

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.  
FACULTAD DE CIENCIAS.  
ESCUELA DE QUÍMICA.**



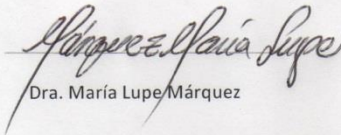
**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Phyllanthus acidus* (L) Skeels  
COLECTADA EN VENEZUELA”**

**Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela por la Br. Ambar  
González García para optar por el título  
de Licenciado en Química.**

**Caracas, Mayo 2018.**

**ACTA DE APROBACIÓN.**

Los abajo firmantes autorizados por la Universidad Central de Venezuela como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **"ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Phyllanthus Acidus* (L) Skeels COLECTADA EN VENEZUELA"**. Presentado por la Br. Ambar Carolina González García, 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 Lupe Márquez

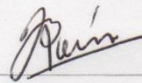
(Tutor)



---

Dra. Alirica Suárez

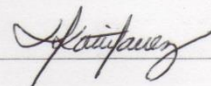
(Tutor)



---

Dr. Jairo Bermúdez

(Jurado)



---

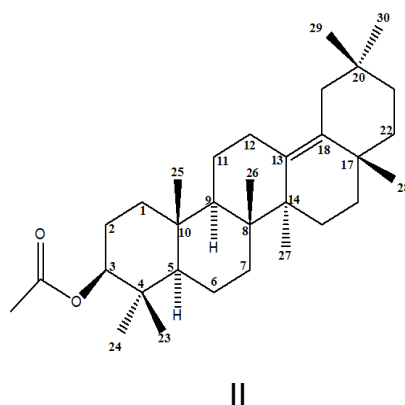
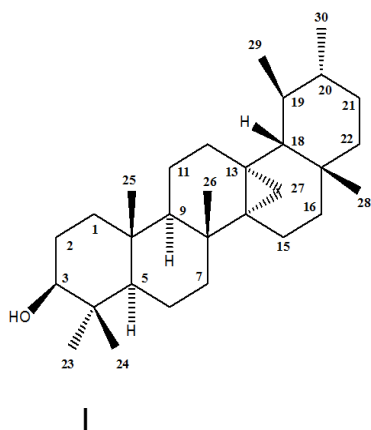
Dra. Katuska Chávez

(Jurado)

## RESUMEN

El presente trabajo describe el primer estudio fitoquímico realizado en la planta *Phyllanthus acidus* (L) Skeels colectada en nuestro país.

Se realizó un proceso de extracción por maceración en metanol, a la corteza de la planta. El extracto total obtenido, fue sometido a partición con solventes de polaridad creciente. De las diferentes fracciones obtenidas, se logró aislar y purificar por métodos cromatográficos, y caracterizar por técnicas espectroscópicas de IR y RMN, dos triterpenos: phyllanthol (**I**) y 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**).



**Palabras claves:** Fitoquímica, Productos Naturales, Química, Metabolitos Secundarios, Triterpenos, *Phyllanthus acidus*, *Phyllanthus*.

## **DEDICATORIA**

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento, dedicarle mi Trabajo Especial de Grado plasmado en este documento, a Dios, por darme la oportunidad de vivir, estando conmigo en cada paso que doy, fortaleciendo mi corazón, iluminando mi mente, dándome de Su Gracia y Su Favor y colocando en mi camino, a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante mi carrera.

A mi madre Rub García y mi padre Julio González, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor, todo esto se los debo a ustedes.

A mis hermanos Stheevens González y Stefani García, por ser una de las principales motivaciones de mi crecimiento, con el fin de darles el mejor ejemplo, recibiendo siempre su apoyo y su amor.

A mi familia, mis abuelas Clara Martínez y Hermelinda García, mi tío Clark García, mi abuelo Rubén García y mi bisabuela (QEPD) Trina Quintana, quienes siempre creyeron en mí y se esforzaron en siempre ayudarme con lo que me hiciera falta durante cada etapa de la carrera.

A mi pastora Gladis Devera (QEPD) quien jugó un papel muy importante en mi vida y siempre me brindó su apoyo y su compañía en los momentos buenos y malos.

A mis amigas Yudimar, Amarelys, Francis, Anyoli, Krisbel, Corina, Mafer, Rocsibel, Josareth, Adrianny, quienes me apoyaron en todo momento en mi formación académica, levantando mis manos en momentos difíciles y celebrando las victorias.

A los profesores que marcaron mi vida universitaria y me ayudaron en asesoría y dudas durante la carrera.

### **AGRADECIMIENTOS.**

Una tesis es un trabajo que no sólo es fruto del esfuerzo personal del tesista, sino que necesita de la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal. Con estas líneas quisiera demostrar mi agradecimiento a todas ellas.

Primeramente, le agradezco a Dios por darme la vida con sus herramientas para mantenerme de pie ante las dificultades y poder cumplir mis sueños.

A la UCV por abrirme las puertas de su casa y formarme como profesional. A las profesoras Alírica Suárez y María Márquez por haber tutorado ésta Tesis y haberme apoyado en todo momento, con el conocimiento y con palabras de aliento para alcanzar esta meta.

A las profesoras Katuska Chávez y Beth Díaz por toda la ayuda prestada durante el desarrollo de la investigación en el laboratorio de productos naturales.

A mi familia por siempre haber creído en mí y siempre apoyarme en la materialización de éste sueño.

Al Centro Cristiano de Caracas y hermanos en Cristo por la ayuda prestada con sus instalaciones y equipos durante la elaboración de éste trabajo.

A mis amigos y amigas por siempre estar cuando los necesité y tener un corazón dispuesto a amar.

A mi pastora Gladis Devera (QDEP) por haberse invertido en mí de una manera muy especial, transformando mi vida y alentándome a salir adelante.

## ÍNDICE GENERAL.

Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de esquemas.....	III
Índice de espectros.....	IV
Lista de abreviaturas (acrónimos) y símbolos.....	V
<b>I.- Introducción</b> .....	1
I.1.- Familia Phyllanthaceae.....	3
I.1.1.- Aspectos botánicos de la familia Phyllanthaceae.....	4
I.2. Género <i>Phyllanthus</i> .....	5
<b>II.- Antecedentes</b> .....	6
II.1.- <i>Phyllanthus acuminatus</i> .....	6
II.2.- <i>Phyllanthus amarus</i> .....	8
II.3.- <i>Phyllanthus discoideus</i> .....	17
II.4.- <i>Phyllanthus emblica</i> .....	19
II.5.- <i>Phyllanthus flexuosus</i> .....	22
II.6.- <i>Phyllanthus maderaspatensis</i> .....	24
II.7.- <i>Phyllanthus muellerianus</i> .....	25
II.8.- <i>Phyllanthus niruri</i> .....	26
II.9.- <i>Phyllanthus reticulatus</i> .....	28
II.10.- <i>Phyllanthus sellowianus</i> .....	29
II.11.- <i>Phyllanthus acidus</i> .....	30
<b>III.- Justificación</b> .....	34
<b>IV.- Objetivos</b> .....	35
IV.1.- Objetivo General.....	35
IV.2.- Objetivos Específicos.....	35
<b>V.- Materiales y equipos</b> .....	36
V.1.- Equipo de laboratorio.....	36
V.2.- Materiales Cromatográficos.....	36
V.3.- Disolventes.....	36

V.4.- Disolventes para RMN.....	37
V.5.- Reveladores.....	37
V.6.- Desecantes.....	37
<b>VI.- Procedimiento Experimental.....</b>	<b>38</b>
VI.1.- Colecta del Material vegetal.....	38
VI.2.- Tratamiento del Material vegetal.....	38
VI.3.- Extracción.....	38
VI.4.- Fraccionamiento del extracto metanólico.....	38
VI.5.- Separación de los componentes por fracción.....	40
VI.5.1.- Separación de los componentes de la fracción de hexano.....	41
VI.5.2.- Separación de los componentes de la fracción de Diclorometano.....	45
VI.5.3.- Separación de los componentes de la fracción de acetato de etilo.....	47
VI.5.4.- Separación de los componentes de la fracción hidrometanólica.....	50
<b>VII.- Resultados y discusiones.....</b>	<b>51</b>
VII.1.-Compuesto (I): Phyllanthol.....	51
VII.2.- Compuesto (II): 3-β-acetoxi-13(18) oleanane.....	60
<b>VIII.- Conclusiones.....</b>	<b>69</b>
<b>IX.- Recomendaciones.....</b>	<b>70</b>
<b>X.- Bibliografía.....</b>	<b>71</b>

## Índice de tablas.

- Tabla N°1.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de hexano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones..... 42
- Tabla N°2.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de las fracciones AGPACHF-4, AGPACHF-5, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones..... 43
- Tabla N°3.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de diclorometano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones..... 45
- Tabla N°4.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de acetato de etilo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones..... 47
- Tabla N°5.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  a los átomos de C presentes en el phyllanthol. .... 54
- Tabla N°6.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^1\text{H}$  a los átomos de H características presentes en el phyllanthol. .... 55



**Tabla N°7.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  a los átomos de C presentes en 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane..... 62

**Tabla N°8.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales más distintivas de RMN  $^1\text{H}$  a los átomos de H características presentes en 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (II)..... 63

### **Índice de figuras.**

**Figura N°1.** Mapa de distribución a nivel mundial de la familia Phyllanthaceae.  
..... 3

**Figura N°2.** Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones colectadas durante la separación de los componentes de AGPACH. Fracciones de la 1-20.....  
41

**Figura N°3.** Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones colectadas durante la separación de los componentes de AGPACH. Fracciones de la 18-34....  
42

**Índice de esquemas.**

<b>Esquema N°1.</b> Fraccionamiento del extracto metanólico de la corteza de <i>Phyllanthus acidus</i> . .....	
39	
<b>Esquema N°2.</b> Separación de componentes de la fracción de hexano del extracto metanólico de la corteza de <i>Phyllanthus acidus</i> .....	
44	
<b>Esquema N°3.</b> Separación de componentes de la fracción de diclorometano del extracto metanólico de la corteza de <i>Phyllanthus acidus</i> .....	
46	
<b>Esquema N°4.</b> Separación de componentes de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de la corteza de <i>Phyllanthus acidus</i> .....	
49	

**Índice de espectros.**

<b>Espectro N°1.</b> Espectro Infrarrojo de Phyllanthol <b>(I)</b> .....	56
<b>Espectro N°2.</b> Espectro <sup>1</sup> H RMN de phyllanthol <b>(I)</b> (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) .....	57
<b>Espectro N°3.</b> Espectro <sup>1</sup> H RMN de phyllanthol <b>(I)</b> ampliado (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) .....	58
<b>Espectro N°4.</b> Espectro RMN <sup>13</sup> C y DEPT de phyllanthol <b>(I)</b> ampliado (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) .....	59
<b>Espectro N°5.</b> Espectro Infrarrojo de 3-β-acetoxi-13(18) oleanane <b>(II)</b> .....	64
<b>Espectro N°6.</b> Espectro <sup>1</sup> H RMN de 3-β-acetoxi-13(18) oleanane <b>(II)</b> (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	65
<b>Espectro N°7.</b> Espectro <sup>1</sup> H RMN de 3-β-acetoxi-13(18) oleanane <b>(II)</b> ampliado (270 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	66

**Espectro N°8.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**) ampliado  
(270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).....  
67

**Espectro N°9.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**)  
(270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )..... 68

### Lista de acrónimos y abreviaturas.

AcOEt	Acetato de Etilo.
CC	Cromatografía de Columna.
CCF	Cromatografía de Capa Fina.
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo.
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
δ	Desplazamiento químico.
g	Gramos.
Hz	Hertz.
IC <sub>50</sub>	Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de una población.
IR	Infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
MHz	Mega Hertz.
ppm	Partes por millón.
AGPACH	Ambar González <i>Phyllanthus acidus</i> Corteza Fracción de Hexano.
AGPACD	Ambar González <i>Phyllanthus acidus</i> Corteza Fracción de Dicloro.
AGPACAc	Ambar González <i>Phyllanthus acidus</i> Corteza Fracción de Acetato de etilo.
AGPACH <sub>2</sub> O	Ambar González <i>Phyllanthus acidus</i> Corteza Fracción acuosa.
UV	Ultravioleta.
R <sub>f</sub>	Factor de retención.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la historia del hombre, se ha conocido que existen plantas cuyos extractos han sido utilizados para tratar diversas enfermedades. Siendo éstas un recurso alternativo para el tratamiento de algunos padecimientos de manera particular en países o regiones de muy bajos ingresos. Estos conocimientos han sido transmitidos de generación en generación, atribuyendo las propiedades medicinales según fuese su forma, color o hábitat. <sup>[1]</sup>

Gracias al interés que ha provocado la medicina “naturista”, en nuestra era de globalización, diariamente se incrementa el número de trabajos que muestran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones; sin embargo, la mayoría de ellos no están suficientemente documentados ni alertan contra los posibles efectos colaterales derivados del uso no controlado de materiales vegetales. <sup>[1]</sup>

La etnobotánica trata de recopilar estos conocimientos de manera precisa, ya que muchas veces provienen de fuentes dudosas. El término *etnobotánica* fue usado por primera vez por John Harshbergers en 1895, para referirse al estudio de las plantas utilizadas por las etnias y en especial, por los pueblos primitivos y/o aborígenes; hoy en día, este término se usa en sentido más amplio como estudio de las interacciones hombre-planta, de cualquier índole. <sup>[1]</sup> Actualmente, en el campo de los productos naturales, la información cubre un poco más, como estructura de los constituyentes químicos, actividad biológica, extracción y purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis. Las fuentes de los metabolitos secundarios son plantas superiores silvestres o cultivadas, plantas inferiores, microorganismos, animales (insectos, principalmente) y desde hace un tiempo han cobrado importancia los productos naturales de origen marino. Los últimos dos casos son consecuencia del agotamiento de fuentes terrestres de fácil acceso y/o del interés por un campo menos explotado. <sup>[1]</sup>

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se define como “producto natural” o “metabolito secundario”, aquél que es propio de

una especie, en la mayoría de los casos, no tienen utilidad aparente para el ser que los sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios, que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. La clasificación de los metabolitos secundarios podría hacerse basado en su estructura, bioformación, fuente de producción o su acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición. <sup>[1]</sup>

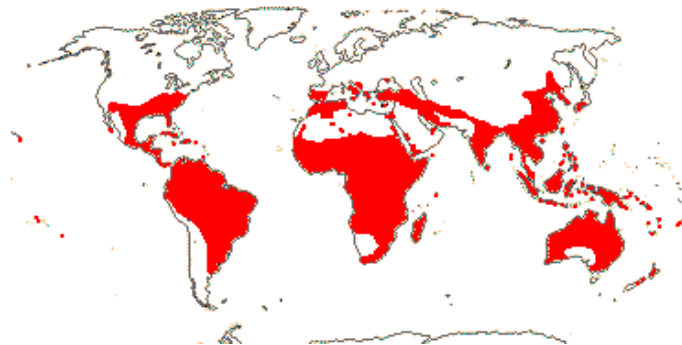
La fitoquímica es una rama de la química que estudia los metabolitos secundarios extraídos de las plantas, estudiando cada grupo de ellas, desde la estructura química molecular de estos compuestos, hasta sus propiedades biológicas. Esta tiene como objetivo el aislamiento, purificación, análisis, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de estas sustancias producidas por los vegetales. <sup>[1]</sup>

Actualmente, se puede encontrar extractos de plantas medicinales en diferentes presentaciones como tabletas y otras formas desconocidas en épocas anteriores, incrementando la disponibilidad de éstas para el consumo humano.

A las plantas pertenecientes a la familia Phyllanthaceae se le han atribuido desde la antigüedad efectos curativos. El género *Phyllanthus* ha sido utilizado en la medicina tradicional, particularmente en el sistema de medicina ayurvédica, para tratar, notablemente, problemas de riñón, trastornos de la vejiga urinaria, diabetes, dolores, ictericia, gonorrea, disentería crónica, úlceras en la piel y hepatitis B. Debido al gran potencial terapéutico de las especies *Phyllanthus*, numerosos estudios fitoquímicos y de bioactividad han sido realizados a estas plantas. <sup>[2]</sup>

## I.1 FAMILIA PHYLLANTHACEAE

La familia Phyllanthaceae fue tratada como Phyllanthoideae, una de las cinco subfamilias de Euphorbiaceae, sin embargo, Phyllanthaceae hoy es considerada como una familia independiente. Entre varias diferencias anatómicas y palinológicas entre estas familias, una de las más importantes para distinguirlas reside en el número de óvulos por lóculo (uno en Euphorbioideae, Alcyphoideae y Crotonoideae y dos en Phyllantoideae y Oldfieldae). Esta familia, con alrededor de 60 géneros y 2000 especies, está dominada por el género *Phyllanthus*, el cual posee más de la mitad de las mismas. Aunque tiene una distribución subcosmopolita, su mayor diversidad se encuentra en los trópicos de Asia. [3]



**Figura 1.** Mapa de distribución a nivel mundial de la familia Phyllanthaceae. [3]



### I.1.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA FAMILIA PHYLLANTHACEAE

Esta familia se caracteriza porque las especies que la constituyen, son árboles, arbustos o plantas herbáceas (anuales o perennes), rara vez trepadores, suculentos o acuáticos, monoicos o dioicos, caducifolios o perennifolios, sin látex, con indumento por lo general de pelos sin ramificar, rara vez de tricomas lepidotos, estrellados o dendríticos; con hojas estipuladas, por lo común alternas, a menudo dísticas o espiraladas, rara vez opuestas, verticiladas o fasciculadas, pecioladas o sésiles, simples y sin lóbulos (trifoliadas solamente en *Bischofia Blume*), penninervadas o rara vez palmatinervadas, con frecuencia entera y sin glándulas; inflorescencias axilares, rara vez terminales o caulifloras, en forma de panículas, racimos, glomérulos o las flores solitarias, pedicelos articulados o sin articulación; flores unisexuales, bracteadas, las de ambos sexos actinomorfas, con 3 a 8 sépalos imbricados o rara vez valvados, generalmente libres; pétalos presentes o ausentes, 4 a 6 libres, flores estaminadas con 3 a 10 estambres, filamentos libres o connados, anteras introrsas o extrorsas, libres o connadas, por lo general con deshiscencia longitudinal o rara vez poricida, disco presente o ausente extraestaminal o raramente intraestaminal, pistilodio presente o ausente; flores pistiladas con o sin disco, ovario súpero, formado por 3 carpelos fusionados, con dos (2) óvulos en cada lóculo, placentación axilar-apical, óvulos generalmente anátropos, rara vez epítropos o hemítropos, estilos libres o connados, a menudo bífidos, estigmas rollizos, aplanados o plumosos, agudos u obtusos, estaminodios por lo común ausentes; frutos por lo general en forma de esquizocarpos triloculares, otras veces con 1 a 15 lóculos, raramente indehiscentes y abayados; semillas 2 o 1 en cada lóculo, por aborción, sin arilo, ecarunculadas, testa comúnmente rígida, lisa o diversamente ornamentada, con o sin endosperma, cotiledones generalmente planos y delgados, rara vez carnosos o plegados.<sup>[3]</sup>

## I.2. GÉNERO *Phyllanthus*.

El género *Phyllanthus* es un género pantropical. Aunque tiene una distribución subcosmopolita, su mayor diversidad se encuentra en los trópicos de Asia. Se encuentra en bosques lluviosos de tierras bajas y montanos; así como también son muy comunes en pantanos. [4]

Una gran variedad de especies de plantas pertenecientes al género *Phyllanthus* han sido investigadas fitoquímicamente y farmacológicamente, siendo aisladas e identificadas diferentes moléculas.[5] En este contexto, diferentes clases de compuestos orgánicos de interés medicinal han sido reportados, incluyendo alcaloides, flavonoides, lactonas, cumarinas, compuestos fenólicos y derivados bencénicos simples, esteroides, terpenoides, lignanos, taninos, entre otros como carbohidratos, azúcares, lípidos, ácidos grasos y proteínas bioactivas. Sin embargo, se debe notar que los lignanos, triterpenos, alcaloides y taninos son los compuestos más abundantes determinados para este género. Entre todas las especies estudiadas, *P. niruri*, *P. emblica*, *P. flexuosus*, *P. amarus* y *P. sellowianus*, han recibido mayor atención fitoquímica. Aunque la mayoría de estos compuestos son químicamente conocidos, permanecen indeterminadas todas las propiedades farmacológicas de ellos. [5]

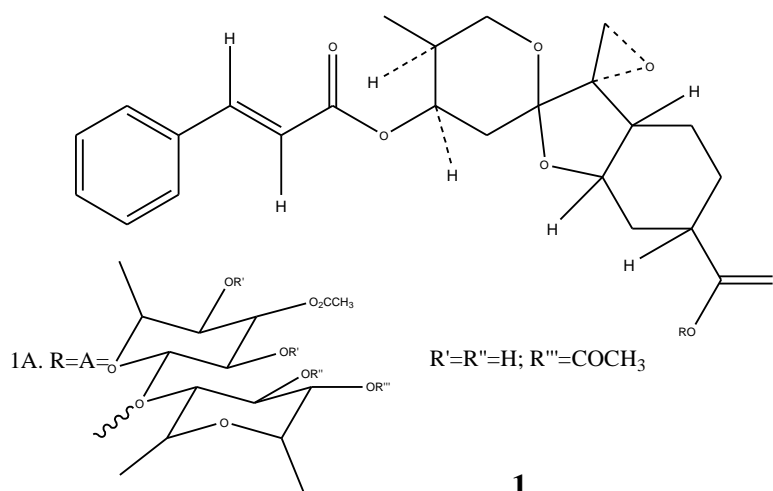
## II. ANTECEDENTES.

### II.1. *Phyllanthus acuminatus*.

En la literatura se encuentra información de algunas especies de este género, entre ellas *P. acuminatus*. Ésta es la especie considerada como la más extendida y por lo tanto más frecuente; muestra muy poca variación geográfica en sus caracteres morfológicos. [6]

Para esta especie, en diferentes investigaciones realizadas y reportadas, se han aislado distintos compuestos que han demostrado actividad antineoplásica, entre ellos están: phyllanthostatina 1 (**1A**), phyllanthostatina 2 (**1B**), phyllanthostatina 3 (**1C**), phyllanthostatina 4 (**1D**), phyllanthostatina A (**1E**). [5]

A su vez, también ha sido aislado el lignano justicidine B (**2**). [5]

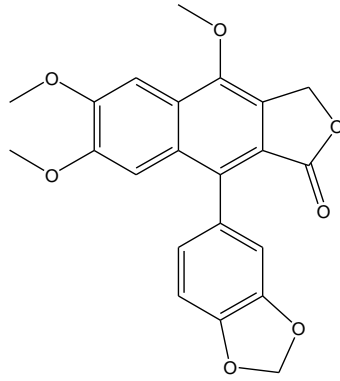


1B. R=A; R'=R'''=H; R''=COCH<sub>3</sub>

1C. R=A; R'=R''=R'''=COCH<sub>3</sub>

1D. R=CH<sub>3</sub>

1E. R=H

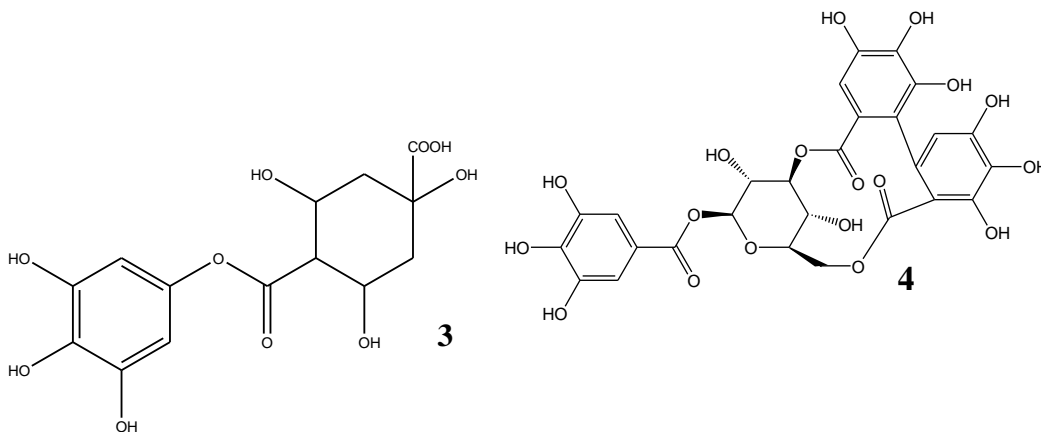
**2**

## II.2. *Phyllanthus amarus*.

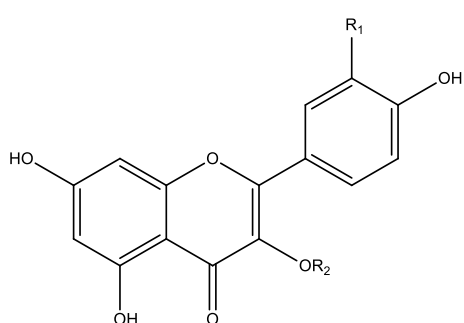
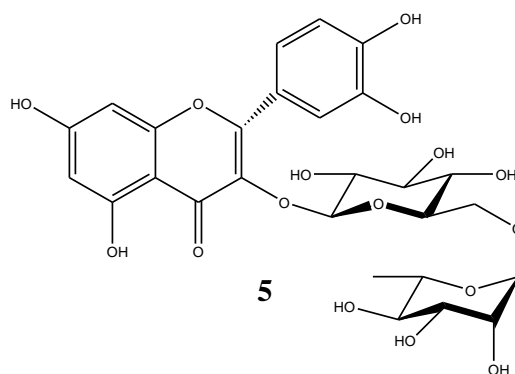
Esta especie es una de las más estudiadas del género *Phyllanthus*, ya que en ella se han reportado una gran cantidad de propiedades medicinales. Se encuentra ampliamente extendida por todos los países tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo la India, en la cual es muy usada en el sistema de medicina ayurvédica, para tratar problemas de riñón y bazo. La literatura ayurvédica ha demostrado su utilidad como antitusivo, antiespasmódico, analgésico, antihemorrágico, antianémico, protector hepático, diurético yantiséptico. [7] En estudios fitoquímicos se han encontrado metabolitos secundarios del tipo: bencenoides, flavonoides, taninos, alcaloides, polifenoles, triterpenos, seco-esteroles y aceites volátiles. [5][7]

Pertencientes a algunas de estas familias de metabolitos se ha logrado identificar algunos de los mostrados a continuación:

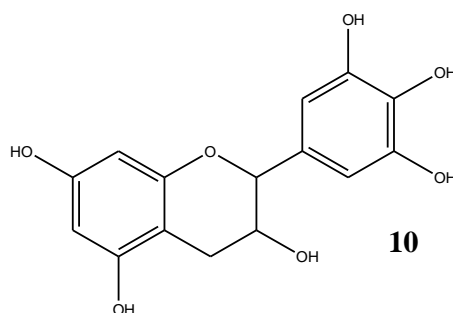
**Bencenoides:** ácido4-O-galoilquinico (**3**), corillagina (**4**). [5] [7]



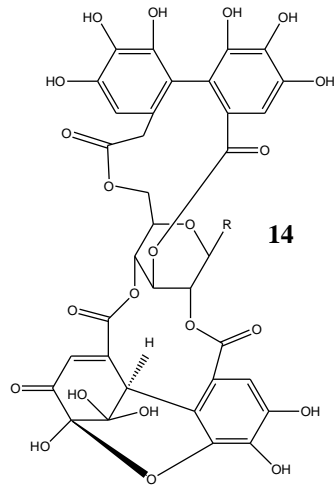
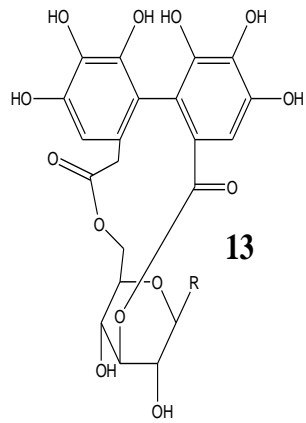
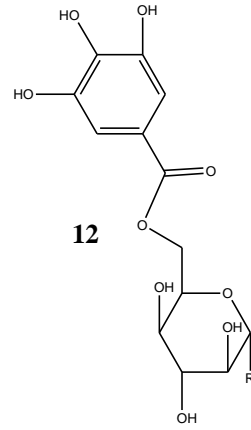
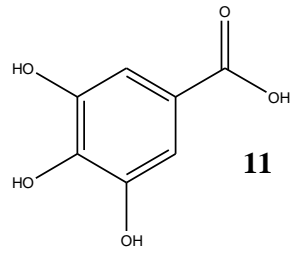
**Flavonoides:** rutina (**5**), kaempferol (**6**), astragalina (**7**), quercetina (**8**), quercitrina (**9**), galocatequina (**10**). [5] [7]

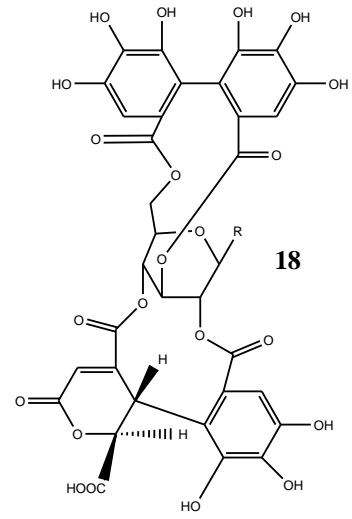
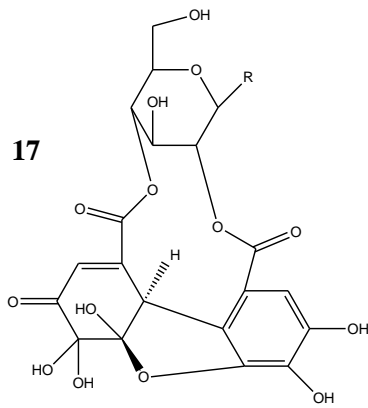
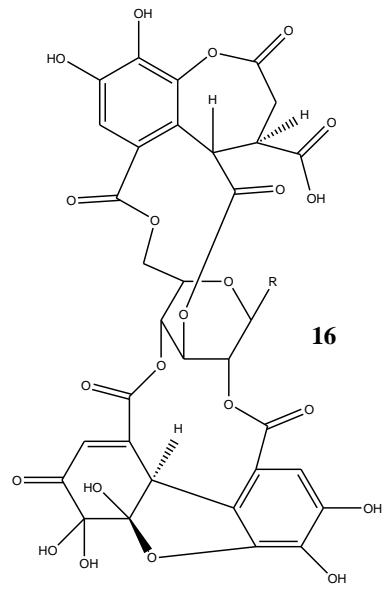
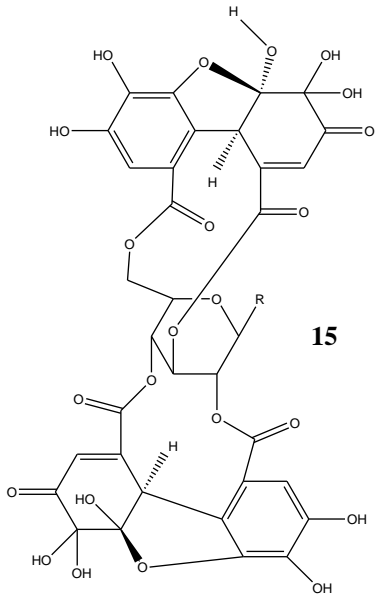


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>6</b>	H	H
<b>7</b>	H	Glu
<b>8</b>	OH	H
<b>9</b>	OH	Rha

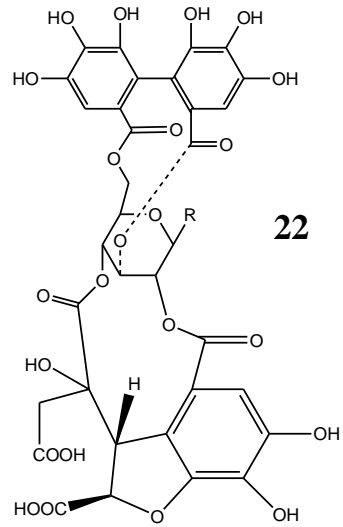
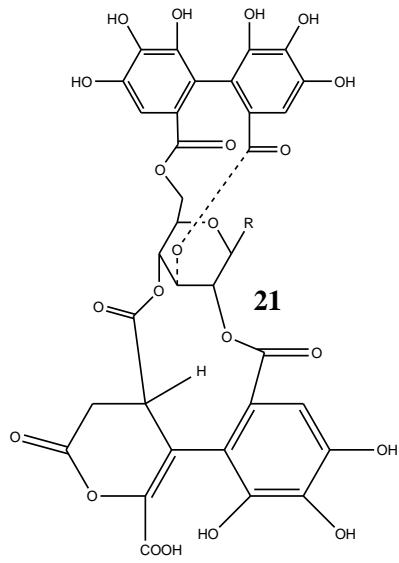
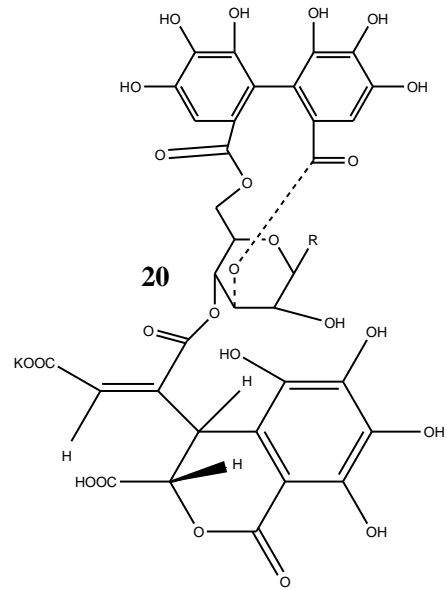
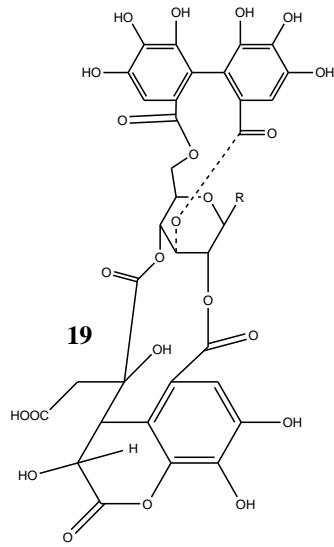


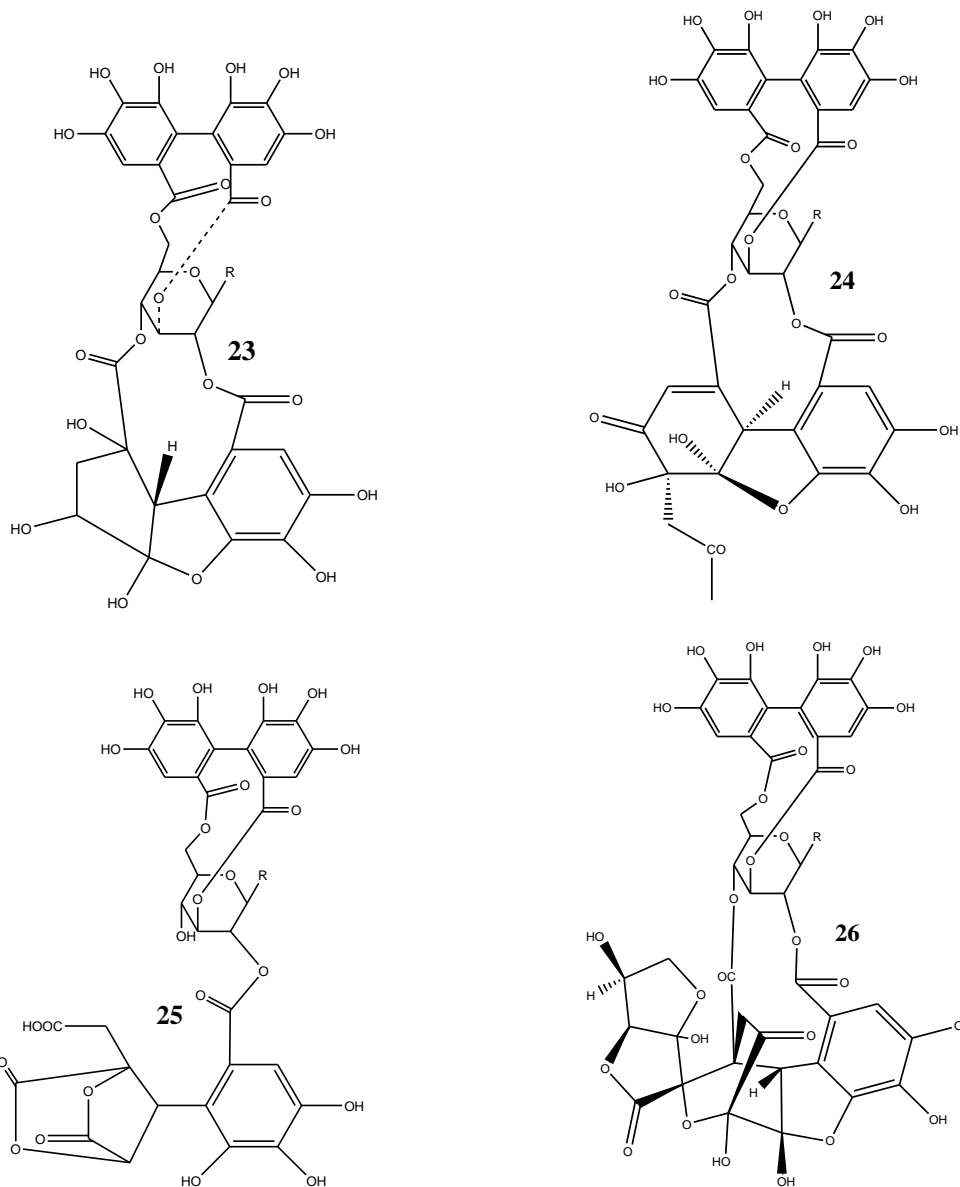
**Taninos:** ácido gálico (**11**), 1,6-digaloilglucopiranososa (**12**), isocorilagina (**13**), geraniina (**14**), amariina (**15**), amarulone (**16**), furosina (**17**), ácido geraniinico B (**18**), ácido amariinico (**19**), ácido repandusinico A (**20**), phyllanthusiin A (**21**), phyllanthusiin B (**22**), phyllanthusiin C (**23**), phyllanthusiin D (**24**), melatonina (**25**), elaeocarpusina (**26**).<sup>[5] [7]</sup>





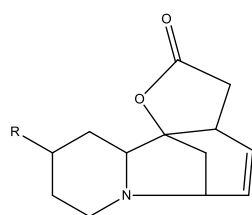






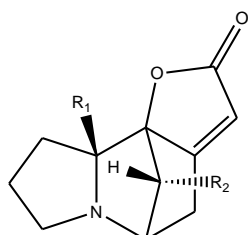
**Alcaloides:** phyllanthina (27), securinina (28), isobubbialina (29), epibubbialina (30), nor-securinina (31), 4-metoxi-nor-securinina (32), phenaxina (33) y derivados de phenaxina. [5] [7]

**Compuesto**      **R**



**27** -OMe

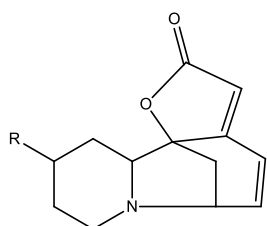
**28** H



**Compuesto** **R<sub>1</sub>** **R<sub>2</sub>**

**29** H -OH

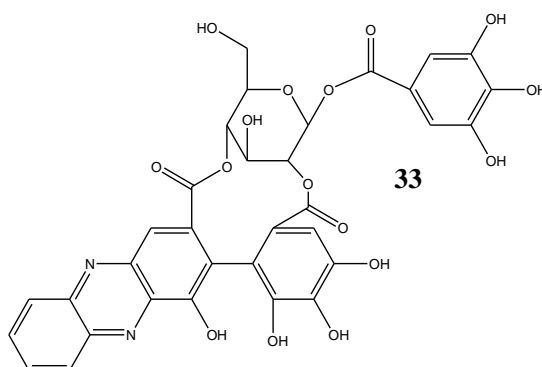
**30** -OH H



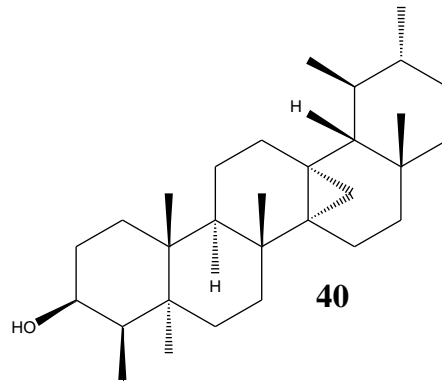
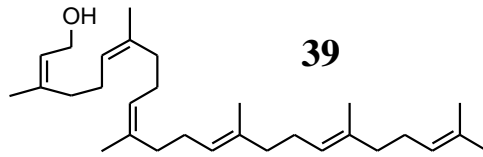
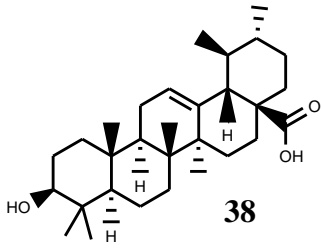
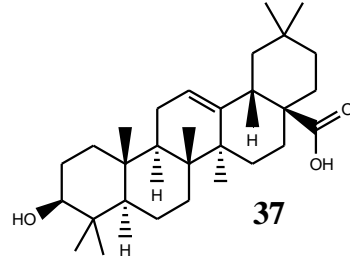
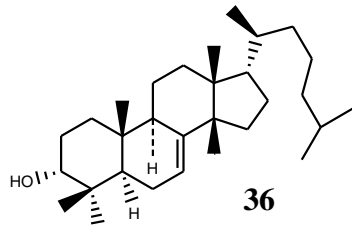
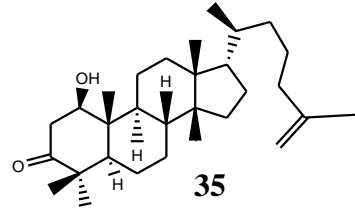
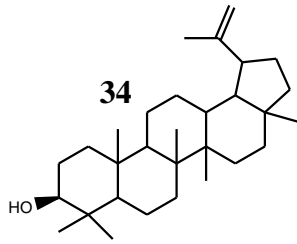
**Compuesto** **R**

**31** H

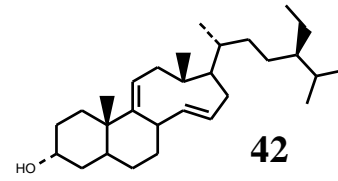
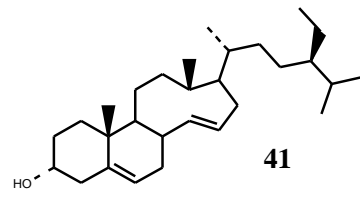
**32** -OCH<sub>3</sub>



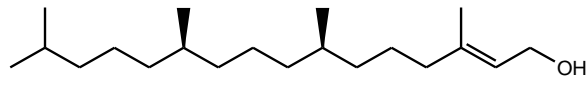
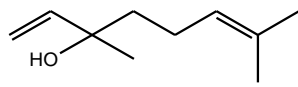
**Triterpenos:** lupeol (**34**), phyllanthanol (**35**), phyllanthol (**36**), ácido oleanólico (**37**), ácido ursólico (**38**), farnesylfarnesol (**39**), phyllantol (**40**). <sup>[5][7]</sup>



**Seco-esteroles: amarosterol A (41), amarosterol B (42).** [5] [7]



**Aceites Volátiles:** linalool (**43**), phytol (**44**). [5] [7]

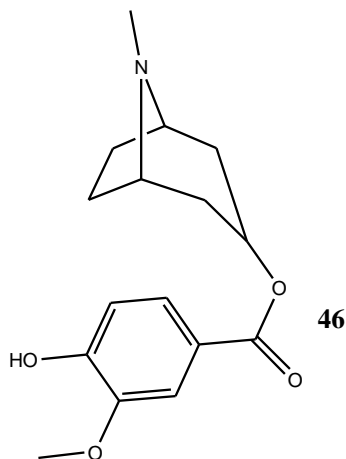
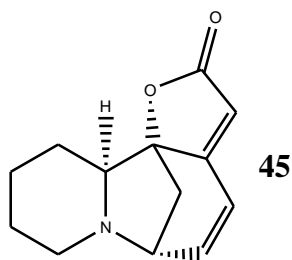


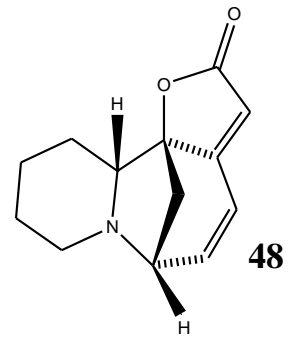
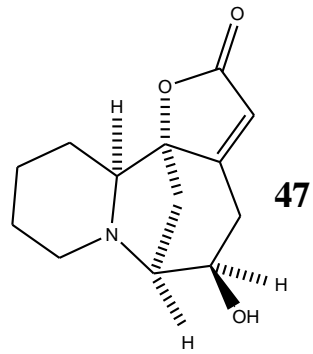
### II.3. *Phyllanthus discoideus*.

Otra de las plantas que han sido estudiadas debido a su uso medicinal es la especie *Phyllanthus discoideus*, la cual, es un árbol pequeño de uso extenso en la medicina local del trópico de África occidental; sus hojas son usadas como tónicos para enfermedades infecciosas, la corteza se usa principalmente como purgante y antipirético. [8]

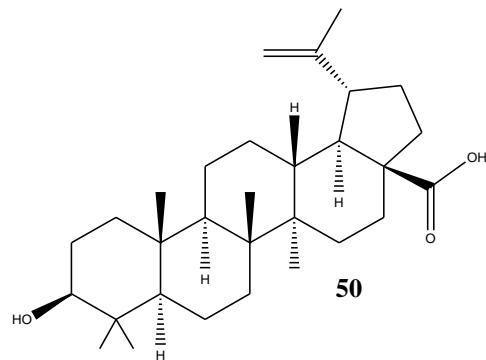
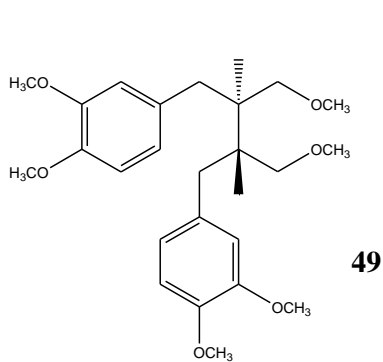
El extracto acuoso de sus hojas ha mostrado actividad antibacteriana; la fracción de alcaloides obtenida de éste inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium* (MIC = 1,6 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 0,78 mg/mL), *Staphylococcus aureus* y *Micobacterium smegmatis* (MIC = 0,2 mg/mL). [8]

Entre los alcaloides aislados se encuentran: phyllochristina (**45**), phyllanthina (**27**), phyllalbina (**46**), 14,15-dihidroallo-securinina-15-β-ol (**47**), securinina (**28**), viro-allo-securinina (**48**) y nor-securinina (**31**). [5]





Para esta especie, además de los compuestos tipo alcaloides, también, se han identificado compuestos del tipo lignano y triterpeno, phyllanthina (**49**) y ácido betulínico (**50**), respectivamente. [5]



#### **II.4 *Phyllanthus emblica*.**

Comúnmente conocida en la India como Grosella, es una hierba usada como tónico rejuvenecedor, en el sistema de medicina Aryuvédica. *P. emblica* es altamente nutritiva y podría ser una importante fuente dietética de vitamina C, aminoácidos y minerales. [9]

La planta contiene compuestos tipo bencenoides, taninos, alcaloides, cumarinas, diterpenos, flavonoides, esteroides, entre otros. [5] Todas las partes de la planta se usan con fines medicinales, especialmente la fruta que se ha utilizado por la medicina ayurvédica como un potente rejuvenecedor y debido a que contiene altos niveles de ácido ascórbico, es usada para tratar la tuberculosis pulmonar. Por otro lado, en la medicina tradicional se usa para el tratamiento de la diarrea, ictericia e inflamación. [9]

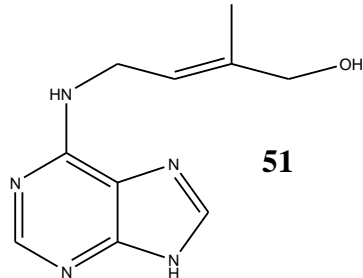
Varias partes de la planta han demostrado propiedades antidiabéticas, hipolipemiantes, antibacterianas, antioxidantes, antiulcerogénicas, protector hepático, protector gástrico y protector a la quimioterapia. [9]

En una investigación realizada, acerca de la fitoquímica y la actividad antibacteriana de las hojas y frutas secas de la planta, bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* fueron utilizadas, y la actividad antimicrobiana de los extractos concentrados (extractos en agua, éter de petróleo, cloroformo y alcohol) fue evaluada por el diámetro de inhibición contra los microorganismos anteriores. Los extractos de la planta resultaron activos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo que indica que *P. emblica* tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana y podría ser considerada como una fuente potencial de nueva clase de antibióticos, que podrían ser útiles para enfermedades infecciosas y el control de la quimioterapia. [10]

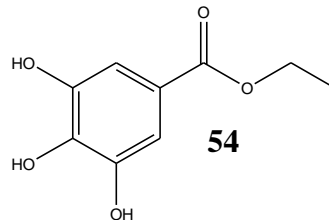
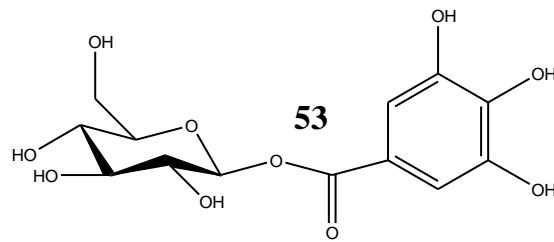
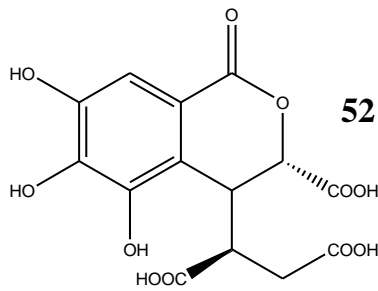


Entre los compuestos aislados para esta planta se encuentran:

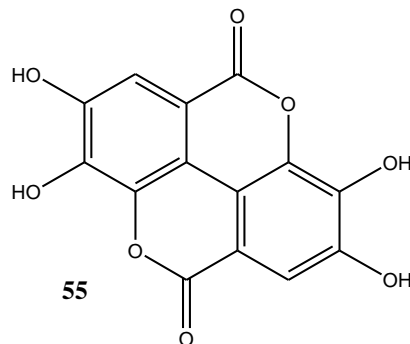
**Alcaloide:** zeatina (**51**). [5] [9] [10]



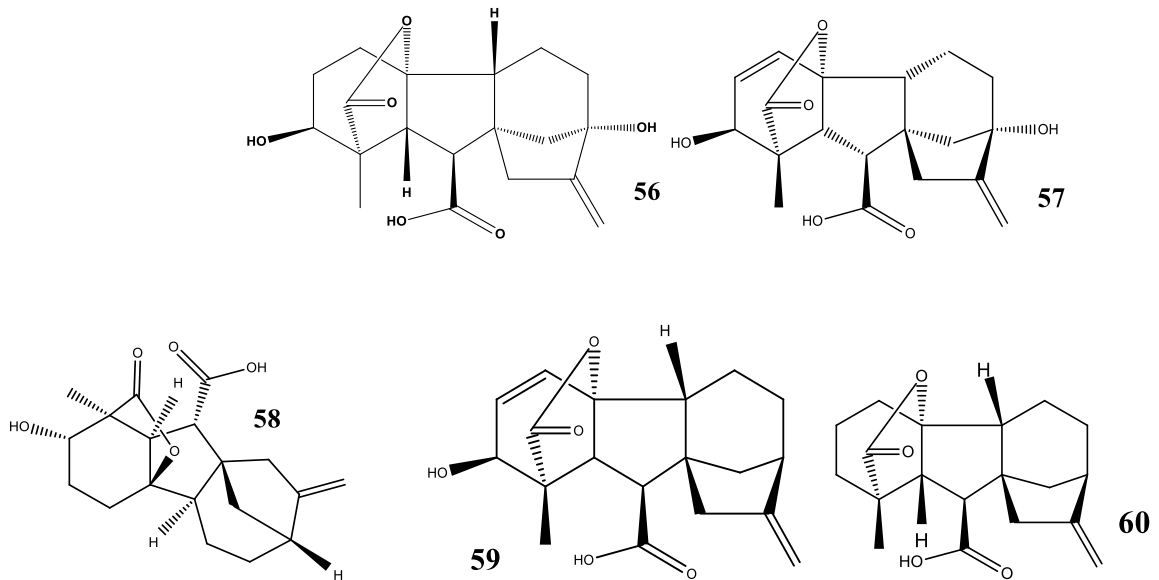
**Bencenoides:** ácido chebullico (**52**), corillagina (**4**), ácido gálico (**11**), glucogalina (**53**), galato de etilo (**54**). [5] [9] [10]



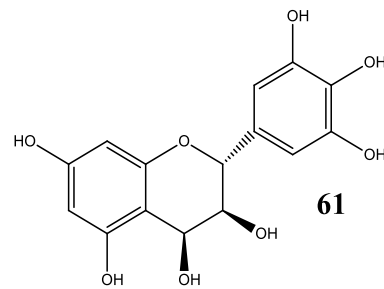
**Polifenol:** ácido elágico (**55**). [5] [9] [10]



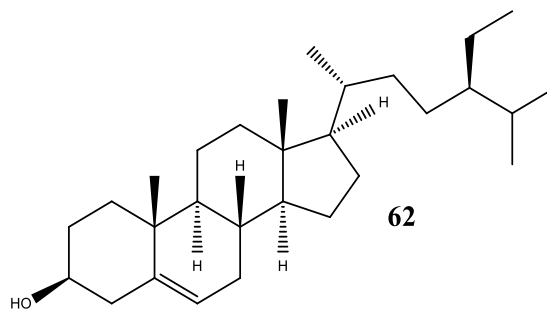
**Diterpenos:** giberelina A-1 (**56**), giberelina A-3 (**57**), giberelina A-4 (**58**), giberelina A-7 (**59**), giberelina A-9 (**60**). [5] [9] [10]



**Flavonoides:** leucodelfinidina (**61**), rutina (**5**). [5] [9] [10]



**Esterol:**  $\beta$ -sitosterol (**62**). [5] [9] [10]

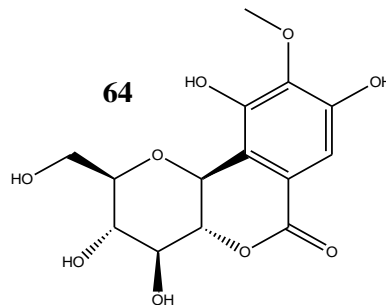
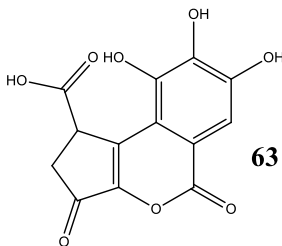


## II.5 *Phyllanthus flexuosus*.

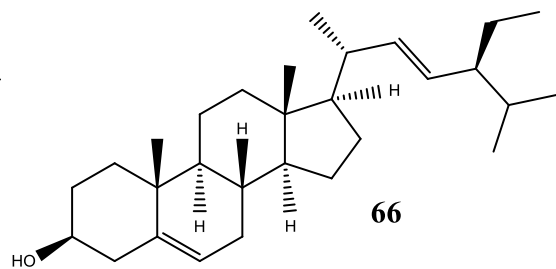
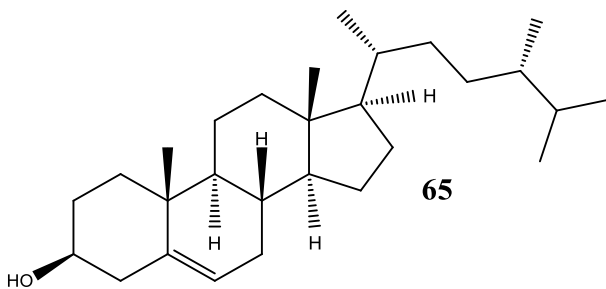
Siguiendo la búsqueda de las diferentes especies que han sido estudiadas alrededor del mundo pertenecientes al género *Phyllanthus*, encontramos *P. flexuosus*, la cual se trata de un arbusto común de la región del Himalaya en el centro de Japón. Entre las propiedades farmacológicas de esta planta se encuentra la actividad analgésica que ésta posee. Se han aislado diferentes compuestos a partir de ella, en los que podemos encontrar compuestos de tipo bencenoides, cumarinas, esteroides, taninos y triterpenos. [5]

**Bencenoide:** corilagina (**4**). [5]

**Cumarinas:** ácido brevifolin carboxílico (**63**) y bergenina (**64**). [5]

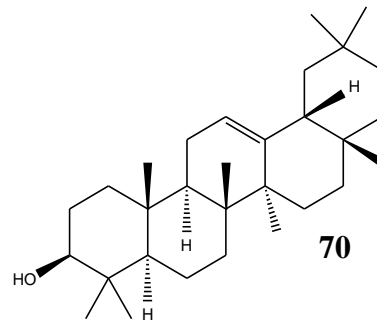
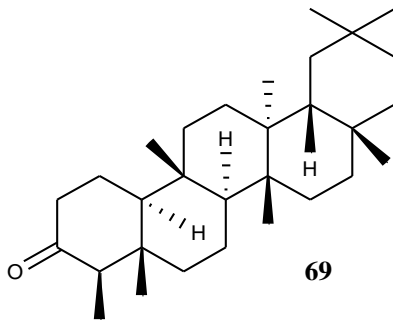
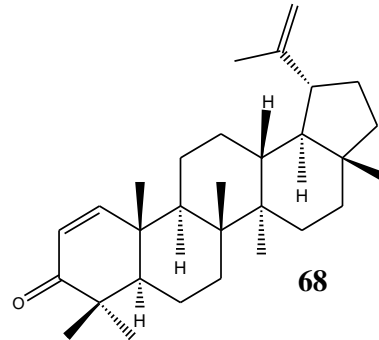
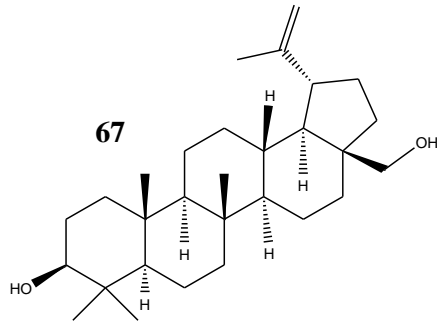


**Esteroides:** campesterol (**65**), estigmasterol (**66**),  $\beta$ -sitosterol (**62**). [5]



**Taninos:** geraniina (**14**), phyllanthusiin A (**21**), phyllanthusiin B (**22**), phyllanthusiin C (**23**), phyllanthusiin D (**24**). [5]

**Triterpenos:** betulinol (**67**), glochidona (**68**), friedelina (**69**),  $\beta$ -amirina (**70**). [5]

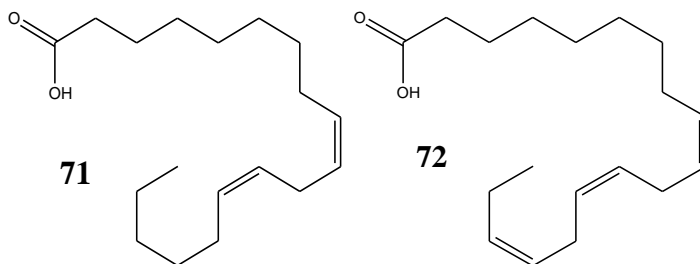


## II.6 *Phyllanthus maderaspatensis*.

Adicionalmente a las especies que ya se han destacado en este trabajo, se encuentra *P. maderaspatensis*, la cual es una planta herbácea medicinal. Las semillas de esta planta tienen un sabor desagradable y se usan como laxante, diurético y para tratar la bronquitis. <sup>[11]</sup> Estudios realizados a sus hojas han reportado propiedades como expectorante, así como también, en el sur de la India, una infusión de estas es usada para tratar la cefalea. <sup>[11]</sup>

Estudios preliminares han demostrado la notable actividad como protector hepático del extracto de agua, *n*-hexano y de alcohol contra el daño en el hígado producido por paracetamol en ratas Wistar, siendo el extracto de mayor actividad el *de n*-hexano para una dosis tan baja como 1,5 mg/Kg. <sup>[11]</sup>

Entre los compuestos reportados para esta planta encontramos los lípidos como el ácido linoléico (**71**) y el ácido linolénico (**72**). <sup>[5]</sup>



## II.7 *Phyllanthus muellerianus*.

La corteza de esta planta es usada en Ghana como un remedio para la curación de heridas infecciosas, trastornos menstruales, fiebre, dolor e inflamación, mientras que sus hojas, son usadas para tratamientos de trastornos cardíacos, renales y hepáticos. <sup>[12]</sup>

Entre los compuestos reportados para esta planta se encuentran los esteroides, triterpenos, taninos, flavonoides.

**Esterol:**  $\beta$ -sitosterol **(62)**. <sup>[12]</sup>

**Taninos:** geraniina **(14)**, furosina **(17)**. <sup>[12]</sup>

**Bencenoide:** corilagina **(4)**. <sup>[12]</sup>

**Flavonoide:** rutina **(5)**. <sup>[12]</sup>

La geraniina es el constituyente fitoquímico principal del extracto acuoso de las hojas de *P. muellerianus*, y se encuentra reportado como inhibidor de la enzima  $\beta$ -secretasa, la cual es la implicada en la enfermedad del Alzheimer, con un porcentaje de inhibición de  $(61,5 \pm 6,70) \%$  para 10mg/Kg. <sup>[12]</sup> Adicionalmente se ha demostrado que tiene actividades antinociceptiva, antihipertensiva y desinflamatoria. <sup>[12]</sup>

## II.8 *Phyllanthus niruri*.

Una de las plantas del género más investigadas y a la cual se le atribuyen gran cantidad de propiedades farmacológicas. Ésta es una planta ampliamente encontrada en Brasil y en otras regiones tropicales, localmente conocida como “tritadora de piedra” y es popularmente usada para el tratamiento de patologías renales, particularmente, urolitiasis. Los compuestos encontrados para esta planta son del tipo: lignanos, alcaloides, cumarinas, flavonoides, lípidos, esteroides, taninos y terpenoides. [13][5]

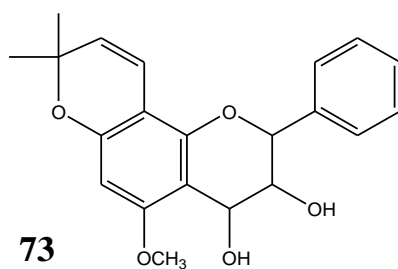
Esta planta es usada en la medicina ayurvédica de la India como remedio para muchas enfermedades como diabetes, hepatotoxicidad, hiperglicemia, enfermedades virales y causadas por bacterias. [14]

Grupos de investigadores de Brasil y la India, fueron los primeros en conducir estudios relacionados a las propiedades medicinales de *P. niruri* ya que esta planta es originaria de sus áreas, con una larga historia en sus usos por parte de sus habitantes. Investigadores brasileños reportaron la actividad antiespasmódica *P. niruri*, la cual ganó atención en todo el mundo a final de la década de los 80 debido a su actividad para tratar también la hepatitis B. El extracto de alcaloides de esta planta demostró una relajación específica para el tracto biliar y urinario. [14]

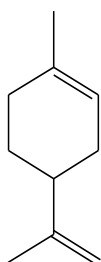
Entre los compuestos aislados para esta planta se tiene:

**Flavonoides:** rutina (**5**), quercetina (**8**), galocatequina (**10**), quercetol (**73**). [5]

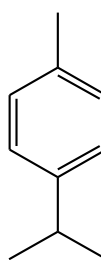
[13][14]



**Terpenoides:** limoneno (**74**), *p*-cimeno (**75**), lupeol (**34**). <sup>[5][13][14]</sup>



74



75

**Taninos:** geraniina (**14**), ácido elágico (**55**), corilagina (**4**). <sup>[5][13][14]</sup>

**Alcaloides:** phyllochristina (**45**), securinina (**28**), norsecurinina (**31**), phyllanthina (**27**). <sup>[5][13][14]</sup>

**Esterol:**  $\beta$ -sitosterol (**62**). <sup>[5][13][14]</sup>

**Polifenol:** ácido elágico (**12**). <sup>[5][13]</sup>



## II.9. *Phyllanthus reticulatus*.

Sumando a la lista de las tantas especies con propiedades medicinales de la familia Phyllanthaceae se encuentra a *P. reticulatus*, la cual se trata de un arbusto que crece fácilmente en regiones tropicales y subtropicales y se encuentra ampliamente distribuido en Tailandia. Su extracto acuoso ha sido usado en Tailandia como tratamiento para asma, anemia, fiebre o usado como diurético, astringente y agente antiinflamatorio. [15]

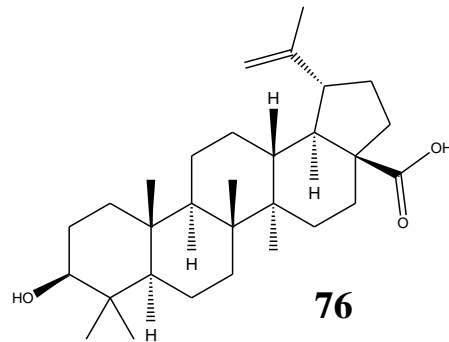
El trabajo biológico para esta planta mostró actividades antidiabéticas, antiplasmodium, antimicrobiana, protector hepático, antibacteriana, antinociceptiva y antihiper glucémica. Las hojas de esta planta se usan como diuréticos y anti-diarréico en infantes. [16]

Para esta planta se han aislado una variedad de compuestos químicos, entre los cuales predominan los triterpenos, sin embargo, también hay presencia de bencenoides, cumarinas y esteroides. [5]

**Esterol:**  $\beta$ -sitosterol (**62**). [5]

**Polifenol:** ácido elágico (**55**). [5]

**Triterpenos:** friedelina (**69**), ácido betulínico (**76**). [5]

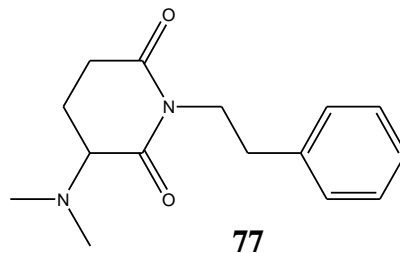


## II. 10. *Phyllanthus sellowianus*.

Planta medicinal de la familia en estudio, es nativa del sur de Brasil, la cual recibe el nombre de *P. sellowianus*. Es ampliamente usada en la medicina popular para el tratamiento del riñón y cálculos de la vejiga. [5]

De esta planta se han aislado una gran cantidad de compuestos, entre ellos: alcaloides, bencenoides, cumarinas, flavonoides, triterpenos, esteroides y azúcares.

**Alcaloide:** phyllanthimida (**77**). [5]



**Flavonoides:** rutina (**5**), quercetina (**8**). [5]

## II. 11. *Phyllanthus acidus*.

### Clasificación taxonómica <sup>[17]</sup>:

**Reino:** Plantae.

**División:** Magnoliophyta.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Orden:** Malgiphiales.

**Familia:** Phyllanthaceae.

**Tribu:** Phyllanthaceae.

**Subtribu:** Flueggeinae

**Género:** *Phyllanthus*.

**Especie:** *Phyllanthus acidus*

Planta en estudio, conocida en Venezuela como “Cerezo agrio” se caracteriza por ser poco ramificada y de hojas simples, es conocida también como “Grosella espinosa de la estrella” (star gooseberry) en la India. Las actividades medicinales de *P. acidus* encontradas en estudios realizados previamente son antipirética, analgésica, antiinflamatoria, antiviral, entre otras. <sup>[18]</sup>

Esta planta es originaria de Brasil, sin embargo, otros autores la ubican en Madagascar. Una gran cantidad de literatura les atribuye diversas propiedades medicinales a sus extractos.

En Indonesia, la India y Tailandia sus hojas son cocinadas como vegetales, ya que en la medicina tradicional de estos países las hojas de *P. acidus* son consideradas como analgésicos, antipiréticos, antirreumáticos, antivirales y con la capacidad de curar la ictericia, viruela y la infección en las encías. [19]

Las frutas de *P. acidus* nacen en racimos sueltos, son pálidas de color amarillo o blanco, crujientes y jugosas con sabor amargo; esta fruta tiene un alto contenido de vitamina C. Se ha usado para mejorar la vista, la memoria y la acción preventiva contra la diabetes. [20] En sus frutos se han encontrado los siguientes compuestos: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, adenosina, kaempferol (**7**). [21]

La corteza de la raíz se utiliza en la India como agente de curtido y por ser su madera dura y resistente se utiliza como combustible. Un estudio realizado en la India en el año 2006, el extracto hidrometanólico de *P. acidus* mostró un efecto protector en el sistema hepático de ratones que habían sufrido daños por causa de CCl<sub>4</sub>. [17] En otro estudio realizado el mismo año, se obtuvo que el extracto metanólico de esta planta posee una importante actividad antibacteriana “*in vitro*”. Los extractos tanto acuoso como de diferentes solventes orgánicos de esta planta medicinal, son reportados como un tratamiento potencial para la fibrosis quística. [17]

Un estudio realizado en Tailandia, en el cual, se midió el efecto de la administración oral, durante seis semanas, del extracto acuoso de las hojas de *Phyllanthus acidus*, sobre las funciones del tejido adiposo perivascular y vascular de ratones masculinos de mediana edad, demostró, que este tratamiento causó una disminución del peso corporal, grasa visceral y subcutánea, acumulación de lípidos en el hígado así como disminución del colesterol, es decir, todos los parámetros beneficiosos que habían sido mostrados para restaurar el sistema vascular, en la disfunción endotelial, en los adultos mayores que padecen de obesidad. [22]

Usando ratas Wistar, se estudió el efecto del extracto etanólico de la fruta de *P. acidus* para validar el uso tradicional de esta planta como protector hepático y

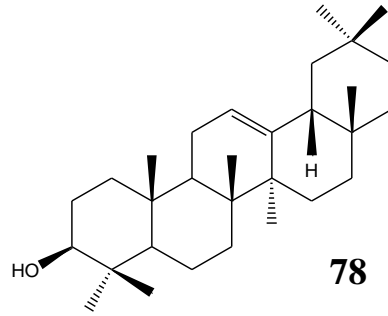
antioxidante en el daño oxidativo del hígado causado por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). El extracto etanólico a una concentración del 70% y la droga de referencia silimarina se le suministró a las ratas de diferentes grupos, una vez al día por cinco días, y el CCl<sub>4</sub> se le dio en los días dos y tres. Para este estudio se obtuvo un significativo efecto como protector hepático en comparación con el grupo control. Los resultados bioquímicos se complementaron con los resultados de la sección histopatológica de los tejidos del hígado. [23]

La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de la fruta de *P. acidus* se llevó a cabo en el continente asiático con once bacterias patógenas. Este extracto mostró una actividad antibacteriana para *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea* en concentración de 500µg/disco, en comparación con el estándar de kanamicina, siendo el rango de la zona de inhibición del extracto clorofórmico de 0,5 a 2,5 mm. En este estudio también encontraron que la actividad antioxidante aumenta ligeramente con aumento de la concentración del extracto y que la misma posee una actividad antioxidante comparativamente más baja que la del ácido ascórbico, siendo el resultado del IC<sub>50</sub> para el extracto de la planta un valor de 2745,86µg/mL y el del ácido ascórbico 13,37µg/mL. [24]

De igual manera, la fruta de *Phyllanthus acidus* colectada en Savar, Dacca, fue sometida a un estudio de tamizaje fitoquímico, en el cual, adicionalmente se evaluó la actividad “*in vitro*” del extracto de éter de petróleo fue probado para actividades citotóxicas, antibacterianas y antioxidantes; el tamizaje fitoquímico reveló la presencia de hidratos de carbono, glucósidos y esteroides. La actividad del extracto antibacteriano exhibido se determinó por el método de difusión en disco contra trece bacterias patógenas, las concentraciones más altas mostraron actividad antimicrobiana contra un número de bacterias incluyendo *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*. [25]

Para esta planta se han reportado compuestos tipo triterpenos:

**Triterpenos:** lupeol (34),  $\beta$ -amirina (78), phyllanthol (40).<sup>[5]</sup>



Otros estudios han demostrado la actividad farmacológica de la  $\beta$ -amirina como analgésico.<sup>[5]</sup>

### III JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los antecedentes que se tienen de la planta *Phyllanthus acidus*, corresponden al estudio y caracterización de metabolitos secundarios presentes en ella, tomando en cuenta el estudio biológico de estos compuestos. Conjuntamente, se puede encontrar una gran cantidad de estudios de los extractos de la planta. Sin embargo, estos estudios han sido realizados para plantas que han sido colectadas en otros países por lo que no se tienen antecedentes de *Phyllanthus acidus* cultivada en Venezuela.

Dados los interesantes resultados obtenidos en el estudio químico y farmacológico de la planta en otros continentes, ha surgido el interés de investigar los compuestos químicos presentes en la corteza esta especie, colectada en nuestro país.

Esto contribuiría a sumar información a nivel mundial acerca de la corteza de esta especie, la cual, es la parte de esta planta a la que se han realizado menos investigaciones. Es por ello, que es interesante estudiar la corteza de *P. acidus*; además, que la pigmentación de la corteza de esta especie posee una coloración especial (roja), lo que es un atractivo para ser investigada.

De encontrarse resultados que correspondan con los ya reportados en otras latitudes, la corteza de *Phyllanthus acidus* presente en Venezuela, podría ser considerada como una planta con potencialidad para ser administrada de manera segura con propósitos terapéuticos, es decir, podría considerarse como una planta medicinal, característica que aún no se le ha dado en esta región.

## IV. OBJETIVOS.

### IV.1 Objetivo general.

Realizar el estudio fitoquímico de la corteza de *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels colectada en Venezuela.

### IV.2 Objetivos específicos.

- Extraer por procedimiento de maceración en metanol los metabolitos secundarios presentes en la corteza de la planta *Phyllanthus acidus*.
- Realizar particiones con solventes de diferente polaridad como hexano, diclorometano y acetato de etilo al extracto metanólico.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios, presentes en las fracciones de hexano, diclorometano, acetato de etilo y el extracto metanólico de la corteza de la planta *Phyllanthus acidus*.
- Elucidar la estructura molecular de los compuestos procedentes de la corteza de *Phyllanthus acidus* mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Protones ( $^1\text{H}$ ) y Carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) e infrarrojo.



## V. MATERIALES Y EQUIPOS.

### V.1 Equipo de laboratorio

- Balanza analítica digital, marca OHAUS Adventurer.
- Secador, modelo HG-751 B.120 V.A.C., 60Hz, 14,5 AMPS. Tango temp. 750/1000 °F (399/538 °C). Master Appliance.
- Estufa Memmert. Modelo 500.
- Rotaevaporador, marca Buchi, modelo B-480.
- Lámpara UV longitud de onda ( $\lambda$ ) 254 y 365 nm, UVP, modelo UVG-11.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, modelo ECLIPSE-JEOL. 270 MHz para los experimentos de  $^1\text{H}$  y 67.5 MHz para los experimentos de  $^{13}\text{C}$ .
- Fusiómetro, marca Fisher-johns.
- Espectrofotómetro de infrarrojo medio (FT-IR), marca Varian, Modelo 640.

### V.2. Materiales cromatográficos

- Sílica gel G60 para cromatografía de columna (CC), 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- Placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G7UV254, 20X20cm. 0,20mm de espesor.
- Placas preparativas de sílica gel 60. F254, 20X20 cm, 0,25 mm de espesor. MERK.
- Columna fase reversa, waters Sep-Pak. Vac 35cc,  $\text{C}_{18}$ -10g.

### V. 3. Disolventes

Se emplearon disolventes grado p.a. Aldrich:

- Metanol (MeOH).

- Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).
- Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).
- Acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ).
- N-hexano ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ).

#### **V.4. Disolventes para RMN**

- Cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) Aldrich.

#### **V.5. Reveladores**

- p-anisaldehído (revelador universal): se preparó mezclando 5 mL de p-anisaldehído con 90 mL de EtOH, 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 1 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial.

#### **V.6. Desecantes**

- Sulfato de magnesio anhidro, ANALAR (BDH).

## **VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **VI.1. Colecta del material vegetal**

La corteza de la especie *Phyllanthus acidus* (L) Skeels, empleada para llevar a cabo el presente trabajo, fue colectada en El Moralito, Municipio Francisco Javier Pulgar, estado Zulia, Venezuela en enero de 2016 e identificada por el Botánico Dr. Stephen S. Tillet.

### **VI. 2. Tratamiento del material vegetal.**

La corteza de la planta *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels se secó al aire libre desde el momento de su colección hasta la fecha de inicio del trabajo, se cortó en trozos pequeños y se pesó la cantidad de (152,0 ± 0,01) g.

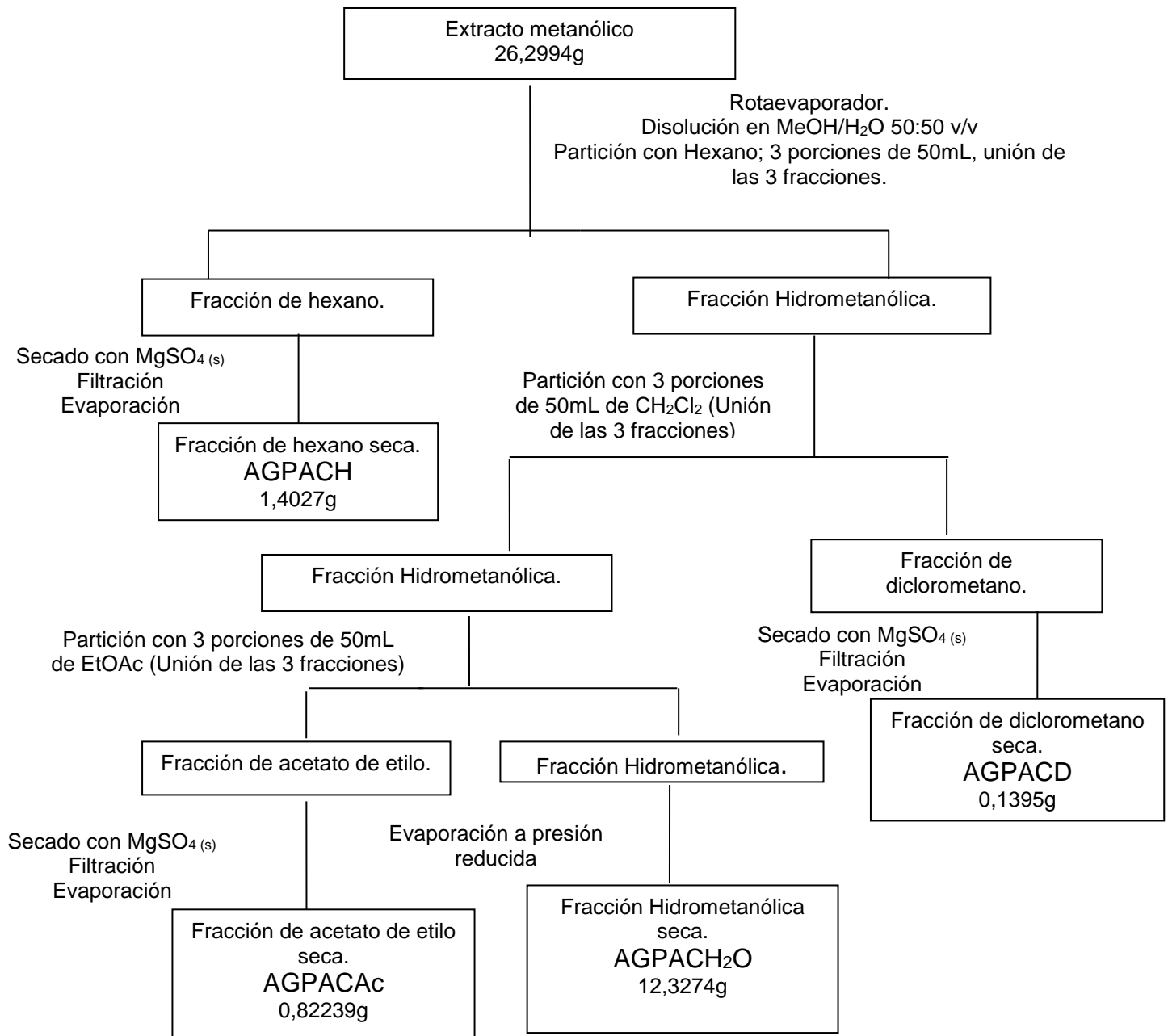
### **VI.3. Extracción.**

La corteza fragmentada fue sometida a un procedimiento de extracción continua por maceración empleando MeOH como disolvente. El extracto metanólico así obtenido se filtró y posteriormente, se sometió a secado en un rotaevaporador para concentrar mediante la eliminación del solvente.

### **VI.4. Fraccionamiento del extracto metanólico**

El extracto metanólico evaporado fue disuelto en una mezcla metanol:agua (50:50; v/v), la solución se vertió en un embudo de separación y se llevó a cabo el proceso de partición añadiendo 3 porciones de 50mL de cada uno de los siguientes solventes, en orden creciente de polaridad: n-hexano, (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y acetato de etilo (AcOEt) obteniéndose así las correspondientes fracciones de hexano (AGPACH), de diclorometano (AGPACD),

acetato de etilo (AGPACAc) y acuosa (AGPACH<sub>2</sub>O). Cada una de estas fracciones fue concentrada, evaporando el disolvente en su totalidad a través de un rotaevaporador. Este procedimiento aplicado se ilustra y sintetiza a través del siguiente esquema:



**Esquema N°1.** Fraccionamiento del extracto metanólico de la corteza de *Phyllanthus acidus*.

### **VI.5. Separación de los componentes por fracción.**

A cada una de las fracciones obtenidas se le aplicó la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) para la determinación y selección de las condiciones de óptima separación de los compuestos constituyentes, visualizando las placas mediante iluminación ultravioleta (254 y 365 nm) seguida de inmersión en solución de p-anisaldehído y posterior calentamiento.

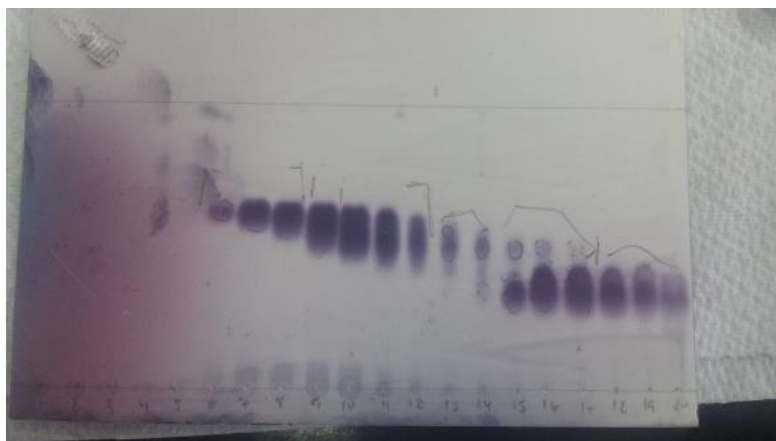
Una vez determinadas las mencionadas condiciones, se aplicó la técnica de cromatografía en columna (CC), en fase normal, sobre sílica gel para llevar a cabo la separación empleando solventes y mezclas de los mismos con incremento de la polaridad a lo largo del proceso, de acuerdo a las determinaciones efectuadas en la cromatografía de capa fina (CCF) Las fracciones obtenidas fueron concentradas, evaporando el disolvente a través de un rotaevaporador y aplicando, posteriormente, vacío hasta la completa sequedad; luego de lo cual fueron monitoreadas por medio de CCF y se agruparon tomando en consideración el número de compuestos observados sobre la placa, así como los factores de retención (Rf).

Los grupos de fracciones en los cuales se observó una composición relativamente sencilla al realizar el monitoreo por CCF, fueron tratadas por un procedimiento de separación y purificación por CC o cromatografía de placa preparativa, de acuerdo a la cantidad obtenida y conveniencia, empleando de nuevo las condiciones de separación determinadas a través de CCF, las fracciones que mostraron estar constituidas por un aparente único componente o componente mayoritario fueron examinadas por espectroscopía de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).

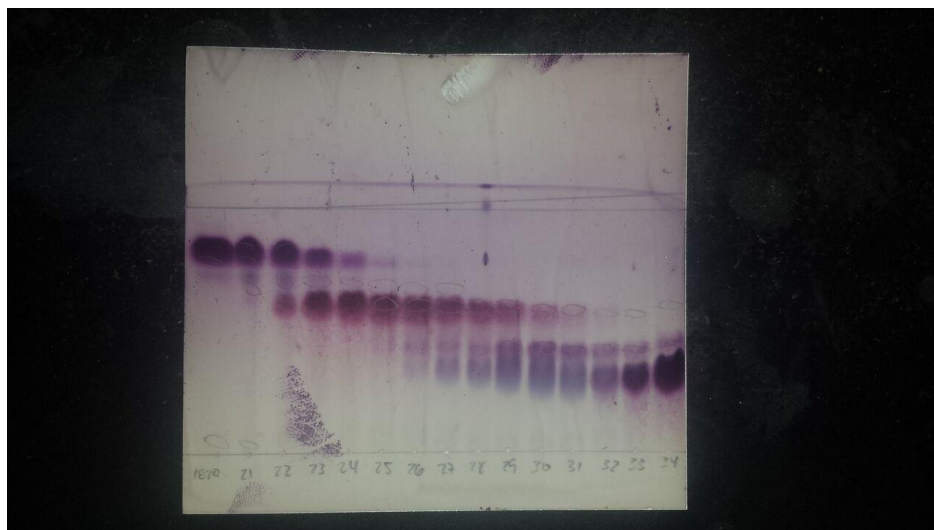
### VI.5.1 Separación de los componentes en la fracción de hexano.

La fracción de hexano obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se trató con metanol, ya que se observó que con este solvente se inducía el precipitado de un sólido blanco, luego de retirar el sólido blanco se analizó a través de CCF la fracción para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, 1:1 v/v diclorometano:hexano, se efectuó el procedimiento de separación a través de CC en fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica muestra 50:1 p/p, iniciando la elución 70:30 v/v Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por 60:40, 30:70, 10:90 v/v y diclorometano puro, luego mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hex 95:5, 90:10 v/v y finalmente metanol puro. Se obtuvo un total de 50 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y continuando con el calentamiento de la placa. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 13 grupos: AGPACHF-1, AGPACHF-2, AGPACHF-3, AGPACHF-4, AGPACHF-5, AGPACHF-6, AGPACHF-7, AGPACHF-8, AGPACHF-9 y AGPACHF-10(ver tabla 1).

**Figura N°2.** Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones colectadas durante la separación de los componentes de AGPACH. Fracciones de la 1-20.



**Figura N°3.** Perfil cromatográfico para el grupo de fracciones colectadas durante la separación de los componentes de AGPACH. Fracciones de la 18-34.



**Tabla N°1.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de hexano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.

Grupo de fracciones	Fracciones combinadas.
AGPACHF-1	6,7 y 8.
AGPACHF-2	9, 10, 11 y 12.
AGPACHF-3	13 y 14
AGPACHF-4	15, 16 y 17
AGPACHF-5	18, 19, 20 y 21.
AGPACHF-6	22, 23, 24, 25 y 26.
AGPACHF-7	27, 28, 29, 30 y 31.
AGPACHF-8	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42.
AGPACHF-9	43.
AGPACHF-10	44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50.

Posteriormente, las fracciones AGPACHF-4, AGPACHF-5 fueron unidas para purificar los compuestos presentes, separándolos a través de una CC en fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica muestra 50:1p/p, iniciando la elución con una mezcla Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 70:30, 50:50, 30:70 v/v. Obteniéndose 28 fracciones que fueron agrupadas en dos grupos AGPACHF-4, 5.1 y AGPACHF4, 5.2.

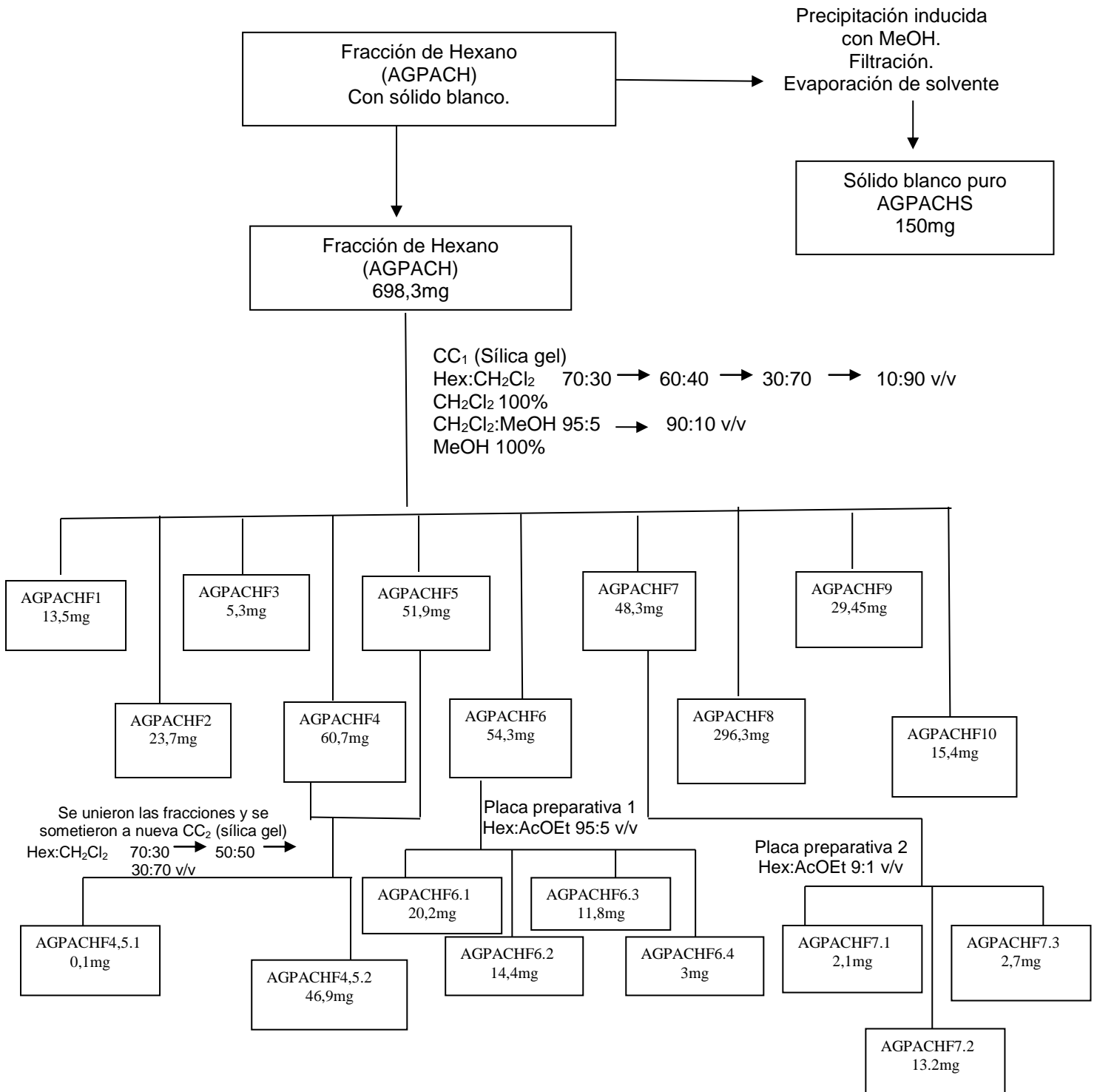
**Tabla N°2.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de las fracciones AGPACHF-4, AGPACHF-5, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.

Grupo de fracciones	Fracciones combinadas.
AGPACHF-4,5.1	12, 13, 14, 15 y 16.
AGPACHF-4,5.2	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28.

Para la purificación de la AGPACHF6 se realizó una separación usando una placa preparativa en fase normal eluyendo con una mezcla Hex:AcOEt 95:5 v/v. En esta separación se separaron 4 fracciones que fueron filtradas y pesadas AGPACHF-6.1, AGPACHF-6.2, AGPACHF-6.3 yAGPACHF-6.4. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora y en maceración por 24 horas empleando como solvente CHCl<sub>3</sub>.

Para la purificación de la AGPACHF7 se realizó una separación usando una placa preparativa en fase normal eluyendo con una mezcla Hex:AcOEt 9:1 v/v. En esta separación se separaron 3 fracciones que fueron filtradas y pesadas AGPACHF-7.1, AGPACHF-7.2 y AGPACHF-7.3. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora y en maceración por 24 horas empleando como solvente CHCl<sub>3</sub>.





**Esquema N°2.** Separación de componentes de la fracción de hexano del extracto metanólico de la corteza de *Phyllanthus acidus*.

R<sub>CC1</sub>= 85, 47%

R<sub>PP1</sub>= 90,98%

R<sub>CC2</sub>= 41,74%

R<sub>PP2</sub>= 37,27%

### VI 5.2 Separación de los componentes en la fracción de diclorometano.

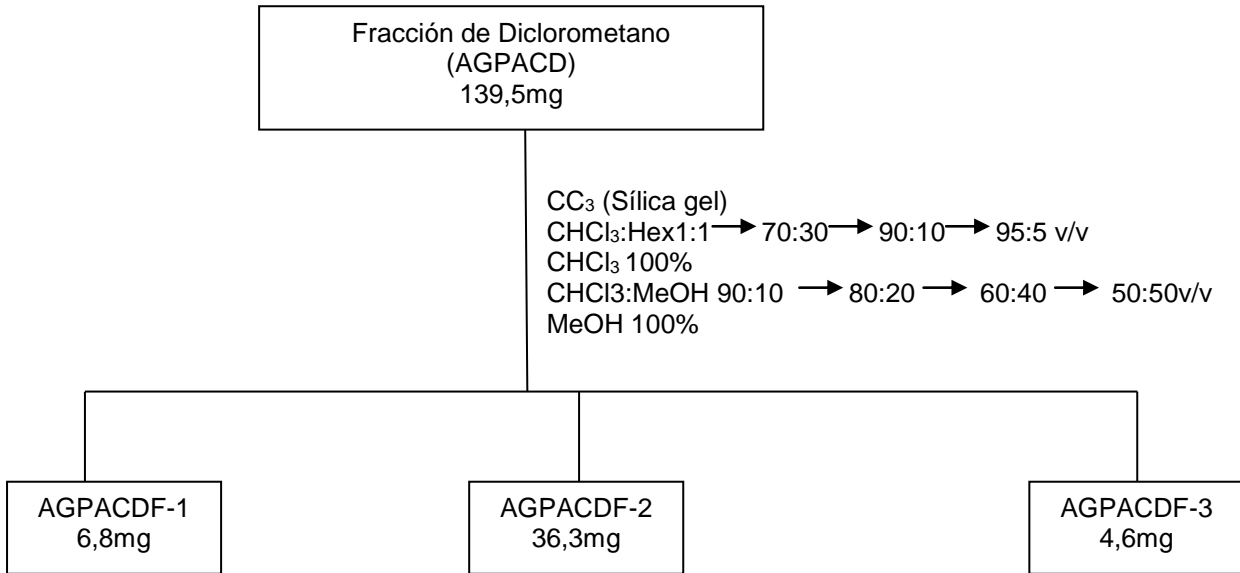
La fracción de diclorometano obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, se efectuó el procedimiento de separación a través de CC en fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica muestra 50:1p/p, iniciando la elución  $\text{CHCl}_3$ : Hex 50:50, 70:30, 90:10, 95:5 v/v;  $\text{CHCl}_3$  100%;  $\text{CHCl}_3$  90:10, 80:20, 60:40, 50:50 v/v y finalmente metanol puro. Se obtuvo un total de 93 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y continuando con el calentamiento de la placa. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 3 grupos: AGPACDF-1, AGPACDF-2, AGPACDF-3. (Ver tabla 2).

**Tabla N°3.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de diclorometano, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.

Grupo de fracciones	Fracciones combinadas.
AGPACDF-1	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40
AGPACDF-2	41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 y 64.
AGPACDF-3	65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 y 93.

La separación no resultó muy efectiva, prácticamente todos los componentes permanecieron contenidos en el grupo AGPACDF-2. De estas fracciones, debido a

la poca cantidad obtenida de compuesto en cada una, solo la fracción AGPACDF- fue examinada por espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).



**Esquema N°3.** Separación de componentes de la fracción de diclorometano del extracto metanólico de la corteza de *Phyllanthus acidus*.

$R_{\text{CC3}} = 34,19\%$

### VI. 5.3. Separación de los componentes en la fracción de acetato de etilo.

La fracción de acetato de etilo obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, se efectuó el procedimiento de separación a través de CC en fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción sílica muestra 50:1 p/p, iniciando la elución con una mezcla  $\text{CHCl}_3$ :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ : MeOH 65:25:10 v/v y luego  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ :MeOH 90:10 v/v. Se obtuvo un total de 28 fracciones, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído y continuando con el calentamiento de la placa. En base a los resultados obtenidos en este monitoreo, las fracciones fueron combinadas en 6 grupos: AGPACAcF-1, AGPACAcF-2, AGPACAcF-3, AGPACAcF-4, AGPACAcF-5 y AGPACAcF-6 (ver tabla 3).

**Tabla N°4.** Combinación de las fracciones obtenidas en la separación de la fracción de acetato de etilo, por cromatografía de columna en fase normal sobre sílica gel, para obtener grupos de fracciones.

Grupo de fracciones	Fracciones combinadas.
AGPACAcF-1	1, 2 y 3.
AGPACAcF-2	4, 5, 6 y 7.
AGPACAcF-3	8, 9, 11, 12, 13 y 14.
AGPACAcF-4	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24.
AGPACAcF-5	25, 26, 27 y 28.

Finalmente, las fracciones AGPACAcF-2 y AGPACAcF-3 se unieron al igual que las fracciones AGPACAcF-4 y AGPACAcF-5 ya que la separación no resultó efectiva. Para la separación y purificación de los compuestos presentes en la AGPACAcF-2-3 se realizó una separación usando una placa preparativa en fase

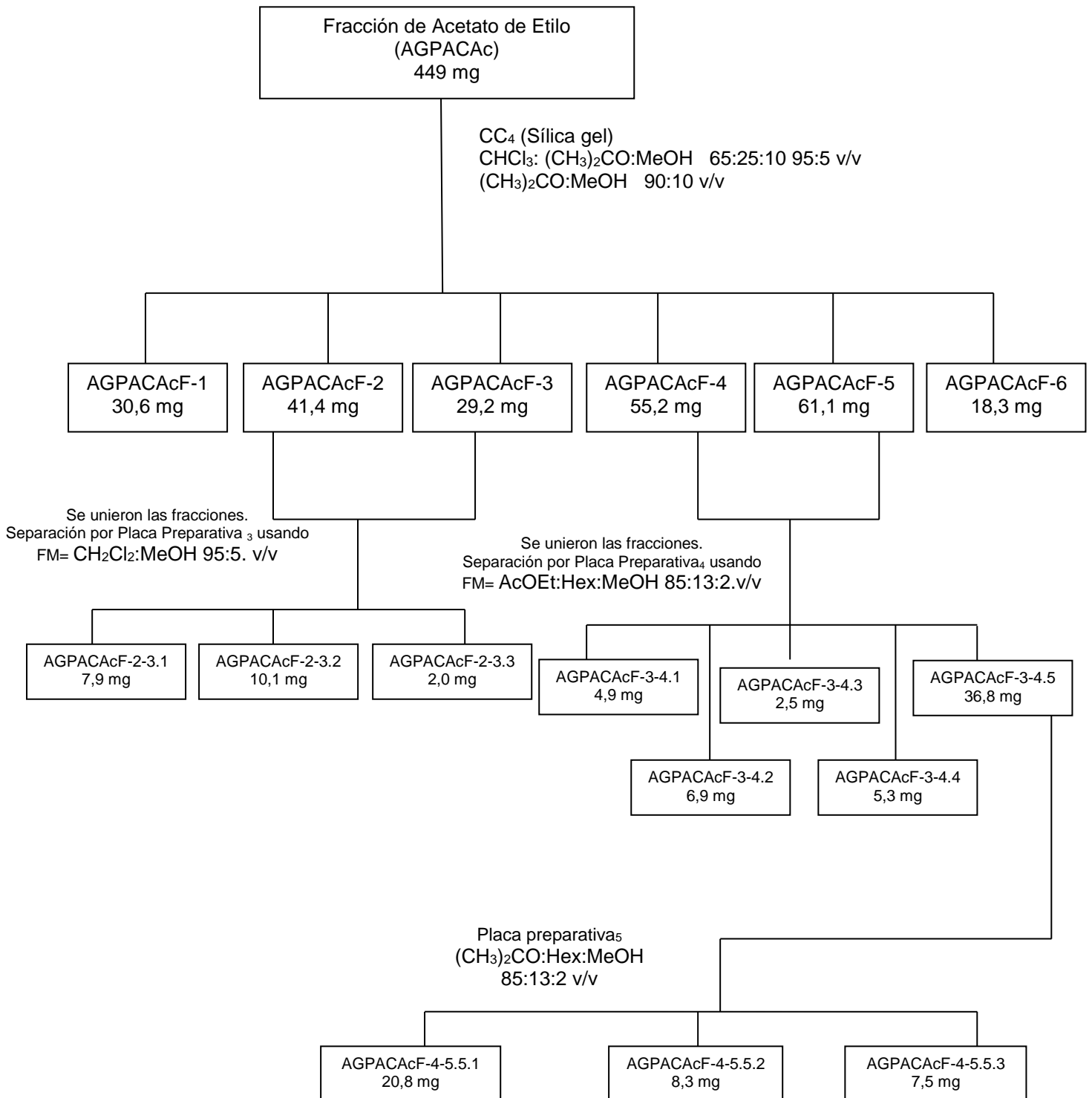
normal eluyendo con una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  95:5 v/v. En esta separación se separaron 3 fracciones que fueron filtradas y pesadas AGPACHF-2-3.1, AGPACHF-2-3.2 y AGPACHF-2-3.3. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora y en maceración por 24 horas empleando como solvente AcOEt 100%.

Para la separación y purificación de los compuestos presentes en la AGPACAcF-4-5 se realizó una separación usando una placa preparativa en fase normal eluyendo con una mezcla AcOEt:Hex:MeOH 85:13:2 v/v. En esta separación se separaron 5 fracciones que fueron filtradas y pesadas AGPACHF-4-5.1, AGPACHF-4-5.2, AGPACHF-4-5.3, AGPACHF-4-5.4, AGPACHF-4-5.5. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora y en maceración por 24 horas empleando como solvente AcOEt 100%.

La fracción AGPACHF-4-5.5 fue sometida a una nueva purificación a través de una nueva placa preparativa en fase normal eluyendo con una mezcla  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{Hex}:\text{MeOH}$  85:13:2 v/v. En esta separación se separaron 4 fracciones que fueron filtradas y pesadas AGPACHF-4-5.5.1, AGPACHF-4-5.5.2, AGPACHF-4-5.5.3 y AGPACHF-4-5.5.4. Cada zona de la placa que contenía adsorbidos estos compuestos fue removida, y se mantuvo en agitación durante 1 hora y en maceración por 24 horas empleando como solvente AcOEt 100%.

De estas fracciones, debido a la poca cantidad obtenida de compuesto en cada una, solo la fracción AGPACAcF-1 fue examinada por espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).

En base al espectro de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) obtenido para AGPACDAcF-1, no se advirtió la presencia de un componente interesante desde el punto de vista químico.



**Esquema N°4.** Separación de componentes de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de la corteza de *Phyllanthus acidus*.

$R_{CC4} = 52,52\%$  $R_{PP4} = 48,50\%$  $R_{PP3} = 28,33\%$  $R_{PP5} = 99,46\%$ 

#### **VI. 5.4 Separación de los componentes en la fracción hidrometanólica.**

La fracción hidrometanólica obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para determinar las condiciones necesarias para la óptima separación de los compuestos constituyentes. Una vez determinada la composición de fase móvil que generó una mejor separación de los compuestos presentes, se efectuó el procedimiento de separación a través de una CC en fase reversa. La fase móvil utilizada fue una mezcla: MeOH:H<sub>2</sub>O 55:45 v/v; de ésta columna se tomaron 28 fracciones pero al realizar el estudio CCF de cada una de ellas se observó que la separación no fue buena por lo que se decidió unir las todas nuevamente y no continuar con el estudio de los componentes de ésta fracción hasta no contar con los materiales e instrumentos idóneos para garantizar la mejor separación de esta fracción.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

Como se ha hecho mención en anteriores oportunidades, los compuestos aislados a partir de la corteza de *Phyllanthus acidus* (L) Skeels fueron caracterizados por medio de espectroscopía de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) en una dimensión y absorción infrarroja siendo comparados con datos reportados a partir de otros estudios.

### VII.1. Compuesto I: phyllanthol (I).

Este compuesto pudo ser identificado, impuro, en la fracción de hexano por precipitación en metanol, cuando al lavar el recipiente donde se encontraba la fracción de hexano, se notó la aparición de un sólido blanco en grandes cantidades, este sólido se lavó con metanol y se sometió a análisis por cromatografía de capa fina CCF para determinar su pureza, observándose que el mismo se encontraba puro después de lavar con metanol, lo que permitió realizar su caracterización por espectroscopía de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y absorción infrarroja.

Este compuesto también se encontró presente en las fracciones AGPACHF-6.3, AGPACHF-7.2 y AGPACHF-8, aun cuando parecía que se tratara de diferentes compuestos, debido a que en el resultado de la CCF realizada se observaban diferentes  $R_f$  para las manchas obtenidas, sin embargo, al observar los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) para estas fracciones, se observa que se trata del mismo phyllanthol en todas estas.

Estudiando el por qué ocurre que un mismo compuesto aparezca con diferentes  $R_f$  en una muestra, se estudia la estructura del phyllanthol, y a través de ella, se puede observar que la presencia del grupo hidroxilo al extremo de su estructura, confiere la posibilidad de formar enlaces del tipo puente de hidrógeno con los demás componentes del extracto. Es por esto, que se cree que la razón por la cual (I) aparece a diferentes  $R_f$  durante el análisis, se debe a que establece interacciones con otros componentes (como por ejemplo ácidos grasos presentes)



que afectan en su polaridad y hacen que estas moléculas puedan ser mayormente retenidas en la columna, y así variar las interacciones de ellas (phyllanthol interaccionando con otros componentes de la muestra) con la fase móvil y la fase estacionaria del sistema de cromatografía, variando así los  $R_f$  obtenidos para cada molécula.

Esto evidencia, que en la fracción de hexano el phyllanthol se encuentra interaccionando, posiblemente vía puente de hidrógeno, con otras moléculas presentes, y estas interacciones ocasionan una variación de la retención en la columna de éste compuesto, ésta variación en el factor de retención, depende de la naturaleza de la molécula acompañante y a su vez, de la fuerza de las interacciones phyllanthol - fase móvil y phyllanthol - fase estacionaria, para obtener finalmente el compuesto puro.

Adicionalmente, existe la posibilidad de tener un diastereoisómero del phyllanthol con una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos (epímero), lo que haga que el arreglo en la columna de éstos diastereoisómeros sea distinto, y por lo tanto, los  $R_f$  varíen entre ellos; esto, tomando en cuenta, que debido al tamaño de la molécula (30 átomos de carbono), y la presencia de un solo grupo hidroxilo, las interacciones del tipo Van der Waals, son consideradas bastante significativas para determinar la causa de la diferencia de los  $R_f$  obtenidos, para la misma molécula caracterizada por RMN e IR.

Finalmente, al identificar lo que estaba sucediendo, se sumó el peso de las fracciones obtenidas que poseían **(I)** puro, alcanzándose una cantidad total para este compuesto de 420,3 mg.

El espectro de absorción infrarroja de este sólido muestra una señal ancha en  $3306,1\text{ cm}^{-1}$ , lo cual es característico de la presencia de un alcohol en la estructura, dicha señal, está relacionada a la vibración de estiramiento del enlace O-H así como también, una señal en  $2943,0\text{ cm}^{-1}$  que muestra la presencia de una vibración por

estiramiento del enlace C-H, además, la señal que se observa en  $1464,6\text{ cm}^{-1}$  es característica de una vibración por estiramiento de un anillo ciclopropil, lo que infiere la presencia del mismo en la estructura. En este espectro se observa que no existe otro grupo funcional significativo en la molécula y que el resto de las señales corresponde a enlaces simples C-C.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , mostró un grupo de señales alifáticas a campo alto (entre 1.55 y 0.81 ppm), muchas de ellas como singletes, que sugerían metilos sobre estructuras terpénicas. Además de ese grupo de señales, un triplete en  $\delta$  3.18 ppm (t,  $J = 4.21\text{ Hz}$ ), sugirió un protón geminal a un grupo hidroxilo, en la posición 3 del anillo A, corroborando lo que se había observado en la absorción de la banda de OH en IR, las demás señales muestran la presencia de metilenos y metinos de tipo alifáticos señales común en muchos triterpenos. Finalmente, una señal doblete integrando dos protones llamo la atención por el alto desplazamiento químico (0.063, d,  $J = 5.45\text{ Hz}$ ), estos desplazamientos son comunes en anillos ciclopropanos como es el caso de los cicloartanos.

La estructura del triterpeno sugerida por las señales en RMN de protón, fue corroborada con el espectro de carbono trece, el cual fue analizado conjuntamente con un DEPT 135. Claramente fueron observadas 30 señales de carbono, indicando lo presumido con el espectro de protones, una estructura terpénica y en este caso debido al número de carbonos, se trataba de un triterpeno, discriminadas con el DEPT en 7 grupos metilo, 11 metilenos, de los cuales particularmente uno aparecía a un desplazamiento inusual de 13,4166ppm, corroborando el ciclopropilo planteado en el RMN  $^1\text{H}$ , 6 carbonos metinicos, uno de ellos oxigenado observado en 79,13 ppm y 6 carbonos cuaternarios, lo que nos ratificó la estructura de un triterpeno.

La comparación con datos de la literatura, especialmente con los compuestos previamente reportados para la especie, nos señalaron la presencia del triterpeno conocido como phyllantol (**I**), el cual es considerado como un marcador

quimiotaxonómico de estas especies; esto corroborado con la medida de su punto de fusión.

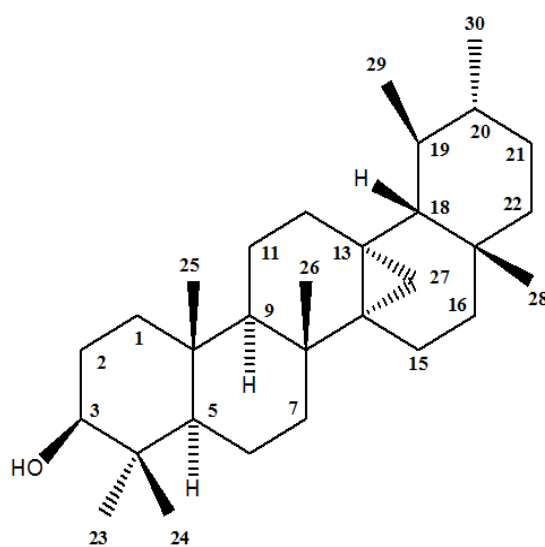
**Tabla N°5.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  a los átomos de C presentes en el phyllanthol.

<b>C</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> (Rep)<sup>[26]</sup></b>	<b>13C (Exp)</b>
1	38,7	38,52
2	27,5	27,98
3	79,3	79,14
4	39,1	38,93
5	55,9	55,83
6	18,3	18,20
7	38,7	38,52
8	37,2	37,03
9	54,2	54,18
10	37,5	37,3}
11	17,8	17,67
12	35,4	35,33
13	26,6	27,38
14	32,4	32,38
15	21,5	21,36
16	27,5	27,98
17	32,1	32,38
18	50,3	50,23
19	41,0	40,82
20	38,7	38,93
21	31,3	31,13
22	42,3	42,10
23	28,1	28,28
24	15,5	15,5
25	16,2	16,08
26	18,2	18,03
27	13,5	13,4
28	28,4	28,22
29	18,3	17,92
30	20,9	20,73

Tomado en  $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz

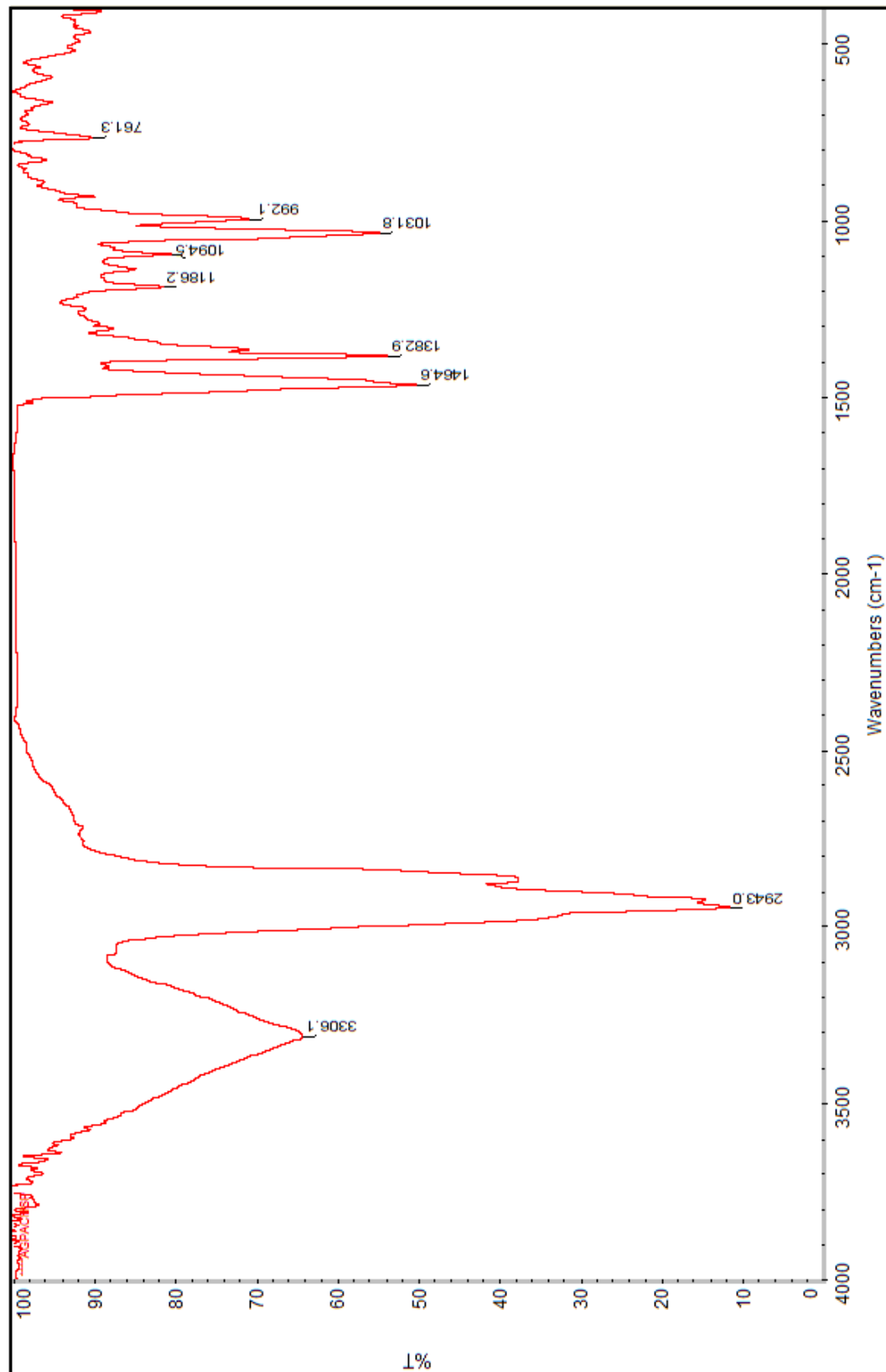
**Tabla N°6.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales más distintivas de RMN  $^1\text{H}$  a los átomos de H características presentes en el phyllanthol.

H	$^1\text{H}$ (Rep) <sup>[26]</sup>	$^1\text{H}$ (Exp)
3	3,18 (d, $J$ =5,75)	3,18 (t, $J$ =4,21Hz)
23	0,96 (s)	0,98 (s)
24	0,77 (s)	0,77 (s)
25	0,86 (s)	0,85 (s)
26	1,11 (s)	1,11 (s)
27	0,066 (d, $J$ =5,55)	0,063 (d, $J$ =5,45Hz)
28	0,89 (s)	0,89 (s)

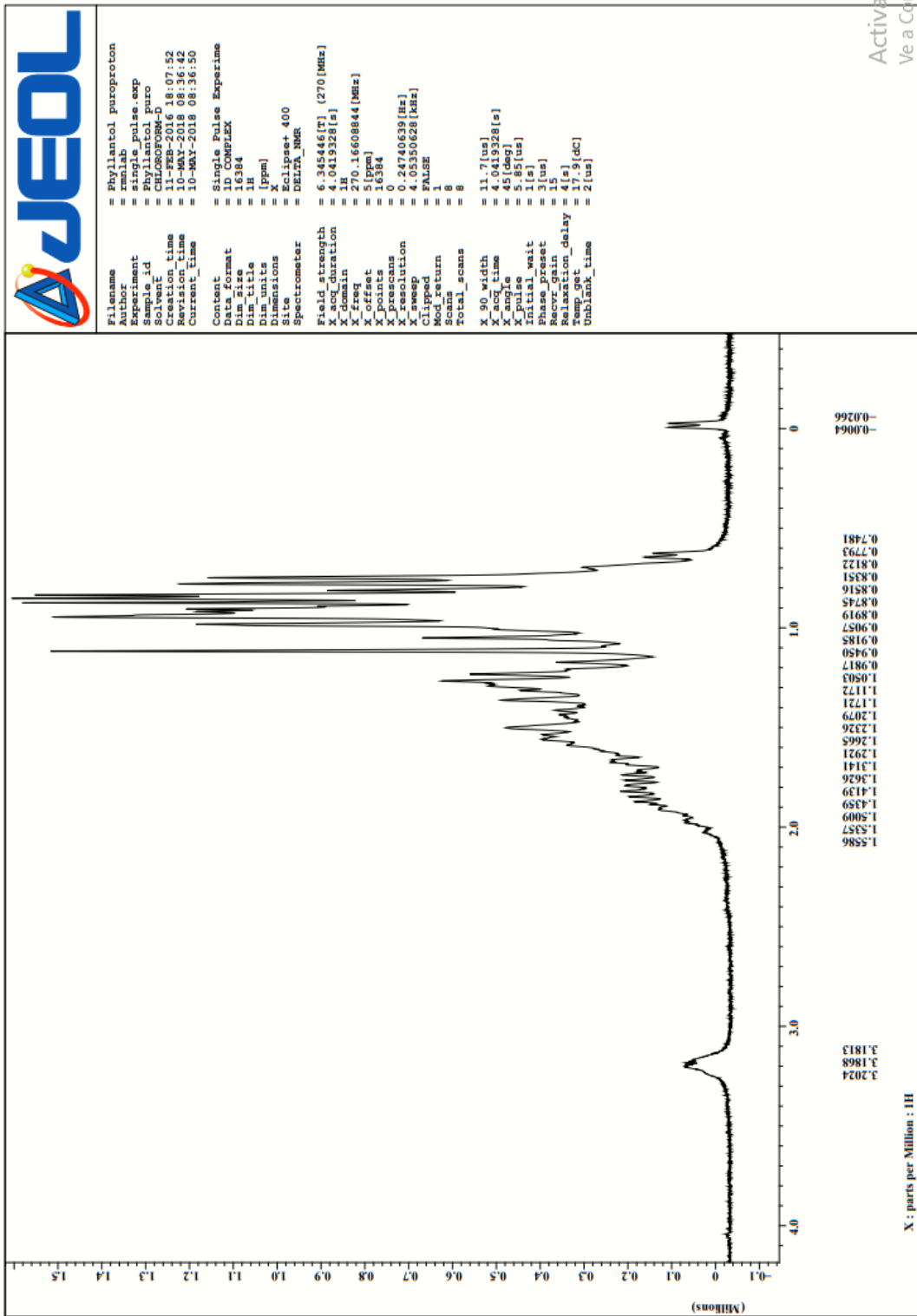


(I)

Phyllanthol

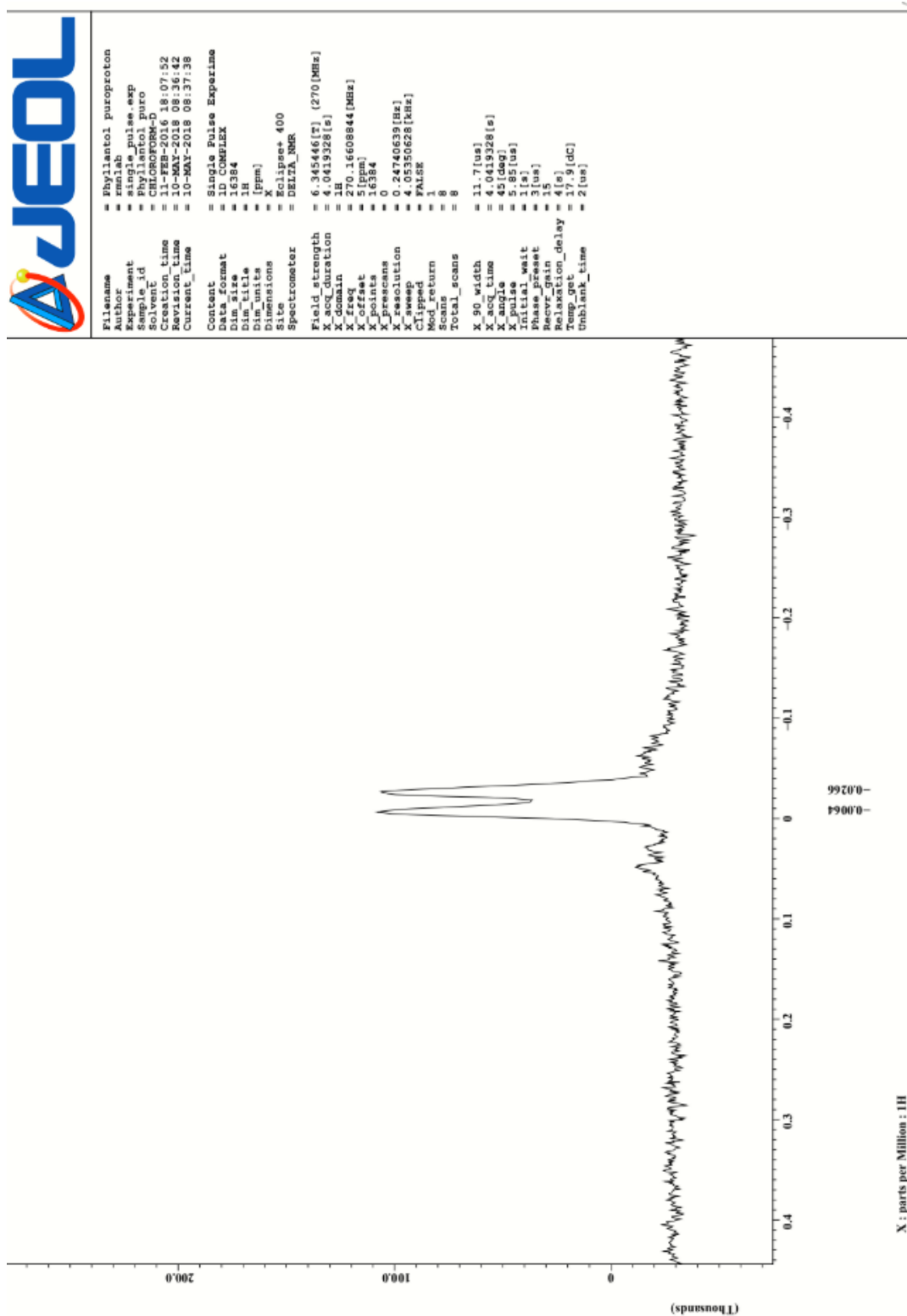
**Espectro N°1.** Espectro Infrarrojo de Phyllanthol.

**Espectro N°2.** Espectro <sup>1</sup>H RMN de phyllanthol (**I**) (δ: 4,0- -0,0266ppm) (270 MHz; CDCl<sub>3</sub>).

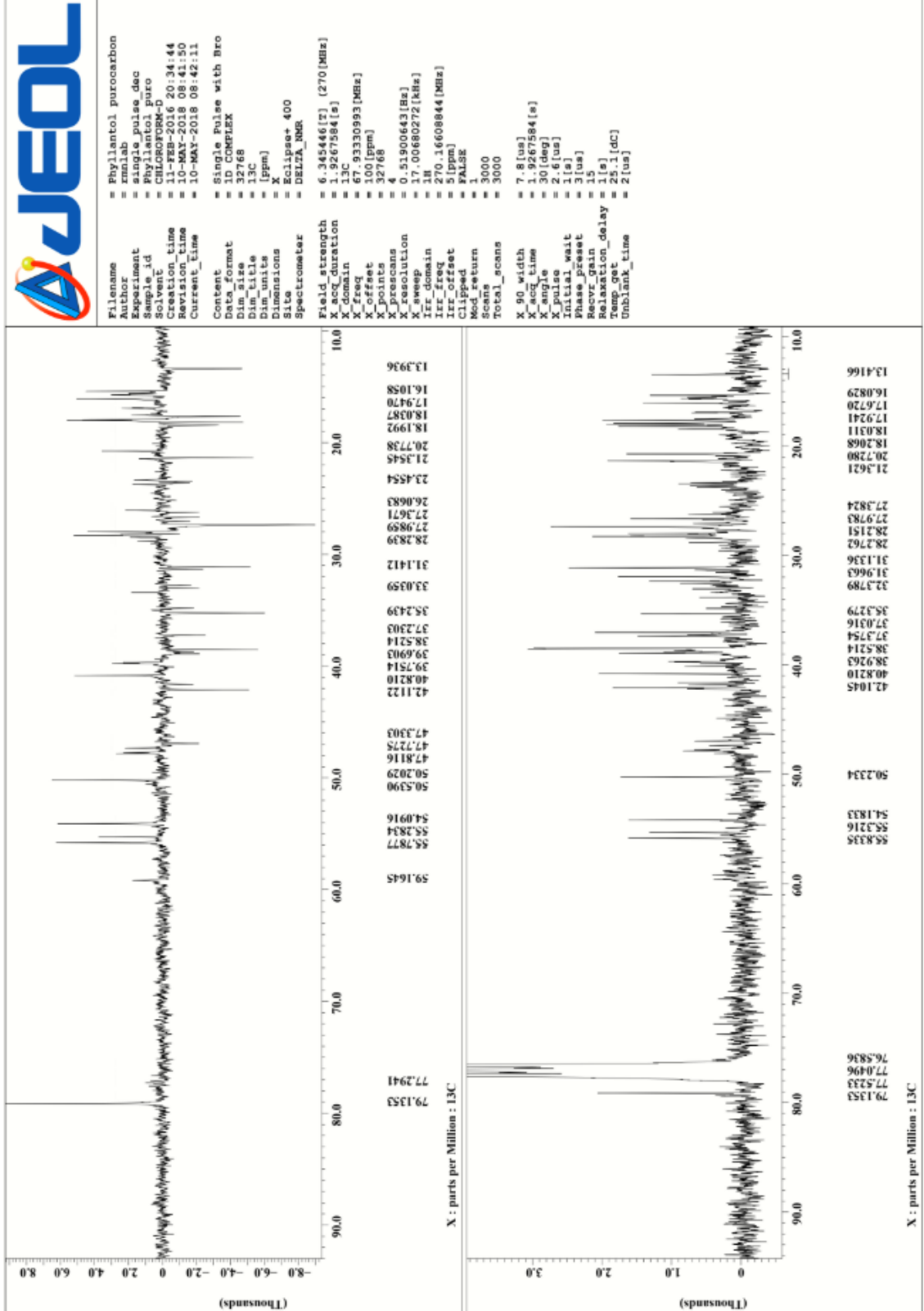


Activat  
Ve a Cqr

**Espectro N°3.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de phyllanthol (**I**) ampliado ( $\delta$ : 7,2473- 3,1428ppm)  
(270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Espectro N°4. Espectro RMN<sup>13</sup>Cy DEPT de phyllanthol (I) (δ: 90,0 - 10,0ppm) (270 MHz; CDCl<sub>3</sub>).**





## VII.2. Compuesto II: 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (II).

Este compuesto se aisló de la fracción AGPACHF-4,5.2 como un sólido de color beige con un punto de fusión de (253-255) °C. Se obtuvo una cantidad de 46,9 mg, lo cual representa un 9,7% de la fracción sembrada en la columna y un 0,30% del material vegetal inicial. En CCF, mostró una mancha que se tornó morado al ser revelado con p-anisaldehído.

El espectro de absorción infrarroja muestra una señal intensa en 1730,1  $\text{cm}^{-1}$  característica de enlaces carbono-oxígeno de compuestos carbonílicos, también, la señal que aparece a 1246,3  $\text{cm}^{-1}$  es característica de la vibración de estiramiento de un enlace C-O presente en los ésteres; éstas señales, indican la presencia de un compuesto que posee en su estructura el grupo funcional "éster", las demás señales indican la presencia de cadenas cíclicas sin heteroátomos y algunos radicales metílicos.

El espectro de protones fue bastante similar al del phyllantol (I), mostrando mayoritariamente señales de tipo alifáticas entre 2.66 y 0.67 ppm, muchas de esas señales sugerían metilos no acoplados y de ellos uno con un desplazamiento de 2.03, sugirió un metilo perteneciente a un grupo acetato. Otra señal importante se visualizó en el espectro, a  $\delta$  4.48, se observó un triplete (t,  $J = 8.18$  Hz), el cual sugería el protón geminal al grupo acetato en la posición 3 de un triterpeno.

El espectro de carbono trece mostró 32 señales (aunque se observó que efectivamente no estaba muy puro), se visualizó la señal de un metino oxigenado, posiblemente donde se encuentra el acetato (81.1 ppm). Entre otras resonancias, se veían claramente las de un carboxilo de éster a 170.9 ppm y dos señales olefínicas a 134.4 y 133.3. El DEPT 135 (más sensible que el carbono) mostró claramente mayor número de impurezas en el compuesto analizado), pero su análisis en conjunto con el espectro de carbono señaló: 9 metilos, 11 metilenos, 9 carbonos cuaternarios y 3 metinos. Al comparar los datos obtenidos se encontró una similitud bastante grande

con los datos del acetato de  $\beta$ -amirina, solo que la olefina pareciera ser una olefina tetrasustituida entre los carbonos 13 y 18. Este compuesto se encuentra reportado para *Phyllanthus polyanthus*, pero sus datos están mal asignados en la referencia. Finalmente la revisión de otro tipo de triterpenos con las características mencionadas indicó que el compuesto aislado corresponde al  $3\beta$ -acetoxo-13(18) oleanane (II). [27].

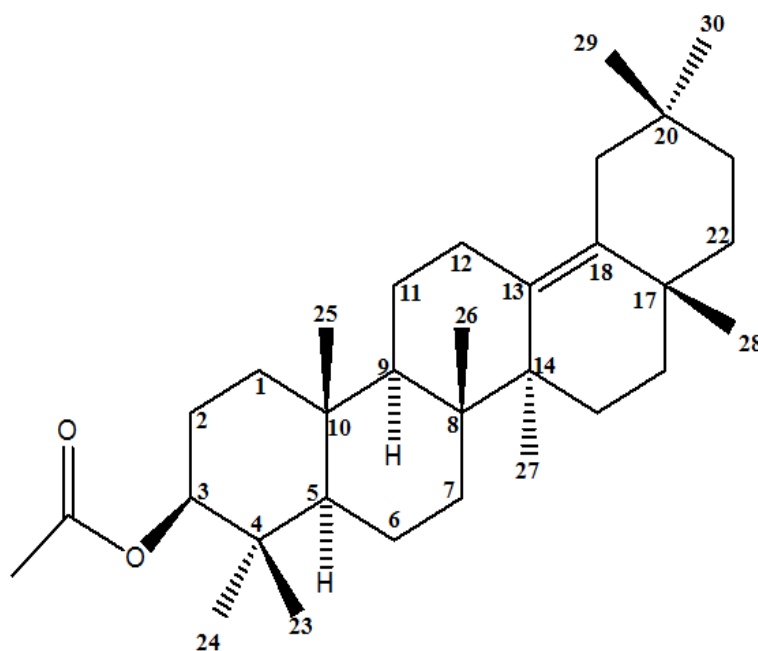
**Tabla N°7.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  a los átomos de C presentes en 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (II).

<b>C</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> (Rep)<sup>[27]</sup></b>	<b>13C (Exp)</b>
1	38,7	38,7
2	23,8	23,8
3	81,1	81,1
4	37,7	37,8
5	55,4	55,5
6	18,4	18,4
7	34,8	34,8
8	41,0	41,1
9	50,6	50,7
10	37,2	37,3
11	21,7	21,8
12	26,5	26,6
13	134,2	134,3
14	44,7	44,7
15	25,0	25,0
16	36,7	36,7
17	34,6	34,6
18	133,3	133,3
19	39,4	39,4
20	33,4	33,3
21	35,4	35,5
22	38,5	38,6
23	28,0	28,1
24	17,7	17,7
25	16,4	16,4
26	16,6	16,6
27	21,3	21,3
28	24,1	24,1
29	32,4	32,8
30	23,8	23,9
C=O	171,2	170,9
CH <sub>3</sub> $\alpha$ C=O	21,5	21,7

Tomado en CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz

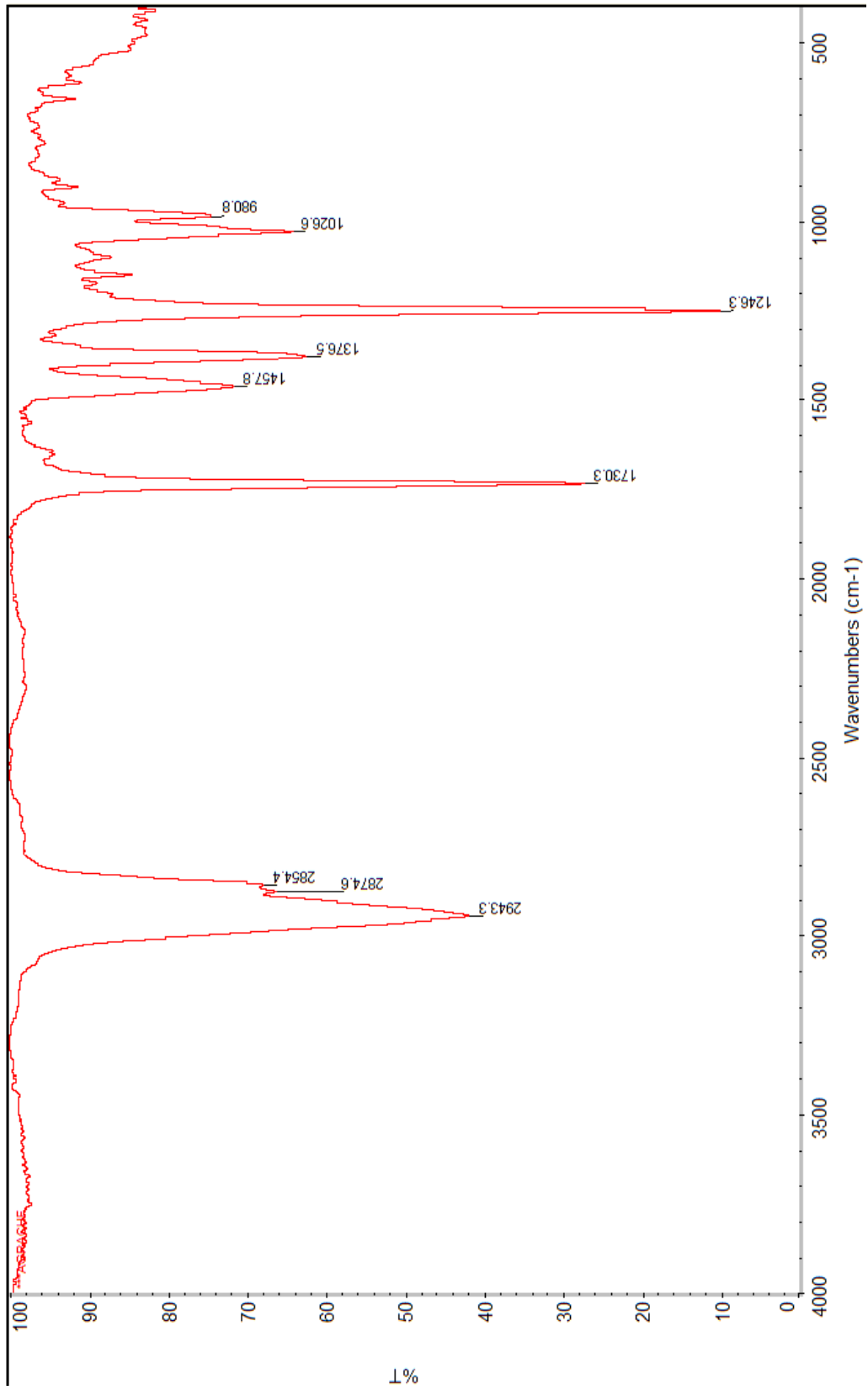
**Tabla N°8.** Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales más distintivas de RMN  $^1\text{H}$  a los átomos de H características presentes en 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (II).

H	$^1\text{H}$ (Rep) <sup>[26]</sup>	$^1\text{H}$ (Exp)
3	4,46 (t)	4,48 (t)
23	0,77 (s)	0,78 (s)
24	0,90 (s)	0,91 (s)
26	0,93 (s)	0,94 (s)
27	1,19 (s)	1,13 (s)
29	0,87 (s)	0,88 (s)
30	0,80 (s)	0,82 (s)
H <sub>3</sub> CCOO	2,04 (s, 3H)	2,03 (s, 3H)

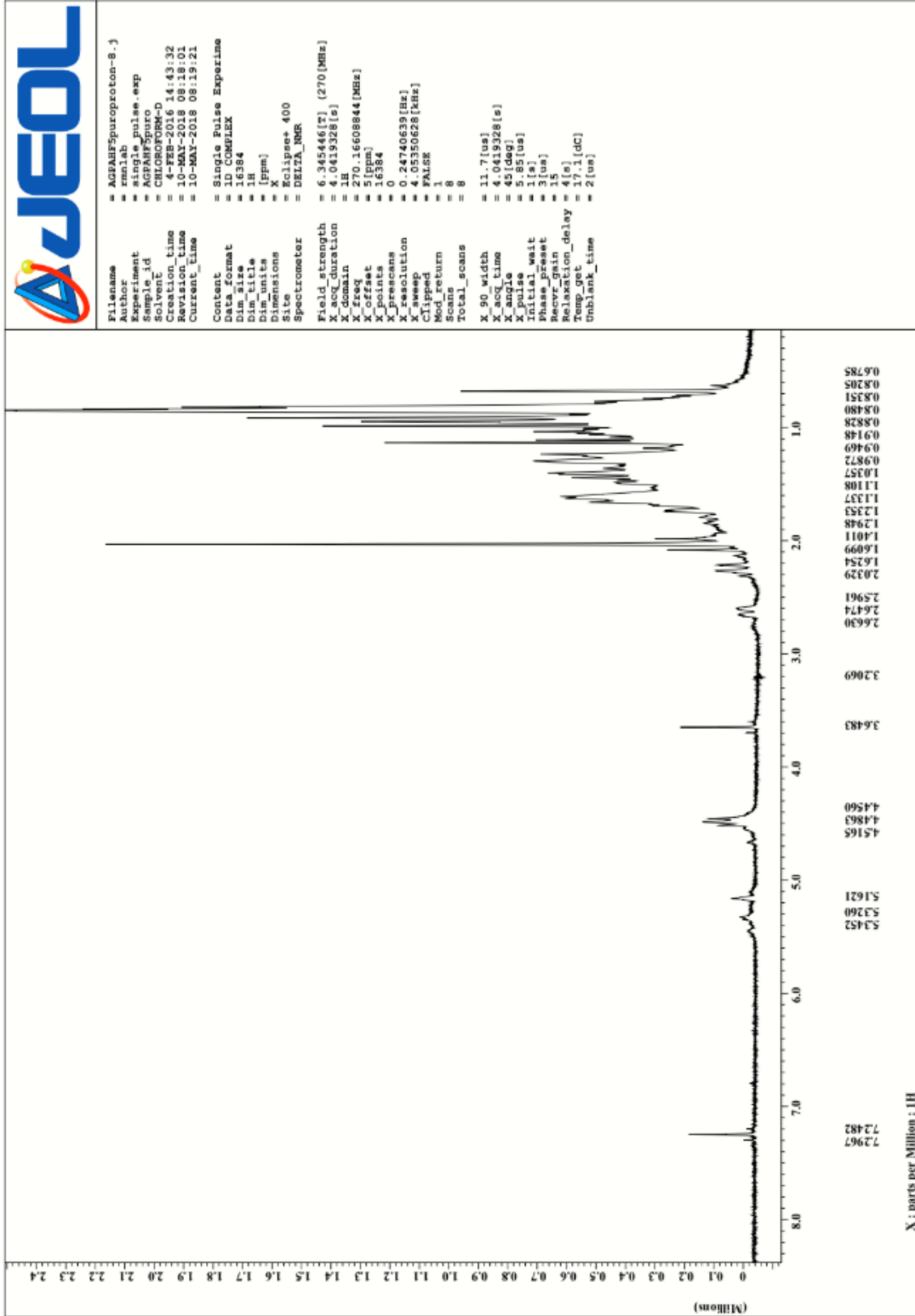


(II)

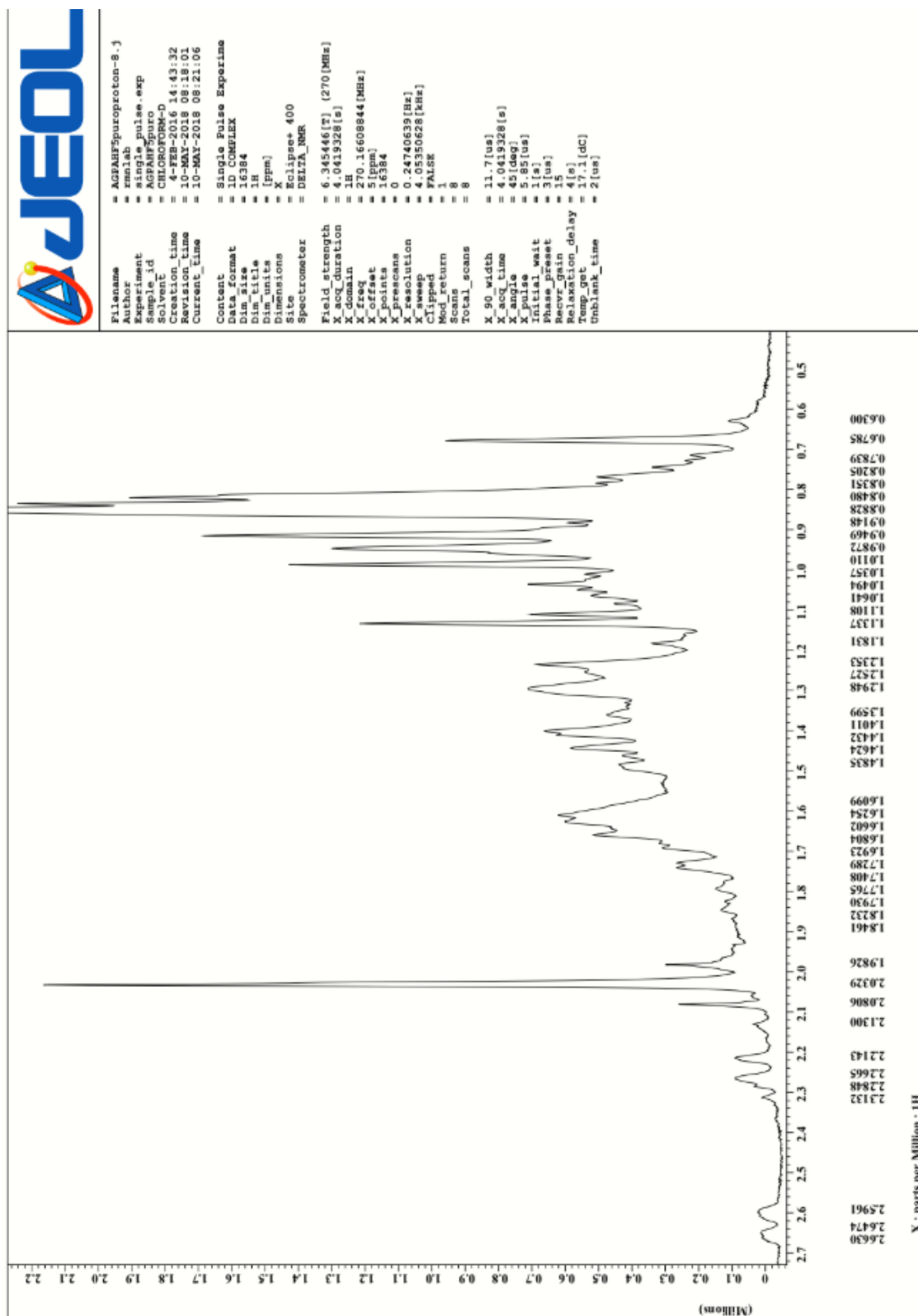
3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane

**Espectro N°5.** Espectro Infrarrojo de acetato de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane.

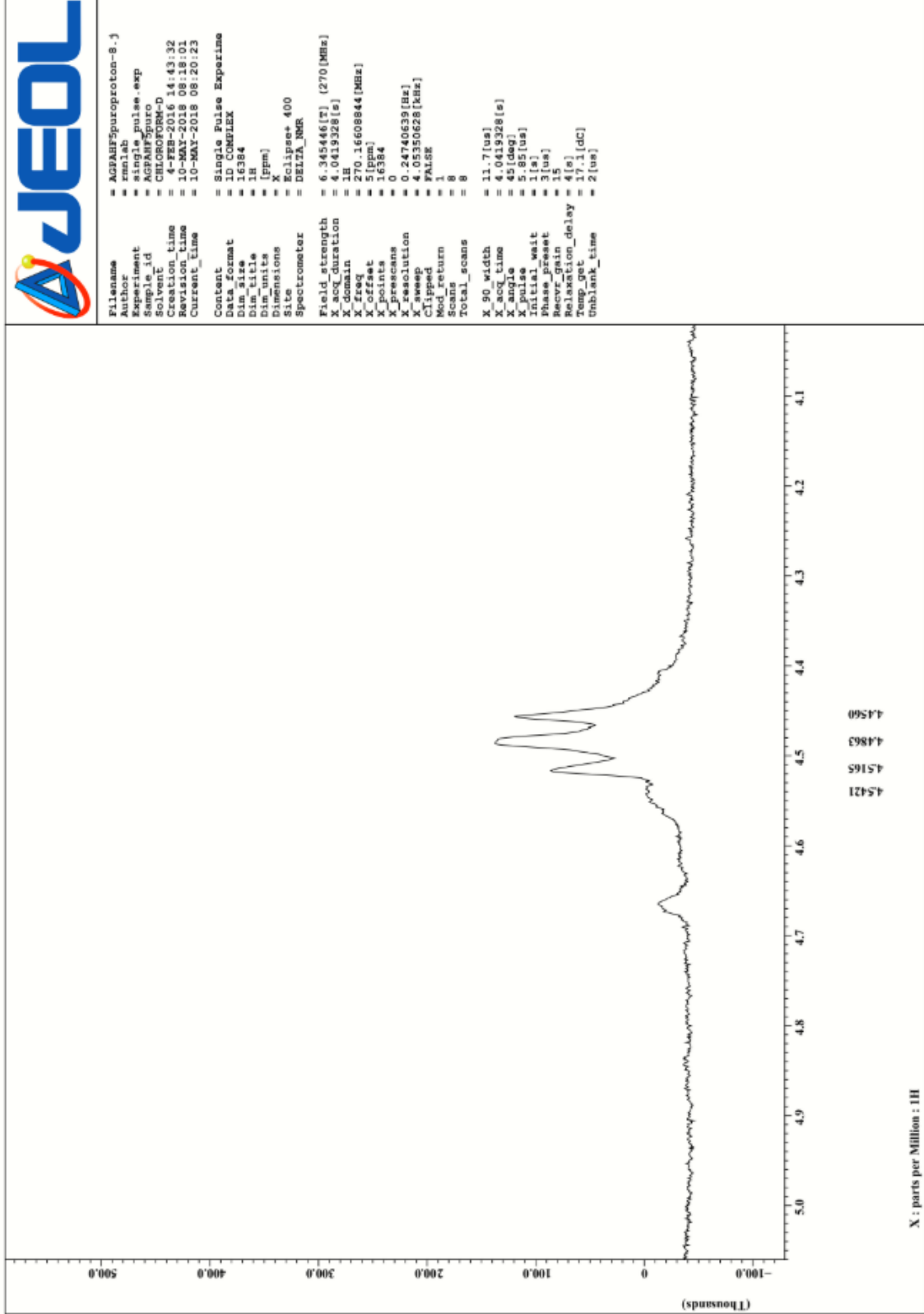
**Espectro N°6.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**) ( $\delta$ : 8,0-0,6785ppm) (270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



**Espectro N°7.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**) ampliado ( $\delta$ : 2,7- 0,5ppm) (270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

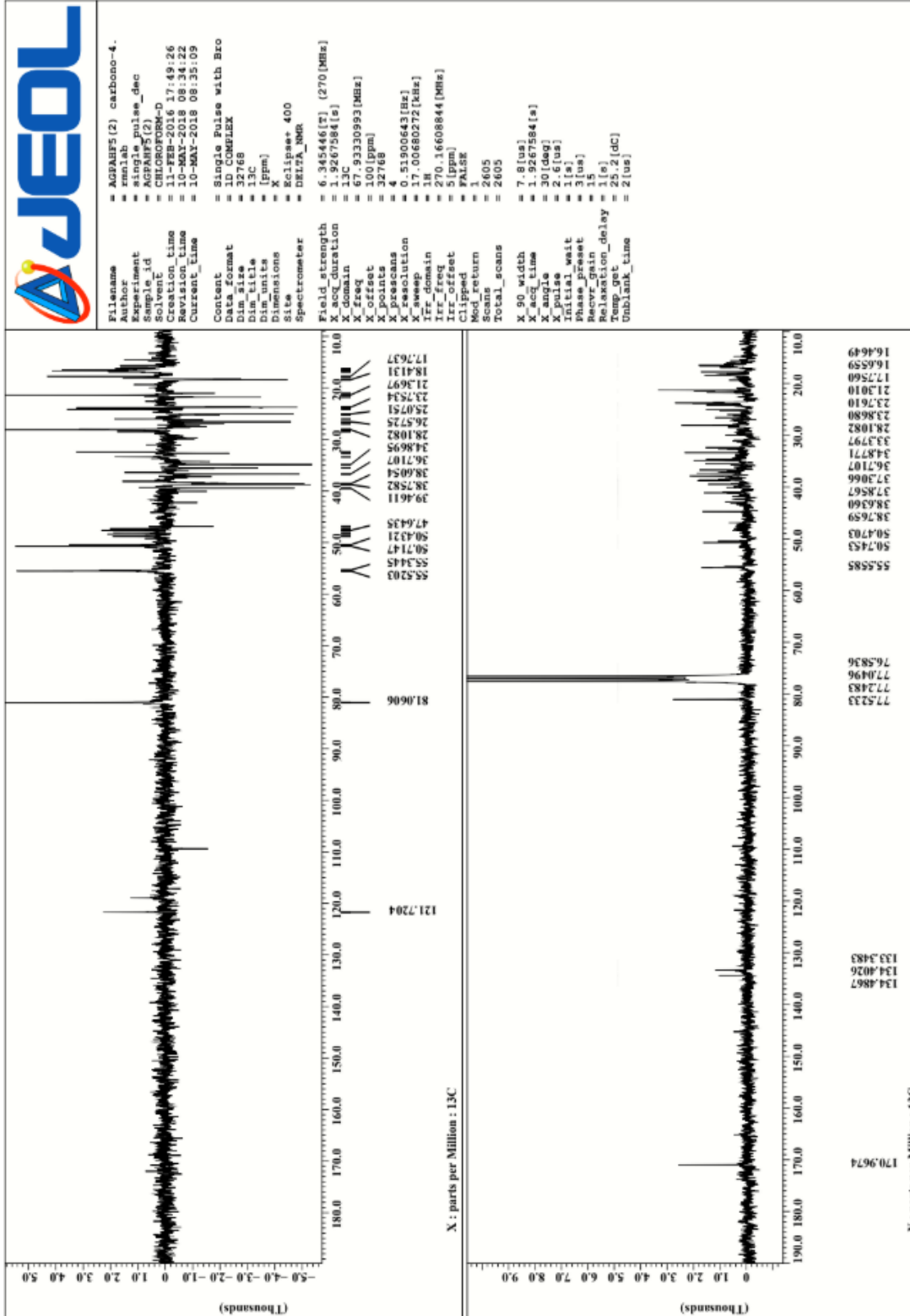


**Espectro N°8.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane (**II**) ampliado ( $\delta$ : 5,0- 4,1ppm) (270 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).





**Espectro N°9. Espectro RMN <sup>13</sup>C y DEPT de 3-β-acetoxi-13(18) oleanane (II)**  
 (δ: 190,0 - 10,0ppm) (270 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



## VIII. CONCLUSIONES.

- ✓ En el estudio fitoquímico realizado a la corteza de la planta *Phyllanthus acidus* (L) Skeels se aislaron 3 compuestos de los cuales 2 fueron identificados como como: phyllanthol **(I)** y 3- $\beta$ -acetoxi-13(18) oleanane **(II)**, un tercer compuesto sin caracterización completa presenta características de un ácido graso.
  
- ✓ Los compuestos aislados, pueden considerarse marcadores quimiotaxonomicos de la especie, ya que han sido reportados en los estudios fitoquímicos previamente realizados a especies de otras latitudes.

## IX. RECOMENDACIONES.

- ✓ Realizar el estudio fitoquímico de otras partes de la especie *Phyllanthus acidus* (L) Skeels, como hojas, frutos y raíz, ya que es probable que se encuentren más compuestos interesantes desde el punto de vista químico.
  
- ✓ Estudiar la fracción acuosa del extracto metanólico de la corteza de la planta *Phyllanthus acidus* (L) Skeels.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Marcano D., Hasegawa M. **(2002)**. "Fitoquímica Orgánica". *Editorial Torino*. 2da edición. Venezuela. Cap. 1, 29-31.

[2] Kuttan R., Harikumar K. B. **(2012)**. "*Phyllanthus* Species. Scientific Evaluation and Medicinal Applications". *CRC Press*. New York. Cap. 1,2-4.

[3] Steinmann V. **(2007)**. "Phyllanthaceae". *Flora del bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 152:1-2.

[4] Hoffmann P., Kathriarachchi H., Wurdack K. J. A. **(2006)**. "Phylogenetic Classification of Phyllanthaceae". *Kew Bulletin*; 61(1):37-53.

[5] Calixto J., Santos A. **(1998)**. "A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Their Chemistry, Pharmacology, and therapeutic potential". *Medicinal Research Reviews*; 18 (4): 226-252.

[6] Pettit G., Brown P., Schmidt J. **(2016)**. "The structures of phyllanthostatin 1 and phyllanthoside from the Central American tree *Phyllanthus acuminatus* Vahl". *Canadian Journal of Chemistry*; 60(1):939-941.

[7] Ram J., Tripathi P., Sharma V., Singh N., Kumar V. **(2011)**. "*Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review". *Journal Ethnopharmacology*; 138(2): 286-313.

[8] Mensah J. **(1988)**. "Alkaloids from the leaves of *Phyllanthus discoideus*". *Journal of Natural Products*; 51(6): 1113-1115.

- [9] Mirunalini S., Krishnaveni M. **(2010)**. "Therapeutic Potential of *Phyllanthus emblica* (AMLA): The Ayurvedic Wonder". *Journal of the Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*; 21 (1): 93-105.
- [10] Dhale D., Mogle P. **(2011)**. "Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Phyllanthus emblica* (L.)". *Science Research Reporter*; 1(3): 138-142.
- [11] Asha V., Akhila S., Wills P., Subramoniam A. **(2004)**. "Further studies on the antihepatotoxic activity of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn". *Journal of Ethnopharmacology*; 92(1): 67-70.
- [12] Boakye Y., Agyare C., Mensah W. **(2016)**. "Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell. and its major constituent, geraniin". *Journal of Ethnopharmacology*; 187(1): 17-27.
- [13] Colpo E., Vilanova C., Pereira R., Reetz L., Oliveira L., Farias I., Boligon A., Athayde M., Batista J. **(2014)**. "Antioxidant effects of *Phyllanthus niruri* tea on healthy subjects". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 1(1): 113-118.
- [14] Bagalkotkar G., Sagineedu S., Saad M., Stanslas J. **(2006)**. "Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 58(1): 1559-1570.
- [15] Pojchaijongdee N. **(2006)**. "Chemical constituents and biological activity of *Phyllanthus reticulatus* Poir. Leaves". Tesis Universidad de Silpakorn. [www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Nuch\\_Pojchaijongdee/Fulltext.pdf](http://www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Nuch_Pojchaijongdee/Fulltext.pdf) Fecha de consulta: 20/10/2016.
- [16] Kumar S., Sharma S., Kumar D., Kumar T., Arya R., Kumar K. **(2012)**. "Pharmacognostic study and anti-inflammatory activity of *Phyllanthus reticulatus* Poir. Fruit. Asian Pacific". *Journal of Tropical Disease*; 1(1):332-335.

[17] Saraju S., Satya B. (2011). "An overview on *Cicca acida* (*Phyllanthus acidus*)". *Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences*; 7(1): 156-160.

[18] Kumar S., Chowdhury A., Das J., Kumar U., Chandra M., Zahir S. (2011). "Assessment of cytotoxicity, antibacterial activity and phytochemical screening of ethanol extract of *Phyllanthus acidus* L. (family: Euphorbiaceae) bark". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*;1(6): 112-114.

[19] Talubmook C., Buddhakala N. (2013). "Hypoglycemic and Hypolipidemic Properties of Leafs Extracts from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels., *Leucaena Leucocephala* (Lam). de Wit. and *Psidium guajava* (L.) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats". *GSTF International Journal of BioSciences*; 2(2): 30-34.

[20] Rahman M., Habib R., Raquibul S., Aktar M., Rana S. (2011). "Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of methanolic extract of *Phyllanthus acidus* L". *International Journal of Drug Development & Research*; 3(2): 154-161.

[21] Bhaumik A., Kanti T., Bhongiri B., Sucharitha M. (2015). "Biomolecules Present in the fruit of *Phyllanthus acidus* L act as Potential Hepatocytes Regenerator against CCl<sub>4</sub> Induced Rat Hepatocytes". *International Journal of Life and Biosciences*; 1(1): 1-6.

[22] Chongsa W., Kanokwiroon K., Jansakul C. (2015). "Effects of 6 weeks oral administration of *Phyllanthus acidus* leaf water extract on the vascular functions of middle-aged male rats". *Journal of Ethnopharmacology*; 1(1): 1-40.

[23] Jain N., Lodhi S., Nahata A., Jain A. (2011). "Effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit on carbon tetrachloride-induced acute oxidative damage in liver of Wistar rats and mice". *Journal of Chinese Integrative Medicine*; 9(1): 49-56.

[24] Habib R., Rahman M., Mannan A., Hasanat A. **(2011)**. "Evaluation of Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial Potential and Phytochemical Screening of Chloroform extract of *Phyllanthus acidus*". *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*; 2(1): 420-427.

[25] Habib R., Aktar M., Rahman M., Hasan R., Saha A. **(2011)**. "In vitro Evaluation of Cytotoxic, Antibacterial, Antioxidant and Phytochemical Screening of Petroleum Ether Extract of *Phyllanthus acidus*". *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*; 2(4): 875.

[26] Mulhoalland D., Crouch N. **(2008)**. "Triterpenoids from the African tree *Phyllanthus polyanthus*". *Phytochemistry letters*; 1(1): 11-17.

[27] Mahato S. B., Kundu A.P. **(1994)**. "13 C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and Some Salient Features". *Phytochemistry*; 37(1): 1517-1575.