

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO:

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

***Tachigali chrysophylla* (Poepp). Zarucchi & Herend.**

Trabajo especial de grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Sofía V. Salazar Bigott, para optar
al título de Licenciada en Química.

Tutores: Profa. María Rodríguez García

Prof. Jairo Bermúdez León

Caracas, Septiembre 2017

Nosotros, la Profesora María Rodríguez García, investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Jairo J. Bermúdez León, investigador del Laboratorio de 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:

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE
Tachigali chrysophylla (Poepp). Zarucchi & Herend.”**

Que presenta la Br. Sofía Valentina Salazar Bigott, para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016 y 2017, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, septiembre de 2017



Profa. María Rodríguez García



Prof. Jairo J. Bermúdez León

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios Presentes en la Especie *Tachigali chrysophylla* (poepp). Zarucchi & Herend**, presentado por la Br. Sofía Valentina Salazar Bigott C.I.: 20327235, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciada en Química.



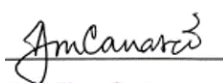
Profa. María Rodríguez García
(Tutora)



Prof. Jairo Bermúdez León
(Tutor)



Profa. Katiuska Chávez
(Jurado principal)



Profa. Diana Carrasco
(Jurado principal)

AGRADECIMIENTOS

“...el hombre toma la materia prima de la naturaleza y la convierte en humanidad...”

Luis Antonio Bigott

A las culturas originarias del mundo y sus dioses.

A la Universidad Central de Venezuela, la del hombre justo.

A la agri dulce Escuela de Química. A sus profesores.

Al Dr. Francisco De Venanzi, fundador de la Facultad de Ciencias y al Dr. Jesús María Bianco, fundador de la Escuela de Química, en el centenario de sus nacimientos. A las voces anónimas de la Renovación Universitaria de los años 60 y 70 y a las que aún hoy creen y hacen de ésta la casa *que vence la sombra*.

A Luis Antonio, esta universidad tiene tu nombre. A Alsacia, por el apoyo incondicional. Gracias por hacerme investigadora y ucevista, pero sobre todo gracias por hacerme feliz. A Flor, porque con sólo tu recuerdo ayudas a empujar esta carreta.

A Belkis, por el ejemplo. Porque mereces estar en la misma página que Bianco y De Venanzi.

A Goyo y Leo, por la paciencia y la confianza. A mi familia entera.

A los conocimientos infinitos en fitoquímica de Jairo Bermúdez (gracias por el apoyo, por no dejar que me desesperara en este largo camino) y a los de María Rodríguez (gracias por las conversaciones infinitas, las peleas y los hermanos académicos que me regaló). Siempre estaré agradecida por la oportunidad y la paciencia. No hubiese podido desear mejores guías en este camino.

Al Laboratorio de Productos Naturales por ser una maravillosa familia: Ynés, Diana, Yuany, Víctor, Ailyn, Manuel y Ricardo. En especial a Luis y Neydimar por haber hecho de éste un trabajo en equipo y hacerse indispensables.

A mis amigos, los de hoy y los de siempre. Daniela, Irene y Silvia, Gustavo, Manuel y Eduardo, Francisco, José y Rodrigo, Francis y Ed, y a los que sus nombres olvido en este momento.

Al mejor de los amigos que he podido tener, Marco. Gracias por acompañarme, por no permitir que me rindiera “...despacio y sin apuro...”.

A ti, porque si estás leyendo esto mereces mi agradecimiento.

RESUMEN

De hojas y ramas de la especie *Tachigali chrysophylla* fueron aislados 3 triterpenos de tipo lupano y una mezcla de esteroides de tipo colestano. Las estructuras de estos compuestos fueron elucidadas por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C . El aislamiento de estos compuestos se llevó a cabo por cromatografía de columna con aumento gradual de la polaridad de los sistemas de solvente.

De esta forma fueron aislados 50,3 mg de una mezcla de al menos 3 compuestos en la que se identificó como compuesto mayoritario el terpeno **lupenona**; 17,3 mg de un compuesto que se identificó como **3-epiglochidiol**, 7mg del triterpeno **lupeol** y 9,6mg de una mezcla de dos esteroides identificados como **estigmasterol** y **β -sitosterol**.

Adicionalmente, se realizaron estudios de la actividad biológica de dos fracciones obtenidas por cromatografía líquida al vacío VLC₂ y VLC₃, frente a la enzima glucosa-6 fosfatasa y se determinó que ambas fracciones son capaces de inhibir la actividad de esta enzima tanto en microsomas rotos como intactos. Se infiere que esta actividad es producto de la acción de compuestos fenólicos como ácidos clorogénicos, flavonoides y taninos, cuya presencia fue identificada en el perfil cromatográfico del extracto metanólico de la especie.

Palabras clave: Leguminosae, *Tachigali chrysophylla*, Terpenos.

Commented [BB1]: MR: no usé CCF para el aislamiento

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
ÍNDICE DE ESQUEMAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ESPECTROS	8
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	10
INTRODUCCIÓN	12
METABOLITOS SECUNDARIOS.....	15
Compuestos Aromáticos.....	17
Flavonoides.....	17
Taninos	20
Terpenos.....	21
SISTEMA ENZIMÁTICO Glucosa-6-fosfatasa.....	22
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	24
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>Tachigali chrysophylla</i>	26
BREVE HISTORIA DEL GÉNERO <i>Tachigali</i>	28
<i>Tachigali myrmecophila</i>	28
<i>Tachigali multijuga</i>	30
<i>Tachigali paniculata</i>	31
JUSTIFICACIÓN	34
OBJETIVOS	35

Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
DISEÑO METODOLÓGICO	36
Descripción del Material Vegetal	36
Inventario del Material Cromatográfico.	37
Cromatografía de capa fina (analítica)	37
Cromatografía en columna.	37
Inventario de Equipos Utilizados.....	37
Descripción de los Agentes Reveladores Utilizados.....	38
Tratamiento de la Muestra y Obtención de los Metabolitos Secundarios	40
Análisis Fitoquímico Preliminar.	41
Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Secundarios.	44
Comparación de especies pertenecientes al género <i>Tachigali</i>	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES	51
Análisis Fitoquímico Preliminar	51
Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Secundarios.....	53
Fracción Tch-C ₁	53
Fracción Tch-C ₂	62
Fracción Tch-C ₃	71
Fracción Tch-E ₁	79
Comparación de tres especies del género <i>Tachigali</i>	87
CONCLUSIONES.....	90
RECOMENDACIONES	91
REFERENCIAS.....	92
ANEXOS	98

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rutas Metabólicas Vegetales.	16
Esquema 2. Lavados metanólicos de Tch.....	40
Esquema 3. Cromatografía líquida al vacío de Tch-Me.	41
Esquema 4. Procedimiento para la cuantificación de taninos presentes en Tch... ..	43
Esquema 5. Cromatografía líquida al vacío de Tch-Me	44
Esquema 6. Extracción de clorofilas de Tch-C.....	46
Esquema 7. Separación de Tch-E.....	46
Esquema 8. Separación cromatográfica de la fracción Tch-C.....	47
Esquema 9. Partición de la fracción Tch-E.....	48
Esquema 10. Esquema total de separación del extracto metanólico de hojas y ramas de la especie <i>Tachigali chrysophylla</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fracciones obtenidas por CLV de Tch-Me.	42
Tabla 2. Fracciones obtenidas por CLV de Tch-Me.	45
Tabla 3. Fracciones obtenidas de Tch-C por la separación con Celita-Carbón activado.	46
Tabla 4. Fracciones obtenidas de Tch-E por la separación con Celita-Carbón activado.	47
Tabla 5. Actividad enzimática y porcentaje de inhibición de las fracciones aisladas de <i>T. chrysophylla</i> sobre la enzima G-6-Pasa.	51
Tabla 6. Resultados de la determinación de la cantidad de taninos presentes en el extracto metanólico de la especie <i>Tachigali chrysophylla</i>	52
Tabla 7. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H de la Fracción Tch-C ₁ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupenona.	60
Tabla 8. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹³ C de la Fracción Tch-C ₁ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupenona.	61
Tabla 9. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H para la fracción Tch-C ₂ y los reportados en la literatura para el compuesto 3-epiglochidiol.	69
Tabla 10. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹³ C para la fracción Tch-C ₂ y los reportados en la literatura para el compuesto 3-epiglochidiol.	70
Tabla 11. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H de la Fracción Tch-C ₃ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupeol.	77
Tabla 12. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹³ C de la Fracción Tch-C ₃ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupeol.	78
Tabla 13. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹ H para la Fracción Tch-E ₁ y su comparación con los reportados en la literatura para una mezcla de β-sitosterol – estigmasterol.	85
Tabla 14. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN para la Fracción Tch-E ₁ y su comparación con los reportados en la literatura para una mezcla de β-sitosterol – estigmasterol.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los flavonoides según la posición de enlace del anillo aromático al benzopirano: (1) <i>flavonoides</i> (2-fenilbenzopiranos), (2) <i>isoflavonoides</i> (3-fenilbenzopiranos) y (3) <i>neoflavonoides</i> (4-fenilbenzopiranos).	18
Figura 2. Estructura de los tipos de flavonoides clasificados según su grado de oxidación. [7]	19
Figura 3. Precursores de los taninos condensados e hidrolizables.	21
Figura 4. Estructura de las unidades fundamentales de los terpenos.	21
Figura 5. Esquema del Sistema enzimático Glucosa 6-fosfatasa.....	23
Figura 6. Fotografías de la especie <i>Tachigali chrysophylla</i> . [23] [24]	27
Figura 7. Estructuras del estigmasterol y sitosterol aislados de <i>Tachigali myrmecophila</i> . [26]	29
Figura 8. Catequina y Epicatequina: compuestos aislados de la fracción de acetato de etilo de <i>T. myrmecophila</i> . [27]	29
Figura 9. Estructuras de blumenol y 4,5-dehidroblumenol aisladas de <i>Tachigali myrmecophila</i> . [28]	30
Figura 10. Estructura del 3-metilindol.	30
Figura 11. Compuestos aislados de la especie <i>Tachigali paniculata</i> [30] [31]	31
Figura 12. Compuestos aislados de la especie <i>Tachigali paniculata</i> . [33]	32
Figura 13. Compuestos aislados de la especie <i>Tachigali paniculata</i> . [34]	33
Figura 14. Imagen del espécimen de <i>Tachigali chrysophylla</i> que reposa en el Herbario Nacional de Venezuela. Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela. Dr. Tobías Lasser.	36
Figura 15. Estructura del (1 β , 3 β)lup-20(29)-eno-1,3-diol.- Compuesto mayoritario de la fracción Tch-C ₂	68
Figura 16. Placa de CCF comparativa de <i>Tca</i> , <i>Tch</i> y <i>Tpa</i> eluida con AN6.	87
Figura 17. Placa de CCF comparativa de <i>Tca</i> , <i>Tch</i> y <i>Tpa</i> eluida con Tol-AcOEt (75:25).	88
Figura 18. Placa de CCF comparativa de <i>Tca</i> , <i>Tch</i> y <i>Tpa</i> eluida con Tol-AcOEt (75:25).	89

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C ₁	54
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliación 0,6-1,9ppm	54
Espectro 3. Espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliación 1,8-2,9ppm	55
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliación 3,9-5,5ppm.	55
Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C de la Fracción Tch-C ₁	56
Espectro 6. Espectro de RMN de ^{13}C de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliaciones de 151-172ppm; 175ppm; 209-210ppm y 217-219 ppm.....	57
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{13}C de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliaciones 109-110ppm y 120-136ppm.	57
Espectro 8. Espectro de RMN de ^{13}C de la Fracción Tch-C ₁ . Ampliación 12-29ppm.	58
Espectro 9. Experimento DEPT135 para la Fracción Tch-C ₁	58
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₂	62
Espectro 11. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₂ . Ampliación 0,7-1,7ppm	63
Espectro 12. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₂ . Ampliación 1,8 – 2,7 ppm	64
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₂ . Ampliación 3,1 – 4,7 ppm	64
Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₂	65
Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₂ . Ampliaciones 49-56ppm; 76-80ppm; 110ppm y 150ppm.....	66
Espectro 16. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₂ . Ampliación 22,0-30,5ppm	67
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₂ . Ampliación 14,0-21,0ppm	67
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₃	71
Espectro 19. Espectro de RMN de ^1H de la fracción Tch-C ₃ . Ampliación entre 0,6ppm y 1,6ppm.....	72
Espectro 20. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₃ . Ampliación entre 3,1ppm y 4,8ppm.....	73

Espectro 21. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C ₃ .Ampliación entre 1,7ppm y 2,7ppm	73
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₃	73
Espectro 23. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₃	74
Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₃ . Ampliación 14,0ppm – 23,0ppm.	75
Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₃ . Ampliación 25,0ppm – 30,0ppm.	75
Espectro 26. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C ₃ .Ampliación 32,0ppm – 43,0ppm.	76
Espectro 27. Espectro de RMN de ^1H del compuesto Tch-E ₁	80
Espectro 28. Espectro de RMN de ^1H del compuesto Tch-E ₁ . Ampliación 0,50ppm- 2,50ppm	80
Espectro 29. Espectro de RMN de ^1H del compuesto TchE ₁ . Ampliación 3,00ppm- 6,00ppm	81
Espectro 30. Espectro de RMN de ^{13}C de la fracción Tch-E ₁	82
Espectro 31. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-E ₁ . Ampliación 37,0ppm- 80,0ppm	83
Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-E ₁ . Ampliación 110,0ppm- 170,0ppm	84

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

δ	Desplazamiento químico.
λ	Longitud de onda.
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado.
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Ac	Acetona
AcOEt	Acetato de etilo.
AS	Revelador Anisaldehído/Ácido Sulfúrico
AN2	Sistema de solventes: AcOEt-MeOH-H ₂ O (100:13,5:10; v/v)
AN6	Sistema de solventes: Hex-AcOEt-HCOOH (75:25:1; v/v)
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano.
CHCl ₃	Cloroformo.
CLV	Cromatografía Líquida al Vacío
<i>d</i>	Doblete.
<i>dd</i>	Doblete de doblete.
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
EtOH	Etanol.
g	Gramo(s).
H	Hora(s).
H ₂ O	Agua.
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ CO	Formaldehído
Hex	Hexano.
Hz	Hertz.

J	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz).
KOM	Revelador Komarowsky.
m	Metro(s).
<i>m</i>	Multiplete.
MeOD	Metanol deuterado.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramo.
MHz	Mega hertz.
<i>mult.</i>	Multiplicidad.
NP	Revelador Naturstoff.
p.a.	Para análisis.
ppm	Partes por millón.
Rf	Factor de retención.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protones.
s	Singlete.
sa	Singlete ancho.
<i>t</i>	Triplete.
<i>Tca</i>	<i>Tachigali cavipes</i>
<i>Tch</i>	<i>Tachigali chrysophylla</i>
<i>td</i>	Triplete de dobletes.
Tol	Tolueno
<i>Tpa</i>	<i>Tachigali paniculata</i>
UV	Ultravioleta.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las distintas culturas se han interesado por obtener compuestos de origen natural, a partir de prebióticos, microbios, plantas e incluso fuentes animales. El ser humano ha desarrollado una fuerte interacción con las plantas y las ha aprovechado como alimento, como punto de partida para el desarrollo de fuentes energéticas y textiles, para la fabricación de herramientas y, en especial, como elementos terapéuticos. Diversos extractos de plantas han sido utilizados para distintos propósitos por su olor, color o por la función que llevan a cabo. Las culturas antiguas tienen múltiples registros del uso de las plantas con fines medicinales, los egipcios, por ejemplo, conocían el uso del opio y del aceite de castor; los chinos, realizaron una recopilación de las tradiciones orales entre los años 300 a. C. y 200 a. C. en la que incluyeron más de 100 plantas con usos medicinales. [1]

Por otra parte, los griegos conocían los usos de la manzanilla y la cicuta, mientras que el romano Dióscorida escribió *Materia Médica* en la que registró todas las plantas conocidas por los griegos y sus usos. Las culturas amerindias tienen registros del uso de plantas con fines medicinales recopilados en obras como el *Codice Badiano* en México, *El Arcano de la Quina* y *La Flora de Santa Fe* en Colombia, mientras que en Perú y Chile existen tratados sobre la coca y la quina. En Venezuela, los registros escritos son más recientes, como las obras de Henry Pittier (1926), la de Blohm (1962) y la de Schnee (1984). [2] Sin embargo, la tradición oral de las distintas etnias del territorio, como la Warao (de quienes se conoce el uso de preparaciones de especies que contienen drogas como la escopolamina, cocaína, atropina, entre muchas otras), refleja el conocimiento de enfermedades y curaciones, algunas de ellas con fines rituales y otras con fines netamente paliativos. [3]

Los Yanomami, no solo han desarrollado el uso de plantas medicinales, sino que han llevado a cabo modificaciones vegetales con el fin de saciar sus necesidades; los Wayúu manejan, a través de la sabiduría femenina, el uso de

plantas medicinales como tratamiento de enfermedades entre ellas la diabetes y las parasitosis; de igual forma, los Makiritares también poseen amplios registros orales del uso de plantas con fines paliativos. En 1776, en Caracas, se realizó un censo de médicos, entre ellas 11 mulatos, que usaban hierbas y plantas medicinales, algunas de las cuales provenían del continente Africano, lo que evidencia la contribución de las culturas de ese continente al uso de las plantas medicinales en Venezuela. [4]

Este uso de las plantas medicinales por las culturas originarias ha llevado a un desarrollo de numerosos estudios *etnobotánicos*¹, que inicialmente estuvieron asociados a temas netamente antropológicos. Sin embargo, hoy día incluyen importantes estudios químicos y farmacológicos que han avalado o refutado las propiedades curativas tradicionalmente vinculadas a las mismas. Adicionalmente, las propiedades farmacológicas han sido asociadas a compuestos químicos aislados de las plantas denominados principios activos, los cuales son capaces de controlar, aliviar o curar enfermedades. Muchas estructuras de estos principios activos han sido comprobadas por métodos sintéticos y se han realizado diversas modificaciones estructurales con el objetivo principal de incrementar su actividad farmacológica y disminuir su toxicidad en beneficio del hombre. [5]

Estos estudios químicos llevaron a la definición del término “producto natural” o “metabolito secundario”: aquel que es propio de una especie y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza [2] . Se sabe que ciertos tipos de plantas presentan metabolitos secundarios de estructura similar por lo que desde inicios del siglo pasado se ha intentado relacionar la morfología de las plantas y los componentes químicos presentes en ella (quimiotaxonomía). Los estudios de estos compuestos químicos son llevados a cabo por una rama de la bioquímica conocida como **fitoquímica**.

¹Término propuesto por Jhon Harshberger en 1895 que se refiere a los estudios hechos del uso de las plantas por culturas primigenias. [52]

La **fitoquímica** es una disciplina científica que comprende el análisis químico de las especies vegetales con el objetivo de aislar y purificar sus componentes, elucidar su estructura, así como la caracterización de la actividad biológica. Por otra parte, los *fitoquímicos* son, literalmente, químicos producidos por plantas, este término está reservado para compuestos químicos que, a diferencia de los *fitonutrientes*, son beneficiosos para la salud humana, mas no son esenciales desde el punto de vista de la nutrición. En la actualidad, se conocen aproximadamente 25000 fitoquímicos existentes en la flora mundial, se estima que cerca de 10000 alcaloides y 4000 flavonoides están distribuidos en el reino plantae. [6]

La investigación que se realizó está orientada a contribuir con el desarrollo de los estudios fitoquímicos de la flora Venezolana, específicamente se aislaron, purificaron y caracterizaron los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie *Tachigali chrysophylla*.

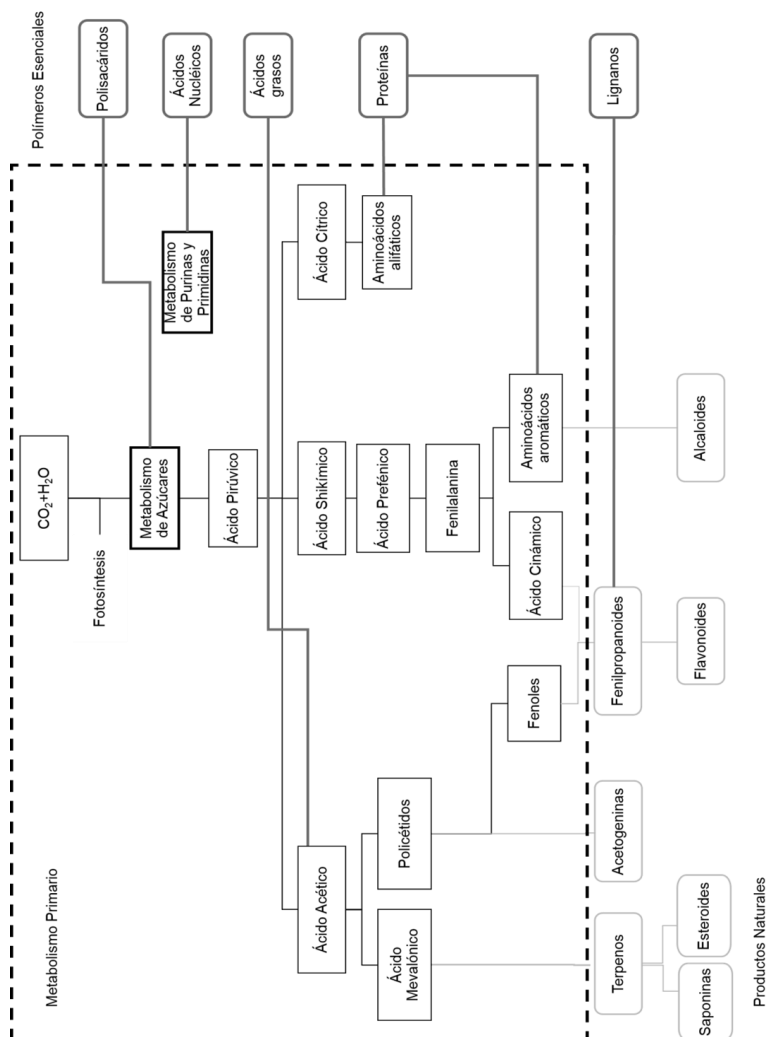
METABOLITOS SECUNDARIOS

Los organismos vivos necesitan transformar una gran cantidad de compuestos orgánicos para vivir, crecer y reproducirse, una red mediada por enzimas y regulada por reacciones químicas es usada para este propósito, las vías implicadas en esta red se conocen como **rutas metabólicas**. Algunas moléculas son esenciales para el desarrollo de los organismos, entre éstas están: proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Los procesos a través de los cuales se producen estas moléculas fundamentales se conocen como **metabolismo primario** y a los compuestos que participan de él como *metabolitos primarios*.

Sin embargo, en contraste con estas rutas del metabolismo primario en las cuales se sintetiza y degrada compuestos que comúnmente se encuentran en todos los organismos vivos, existe un área del metabolismo que involucra compuestos que tienen una distribución mucho más limitada en la naturaleza: el **metabolismo secundario**. Estos compuestos se conocen como *metabolitos secundarios* y son encontrados en organismos, o grupos de organismos, particulares y son expresión de su individualidad. [7]

Los *metabolitos secundarios* no son producidos bajo todas las condiciones y en la mayoría de los casos, la función de estos compuestos y sus beneficios para los organismos que los producen no son conocidos aún. Algunos son generados por razones fácilmente apreciables: compuestos tóxicos para los depredadores o compuestos de olor atractivo para otras especies que colaboren con su reproducción. A este grupo pertenece la mayoría de los productos naturales farmacológicamente activos. [7]

Un esquema general del metabolismo vegetal se presenta a continuación:



Esquema 1. Rutas Metabólicas Vegetales.²

² Esquema realizado con base en los diagramas de rutas metabólicas de Marcano y Hasegawa (2002) y Hendrickson (1975). [2] [10]

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse de distintas formas: por su estructura, por la ruta biosintética que siguen o por su acción biológica.

Compuestos Aromáticos

Los productos naturales aromáticos constituyen una amplia gama de compuestos, ya que se incluyen desde derivados muy sencillos de benceno, pasando por estructuras más complejas como los flavonoides, hasta moléculas de muy alto peso molecular como lignanos y taninos, lo que hace que se presenten en muchas de las especies del reino Plantae. En su mayoría provienen de las rutas biosintéticas del acetato y el shikimato, o mixto: acetato-shikimato. [2] A continuación, se presenta una síntesis de los aspectos más importantes vinculados a los flavonoides y taninos, compuestos aromáticos con una fuerte presencia en la especie *Tachigali chrysophylla*:

Flavonoides

Los flavonoides son los más comunes de los compuestos aromáticos y los estudios sobre ellos se han desarrollado, como las investigaciones del resto de los productos naturales, con la finalidad de encontrar nuevos compuestos con propiedades fisiológicas que puedan ser aprovechadas. El término flavonoide se usa generalmente para describir una serie de metabolitos secundarios que incluyen un esqueleto de carbonos del tipo $C_6-C_3-C_6$, específicamente un grupo funcional fenilbenzopirano. Dependiendo de la posición del enlace del anillo aromático al benzopirano, este tipo de compuesto puede clasificarse en: (1) *flavonoides* (2-fenilbenzopiranos), (2) *isoflavonoides* (3-fenilbenzopiranos) y (3) *neoflavonoides* (4-fenilbenzopiranos). Estos grupos usualmente comparten una chalcona como precursor, por lo tanto biogenéticamente y estructuralmente están relacionados. [8]

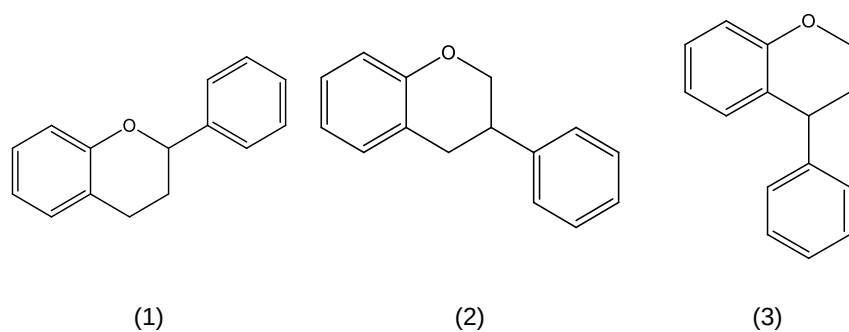


Figura 1. Clasificación de los flavonoides según la posición de enlace del anillo aromático al benzopirano: (1) *flavonoides* (2-fenilbenzopiranos), (2) *isoflavonoides* (3-fenilbenzopiranos) y (3) *neoflavonoides* (4-fenilbenzopiranos).

Además, pueden clasificarse por el grado de oxidación de la molécula como: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, leucoantocianidinas, catequinas, chalconas, auronas e isoflavonas. [7]

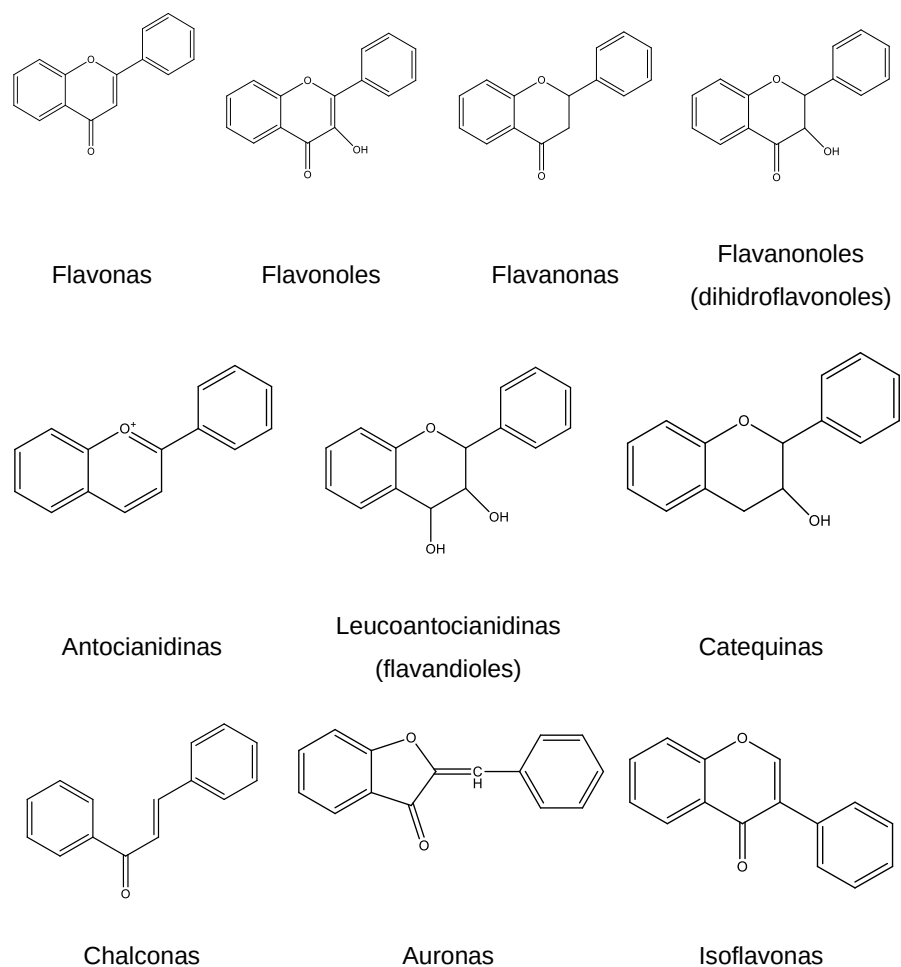


Figura 2. Estructura de los tipos de flavonoides clasificados según su grado de oxidación. [7]

Los flavonoides son aprovechados por la humanidad como antioxidantes, secuestradores de radicales libres, agentes quelantes de metales, entre otros. [2] Sin embargo, tienen múltiples funciones en las plantas: las antocianinas (glicósidos de antocianidinas), por ejemplo, absorben el color verde lo que le da a la planta la

protección de sus cloroplastos de la luz intensa; por otra parte, los flavonoles y las flavonas no afectan directamente la fotosíntesis, mas atraen a cierto tipo de insectos y son altamente efectivos como filtros de radiación UV. [9]

Taninos

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios. Estos compuestos que aparentemente no tienen ninguna función primaria para el metabolismo de los individuos que los producen, han demostrado tener diversas actividades biológicas [10]. En particular, los compuestos fenólicos son un grupo con una gran diversidad de reactividades y actividades biológicas, ya que en él se pueden encontrar desde pigmentos como las antocianidinas, hasta compuestos fenólicos complejos que le dan dureza a la pared celular como los lignanos [2].

Un grupo de compuestos de este tipo que se diferencia del resto, son los taninos. Tradicionalmente, han sido usados en el tratamiento de pieles de animales para ser convertidas en cuero ("tanning" en inglés). Este uso se debe a una de las principales reactividades de los taninos, que es su capacidad para interactuar y precipitar proteínas. Además, los taninos son capaces de quelar iones metálicos y son potenciales antioxidantes. [11]

Los taninos han sido definidos por Bate-Smith como compuestos fenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares entre 500 y 3000, capaces de sufrir las reacciones usuales de los compuestos fenólicos y que poseen la particularidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. [12] Sin embargo, Haslam afirma que se han reportado taninos con pesos moleculares mayores a 20000 y que los taninos no sólo son capaces de acomplejarse con proteínas y alcaloides, sino también con polisacáridos. [11]

Es posible distinguir dos tipos de taninos: *condensados* e *hidrolizables*. Los primeros, derivados de 3-hidroxi y 3,4-dihidroxi flavanos (4) y los segundos, derivados del ácido gálico (5) o del ácido hexahidroxidifénico (Figura 3) (6). [2] Los

taninos condensados también son llamados proantocianidinas o poliflavonoides, mientras que los hidrolizables son llamados galotaninos o elagitaninos. Ambas clases de taninos provienen de la ruta biosintética del shikimato y es posible encontrar unidades de ácido gálico en los taninos condensados. [13]

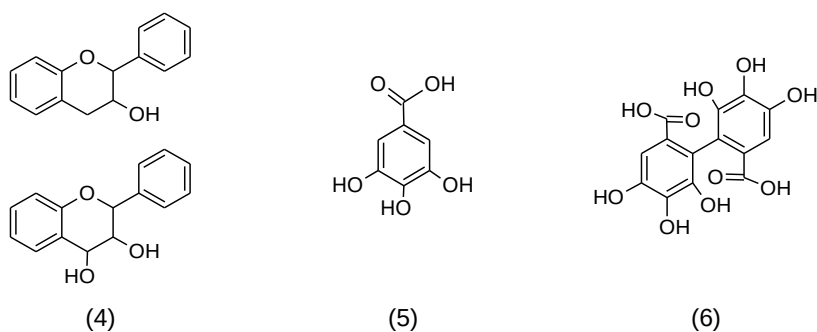


Figura 3. Precursores de los taninos condensados e hidrolizables. [11]

Terpenos

Los terpenos o isoprenoides son metabolitos secundarios que siguen un principio general: residuos de 2-metilbutano (7) forman su esqueleto carbonado y se obtienen a partir de unidades de isopreno (8). Alrededor de 55000 terpenos han sido reportados en la literatura, éstos suelen encontrarse en la naturaleza como hidrocarburos, alcoholes y sus glicósidos, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres. Dependiendo del número de unidades de isopreno en la molécula, los terpenos se clasifican en hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) y politerpenos (C_{5n}, donde n > 8). [14]



Figura 4. Estructura de las unidades fundamentales de los terpenos. [14]

La molécula de isopreno se considera como el bloque de construcción de los terpenos. Wallach (1887) propone la *regla del isopreno*, que define los terpenos como moléculas que contienen un esqueleto carbonado formado por la unión de unidades de isopreno. [15]

SISTEMA ENZIMÁTICO Glucosa-6-fosfatasa

Los metabolitos secundarios han sido utilizados por los seres humanos por sus propiedades para el tratamiento de enfermedades, entre ellas su acción sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa: blanco terapéutico para el tratamiento de la Diabetes Mellitus³.

En el organismo humano la glucosa es formada a partir de los precursores de la gluconeogénesis en el tejido hepático y renal; y en el hígado a partir del glucógeno. Ambos procesos, tanto la gluconeogénesis como la glucogenólisis, resultan en la formación de la glucosa-6-fosfato, hidrolizada por la glucosa-6-fosfatasa para liberar glucosa al torrente sanguíneo. Es decir, la enzima glucosa-6-fosfatasa juega un papel fundamental en los niveles de glucosa en sangre. [16]

La glucosa-6-fosfatasa se ubica en el retículo endoplasmático y fue descrita por Burchell *et al* (1991), como un sistema formado por 5 polipéptidos (subunidad catalítica SUC), una proteína estabilizadora y 3 proteínas transportadoras. Las proteínas transportadoras son T1 que se encarga de transportar la glucosa-6-fosfato al lumen del retículo endoplasmático donde es hidrolizada en glucosa y fosfato inorgánico, T2 y T3 luego transportan los productos formados al citosol (Figura 5). [17]

Esta reacción es de suma importancia en el control de la glucosa en el torrente sanguíneo, por lo que el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa es un blanco terapéutico para el control de la diabetes, tanto la subunidad catalítica como los transportadores.

³ Término que se refiere a un conjunto de afecciones en las cuales el organismo es incapaz de asimilar los hidratos de carbono alimenticios suministrados masivamente. [53]

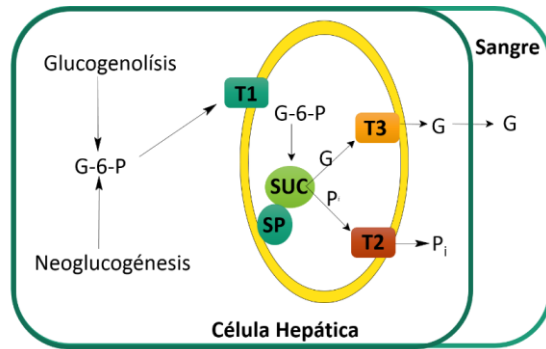


Figura 5. Esquema del Sistema enzimático Glucosa 6-fosfatasa. [16]

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En esta sección se hará referencia de forma general a los métodos cromatográficos, su definición y clasificación. Marcano y Hasegawa (2002) afirman que la cromatografía es uno de los métodos de separación más utilizados en los análisis fitoquímicos. [2] La cromatografía puede definirse como un proceso de separación por la distribución de las sustancias en dos fases: una móvil y una estacionaria; aquellos solutos que sean más afines a la fase móvil se moverán más rápido dentro del sistema que aquellos que tengan una mayor afinidad con la fase estacionaria, es decir, los solutos eluirán en orden creciente de su coeficiente de distribución en la fase estacionaria. [18]

En primera instancia, los métodos cromatográficos pueden clasificarse según el tipo de fase móvil que se utiliza y, posteriormente, según la fase estacionaria o el tipo de equilibrio que se lleva a cabo [19]:

- Cromatografía líquida.
 - Líquido-líquido adsorbido sobre sólido.
 - Líquido-sólido.
 - Intercambio iónico.
 - Exclusión por tamaño.
- Cromatografía de gases.
 - Gas-líquido.
 - Gas-sólido
- Cromatografía de fluidos supercríticos.

Por otra parte, la cromatografía puede ser clasificada por el mecanismo de interacción de los compuestos a separar y las fases móvil y estacionaria del sistema. Utilizando este criterio se clasifica en: *cromatografía de adsorción, cromatografía de reparto, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.*

La *cromatografía de adsorción*: es del tipo líquido-sólido, el soluto es adsorbido en la fase estacionaria. La *cromatografía de reparto*: puede ser del tipo líquido-líquido o gas-líquido, el soluto está en equilibrio entre las dos fases. La *cromatografía de intercambio iónico*, en este caso, la fase estacionaria se trata de una resina que posee aniones o cationes unidos de manera covalente a ella, los iones del soluto interaccionan de forma electrostática. La *cromatografía de exclusión molecular*: la fase estacionaria es un material poroso que permite el paso de moléculas de gran tamaño, pero no el de solutos pequeños. Por último, la *cromatografía de afinidad*: es el más selectivo de los métodos cromatográficos, emplea interacciones específicas entre las moléculas del soluto y cierto tipo de moléculas covalentemente unidas a la fase estacionaria. [20]

También existe otra clasificación de los métodos cromatográficos sumamente importante, asociada a la forma en que entran en contacto la fase estacionaria y la fase móvil. Este tipo de clasificación distingue cromatografía en columna y cromatografía plana (incluye a la cromatografía en papel y la cromatografía de capa fina), ambas ampliamente usadas en los análisis fitoquímicos tanto para el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios como para el monitoreo de los análisis. [21]

En el caso específico de la investigación fitoquímica de la especie *Tachigali chrysophylla*, desarrollada en este trabajo se utilizaron los dos métodos derivados de la anterior clasificación, a saber: cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC).

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE *Tachigali chrysophylla*

La especie *Tachigali chrysophylla* es un arbusto sumergido de 4m perteneciente a la familia Leguminosae o Fabaceae, es reconocida fácilmente por la combinación de sus domacios: cilíndricos y moderadamente hinchados, usualmente más allá del primer par de hojas. Las hojas poseen una base fuerte y desigual y una superficie inferior serícea. Las estípulas, cuando están presentes, son pectinadas y las flores son glabras y lineales. La mayoría de los especímenes recolectados son del espacio continental. Está distribuida en América del Sur: Perú, Venezuela, Brasil y Ecuador. [22]

Son sinónimos botánicos de *Tachigali chrysophylla* los nombres *Sclerolobium chrysophyllum* Poepp. y *Sclerolobium sericeum* Tul. En Perú es conocida como “huamansisamana”, “tangerana” o “ucshaquiro”; en Brasil: “tachy” o “tachyrana”. En Venezuela se le llama “guamillo”, “guamillo negro”, “guamo colorado” o “San Francisco negro”, la etnia Pemón la nombra “anarabadek”, los Makiritare “jueneji” y los Yanomami “monenaqueji”. [23]

En Venezuela se encuentra en los estados Bolívar y Amazonas donde es usada como cataplasma en lesiones de leishmaniasis. La clasificación taxonómica de esta especie es la siguiente:

Reino: Plantae.

División: Tracheophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae.

Subfamilia: Caesalpinioideae.

Género: *Tachigali*.

Especie: *Tachigali chrysophylla*.

A continuación se observan imágenes que recogen las características de hojas y frutos de la especie *Tachigali chrysophylla*



Detalles de las hojas de la especie *Tachigali chrysophylla*



Detalles de los frutos de la especie *Tachigali chrysophylla*



Especie *Tachigali chrysophylla*

Figura 6. Fotografías de la especie *Tachigali chrysophylla*. [24] [25]

BREVE HISTORIA DEL GÉNERO *Tachigali*

Tachigali Aublet es un género neotropical que contiene aproximadamente 60 especies, entre ellas 35 especies que estaban formalmente incluidas en el género *Sclerobium* Vogel (Zarucchi & Herendeen 1993). Los géneros se distinguen por la posición de la estípita de los pistilos, con referencia a la copa del receptáculo (central en *Sclerobium* y excéntrica en *Tachigali*) más que en cualquier otro carácter (Dwyer 1954, 1957, en Pipolly 1995). Sin embargo, Zarucchi y Herendeen (1993) indicaron que es una continuidad en el estípita y que ningún otro carácter ni morfológico, ni anatómico permitía que fueran separados en dos grupos. [26]

Compuestos con propiedades antioxidantes y antirradicales libres han sido encontrados en algunas especies del género *Tachigali*. A continuación se presentan algunas investigaciones fitoquímicas realizadas en especies de este género.

Tachigali myrmecophila

Tachigali myrmecophila pertenece a la familia Leguminosae, conocida popularmente como Tachi negro y ha sido objeto de diversos estudios, entre ellos, el de Lobo *et al.* (2004), quienes desarrollaron una investigación fitoquímica y evaluaron su actividad alelopática. Con respecto a su alelopatía, fue constatado que pocas plantas crecían entorno al “Tachi negro”, sugiriendo la presencia de sustancias con propiedades alelopáticas. Los ensayos realizados por estos investigadores, sobre los extractos de la planta confirmaron la existencia de compuestos con estos efectos sobre plantas invasoras. Esta planta se encuentra en grandes cantidades en el Amazonas, representando una de las especies más comunes de la Flora de Tapajós (Brasil). En dicha investigación, se lograron aislar seis sustancias: dos catequinas, dos derivados de carotenoides, loliolida, un derivado de blumenol y una mezcla de estigmasterol (9) y sitosterol (10) (Figura 7). [27]

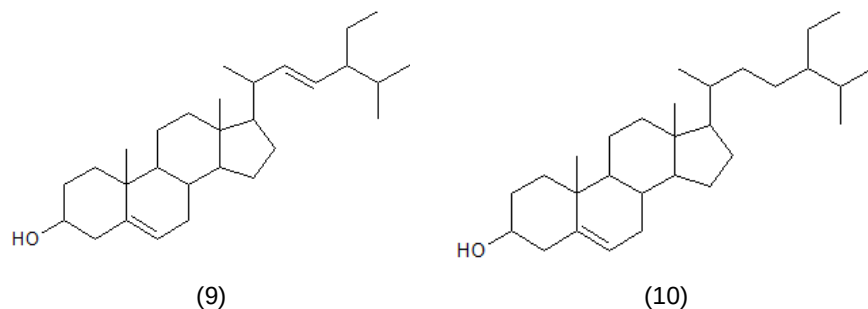


Figura 7. Estructuras del estigmasterol y sitosterol aislados de *Tachigali myrmecophila*. [27]

Posteriormente, en otra publicación de esta investigación, Lobo *et al.* (2008), se logró asociar la actividad alelopática de la especie *Tachigali myrmecophila* a las catequinas aisladas: (+)-catequina (11) y (-)-catequina (12) (Figura 8). [28]:

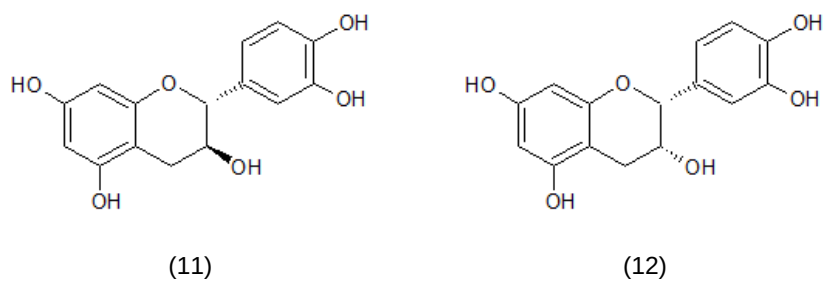
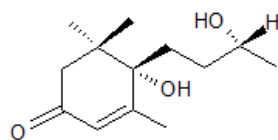
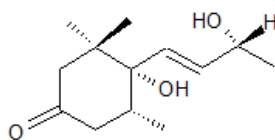


Figura 8. Catequina y Epicatequina: compuestos aislados de la fracción de acetato de etilo de *Tachigali myrmecophila*. [28]

Por otra parte, Rahman atribuye la actividad alelopática de esta planta a la presencia de un derivado de blumenol (13): 4,5-dehidroblumenol (14) (Figura 9). [29]



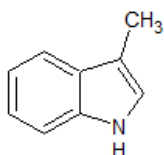
(13)



(14)

Figura 9. Estructuras de blumenol y 4,5-dehidroblumenol aisladas de *Tachigali myrmecophila*. [29]

En las investigaciones de Svoboda *et al.* (1979) se afirma, citando los estudios de Altman (1958) y Mors *et al.* (1966), la presencia de 3-metilindol (15) (Figura 10) y taninos en las hojas de esta especie [30].



(15)

Figura 10. Estructura del 3-metilindol. [30]

Tachigali multijuga

La especie *Tachigali multijuga* es una planta de la familia Leguminosae, de amplia presencia en la flora Brasileira, fue estudiada por Da Silva en 2002, quien determinó que las semillas de esta planta poseían una alta actividad de la enzima α -galactosidasa durante la germinación. Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar desde el punto de vista bioquímico y cinético esta enzima y probar su acción frente a polisacáridos derivados del grano de soya. [31]

Tachigali paniculata

Tachigali paniculata, es un árbol perteneciente al género *Tachigali*, quizá la especie de este género con mayor número de estudios fitoquímicos asociados. Svoboda, *et al.* (1979) determinaron la presencia de pequeñas cantidades de dos alcaloides en el extracto etanólico de las inflorescencias de *Tachigali paniculata*: triptamina (16) y *N*-metiltriptamina (17) (Figura 11). [32] Por otra parte, Dias, *et al.* (1982) lograron aislar de la corteza de esta especie ésteres alifáticos, sitosterol (10) (Figura 7) y el ácido indolacético (18) (Figura 11). [33]

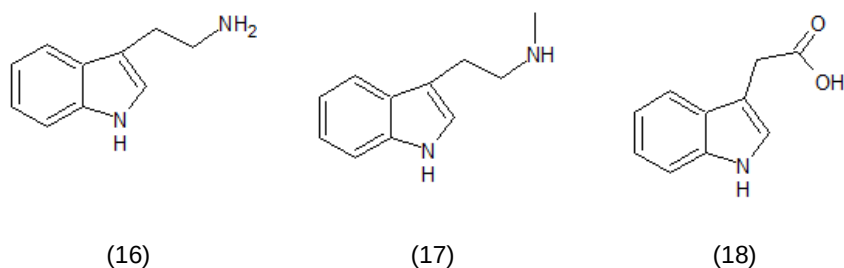


Figura 11. Compuestos aislados de la especie *Tachigali paniculata* [32] [33]

Así mismo, Buckingham, *et al.* (2015) determinaron la presencia de los flavonoides miricetina 7-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosido] (miricetina-7-rutinósido) (19) y miricetina 7-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosido] (miricetina-7-gentiobiosido) (Figura 12) (20) en las hojas de la especie *Tachigali paniculata*. [34] Cioffi *et al.* (2002), desarrollaron una investigación sobre los compuestos presentes en las hojas de la especie *Tachigali paniculata* y su actividad como antioxidantes y secuestradores de radicales libres en la cual se determinó la presencia de los siguientes flavonoides: miricetina 7-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosido (19) y miricetina 7-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosido (20), quercetina 3-*O*- β -D-glucopiranosido (21), quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosido (22), quercetin 3-*O*- β -D-

galactopiranosido (23), galato de metilo (24), isovainillina (25), 4-hidroxibenzoato de metilo (26), 3,4-dihidroxibenzoato de metilo (27) y el aldehído del ácido caféico (28) (Figura 12). Además, se determinó que 21, 22 y 26 poseen el mayor potencial antioxidante. [35]

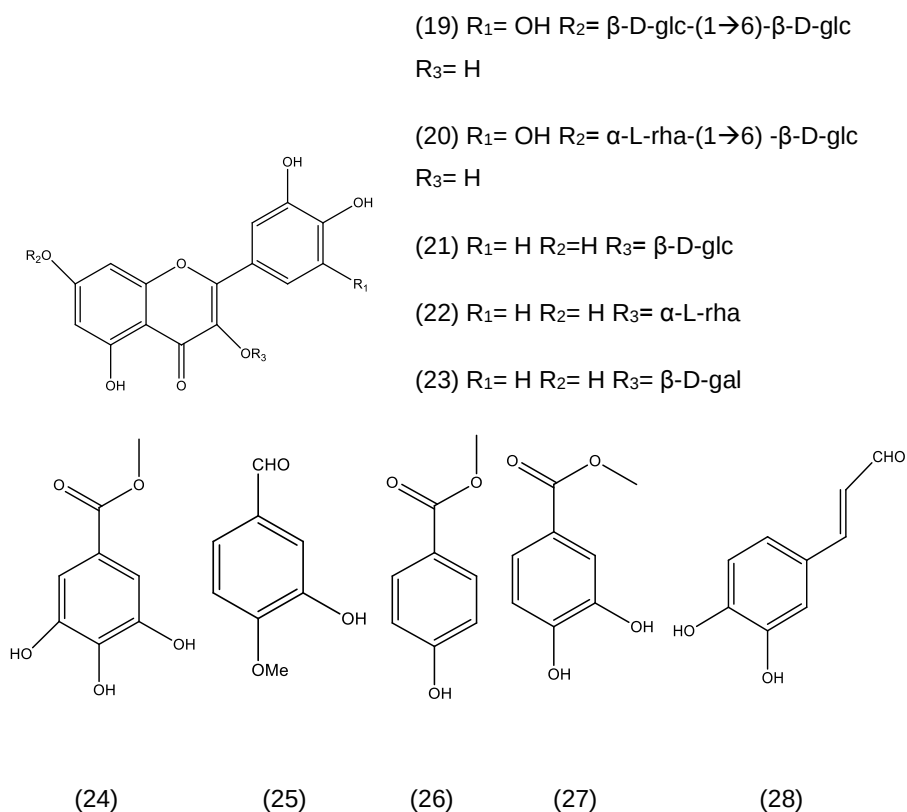


Figura 12. Compuestos aislados de la especie *Tachigali paniculata*. [35]

De *Tachigali paniculata* fueron aislados, por Alvino, et al. (2016) 4 compuestos identificados como lupenona (29), lupeol (30) (Figura 13) y la mezcla de esteroides sitosterol (10) y estigmasterol (9) (Figura 7). [36]

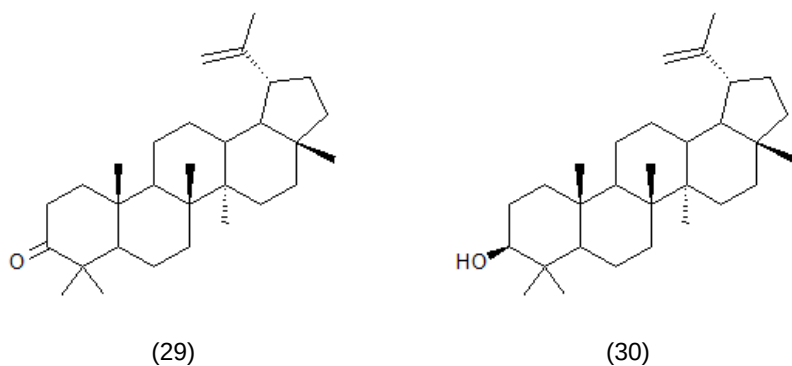


Figura 13. Compuestos aislados de la especie *Tachigali paniculata*. [36]

Las diversas fuentes de investigación referenciadas anteriormente ilustran el escaso estudio de un género que posee 60 especies conocidas.

JUSTIFICACIÓN

Venezuela desde el año 2002, es reconocida por la Organización de las Naciones Unidas como un país *megadiverso* en el que se registran más de 15000 especies de plantas lo que representa un gran potencial para el desarrollo de investigaciones fitoquímicas. [37], lo anterior, genera la necesidad de una permanente profundización en las investigaciones de este tipo.

A pesar de que especies pertenecientes al género *Tachigali* han mostrado actividad antihiperglicemiante asociada, principalmente, a la presencia de flavonoides glicosilados, fenilpropanoides y polifenoles, y a su inhibición sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa, tal como se ha evidenciado en las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela⁴, no se han encontrado estudios fitoquímicos realizados sobre la especie *Tachigali chrysophylla*. Es por esto que se consideró importante el desarrollo de investigaciones fitoquímicas y farmacológicas sobre esta especie.

⁴ Investigaciones fitoquímicas desarrolladas por Panqueva, M.; Salazar, S.; Alvino, V.; Higuera, R. Bermúdez, J.; Rodríguez, M.; González-Mujica, F.; Duque, S.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios de la especie *Tachigali chrysophylla*.

Objetivos Específicos

- Aislar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de las hojas y ramas de la planta *Tachigali chrysophylla*.
- Purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios aislados de las hojas y ramas de la planta *Tachigali chrysophylla*.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante sus propiedades físicas y técnicas espectroscópicas de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y espectrometría de masas.

DISEÑO METODOLÓGICO

En el presente apartado se hace referencia a la descripción de la muestra, los materiales y equipos utilizados, así como a las fases del trabajo experimental realizadas para el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie *Tachigali chrysophylla* (Poepp). Zarucchi & Herend.

Descripción del Material Vegetal

El diseño experimental utilizado para el **Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios Presentes en la especie *Tachigali chrysophylla* (Poepp). Zarucchi & Herend** se inició con el extracto metanólico de la especie *Tachigali chrysophylla*, preparado a partir de muestras de hojas y ramas de *Tachigali chrysophylla* recolectadas en el Río Cuao, entre la Comunidad Coromoto y la Comunidad Santa Teresita, municipio Autana, Estado Amazonas (45°4'-5°3'N;67°24'-67°46'O) por el Dr. Aníbal Castillo. Una muestra está depositada en el Herbario Nacional de Venezuela, en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela Dr. Tobías Lasser, bajo el N° AC-6218 (figura 14).



Figura 14. Imagen del espécimen de *Tachigali chrysophylla* que reposa en el Herbario Nacional de Venezuela. Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela. Dr. Tobías Lasser.

Inventario del Material Cromatográfico.

A continuación se enumeran los materiales utilizados para el desarrollo del proceso de cromatografía.

Cromatografía de capa fina (analítica)

- Placas analíticas de sílica gel 60; 0,25mm con indicador de fluorescencia UV₂₅₄ con soporte de aluminio y de vidrio de la casa comercial Merck.
- Placas analíticas de RP-18; 0,25mm de espesor con soporte de vidrio de la casa comercial Merck.

Cromatografía en columna.

- Sílica gel (0,063-0,2 mm, Riedel-de Haen AG).
- LH-20 (25-100µm, Sigma-Aldrich).

Inventario de Equipos Utilizados

Los equipos utilizados en el desarrollo de la presente investigación son los siguientes:

- Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200.
- Rota evaporadores marca BÜCHI R-111 con un baño de agua BÜCHI 461.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, JEOL. Campo aplicado para protones 270MHz y 75MHz para carbono (Laboratorio de RMN de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela).
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, BRUKER AM500. Campo aplicado para protones 300 MHz y 600 MHz para carbono (Laboratorio de RMN del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas).

- Lámpara UV marca MINERALIGHT® LAMP, Modelo UVSL-58, con dos longitudes de onda disponibles: 254 y 366 nm.

Descripción de los Agentes Reveladores Utilizados

Los agentes reveladores utilizados, su preparación y su uso se detallan a continuación:

- Lámpara UV ($\lambda=254\text{nm}$, 365nm): las placas de cromatografía de capa fina utilizadas contienen un indicador de fluorescencia, por lo que los compuestos activos bajo esta longitud de onda pueden observarse como bandas de quenching de fluorescencia, especialmente aquellos con conjugación extendida como compuestos aromáticos. [38]
- Anisaldehído-Ácido Sulfúrico (AS): 0,5mL de anisaldehído se mezclan con 10mL de ácido acético glacial, seguido de 85mL de metanol y 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se rocía la placa de cromatografía de capa fina con el reactivo preparado y se calienta a 100°C para obtener la mayor intensidad de color. Los compuestos flavonoidales son revelados como manchas amarillas en el visible, mientras que los compuestos terpenoidales se pueden observar como manchas moradas. [39]
- Naturstoff (PN): la placa es rociada con una mezcla de difenilboriloxietilamina metanólica al 1% y polietilenglicol-4000 etanólico. La presencia de flavonoides produce fluorescencia intensa en la luz UV-365 y las coloraciones dependen del núcleo de flavonoide presente, por ejemplo, los flavonoles pueden presentar coloraciones amarillo verdoso (cuando contienen un grupo hidroxilo en la posición 4'), naranja (cuando contienen grupos hidroxilo en posiciones 3' y 4') y rojo (cuando contienen hidroxilo en posiciones 3', 4' y 5'); mientras que las flavanonas pueden presentar coloraciones verde oscuro (cuando contienen un grupo hidroxilo en la posición 4') y violeta (cuando contienen grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4'); por último, las flavonas presentan

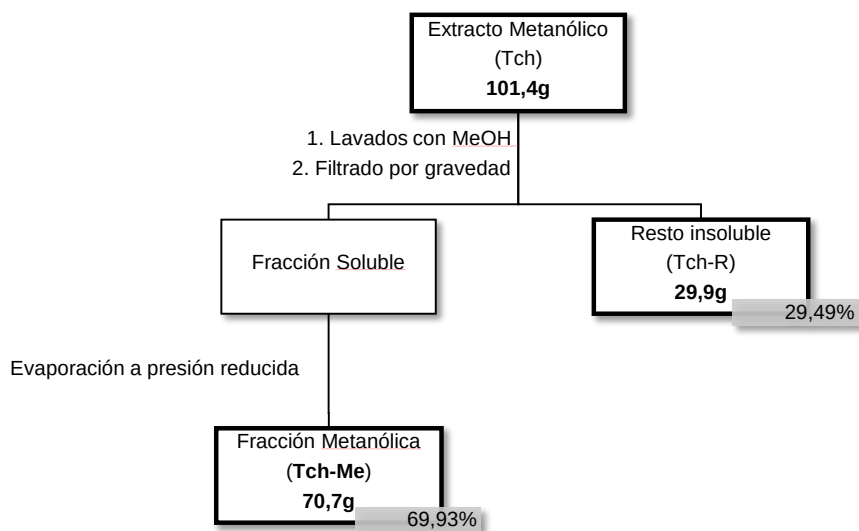
coloraciones amarillo verdoso (cuando poseen grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4'). [39]

- Ácido Fosfomolibdico (PMA): la placa es rociada con una solución entre 2 y 20% de ácido fosfomolibdico en EtOH. Posteriormente es calentada a 105°C. Este agente revelador permite identificar la presencia de ácidos grasos y sus ésteres metílicos, triglicéridos, sustituyentes fenólicos, derivados de índoles, prostaglandinas, entre otros. [40]
- Komarowsky (KOM): la placa es rociada con una mezcla de 1 mL de una solución etanólica al 50% de ácido sulfúrico y 10 mL de una solución metanólica al 2% de 4-hidroxibenzaldehído. Se rocía la placa y se calienta a 100 °C por 5-10 min y se evalúa en el visible. Coloraciones azules, amarillas y rojas son indicativas de saponinas. [39]

Tratamiento de la Muestra y Obtención de los Metabolitos Secundarios

El proceso experimental para el tratamiento de la muestra y la obtención de los metabolitos secundarios de la especie *Tachigali chrysophylla* se estructuró en dos fases: *Análisis Fitoquímico Preliminar* y *Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Secundarios*. Así mismo, se realizó una tercera fase de *Comparación de tres especies del género Tachigali*. La descripción metodológica de las dos primeras fases se presenta de manera resumida en esta sección:

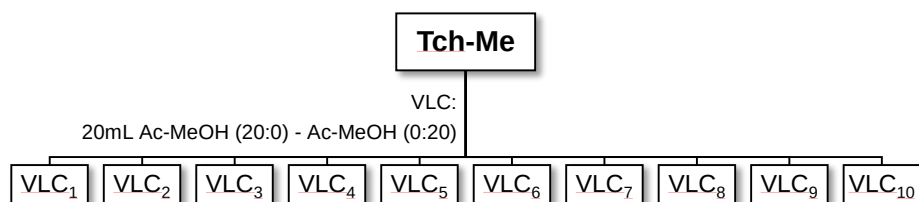
Inicialmente el extracto metanólico de la especie *Tachigali chrysophylla* (Tch) se solubilizó en metanol y se filtró por gravedad, se obtuvieron dos fracciones una soluble que posteriormente fue concentrada a presión reducida (Tch-Me) con una masa de 70,7g, lo que representó un 69,93% respecto al extracto original y 8,83% respecto al material vegetal seco; y otra insoluble (Tch-R) con una masa de 29,9g, lo que significó un 29,49% respecto al extracto metanólico y 3,74% respecto al material vegetal seco (Esquema 2).



Esquema 2. Lavados metanólicos de Tch.

Análisis Fitoquímico Preliminar y Análisis Biológico.

Una porción de 1,1114g de la fracción Tch-Me fue sometida a una separación cromatográfica líquida al vacío (CLV), empleando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de solvente de polaridad creciente: Acetona-MeOH (20:0) a Acetona-MeOH (0:20). Se obtuvieron 23 fracciones, que fueron unidas según su factor de retención y comportamiento frente al agente revelador en 11 fracciones colectivas (Esquema 3).



Esquema 3. Cromatografía líquida al vacío de Tch-Me.

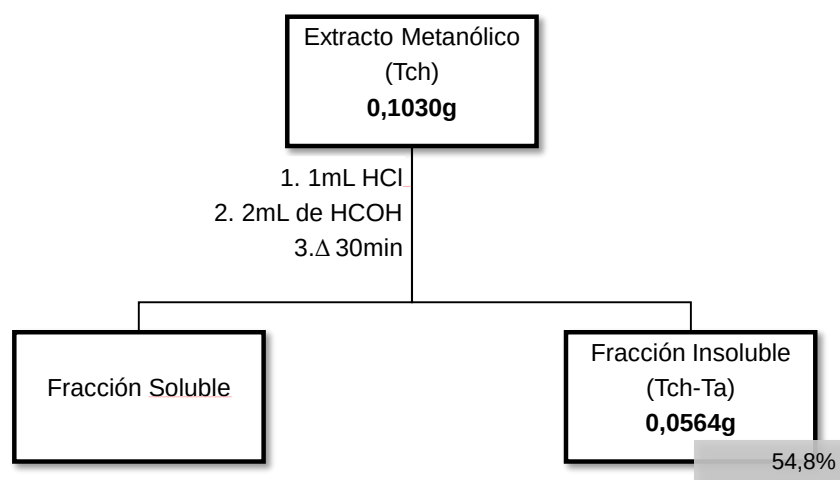
Las fracciones obtenidas fueron pesadas (Tabla 1) y se analizaron por cromatografía de capa fina. De los 1,1114g de muestra sembrados en la columna, fueron recuperados 0,8305g, lo que representó 74,73% de la muestra.

Tabla 1. Fracciones obtenidas por CLV de Tch-Me.

Sistema de Solventes	Volumen de fase móvil (± 1 mL)	Subfracciones	Fracción	Masa ($\pm 0,0001$ g)
Ac-MeOH (20:0-19:1)	20	1,2	VLC ₁	0,3816
Ac-MeOH (18:2-17:3)	20	3,4	VLC ₂	0,1818
Ac-MeOH (16:4)	20	5	VLC ₃	0,0824
Ac-MeOH (15:5)	20	6	VLC ₄	0,0749
Ac-MeOH (14:6)	20	7	VLC ₅	0,0332
Ac-MeOH (13:7)	20	8	VLC ₆	0,0203
Ac-MeOH (12:8)	20	9	VLC ₇	0,0261
Ac-MeOH (11:9)	20	10	VLC ₈	0,0004
Ac-MeOH (10:10-6:14)	20	11-14	VLC ₉	0,0134
Ac-MeOH (5:15-0:20)	20	15-23	VLC ₁₀	0,0128

Las fracciones VLC₂ y VLC₃ fueron evaluadas como potenciales inhibidores del sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa, debido a las cantidades de masa que presentaron y a la presencia de compuestos derivados de fenilpropanoides que son potencialmente inhibidores de este sistema.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación del contenido de taninos del extracto metanólico de la especie. Para ello, 0,1g del extracto metanólico se disolvió en 10mL de MeOH, se añadieron 1mL de HCl y 2mL de HCOH, se calentó a ebullición por 30min, se enfrió, se filtró y se pesó el filtrado seco (Esquema 4) [41].



Esquema 4. Procedimiento para la cuantificación de taninos presentes en Tch.

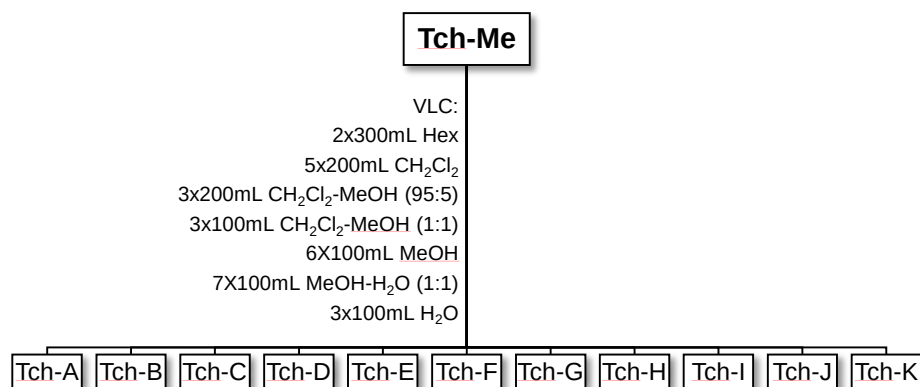
Con la masa del filtrado se calculó el número de Stiasny según la siguiente ecuación:

$$\#Stiasny = \frac{Tch - Tch_{Ta}}{Tch} \times 100\%$$

Ecuación 1. Cálculo del número de Stiasny. [41]

Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Secundarios.

Una porción de 54,35g de la fracción Tch-Me fue sometida a una CLV, empleando como fase estacionaria 150g de sílica gel y como fase móvil mezclas de solvente de polaridad creciente: Hex, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (95:5), CH₂Cl₂-MeOH (50:50), MeOH, MeOH-H₂O (50:50) y finalmente H₂O. Se obtuvieron 30 fracciones que fueron unidas según su factor de retención en placas de cromatografía de capa fina y su coloración frente a la reacción con agentes reveladores. Finalmente, se obtuvieron 11 fracciones colectivas (Esquema 5).



Esquema 5. Cromatografía líquida al vacío de Tch-Me

Las fracciones obtenidas fueron pesadas (Tabla 2) y se analizaron por cromatografía de capa fina. Se determinó que las primeras 5 fracciones contenían compuestos de tipo terpenoidal, mientras que las siguientes fracciones contenían compuestos de tipo flavonoidal y una gran cantidad de taninos. De los 54,35g de muestra sembrados en la columna, fueron recuperados 28,0667g, lo que representó 51,64% de la muestra; 27,60% del extracto original y 3,51% del material vegetal seco.

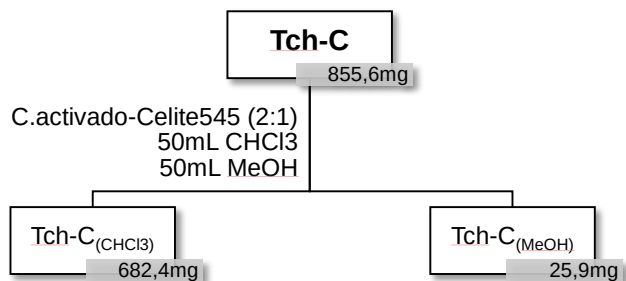
Tabla 2. Fracciones obtenidas por CLV de Tch-Me.

Sistema de Solventes	Volumen de fase móvil (± 1 mL)	Subfracciones	Fracción	Masa ($\pm 0,0001$ g)
Hex	200	VLC ₁₋₂	Tch-A	0,0109
CH ₂ Cl ₂	200	VLC ₃	Tch-B	0,1645
CH ₂ Cl ₂	300	VLC ₄₋₅	Tch-C	0,8556
CH ₂ Cl ₂	150	VLC ₆	Tch-D	0,1953
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95:5)	500	VLC ₇₋₁₀	Tch-E	0,6294
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	150	VLC ₁₁	Tch-F	0,5379
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	450	VLC ₁₂₋₁₄	Tch-G	3,3894
MeOH	150	VLC ₁₅	Tch-H	0,3832
MeOH	400	VLC ₁₆₋₂₀	Tch-I	9,9010
MeOH-H ₂ O (1:1)	450	VLC ₂₁₋₂₇	Tch-J	5,9371
H ₂ O	450	VLC ₂₈₋₃₀	Tch-K	6,0143

Por cromatografía de capa fina se observó que la fracción Tch-A mostraba un banda mayoritaria que revelaba color morado con el revelador Anisaldehído-Ácido Sulfúrico (AS), con un factor de retención $R_f=0,8$ al ser desarrollada con un sistema de solventes Hex-AcOEt-HCOOH en proporciones 75:25:1, v/v (AN6). Por lo que se tomaron espectros de resonancia magnética nuclear.

Por otra parte, las fracciones Tch-C y Tch-E fueron sometidas a la separación cromatográfica planteada por Khor (1979) para la eliminación de clorofilas de la muestra, que consistió en hacer pasar cada muestra disuelta en CHCl₃ a través de un filtro de placa porosa con un lecho de aproximadamente 5cm de una mezcla Carbon activado-Celite 545 en relación de masa 2:1. Posteriormente, se eluyó con una fracción de 50mL de CHCl₃, y se obtuvieron Tch-C_(CHCl₃) y Tch-E_(CHCl₃), y una fracción de 50mL de MeOH para obtener Tch-C_(MeOH) y Tch-E_(MeOH). [42] (Esquemas 6 y 7)

La metodología utilizada para la fracción Tch-C se muestra a continuación:



Esquema 6. Extracción de clorofilas de Tch-C.

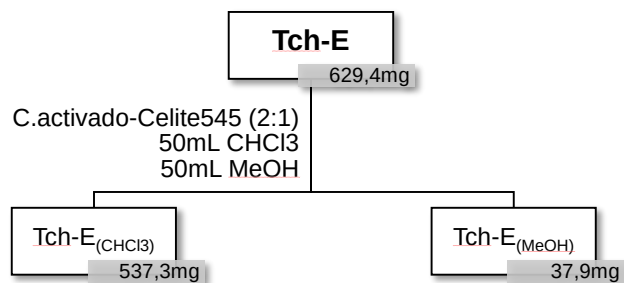
Las fracciones obtenidas fueron pesadas y las masas obtenidas se muestran a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Fracciones obtenidas de Tch-C por la separación con Celita-Carbón activado.

<i>Solvente</i>	<i>Volumen de la fase móvil (±1mL)</i>	<i>Fracción</i>	<i>Masa (±0,0001g)</i>
CHCl ₃	100	Tch-C _(CHCl3)	0,6824
MeOH	50	Tch-C _(MeOH)	0,0259

Se sembraron 0,8556g de muestra y se colectaron 0,7083g, lo que representa el 82,78% respecto a la muestra.

Por otra parte, la metodología utilizada para la muestra Tch-E se muestra a continuación:



Esquema 7. Separación de Tch-E.

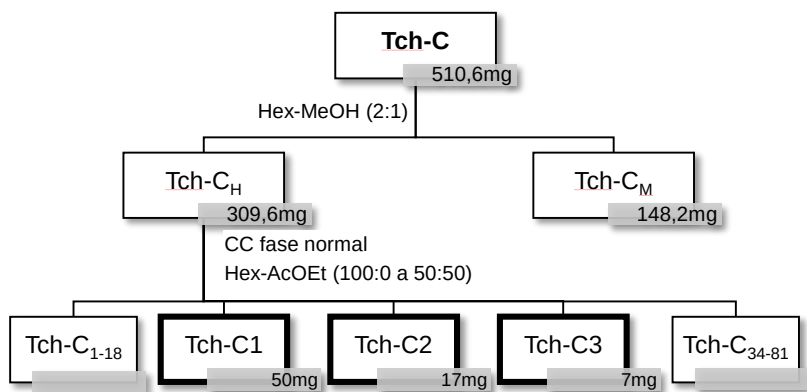
Las fracciones obtenidas fueron pesadas y las masas obtenidas se muestran a continuación (Tabla 4):

Tabla 4. Fracciones obtenidas de Tch-E por la separación con Celita-Carbón activado.

Solvente	Volumen de la fase móvil ($\pm 1\text{mL}$)	Fracción	Masa ($\pm 0,0001\text{g}$)
CHCl_3	100	Tch-E(CHCl_3)	0,5373
MeOH	50	Tch-E(MeOH)	0,0379

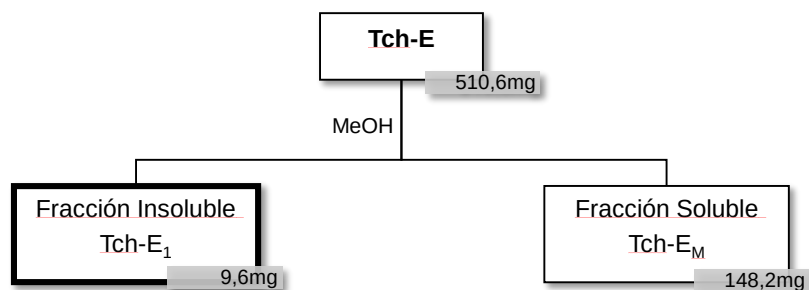
Se sembraron 0,6294g de muestra y se colectaron 0,5752g, lo que representó el 91,93% respecto a la muestra.

La fracción Tch-C(CHCl_3) se separó usando un sistema de solvente Hex-MeOH (2:1; v/v) y se obtuvieron las fracciones Tch-C_H y Tch-C_M. Posteriormente, la fracción Tch-C_H se sometió a una separación cromatográfica usando sílica gel como fase estacionaria y mezclas de solvente de polaridad creciente Hex-AcOEt (100:0 a 50:50, v/v). Se obtuvieron 81 fracciones que fueron unidas en 25 fracciones colectivas según su factor de retención y coloración frente a agentes reveladores. Se tomaron espectros de RMN de las fracciones Tch-C₁, Tch-C₂ y Tch-C₃ (Esquema 8).

**Esquema 8.** Separación cromatográfica de la fracción Tch-C.

Así mismo, la fracción Tch-E(CHCl_3) fue lavada con MeOH y posteriormente centrifugada para obtener una fracción soluble (Tch-E_M) y una insoluble con una

masa de 9,6mg (Tch-E₁) (Esquema 9). Se determinó por CCF que ésta última poseía sólo una banda que revelaba color morado con un R_f=0,6 al ser desarrollada con AN6 y rociada con AS, característico de núcleos terpenoidales. Por lo que se tomaron espectros de resonancia magnética nuclear de esta fracción.



Esquema 9. Partición de la fracción Tch-E.

La separación cromatográfica de las fracciones ricas en flavonoides se inició con una partición en el sistema de solventes tBuOMe-BuOH-ACN-THF-H₂O (1:3:0,5:0,5:5, v/v) de la fracción Tch-I y una posterior cromatografía en columna. Sin embargo, el alto contenido de taninos en esta fracción no permitió el aislamiento de masa suficiente de ningún metabolito secundario de tipo flavonoidal para efectos de esta investigación. El Esquema completo de separación del extracto metanólico de hojas y ramas de la especie *Tachigali chrysophylla* se presenta a continuación:

Comparación de especies pertenecientes al género Tachigali.

Otra de las actividades experimentales desarrolladas en el marco de este trabajo fue la comparación de los perfiles cromatográficos por CCF de los extractos metanólicos de la planta en estudio *Tachigali chrysophylla* y otras dos especies pertenecientes al mismo género: *Tachigali cavipes* y *Tachigali paniculata*⁵. Esta comparación se efectuó con el objetivo de revisar las similitudes en cuanto a metabolitos secundarios sintetizados por especies de este género.

Para ello, se realizaron placas comparativas de los extractos metanólicos de cada especie en distintos sistemas de solvente y se revelaron con distintos agentes de coloración con la finalidad de comparar los perfiles flavonoidales y terpenoidales de las especies mencionadas.

⁵ Extractos disponibles en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presentarán los resultados de la investigación, a partir de cada una de las fases experimentales.

Análisis Fitoquímico Preliminar y Análisis Biológico.

Las fracciones colectivas se analizaron por CCF. Las placas fueron reveladas con AS y se evidenció un alto contenido de compuestos de tipo flavonoidal y terpenoidal. Además, se observa la presencia mayoritaria de taninos en el material vegetal.

Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela arrojaron como resultado la evidencia de compuestos de tipo fenólico en el extracto metanólico de la especie de estudio, así como resultados positivos de inhibición de estos extractos frente al sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa. Por esta razón y la evidencia de compuestos fenólicos en las fracciones VLC₂ y VLC₃, estas fracciones fueron analizadas como posibles inhibidores de este sistema enzimático y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5. Actividad enzimática y porcentaje de inhibición de las fracciones aisladas de *T. chrysophylla* sobre la enzima G-6-Pasa.

Fracción	Microsomas permeabilizados			Microsomas intactos		
	Control (AE±ds)	Actividad (AE±ds)	Inhibición (%)	Control (AE±ds)	Actividad (AE±ds)	Inhibición (%)
Tch VLC₂	4,25±0,59	1,14±0,34	73	1,67±0,29	0,45±0,15	83
Tch VLC₃	7,65±1,58	0,99±0,46	80	1,73±0,64	0,28±0,08	37

La actividad está presentada en unidades de $\mu\text{molPi/h. } \mu\text{g Proteína}$

En la Tabla 5 se exponen los resultados del efecto de las fracciones estudiadas sobre la actividad enzimática, tanto en microsomas intactos, como en microsomas permeabilizados, en ausencia de las fracciones VLC₂ y VLC₃ (Control) y en presencia de estas fracciones (Actividad). Se puede observar que la fracción

control tiene actividad en el sistema, mas no tienen asociados porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición obtenidos para la fracción VLC₂ permiten afirmar que los compuestos presentes en esta fracción son capaces de inhibir la actividad del sistema enzimático, tanto por su acción sobre la subunidad catalítica como sobre los transportadores T1, T2 y T3.

Así mismo, los porcentajes de inhibición asociados a la fracción VLC₃ evidencian la capacidad que tienen los compuestos presentes en ella para inhibir la actividad enzimática por su acción sobre la subunidad catalítica y en menor medida sobre los transportadores T1, T2 y T3.

Se presume que los efectos referidos anteriormente pueden atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios como fenilpropanoides, flavonoides y polifenoles en las fracciones estudiadas.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación del contenido de taninos en el extracto metanólico. Por lo que se determinó el número de Stiasny (Esquema 4). El precipitado resultante correspondió a los taninos condensados presentes en el extracto (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la determinación de la cantidad de taninos presentes en el extracto metanólico de la especie *Tachigali chrysophylla*.

Tch ($\pm 0,0001g$)	Tch-Ta ($\pm 0,0001g$)	% (%m/m)
0,1030	0,0564	54,8

Finalmente, se puede afirmar que el contenido total de polifenoles del extracto metanólico de la especie *Tachigali chrysophylla* es de 54,8%.

Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Secundarios.

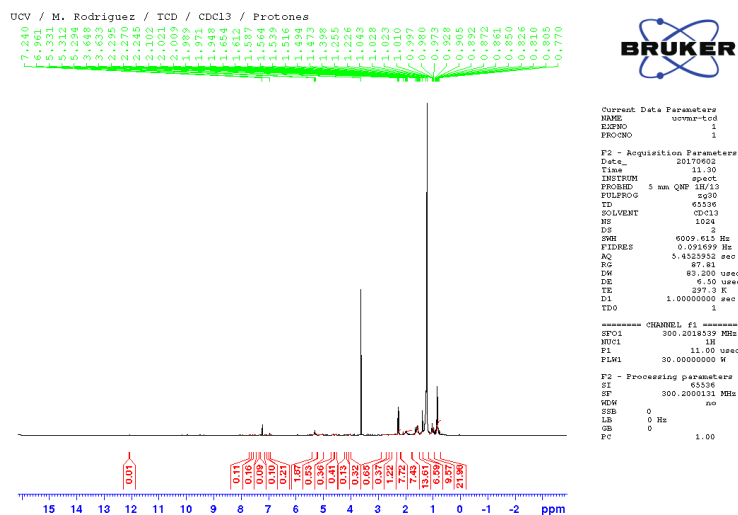
La presentación de los resultados obtenidos será organizada en función de las fracciones analizadas:

Fracción Tch-C₁

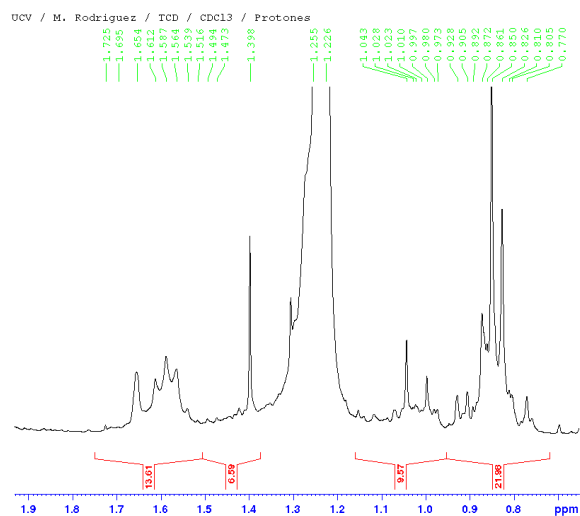
La fracción Tch-C₁ fue eluída en una CC con una mezcla Hex-AcOEt, de la fracción Tch-C eluída previamente en una CLV con CH₂Cl₂. Se obtuvieron 50,3mg (0,0063% del material vegetal seco) de un aceite amarillo, soluble en CH₂Cl₂, CHCl₃, Hex y parcialmente soluble en MeOH. En el análisis por CCF se evidenció que se trataba de una mezcla de 2 compuestos que revelaron color morado con AS y que se observan al rociar la placa con Ácido Fosfomolibdico (PMA), con factores de retención iguales a 0,83 y 0,85 al ser eluída con AN6. Adicionalmente, se observa una banda que presenta *quenching* de fluorescencia a una longitud de onda de 254nm, con un R_f=0,82. La estructura de los compuestos de esta mezcla se determinó por análisis espectroscópico de RMN de ¹³C, ¹H y DEPT (Anexo 1).

En los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se observan más de 100 señales de distintas intensidades, algunas de ellas asociadas a contaminaciones y solventes no deuterados, por lo que se procedió a asignar las más importantes.

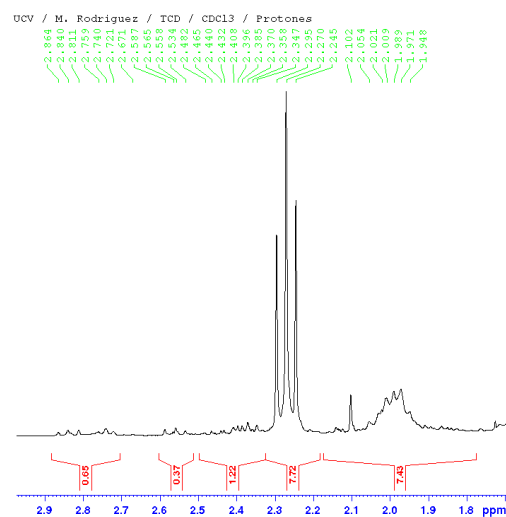
El patrón de señales observadas a campo alto permite inferir que existe un compuesto de naturaleza terpenoidal dentro de la mezcla. Así, se observan singletes con desplazamientos de 0,77; 0,85; 0,93; 0,97; 1,01; 1,48 y 1,67 ppm, asignados a metilos unidos a un esqueleto de un triterpeno (Espectro 2). Adicionalmente, se observa un triplete en 2,27 ppm asociado a un protón unido a un metino de un doble enlace (Espectro 3). Finalmente, dos singletes en 4,69 y 4,54 ppm, son asignados a los protones de un carbono olefínico terminal (Espectro 4).



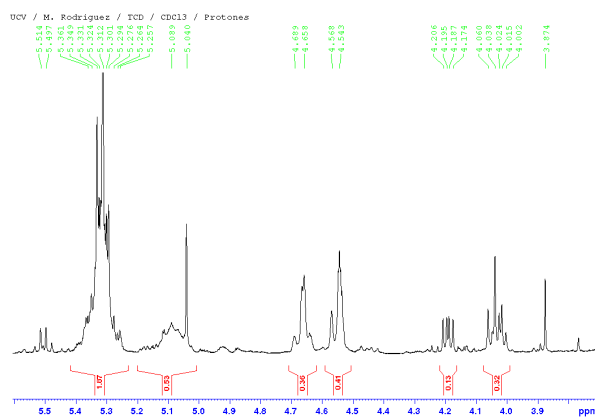
Espectro 1. Espectro de RMN ¹H de la Fracción Tch-C₁.



Espectro 2. Espectro de RMN ¹H de la Fracción Tch-C₁.
Ampliación 0,6-1,9ppm



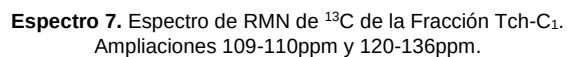
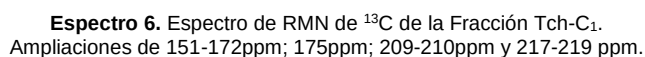
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H de la Fracción Tch-C₁.
Ampliación 1,8-2,9ppm



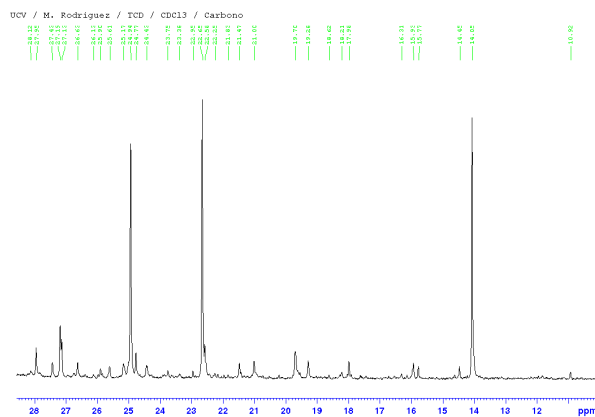
Espectro 4. Espectro de RMN ¹H de la Fracción Tch-C₁.
Ampliación 3,9-5,5ppm.



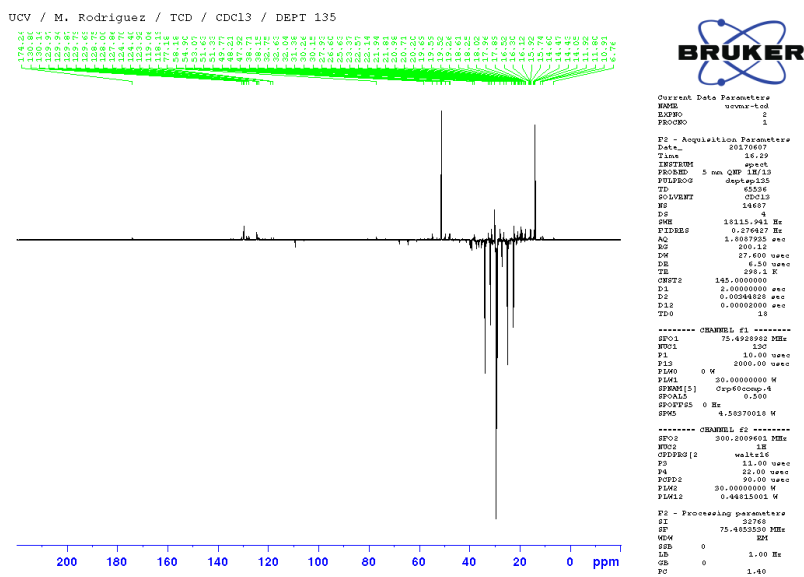
Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C de la Fracción Tch-C₁.



Las señales con desplazamientos de 26,6; 21,0; 15,9; 16,3; 14,5; 18,6 y 19,3ppm se asignan a metilos unidos al esqueleto carbonado de un triterpeno (Espectro 8).



Espectro 8. Espectro de RMN de ¹³C de la Fracción Tch-C₁.
Ampliación 12-29ppm.



Espectro 9. Experimento DEPT135 para la Fracción Tch-C₁.

Con base en los desplazamientos químicos en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C y las señales en el experimento DEPT135 se identificaron en la estructura 7 metilos, 11 metilenos (incluyendo 1 carbono olefínico), 5 metinos y 7 carbonos cuaternarios, entre los que se incluyen un carbono carbonílico cetónico no conjugado y uno olefínico.

Los desplazamientos y tipos de carbono, así como las señales en los espectros de RMN ^1H permiten inferir que el componente mayoritario de esta mezcla corresponde al compuesto **lupenona** (Figura 15). Se compararon los resultados espectroscópicos de RMN de ^1H , obtenidos para la fracción Tch-C₁ con los datos reportados en la bibliografía para la lupenona (Tabla 7).

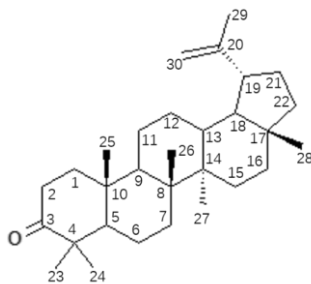


Figura 15. Estructura del compuesto lupenona.

Tabla 7. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C₁ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupenona.

H	δ ppm reportado, tomado en CDCl ₃ a 270 MHz (<i>m</i> ; J (Hz)) [36]	δ ppm exp., tomado en CDCl ₃ a 300 MHz (<i>m</i> ; J (Hz))
H-19	2,38 (<i>m</i>)	2,27 (<i>t</i> ; 7,5)
H-23	1,05 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)
H-24	1,43 (<i>s</i>)	1,47 (<i>s</i>)
H-25	0,82 (<i>s</i>)	0,85 (<i>s</i>)
H-26	0,91 (<i>s</i>)	0,93 (<i>s</i>)
H-27	0,77 (<i>s</i>)	0,77 (<i>s</i>)
H-28	1,00 (<i>s</i>)	0,97 (<i>s</i>)
H-29	1,66 (<i>s</i>)	1,65 (<i>s</i>)
H-30 ^a	4,55 (<i>s</i>)	4,54 (<i>s</i>)
H-30 ^b	4,67 (<i>s</i>)	4,69 (<i>s</i>)

Además, se compararon los desplazamientos químicos del espectro de RMN de ^{13}C con los reportados para la lupenona aislada de otra especie de *Tachigali* [36].

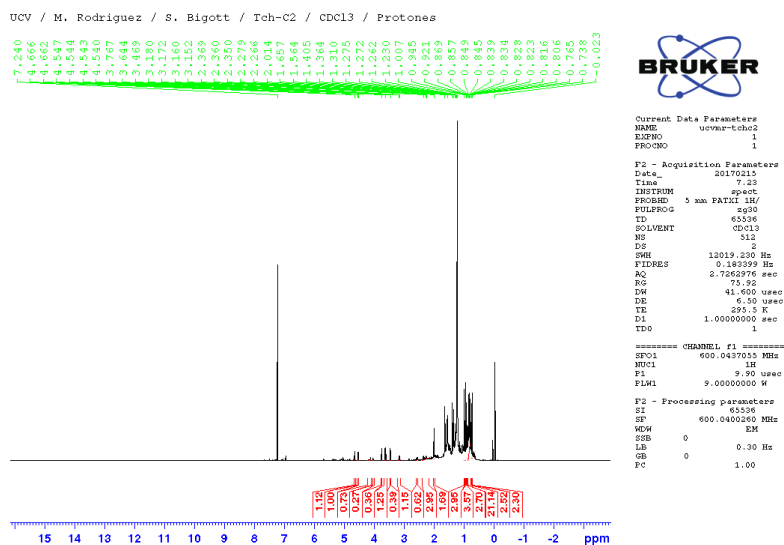
Tabla 8. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C de la Fracción Tch-C₁ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupenona.

C	δ (ppm) reportado [36]. Tomado en CDCl_3 a	δ (ppm) experimental. Tomado en CDCl_3 a 300	DEPT135
	300 MHz.	MHz.	
1	39,7	39,7	CH ₂
2	34,2	34,4	CH ₂
3	218,0	217,9	C
4	47,4		C
5	55,1	55,4	CH
6	19,8	21,5	CH ₂
7	33,7	33,6	CH ₂
8	40,9	42,8	C
9	49,9	49,8	CH
10	37,0		C
11	21,6	21,5	CH ₂
12	25,3	25,2	CH ₂
13	38,3	38,2	CH
14	43,0	43,0	C
15	27,5	27,4	CH ₂
16	35,6	35,5	CH ₂
17	43,0	-	C
18	48,4	48,3	CH
19	48,0	47,9	CH
20	150,9	150,8	C
21	29,9	29,9	CH ₂
22	40,0	40,0	CH ₂
23	26,7	26,6	CH ₃
24	21,1	21,0	CH ₃
25	15,9	15,9	CH ₃
26	16,0	16,3	CH ₃
27	14,6	14,5	CH ₃
28	18,1	18,6	CH ₃
29	19,4	19,3	CH ₃
30	109,4	109,4	CH ₂

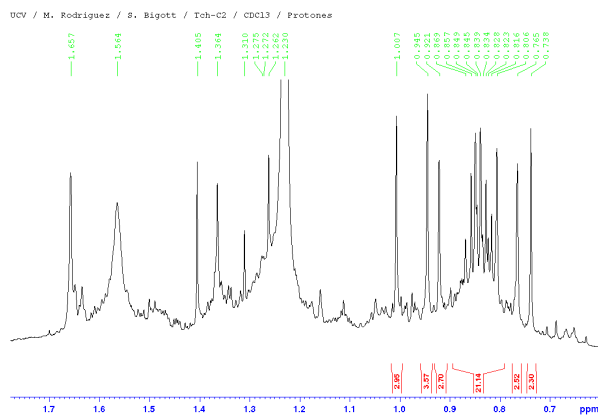
Fracción Tch-C₂

La fracción Tch-C₂ fue eluida con una mezcla Hex-AcOEt en una CC de la fracción Tch-C (Esquema 7). Se obtuvieron 17,1mg de un sólido blanco amorfo soluble en Hex, CHCl₃ y CH₂Cl₂. Esta fracción representó el 0,0021% respecto al material vegetal seco. Al ser analizada por CCF, se observa una banda mayoritaria con un R_f=0,6 que reveló color morado con AS al ser desarrollada con AN6, lo que permitió inferir que se trataba de un compuesto de tipo terpenoidal. La estructura del compuesto presente en esta fracción se determinó por análisis de RMN de ¹H, ¹³C y DEPT (Anexo 2).

La presencia de un gran número de señales a campo alto en el espectro de RMN ¹H confirma la naturaleza terpenoidal del compuesto mayoritario presente en la fracción Tch-C₂. La presencia de 7 singletes con desplazamientos de 1,66; 1,01; 0,95; 0,92; 0,85; 0,81 y 0,77 ppm se asocia a metilos unidos al esqueleto de un triterpeno (Espectro 11).

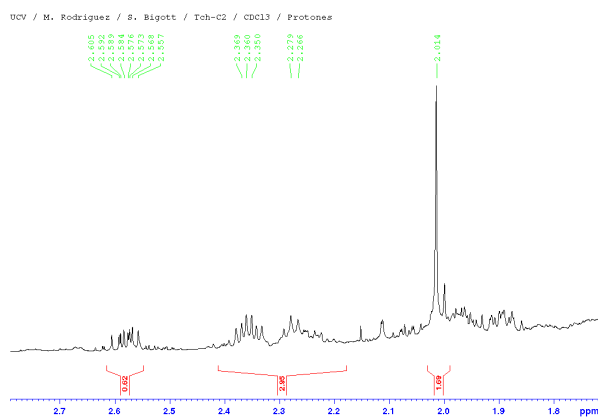


Espectro 10. Espectro de RMN ¹H de la fracción Tch-C₂.

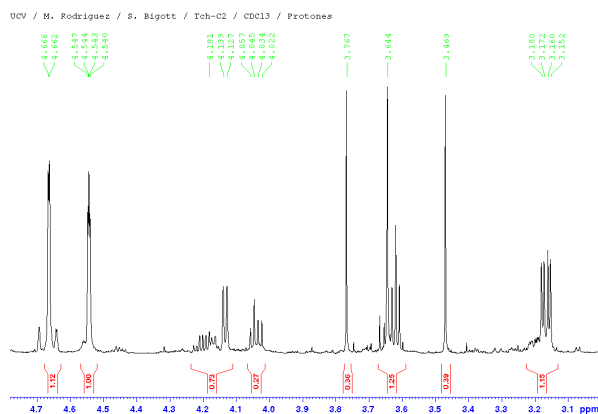


Espectro 11. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C₂. Ampliación 0,7-1,7ppm

A campo medio se observan dos señales, asociadas a los protones unidos a un carbono olefínico terminal a 4,67ppm (d , $J=1,2\text{Hz}$) y 4,55ppm (d , $J=0,7\text{Hz}$) (Espectro 13). Así mismo, es posible observar un multiplete, con desplazamientos químicos de 3,18ppm y un singlete en 3,47ppm que son atribuidos a protones de carbonos unidos a un grupo hidroxilo (Espectro 13). Adicionalmente, se observa un multiplete con un desplazamiento de 2,21ppm que se asigna a un protón unido a un carbono terciario, enlazado a un doble enlace (Espectro 12).

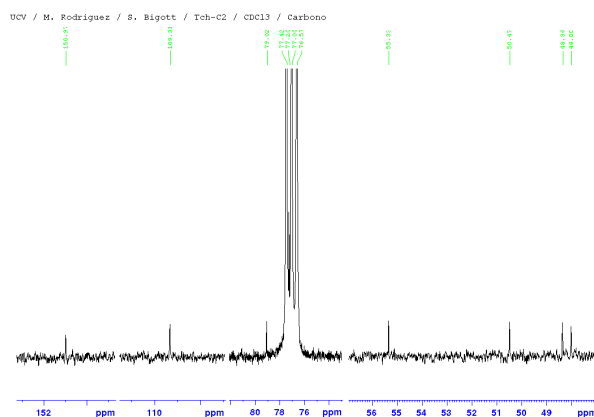


Espectro 12. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C₂. Ampliación 1,8 – 2,7 ppm



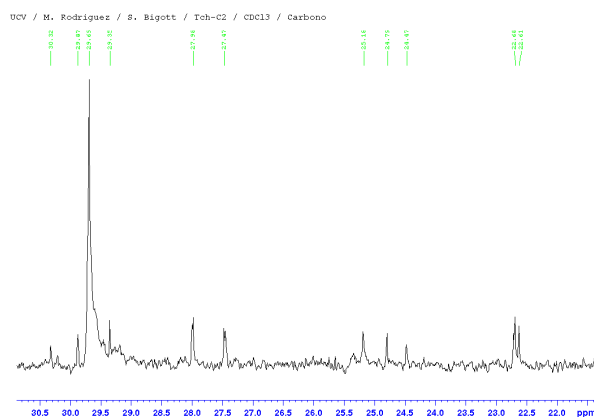
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C₂. Ampliación 3,1 – 4,7 ppm

En el espectro de ^{13}C se observan 50 señales, algunas de las cuales se asocian a impurezas y solventes utilizados en el proceso, quedando 30 señales mayoritarias.

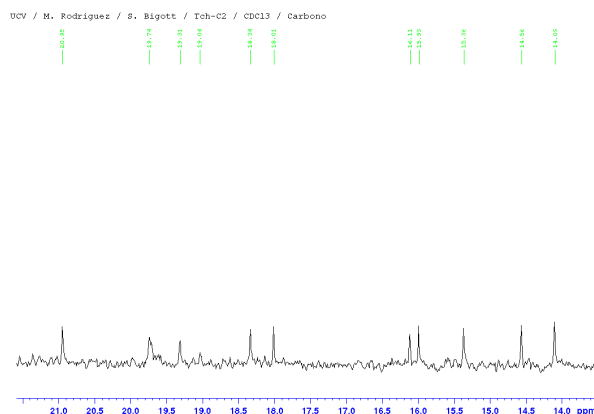


Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C₂.
Ampliaciones 49-56ppm; 76-80ppm; 110ppm y 150ppm.

Finalmente, se observan 6 señales positivas en el experimento DEPT135, con desplazamientos de 14,1; 14,6; 16,1; 18,01; 19,3 y 28,0 ppm que se asocian a metilos unidos al esqueleto de un triterpeno (Espectros 16 y 17). A pesar de que en el espectro de carbono 13 se observan 6 señales, el espectro de RMN ^1H confirma la presencia de 7 grupos metilo.



Espectro 16. Espectro de RMN ¹³C de la fracción Tch-C₂. Ampliación 22,0-30,5ppm

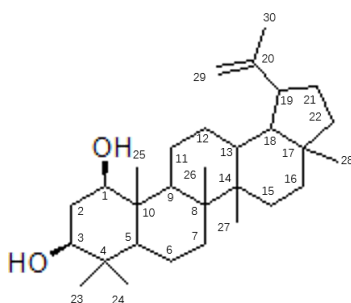


Espectro 17. Espectro de RMN ¹³C de la fracción Tch-C₂. Ampliación 14,0-21,0ppm

Con base en los desplazamientos químicos en los espectros de ¹H y ¹³C; y las señales observadas en el espectro DEPT135, se confirma la presencia de 7 grupos metilos, 10 metilenos, 7 metinos y 6 carbonos cuaternarios. Los

desplazamientos, así como las características de los carbonos evidencian la presencia de un compuesto mayoritario de tipo lupano.

La presencia de dos carbonos unidos a grupos hidroxilo, confirmados en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , permiten proponer la oxidación de dos carbonos que forman la estructura carbonada del triterpeno. Las posibilidades de oxidación están relacionadas con las rutas biosintéticas y permite identificar géneros y especies a través de la quimiotaxonomía. En el caso de la fracción Tch-C₂, además de la oxidación del C-3 asociada a la ciclación del óxido de escualeno, precursor de los triterpenos, se propone la oxidación del carbono C-1 por comparación con los desplazamientos reportados en la literatura para el estructura del compuesto mayoritario presente en la fracción Tch-C₂: (1 β , 3 β)lup-20(29)-eno-1,3-diol (31), también llamado 3-epiglochidiol (Figura 16).



(31)

Figura 16. Estructura del (1 β , 3 β)lup-20(29)-eno-1,3-diol.-
Compuesto mayoritario de la fracción Tch-C₂.

Se hizo una comparación entre los desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H obtenidos para la fracción Tch-C₂ y los reportados para 3-epiglochidiol aislado de la especie *Salvia deserta* (Tabla 9) [43]:

Tabla 9. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H para la fracción Tch-C₂ y los reportados en la literatura para el compuesto 3-epiglochidiol.

H	δ ppm reportado* [43] (mult.; J Hz)	δ ppm exp. (mult.; J Hz)
H-1	3,43 (dd; 4,7; 11,3)	3,47 (s)
H-3	3,24 (s)	3,18 (s)
H-13	2,38 (td; 10,8)	2,37 (m)
H-19	2,16 (m)	2,21 (m)
H-24	0,75 (s)	0,77 (s)
H-25	0,90 (s)	0,81 (s)
H-26	1,04 (s)	1,01 (s)
H-27	0,95 (s)	0,95 (s)
H-28	0,79 (s)	0,81 (s)
H-29a	4,68 (d; 1,4)	4,67 (d; 1,2)
H-29b	4,55 (dd; 2,4)	4,55 (dd; 0,7)
H-30	1,67 (s)	1,66 (s)

También se compararon los desplazamientos químicos en el espectro de RMN de ^{13}C [43]:

Tabla 10. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C para la fracción Tch-C₂ y los reportados en la literatura para el compuesto 3-epiglochidiol.

C	δ (ppm) reportado [43]. Tomado en CDCl_3 a 300 MHz.	δ (ppm) experimental. Tomado en CDCl_3 a 300 MHz.	DEPT135
1	79,0	79,0	CH
2	37,5	37,3	CH ₂
3	75,7	76,6	CH
4	38,9	38,9	C
5	53,1	55,3	CH
6	18,0	18,3	CH ₂
7	34,1	34,1	CH ₂
8	41,3	40,9	C
9	51,4	50,5	CH
10	43,5	43,0	C
11	23,8	24,5	CH ₂
12	25,0	25,2	CH ₂
13	38,0	38,1	CH
14	42,8	42,9	C
15	27,4	27,5	CH ₂
16	35,5	35,6	CH ₂
17	42,9	-	C
18	48,3	48,3	CH
19	47,9	48,0	CH
20	29,7	29,7	C
21	39,9	40,0	CH ₂
22	27,8	28,0	CH ₂
23	14,9	14,6	CH ₃
24	11,9	-	CH ₃
25	16,2	16,1	CH ₃
26	14,4	14,1	CH ₃
27	18,0	18,0	CH ₃
28	150,8	151,0	CH ₃
29	19,2	19,3	CH ₂
30	109,4	109,4	CH ₃

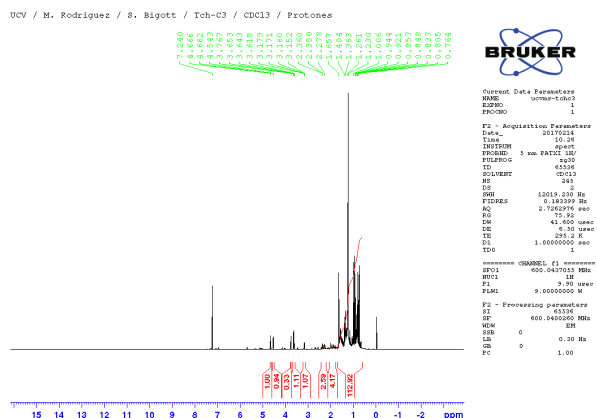
Este compuesto fue aislado por primera vez del género *Glochidion* de la familia Phyllanthaceae. Además, ha sido aislado anteriormente de plantas de la

familia Leguminoae, como *Saraca asoca*. [44] Sin embargo es la primera vez que se aísla e identifica en una especie del género *Tachigali*.

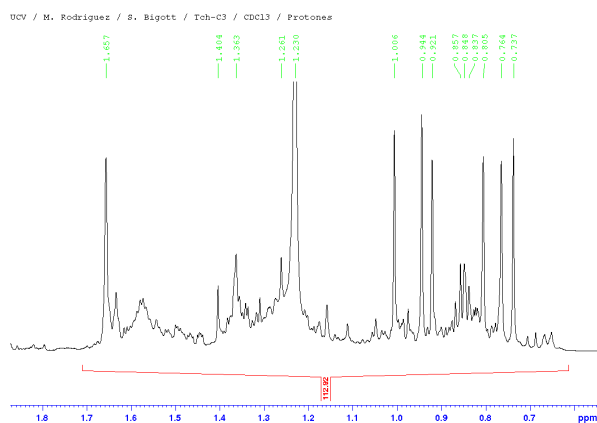
Fracción Tch-C₃

La fracción Tch-C₃ fue eluída con una mezcla de Hex-AcOEt en una CC de la fracción Tch-C que fue eluída por CLV con CH₂Cl₂. Se obtuvieron 7,0mg de un sólido cristalino en forma de agujas soluble en Hex, CHCl₃ y CH₂Cl₂. Esta fracción representó el 0,0009% respecto al material vegetal seco. Al ser analizado por CCF se observa una banda mayoritaria que revela de color morado con AS y calor. Esta banda tiene un R_f=0,65 al ser desarrollada con AN6, lo que permitió inferir que se trataba de un compuesto terpenoidal. La estructura del compuesto presente en esta fracción se determinó por los espectros de RMN de ¹H, ¹³C y DEPT.

En el espectro de RMN de protones se observa un gran número de señales a campo alto, característico de núcleos terpenoidales. La presencia de 7 singletes con desplazamientos de 1,66; 1,01; 0,95; 0,92; 0,85; 0,81 y 0,77ppm se asocia a metilos unidos al esqueleto de un triterpeno. Tal como se ha evidenciado en los compuestos aislados e identificados anteriormente en esta investigación.

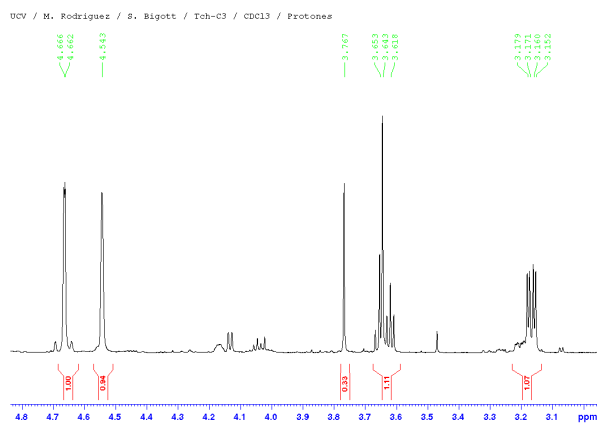


Espectro 18. Espectro de RMN ¹H de la fracción Tch-C₃.

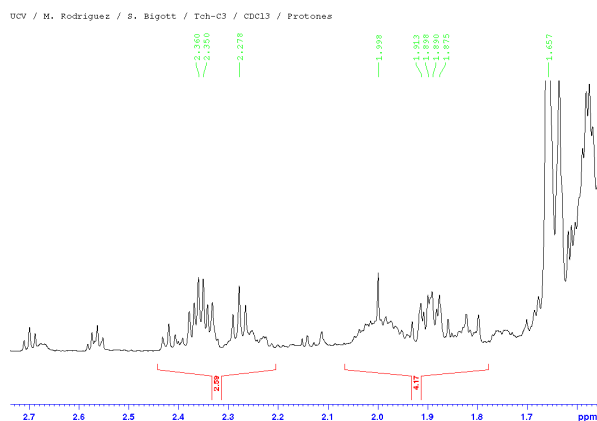


Espectro 19. Espectro de RMN de ¹H de la fracción Tch-C₃. Ampliación entre 0,6ppm y 1,6ppm.

Por otra parte, a campo medio se observan dos singletes, asociados a los protones unidos a un carbono olefínico terminal a 4,66 y 4,54ppm y un doblete de dobletes a 3,17ppm atribuido a un protón de un carbono unido a un grupo hidroxilo, con una constante de acoplamiento $J=2,4\text{Hz}$ (Espectro 20). Finalmente, se observa un triplete con un desplazamiento de 2,36ppm que se atribuye un protón unido a un carbono terciario, enlazado a un doble enlace (Espectro 21).

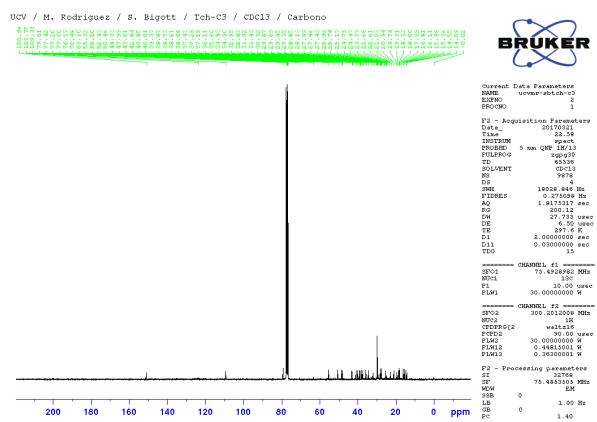


Espectro 20. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C₃. Ampliación entre 3,1ppm y 4,8ppm



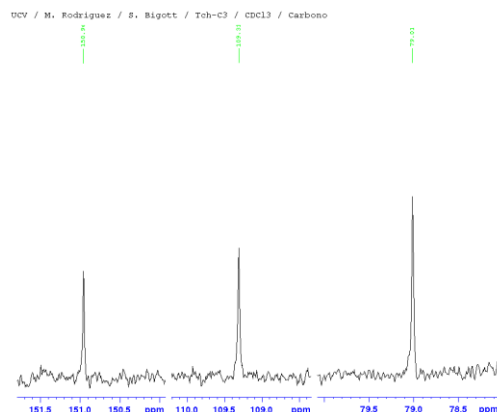
Espectro 21. Espectro de RMN ^1H de la fracción Tch-C₃.Ampliación entre 1,7ppm y 2,7ppm

En el espectro de RMN ^{13}C se observan 35 señales, 5 de las cuales se asocian a impurezas y solventes utilizados en el proceso cromatográfico, las 30 señales restantes confirman que el compuesto presente en la fracción es un triterpeno.



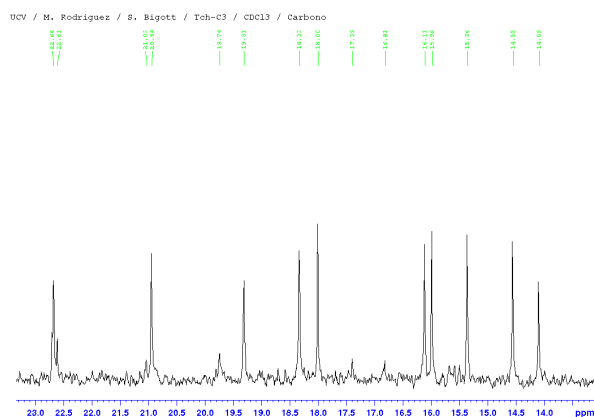
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C₃.

Entre las señales de más intensidad se observa un carbono con un desplazamiento de 79,0 ppm, que presenta una señal positiva en el DEPT135, por lo que se asigna a un metino hidroxilado. Además, se observan dos señales importantes con desplazamientos a 151,0 y 109,3ppm. La primera de ellas desaparece en el espectro DEPT135, por lo que se asigna a un carbono olefínico cuaternario, mientras que la segunda presenta una señal negativa en el DEPT135, por lo que se asigna a un CH₂ olefínico (Espectro 22).

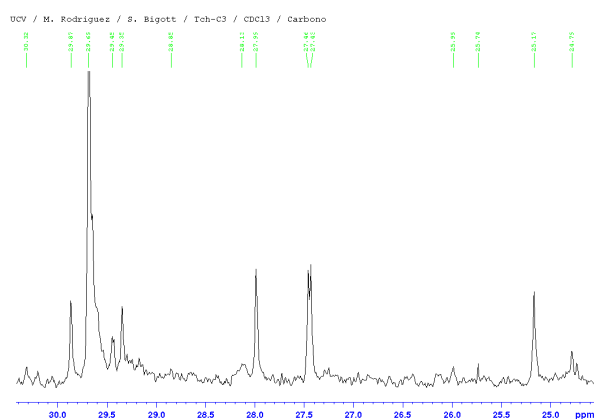


Espectro 23. Espectro de RMN ¹³C de la fracción Tch-C₃.
Ampliaciones 76,5ppm-79,5ppm; 109ppm – 110ppm y 150,5ppm – 151,5ppm.

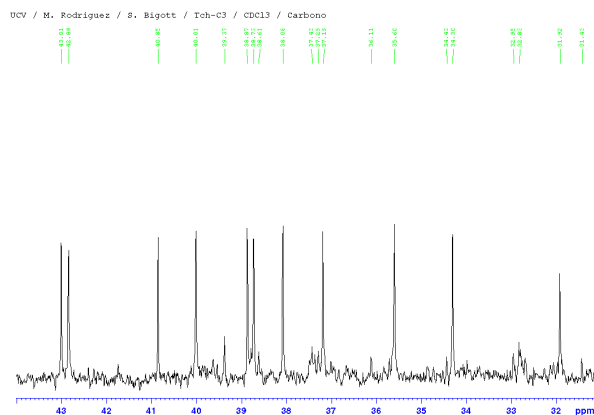
Señales positivas en el espectro DEPT135 con desplazamientos de 40,01; 28,0; 15,4; 16,1; 16,0; 14,6; 19,3 ppm confirman la presencia de 7 metilos unidos al esqueleto de la estructura del triterpeno (Espectros 24 y 25).



Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C₃. Ampliación 14,0ppm – 23,0ppm.



Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-C₃. Ampliación 25,0ppm – 30,0ppm.



Espectro 26. Espectro de RMN ¹³C de la fracción Tch-C₃.Ampliación 32,0ppm – 43,0ppm.

Con base en los desplazamientos químicos y las señales observadas en el espectro DEPT135, se confirma la presencia de 7 grupos metilos, 11 metilenos, 6 metinos y 6 carbonos cuaternarios. Los desplazamientos, así como las características de los carbonos evidencia la presencia de un compuesto mayoritario de tipo lupano, específicamente el compuesto **lupeol** (Figura 17).

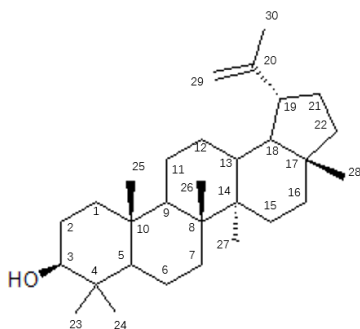


Figura 17. Estructura del lupeol

Se hizo una comparación entre los desplazamientos químicos en el espectro de RMN ¹H obtenidos para la fracción Tch-C₃ y los reportados para lupeol aislado de otra especie del género *Tachigali* (Tabla 11) [36]:

Tabla 11. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H de la Fracción Tch-C₃ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupeol.

H	δ ppm reportado* [36] (mult.; J Hz)	δ ppm exp. (multi.; J Hz)
H-3	3,17 (m)	3,17 (dd; 2,4)
H-19	2,34 (t; 2,6)	2,36 (t; 2,6)
H-23	0,94 (s)	0,95 (s)
H-24	0,76 (s)	0,77 (s)
H-25	0,85 (s)	0,85 (s)
H-26	1,07 (s)	1,01 (s)
H-27	0,92 (s)	0,92 (s)
H-28	0,80 (s)	0,81 (s)
H-29	1,66 (s)	1,66 (s)
H-30a	4,66 (s)	4,66 (s)
H-30b	4,53 (s)	4,54 (s)

También se compararon los desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C obtenidos para la fracción Tch-C₃ y los reportados para lupeol aislado de otra planta del género *Tachigali* en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela (Tabla 12) [45]:

Tabla 12. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C de la Fracción Tch-C₃ y comparación con datos reportados en la literatura para la lupeol.

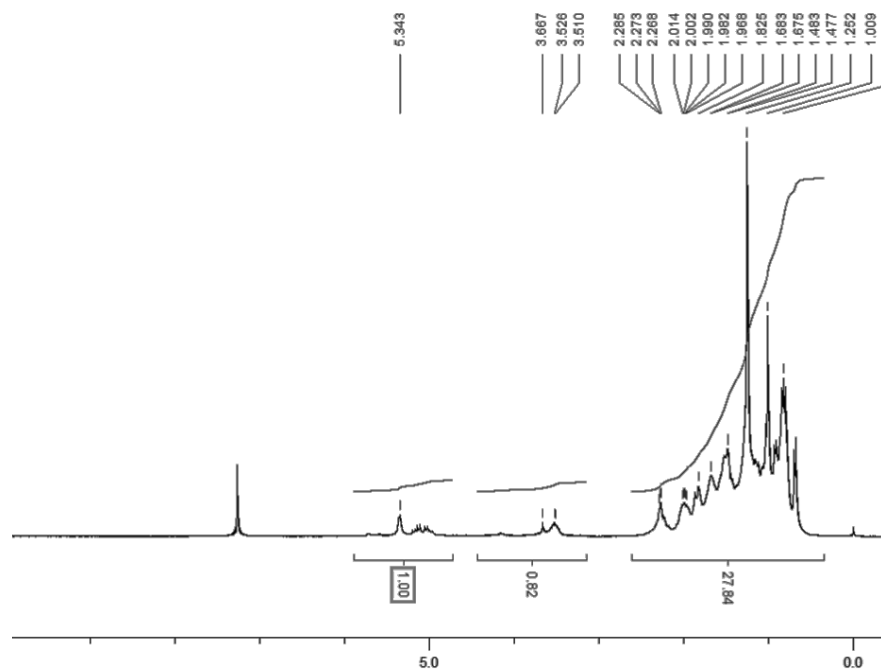
C	δ (ppm) reportado [45]. <i>Tomado en CDCl_3 a 270 MHz.</i>	δ (ppm) experimental. <i>Tomado en CDCl_3 a 300 MHz.</i>	DEPT135
1	38,79	38,72	CH ₂
2	27,44	27,46	CH ₂
3	79,1	79,01	CH
4	38,92	38,87	C
5	55,16	55,32	CH
6	18,48	18,33	CH ₂
7	33,42	34,30	CH ₂
8	41,78	40,85	C
9	50,50	50,46	CH
10	37,20	37,18	C
11	20,93	20,94	CH ₂
12	23,97	25,17	CH ₂
13	----	38,07	CH
14	44,27	42,84	C
15	27,44	27,43	CH ₂
16	32,72	35,59	CH ₂
17	42,30	43,01	C
18	48,77	48,33	CH
19	47,97	47,99	CH
20	148,30	150,96	C
21	31,65	29,87	CH ₂
22	40,23	40,01	CH ₂
23	28,08	27,99	CH ₃
24	15,44	15,40	CH ₃
25	16,96	15,36	CH ₃
26	16,60	16,11	CH ₃
27	15,18	15,98	CH ₃
28	16,76	14,55	CH ₃
29	19,72	19,31	CH ₂
30	109,50	109,31	CH ₂

Fracción Tch-E₁

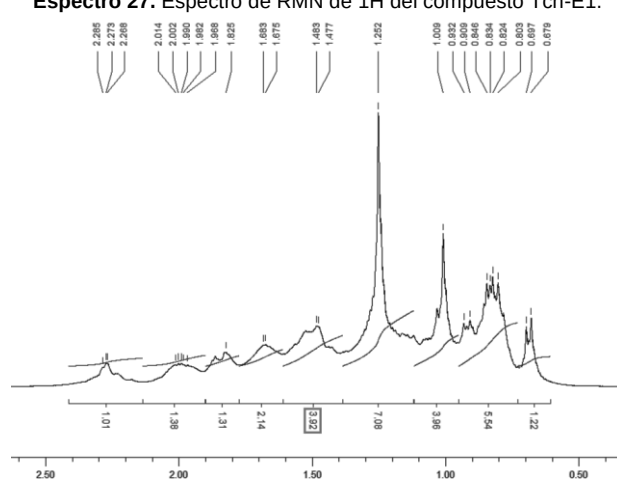
La fracción Tch-E₁ fue obtenida como porción insoluble en MeOH de los lavados hechos sobre la fracción Tch-E(CHCl₃), proveniente de la separación cromatográfica de la muestra Tch-E (Esquema 3). La fracción Tch-E fue eluida por CLV, con una mezcla de solventes CH₂Cl₂-MeOH (95:5), para obtener 9,6mg de un sólido blanco amorfo, lo que representó el 0,0012% respecto al material vegetal seco. Esta fracción reveló color morado al ser rociada con AS y sometida a calor. Este resultado permitió inferir que se trataba de un compuesto de tipo terpenoidal.

Se realizó una comparación entre el compuesto Tch-E₁ y patrones de lupeol y β -sitosterol por CCF, mostrando características similares en cuanto al factor de retención y coloración al comparar con el patrón de β -sitosterol. En consecuencia, se procedió a confirmar la estructura por espectros de RMN de ¹H y ¹³C.

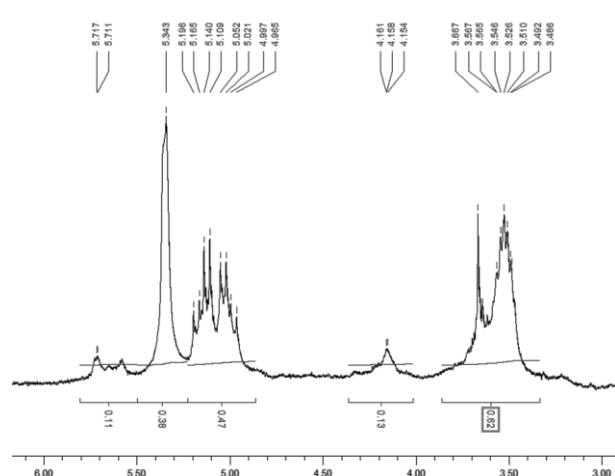
La presencia de señales intensas a campo alto en el espectro de RMN de protones, confirma la presencia de una estructura de tipo esteroideal. Así, se distinguen dos singletes a 0,70 ppm y 1,01 ppm que se asignan a los protones correspondientes a metilos que se encuentran como sustituyentes de un ciclo. Un multiplete observado en 0,82 ppm se puede atribuir a señales de grupos metilo en una cadena alifática (Espectro 28). A campo medio se observa un multiplete en 3,53 ppm que se asigna a un protón unido a un carbono que se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo. Por otra parte, se observa un multiplete a 5,34 ppm característico de protones olefínicos endocíclicos (Espectro 29).



Espectro 27. Espectro de RMN de ^1H del compuesto Tch-E1.

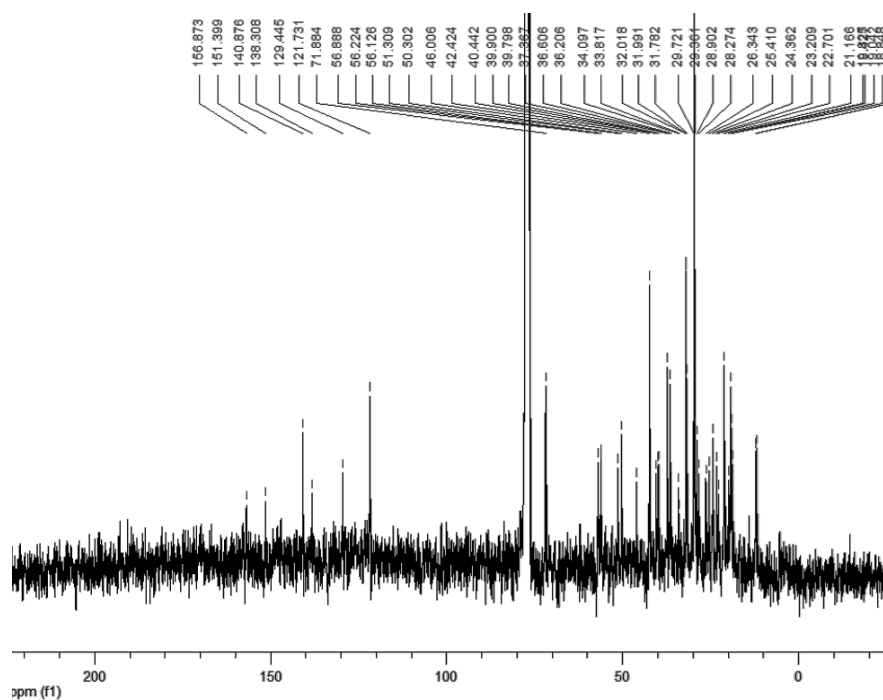


Espectro 28. Espectro de RMN de ^1H del compuesto Tch-E1. Ampliación 0,50ppm-2,50ppm



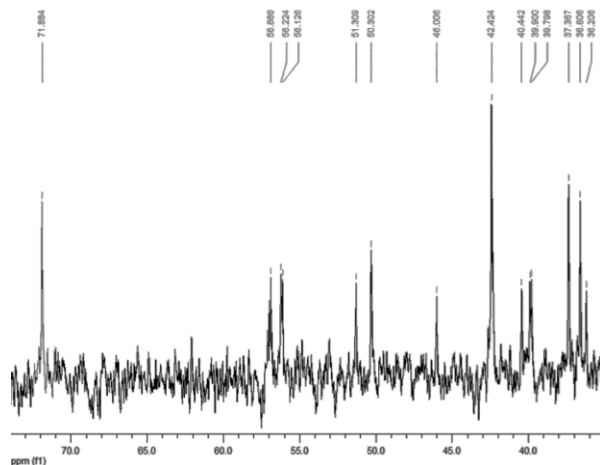
Espectro 29. Espectro de RMN de ¹H del compuesto TchE1. Ampliación 3,00ppm-6,00ppm

El espectro de RMN ¹³C muestra 41 señales, 8 de las cuales poseen muy poca intensidad por lo que son atribuidas a contaminaciones. Por otra parte, la diferencia de intensidades en el resto de las señales permite afirmar que la fracción Tch-E₁ se trata de una mezcla de compuestos de estructura similar.



Espectro 30. Espectro de RMN de ^{13}C de la fracción Tch-E₁.

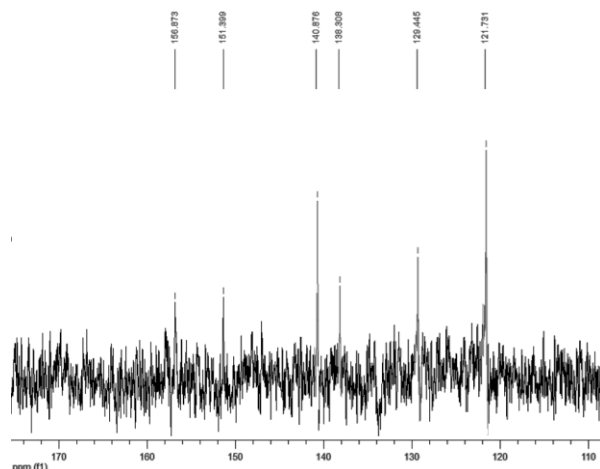
Entre las señales de mayor intensidad se observa un carbono con un desplazamiento de 71,9 ppm, que presenta una señal positiva en el DEPT135, asignada a un metino unido a un grupo hidroxilo (Espectro 31).



Espectro 31. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-E₁. Ampliación 37,0ppm-80,0ppm

Además, se observan dos señales importantes con desplazamientos a 140,9 ppm y 121,7 ppm. La primera de ellas desaparece en el espectro DEPT135, por lo que se asigna a un carbono olefínico cuaternario, mientras que la segunda presenta una señal positiva en el DEPT135, por lo que se asigna a un metino olefínico (Espectro 32).

Existen otras dos señales que por sus desplazamientos químicos pueden ser asignadas a carbonos olefínicos: 138,3 ppm y 129,5 ppm que presentan señales positivas en el DEPT135, por lo que son asignadas a metinos. Estas dos señales son de menor intensidad, lo que permite inferir que la diferencia entre los compuestos presentes en la mezcla es un doble enlace adicional en el que está en menor proporción (Espectro 32).



Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Tch-E₁. Ampliación 110,0ppm-170,0ppm

Con base en los desplazamientos químicos y las señales observadas en el espectro DEPT135, se confirma la presencia de 6 grupos metilos, 11 metilenos, 7 metinos y 3 carbonos cuaternarios. Los desplazamientos, así como las características de los carbonos evidencian la presencia de un compuesto mayoritario de tipo colestano, específicamente el compuesto β -sitosterol, tal y como se infirió por el análisis de CCF comparativo con un patrón del mismo.

Además de lo expuesto anteriormente, la presencia de otros dos metinos olefínicos permite afirmar que el segundo compuesto de la mezcla es el estigmasterol. Los compuestos propuestos: β -sitosterol y estigmasterol han sido reportados en otras investigaciones como esteroides difíciles de separar, por lo que suelen ser aislados como mezcla. [46] En el caso específico de esta investigación, se puede inferir, por la relación que se observa en el espectro de RMN ^{13}C entre las intensidades de las señales de los carbonos 22 y 23 para el estigmasterol (9) y el β -sitosterol (10) (Figura 18), que la proporción en la que se encuentran estos compuestos en la mezcla es 3:1 respectivamente. Esta proporción es también consistente con la relación entre las intensidades de las señales de los carbonos 6 de las estructuras.

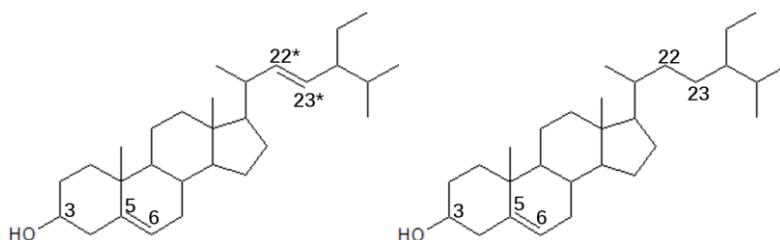


Figura 18. Estructuras del estigmasterol y β -sitosterol

A continuación, se presenta la tabla comparativa entre los desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H (Tabla 13) y RMN ^{13}C (Tabla 14) de la fracción Tch-E₁ y una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol aislada de otra especie del género *Tachigali* [36], en la que se evidencia correspondencia entre los datos experimentales y los reportados.

Tabla 13. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H para la Fracción Tch-E₁ y su comparación con los reportados en la literatura para una mezcla de β -sitosterol – estigmasterol.

H	δ ppm reportado* [36] (mult.; J Hz)	δ ppm exp. (mult.; J Hz)
H-3	3,49 (m)	3,53 (m)
H-6	5,32 (d, 4,7)	5,34 (m)
H-18	0,66 (s)	0,70 (s)
H-19	0,98 (s)	1,01 (s)
H-21	1,01 (d, 7,5)	0,92 (d; 6,21)
H-22*	5,12* (dd, 8,1, 15,7)	5,15 (dd; 8,4; 15,1)
H-23*	5,01* (dd, 8,1, 15,6)	5,01 (dd; 8,4; 15,1)
H-26	0,89 (d, 6,4)	
H-27	0,79 (d, 6,2)	0,82 (m)
H-29	0,78	

Tabla 14. Desplazamientos químicos en el espectro de RMN para la Fracción Tch-E₁ y su comparación con los reportados en la literatura para una mezcla de β -sitosterol – estigmasterol.

C	δ (ppm) reportado [36]. Tomado en $CDCl_3$ a 270 MHz.	δ (ppm) experimental. Tomado en $CDCl_3$ a 270 MHz.	DEPT135
1	37,4	37,4	CH ₂
2	31,8	31,8	CH ₂
3	71,8	71,9	CH
4	42,4	42,4	CH ₂
5	140,8	140,9	C
6	121,7	121,7	CH
7	31,7	32,0	CH ₂
8	31,9	32,0	CH
9	50,2	50,3	CH
10	36,5	36,6	C
11	21,1	21,1	CH ₂
12	39,8	39,8	CH ₂
13	42,4	42,4	C
14	56,8	56,9	CH
15	24,3	24,4	CH ₂
16	29,0	28,3	CH ₂
17	55,9	56,1	CH
18	12,0	121	CH ₃
19	19,4	19,0	CH ₃
20	40,5	39,9	CH
21	21,1	18,9	CH ₃
21*	-	22,7	CH ₃
22	34,0	34,1	CH ₂
22*	138,3	138,3	CH
23	26,3	26,3	CH ₂
23*	129,4	129,5	CH
24	51,3	46,6	CH
25	31,9	29,0	CH
26	21,1	19,3	CH ₃
27	19,1	19,0	CH ₃
28	25,4	23,2	CH ₂
29	12,2	12,1	CH ₃

*Señales correspondientes a los desplazamientos químicos del estigmasterol.

Comparación de tres especies del género *Tachigali*.

Se realizó la comparación de los extractos metanólicos de las 3 especies del género *Tachigali* mencionadas anteriormente, a saber, *Tachigali chrysophylla* (*Tch*), *Tachigali cavipes* (*Tca*) y *Tachigali paniculata* (*Tpa*), con la finalidad de encontrar semejanzas en los metabolitos secundarios sintetizados por este género. A efectos de esta comparación se realizaron placas de CCF en dos diferentes sistemas de solvente: AN6 y Tol-AcOEt (75:25; v/v). Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Sistema de Solvente: AN6

Se desarrollaron placas comparativas de CCF y se revelaron con dos agentes de coloración. Bajo este sistema de solventes es posible observar diferencias en el perfil fitoquímico de las tres especies, en especial bajo luz UV a 365 nm, donde sólo se observa una banda común con un $R_f=0,53$; distinta a las bandas de color rosado características de clorofilas (Figura 16).

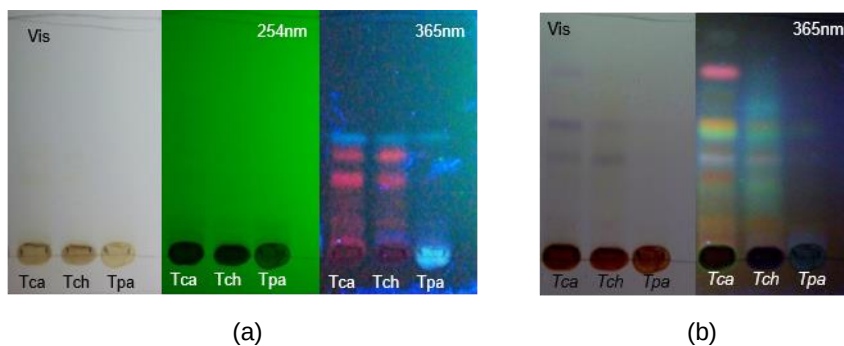


Figura 19. Placa de CCF comparativa de *Tca*, *Tch* y *Tpa* eluida con AN6.
(a) sin revelar. (b) revelada con AS

Cuando la placa es rociada con AS se siguen observando fuertes diferencias entre los perfiles cromatográficos de las tres especies. Sin embargo, *Tca* y *Tch*, presentan un perfil similar bajo estas condiciones. En el visible se observan 2 bandas color morado, característico de compuestos terpenoidales, con factores de

retención iguales a 0,40 y 0,55 que son comunes para *Tch* y *Tca* (Figura 16). Debido a la similitud en el comportamiento en la elución y frente al agente revelador se puede inferir que ambas especies contienen compuestos terpenoidales de estructura similar.

Adicionalmente, se observan bandas con coloraciones naranjas y amarillas bajo la luz a 365nm, con factores de retención iguales a 0,56 y 0,50 comunes para las 3 especies, estas coloraciones son particulares para compuestos de tipo flavonoidal (Figura 16).

Sistema de Solvente: Tol-AcOEt (75:25; v/v)

Se desarrollaron placas de CCF con este solvente y se revelaron con dos sistemas de coloración. Antes de revelar, no se obtiene demasiada información, sin embargo se observa una primera banda similar para las 3 especies con un $R_f=0,8$ (Figura 17).

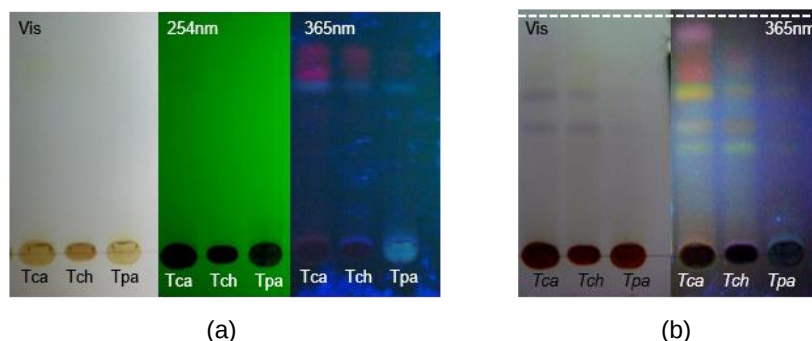


Figura 20. Placa de CCF comparativa de *Tca*, *Tch* y *Tpa* eluida con Tol-AcOEt (75:25). (a) sin revelar. (b) revelada con AS.

La placa comparativa eluida con este sistema de solventes fue revelada utilizando AS. Con este agente de coloración se puede observar bajo luz visible, dos bandas de color morado con $R_f=0,51$ y $R_f=0,67$ comunes para las 3 especies. Esta coloración indica compuestos con características terpenoidales y su comportamiento tanto en la elución, como frente al agente de coloración permite inferir que en todas las especies existen compuestos de este tipo con estructuras similares (Figura 17).

Por otra parte, a 365nm se observan, nuevamente, bandas comunes para las 3 especies, con $R_f=0,66$; $R_f=0,5$ y $R_f=0,44$ con coloraciones amarillas y naranjas. Esta coloración es particular de compuestos flavonoidales y son comunes para las 3 especies (Figura 17).

Adicionalmente, se reveló con Komarowsky (KOM) una placa eluida con este sistema de solvente. Donde se observó que los perfiles de *Tch* y *Tca* son bastante similares. Bandas con $R_f= 0,37$; $R_f=0,44$; $R_f=0,6$ con coloraciones moradas están presentes tanto en el extracto metanólico de *Tachigali chrysophylla*, como en el de *Tachigali cavipes*. Esta coloración es indicativa de compuestos terpenoidales glicosilados (Figura 18).



Figura 21. Placa de CCF comparativa de *Tca*, *Tch* y *Tpa* eluida con Tol-AcOEt (75:25).

Revelada con KOM.

El estudio comparativo entre las 3 especies del género *Tachigali* arroja información importante sobre las similitudes entre los tipos de compuestos presentes en las 3 plantas: compuestos de tipo terpenoidal y flavonoidal.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el contenido total de polifenoles en el extracto metanólico de hojas y ramas de la especie *Tachigali chrysophylla* es de 55% a partir del cálculo del número de Stiasny.
- Se lograron aislar 6 fracciones de interés: Tch-A, Tch-C₁, Tch-C₂, Tch-C₃, Tch-E₁, Tch-I₁ a través de cromatografía en columna y cromatografía líquida al vacío. De las cuales, pudieron identificarse los compuestos presentes en las fracciones Tch-C₁, Tch-C₂, Tch-C₃, Tch-E₁.
- La fracción Tch-C₁ se aisló como un aceite amarillo, soluble en hexano, diclorometano y cloroformo y parcialmente soluble en metanol. Esta fracción está conformada por una mezcla de compuestos en la que se identificó como compuesto mayoritario el triterpeno lupenona.
- La fracción Tch-C₂ se aisló como un sólido blanco amorfo, soluble en hexano, diclorometano y cloroformo. Este compuesto fue identificado como 3-epiglochidiol. Es la primera vez que se reporta este compuesto en una especie del género *Tachigali*.
- La fracción Tch-C₃ se aisló como un sólido cristalino en forma de agujas, soluble en hexano, diclorometano y cloroformo. Este compuesto fue identificado como lupeol.
- La fracción Tch-E₁ se aisló como un sólido blanco amorfo, soluble en hexano, diclorometano y cloroformo. De este compuesto se identificó la mezcla de esteroides estigmasterol y β -sitosterol, en proporción 3:1.
- Dos fracciones aisladas de una cromatografía líquida al vacío, VLC₂ y VLC₃ dieron resultados positivos en la inhibición del sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa, tanto en microsomas intactos, como permeabilizados. Para la fracción VLC₂, los porcentajes de inhibición fueron de 73% y 83% para microsomas permeabilizados e intactos respectivamente. Mientras que para la fracción VLC₃, los porcentajes de inhibición fueron de 80% y 37%.

RECOMENDACIONES

- Continuar las investigaciones fitoquímicas sobre *Tachigali chrysophylla*, debido al alto contenido de metabolitos secundarios.
- Con la finalidad de aislar flavonoides glicosilados detectados, se propone hacer uso de soportes cromatográficos como Sephadex LH-20 con el objetivo de separar los taninos de la matriz.
- Continuar las investigaciones sobre *Tachigali chrysophylla*, orientadas sobre sus potencial actividad biológica como antihiperglicemiante.

REFERENCIAS

- [1] R. Ikan, *Selected Topics in the Chemistry of Natural Products*, Singapur: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2008, p. 1.
- [2] D. Marcano y M. Hasegawa, *Fitoquímica Orgánica*, Caracas: Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, 2002, pp. 29-31.
- [3] W. Wilbert, *Fitoterapia Warao*, Caracas: Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Instituto Caribe de Antropología y Sociología, 1996, p. 4.
- [4] I. C. Clemente, «Importancia del Uso de Plantas Medicinales en el Desarrollo Endógeno del Municipio Acevedo, Estado Miranda (caso Comunidad Mendoza),» de *Reconociéndonos en Nuestros Saberes y Haceres*, Venezuela, Consejo Nacional de la Cultura, 2006, pp. 209-228.
- [5] O. Lock, «Manual de Fitoterapia,» Pontificia Universidad Católica de Perú.
- [6] A. S. Saroya, *Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology*, Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2011, pp. 33,37.
- [7] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*, England: John Wiley & Sons, 2002, pp. 7,8.
- [8] J. Marais, B. Deavours, R. Dixon y D. Ferreira, «The Stereochemistry of Flavonoids,» de *The Science of Flavonoides*, Ohio, Springer, 2006, pp. 1-46.
- [9] K. Gould y C. Lister, «Flavonoid Functions in Plants,» de *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Florida, CRC Press, 2006, pp. 397-441.
- [10] J. Hendrickson, *The Molecules of Nature*, New York: W. A. Benjamin, Inc., 1975.

- [11] A. Hagerman, «Tannin Handbook,» 28 Marzo 2002. [En línea]. Available: [http://dlx.b-ok.org/genesis/459000/e71a04cdb8c07ac18d049266691f4d65/_as/\[Ann_E._Hagerman\]_Tannin_Handbook\(b-ok.org\).pdf](http://dlx.b-ok.org/genesis/459000/e71a04cdb8c07ac18d049266691f4d65/_as/[Ann_E._Hagerman]_Tannin_Handbook(b-ok.org).pdf). [Último acceso: 16 Junio 2017].
- [12] E. Bate-Smith y T. Swain, «Flavonoid Compounds,» *Comparative Biochemistry*, vol. 3A, pp. 705-809, 1962.
- [13] R. Hemingway y J. Karchessy, *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, London: Plenum Press, 1988.
- [14] E. Breitmaier, *Terpenes*, Mörlenbach: WILEY-VCH, 2008, pp. 1-3.
- [15] C. Sell, *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003.
- [16] E. van Schaftingen y I. Gerin, «The glucose-6-phosphatase system,» *Biochem. J.*, vol. 362, pp. 513-532, 2002.
- [17] R. Hume, M. Voice, S. Pazouki, R. Giunti, A. Benedetti y A. Burchell, «The Human Adrenal Microsomal Glucose-6-phosphatase System,» *Journal of Critical Endocrinology and Metabolism*, vol. 80, nº 6, pp. 1960-1966, 1995.
- [18] J. Cazes y R. P. Scott, *Chromatography Theory*, New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.
- [19] D. A. Skoog, F. J. Holler y T. A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, Madrid: McGrawHill, 2001.
- [20] D. C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo*, Barcelona: Editorial Reverté, 2007.
- [21] J. Miller, *Chromatography: Concepts and Contrasts*, New York: John Wiley & Sons.

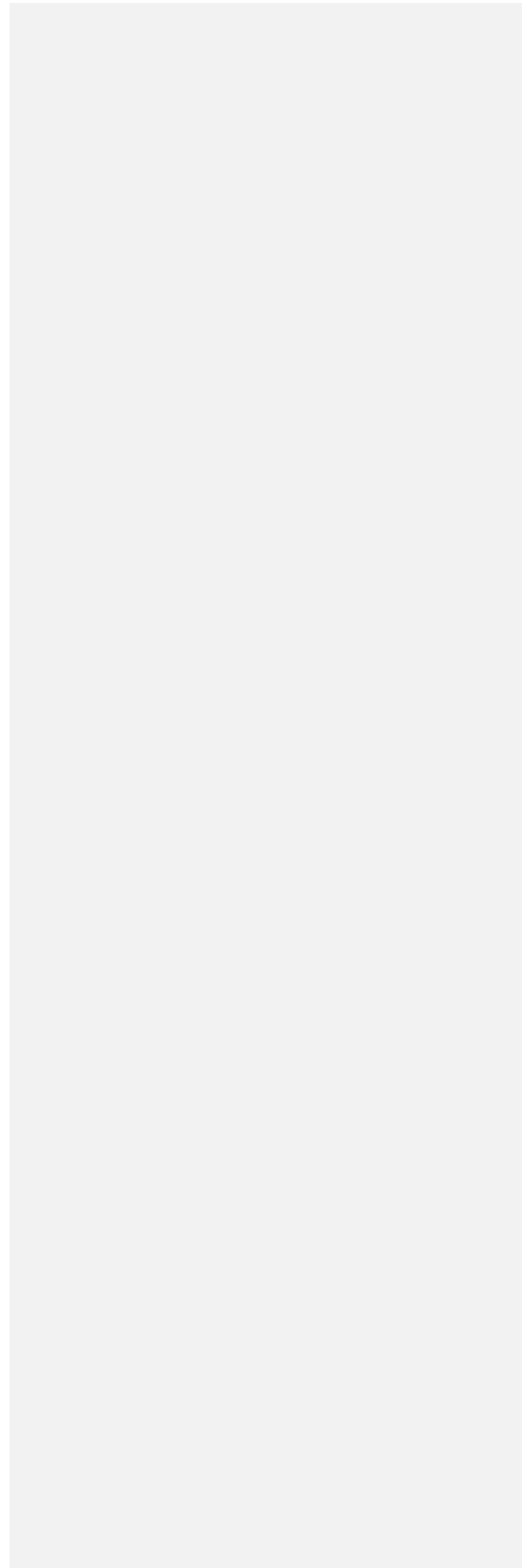
- [22] H. van der Werff, «A Synopsis of the Genus Tachigali (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Northern South America,» *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 95, nº 4, pp. 618-660, 2008.
- [23] M. Grandtner y J. Chevrette, Dictionary of Trees, Vols. %1 de %2II South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology, USA: ELSEVIER, 2014.
- [24] [En línea]. Available: <http://sites.unicentro.br/wp/manejoforestal/tachigali-chrysophylla-poepp-zaruchi-herend-taxi-vermelho/>. [Último acceso: 21 febrero 2016].
- [25] [En línea]. Available: <http://sites.unicentro.br/wp/manejoforestal/tachigali-chrysophylla-poepp-zaruchi-herend-taxi-vermelho/>. [Último acceso: 30 marzo 2016].
- [26] J. J. Pipoly III, «A New Tachigali from Western Amazonia,» *SIDA, Contributions to Botany*, vol. 16, nº 3, pp. 407-411, 1995.
- [27] L. Lobo, «Estudo das propriedades alelopáticas de plantas: investigação de aleloquímicos de Tachigali myrmecophylla (Leguminosae),» Embrapa Amazônia Oriental, Belem, Pará, 2004.
- [28] L. Lobo, K. C. Ferreira Castro, M. N. Da Silva, M. S. P. Arruda, A. C. Arruda, A. H. Müller, G. M. S. P. Arruda y A. Silva Santos, «Potencial Alelopático de Catequinas de Tachigali myrmecophylla,» *Quim. Nova*, vol. 31, nº 3, pp. 493-497, 2008.
- [29] A.-u. Rahman, *Studies in Natural Products*, vol. 38, Great Britain: Elsevier, 2012, p. 385.
- [30] K. Svoboda, S. Smolenski and A. D. Kinghorn, "Indole Alkalamines from Tachigali Paniculata," *Journal of Natural Products*, vol. 42, no. 3, pp. 307-308, 1979.

- [31] L. d. S. Fialho, V. M. Guimaraes, C. M. Callegari, A. P. Reis, D. S. Barbosa, E. E. d. L. Borges, M. A. Moreira y S. T. d. Rezende, «Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds,» *Phytochemistry*, vol. 69, nº 14, pp. 2579-2585, 2013.
- [32] K. Svoboda, S. Smolenski y D. Kinghorn, «Indole Alkylamines from *Tachigali paniculata*,» *Journal of Natural Products*, vol. 42, nº 3, pp. 307-308, 1979.
- [33] S. Dias, J. Maia, Z. Ferreira y O. Gottlieb, «Indolylacetic acid from *Tachigali paniculata*,» *Acta amazonica*, vol. 12, nº 4, pp. 805-807, 1982.
- [34] J. Buckingham, V. Ranjit y N. Munasinghe, Dictionary of Flavonoids, Florida: CRC Press, 2015, p. 359.
- [35] G. Cioffi, M. D'Auria, A. Braca, J. Mendez, A. Castillo, I. Morelli, F. De Simone y N. De Tommasi, «Antioxidant and free-radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*,» *Natural Products*, vol. 65, nº 11, pp. 1526-1529, 2002.
- [36] V. Alvino, Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios Presentes en la Especie *Tachigali paniculata*, Caracas: Tesis-Universidad Central de Venezuela, 2016.
- [37] G. d. P. M. Afines, «REUNIÓN DE CANCÚN,» PNUMA, Cancún, 2002.
- [38] «Stains for Developing TLC Plates,» [En línea]. Available: http://www.chemistry.mcmaster.ca/adronov/resources/Stains_for_Developing_TLC_Plates.pdf. [Último acceso: 15 Julio 2017].
- [39] H. Wagner y S. Bladt, Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, Berlin: Springer, 2001.
- [40] H. Jork, W. Funk, W. Fischer y H. Wimmer, Thin-Layer Chromatography reagents and detection methods, vol. 1. Physical and Chemical Detection Methods, New York: VCH, 1990.

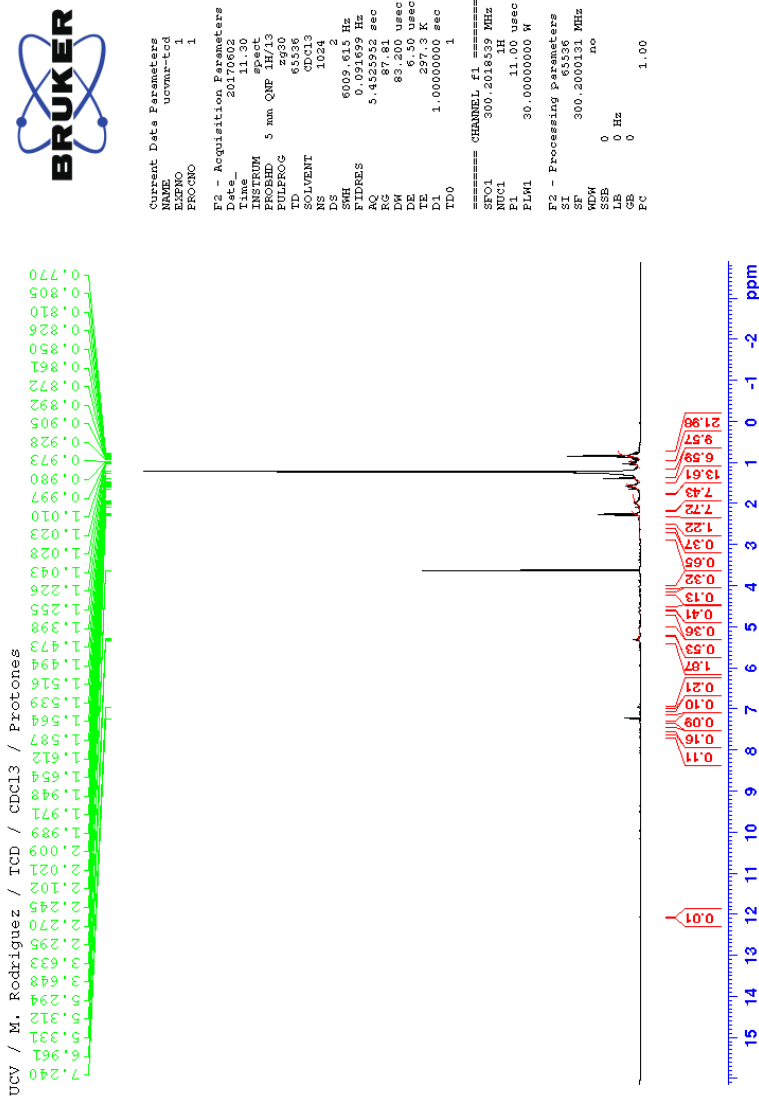
- [41] M. Cardoso Vieira, R. C. Costa Lelis, B. Couto da Silva y G. de Lima Oliveira, «Tannin Extraction from the Bark of *Pinus oocarpa* var. *oocarpa* with Sodium Carbonate and Sodium Bisulfite,» *Floresta e ambiente*, vol. 18, nº 1, pp. 1-8, 2011.
- [42] H. T. Khor, «Removal of chlorophyll pigments from plant neutral lipids,» *Journal of Chromatography*, vol. 179, pp. 225-226, 1979.
- [43] M. B. B. R. J. L. M. GIUSEPPE SAVONA, «Triterpenoides de *Salvia deserta*,» *Phytochemistry*, vol. 26, nº 12, pp. 3305-3308, 1987.
- [44] F. Ahmad, L. Misra, R. Tewari y M. Darokar, «Isolation and HPLC profiling of chemical constituents of *Saraca asoca* stem bark,» Marzo 2016. [En línea]. Available: https://www.researchgate.net/publication/301581531_Isolation_and_HPLC_profiling_of_chemical_constituents_of_Saraca_asoca_stem_bark. [Último acceso: 28 Julio 2017].
- [45] K. Mora, AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA ESPECIE *Pterocarpus santalinus*. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA, Caracas: Tesis-Universidad Central de Venezuela, 2005.
- [46] A. Puma Araujo, Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae), Quito: Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas., 2013.
- [47] «Enciclopedia Británica,» 20 marzo 2015. [En línea]. Available: <http://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Fabaceae-2021803>. [Último acceso: 30 marzo 2016].

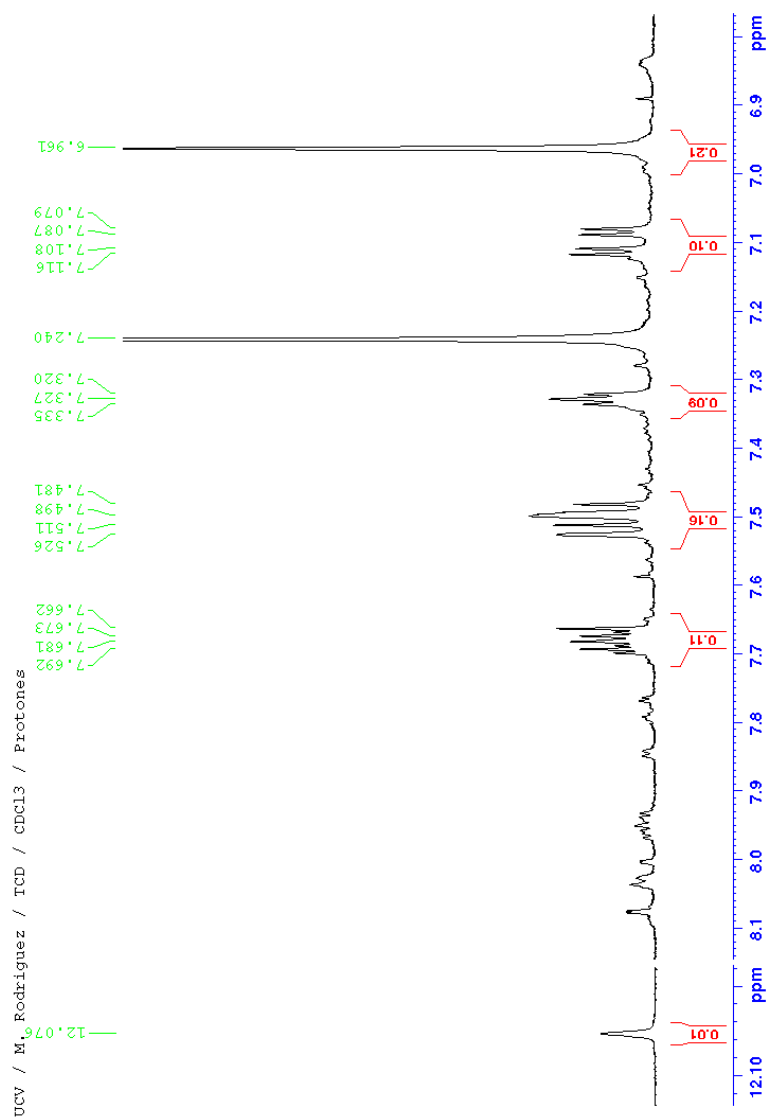
- [48] J. Harborne, «Phytochemistry of the Leguminosae,» de *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, vol. I, Cambridge, Chapman & Hall, 1994, pp. xx-xxiii.
- [49] P. M. Hrishna, Rao KNV, Sandhya S y D. Banji, «A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus Sophora, Fabacea,» *Rev. bras. farmacogn.*, vol. 22, nº 5, 2012.
- [50] S. Touqeer, M. Asad Saced y M. Ajaib, «A Review on the Phytochemistry and Pharmacology of Genus Tephrosia,» *Phytopharmacology*, vol. 4, nº 3, pp. 598-637, 2013.
- [51] J. X. de Araújo-Júnior, M. S. de Oliveira, P. G. V. Aquino, M. S. Alexandre-Moreira y A. E. G. Sant'Ana, «InTech,» 21 March 2012. [En línea]. [Último acceso: 10 March 2016].
- [52] K. J. Young, *The Green World*, Chelsea Horse Publisher.
- [53] *Diccionario Terminológico de Ciencias médicas*, 12 ed., Mallorca: Salvat Editores S.A., 1990, p. 316.

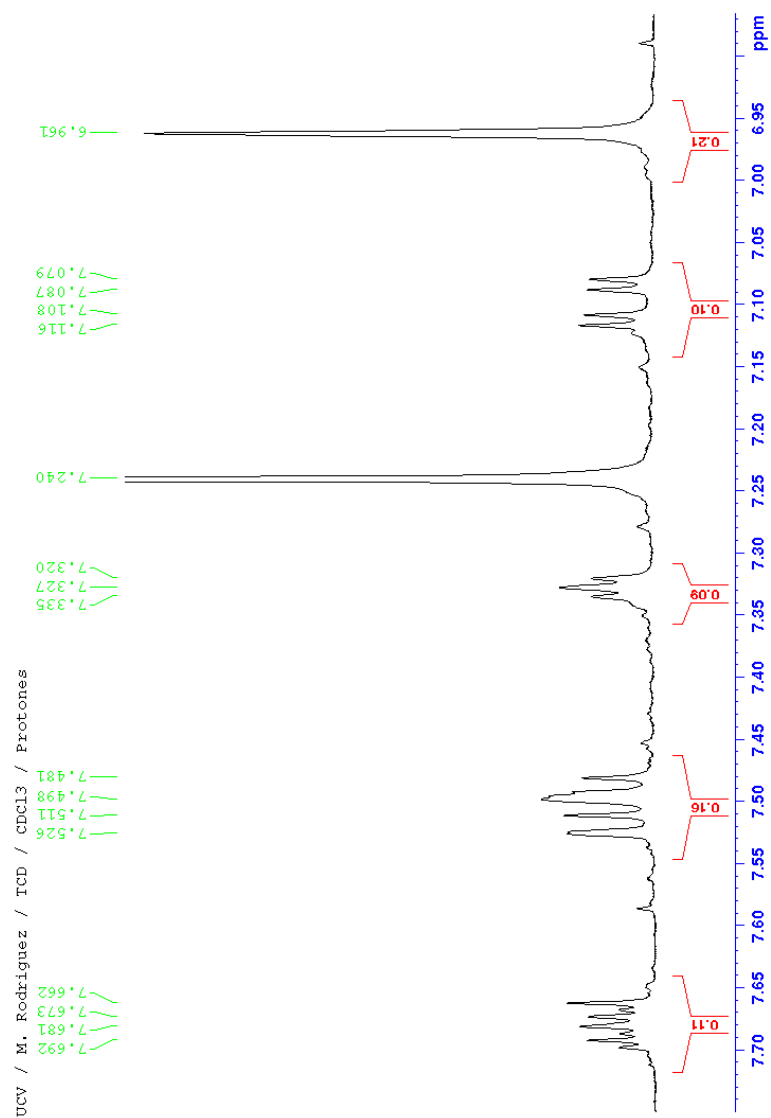
ANEXOS

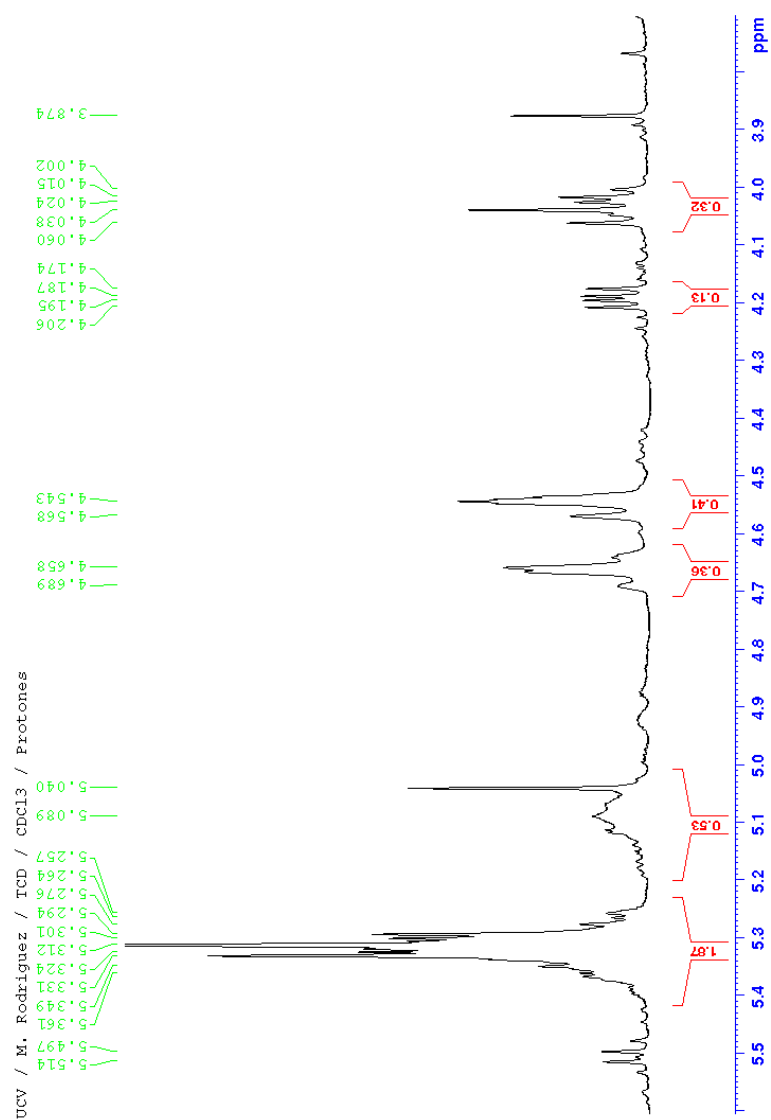


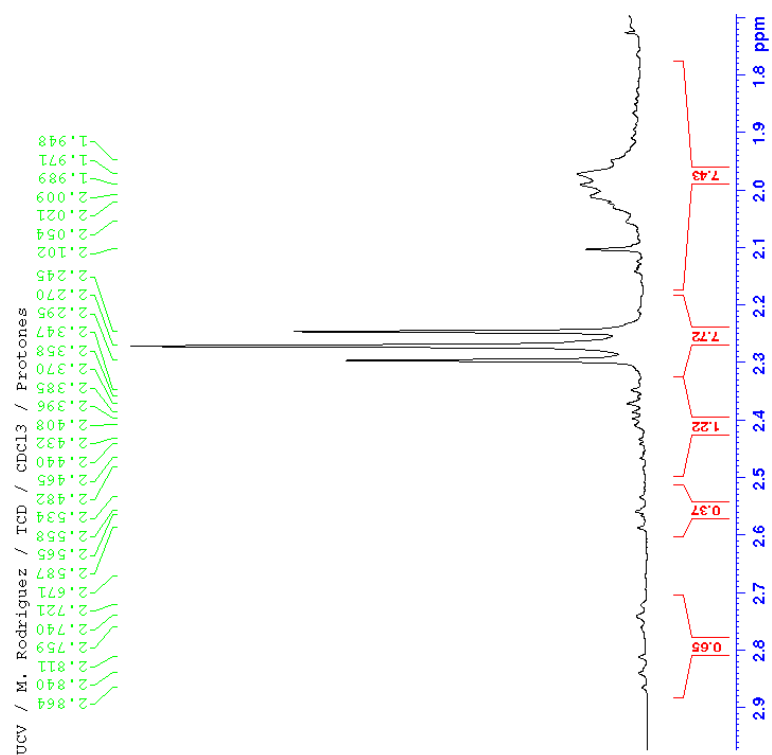
Anexo 1. Espectros de RMN ¹H y ¹³C de la Fracción Tch-C₁.

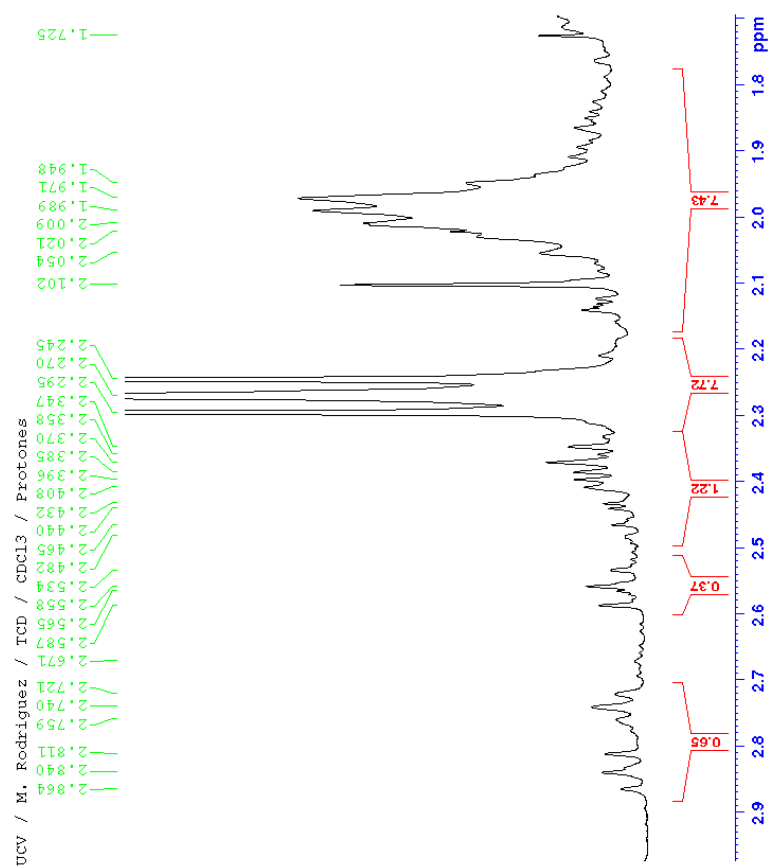


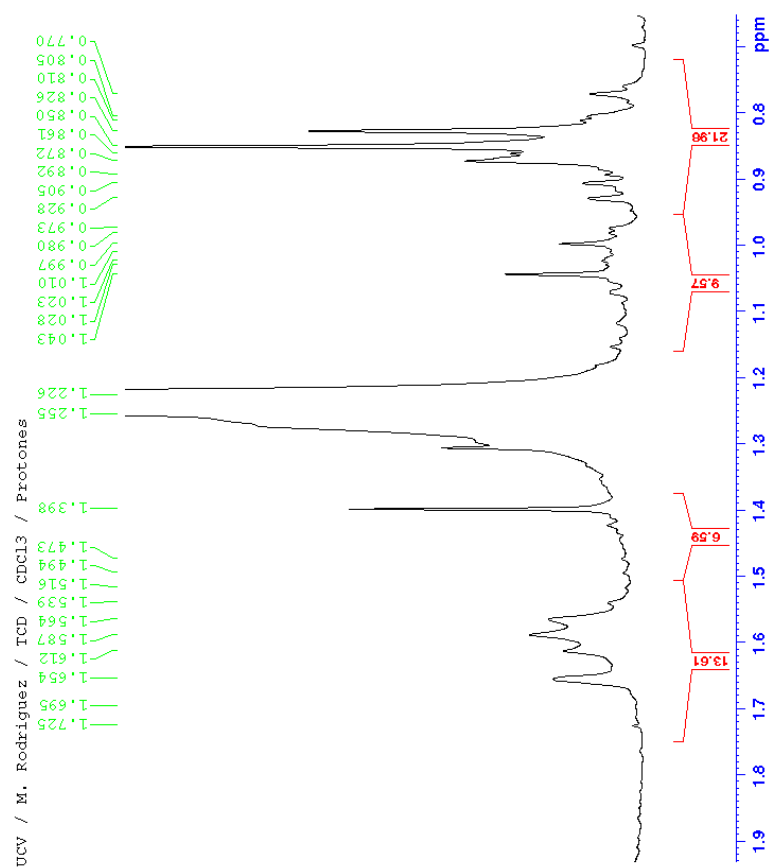












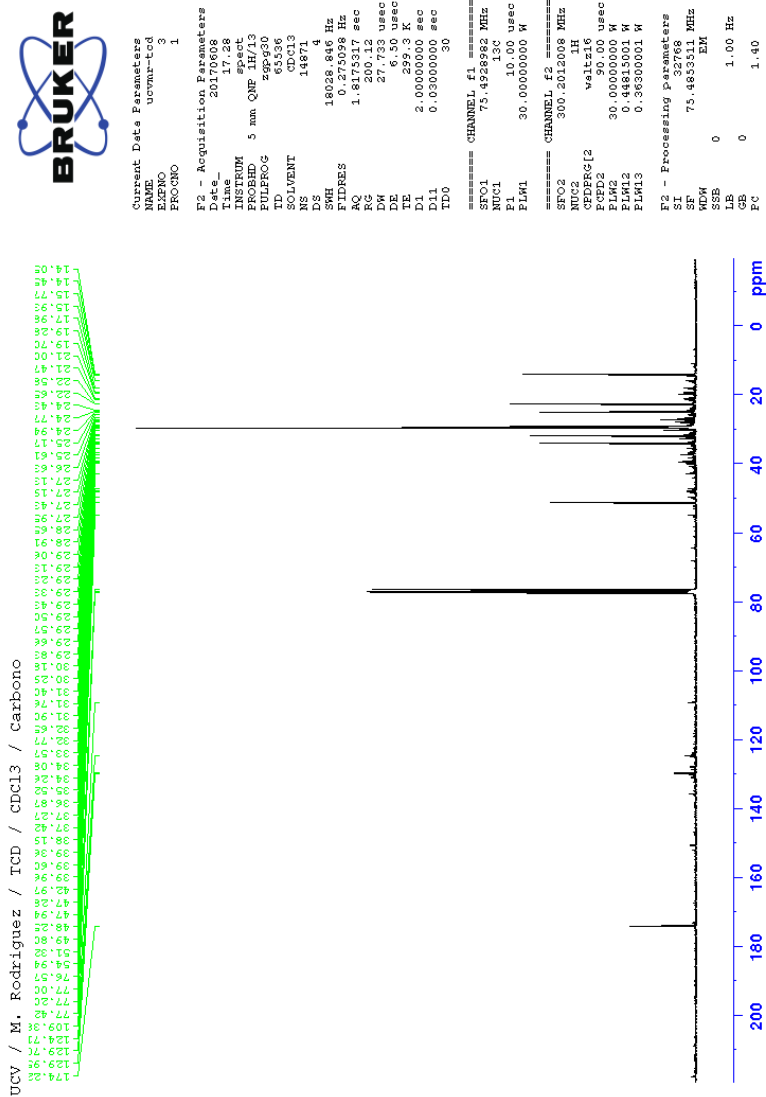
Peak	v(F1) [ppm]	v(F1) [Hz]	Intensity [rel]
1	12.0764	3625.3354	0.01
2	10.1666	3052.0135	0.01
3	9.5109	2855.1723	0.00
4	7.6920	2309.1385	0.01
5	7.6809	2305.8063	0.01
6	7.6730	2303.4347	0.01
7	7.6619	2300.1025	0.01
8	7.5255	2259.1552	0.01
9	7.5108	2254.7423	0.01
10	7.4978	2250.8397	0.02
11	7.4806	2245.6762	0.01
12	7.3345	2201.8170	0.01
13	7.3272	2199.6255	0.01
14	7.3200	2197.4641	0.01
15	7.2399	2173.4181	0.47
16	7.1160	2136.2233	0.01
17	7.1077	2133.7316	0.01
18	7.0874	2127.6376	0.01
19	7.0790	2125.1159	0.01
20	6.9613	2089.7824	0.09
21	5.5139	1655.2729	0.01
22	5.4965	1650.0494	0.01
23	5.3605	1609.2222	0.02
24	5.3488	1605.7098	0.03
25	5.3305	1600.2162	0.11
26	5.3239	1598.2348	0.07
27	5.3121	1594.6925	0.20
28	5.3005	1591.2102	0.07
29	5.2935	1589.1088	0.07

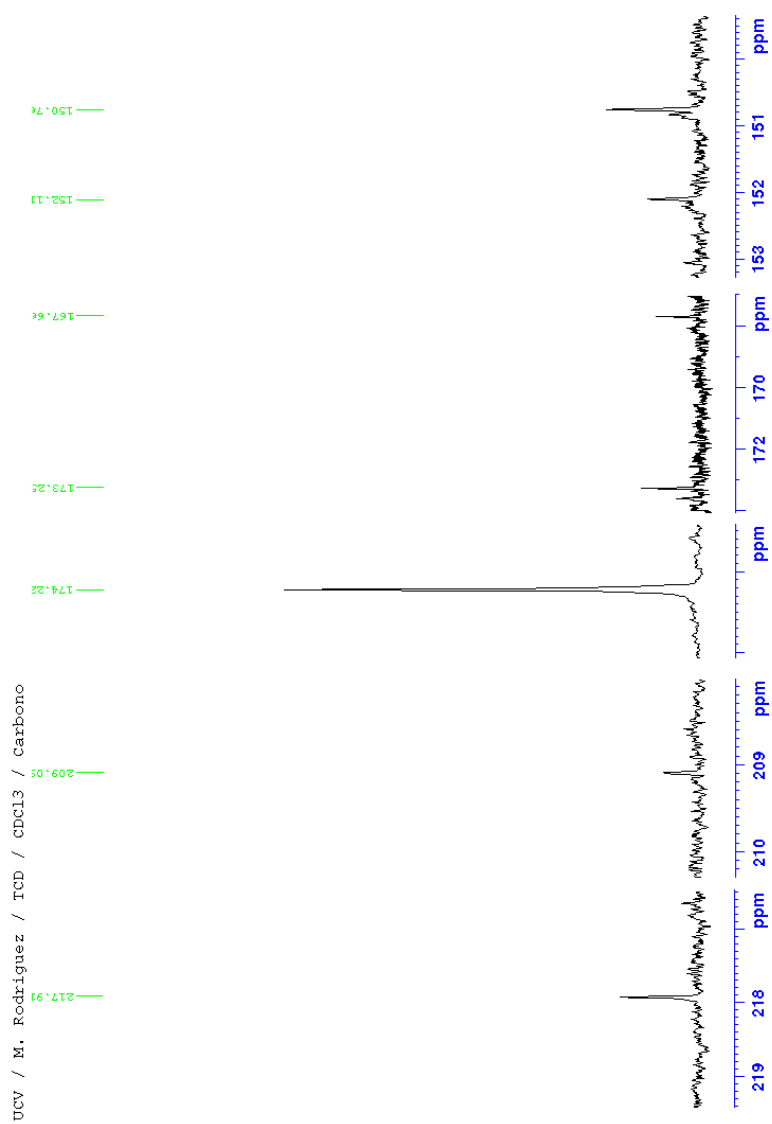
30	5.2756	1583.7352	0.02
31	5.2641	1580.2829	0.01
32	5.2568	1578.0914	0.01
33	5.0887	1527.6278	0.01
34	5.0401	1513.0381	0.06
35	4.6894	1407.7579	0.01
36	4.6579	1398.3016	0.04
37	4.5684	1371.4337	0.02
38	4.5430	1363.8087	0.05
39	4.2063	1262.7313	0.02
40	4.1945	1259.1890	0.02
41	4.1873	1257.0275	0.02
42	4.1744	1253.1549	0.02
43	4.0604	1218.9321	0.02
44	4.0378	1212.1476	0.05
45	4.0242	1208.0649	0.02
46	4.0153	1205.3931	0.02
47	4.0021	1201.4305	0.01
48	3.8744	1163.0949	0.03
49	3.6478	1095.0696	0.11
50	3.6327	1090.5366	6.58
51	3.5691	1071.4439	0.02
52	3.3862	1016.5373	0.03
53	3.2925	988.4085	0.01
54	3.1165	935.5733	0.01
55	3.0078	902.9416	0.01
56	2.9892	897.3579	0.01
57	2.8642	859.8329	0.01
58	2.8396	852.4480	0.02
59	2.8111	843.8923	0.02

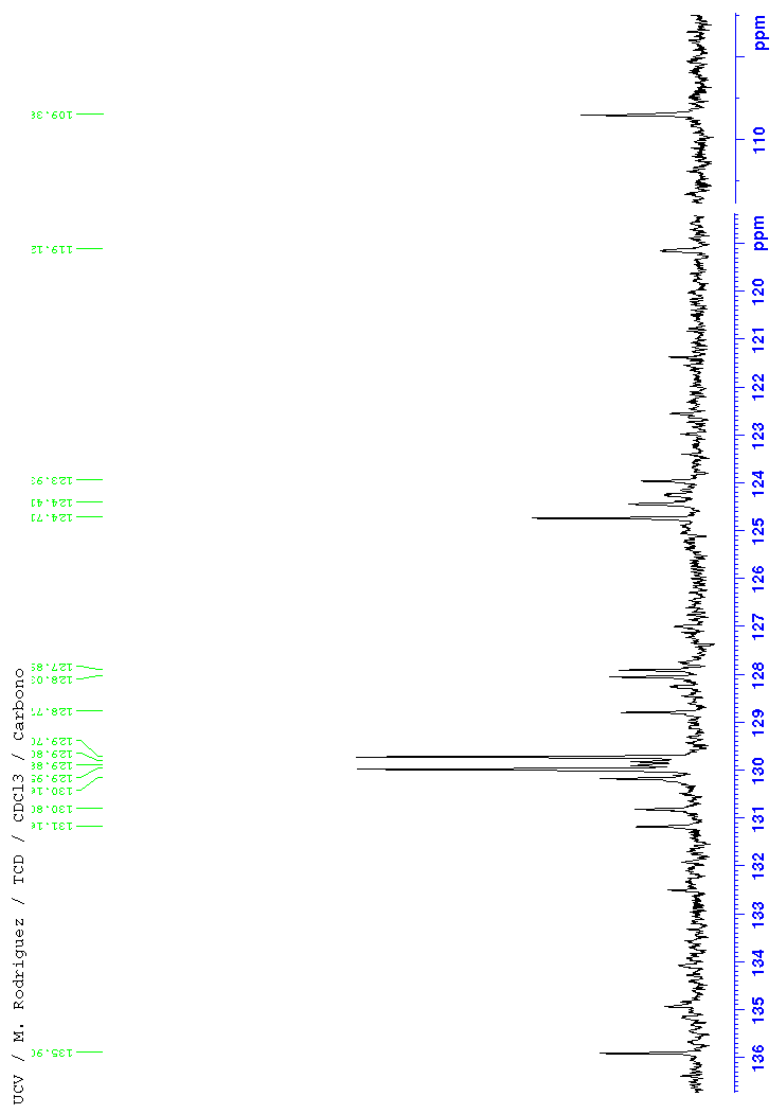
60	2.7591	828.2819	0.02
61	2.7402	822.6081	0.03
62	2.7210	816.8442	0.02
63	2.6712	801.8943	0.01
64	2.5865	776.4673	0.02
65	2.5651	770.0431	0.01
66	2.5577	767.8216	0.03
67	2.5337	760.6168	0.02
68	2.4816	744.9764	0.01
69	2.4647	739.9030	0.02
70	2.4401	732.5181	0.02
71	2.4324	730.2065	0.02
72	2.4078	722.8216	0.03
73	2.3961	719.3093	0.04
74	2.3851	716.0071	0.04
75	2.3703	711.5641	0.05
76	2.3581	707.9017	0.02
77	2.3467	704.4794	0.04
78	2.2950	688.9590	0.75
79	2.2703	681.5441	1.28
80	2.2448	673.8890	0.88
81	2.1020	631.0204	0.15
82	2.0539	616.5808	0.05
83	2.0211	606.7342	0.10
84	2.0085	602.9517	0.14
85	1.9894	597.2179	0.17
86	1.9708	591.6342	0.17
87	1.9480	584.7896	0.09
88	1.7249	517.8150	0.05
89	1.6952	508.8991	0.04

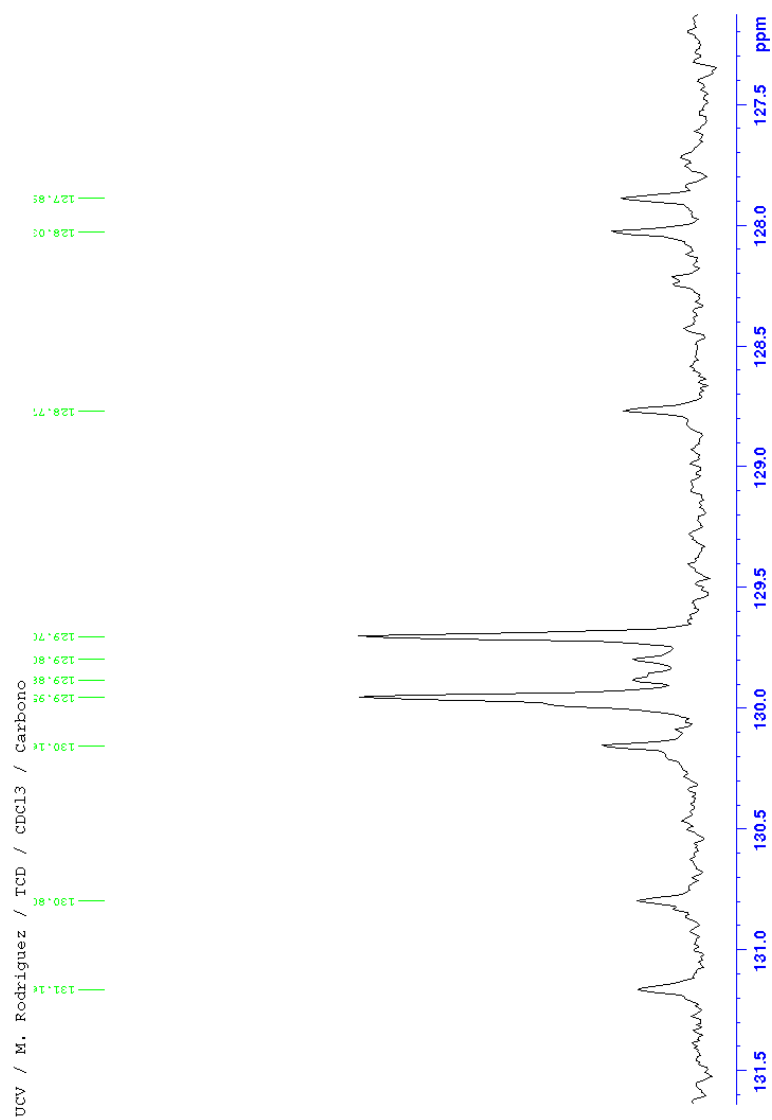
90	1.6544	496.6509	0.35
91	1.6119	483.8924	0.31
92	1.5874	476.5375	0.44
93	1.5640	469.5128	0.37
94	1.5388	461.9478	0.15
95	1.5164	455.2233	0.08
96	1.4940	448.4988	0.09
97	1.4726	442.0745	0.10
98	1.3976	419.5595	1.10
99	1.2553	376.8411	2.10
100	1.2255	367.8951	15.00
101	1.0428	313.0486	0.52
102	1.0281	308.6356	0.15
103	1.0227	307.0146	0.17
104	1.0097	303.1120	0.14
105	0.9968	299.2394	0.32
106	0.9803	294.2861	0.14
107	0.9728	292.0346	0.14
108	0.9278	278.5256	0.22
109	0.9053	271.7711	0.24
110	0.8923	267.8685	0.16
111	0.8717	261.6844	0.67
112	0.8605	258.3221	0.51
113	0.8500	255.1700	2.20
114	0.8263	248.0553	1.25
115	0.8102	243.2221	0.25
116	0.8047	241.5710	0.22
117	0.7703	231.2441	0.21
118	0.6968	209.1794	0.05
119	0.6690	200.8338	0.02

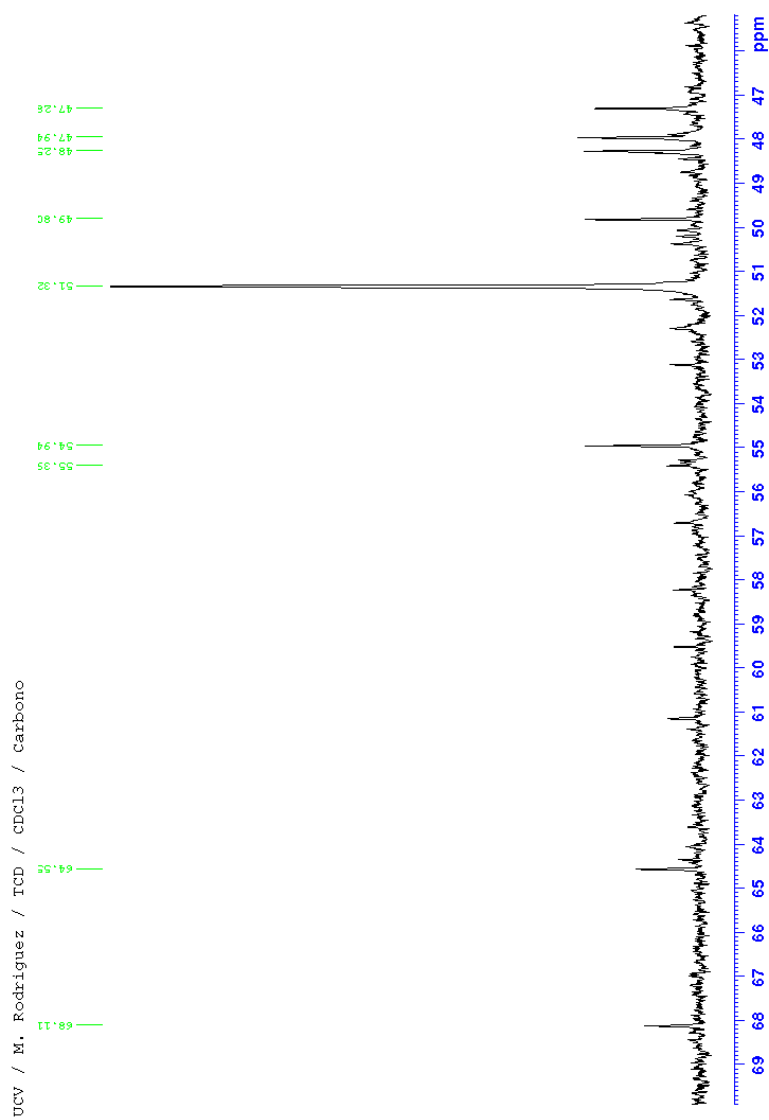
120	0.6507	195.3401	0.04
121	0.6412	192.4882	0.02
122	0.0440	13.2088	0.01

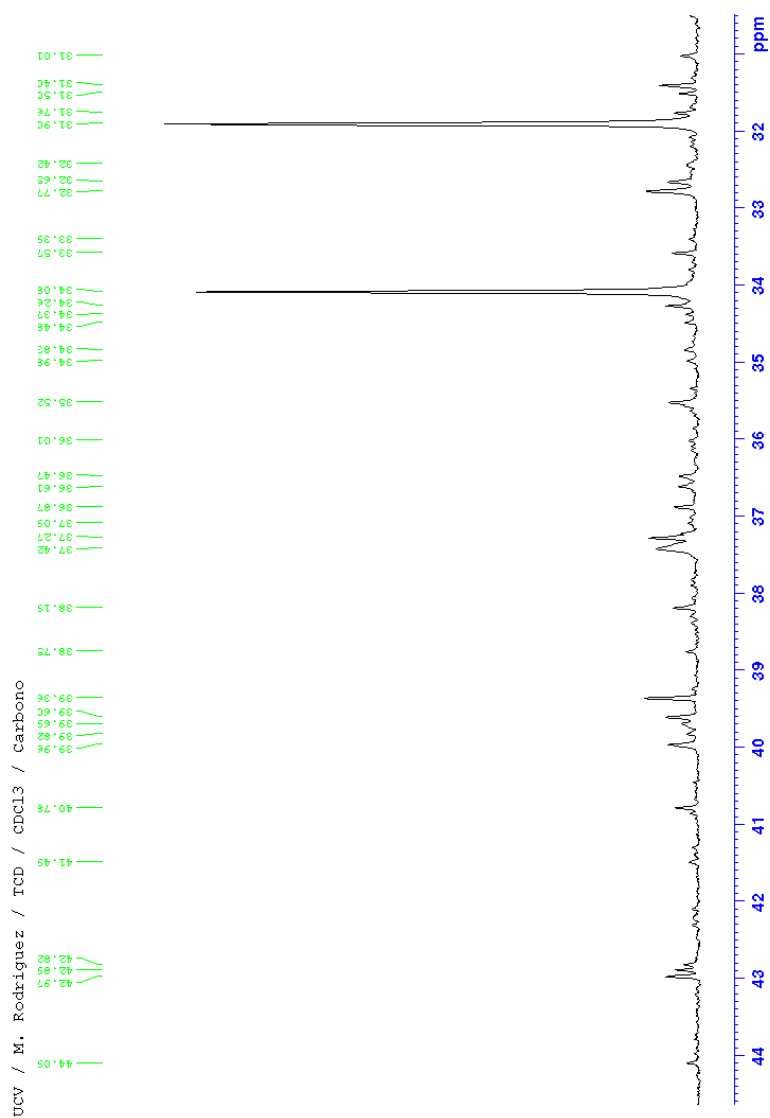


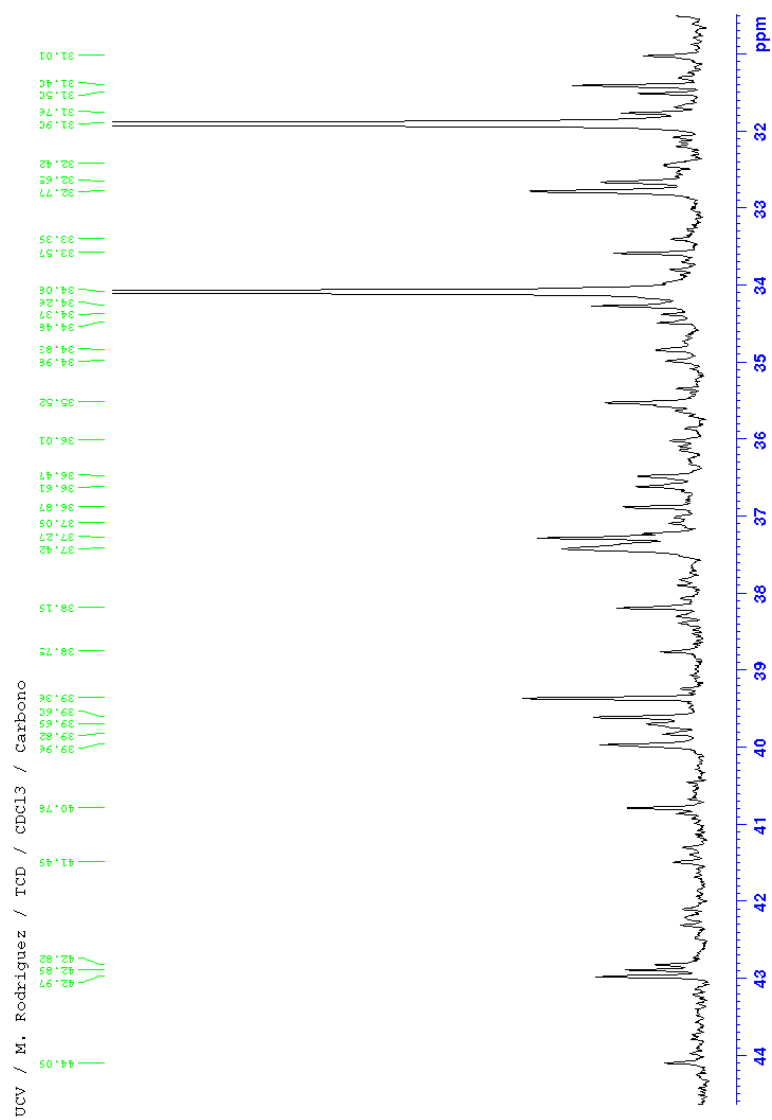


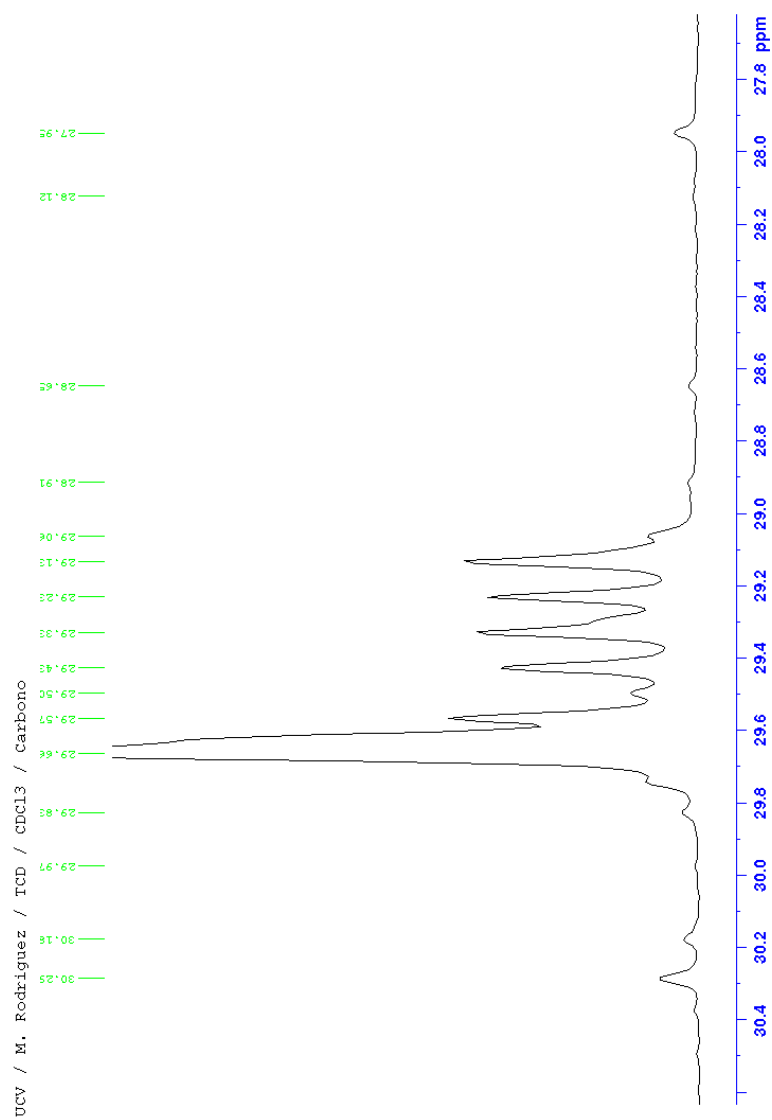


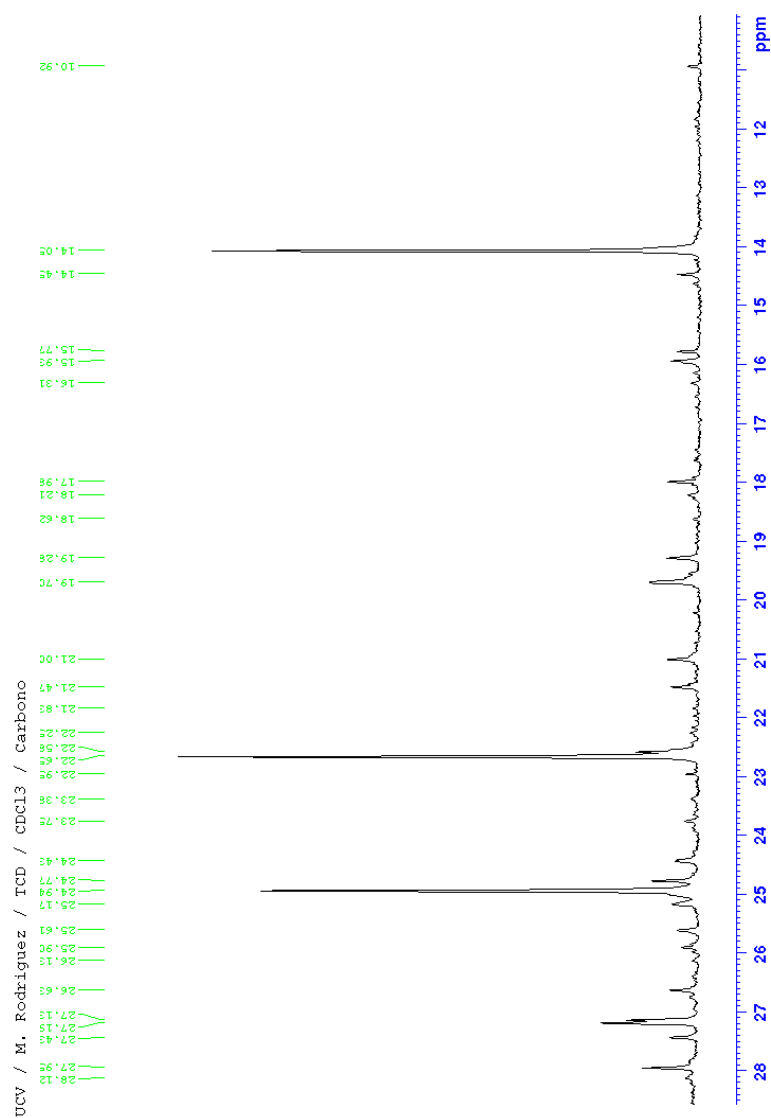












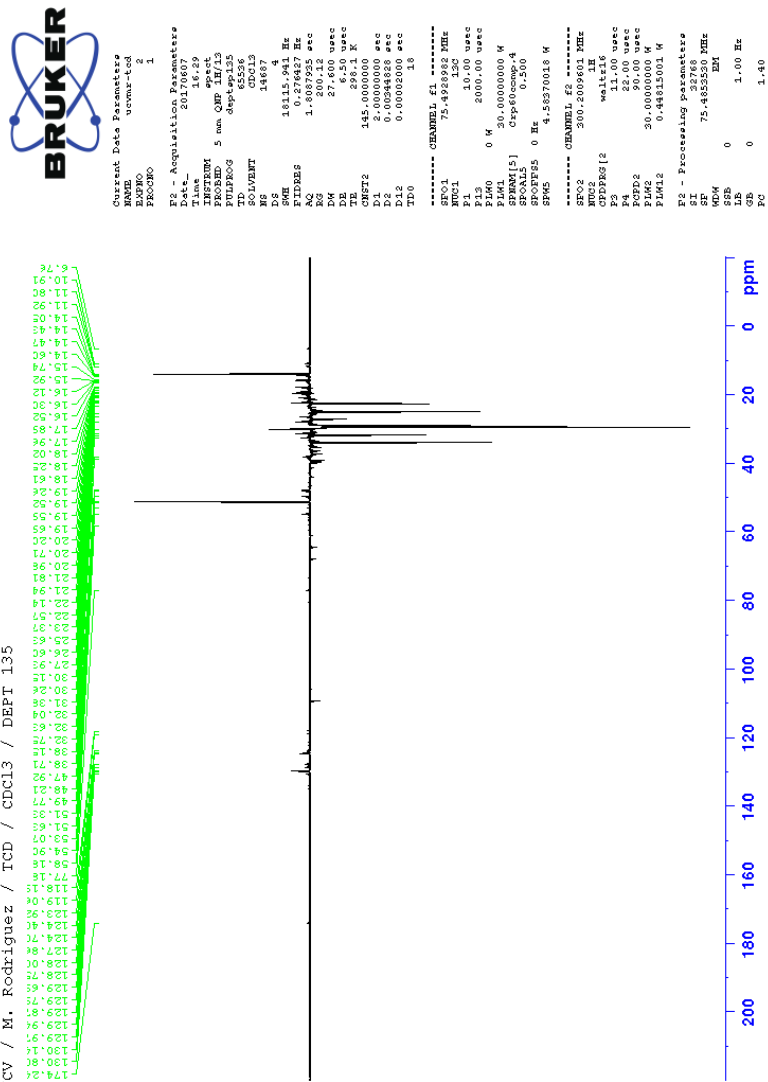
Peak	v(F1) [ppm]	v(F1) [Hz]	Intensity [rel]
1	217.9102	16449.0280	0.13
2	209.0868	15782.9905	0.06
3	174.2225	13151.2466	1.77
4	173.2455	13077.4974	0.10
5	167.6622	12656.0400	0.07
6	152.1081	11481.9333	0.08
7	150.7591	11380.1036	0.15
8	135.8950	10258.0818	0.16
9	131.1635	9900.9228	0.10
10	130.7964	9873.2122	0.11
11	130.1554	9824.8261	0.17
12	129.9542	9809.6384	0.58
13	129.8823	9804.2110	0.11
14	129.7978	9797.8325	0.11
15	129.7026	9790.6463	0.57
16	128.7685	9720.1354	0.13
17	128.0272	9664.1781	0.15
18	127.8892	9653.7612	0.13
19	124.7109	9413.8461	0.28
20	124.4105	9391.1703	0.12
21	123.9306	9354.9449	0.10
22	119.1189	8991.7320	0.06
23	109.3793	8256.5349	0.20
24	77.4187	5843.9777	8.71
25	77.1974	5827.2728	0.48
26	76.9954	5812.0248	8.82
27	76.5721	5780.0719	8.68
28	68.1082	5141.1714	0.10
29	64.5532	4872.8210	0.12

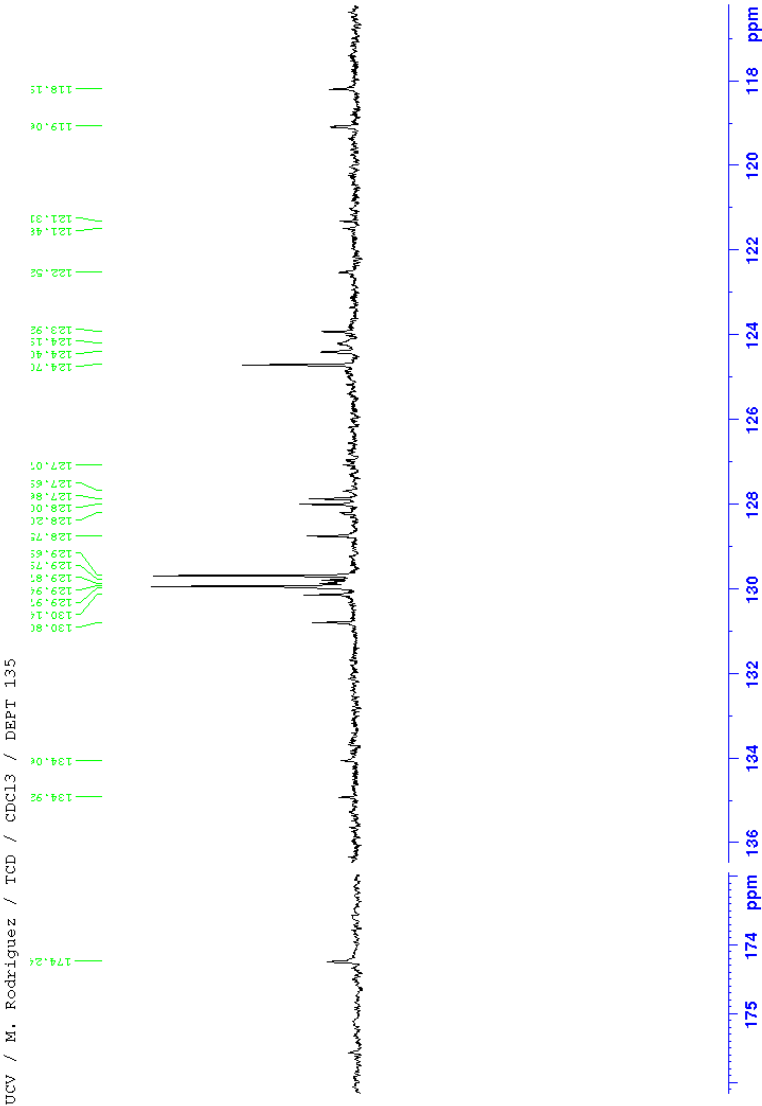
30	55.3914	4181.2393	0.06
31	54.9419	4147.3086	0.22
32	51.3244	3874.2404	3.90
33	49.8000	3759.1705	0.22
34	48.2546	3642.5154	0.22
35	47.9443	3619.0923	0.23
36	47.2841	3569.2569	0.20
37	44.0939	3328.4435	0.09
38	42.9724	3243.7867	0.26
39	42.8866	3237.3101	0.19
40	42.8225	3232.4714	0.11
41	41.4858	3131.5702	0.07
42	40.7817	3078.4209	0.19
43	39.9634	3016.6513	0.25
44	39.8249	3006.1966	0.09
45	39.6900	2996.0136	0.13
46	39.6047	2989.5747	0.26
47	39.3580	2970.9524	0.44
48	38.7518	2925.1932	0.10
49	38.1856	2882.4534	0.21
50	37.4152	2824.2995	0.35
51	37.2746	2813.6863	0.41
52	37.0857	2799.4271	0.08
53	36.8744	2783.4770	0.20
54	36.6106	2763.5640	0.16
55	36.4747	2753.3055	0.16
56	36.0119	2718.3709	0.07
57	35.5177	2681.0661	0.24
58	34.9767	2640.2285	0.08
59	34.8337	2629.4341	0.11

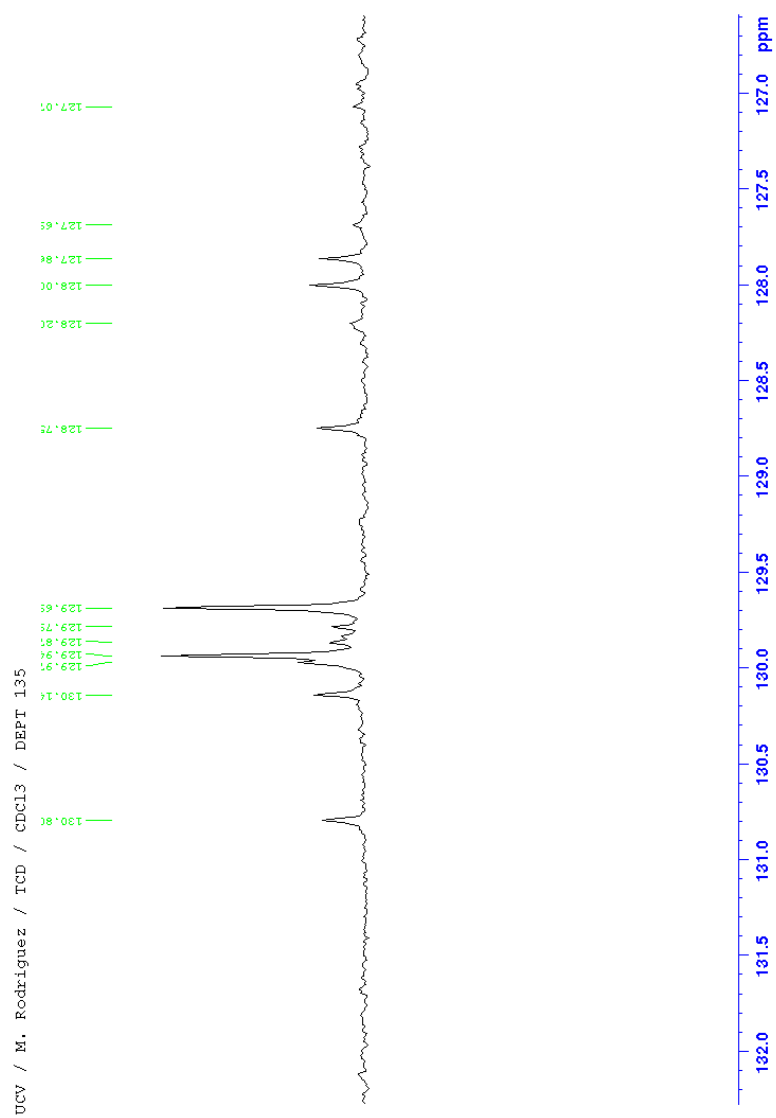
60	34.4815	2602.8481	0.11
61	34.3728	2594.6429	0.10
62	34.2636	2586.3999	0.27
63	34.0777	2572.3671	4.21
64	33.5746	2534.3905	0.22
65	33.3934	2520.7125	0.07
66	32.7714	2473.7606	0.43
67	32.6521	2464.7552	0.25
68	32.4242	2447.5521	0.09
69	31.8993	2407.9299	4.45
70	31.7566	2397.1581	0.20
71	31.5024	2377.9697	0.16
72	31.3986	2370.1343	0.32
73	31.0132	2341.0423	0.14
74	30.2860	2286.1493	0.87
75	30.1775	2277.9592	0.33
76	29.9732	2262.5375	0.10
77	29.8266	2251.4714	0.36
78	29.6638	2239.1824	15.00
79	29.5673	2231.8980	5.34
80	29.4967	2226.5688	1.47
81	29.4265	2221.2697	4.29
82	29.3298	2213.9703	4.76
83	29.2311	2206.5198	4.53
84	29.1332	2199.1298	5.05
85	29.0634	2193.8610	1.10
86	28.9147	2182.6363	0.25
87	28.6476	2162.4741	0.23
88	28.1232	2122.8896	0.13
89	27.9481	2109.6721	0.55

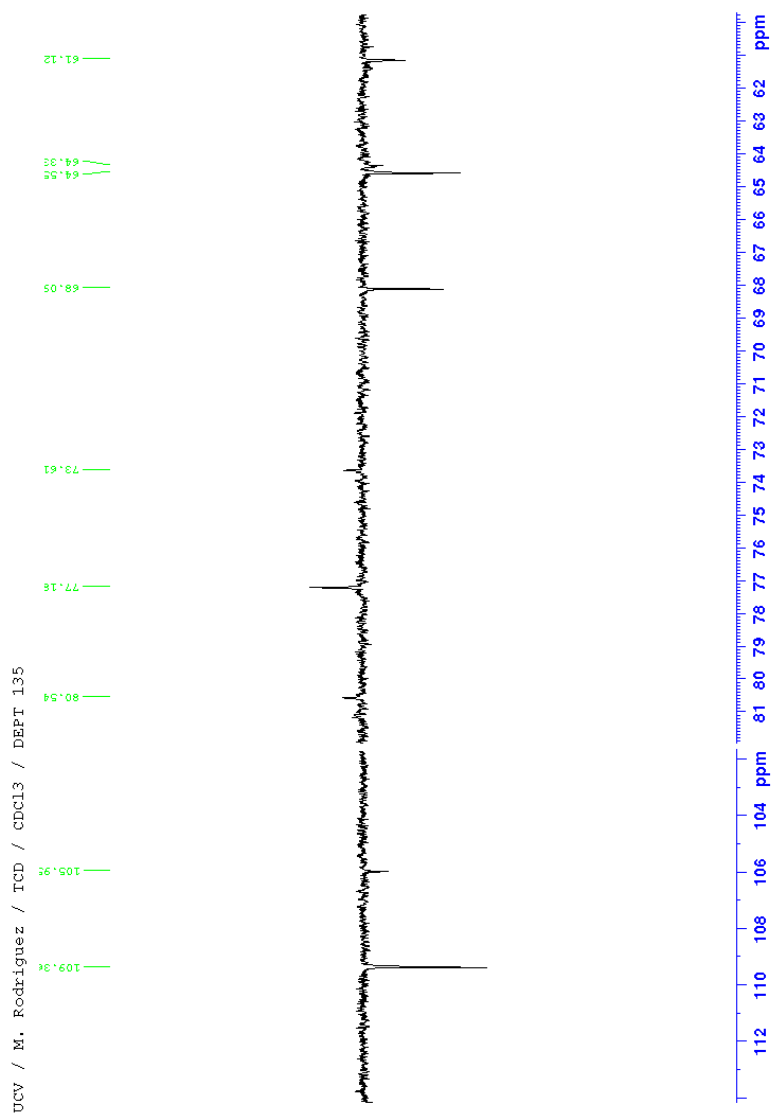
90	27.4305	2070.6009	0.28
91	27.1868	2052.2051	0.95
92	27.1349	2048.2875	0.70
93	26.6264	2009.9032	0.28
94	26.1275	1972.2435	0.07
95	25.8998	1955.0555	0.18
96	25.6067	1932.9307	0.22
97	25.1681	1899.8229	0.26
98	24.9379	1882.4461	4.21
99	24.7680	1869.6212	0.46
100	24.4349	1844.4770	0.23
101	23.7538	1793.0639	0.15
102	23.3801	1764.8551	0.08
103	22.9497	1732.3662	0.13
104	22.6542	1710.0602	5.08
105	22.5777	1704.2856	0.60
106	22.2517	1679.6774	0.09
107	21.8328	1648.0566	0.06
108	21.4712	1620.7611	0.27
109	21.0000	1585.1924	0.31
110	19.6966	1486.8048	0.47
111	19.2795	1455.3198	0.32
112	18.6170	1405.3108	0.06
113	18.2078	1374.4222	0.11
114	17.9790	1357.1511	0.30
115	16.3058	1230.8490	0.09
116	15.9250	1202.1042	0.27
117	15.7659	1190.0945	0.21
118	14.4531	1090.9973	0.22
119	14.0534	1060.8258	4.75

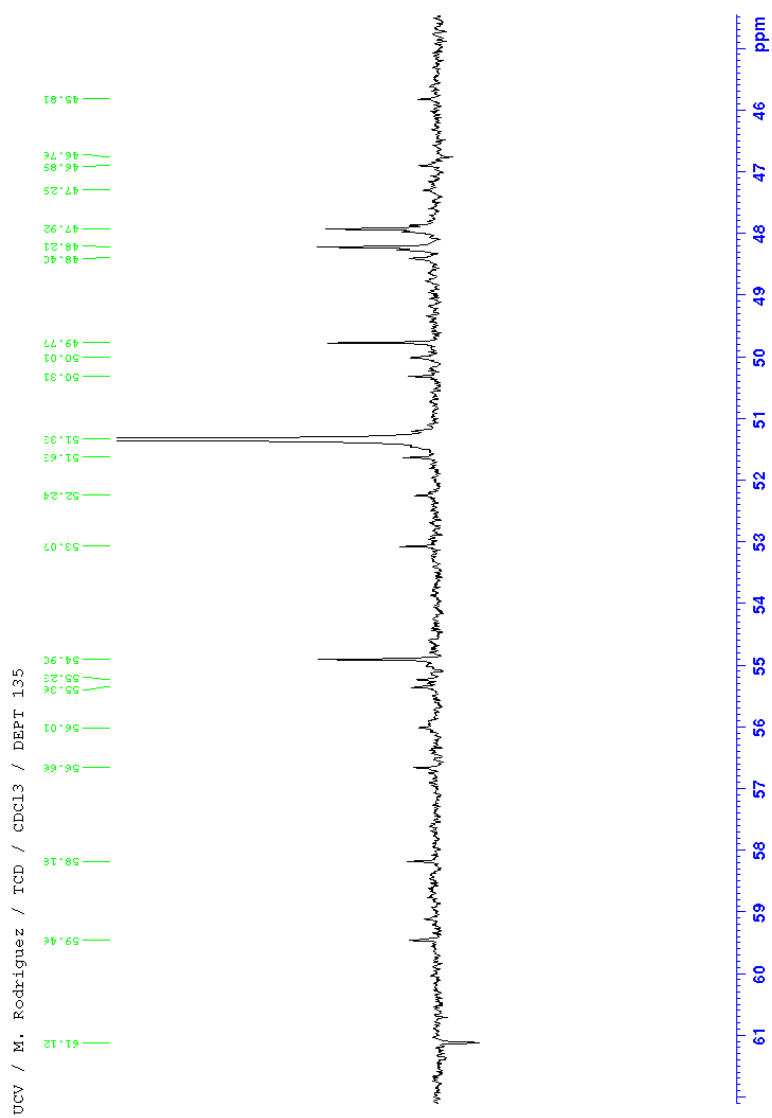
120	10.9181	824.1566	0.11
-----	---------	----------	------

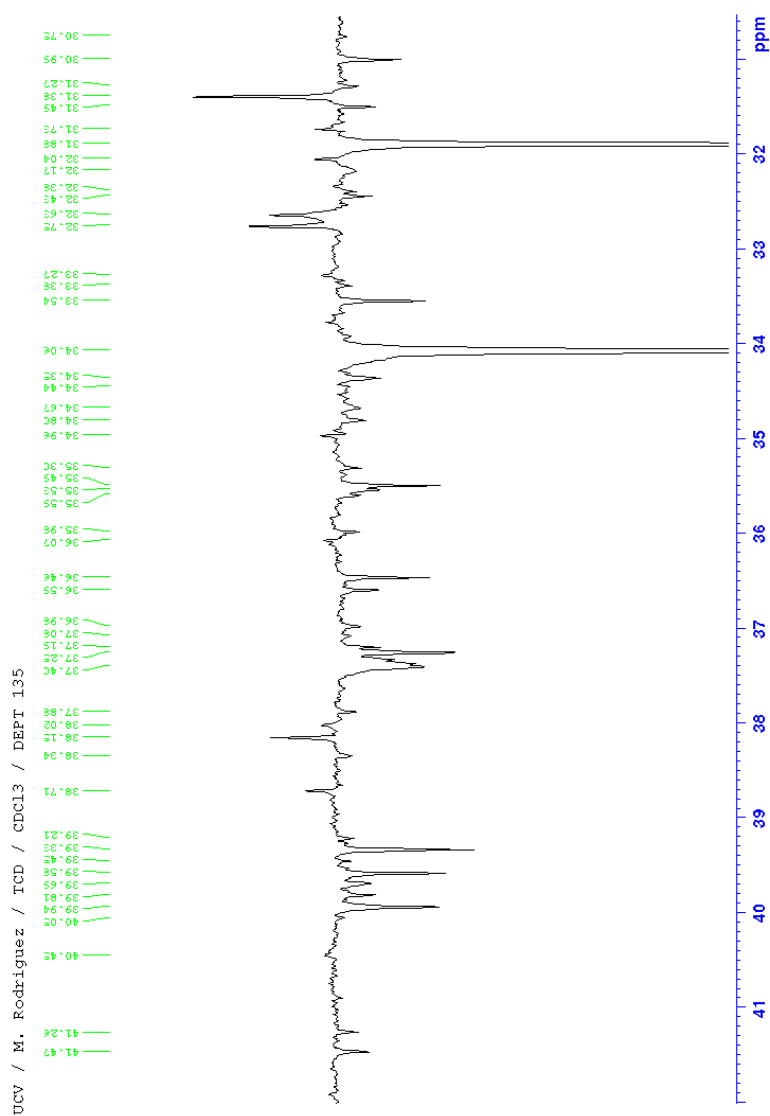


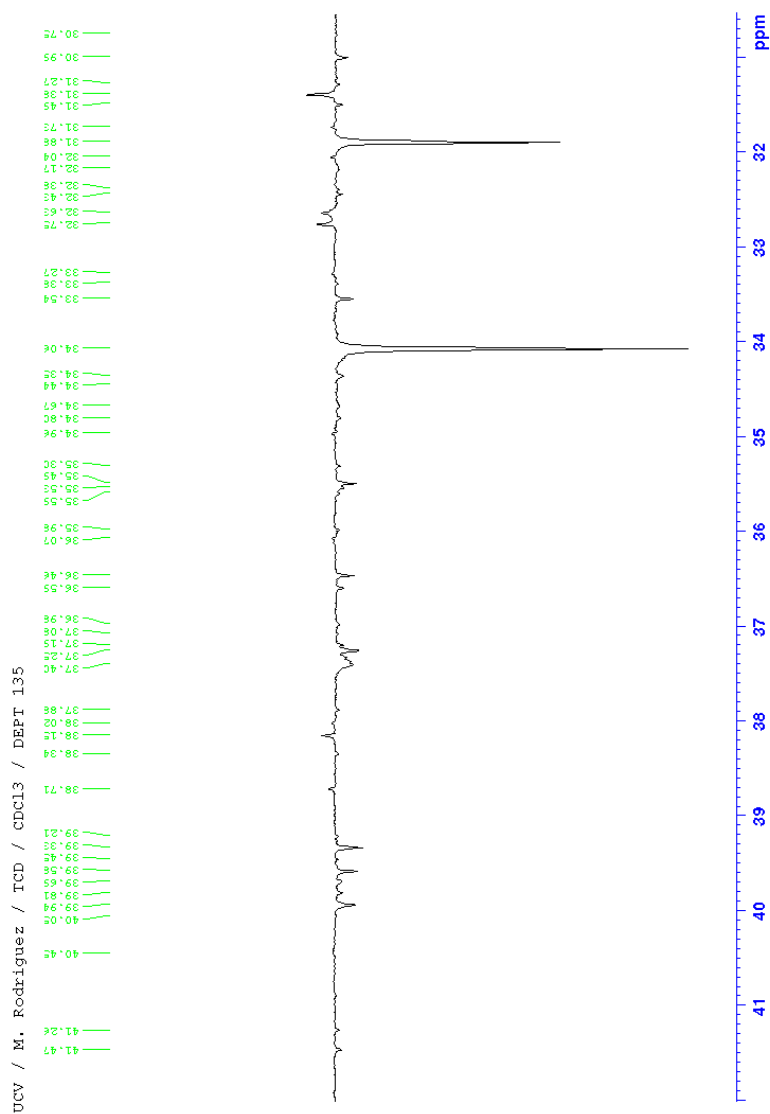


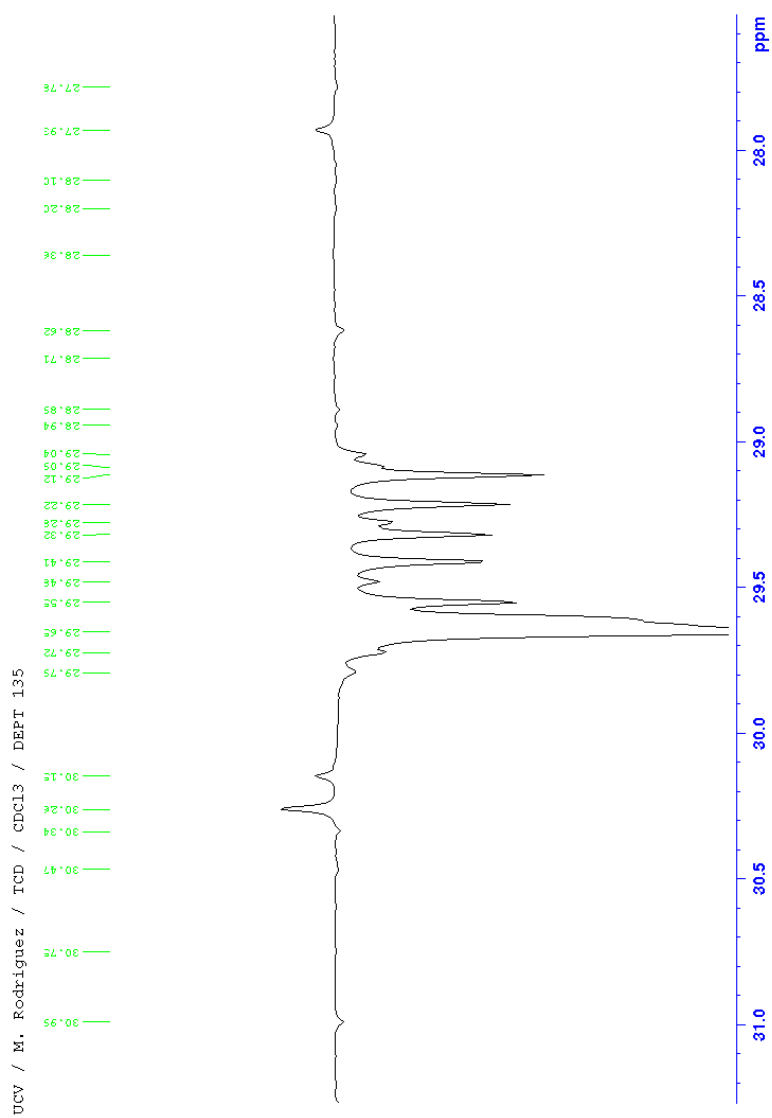


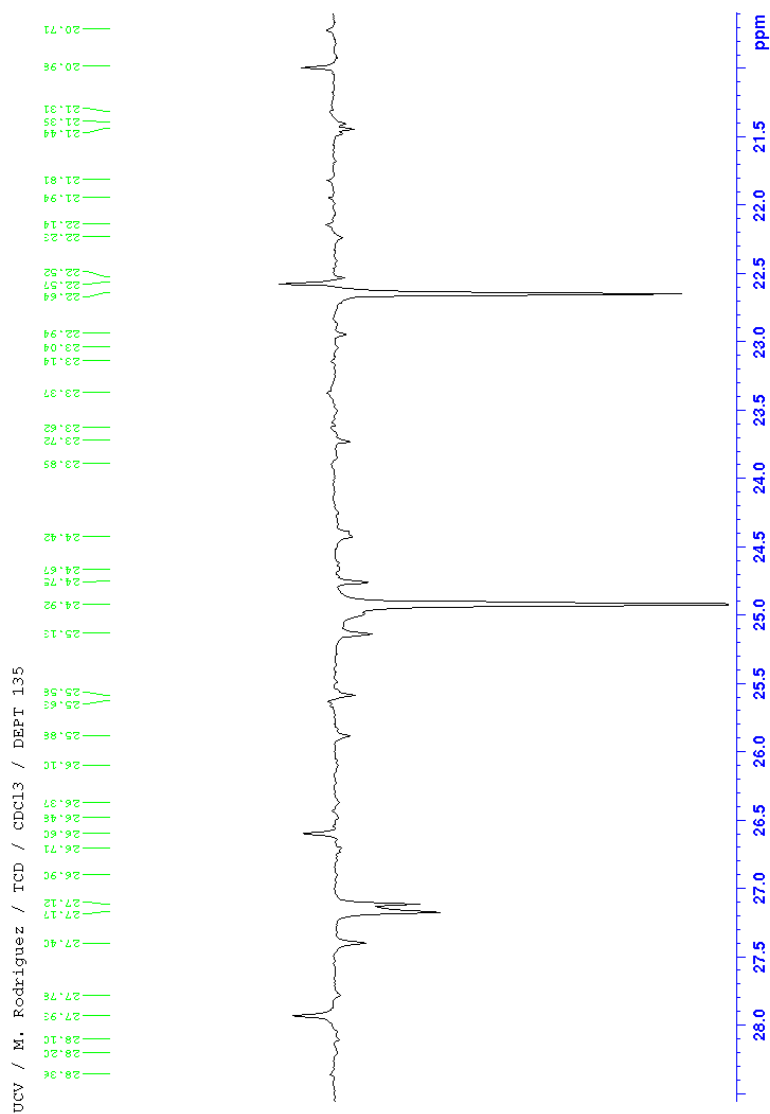


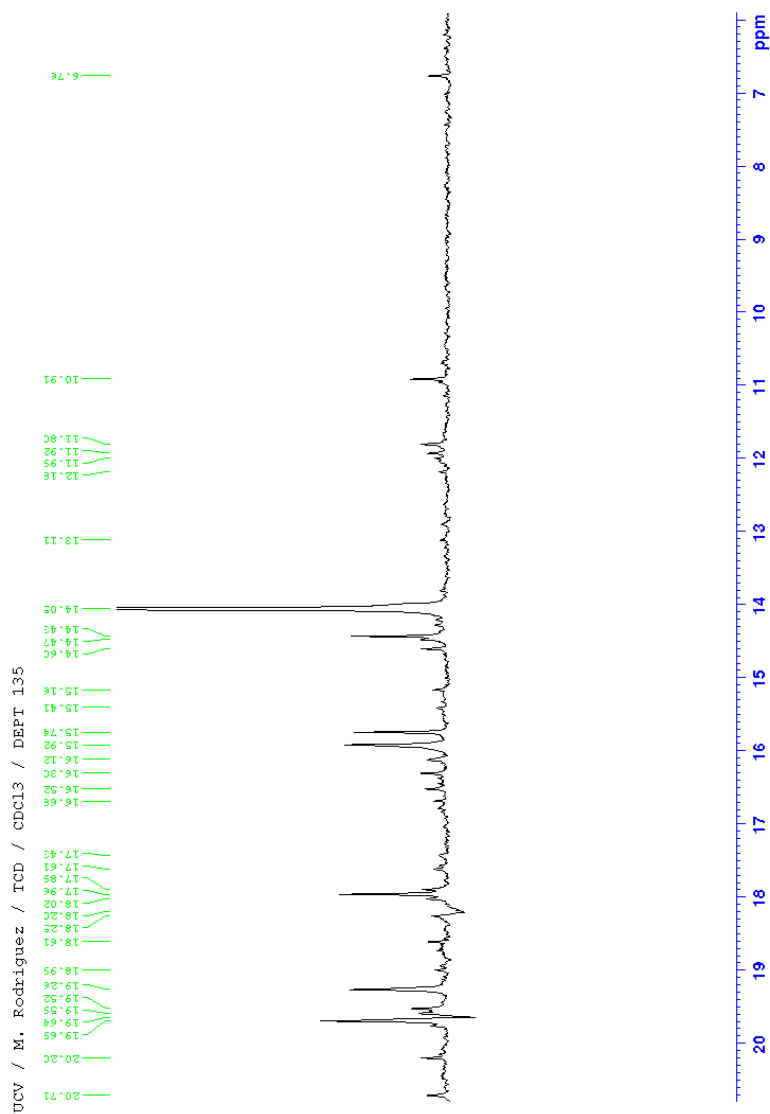












Peak	v(F1) [ppm]	v(F1) [Hz]	Intensity [rel]
1	174.2352	13152.2056	0.11
2	134.9244	10184.8160	0.06
3	134.0596	10119.5362	0.06
4	130.7952	9873.1218	0.16
5	130.1414	9823.7695	0.18
6	129.9723	9811.0049	0.24
7	129.9374	9808.3705	0.72
8	129.8675	9803.0941	0.13
9	129.7857	9796.9194	0.13
10	129.6868	9789.4539	0.72
11	128.7487	9718.6411	0.17
12	128.2028	9677.4336	0.06
13	128.0025	9662.3139	0.20
14	127.8642	9651.8743	0.17
15	127.6880	9638.5738	0.05
16	127.0707	9591.9766	0.05
17	124.7040	9413.3255	0.42
18	124.3972	9390.1666	0.13
19	124.1906	9374.5713	0.07
20	123.9165	9353.8807	0.12
21	122.5154	9248.1182	0.06
22	121.4792	9169.9003	0.05
23	121.3064	9156.8564	0.06
24	119.0629	8987.5050	0.10
25	118.1855	8921.2742	0.10
26	109.3615	8255.1914	-0.38
27	105.9496	7997.6430	-0.07
28	80.5442	6079.9074	0.06
29	77.1810	5826.0350	0.15

30	73.6131	5556.7108	0.06
31	68.0864	5139.5259	-0.21
32	64.5496	4872.5493	-0.26
33	64.3264	4855.7010	-0.05
34	61.1213	4613.7629	-0.11
35	59.4576	4488.1779	0.08
36	58.1798	4391.7227	0.09
37	56.6607	4277.0529	0.06
38	56.0141	4228.2441	0.05
39	55.3576	4178.6880	0.07
40	55.2347	4169.4108	0.06
41	54.9026	4144.3421	0.32
42	53.0709	4006.0756	0.10
43	52.2423	3943.5285	0.06
44	51.6288	3897.2182	0.09
45	51.3318	3874.7990	7.27
46	50.3125	3797.8568	0.08
47	50.0102	3775.0376	0.07
48	49.7668	3756.6645	0.30
49	48.4006	3653.5364	0.08
50	48.2146	3639.4961	0.33
51	47.9208	3617.3185	0.30
52	47.2903	3569.7250	0.04
53	46.8913	3539.6063	0.05
54	46.7552	3529.3328	-0.04
55	45.8133	3458.2331	0.05
56	44.0825	3327.5831	-0.16
57	43.7678	3303.8278	-0.05
58	42.7737	3228.7878	0.07
59	41.4682	3130.2417	-0.14

60	41.2604	3114.5559	-0.10
61	40.4507	3053.4354	0.04
62	40.0518	3023.3243	-0.04
63	39.9370	3014.6585	-0.42
64	39.8093	3005.0191	-0.16
65	39.6886	2995.9080	-0.15
66	39.5806	2987.7556	-0.44
67	39.4537	2978.1765	-0.07
68	39.3329	2969.0578	-0.56
69	39.2116	2959.9015	-0.08
70	38.7118	2922.1739	0.12
71	38.3417	2894.2368	-0.07
72	38.1481	2879.6228	0.27
73	38.0183	2869.8248	0.05
74	37.8789	2859.3021	-0.09
75	37.4001	2823.1598	-0.36
76	37.2477	2811.6558	-0.50
77	37.1930	2807.5267	-0.18
78	37.0769	2798.7629	-0.06
79	36.9758	2791.1313	-0.10
80	36.5896	2761.9789	-0.18
81	36.4585	2752.0827	-0.39
82	36.0653	2722.4019	0.04
83	35.9766	2715.7064	-0.10
84	35.5909	2686.5916	-0.11
85	35.5327	2682.1984	-0.18
86	35.4868	2678.7336	-0.42
87	35.3032	2664.8745	-0.11
88	34.9611	2639.0510	0.06
89	34.7990	2626.8148	-0.12

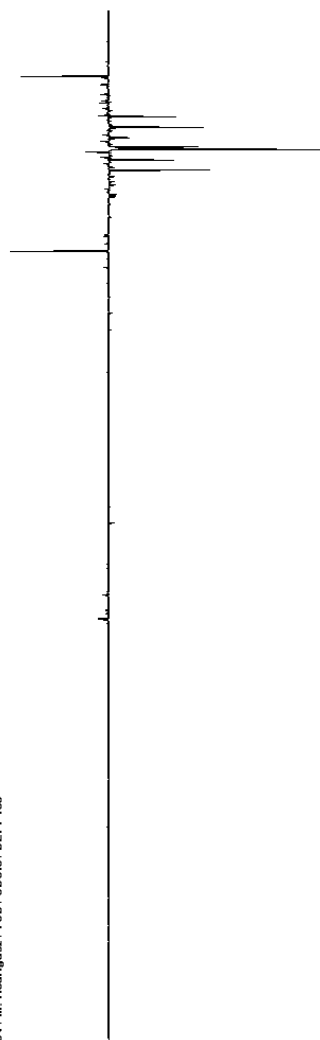
90	34.6689	2616.9942	-0.10
91	34.4405	2599.7533	-0.06
92	34.3526	2593.1181	-0.19
93	34.0638	2571.3180	-7.15
94	33.5387	2531.6806	-0.36
95	33.3779	2519.5426	-0.07
96	33.2686	2511.2920	0.05
97	32.7509	2472.2132	0.36
98	32.6314	2463.1927	0.26
99	32.4313	2448.0881	-0.15
100	32.3831	2444.4497	-0.09
101	32.1691	2428.2959	-0.09
102	32.0404	2418.5809	0.09
103	31.8836	2406.7448	-4.50
104	31.7281	2395.0068	0.08
105	31.4862	2376.7469	-0.16
106	31.3817	2368.8587	0.59
107	31.2702	2360.4421	-0.10
108	30.9901	2339.2986	-0.26
109	30.7496	2321.1444	-0.05
110	30.4668	2299.7972	-0.12
111	30.3379	2290.0671	-0.16
112	30.2614	2284.2925	1.67
113	30.1485	2275.7702	0.59
114	29.7924	2248.8898	-0.64
115	29.7232	2243.6662	-1.53
116	29.6537	2238.4200	-15.00
117	29.5518	2230.7281	-5.51
118	29.4803	2225.3309	-1.33
119	29.4109	2220.0922	-4.63

120	29.3181	2213.0871	-4.74
121	29.2787	2210.1130	-1.76
122	29.2167	2205.4329	-5.20
123	29.1155	2197.7938	-6.25
124	29.0873	2195.6651	-1.48
125	29.0439	2192.3890	-0.97
126	28.9438	2184.8330	-0.09
127	28.8893	2180.7190	-0.14
128	28.7145	2167.5242	0.06
129	28.6196	2160.3606	-0.27
130	28.3593	2140.7118	0.06
131	28.1996	2128.6568	-0.04
132	28.1029	2121.3573	-0.06
133	27.9310	2108.3814	0.58
134	27.7816	2097.1039	-0.08
135	27.3988	2068.2081	-0.42
136	27.1710	2051.0125	-1.45
137	27.1153	2046.8080	-1.13
138	26.8990	2030.4805	-0.04
139	26.7053	2015.8590	-0.09
140	26.5985	2007.7972	0.44
141	26.4832	1999.0937	-0.05
142	26.3686	1990.4431	-0.06
143	26.0957	1969.8431	-0.05
144	25.8794	1953.5156	-0.21
145	25.6278	1934.5235	0.09
146	25.5840	1931.2173	-0.28
147	25.1312	1897.0375	-0.51
148	24.9191	1881.0271	-6.65
149	24.7524	1868.4437	-0.46

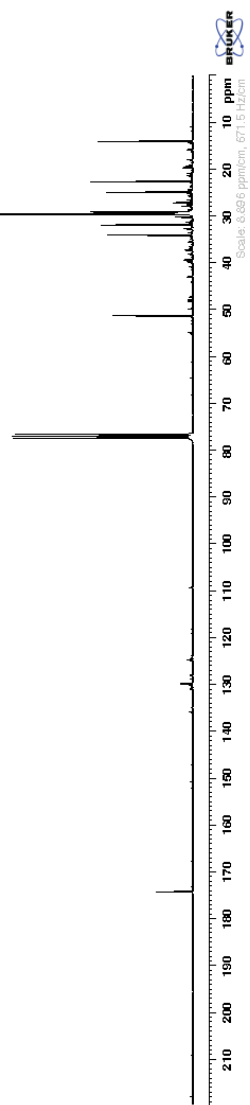
150	24.6657	1861.8991	-0.07
151	24.4218	1843.4882	-0.24
152	23.8930	1803.5715	0.05
153	23.7220	1790.6635	-0.21
154	23.6237	1783.2433	0.05
155	23.3714	1764.1984	0.10
156	23.1384	1746.6103	0.05
157	23.0359	1738.8730	-0.05
158	22.9363	1731.3547	-0.16
159	22.6419	1709.1318	-4.71
160	22.5659	1703.3949	0.74
161	22.5238	1700.2170	-0.13
162	22.2319	1678.1828	-0.11
163	22.1362	1670.9589	0.12
164	21.9420	1656.2996	0.09
165	21.8128	1646.5469	0.11
166	21.4383	1618.2776	-0.27
167	21.3933	1614.8808	-0.15
168	21.3134	1608.8495	0.07
169	20.9835	1583.9469	0.45
170	20.7101	1563.3092	0.12
171	20.2006	1524.8494	0.14
172	19.6878	1486.1405	0.67
173	19.6427	1482.7361	-0.15
174	19.5895	1478.7203	0.16
175	19.5239	1473.7685	0.20
176	19.2617	1453.9762	0.52
177	18.9922	1433.6329	0.07
178	18.6081	1404.6390	0.11
179	18.2536	1377.8794	0.09

180	18.2001	1373.8410	-0.09
181	18.0243	1360.5706	0.12
182	17.9592	1355.6566	0.57
183	17.8938	1350.7198	0.14
184	17.6128	1329.5084	0.08
185	17.4274	1315.5134	0.05
186	16.6846	1259.4429	0.08
187	16.5195	1246.9803	0.12
188	16.3012	1230.5018	0.15
189	16.1165	1216.5597	0.11
190	15.9156	1201.3947	0.54
191	15.7412	1188.2300	0.50
192	15.4066	1162.9726	0.06
193	15.1633	1144.6071	0.08
194	14.5973	1101.8823	0.14
195	14.4701	1092.2806	0.15
196	14.4302	1089.2687	0.51
197	14.0503	1060.5919	6.15
198	13.1098	989.5979	0.04
199	12.1826	919.6079	0.05
200	11.9926	905.2656	0.07
201	11.9237	900.0647	0.11
202	11.7999	890.7196	0.14
203	10.9050	823.1678	0.20
204	6.7588	510.1904	0.11

UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



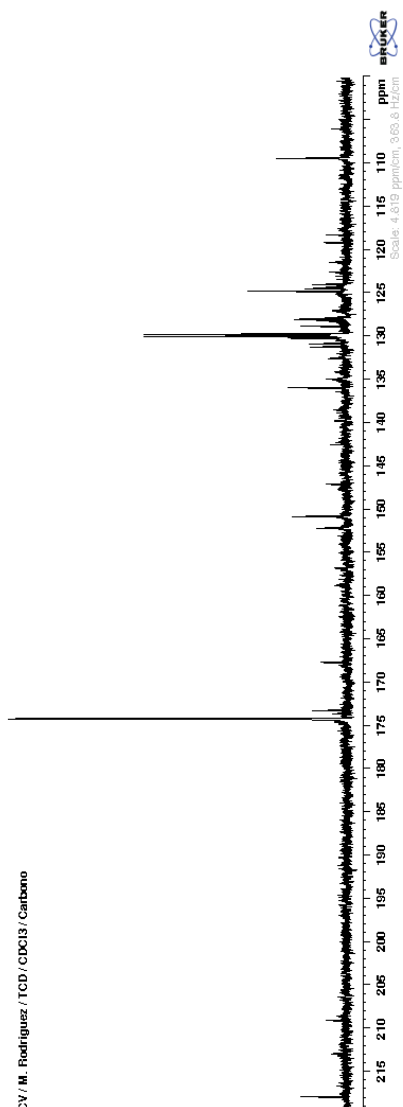
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbano



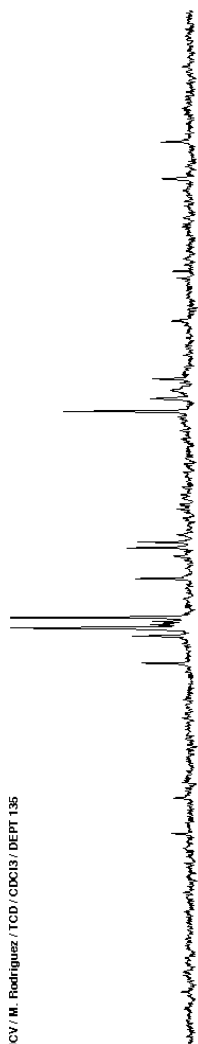
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



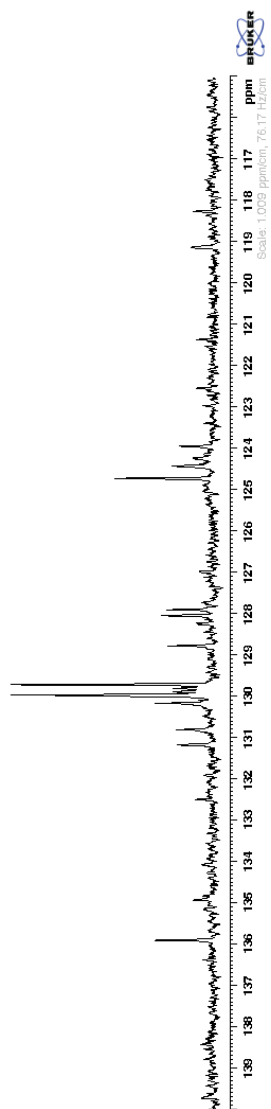
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbono



UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



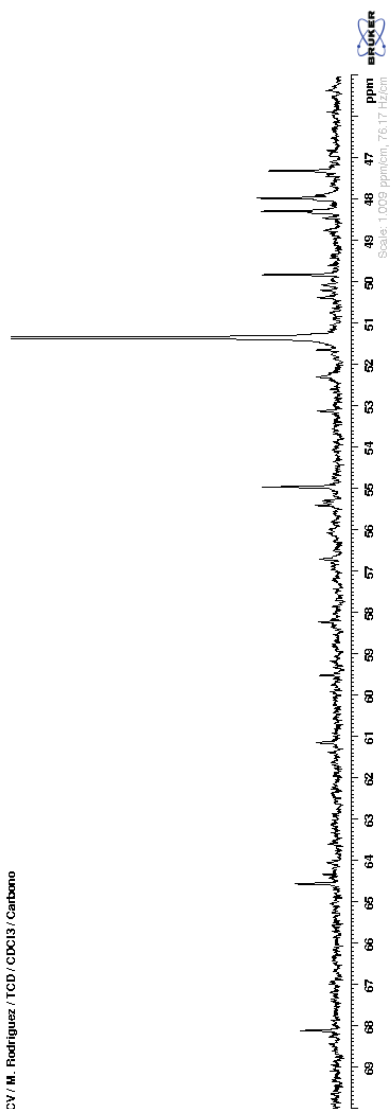
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbono



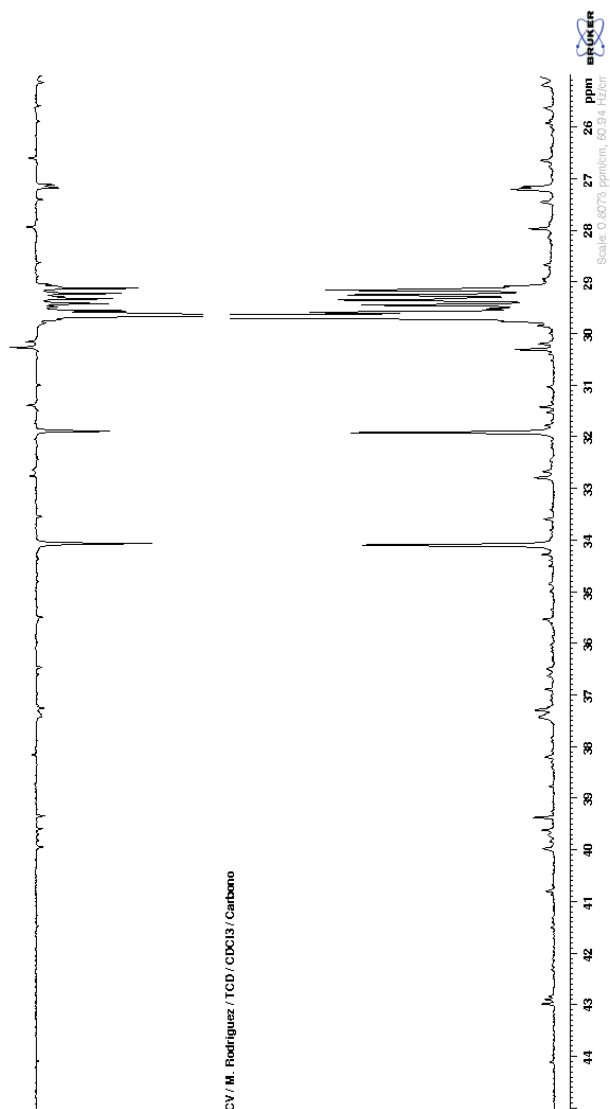
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbono

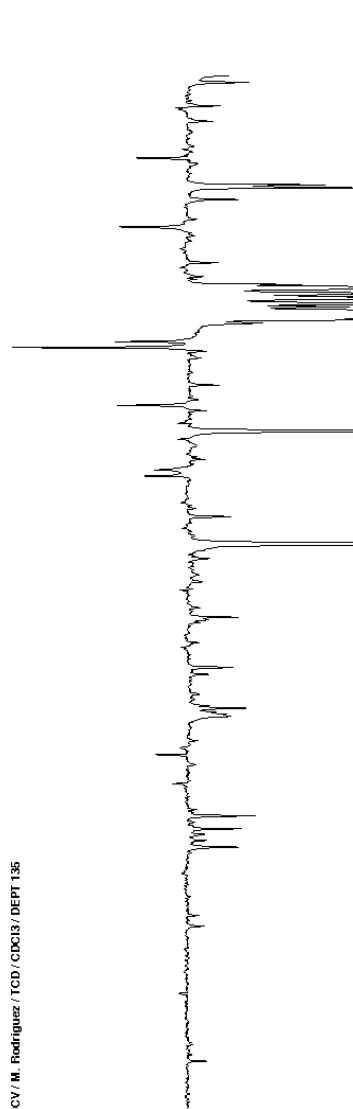


UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135

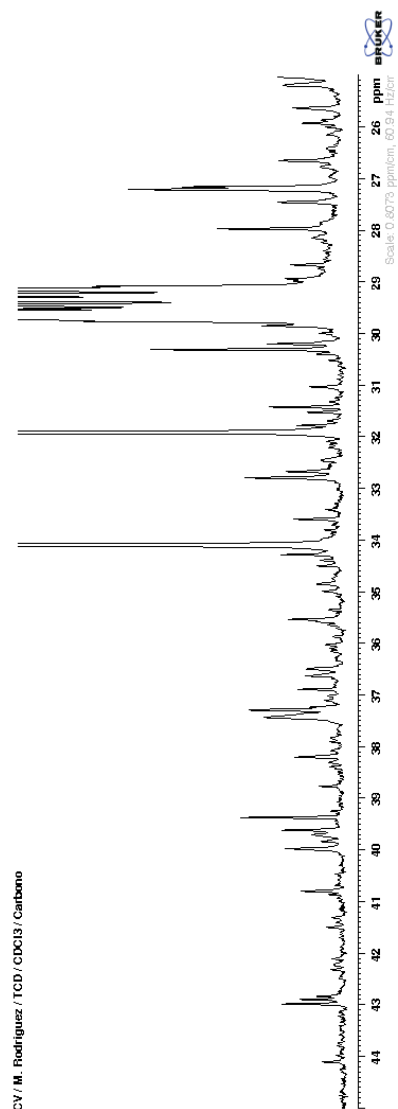


UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbano

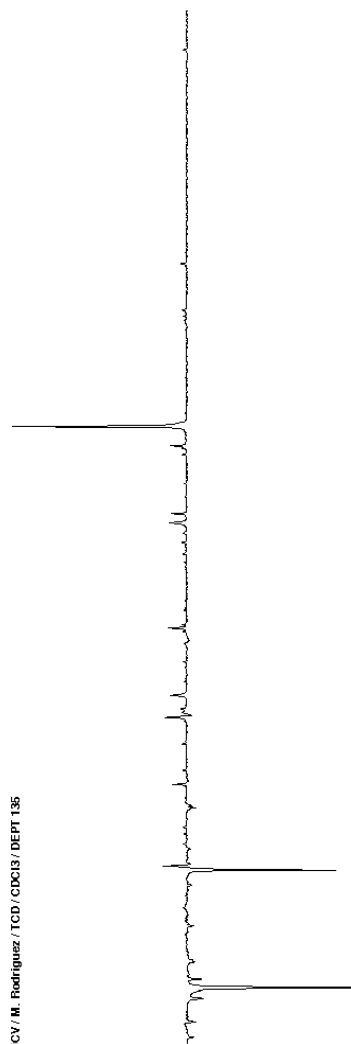
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



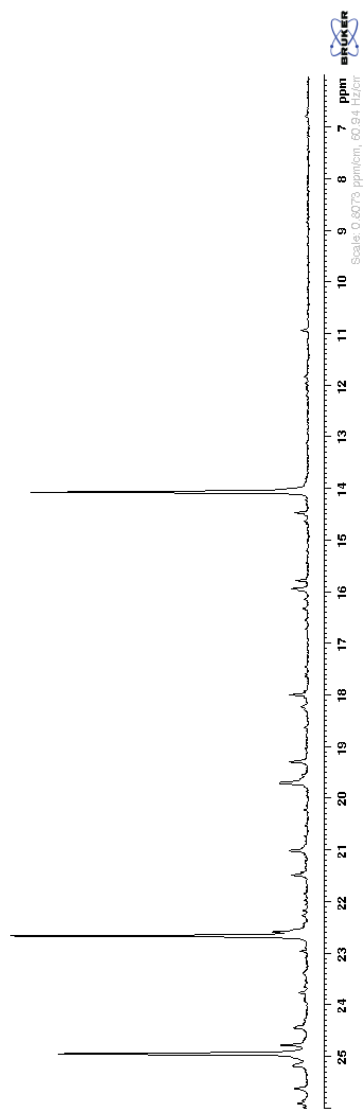
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbono

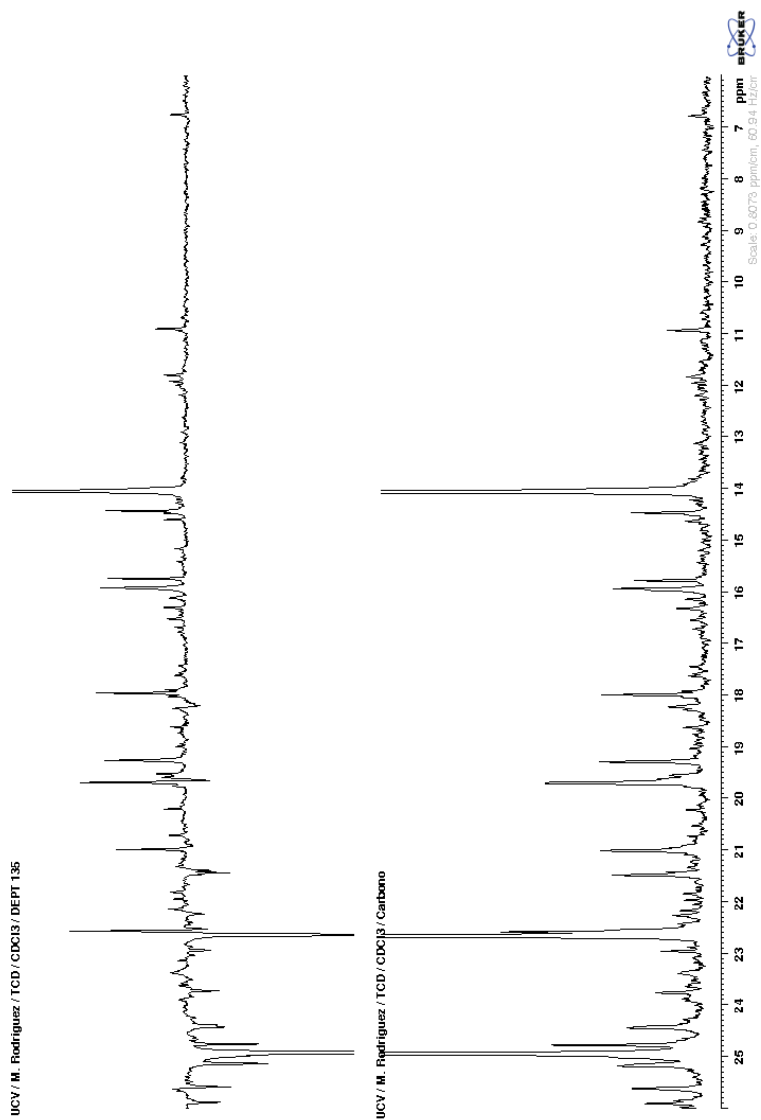


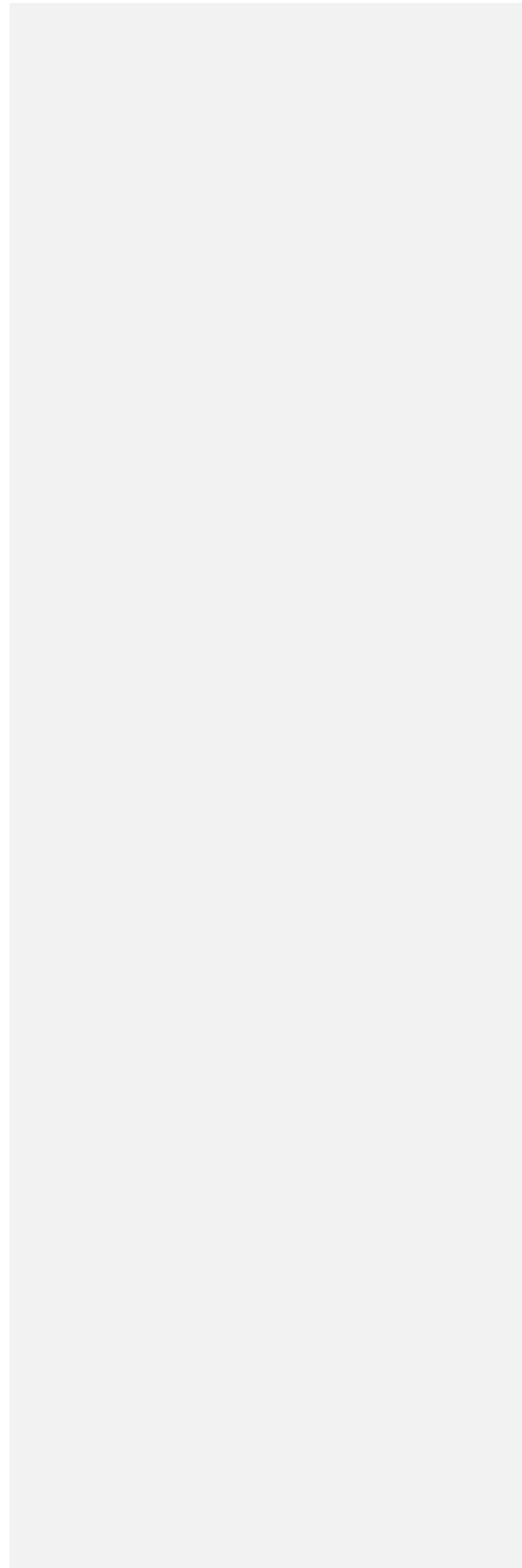
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / DEPT 135



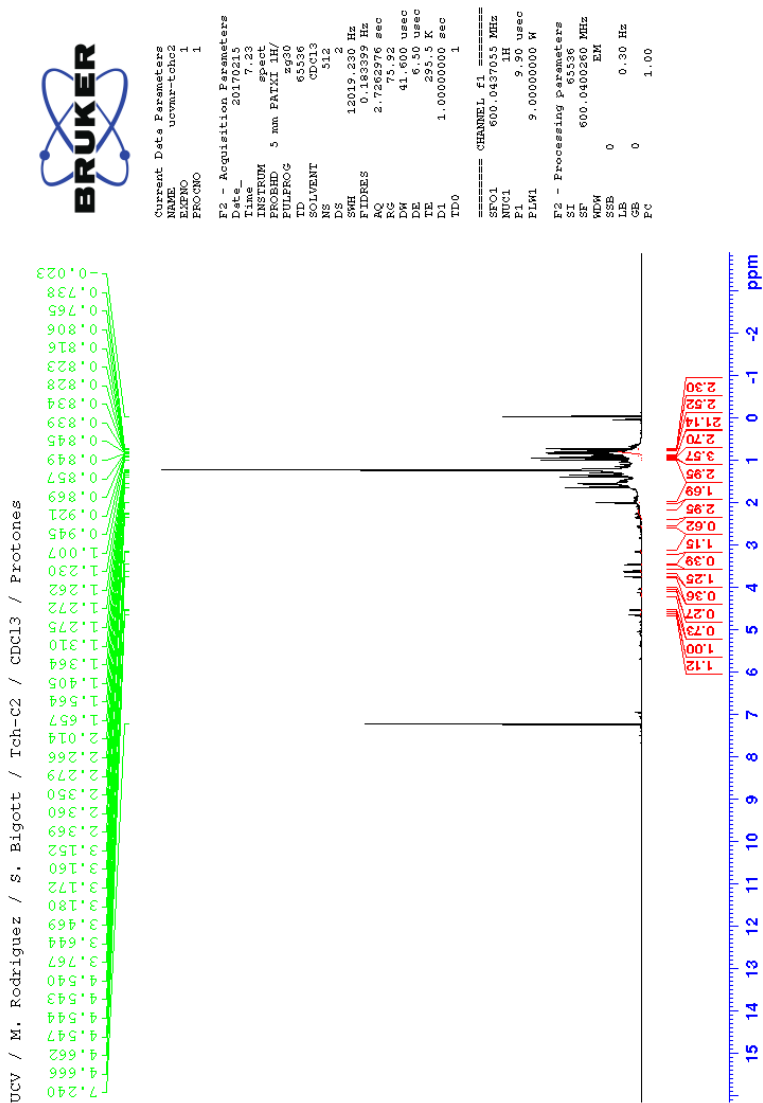
UCV / M. Rodriguez / TCD / CDCl₃ / Carbano

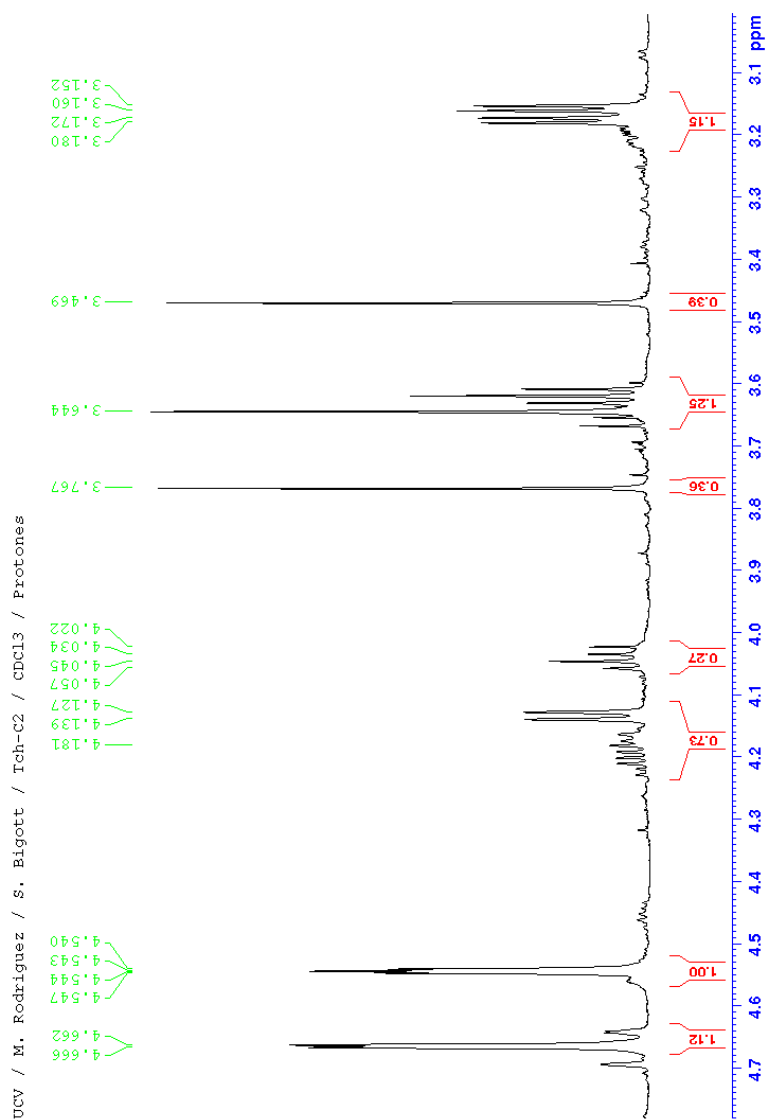


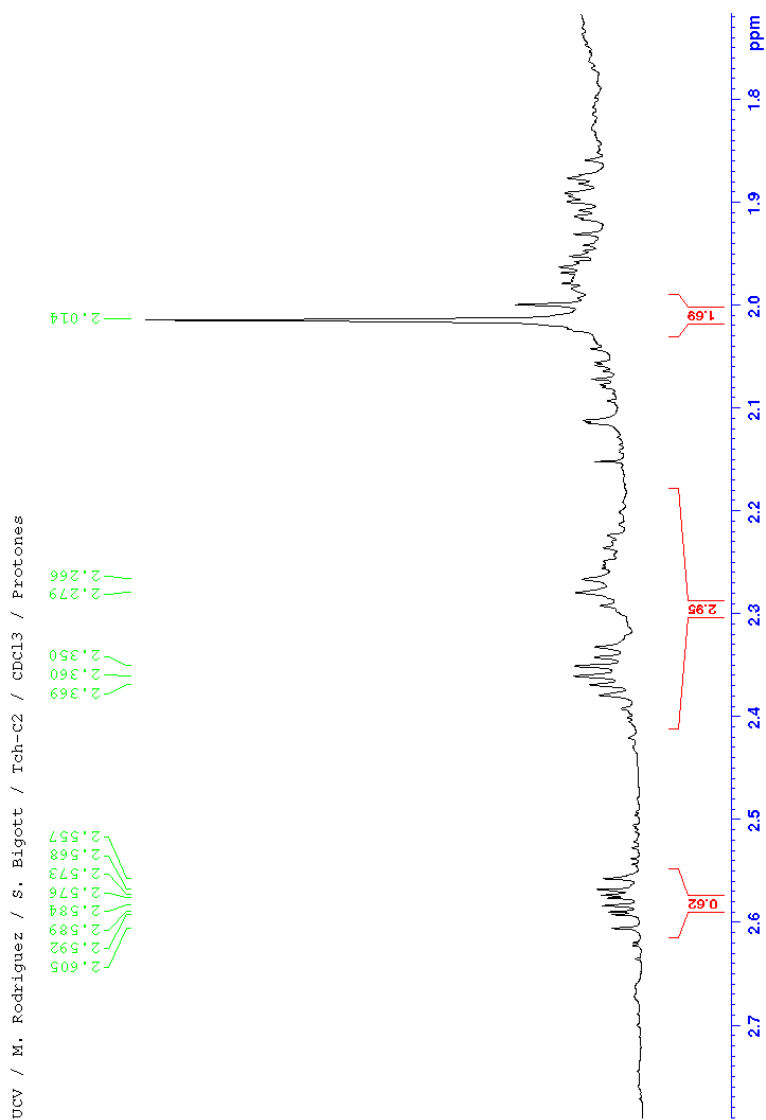


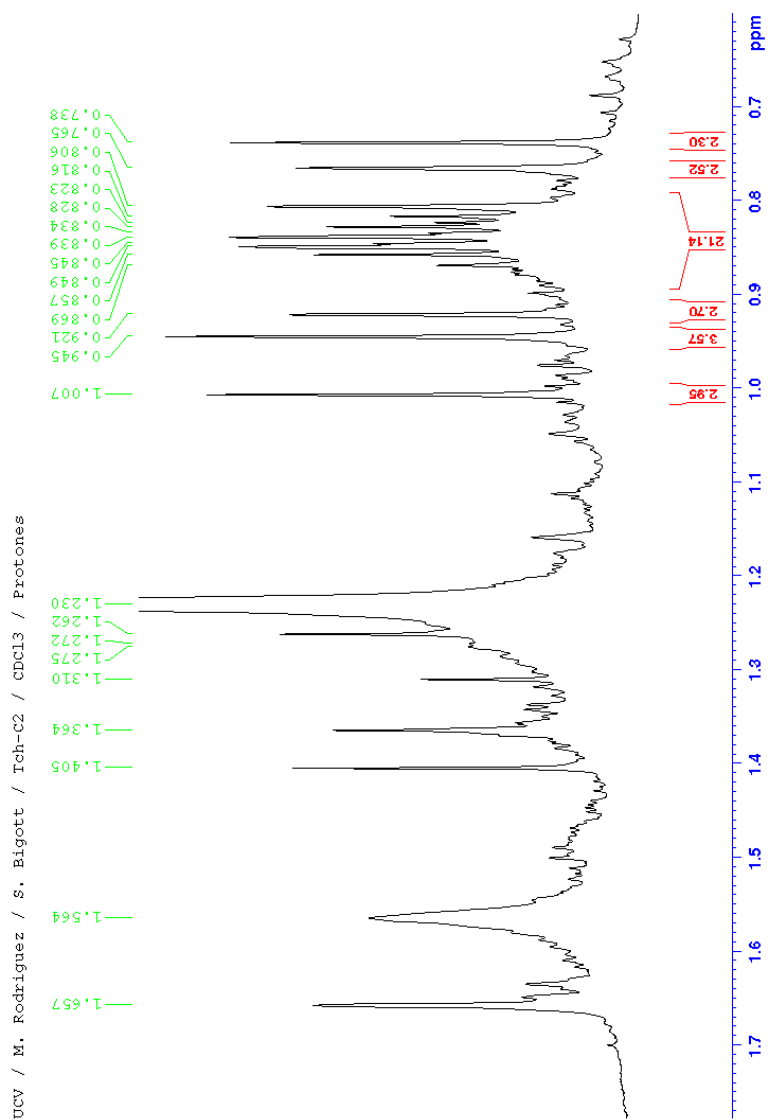


Anexo 2. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C de la Fracción Tch-C2





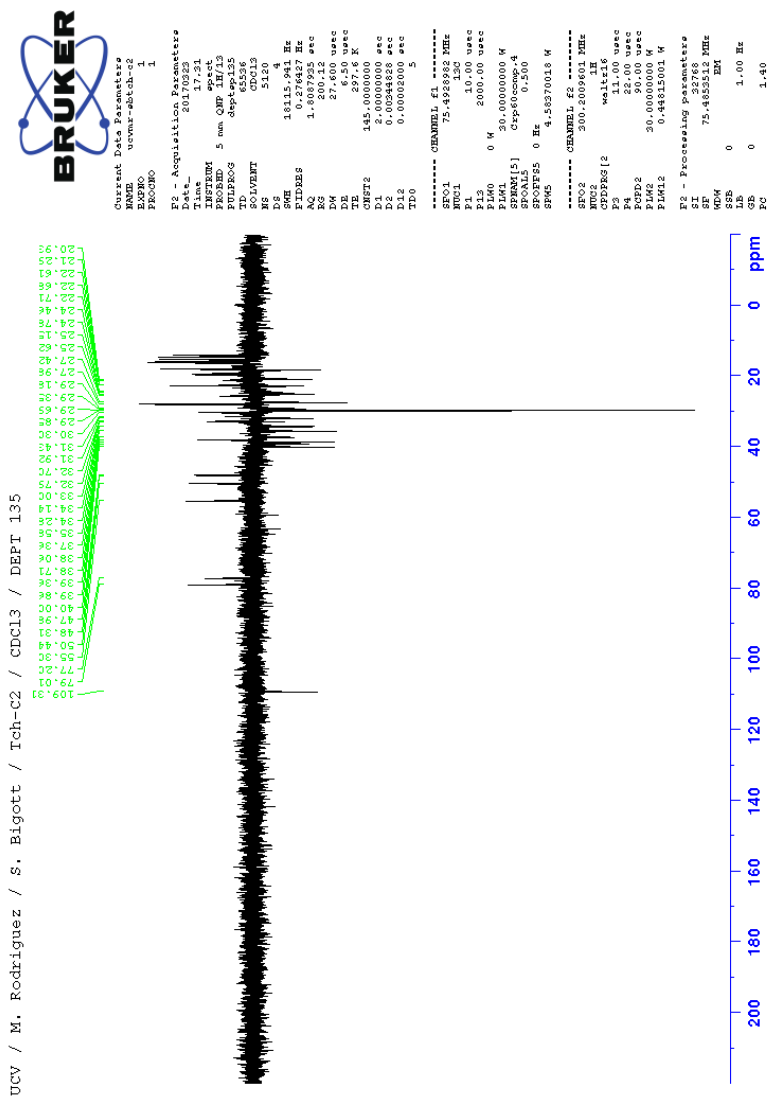


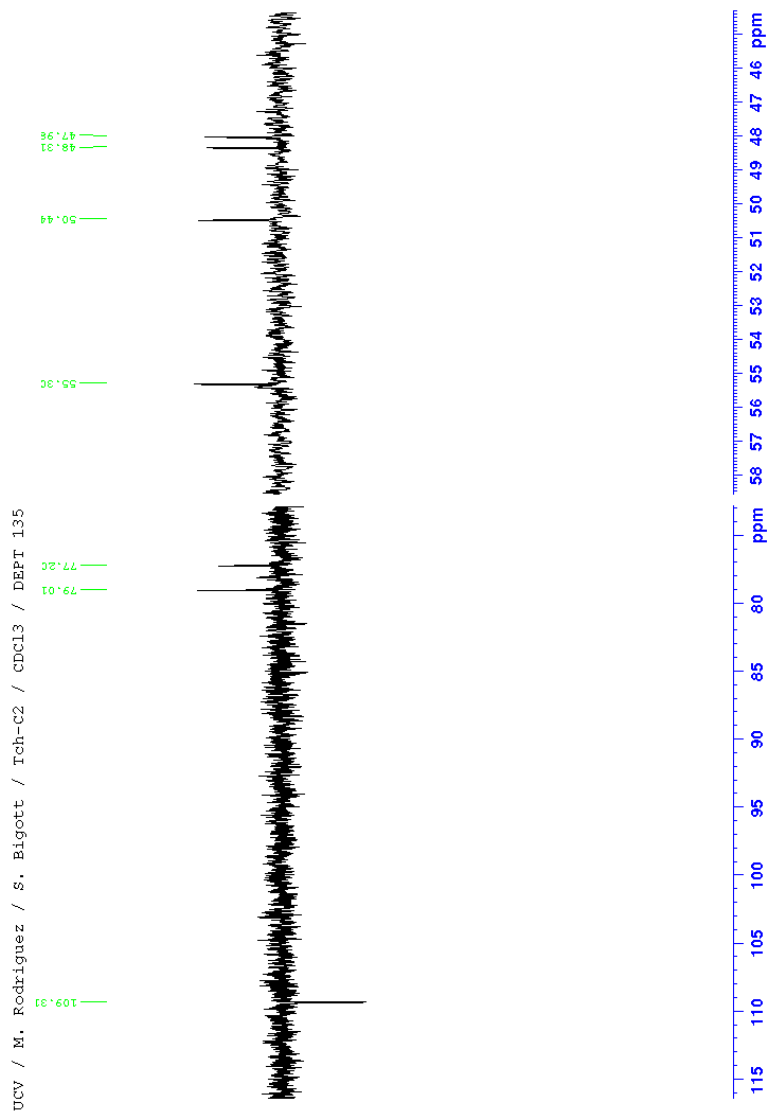


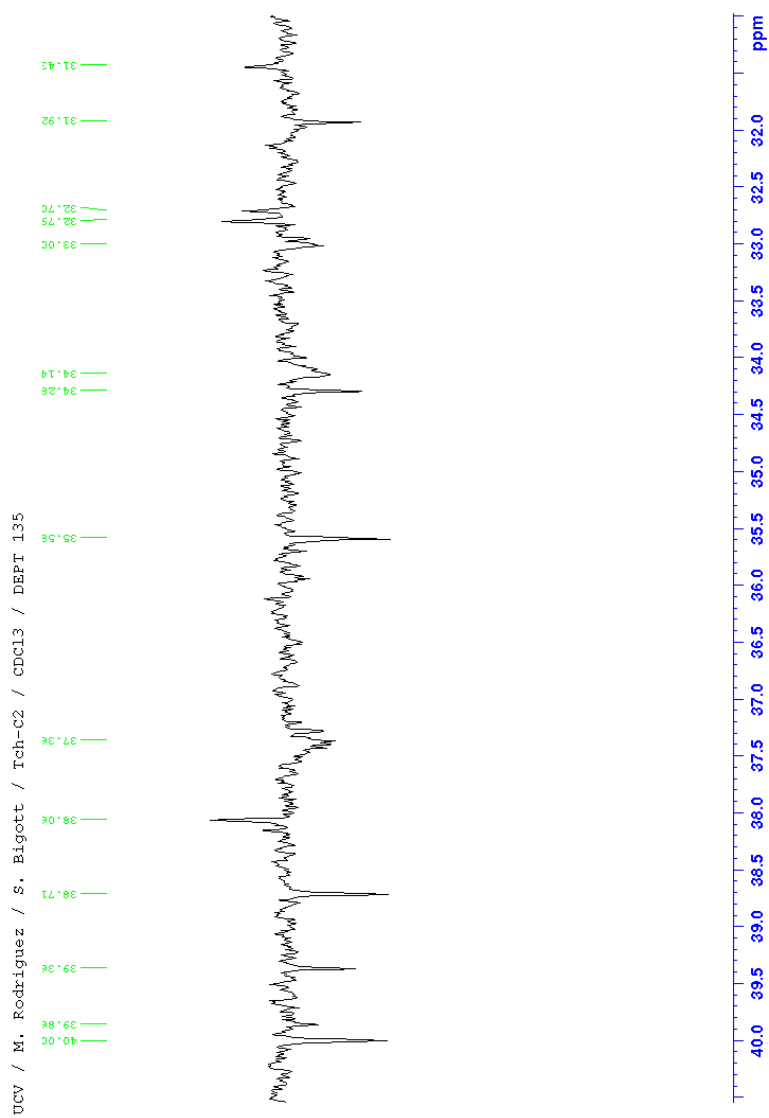
Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	$\nu(\text{F1})$ [Hz]	Intensity [rel]
1	7.2400	4344.2898	8.65
2	4.6663	2799.9668	0.37
3	4.6623	2797.5666	0.39
4	4.5465	2728.0820	0.30
5	4.5443	2726.7619	0.37
6	4.5425	2725.6818	0.36
7	4.5402	2724.3017	0.28
8	4.1813	2508.9474	0.04
9	4.1386	2483.3257	0.13
10	4.1271	2476.4252	0.13
11	4.0567	2434.1824	0.05
12	4.0453	2427.3419	0.11
13	4.0339	2420.5015	0.06
14	4.0221	2413.4210	0.06
15	3.7673	2260.5308	0.55
16	3.6438	2186.4258	0.55
17	3.4691	2081.5989	0.53
18	3.1795	1907.8273	0.18
19	3.1716	1903.0869	0.18
20	3.1603	1896.3065	0.21
21	3.1523	1891.5062	0.19
22	2.6052	1563.2243	0.09
23	2.5921	1555.3638	0.09
24	2.5892	1553.6236	0.10
25	2.5835	1550.2034	0.12
26	2.5760	1545.7031	0.10
27	2.5731	1543.9630	0.12
28	2.5677	1540.7228	0.13
29	2.5571	1534.3624	0.11

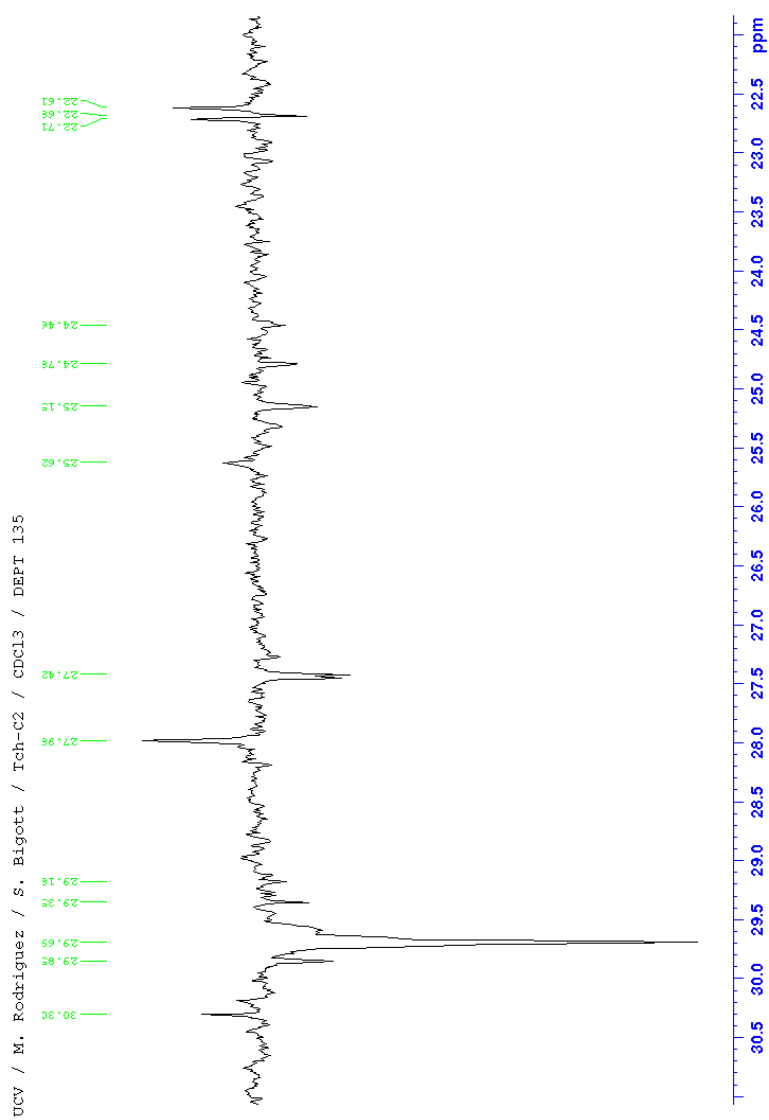
30	2.3686	1421.2548	0.15
31	2.3601	1416.1545	0.20
32	2.3504	1410.3341	0.20
33	2.2790	1367.4912	0.19
34	2.2661	1359.7507	0.17
35	2.0138	1208.3606	1.41
36	1.6572	994.3863	2.38
37	1.5644	938.7026	1.98
38	1.4045	842.7562	2.55
39	1.3643	818.6346	2.24
40	1.3101	786.1124	1.61
41	1.2752	765.1710	1.26
42	1.2720	763.2509	1.26
43	1.2617	757.0705	2.63
44	1.2301	738.1092	15.00
45	1.0065	603.9403	3.16
46	0.9446	566.7978	3.43
47	0.9212	552.7569	2.54
48	0.8685	521.1348	1.49
49	0.8571	514.2943	2.38
50	0.8486	509.1940	2.91
51	0.8454	507.2738	1.96
52	0.8388	503.3136	2.98
53	0.8342	500.5534	1.55
54	0.8275	496.5331	2.28
55	0.8230	493.8329	1.51
56	0.8162	489.7527	1.82
57	0.8059	483.5723	2.71
58	0.7649	458.9706	2.50
59	0.7378	442.7095	2.99

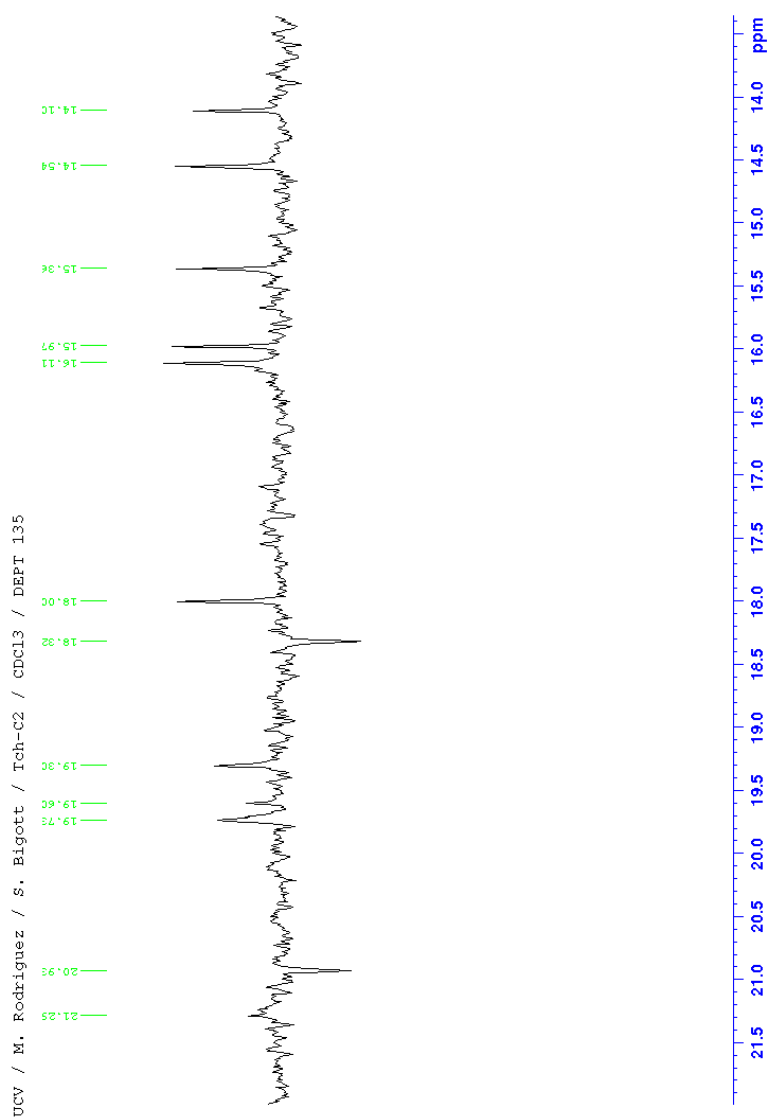
60	-0.0229	-13.7409	4.38
----	---------	----------	------





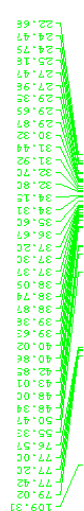






Peak	v(F1) [ppm]	v(F1) [Hz]	Intensity [rel]
1	109.3095	8251.2660	-2.28
2	79.0073	5963.8938	2.20
3	77.1978	5827.3030	1.65
4	55.3014	4174.4456	2.33
5	50.4436	3807.7529	2.17
6	48.3070	3646.4709	1.97
7	47.9830	3622.0136	2.00
8	39.9990	3019.3386	-2.74
9	39.8583	3008.7178	-0.97
10	39.3631	2971.3374	-1.91
11	38.7097	2922.0153	-2.77
12	38.0575	2872.7838	1.89
13	37.3626	2820.3290	-1.40
14	35.5825	2685.9575	-2.82
15	34.2826	2587.8341	-2.17
16	34.1370	2576.8434	-1.28
17	33.0023	2491.1902	-1.11
18	32.7857	2474.8401	1.56
19	32.6969	2468.1370	1.03
20	31.9152	2409.1301	-2.06
21	31.4266	2372.2479	1.02
22	30.3036	2287.4779	1.87
23	29.8486	2253.1321	-2.61
24	29.6879	2241.0016	-15.00
25	29.3493	2215.4422	-1.79
26	29.1750	2202.2851	-1.02
27	27.9804	2112.1103	3.85
28	27.4185	2069.6951	-3.24
29	25.6231	1934.1687	1.13

30	25.1462	1898.1697	-2.07
31	24.7837	1870.8063	-1.48
32	24.4569	1846.1377	-0.98
33	22.7060	1713.9704	2.26
34	22.6778	1711.8417	-1.70
35	22.6126	1706.9201	2.81
36	21.2859	1606.7736	1.04
37	20.9277	1579.7348	-2.00
38	19.7343	1489.6506	1.97
39	19.6023	1479.6865	1.10
40	19.3003	1456.8899	2.10
41	18.3157	1382.5670	-2.37
42	17.9962	1358.4495	3.23
43	16.1086	1215.9633	3.58
44	15.9712	1205.5916	3.39
45	15.3559	1159.1455	3.23
46	14.5426	1097.7533	3.25
47	14.1014	1064.4491	2.71



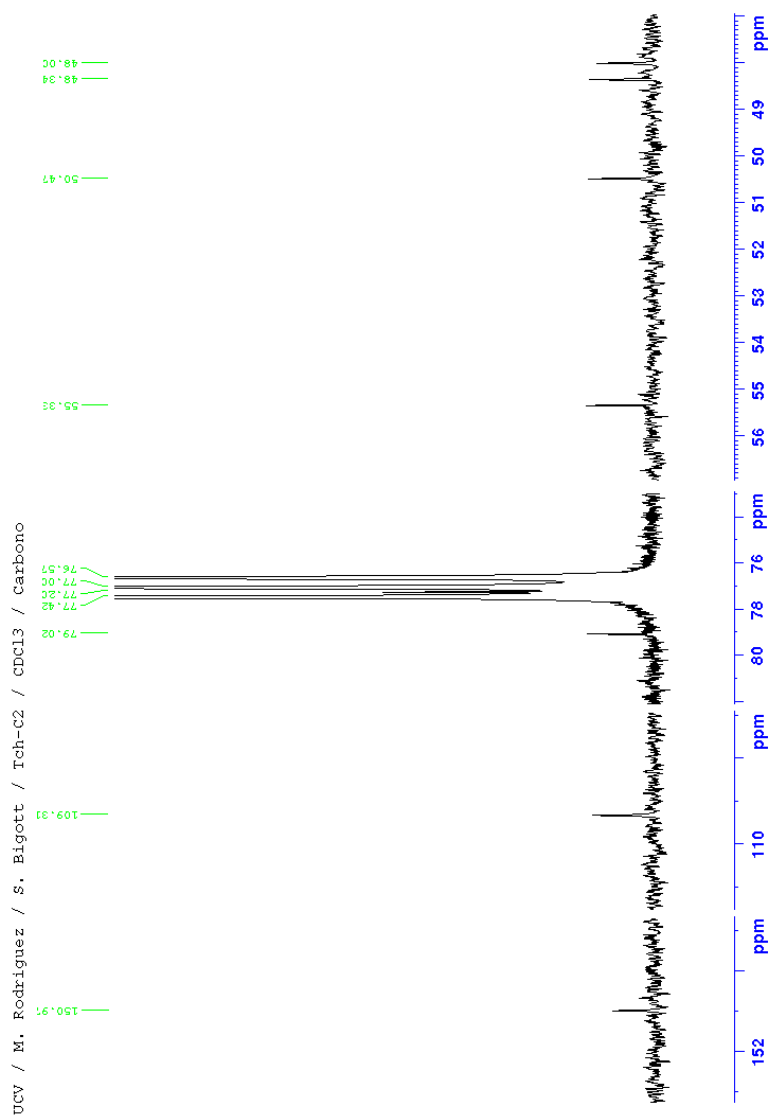
Current Data Parameters
NAME ssmr-ssch-c2
EXPNO 2
PROCNO 1

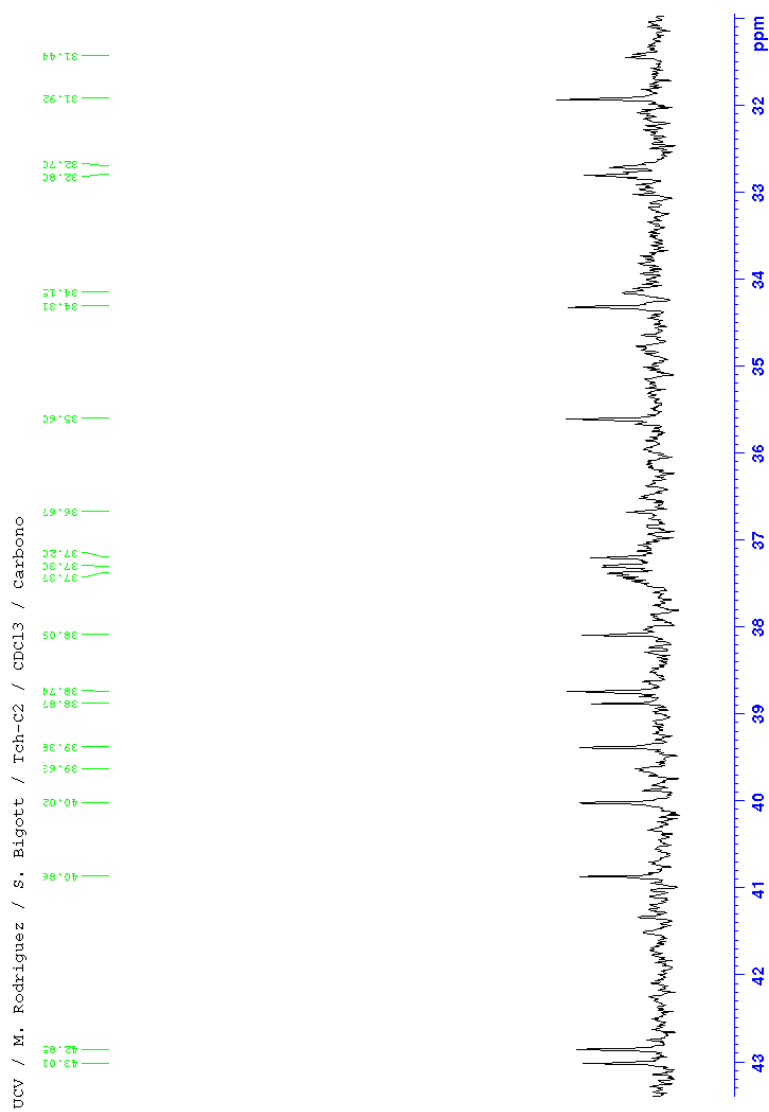
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170320
Time 23.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 10195
DS 4
SWH 18029.844 Hz
FIDRES 0.171939 Hz
AQ 1.8175317 sec
RG 200.12
DM 27.733 usec
DE 8.50 usec
TE 300.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 15

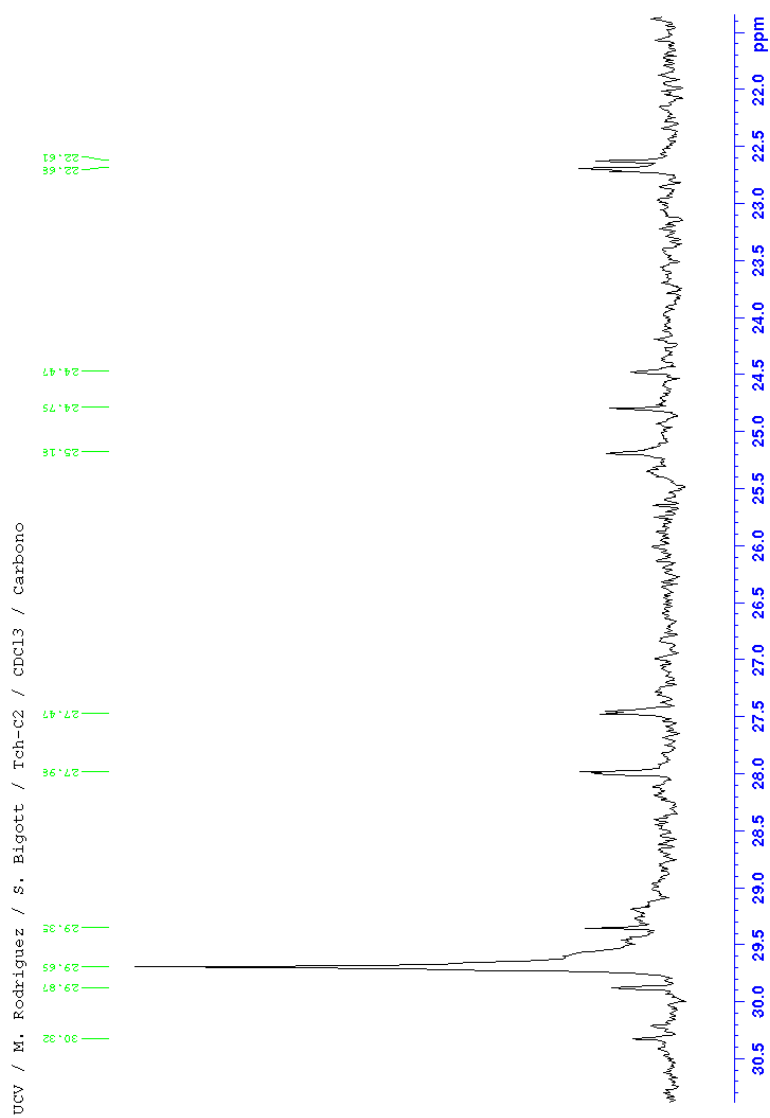
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.483300 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 30.00000000 W

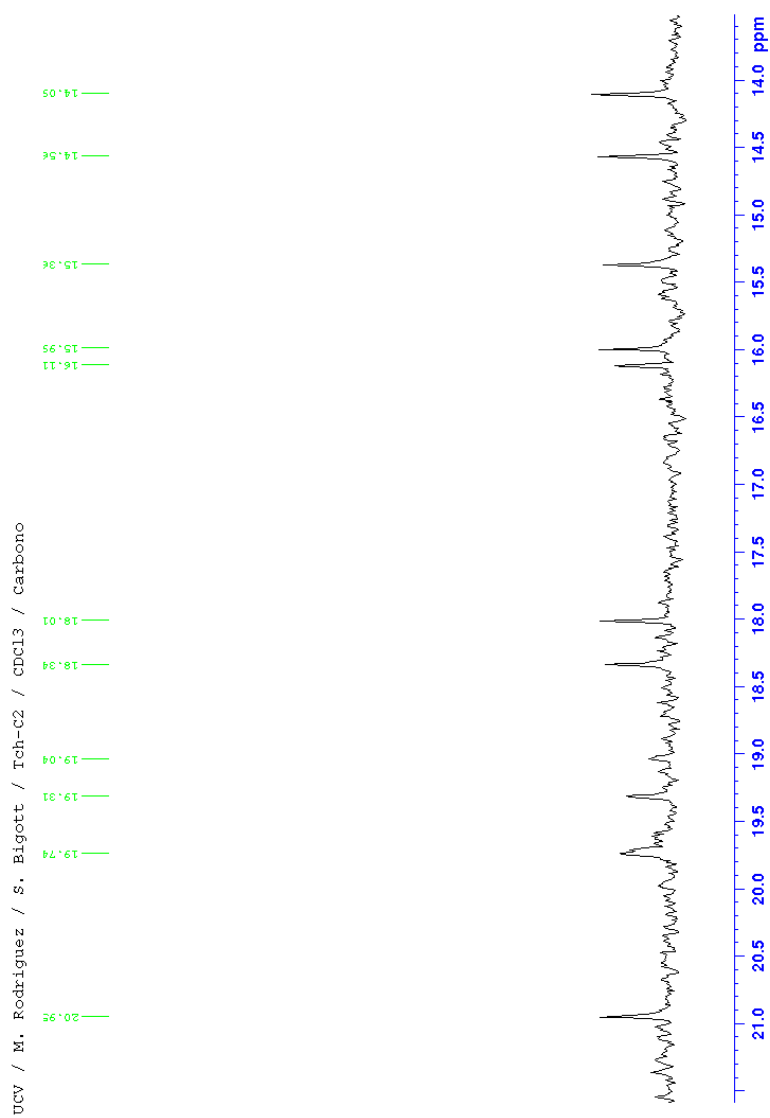
===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CDEPRG2 waltz16
PRG2 30.00000000 usec
PLW2 30.00000000 W
PLW12 0.44815001 W
PLW13 0.36300001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.483300 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.40





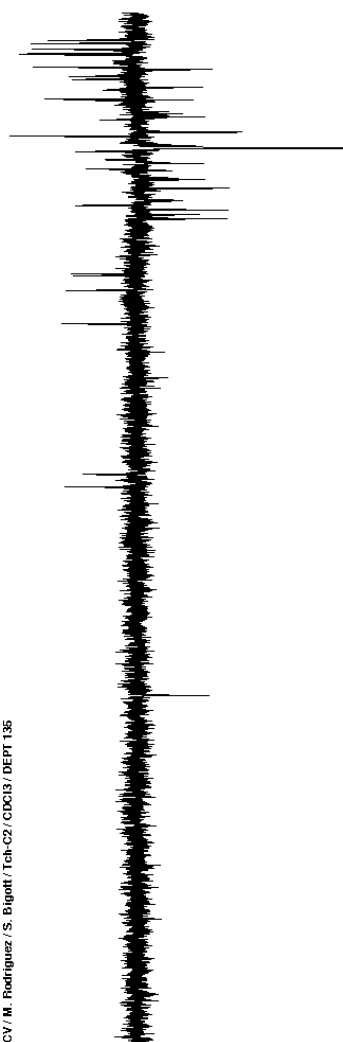




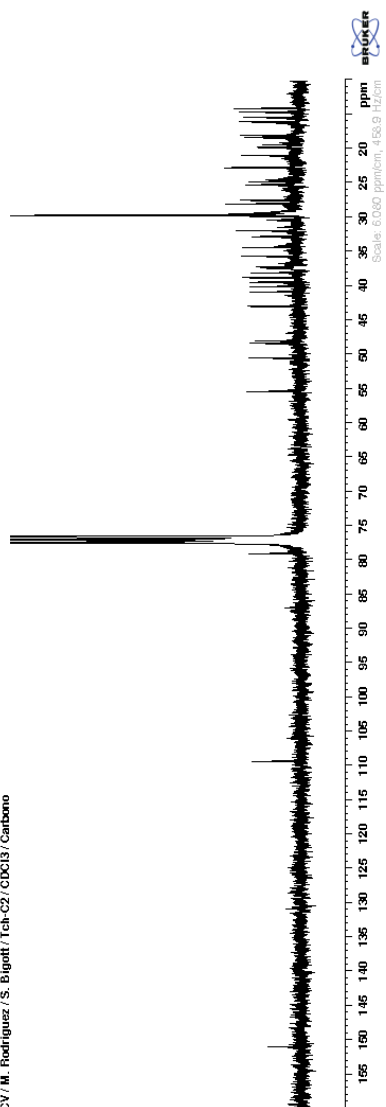
Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	$\nu(\text{F1})$ [Hz]	Intensity [rel]
1	150.9686	11395.9176	0.19
2	109.3136	8251.5754	0.24
3	79.0193	5964.7995	0.26
4	77.4204	5844.1060	14.69
5	77.2000	5827.4690	0.75
6	76.9972	5812.1606	15.00
7	76.5741	5780.2227	14.75
8	55.3326	4176.8007	0.26
9	50.4728	3809.9570	0.25
10	48.3376	3648.7807	0.25
11	47.9978	3623.1307	0.24
12	43.0134	3246.8816	0.24
13	42.8536	3234.8190	0.26
14	40.8637	3084.6107	0.25
15	40.0155	3020.5840	0.25
16	39.6254	2991.1372	0.14
17	39.3784	2972.4923	0.25
18	38.8739	2934.4099	0.23
19	38.7360	2924.0005	0.27
20	38.0865	2874.9728	0.25
21	37.3725	2821.0762	0.20
22	37.2982	2815.4677	0.21
23	37.1957	2807.7304	0.23
24	36.6692	2767.9874	0.16
25	35.6017	2687.4068	0.27
26	34.3114	2590.0080	0.27
27	34.1460	2577.5228	0.17
28	32.7957	2475.5949	0.24
29	32.7019	2468.5144	0.19

30	31.9207	2409.5452	0.29
31	31.4357	2372.9348	0.16
32	30.3203	2288.7385	0.20
33	29.8742	2255.0644	0.25
34	29.6907	2241.2129	1.40
35	29.3498	2215.4799	0.31
36	27.9783	2111.9518	0.32
37	27.4671	2073.3637	0.28
38	25.1781	1900.5777	0.26
39	24.7872	1871.0705	0.25
40	24.4666	1846.8699	0.20
41	22.6799	1712.0002	0.32
42	22.6139	1707.0182	0.28
43	20.9513	1581.5162	0.27
44	19.7380	1489.9298	0.23
45	19.3147	1457.9769	0.21
46	19.0356	1436.9089	0.16
47	18.3350	1384.0239	0.26
48	18.0074	1359.2949	0.27
49	16.1142	1216.3860	0.24
50	15.9887	1206.9126	0.28
51	15.3617	1159.5833	0.27
52	14.5589	1098.9837	0.28
53	14.0947	1063.9434	0.30

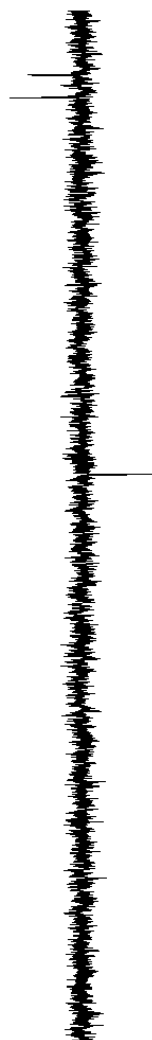
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / DEPT 135



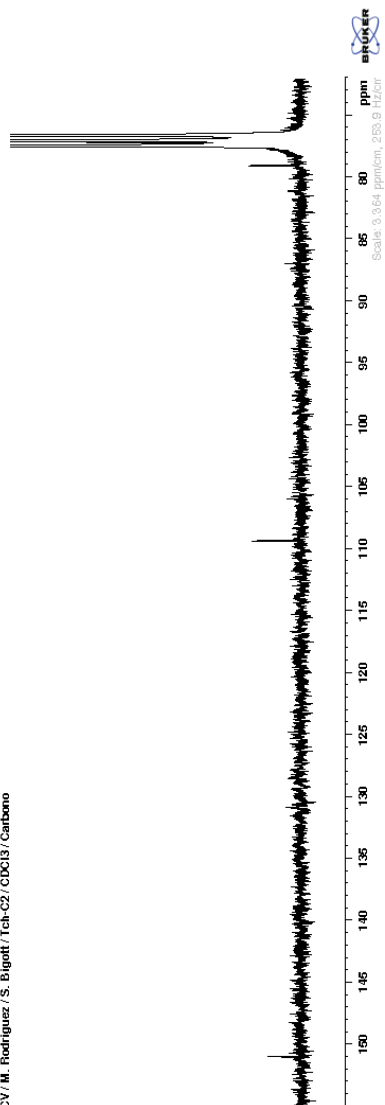
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / Carbono



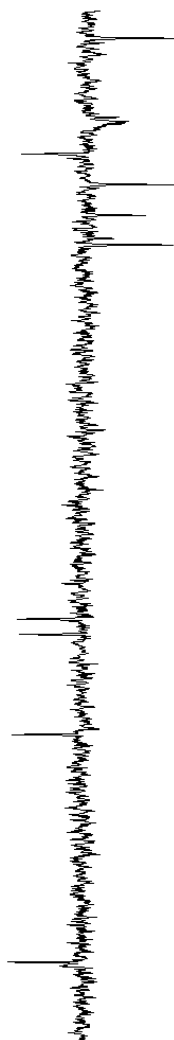
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / DEPT 135



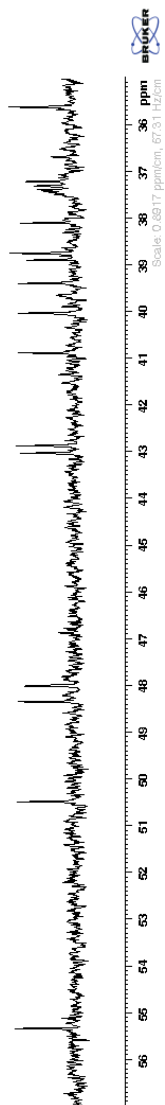
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / Carbono



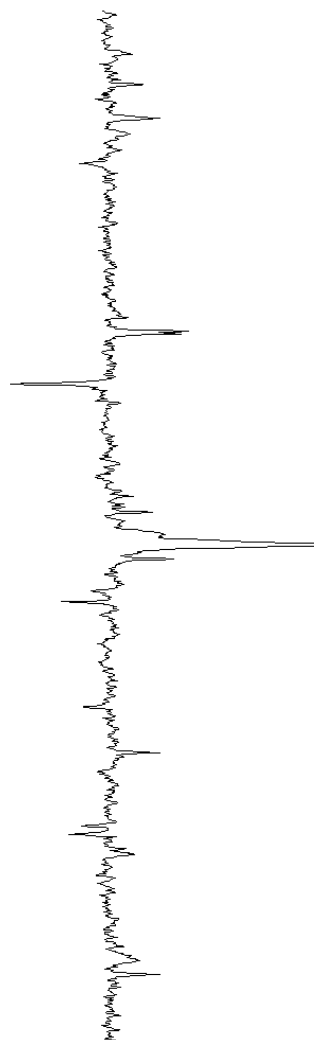
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / DEPT 135



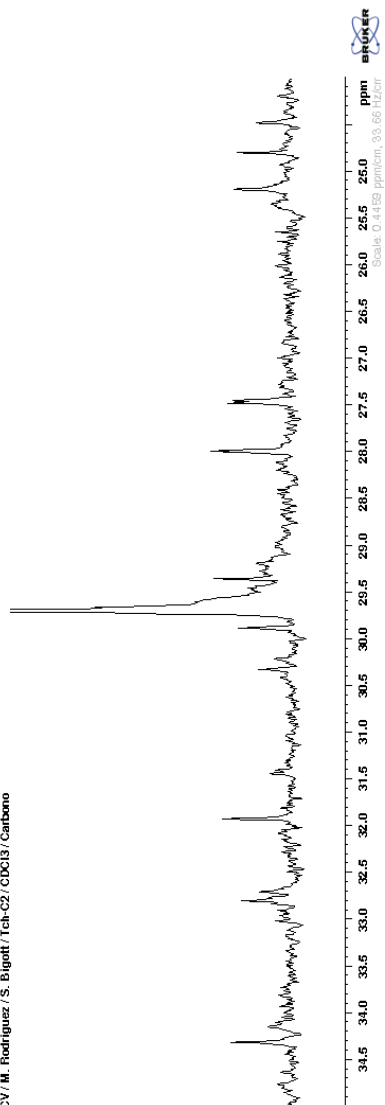
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / Carbono



UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / DEPT 135

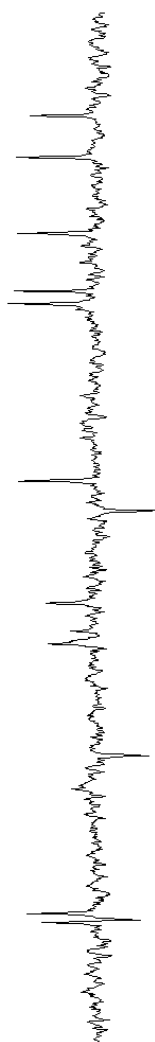


UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / Carbono

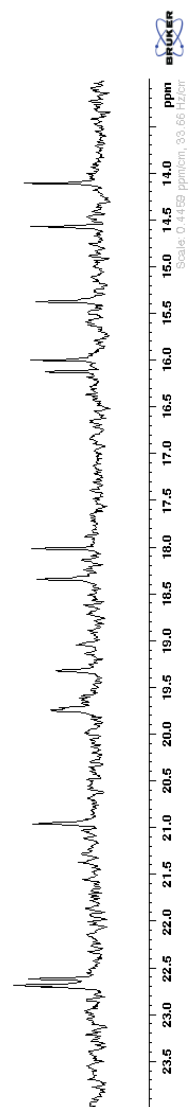


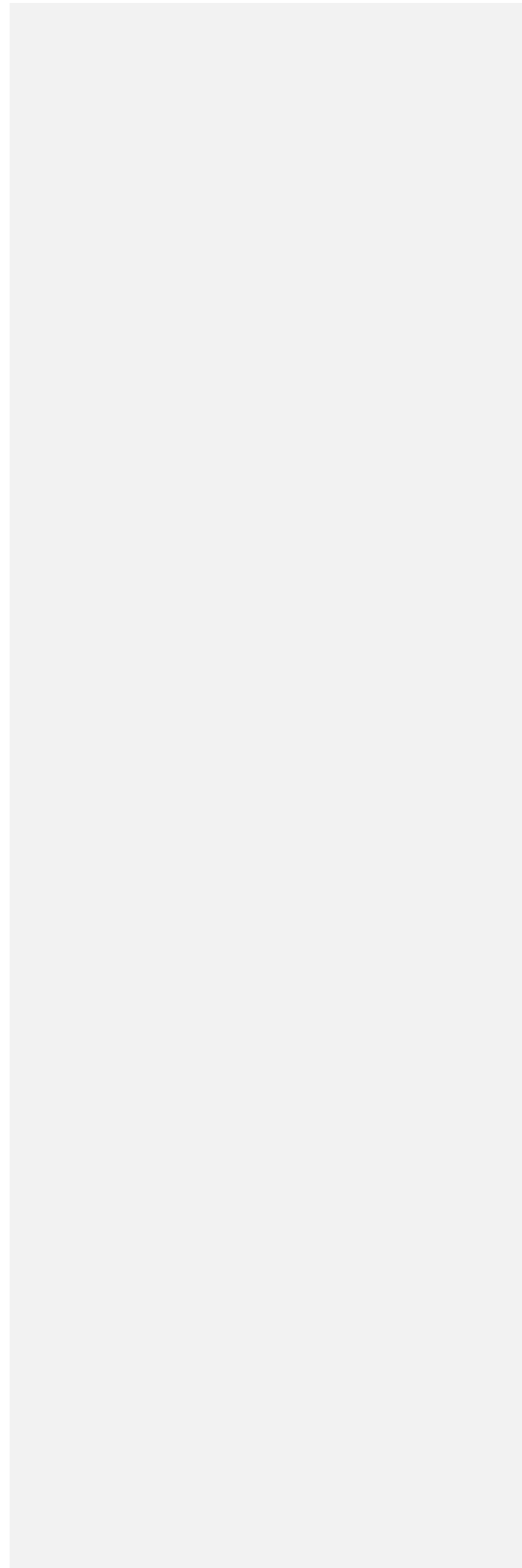
CDCl₃

UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / DEPT 135

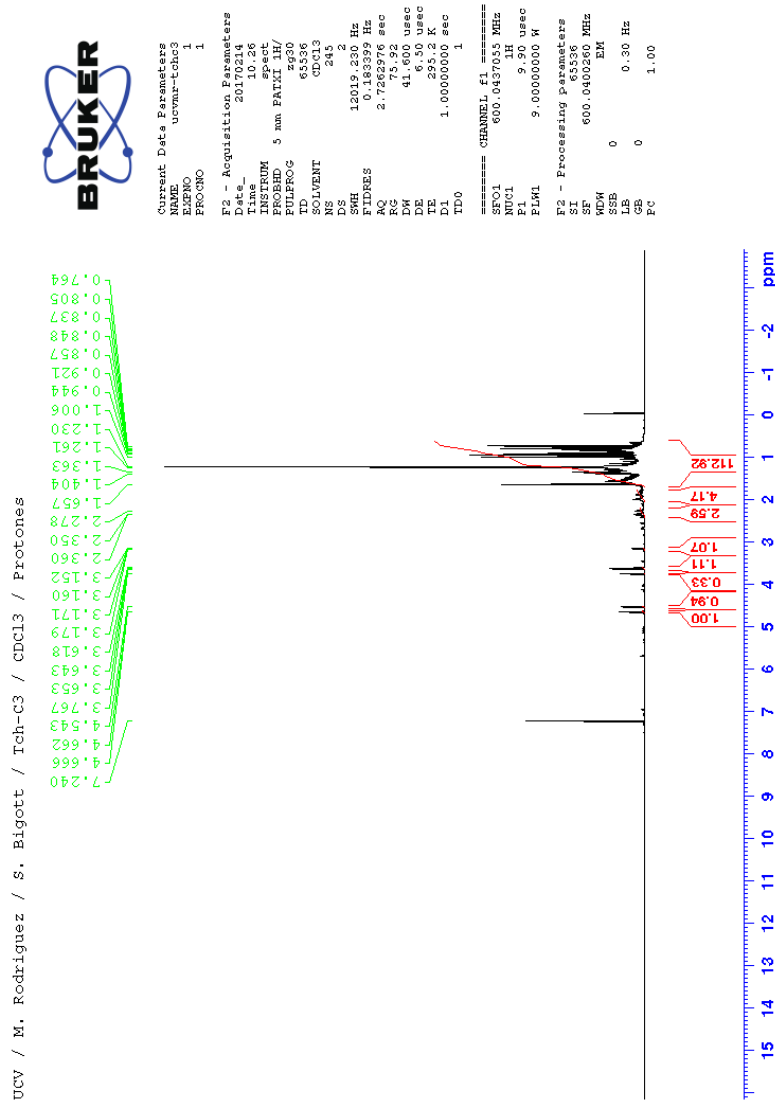


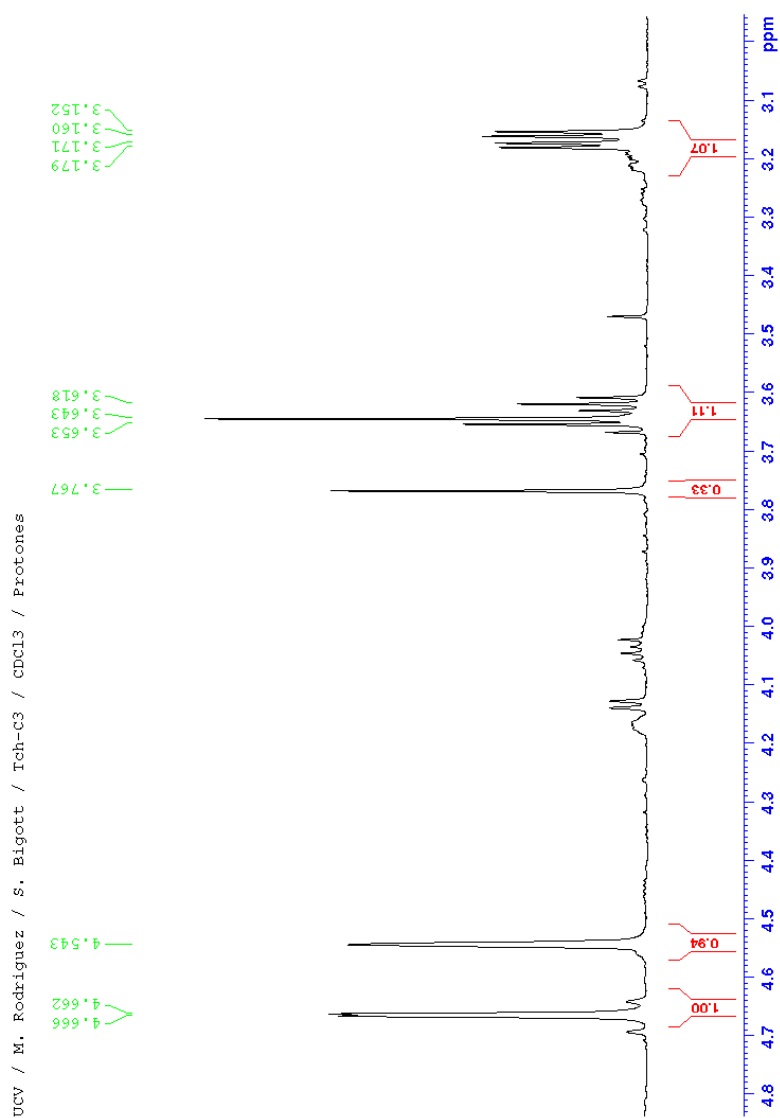
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C2 / CDCl₃ / Carbono

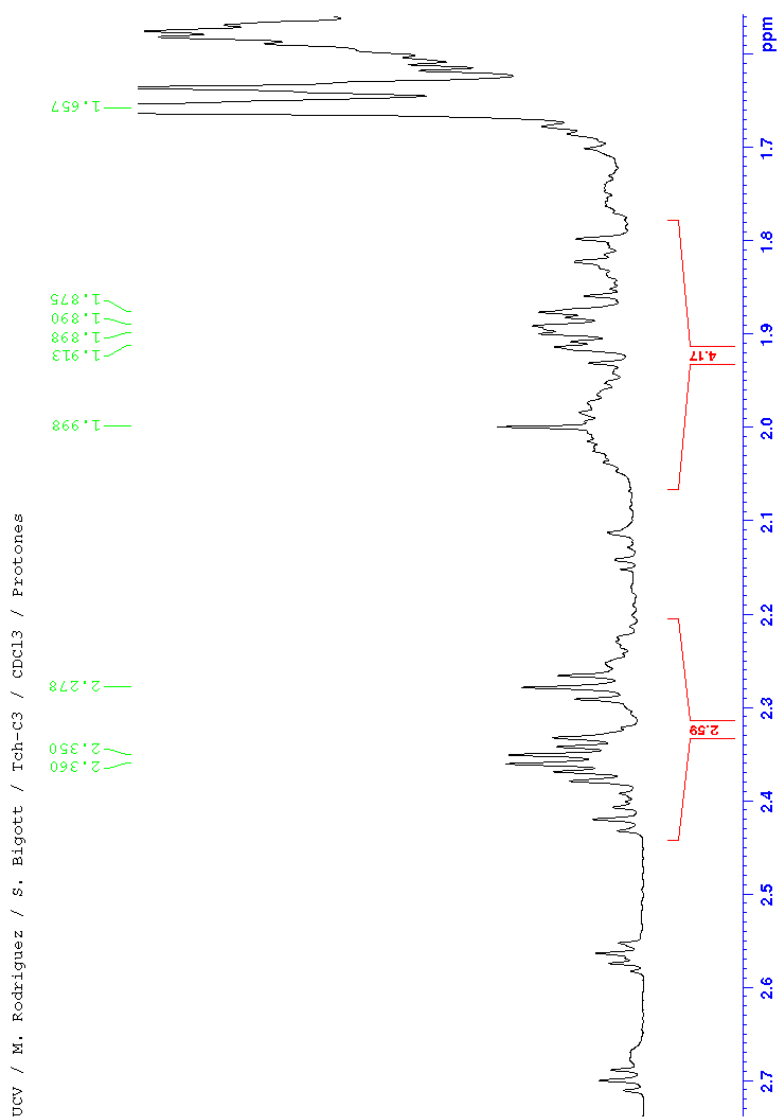


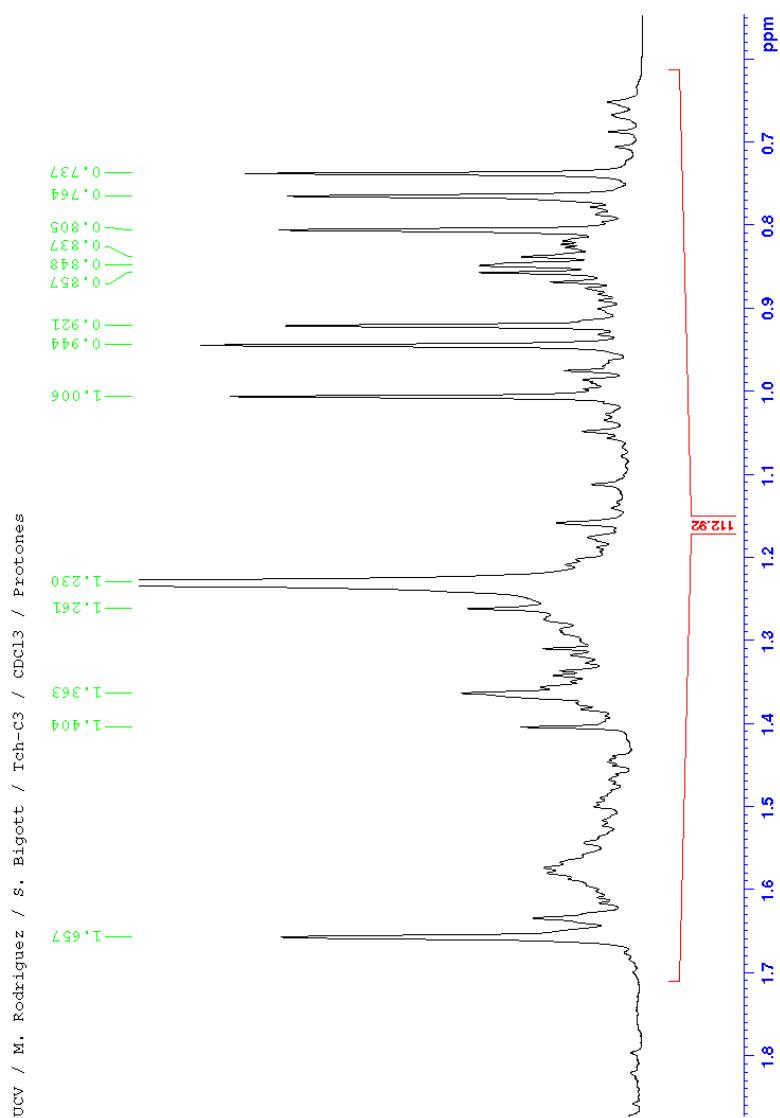


Anexo 3. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C de la Fracción Tch-C₃



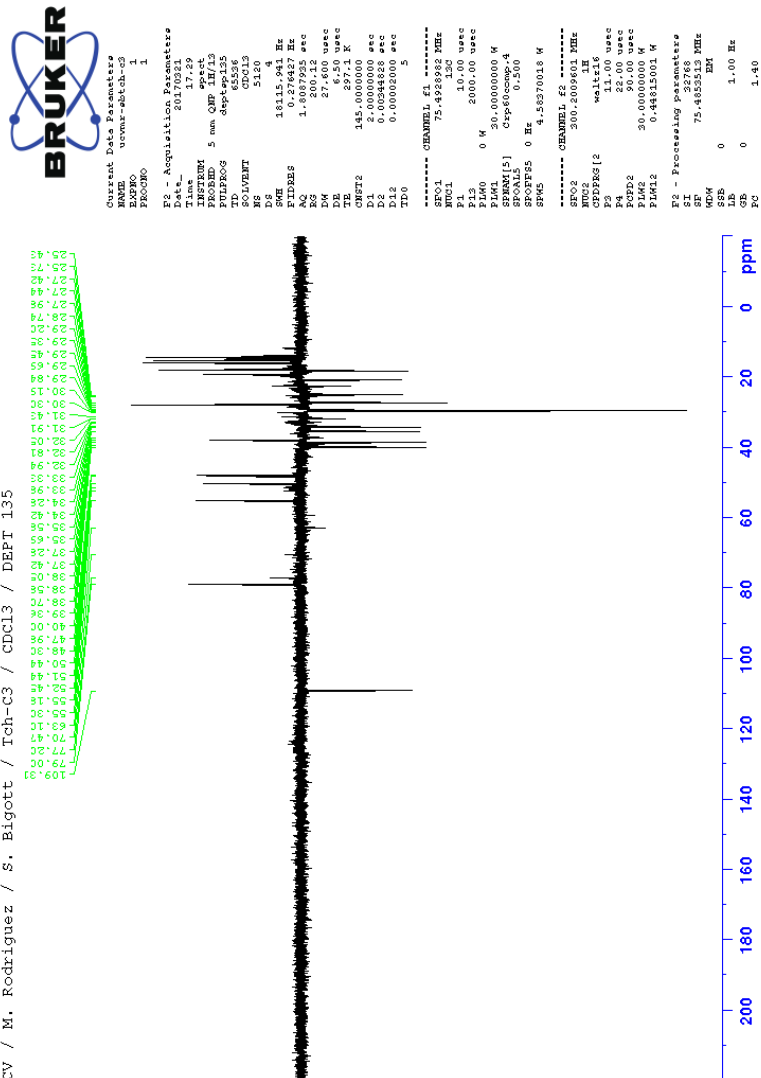


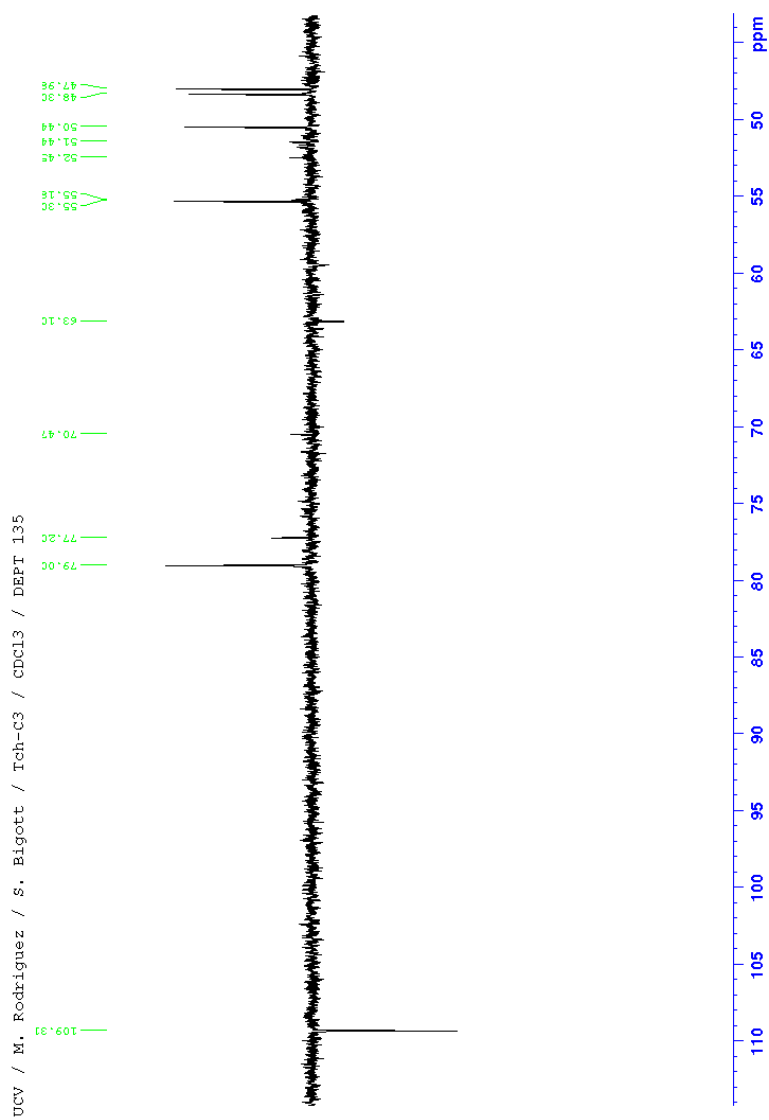


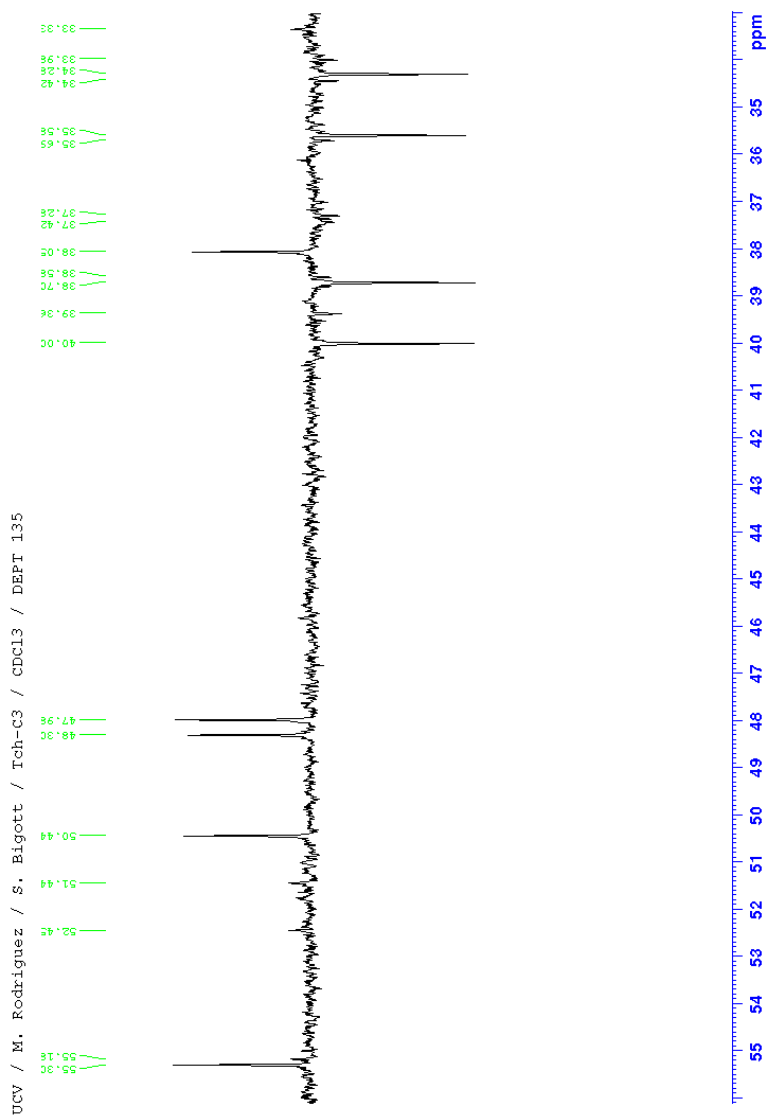


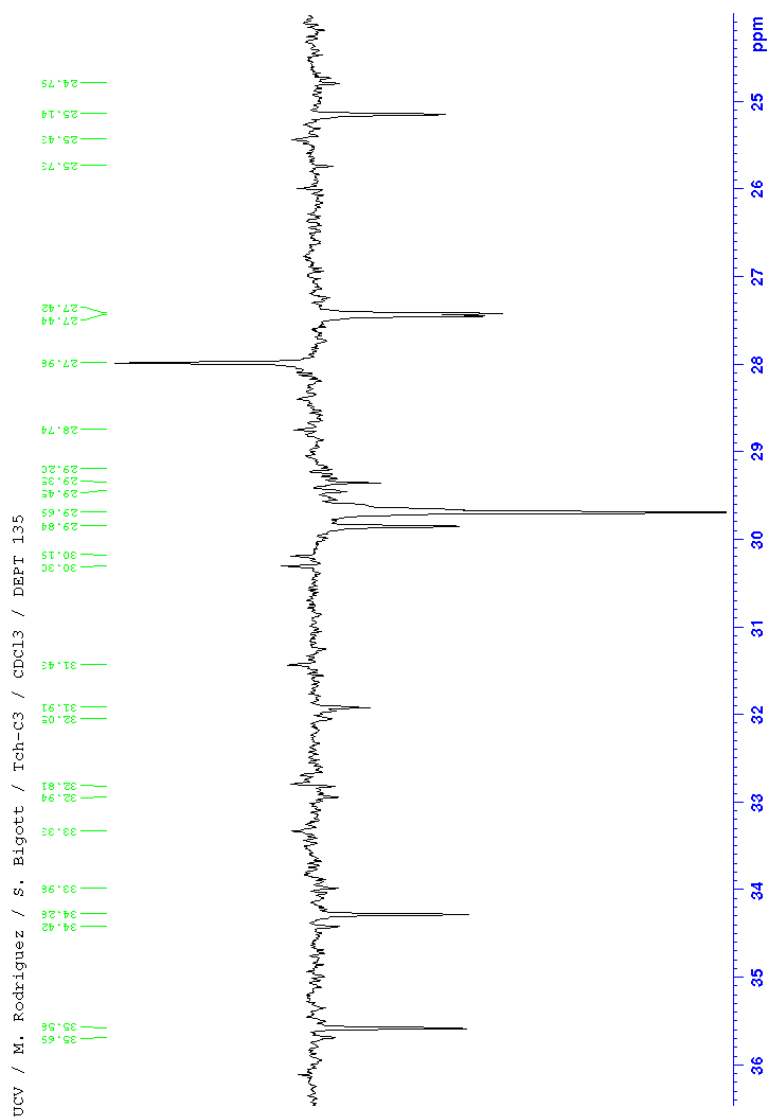
Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	$\nu(\text{F1})$ [Hz]	Intensity [rel]
1	7.2400	4344.2898	3.70
2	4.6655	2799.4867	0.75
3	4.6621	2797.4466	0.78
4	4.5434	2726.2219	0.73
5	3.7667	2260.1708	0.77
6	3.6527	2191.7662	0.45
7	3.6433	2186.1258	1.09
8	3.6179	2170.8848	0.31
9	3.1789	1907.4672	0.36
10	3.1709	1902.6669	0.37
11	3.1596	1895.8865	0.40
12	3.1517	1891.1461	0.37
13	2.3598	1415.9745	0.34
14	2.3501	1410.1541	0.33
15	2.2777	1366.7112	0.30
16	1.9982	1199.0000	0.36
17	1.9125	1147.5765	0.22
18	1.8981	1138.9360	0.26
19	1.8897	1133.8956	0.27
20	1.8752	1125.1951	0.26
21	1.6570	994.2663	4.44
22	1.4039	842.3962	1.52
23	1.3632	817.9746	2.24
24	1.2613	756.8305	2.17
25	1.2299	737.9892	15.00
26	1.0059	603.5803	5.08
27	0.9441	566.4978	5.44
28	0.9206	552.3968	4.40
29	0.8566	513.9943	2.02

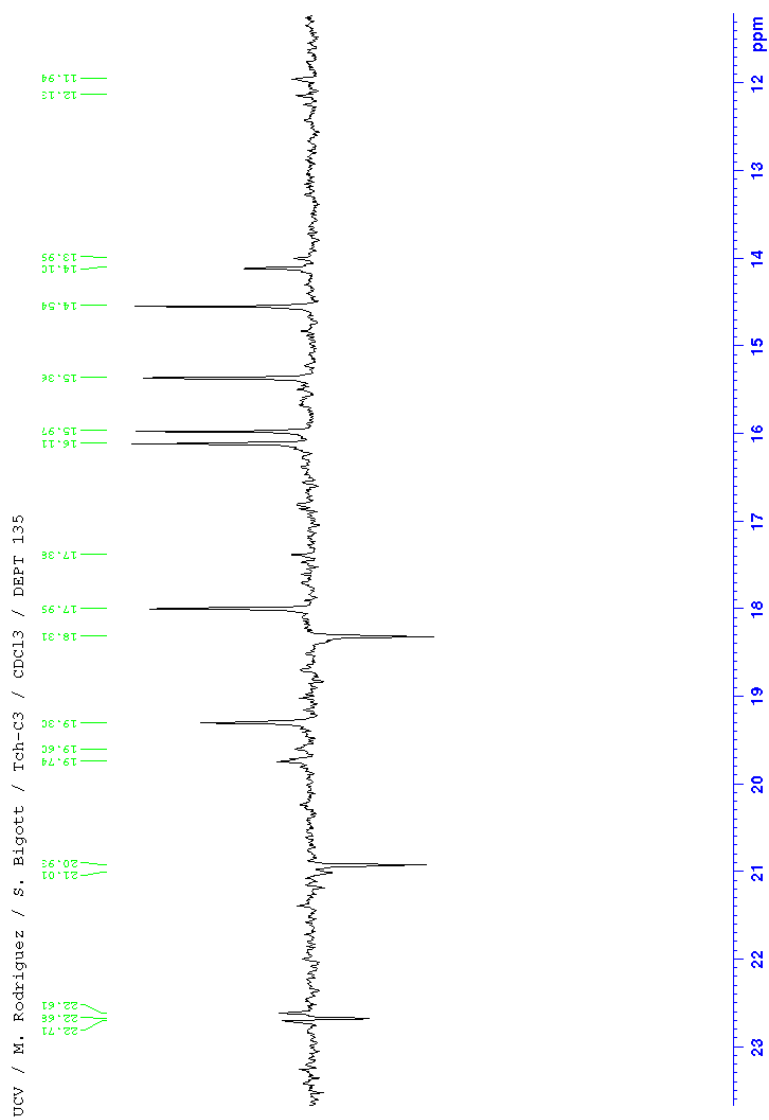
30	0.8481	508.8939	2.02
31	0.8374	502.4735	1.51
32	0.8052	483.1522	4.47
33	0.7644	458.6706	4.37
34	0.7372	442.3495	4.89
35	-0.0234	-14.0409	1.90









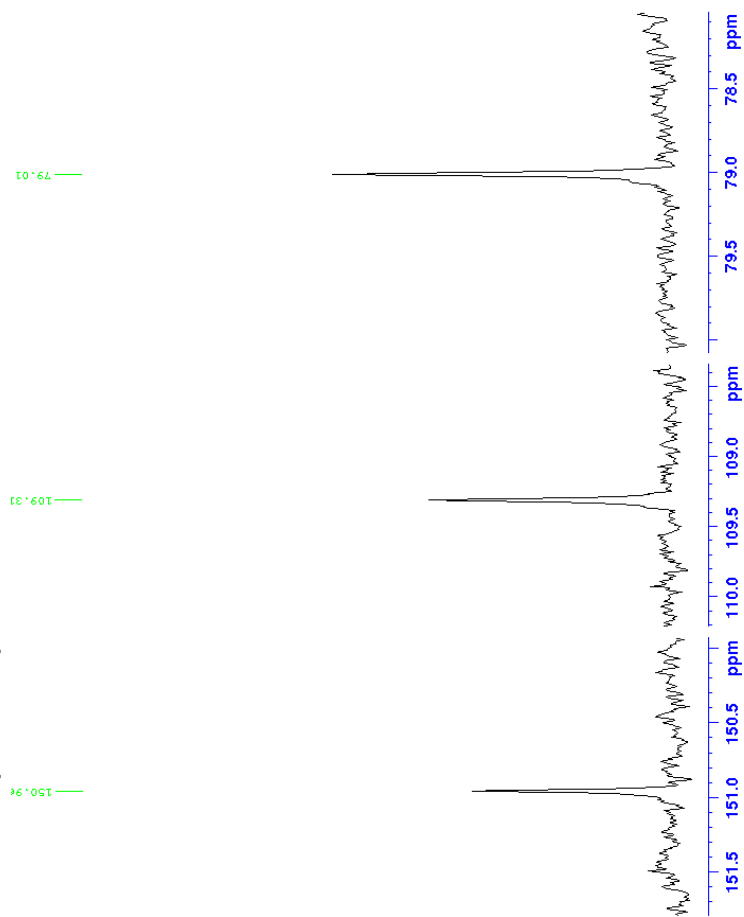


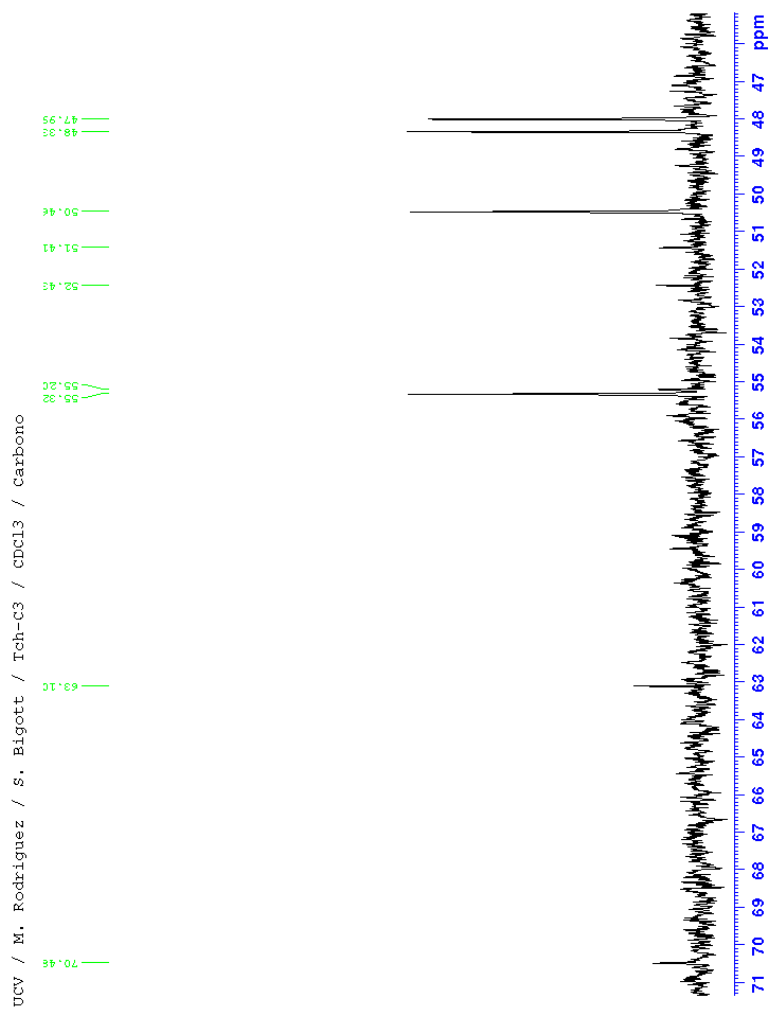
Peak	$\nu(\text{F1})$ [ppm]	$\nu(\text{F1})$ [Hz]	Intensity [rel]
1	109.3090	8251.2283	-4.47
2	78.9999	5963.3352	4.35
3	77.2004	5827.4993	1.24
4	70.4657	5319.1281	0.63
5	63.1023	4763.2993	-1.00
6	55.2974	4174.1437	4.08
7	55.1754	4164.9345	0.60
8	52.4481	3959.0633	0.67
9	51.4384	3882.8457	0.65
10	50.4365	3807.2169	3.80
11	48.3025	3646.1312	3.67
12	47.9815	3621.9004	3.99
13	39.9973	3019.2102	-4.83
14	39.3614	2971.2091	-0.89
15	38.7043	2921.6077	-4.96
16	38.5834	2912.4815	-0.60
17	38.0514	2872.3233	3.54
18	37.4191	2824.5939	-0.68
19	37.2798	2814.0788	-0.85
20	35.6871	2693.8533	-0.69
21	35.5792	2685.7084	-4.73
22	34.4195	2598.1680	-0.82
23	34.2784	2587.5171	-4.61
24	33.9787	2564.8941	-0.79
25	33.3284	2515.8060	0.61

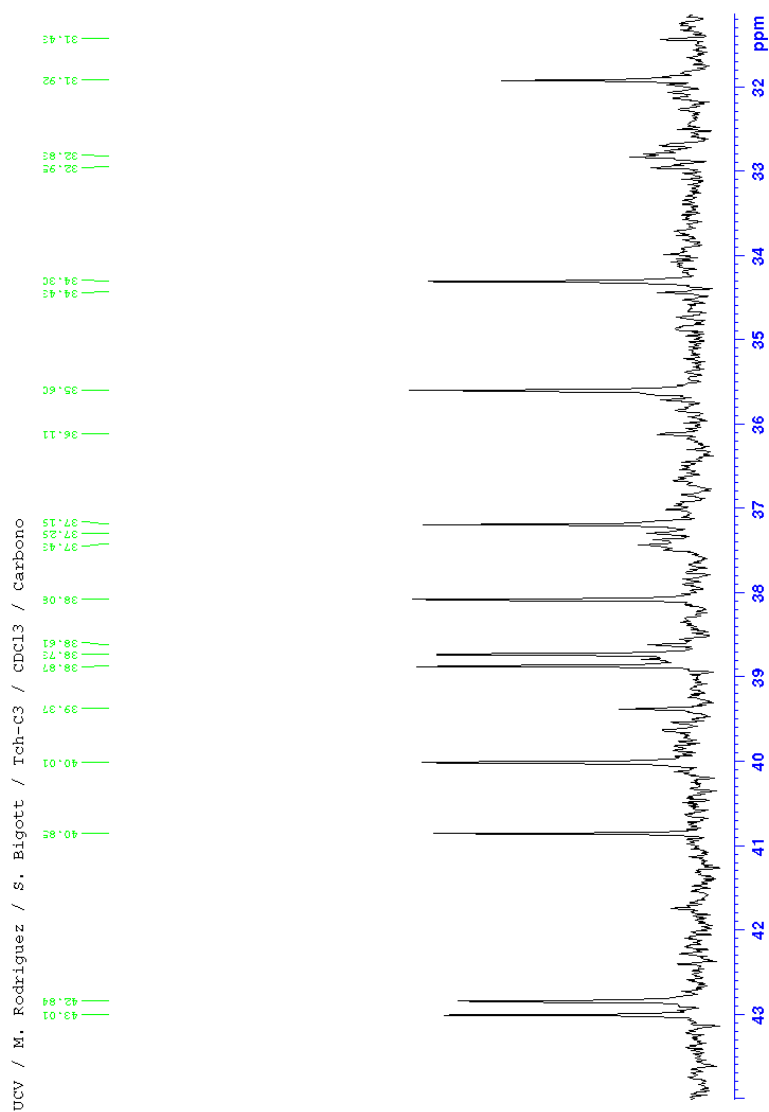
26	32.9399	2486.4799	-0.78
27	32.8149	2477.0443	-0.70
28	32.0471	2419.0866	-0.59
29	31.9145	2409.0772	-1.74
30	31.4279	2372.3461	0.74
31	30.3009	2287.2741	0.91
32	30.1861	2278.6084	0.65
33	29.8443	2252.8075	-4.48
34	29.6877	2240.9865	-15.00
35	29.4498	2223.0285	-1.04
36	29.3496	2215.4649	-2.03
37	29.1967	2203.9232	-0.59
38	28.7425	2169.6377	0.53
39	27.9801	2112.0877	6.52
40	27.4411	2071.4011	-5.22
41	27.4157	2069.4837	-5.60
42	25.7317	1942.3664	-0.61
43	25.4259	1919.2830	0.61
44	25.1399	1897.6942	-3.98
45	24.7864	1871.0101	-0.79
46	22.7086	1714.1666	1.03
47	22.6786	1711.9021	-1.96
48	22.6146	1707.0710	1.17
49	21.0127	1586.1510	-0.68
50	20.9257	1579.5838	-3.87
51	19.7405	1490.1186	1.18
52	19.6003	1479.5355	0.58
53	19.2995	1456.8295	3.79
54	18.3137	1382.4161	-4.17
55	17.9946	1358.3287	5.68

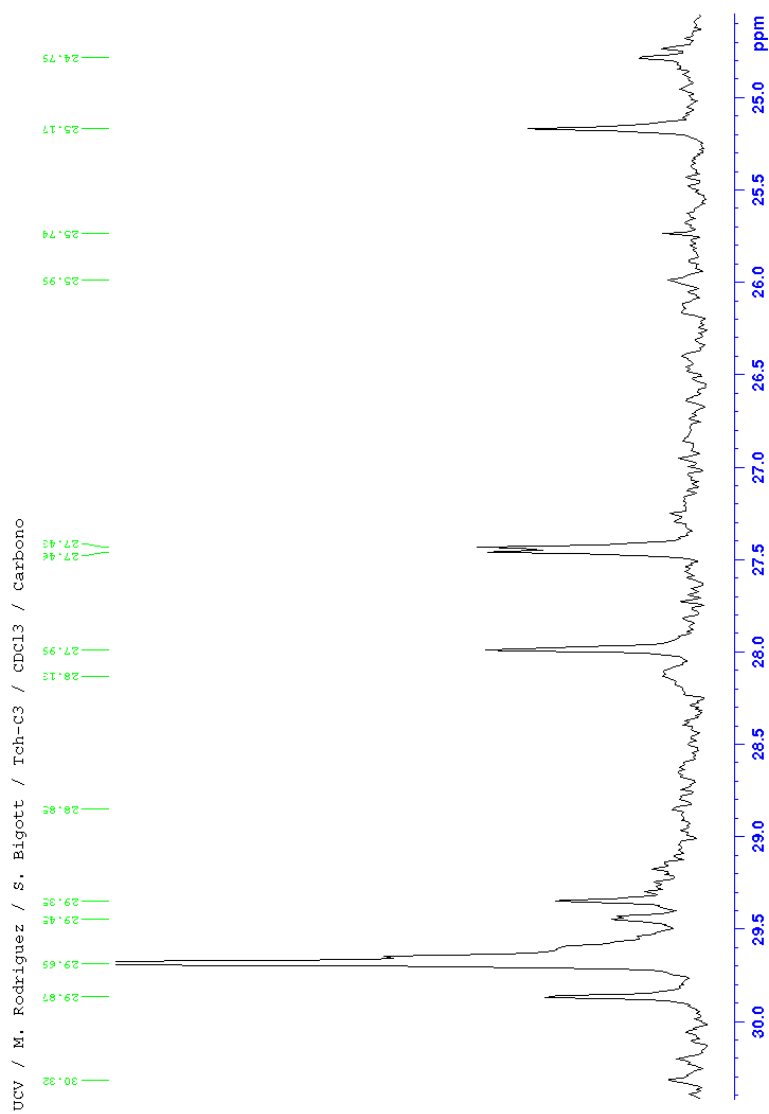
56	17.3778	1311.7693	0.73
57	16.1088	1215.9784	6.16
58	15.9692	1205.4407	5.98
59	15.3582	1159.3191	5.85
60	14.5409	1097.6249	5.99
61	14.1047	1064.6982	2.41
62	13.9912	1056.1306	0.62
63	12.1322	915.8034	0.54
64	11.9420	901.4461	0.70

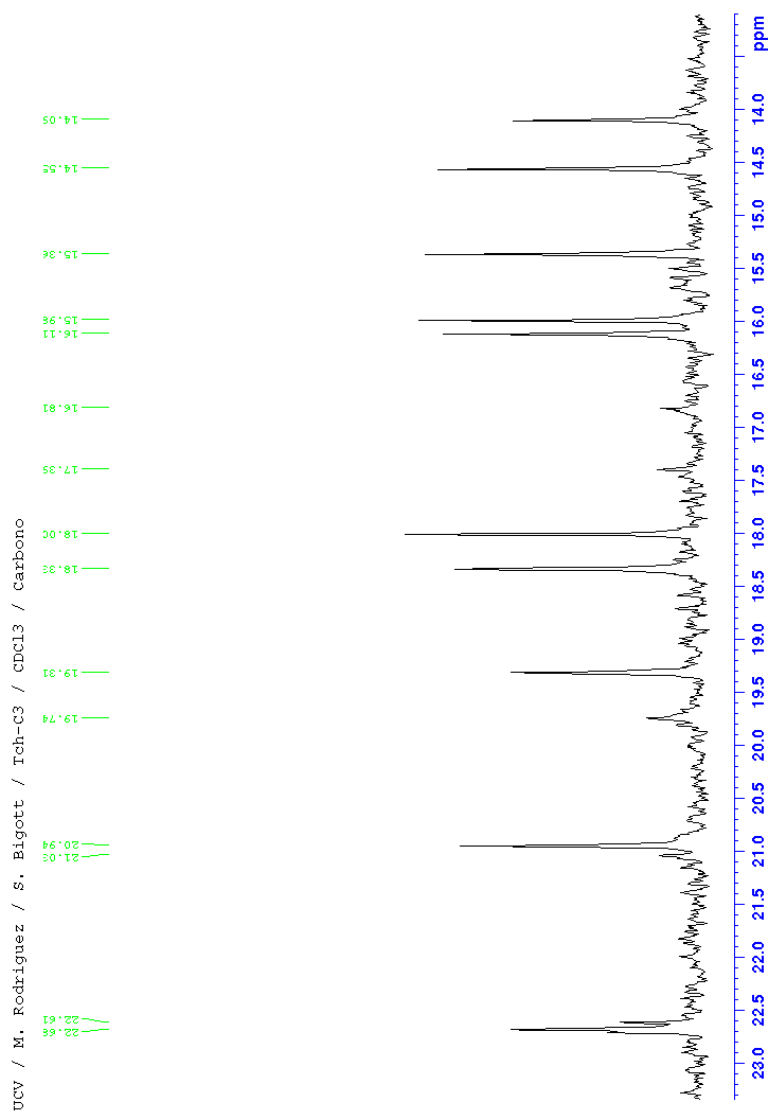
UCV / M. Rodríguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono









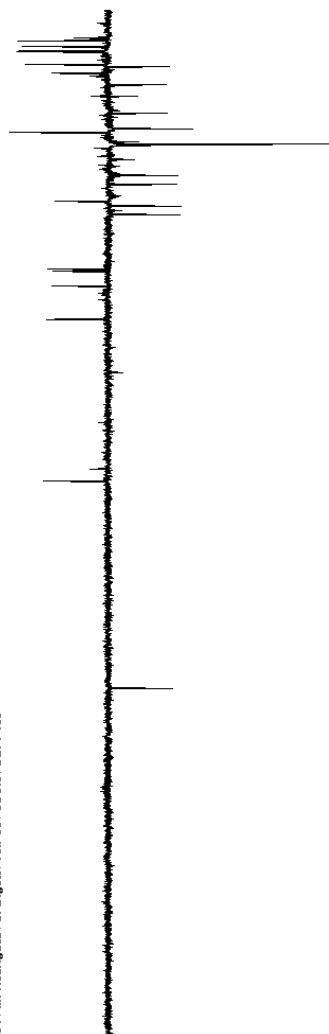


Peak	v(F1) [ppm]	v(F1) [Hz]	Intensity [rel]
1	150.9616	11395.3893	0.33
2	123.7496	9341.2819	0.07
3	109.3096	8251.2735	0.40
4	79.0096	5964.0673	0.55
5	77.4182	5843.9400	14.78
6	77.1980	5827.3181	0.68
7	76.9951	5812.0021	15.00
8	76.5719	5780.0567	14.69
9	70.4814	5320.3132	0.07
10	63.1039	4763.4200	0.10
11	55.3231	4176.0836	0.49
12	55.1998	4166.7762	0.07
13	52.4266	3957.4403	0.07
14	51.4144	3881.0340	0.06
15	50.4636	3809.2625	0.48
16	48.3285	3648.0938	0.48
17	47.9909	3622.6099	0.46
18	43.0062	3246.3381	0.43
19	42.8442	3234.1095	0.40
20	40.8526	3083.7728	0.43
21	40.0087	3020.0707	0.46
22	39.3734	2972.1149	0.13
23	38.8672	2933.9042	0.47
24	38.7272	2923.3363	0.44
25	38.6119	2914.6328	0.08

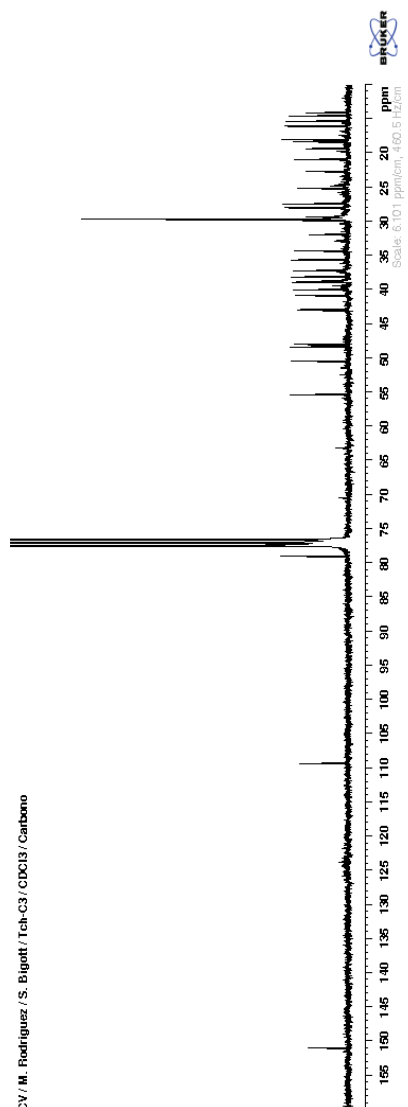
26	38.0774	2874.2859	0.48
27	37.4289	2825.3336	0.10
28	37.2930	2815.0752	0.08
29	37.1861	2807.0058	0.45
30	36.1134	2726.0327	0.06
31	35.5959	2686.9690	0.47
32	34.4316	2599.0814	0.06
33	34.3023	2589.3211	0.45
34	32.9499	2487.2347	0.08
35	32.8251	2477.8142	0.11
36	31.9158	2409.1753	0.32
37	31.4281	2372.3611	0.06
38	30.3162	2288.4290	0.07
39	29.8654	2254.4002	0.38
40	29.6860	2240.8581	2.17
41	29.4466	2222.7869	0.21
42	29.3474	2215.2988	0.35
43	28.8517	2177.8807	0.06
44	28.1306	2123.4482	0.09
45	27.9889	2112.7519	0.52
46	27.4597	2072.8051	0.52
47	27.4339	2070.8576	0.54
48	25.9893	1961.8114	0.07
49	25.7359	1942.6834	0.08
50	25.1687	1899.8681	0.42
51	24.7852	1870.9195	0.14
52	24.4666	1846.8699	0.07
53	23.3740	1764.3946	0.07
54	22.6760	1711.7058	0.35
55	22.6107	1706.7766	0.15

56	21.0347	1587.8117	0.07
57	20.9437	1580.9425	0.45
58	19.7390	1490.0053	0.10
59	19.3075	1457.4334	0.35
60	18.3280	1383.4955	0.45
61	18.0017	1358.8646	0.54
62	17.3890	1312.6148	0.07
63	16.8141	1269.2182	0.07
64	16.1114	1216.1747	0.49
65	15.9826	1206.4522	0.52
66	15.3570	1159.2285	0.51
67	14.5525	1098.5006	0.49
68	14.0933	1063.8377	0.35
69	-0.0230	-1.7362	0.10

UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



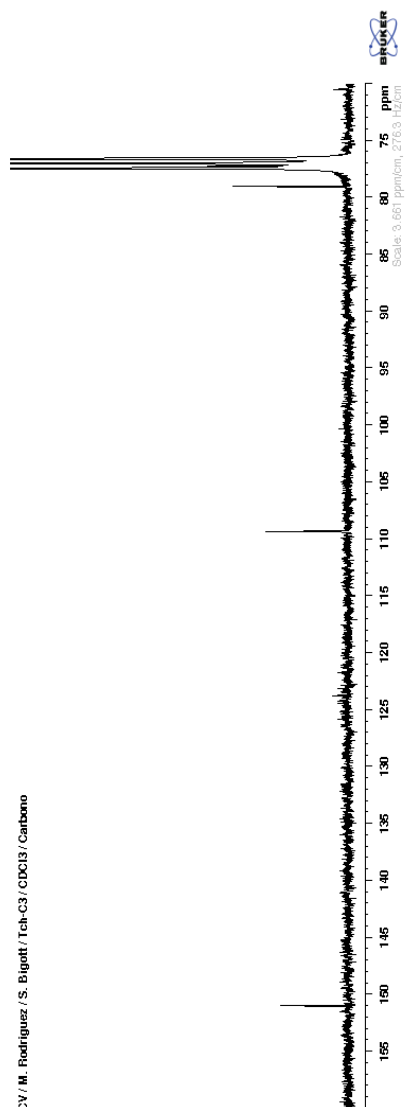
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



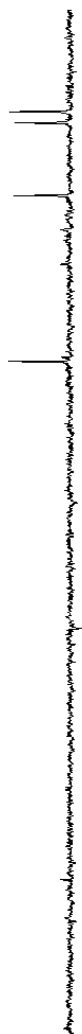
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



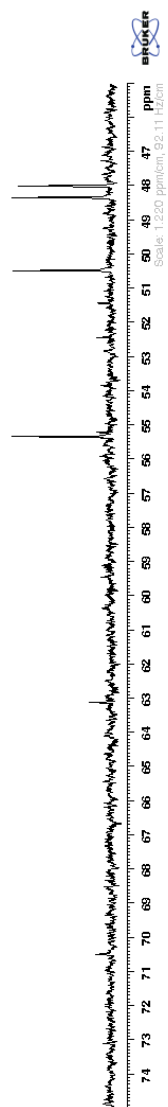
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



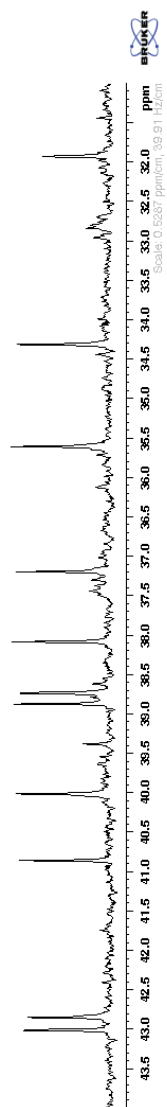
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



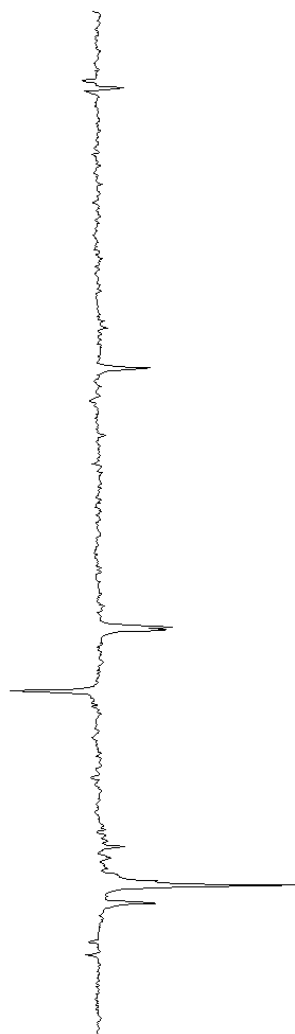
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



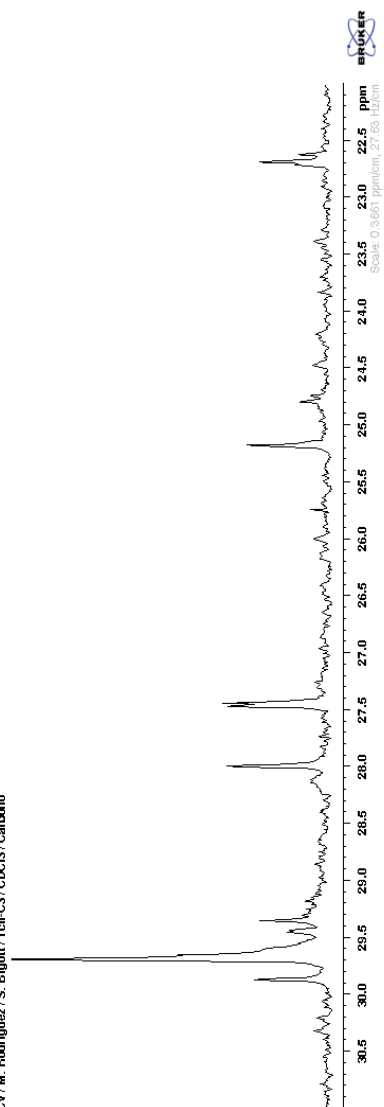
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



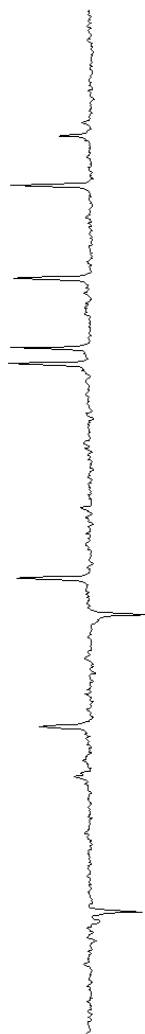
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



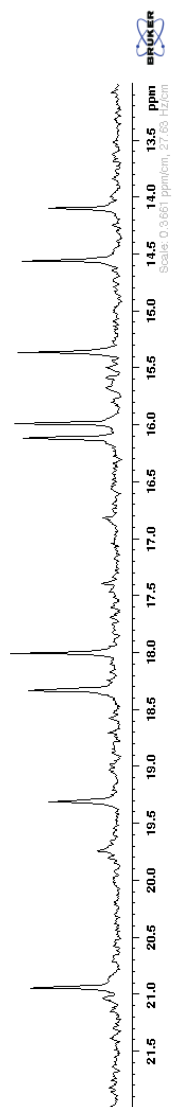
UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / DEPT 135



UCV / M. Rodriguez / S. Bigott / Tch-C3 / CDCl₃ / Carbono



Anexo 4. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la Fracción Tch-E₁

