

***Couepia paraensis*: Estudio fitoquímico, ensayos de citotoxicidad y de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa**

[*Couepia paraensis*: Phytochemical study, cytotoxicity assays and inhibition of glucose-6-phosphatase]

Gustavo CABRERA¹, María Alexandra GUARAMATO¹, Miguel RODRÍGUEZ¹, Jeannette MÉNDEZ¹, Morella RODRÍGUEZ-ORTEGA^{2,3}, Zaida CARVAJAL³ & Freddy GONZÁLEZ-MUJICA⁴,

¹Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Centro de Química Orgánica, Laboratorio de Productos Naturales. Caracas, Venezuela.

²Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

³Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina del Ministerio del Poder Popular de Salud y Desarrollo Social.

⁴Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Experimental, Sección de Bioquímica Médica. Caracas, Venezuela.

Contactos / Contacts: Gustavo CABRERA - E-mail address: gustavo.cabrera@ciens.ucv.ve

Abstract

From the *chloroform* extract of the aerial parts of *Couepia paraensis* the triterpenes β -sitosterol **1**, betulinic acid acetate **2**, and oleanolic acid acetate **3**, were isolated. Six triterpenes from the chloroform-methanol, acids: oleanolic **4**, pomolic **5**, ursolic **6**, betulinic **7**, 6- β -hydroxybetulinic **8**. Additionally from the methanolic extract three flavonoids were isolated: miricetin **9**, quercetin **10** y rutina **11**. The chloroform and chloroform-methanol extracts were not cytotoxic at concentration of 2,5 and 3,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively after 24 hours of incubation. The methanol extract was found to be harmless to a concentration of 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, both at 24 hours ($\text{LD}_{50} = 10.77 \mu\text{g} / \text{ml}$) and 120 hours ($\text{LD}_{50} = 28.86 \mu\text{g} / \text{ml}$) of incubation. Only the methanol extract showed significant inhibition (41%) of the activity of G-6-Pase in intact microsomes without affecting the activity of the enzyme in microsomes broken.

Keywords: *Couepia paraensis*, triterpenes, flavonoids, cytotoxicity, glucose-6-phosphatase

Resumen

Se aislaron e identificaron tres triterpenos: β -sitosterol **1**, acetato del ácido betulínico, **2** y acetato del ácido oleanólico **3** del extracto clorofórmico. Seis triterpenos del extracto cloroformo:metanol (9:1) que fueron identificados como ácidos: oleanólico **4**, pomólico **5**, ursólico **6**, betulínico **7**, 6- β -hidroxibetulínico **8**. Mientras que del extracto metanólico se identificaron 3 flavonoides: miricetina **9**, quercetina **10** y rutina **11**. Los extractos de cloroformo y cloroformo /metanol resultaron inocuos hasta las concentraciones de 2,5 y 3,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, después de 24 horas de incubación. El extracto metanólico es inocuo hasta una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tanto a 24 horas ($\text{LD}_{50} = 10,77 \mu\text{g}/\text{ml}$) como a 120 horas ($\text{LD}_{50} = 28,86 \mu\text{g}/\text{ml}$) de incubación. Solamente el extracto metanólico mostró una inhibición significativa (41%) de la actividad de la G-6-Pasa de microsomas intactos sin afectar la actividad de la enzima en microsomas rotos.

Palabras Clave: *Couepia paraensis*, triterpenos, flavonoides, citotoxicidad, glucosa-6-fosfatasa

Recibido | Received: 7 de Diciembre de 2011

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 22 de Febrero de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2012.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Este trabajo fue realizado gracias a los PG 03-00-5741-2004 y PI-09-7645-09/1, del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Gustavo Cabrera, María A. Guaramato, Miguel Rodríguez, Jeannette Méndez, Morella Rodríguez-Ortega, Zaida Carvajal, Freddy González-Mujica. 2012. *Couepia paraensis*: Estudio fitoquímico, ensayos de citotoxicidad y de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 11(3): xxx - xxx.

Introducción

La Chrysobalanaceae es una familia de árboles y arbustos con flores, compuesta por más de 400 especies en 17 géneros, distribuidos en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En general, son habitantes de regiones húmedas y cálidas y a menudo crecen en las orillas de los ríos. Desde el punto de vista botánico, la familia Chrysobalanaceae, se había considerado una subfamilia de las Rosaceae y posteriormente fue excluida debido al establecimiento de diferencias significativas en la morfología de sus órganos sexuales. Este hecho permitió la separación de los géneros *Chrysobalanus*, *Licania*, *Parinari*, *Aceioa*, *Exellodendron*, *Hirtella* y *Couepia* de la familia Roseaceae (Bilia et al., 1996). En Venezuela, se encuentran 7 géneros de esta familia.

Existen escasos reportes en la literatura sobre la fitoquímica y la actividad biológica de *C. paraensis*. En lo que respecta a estudios fitoquímicos de la planta, un reporte publica el aislamiento de 5-hidroxi-2,8-dimetil-6,7-dimetoxibenzopirán-4-ona, β -sitosterol, el ácido oleanólico y su acetato, ácido espinosico A y B y tres flavonoides: naringenina, quercitina y rutina (Sanduja et al., 1982). En cuanto a la actividad biológica ensayada, los reportes también son escasos; el ensayo de actividad del extracto etanólico de las hojas de *C. paraensis* contra *Mycobacterium tuberculosis* resultó negativo (Oliveira et al., 2011). Sin embargo, un fraccionamiento biodirigido permitió aislar dos compuestos del extracto de acetato de etilo de los tallos de *Couepia ule*, el eritro-2,3-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-etoxipropan-1-ol y el evofolin-B. Estos compuestos mostraron actividad inductora de la reductasa quinona (Jang et al., 2004). En otro trabajo, se evaluó la citotoxicidad, actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante de los extractos de hexano y etanol de *C. grandiflora*. La actividad citotóxica de los extractos de hexano y etanol mostró una CL_{50} de 0,1082 mg/ml y 0,1408 mg/ml, respectivamente (Zuque et al., 2004).

Debido al alarmante aumento, a nivel mundial, de la incidencia de la diabetes en la población se hace

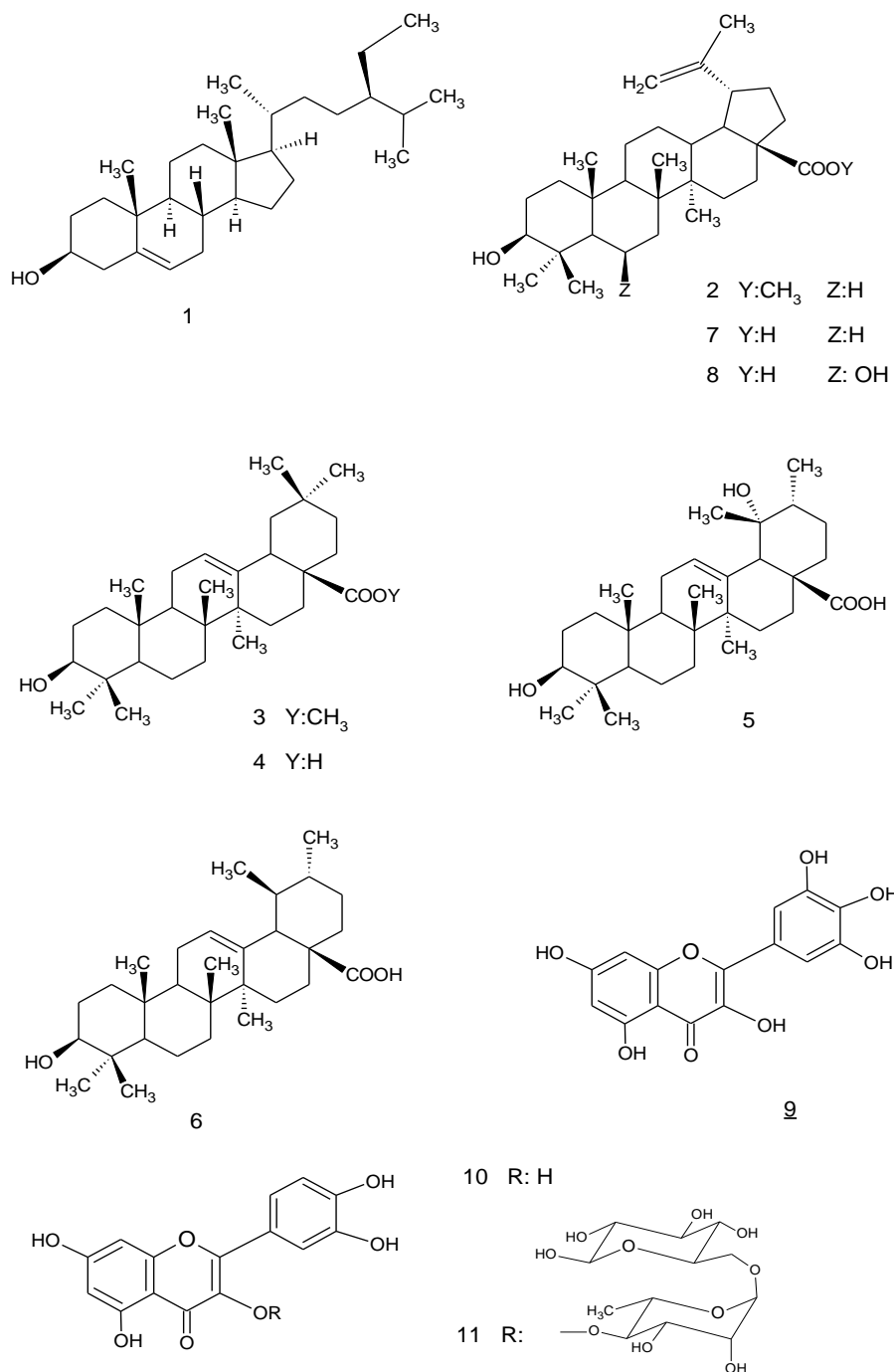
necesario la búsqueda de sustancia que regulen la glicemia en la sangre. En este sentido, la glucosa 6-fosfatasa (G-6-Pasa) es la enzima que cataliza la reacción final de los procesos de neoglucogénesis y glucogenólisis siendo, por lo tanto, un factor clave en la regulación de la glicemia. Dicha enzima se encuentra ubicada en retículo endoplasmático (RE) y envoltura nuclear de hígado, riñón e islotes pancreáticos. En mamíferos la enzima se ha descrito como un sistema multicomponente formado por, al menos, 5 polipéptidos: la subunidad catalítica, cuyo centro activo se orienta hacia el lumen del RE, la cual está asociada a una proteína estabilizadora, y tres proteínas transportadoras (Burchell y Waddell, 1991).

En el presente trabajo, se realizaron estudios fitoquímicos y de actividad biológica (ensayos hipoglicemiantes y citotoxicidad) de *C. paraensis*, un árbol de hasta 20 m de altura, distribuido al sur de Venezuela y en Brasil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del extracto clorofórmico de *C. paraensis* se logró identificar tres triterpenos: β -sitosterol **1**, acetato del ácido betulínico, **2*** y acetato del ácido oleanólico **3**. Del extracto cloroformo:metanol (9:1) se aislaron seis triterpenos, de los cuales los compuestos del **4-8** fueron identificados como ácidos: oleanólico **4**, pomólico **5***, ursólico **6***, betulínico **7***, 6- β -hidroxibetulínico **8***; y un triterpeno, que debido a la poca cantidad obtenida, sólo pudo ser parcialmente caracterizado como un éster aromático del ácido betulínico. Mientras que del extracto metanólico se aislaron 4 flavonoides, pudiéndose identificar tres de ellos: miricetina **9***, quercetina **10** y rutina **11**. El otro compuesto fue caracterizado como un flavonoide pentahidroxilado en las posiciones 5, 7, 2',4' y 5' y glicosilado en la posición C-3, probablemente con un disacárido. Los compuestos marcados con * son reportados por primera vez en esta planta, pero son comunes en la familia (Figura 1).

Figura 1
Triterpenos y flavonoides aislados de *C. paraensis*



A diferencia de otros géneros estudiados de la familia Chrysobalanaceae, *C. paraensis*, resultó ser una planta más rica en triterpenos que en flavonoides. Sin embargo, se ha encontrado gran parte de aquellos metabolitos secundarios que han sido propuestos como marcadores quimiotaxonómicos de Chrysobalanaceae. Estos metabolitos son: quercetina, quercetina-3-O-ramnosido, quercetina-3-O-arabinósido, miricetina, mirecitina-3-O-ramnósido, ácido ursólico, ácido betulínico y ácido olenólico (Carrasco, 2009).

Se evaluó la citotoxicidad en un rango de concentración de 0,7-50 µg/ml de los extractos clorofórmico, cloroformico/metanolico y metanólico en células Vero. El extracto de cloroformo y cloroformo/metanol resultaron ser inocuos sólo a concentraciones menores de 2,5 y 3,1 µg/ml respectivamente, después de 24 horas de incubación. Estos resultados están acordes con lo reportados por otros autores para los triterpenos presentes en estos extractos (Fontanay et al., 2008). El extracto metanólico resultó ser inocuo en el rango de concentraciones utilizado, tanto a 24 horas (LD₅₀ = 10,77 µg/ml) como a 120 horas (LD₅₀ = 28,86 µg/ml) de incubación.

Solamente el extracto metanólico mostró una inhibición significativa (41%) de la actividad de la G-6-Pasa de microsomas intactos sin afectar la actividad de la enzima en microsomas rotos (tratados con histonas), este resultado sugiere que para la inhibición de la actividad enzima por el o los componentes del extracto es necesaria la integridad de la membrana microsomal, posiblemente afectan alguno de los transportadores del sistema de la G-6-Pasa, como el T1, el cual media el transporte del sustrato glucosa 6 fosfato (G-6-P) hacia el lumen del RE y/o T2 y T3 que permiten la salida de los productos ortofosfato (Pi) y glucosa, respectivamente, hacia el citosol (Burchell y Waddell, 1991), pero no afecta a la subunidad catalítica. Es interesante mencionar que la floricina, un conocido inhibidor del transportador T1 (Arion et al., 1980), inhibe en aproximadamente un 28% la actividad de la G-6-Pasa de microsomas intactos en condiciones similares (Estrada et al., 2005). La inhibición de la enzima G-6-Pasa por el extracto metanólico de *Coeupia paraensis* es similar a la encontrada para los flavonoides obtenidos a partir de *Exellodendron coriaceum* (Carrasco, 2009), de *Bauhinia megalandra* (Estrada et al., 2005) y de *Licania densiflora*, en los cuales están presente quercetina y quercetina- 3-O-α-L-ramnopyranosido

(Fernández, 1996). Estos resultados sugieren que la presencia de quercetina es importante para la inhibición de la enzima (Carrasco et al., 2009)

Los resultados encontrados por nuestro grupo de trabajo (Méndez et al., 1997; Carrasco, 2009), sugieren que las especies de la familia de las Chrysobalanaceae son más ricas en flavonoides que triterpenos. Además han exhibido actividad biológica, tales como: citotoxicidad, antibacterial, antiviral e inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (Braca et al., 2003). Sin embargo, la cantidad de triterpenos encontrados por nosotros en *Coeupia paranensi* es considerablemente mayor que la cantidad de flavonoides reportado anteriormente en plantas de esta familia. Pese a que los resultados de citotoxicidad e inhibición de la glucosa 6 fosfatasa del extracto metanólico concuerda con obtenidos anteriormente (Braca et al., 2003).

En la continuación de este proyecto se hace necesaria la obtención de los compuestos identificados en las fracciones, ya que teniendo los rango de concentraciones inocuas de los mismos, utilizarlos para determinar su posible actividad como antivirales.

PARTE EXPERIMENTAL

General

Todos los experimentos de RMN fueron registrados en espectrómetros JOEL de 270 MHz y BRUKER de 500 MHz. Como solventes se usó CDCl₃, MeOH-d₄, DMSO-d₆. Para el fraccionamiento por cromatografía de columna se empleó como soportes: sephadex LH20 y RP18. Para la cromatografía de capa fina se empleó sílica gel 60 F254 en placas de aluminio (Merck, Darmstadt, Germany). Las placas de cromatografía de capa fina fueron rociadas con una solución saturada de sulfato cérico al 65% de ácido sulfúrico y calentadas a 120° C. También fue empleado el reactivo de Naturstoff (1% 2-aminoetildifenylborinato en MeOH) específico para flavonoides.

Material vegetal

Coeupia paraensis (Mart. & Zucc.) Benth. (Familia Chrysobalanaceae) fue recolectada en las cercanías del río Sipapo, Municipio Autana. Estado Amazonas, región cercana a Puerto Ayacucho por el Dr. Anibal Castillo del Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Esta planta se presenta cómo un árbol de hasta 20 metros de altura y en el territorio venezolano se encuentra distribuida en los estados de: Apure,

Bolívar, Guárico y Amazonas. Un espécimen de la planta se encuentra en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela.

Material biológico

Células Vero: fibroblastos aislados de riñón de mono *Macacus rhesus*, suministradas por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Ministerio del Poder Popular de Salud y Desarrollo Social (MPPSDS). Todo el material ensayado fue pesado y disuelto en dimetil sulfóxido al 10%.

Ensayo de citotoxicidad: En placa de fondo plano de 96 pozos se sembró 100 µl/pozo de una suspensión de células Vero de 2 x 10⁵ células/ml y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95:5 de O₂:CO₂. Después de 24 a 120 horas de incubación se realizó el ensayo de citotoxicidad por cuadruplicado, empleando el método colorimétrico del 3-(4,5-Dimetiltiazol 2yl)-2,4-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). El número de células viables por pozo fue proporcional a la producción de cristales de formazan, resultante de la reducción de la sal de tetrazolio, el cual pudo ser medido espectrofotométricamente. La absorbancia fue determinada a 570 nm en un lector de Elisa Multiscan EX. Con los datos obtenidos se determinó la viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\%VC = 100 - (DO_C - DO_{EX} / DO_C) \times 100$$

Donde:

%VC = Porcentaje de viabilidad delular

DO_C = Densidad óptica del control celular

DO_{EX} = Densidad óptica de células con extracto

Los valores encontrados en el rango comprendido entre 80 y 120%, indica que el extracto de la planta es inocuo sobre las células Vero. Por encima de 120 o por debajo 80 se consideró proliferativo o citotóxico, respectivamente (Paredes *et al.*, 2001).

Purificación de Microsomas y ensayo con G-6-Pasa

Para todos los experimentos se utilizó ratas macho de la cepa Sprague Dawley ayunadas durante 24 horas y de peso corporal entre 180 y 200 g. Se purificó los microsomas a partir del hígado según el procedimiento descrito (Marcucci *et al.*, 1983). Las proteínas fueron

determinadas usando una modificación del método de Lowry (Marwell *et al.*, 1978) y los ensayos enzimáticos por el método de Burchell (1988).

Extracción y aislamiento

El material vegetal (hojas) seco (700 g) fue molido y desgrasado con n-hexano. Luego se realizaron maceraciones sucesivas por 48-72 h con cloroformo, cloroformo-metanol (9:1) y metanol, para obtener 10,5 g; 13,6 g; 37,8 g respectivamente.

El extracto de cloroformo, 10 g, fue fraccionado mediante cromatografía de columna con sílica gel y con solventes de polaridad creciente. Se colectaron fracciones de 10 ml, las cuales se agruparon de acuerdo a su cromatografía de capa fina. La fracción 5 (15,3 mg) fue identificada como **1**, la fracción 11 (9,15 mg) fue identificada como **2** y la fracción 13 como **3** (12,46 mg).

El extracto cloroformo-metanol (10 g), fue fraccionado utilizando cromatografía de columna de sílica gel con solventes de polaridad creciente. Siguiendo el mismo procedimiento anterior se identificaron los triterpenos: **4** (16,2 mg), **5** (18,3 mg), **6** (8,8 mg), **7** (13,7 mg) y **8** (11,9 mg).

El extracto metanólico fue fraccionado mediante cromatografía de columna con LH20 y RP18. Se identificaron los flavonoides: **9** (7,8 mg), **10** (8,1 mg) y **11** (7,2 mg).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo por métodos espectroscópicos y por comparación con datos de la literatura (Dos Santos *et al.*, 2005; Mahato *et al.*, 1994)

β-sitosterol (1):

¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): 3,50 (1H, m, H-3); 5,27 (1H, m, H-6); 0,56 (3H, s, Me); 1,02 (3H, s, Me); 0,90 (3H, d, 6,4 Hz, Me); 0,80 (3H, d, 6,5 Hz, Me); 0,88 (3H, d, 6,5 Hz, Me); 0,85 (3H, t, 7,4 Hz, Me); ¹³C RMN (67,5 MHz, CDCl₃): 37,2 (C-1); 31,2 (C-2); 72,5 (C-3); 41,4 (C-4); 141,2 (C-5); 120,7 (C-6); 32,0 (C-7); 32,1 (C-8); 52,1 (C-9); 36,5 (C-10); 21,0 (C-11); 38,9 (C-12); 42,3 (C-13); 56,9 (C-14); 24,4 (C-15); 28,8 (C-16); 56,1 (C-17); 10,5 (C-18); 20,0 (C-19); 36,7 (C-20); 18,3 (C-21); 33,2 (C-22); 35,9 (C-23); 46,1 (C-24); 28,9 (C-25); 19,7 (C-26); 19,1 (C-27); 22,9 (C-28); 12,3 (C-29)

Acetato del ácido betulínico (2):

¹H RMN (270 MHz, MeOH-d₄): 0,86 (3H, s, Me); 0,89 (3H, s, Me); 0,90 (3H, s, Me); 0,93 (3H, s, Me); 1,03 (3H, s, Me); 1,77 (3H, s, Me); 3,33 (1H, m, H-3);

3,61 (3H, s, OMe); ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 38,7 (C-1); 26,9 (C-2); 80,5 (C-3); 38,1 (C-4); 56,2 (C-5); 18,4 (C-6); 34,9 (C-7); 38,7 (C-8); 51,2 (C-9); 33,9 (C-10); 21,5 (C-11); 24,7 (C-12); 37,9 (C-13); 42,0 (C-14); 31,7 (C-15); 37,8 (C-16); 55,7 (C-17); 47,9 (C-18); 48,7 (C-19); 151,2 (C-20); 28,4 (C-21); 37,5 (C-22); 28,0 (C-23); 14,1 (C-24); 15,8 (C-25); 17,1 (C-26); 14,3 (C-27); 176,2 (C-28); 111,6 (C-29); 19,5 (C-30); 51,7 (OMe).

Acetato del ácido oleanólico (3):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,70 (3H, s, Me); 0,72 (3H, s, Me); 0,79 (3H, s, Me); 0,82 (3H, s, Me); 0,88 (3H, s, Me); 0,90 (3H, s, Me); 1,03 (3H, s, Me); 3,60 (3H, s, OMe); 2,76 (1H, dd, 4,5; 14 Hz, H-10); 3,16 (1H, dd, 5,9; 15,7 Hz, H-3), 5,24 (1H, *m*, H-11). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 38,3 (C-1); 27,5 (C-2); 79,3 (C-3); 38,8 (C-4); 55,7 (C-5); 17,8 (C-6); 32,5 (C-7); 39,4 (C-8); 46,7 (C-9); 37,5 (C-10), 23,3 (C-11); 122,5 (C-12), 143,8 (C-13); 42,1 (C-14); 27,3 (C-15); 37,6 (C-16); 46,8 (C-17); 40,8 (C-18); 45,9 (C-19); 30,6 (C-20); 33,9 (C-21); 37,3 (C-22); 27,7 (C-23); 15,4 (C-24); 15,6 (C-25); 16,7 (C-26); 25,8 (C-27), 176,5 (C-28); 32,7 (C-29); 24,0 (C-30); 50,2 (OMe)

Ácido oleanólico (4):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,74 (3H, s, Me); 0,79 (3H, s, Me); 0,83 (3H, s, Me); 0,86 (3H, s, Me); 0,90 (3H, s, Me); 0,93 (3H, s, Me); 1,15 (3H, s, Me); 2,72 (1H, *m*, H-10); 3,20 (1H, *m*, H-3); 5,12 (1H, *m*, H-11). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 37,9 (C-1); 28,2 (C-2); 80,5 (C-3); 37,9 (C-4); 54,8 (C-5); 17,4 (C-6); 32,7 (C-7); 38,9 (C-8); 46,0 (C-9); 37,5 (C-10), 23,8 (C-11); 120,9 (C-12), 142,5 (C-13); 41,8 (C-14); 27,6 (C-15); 23,6 (C-16); 46,3 (C-17); 39,8 (C-18); 44,7 (C-19); 30,6 (C-20); 33,9 (C-21); 32,3 (C-22); 27,0 (C-23); 15,2 (C-24); 15,5 (C-25); 15,7 (C-26); 24,2 (C-27), 181,4 (C-28); 31,3 (C-29); 23,9 (C-30)

Ácido pomólico (5):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,86 (3H, s, Me); 0,79 (3H, s, Me); 0,93 (3H, d, Me); 0,95 (3H, s, Me); 1,06 (3H, s, Me); 1,19 (3H, s, Me); 1,33 (3H, s, Me); 3,17 (1H, *m*, H-3), 5,22 (1H, *m*, H-11). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 39,8 (C-1); 26,1 (C-2); 85,5 (C-3); 41,1 (C-4); 56,9 (C-5); 19,6 (C-6); 33,8 (C-7); 41,0 (C-8); 47,9 (C-9); 37,9 (C-10); 24,3 (C-11); 130,1 (C-12); 140,6 (C-13); 42,7 (C-14); 28,9 (C-15); 26,9 (C-16); 50,3 (C-17); 55,9 (C-18); 73,0 (C-19); 43,2 (C-20); 26,3 (C-21); 38,9 (C-22); 28,3 (C-23); 16,9 (C-

24); 16,2 (C-25); 17,2 (C-26); 25,6 (C-27); 183,5 (C-28); 26,7 (C-29); 16,8 (C-30)

Ácido ursólico (6):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,74 (3H, s, Me); 0,87 (3H, s, Me); 0,93 (3H, *m*, Me); 0,96 (3H, *m*, Me); 1,01 (3H, s, Me); 1,11 (3H, s, Me); 1,23 (3H, s, Me); 3,16 (1H, *m*, H-3); 5,24 (1H, *m*, H-11). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 38,7 (C-1); 27,5 (C-2); 79,2 (C-3); 38,1 (C-4); 55,6 (C-5), 18,2 (C-6); 31,9 (C-7); 39,1 (C-8); 46,8 (C-9), 37,3 (C-10); 23,6 (C-11), 126,1 (C-12); 139,8 (C-13); 41,5 (C-14); 28,3 (C-15); 24,9 (C-16); 47,8 (C-17); 52,2 (C-18), 39,5 (C-19); 29,6 (C-20); 31,1 (C-21); 37,0 (C-22); 28,0 (C-23); 15,4 (C-24); 15,5 (C-25); 16,7 (C-26); 23,8 (C-27); 179,9 (C-28); 23,5 (C-29); 21,2 (C-30).

Ácido betulínico (7):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,90 (3H, s, Me); 0,86 (3H, s, Me); 0,91 (3H, s, Me); 0,97 (3H, s, Me); 1,05 (3H, s, Me); 1,72 (3H, s, Me); 3,29 (1H, *m*, H-3); 4,83 (2H, *m*, H-29 y 29'). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 38,7 (C-1); 27,4 (C-2); 79,5 (C-3); 38,7 (C-4); 55,2 (C-5); 18,5 (C-6); 34,3 (C-7); 40,7 (C-8); 50,4 (C-9); 37,2 (C-10); 21,0 (C-11); 25,5 (C-12); 38,8 (C-13); 42,9 (C-14); 30,6 (C-15); 31,8 (C-16); 55,9 (C-17); 47,1 (C-18); 49,5 (C-19); 150,7 (C-20); 29,5 (C-21); 36,8 (C-22); 28,6 (C-23); 14,9 (C-24); 16,3 (C-25); 16,5 (C-26); 14,6 (C-27); 178,39 (C-28); 110,1 (C-29); 19,4 (C-30)

Ácido- 6- β -hidroxibetulínico (8):

^1H RMN (270 MHz, MeOH- d_4): 0,91 (3H, s, Me); 0,88 (3H, s, Me); 0,90 (3H, s, Me); 0,96 (3H, s, Me); 1,07 (3H, s, Me); 1,70 (3H, s, Me); 3,16 (1H, *m*, H-3); 4,53 (2H, *m*, H-29 y 29'). ^{13}C RMN (67,5 MHz, MeOH- d_4): 38,7 (C-1); 27,5 (C-2); 79,1 (C-3); 39,7 (C-4); 55,6 (C-5); 68,7 (C-6); 42,6 (C-7); 40,6 (C-8); 51,1 (C-9); 36,9 (C-10); 22,6 (C-11); 25,5 (C-12); 39,5 (C-13); 42,5 (C-14); 29,6 (C-15); 31,8 (C-16); 56,3 (C-17); 46,7 (C-18); 49,5 (C-19); 150,3 (C-20); 29,3 (C-21); 37,3 (C-22); 27,5 (C-23); 17,6 (C-24); 16,8 (C-25); 16,9 (C-26); 14,9 (C-27); 181,50 (C-28); 109,7 (C-29); 19,3 (C-30)

Miricetina (9):

^1H RMN (500 MHz, MeOH- d_4): 6,19 (s, H-6); 6,38 (s, H-8); 7,25 (s, H-2' y H-5'). ^{13}C RMN (125 MHz, MeOH- d_4): 147,3 (C-2); 136,3 (C-3); 176,2 (C-4); 161,2 (C-5); 98,6 (C-6); 164,3 (C-7); 93,6 (C-8); 156,5

(C-9); 103,4 (C-10); 121,2 (C-1'); 107,6 (C-2'); 146,2 (C-3'); 136,3 (C-4'); 146,2 (C-5'); 107,59 (C-6').

Quercetina (10):

¹H RMN (500 MHz, MeOH-d₄): 6,15 (d, 2,1Hz H-6); 6,37 (d, 2,1Hz H-8); 7,72 (d, 2,1Hz H-2'); 6,87 (d, 8,7Hz H-5'); 7,61 (dd, 2,4Hz 8,7Hz H-6'). ¹³C RMN (125 MHz, MeOH-d₄): 146,5 (C-2); 135,8 (C-3); 175,9 (C-4); 161,0 (C-5); 97,8 (C-6); 164,0 (C-7); 92,9 (C-8); 156,7 (C-9); 103,0 (C-10); 122,7 (C-1'); 114,5 (C-2'); 144,8 (C-3'); 147,3 (C-4'); 114,7 (C-5'); 120,0 (C-6').

Rutina (11):

¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1,01 (3H, d, J= 6.1Hz, HRha-6); 4,49 (1H, ba, HRha -1); 5,19 (1H, d, J= 6,8 Hz, HGlc-1); 6,01 (1H, ba, H-6); 6,12 (1H, ba, H-8); 6,79 (1H, d, J= 8,4 Hz, H-5'); 7,49 (1H, ba, H-2'); 7,60 (1H, d, J= 8,4 H-6'); 12,91 (1H, s, OH-5). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆): 156,9 (C-2); 134,0 (C-3); 177,8 (C-4); 162,0 (C-5); 100,4 (C-6); 163,9 (C-7); 95,1 (C-8); 158,5 (C-9); 104,9 (C-10); 120,8 (C-1'); 116,5 (C-2'); 145,0 (C-3'); 151,2 (C-4'); 116,7 (C-5'); 123,5 (C-6'); 102,7 (HGlc-1); 75,3 (HGlc-2); 76,9 (HGlc-3); 70,1 (HGlc-4); 76,7 (HGlc-5); 68,1 (HGlc-6); 101,7 (HRha-1); 71,1 (HRha-2); 71,7 (HRha-3); 72,3 (HRha-4); 69,0 (HRha-5); 18,2 (HRha-6).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a los PG 03-00-5741-2004 y PI-09-7645-09/1, del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS

Arion WJ, Lange AJ, Walls HE. 1980. Microsomal membrane integrity and the interaction of phlorizin with glucose-6-phosphatase system. **J Biol Chem** 255: 10387 - 10395.

Bilia AR, Morelli I, Méndez J. 1996. New lupane derivatives from the leaves of *Licania pyrifolia*. **J Nat Prod** 59: 297 - 230.

Braca A, Bilia AR, Méndez J, Pizza C, Morelli I, De Tommasi N. 2003. **Chemical and biological studies on *Licania* genus**. *Studies in Natural Products Chemistry*. Atta U-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam. Netherland.

Burchell A, Waddell I, Countaway J, Arion W, Hume R. 1988. Identification of the human hepatic

microsomal glucose-6-phosphatase enzyme. **FEBS lett** 242: 153 - 156.

Burchell A, Waddell ID. 1991. The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase. **Biochim Biophys Acta** 1092: 129 - 137.

Carrasco D. 2009. **Estudio fitoquímico y análisis de la actividad biológica de *Exellodendron coriaceum*. Una aproximación a la quimio-taxonomía de la familia Chrysobalanaceae**. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Carrasco D, Méndez J, Braca A, De leo M, González-Mujica F, Duque S. 2009. Effect of flavonoids from *Exellodendron coriaceum* (Chrysobalanaceae) on Glucose-6-Phosphatase. **Nat Prod Commun** 12: 1657 - 1659.

Dos Santos PM, Schripsema J, Kuster R. 2005. Flavonoides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae). **Brazil J Pharmacog** 15: 321 - 325.

Estrada O, Hasegawa M, Gonzalez-Mujica F, Motta N, Perdon E, Solórzano A, Méndez J, Méndez B, Zea EG. 2005. Evaluation of flavonoids from *B. megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. **Phytother Res** 19: 859 - 863.

Fontanay S, Grave M, Mayer J, Finance C, Durval RE. 2008. Ursolic, Oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **J Ethnopharmacol** 120: 272 - 276.

Fernandez M. 1996. **Fitoquímica del extracto polar de *Licania densiflora* (chrysobalanaceae) Actividad hipoglicemiante**. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Jang DS, Park EJ, Kang YH, Vigo JS, Graham J, Cabieses F, Fong HS, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 2004. Phenolic compounds obtained from stems of *Couepia ulei* with the potential to induce quinone reductase. **Arch Pharmacol Res** 27: 169 - 172.

Mahato S, Kundu A. 1994. Review article number 98. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. **Phytochemistry** 37: 1517 - 1575.

Marcucci OL, González-Mujica F, Perez-Ayuso E. 1983. Alterations of liver nuclear envelopes accompanying thioacetamide administration in rats. **Acta Cient Venezolana** 34: 109 - 117.

- Marwell M, Hass S, Bieber L, Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample. **Anal Biochem** 87: 206 - 210.
- Mendez J, Guaramato MA, Mota M, Gonzales F, Jimenez G, Rodriguez M, Morelli I, Bilia AR. 1997. **Fitoquímica y actividad biológica de Couepia paraensis**. VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Quito, Ecuador.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Method** 65: 55 - 63.
- Oliveira DR, Leitão GG, Coelho TS, Almeida da Silva PE, Lourenço MCS, ARQMO, Leitão SG. 2011. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Rev Bras Farmacog** 21: 793 - 806.
- Paredes A, Hasegawa M, Prieto F, Méndez J, Rodríguez M, Rodríguez-Ortega M. 2001. Biological activity of *Guatteria cardona* fractions. **J Ethnopharmacol** 78: 129 - 132.
- Sanduja R, Euler KL, Alam M, Korp JD, Bernal I. 1982. Isolation and crystal structure of 5-hydroxy-2,8-dimethyl-6,7-dimethoxybenzopyran-4-one from *Couepia paraensis*. **Phytochemistry** 21: 1451 - 1453.
- Zuque ALF, Watanabe E, Ferreira AMT, Arruda ALA, Resende Bueno NR, Castilho RO. 2004. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Rev Bras Farmacog** 14: 129 - 136.