

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE**

***Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith.**

Trabajo especial de grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Yuary Pino, para
optar al título de Licenciada en Química.

Tutores: Prof. Jairo Bermúdez.
Profa. María Rodríguez.

Caracas, octubre 2019.

Nosotros, Prof. Jairo Bermúdez y Profa. María Rodríguez, investigadores del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que el presente Trabajo Especial de Grado titulado:

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE
Strychnos bredemeyeri (Schult.) Spragüe & Sandwith”**

Que presenta la Br. Yuary Pino, para aspirar al Título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016-2019, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, octubre 2019.

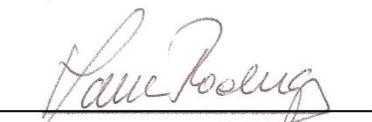


Dra. María Rodríguez



Dr. Jairo Bermúdez

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 *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith**, presentado por la Br. Yuary Pino C.I.:19.796.755, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciada en Química.



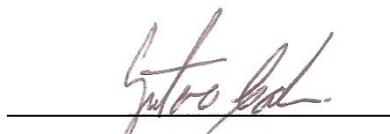
Profa. María Rodríguez
(Tutora)



Prof. Jairo Bermúdez
(Tutor)



Profa. Katuska Chávez
(Jurado principal)



Prof. Gustavo Cabrera
(Jurado principal)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela, que me dio más que formación académica. A mis tutores, por la oportunidad de trabajar con ustedes y por enseñarme tanto. A mi familia, por impulsarme todos estos años y nunca perder la fé. A mis amigos, por siempre estar para apoyarme. Ustedes saben quiénes son, infinitamente agradecida.

CONTENIDO

RESUMEN	I
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y SIMBOLOS	III
INDICE DE ESPECTROS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
Metabolitos secundarios	2
Terpenos y terpenoides	3
Compuestos aromáticos o fenólicos	5
Alcaloides	7
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>STRYCHNOS BREDEMEYERI</i>	9
ANTECEDENTES	10
La familia Loganiaceae	10
El género <i>Strychnos</i>	11
<i>Strychnos fendleri</i> Spragüe & Sandwith	12
<i>Strychnos guianensis</i> (Aublet.) C. Martius	15
<i>Strychnos pseudo-quina</i> A. St. Hil	18
El género <i>Strychnos</i> en América	21
Metabolitos no-alcaloidales del género <i>Strychnos</i>	31
<i>Strychnos bredemeyeri</i> (Schult.) Spragüe & Sandwith	36
JUSTIFICACIÓN	37
OBJETIVOS	38
Objetivo General	38
Objetivos Específicos	38
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39

Materiales	39
Inventario del material cromatográfico	39
Inventario de solventes	40
Inventario de equipos utilizados	40
Descripción del material vegetal	41
Tratamiento del material vegetal para la obtención de los metabolitos secundarios	42
Purificación de los Compuestos A y B a partir de SbD ₁₋₂	46
Purificación del Compuesto C a partir de SbD ₁₋₅ .	48
Purificación del Compuesto D a partir de SbD ₁₋₆ .	49
Purificación del Compuesto E a partir de SbB _i .	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
Caracterización de Compuestos A y B	58
Caracterización del Compuesto C	75
Caracterización del Compuesto D	79
Caracterización del Compuesto E	94
CONCLUSIONES	96
RECOMENDACIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXOS	104

RESUMEN

De las hojas y ramas de la especie *Strychnos bredemeyeri*, se aislaron cinco compuestos, cuatro flavonoides (Compuestos A, B, C y D) y un terpeno (Compuesto E).

El aislamiento de los compuestos A, B, C, D y E, se llevó a cabo sometiendo el extracto metanólico crudo (Sb-EMeOH) a cromatografía líquida al vacío (CLV), obteniendo una fracción rica en flavonoides (SbD) que, posteriormente, fue fraccionada mediante cromatografía de exclusión molecular, logrando separar los metabolitos de interés en las fracciones SbD₁₋₂, SbD₁₋₅ y SbD₁₋₆.

La purificación de los flavonoides se realizó mediante cromatografía en columna (CC) y la posterior caracterización mediante espectroscopía UV-Vis. A partir de SbD₁₋₂ se consiguió aislar (16,6±0,1)mg de una mezcla de dos componentes, los espectros de UV-Vis sugieren que núcleo flavonoidal del compuesto mayoritario (B) corresponde a un 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol sustituido en la posición 3, mientras que, el compuesto minoritario (A) corresponde a 4',5,7-trihidroxiflavona. Así mismo, a partir de SbD₁₋₅ se aisló el compuesto C, los espectros de UV-Vis indican que se trata de un 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol sustituido en la posición 3 y, finalmente, el compuesto D se purificó a partir de SbD₁₋₆, (13,5±0,1)mg.

Los flavonoides B y D se identificaron a partir del análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY y HSQC) como **Quercitrina** (quercetina-3-O-α-L-ramnósido) y **quercetina-3,7-O-α-L-diramnósido**, respectivamente.

El compuesto E, que no ha sido identificado, se aisló por CC de la fracción rica en terpenos SbB, (34,1±0,1)mg. Adicionalmente, el ensayo comparativo de SbB con

patrones de **Lupeol** y **β -sitosterol** por cromatografía en capa fina (CCF) evidenció la presencia de ambos.

Palabras clave: *Strychnos*, *Strychnos bredemeyeri*, flavonoides, terpenos, quercitrina, quercetina-3-O- α -L-ramnósido, quercetina-3,7-O- α -L-diramnósido, Lupeol, β -sitosterol.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y SIMBOLOS

Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
Et₂O	Dietiléter
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
NaOAc	Acetato de sodio
NaOEt	Etóxido de sodio
NaOMe	Metóxido de sodio
p.a.	Para análisis
R_f	Factor de retención
<i>sh</i>	Hombro (<i>shoulder</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CLV	Cromatografía líquida al vacío
COSY	Correlación homonuclear de hidrógenos a través de átomos de carbono vecinos
HSQC	Correlación heteronuclear simple de enlaces carbono-hidrógeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
AlCl₃	Tricloruro de aluminio
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CHCl₃	Cloroformo
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃CO₂H	Ácido acético
<i>br. s</i>	Singlete ancho (broad singlet)

cm	Centímetro(s)
J	Constante de acoplamiento medida en Hertz
δ	Desplazamiento químico medido en partes por millón
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
g	Gramo(s)
HCl	Ácido clorhídrico
HCO₂H	Ácido fórmico
H₂O	Agua
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃BO₃	Ácido bórico
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milimetro(s)
m	Multiplete
nm	Nanometro(s)
ppm	Partes por millón
s	Singlete
t	Triplete
°C	Grados centígrados
λ	Longitud de onda
Δλ_{max}	Desplazamiento del máximo de longitud de onda
μm	Micrometro(s)

INDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^1H del Compuesto B.	65
Espectro 2. RMN ^{13}C del Compuesto B.	66
Espectro 3. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 6,0-7,5ppm.	67
Espectro 4. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 6,0-7,5ppm.	67
Espectro 5. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 8,6-13,4ppm.	68
Espectro 6. RMN ^{13}C del Compuesto B. Ampliación 90,0-180,0ppm	68
Espectro 7. RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto B. Ampliación 6,1-7,4ppm/90,0-125,0ppm.	69
Espectro 8. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 3,1-5,3ppm.	70
Espectro 9. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 0,5-5,5ppm.	71
Espectro 10. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 3,0-3,6ppm.	71
Espectro 11. RMN ^{13}C del Compuesto B. Ampliación 15,0-105,0ppm.	72
Espectro 12. RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto B. Ampliación 3,0-4,0ppm/67,0-73,0ppm.	72
Espectro 13. RMN ^1H del Compuesto D.	82
Espectro 14. RMN ^{13}C del Compuesto D.	83
Espectro 15. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 8,0-13,0ppm.	84
Espectro 16. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 6,4-7,4ppm.	84
Espectro 17. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 6,4-7,4ppm.	85
Espectro 18. RMN ^{13}C del Compuesto B. Ampliación 90,0-180,0ppm.	86
Espectro 19. RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto D. Ampliación 6,2-7,6ppm/90,0-125,0ppm.	86
Espectro 20. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 0,5-6,0ppm.	88
Espectro 21. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 3,1-4,0ppm.	88
Espectro 22. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 0,5-6,0ppm.	89
Espectro 23. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 3,0-4,1ppm.	90
Espectro 24. RMN ^{13}C del Compuesto D. Ampliación 15,0-105,0ppm.	90
Espectro 25. RMN ^{13}C del Compuesto D. Ampliación 70,0-72,2ppm.	91
Espectro 26. RMN HSQC del Compuesto D. Ampliación 3,1-4,0ppm/68,5-73,5ppm.	91

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios en plantas.	4
Esquema 2. Obtención del extracto metanólico de <i>S. bredemeyeri</i> .	42
Esquema 3. Cromatografía líquida al vacío de Sb-EMeOH.	43
Esquema 4. Lavados de la fracción SbD con acetato de etilo.	44
Esquema 5. Cromatografía de exclusión molecular de la fracción SbD ₁ .	46
Esquema 6. Lavados de la fracción SbD ₁₋₂ con dietiléter (Et ₂ O).	47
Esquema 7. Purificación de flavonoides A y B por cromatografía de columna de la fracción SbD _{1-2-A} .	48
Esquema 8. Purificación del flavonoide C por cromatografía de columna de la fracción SbD ₁₋₅ .	49
Esquema 9. Purificación del flavonoide D por cromatografía de columna de la fracción SbD ₁₋₆ .	50
Esquema 10. Filtración a través de Carbón activado-Celita 545 de SbB.	51
Esquema 11. Purificación del terpeno E por cromatografía de columna de la fracción SbBi.	53
Esquema 12. Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico Sb-EMeOH de hojas y ramas de <i>Strychnos bredemeyeri</i> .	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo de Flavano y tipos estructurales de flavonoides.	7
Figura 2. Tipos de alcaloides.	8
Figura 3. Flores, hojas y zarcillo de <i>Strychnos bredemeyeri</i> (Schult.) Spragüe & Sandwith.	9
Figura 4. Distribución mundial de la familia Loganiaceae.	10
Figura 5. Ubicación geográfica de <i>Strychnos bredemeyeri</i> .	11
Figura 6. Hojas y frutos de <i>Strychnos bredemeyeri</i> (Schult.) Spragüe & Sandwith. Especimen almacenado en el Jardín Botánico de Caracas, código AC-4359.	41
Figura 7. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbA, SbB y SbC desarrollada en AN6 sin revelar (7a) y revelada con AS (7b).	55
Figura 8. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbC, SbD, SbE y SbF desarrollada en AN2 sin revelar (8a) y revelada con AS (8b).	56
Figura 9. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbC, SbD, SbE y SbF desarrollada en AN2 sin revelar (9a) y revelada con NP (9b).	57
Figura 10. Placa de SbD ₁ y las fracciones colectivas SbD ₁₋₁ – SbD ₁₋₁₄ en AN2 revelada con NP.	57
Figura 11. Placa de Compuesto B con trazas de Compuesto A, desarrollada con AN2 y revelada con NP.	59
Figura 12. Grupos funcionales que influyen en el espectro de absorción de UV-Vis de flavonoides.	59
Figura 13. Estructura química propuesta para el Compuesto A aislado de la subfracción SbD _{1-2-A} .	60
Figura 14. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto A.	61
Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto B.	64
Figura 16. Estructura química del compuesto Quercitrina aislado de la subfracción SbD ₁₋₂ .	73
Figura 17. Placa de Compuesto C desarrollada con AN2 y revelada con NP.	76
Figura 18. Estructura química propuesta para el Compuesto C aislado de la subfracción SbD ₁₋₅ .	77
Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto C.	78
Figura 20. Placa de Compuesto D desarrollada con AN2 y revelada con NP.	79
Figura 21. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto D.	80
Figura 22. Estructura química del compuesto Quercetina-3,7-O- α -L-diramnósido aislado de la fracción SbD ₁₋₆ .	92
Figura 23. Placa comparativa de fracciones SbB ₁ , SbB ₂ , lupeol y β -sitosterol en AN6 y AS.	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos alcaloidales aislados de especies americanas del género <i>Strychnos</i> .	22
Tabla 2. Actividad biológica reportada para los metabolitos secundarios alcaloidales aislados de especies americanas del género <i>Strychnos</i> y (*) las especies utilizadas en preparaciones tradicionales.	25
Tabla 3. Metabolitos no-alcaloidales aislados de especies del género <i>Strychnos</i> .	31
Tabla 4. Fracciones obtenidas por CLV de Sb-EMeOH.	43
Tabla 5. Fracciones obtenidas por CC de exclusión molecular, Sephadex LH-20, de SbD ₁ .	45
Tabla 6. Fracciones obtenidas por lavados con dietiléter de SbD ₁₋₂ .	47
Tabla 7. Fracciones obtenidas por filtración a través de Carbón activado-Celita 545 de SbB.	52
Tabla 8. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto A según el medio. Comparación con los datos reportados para Apigenina.	62
Tabla 9. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto B según el medio. Comparación con los datos reportados para Quercitrina.	63
Tabla 10. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H y ¹ H- ¹ H COSY del Compuesto B comparado con datos reportados en la literatura para quercitrina.	73
Tabla 11. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹³ C y HSQC del Compuesto B comparado con datos reportados en la literatura para quercitrina.	74
Tabla 12. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto C según el medio. Comparación con los datos reportados para Rutina.	77
Tabla 13. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto D según el medio.	81
Tabla 14. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H y ¹ H- ¹ H COSY del Compuesto D y quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.	92
Tabla 15. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹³ C y HSQC del Compuesto D y quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.	93

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se han empleado con fines curativos 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 que poseen propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que se extraen a partir de ellas.¹

Los compuestos en los organismos vivos se pueden dividir en dos grandes grupos: metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son aquellos que se producen y participan en los procesos metabólicos primarios tales como la respiración y la fotosíntesis, son necesarios para el crecimiento, desarrollo y supervivencia del organismo, incluyen azúcares, aminoácidos, ácidos tricarbónicos, proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos; los metabolitos secundarios son producidos por las vías metabólicas derivadas de rutas primarias, son numerosos y muy diversos, sobre todo en las plantas superiores.²

Las plantas medicinales son una rica fuente de fitoquímicos bioactivos o bionutrientes. Los fitoquímicos se acumulan en diferentes partes de la planta, como en las raíces, tallo, hojas, flores, frutos o semillas. Los niveles varían de una planta a otra, dependiendo de la variedad, el procesamiento y las condiciones de cultivo. Estos compuestos fitoquímicos son conocidos como metabolitos secundarios de plantas y tienen propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, efecto antimicrobiano, modulación de las enzimas de desintoxicación, estimulación del sistema inmunológico y propiedad anticancerígena.³

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios o productos naturales no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas y asimilación de nutrientes; tienen una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal.⁴

Los productos naturales contribuyen al color, aroma y sabor de la planta, la protegen de peligros ambientales como la contaminación, el estrés, la sequía, la exposición UV, así como de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos, además sirven como atrayentes de polinizadores y de dispersores de semillas, entre otras cosas.^{3, 4}

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica, sin embargo, en todos los casos es inevitable la superposición, por lo que el criterio más acertado es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico engloba metabolitos primarios y secundarios. De acuerdo al criterio biosintético propuesto en el Esquema 1 se obtienen entonces tres grandes grupos de compuestos: terpenos y terpenoides, compuestos aromáticos o fenólicos y compuestos tipo alcaloides.^{5a}

Terpenos y terpenoides

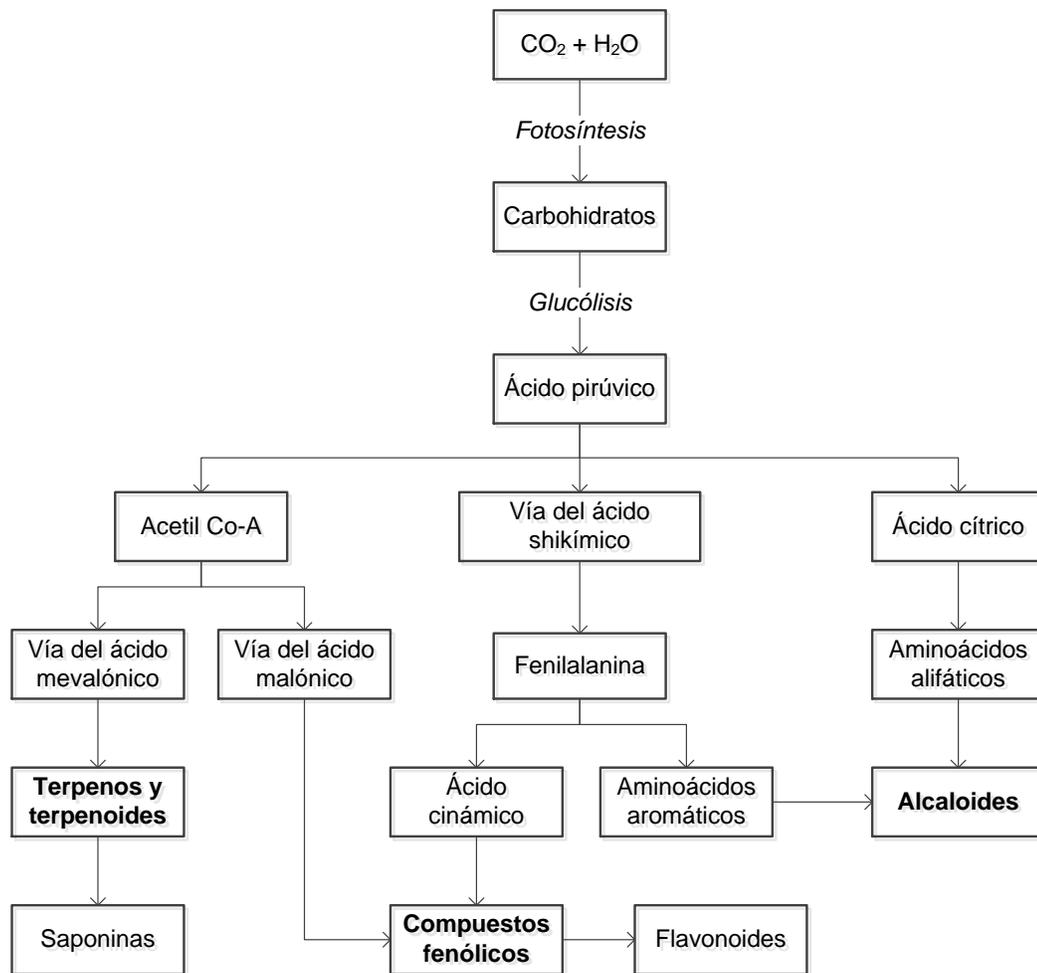
Los terpenos son hidrocarburos de origen vegetal que pertenecen a las familias de los alcanos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas; cuando las moléculas contienen átomos de oxígeno se emplea preferentemente el término terpenoide, también se les conoce como isoprenoides por ser derivados del precursor inmediato del isopreno, el isopentenil difosfato, una molécula de cinco átomos de carbono. El precursor biogenético de los terpenos es la acetil-coenzima A, la condensación de tres moléculas de acetil-CoA da lugar a la formación del (*R*)-ácido mevalónico, este último es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para obtener el isopentenil difosfato, que no es más que la forma activada del isopreno, a partir del cual se forman los terpenos.^{6,}

7a

Los terpenos no sólo son el mayor grupo de productos naturales en las plantas, que comprende al menos 30.000 compuestos, sino también es el más surtido de tipos estructurales. La unión sucesiva de dos, tres, cuatro, cinco, seis y ocho unidades de isopreno, generan, respectivamente, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, si la molécula es el resultado de la unión de más de ocho unidades de isopreno se denomina politerpeno, y aunque estos compuestos presentan una biosíntesis y una estructura común, no desempeñan las mismas funciones.^{6,8}

Las funciones defensivas de los terpenos en las plantas abarcan agresiones bióticas como la herbívora e infecciones causadas por patógenos víricos, bacterianos o fúngicos, también ofrecen protección a nivel celular y tisular frente a agresiones abióticas como el exceso de luz, la sequía o la contaminación atmosférica, estas perturbaciones dan lugar a la formación de compuestos oxidantes que limitan el

desarrollo de la planta y son contrarrestados por las propiedades antioxidantes de los terpenos.⁶



Esquema 1. Rutas biosintéticas de metabolitos secundarios en plantas.^{5a}

Los terpenos tienen un papel importante como: fragancias en perfumería, constituyentes de los condimentos para alimentos, atractores naturales de insectos imitando sus propias feromonas, medicamentos para el tratamiento de numerosas enfermedades, entre otras. Se ha encontrado que poseen una variedad de efectos

biológicos, incluyendo antibacterial, sedante, antitumoral, citotóxico, antiinflamatorio, insecticida, entre otros.^{7b, 9}

El óxido de escualeno es un terpenoide de 30 átomos de carbono, precursor de triterpenos, esteroides y saponinas. Las saponinas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, producidos principalmente en el reino vegetal; son solubles en agua y tienen diversas propiedades, entre ellas, dulzor o amargor, debido a la cantidad de glicósidos presentes, formación de espuma y propiedades emulsionantes, propiedades hemolítica, antimicrobiana, insecticida y molusquicida, adicionalmente se han encontrado amplias aplicaciones en bebidas y productos de confitería, cosméticos y farmacéuticos. Tienen acción estimulante sobre el sistema nervioso central, actividad antipirética, sedante, expectorante, antitúscica, antiinflamatoria, previenen las úlceras provocadas por el estrés, aceleran la movilidad intestinal y, además, promueven la síntesis de ARN y de proteínas.^{5b, 10}

Las saponinas pueden ser clasificadas químicamente en triterpenoidales o esteroidales, sin embargo, son metabolitos estructuralmente diversos por ser susceptibles a reacciones de fragmentación, homologación y degradación; se componen de agliconas no polares enlazadas a uno o más restos de sacáridos y, en algunos casos, tensoactivos no volátiles, que además de azúcares, poseen un glicérido que contiene dos unidades de ácido linolénico y una unidad de galactosa con la cual se conecta el resto glicerilo al esqueleto del ácido oleanólico.^{5b, 10}

Compuestos aromáticos o fenólicos

Los compuestos fenólicos se derivan generalmente de las vías de las pentosas fosfato y producen compuestos aromáticos después de una serie de transformaciones en las rutas metabólicas de los ácidos shikímico y acético. Incluyen derivados simples

de benceno, anillos bencénicos condensados, monómeros, dímeros o polímeros de alto peso molecular. Se pueden clasificar en cuatro grupos: ácidos fenólicos, que se divide en hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos; flavonoides, que incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y antocianinas; taninos que pueden ser hidrolizables o condensados y, finalmente, lignanos.^{5c, 11, 12}

Los polifenoles están involucrados en la defensa de las plantas contra la radiación ultravioleta, la agresión por agentes patógenos, parásitos y depredadores. Adicionalmente, contribuyen tanto a los colores de las plantas, como, al amargor y la astringencia de las frutas. Se ha encontrado que presentan diversas actividades biológicas como la inhibición de patógenos y microorganismos de descomposición, antideposición de triglicéridos, disminución en la incidencia de las enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer y los accidentes cerebrovasculares, efectos antiinflamatorio y antialérgico a través de procesos que involucran especies reactivas de oxígeno.^{11, 12, 13}

Los ácidos fenólicos, taninos hidrolizables y flavonoides tienen efectos anticancerígenos y antimutagénicos ya que actúan como agentes protectores de ADN contra los radicales libres, mientras que, los flavonoides, catequinas y sus derivados son considerados en estudios centrados en las enfermedades degenerativas del cerebro y los procesos de envejecimiento, encontrándose que sirven como posibles agentes neuroprotectores en los trastornos como el Parkinson y el Alzheimer.¹²

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena del policétido, un anillo B derivado del ácido shikímico y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano.^{5d}

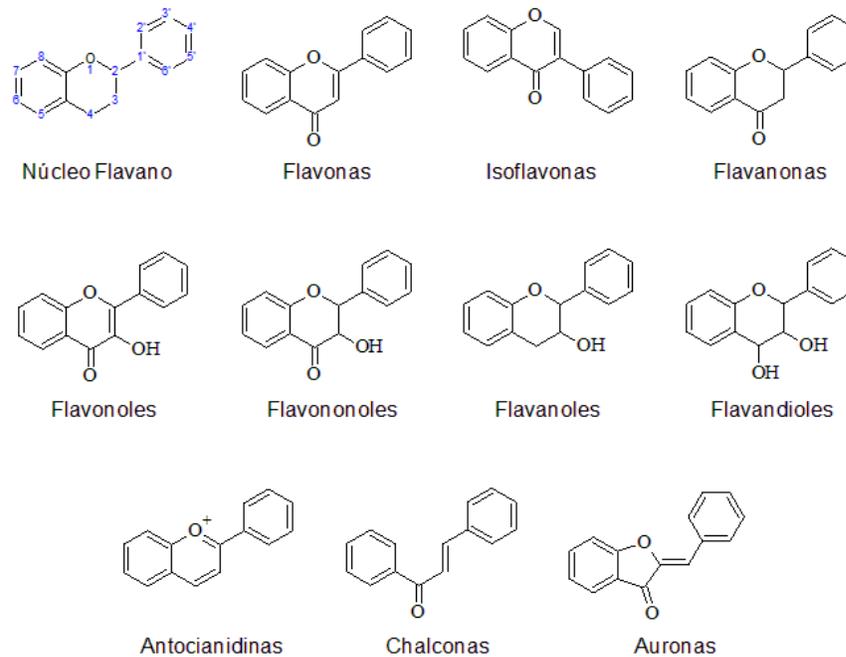


Figura 1. Núcleo de Flavano y tipos estructurales de flavonoides.^{5e}

Alcaloides

Los alcaloides incluyen todos los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno y no están clasificados de otra manera como péptidos, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, cofactores, fitohormonas o metabolitos primarios. Se pueden clasificar de acuerdo a sus grupos estructurales, que a su vez representa en cierto modo, su origen genético, resultando en seis grandes grupos: anillos sencillos derivados de piridina, pirrolidina y piperidina; compuestos bicíclicos derivados de tropina; pirrolizidinas, indolizidinas y quinolizidinas; isoquinolinas, alcaloides bencilisoquinolínicos, de eritrina, de Amarillydaceas, alcaloides quinolínicos; indoles, incluye betalaínas; y, finalmente, alcaloides esteroidales y terpenoidales.^{5f, 14}

La ruta biosintética que da lugar al esqueleto de la mayoría de los alcaloides es a partir de aminoácidos, pero también se conocen otras rutas tales como la del isopreno que da lugar a estructuras como la del taxol y la estricnina, o la del ácido shikímico por la que se obtienen derivados de los aminoácidos tirosina (morfina) y triptofano (estricnina), a menudo estas rutas se combinan. Además, se añade una serie de alcaloides derivados de intermediarios del ciclo de Krebs como el Aspartato y el Glutamato, de donde se forman los aminoácidos lisina y ornitina, respectivamente.^{14a}

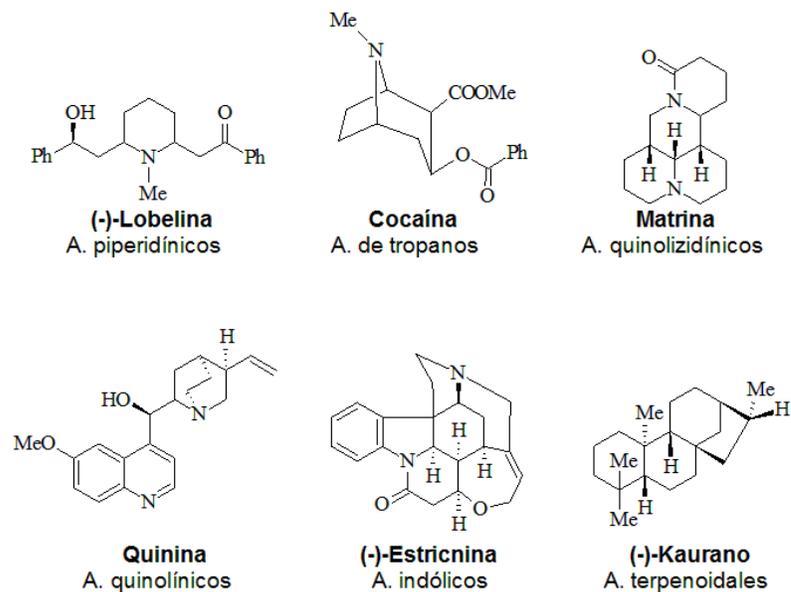


Figura 2. Tipos de alcaloides.⁵

Los alcaloides han sido utilizados por la humanidad durante miles de años como colorantes (añil), saborizantes (capsaicina), estimulantes (cafeína, nicotina), alucinógenos (escopolamina), insecticidas (piperina), venenos para vertebrados y humanos (estricnina) e incluso como agentes terapéuticos (atropina, quinina, codeína).^{14b}

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE *STRYCHNOS BREDEMEYERI*

La especie *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith, presenta la siguiente clasificación taxonómica.¹⁵

Reino: Plantae.

Phylum: Tracheophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Gentianales.

Familia: Loganiaceae.

Género: *Strychnos*.

Especie: *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith.

La bibliografía indica que los siguientes nombres son sinónimos de la especie: *Lasiostoma bredemeyeri* Schult. & Schult. F., *Lasiostoma glabrum* Willd. ex DC., *Rouhamon bredemeyeri* (Schult. & Schult. f.) A. DC., *Rouhamon pedunculatum* A. DC., *Strychnos pedunculata* (A. DC.) Benth., *Strychnos schomburgkiana* Klotzsch ex R.H. Schomb., *Strychnos trinitensis* Griseb., *Strychnos ulei* Gilg ex Ule. y *Strychnos darienensis* Seem.^{15, 16}



Figura 3. Flores, hojas y zarcillo de *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith.¹⁷

ANTECEDENTES

La familia Loganiaceae

Loganiaceae es una familia, sobre todo pantropical que se extiende hacia los climas templados de Australia y América del Norte. Está constituida de poco más de 400 especies distribuidas en 15 géneros, siendo el miembro más prominente de la familia el género *Strychnos* con, aproximadamente, 200 especies y una rica historia cultural de usos terapéuticos tradicionales.¹⁸

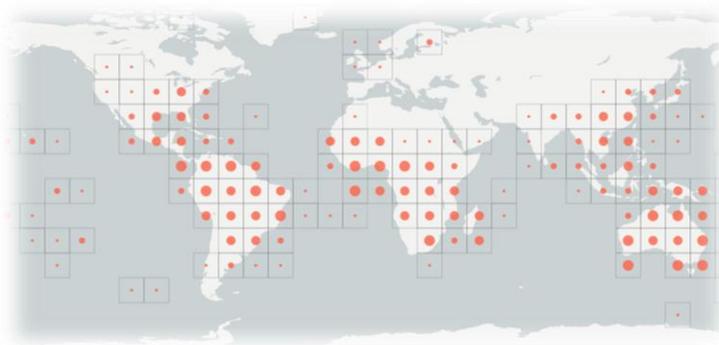


Figura 4. Distribución mundial de la familia Loganiaceae.¹⁹

Los miembros de la familia son, en su mayoría, géneros leñosos como árboles y lianas, pero también incluyen hierbas. Se halla en los biotopos secos, raramente a altitudes superiores a 3000m, nunca forman masas densas y suelen presentarse ejemplares aislados o en pequeños grupos de reducida importancia ecológica. Sus hojas son generalmente opuestas, simples, enteras a lobuladas con estípulas más o menos desarrolladas, sésiles o pecioladas, glabras, pubescentes o tomentosas. Sus flores no son grandes, son actinomorfas o ligeramente zigomorfas, tetracíclicas 5-4 meras, rara vez uno de los lóbulos del cáliz o pétalos se agranda, son bisexuales,

raramente unisexuales o polígamas–dioicas, son solitarias, en cabezuelas, espigas, panojas o cimas. Las especies de polinizadores son diversas e incluso pueden incluir murciélagos. Los frutos se presentan en forma de cápsula, drupa o baya. Semillas pequeñas con endosperma. Son plantas monoicas o dioicas.^{19, 20, 21a}

El género *Strychnos*

El género *Strychnos* es el más amplio de la familia Loganiaceae, es un género de árboles, lianas y arbustos, erectos y de escalada, que comprende cerca de 200 diferentes especies, está distribuida en todas las regiones cálidas de Asia, América y África y se puede subdividir geográficamente en tres grupos: el primero de ellos América Central y del Sur (al menos 73 especies), el segundo África (75 especies) y el tercero que incluye Asia, Australia y Polinesia (alrededor de 58 especies).^{22, 23}



Figura 5. Ubicación geográfica de *Strychnos bredemeyeri*.¹⁹

En Venezuela se hallan tres subgéneros de *Strychnos*: *Strychnos*, *Rouhamon* y *Breviflorae*, entre ellas lianas, raramente arbustos, que se caracterizan por tener tallos de hasta 55m de largo y 30cm de diámetro en la base; usualmente están dotadas de zarcillos, espinas o ambas cosas; tienen hojas opuestas, simples y enteras;

inflorescencias terminales, axilares o ambas; flores blancas o amarillas que tienen cuatro o cinco lóbulos cáliz, corola de cuatro o cinco partes, cinco estambres y un pistilo. Los frutos tienen forma de baya, generalmente elipsoide o esferoide a globosa y achatada, puede encontrarse entre 1-14cm de diámetro con apariencia opaca o brillante y de colores verde, pardo, amarillo o naranja, la pulpa es suave y amarillenta o blancuzca. En general, las semillas y corteza de muchas plantas de este género contienen el alcaloide estricnina.^{22, 24, 25a}

La actividad biológica de las especies de *Strychnos* ha sido ampliamente estudiada debido a las diversas aplicaciones etnobotánicas del género como veneno y como tratamiento de mordeduras de serpientes, también es empleada para tratar diversas enfermedades, incluyendo el reumatismo, problemas gastrointestinales y malaria. Las plantas de este género han evidenciado propiedades coagulantes, diuréticas, analgésicas, además de actividades antiinflamatorias, antidiarréicas, antimicrobianas, hepatoprotectoras y antiplasmódicas. Se ha reportado actividad antitumoral, citotoxicidad sobre líneas celulares de hematoma humana y potencial antiulcerogénico ayudando a prevenir las úlceras gástricas.^{25b, 26a}

Las especies del género *Strychnos* más ampliamente estudiadas en América presentan amplio contenido alcaloidal, principalmente del tipo indólico, aunque también se han reportado flavonoides, terpenoides y saponinas.^{25c}

Strychnos fendleri Spragüe & Sandwith.

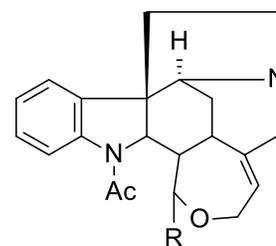
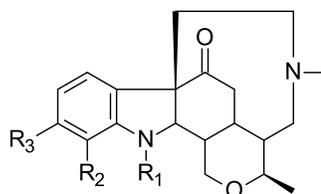
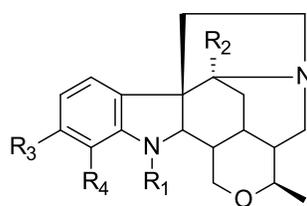
Strychnos fendleri, es un árbol pequeño de 10m de altura, con espinas afiladas, sin zarcillos; frutos de color naranja con 2,5 cm de diámetro. Se extiende en las partes secas del norte de Bolívar, Anzoátegui, Aragua, Distrito Capital, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, Nueva Esparta, Sucre, Zulia; noreste de Colombia y Brasil (Roraima).^{21b, 25d}

La especie *Strychnos fendleri* es conocida comúnmente como cruceto y palo de loro, los nativos emplean la corteza del tallo como tratamiento de malaria y fiebre, o como ingrediente en la preparación de curare.^{25d, 27}

Los metabolitos aislados de la corteza de esta especie son, en su mayoría, de tipo alcaloidal, como espermoestricnina (**1b**), *N*-deacetilespermoestricnina (**1a**), estricnosplendina (**1c**), *N*-acetilestricnosplendina (**1d**), *N*-acetil-*O*-metilestricnosplendina (**1e**), *N*-acetil-12-hidroxi-11-metoxiestricnosplendina (**1f**), estricnofendlerina (**2a**), *N*-deacetilestricnofendlerina (**2b**), 11-metoxiestricnofendlerina (**2c**), 12-hidroxi-11-metoxiestricnofendlerina (**2d**), diabolina (**3a**), heningsamina (**3b**), estricnosinol (**4**), pseudoestricnina (**5**), 19,20-dihidroicajina (**6**).^{21c, 26a, 27}

El análisis fitoquímico de la especie también reporta metabolitos no alcaloidales como el poliol *D*-1-metil-*myo*-inositol (**7**), el secoiridoide vogelosido (**8**) y el flavonoide kaempferitrina (**10**) de las hojas de *Strychnos fendleri* y, de la corteza, el iridoide booneina (**9**), y los compuestos fenólicos 3-metoxiquercetina (**11**), 1,3-Di-*O*- β -*D*-glucopiranosil-4-metoxibenceno (**12**) y ácido 4-[-*O*- β -glucopiranosil-(2 \rightarrow 3)-*D*-1-*O*-metil-*myo*-inositol]-3-hidroxibenzóico (**13**).^{21c, 25e, 27}

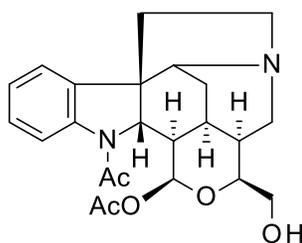
Para los compuestos **4** y **13** se reporta actividad citotóxica y selectividad hacia carcinoma de mamas y de páncreas. El alcaloide **1d** muestra actividad citotóxica ante carcinoma de próstata, cérvix, mamas y páncreas, siendo menos efectivo con las células de control (fibroblastos normales).²⁷



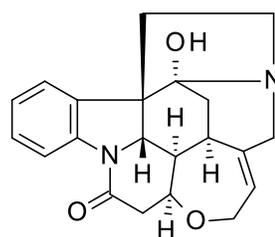
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1a	H	H	H	H
1b	Ac	H	H	H
1c	H	OH	H	H
1d	Ac	OH	H	H
1e	Ac	OMe	H	H
1f	Ac	OH	OMe	OH

	R ₁	R ₂	R ₃
2a	Ac	H	H
2b	H	H	OMe
2c	Ac	H	OMe
2d	Ac	OH	OMe

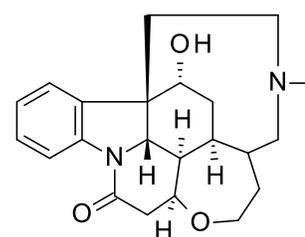
	R
3a	OH β
3b	OAc β



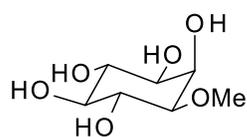
4



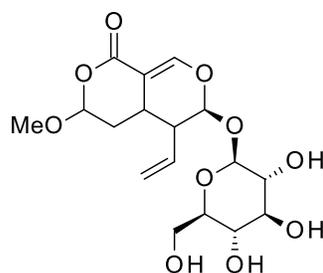
5



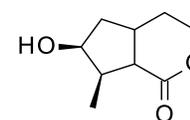
6



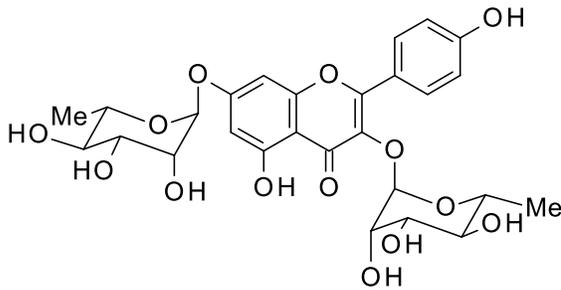
7



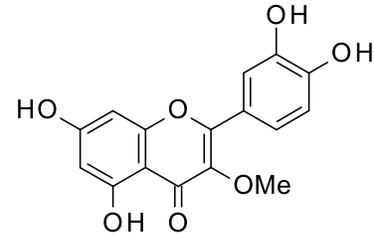
8



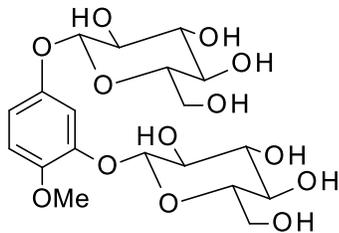
9



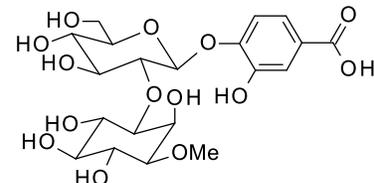
10



11



12



13

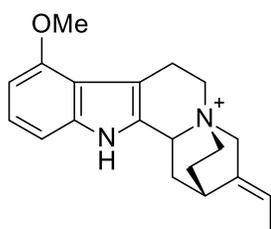
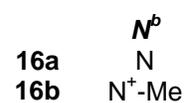
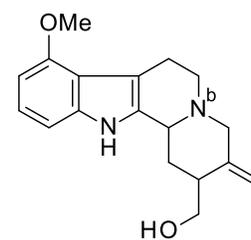
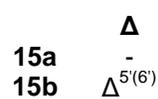
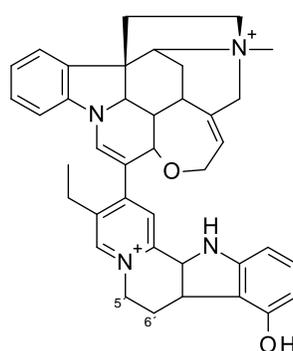
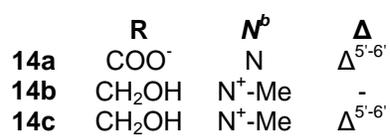
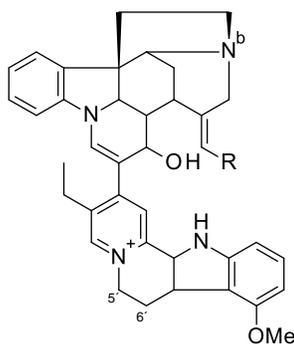
Strychnos guianensis (Aublet.) C. Martius.

Es un bejuco de tamaño moderado, con frutos anaranjados de semillas venenosas, se encuentra en la cuenca media y alta del Río Orinoco y en toda la cuenca del Amazonas. Es una de las especies más frecuentes de este género en América del Sur, es ampliamente utilizada en la preparación de curare desde Colombia hasta Surinam, abarcando Ecuador y Brasil; extractos crudos de la raíz y corteza de tallo de *S. guianensis* presentan actividad como relajante muscular.^{25f, 28, 29}

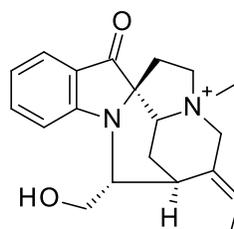
S. guianensis es conocida como curare de pescado, los indígenas Tiriyo, que habitan en Surinam y Brasil, la llaman würarimö y la utilizan para tratar anemia y debilidad general, puede ser ingerida como infusión de brotes jóvenes o de uso externo. Los metabolitos secundarios aislados de esta especie son alcaloides, sin embargo, aunque no han sido aislados, hay evidencia de la presencia de flavonoides en extractos de hojas y de saponinas en extractos de hojas y tallos.^{25c, 25f}

Los metabolitos aislados de la corteza del tallo de *S. guianensis* son los alcaloides indólicos guianensina (**14a**), guiacrisina (**14b**), 5',6'-dehidroguiacrisina (**14c**), guiaflavina (**15a**); 5',6'-dehidroguiaflavina (**15b**), 9-metoxigeissoschizol (**16a**), 9-metoxi-*N*^b-metilgeissoschizol (**16b**). Adicionalmente, se reporta la presencia de C-alcaloide O (**17**), fluorocurina (**18**), C-profluorocurina (**19**), mavacurina B (**20**), macusina B (**21**), harmano (**22**) y C-curarina I (**23**), también reportado como C-alcaloide K.^{26b, 28, 29, 30, 31, 32, 33}

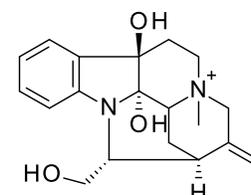
Ensayos comparativos entre el extracto crudo de curare *calabash* venezolano, el extracto crudo de *S. guianensis* y los compuestos aislados sobre hemidiafragma aislado de ratón, muestran actividad como inhibidores competitivos de los receptores de acetilcolina. Así, se observó que la disminución inducida en la transmisión neuromuscular depende de la dosis administrada; sin embargo, hubo marcadas diferencias en las respuestas respectivas a los alcaloides diméricos sobre los alcaloides monoméricos, resultando que los alcaloides diméricos presentaron mayor actividad que los monoméricos, obteniéndose que, en orden decreciente, el extracto crudo de curare *calabash*, guiacrisina (**14b**), 5',6'-dehidroguiacrisina (**14c**), extracto crudo de *S. guianensis*, guiaflavina (**15a**) y 5',6'-dehidroguiaflavina (**15b**) demuestran mayor potencia que 9-metoxi-*N*^b-metilgeissoschizol (**16b**) y C-alcaloide O (**17**).³³



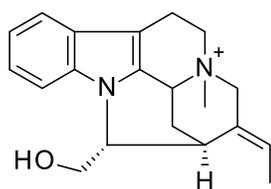
17



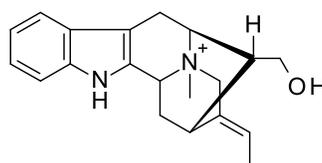
18



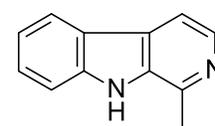
19



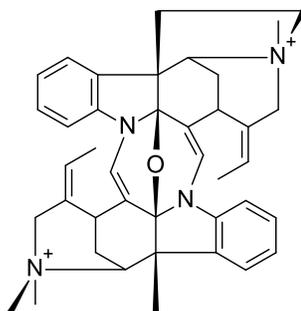
20



21



22



23

Strychnos pseudo-quina A. St. Hil.

Es un árbol común, alcanza de 3-6 m de altura, corteza gruesa, hoja ovalada, fruto redondeado, sin pelo y color amarillo. Está presente particularmente en la zona Central de Brasil y las adyacencias de Paraguay. Es conocida como quina de campo, quina de sabana, quina falsa, quina blanca, quina cruzeiro, quina dachapada, quina de mandá, quina de borde grueso, quina de periquito, quino de velozo y quina-quina.^{25g, 34, 35}

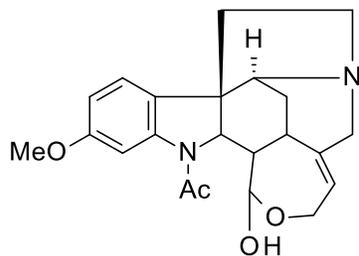
Los usos medicinales en Brasil incluyen un remedio común preparado con el tallo de la planta que se empleaba exitosamente como tónico, restaurador y febrífugo, una preparación medicinal llamada agua inglesa útil contra enfermedades del hígado, bazo, algunos males estomacales y fiebres palúdicas, y además, la cáscara gruesa del fruto preparada como un té es considerada infalible para curar la malaria.^{25g}

Los metabolitos secundarios aislados de *S. pseudoquina* son variados, entre los alcaloides se encuentra nordihidrotoxiferina, aislado a partir de la corteza de las ramas, corteza interna del tallo y corteza de la raíz; de las hojas se aisló diabolina (**3a**),

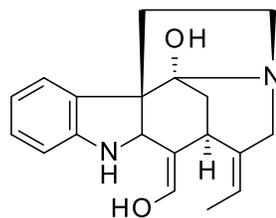
11-metoxidiabolina (**24**), el 3-hidroxi-enolato de nordihidrofluorocurarina (**25**), bisnordihidrotoxiferina (**26**) y, de la corteza, el 11-metoxi-aldehído Wieland-Gumlich (**27**). De las hojas se han aislado los flavonoides éter de 3-O-metil-quercetina (**11**), isoramnetina (**28**), estricnobiflavona (**29**), rutina (**30a**), kaempferol 3-O- β -rutinosido (**30b**) y, además, se aisló β -sitosterol (**31**).^{35a, 36, 37, 38, 39}

La quina de sabana presenta una amplia actividad biológica, probablemente asociada a la presencia de alcaloides. Muchos de los alcaloides reportados en *Strychnos* han presentado potencial farmacológico, exhibiendo actividad antimicrobiana, antiplasmódica y antitumoral. El extracto acuoso del tallo presenta actividad hipoglucémica, pero no cicatrizante en ratas diabéticas; el extracto metanólico y el extracto metanólico enriquecido en alcaloides presentan actividad en la mucosa gástrica contra agentes perjudiciales como anti-inflamatorios no esteroideos sin reportar efectos tóxicos o mortalidad durante 14 días; el extracto metanólico alcaloidal de las hojas presenta actividad importante citoprotectora y en la regeneración de la mucosa por proliferación celular en lesiones gástricas, lo que se traduce en actividad anti-úlceras, además del efecto antibacterial sobre *Helicobacter pylori*, y finalmente, antioxidante.^{34, 35b, 38, 40}

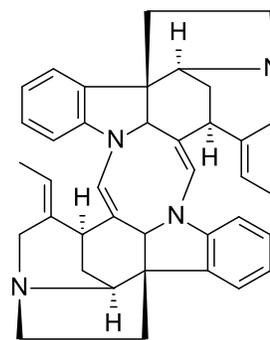
La actividad leishmanicida en los extractos de la planta es atribuida a diversos tipos de metabolitos como alcaloides isoquinolínicos e indólicos, quinonas, terpenos, esteroides, carbohidratos, lignanos, proteínas y flavonoides. Los extractos de acetato de etilo de la corteza del tallo de *S. pseudoquina* ricos en los flavonoides estricnobiflavona y éter 3-O-metil-quercetina (**11**), presentan un efecto importante como antileishmaniásico sobre *L. amazonensis*, sin toxicidad o actividad hemolítica significativa.^{39, 40}



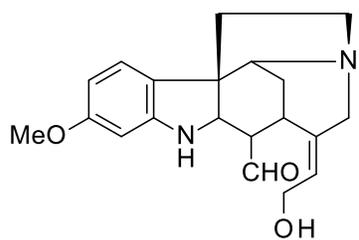
24



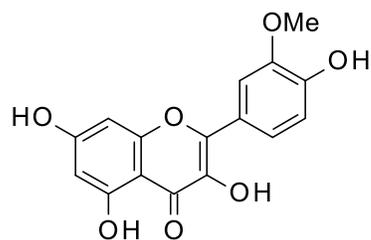
25



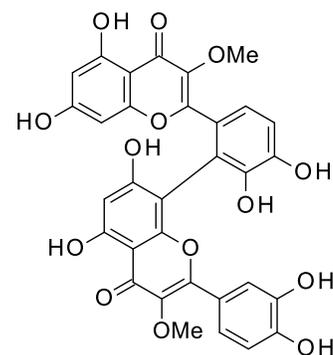
26



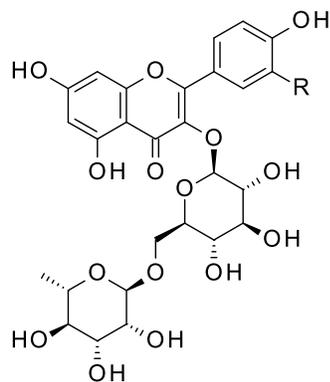
27



28

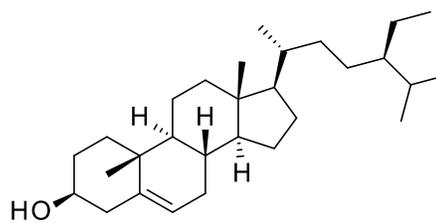


29



30a
30b

R
OH
H



31

El género *Strychnos* en América

Los conocimientos etnobotánicos de algunas especies del género permiten el uso de éstas en recetas medicinales, mediante brebajes y otras preparaciones, haciendo posible el tratamiento de diversas enfermedades. Los usos tradicionales reportados de las especies autóctonas de América son:

- *S. brasiliensis*: la raíz de *Sallta-martinho* o *Quassia-mineira* se usa como tónico, febrífugo y para tratar males estomacales.^{25h}
- *S. erichsonii*: conocida como *Koni-koni-bitá* o *doberdoewa* entre los Saramaka de Surinam, se prepara un macerado que se emplea para enfermedades del estómago y venéreas, como afrodisíaco y también para el sangrado después del aborto. La corteza del tallo tiene actividad espasmódica.^{25d}
- *S. gardneri* : conocida como *quina-de-cipó* (bejuco de quina o bejuco de guan), es tóxica pero en Brasil se usa en dosis pequeñas como febrífugo.^{25f}
- *S. melinoniana*: la corteza de la raíz de *dobroedoewa* o *doberdoea*, se emplea como potente afrodisíaco.²⁵ⁱ
- *S. mitscherlichii*: en Colombia se conoce como *veneno caimán* y, en Guyana, se utiliza como afrodisíaco.²⁵ⁱ
- *S. panamensis*: en México se usa la semilla molida para matar perros y coyotes, en Honduras, se le conoce como *Guaco*, se emplea como remedio para los dolores,

debido a la actividad analgésica y antirreumática; en Panamá se le conoce como *fruta de murciélago* y en Venezuela como *naranjuelo*.²⁵ⁱ

- *S. rubiginosa*: en forma de brebajes llamados *capitao* se utiliza para una amplia variedad de enfermedades.^{25j}
- *S. tabascanana*: conocida como *cabalonga de Tabasco*, *mata-perros* o *veneno del Diablo*, en México se utiliza la semilla para matar perros y otros animales.^{25j}
- *S. toxifera*: la corteza de la planta es utilizada de dos formas diferentes, uso externo como remedio para úlceras en forma de llagas supurantes y, solo cuando es seguro de manipular, uso interno para el tratamiento de trastornos convulsivos y espasmódicos.^{25j}

Las especies del género *Strychnos* más estudiadas en América se resumen en la Tabla 1, especificándose la parte de la planta objeto de estudio y los metabolitos aislados de la misma. Adicionalmente, la actividad biológica reportada para estos metabolitos se presenta en la Tabla 2; en todos los casos se trata de compuestos alcaloidales.

Tabla 1. Metabolitos alcaloidales aislados de especies americanas del género *Strychnos*.

ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	METABOLITOS AISLADOS
<i>S. amazonica</i>	Corteza de raíz	Macusina B (21), 11-metoxidiabolina (24), nordihidrofluorocurarina (32a), bisnordihidrotoxiferina (26), mavacurina B (20) y C (33). ^{21d, 25k}
	Corteza de tallo	Macusina B (21), 11-metoxidiabolina (24), mavacurina B (20). ^{25k}

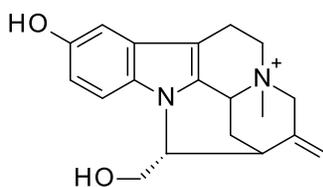
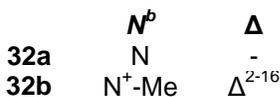
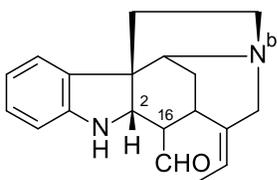
<i>S. atlantica</i>	Raíz, corteza de raíz	Bisnordihidrotoxiferina (26), normacusina B (34a), longicaudatina (35) ^{42, 43}
<i>S. brasiliensis</i>	Corteza de tallo	Espermoestricnina (1b), 12-hidroxi-11-metoxiespermoestricnina (36), estricnobrasilina (37a), 12-hidroxi-11-metoxiestricnobrasilina (37b), 10,11-dimetoxiestricnobrasilina (37c), estricnosilina (38a), estricnosilidina (38b), deacetilestribnosilidina (38c). ^{21e, 25k, 44}
<i>S. castelnaeana</i>	Corteza de raíz	Diabolina (3a). ^{25k}
	Corteza de tallo	Diabolina (3a), 3-hidroxi diabolina (39a), jobertina (39b), C-alcaloide D (40). ^{21e, 25k}
<i>S. diabolii</i>	Corteza	Estricnina (41a), diabolina (3a), deacetildiabolina (39c), fluorocurarina (32b), alcaloides F (42b), G (43a) y K (23). ^{26c}
<i>S. divaricans</i>	Tallo	Calebasinina (44), C-curarina I (23), mavacurina B (20) y C (33), fluorocurarina (32b). ^{25k}
<i>S. divaricans</i>	Raíz	Dihidrotoxiferina (45a), warifiteina (46), C-curarina I (23), C-toxiferina II o calebasina (42c), bisnordihidrotoxiferina (26), divarina (47), divaricina (48), velosimina (49). ^{45, 46, 47}
<i>S. erichsonii</i>	Corteza de raíz	Diabolina (3a). ^{25k}
	Corteza de tallo	Diabolina (3a), N-deacetildiabolina (39c), condensamina (50), heningsamina (3b), ericsonina (51), epiafinina (52a), O-acetilepiafinina (52b) y angustina (53). ^{25k, 48}
<i>S. froessii</i>	Tallo	Toxiferina I (45b), C-curarina I (23), mavacurina B (20) y C (33). ^{25e, 30}
	Corteza de raíz	Toxiferina I (45b), mavacurina B (20) y C (33), C-curarina I (23), diabolina (3a), nordihidrofluorocurarina (32a), dihidrotoxiferina (45a), N-deacetildiabolina (39c), C-alcaloide E (43b). ^{25e, 26, 30}
<i>S. gardneri</i>	Corteza de raíz	Acagerina (54), C-curarina I (23), C-alcaloide H (45c), 11-metoxidiabolina (24). ^{25e, 30}
<i>S. hirsuta</i>	Cortezas de tallo de raíz.	Estricnohirsutina (54a), tetrahydroestricnohirsutina (54b). ^{26c, 30, 49}
<i>S. macrophylla</i>	Tallo	Fluorocurarina (18), mavacurina B (20) y C (33). ^{25e, 30}
<i>S. mattogrossensis</i>	Raíz y ramas	Matogrosina (56), estricnobrasilina (37a), 12-hidroxi-11-metoxiestricnobrasilina (37b). ^{25e, 50}
	Corteza de tallo	Estricnobrasilina (37a), 11-metoxiestricnobrasilina (37d), 12-hidroxi-11-metoxiestricnobrasilina (37b), 10,11-dimetoxiestricnobrasilina (37c), 12-hidroxi-10,11-dimetoxiestricnobrasilina (37e). ^{25e, 51}

<i>S. melinoniana</i>	Tallo	Melinonina A (57), B (58), E (59), F (60) y G (61), fluorocurina (18), angustina (53), mavacurina B (20) y C (33). ^{25l, 30}
	Corteza	Melinonina E (59). ⁵²
<i>S. mitscherlichii</i>	Corteza interna y de raíz	Fluorocurarina (32b), C-toxiferina II o calebasina (42c), bisnordihidrotoxiferina (26). ^{25l, 30}
<i>S. mitscherlichii v. amapensis</i>	Corteza	Fluorocurina (18), Mavacurina C (33), C-curarina I (23), C-alcaloide D (40), C-alcaloide F (42b), calebasina (42c). ^{25l, 30}
<i>S. panamensis</i>	Semillas maduras	Estricnina (41a), brucina (41b). ^{25l, 30}
	Corteza de tallo	Fluorocurarina (32b), Dihidrotoxiferina (45a), Diabolina (3a), C-alcaloide F (42b), C-alcaloide G (43a). ^{25l, 30}
<i>S. rubiginosa</i>	Corteza de raíz y tallo	Estricnorubigina (62), 11-metoxidiabolina (24), normacusina B (34a). ^{25m, 54}
<i>S. solimoesana</i>	Corteza de raíz.	Diabolina (3a), C-calebasina (42c), C-curarina I (23). ^{25m, 30}
	Corteza de tallo	Fluorocurina (18), Fluorocurarina (32b), C-calebasina (42c), C-curarina I (23), C-alcaloide C (63), C-alcaloide G (43a), ^{25m}
	-	C-alcaloide A (42a), D (40), E (43b), F (42b), C-toxiferina II (42c). ³⁰
<i>S. tabascana</i>	Corteza de raíz	Estricnobrasilina (37a), 11-metoxi-estricnobrasilina (37d), estricnosilidina (38b), tabascanina (38d), N-acetil-O-metil-estricnosplendina (1e). ^{25m, 30}
<i>S. toxifera</i>	Corteza	C-Toxiferina I (45b), II (42c) y IX (64a), hemitoxiferina I (39d), bisnordihidrotoxiferina (26), dihidrotoxiferina (45a), mavacurina B (20) y C (33), macusina A (34b), B (21) y C (34c), normacusina B (34a), caracurina (65), caracurina VIII o N-deacetildiabolina (39c), curacurina II (64b), fluorocurina (18), heningsamina (3b), C-alcaloide A (42a). ^{25m, 30}
<i>S. trinervis</i>	Corteza de raíz	Normacusina B (34a), fluorocurarina (32b), bisnordihidrotoxiferina (26), C-alcaloide H (45c), longicaudatina (35), trinervina (66), cantleina (67), C-curarina I (23), C-toxiferina II (42c). ^{25m, 30, 55, 56, 57, 58, 59}

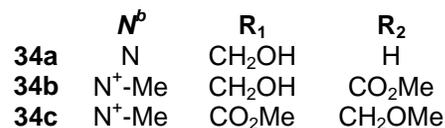
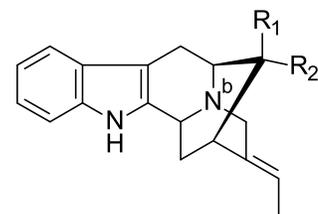
Tabla 2. Actividad biológica reportada para los metabolitos secundarios alcaloidales aislados de especies americanas del género *Strychnos* y (*) las especies utilizadas en preparaciones tradicionales.

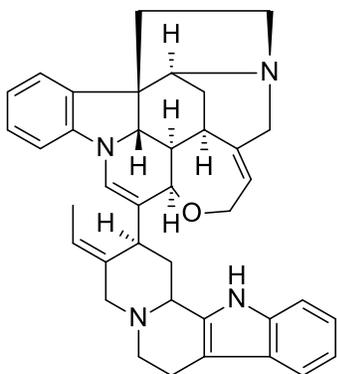
ACTIVIDAD	METABOLITO	ESPECIE
Analéptica 21f, 25m, 30	Macusina B	<i>S. amazonica</i> , <i>S. brasiliensis</i> *, <i>S. guianensis</i> *, <i>S. pseudoquina</i> *, <i>S. rubiginosa</i> *, <i>S. trinervis</i> *
Analgésica 21f, 30	Macusina B, estricnina y brucina	<i>S. amazonica</i> , <i>S. panamensis</i> *
Anestésico 21f, 25m	Normacusina B	<i>S. atlantica</i>
Antidepresivo 25m	Harmano	<i>S. guianensis</i>
Antidiarreica 21f, 25m, 59	Bisnordihidrotoxiferina y Nordihidrotoxiferina	<i>S. amazonica</i>
Antimalárica 25m, 26d, 30	Estricnobrasilina	<i>S. mattogrossensis</i> , <i>S. brasiliensis</i> *, <i>S. fendleri</i> *, <i>S. pseudoquina</i> *, <i>S. trinervis</i> *
Antimicobacteriana 58	Bisnordihidrotoxiferina	<i>S. trinervis</i>
Antimicótica 21f, 30	Matogrosina y melinonina F	<i>S. mattogrossensis</i> , <i>S. melinoniana</i>
Antimicrobiana 21f, 25m, 30, 58	Bisnordihidrotoxiferina, curacurina II, nordihidrotoxiferina y caracurina	<i>S. amazonica</i> , <i>S. toxifera</i>
Antipirética 25m, 26d, 30	Estricnobrasilina	<i>S. mattogrossensis</i> , <i>S. brasiliensis</i> *, <i>S. fendleri</i> *, <i>S. pseudoquina</i> *, <i>S. trinervis</i> *
Cicatrizante 21f, 30	C-alcaloide D, A, E, F y G. Mavacurina B, mavacurina C, nordihidrofluorocurarina y C-toxiferina I	<i>S. mitscherlichii</i> , <i>S. panamensis</i> , <i>S. solimoesa</i>
Citotóxica 21f, 25m, 27, 53, 58	Acagerina, harmano, estricnosinol, N-acetilestricnosplendina, bisnordihidrotoxiferina	<i>S. fendleri</i> , <i>S. gardneri</i> , <i>S. mitscherlichii</i> , <i>S. trinervis</i>
Convulsivante 21f, 25m, 30	Acagerina, brucina, diabolina, estricnina, macusina B y normacusina B	<i>S. amazonica</i> , <i>S. atlantica</i> , <i>S. panamensis</i>

Depresora del SNC 25m, 30, 33	Bisnordihidrotoxiferina, nordihidrotoxiferina, guiacrisina, 5',6'-dehidroguiacrisina, guiaflavina y 5',6'-dehidroguiaflavina	<i>S. amazónica</i> , <i>S. atlántica</i> , <i>S. guianensis</i>
Espasmódica 21f, 30, 43, 46, 56, 57, 58	Bisnordihidrotoxiferina, cantleina, longicaudatina, trinervina y velosimina	<i>S. amazonica</i> , <i>S. atlantica</i> , <i>S. divaricans</i> , <i>S. toxifera</i> *, <i>S. trinervis</i>
Hipotensora 21f, 25m, 30, 43	Diabolina, longicaudatina, macusina B y normacusina B	<i>S. amazonica</i> , <i>S. atlantica</i>
Relajante muscular (*en dosis elevadas produce parálisis respiratoria) 21f, 25m, 30	Bisnordihidrotoxiferina, dihidrotoxiferina, C-toxiferina I, II y IX; C-alcaloide A, D, E, F, G y H, curacurina II, diabolina*, estricnina*, brucina*, nordihidrocurarina, fluorocurarina, fluorocurina, mavacurina B y C, N-acetilestricnosplendina, N-acetil-O-metil-estricnosplendina y nordihidrotoxiferina.	<i>S. amazonica</i> , <i>S. castelnaeana</i> , <i>S. panamensis</i>
Sedativa 21f, 25m, 26	Bisnordihidrotoxiferina, Nordihidrotoxiferina y normacusina B	<i>S. amazonica</i> , <i>S. atlantica</i>
Tranquilizante 21f	Longicaudatina	<i>S. atlantica</i>
Tóxica 25m	Brucina, estricnina y diabolina	<i>S. castelnaeana</i> , <i>S. diaboli</i> , <i>S. panamensis</i> , <i>S. tabascana</i>
Vasodilatadora 25m	Macusina B	<i>S. amazónica</i>

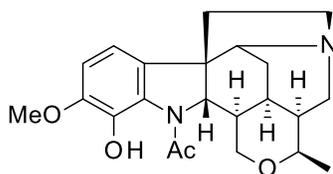


33

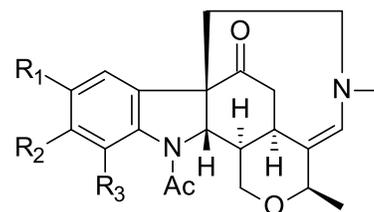




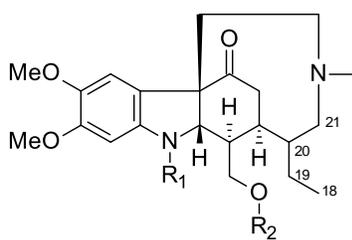
35



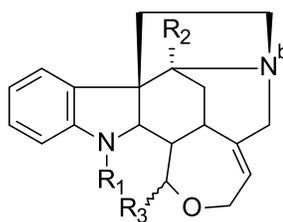
36



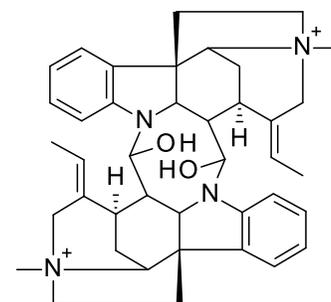
	R ₁	R ₂	R ₃
37a	H	H	H
37b	H	OMe	OH
37c	OMe	OMe	H
37d	H	OMe	H
37e	OMe	OMe	OH



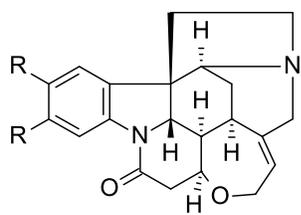
	R ₁	R ₂	Δ
38a	Ac	Ac	Δ ¹⁸⁻¹⁹ Δ ²⁰⁻²¹
38b	Ac	Ac	Δ ¹⁹⁻²⁰
38c	H	H	Δ ¹⁸⁻¹⁹ Δ ²⁰⁻²¹
38d	Ac	H	Δ ¹⁹⁻²⁰



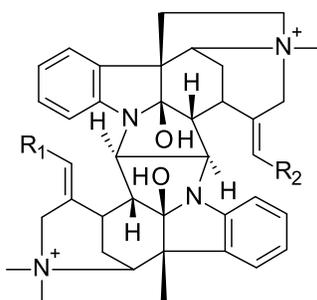
	N ^p	R ₁	R ₂	R ₃
39a	N	Ac	OH	OH ^β
39b	N	Ac	H	OAc ^α
39c	N	H	H	OH ^β
39d	N ⁺ -Me	H	H	OH ^β



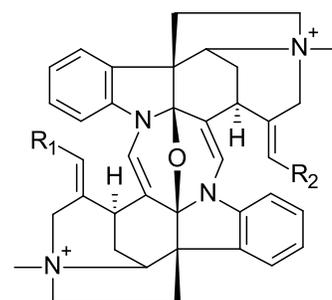
40



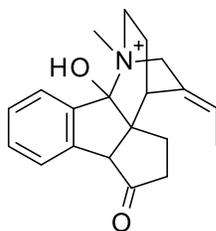
41a R
H
41b OMe



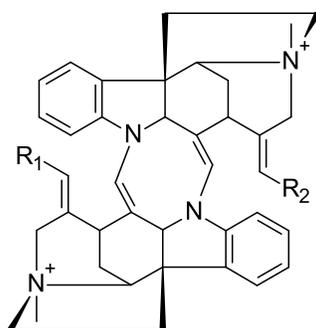
42a R₁ R₂
CH₂OH CH₂OH
42b Me CH₂OH
42c Me Me



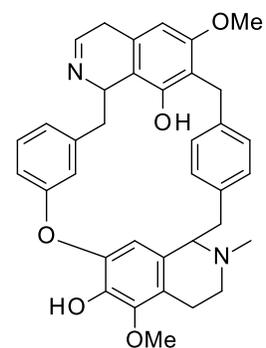
43a R₁ R₂
Me CH₂OH
43b CH₂OH CH₂OH



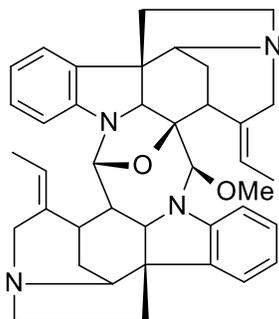
44



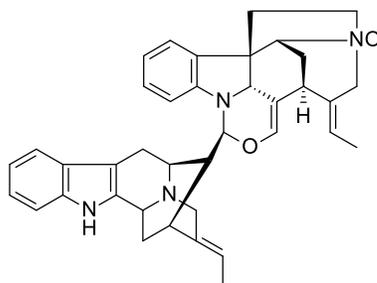
45a R₁ R₂
Me Me
45b CH₂OH CH₂OH
45c CH₂OH H



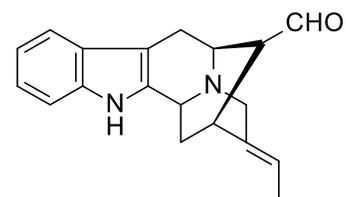
46



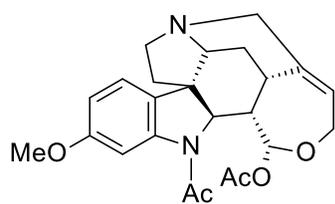
47



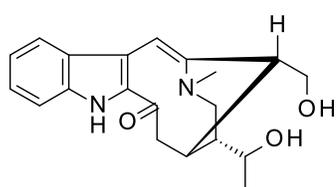
48



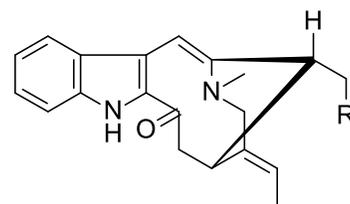
49



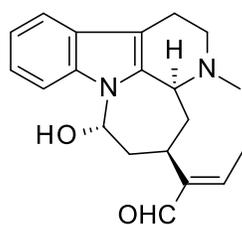
50



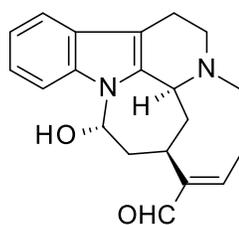
51



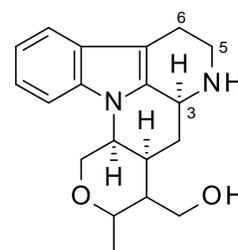
52a R
OH
52b OAc



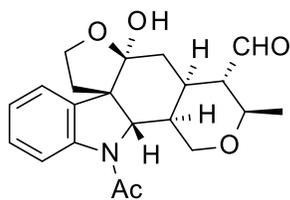
53



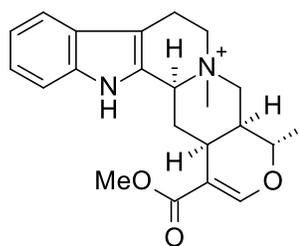
54



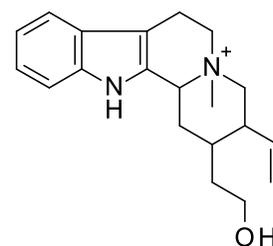
55a Δ
55b $\Delta^{3-4, 5-6}$



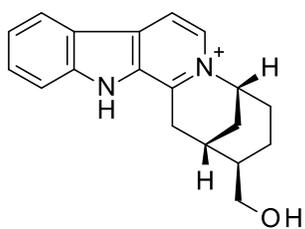
56



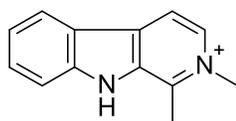
57



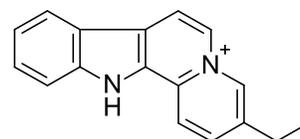
58



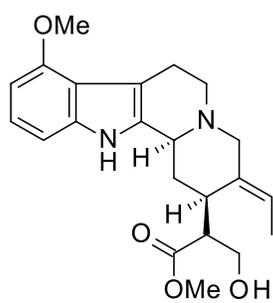
59



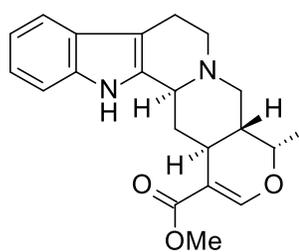
60



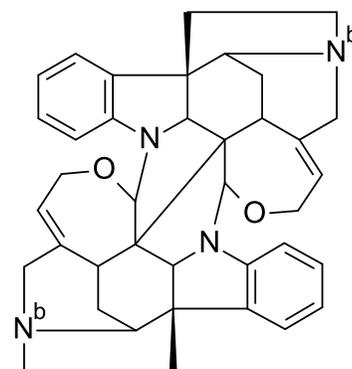
61



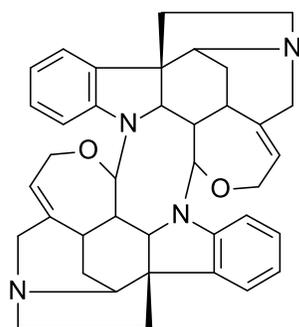
62



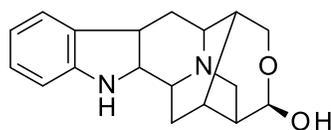
63



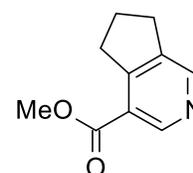
64a N^b
N⁺-Me
64b N



65



66



67

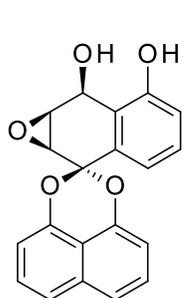
Metabolitos no-alcaloidales del género *Strychnos*

Las especies pertenecientes al género *Strychnos* son particularmente ricas en alcaloides. Sin embargo, en la Tabla 3 se resumen los metabolitos de tipo no-alcaloidal reportados para especies foráneas.

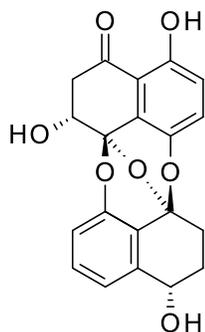
Tabla 3. Metabolitos no-alcaloidales aislados de especies del género *Strychnos*.

ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	COMPUESTOS AISLADOS	ORIGEN	
COMPUESTOS FENÓLICOS	<i>S. angustiflora</i>	Semilla	Los espirobisnaftalenos palmarumicina SA1 (68), SA2, SA3, C11 (69) y BG3, preusomerina SA1 (70), BG1 y C (71), compuesto ymf 1029D y las lactonas lasiodiplodina, (+)-(7 <i>R</i>)-7-hodroxilasiodiplodina (72a), (-)-(7 <i>S</i>)-7-hodroxilasiodiplodina (72b). ⁶⁰	China
	<i>S. axillaris</i>	Corteza y madera	Escorzonosido, (+)-siringaresinol O-β-D-glucosido, (7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-balanofonina 4-O-β-D-glucopiranosido, liriodendrina, calerianina, cafeoilcalerianina, vanillosesido, tachiosido, isotachiosido, alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxibencilico 4-O-β-D-glucopiranosido, ácidos 3,4-di-O-cafeoilquinico y 3,5-di-O-cafeoilquinico, (-)-pinoresinol 4-O-β-D-glucopiranosido, (+)-lariciresinol 4-O-β-D-glucosido, 3,4,5-trimetoxifenol 1-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosido, 6'-O-β-D-apiofuranosilcalerianina (73), 5''-O- <i>trans</i> -feruloil-6'-O-β-D-apiofuranosilcalerianina, 5''-O- <i>trans</i> -feruloil-6'-O-β-D-apiofuranosilvanillosesido, 7-O- <i>trans</i> -cafeoilvanillosesido (74), 4''-O-β-D-glucopiranosilcafeoilcalerianina. ⁶¹	Tailandia
	<i>S. nuxvomica</i>	Semilla	Salidrosido AKC35 (75a) y cuchilosido AKC38 (75b). ⁶²	Tailandia
	<i>S. spinosa</i>	Ramas	Los flavonoides kaempferol 3-O-β-D-galactosido o trifolina (76a), kaempferol 3-O-glucosido o astragalina (76b), geraldol (77), quercetina 3-O-galactosido o hiperina (78) y los compuestos suerosido, alcohol bencil O-α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosido y 2,4,6-trimetoxifenol 1-O-β-D-glucopiranosido. ⁶³	Japón
	<i>S. vanprukii</i>	Tallo	Los lignanos vanprukosido, estricnosido, (+)-lioniresinol-3α-O-β-D-glucopiranosido. ⁶⁴	Tailandia

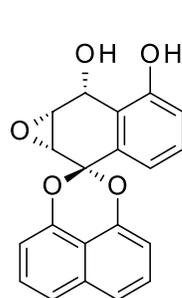
ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	COMPUESTOS AISLADOS	ORIGEN			
COMPUUESTOS FENÓLICOS	<i>S. variabilis</i>	Hojas	Quercetina 3-O-galactosido (78), quercetina 3-O-robinobiosido (79a), kaempferol 3-O-robinobiosido (79b). ⁶⁵ Variabilosido A o quercetina 3-(4''- <i>trans-p</i> -cumaroil)robinobiosido-7-glucosido, Variabilosido B o quercetina 3-(4''- <i>cis-p</i> -cumaroil)robinobiosido-7-glucosido (79c), Variabilosido C o kaempferol 3-(4''- <i>trans-p</i> -cumaroil)robinobiosido-7-glucosido, Variabilosido D o kaempferol 3-(4''- <i>cis-p</i> -cumaroil)robinobiosido-7-glucosido (79d). ⁶⁶ Variabilosido E o quercetina 3-(4''- <i>trans-p</i> -cumaroil)robinobiosido, Variabilosido F o quercetina 3-(4''- <i>cis-p</i> -cumaroil)robinobiosido (79e), Variabilosido G o kaempferol 3-(4''- <i>trans-p</i> -cumaroil)robinobiosido, Variabilosido H o kaempferol 3-(4''- <i>cis-p</i> -cumaroil)robinobiosido (79f), quercetina 3-robinobiosido-7-glucosido (79g), kaempferol 3-robinobiosido-7-glucosido (79h). ⁶⁷	China		
			<i>S. axillaris</i>	Corteza y madera	Axilarosido (80), cantleiosido, ácido logánico(81a), loganina, piconiosido I, swerosido. ⁶¹	Tailandia
			<i>S. nux vomica</i>	Semilla	Ácido 6'-O-acetil-logánico (81b), ácido 4'-O-acetil-logánico, ácido 3'-O-acetil-logánico, ácido 7-O-acetil-logánico, ácido logánico (81a), loganina. ^{26d, 68}	Tailandia
			<i>S. potatorum</i>	Semilla	Amirina, lupeol (82), sitosterol (31), estigmasterol. ⁶⁹	India, Sri Lanka, Burma
				Hojas y corteza	Ismotiol (83), sitosterol (31), estigmasterol, campesterol, loganina, ácidos araquidónico, linocerico, linoleico, oleico, palmítico y esteárico. ^{69, 70}	
				Fruto	Estrispinolactona, liriioresinol B. ⁷¹	
			<i>S. spinosa</i>	Ramas	Los iridoides estripinosido (84), estricosido A y B, (<i>E</i>)-aldosecologanina, loganina, secologanina, secoxiloganina, swerósido, secologanosido, éster 7-metil-secologanosido, éster dimetilsecologanosido, ácido secologánico, cantleiosido, vogelosido, <i>epi</i> -vogelosido y triplosido A. ⁶³	Japón
				Corteza	El terpeno 7-β-hidroxiprimara-8,15-dien-14-ona (85). ⁷²	
			<i>S. vanprukii</i>	Hojas	Ácido 3β-O- <i>trans</i> -feruloilbetulínico (86), ácido 3β-O- <i>cis</i> -feruloilbetulinico, ácido 3β-O- <i>cis</i> -cumaroilbetulinico, ácido 3β-O- <i>trans</i> -cumaroilbetulinico, ácido ursólico (87). ⁷³	India, Borneo, Tailandia



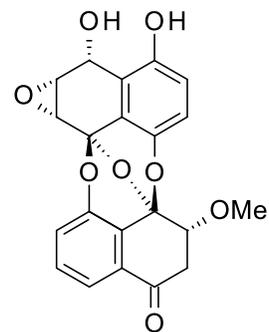
68



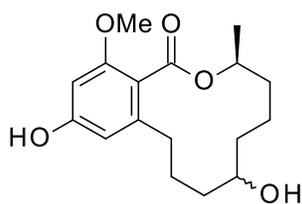
69



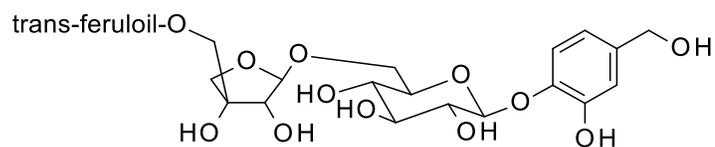
70



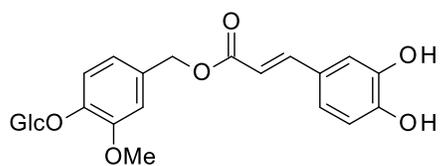
71



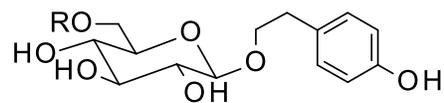
72a 7R
72b 7S



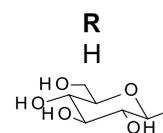
73



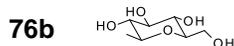
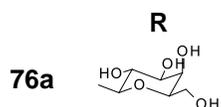
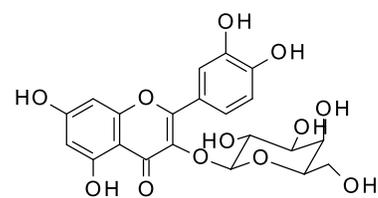
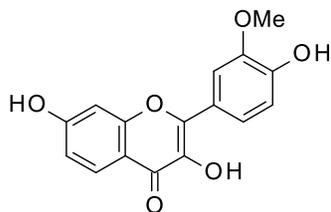
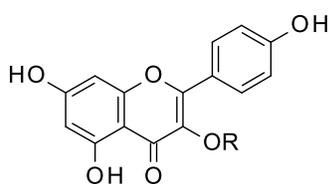
74



75a

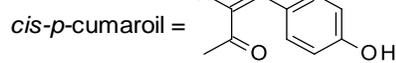
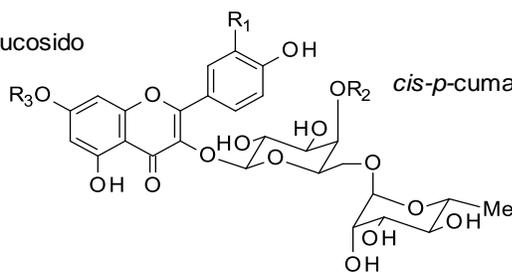
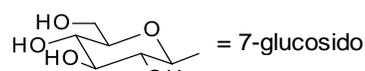


75b

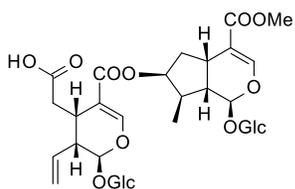


77

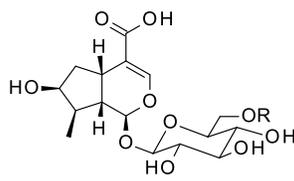
78



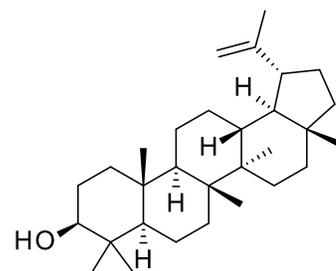
	R₁	R₂	R₃
79a	OH	H	H
79b	H	H	H
79c	OH	<i>cis-p-cumaroil</i>	7-Glu
79d	H	<i>cis-p-cumaroil</i>	7-Glu
79e	OH	<i>cis-p-cumaroil</i>	H
79f	H	<i>cis-p-cumaroil</i>	H
79g	OH	H	7-Glu
79h	H	H	7-Glu



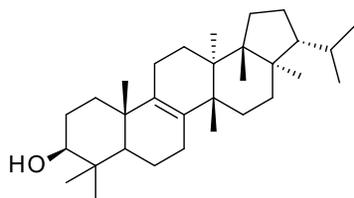
80



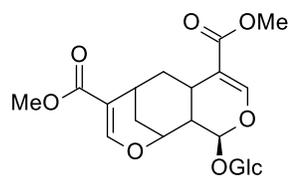
81a **R**
81b Ac



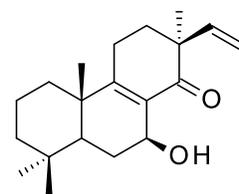
82



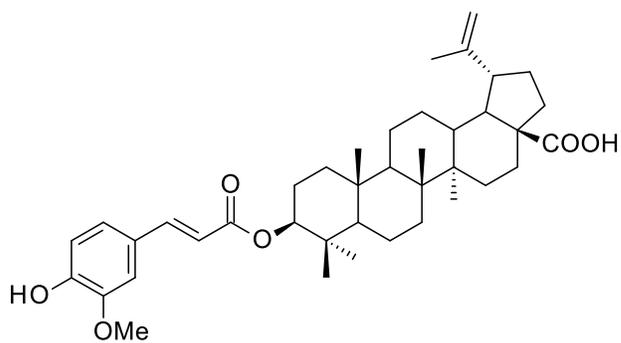
83



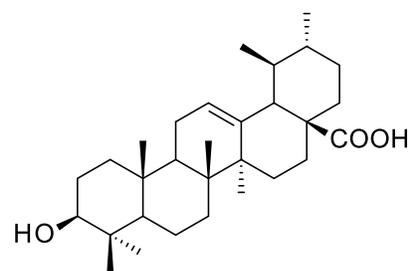
84



85



86

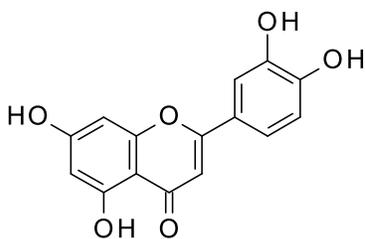


87

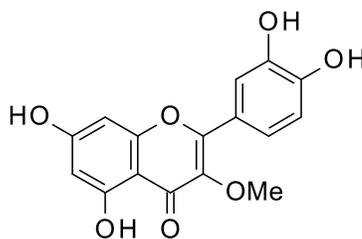
Strychnos bredemeyeri (Schult.) Spragüe & Sandwith.

La especie *Strychnos bredemeyeri*, es conocida como cumudua o cumarua por los indígenas Maquiritare de Brasil y Venezuela, descrita como una trepadora con zarcillos de dimensiones modestas, flores blancas con matices lila y pedúnculos morados, a partir de tirso axilares alargados, hojas elípticas u ovadas a lanceoladas con 5 plenerados y frutos globosos con cascara brillante y lisa; los indígenas la utilizan en la preparación de curare para envenenar la punta de las flechas. Es autóctona de América del Sur y Centroamérica, más específicamente en Brasil (Roraima), Venezuela (Amazonas, Apure, Bolívar, Delta Amacuro, Distrito Federal, Falcón, Lara, Miranda, Sucre, Zulia), Guyana, Perú, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Colombia (Arauca, Guainía, Vichada), Trinidad, Guayana Francesa, Surinam y Nicaragua.^{15, 24}

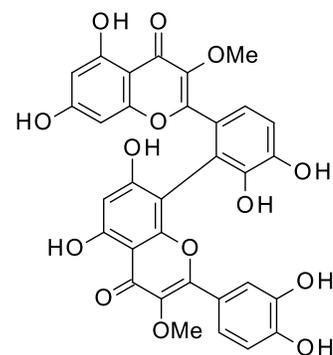
El único estudio fitoquímico reportado en la literatura de la especie se halla bajo el sinónimo *Strychnos aff. darienensis* Seem., llamada comúnmente devildoer (malhechor). De la corteza del tallo la planta, colectada en Perú, se aisló luteolina (**88**), estricnobiflavona (**29**), venoterpina y 3-O-metil-quercetina (**11**), reportada por primera vez en la especie.^{17, 74}



88



11



29

JUSTIFICACIÓN

Strychnos bredemeyeri es una especie endémica de América del Sur, distribuida en varios estados venezolanos, de la cual existe un único antecedente fitoquímico reportado en la literatura. Sin embargo, se conoce un extenso registro etnobotánico del género *Strychnos* y su aplicación en la medicina tradicional de diversas culturas en el mundo. De esta manera, con el fin de aislar, purificar y caracterizar nuevos metabolitos secundarios para la especie *S. bredemeyeri*, y así contribuir con el conocimiento de la química del género *Strychnos*, se ha propuesto llevar a cabo el estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas y ramas de esta especie.

Basados en los antecedentes del género *Strychnos*, es probable que los metabolitos secundarios más abundantes sean de origen alcaloidal. Así mismo, los reportes de compuestos fenólicos en este género dirigen el estudio fitoquímico de la especie *S. bredemeyeri* hacia la búsqueda de metabolitos secundarios de tipo flavonoidal, considerando que este tipo de compuestos es conocido por presentar una amplia gama de actividades biológicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie *Strychnos bredemeyeri*.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto metanólico de las hojas y ramas de la especie *Strychnos bredemeyeri* mediante la técnica de maceración.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de las hojas y ramas de la especie *Strychnos bredemeyeri*.
- Caracterizar los compuestos aislados de la especie *Strychnos bredemeyeri* mediante sus propiedades físicas y técnicas espectroscópicas de UV-Vis, RMN¹H y RMN¹³C.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Materiales

Inventario del material cromatográfico

- Cromatografía de capa fina.
Placas analíticas de sílica gel 60; de 0,25mm de espesor con indicador de fluorescencia UV-254nm soportada en aluminio marca Merck.
- Sistemas de desarrollo para cromatografía en capa fina.
 - × AN-2: AcOEt-MeOH-H₂O (100:13,5:10; v/v).
 - × AN-6: Hex-AcOEt-HCOOH (75:25:1; v/v).
- Agentes reveladores.
 - × AN: Anisaldehído-Ácido sulfúrico.
 - × Dragendorff/Nitrito de Sodio o Ácido Sulfúrico.
 - × Komarowsky (KOM).
 - × Naturstoff; Natural product/Polietilenglicol (NP/PEG).
Utilizados según el procedimiento reportado en la literatura.⁷⁵
- Cromatografía en columna.
Sílica gel 60 (0,04-0,06mm, 230-400 mesh ASTM, Scharlau o *Riedel-de Haen* AG).
Sephadex LH-20 (25-100µm. CAS, 9041-37-6, Sigma-Aldrich).

Inventario de solventes

- Acetato de etilo (AcOEt). Grado técnico, destilado.
- Diclorometano (CH₂Cl₂). Grado técnico, destilado.
- Metanol (MeOH). Grado técnico, destilado.
- *n*-Hexano (Hex). Grado técnico, destilado.
- Cloroformo (CHCl₃). Grado técnico, destilado.
- Ácido acético (CH₃COOH) p.a.
- Ácido fórmico (HCOOH) p.a.

Inventario de equipos utilizados

- Lámpara UV MINERALIGHT® LAMP, modelo UVSL-58 ($\lambda=254\text{nm}$, 365nm).
- Rota evaporador BÜCHI, modelo R-111 con baño de agua BÜCHI 461.
- Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200.
- Espectrofotómetro de UV-Visible Thermo Electron Corporation, modelo Nicolet evolution 300 de doble haz.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 400MHz.

Descripción del material vegetal

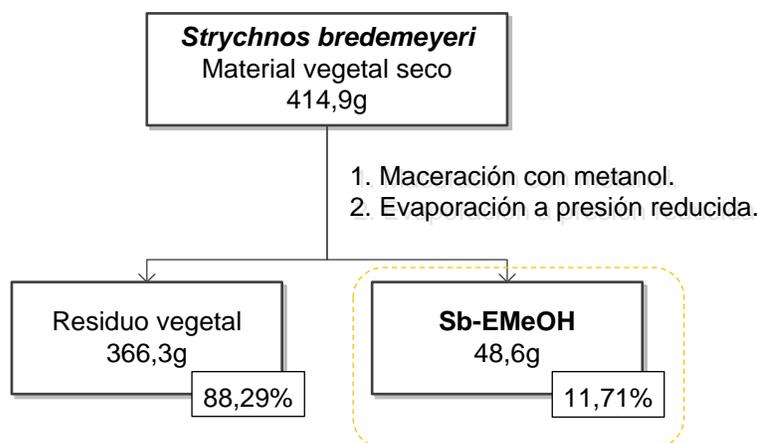
El procedimiento experimental utilizado en el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith, inició con el tratamiento del material vegetal de *Strychnos bredemeyeri* colectado por el Dr. Anibal Castillo en el Río Sipapo entre Isla Lencho y comunidad Piaroa “Monte Negro” en el Municipio Autana, Estado Amazonas (4°54'-5°3'N; 67°34'-67°46'O). Una muestra se encuentra depositada en el Herbario Nacional de Venezuela, en el Jardín Botánico de Caracas Dr. Tobías Lasser en la Universidad Central de Venezuela bajo el código AC-4359, colectado el 27 de enero de 1997 financiada a través del Proyecto CONICIT S1-95-001697.



Figura 6. Hojas y frutos de *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Spragüe & Sandwith. Espécimen almacenado en el Jardín Botánico de Caracas, código AC-4359.

Tratamiento del material vegetal para la obtención de los metabolitos secundarios

El material vegetal que consistió en hojas y ramas de *S. bredemeyeri* se dejó secar a temperatura ambiente y luego fué molido obteniéndose (414,9±0,1)g que se sometieron a maceración con metanol durante tres semanas, el extracto obtenido se concentró y secó a presión reducida haciendo uso del rota evaporador BÜCHI R-111, resultando en (366,3±0,1)g de residuo vegetal (88,29%) y (48,6±0,1)g de crudo metanólico Sb-EMeOH que representa 11,71% de la masa del material vegetal seco (Esquema 2).

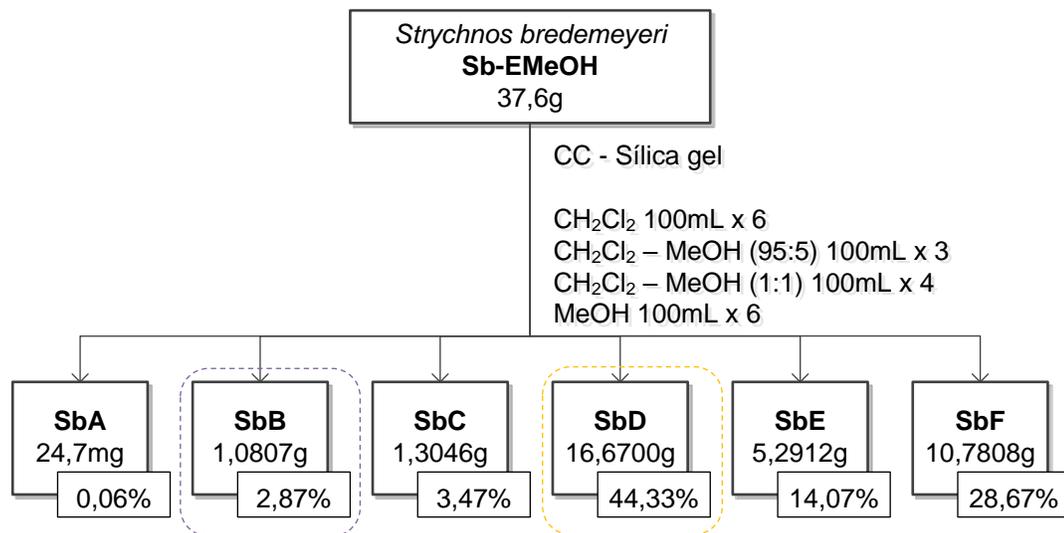


Esquema 2. Obtención del extracto metanólico de *S. bredemeyeri*.

Una porción de (37,6±0,1)g (9,06% respecto al material vegetal) del extracto metanólico crudo Sb-EMeOH se sometió a una Cromatografía Líquida al Vacío (CLV) con un lecho de (29,8±0,1)g de sílica gel como fase estacionaria y mezclas de solvente de polaridad creciente como fase móvil: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (95:5 y 1:1) y MeOH. Se obtuvieron 19 fracciones que fueron unidas según su perfil en cromatografía de capa fina (CCF) frente al reactivo de coloración Anisaldehído-Ácido sulfúrico (AS), resultando en 6 fracciones colectivas, obteniendo un porcentaje de recuperación de 93,47% (Esquema 3, Tabla 4).

Tabla 4. Fracciones obtenidas por CLV de Sb-EMeOH.

FRACCIÓN COLECTIVA	UNIONES	MASA ($\pm 0,0001\text{g}$)	% MASA Sb-EMeOH	SISTEMA DE SOLVENTE	V FASE MÓVIL ($\pm 1\text{mL}$)
SbA	CLV ₁	0,0247g	0,06%	CH ₂ Cl ₂	100mL
SbB	CLV ₂₋₆	1,0807g	2,87%	CH ₂ Cl ₂	500mL
SbC	CLV ₇₋₉	1,3046g	3,47%	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 95:5	300mL
SbD	CLV ₁₀₋₁₃	16,6700g	44,33%	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 1:1	400mL
SbE	CLV ₁₄	5,2912g	14,07%	MeOH	100mL
SbF	CLV ₁₅₋₁₉	10,7808g	28,67%	MeOH	500mL

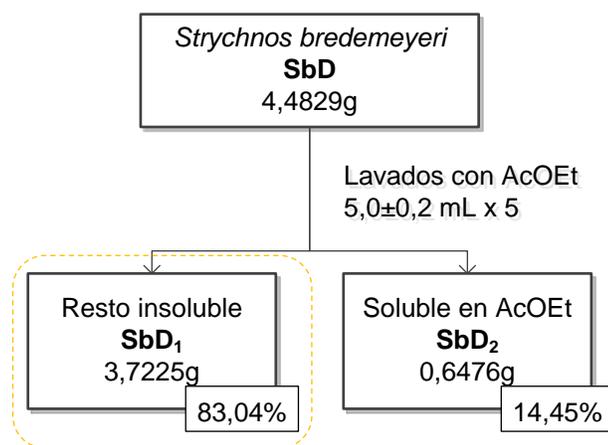


Esquema 3. Cromatografía líquida al vacío de Sb-EMeOH.

Las fracciones colectivas obtenidas de la CLV se sometieron a CCF desarrolladas con mezclas de solventes Hex-AcOEt-HCO₂H (75:25:1; v/v) (AN6) y AcOEt-MeOH-H₂O (100:13,5:10; v/v) (AN2). Al utilizar el agente de coloración Anisaldehído-Ácido sulfúrico (AS), se observó que las fracciones SbA, SbB y SbC estaban enriquecidas en

metabolitos secundarios de tipo terpenoidal, mientras SbD, SbE y SbF presentaban un mayor contenido de metabolitos secundarios de tipo flavonoidal. Además, la fracción SbD presenta el perfil cromatográfico en CCF más parecido al extracto metanólico Sb-EMeOH.⁷⁵

El procedimiento para el aislamiento de los metabolitos secundarios de tipo flavonoidal se llevó a cabo utilizando una porción de (4,4829±0,0001)g, correspondiente al 26,89% de la masa de SbD y 11,92% respecto a la masa de Sb-EMeOH. Esta porción se lavó cinco veces con volúmenes de (5,0±0,2)mL acetato de etilo (AcOEt), hasta que no se observó clorofila en el perfil cromatográfico en CCF, obteniéndose una fracción de (0,6476±0,0001)g soluble en AcOEt (SbD₂) y (3,7225±0,0001)g de resto insoluble (SbD₁) (Esquema 4).



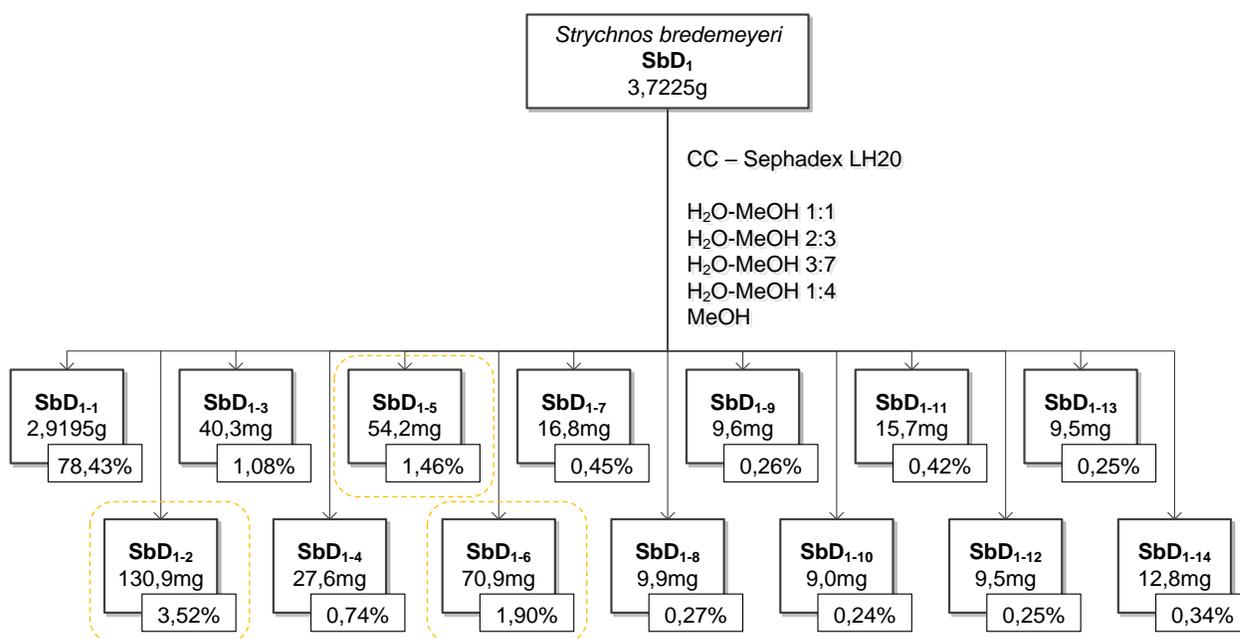
Esquema 4. Lavados de la fracción SbD con acetato de etilo.

La fracción SbD₁ se sometió a cromatografía de columna de exclusión molecular con (44,0573±0,0001)g de Sephadex LH-20 como fase estacionaria, eluida con mezclas

de solvente H₂O-MeOH (1:1, 2:3, 3:7 y 1:4) y MeOH como fase móvil, resultando en catorce fracciones colectivas desde SbD₁₋₁ hasta SbD₁₋₁₄, unidas según el perfil cromatográfico en CCF luego de revelarse con *Natural product* (NP), observándose que la fracción SbD₁₋₁ no presentó contenido flavonoidal a diferencia de las fracciones SbD₁₋₂ a SbD₁₋₁₄. La fracción SbD₁₋₁ se sembró en una placa de CCF y se roció con el reactivo de Komarowsky (KOM) mostrando ser rica en saponinas. Las fracciones fueron pesadas y se calculó un porcentaje de recuperación de 89,61% (Esquema 5, Tabla 5).⁷⁵

Tabla 5. Fracciones obtenidas por CC de exclusión molecular, Sephadex LH-20, de SbD₁.

FRACCIÓN COLECTIVA	UNIONES	MASA (±0,0001g)	% MASA SbD ₁	SISTEMA DE SOLVENTE	V _{FASE MÓVIL} (±1mL)
SbD ₁₋₁	CC ₁₋₂₆	2,9195g	78,43%	H ₂ O-MeOH 1:1	78mL
SbD ₁₋₂	CC ₃₄₋₄₂	0,1309g	3,52%	H ₂ O-MeOH 1:1 H ₂ O-MeOH 2:3	27mL
SbD ₁₋₃	CC ₄₃₋₄₆	0,0403g	1,08%	H ₂ O-MeOH 2:3	12mL
SbD ₁₋₄	CC ₅₀₋₅₅	0,0276g	0,74%	H ₂ O-MeOH 2:3	18mL
SbD ₁₋₅	CC ₅₆₋₆₉	0,0542g	1,46%	H ₂ O-MeOH 3:7	42mL
SbD ₁₋₆	CC ₇₄₋₈₆	0,0709g	1,90%	H ₂ O-MeOH 3:7 H ₂ O-MeOH 1:4	39mL
SbD ₁₋₇	CC ₉₆₋₁₀₂	0,0168g	0,45%	H ₂ O-MeOH 1:4	21mL
SbD ₁₋₈	CC ₁₀₄₋₁₀₆	0,0099g	0,27%	H ₂ O-MeOH 1:4	9mL
SbD ₁₋₉	CC ₁₀₈₋₁₁₂	0,0096g	0,26%	H ₂ O-MeOH 1:4 MeOH	15mL
SbD ₁₋₁₀	CC ₁₁₃₋₁₁₈	0,0090g	0,24%	MeOH	18mL
SbD ₁₋₁₁	CC ₁₂₀₋₁₂₅	0,0157g	0,42%	MeOH	18mL
SbD ₁₋₁₂	CC ₁₂₈₋₁₃₁	0,0095g	0,25%	MeOH	12mL
SbD ₁₋₁₃	CC ₁₃₄₋₁₄₂	0,0095g	0,25%	MeOH	27mL
SbD ₁₋₁₄	CC ₁₄₄₋₁₄₇	0,0128g	0,34%	MeOH	12mL



Esquema 5. Cromatografía de exclusión molecular de la fracción SbD₁.

Las fracciones colectivas SbD₁₋₂, SbD₁₋₅ y SbD₁₋₆ mostraron la presencia de un flavonoide mayoritario en cada fracción al realizar el perfil cromatográfico en AN2 y usando NP como agente revelador.⁷⁵

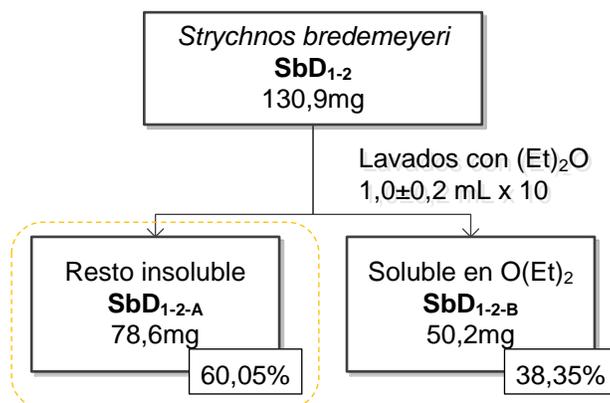
Purificación de los Compuestos A y B a partir de SbD₁₋₂

La fracción SbD₁₋₂ (130,9±0,1mg), presentó una coloración marrón brillante de aspecto similar al caramelo, fué soluble en metanol, parcialmente soluble en acetona e insoluble en acetato de etilo, dietiléter y hexano. Se sometió a lavados con dietiléter y se observó la formación de una suspensión blanca escarchada. Al tratar la solución se obtuvieron dos subfracciones una de cristales marrones y masa (78,6±0,1)mg (60,05%

respecto a SbD_{1-2}) rica en los flavonoides A y B denominada SbD_{1-2-A} y la otra, SbD_{1-2-B} , que consiste en $(50,2 \pm 0,1)$ mg (38,35%) de cristales blancos, recuperándose un 98,4% de la masa (Tabla 6, Esquema 6).

Tabla 6. Fracciones obtenidas por lavados con dietiléter de SbD_{1-2} .

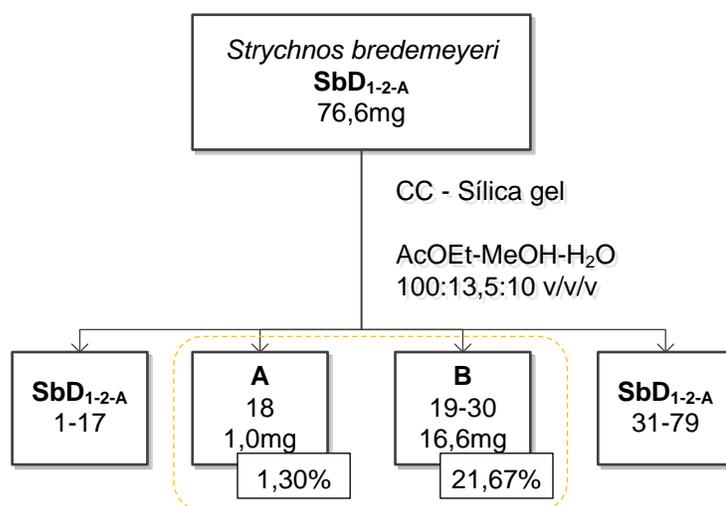
FRACCIÓN	DIETILÉTER	MASA ($\pm 0,0001$ g)	% MASA SbD_1
SbD_{1-2-A}	Insoluble	0,0786g	60,05%
SbD_{1-2-B}	Soluble	0,0502g	38,05%



Esquema 6. Lavados de la fracción SbD_{1-2} con dietiléter (Et_2O).

La subfracción SbD_{1-2-A} ($76,6 \pm 0,1$ mg) se purificó mediante cromatografía de columna con $(6,5044 \pm 0,0001)$ g de sílica gel como fase estacionaria y el sistema $AcOEt-MeOH-H_2O$ 100:13,5:10 (AN2) como fase móvil, lo cual produjo 79 fracciones. La unión de las fracciones 19-30 resultó en $(16,6 \pm 0,1)$ mg del flavonoide B con trazas del flavonoide A; ésta muestra fue disuelta en dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$) y enviada a analizar por resonancia magnética nuclear (RMN) (Esquema 7).

Las fracciones 18 (1mg) y 30 (<1mg) correspondientes a los compuestos A y B puros, respectivamente, fueron analizados por CCF y por espectroscopía UV-Vis. En CCF usando AN2 como sistema de elución y NP como agente revelador, el compuesto A se observa como a una banda de color amarillo verdoso con un $R_f=0,35$, mientras que el compuesto B corresponde a una banda anaranjada de $R_f=0,28$.⁷⁵

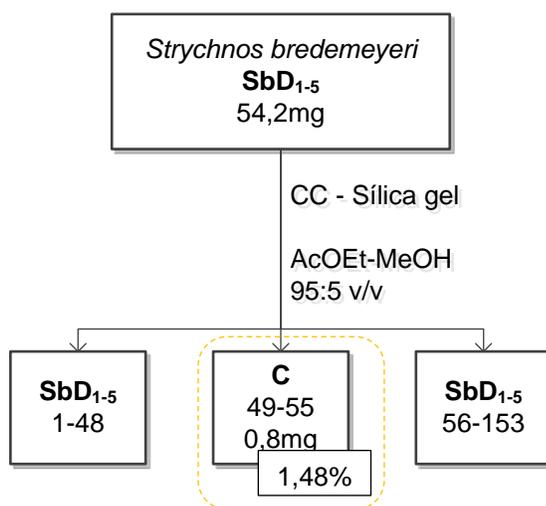


Esquema 7. Purificación de flavonoides A y B por cromatografía de columna de la fracción SbD_{1-2-A} .

Purificación del Compuesto C a partir de SbD_{1-5} .

La fracción SbD_{1-5} fue un sólido de color marrón brillante, muy similar a SbD_{1-2} , presentó una banda mayoritaria de color naranja con un factor de retención (R_f) de 0,39 en CCF, desarrollada con AN2 y revelada con NP, indicando la presencia de un flavonoide. Este compuesto fue purificado a partir de $(54,2 \pm 0,1)$ mg de SbD_{1-5} , mediante cromatografía de columna (CC), en un lecho de $(5,5055 \pm 0,0001)$ g de sílica gel como

fase estacionaria y elución isocrática con una mezcla AcOEt-MeOH (95:5; v/v) como fase móvil de la que se obtuvieron 153 fracciones. La unión de las fracciones 49-55 permitió aislar $(0,8\pm 0,1)$ mg del compuesto C puro que se analizó por espectroscopía UV-Vis para determinar el posible patrón de sustitución (Esquema 8).⁷⁵

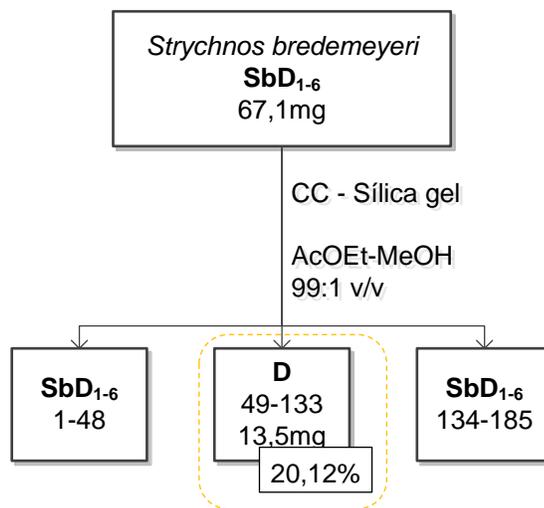


Esquema 8. Purificación del flavonoide C por cromatografía de columna de la fracción SbD₁₋₅.

Purificación del Compuesto D a partir de SbD₁₋₆.

La fracción SbD₁₋₆, fue un sólido de color marrón brillante, muy similar a SbD₁₋₂. En CCF, desarrollada con el sistema AN2 y revelada con NP, se observó una banda de color naranja correspondiente al compuesto flavonoidal mayoritario de $R_f=0,49$. El componente mayoritario fue purificado empleando cromatografía de columna a partir de $(67,1\pm 0,1)$ mg de SbD₁₋₆ en un lecho de $(6,7452\pm 0,0001)$ g de sílica gel como fase estacionaria mediante elución isocrática con una mezcla AcOEt-MeOH (99:1; v/v) como

fase móvil, este proceso produjo un total de 185 fracciones. La unión de las fracciones 49-133 resultó en $(13,5\pm 0,1)$ mg del compuesto D puro, el cual fue analizado por espectroscopía UV-Vis. La muestra fue disuelta en dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) y enviada a analizar por resonancia magnética nuclear (RMN) (Esquema 9).⁷⁵

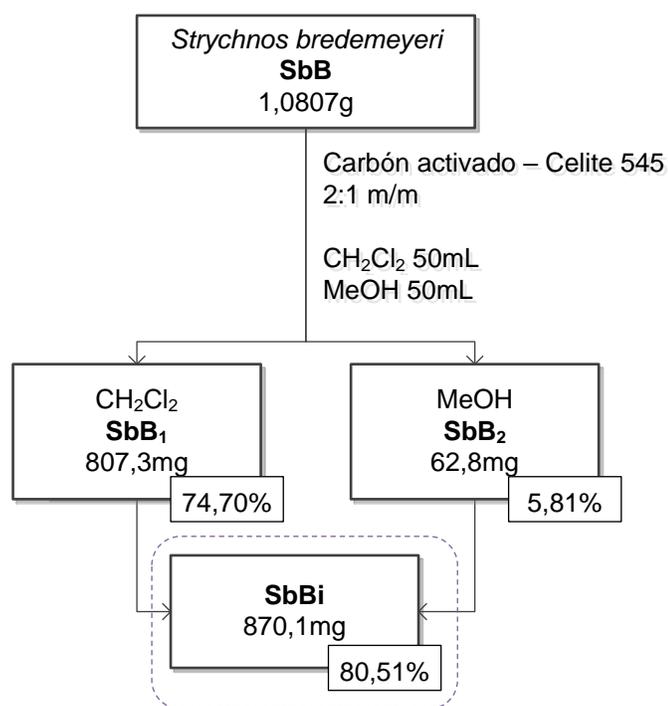


Esquema 9. Purificación del flavonoide D por cromatografía de columna de la fracción SbD_{1-6} .

Purificación del Compuesto E a partir de SbB_i .

La fracción SbB ($1,0807\pm 0,0001$ g) presentó un alto contenido de clorofilas y metabolitos secundarios terpenoidales no polares. La eliminación de los pigmentos coloreados fue realizada empleando el método descrito en la literatura, para ello se utilizó un sistema de filtración por succión y un embudo de placa porosa de 2cm de diámetro, en el cual se colocó un lecho de 5cm de alto de la mezcla Carbón activado-

Celite 545 (2:1; m/m). La muestra fué disuelta en CH_2Cl_2 y eluida a sequedad, por succión, con 50mL de CH_2Cl_2 seguido de 50mL de MeOH hasta que el lecho estuvo seco, dicho procedimiento originó dos fracciones, SbB_1 producto de la elución con CH_2Cl_2 y SbB_2 producto de la elución con MeOH. Éstas fueron comparadas mediante CCF observándose un mismo perfil cromatográfico al ser desarrolladas en AN2 y reveladas con AS, razón por la cual fueron unidas obteniéndose la fracción SbBi (Esquema 10, Tabla 7).⁷⁶



Esquema 10. Filtración a través de Carbón activado-Celite 545 de SbB.

La fracción SbBi de color amarillo pálido, parcialmente soluble en hexano, dietiléter, acetato de etilo y metanol, soluble en la mezcla AcOEt-Hex (7:3; v/v), presentó un compuesto terpenoidal mayoritario de $R_f=0,82$, bajo el sistema AN6 y revelado con AS

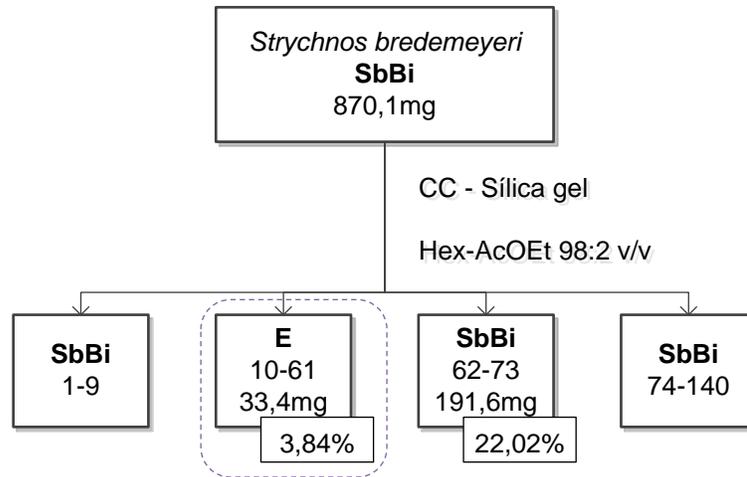
Adicionalmente, se detectó la presencia de lupeol y β -sitosterol, los cuales han sido aislados y reportados previamente de este género.⁷⁵

Tabla 7. Fracciones obtenidas por filtración a través de Carbón activado-Celita 545 de SbB.

FRACCIÓN	SOLVENTE	MASA ($\pm 0,0001$ g)	% MASA SbB
SbB ₁	CH ₂ Cl ₂	0,8073g	74,70%
SbB ₂	MeOH	0,0628g	5,81%
SbBi	-	0,8701g	80,51%

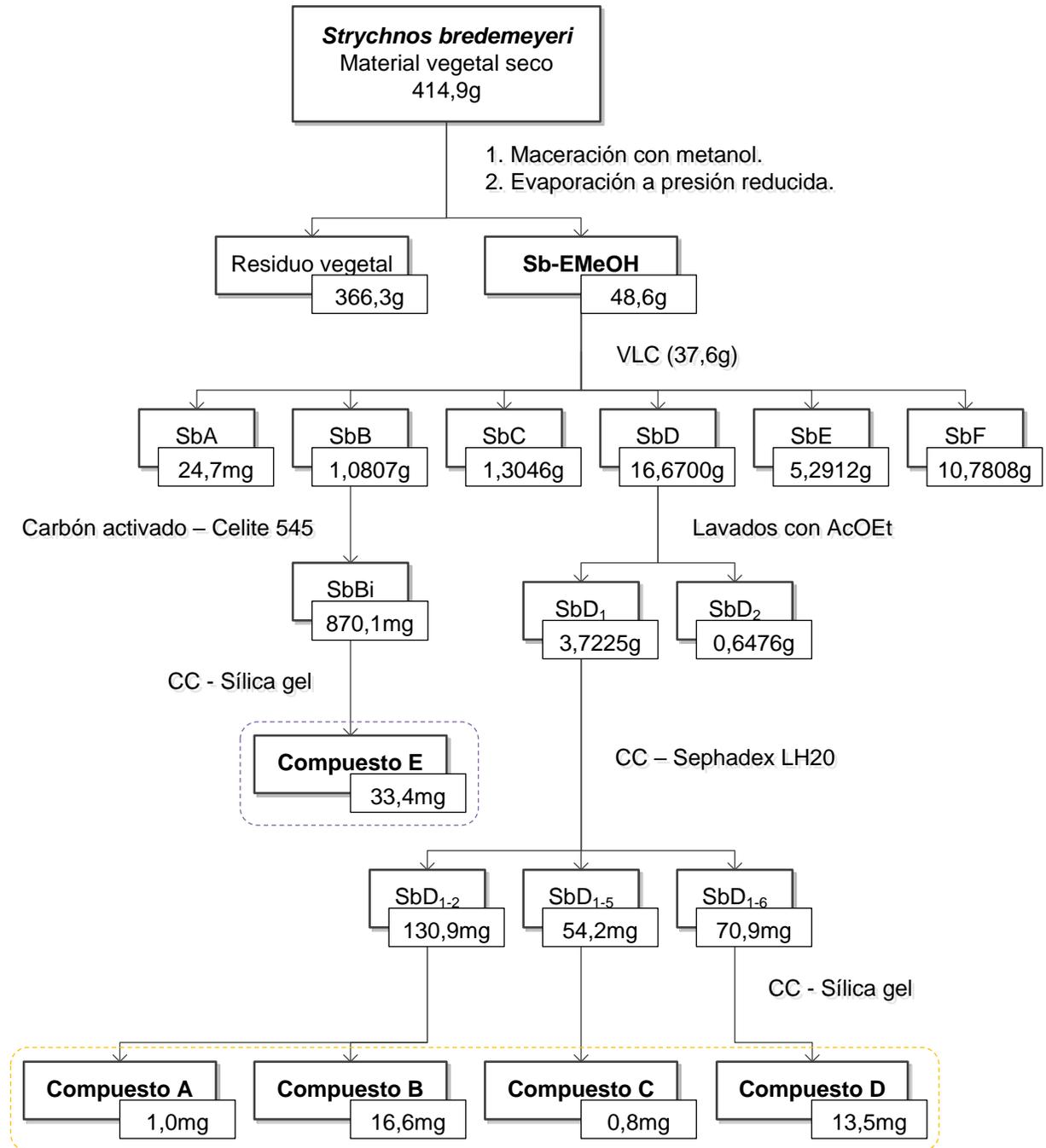
El compuesto E presente en SbBi se purificó mediante cromatografía de columna. Para ello se sembraron (870,1 \pm 0,1)mg en seco sobre un lecho de (86,9723 \pm 0,0001)g de sílica gel como fase estacionaria en elución isocrática con una mezcla Hex-AcOEt (98:2; v/v) como fase móvil para obtener 140 fracciones que fueron unidas según su perfil en CCF desarrollada en la mezcla Hex-AcOEt (95:5; v/v) como fase móvil y AS como agente revelador (Esquema 11).

La unión de las fracciones 10-61 resultó en (33,4 \pm 0,1)mg del compuesto E puro. Esta muestra fue disuelta en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) y enviada a analizar por resonancia magnética nuclear (RMN). Adicionalmente, la unión de las fracciones 62-73 resulta en (191,6 \pm 0,0001)mg del compuesto E y otros terpenos (Esquema 11).



Esquema 11. Purificación del terpeno E por cromatografía de columna de la fracción SbBi.

El procedimiento experimental para aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las hojas y ramas de la especie *Strychnos bredemeyeri* (Sb-EMeOH), denominados Compuestos A, B, C, D y E, se resume en el Esquema 12.



Esquema 12. Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico Sb-EMeOH de hojas y ramas de *Strychnos bredemeyeri*.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El extracto metanólico crudo de *Strychnos bredemeyeri* (Sb-EMeOH) resultó ser un líquido muy viscoso de color marrón oscuro, una porción de (37,6±0,1)g se sometió a cromatografía líquida al vacío (CLV) de la que se obtuvieron 19 fracciones que fueron unidas según su perfil en cromatografía en capa fina (CCF) usando Anisaldehído-Ácido sulfúrico (AS) como agente revelador, resultando en 6 fracciones colectivas enumeradas desde SbA hasta SbF (Esquema 3, Tabla 4).

Las fracciones colectivas se sometieron nuevamente a CCF, las fracciones SbA, SbB y SbC por ser de carácter menos polar se desarrollaron utilizando Hex-AcOEt-HCO₂H 75:25:1 (AN6) como fase móvil. Una vez reveladas con AS en el visible se observa que SbA y SbB mostraron bandas de color morado y azul indicando presencia de compuestos terpenoidales del tipo saponinas. Por otro lado, la fracción SbC, en el visible después de ser rociada con AS, presentó bandas color amarillo de mayor polaridad, correspondiente a compuestos flavonoidales (Figura 7).

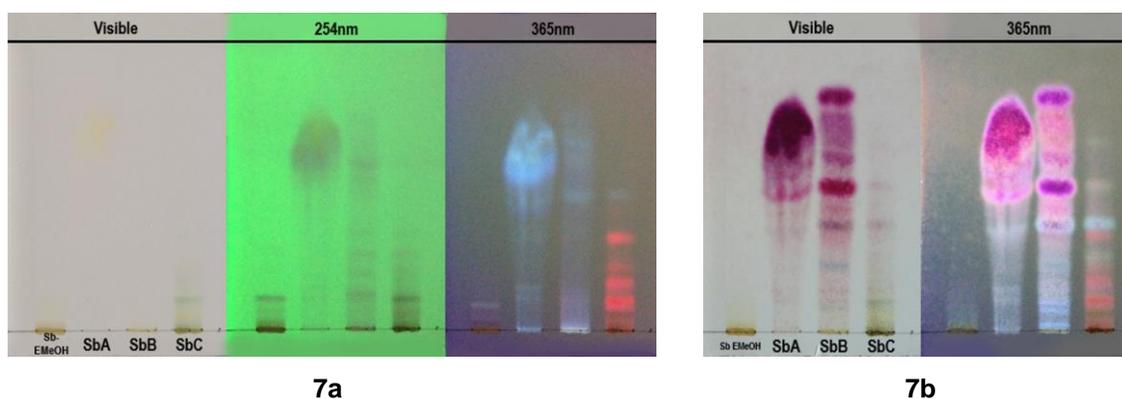


Figura 7. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbA, SbB y SbC desarrollada en AN6 sin revelar (7a) y revelada con AS (7b).

Las fracciones SbC, SbD, SbE y SbF fueron desarrolladas con AN2, en el visible y antes de revelar la placa a 365nm, mostraron la presencia de diferentes tipos de metabolitos. La fracción SbC contiene, en su mayoría, clorofila. Una vez rociada con revelador universal (AS) se observa en el visible que las fracciones SbD, SbE y SbF son ricas en bandas de color amarillo, característico de los compuestos flavonoidales (Figura 8).

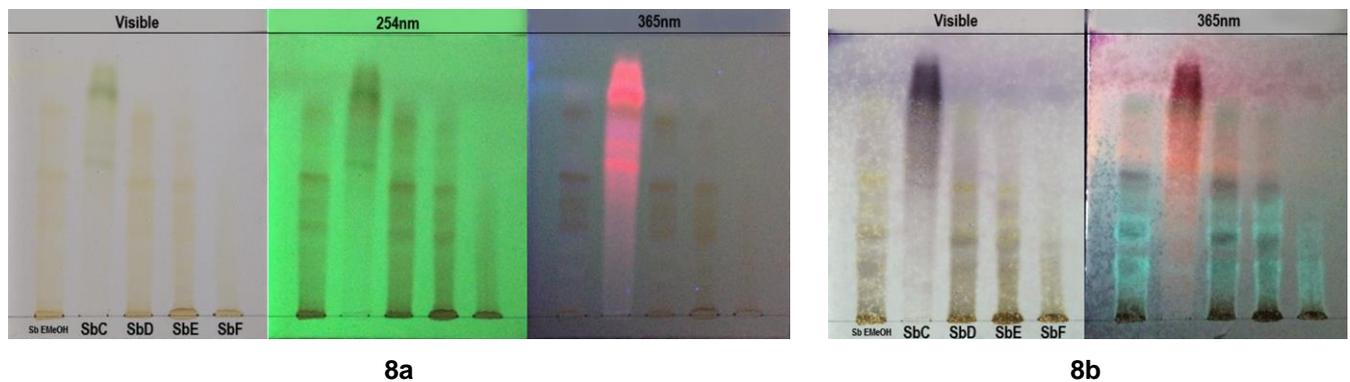


Figura 8. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbC, SbD, SbE y SbF desarrollada en AN2 sin revelar (8a) y revelada con AS (8b).

Los compuestos presentes en las fracciones colectivas SbD, SbE y SbF se observan con mayor claridad al desarrollar la placa con AN2 y rociar con *Natural Product* (NP), revelador específico para compuestos flavonoidales. Antes de revelar se observan numerosas bandas color naranja, características de compuestos tipo flavonoide; después de rociar con NP se observan las bandas color naranja, correspondientes a los compuestos mayoritarios con mayor intensidad en el visible, mientras que, a UV-365nm se observa fluorescencia que depende de la estructura del compuesto. Por lo general, los flavonoides glicosilados con un grupo hidroxilo en el anillo B presentan fluorescencia amarillo-verde, mientras que compuestos con dos o más grupos hidroxilos en el anillo B presentan fluorescencia naranja (Figura 9).⁷⁶

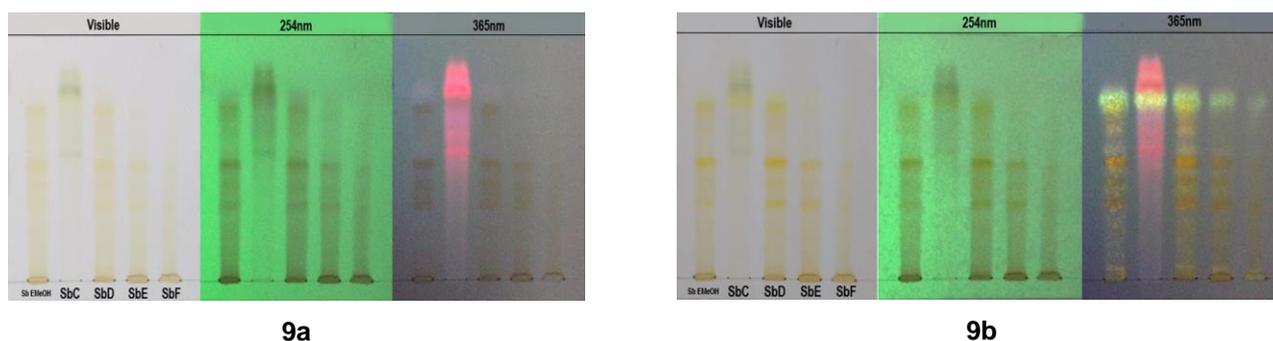


Figura 9. Placa de Sb-EMeOH y las fracciones colectivas SbC, SbD, SbE y SbF desarrollada en AN2 sin revelar (9a) y revelada con NP (9b).

La fracción SbD, con $(16,6700 \pm 0,0001)$ g, representando el 44,33% de la masa de extracto metanólico crudo de *S. bredemeyeri*, mostró un perfil cromatográfico en CCF similar al extracto Sb-EMeOH respecto al contenido de metabolitos secundarios de tipo flavonoidal (Figura 9). Para aislar los flavonoides se lavó una porción de $(4,4829 \pm 0,0001)$ g de SbD (26,89%) con acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose una subfracción de $(3,7225 \pm 0,0001)$ g de resto insoluble denominada SbD₁ (Esquema 4), tratada por CC de exclusión molecular con Sephadex LH-20 como fase estacionaria, resultando en catorce fracciones colectivas, desde SbD₁₋₁ hasta SbD₁₋₁₄ (Esquema 5, Figura 10, Tabla 5).

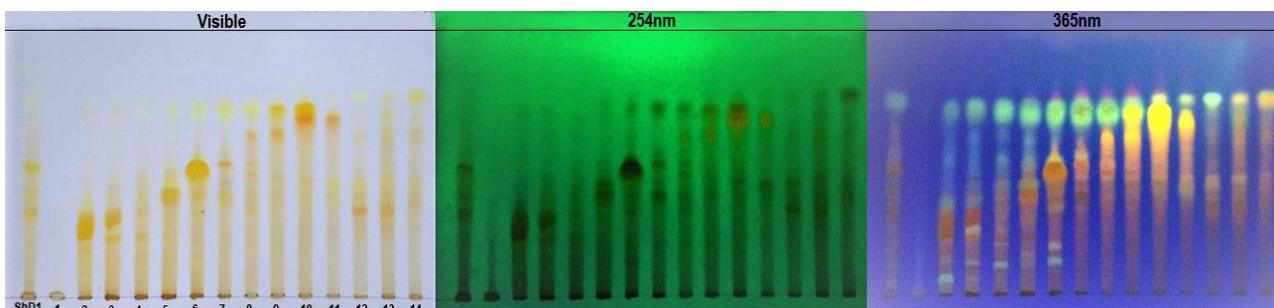


Figura 10. Placa de SbD₁ y las fracciones colectivas SbD₁₋₁ – SbD₁₋₁₄ en AN2 revelada con NP.

El perfil cromatográfico de la subfracción SbD₁, desarrollada en AN2 y revelada con NP permite observar la presencia de tres flavonoides mayoritarios que, tanto en el visible como en UV-365nm, se observan como bandas de color naranja con factor de retención (Rf) de 0,28, 0,39 y 0,49, aislados satisfactoriamente en las fracciones colectivas SbD₁₋₂, SbD₁₋₅ y SbD₁₋₆, respectivamente (Figura 10). La purificación de los flavonoides mayoritarios presentes en las tres subfracciones dio lugar a la obtención de los Compuestos A, B, C y D.

Caracterización de Compuestos A y B

La subfracción SbD_{1-2-A} se sometió a cromatografía de columna con sílica gel como fase estacionaria y elución isocrática con AcOEt-MeOH-H₂O 100:13,5:10 (AN2) como fase móvil para purificar el Compuesto B. La unión de las fracciones 19 a 30 produjo (16,6±0,1)mg del flavonoide B con trazas del flavonoide A (Esquema 7). Esta subfracción, se sometió a CCF empleando AN2 como sistema de desarrollo y NP como agente revelador observando el Compuesto B en el visible, como una banda naranja, mientras que, en UV-365nm el Compuesto A se presenta como a una banda de fluorescencia color amarillo verdoso y un Rf=0,35, seguido del Compuesto B como una banda de fluorescencia anaranjada cuyo Rf fue 0,28. Adicionalmente, a UV-254nm ambos compuestos muestran "*quenching*" de fluorescencia del indicador incorporado en la sílica de la cromatoplaca. (Figura 11).

El espectro de UV-Vis de un compuesto flavonoidal proporciona información acerca de la posición, tipo y cantidad de sustituyentes en el sistema conjugado. La mayoría de los flavonoides presentan principalmente dos bandas de absorción, la Banda I entre 300 y 400nm, producto de las transiciones electrónicas en el grupo cinamoilo, y la Banda II

desde 240 hasta 280nm, procedente de las transiciones electrónicas en el grupo benzoílo. El máximo y la forma de las Bandas I y II se modifica según la sustitución en los anillos A y B, generalmente, ambas bandas presentan desplazamiento batocrómico de los máximos de absorción conforme aumenta la cantidad de grupos hidroxilo presentes en el sistema aromático (Figura 12).^{77a}

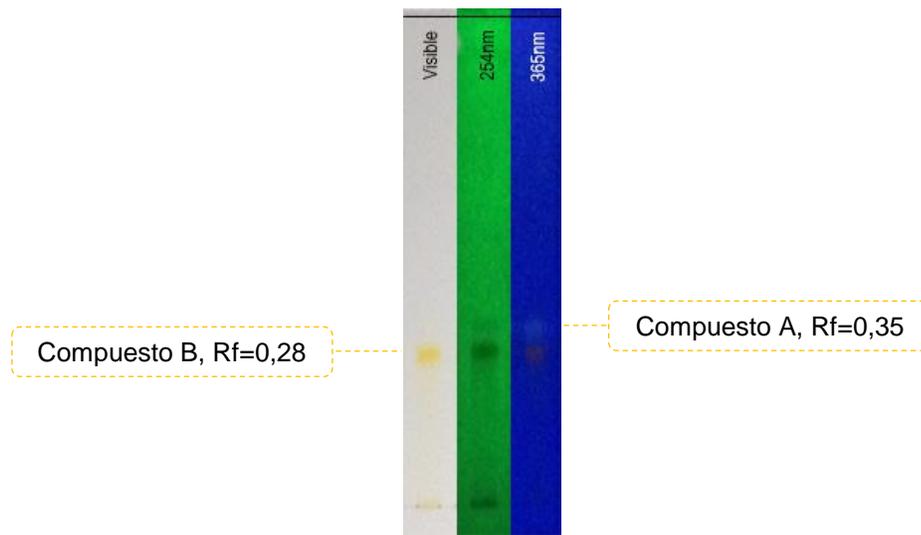


Figura 11. Placa de Compuesto B con trazas de Compuesto A, desarrollada con AN2 y revelada con NP.

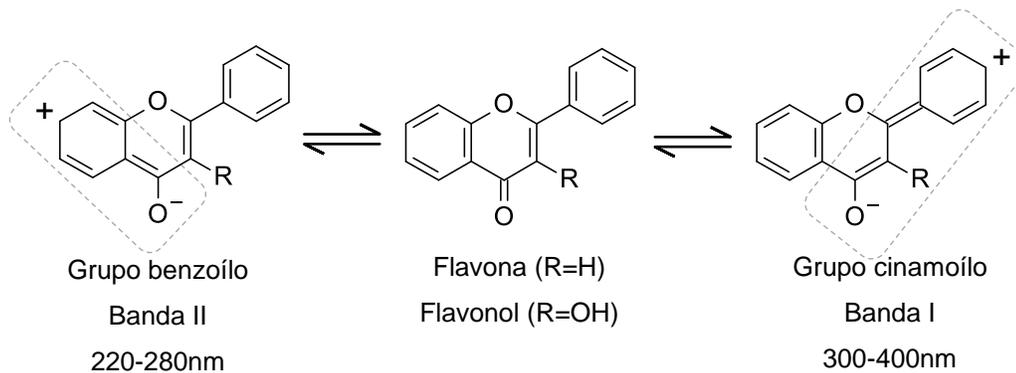


Figura 12. Grupos funcionales que influyen en el espectro de absorción de UV-Vis de flavonoides.⁷⁷

El Compuesto A se aisló puro en la fracción 18 y se analizó por espectroscopía UV-Vis para determinar el posible patrón de sustitución del flavonoide. Se obtuvieron los espectros en metanol (MeOH), metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc) y tricloruro de aluminio (AlCl_3). Los datos espectroscópicos se resumen en la Tabla 8.

El espectro del Compuesto A en metanol presenta máximos en 333nm (banda I) y 259nm (banda II) característicos de flavonoles sustituidos en la posición 3 y flavonas. El desplazamiento batocrómico de la banda Ia ($\Delta\lambda_{\text{max}}=51\text{nm}$) en NaOMe/MeOH indica la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4'; en NaOAc/MeOH se observa el desplazamiento batocrómico de la banda II ($\Delta\lambda_{\text{max}}=7\text{nm}$) que sugiere un grupo hidroxilo en la posición 7 y, finalmente, los desplazamientos batocrómicos de las bandas Ia y IIa ($\Delta\lambda_{\text{max}}=58\text{nm}$ y $\Delta\lambda_{\text{max}}=37\text{nm}$, respectivamente) en $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ indican posible formación de complejo quelato entre las posiciones 4 y 5 y/o grupo orto-hidroxilo (Figura 14, Tabla 8).^{77a, 78a}

Es posible que el Compuesto A, de acuerdo con la información obtenida mediante CCF y espectroscopía UV-Vis, corresponda a 4',5,7-trihidroxiflavona, por lo que se comparan los resultados espectroscópicos del Compuesto A con los reportados en la literatura para Apigenina (Figura 13, Tabla 8).^{78b}

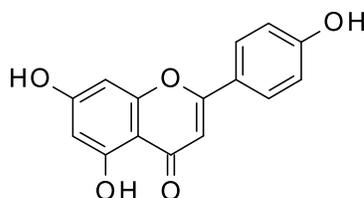


Figura 13. Estructura química propuesta para el Compuesto A aislado de la subfracción SbD_{1-2-A} .

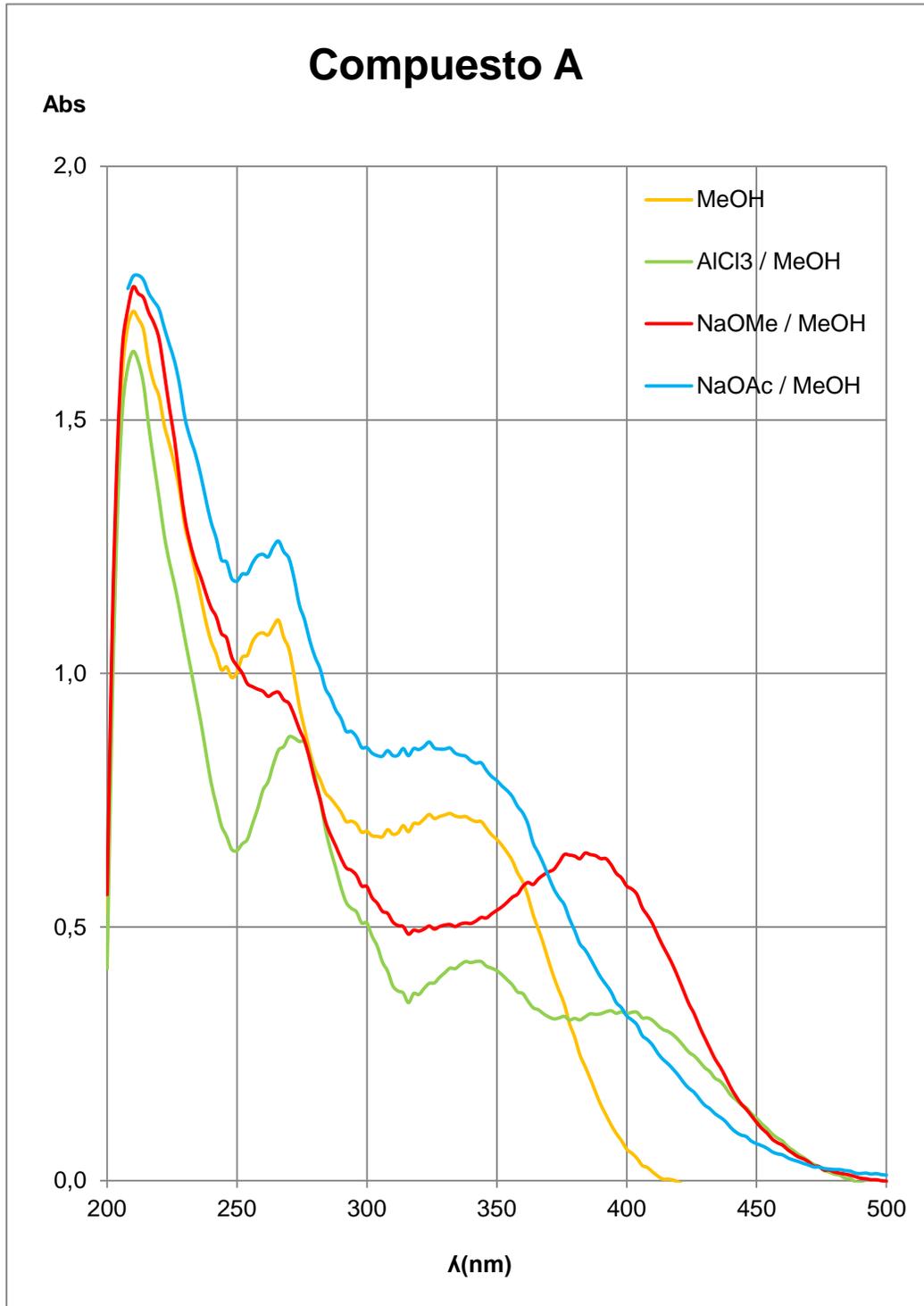


Figura 14. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto A.

Tabla 8. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto A según el medio. Comparación con los datos reportados para Apigenina.^{78b}

	Apigenina λ_{\max} reportado [nm]				Compuesto A λ_{\max} experimental [nm]			
	Ia	Ib	Ila	Ilb	Ia	Ib	Ila	Ilb
MeOH	336	296 sh	267	-	333	-	259	-
NaOMe	392	324	275	-	384	326	297 sh	266
NaOAc	376	301	274	-	324	-	266	-
AlCl₃	384	348	301	276	391	343	296 sh	271

El Compuesto B se aisló puro en la fracción 30 y se sometió a espectroscopía UV-Vis para determinar el posible patrón de sustitución. Se obtuvieron los espectros en etanol (EtOH), etóxido de sodio (NaOEt), acetato de sodio (NaOAc), acetato de sodio-ácido bórico (NaOAc/H₃BO₃), tricloruro de aluminio (AlCl₃) y tricloruro de aluminio-ácido clorhídrico (AlCl₃/HCl), todos presentan máximos de absorción entre 220nm y 400nm resumidos en la Tabla 9 (Figura 15).

El espectro del Compuesto B en etanol (EtOH) presenta máximos en 335nm (banda Ia), 264nm y 258nm (banda IIb y Ila, respectivamente) consistente con núcleo de flavona o flavonol sustituido en la posición 3. En NaOEt/EtOH el desplazamiento batocrómico de 51nm de la banda I sugiere un grupo hidroxilo en la posición 4'. El desplazamiento batocrómico de la banda Ila ($\Delta\lambda_{\max}=6\text{nm}$) en NaOAc/EtOH indica un posible grupo hidroxilo en la posición 7, además, la forma alargada de la banda I sugiere que existe un grupo hidroxilo en 4' y sustitución (-OR) en las posiciones 3 y/o 7. En NaOAc/H₃BO₃/EtOH se observa un desplazamiento batocrómico de 13nm en la

banda I, sugiriendo la presencia de grupos hidroxilo en posición *orto*- en el anillo B (Figura 15, Tabla 9).^{77a, 78a}

El espectro del Compuesto B en $\text{AlCl}_3/\text{HCl}/\text{EtOH}$ comparado con el espectro en $\text{AlCl}_3/\text{EtOH}$ presenta un desplazamiento hipsocrómico en la banda Ia ($\Delta\lambda_{\text{max}}=12\text{nm}$), indicando que la formación de quelatos proviene tanto de los grupos *orto*-hidroxilo como de los asociados a C-4. El desplazamiento batocrómico de la banda Ia ($\Delta\lambda_{\text{max}}=54\text{nm}$) en AlCl_3/HCl comparada con la banda I en EtOH sugiere un posible 5-hidroxiflavonol sustituido en la posición 3.^{78a}

De acuerdo con la información obtenida mediante CCF y espectroscopía UV-Vis se sospecha que el Compuesto B presenta la estructura de un 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol sustituido en la posición 3, por lo que se comparan los datos espectroscópicos experimentales con los reportados para Quercitrina (Figura 16, Tabla 9).

Tabla 9. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto B según el medio. Comparación con los datos reportados para Quercitrina.^{78c}

	Quercitrina en MeOH λ_{max} reportado [nm]				Compuesto B en EtOH λ_{max} experimental [nm]			
	Ia	Ib	Ila	Ilb	Ia	Ib	Ila	Ilb
EtOH	350	301sh	265	256	335	-	264sh	258
NaOEt	393	326	270	-	386	-	270sh	-
NaOAc	372	322sh	272	-	369sh	309	270sh	265
H₃BO₃	367	300sh	260	-	348	-	263	-
AlCl₃	430	333	304sh	276	401sh	335	287sh	271
HCl	401	353	303sh	272	389sh	334	290sh	271

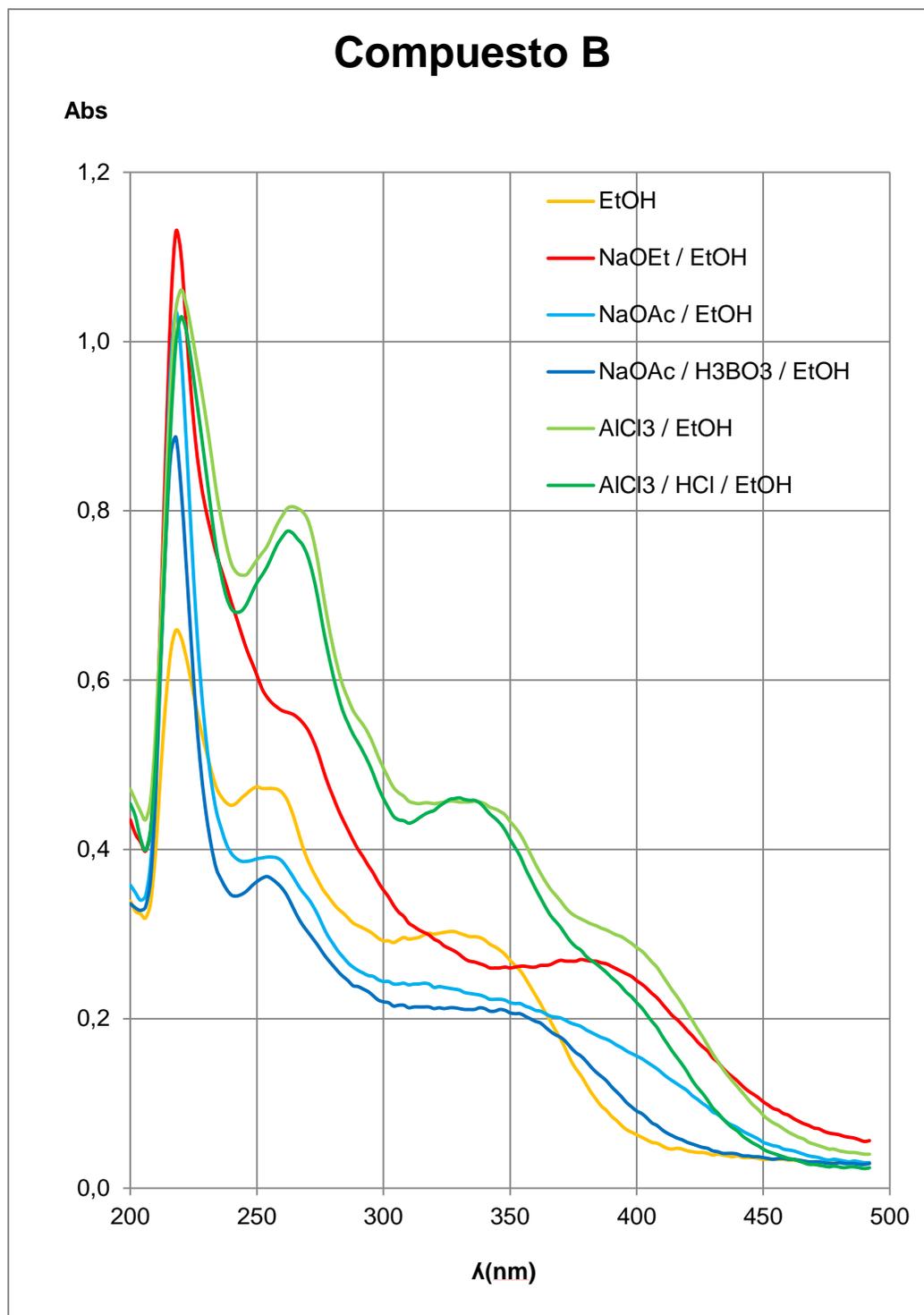
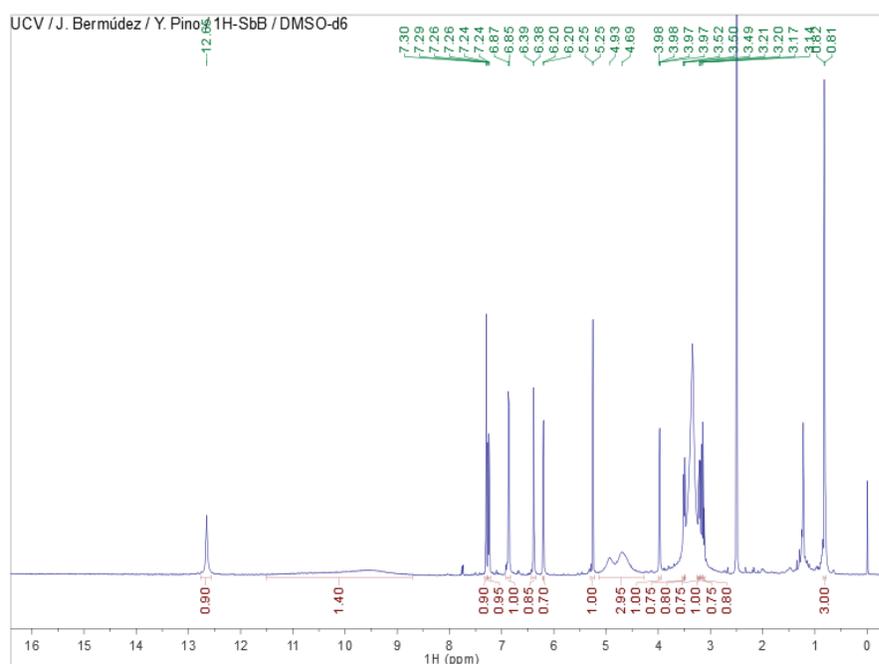


Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto B.

La estructura del Compuesto B se determinó mediante análisis por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y HSQC.

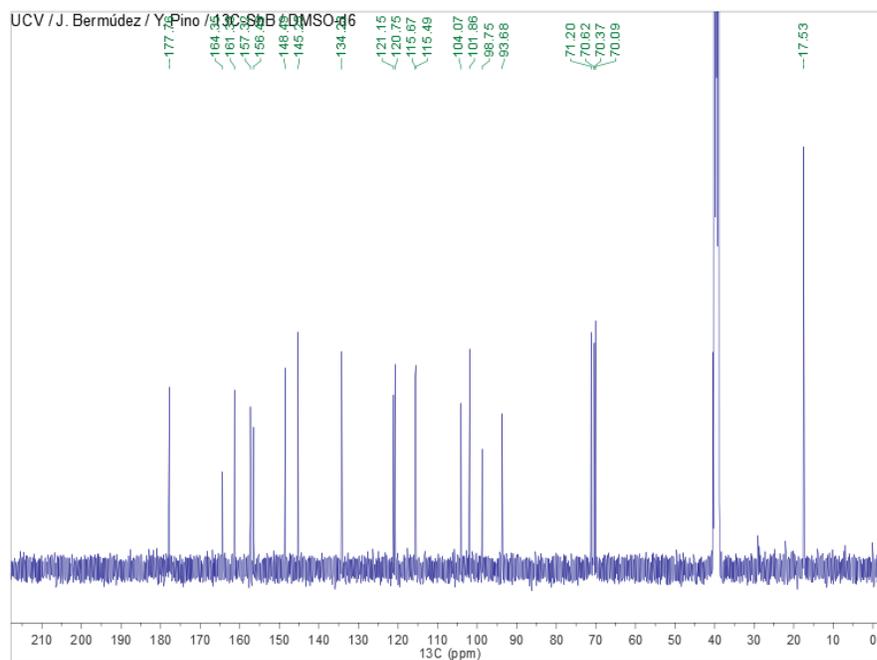
Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C indican que el Compuesto B presenta un núcleo flavonoidal de quince átomos de carbono, entre ellos cinco C-H aromáticos y diez carbonos cuaternarios, adicionalmente, presenta seis carbonos que corresponden a un glucósido que sustituye la posición 3 del flavonol (Espectros 1 y 2).



Espectro 1. RMN ^1H del Compuesto B.

En el espectro de RMN ^1H se observan las señales de los protones enlazados a carbonos aromáticos en la región comprendida entre 6,00 y 7,50ppm. Los protones del anillo A H-6 y 8 se presentan como dobletes (*d*) en 6,20 y 6,39ppm acoplados entre sí con constantes (J_{meta}) de 1,9 y 1,7Hz, respectivamente. Los protones del anillo B H-2' y 5' corresponden a los dobletes (*d*) en 7,30 (2,2Hz) y 6,86ppm (8,3Hz), ambos acoplados

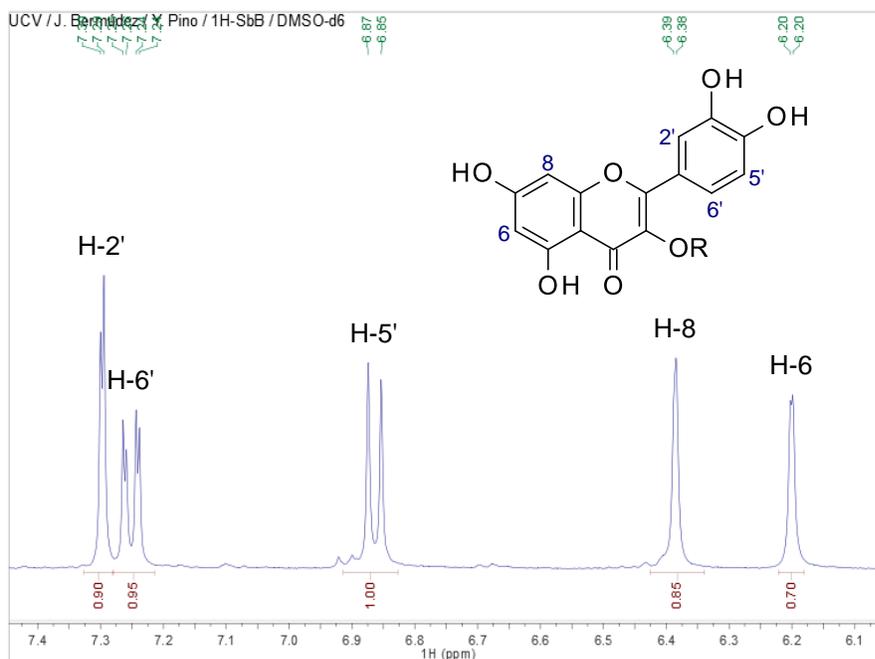
con el protón H-6' que se observa como un doblete de dobletes (*dd*) en 7,25ppm ($J_{meta}=2,2\text{Hz}$ y $J_{orto}=8,3\text{Hz}$) (Espectro 3).^{77b}.



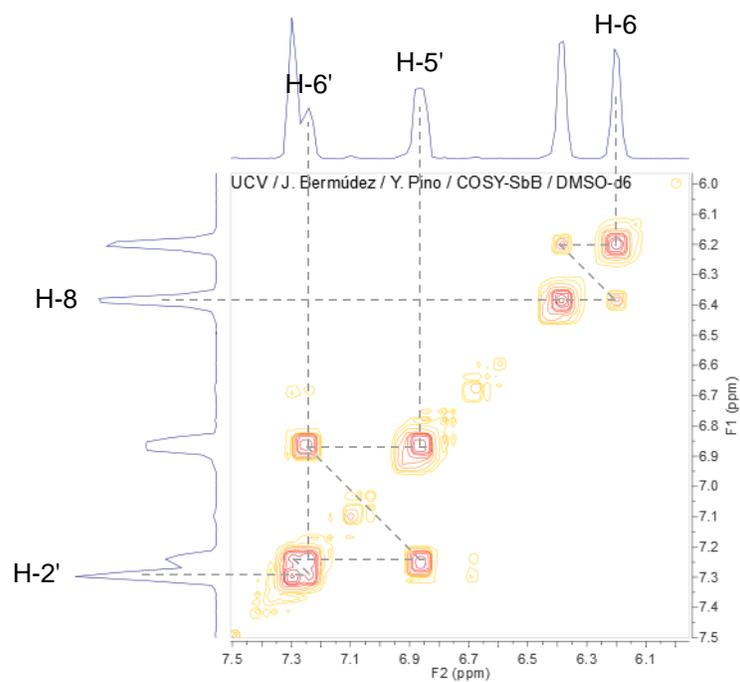
Espectro 2. RMN ^{13}C del Compuesto B.

En el espectro de correlación ^1H - ^1H COSY del Compuesto B se observan los acoplamientos entre los protones tanto en el anillo A, H-6 con H-8, como en el anillo B, H-2' con H-6', H-5' con H-6' y H-6' con H-2' y H-5' (Espectro 4).^{77b}

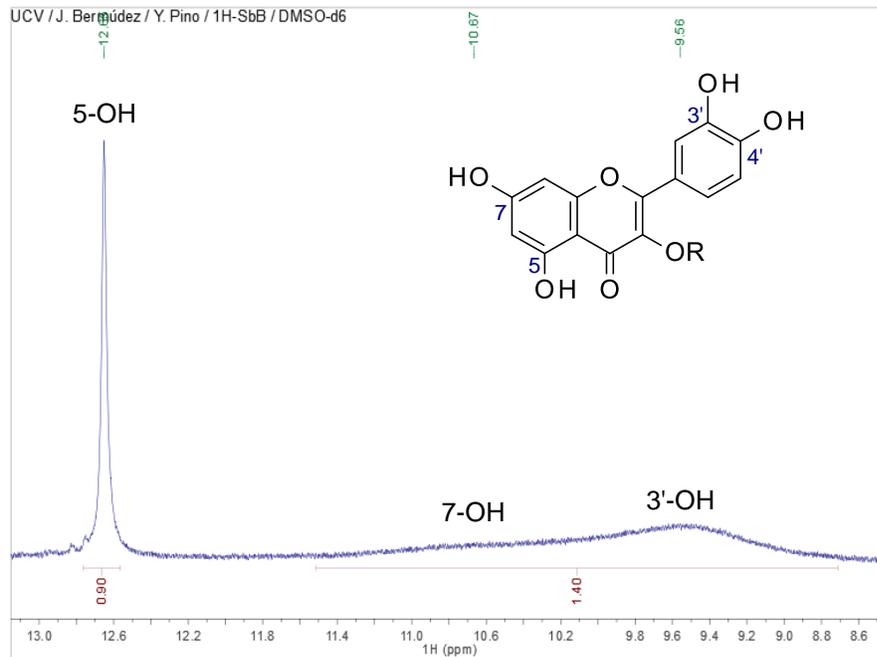
Las señales de los grupos hidroxilo se observan en el espectro de RMN ^1H en aproximadamente 9,56ppm para 3'-OH y 10,67ppm para 7-OH como una banda ancha (*br. s*) entre 8,70 y 11,50ppm. El singlete (*s*) en 12,65ppm corresponde a 5-OH (Espectro 5).^{77b}



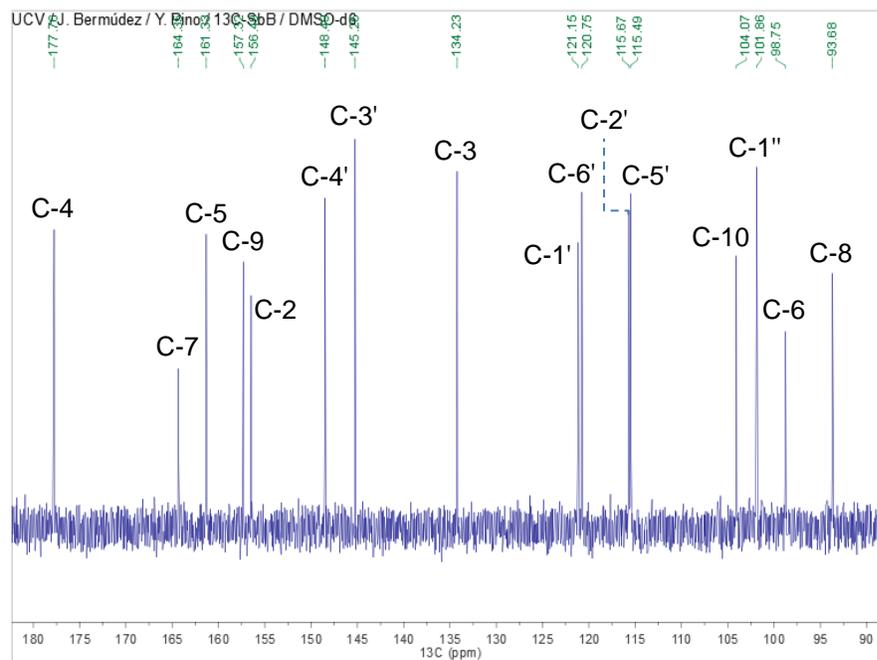
Espectro 3. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 6,0-7,5ppm.



Espectro 4. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 6,0-7,5ppm.

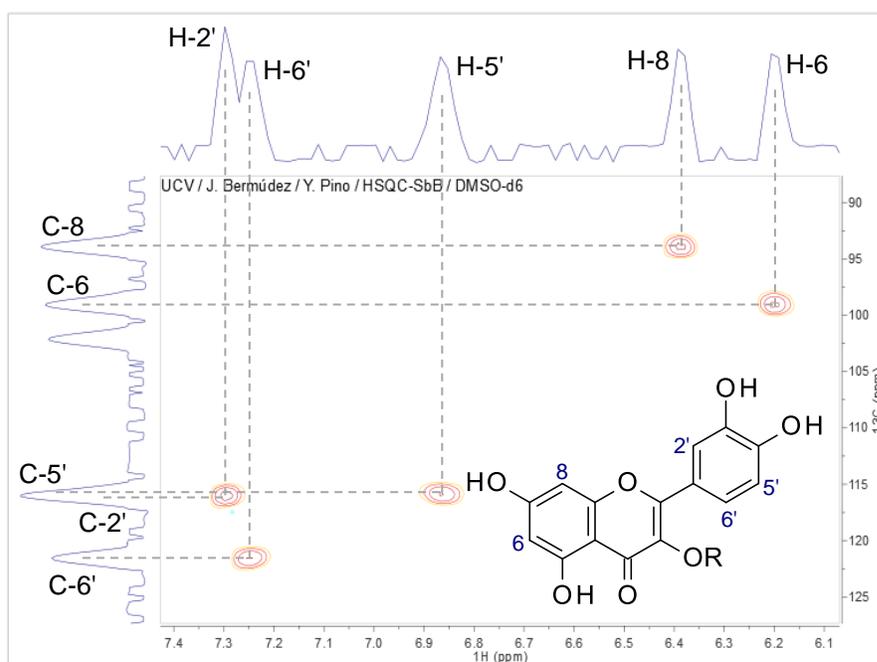


Espectro 5. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 8,6-13,4ppm.



Espectro 6. RMN ^{13}C del Compuesto B. Ampliación 90,0-180,0ppm

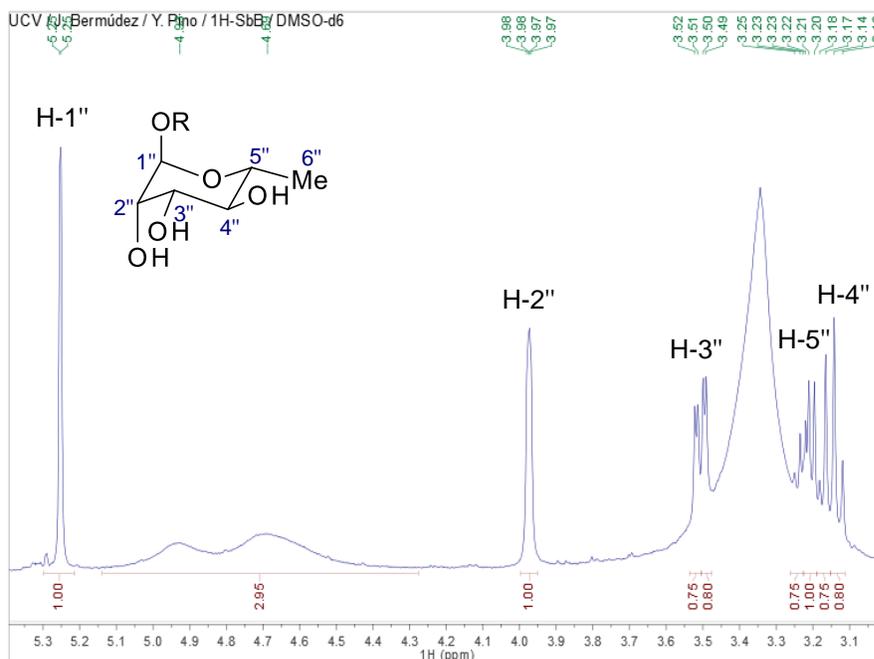
Los espectros de ^{13}C y HSQC confirman los desplazamientos de C-6, 8, 2', 5' y 6', en 98,75, 93,68, 115,49, 115,67 y 120,75ppm, respectivamente, como cinco carbonos enlazados a un protón en un sistema aromático, los desplazamientos de 145,25, 148,49, 161,33 y 164,35ppm que corresponden a los carbonos enlazados a grupos hidroxilo C-3', 4', 5 y 7, respectivamente, y C-3 sustituido en 134,23ppm, por lo que se sospecha que el núcleo flavonoidal corresponde a Quercetin 3-O-glicósido (Espectros 6 y 7).^{77b}



Espectro 7. RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto B. Ampliación 6,1-7,4ppm/90,0-125,0ppm.

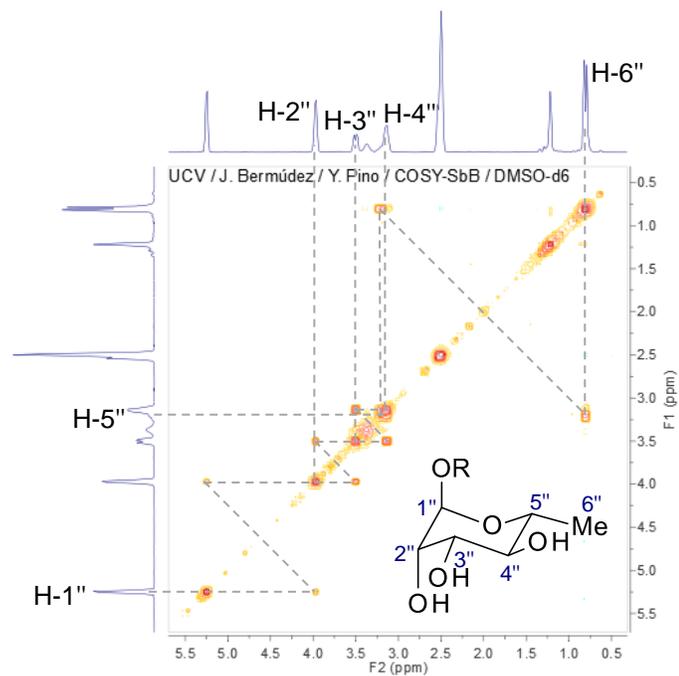
El espectro de RMN- ^1H del Compuesto B presenta las señales de los protones del glicósido entre 0,80 y 5,30ppm. El protón enlazado al carbono anomérico H-1'' se presenta como un doblete (*d*) en 5,25ppm con una constante (*J*) de 1,6Hz debido a su acoplamiento con H-2'', el protón H-2'' es asignado al doblete de dobletes (*dd*) en 3,97ppm con constantes (*J*) 1,7 y 3,3Hz por su acoplamiento con H-1'' y H-3'', el doblete

de dobletes (*dd*) en 3,51ppm corresponde al protón H-3'' con constantes (*J*) de 3,3 y 9,0Hz por acoplarse con H-2'' y H-4'', los protones H-4'' y H-5'' se agrupan en un multiplete entre 3,10 y 3,30ppm, los protones del grupo metilo terminal H-6'' se observan en 0,81ppm como un doblete (*d*) de constante $J_{6''-5''}=6,0\text{Hz}$ y las bandas de los grupos hidroxilo se observan entre 4,28 y 5,14ppm (Espectro 8).^{77b}

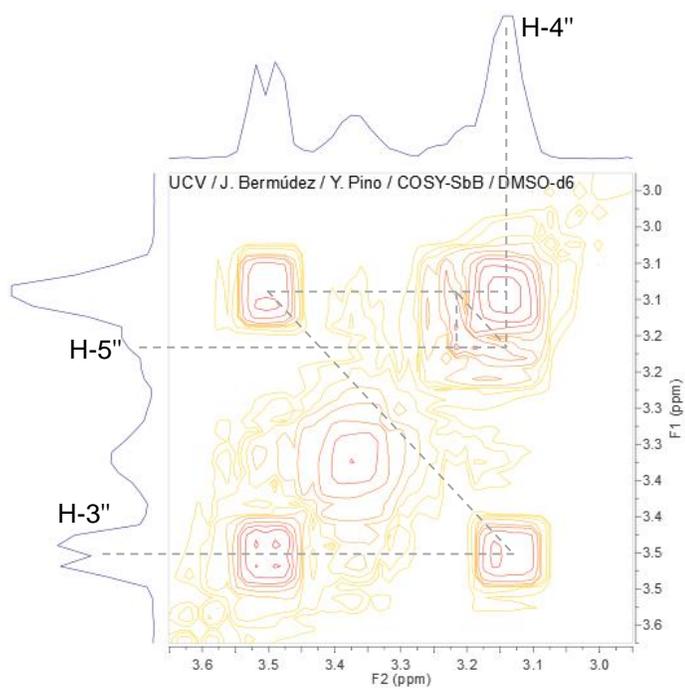


Espectro 8. RMN ^1H del Compuesto B. Ampliación 3,1-5,3ppm.

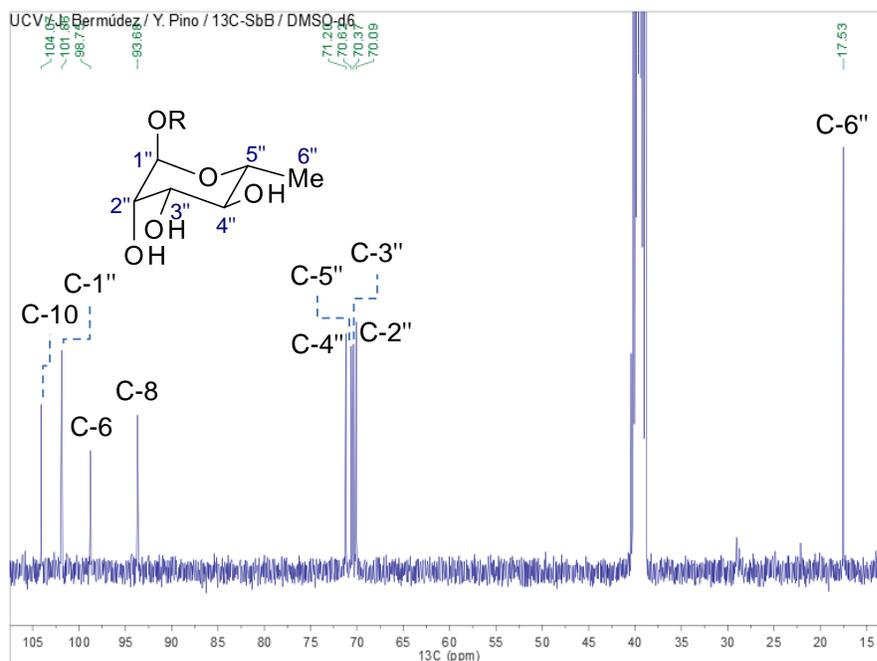
En el espectro de correlación espectroscópica ^1H - ^1H COSY se observa el acoplamiento entre el protón del carbono anomérico 1'' con 2'', 2'' con 1'' y 3'', 3'' con 2'' y 4'', 4'' con 3'' y 5'', 5'' con 6'' (Espectros 9 y 10). Por otro lado, el espectro de RMN ^{13}C muestra un desplazamiento en 101,86ppm corresponde a C-1'' y el de 17,53ppm a C-6'', los carbonos C-2'', 3'', 4'' y 5'' se hallan entre 70,09 y 71,20ppm. A partir del RMN HSQC se establece la correlación entre los protones y carbonos presentes en el glicósido, identificado como α -L-ramnósido (Espectros 11 y 12).^{77b}



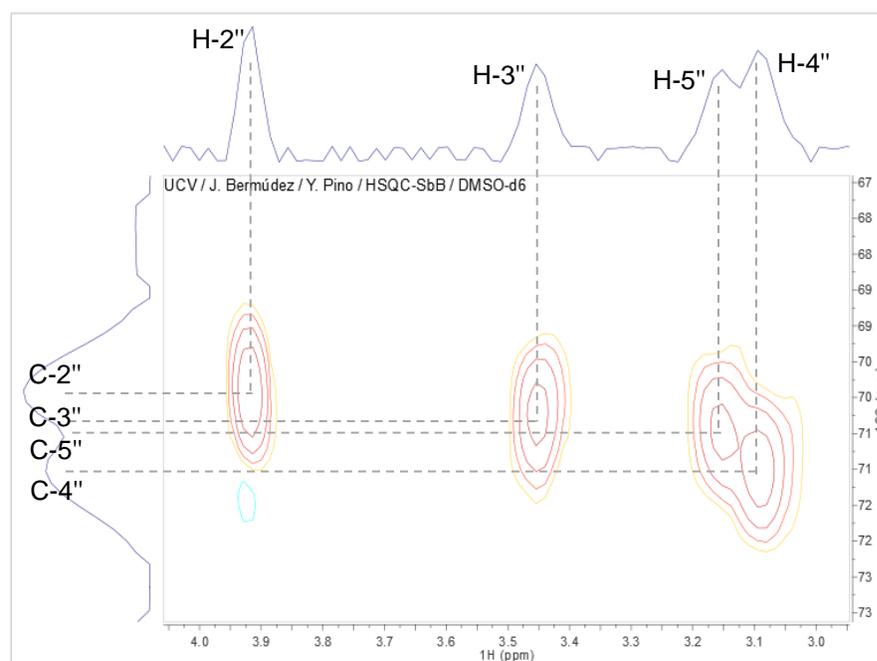
Espectro 9. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 0,5-5,5ppm.



Espectro 10. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B. Ampliación 3,0-3,6ppm.



Espectro 11. RMN ^{13}C del Compuesto B. Ampliación 15,0-105,0ppm.



Espectro 12. RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto B. Ampliación 3,0-4,0ppm/67,0-73,0ppm.

Los desplazamientos en los espectros de UV-Vis, RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y HSQC permiten inferir que el Compuesto B corresponde a Quercitrina, también conocido como quercetin-3-O- α -L-ramnósido, de manera que, se comparan los datos experimentales con los reportados en la literatura para Quercitrina aislada de las hojas de *Zanthoxylum bungeanum* (Figura 16, Tablas 10 y 11).⁷⁹

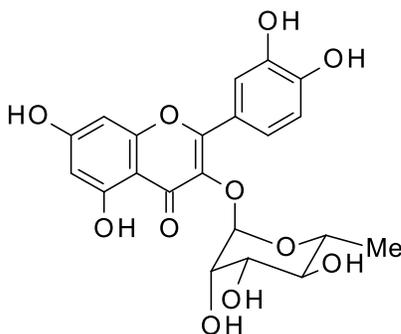


Figura 16. Estructura química del compuesto Quercitrina aislado de la subfracción SbD₁₋₂.

Tabla 10. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H y ^1H - ^1H COSY del Compuesto B comparado con datos reportados en la literatura para quercitrina.⁷⁹

H	Quercitrina reportado en DMSO- <i>d</i> ₆ a 500MHz		Compuesto B en DMSO- <i>d</i> ₆ a 400MHz	
	δ REPORTADO [ppm] (<i>m</i> ; J[Hz])	COSY	δ EXPERIMENTAL [ppm] (<i>m</i> ; J[Hz])	COSY
H-5	12,66 (s)		12,65 (s)	
H-6	6,21 (<i>br. s</i>)	H-8	6,20 (<i>d</i> ; 1,9)	H-8
H-8	6,40 (<i>br. s</i>)	H-6	6,39 (<i>d</i> ; 1,7)	H-6
H-2'	7,30 (<i>d</i> ; 1,5)		7,30 (<i>d</i> ; 2,2)	H-6'
H-5'	6,87 (<i>d</i> ; 8,4)	H-6'	6,86 (<i>d</i> ; 8,3)	H-6'

H-6'	7,25 (<i>d</i> ; 8,4)	H-5'	7,25 (<i>dd</i> ; 2,2/8,3)	H-5', H-2'
H-1''	5,27 (<i>s</i>)	H-2''	5,25 (<i>d</i> ; 1,6)	H-2''
H-2''	3,99 (<i>dd</i>)	H-1'', H-3''	3,97 (<i>dd</i> ; 1,7/3,3)	H-1'', H-3''
H-3''	3,53 (<i>dd</i>)	H-2'', H-4''	3,51 (<i>dd</i> ; 3,3/9,0)	H-2'', H-4''
H-4''	3,17 (<i>dd</i>)	H-3''	3,15 (<i>m</i>)	H-3'', H-5''
H-5''	3,23 (<i>dd</i>)	H-6''	3,20 (<i>m</i>)	H-4'', H-6''
H-6''	0,82 (<i>d</i> ; 6,0)	H-5''	0,81 (<i>d</i> ; 6,0)	H-5''

Tabla 11. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C y HSQC del Compuesto B comparado con datos reportados en la literatura para quercitrina.⁷⁹

C	Quercitrina reportado en DMSO- d_6 a 125MHz	Compuesto B en DMSO- d_6 a 100MHz	HSQC
	$\delta_{\text{REPORTADO}}$ [ppm]	$\delta_{\text{EXPERIMENTAL}}$ [ppm]	
2	156,93	157,32	
3	134,60	134,23	
4	178,23	177,76	
5	161,78	161,33	
6	99,17	98,75	H-6
7	164,69	164,35	
8	94,10	93,68	H-8
9	157,76	156,49	
10	104,56	104,07	
1'	121,23	121,15	
2'	115,94	115,49	H-2'
3'	145,68	145,25	

4'	148,91	148,49	
5'	116,15	115,67	H-5'
6'	121,59	120,75	H-6'
1''	102,33	101,86	H-1''
2''	70,54	70,09	H-2''
3''	71,05	70,37	H-3''
4''	71,69	71,20	H-4''
5''	70,86	70,62	H-5''
6''	17,96	17,53	H-6''

Caracterización del Compuesto C

La purificación del Compuesto C se realizó a partir de la subfracción SbD₁₋₅ mediante a cromatografía de columna en un lecho de sílica gel como fase estacionaria y elución isocrática con una mezcla AcOEt-MeOH (95:5; v/v) como fase móvil, la unión de las fracciones 49-55 resultó en (0,8±0,1)mg del Compuesto C puro (Esquema 8).

El Compuesto C se sometió a CCF empleando AN2 como sistema de desarrollo y NP como agente revelador, se observa como una banda naranja tanto en el visible como en UV-365nm con factor de retención de 0,39 (Figura 17).

El análisis de C por espectroscopía UV-Vis, en metanol (MeOH), metóxido de sodio (NaOMe/MeOH), acetato de sodio (NaOAc/MeOH) y tricloruro de aluminio (AlCl₃/MeOH), permitió determinar los máximos de absorción entre 200nm y 400nm. Los datos espectroscópicos se resumen en la Tabla 12.

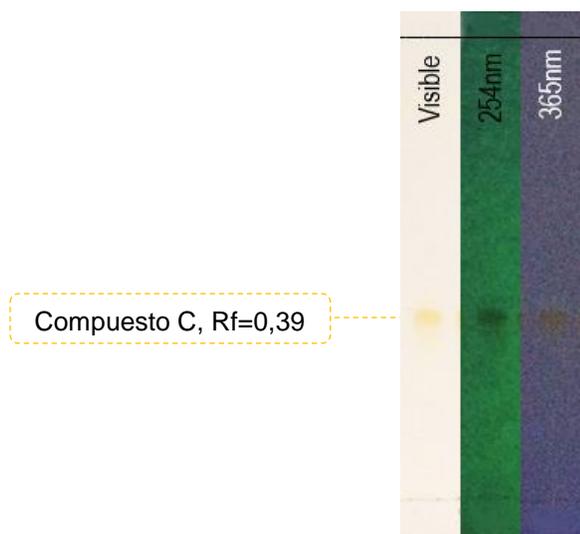


Figura 17. Placa de Compuesto C desarrollada con AN2 y revelada con NP.

El espectro del Compuesto C en metanol presenta máximos en 344, 292 sh , 269 sh y 257nm (bandas Ia, Ib, IIa y IIb, respectivamente), generalmente asociados a flavonoles sustituidos en la posición 3 (Figura 19, Tabla 12).^{77a, 78a}

El desplazamiento ($\Delta\lambda_{max}$) batocrómico de 55nm de la banda I en NaOMe/MeOH sugiere la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4', mientras que, por el desplazamiento batocrómico de 11nm de la banda II en NaOAc/MeOH, se sospecha la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 7. En AlCl₃/MeOH los desplazamientos batocrómicos en las bandas Ia y IIb ($\Delta\lambda_{max}$ 51nm y 9nm, respectivamente) indican posible formación de complejos quelatos con grupo orto-hidroxilo y/o con las posiciones 4 y 5 (Figura 19, Tabla 12).^{78a}

Es posible que el Compuesto C, de acuerdo con la información obtenida mediante CCF y espectroscopía UV-Vis, presente la estructura de un 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol

sustituido en la posición 3. Se comparan los datos espectroscópicos con los reportados para Rutina (Figura 18, Tabla 12).^{78d}

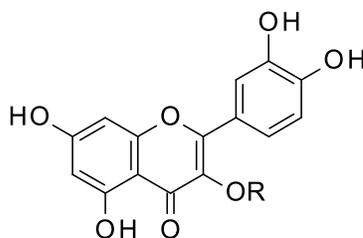


Figura 18. Estructura química propuesta para el Compuesto C aislado de la subfracción SbD₁₋₅.

Tabla 12. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto C según el medio. Comparación con los datos reportados para Rutina.^{78d}

	Rutina λ_{\max} reportado [nm]				Compuesto C λ_{\max} experimental [nm]			
	Ia	Ib	Ila	Ilb	Ia	Ib	Ila	Ilb
MeOH	359	299	266sh	259	344	292sh	269sh	257
NaOMe	410	327	272	-	399	320sh	268	-
NaOAc	393	325	271	-	353	330sh	268	-
AlCl₃	433	303sh	275	-	395	348sh	304sh	266

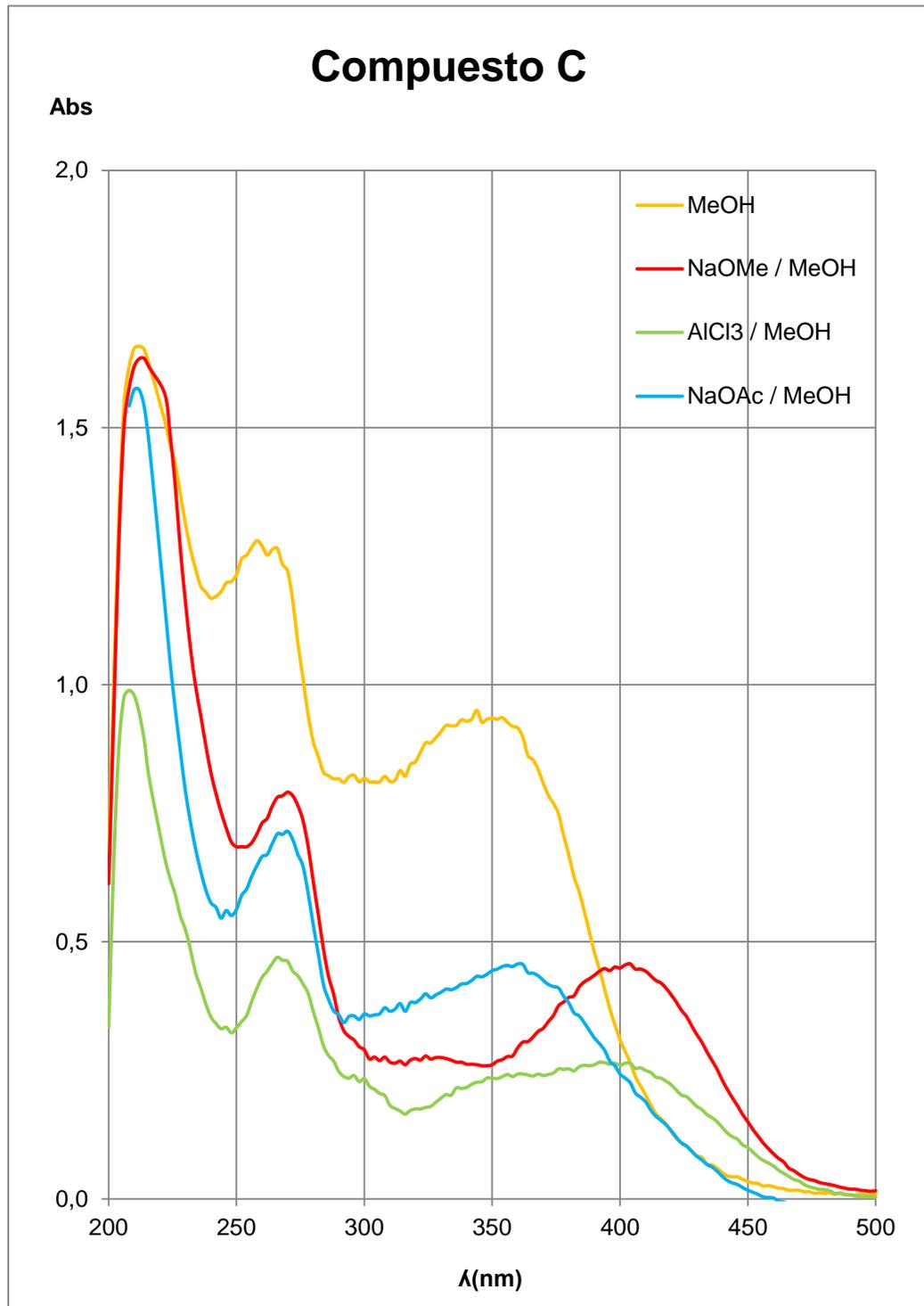


Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto C.

Caracterización del Compuesto D

El Compuesto D se purificó a partir de una cromatografía de columna de la subfracción SbD₁₋₆ empleando sílica gel como fase estacionaria y elución isocrática con una mezcla AcOEt-MeOH (99:1; v/v) como fase móvil. La unión de las fracciones 49-133 resultó en (13,5±0,1)mg de un puro denominado Compuesto D (Esquema 9). El mismo presentó un R_f de 0,49 en CCF desarrollada con AN2 y una coloración anaranjada por tratamiento con NP (Figura 20).

El Compuesto D se analizó por espectroscopía UV-Vis en etanol (EtOH), etóxido de sodio (NaOEt), acetato de sodio (NaOAc), acetato de sodio-ácido bórico (NaOAc/H₃BO₃), tricloruro de aluminio (AlCl₃) y tricloruro de aluminio-ácido clorhídrico (AlCl₃/HCl). Los espectros presentan los máximos de absorción entre 225nm y 405nm resumidos en la Tabla 13.

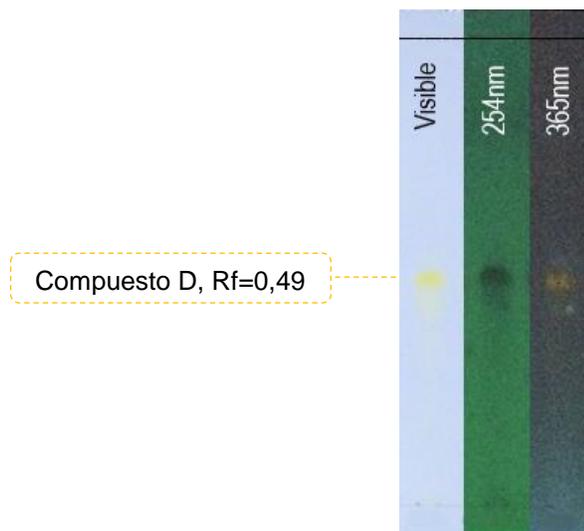


Figura 20. Placa de Compuesto D desarrollada con AN2 y revelada con NP.

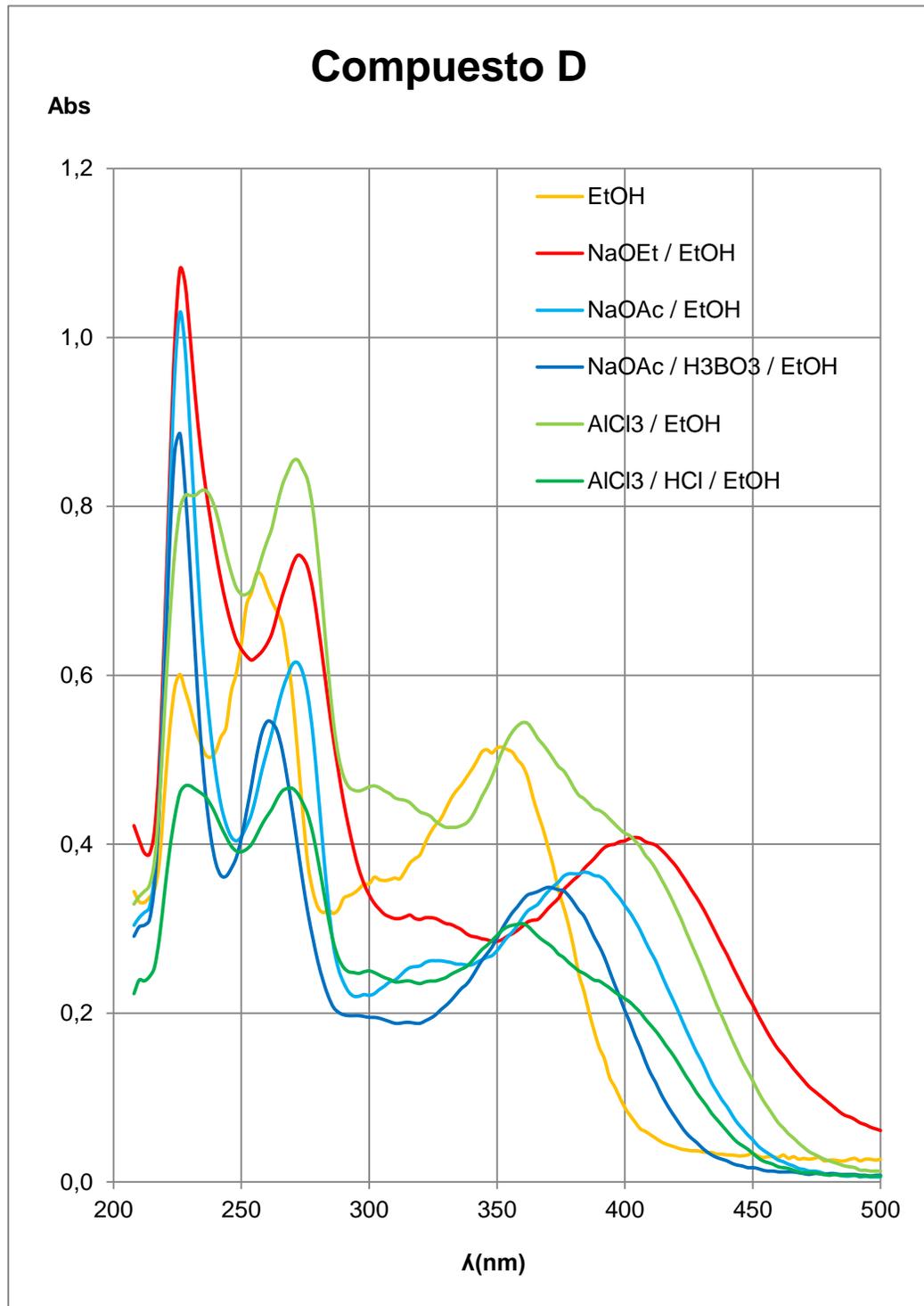


Figura 21. Espectros de absorción UV-Vis del Compuesto D.

El espectro de UV-Vis del Compuesto D en etanol (EtOH) presenta máximos a 353, 256 y 264nm (banda Ia, banda IIb y Ila, respectivamente) característicos de flavonoles 3-O-sustituídos (Figura 21, Tabla13).^{77a, 78a}

El desplazamiento batocrómico de la banda I ($\Delta\lambda_{\max}=52\text{nm}$) en NaOEt/EtOH se asocia a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4' y posible sustitución (-OR) en 3. Por otro lado, en NaOAc/EtOH el desplazamiento batocrómico de las bandas I y Ila ($\Delta\lambda_{\max}=31\text{nm}$ y $\Delta\lambda_{\max}=15\text{nm}$, respectivamente) sugieren grupos hidroxilo en las posiciones 4' y 7, mientras que en NaOAc/H₃BO₃/EtOH se observa un desplazamiento batocrómico de 13nm en la banda I que indica la presencia de grupo orto-hidroxilo en el anillo B (Figura 21, Tabla13).^{78a}

Tabla 13. Resumen de datos espectroscópicos en el UV-Vis para el Compuesto D según el medio.

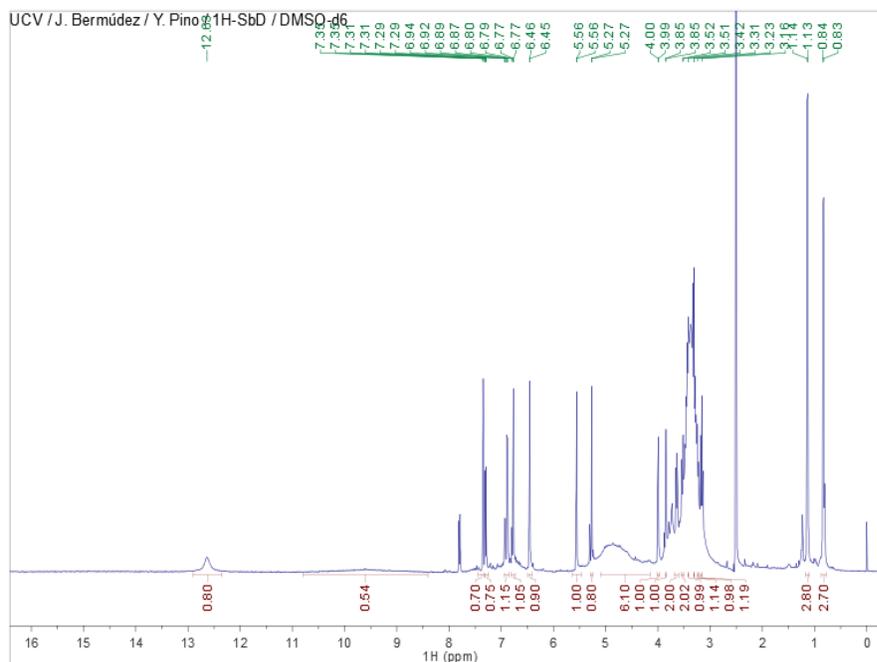
	Compuesto D λ_{\max} experimental [nm]			
	Ia	Ib	Ila	IIb
EtOH	353	305 sh	264 sh	256
NaOEt	405	316 sh	272	-
NaOAc	384	328 sh	271	-
H₃BO₃	371	303 sh	261	-
AlCl₃	392 sh	360	302 sh	271
HCl	389 sh	358	300 sh	269

Los espectros obtenidos para el Compuesto D en AlCl₃/EtOH y AlCl₃/HCl/EtOH presentan máximos de absorción a las mismas longitudes de onda, esto sugiere que la formación de complejo quelato no proviene de grupos orto-hidroxilo, sino únicamente de los que involucran al carbono 4. Así mismo, el desplazamiento batocrómico de 36nm de

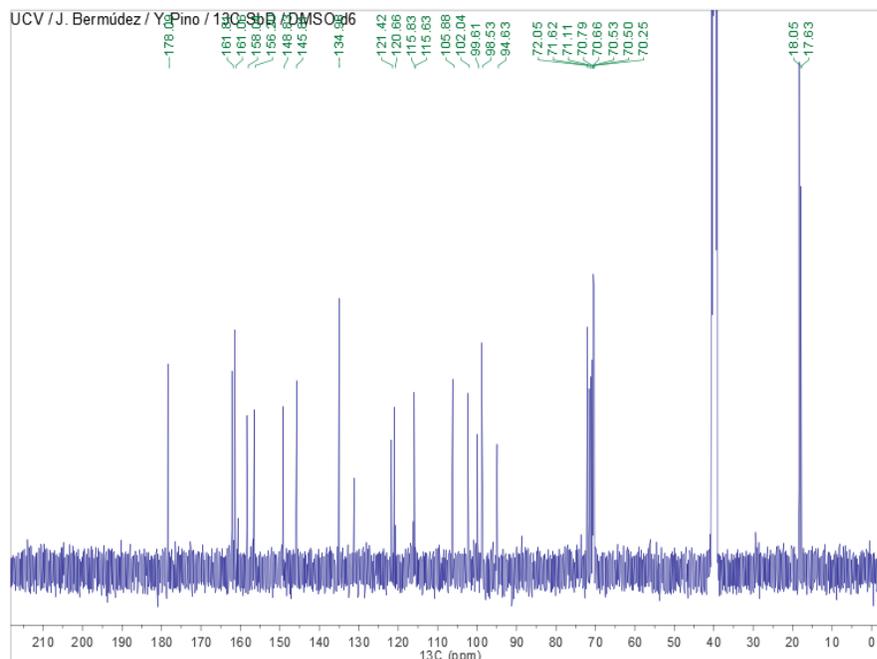
la banda la en medio ácido, comparada con la banda la en EtOH indica un posible 5-hidroxiflavonol sustituido en la posición 3 (Figura 21, Tabla13).^{78a}

Los datos obtenidos mediante CCF y espectroscopía UV-Vis sugieren que el Compuesto D corresponde a un 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol 3-O-sustituido.

La estructura del Compuesto D se determinó mediante análisis de RMN de ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y HSQC. Los datos espectroscópicos indican que el Compuesto D presenta un núcleo flavonoidal de quince átomos de carbono, cinco protones enlazados a carbonos en un sistema aromático, diez carbonos cuaternarios y doce carbonos adicionales correspondientes a dos glicósidos que sustituyen las posiciones 3 y 7 del flavonol (Espectros 13 y 14).



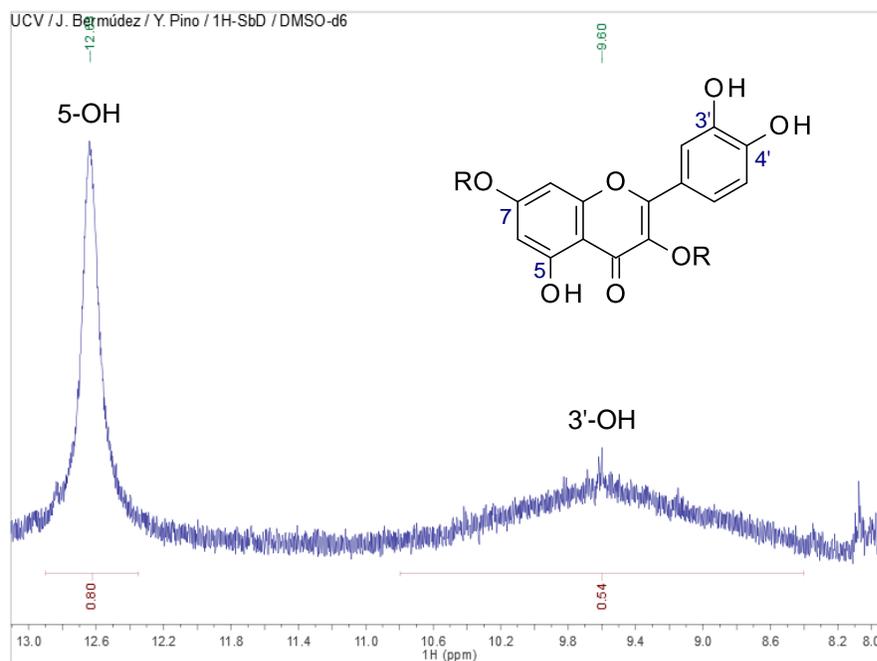
Espectro 13. RMN ^1H del Compuesto D.



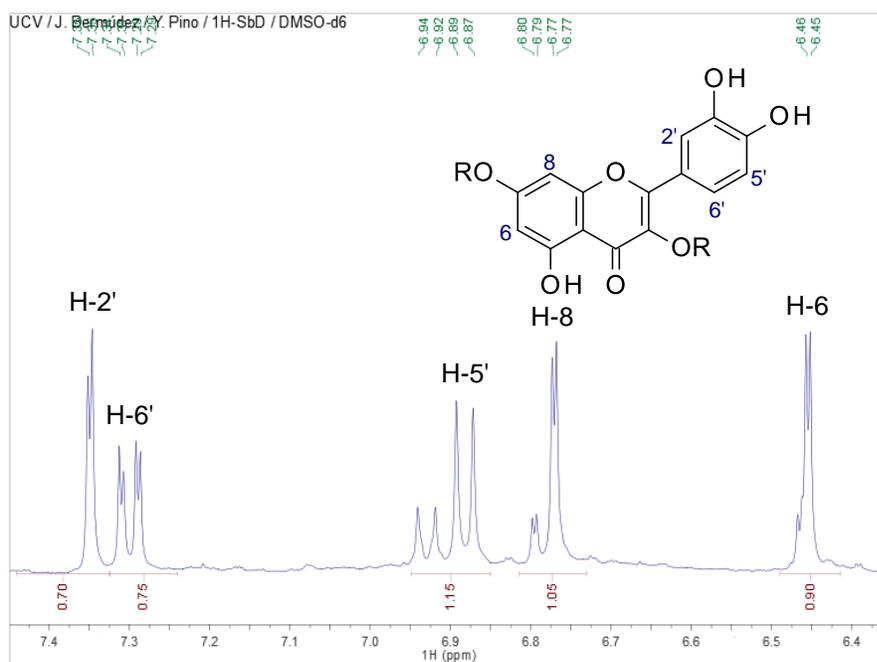
Espectro 14. RMN ^{13}C del Compuesto D.

En el espectro de RMN ^1H los grupos hidroxilo se presentan como una banda ancha (*br. s*) entre 8,40 y 9,80ppm que corresponde a 3'-OH y un singlete (*s*) en 12,64ppm asignado a 5-OH (Espectro 15).^{77b}

Los protones enlazados a los carbonos aromáticos se observan en el espectro de RMN ^1H entre 6,40 y 7,40ppm. Los protones del anillo A H-6 y H-8 se presentan como un par de dobletes (*d*) en 6,46ppm y 6,78ppm, respectivamente, ambos con una constante (J_{meta}) de 2,1Hz. Respecto al anillo B, el protón H-2' corresponde a la señal en 7,35ppm que se observa como un doblete (*d*) con constante de acoplamiento J_{meta} de 2,2Hz, el protón H-5' se presenta como un doblete (*d*) en 6,90ppm ($J_{orto}=8,2\text{Hz}$) y el protón H-6', acoplado con H-2' y 5' corresponde al doblete de dobletes (*dd*) en 7,30ppm ($J_{orto}=8,2\text{Hz}$ y $J_{meta}=2,2\text{Hz}$) (Espectro 16).^{77b}

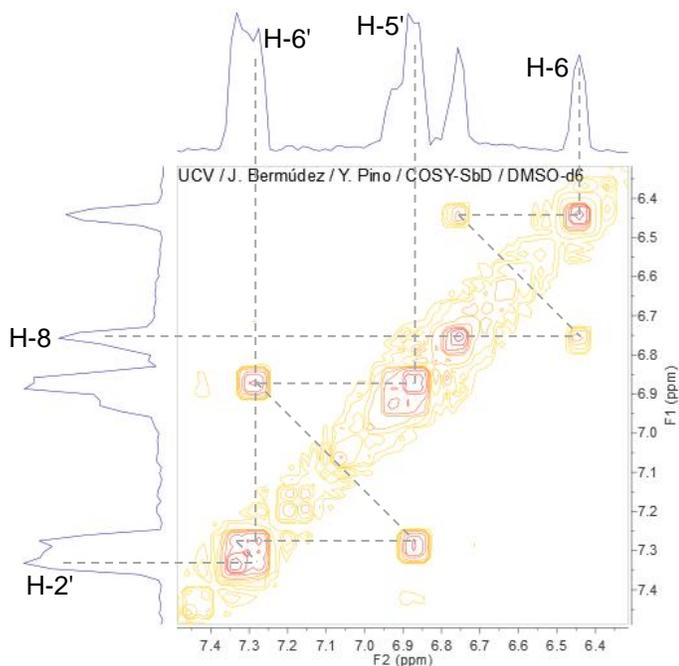


Espectro 15. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 8,0-13,0ppm.



Espectro 16. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 6,4-7,4ppm.

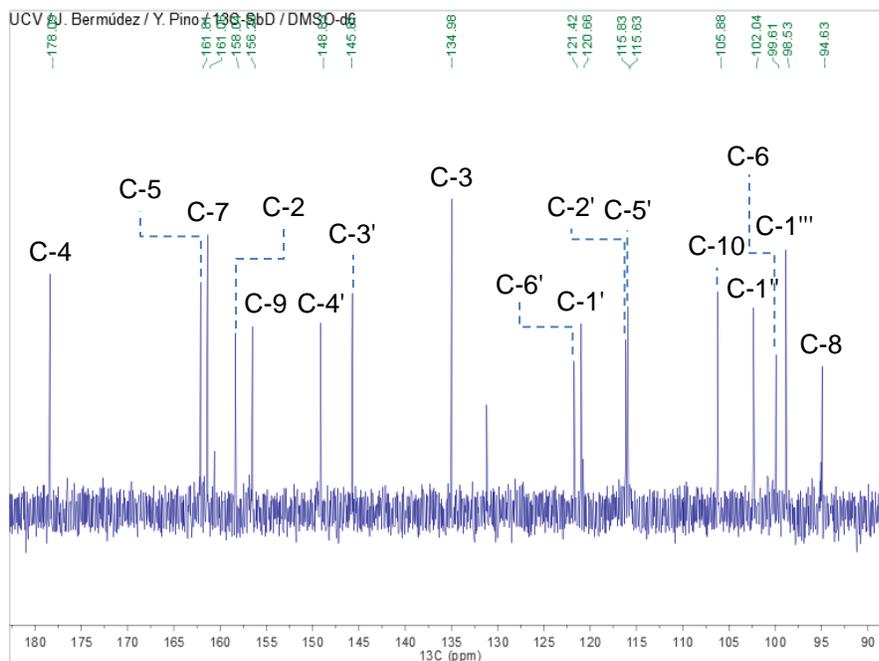
El espectro ^1H - ^1H COSY muestra los acoplamientos de los protones enlazados a carbonos aromáticos, tanto en el anillo A entre H-6 y 8, como en el anillo B entre C-2', 5' y 6' (Espectro 17).



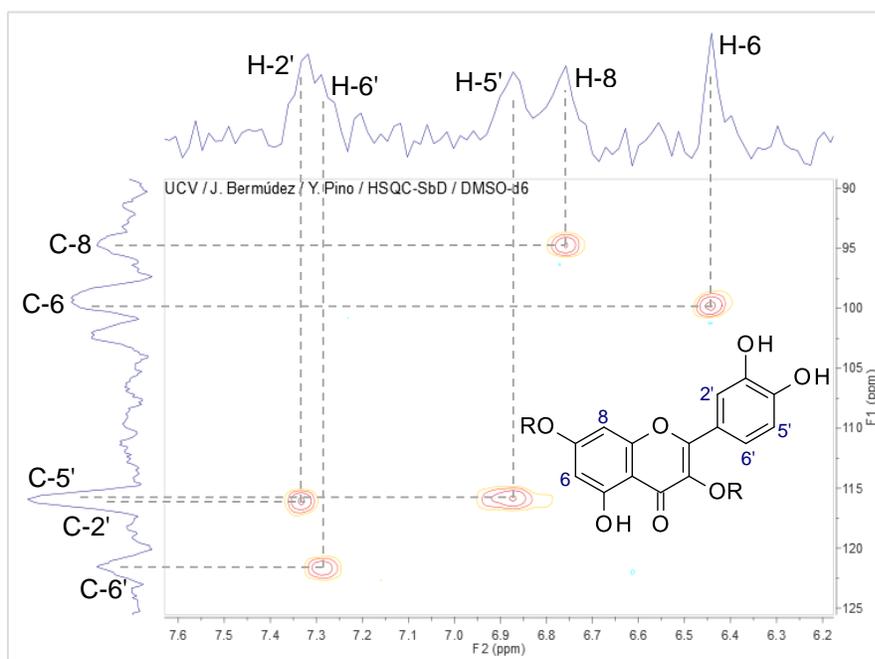
Espectro 17. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 6,4-7,4ppm.

En el espectro RMN ^{13}C se asignan las señales en 158,0, 135,0 y 178,1ppm a los carbonos que conforman el anillo C, C-2, C-3 y C-4, la señal en 161,0ppm corresponde a C-7-O-glicósido y los desplazamientos de 145,8, 148,8 y 161,8ppm a los carbonos enlazados a grupo hidroxilo C-3', 4' y 5 (Espectro 18).^{77b}

En el RMN ^1H - ^{13}C HSQC se observan los acoplamientos de los carbonos aromáticos no cuaternarios C-6, 8, 2', 5' y 6' en 99,6, 94,6, 115,8, 115,6 y 121,4ppm, respectivamente (Espectro 19).^{77b}



Espectro 18. RMN ¹³C del Compuesto D. Ampliación 90,0-180,0ppm.



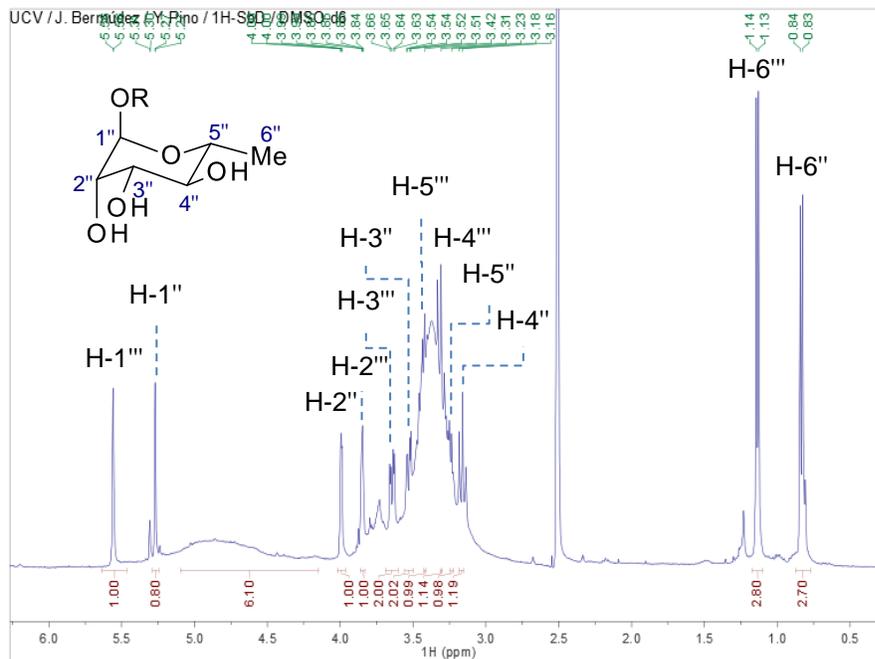
Espectro 19. RMN ¹H-¹³C HSQC del Compuesto D. Ampliación 6,2-7,6ppm/90,0-125,0ppm.

Por lo anterior, se propone que el núcleo flavonoidal del Compuesto D corresponde a quercetin-3,7-O-diglicosido

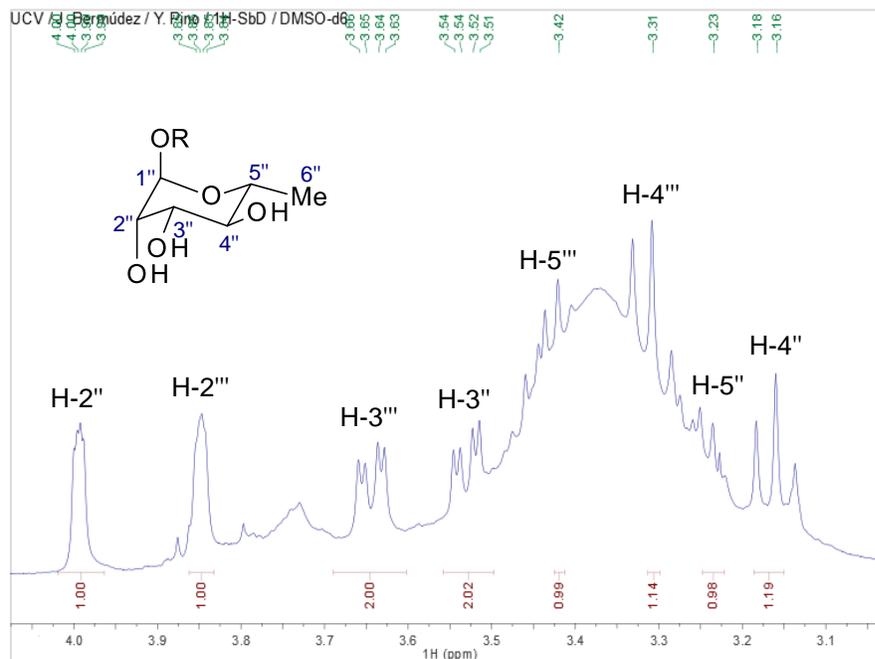
Los desplazamientos correspondientes a los protones en los residuos de glicósido se observan en el espectro de RMN ^1H , en la región comprendida entre 0,80 y 5,60ppm, presentándose los protones de los grupos hidroxilo como bandas anchas entre 4,20 y 5,05ppm. Los protones enlazados a los carbonos anoméricos H-1'' y H-1''' se observan como dobletes (*d*) en 5,27 ($J=1,6\text{Hz}$) y 5,56ppm ($J=1,8\text{Hz}$), respectivamente, por el acoplamiento de H-1'' con H-2'' y de H-1''' con H-2'''. Los protones de los dos grupos metilo asignados a las posiciones 6'' y 6''' corresponden a las señales en 0,83 y 1,14ppm, respectivamente, como dobletes (*d*) de 6,1Hz por el acoplamiento de H-6'' con H-5'' y de H-6''' con H-5''' (Espectro 20).^{77b}

Así mismo, el protón H-2'' es asignado al doblete de dobletes (*dd*) en 3,99ppm con $J=1,7\text{Hz}$ por el acoplamiento con H-1'' y $J=3,3\text{Hz}$ por su acoplamiento con el protón H-3'', éste último se observa como un doblete de dobletes (*dd*) en 3,53ppm con constantes de acoplamiento de $J_{3''-2''}=3,3\text{Hz}$ y $J_{3''-4''}=9,3\text{Hz}$. Por otro lado, los protones H-4'' y 5'' se observan como parte de un multiplete (*m*) entre 3,10-3,45ppm, aproximadamente, solapadas con la banda de agua que contamina al solvente (DMSO-*d*6). Sin embargo, H-4'' se encuentra cercano a la señal en 3,17ppm con dos constantes (J) de 9,3Hz por el acoplamiento tanto con H-3'' como con H-5'', que se halla alrededor de 3,23ppm (Espectro 21).^{77b}

El protón H-2''' se observa en 3,85ppm como un doblete de dobletes (*dd*) con constantes de acoplamiento $J_{2'''-1'''}=1,8\text{Hz}$ y $J_{2'''-3'''}=3,3\text{Hz}$, mientras que el protón H-3''' corresponde al doblete de dobletes (*dd*) en 3,64ppm con constantes de acoplamiento $J_{3'''-2'''}=3,3\text{Hz}$ y $J_{3'''-4'''}=9,3\text{Hz}$. Finalmente, los protones H-4''' y 5''' se encuentran en el multiplete (*m*), cercanos a 3,31 y 3,42ppm, respectivamente. (Espectro 21).^{77b}



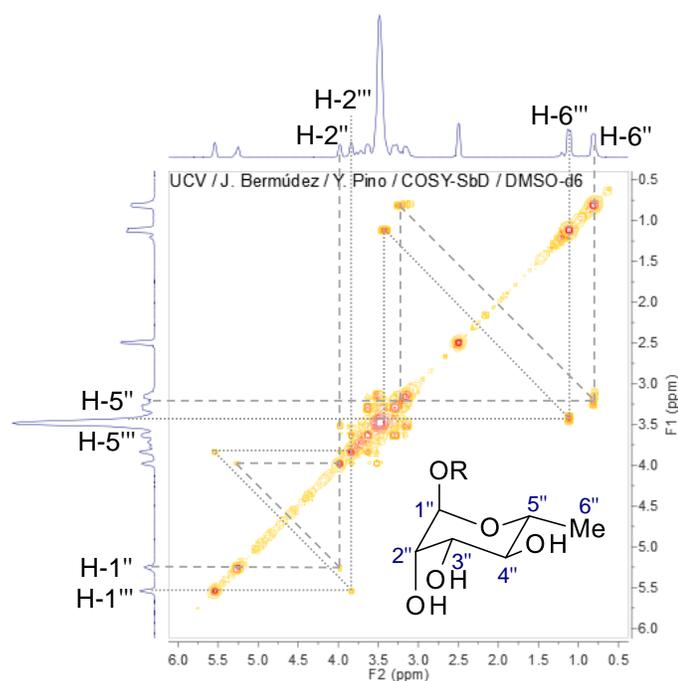
Espectro 20. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 0,5-6,0ppm.



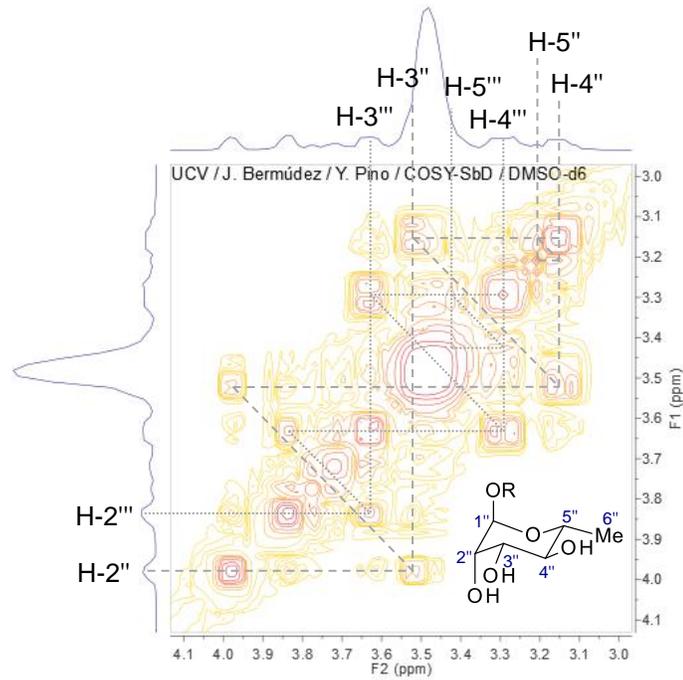
Espectro 21. RMN ^1H del Compuesto D. Ampliación 3,1-4,0ppm.

En el espectro de correlación ^1H - ^1H COSY se pueden observar claramente los acoplamientos de H-1'' con 2'', H-4'' con 5'', H-6'' con 5'', H-1''' con 2''', H-2''' con 3''' y H-3''' con 4'''. Debido al solapamiento de las señales con la banda del agua no se observa el acoplamiento de los protones 3'' (con H-2'' y 4'') y 5''' (con H-4''' y 6''') (Espectros 22 y 23).

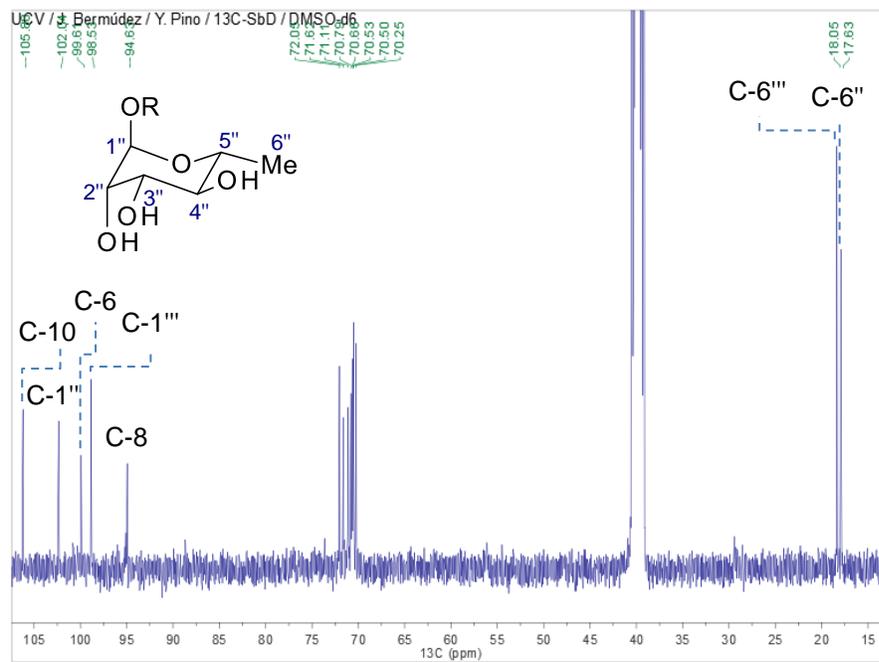
El espectro de RMN ^{13}C del Compuesto D muestra señales en 102,04, 98,53, 17,63 y 18,05ppm, correspondientes a los protones H-1'', 1''', 6'' y 6''', respectivamente, los protones H-2'', 3'', 4'', 5'', 2''', 3''', 4''' y 5''' se observan entre 69,90 y 71,80ppm, la correlación entre los protones y carbonos se establece a partir del espectro HSQC, el cual permite identificar los glicósidos que sustituyen las posiciones 3 y 7 del flavonol como α -L-ramnósido (Espectros 24, 25 y 26).^{77b}



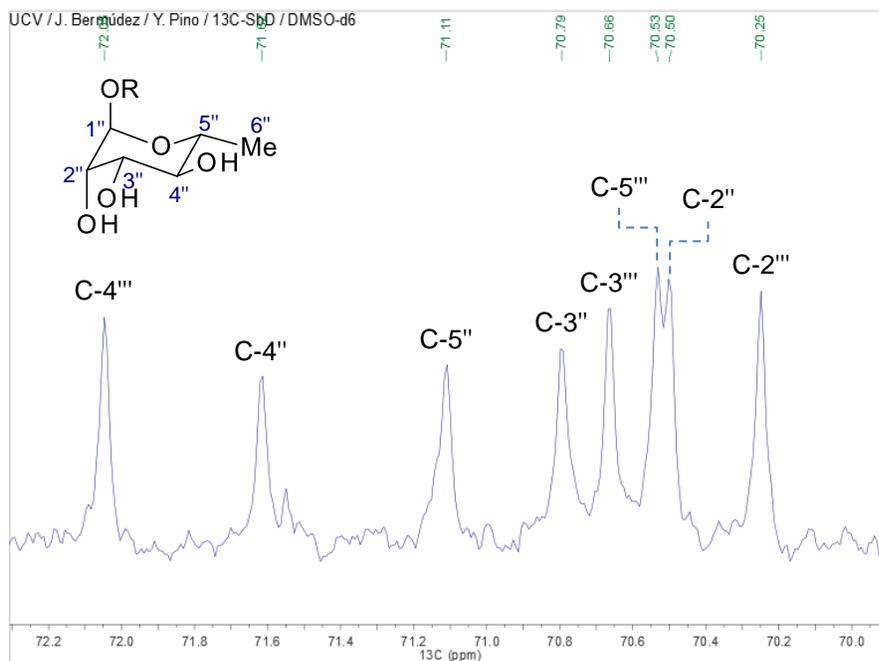
Espectro 22. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 0,5-6,0ppm.



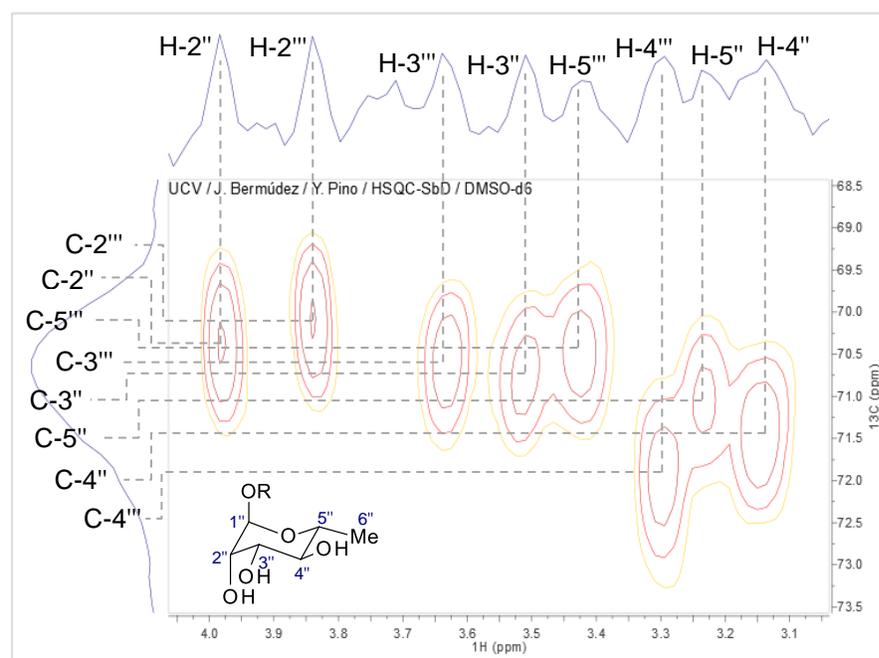
Espectro 23. RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D. Ampliación 3,0-4,1ppm.



Espectro 24. RMN ^{13}C del Compuesto D. Ampliación 15,0-105,0ppm.



Espectro 25. RMN ^{13}C del Compuesto D. Ampliación 70,0-72,2ppm.



Espectro 26. RMN HSQC del Compuesto D. Ampliación 3,1-4,0ppm/68,5-73,5ppm.

El análisis de los espectros de RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY y HSQC permite inferir que el Compuesto D corresponde a quercetina-3,7- O - α -L-diramnósido. La comparación de los datos experimentales con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se muestra en las tablas 14 y 15. (Figura 22).⁸⁰

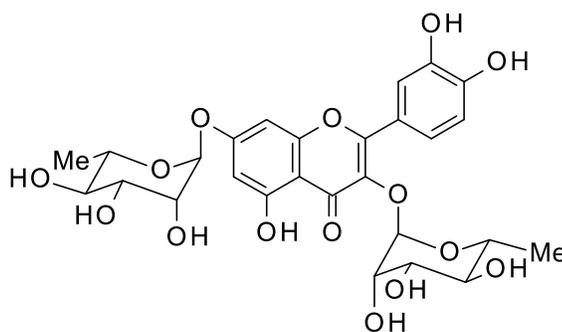


Figura 22. Estructura química del compuesto Quercetina-3,7- O - α -L-diramnósido aislado de la fracción SbD₁₋₆.

Tabla 14. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H y ^1H - ^1H COSY del Compuesto D y quercetina-3,7- O - α -L-diramnósido.⁸⁰

	Quercetina-3,7- O - α -L-diramnósido en DMSO- d_6 a 400MHz	Compuesto D en DMSO- d_6 a 400MHz	
H	δ REPORTADO [ppm] (<i>m</i> ; J[Hz])	δ EXPERIMENTAL [ppm] (<i>m</i> ; J[Hz])	COSY
H-5	12,66 (s)	12,63 (s)	
H-6	6,44 (<i>d</i> ; 1,9)	6,46 (<i>d</i> ; 2,1)	H-8
H-8	6,76 (<i>d</i> ; 1,9)	6,78 (<i>d</i> ; 2,1)	H-6
H-2'	7,34 (<i>d</i> ; 1,9)	7,35 (<i>d</i> ; 2,2)	H-6'
H-5'	6,87 (<i>d</i> ; 8,3)	6,90 (<i>d</i> ; 8,5)	H-6'
H-6'	7,29 (<i>dd</i> ; 8,3/1,9)	7,30 (<i>dd</i> ; 8,3/2,2)	H-5', H-2'
H-1''	5,26 (s)	5,27 (<i>d</i> ; 1,6)	H-2''
H-2''	3,84 (<i>m</i>)	3,99 (<i>dd</i> ; 3,3/1,7)	H-1'', H-3''

H-3''	3,52 (<i>m</i>)	3,53 (<i>dd</i> ; 9,1/3,3)	H-2'', H-4''
H-4''	3,15 (<i>d</i> ; 9,4)	3,17 (<i>m</i> ; 9,3, 9,3)	H-3'', H-5''
H-5''	3,23 (<i>dd</i>)	3,23 (<i>m</i>)	H-4'', H-6''
H-6''	0,82 (<i>d</i> ; 6,1)	0,83 (<i>d</i> ; 6,1)	H-5''
H-1'''	5,55 (<i>s</i>)	5,56 (<i>d</i> ; 1,8)	H-2'''
H-2'''	3,98 (<i>m</i>)	3,85 (<i>dd</i> ; 3,3/1,8)	H-1''', H-3'''
H-3'''	3,63 (<i>dd</i> ; 9,1/2,9)	3,64 (<i>dd</i> ; 9,3/3,3)	H-2''', H-4'''
H-4'''	3,30 (<i>m</i>)	3,31 (<i>m</i>)	H-3''', H-5'''
H-5'''	3,50 (<i>m</i>)	3,42 (<i>m</i>)	H-4''', H-6'''
H-6'''	1,13 (<i>d</i> ; 6,1)	1,14 (<i>d</i> ; 6,1)	H-5'''

Tabla 15. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C y HSQC del Compuesto D y quercetina-3,7-O- α -L-diramnósido.⁸⁰

C	Quercetina-3,7-O- α -L-diramnósido en DMSO-d ₆ a 100MHz	Compuesto D en DMSO-d ₆ a 100MHz	HSQC
	$\delta_{\text{REPORTADO}}$ [ppm]	$\delta_{\text{EXPERIMENTAL}}$ [ppm]	
2	157,8	158,0	
3	134,5	135,0	
4	177,9	178,1	
5	161,9	161,8	
6	101,9	99,6	H-6
7	160,9	161,0	
8	94,3	94,6	H-8
9	156,0	156,2	
10	105,7	105,9	

1'	121,2	120,7	
2'	115,2	115,8	H-2'
3'	145,2	145,8	
4'	148,6	148,8	
5'	115,7	115,6	H-5'
6'	120,5	121,4	H-6'
1''	99,4	102,0	H-1''
2''	70,2	70,5	H-2''
3''	70,6	70,8	H-3''
4''	71,6	71,6	H-4''
5''	70,0	71,1	H-5''
6''	17,9	17,6	H-6''
1'''	98,4	98,5	H-1'''
2'''	70,1	70,2	H-2'''
3'''	70,3	70,7	H-3'''
4'''	71,1	72,0	H-4'''
5'''	69,8	70,5	H-5'''
6'''	17,5	18,0	H-6'''

Caracterización del Compuesto E

La fracción SbB ($1,0807 \pm 0,0001\text{g}$) se sometió a purificación con Carbón activado-Celite 545 (2:1; m/m). El procedimiento originó dos fracciones, SbB₁ producto de la elución con CH₂Cl₂ y SbB₂ producto de la elución con MeOH (Esquema 10, Tabla 7).

Las fracciones SbB_1 y SbB_2 fueron comparadas con patrones de lupeol y β -sitosterol mediante CCF desarrolladas en AN6 y reveladas con AS, observándose varias bandas correspondientes a metabolitos secundarios mayoritarios, entre ellos los terpenos lupeol y β -sitosterol, además del Compuesto E con un factor de retención de 0,82. Por otro lado, se observó que las fracciones SbB_1 y SbB_2 tienen el mismo perfil en CCF, razón por la cual fueron unidas obteniéndose la fracción $SbBi$ (Figura 23).

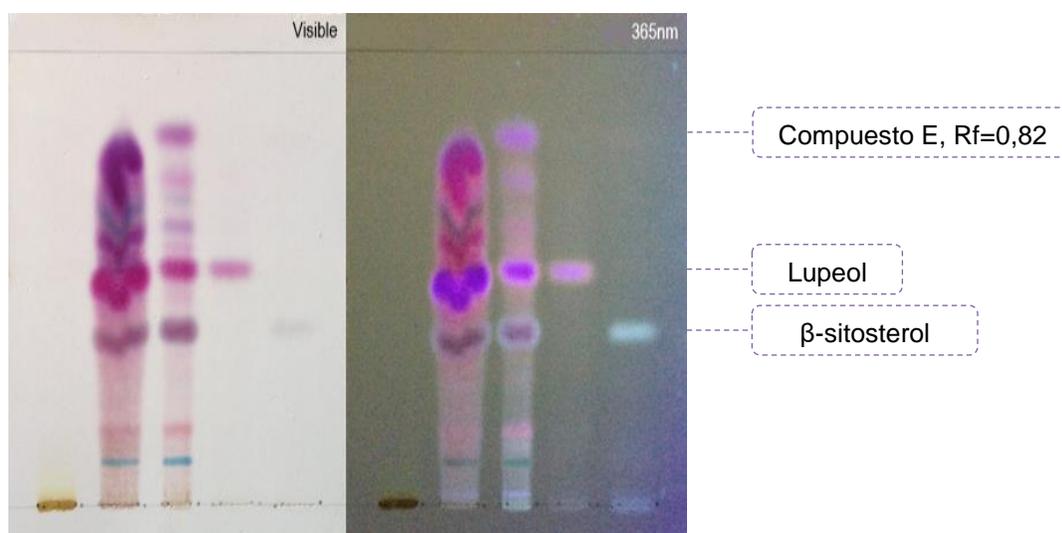


Figura 23. Placa comparativa de fracciones SbB_1 , SbB_2 , lupeol y β -sitosterol en AN6 y AS.

El compuesto E presente en $SbBi$ se purificó mediante cromatografía de columna sembrando $(870,1 \pm 0,1)$ mg sobre un lecho de $(86,9723 \pm 0,0001)$ g de sílica gel como fase estacionaria y elución isocrática con una mezcla Hex-AcOEt (98:2; v/v) como fase móvil. La unión de las fracciones 10-61 resultó en $(33,4 \pm 0,1)$ mg del compuesto E puro. Esta muestra fue disuelta en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) y enviada a analizar por resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo la estructura del Compuesto E no pudo ser identificada.

CONCLUSIONES

- Se aislaron cuatro fracciones de interés (SbD₁₋₂, SbD₁₋₅, SbD₁₋₆ y SbBi) a partir del extracto metanólico (Sb-EMeOH) de *S. bredemeyeri*, de las cuales se purificaron cuatro flavonoides y un terpeno.
- De la subfracción SbD₁₋₂, se se aislaron dos solidos amarillentos, Quercitrina y un flavonoide del tipo 4',5,7-trihidroxi-flavona.
- De la subfracción SbD₁₋₅, se aisló un sólido amarillento que corresponde a un flavonoide del tipo 3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol sustituido en la posición 3.
- De la subfracción SbD₁₋₆, se aisló un sólido amarillento que se identificó como Quercetina-3,7-O- α -L-diramnósido.
- De la subfracción SbBi se aisló un sólido blanco denominado Compuesto E, de tipo terpenoidal, que no pudo ser identificado. Además, se identificaron los compuestos terpenoidales Lupeol y β -sitosterol mediante cromatografía en capa fina.

RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio fitoquímico de la especie *Strychnos bredemeyeri*, debido al alto contenido en metabolitos secundarios de tipo flavonoidal y terpenoidal, especialmente saponinas.
- Con la finalidad de identificar los compuestos flavonoidales mayoritarios realizar el estudio fitoquímico a partir de una mayor cantidad de la fracción SbD.
- Con base en la amplia actividad biológica reportada en la literatura para compuestos flavonoidales, realizar ensayos biológicos con los compuestos A, C, Quercitrina y Quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido aislados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pino-Rodriguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodriguez, M. E., Molina-Torres, J. Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm Bonaer.* 2004; 2(23): 252.
2. Seigler D. S. *Plant Secondary Metabolism*. Springer Science+Business Media, LLC. 1th ed. New York: 199: 3.
3. Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh D., Gupta A. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. J Pharmacogn Phytochem. 2013;1(6):168-169.
4. Taiz L., Zeiger E. *Fisiología vegetal*. Publicacions de la Universitat Jaume I, D. L. 3rd ed. Castelló de la Plana: 2006; 1: 533-534.
5. Marcano D., Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*. 2da Edición. Caracas: CDCH-UCV; 2002: a. 32, 34; b. 361, 362, 368; c. 117; d. 138; e. 139; f. 380.
6. Ormeño E., Fernández C. Los terpenos de las plantas. *Investigación y Ciencia*. 2012:64-66.
7. Breitmaier E. *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. 2th ed. Germany: 2006: a. 3-4; b. IX.
8. Degenhardt J., Köllner T. G., Gershenzon J. Review Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. 2009;70:1621.
9. Zhang H., Qiu M., Chen Y., Chen J., Sun Y., Wang C., et al. *Phytochemistry and Pharmacognosy - Plant Terpenes*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). 2008: 6.
10. Vincken J., Heng L., De Groot A., Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, a review. *Phytochemistry*. 2007;68:276.
11. Li Z., Wang Q., Ruan X., Pan C., Jiang D. Phenolics and Plant Allelopathy, a review. *Molecules*. 2010;15:8933-8935.
12. Ozcan T., Akpınar-Bayazit A., Yılmaz-Ersan L., Delikanlı D. Phenolics in Human Health. *Int J Chem Eng Appl*. 2014;5(5):393, 394.
13. Dai J., Mumper R.. *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties Review*. *Molecules*. 2010;15:7314.
14. Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press in Elsevier Inc.. 2016;1: a. 97, 98, 100; b.103.
15. Hassler M. *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Sprague & Sandwith [Species details in internet] *Catalogue of Life*. World Plants; 2019 [cited 2019 May 1th]. Latest taxonomic scrutiny: Nov-2018. Available from: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/6ff9b9d6f1e4476501f1f171d63ef580>

16. The Plant List (2013). Version 1.1. Species details: *Strychnos bredemeyeri* (Schult.) Sprague & Sandwith. Record: kew-2597815. [Internet]. [accessed 2019 May 1th]. Available from: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2597815?ref=tpl1>
17. Encyclopedia of Life. Species media: *Strychnos darienensis* (Devildoer). [Internet]. [accessed 2019 May 1th]. Available from: <http://eol.org/pages/5344871/media>
18. Frasier C. L. Evolution and Systematics of the Angiosperm order Gentianales with an In-Depth focus on Loganiaceae and its species-rich and toxic genus *Strychnos* [dissertation]. New Brunswick: The State University of New Jersey. 2008:40-41.
19. Global Biodiversity Information Facility (GBIF) [Internet]. [cited 2019 May 1th]. Available from: https://www.gbif.org/occurrence/map?taxon_key=5645675
20. Vinckier S., Smets E. Morphology, ultrastructure and typology of orbicules in Loganiaceae s.l and related genera, in relation to systematics. Elsevier Review of Palaeobotany and Palynology. 2002;119:162-163.
21. Mancebo M. Estudio fitoquímico de las hojas y corteza de *Strychnos fendleri* Sprague & Sandwith [tesis]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias; 2014: a. 3; b. 29; c.30; d. 8; e. 11-13; f. 10, 12, 14, 17-18, 22-28.
22. Gupta R. C. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2th ed. London: Elsevier Inc.; 2015:215.
23. Philippe G., Angenot L., Tits M., Frédéric M. Review: About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. Toxicon. 2004;44:406.
24. Krukoff B. A., Barneby R. C. El Género *Strychnos* en Venezuela. Acta Bot. Venez. 9 (1-4). 1974:66-68,88-89.
25. Quetin-LeClerc J., Angenot L., Bisset N. Review: South American *Strychnos* species. Ethnobotany (except Curare) and Alkaloid Screening. J Ethnopharmacol. 1990;28: a. 44; b. 39-42; c. 32-36; d. 14; e. 32; f. 15; g. 19; h. 13; i. 17, 18; j. 20, 21, 22; k. 28-31; l. 34; m. 37-40.
26. Rajesh P., Rajesh Kannan V., Latha S., Selvamani P. Phytochemical and Pharmacological Profile of Plants belonging to *Strychnos* Genus: A Review. Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine. 2010;1: a. 276,321; b. 278, 279; c. 277, d. 316.
27. Suárez A. I., Mancebo M., Delle Monache F., Tirri M. M., Sojo F., Arvelo F., et al. A new indole-alkaloid and a new phenolic-glycoside with cytotoxic activity from *Strychnos fendleri*. Nat Prod Lett. 2015:1-3.
28. Quetin-Leclercq J., Llabres C., Warin R., Belem-Pinheiro M. L., Mavar-Manga H., Angenot L. Guianensine, a zwitterionic alkaloid from *S. guianensis*. Phytochemistry. 1995;40(5):1557,1558.

29. Penelle J., Tits M., Christen P., Molgo J., Brandt V., Frederich M., et al. Quaternary indole alkaloids from the stem bark of *Strychnos guianensis*. *Phytochemistry*. 2000;53:1057.
30. Silva M. A., Souza-Brito A. R., Hiruna-Lima C. A., Santos L. C., Sannomiya M., Vilegas W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. *Braz J Pharmacognosy*. 2005;15(3):259-261.
31. Mavar-Manga H., Quetin-Leclercq J., Llabres G., Belem-Pinheiro M., Imbiriba A. F., Angenot L. 9-methoxygeissoschizol, an Alkaloid from Bark of *Strychnos guianensis*. *Phytochemistry*. 1996;43(5):1125.
32. Penelle J., Tits M., Christen P., Molgo J., Brandt V., Frederich M., Angenot L. Guiaflavine, a New Bisindole Quaternary Alkaloid from the Stem Bark of *Strychnos guianensis*. *J Nat Prod*. 1999;62:898.
33. Penelle J., Christen P., Molgó J., Tits M., Brandt V., Frederich M., Angenot L. 5',6'-Dehydroguiachrysine and 5',6'-Dehydroguiaflavine. Two curarizing quaternary indole alkaloids from the stem bark of *Strychnos guianensis*. *Phytochemistry*. 2001;58:619, 624.
34. Honorio-Franca A. C., Ferreira C. M., Boldrini F., Luzia E. F. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* St. Hill.). *Acta Cir Bras*. 2008;23(6):505, 506, 507, 508, 509.
35. Bonamin F., Moraes T. M., Kushima H., Silva M. A., Rozza A. L., Pellizzon C. H., et al. Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing from alkaloid fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hill. (Loganiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2011;138: a. 52; b. 48-51.
36. Delle Monache F., Poce A., Marini-Bettolo G. B. The occurrence of Nor-dihydrotoxiferine in *Strychnos pseudo-quina* A. St. Hil. *Tetrahedron Letters*. 1969;25:2009-2010.
37. Nicoletti M., Goulart M. O., De Lima R. A., Goulart A. E., Delle Monache F., Marini-Bettolo G. B. Flavonoids and Alkaloids from *S. pseudo-quina*. *J Nat Prod*. 1984;47(6):953-355.
38. Da Silva M. A., Murino B. P., Hiruma-Lima C. A., Monteiro L. R., Vilegas W. Evaluation of *Strychnos pseudo-quina* St. Hil. Leaves Extract on Gastrointestinal Activity in Mice. *Chem Phram Bull* 2005;53(8):881,882,884.
39. Sousa P., Rocha de Andrade P. H., De Santana A., Chavez M. A., Garcia D., Costa M., et al. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present an Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. *Hindawi*. 2013:1-3,6-8.
40. Santos F. V., Colus I. M., Silva M. A., Vilegas W., Varanda E. A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:1585,1588,1589.
41. Galeffi C. New trends in the separation of active principles from plants. *J Ethnopharmacol*. 1980;2: 131.

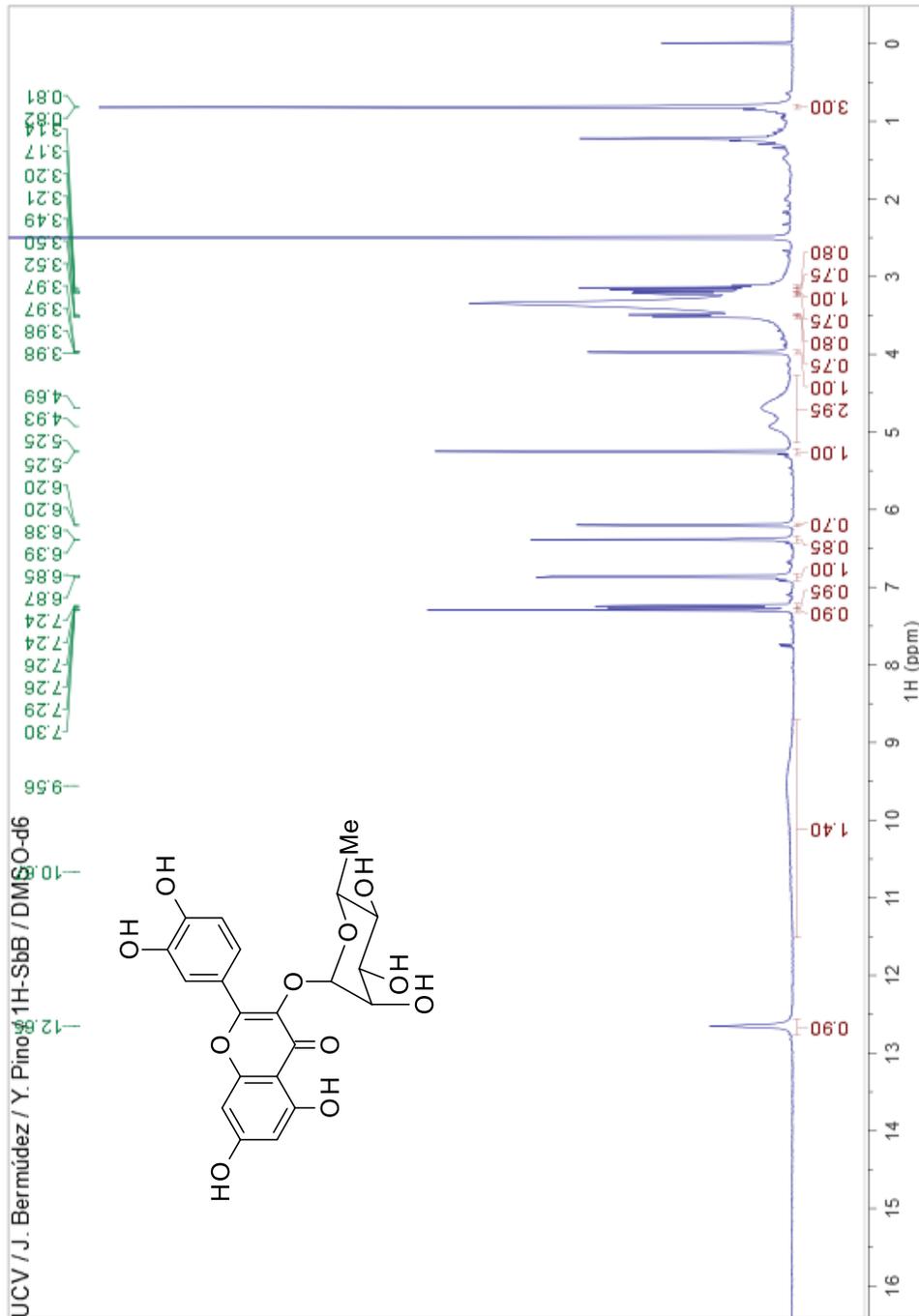
42. Mukherjee R., da Silva T. M., Guimaraães J. B., Oliveira E. J., Keifer P. A., Shoolery J. N.. Tertiary Alkaloid Fraction of the *Strychnos atlantica*: Confirmation of de Identity and Structures of Indole Alkaloids by High Field Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Phytochemical Analysis*. 1997;8:116.
43. Oliveira E. J., Medeiros I. A., Mukherjee R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. *Phytomedicine*. 1996;3(1):45.
44. Iwataki I., Comin J. Studies on Argentine Plants – XXXI: Alkaloids from *Strychnos brasiliensis*. *Tetrahedron*. 1971;27:2541-2543,2541-2543.
45. Mukherjee R., da Silva B. A., de Araújo A. P. Bisnordihydrotoxiferine and Vellosimine from *Strychnos divaricans* Root: Spasmolytic Properties of Bisnordihydrotoxiferine. *Phytotherapy Research*. 1993;7:419.
46. Mukherjee R., da Silva B. A., Das B. C., Keifer P. A., Shoolery J. N. Structure and stereochemistry of divaricine, a new bisindole alkaloid from *S. divaricans* ducke. *Heterocycles* 1991;32(5):985-990.
47. Mukherjee R., Das B. C., Keifer P. A., Shoolery J. N.. Structure and stereochemistry of Divarine, another new bisindole alkaloid from *S. divaricans* ducke. *Heterocycles*.1994;38(9):1965-1970.
48. Forgacs P., Jehanno A., Provost J., Thal C., Guilhem J., Pascard C., Moretti C. An Indole Alkaloid from *Strychnos erichsonii*. *Phytochemistry*. 1986;25(4):969-971.
49. Galeffi C., Marini-Bettolo G. B. The Alkaloids of *Strychnos hirsuta* Spruce. Ex Bentham.: Two new β -carbolinic Alkaloids, Strychnohirsutine and Tetradehydrostrychnohirsutine. *Tetrahedron*. 1981;37(18):3167, 3469.
50. Angenot L., Belem-Pinheiro M. L., Imbiriba da Rocha A. F., Poukens-Renwart P., Quetin-Leclercq J. An Indolinic Cryptoalkaloid from *Strychnos mattogrossensis*. *Phytochemistry*. 1990;29(8):2746,2748-2749.
51. Belem-Pinheiro M. L., Couceiro P. R, da Rocha A. F., Q. Monte F. J., Villar J. D. A new Strychnobrasiline base of *Strychnos mattogrossensis*. *Nat Prod Lett*. 2002;16(4):229-232.
52. Borris R. P., Guggisberg A., Hesse M. The Structure of Melinonine-E, a Quaternary Indole Alkaloid from *Strychnos melinoniana* Baillon. *Helvetica Chimica Acta*. 1984. Fasc. 2. Pag. 455-459.
53. Aponte J. C., Vaisberg A. J., Rojas R., Caviedes L., Lewis W. H., Lamas G., et al. Isolation of Cytotoxic Metabolites from Targeted Peruvian Amazonian Medicinal Plants. *J Nat Prod*. 2008;71:102-104.
54. Marini-Bettolo G. B., Galeffi C., Nicoletti M., Messana I. Alkaloids of *Strychnos rubiginosa*. *Phytochemistry*. 1980;19:992-994.
55. Da Silva T. M. S., Da Silva B. A., Mukherjee R. The monoterpene alkaloid cantleyina from *Strychnos trinervis* root and its spasmolytic properties. *Phytomedicine*. 1999;6(3):169-174.

56. Melo Diniz M., da Silva B. A., Mukherjee R. Spasmolytic actions of the new indole alkaloid Trinervine from *Strychnos trinervis* root. *Phytomedicine*. 1994;1:205-207.
57. De Medeiros C. L. C., Thomas G., Mukherjee R. The Source of Ca²⁺ for the Spasmolytic Actions of Longicaudatine, a Bisindole Alkaloid Isolated from *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart. (Loganiaceae). *Phytotherapy Research*. 1991;5(1):24-28.
58. Melo F. F., Santos M., Chiappeta A., Melo J. F., Mukherjee R. Chemistry and Pharmacology of a Tertiary Alkaloid from *Strychnos trinervis* root bark. *J Ethnopharmacol*. 1987;19:319-324.
59. Melo M., Thomas G., Mukherjee R. Antidiarrhoeal activity of bisnordihidrotoxiferine isolated from the root bark of *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart. (Loganiaceae). *J Pharm Pharmacol*. 1988;40(1):79-82.
60. Jiang H., Ma S., Li Y., Liu Y., Li L., Qu J., et al. Spirobisnaphthalenes and lactones from the seeds of *Strychnos angustiflora* with potential anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*. 2016;26:4832,4833,4835.
61. Itoh A., Tanaka Y., Nagakuna N., Akita T., Nishi T., Tanahashi T. Phenolic and iridoid glycosides from *Strychnos axillaris*. *Phytochemistry*. 2008;69:1208-1211.
62. Bisset N. G., Choundhury A. K., Houghton P. J. Phenolic glycosides from the fruit of *Strychnos nux vomica*. *Phytochemistry*. 1989;28(5):1553,1554.
63. Itoh A., Oya N., Kawaguchi E., Nishio S., Tanaka Y., Kawachi E., et al. Secoiridoid Glucosides from *Strychnos spinosa*. *J Nat Prod*. 2005;68:1434-1436.
64. Thongphasuk P., Suttisri R., Bavovada R., Verpoorte R. Antioxidant lignan glucosides from *Strychnos vanprukii*. *Phytotherapy*. 2004;75:623,624.
65. Brasseur T., Angenot L. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. *Phytochemistry*. 1986;25(2):563.
66. Brasseur T., Angenot L. Four acylated flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. *Phytochemistry*. 1987;26(12):3331.
67. Brasseur T., Angenot L. Six flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. *Phytochemistry*. 1988;27(5):1487,1490.
68. Zhang X., Xu Q., Xiao H., Liang X. Iridoid glucosides from *Strychnos nux-vomica*. *Phytochemistry*. 2013;64:1341-1343.
69. Singh H., Kapoor V. K., Piozzi F., Passannanti S., Paternostrot M. Ismotiol, a new triterpene from *Strychnos potatorum*. *Phytochemistry*. 1978;17:154-155.
70. Sanmuga P. E., Venkataraman S. Pharmacognostical And Phytochemical Studies of *Strychnos potatorum* Linn. Seeds. *Short reports*. 2010;2(8):190.

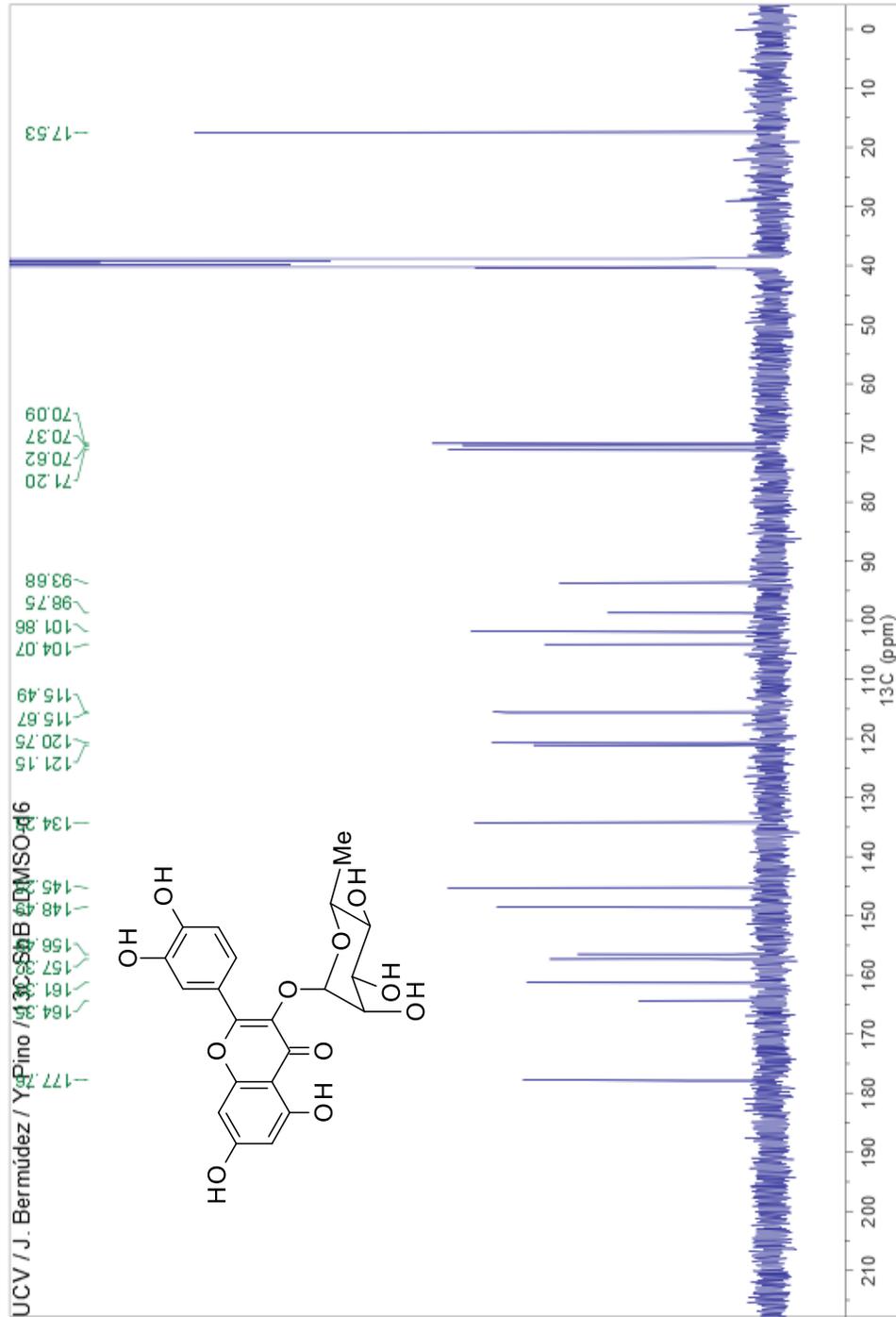
71. Msonthi J. D., Galeffi C., Nicoletti M., Messana I., Marini-Bettolo G. B. Kingside aglucona, a natural secoiriso de Kingside aglucone, a natural secoiridoide from unripe fruits of *Strychnos spinosa*. *Phytochemistry*. 1985;24(4):771,772.
72. Thongphasuk P., Surrisri R., Bavovada R., Verpoorte R. Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry*. 2003;64:897,898.
73. Chien N. Q., Van Hung N., Santarsiero B. D., Mesecar A. D., Cuong N. M., Soejarto D. D., et al. New 3-O-Acyl Betullinic Acids from *Strychnos vanprukii* Craib. *J Nat Prod*. 2004;67:994.
74. Travasarou, K. Vougianniopoulou, N. Fokialakis, C. Cantrell, A. Skaltsounis. Phytochemical investigation of the Neotropical plant *Strychnos* aff. *darienensis*. *Planta Medica*. [Internet]. [cited 2016 October 17th]. Available from:
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1282721>
75. Wagner H., Blatt S., Zgainski E. M. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. Springer. Berlin, 2001.
76. Khor T. H. Removal of chlorophyll pigments from plant neutral lipids. *J Chrom*. 1979;179(1):225-226.
77. Feng W., Hao Z., Li M. *Flavonoids from Biosynthesis to Human Health: Isolation and Structure Identification of Flavonoids*. INTEC. 2017: a. 24-25, b 26-32.
78. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin, 1970: a. 41-54, b. 81, c. 129, d. 130.
79. Zhang Y., Wang D., Yang L., Zhou D., Zhang J. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. *PLoS ONE*. 2014;9(8) e105725: 6.
80. Kim H. J., Kim B., Ahm J. Regioselective synthesis of flavonoid bisglycosides using *Escherichia coli* harboring two glycosyltransferases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:5277.

ANEXOS

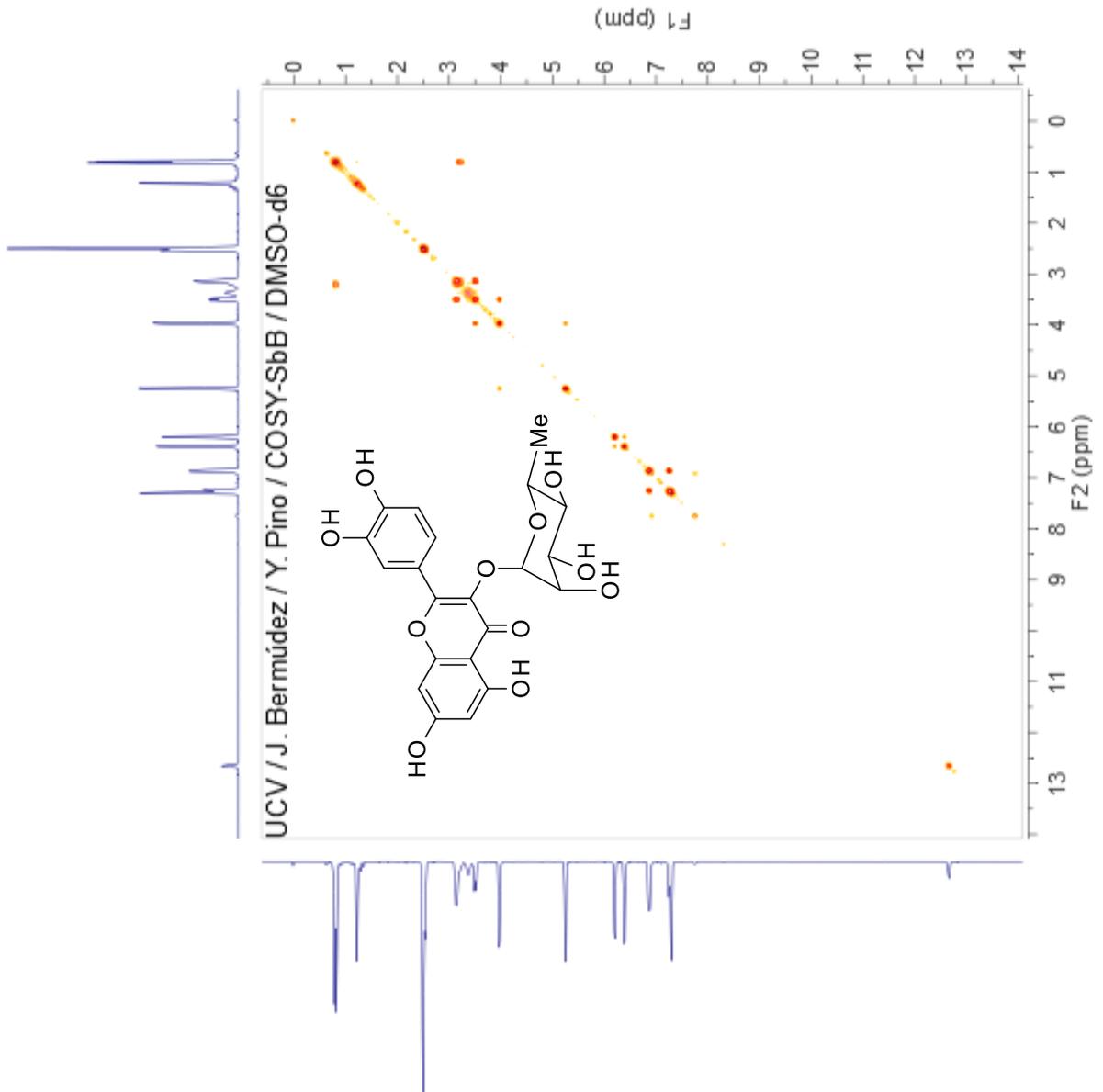
Anexo 1. Espectro de RMN ¹H del Compuesto B (Quercitrina) en DMSO-d₆ a 400MHz.



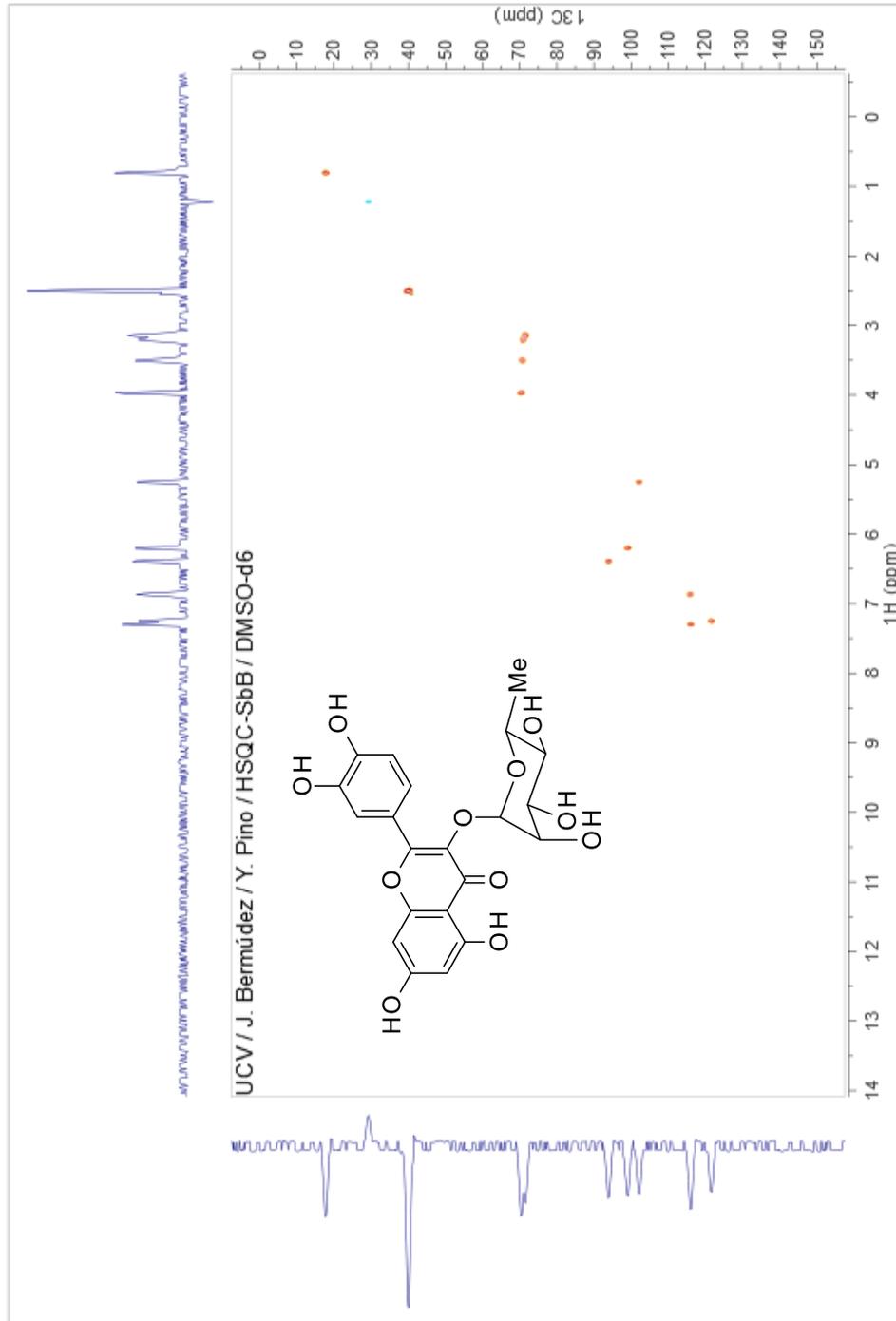
Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C del Compuesto B (Quercitrina) en $\text{DMSO-}d_6$.



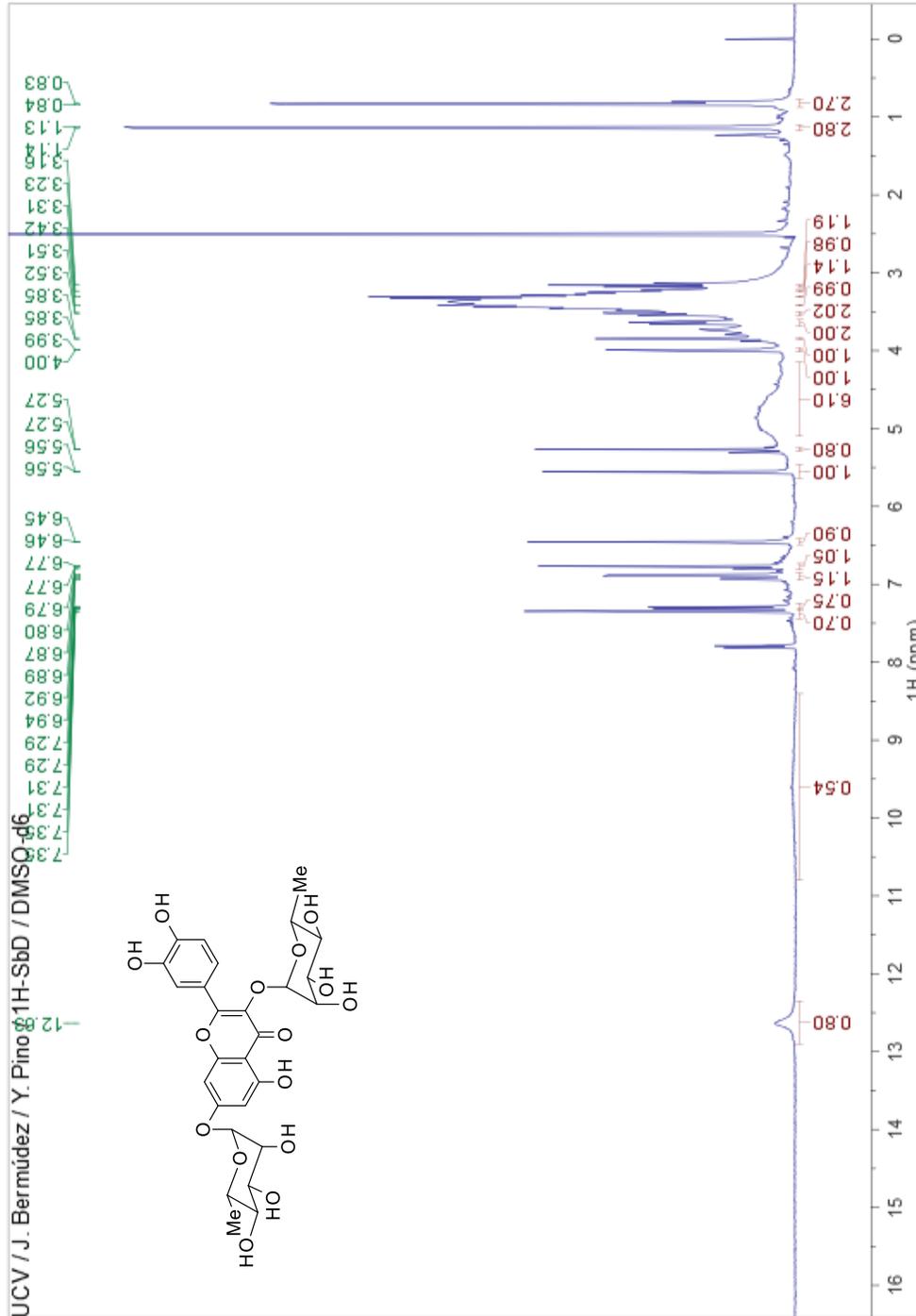
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto B (Quercitrina) en $\text{DMSO-}d_6$.



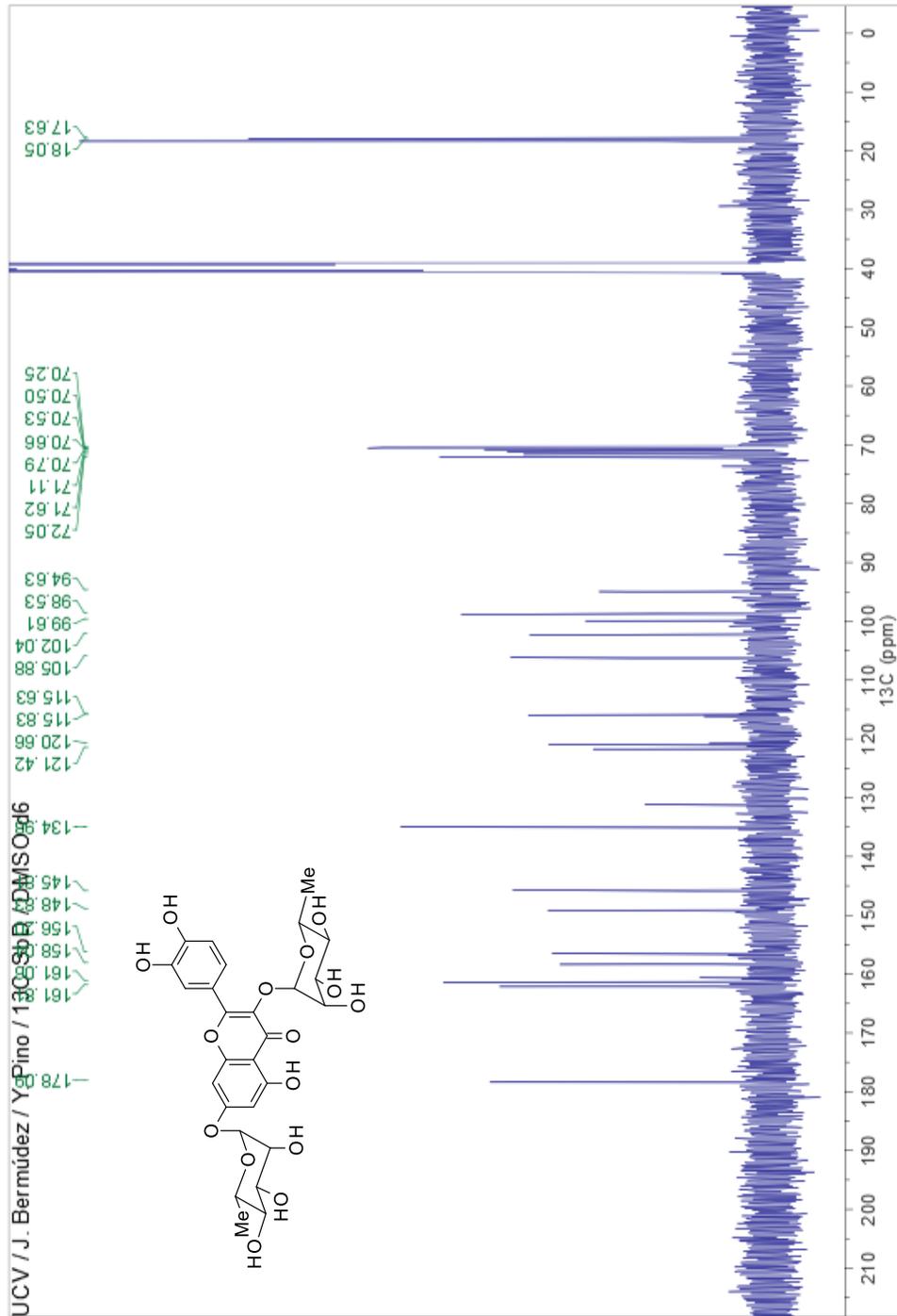
Anexo 4. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto B (Quercitrina) en DMSO-d_6 .



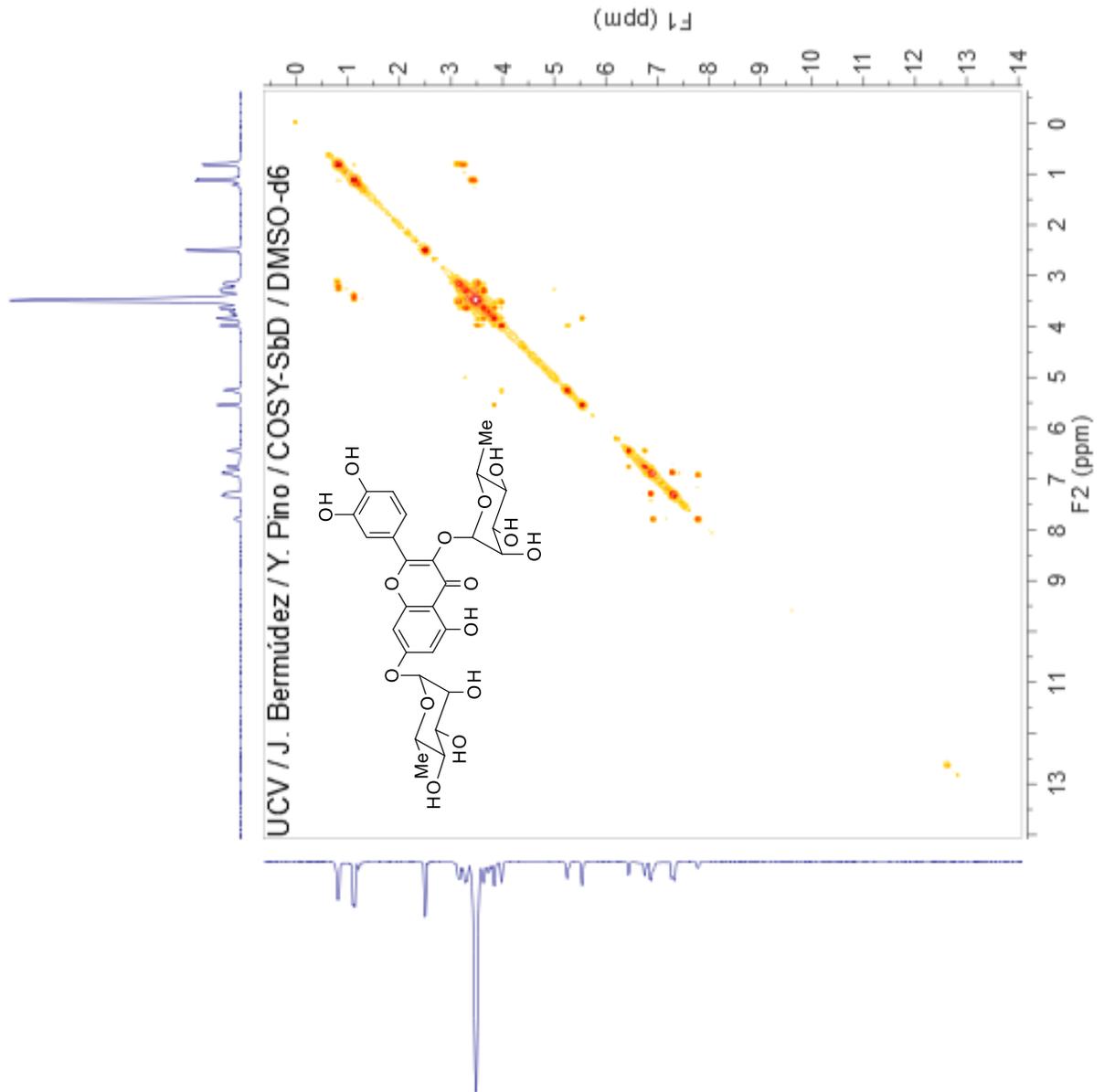
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H del Compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$ a 400MHz, Quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.



Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C del Compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$, Quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.



Anexo 7. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY del Compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$,
Quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.



Anexo 8. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC del Compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$, Quercetin-3,7-O- α -L-diramnosido.

