

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**Estudio Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios del Extracto Metanólico
Acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la T.S.U. en
Química pura Adriana C Del
Valle, para optar al título de
Licenciada en Química.

Tutores: Dra. Diana Carrasco.
Dr. Gustavo Cabrera.

Caracas, Octubre de 2017

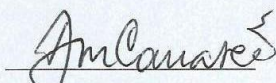
Nosotros, Dra. Diana Carrasco y Dr. Gustavo Cabrera, Investigadores del Laboratorio Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela

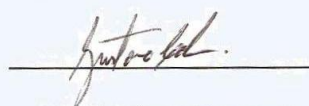
Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Estudio Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios del Extracto Metanólico Acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance”

Que presenta la T.S.U. en Química pura Adriana Carolina Del Valle Medina, para aspirar al título de Licenciado en Química, se está realizando en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química, en la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016 y 2017, con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 5 de Octubre de 2017


(Dra. Diana Carrasco)


Dr. Gustavo Cabrera

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil escribir los agradecimientos de un trabajo que resume 10 años de carrera, sin embargo, lo voy a intentar.

En principio debo agradecer a mis padres, Nora Medina y Carlos Del Valle, que no tienen la culpa de haber tenido una hija lo suficientemente loca para estudiar una ciencia pura, y que lo entendieron y apoyaron en todo momento. A mis tías Iraima Medina y Aracelis Medina, mis segundas madres, los pilares de mi familia, las mujeres de la casa.

A mis padres académicos, el prof. Gustavo Cabrera y la profa. María Rodríguez. Les agradezco mucho todo el conocimiento y la guía que me otorgaron a través del pregrado. A la profa. Diana Carrasco por guiarme en la realización de este trabajo, continuación del suyo. Gracias a todos los profesores de la Escuela de Química que han aportado a mi formación, a la Facultad de Ciencias y a la Universidad Central de Venezuela, mi segunda casa.

A todos mis amigos, Los Macaguayos por siempre estar presentes y ser un apoyo incondicional durante toda la carrera. Siempre valoraré sus consejos y opiniones. Si bien todos somos muy distintos, compartimos el mismo amor por la Química y esto nos llevara a ser los mejores profesionales.

A los jurados de este trabajo, profa. Alirica Suárez, profa. Beth Díaz y prof. Jairo Bermúdez, sin sus observaciones este trabajo no sería lo que hoy se está presentando, muchas gracias.

A mis jefas Lilibeth Leottau y Migdalia Morales por apoyarme durante el último tramo de este trabajo y ser siempre comprensivas a la situación de un tesista.

No puedo dejar de agradecer a todas esas personas que estuvieron ahí en el primer tramo de esta carrera en el IUT Región Capital. A todos los profesores, en especial a la profa. Elsa Mateu (QEPD), quien me abrió los ojos a los productos naturales y me enseñó lo que siempre quise hacer. A mis amigos en esta institución, quienes hoy en día todos son profesionales exitosos y que aportan mucho al país.

A mis compañeros del Laboratorio 317 de la Escuela de Química: Diana Rangel, José Leonardo Carrero y Samuel Bermúdez. Les prometo que todo el tiempo que estuvimos en ese laboratorio se verá recompensado por cosas grandes. Tengan presente que a pesar de las dificultades, somos afortunados en poder estudiar e investigar en el área que siempre quisimos, no muchas personas en el mundo pueden darse ese lujo, aunque no parezca uno. Los aprecio y les deseo lo mejor en sus proyectos.

Todo el grupo de personas que hacemos vida en el piso 3 de la Escuela de Química, gracias.

Al Doctor Freddy González y a Sandra Duque, por su apoyo en la realización de la actividad de las subfracciones sobre la Glucosa-6-fosfatasa. Gracias por todo su trabajo.

Un gracias totales a todos...

RESUMEN

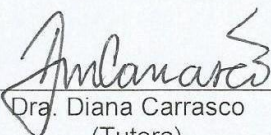
Las Chrysobalanaceas son una familia de plantas ampliamente estudiadas en busca de su correcta clasificación taxonómica. Su abundancia y distribución hacen de esta familia de plantas objeto de estudio fitoquímico. En este trabajo se presentan resultados del estudio fitoquímico del extracto metanólico-acuoso (1:1) de las partes aéreas y frutos de la especie *Exellodendron coriaceum* Prance. En un trabajo anterior, por maceración del material vegetal seco y triturado de *E. coriaceum* con solventes de creciente polaridad (hexano, cloroformo, cloroformo-metanol 9:1, metanol y metanol-agua 1:1) se obtuvieron los correspondientes extractos.

En el presente trabajo el extracto metanólico-acuoso fue tratado por dos procedimientos. Para el procedimiento A se trató el extracto con cromatografía en columna de sílica gel en fase inversa RP-18 y en el procedimiento B por una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20. Las fracciones resultantes de ambos procedimientos se estudiaron por cromatografía de capa fina en fase normal, cromatografía de columna y capa preparativa, obteniéndose los compuestos 1, 2 y 3 mediante el procedimiento A y los compuestos 4, 5 y 6 del procedimiento B. La estructura del compuesto 4 se propone como quercetina sustituida en las posiciones 6 y/o 8.


Las subfracciones provenientes del procedimiento A, F-35 a 42, F-43 a 49 y F-50 a 68, en conjunto con las obtenidas del procedimiento B, Sp¹-25 a 41, Sp¹-78 a 88, Sp²-8 a 11, Sp²-12 a 17, Sp²-28 a 36 y Sp²-37 a 41, se sometieron a estudios de actividad inhibitoria de la enzima glucosa-6-fosfatasa, obteniéndose entre 72 y 94% de inhibición del sistema de G-6-Pasa en microsomas intactos, y entre 6 a 31% en microsomas rotos.

Palabras claves: Chrysobalanaceae, *Exellodendron coriaceum*, actividad hipoglicemiante.


Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado "Estudio Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios del Extracto Metanólico Acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance", presentado por la T.S.U en Química pura Adriana Carolina Del Valle Medina, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.



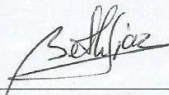
Dra. Diana Carrasco
(Tutora)



Dr. Gustavo Cabrera
(Tutor)



Dr. Jairo Bermúdez
(Jurado)



Dra. Beth Díaz
(Jurado)

ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido Acético
BuOH	Butanol
°C	Grado centígrado
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
Chl	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
C ₇ H ₁₆	Heptano
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete de doblete
EtOH	Etanol
<i>E. coriaceum</i>	<i>Exellodendron coriaceum</i> Prance
g	Gramo
H ₂ O	Agua
HCOOH	Ácido Fórmico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
Hz	Hertz
CCP	Cromatografía de capa fina preparativa
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
<i>J</i>	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz)
<i>m</i>	Multiplete
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
nm	Nanómetro
EDTA	Etilendiamin acetato tetrasódico

MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
PAS	<i>p</i> -anisaldehído en ácido sulfúrico
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protones
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<i>s</i>	Singlete
<i>s.a</i>	Singlete ancho
<i>t</i>	Triplete
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	11
CAPITULO I. MARCO REFERENCIAL.....	14
1.1. Las Chrysobalanaceas.....	14
1.2. Género <i>Exellodendron</i>	14
1.2.1. Descripción botánica y distribución de <i>E. coriaceum</i> Prance...	16
1.3. Relación del género <i>Exellodendron</i> con <i>Parinari</i>	17
1.4. Metabolitos secundarios en las Chrysobalanaceas.....	17
1.4.1. Flavonoides.....	17
1.4.2. Terpenos.....	27
1.5. Justificación.....	33
1.6. Objetivos de la Investigación.....	33
1.6.1. Objetivo General.....	33
1.6.2. Objetivos Específicos.....	34
CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	35
2.1. Materiales y métodos.....	35
2.1.1. Materiales.....	35
2.1.1.1. Material vegetal.....	35
2.1.1.2. Soportes cromatográficos.....	36
2.1.1.3. Solventes.....	37
2.1.1.4. Reactivos para revelado de placas y reacciones de Coloración.....	37
2.1.1.5. Reactivos para bioensayos sobre la enzima Glucosa- 6-fosfatasa.....	39
2.1.1.6. Equipos.....	39
2.1.1.7. Instrumentos para bioensayo sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa.....	39
2.1.2. Métodos.....	39
2.1.2.1. Cromatográficos.....	39

2.1.2.2. Bioensayo sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa.....	40
2.2. Fraccionamiento del Extracto Metanólico-Acuoso (1:1) de <i>E. coriaceum</i>	47
2.2.1. Procedimiento A. Cromatografía en fase inversa.....	47
2.2.2. Procedimiento B. Cromatografía de exclusión molecular...	51
CAPÍTULO III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
3.1. Análisis cromatográfico.....	55
3.1.1. Del extracto metanólico-acuoso (1:1) de <i>E. coriaceum</i>	55
3.1.2. Procedimiento A.....	55
3.1.3. Procedimiento B.....	75
3.2. Resultados de los ensayos biológicos sobre inhibición de Glucosa-6-fosfatasa.....	87
CONCLUSIONES.....	93
RECOMENDACIONES.....	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años la humanidad ha buscado en la naturaleza un refugio para aliviar muchas de sus dolencias. En la antigüedad los conocimientos obtenidos a partir del uso de las plantas como fuente de alimento, medicinal e incluso como protección y transporte, fueron otorgados mediante tradición oral entre los integrantes de dichas sociedades antiguas. A partir de esta información, las sociedades contemporáneas se han visto en la facultad de diseñar una cantidad innumerable de medicamentos, como alternativas a los padecimientos.

Las plantas son aliados importantes para la salud mundial y debido a esto la relevancia de su estudio, no solo en su inmensa variedad botánica sino también química. El área de esta ciencia dedicada al estudio de estos organismos es llamada Fitoquímica¹, y una de sus finalidades es obtener más y mejores opciones para el tratamiento de diversas afecciones. Si bien esta finalidad es muy resaltante, las plantas también poseen compuestos de interés para la investigación de diversos productos no asociados con la medicina².

Estos compuestos, producidos por las plantas y de interés para la fitoquímica son llamados metabolitos secundarios o productos naturales. A diferencia de los compuestos del metabolismo primario, como los carbohidratos, lípidos y proteínas, los productos naturales parecen no tener una utilidad para el organismo que lo sintetiza¹.

Los metabolitos secundarios son propios de una especie y muchas veces también sirven para clasificar un grupo de plantas que posean en común un producto natural. Estos compuestos son polifuncionales y no son fáciles de clasificar en un determinado grupo químico. Reciben la siguiente clasificación general: terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos y compuestos alifáticos¹.

La clasificación taxonómica de la planta a estudiar según Ghillean Prance es la siguiente:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Familia	Chrysobalanaceae
Genero	<i>Exellodendron</i>
Especie	<i>Exellodendron coriaceum</i> Prance

El género *Exellodendron* posee otras cinco especies dentro de su clasificación; *Exellodendron cordatum*, *Exellodendron barbatum*, *Exellodendron gardneri*, *Exellodendron gracile* y *Exellodendron coriaceum*^{3,4}. Sin embargo, la especie *Exellodendron coriaceum* es la especie tipo para este género, que se distribuye desde Venezuela hasta Brasil Central³.

Por mucho tiempo se ha discrepado respecto a considerar la familia de las Chrysobalanaceae como una familia separada o una subfamilia de las Rosaceae. A pesar de esto mediante estudios fitoquímicos las Chrysobalanaceae han logrado separarse como una familia aparte^{3,4}.

De las Chrysobalanaceae se han realizado diversos estudios por distintos grupos de investigación donde se ha obtenido resultados en estudios biológicos de actividad hipotensora, hipoglicemiante, antiviral, antiparasitaria, antifúngica, etc⁵. Esto y su amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, convierten a esta familia de plantas objeto de estudio fitoquímico.

En 2009, en una investigación realizada por la Dra. Diana Carrasco, de acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (DIF), la prevalencia de esta enfermedad en las Américas para el año 2000, se estimó en 35 millones de personas, de los cuales 19 millones (54%) residen en América Latina y el Caribe. Según esta organización, para el año 2025 la cantidad de personas que padecerán esta enfermedad será de 64 millones, de las cuales se pronostica que 40 millones (62%) se encontraran en América Latina y el Caribe⁶.

De igual forma, en esta investigación se menciona que según la Organización Mundial de la Salud se reconocen 3 tipos de diabetes: Tipo I, o insulino dependiente; Tipo 2, no insulino dependiente y Tipo 3 o diabetes gestacional. En los tres casos

existen problemas en la secreción de insulina, aunado a un incremento de la secreción de la hormona glucagón, ambas hormonas producidas en el páncreas, lo que aumenta la producción hepática de glucosa por glucogenólisis o neoglucogenólisis⁶.

CAPITULO I. MARCO REFERENCIAL

1.1. Las Chrysobalanaceas

Es una familia de árboles compuesta por 17 géneros y 525 especies, distribuida en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en Suramérica y el Caribe. Esta familia subdivide sus géneros en cuatro tribus: Chrysobalanaceae, que incluye a los géneros *Chrysobalanus*, *Grangeria*, *Licania* y *Parastemon*; Couepieae, que contiene a los géneros *Acioa*, *Coupeia* y *Maranthes*; Parinarieae, con los géneros *Bafodeya*, *Exellodendron*, *Hunga*, *Neocarya* y *Parinari*; y por último la tribu Hirtella, que incluye a los géneros *Atuna*, *Dactyladenia*, *Hirtella*, *Kostermanthus* y *Magnistipula*⁵.

En Venezuela los géneros encontrados hasta ahora son: *Acioa*, *Chrysobalanus*, *Coupeia*, *Exellodendron*, *Hirtella*, *Licania* y *Parinari*, siendo estos últimos dos géneros con mayor abundancia de especies y además con más estudios fitoquímicos⁶.

1.2. Género *Exellodendron*

El nombre de este género fue dado por el Dr. A. W. Exell³, sin embargo la primera descripción de este género se le atribuye a Ghilleen Tolmie Prance publicada en 1972⁶.

Las especies de este género son árboles o arbustos con flores hermafroditas de 6-7 mm de largo. Como se observa en la Fig. 1. las hojas enteras, glabras en el haz, glabras o densamente lanadas en el envés, sin cavidades estomatales. Inflorescencias en panículas terminales. Fruto con una drupa carnosa; endocarpio liso, delgado y duro, con un pico apretado a un lado de la base y una línea simple de dehiscencia⁶.



Fig. 1. Imagen de hojas, tallos y fruto de un espécimen de *Exellodendron coriaceum*⁷

Se han descrito y aceptado 5 especies: *Exellodendron cordatum*, *Exellodendron barbatum*, *Exellodendron gracile*, *Exellodendron gardneri* y *Exellodendron coriaceum*, de las cuales esta última es considerada la especie tipo de este género, es decir, la especie cuya descripción puede ser sistematizada para todo el género^{3,8}.

La distribución geográfica del género *Exellodendron* se limita a América del Sur, específicamente en Venezuela, Brasil, Surinam y Guyana⁶.

1.2.1. Descripción botánica y distribución de *Exellodendron coriaceum* Prance

Es un árbol de hasta 10 m de alto. Hojas con estípulas de 2 mm de largo, pecíolos de 5-6 mm de largo, por encima canaliculadas; laminas oblongas elípticas, de 9-12 x 3-7,5 cm, cuneadas hasta subcuneadas en la base, con acumen de 1-1,5 cm de largo, glabra por encima, densamente aracnoides debajo; nervadura central prominente en ambas superficies; venas primarias 13-19 pares, no prominentes. Las inflorescencias densas axilares o terminales panículas de flores son mucho más cortas que las hojas, con pubescencia de color gris plateado. Las brácteas y bractéolas son de unos 1-3 mm de largo^{4,6}.

Llegan a tener hasta 5 pétalos, blanco y 7 estambres, con estaminoides representados únicamente por inflamaciones en el círculo estaminal u ocasionalmente con 1 ó 2 filamentos cortos. Sus frutos son redondos u ovalados, basalmente estrechos, de 1,5-2,5 cm de largo, 1,2-2 cm de ancho; epicarpio suave y sin vellosidades; mesocarpio carnoso y delgado; endocarpio delgado y dura, con una superficie lisa, con baja densidad forrada en el interior con pelos suaves, cortos y plateados^{4,6}.

Otros nombres dados a esta especie son *Ferolia coriacea* (Benth.) Kuntze y *Parinari coriacea* Benth⁹.

Su distribución geográfica se encuentra en América del sur, específicamente



Fig. 2. Mapa de distribución geográfica de la especie *Exellodendron coriaceum*¹⁰

en las zonas indicadas en el mapa de la Fig. 2. Este tipo de clima abarca países como Venezuela, Guyana y Brasil (Amazónico)⁶.

1.3. Relación del género *Exellodendron* con *Parinari*

Ya en 1972, G.T. Prance hacía una referencia en su monografía *Chrysobalanaceae*, publicada en el volumen 9 de la revista *Flora Neotrópica*, de la poca similitud entre ciertas especies del género *Parinari*. La única similitud entre ellas era el septum falso del ovario, por lo que dividió este género en 7 distintos, de donde unas 5 especies de *Parinari* originarias de América resaltaban por su gran diferencia entre las demás. Estas 5 especies americanas fueron catalogadas dentro del género *Exellodendron*, donde hoy en día siguen siendo las únicas especies descritas^{3,4,6}.

1.4. Metabolitos secundarios en las *Chrysobalanaceae*

1.4.1. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura comprendida por 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, correspondiente a la parte alquílica del fenilpropano. Es por ellos que se les conoce como unidades C₁₅: C₆-C₃-C₆ y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano¹ (Fig. 3.).

Estos pueden contener un anillo central heterociclo (γ -pironas) que son los más abundantes, o una cadena abierta: chalconas, como precursores de los anteriores. La proporción de oxigenación varía y puede estar como grupo hidroxilo, metoxilo, dioximetileno y aún formando glicósidos. Las polimerizaciones son frecuentes, hay muchos monómeros, algunos dímeros, pocos trímeros y tetrámeros; la mayoría son polímeros entre los cuales se encuentran los taninos condensados¹.

En esta familia de plantas se ha reportado la presencia de estos compuestos lo cual es una característica del reino vegetal.

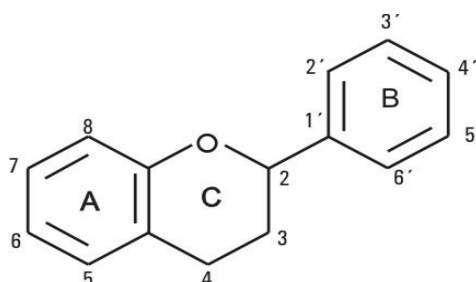


Fig. 3. Estructura básica del núcleo flavano¹².

Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas. Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C, exceptuando las chalconas, las cuales al no estar cicladas, no poseen anillo C. Ejemplos de las estructuras de estos subgrupos de flavonoides se muestra en la Fig. 4.¹¹.

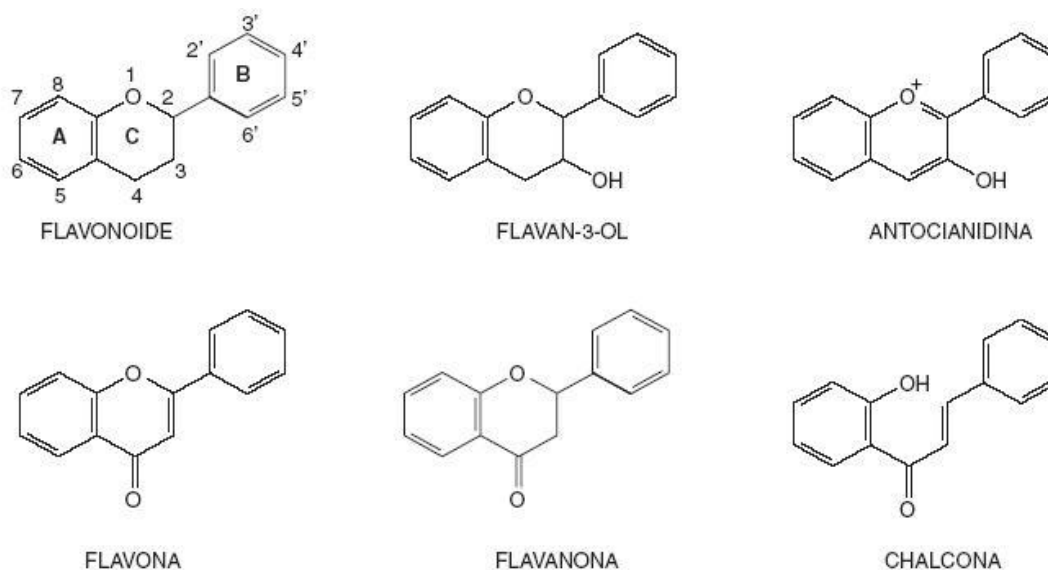


Fig. 4. Estructuras de subgrupos de flavonoides¹³.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas (Fig. 5.), debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo.

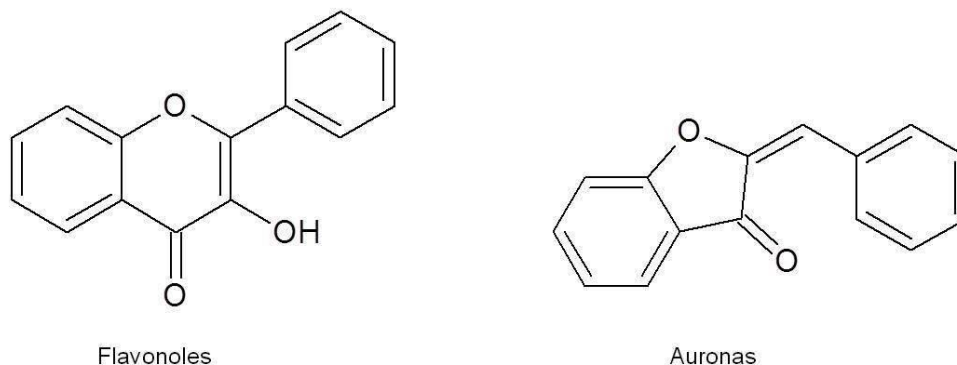


Fig. 5. Estructura general de flavonoles y auronas²²

Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C₂ presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos. La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes¹⁴.

La biosíntesis de estos compuestos en las plantas presenta la misma vía precursora para todos los tipos de flavonoides y la diferenciación en la oxidación de algunas posiciones puede resultar una característica quimiotaxonómica de la planta, tener alguna función biológica o simplemente ser generado como un producto de la descomposición del material vegetal¹.

Esta biosíntesis tiene una ruta mixta, es decir, convergen dos compuestos provenientes de distintas partes del metabolismo primario. El anillo A proviene de la ruta de la malonil coenzima A y el anillo B y la cadena C₃ provienen de la ruta del ácido shikímico¹.

Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido *p*-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil CoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A este

meta-oxigenado, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonil CoA; por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es *orto*-oxigenado¹⁴.

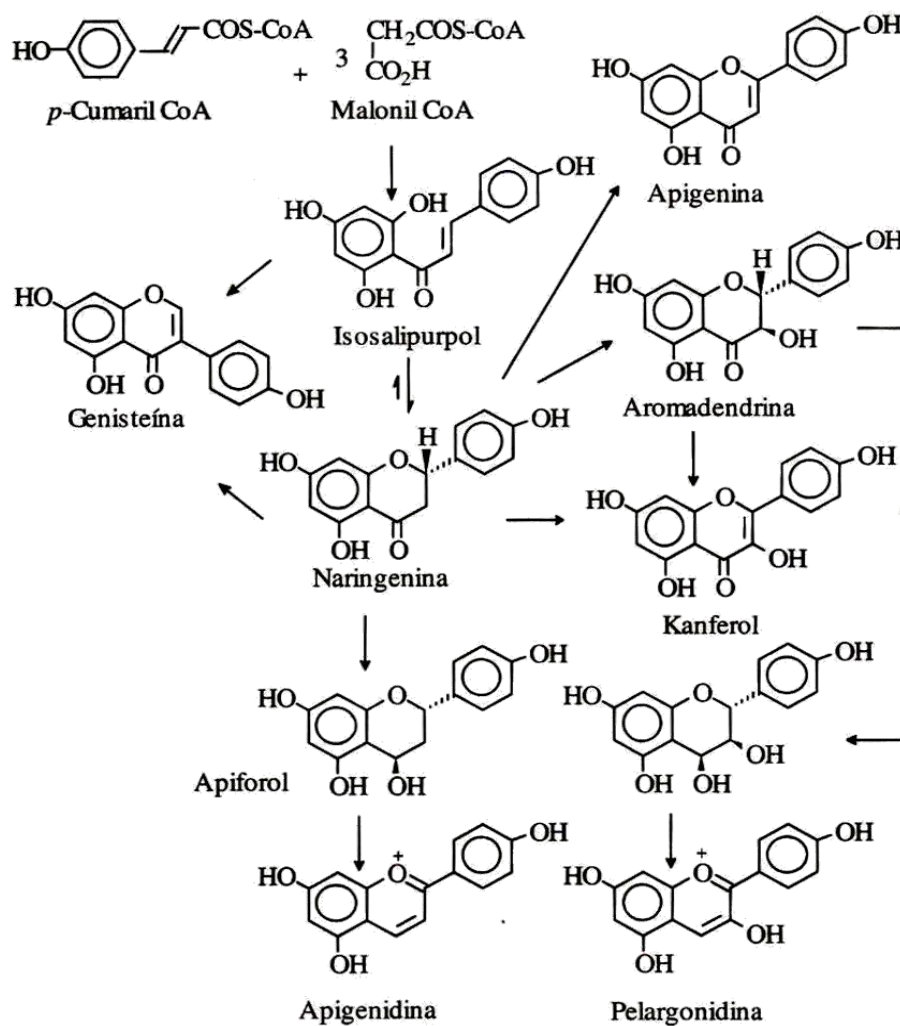


Fig. 6. Biosíntesis de flavonoides y sus derivados¹.

En este esquema (Fig. 6.) se presenta la evolución de los flavonoides. Luego de la condensación de una molécula de *p*-cumaril CoA con tres moléculas de Malonil CoA¹⁴, en la cual interviene la enzima chalcona-sintetasa (CHS) que cataliza esta condensación, se da la ciclación por medio de la chalcona-isomerasa (CHI) que cataliza esta reacción para la obtención de la flavanona correspondiente¹.

En el caso de este esquema, después de la obtención de la chalcona Isosalipurpol, la chalcona-isomerasa interviene en la obtención del siguiente producto, la flavanona Naringenina¹.

Las flavanonas por acción de la flavanona-3-hidroxilasa son transformadas a flavononoles. En el caso de la naringenina de la Fig. 6. la misma fue transformada en Aromadendrina¹.

Esta naringenina también puede ser transformada en la flavona correspondiente (apigenina), por medio de la intervención de la flavona-sintetasa que cataliza la deshidrogenación entre C₂ y C₃¹.

Para la formación de las antocianidinas es necesario reducir el grupo carbonilo en C₄. La enzima asociada con esta reducción se conoce como dihidroflavonol-reductasa. En el esquema de la Fig. 6., se puede observar que por medio de esta reducción la aromadendrina puede ser transformada a su flavan-3,4-diol. Estos compuestos son inestables y se convierten rápidamente en antocianidinas como la pelargonidina. Este último paso es catalizado por una enzima llamada antocianidina-sintetasa (ANS)¹.

Existen antocianidinas que no poseen el grupo -OH en el C₃. Para su formación se propone al 4-hidroxifavanol como intermediario. En el caso de la Fig. 6., el apioforol. En esta reducción interviene la enzima flavanona-4-reductasa (FNR) en presencia de NADPH. De esta forma, como último paso se obtiene la antocianidina apigenidina¹.

El flavonol aromadendrina puede convertirse a kanferol por medio de la deshidrogenación entre C₂ y C₃ mediada por la enzima flavonol-sintetasa (FLS)¹.

Mediante el análisis fitoquímico de especies de la familia Chrysobalanaceae se ha observado reiteradamente la presencia de flavonoides en esta familia. Estudios resaltan la presencia de tres tipos de flavonoides, mayormente glicosilados, en distintas especies de Chrysobalanaceas; la miricetina, quercetina y kanferol; los

cuales se encuentran dentro de los marcadores quimiotaxonómicos para esta familia de plantas^{5,6}. Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo¹⁶. Para los flavonoides aislados en esta familia, se reportan muchos glicósidos de los núcleos de miricetina, quercetina y kanferol⁵.

En 2006 fueron reportados varios derivados de miricetina glicosilados, por el grupo de investigación de la Universidad Federal do Pará de Peres, A., y la Universidad de Studi di Firenze. Estudio realizado por los investigadores Gallori, S. y Vincieri, F, del extracto hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Chysobalanus icaco* L¹⁷.

El extracto fue purificado por HPLC/DAD con una columna de RP-18 analítica LiChroCART® Purosphere STAR RP-18 (4μ), aplicando un gradiente de solvente lineal desde agua acidificada con ácido acético hasta pH 3,2, acetonitrilo y metanol y HPLC/MS usando esas mismas condiciones¹⁷.

En este estudio reportaron miricetina-3-O-rutenósido (**1**), miricetina-3-O-ramnósido (**2**), y quercetina-3-O-ramnósido (**3**) cuyas estructuras se encuentran en la Fig. 7.¹⁷

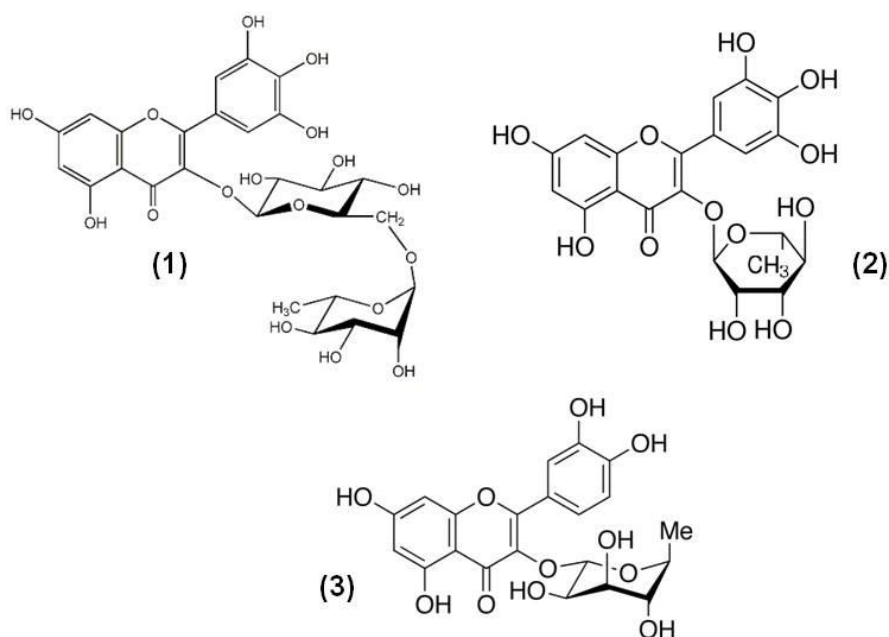


Fig. 7. Flavonoides glicosilados aislados de *Chrysobalanus icaco* L.^{17,18,19}.

La especie *Chrysobalanus icaco* L. es tradicionalmente utilizada en infusiones para el control de la glicemia en pacientes con diabetes en Brasil. En dicho estudio también se encontró la presencia de rutina (4) (Fig. 8.) en este extracto¹⁷. Se ha reportado en diversos estudios que este favonol posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiarterioesclerótica¹⁹.

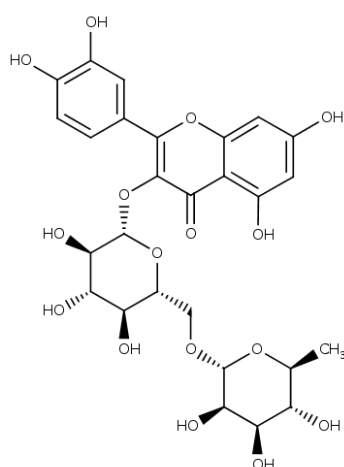


Fig. 8. Estructura de la Rutina¹⁸.

En 2012 en la Universidad Central de Venezuela, en un trabajo conjunto entre la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina se realizó un estudio fitoquímico de *Coupeia paraensis* con ensayos de toxicidad e inhibición de la glucosa-6-fosfatasa. Del extracto metanólico se aislaron los flavonoides rutina (4), miricetina (5) y quercetina (6). Con respecto a la actividad biológica, se reportó que la actividad hipoglicemiante de este extracto fue de un 41% en inhibición de la glucosa-6-fosfatasa en microsomas intactos y que no poseía una citotoxicidad en células Vero, en todo el rango de concentraciones utilizadas para la determinación (0,7-50 µg/mL), es decir, resultó inocuo²¹.

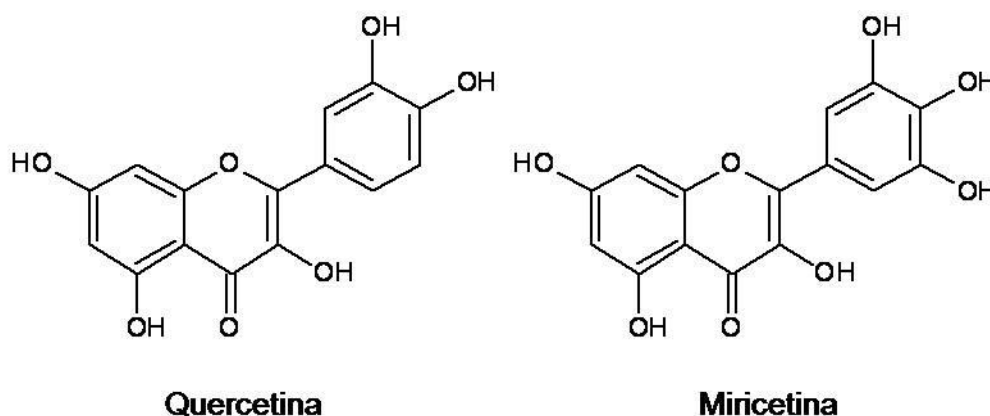


Fig 9. Estructuras de la quercetina (6) y la miricetina (5)²²

La quercetina ha demostrado tener propiedades contra la arterioesclerosis, mejorando la vasorrelajación dependiente del endotelio en la aorta, disminuye la presión arterial sistólica, y reduce la hipertrofia cardíaca y la cantidad de proteína en la orina en ratas hipertensas. Entre las otras bondades de la quercitina está la regulación del metabolismo de lípidos a través de la estimulación de la actividad de la lipólisis²⁰.

En un estudio clínico realizado en la India en 2014, se utilizaron pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 a los cuales se los dividió en dos grupos. Un grupo recibiría Metformina 500 mg diario y el otro grupo recibiría una formulación estandarizada de extractos acuosos de seis hierbas, en una pastilla de 500 mg/día,

la cual poseía un contenido de berberina de 1,27%, quercetina en un 0,01% y ácido gálico en 3,09%. El criterio de valoración primario fue el efecto sobre el cambio de la línea de base en la glucosa en sangre (Glucosa en sangre en ayunas y glucosa en sangre postprandial) y hemoglobina glicosilada (HbA1c)⁴⁷.

Después de 24 semanas, los resultados medido en ayunas sobre glucosa en sangre postprandial mostró una disminución del 25,52% y 24,22% en el grupo tratado con formulación estandarizada de seis hierbas, comparado con 31,46% y 24% de reducción en el grupo tratado con metformina (diferencia de tratamiento estimada -10,8; IC del 95%: -22,63 a 1,03 y -0,36; -12,1 a 11,38, respectivamente). La reducción de HbA1c también fue similar para el grupo tratado con la formulación polihierbal y Metformina (diferencia de tratamiento estimada 0,01; IC del 95%: -0,51 a 0,53). Sin embargo, la disminución del nivel medio de colesterol total fue más pronunciada en el grupo tratado con PHF (diferencia de medias estimada 61,3; IC 95%: 55,32 a 67,28) que el grupo tratado con metformina (diferencia de medias estimada 41,12; IC del 95%: 34,92 a 47,32) y además hubo significación estadística entre los grupos de tratamiento en el nivel de colesterol total al final del tratamiento de seis meses (diferencia de tratamiento estimada 20,18; IC del 95%: 12,34 a 28,02). El estudio demostró que la ingesta diaria de esta formulación que contenía el flavonol quercetina disminuyó el nivel glucémico y mejoró la homeostasis lipídica⁴⁷.

Para la especie de estudio *Exellodendron coriaceum* Prance, en el año 2009, se aisló del extracto de cloroformo diversos derivados de la quercitina, el cual se ha considerado uno de los marcadores quimiotaxonómicos de las Chrysobalanaceas. En este estudio, dicho extracto se obtuvo por maceración de las partes aéreas y frutos con solventes de polaridad creciente desde hexano, hasta metanol-agua en proporción 1:1. Todos los extractos se sometieron a ensayos de actividad antiviral con el virus de fiebre amarilla cepa vacunal 17D. El extracto metanólico-acuoso mostró un 60% de inhibición de la replicación del virus a una concentración de 25 µg/mL, con respecto a los otros extractos⁶.

Este estudio fue realizado por la Dra. Diana Carrasco, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y es el único estudio conocido sobre la especie *Exellodendron coriaceum* Prance. Entre los compuestos que se aislaron y caracterizaron de los extractos de cloroformo, metanol y butanol están la quercetina-3-O-ramnósido (fig. 5), quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosido (7), quercetina-3-O- β -L-galactopiranosido (Hiperina) (8), quercetina-3-O- α -L-arabinósido (9) y quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1-6)- β -D-galactopiranosido (10) (Fig. 10)⁶.

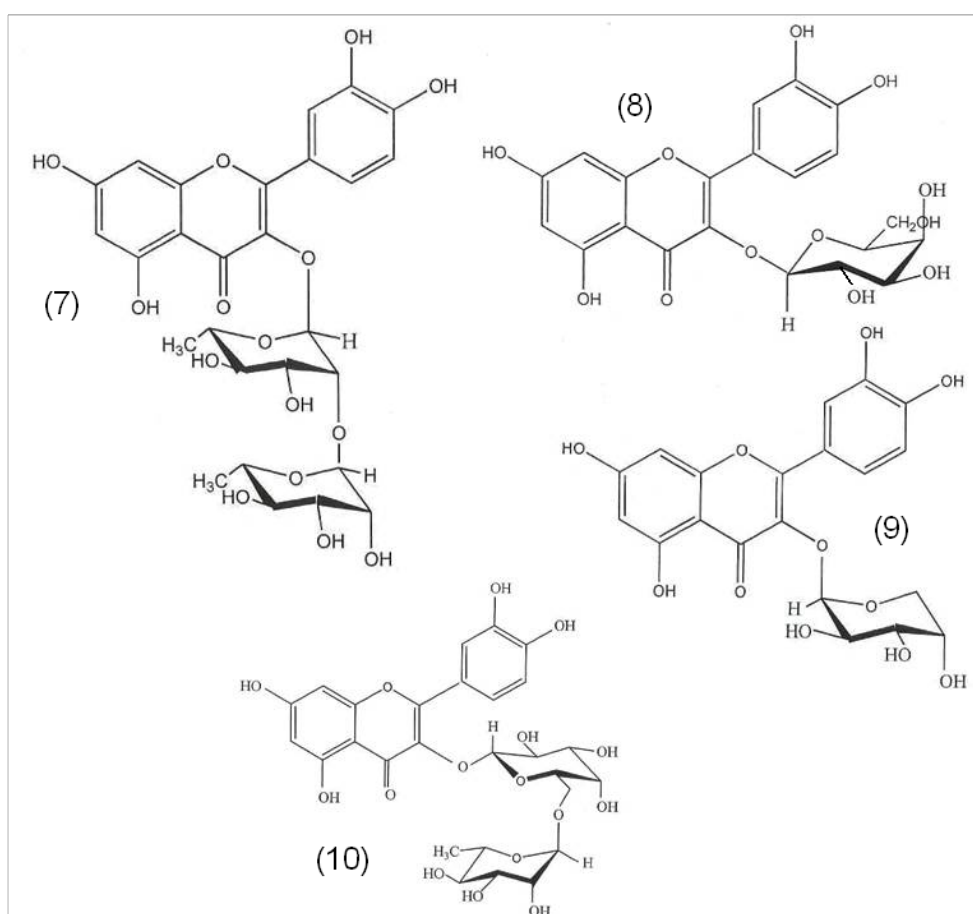


Fig. 10. Derivados de quercetina aislados de *Exellodendron coriaceum*⁶

Con los derivados 7, 8, 9 y 10 de quercetina se realizaron ensayos de actividad hipoglicemiante sobre el sistema G-6-Pasa microsomal, obteniéndose que todos poseen efecto en la inhibición de la actividad de esta enzima a una concentración de 160 μ g/mL, con valores que van de 24,3% a 52,3% en microsomas

intactos. Mientras que en microsomas rotos los valores de actividad se encontraron entre 26,74% a 49,77%⁶.

También logró aislar dos agliconas, cuyas estructuras no se encuentran reportadas como marcadores quimiotaxonómicos de esta familia de plantas sin embargo, la ruta biosintética de estos compuestos hace posible los distintos derivados con el esqueleto flavonoidal. Entre las agliconas encontradas en el extracto de cloroformo están 2',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (**11**) y la 7-metoxi-apigenina (**12**) (Fig. 11)⁶.

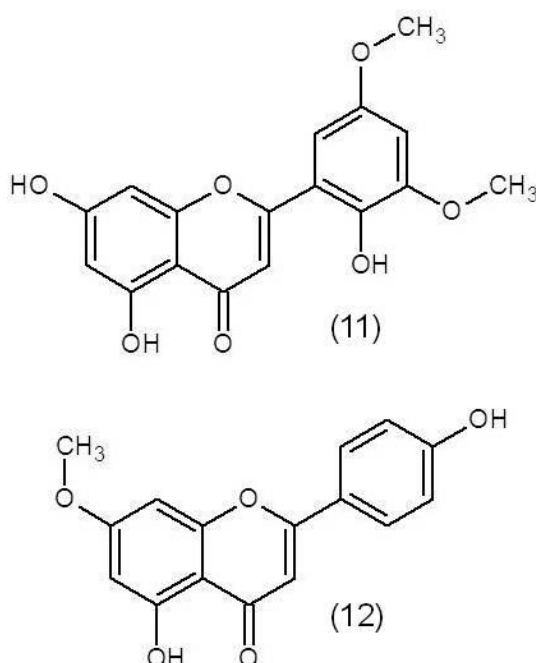


Fig. 11. Agliconas aisladas de *Exellodendron coriaceum* Prance^{6,22}.

1.4.2. Terpenos

Otra familia de compuestos ampliamente reportada para la familia de las Chrysobalanaceas son los terpenos⁵.

La unidad fundamental que define a los esqueletos de estos compuestos contiene 5 átomos de carbono y se le conoce como isopreno (Fig. 12). No es frecuente encontrar esta molécula en las plantas sino que se encuentra asociada a otras unidades iguales o a otras moléculas¹.

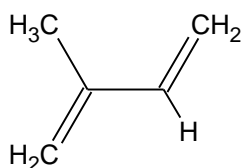


Fig. 12. Estructura del isopreno²²

De manera general los terpenos responden a lo que se conoce como la *regla del isopreno*, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. Esto no siempre se evidencia, ya que pueden derivarse estructuras cuyo número de átomos de carbono no sea un múltiplo de 5, pues son frecuentes las reacciones de degradación o bien pueden suceder rearrreglos en los esqueletos que conducen a secuencias anormales de la unidad de C₅¹.

Debido a esto, una clasificación de los terpenos según las unidades de isopreno que contengan dicha estructura puede darse de la siguiente forma¹⁶:

Tabla 1. Clasificación de los terpenos según las unidades de isopreno que contengan en su estructura¹⁶

Tipo de terpeno	Unidades de isopreno que contiene
Monoterpenos	2
Sesquiterpenos	3
Diterpenos	4
Sesterpenos	5
Triterpenos	6
Carotenoides	8

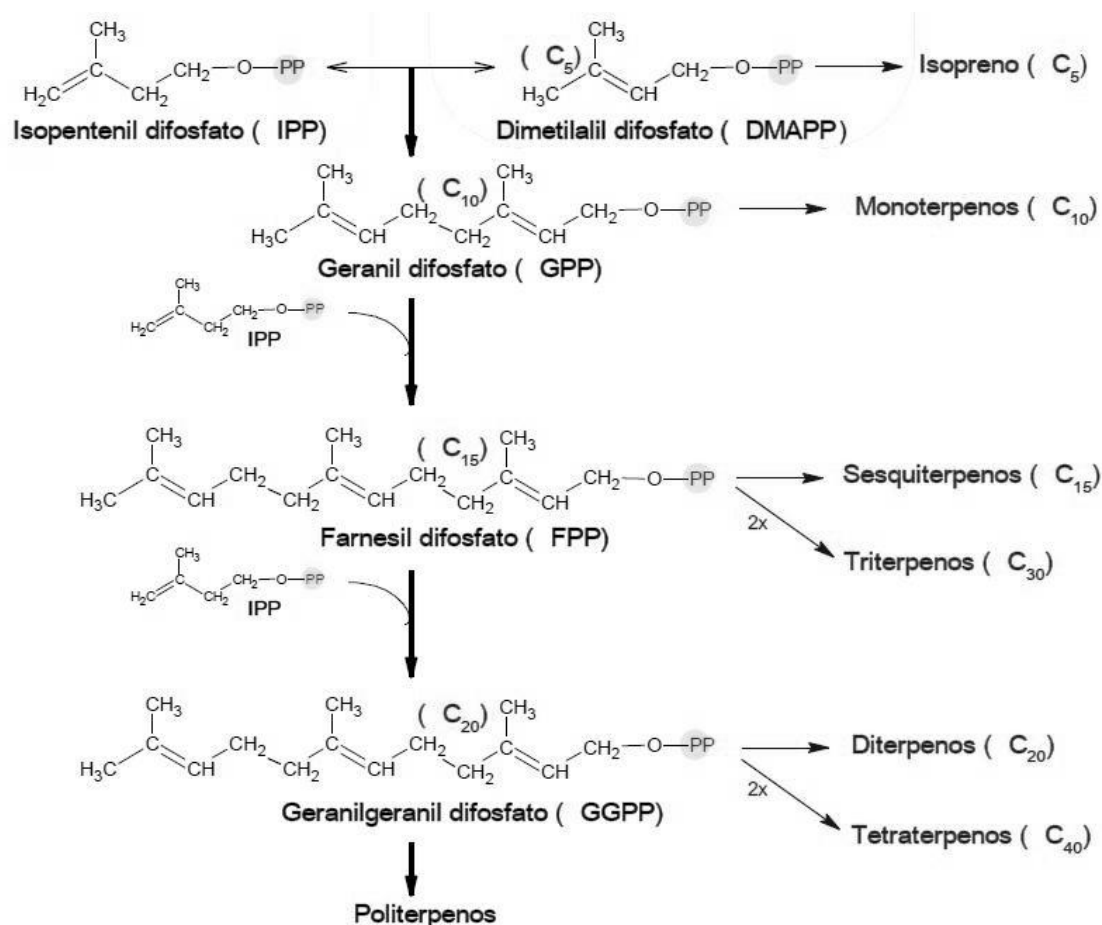


Fig 13. Resumen de biosíntesis general de terpenos¹⁶.

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos¹⁶.

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales. Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista

de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial¹⁶.

Para la familia de las Chrysobalanaceas se han reportado una gran variedad de compuestos de este tipo, entre los que resaltan los núcleos de lupano, oleanano, ursano, curcubitano, kaurano y clerodano⁵.

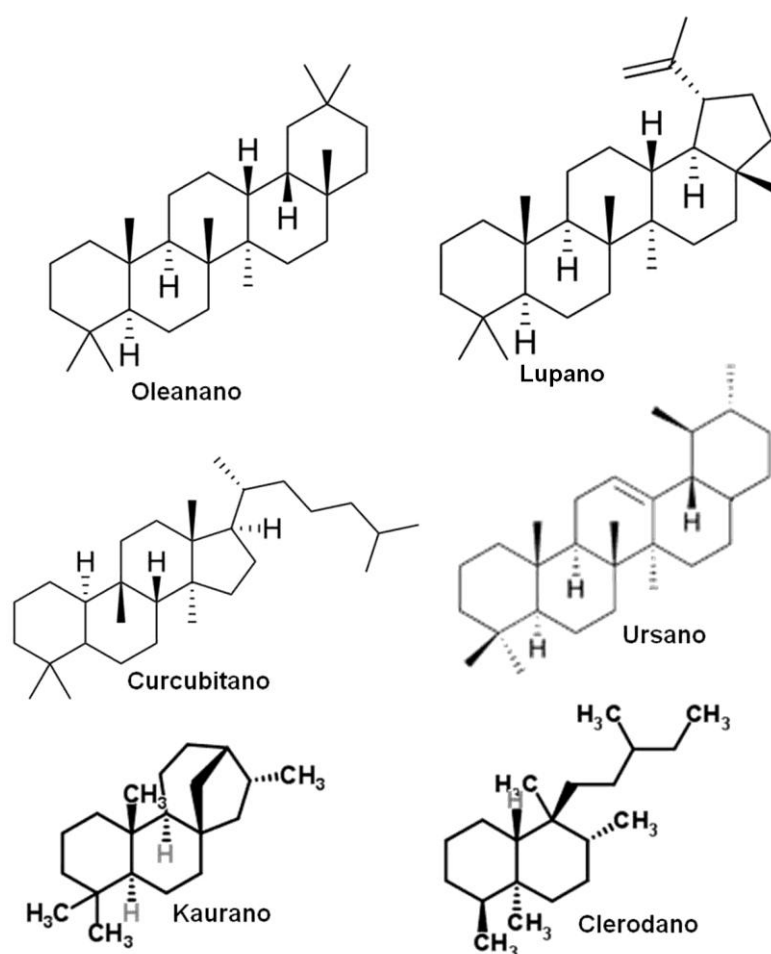


Fig. 14. Núcleos triterpenoidales encontrados en Chrysobalanaceas²²

Del estudio de *Couepia paraensis* anteriormente mencionado²¹, se aislaron 8 triterpenos cuyos núcleos están asociados a los reportados continuamente para las Chrysobalanaceas. En este estudio se aislaron el β -sitosterol (**13**), éster metílico del ácido betulínico (**14**) y éster metílico del ácido oleanólico (**15**) del extracto de

cloroformo. Mientras que del extracto cloroformo-metanol (9:1) se aislaron los siguientes ácidos: oleanólico (16), pomólico (17), ursólico (18), betulínico (19) y 6- β -hidroxibetulínico (20)²¹.

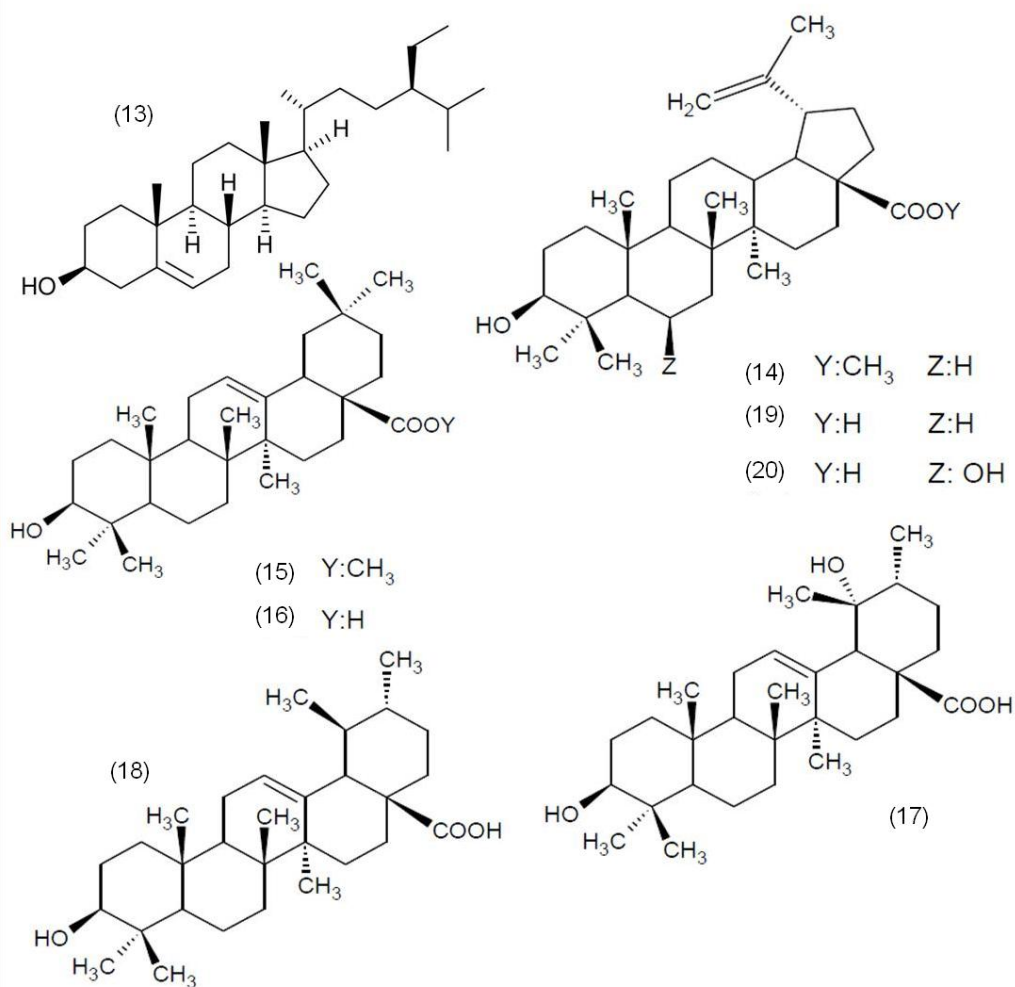


Fig. 15. Compuestos terpenoidales aislados de *Couepeia paraensis*²¹

De los extractos que contenían cloroformo y cloroformo-metanol realizaron un estudio de citotoxicidad en células Vero, obteniendo que sólo resultaron inocuos en concentraciones menores a 3,1 $\mu\text{g/ml}$ después de 24 horas de incubación. De igual forma se estudió el efecto de los mismos ante la actividad de la glucosa-6-Pasa, a una concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$. El único extracto con actividad significativa fue el

de metanol (41% en inhibición en microsomas intactos), del cual se obtuvieron los flavonoides ya mencionados²¹.

Otra especie estudiada para conocer su contenido de terpenos es *Licania arianae* Prance, la cual fue estudiada en Brasil en el año 2008, por el grupo de investigación de Carvalho, M²⁴.

En este caso tomaron las hojas y raíces de la planta para realizar extractos por maceración utilizando hexano y metanol. Luego de distintas particiones obtuvieron más de 20 compuestos de núcleo oleanano y ursano, incluyendo dos saponinas, el ácido 3 β -O- β -D-glucopiranosil-24-hidroxiursa-12-en-28-oico (**34**) y ácido 3 β -O- β -D-glucopiranosil-19 α ,24-dihidroxiursa-12-en-28-oico (**36**), nuevas para la biblioteca de compuestos aislados de las Chrysobalanaceas²⁴.

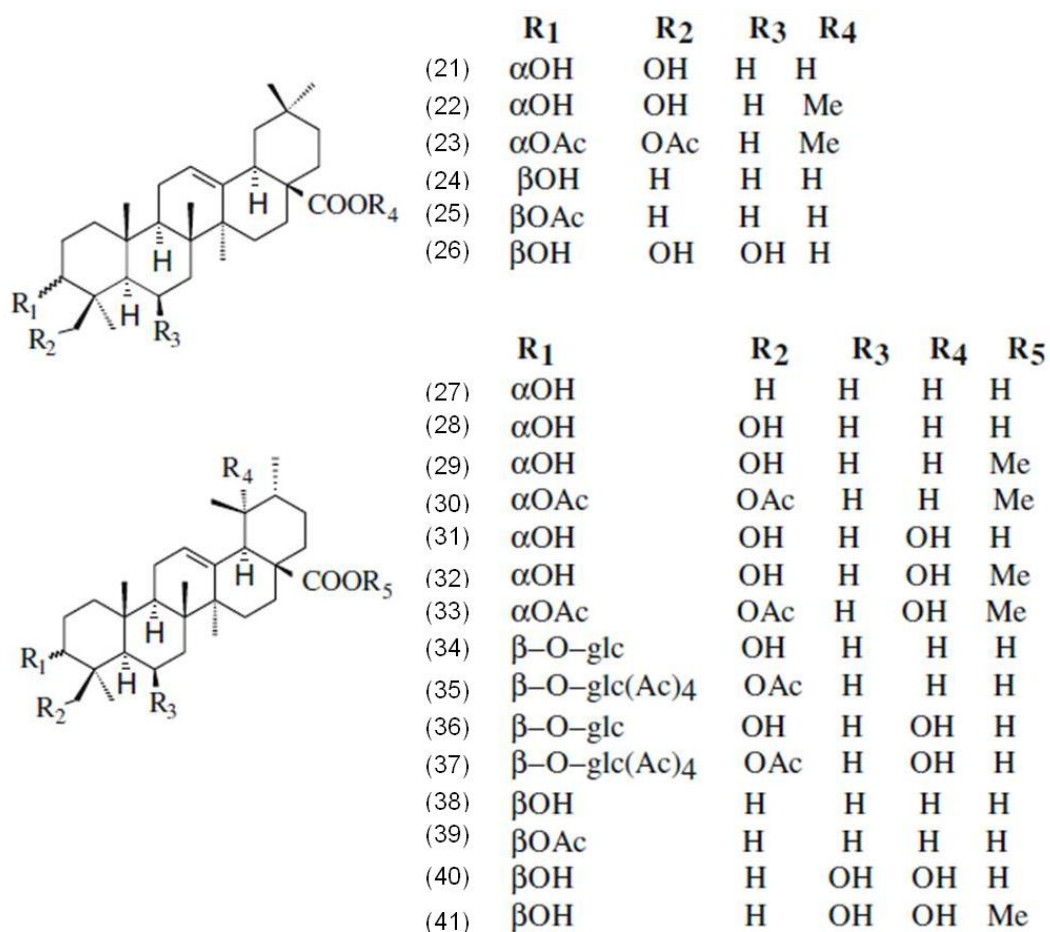


Fig. 16. Compuestos terpenoidales aislados de *Licania arianae*²⁴

Las saponinas son glicósidos de alto peso molecular, que consisten en azúcares enlazados a triterpenos o esteroides. Tienen propiedades detergentes, muestran actividad hemolítica, pueden ser amargas al gusto y tóxicas en organismos marinos²⁵.

1.5. Justificación

Las Chrysobalanaceas como familia de plantas han sido objeto de estudio tanto de la botánica como de la fitoquímica. En esta área es de interés el hallar compuestos que puedan servir como marcadores quimiotaxonómicos y/o compuestos que promuevan la cura de diversas enfermedades o sean eficaces en el tratamiento de éstas. El grupo de productos naturales perteneciente a la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela ha hecho aportes significativos a la biblioteca de compuestos que se encuentran en las Chrysobalanaceae, debido a los numerosos estudios fitoquímicos que se han realizado con distintas especies de esta familia.

En el caso de *Exellodendron coriaceum* Prance, la motivación del estudio del extracto de metanol-agua (1:1) radica en su importante actividad antiviral frente al virus de fiebre amarilla⁶ y en el estudio de su composición química del cual no se posee información en el estudio previo donde se menciona este extracto.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

- Realizar el estudio fitoquímico del extracto metanólico acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance.
- Caracterizar por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C), espectrometría de masas (EM) e infrarrojo (IR) los metabolitos secundarios aislados del extracto metanólico acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance.
- Evaluar la actividad hipoglicemiante de fracciones o compuestos aislados del extracto metanólico acuoso de *Exellodendron coriaceum* Prance.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Materiales

2.1.1.1. Material vegetal⁶

Exellodendron coriaceum fue recolectada en las cercanías del Río Sipapo, Municipio Autana, Estado Amazonas, en octubre de 1998. La recolección e identificación del espécimen estuvo a cargo del Dr. Aníbal Castillo del Centro de Botánica de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela. El material estudiado consistió en las partes aéreas y frutos de la planta.

El material fresco se secó en estufa a 30°C y se molió. El proceso de extracción fue mediante su maceración sucesiva del material con solventes de creciente polaridad: hexano, cloroformo, cloroformo/metanol 9:1, metanol y metanol/agua 1:1.

La maceración se llevó a cabo por 48 a 36 horas con cada solvente y luego se filtró la solución. La evaporación del solvente se llevó a cabo a presión reducida y de esta forma se obtuvieron los distintos extractos. En el caso del extracto metanólico-acuoso (1:1) la masa obtenida fue de 21,21 g, resultando en un 1,53% del material vegetal utilizado inicialmente (1389 g). En la siguiente figura se observa el proceso de obtención de cada extracto de manera esquemática.

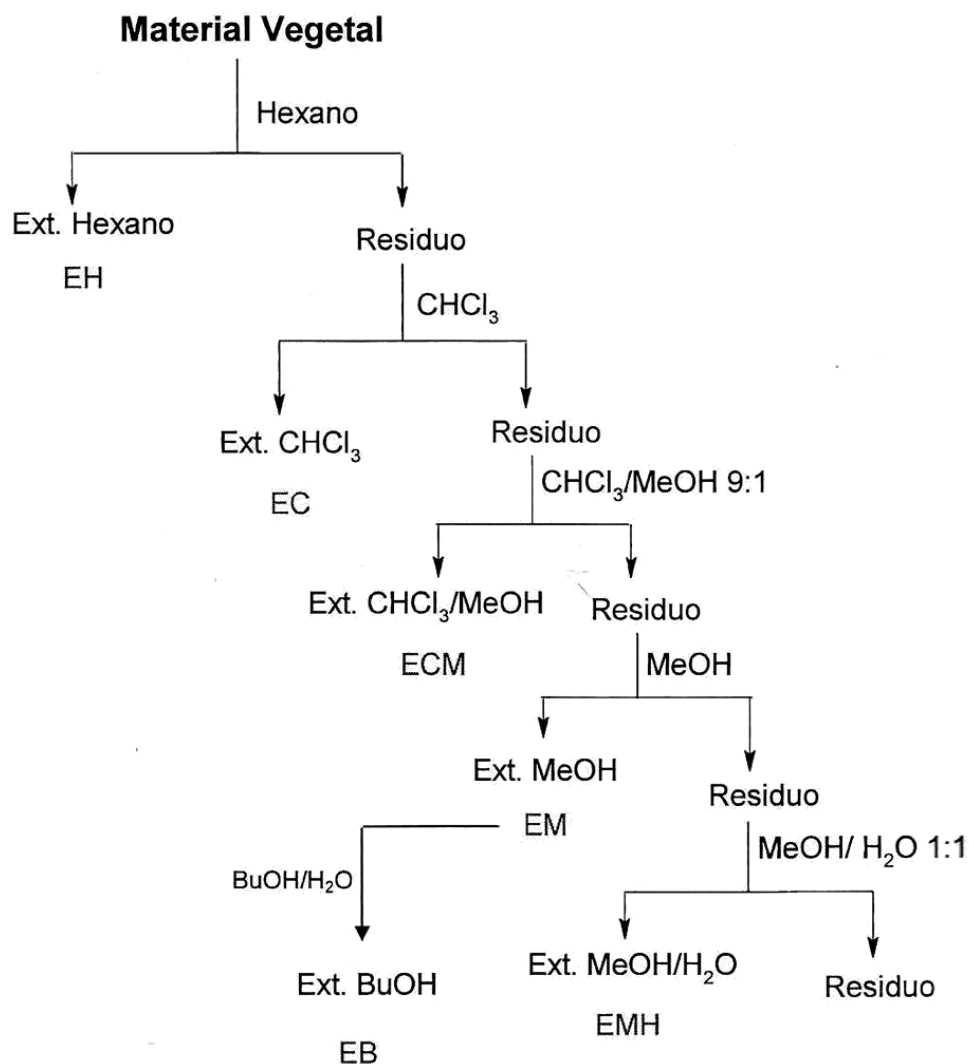


Fig. 17. Esquema de obtención de los extractos crudos de las partes aéreas y frutos de *Exellodendron coriaceum* Prance⁶

2.1.1.2. Soportes cromatográficos

a) Cromatografía en columna: sílica gel 60 RP-18 (40-63 μm), sephadex LH-20. Se utilizaron columnas cromatográficas de vidrio con las siguientes especificaciones de largo x ancho, en centímetros:

Columna F: 63x3 cm

Columna Sp: 90x2,5 cm

Columna A: 45x2,5 cm

Columna B: 64x0,9 cm

Columna C: 45x1 cm

b) Cromatografía de capa fina: placas de aluminio sílica gel 60 F₂₅₄ con indicador de fluorescencia. Placas de aluminio sílica gel 60 RP-18.

c) Placas preparativas de sílica gel 60. F₂₅₄, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor. MERK.

2.1.1.3. Solventes

Agua destilada	Cloroformo
Etanol	Isopropanol
n-Butanol	Metanol
Ácido acético	Acetona
Ácido fórmico 85%	Heptano
Acetato de etilo	Hexano

2.1.1.4. Reactivos para revelado de placas y reacciones de coloración

***p*-Anisaldehído-ácido sulfúrico²⁶**

Para preparar este revelador se mezclan 0,5 ml de *p*-anisaldehído con 10 mL de ácido acético glacial. A esta mezcla se le agregan 85 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

La placa se sumerge en 5 mL la mezcla de revelador *p*-anisaldehído-ácido sulfúrico, en una placa de Petri de cristal, se deja secar y se calienta a 100°C por 5-10 minutos. Luego es evaluada en el visible o en lámpara UV-365 nm.

Los diversos compuestos derivados de plantas, fenoles, terpenos, azúcares y esteroides dan coloración violeta, azul, rojo, gris o verde dependiendo de su estructura³².

Éster del ácido 2-aminoetil-difenilbórico (Naturstoff)⁴¹

Se disuelve 1 g del reactivo éster del ácido 2-aminoetil-difenilbórico (Naturstoff) en 100 mL de metanol.

Luego de secar bien la placa cromatográfica, se rocía o se sumerge la placa durante 1 segundo en la solución del reactivo y se deja secar. Como segundo paso se sumerge la placa en una solución de parafina/hexano, se deja secar y se irradia con luz UV a 365 nm. Con este reactivo la fluorescencia es dependiente de la estructura del compuesto.

Con este método de revelado de placas los glicósidos de quercetina, miricetina y luteolina dan una coloración naranja. Los glicósidos de kanferol, apigenina e isoramnetina coloraciones entre amarillos y verdes³⁹.

En luz UV de 365 nm, la glucosa, fructosa y lactosa dan coloración azul pálida en contraste con el fondo negro pálido de la placa⁴¹.

Cloruro férrico 10%²⁶

Se pesa 1 gramo de cloruro de hierro y se disuelven en 10 mL de agua destilada.

Reacción con cloruro de hierro al 10%³³

Se prepara una solución acuosa del extracto al 2% y se colocan 3 mL de esta solución en un tubo de ensayo. Se le agrega una gota de disolución de cloruro de hierro al 10%. El resultado de la prueba dependerá del tipo de tanino contenido en el extracto. Se debe observar una coloración verde a azul.

Esta solución se puede utilizar para revelado de placas, observándose colores que van desde azul, verde o rojo.

Ácido clorhídrico concentrado³³

Se agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado sobre 5 mL de solución acuosa del extracto al 2%. Se calienta en baño de agua y se observa la coloración. En el caso de taninos condensados, debe formarse un sólido globular rojo conocido como flobáfeno.

2.1.1.5. Reactivos para bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa⁶

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| a) Glucosa-6-fosfato | i) Tartrato de sodio-potasio |
| b) Histona II-A | j) Carbonato de sodio |
| c) Dodecil sulfato de sodio (SDS) | k) Sulfato cúprico |
| d) HEPES | l) Heptamolibdato de amonio |
| e) EDTA | m) Ácido ascórbico |
| f) Sacarosa | n) Ácido sulfúrico 37 N |
| g) Hidróxido de sodio | o) Albúmina bovina |
| h) Reactivo Folin-Ciocalteu | |

2.1.1.6. Equipos

- Lámpara UV GL-25. Multibanda UV – 254/366 nm
- Balanza analítica Mettler Instrumente AG CH- 8606
- Plancha de calentamiento con agitación Corning 6795 - 220

2.1.1.7. Instrumentos para bioensayo sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa⁶

- a) Centrifuga Sorvall Instruments (Duport) Modelo RC5C. Rotor 5S34
- b) Ultracentrífuga Beckmann, modelo L5-75 B; rotor 30 de titanio
- c) Cava Ultra-low regulable
- d) pHmetro
- e) Espectrofotómetro Pharmacia, modelo Novaspec II
- f) Espectrofotómetro Beckmann de doble haz DU-640

2.1.2. Métodos

2.1.2.1. Cromatográficos

- Cromatografía de columna en fase normal (sílica) y fase inversa (RP-18).
- Cromatografía de capa fina en fase normal (sílica) y fase inversa (RP-18).

- Cromatografía de capa fina preparativa en fase normal.
- Cromatografía de columna por exclusión molecular (LH-20).

2.1.2.2. Bioensayo sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa

Las rutas metabólicas responsables de la producción de glucosa en el hígado son la gluconeogénesis y la glicogenólisis. La enzima Glucosa-6-fosfatasa cataliza el paso final de ambas rutas metabólicas²⁷.

La enzima glucosa-6-fosfatasa hepática está situada en la membrana del retículo endoplasmático (RE) y su sitio activo se encuentra en el lumen del RE mientras que todas las otras enzimas involucradas el metabolismo del glucógeno, la gluconeogénesis y la glucólisis se encuentran en otra parte de la célula. Para mantener una actividad enzimática normal de la Glucosa-6-fosfatasa, *in vivo* o *in vitro*, son necesarias la subunidad catalítica de la enzima y una proteína reguladora de fijación de calcio, denominada proteína estabilizante (SP). Por lo tanto, es necesario transportadores para los sustratos y productos de la enzima glucosa-6-fosfatasa a través de la membrana del RE²⁷.

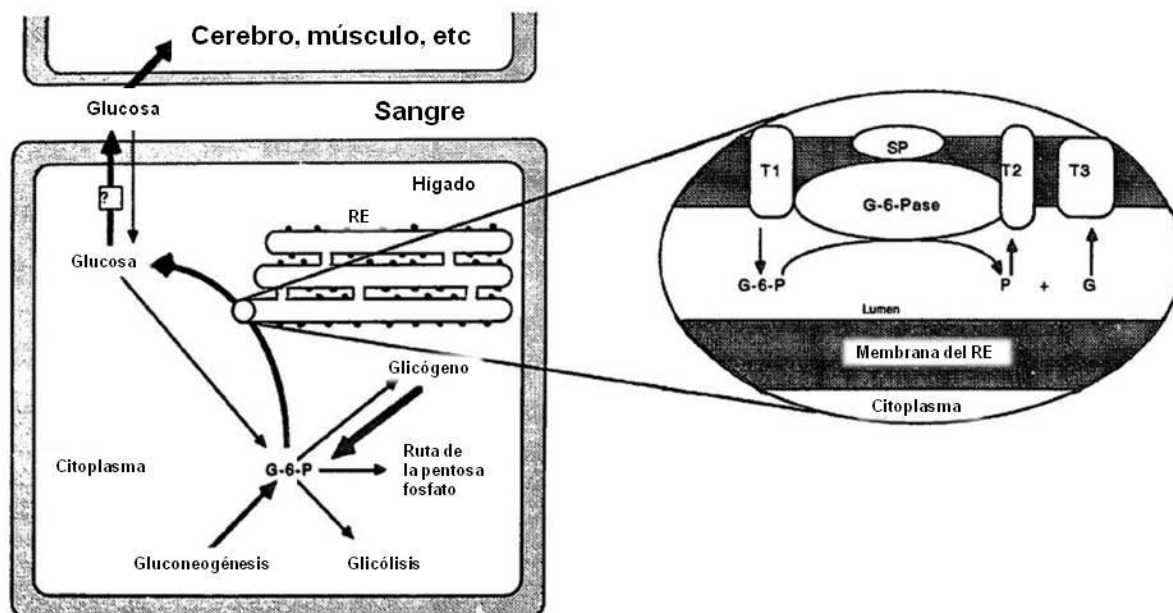
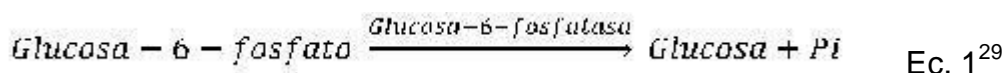


Fig. 18. Representación esquemática de las vías del metabolismo hepático de la glucosa y el papel de la glucosa-6-fosfatasa. Las flechas oscuras indican las vías por las que la glucosa es producida por el hígado cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos o en tiempos de estrés. La proyección del óvalo del lado derecho es una representación de la glucosa-6-fosfatasa hepática dentro del retículo endoplasmático. Leyenda: G-6-Pase = glucosa-6-fosfatasa; SP = proteína estabilizante de unión al calcio; T1 = proteína de transporte de glucosa-6-fosfato; T2 = proteína de transporte de fosfato / pirofosfato; T3 = Proteína de transporte de glucosa; P = fosfato; G = glucosa²⁷.

Hay tres proteínas de transporte denominadas T1, T2 y T3 (o GLUT 7), que transportan glucosa-6-fosfato, fosfato y glucosa, respectivamente (Fig. 18) a través de la membrana del RE. Para que la glucosa-6-fosfatasa hepática microsomal tenga actividad *in vivo* al menos cinco proteínas diferentes son necesarias²⁷.

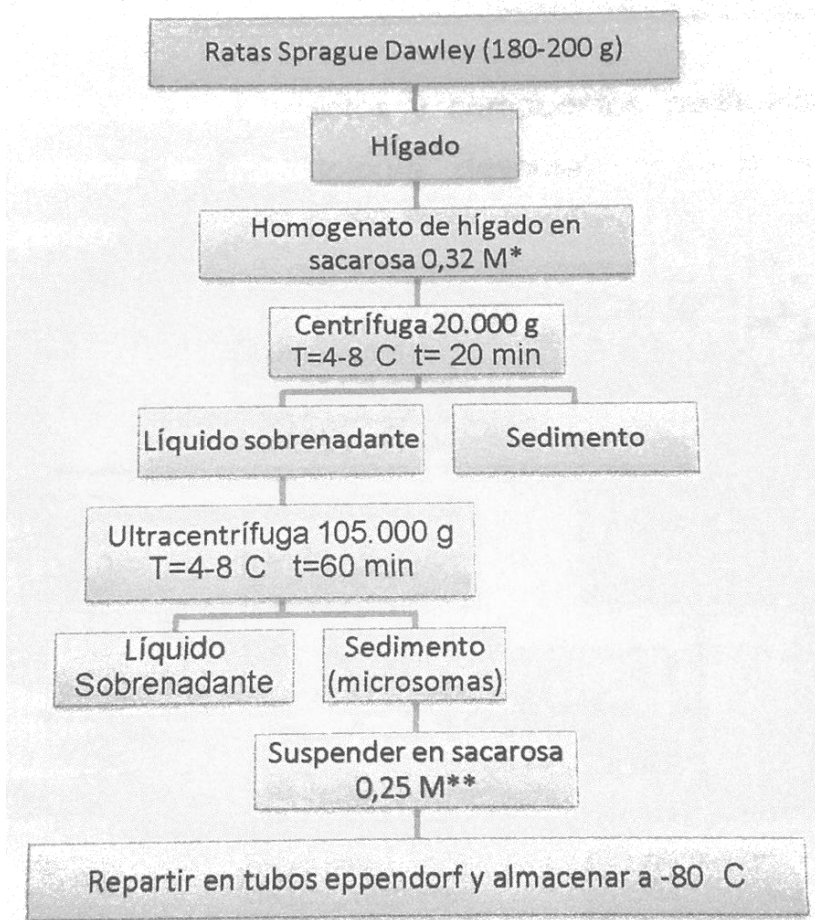
Como productos de esta reacción están la glucosa y el fosfato inorgánico (Pi), por lo que la actividad de esta enzima puede ser medida mediante la desaparición del sustrato o la aparición de alguno de sus productos, en este caso, del fosfato inorgánico^{28,29}.



El fosfato inorgánico obtenido en esta reacción puede ser cuantificado colorimétricamente por la formación de un complejo azul con el heptamolibdato de amonio en medio ácido, cuya absorbancia es determinada a una longitud de onda de 820 nm. El heptamolibdato de amonio es conveniente a este método ya que también detiene la reacción^{28,29}.

Para diferenciar si el compuesto al que se le está determinando su capacidad de inhibición de la enzima, actúa sobre el transportador T1 o sobre la subunidad catalítica (SUC), se utilizaron microsomas intactos y microsomas rotos. En el caso de los microsomas rotos, al carecer de membrana limitante, el sustrato tiene libre acceso a la SUC. Estos se obtienen mediante la incorporación de histonas durante el ensayo. Las histonas son unas proteínas que rompen la integridad de las estructuras microsomales^{28,29}.

Para la preparación de los microsomas se utilizó el siguiente procedimiento²⁸:



*Sacarosa 0,32 M; $MgCl_2$ 3mM

**Sacarosa 0,25 M; HEPES 5mM; $MgCl_2$ 1mm pH 6,5

Fig. 19. Esquema de obtención de microsomas²⁸

Para el ensayo general de la enzima se utilizó Glucosa-6-Pasa 5 mM, tanto con histonas (+H), como sin histonas (-H), en la siguiente tabla se resume la cantidad de reactivos necesarios para prepararlas:

Tabla 2. Preparación de los sustratos^{28,29}

	G-6-P 100mM (μL) pH 6,5	EDTA 0,1 mM (μL) pH 6,5	HEPES 1M (μL) pH 6,5	H₂O (μL)	Histonas* (tipo II AS) (μL)	V₁ (mL)
-H	250	100	80	1570	-	2
+H				1370	200	

La determinación de la actividad de las subfracciones sobre la enzima G-6-Pasa se llevó a cabo por la siguiente metodología descrita por Burchell y col.^{6,27,28,29}.

- Se utilizaron tubos para los ensayos sin histonas (-H) por triplicado, y para el blanco por duplicado. En total ocho tubos para cada conjunto de control y subfracción a evaluar.
- Para los controles se colocó en cada tubo 40 μL de sustrato y 40 μL de agua. Para los ensayos experimentales se añade 40 μL de la subfracción disuelta a la concentración deseada en lugar de agua.
- Se diluyeron los microsomas hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL en sacarosa al 0,25 M, 5 mM HEPES y 1 mM MgCl₂, se llevó el pH a 6,5.
- Se colocaron los tubos en una gradilla a temperatura controlada de 30°C.
- Se adicionaron 20 μL de los microsomas a cada uno de los tubos y se incubó por 10 min.
- Se detuvo la reacción tubo por tubo, incluyendo a los blancos, en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de parada, el cual consta de una mezcla de solución de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0,42% en H₂SO₄ 0,5 M, SDS 5% y ácido ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1. Por último se añadió 20 μL de los microsomas a los blancos.
- Se incubó la gradilla por 20 minutos, en un baño a 46°C.
- Se determinó la absorbancia de cada uno de los tubos a 820 nm

i) La actividad enzimática se expresa en $\mu\text{moles de Pi/hora} \times \text{mg de proteína}$.

En la siguiente figura se muestra un esquema se resume la metodología utilizada para la determinación de la actividad de la enzima G-6-Pasa en las subfracciones.

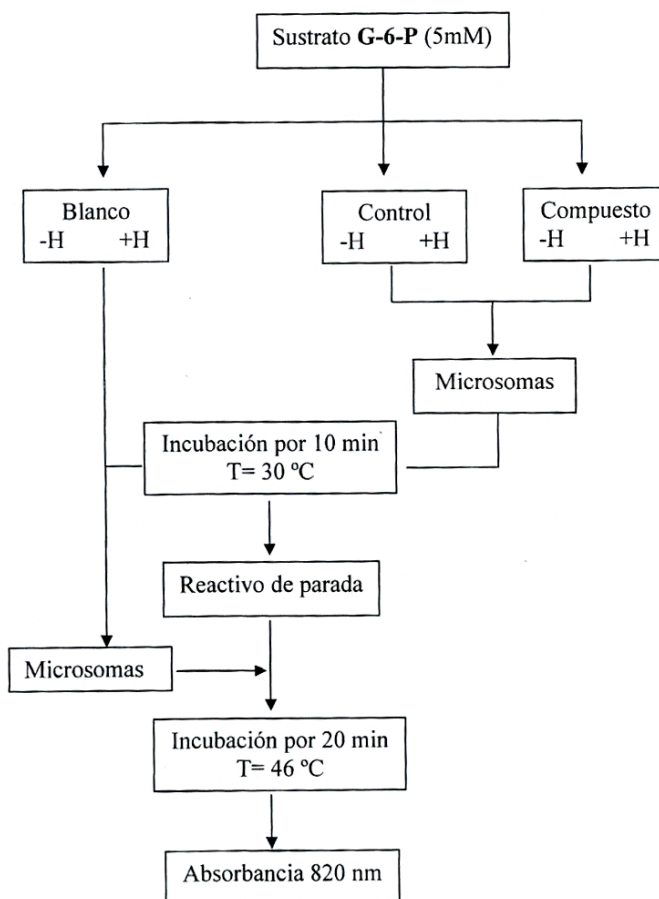


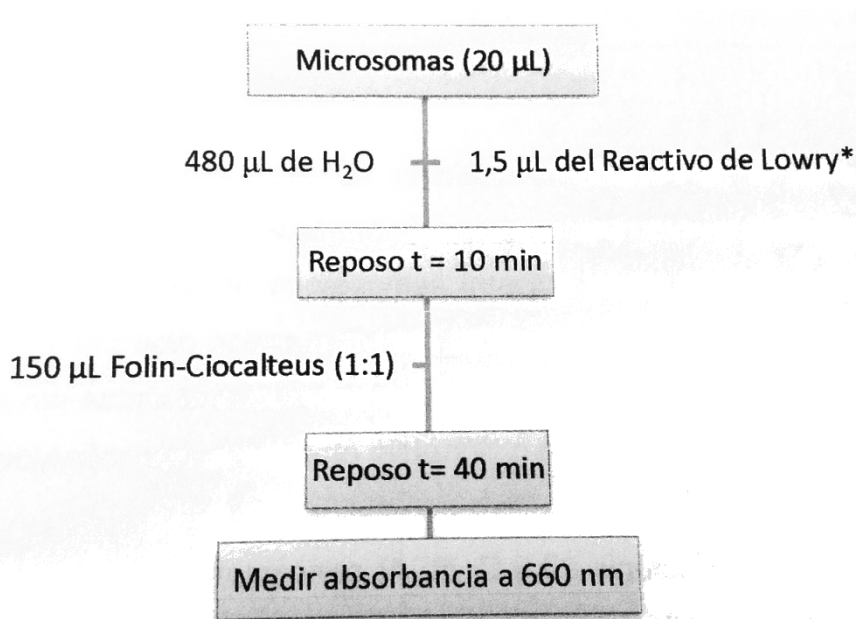
Fig. 20. Esquema del procedimiento del ensayo para medir actividad sobre G-6-Pasa⁶

La determinación de fosfato inorgánico liberado en la reacción se llevó a cabo utilizando una curva de calibración. Se partió de una solución de KH_2PO_4 1 M y por dilución de esta se obtuvieron las soluciones para construir dicha curva (10, 25, 50, 75 y 100 mM con un volumen final de 100 μL)⁶.

Para determinar la cantidad de proteína se siguió el procedimiento de Lowry y col³⁰ modificado por Markwell y col³¹. Este método combina la reacción de Biuret de

los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones cobre del reactivo en medio alcalino y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas. Esta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína^{6,28,29}.

Para determinar la concentración de proteínas, los valores de densidad óptica obtenidos de este procedimiento se llevaron a una curva de calibración de concentración vs. densidad óptica, construida con soluciones patrón de albúmina sérica de bovino 500 µg/mL. Por diluciones de esta solución madre se prepararon 500µL de soluciones de 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Como blanco se utilizó una solución que sólo contenía agua. En la siguiente figura se encuentra un esquema del procedimiento de determinación de proteínas⁶.



*Reactivo de Lowry: 100 A + 1B

A: Na₂CO₃ 2%, NaOH 0,4%, KNaC₄H₄O₆ 0,16%, SDS 1%

B: CuSO₄ 4%

Fig. 21. Determinación de proteínas²⁸

2.2. Fraccionamiento del Extracto Metanólico-Acuoso (1:1) de *Exellodendron coriaceum* Prance

2.2.1 Procedimiento A

Se pesó 1086,50 mg del extracto metanólico-acuoso y se sembró en la Columna F que contenía aproximadamente 100 g de sílica gel 60 RP-18.

Para eluir se utilizaron 200 mL de cada mezcla de solventes indicada en la siguiente tabla.

Tabla 3. Mezclas utilizadas para la elución de la columna de RP-18

Mezcla	Proporción (v/v%)
H ₂ O	100
H ₂ O/EtOH	80:20
	60:40
	40:60
EtOH	100

Se obtuvieron un total de 192 fracciones, las cuales se les designó la letra F-# (número de la fracción).

Se realizó análisis cromatográfico por CCF en fase inversa hasta la F-68 utilizando mezclas de CH₃CN/H₂O y EtOH/H₂O. Las fracciones F-68 hasta F-192 se analizaron mediante CCF en fase normal y se utilizó como fase móvil cloroformo y mezclas CHl/EtOH 9:1 y 8:2. Según los resultados obtenidos por estos análisis, se unieron fracciones; lo cual dio un total de 15 subfracciones. En la siguiente tabla se indica la subfracción y la masa obtenida para cada una.

Tabla 4. Subfracciones obtenidas de la columna RP-18

Subfracción	Masa Subfracción (mg)	Observaciones
F-0 a 3	223,0	Sólido marrón
F-4 y 5	100,70	
F-6 a 9	111,50	
F-10 a 13	22,00	
F-14 a 20	89,90	
F-22 a 27	221,00	
F-28 a 34	54,30	
F-35 a 42	48,04	
F-43 a 49	88,54	
F-50 a 68	52,89	
F-69 a 97	1022,23	Aceite amarillo
F-98 a 165	164,52	Sólido blanco
F-100	3,85	
F-134	1,17	
F-166 a 192	38,31	

De estas 15 subfracciones, se sometieron a posterior separación, dos de ellas: la subfracción F-0 a 3 y la F-98 a F-165.

La subfracción F-98 a F-165, de masa 164,52 mg, se sometió a CC en fase normal utilizando la Columna A con 16,5 g de sílica gel y como eluyente cloroformo hasta etanol. A estas fracciones se les denominó A-# (número de la fracción), y se obtuvieron un total de 291 fracciones.

Mediante análisis cromatográfico en CF en fase normal de estas 291 fracciones se unieron las siguientes subfracciones:

Tabla 5. Subfracciones obtenidas de la Columna A

Subfracciones	Masa (mg)
A-0 a 2	44,48
A-3 a 13	31,59
A-13 a 23	5,12
A-24 a 67	7,37
A-68 a 125	7,25
A-180 a 200	19,56

A-201 a 236	5,29
A-237 a 250	1,15
A-251 a 291	3,77

De esta columna se obtuvo la subfracción A-0 a 2 con una masa de 44,48 mg. Por análisis en CCF en fase normal se observaron 2 manchas de distintos R_f y con buena separación por lo que se sometió a otra CC con la Columna B utilizando 4,44 g de sílica gel. Se utilizó heptano hasta cloroformo y luego mezclas de Chl/EtOH en proporciones 9:1 y 1:1. A las fracciones obtenidas de esta CC se les denominó B-# (número de la fracción) y se obtuvieron un total de 52 fracciones. Por análisis de CCF se reunieron de la siguiente forma

Tabla 6. Subfracciones obtenidas de la Columna B (fase normal)

Subfracción	Masa Subfracción (mg)
B- 1 a 14	13,48
B- 15 a 31	9,96
B- 32 a 52	14,00

De esta columna se obtuvo la subfracción B-1 a 14. Por análisis de CCF mostraba un solo compuesto puro de masa de 13,48 mg y se le designó el nombre de Compuesto 1. Esta subfracción se sometió a análisis por RMN de ¹H, ¹³C.

La subfracción denominada F-0 a 3 (223,0 mg) se separó mediante cromatografía de placa preparativa fase normal, sembrando entre 20 y 25 mg, utilizando una fase móvil de BuOH/PrOH/AcOH/H₂O en proporciones 3:1:1:1. Luego del tratamiento adecuado de raspado, extracción y filtración, se obtuvieron los compuestos 2 (2,0 mg) y 3 (2,5 mg) a los cuales se les sometió a análisis por RMN ¹H y ¹³C.

En el siguiente esquema se resume el fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum*.

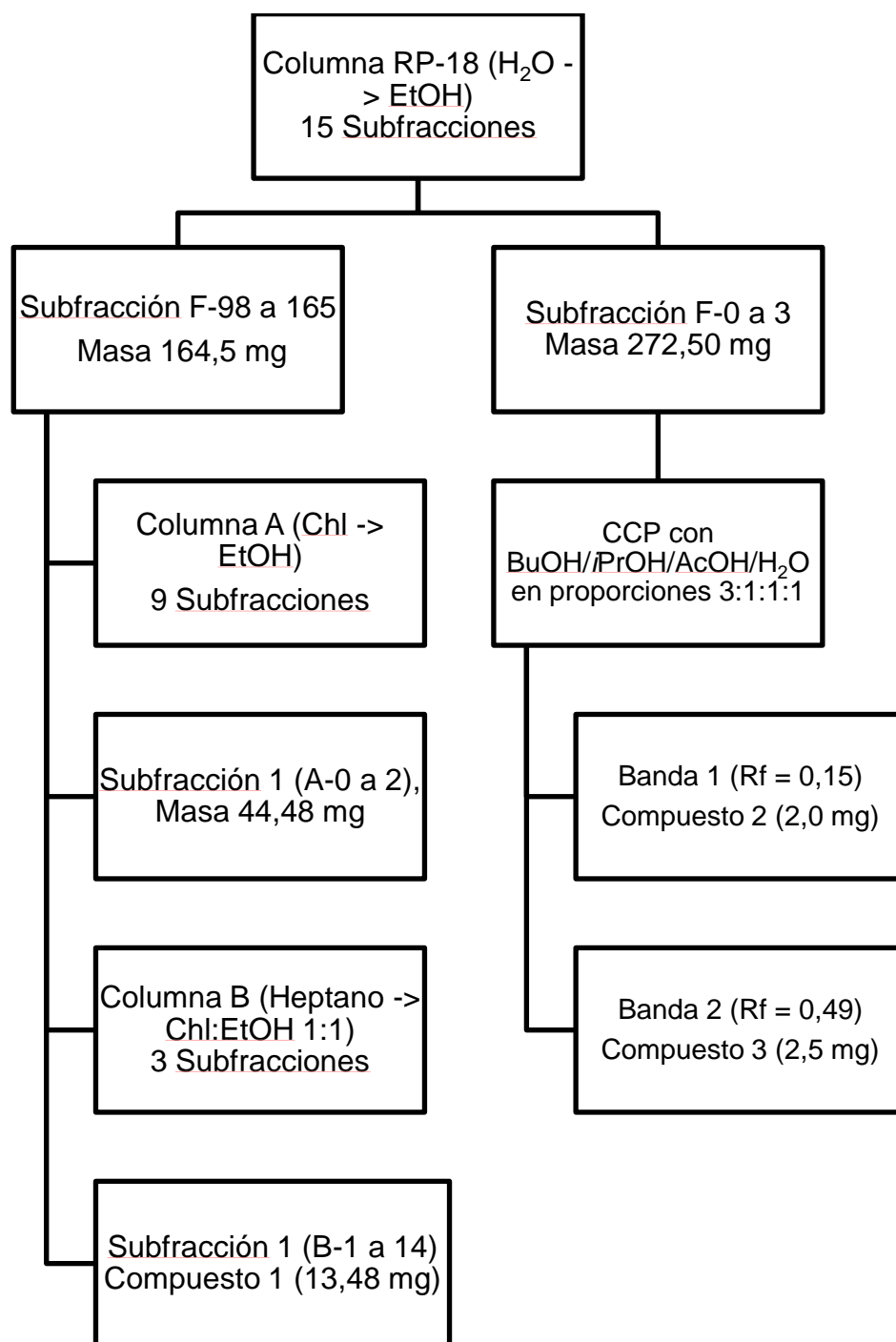


Fig. 22. Esquema de fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso 1:1 de *E. coriaceum* por el procedimiento A

2.2.2. Procedimiento B

Este procedimiento se realizó por duplicado, en el primer caso se pesaron 1064,49 mg del extracto y para el segundo caso se pesaron 1012,83 mg del extracto. En ambos casos se sembró la cantidad sobre una la Columna Sp, conteniendo aproximadamente 50 g de Sephadex LH-20.

Para eluir, se utilizaron 200 mL de agua destilada y mezclas H₂O/EtOH en las siguientes proporciones

Tabla 7. Mezclas de solventes utilizadas para la elución de la columna de Sephadex LH-20

Mezcla	Proporción (v/v%)
H ₂ O	100
H ₂ O/EtOH	50:50
EtOH	100

Las fracciones obtenidas en ambas columnas se les denominó Sp¹-#, para el primer caso y Sp²-# para el segundo respectivamente. Se obtuvieron 106 fracciones para el primer caso y 76 para el segundo caso. Se realizó CCF en fase normal utilizando mezclas de EtOH/Chl en proporciones 9:1, 8:2 y 1:9 como eluente y se logró unir las siguientes subfracciones:

Tabla 8. Subfracciones obtenidas de las dos columnas realizadas con el Procedimiento B

Subfracción	Masa Subfracción (mg)	Observación
Sp ¹ -0 a 3	460,60	Sólido marrón
Sp ¹ -4 a 12	115,15	
Sp ¹ - 13 a 24	293,19	
Sp ¹ - 25 a 41	71,84	
Sp ¹ - 42 a 77	247,63	
Sp ¹ - 78 a 88	27,51	
Sp ¹ -89 a 106	26,81	
Sp ² - 0 a 7	380,98	
Sp ² - 8 a 11	31,20	
Sp ² - 12 a 17	42,06	
Sp ² - 18 a 22	135,78	
Sp ² -23 a 27	33,67	
Sp ² - 28 a 36	17,71	
Sp ² - 37 a 41	40,46	
Sp ² - 42 a 57	6,22	
Sp ² - 58 a 76	48,91	

Mediante análisis por CCF en fase normal utilizando Chl/EtOH 9:1 como fase móvil se unieron las subfracciones Sp¹-89 a 106 y Sp²-23 a 27 y se les sometió a CC en fase normal utilizando cloroformo hasta acetato de etilo y luego una mezcla de AcOEt/EtOH en proporción 8:2. A las fracciones obtenidas de esta columna se les nombró C-# (número de la fracción) y se obtuvieron un total de 83 fracciones que mediante análisis por CCF se unieron de la siguiente forma

Tabla 9. Subfracciones obtenidas de la Columna C (fase normal)

Subfracción	Masa Subfracción (mg)
C- 1 a 23	2,02
C- 24 a 43	3,53
C- 45 a 79	3,20
C- 80 a 83	1,12

De esta columna la subfracción C-24 a 43, por análisis de CCF se mostró como una sola mancha, lo cual sugería la presencia de un compuesto puro. Se le denominó compuesto 4 y se lo sometió a RMN ^1H .

Se realizaron dos placas de cromatografía de placa preparativa para la subfracción Sp¹-13 a 24, sembrando aproximadamente 25 mg por placa y utilizando una fase móvil de Chl/MeOH/H₂O en proporción 75:30:4. Luego de su tratamiento se obtuvieron dos compuestos, llamados compuesto 5 (1,0 mg) y compuesto 6 (1,5 mg) respectivamente. Ambos fueron sometidos a análisis por RMN ^1H .

En el siguiente esquema se resume el procedimiento de fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum* según el procedimiento B.

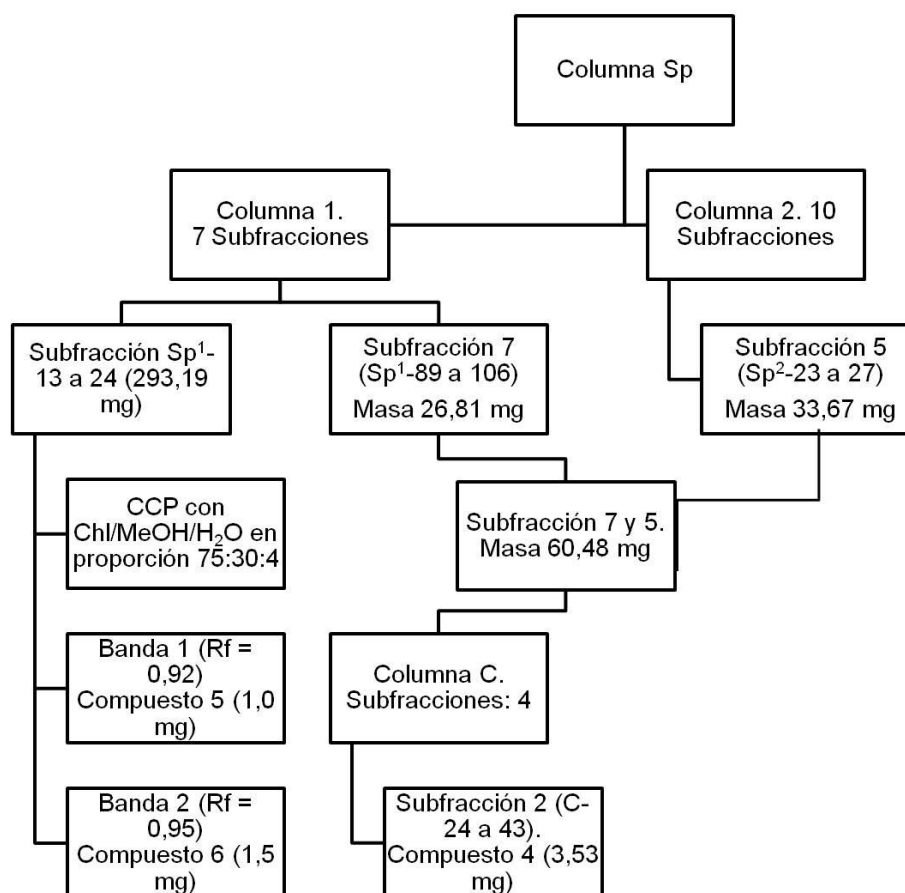


Fig. 23. Esquema de fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso 1:1 de *E. coriaceum* por el procedimiento B

CAPITULO III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Análisis cromatográfico

3.1.1. Del extracto metanólico-acuoso (1:1) de *E. coriaceum*

En CCF en fase inversa se observaron manchas marrones, azules y amarillas al revelar con PAS

3.1.2. Procedimiento A

Una vez obtenidas las primeras 68 fracciones secas, se procedió a realizar su análisis por CCF en fase inversa. Utilizando como eluyente CH₃CN/H₂O en proporciones 8:2 y 7:3, se observaron manchas de diversos colores al revelar con PAS. Estas fracciones fueron pesadas luego de ser agrupadas por los R_f de las distintas manchas como indica la Tabla 10 y las masas correspondientes para cada una se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 10. Observaciones en el visible del análisis por CCF en fase inversa de las fracciones F-0 a F-68, usando como revelador PAS.

Subfracciones	Soporte; Fase móvil	Observaciones
F-0 a 3	Fase inversa; CH ₃ CN/H ₂ O 7:3	Punto de siembra revela color verde claro Se observó una mancha marrón muy tenue con el mismo R _f (≈0,84) para todos los puntos de siembra
F-4 y F-5		Punto de siembra revela verde oscuro Se observó una mancha marrón con el mismo R _f (≈0,5) para los dos puntos de siembra
F-6 a 9	Fase inversa; CH ₃ CN/H ₂ O 8:2	Punto de siembra revela verde oscuro Se observaron manchas rosadas con el mismo R _f (≈0,71) para todos los puntos de siembra
F-10 a 13		Punto de siembra revela verde oscuro Se observaron manchas azules (R _f ≈ 0,37) y rosadas (≈0,71) todos los puntos de siembra
F-14 a 20		Punto de siembra revela verde oscuro

		Se observaron manchas rosadas ($R_f \approx 0,74$) y marrones ($R_f \approx 0,80$) para todos los puntos de siembra
F-22 a 27	Fase inversa; $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 8:2	Punto de siembra revela marrón intenso Eluye como una línea marrón por toda la placa, dejando una mancha marrón más oscura con un $R_f \approx 0,9$
F-28 a 34		Punto de siembra revela marrón claro. Se observan al menos 3 bandas separadas: amarilla, naranja y marrón
F-35 a 42		Punto de siembra revela marrón. No se observó ninguna separación de bandas, solo un punto marrón cerca de la línea de solvente
F-43 a 49		En cuanto a estas fracciones se observó solo una línea continua de color marrón con un punto marrón cerca de la línea del solvente. Punto de siembra es marrón oscuro.
F-50 a 68	Fase inversa; $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 8:2	Punto de siembra reveló marrón oscuro Se observan al menos 4 bandas poco resueltas, del punto de siembra a la línea del solvente: gris, azul, marrón y azul claro.

De igual forma se realizó su análisis por CCF en fase normal, y al eluir en mezclas de Ch/EtOH 2:8 y 1:9 no se observó separación de alguna banda.

De la fracción 69 en adelante, se observó en todas, en mayor o menor cantidad, un sólido blanco amarillento, de olor fuerte a grasa. Se realizó una placa en fase reversa de F-69 hasta F-78 utilizando como fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ en proporción 1:1, pero se observó que no había ningún desarrollo de bandas en la placa, por lo que se cambió a placas de fase normal para analizar estas fracciones. Se utilizó cloroformo como fase móvil para las fracciones de F-69 en adelante, obteniéndose placas como la siguiente figura

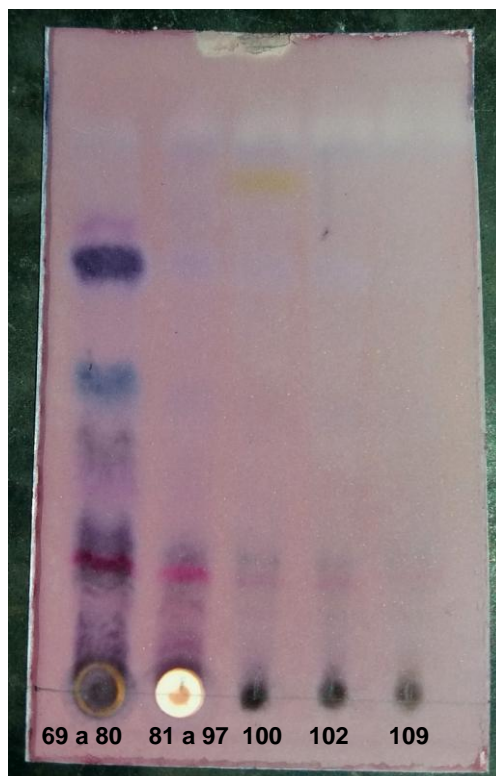


Fig. 24. Placa en fase normal de F-69 a 80, F-81 a 97, F-100, F-102 y F-109. Eluída con Chl, revelada con PAS y fotografiada en luz visible.

De esta manera se realizó la unión de la subfracción F-69 a 80 con F-81 a 97. A partir de la fracción 98 el sólido obtenido era totalmente blanco, por lo que se no se unió con la subfracción F-69 a 97.

Al analizar las fracciones 99, 100 y 101, se obtuvo que la fracción 100 era la única que poseía una banda amarilla con un $R_f \approx 0,87$ (Fig. 24), por lo que no se unió con el resto de las subfracciones. Sin embargo, al tener una masa pequeña (3,85 mg) y un perfil cromatográfico que sugiere la presencia de varios compuestos, no fue posible el aislamiento de ese compuesto por los métodos cromatográficos disponibles.

De la fracción 98 en adelante se reunió hasta la fracción 165, para obtener 164,52 mg que luego fueron sembrados en la columna denominada A. De esta se obtuvo la subfracción A-0 a 2 con una masa de 44,48 mg y mediante análisis de CCF, revelando con PAS, se observaban sólo dos bandas en la placa, una banda morada con un $R_f \approx 0,35$ y una banda blanquecina con un $R_f \approx 0,90$.

La subfracción A-0 a 2 era un sólido blanco, inoloro, soluble en heptano, hexano y cloroformo. A esta subfracción se la sometió a una nueva CC utilizando C_7H_{14} hasta Chl y luego mezclas de Chl/EtOH. A esta columna se le asignó la letra B y de la cual se obtuvo la subfracción B-1 a 14 como un sólido blanco con una masa de 13,48 mg, soluble en heptano, hexano y cloroformo. Por análisis de CCF en fase normal utilizando como fase móvil C_7H_{14} /Chl en proporción 6:4, se observó una sola banda morada muy tenue, con un R_f de 0,83, casi blanquecina al revelar con PAS, por lo que se infirió que se trataba de un compuesto puro. Se le designó el número 1 a este compuesto y se le realizaron sus respectivos espectros RMN de 1H y ^{13}C (Figs. 25, 26 y 27).

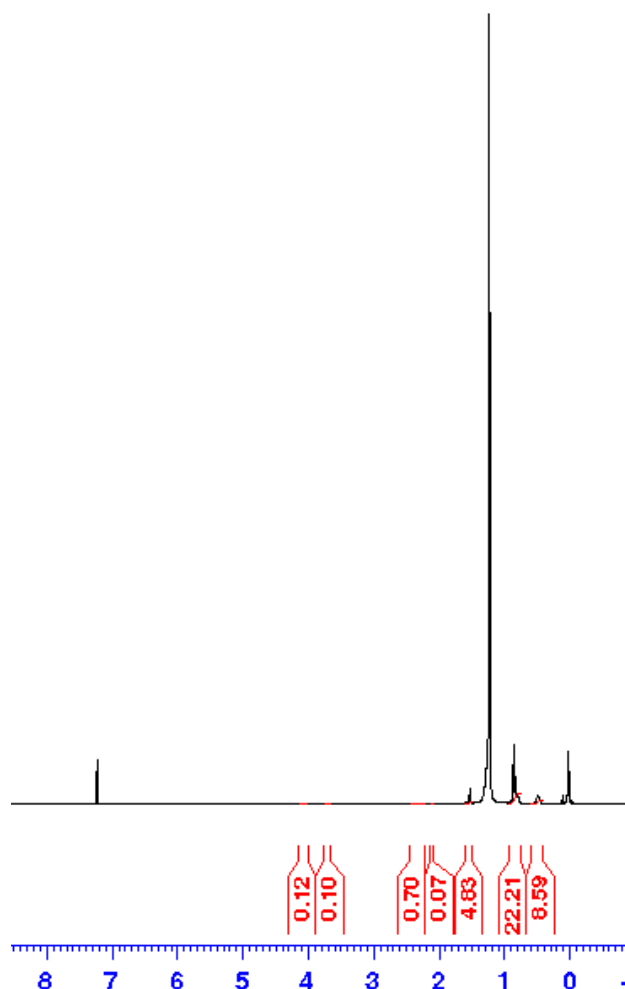


Fig. 25. Espectro RMN 1H de Compuesto 1 ($CDCl_3$, 300 MHz)

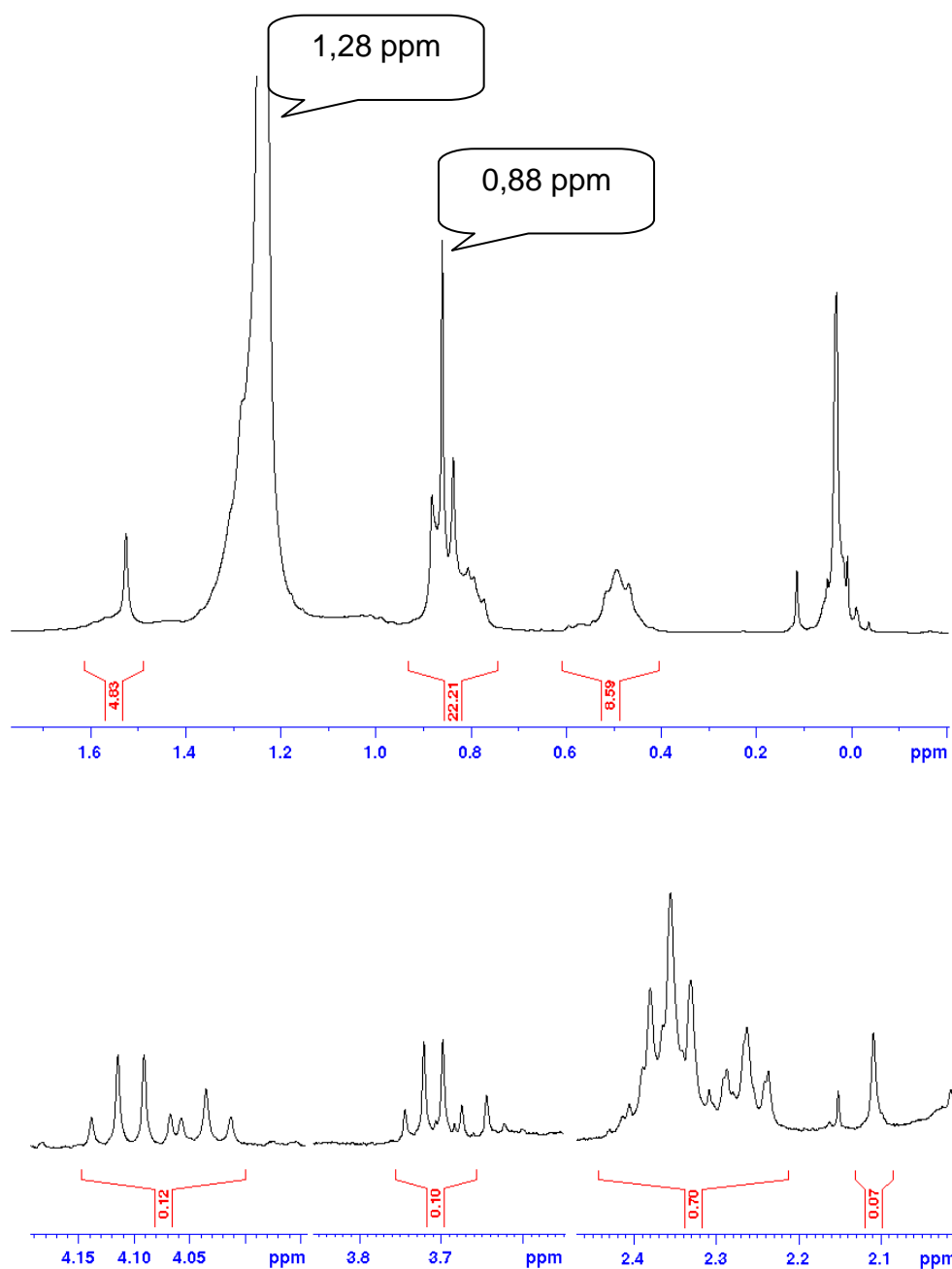


Fig. 26. Ampliación Espectro RMN ^1H a campo alto del Compuesto 1 (CDCl_3 , 300 MHz)

Al observar el espectro RMN ^1H son evidentes las señales correspondientes a protones unidos a carbonos alifáticos (0 a 4 ppm³⁴). De igual forma con RMN ^{13}C , que va de 14 a 34 ppm (Figs. 27 y 28), sin embargo, por la complejidad de las

señales en estos espectros, la información que se obtiene de ambos espectros no es suficiente para confirmar una estructura³⁴.

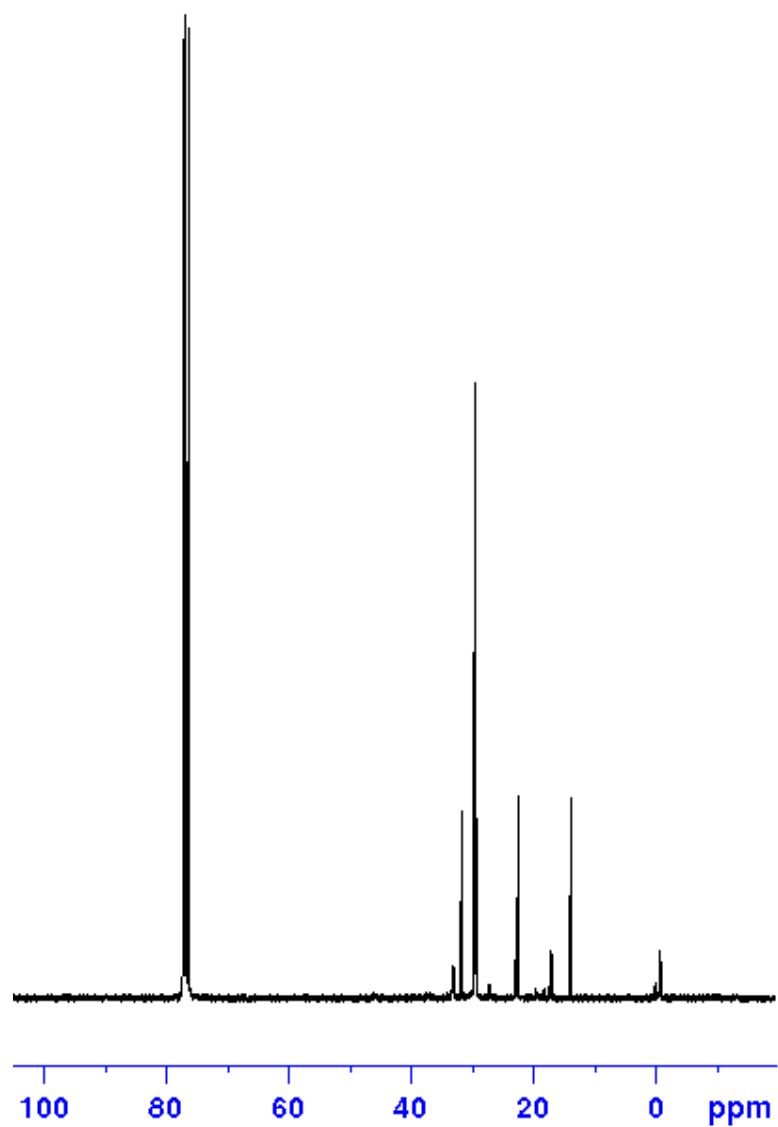


Fig. 27. Espectro de RMN ^{13}C de Compuesto 1 (CDCl_3 , 300 MHz)

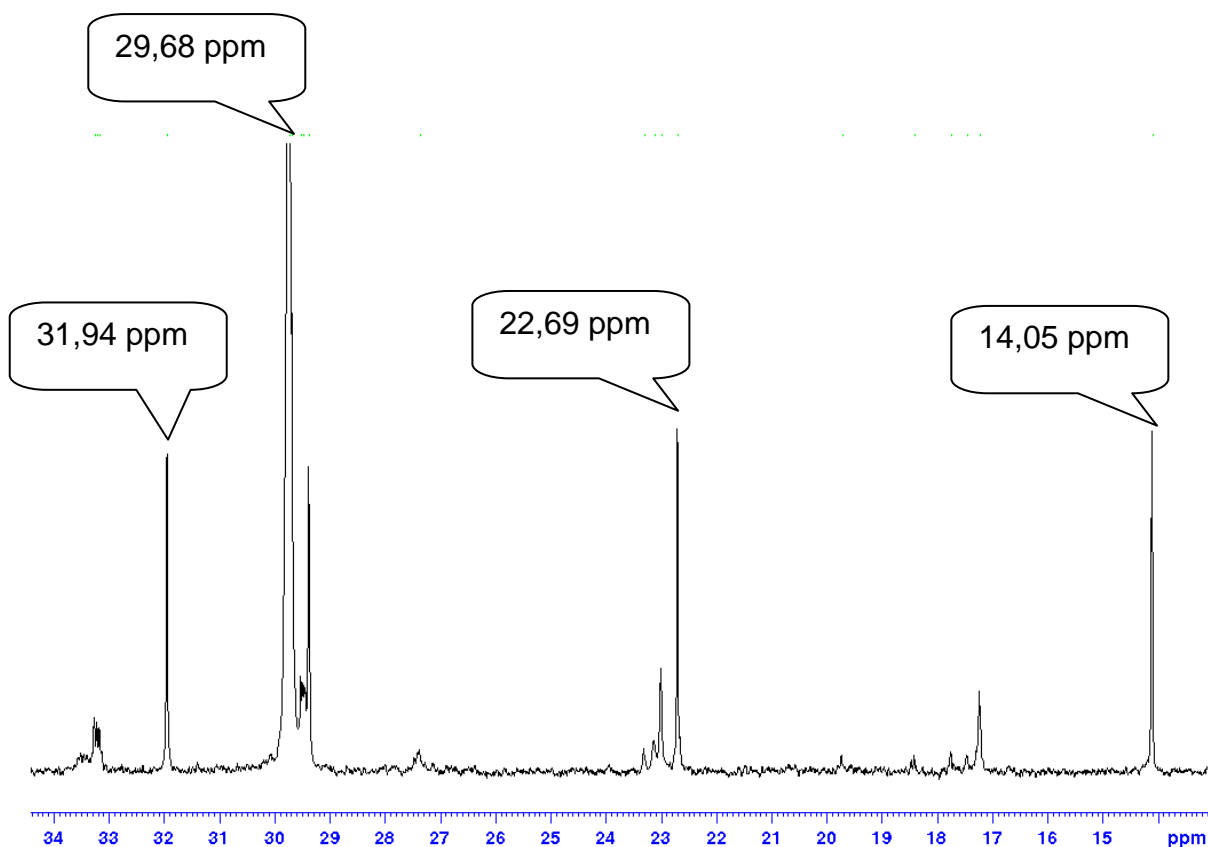


Fig. 28. Ampliación a campo alto del espectro RMN ^{13}C del Compuesto 1 (CDCl_3 , 300 MHz)

Adicionalmente por sus características de solubilidad en solventes no polares y poco polares, se infiere la presencia de algún compuesto alifático, de cadena larga.

Entre los picos diferenciables en estos espectros, se encuentran picos de heptano, uno de los solventes utilizados en el proceso de obtención de este compuesto. En las Figs. 29 y 30 se observan los espectros de ^1H y ^{13}C de *n*-Heptano en cloroformo deuterado a 89,56 MHz para el de protones y a 25,16 MHz para el espectro de carbonos⁴⁷.

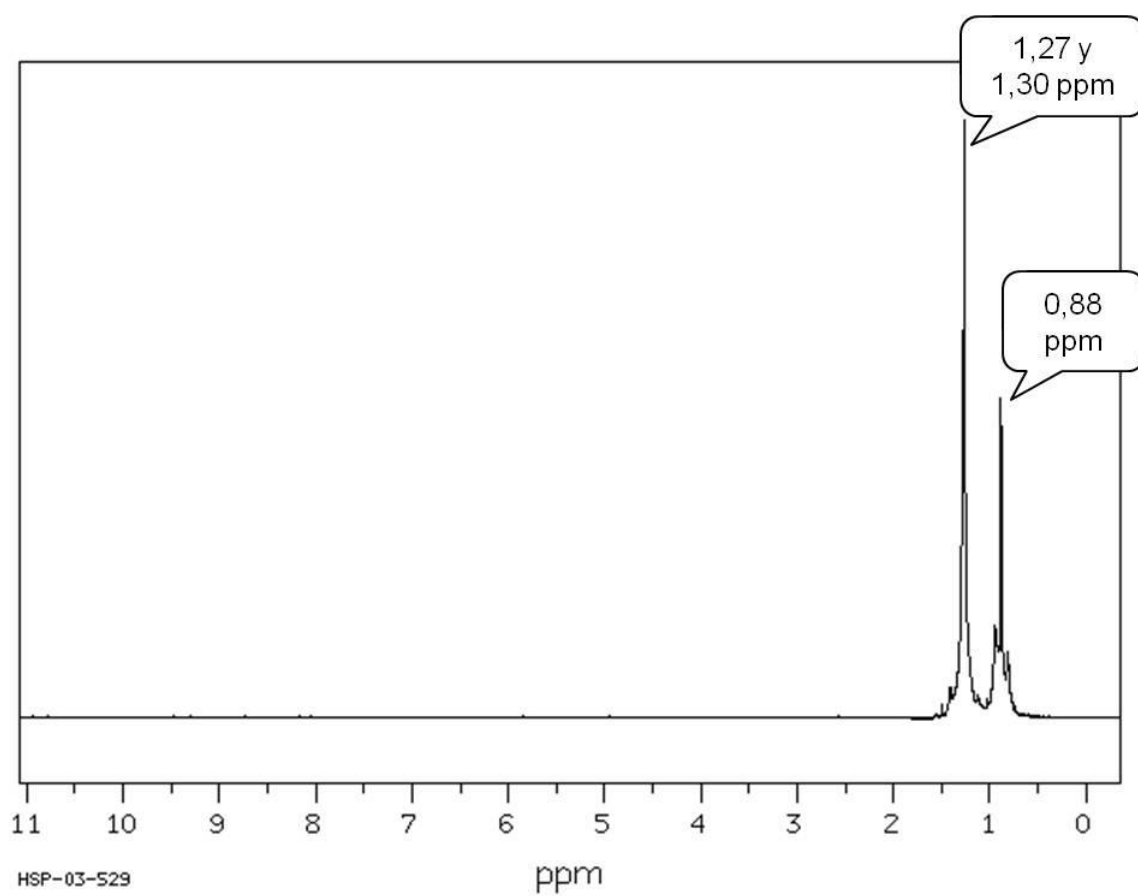


Fig. 29. Espectro ^1H de *n*-Heptano en CDCl_3 a 89,56 MHz⁴⁸

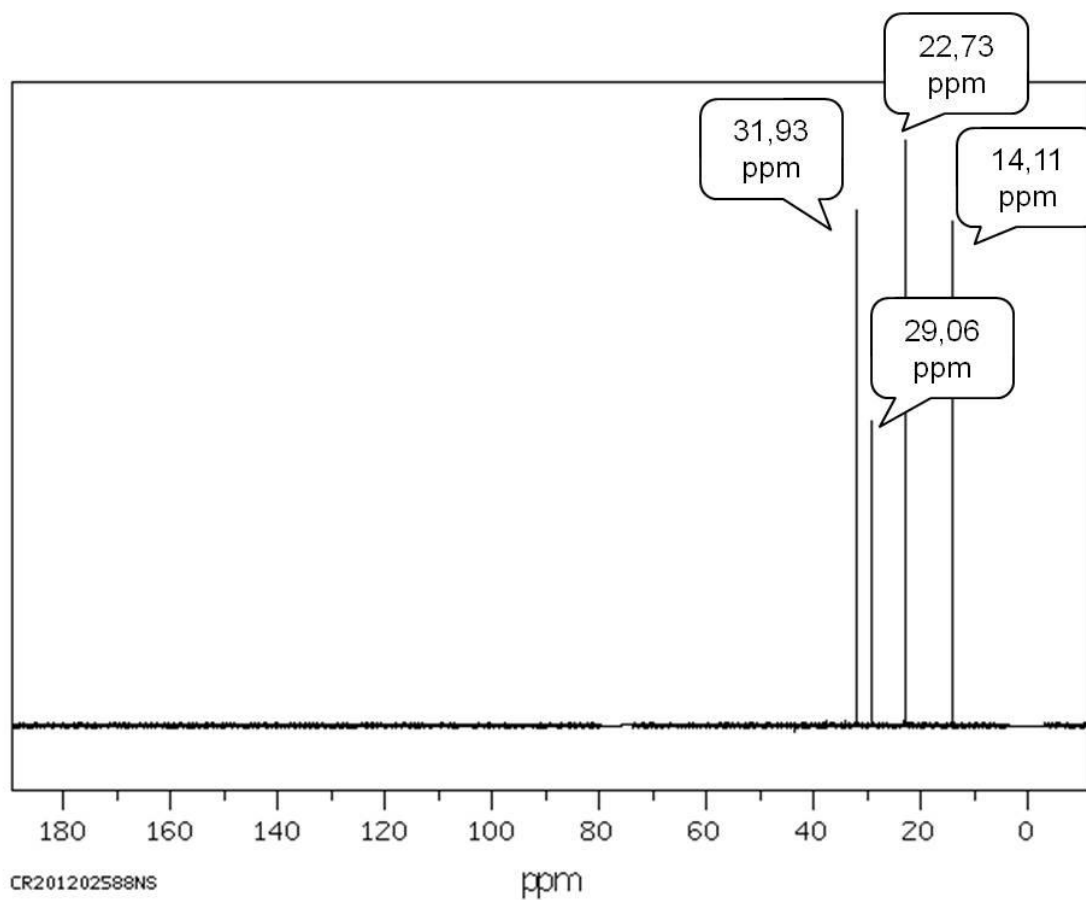


Fig. 30. Espectro ^{13}C de *n*-Heptano en CDCl_3 a 25,16 MHz⁴⁸

Como se puede observar en los espectros de ^1H y ^{13}C del compuesto 1 y del *n*-Heptano, hay señales que coinciden en su desplazamiento, es decir, el compuesto 1 se encuentra contaminado de este solvente. Los datos de los espectros se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 11. Desplazamientos de algunas señales de los espectros de ^1H y ^{13}C del compuesto 1 y señales correspondientes al espectro del solvente *n*-Heptano⁴⁸

Compuesto 1		<i>n</i> -Heptano ⁴⁸	
^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
0,88	14,05	0,88	14,12
1,27	22,69	1,27	22,89
-	29,68	1,30	29,26
-	31,94	-	32,14

Observando los datos obtenidos por los espectros y las características del Compuesto 1, se puede inferir que puede ser una grasa proveniente del soporte utilizado.

Para el procedimiento A de fraccionamiento del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum* se encontraron problemas de tipo solubilidad en las primeras subfracciones provenientes de la columna de RP-18. Por este motivo el análisis por CCF se volvió un procedimiento engorroso al no poder homogeneizar dichas subfracciones. Debido a esto no se realizó en estas subfracciones ensayos biológicos sobre Glucosa-6-Pasa.

Una de las razones por la cual estas subfracciones presentaron problemas de solubilidad puede ser atribuida a la presencia de taninos condensados que tienden a polimerizar y a formar productos insolubles³⁵.

Los taninos son compuestos de tipo fenólicos de alto peso molecular. Entre sus características están la precipitación formando complejos insolubles con proteínas e iones metálicos. Se clasifican de manera general en taninos hidrolizables y taninos condensados, de los cuales, estos últimos están más ampliamente

distribuidos en el reino vegetal y su estructura está basada en oligómeros o polímeros de unidades flavonoides (flavan-3-ol) unidas por uniones carbono-carbono no susceptibles de dividirse por hidrólisis³⁵.

Su análisis es complicado debido a la diversidad de estructuras encontradas en este grupo de metabolitos. Entre los métodos más utilizados para su análisis están la precipitación con proteínas o con iones metálicos (Fe^{+2} , Yb^{+3}), ensayo de butanol en medio ácido, ensayo con vainillina en medio ácido, oxidación con ácidos minerales, etc^{36,37}.

Para corroborar su presencia se realizó un ensayo sobre una solución acuosa del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum* utilizando cloruro de hierro al 10%, dando como resultado una coloración verde³³. Esta solución se centrifugó y se separó el sólido formado del líquido, confirmando la coloración de la solución como verde oscura (Fig. 31). El resultado de este ensayo indica la presencia de taninos condensados de tipo catecólico, ya que los taninos hidrolizables tienden a dar coloraciones azules en este ensayo^{33,42}.

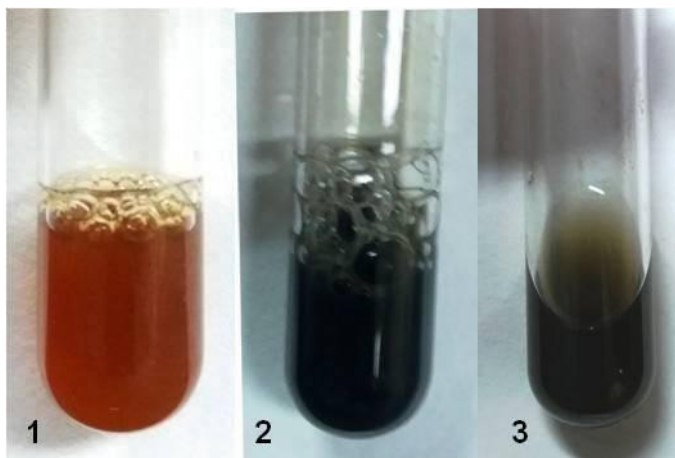


Fig. 31. Prueba con cloruro de hierro al 10%. **1.** Apariencia del extracto acuoso de *E. coriaceum*. **2.** Después de agregar 1 gota de FeCl_3 10%. **3.** Después de centrifugar y eliminar el sólido formado.

El sólido formado en este ensayo tenía apariencia de polvo fino, no cristalino, verde y opaco.

Otro ensayo aplicado a la solución acuosa del extracto metanólico-acuoso fue una oxidación en ácido clorhídrico. En este caso, luego del calentamiento de dicha

mezcla, se pudo observar un color rojo en la solución y un precipitado globular del mismo color.



Fig. 32. Prueba de oxidación con ácido clorhídrico concentrado

Esta coloración es característica de este tipo de taninos al reaccionar con ácidos concentrados en caliente ya que no se hidrolizan, sino que producen un precipitado rojo llamado flobáfeno o tanino rojo insoluble^{33,38}.

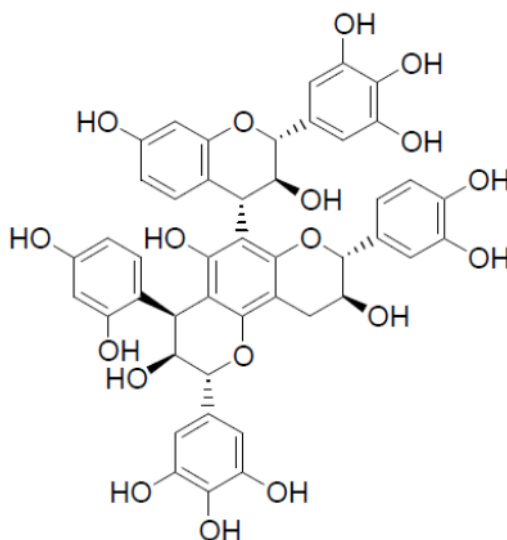


Fig. 33. Ejemplo de estructura de un flobáfeno³⁸

Los taninos condensados son también llamados proantocianidinas, ya que la reacción de oxidación con un ácido mineral en medio alcohólico puede resultar en

este tipo de compuestos. Las antocianidinas más comúnmente obtenidas en esta reacción son cianidina, delphinidina y prodelfinidina³⁵.

La presencia de estos compuestos puede ser verificada por cromatografía en capa fina de los resultados del ensayo, una vez centrifugado y separado el líquido sobrenadante del sólido globular y rediseuelto este sólido en acetona y metanol²⁶. De esta manera, en una fase móvil de AcOEt/AcOH/HCOOH/H₂O en proporción 100:11:11:26 y revelada con PAS, se obtuvo la siguiente placa:

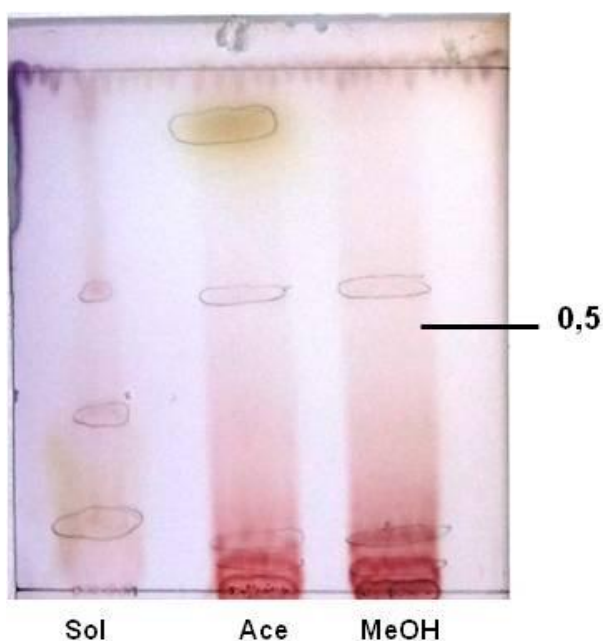
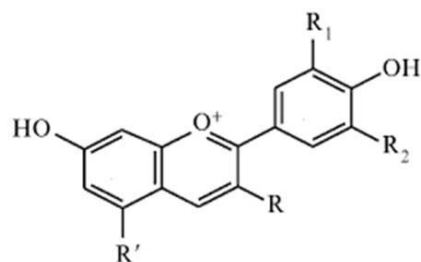


Fig. 34. Placa con la solución sobrenadante del ensayo con ácido clorhídrico (Sol), el sólido centrifugado obtenido del ensayo y rediseuelto en acetona (Ace) y metanol (MeOH). Revelada con PAS y fotografiada en luz visible.

Se observaron bandas con Rf de 0,07, 0,12 y 0,58 respectivamente para el sólido rojo disuelto en ambos solventes. Las bandas con Rf de 0,07 y 0,12 por su aspecto y por la fase móvil utilizada, pueden corresponderse con 3,5-diglucósidos de proantocianidinas como petunidina (**42**), malvidina (**43**) y peonidina (**44**)³⁹.



	Antocianidina	R ₁	R ₂	R'	R	R _f
42	Petunidina-3,5-diglucosido	OCH ₃	OH	O- Glucosa	O- Glucosa	0,074
43	Malvidina-3,5-diglucosido	OCH ₃	OCH ₃			0,104
44	Peonidina-3,5-diglucosido	OCH ₃	H			0,119

Fig. 35. Estructuras de las posibles antocianidinas generadas en un ensayo de oxidación de taninos condensados con ácidos minerales³⁹.

En cuanto al tratamiento de la subfracción F-0 a 3 (272,5 mg) se realizó CCP, utilizando una fase móvil de BuOH/*i*PrOH/AcOH/H₂O en proporciones 3:1:1:1. Luego de observarla bajo lámpara UV 254 nm se marcaron bandas con R_f de 0,15 y 0,49 y que al revelar con PAS mostraban una coloración amarilla-naranja, características de compuestos de tipo flavonoides al utilizar este revelador²⁶.

Posteriormente del tratamiento adecuado se obtuvieron los compuestos 2 (2,0 mg) y 3 (2,5 mg). Al realizar CCF a dichos compuestos utilizando como fase móvil AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O en proporción 100:11:11:26 y revelando con reactivo Naturstoff, se observó en el visible una coloración amarillo pálida y bajo luz UV 365 nm una coloración azul pálida con un R_f de 0,9 para ambos compuestos.

Por estos motivos se les realizó a estos compuestos un análisis de RMN ¹H, arrojando los siguientes espectros. Para ambos se realizó supresión del solvente al tomar los espectros.

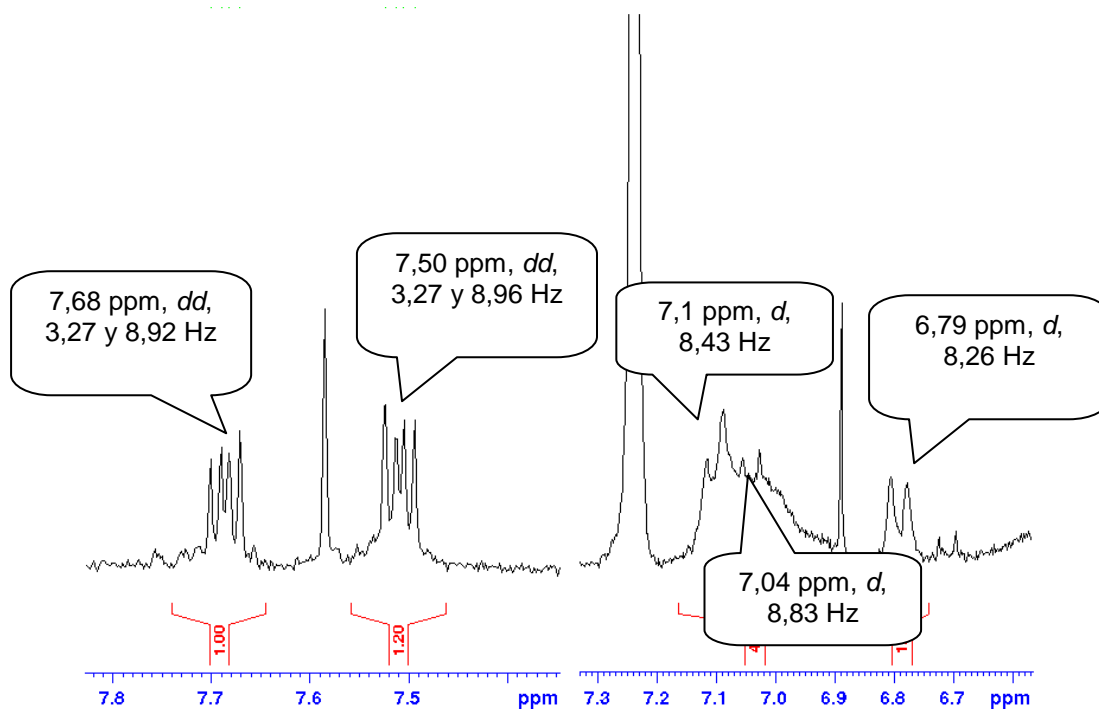


Fig. 36. Ampliación a campo bajo del espectro del compuesto 2 (CDCl₃, 300 MHz)

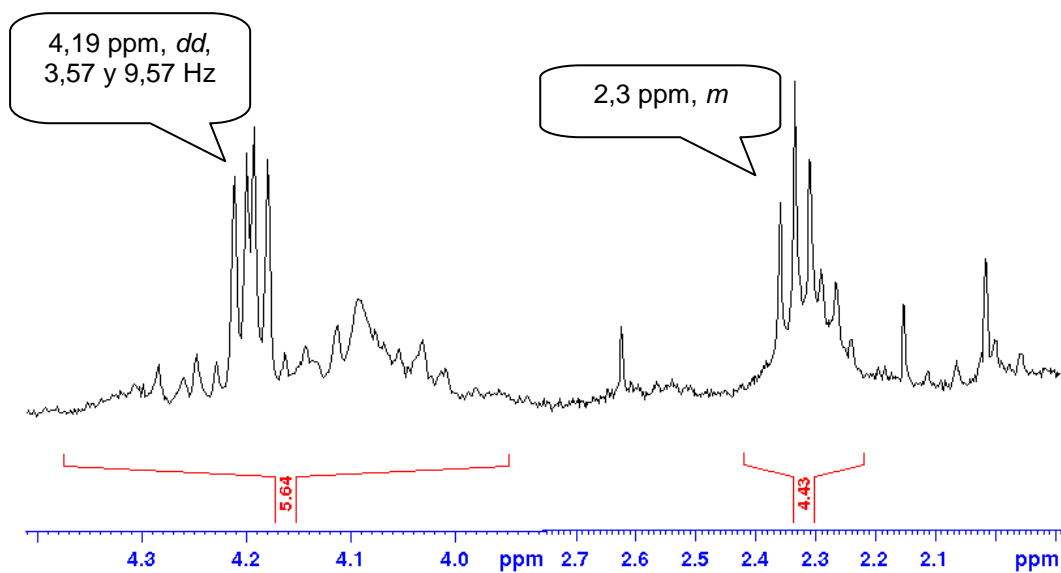


Fig. 37. Ampliación a campo alto del espectro del compuesto 2 (CDCl₃, 300 MHz)

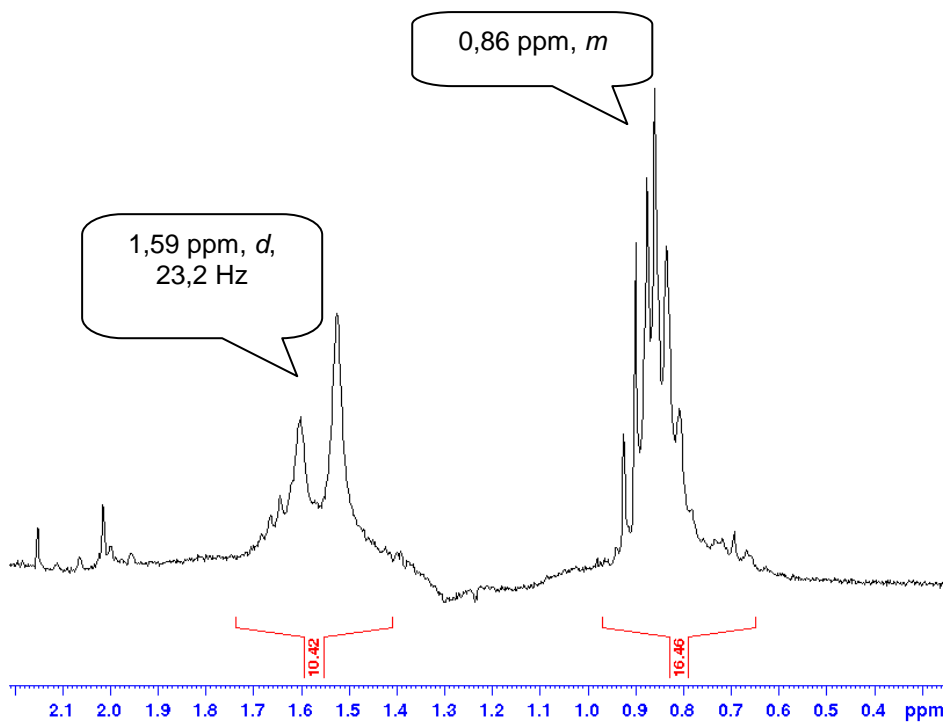


Fig. 38. Ampliación a campo alto del espectro del compuesto 2 en (CDCl_3 , 300 MHz)

De igual forma para el compuesto 3, se obtuvo su espectro RMN ^1H con supresión de solvente y se muestran las ampliaciones a continuación.

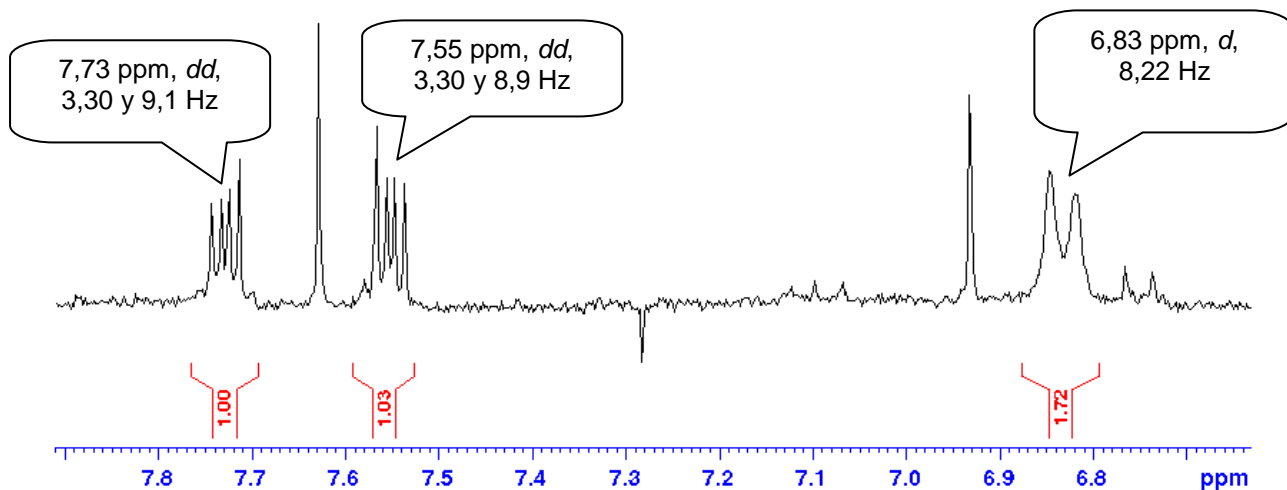


Fig. 39. Ampliación a campo bajo del espectro del compuesto 3 en (CDCl_3 , 300 MHz)

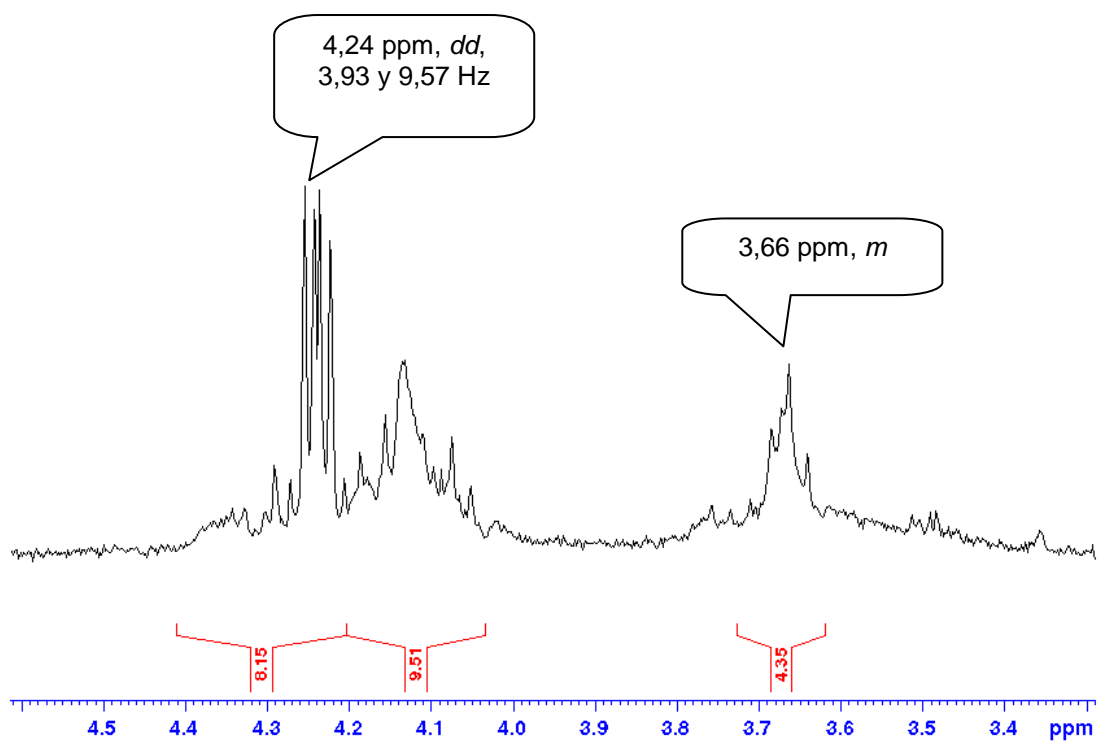


Fig. 40. Ampliación a campo alto del espectro del compuesto 3 en (CDCl_3 , 300 MHz)

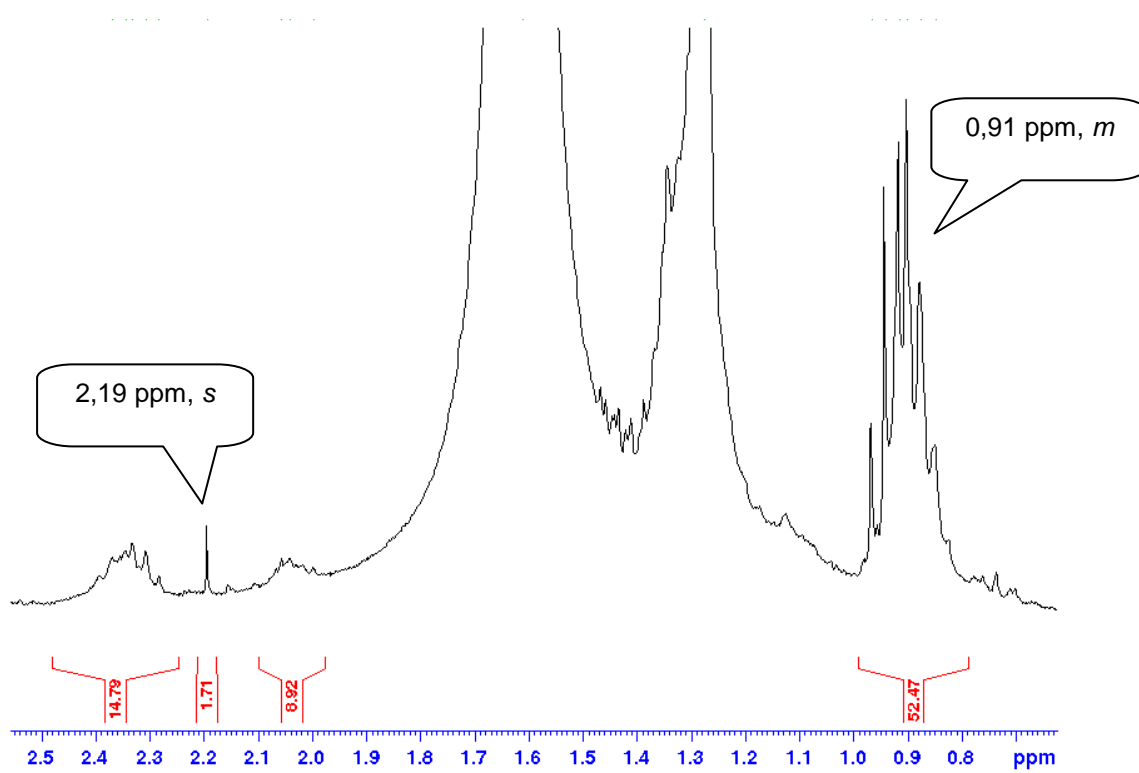


Fig. 41. Ampliación a campo alto del espectro del compuesto 3 en (CDCl_3 , 300 MHz)

En la siguiente tabla se resumen los datos espectroscópicos para los compuestos 2 y 3

Tabla 12. Datos espectroscópicos del espectro de protones de los compuestos 2 y 3

Compuesto 2 (δ (ppm); multiplicidad; J en Hz)	Compuesto 3 (δ (ppm); multiplicidad; J en Hz)
7,68; <i>dd</i> , 3,27 y 8,92	7,73; <i>dd</i> ; 3,30 y 9,06
7,50; <i>dd</i> , 3,27 y 8,96	7,55; <i>dd</i> ; 3,30 y 8,98
7,1; <i>d</i> ; 8,43	6,83; <i>d</i> ; 8,22
7,04; <i>d</i> ; 8,83	6,75; <i>d</i> ; 8,74
6,79; <i>d</i> ; 8,26	4,24; <i>dd</i> ; 3,9 y 9,57
6,70; <i>d</i> ; 8,82	3,66; <i>m</i>
4,19; <i>dd</i> ; 3,57 y 9,57	2,33; <i>m</i>
2,3; <i>m</i>	2,19; <i>s</i>
1,56; <i>d</i> , 23,2	0,91; <i>m</i>
0,86; <i>m</i>	

En ambos espectros se pueden observar señales similares, que también guardan relación en su multiplicidad y constantes de acoplamiento. Entre el compuesto 2 y el compuesto 3, la señal que diferencia a ambos es el multiplete en 3,6 ppm del compuesto 3 que no se encuentra en el compuesto 2.

A campo bajo se observan señales aromáticas y por su forma, pueden atribuirse posiblemente a estructuras del tipo ftalato (Fig. 42).

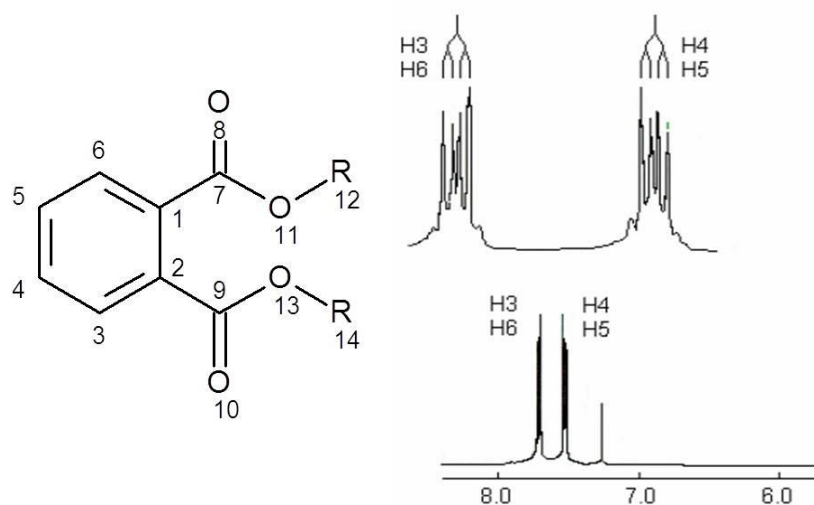


Fig. 42. Estructura del ftalato y forma de las señales del espectro RMN ^1H a campo bajo en la zona aromática^{22,49}

En la siguiente tabla se comparan las señales a campo bajo del grupo aromático del ftalato del compuesto 47, con las señales de esta misma zona del espectro de los compuestos 2 y 3.

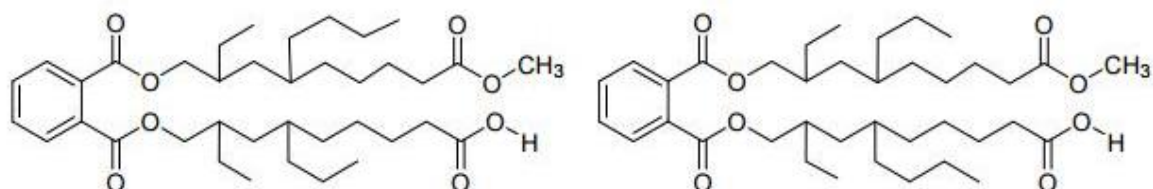


Fig. 9. Estructura del Compuesto 47⁵⁰

Tabla 13. Comparación de las señales a campo bajo de los espectros de los compuestos 2 y 3 con un espectro del compuesto 47

Compuesto 2	Compuesto 3	Núcleo ftalato del compuesto 47 ⁵⁰	
(δ (ppm); <i>multiplicidad</i> ; <i>J</i> en Hz)			Asignación ⁵⁰
7,68; <i>dd</i> , 3,27 y 8,92	7,73; <i>dd</i> ; 3,30 y 9,06	7,70; <i>dd</i> ; 2,0 y 8,8	H3 y H6
7,50; <i>dd</i> , 3,27 y 8,96	7,55; <i>dd</i> ; 3,30 y 8,98	7,53; <i>dd</i> ; 2,4 y 8,8	H4 y H5

Se puede observar correlación entre el núcleo ftalato con las señales del espectro de los compuestos 2 y 3.

En esta zona del espectro, para los compuestos 2 y 3, se encuentran otras señales de tipo aromático. En el caso del compuesto 2, cuatro dobletes centrados en 7,1, 7,04, 6,79 y 6,70 ppm con constantes de acoplamiento de 8,43, 8,83, 8,26 y 8,82 Hz respectivamente. Para el compuesto 3, estas señales se encuentran en 6,83 y 6,75 ppm con constantes de acoplamiento de 8,22 y 8,74 Hz respectivamente.

Por la información que se obtiene de sus constantes de acoplamiento, estos protones pertenecen a un anillo aromático, se encuentran en posición *orto* entre si y tienen correlación en sus señales con protones del anillo B de flavonoides (Tabla 14). De igual forma se encontró que tienen similitud con señales de espectros de compuestos de tipo catequina (Tabla 15).

Tabla 14. Comparación de las señales aromáticas de los espectros RMN ^1H de los compuestos 2 y 3 con algunas señales de espectros de flavonoides⁵¹

Compuest o 2	Compuest o 3	Kanferol ⁵¹	Dihidrokanf erol ⁵¹	Naringenina ⁵¹	Asignación ⁵¹
(δ (ppm); <i>multiplicidad</i> ; <i>J</i> en Hz)					
6,79; <i>d</i> ; 8,26	6,83; <i>d</i> ; 8,22	6,92; <i>d</i> ; 8,82	6,78; <i>d</i> ; 8,4	6,79; <i>d</i> ; 8,52	H3' y H5'

Tabla 15. Comparación de las señales aromáticas de los espectros RMN ^1H de los compuestos 2 y 3 con algunas señales de espectros de catequinas⁵²

Compuest o 2	Compuest o 3	Catequina-3- O-galato ⁵²	Epicatequin a ⁵²	Epicatequin a-3-O- galato ⁵²	Asignación ⁵²
(δ (ppm); <i>multiplicidad</i> ; <i>J</i> en Hz)					
6,79; <i>d</i> ; 8,26	6,83; <i>d</i> ; 8,22	6,79; <i>d</i> ;	6,78; <i>d</i> ; 8,1	6,76; <i>d</i> ; 8,2	H5' y H6'
6,70; <i>d</i> ; 8,82	6,75; <i>d</i> ; 8,74		6,84; <i>d</i> ; 8,1	6,89; <i>d</i> ; 8,1	

Para corroborar la estructura de estos compuestos se hace necesario conocer su espectro RMN ^{13}C , por lo que se propone que su estructura pudiese tener un grupo ftalato y un anillo aromático sustituido por hidroxilos.

3.1.3. Procedimiento B

Para la primera columna de sephadex LH-20 realizada, a la cual se les designaron las siglas Sp¹-# a las fracciones, se les realizó análisis por CCF en fase inversa, utilizando como revelador PAS y como fase móvil CH₃CN/H₂O en proporción 7:3 para determinar qué fracciones unir en subfracciones. En la siguiente

tabla se resumen las observaciones de cada subfracción analizada por CCF en las mismas condiciones.

Tabla 16. Subfracciones obtenidas de las columnas Sp y sus observaciones en luz visible por análisis de CCF en fase reversa usando como revelador PAS

Subfracciones	Observaciones
Sp¹-0 a 3	Se observó una mancha azul claro con un Rf≈0,3
Sp¹-4 a 12	Se observaron manchas rosadas con un Rf≈0,48
Sp¹-13 a 24	Se observaron manchas amarillas, rodeadas de manchas rosadas con Rf≈0,3
Sp¹-25 a 41	Se observó una sola mancha marrón con un Rf≈0,95.
Sp¹-42 a 77	Se observaron 2 manchas, una marrón y una azul grisáceo, poco resueltas con Rf próximos.
Sp¹-78 a 88	Sólo se observaron manchas marrones cerca de la línea de solvente.
Sp¹-89 a 106	Se observó una mancha amarilla fuerte con un Rf≈0,85. Masas muy pequeñas (0,3-5mg), se unen todas para posterior análisis por TLC

De la fracción Sp¹-25 en adelante las masas de cada fracción eran pequeñas. Su unión se basó en criterios de resultados de CCF, mas para algunas fracciones cuando no se observó en la placa alguna banda que la asociara con las fracciones anteriores o siguientes, se unió con el grupo de fracciones con la que más similitud en apariencia tuviese.

De igual forma a estas subfracciones se les realizó CCF en fase normal utilizando una fase móvil de CH₂Cl₂/EtOH en proporción 6:4 y además revelada con PAS de la cual no se obtuvo ninguna definición de bandas en la placa. Se le disminuyó la

polaridad a esta fase móvil, realizando una nueva placa Chl/EtOH en proporción 9:1 y observando bajo lámpara UV a 254 nm se obtuvo lo siguiente (Fig. 43).

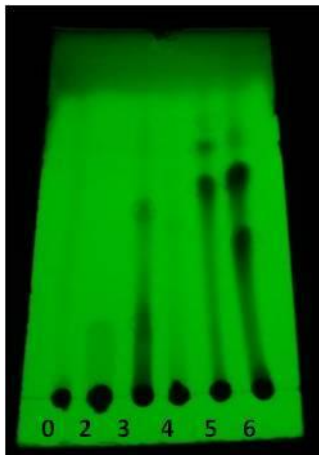


Fig. 43. Placa en fase normal eluída en Chl/EtOH 9:1 y vista bajo luz UV 254 nm. Se indican las subfracciones como números debajo de su punto de siembra: 0 = Sp¹-0 a 3, 2 = Sp¹-13 a 24, 3 = Sp¹-25 a 41, 4 = Sp¹-42 a 77, 5 = Sp¹-78 a 88, 6 = Sp¹-89-106

Al revelar esta placa con PAS no se observó ninguna coloración en estos puntos. Esto puede deberse a que en su estructura no exista un centro de reacción capaz de formar alguna coloración con aldehídos aromáticos en medio ácido⁴¹.

Estas observaciones también se dieron con algunas subfracciones de la columna F, la columna A y de la segunda columna de sephadex LH-20, en CCF realizadas con fases de Chl o Chl/EtOH 9:1, por lo que se realizó una nueva placa conteniendo todas las fracciones con esta característica (Fig. 44) y se verificó si dichas bandas que no presentaban coloración al revelar tenían los mismos R_f entre todas estas fracciones.

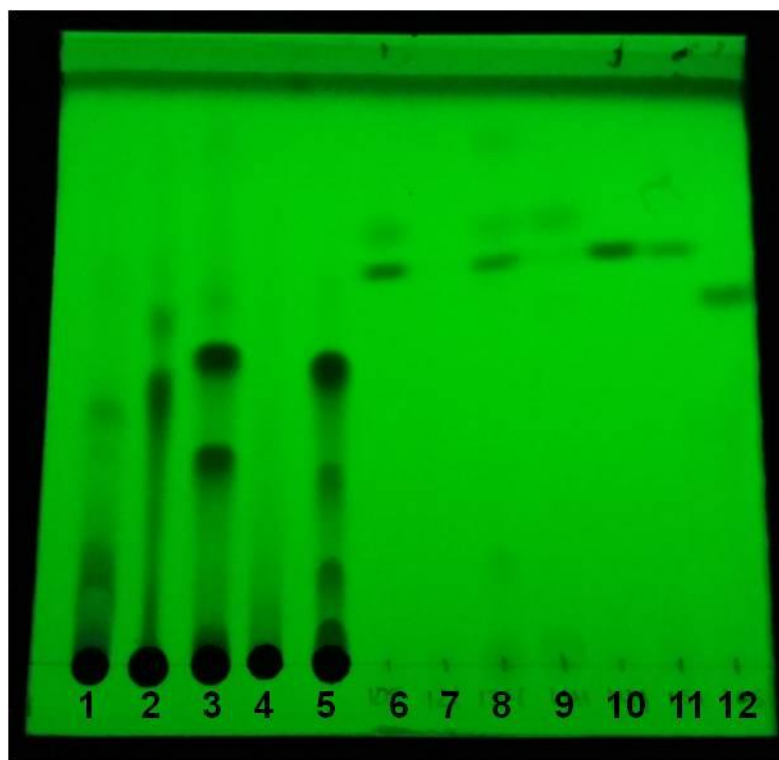


Fig. 44. Placa con fracciones y subfracciones que no presentaban coloración al revelar con PAS, vista bajo luz UV 254 nm. Punto 1 = Sp¹-25 a 41, 2 = Sp¹-78 a 88, 3 = Sp¹- 89 a 106, 4 = Sp²-8 a 11, 5 = Sp²-23 a 27, 6 = A-106, 7 = A-122, 8 = F-134, 9 = A-142, 10 = A-145, 11 = A-152 y 12 = A-166.

De esta forma se unieron las subfracciones Sp¹-89 a 106 y Sp²- 23 a 27 (3 y 5 en la Fig. 44) y las fracciones F-134, A-106, 122, 142, 145, 152 y 166. En el primer caso la masa alcanzada fue de 60,48 mg, mientras que en el segundo caso, luego de unirse todas las fracciones de la columna A y la fracción de la columna F se obtuvo una masa de 2,03 mg.

Las subfracciones Sp¹ y Sp² reunidas fueron sometidas a CC, en la columna C, obteniéndose 83 fracciones y que fueron reunidas después de análisis por CCF en 4 subfracciones. La subfracción C-24 a 43 con una masa de 3,53 mg por su análisis en CCF parecía un compuesto puro, no presentaba coloración al revelar con PAS, mientras que con el reactivo éster del ácido 2-aminoetil-difenilbórico presentaba coloración amarillo pálida y sin revelado se observaba bajo luz UV 254

nm como un solo punto. A esta subfracción se le asignó como nombre Compuesto 4 al cual se le realizó su espectro de RMN ^1H .

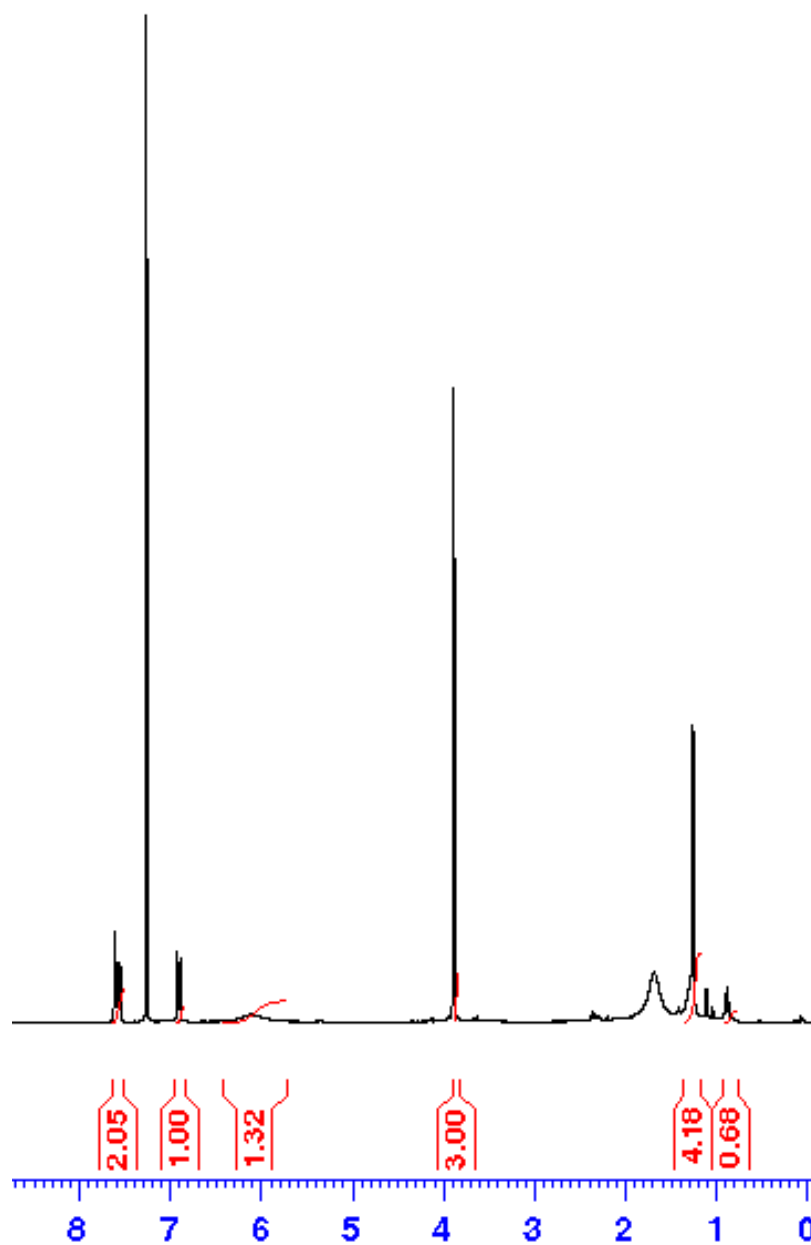


Fig. 45. Espectro RMN ^1H del Compuesto 4 (CDCl_3 , 300 MHz)

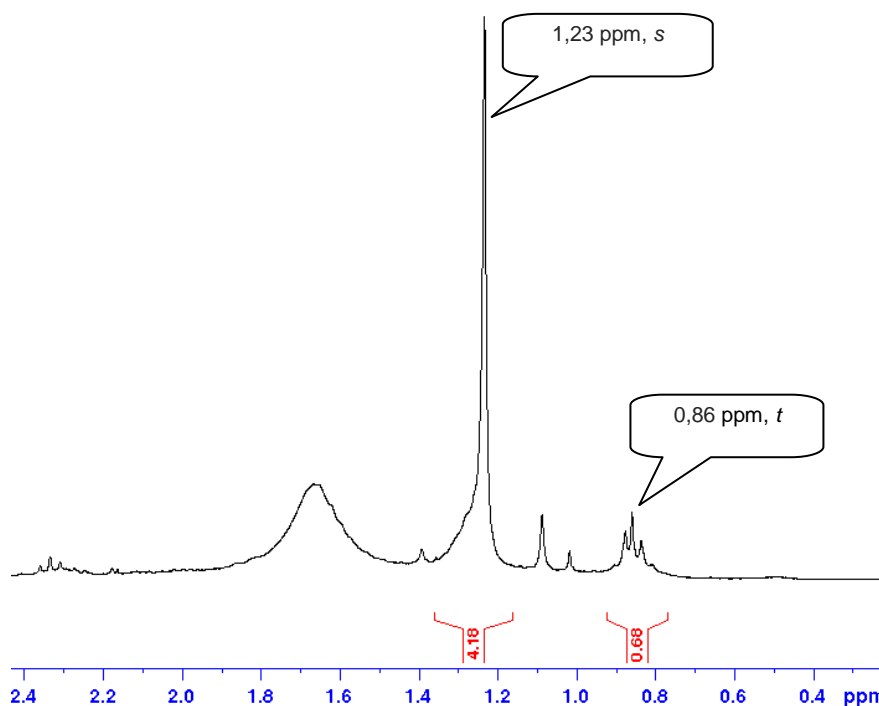


Fig. 46. Espectro RMN ^1H de Compuesto 4 a campo alto (CDCl_3 , 300 MHz)

Como se puede ver en la Fig. 46, el espectro del Compuesto 4, a campo alto se observa una señal intensa en forma de singlete a 1,23 ppm, que integra para 4 protones mientras que un triplete centrado en 0,86 ppm que integra para 0,68 protones (≈ 1 protón). Por el desplazamiento que muestran este par de señales, parecen ser característicos de una cadena alifática, posiblemente restos de contaminantes en algún solvente utilizado para su obtención.

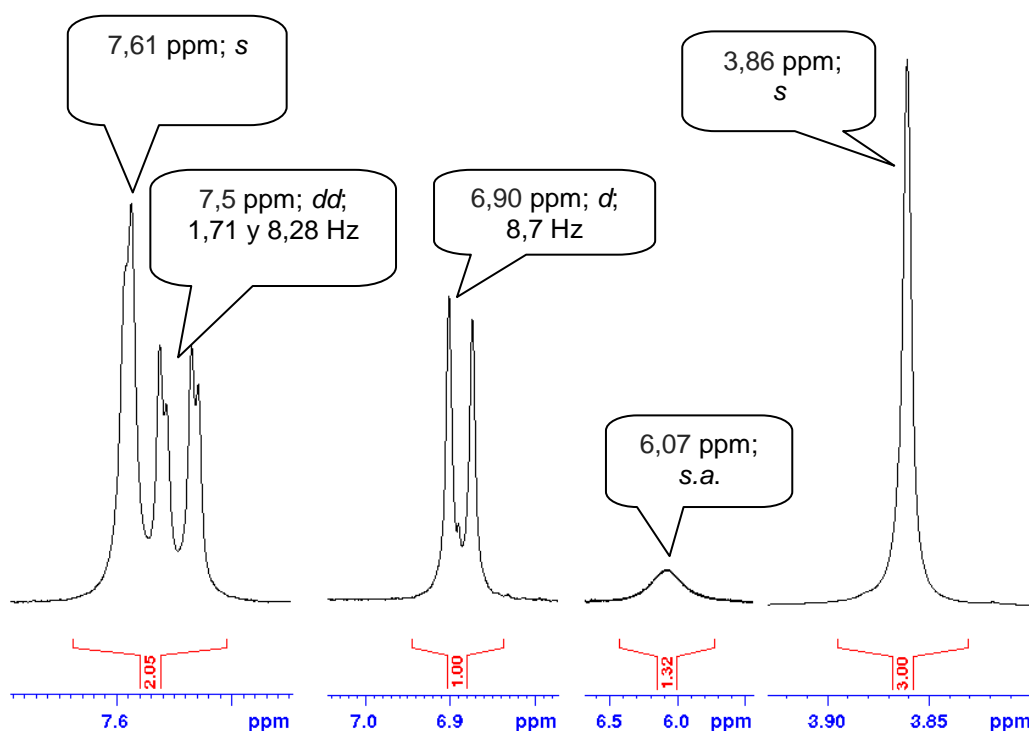


Fig. 47. Ampliación del espectro RMN ^1H a campo bajo del Compuesto 4 (CDCl_3 , 300 MHz)

En la Fig. 47, se puede observar una ampliación del espectro de protones a campo bajo del compuesto 4, donde se muestran señales aromáticas en los desplazamientos de 6 a 7,6 ppm y una señal alifática en 3,86 ppm que integra para 3 protones, la cual corresponde a un grupo metoxi³⁴. Este grupo es dador de electrones por resonancia, por lo que los protones en posiciones *orto* y *para* al mismo estarán más desapantallados y se observarían en desplazamientos menores a los típicos de protones aromáticos^{34,42}.

En la zona aromática, el primer pico se observa en 6,07 ppm e integra para 1,32 protones (≈ 1 protón). Continuando a campo bajo, la siguiente señal es un doblete entre 6,87 y 6,90 ppm que integra para 1 protón. La constante de acoplamiento entre los picos de este doblete es de 8,28 Hz, lo que indica que se encuentra en posición *orto* a otro protón dentro del anillo aromático.

Los picos encontrados entre 7,52 y 7,56 poseen una constante de acoplamiento de 1,71, lo cual es indicativo de acoplamiento en posición *meta* a otro protón^{34,42}.

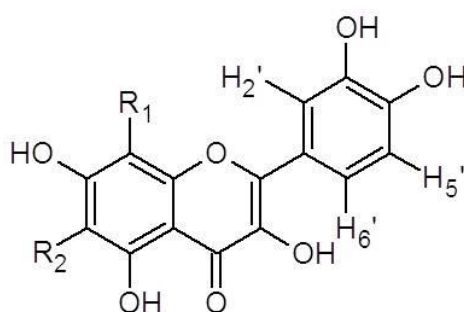
Luego de hacer una revisión bibliográfica sobre trabajos de Chrysobalanaceas donde han aislado flavonoides, especialmente agliconas de quercetina, los desplazamientos del núcleo de este flavonol conservan parecido con los desplazamientos del espectro de RMN ^1H del compuesto 4. En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos del compuesto 4 comparados con los desplazamientos para el núcleo de quercetina aislada en la especie *Coupeia paraensis*²¹ y para el estudio previo de *E. coriaceum*⁶.

Tabla 17. Señales del espectro ^1H del compuesto 4 en CDCl_3 a 300 MHz. Se incluyen los datos reportados en MeOD para el núcleo de la estructura de la quercetina aislada de *C. paraensis*, *E. coriaceum* y *L. carii*.

Compuesto 4	Quercetina de <i>C. paraensis</i> ²¹ (6)	Quercetina de <i>E. coriaceum</i> ⁶ (3)	Quercetina de <i>Licania carii</i> ⁴⁶	Asignación ^{6,21,46}
(δ (ppm); <i>multiplicidad</i> ; <i>J</i> en Hz)				
-	6,15 (<i>d</i> , 2,1 Hz)	6,19 (<i>d</i>)	6,18 (<i>d</i> , 1,9 Hz)	H6
-	6,37 (<i>d</i> , 2,1 Hz)	6,30 (<i>d</i>)	6,45 (<i>d</i> , 1,9 Hz)	H8
7,6 (<i>s</i>)	7,72 (<i>d</i> , 2,1 Hz)	7,40 (<i>s.a</i>)	7.58 (<i>d</i> , 2,0 Hz)	H2'
6,88 (<i>d</i> , 8,28 Hz)	6,87 (<i>d</i> , 8,7Hz)	6,88 – 6,92	6.85 (<i>d</i> , 8,4 Hz)	H5'
7,5 (<i>dd</i> , 1,71 y 8,28 Hz)	7,61 (<i>dd</i> , 2,4 y 8,7 Hz)	7,40-7,39	7.65 (<i>dd</i> , 2.0 y 8.4 Hz)	H6'

Como se puede observar hay buena correlación entre las señales del compuesto 4 y las correspondientes a la quercetina reportadas para 3 especies de Chrysobalanaceae, sin embargo están ausentes las señales del protón H6 y H8.

La asignación del grupo metoxi se puede tomar en la posición 6 ó 8, ya que para corroborar su posición sería necesario el espectro RMN ^{13}C del compuesto 4. Entre las estructuras que se proponen para este compuesto están la patuletina (45), la 8-metoxi-quercetina (46), 8-hidroxi-quercetina o gossypetina (47) y la 6-hidroxi-quercetina o quercetagetina (48). En la Tabla 18 se comparan las señales RMN ^1H de los espectros reportados para las estructuras de los compuestos 45 y 46 con las señales del compuesto 4. (Fig. 48.)



	R ₁	R ₂
(45) Patuletina	H	-OCH ₃
(46) 8-metoxi-quercetina	-OCH ₃	H
(47) 8-hidroxi quercetina	-OH	H
(48) 6-hidroxi-quercetina	H	-OH

Fig. 48. Estructuras propuestas para el compuesto 4²².

Tabla 18. Comparación de las señales del espectro RMN ^1H del compuesto 4 con el espectro RMN ^1H de la patuletina y la 8-metoxi-quercetina

Compuesto 4	Patuletina ⁵³	8-metoxi-quercetina ⁵⁴	Asignación ^{53,54}
(δ (ppm); <i>multiplicidad</i> ; <i>J</i> en Hz)			
3,86; s	3,97; s; (H6)	3,90; s; (H8)	-OCH ₃
6,07; s.a	6,25; s (H8)	6,27; s (H6)	-
7,6; s	7,40; <i>d</i> ; 2	7,61; <i>d</i> ; 2,5	H2'
6,88; <i>d</i> ; 8,28	6,93; <i>d</i> ; 8,3	6,92; <i>d</i> ; 8,2	H5'
7,5; <i>dd</i> ; 1,71 y 8,28	7,36; <i>dd</i> ; 2 y 8,3	7,56; <i>dd</i> ; 2,5 y 8,2	H6'

La quercetina y sus derivados glicosilados se han aislado de varias especies de Chrysobalanaceae⁵ y se considera un marcador quimiotaxonómico de esta familia de plantas^{5,6}.

Para la subfracción Sp¹-13 a 24 se realizaron dos placas de CCP para la purificación de dos bandas que utilizando una fase móvil de Chl/MeOH/H₂O en proporción 75:30:4, mostraban coloración azul (Rf = 0,92) y coloración verde (Rf = 0,96) al ser revelados con PAS. Luego de su tratamiento se obtuvieron dos compuestos, llamados compuesto 5 (1,0 mg) y compuesto 6 (1,5 mg) respectivamente. Sólo se obtuvo el análisis por RMN ^1H del compuesto 6, el cual se presenta el espectro con supresión de solvente, a continuación.

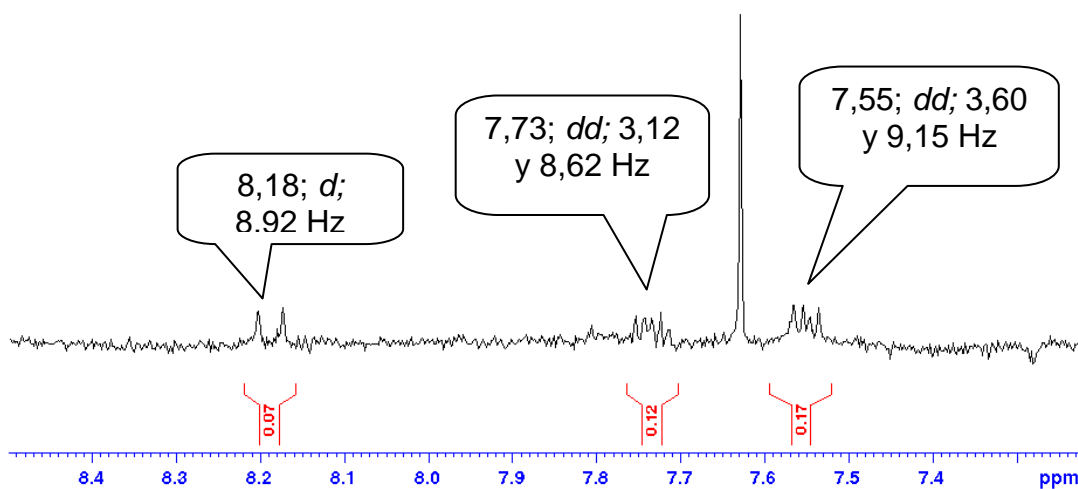


Fig. 49. Ampliación a campo bajo del espectro RMN ^1H de Compuesto 6 (CDCl_3 , 300 MHz)

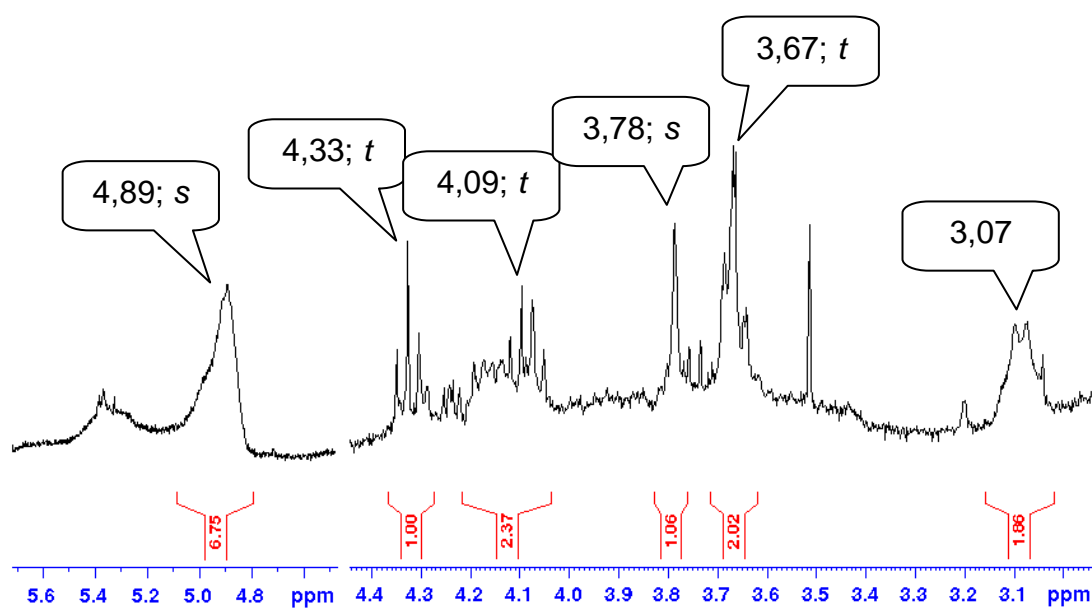


Fig. 50. Ampliación a campo alto del espectro RMN ^1H de Compuesto 6 (CDCl_3 , 300 MHz)

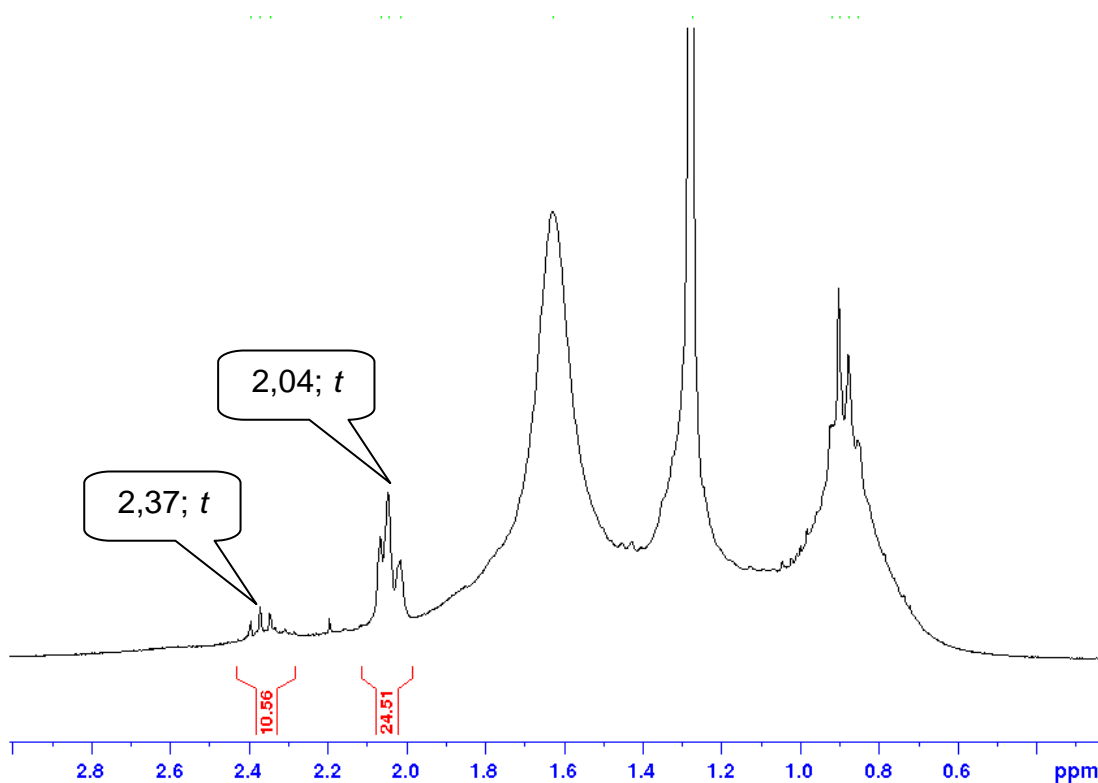


Fig. 51. Ampliación a campo alto del espectro RMN ^1H de Compuesto 6 (CDCl_3 , 300 MHz)

Al igual que para los compuestos 2 y 3, en la zona aromática, el compuesto 6 presenta dos dobletes de doblete con constantes de acoplamiento entre 3 y 9 Hz, sin embargo, sus intensidades son tan bajas que pueden ser parte de algún contaminante resultante del método de obtención de estos compuestos.

A campo alto (2-5ppm) se pueden observar señales características de protones enlazados a carbonos que a su vez están enlazados a átomos electronegativos como oxígeno o nitrógeno. Ejemplo de este tipo de estructuras son los glicósidos, sin embargo, la interpretación de espectros de RMN de carbohidratos requiere no sólo del protones para confirmar algún tipo de estructura, sino también de un espectro de carbono y correspondientes espectros en dos dimensiones.

3.2. Resultados de los ensayos biológicos sobre inhibición de Glucosa-6-fosfatasa

Para elegir que subfracciones realizarles ensayos de G-6-Pasa, se tomaron en cuenta aquellas fracciones con masas entre 10 y 70 mg, que imposibilitaba el tratamiento cromatográfico por los métodos disponibles, para el aislamiento de algún compuesto. De esta manera, las subfracciones seleccionadas para la realización de los ensayos de inhibición de la enzima G-6-Pasa se muestran en la siguiente tabla

Tabla 19. Subfracciones seleccionadas para la realización de la actividad hipoglicemiante

Subfracción	Masa (mg)	Observaciones por CCF
Extracto metanólico-acuoso de <i>E. coriaceum</i> (crudo)	≈100	-
F-35 a 42	48,04	Ver tabla 10
F-43 a 49	88,54	
F-50 a 68	52,89	
Sp ¹ -25 a 41	71,84	Ver tabla 11
Sp ¹ -78 a 88	27,51	
Sp ² -8 a 11	31,20	Placa en fase normal, fase móvil: AcOEt/AcOH/HCOOH/H ₂ O en proporción 100:11:11:26. Revelada con PAS, manchas azules Rf≈0,7
Sp ² -12 a 17	42,06	Placa en fase normal, fase móvil: CH ₃ CN/Chl en proporción 9:1. Bandas observables bajo UV 254nm con Rf≈0,7
Sp ² -28 a 36	17,71	Placa en fase normal, fase móvil: CH ₃ CN/Chl en proporción 9:1.

		Bandas observables bajo UV 254nm con Rf≈0,7
Sp ² -37 a 41	40,43	Placa en fase normal, fase móvil: AcOEt/AcOH/HCOOH/H ₂ O en proporción 100:11:11:26. Revelada con PAS, manchas amarillas Rf≈0,5
Sp ² -58 a 76	48,91	Placa en fase normal, fase móvil: nBuOH/AcOH/H ₂ O en proporción 50:10:40. Revelada con PAS, manchas marrones Rf≈0,3

A continuación en la tabla 20 se presentan los resultados del ensayo de actividad hipoglicemiante sobre el sistema G-6-Pasa microsomal con las subfracciones ya mencionadas.

Tabla 20. Efecto del crudo del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum* y algunas subfracciones obtenidas de los procedimientos A y B sobre G-6-Pasa de microsomas hepáticos. La concentración final de las subfracciones fue de 2 mg/mL. La actividad de la enzima está expresada en $\mu\text{mol Pi liberados/h/mg}$ de proteína y cada valor representa el promedio de tres experimentos separados, cada uno realizado por triplicado

Subfracciones	Actividad en microsomas intactos	Microsomas intactos (%Inhibición)	Actividad en microsomas rotos	Microsomas rotos (% Inhibición)
Control	2743,3±569,4	-	4058,7±765,9	-
F-35 a 42	467,6±133,3	82	5300,6±817,0	-
F-43 a 49	539,3±67,7	80	2961,4±226,3	28
F-50 a 68	372,3±217,2	86	3033,0±315,3	26
Sp¹-25 a 41	681,1±44,4	75	3270,0±615,2	20
Sp¹-78 a 88	609,1±285,7	78	3853,5±569,4	6
Sp²-8 a 11	543,3±136,4	80	2822,4±508,7	31

Sp²-12 a 17	355,1±183,6	87	3389,5±645,0	17
Sp²-28 a 36	355,0±95,5	87	3445,2±333,8	16
Sp²-37 a 41	161,5±122,5	94	3715,2±225,7	9
Sp²-58 a 76	-	-	-	-
<i>E. coriaceum</i> (crudo)	-	-	-	-

La tabla muestra el efecto que ejercieron estas subfracciones sobre el sistema de la G-6-Pasa. En los casos del crudo y la subfracción Sp²-58 a 76, la solubilización total de dichas muestras no se logró, por lo que no se pudieron someter al ensayo.

En el modelo del sistema de la G-6-Pasa se postula que el transportador T1 actúa específicamente en la transferencia de Glucosa-6-fosfato del citoplasma a la cisterna del retículo endoplasmático donde es hidrolizado por la subunidad catalítica, poco específica y activada por una proteína estabilizadora (SP). Los productos de la hidrólisis son exportados por los transportadores T2 para fosfato y T3 para glucosa⁴⁴. Es decir, la enzima puede ser inhibida por alteraciones en el funcionamiento de la subunidad catalítica o de uno de los tres transportadores⁶.

Cuando una molécula inhibe la actividad enzimática en los microsomas, el efecto pudiera deberse a que dicha molécula actué sobre la subunidad catalítica o sobre uno de los transportadores. Si la inhibición se observa tanto en los microsomas intactos como rotos, el compuesto ensayado actúa sobre la subunidad catalítica. De igual forma, si su inhibición es sólo en microsomas intactos, su actuación es directamente asociada al transportador T1^{44,6}.

Por los resultados obtenidos en este ensayo, reflejados en la tabla 14, se muestra que todas las subfracciones tratadas tienen un porcentaje de inhibición alto para los microsomas intactos, mientras que para los microsomas rotos los porcentajes de inhibición son considerablemente más bajos. De esta forma, se puede considerar que la inhibición de la enzima por las subfracciones es específica

para el transporte de la glucosa-6-fosfato del citoplasma al interior del retículo endoplasmático.

Si bien la inhibición de la enzima en microsomas intactos de las subfracciones no fueron menores de 75%, las subfracción que presenta la mayor inhibición en este caso es la Sp²-37 a 41, que fue de un 94%. Durante el tratamiento cromatográfico de las fracciones obtenidas durante este procedimiento, se realizó una placa en fase normal usando como eluyente el sistema AcOEt/AcOH/HCOOH/H₂O en proporción 100:11:11:26, la cual es una fase utilizada comúnmente para analizar cromatográficamente flavonoides glicosilados por CCF²⁶. Luego de revelar con PAS, se obtuvo que para las fracciones que componen esta subfracción se observó una mancha amarilla con un R_f de 0,55.

En este sistema de solventes se reportan compuestos con R_f entre 0,5 y 0,55 al ácido clorogénico (**47**) y el flavonoide glicosilado isoquercitrina (**48**)²⁶. En cuanto al ácido clorogénico es considerado un inhibidor competitivo reversible de la G-6-Pasa, específicamente para el transportador T1⁴⁴.

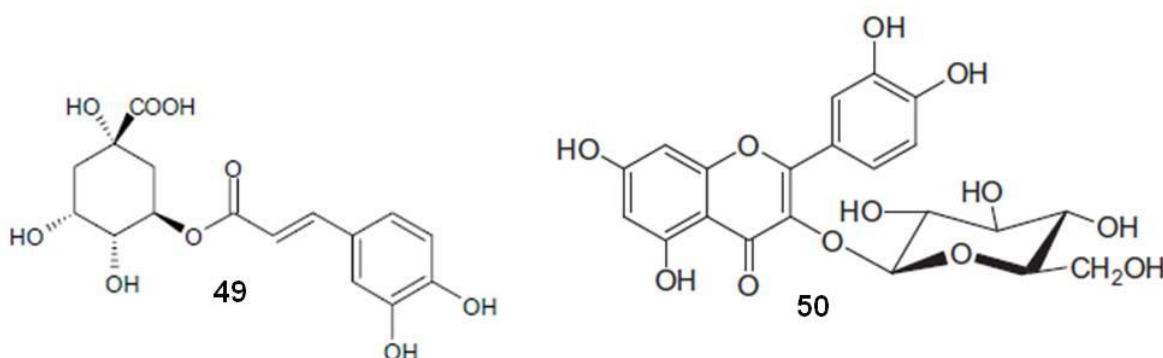


Fig. 52. Estructuras del ácido clorogénico⁴⁴ y de la isoquercitrina⁴⁵.

Continuando con el orden decreciente en porcentaje de inhibición en microsomas intactos, están las subfracciones Sp²-12 a 17 y Sp²-28 a 36 con 87% cada uno y en inhibición en microsomas rotos 17 y 16% respectivamente. Con estos

resultados, estas subfracciones pueden ser unidas para futuras caracterizaciones cromatográficas biodirigidas.

A diferencia de las subfracciones Sp²-12 a 17 y Sp²-28, la subfracción F-50 a 68, proveniente del procedimiento A, que posee un porcentaje de inhibición de la enzima en microsomas intactos de 86%, muy cercana a la de las subfracciones Sp², también posee un porcentaje de inhibición en microsomas rotos de 26%, mayor que las subfracciones provenientes del procedimiento B. Esto indica que posee mayor actividad de inhibición sobre la subunidad catalítica que las subfracciones Sp².

De igual forma, las subfracciones F-43 a 49 y Sp²-8 a 11, presentaron un porcentaje de inhibición en microsomas intactos de 80%, mientras que en microsomas rotos fue de 28 y 31% respectivamente. Si bien, los procedimientos para la obtención de ambas subfracciones fueron distintos, se podría considerar unir dichas subfracciones para realizar caracterizaciones cromatográficas biodirigidas.

En el caso de la subfracción F-35 a 42, no se detectó actividad inhibitoria en microsomas rotos, mientras que en los intactos tiene una actividad comparable con las subfracciones F-43 a 49 y Sp²-8 a 11 (82%). Por este resultado esta fracción resulta específica para la inhibición del transportador T1.

Para las subfracciones con la menor actividad en microsomas intactos, Sp¹-25 a 41 y Sp¹-78 a 88 (75 y 78%), se puede observar que la inhibición de la enzima G-6-Pasa en microsomas rotos fue de 20 y 6% respectivamente, indicando que a medida de que la separación del crudo por cromatografía de exclusión molecular se eluye con solventes de menor polaridad, se obtienen fracciones con más especificidad en la inhibición del transportador T1. Esta tendencia también se observa en el caso de las subfracciones Sp².

Si bien de ninguna de estas fracciones se aisló algún compuesto de tipo flavonoidal, se observó que en las mismas hay presencia de este tipo de compuestos, al igual que de taninos condensados.

La dificultad que se presentó para la disolución del extracto metanólico-acuoso de *E. coriaceum* Prance y realizar el ensayo de su actividad hipoglicemiante se presenta como un inconveniente limitante para comparar la actividad de estas subfracciones en relación al crudo de donde provienen. Sin embargo, se poseen datos de ensayos biológicos de inhibición de G-6-Pasa sobre compuestos de tipo flavonoide provenientes de esta planta, aislados de los extractos de cloroformo, metanol y butanol y sobre el extracto metanólico de la especie *Coupeia paraensis*^{6,21}. De estos resultados el porcentaje mayor de inhibición de la actividad de la enzima en microsomas rotos para los compuestos caracterizados en el estudio previo de *E. coriaceum*, fue de 52,3% para quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosido, mientras que para el estudio de *C. paraensis* el extracto metanólico mostró un porcentaje de inhibición de 41%. Este valor dista al menos en un 20% de los valores obtenidos para las subfracciones de la tabla 14, lo cual puede ser un indicativo de que la sinergia entre los componentes de las subfracciones es la responsable por la actividad de inhibición del sistema de la G-6-Pasa afectando específicamente al transportador T1.

CONCLUSIONES

- Del procedimiento A, se aislaron los compuesto 1, 2 y 3, de los cuales sólo del compuesto 1 se ha obtenido sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C , mientras que de los compuestos 2 y 3 su espectro RMN ^1H . Se propone el compuesto 1 como una grasa proveniente del procedimiento de fraccionamiento mientras que para los compuestos 2 y 3 es necesario su espectro RMN ^{13}C para confirmar estructuras.
- Del procedimiento B, se aislaron los compuestos 4, 5 y 6. Sólo se obtuvieron los espectros RMN ^1H de los compuestos 4 y 6. Se proponen para la estructura del compuesto 4 el núcleo de la quercetina sustituida en posición 6 y/o 8, siendo necesario un espectro RMN ^{13}C para confirmar la estructura del compuesto 4.
- De las subfracciones F-35 a 42, F-43 a 49, F-50 a 68, Sp 1 -25 a 41, Sp 1 -78 a 88, Sp 2 -8 a 11, Sp 2 -12 a 17, Sp 2 -28 a 36, Sp 2 -37 a 41, se obtuvieron resultados de entre 72 y 94% de inhibición del sistema de G-6-Pasa en microsomas intactos, y entre 6 a 31% en microsomas rotos, por lo que se concluye que son inhibidoras específicas del transportador T1. De la revisión bibliográfica se obtuvo que compuestos previamente aislados y caracterizados de esta especie de Chrysobalanaceae poseen actividad hipoglicemiante de un 52%, determinando así que la responsabilidad por la alta actividad hipoglicemiante de estas subfracciones puede deberse a la sinergia entre los compuestos que se encuentran en estas subfracciones y no a metabolitos específicos encontrados en esta especie.

RECOMENDACIONES

- Determinar la cantidad de taninos del extracto mediante métodos cuantitativos.
- Realizar ensayos de citotoxicidad sobre el extracto crudo y sobre subfracciones obtenidas de los procedimientos de separación realizados según resultados previos de inhibición de G-6-Pasa.
- Repetir ensayos de actividad viral contra el virus de fiebre amarilla sobre el extracto y las subfracciones obtenidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Marcano, D. & Masahisa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica. UCV Cons. Desarrollo. Científico Caracas, Venezuela*
- 2 Pinto, P. C., Sousa, G., Crispim, F., Silvestre, A. J., & Neto, C. P. (2013). Eucalyptus globulus bark as source of tannin extracts for application in leather industry. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(8), 950-955.
- 3 Prance, G. T., & White, F. (1988). The genera of Chrysobalanaceae: a study in practical and theoretical taxonomy and its relevance to evolutionary biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 320(1197), 1-184.
- 4 Prance, G. T. (1972). *Flora Neotropica, Vol. 9, Chrysobalanaceae*. New York: Hafner Publishing Company.
- 5 Neto, F. C., Pilon, A. C., da Silva Bolzani, V., & Castro-Gamboa, I. (2013). Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. *Phytochemistry reviews*, 12(1), 121-146.
- 6 Carrasco, D. (2009). *Estudio fitoquímico y análisis de la actividad biológica de Exellodendron coriaceum. Una aproximación a la quimiotaxonomía*. Trabajo de Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela
- 7 Del Valle, A. (2016). Visita al Herbario Nacional de Venezuela [Fotografía]
- 8 Font Quer, P. (2000). *Diccionario de Botánica*. (2da Ed.). Editorial Península. Barcelona
- 9 International Organization for Plant Information (1996-2007). Disponible en: <https://www.bgbm.org/IOPI/GPC/PTaxonDetail.asp?RIDentifier=512184>. Consultado el 30 de Marzo de 2016.
- 10 Discover life. (2017). Missouri: Designed by The Polistes Corporation
Disponible en: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Exellodendron+coriaceum>.

- 11 Cartaya, O., & Reynaldo, I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales, vol. 22, núm. 2, 2001. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba*, 5-14.
- 12 Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas versión On-line*. Vol.22, no.1, p.0-0. ISSN 0864-0300. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/f0107103.jpg
- 13 Tenorio, F., Mondragón, M. y Pastelín, G. (2006). Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?. *Archivos de cardiología de México versión impresa*. Vol. 76 supl.4. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/img/revistas/acm/v76s4/a4f1.jpg>
- 14 Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Universidad de Antioquia. Medellín.
- 15 Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., & Panopoulos, N. (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology journal*, 2(10), 1214-1234.
- 16 Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119-145.
- 17 Barbosa, W. L. R., Peres, A., Gallori, S., & Vincieri, F. F. (2006). Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(3), 333-337.
- 18 Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024. Disponible en: <http://molddb.wishartlab.com/molecules/PE000308/image.png>.
- 19 Nara Institute of Science and Technology. (2007). Disponible en: http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/information.jsp?mode=r&word=C00005730&key=27
- 20 Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N. A., Ahmad. S. A., Shukor. M. Y. (2014). Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids. *BioMed*

Research International. Volume 2014. Article 480258. 11 págs.

- 21 Cabrera, G., Guaramato, M. A., Rodríguez, M., Méndez, J., Rodríguez-Ortega, M., Carvajal, Z. y González-Mujica, F. (2012). *Couepia paraensis*: Estudio fitoquímico, ensayos de citotoxicidad y de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(3) 440-447.
- 22 2010. ACD/Chem Sketch freeware. Advanced Chemistry Development. 12.01. Microsoft Windows XP(Servipack 3). Toronto, Canadá.
- 23 Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, Á., Gómez Puyou, A., Tapia Ibarquengoytia, R. (2004). *Bioquímica*. Editorial Limusa. México.
- 24 de Carvalho, M. G., de Oliveira Cândido, L. F., da Costa, P. M., do Nascimento, I. A., & Braz-Filho, R. (2008). Triterpenes acids and saponins isolated from *Licania arianae* Prance (Chrysobalanaceae). *Journal of natural medicines*, 62(3), 360-361.
- 25 Hostettmann, K., Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge University Press. Cambridge. Gran Bretaña.
- 26 Wagner, H., Blatt, S. y Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis A thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Pgs 299, 301.
- 27 Burchell, A., & Waddell, I. D. (1991). The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1092(2), 129-137.
- 28 Avila, L. (2008). *Aislamiento de los Metabolitos secundarios presentes en la Bauhinia variegata L. Biodirigido por ensayos de inhibición sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.
- 29 Bermúdez, J. (2016). *Estudio fitoquímico de plantas utilizadas en el control de la diabetes mellitus y evaluación de la actividad biológica sobre glucosa-6-fosfatasa de los metabolitos aislados y productos sintetizados*. Trabajo de Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.

- 30 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- 31 Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry*, 87(1), 206-210.
- 32 Stahl, E. (1969). *Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. Springer International Student Edition. Pgs. 854-909.
- 33 Delporte, C. (2010). *Farmacognosia. Trabajos prácticos*. Universidad de Chile. Pgs. 32-36.
- 34 Prestch, E., Clerc, T., Seibl, J., & Simon, W. (1998). *Tablas para la dilucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos: ¹³C-RMN, ¹H-RMN, IR, EM, UV-Vis*.
- 35 Latorre, J. y Calderón, C. (1998). *Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos (Sorghum bicolor L moench) cultivados en Colombia*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bucaramanga-Colombia. Pgs. 17 y 18.
- 36 Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 21-40.
- 37 Santos, S. C., Costa, W. F., Ribeiro, J. P., Guimarães, D. O., Ferri, P. H., Ferreira, H. D., & Seraphin, J. C. (2002). Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 73(4), 292-299.
- 38 Braun de Macedo, G. (2015). *Estabilidade e tratamento de taninos condensados*. Trabalho de diplomação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. Pg. 13.
- 39 Wagner, H. y Bladt, S. (2009). *Plant Drug Analysis A thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg London New York. Pgs 281-289.

- 40 Andersen, Ø. y Markham, K. (2006). *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press. Pg. 266.
- 41 Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., & Burns, D. T. (1990). Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv+ 464 pp. Price DM 148.00. *Analytica Chimica Acta*, 237, 511-512.
- 42 Silverstein, R., Webster, F. y Kiemle, D. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Jhon Wiley & Sons (7th Ed.), INC. EEUU.
- 43 Khokhar, S., & Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chemistry*, 81(1), 133-140.
- 44 González-Mujica, F. y Bermúdez, J. (2017). *Diabetes. El sistema de la glucosa-6-fosfatasa. Algunos de sus inhibidores*. Editorial Académica Española. Alemania. Pg. 7,33.
- 45 Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., & Křen, V. (2014). Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.
- 46 Bilia, A. R., Mendez, J., & Morelli, I. (1996). Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71(3), 191-197.
- 47 Awasthi, H., Nath, R., Usman, K., Mani, D., Khattri, S., Nischal, A., & Sawlani, K. K. (2015). Effects of a standardized Ayurvedic formulation on diabetes control in newly diagnosed Type-2 diabetics; a randomized active controlled clinical study. *Complementary therapies in medicine*, 23(4), 555-561.
- 48 SDBSWeb <http://sdb.sdb.aist.go.jp>. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Consultado el 17/07/2017
- 49 Fernández, B. (2006). *Aislamiento y caracterización del tilirósido a partir de las semillas de *Heliocharpus terebinthinaceus* (Cuetla)*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca, México.

- 50 Sultan, M. Z., Moon, S. S., & Park, K. (2009). Natural phthalate derivatives from the bacterium *Burkholderia cepacia* K87. *Journal of Scientific Research*, 2(1), 191-195.
- 51 Malla, S., Pandey, R. P., Kim, B. G., & Sohng, J. K. (2013). Regiospecific modifications of naringenin for astragalin production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 110(9), 2525-2535.
- 52 Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., & Lewis, J. R. (1996). ^1H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic resonance in Chemistry*, 34(11), 887-890.
- 53 Costa, S. S., Jossang, A., Bodo, B., Souza, M. L. M., & Moraes, V. L. G. (1994). Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *Journal of natural products*, 57(11), 1503-1510.
- 54 Servettaz, O., Colombo, M. L., De Bernardi, M., Uberti, E., Vidari, G., & Vita-Finzi, P. (1984). Flavonol glycosides from *Dryas octopetala*. *Journal of natural products*, 47(5), 809-814.