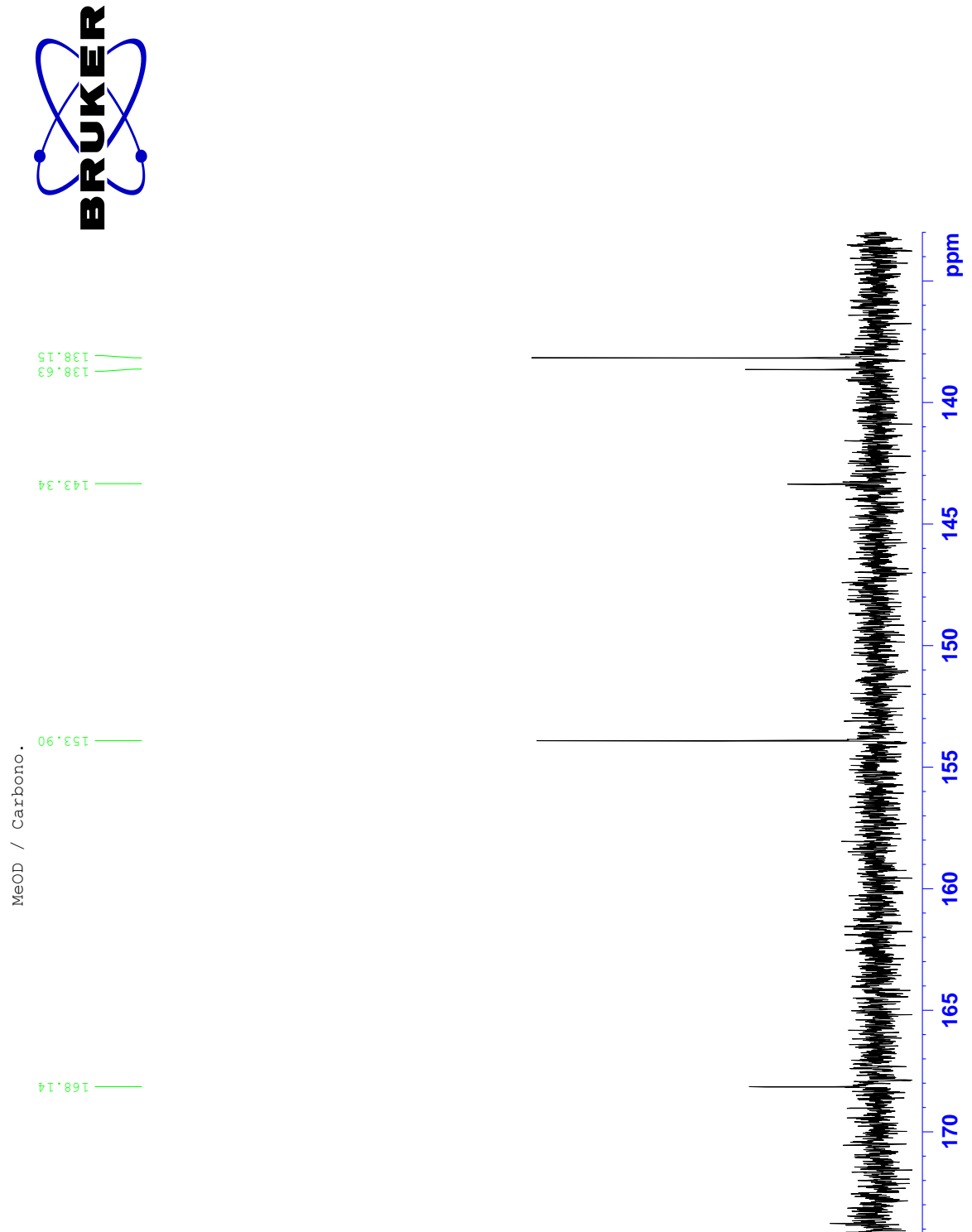
Espectro 4. Ampliación del RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



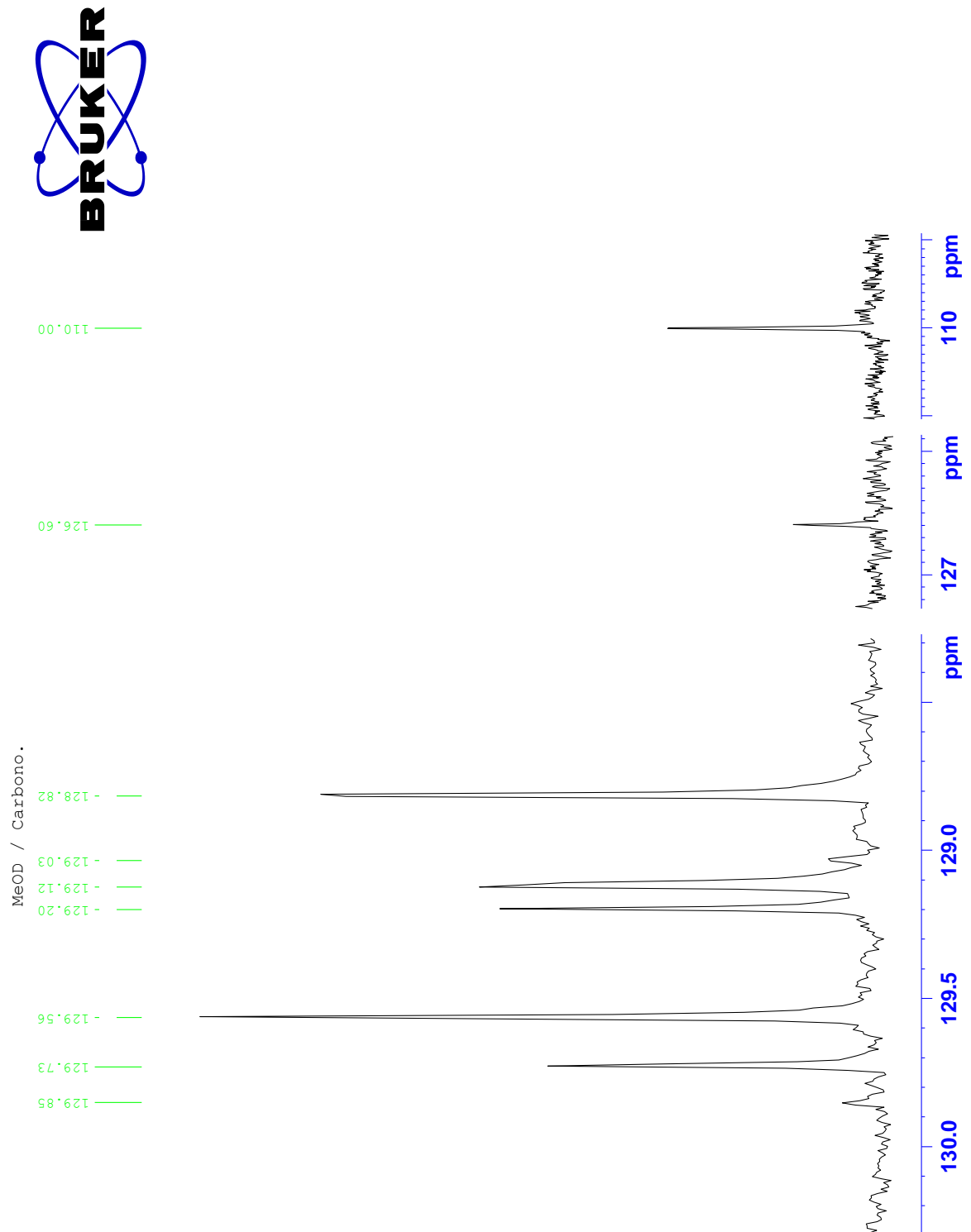
Espectro 5. Ampliación del RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



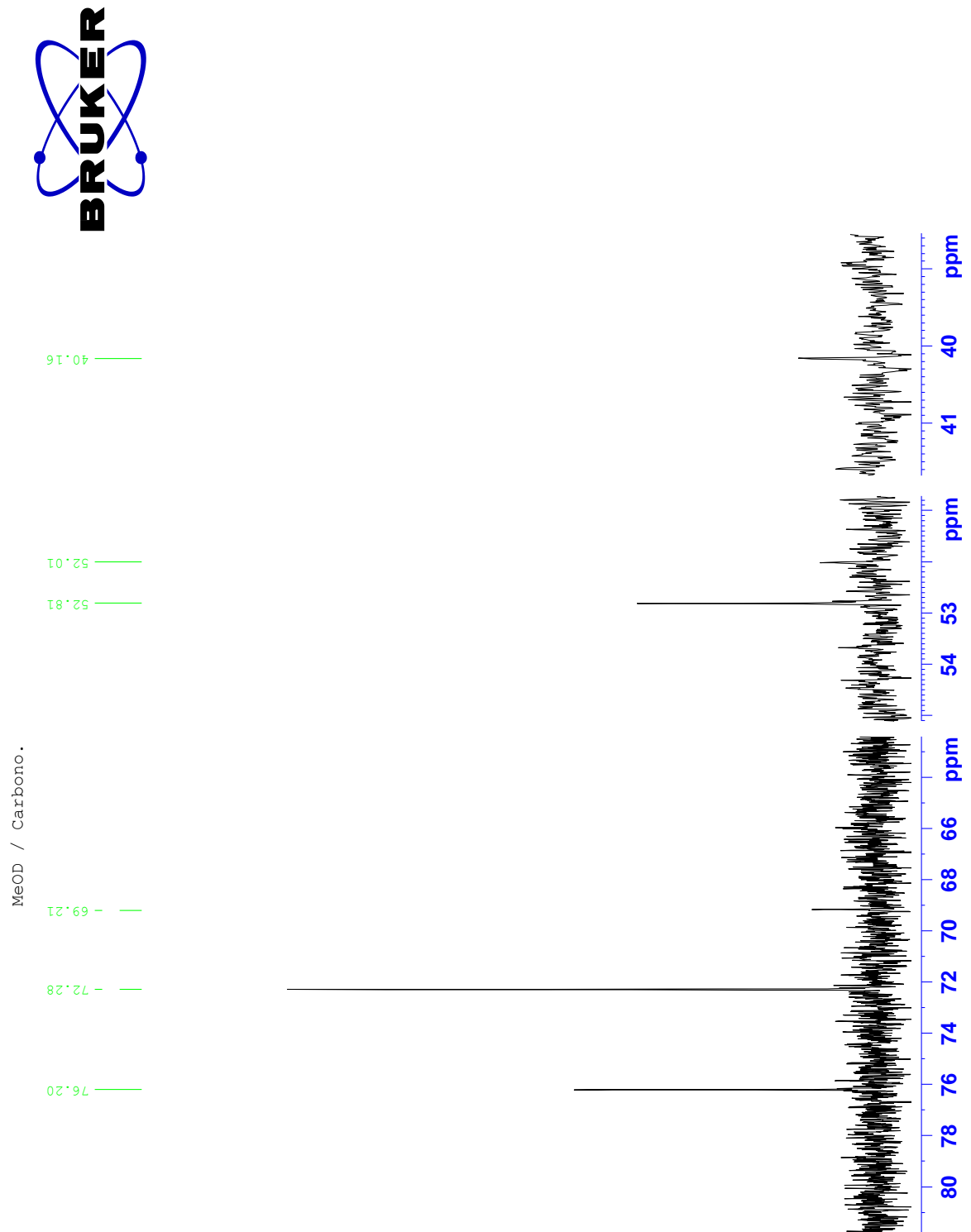
Espectro 6. RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



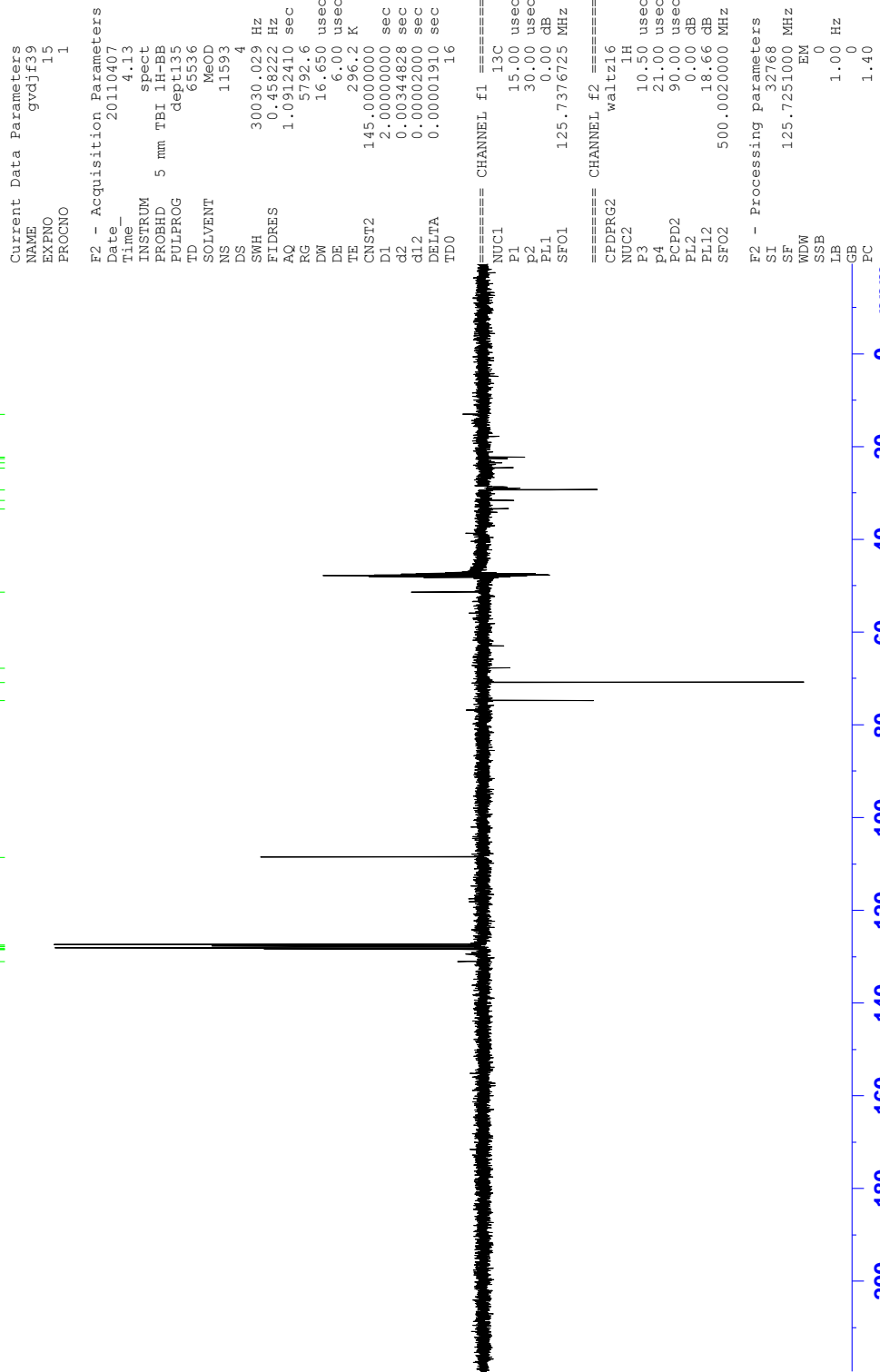
Espectro 7. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD-d_4 para el compuesto F_D .



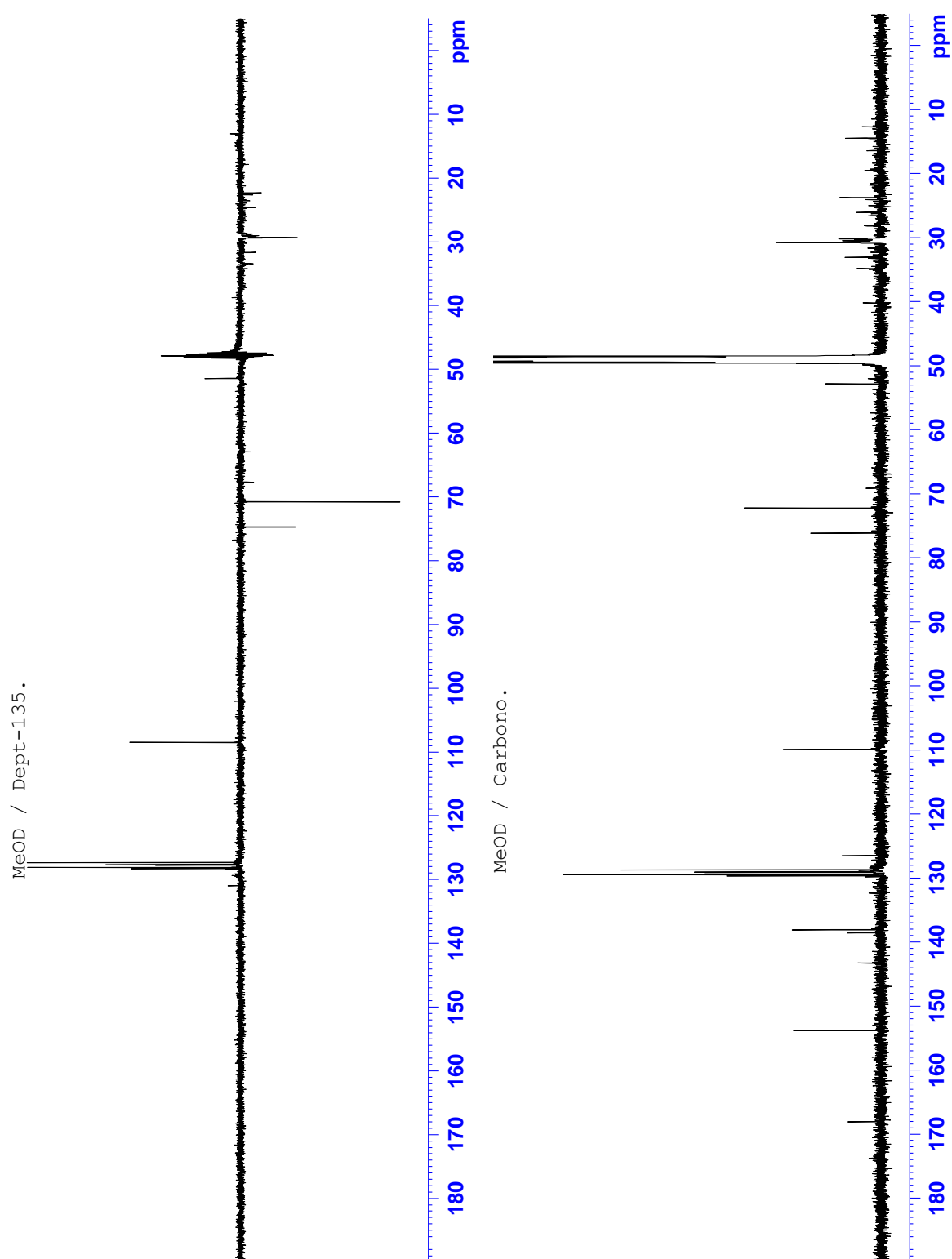
Espectro 8. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



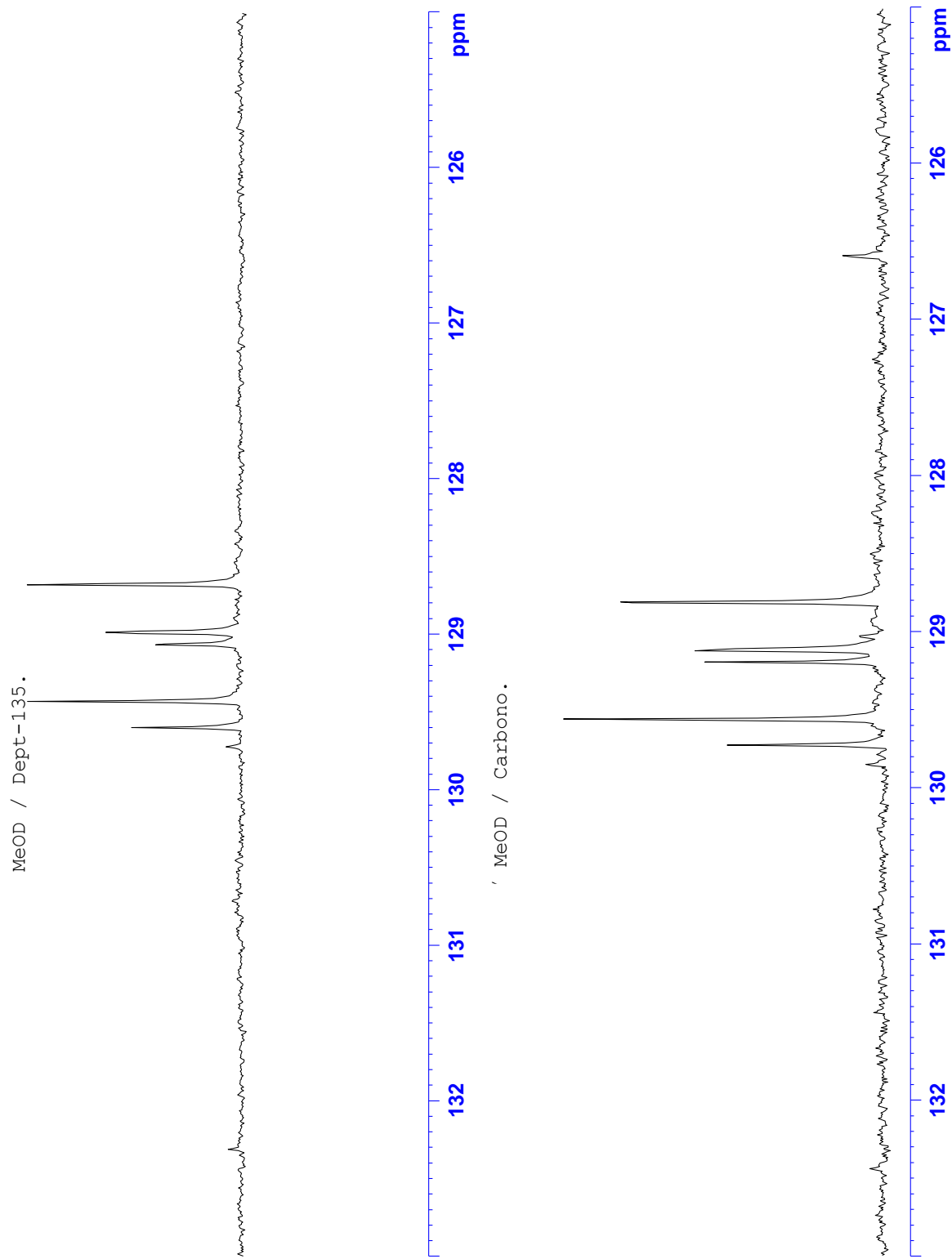
Espectro 9. Ampliación del RMN ^{13}C tomado en MeOD-d_4 para el compuesto F_D .



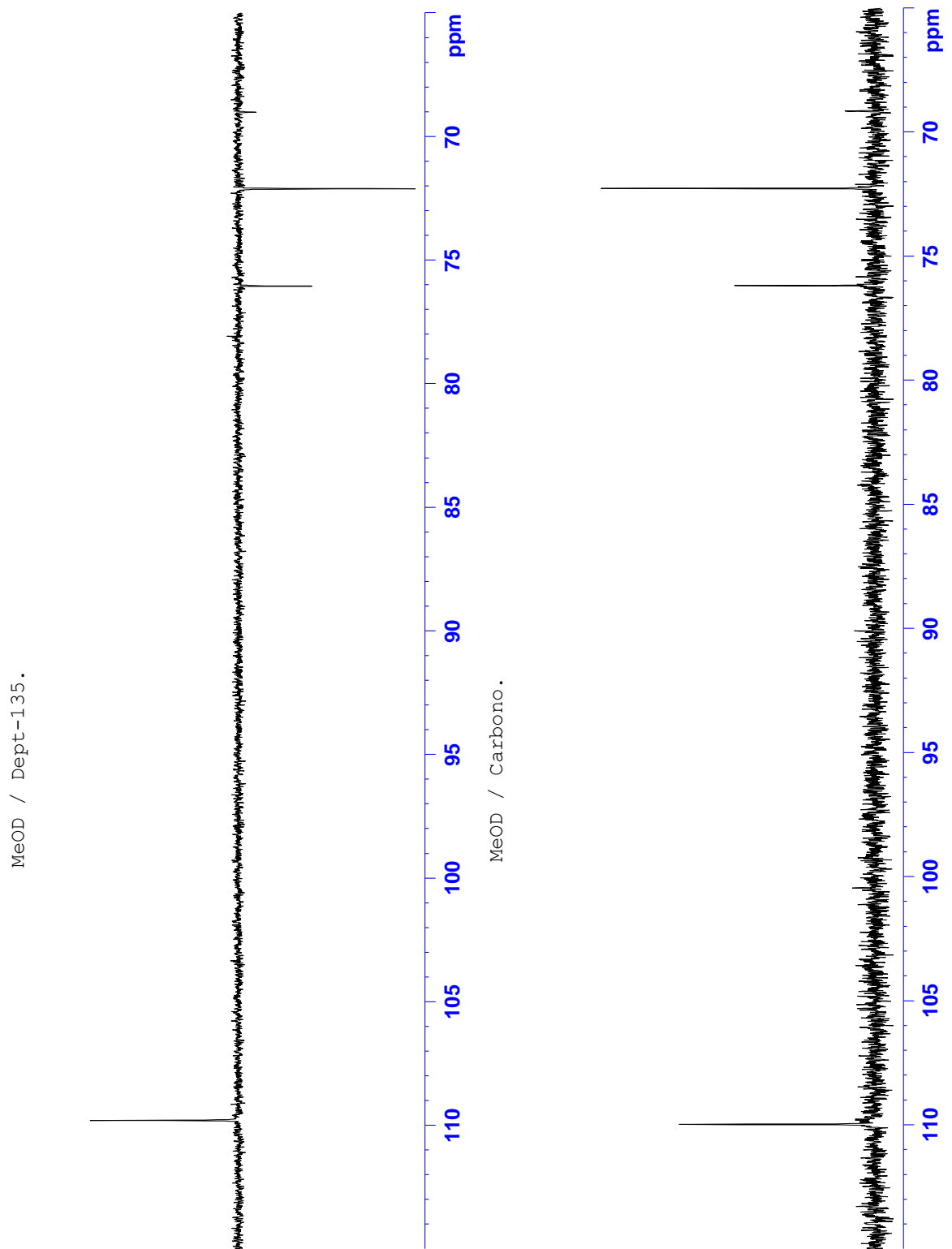
Espectro 10. RMN DEPT tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



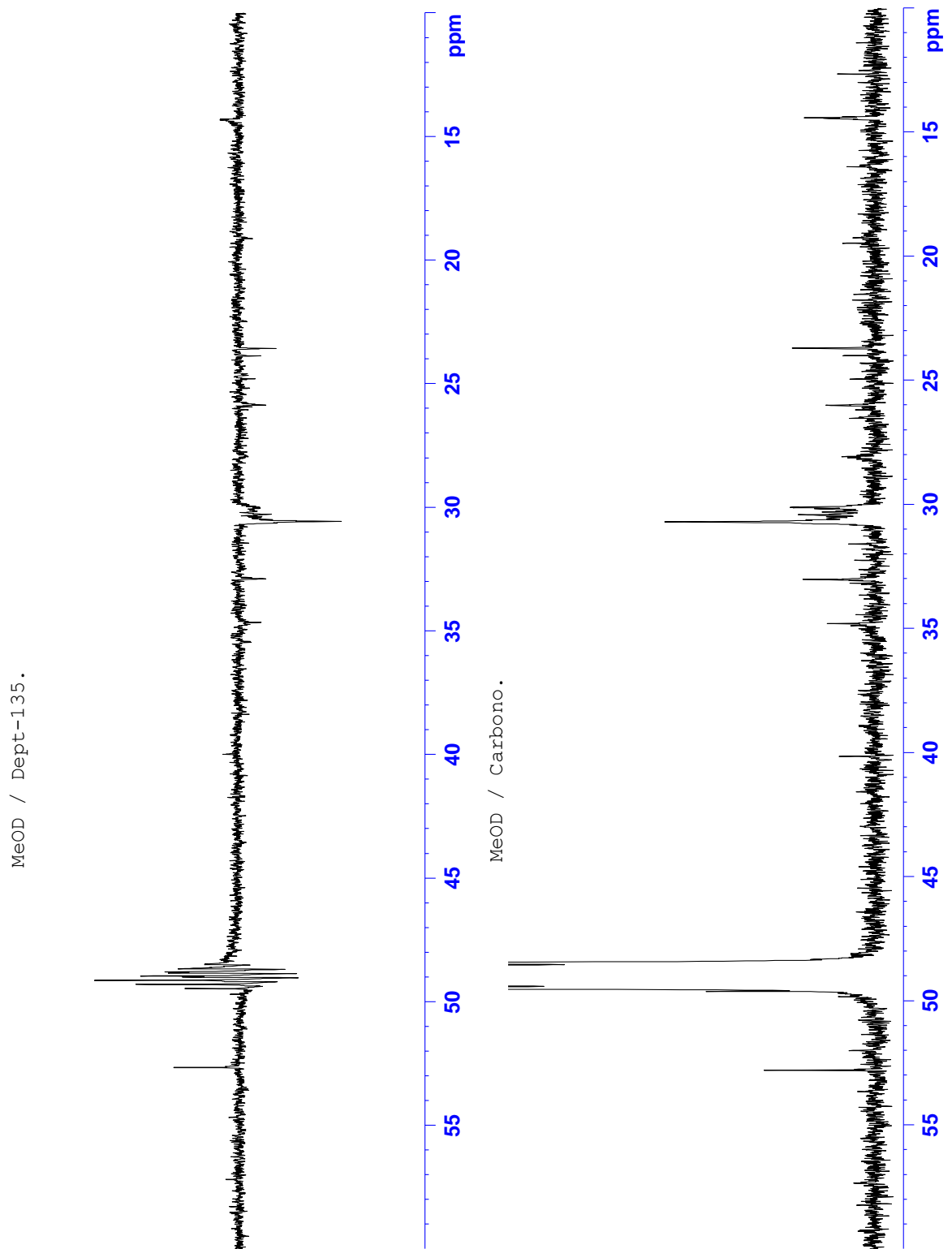
Espectro 11. Ampliación del RMN ^{13}C -DEPT tomado en $\text{MeOD}-d_4$ para el compuesto F_D .



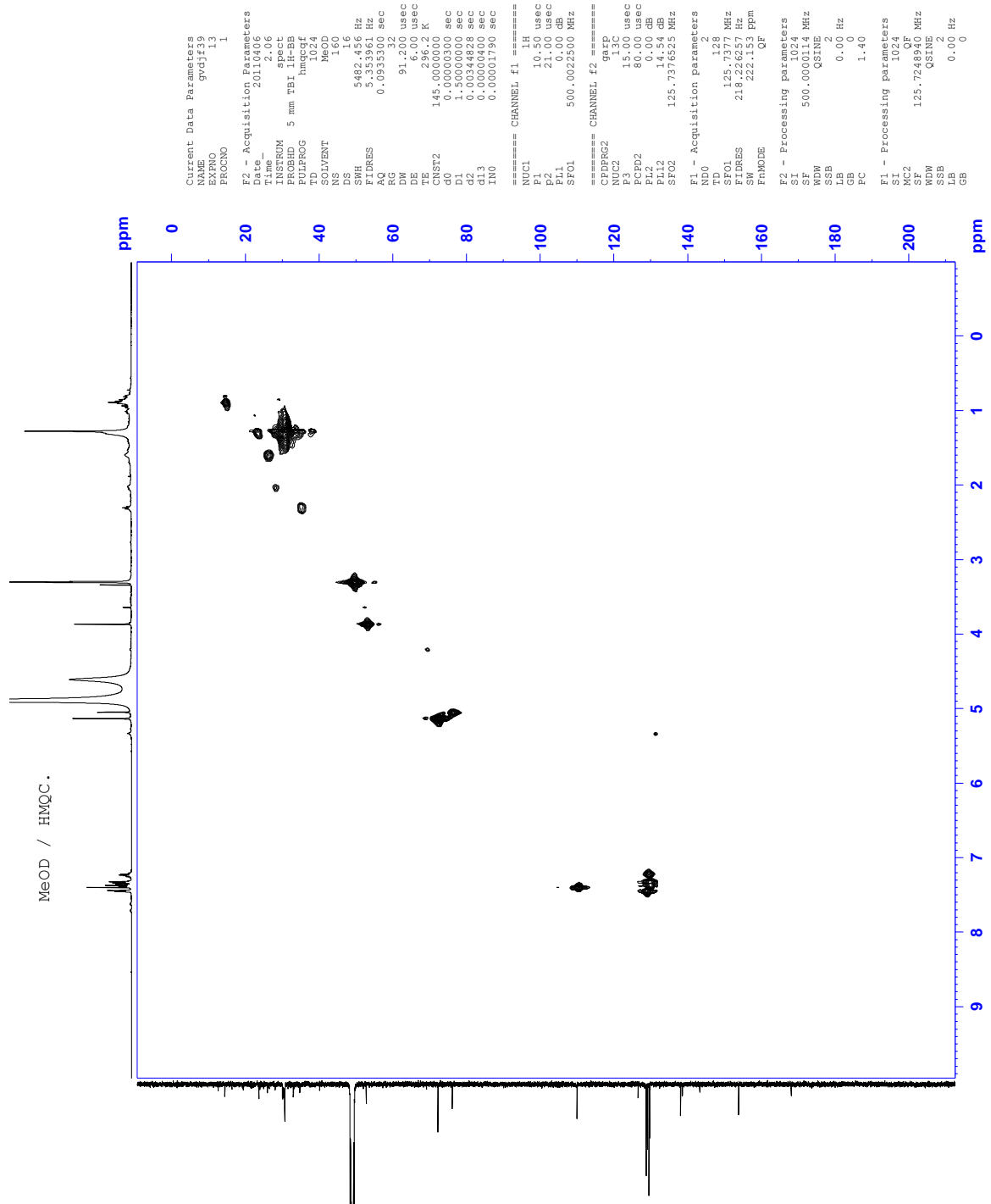
Espectro 12. Ampliación del RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOD-d_4 para el compuesto F_D .



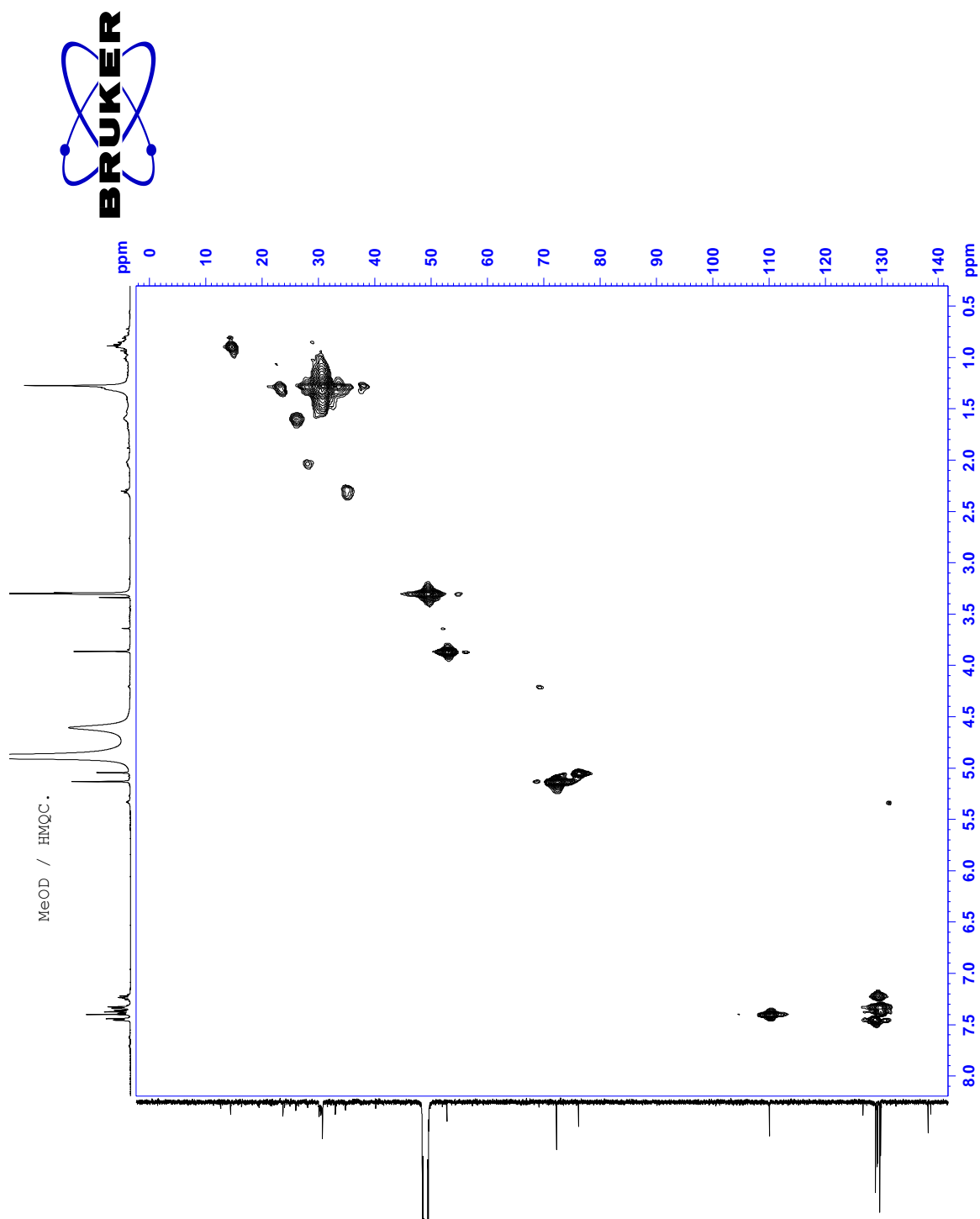
Espectro 13. Ampliación del RMN ^{13}C -DEPT tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



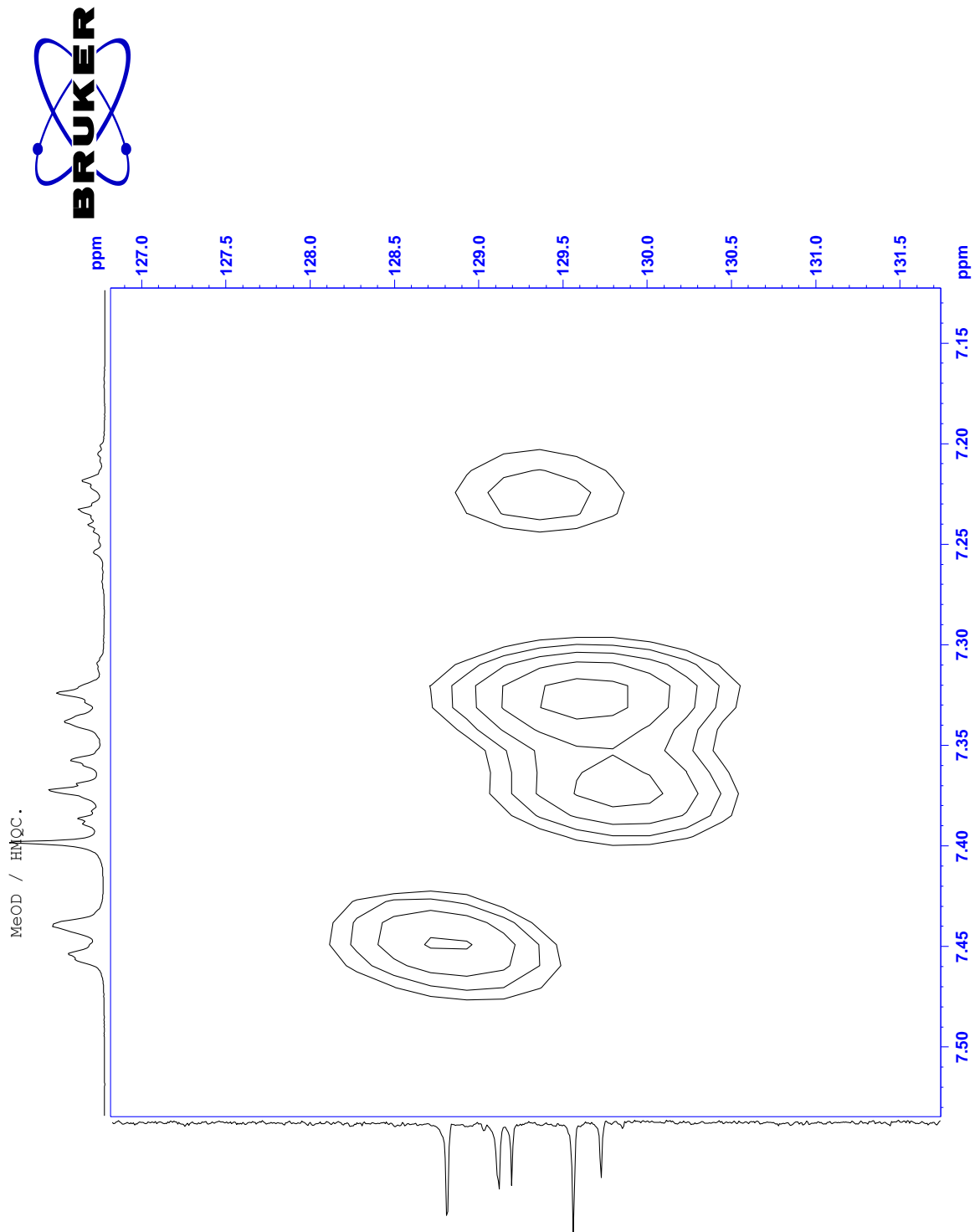
Espectro 14. Ampliación del RMN ¹³C-DEPT tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



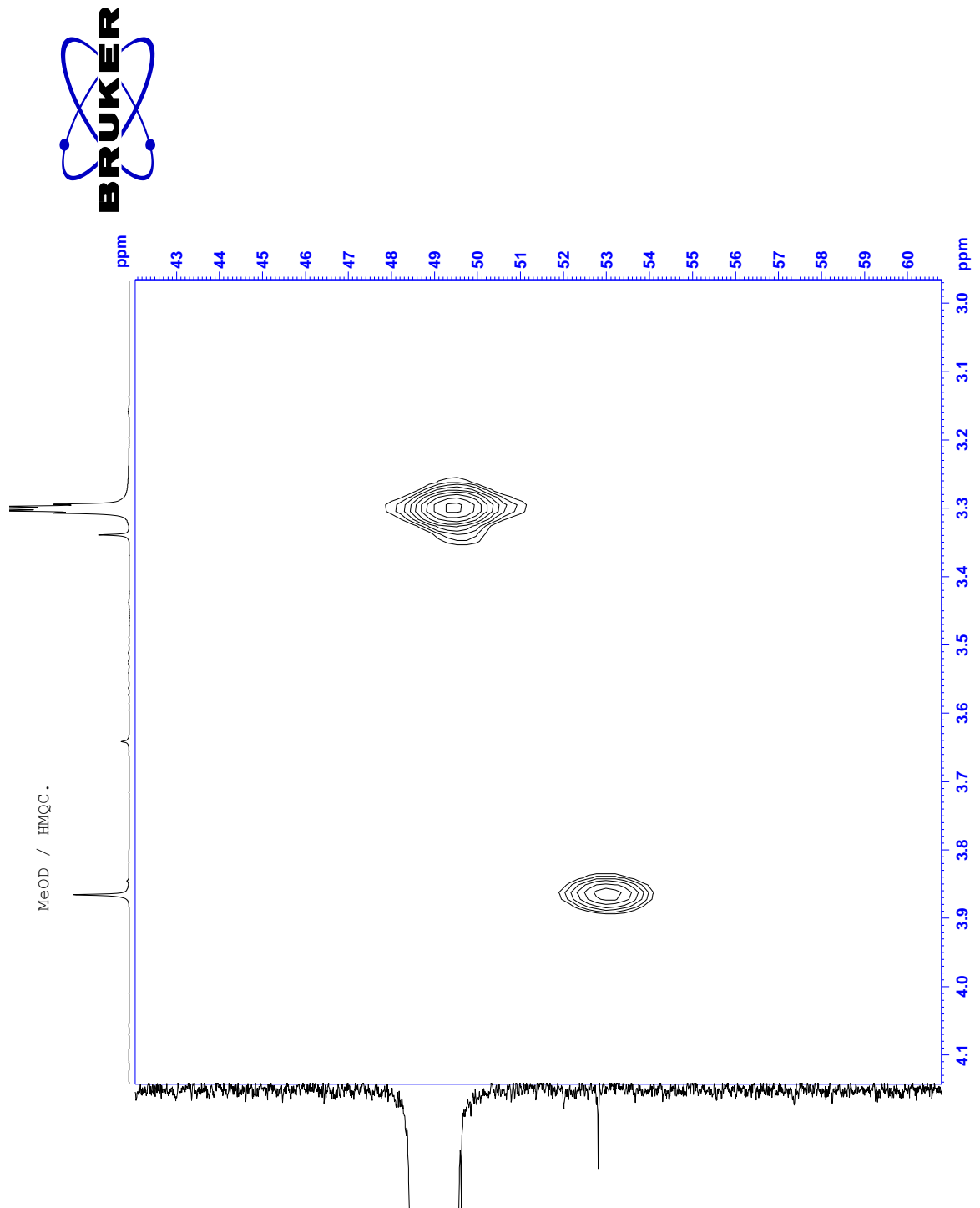
Espectro 15. RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



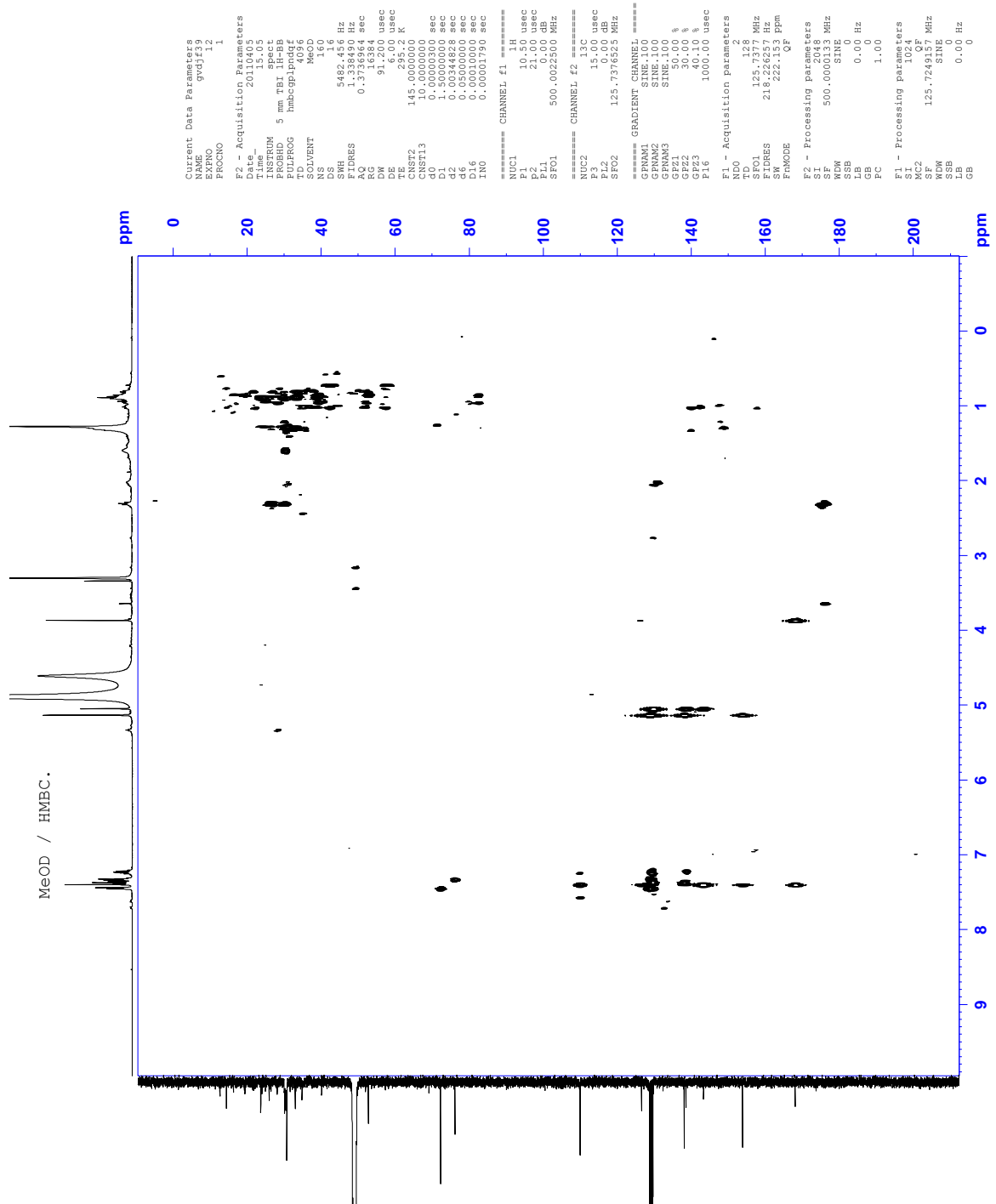
Espectro 16. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



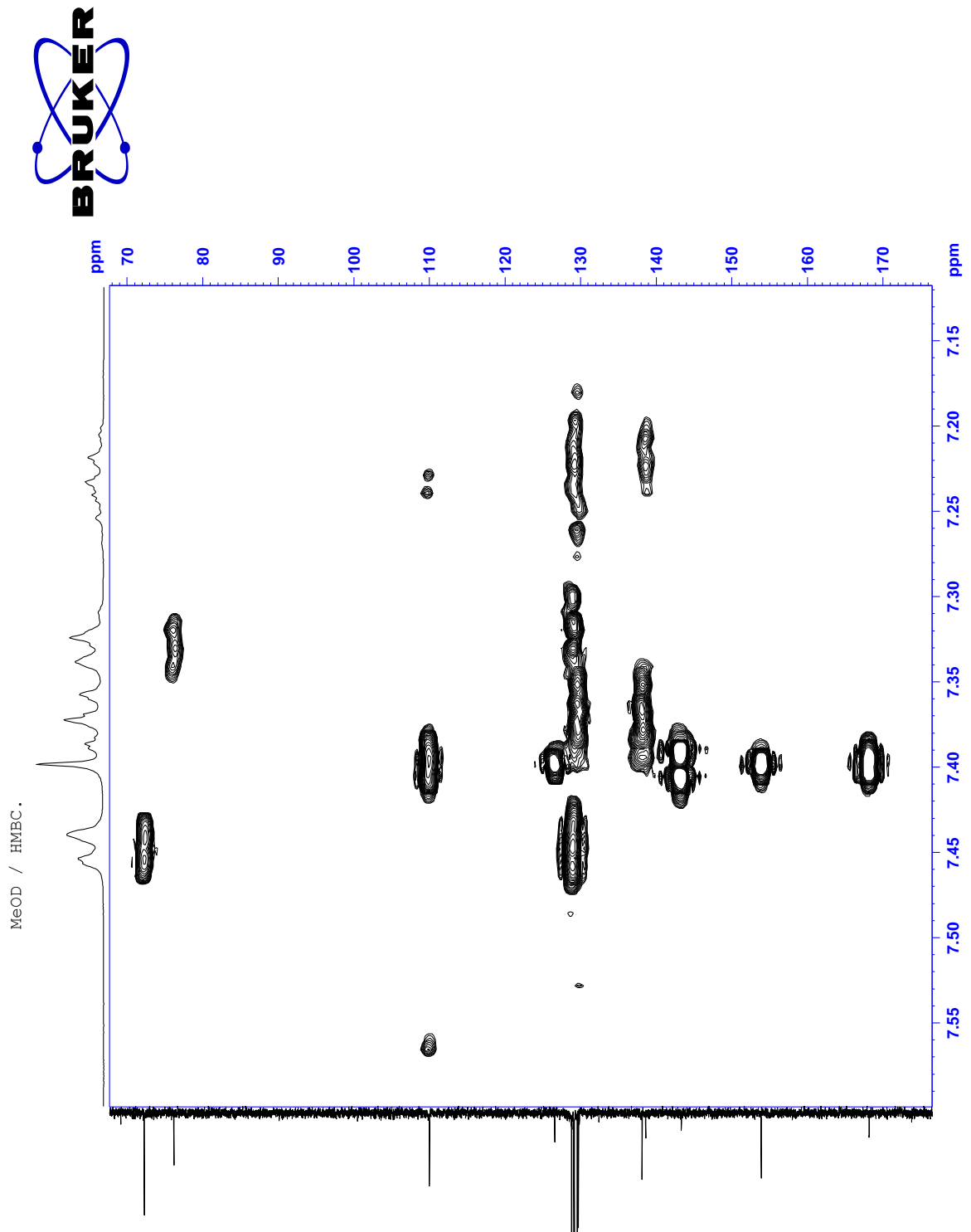
Espectro 17. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_D.



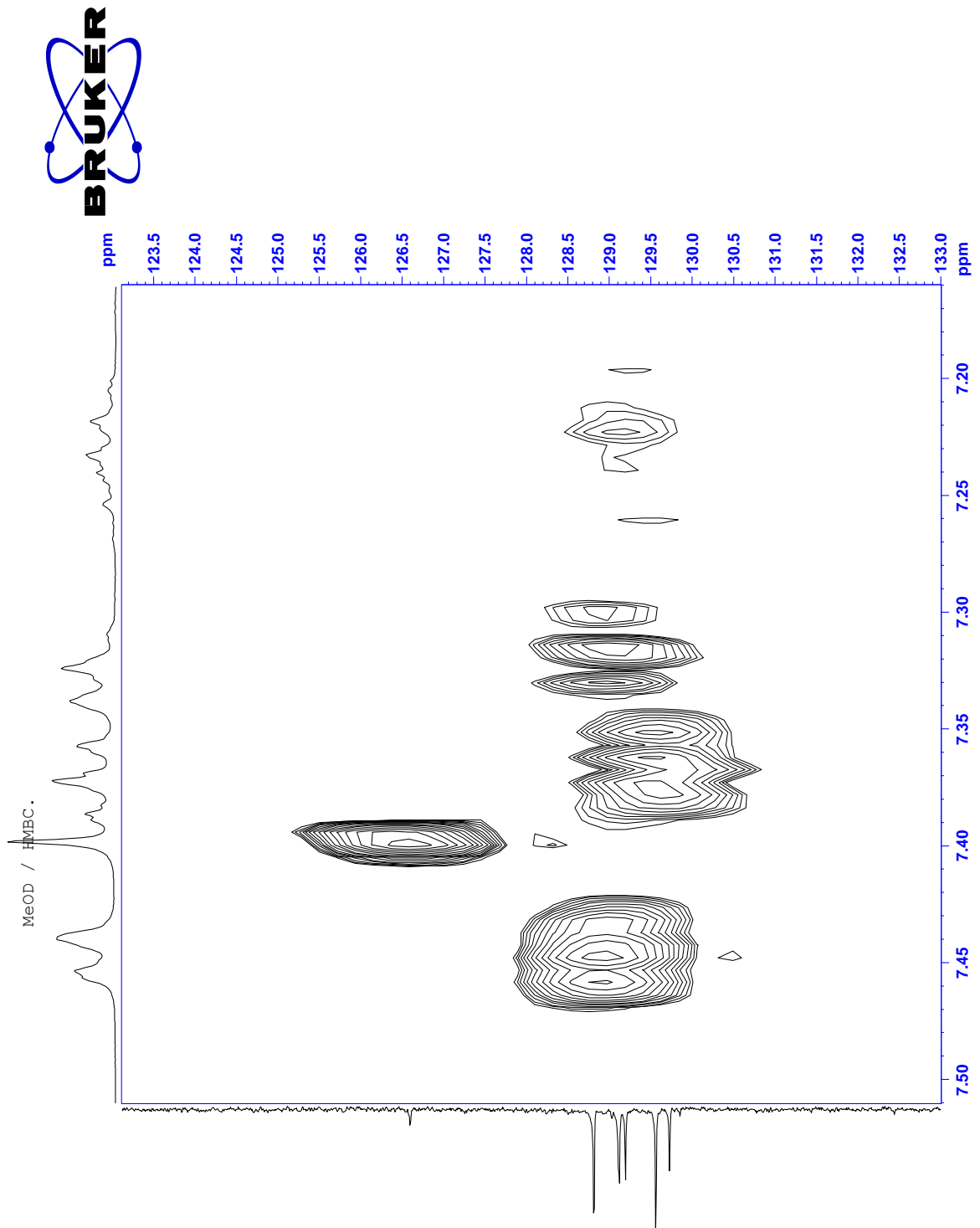
Espectro 18. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



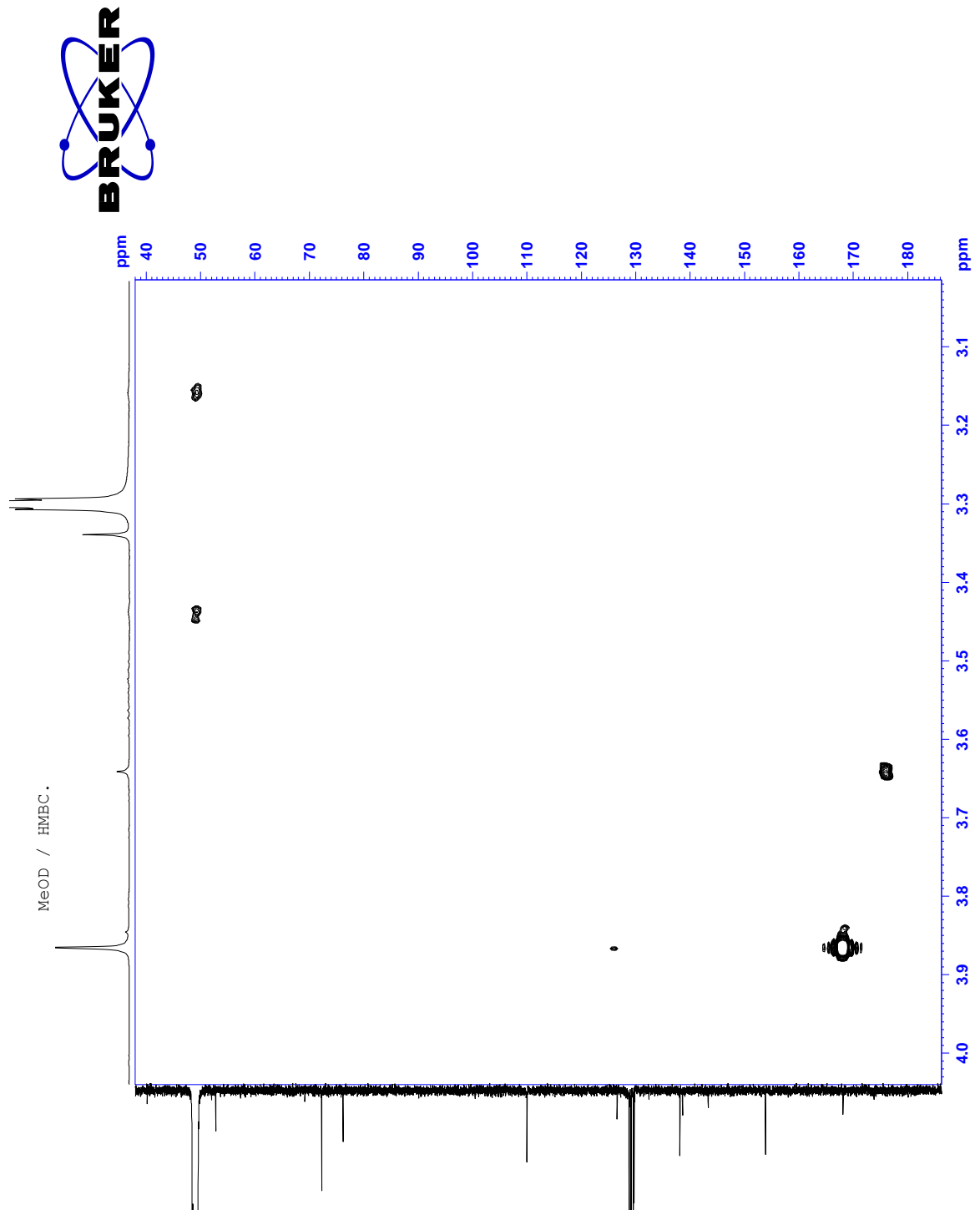
Espectro 19. RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D.



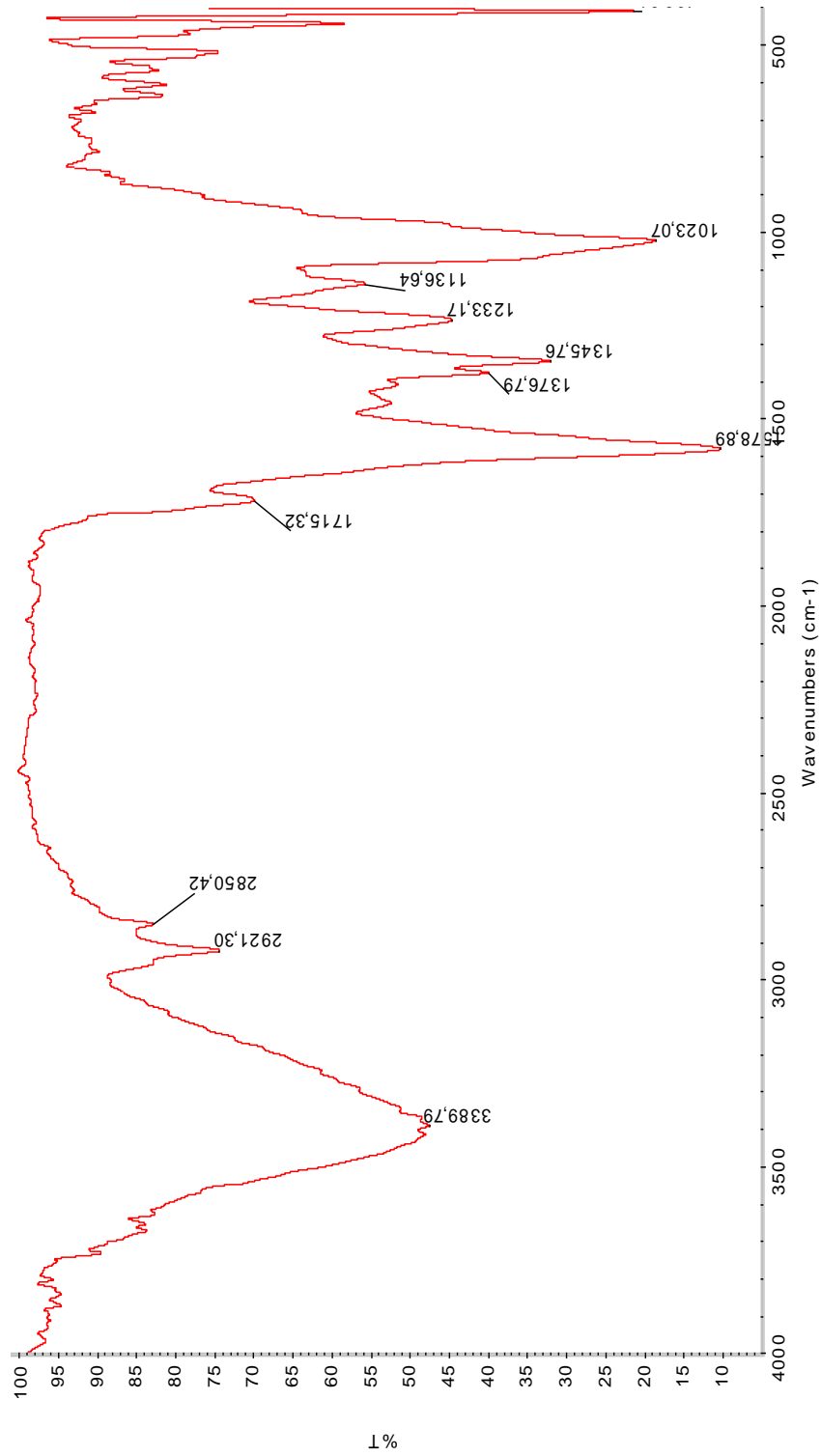
Espectro 20. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



Espectro 21. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .

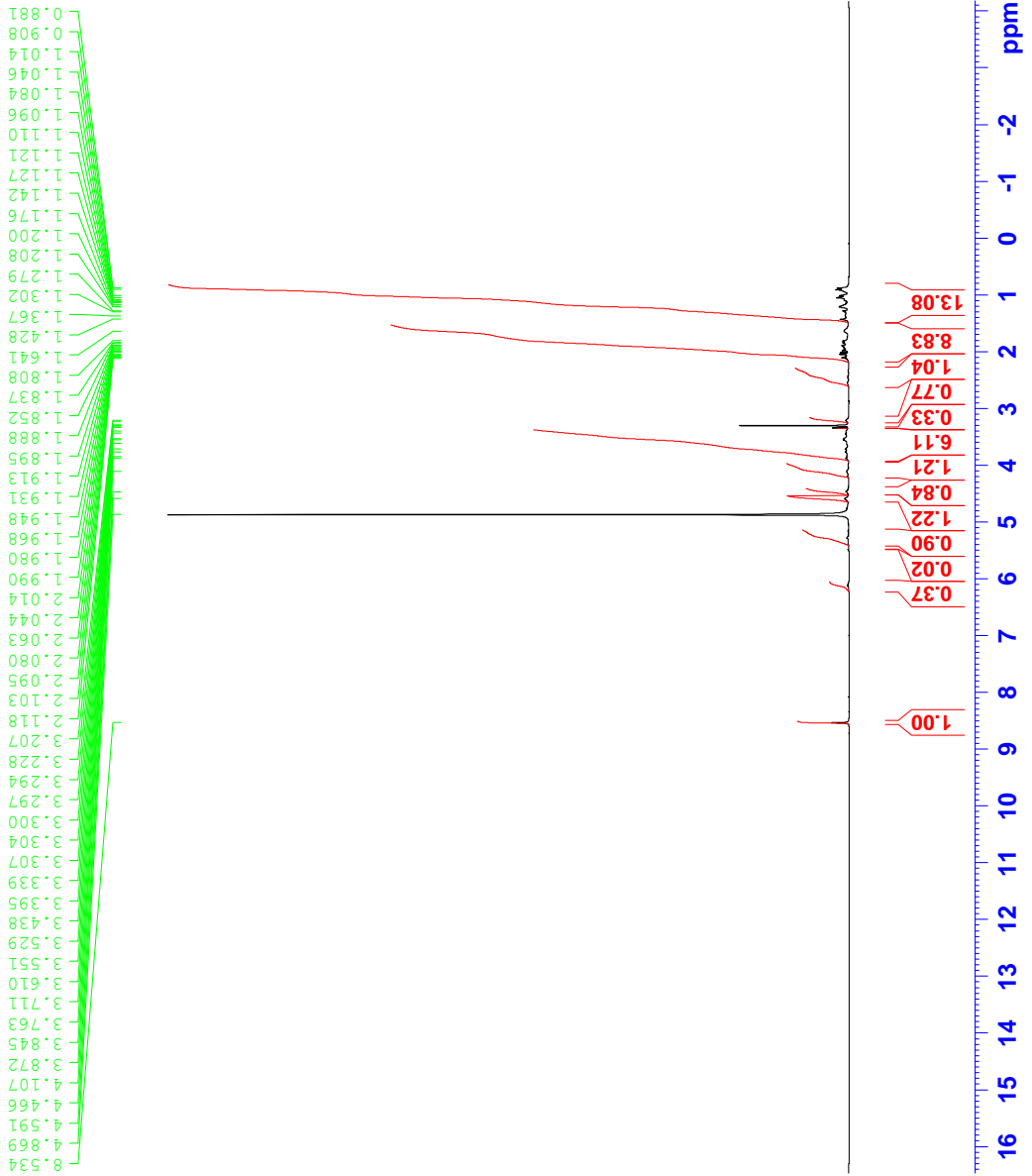


Espectro 22. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_D .



Espectro 23. IR para el compuesto F_{17C}.

MeOD / Protones.



```

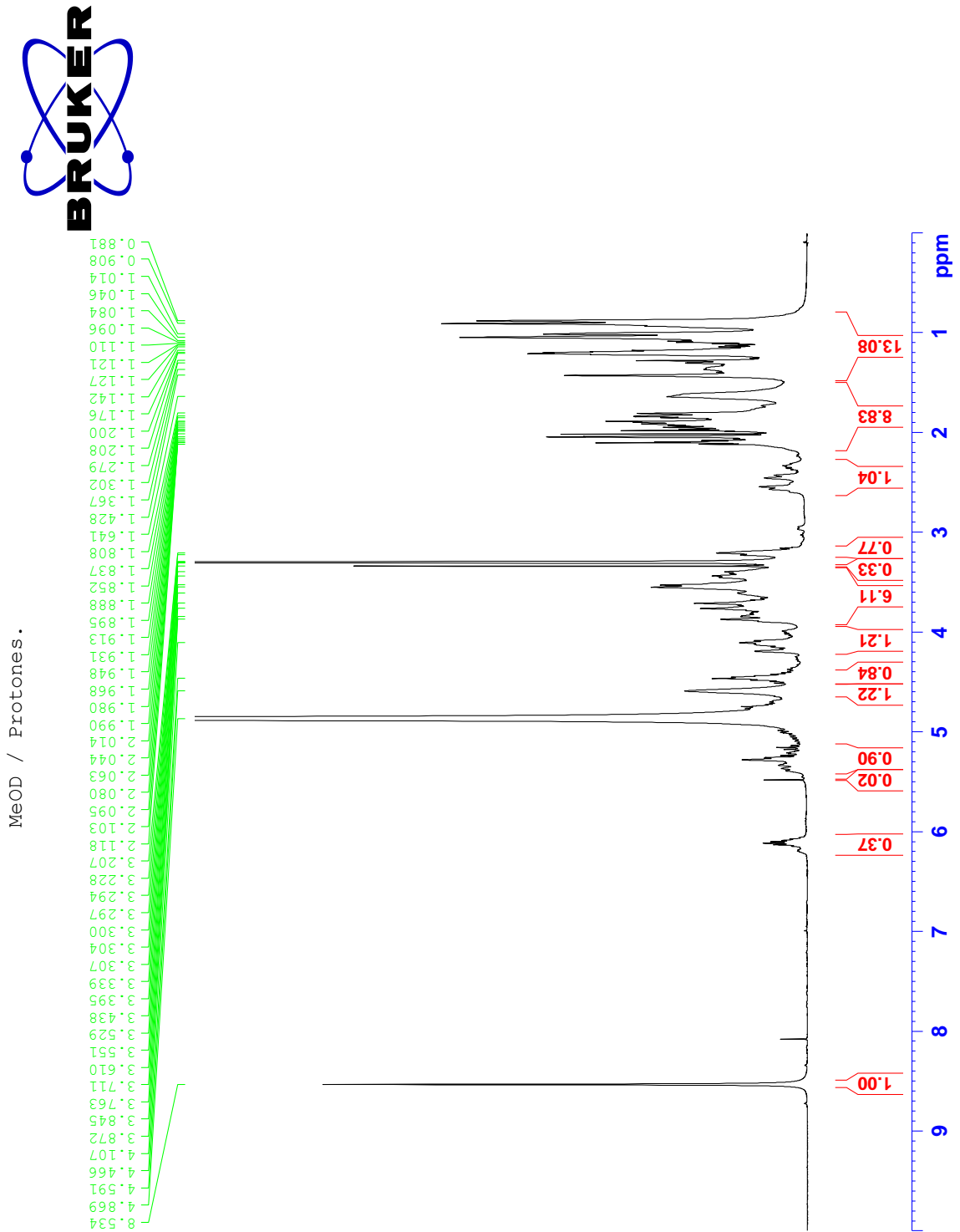
Current Data Parameters
NAME          gvspfh3
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20110901
Time          17.14
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm TBI IH-BB
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            3072
DS            2
SWH           10330.578 Hz
FIDRES        0.157632 Hz
AQ            3.1720407 sec
RG            114
DW            48.400 usec
DE            6.00 usec
TE            296.2 K
D1            1.00000000 sec
TD0           6

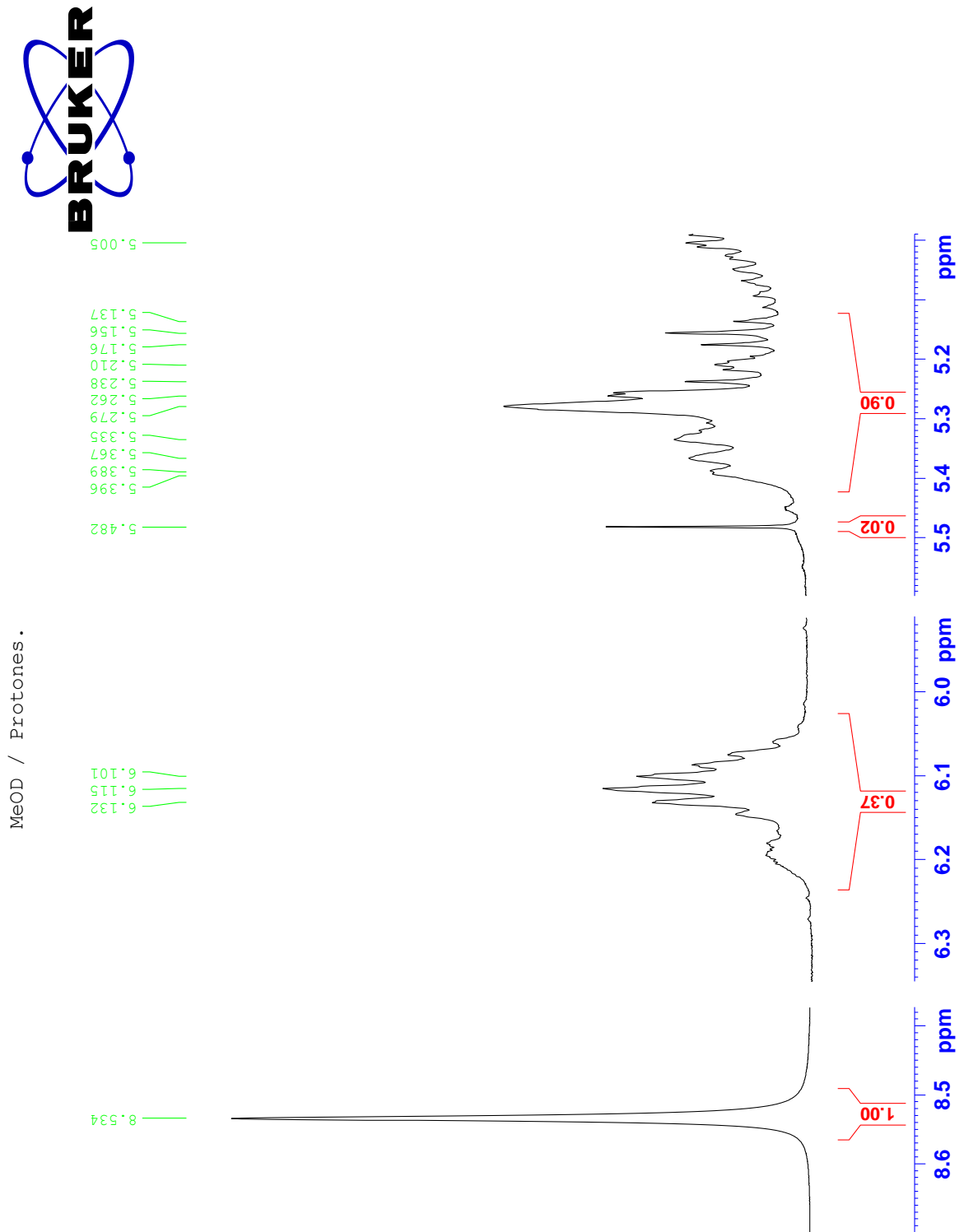
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            10.50 usec
PL1           0.00 dB
SFO1          500.0030877 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            500.0000146 MHz
WDW           no
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```

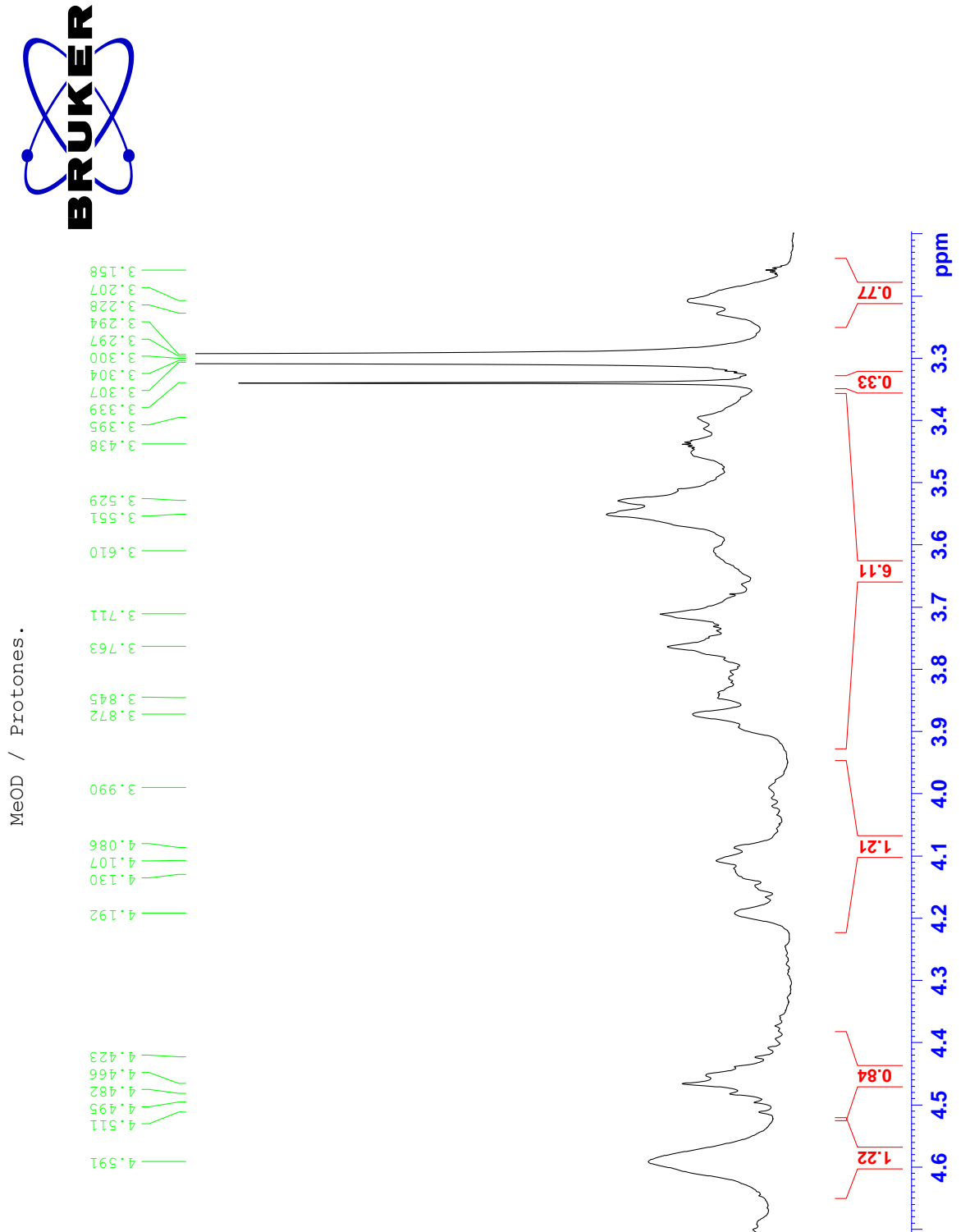
Espectro 24. RMN ¹H tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}.



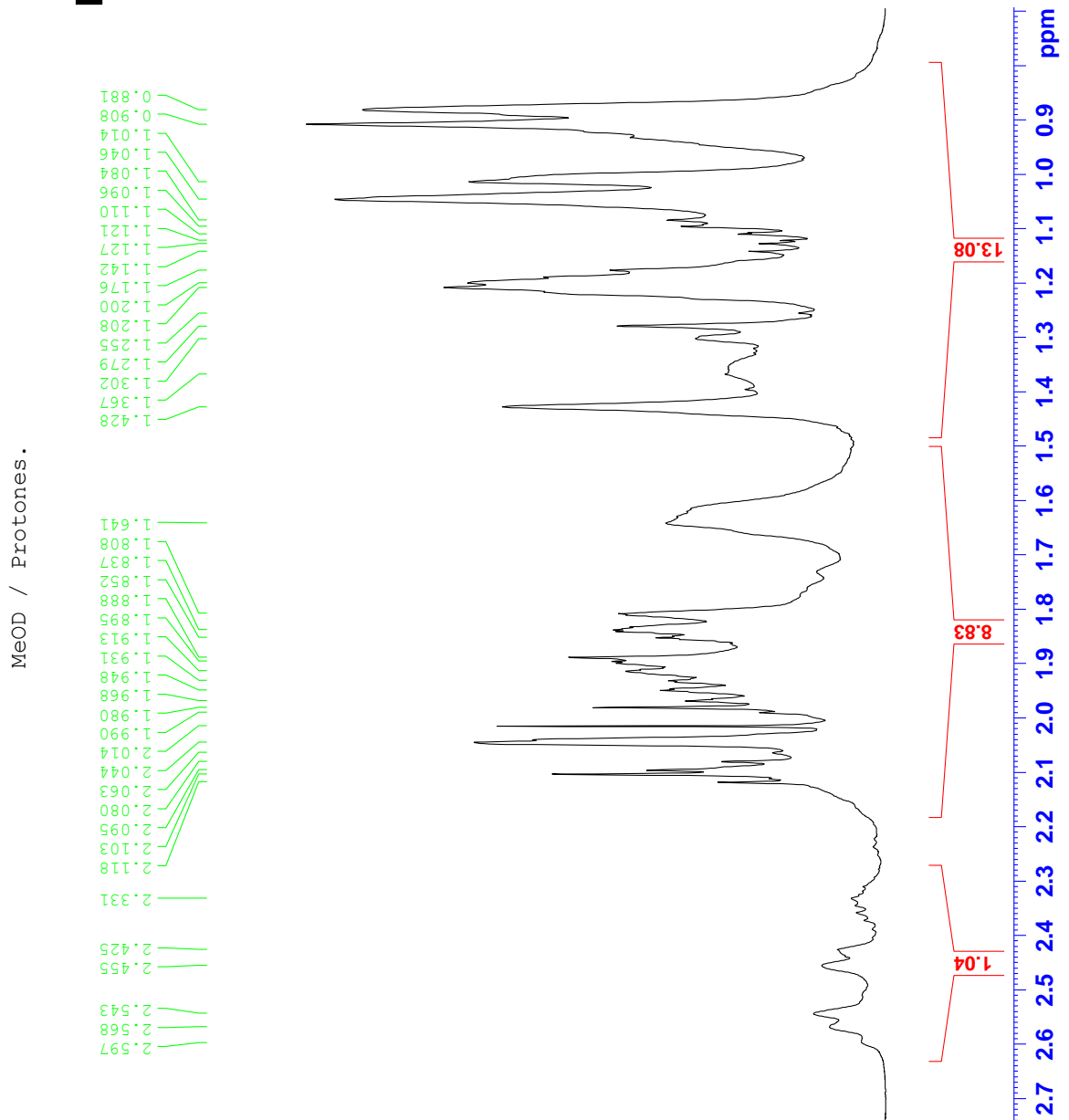
Espectro 25. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17C}.



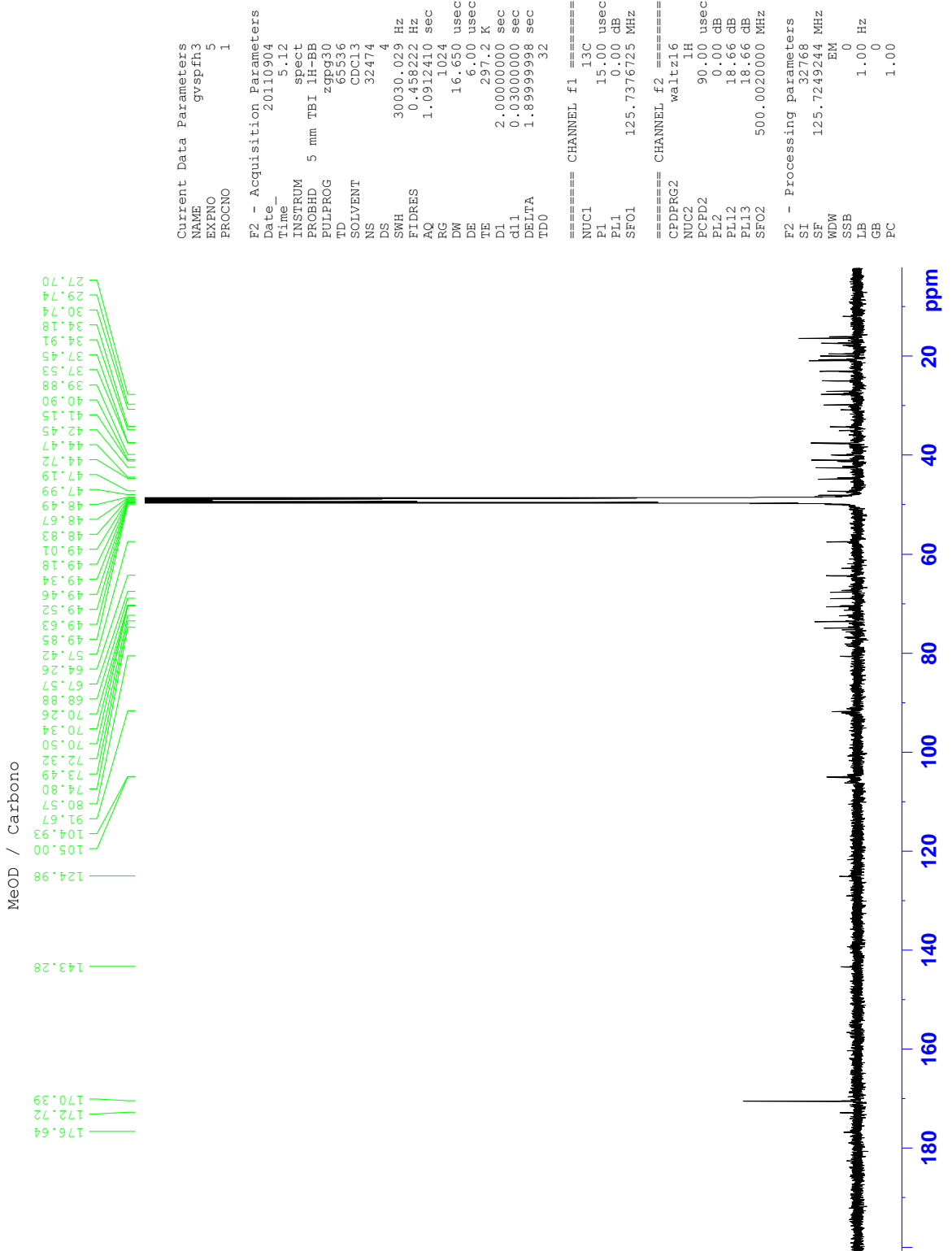
Espectro 26. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17C}.



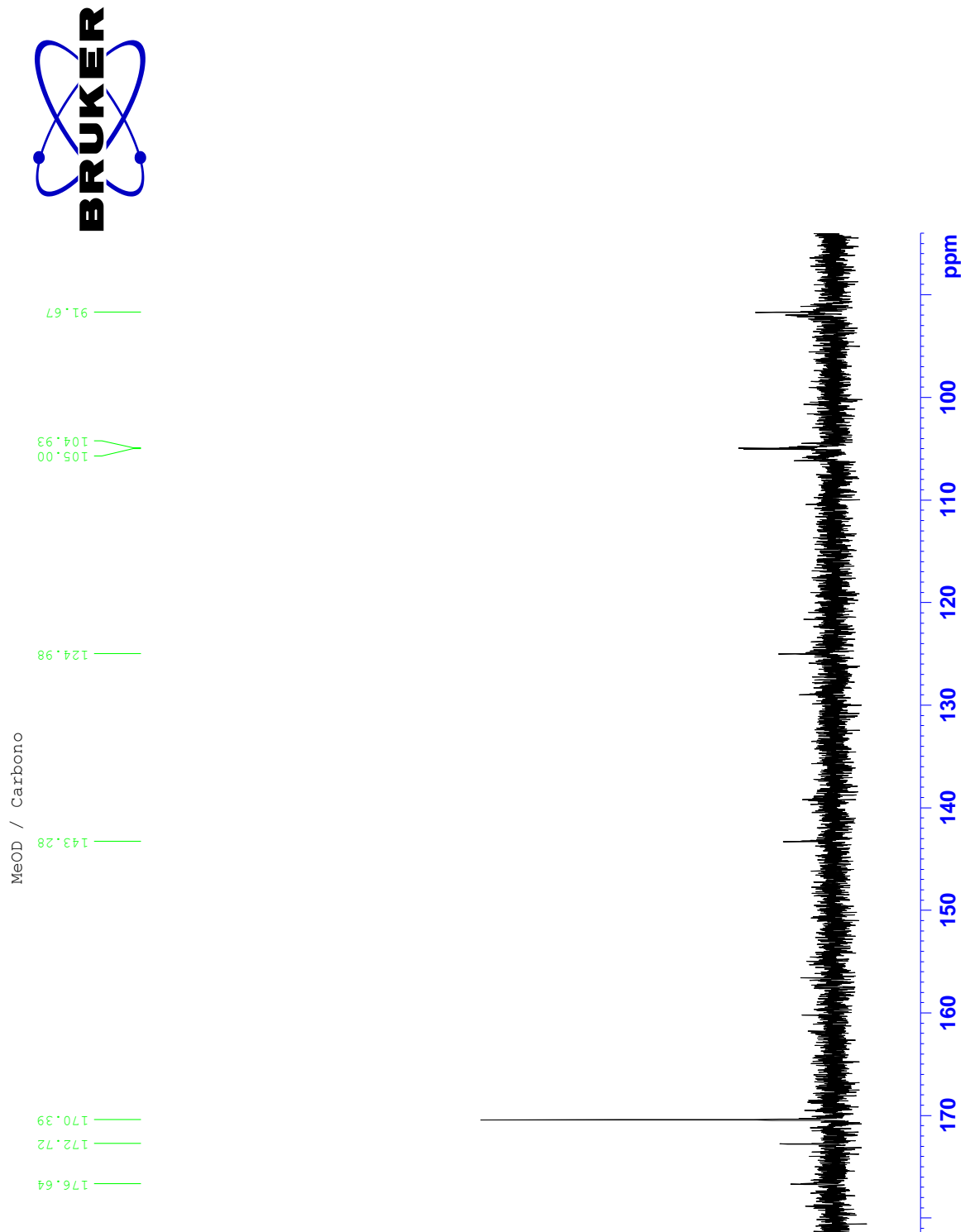
Espectro 27. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17C}.



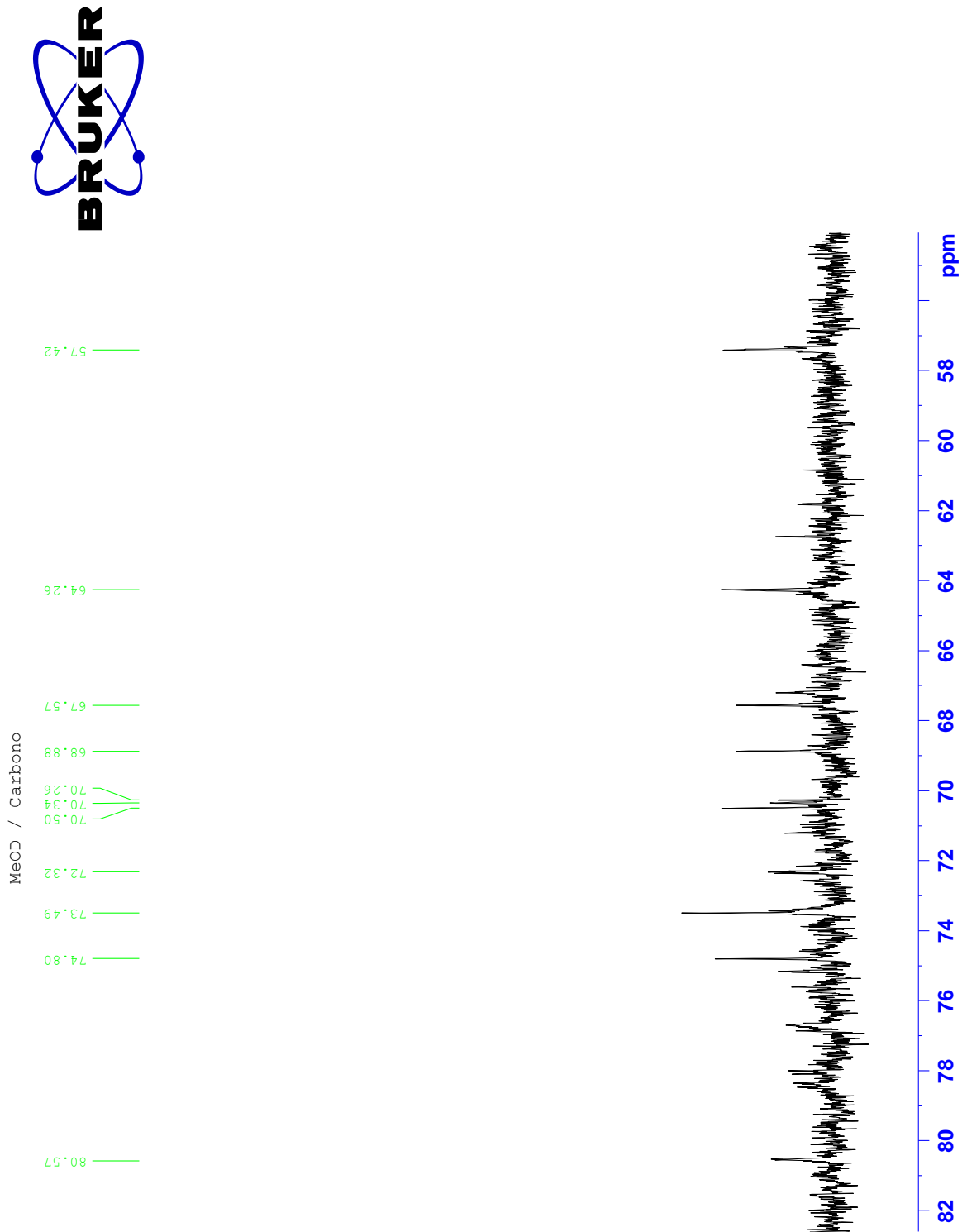
Espectro 28. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17C}.



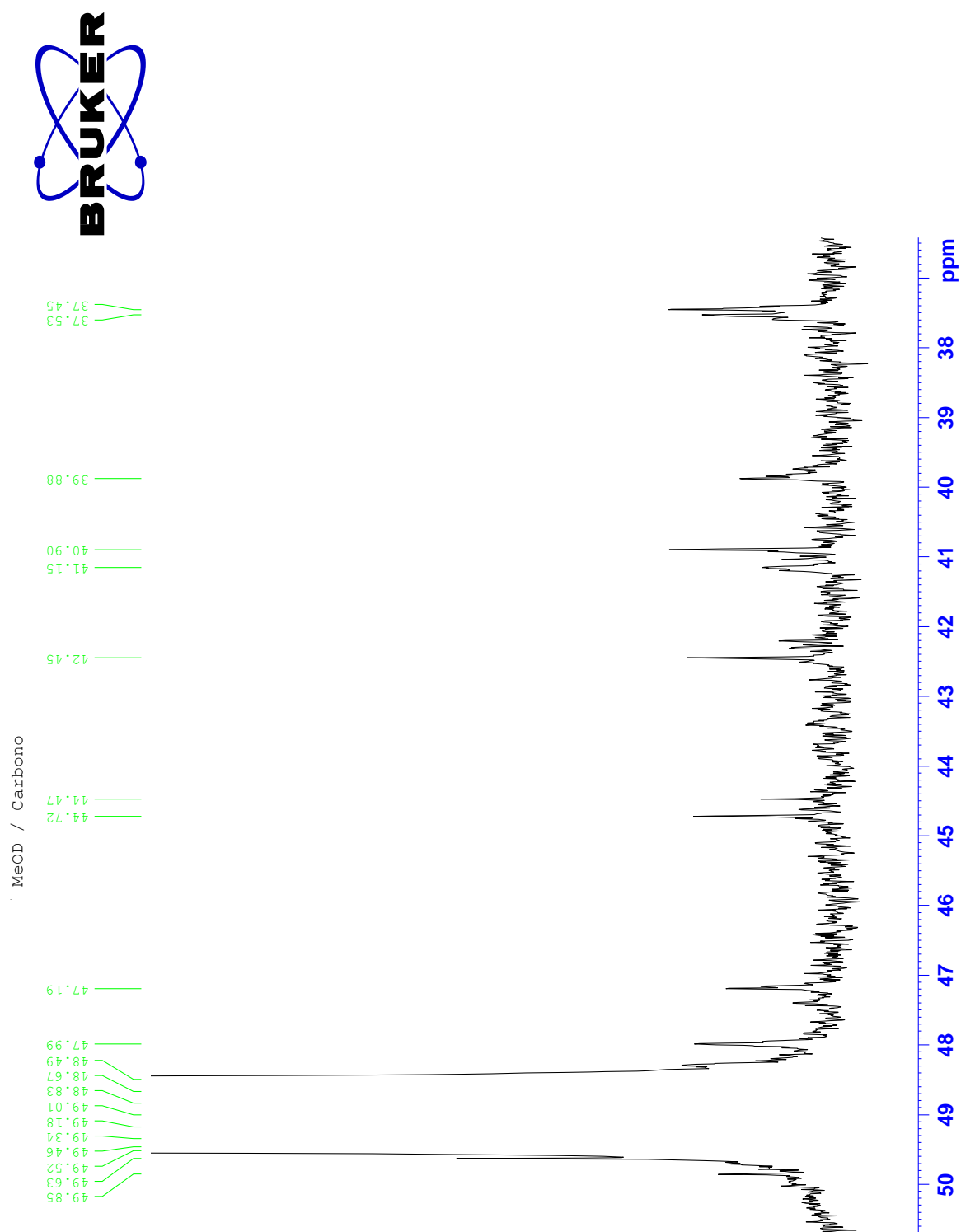
Espectro 29. RMN ¹³C tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F₁₇C.



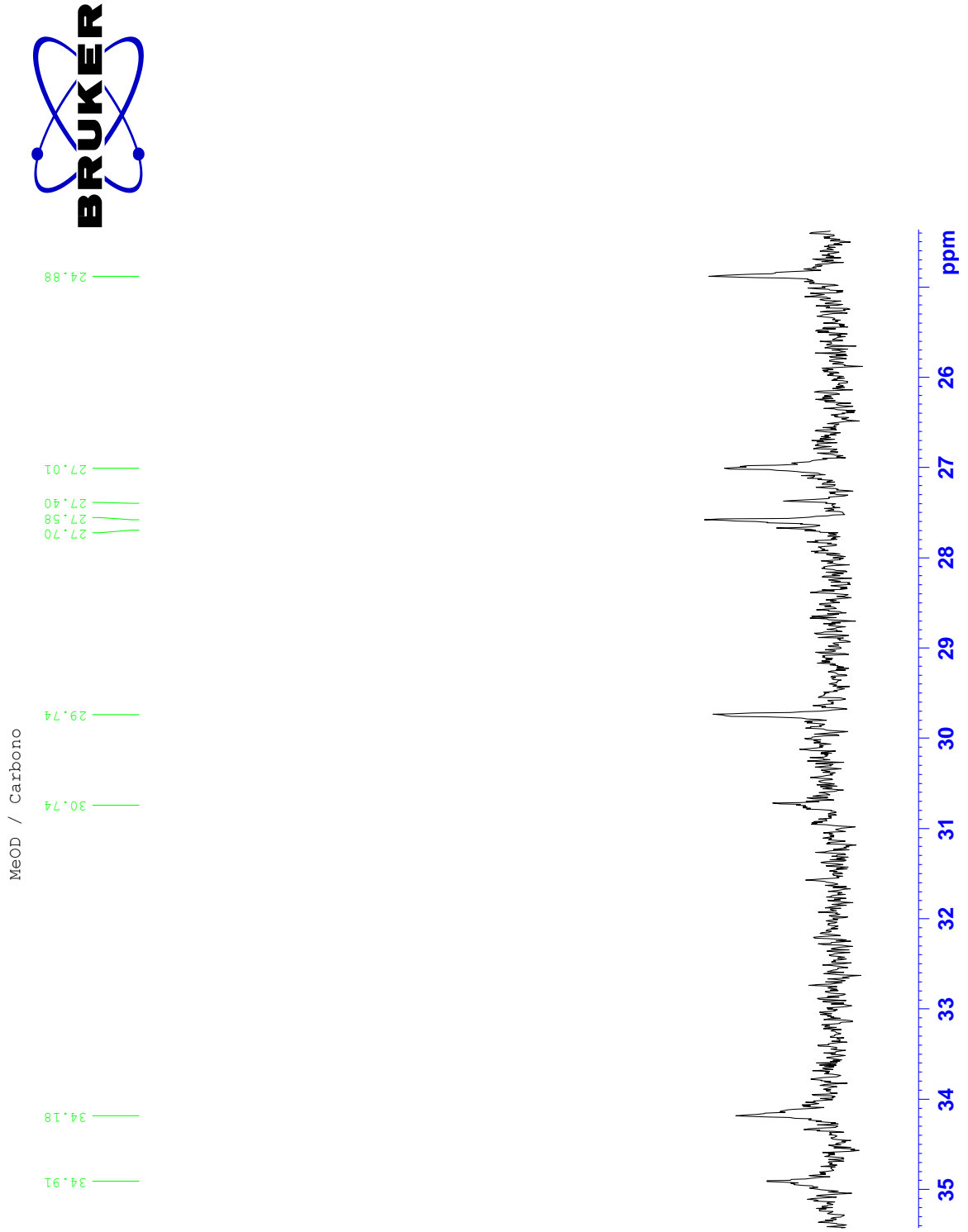
Espectro 30. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto $\text{F}_{17\text{C}}$.



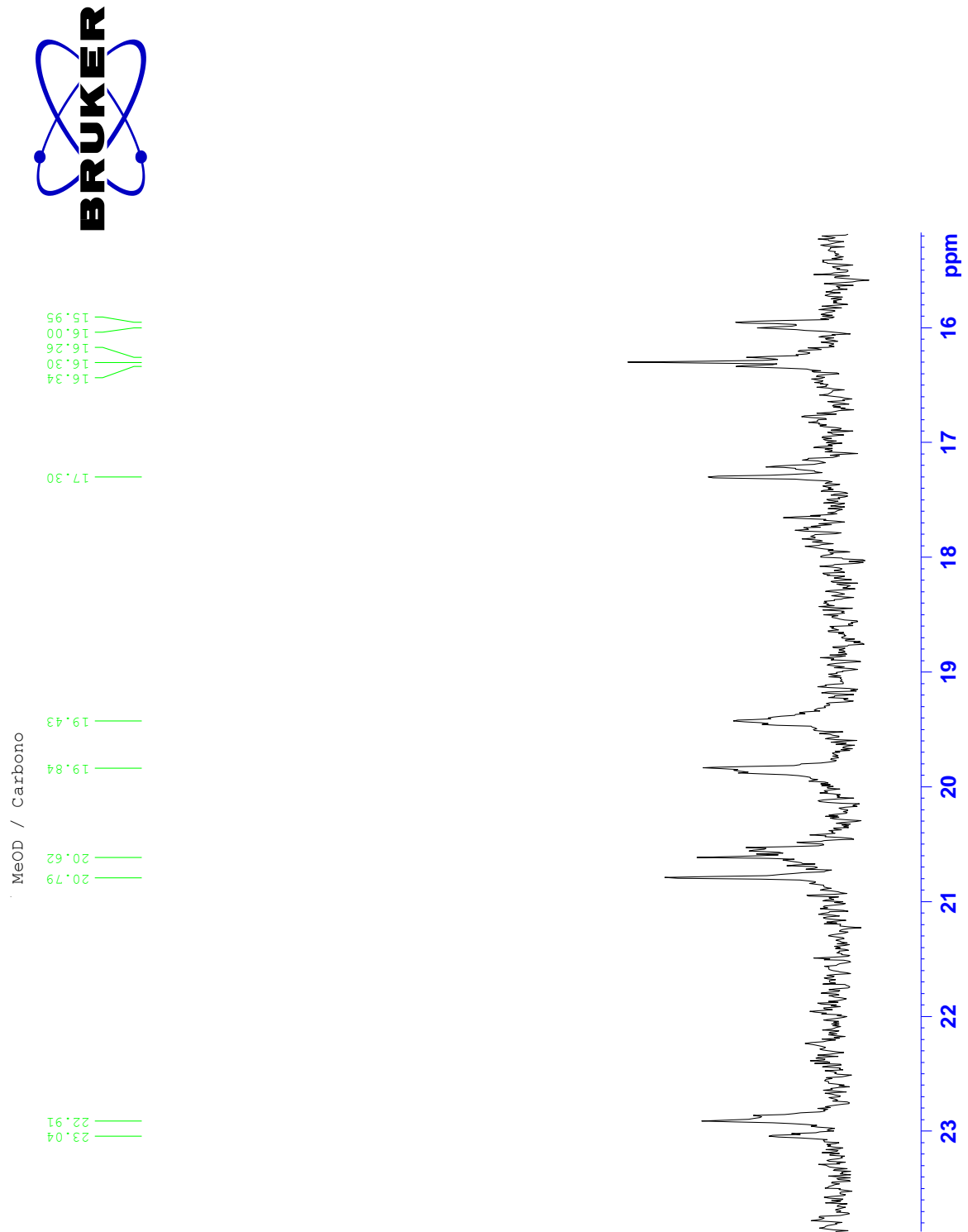
Espectro 31. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}.



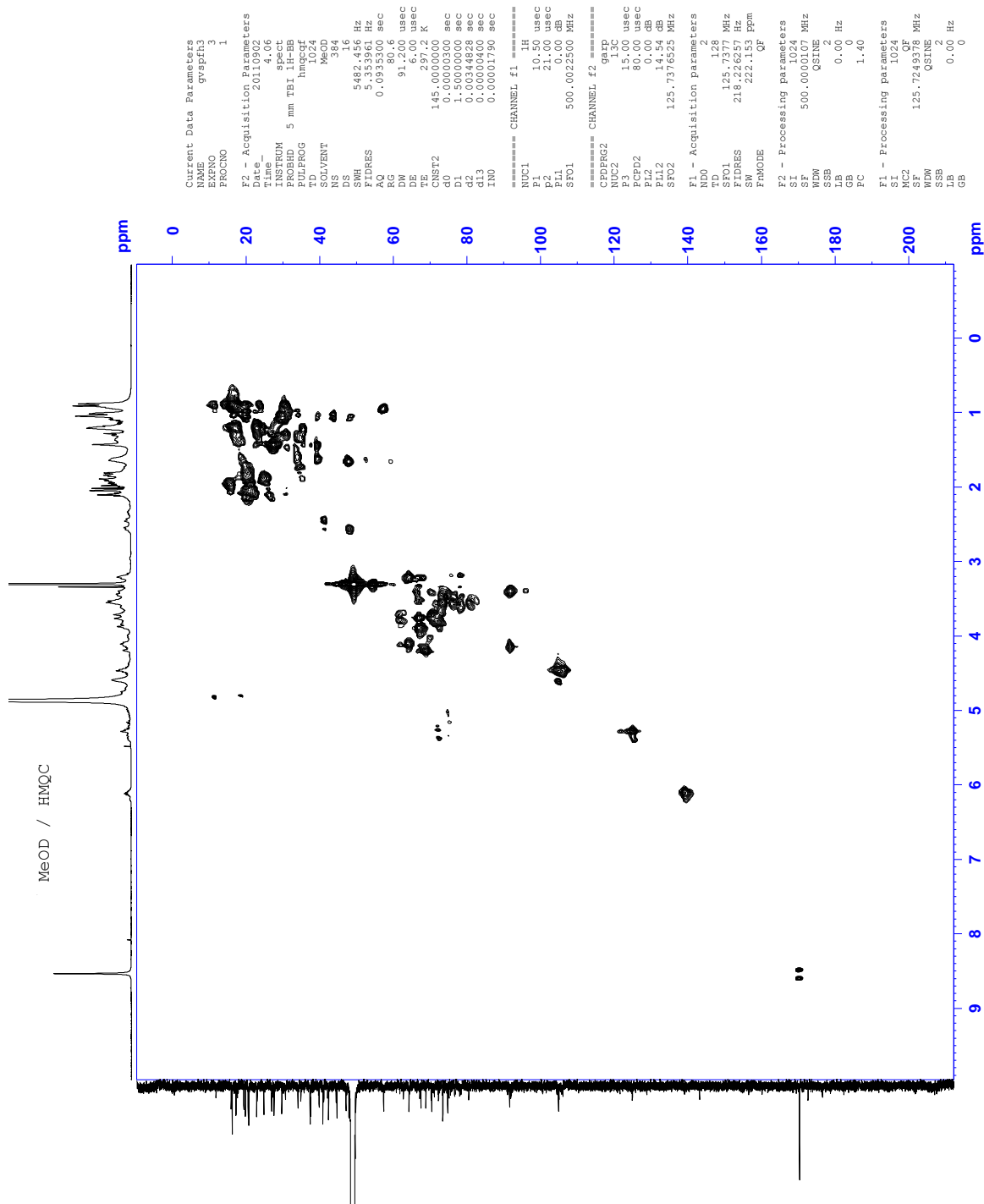
Espectro 32. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F $_{17\text{C}}$.



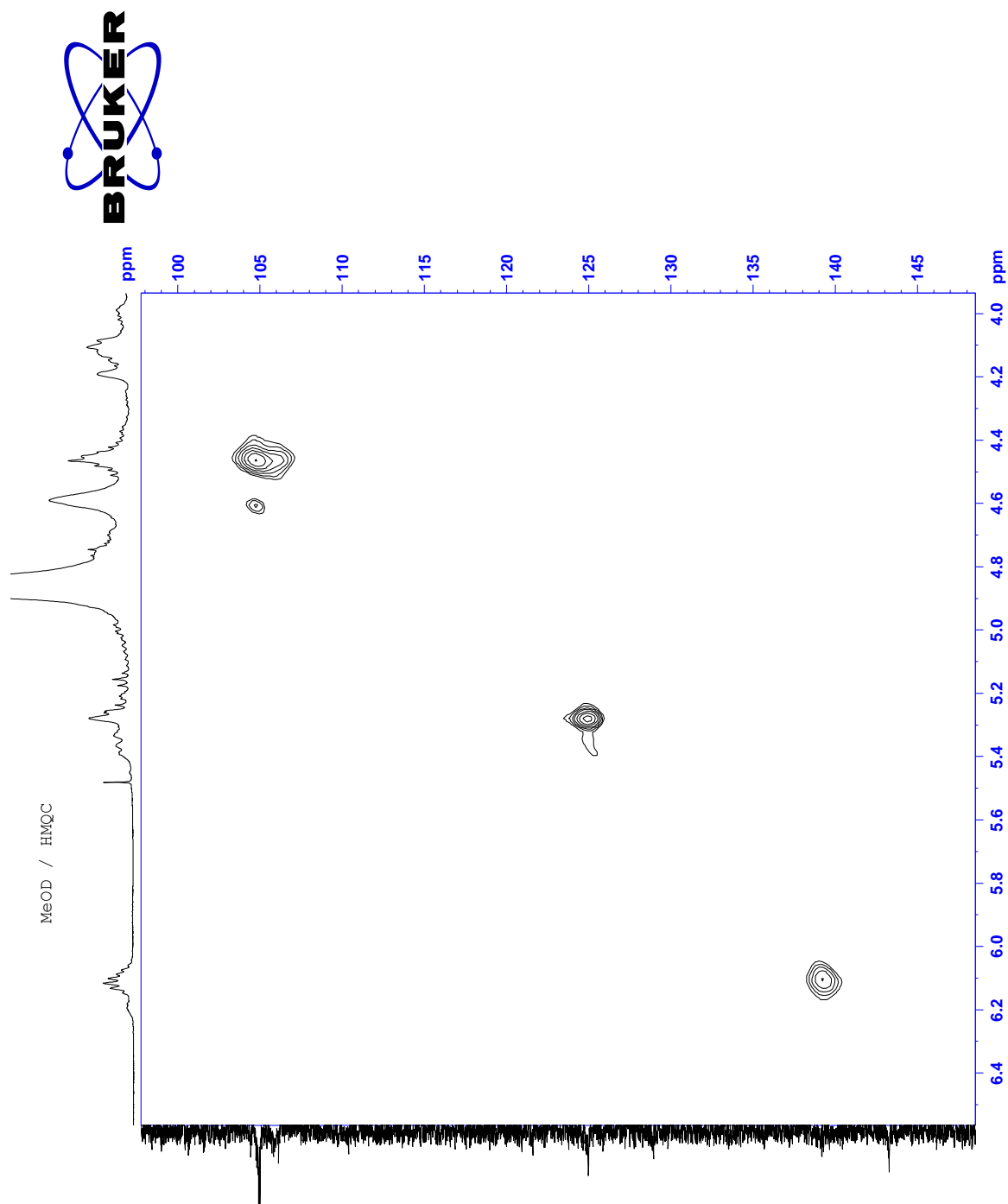
Espectro 33. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD-*d*₄ para el compuesto F_{17C}.



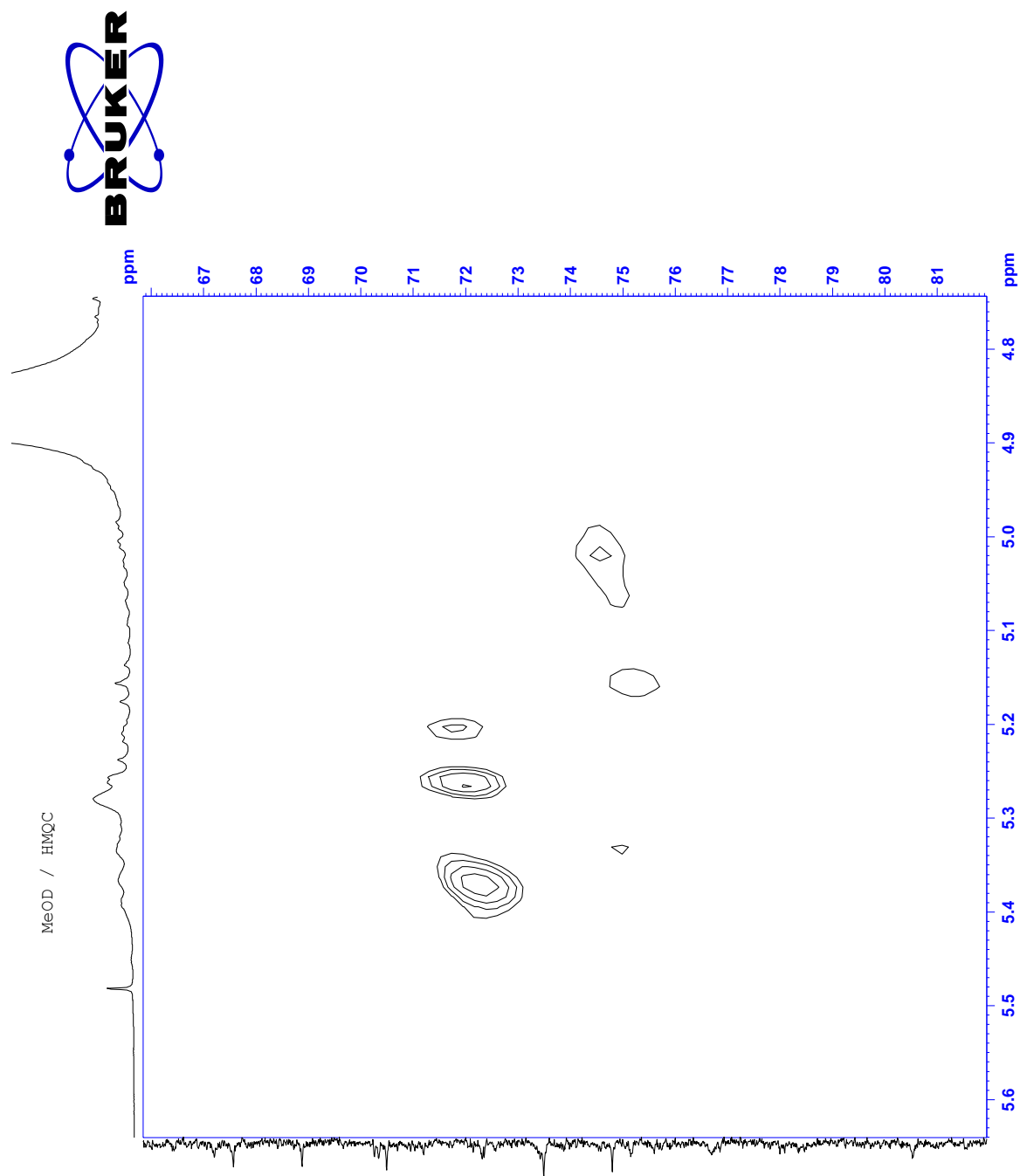
Espectro 34. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17C}.



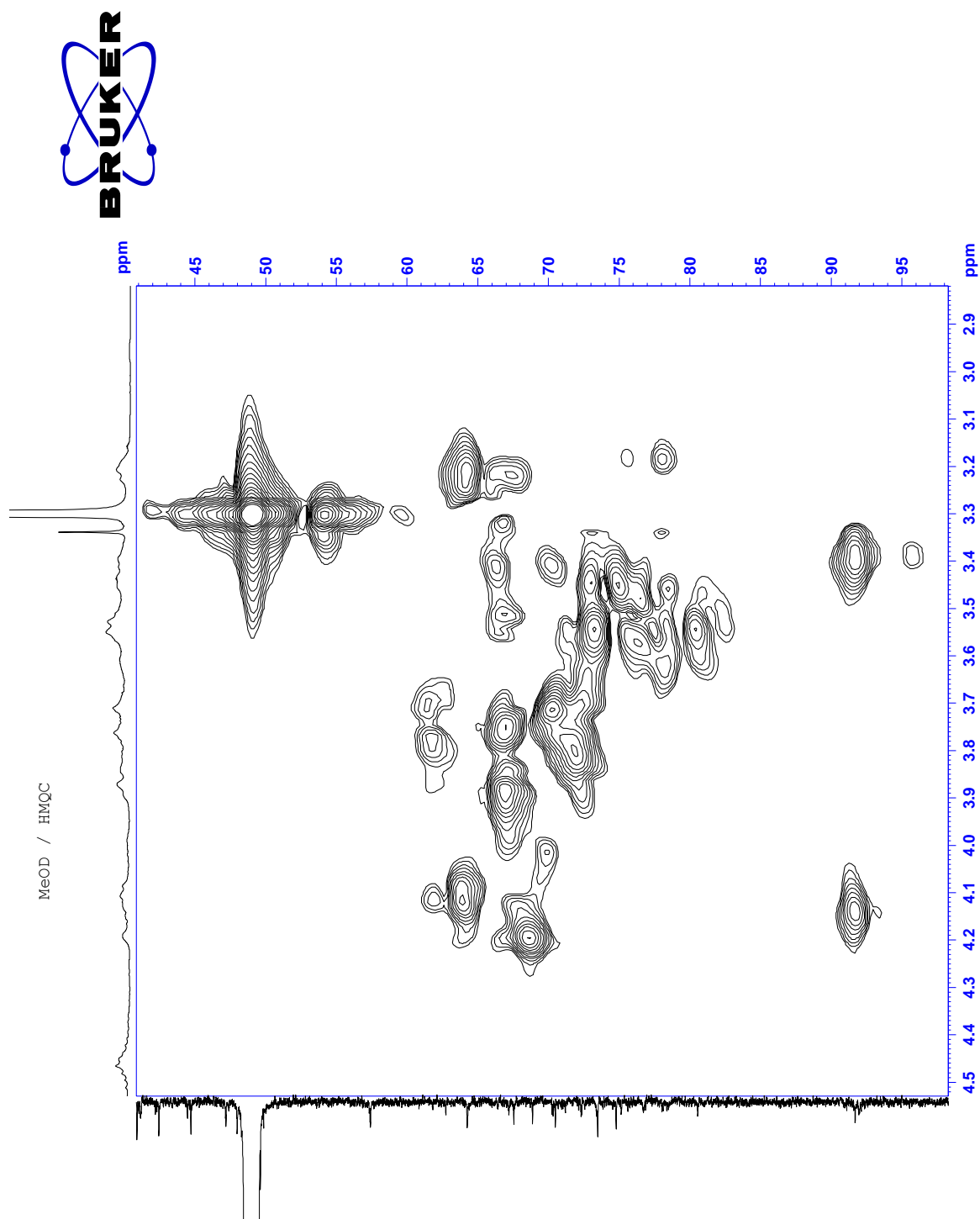
Espectro 35. RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}.



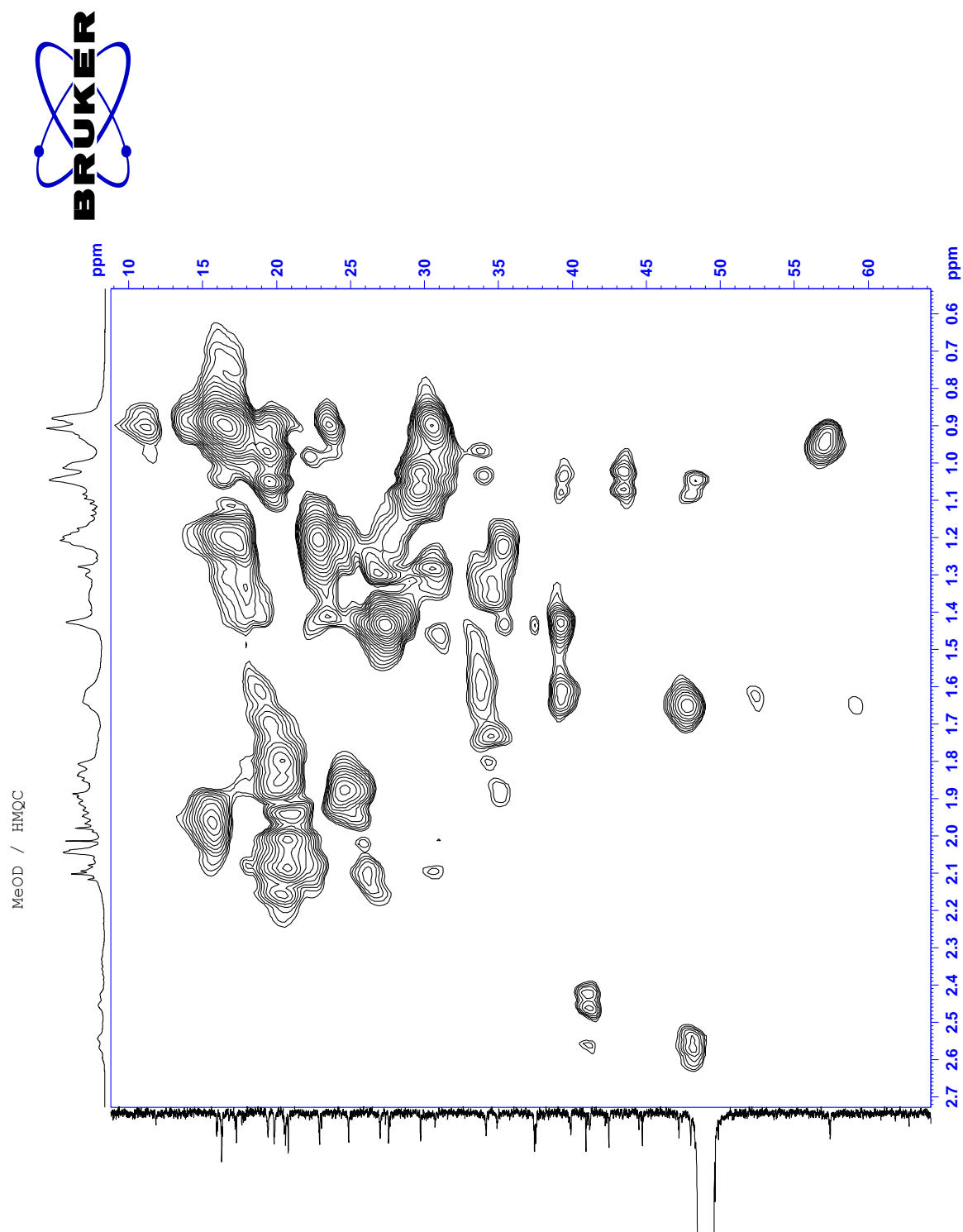
Espectro 37. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17c}.



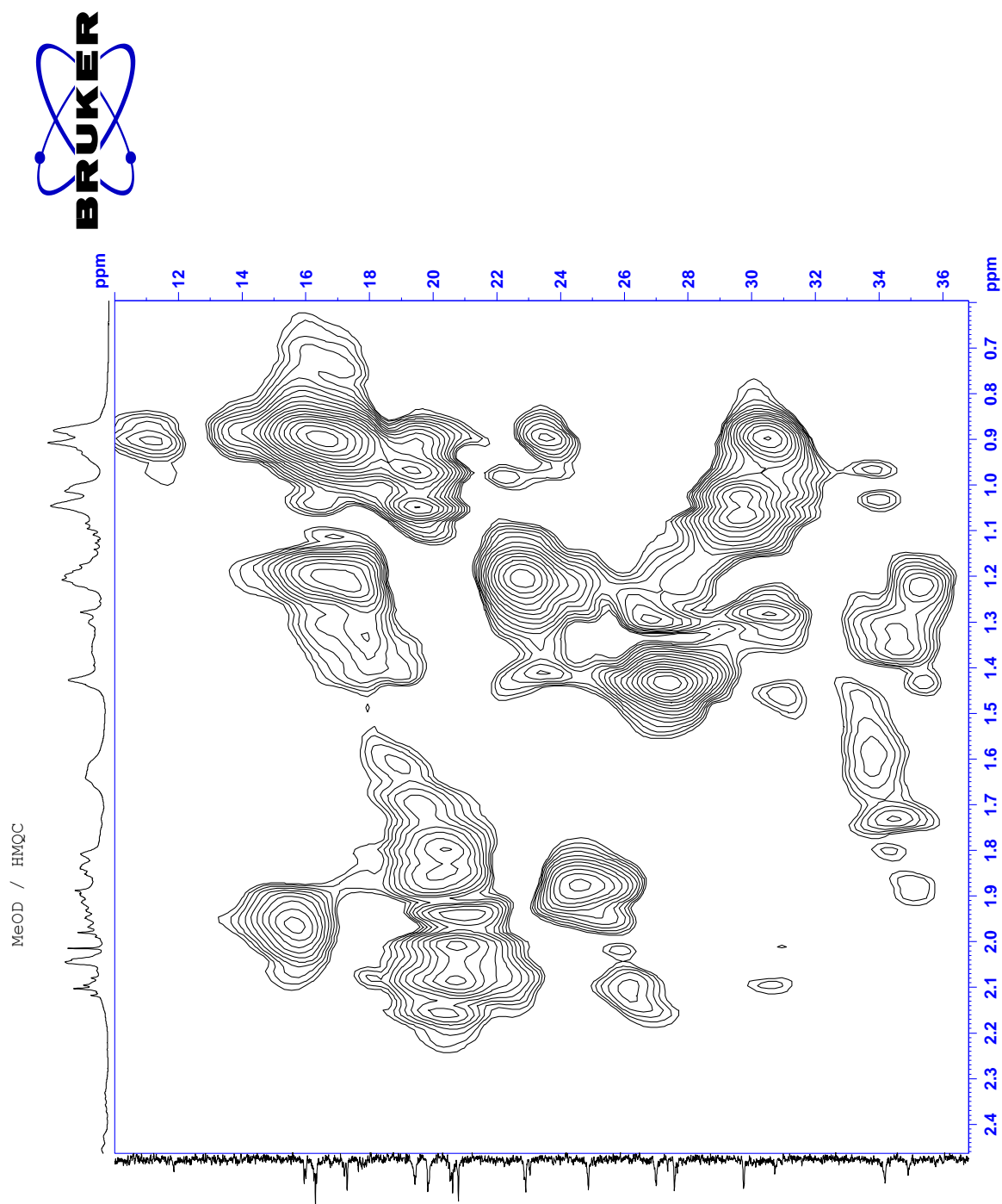
Espectro 38. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17c}.



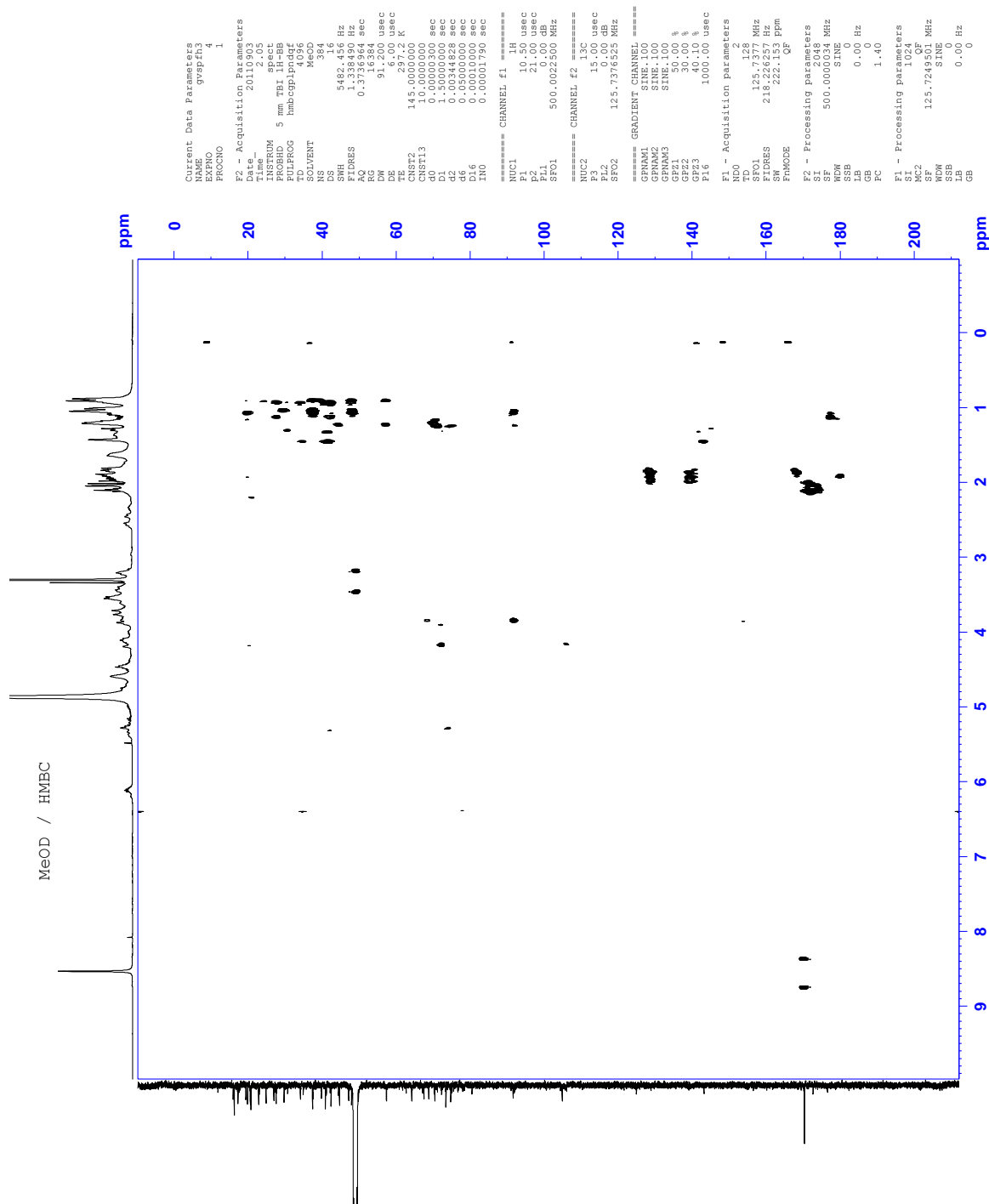
Espectro 39. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17c}.



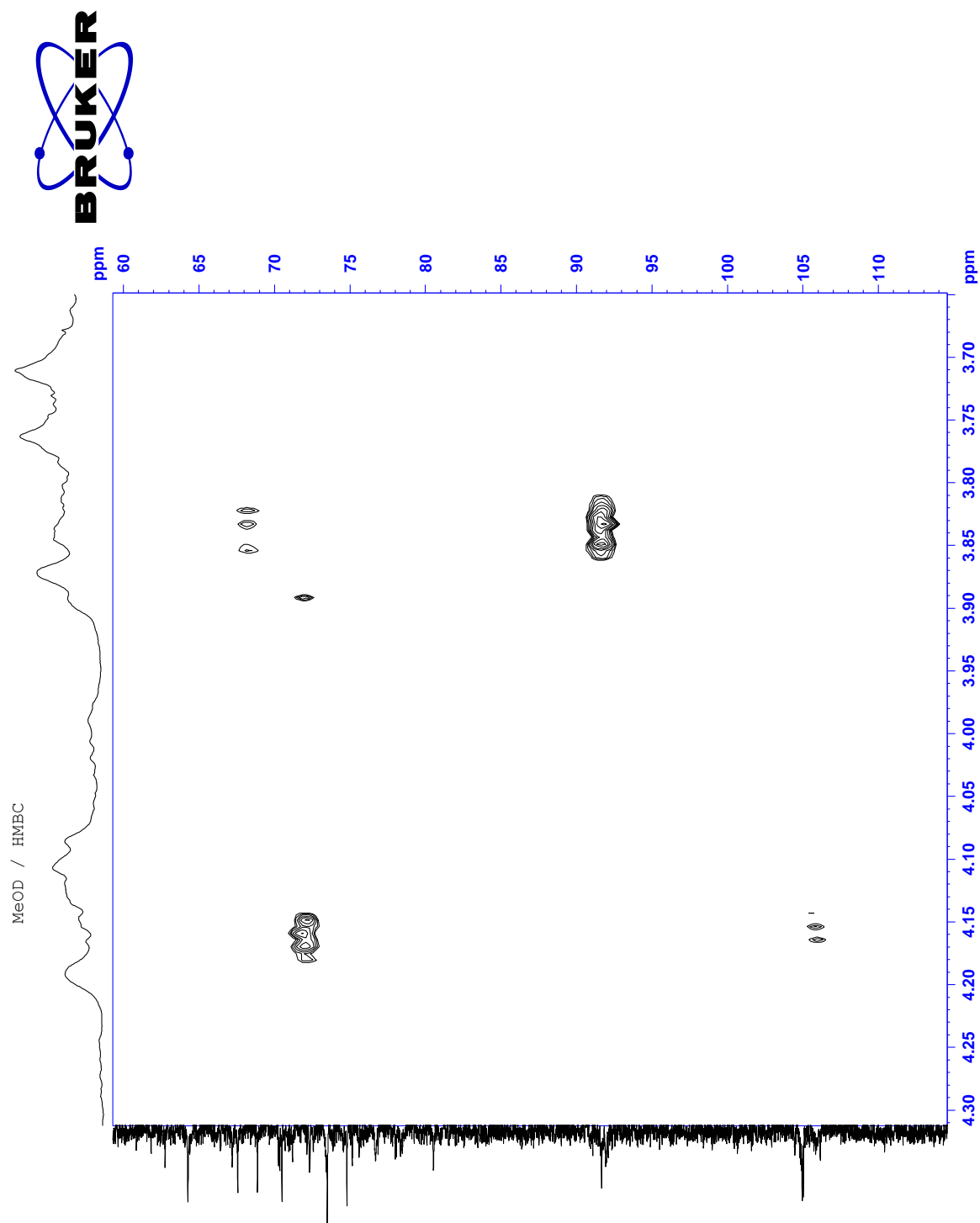
Espectro 40. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17c}.



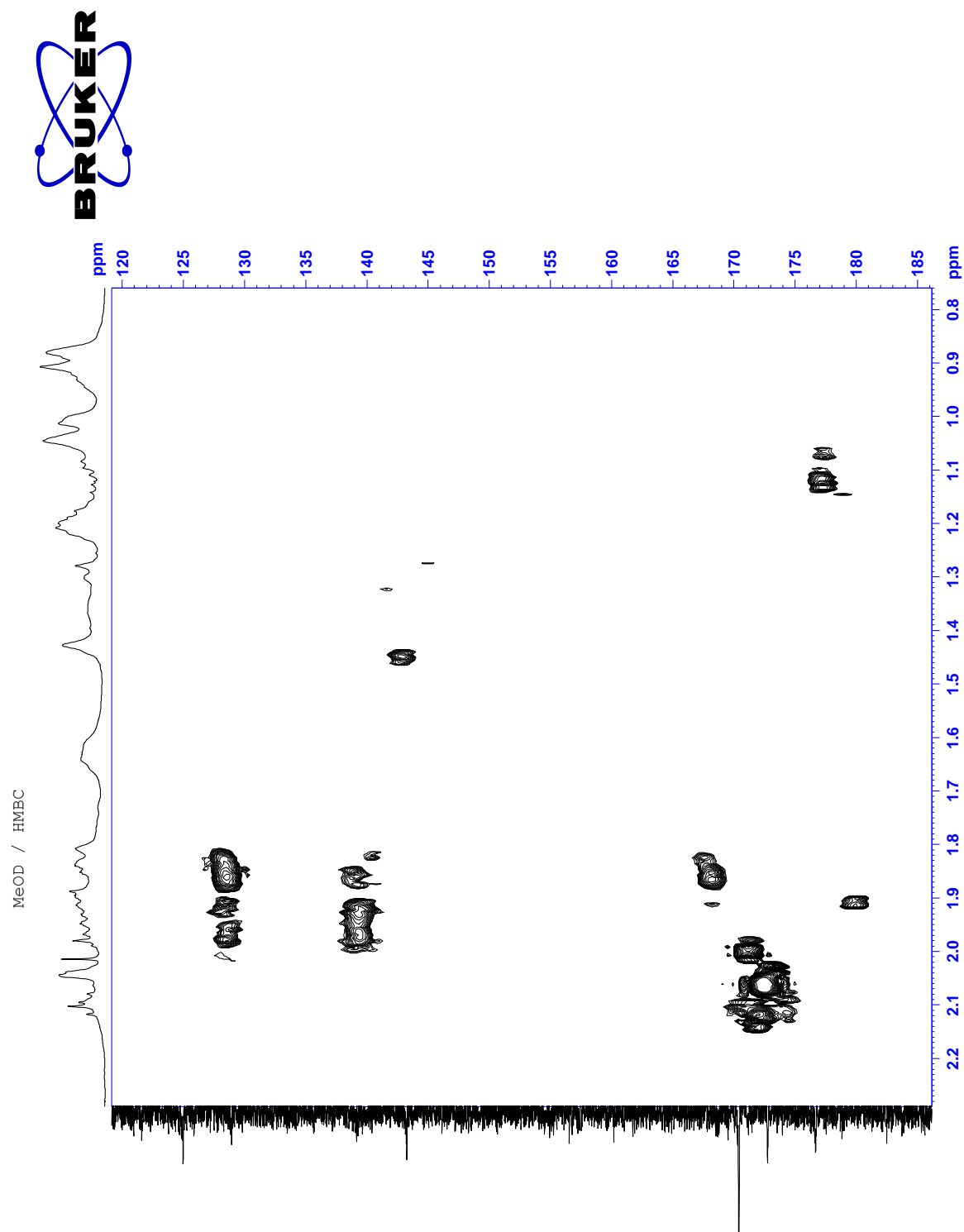
Espectro 41. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17c} .



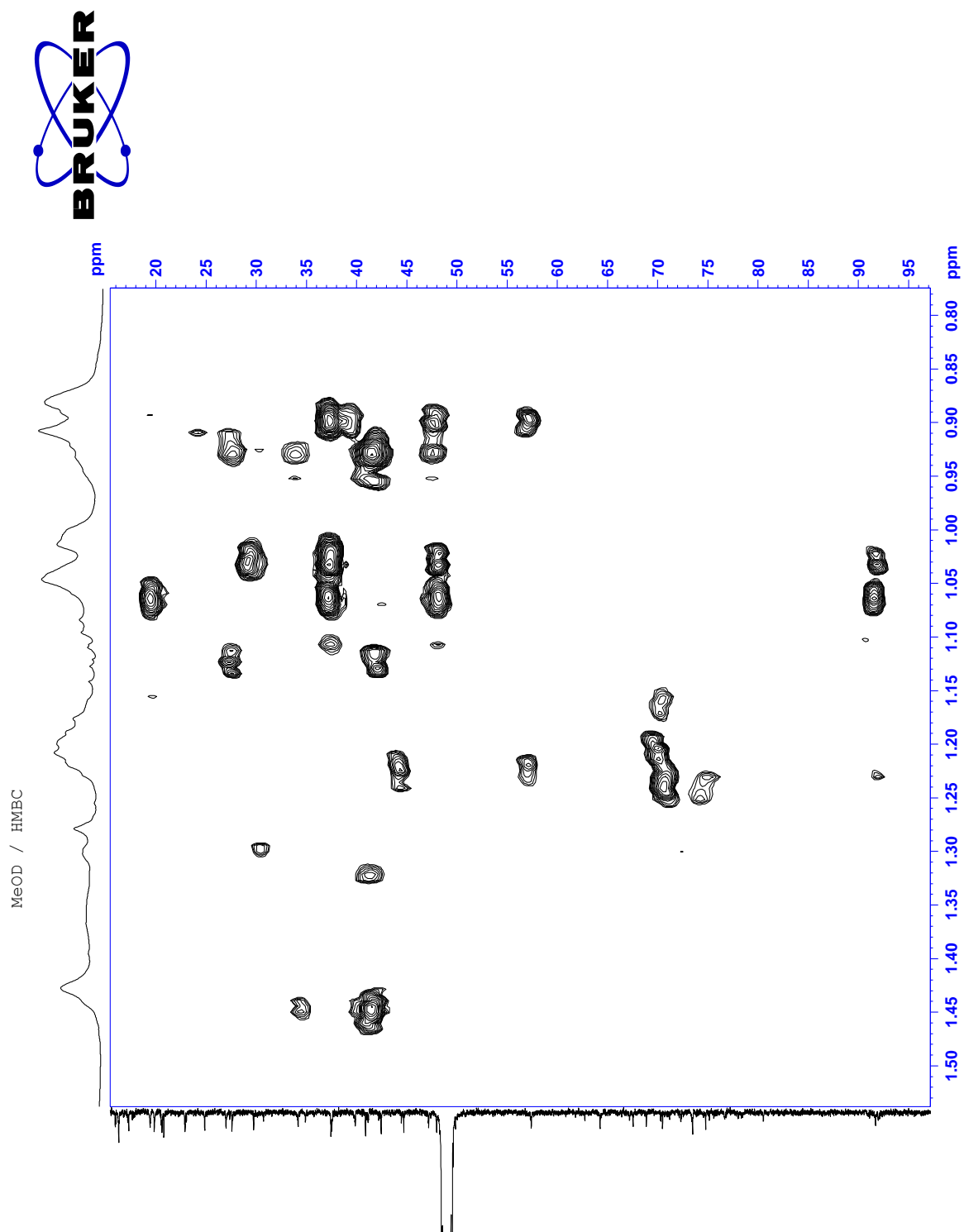
Espectro 42. RMN HMBC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}.



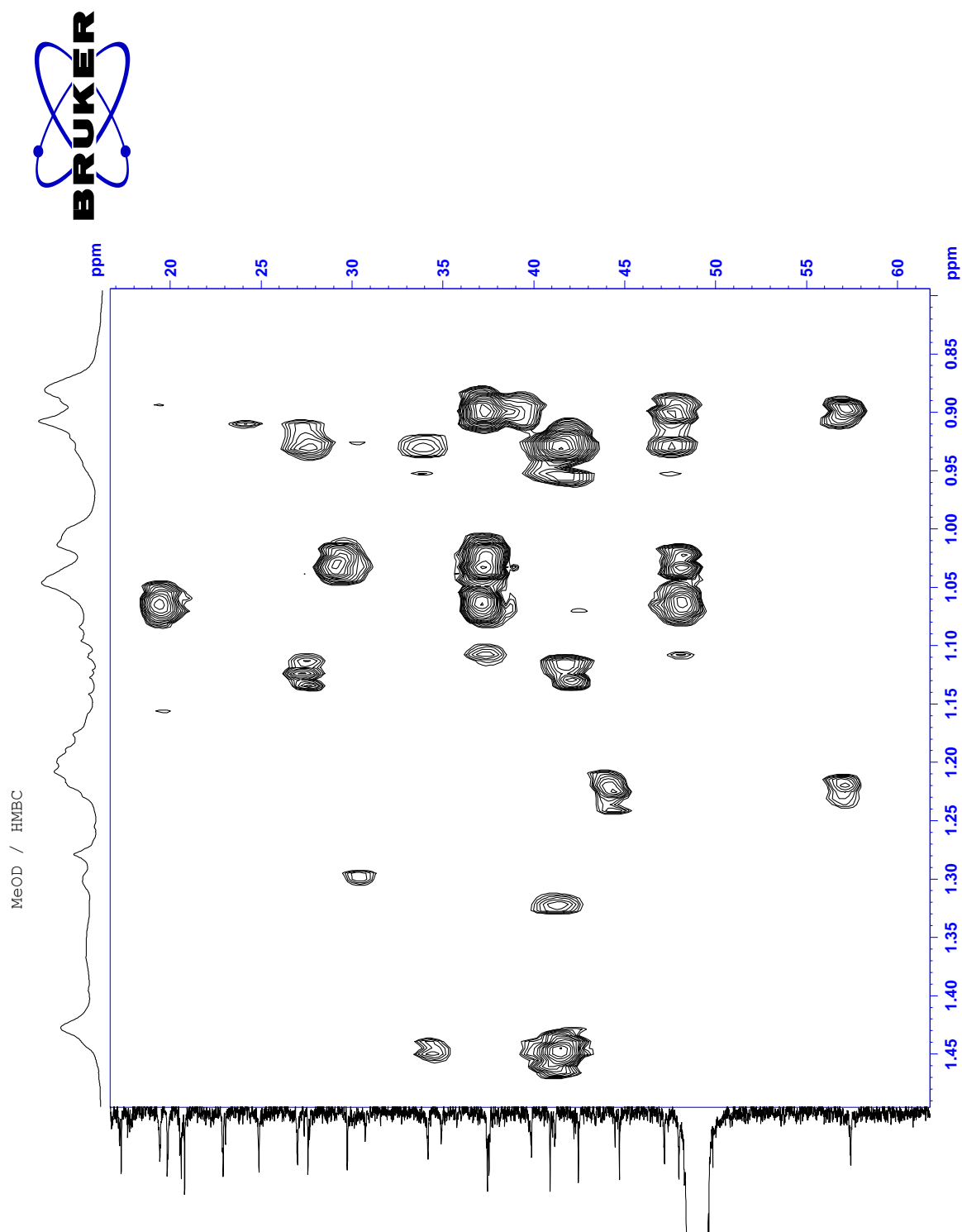
Espectro 43. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17c}.



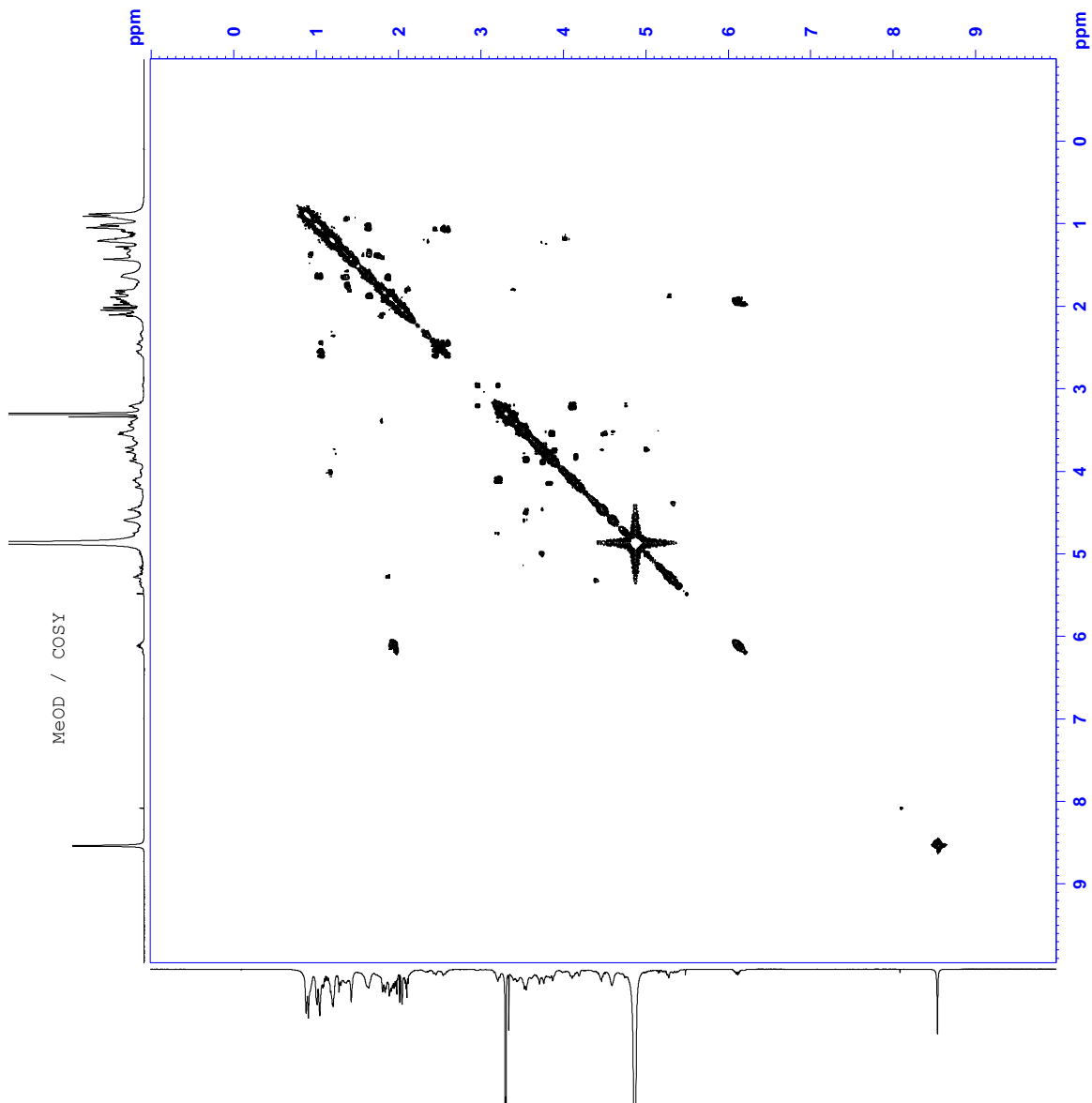
Espectro 44. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17c}.



Espectro 45. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17c} .



Espectro 46. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17c} .



```

Current Data Parameters
NAME          gvspfh3
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20110901
Time         20.17
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm TBT 1H-BB
PULPROG       cosygpcrf
TD            2048
SOLVENT       MeOD
NS            128
DS            16
SWH           5482.456 Hz
FIDRES       2.1676998 Hz
AQ           0.1869184 sec
RG            64
DW            91.200 usec
DE            6.00 usec
TE            296.2 K
d0            0.0000300 sec
d1            1.48689198 sec
d13           0.00000400 sec
d16           0.00010000 sec
INO           0.00018180 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P0            10.50 usec
P1            10.50 usec
PL1           0.00 dB
SFO1          500.0022500 MHz

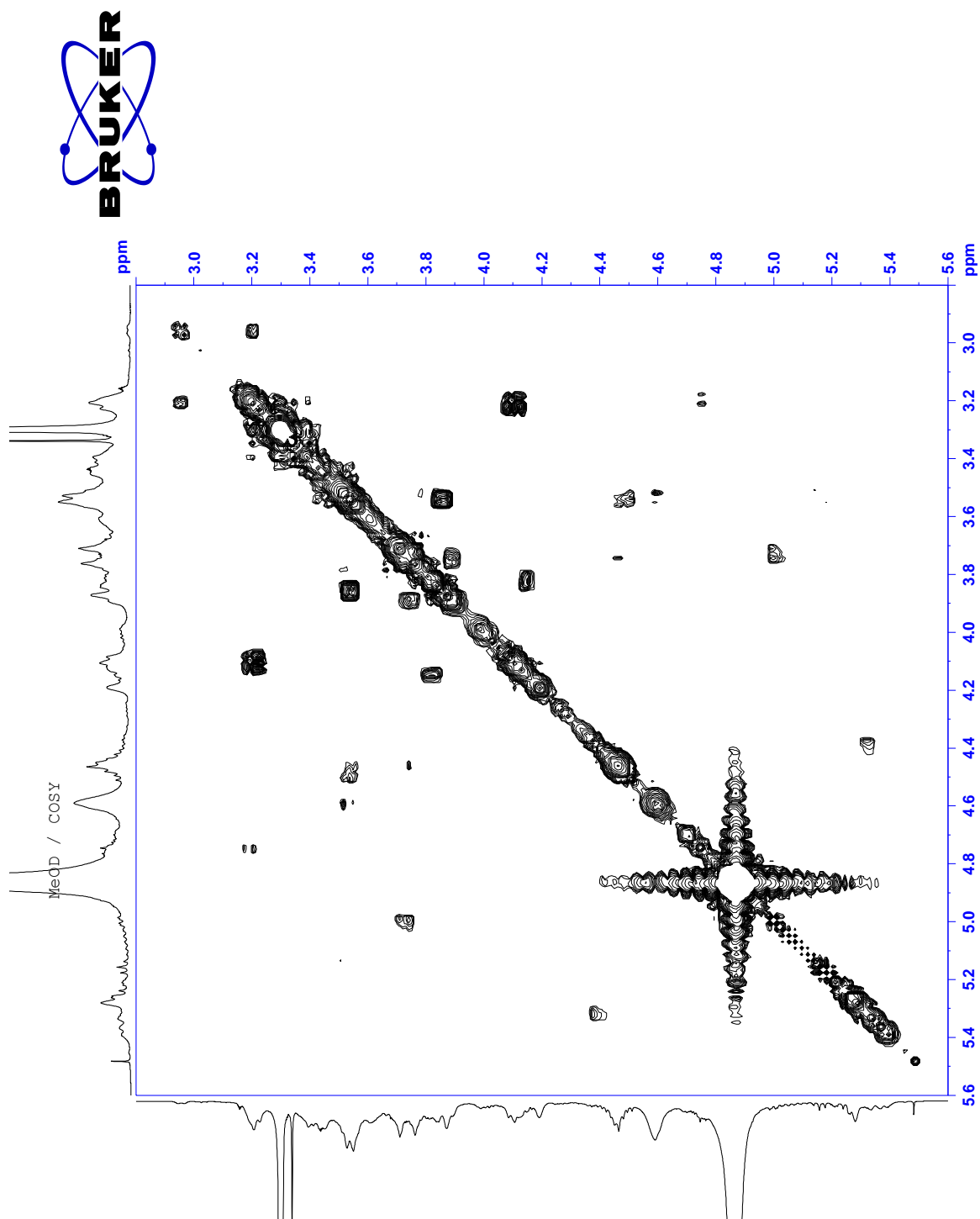
===== GRADIENT CHANNEL =====
GENAM1        SINE_VFO
GEZ1          10.00 %
P16           1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0           1
TD            128
SFO1          500.0023 MHz
FIDRES       42.9730049 Hz
SFO2          11.001 Ppm
PRMODE        QF

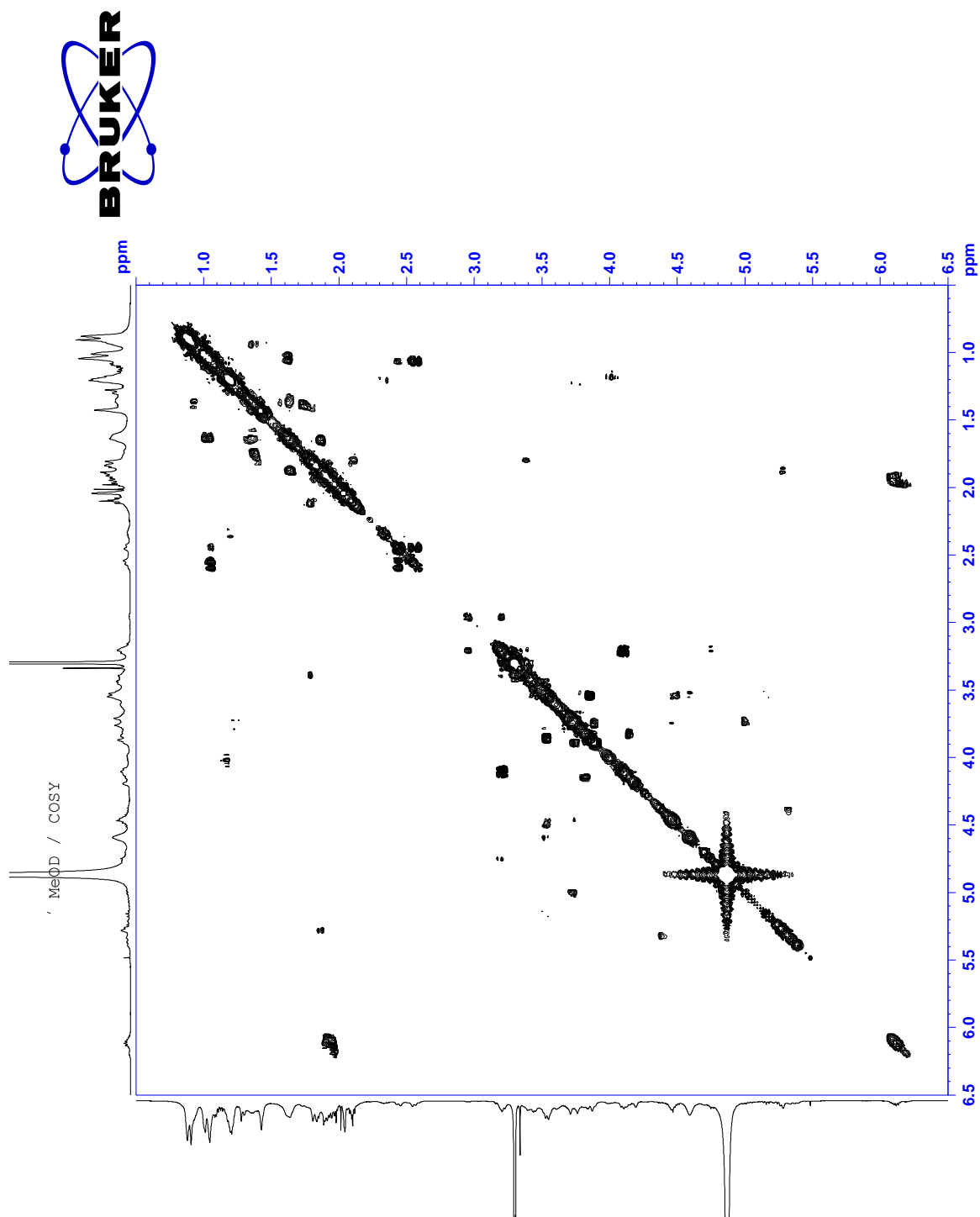
F2 - Processing parameters
SI            1024
SF            500.000132 MHz
WDW           SINE
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.00

F1 - Processing parameters
SI            1024
MC2           QF
SF            500.000120 MHz
WDW           SINE
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0
  
```

Espectro 47. RMN COSY tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}.

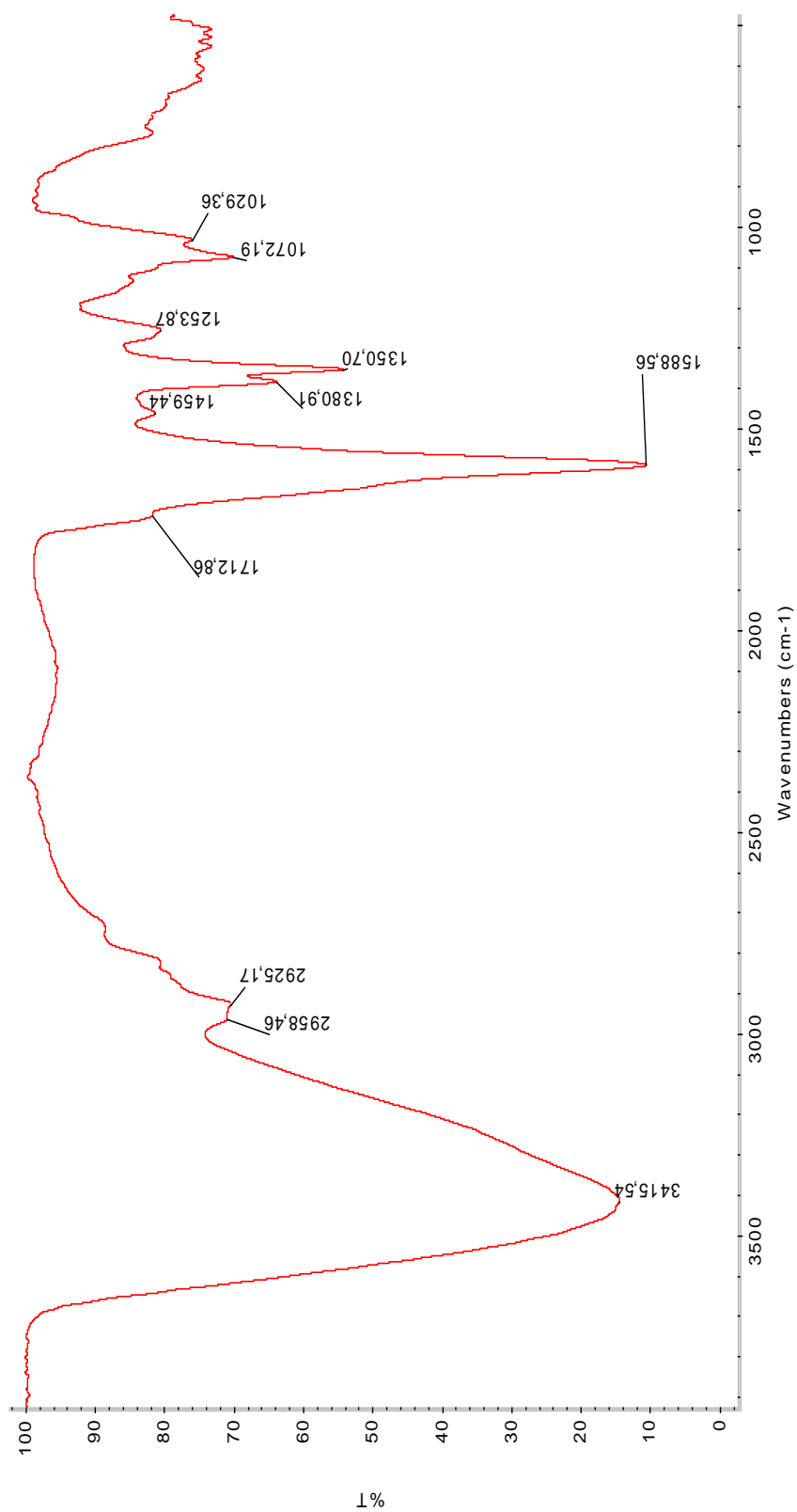


Espectro 48. Ampliación de RMN COSY tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17c}.



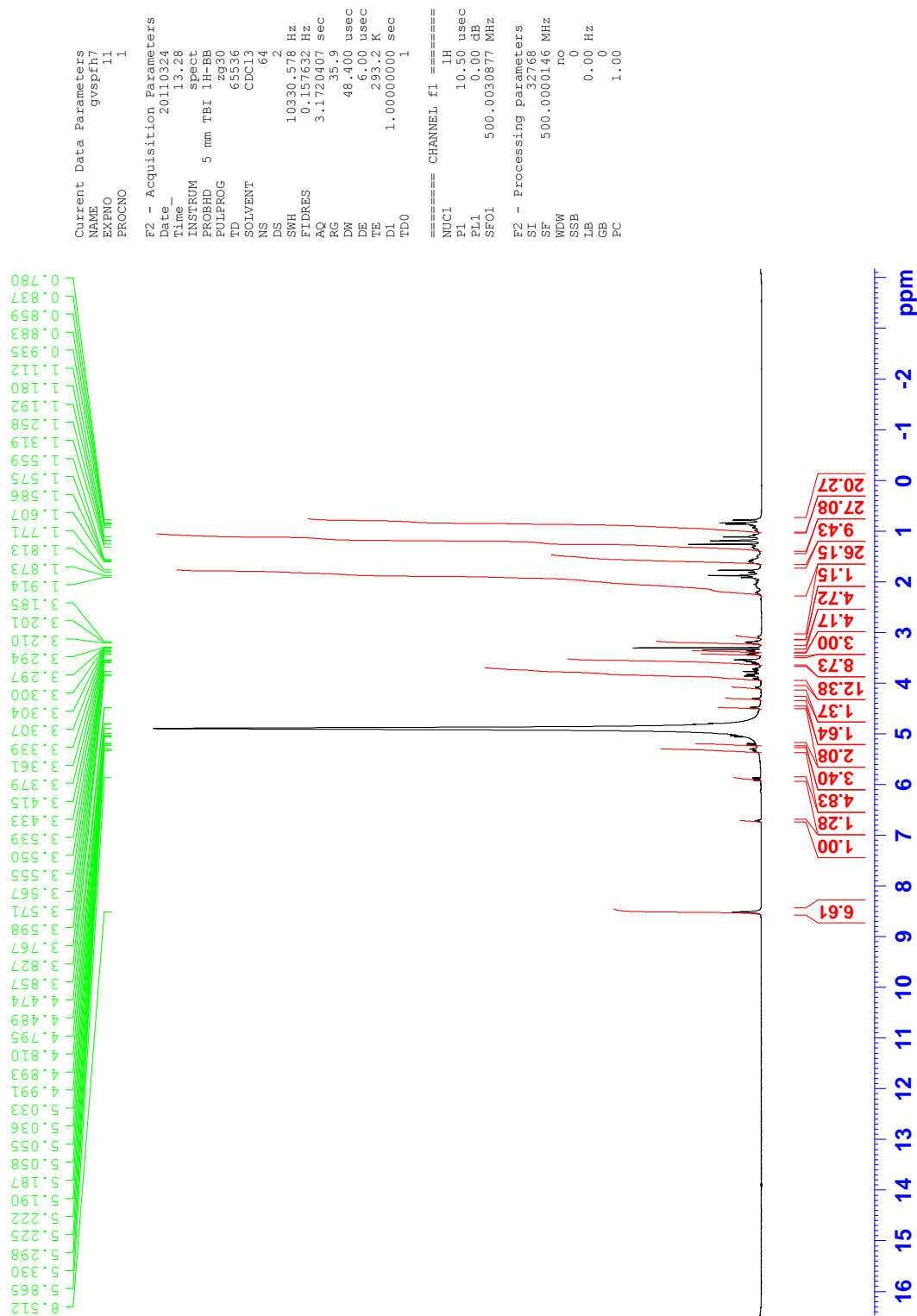
BRUKER

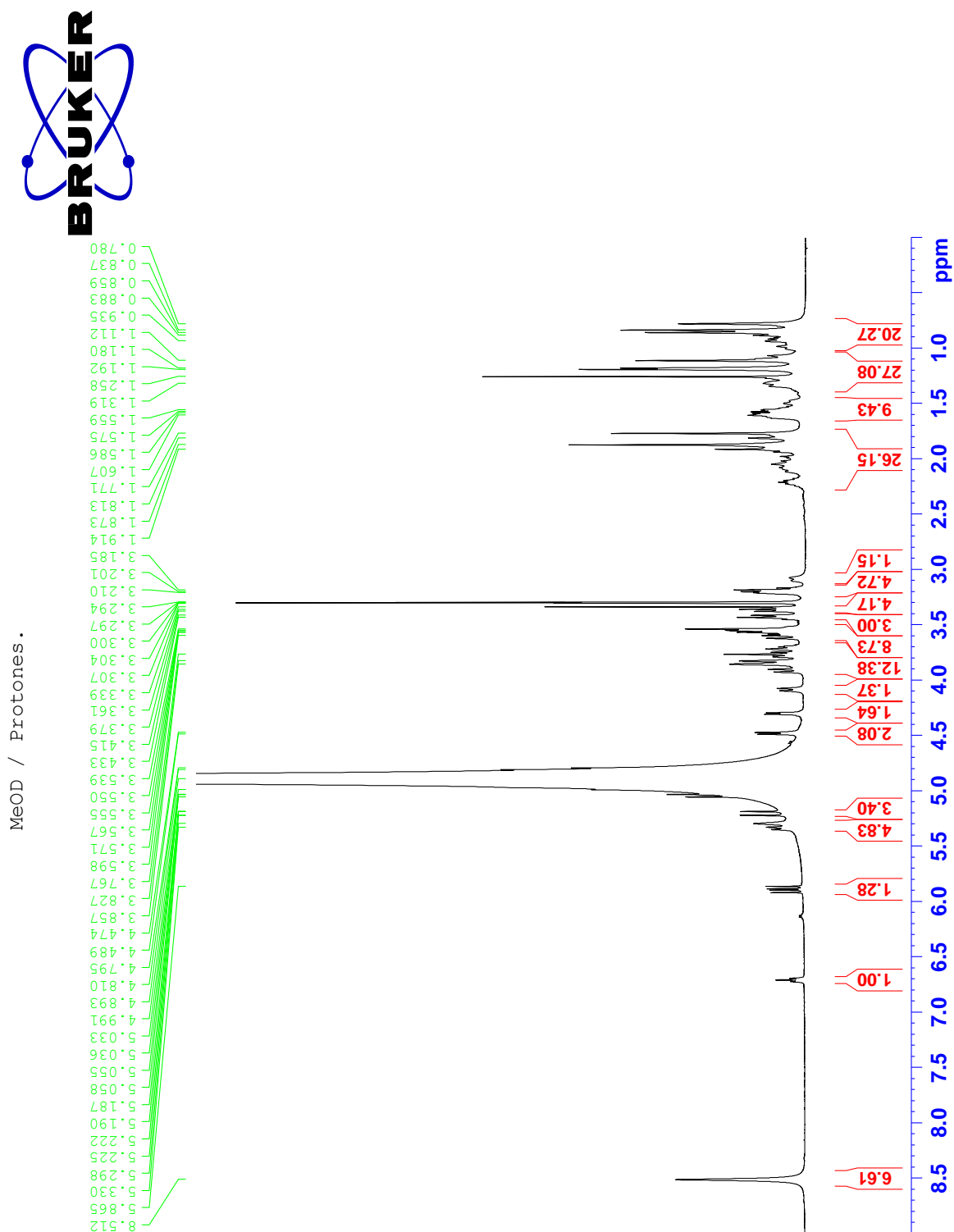
Espectro 49. Ampliación de RMN COSY tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17C}



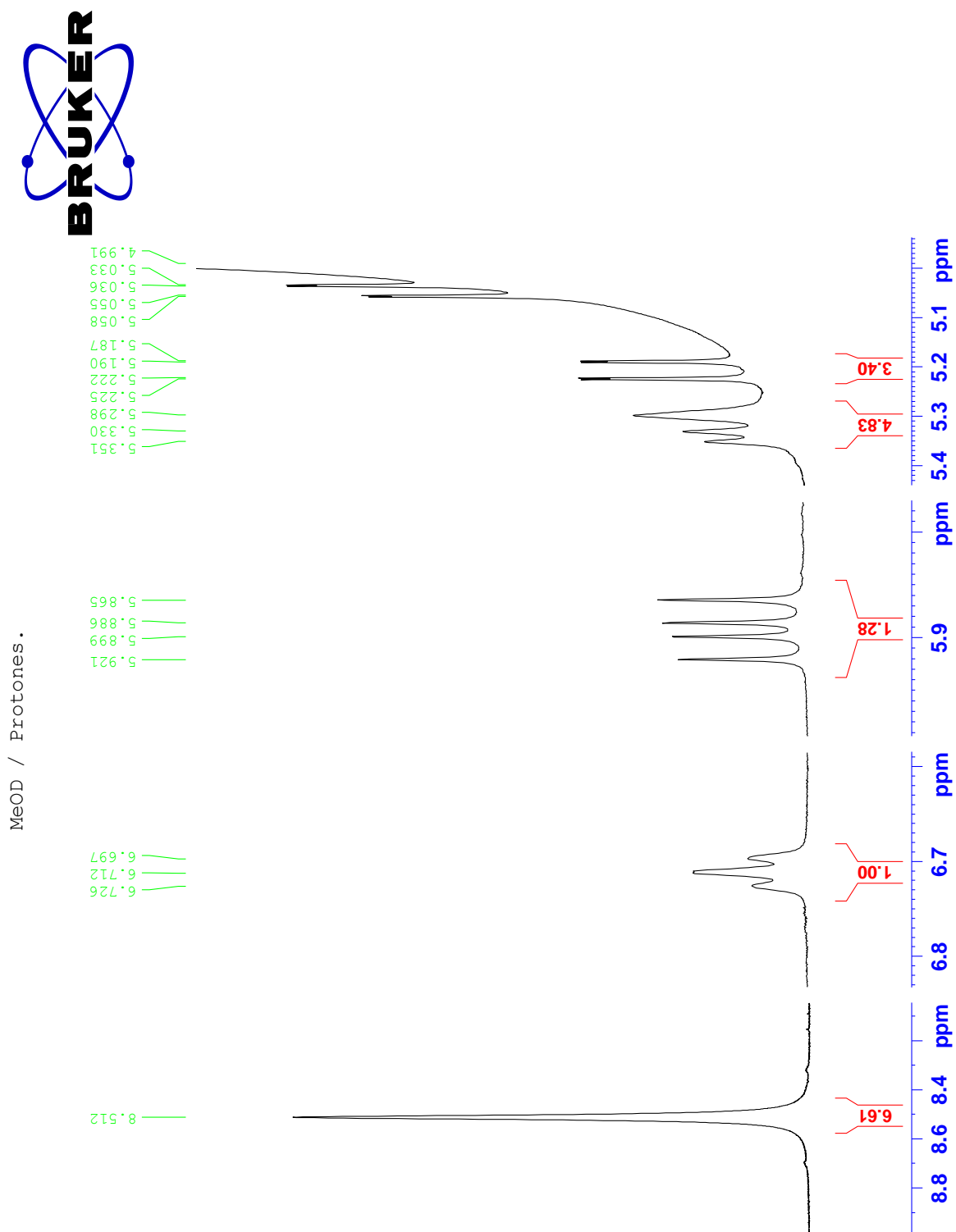
Espectro 50. IR para el compuesto F_{17E}.

MeOD / Protones.

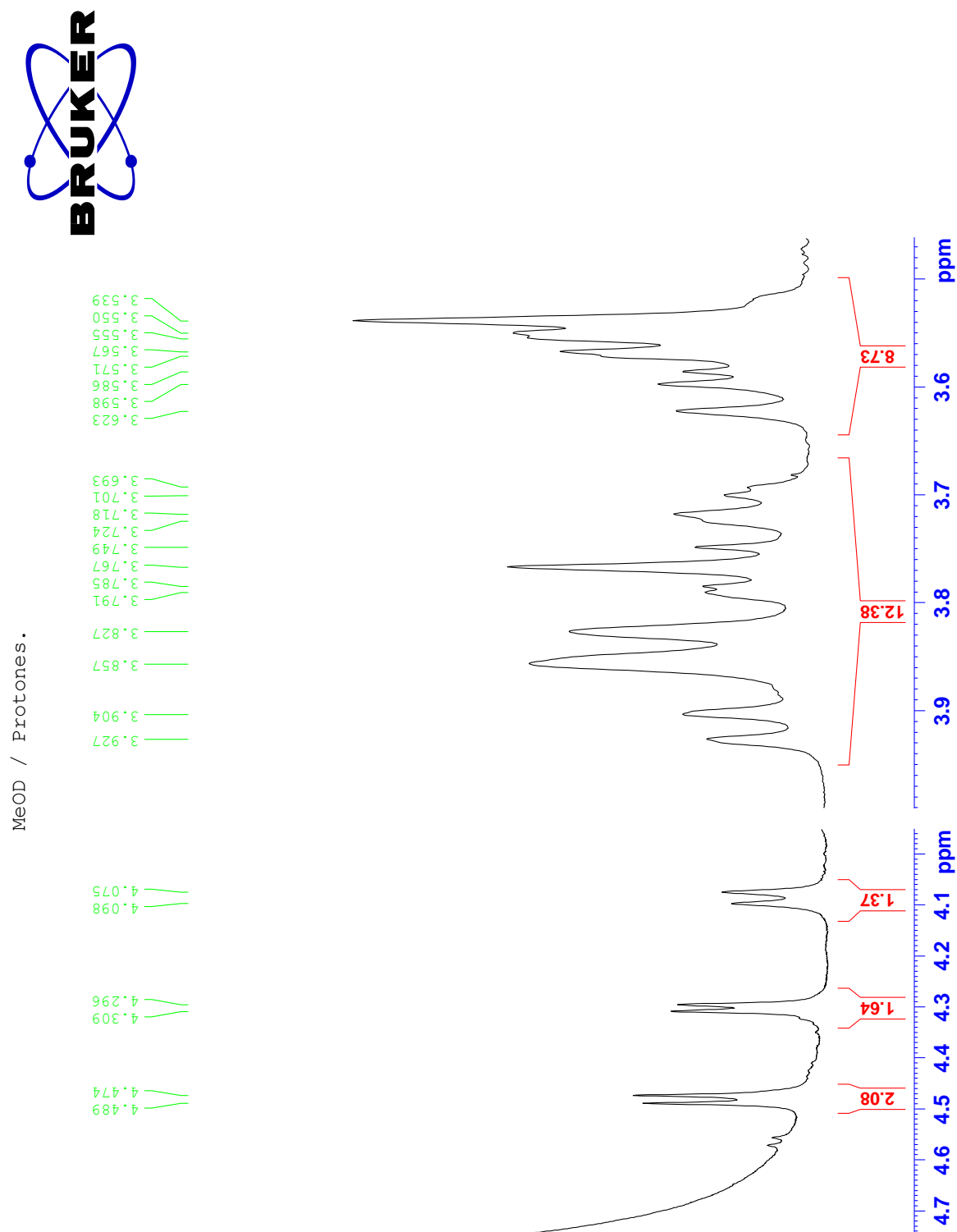
Espectro 51. RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



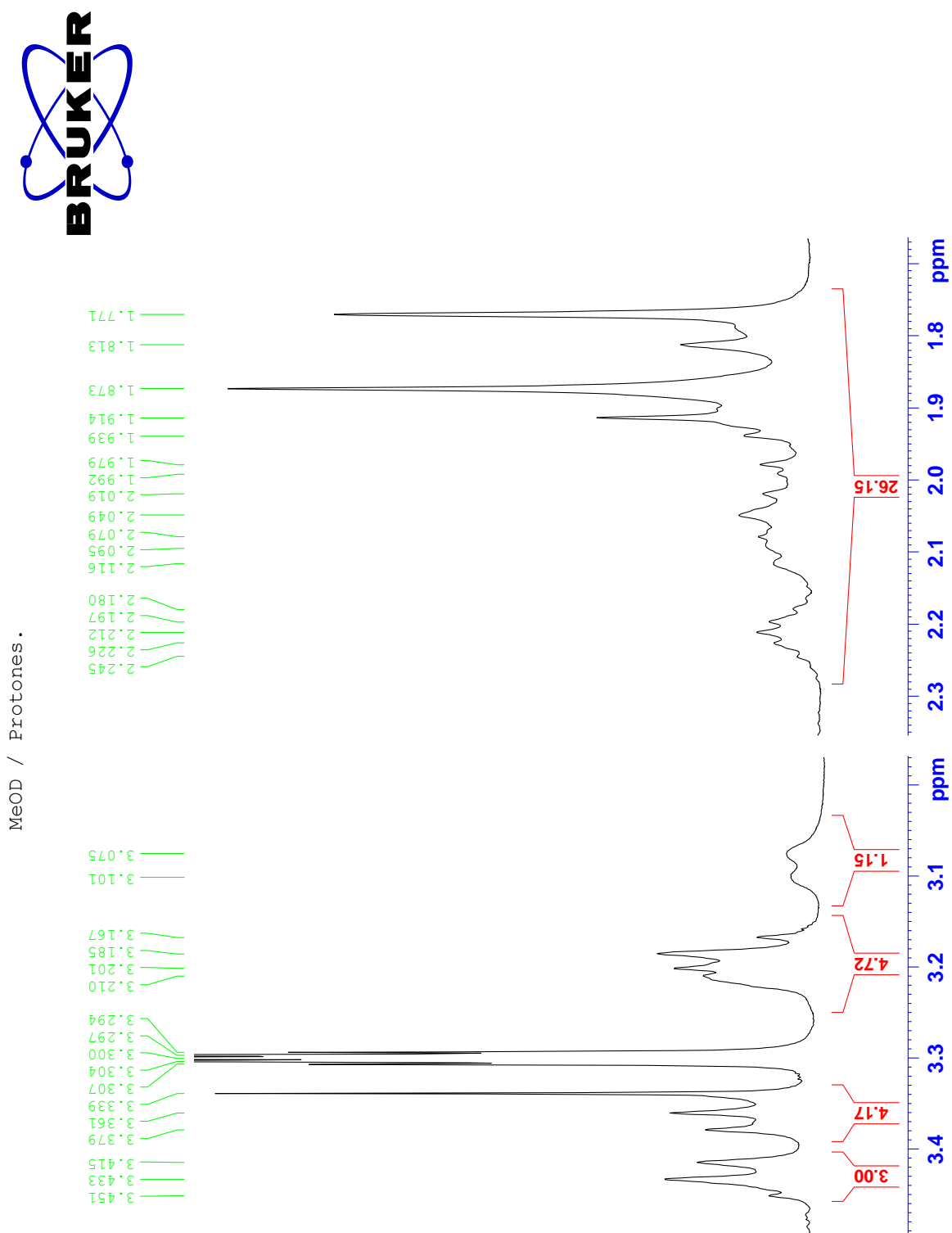
Espectro 52. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



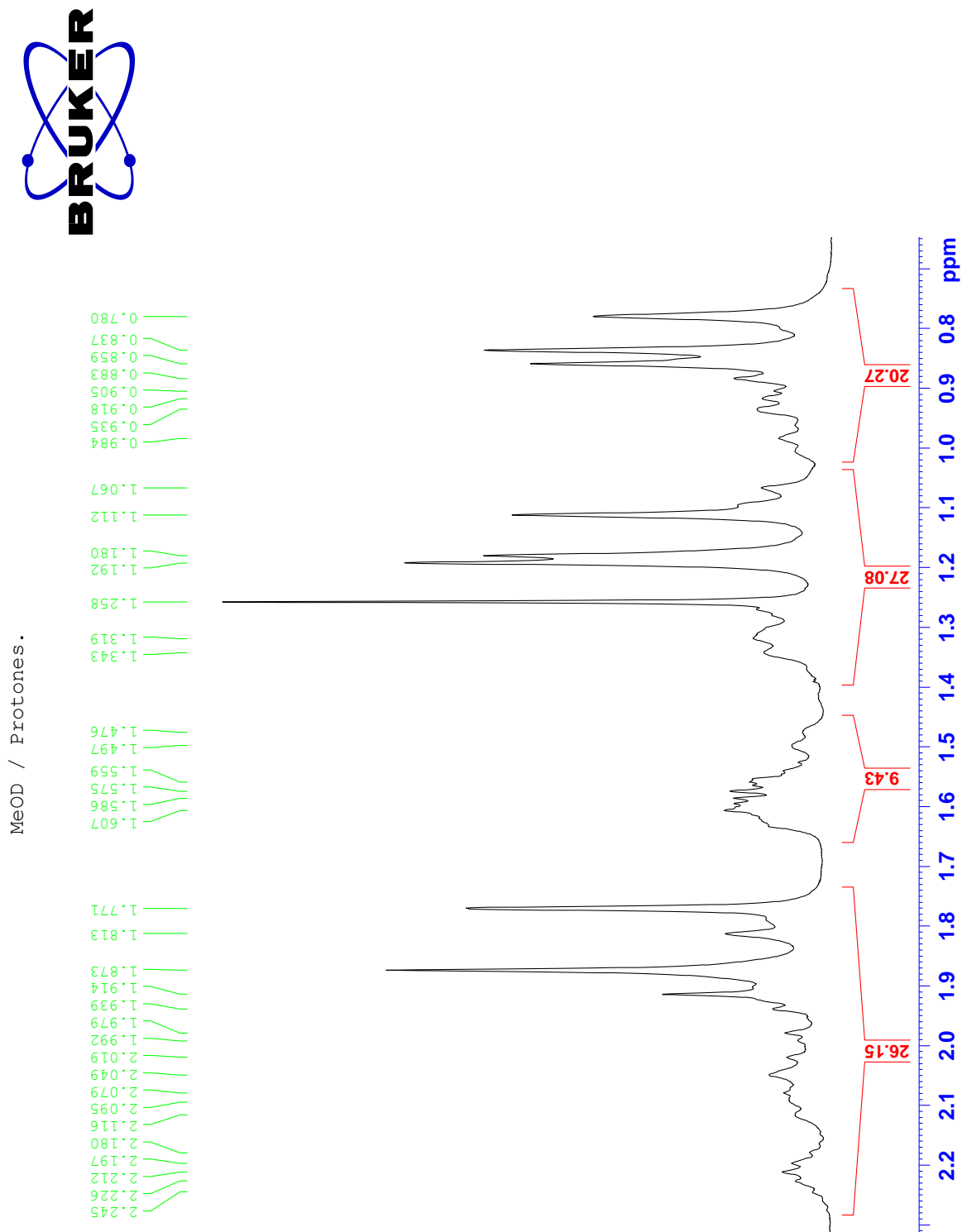
Espectro 53. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



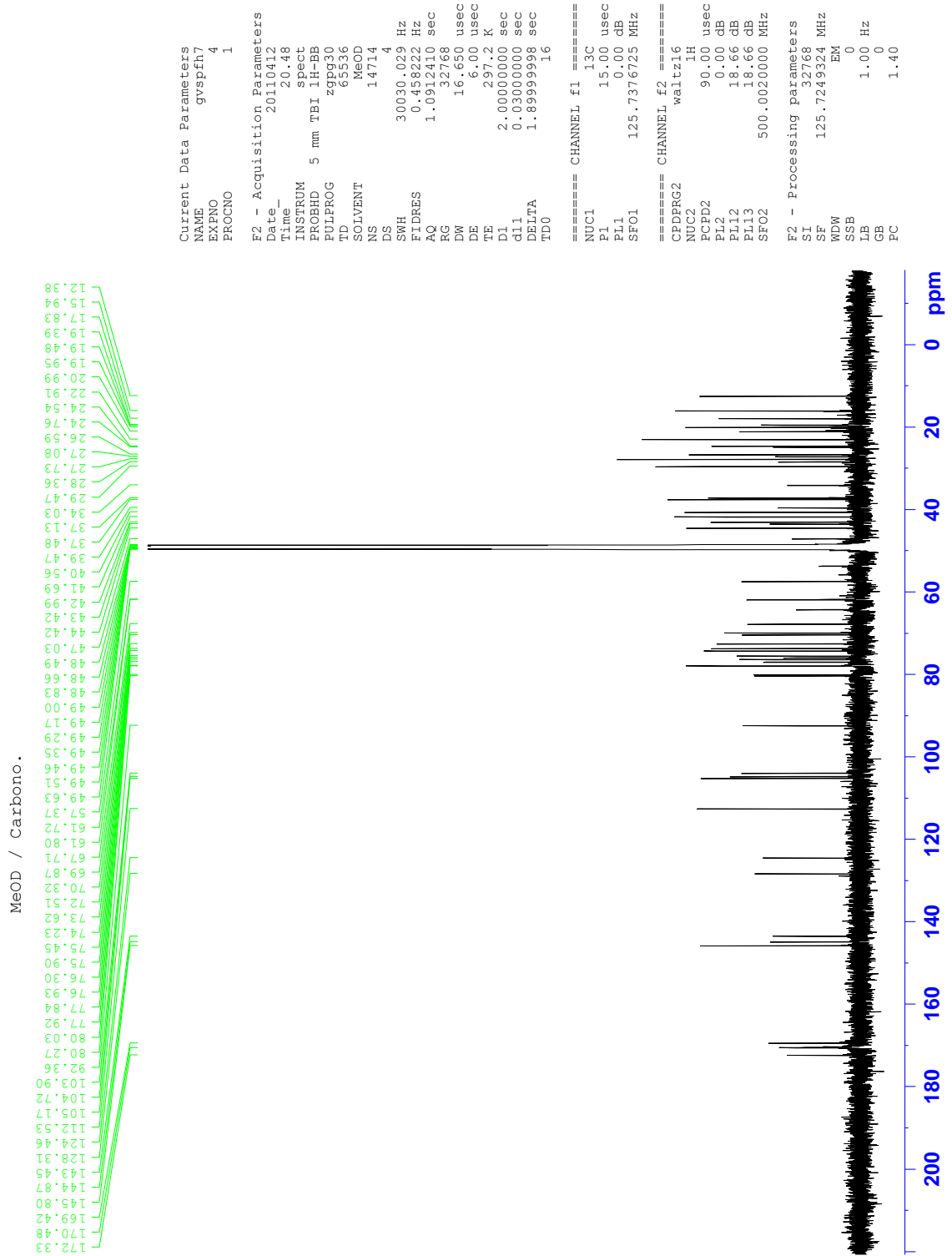
Espectro 54. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



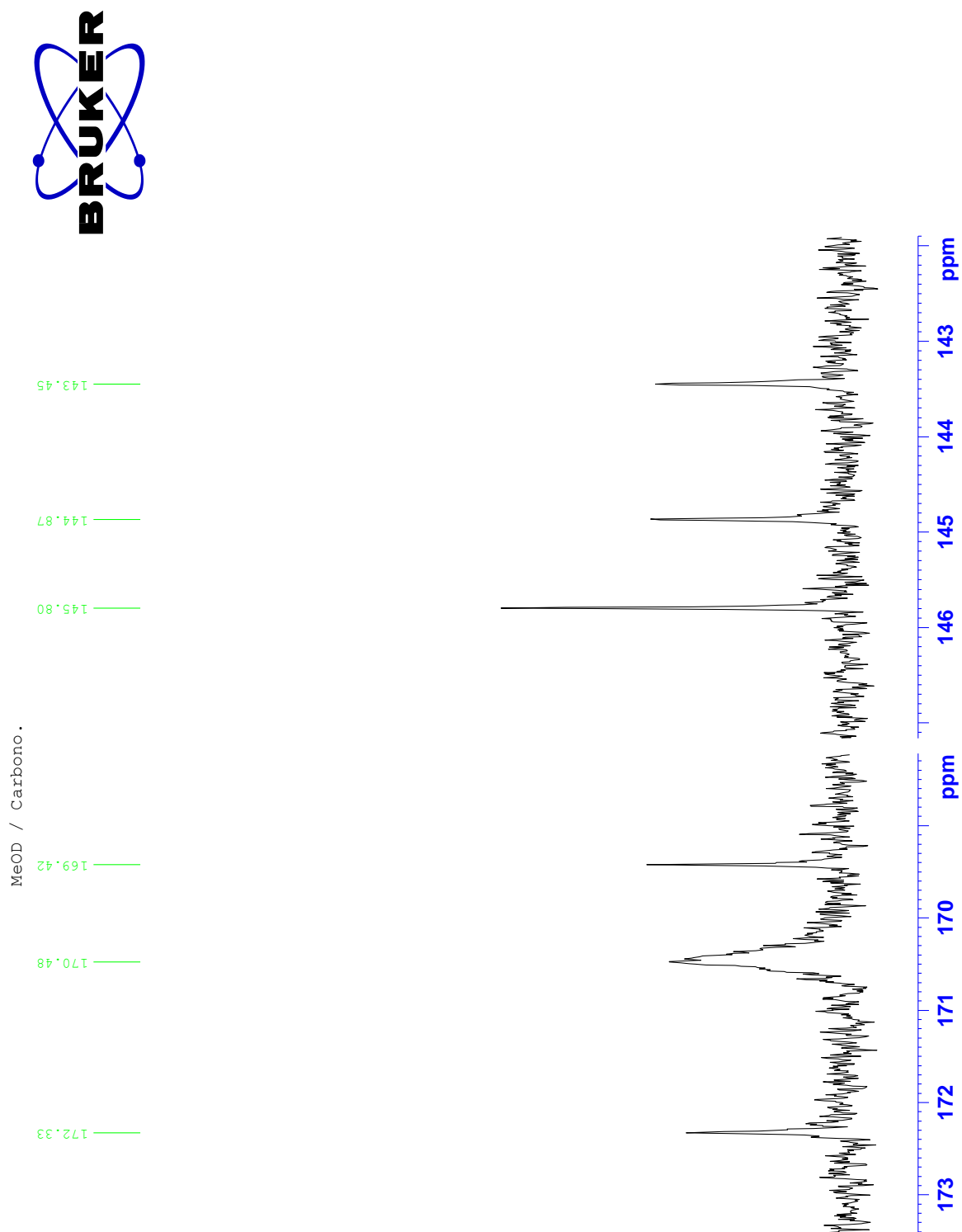
Espectro 55. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



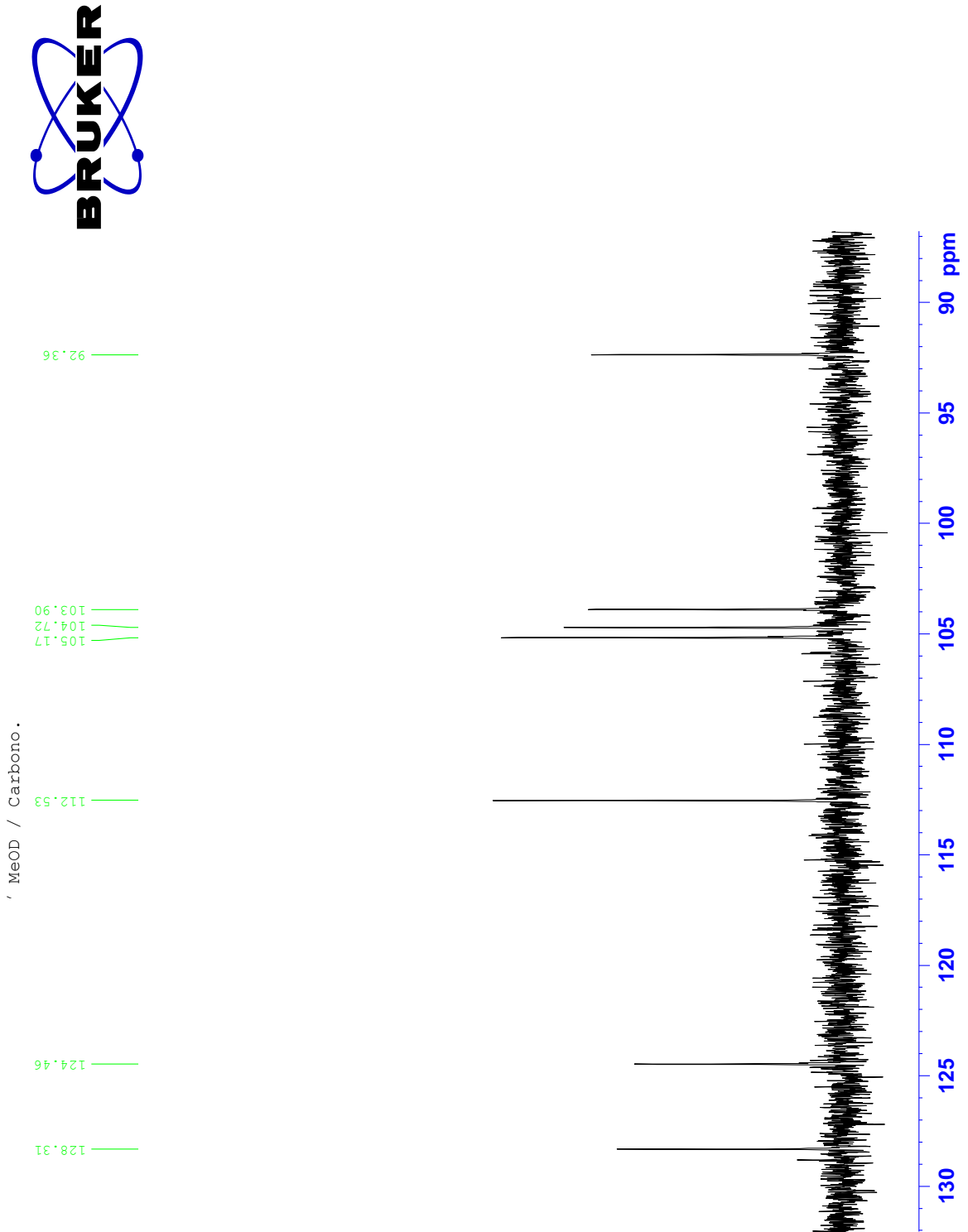
Espectro 56. Ampliación de RMN ^1H tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



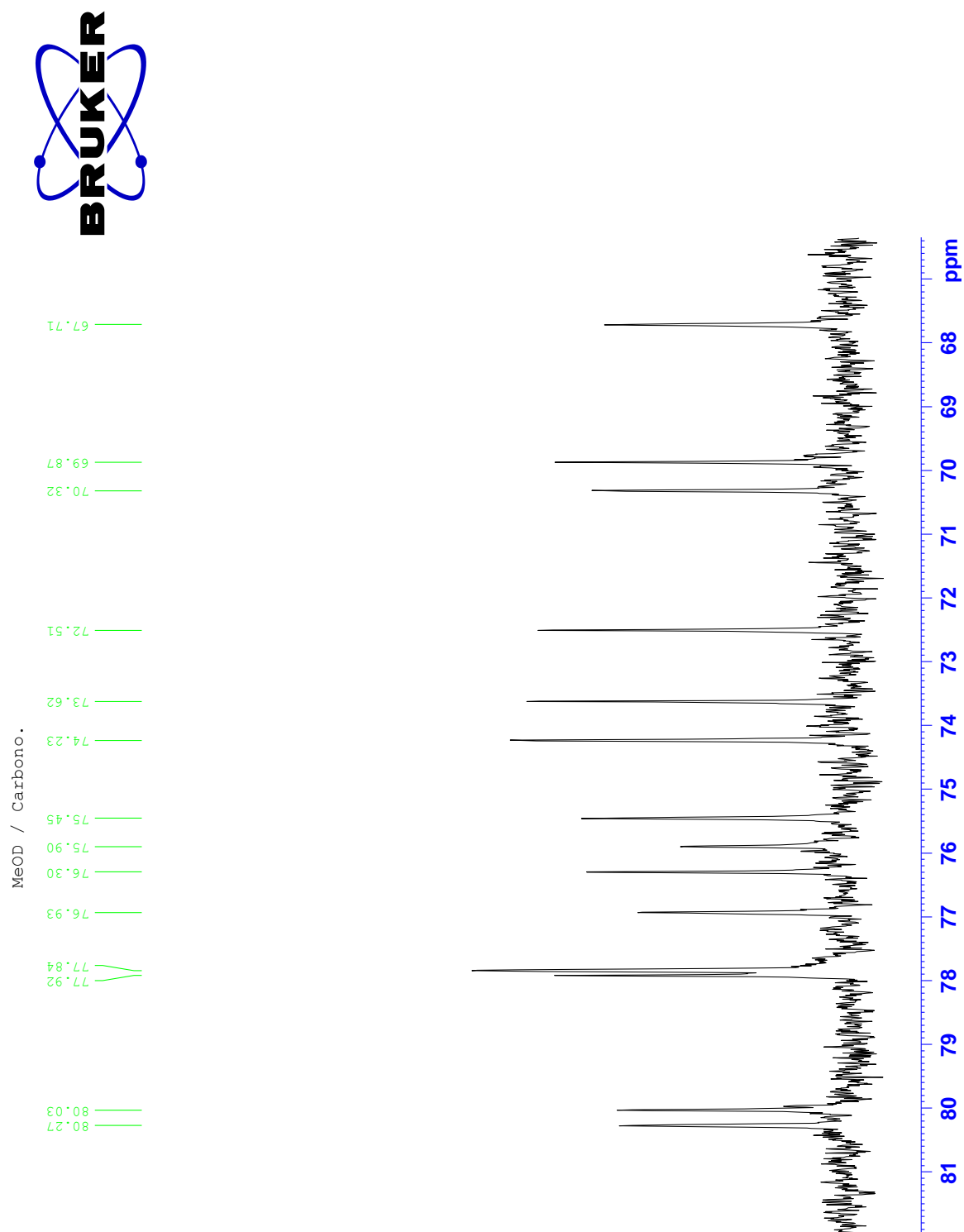
Espectro 57. RMN ¹³C tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



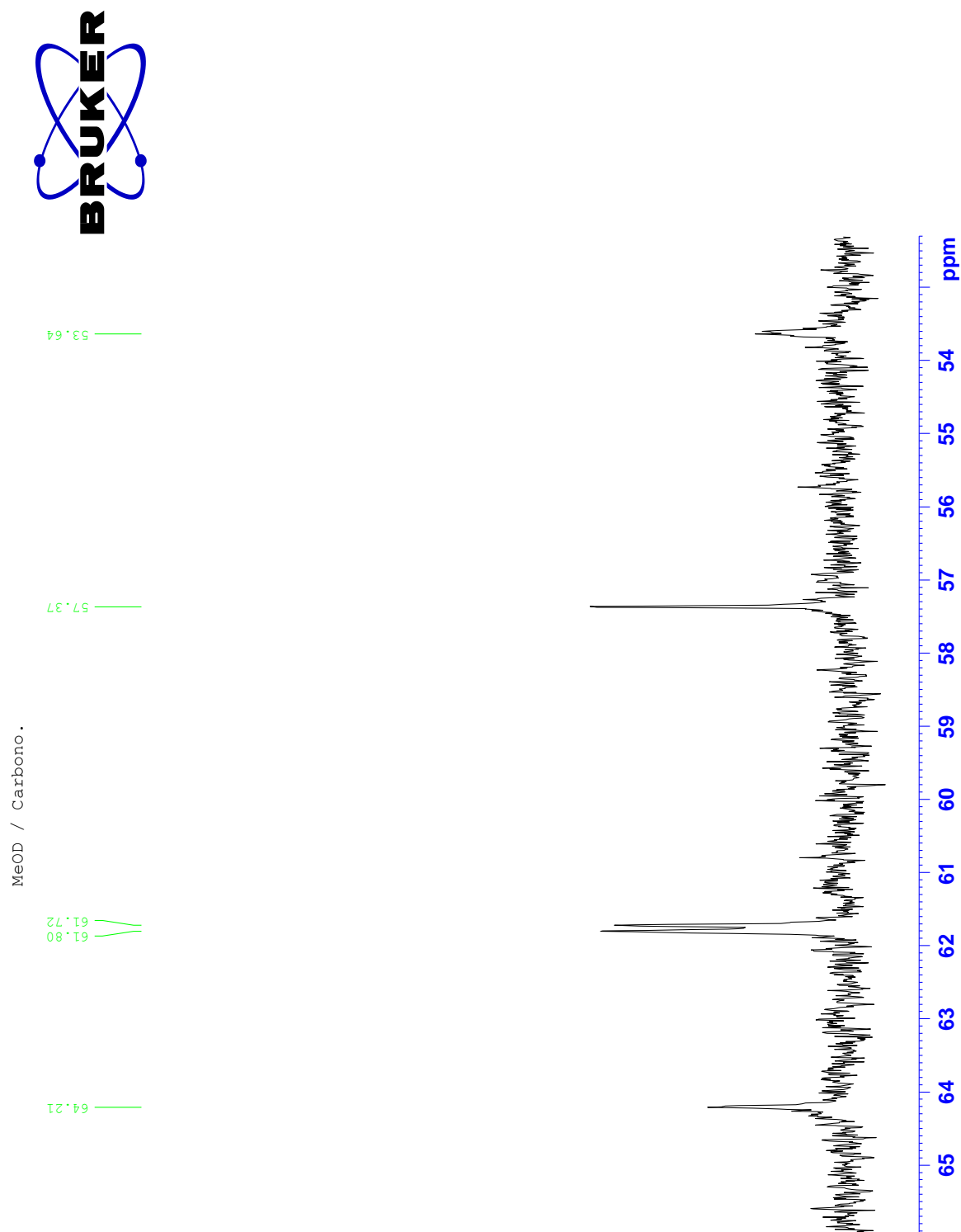
Espectro 58. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



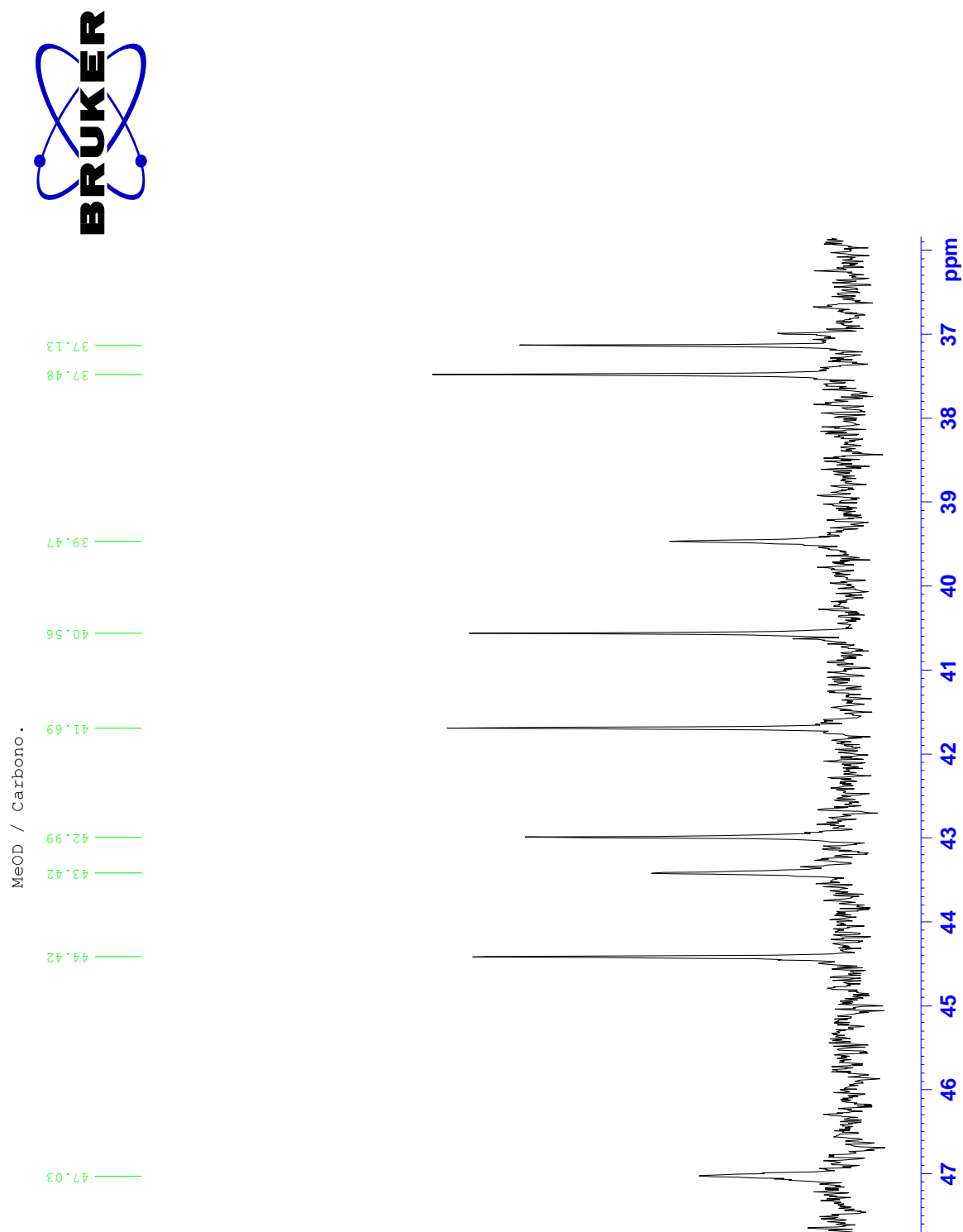
Espectro 59. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



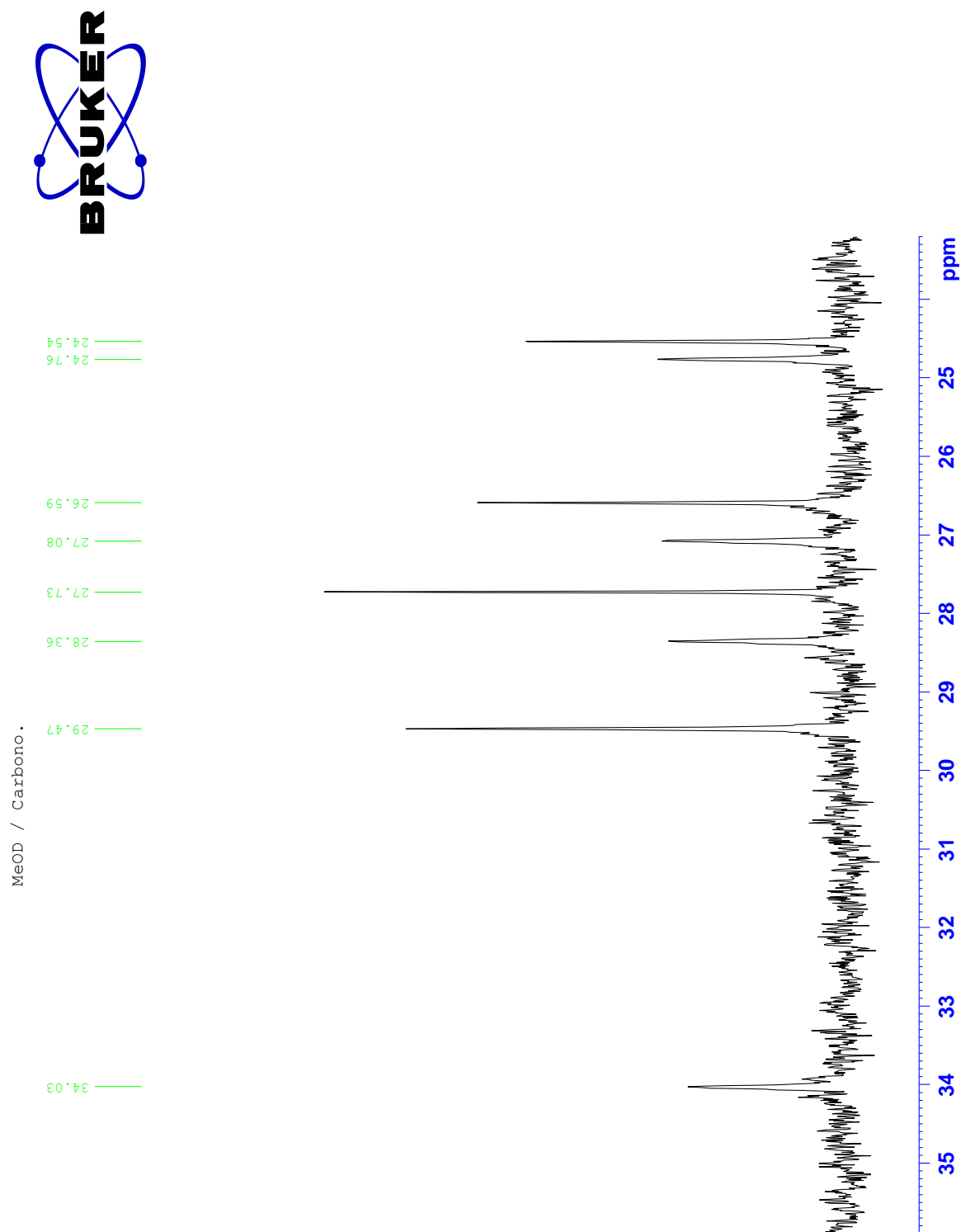
Espectro 60. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD-d_4 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



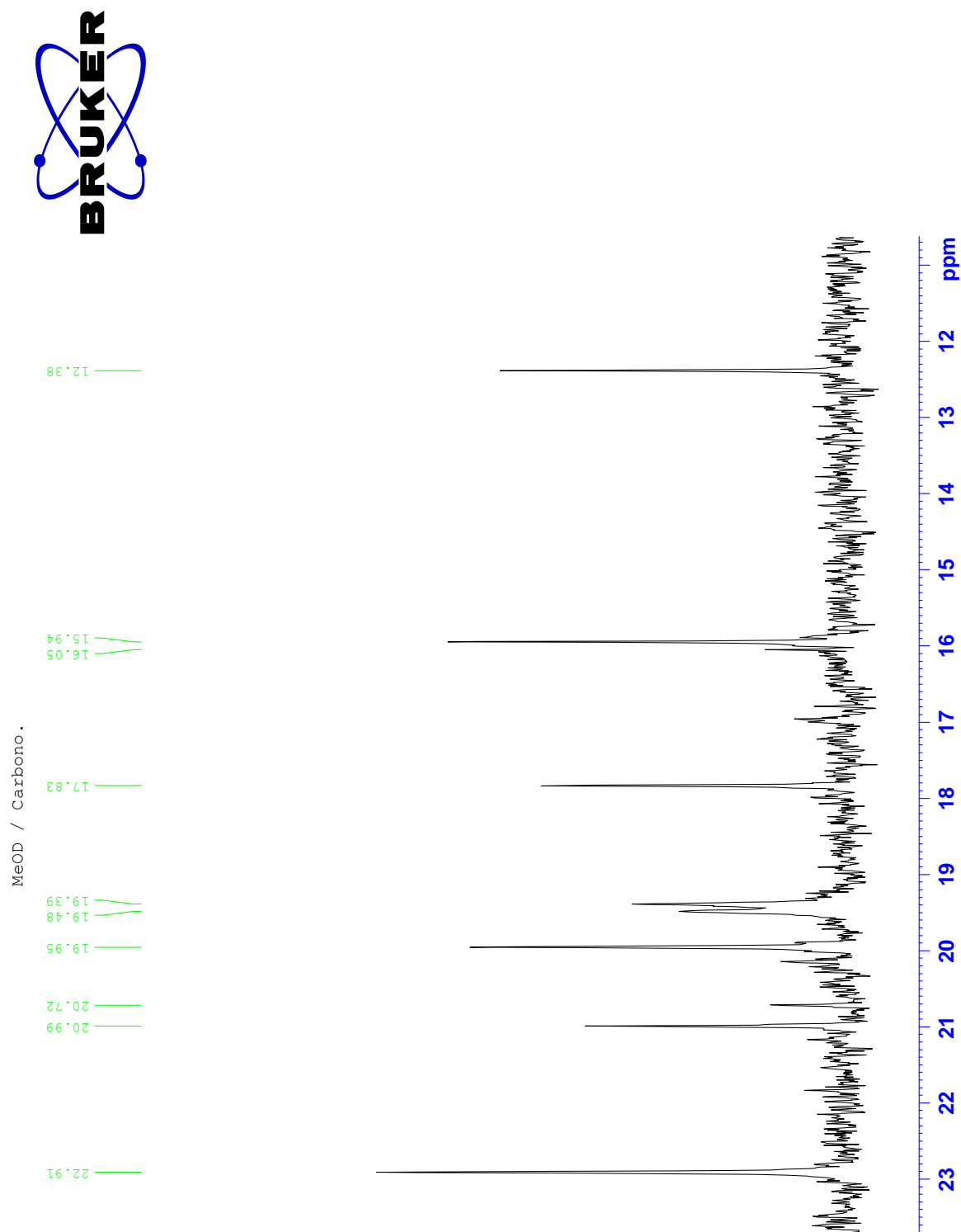
Espectro 61. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



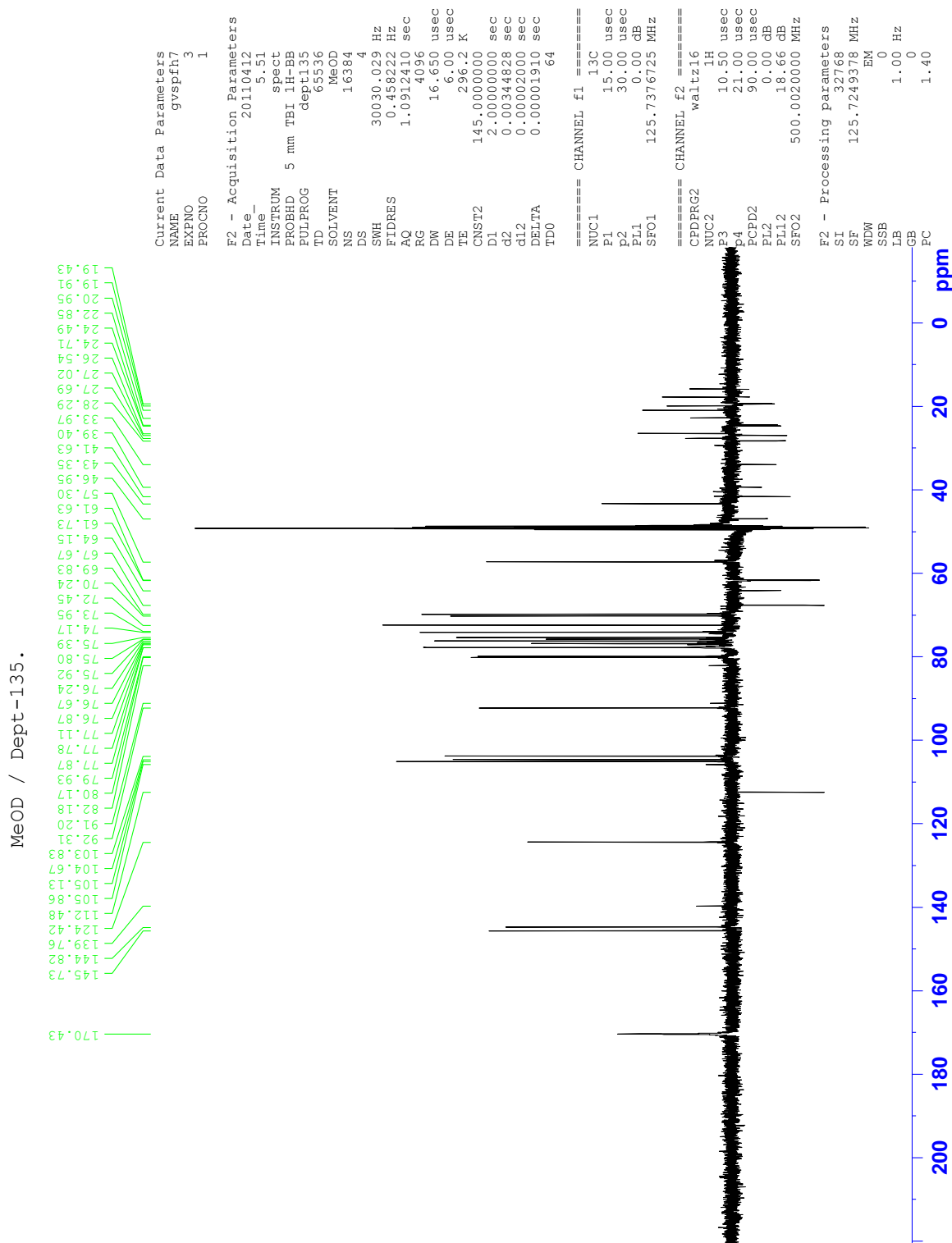
Espectro 62. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



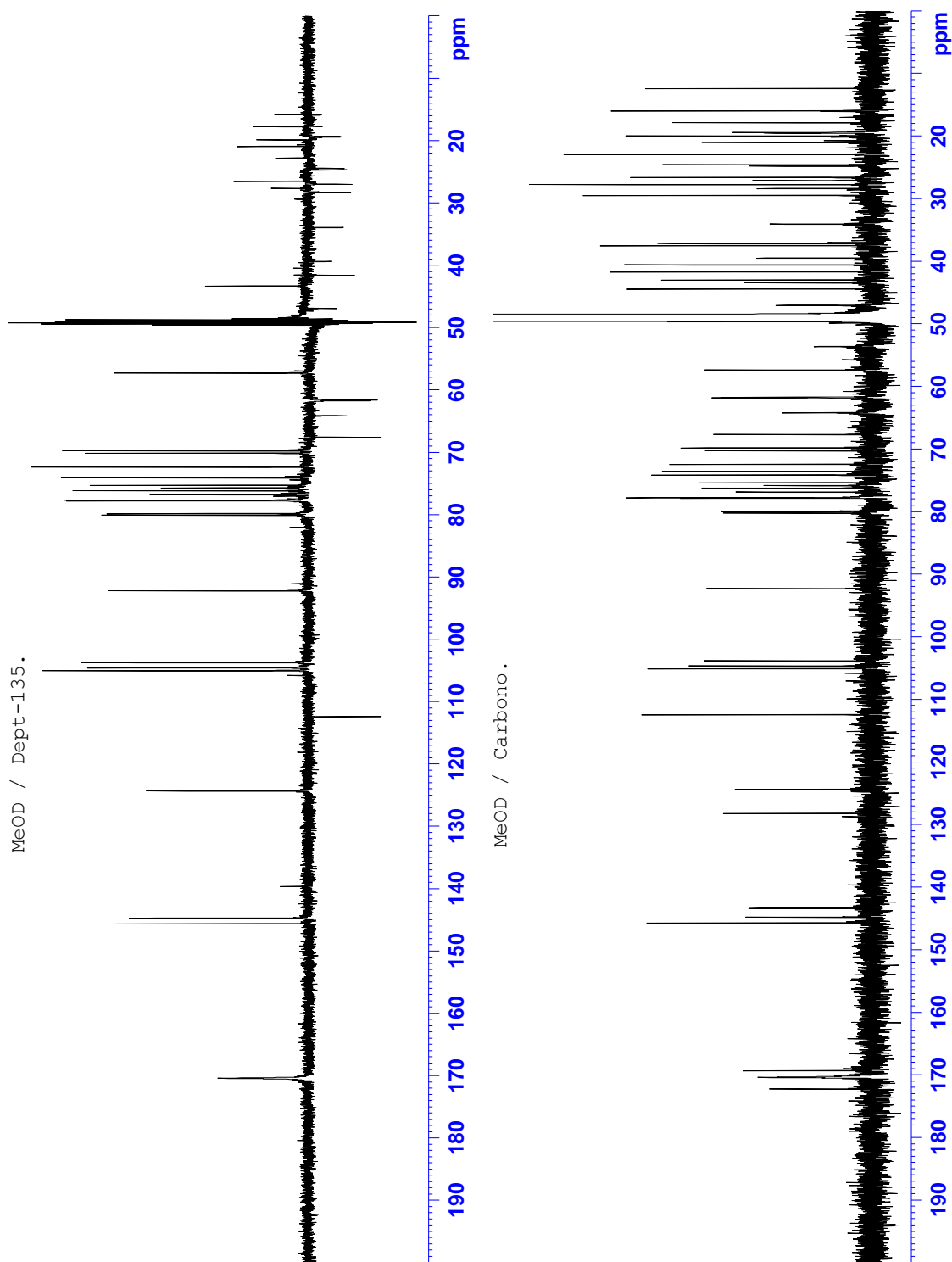
Espectro 63. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



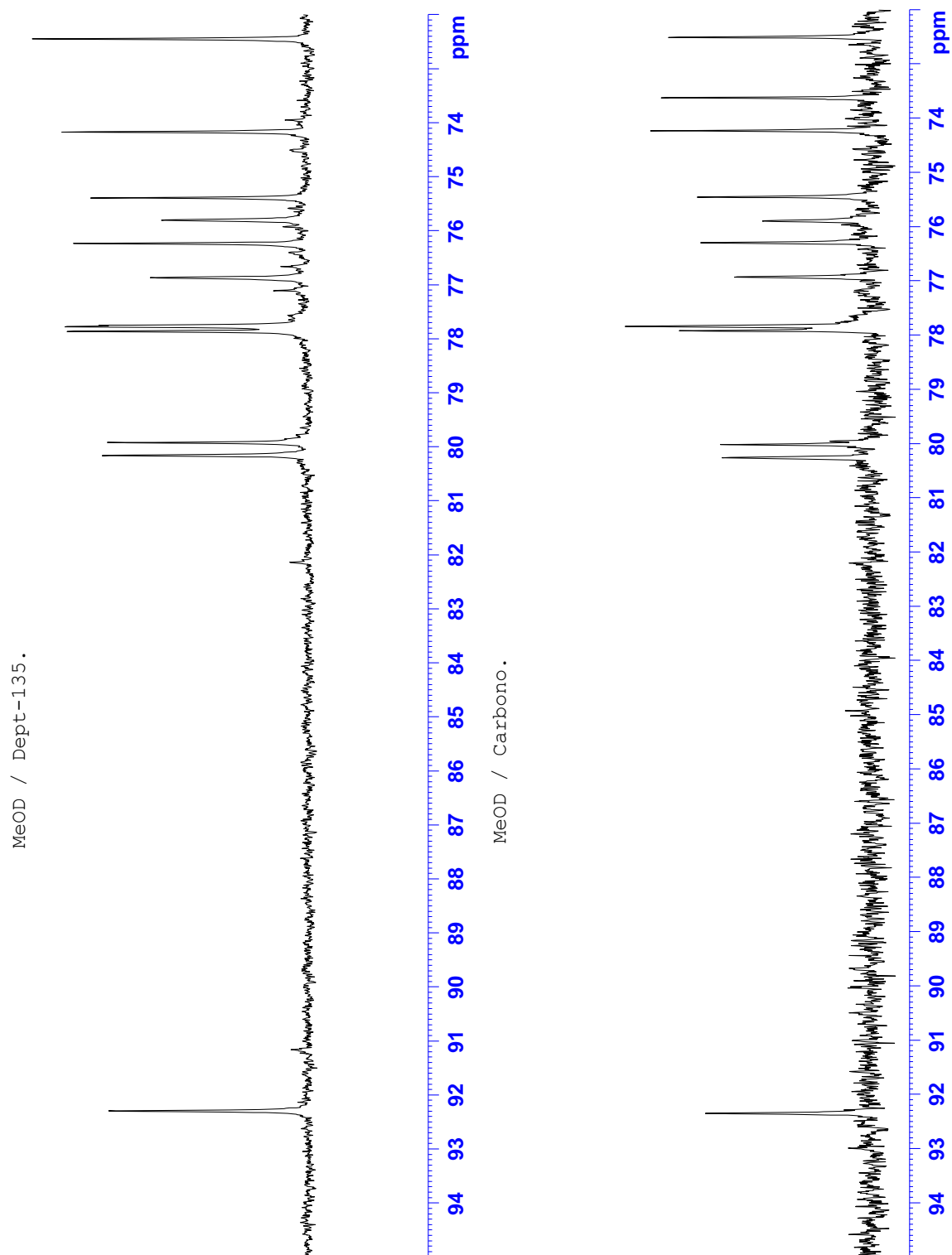
Espectro 64. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en MeOD- d_4 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



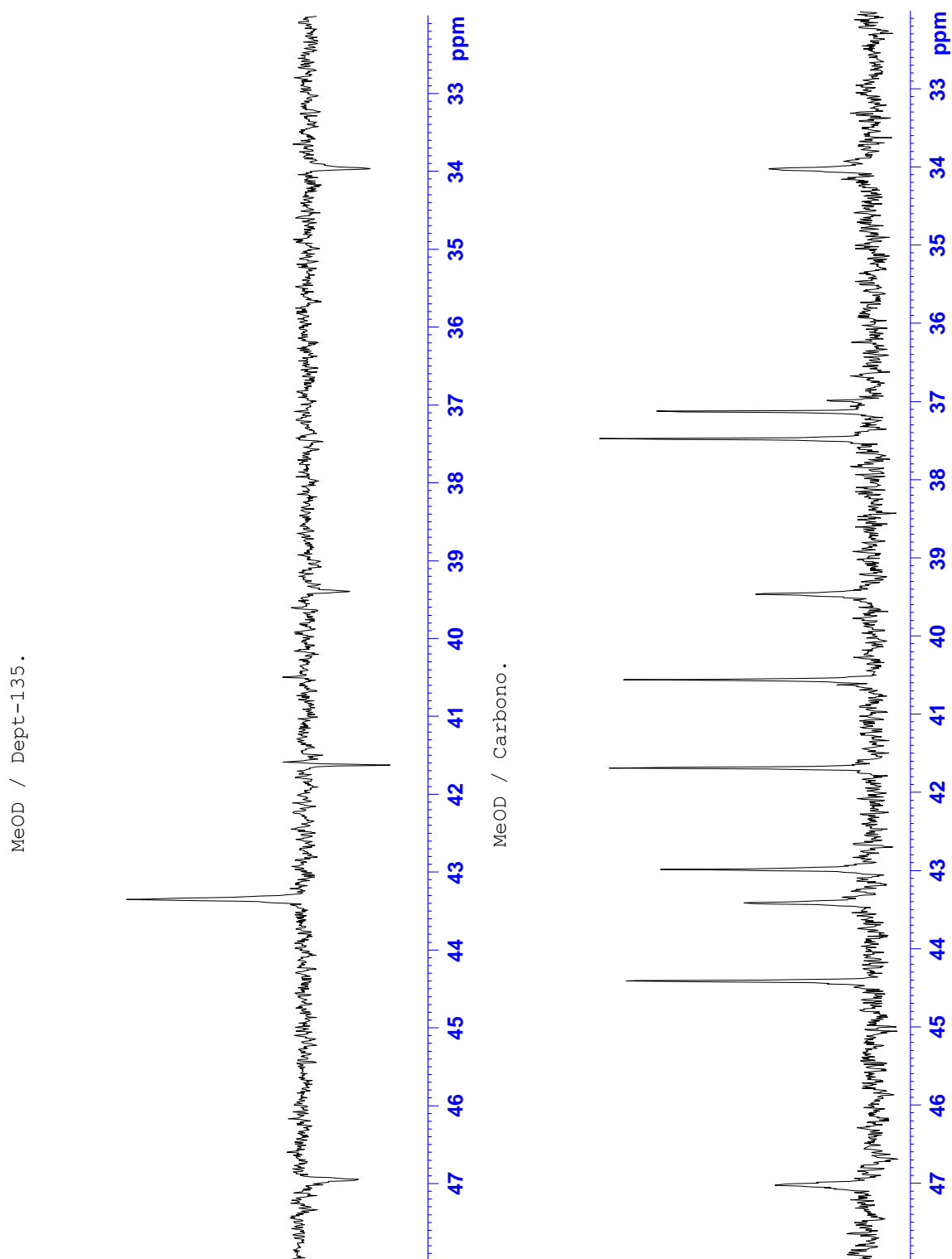
Espectro 65. RMN DEPT tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



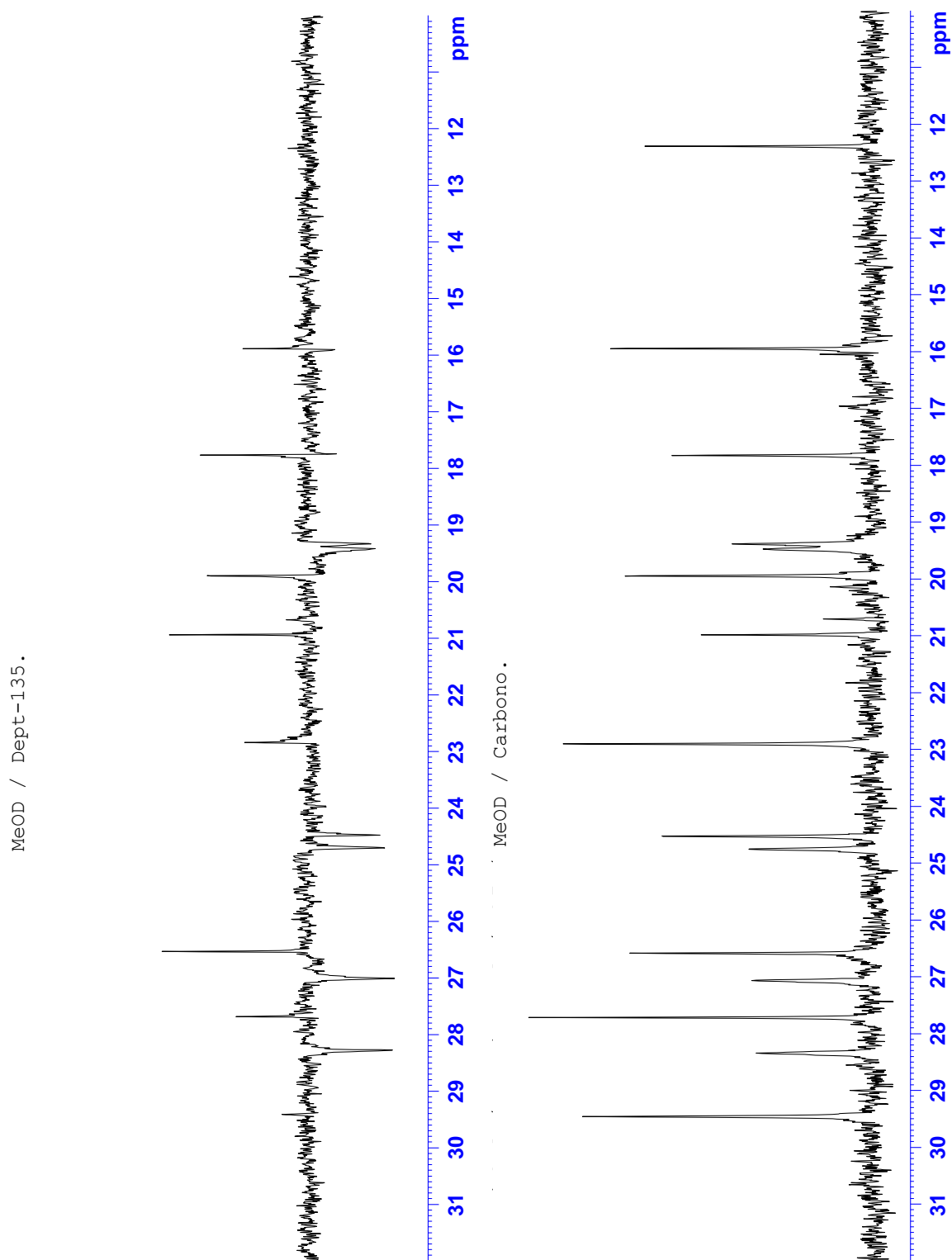
Espectro 66. Ampliación de RMN ^{13}C - DEPT tomado en $\text{MeOD}-d_4$ para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



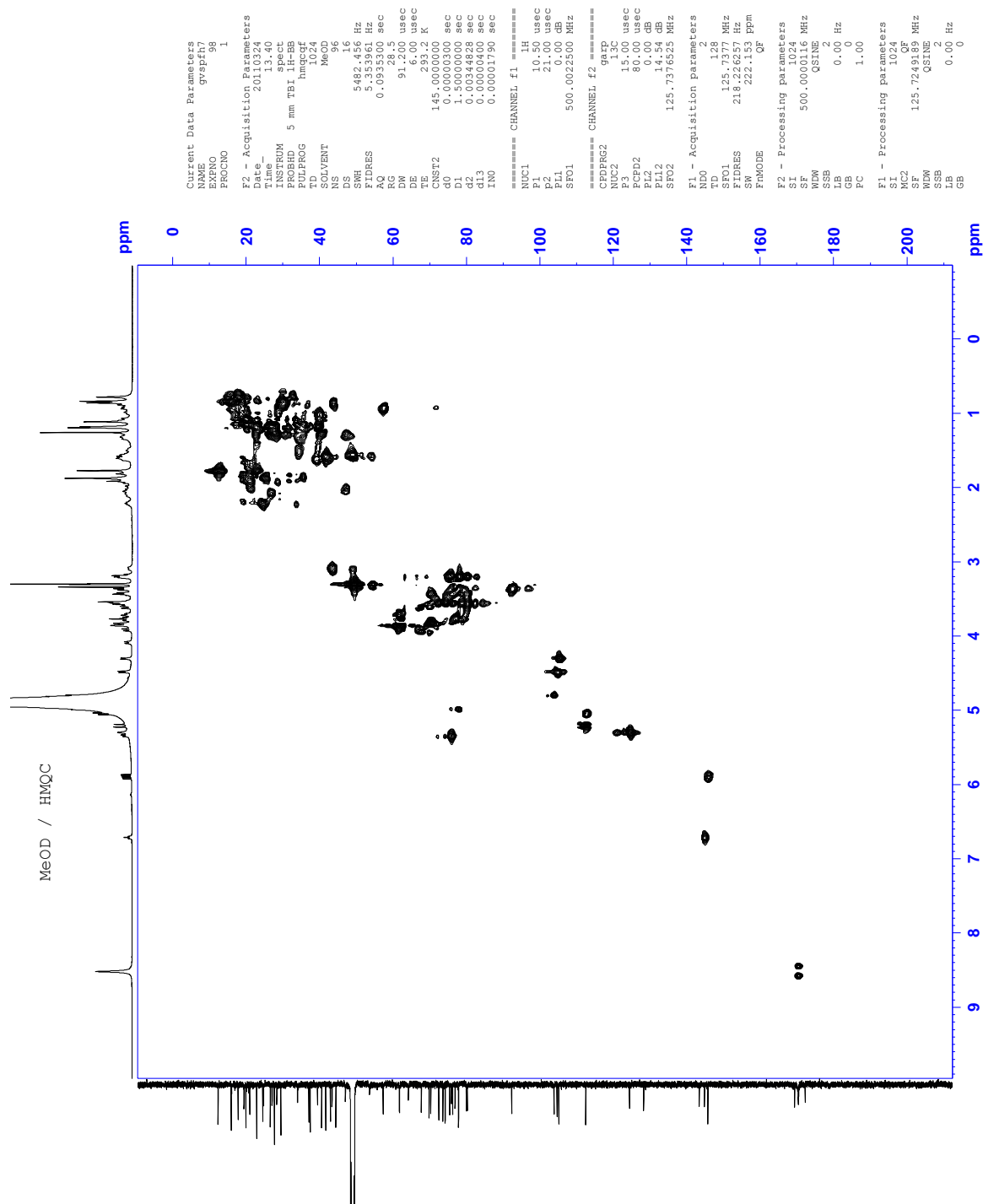
Espectro 67. Ampliación de RMN ^{13}C - DEPT tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



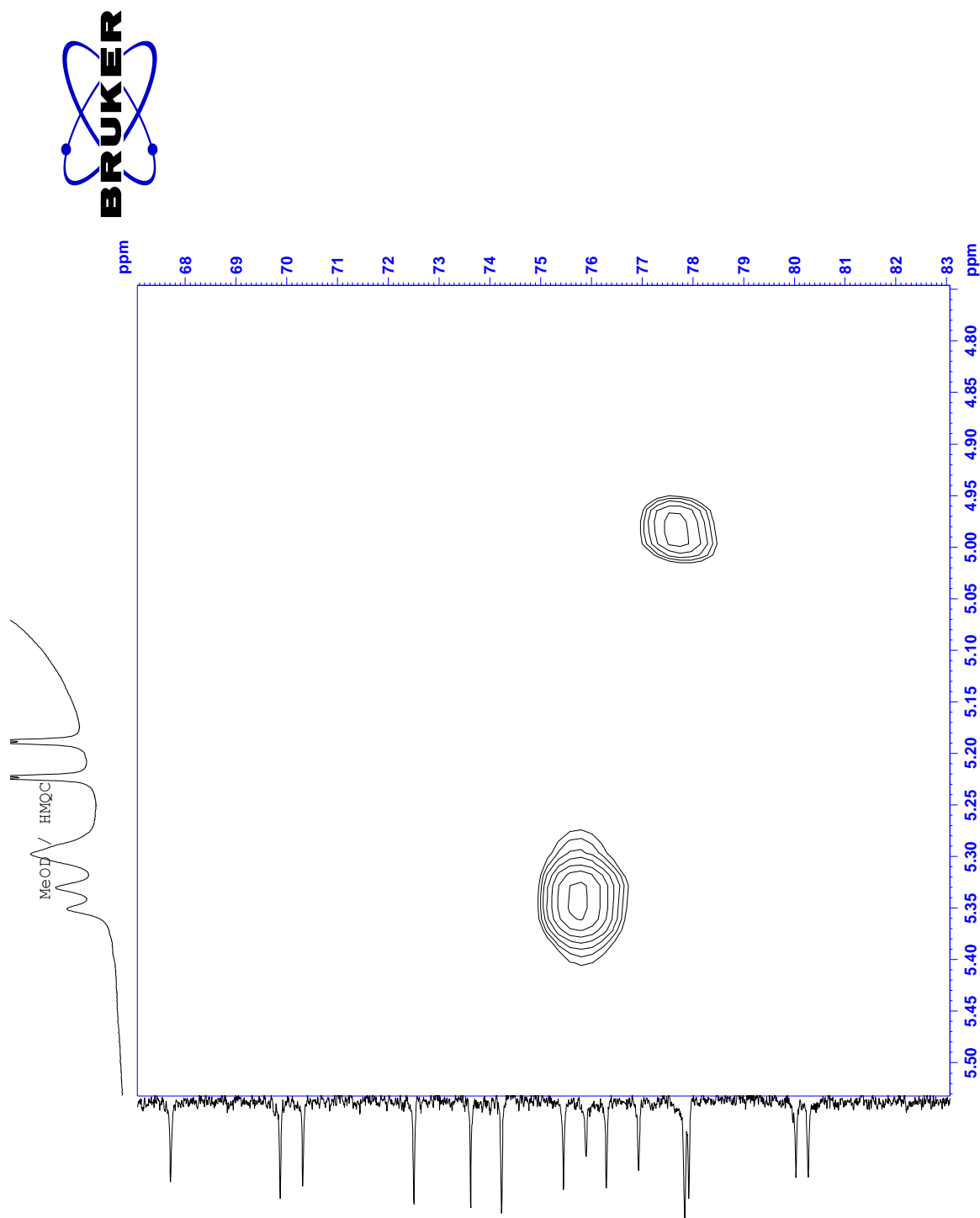
Espectro 68. Ampliación de RMN ^{13}C - DEPT tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



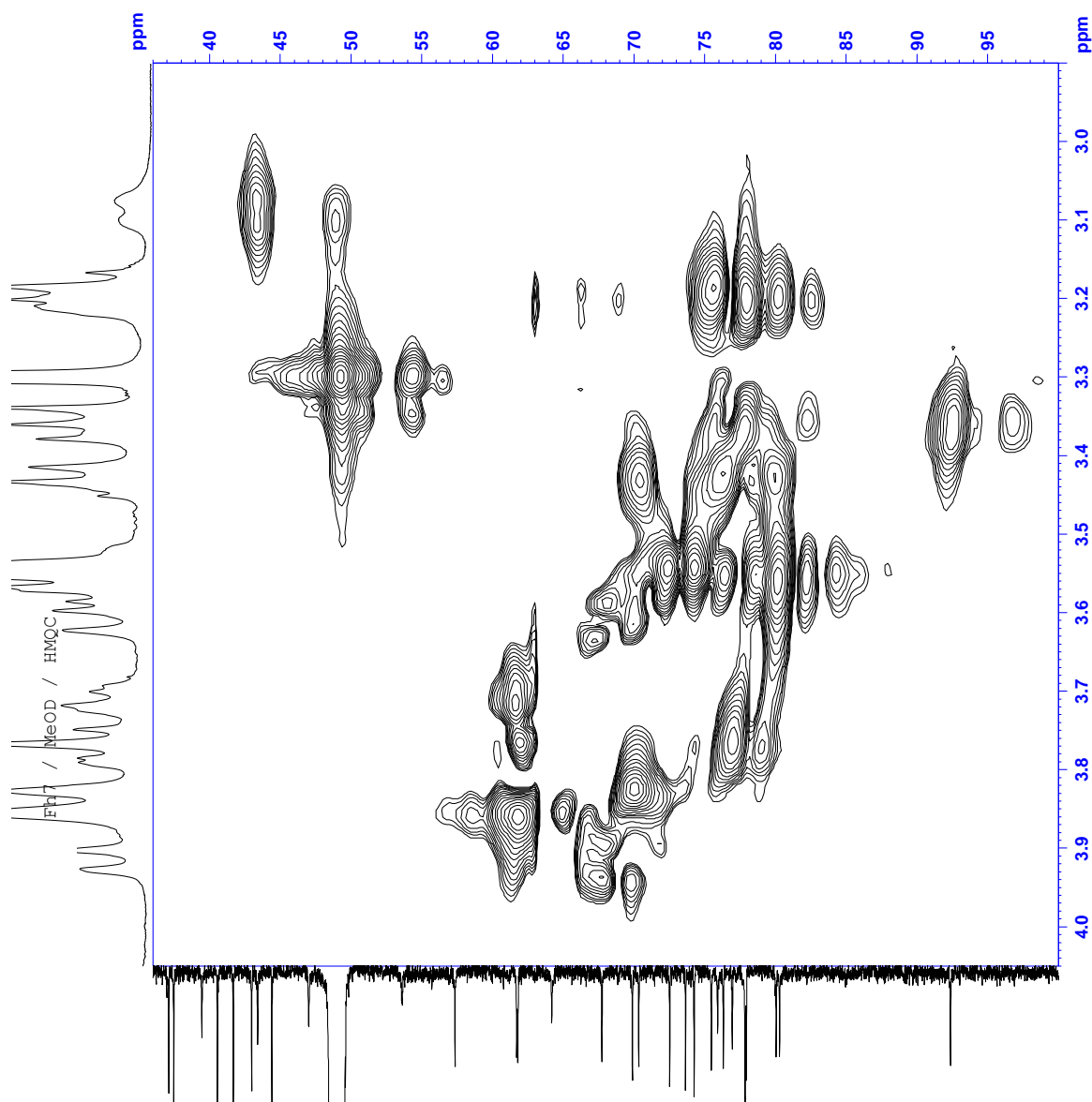
Espectro 69. Ampliación de RMN ^{13}C - DEPT tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



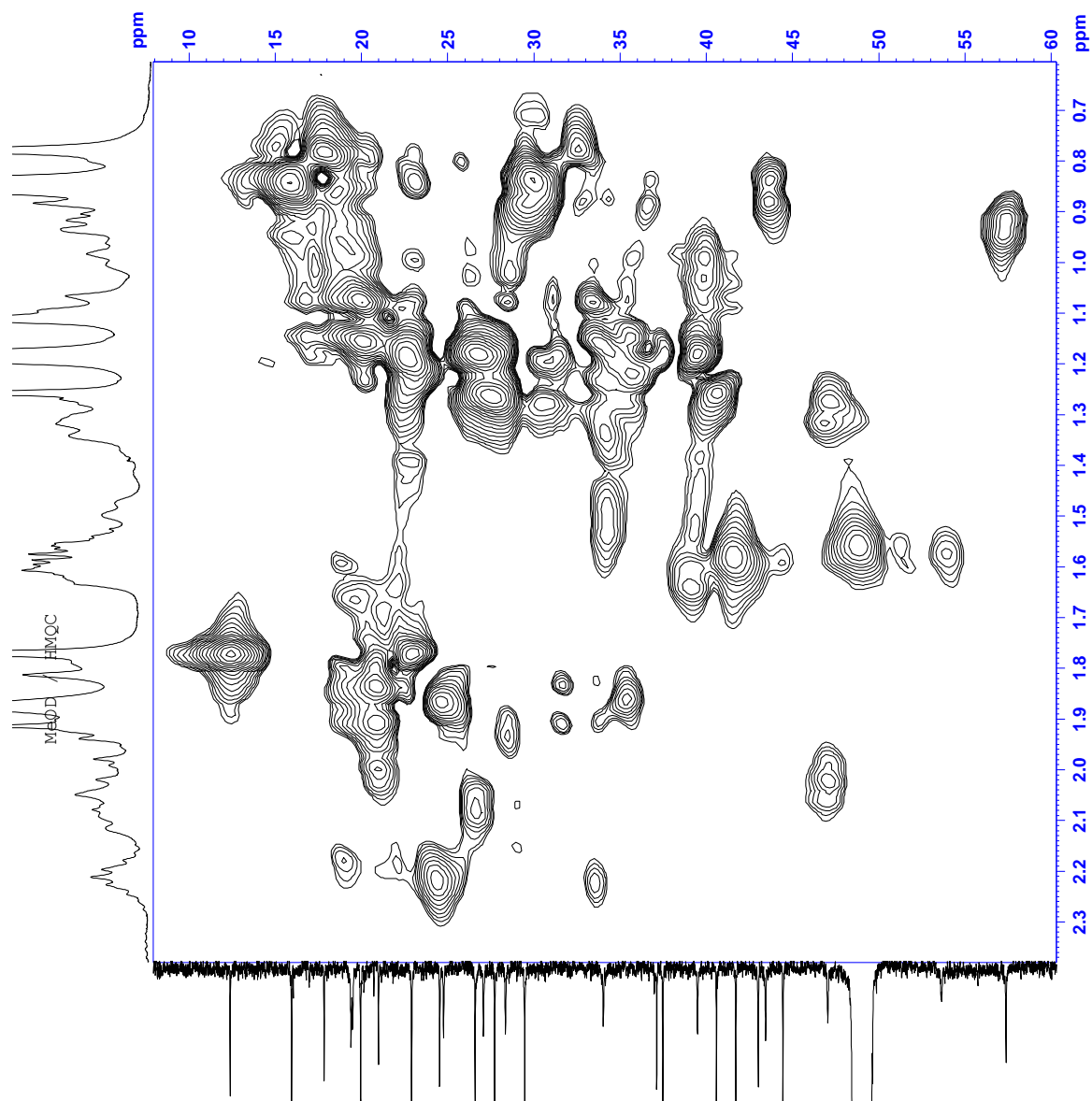
Espectro 70. RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



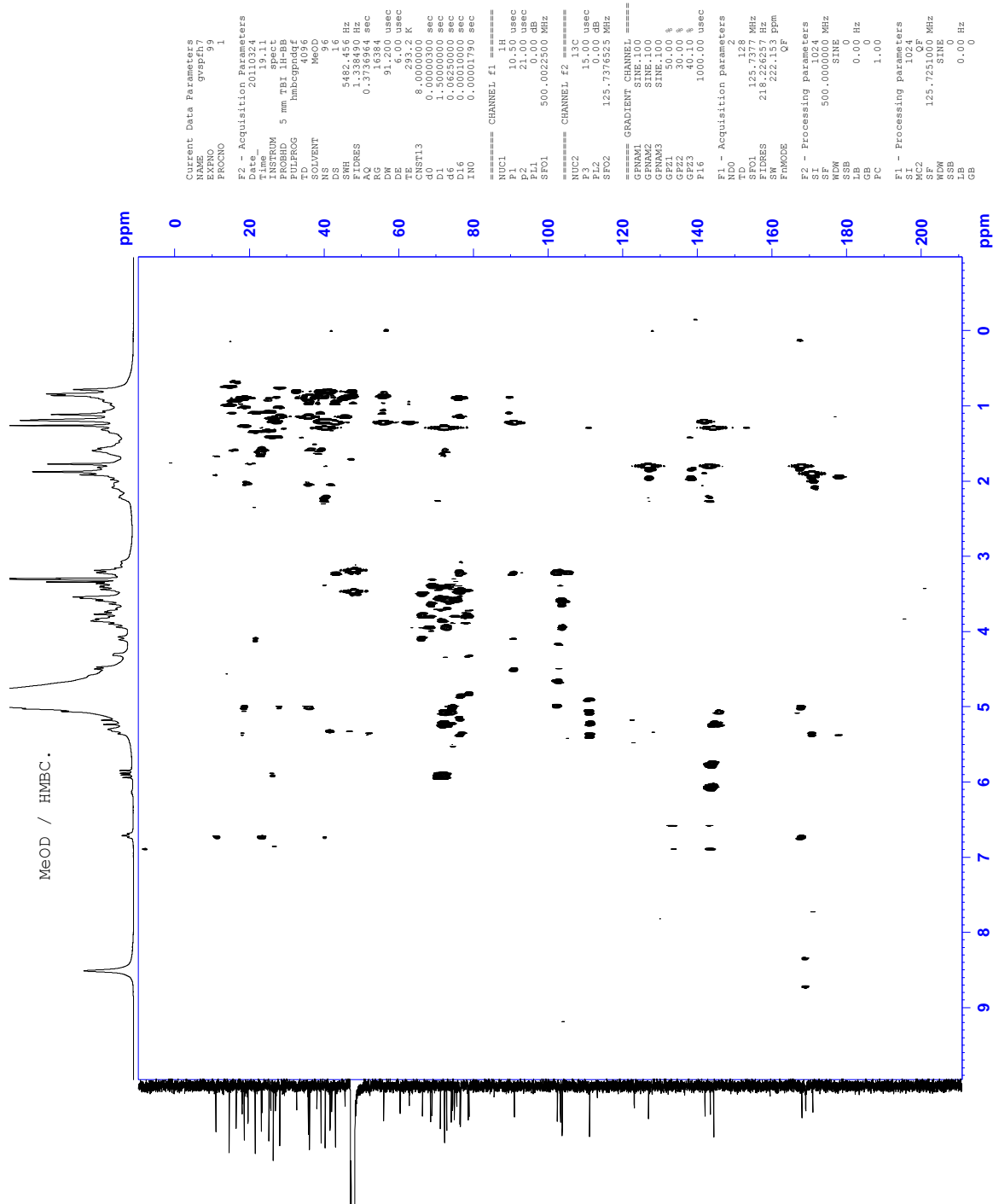
Espectro 71. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



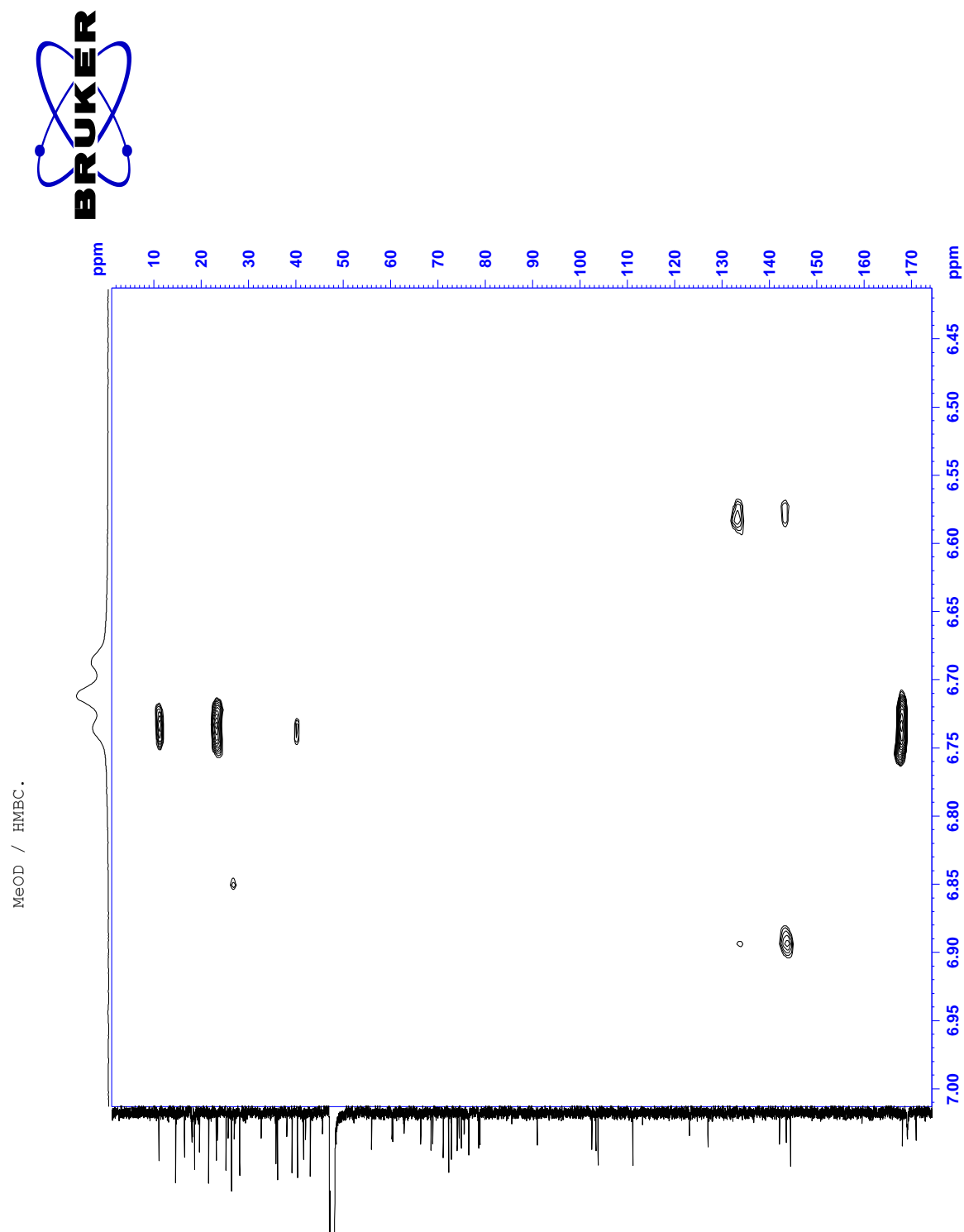
Espectro 72. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



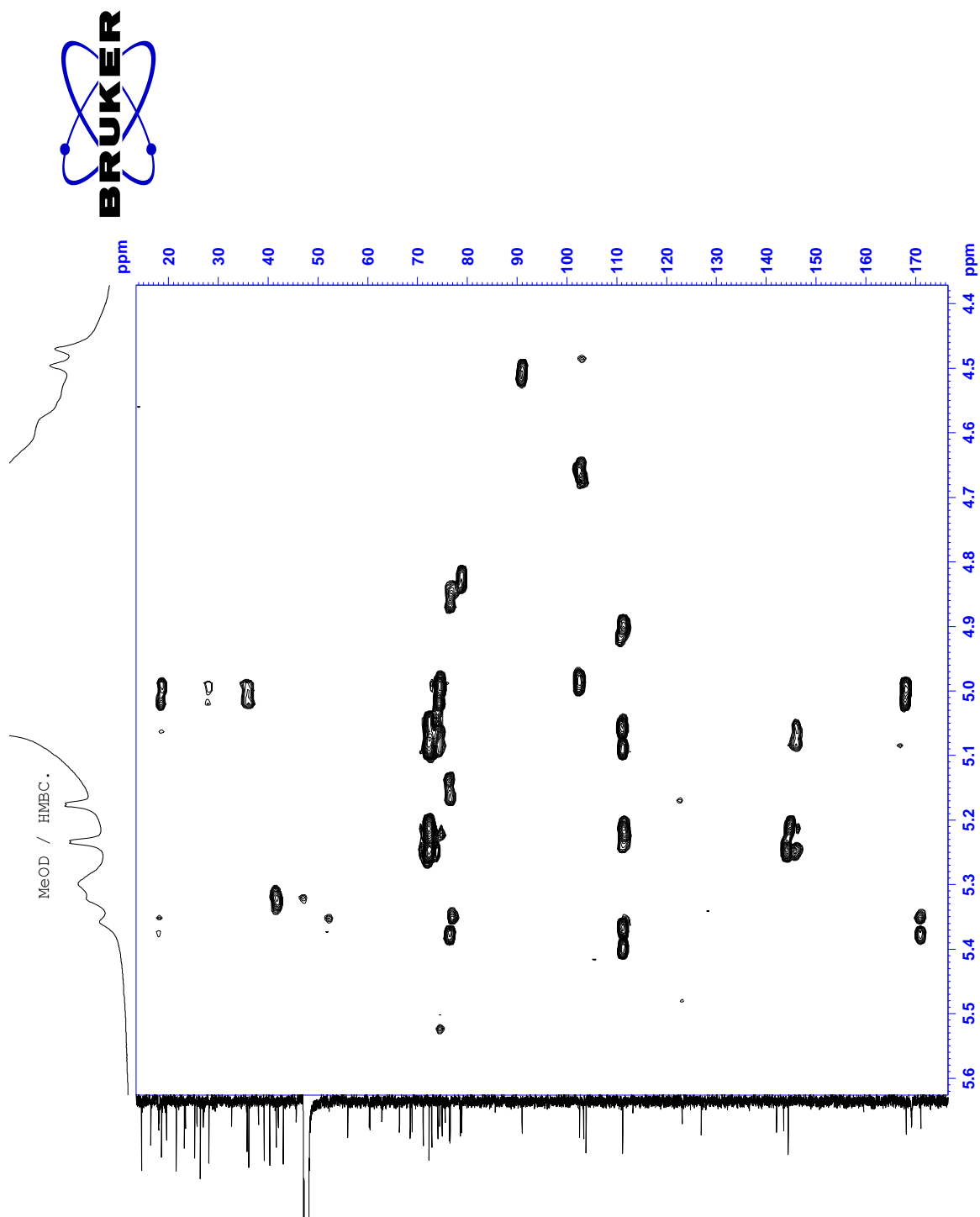
Espectro 73. Ampliación de RMN HMQC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



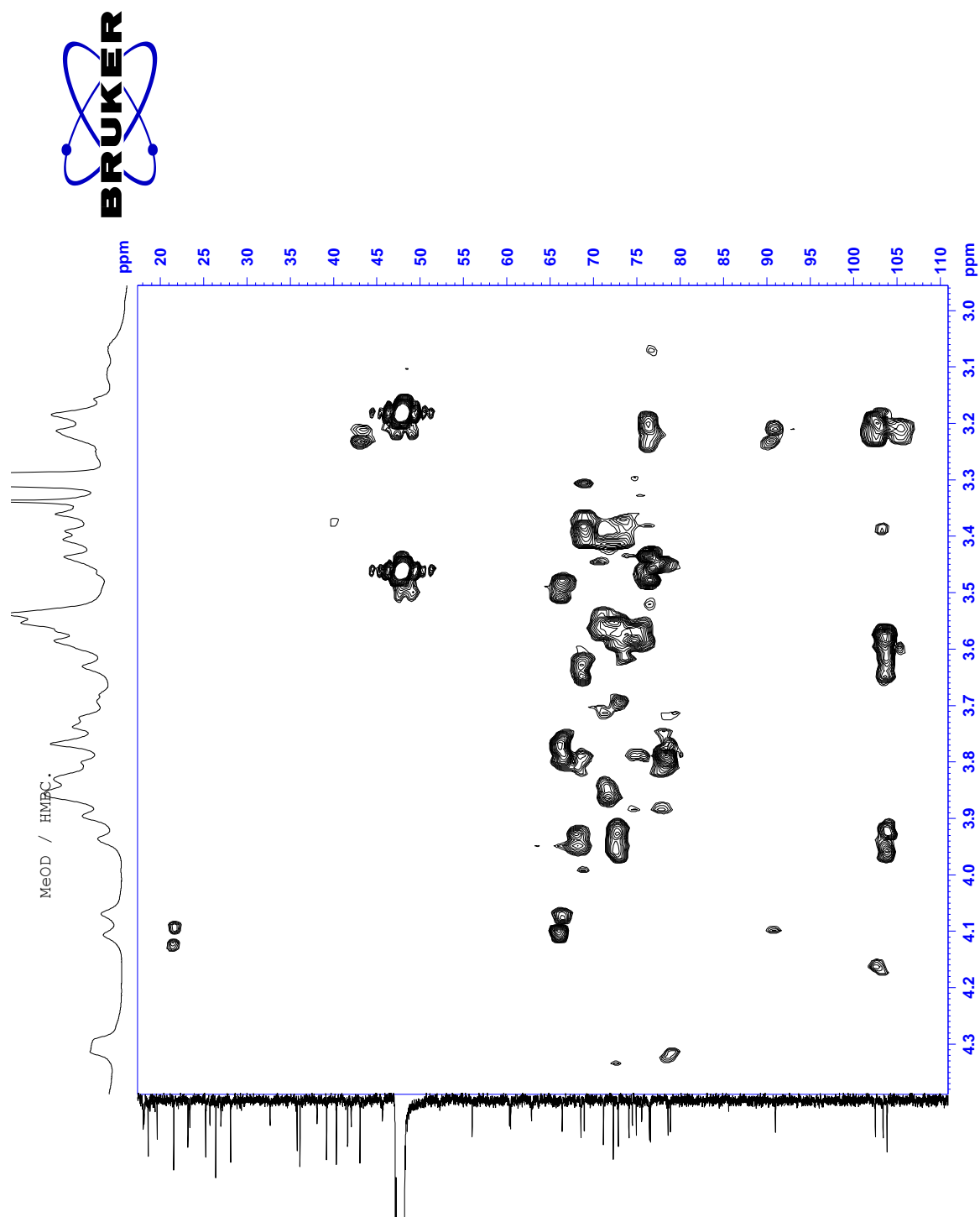
Espectro 74. RMN HMBC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.



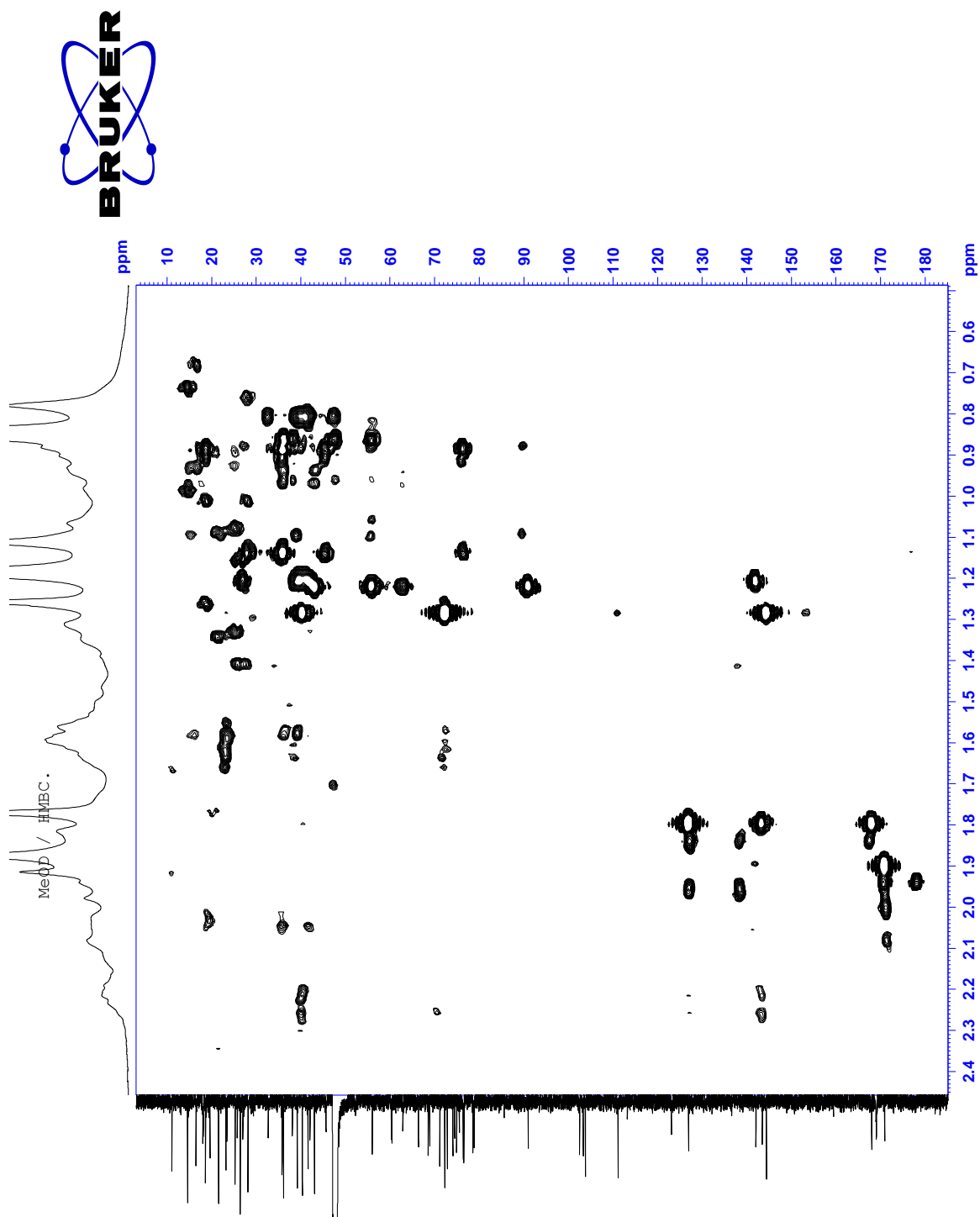
Espectro 75. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E} .



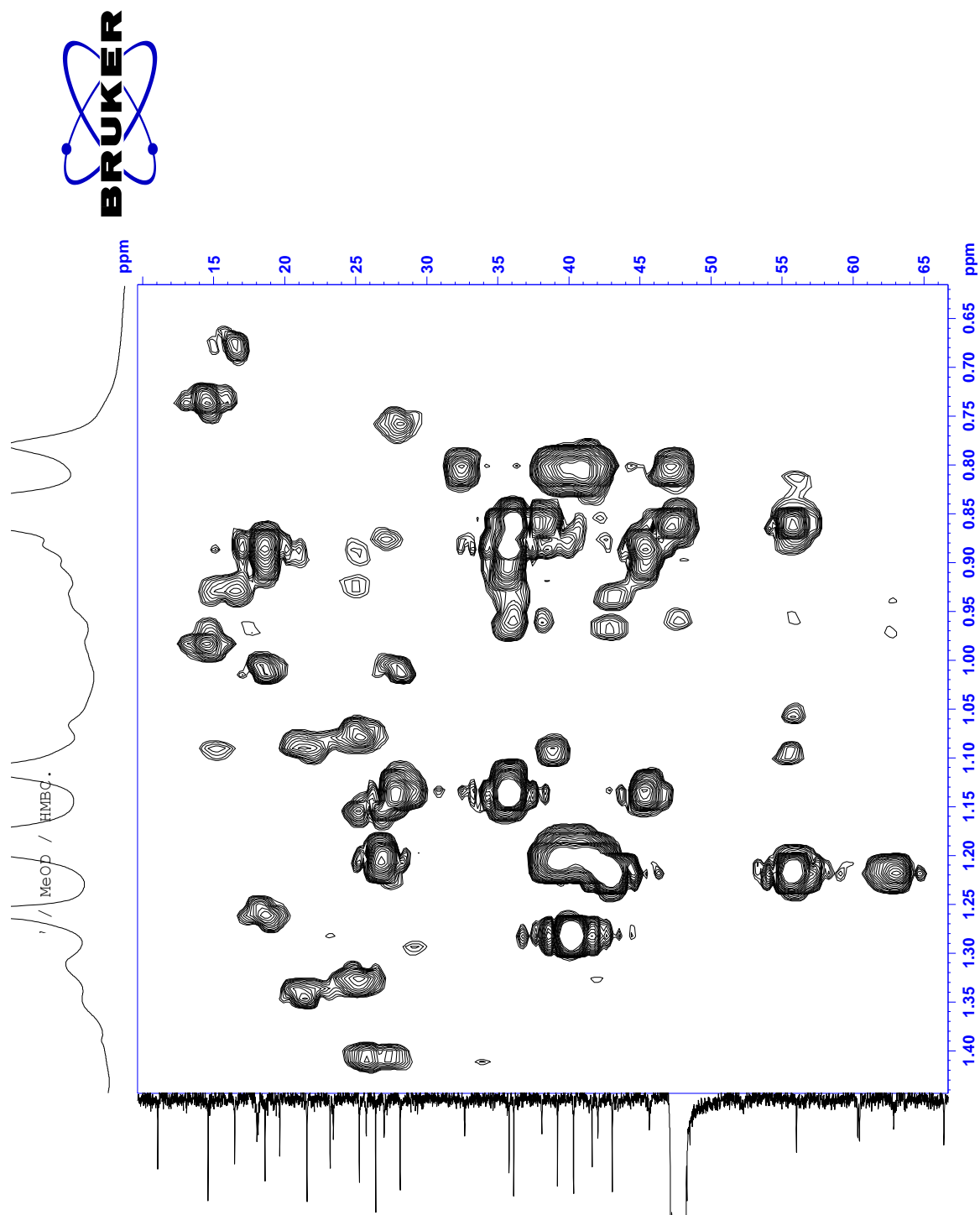
Espectro 76. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.



Espectro 77. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD-d₄ para el compuesto F_{17E}.

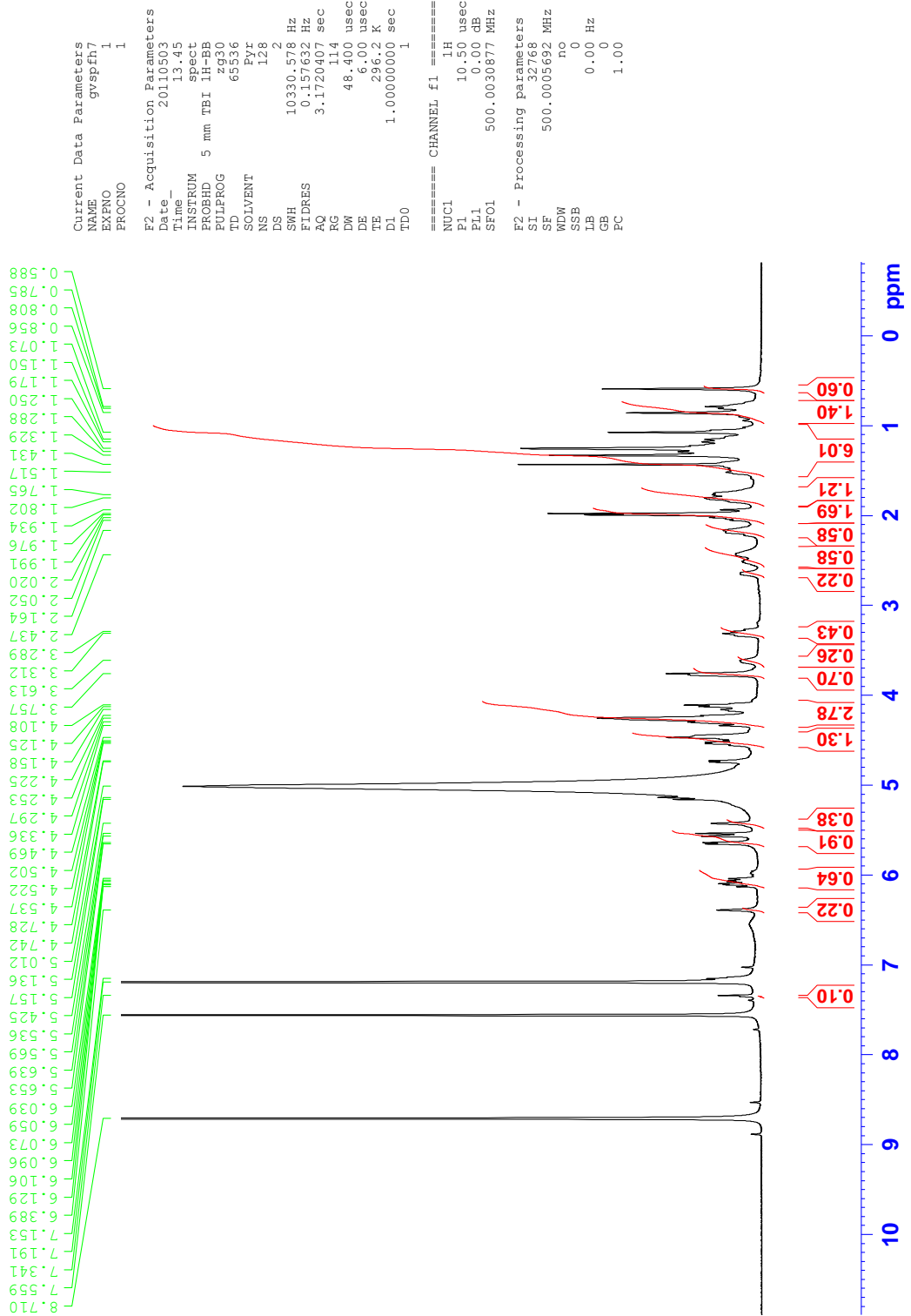


Espectro 78. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.

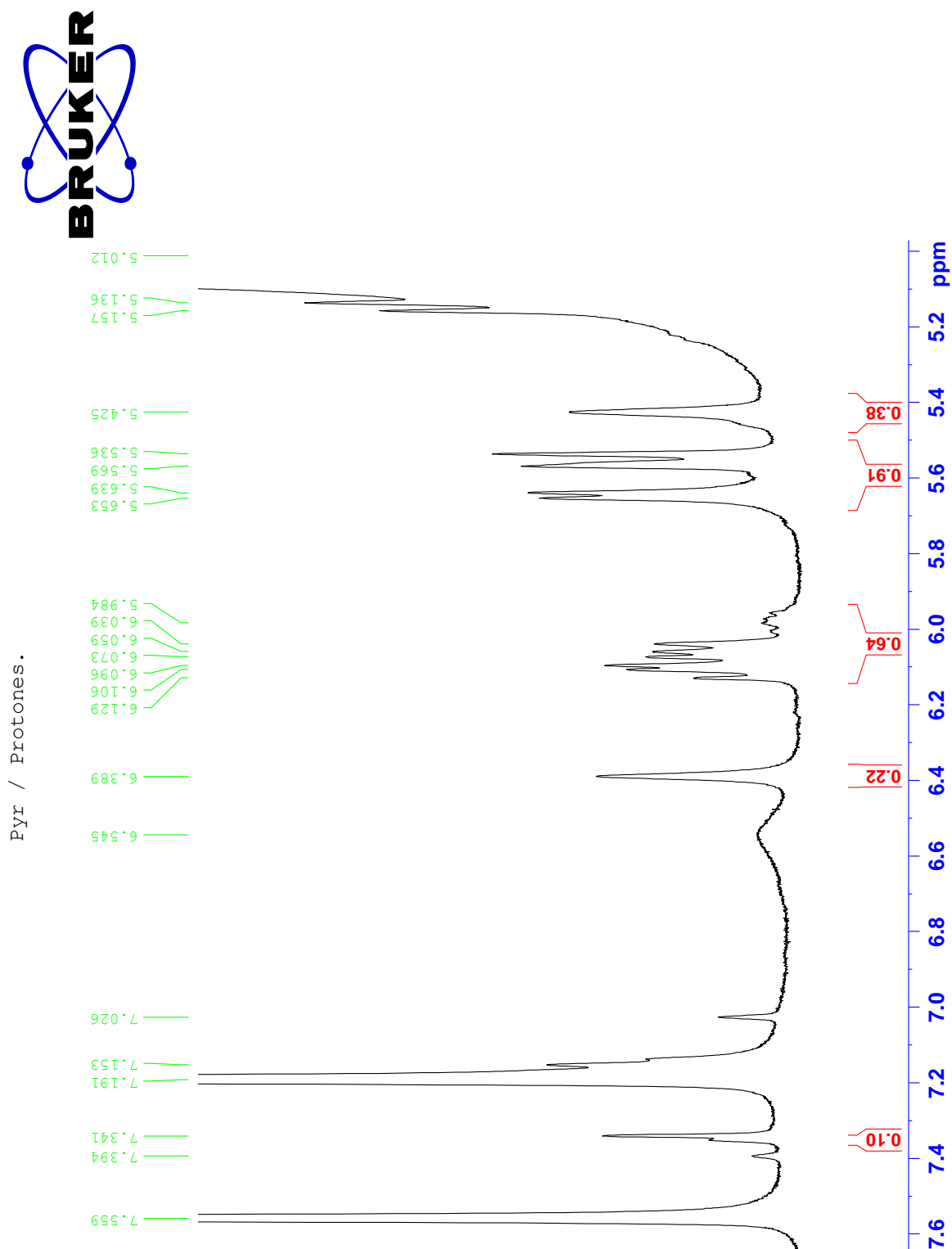


Espectro 79. Ampliación de RMN HMBC tomado en MeOD- d_4 para el compuesto F_{17E}.

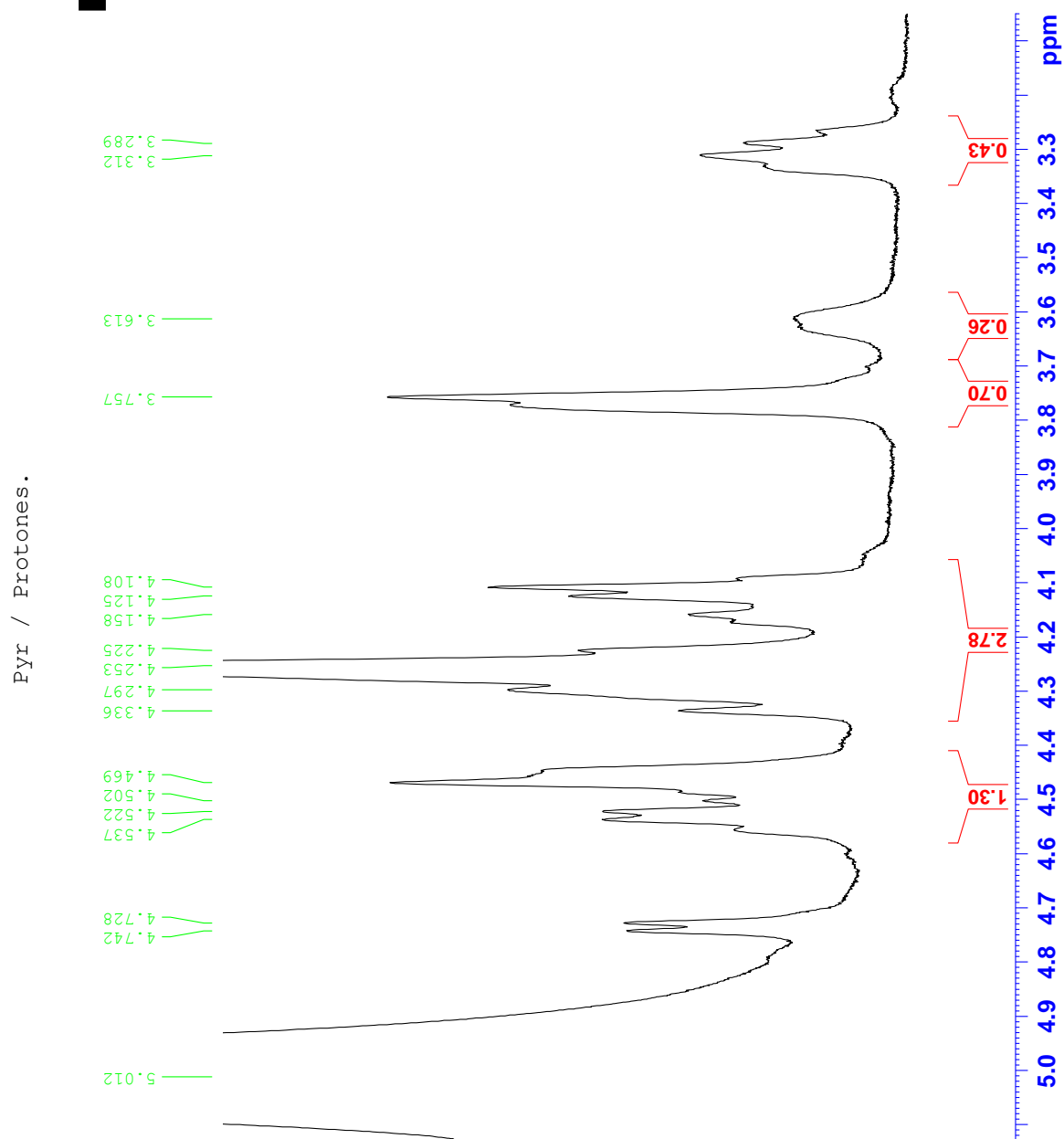
Pyr / Protones.



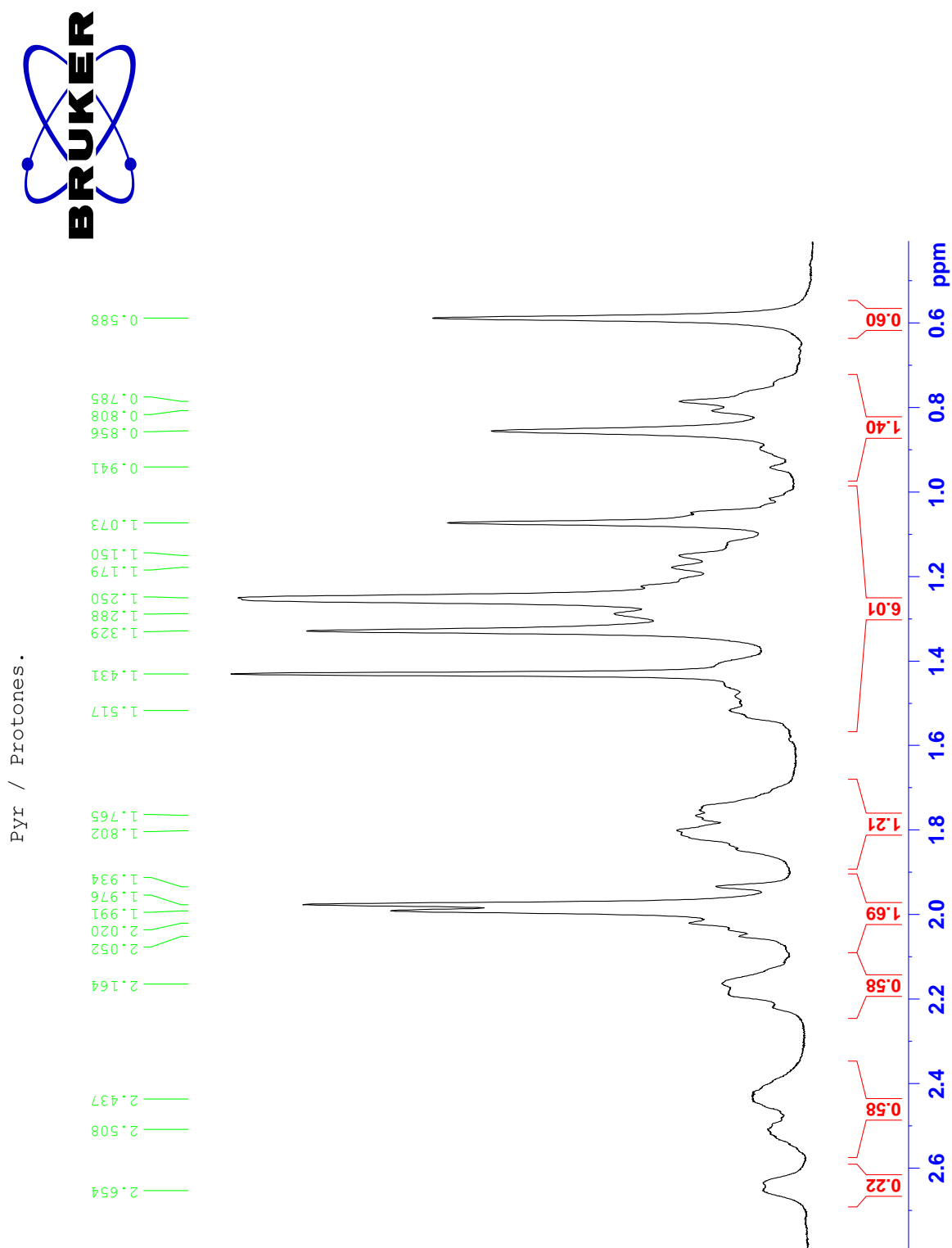
Espectro 80. RMN ¹H tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



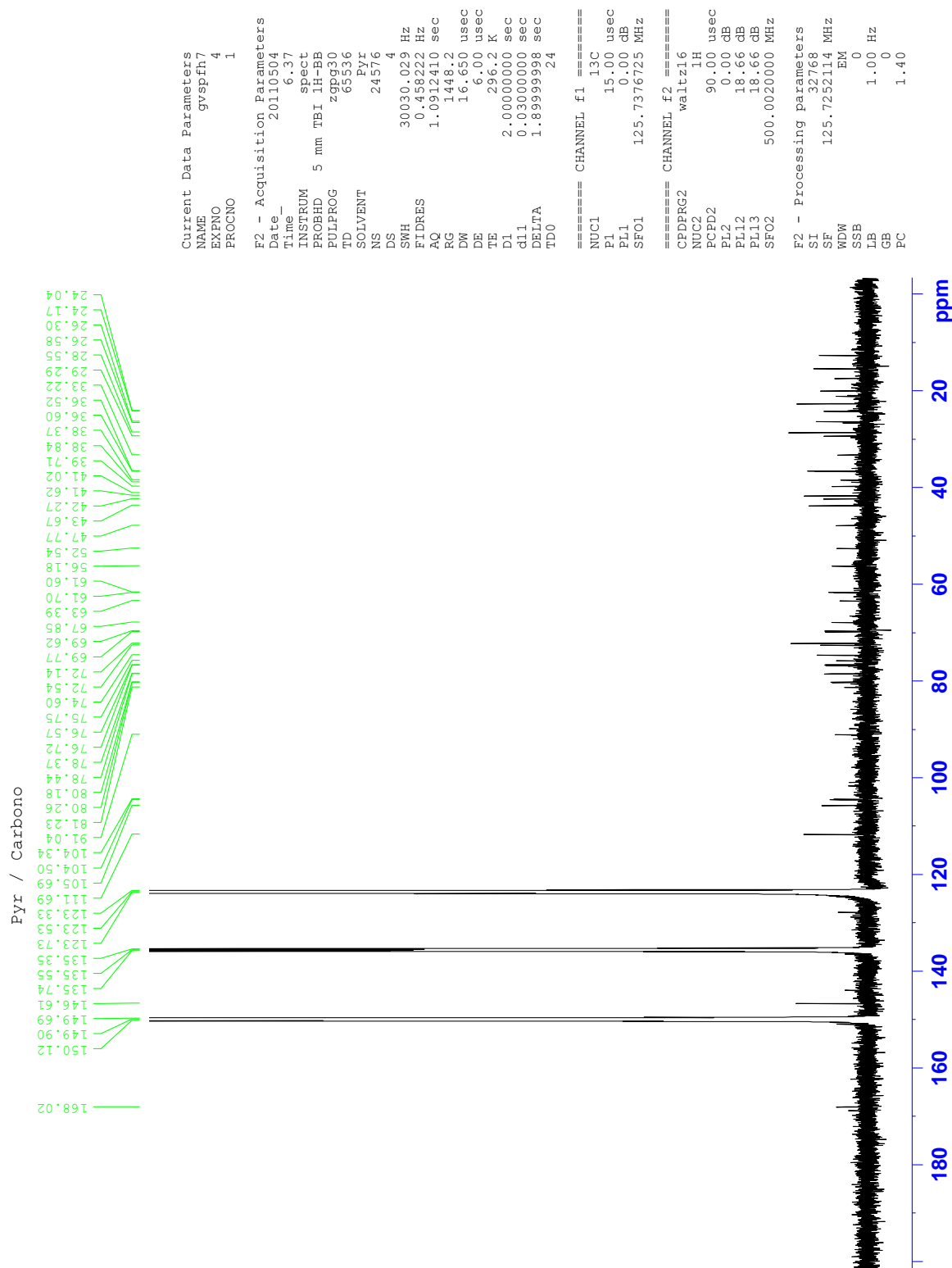
Espectro 81. Ampliación de RMN ^1H tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{ITE} .



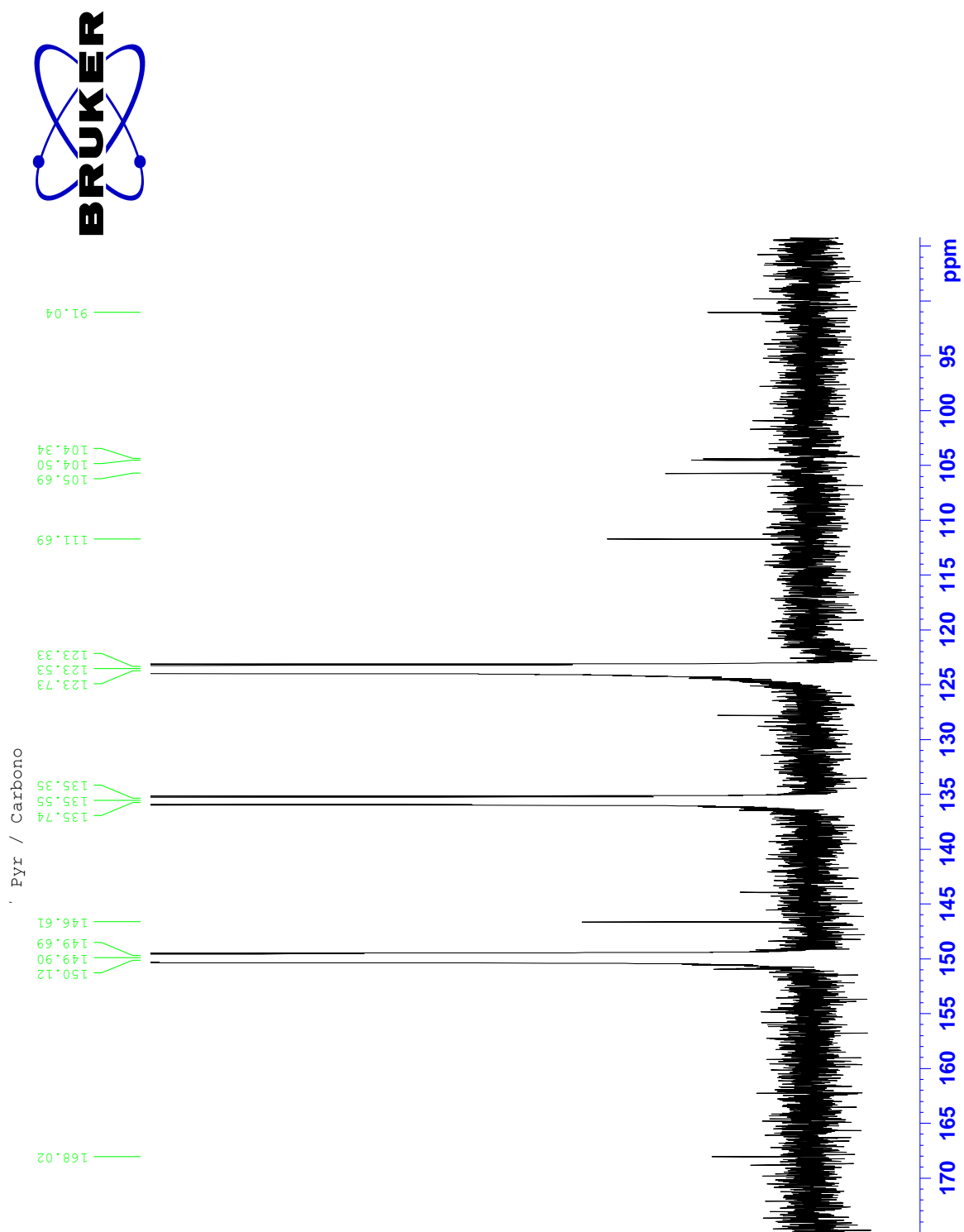
Espectro 82. Ampliación de RMN ^1H tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{ITE} .



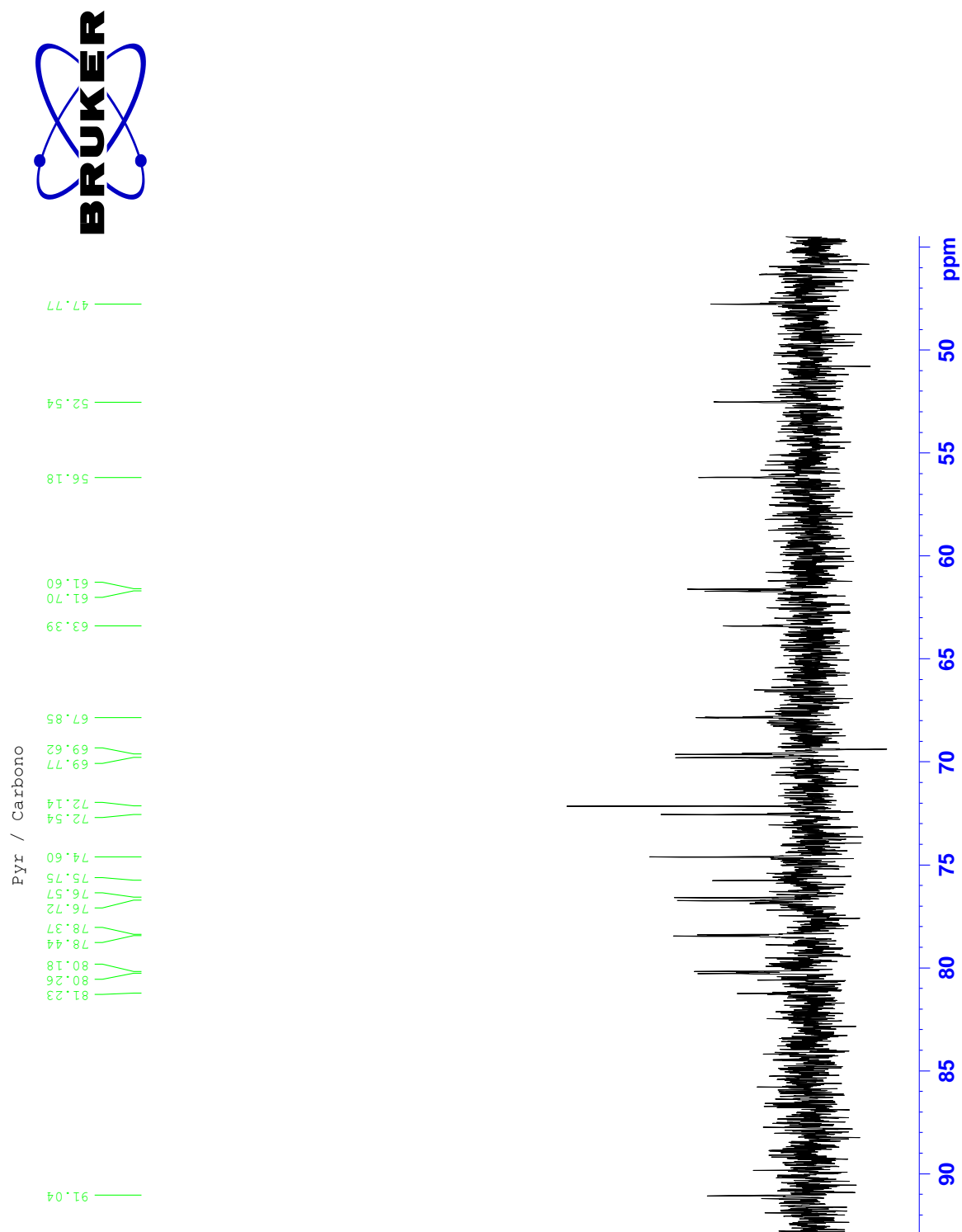
Espectro 83. Ampliación de RMN ^1H tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{7\text{E}}$.



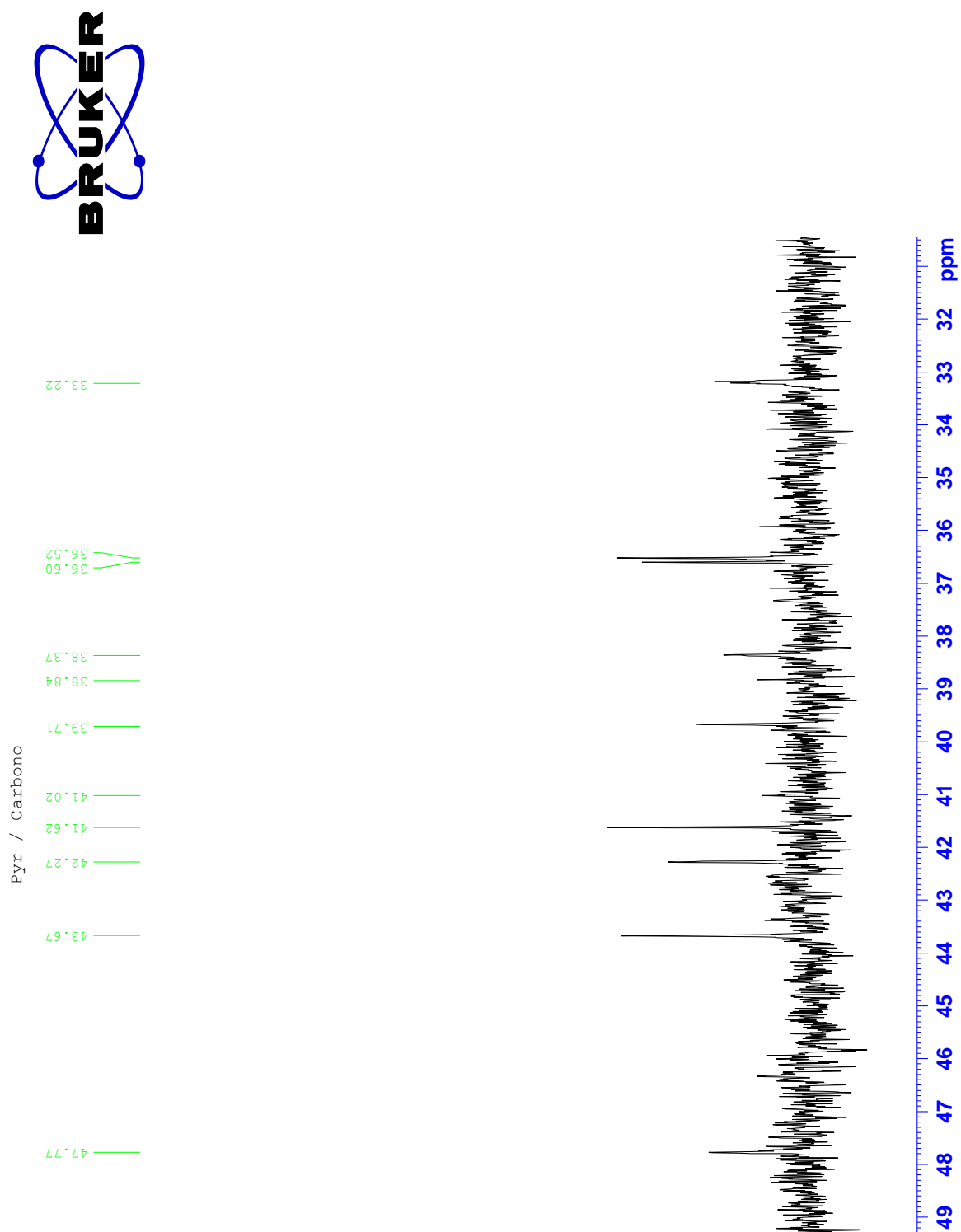
Espectro 84. RMN ^{13}C tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



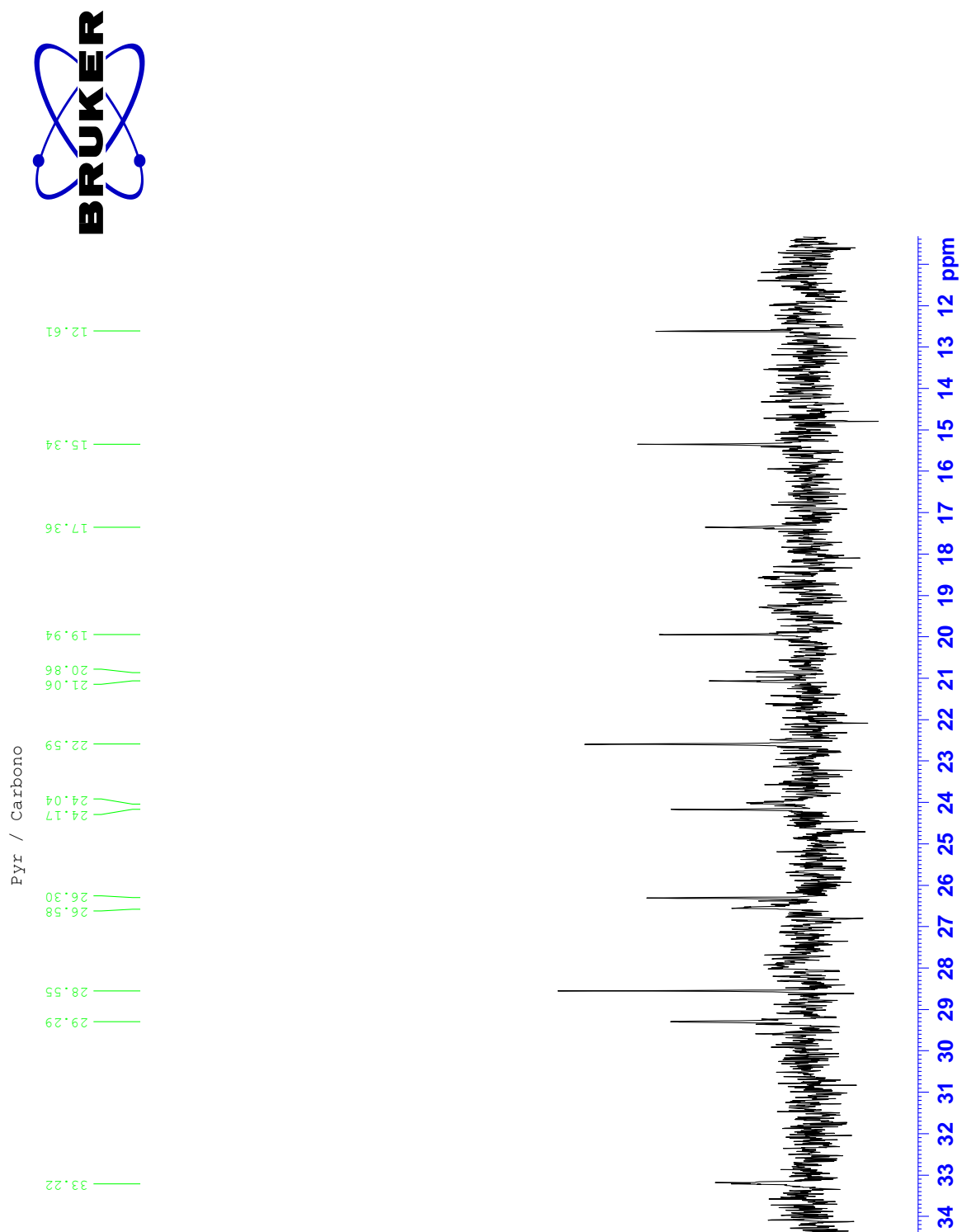
Espectro 85. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



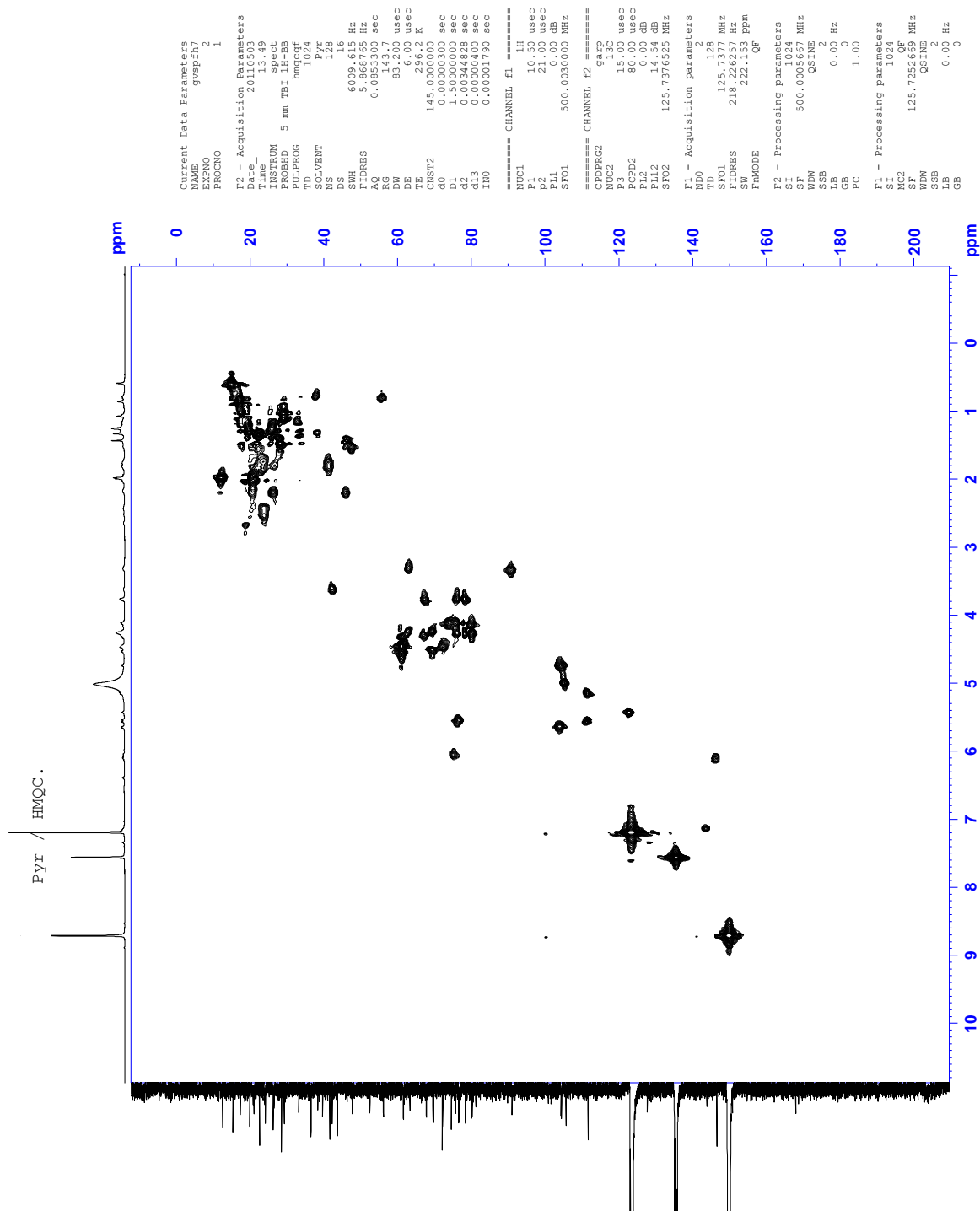
Espectro 86. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



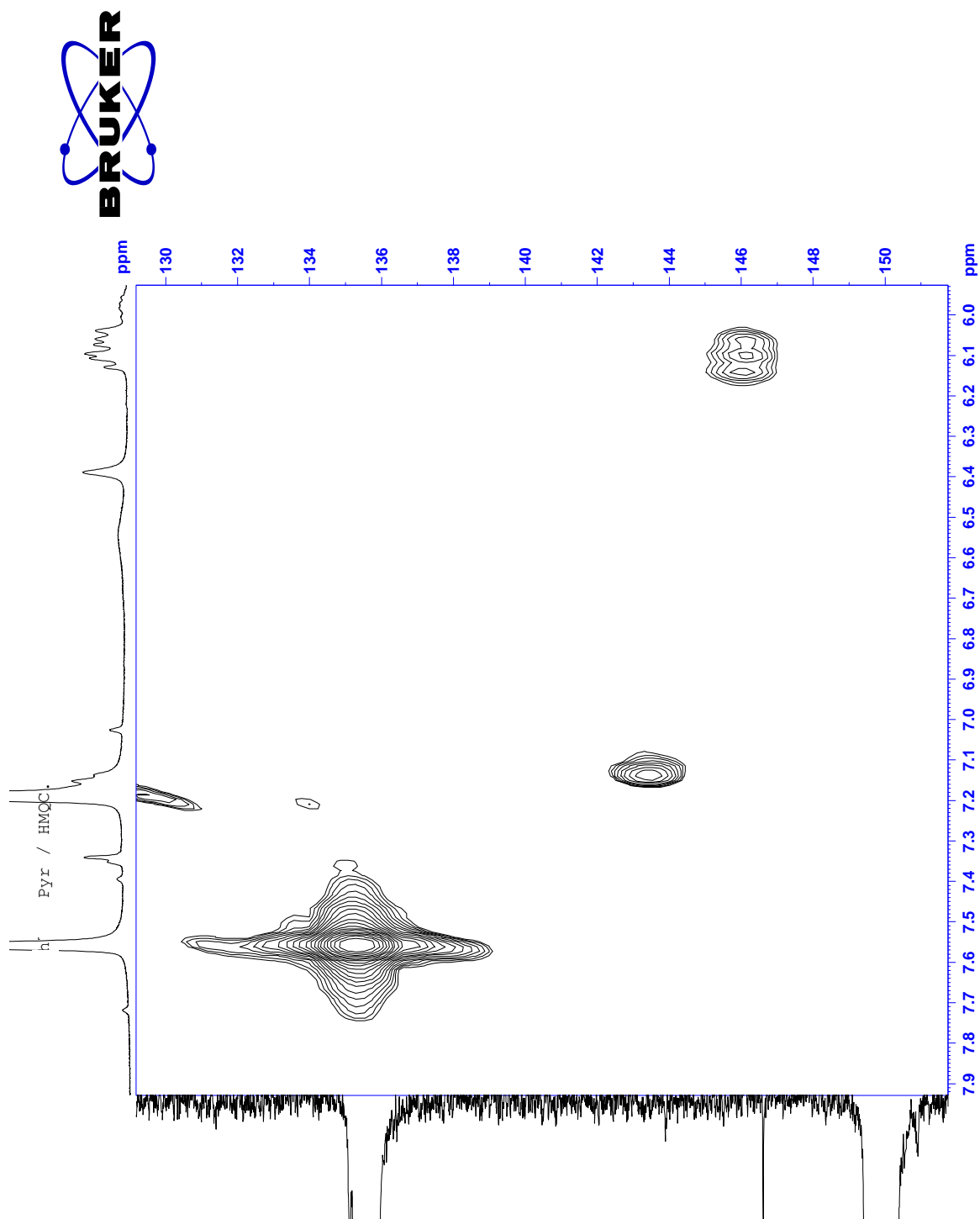
Espectro 87. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



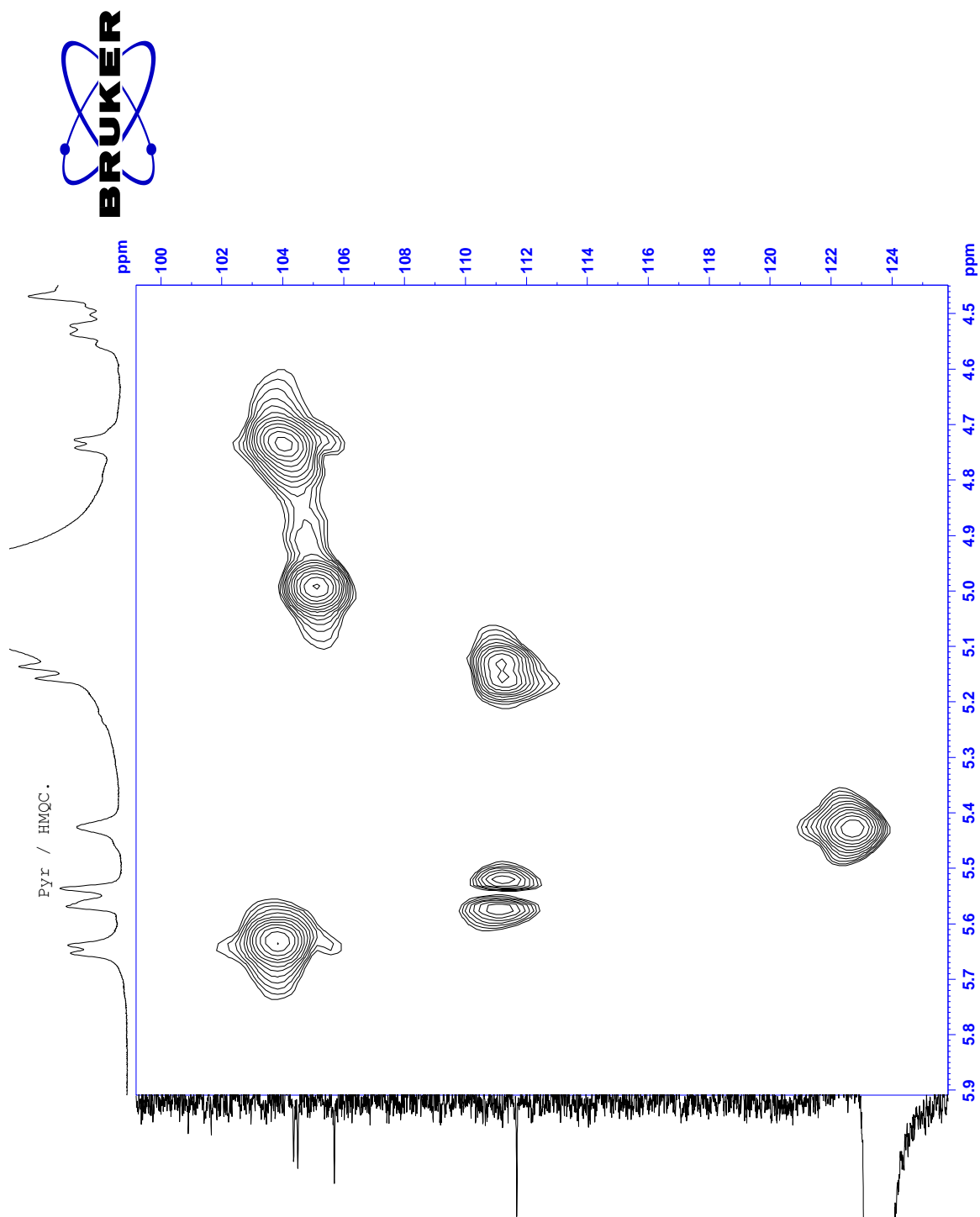
Espectro 88. Ampliación de RMN ^{13}C tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



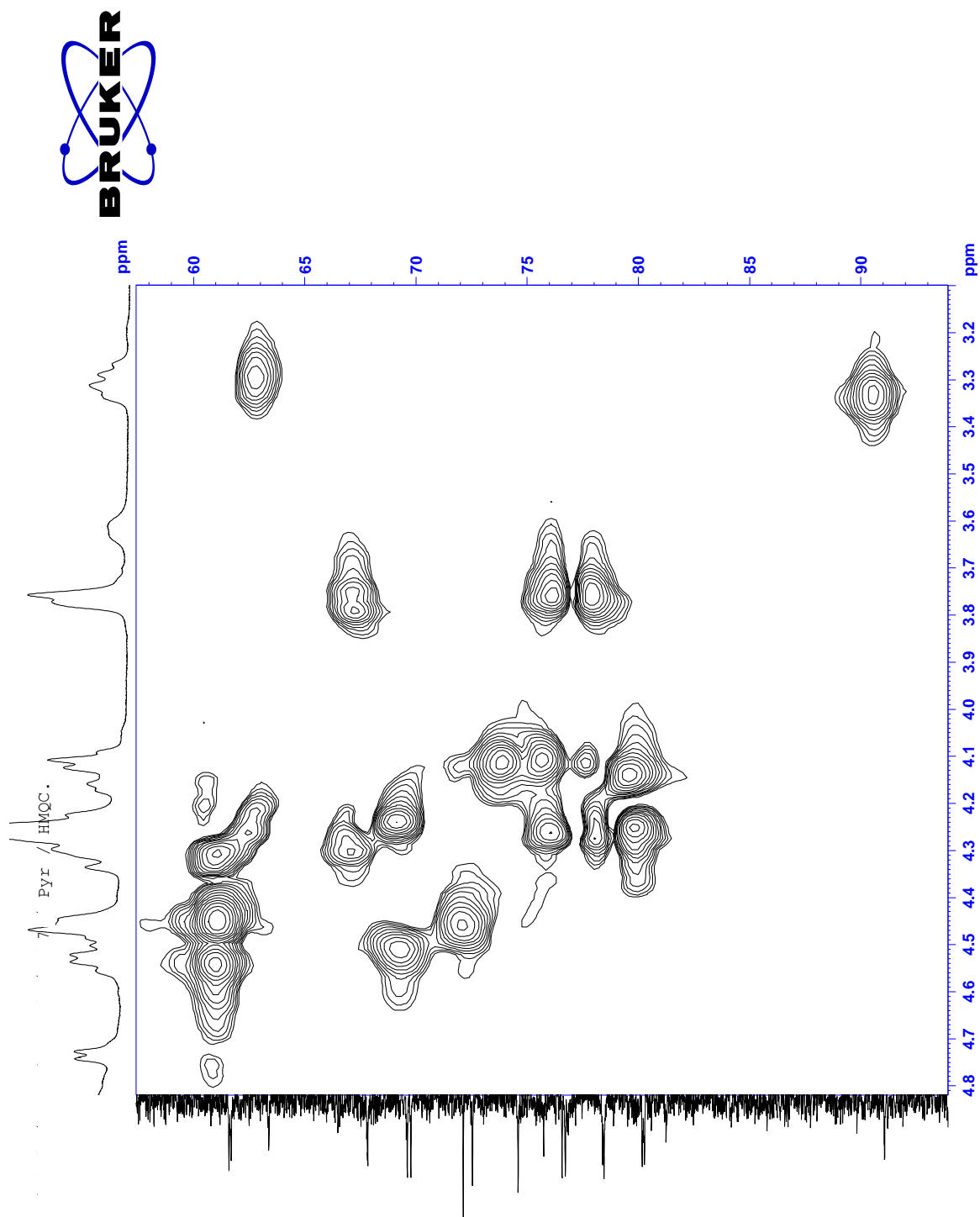
Espectro 89. RMN HMQC tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



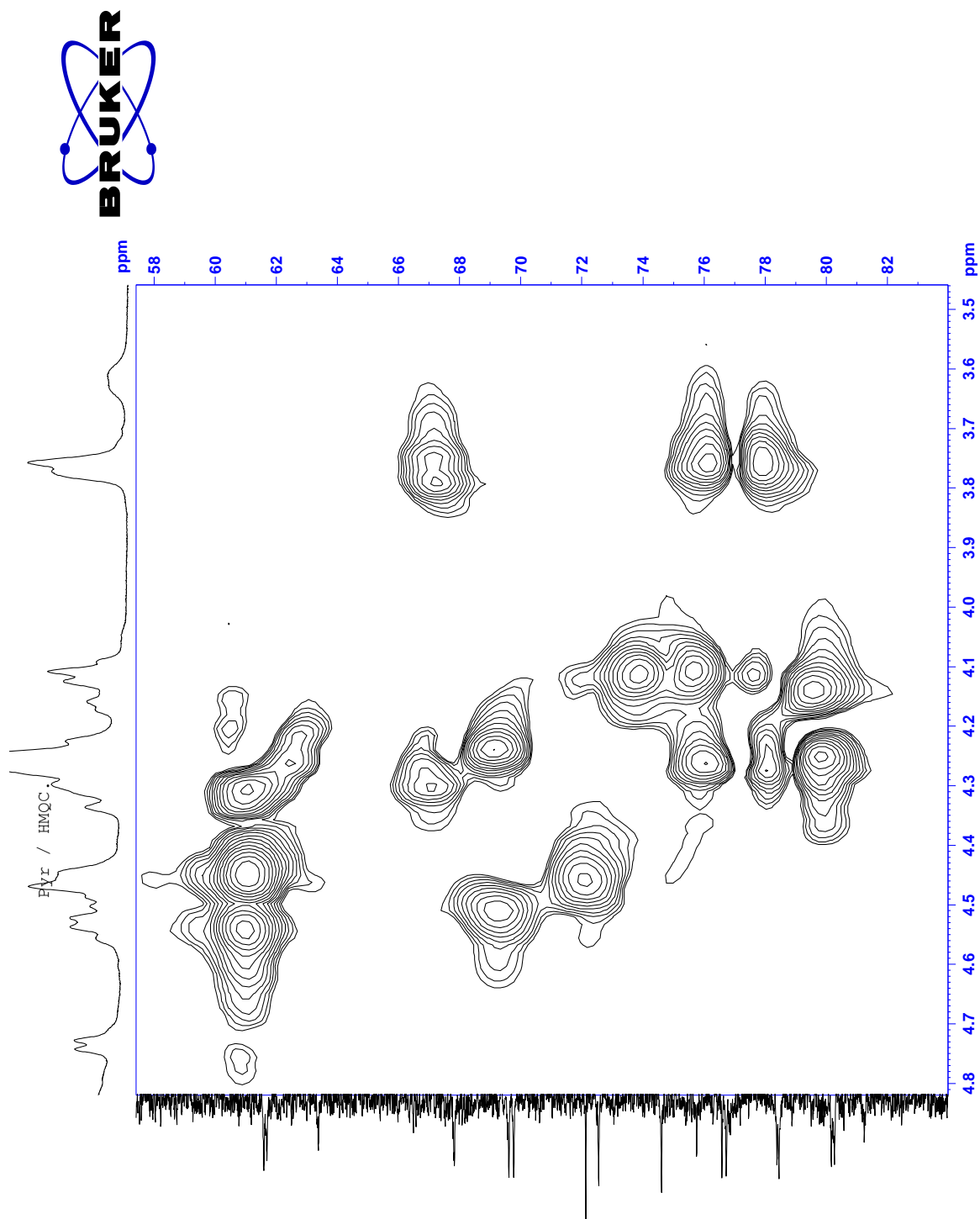
Espectro 90. Ampliación de RMN HMQC tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



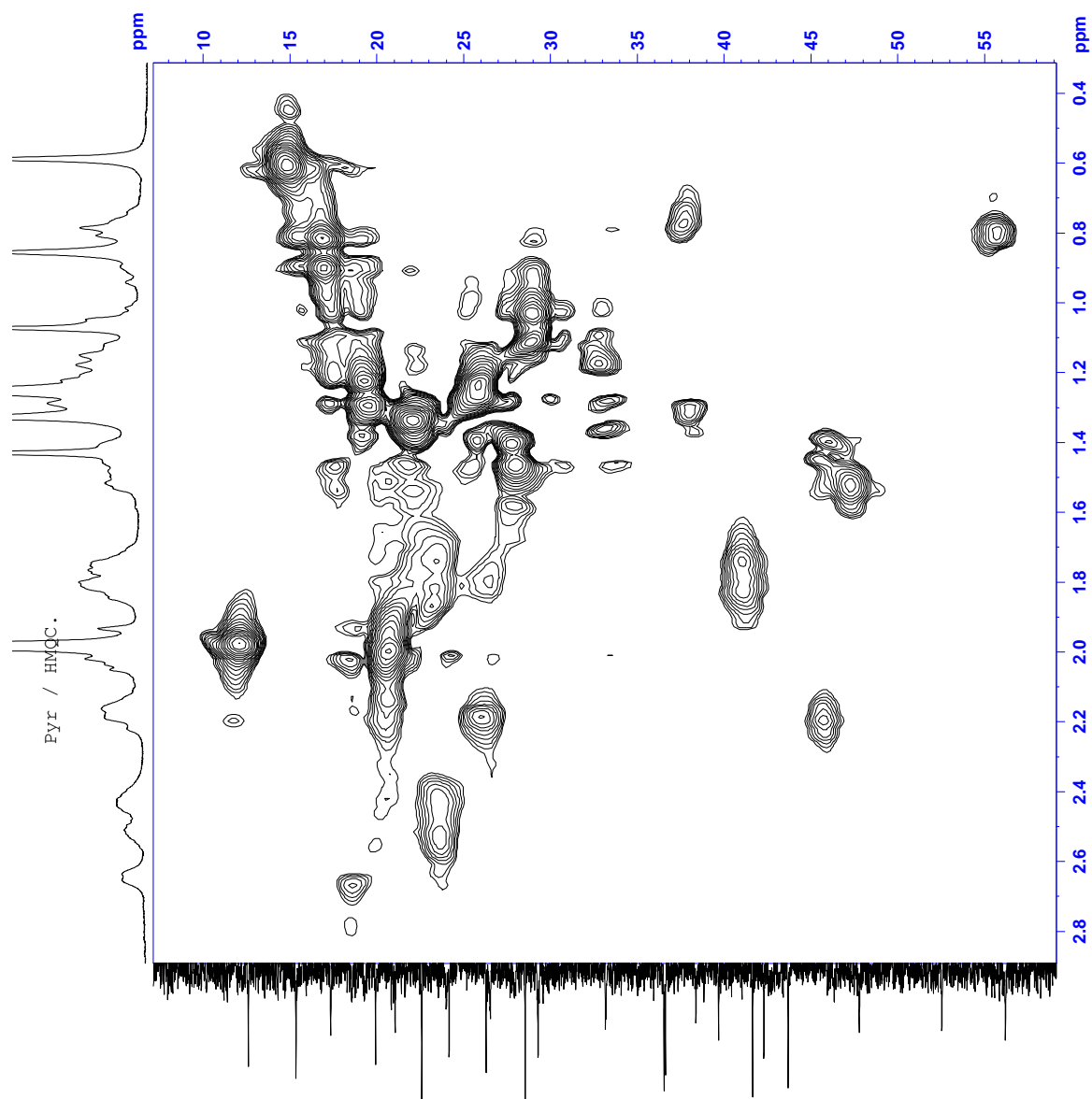
Espectro 91. Ampliación de RMN HMQC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E} .



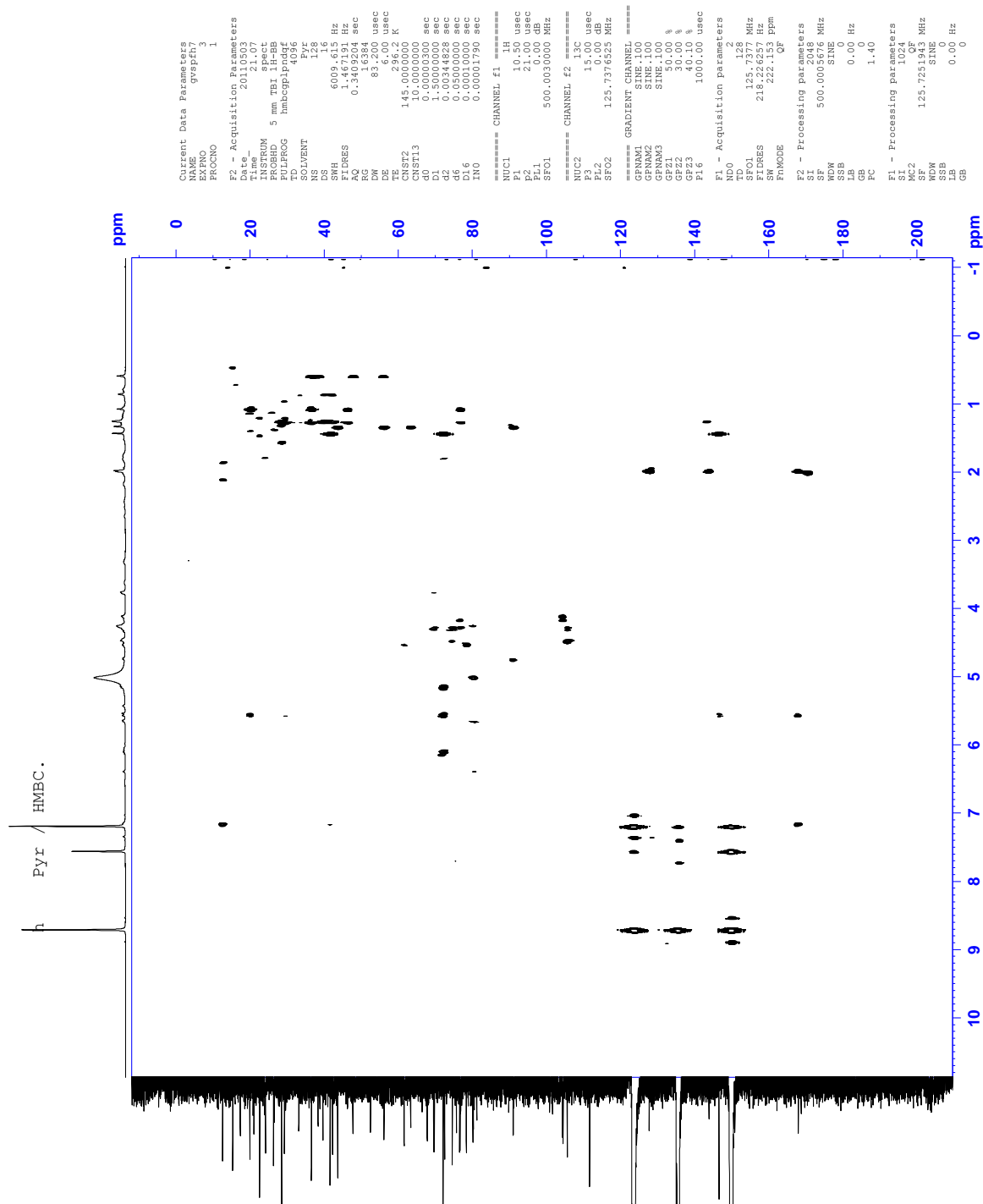
Espectro 92. Ampliación de RMN HMQC tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



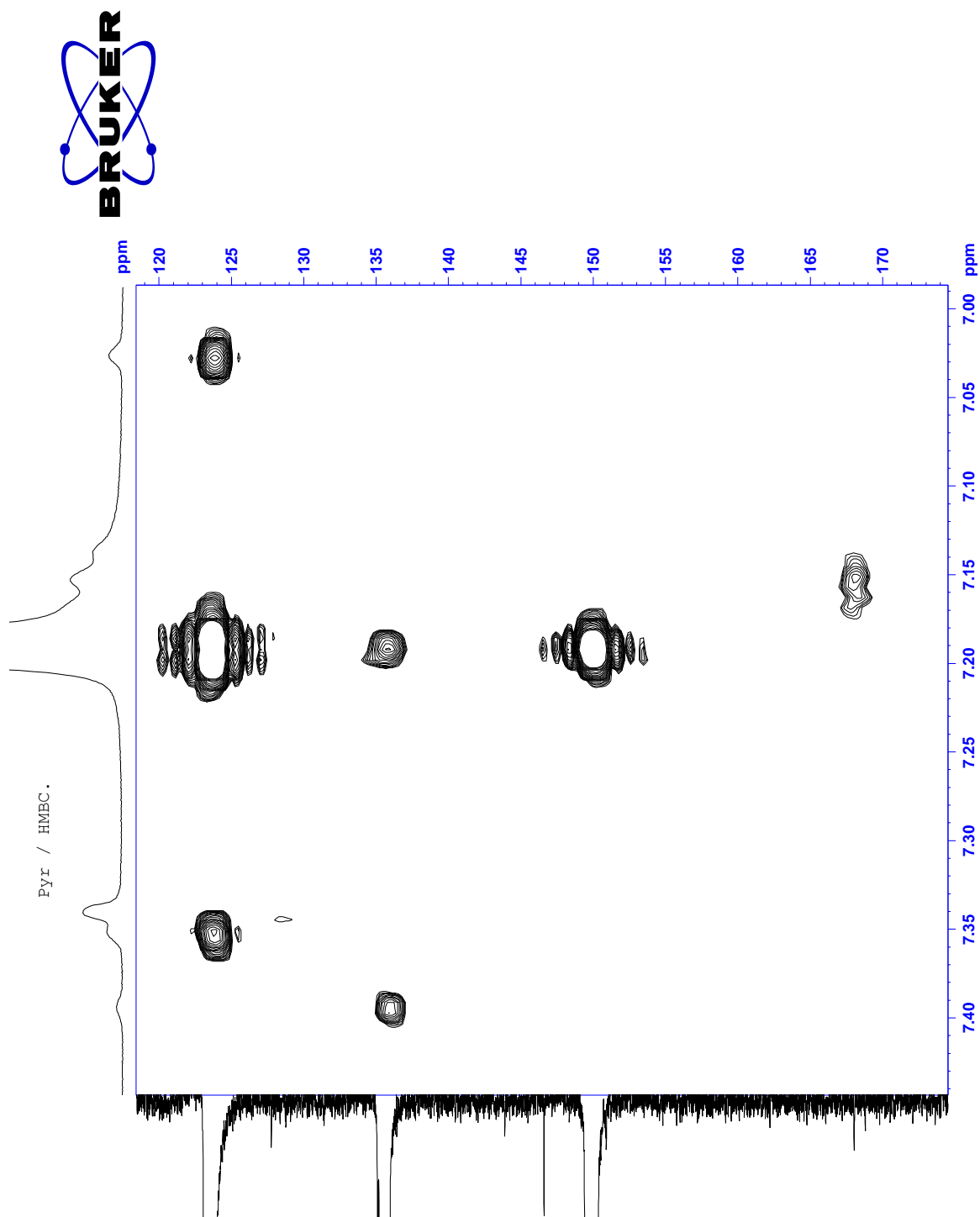
Espectro 93. Ampliación de RMN HMQC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



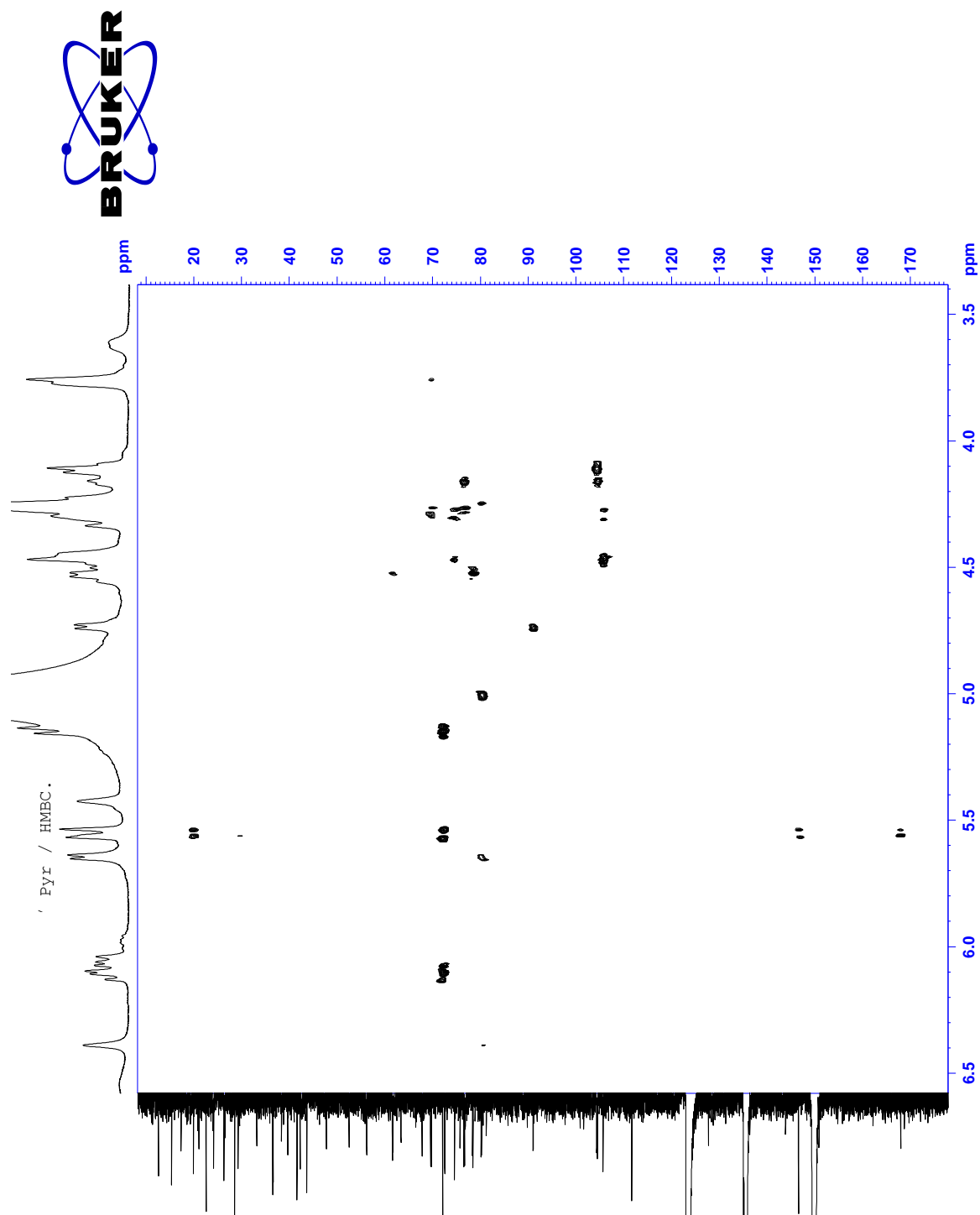
Espectro 94. Ampliación de RMN HMQC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



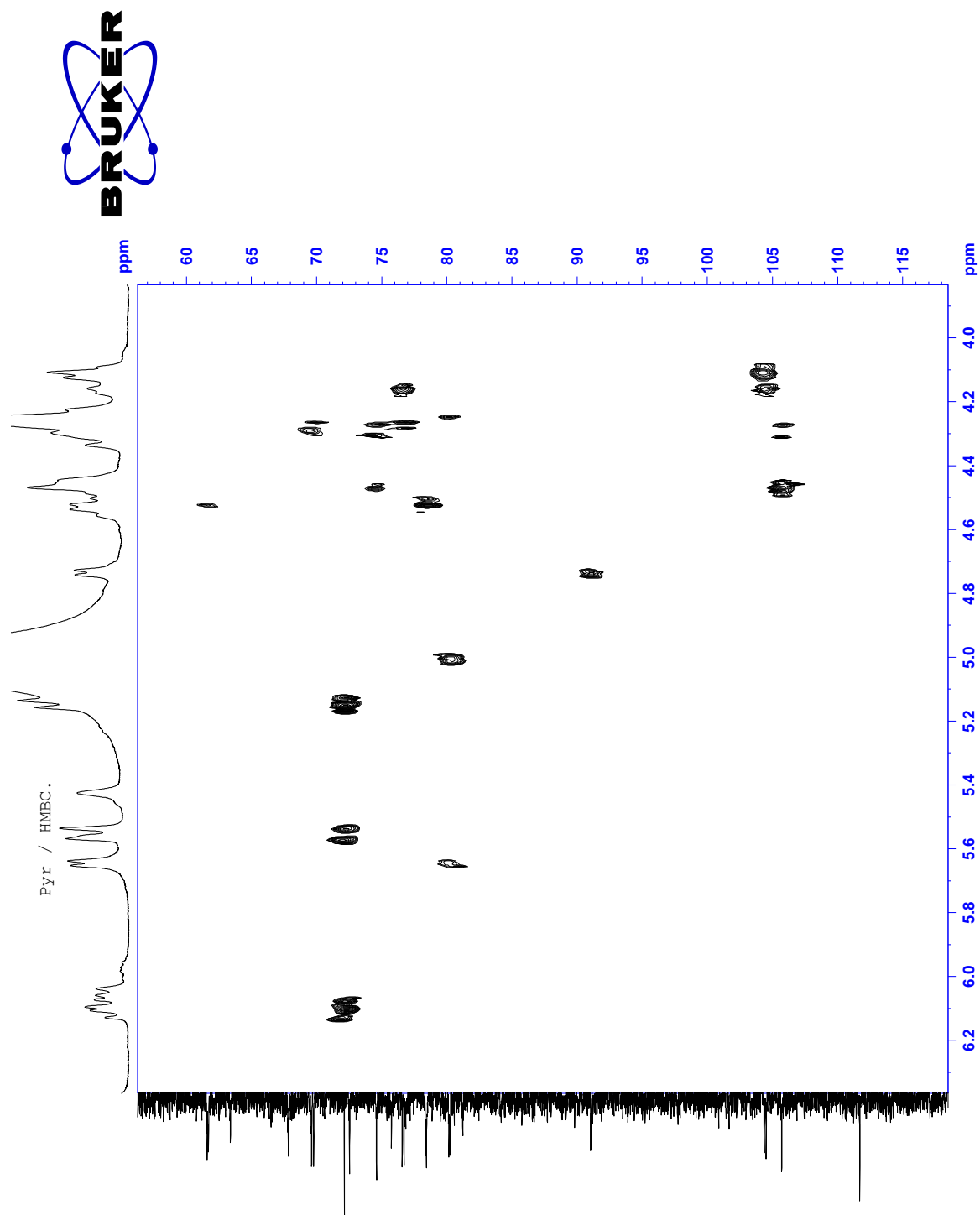
Espectro 95. RMN HMBC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



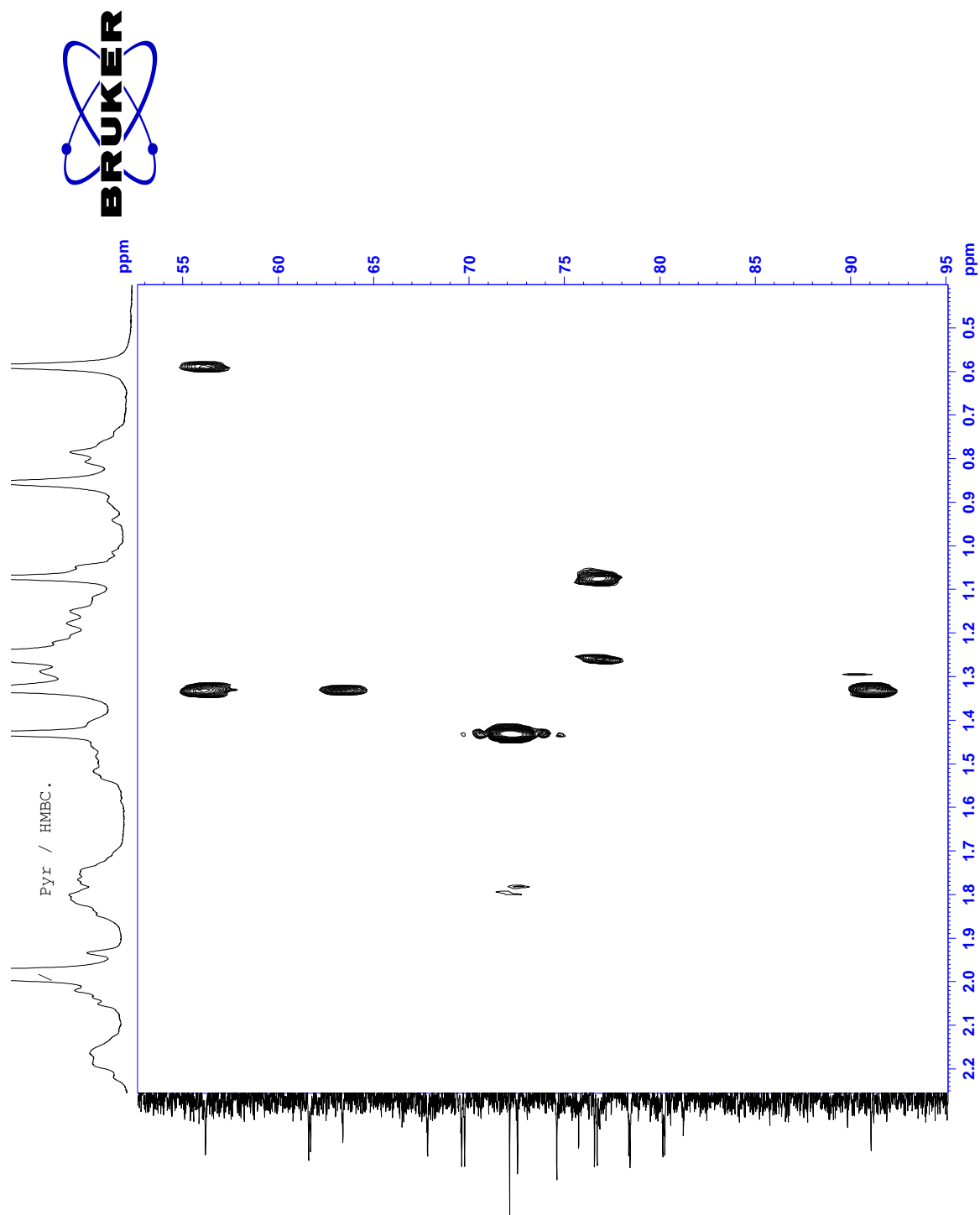
Espectro 96. Ampliación de RMN HMBC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



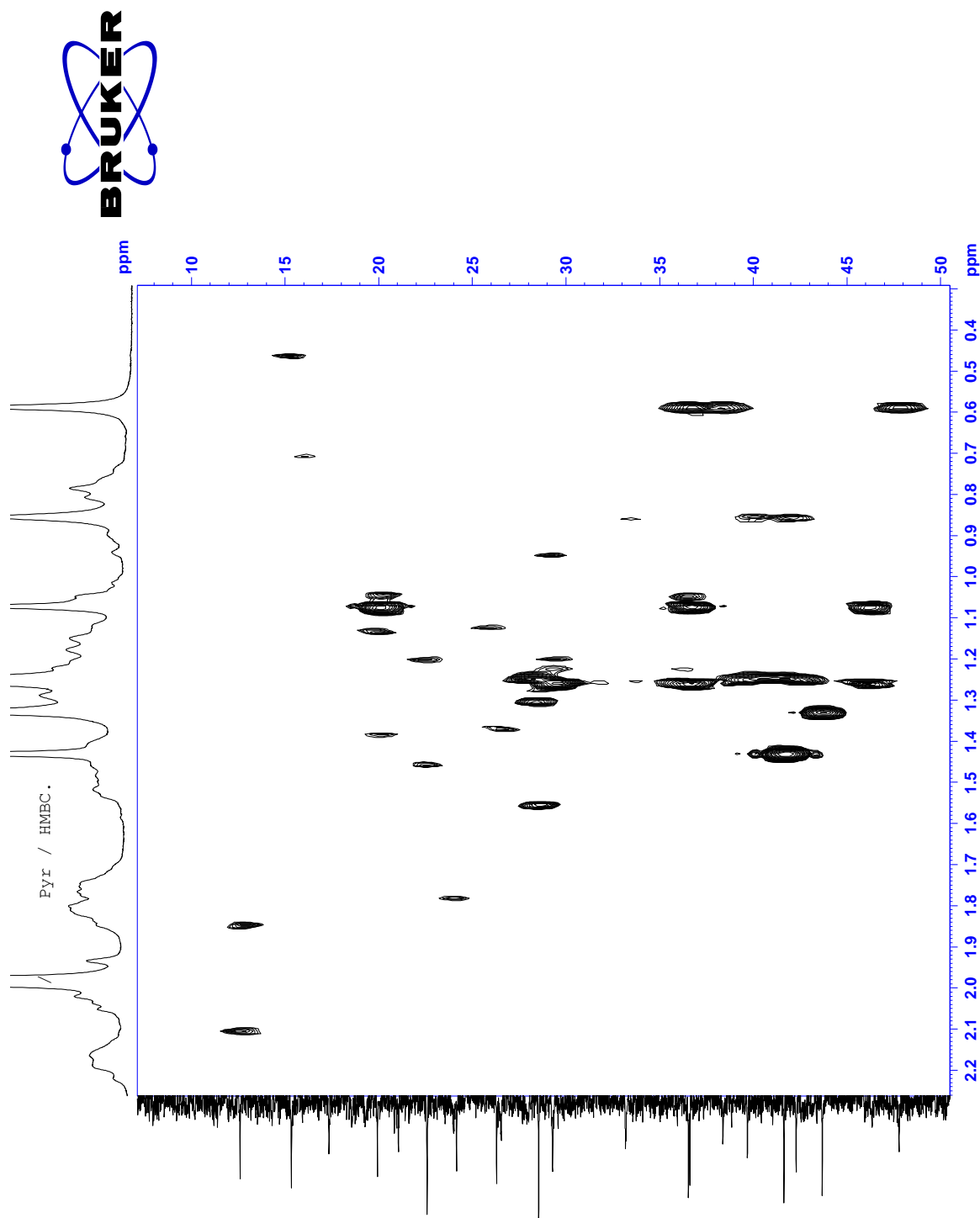
Espectro 97. Ampliación de RMN HMBC tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



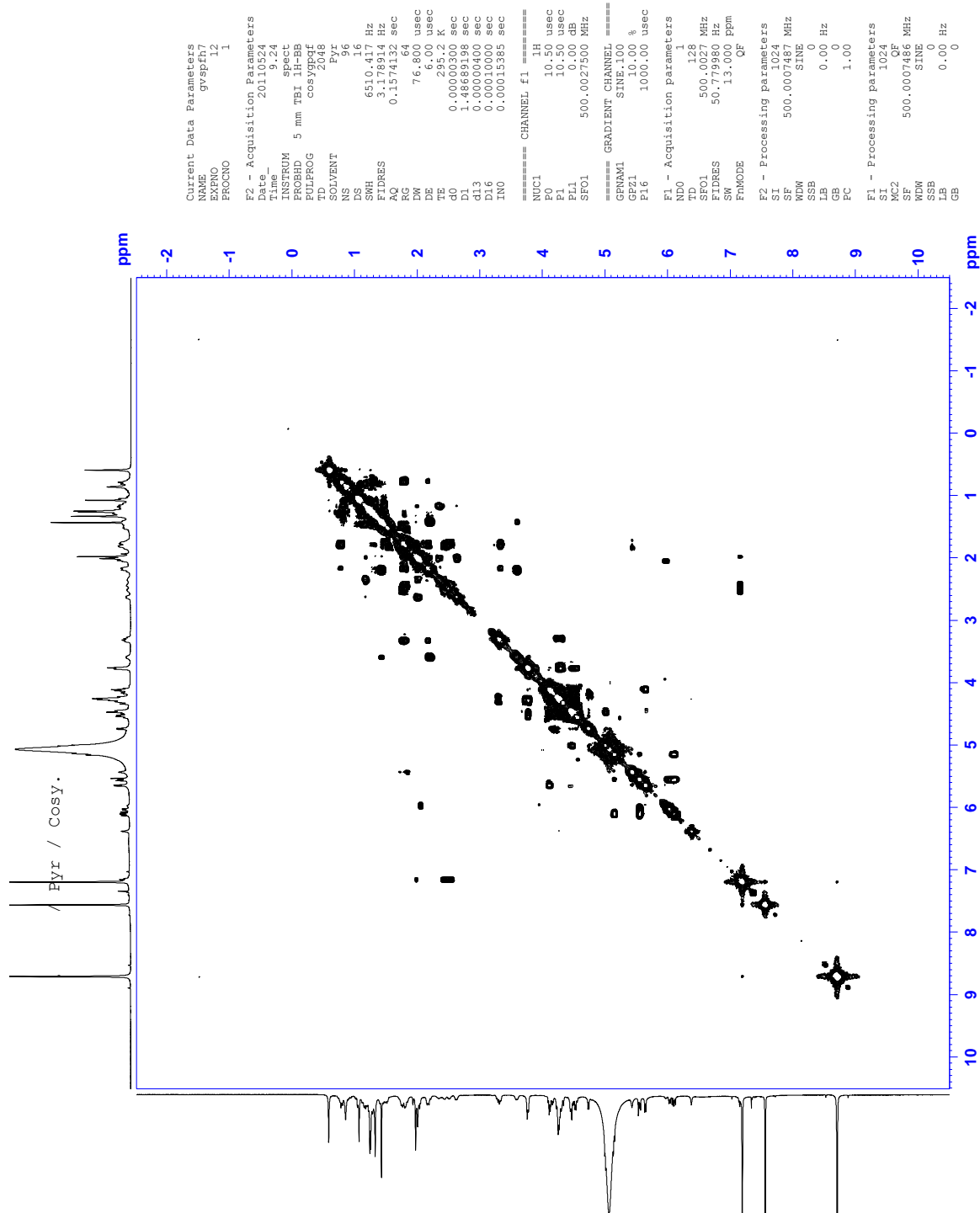
Espectro 98. Ampliación de RMN HMBC tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



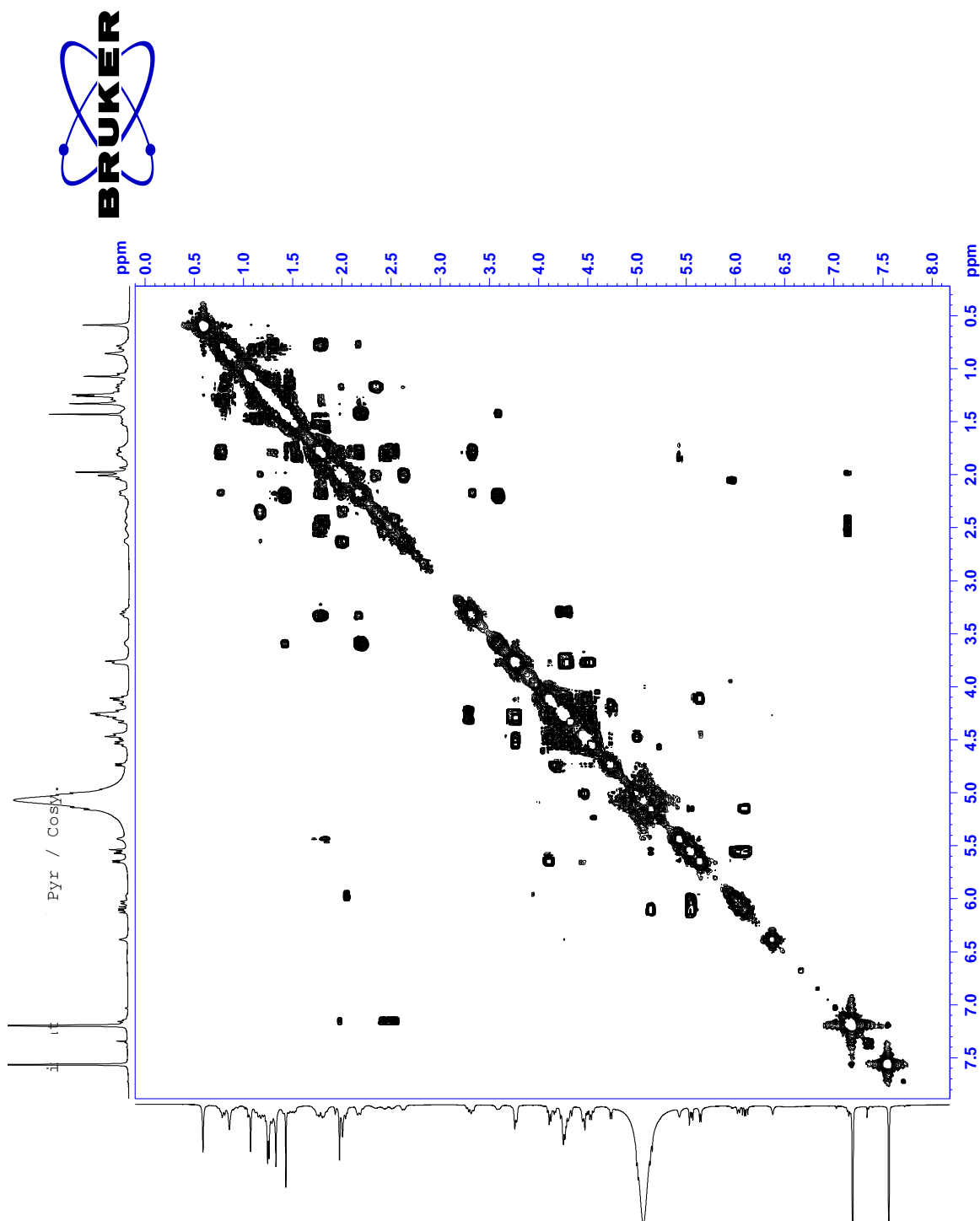
Espectro 99. Ampliación de RMN HMBC tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



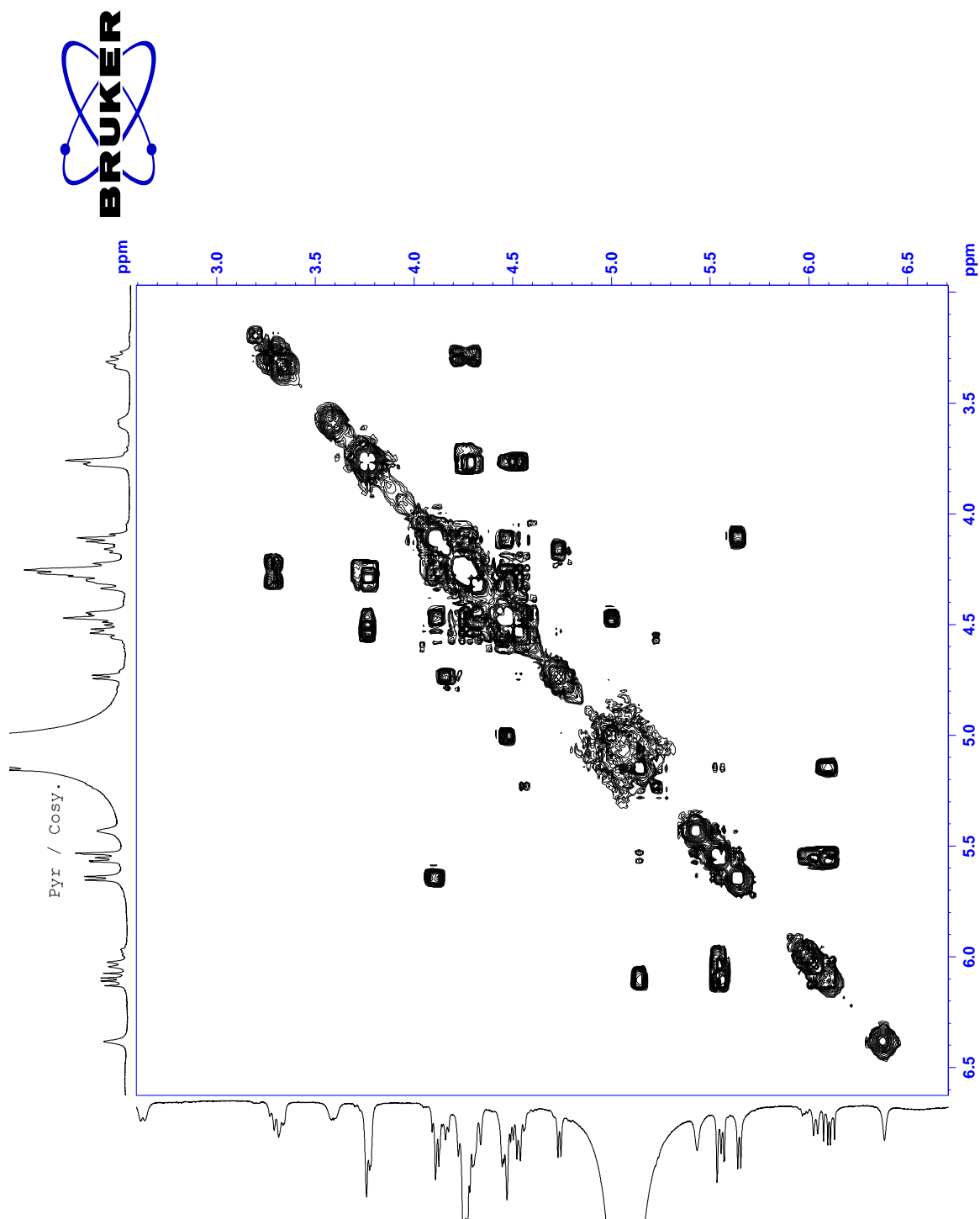
Espectro 100. Ampliación de RMN HMBC tomado en piridina- d_5 para el compuesto $\text{F}_{17\text{E}}$.



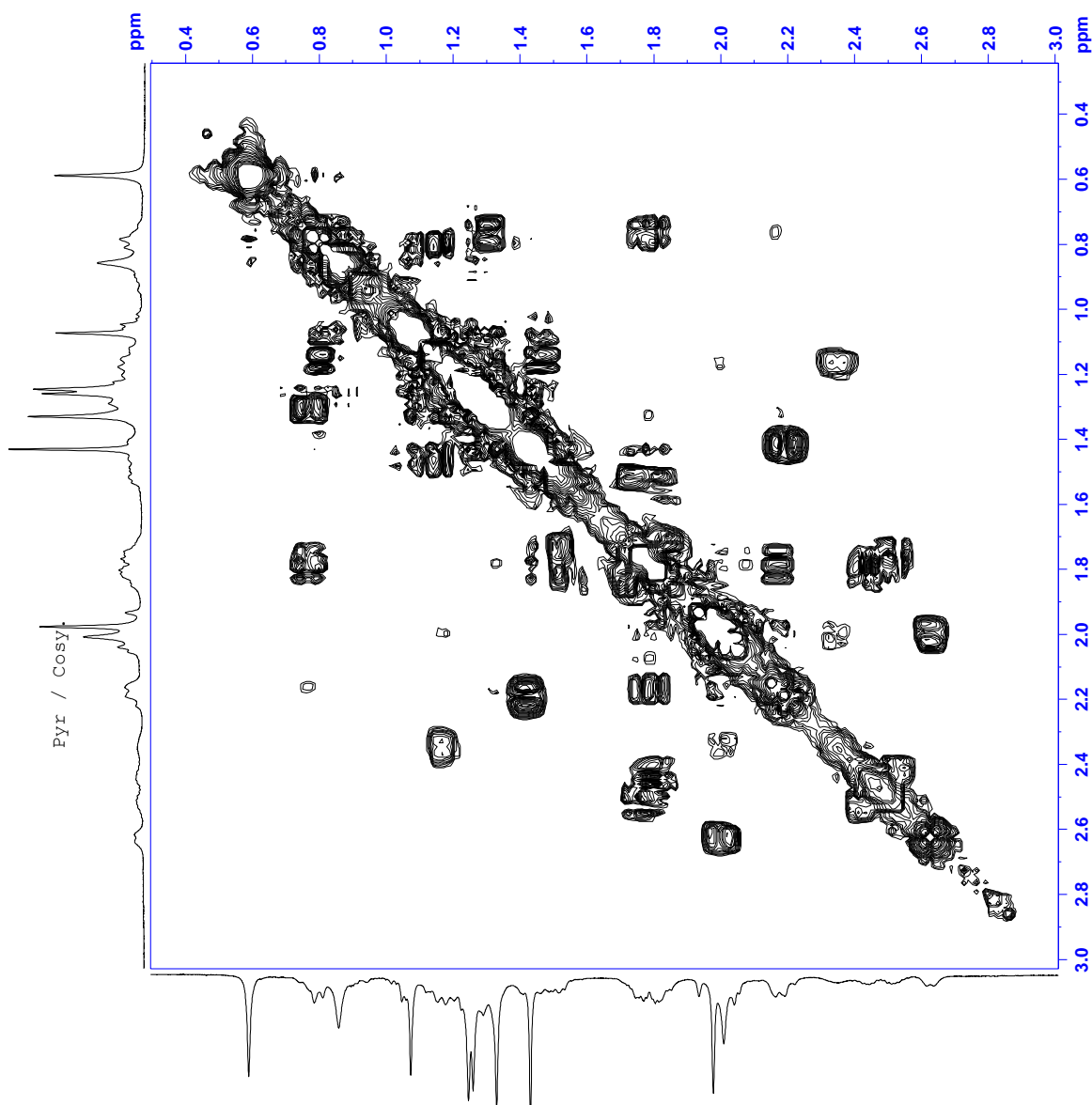
Espectro 101. RMN COSY tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



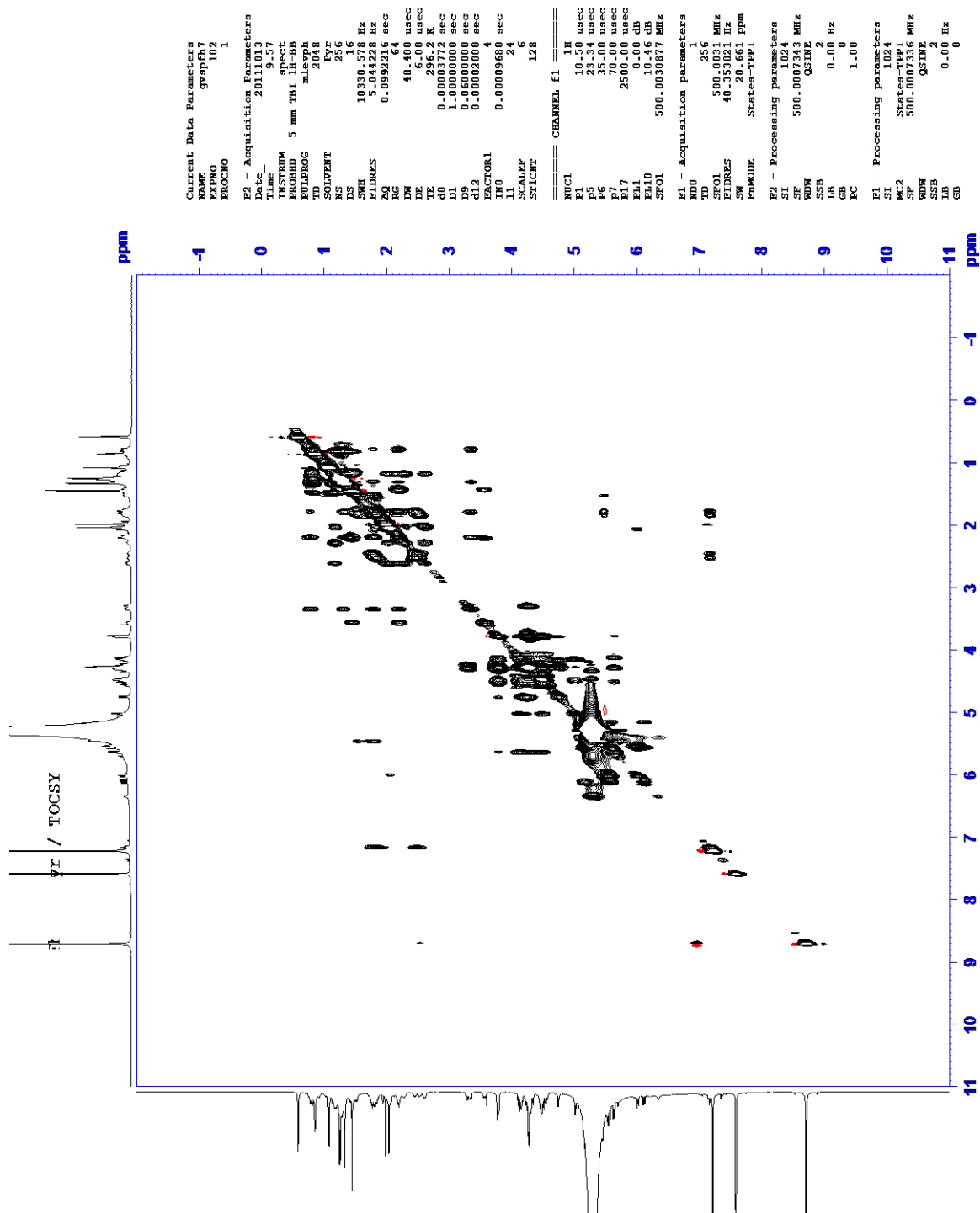
Espectro 102. Ampliación de RMN COSY tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



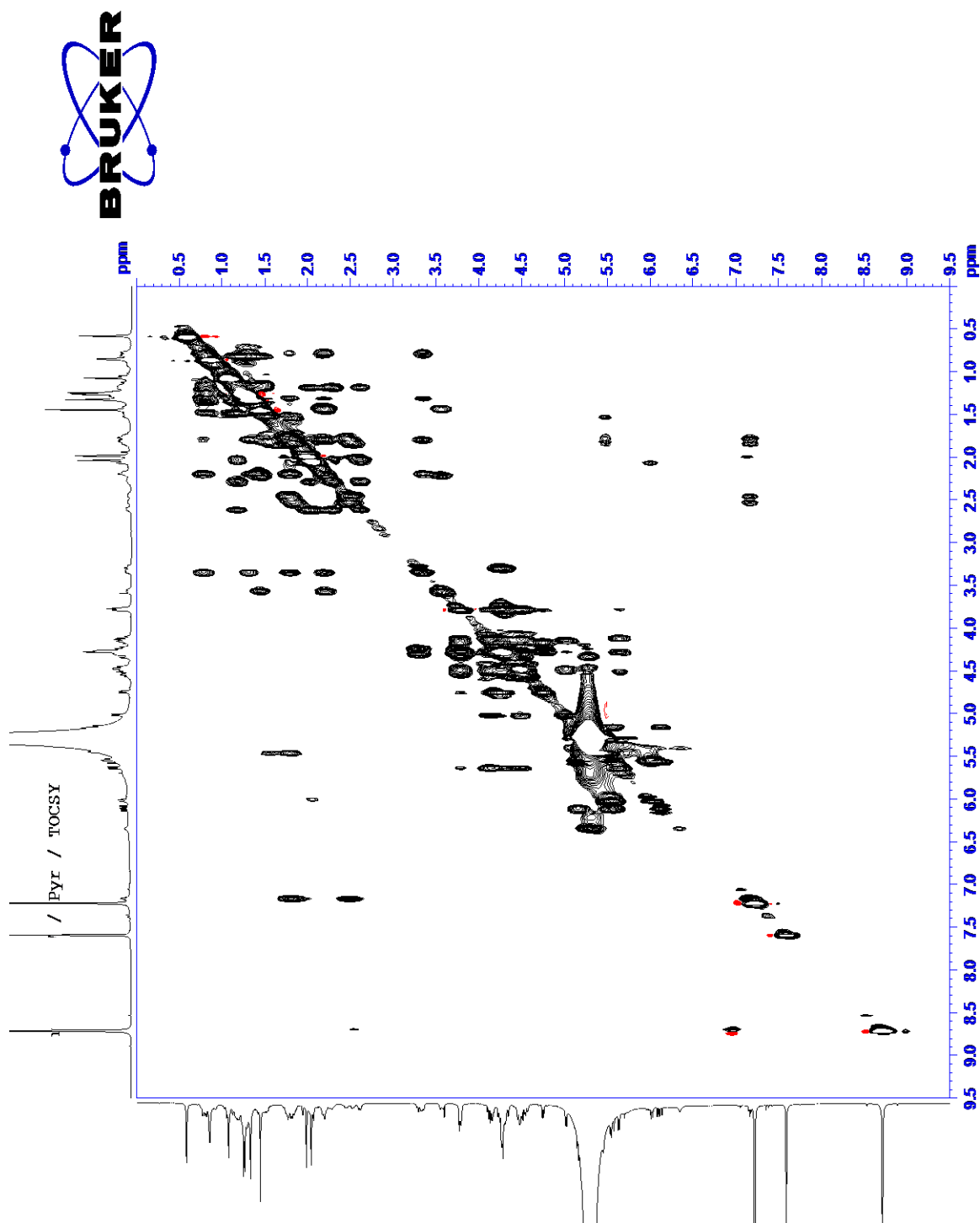
Espectro 103. Ampliación de RMN COSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



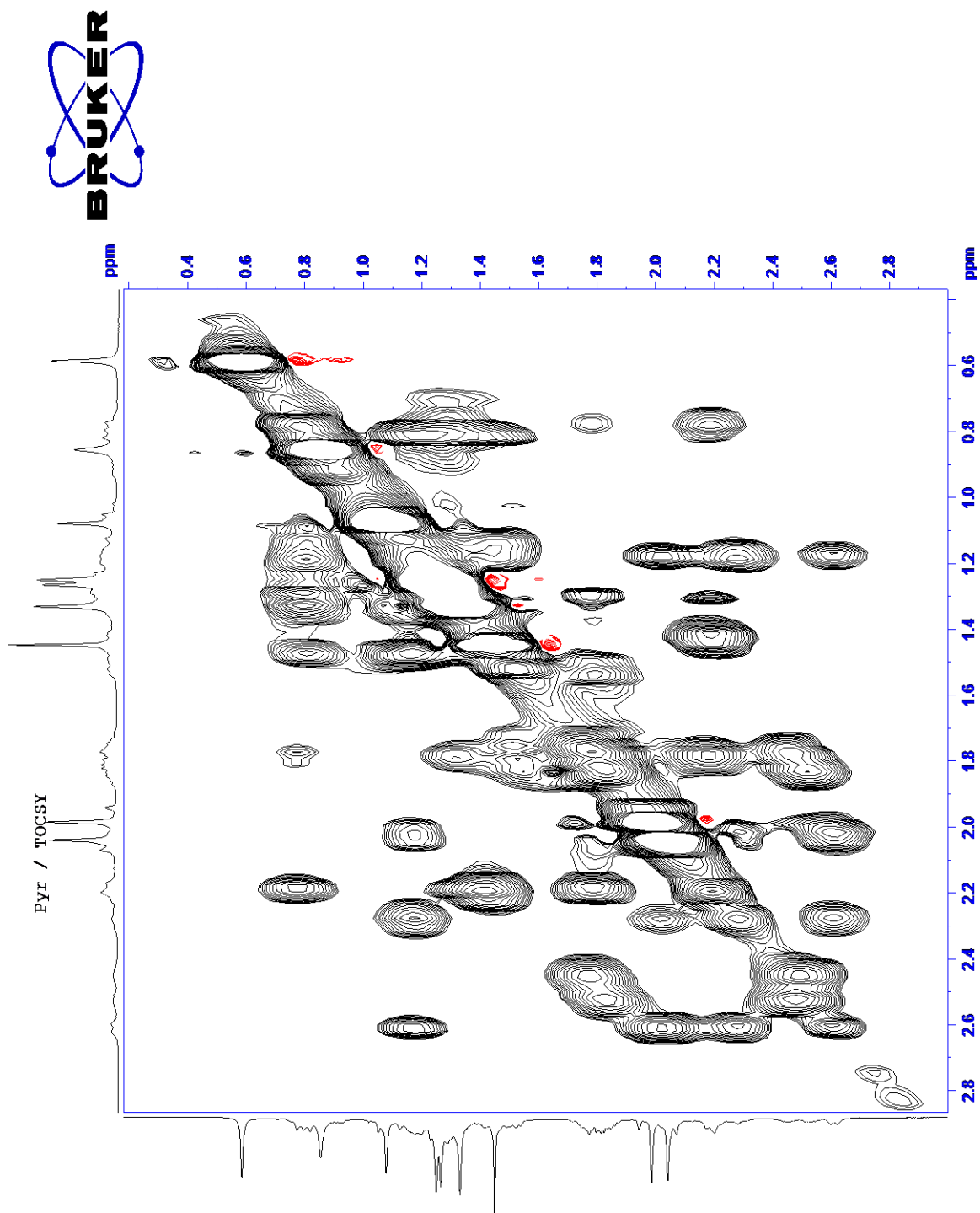
Espectro 104. Ampliación de RMN COSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



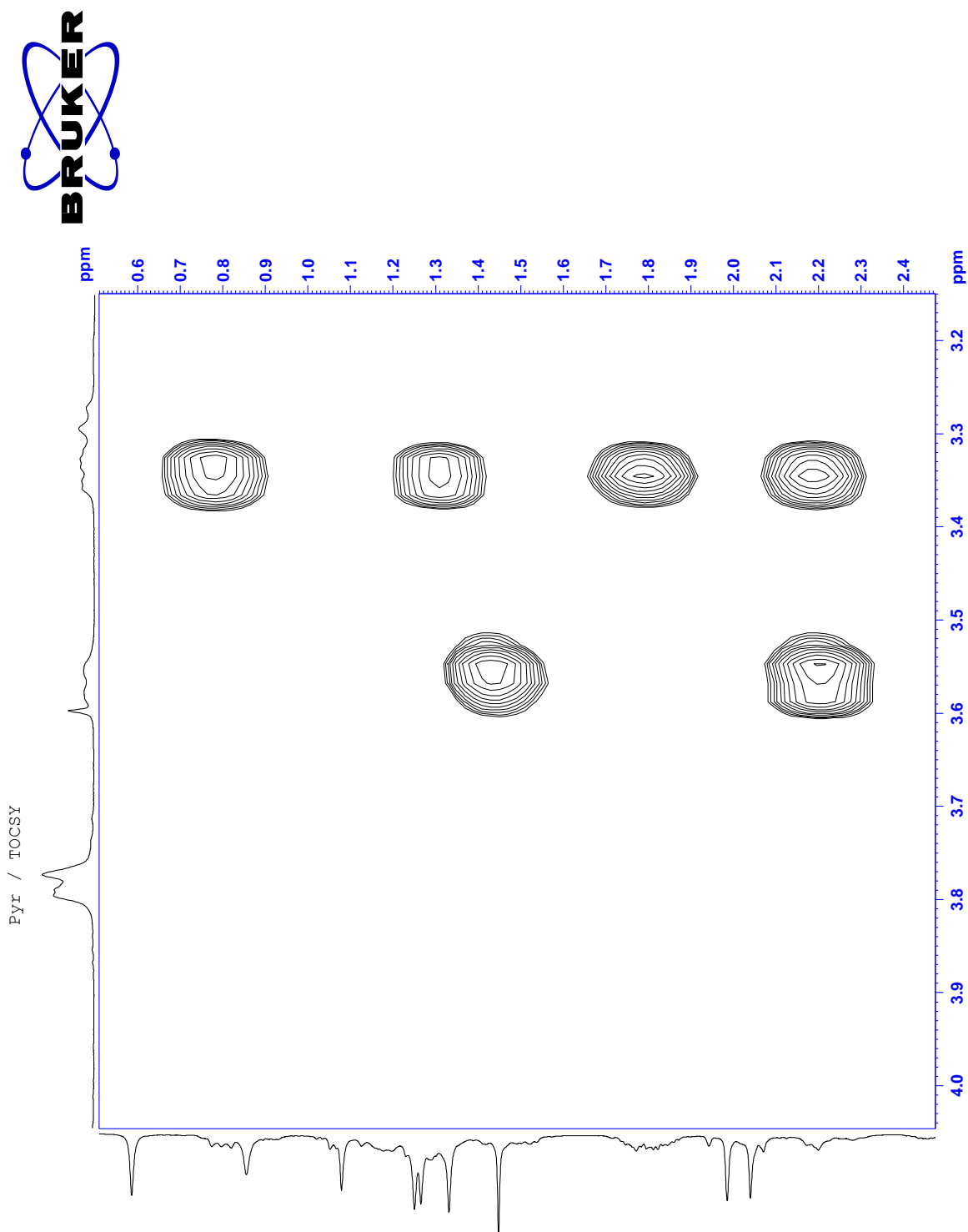
Espectro 105. RMN TOCSY tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E} .



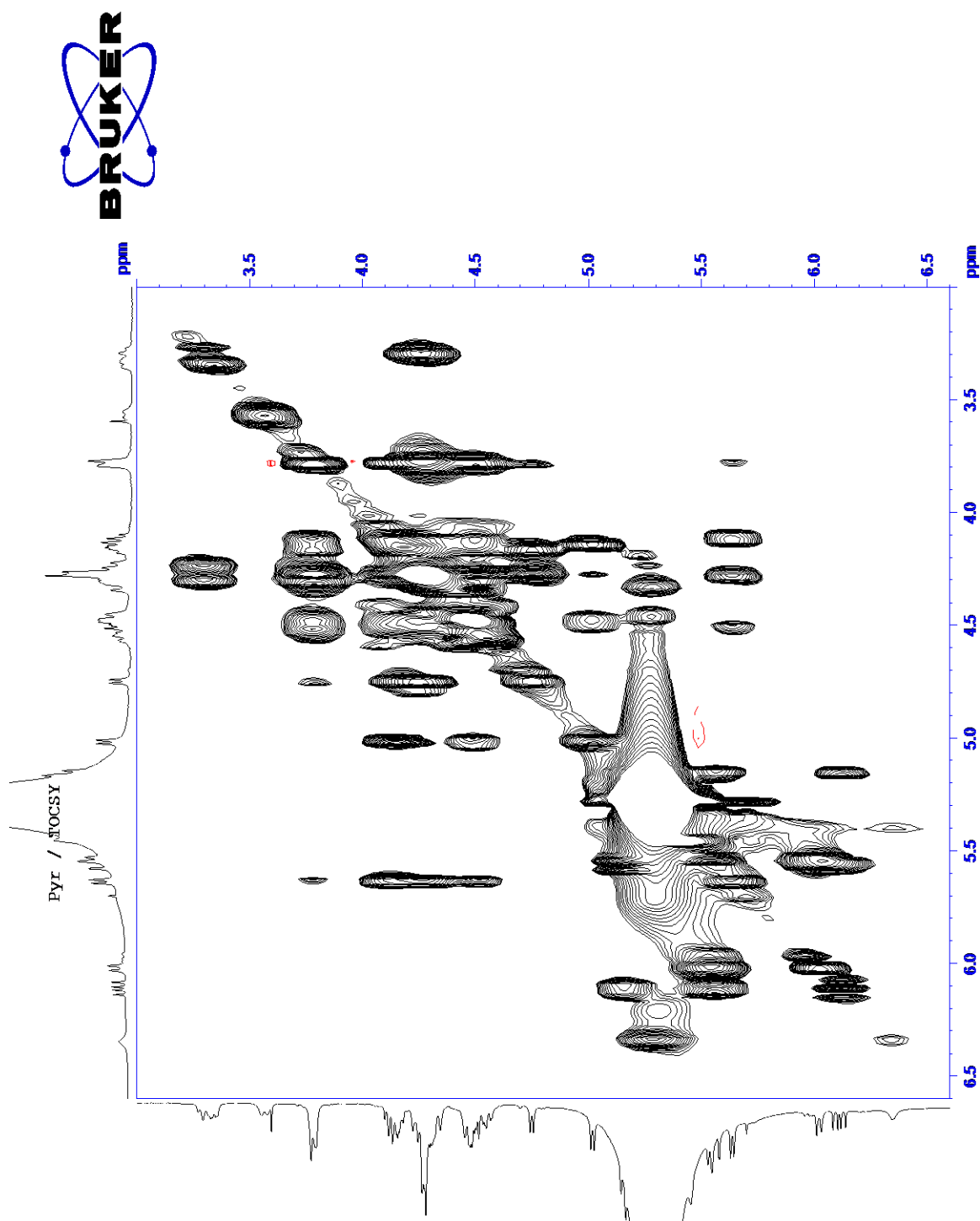
Espectro 106. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E}.



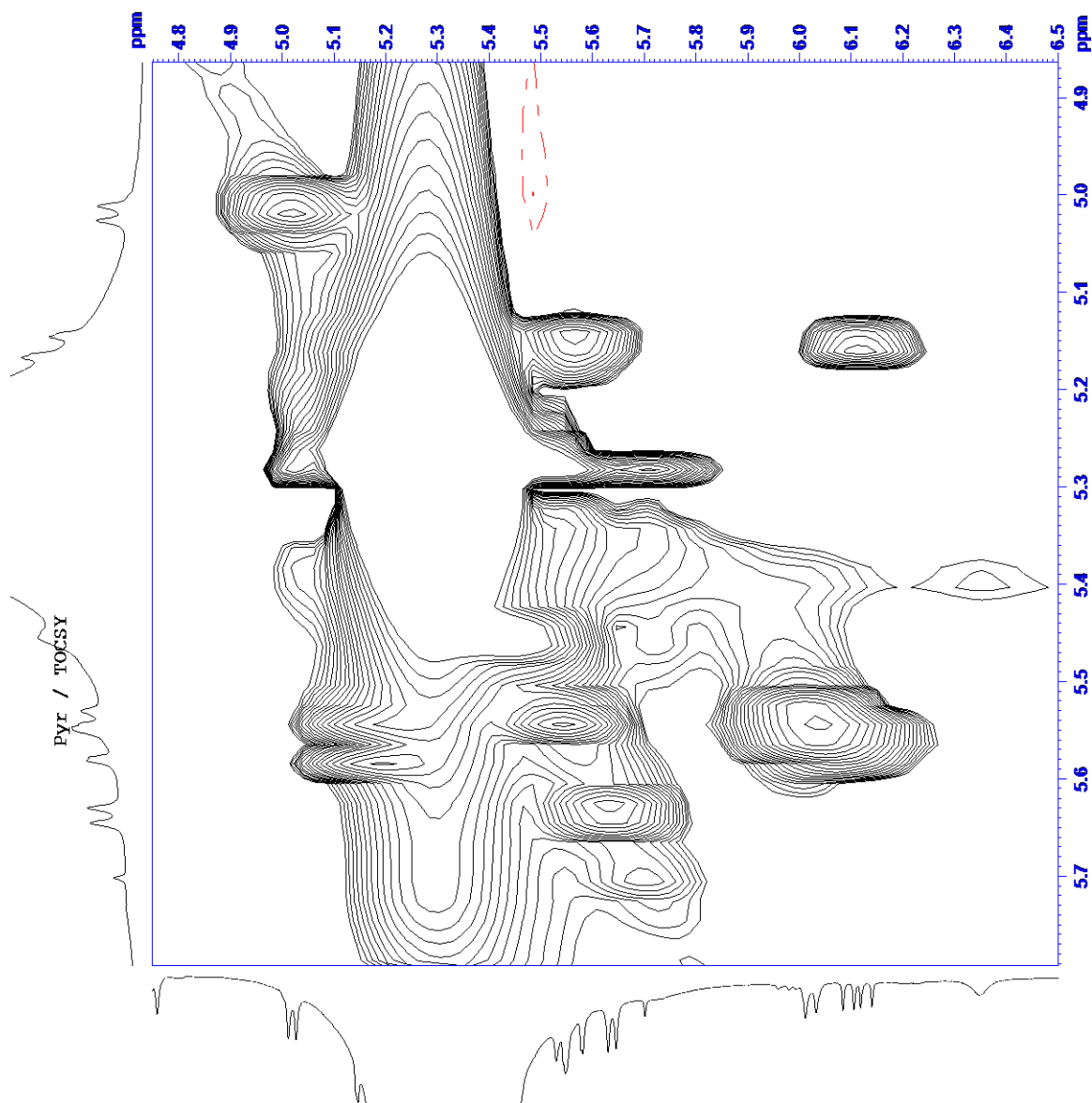
Espectro 107. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



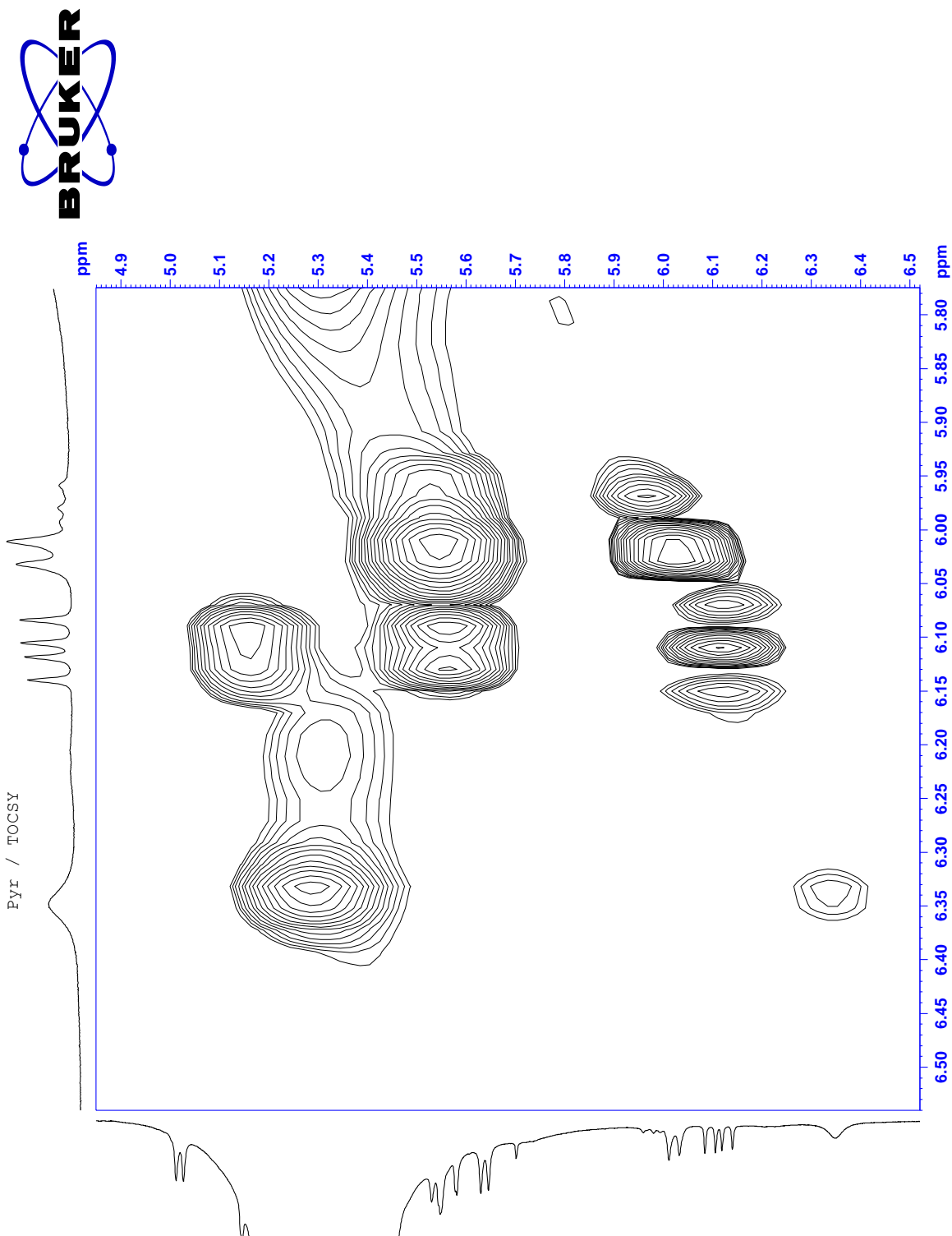
Espectro 108. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



Espectro 109. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.



Espectro 110. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina- d_5 para el compuesto F_{17E} .



Espectro 111. Ampliación de RMN TOCSY tomado en piridina-d₅ para el compuesto F_{17E}.

