

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO:

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS
 SECUNDARIOS DE LA ESPECIE *Tachigali paniculata* Aubl.**

Trabajo especial de grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Victor A. Alvino V., para
optar al título de Licenciado en
Química.

Tutor: Dra. María Rodríguez.

Caracas, Octubre de 2016

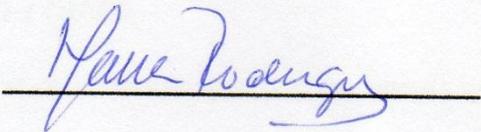
Yo, Dra. María Rodríguez, Profesora investigadora del laboratorio de productos naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA ESPECIE *Tachigali paniculata* Aubl.”**

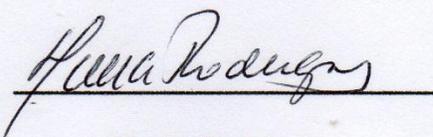
Que presenta el Br. Victor Alfonzo Alvino Veracierta, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el laboratorio de productos naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2015 y 2016, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, octubre de 2016



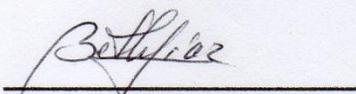
Dra. María Rodríguez

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios de la especie *Tachigali paniculata* Aubl., presentado por Br. Victor Alfonzo Alvino Veracierta C.I.: 20634627, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Química.



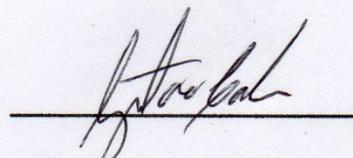
Maria Rodriguez

(Tutor)



Beth Diaz

(Jurado Principal)



Gustavo Cabrera

(Jurado Principal)

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, María Veracierta, por la confianza que siempre me ha tenido y por apoyarme en cada meta que me propongo, por ser mi inspiración y mi motor para seguir siempre adelante.

A mi papá, Luis Alvino, por creer en mí y darme todo para que pudiese cumplir mis metas, por su comprensión y confianza.

A Tony, por ser el mejor compañero que me ha regalado la vida.

A la Señora Judith, quien en vida me hizo sentir como su hijo adorado, por su amor incondicional, respeto y confianza.

Al señor Miguel, por el cariño y el apoyo que me ha dado en todo este tiempo.

A Katy, por su cariño y apoyo incondicional siempre que lo he necesitado.

A mis hermanas y hermanos, Luisana, Yenny, Yoryana, Liliana, Yurvi, Leonardo, Javier, Luis y David, por el amor incondicional, el respeto y el apoyo siempre.

A mis sobrinos, Alejandro, Francelys, Alfonso, Alberitza, Argeriannys, Jonathan, Tony, Samuel, Josué, Lucianny, Victor, Luis J., José, Victoria, Yubran, Luis M., Moisés, Fabiola, Juan y Katherine, por inspirarme a seguir siempre adelante y ser un buen ejemplo para ellos.

A la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por crear Ciencia y Cultura. Por las victorias y derrotas, por las mejores experiencias de mi vida.

A mi tutora, Dra. María Rodríguez, por ser inspiración para seguir adelante a pesar de las adversidades, por el apoyo y cariño.

A Albamarina, por todos los momentos que hemos vivido juntos, por los sueños, por la amistad verdadera.

A mis amigos y compañeros de clases, en especial a Mariale, Jeniree, Juan, Jesus, Rodrigo, Janetsi, Anny, Rosimar, Denis.

Al Dr. Jairo Bermudez, por el apoyo y la paciencia. A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales, Neydimar, Ricardo, Sofía, Yuary, Ynés, Lic. Luis, Lic. Reine.

A mis profesoras del colegio y liceo, Carmen, Aivy Gómez, Mary García, por el gran trabajo que hacen, por lo valiosas que son, por el apoyo y los consejos.

A mis profesores universitarios, por inspirarme a seguir adelante, a amar la Ciencia y a buscar la excelencia, en especial a Carlos Landaeta, Mary Lorena Araujo, José D. Martínez, Laura Delgado.

A mis compañeros de Movimiento Estudiantil, por el amor a la Universidad y al país, que me inspiró en cada lucha a trabajar por ambos, en especial a Kizzy, Alfredo, Freddy, Daniela, Javier, Vannesa.

A mis madrinas, Alcira, Lismary y Olga. A mi prima Dainare por su disposición a apoyarme cuando lo he necesitado.

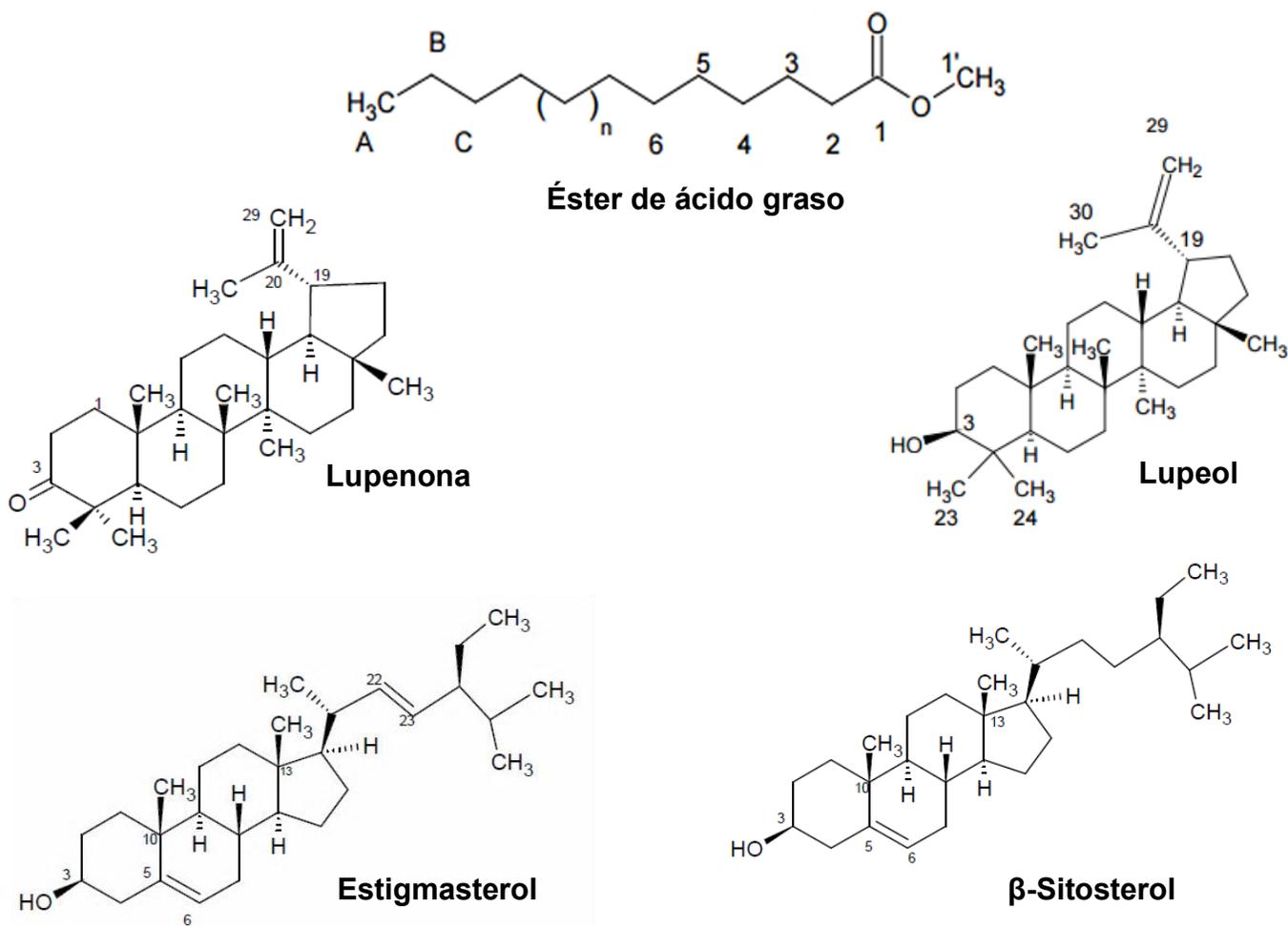
A mis abuelos, tías, primos y primas.

A José María Vargas, Rómulo Betancourt, Jacinto Convit y todos los héroes civiles egresados de la UCV, por todos los aportes al país y al mundo, por inspirarme a trabajar por la Universidad y el país.

RESUMEN

Se realizó el estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas y ramas de *Tachigali paniculata* Aubl., colectada en el estado Amazonas, utilizando Cromatografía en Columna con aumento gradual de la polaridad como método de separación. Así, se obtuvieron 3 compuestos con esqueletos triterpénicos. La caracterización de los compuestos obtenidos se realizó mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT.

De esta manera, se logró aislar 20 mg (0,09 %p/p) de un **éster de ácido graso** no identificado, 203 mg (0,95 %p/p) de **Lupenona**, 19 mg (0,09 %p/p) de **Lupeol** y 20 mg (0,09%) de una mezcla de esteroides conocidos como **estigmasterol** y **β -sitosterol**, el %p/p está en base al peso del extracto metanólico. Este es el primer reporte del aislamiento de Lupenona y Lupeol en el género *Tachigali*.



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1. ACACIA | 4 |
| 2.1.1 <i>Acacia cedilloi</i> y <i>Acacia gaumeri</i> | 4 |
| 2.1.2 <i>Acacia dealbata</i> | 5 |
| 2.2 CASSIA..... | 6 |
| 2.2.1. <i>Cassia abbreviata</i> | 6 |
| 2.2.2 <i>Cassia alata</i> | 9 |
| 2.2.3 <i>Cassia angustifolia</i> | 11 |
| 2.2.4 <i>Cassia fruticosa</i> | 13 |
| 2.3 DIPLotropIS | 15 |
| 2.3.1 <i>Diplotropis purpurea</i> | 15 |
| 2.4 GEOFROEA..... | 15 |
| 2.4.1 <i>Geofroea decorticans</i> | 15 |
| 2.5 GLEDITSIA | 16 |
| 2.5.1 <i>Gleditsia triacanthos</i> | 16 |
| 2.5.2 <i>Gleditsia Caspia</i> | 17 |
| 2.6 TACHIGALI | 18 |
| 2.6.1 <i>Tachigali myrmecophyla</i> | 18 |
| 2.6.2 <i>Tachigali paniculata</i> | 20 |
| 3. TAXONOMÍA..... | 22 |
| 3.1 FAMILIA LEGUMINOSAE..... | 22 |
| 3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>TACHIGALI PANICULATA</i> AUBL. | 23 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 5. OBJETIVOS | 26 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL | 26 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 26 |
| 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 27 |
| 6.1 MATERIAL VEGETAL | 27 |
| 6.2 MATERIALES Y EQUIPOS | 28 |
| 6.2.1 <i>Materiales</i> | 28 |
| 6.2.2 <i>Equipos</i> | 29 |
| 6.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 6.3.1. Tratamiento del extracto metanólico de <i>Tachigali paniculata</i> Aubl. | 29 |
| 6.3.2. Aislamiento de metabolitos secundarios | 30 |
| 7.1 COMPUESTO TPVA-B10..... | 34 |
| 7.2 COMPUESTO TPVA-B80..... | 37 |
| 7.3 COMPUESTO TPVA-C18..... | 43 |
| 7.4 COMPUESTO TPVA-C60..... | 46 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 53 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 54 |
| 11. ANEXOS..... | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 . Ubicación geográfica de <i>Tachigali Paniculata</i> | 23 |
| Figura 2 Flores y hojas de <i>Tachigali Paniculata</i> Aubl | 24 |
| Figura 3. Muestra de la muestra de <i>Tachigali Paniculata</i> Aubl., almacenada en el herbario nacional de Venezuela..... | 27 |

ÍNDICE DE ESPECTROS

| | |
|--|----|
| Espectro 1. RMN ^1H para el compuesto TpVA-B10..... | 35 |
| Espectro 2. RMN ^{13}C para el compuesto TpVA-B10 | 36 |
| Espectro 3. DEPT-135 para el compuesto TpVA-B10 | 36 |
| Espectro 4. RMN ^1H a campo alto, para el compuesto TpVA-B80 | 38 |
| Espectro 5. RMN ^1H a campo medio, para el compuesto TpVA-B80 | 39 |
| Espectro 6. Espectro ^{13}C para el compuesto TpA-B80..... | 39 |
| Espectro 7. RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto TpVA-B80 | 40 |
| Espectro 8. DEPT-135 del compuesto TpVA-B80 | 40 |
| Espectro 9. RMN ^1H del compuesto TpVA-C18 | 44 |
| Espectro 10. RMN ^1H a campo medio del compuesto TpVA-C60 | 47 |
| Espectro 11. RMN ^1H a campo alto del compuesto TpVA-C60 | 47 |
| Espectro 12. RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto TpVA-C60 | 47 |
| Espectro 13. RMN ^{13}C a campo medio del compuesto TpVA-C60 | 49 |
| espectro 14. DEPT-135 del compuesto TpVA-C60 | 49 |

1. INTRODUCCIÓN

Desde la prehistoria se conoce el uso de extractos de diferentes partes de plantas superiores en pócimas o en preparaciones. Este conocimiento de la humanidad ha sido transmitido por generaciones, principalmente de manera verbal.

Con el interés que ha despertado la medicina “naturista”, incrementa a diario el número de investigaciones que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones.

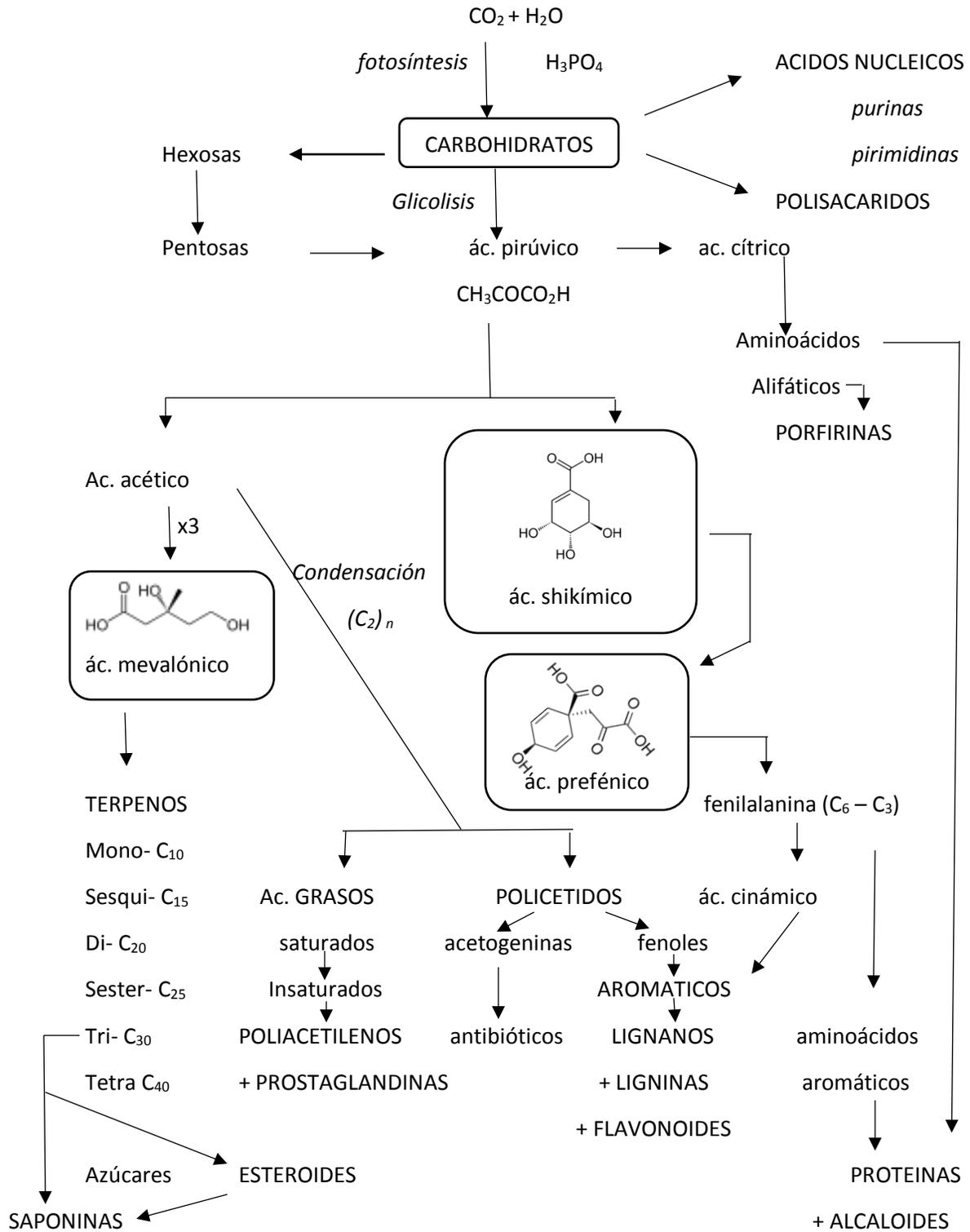
Los seres vivos son capaces de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples o degradar las complejas y obtener las simples a través de un conjunto de reacciones químicas, que realizan sus células, esto se conoce como metabolismo. Las moléculas producidas por los seres vivos, comunes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

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales.

Es interesante mencionar la diferencia significativa entre los metabolitos secundarios y los primarios, particularmente en su distribución limitada al reino vegetal y a que se presentan típicamente en solo una especie o un grupo de especies relacionadas taxonómicamente. ^[2]

Algunos productos naturales tienen funciones protectoras frente a predadores, proporcionando a la planta un sabor amargo o incluso haciéndola venenosa luego de su ingesta. Por otra parte, algunos de los metabolitos producidos por las plantas son los responsables de las coloraciones observadas en sus flores o frutos, lo cual permite que los insectos polinizadores se acerquen a ella contribuyendo así a su dispersión. Es importante destacar que son estos metabolitos secundarios los responsables de la propiedad terapéutica asociada a una planta frente a cierta enfermedad o afección del ser humano. ^[3]

Se agrupan en cuatro clases principales. Terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales), compuestos fenólicos (Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), Glicósidos (Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y Alcaloides. ^[1]



Esquema 1. Biosíntesis general de metabolitos primarios y secundarios ^[1].

2. ANTECEDENTES

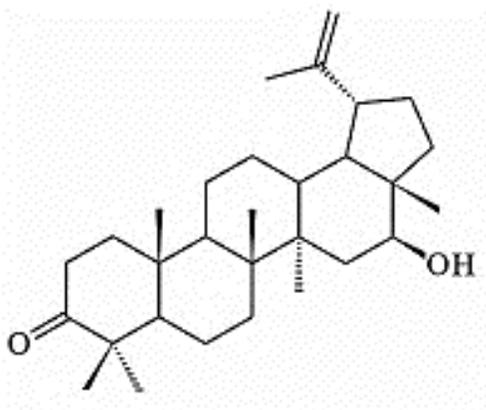
El género *Tachigali* ha sido poco estudiado por lo que, a continuación, se presentan los estudios realizados sobre especies de la misma familia (Fabaceae), de las cuales se han aislado metabolitos secundarios que son de interés para esta investigación.

2.1. ACACIA

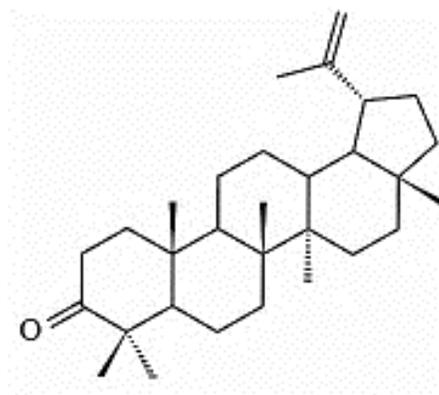
2.1.1 *Acacia cedilloi* y *Acacia gaumeri*

En 2002, Gwendoli y col.,^[4] realizaron el estudio fitoquímico de *Acacia cedilloi*, logrando aislar mediante CC (sílica gel), de la fracción de Hexano: CH₂Cl₂; 70:30; %v/v,, un compuesto del tipo terpenoidal (16β-hidroxi-20(29)-en-3-ona). De las fracciones de polaridad baja se aislaron los compuestos escualeno, mezcla de hidrocarburos comunes (C₁₂-C₂₀), ácido oleico y ácido palmítico. De las fracciones Hexano:AcOEt; 90:10; %v/v y Hexano:AcOEt; 70:30; %v/v, se aisló Lupeol y β-sitosterol respectivamente.

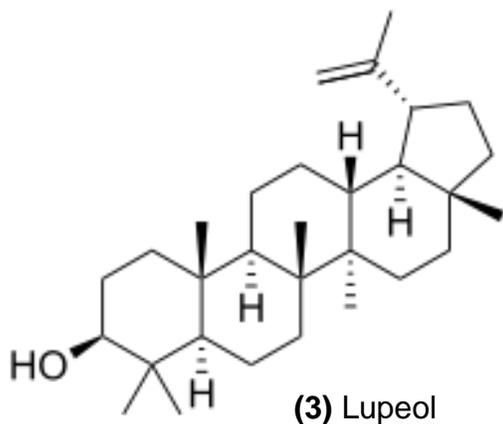
De la fracción de Hexano:AcOEt; 90:10; %v/v, de la CC con sílica gel de *Acacia gaumeri*, se logró aislar Lupenona y Lupeol.



(1) 16β-hidroxi-20(29)-en-3-ona

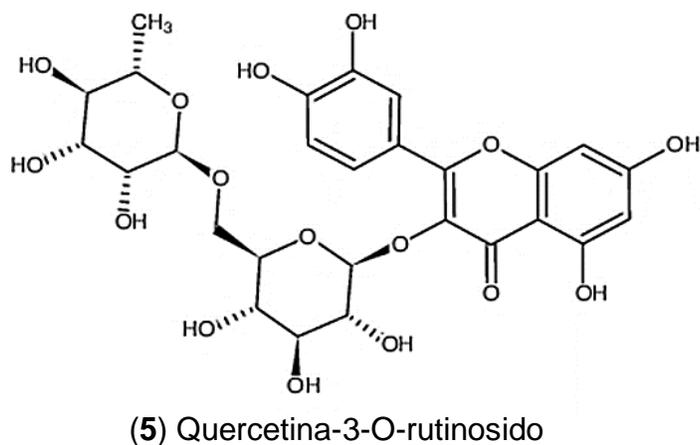
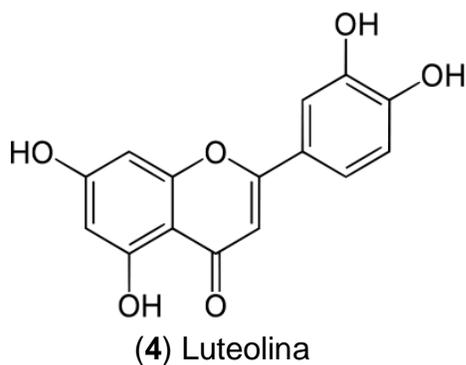


(2) Lupenona



2.1.2 *Acacia dealbata*

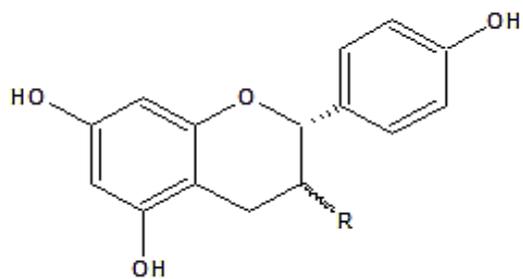
En el 2007, Anjos y col.,^[5] evaluaron como fuente de flavonoides el polen de *A. dealbata* para su uso en la investigación de nuevas moléculas activas utilizando HPLC / DAD. La muestra se recogió directamente de los estambres de la flor y se utilizó para la extracción a gran escala y el aislamiento de los flavonoides. Aproximadamente 10 mg de muestra de polen se secó y se extrajeron con etanol al 50% (1: 1, v / v) asistido por ultrasonido (30 min), se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para el análisis de HPLC / DAD, generando los cromatogramas estándar a 260 y 340 nm y los datos espectrales entre 220 y 400 nm (zona espectral de los ácidos fenólicos y flavonoides en este estudio). Las estructuras de los compuestos se determinaron por espectroscopia de absorción UV. Las estructuras flavonoidales más comunes observadas en las muestras de polen de *A. dealbata* eran derivados de naringenina-chalcona con diferentes tiempos de retención. Los otros compuestos relevantes presentes en el polen de *A. dealbata* fueron derivados de luteolina (**4**) (con 6 u 8-O-sustituciones), un dihidroflavonol, derivados de quercetina con 3-O-sustituciones (**5**) y un derivado de ácido fenólico.



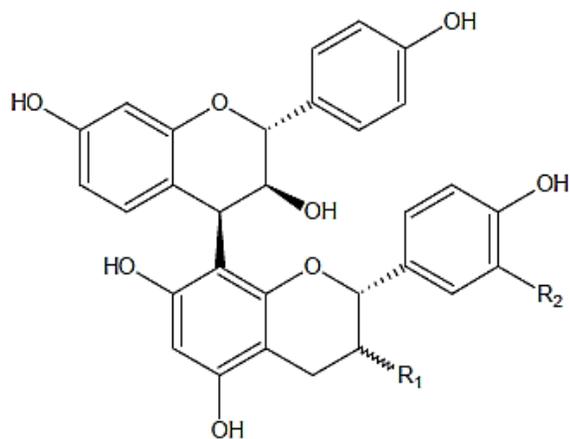
2.2 CASSIA

2.2.1. *Cassia abbreviata*

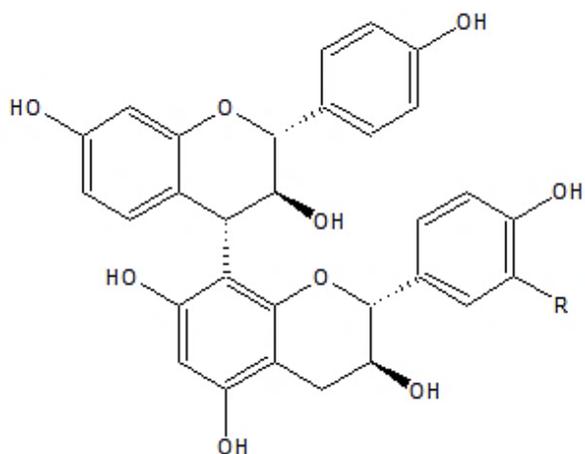
En 1996, Malan y col., ^[6] aislaron del extracto de acetona de la corteza de esta especie por CC sobre Sephadex LH-20, afzelequina (6) y *epi*-afzelequina (7) (catequinas) y siete dímeros no hidrolizables de catequinas, conocidos como: guibourtinidol-(4 β →8)-*epi*-afzelequina (8), guibourtinidol- (4 β →8)-*epi*-catequina (9), guibourtinidol-(4 β →8)-afzelequina (10), guibourtinidol-(4 α →8)- catequina (11), guibourtinidol-(4 α →8)-afzelequina (12), *ent*-guibourtinidol-(4 β →8)-*epi*-catequina (13), guibourtinidol-(4 α →6)-afzelequina (14), los cuales fueron identificados por los datos espectroscópicos de sus derivados 3-O-acetil permetilados o peracetilados.



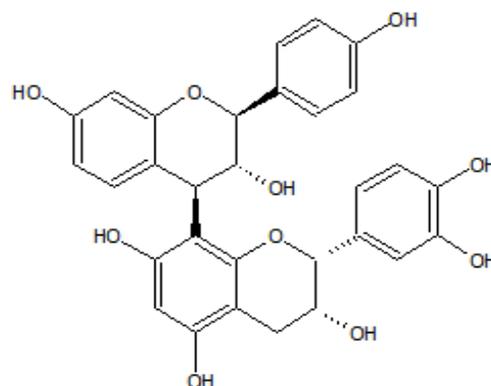
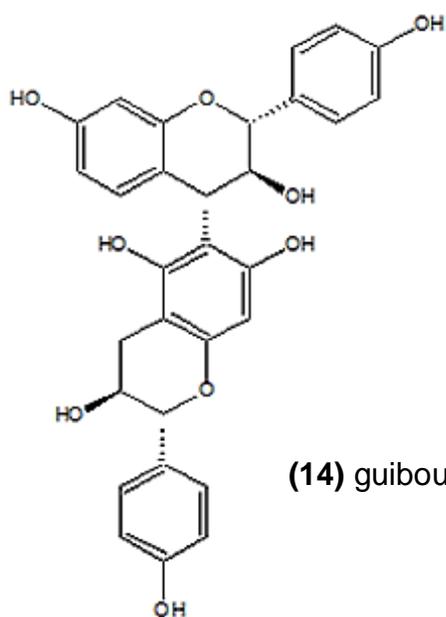
| R | |
|---------|-------------------------|
| (6) OH | afzelequina |
| (7) OH | <i>epi</i> -afzelequina |



| | R ₁ | R ₂ | |
|------|----------------|----------------|--|
| (8) | OH | H | guibourtinidol-(4 β →8)- <i>epi</i> -afzelequina |
| (9) | OH | OH | guibourtinidol-(4 β →8)- <i>epi</i> -catequina |
| (10) | OH | H | guibourtinidol-(4 β →8)-afzelequina |

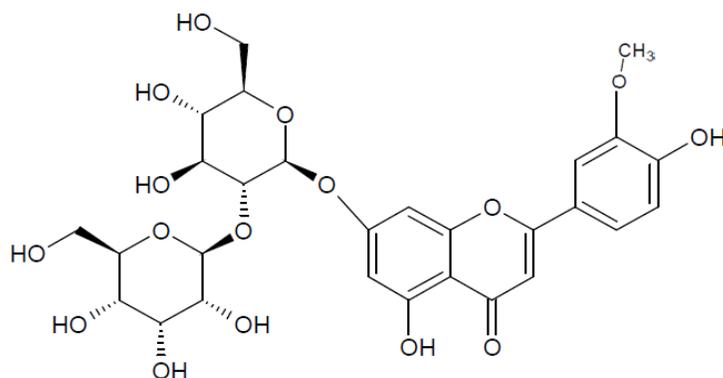


R

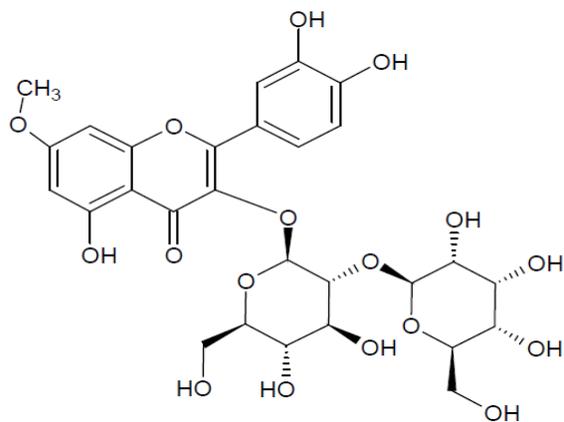
(11) OH guibourtinidol-(4 α \rightarrow 8)-catequina(12) H guibourtinidol-(4 α \rightarrow 8)-afzelequina(13) ent-guibourtinidol-(4 β \rightarrow 8)-epi-catequina(14) guibourtinidol-(4 β \rightarrow 8)-epi-catequina

2.2.2 *Cassia alata*

En 1991, Gupta y col., [7] trabajaron con la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto etanólico de las semillas de la planta y aislaron por CC Flash sobre sílica gel, dos flavonoides glicosilados: crisoeriol-7-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-galopiranosido (**15**) y ramnetin-3-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-galopiranosido (**16**) utilizando como eluyente una mezcla de EtOAc-Me₂CO (9:1) para el primer flavonoide y 4:1 para el segundo, ambos fueron identificados por sus datos de UV, IR, RMN-1H y RMN-13C.

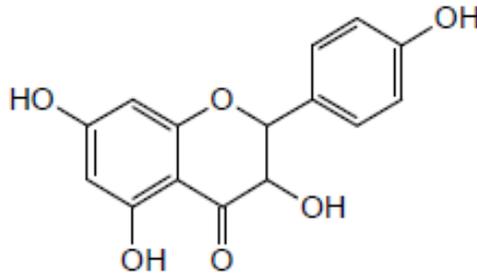


(**15**) Crisoeriol-7-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-galopiranosido

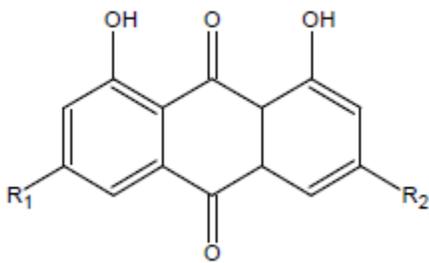


(**16**) Ramnetin-3-O-(2''-O-β-D-manopiranosil)-β-D-galopiranosido

En el 2008, Fernand y col., ^[8] determinaron la presencia de seis compuestos en las raíces de esta especie: Kaempferol (**17**), rheína (**18**), aloe-emodina (**19**), crisofanol (**20**), emodina (**21**) y parietina (**22**). Para ello secaron las raíces a 40°C en una estufa y extrajeron con etanol, luego realizaron la separación e identificación de dichos compuestos mediante la técnica de HPLC, utilizando una columna de Phenomenex Luna C18 y realizando una elución isocrática con la mezcla ACN-MeOH-NH₄OH a pH=6,8 (25:55:20; v/v/v).



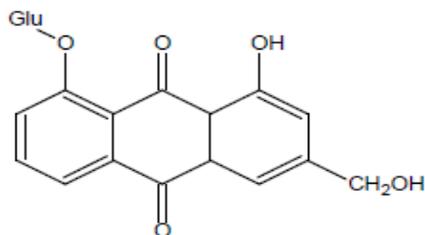
(17) Kaempferol



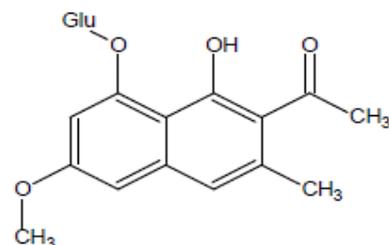
| | R1 | R2 | |
|------|------------------|--------------------|--------------|
| (18) | H | CO ₂ H | rheína |
| (19) | H | CH ₂ OH | aloe-emodina |
| (20) | H | CH ₃ | crisofanol |
| (21) | OH | CH ₃ | emodina |
| (22) | OCH ₃ | CH ₃ | parietina |

2.2.3 *Cassia angustifolia*

En 1994, Kinjo y col.,^[9] aislaron de las hojas de *C. angustifolia* ocho nuevos metabolitos. Para ello, el extracto metanólico de las hojas, fue particionado con AcOEt al 40% en MeOH. La fracción de AcOEt fue sometida a estudio fitoquímico usando CC con una resina de estireno y divinilbenceno como soporte sólido, denominada MCI gel CHP20P. Los compuestos fueron identificados mediante las técnicas de FAB-MS, RMN-13C y RMN-1H, como: aloe-emodina 8-O-glucósido (**23**), toracrisona 8-O-glucósido (**24**), aloe-emodina diantrona 8,8'-di-O-glucósido (**25**), kaempferol 3-O-gentiobiosido (**26**), quercetina 3-O-gentiobiosido (**27**), isoramnetina 3-O-gentiobiosido (**28**), syringaresinol 4-O-glucósido (**29**) y emodina 8-O-soforósido (**30**).

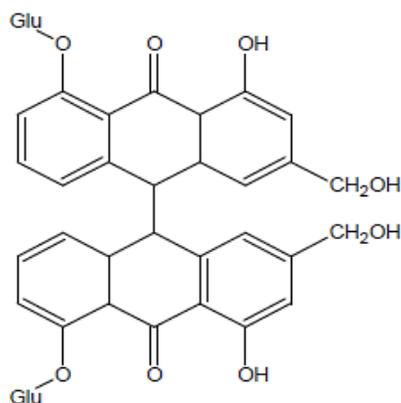


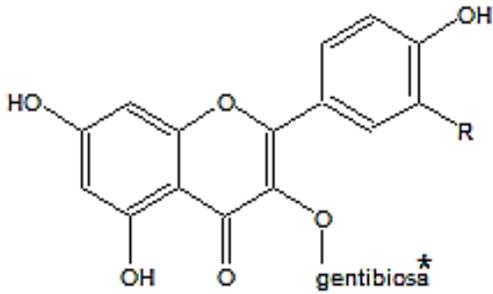
(**23**) aloe-emodina 8-O-glucósido



(**24**) toracrisona 8-O-glucósido

(**25**) aloe-emodina diantrona 8,8'-di-O-glucósido





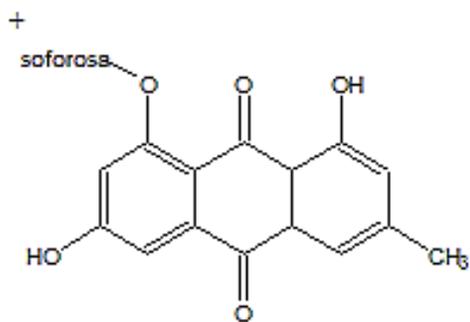
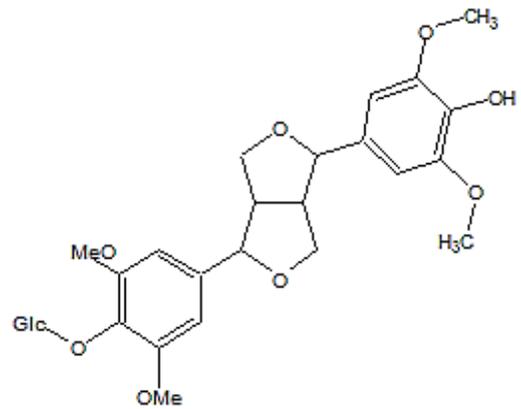
R

H kaempferol 3-O-gentiobiosido (26)

OH quercetina 3-O-gentiobiosido (27)

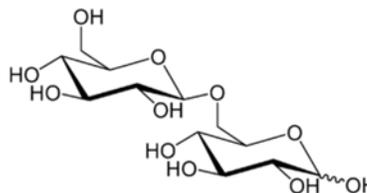
OMe isoramnetina 3-O-gentiobiosido (28)

(29) syringarenisol 4-O-glucósido

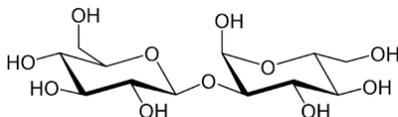


(30) Emodina 8-O-soforósido

*dímero de glucosa: β -D-glc (1 \rightarrow 2)- β -D-glc

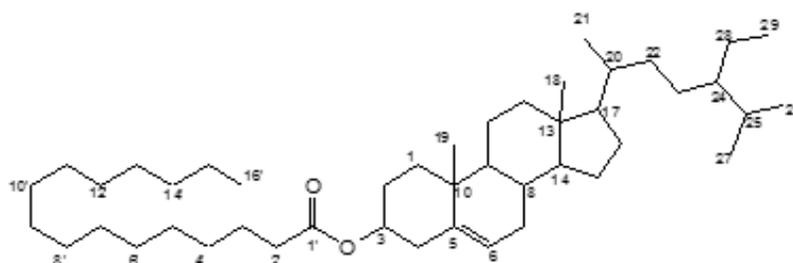


*Soforosa:

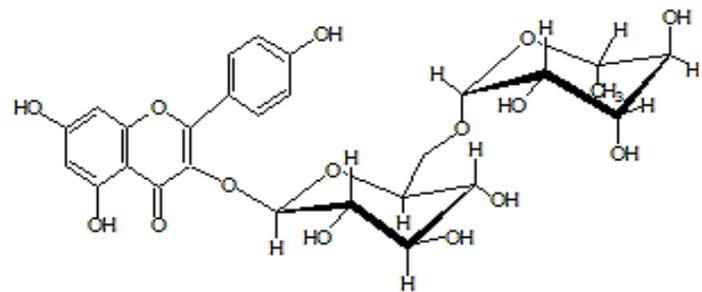


2.2.4 *Cassia fruticosa*.

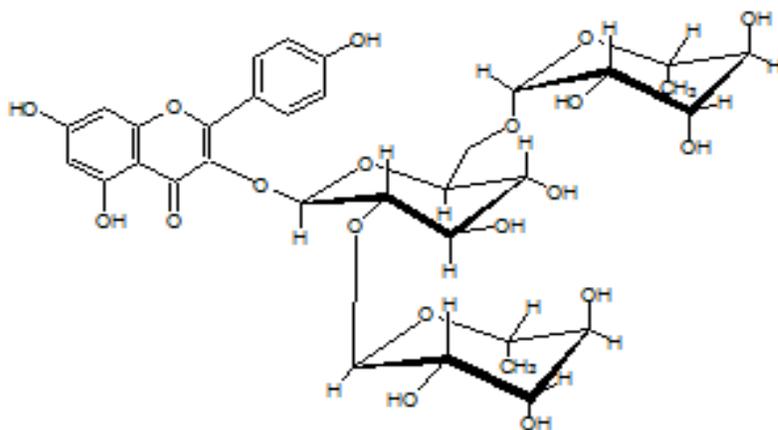
En 2013, Mendoza ^[10] aisló de las ramas y hojas de *Cassia fruticosa* Mill, tres metabolitos. El extracto metanólico de las ramas fue sometido a una hidrólisis ácida utilizando CHCl_3 -MeOH- H_2SO_4 20% en proporción (1;1;2; v/v) y de la fracción insoluble, mediante cromatografía flash, se logró aislar palmitato de β -sitosterol (**31**). El extracto metanólico de las hojas, fue tratado con una mezcla MeOH- H_2O (1:1; v/v), obteniéndose 2 fracciones. Una de las fracciones fue suspendida en agua y extraída con la fase orgánica del sistema de solventes t-BuOMe: *n*-BuOH: THF:0,2%TFA (1:3:1:5; v/v), obteniéndose dos subfracciones: **CfH-C1** y **CfH-C2**; de esta última se tomó una porción y fue sometida a elución por gradiente, igualmente por la técnica de cromatografía flash, con el sistema de solventes CH_2Cl_2 : MeOH en proporción inicial (5; 95; %v/v) hasta (30;70; %v/v). de donde se obtuvo dos compuestos, identificados respectivamente como: kaempferol 3-O-[α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranosido (Pf. 165-167°C) (**32**) y el kaempferol 3-O-[α -L-ramnosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]- α -L-ramnopiranosido (**33**).



(31) palmitato de β -sitosterol



(32) kaempferol 3-O-[α -L-ramnosil (1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranosido

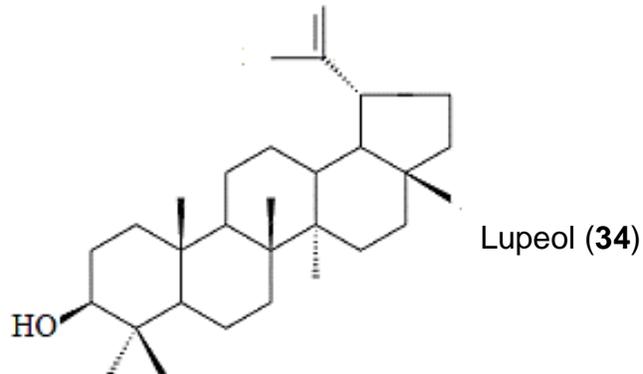


(33) kaempferol 3-O-[α -L-ramnosil (1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosil]- α -L-ramnopiranosido

2.3 DIPLLOTROPIS

2.3.1 *Diplotropis purpurea*

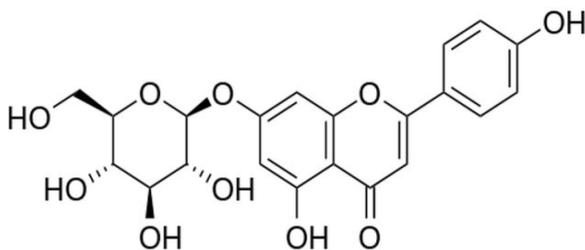
En 2003, Menezes y col., ^[11] aislaron Lupeol (**34**) del extracto hexanoico de las hojas y ramas de esta planta.



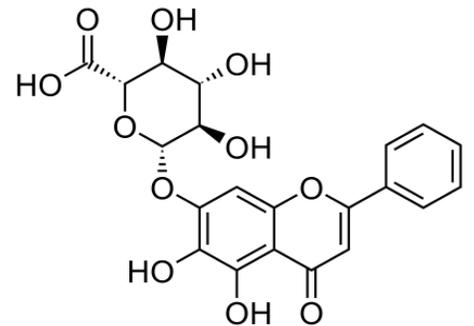
2.4 GEOFROEA

2.4.1 *Geofroea decorticans*

En 1999, Silva y col., ^[12] aplicando la técnica de extracción con solventes en polaridad creciente, para aislar e identificar varios flavonoides. De la extracción con acetato de etilo se aisló quercetina, mientras que en el extracto metanólico se identificaron cinco glicósidos, apigenina 7-O-glucósido (**35**), baicalina (**36**), quercetina 3-O-glucósido-7-O-ramnósido, quercetina 7-O-ramnósido y quercetrina.



(**35**) apigenina-7-O-glucósido



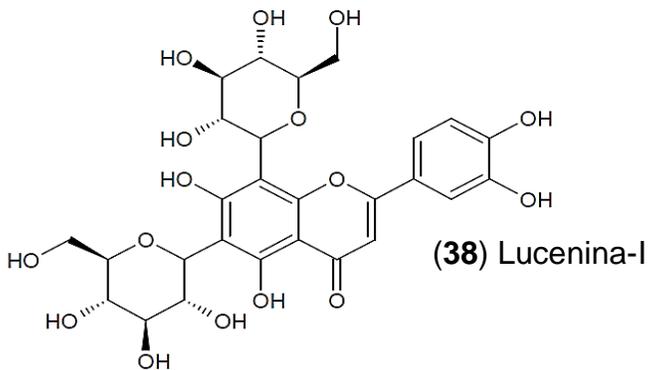
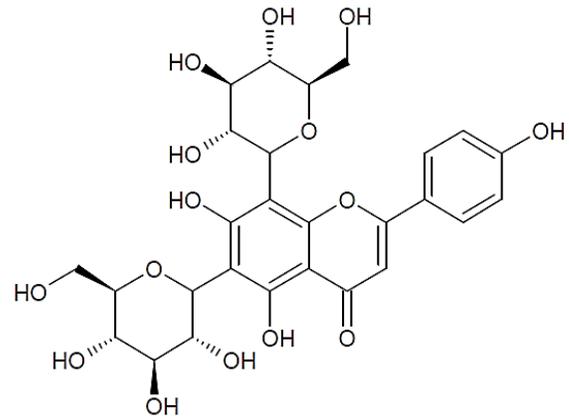
(**36**) Baicalina

2.5 GLEDITSIA

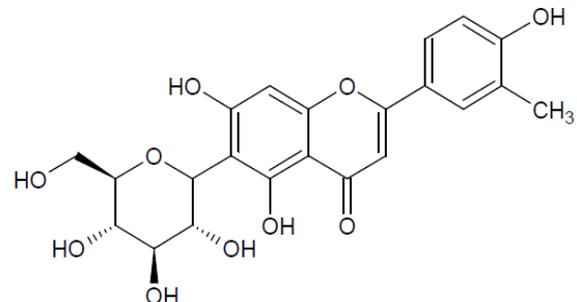
2.5.1 *Gleditsia triacanthos*

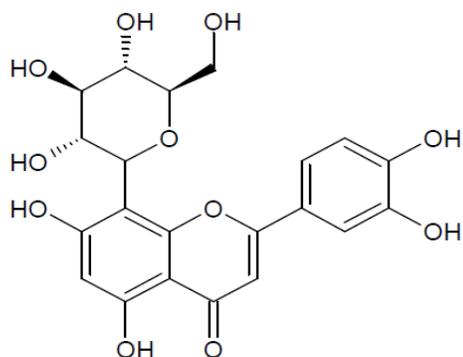
En 2013, Mohamed, y col., ^[13] estudiaron los polifenoles presentes las hojas de *Gleditsia triacanthos* L. La separación cromatográfica de 70% de extracto etanólico de las hojas dio como resultado el aislamiento de ocho flavonoides incluyendo seis flavonoides glicosilados, Vicenina-II (**37**), Lucenina-I (**38**), Isoorientina (**39**), orientina (**40**), vitexina (**41**), isovitexina (**42**), junto con dos agliconas, luteolina y apigenina.

(**37**) Vicenina-II

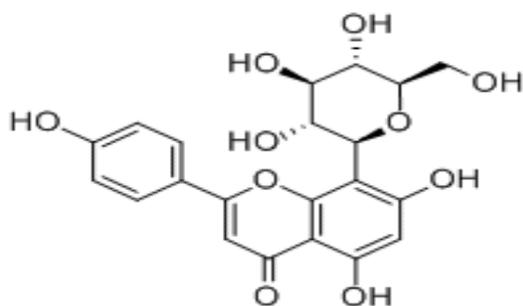


(**39**) Isoorientina

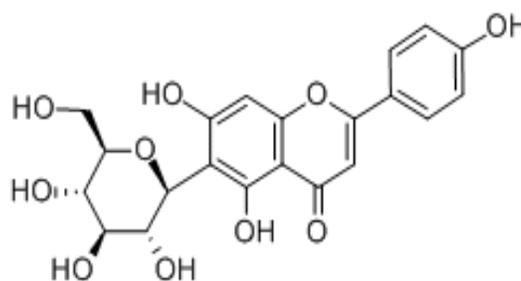




(40) Orientina



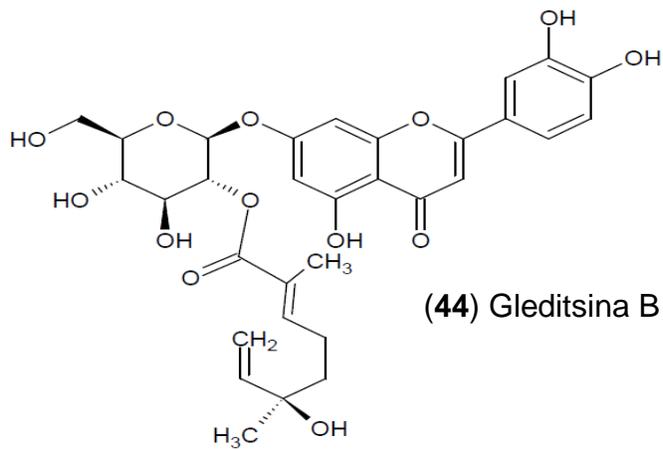
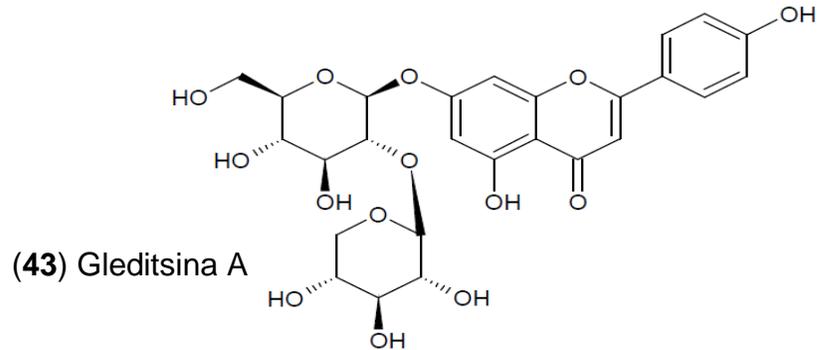
(41) Vitexina



(42) Isovitexina

2.5.2 *Gleditsia Caspia*

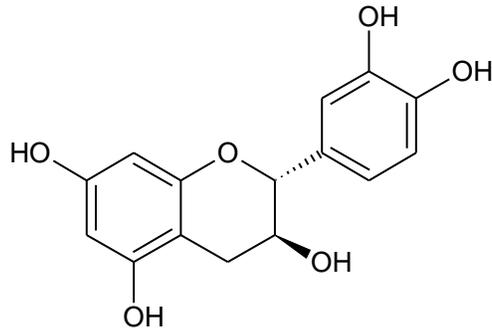
En 2009, Ragab y col.,^[14] realizaron una investigación química de un concentrado de *caspia* que resultó en el aislamiento y la identificación de dos nuevos glicósidos de flavanona. Gleditsina A (**43**) ó (2S)-5,7,4'-trihidroxi flavanona-7-O- [β-D-xilopiranosil- (1 → 2)] - β-D-glucopiranosido, y Gleditsina B (**44**), (2S) -5,7,3', 4'--tetrahydroxi flavanona-7-O- [2,6-dimetil-6-hidroxilo-2-trans-2,7- ácido octadienoico (1 → 2)] - β-D-glucopiranosil éster, así como dos glicósidos de flavanona conocidos, naringenina-7-O-glicósido y eriodictiol-7-O-glicósido. Las estructuras de los nuevos compuestos se establecieron por análisis espectroscópico y modificación química.



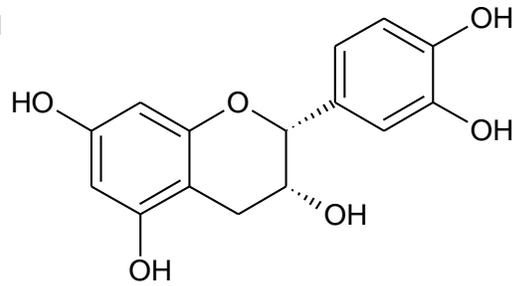
2.6 TACHIGALI

2.6.1 *Tachigali myrmecophyla*

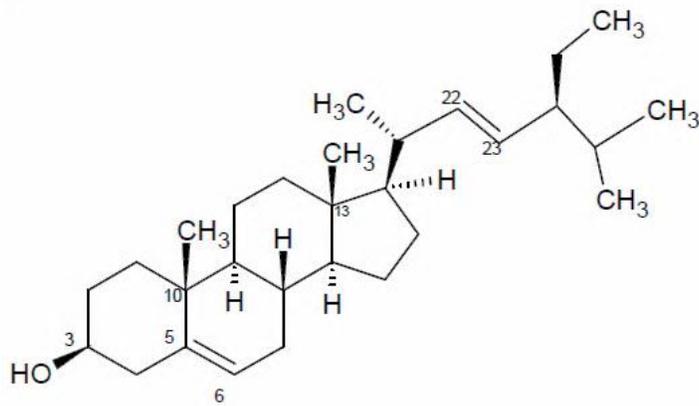
Lôbo L., y col., ^[15] realizaron un estudio fitoquímico a las hojas de esta especie, aislando dos catequinas identificadas como: (+)-catequina (45) y epicatequina (46), así como también una mezcla de esteroides, estigmasterol (47) y β -sitosterol (48)



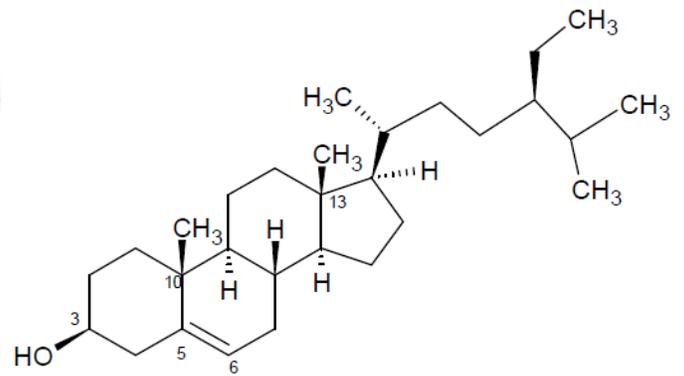
(45) (+)-catequina



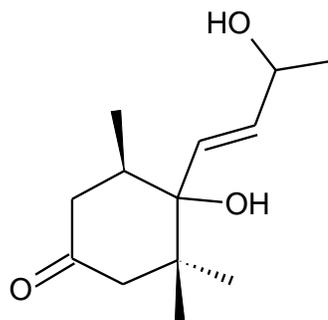
(46) epicatequina



(47) Estigmasterol

(48) β -sitosterol

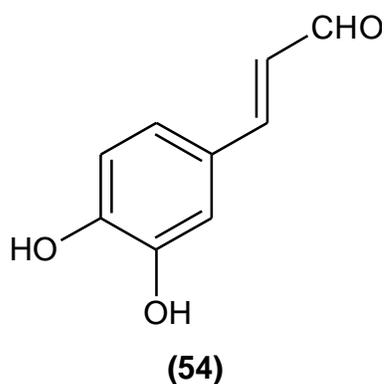
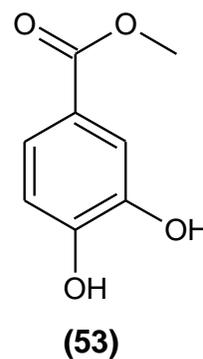
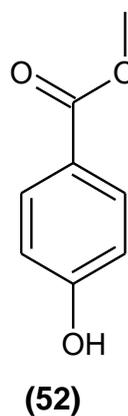
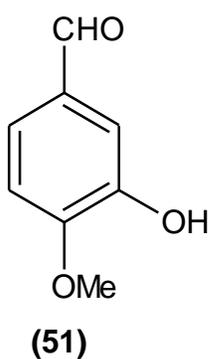
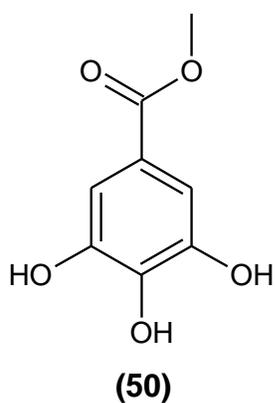
Souza F. y col ^[16], lograron aislar de la fracción con diclorometano proveniente del extracto hidroalcohólico de las hojas de esta especie el compuesto 4,5-diidroblumeniol A (49), el cual presentó una actividad alelopática dependiente de la concentración.

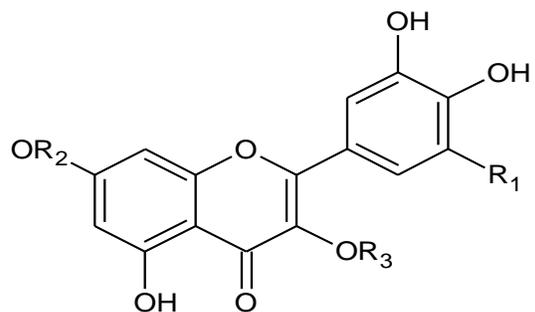


(49) 4,5-diidroblumeniol A

2.6.2 *Tachigali paniculata*

Cioffi G. y col., ^[17] realizaron un estudio fitoquímico a las hojas de esta especie logrando aislar dos flavonoides del extracto con éter de petróleo, galato de metilo (**50**), isovanillina (**51**), 4-hidroximetilbenzoato (**52**), 3,4-dihidroximetilbenzoato (**53**), caffeoil aldehído (**54**), Myricetina 7-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosido (**55**) y Myricetina 7-O-r-L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosido (**56**); mientras que del extracto metanólico lograron aislar, quercetina 3-O- α -D-glucopiranosido (**57**), quercetina 3-O-R-L-rhamnopiranosido (**58**) y quercetina 3-O- α -D-galactopiranosido (**59**),





(55) $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \beta\text{-D-glc-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$ $R_3 = \text{H}$

(56) $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \alpha\text{-L-rha-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glc}$ $R_3 = \text{H}$

(57) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \beta\text{-D-glc}$

(58) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \alpha\text{-L-rha}$

(59) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \beta\text{-D-gal}$

3. TAXONOMÍA

3.1 Familia Leguminosae

La familia Leguminosae o Fabaceae es una de las mayores familias de angiospermas, con cerca de 700 géneros y 18000 especies, distribuidas por todo el mundo, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales. ^[18] Es la familia más representada en los bosques tropicales lluviosos y en los bosques secos de América y África. Comprende árboles, arbustos o hierbas anuales o perennes, inermes o espinosos. Sus hojas son alternas, pinnadas o bipinnadas, con uno a numerosos pares de folíolos, en algunos casos reducidos o ausentes; algunas especies con glándulas peciolares o bien raqueales. ^[19]

Las leguminosas presentan una destacada importancia económica y cultural debido a su extraordinaria diversidad y abundancia en diversas formaciones vegetales y por sus aplicaciones en jardinería y ornamentación, alimento, obtención de compuestos con interés medicinal. ^[20] Como ejemplo del uso de esta familia en la alimentación, se encuentra *Lens culinaris*, conocida como lenteja, *Cicer arietinum* conocida como garbanzo, *Arachis hypogaea* como maní, entre otras. Dentro de sus usos industriales se encuentra la producción de gomas de la especie *Acacia senegal* de donde se obtiene la goma arábica ^[21] y dentro de los usos ornamentales se encuentra la especie *Peltoporum pterocarpum* conocida como la “Acacia de San Francisco”, originaria del Sur de la India, Malasia y el Norte de Australia. ^[22]

3.2 Descripción botánica de la especie *Tachigali paniculata* Aubl.

Tachigali es un género de plantas con flores perteneciente a la familia Fabaceae. Comprende 125 especies descritas y de estas, solo 74 aceptadas. [23] Se encuentran distribuidas en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela. [24]

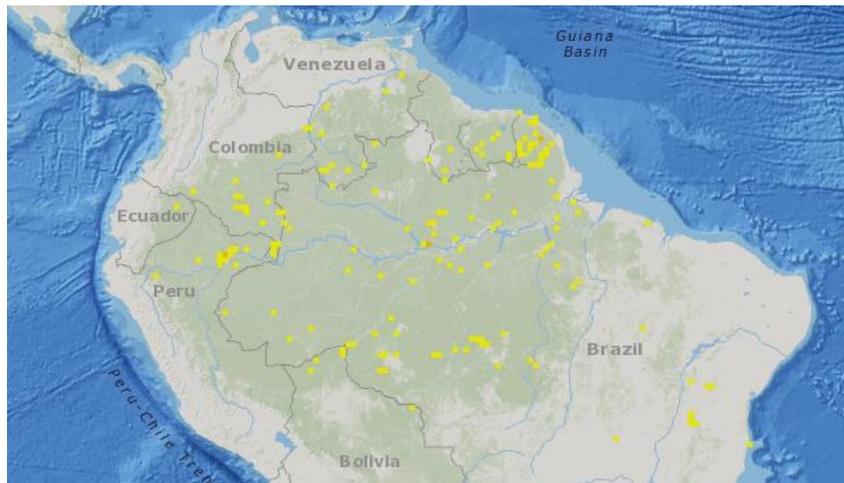


Figura 1 . Ubicación geográfica de *Tachigali Paniculata*. [25]

La especie *Tachigali paniculata* Aubl., posee la siguiente clasificación taxonómica [24]:

Reino: Plantae

División: Tracheofita

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Tachigali*

Especie: *Tachigali paniculata* Aubl.

Esta especie se caracteriza por ser un árbol con una densa copa redonda; puede crecer hasta 36 metros de altura. El tronco es recto y cilíndrico; que puede estar libre de ramas alrededor de la mitad de su altura, hasta 70 cm de diámetro con estribos fuertes que se produce en los márgenes inundables de ríos y bosques siempre verdes de tierras bajas [25]. Es conocida en Venezuela como Tachi o Bergantín. [26]



Figura 2 Flores y hojas de *Tachigali Paniculata* Aubl. [27]

4. JUSTIFICACIÓN

Muchas plantas pertenecientes a la familia Fabaceae han sido investigadas por su uso en diferentes partes del mundo como medicina natural. De estas se han aislado muchos metabolitos secundarios, mayormente derivados de la ruta del ácido shikímico. Hay pocos estudios fitoquímicos sobre el género *Tachigali* a pesar del número de especies aceptadas, por lo anterior se procede a la caracterización fitoquímica de *Tachigali paniculata*. Esta una especie de *Tachigali* poco conocido y estudiado en Venezuela, y contiene metabolitos secundarios que presentan importante actividad biológica.

Este trabajo es una contribución para el desarrollo científico del país, en el campo de la química orgánica y específicamente en la investigación de productos naturales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar, purificar y caracterizar metabolitos secundarios de origen terpenoidal de la especie *Tachigali Paniculata* Aubl.

5.2 Objetivos específicos

- a) Extraer y aislar los metabolitos secundarios de la especie *Tachigali paniculata* Aubl.
- b) Purificar los metabolitos secundarios aislados de la especie *Tachigali paniculata* por métodos cromatográficos como TLC, CC, MPLC y/o HPLC.
- c) Caracterizar los metabolitos secundarios aislados de esta especie por técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN-1 y 2D y masas)

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Material vegetal

El material vegetal fue colectado por el Dr. Anibal Castillo en el Río Cuao, entre Raudal Murciélago y Comunidad Coromoto, Municipio Autana, Estado Amazonas (4°54'-5°3'N;67°34'-67°46'O). Una muestra se encuentra depositada en el Herbario Nacional de Venezuela, ubicado en el jardín botánico, Universidad Central de Venezuela, bajo el código AC6209.

El material vegetal previamente secado y molido se llevó a percolación con metanol por tres días. Los extractos obtenidos se secaron a presión reducida.



Figura 3. Muestra de la muestra de *Tachigali Paniculata* Aubl., almacenada en el herbario nacional de Venezuela.

6.2 Materiales y equipos

6.2.1 Materiales

Cromatografía:

- Cromatografía en fase normal utilizando como fase estacionaria sílica gel 60; 0,016 – 0,2 mm (70-230 mesh ASTM). Marca Scharlau.
- Capa fina: Placas analíticas de sílica gel 60 de 0,25 mm de espesor e indicador de fluorescencia UV₂₅₄; marca Merck.

Solventes Utilizados:

- Extracción y obtención de fracciones de interés: Acetato de etilo, butanol, diclorometano, hexano, heptano y metanol grado técnico.
- Eluyentes: hexano, heptano-hexano y hexano-acetato de etilo (grado técnico).
- Análisis espectroscópico: Cloroformo deuterado marca Aldrich.

Revelador:

- Anisaldehido-Ácido Sulfúrico (AS): 0,5mL de anisaldehido se mezclan con 10mL de ácido acético glacial, seguido de 85mL de metanol y 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se rocía la placa de TLC con el reactivo y se calienta a 100°C durante 5-10min o hasta obtener una máxima intensidad de color. La aparición de manchas moradas en el visible, es indicativo de la presencia de compuestos terpenoidales, amarillo para flavonoides, etc. ^[28]

6.2.2 Equipos

- Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200.
- Balanza Sartorius Waage 1103
- Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz
(Laboratorio de RMN, Facultad de Farmacia. U.C.V.).
- Fusiometro Sybron-Thermolyne; modelo MP-12615; 120v; 2,1 amp.; 250W; 50-60 ciclos
- Lámpara UV 254/365 nm, 115V, multibanda, 60 Hz, marca MINERALIGHT.

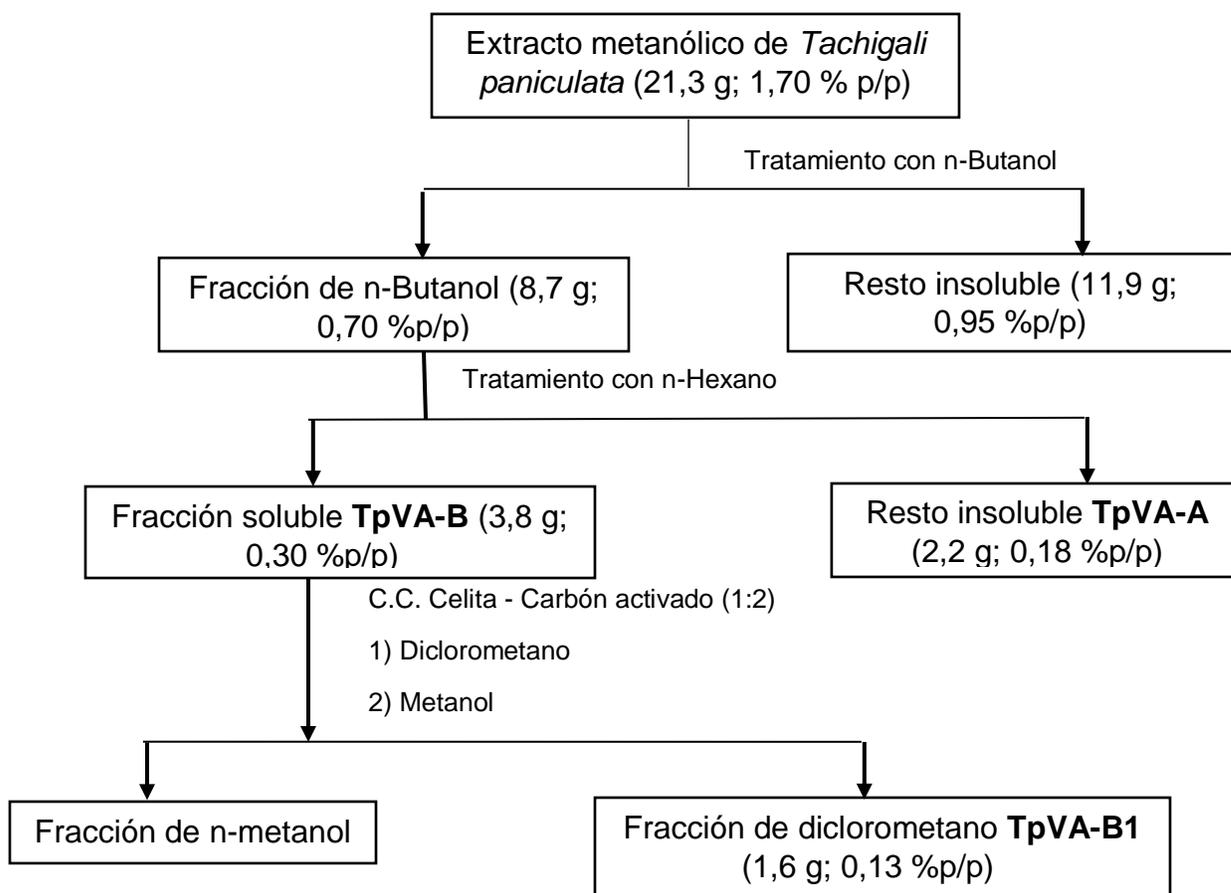
6.3. Tratamiento de la muestra y aislamiento de los metabolitos secundarios.

6.3.1. Tratamiento del extracto metanólico de *Tachigali paniculata*

Aubl.

Para la obtención del extracto metanólico, se pesó 1250 gramos de hojas y ramas de *Tachigali paniculata*, se maceró con 3,5 Litros de metanol y se realizó este procedimiento dos veces más, con 2 Litros del mismo solvente. Posteriormente, se evaporó al vacío y se obtuvo 21,3 mg de una pasta oscura (1,70 %p/p con respecto al peso inicial de planta).

La pasta correspondiente al extracto metanólico se lavó con butanol y se filtró por gravedad, obteniéndose dos fracciones, la fracción soluble (8,7 g) y la insoluble (11,9 g). La fracción soluble fue tratada con hexano obteniéndose nuevamente dos fracciones, 2,2 gramos de **TpV-A** (fracción insoluble) y 3,8 gramos de **TpV-B** (fracción soluble); esta última se sembró en una columna cromatográfica de celita - carbón activado 2:1, utilizando como solventes diclorometano y metanol, con el fin de eliminar las clorofilas presentes en la muestra, según el procedimiento descrito por H.T. Khor. ^[29]

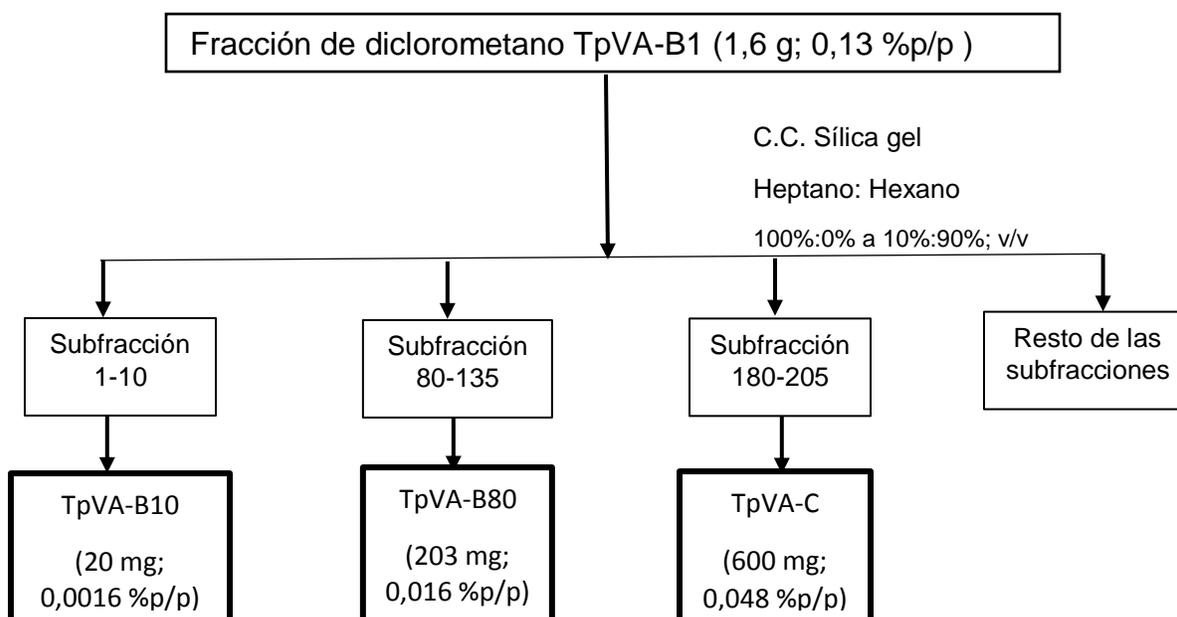


Esquema 2. Tratamiento del extracto metanólico de *Tachigali paniculata*.

6.3.2. Aislamiento de metabolitos secundarios

De la fracción de diclorometano, se obtuvo 1,6 gramos. Un análisis preliminar por CCF permitió detectar diferentes manchas moradas, al rociar con el reactivo (AS), lo que indicó la naturaleza terpenoidal de los compuestos presentes en esta fracción. La separación se realizó mediante cromatografía en columna (CC), utilizando como fase estacionaria sílica gel en una proporción 1:100 (peso muestra: sílica) y como fase móvil inicial heptano, seguido de las mezclas de heptano: hexano 90:10 %v/v, 85:15 %v/v, 80:20 %v/v hasta llegar a 10:90 %v/v, recolectando 230 fracciones.

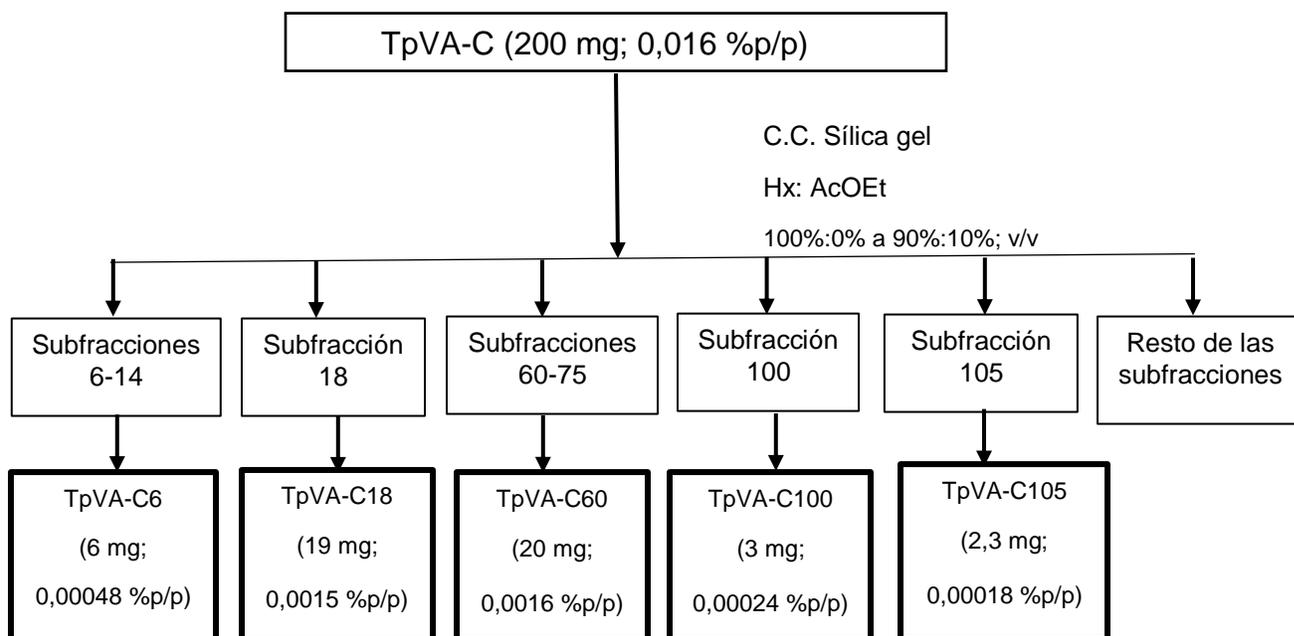
De las subfracciones (1-10) eluidas con hexano, se aisló 20 mg de un sólido de color blanco que mostró una coloración morada frente al AS y que se identificó como **TpVA-B10**. Por otro lado, de la subfracción 80-135 se aisló 203 mg de un sólido blanco que mostró ser de naturaleza terpenoidal por su comportamiento frente a AS y que se identificó como **TpVA-B80** (Esquema 3).



Esquema 3. Obtención de los compuestos TpVA-B10 y TpVA-B80.

La fracción TpVA-C (180-205), mostró diferentes manchas (la mayoría de color morado) que indicaban la presencia de varios compuestos de tipo terpenoidal. Se sembró 200 mg de esta fracción en una columna cromatográfica de fase normal, con sílica gel y una relación de 1:70 peso de la muestra: peso de la sílica. La elución se realizó con una mezcla de polaridad creciente hexano: acetato de etilo, hasta llegar a una relación Hx: AcOEt; 90:10 %v/v, colectándose así 110 fracciones.

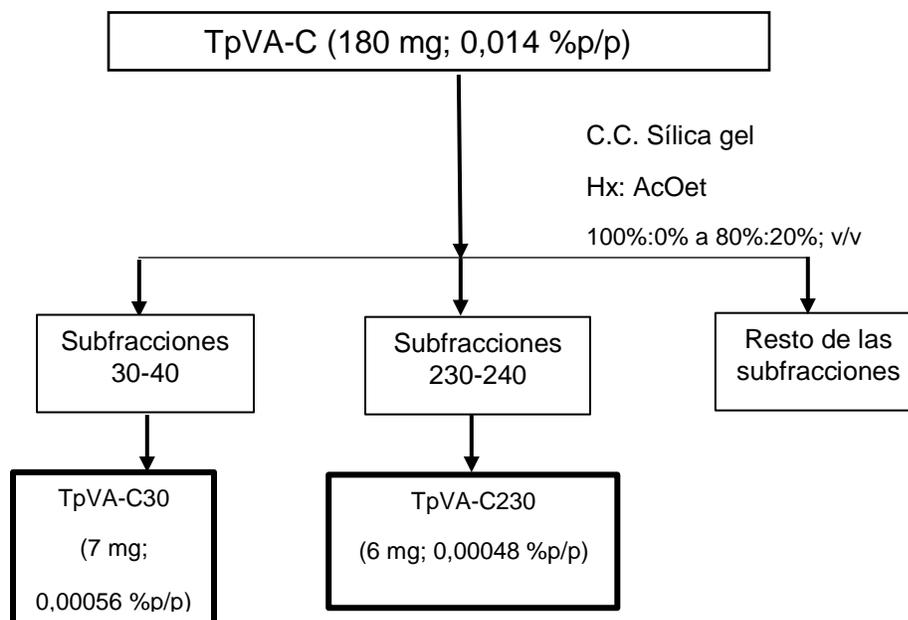
El análisis por CCF utilizando como eluyente la mezcla de Hx: AcOEt; 90:10 %v/v y p-anisaldehído como agente revelador, permitió evaluar las diferentes fracciones y obtener así 5 fracciones colectivas. De las fracciones **TpVA-C18** (Subfracción 18) y **TpVA-C60** (Subfracciones 60-75) se aislaron dos sólidos de color blanco. (Esquema 4).



Esquema 4. Obtención de los compuestos TpVA-C18 y TpVA-C60

El análisis por CCF de las fracciones **TpVA-C6**, **TpVA-C100** y **TpVA-C105** indicaba la presencia de un solo compuesto en cada una de estas fracciones, pero en poca cantidad, por tal motivo se procedió a realizar una tercera separación por CC, con 180 mg de la fracción **TpVA-C** (Esquema 3). La elución se realizó inicialmente con hexano y se aumentó gradualmente la polaridad hasta una mezcla de Hx: AcOEt; 80:20; %v/v (Esquema 5).

La evaluación por CCF utilizando como eluyente una mezcla de Hx: AcOEt; 80:20; %v/v y como agente revelador AS, mostró un comportamiento similar al observado en la primera columna. Se aisló 7 y 6 mg respectivamente de los compuestos denominados **TpVA-C30** y **TpVA-230** (Esquema 5).



Esquema 5. Obtención de los compuestos TpVA-C30 y TpVA-C230.

Las fracciones **TpVA-C6** (Esquema 4) y **TpVA-C30** (Esquema 6), se unieron al comprobar que se trataba del mismo compuesto para obtener una fracción final de 13 mg renombrada como **TpVA-C630**. Las fracciones **TpVA-C100** y **TpVA-C105** (Esquema 4) y **TpVA-230** (Esquema 5), no fueron estudiadas debido a la poca cantidad de masa que presentaban en relación al número de manchas observadas en el análisis por CCF.

Se midió el punto de fusión de los compuestos aislados y fueron caracterizados por medio de la espectroscopia de RMN en una dimensión (^1H , ^{13}C y DEPT-135) y por comparación con datos reportados en la bibliografía.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

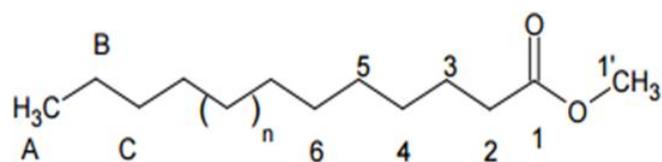
7.1 Compuesto TpVA-B10

De la fracción TpVA-B10, se aisló 20 mg de este compuesto, como un sólido blanco. Se analizó por CCF en sílica gel, utilizando como sistema de solvente hexano: acetato de etilo; 85:15, mostrando un $R_f = 0,9$. Al ser revelado con *p*-anisaldehído se observa una mancha de color morado intenso.

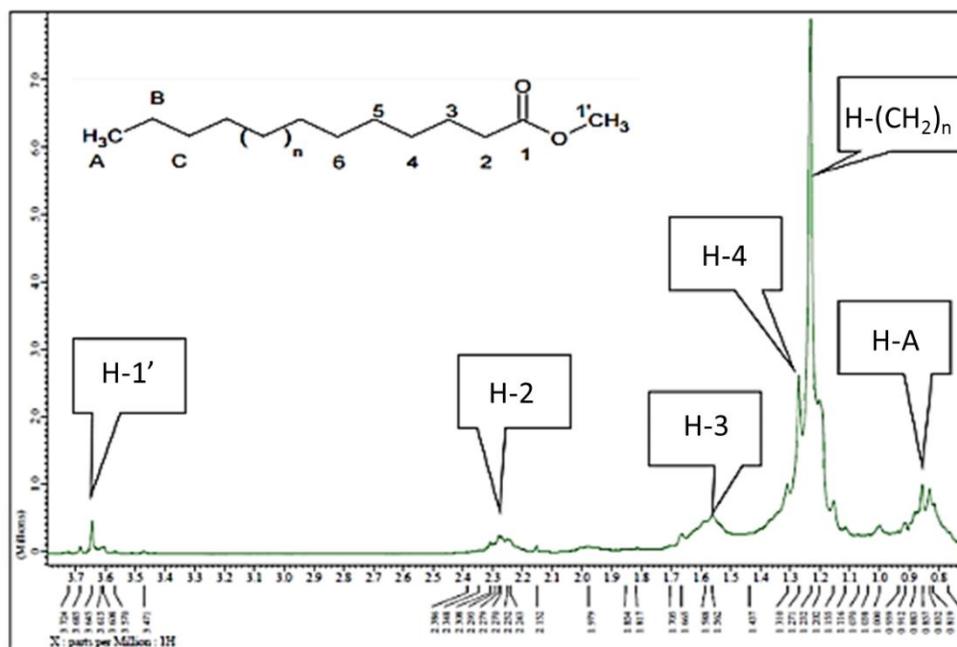
El espectro de ^1H (espectro 1), tomado en CDCl_3 , muestra a campo alto señales características de cadenas alifáticas. Así, se observa a 0,83 ppm, un triplete correspondiente a un metilo terminal de una cadena saturada. A 2,26 ppm se observa un triplete deformado asignado a protones vecinos a un carbonilo (C-2). Así mismo, los protones del C-3 aparecen como un multiplete a 1,59 ppm. Por otro lado, a 1,30 ppm se observa un singlete que se asigna a los protones del C-4. Por último, en 1,23 ppm se observa un singlete ancho y pronunciado que es característico de grupos metilénicos.

En el espectro de ^{13}C (espectro 2) se observan cinco señales a campo alto. Dichas señales corresponden a cadenas saturadas y lineales. La señal a 29,7 ppm corresponde a metilenos de una cadena carbonada, por la intensidad de la misma. Por otro lado, se pudo determinar la naturaleza de las señales observadas en el espectro de ^{13}C , a través del experimento DEPT-135 (espectro 3), el cual se encuentra desfasado y se observa la presencia de dos grupos metilos, a 14,1 y 51,4 ppm, que se asignan a los protones de A (metilo terminal de una cadena saturada) y 1' (metilo unido a un oxígeno), respectivamente. Estas señales permiten inferir una estructura lineal que puede corresponder a un éster de ácido graso, sin que sea posible definir la cantidad de carbonos metilénicos que componen dicha estructura.

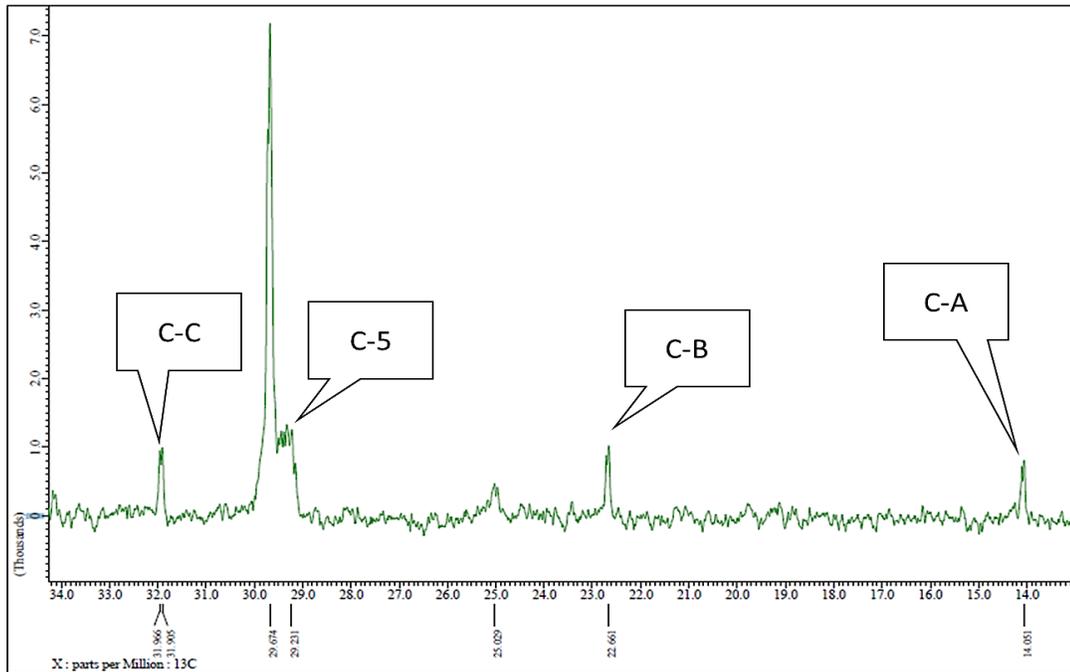
Las tablas 1 y 2 muestran las asignaciones para los protones y carbonos del compuesto aislado y la comparación con los datos reportados para un compuesto del tipo éster de ácido graso.^[30]



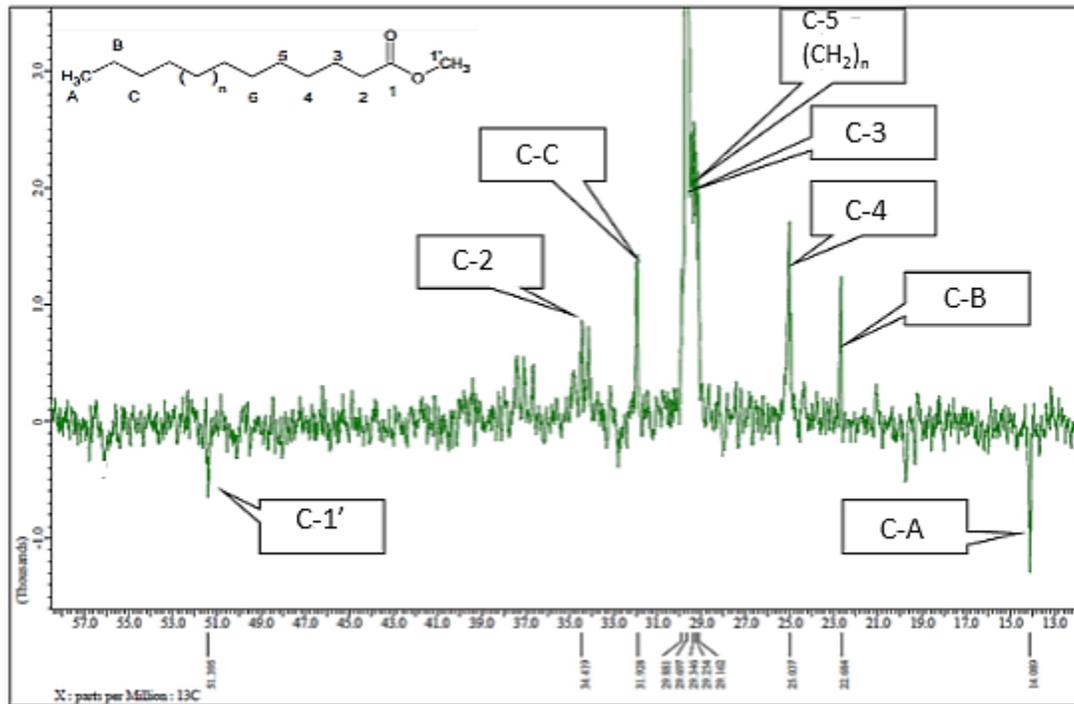
Éster de ácido graso.

Espectro 1. RMN ^1H para el compuesto TpVA-B10**Tabla 1.** Desplazamientos de los protones (ppm) para el compuesto TpVA-B10 y metil palmitato.

| H | δ ppm reportado, tomado en CDCl_3 a 200 MHz (m; J (Hz)) ^[30] | δ ppm exp., tomado en CDCl_3 a 270 MHz (m; J (Hz)) |
|-------------------|--|---|
| 1' | 3,66 (s) | 3,65 (s) |
| 2 | 2,29 (t) | 2,26 (m) |
| 3 | 1,60 (m) | 1,59 (m) |
| 4 | 1,25 (s) | 1,30 (s) |
| A | 0,87 (t) | 0,83 (t) |
| $(\text{CH}_2)_n$ | 1,24 (s) | 1,23 (s) |



Espectro 2. RMN ^{13}C para el compuesto TpVA-B10



Espectro 3. DEPT-135 para el compuesto TpVA-B10

Tabla 2. Desplazamientos de los carbonos (ppm) para el compuesto TpVA-B10 y metil palmitato.

| C | δ ppm reportado, tomado en CDCl_3 a 200 MHz ^[30] | δ ppm exp., tomado en CDCl_3 a 270 MHz | DEPT |
|----|---|--|---------------|
| 1 | 174,3 | - | C |
| 2 | 34,1 | 34,1 | CH_2 |
| 3 | 29,4 | 29,3 | CH_2 |
| 4 | 24,9 | 25,0 | CH_2 |
| A | 14,1 | 14,1 | CH_2 |
| 1' | 51,4 | 51,4 | CH_3 |

7.2 Compuesto TpVA-B80.

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco (203 mg), con punto de fusión de (164 - 166) °C, soluble en diclorometano y acetato de etilo. Al analizarlo por CCF sobre sílica gel, eluyendo con Hx: AcOEt; 85:15, se observó una mancha morada con un Rf de 0,6, utilizando como agente revelador AS, indicando así que se trataba de un compuesto del tipo terpenoidal.

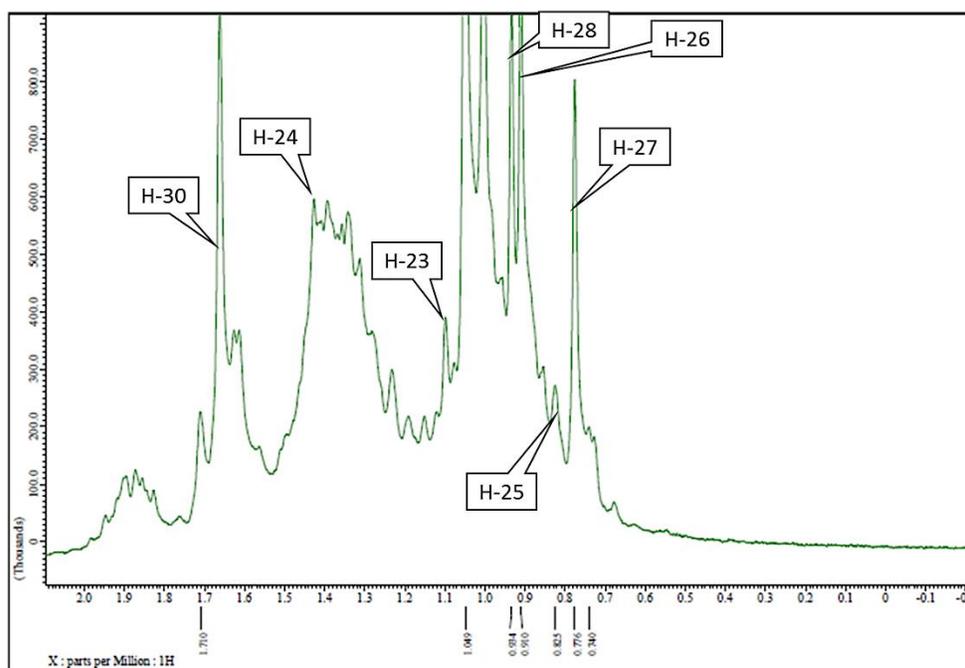
En el espectro RMN ^1H (espectro 4 y 5) tomado en CDCl_3 , se observó a campo alto siete singletes en 0,77, 0,82, 0,91, 1,00, 1,05, 1,43 y 1,66 ppm correspondiente a metilos de una estructura de un triterpeno. Se observa en 2,38 ppm un multiplete, asignado a un protón unido a un metino de un doble enlace; así mismo, se observan, a campo medio, dos singletes con desplazamientos de 4,67 y 4,55 ppm, correspondientes a dos protones de un enlace olefínico terminal.

En el espectro RMN ^{13}C (espectro 6 y 7), tomado en CDCl_3 , se observan 30 señales que confirman la presencia de un triterpeno. Así, a campo bajo se observa una señal a 218,0 ppm característica de un grupo carbonilo y señales en 150,9 y 109,4 ppm que se atribuyen a un carbono cuaternario del tipo olefínico y a un carbono metilénico olefínico

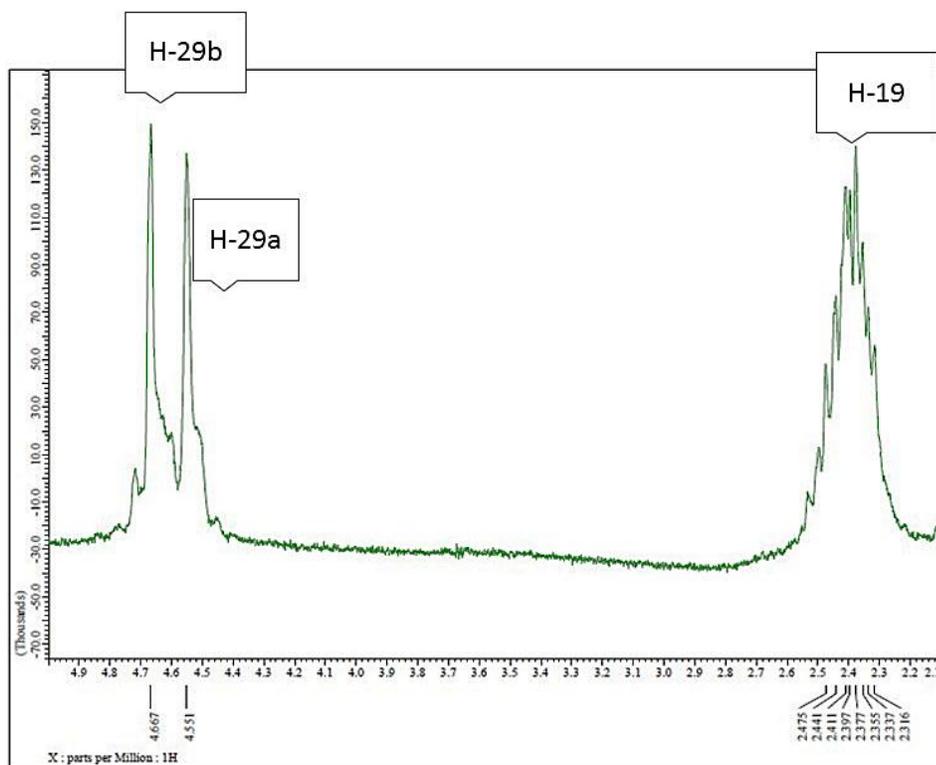
terminal, respectivamente. Hacia campo alto se observan las señales que corresponden a los carbonos que conforman la estructura del terpeno.

El espectro DEPT (Anexo VI), permite identificar 7 metilos, 11 metilenos, incluyendo 1 carbono olefínico, 5 metinos y 7 carbonos cuaternarios incluyendo al carbono carbonílico, para un total de 30 carbonos. Estos resultados, junto con los acoplamientos en RMN ^1H permiten inferir una estructura del tipo Lupano.

Los dos singletes que se observan en 4,67 y 5,55 ppm en el espectro de RMN ^1H corresponden a los dos protones del enlace olefínico terminal de la estructura (H-29b y H-29a, respectivamente). El multiplete en 2,38 ppm se asigna al protón del carbono terciario, enlazado al doble enlace (H-19). Los singletes en 0,77, 0,82, 0,91, 1,00, 1,05, 1,43 y 1,66 ppm corresponde a los 7 metilos del esqueleto triterpénico (H-27, H-25, H-26, H-28, H-23, H-24 y H-30)

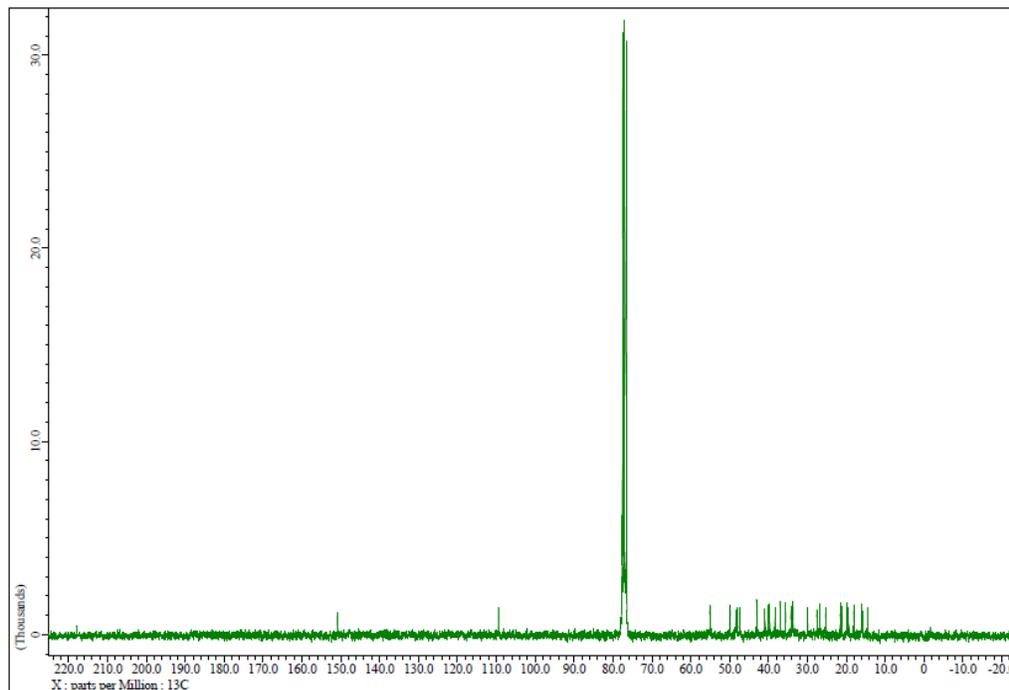


Espectro 4. RMN ^1H a campo alto, para el compuesto TpVA-B80

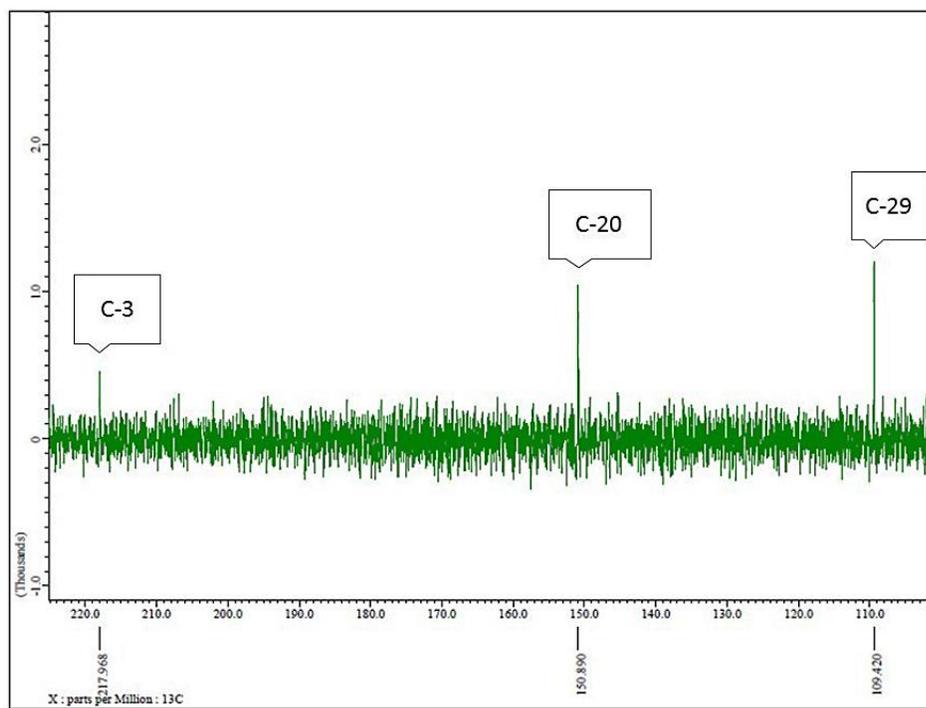


Espectro 5. RMN ^1H a campo medio, para el compuesto TpVA-B80

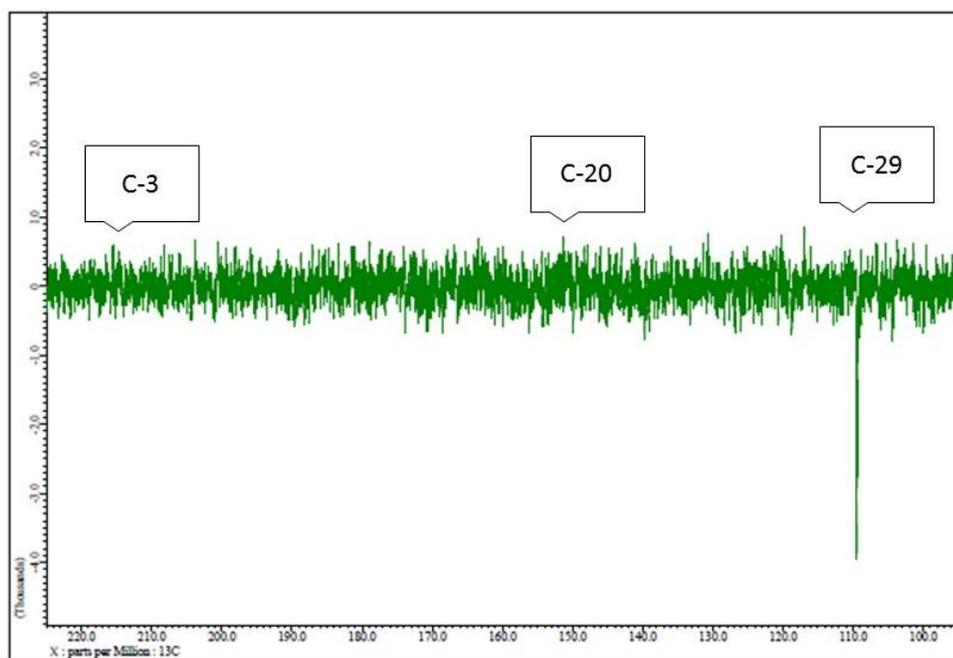
La señal en 217,9 ppm correspondiente al carbonilo, se asigna al C-3 de la estructura. Adicionalmente, las señales en 150,9 y 109,4 ppm se asignan al carbono cuaternario en C-20 y al carbono olefínico terminal C-29, respectivamente.



Espectro 6. Espectro ^{13}C para el compuesto TpA-B80

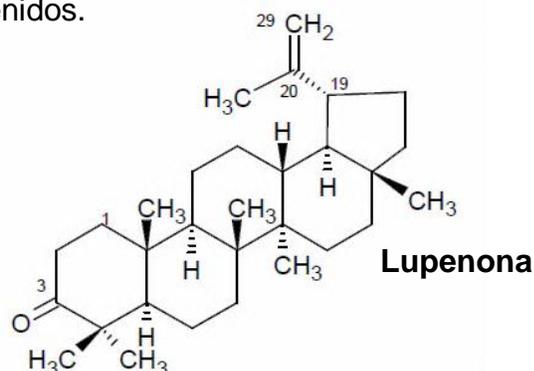


Espectro 7. RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto TpVA-B80



Espectro 8. DEPT-135 del compuesto TpVA-B80

Al realizar una comparación con los datos reportados en la bibliografía para estructuras de este tipo, se encontró que los datos reportados para la Lupenona coinciden con los datos experimentales obtenidos.



En las tablas 3 y 4 se muestran los desplazamientos y asignaciones de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y DEPT para el compuesto TpVA-B80 y los datos reportados en la literatura para la lupenona. ^[31]

Tabla 3. Desplazamientos de protones (ppm) para compuesto TpVA-B80 y lupenona.

| H | δ ppm reportado, tomado en CDCl_3 a 400 MHz (m; J (Hz)) ^[31] | δ ppm exp., compuesto TpVA-B80, tomado en CDCl_3 a 270 MHz (m; J (Hz)) |
|-----------------|---|--|
| 19 | 2,32 (m) | 2,38 (m) |
| 23 | 1,08 (s) | 1,05 (s) |
| 24 | 1,35 (s) | 1,43 (s) |
| 25 | 0,80 (s) | 0,82 (s) |
| 26 | 0,90 (s) | 0,91 (s) |
| 27 | 0,76 (s) | 0,77 (s) |
| 28 | 0,98 (s) | 1,00 (s) |
| 29 ^a | 4,57 (s) | 4,55 (s) |
| 29b | 4,69 (s) | 4,67 (s) |
| 30 | 1,65 (s) | 1,66 (s) |

Tabla 4. Desplazamientos de los carbonos (ppm) para el compuesto TpVA-B80 y la lupenona.

| C | DEPT | δ ppm reportado, tomado en CDCl_3 a 100 MHz ^[31] | δ ppm exp. compuesto TpVA-B80, tomado en CDCl_3 a 270 MHz |
|----|-----------------|---|---|
| 1 | CH ₂ | 39,6 | 39,7 |
| 2 | CH ₂ | 34,5 | 34,2 |
| 3 | C | 217,9 | 218,0 |
| 4 | C | 47,1 | 47,4 |
| 5 | CH | 55,4 | 55,1 |
| 6 | CH ₂ | 19,6 | 19,8 |
| 7 | CH ₂ | 34,1 | 33,7 |
| 8 | C | 42,7 | 40,9 |
| 9 | CH | 49,8 | 49,9 |
| 10 | C | 36,9 | 37,0 |
| 11 | CH ₂ | 21,5 | 21,6 |
| 12 | CH ₂ | 25,2 | 25,3 |
| 13 | CH | 38,2 | 38,3 |
| 14 | C | 42,9 | 43,0 |
| 15 | CH ₂ | 27,3 | 27,5 |
| 16 | CH ₂ | 35,8 | 35,6 |
| 17 | C | 42,9 | 43,0 |
| 18 | CH | 48,3 | 48,4 |
| 19 | CH | 47,9 | 48,0 |
| 20 | C | 151,2 | 150,9 |
| 21 | CH ₂ | 30,2 | 29,9 |
| 22 | CH ₂ | 40,0 | 40,0 |

| | | | |
|----|-----------------|-------|-------|
| 23 | CH ₃ | 26,2 | 26,7 |
| 24 | CH ₃ | 21,0 | 21,1 |
| 25 | CH ₃ | 15,8 | 15,9 |
| 26 | CH ₃ | 15,9 | 16,0 |
| 27 | CH ₃ | 14,4 | 14,6 |
| 28 | CH ₃ | 18,0 | 18,1 |
| 29 | CH ₂ | 110,0 | 109,4 |
| 30 | CH ₃ | 19,3 | 19,4 |

7.3 Compuesto TpVA-C18.

Este compuesto se obtuvo como un sólido (19 mg) en forma de agujas, de color blanco con punto de fusión (208- 210) °C. Presentó un R_f de 0,3 al analizarlo por CCF sobre sílica gel, eluyendo con Hx: AcOEt; 85:15 y utilizando como agente revelador AS, se observó una mancha morada, indicando así que se trataba de un compuesto del tipo terpenoidal.

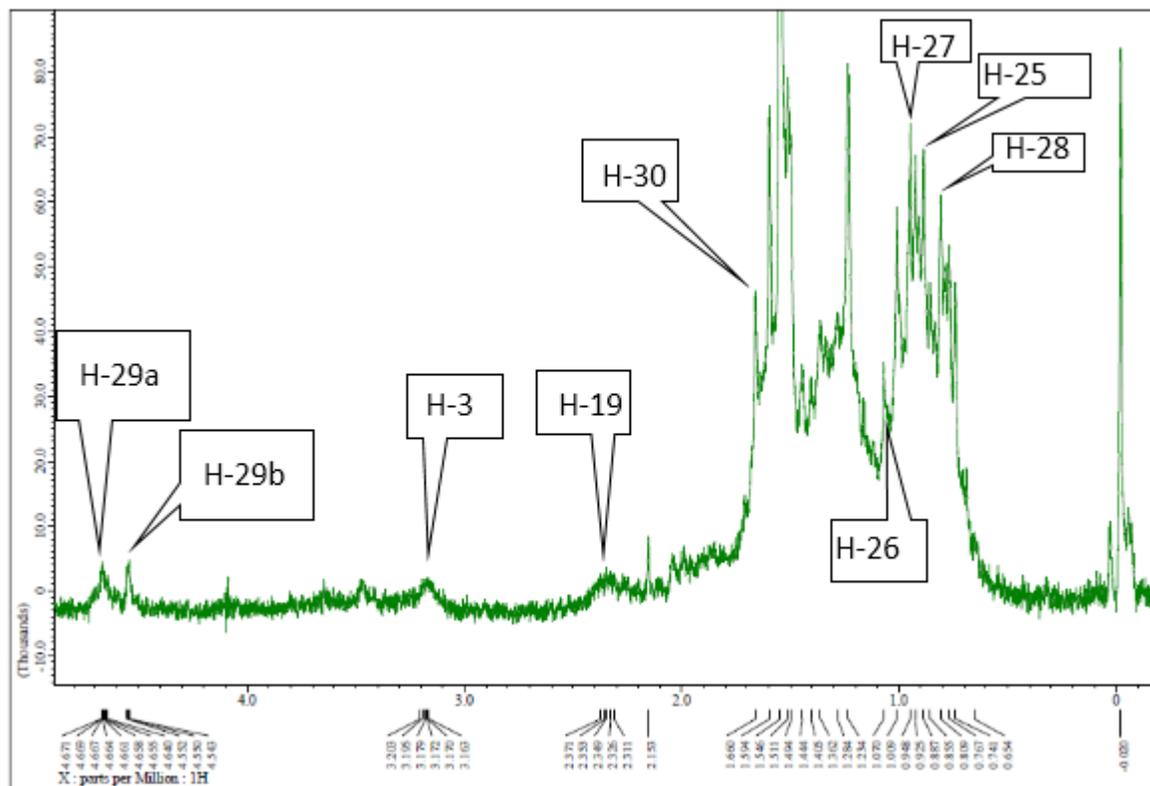
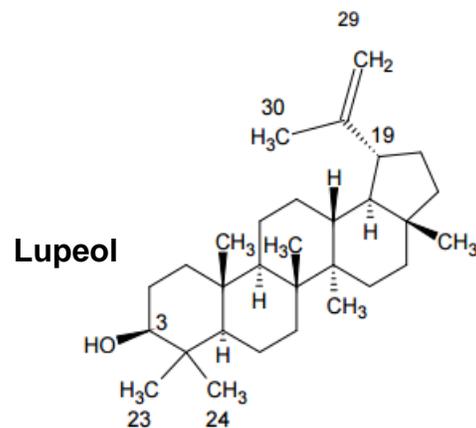
El espectro de RMN ¹H (espectro 9) muestra a campo medio un par de singletes, a 4,53 y 4,66 ppm, que corresponden a protones de un carbono olefínico terminal. El multiplete que se observa a 3,18 ppm se atribuye a un protón que se encuentra unido a un carbono hidroxilado. Se observa también, una señal a 2,34 ppm característica de un protón unido a un carbono terciario, enlazado a un doble enlace.

A campo alto, se observan 7 singletes, 1,66, 1,07, 0,94, 0,92, 0,85, 0,80 y 0,76 ppm, que se atribuyen a los metilos de un triterpeno.

Al comparar el espectro del compuesto con el obtenido para la Lupenona, se pudo comprobar la similitud de la mayoría de las señales observadas en el espectro de protones. Así, los singletes observados a 4,53 y 4,66 ppm corresponden al carbono olefínico terminal (H-29b y H-29a) del compuesto. El multiplete observado a 3,18 ppm se

atribuye al protón H-3 del ciclo A del triterpeno y la señal a 2,34 ppm se asigna al protón H-19.

Con estos datos se infiere que el esqueleto del compuesto TpVA-C18 es del tipo lupano, mostrando señales similares a las observadas para el compuesto lupeol.



Espectro 9. RMN ^1H del compuesto TpVA-C18

Asimismo, se realizó una CCF sobre sílica gel, en la cual se desarrolló el compuesto TpVA-C18 y un patrón de Lupeol. Se obtuvo como resultado que ambos compuestos presentaron el mismo Rf, así como el color morado característico de los terpenos. Esto sugiere que el compuesto puede ser Lupeol, quedando por confirmar esta inferencia con el espectro de RMN ^{13}C . En la tabla 5, se muestra la comparación entre los datos reportados para Lupeol y los obtenidos para el compuesto aislado.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de protones para el compuesto TpVA-C18 y Lupeol.

| H | δ (ppm) reportado, tomado en CDCl_3 a 500 MHz (m; J (Hz)) ^[32] | δ (ppm) experimental, tomado en CDCl_3 a 270 MHz (m; J (Hz)) |
|-----|--|---|
| 3 | 3,18 (m) | 3,18 (m) |
| 19 | 2,38 (m) | 2,34 (m) |
| 23 | 0,97 (s) | 0,94 (s) |
| 24 | 0,77 (s) | 0,76 (s) |
| 25 | 0,84 (s) | 0,85 (s) |
| 26 | 1,04 (s) | 1,07 (s) |
| 27 | 0,96 (s) | 0,92 (s) |
| 28 | 0,80 (s) | 0,80 (s) |
| 29a | 4,68 (s) | 4,66 (s) |
| 29b | 4,56 (s) | 4,53 (s) |
| 30 | 1,70 (s) | 1,66 (s) |

7.4 Compuesto TpVA-C60.

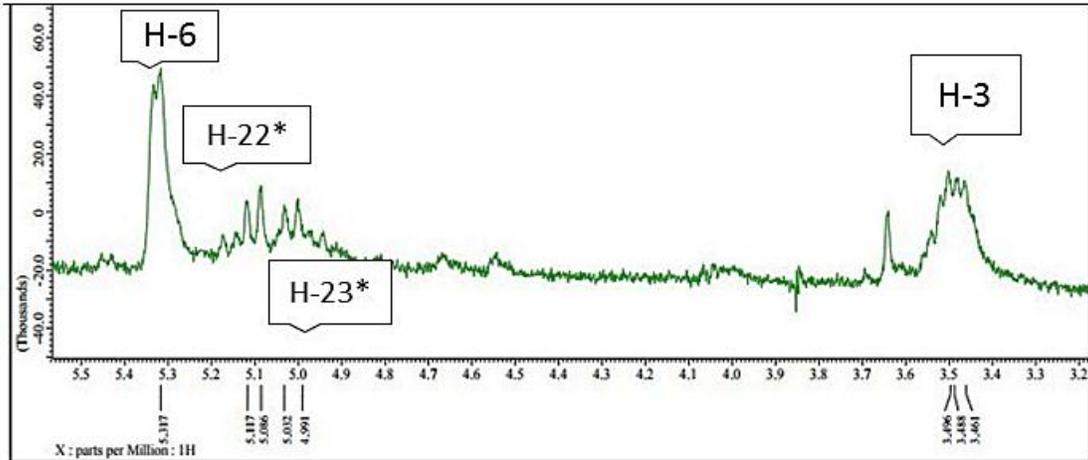
El compuesto **TpVA-C60** se aisló como un sólido amorfo (20 mg) de color blanco, con un punto de fusión de (134-138) °C, soluble en diclorometano y acetato de etilo. El estudio por CCF utilizando el sistema de solvente Hx:AcOEt; 85:15, mostró una mancha con un Rf de 0,20 que revelaba morado con AS, indicando la naturaleza terpenoidal del compuesto.

El espectro RMN ¹H (espectro 10 y 11) tomado en CDCl₃, muestra la mayoría de las señales en la región de campo alto, en donde se puede distinguir dos singletes en 0,66 y 0,98 ppm que se asignan a los protones de grupos metilos que sustituyen un ciclo, también se observa un doblete en 0,89 ppm con una constante de acoplamiento J= 6,4 Hz correspondientes a protones de metilos de un grupo isopropil y un multiplete en 0,78 ppm que se atribuye a protones de grupos metilos de una cadena alifática. ^[33] A campo medio, el espectro muestra un desplazamiento químico a 3,49 ppm, que se asigna a un protón unido a un carbono sustituido por un OH. Adicionalmente, a 5,12 ppm y 5,01 ppm se observa un par de dobletes de dobletes, con constantes de acoplamientos de 8,1 - 15,7 Hz y 8,1 - 15,6 Hz respectivamente, asignados a protones de un enlace olefínico que se encuentran en posición trans ^[33]. Se observa también un triplete deformado a 5,31 ppm, característico de un protón olefínico endocíclico.

En el espectro ¹³C (espectro 12 y 13) se observan dos señales en 140,8 y 121,7 ppm, correspondientes a carbonos olefínicos endocíclicos. Por otro lado, las señales en 138,3 y 129,4 ppm son características de átomos de carbono olefínicos exocíclicos, estos desplazamientos han sido reportados anteriormente para una mezcla de esteroides, derivados del colestano. Mediante el espectro DEPT (espectro 14) se pudo determinar la naturaleza de los carbonos que conforman la estructura de esta mezcla de compuestos.

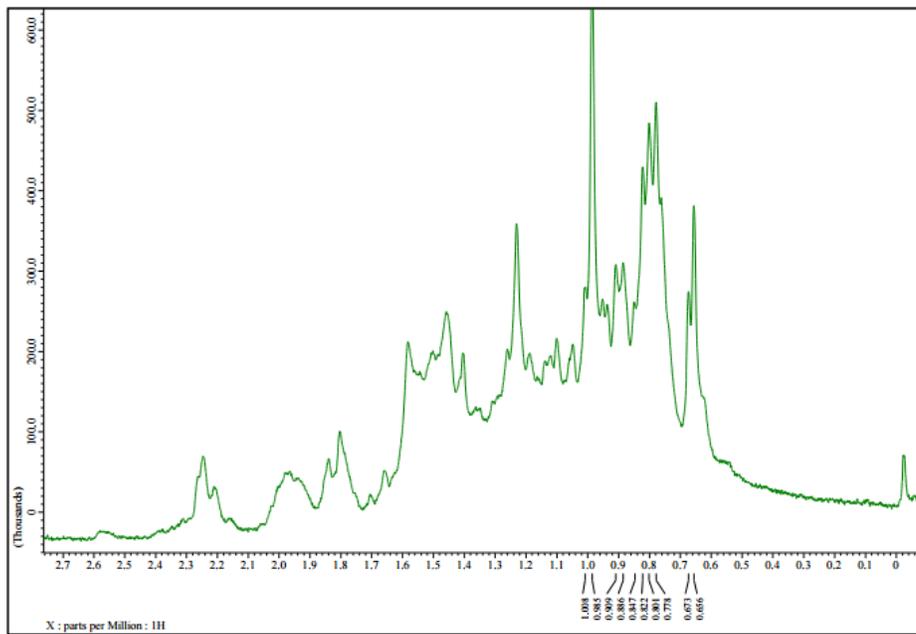
En el RMN ¹H, la señal que se observa en 3,49 ppm se asigna a H-3, mientras que el singlete en 5,31 ppm se atribuye al protón olefínico del anillo B de la estructura (H-6). El par de doblete de doblete a 5,12 y 5,01 ppm son asignados a los protones del enlace

olefínico exocíclico (H-22 y H-23). El multiplete a 0,80 ppm corresponde a grupos metilos de cadenas alifáticas y se asigna a H-29.



Espectro 10. RMN ^1H a campo medio del compuesto TpVA-C60

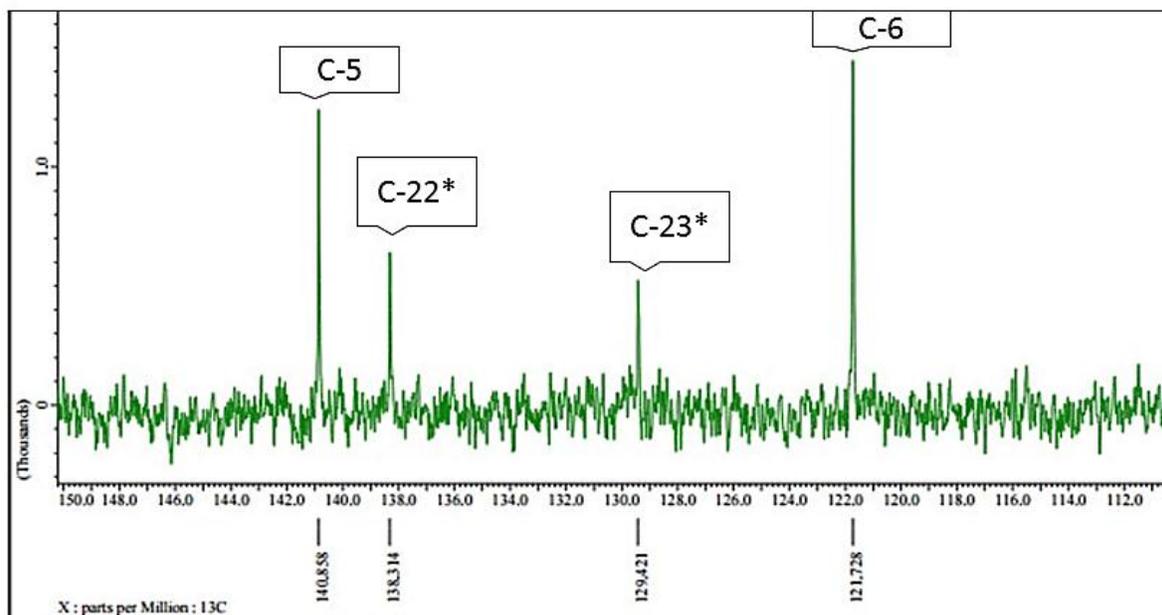
*Señales correspondientes a Estigmasterol



Espectro 11. RMN ^1H a campo alto del compuesto TpVA-C60

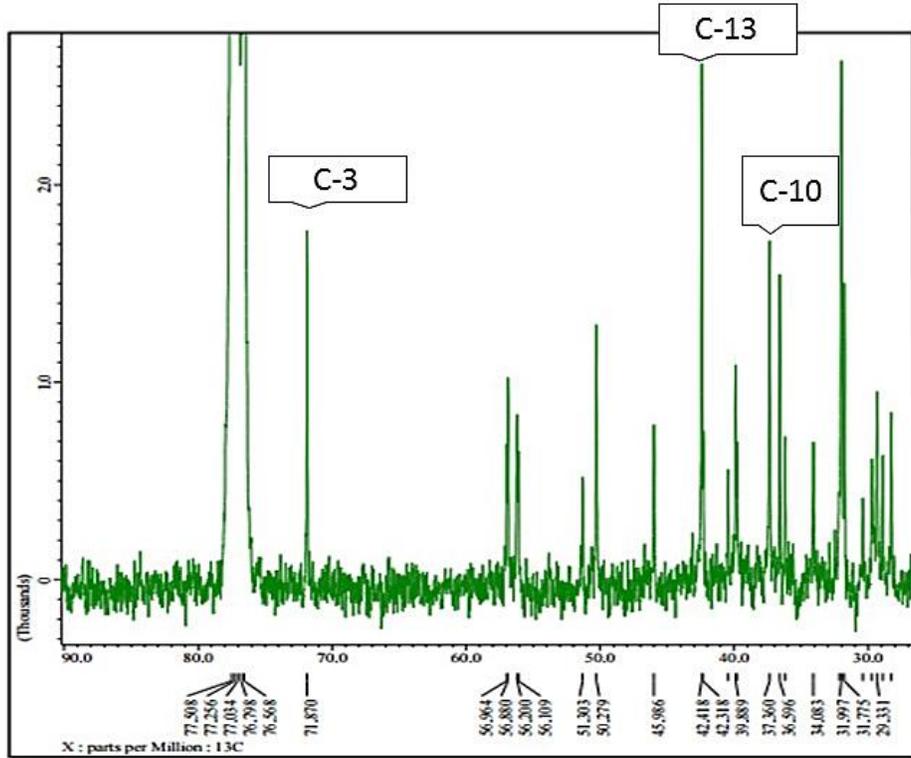
Las señales que se observan en el espectro de carbono a 148,9 y 121,7 ppm se asignan a los carbonos del enlace olefínico endocíclico en el ciclo A (C-5 y C-6, respectivamente) que es común en los dos compuestos que conforman la mezcla de esteroides. Por otro lado, las señales a 138,3 y 129,4 ppm se asignan a los C-22 y C-23, respectivamente, correspondientes al doble enlace olefínico exocíclico que presenta el estigmasterol, uno de los compuestos de dicha mezcla.

Con los datos obtenidos, se puede deducir entonces que el compuesto TpVA-C60 corresponde a una mezcla de esteroides, en la cual uno de los compuestos posee al menos un grupo hidroxil en posición β , un doble enlace y un grupo isopropil, además de estar formado por mínimo 28 carbonos. Del mismo modo, el otro compuesto que conforma la mezcla posee una estructura muy parecida al primero, con un doble enlace extra.

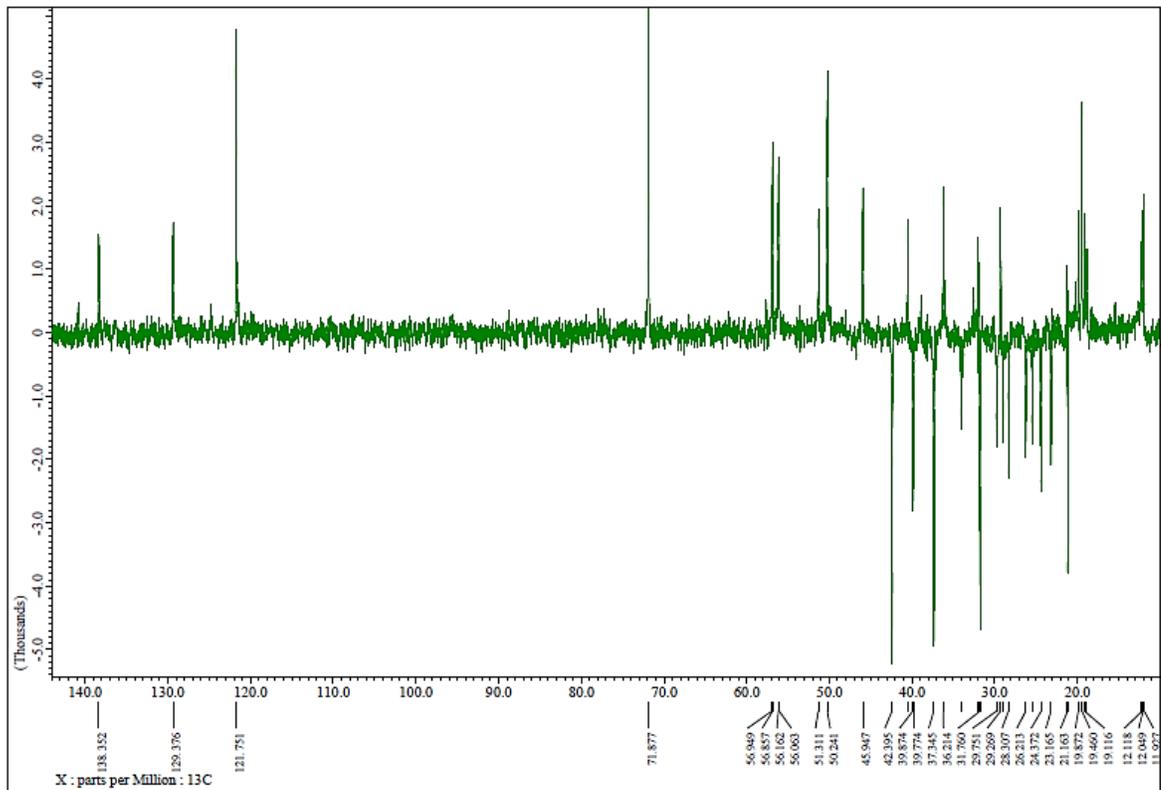


Espectro 13. RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto TpVA-C60

*Señales correspondientes a Estigmasterol

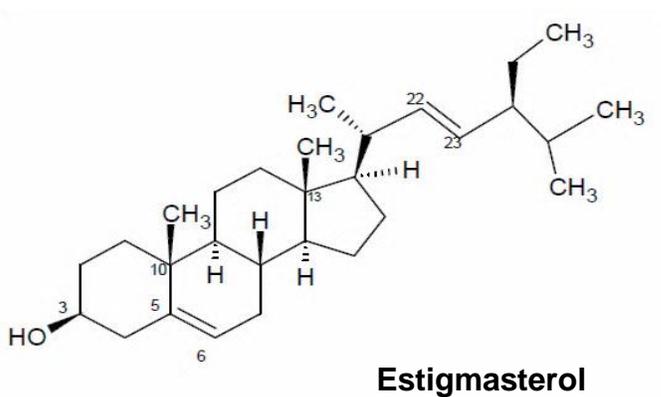
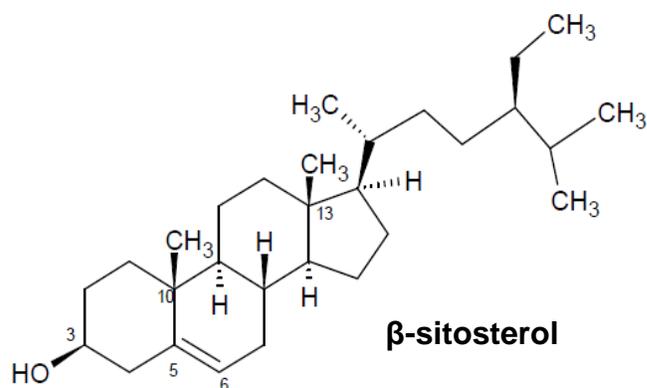


Espectro 14. RMN ¹³C a campo medio del compuesto TpVA-C60



espectro 15. DEPT-135 del compuesto TpVA-C60

Como se mencionó anteriormente, los datos experimentales concuerdan con estructuras del tipo esteroles, específicamente para una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.



En las tablas 6 y 7 que se muestran a continuación se indican los desplazamientos y asignaciones de las señales observadas en los espectros de ^1H , ^{13}C y DEPT y la comparación con los datos reportados en la bibliografía para la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. [34]

Tabla 6. Desplazamientos de los protones (ppm) para el compuesto TpVA-C60 y la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

| H | δ ppm reportado, tomado en CDCl_3 a 600 MHz (mult., J (Hz)) ^[34] | δ ppm exp. compuesto TpVA-B80, tomado en CDCl_3 a 270 MHz (mult., J (Hz)) |
|----|---|---|
| 3 | 3,53 (m) | 3,49 (m) |
| 6 | 5,35 (d, 4,7) | 5,32 (d, 4,7) |
| 18 | 0,70 (s) | 0,66 (s) |
| 19 | 1,01 (s) | 0,98 (s) |
| 21 | 1,02 (d, 7,5) | 1,01 (d, 7,5) |
| 22 | 5,15* (dd, 8,1, 15,1) | 5,12* (dd, 8,1, 15,7) |
| 23 | 5,02* (dd, 8,1, 15,1) | 5,01* (dd, 8,1, 15,6) |
| 26 | 0,80 (d, 6,4) | 0,89 (d, 6,4) |
| 27 | 0,85 (d, 6,1) | 0,79 (d, 6,2) |
| 29 | 0,80 | 0,78 |

*Señales correspondientes a los protones en posición 22 y 23 del estigmasterol.

Tabla 7. Desplazamientos de los carbonos (ppm) para el compuesto TpVA-C60 y la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

| C | δ ppm reportado tomado en CDCl_3 a 1500 MHz. ^[34] | δ ppm experimental tomado en CDCl_3 a 270 MHz. | DEPT |
|---|--|--|-----------------|
| 1 | 37,2 | 37,4 | CH ₂ |
| 2 | 31,6 | 31,8 | CH ₂ |
| 3 | 71,8 | 71,8 | CH |
| 4 | 42,3 | 42,4 | CH ₂ |
| 5 | 140,7 | 140,8 | C |

| | | | |
|----|---------------|---------------|-----------------------|
| 6 | 121,7 | 121,7 | CH |
| 7 | 31,9 | 31,7 | CH ₂ |
| 8 | 31,9 | 31,9 | CH |
| 9 | 50,1 | 50,2 | CH |
| 10 | 36,5 | 36,5 | C |
| 11 | 21,1 | 21,1 | CH ₂ |
| 12 | 39,7 | 39,8 | CH ₂ |
| 13 | 42,3 | 42,4 | C |
| 14 | 56,8 | 56,8 | CH |
| 15 | 24,4 | 24,3 | CH ₂ |
| 16 | 28,9 | 29,0 | CH ₂ |
| 17 | 55,9 | 55,9 | CH |
| 18 | 12,0 | 12,0 | CH ₃ |
| 19 | 19,4 | 19,4 | CH ₃ |
| 20 | 40,5 | 40,5 | CH |
| 21 | 21,1 | 21,1 | CH ₃ |
| 22 | 33,9 (138,3*) | 34,0 (138,3*) | CH ₂ (CH*) |
| 23 | 26,0 (129,2*) | 26,3 (129,4*) | CH ₂ (CH*) |
| 24 | 51,2 | 51,3 | CH |
| 25 | 31,9 | 31,9 | CH |
| 26 | 21,2 | 21,1 | CH ₃ |
| 27 | 19,0 | 19,1 | CH ₃ |
| 28 | 25,4 | 25,4 | CH ₂ |
| 29 | 12,3 | 12,2 | CH ₃ |

*Señales correspondientes a los carbonos en posición 22 y 23 del estigmasterol

8. CONCLUSIONES

- Se aisló un éster de ácido graso que no pudo ser caracterizado totalmente, este tipo de compuestos es común en las plantas superiores.
- Se aisló e identificó el compuesto TpVA-B80, un triterpeno común en las plantas superiores, conocido como **Lupenona**. Este compuesto no ha sido reportado anteriormente en análisis fitoquímicos del género *Tachigali*.
- Se aisló e identificó el triterpeno **Lupeol**, reportado por primera vez en el género *Tachigali*.
- Se aisló e identificó la mezcla de compuestos **estigmasterol** y **β -sitosterol**, mezcla de esteroides reportada y aislada en la especie *Tachigali mymercophyla*. Es el primer reporte del aislamiento de esta mezcla de esteroides en la especie *Tachigali paniculata*.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio fitoquímico de los componentes polares presentes en el extracto metanólico.
- Identificar la estructura final del éster metílico de ácido graso TpVA-B10.
- Caracterizar el compuesto denominado TpVA-C630.

10. BIBLIOGRAFIA

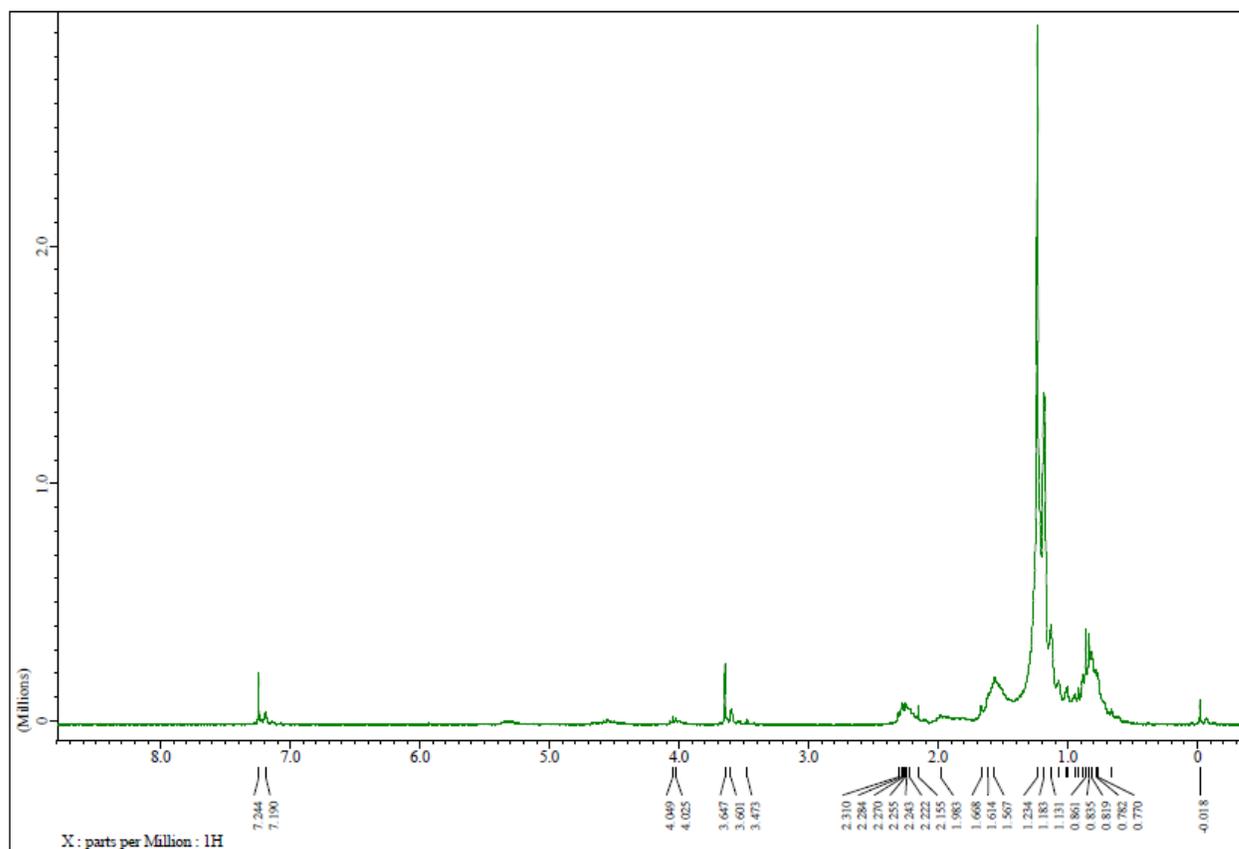
- [1] Marcano D. y Hassegawa M., (2002). "Fitoquímica Orgánica", CDCH-UCV, 2^{da} edición, Caracas – Venezuela.
- [1] Ávalos A. y Pérez-Urria E., (2009). "Metabolismo secundario de plantas", *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, **2** (3), 119-145.
- [3] García D. E., (2004). "Los metabolitos secundarios de las especies vegetales", *Pastos y forrajes*, **21** (1)., Matanzas - Cuba.
- [4] Gwendoli G. Pech, Wendy F. Brito, Gonzalo J. Mena and Leovigildo Quijano., (2002). "Constituents of *Acacia cedilloi* and *Acacia gaumeri*. Revised Structure and Complete NMR Assignments of Resinone", *Z. Naturforsch.* **57c**: 773-776.
- [5] Anjos O, Santos A, Simões R., (2006). "Paper making potencial of Acacia", *APPITA journal*. **59** (1): 58 – 64.
- [6] Malan E., Swinny E., Ferreira D. y Steynberg P., (1996). "The structure and synthesis of proguibourtinidins from *Cassia abbreviata*" *Phytochemistry*, **41** (4): 1209- 1213.
- [7] Gupta D. y Singh J., (1991). "Flavonoid glycosides from *Cassia alata*" *Phytochemistry*, **30**(8), 2761-2763.
- [8] Fernand V.E., Dinh D.T., Washington S.J., Fakayode S.O., Losso J.N., Van Ravenswaay R.O. y Warner I.M., (2008). "Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of High Performance Liquid Chromatography" *Talanta*, **74** (4): 896-902.
- [9] Kinjo J., Ikeda T., Watanabe K. y Nohara T, (1994). "An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves" *Phytochemistry*, **37** (6): 1685-1687.
- [10] Mendoza Reine., (2013). "Aislamiento y caracterización de los principios activos presentes en las ramas y hojas de la especie *Cassia fruticosa Mill*"., Tesis. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas – Venezuela.

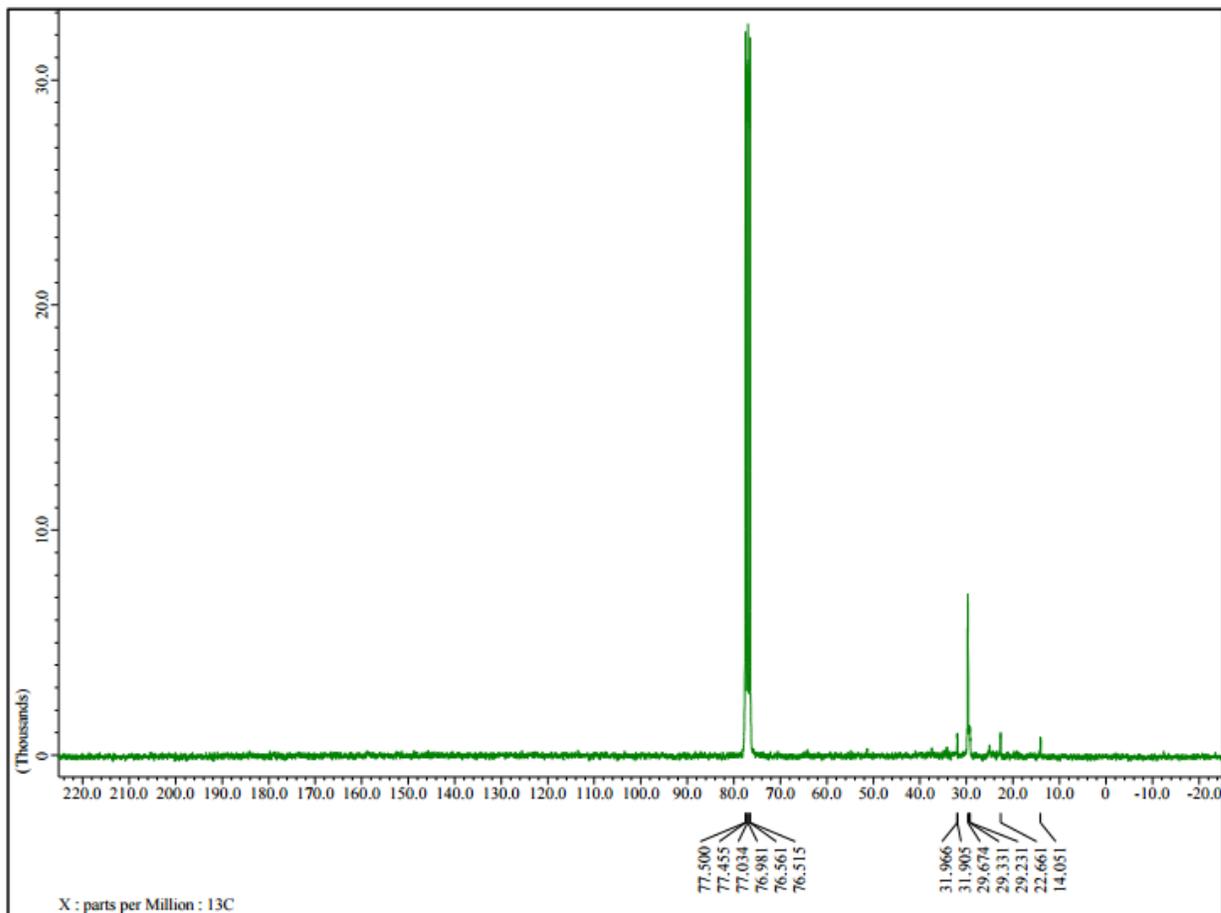
- [11] Laís Souza Menezes; Mariana da Silva Lima Monteiro; Lorena Mayara de Carvalho Cursino y Cecilia Veronica Nunez, (2013). “Estudo fitoquímico dos galhos de *diploptropis purpurea* (fabaceae)”. II Congresso de Iniciação Científica, Manaus – Brasil.
- [12] Silva Raúl Alejandro, López de Ruiz Rosa Evelia Ruiz y Sohar Osvaldo, (1999). “Estudio fitoquímico de frutos de *Geofroea decorticans* (Gill. ex Hook. et Arn.) Burk. Leguminosae (Fabaceae)”., **18** (03): 217-219
- [13] Tahia K. Mohamed, Amel M. Kamal, Mahmoud I. Nassar, Maha A. E. Ahmed, Maha G. Haggag y Heba A.M. Ezzat. (2013). “Phenolic Contents of *Gleditsia triacanthos* Leaves and Evaluation of its Analgesic, Anti-inflammatory, Hepatoprotective and Antimicrobial Activities”. Life Sci J; **10** (4): 3445-3466.
- [14] Ehab A. Ragab, et al., (2010). “Flavanone Glycosides from *Gleditsia caspia*”. Journal of Natural Products, **3**: 35-46.
- [15] L. Lôbo, K. Ferreira, M. Arruda, M. Silva, A. Arruda, A. Müller, G. Arruda y A. Santos. (2008). “Potencial alelopático de catequinas de *tachigali myrmecophyla* (leguminosae)”.., Quim. Nova., **31** (3): 493-497.
- [16] Souza F. y Lôbo L., (2005). “Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla*”, Planta Daninha, **23** (4): 557-564.
- [17] Cioffi G., D’Auria M., Braca A., Mendez J., Castillo A. Morelli I., Tommasi N., (2002). “Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activity of Constituents of the Leaves of *Tachigalia paniculata*”., J. Nat. Prod. **65** (11): 1526-1529.
- [18] Talavera S., Aedo C., Castroviejo S., Romero C. y Sáez L., F.J., Salgueiro y M. Velayos. (1999). “Flora Ibérica” Leguminosae. **7** (1)
- [19] Juárez F., (2001). “Fabaceae Lidl. Subfam. Caesalpinioideae”., Aportes Botánicos de Salta, **6** (10): 1-10.

- [20] Allen O. y Allen E., (1981). "The Leguminosae", A Source Book of Characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison - USA.
- [21] Kuklinsky C., (2000). "Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural". Editorial Omega. Barcelona - España.
- [22] Atencio L., Colmenares R., Ramírez-Villalobos M. y Marcano D., (2003). "Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltophorum pterocarpum*) Fabaceae". Rev. Facultad de agronomía, **20** (1).
- [23] *The Plant List* (2013). Versión 1.1. Publicado en internet; <http://www.theplantlist.org/> (acceso 05/05/2015).
- [24] Contu S., (2012). "*Tachigali paniculata*". *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2* www.iucnredlist.org (acceso 05/05/2015)
- [25] Van Roosmalen M., (1985). "Fruits of the Guianan Flora"., Institute of Systematic Botany, Utrecht University, Netherlands. 483p.
- [26] ILDIS and CHCD., (1992). *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*; **1**: 644.
- [27] disponible en <http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/index.html> (Acceso 30/05/2015)
- [28] Wagner H. y Blatt S., (2001). "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas". Springer, 2da edición, 359: 195-197.
- [29] H. T. Khor., (1979). "Removal of chlorophyll pigments from plant neutral lipids". *Journal of Chromatography*. 179; 225-226.
- [30] Fujian L., Weiping K., Liang W., Xianfeng Y., Iman Noshadi., Amin Zheng y Chenze Q., (2014). "Efficiente biomass transformations catalyzed by graphene-like nanoporous carbons functionalized with strong acid ionic liquids and sulfonic group". The Royal Society of Chemistry.
- [31] Shyamal K. Jash y Arindam Gangopadhyay., (2013) "Phytochemical investigation of the hexane extract of stem bark of *Peltophorum pterocarpum* (DC.)". *Der Pharma Chemica*. **5** (5): 49-53

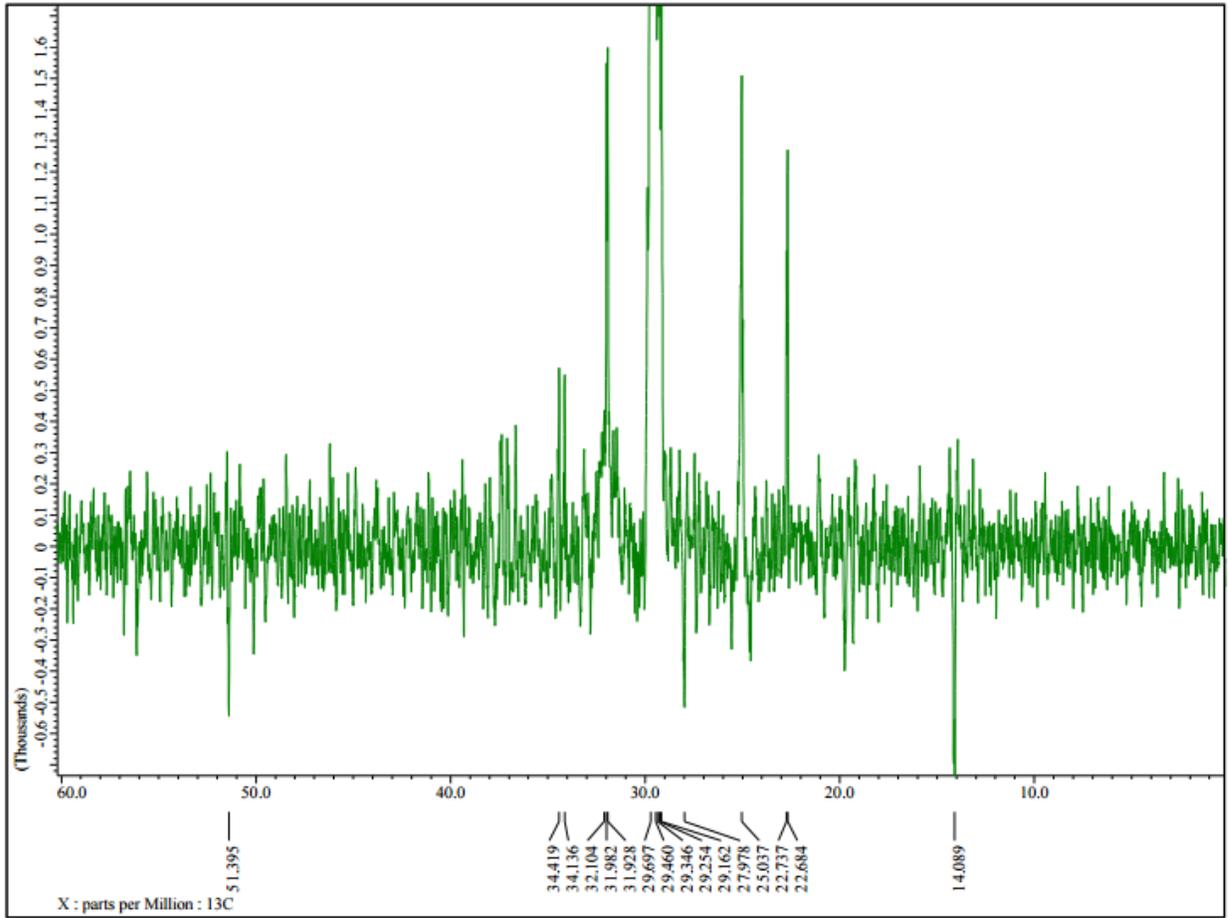
- [32] Soumia M. y Hamada Haba., (2012) "Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha*". *Rec. Nat. Prod.* **6** (3): 292-295
- [33] Lacruz E., (2008)., "Estudio fitoquímico de *Simsia pubescens* Triana". Tesis. Universidad de Los Andes / Facultad de Ciencias. Mérida – Venezuela.
- [34] Chaturvedula, V. y Prakash, I., (2012)., "Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*". *International Current Pharmaceutical Journal.*, **1** (9): 239-242.

11. ANEXOS

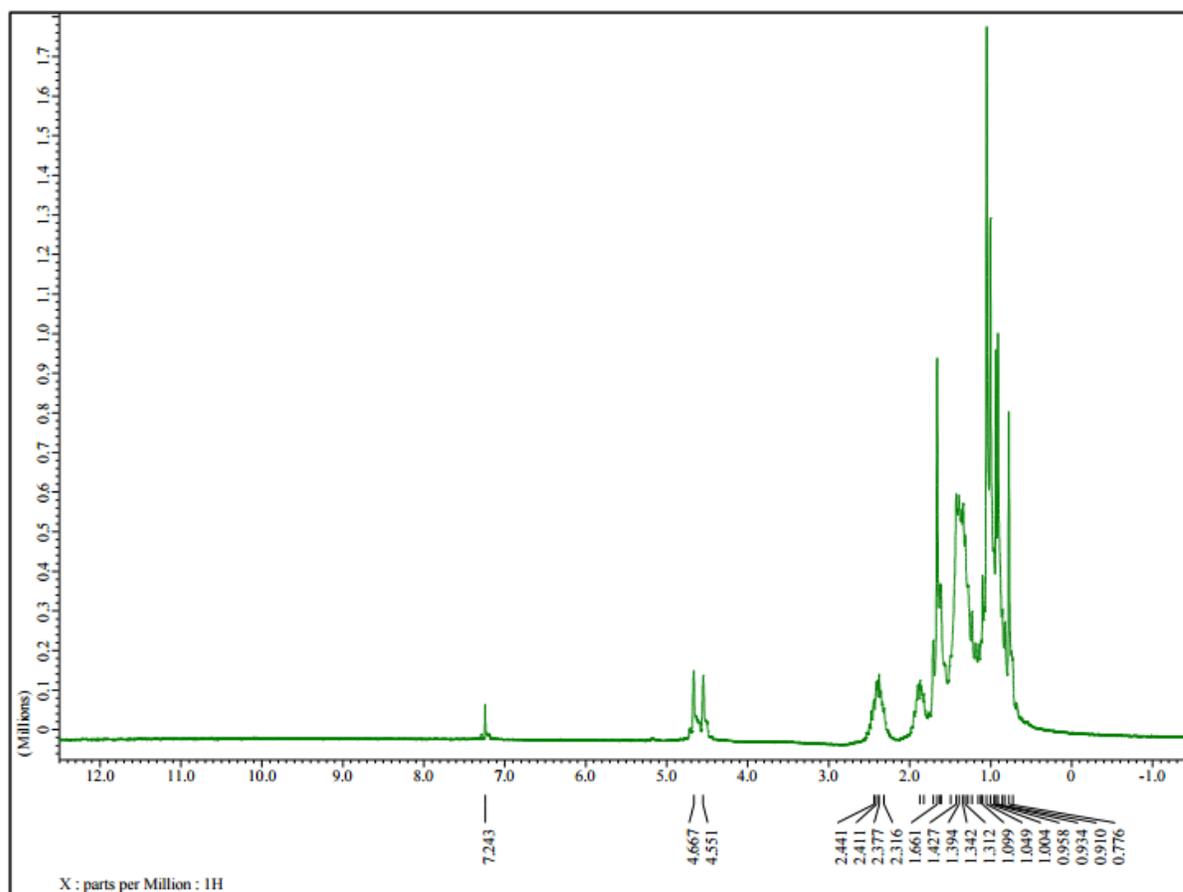
Anexo I. Espectro RMN ^1H del compuesto TpVA-B10



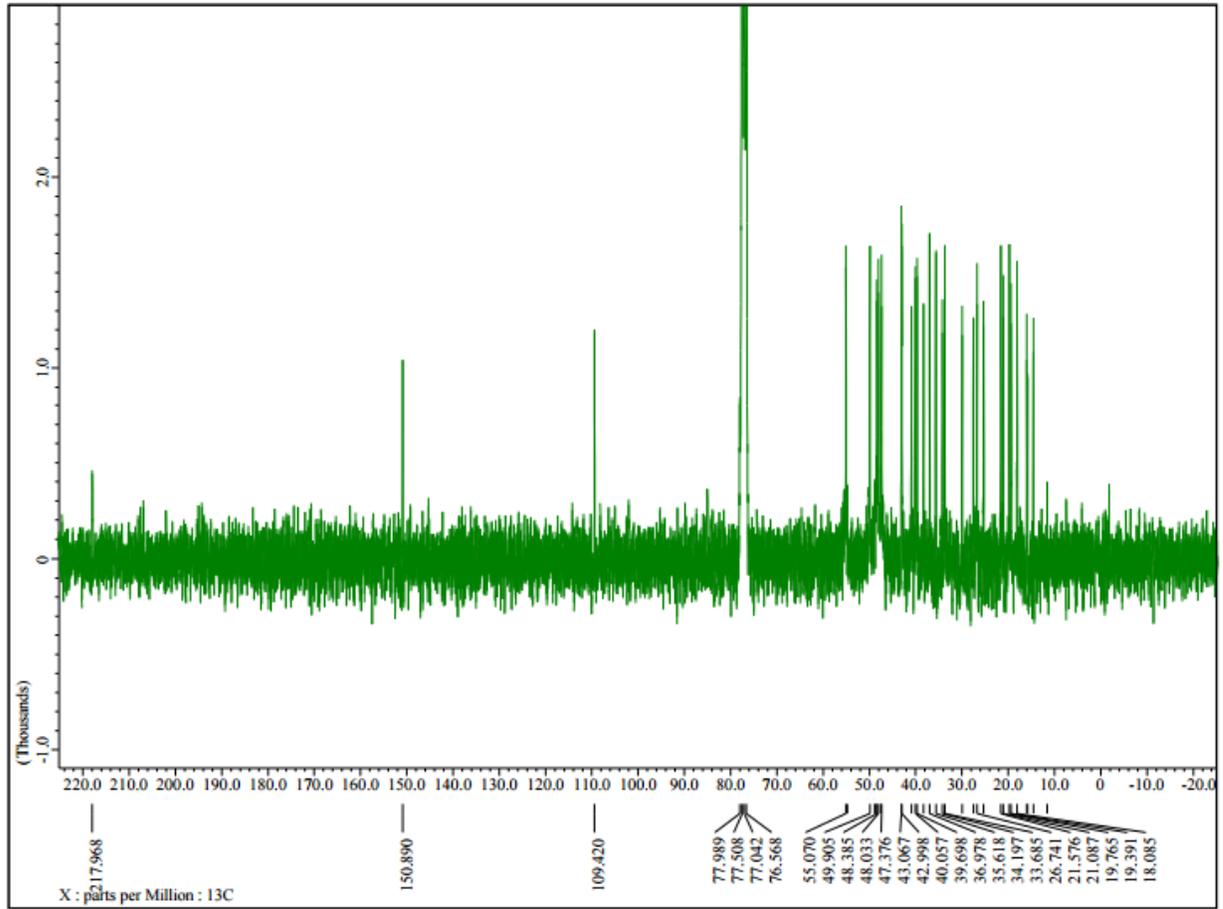
Anexo II. Espectro RMN ^{13}C del compuesto TpVA-B10



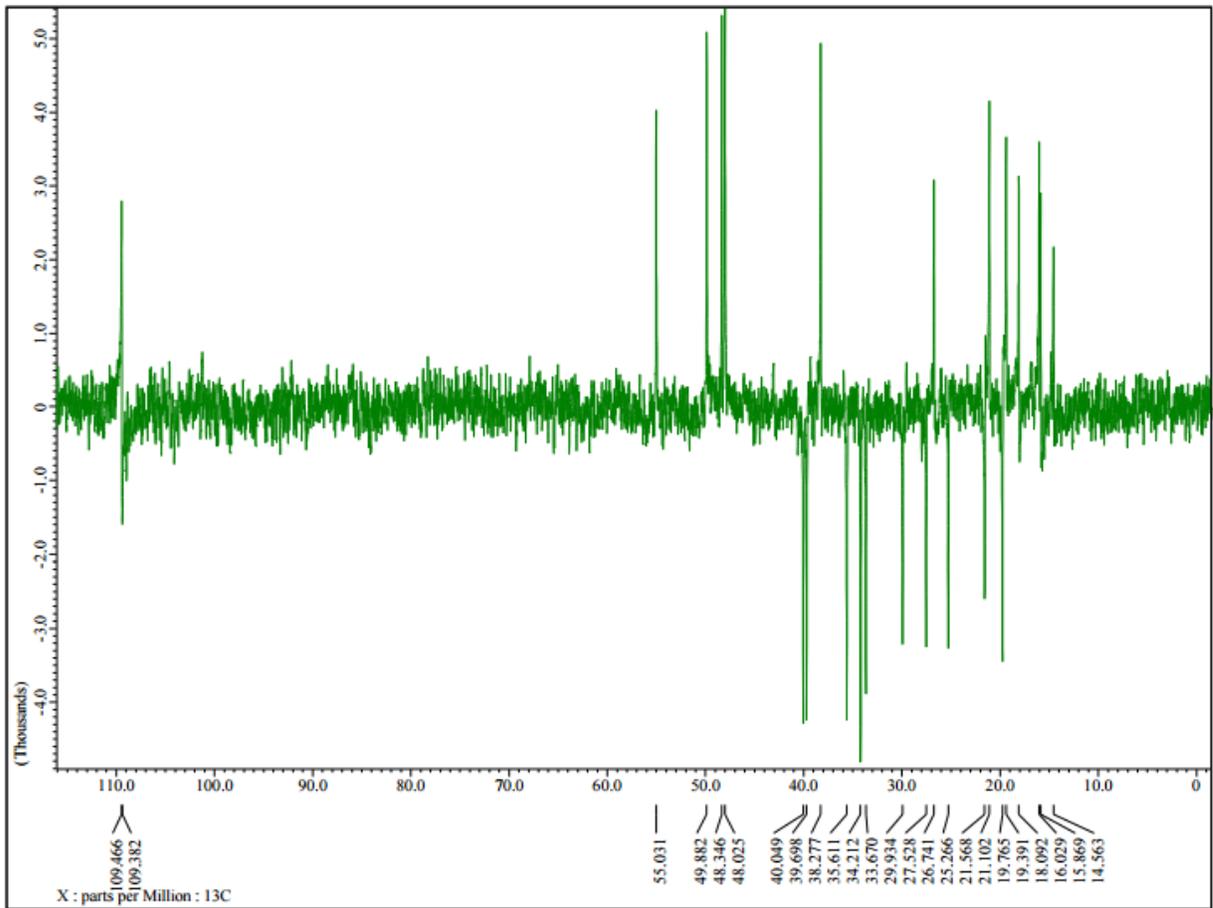
Anexo III. DEPT-135 del compuesto TpVA-B10



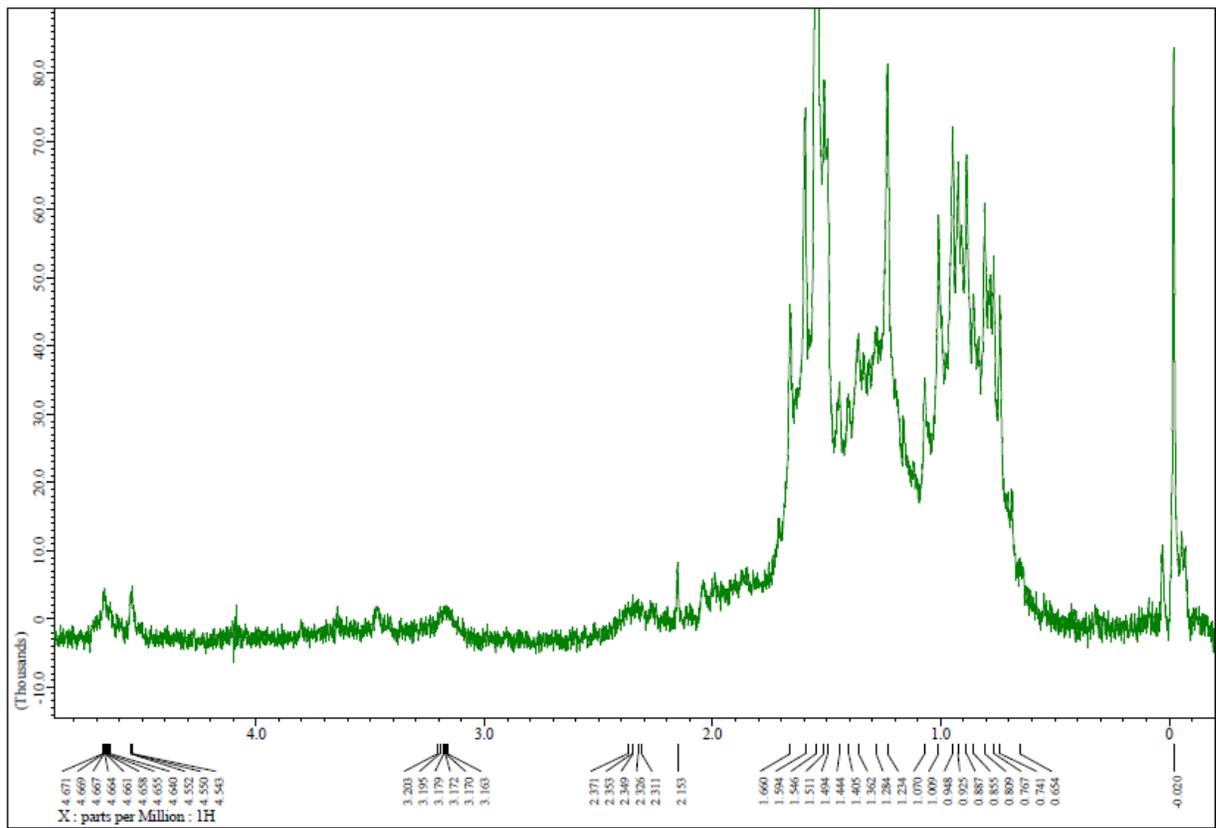
Anexo IV. Espectro RMN ^1H del compuesto TpVA-B80



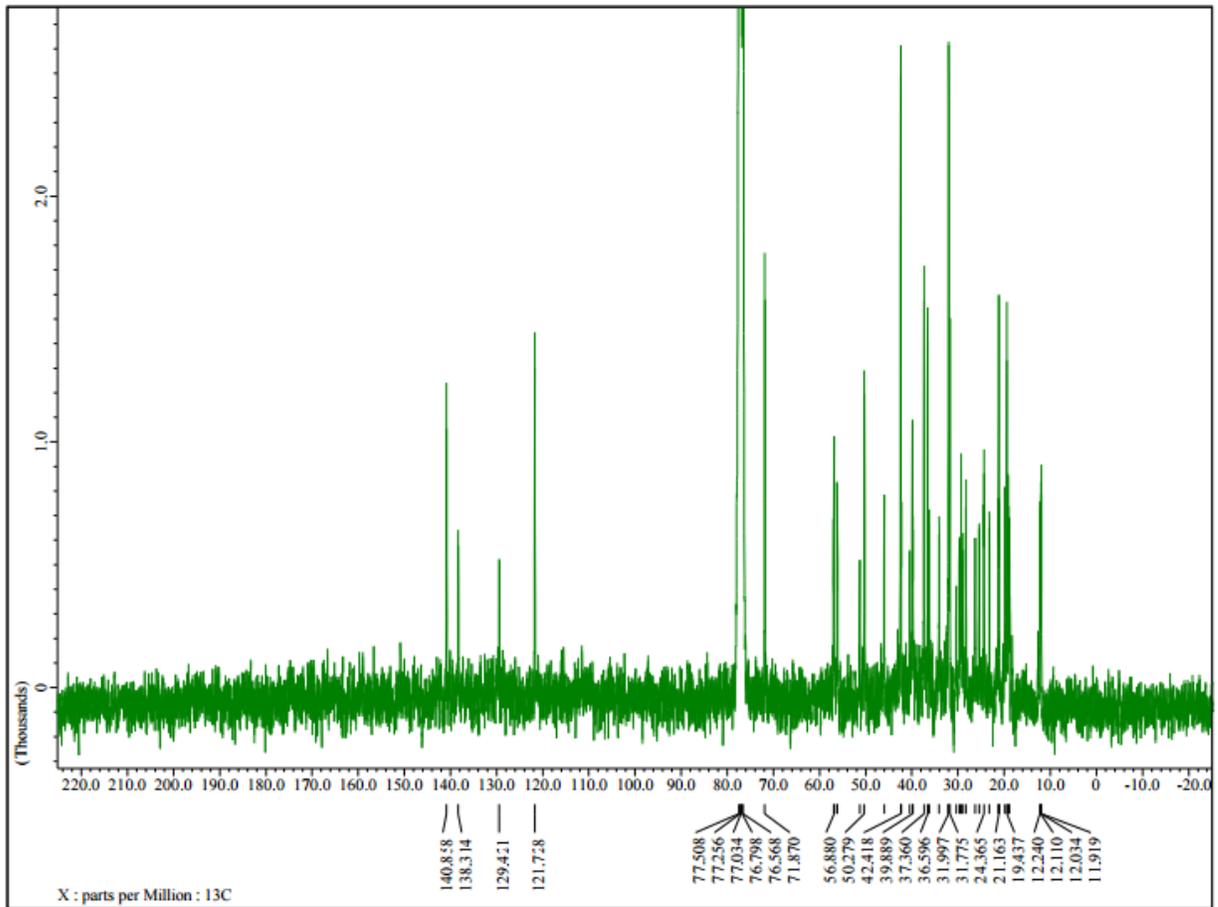
Anexo V. Espectro RMN ^{13}C del compuesto TpVA-B80



Anexo VI. DEPT-135 del compuesto TpVA-B80



Anexo VII. Espectro RMN ^1H del compuesto TpVA-C18



Anexo VIII. RMN ^{13}C del compuesto TpVA-C60