

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS FRUTOS DE
HELIOCARPUS AMERICANUS L.
(TILIÁCEAS)**

(Tesis de Grado)

**Br. José Camilo Torres Vielma
Tutor: Dr. Carmelo Rosquete Porcar**

AGRADECIMIENTOS

- A mi Dios, por enseñarme el camino correcto de vida, le debo todo lo que soy y seré. Gracias por ser quien soy.
- A mi madre Iria y a mi padre José, por amarme, por creer en mí y por educarme para conseguir este éxito. Los amaré por siempre.
- A mi mamá Eloina, por influir en mi crianza y darme tanto amor. La adoro por siempre.
- A mi hermanita Iliana, por llenarme de amor y felicidad siempre. La amo.
- A mi hermano Enrique, por enseñarme que los tropiezos nos hacen crecer y ser mejores personas. Lo amo hermanito,
- A mi amor Adakarleny, gracias, mil gracias por estar conmigo en todo momento, usted lo es todo para mí y es un gusto compartir mi vida a su lado. La amaré por siempre.
- A mis sobrinos, María Victoria, Paola, María Camila, Fabio y Luciano, por llenarme la vida de amor y felicidad. Los amo.
- A mi Mayela, gracias por ser quien es, puro amor hacia mí. La quiero muchísimo.
- A mi tía Violeta y a mis primos Robinson, Mariana, Mario y Samuel, por estar siempre presentes. Los quiero mucho.
- A Ezio, por ser mi amigo desde hace tanto tiempo, le debo mucho. Gracias por todo.
- A Beatriz, por siempre tener una sonrisa para mí y por sus buenos consejos.
- Al profe Carmelo, por tener paciencia y saber esperar por este triunfo. Gracias. Lo quiero mucho.
- A María José, por ser siempre mi amiga incondicional, gracias por todo. La quiero.
- A mis amigos del alma, Asdrúbal, Antonio, Danielito por ser originales y llenarme de felicidad. Los quiero mucho.
- A los profesores Elkis Weinhold, Alberto Oliveros y Marisela Choy, por guiarme en el camino correcto y ayudar al éxito de este proyecto.
- A los técnicos Ciro, Iris, Pedro, Carolina y Karina, por brindarme su ayuda.
- Al CDCHTA por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto C-1714-10-08-F.

RESUMEN

En este trabajo se expone en primer lugar una revisión bibliográfica general de la familia Tiliácea, tomando en cuenta aspectos botánicos, fitoquímicos, farmacológicos y etnomedicinales. Además se describen las aplicaciones populares de la especie *Heliocarpus americanus* L. (amores secos) objeto de este estudio.

En segundo lugar, se describen los resultados obtenidos del estudio fitoquímico de los frutos de *Heliocarpus americanus* L., encontrándose como componentes mayoritarios flavonoides y terpenos entre los cuales se pueden mencionar: el β -sitosterol (**I**), el (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavano (**II**) y el (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavano (**III**). Todos estos compuestos son reportados por primera vez para la especie *Heliocarpus americanus* L., y para el género *Heliocarpus*. Estos productos fueron identificados a través de sus constantes físicas y estudios espectroscópicos uni y bidimensionales.

En tercer lugar se exponen los resultados obtenidos de los ensayos antibacterianos realizados a los extractos de diclorometano y metanol. La ausencia de reportes biológicos de la especie *Heliocarpus americanus* L., hace de este estudio el primero para dicha especie.

ABSTRACT

In this work it is exposed, in the first place, a general bibliographical revision of the Tiliaceae family, taking into account botanical, phytochemical, pharmacological and ethnomedicinal aspects. In addition, the popular applications of the species *Heliocarpus americanus* L. (droughts loves) are described.

In second place, the obtained results from the phytochemical study of the fruits of *Heliocarpus americanus* L. were described, being reported as major components: terpenoids and flavonoids such as β -sitosterol (**I**), (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane (**II**) and (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane (**III**). These compounds are described for first time for this specie (*Heliocarpus americanus* L.) and for the *Heliocarpus* genus. They were identified through their physical constants and one- and two-dimensional spectroscopic analysis.

In third place, the obtained results of the anti-bacterial test realized to the dichlorometane and methanol extracts are exposed. This is the first report of biological study for the specie *Heliocarpus americanus* L.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Presentación.	i
Acta.	ii
Agradecimientos.	iii
Resumen.	iv
Abstract.	v
Índice general.	vi
Índice de figuras.	viii
Índice de tablas.	xi
1. Introducción.	1
1.1 Antecedentes botánicos de la familia Tiliaceae.	2
1.2 Importancia de las especies de la familia Tiliaceae como plantas medicinales.	4
1.3 Fitoquímica reportada para algunos géneros emblemáticos de la familia Tiliaceae.	8
2. Hipótesis.	17
3. Objetivos.	17
4. Procedimiento experimental.	18
4.1 Selección de la especie a estudiar.	18
4.2 Estudio de los antecedentes botánicos y fitoquímicos.	18
4.3 Recolección y confirmación de la determinación botánica.	18
4.4. Tratamiento del material vegetal.	18
4.4.1 Tratamiento del extracto de diclorometano.	19
4.4.2 Tratamiento del extracto de metanol.	20
4.5 Separación de los productos.	22
4.5.1 Cromatografía de columna	22
4.5.2 Cromatografía de capa fina	22
4.6 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.	22
4.6.1 Puntos de fusión	22

4.6.2	Rotaciones específicas	22
4.6.3	Espectros infrarrojos	23
4.6.4	Espectros ultravioletas	23
4.6.5	Espectros RMN ^1H y ^{13}C	23
4.6.6	Espectros de masas	23
4.7	Análisis espectroscópicos.	23
4.8	Preparación del ensayo biológico.	28
4.8.1	Preparación de los inóculos bacterianos.	28
4.8.2	Preparación de las placas e inoculación.	28
4.8.3	Preincubación e incubación.	29
4.8.4	Lectura de las pruebas.	29
5.	Resultados y discusión.	32
5.1	Compuesto I. (β -sitosterol).	34
5.2	Compuesto II. (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	44
5.3	Compuesto III. (2- <i>trans</i>)- 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	55
5.4	Ensayo antibacterial.	63
6.	Conclusiones.	64
7.	Referencias bibliohemerográficas.	65
8.	Glosario.	73
9.	Abreviaturas.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución geográfica de las Tiliáceas.	2
Figura 2. Características botánicas de la familia Tiliaceae.	3
Figura 3. <i>Tilia tomentosa</i> .	4
Figura 4. <i>Tilia argentea</i> .	4
Figura 5. <i>Tilia platyphyllos</i> .	5
Figura 6. <i>Triumfetta rhomboidea</i> .	5
Figura 7. <i>Apeiba membrenacea</i> .	5
Figura 8. <i>Corchorus olitorius</i> .	6
Figura 9. <i>Corchorus trilocularis</i> .	6
Figura 10. <i>Muntingia calabura</i> .	6
Figura 11. <i>Microcos paniculata</i> .	7
Figura 12. <i>Luehea divaricata</i> .	7
Figura 13. <i>Grewia mollis</i> .	7
Figura 14. <i>Heliocarpus terebinthinaceus</i> .	7
Figura 15. <i>Heliocarpus reticulatus</i> .	8
Figura 16. <i>Heliocarpus americanus</i> L. a) hojas; b) fruto.	8
Figura 17. Esquema del procedimiento experimental utilizado para el estudio fitoquímico de los frutos de <i>Heliocarpus americanus</i> L.	21
Figura 18. Procedimiento experimental empleado para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de <i>Heliocarpus americanus</i> L.	29
Figura 19. β -sitosterol.	33
Figura 20. (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxiflavano.	33
Figura 21. (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxiflavano.	33
Figura 22. Espectro infrarrojo (KBr) de β -sitosterol.	34
Figura 23. Espectro de masas de β -sitosterol.	35

Figura 24.	Patrón de fragmentación del espectro de masas de β -sitosterol.	36
Figura 25.	Espectro RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del β -sitosterol.	37
Figura 26.	Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de β -sitosterol.	38
Figura 27.	Esqueleto fundamental de los esteroides de la serie del estigmastano.	38
Figura 28.	Acoplamiento del protón olefínico (H-6) con los protones vecinales (H-7) y de H-3 con los H-2 y H-4.	40
Figura 29.	Experimento HMQC (CDCl_3) de β -sitosterol.	40
Figura 30.	Experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (CDCl_3) de β -sitosterol.	41
Figura 31.	Experimento HMBC (CDCl_3) de β -sitosterol.	42
Figura 32.	Estructura de I (β -sitosterol).	43
Figura 33.	Espectro infrarrojo (KBr) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	44
Figura 34.	Espectro de masas de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	45
Figura 35.	Espectro RMN ^{13}C (DMSO-D_6 , 100 MHz) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	46
Figura 36.	Espectro RMN ^1H (DMSO-D_6 , 400 MHz) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	47
Figura 37.	Esqueleto básico de los flavanos.	48
Figura 38.	Experimento HSQC (DMSO-D_6) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	49
Figura 39.	Patrón de sustitución del compuesto II .	50
Figura 40.	Experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (DMSO-D_6) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	51
Figura 41.	Experimento HMBC (DMSO-D_6) de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	53
Figura 42.	Espectro UV de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano en MeOH.	54
Figura 43.	Estructura de II [(2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano].	54
Figura 44.	Espectro infrarrojo (KBr) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	55
Figura 45.	Espectro de masas del (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavano.	56

Figura 46.	Espectro RMN ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	57
Figura 47.	Espectro de RMN ^1H (DMSO- D_6 , 400 MHz) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	58
Figura 48.	Experimento HMQC (DMSO- D_6) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	59
Figura 49.	Experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (DMSO- D_6) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	60
Figura 50.	Experimento HMBC (DMSO- D_6) de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	61
Figura 51.	Espectro UV de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano en MeOH.	62
Figura 52.	Estructura de III [(2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano].	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Peso de los extractos de hexano, diclorometano y metanol.	19
Tabla 2. Resultados de la cromatografía general del extracto de diclorometano.	19
Tabla 3. Resultados de la cromatografía general del extracto de metanol.	20
Tabla 4. Antibióticos de referencia como controles positivos de cada cepa bacteriana.	29
Tabla 5. Cantidades, origen y propiedades físicas de los compuestos I , II y III .	31
Tabla 6. Bandas de absorción del espectro IR de β -sitosterol.	34
Tabla 7. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de β -sitosterol.	38
Tabla 8. Desplazamientos (δ) en el espectro de RMN ^1H de algunos protones de β -sitosterol.	39
Tabla 9. Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY de β -sitosterol.	41
Tabla 10. Interacciones significativas en el experimento HMBC de β -sitosterol.	43
Tabla 11. Bandas de absorción del espectro IR de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	45
Tabla 12. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de (2- <i>cis</i>) 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	46
Tabla 13. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^1H de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	47
Tabla 14. Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	52
Tabla 15. Interacciones significativas en el experimento HMBC de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	53
Tabla 16. Bandas de absorción del espectro IR de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	56
Tabla 17. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	57
Tabla 18. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^1H de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	58

Tabla 19.	Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	61
Tabla 20.	Interacciones significativas en el experimento HMBC de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.	62
Tabla 21.	Actividad antibacteriana de los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de <i>Heliocarpus americanus</i> L.	63

INTRODUCCIÓN

El primer texto escrito sobre plantas medicinales data del año 3000 AC; sus autores, los sumerios, grabaron en tablillas de arcilla todos los conocimientos recopilados hasta aquella época sobre las propiedades curativas de las plantas. En la Biblia, se describen también más de 200 plantas medicinales. Así es como comienza la historia oficial de la fitoterapia (Hung, 1982).

Aunque en realidad las plantas han sido utilizadas por el hombre desde los tiempos más remotos, tanto para alimentarse como para curarse, el efecto empírico acerca de las plantas medicinales y sus efectos curativos se acumuló durante milenios y posteriormente pasó a ser parte integral de sistemas y tradiciones curativas como el Ayurveda en la India, la medicina tradicional china o las tradiciones curativas de los indios de Norteamérica (Marcano y Hasegawa, 2002).

A pesar de que durante casi todo el siglo pasado los intereses comerciales de la industria farmacéutica hicieron parecer que la terapéutica fundamental y el empleo de plantas vinieran a verse como una práctica “primitiva” y hasta “irracional”, en décadas recientes la fitoterapia ha experimentado un extraordinario resurgir.

En la actualidad, se llevan a cabo cada día descubrimientos de compuestos, de origen vegetal, que confirman el enorme potencial curativo de las plantas y que están transformando la fitoterapia en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados. La cantidad de plantas medicinales con propiedades curativas es tan grande, que nadie puede dominar en su totalidad el conocimiento de esta materia. Los sanadores tradicionales de numerosas culturas por lo general conocen los usos de cientos de plantas de su país o región, pero no conocen plantas oriundas de otras regiones. De cualquier modo, en nuestros días quedan pocos de estos sanadores tradicionales, por lo que el conocimiento de las propiedades curativas de muchas plantas corre el riesgo de perderse o más difícil de determinar (Cseke y colaboradores, 2006).

En Venezuela, el uso de las plantas medicinales es muy común, esto debido a la gran diversidad en la flora existente y a la dependencia foránea para el suministro de medicamentos o la materia prima para elaborarlos.

1.1 Antecedentes botánicos de la familia Tiliaceae:

Las Tiliáceas es el nombre de una familia de plantas con flores, en su mayor parte leñosas, perteneciente al mismo orden que la familia de las Malváceas con las cuales algunas veces son confundidas. Engloba más de 48 géneros y 725 especies de árboles y arbustos, de distribución tropical especialmente al sur de México, Centro América, Sur América, África y Asia tropical (figura 1).

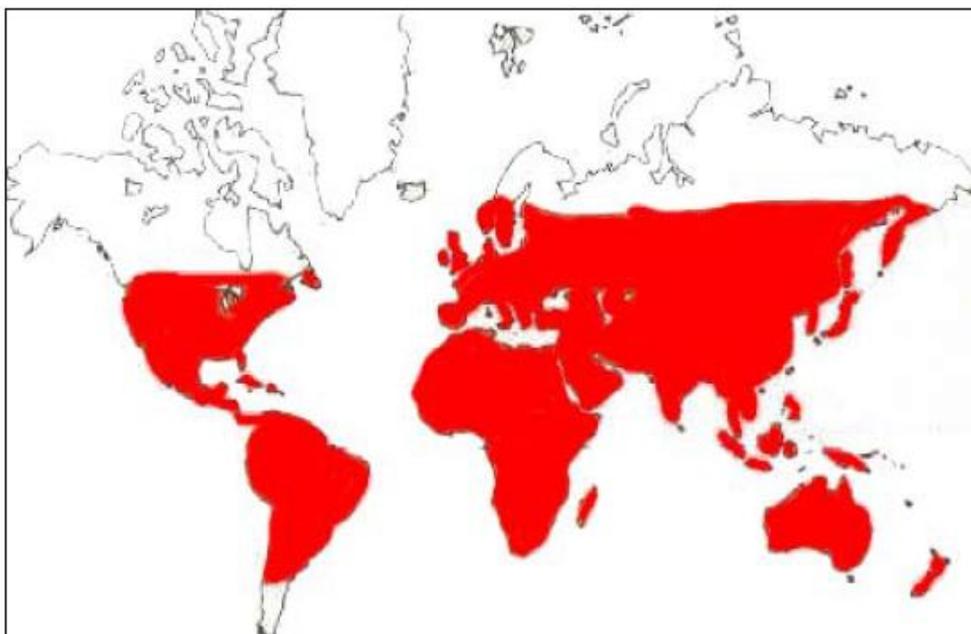


Figura 1. Distribución geográfica de las Tiliáceas.

La familia de las Tiliáceas está constituida por árboles, arbustos o plantas de hojas alternas, raras veces opuestas, simples, enteras, dentadas o lobuladas, pecioladas, con estípulas caedizas o persistentes. Flores regulares, generalmente bisexuales, solitarias, dispuestas en cimas, corimbos o panículas auxiliares o terminales. Tienen 5 sépalos, raras veces 3 o 4, libres o unidos, 5 pétalos o a veces menos o ausentes, y numerosos estambres libres (figura 2).

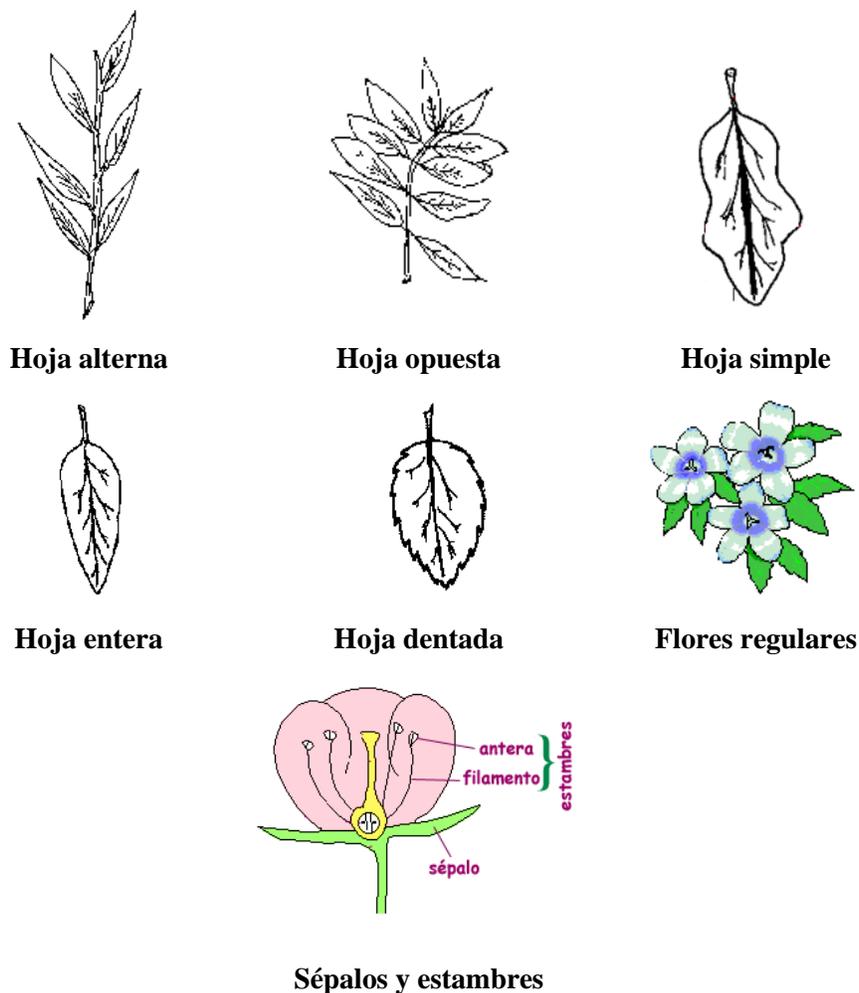


Figura 2. Características botánicas de la familia Tiliaceae.

En Venezuela, esta familia se encuentra representada por 11 géneros (8 de ellos netamente arbóreos, como son: *Apeiba*, *Christiana*, *Goethalsia*, *Heliocarpus*, *Luhea*, *Lueheopsis*, *Mollia* y *Trichospermum*; y los otros tres, herbales: *Corchorus*, *Muntingia* y *Triumfetta*) conteniendo más de 35 especies y con una amplia distribución en todo el territorio nacional, especialmente en los Andes, sur del Lago de Maracaibo, Llanos Occidentales y selvas húmedas del norte y oriente del país. Desde el punto de vista económico, la familia de las Tiliáceas tienen cierta relevancia ya que a ella pertenecen dos plantas herbáceas, conocidas con el nombre de “Yute” (*Corchorus capsularis* y

C. olitorius), cultivadas fundamentalmente en La India para la obtención de su fibra textil (Badillo, 1965).

1.2 Importancia de las especies de la familia Tiliaceae como plantas medicinales:

Algunas plantas pertenecientes a la familia Tiliaceae presentan una gran importancia debido a sus propiedades medicinales, las cuales han sido aprovechadas por las diferentes culturas para la cura de diversas enfermedades. Entre algunas de esas especies y sus correspondientes usos medicinales encontramos: *Tilia tomentosa*, llamada popularmente “Tilo” (figura 3), la cual es empleada en infusión como antioxidante y sedante (Viola y colaboradores, 1994); la corteza y las hojas de la especie *Tilia argentea*, conocida como “Tilo de plata” (figura 4), son usadas para aliviar dolores de estómago, como expectorante, para los síntomas de bronquitis y tos, como sedante o tranquilizante; también se le atribuyen propiedades emolientes y antiasmáticas (Martínez, 1969).



Figura 3. *Tilia tomentosa*.



Figura 4. *Tilia argentea*.

Las flores de *Tilia platyphyllos*, conocida por la población como “Tilo de Holanda” (figura 5), son empleadas en infusión para el tratamiento de asma, tos y dolores abdominales (Kültür, 2007). Por otra parte, a la especie *Triumfetta rhomboidea*, conocida

comúnmente como “Cadillo” (figura 6), se le atribuyen propiedades antioxidantes, antibacterianas y sedantes.



Figura 5. *Tilia platyphyllos*.



Figura 6. *Triumfetta rhomboidea*.

Entre otras especies de las Tiliáceas usadas en la medicina popular, se encuentra la *Apeiba membranacea*, nombrada comúnmente como “Peine de Mono” (figura 7), cuyas hojas son utilizadas en infusiones para aliviar los cólicos menstruales, y de cuyas semillas se extrae un aceite usado contra el reumatismo. La corteza de la especie *Corchorus olitorius* ó “Yute” (figura 8) se utiliza para aliviar malestares del hígado y como laxante (Pal y colaboradores, 2006).



Figura 7. *Apeiba membranacea*.

Figura 8. *Corchorus olitorius*.

Las semillas de la especie *Corchorus trilocularis*, de nombre popular “Imbamba” (figura 9), son empleadas para el tratamiento de fiebres y obstrucciones abdominales (Ali y Nasir, 1974). Otra especie de interés medicinal es *Muntingia calabura*, conocida como “Memiso” (figura 10), la cual se utiliza como diurético (Su y colaboradores, 2003).



Figura 9. *Corchorus trilocularis*.



Figura 10. *Muntingia calabura*.

La especie *Microcos paniculata*, de nombre común “Shira” (figura 11) es empleada como insecticida en algunas zonas rurales (Wei y colaboradores, 2006).



Figura 11. *Microcos paniculata*.

Las hojas de la especie *Luehea divaricata* ó “Azota caballos” (figura 12), son empleadas popularmente en el tratamiento de diarreas, enfermedades vaginales y como antiinflamatorio; también se le atribuyen propiedades antitumorales. La infusión de las flores de esta planta se utiliza como expectorante y la raíz como depurativo de cálculos renales (Marodin, 2000). Otra especie de las Tiliáceas que presenta importancia medicinal es la “Draganza”, *Grewia mollis* (figura 13), cuyas raíces son utilizadas para tratar algunas enfermedades de transmisión sexual. (Adamu y colaboradores, 2004).



Figura 12. *Luehea divaricata*.



Figura 13. *Grewia mollis*.

El árbol de “Cuelta”, *Heliocarpus terebinthinaceus* (figura 14) es utilizado en infusión para tratar el paño, el acné, la gastritis y las enfermedades estomacales asociadas a agentes microbianos (Fernández, 2006); también *Heliocarpus reticulatus*, de nombre popular “Guajpó” (figura 15), otro árbol del género, es utilizado en la medicina tradicional como laxante, sudorífico y diurético.



Figura 14. *Heliocarpus terebinthinaceus*.

Figura 15. *Heliocarpus reticulatus*.

Heliocarpus americanus L. tiene como nombre común “Amores secos” (figura 16). Esta planta es empleada para tratar heridas, facilitar los partos y aliviar síntomas de la malaria tales como la fiebre; la corteza se emplea como decocción y las hojas se usan como cataplasma sobre las heridas. (Muñoz y colaboradores, 2000). Toda esta información etnobotánica acrecentó el interés para la realización de un estudio fitoquímico de esta planta conducente al aislamiento e identificación de los compuestos mayoritarios y la determinación de sus actividades biológicas.

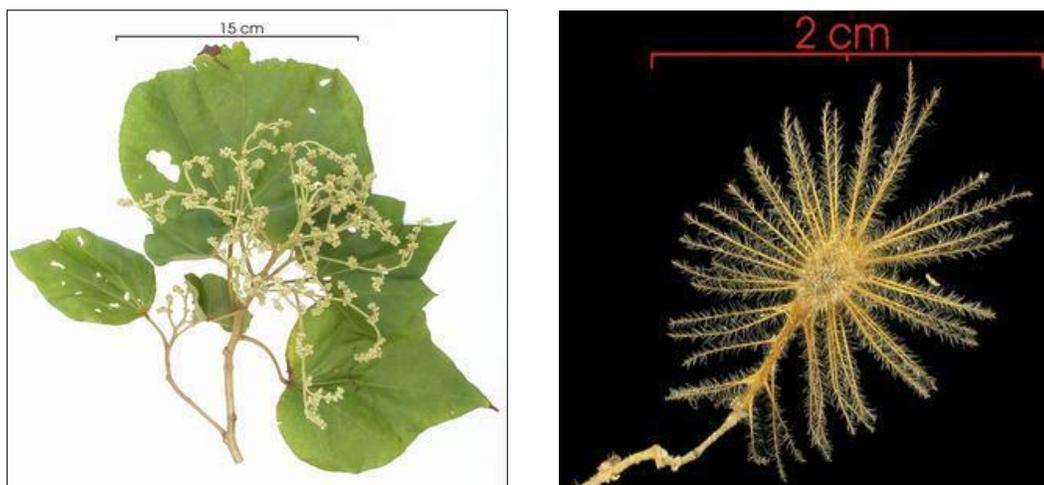
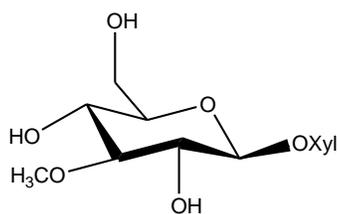


Figura 16. *Heliocarpus americanus* L. a) hojas; b) fruto.

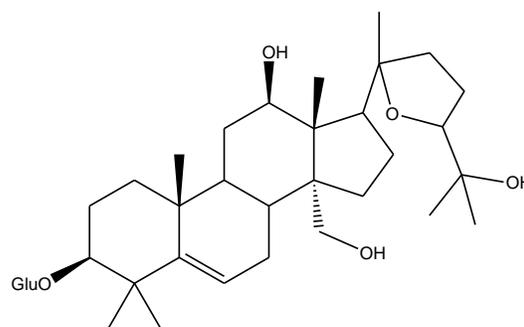
1.3 Fitoquímica reportada para algunos géneros emblemáticos de la familia Tiliaceae:

Desde el punto de vista fitoquímico, la familia Tiliácea presenta diversos estudios de especies de algunos géneros en donde reportan la presencia de metabolitos tales como: azúcares, terpenoides, alcaloides y flavonoides, entre otros.

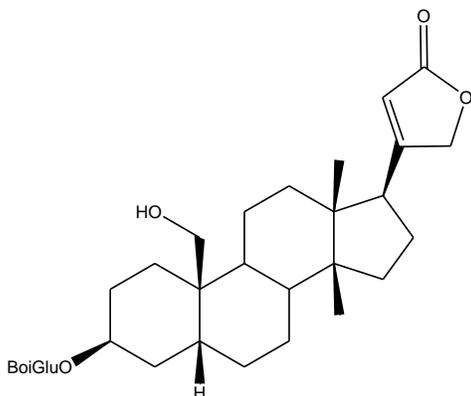
Un estudio fitoquímico realizado a las fibras de la especie *Corchorus capsularis* reportó el aislamiento de (4-*O*-metil-*D*-glucurono)-*D*-xilano (**1**) (Vignon y colaboradores, 1997). En Pakistán, en el año 1984, fue aislado de las hojas de esta misma especie un triterpeno glucosilado, capsina (3-*O*-glucósido de 20,24-epoxi-3 β ,12 β ,25,30-tetrahidroxidammarano) (**2**) (Hasan y colaboradores, 1984). Tres nuevos cardenoles glucosilados se determinaron estructuralmente del estudio fitoquímico realizado al extracto etanólico de las semillas de *Corchorus olitorius*, siendo estos compuestos: kannogenol ó 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil(1-4)-*O*- β -*D*-boivinopiranosido (**3**), 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil(1-4)-*O*- β -*D*-digitoxopiranosido de periplogenina (**4**) y 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil(1-6)-*O*- β -*D*-digitoxopiranosido de digitoxigenina (**5**) (Nakamura y colaboradores, 1998).



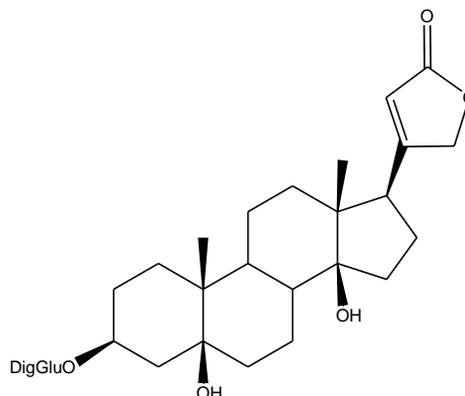
(1)



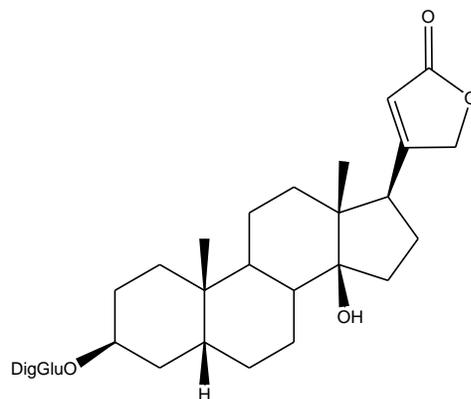
(2)



(3)

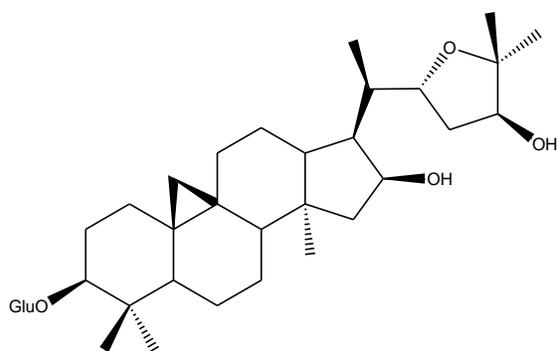


(4)

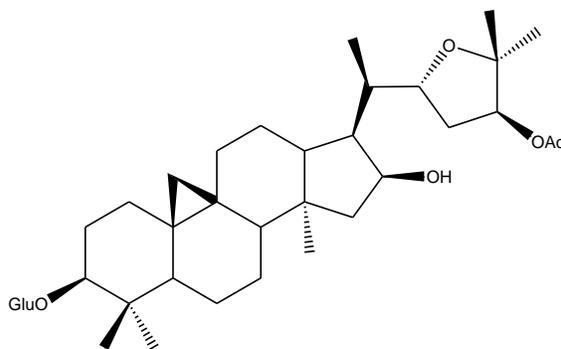


(5)

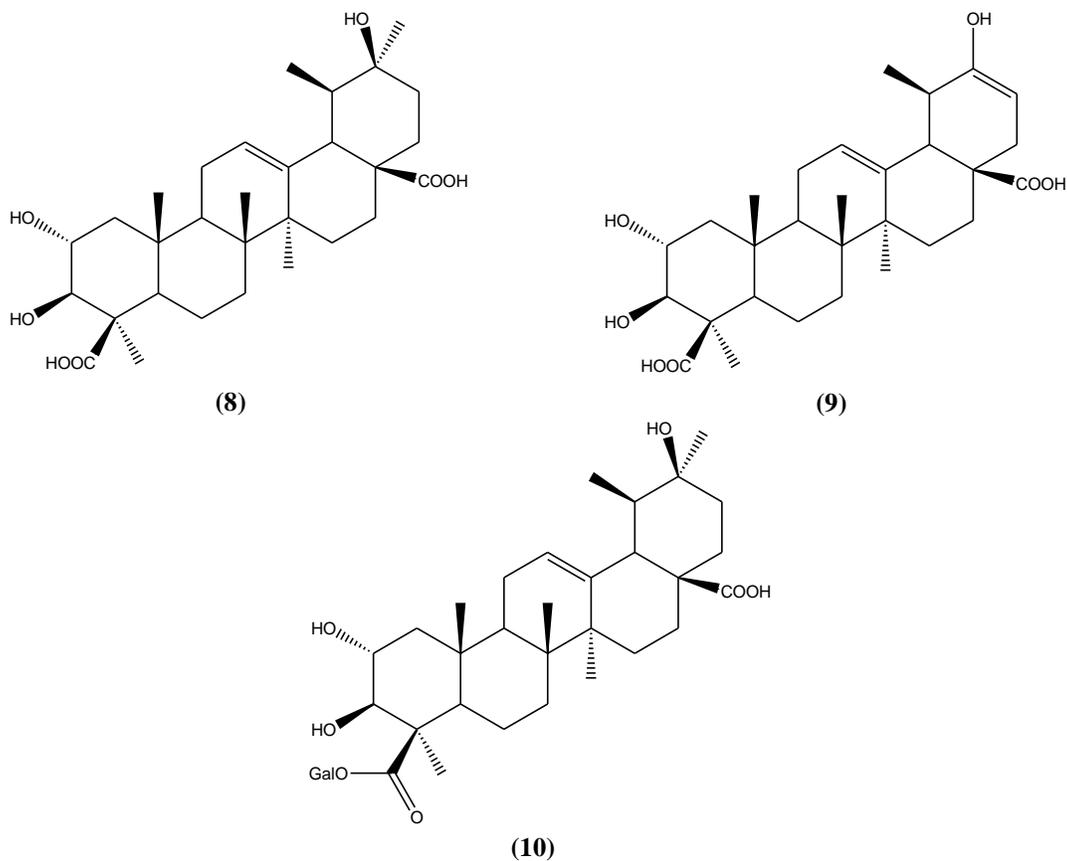
El estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas del *Corchorus depressus*, en Pakistán, reportó dos cicloartanos triterpénicos glucosilados: 3-*O*- β -D-glucopiranosido de 9,19-ciclolanosta-22(R),25epoxi-3 β ,16 β ,24(S)-triol (**6**) y 3-*O*- β -D-glucopiranosido de 9,19-ciclo-lanosta-22(R),25-epoxi,24(S)-acetoxi-3 β ,16 β -diol (**7**) (Uddin y colaboradores, 1998). Por otra parte, otro estudio realizado a la planta entera, reportó el aislamiento de tres derivados de la α -amirina como son: ácido cordepresico (**8**), ácido cordepresínico (**9**) y cordepresina (**10**) (Khan y colaboradores, 1991).



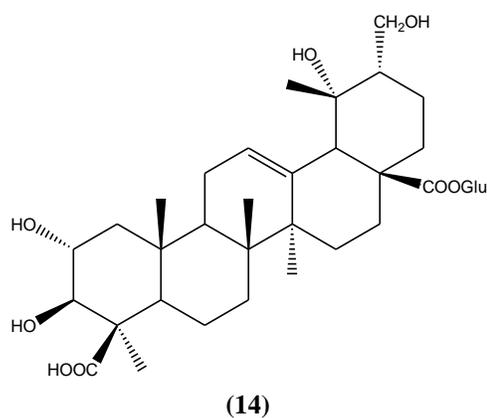
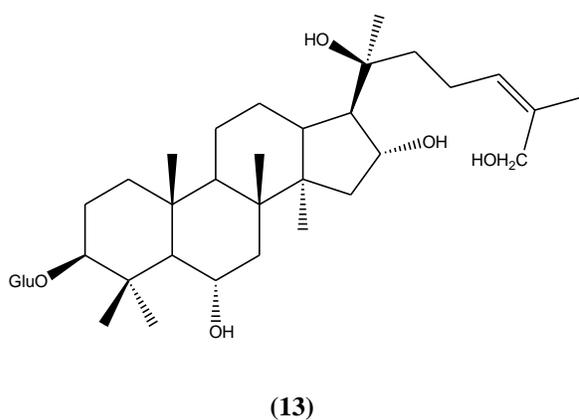
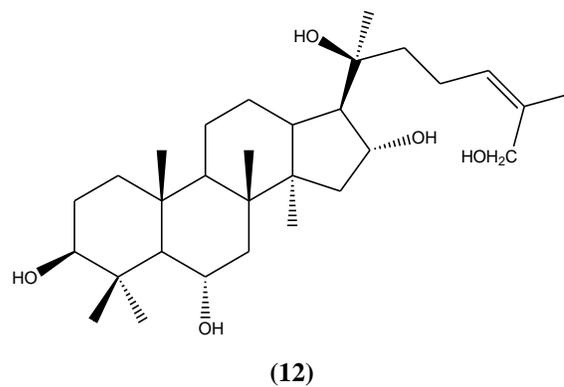
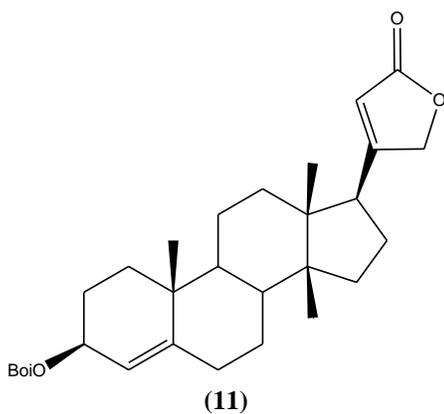
(6)



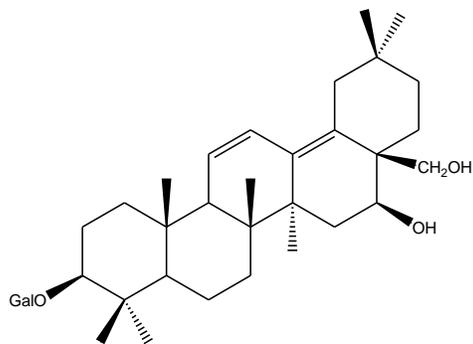
(7)



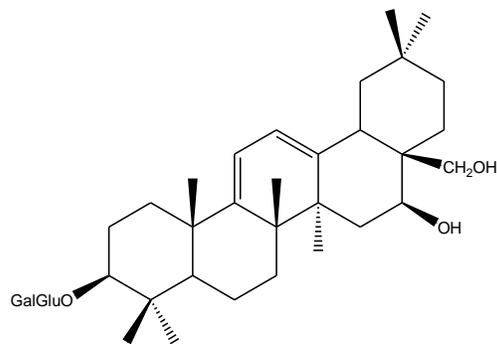
Un nuevo cardenólido se aisló de las semillas del *Corchorus trilocularis*, trilocularina, (canarigenin-3-*O*- β -D-boivinósido) (**11**) (Venkata y Venkata, 1975). En el 2003, en Pakistán, se aislaron tres triterpenos de esta misma especie, el 3 β ,6 α ,16 α ,20(S),27-pentahidroxidammar-24(Z)-eno (**12**), 3 β -D-glucopiranosiloxi-6 α ,16 α ,20(S),27-tetrahidroxidammar-24(Z)-eno (**13**) y ácido 2 α ,3 β ,19 α ,30-tetrahidroxi-28-*O*- β -D-glucopiranosilo-12-en-24,28-dioico (**14**) (Ahmed y colaboradores, 2003).



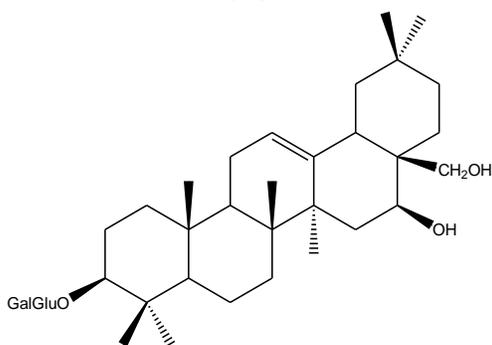
De las partes aéreas de *Corchorus acutangulus*, se reportó la elucidación estructural de cuatro triterpenos: 3-O-β-D-galactopiranosido de saikogenina C (**15**), 3-O-β-D-glucopiranosil(1-2)-β-D-galactopiranosido de saikogenina B (**16**), 3-O-β-D-glucopiranosil(1-2)-β-D-galactopiranosido de longispinogenina, (**17**) y 3-O-β-D-glucopiranosil(1-2)-β-D-galactopiranosido de saikogenina C, (**18**) (Mahato y colaboradores, 1987).



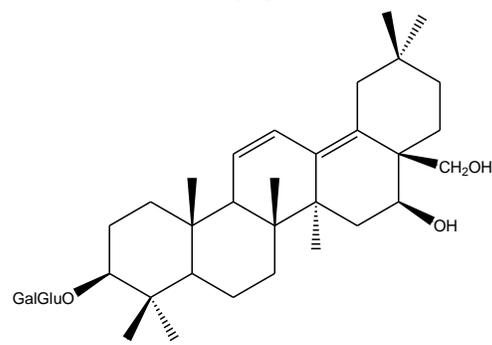
(15)



(16)

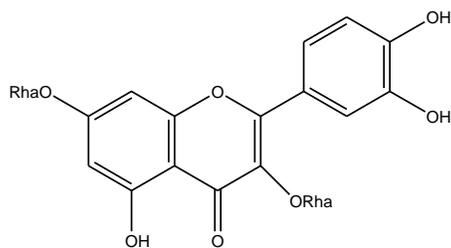


(17)

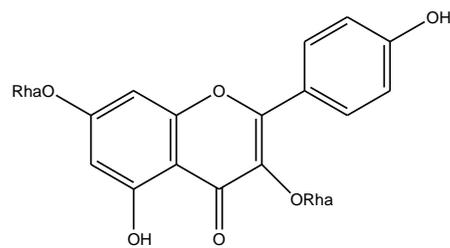


(18)

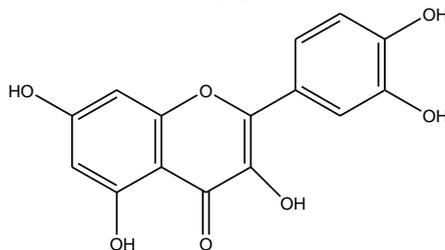
Otra planta representativa de la familia Tiliaceae que ha sido estudiada fitoquímicamente es *Tilia argentea*; en el año 2004 se reportó el aislamiento de varios compuestos del extracto etanólico de las hojas de esta especie: 3,7-*O*- α -diramnosilquercetina (19), 3,7-*O*- α -diramnosilkanferol (20), quercetina (21), quercitrina (22) y rutina (23), (Toker y colaboradores, 2004).



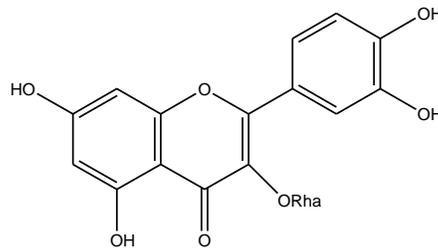
(19)



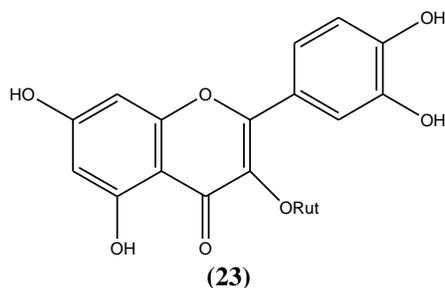
(20)



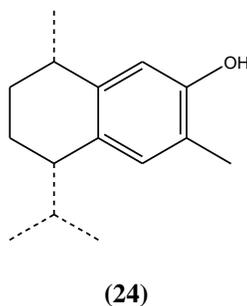
(21)



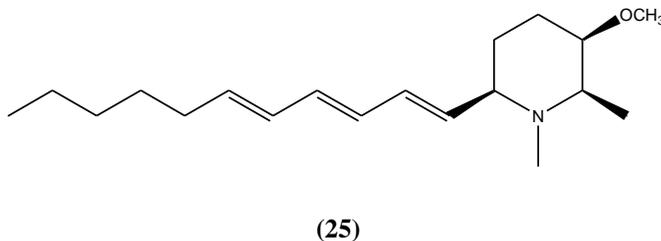
(22)



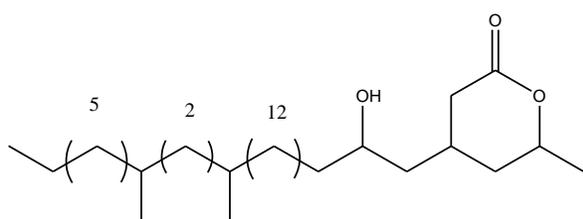
Durante ese mismo año, se realizó otro estudio fitoquímico a esta misma especie, pero enfocándose en el extracto metanólico de las hojas, reportándose el aislamiento de dos flavonoides glicosilados: 3,7-*O*- α -diramnósido de kanferol (**20**) y 3,7-*O*- α -diramnósido de quercetina (**19**) (Toker y colaboradores, 2004). Un sesquiterpeno de nombre (-)-7-hidroxicalameneno (**24**) fue aislado de otra especie del género *Tilia* (*Tilia europea*) (Burden y Kemp, 1983).



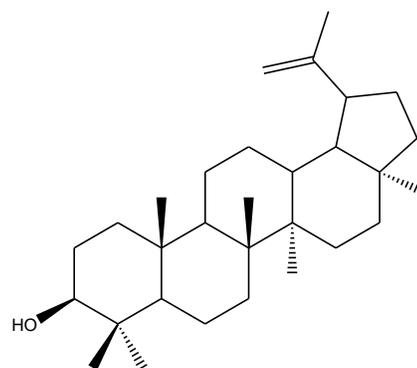
Un nuevo alcaloide piperidínico (*N*-metil-6 β -(deca-1',3',5'-trienil)-3 β -metoxi-2 β -metilpiperidina) bautizado con el nombre de micropina (**25**) se logró aislar de las hojas de *Microcos philippinensis* (Aguinaldo y Read, 1990). En el año 2000 se hizo un estudio fitoquímico a la especie *Microcos paniculata* L., donde se reportó el aislamiento de ese mismo alcaloide (Premaratne y colaboradores, 2000).



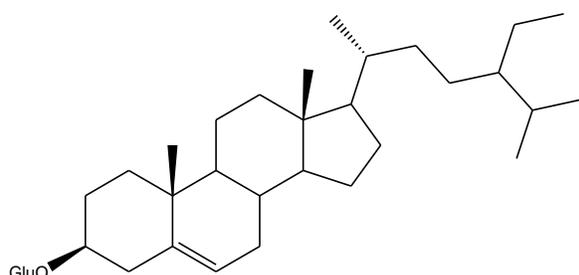
La especie *Grewia asiática* fue estudiada fitoquímicamente en el año 1976, en la India, aislándose la δ -lactona del ácido 3,21,24-trimetil-5,7-dihidroxihentriacontánico (**26**) (Lakshmi y colaboradores, 1976). Por otra parte, de los extractos de metanol y *n*-butanol de las hojas de otra especie del género *Grewia* (*Grewia damine*) se aislaron tres compuestos: lupeol (**27**), 3-*O*- β -glucopiranosil- β -sitosterol (**28**) y la isovitexina (**29**) (Jayasinghe y colaboradores, 2004).



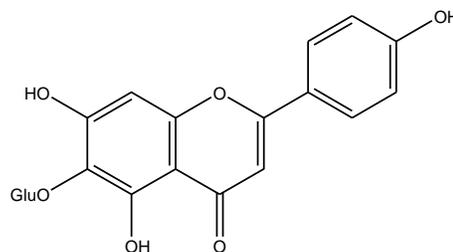
(26)



(27)

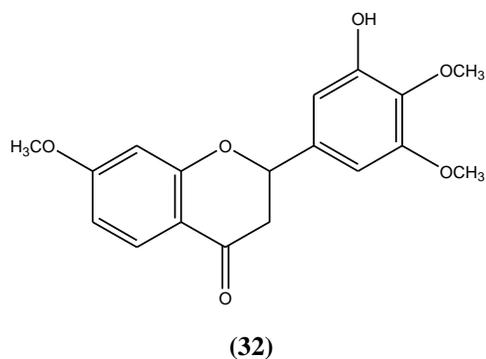
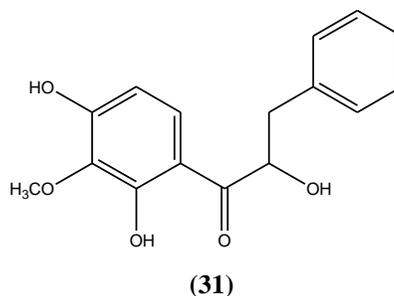
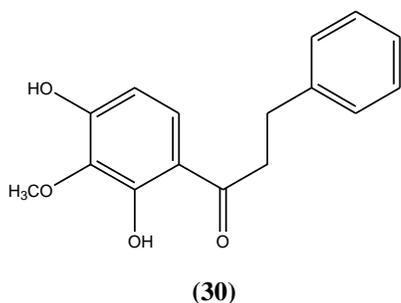


(28)



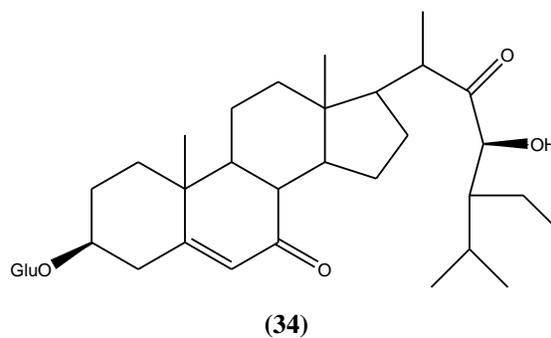
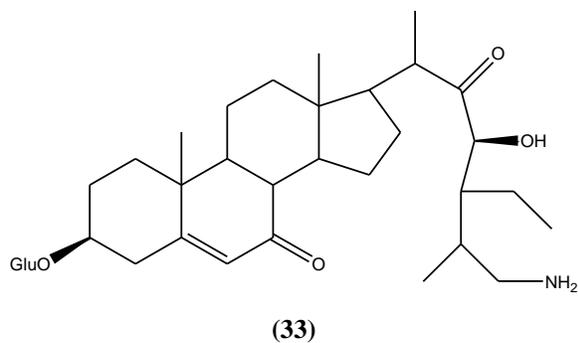
(29)

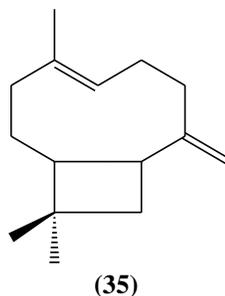
El aislamiento de dos chalconas fue reportado en un estudio fitoquímico realizado a las hojas de la especie *Muntingia calabura*: 2',4'-dihidroxi-3'-metoxidihidrochalcona (**30**) y (-)-3'-metoxi-2',4', β -trihydroxidihidrochalcona (**31**), también se logró elucidar estructuralmente una flavanona, (2*S*)-9-(-)-5'-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona (**32**) (Chen y colaboradores, 2005).



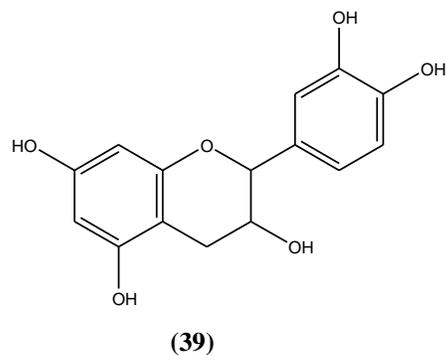
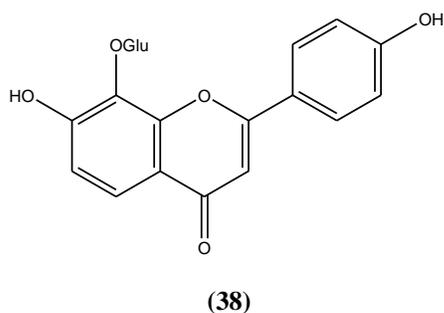
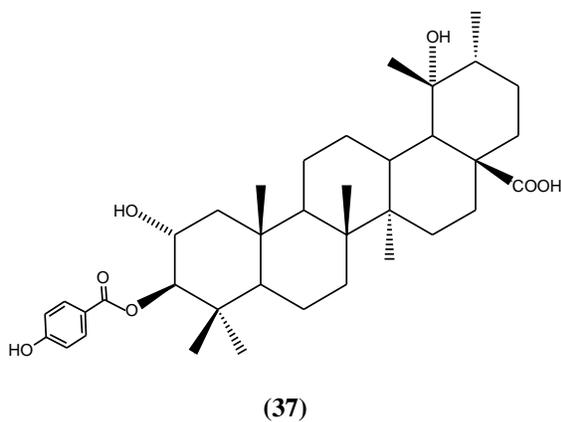
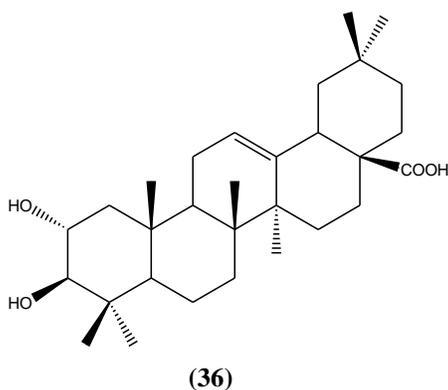
Del estudio químico realizado a las partes aéreas de la especie *Triumfetta flavescens* se logró determinar estructuralmente un nuevo alcaloide 3-*O*- β -D-glucósido de estigma-5(6)-ene-7,22-dione-25-metilamino-3 β ,23 β -diol (triumfettosoide) **(33)** y un nuevo esterol: el estigma-5(6)-ene-7,22-dione-3 β ,23-diol (triumfettosterol) **(34)** (Ahmed y colaboradores, 2002).

En el año 2004, en Francia, se reportó la identificación de constituyentes del aceite esencial extraído de las partes aéreas de otra especie perteneciente al género *Triumfetta* (*Triumfetta rhomboidea*), el mayoritario de ellos fue el *trans*- β -cariofileno **(35)** (Mevy y colaboradores, 2005).





Otra especie perteneciente a la familia de las Tiliáceas donde se han reportado estudios fitoquímicos es *Luehea divaricata*. En el año 2003, en Brasil, se estudió el extracto metanólico de las hojas de esta planta y se reportó el aislamiento de una mezcla de dos triterpenos, el ácido maslínico (36) y el ácido 3β-*p*-hidroxibenzoiloxitorméntico (37) (Cohelo y colaboradores, 2004). Dos años más tarde, en el 2005, se lograron aislar tres compuestos más de esta especie: vitexina (38), 3-*O*-β-glucopiranosil-β-sitosterol (28) y epicatequina (39) (Akio y colaboradores, 2005).



Esta información etnobotánica y su creciente uso en la medicina popular, además de la ausencia de reportes fitoquímicos, farmacológicos y biológicos, incentivó el interés por la realización de este estudio fitoquímico para el cual se planteó la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

“Algunas sustancias similares a las responsables de las actividades farmacológicas atribuidas a especies de la familia Tiliácea (flavonoides, alcaloides, terpenos) pueden encontrarse en los extractos de los frutos de *Heliocarpus americanus* L.”

Con la finalidad de confirmar la hipótesis propuesta se plantearon los siguientes objetivos:

3. OBJETIVOS

- ✓ Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los frutos de *Heliocarpus americanus* L.
- ✓ Identificar mediante técnicas espectroscópicas: espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía ultravioleta (UV), espectrometría de masa (EM), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), y transformaciones químicas (de ser necesarias), las sustancias aisladas.
- ✓ De ser posible, realizar una evaluación de la actividad biológica de los compuestos aislados en busca de propiedades farmacológicas interesantes.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental seguido en el estudio fitoquímico de la especie *Heliocarpus americanus* L. fue el siguiente:

4.1 Selección de la especie a estudiar: Utilizando la información obtenida en la revisión bibliográfica, se seleccionó la especie, *Heliocarpus americanus* L., conocida popularmente con el nombre de “amores secos”, como material vegetal a estudiar, debido al interés farmacológico que presenta.

4.2 Estudio de los antecedentes botánicos y fitoquímicos: Se realizó una revisión bibliográfica detallada de la familia Tiliaceae, haciendo especial énfasis en el género *Heliocarpus*, y a su vez en la especie *Heliocarpus americanus* L. Este estudio se enfocó en la búsqueda de los trabajos de aspecto botánico y fitoquímico, así como de cualquier otro tipo de información de carácter farmacológico y etnobotánico relevante. Esta revisión se realizó utilizando como fuentes bibliográficas secundarias el Science Citation Index, Chemical Abstracts, Biological Abstracts, Pharmaceutical Abstracts, y como fuentes primarias los artículos referidos en los índices y la bibliografía disponible en INTERNET.

4.3 Recolección y confirmación de la determinación botánica: La recolección de la planta se realizó el día 15 de Diciembre de 2006, en la ciudad de Mérida, en el sector La Hechicera, a la altura de la Capilla Universitaria, recolectando un peso total de 5 Kg. Para la clasificación botánica de la especie se preparó una muestra testigo (voucher) siguiendo el método de prensado y secado, y una vez etiquetado, el mismo se depositó en el Herbario MER de la Facultad de Forestal de la ULA. La especie fue identificada como *Heliocarpus americanus* L., por el profesor Gilberto Morillo.

4.4 Tratamiento del material vegetal: Esta etapa consistió en la extracción sucesiva del material de trabajo (1,7 kg de los frutos secos de *H. americanus*) utilizando un aparato soxhlet y siguiendo un orden de polaridad creciente de los solventes: hexano, diclorometano y metanol, obteniéndose 6,8 g del extracto de hexano; 9,3 g del extracto de

diclorometano y 12,5 g del extracto de metanol (tabla 1). La temperatura usada para la concentración al vacío empleando un rotavapor de cada uno de los extractos fue aproximadamente de 40 °C. Luego se analizó cada extracto crudo por cromatografía de capa fina (CCF) (Stahl, 1969; Mikes, 1979), con la finalidad de conocer la naturaleza y el número de productos mayoritarios presentes en la especie. En este estudio se hace referencia a los extractos de diclorometano y metanol, ya que el estudio realizado al extracto de hexano no arrojó resultados satisfactorios.

EXTRACTO	PESO (g)
Hexano	6,8
Diclorometano	9,3
Metanol	12,5

4.4.1 Tratamiento del extracto de diclorometano: Este extracto con un peso de 9,3 g fue separado por cromatografía de columna empleando una columna plástica con sílica-gel como adsorbente (900 g), utilizando como eluyente una mezcla de hexano/diclorometano en diferentes proporciones y un desarrollo mixto. Una vez desarrollada la columna, se realizaron cortes entre 4 y 5 cm obteniéndose 53 fracciones, las cuales fueron extraídas con acetona para su posterior análisis por CCF. En la tabla 2 se muestran las características de cada fracción.

Fracciones	Eluyentes	Peso (g)	Composición
1-2	Hex/DCM (9:1)	0,332	Mezcla compleja
3-7	Hex/DCM (6:4)	0,485	Mezcla compleja
8-13		1,368	Mezcla compleja
13-16	Hex/DCM (5:5)	0,924	Compuesto I + Mezcla compleja
17-25		0,449	Mezcla compleja
26-31		0,819	Mezcla compleja
32-34	DCM	0,155	Mezcla compleja
35-42		1,132	Mezcla compleja
43-53		1,485	Mezcla compleja

4.4.2 Tratamiento del extracto de metanol: Este extracto, con un peso de 12,5 g, se separó por cromatografía de Sephadex® LH-20 empleando como eluyente metanol, obteniéndose un total de 68 fracciones, las cuales fueron tratadas de acuerdo a sus características observada en CCF. En la tabla 3 se muestran cada una de las reuniones con su respectivo peso y eluyente empleado.

Tabla 3. Resultados de la cromatografía general del extracto de metanol.			
Fracciones	Eluyente	Peso (g)	Compuestos
1-10	MeOH	1,205	Mezclas complejas
11-14		1,774	Mezclas complejas
15-18		0,343	Compuesto II + Mezclas complejas
19-21		1,101	Mezclas complejas
22-25		0,958	Compuesto III + Mezclas complejas
26-32		1,164	Mezclas complejas
33-38		0,220	Mezcla complejas
39-44		0,396	Mezclas complejas
45-48		0,512	Sólidos
49-52		0,665	Mezclas complejas
52-57		0,302	Mezclas complejas
58-68		1,332	Mezclas complejas

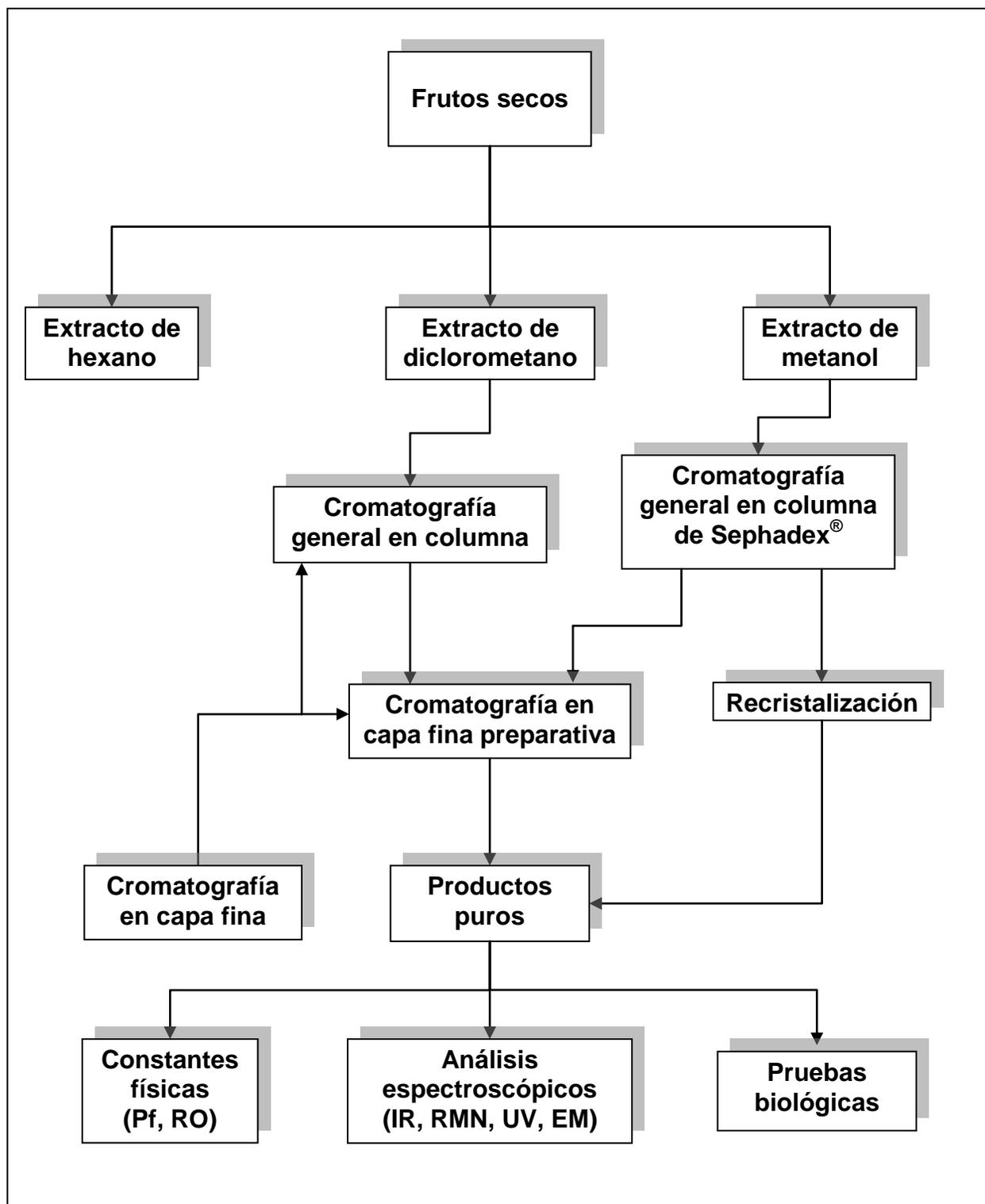


Figura 17. Esquema del procedimiento experimental utilizado para el estudio fitoquímico de los frutos de *Heliocarpus americanus* L.

4.5 Separación de los productos:

4.5.1 Cromatografía de columna

Para la cromatografía en columna seca (CC) se utilizó como adsorbente gel de sílice 60 (70-230 mesh, Merck, 63 a 200 μ), y el criterio para el correcto desarrollo de esta técnica cromatográfica se fundamentó en experiencias previas y en las técnicas descritas en la bibliografía (Cassydy 1966; Sthalt 1969).

4.5.2 Cromatografía de capa fina

Para la cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) se empleó como adsorbente sílica gel Merck HF 254 (10 – 40 μ) depositada sobre placas de vidrio (0,25 y 0,5 mm de espesor, respectivamente) (Hostettmann, y colaboradores 1986).

La fase móvil para CCF se eligió por tanteo y para la CCFP fue escogida utilizando el sistema más adecuado de separación observado y monitoreado en CCF. El revelado de las placas se realizó utilizando una solución de oleum ($H_2O/H_2SO_4/AcOH$ 8/2/40) con un calentamiento posterior de las placas cromatografiadas.

4.6 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas: Se le determinaron las constantes físicas (punto de fusión, rotación específica) a cada uno de los productos aislados para su posterior identificación.

4.6.1 Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer–Johns dotado de plancha de calentamiento para el rango de 20 a 300 °C.

4.6.2 Rotaciones específicas

Las rotaciones específicas fueron medidas en un polarímetro Atago-Polax-2L empleando metanol como solvente.

4.6.3 Espectros infrarrojos

Los espectros infrarrojos fueron realizados en pastillas de KBr (con una proporción de 1 mg de compuesto por cada 100 mg de KBr) en un espectrofotómetro Perkin–Elmer modelo FT-1725X.

4.6.4 Espectros ultravioletas

Los espectros ultravioletas se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Varian modelo Scan 3.

Para la toma de los espectros ultravioletas de los compuestos **II** y **III** se disolvieron por separado 1 mg de flavano en 10 mL de metanol de grado espectroscópico.

4.6.5 Espectros RMN ^1H y ^{13}C

Los espectros RMN- ^1H y ^{13}C fueron tomados en un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker–Avance DRX 400 (a 400 y 100 MHz, respectivamente). Para cada espectro se usó TMS como patrón interno. Los solventes deuterados utilizados fueron escogidos de acuerdo a la solubilidad de los compuestos aislados.

4.6.6 Espectros de masas

Los espectros de masas se realizaron utilizando un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5930^a y un potencial electrónico de 70 eV.

4.7 Análisis espectroscópicos: Después de obtener las constantes físicas de los productos aislados, se les realizaron los estudios espectroscópicos necesarios, utilizando las técnicas: IR, UV, EM, RMN ^1H , ^{13}C y técnicas bidimensionales de RMN como ^1H , ^1H COSY, HMQC y HMBC.

Inicialmente se utilizará la espectroscopia de infrarrojo, **IR** (Bellamy, 1975), para la determinación de algunos grupos funcionales, y además para la confirmación de derivados que puedan producirse como resultado de reacciones químicas aplicadas a los productos obtenidos.

Por otro lado, la espectroscopia ultravioleta, **UV** (Scott, 1969), se utilizará para compuestos que presenten, como parte de su estructura, grupos cromóforos. Esta técnica es de gran importancia para la identificación de compuestos aromáticos como flavonoides y xantonas, ya que la frecuencia de cada banda y los coeficientes de extinción están tabulados para cada sistema en particular, además permite identificar dichos compuestos al realizar reacciones químicas que producen desplazamientos en las bandas y que aportan información en la elucidación estructural.

Con respecto a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono-13, **RMN ¹³C** (Kalinowski y colaboradores, 1988) es la técnica que indica el número y tipo de carbonos presentes en la molécula, es decir, en función a la hibridación y grado de sustitución que presentan lo que ayuda a determinar la fórmula molecular.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, **RMN ¹H**, (Atta-Ur-Rhaman, 1986; Jackmann y Sternhell, 1969) es la técnica espectroscópica de mayor uso debido al aporte de información que proporciona referente a las características propias de cada compuesto, la presencia o ausencia de algunos grupos funcionales, la posición de sustituyentes y algunos rasgos que permiten la elucidación de las estructuras, esto debido a que determina las constantes de acoplamiento, la multiplicidad y los desplazamientos de las señales, siendo la técnica por excelencia que aporta mayor ayuda al investigador.

Las técnicas bidimensionales **RMN ¹H, ¹H COSY, HMQC, HSQC, HMBC**, entre otras, completan la información en torno a la estructura. El experimento **¹H, ¹H COSY** permite observar las correlaciones existentes entre hidrógenos vecinales y geminales; por su parte los experimentos **HMQC y HSQC** son utilizados para establecer las correlaciones entre cada carbono con su respectivo hidrógeno, y finalmente el experimento **HMBC** es empleado para determinar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos a dos, tres y hasta cuatro enlaces (Breitmaier, 2002).

La espectrometría de masas, **EM** (Waller, 1972) (Budzikiewicz y colaboradores, 1967) proporciona el peso molecular de los productos aislados y aporta información estructural a través del análisis de los patrones de fragmentación.

Compuesto I. β -sitosterol:

Este compuesto fue aislado de las fracciones 13-16, provenientes del proceso cromatográfico en columna de sílica-gel realizado al extracto de diclorometano, obteniéndose como cristales blancos, con un peso de 97,2 mg. La purificación de este esterol se logró empleando cromatografía de capa fina preparativa.

Fórmula molecular: $C_{29}H_{50}O$

Punto de fusión: 139-141 °C

Índice de refracción: $[\alpha]_D^{22}$: -36°

Peso molecular: 414 g/mol

Espectro Infrarrojo: (ver figura 22 y tabla 6)

Espectro de Masas: (ver figura 23)

Espectro de RMN ^{13}C : (ver figura 25 y tabla 7)

Espectro de RMN 1H : (ver figura 26 y tabla 8)

Experimento HMQC: (ver figura 29)

Experimento $^1H, ^1H$ COSY: (ver figura 30)

Experimento HMBC: (ver figura 31)

Compuesto II. (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano:

Este compuesto fue aislado de las fracciones 15-18 del extracto de metanol obtenidas por cromatografía en columna de Sephadex[®] LH-20 usando como eluyente metanol, y fue posteriormente purificado por cromatografía de capa fina preparativa empleando como eluyente una mezcla de diclorometano/acetona en proporciones 4:6 y con un total de 3 recorridos a cada placa, obteniéndose un peso de 51,8 mg. Este compuesto fue reportado anteriormente por Markham y Ternai en el año 1976.

Fórmula molecular: C₁₅H₁₄O₆

Punto de fusión: 248-249 °C

Índice de refracción: $[\alpha]_D^{22}$: -68°

Peso molecular: 290 g/mol

Espectro Infrarrojo: (ver figura 33 y tabla 11)

Espectro de Masas: (ver figura 34)

Espectro de RMN ¹³C: (ver figura 35 y tabla 12)

Espectro de RMN ¹H: (ver figura 36 y tabla 13)

Experimento HSQC: (ver figura 38)

Experimento ¹H, ¹H COSY: (ver figura 40)

Experimento HMBC: (ver figura 41)

Espectro UV: (ver figura 42)

Compuesto III. (2-*trans*)- 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano:

Este flavano fue obtenido de las fracciones 22-25 empleando el mismo procedimiento cromatográfico que se utilizó para el compuesto **II** y se recristalizó en metanol, con un peso de 42,1 mg. Este compuesto se reportó en el año 1987 por Naherstedt y colaboradores.

Fórmula molecular: C₁₅H₁₄O₆

Punto de fusión: 178-179 °C

Índice de refracción: [α]_D²²: +15°

Peso molecular: 290 g/mol

Espectro Infrarrojo: (ver figura 44 y tabla 16)

Espectro de Masas: (ver figura 45)

Espectro de RMN ¹³C: (ver figura 46 y tabla 17)

Espectro de RMN ¹H: (ver figura 47 y tabla 18)

Experimento HMQC: (ver figura 48)

Experimento ¹H, ¹H COSY: (ver figura 49)

Experimento HMBC: (ver figura 50)

Espectros UV: (ver figura 51)

4.8 Preparación del ensayo biológico: La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión del disco en agar (Rangel y colaboradores, 2001), modificada en el laboratorio. Este ensayo se hizo por duplicado. Se ensayaron los siguientes microorganismos:

- ✓ Cepas Gram-positivas:
 - *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
 - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (nosocomial)
- ✓ Cepas Gram-negativas:
 - *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357)
 - *Pseudomonas aeruginosa* (nosocomial)
- ✓ Hongos:
 - *Candida albicans* (ATCC 44548).

4.8.1 Preparación de los inóculos bacterianos: Se realizaron a partir de cepas frescas purificadas en un medio de cultivo básico; con un asa de aro se tomó una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85% estéril, hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0,5 McFarland (10^{6-8} UFC/ml).

4.8.2 Preparación de las placas e inoculación: Se colocaron 20 mL del preparado estéril de agar Mueller-Hinton en las placas de petri previamente esterilizadas, dejándose solidificar a temperatura ambiente. Una vez preparadas las placas se inocularon de forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con los inóculos bacterianos, utilizando para ello un hisopo de algodón estéril (García y colaboradores, 1998) (Velasco y colaboradores, 2007). Luego se colocó sobre la superficie un disco de papel de filtro (13 mm diámetro) previamente impregnado con 10 μ L del extracto en estudio, además fue colocado en la misma placa, el disco del control negativo respectivo, impregnado sólo con DMSO (dimetilsulfóxido) y el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo para cada uno de los microorganismos (figura 18) (tabla 4).

Tabla 4. Antibióticos de referencia como controles positivos de cada cepa bacteriana.			
Microorganismo	Compuesto de referencia (Antibiótico)	Cantidad impregnada en el disco (µg)	Marca
<i>E. faecalis</i>	Penicilina	10	BBL™
<i>S. aureus</i>	Vancomicina	30	BBL™
<i>K. pneumoniae</i>	Cefotaxima	30	Liofilchem s.r.l
<i>P. aeruginosa</i>	Polimixina B	300	BioDiscs
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	25	BBL™

4.8.3 Preincubación e incubación: Después de la colocación de los discos en las placas de agar Müeller-Hinton, éstas se preincubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y finalmente se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas en la estufa (De Los Rios y colaboradores, 1999) (Rondón y colaboradores, 2006) (Velasco y colaboradores, 2007).

4.8.4 Lectura de las pruebas: Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a revisar cada una de las placas. Se consideró como resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando un halo de inhibición del crecimiento bacteriano se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de dicho halo se interpretó como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana).

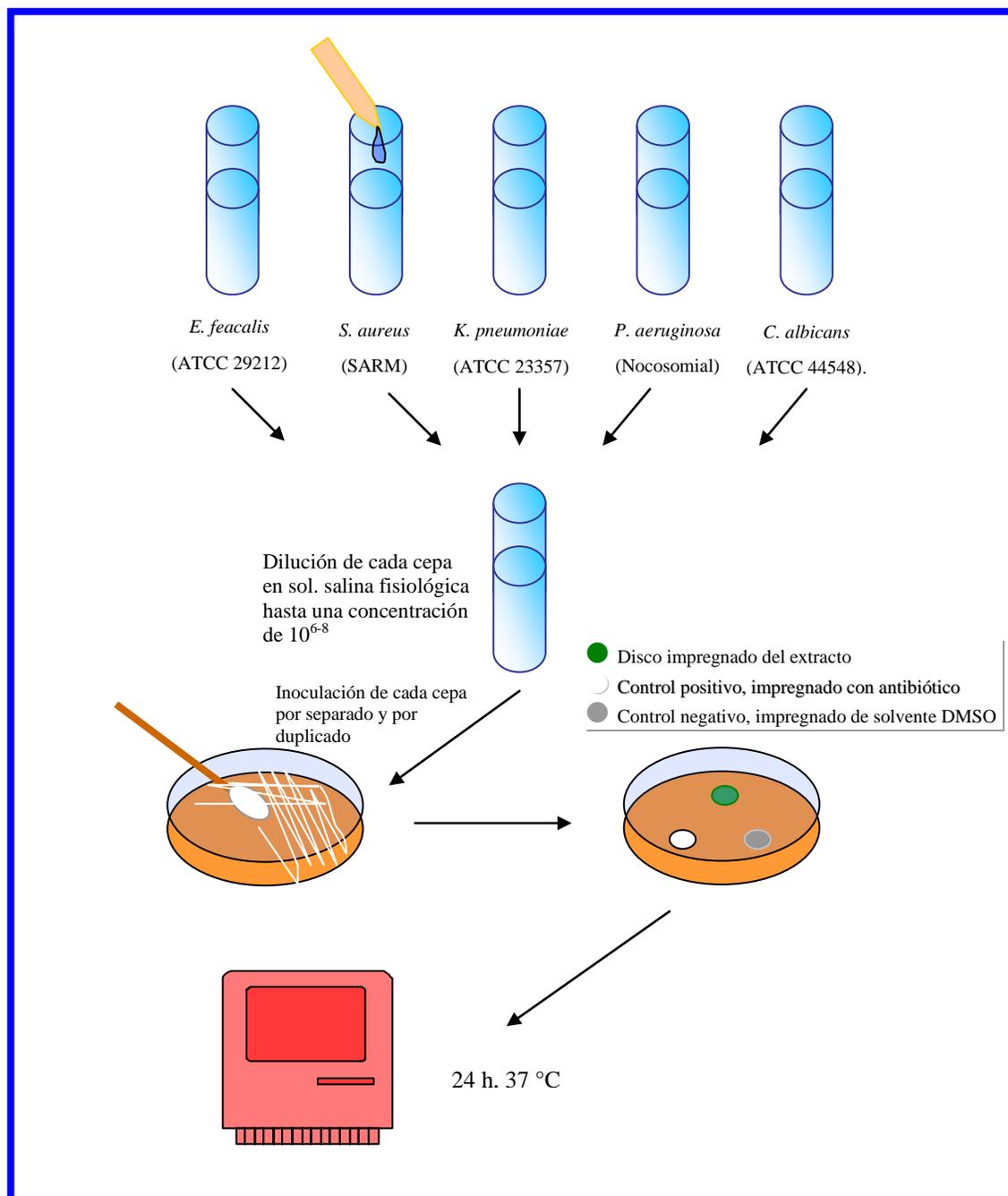


Figura 18. Procedimiento experimental empleado para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de *Heliocarpus americanus* L.

Tabla 5. Cantidades, origen y propiedades físicas de los compuestos I, II y III.

Compuesto	[I]	[II]	[III]
Extracto	Diclorometano	Metanol	Metanol
Fracciones	13-16	15-18	22-25
Estado físico	Sólido blanco	Sólido amarillo	Sólido amarillo
Masa (mg)	97,2	51,8	42,1
Punto de fusión (°C)	139-141	248-249	178-179
Rotación óptica específica ($[\alpha]_D^{22}$)	-36°	-68°	+15°
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₅₀ O	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Peso molecular (g/mol)	414	290	290
Nombre	β-sitosterol	(2- <i>cis</i>)- 3,3',4',5,7- pentahidroxiflavano	(2- <i>trans</i>)- 3,3',4',5,7- pentahidroxiflavano

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Heliocarpus americanus L. (figura 16) se recolectó en la ciudad de Mérida, en el sector La Hechicera, a la altura de la Capilla Universitaria, obteniéndose un peso total de 5 Kg. La planta fue identificada por el profesor Gilberto Morillo por comparación directa con ejemplares depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes (MER). Los frutos tanto maduros como verdes, fueron separados del resto del material vegetal, se dejaron secar a la sombra y luego fueron extraídos utilizando un aparato de extracción sólido-liquido (soxhlet) y siguiendo un orden de polaridad creciente con los siguientes solventes: hexano, diclorometano y metanol. En este estudio solo se hace referencia a los extractos de diclorometano y metanol.

El extracto de diclorometano fue analizado mediante cromatografía de columna de sílice (CC), empleando como eluyente una mezcla de hexano, diclorometano y metanol en diferentes proporciones. Las fracciones obtenidas que presentaron mayor interés fueron separadas mediante columna de Sephadex LH-20 y capa fina preparativa (CCFP), lográndose aislar un esteroide (figura 19).

El extracto de metanol fue separado utilizando una columna de Sephadex LH-20, empleando metanol como eluyente. Las fracciones de interés se separaron mediante CC y CCFP, aislándose dos derivados fenólicos de tipo flavonoide (figuras 20 y 21). Cada uno de estos compuestos fue analizado por medio de técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN ^1H y ^{13}C , y EM).

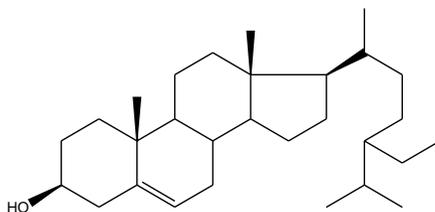


Figura 19. β -sitosterol.

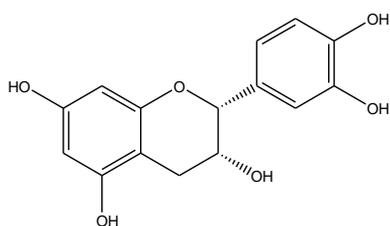


Figura 20. (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

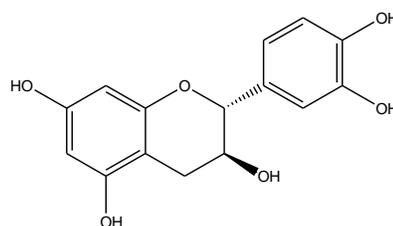


Figura 21. (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

5.1 Compuesto I. (β -sitosterol):

De las fracciones 13-16, de la cromatografía general realizada al extracto de diclorometano, se aisló después de repetidos procesos cromatográficos (Sephadex LH-20 y CCFP) un sólido de color blanco (97,2 mg) el cual cristalizó en forma de finas agujas con un punto de fusión de 139-141 °C y una rotación óptica de -36°.

En su espectro infrarrojo (IR) (figura 22) se notan bandas de absorción características de grupos hidroxilos a 3417 cm^{-1} y de dobles enlaces a 958 cm^{-1} (tabla 6). Del espectro de masas (figuras 23 y 24) se determinó el ión molecular a m/z 414.

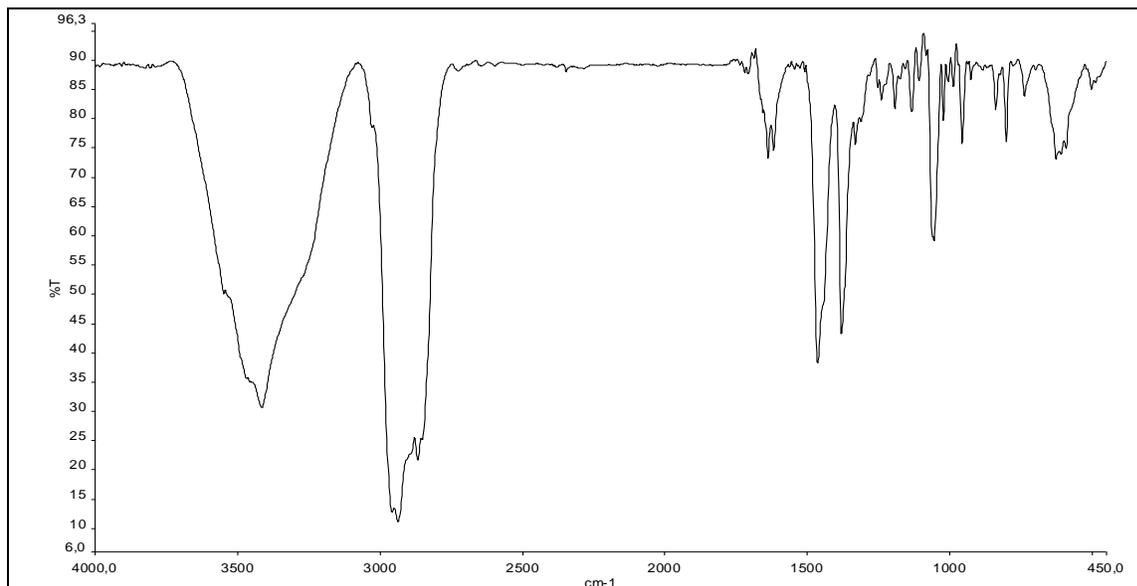


Figura 22. Espectro infrarrojo (KBr) de β -sitosterol.

Tabla 6. Bandas de absorción del espectro IR de β -sitosterol.							
Asignación	t O-H	t(a) C-H	t(s) =C-H	dt C-C	dep C-H	t C-O	dfp =C-H
ν (cm^{-1})	3417	2958	2867	1464	1381	1054	958

a=asimétrica, d=deformación, dep=deformación en el plano, dfp=deformación fuera del plano, s=simétrica, t=vibración de tensión, dt=deformación de tijera.

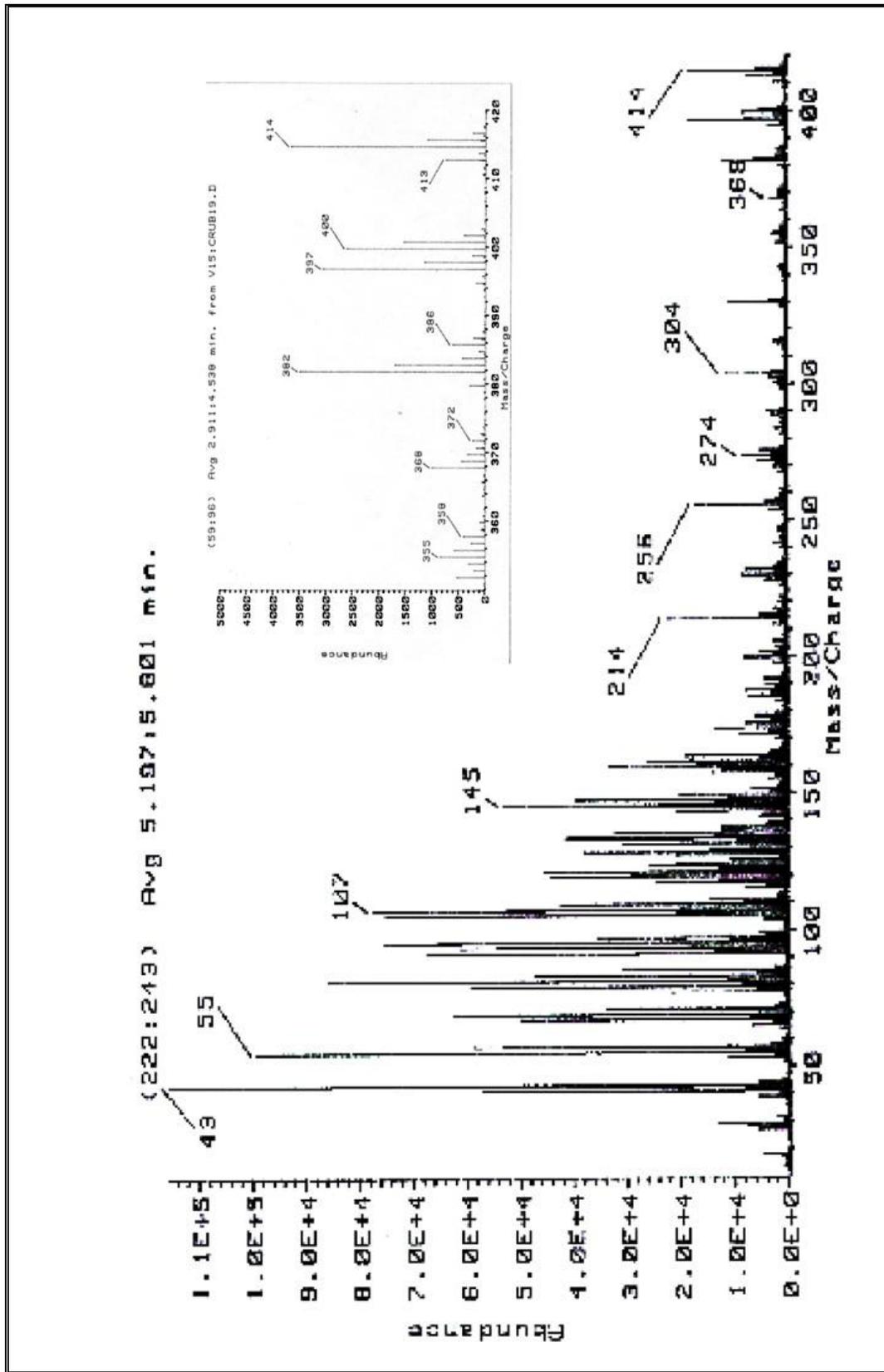


Figura 23. Espectro de masas de β -sitosterol.

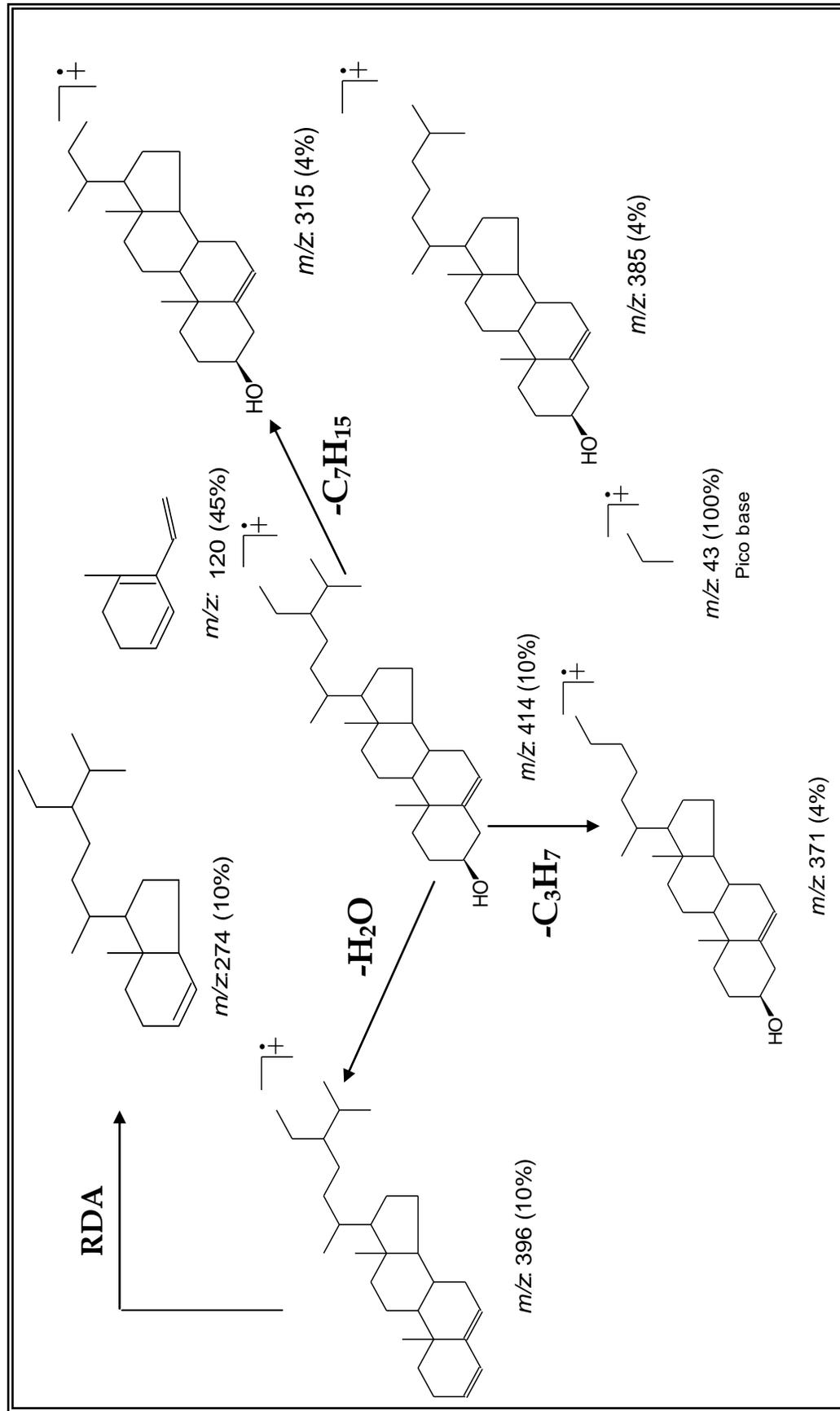


Figura 24. Patrón de fragmentación del espectro de masas de β -sitosterol. (RDA: Retro Diels-Alder)

En el espectro de banda ancha de RMN ^{13}C (figura 25) se observan un total de veintinueve señales de carbonos (tabla 7) desglosadas en un carbono sp^3 unido a un oxígeno a δ : 72,8; dos carbonos sp^2 a δ : 122,7 y δ : 141,8 y veintiséis carbonos sp^3 unidos a hidrógenos. En el experimento DEPT-135 se distinguen seis carbonos metilos, $-\text{CH}_3$, once carbonos metilenos, $-\text{CH}_2-$, y nueve carbonos metinos, $>\text{CH}-$ (incluyendo uno olefínico y uno oxigenado), por lo que los tres carbonos restantes corresponden a carbonos cuaternarios.

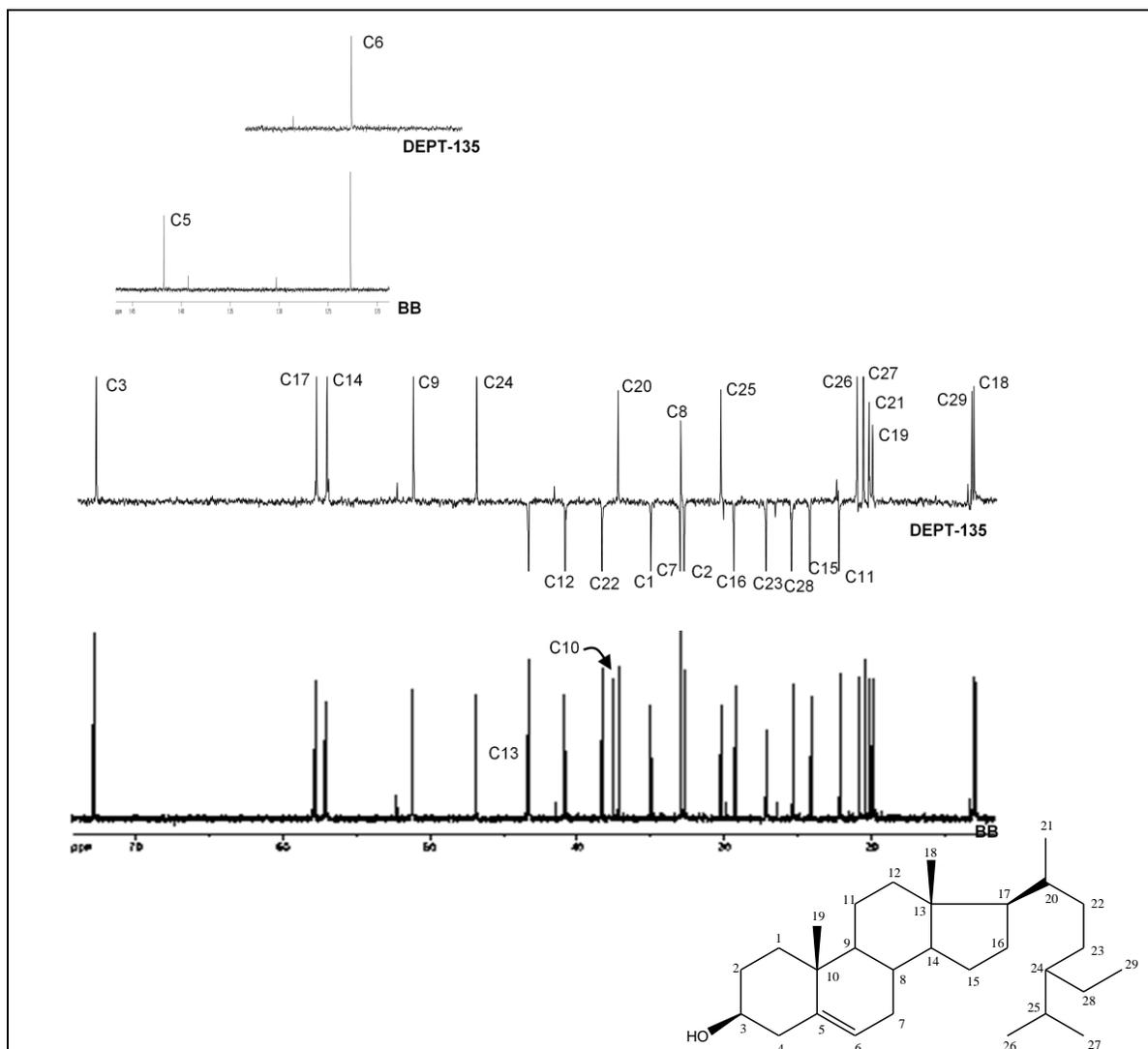


Figura 25. Espectro RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de β -sitosterol.

Tabla 7. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de β -sitosterol.										
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
δ (ppm)	38,2	32,8	72,8	43,2	141,8	122,7	32,9	32,7	51,1	37,5
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CHO-	-CH ₂ -	>C<	=C-H	-CH ₂ -	>C-H	>C-H	>C<
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
δ (ppm)	22,1	40,7	43,3	57,1	24,1	29,2	57,8	12,8	19,2	37,1
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CH-	-CH ₃	-CH ₃	>CH-
C	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
δ (ppm)	19,8	34,9	27,1	46,8	30,2	20,8	20,0	25,3	12,9	
Tipo	-CH ₃	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CH-	>CH-	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ -	-CH ₃	

El espectro RMN ^1H (figura 26) muestra señales de seis metilos entre δ : 0,80 y δ : 1,30, así como también, un gran grupo de señales de protones unidos a carbonos del esqueleto entre δ : 1,30 y δ : 2,30; además en δ : 3,52 se aprecia una señal ancha de un hidrógeno unido a un carbono oxigenado (que por los grupos funcionales vistos en el espectro IR se podría asignar como un grupo hidroxilo). También se logra distinguir una señal en δ : 5,35 característico de un hidrógeno olefínico (tabla 8).

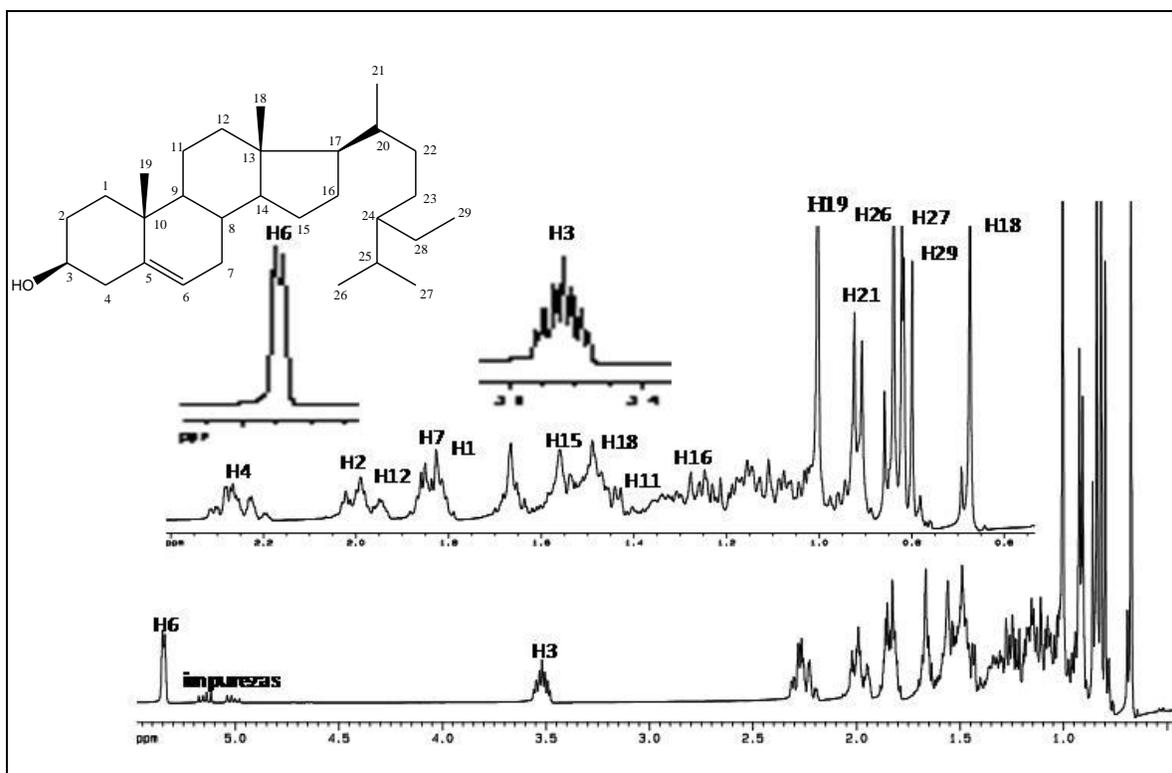


Figura 26. Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de β -sitosterol.

H	1_{ec}	1_{ax}	2_{ec}	2_{ax}	3	4_{ec}	6	7_{ec}	7_{ax}	8	9
δ(ppm)	1,84	1,07	1,99	1,50	3,52	2,28	5,35	1,91	1,84	1,44	0,92
M	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>tt</i>	<i>dd</i>	<i>d</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>m</i>	<i>c</i>
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	16; 5	13; 5	6	-	-	-	-
H	11_{ec}	12_{ec}	14	15_{ec}	16_{ec}	16_{ax}	17	18	19	20	21
δ(ppm)	1,48	2,01	1,10	1,55	1,28	1,25	0,96	0,59	1,04	1,35	0,95
M	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>d</i>
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5
H	22	23	24	25	26	27	28	29			
δ(ppm)	1,31	1,11	0,93	1,66	0,85	0,82	1,02	0,80			
M	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>t</i>			
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	7,0	7,0	-	7,7			

c=cuarteto, *d*=doblete, *dd*=doblete de dobletes, *m*=multiplete, *M*=multiplicidad, *s*=singulete *t*=tripleto, *tt*=tripleto de tripletes.

Estos datos permitieron establecer su fórmula molecular, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, correspondiente al ión molecular observado en el espectro de masas (figura 23); y si se toman en cuenta los cinco grados de insaturación que rige dicha fórmula, los grupos funcionales presentes, el número y la naturaleza de sus carbonos e hidrógenos que la conforman, podemos concluir que se trata de un esteroide tetracíclico de la serie del estigmastano (figura 27).

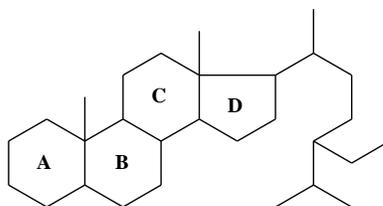


Figura 27. Esqueleto fundamental de los esteroides de la serie del estigmastano.

El análisis del experimento HMQC (figura 29) permitió correlacionar cada carbono con su respectivo hidrógeno. Por otro lado, en el experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (figura 30, tabla 9) se observan acoplamientos de un hidrógeno metino, H-3 (que resuena como un tripleto de tripletes a δ 3,52) con dos pares de hidrógenos vecinos: H-2 que aparecen entre δ 1,50-1,99 y con H-4 que se muestran entre δ 2,15-2,35. También se destacan correlaciones del hidrógeno olefínico H-6 (doblete de dobletes, δ 5,35) con un par de hidrógenos vecinos, (H-7_{ec}, δ 1,91 y H-7_{ax}, δ 1,84) tal como se muestra en la figura 28.

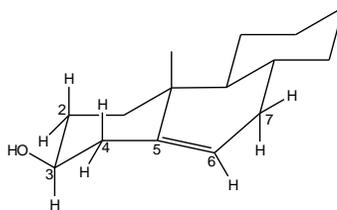


Figura 28. Acoplamientos del protón olefínico (H-6) con los protones vecinales (H-7) y de H-3 con los H-2 y H-4.

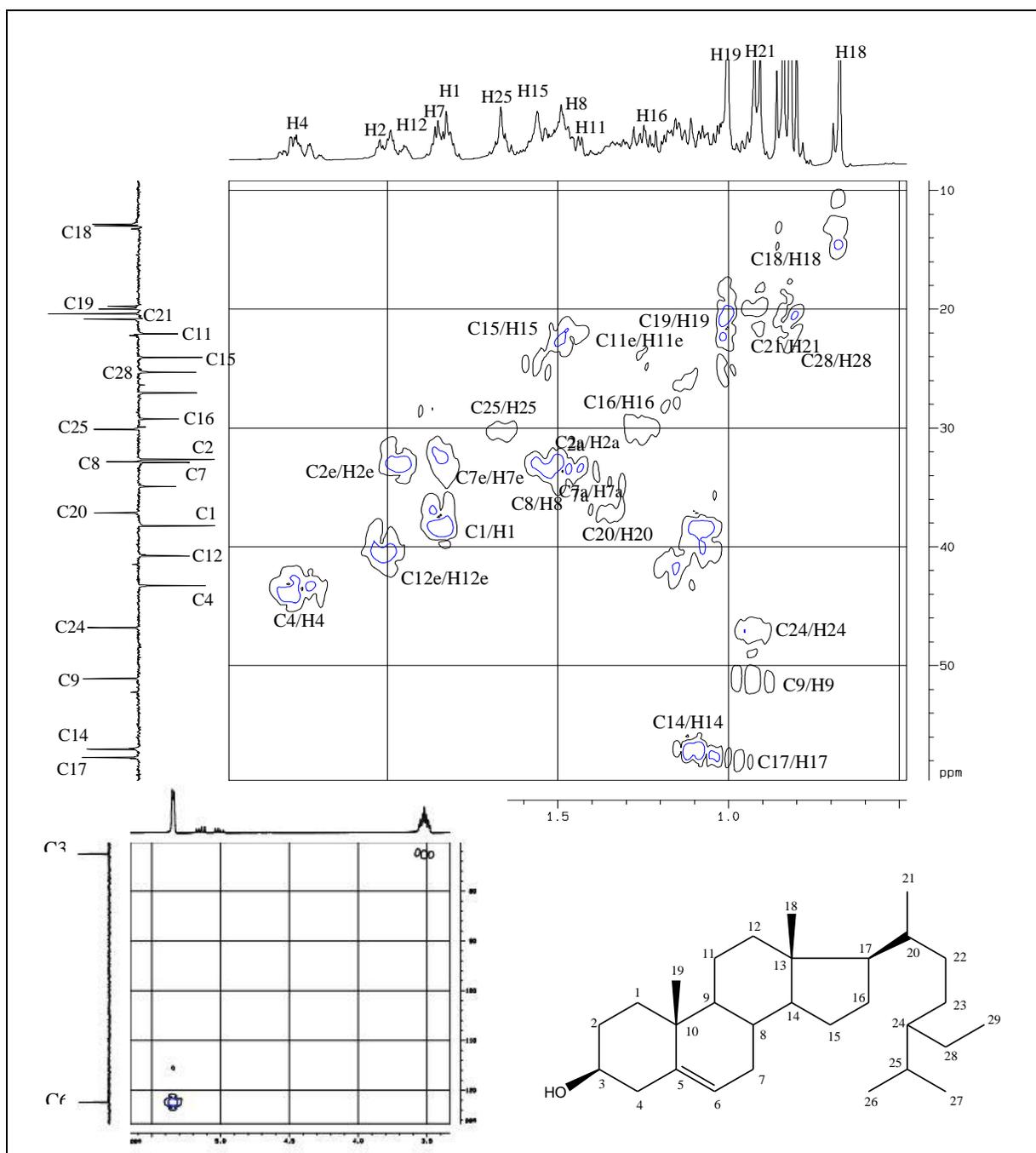


Figura 29. Experimento HMQC (CDCl_3) de β -sitosterol.

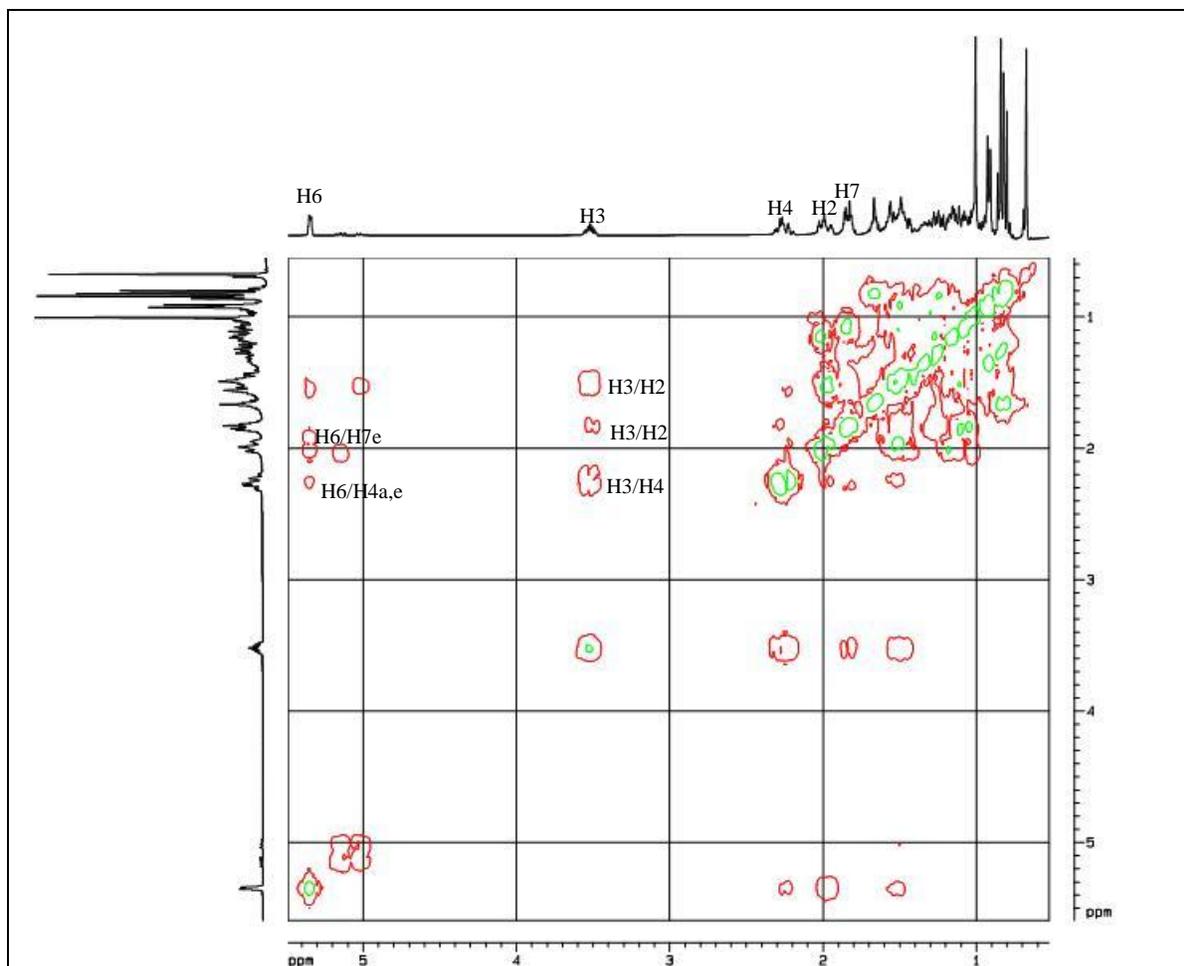
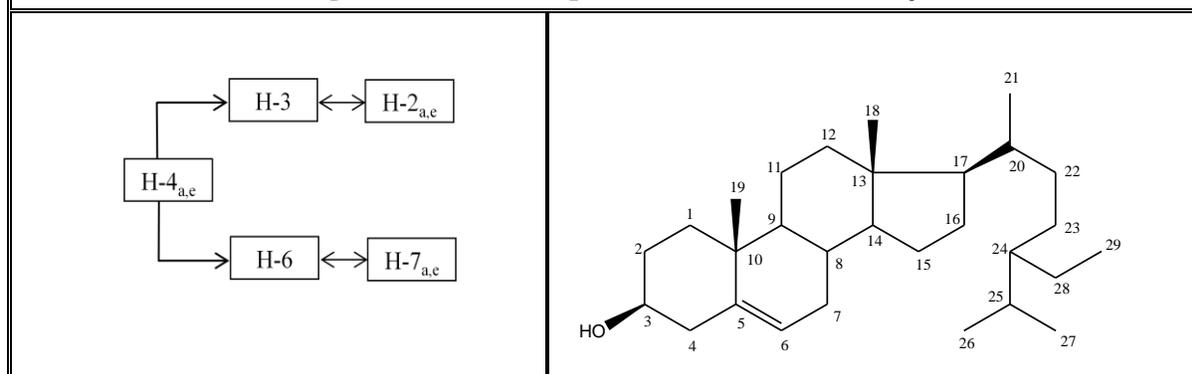


Figura 30. Experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (CDCl_3) de β -sitosterol.

Tabla 9. Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de β -sitosterol.



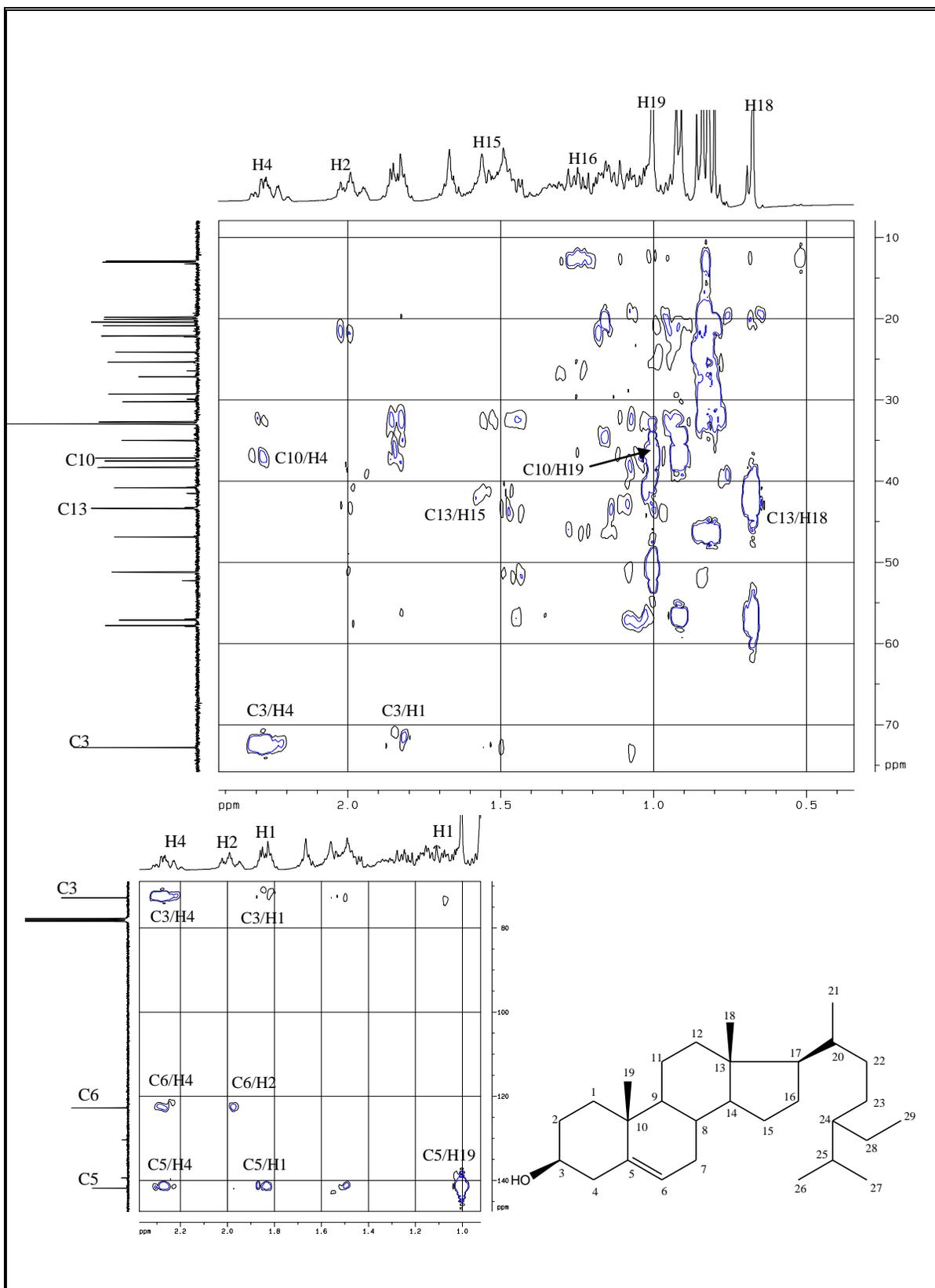


Figura 31. Experimento HMBC (CDCl_3) de β -sitosterol.

Tabla10. Interacciones significativas en el experimento HMBC de β -sitosterol.	

Con el punto de fusión y los análisis espectroscópicos anteriores, se ubicó en la bibliografía (Kovgandro y colaboradores, 2000) que el compuesto **I** correspondía al β -sitosterol (figura 30), el cual es un derivado de la serie del estigmastano; esta información permitió asignar correctamente los desplazamientos de cada carbono en el espectro de RMN ^{13}C y de los hidrógenos en el espectro de RMN ^1H , y para confirmar dicha estructura se hizo el estudio del experimento HMBC (figura 29) donde se perciben las correlaciones de carbonos e hidrógenos a tres enlaces (tabla 5).

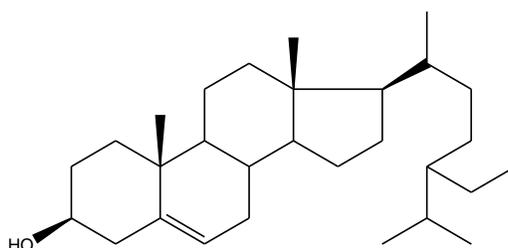


Figura 32. Estructura de **I** (β -sitosterol).

5.2 Compuesto II. (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano:

De las fracciones 15-18 del proceso cromatográfico general realizado en columna de Sephadex LH-20 para el extracto de metanol, y tras repetidos procesos de cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), se lograron aislar 51,8 mg de un sólido de color amarillo claro el cual presentó un punto de fusión de 248-249 °C y una rotación óptica de -68°. Dicho sólido al ser cromatografiado sobre capa fina (CCF), presentaba una coloración amarilla oscura bajo luz UV (366 nm) que se intensificaba al ser revelado con una solución de oleum (H₂O/H₂SO₄/AcOH 8/2/40 v/v), lo que es característico de derivados fenólicos, como los flavonoides.

En el espectro IR (figura 33), se observan bandas de vibración de tensión O-H a 3457 cm⁻¹, correspondientes a hidroxilos fenólicos, vibraciones de tensión =C-H a 2932 cm⁻¹, bandas de tensión C=C de carbonos sp² a 1521 cm⁻¹, además se aprecian bandas de vibraciones de tensión de enlaces C-O a 1143 cm⁻¹ (tabla 11). El espectro de masas presentó un ión molecular de 290 m/z (figura 34).

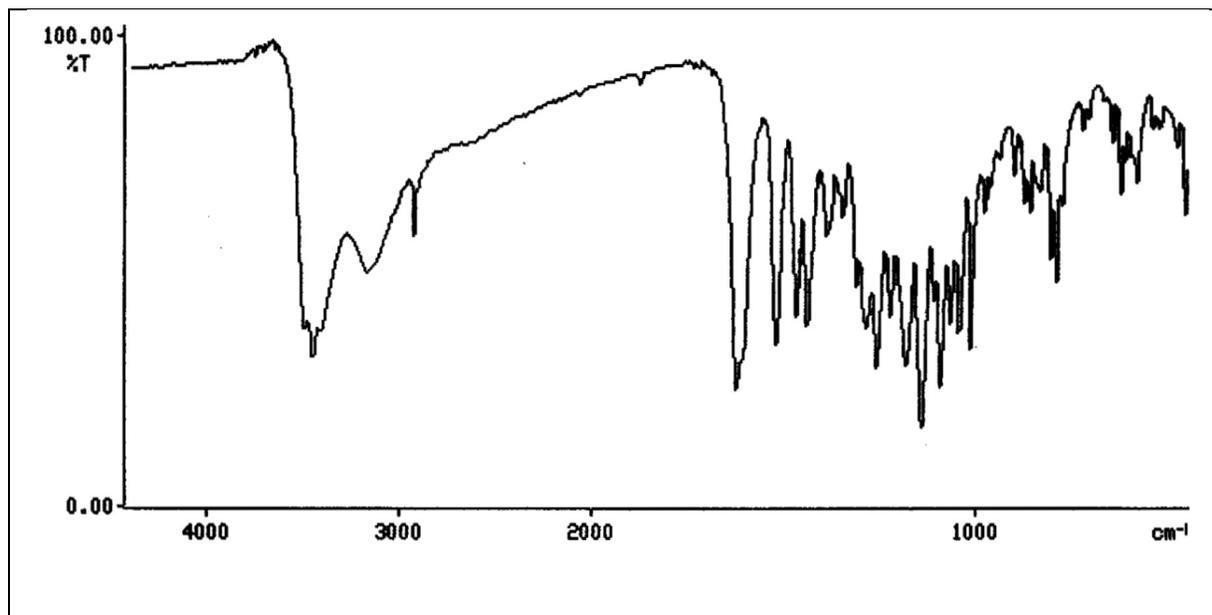


Figura 33. Espectro infrarrojo (KBr) de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

Tabla 11. Bandas de absorción del espectro IR de (2-cis)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.					
Asignación	t O-H	t =C-H	t C=C	t C-O	dfp =C-H
ν (cm ⁻¹)	3457	2932	1521	1143	794

dfp=deformación fuera del plano, t=vibración de tensión.

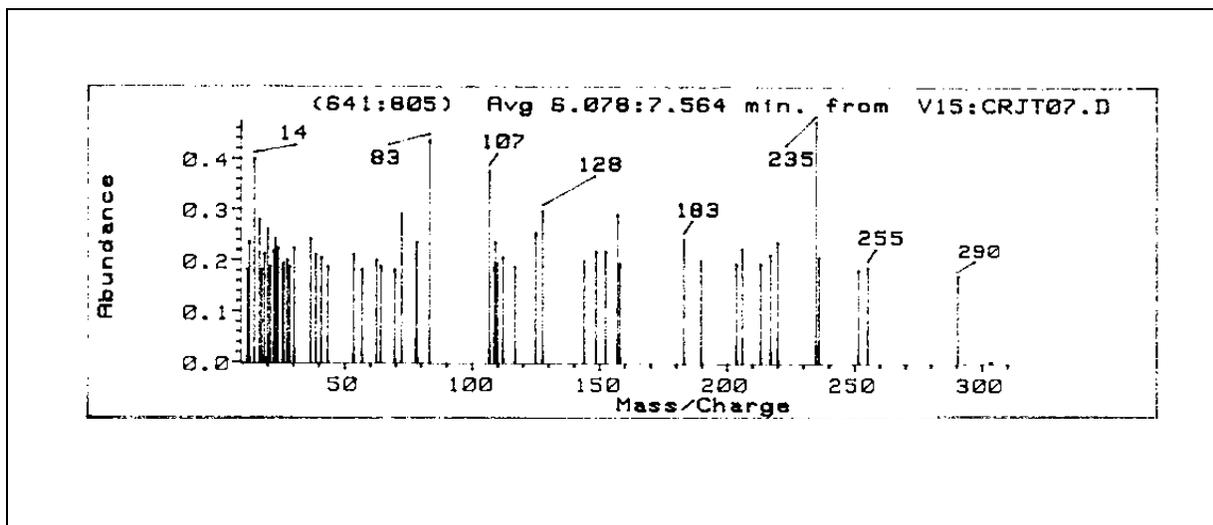


Figura 34. Espectro de masas de (2-cis)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano .

En el espectro de RMN ¹³C de banda ancha (figura 35, tabla 12), se observan un total de 15 carbonos, y según el desplazamiento químico, se distingue un metileno (δ 28,4), siete señales de carbonos sp² cuaternarios, de los cuales cinco señales corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados (δ 156,7; 156,4; 155,9; 144,6; 144,7) y dos a carbonos solo unidos a carbonos (δ 98,7 y 130,8); además se observan dos carbonos sp³ oxigenados (δ 78,2 y δ 65,1), y cinco señales de metinos (δ 118,2; 115,1; 114,9; 95,3 y 94,3).

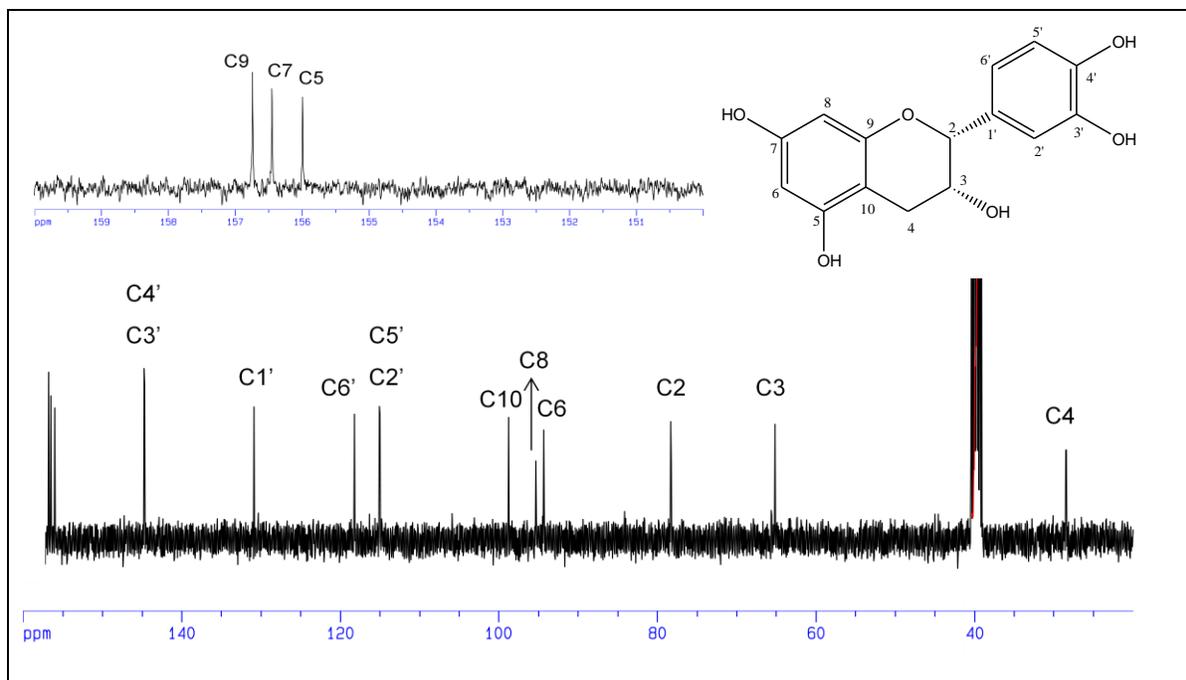


Figura 35. Espectro RMN ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz) de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

Tabla 12. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.								
C	2	3	4	5	6	7	8	9
$\delta(\text{ppm})$	78,2	65,1	28,4	155,9	94,3	156,4	95,3	156,7
Tipo	>CHO-	>CHO-	>CH ₂	=C(O)-	=CH-	=C(O)-	=CH-	=C(O)-
C	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
$\delta(\text{ppm})$	98,7	130,8	114,9	144,6	144,7	115,1	118,2	
Tipo	=C<	=C<	=CH-	=C(O)-	=C(O)-	=CH-	=CH-	

En el espectro RMN ^1H (figura 36, tabla 13) se observan cinco señales ubicadas a campo bajo, en la zona de los protones aromáticos, que integran para cinco hidrógenos (δ : 6,88-5,71). A campo alto y medio se ubican cuatro señales que integran para cuatro protones (δ 2,45-4,66), y de las cuales dos de ellas, según sus desplazamientos químicos, son características de hidrógenos enlazados a carbonos sp^3 oxigenados (δ 4,66 y δ 3,99).

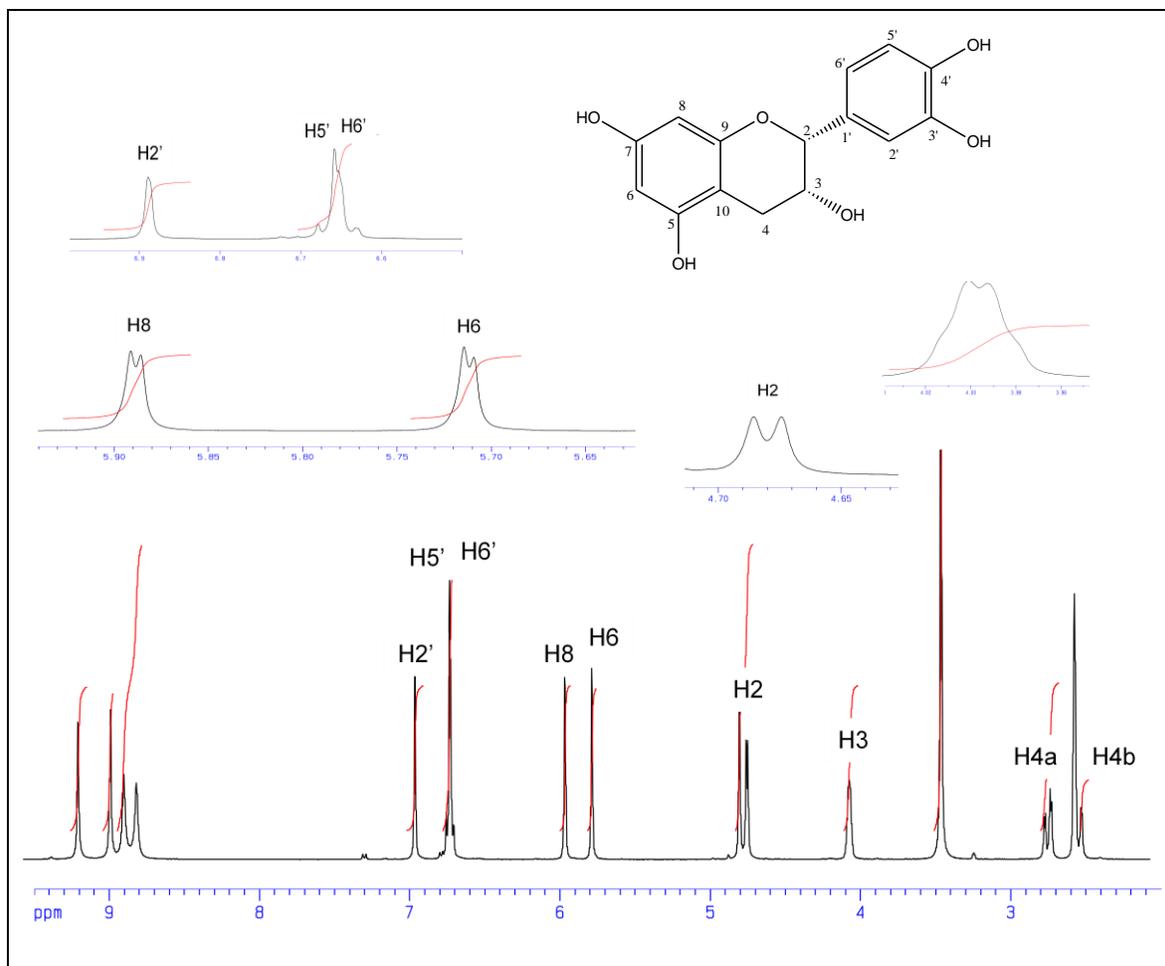


Figura 36. Espectro RMN ^1H (DMSO- D_6 , 400 MHz) de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavono.

Tabla 13. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^1H de (2- <i>cis</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavono.									
H	2	3	4a	4b	6	8	2'	5'	6'
$\delta(\text{ppm})$	4,66	3,99	2,67	2,45	5,71	5,89	6,88	6,66	6,64
M	<i>d</i>	<i>ddd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>dd</i>
<i>J</i> (Hz)	2,2	4,0;2,2;4,6	16,1;4,0	16,1;4,6	2,1	2,1	2,1	8,1	8,1; 2,1

d=doblete, *dd*=doblete de dobletes, *ddd*=doblete de doblete de dobletes, M=multiplicidad.

La información obtenida de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , donde se puede observar la naturaleza de los hidrógenos y carbonos presentes, permite determinar como fórmula molecular del compuesto **II**, $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, lo que indica que presenta 9 insaturaciones. La ausencia en el espectro RMN ^{13}C de una señal correspondiente a un grupo carbonilo y de su banda característica en el espectro IR, junto a las características físicas ya antes

mencionadas, nos permite proponer como estructura base el esqueleto de los flavanos (figura 37) (Marcano y Hasegawa, 2002; Harborne, 1988, 1992, 1994). Dicho esqueleto presenta una insaturación que corresponde al anillo pirano y 8 insaturaciones de dos anillos aromáticos, lo que concuerda con las 9 insaturaciones esperadas según la fórmula molecular para el compuesto **II**.

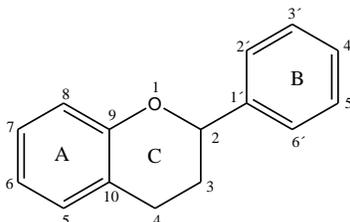


Figura 37. Esqueleto básico de los flavanos.

Mediante el uso del experimento HSQC (figura 38) se asignaron los carbonos presentes en el esqueleto flavonoide con sus respectivos hidrógenos, además se determinó la presencia de un metileno ubicado a δ 28,4, el cual presentó conectividad con las señales de dos hidrógenos localizados a δ 2,45 y δ 2,67, que por su desplazamiento químico es característico del metileno que se encuentra en la posición C-4 de los flavanos. Es importante señalar que en este experimento las correlaciones de color rojo corresponden a las señales debidas a metilenos, y las de color azul corresponden a metinos y metilos.

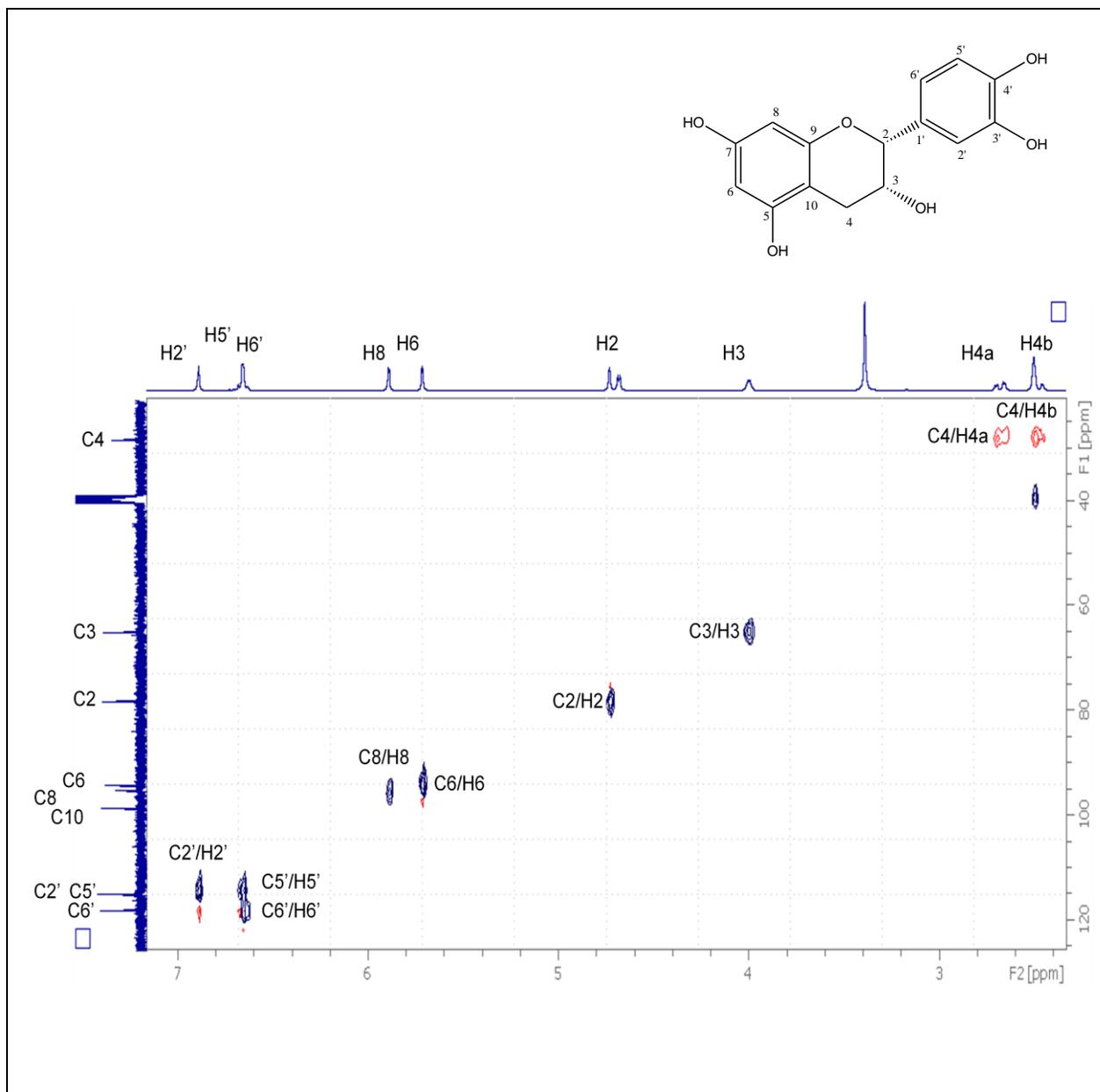


Figura 38. Experimento HSQC (DMSO- D_6) de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavano.

Con la finalidad de conocer el patrón de sustitución en el esqueleto flavonoide y asignar los hidrógenos presentes, se procedió a realizar el análisis del experimento $^1H, ^1H$ -COSY (figura 40, tabla 14), en el cual se observan las correlaciones de varias señales características de los hidrógenos presentes en el anillo pirano (anillo C) en las posiciones C-2, C-3 y C-4 con sus hidrógenos vecinos; una de ellas corresponde a un doblete de dobletes que integra para un protón ubicado a δ 3,99 (H-3) y que presenta

acoplamiento con los hidrógenos del metileno [δ 2,45 y δ 2,67 (H4a y H4b)] y con el protón localizado a δ 4,66 (H-2); además se distinguen la correlación de un doblete que integra para un hidrógeno [δ 4,66 (H-2)], correspondiente al protón del carbono C-2, con su hidrógeno vecino [δ 3,99 (H-3)]. En este experimento también se distinguen dos señales correspondientes a dos dobletes (δ 5,71 y δ 5,89) (H6 y H8) que integran para un protón cada una y que debido a su desplazamiento químico pertenecen al anillo **A** del flavonoide.

La presencia de un sistema AMX, conformado por tres señales a δ 6,66 (H5', doblete, $J= 8,1$ Hz), δ 6,64 (H6', doblete de dobletes, $J_1= 2,1$ y $J_2= 8,1$ Hz) y δ 6,88 (H2', doblete, $J= 2,1$ Hz) que integran para un protón cada una, que definen al anillo **B** como trisustituído en las posiciones C-1', C-3' y C-4'. Basándonos en esta información, procedimos a asignar los carbonos desde C-2 a C-6' según los valores conocidos para flavonoides que presentan dicho patrón de sustitución (figura 39) (Bohm, 1998).

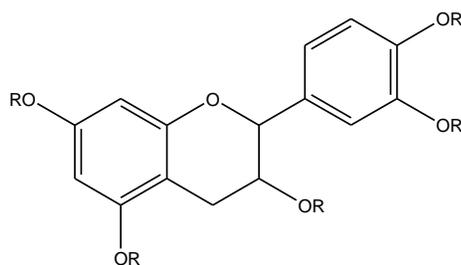


Figura 39. Patrón de sustitución del compuesto II.

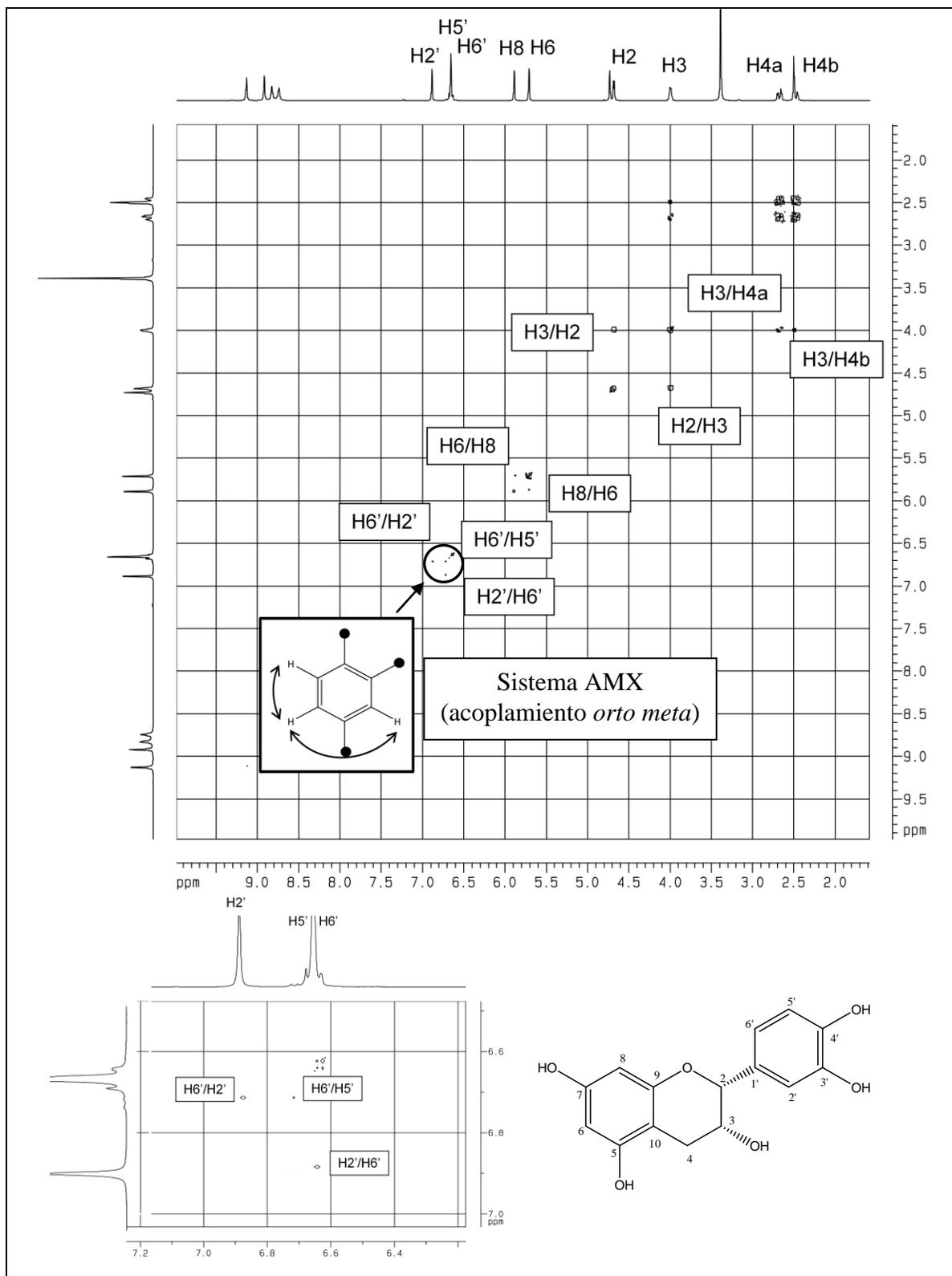
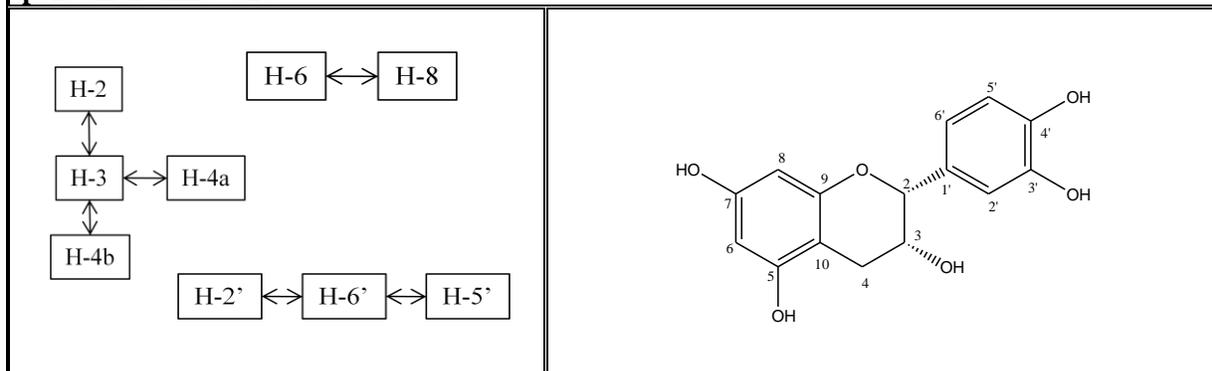


Tabla 14. Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.



Para determinar las posiciones de algunos sustituyentes presentes en el compuesto **II** y confirmar el patrón de sustitución propuesto, se procedió al análisis del experimento HMBC, el cual permite observar las correlaciones C-H a dos y tres enlaces (figura 41), de esta manera se observa una correlación entre el carbono asignado como C-4 (δ 28,4) y el protón ubicado a δ 4,66 asignado como H-2; también se distingue la correlación del carbono localizado a δ 78,2 (C-2) con el hidrógeno que resonaba a δ 6,88 (H-2'), con los protones ubicados sobre el metileno [δ 2,45 y δ 2,67 (H-4a y H-4b)] y con el protón asignado como H-6' (δ 6,64) (tabla 15).

Otra correlación observada en este experimento corresponde al carbono C-9 (δ 156,7) con varios hidrógenos como son: H-2 (δ 4,66), H-6' (δ 6,64) y H-4a y H-4b (δ 2,45 y δ 2,67). Por su parte el carbono localizado a δ 130,8 correlacionó con los protones H-2 (δ 4,66), H-6' (δ 6,64), H-3 (δ 3,99) y H-5' (δ 6,66). Con respecto al carbono C-3 (65,1) se observó su acoplamiento con los hidrógenos del metileno [δ 2,45 y δ 2,67 (H-4a y H-4b)] y con H-2 (δ 4,66).

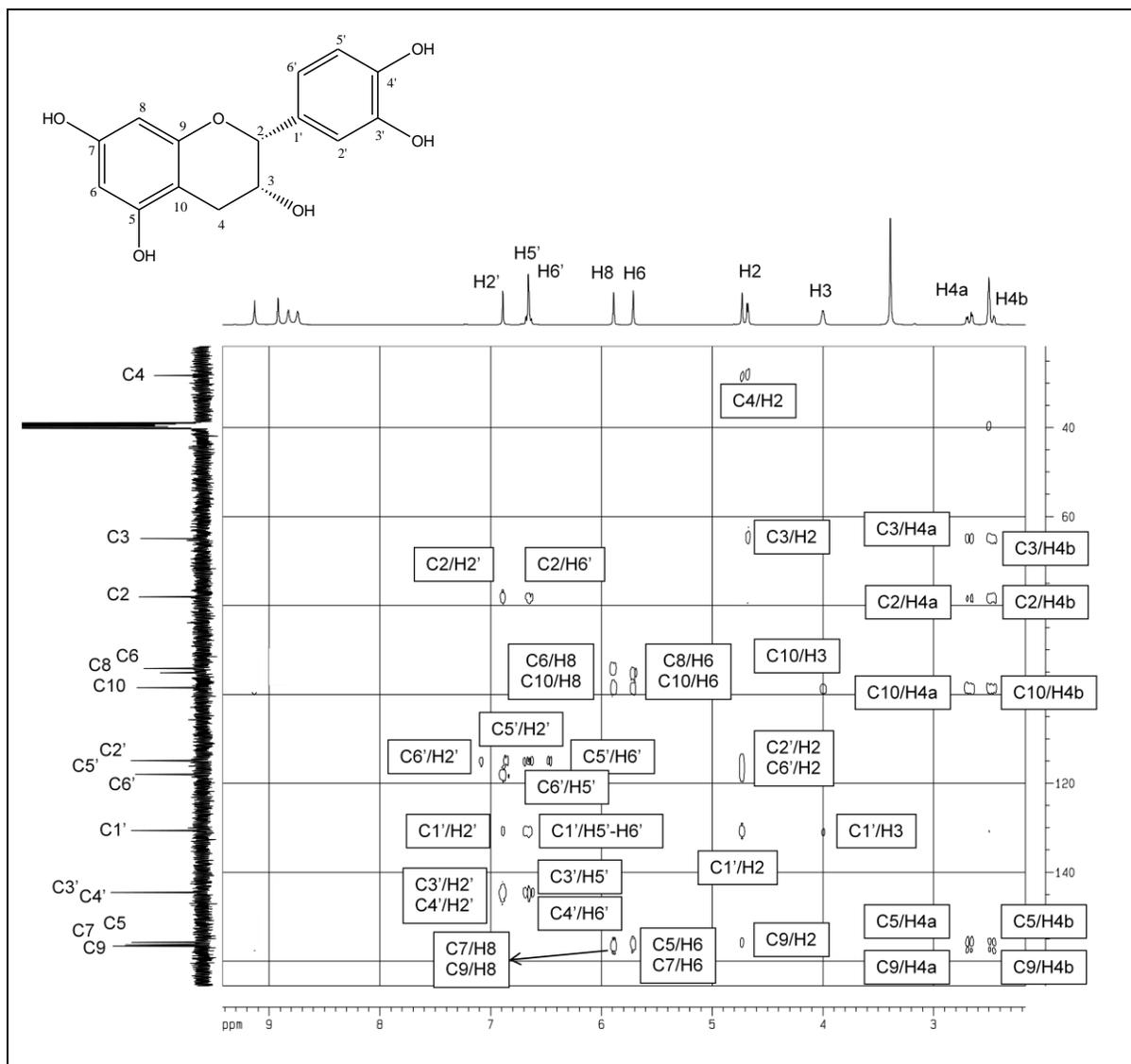


Figura 41. Experimento HMBC (DMSO- D_6) de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

Tabla 15. Interacciones significativas en el experimento HMBC de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

<p> $H-4a \leftrightarrow C-3 \leftrightarrow H-2$ $H-4a \leftrightarrow C-2 \leftrightarrow H-2'$ $H-2' \leftrightarrow C-6' \leftrightarrow H-2$ $H-2' \leftrightarrow C-4' \leftrightarrow H-6'$ </p>	<p> $H-5' \leftrightarrow C-1' \leftrightarrow H-2'$ $H-6' \leftrightarrow C-1' \leftrightarrow H-2'$ $H-3 \leftrightarrow C-1' \leftrightarrow H-2'$ $H-2 \leftrightarrow C-1' \leftrightarrow H-2'$ $H-4a \leftrightarrow C-9 \leftrightarrow H-8$ $H-3 \leftrightarrow C-9 \leftrightarrow H-8$ </p>	
---	--	--

El espectro UV del compuesto **II** en MeOH (figura 42) presentó dos bandas bien definidas con longitudes de onda características de los flavanos (240 y 280 nm).

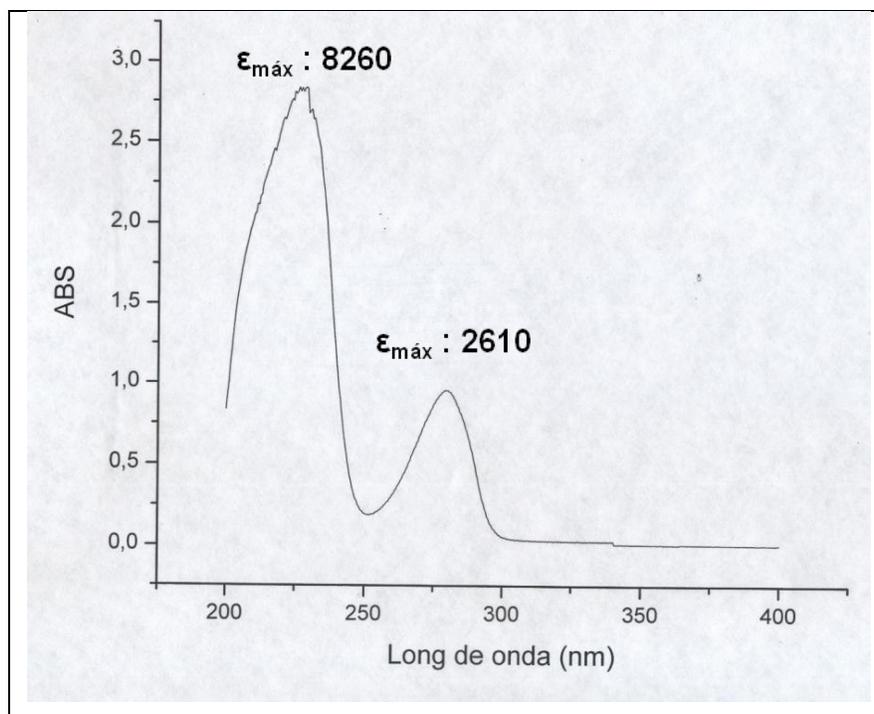


Figura 42. Espectro UV de (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano en MeOH.

De acuerdo al análisis espectral, a lo reportado en la bibliografía (Markham y Ternai, 1976) (Agrawal, 1987), y a la constante de acoplamiento observada en el espectro de RMN ^1H entre los protones H-2 (δ 4,66) y H-3 (δ 3,99) ($J= 2,2$ Hz) la cual indica un ángulo diedral próximo a 60° , se logró determinar que el compuesto **II** correspondía al (2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano (figura 43).

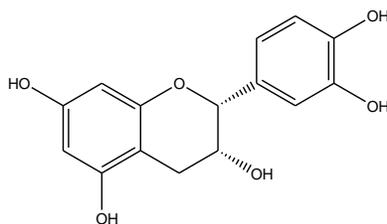


Figura 43. Estructura de **II** [(2-*cis*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano].

5.3 Compuesto III. (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano:

De las fracciones 22-25 de la cromatografía general realizado en columna de Sephadex LH-20 al extracto de metanol, y tras repetidos procesos cromatográficos de capa fina preparativa (CCFP), se lograron aislar 42,1 mg de un sólido amarillo el cual presentó un punto de fusión de 178-179 °C y una rotación óptica de +15°. Este sólido al ser cromatografiado sobre capa fina (CCF), presentaba características similares al compuesto **II**, ya que la coloración observada bajo luz UV (366 nm) era amarilla oscura y al ser revelado con una solución de oleum (H₂O/H₂SO₄/AcOH 8/2/40) se tornaba más intensa, lo que sugirió que nuevamente se estaba en presencia de un compuesto de tipo flavonoide.

El espectro IR (figura 44, tabla 16) presenta señales correspondientes a vibraciones de tensión O-H a 3411 cm⁻¹ características de grupos hidroxilos fenólicos, vibraciones de tensión =C-H a 2950 cm⁻¹, vibraciones de tensión del enlace C=C a 1514 cm⁻¹ y vibraciones de tensión de enlaces C-O a 1144 cm⁻¹. En el espectro de masas (figura 45) se observó un ión molecular a m/z 290.

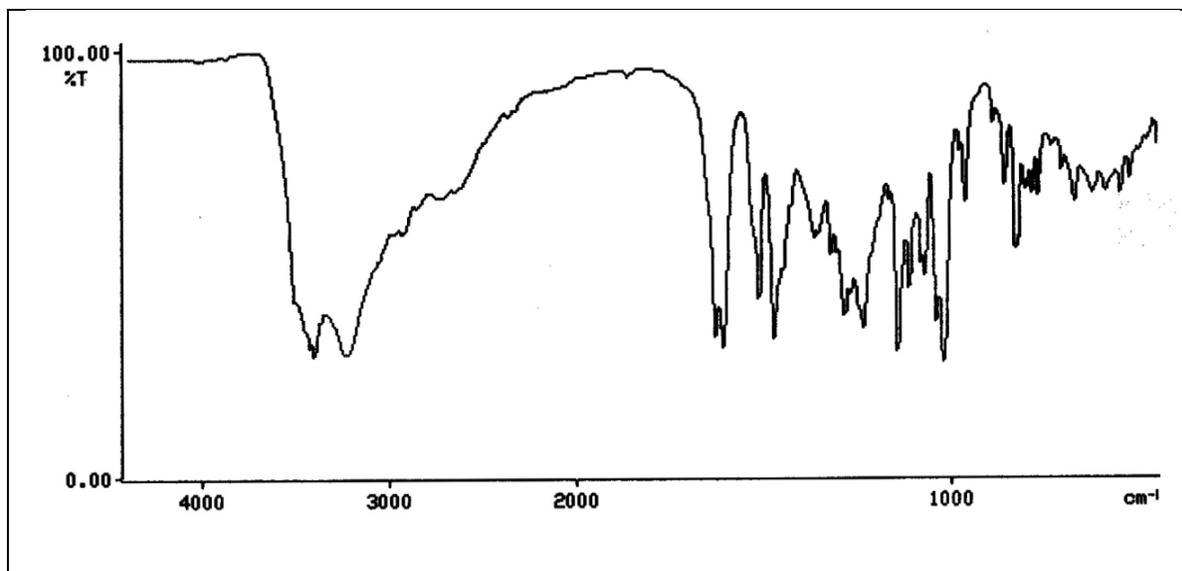


Figura 44. Espectro infrarrojo (KBr) de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano .

Tabla 16. Bandas de absorción del espectro IR de (2-trans)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.					
Asignación	t O-H	t =C-H	t C=C	t C-O	dfp =C-H
$\nu(\text{cm}^{-1})$	3411	2950	1514	1144	831

dfp=deformación fuera del plano, t=vibración de tensión.

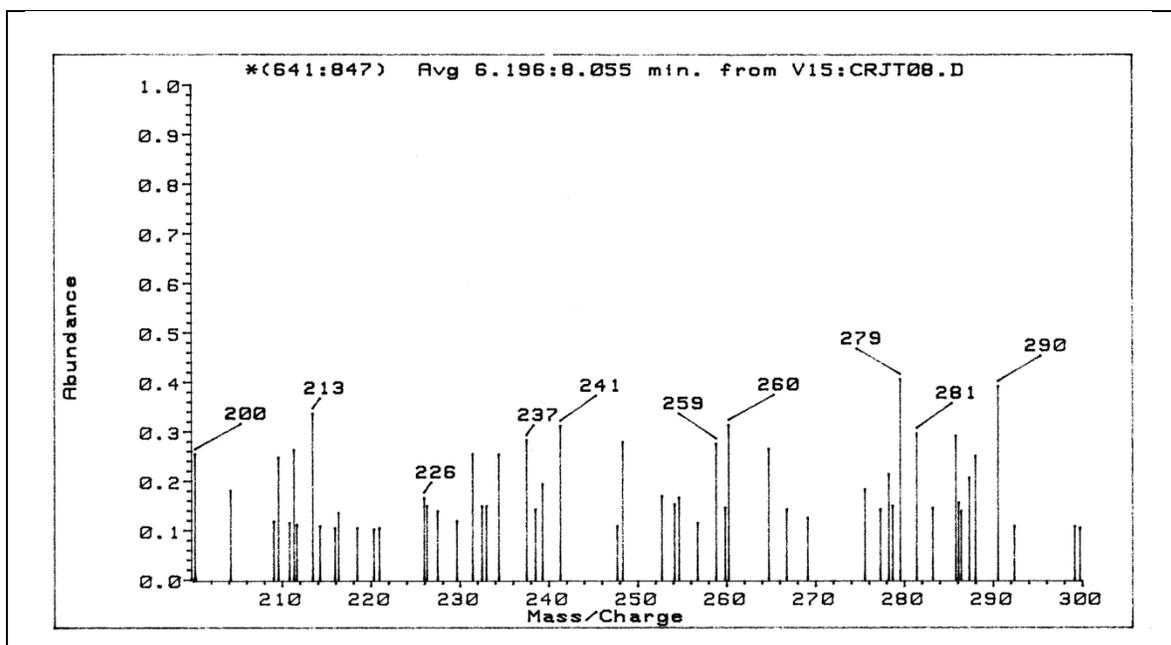


Figura 45. Espectro de masas de (2-trans)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano .

El espectro de RMN ^{13}C (figura 46, tabla 17), con un total de 15 carbonos, es similar al del compuesto **II** y en el espectro de RMN ^1H (figura 47, tabla 18) se observaron señales similares en número y forma a las del compuesto **II**, presentando solo ligeras diferencias en los desplazamientos químicos reportados para el compuesto anterior. Tomando en cuenta estas informaciones espectroscópicas, y debido a las características físicas descritas anteriormente, presumimos que el compuesto **III** corresponde a una estructura isomérica del compuesto **II**.

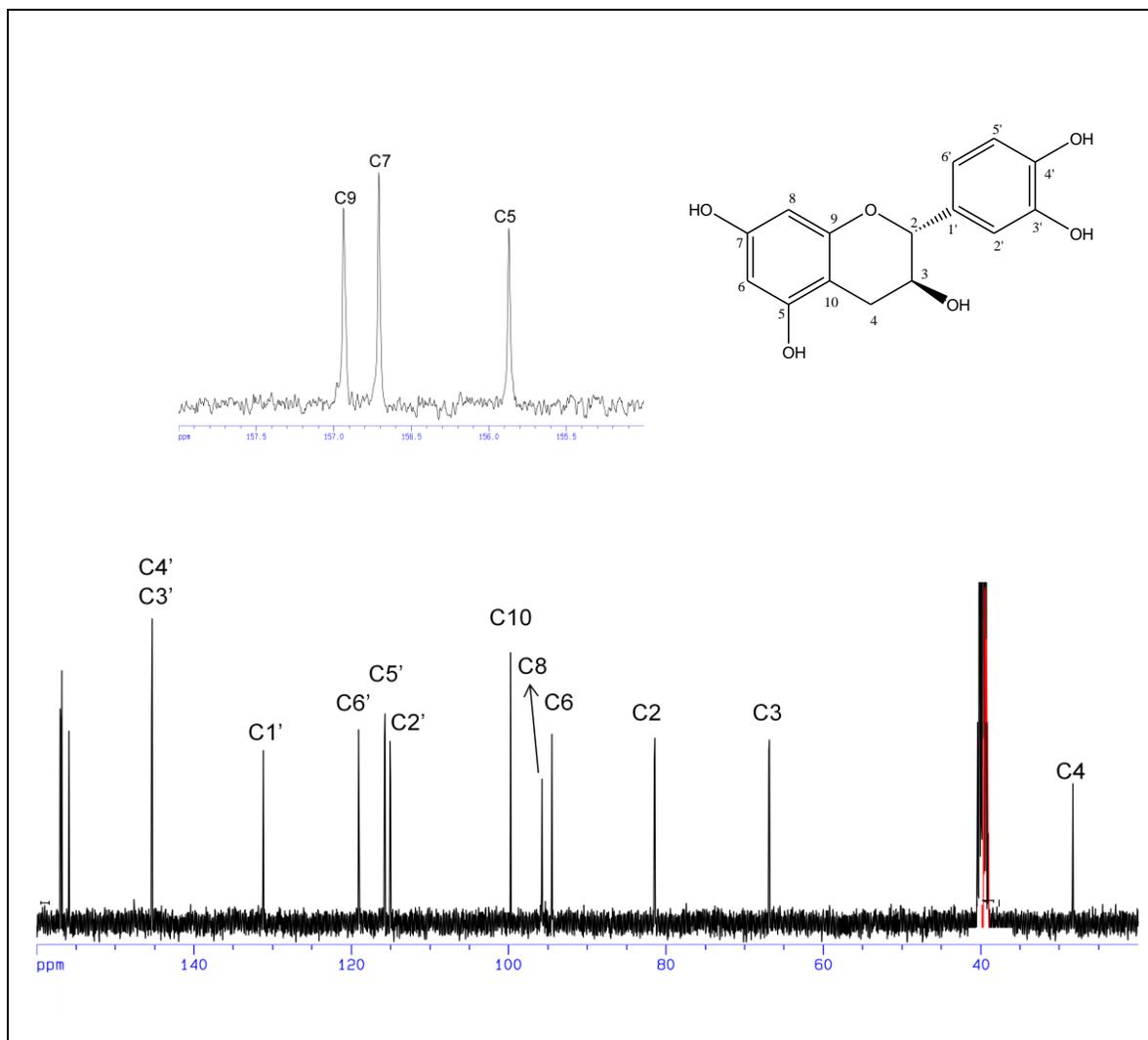


Figura 46. Espectro RMN ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz) de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

Tabla 17. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^{13}C de (2- <i>trans</i>)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.								
C	2	3	4	5	6	7	8	9
$\delta(\text{ppm})$	81,4	66,8	28,2	155,8	94,5	156,7	95,7	156,9
Tipo	>CHO-	>CHO-	>CH ₂	=C(O)-	=CH-	=C(O)-	=CH-	=C(O)-
C	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
$\delta(\text{ppm})$	99,7	131,1	115,0	145,3	145,4	115,7	119,0	
Tipo	=C<	=C<	=CH-	=C(O)-	=C(O)-	=CH-	=CH-	

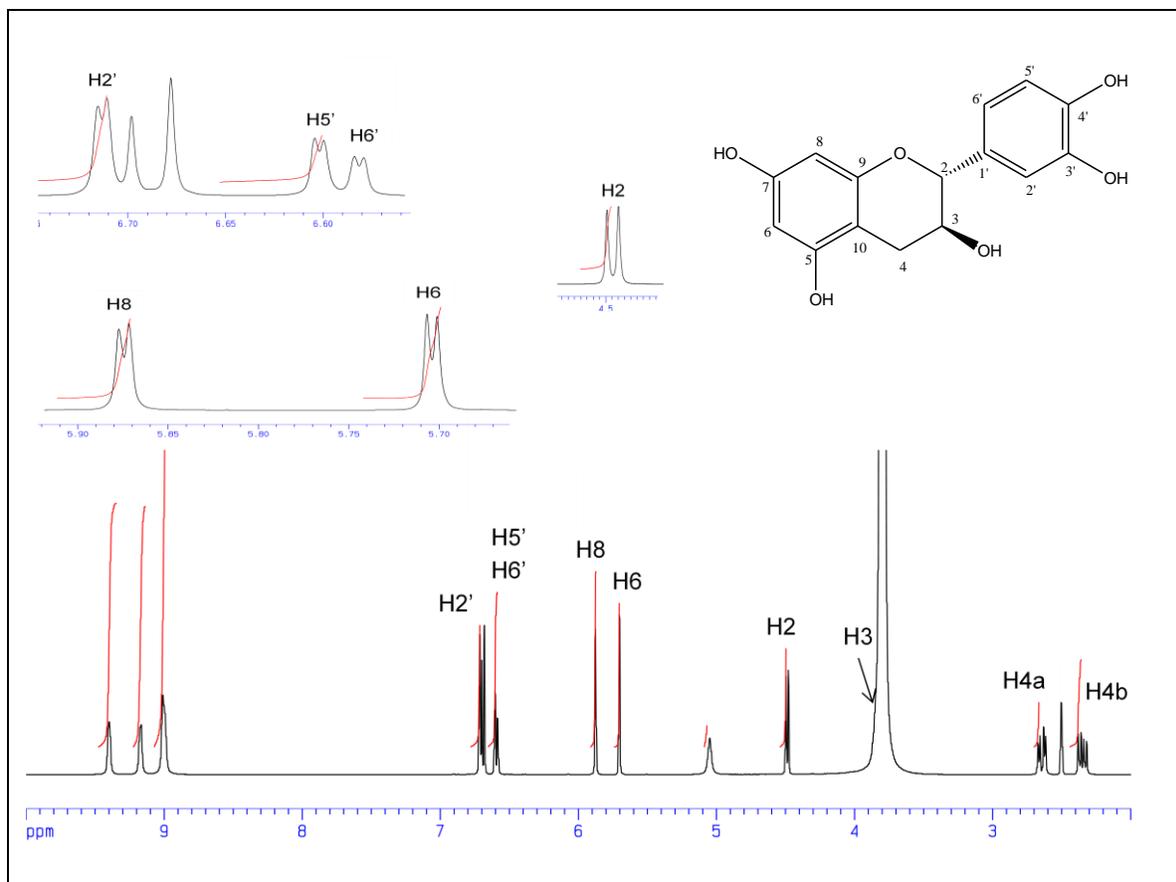


Figura 47. Espectro RMN ^1H (DMSO- D_6 , 400 MHz) de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

Tabla 18. Desplazamientos (δ) en el espectro RMN ^1H de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

H	2	3	4a	4b	6	8	2'	5'	6'
δ (ppm)	4,48	3,82	2,64	2,34	5,70	5,87	6,71	6,60	6,58
M	<i>d</i>	<i>ddd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>dd</i>
<i>J</i> (Hz)	7,4	7,9;7,4;5,3	16,0; 5,3	16,0; 7,9	2,2	2,2	2,0	8,0	8,0;2,0

d=doblete, *dd*=doblete de dobletes, *ddd*=doblete de doblete de dobletes, M=multiplicidad.

Con la finalidad de confirmar lo antes mencionado, se procedió al análisis de los espectros bidimensionales, encontrando una gran similitud respecto al compuesto **II**, tanto entre las señales como entre las interacciones de los diferentes experimentos (COSY, HMQC y HMBC) (figuras 48, 49 y 50) (tabla 19 y 20), lo que facilitó el análisis y la discusión de dichos espectros. Así pues, se pudo determinar que el compuesto **III** poseía el mismo patrón de sustitución sobre el esqueleto flavonoide.

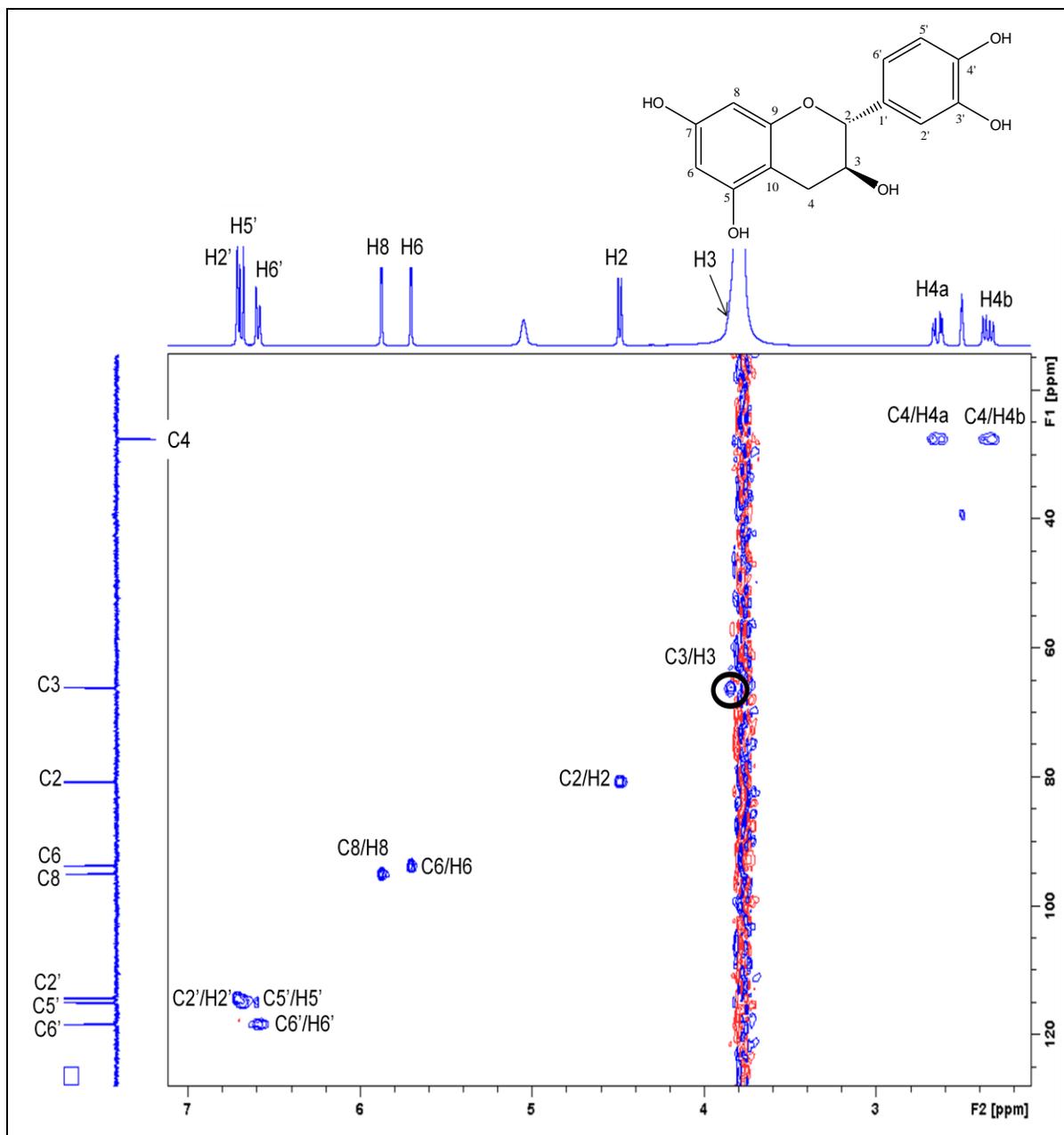


Figura 48. Experimento HMQC (DMSO-D₆) de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxiavano.

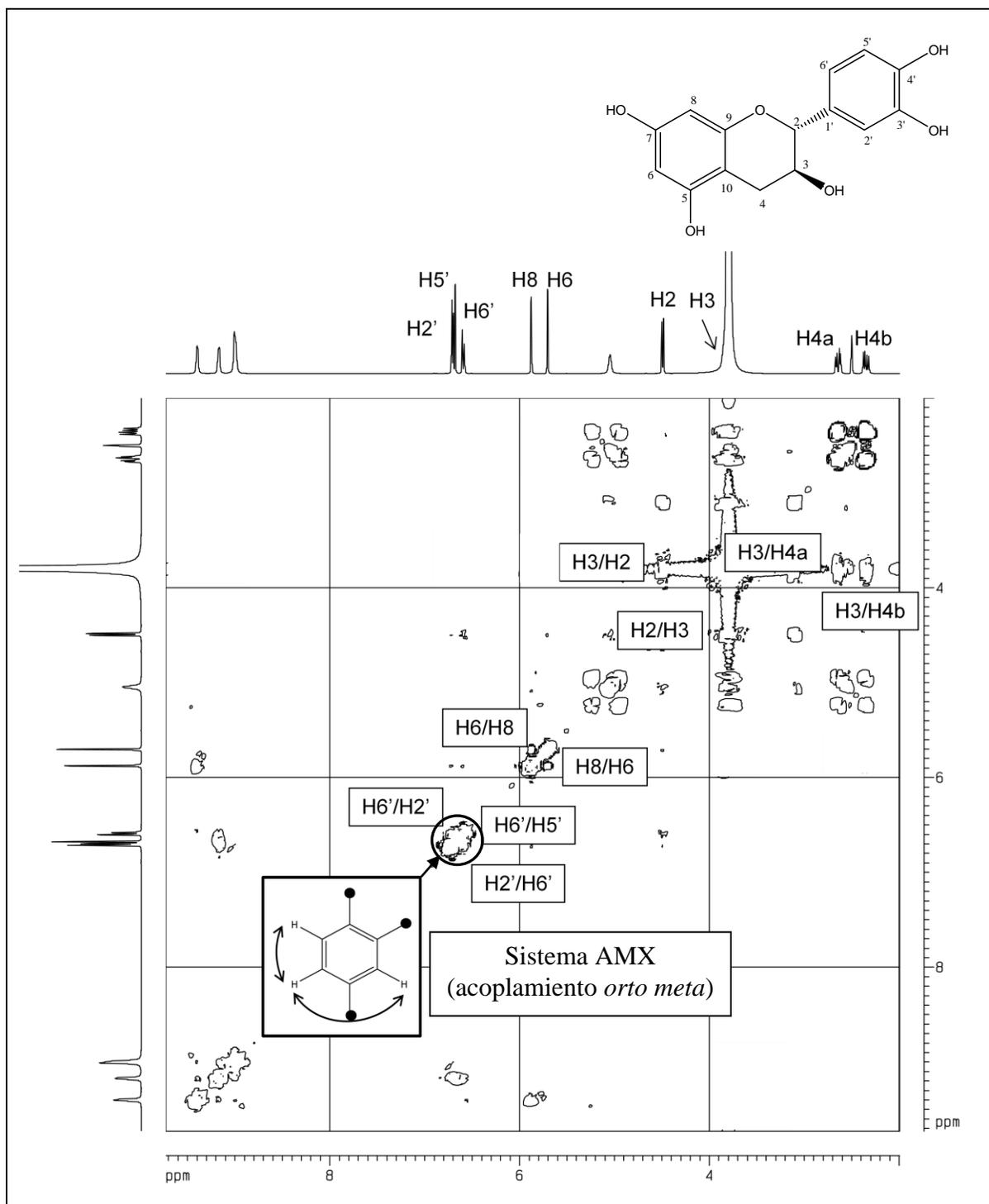


Figura 49. Experimento ^1H , ^1H COSY (DMSO- D_6) de (2-trans)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

Tabla 19. Interacciones significativas en el experimento $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

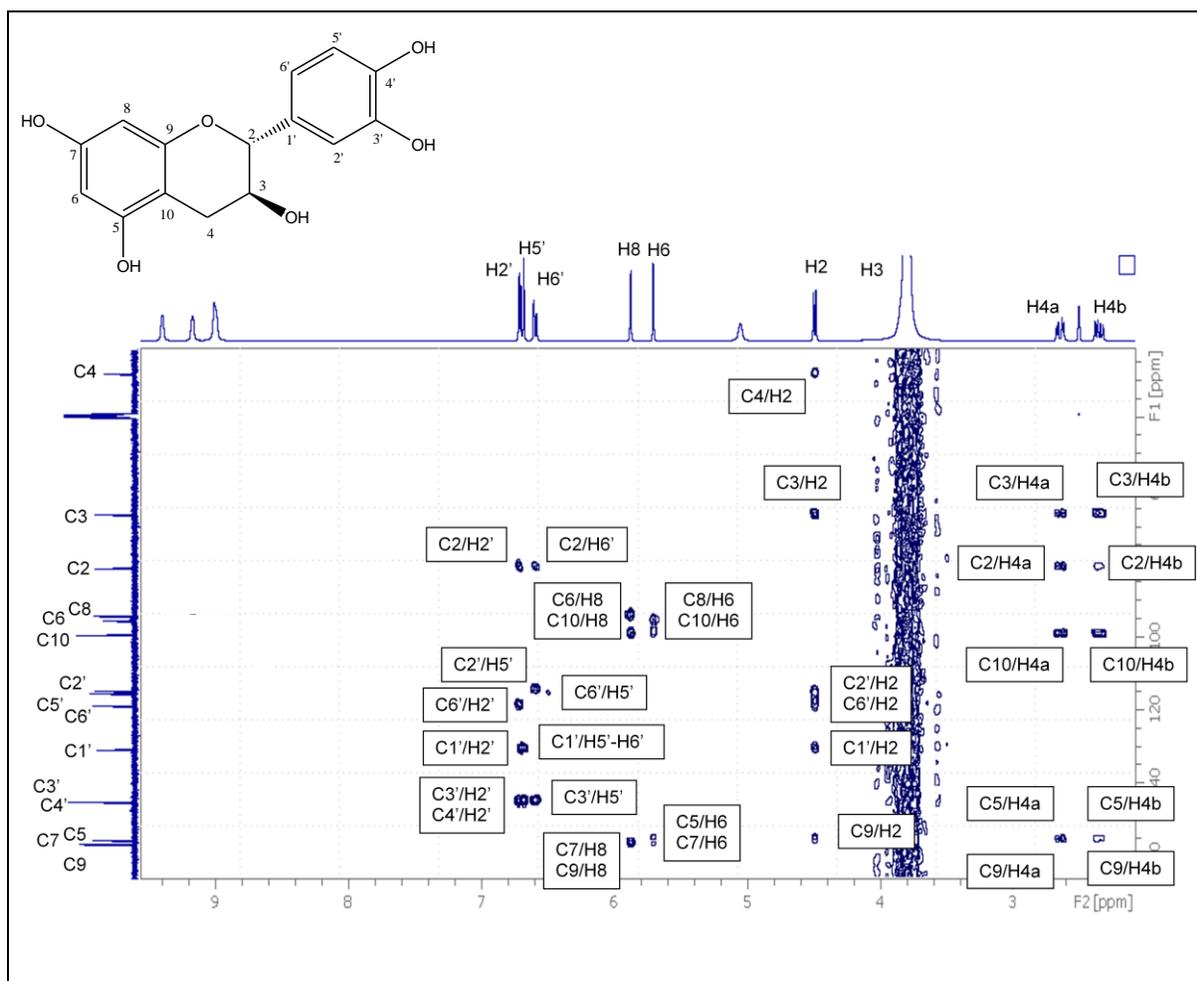
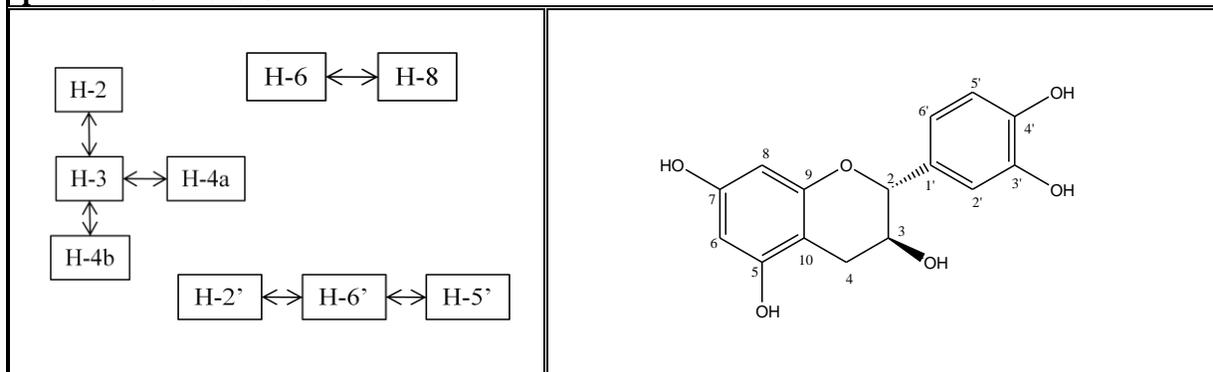
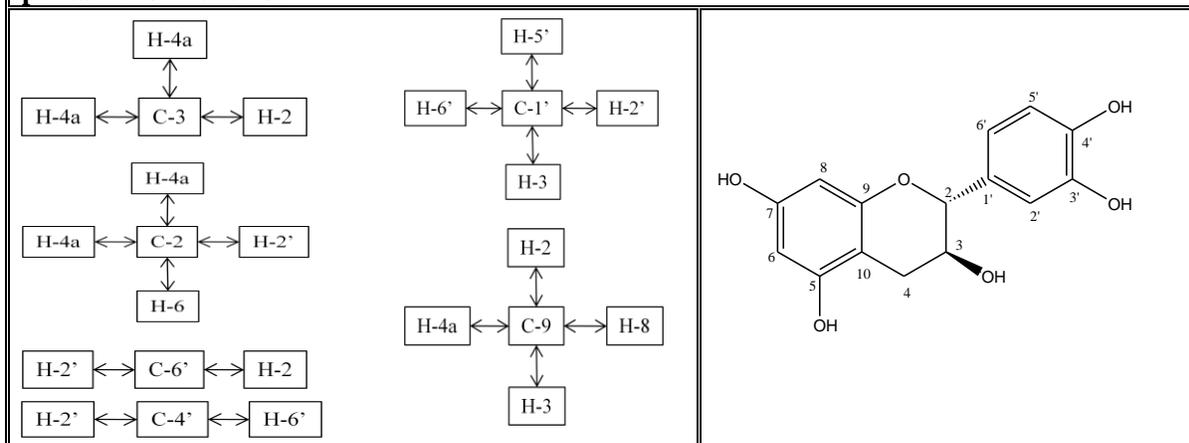


Figura 50. Experimento HMBC (DMSO- D_6) de (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.

Tabla 20. Interacciones significativas en el experimento HMBC de (2-trans)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano.



Nuevamente, el estudio por espectroscopía ultravioleta-visible en MeOH del compuesto **III** (figura 51) presentó dos bandas bien definidas características de los flavanos, al igual que lo observado para el compuesto **II**.

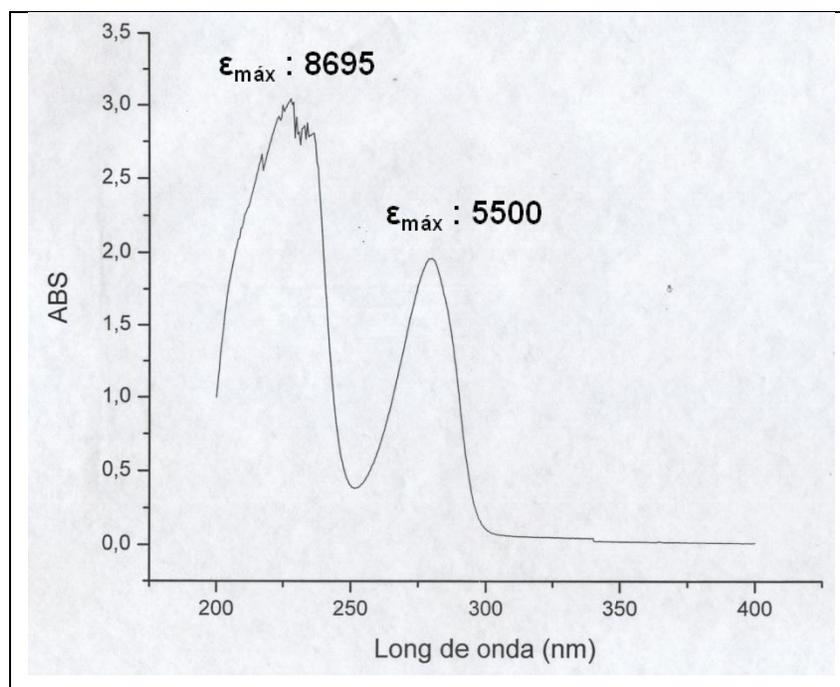


Figura 51. Espectro UV de (2-trans)-3,3',4',5,7-pentahidroflavano en MeOH.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto y según la constante de acoplamiento observada entre H-2 y H-3 ($J= 7,4$ Hz), la cual indica un ángulo diedral de aproximadamente 120° , correspondiente a un acoplamiento *trans*, además de lo reportado en la bibliografía (Naherstedt y colaboradores, 1987), se determinó que el compuesto **III** correspondía al (2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano (figura 52).

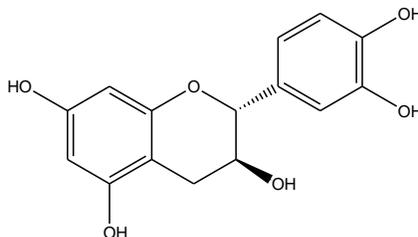


Figura 52. Estructura de III [(2-*trans*)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano].

5.4 Ensayo antibacterial:

Los resultados del ensayo antibacterial realizado a los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de *Heliocarpus americanus* L., frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, se reportan en la tabla 21.

Tabla 21. Actividad antibacterial de los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de <i>Heliocarpus americanus</i> L.		
CEPAS	Extracto de DCM (mm)	Extracto de MeOH (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Nosocomial)	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 44548	0	0

6. CONCLUSIONES

❖ Del extracto de diclorometano de los frutos de la especie *Heliocarpus americanus* L. se logró aislar e identificar por medio de técnicas espectroscópicas uni y bidimensionales un terpenoide (esterol) de nombre: β -sitosterol.

❖ Del extracto de metanol se lograron separar por medio de técnicas cromatográficas dos flavanos, que presentaron estructuras epiméricas:

- (2-*cis*)- 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.
- (2-*trans*)- 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavano.

Ambos compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas uni y bidimensionales.

❖ A pesar de que estos compuestos han sido aislados anteriormente de otras especie, este es el primer reporte fitoquímico que se hace para la especie *Heliocarpus americanus* L., y para el género *Heliocarpus*.

❖ Los extractos de diclorometano y metanol de los frutos de *Heliocarpus americanus* L., no reportaron actividad antibacterial significativa frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, siendo este estudio biológico el primero en reportarse para dicha especie.

7. REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. ADAMU, H.; ABAYEH, O.; AGHO, M.; ABDULLAHI, M.; UBA, A.; DUKKU, H.; WUFEM, B. 2004. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, **99**: 1-4.
2. AGRAWAL, P. 1989. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier. New York. 440-470 pp.
3. AGUINALDO, A.; READ, R. 1990. A major piperidine alkaloid from *Microcos philippinensis*. **Phytochemistry**, **29**: 2309-2313.
4. AHMDED, A.; ASIM, M.; ZAHID, M.; ALI A. 2003. New triterpenoids from *Corchorus trilocularis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **51**: 851-853.
5. AHMDED, B.; AL-YANYA, M., AL-YANYA, A. 2002. Triumfettosoide, a new alkaloidal steroid glycoside and triumfestosterol, a new sterol from *Triumfetta flavescens*. **Pharmazie**, **57**: 709-713.
6. AKIO, J.; DA SILVA, C.; PRADO B.; NAKAMURA, C.; CARVALHO, J.; FOGLIO, M. 2005. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). **Química Nova**, **28**: 834-837.
7. ALI, S.; NASIR, E. 1974. **Flora de Pakistan**. **75**. Ferozsons. Karachi, Pakistan. 28 p.
8. ATTA-UR-RHAMAN. 1986. **Nuclear Magnetic Resonance: Basic Principles**. Springer-Verlag. New York. 212 p.

9. BADILLO, V.; SCHNEE, L.; BENITEZ, C. 1965. Clave de las familias de las plantas superiores. **Ernstia**, **14**: 1-245.
10. BELLAMY, L. 1975. **The Infrared Spectra of Complex Molecules, 1 & 2**. Chapman and Hall. London. 356 p.
11. BOHM, B. 1998. **Introduction to Flavonoids, 2**. Harwood Academic Publishers. Canada. 241 p.
12. BREITMAIER, E. 2002. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry**. John Wiley &- Sons, LTD. London. 275 p.
13. BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. 1967. **Mass Spectrometry of Organic Compounds**. Holden-Day. San Francisco. 387 p.
14. BURDEN, R.; KEMP, M. 1983. (-)-7-Hidroxicalamenene, a phytoalexin from *Tilia europea*. **Phytochemistry**, **22**: 1039-1040.
15. CASSYDY, H. 1996 **Fundamentals of Chromatography**. Interscience. New York. 446 p.
16. CHEN, J.; LEE, H.; DUH, C.; CHEN, I. 2005. Citotoxic chalcones and flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. **Planta Medica**, **71**: 970-973.
17. COELHO, G.; HASS, A.; POSER, G. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, **90**: 135-143.

18. CSEKE, L.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.; WARBER, S.; DUKE, J.; BRIELMANN, H. 2006. **Natural Products from Plants**. Taylor & Francis. New York. 587 p.
19. DE LOS RIOS, C.; HIDALGO, D.; QUINTERO, M.; MARQUEZ, G.; CRESENTE, O. 1999. Estudio preliminar in vitro de la actividad biológica de *Chromolaena voglii* (Robinson) H. Huber. **Revista de la Facultad de Farmacia – Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela**, **36**: 2-5.
20. FERNANDEZ, B. 2006. Aislamiento y caracterización del tilirósido a partir de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. **Tesis de grado**. Universidad Tecnológica de la Mixteca. México. 59 p.
21. GARCÍA, L.; CORREA, E.; ROJAS, N. 1998. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, **23**: 47-51.
22. HARBORNE, J. 1988. **The Flavonoids**. Chapman & Hall. London. RMN: 295-296; EM: 294-295 pp.
23. HARBORNE, J. 1992. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**, 2nd edition. Chapman & Hall. London. 679 p.
24. HARBORNE, J. 1994. **The Flavonoids**. Chapman & Hall. London. 441-473 pp.
25. HASAN, C.; ISLAM, A.; AHMED, M.; AHMED, M.; WATERMAN, P. 1984. Capsugenin, a dammarane triterpene from *Corchorus capsularis*. **Phytochemistry**, **23**: 2583-2587.

26. HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. 1986. **Preparative Chromatography Techniques, Application in Natural Products Isolation**. Springer-Verlag. Berlín. 474 p.
27. HUNG, M. 1982. **Estudio Fitoquímico de la *Stevia lucida* Lag.** Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. 88 p.
28. JACKMANN, L.; STERNHELL, S. 1969. **Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd edition**. Pergamon Press. Oxford-UK. 322 p.
29. JAYASINGHE, U.; BALASOORIYA, B.; FUJIMOTO, Y. 2004. Glicosides from *Grewia damine* and *Filicium desipiens*. **Natural Product Research**, **18**: 499-502.
30. KALINOWSKI, H.; BERGER, S.; BRAUN, S. 1988. **Carbon 13-NMR Spectroscopy**. John Wiley. Chichester-UK. 570 p.
31. KHAN, M.; JAVED, K.; KHAN, M.; SHAMSI, M.; SIDDIQUI, A. 1991. α -Amyrin derivatives from *Corchorus depressus*. **Phytochemistry**, **30**: 1989-1992.
32. KOVGANDRO, N.; KASHKAN, Z.; BORISOV, E. 2000. ^{13}C spectra of functionally substituted 3β -chloroderivates of cholesterol and β -sitosterol. **Chemistry of Natural Compounds**, **36**: 595-597.
33. KÜLTÜR, S. 2007. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, **111**: 341-364.
34. LAKSHMI, V.; AGARWAL, S.; CHAUHAN, J. 1976. A new δ -lactone from the flowers of *Grewia asiatica*. **Phytochemistry**, **15**: 1397-1399.

35. MAHATO, S.; PAL, B.; SAKAR, S. 1987. New triterpenoid saponins from *Corchorus acutangulus*. **Phytochemistry**, **27**: 1433-1437.
36. MARCANO, D.; HASEGAWA, M. 2002. **Fitoquímica orgánica**. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 117-235 pp.
37. MARKHAM, K.; TERNAI, B. 1976. ¹³C NMR of flavonoids—II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, **32**: 2607-2612.
38. MARODIN, S.M. 2000. **Plantas utilizadas como medicinais no o Município de Dom Pedro de Alcantara, Rio Grande do Sul**. Editora da UFRGS. Porto Alegre. 172 p.
39. MARTÍNEZ, M. 1969. **Las plantas medicinales de México. 5ª edición**. Ediciones Andrés Botas. México. 479 p.
40. MEVY, J.; BESSIERE, J.; RABIER, J.; DHERBOMEZ, M.; RUZZIER, M.; MILLOGO, J.; VIANO, J. 2005. Composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Triumfetta rhomboidea* Jacq. **Flavour & Fragrance Journal**, **21**: 80-83.
41. MIKES, O. 1979. **Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods**. Ellis Horwood. Chichester-UK. 217 p.
42. MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. 2000. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity some plants used by Mosekene Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, **69**: 139-155.

43. NAHERSTEDT, A.; PROKCH, P.; CONN, E. 1987. [Dhurrin, \(-\)-catechin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*](#). **Phytochemistry**, **26**: 1546-1547.
44. NAKAMURA, T.; GODA, Y.; SAKAI, S.; KONDO, K.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M. 1998. Cardenolide glycosides from seeds of *Corchorus olitorius*. **Phytochemistry**, **49**: 2097-2101.
45. PAL, D.; MANDAL, M.; SENTHINKUMAR, G.; PADHIARI, A. 2006. Antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* ítem and *Corchorus olitorius* seed. **Fitoterapia**, **77**: 589-591.
46. PREMARATNE, K.; KUMAR, V.; JACOBSSON, U.; MOLLEYRES, L. 2000. Insecticidal piperidine alkaloids from *Microcos paniculata* stem bark. **Phytochemistry**, **54**: 29-32.
47. RANGEL, D.; GARCIA, I.; VELAZCO, J.; BUTRIAGO, D.; VELASCO, E. 2001. [Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* \(Ruiz et Pavon\) Pers.](#) **Revista de la Facultad de Farmacia – Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela**, **42**: 43-6.
48. RONDÓN, M.; VELASCO, J.; HERNÁNDEZ, J.; PECHENEDA, M.; ROJAS, J.; MORALES, A.; CARMONA, J.; DÍAZ, T. 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the *Tagetes patula* L (Astereaceae) collected from the Venezuela Andes. **Revista Latinoamericana de Química**, **34**: 1-3.
49. SCOTT, A.I. 1969. **Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products**. Pergamon Press. Oxford-UK. 251 p.
50. STAHL, E. 1969. **Thin-Layer Chromatography: Laboratory Handbook, 2nd edition**. Springer-Verlag. Berlín. 95 p.

51. SU, B.; PARK, E.; VIGO, J.; GRAHAM, J.; CABIESES, F.; FONG, H.; PEZZUTO, J.; KINGHORN, A. 2003. Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. **Phytochemistry**, **63**: 335-341.
52. TOKER, G., KÜPELI, E.; MEMISOGLU, M.; YESILADIA, E. 2004. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). **Journal of Ethnopharmacology**, **95**: 393-397.
53. UDDIN, A.; ALI, A.; ALI, Z.; BAQAI, F.; NAZ, F. 1998. Cycloartane triterpene glucosides from *Corchorus depressus*. **Phytochemistry**, **49**: 829-834.
54. VELASCO, J.; ROJAS, J.; SALAZAR, P.; RODRÍGUEZ, M.; DÍAZ, T.; MORALES, A.; RONDÓN, M. 2007. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. **Natural Products Communications**, **2**: 85-88.
55. VENKATA, D.; VENKATA, E. 1975. New cardenolides from seeds of *Corchorus triloculari*. **Phytochemistry**, **14**: 533-537.
56. VIGNON, M.; GEY, C. 1998. Isolation, ¹H and ¹³C NMR studies of (4-*O*-methyl-D-glucorono)-D-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. **Carbohydrate Research**, **307**: 107-111.
57. VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; WASOWSKI, C.; PEÑA, C.; MEDINA, J.; PALADIN, A. 1994. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **44**: 47-53.

58. WALLER, G. 1972. **Biochemical Applications of Mass Spectrometry**. Wiley-Interscience. New York. 243 p.
59. WEI, B.; CHEN, J.; HUANG, P. 2006. A new approach for the asymmetric syntheses of 2-*epi*-deoxoprosopinine and azasugar derivatives. **Tetrahedron**, **62**: 190-198.

8. GLOSARIO

Agar Mueller-Hinton: Medio de cultivo que ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

Alternas: Son aquellas hojas que salen en una cantidad de una por cada nudo y cada vez en un lado opuesto del tallo.

Antibacteriano: Todo lo que destruye las bacterias o suprime su crecimiento o su capacidad para reproducirse.

Bisexual: Que tienen los dos sexos, hermafrodita.

Caedizas: Hojas caducas, pérdidas de hojas y flores.

Cepa: Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida.

Cima: Inflorescencia cuyo eje acaba en una flor, al igual que sus ramificaciones laterales.

Corimbo: Inflorescencia en la que las flores están situadas a un mismo nivel en la parte apical, naciendo sus pedúnculos a diferentes alturas del eje principal.

Cultivo: Método de obtención de microorganismos, células o tejidos mediante siembras controladas en medios adecuados.

Dentadas: Hojas que tienen pequeños dientes al margen.

Enteras: Son las hojas que tiene el margen liso.

Estambre: Hoja fértil masculina de la flor.

Estípula: Referente a la flor. Apéndice generalmente laminar y en pares en la base foliar.

Inocular: Introducir en un medio una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad.

Lobuladas: Hojas que presentan entrantes y salientes redondeados.

Opuestas: Son aquellas que están en un número de dos por cada nudo y cada una en el lado opuesto del tallo de la otra.

Panícula: Inflorescencia, racemosa, compuesta de forma piramidal.

Pecioladas: Hojas que tienen pecíolo que pueden tener varios tamaños.

Pétalo: Cada pieza de la corola.

Regular: Dicho de una flor, un cáliz, una corola, un ovario, etc., que tiene más de dos planos de simetría, actinomorfo.

Simples: Hojas que tiene un limbo sin partir o, aunque este limbo este partido, las divisiones no llegan hasta el nervio principal.

Sépalo: Cada una de las piezas del cáliz.

9. ABREVIATURAS

Generales

AcOH	Ácido acético
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
eV	Electronvoltio
MeOH	Metanol
RDA	Retro Diels-Alder
[α] _D ²²	Rotación óptica específica

Espectroscópicas

a	Tensión asimétrica
BB	Broad Band
COSY	COrrrelation SpectroscopY
c	Cuarteto
dep	Deformación en el plano
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d	Deformación
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete de dobletes
<i>ddd</i>	Doblete de doblete de dobletes
dfp	Deformación fuera del plano
dt	Deformación de tijera
EM	Espectro de Masas
ε _{máx}	Coefficiente de extinción
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento espín-espín
<i>m</i>	Multiplete
M	Multiplicidad
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Tensión simétrica
<i>s</i>	Singlete
t	Vibración de tensión
<i>t</i>	Triplete
<i>tt</i>	Triplete de tripletes
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico (ppm) respecto del TMS
λ	Longitud de onda (nm)
ν _{max}	Número de ondas (cm ⁻¹)

