

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE
Arrabidaea inaequalis (DC. ex Splitg.) L.”**

Trabajo especial de grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Neydimar F.
Franquiz H., para optar al título de
Licenciada en Química.

Tutora: Dra. María Rodríguez García

Caracas, Junio de 2017

Yo, Profesora María Rodríguez García, 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 Seminario de Investigación, titulado:

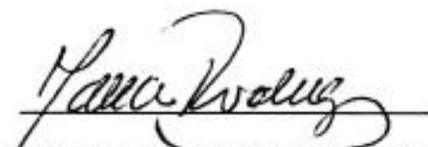
**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE
Arrabidaea inaequalis (DC. ex Splitg.) L.”**

Que presenta la Br. Neydimar Frinee Franquiz Hidalgo, 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 2017, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, junio de 2017

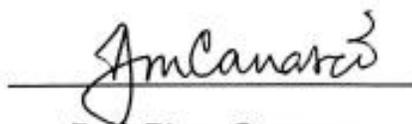

Dra. María Rodríguez

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 Mayoritarios Presentes en la Especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L., presentado por la Br. Neydimar Frinee Franquiz Hidalgo, C.I.: 19.693.582, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Química.



Dra. María Rodríguez García

(Tutor)



Prof. Diana Carrasco

(Jurado principal)



Profa. Zuleyma Blanco

(Jurado principal)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me han dado todo y han hecho de mí, la persona que soy hoy en día, con su paciencia, amor y apoyo incondicional, han aguantado todo de mí y por mí, a mis hermanas que aún me cuidan, me consienten y me apoyan como si fuera una niña. Gracias a ustedes cuatro todo esto fue posible, los amo inmensamente.

A mi tutora María Rodríguez gracias por la paciencia, comprensión y por ser más que una tutora, más que mi mamá académica, por enseñarme más que Química y aceptarme como parte de esa familia que es el Laboratorio de Productos Naturales donde conocí excelentes personas, en su mayoría.

A Jairo Bermúdez porque aprendí muchísimo de él, por la comprensión, paciencia y apoyo durante todo este tiempo, por ser para mí un modelo a seguir, a Ynes y Diana que también me soportaron y apoyaron en este camino.

Esas personas que conocí durante la carrera y que sin pensar se convirtieron en grandes amigos que han estado en las buenas y en las malas, Yuary, Rodrigo, José y especialmente aquellos con los que más he reído y llorado, con los cuales aprendí y disfrute hasta de los malos ratos y que significan mucho para mí Jorge, Sofí, Luis y Marco gracias.

A esas personas que de una u otra forma se han alejado pero que estuvieron para mí y siempre recibí su ayuda y apoyo, además gracias Kay.

Gracias tía Vicen sé que aún me cuidas.

RESUMEN

El extracto metanólico de hojas y tallos de *Arrabidaea inaequalis* (**Ai**) fue sometido a diferentes procesos de separación cromatográfica. Se inició con una separación mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) con sílica gel eluyendo con sistemas de solvente en polaridad creciente, lo cual produjo cinco fracciones denominadas de **Ai-A** – **Ai-E**. La fracción **Ai-C**, se sometió a una separación mediante CLV sobre sílica gel eluyendo con un sistema de solvente de polaridad creciente, de la cual se obtuvieron seis subfracciones, **Ai-C₁–Ai-C₆**. Seguidamente, la subfracción **Ai-C₄** fue separada por cromatografía de exclusión molecular empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria, con una fase móvil de polaridad decreciente. Los eluatos de ésta purificación fueron denominados **Ai-C₄₋₁–Ai-C₄₋₂₃**. La fracción **Ai-C₄₋₈** fue tratada en una columna cromatográfica (CC) Lobar obteniendo nueve fracciones denominadas **Ai-C₄₋₈L₁ – Ai-C₄₋₈L₉**. La subfracción **Ai-C₄₋₈L₃** fue sembrada en una placa preparativa, obteniéndose 18 subfracciones de las cuales se aislaron los compuestos nombrados **Ai-C₄₋₈L_{3-D}, Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, Ai-C₄₋₈L_{3-I}, Ai-C₄₋₈L_{3-L}**.

Posteriormente, se unieron las fracciones **Ai-C₄₋₁, Ai-C₄₋₁₁** obtenidas de la CC Sephadex-LH20 y las fracciones **Ai-C₄₋₈L₂** y **Ai-C₄₋₈L₄** provenientes de la CC Lobar, esta unión se nombró **Ai-C₄A**, se sometió a una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria sílica gel y fase móvil aumentando su polaridad gradualmente de la cual se aislaron los compuestos **Ai-C₄A₇, Ai-C₄A₉, Ai-C₄A₁₀, Ai-C₄A₁₅, Ai-C₄A₂₂, Ai-C₄A₂₈** y **Ai-C₄A₃₉**.

Los compuestos **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}** y **Ai-C₄A₉** se caracterizaron por técnicas espectroscópicas de RMN de una y dos dimensiones y fueron identificados como las saponinas **3-O-β-D-glucopiranosil-28-β-D-glucopiranosil bayogenina** y **3-O-soforosil-bayogenina**,

respectivamente, los cuales se reportan por primera vez para la literatura de productos naturales.

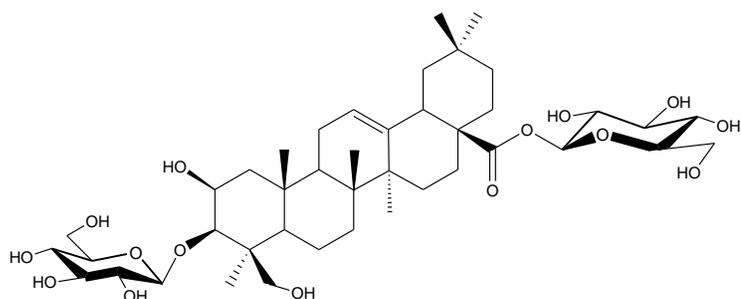
Se reporta el aislamiento del compuesto **Ai-C₄₋₈A₇**, una saponina de nombre **3-O-β-D-glucopiranosil-hederagenina**, como un nuevo metabolito secundario reportado por primera vez para la familia Bignoniaceae.

Se reporta el aislamiento de **Ai-C₄₋₈A₁₀** como una saponina monodesmosídica de nombre **3-O-β-D-glucopiranosil-bayogenina** que resultó ser un nuevo metabolito secundario en la literatura de productos naturales.

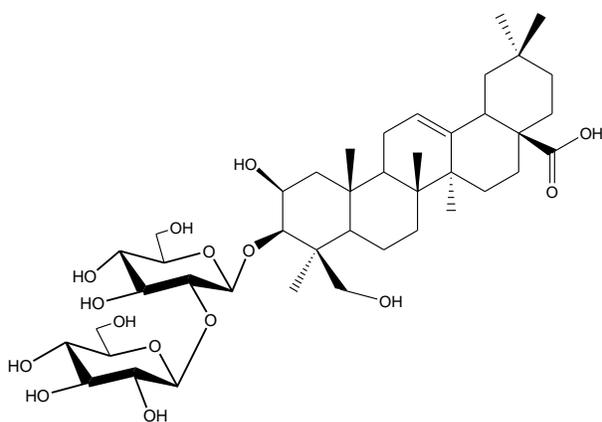
Los compuestos **Ai-C₄₋₈L₃₋₁** y **Ai-C₄A₂₈** se caracterizaron por propiedades químicas y por la información espectroscópica de RMN-¹H y RMN-¹³C. Así, se confirmó que **Ai-C₄₋₈L₃₋₁**, es una saponina monodesmosídica tipo oleanano, sustituida en C-28 por tres unidades de azúcar y **Ai-C₄₋₈A₂₈**, es una mezcla de saponinas monodesmosídicas una con núcleo tipo bayogenina y otra con núcleo tipo oleanano, ambas sustituidas en C-28 por unidades de azúcar.

Los compuestos **Ai-C₄₋₈L_{3-D}**, **Ai-C₄₋₈L_{3-L}**, **Ai-C₄A₁₅**, y **Ai-C₄A₃₉** son saponinas triterpenoidales, cuya estructura aún no ha sido elucidada completamente.

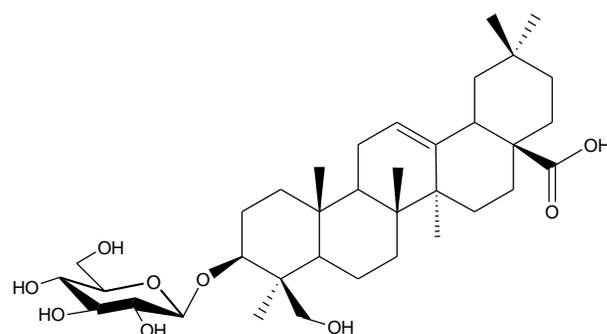
Palabras claves: *Arrabidaea inaequalis*, Arrabidaea, Bignoniaceae, Saponinas



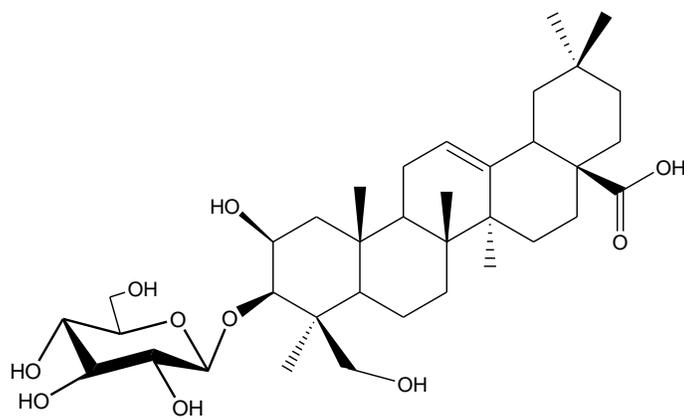
3-O-β-D-glucopiranosil-28-β-D-glucopiranosil bayogenina



3-O-soforosil-bayogenina



3-O-β-D-glucopiranosil-hederagenina



3-O-β-D-glucopiranosil-bayogenina

ÍNDICE

.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE ESQUEMAS	xii
INDICE DE ESPECTROS	xiii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS	4
1.1.a. Compuestos fenólicos.	4
1.1.b. Terpenos.....	5
2. FAMILIA BIGNONIACEAE	9
3. ANTECEDENTES DEL GENERO <i>Arrabidaea</i>	11
3.1. <i>Arrabidaea samydoides</i> (Cham.) Sandwith	11
3.2. <i>Arrabidaea pulchra</i> (Cham.) L.G.Lohmann	15
3.3. <i>Arrabidaea brachypoda</i> (A. DC.) Bureau	17
3.4. <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. Bonpl.)	22
4. DESCRIPCIÓN BOTANICA DE LA ESPECIE <i>Arrabidaea inaequalis</i> (DC.ex Splitg.)	27
5. JUSTIFICACIÓN	31
6. OBJETIVOS	32
6.1. OBJETIVO GENERAL	32
6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
7. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	33
7.1. MATERIALES Y EQUIPOS	33
7.1.a. Soportes cromatográficos	33
7.1.b. Agentes reveladores	34

7.1.c. Equipos	35
7.2. METODOLOGIA APLICADA.....	36
7.2.a. Recolección del material vegetal	36
7.2.b. Análisis Fitoquímico	37
8. RESULTADO Y DISCUSIONES.....	51
8.1 Compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}	52
8.2 Compuesto Ai-C ₄₋₈ L ₃₋₁	63
8.1 Compuesto Ai-C ₄ A ₇	68
8.2 Compuesto Ai-C ₄ A ₉	74
8.3 Compuesto Ai-C ₄ A ₁₀	86
8.1 Compuesto Ai-C ₄ A ₂₂	91
8.2 Mezcla Ai-C ₄ A ₂₈	96
9. CONCLUSIONES.....	101
10. RECOMENDACIONES	102
11. BIBLIOGRAFIA	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del núcleo de Flavano.	4
Figura 2. Estructura del isopreno	5
Figura 3. Estructura de isoprenos activos. (3) DMAPF, (4) IPPF.	5
Figura 4. Estructura del Escualeno.	6
Figura 5. Estructura del Dammarano	7
Figura 6. Estructuras básicas de los triterpenos pentacíclicos, tipo oleanano, ursano y lupano	8
Figura 7. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea samydoides</i> por P. Mendoza	12
Figura 8. Xantonas identificados en <i>Arrabidaea samydoides</i> por P. Mendoza.	14
Figura 9. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea pulchra</i> por Catarina	16
Figura 10. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea brachypoda</i> por Alcerito.	17
Figura 11. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea brachypoda</i> por Da Rocha.	19
Figura 12. Flavonoides diméricos identificados en <i>Arrabidaea brachypoda</i> .	21
Figura 13. Estructura del antiparasitario Benzimidazol	21
Figura 14. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea chica</i> por Ribeiro	23
Figura 15. Compuestos identificados en <i>Arrabidaea chica</i> por Da Rocha y Taffarello	26
Figura 16. Imagen de <i>Arrabidaea inaequalis</i> (DC. ex Splitg.) L	28
Figura 17. Flores de <i>Arrabidaea inaequalis</i> (DC. ex Splitg.) L	29
Figura 18. Hojas de <i>Arrabidaea inaequalis</i> (DC. ex Splitg.) L .	29
Figura 19. Ubicación geográfica de <i>Arrabidaea inaequalis</i> .	30
Figura 20. Imagen del espécimen de <i>Arrabidaea inaequalis</i> (DC. ex Splitg.) L. depositada en el Jardín Botánico de Caracas.	36
Figura 21. Placa de fracciones obtenidas en la CLV del extracto 1-Ai	39
Figura 22. Placa de fracciones obtenidas en CC- LH-20 realizada a la fracción Ai-C₄ .	42
Figura 23. Placa de fracciones obtenidas en la Lobar realizada a la fracción Ai-C ₄₋₈ .	45
Figura 24. Placa de fracciones obtenidas de placa preparativa de la fracción Ai-C ₄₋₈ L ₃ .	47
Figura 25. Prueba de la espuma para identificar presencia de saponinas.	51
Figura 26. Estructura propuesta del compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}	62
Figura 27. Estructura parcial para el compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-I} .	67
Figura 28. Estructura propuesta del compuesto Ai-C ₄₋₈ A ₇ .	73
Figura 29. Estructura propuesta del compuesto Ai-C ₄ A ₉ .	85
Figura 30. Estructura propuesta del compuesto Ai-C ₄ A ₁₀ .	90
Figura 31. Estructura parcial para el compuesto Ai-C ₄₋₈ A ₂₂	95
Figura 32. Estructuras propuestas del compuesto Ai-C ₄₋₈ A ₂₈	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potencial de radicales redox (V) y actividad de los compuestos 18-23 para DPPH	15
Tabla 2. Actividad antiviral in vitro (EC_{50}), para el extracto etanólico de las hojas <i>Arrabidaea pulchra</i> y fracciones	16
Tabla 3. Valores inhibitorios del Extracto Etanólico de <i>A. Brachypoda</i>	19
Tabla 4. Valores de inhibición de crecimiento de promastigotes <i>Leishmania</i> (L.) amazonensis (MHOM / BR / 71973 / M2269)	20
Tabla 5. Citotoxicidad y anti T. cruzi de la Braquidina A, B, C y el benznidazole.	22
Tabla 6. Medición del crecimiento del tumor sólido Ehrlich en almohadilla de la pata del ratón 48 h	23
Tabla 7. Fracciones obtenidas en la CLV realizada al extracto 1-Ai.	39
Tabla 8. Fracciones obtenidas en la CLV realizada al extracto Ai-C.	41
Tabla 9. Fracciones obtenidas en la CC-LH-20 realizada al extracto Ai-C ₄ .	43
Tabla 10. Fracciones obtenidas en la CC- Lobar realizada a la fracción Ai-C ₄₋₈ .	45
Tabla 11. Fracciones obtenidas en la preparativa realizada a l fracción Ai-C ₄₋₈ L ₃ .	48
Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm), RMN- ¹ H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC para el compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz)	59
Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm), RMN- ¹ H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de los azúcares de Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	60
Tabla 14. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm), RMN- ¹ H δ (ppm) para el compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} y el glucósido de la bayogenina. (Piridina-d ₅)	61
Tabla 15. Desplazamientos de ¹³ C-RMN de los compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-l} y el ácido oleanólico (piridina-d ₅).	66
Tabla 16. Comparación de data ¹³ C-RMN del compuesto Ai-C ₄₋₈ A ₇ y la hederagenina[71
Tabla 17. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de la glucosa unida a	72
Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm), RMN- ¹ H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de Ai-C ₄₋₈ A ₉ . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	81
Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm), RMN- ¹ H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de los azúcares de Ai-C ₄₋₈ A ₉ . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	82

Tabla 20. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} , Ai-C ₄₋₈ A ₉ y la saponina Aislada por Maeda (2005) ^[38] . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	83
Tabla 21. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de las azúcar de Ai-C ₄₋₈ A ₉ y la saponina Aislada por Shawskov(2000)[43]. (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	84
Tabla 22. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de Ai-C ₄₋₈ A _{3-FG} , Ai-C ₄₋₈ A ₉ y Ai-C ₄₋₈ A ₁₀ . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	89
Tabla 23. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de azúcar de Ai-C ₄₋₈ A ₁₀ .	90
Tabla 24. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C δ (ppm) de Ai-C ₄₋₈ A _{3-FG} , Ai-C ₄₋₈ A ₉ y Ai-C ₄₋₈ A ₂₂ . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz).	94
Tabla 25. Comparación de data ¹³ C-RMN en piridina-d ₅ de hederagenina Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} , con la genina Ai-C ₄₋₈ A ₉ y Ai-C ₄₋₈ A ₂₈	99

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.	3
Esquema 2. Obtención de los extractos iniciales 1-Ai y 2-Ai.	37
Esquema 3. Cromatografía Liquida al vacío de 1-Ai.	38
Esquema 4. Separación cromatográfica de Ai-C ₃ .	40
Esquema 5. Separación cromatográfica de Ai-C ₄ .	42
Esquema 6. Separación cromatográfica de C.C Lobar Ai-C₄₋₈ .	44
Esquema 7. Separación de la fracción Ai-C ₄₋₈ L ₃ .	46
Esquema 8. Separación cromatográfica completa de 1-Ai	50

INDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	53
Espectro 2. RMN ¹³ C para el Compuesto Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	54

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 Mayoritarios Presentes en la Especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L., presentado por la Br. Neydimar Frinee Franquiz Hidalgo, C.I.: 19.693.582, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Química.



Dra. María Rodríguez García

(Tutor)



Prof. Diana Carrasco

(Jurado principal)



Profa. Zuleyma Blanco

(Jurado principal)

Espectro 3	55
HMQC para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	55
Espectro 4. HMQC para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	56

Espectro 5. HMBC para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina d ₅ ; 600 MHz).....	57
Espectro 6. HMBC para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz)	57
Espectro 7. HMBC para Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG} . (Piridina-d ₅ ; 600 MHz)	58
Espectro 8. RMN ¹ H para el Compuesto Ai-C ₄₋₈ L ₃₋₁ . (Piridina-d ₅ ; 300 MHz).....	64
Espectro 9. RMN ¹³ C y DEPT para el Compuesto Ai-C ₄₋₈ L ₃₋₁ (Piridina-d ₅ ; 300 MHz).....	65
Espectro 10. RMN ¹ H para el Compuesto Ai-C ₄ A ₇ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz).....	69
Espectro 11. RMN ¹³ C y DEPT para el Compuesto Ai-C ₄ A ₇ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz)	70
Espectro 12. RMN ¹ H para el Compuesto Ai-C ₄ A ₉ . (Piridina d ₅ ; 600 MHz).....	75
Espectro 13. RMN ¹³ C para el Compuesto Ai-C ₄ A ₉ (Piridina d ₅ ; 600 MHz).....	76
Espectro 14. HMQC para el Compuesto Ai-C ₄ A ₉ . (Piridina d ₅ ; 600 MHz).....	77
Espectro 15. HMQC para el Compuesto Ai-C ₄ A ₉ . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	78
Espectro 15. HMBC para el Compuesto Ai-C ₄ A ₉ . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	79
Espectro 17. RMN ¹ H para el Compuesto Ai-C ₄ A ₁₀ . (Piridina d ₅ ; 600 MHz)	87
Espectro 18. RMN ¹³ C para el Compuesto Ai-C ₄ A ₁₀ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz).....	88
Espectro 19. RMN ¹ H para el Compuesto Ai-C ₄ A ₂₂ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz)	92
Espectro 20. RMN DEPT para el Compuesto Ai-C ₄ A ₁₀ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz).....	93
Espectro 21. RMN ¹ H para la mezcla Ai-C ₄ A ₂₈ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz)	97
Espectro 21. RMN ¹³ C para el Compuesto Ai-C ₄ A ₂₈ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz).....	98
Espectro 22. RMN ¹³ C para la mezcla Ai-C ₄ A ₂₈ . (Piridina d ₅ ; 300 MHz).....	98

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

δ	Desplazamiento químico.
λ	Longitud de onda.
AcOEt	Acetato de etilo.
°C	Grado centígrado.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CHCl ₃	Cloroformo.
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano.
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50 %.
CPP	Cromatografía en placa preparativa.
<i>d</i>	Doblete.
<i>dd</i>	Doblete de doblete.
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
EtOH	Etanol.
g	Gramo (s).
h	Hora (s).
H ₂ O	Agua.
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
Hex.	Hexano.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz).
μL	Microlitro
μM	Micromolar
<i>m</i>	Multiplete.
MeOD- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado.

MeOH	Metanol.
mg	Miligramo.
MHz	Mega hertz.
Mult.	Multiplicidad.
nm	Nanómetros.
p.a.	Para análisis.
ppm	Partes por millón.
R _f	Factor de retención.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protones.
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono.
s	Singlete.
s _a	Singlete ancho.
t	Triplete.
UV	Ultravioleta.

1. INTRODUCCIÓN

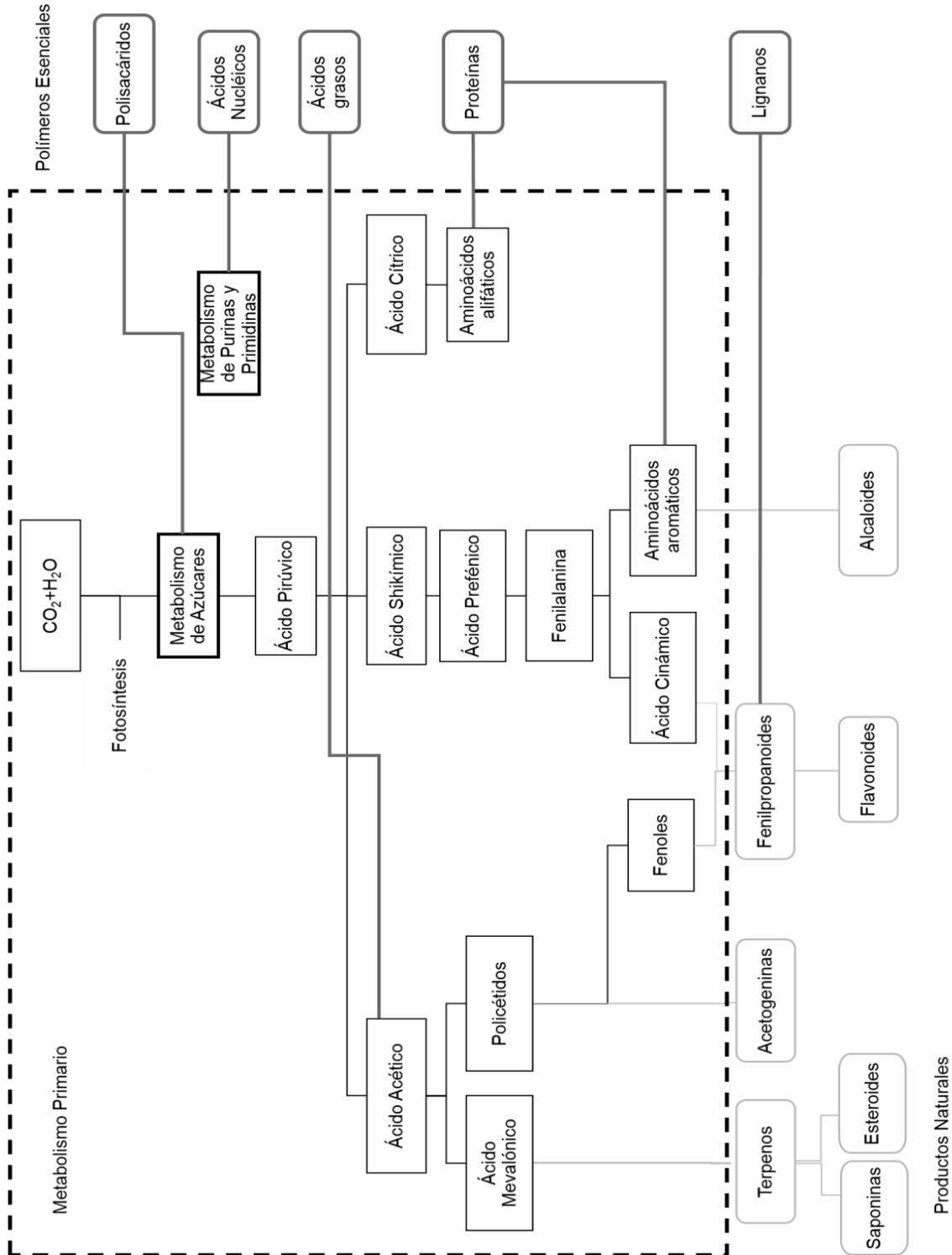
El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica muy común desde hace miles de años. Durante mucho tiempo los remedios naturales, sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso terapéutico disponible. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales con propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que se extraen a partir de ellas^[1].

Las plantas son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se definen como “productos naturales” o “metabolitos secundarios” aquellos que son propios de una especie y que, en la mayoría de los casos, no tienen utilidad aparente para el ser que los sintetiza^[2], a diferencia de los “metabolitos primarios”, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta^[3]. Los metabolitos secundarios fueron antiguamente considerados como “productos de desecho” sin función fisiológica para la planta. Con el surgimiento del campo de la ecología química hace unos 30 años, se hizo evidente que estos productos cumplen funciones importantes en la interacción entre las plantas y su biótica y medio abiótico. Los metabolitos secundarios poseen diversas funciones y usos, pueden servir como compuestos de defensa contra herbívoros y patógenos, pigmentos de flores, hormonas o moléculas de señalización. Además de su función fisiológica en las plantas, los productos naturales también tienen un fuerte impacto en la cultura humana y se han utilizado como condimentos, pigmentos y productos farmacéuticos^[3].

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a su estructura, bioformación, fuente de producción o a su acción biológica^[2]. Aunque ninguna de estas clasificaciones son exclusivas ni excluyentes, la forma más acertada de clasificación corresponde a las vías químicas por las cuales un organismo los elabora dentro de lo que se denomina ruta biogenética o biosíntesis^[4].

En relación al criterio biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados de forma general en terpenos y terpenoides, compuestos fenólicos y los compuestos nitrogenados o alcaloides, todos ellos fabricados a partir del dióxido de carbono (CO₂), como fuente de carbono^[4] (Esquema 1).

Esquema 1. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.^[2]



Generalmente quienes se encuentran en mayor proporción en la mayoría de las plantas son los compuestos fenólicos y los terpenoides. Si bien los compuestos fenólicos no presentan la riqueza estructural de los terpenos, la funcionalización y grados de oxidación de sus estructuras generan compuestos con actividades biológicas interesantes^[2].

1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS

1.1.a. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, las dos rutas básicas implicadas son la ruta del ácido shikímico que es responsable de la mayoría de los fenoles en las plantas y la ruta del ácido malónico que es fuente importante de fenoles en hongos y bacterias pero poco empleada en plantas superiores^[5]. Existen numerosas categorías de estos compuestos, los cuales se pueden considerar los compuestos fenólicos simples, fenilpropanoides, flavonoides, taninos, y quinonas^[6], se les conoce como unidades C₁₅: C₆-C₃-C₆ y el esqueleto recibe el nombre de Flavano (Figura 1), se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores y por ello se consideran productos universales^[2]. La mayoría de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos son los flavonoides provenientes de las plantas, que poseen propiedades biológicas y químicas comunes, entre las que se pueden citar: actividad antioxidante, captación de especies oxigenadas activas, capacidad de modular ciertas actividades enzimáticas, entre otras^[7].

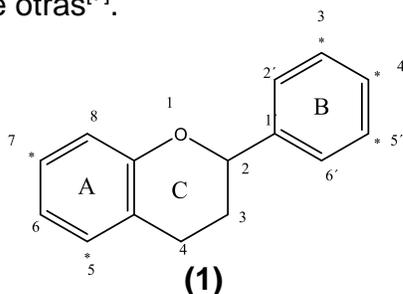


Figura 1. Estructura del núcleo de Flavano.^[2]

Los más abundantes son los triterpenos (30 átomos de carbono: seis unidades isoprenicas), se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza^[9] tanto en el reino vegetal como en el reino animal, por lo cual han sido rigurosamente estudiados^[2]. Éstos pueden encontrarse tanto en forma libre como asociados con azúcares (glicósidos) o aminoácidos^[2].

El precursor común de todos los triterpenos es el escualeno **(5)**. Sin embargo, existe una amplia variedad estructural^[2], y se clasifican tomando en cuenta el número de anillos que lo conforman (tetracíclicos y pentacíclicos) y dentro de esta clasificación, se encuentran subclasificados por grupos^[9].

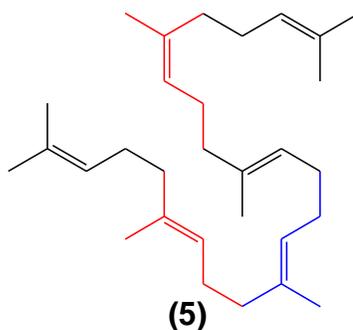


Figura 4. Estructura del Escualeno.[8]

La mayoría de los compuestos triterpenoidales en plantas adaptogénicas se encuentran como saponinas, que se refieren a la unión de diversas moléculas de azúcar a la unidad de triterpeno^[2].

Las saponinas son un grupo de sustancias glicosídicas de alto peso molecular, que se disuelven en agua, poseen propiedades tensoactivas (la propiedad de formar espuma al agitar la solución), tienen sabor amargo y por su acción hemolítica, son tóxicas para algunos animales acuáticos. De acuerdo con la naturaleza química de la

sapogenina (aglicona de la saponina) pueden ser clasificadas igualmente como esteroidales y triterpenoidales. Las saponinas esteroidales son menos frecuentes que las triterpenoidales^[2].

Las saponinas triterpenoidales están contenidas entre las drogas “naturales” orientales^[2] y todas derivan todas del dammarano **(6)** y se subdividen a su vez en tetra y pentacíclicas^[10].

- Tetracíclicas: Conservan la estructura básica del dammarano **(6)**, con tres ciclos de seis miembros y un ciclo de cinco miembros (ciclopentanoperhidrofenantreno)^[10].

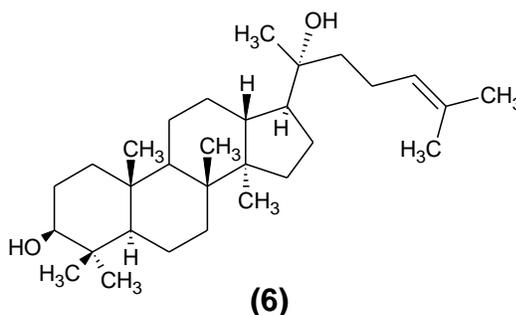


Figura 5. Estructura del Dammarano^[8].

- Pentacíclicas: Hay tres grupos representados por los grupos de la β -amirina (oleananos) **(7)** y α -amirina (ursanos) **(8)**, que tienen cinco ciclos de seis miembros, dos metilos en la posición 20 y dos metilos en la posición 19 y 20 del anillos E, respectivamente y el grupo del lupeol **(9)** que se caracterizan porque el anillo E tiene 5 miembros^[10].

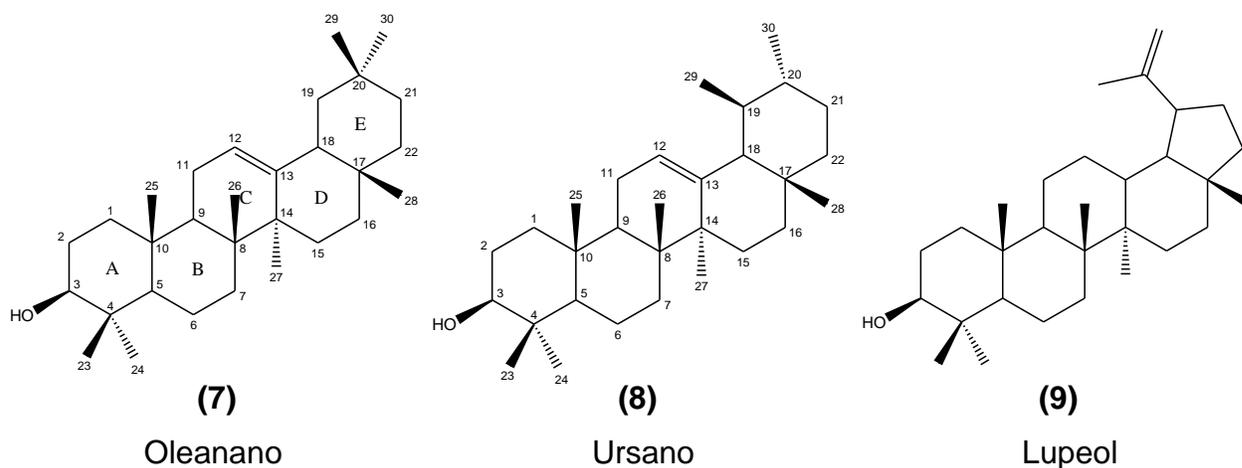


Figura 6. Estructuras básicas de los triterpenos pentacíclicos, tipo oleanano, ursano y lupano^[2]

El aislamiento, análisis, purificación, elucidación y caracterización de la estructura de los metabolitos secundarios producidos por las plantas se denomina fitoquímica.

La siguiente investigación está basada en el estudio fitoquímico de los metabolitos secundarios mayoritarios presente en la especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L, perteneciente a la familia Bignoniaceae ampliamente estudiada y resumida a continuación.

2. FAMILIA BIGNONIACEAE

Bignoniaceae es una familia que se encuentra en los principales grupos de angiospermas^[11], con aproximadamente 120 géneros y 800 especies^[12] que se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales ^[13]. La familia Bignoniaceae se caracteriza por incluir varios géneros de grandes árboles y un gran número de lianas, así como por las hojas opuestas y compuestas^[12]. Dentro de esta familia se encuentra el género *Arrabidaea*, el cual comprende entre 70 y 100 especies en las que destacan *A. chica*, *A. samydoides*, *A. florida*, entre otras. Las especies del género *Arrabidaea*, han llamado la atención de los investigadores alrededor del mundo, debido a la gran variedad de actividades farmacológicas que presentan como: antioxidante^[14], antiviral^[15], anti-inflamatoria, antinociceptivo^[16], leishmanicida^[17], inmunomodulador, antitumoral^[18], antimicrobiano^[19], anticancerígena^[20], cicatrizante^[21], entre otras.

El género *Arrabidaea* cuenta con una amplia distribución desde Centroamérica hasta Argentina y Paraguay^{[22]. [23]}. Este género es un grupo grande y morfológicamente diverso de lianas neotropicales^[13] que crecen tanto en bosques húmedos como secos^[23]. Lianas, raras veces arbustos o árboles pequeños con tallos con 4 brazos de floema en sección transversal, ramas secundarias teretes, usualmente con campos glandulares interpeciolares. Las hojas por lo común folioladas, el foliolo terminal con frecuencia reemplazado por un zarcillo simple. Inflorescencia generalmente una panícula multiflora grande, terminal o axilar, con muchas flores. Las flores con el cáliz por lo general cupular, truncado o bilabiado, por lo común diminutamente denticulado, usualmente pubescente; corola roja o rosado clara hasta púrpura (algunas especies con flores blancas) generalmente pequeñas, más o menos campanuladas y pubescentes por fuera por lo menos sobre los lóbulos; anteras glabras, tecas rectas o ligeramente recurvadas, por lo general divaricadas y el pistillo con ovario angostamente cilíndrico a linear-tetragonal, por lo regular diminutamente lepidoto y óvulos seriados. El fruto una

cápsula linear, comprimida por lo regular esencialmente lisa, rara vez verrugosa, por lo común con el nervio medio ligeramente elevado; semillas biliadas, las alas usualmente más o menos hialinas y diferenciadas del cuerpo de la semilla.^[12]

Varias especies de éste género han sido estudiadas^[19] a lo largo de los años con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios presentes y asociarlos a las propiedades terapéuticas de este género de plantas.^[22]

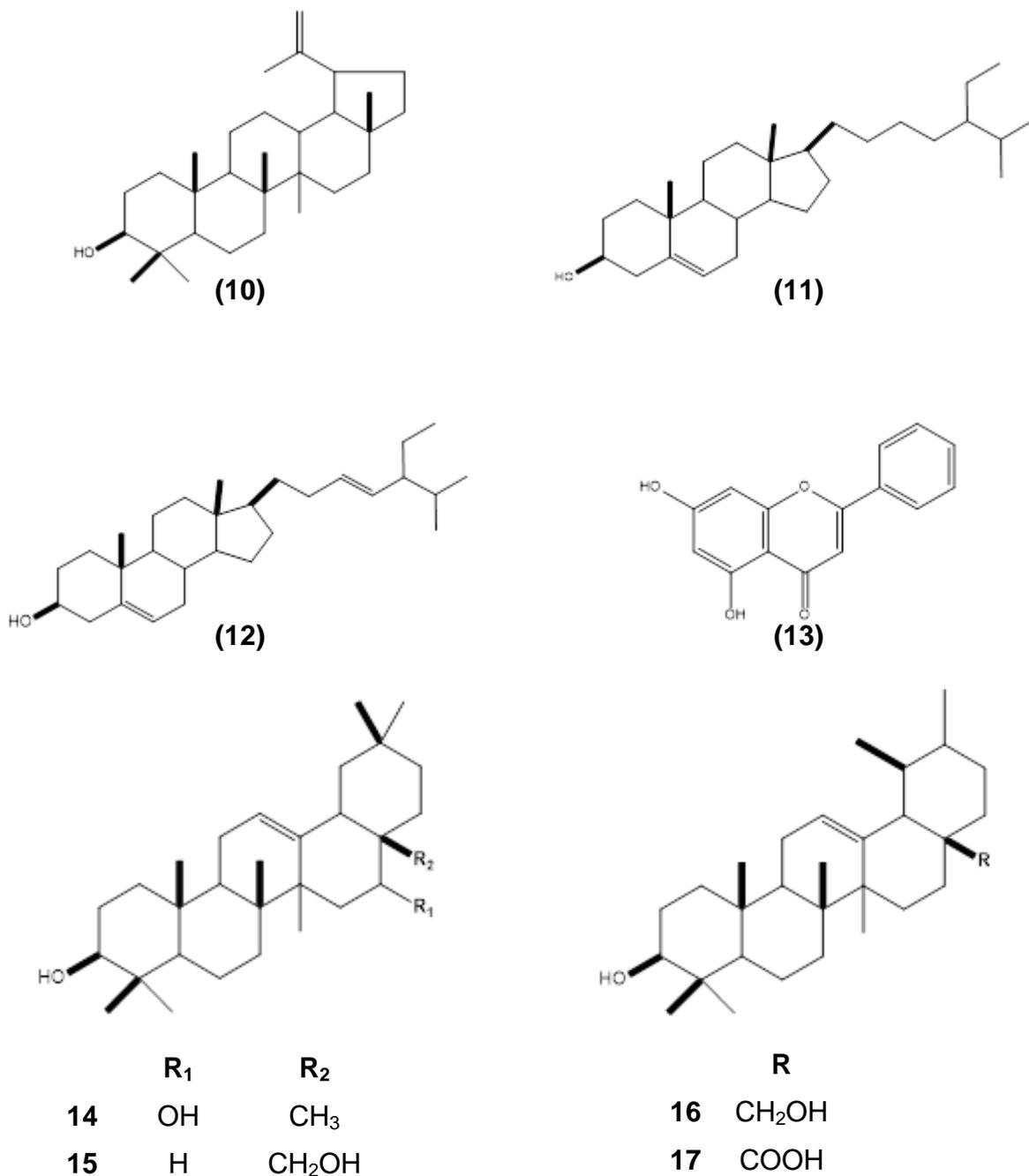
Estudios fitoquímicos previos han demostrado que plantas de este género producen C-glucosilxantonas, fenilpropanoides, flavonoides, derivados de alantoína y triterpenos. Así mismo, se ha realizado diversos estudios sobre su uso para tratar diferentes dolencias como por ejemplo, *A. florida* para problemas estomacales y digestivos; *A. candicans* en afecciones de fiebre; *A. spicata* para el dolor de cabeza; *A. candicans* y *A. platyphylla* para la diarrea^{[14], [15]} y hasta se reporta el uso de la *A. chica*, para dolores relacionados con la menstruación, además de su uso como colorante natural^[22].

3. ANTECEDENTES DEL GENERO *Arrabidaea*

3.1. *Arrabidaea samydoides* (Cham.) Sandwith

P. Mendoza publicó diferentes estudios de la especie *Arrabidaea samydoides* en 2003, luego del análisis fitoquímico realizado, esta investigadora identificó la presencia de flavona, triterpenos y esteroides. La investigación dio como resultado el aislamiento de lupeol (**10**), sitosterol (**11**), estigmasterol (**12**), crisina (**13**), 3 β ,16 α -dihidroxi-olean-12-eno (**14**), eritrodiol (**15**), uvaol (**16**) y ácido ursólico(**17**)^[24].

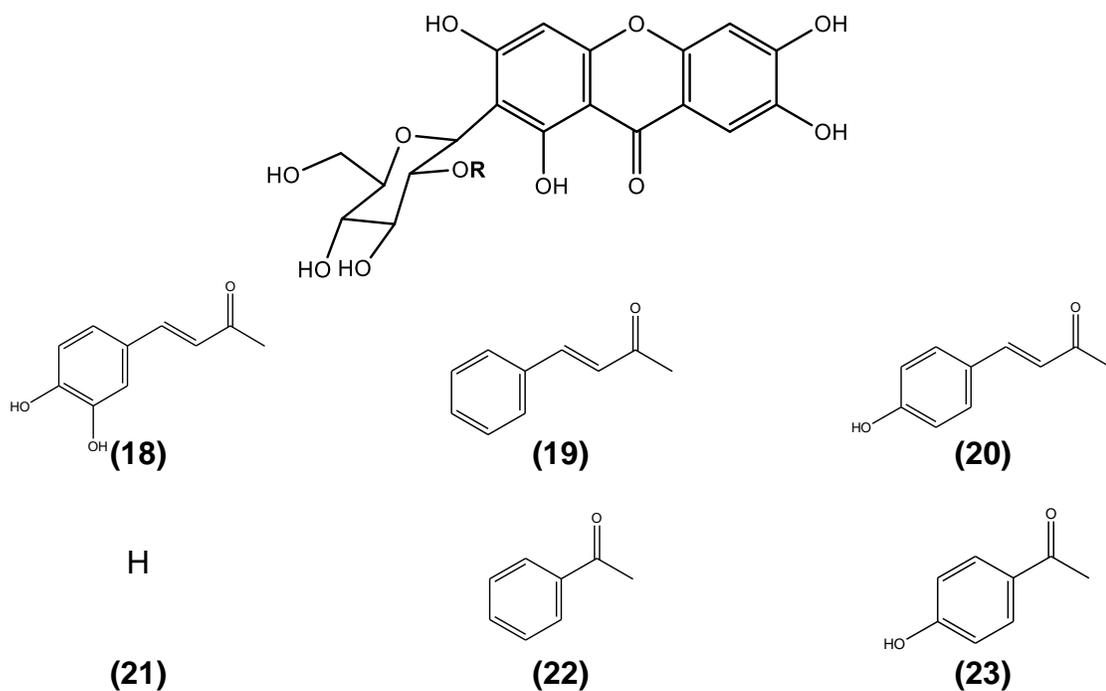
Las hojas y los tallos de *A. samydoides* secos y pulverizados se extrajeron con etanol, el extracto etanólico se particionó con hexano, cloroformo y acetato de etilo por separado. De la fracción de cloroformo del tallo, se obtuvieron los compuestos lupeol (**10**), sitosterol (**11**), estigmasterol (**12**) y crisina (**13**). De la fracción de hexano del tallo se aisló el compuesto 3 β ,16 α -dihidroxi-olean-12-eno (**14**) y finalmente de la fracción de cloroformo de las hojas se aisló el eritrodiol (**15**), uvaol (**16**) y ácido ursólico (**17**)^[24].



(10) Lupeol, (11) Sistosterol, (12) Estigmasterol, (13) Crisina, (14) 3 β ,16 α -dihydroxiolean-12eno, (15) Eritrodiol, (16) Uvaol, (17) Acido Ursólico.

Figura 7. Compuestos identificados en *Arrabidaea samydoides* por P. Mendoza^[24].

Más adelante ese mismo año, esta investigadora publicó un estudio de la presencia de compuestos antioxidantes, incluyendo tres nuevas estructuras químicas del tipo C-Glucosilxantonas en los tallos de *Arrabidaea samydoides*. El extracto etanólico de los tallos mostró una prometedora actividad antioxidante (Tabla 1) y condujo al aislamiento de tres nuevos C-glucopiranosilxantonas, 2-(2'-O-trans-cafeoil)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona **(18)**, 2-(2'-O-trans-cinamoilo)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona **(19)**, y 2-(2'-O-trans-cumaroil)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona **(20)**, además de tres compuestos ya conocidos, la mangiferina **(21)**, 2-(2-O-benzoil)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona **(22)** y la muraxantona **(23)**. Las estructuras químicas se asignaron sobre la base de experimentos de Espectrometría de Masas (MS) y por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de una y dos dimensiones. Las xantonas 18-23 mostraron actividad captadora de radicales libres moderada contra 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), así como actividad antioxidante por sus propiedades redox medidos en EICD-HPLC (Tabla 1)^[14]. En la Tabla 1 se observa que los compuestos **(18)** y **(20)** mostraron las mejores actividades de inhibición, tomando como referencia la rutina (IC₅₀ 12,34 µg/mL), revelando una actividad antioxidante moderada, mientras que los compuestos **(19)**, **(21)** y **(23)** mostraron actividades más bajas y valores similares de IC₅₀. Este resultado indica que la actividad moderada de inhibición de radicales libres de los xantonas se debe a su capacidad donadora de hidrógeno, de modo que el aumento del número de grupos hidroxilo o catecol resulta en un efecto de eliminación de radicales más eficaz. El comportamiento electroquímico mostrado por estos compuestos mostró una buena correlación con el efecto de eliminación de radicales medido en el ensayo de DPPH. Esta observación indica que las sustancias con picos oxidativos por debajo de +1,2 V (Tabla 1) y una gran capacidad oxidativa tienen propiedades de inhibición de radicales más prometedoras que aquellas que se oxidan en potencias superiores.



(18) 2-(2'-O-trans-cafeóilo)-C β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona,
 (19) 2-(2'-O-trans-cinamoilo)-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona,
 (20) 2-(2'-O-trans-cumaroilo)-C-β-D-glucopiranosil- 1,3,6,7-tetrahidroxixantona,
 (21) mangiferina (22) 2-(2- O-benzoil)-C-β-D-glucopiranosil- 1,3,6,7-tetrahidroxixantona,
 (23) muraxantona

Figura 8. Xantonas identificados en *Arrabidaea samydoides* por P. Mendoza.^[14]

Tabla 1. Potencial de radicales redox (V) y actividad de los compuestos 18-23 para DPPH^[14].

Compuesto	IC ₅₀ (μmol)*	E _{ox} (+)	E _{red} (-)
18	17.81	0.90	0.05
19	31.36	0.60	0.40
20	25.45	0.80	0.35
21	35.02	0.50	0.45
22	32.66	0.60	0.40
23	30.72	0.65	0.40
standard (rutina)	12.34	0.90	0.10

*Concentración requerida para secuestrar el 50% de los radicales libres DPPH.

3.2. *Arrabidaea pulchra* (Cham.) L.G.Lohmann

En 2013 se estudió la actividad antiviral del extracto etanólico de *Arrabidaea pulchra* por extracciones secuenciales del extracto metanólico acuoso con disolventes inmiscibles que condujo a la obtención de cuatro fracciones: diclorometano, acetato de etilo, *n*-butanol y agua. En la Tabla 2 se aprecia que la fracción de diclorometano mostró buena actividad contra el virus del herpes humano 1 (HSV-1) y el virus dengue 2 (DENV-2), mientras que la fracción de acetato de etilo fue débilmente activa contra virus del herpes humano 1 (HSV-1) y mostró una buena actividad contra virus Vaccinia (VACV-WR) y el virus dengue 2 (DENV-2), para estos analisis se utilizó com patron el aciclovir y el α-2a Interferón. La fracción de acetato de etilo fue separada a través de una columna de Sephadex LH-20 para aislar verbascósido (**24**) y cafeoilcalleryanin (**25**), los cuales mostraron una buena actividad contra virus dengue 2 (DENV-2) (Tabla 2). Asimismo, de la fracción de diclorometano se extrajo con éter dietílico el ácido ursólico (**17**), el cual mostro buena actividad contra virus del herpes humano 1 (HSV-1) y el virus dengue 2 (DENV-2). En el 2014 un análisis fitoquímico y citotóxico de la especie

Arrabidaea pulchra, determinó la presencia de flavonoides y taninos, además de efectos antiproliferativos y citotóxicos^[25].

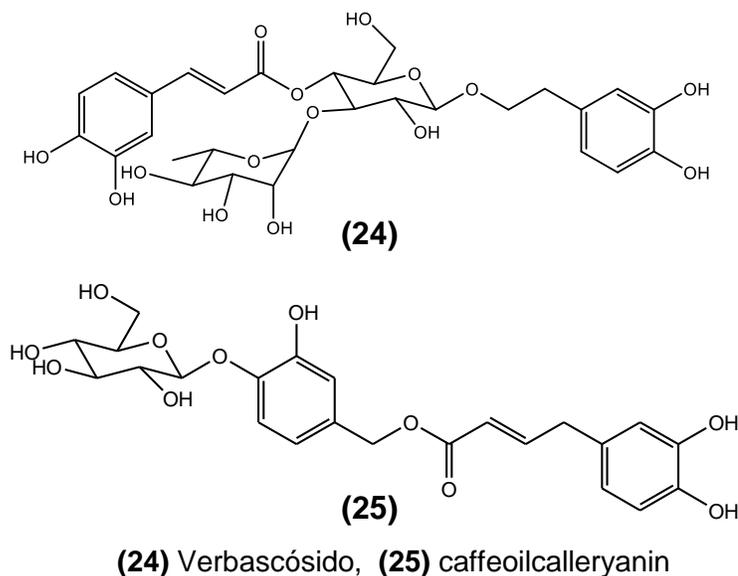


Figura 9. Compuestos identificados en *Arrabidaea pulchra* por Catarina^[25]

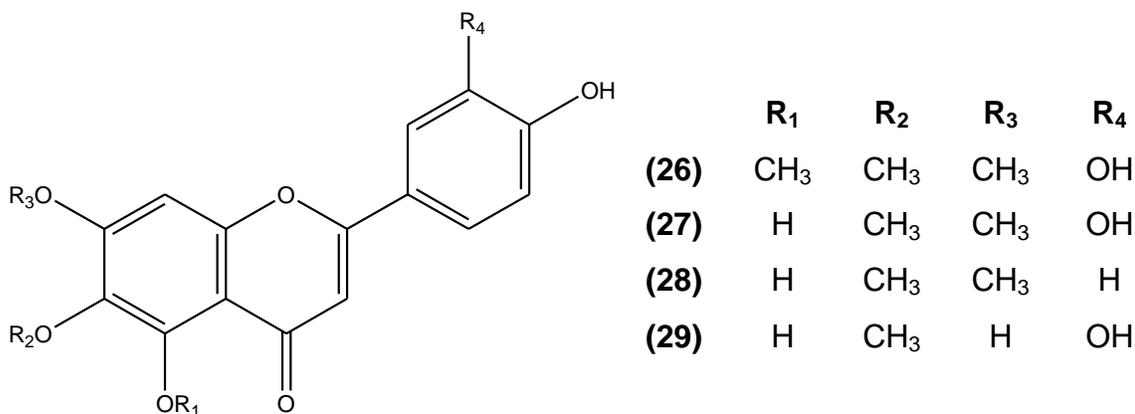
Tabla 2. Actividad antiviral in vitro (EC₅₀), para el extracto etanólico de las hojas *Arrabidaea pulchra* y fracciones.^[15]

Extracto / Compuesto	HSV-1 EC ₅₀ µg/mL	VACV-WR EC ₅₀ µg/mL	DENV - 2 EC ₅₀ µg/mL
Extracto etanólico	235.3 ± 9.7	245.2 ± 13.4	46.8 ± 1.6
Fracción CH ₂ Cl ₂	NA	18.6 ± 0.9	15.4 ± 2.1
Fracción AcOEt	121.9 ± 9.8	18.4 ± 1.9	12.2 ± 1.6
24	NA	NA	3.4 ± 0.4
25	NA	NA	2.8 ± 0.4
17	6.2 ± 0.1	NA	3.2 ± 0.6
Aciclovir	40		
α-2a Interferón		2.5 x 10 ²	2.5 x 10 ³

3.3. *Arrabidaea brachypoda* (A. DC.) Bureau

En el 2002, Alcerito *et al.* analizaron el extracto clorofórmico de la cera epicuticular de las hojas secas de *A. brachypoda*, logrando aislar por dos métodos cuatro flavonoides, mediante cromatografía de papel, usando ácido acético acuoso al 15% como disolvente y eluyendo las tiras de papel con MeOH y por cromatografía en columna de Sephadex LH-20, seguida por UV (MeOH al 80%). Las cuatro flavonas mostraron actividad antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* y fueron identificadas como 3 α ,4 α -dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**26**), cirsiol (**27**), cirsimaritina (**28**) e hispidulina (**29**).^[26]

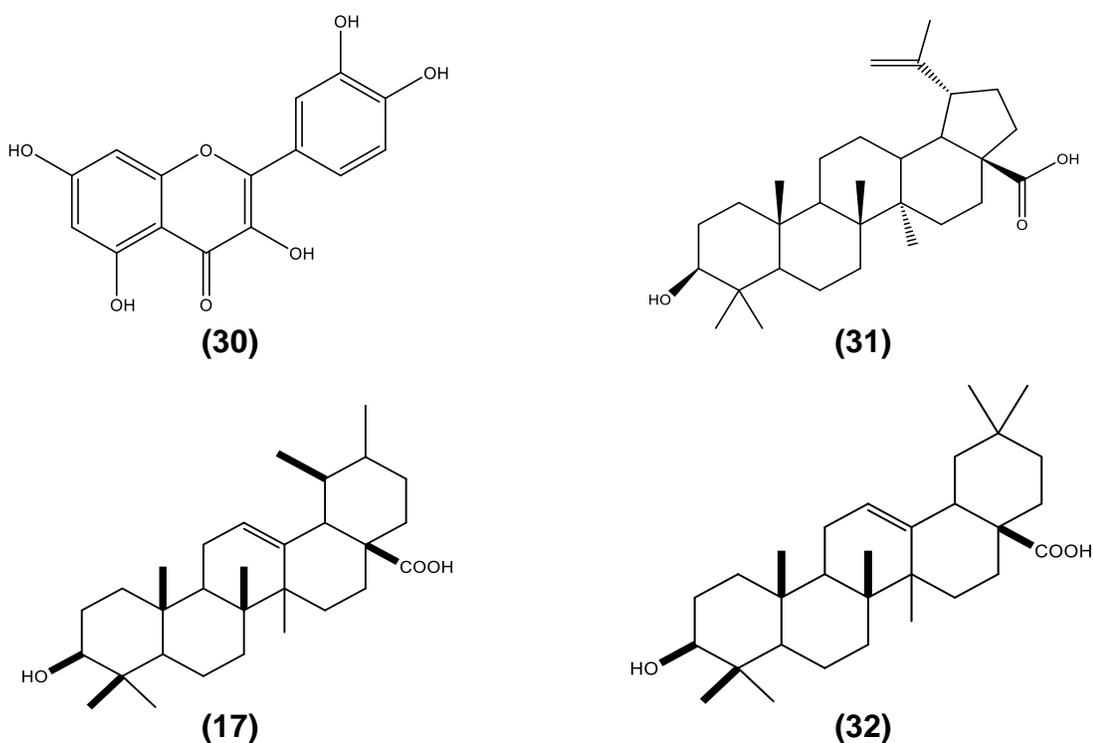
Los flavonoides cirsiol (**27**), cirsimaritina (**28**) e hispidulina (**29**) se encuentran muy comúnmente como flavonoides en la cera epicuticular. Cirsimaritina (**28**) e hispidulina (**29**), se encontraron previamente en Bignoniaceae, pero esta fue el primer informe de cirsiol (**27**) para esta familia. El flavonoide, 3 α ,4 α -dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**26**), sólo se había descrito como un compuesto sintetizado, que tiene actividad inhibitoria frente a araquidonato 5-lipoxigenasa^[26].



(26) 3 α ,4 α -dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona, **(27)** cirsiol,
(28) cirsimaritina, **(29)** hispidulina.

Figura 10. Compuestos identificados en *Arrabidaea brachypoda* por Alcerito.^[26]

En 2010, Cláudia Q. da Rocha realizó varias investigaciones sobre *Arrabidaea brachypoda*, mostrando que el extracto etanólico de las raíces posee acción anti-inflamatoria en ratas *Wistar* y actividad antinociceptiva en ratones suizos. Los resultados obtenidos señalan el potencial de esta planta para el control farmacológico del dolor y los procesos inflamatorios en una concentración de 100 mg/Kg o más como se aprecia en la Tabla 3. Además, los resultados apoyan el uso tradicional de esta especie en algunas condiciones dolorosas e inflamatorias. El análisis fitoquímico mostró que el extracto etanólico acuoso de las hojas contenía saponinas, glucósidos cardíacos, compuestos fenólicos, taninos, esteroides y flavonoides, los cuales han sido asociados con diversos grados de actividades anti-inflamatorias y analgésicas. En el análisis por HPLC se identificó la quercetina **(30)** y se observó la presencia de otros compuestos fenólicos aún no identificados. Además, en un estudio del 2002 informan sobre el aislamiento de los flavonoides 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona **(26)**, cirsiol **(27)**, cirsimarina **(28)** e hispidulina**(29)**, a partir de hojas de *A. brachypoda*. Estas sustancias comparten una gran similitud química con una flavona de *A. samydoide* descrita en 2003, la crisina **(13)**, que muestra una significativa actividad antioxidante. Finalmente, se encontraron en las raíces de *A. brachypoda* los triterpenos pentacíclicos de ácido betulínico **(31)**, ácido ursólico **(17)** y ácido oleanólico **(32)**.^[16]



(30) Quercetina, (31) Acido betulínico, (17) Acido Ursólico, (32) Acido oleanólico

Figura 11. Compuestos identificados en *Arrabidaea brachypoda* por Da Rocha. ^[16]

Tabla 3. Valores inhibitorios del Extracto Etanólico de *A. Brachypoda* ^[16]

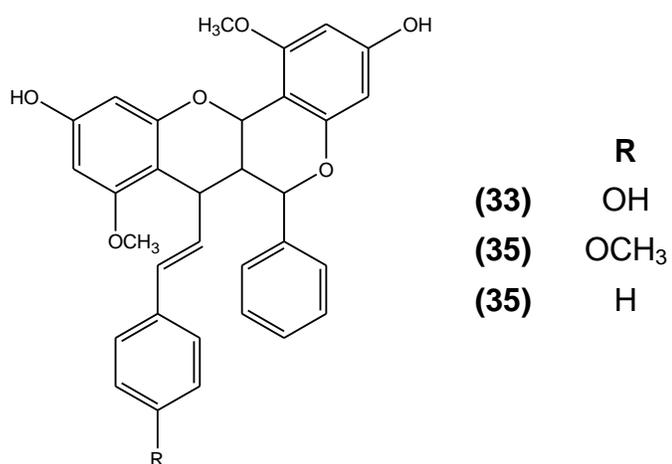
	Indometacina		Extracto Etanólico <i>A. Brachypoda</i>	
	10 mg/Kg	30 mg/Kg	100 mg/Kg	300 mg/Kg
Carragenina (Edema / inhibición de edema)	40,97%	34,24%	43,10%	54,95%
lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> serotipo 026: B6 (Peritonitis/ inhibición de reclutamiento de leucocitos)	67,44%	24,41%	44,32%	45,38%

En el 2012, el mismo grupo de investigadores evaluaron la actividad leishmanicida del extracto hidro-etanólico de diferentes partes (hojas, tallo y raíz) de *Arrabidaea brachypoda*, mostrando una importante actividad leishmanicida *in vitro*^[17].

Tabla 4. Valores de inhibición de crecimiento de promastigotes *Leishmania* (L.) *amazonensis* (MHOM / BR / 71973 / M2269).^[17]

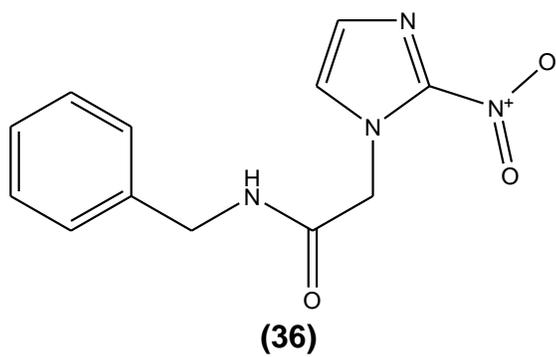
	Anfotericina B	Extracto Etanólico Tallo	Extracto Etanólico Hojas	Extracto Etanólico Raíz
IC ₅₀ (µg/mL)	3,68	9,32	4,85	15,32
IC ₉₀ (µg/mL)	8,82	23,52	14,89	34,36

Da Rocha y *et al.*, estudiaron la fracción menos polar de un extracto de etanol acuoso de las raíces de *Arrabidaea brachypoda*. En 2014, observando que la especie mostró una actividad significativa *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, el parásito responsable de la enfermedad de Chagas, se realizó el estudio de los componentes activos, lo cual condujo al aislamiento de tres nuevos flavonoides diméricos (**33-35**). El compuesto (**33**) no exhibió ninguna actividad hacia *T. cruzi*, mientras que los flavonoides (**34**) y (**35**) exhibieron actividad selectiva contra estos tripomastigotes (Tabla 5). Los compuestos (**34**) y (**35**) inhiben el proceso de invasión del parásito y su desarrollo intracelular en células huésped con potencias similares a benznidazol como se muestra en la Tabla 5, (**36**).^[13]



(33) Braquidina A, **(34)** Braquidina B, **(35)** Braquidina C.

Figura 12. Flavonoides diméricos identificados en *Arrabidaea brachypoda*^[13].



Benznidazol

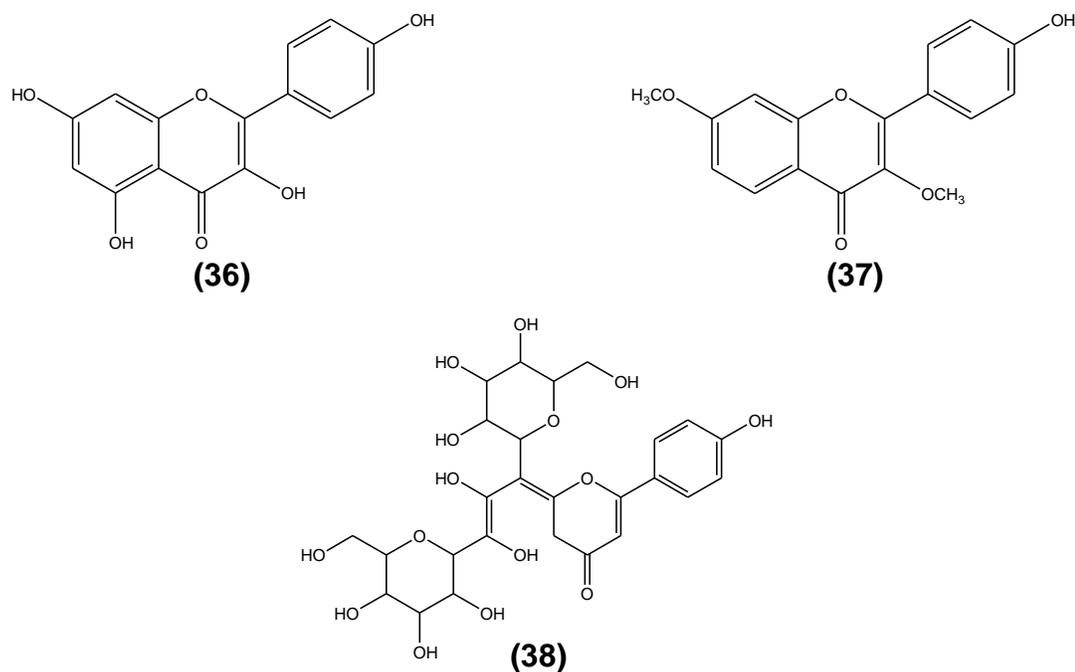
Figura 13. Estructura del antiparasitario Benznidazol^[13].

Tabla 5. Citotoxicidad y anti *T. cruzi* de la Braquidina A, B, C y el benznidazole^[13].

Compuesto	Células huésped LC ₅₀ (µM)	Cepa Y de <i>T. cruzi</i> , IC ₅₀ (µM)	
		Tripomastigotes	Amastigotes
(30) Braquidina A	>20	>20	>20
(31) Braquidina B	15,6 ± 0,02	5,3 ± 1,15	6,0 ± 0,33
(32) Braquidina C	17,3 ± 0,84	6,6 ± 0,39	6,8 ± 0,41
Benznidazole	>20	11,3 ± 1,84	14 ± 0,38
Violeta de genciana	0,48 ± 0,05		

3.4. *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.)

La especie más estudiada ha sido *Arrabidaea Chica*. En 2011 se estudió el efecto en el desarrollo de tumores para ello se usó las hojas de *A. chica* se extrajeron con etanol y agua. El análisis fitoquímico de los extractos indicó la presencia de antocianidinas, flavonoides, taninos y saponinas[18]. Flavia *et al.*, realizaron el estudio por HPLC del extracto etanólico indicando la presencia de kaempferol **(36)**, además en 2008 fueron Aislados otros dos flavonoides del extracto etanólico de *A. chica*, 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona **(37)** y vicenin-2 **(38)** ^{[18], [27]}. Los estudios biológicos realizados a los extractos acuosos y etanólicos de *A. chica* mostraron que estos presentan actividades inmunomoduladoras y antitumorales atribuidas a la presencia de flavonoides, tales como kaempferol **(36)**^[18].



(36) Kaempferol, **(37)** 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona, **(38)** vicenin-2

Figura 14. Compuestos identificados en *Arrabidaea chica* por Ribeiro[16]

Tabla 6. Medición del crecimiento del tumor sólido Ehrlich en almohadilla de la pata del ratón 48 h

Grupo	Día de desarrollo del tumor				
	3	5	7	9	12
Control	2.068±0.08	2.092±0.06	2.307±0.18	2.451±0.46	3.237±0.75
Extracto acuoso	2.108±0.10	2.053±0.08	2.097±0.13	2.290±0.33	2.495±0.51
Extracto EtOH	1.968±0.14	1.935±0.13	1.918±0.11	2.067±0.22	2.357±0.47

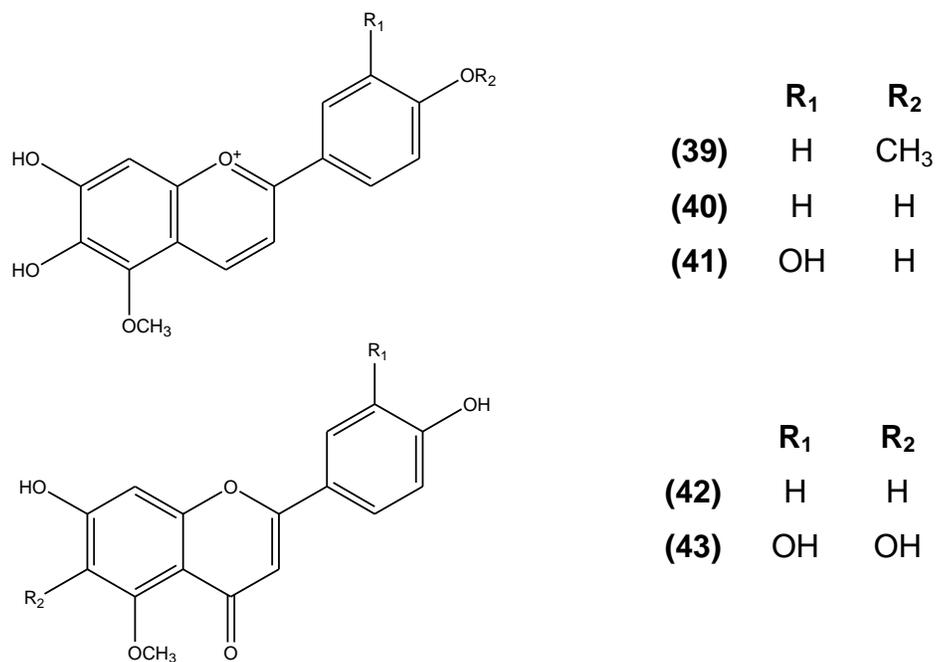
Adicionalmente, en el 2013 se evaluó la toxicidad y la actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de *Arrabidaea chica*. El análisis fitoquímico por métodos colorimétricos reveló la presencia de compuestos fenólicos especialmente flavonas y flavonoles; el análisis espectroscópico reveló presencia de 3-desoxiantocianidinas y kaempferol **(36)**, sugiriendo que los compuestos fenólicos presentes en altas concentraciones son los responsables de la actividad antimicrobiana, sabiendo que el kaempferol **(36)**, uno de los flavonoides polifenólicos identificados, es un agente antimicrobiano potente, mediante la formación de un complejo con la pared celular bacteriana, y por lo tanto previene el crecimiento bacteriano^[19].

En 2012, Dos Santos y col., realizaron el estudio fitoquímico y evaluaron los efectos mutagénicos y genotóxicos/antigenotóxicos de la fracción clorofórmica de *A. chica*. El análisis fitoquímico indicó la presencia de saponinas, alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos, atribuyendo los efectos antigenotóxicos a la presencia de los flavonoides y compuestos fenólicos. Las propiedades antiinflamatorias y de cicatrización de la planta se relacionaron a la presencia de desoxiantocianidinas, como carajurina **(39)** y carajurona **(40)**^[28].

En el 2013, D. Taffarello y col. realizaron el análisis fitoquímico y la determinación de la influencia del proceso de fermentación enzimática de hojas de *A. chica* Verlot sobre la actividad anticancerígena, utilizando modelos *in vitro* de células tumorales humanas, reportando, en las hojas de *A. chica*, la presencia de 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavilio **(41)**, carajurona o 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilio **(40)** y la carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio **(42)**. Además de fitoesteroles, taninos y los flavonoides 7,4'-dihidroxi-5-metoxiflavona **(43)** y 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona) **(44)**, mostrando la influencia de la variación en la proporción relativa de antocianinas en los extractos metanólicos de *A. chica*, sin tratamiento enzimático

mejorando la actividad anticancerígena y analizando el potencial de actividad antioxidante^[20].

Ese mismo año se investigó el efecto de la aplicación tópica del extracto de *A. chica* en la curación del tendón dañado quirúrgicamente en ratas wistars, obteniendo resultados positivos en el séptimo día después de la lesión, las secciones del tendón mostraron un notable aumento de la reconstitución del colágeno y un aumento del número de vasos sanguíneos en el área seccionada tratada con la planta. El extracto crudo *A. chica* actuó en la fase proliferativa de reparación del tendón y en la mejora de la organización molecular de las fibras de colágeno. Estos investigadores relacionaron el efecto curativo observado con la presencia de las agliconas carajurina **(39)** y carajurona **(40)**, las cuales son componentes de las antocianinas presentes en las hojas de *Arrabidaea chica*. Del extracto liofilizado de la planta se Aislaron y caracterizaron tres pigmentos, pigmento **(39)** (carajurina), pigmento **(40)** (carajurona) y pigmento **(44)** (carajurina)^[21].



- (39) 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio (Carajurina),
 (40) 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilio (carajurona),
 (41) 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavilio, (43) 7,4'-dihidroxi-5-metoxiflavona,
 (44) 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavona.

Figura 15. Compuestos identificados en *Arrabidaea chica* por Da Rocha y Taffarello.^{[16], [20]}

4. DESCRIPCIÓN BOTANICA DE LA ESPECIE *Arrabidaea inaequalis* (DC.ex Splitg.)

La especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L. (Figura 15,16 y 17), posee la siguiente clasificación taxonómica^[29]:

Reino:	Plantae.
Phylum:	Magnoliophyta.
Clase:	Magnoliopsida.
Orden:	Lamiales.
Familia:	Bignoniaceae.
Género:	Arrabidaea.
Especie:	<i>Arrabidaea inaequalis</i> .
Autor:	(DC. ex Splitg.) K. Schum.
Determinador:	Dugand
Fecha determinación:	1 de enero de 1955

Arrabidaea inaequalis o como se conoce por su nombre común Bejuco guacarayo, en México se conoce como Tronador o Paludo, es una trepadora leñosa con hojas opuestas e internadas a veces con un zarcillo simple^[30] raramente folioladas en parte, la lámina elíptica aguda o cortamente acuminada la base redondeada con frecuencia muy desiguales, el fruto es una cápsula linear achatada de color marrón oscuro o negruzca cuando se seca, ligeramente glandular punteada los márgenes ligeramente elevados, posee el nervio medio ligeramente elevado o no^[31], las flores purpúreo-rojizas. Es común en bosques siempre verdes de tierras bajas y montañosos entre 50 y 500 msnm, en Venezuela se puede encontrar en el Río Cuao: entre Pozo Hormiga y Caño Samariapo^[30].



Figura 16. Imagen de *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L^[32]

Se puede encontrar con los siguientes sinónimos de *A. inaequalis*: *Bignonia inaequalis* DC. ex Splitg., *Bignonia decomposita* Pleonotoma decompasita (Miq.), *P. inaequalis* (OC. ex Splitg.), *P. triternata*, *Tetrastichella inaequalis* (OC. ex Splitg.), *Chasmia* Schott ex Spreng., *Cremastus* Miers, *Neomacfadya* BAill., *Panterpa* Miers, *Paramansoa* BAill., *Pentelesia* Raf., *Petastoma* Miers, *Scobinaria* Seibert, *Vasconcellia* Mart.^{[31], [33]}



Figura 17. Flores de *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L.^[34]



Figura 18. Hojas de *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L.^[34]

Arrabidaea inaequalis se encuentra principalmente en Centroamérica y parte de Suramérica (Figura 19), entre ellas Sureste de México, Belice, Guatemala, Colombia, Trinidad, Guyana, Surinam, Guayana Francesa, Perú, Brasil, Bolivia



Figura 19. Ubicación geográfica de *Arrabidaea inaequalis*.^[35]

5. JUSTIFICACIÓN

Numerosos antecedentes botánicos y estudios biológicos señalan diversas actividades y propiedades medicinales de varias especies de la familia Bignoniaceae y del género *Arrabidaea*. Sin embargo, no se encuentran reportes de estudios fitoquímicos y/o biológicos de la especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L, por esta razón se propuso el análisis fitoquímico de esta especie con el fin de generar una contribución importante para el desarrollo científico del país, en el campo de la química orgánica y específicamente en la investigación de productos naturales por medio del análisis fitoquímico de la especie y así, servir como precursor de futuros trabajos fitoquímicos o biológicos de la misma

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Realizar el estudio fitoquímico de la especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de los tallos y hojas de la especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L por técnicas cromatográficas como Cromatografía de Capa Fina (CCF), Cromatografía en Columna (CC) y Cromatografía Líquida de Presión Media (CLPM) para su Aislamiento y caracterización.
- Caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios Aislados de los tallos y hojas de la especie *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L por sus propiedades físicas y por medio de técnicas espectroscópicas como RMN de una (RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT-135) y dos dimensiones (HMQC y HMBC).

7. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1. MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales utilizados para los diferentes métodos cromatográficos que se emplearon en el estudio fitoquímico de la planta *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L, se presentan a continuación:

7.1.a. Soportes cromatográficos

Cromatografía de capa fina fase normal (analítica)

- Placas de sílica gel con soporte de aluminio, TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ de la casa comercial Merck ® de dimensiones 20 x 20 cm, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.
- Placas analíticas de RP-18; 0,25 mm de espesor con soporte de vidrio de la casa comercial Merck ®

Columnas cromatográficas

- Sílica gel 60, de 0,063-0,2 mm, *Riedel-de Haen*® AG
- Sephadex™ LH-20 de 25-100µm, CAS 9041-37-6, Sigma-Aldrich ®
- Lobar Lichroprep Si60, de 40-63µm, Tipo A, Sigma-Aldrich ®
- Cromatoplasmas Preparativa Sílica gel 60 F₂₅₄, de 20 x 20 con zona de concentración 4 x 20 cm de Merck ®

7.1.b. Agentes reveladores

Los agentes reveladores que se emplearon en el estudio fitoquímico de la planta *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L, fueron los siguientes:

- Reactivo de vainillina en ácido sulfúrico.

El proceso de revelado consiste en rociar la placa con 10 mL de una solución de vainillina al 1% en etanol con 10 mL de una solución de ácido sulfúrico al 10% en etanol. Luego se calienta a 110 °C durante 5-10 min y se evalúa la placa en el visible. La detección de componentes de aceites esenciales como terpenoides e iridoides producen coloraciones moradas y/o rosadas. Terpenos como glicósidos dan coloraciones azul-violetas oscuras y algunas saponinas dan coloraciones amarillas^[36].

- Reactivo de *p*-Anisaldehído.

Se mezclan 0,5 mL de *p*-anisaldehído con 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se rocía la placa de CCF con este reactivo y se calienta a 100 °C durante 5-10 min o hasta obtener una máxima intensidad de color. La aparición de manchas amarillas, verdes, rosadas, moradas y azules, es indicativo de la presencia de flavonoides, terpenoides glicosilados, secoiridoides terpenoides, saponinas y respectivamente^[36].

- Reactivo de Komarowsky.

Se mezcla 1 mL de una solución etanólica al 50% de ácido sulfúrico y 10 mL de una solución metanólica al 2% de 4-hidroxibenzaldehído. Se rocía la placa y se calienta a 100 °C durante 5-10 min y se evalúa en el visible. Coloraciones azules, amarillas y rojas son indicativas de saponinas^[36].

7.1.c. Equipos

Los equipos utilizados en el en el estudio fitoquímico de la planta *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L, fueron los siguientes:

- Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200.
- Rota evaporadores marca BÜCHI R-111 con un baño de agua BÜCHI 461.
- Se utilizó la lámpara de UV-Vis marca MINERALIGHT® LAMP, Modelo UVSL-58, con dos longitudes de onda disponibles: 254 y 366 nm.
- Columna Lobar conectada a una bomba HPLC Waters™ 600S Controller, la presión máxima de 5.000 psi y flujo de 0,01 a 5,0 mL/min.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, marca BRUKER, modelo AM500, con campo aplicado de 300 y 600 MHz para protones y 75 y 125 MHz para carbono, ubicado en el Laboratorio de RMN del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

7.2. METODOLOGIA APLICADA

7.2.a. Recolección del material vegetal

La muestra de *Arrabidaea inaequalis* (Ai) fue recolectada en 1993 en el Río Sipapo, Puerto Samario, Estado Amazonas, en las coordenadas 6°34'N; 67°5'O por el Dr. Aníbal Castillo y fue conservada molida y seca en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela. Una muestra de esta especie se encuentra depositada en el Herbario Nacional de Venezuela, en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela Dr. Tobías Lasser, bajo el código N° 3542 (Figura 20).

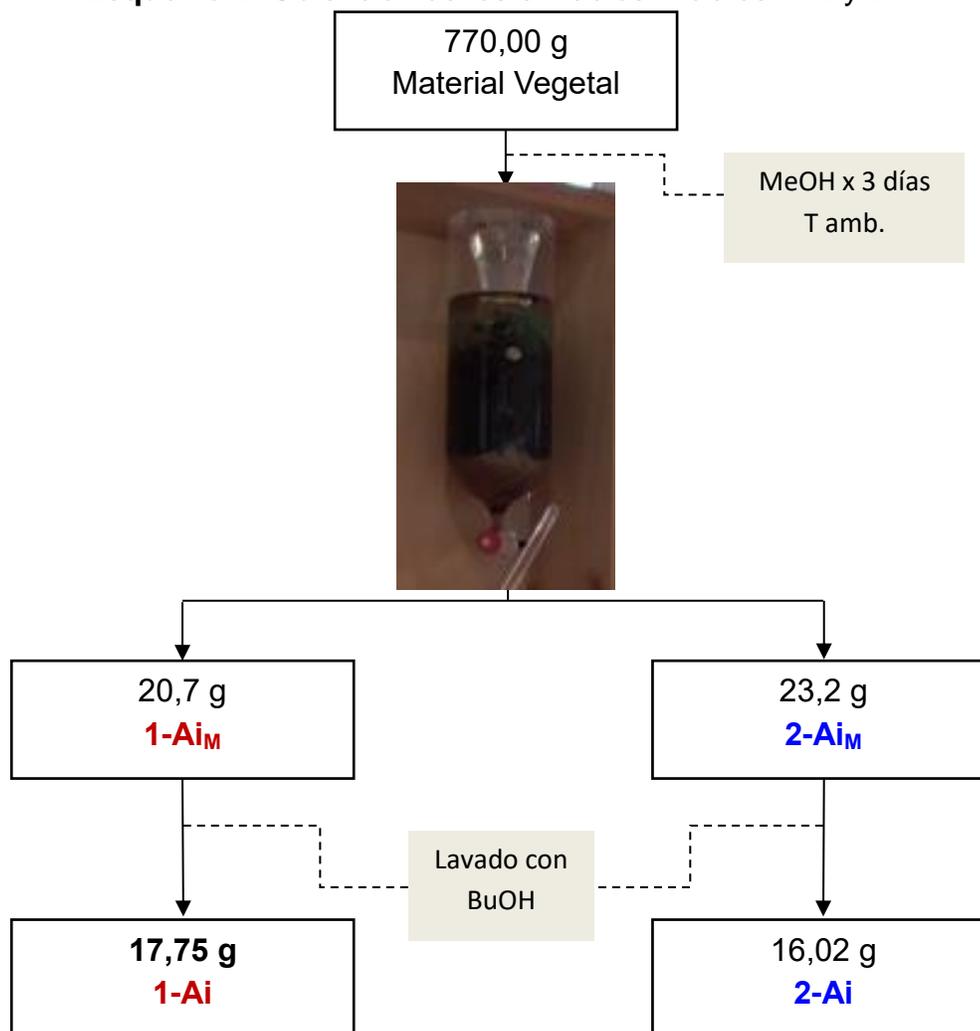


Figura 20. Imagen del espécimen de *Arrabidaea inaequalis* (DC. ex Splitg.) L. depositada en el Jardín Botánico de Caracas.

7.2.b. Análisis Fitoquímico

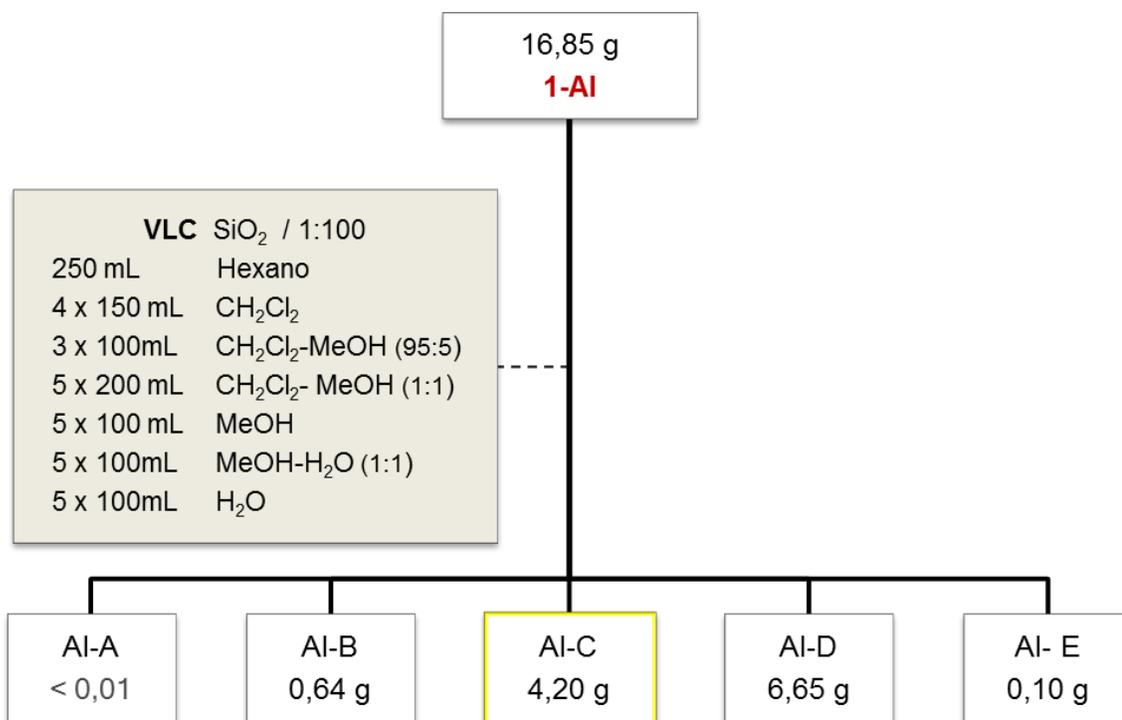
Un total de 770,00 g de hojas y tallos secos y molidos fueron sometidos a percolación con MeOH a temperatura ambiente durante tres días, obteniendo dos porciones de una pasta marrón del extracto metanólico, una de 20,7 g (**1-Ai_M**) y otra de 23,2 g (**2-Ai_M**), ambas fueron tratadas con *n*-butanol para eliminar la mayor cantidad de azúcares y trabajar con la mayor cantidad de compuestos polares solubles en *n*-butanol. Así, se obtuvo una pasta de 17,75 g (**1-Ai**) y 16,02 g (**2-Ai**) de las fracciones butanólicas (Esquema 2).

Esquema 2. Obtención de los extractos iniciales 1-Ai y 2-Ai.



La fracción **1-AI** (16,85 g) fue analizada por Cromatografía Líquida al Vacío (CLV), empleando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil mezclas de solventes en orden creciente de polaridad, a saber: Hexano, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (95:5), CH₂Cl₂-MeOH (50:50), MeOH, MeOH-H₂O (50:50) y finalizando con H₂O como se muestra en el Esquema 3, recolectando diez fracciones, las cuales, fueron agrupadas según el factor de retención observado en placas de cromatografía de capa fina (Figura 21), obteniendo así cinco fracciones denominadas de **Ai-A–Ai-E** (Esquema 3, Tabla 7).

Esquema 3. Cromatografía Líquida al vacío de **1-Ai**.



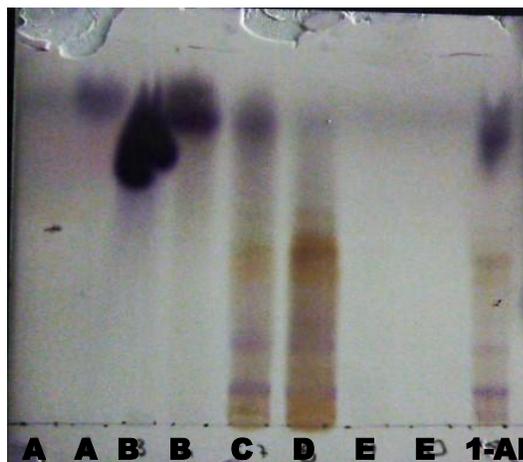


Figura 21. Placa de fracciones obtenidas en la CLV del extracto **1-Ai**
AcOEt:MeO:H₂O (100:13,5:10) y rociado con vAinillina-ácido sulfúrico

Tabla 7. Fracciones obtenidas en la CLV realizada al extracto **1-Ai**.

Muestra	1-Ai	
Masa (g)	16,8	
Columna	Sílica 0,063-0,02mm	
VC (mL)	170	
Fase móvil	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; MeOH; H ₂ O	
Fracción	Muestra	Masa muestra (g)
VLC ₁₋₂	Ai-A	< 0,01
VLC ₃₋₄	Ai-B	0,64
VLC ₅₋₇	Ai-C	4,20
VLC ₈₊	Ai-D	6,65
VLC ₉₋₁₀	Ai-E	0,10
	Total	11,59
	Rendimiento (%)	69,0

Por ser la fracción **Ai-C** una de las fracciones con mayor masa y cantidad de compuestos, se realizó nuevamente una CLV sobre sílica gel utilizando como fase móvil mezclas de CH₂Cl₂-MeOH de polaridad creciente (95:5→0:100 v/v), Esquema 4, lo cual produjo sesenta y siete fracciones unidas según su perfil cromatográfico sobre placas de sílica gel (Tabla 8) para obtener seis fracciones combinadas, denominadas **Ai-C₁** – **Ai-C₆**.

Esquema 4. Separación cromatográfica de **Ai-C₃**.

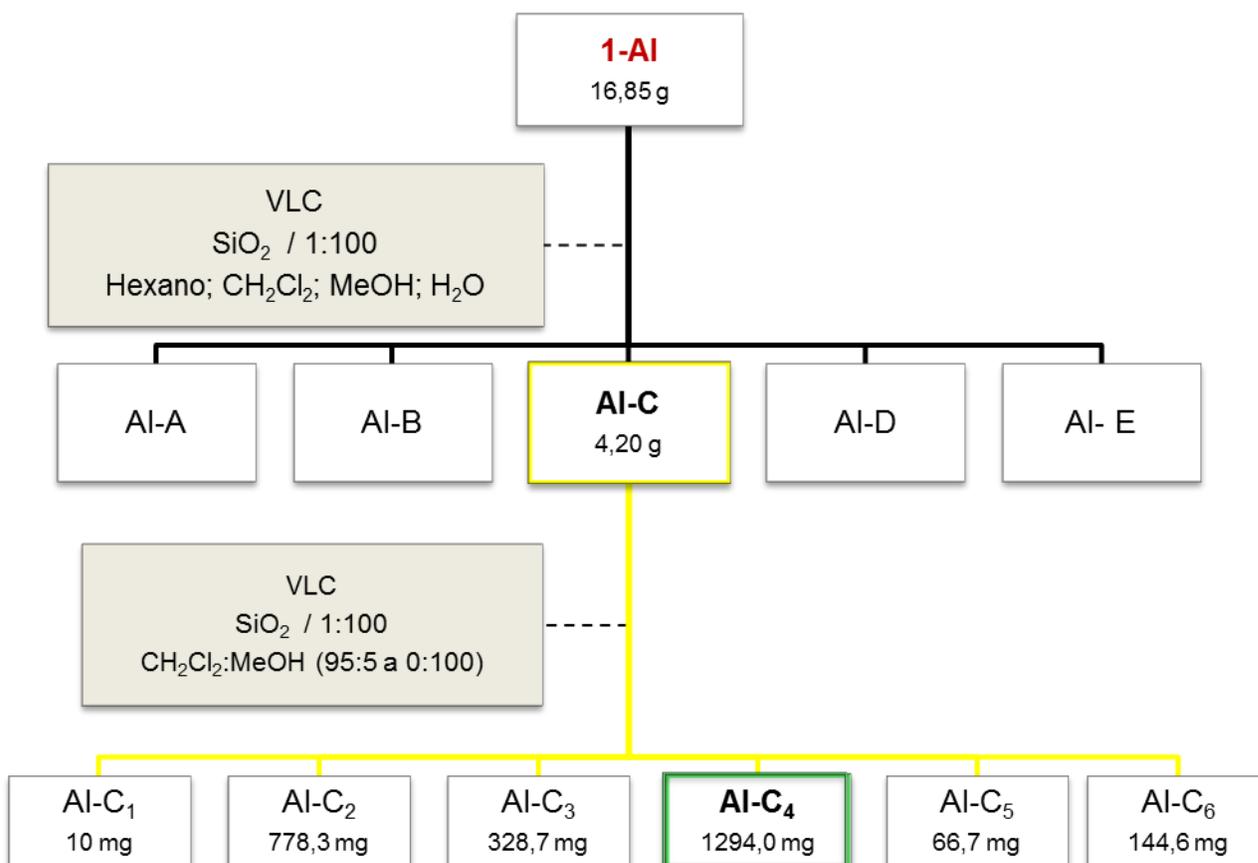


Tabla 8. Fracciones obtenidas en la CLV realizada al extracto **Ai-C**.

Muestra	Ai-C		
Masa (g)	3,2		
Columna	Sílica 0,063-0,02mm		
VC (ml)	50		
Fase móvil	CH ₂ Cl ₂ ; MeOH (95:5 → 0:100), el gradiente de elución fue variado en 5% cada 50 mL de eluyente		
Fracción	Muestra	Masa muestra (g)	Masa muestra (mg)
C-VLC ₁	Ai-C₁	0,0100	10,0
C-VLC ₂₋₁₉	Ai-C₂	0,7783	778,3
C-VLC ₂₀₋₂₇	Ai-C₃	0,3287	328,7
C-VLC ₂₈₋₃₉	Ai-C₄	1,2940	1294,0
C-VLC ₄₀₋₄₈	Ai-C₅	0,0667	66,7
C-VLC ₄₉₋₆₇	Ai-C₆	0,1446	144,6
Total		2,6223	2622,3
Rendimiento (%)		81,9	81,9

Posteriormente, una porción de la fracción de **Ai-C₄** (1,0 g) se sometió a una separación por Cromatografía en Columna (CC) utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil un sistema de solventes que se inició con H₂O, seguido la mezcla H₂O-MeOH (1:1) y finalizando con MeOH (Esquema 5), obteniendo ciento cincuenta (150) fracciones. Las cuales fueron analizadas por cromatografía de capa fina, observándose en las primeras 4 fracciones la presencia de saponinas, de la fracción 5 a la 95 se encuentran diferentes compuestos del tipo terpenoidal glicosilados y no glicosilados, de la fracción 96 a la 98 se observó una mezcla de compuestos (terpenos, polifenoles) y finalmente de la fracción 99 a la 150 se observaron compuestos de tipo flavonoidal (Figura 22, Tabla 9), se agruparon las fracciones consecutivas que mostraron manchas comunes entre sí de acuerdo a su factor de retención y coloraciones observadas por CCF., obteniendo un total de veintidós (22) fracciones denominadas de **Ai-C₄₋₁** – **Ai-C₄₋₂₂**.

Esquema 5. Separación cromatográfica de Ai-C4.

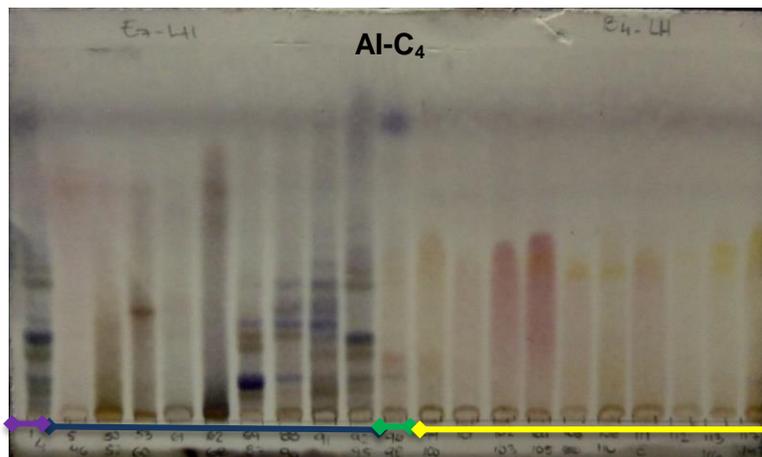
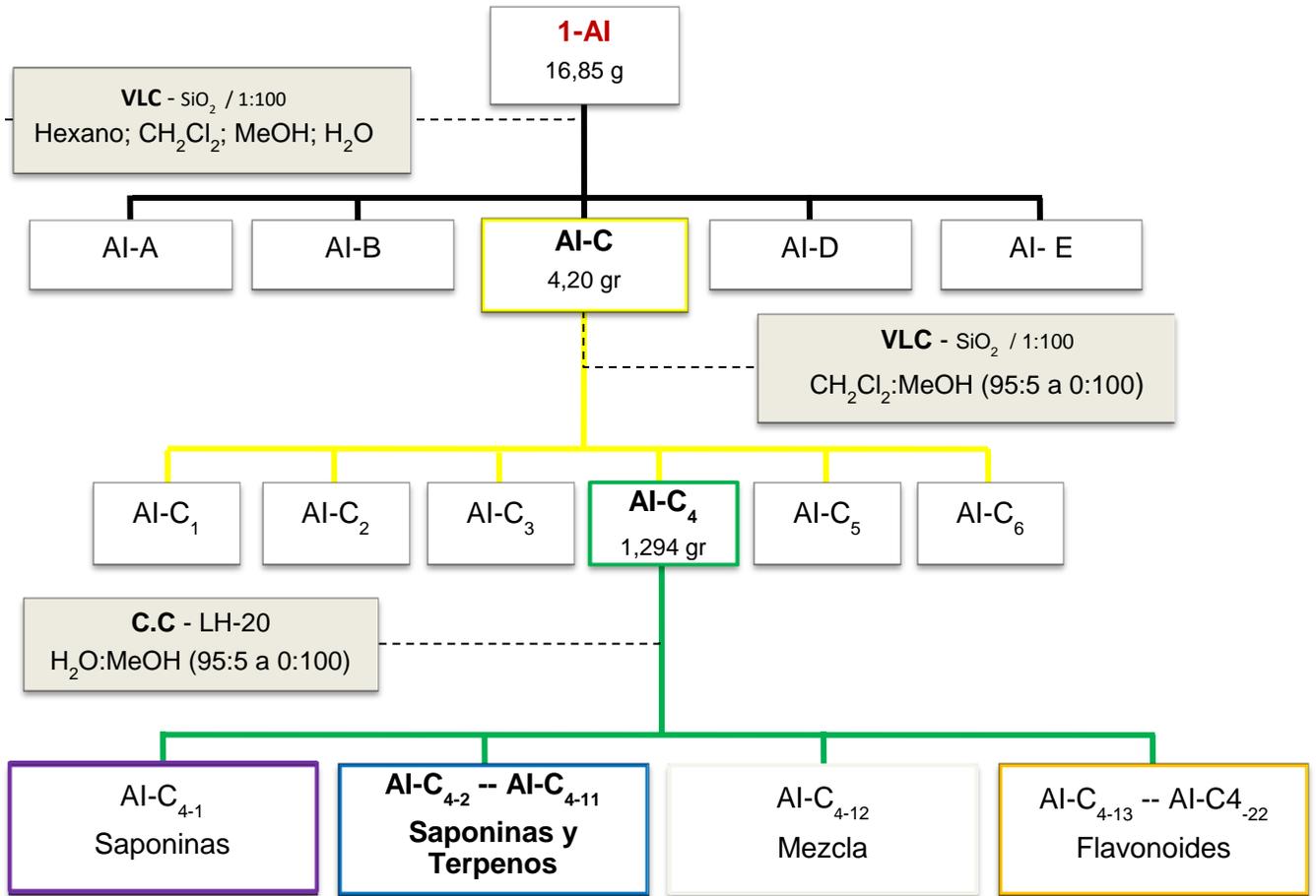


Figura 22. Placa de fracciones obtenidas en CC- LH-20 realizada a l fracción Ai-C4.

AcOEt-MeO-H₂O (100:13,5:10) y rociado con vainillina-ácido sulfúrico

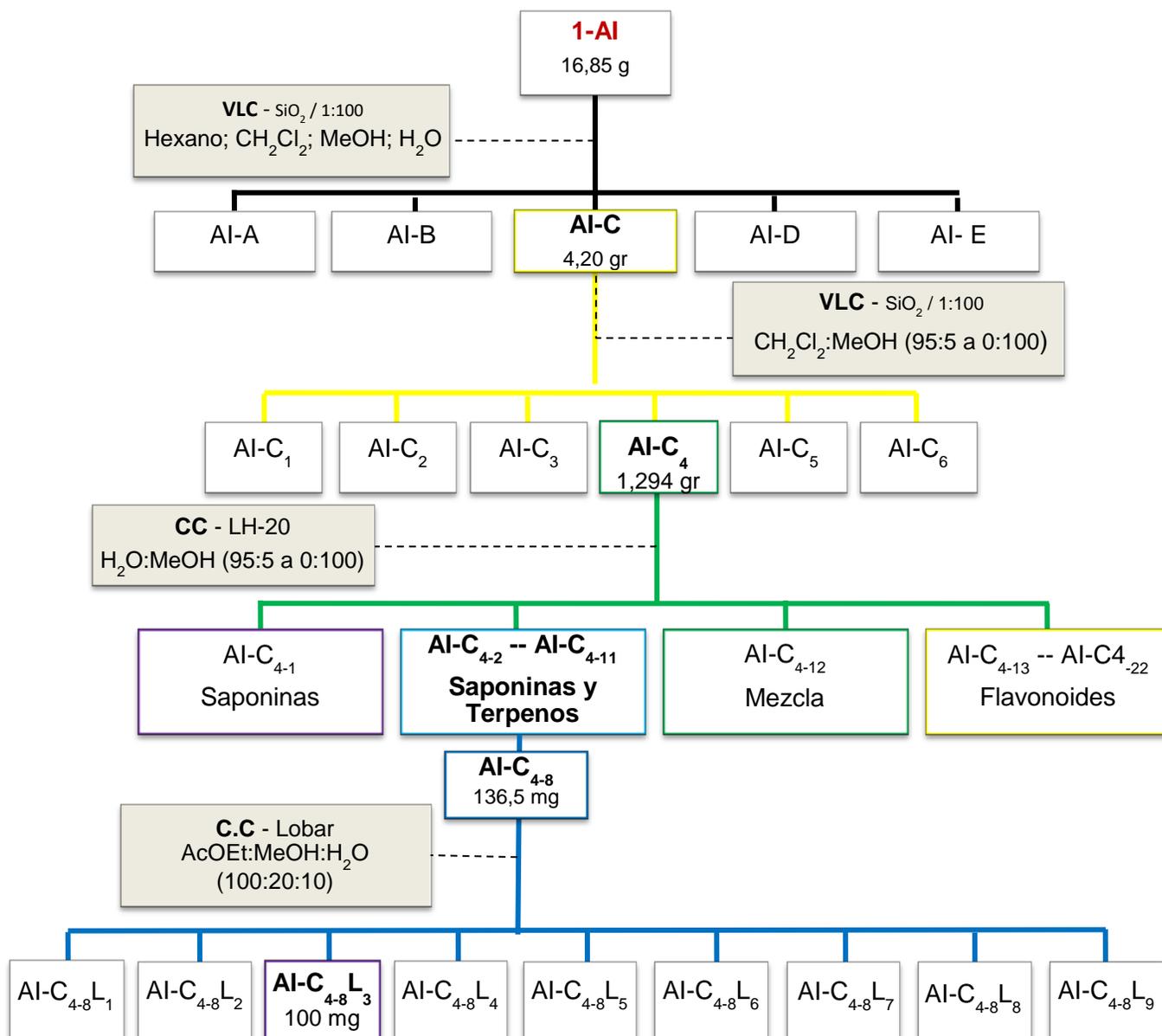
✦ Saponinas ✦ Terpenos y Saponinas ✦ Mezcla ✦ Flavonoides

Tabla 9. Fracciones obtenidas en la CC-LH-20 realizada al extracto **AI-C₄**.

Muestra	AI-C ₄		
Masa (g)	1,00		
Columna	Sephadex LH-20 (50 g; 24 x 2 cm)		
Fase móvil	H ₂ O-MeOH (100:0 → 0:100)		
Fracción	Muestra	Masa muestra (g)	Masa muestra (mg)
LH ₁₋₄	AI-C ₄₋₁	0,0405	40,5
LH ₅₋₄₀	AI-C ₄₋₂	0,0300	30,0
LH ₄₁₋₄₉	AI-C ₄₋₃	0,0568	56,8
LH ₅₀₋₅₂	AI-C ₄₋₄	0,0622	62,2
LH ₅₃₋₆₀	AI-C ₄₋₅	0,0508	50,8
LH ₆₁	AI-C ₄₋₆	0,0008	0,8
LH ₆₂₋₆₈	AI-C ₄₋₇	0,0855	85,5
LH ₆₉₋₈₇	AI-C ₄₋₈	0,1956	195,6
LH ₈₈₋₉₀	AI-C ₄₋₉	0,0175	17,5
LH ₉₁	AI-C ₄₋₁₀	0,0341	34,1
LH ₉₂₋₉₅	AI-C ₄₋₁₁	0,1325	132,5
LH ₉₆₋₉₈	AI-C ₄₋₁₂	0,0284	28,4
LH ₉₉₋₁₀₀	AI-C ₄₋₁₃	0,0182	18,2
LH ₁₀₁	AI-C ₄₋₁₄	0,0101	10,1
LH ₁₀₂₋₁₀₅	AI-C ₄₋₁₅	0,0227	22,7
LH ₁₀₆	AI-C ₄₋₁₆	0,0061	6,1
LH ₁₀₇	AI-C ₄₋₁₇	0,0095	9,5
LH ₁₀₈₋₁₁₀	AI-C ₄₋₁₈	0,0191	19,1
LH ₁₁₁	AI-C ₄₋₁₉	0,0000	0,0
LH ₁₁₂	AI-C ₄₋₂₀	0,0048	4,8
LH ₁₁₃₋₁₁₆	AI-C ₄₋₂₁	0,0245	24,5
LH ₁₁₇₋₁₅₀	AI-C ₄₋₂₂	0,1560	156,0
Total		0,7646	765
Rendimiento (%)		76,5	76,5

La fracción **AI-C₄₋₈** (136,5 mg) fue sometió a una columna Lobar Tipo A de sílica gel utilizando como fase móvil de AcOEt-MeOH-H₂O (100:20:10) (Esquema 6), obteniendo así 267 fracciones, las cuales, fueron unidas según el factor de retención y perfil cromatográfico observado por CCF para finalmente llegar a nueve fracciones colectivas denominadas de **AI-C₄₋₈L₁ – AI-C₄₋₈L₉** (Figura 23, Tabla 10).

Esquema 6. Separación cromatográfica de C.C Lobar **AI-C₄₋₈**.



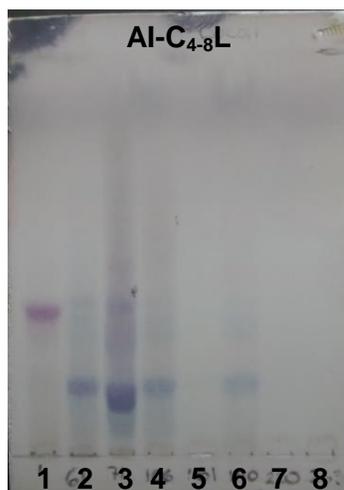


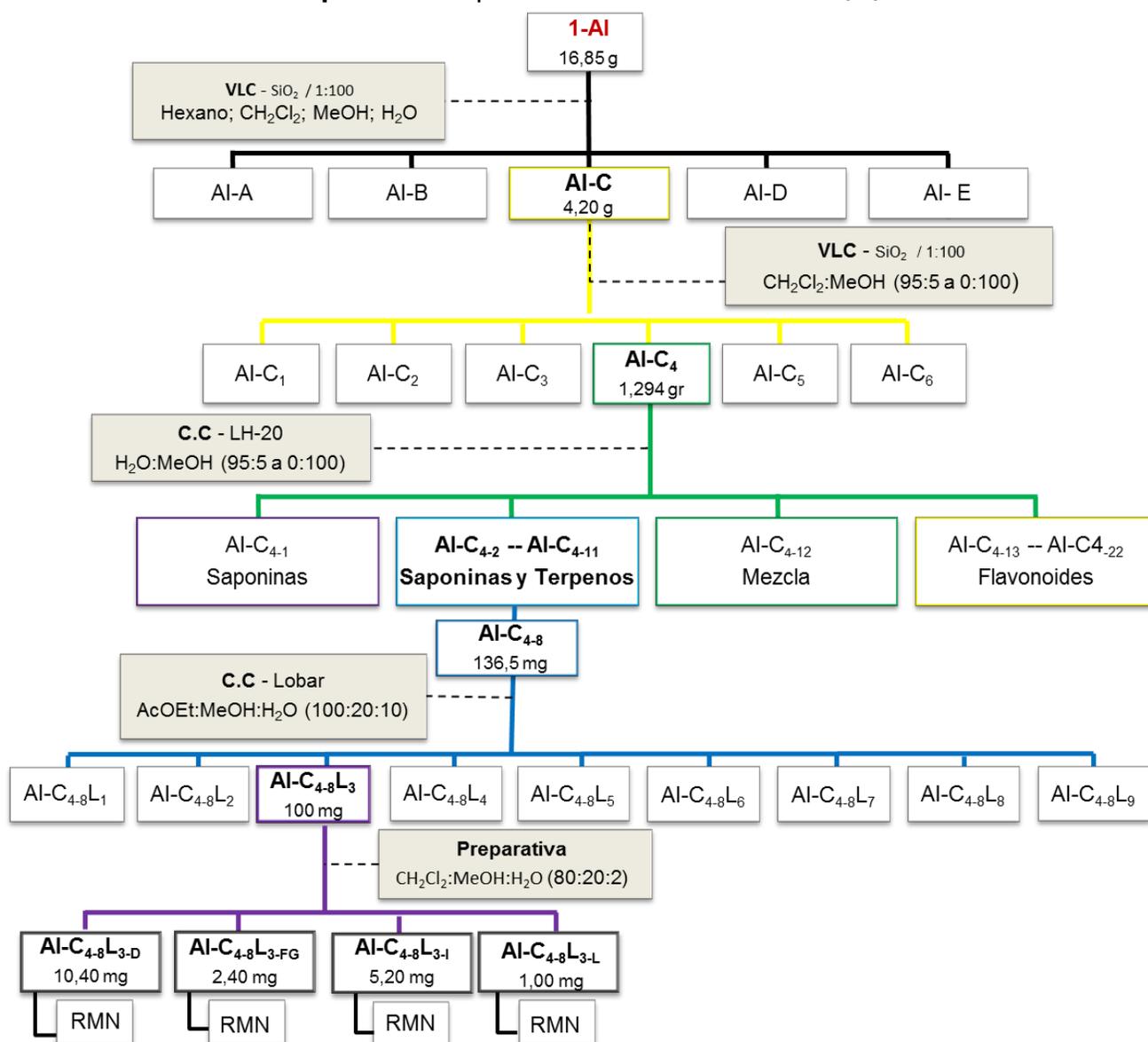
Figura 23. Placa de fracciones obtenidas en la Lobar realizada a la fracción **Ai-C₄₋₈**.
AcOEt-MeO-H₂O (100:13,5:10); Rociado con vainillina-ácido sulfúrico

Tabla 10. Fracciones obtenidas en la CC- Lobar realizada a la fracción **Ai-C₄₋₈**.

Muestra		Ai-C ₄₋₈	
Masa (mg)		136,5	
Columna		Lobar Si60 (40-63µm)	
Fase móvil		AcOEt : MeOH : H ₂ O	
Fracción	Muestra	Masa muestra (g)	Masa muestra (mg)
L ₁₋₆₀	Ai-C ₄₋₈ L ₁	0,0032	3,2
L ₆₁₋₇₀	Ai-C ₄₋₈ L ₂	0,0021	2,1
L ₇₁₋₁₀₅	Ai-C ₄₋₈ L ₃	0,1035	103,5
L ₁₀₆₋₁₈₀	Ai-C ₄₋₈ L ₄	0,0001	0,1
L ₁₈₁₋₁₈₉	Ai-C ₄₋₈ L ₅	0,0017	1,7
L ₁₉₀₋₂₁₈	Ai-C ₄₋₈ L ₆	0,0057	5,7
L ₂₂₀₋₂₅₀	Ai-C ₄₋₈ L ₇	0,0000	0,0
L ₂₅₁₋₂₆₂	Ai-C ₄₋₈ L ₈	0,0010	1,0
L ₂₆₃₋₂₆₇	Ai-C ₄₋₈ L ₉	0,0038	3,8
Total		0,1211	121
Rendimiento (%)		88,7	88,7

La fracción **AI-C₄₋₈L₃** se sometió a una separación en una placa preparativa de sílica gel 20x20 desarrollada con un sistema de solvente de CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (80:20:10) obteniendo 18 fracciones (Esquema 7), nombradas **AI-C₄₋₈L_{3-A} – AI-C₄₋₈L_{3-R}**. Al ser analizadas por CCF se observaron bandas unitarias y bien definidas (Figura 24, Tabla 11). Las fracciones **AI-C₄₋₈L_{3-D}**, **AI-C₄₋₈L_{3-FG}**, **AI-C₄₋₈L_{3-I}**, **AI-C₄₋₈L_{3-L}** fueron analizadas por RMN 1D y 2D, cuyos resultados son discutidos más adelante.

Esquema 7. Separación de la fracción **AI-C₄₋₈L₃**.



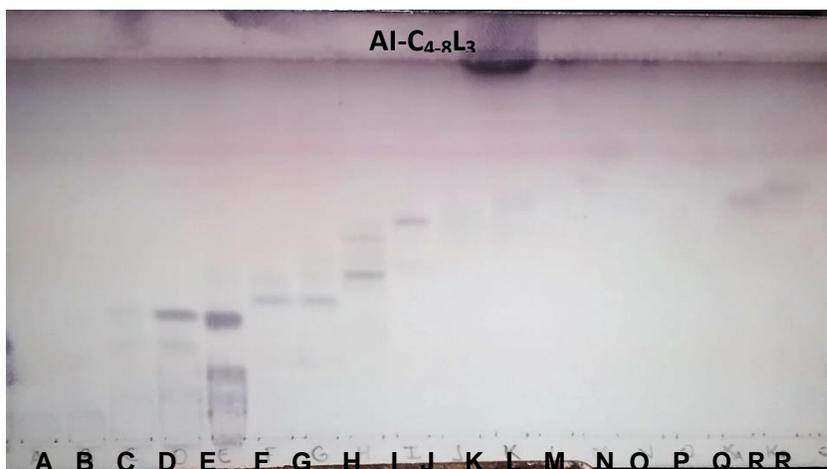


Figura 24. Placa de fracciones obtenidas de placa preparativa de la fracción **Ai-C_{4.8}L₃**.
CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (80:20:2) (50-70-100%)**; p-Anisaldehido

** Desarrollada tres veces, primero al 50 %, la segunda vez hasta su 70% y finalmente desarrollada al 100%

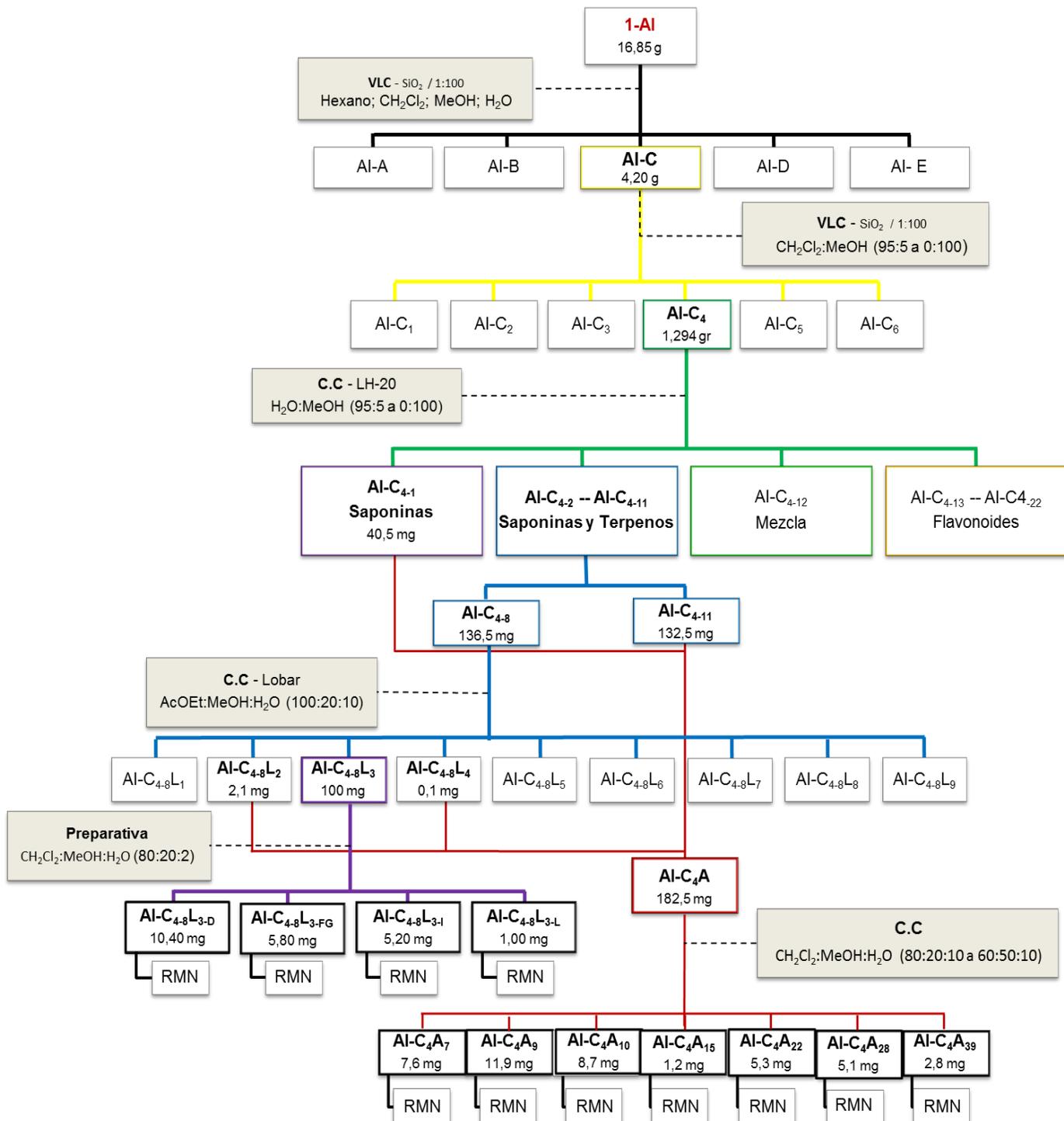
Tabla 11. Fracciones obtenidas en la preparativa realizada a l fracción **Ai-C₄₋₈L₃**.

Muestra		Ai-C ₄₋₈ L ₃	
Masa (mg)		100	
Placa		Preparativa (20x20)	
Fase móvil		CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O	
Fracción	Muestra	Masa muestra (g)	Masa muestra (mg)
A	Ai-C ₄₋₈ L _{3-A}	0,00520	5,20
B	Ai-C ₄₋₈ L _{3-B}	0,00290	2,90
C	Ai-C ₄₋₈ L _{3-C}	0,00280	2,80
D	Ai-C₄₋₈L_{3-D}	0,01040	10,40
E	Ai-C ₄₋₈ L _{3-E}	0,01380	13,80
F	Ai-C₄₋₈L_{3-F}	0,00240	2,40
G	Ai-C₄₋₈L_{3-G}	0,00340	3,40
H	Ai-C ₄₋₈ L _{3-H}	0,00860	8,60
I	Ai-C₄₋₈L_{3-I}	0,00520	5,20
J	Ai-C ₄₋₈ L _{3-J}	0,00000	0,00
K	Ai-C ₄₋₈ L _{3-K}	0,00060	0,60
L	Ai-C₄₋₈L_{3-L}	0,00100	1,00
M	Ai-C ₄₋₈ L _{3-M}	0,00080	0,80
N	Ai-C ₄₋₈ L _{3-N}	0,00080	0,80
O	Ai-C ₄₋₈ L _{3-O}	0,00080	0,80
P	Ai-C ₄₋₈ L _{3-P}	**	**
Q	Ai-C ₄₋₈ L _{3-Q}	**	**
R	Ai-C ₄₋₈ L _{3-R}	**	**
S	Ai-C ₄₋₈ L _{3-S}	**	**
Total		0,0587	58,70
Rendimiento (%)		58.7	58,7

** No se poseen los pesos

Luego, por comparación en las placas cromatográfica de las diferentes columnas, según el color y factores de retención, se decidió unir las fracciones **Ai-C₄₋₁**, **Ai-C₄₋₁₁** extraídas de la CC Sephadex LH20 (Esquema 5) y las fracciones **Ai-C_{4-8L₂}** y **Ai-C_{4-8L₄}** extraídas de la CC Lobar (Esquema 6), esta unión se nombró **Ai-C_{4A}** (182,5 mg) y fue purificada a través de una CC (sílica gel) eluída la mezcla CH₂Cl₂-MeOH-H₂O con un gradiente de polaridad creciente (80:20:10 → 60:50:10), y se colectaron 474 fracciones de aproximadamente 1 mL cada una, las cuales fueron analizadas por cromatografía de capa fina y unidas en 50 fracciones colectivas según su perfil fitoquímico. Debido a la poca masa y lo complejo de algunas fracciones, se eligieron siete fracciones para los análisis de RMN en una y dos dimensiones. Las fracciones respectivas son: **Ai-C_{4A7}**, **Ai-C_{4A9}**, **Ai-C_{4A10}**, **Ai-C_{4A15}**, **Ai-C_{4A22}**, **Ai-C_{4A28}** y **Ai-C_{4A39}**.

Esquema 8. Separación cromatográfica completa de 1-Ai



8. RESULTADO Y DISCUSIONES

Aplicando la metodología experimental descrita anteriormente se logró Aislar ocho saponinas y un terpeno. En este trabajo se discutirá la identidad de cuatro de estas saponinas.

El extracto metanólico de las ramas y hojas de *Arrabidaea inaequalis* posee una cantidad relativamente alta de saponinas tal como lo demuestra la prueba de la espuma (Figura 25) y las separaciones por cromatografía de capa fina realizadas. Las saponinas poseen propiedades tensoactivas que les permite formar micelas en agua, por ello al agitar una solución acuosa de saponinas estas generan espuma[37]. Los compuestos Aislados revelaron como manchas púrpuras-azules al tratarlas con *v*Ainillina-ácido sulfúrico o en *p*-anisaldehido, sugiriendo su naturaleza terpenoidal.

La caracterización de los compuestos, se llevó a cabo a través de técnicas espectroscópicas como: RMN de ^1H y ^{13}C , DEPT 135, HMBC y HMQC y por comparación con estructuras en la bibliografía.



Figura 25. Prueba de la espuma para identificar presencia de saponinas.

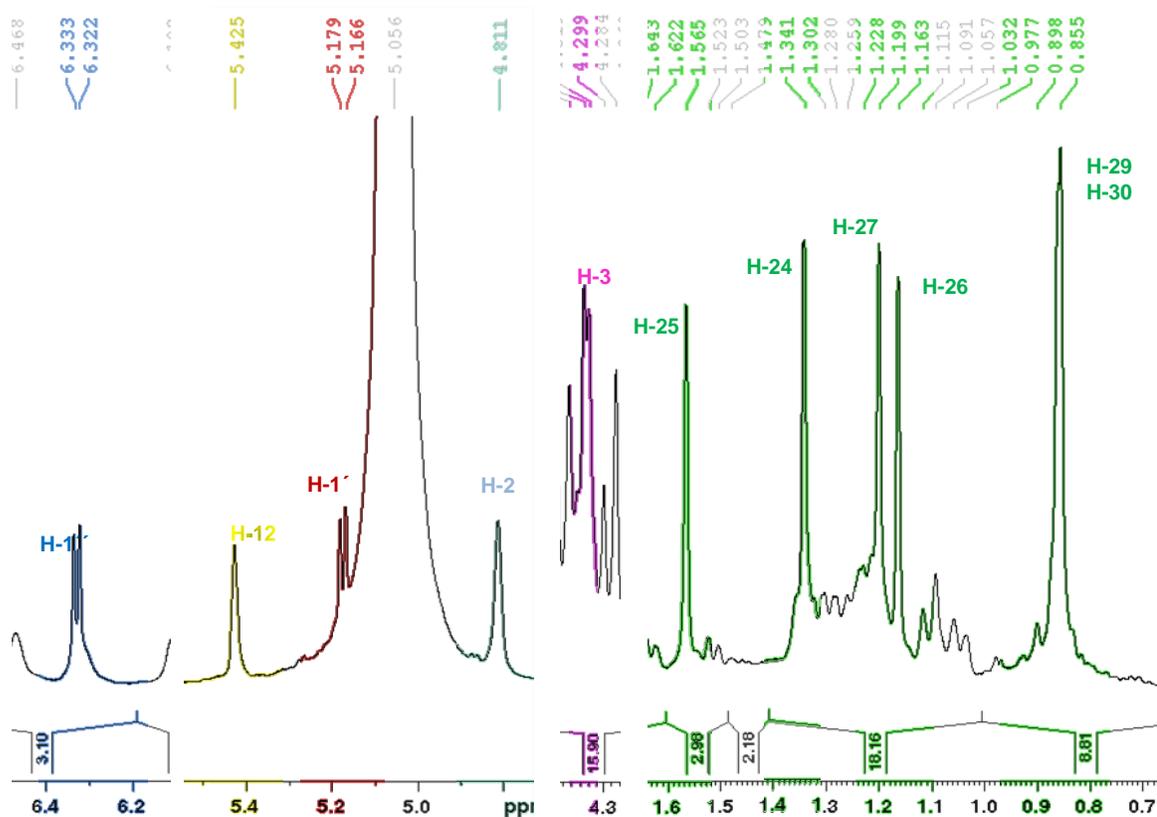
8.1 Compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-FG}

El compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-FG} (5,8 mg) fue un sólido blanco que se obtuvo a través de una placa preparativa eluída con una mezcla CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (80:20:10), fue soluble en solventes polares como agua y metanol e insoluble en solventes no polares como hexano. En la CCF, eluída con mismo sistema de desarrollo que la placa preparativa, se observó como una banda de coloración azul-violeta en el visible y un R_f = 0,38, luego de ser revelada con p-Anisaldehído en ácido sulfúrico (AS), y represento el 0,028% con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M.

La estructura del compuesto fue elucidada mediante el análisis de datos espectrales de RMN de una y dos dimensiones; específicamente ¹H, ¹³C, DEPT-135, HMQC y HMBC, en piridina-d₅. Los datos espectroscópicos obtenidos son característicos de un triterpeno del tipo oleanano bidesmosídico con 2 unidades de azúcares (Tablas 12 y 13).

En el espectro RMN ¹H (Espectro 1) se observaron 6 singletes a campo alto que integran para tres protones cada uno, en 0,86; 1,16; 1,20; 1,34 y 1,56 ppm, (la señal en 0,86 pm corresponde a 2 singletes solapados) correspondientes a seis metilos sobre seis carbonos cuaternarios, característicos de compuestos triterpenoidales con núcleos oleananos sustituidos. Así mismo, se observan dos señales de metinos oxigenados centrados en 5,17 ppm (d; 7,8 Hz) y 6,32 ppm (d; 8,4 Hz) asignadas a protones sobre carbonos anoméricos. Con el desplazamiento a campo bajo del segundo protón anomérico, se deduce que dicha fracción glicosídicas se encuentra unida a un grupo desapantallante, indicando que la aglicona es bidesmosídica, es decir, la aglicona se encuentra sustituida por solo una unidad de azúcar en dos posiciones o disustituida. En 5,43 ppm se observó un singlete ancho (sa) asociado a un metino de una olefina alílica

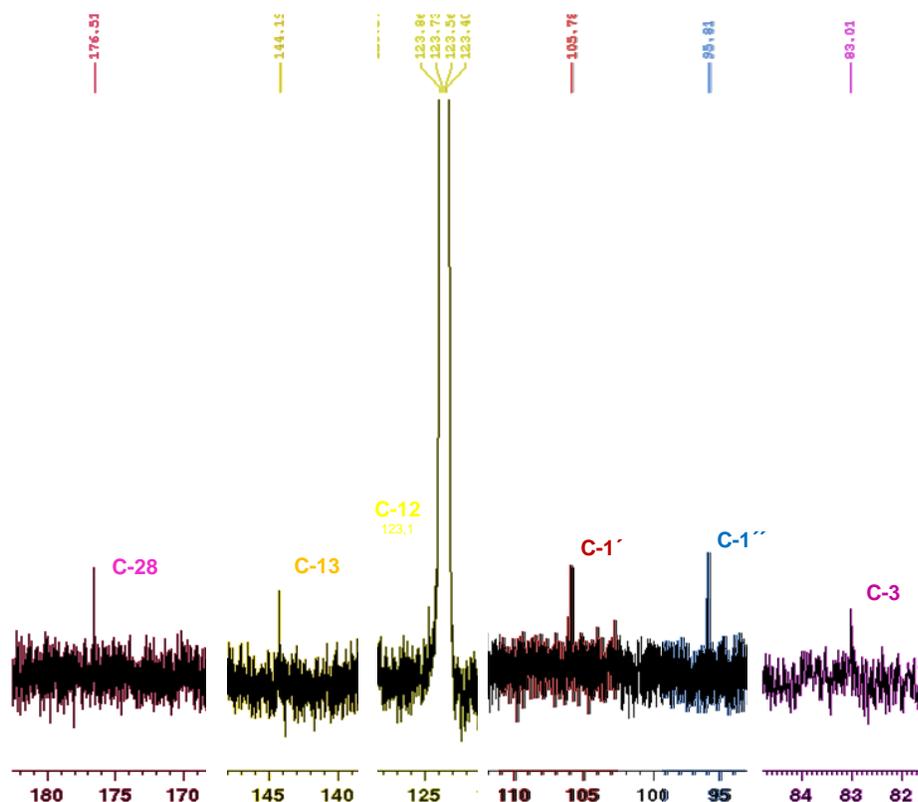
trisustituida. Adicionalmente, se observan dos señales de metinos oxigenados centrados en 4,32 ppm (d; 3 Hz) y 4,82 ppm (sa).



Espectro 1. RMN-¹H para Ai-C₄₋₈L₃-FG. (Piridina d₅; 600 MHz)

En el análisis del espectro de RMN-¹³C tomado en piridina-d₅ (Espectro 2), se observan 42 señales, correspondientes a 6 metilos, 12 metilenos (tres de ellos unidos a oxígeno), 16 metinos (siete de ellos unidos a oxígeno) y 8 carbonos cuaternarios, según lo observado en el espectro de DEPT-135 (Espectro xx), destacando las señales en 176,5 ppm, correspondiente a un grupo éster (COOR), dos carbonos desapantallados, en 144,2 ppm y 123,1 ppm, confirmando la presencia de un doble enlace en la molécula y un metino unido a un heteroátomo en 83,0 ppm. Asimismo, fue posible observar señales en 105,9 y 95,8 ppm asociada a los carbonos anoméricos que junto a las señales observadas en 62,7 y 62,2 ppm, de fase invertida en DEPT-135, permiten

inferir que el núcleo oleanano posee dos unidades de glucosa. Finalmente, se observa una señal en 65,4 ppm correspondiente al átomo de carbono de un grupo hidroximetílico, indicando que uno de los metilos del núcleo oleanano se encuentra oxidado, y un metino unido a oxígeno en 70,6 ppm sugiriendo la oxidación de un metileno de la estructura del oleanano.

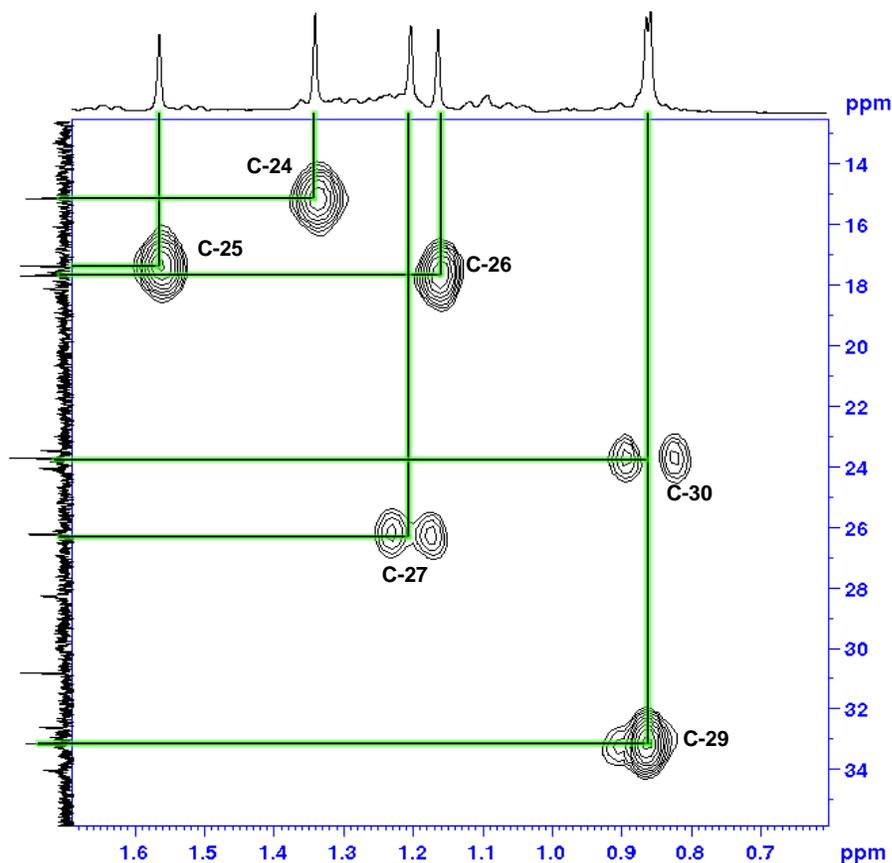


Espectro 2. RMN ^{13}C para el Compuesto Ai-C₄₋₈L₃-FG. (Piridina d₅; 600 MHz)

El análisis anterior permite inferir la presencia de una saponina triterpenica del tipo oleanano con dos unidades de glucosa.

El análisis del espectro de HMQC (Espectros 3-4) permite asignar inequívocamente las señales observadas en el espectro de protones con sus átomos de carbonos (Tabla 12). De esta manera, la señal en 0,86 ppm se asignó a los metilos C-

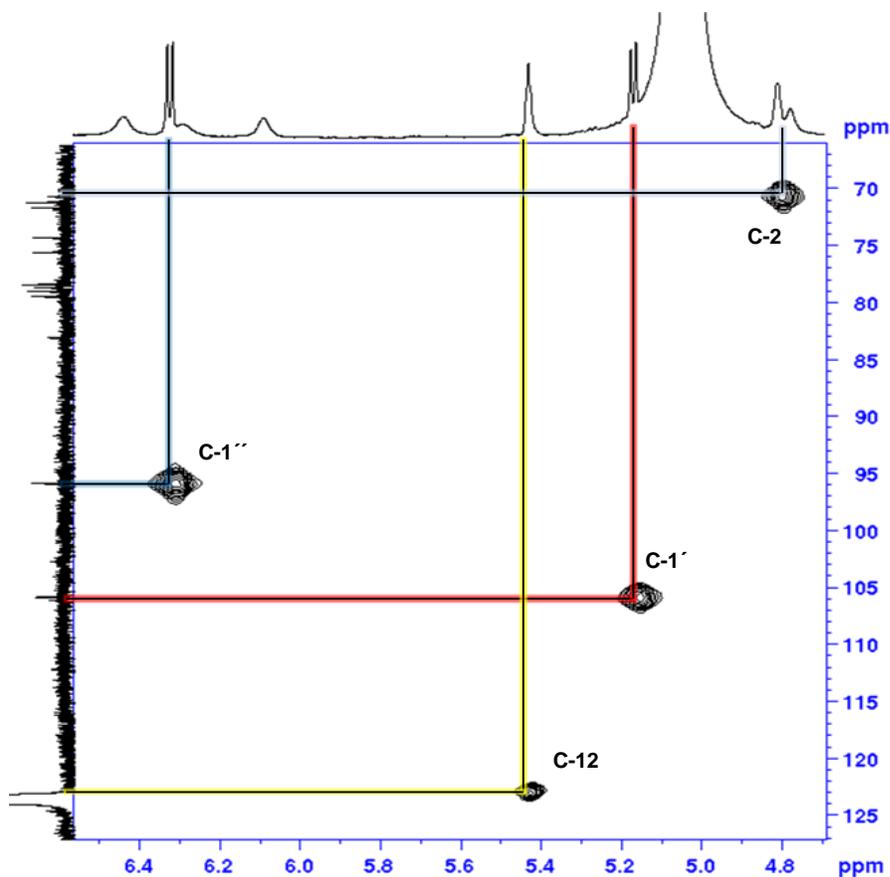
29 y C-30 con desplazamientos en 23,1 y 33,1 ppm, respectivamente. Mientras que, los singletes en 1,16; 1,20; 1,34 y 1,56 ppm, se asignaron a los carbonos C-26, C-27, C-24 y C-25, respectivamente.



Espectro 3. HMQC para Ai-C₄₋₈L₃-FG. (Piridina d₅; 600 MHz)
Ampliación 13-35 ppm -/ 0,6-1,7 ppm

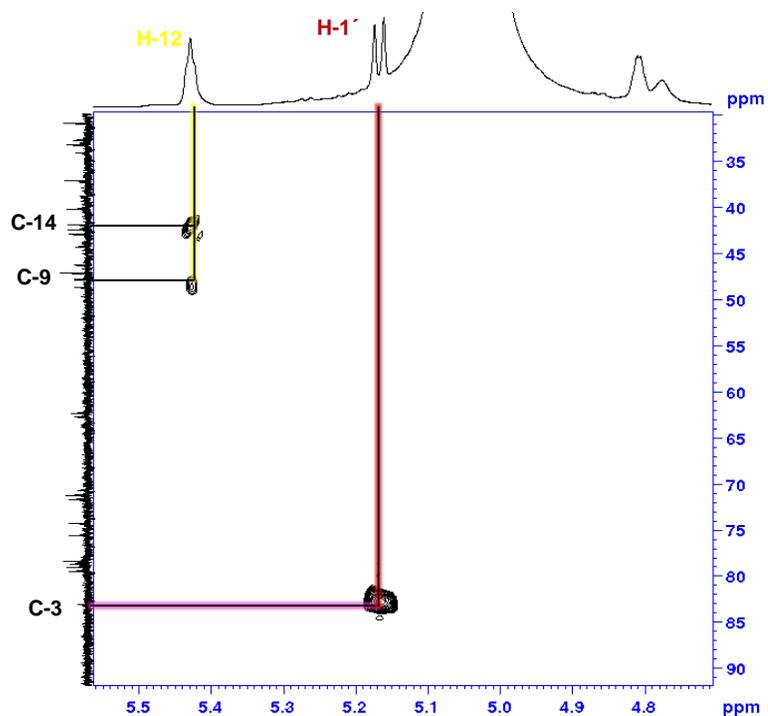
En el espectro de HMQC (Espectro 4) se observa la correlación de los protones del metino H-1' en 5,17 (d, $J=7,8$ Hz) y H-1'' en 6,32 (d; $J=8,4$ Hz), con las señales de los carbonos en 105,8 ppm y 95,5 ppm, respectivamente, que junto a las señales de H-6' en 4,28 ppm (62,7 ppm) y H-6'' en 4,47 ppm (62,2 ppm) confirman la presencia de dos unidades de glucosa, los desplazamientos encontrados permiten inferir la presencia del isómero β -D-glucosa. Asimismo, el singlete en 5,43 ppm, de la olefina alílica, se correlaciona con el carbono 123,1 ppm y fue asignado al protón H-12 del esqueleto

oleanano (Espectro 4). Por otro lado, el metino en 83,0 ppm está unido a un protón en 4,32 (d; $J=3$ Hz) y fue asignado a C-3. Es importante señalar que el carbono en 70,6 ppm asociado a un singlete ancho en 4,8 ppm fue asignado al C-2 al comprobar el efecto apantallante sobre C-1 (44,2 ppm) (Tabla 12).



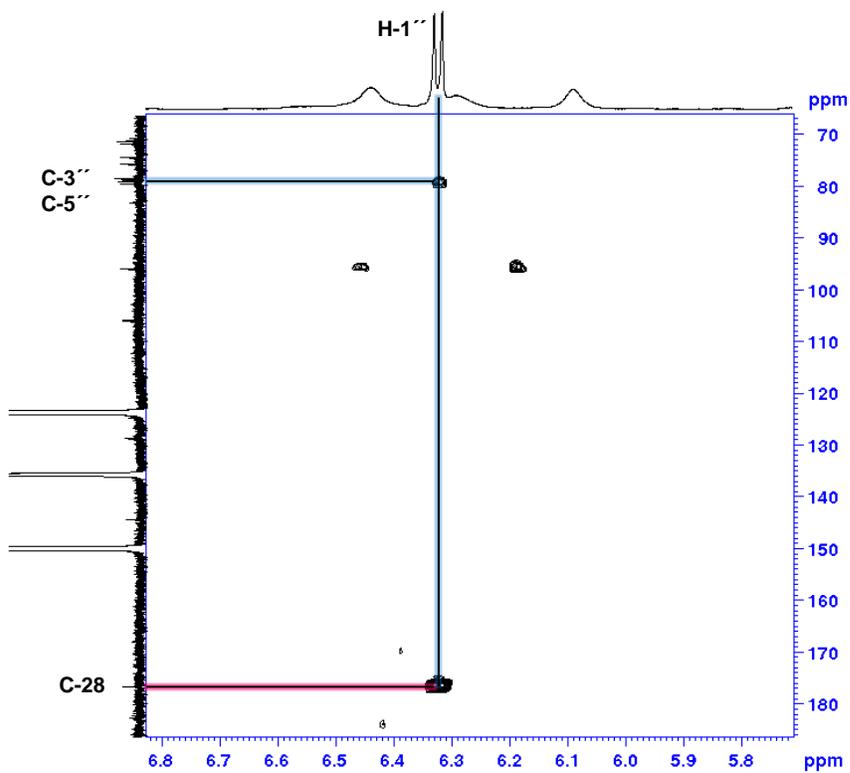
Espectro 4. HMQC para Ai-C₄₋₈L_{3-FG}. (Piridina d₅; 600 MHz)
Ampliación 70-125 ppm -/ 4,9-6,4 ppm.

El espectro HMBC (Espectros 5 y 6) permitió corroborar la asignación de los protones y carbonos del núcleo oleanano y asignar, de manera inequívoca, la posición de las señales de las glucosas. Así, el protón H-1' en 5,17 ppm se correlacionó con C-3 en 83,0 ppm (Espectro 5) y el protón H-1'' en 6,32 ppm, desapantallado en relación a H-1', se correlacionó con el carbono del carbonilo C-28 indicando que se trataba de una saponina bidesmosídica (Espectro 6).



Espectro 5. HMBC para Ai-C₄₋₈L₃-FG. (Piridina d₅; 600 MHz)

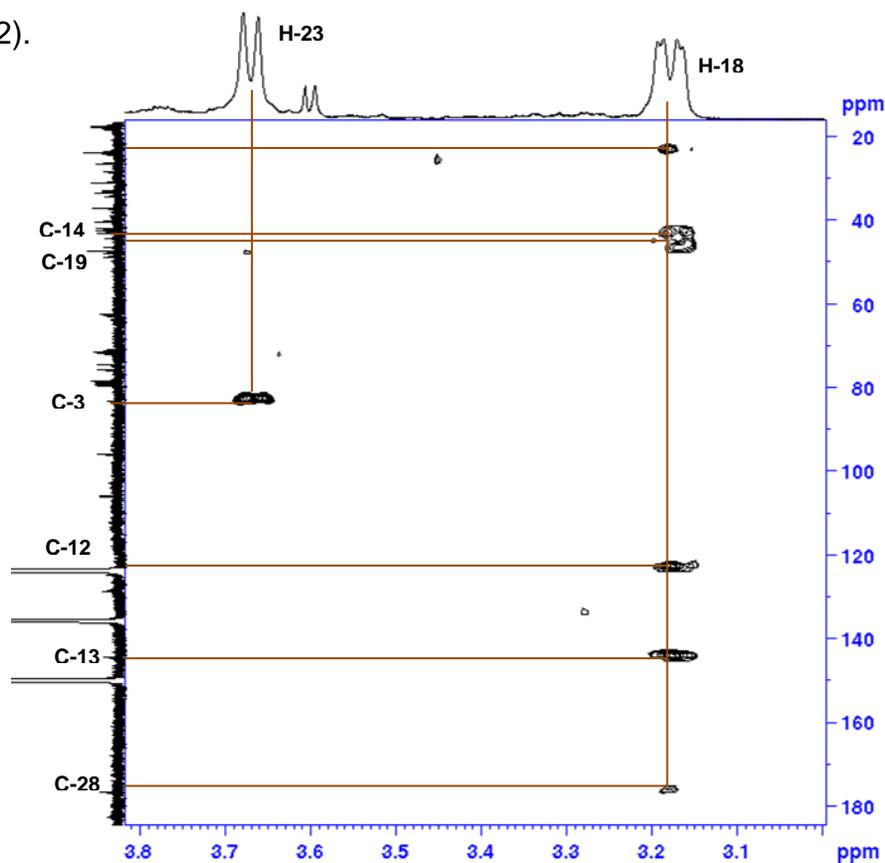
Ampliación 35-90ppm +/- 3,9-5,5 ppm



Espectro 6. HMBC para Ai-C₄₋₈L₃-FG. (Piridina-d₅; 600 MHz)

Ampliación 70-180 ppm +/- 5,8-6,8 ppm

El estudio detallado del espectro bidimensional HMBC permitió observar la relación de H-12 con la señal C-18 (41,8 ppm), confirmando la presencia del doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13. Por otro lado, fue posible confirmar la posición de C-3 por la correlaciones H-23↔C-3 y H-24↔C-3; la posición de C-1 se asignó mediante la interacción entre los átomos H-25↔C-1 y la posición de C-2 oxidado a través de las interacciones de H-1↔C-2. Otras correlaciones observadas en HMBC son indicadas a continuación: **H-23**↔ C-3, C-4, C-5 y C-24; **H-24**↔C-3, C-4, C-5 y C-23; **H-25**↔C-1, C-5, C-10 y C-9; **H-26**↔C-7, C-8, C-9 y C-14; **H-27**↔C-8, C-13, C-14 y C-15; **H-29**↔C-19, C-20 y C-30 y **H-30**↔C-19, C-20 y C-21. Por último, la correlación de los protones asignados a H-18 permitió confirmar la posición de los carbonos adyacentes a este, entre ellos C-28, a través de las interacciones: **H-18**↔C-12, C-13, C-16, C-19 y C-28 (Tabla 12).



Espectro 7. HMBC para Ai-C₄₋₈L_{3-FG}. (Piridina-d₅; 600 MHz)
Ampliación 20-180 ppm -/ 3,8-3,8 ppm

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm), RMN-¹H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC para el compuesto Al-C₄₋₈L_{3-FG}. (Piridina-*d*₅; 600 MHz)

Nº C	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm) y J (Hz)	HMBC	DEPT
1	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm) y J (Hz)	HMBC	DEPT
2	44,2	α 1,20; <i>m</i> β 2,25 (<i>d</i> ; J=12,8 Hz)	C-2, C-3, C-5, C-9, C-25	-CH ₂ -
3	70,6	4,81; <i>m</i>	-	>CH-OH
4	83,0	4,32 (<i>d</i> ; J=3 Hz)	C-4, C-23, C-24, C-1'	>CH-O-
5	42,8	-	-	C
6	48,6	1,73; <i>m</i>	C-4, C-6, C-24, C-10, C-5, C-1, C-9	>CH-
7	18,1	α 1,40; <i>m</i> β 1,50; <i>m</i>	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10	-CH ₂ -
8	32,9	α 1,30; <i>m</i> β 1,73; <i>m</i>	C-6	-CH ₂ -
9	40,1	-	-	C
10	47,7	1,72; <i>m</i>	C-1, C-7, C-8, C-10, C-25, C-26	>CH-
11	37,0	-	-	C
12	24,0	1,97; <i>m</i>	C-8, C-12, C-13	-CH ₂ -
13	123,1	5,43; <i>s</i>	C-17, C-14, C-18	=CH-
14	144,2	-	-	=C<
15	42,3	-	-	C
16	28,3	α 1,25; <i>m</i> β 2,31; <i>m</i>	C-13, C-14, C-16 C-12, C-13	-CH ₂ -
17	23,4	α 1,91; <i>m</i> β 2,09; <i>m</i>	C-28	-CH ₂ -
18	47,0	-	-	C
19	41,8	3,19 (<i>dd</i> ; J= 4,2 Hz)	C-12, C-13, C-14, C-16, C- 17, C-19, C-28	>CH-
20	46,2	α 1,22, <i>m</i> β 1,71 <i>m</i>	C-13, C-18, C-20, C-29	-CH ₂ -
21	30,8	-	-	C
22	34,0	α 1,10 <i>m</i>	C-17, C-29, C-30	-CH ₂ -
23	32,6	α 1,70 <i>m</i> β 1,85, <i>m</i>	C-18, C-20	-CH ₂ -
24	65,4	3,68 (<i>d</i> ; J= 10,2 Hz)	C-3, C-4, C-5, C-24	-CH ₂ -OH
25	17,3	1,56; <i>s</i>	C-1, C-5, C-9, C10	-CH ₃
26	17,6	1,16; <i>s</i>	C-7, C-8, C-9, C-14	-CH ₃
27	26,2	1,20; <i>s</i>	C-8, C-13, C-14, C-15	-CH ₃
28	176,5	-	-	-COOR
29	33,1	0,86; <i>s</i>	C-19, C-20, C-21	-CH ₃
30	23,7	0,86; <i>s</i>	C-19, C-20, C-21	-CH ₃

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C δ (ppm), RMN- ^1H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de los azúcares de Al-C₄₋₈L_{3-FG}. (Piridina- d_5 ; 600 MHz).

Nº C	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm) y J (Hz)	HMBC	DEPT
Glucosa I (C-3)				
1'	105,8	5,17 (<i>d</i> ; $J=7,8$ Hz)	C-3	>CH-
2'	75,5	4,20; <i>m</i>	C-3', C-5	>CH-
3'	78,6	4,17 (<i>t</i> ; $J=9$ Hz)	C-1', C-5'	>CH-
4'	71,6	4,23 (<i>t</i> ; $J=9$ Hz)	C-5', C-3'	>CH-
5'	78,3	3,91; <i>m</i>	C-2'	>CH-
6'	62,7	4,28; <i>m</i> 4,47; <i>m</i>	C-4'	-CH ₂ -OH
Glucosa II (C-28)				
1''	95,8	6,32 (<i>d</i> ; $J=8,4$ Hz)	C-28	>CH-
2''	74,2	4,19; <i>m</i>	C-1'', C-3'', C-5''	>CH-
3''	79,4	4,21; <i>m</i>	C-5''	>CH-
4''	71,2	4,32	C-5'', C-3''	>CH-
5''	78,9	4,30 (<i>t</i> ; $J=9$ Hz)	C-2'', C-4''	>CH-
6''	62,2	4,47 (<i>d</i> ; $J=12,6$ Hz)	C-4''	-CH ₂ -OH

Los espectros bidimensionales mostraron que el núcleo oleanano estaba oxidado en C-2 y C-23, permitiendo elucidar una saponina bidesmosídica derivada de la bayogenina. La Tabla 14 muestra la comparación de los desplazamientos en ^1H y ^{13}C para Al-C₄₋₈L_{3-FG} y su comparación con el glicósido de bayogenina, el éster 3-O-(β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil-28-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil) bayogenina[38].

Tabla 14. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm), RMN-¹H δ (ppm) para el compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-FG} y el glucósido de la bayogenina. (Piridina-d₅)^[38]

Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}				Glicósido de la Bayogenina ^[38]		
N° C	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm) y J (Hz)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm) y J (Hz)	DEPT
1	44,2	α 1,20; <i>m</i> β 2,25 (<i>d</i> ; <i>J</i> =12,8 Hz)	-CH ₂ -	44,0		-CH ₂ -
2	70,6	4,81; <i>sa</i>	-CH ₂ -	70,3	4,80; <i>sa</i>	-CH ₂ -
3	83,0	4,32 (<i>d</i> ; <i>J</i> =3 Hz)	>CH-O-	83,1	4,16 (<i>d</i> ; <i>J</i> =3Hz)	>CH-O
4	42,8	-	C	42,7		C
5	48,6	1,73; <i>m</i>	>CH-	48,5		>CH-
6	18,1	α 1,40; <i>m</i> β 1,50; <i>m</i>	-CH ₂ -	18,1		-CH ₂ -
7	32,9	α 1,30; <i>m</i> β 1,73; <i>m</i>	-CH ₂ -	33,0		-CH ₂ -
8	40,1	-	C	40,0		C
9	47,7	1,72; <i>m</i>	>CH-	48,2		>CH-
10	37,0	-	C	36,9		C
11	24,0	1,97; <i>m</i>	-CH ₂ -	24,0		-CH ₂ -
12	123,1	5,43; <i>s</i>	=CH-	123,1	5,48; <i>sa</i>	=CH-
13	144,2	-	=C<	144,3		=C<
14	42,3	-	C	42,3		C
15	28,3	α 1,25; <i>m</i> β 2,31; <i>m</i>	-CH ₂ -	28,3		-CH ₂ -
16	23,4	α 1,91; <i>m</i> β 2,09; <i>m</i>	-CH ₂ -	23,2		-CH ₂ -
17	47,0	-	C	47,4		C
18	41,8	3,19 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 4,2 Hz)	>CH-	41,7	3,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 4, 14)	>CH-
19	46,2	α 1,22; <i>m</i> β 1,71; <i>m</i>	-CH ₂ -	46,3		-CH ₂ -
20	30,8	-	C	30,9		C
21	34,0	α 1,10; <i>m</i>	-CH ₂ -	34,2		-CH ₂ -
22	32,6	α 1,70; <i>m</i> β 1,80; <i>m</i>	-CH ₂ -	32,7		-CH ₂ -
23	65,4	3,68 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 10,2 Hz)	-CH ₂ OH	65,8	3,64 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 11 Hz) 4,32 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 11 Hz)	CH ₂ OH
24	15,1	1,34; <i>s</i>	-CH ₃	14,8	1,34; <i>s</i>	-CH ₃
25	17,3	1,56; <i>s</i>	-CH ₃	17,2	1,51; <i>s</i>	-CH ₃
26	17,6	1,16; <i>s</i>	-CH ₃	17,5	1,09; <i>s</i>	-CH ₃
27	26,2	1,20; <i>s</i>	-CH ₃	26,1	1,24; <i>s</i>	-CH ₃
28	176,5	-	-COOR	176,2	-	COOR
29	33,1	0,86; <i>s</i>	-CH ₃	33,1	0,91; <i>s</i>	-CH ₃
30	23,7	0,86; <i>s</i>	-CH ₃	23,7	0,99; <i>s</i>	-CH ₃

Finalmente, la estructura propuesta para el compuesto **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}** (Figura 26) corresponde al *éster del ácido 3-O-β-D-glucopiranosil-28-O-β-D-glucopiranosil bayogenina*.

Es importante mencionar que no se han aislado saponinas del género *Arrabidaea*. El núcleo bayogenina es muy común en las familias *Caryocaraceae* y *Asteraceae* pero no han sido aisladas anteriormente en la familia *Bignoniaceae*. Por lo anterior, esta saponina se reporta como un nuevo compuesto para la bibliografía de productos naturales.

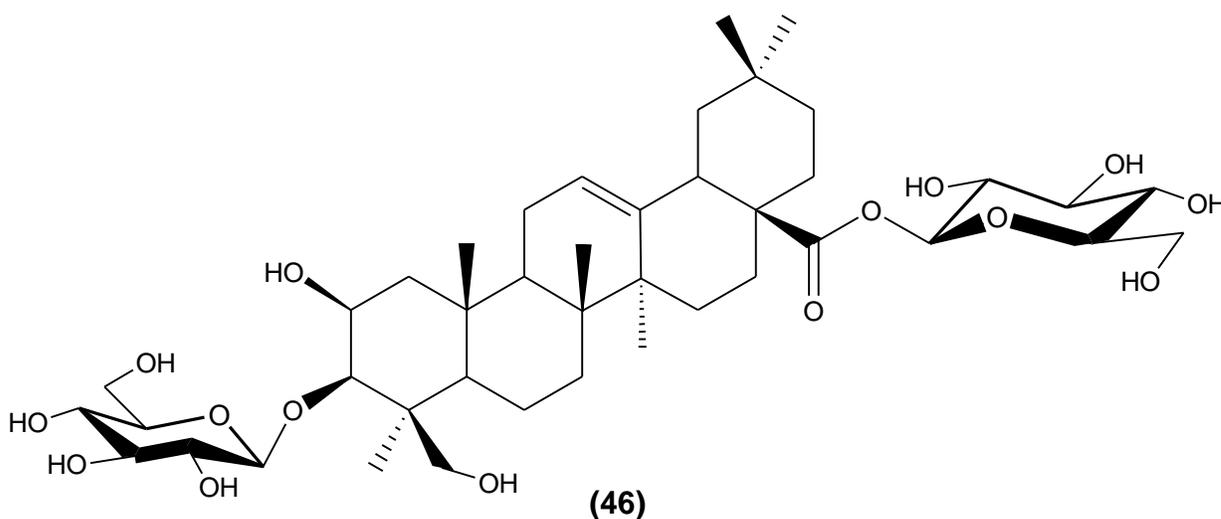


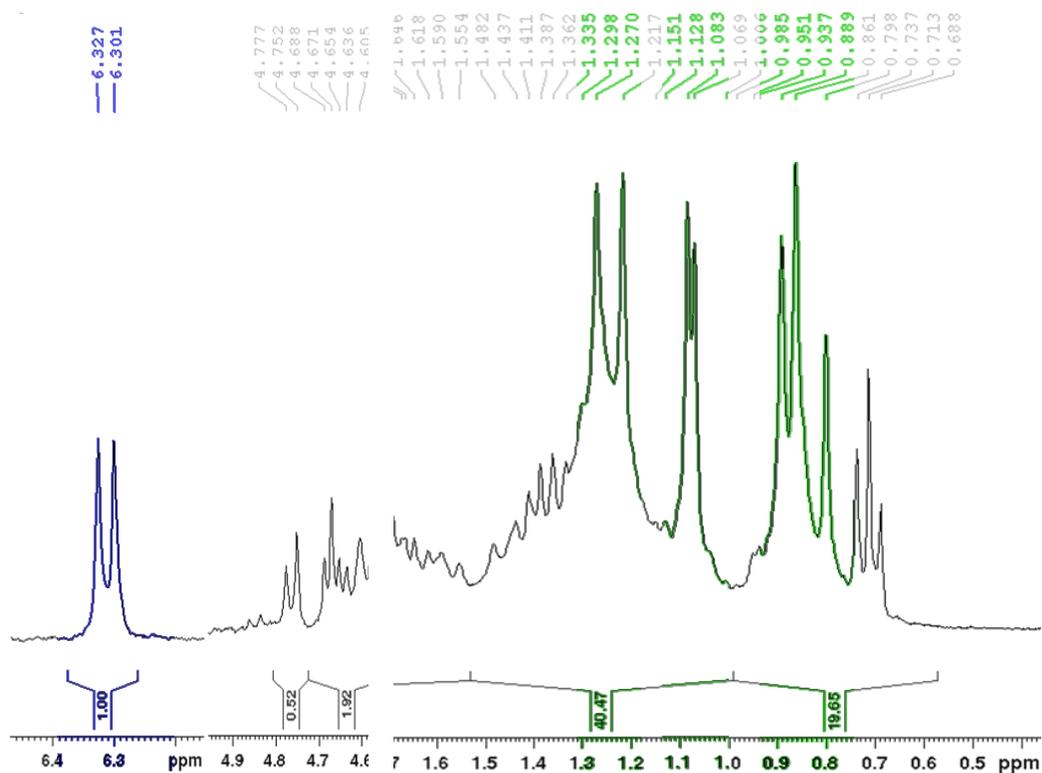
Figura 26. Estructura propuesta del compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-FG}

8.2 Compuesto Ai-C₄₋₈L₃₋₁

El compuesto Ai-C₄₋₈L₃₋₁ (5,20 mg) se aisló como un sólido ceroso blanco perlado, soluble en solventes polares e insoluble en solventes no polares, que al ser observado en CCF desarrollada con la mezcla CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (80:20:10) y revelada con p-Anisaldehído, se observó como una coloración azul-violeta en el visible y un R_f de 0,57, representando el 0,025% con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M.

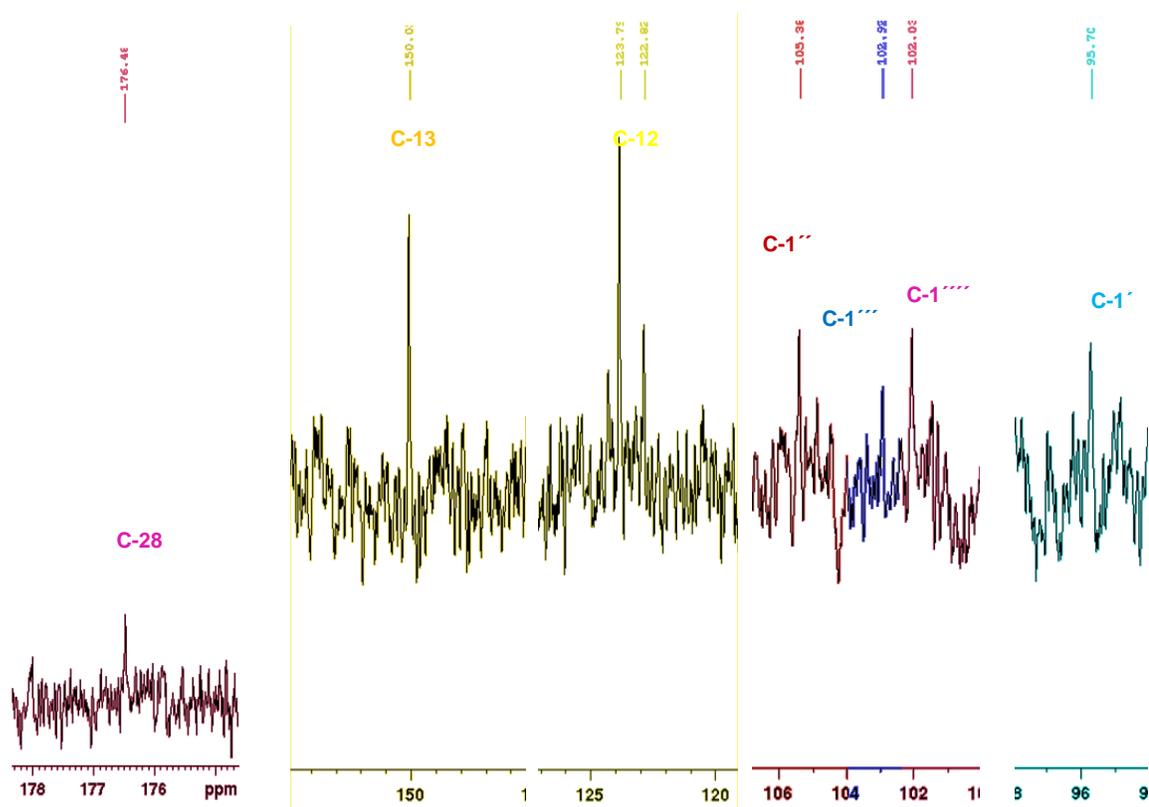
El estudio de los espectros de RMN-¹H, RMN- ¹³C, DEPT, en piridina-d₅, permitió observar que la mayoría de las señales e interacciones observadas son características de un triterpeno del tipo oleanano. La mayor parte de las señales de la genina de Ai-C₄₋₈L₃₋₁ (Figura 27; estructura 47) coinciden con el ácido oleanólico como se muestra en la Tabla 10, con una glucosa unida al carbono carboxílico.

En el espectro RMN ¹H (espectro 8) se observaron 7 singletes a 0,80, 0,86, 0,89, 1,07, 1,08, 1,22 y 1,27 ppm asociados a una estructura triterpénica. Así mismo, se observó una señal con multiplicidad de doblete correspondiente a un protón de metino unido oxígeno a 6,32 ppm (*d*; 7,8 Hz), que por su desplazamiento permite inferir que está unido a un grupo desapantallante. El espectro de protones fue tomado con supresión de solvente y no se observan las señales de 4,9 a 6,1 ppm asociadas a los azúcares unidos al núcleo de la genina.



Espectro 8. RMN ^1H para el Compuesto Ai-C₄₋₈L₃₋₁. (Piridina-d₅; 300 MHz)

El análisis del espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 9) tomado en piridina-d₅, permite observar 48 señales, correspondientes a 7 metilos, 13 metilenos (tres de ellos como CH₂OH), 20 metinos (con diez metinos unidos a oxígeno) y 8 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135, destacando las señales correspondientes a un carbonilo en 176,5 ppm correspondiente a un grupo ester (COOR) y dos carbonos desapantallados en 150,1 ppm y 122,8 ppm.



Espectro 9. RMN ^{13}C y DEPT para el Compuesto Ai-C $_4$ -8L $_3$ -1 (Piridina-d $_5$; 300 MHz)

Por carecer hasta este momento de datos espectroscópicos bidimensionales, se realizó la asignación de carbonos por comparación con los datos reportados para el ácido oleanólico (Tabla 15). La comparación de los datos permite inferir la presencia de una saponina triterpénica de núcleo oleanano con tres unidades de glucosa. Así, se observan 8 señales en 39,6, 39,9, 37,0, 150,0, 42,1, 47,0, 30,7 y 176,5 correspondientes a carbonos cuaternarios según los espectros de DEPT y ^{13}C asignados a C-4, C-8, C-10, C-13, C-14, C-17, C-20 y C-28, respectivamente.

Tabla 15. Desplazamientos de ^{13}C -RMN de los compuesto Ai-C₄₋₈L₃₋₁ y el ácido oleanólico (piridina-d₅)[39].

Ai-C ₄₋₈ L _{3-i}			Ac. Oleanólico*[39]	
N° C	^{13}C δ (ppm)	DEPT	^{13}C δ (ppm)	DEPT
1	39,6	-CH ₂ -	39,0	-CH ₂ -
2	28,2	-CH ₂ -	28,1	-CH ₂ -
3	78,2	>CH-OH	78,2	>CH-OH
4	39,6	C	39,4	C
5	56,0	>CH-	55,9	>CH-
6	18,5	-CH ₂ -	18,8	-CH ₂ -
7	32,5	-CH ₂ -	33,4	-CH ₂ -
8	39,9	C	39,8	C
9	47,0	>CH-	48,2	>CH-
10	37,0	C	37,4	C
11	23,5	-CH ₂ -	23,8	-CH ₂ -
12	122,8	=CH-	122,6	=CH-
13	150,1	=C<	144,8	=C<
14	42,1	C	42,2	C
15	**	-CH ₂ -	28,4	-CH ₂ -
16	23,5	-CH ₂ -	23,8	-CH ₂ -
17	47,0	C	46,7	C
18	41,8	>CH-	42,1	>CH-
19	4,3	-CH ₂ -	46,6	-CH ₂ -
20	30,7	C	31,0	C
21	**	-CH ₂ -	34,3	-CH ₂ -
22	32,5	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -
23	**	-CH ₃	28,8	-CH ₃
24	15,4	-CH ₃	16,5	-CH ₃
25	16,7	-CH ₃	15,6	-CH ₃
26	17,4	-CH ₃	17,5	-CH ₃
27	26,0	-CH ₃	26,2	-CH ₃
28	176,5	-COOR	180,0	-COOH
29	33,1	-CH ₃	33,4	-CH ₃
30	23,6	-CH ₃	23,8	-CH ₃

*Datos tomados por Werner Seebacher y col. (2003).

** No determinado

Por los desplazamientos de los carbonos en 105,4, 102,0 y 95,7 ppm se infiere que hay tres unidades de azúcares en la genina. El desplazamiento del carbono carboxílico en 176,5 ppm es asignado a C-28. Por otro lado, la señal en 6,32 ppm (d ; 7,8 Hz) esta correlacionada con el carbono en 95,70 ppm y es asignada a una unidad de glucosa unida al carbono carbonílico en C-28 por comparación con lo reportado para **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}**. De esta manera, se propone una estructura de una saponina tipo oleanano con una función tipo ester en C-28 (Figura 27; Estructura 47)

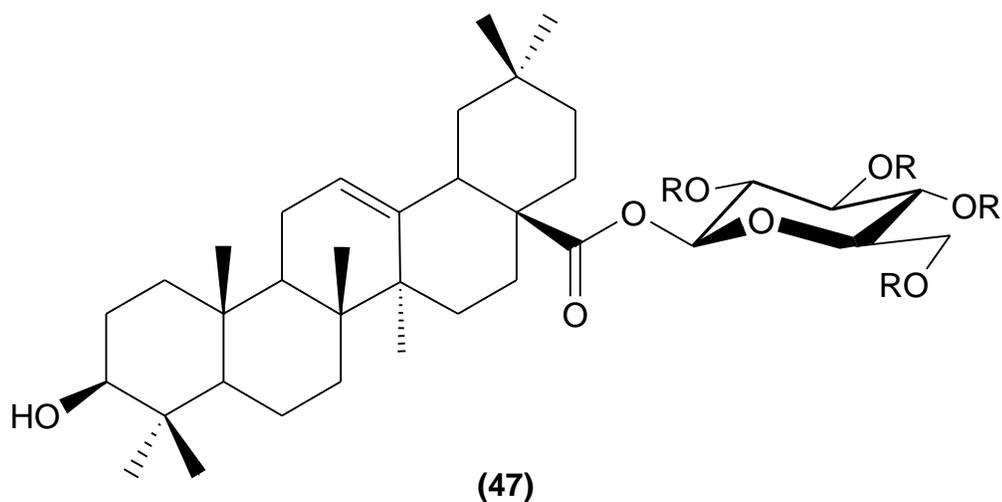


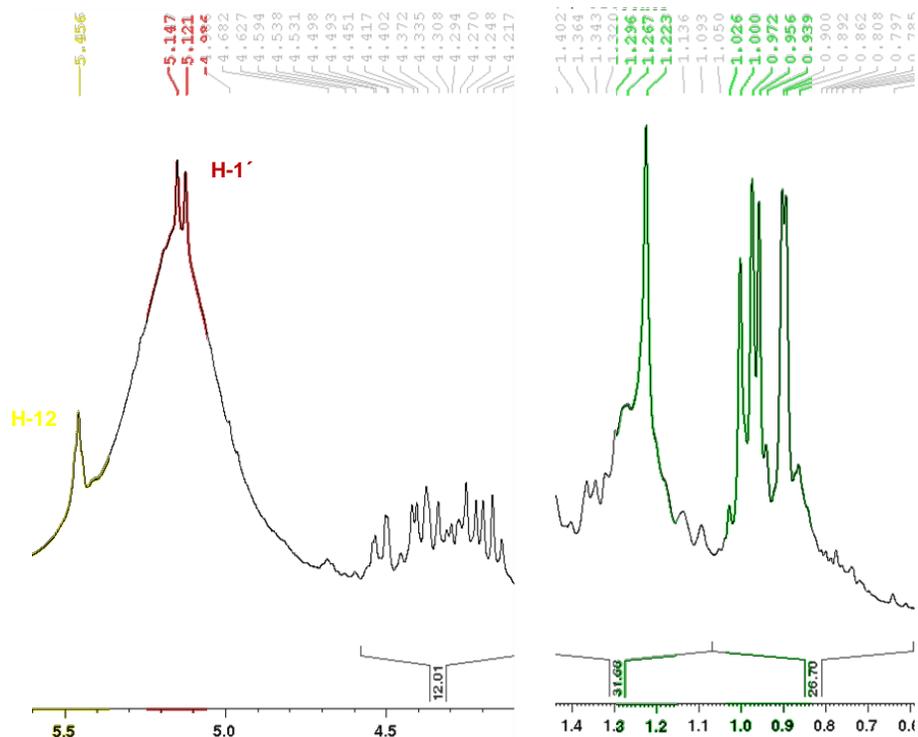
Figura 27. Estructura parcial para el compuesto **Ai-C₄₋₈L₃₋₁**.

8.1 Compuesto Ai-C₄A₇

El compuesto Ai-C₄A₇ se aisló como 7,6 mg de un sólido de apariencia de cera de color crema, soluble en solventes polares e insoluble en compuestos no polares, que en CCF desarrollada con la mezcla CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (80:20:10) y revelada con p-Anisaldehído, muestra una coloración azul intensa en el visible y un R_f de 0,56, representando el **0,037%** con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M

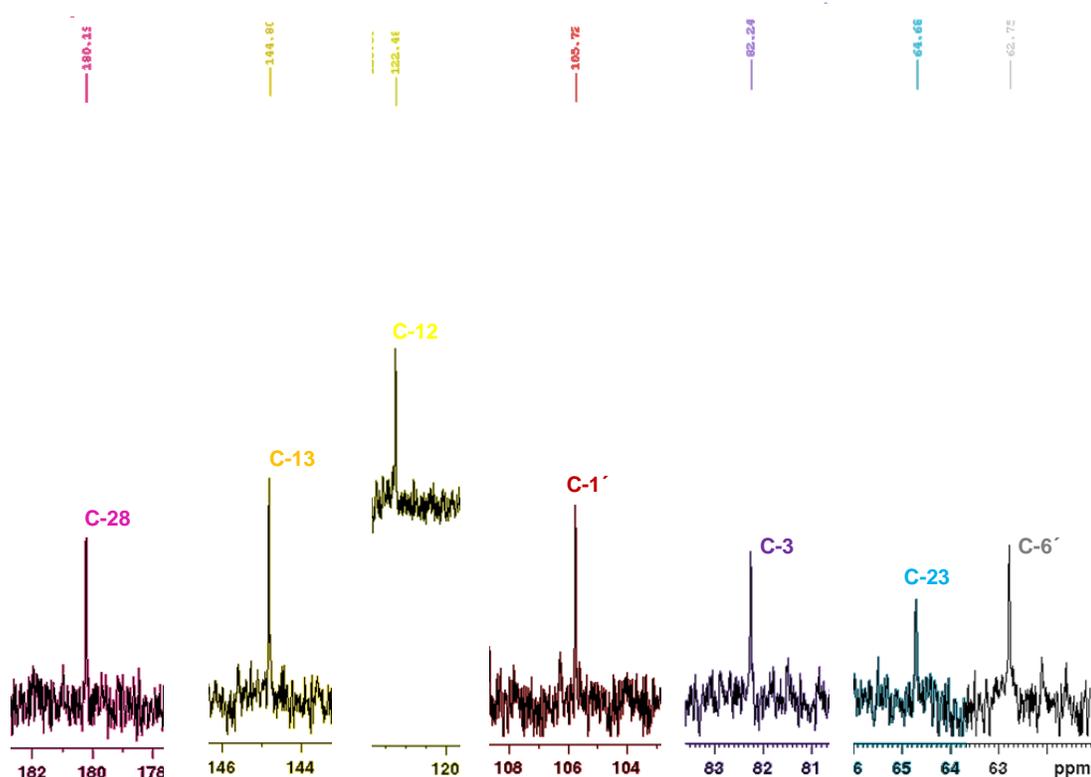
Mediante el estudio de los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, en piridina-d₅, se pudo observar que la mayoría de las señales e interacciones observadas son características de un triterpeno del tipo oleanano. La mayor parte de las señales de la genina de **Ai-C_{4.8}A₇** (figura 28; estructura 48), coinciden con las observadas para la hederagenina como se muestra en la tabla 16.

En el espectro RMN ¹H (espectro 10) se observaron 6 singletes a 0,89, 0,90, 0,96, 0,97, 1,00 y 1,22 ppm correspondientes a metilos sobre carbonos cuaternarios. Así mismo, se observó una señal con multiplicidad de doblete correspondiente a un protón de metino unido oxígeno a 5,13 ppm (*d*; 7,8 Hz) que por su desplazamiento está unido a un grupo desapantallante. En 5,46 ppm se observó un singlete ancho asociado a un metino de un doble enlace.



Espectro 10. RMN ¹H para el Compuesto Ai-C4A₇. (Piridina d₅; 300 MHz)

En el espectro de RMN ¹³C (Espectro 11) tomado en piridina-d₅ se observan 36 señales, correspondientes a 6 metilos, 12 metilenos (2 como metilenos unidos a oxígeno, uno de ellos asociados a C-6 de unidades de glucosa), 10 metinos (5 metinos unidos a oxígeno) y 8 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135, destacando las señales correspondientes a un carbonilo en 180,2 ppm correspondiente a un grupo carboxílico (COOH) y dos carbonos desapantallados, en 144,8 ppm y 122,5 ppm.



Espectro 11. RMN ^{13}C y DEPT para el Compuesto Ai-C4A₇. (Piridina d₅; 300 MHz)

Por carecer hasta este momento de datos espectroscópicos bidimensionales, se realizó la asignación de carbonos por comparación con datos reportados para la hederagenina por Joshi y *et al.* (1999)[40](Tabla 16). La comparación de los datos permite inferir la presencia de una saponina triterpénica de núcleo oleanano con una unidad de glucosa. Así, se observan 8 señales en 43,4, 39,7, 36,9, 144,8, 42,1, 46,6, 30,9 y 180,2 correspondientes a carbonos cuaternarios según los espectros de DEPT y ^{13}C asignados a C-4, C-8, C-10, C-13, C-14, C-17, C-20 y C-28, respectivamente. Por otro lado, un metino en 105,7 ppm y 5,13 ppm (d; 7,8 Hz) correspondiente a un carbono anomérico, permite inferir la unión de una glucosa a la genina. El desplazamiento del carbono en 82,2 ppm asignado a C-3 indica su unión a la glucosa, por lo cual se propone una estructura tipo hederagenina monodesmosídica con una unidad de glucosa en C-3.

Tabla 16. Comparación de datos ^{13}C -RMN del compuesto Ai-C₄₋₈A₇ y la hederagenina[40].
(piridina-d₅)

Ai-C ₄₋₈ A ₇			Hederagenina*[40]	
N° C	^{13}C δ (ppm)	DEPT	^{13}C δ (ppm)	DEPT
1	38,7	-CH ₂ -	38,9	-CH ₂ -
2	28,2	-CH ₂ -	27,6	-CH ₂ -
3	82,2	>CH-O-	73,5	>CH-O-
4	43,4	>C<	43,0	>C<
5	48,2	>CH-	48,7	>CH-
6	18,1	-CH ₂ -	18,7	-CH ₂ -
7	33,1	-CH ₂ -	33,1	-CH ₂ -
8	39,7	>C<	39,9	>C<
9	47,6	>CH-	48,3	>CH-
10	36,9	>C<	37,4	>C<
11	23,8	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -
12	122,5	=CH-	122,7	=CH-
13	144,8	=C<	145,0	=C<
14	42,1	>C<	42,3	>C<
15	29,9	-CH ₂ -	28,5	-CH ₂ -
16	23,6	-CH ₂ -	23,8	-CH ₂ -
17	46,6	>C<	46,9	>C<
18	41,9	>CH-	42,1	>CH-
19	46,4	-CH ₂ -	46,6	-CH ₂ -
20	30,9	>C<	31,1	>C<
21	34,1	-CH ₂ -	34,3	-CH ₂ -
22	32,8	-CH ₂ -	33,4	-CH ₂ -
23	64,7	-CH ₂ -OH	67,8	-CH ₂ -OH
24	13,6	-CH ₃	13,3	-CH ₃
25	16,0	-CH ₃	16,1	-CH ₃
26	17,4	-CH ₃	17,7	-CH ₃
27	26,2	-CH ₃	26,3	-CH ₃
28	180,2	-COOH	180,6	-COOH
29	33,2	-CH ₃	33,4	-CH ₃
30	23,7	-CH ₃	23,9	-CH ₃

En la tabla 17 se compara los desplazamientos de la glucosa del compuesto Ai-C₄₋₈A₇, coincidente con los desplazamientos reportados para la glucosa ubicada en el C-3 del compuesto **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}**.

Tabla 17. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm) de la glucosa unida a Ai-C₄₋₈A₁₀. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Glucosa I (C-3)		
N° C	¹³C δ (ppm)	¹³C δ (ppm)
	Ai-C₄₋₈L_{3-FG}	Ai-C₄₋₈A₇
1	105,8	105,7
2	75,5	75,7
3	78,6	78,6
4	71,6	71,6
5	78,3	78,2
6	62,7	62,7

Finalmente, se propone la estructura del compuesto **Ai-C₄₋₈A₇** (Figura 28; Estructura 48) que corresponde al *3-O-β-D-glucopiranosil-hederagenina*. Vale la pena destacar que se debe esperar el análisis espectroscópico de dos dimensiones para confirmar la estructura.

Es importante hacer notar que saponinas con un núcleo tipo hederagenina no han sido Aislado anteriormente de la familia *Bignoniaceae*.

Por otro lado, las saponinas tipo hederagenina son comunes en la familia *Araliaceae* y en géneros como *Clematis*, *Holboellia*, *Hedera*, *Momordica*. El primer Aislamiento en forma impura fue en 1899 como Hederagenina.^[41] y en 2006 Gülçin y col. evaluaron la actividad antioxidante del glucósido 3-O-(β -D-glucopiranosil)-hederagenina, el cual fue Aislado de las bayas de *Hedera colchica*, una especie de hiedra endémica en Georgia ^[42].

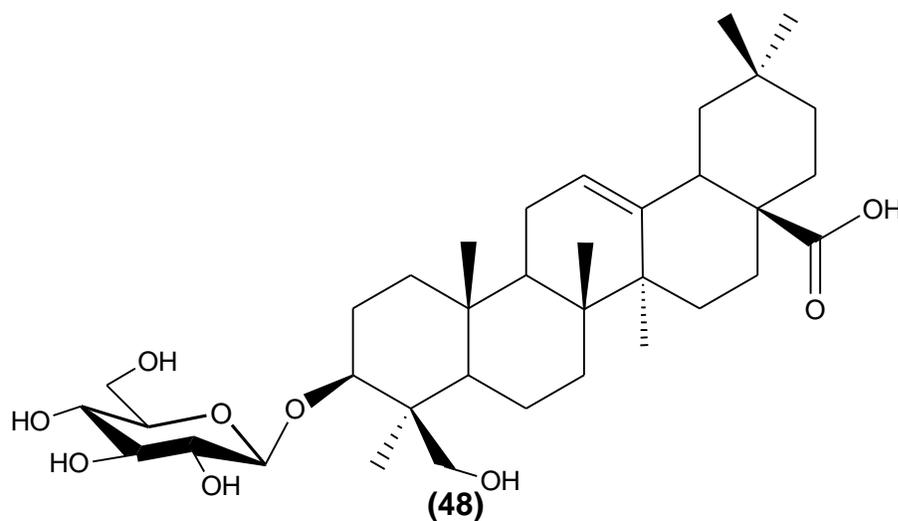


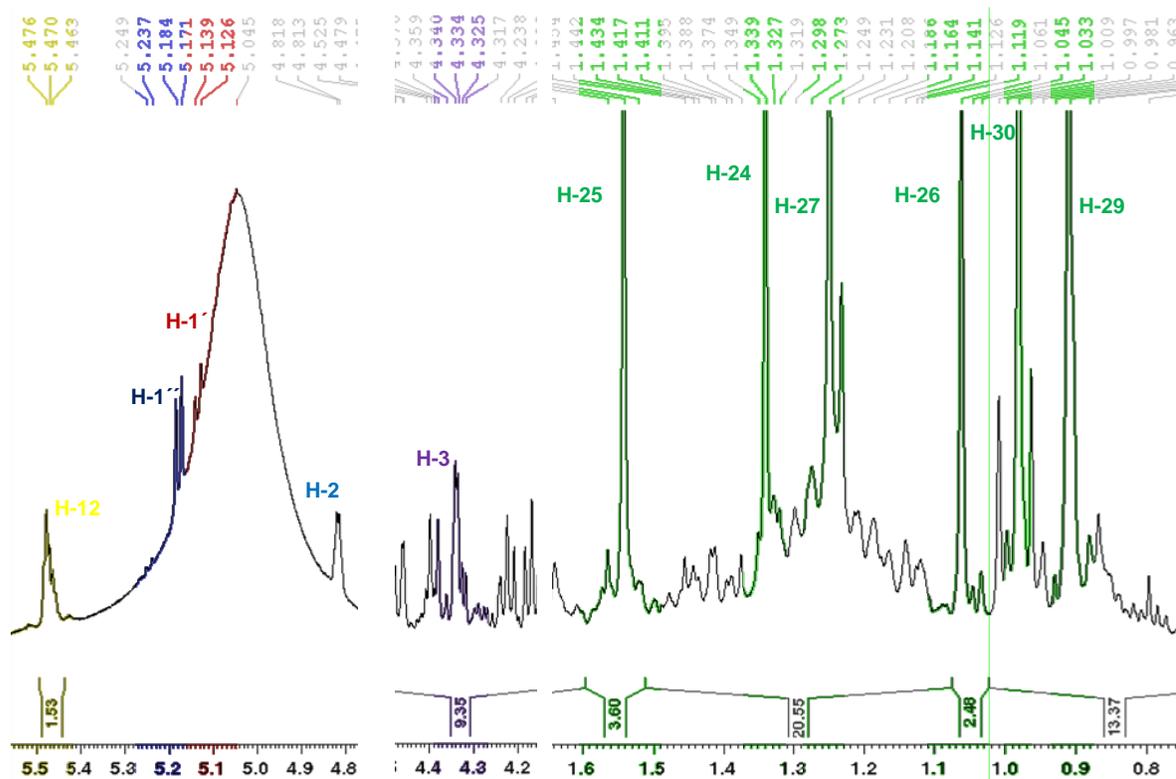
Figura 28. Estructura propuesta del compuesto Ai-C₄₋₈A₇.

8.2 Compuesto Ai-C₄A₉

El compuesto Ai-C₄A₉ se obtuvo como 11,9 mg de un sólido ceroso color crema, soluble en solventes polares (agua, metanol, piridina) e insoluble en compuestos no polares. Al ser desarrollado en CCF con un sistema de elución CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (80:20:2) y revelada con p-Anisaldehído, se observan dos bandas una de coloración azul-violeta con un R_f = 0,66 y otra de coloración azul y R_f = 0,74, con esto se infirió inicialmente que era una mezcla de saponinas triterpenoidales, representando el **0,058%** con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M.

Sin embargo, al analizar los espectros de RMN se observaron señales correspondientes a un compuesto mayoritario. La estructura del compuesto fue elucidada mediante el análisis de datos espectroscópicos de RMN de una y dos dimensiones, ¹H, ¹³C, DEPT-135, HMQC y HMBC, en piridina-d₅. Los datos espectroscópicos obtenidos son característicos de un triterpeno del tipo oleanano monodesmosídico con 2 unidades de azúcares (Tablas 18 y 19).

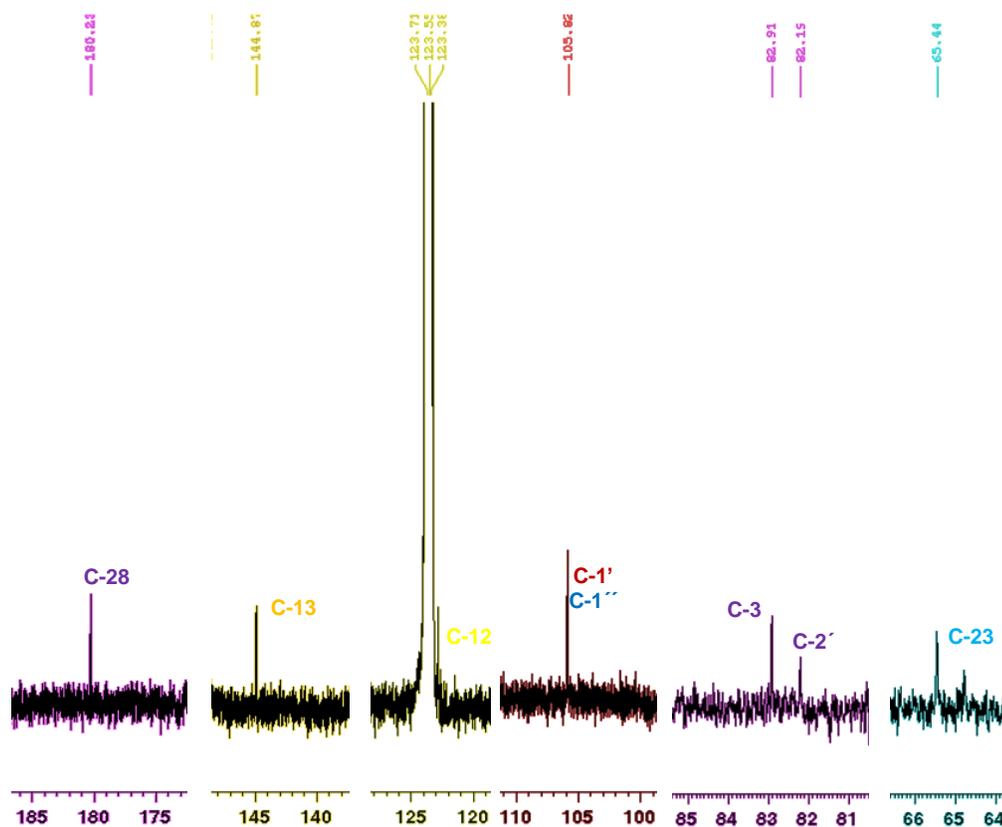
En el espectro RMN ¹H (espectro 12), se visualizaron 6 singletes que integran para tres protones cada uno, a 0,93, 1,00, 1,06, 1,25, 1,54 y 1,34 ppm asociados a metilos sobre una estructura triterpenica. Igualmente, se observan dos señales con multiplicidad de doblete correspondiente a dos protones de metinos unidos a oxígeno a 5,18 ppm (*d*; 7,8 Hz) y 5,13 ppm (*d*; 7,8 Hz) asociados a carbonos anoméricos. Así mismo, en 5,48 ppm se observó un singlete ancho asociado a un metino de un doble enlace que por su multiplicidad se infiere su unión a un carbono cuaternario y un multiplete en 4,34 ppm asociado a un metino unido a oxígeno característico de la oxidación del C-3 del núcleo oleanano y a 4,82 ppm se observa un singlete ancho asignado también a un metino unido a oxígeno.



Espectro 12. RMN ^1H para el Compuesto Ai-C4A₉. (Piridina d₅; 600 MHz)

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 13) tomado en piridina-d₅, se observan 42 señales, correspondientes a 6 metilos, 12 metilenos (3 como -CH₂OH, dos de ellos asociados a C-6 de unidades de glucosa), 16 metinos (ocho de ellos unido a oxígeno) y 8 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135, destacando las señales correspondientes a un carbonilo en 180,2 ppm asociado a un ácido carboxílico (COOH), dos carbonos desapantallados, en 144,8 ppm y 122,6 ppm, confirmando la presencia de un doble enlace en la molécula y un metino unido a un heteroátomo en 82,9 ppm. Así mismo, fue posible observar señales en 105, 9 y 105,8 ppm asociada a los carbonos anoméricos que junto a las señales observadas en 64,7 y 62,2 ppm, permiten inferir que el núcleo oleanano posee dos unidades de glucosa una de ellas unida al C-3. Finalmente, se observa una señal en 65,4 ppm correspondiente a un metileno unido a un oxígeno, indicando que uno de los metilos del núcleo oleanano

se encuentra oxidado y un metino unido a oxígeno en 70,6 ppm, sugiriendo la oxidación de un metileno de la estructura del oleanano.

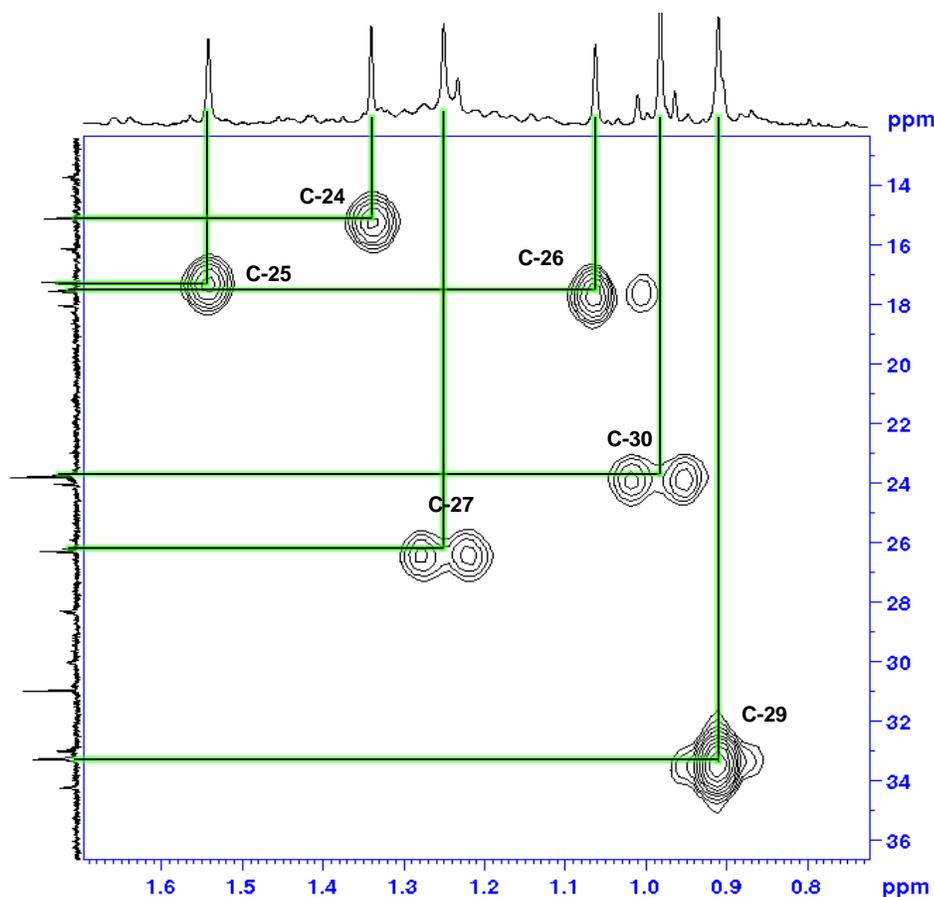


Espectro 13. RMN ^{13}C para el Compuesto Ai-C4A₉ (Piridina d₅; 600 MHz)

El análisis de los espectros de ^1H y ^{13}C , permite inferir la presencia de una saponina triterpenica de núcleo oleanano con dos unidades de glucosa.

De esta manera, además de las señales indicadas anteriormente, se observan 8 señales en 43,5, 39,8, 37,0, 144,8, 42,2, 46,6, 31,0 y 180,2, correspondientes a carbonos cuaternarios según los espectros de DEPT y ^{13}C y que son atribuidos a los C-4, C-8, C-10, C-13, C-14, C-17, C-20 y C-28 del núcleo oleanano.

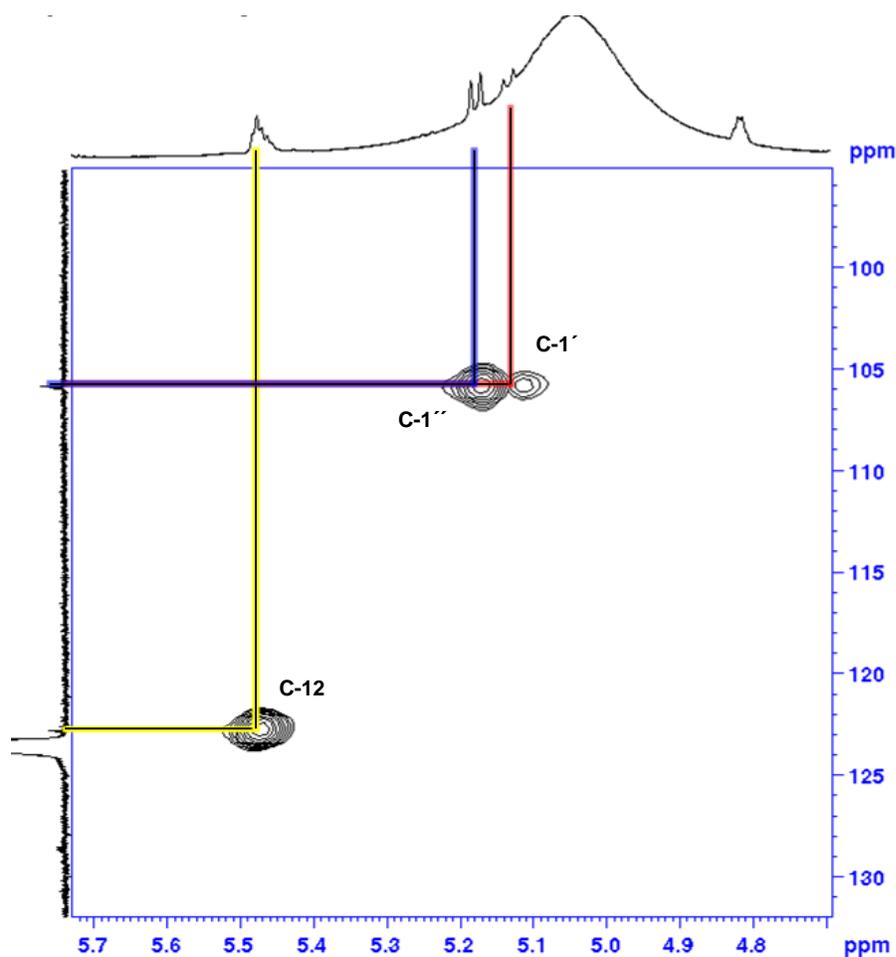
Los espectros bidimensionales (Espectros 14-16), permitieron la correlación de cada carbono con sus protones (HMQC) y la unión de estos a grupos vecinos (HMBC). De esta manera, los singletes en 0,93, 1,00, 1,06, 1,25, 1,34 y 1,54 ppm se asignan a los carbonos C-29, C-30, C-26, C-27, C-24 y C-25 con desplazamientos en 33,3, 23,8, 17,5, 26,3, 15,1 y 17,2 ppm, respectivamente (Espectro 14).



Espectro 14. HMQC para el Compuesto Ai-C4A₉. (Piridina d₅; 600 MHz)
Ampliación 14-35 ppm -/- 1,6-0,8 ppm

Adicionalmente, en el espectro de HMQC se observa la correlación de los protones H-1' en 5,18 ppm (δ ; 7,8 Hz) y H-1'' en 5,13 ppm (δ ; 7,8 Hz), con las señales en 105,9 ppm y 105,8 ppm, respectivamente, estas señales junto a las señales de H-6' en 4,39 ppm (64,7 ppm) y H-6'' en 4,47 ppm (62,2 ppm), confirman la presencia de dos

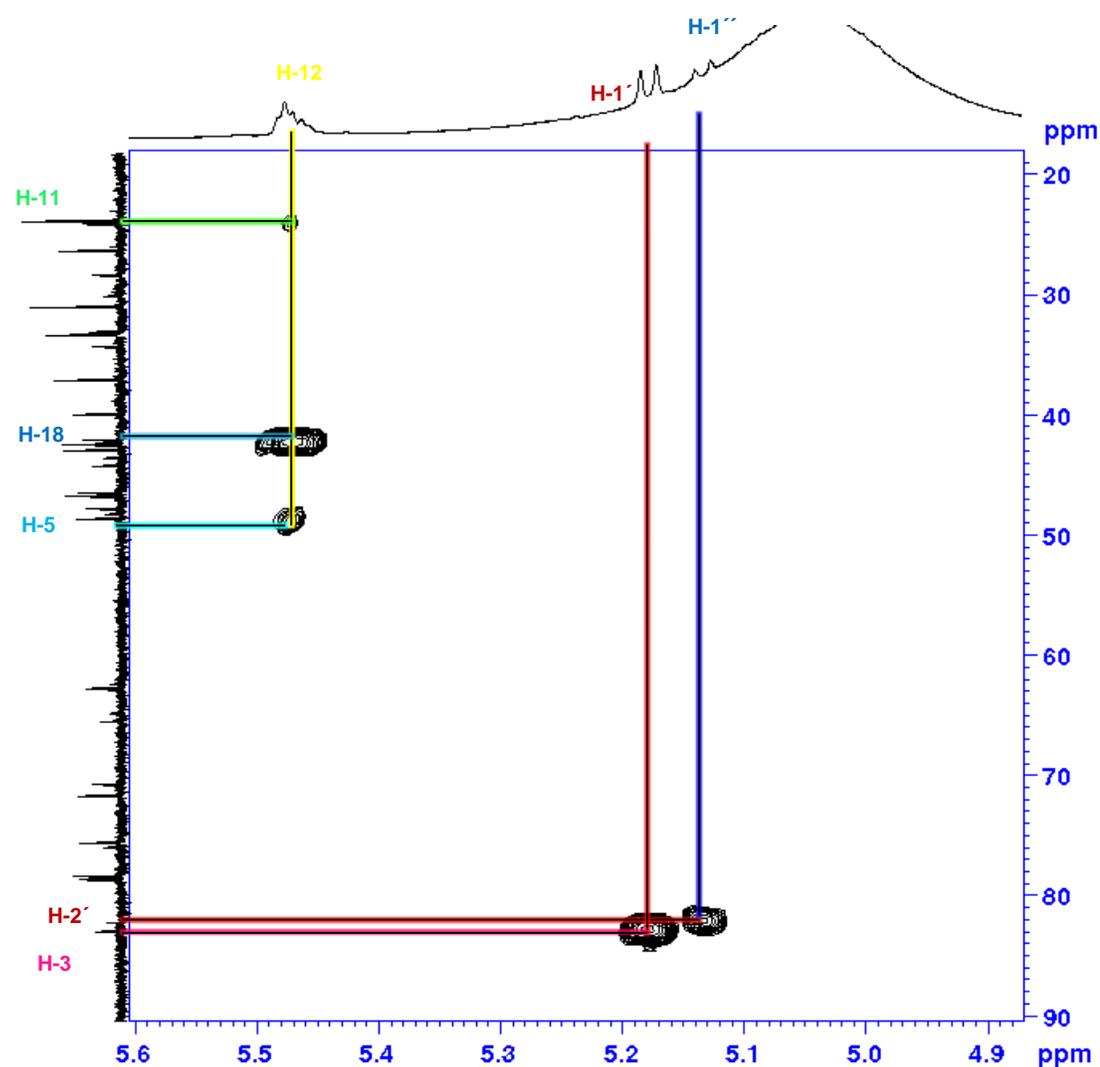
unidades de glucosa (Espectro 15). La señal en 5,48 ppm (123,8 ppm) como un singlete ancho se asignó al protón H-12, común en esqueletos tipo oleanano (Espectro 15). Por otro lado, el metino unido a un heteroátomo en 82,9 ppm con una multiplicidad de *d* y una constante de 3 Hz en 4,34 ppm se asigna a C-3. El espectro HMBC permitió asignar la posición de las azúcares a través de la correlación del protón del carbono anomérico H-1' con C-3 y el protón H-1'' con el carbono C-2' de la primera glucosa (espectro 15). Es importante señalar que el carbono en 70,6 asociado a un singlete ancho en 4,82 ppm fue asignado al C-2, al comprobar el efecto apantallante sobre C-1 en 44,2 ppm y 1,21 (*m*), 2,25 ppm (*d*; $J=12$ Hz).



Espectro 15. HMBC para el Compuesto Ai-C4A₉. (Piridina d₅; 600 MHz)

Ampliación 100-130ppm \pm 8,8-5,7 ppm

El espectro HMBC permitió corroborar la asignación de los protones y carbonos del núcleo oleanano y asignar, de manera inequívoca, la posición de las señales de las glucosas. Así, el protón H-1' en 5,18 ppm se correlacionó con C-3 en 83,0 ppm (espectro 16) y el protón H-1'' en 5,13 ppm, se correlacionó con C-2' de la primera glucosa, indicando que se trataba de una saponina monodesmosídica con dos unidades de glucosa (espectro 16).



Espectro 16. HMBC para el Compuesto Ai-C4A₉. (Piridina d₅; 600 MHz)
Ampliación 20-90ppm +/- 4,9-5,6 ppm

El estudio detallado de los espectros bidimensionales HMBC permitió observar la interacción de H-12 con la señal de C-18 (39,8 ppm) la cual confirma la presencia del doble enlace entre los carbonos C-12 y C-13. Así mismo, la posición de C-3 se confirmó por las interacciones H-23↔C-3 y H-24↔C-3. Otras señales observadas en HMBC permitieron asignar la posición de carbonos cercanos a los grupos metilos: **H-23**↔ C-3, C-4, C-5 y C-24; **H-24**↔C-3, C-4, C-5 y C-23; **H-25**↔C-1, C-5, C-10 y C-9; **H-26**↔C-7, C-8, C-9 y C-14; **H-27**↔C-8, C-13, C-14 y C-15; **H-29**↔C-19, C-20 y C-30 y **H-30**↔C-19, C-20 y C-21. Por último, la correlación de H-18 permitió confirmar la posición de los C-28, a través de los cruces: **H-18**↔C-12, C-13, C-14, C-16, C-19 y C-28.

Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm), RMN-¹H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de Ai-C₄₋₈A₉. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Nº C	δ ¹³ C(ppm)	δ ¹ H (ppm)	HMBC	DEPT
1	44,1	1,21; <i>m</i> 2,25 (<i>d</i> ; J=12 Hz)	C-2, C-3, C-5, C-9, C-10, C-25	-CH ₂ -
2	70,6	4,82 (<i>d</i> ; J=3 Hz)	-	-CH ₂ -
3	82,9	4,34; <i>m</i>	C-1, C-5, C-23, C-24, C-1', C-3'	>CH-O-
4	43,5	--	--	C
5	48,6	1,75; <i>m</i>	C-3, C-23, C-24, C-25	>CH-
6	18,0	1,74; <i>m</i> 1,07; <i>m</i>	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10	-CH ₂ -
7	33,2	1,31; <i>m</i>	C-5, C-9, C-14	-CH ₂ -
8	39,8	--	--	>C<
9	47,8	1,78; <i>m</i>	C-1, C-7, C-10, C11, C-25, C-26	>CH-
10	37,0	--	--	C<
11	24,0	2,30; <i>m</i> 1,91; <i>m</i>	C-8, C-9, C-10, C-12, C-13	-CH ₂ -
12	122,6	5,48; <i>s</i>	C-11, C-14, C-9, C-18	=CH-
13	144,8	--	--	=C<
14	42,2	--	--	C
15	28,3	1,10; <i>m</i> 2,15; <i>m</i>	C-13, C-14, C-16, C-17, C-27	-CH ₂ -
16	23,6	2,30; <i>m</i> 1,90; <i>m</i>	C-12, C-14, C-16, C-17, C-19, C-28	-CH ₂ -
17	46,6	--	--	C
18	42,0	3,28 (<i>dd</i> ; J = 13,2)	C-12 C-14, C-16, C-17, C-19, C-28	>CH-
19	46,4	1,30; <i>m</i>	C-18	-CH ₂ -
20	31,0	--	--	C
21	34,2	1,08; <i>m</i> 1,42; <i>m</i>	C-14, C-20, C-16, C-17, C,22	-CH ₂ -
22	33,0	1,33; <i>m</i>	C-17, C-18	-CH ₂ -
23	65,4	3,68 (<i>d</i> ; J = 10,2 Hz)	C-1, C-3, C-5, C-24	-CH ₂ -OH
24	15,1	1,34; <i>s</i>	C3, C-5, C-6, C-23	-CH ₃
25	17,2	1,54; <i>s</i>	C-1, C-5, C-9 C-10	-CH ₃
26	17,4	1,06; <i>s</i>	C-7, C-8, C-9, C-4	-CH ₃
27	26,3	1,25; <i>s</i>	C-8, C-14, C-15, C-18	-CH ₃
28	180,2	--	--	-COOH
29	33,3	0,93; <i>s</i>	C-19, C-20, C-21, C-30	-CH ₃
30	23,8	1,00; <i>s</i>	C-19, C-20, C-21, C-29	-CH ₃

Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm), RMN-¹H δ (ppm) y correlaciones HMQC y HMBC de los azúcares de Ai-C₄₋₈A₉. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Nº C	δ ¹³ C(ppm)	δ ¹ H (ppm)	HMQC	DEPT
Glucosa I (C-3)				
1'	105,9	5,18 (<i>d</i> ; J = 7,8 Hz)	C-3	>CH-
2'	82,2	4,32; <i>m</i>	C-3', C-5', C-1''	>CH-
3'	78,7	4,17 (<i>t</i> ; J = 9 Hz)	C-2', C-4', C-6'	>CH-
4'	75,9	4,03; <i>m</i>		>CH-
5'	78,8	3,91 (<i>d</i> ; J=4,2 Hz)	--	>CH-
6'	64,7	4,39 (<i>d</i> ; J=10,8 Hz)	C-2',	-CH ₂ -
Glucosa II (1''→2')				
1''	105,8	5,13 (<i>d</i> ; J = 7,8 Hz)	C-2'	>CH-
2''	75,5	4,03 (<i>t</i> ; J = 8,4 Hz)	C-1'', C-3'', C-5''	>CH-
3''	78,6	4,15 (<i>t</i> ; J = 9 Hz)	C-4'', C-2'	>CH-
4''	71,6	4,22 (<i>t</i> ; J = 9 Hz)	C-3'', C-5'', C-6''	>CH-
5''	78,3	3,91 (<i>d</i> ; J=4,2 Hz)	--	>CH-
6''	62,7	4,47 (<i>d</i> ; J = 9,6 Hz)	C-4''	-CH ₂ -

Los espectros bidimensionales mostraron que el núcleo oleanano estaba oxidado en C-2 y C-23, permitiendo sugerir una saponina monodesmosídica derivada de bayogenina. La tabla 20 muestra la comparación de los desplazamientos en ¹³C para Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, Ai-C₄₋₈A₉ y su comparación con el glucósido de bayogenina, el ester 3-O-(β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil-28-(α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil) bayogenina^[38].

Tabla 20. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm) de Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, Ai-C₄₋₈A₉ y la saponina Aislada por Maeda (2005)^[38]. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}			Ai-C ₄₋₈ A ₉		Glucósido de Bayogenina* ^[38]	
N° C	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT
1	44,2	-CH ₂ -	44,1	-CH ₂ -	44,0	-CH ₂ -
2	70,6	-CH ₂ -	70,6	-CH ₂ -	70,3	-CH ₂ -
3	83,0	>CH-O-	82,9	>CH-OH	83,1	>CH-OH
4	42,8	C	43,5	C	42,7	C
5	48,6	>CH-	48,6	>CH-	48,5	>CH-
6	18,1	-CH ₂ -	18,0	-CH ₂ -	18,1	-CH ₂ -
7	32,9	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -
8	40,1	C	39,8	C	40,0	C
9	47,7	>CH-	47,8	>CH-	48,2	>CH-
10	37,0	C	37,0	C	36,9	C
11	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -
12	123,1	=CH-	122,6	=CH-	123,1	=CH-
13	144,2	=C<	144,8	=C<	144,3	=C<
14	42,3	C	42,2	C	42,3	C
15	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -
16	23,4	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -	23,2	-CH ₂ -
17	47,0	C	46,6	C	47,4	C
18	41,8	>CH-	42,0	>CH-	41,7	>CH-
19	46,2	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -	46,3	-CH ₂ -
20	30,8	C	31,0	C	30,9	C
21	34,0	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -
22	32,6	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -	32,7	-CH ₂ -
23	65,4	-CH ₂ OH	65,4	-CH ₃	65,8	-CH ₃
24	15,1	-CH ₃	15,1	-CH ₃	14,8	-CH ₃
25	17,3	-CH ₃	17,2	-CH ₃	17,2	-CH ₃
26	17,6	-CH ₃	17,4	-CH ₃	17,5	-CH ₃
27	26,2	-CH ₃	26,3	-CH ₃	26,1	-CH ₃
28	176,5	-COOR	180,2	-COOR	176,2	-COOH
29	33,1	-CH ₃	33,3	-CH ₃	33,1	-CH ₃
30	23,7	-CH ₃	23,8	-CH ₃	23,7	-CH ₃

En la Tabla 2 se compara el desplazamiento de las glucosas presente en el compuesto $\text{Ai-C}_{4-8}\text{A}_9$ unidas $1'' \rightarrow 2'$ con las glucosas del compuesto *3-O 3-soforosil hederagenina* Aislada por Shawskov (2000)^[43], ya que ambas son saponinas monodesmosídicas que tienen dos azúcares con unión $1'' \rightarrow 2'$ ubicados en el C-3 del núcleo y se diferencian solo en la oxidación del C-2 de la genina.

Tabla 21. Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C δ (ppm) de las azúcar de $\text{Ai-C}_{4-8}\text{A}_9$ y la saponina Aislada por Shawskov(2000)[43]. (Piridina- d_5 ; 600 MHz).

Glucosa I			Glucosa II (1 \rightarrow 2)	
N° C	^{13}C δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
	Ai-C₄₋₈A₉	3-O-(3-soforosil)-hederagenina[43]	Ai-C₄₋₈A₉	3-O-(3-soforosil)-hederagenina[43]
1	105,8	103,8	105,9	105,9
2	82,2	84,1	75,5	76,6
3	78,7	78,0	78,6	78,5
4	75,9	71,4	71,6	71,4
5	78,8	78,1	78,3	78,3
6	64,7	62,8	62,7	62,6

Finalmente, se concluyó que la estructura del compuesto **Ai-C₄₋₈A₉** (Figura 29; Estructura 49) corresponde a *3-O-[O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil-bayogenina* o *3-O-(3-soforosil)-Bayogenina*.

El núcleo bayogenina es muy común en las familias *Caryocaraceae* y *Asteraceae*, sin embargo, la saponina 3-O-(3-soforosil)-Bayogenina no se encuentra reportada. Por lo anterior, esta saponina se reporta como un nuevo compuesto para la bibliografía de productos naturales.

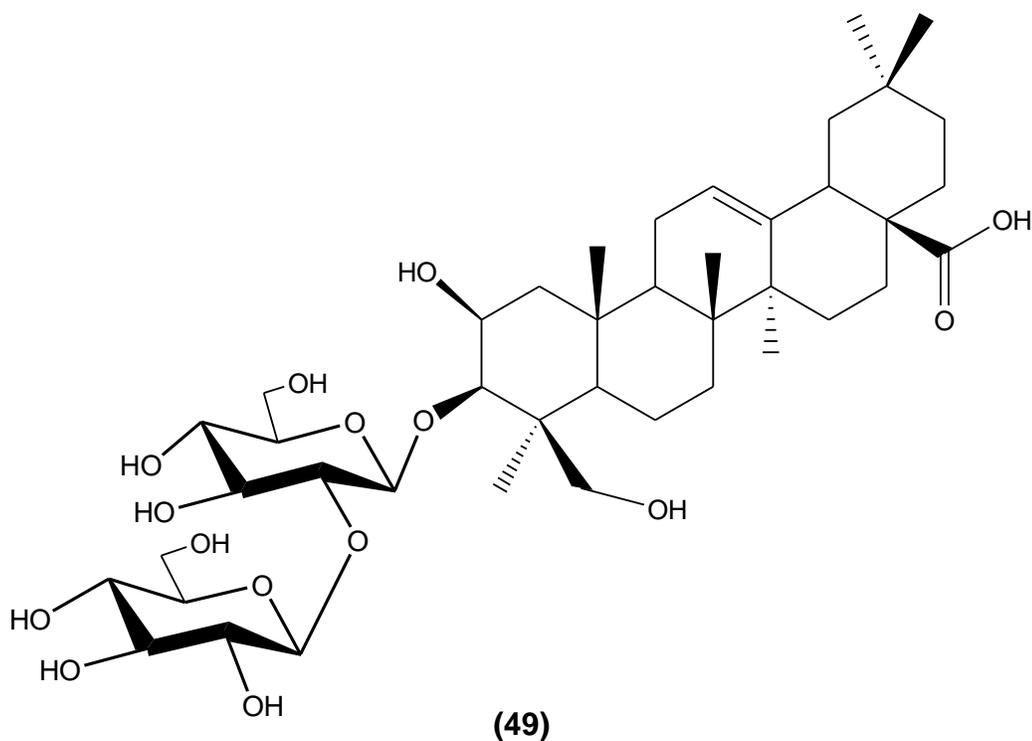


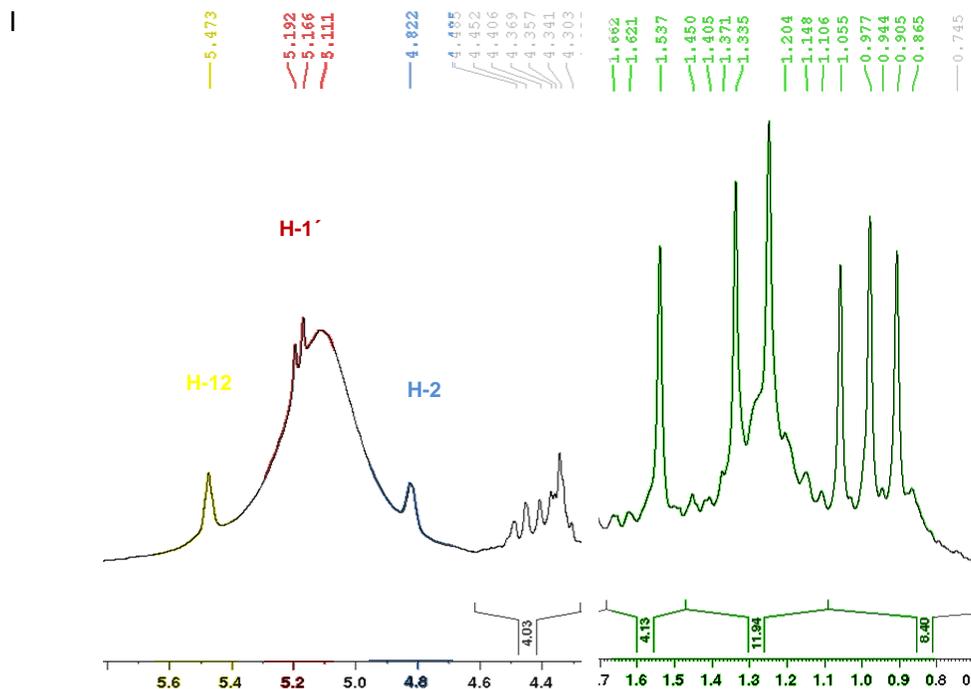
Figura 29. Estructura propuesta del compuesto **Ai-C₄A₉**.

8.3 Compuesto Ai-C₄A₁₀

El compuesto Ai-C₄A₁₀ se aisló como 8,7 mg de un sólido como cera color blanco, soluble en solventes polares e insoluble en compuestos no polares, que al ser observado por CCF desarrollada con la mezcla CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (80:20:10) y revelada con p-Anisaldehído se observa una coloración azul intensa en el visible y un R_f de 0,65, representando el **0,042 %** con respecto al material seco.

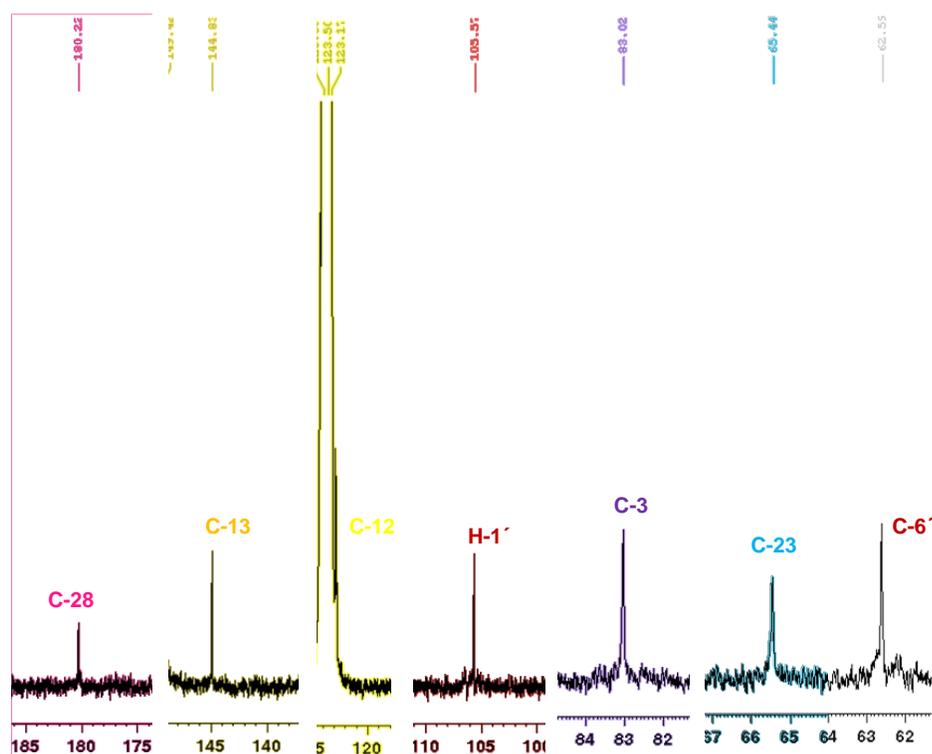
Mediante el estudio de los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, en piridina-d₅, se pudo observar que la mayoría de las señales e interacciones observadas son característicos de un triterpeno del tipo oleanano. La mayor parte de las señales de la genina de **Ai-C₄₋₈A₁₀** (figura 30; estructura 50), coinciden con las observadas para el compuesto **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}** y para **Ai-C₄₋₈A₉** como se muestra en la tabla 12.

En el espectro RMN ¹H (espectro 17) se observaron 6 singletes en campo alto, cada uno a 0,86, 0,98, 1,06, 1,25, 1,34, y 1,54 ppm asociados a metilos sobre carbonos cuaternarios del núcleo oleanano. Además, se observa una señal con multiplicidad de doblete correspondiente a un protón de metino -CHOH a 5,18 ppm (*d*; 7,8 Hz). En 5,48 ppm se observó un singlete ancho asociado a un metino de un doble enlace que por su multiplicidad se infiere su unión a un carbono cuaternario y en 4,82 ppm se observa un singlete ancho asignado también a un metino unido a oxígeno.



Espectro 17. RMN ^1H para el Compuesto Ai-C4A₁₀. (Piridina d₅; 600 MHz)

En el análisis de RMN ^{13}C (Espectro 18) tomado en piridina-d₅, se observan 36 señales correspondientes a 6 metilos, 12 metilenos (2 como metilenos unidos a oxígeno, uno de ellos asociados a C-6' de una unidad de glucosa), 10 metinos (5 metinos unidos a oxígeno) y 8 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135, destacando las señales correspondientes a un carbonilo en 180,2 ppm correspondiente a un grupo carboxílico (COOH) y dos carbonos desapantallados, en 144,8 ppm y 122,7 ppm, confirmando la presencia de un doble enlace en la molécula y por último, un metino unido a un heteroátomo en 83,0 ppm asociado al C-3 del núcleo oleanano. Así mismo, fue posible observar señales en 105,6 asociada a un carbono anomérico que junto a la señal 62,6 permiten inferir que el núcleo oleanano posee una unidad de glucosa. Finalmente, se observa una señal en 65,4 correspondiente a un metileno unido a un oxígeno, indicando que uno de los metilos del núcleo oleanano se encuentra oxidado y un metino unido a oxígeno en 70,5 sugiriendo la oxidación de un metileno de la estructura del oleanano..



Espectro 18. RMN ^{13}C para el Compuesto Ai-C4A₁₀. (Piridina d₅; 300 MHz)

Por falta de datos espectroscópicos como RMN de dos dimensiones se realizó la asignación de carbonos por comparación con el núcleo oleanano y los compuestos **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}** y **Ai-C₄₋₈A₉** permítelo que permite inferir la presencia de una saponina triterpenica de núcleo oleanano con una unidad de sacárido unida a la genina (Tabla 22 y 23).

Por el desplazamiento de carbono en 105,6 ppm y 5,18 ppm (d ; 7,8 Hz) se infiere que hay un azúcar en la genina. El desplazamiento del carbono en 83,0 ppm (C-3) permite sugerir que la unión de la azúcar en la genina es en C-3. Así, se propone una estructura de una saponina tipo oleanano monodesmosídica con una unidad de glucosa unida al C-3.

Tabla 22. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm) de Ai-C₄₋₈A_{3-FG}, Ai-C₄₋₈A₉ y Ai-C₄₋₈A₁₀. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}			Ai-C ₄₋₈ A ₉		Ai-C ₄₋₈ A ₁₀	
N° C	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT
1	44,2	-CH ₂ -	44,1	-CH ₂ -	44,0	-CH ₂ -
2	70,6	-CH ₂ -	70,6	-CH ₂ -	70,4	-CH ₂ -
3	83,0	>CH-O-	82,9	>CH-O-	83,0	>CH-O-
4	42,8	C	43,5	C	42,7	C
5	48,6	>CH-	48,6	>CH-	48,5	>CH-
6	18,1	-CH ₂ -	18,0	-CH ₂ -	18,0	-CH ₂ -
7	32,9	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -	32,9	-CH ₂ -
8	40,1	C	39,8	C	39,9	C
9	47,7	>CH-	47,8	>CH-	47,7	>CH-
10	37,0	C	37,0	C	36,9	C
11	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -
12	123,1	=CH-	122,6	=CH-	122,6	=CH-
13	144,2	=C<	144,8	=C<	144,8	=C<
14	42,3	C	42,9	C	42,3	C
15	28,2	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -	28,2	-CH ₂ -
16	23,4	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -
17	47,0	C	46,6	C	46,6	C
18	41,8	>CH-	42,0	>CH-	42,0	>CH-
19	46,2	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -
20	30,8	C	31,0	C	30,9	C
21	34,0	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -
22	32,6	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -	33,1	-CH ₂ -
23	65,4	-CH ₂ OH	65,4	-CH ₂ -OH	65,4	-CH ₂ -OH
24	15,1	-CH ₃	15,1	-CH ₃	15,0	-CH ₃
25	17,3	-CH ₃	17,2	-CH ₃	17,2	-CH ₃
26	17,6	-CH ₃	17,4	-CH ₃	17,5	-CH ₃
27	26,2	-CH ₃	26,3	-CH ₃	26,2	-CH ₃
28	176,5	-COOR	180,2	-COOH	180,2	-COOH
29	33,1	-CH ₃	33,3	-CH ₃	33,2	-CH ₃
30	23,7	-CH ₃	23,8	-CH ₃	23,7	-CH ₃

En la tabla 23 se compara los desplazamientos de la glucosa del compuesto Ai-C₄₋₈A₁₀, que coinciden con los desplazamientos reportados para la glucosa ubicada en el C-3 del compuesto **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}**.

Tabla 23. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm) de azúcar de Ai-C₄₋₈A₁₀.

Glucosa I (C-3)		
N° C	¹³ C δ (ppm)	¹³ C δ (ppm)
	Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}	Ai-C ₄₋₈ A ₁₀
1	105,8	105,6
2	75,5	75,4
3	78,6	78,5
4	71,6	71,6
5	78,3	78,2
6	62,7	62,6

Finalmente, se propone la estructura del compuesto **Ai-C₄₋₈A₁₀** (Figura 30; Estructura 50) como *3-O-β-D-glucopiranosil- bayogenina*. No obstante, se debe esperar los espectros bidimensionales para confirmar la estructura. Vale la pena acotar que *3-O-β-D-glucopiranosil- bayogenina*, se reporta como un nuevo compuesto para la bibliografía de productos naturales.

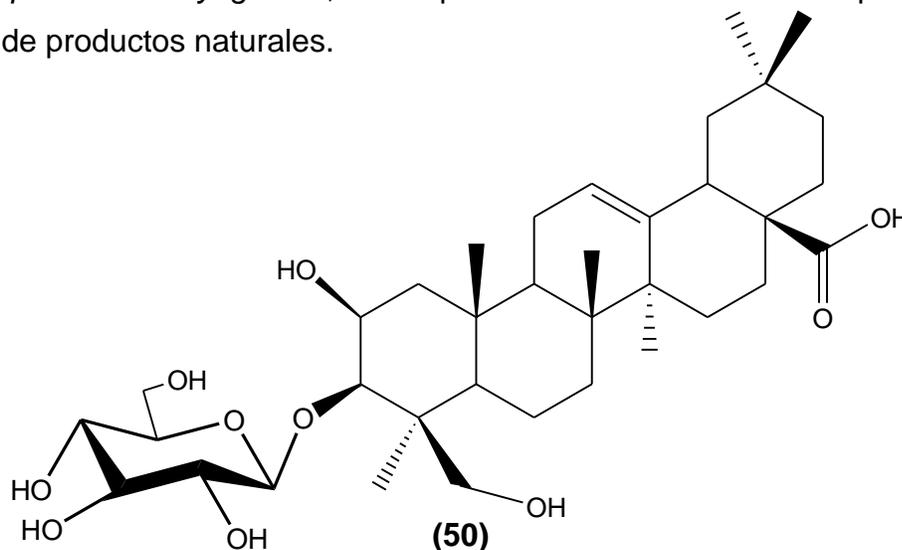


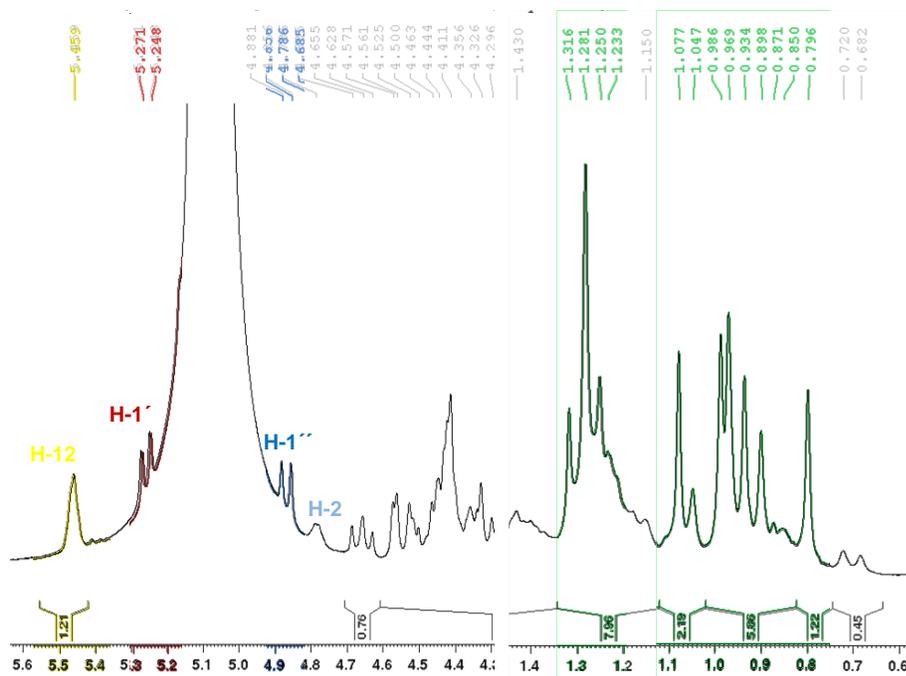
Figura 30. Estructura propuesta del compuesto Ai-C₄A₁₀.

8.1 Compuesto Ai-C₄A₂₂

El compuesto Ai-C₄₋₈A₂₂ se aisló como 5,3 mg de un sólido como cera blanquecina, soluble en compuestos polares como agua y metanol e insoluble en compuestos no polares, que al ser observado en CCF desarrollada con la mezcla CH₂Cl₂: MeOH:H₂O (80:20:10) y revelada con p-Anisaldehído, se observó como una coloración azul-violeta en el visible y un R_f de 0,35, representando el **0,026 %** con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M.

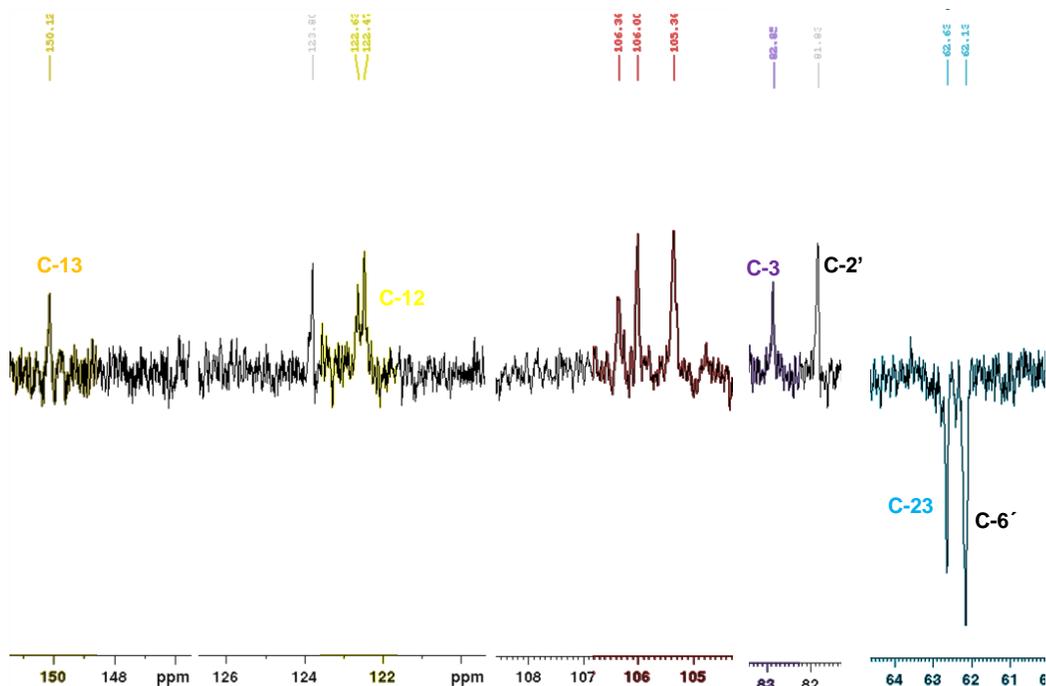
El estudio de los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, en piridina-d₅, permitió observar que la mayoría de las señales e interacciones observadas son características de un triterpeno del tipo oleanano. La mayor parte de las señales de la genina de **Ai-C₄₋₈A₂₂** (figura 31; estructura 51), coinciden con las observadas para el compuesto **Ai-C₄₋₈L₃-FG** como se muestra en la tabla 24.

En el espectro RMN ¹H (espectro 19) se visualizaron 7 singletes a campo alto, que integran para tres protones cada uno, a 1,28, 1,08, 0,99, 0,97, 0,93, 0,90 y 0,80 ppm. Igualmente, se observan dos señales con multiplicidad de doblete correspondientes a dos protones de metino -CHOH a 4,87 ppm (*d*; 7,5 Hz) y 5,26 ppm (*d*; 6,9 Hz) asociados a protones anoméricos. Por otro lado, en 5,43 ppm se observó un singlete ancho asociado aun metino de un doble enlace característico del H-12 del núcleo oleanano y a 4,79 ppm un singlete ancho asignado también de un metino unido a oxígeno.



Espectro 19. RMN ^1H para el Compuesto Ai-C4A₂₂. (Piridina d₅; 300 MHz)

El análisis del espectro de RMN ^{13}C (Espectro 20) tomado en piridina-d₅, permite observar 48 señales correspondientes a 7 metilos, 12 metilenos (dos de ellos como CH₂OH), 14 metinos (con seis -CHOH) y 8 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135, destacando dos carbonos desapantallados en 144,5 ppm y 122,5 ppm.



Espectro 20. RMN DEPT para el Compuesto Ai-C4A₁₀. (Piridina d₅; 300 MHz)

La asignación de carbonos y protones se realizó por comparación con los datos reportados para el ácido oleanólico y el compuesto **Ai-C₄₋₈L₃FG** (Tabla 24). La comparación de los datos permite inferir la presencia de una saponina triterpénica de núcleo oleanano con tres o cuatro unidades de glucosa. Así, se observan 8 señales en 30,9, 36,9, 39,7, 42,1, 42,8, 46,7 y 144,5 correspondientes a carbonos cuaternarios según los espectros de DEPT y ¹³C asignados a C-20, C-10, C-8, C-14, C-4, C-17, C-13, respectivamente. Con los datos que se disponen solo es posible inferir que la saponina posee un núcleo oleanano, sin oxidación del C-23. Es necesario realizar análisis bidimensionales que permitan la asignación inequívoca de la estructura del compuesto **Ai-C4A₂₂**.

Tabla 24. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C δ (ppm) de Ai-C₄₋₈A_{3-FG}, Ai-C₄₋₈A₉ y Ai-C₄₋₈A₂₂. (Piridina-d₅; 600 MHz).

Ai-C ₄₋₈ L _{3-FG}			Ai-C ₄₋₈ A ₉		Ai-C ₄₋₈ A ₂₂	
N° C	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT	¹³ C δ (ppm)	DEPT
1	44,2	-CH ₂ -	44,1	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
2	70,6	-CH ₂ -	70,6	-CH ₂ -	70,6	-CH ₂ -
3	83,0	>CH-O-	82,9	>CH-O-	82,9	>CH-O-
4	42,8	C	43,5	C	42,8	C
5	48,6	>CH-	48,6	>CH-	55,8	>CH-
6	18,1	-CH ₂ -	18,0	-CH ₂ -	18,4	-CH ₂ -
7	32,9	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -
8	40,1	C	39,8	C	39,7	C
9	47,7	>CH-	47,8	>CH-	48,0	>CH-
10	37,0	C	37,0	C	36,9	C
11	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -
12	123,1	=CH-	122,6	=CH-	122,5	=CH-
13	144,2	=C<	144,8	=C<	144,5	=C<
14	42,3	C	42,9	C	42,1	C
15	28,2	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -
16	23,4	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -
17	47,0	C	46,6	C	46,7	C
18	41,8	>CH-	42,0	>CH-	42,0	>CH-
19	46,2	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -	46,5	-CH ₂ -
20	30,8	C	31,0	C	30,9	C
21	34,0	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -
22	32,6	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
23	65,4	-CH ₂ OH	65,4	-CH ₂ -OH	28,2	-CH ₂ -OH
24	15,1	-CH ₃	15,1	-CH ₃	16,8	-CH ₃
25	17,3	-CH ₃	17,2	-CH ₃	15,4	-CH ₃
26	17,6	-CH ₃	17,4	-CH ₃	17,4	-CH ₃
27	26,2	-CH ₃	26,3	-CH ₃	26,2	-CH ₃
28	176,5	-COOR	180,2	-COOH	**	-COOH
29	33,1	-CH ₃	33,3	-CH ₃	33,2	-CH ₃
30	23,7	-CH ₃	23,8	-CH ₃	23,7	-CH ₃

** No determinado

El desplazamiento del carbono en 83,0 ppm (C-3) permite sugerir que la unión de la azúcar en la genina es en C-3 y por los desplazamientos de los carbonos en 105,3 y 106,0 ppm y los desplazamientos de protones en 5,26 ppm (d ; $J=6,9$ Hz) y 4,87 (d ; $J=7,5$ Hz) se infiere que hay dos unidades de azúcares en la genina. No se observa desplazamiento asociado a ácido carboxílico o éster por lo que no se asigna desplazamiento a C-28. De esta manera, se propone una estructura de una saponina monodesmosídica tipo oleanano con dos azúcares en C-3 y donde C-28 puede ser un grupo ácido o un grupo éster (Figura 31; Estructura 51)

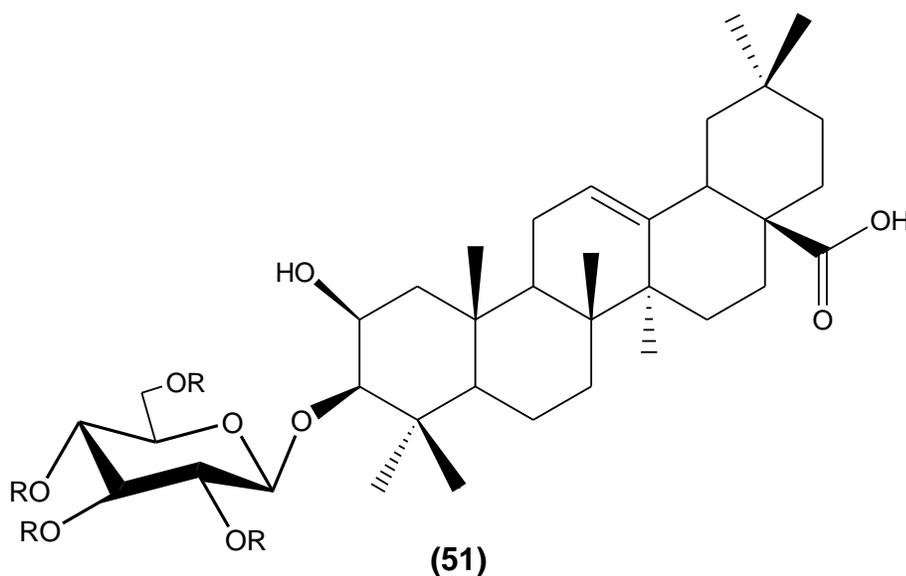


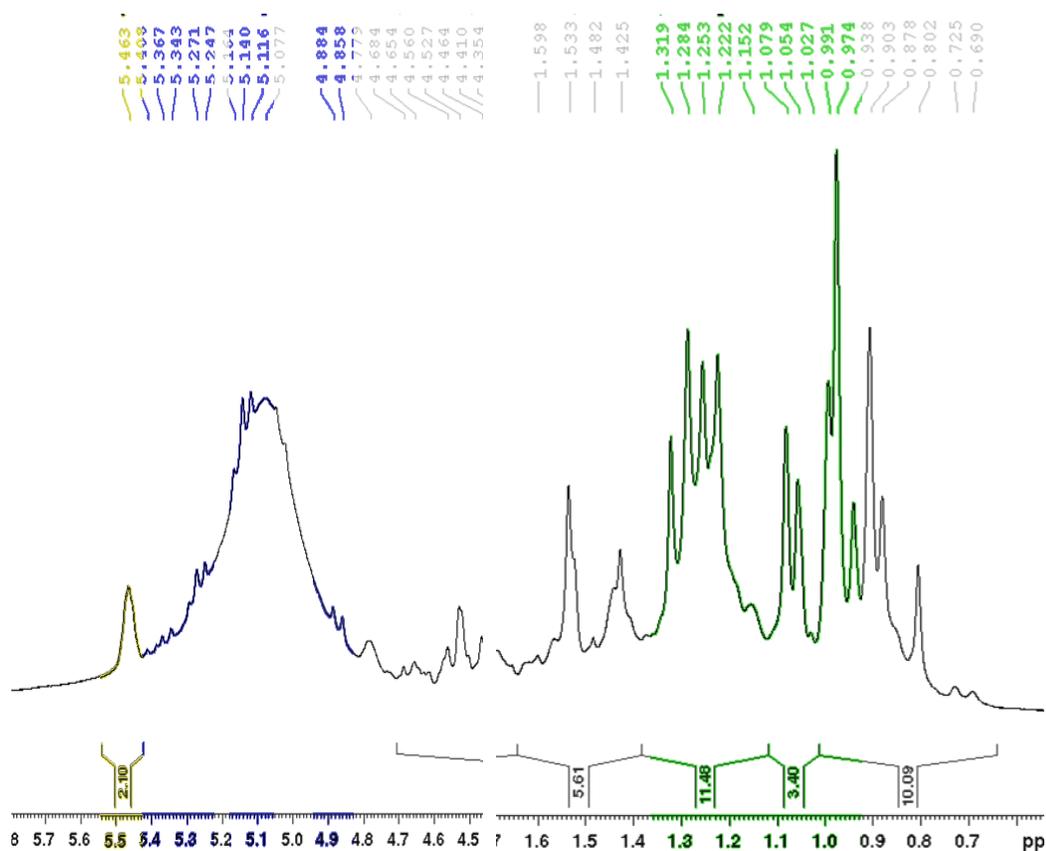
Figura 31. Estructura parcial para el compuesto Ai-C₄₋₈A₂₂

8.2 Mezcla Ai-C₄A₂₈

La mezcla Ai-C₄A₂₈ se aisló como 5,1 mg de un sólido de apariencia cerosa color crema, soluble en solventes polares e insoluble en compuestos no polares, que al ser observado por CCF desarrollada con la mezcla CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (80:20:10) y revelada con p-Anisaldehído mostró una coloración azul intensa en el visible y un R_f de 0,35, representando el **0,025 %** con respecto al extracto metanólico inicial Ai_M.

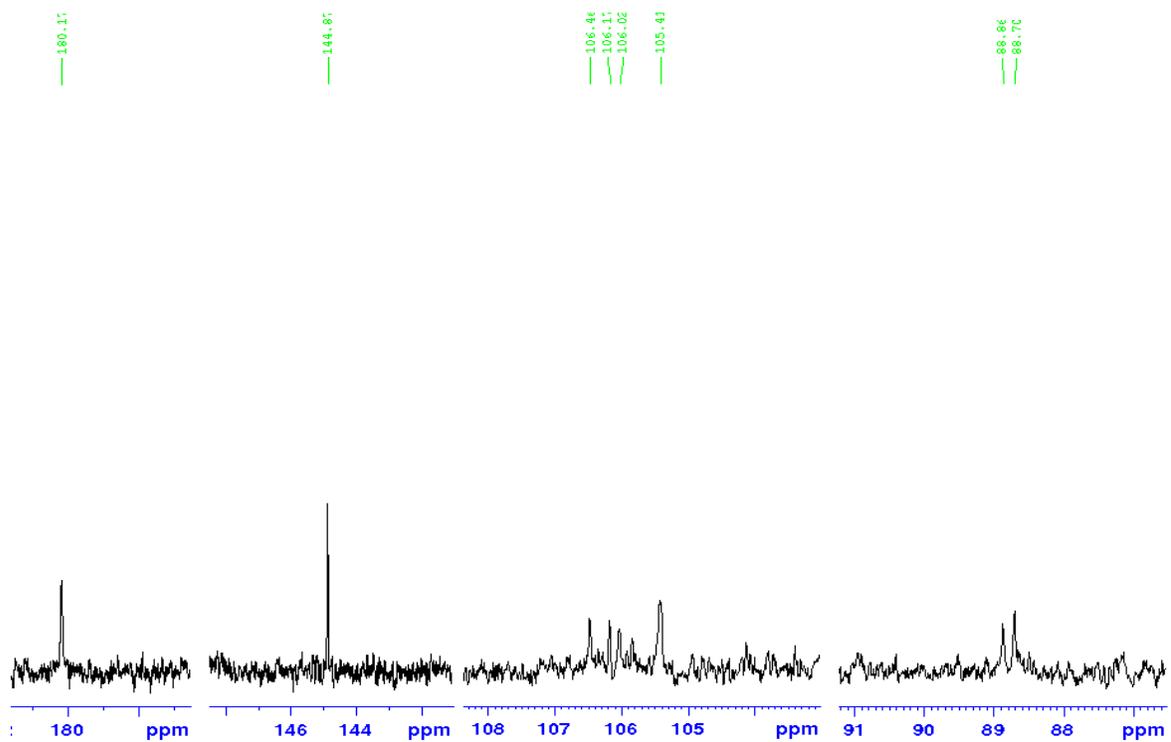
Mediante el estudio de los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT 135 en piridina-d₅, se pudo observar que existían señales duplicadas sugiriendo la presencia de una mezcla de compuestos. La mayor parte de las señales de la genina de **Ai-C₄₋₈A₂₈** coinciden con las geninas bayogenina y hederagenina, ya aisladas (tabla 25).

En el espectro RMN ¹H (espectro 21) se visualizaron 12 singletes a campo alto, a 1,32, 1,28, 1,25, 1,22, 1,08, 1,05, 0,99, 0,97, 0,94, 0,90, 0,88 y 0,80 ppm. Así mismo, se observan cuatro señales con multiplicidad de doblete correspondientes a protones unidos a oxígeno en 5,36 ppm (*d*; 7,2 Hz), 5,26 ppm (*d*; 7,2 Hz), 5,13 ppm (*d*; 7,2 Hz) y 4,87 ppm (*d*; 7,2 Hz) asociados a carbonos anoméricos. Por último, se observa un singlete ancho en 5,46 ppm asociado a un metino de un doble enlace.



Espectro 21. RMN ^1H para la mezcla Ai-C4A₂₈. (Piridina d₅; 300 MHz)

En el espectro de ^{13}C (Espectro 22) tomado en piridina- d₅ se observan 54 señales, correspondientes a 12 metilos, 22 metilenos (con 5 CH₂OH), 25 metinos (con 16 CHOH) y 16 carbonos cuaternarios según lo observado en el espectro de DEPT 135 destacando las señales correspondientes a un carbonilo en 180,2 ppm correspondiente a un grupo carboxílico (COOH), y dos pares de carbonos desapantallados, en 144,9 ppm y 122,6 ppm y 150,2 ppm y 122,8 ppm (los desplazamientos de 122,6 y 122,8 pueden ser intercambiados).



Espectro 23. RMN ^{13}C para la mezcla Ai-C4A₂₈. (Piridina d₅; 300 MHz)

Adicionalmente, se identifica un carbono con un desplazamiento en 65,5 correspondiente a un metileno que junto con la señal en 48,6 ppm permite asignar al C-23 y al C-5 respectivamente y otra señal en 55,9 ppm, asociada al C-5 de un núcleo derivado de la bayogenina.

Debido a la ausencia de datos de correlación bidimensional protón- carbono se realizó la asignación de carbonos por comparación con los compuesto **Ai-C₄₋₈L_{3-FG}** y **Ai-C₄₋₈A₉**, como se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Comparación de data ^{13}C -RMN en piridina- d_5 de hederagenina Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, con la genina Ai-C₄₋₈A₉ y Ai-C₄₋₈A₂₈

Ai-C ₄₋₈ L _{3-G}			Ai-C ₄₋₈ A ₉		Ai-C ₄₋₈ A ₂₈			
N° C	^{13}C δ (ppm)	DEPT	^{13}C δ (ppm)	DEPT	A28'		A28''	
					^{13}C δ (ppm)	DEPT	^{13}C δ (ppm)	DEPT
1	44,2	-CH ₂ -	44,1	-CH ₂ -	44,2	-CH ₂ -	38,8	-CH ₂ -
2	70,6	-CH ₂ -	70,6	-CH ₂ -	≈ 70	-CH ₂ -	*	-CH ₂ -
3	83,0	>CH-O-	82,9	>CH-O-	83,0	>CH-O-	82,8	>CH-O-
4	42,8	C	43,5	C	42,9	>C<	39,6	C
5	48,6	>CH-	48,6	>CH-	48,6	>CH-	55,9	>CH-
6	18,1	-CH ₂ -	18,0	-CH ₂ -	18,3	-CH ₂ -	18,5	-CH ₂ -
7	32,9	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -	33,2	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -
8	40,1	C	39,8	C	39,9	>C<	**	C
9	47,7	>CH-	47,8	>CH-	47,6	>CH-	48,1	>CH-
10	37,0	C	37,0	C	37,0	>C<	**	C
11	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -	24,0	-CH ₂ -	23,8	-CH ₂ -
12	123,1	=CH-	122,6	=CH-	122,6	=CH-	122,8	=CH-
13	144,2	=C<	144,8	=C<	144,9	=C<	150,2	=C<
14	42,3	C	42,2	C	42,2	>C<	42,3	C
15	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -	28,3	-CH ₂ -
16	23,4	-CH ₂ -	23,6	-CH ₂ -	23,7	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
17	47,0	C	46,6	C	46,7	>C<	**	C
18	41,8	>CH-	42,0	>CH-	42,0	>CH-	**	>CH-
19	46,2	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -	46,4	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
20	30,8	C	31,0	C	30,9	>C<	**	C
21	34,0	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -	34,2	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
22	32,6	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -	33,0	-CH ₂ -	**	-CH ₂ -
23	65,4	CH ₂ OH	65,4	CH ₂ -OH	65,5	-CH ₂ -OH	**	-CH ₂ -OH
24	15,1	-CH ₃	15,1	-CH ₃	15,0	-CH ₃	15,5	-CH ₃
25	17,3	-CH ₃	17,2	-CH ₃	17,2	-CH ₃	16,8	-CH ₃
26	17,6	-CH ₃	17,4	-CH ₃	17,5	-CH ₃	17,5	-CH ₃
27	26,2	-CH ₃	26,3	-CH ₃	26,2	-CH ₃	26,2	-CH ₃
28	176,5	-COOR	180,2	-COOH	180,2	-COOH	**	-COOH
29	33,1	-CH ₃	33,3	-CH ₃	33,2	-CH ₃	33,3	-CH ₃
30	23,7	-CH ₃	23,8	-CH ₃	23,8	-CH ₃	23,8	-CH ₃

* No determinado. ** Los desplazamientos de estos carbonos para ambas geninas son similares por lo que se asignan a la genina de A28' para indicar la presencia de este núcleo en la mezcla. Sin embargo, es necesario el análisis de los espectros bidimensionales para la asignación inequívoca de cada señal dentro de la mezcla **Ai-C₄₋₈A₂₈**

Por los desplazamientos en 82,8 y 82,9 ppm, se proponen dos saponinas monodesmosídicas con azúcares en el C-3. Se propone la saponina **A28'** (Figura 32; Estructura 52) con núcleo tipo bayogenina con desplazamiento de 65,5 ppm y 48,6 ppm asignado a C-23 y C-5, respectivamente y finalmente, un doble enlace entre C-12 y C-13 con desplazamientos en 122,6 y 144,9 ppm (intercambiables). Para la saponina **A28''** (Figura 31; Estructura 53), se propone un núcleo derivado del ácido oleanólico con un desplazamiento característico de 55,9 ppm asignado a C-5 y un doble enlace entre C-12 y C-13 con desplazamiento en 122,8 y 150,2 ppm (intercambiables). Ya que se observa una sola señal del grupo carboxilo en 180,2 ppm no se le asigna a ninguna estructura específica.

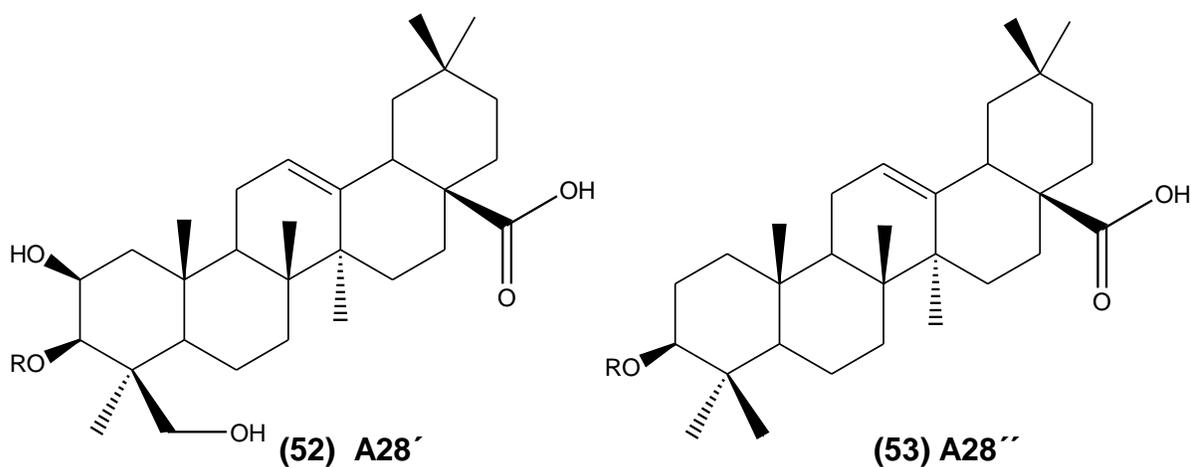


Figura 32. Estructuras propuestas del compuesto Ai-C₄₋₈A₂₈

Para los compuestos Ai-C₄₋₈L_{3-D}, Ai-C₄₋₈L_{3-L}, Ai-C₄A₁₅ y Ai-C₄A₃₉ no se tienen aún datos espectroscópicos de las muestras.

9. CONCLUSIONES

- Se aislaron 11 sólidos de color blanco y crema, Ai-C₄₋₈L_{3-D}, Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, Ai-C₄₋₈L_{3-I}, Ai-C₄₋₈L_{3-L}, Ai-C₄A₇, Ai-C₄A₉, Ai-C₄A₁₀, Ai-C₄A₁₅, Ai-C₄A₂₂, Ai-C₄A₂₈ y Ai-C₄A₃₉, solubles en solventes polares de las hojas y tallos de *Arrabidaea inaequalis*. Todos los sólidos Aislados revelaron como manchas púrpura-azules en vainillina-ácido sulfúrico y p-anisaldehído, indicando su naturaleza terpénica.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, HSQC y HMBC se logró identificar al compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-FG} como *3-O-β-D-glucopiranosil-28-O-β-D-glucopiranosil bayogenina*.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, se propone al compuesto Ai-C₄₋₈L_{3-I} como una saponina monodesmosídica de tipo oleanano con tres unidades de azúcar.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, se propone al compuesto Ai-C₄₋₈A₇ como *3-O-β-D-glucopiranosil-hederagenina*.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, HSQC y HMBC se logró identificar al compuesto Ai-C₄₋₈A₉ como *3-O-[O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil bayogenina o 3-O-(3-soforosil)-bayogenina*.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, se propone al compuesto Ai-C₄₋₈A₁₀ como *3-O-β-D-glucopiranosil-bayogenina*.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, se propone al compuesto Ai-C₄₋₈A₂₂ como una saponina monodesmosídica de tipo bayogenina con dos unidades de azúcar.
- Mediante análisis de los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, se propone al compuesto Ai-C₄₋₈A₂₈ como una mezcla de dos saponinas monodesmosídicas.
- Las saponina Ai-C₄₋₈L_{3-FG}, Ai-C₄₋₈A₉, Ai-C₄₋₈A₁₀ corresponden a nuevos metabolitos secundarios en la literatura de productos naturales.
- La saponina Ai-C₄₋₈A₇ corresponde a un nuevo metabolito secundario reportado para la familia Bignoniaceae.

10. RECOMENDACIONES

- Continuar con análisis fitoquímico de la especie *Arrabidaea inaequalis* debido a que es rica en metabolitos secundarios, especialmente en saponinas.
- Realizar la caracterización de los diversos compuestos que Aislados que aún no han sido analizados por RMN.
- Usar mayor cantidad de masa, para acumular mayor cantidad de metabolitos presentes, en función de poder caracterizar aquellos que fueron descartados o no detectados.
- Para próximos estudios fitoquímicos de metabolitos secundario del tipo terpenoidal glicosilado no usar CLV.
- Para próximos estudios fitoquímicos de metabolitos secundario del tipo terpenoidal glicosilado usar CC con fase estacionaria de sílica gel en fase normal y Sephadex LH20
- Para próximos estudios fitoquímicos de metabolitos secundario del tipo terpenoidal glicosilado usar como fase móvil sistemas de solventes de CH₂Cl₂-MeOH-H₂O.

11. BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Pino-Rodriguez, S. Prieto-González, M. E. Pérez-Rodriguez, and J. Molina-Torres, "Género Erythrina: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica," *Acta Farm. Bonaer.*, vol. 23, no. 2, pp. 252–258, 2004.
- [2] D. Marcano and M. Hasegawa, "Fitoquímica Organica," in *Fitoquímica Organica*, 2da Edició., Caracas: CDCH-UCV, 2002, pp. 32–34, 237–239, 317, 318, 379.
- [3] A. Osbourn and V. Lanzotti, "Plant-derived Natural Products. Synthesis, Function, and Application," in *Plant-derived Natural Products. Synthesis, Function, and Application*, S. D. Heidelberg, Ed. New York, 2009, p. 3.
- [4] A. Guarnizo and P. Martinez, "Experimentos de Química Organica," in *Experimentos de Química Organica*, Ediciones., E. Elizcom, Ed. Quindio, Colombia: Ediciones Elizcom, 2009, pp. 4, 7.
- [5] L. Taiz and E. Zeiger, "Fisiología Vegetal," in *Fisiología Vegetal*, 3rd ed., D. L. Publicacions de la Universitat Jaume I, Ed. 2006, p. 536, 537.
- [6] P. Kaufman, L. Cseke, W. Sara, J. Duke, and H. Brielmann, "Natural Products from Plants," in *Natural Products from Plants*, C. P. LLC, Ed. Boca raton, Florida: CRC Press LLC, 1999, pp. 9, 11.
- [7] M. Ruiz Maqueda, S. Mendoza Díaz, and J. Zavala Nigoa, "Determinación de compuestos fenólicos de tres poblaciones de orégano (*Lippia graveolens* Kunt)." .
- [8] P. L. Rodriguez, "Semisíntesis en disolución y en fase sólida de derivados triterpénicos de *Olea europaea* . Obtención de sintones quirales , inhibidores de serin-proteasas y agentes apoptóticos Departamento de Química Orgánica," 2007.
- [9] A. Romo de Vivar Romo, "Química de la flora Mexicana," in *Química de la flora Mexicana*, Pimera Ed., S. y G. editores de S. de CV, Ed. Mexico: S y G editores de SA de CV, 2006, p. 89.
- [10] K. Hostettmann and A. Marston, "Saponins," in *Saponins*, Cambridge ., G. B. Cambridge University Press, Ed. Gran Bretaña, 1995.
- [11] "The plant list." [Online]. Available: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Bignoniaceae/>.

- [12] A. Gentry, "Flora de Colombia," in *Flora de Colombia*, 1st ed., A. E. e I. Ltda., Ed. Bogota, Colombia: Arfo Editores e Impresores Ltda., 2009, p. 6.
- [13] C. Q. Da Rocha, E. F. Queiroz, C. S. Meira, D. R. M. Moreira, M. B. P. Soares, L. Marcourt, W. Vilegas, and J. L. Wolfender, "Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti- *Trypanosoma cruzi* activity," *J. Nat. Prod.*, vol. 77, no. 6, pp. 1345–1350, 2014.
- [14] P. Mendonça Pauletti, I. Castro-Gamboa, D. H. Siqueira Silva, M. C. Marx Young, D. M. Tomazela, M. Nogueira Eberlin, and V. Da Silva Bolzani, "New Antioxidant C-Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*," *J. Nat. Prod.*, vol. 66, no. 10, pp. 1384–1387, 2003.
- [15] G. C. Brandão, E. G. Kroon, D. E. R. Souza, J. D. S. Filho, and A. B. Oliveira, "Chemistry and antiviral activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae)," *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9919–9932, 2013.
- [16] C. Q. Da Rocha, F. C. Vilela, G. P. Cavalcante, F. V. Santa-Cecília, L. Santos-E-Silva, M. H. Dos Santos, and A. Giusti-Paiva, "Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 133, no. 2, pp. 396–401, 2011.
- [17] I. Pereira, "Leishmanicidal activity of different parts from *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (Bignoniaceae)," *Rev. da Univ. Val. do Rio Verde*, vol. 10, no. 1, pp. 49–55, 2012.
- [18] A. F. C. Ribeiro, T. C. Telles, V. P. Ferraz, E. M. Souza-Fagundes, G. D. Cassali, A. T. Carvalho, and M. M. Melo, "Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 22, no. 2, pp. 364–373, 2012.
- [19] L. Mafioleti, I. F. da Silva Junior, E. M. Colodel, A. Flach, D. T. D. O. Martins, and D. T. De Oliveira Martins, "Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 150, no. 2, pp. 576–582, Nov. 2013.
- [20] D. Taffarello, I. D. C. Biomédicas, U. D. S. Paulo, A. Prof, L. Prestes, S. P. S. P. Centro, M. P. Jorge, I. Maria, D. O. Sousa, M. Cristina, T. Duarte, G. M. Figueira, N. De, C. A. Queiroz, R. Alexandre, F. Rodrigues, J. E. De Carvalho, A. Lucia, T. Ruiz, A. Foglio, I. De Química, U. D. S. Paulo, A. Prof, L. Prestes, and S. P. Sp, "Atividade de extractos de *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT obtidos

por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas.,” *Quim. Nova*, vol. 36, no. 3, pp. 431–436, 2013.

- [21] a. a. Aro, K. M. Freitas, M. a. Foglio, J. E. Carvalho, H. Dolder, L. Gomes, B. C. Vidal, and E. R. Pimentel, “Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon,” *Life Sci.*, vol. 92, no. 13, pp. 799–807, 2013.
- [22] R. Díaz, J. F. Cició, and R. Ocampo, “Domesticación de recursos naturales nativos en condiciones agroecológicas en el trópico húmedo en el Caribe de Costa,” 2000.
- [23] C. . Torres, M. B. Núñez, M. P. Castro, and A. M. González, “Actividad antimicrobiana de cinco especies del genero *Arrabidaea* del Nordeste argentino,” 2011. [Online]. Available: http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=20620&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1496608. [Accessed: 15-May-2015].
- [24] P. M. Pauletti, V. Da Silva Bolzani, and M. C. M. Young, “Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae),” *Quim. Nova*, vol. 26, no. 5, pp. 641–643, 2003.
- [25] S. Catarina, S. Oloris, M. Samara, D. Alves, M. J. De Medeiros, M. Luan, and S. De Medeiros, “Análise citotóxica e fitoquímica de *Arrabidaea pulchra* (Cham .),” vol. 3, no. 3, pp. 53–63, 2014.
- [26] T. Alcerito, F. E. Barbo, G. Negri, Cd. Y. A. C. Santos, Christiane I. Meda, M. Claudia, M. Young, D. Chavez, and C. T. T. Blatt, “Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 30, pp. 677–683, 2002.
- [27] W. L. R. Barbosa, L. D. N. Pinto, E. Quignard, J. M. D. S. Vieira, J. O. C. Silva, and S. Albuquerque, “*Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities,” *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 18, no. 4, pp. 544–548, 2008.
- [28] V. C. dos Santos, T. B. Longo, A. L. H. Garcia, M. F. Richter, T. N. Guecheva, J. A. P. Henriques, A. D. B. F. Ferraz, and J. N. Picada, “Evaluation of the Mutagenicity and Genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae), an Amazon Plant with Medicinal Properties,” *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, vol. 76, no. 6, pp. 381–390, 2013.

- [29] "Instituto de Ciencias Naturales. Colombia." [Online]. Available: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=89440>. [Accessed: 16-May-2015].
- [30] I. C. Fedón and A. Castillo, *Angiospermas trepadoras de los bosques ribereños de una sección de la cuenca baja de los Ríos Cuo-Sipapo (Estado Amazonas, Venezuela)*, Acta Botán. Caracas, Venezuela: Fundación Instituto Botánico de Venezuela (FIBV), 2005.
- [31] A. . Gentry, *Flora de Veracruz. Bignoniaceae*, vol. 24. 1982.
- [32] A. G. Martius, C., Eichler, "Plantillustrations," *Flora Brasiliensis*. [Online]. Available: http://plantillustrations.org/volume.php?id_volume=213. [Accessed: 19-May-2017].
- [33] M. B. Garden, "Tropicos." [Online]. Available: <http://www.tropicos.org/Name/40019885>.
- [34] "Kew Royal Botanic Garden." [Online]. Available: <http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/index.html>. [Accessed: 22-May-2015].
- [35] "EOL- Enciclopedia of life." [Online]. Available: http://eol.org/data_objects/21114068. [Accessed: 19-May-2015].
- [36] H. Wagner and S. Blatt, "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas," in *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed., Springer Dordrecht Heidelberg, Ed. Germany, 2009.
- [37] Flores T., J. Huamán, and G. Tomás, *Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la Melisa officinalis Toronjil*. 2013.
- [38] T. Fujioka and M. Iwamoto, "Studies on the Constituentes of Actinostemma lobatum MAXIM. V. Structures of Lobatosides B, E, F and G, the Dicrotalic Acid Esters of Bayogenin Bidesmosides Isolated from th Herb," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 58, no. 5, pp. 481–484, 1996.
- [39] W. Seebacher, N. Simic, R. Weis, R. Saf, and O. Kunert, "Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 41, no. 8, pp. 636–638, 2003.

- [40] B. S. Joshi, K. L. Singh, and R. Roy, "Complete assignments of H-1 and C-13 NMR spectra of the pentacyclic triterpene hederagenin from *Nigella sativa* Linn.," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 37, no. 4, pp. 295–298, 1999.
- [41] C. Profile, "Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd."
- [42] I. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen, and R. Elias, "The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin," *Phyther. Res.*, vol. 20, no. 2, pp. 130–134, 2006.
- [43] A. S. Shashkov and V. Y. Chirva, "Chemistry of Natural Compounds, Vol 36, No. 2, 2000," vol. 36, no. 2, pp. 131–133, 2000.