



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Química de Medicamentos



**Estudio de la composición química y diversas actividades de los extractos,
aceites esenciales y compuestos puros aislados de la corteza y frutos de
Vismia baccifera var. *dealbata* (Triana & Planch).**

(Tesis Doctoral)

Por: Lic. Marietta Vizcaya S.

Tutora: Dra. Janne del Carmen Rojas V.

Noviembre, 2013.

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae)

[A review on the chemical composition and pharmacological activities of *Vismia* genus (Guttiferae)]

Marietta VIZCAYA, Antonio MORALES, Janne ROJAS*, Richard NUÑEZ

Grupo de investigación "Biomoléculas Orgánicas", Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*Contactos | Contacts: Janne Rojas - E-mail address: janner@ula.ve

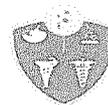
Abstract

Vismia genus is an important source of natural medicinal products, thus, information collected in this review is an attempt to cover the most recent developments in the ethnopharmacology, pharmacology and phytochemistry of this genus. Anthraquinones and other quinonoid derivatives, terpenoids and volatile constituents have been reported as the major constituents isolated from different *Vismia* species. On the other hand, pharmacological studies carried out to date have revealed the variety of anti-plasmodium, antioxidant, antimicrobial and antifungal properties of extracts and pure isolated compounds of the different species tested. The information summarized in this paper intends to serve as a reference tool to practitioners in the fields of ethnopharmacology and chemistry of natural products.

Keywords: *Vismia*, Guttiferae, terpenoids, anthraquinones, santonins, pharmacological activities.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO EN MICROBIOLOGÍA
COLEGIO DE BIOANALISTAS DEL ESTADO MERIDA
MERIDA-VENEZUELA



CERTIFICADO

QUE SE OTORGA A:

MARIETTA VIZCAYA

COMO PONENTE DE LA CONFERENCIA

"Es el género *Vismia* fuente de sustancias con potencial antimicrobiano?"

2 UC FECOBIOVE

En el marco de las

V JORNADAS DEL POSTGRADO EN MICROBIOLOGÍA "XX ANIVERSARIO"

Realizadas en Mérida del 28 al 29 de junio de 2012



Dr. José Rafael Luna
Decano
Facultad de Farmacia y
Bioanálisis

Dr. César Pérez M
Coordinador
Postgrado en Microbiología

Farm. Cándida Díaz R.
Coordinadora
Comité Organizador



Dr. Reina Argüeso
Presidenta
Colegio de Bioanalistas del Estado Mérida

www.bdigital.ula.ve

A la memoria de:

Dr. Ramón María Soto.

Dr. Ramón Alfonso Soto.

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de un Doctorado, inmediatamente me embarga la idea de que el mismo hubiese sido imposible sin la participación de seres e instituciones que han facilitado los objetivos para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellos, expresándoles mis agradecimientos.

- A Dios Todopoderoso.
- A mi Madre MSc. Mariela Soto y mi Hija Sofia Vizcaya.
- A mi Esposo Orlando Marquéz.
- A mis Abuelas María de Soto y Ana Elda Mora.
- A mis Hermanos Ing. Marielisa Vizcaya, MSc. Nilmar Vizcaya. Y Victor Sánchez
- A mi Sobrinos Mariel Páez, Sebastián Sánchez y Juan Diego Aranguibel.
- A la ilustre Universidad de los Andes.
- A mi Tutora Dra. Janne del Carmen Rojas Vera.
- A mi Cotutor Dr. Antonio Morales.
- A mis Profesores del Postgrado MSc. Ginna Meccia, MSc. Nancy Kuhory, Dr. Alfredo Usubillaga, Dr. Luis Rojas, Dr. Andres Abad, Dra. Irama Ramírez, Dr. Gerardo Medina, Lic. Cristina Grassi, MSc. Efren Andrade, Dra. Margarita Boogkman y Dr. Ali Bahsas
- A mis Compañeros de Cohorte MSc. Joel Lara y Microbiólogo Shirley Baldovino.
- A mis Compañeros del Postgrado Licda. Patricia Pérez, Fam. Claudia Plaza, Fam. Richard Núñez, Fam. Julio Rojas, Fam. Kaylin Armas, Fam. Lenny Pérez, Dra. Marcela Torres, Dra. Alida Pérez, Fam. Ysbelia Obregón, MSc. Lorena Díaz y Fam. Vanessa Hernández.
- A mis asesores en actividad biológica Dra. Celina Pérez, MSc. Elaisa Salas, Dr. Argenis Mora e Ing. Wilson Ramírez.
- A mis amigos de siempre Esp. Tbisay Ramírez, Zaira Nava, Rafael Montoya, T.S.U. Daniela Lobo, Dra. Lorena Lozada, Lic. Diego Sánchez, Dra. Nahir Dugarte, T.S.U. Solcire Montilva y Lic. Gabriela Ayestaran.

¡Mi Gratitud eterna!

Marietta Vizcaya. Tesis Doctoral

RESUMEN

De Corteza y Frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Triana & Planch) (Guttiferae), se aislaron tres Triterpenos: lupeol, epifriedelanol y friedelina, junto a una mezcla de esteroides 70:30 de núcleo estigmastano de nombre β -sitosterol:Estigmasterol y la antraquinona Vismiaquinona; los cuales fueron caracterizados por estudios espectroscópicos de RMN uni y bi-dimensional y espectrometría de masas. Se obtuvieron los aceites de ambas partes de la especie, con un rendimiento de 1,7mL para la corteza (0,011%) y 0,8mL (0,007%) para los frutos, los cuales fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas empleando la base de datos Willey Ms data Library 6th y calculando los índices de Kovats para la identificación de los compuestos. Estas esencias se reportan por primera vez, constituyendo un aporte para el estudio fitoquímico del género *Vismia*. De los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de la corteza y frutos de la especie bajo estudio se ensayó la actividad antibacteriana contra 5 especies gram positivas y 7 especies gram negativas, la actividad antifúngica contra 5 levaduras de *Candida*, la actividad antioxidante frente al test de radical DPPH• y la actividad insecticida contra larvas de *Tecia solanivora* encontradas en *Solanum tuberosum*, lo que logró considerar a la planta como una posible fuente importante de antimicrobianos, antioxidantes e insecticidas de origen natural.

SUMMARY

From Bark and Fruit of *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Triana & Planch) (Guttiferae), three Triterpenes were isolated: Lupeol, Epifriedelanol, Friedelin, and mixture 70:30 of sterols of name β -sitosterol:Stigmasterol with the Vismiaquinona anthraquinone. The compounds were characterized by one two-dimensional NMR spectroscopic studies and mass spectrometry. The essential Oils were obtained from both parts of the specie, yielding 1.7 mL for Bark (0.011%) and 0.8 mL (0.007%) for fruits, which was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry using the Willey data base Library 6th edition and the calculation of Kovats indices for identification of the components. These essences are reported for the first time, constituting a contribution to the phytochemical study of the *Vismia* genus. Extracts, essential oils and compounds isolated from the bark and fruit of the this specie were assayed for antibacterial activity against five gram positive species and 7 gram-negative species, the antifungal activity against 5 *Candida* yeasts, the antioxidant activity with test •DPPH radical and insecticidal activity against larvae of *Tecia solanivora* found in *Solanum tuberosum*, according to this study the plant is as possible source of antimicrobials, antioxidants and naturally insecticides.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pag.
1.-INTRODUCCIÓN.....	01
2.- ANTECEDENTES.....	03
2.1.- Composición Química del Género <i>Vismia</i>	03
2.1.1.-Antraquinonas.....	03
2.1.2.-Antronas.....	06
2.1.3.-Antranoides Prenilados.....	07
2.1.4.- Flavonoides.....	10
2.1.5.- Benzofenonas.....	10
2.1.6.- Xantonas.....	12
2.1.7.- Cumarinas.....	16
2.1.8.-Terpenos.....	16
2.1.8.1.-Sesquiterpenos.....	17
2.1.8.2.-Triterpenos.....	18
2.1.9.-Lignanos.....	20
2.2.-Cronología de los usos tradicionales y ensayos biológicos realizados a los extractos y algunos compuestos químicos aislados del género <i>Vismia</i> a partir del año 1962.....	21
2.3.-Composición Química de Aceites esenciales del género <i>Vismia</i>	28
2.4.-Evaluaciones antibacterianas en el género <i>Vismia</i>	28
2.5.-Evaluaciones de la actividad antifúngica en el género <i>Vismia</i>	37
2.6.-Evaluaciones de la actividad antioxidante del género <i>Vismia</i>	40
2.7.-Evaluación de la actividad insecticida en el género <i>Vismia</i>	41
3.- HIPOTESIS.....	43
4.- OBJETIVOS.....	43
4.1.-Objetivo general.....	43
4.2.-Objetivos específicos.....	43
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1.- Recolección del material botánico.....	45
5.2.- Extracción del material botánico.....	45
5.3.- Separación, purificación e identificación de los componentes presentes en el extracto.....	46
5.3.1.-Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	46
5.3.2.-Cromatografía de Capa Preparativa.....	47
5.3.3.-Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-SM).....	47
5.3.4.-Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).....	48
5.3.5.-Espectroscopia Infrarroja (IR).....	49
5.3.6.-Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C (RMN).....	49
5.3.7.-Punto de Fusión.....	49
5.4.-Obtención de los aceites esenciales.....	49
5.5.-Evaluación de la actividad antibacteriana.....	51

5.5.1.-Microorganismos y sustancias de referencia.....	52
5.5.2.-Medios de cultivo.....	52
5.5.3.-Ensayo cualitativo.....	53
5.5.4.-Ensayo cuantitativo.....	53
5.6.-Evaluación de la actividad antifúngica.....	55
5.6.1.-Microorganismos y sustancias de referencia.....	56
5.6.2.-Medios de cultivo.....	56
5.6.3.-Ensayo cualitativo.....	57
5.6.4.-Ensayo cuantitativo.....	58
5.7.- Evaluación de la actividad antioxidante.....	60
5.7.1.-Materiales y métodos.....	60
5.7.2.-Sustancias a ensayar.....	60
5.7.3.-Sustancias de referencia.....	60
5.7.4.-Ensayo experimental.....	61
5.8.-Evaluación de la actividad insecticida sobre larvas de <i>Tecia solanivora</i>	62
5.8.1.-Sustancias a ensayar.....	63
5.8.2.-Organismos y sustancias de referencia.....	63
5.8.3.-Recolección del insecto.....	64
5.8.4.-Ensayo experimental.....	64
6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
6.1.- Proceso experimental para la fitoquímica de corteza y frutos de <i>V. baccifera</i>	67
6.2.- Identificación de sustancias químicas presentes en corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	67
6.3.-Caracterización por IR, RMN y MS de sustancias aisladas de corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	77
6.3.1-Compuestos (1) y (2). Mezcla 30:70 estigmasta-5,22-dien-3 β -ol,(Estigmasterol) y estigmasta-5-en-3 β -ol (β -Sitosterol).....	77
6.3.2-Compuesto (3). Lup-20(29)en-3 β -ol. (Lupeol).....	94
6.3.3-Compuestos (4) y (5). Triterpenos de núcleo friedelano. Friedelan-3-ona (4) (Friedelina) y friedelan-3- β -ol (5) (Epifriedelanol).....	106
6.3.4.-Compuesto (6). {1,8-dihidroxi-3-metil-7-(4'-metil-1-pentenil)-6-metoxi-antraquinona} (Vismiaquinona).....	126
6.4.-Aceites esenciales.....	141
6.5.-Evaluación de la actividad antibacteriana.....	148
6.6.-Evaluación de la actividad antifúngica.....	151
6.7.-Evaluación de la actividad antioxidante.....	155
6.8.-Evaluación de la actividad insecticida.....	160
7.-CONCLUSIONES.....	164
8.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura N° 1	45
Figura N° 2	51
Figura N° 3	54
Figura N° 4	55
Figura N° 5	58
Figura N° 6	59
Figura N° 7	61
Figura N° 8	63
Figura N° 9	66
Figura N° 10	68
Figura N° 11	69
Figura N° 12	77
Figura N° 13	78
Figura N° 14	79
Figura N° 15	80
Figura N° 16	81
Figura N° 17	83
Figura N° 18	85
Figura N° 19	88
Figura N° 20	89
Figura N° 21	89
Figura N° 22	90
Figura N° 23	91
Figura N° 24	92
Figura N° 25	94
Figura N° 26	95
Figura N° 27	96
Figura N° 28	98
Figura N° 29	99
Figura N° 30	102
Figura N° 31	102
Figura N° 32	103
Figura N° 33	103

Figura N°34	Ampliación del espectro HMBC del compuesto (3) para los carbonos situados a campo bajo.....	104
Figura N°35	Ampliación del espectro HMBC del compuesto (3) para los carbonos situados a campo alto.....	104
Figura N°36	Cromatogramas de los compuestos (4) y (5).....	107
Figura N°37	Espectros infrarrojos (film en KBr) de los compuestos (4) y (5).....	108
Figura N°38	Espectros ¹ H-RMN y ampliaciones (400MHz, CDCl ₃) de los compuestos (4) (5).....	109
Figura N°39	Desplazamientos químicos y ampliación del espectros ¹³ C-RMN (100MHz, CDCl ₃) del compuesto (4).....	112
Figura N°40	Espectro RMN- ¹³ C/DEPT-135 del compuesto (4).....	113
Figura N°41	Desplazamientos químicos y ampliación del espectros ¹³ C-RMN (100MHz, CDCl ₃) del compuesto (5).....	114
Figura N°42	Espectro RMN- ¹³ C/DEPT-135 del compuesto (5).....	115
Figura N°43	Espectros de masas del compuesto (4).....	118
Figura N°44	Espectros de masas del compuesto (5).....	118
Figura N°45	Propuesta de patrones de fragmentación de los triterpenos de núcleo Friedelano. Compuestos (4) y (5).....	120
Figura N°46	Espectros ¹ H, ¹ H-COSY de los compuestos (4) y (5).....	122
Figura N°47	Espectro HSQC del compuesto (4).....	123
Figura N°48	Espectro HSQC del compuesto (5).....	124
Figura N°49	Espectro HMBC del compuesto (4).....	124
Figura N°50	Espectro HMBC del compuesto (5).....	125
Figura N°51	Cromatograma del compuesto (6).....	126
Figura N°52	Espectro de masas del compuesto (6) y de la Vismiaquinona.....	127
Figura N°53	Propuesta de patrón de fragmentación del compuesto (6).....	129
Figura N°54	Espectro infrarrojo (KBr) del compuesto (6).....	130
Figura N°55	Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto (6).....	131
Figura N°56	Espectro ¹ H, ¹ HCOSY (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto (6).....	134
Figura N°57	Espectro de ¹³ C-RMN (CDCl ₃ , 100 MHz) del compuesto (6).....	135
Figura N°58	Espectro RMN- ¹³ C/DEPT-135 del compuesto (6).....	137
Figura N°59	Espectro y ampliaciones HSQC (CDCl ₃) del compuesto (6).....	138
Figura N°60	Espectro HMBC y ampliaciones (CDCl ₃) del compuesto (6).....	139
Figura N°61	Resultados del ensayo antifúngico.....	153
Figura N°62	Determinación del porcentaje de reducción medio del DPPH• (IC ₅₀) para EMC y EMF.....	158
Figura N°63	Efectos de las sustancias en los tratamientos aplicados a larvas de <i>Tecia solanivora</i>	162

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla N° 1 Composición química de aceites esenciales del género <i>Vismia</i>	28
Tabla N° 2 Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género <i>Vismia</i>	29
Tabla N° 3 Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram negativas de sustancias provenientes de especies del género <i>Vismia</i>	34
Tabla N° 4 Estudios de susceptibilidad antifúngica de sustancias provenientes de especies del género <i>Vismia</i>	37
Tabla N° 5 Composición química de los extractos de corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> por cromatografía de gases espectrometría de masas.....	70
Tabla N° 6 Bandas de absorción del espectro infrarrojo de la mezcla de compuestos (1) y (2) y datos reportados en la bibliografía para el colesterol.....	80
Tabla N° 7 Desplazamientos químicos (δ), en el espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de los hidrógenos de la mezcla de compuestos (1) y (2).....	82
Tabla N° 8 Desplazamientos químicos de espectros RMN- ¹³ C (100Hz, CDCl ₃) y asignación de carbonos a partir de espectros DEPT-135 de los compuestos (1), (2) y compuestos de referencia.....	86
Tabla N° 9 Información de los espectros de masas de los compuestos (1) y (2) y de los datos reportados en la bibliografía del espectro de masas.....	88
Tabla N°10 Bandas de absorción significativas en el espectro IR (KBr) del compuesto (3).....	95
Tabla N°11 Información de espectro RMN ¹ H del compuesto (3) y datos reportados en la bibliografía para el (Lupeol).....	97
Tabla N°12 Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C (100Hz, CDCl ₃) y asignación del tipo de carbono a partir de espectros DEPT-135 del compuesto (3) y comparación con el Lupeol.....	100
Tabla N°13 Bandas de absorción significativas en el espectro IR (KBr) de los compuestos (4) y (5).....	108
Tabla N°14 Desplazamientos químicos en los espectros ¹ H-RMN (400Hz, CDCl ₃) de los compuestos (4) y (5) y datos reportados en la bibliografía.....	110
Tabla N°15 Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C (100Hz, CDCl ₃) y asignación del tipo de carbono a partir de DEPT-135 de los compuestos (4) y (5) y de Friedelina y Epifriedelinol.....	116
Tabla N°16 Información de espectro de masas del compuesto (6) y datos reportados en la bibliografía para la <i>Vismiaquinona</i>	128
Tabla N°17 Información de espectro infrarrojo del compuesto 6 y datos reportados en la bibliografía para la <i>Vismiaquinona</i>	130

Tabla N°19	Información de espectro RMN ¹³ C del compuesto 6 (Vismiaquinona) y datos reportados en la bibliografía.....	136
Tabla N°20	Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de la corteza de <i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	141
Tabla N°21	Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de de los frutos de <i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	143
Tabla N°22	Resultados de la susceptibilidad antibacteriana de las sustancias provenientes de la corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	148
Tabla N°23	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de las sustancias provenientes de la corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	149
Tabla N°24	Actividad antifúngica de los aceites esenciales de la corteza y frutos de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	151
Tabla N°25	Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de la capacidad secuestrante de radicales libres (CSRL) para las sustancias obtenidas de <i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i> a 1000µg/mL.....	155
Tabla N°26	Determinación de la capacidad secuestrante de radicales libres (CSRL) para los extractos metanólicos de Corteza y Frutos obtenidos de <i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i> a diferentes concentraciones.....	157
Tabla N°27	Datos obtenidos del análisis de regresión lineal en la determinación gráfica del porcentaje de reducción medio del DPPH• (IC ₅₀) para EMC y EMF.....	159
Tabla N°28	Resultados de la evaluación de la actividad insecticida de sustancias provenientes de <i>Vismia baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	160

1.- INTRODUCCIÓN

La fitoterapia, conocida también como herbolaria, es la ciencia del uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos para prevención o tratamiento de patologías. Los medicamentos fitoterápicos están constituidos exclusivamente por ingredientes activos de origen vegetal, usualmente no definidos químicamente, formulados bajo la forma farmacéutica más adecuada para su administración, lo que implica que para la elaboración de medicamentos fitoterápicos se pueden emplear principalmente: drogas vegetales, que generalmente se presentan en forma molida o pulverizada, productos obtenidos por extracción o en algunos casos particulares, principios activos purificado (Cañigüeral *et al.*, 2003).

Durante mucho tiempo, la mayoría de los fármacos, han sido de origen natural y han tenido en su composición hierbas, productos de origen animal y materiales inorgánicos. El gran avance que ha aportado la fitoquímica al desarrollo de herramientas terapéuticas, a través del aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales, ha conducido a que ambas ciencias estén estrechamente relacionadas, pues se unen con el mismo objetivo solo que la fitoquímica antecede a la fitoterapia, es decir, para la obtención de un fitoterápico es necesario realizar un análisis fitoquímico previo.

El principal motivo que despierta la realización de esta investigación, es conocer desde el punto de vista de composición química, la planta de nombre *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch, perteneciente al género *Vismia* de la familia Guttiferae (Clusiaceae), descrita por Antonie Laurent de Jussieu, perteneciente a una familia que comprende aproximadamente 1370 especies, dentro de 97 géneros (Ewan 1962).

El género *Vismia* no solo es precursor de muchos fármacos y por ende objeto de múltiples estudios e investigaciones, sino que también es relevante por poseer especies de importancia económica para la producción de madera, gomas, pigmentos, óleos, esencias y resinas (Ewan 1962). Métodos y ensayos variados, hicieron de los extractos de las especies de *Vismia*, importantes antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios, insecticidas y antivirales entre otros, cuyos descubrimientos merecen especial atención y profundización en el estudio de este importante género del cual han sido

reportados como principales fitoconstituyentes, antraquinonas y otros derivados quinónicos, terpenoides, benzofenonas, xantonas, lignanos, cumarinas y componentes volátiles (Vizcaya et al., 2011).

El estudio de la composición química y diversas actividades de *Vismia baccifera* var. *dealbata* representa una investigación prometedora, esta afirmación se basa en los antecedentes descritos de este importante género y los que están directamente relacionados con la especie bajo estudio, los cuales han hecho de *Vismia baccifera* una especie vinculada al área de Química de Medicamentos y una fuente natural con destacadas actividades farmacológicas.

www.bdigital.ula.ve

2.-ANTECEDENTES

2.1.-Composición Química del Género *Vismia*

La Familia Clusiaceae Lindley (Guttiferae Jussieu, nomina conservanda) se caracteriza por presentar arboles o arbustos de hojas simples, enteras u opuestas. Sus flores pueden ser bisexuales o unisexuales mientras que sus frutos se exhiben en drupas, bayas o cápsulas. Al realizar un corte expiden un exudado lechoso o de color amarillo-anaranjado. Por su parte, el género *Vismia*, comprendido dentro de esta familia, consta alrededor de 55 especies distribuidas en las regiones tropicales de América con algunas especies presentes en Asia y África tropical (Ewan, 1962).

El deseo permanente de los investigadores por conseguir medicamentos de origen natural, así como el reiterado uso y aprobación de la medicina folclórica tradicional, llevó a una serie de científicos a desarrollar detallados y minuciosos experimentos destinados a conocer plantas con actividades farmacológicas. Métodos y ensayos variados, hicieron de los extractos de las especies de *Vismia*, importantes antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios, insecticidas y antivirales entre otros,

cuyos descubrimientos merecen especial atención y profundización en el estudio de este importante género. Antraquinonas y otros derivados quinónicos, terpenoides, benzofenonas, xantonas, lignanos, cumarinas y componentes volátiles han sido reportados como constituyentes de las especies de *Vismia*.

2.1.1.-Antraquinonas

Las antraquinonas son compuestos aromáticos derivados del antraceno. Constituyen el grupo más importante de las quinonas naturales, son la fuente de una cantidad importante de colorantes y se caracterizan por su poder laxante (García, 1992). Las más populares aisladas del género bajo estudio son las llamadas vismiaquinonas; las cuales son generalmente coloreadas y se caracterizan por ser polvos de grano muy fino.

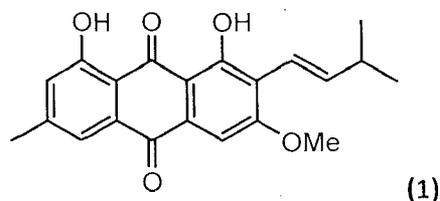
Dentro de ellas se pueden mencionar: vismiaquinona A **(1)** aislada de *V. reirchartiana* Ewan (Goncalves y Mors, 1981), *V. japurensis* Reichard (Miraglia *et al.*, 1981), *V. martiana* Richard (Nagen y Faria de Jesús, 1990), *V. parviflora* Cham & Schltidl (Nagen y Faustino, 1997), *V. baccifera* Planch & Triana (Hussein *et al.*, 2003), *V. laurentii* De Wild (Nguemaving *et al.*, 2006) y *V. baccifera var. dealbata* Planch & Triana (Salas *et al.*, 2008); vismiaquinona B **(2)** extraída de *V. japurensis*

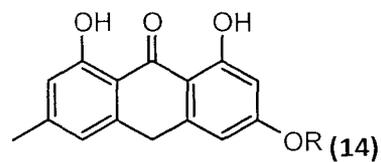
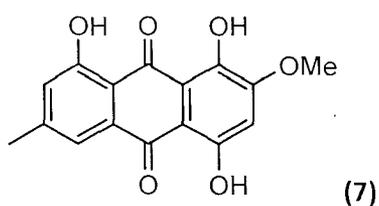
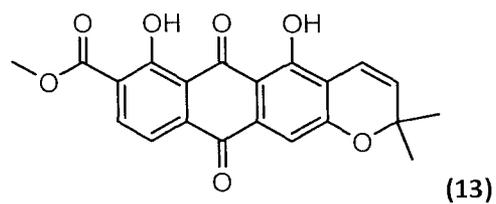
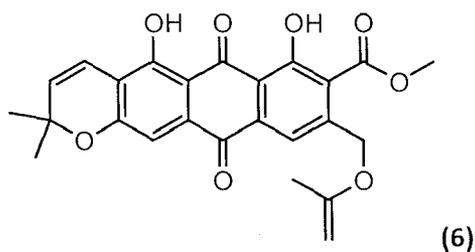
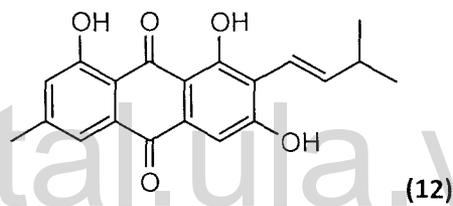
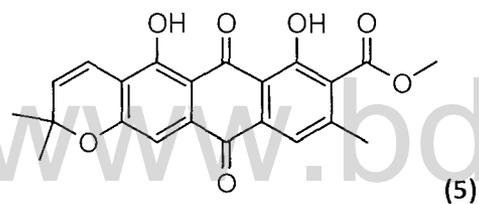
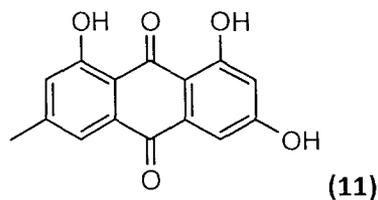
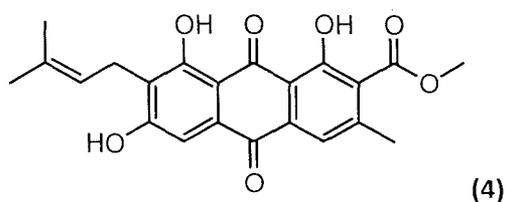
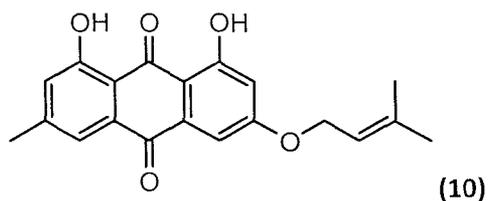
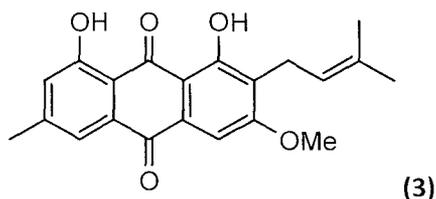
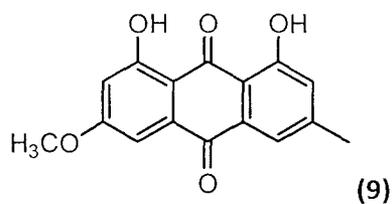
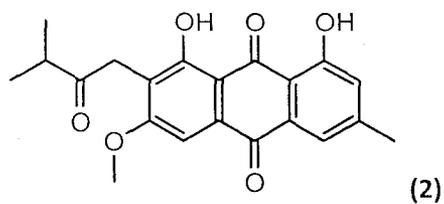
(Miraglia *et al.*, 1981), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990) y *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006); y por último la vismiaquinona C (**3**) encontrada en *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990) y *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997). Este tipo de quinonas tienen la peculiaridad de estar incluidas dentro de gomas de resinas y son usadas como laxantes drásticos.

Por otra parte, las laurentiquinonas llamadas así por ser aisladas de la *V. laurentii* demostraron actividad antimalárica contra el *Plasmodium falciparum*, y recibieron los nombres de Laurentiquinona A (**4**), B (**5**) y C (**6**) (Noungoue *et al.*, 2008). Cabe destacar otra serie de antraquinonas que representan un grupo de compuestos que son comunes en productos naturales; Isoxantrorina (**7**) extraída de *V. laurentii* (Noungoue *et al.*, 2008), ácido crisofánico (**8**) encontrado en *V. guaramirangae* Huber (Camele *et al.*, 1982), *P. febrifugum* Hochr (Botta *et al.*, 1983) *V. cayenneensis* Jacq (Pinheiro *et al.*, 1984), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990), y *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997); fisciión (**9**) aislado de *V. cayennensis* (Nagen y Faria de Jesús, 1990), *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982), *V. japurensis*, *V. mexicana* (Pinheiro *et al.*, 1984) y *V. rubescens* Oliv (Schultes, 1993); madagascina (**10**) hallada en *V. guaramirangae* (Camele, 1982), *V.*

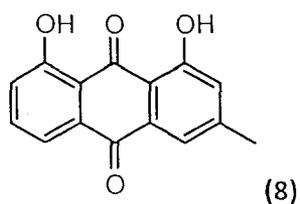
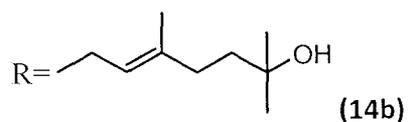
martiana (Nagen y Faria de Jesús, 1990) y *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997); emodina (**11**) localizada en *P. glaberrimum* Spach (Delle Monache *et al.*, 1985); 2-Isoprenil-emodina (**12**) aislada de *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982), *P. febrifugum* (Botta *et al.*, 1983), *P. glaberrimum* (Delle Monache *et al.*, 1985) y *P. corymbiferum* Hochr y el Metil-5,7-dihidroxi-2,2,9-trimetil-6,11-dihidroxi-2-Hantra [2,3-b]piran-8-carboxilato (**13**) extraído de *V. laurentii* (Noungoue *et al.*, 2008).

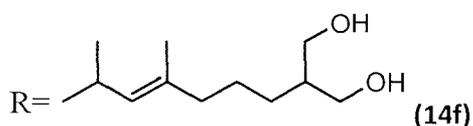
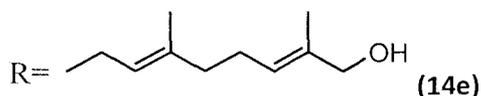
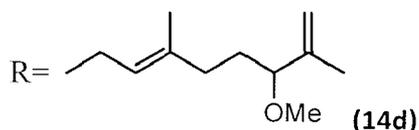
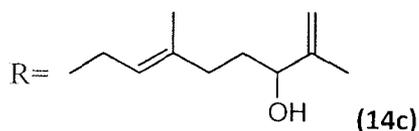
De la *V. guianensis* Aubl y de la *V. orientalis* Engl se aislaron una serie de antraquinonas que llevan por núcleo la figura (**14**) las cuales fueron sometidas a ensayos citogénicos *in vitro* mostrando ser activos el 3-geranil-oxi-6-metil-1,8-dihidroxi-antraquinona (**14a**), 3-(19-hidroxigeraniloxi)-6-metil-1,8-dihidroxi-antraquinona (**14b**), 3-O-(2-hidroxi-3-metil-but-3-enil)emodina (**14c**), 3-O-(2-metoxi-3-metil-but-3-enil)emodina (**14d**), 3-O-(3-hidroximetil-but-2-enil)emodina (**14e**) y 3-O-(3-hidroximetil-4-hidroxi-2-enil) emodina (**14f**) (Epifano *et al.*, 2007).





R = Geranyl (14a)

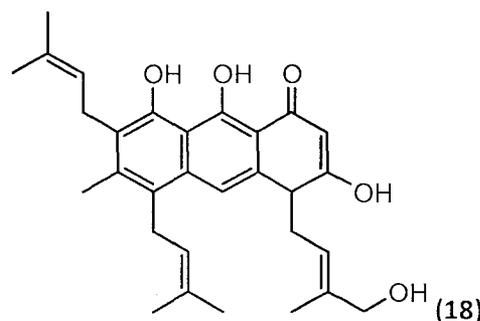
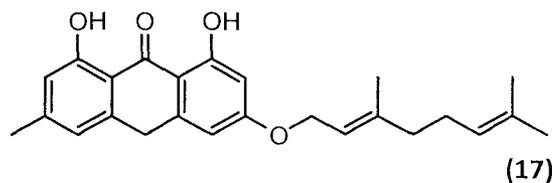
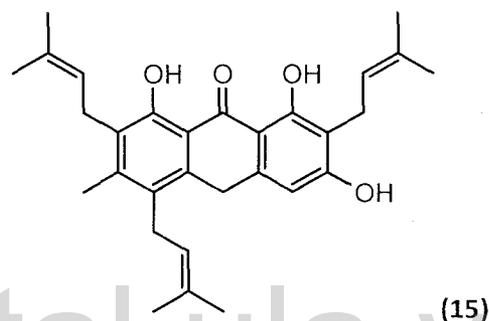


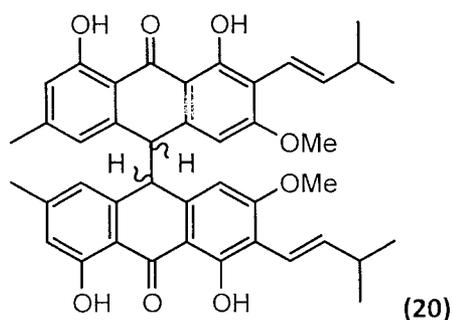
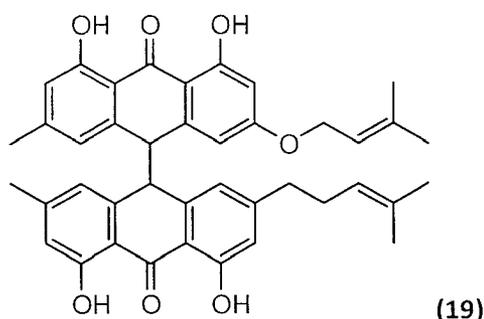


2.1.2.-Antronas

Las Antronas son derivados antraquinónicos reducidos que existen de forma libre y combinada; por lo general son productos amarillos pálidos e insolubles en medios básicos. Dentro de las antronas reportadas con frecuencia en este género se encuentran: ferruantrona (15) observada en *V. baccifera* var. *ferruginea* (Delle Monache et al., 1979) y *V. decipiens* Cham & Schltdl (Delle Monache et al., 1980); 2-geranilemodin-antrona (16) aislada de *P. corymbiferum* (Delle Monache et al., 1985); 3-geraniloxi-6-metil-1,8-dihidroantrona (17) extraída de *P. febrifugum* (Botta et al., 1983) y *V. laurentii* (Nguemeving et al., 2006); y la γ -hidroantrona A₃ (18) encontrada en *V. guaramirangae* (Delle Monache et al., 1983). Las antronas son especies muy inestables y

pueden unirse por el carbono diez y dar las diantronas, homodiantronas (si las dos antronas son iguales) o heterodiantronas (si las dos antronas son diferentes), como el caso de la bioantrona A₁ (19) obtenida de *V. guianensis* (Botta et al., 1986); y la bivismiaquinona (20) hallada en estudios fitoquímicos de *V. baccifera* (Hussein et al., 2003) y *V. laurentii* (Nguemeving et al., 2006).

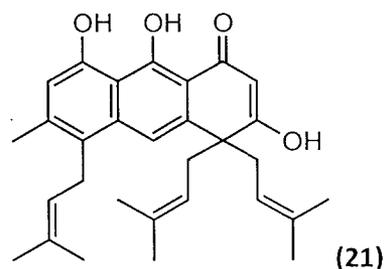


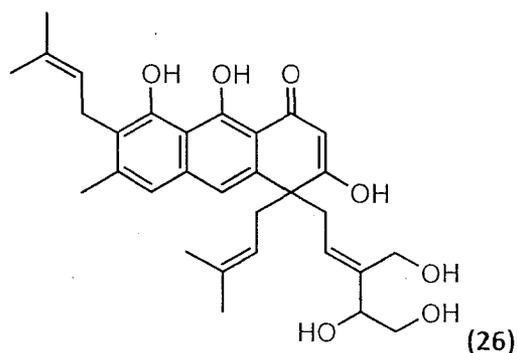
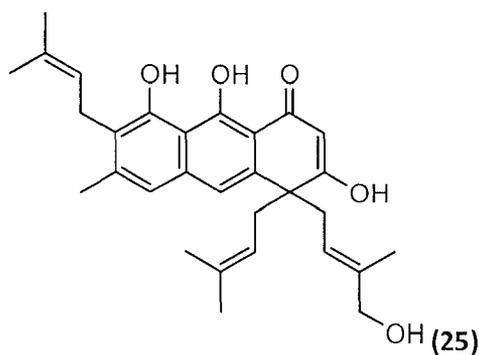
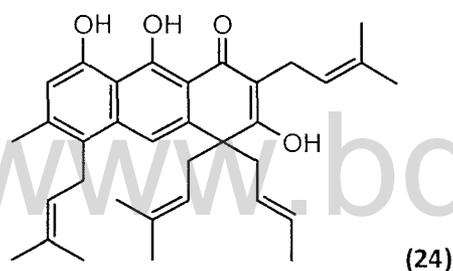
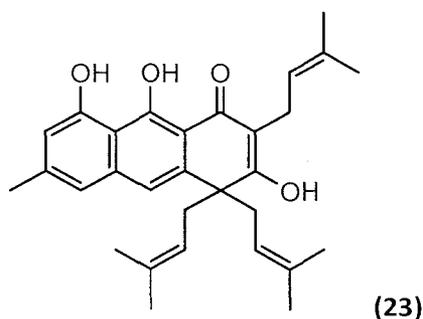
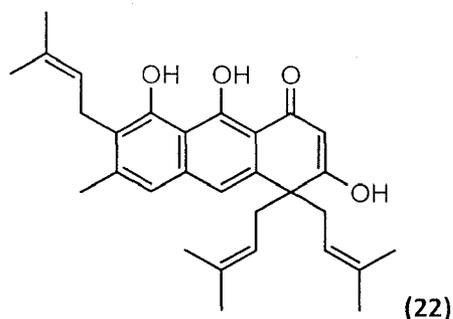


2.1.3.-Antranoides prenilados

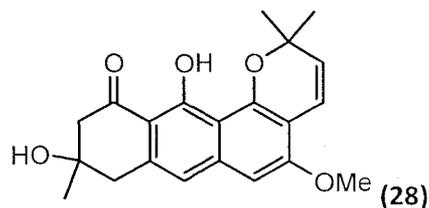
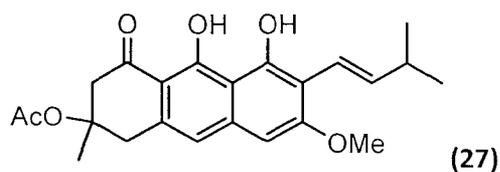
Los compuestos de tipo antranoides prenilados, se pueden describir químicamente como dihidroxi-antraquinonas que poseen dentro de su núcleo una o varias cadenas preniladas, es decir, cadenas alquílicas que en su estructura pueden contener un grupo isoprenilo. La característica principal de estos compuestos es que poseen un efecto laxante (Dimayuga y García, 1991). Dentro de los primeros reportados del género *Vismia* se encuentran la harunganina (21) aislada de *V. baccifera* var. *ferruginea* (Delle Monache et al., 1979), *V. decipiens* (Delle Monache et al., 1980) y *V. macrophyla* Kunth (Hussein et al., 2003); y una serie de ferrugininas que llevan

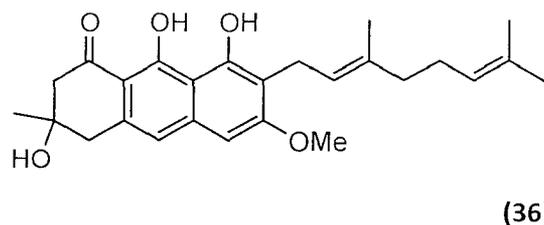
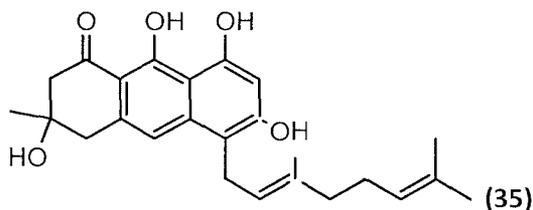
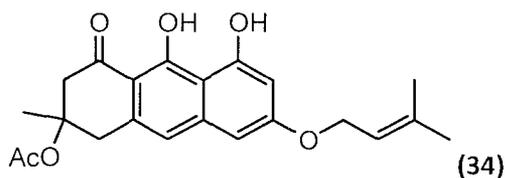
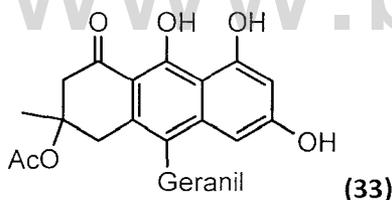
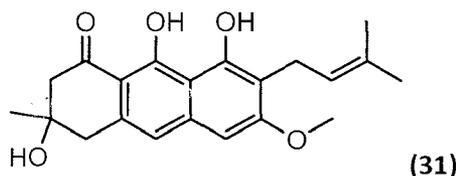
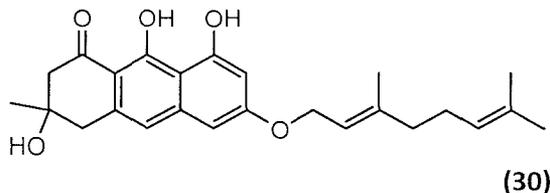
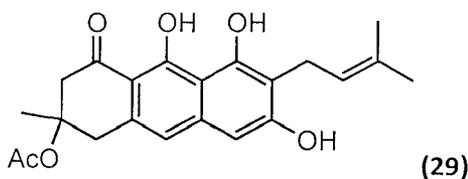
por nombre ferruginina A (22) encontrada en *V. baccifera* var. *ferruginea* (Delle Monache et al., 1979), *V. decipiens* (Gonzales et al., 1980) y *V. macrophyla* (Hussein et al., 2003); ferruginina B (23) localizada en *V. baccifera* var. *ferruginea* (Delle Monache et al., 1979), *V. decipiens* (Delle Monache et al., 1980) *V. macrophyla* (Hussein et al., 2003), *P. febrifugum* (Botta et al., 1983) y *V. mexicana* (Pinheiro et al., 1984); ferruginina C (24) aislada de *V. macrophyla* (Hussein et al., 2003). Esta serie de ferrugininas se utilizan como indicadores estables térmicamente en reacciones químicas colorimétricas al igual que la γ -hidroxiferruginina A (25) obtenida de *V. decipiens* [19] y *V. guaramirangae* (Camele et al., 1982) así como también la γ,γ' -dihidroxiferruginina A (26), extraída de *V. decipiens* (Delle Monache et al., 1980), *V. guaramirangae* (Delle Monache et al., 1983) y *V. mexicana* Schtdl (Pinheiro et al., 1984).



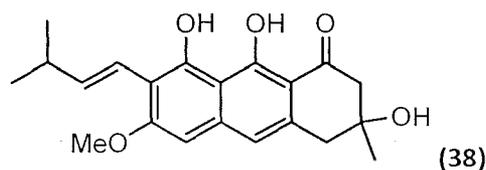
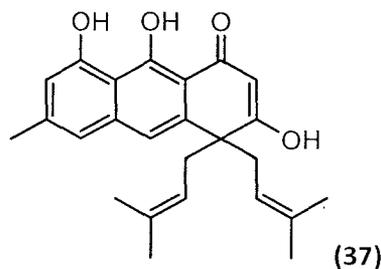


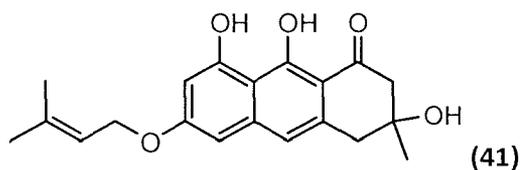
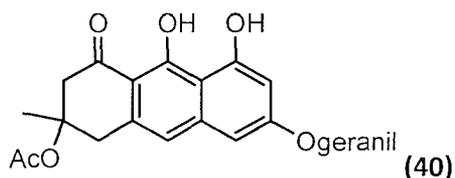
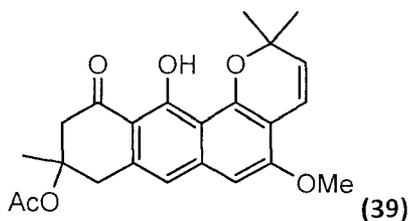
Las Vismionas son compuestos que exhiben actividad citotóxica contra diferentes células tumorales, además de tener potente actividad insecticida contra ciertas plagas de cultivo; este grupo de antranoides prenilados es amplio y dentro de él se encuentran la vismiona A (27) aislada de *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980), *V. japurensis* (Miraglia *et al.*, 1981) y *V. mexicana* (Pinheiro *et al.*, 1984); bismiona B (28) extraída de *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980), *V. mexicana* (Pinheiro *et al.*, 1984) y *V. baccifera* (Hussein *et al.*, 2003); vismiona C (29) al igual que la vismiona D (30) y vismiona E (31) aisladas y purificadas del *P. febrifugum* (Botta *et al.*, 1983); la vismiona F (32) fue hallada junto con la Vismiona G (33) en *P. glaberrimum* (Cassinelli *et al.*, 1986) y la vismiona H (34) se ha extraído de *V. guianensis* (Botta *et al.*, 1986); por último la vismiona L (35) y vismiona M (36) se aislaron de una especie de *Ochna pulcra* Hook (Sibanda *et al.*, 1993) oriunda de Brasil.



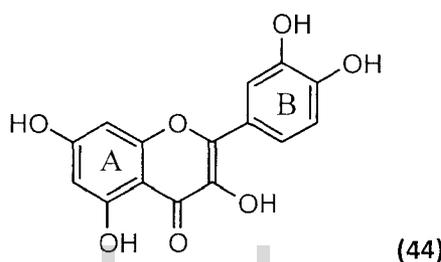
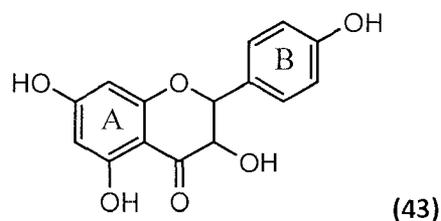


Por su parte, dentro de este grupo se encuentran la vismina (37) extraída de *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980) y *V. baccifera* (Hussein *et al.*, 2003); junto con un grupo especial de vismionas acetiladas como la deacetilvismiona A (38) encontrada en *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980) y *V. jefensis* N.Robson (Fuller *et al.*, 1999); la acetilvismiona B (39) extraída de *V. japurensis* (Pinheiro *et al.*, 1984); la acetilvismiona D (40) localizada en *P. tendifulum* Hook.f. (Cassinelli *et al.*, 1986); la deacetilvismiona H (41) extraída de *V. jefensis* (Hussein *et al.*, 2003); y la acetilvismiona F (42) hallada en *P. corymbiferum* (Delle Monache *et al.*, 1985).





reproducción de las especie; (Bruneton, 1991), en *Vismia* se han hallado el kaempferol (43) de *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006) y la quercetina (44) de *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997).



2.1.4.- Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran en la mayoría de plantas superiores. Su estructura general comprende un anillo "A" derivado de una cadena policétida; un anillo "B" derivado del ácido shikímico y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B tal como se señalan en las figuras (43) y (44).

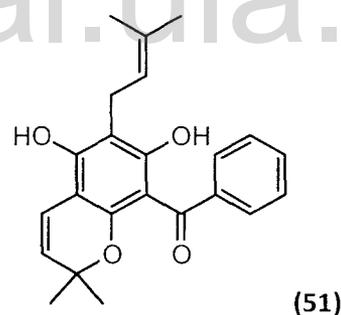
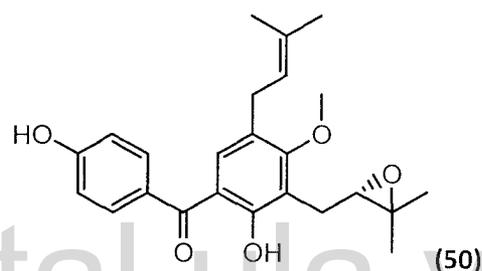
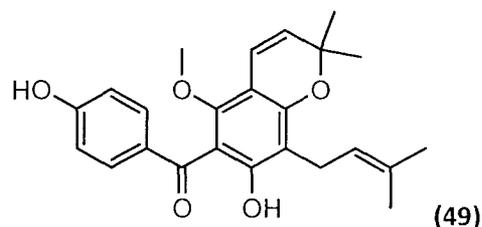
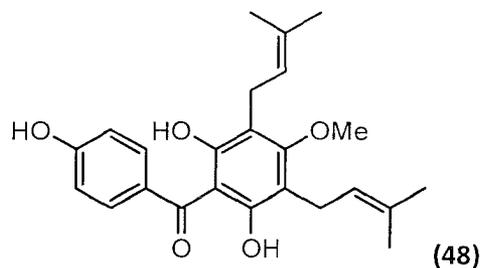
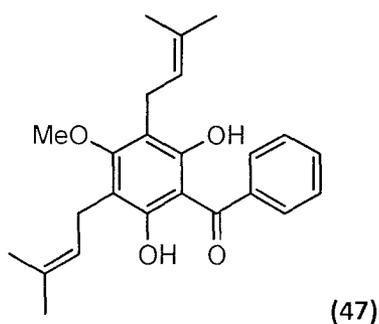
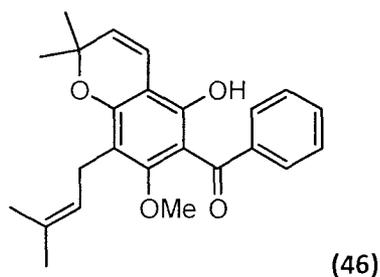
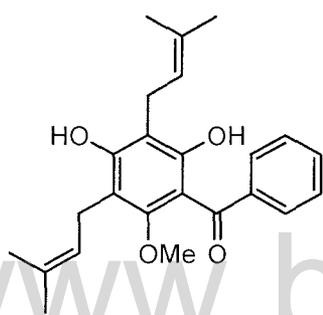
Se caracterizan por ser antioxidantes e inhibidores enzimáticos, pero en su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de flores y frutos, capaces de atraer y guiar a los polinizadores, favoreciendo así la

2.1.5.-Benzofenonas

Las benzofenonas son las precursoras de las xantonas y son utilizadas en la industria cosmética como fijador de fragancias en perfumes y jabones mientras que en la industria farmacéutica son utilizadas en la preparación de antihistamínicos, hipnóticos e insecticidas (Sadaquat *et al.*, 2000). Existen dos grupos especiales de estructuras aisladas del género *Vismia* con núcleo benzofenónico, las vismiafenonas y las vismiagianonas.

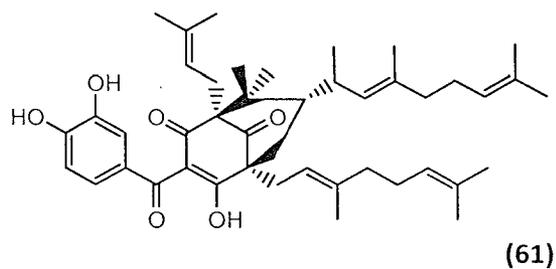
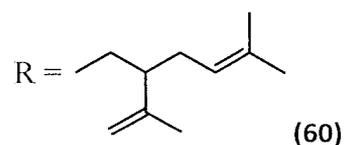
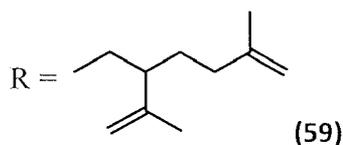
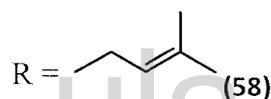
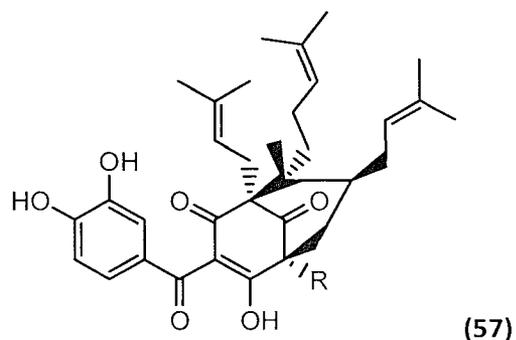
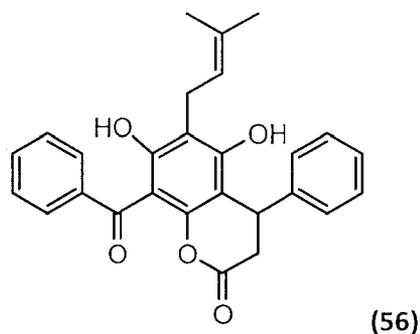
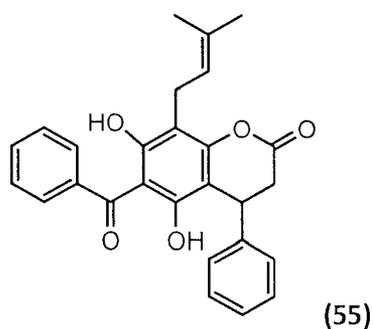
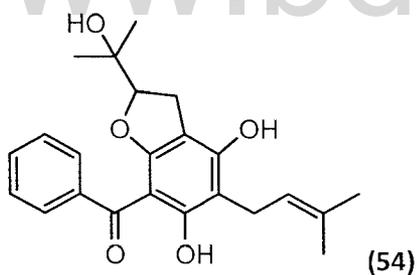
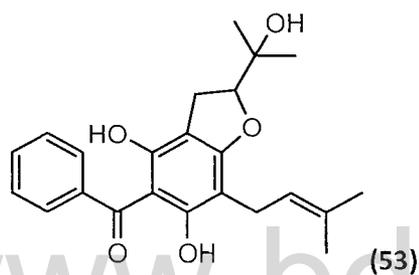
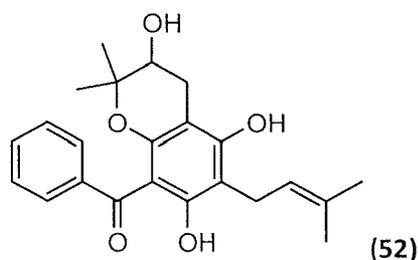
La vismiofenona A (45) fue encontrada por primera vez en *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980), y posteriormente en *V.*

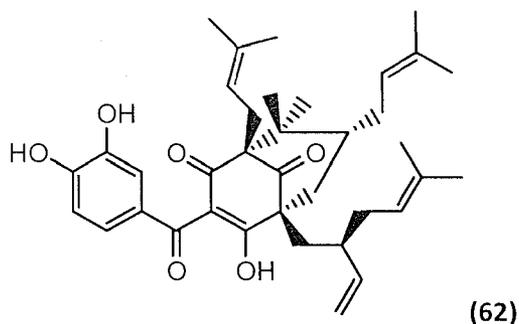
guaramirangae (Camele *et al.*, 1982), por otro lado la vismiofenona B (46) se ha encontrado solo en *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980), mientras que la vismiafenona C (47) en *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982). Las vismiafenona D (48), F (49) y G (50) fueron identificadas en *V. cayennensis* Jacq (Fuller *et al.*, 1999) y la isovismiafenona B (51) fue encontrada en *V. decipiens* (Delle Monache *et al.*, 1980).



El grupo de vismiaguanonas está comprendido por cinco benzofenonas de nombre vismiaguanona A (52), B (53), C (54), D (55) y E (56) extraídas de *V. guianensis* (Seo *et al.*, 2000). Por último se encuentran un grupo de benzofenonas llamadas guttiferonas inhibidores de los efectos citopáticos del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) *in vitro*. Estas guttiferonas se han aislado de

especies de *Vismia* spp. (Reyes y Huerta, 2009) y llevan por núcleo común la figura (57), en el caso de las guttiferonas A (58), C (59) y D (60) mientras que las guttiferonas B (61) y F (62) son estructuralmente diferentes.

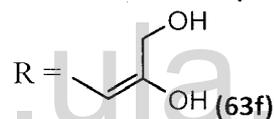
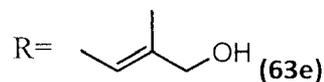
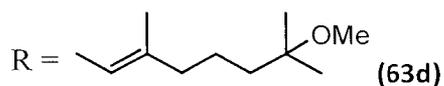
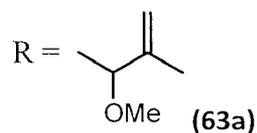
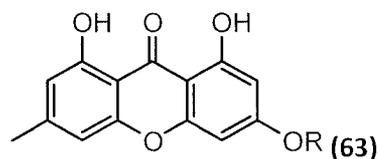




2.1.6.- Xantonas

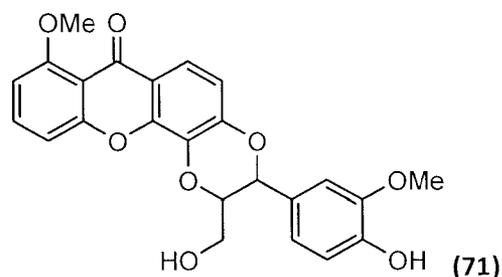
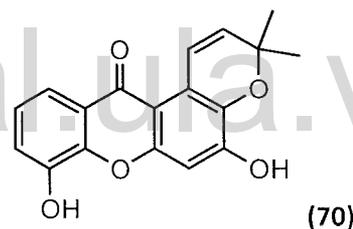
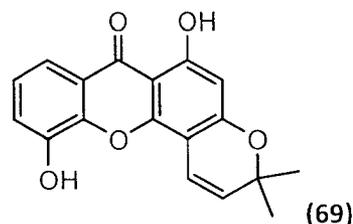
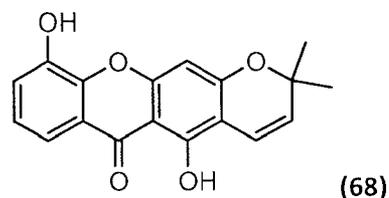
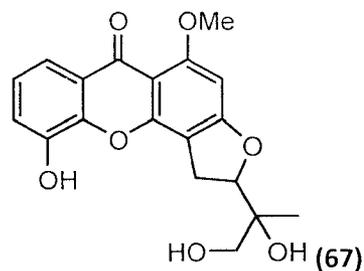
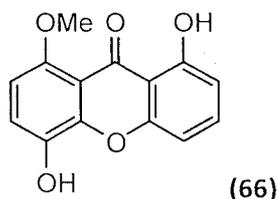
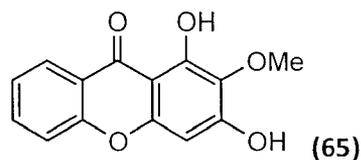
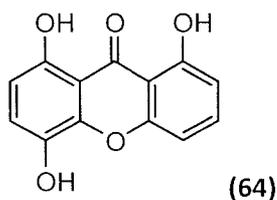
La estructura de las xantonas consta de dos anillos de benceno conectados por un grupo carbonilo y oxígeno. Cada anillo está unido en una formación fusionada que no permite una rotación alrededor de las uniones de carbono-carbono. Esta estructura única junto con el tipo y la posición de los grupos químicos adheridos define las funcionalidades específicas o propiedades de las xantonas (Dimayuga y Garcia, 1991). De la especie *V. guianensis* se realizó un estudio del aislamiento de Xantonas, que llevan por núcleo la estructura (63). Las variantes de la misma están representadas por los diferentes radicales y se enumerarán como: 1,8-dihidroxi-3-(2-metoxi-3-metilbut-3-eniloxi)-6-metilxantona (63a) 1,8-dihidroxi-3-geraniloxi-6-metilxantona (63b) 1,8-dihidroxi-3-isopenteniloxi-6-metilxantona (63c) 1,8-dihidroxi-3-(3,7-dimetil-7-metoxi-oct-2-eniloxi)-6-metilxantona (63d) 1,8-dihidroxi-3-(E-3-hidroxi-3-metil-but-2-eniloxi)-6-metilxantona (63e) 1,8-dihidroxi-3-(3-hidroxi-3-metil-4-hidroxibut

-2-bueniloxi)-6-metilxantona (63f) (Epifano et al., 2007).



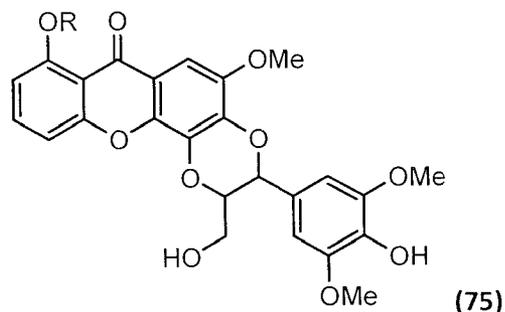
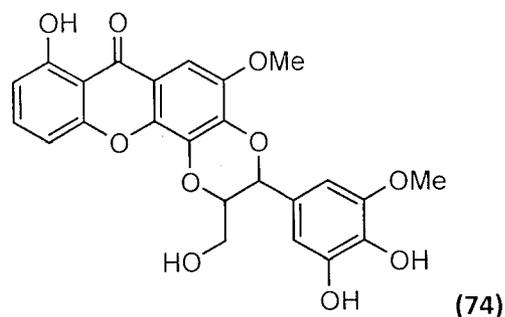
Las xantonas son un grupo biológicamente activo de moléculas donde sus uniones dan gran estabilidad y le confieren propiedades fitocéticas (antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-histamínicos, anti-tumorales, entre otras), lo que las hace únicas son los enlaces dobles 1-8, que les permiten pasar fácilmente por la mucosa intestinal y entrar al torrente sanguíneo sin ser metabolizadas (Dimayuga y Garcia, 1991). Otro grupo reportado de xantonas aisladas de *Vismia* es 1,4,8-trihidroxi-xantona (64) aislada de *V. latifolia* Aubl (Dos Santos et al., 2000) y *V. rubescens* (Tamokou et al., 2009); la 1,3-dihidroxi-2-

metoxixantona (65) extraída de *V. latifolia* (Dos Santos *et al.*, 2000); la 1,5-dihidroxi-8-metoxixantona (66) hallada en *V. latifolia* (Dos Santos *et al.*, 2000), un compuesto peculiar de nombre O1-demetil-3',4'-dioxiporospermin-3',4'-diol (67) encontrado en *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006) al noroeste de África y unos derivados de la misma que llevan por nombre 6-deoxijacareubina (68) obtenida de las hojas de *V. latifolia* (Doriguetto *et al.*, 2001) y 6-deoxi-isojacareubina (69) aislada de las raíces de *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006). Además, se han aislado una serie de xantonas comunes en productos naturales como lo es la hipericanarina (70) obtenida de *V. guaramirangae* (Cardona *et al.*, 1986) junto con la kielcorina (71) obtenida de la misma especie (Peres y Nagem, 1997).

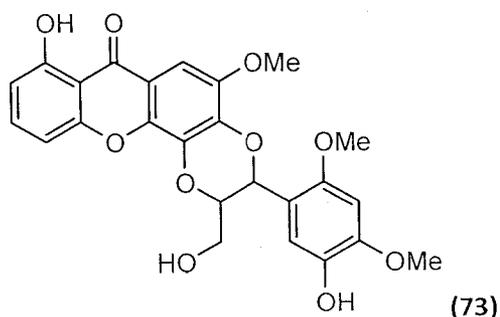
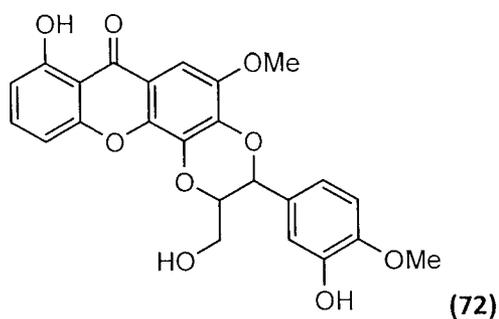
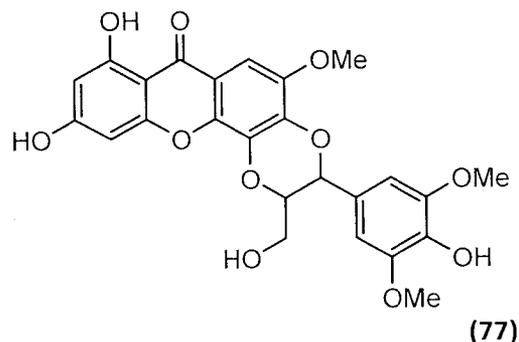
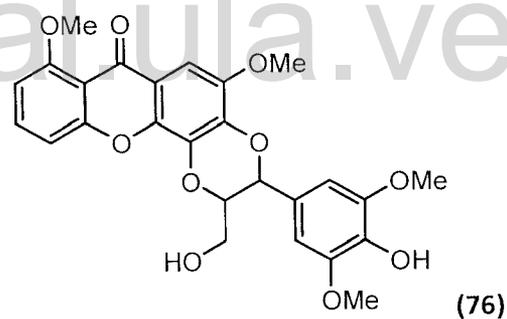


El estudio de las xantonas es interesante no sólo desde el punto de vista farmacológico sino desde el punto de vista quimiosistemático, ya que dentro de esta variedad de núcleos hallados particularmente en los líquenes y en algunas plantas superiores como el género *Vismia* se

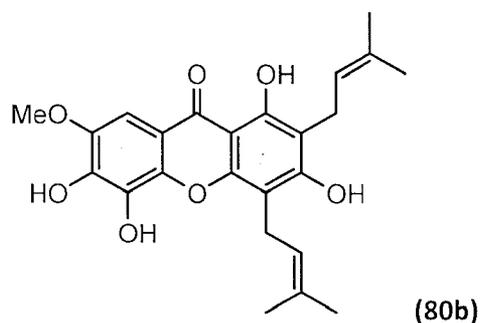
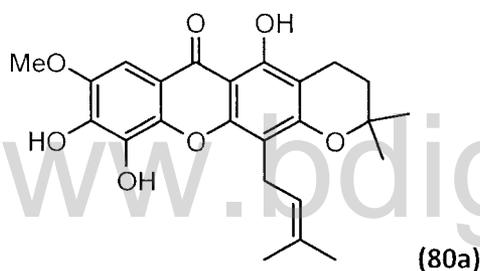
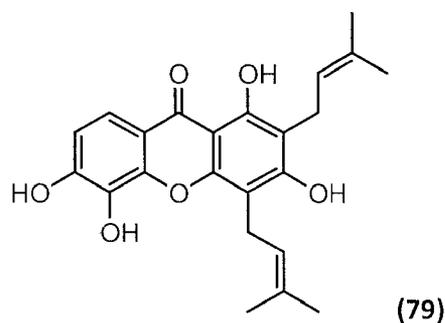
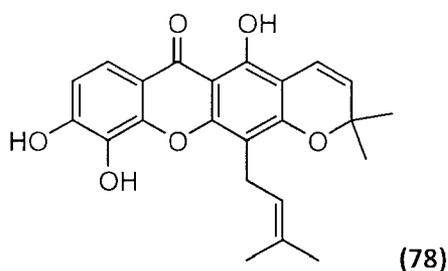
encuentran tres subgrupos de xantonas denominadas cadensinas, xantonas preniladas y laurentixantonas. El primero está representado por xantonas aisladas de *V. guineensis* Druce (Peres *et al.*, 2000) que llevan por nombre Cadensina A (72), B (73), C (74) y D (75a), esta última sustituida en la posición ocho, 8-hidroxi-cadensina D (75b) extraída de *V. guaramirangae* (Cardona *et al.*, 1986) y por último las Cadensinas F (76) y G (77) encontradas en *P. febrifugum* (Peres *et al.*, 2000). En segundo lugar se observan las xantonas preniladas que poseen potente actividad antitumoral y citotóxica las cuales son: Xantona Prenilada V1 (78) obtenida de *V. guineensis* (Botta *et al.*, 1986) al igual que las xantonas preniladas V1a (79), V2 (80a), y V2a (80b).



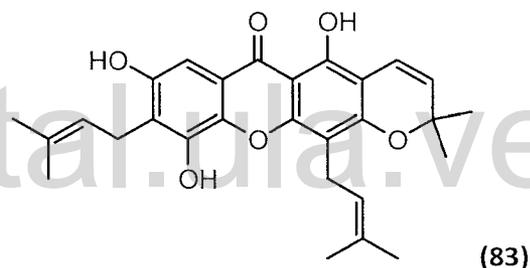
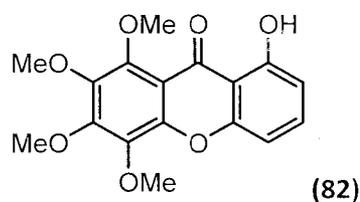
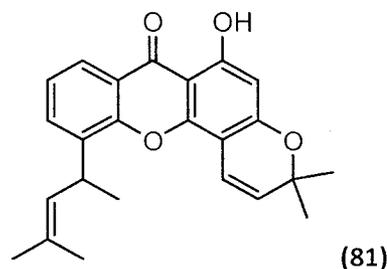
R= H (75a);
R= OH (75b)



esta última posee actividad antifúngica y alguicida (Tala *et al.*, 2007).

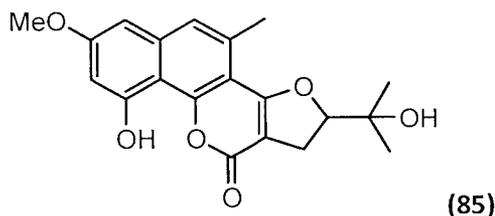
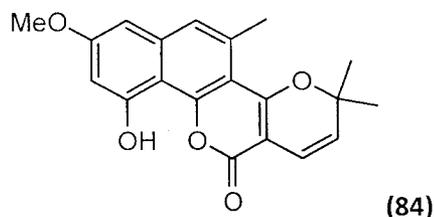


El tercer grupo antes mencionado, laurentixantonas, se caracterizan por ser xantonas extraídas de *Vismia laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006) -de allí su nombre- y fueron denominadas como Laurentixantona A (81), B (82) y C (83), cabe mencionar que



2.1.7.-Cumarinas

La hidroxilación en posición orto del ácido cinámico a la cadena lateral como se ve en la biosíntesis del ácido salicílico es un paso crucial en la formación de un grupo de orto derivados lactónicos del ácido cinámico llamado cumarinas, pertenecientes a la vía del ácido shikimico que hasta ahora sólo se han reportado en la especie *V. guianensis* (Seo *et al.*, 2000) dos benzocumarinas que llevan por nombre Vismiagianina A (84) y B (85).



2.1.8.-Terpenos

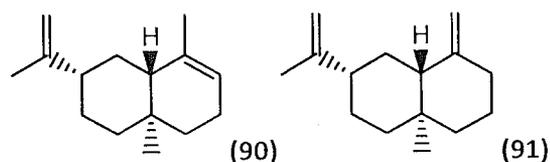
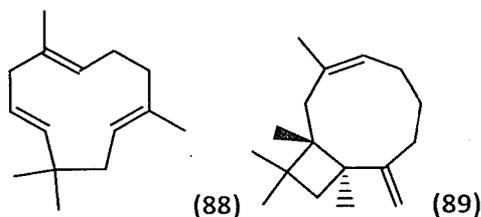
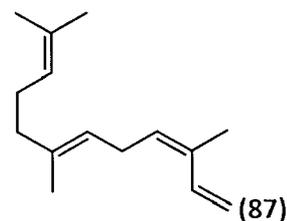
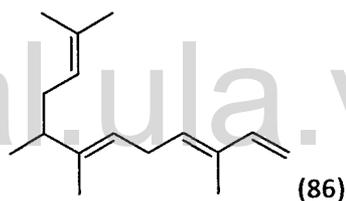
Los terpenos o isoprenoides son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno. El nombre proviene de los primeros miembros de esta clase los cuales fueron derivados del aguarrás ("turpentine" en inglés, "terpentin" en alemán). Cuando los terpenos son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse terpenoides (Dimayuga y García, 1991).

2.1.8.1.-Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son terpenos de 15 carbonos. Como los monoterpenos, muchos sesquiterpenos están presentes en los aceites esenciales. Además muchos sesquiterpenos actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios, y como inhibidores de la alimentación de los

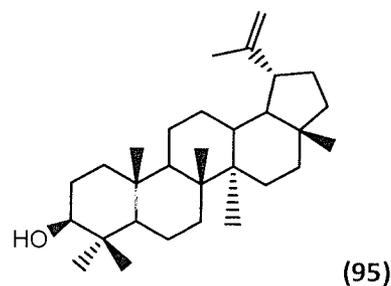
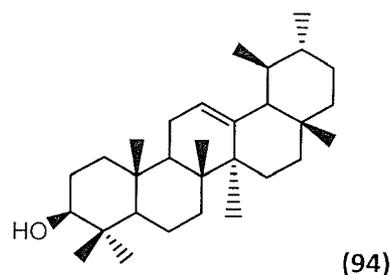
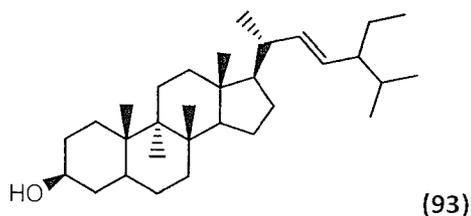
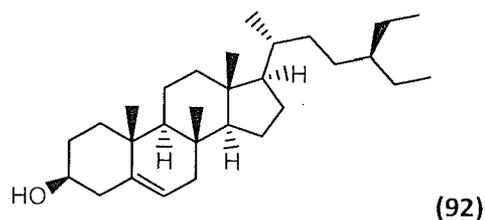
herbívoros oportunistas (Dimayuga y García, 1991).

Dentro del género bajo estudio se han podido aislar e identificar el trans- α - farneseno (86) encontrado en *V. cayennensis* (Pinheiro *et al.*, 1984), el cis- α -farneseno (87) hallado en *V. mexicana* (Pinheiro *et al.*, 1984), Humuleno (88) extraído de *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982) al igual que el β -cariofileno (89) y el α -selineno (90) *P. febrifugum* (Botta *et al.*, 1983) junto con β -selineno (91) de *V. japurensis* y *V. cayennensis* (Pinheiro *et al.*, 1984).



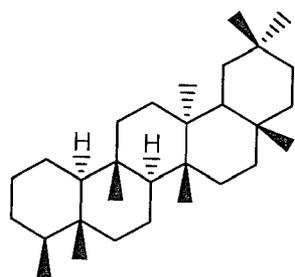
2.1.8.2.-Triterpenos

Los triterpenos son terpenos de 30 carbonos y por lo general son obtenidos a través de la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Esta gran clase de moléculas incluye componentes de la membrana que son fitoesteroles, algunas fitoalexinas, varias toxinas y componentes de las ceras de la superficie de las plantas (Nguemeving *et al.*, 2006). Dentro de estas estructuras se han observado el Sitosterol (92) en *V. cayenensis* (Miraglia *et al.*, 1981), *V. japurensis* (Simmonds *et al.*, 1985), *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982), *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997), y *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990); el Estigmasterol (93) en *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006); la β -amirina (94) en *V. cayenensis* (Miraglia *et al.*, 1981) y Lupeol (95) en *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997).

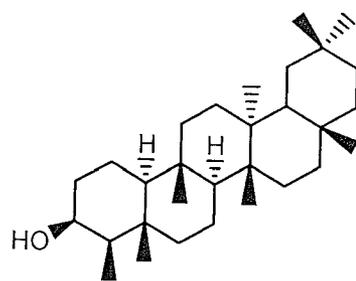


Los triterpenos y esteroides son un grupo de principios activos constituidos por numerosos compuestos, estructuralmente muy similares, derivados mayoritariamente del epoxi-escualeno o en menor número del propio escualeno. Se pueden establecer dos grandes grupos dependiendo de su estructura química: triterpenos (tetra y pentacíclicos) y esteroides. Se encuentran en estos grupos compuestos de gran interés farmacéutico como son los saponósidos y los heterósidos cardiotónicos (García, 1992). Dentro de esta serie de compuestos aislados y purificados de especies de este género se encuentra el Friedelano (96) extraído de *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006); el Friedelanol (97) de *V. rubescens* (Tamokou *et al.*, 2009), *V. laurentii* (Nguemeving *et al.*, 2006) y *V. japurensis* (Miraglia *et al.*, 1981); la Friedelina

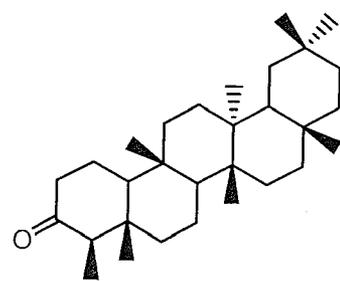
(98) obtenida de *V. japurensis* (Miraglia *et al.*, 1981), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesus, 1990), *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997), *V. laurentii* (Kuede *et al.*, 2007), *V. rubescens* (Tamokou *et al.*, 2009), y *V. baccifera* var. *dealbata* (Salas *et al.*, 2008), el Dammaradienol (99) conseguido por primera vez en la década de los ochenta en *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982) y posteriormente en los noventa en *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990). Para finalizar con este grupo sistemático tan prometedor, es necesario nombrar tres ácidos como los son el ácido Vismiaefólico (100) y el ácido Bartogénico (101) localizados en *Vochysia vismiaefolia* (Araujo *et al.*, 1990) y el ácido Betulínico (102) aislado de *V. cayennensis* (Miraglia *et al.*, 1981), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990). El Tirucal-7,24-dien-3-ona (103) observado en *V. laurentii* (Noungoue *et al.*, 2008) junto con el Stigmata-7,22-dien-3-ol (104) que representan dos terpenos con actividad antibacteriana.



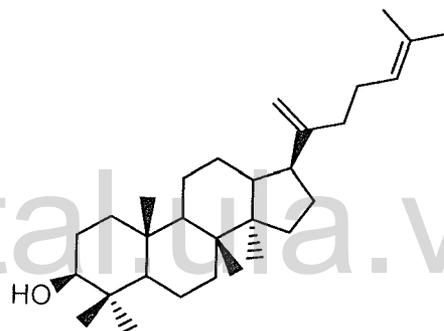
(96)



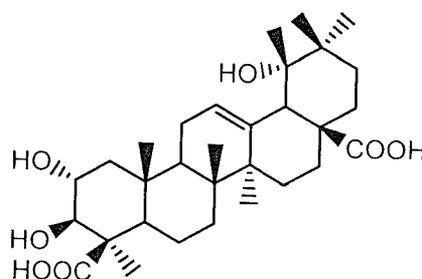
(97)



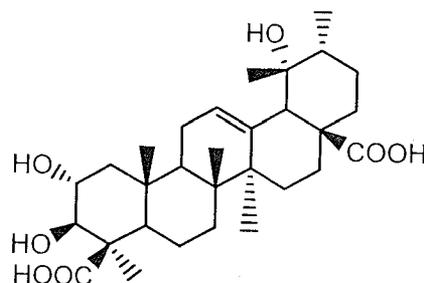
(98)



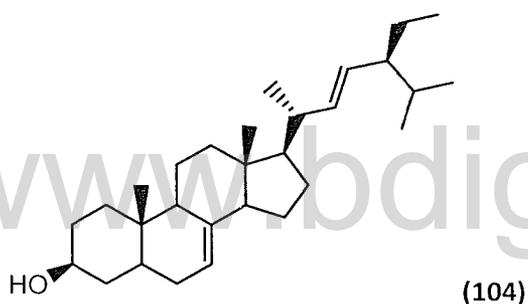
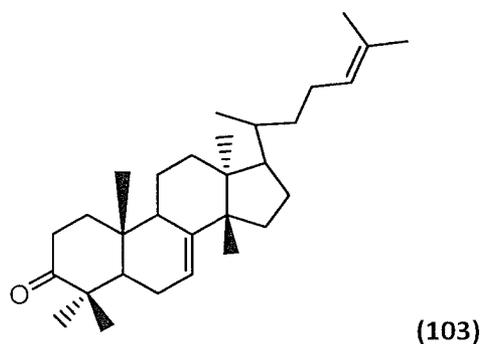
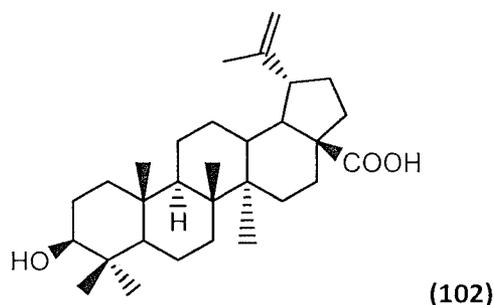
(99)



(100)



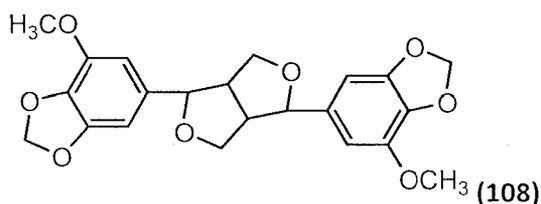
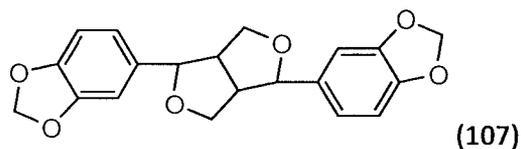
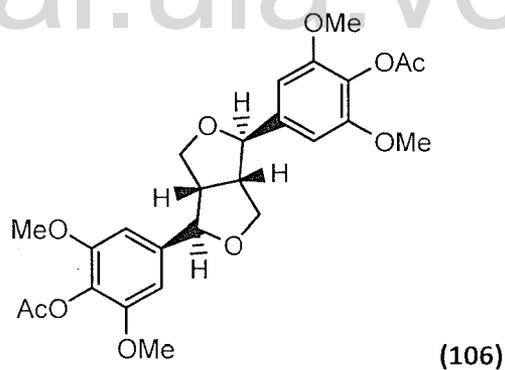
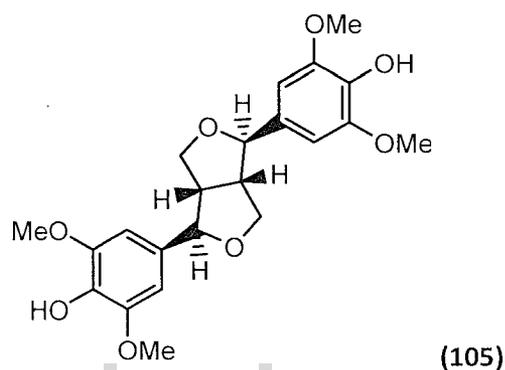
(101)



2.1.9.- Lignanos

Los lignanos son compuestos provenientes de la ruta del ácido shikimico, en su mayoría son dímeros que se forman por condensación oxidativa de dos moléculas de alcoholes cinámicos entre sí o por la unión de moléculas de ácidos cinámicos. Dentro del género *Vismia* se han reportado cuatro lignanos con estructura química similar, y con actividad citotóxica; el siringaresinol (105) y el deacetilsiringaresinol (106) aislados de *V. guaramirangae* (Delle Monache *et al.*, 1983),

la Sesamina (107) identificada en *V. guaramirangae* (Delle Monache *et al.*, 1983) en Brasil y *V. baccifera var. dealbata* (Salas *et al.*, 2008) en Venezuela y un derivado metoxilado de esta última de nombre 5,5'-dimetoxisesamina (108) hallada en *V. guaramirangae* en el año 1982 (Camele *et al.*, 1982).



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

2.2.- Cronología de los usos tradicionales y ensayos biológicos realizados a los extractos y algunos compuestos químicos aislados del género *Vismia* a partir del año 1962.

Es la savia que se desprende de las especies de *Vismia* y su uso por parte de las tribus del Amazonas, la que impulsó los primeros estudios a comienzos de la década de los sesenta. Los mismos la utilizaban como un tratamiento eficaz para la protección de mordeduras de serpiente, además de ser una pintura decorativa utilizada en el cuerpo para el desarrollo de sus tradiciones (Ewan, 1962).

A finales de los setenta, en Colombia y Brasil, la savia fresca de *Vismia guianensis* se reportó como un importante purgante, para tratar afecciones del tracto urinario y enfermedades superficiales de la piel; su corteza y hojas, como antipirético y antirreumático (Peres, 1978). Además de estas cualidades, el jugo amarillo-anaranjado de los frutos de la misma especie, puede ser utilizado para teñir lana y para preparar alimentos (Peres y Nagen, 1997). Bajo esta última tendencia –más allá de lo farmacológico–, en 1979 se reportó que la madera de *Vismia baccifera* es útil en la fabricación de mangos o empuñaduras de herramientas domésticas, mientras que de la resina de esta especie se obtienen tintes, taninos y aceites (Ferrari *et al.*, 1979).

Vismia cayennensis es conocida especialmente por sus usos medicinales por la tribu Yanomami del Amazonas, donde es utilizada como un remedio para el “pano branco”, que es una infección superficial (Pitiriasis), así como para las lesiones cutáneas producidas por la leishmaniasis. En 1984, se reportó un tratamiento que involucra los extractos de esta especie: para tratar la Pitiriasis, el látex se frota en la región afectada después que la piel se ha tratado con las hojas de *Pourouma bicolor*; y para la leishmaniasis, el látex se frota en los bordes de las lesiones (Delle Monache *et al.*, 1984).

Un año después, en 1985, se reportó un estudio que menciona a las especies de *Vismia* y su importancia en la Guayana Francesa: las mismas son utilizadas para aliviar el prurito y tratar las heridas externas, mientras que la decocción de las hojas es tomada para bajar la fiebre. Los Wayãpi, tribu que habita en ese país, usan el látex de la corteza para tratar infecciones fúngicas bucales en los niños, y la tribu llamada Creoles aplica el látex de la fruta en las lesiones producidas por leishmaniasis. Este estudio también reportó y en la misma fecha, que las vismionas y ferrugininas aisladas del género *Vismia* representan una nueva clase de antranoides lipofílicos, donde se halló

que inhiben el apetito en larvas de especies de *Spodoptera*, *Heliothis* y *Locusta migratoria* (Simmonds *et al.*, 1985).

En ese mismo año, se realizaron varios estudios a la tribu *Vismiae*, específicamente a la especie *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir, detectándose los efectos farmacológicos de esta especie como un hepatoprotector en daño agudo y crónico (Delle Monache, 1985). Algunas especies de *Vismia* en Suramérica y de *Psorospermum* en África, fueron estudiadas y sus resultados publicados en 1984, por un grupo de investigadores de Italia, los cuales determinaron la actividad citotóxica y antitumoral de compuestos aislados de este género. Para este ensayo utilizaron células leucémicas P-388 tanto resistentes como sensibles al Doxorubicin®, la citotoxicidad fue determinada en células que sobrevivían después de 72 horas de exposición continua a las drogas (Delle Monache *et al.*, 1979; Delle Monache *et al.*, 1983; Delle Monache *et al.*, 1984; Delle Monache *et al.*, 1985).

En 1993, se publicó que los indios del noreste amazónico de edad avanzada se tratan los daños causados por la Demencia Senil a partir de la medicina natural; al menos 25 especies de plantas son empleadas en el tratamiento de Alzheimer y enfermedades similares, siendo administradas sus hojas y raíces oralmente como un té por períodos de varios días o semanas. Dentro de estas plantas se encontró que la *Vismia tomentosa* Ruiz & Pav es utilizada para disminuir la dificultad de comprender instrucciones debido a los procesos propios del envejecimiento (Schultes, 1993).

En 1997, la Oficina Española de Patentes y Marcas, publicó la composición cosmética dermatológica que contiene un extracto de *Vismia* la cual lleva por número de patente "2102818". Esta invención por parte de Frédéric Bonte y Alain Meybeck, se refiere a una composición cosmética o farmacológica que estimula principalmente la síntesis de colágeno, luchando contra los efectos del envejecimiento cutáneo; así mismo, mejora la cicatrización y trata las diversas patologías acompañadas de una deficiencia de colágeno, en particular, el colágeno I. Según una variante de realización preferida, el extracto anteriormente mencionado se obtiene de una especie de *Vismia* pudiéndose usar cualquiera de las especies que se mencionan a continuación: *V. cayennensis*, *V. guianensis*, *V. macrophylla*, *V. latifolia*, *V. sandwithii* Klotzsch, *V. sessilifolia* Aubl, *V. guinnensis*, *V. angusta* Miq, *V. confertiflora* Spruce, *V. amazonica* Ewan, *V. dealbata* Kunth, *V. ferruginia* Kunth, *V. tomentosa*, *V. baccifera*, *V. lindeniana* A.St.-Hil y *V. japurensis* (Bonte y Meybeck, 1995).

Por otro lado, un estudio realizado en el año 1999, demostró que los extractos de metanol y diclorometano de *Vismia baccifera*, conocida en la región como "Lancillo", fue evaluada por su actividad insecticida contra *Sitophilus oryzae*, encontrándose que la diferencia del extracto y el control positivo no fue significativamente satisfactoria (Broussalis *et al.*, 1999). Ese mismo año, un protocolo de regeneración *in vitro* a través de organogénesis fue establecido para *Vismia guianensis*, el interés de regeneración de la especie radica en que la misma es catalogada como una especie que produce un compuesto anticanceroso llamado Vismiona A **(27)** (Monacelli *et al.*, 1999).

Las actividades antivirales y antimicrobianas detectadas para 24 extractos de plantas de uso medicinal en el tratamiento de enfermedades de la piel en cuatro diferentes regiones de Colombia fueron estudiadas en el 2001. El extracto de *Vismia macrophylla* resultó inactivo contra el virus de Herpes Simple; pero el extracto de corteza de esta misma especie es activa en un ensayo antimicrobial contra *Mycobacterium phlei* (Lopez *et al.*, 2001).

Una investigación fitoquímica de los extractos etanólicos de los frutos de *Vismia orientalis* fue reportado en Tanzania en el 2004, indicando actividad contra *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* exhibiendo un rango de actividad antiprotozoaria $>10 \mu\text{g/mL}$ (Zacaria *et al.*, 2004). Asimismo, un reporte realizado en el 2005, estudió los extractos y moléculas de plantas medicinales contra el virus de Herpes Simple (HSV-1 y -2), donde se obtuvo que la resina de *Vismia macrophylla* posee actividad contra este virus, mostrando una concentración mínima inhibitoria de $5,5 \mu\text{g/mL}$ (Khan *et al.*, 2005).

La actividad antimalarica y citotóxica de plantas usadas en la medicina tradicional en el este de África para el tratamiento de la malaria fue reportado en el año 2006, dentro del grupo de especies que mostraron actividad, la *Vismia guianensis* fue reportada con un compuesto aislado: Vismiona H **(34)** la cual posee un $\text{IC}_{50} = 0,088 \mu\text{g/mL}$ (Menán *et al.*, 2006). Por otra parte, en el año 2007 se evaluaron las propiedades del color y la estabilidad a diferentes factores (temperatura y pH) de soluciones de antranoides prenilados; Ferruginina A **(22)**, y -hidroxiferruginina A **(25)**, obtenidos a partir de los frutos de las especies de *Vismia guianensis* y *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. El estudio de la influencia de la temperatura sobre las características espectrales reveló que las soluciones en propilenglicol de la Ferruginina A y la γ -hidroxiferruginina A son relativamente estables al calor a temperaturas entre 50°C y 80°C , mientras que 100°C y 150°C presentaron

cambios ligeros en la intensidad (ϵ) y tonalidad (λ vis max coordenadas colorimétricas $L^*a^*b^*$). Adicionalmente, las variaciones del color (λ vis max, ϵ) para los antranoides en el rango de pH 1,0-11,0 durante 60 días de almacenamiento a 4° y 25° C demostraron una mayor estabilidad del color en condiciones de refrigeración y pH 6,0 y 8,0 la cual fue superior para las soluciones de γ -hidroxiferruginina A. Lo interesante de este estudio es que las características de los compuestos los hacen potencialmente útiles como colorantes naturales en la industria de los cosméticos, textil y farmacológica (Jiménez *et al.*, 2007).

Por otro lado, la historia lleva a recordar que en los mercados populares consolidados en cada región, existe un intercambio de información cultural sobre prácticas y costumbres, ya que los grupos de personas que asisten o se concentran (ancianos, extranjeros, entre otros) comparten experiencias caseras o tradicionales de sus familias o lugares de origen. Estos espacios son destinados por cada cultura para exponer los diferentes productos generados en las regiones, tanto culturales como biológicas. En el 2007 se reveló como, en un mercado de Pernambuco al noreste de Brasil, se comercializan las hojas de *Vismia guianensis* –comúnmente llamada lacre– para aliviar dolores en general, especialmente en riñones y como planta mágica religiosa (Alburquerque *et al.*, 2007).

En ese mismo año, se realizó un estudio etnobotánico referente a la medicina herbaria tradicional usada para el tratamiento de enfermedades cerebrales, dentro de la cual se reafirma el estudio realizado en 1993 sobre la *Vismia tomentosa* de la familia Cluseaceae, la cual es preparada como una infusión para personas que sufren dificultad de entendimiento de instrucciones; lo innovador de este estudio es que esta especie se usa para la relajación de los músculos en personas que poseen dificultad para hablar, debido a degeneración motora (Adams *et al.*, 2007).

También en el 2007, se reportó la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de *Vismia baccifera* var. *dealbata* en animales de experimentación. La dosis tóxica media obtenida en la determinación de la toxicidad aguda fue de 420 mg/kg, exhibiendo en los animales el signo de caminata en alzada como efecto tóxico más representativo, no observándose letalidad. La actividad analgésica significativa fue observada a los 30 minutos pos-tratamiento a la dosis de 210 mg/kg de

extracto acuoso de hojas con respecto al control; mostrando un efecto analgésico similar al ácido acetil salicílico (ASA) y menor al de la morfina (Salas *et al.*, 2007).

Es el 2007, el año con el mayor número de ensayos vinculados al género *Vismia*, registrados hasta la fecha siendo importante destacar el estudio de un total de 27 especies, las cuales fueron analizadas *in vitro* contra la *Leishmania amazonensis*. Más de 19 especies son utilizadas por el grupo étnico "Peruvian Chayahuita" para el tratamiento de afecciones de la piel mostrando una buena actividad contra la leishmaniasis. En esta investigación se demostró que la *Vismia tomentosa* presenta una $IC_{50} = 52,4 \mu\text{g/ml}$ contra la *Leishmania amazonensis* (Estévez *et al.*, 2007).

Asimismo, en este año de importantes avances sobre las ventajas farmacológicas de este género, se encontró a través de métodos taxonómicos, etnobotánicos y etnográficos, que las especies de plantas usadas por los habitantes de la población de Guinea –tales como la *Vismia guiannensis* y *Vismia leonensis*– son utilizadas para enfermedades infecciosas, y muy especialmente de transmisión sexual (Magassouba *et al.*, 2007). También para ese año, se reporta en Brasil la actividad citotóxica *in vitro* del extracto de la *Vismia guiannensis* la cual fue ensayada presentando un porcentaje de letalidad de -100 en la línea de células cancerosa KM-12 (Suffredini *et al.*, 2007).

Es para el año 2008 cuando se reportó que los frutos de *Vismia baccifera* var. *ferruginea* y *Vismia guiannensis* extraídos mediante percolación sucesiva con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol, mostraron –usando métodos de coloración– su capacidad captadora de radicales, observándose la mayor actividad en el extracto de acetato de etilo seguido por el de éter de petróleo estableciendo claramente a estos extractos como potenciales antioxidantes, actividad posiblemente asociada con las características químicas de los metabolitos aislados ya reportados en publicaciones anteriores como los antranoides prenilados ferruginina A, **(22)** γ -hidroxiferruginina **(25)** y la antraquinona vismiaquinona A **(1)** (Álvarez *et al.*, 2008).

Por otra parte, en el 2008 se publicó un estudio de la sesamina **(107)**; aislado de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, el cual demostró tener actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer pulmonar con un IC_{50} de 1mg/mL (Salas *et al.*, 2008). En el Valle de Chazuta, ubicado en el Amazonas del Perú, se reportó en el 2009, una investigación acerca de las plantas utilizadas por los habitantes de la

región con algún tipo de interés farmacológico. Dentro de las plantas nombradas se encuentra *Vismia macrophylla*, comúnmente llamada en la región “pichirina”, donde el látex de la planta se usa como unguento aplicado en la piel para combatir la sarna y la decocción del exudado de los frutos de la *Vismia sandwithii* es usado para combatir la Hepatitis (Sanz - Biset *et al.*, 2009).

La ciencia ha demostrado que por ciertas características aun no desarrolladas en el cuerpo de los niños de temprana edad –por inmadurez del sistema inmunológico–, estos son mucho más vulnerables a las enfermedades que los adultos, desempeñando los remedios folklóricos etnobotánicos un rol importante para combatir las infecciones y sus principales síntomas. Es en el año 2009 y luego de analizar en Surinam 178 especies utilizadas con diferentes propósitos en los niños, donde se reportó que las hojas cocidas de *Vismia cayennensis* son utilizadas para bañar al bebé antes de dormir a fin de proporcionarle un mayor descanso. En este mismo país, la Tribu “Saramaccon Maroons” utiliza los baños de las hojas cocidas de *Vismia guianensis* para preservar la salud del bebé en general, de este mismo modo utilizan las hojas de *Vismia macrophylla* para tratar dolores estomacales (Ruyschaert *et al.*, 2009).

De igual forma en el año 2009 se reportó la actividad contra *Leishmania amazonensis* y el *Plasmodium falciparum* en extractos etanólicos de plantas medicinales ubicadas en Yanesha, un grupo étnico de Perú. Dentro de las plantas estudiadas se encontró que la corteza de *Vismia baccifera*, que se utiliza en heridas infecciosas, exhibió un $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ para la Leishmaniasis y la infusión de hojas de *Vismia pozuzoensis* Engl, utilizada por esta tribu para controlar los escalofríos, mostró un $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ para la Leishmaniasis y $22,9 \pm 8,9 \mu\text{g/ml}$ contra la Malaria (Valadeau *et al.*, 2009). Ese mismo año se reportó que compuestos aislados de *Vismia laurentii* también son activos contra la Malaria (Noungoue *et al.*, 2009). Trece plantas medicinales recolectadas en Burkina Faso (África Occidental) fueron evaluadas en el 2010 contra *Plasmodium falciparum* encontrándose que el extracto en diclorometano de las hojas del *Psorospermum senegalense* Spach (Clusiaceae) presentó un IC_{50} de $10,03 \pm 2,00 \mu\text{g/mL}$ (Jansen *et al.*, 2010).

Yanesha, también llamado Amuesha, es un grupo de personas amerindio, pertenecientes a la familia lingüística “Arawak” y viven en la región central del Perú, en las estribaciones orientales de los Andes. Su territorio abarca una gran gama de situaciones ecológicas y comunidades diseminadas

desde 1800 hasta 400 msnm. En la cultura Yanéscha se toma muy en cuenta la medicina tradicional en su vida cotidiana; una exhaustiva encuesta llevada a cabo en el 2010 reunió especies con usos medicinales, vinculando a las infusiones de los tallos de *Vismia popuzoensis* para el dolor de garganta, así como también para tratar y prevenir el virus de la Influenza (Valadeau *et al.*, 2010).

Un trabajo realizado en Brasil en el 2010, investigó el mecanismo que interviene en el efecto vasodilatador sobre las arterias mesentéricas inducido por una Xantona aislada de *Vismia latifolia*, en ratas pequeñas. Los resultados sugieren que la Xantona induce su efecto vasodilatador a través de la inhibición de los mecanismos sensibles al calcio activados por la proteína quinasa C (Cámara *et al.*, 2010). También ese mismo año, se evaluó la actividad antioxidante de plantas de la Amazonia, dentro de las cuales los extractos de los tallos de *Vismia baccifera* mostraron elevada actividad antioxidante, lo que representa una prometedora planta medicinal (Lizcano *et al.*, 2010).

www.bdigital.ula.ve

2.3.- Composición química de aceites esenciales del género *Vismia*

Las especies de *Vismia* se han cultivado en gran escala y están distribuidas principalmente en la frontera de Venezuela con Colombia y Brasil (Ewan 1962). Se han reportado estudios acerca de la obtención de aceites esenciales de estas especies de la familia Guttiferae y en algunos casos se ha evaluado el poder antimicrobiano de los aceites esenciales de plantas de *Vismia* (Rojas et al., 2011, Salas et al., 2008). Estos aceites parecen exhibir compuestos mayoritarios comunes tal como se resume en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Composición química de aceites esenciales del género *Vismia*

Aceite esencial de <i>Vismia</i>	Compuestos Mayoritarios (%)	Referencia
Hojas de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> (Chiguará)	β - cariofileno (10,10) Germacreno D (15,8) α - cadinol (14,50)	Buitrago et al., 2009
Hojas de <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i> (La Hechicera)	β - cariofileno (45,7) Valenceno (12,3) α - humeleno (8,9)	Buitrago et al., 2009
Frutos de <i>V. baccifera</i>	β - cariofileno (11,9) cis- cadien-1,4-dieno (18,8) trans- cadien-1,4-dieno (36,6)	Rojas et al., 2011
Hojas de <i>V. macrophylla</i>	β - cariofileno (20,10) Germacreno D (11,6) β - elemeno (7,0)	Rojas et al., 2010
Hojas de <i>V. guianensis</i>	β - cariofileno (19,58) γ - cadineno (11,6) α - copaeno (13,1)	Silvestre et al., 2012

2.4.- Evaluaciones antibacterianas en el género *Vismia*

Diferentes microorganismos pertenecientes al reino de las bacterias se han estudiado, y han reportado múltiples evaluaciones de susceptibilidad antibacteriana, utilizando sustancias obtenidas a partir de especies del género *Vismia*, los cuales se pueden resumir en las tablas N° 2 y 3 para bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente.

Tabla Nº 2. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*

<i>V. laurentii</i>	<i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>				<i>V. laurentii</i>		<i>V. macrophylla</i>		Especie	Referencia
	Extracto metanólico de hojas	Vismia-quinona	Friede-lina	Sesamina	Extracto metanol hojas	Laurenti xantona B	Laurenti xantona A	Extracto metanólico corteza de raíces	Extracto metanólico de corteza de tallo	
+ 78	+ 400	-	-	+ 109	-	+ 1,2	+	-	<i>E. faecalis</i>	Microorganismos [Presencia de Halo/CMI (µg/mL)]
+ 625	-	+400	+ 200	+ 109	-	-	-	-	<i>S. aureus</i>	
+ 625					+ 78	+ 78			<i>B. cereus</i>	
+ 78					-	+ 2			<i>B. megateirum</i>	
+ 19					-	+ 4,8			<i>B. stearothermophilus</i>	
+ 312					+ 2,4	+ 4,8	-	-	<i>B. subtilis</i>	
									<i>M. smegmatis</i>	
									<i>M. tuberculosis</i>	
									<i>S. mitis</i>	
									<i>S. sanguis</i>	
									<i>S. mutans</i>	
									<i>L. monocitogenes</i>	
									<i>B. cereus</i>	
							+	+	<i>M. plehy</i>	
									<i>S. xylosus</i>	
									<i>S. epidermidis</i>	
									<i>S. lentus</i>	
									<i>S. typhimurium</i>	
Kuete et al., 2007	Salas et al., 2006				Nguemeving et al 2006		López et al., 2001			

Tabla No 2. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*. (Cont.)

<i>V. laurentii</i>									Espece
6 - deoxi-jacareubina	O ¹ -demetil-3'4'-dioxi-psorospermin 3'4' diol	1,8dihidroxi 6-metoxi-3-metilantraquinona	3-genarioxi-6-metil-1,8 dihidroxiantraquinona	Bivismia-quinona	Vismia-quinona	Vismia-quinona C	Extracto metanólico de raices	Extracto metanólico de ramas	Sustancia
-	+ 78	+ 4,8	+ 78	-	+ 4,8	+ 4,8	+ 625	+ 312	<i>E. faecalis</i>
+ 39	+ 19	+ 19	-	-	+ 39	+ 39	+ 78	+ 625	<i>S. aureus</i>
+ 78	-	+ 2,4	+ 78	-	+ 78	-	+ 625	+ 312	<i>B. cereus</i>
-	-	+ 9	+ 2	+ 2	+ 78	+ 39	+ 78	+ 78	<i>B. megateirum</i>
+ 1,2	-	+ 4,8	-	-	-	-	+ 19	+ 78	<i>B. stearothermophilus</i>
+ 4,8	+ 1,2	+ 1,2	+ 4,8	+ 2,4	+ 2,4	-	+ 312	+ 312	<i>B. subtilis</i>
									<i>M. smegmatis</i>
									<i>M. tuberculosis</i>
									<i>S. mitis</i>
									<i>S. sanguis</i>
									<i>S. mutans</i>
									<i>L. monocitogenes</i>
									<i>B. cereus</i>
									<i>M. plehy</i>
									<i>S. xylosus</i>
									<i>S. epidermidis</i>
									<i>S. lentus</i>
									<i>S. typhimurium</i>
Kuede et al., 2007									Referencia

Microorganismos [Presencia de HalocMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)]

Tabla No 2. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*. (Cont.)

V. guineensis						V. laurentii			Especie
Vismiaqui- nona B	Vismiaqui- nona	3genariloxi-6- metil-1,8 dihidroxi-antra quinona	Extracto metanol raices	Extracto metanol ramas	Extracto metanol hojas	Laurentixan- tona C	Kaemp- ferol	Friedelina	Sustancia
+ 39			+ 78	+ 39	+ 39		+ 39	+ 2,4	<i>E. faecalis</i>
-			+ 78	+ 78	+ 78		+ 9,7	+ 19	<i>S. aureus</i>
-			+ 39	+ 39	+ 39	+ -	-	+ 78	<i>B. cereus</i>
-			+ 9	+ 9	+ 9		+ 9	+ 2	<i>B. megateirum</i>
-			+ 78	+ 39	+ 156		+ 9,7	+ 9	<i>B. stearothermophilus</i>
-			+ 156	+ 156	+ 156		+ 2,4	+ 9,7	<i>B. subtilis</i>
+ 156	+ >312	+ 39	+ 78	+ 156	+ 312				<i>M. smegmatis</i>
		+ 78	+ 78						<i>M. tuberculosis</i>
									<i>S. mitis</i>
									<i>S. sanguis</i>
									<i>S. mutans</i>
									<i>L. monocitogenes</i>
									<i>B. cereus</i>
									<i>M. plehy</i>
									<i>S. xylosus</i>
									<i>S. epidermidis</i>
									<i>S. lentus</i>
									<i>S. typhimurium</i>
Mbaveng et al., 2008						Tala et al., 2007	Kuete et al., 2007		Referencia

Microorganismos [Presencia de Halo/CMI (µg/mL)]

Tabla No 2. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*. (Cont.)

<i>V. rubescens</i>			<i>V. guineensis</i>						Especie	
Extracto metanólico de corteza	Kaempferol	1,8dihidroxi 6-metoxi 3-metilanttraquina	Friedelina	1,7dihidroxi Xantona	6-deoxi-jacareubina	O ¹ -demetil-3'4'-dioxi-psorospermin 3'4' diol	Caloxantona	Ácido betulínico	Sustancia	Microorganismos [Presencia de Halo/CMI (µg/mL)]
				+ 4,8			+ 39	-	<i>E. faecalis</i>	
+ 125				+ 19			+ 19	-	<i>S. aureus</i>	
				+ 19			-	-	<i>B. cereus</i>	
				+ 2			-	-	<i>B. megateirum</i>	
				+ 2,4			+ 39	-	<i>B. stearothermophilus</i>	
				+ 39			-	-	<i>B. subtilis</i>	
	+ 39	+ 312	+ >312	+ 312	+ >312	+ 0.6	+ 312	+ >312	<i>M. smegmatis</i>	
	+ 19					+ 4,8			<i>M. tuberculosis</i>	
									<i>S. mitis</i>	
									<i>S. sanguis</i>	
									<i>S. mutans</i>	
									<i>L. monocitogenes</i>	
									<i>B. cereus</i>	
									<i>M. plehy</i>	
									<i>S. xylosus</i>	
									<i>S. epidermidis</i>	
									<i>S. lentus</i>	
									<i>S. typhimurium</i>	
Tamokou et al., 2009			Mbaveng et al., 2008						Referencia	

Tabla Nº 2. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram positivas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*. (Cont.)

<i>V. guineensis</i>								Especie
Extracto acuoso de planta	Aceite esencial de frutos	Extracto etanólico de corteza	Aceite esencial frutos	Friedelina	Fisción	1,7dihidro-xixantona	1,4,8-dihidroxi-xantona	Sustancia
			+ 19					<i>E. faecalis</i>
-	+ 12500	+ 31250	+ 37	+ 200	+ 50	+ 6,2	+ 125	<i>S. aureus</i>
								<i>B. cereus</i>
								<i>B. megateirum</i>
								<i>B. stearothermophilus</i>
								<i>B. subtilis</i>
								<i>M. smegmatis</i>
								<i>M. tuberculosis</i>
		+ 31250						<i>S. mitis</i>
		+ 31250						<i>S. sanguis</i>
		-						<i>S. mutans</i>
-	-							<i>L. monocitogenes</i>
-	+ 12500							<i>B. cereus</i>
								<i>M. plehy</i>
	+ 12500							<i>S. xylosus</i>
	+ 12500							<i>S. epidermidis</i>
	+ 12500							<i>S. lentus</i>
								<i>S. typhimurium</i>
Lizcano et al., 2012	Silvestre et al., 2012	Camelo et al., 2011						Referencia
Mbaveng et al., 2008								

Microorganismos [Presencia de Halo/CMI (µg/mL)]

Tabla N° 3. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram negativas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*

Especie		Sustancia	Microorganismos [Presencia de HalocMI ($\mu\text{g/ml}$)]											Referencia			
			Extracto melanólico corteza de tallo	Extracto melanólico corteza de raíces	Laurenti-xantona A	Laurenti-xantona B	Extracto melanólico de hojas	Sesamina	Friedelina	Vismia-quinona	Extracto melanólico hojas	Extracto melanólico ramas	Extracto melanólico raíces		Vismia-quinona C	Vismia-quinona	Bvismia-quinona
	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 625	+ >625	+ 625	-	-	-	-
	<i>E. aerogens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 625	+ 625	+ 625	-	-	-	+ 78
	<i>E. cloacae</i>	-	-	+ 39	-	-	-	-	-	-	+ >625	+ >625	+ 625	-	-	-	+ >78
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ >625	+ >625	+ >625	-	-	-	+ 78
	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 625	+ 625	+ 312	+ 39	-	-	-
	<i>M. morgani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 78,1	+ 78,1	+ 625	+ 4,8	-	-	+ 9,7
	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 312	+ 312	+ 78,1	-	-	-	+ 39
	<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 78,1	+ 625	+ 625	+ 78,1	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	500 +	400 +	-	+ 78,1	+ 156	+ 156	+ 2,4	-	-	+ 4,8
	<i>S.dysenteriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 156	+ 156	+ 312	-	-	-	-
	<i>S. flexnery</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ 312	+ 312	+ 625	+ 2,4	-	-	+ 4,8
	<i>S. typhy</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ >625	+ >625	+ 78	-	-	-	-
	<i>V. vunificus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V.alginolitycus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>V. parahemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. enterica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuetel et al., 2007										Salas et al., 2006			Nguemaving et al 2006	López et al., 2001	Referencia		

Tabla No 3. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram negativas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia* (Cont.)

<i>V. guineensis</i>							<i>V. laurentii</i>					Especie	Microorganismos [Presencia de Halo/CMI (µg/mL)]	Referencia
1,7-dihidro-xi-xantonina	Caloxantonina	Ácido betulínico	Vismia-quinona B	Extracto melánico raíces	Extracto melánico de ramas	Extracto melánico de hojas	Laurenti-xantonina C	Kaempferol	Friedelina	O'-demetil-3,4'-dioxi-psorospermin 3,4'-diol	6-deoxi-jacarubina	1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antraquinona		
+ 19	-	-	-	+ 4,8	+ 78	+ 78		+78	+4,8	-	+19	-	<i>C. freundii</i>	
+ 4,8	+19	-	-	+78	+ 78	+ 78		+39	+78	-	-	-	<i>E. aerogens</i>	
+ 9,7	+19	-	-	+78	+ 39	+ 39		+19	+78	+ 19	+ 78	-	<i>E. cloacae</i>	
+ 19	+19	-	-	+78	+ 78	+ 78		-	+78	-	-	-	<i>E. coli</i>	
+ 19	+19	-	-	+78	+ 78	+ 78		-	-	+ 78	-	+ 39	<i>K. pneumoniae</i>	
-	+19	+ 39	+ 39	+ 78	+ 4,8	+ 39		+ 39	+4,8	+ 39	+ 19	+ 78	<i>M. morgani</i>	
-	-	-	-	+ 312	+ 3,9	+ 156		+ 39	+3,9	+ 19	-	+ 78	<i>P. mirabilis</i>	
+ 39	-	-	-	+ 156	+ 9,7	+ 156		+ 39	+9,7	-	+ 19	+ 39	<i>P. vulgaris</i>	
-	-	-	-					-	+2,4	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	
+ 4,8	+19	-	-	+ 156	+ 2,4	+ 156		+4,8	+2,4	-	+ 4,8	-	<i>S. dysenteriae</i>	
+ 2,4	+19	-	-	+39	+ 2,4	+ 78		+39	+2,4	+ 39	-	-	<i>S. flexneri</i>	
-	+39	-	+39	+ 78	+ 2,4	+ 78		+9,7	+2,4	-	-	-	<i>S. typhi</i>	
													<i>V. vulnificus</i>	
													<i>V. alginolyticus</i>	
													<i>V. parahemolyticus</i>	
													<i>S. enterica</i>	
Mbaveng et al., 2008							Tala et al, 2007	Kuete et al., 2007						Referencia

Tabla N° 3. Estudios de susceptibilidad para bacterias Gram negativas de sustancias provenientes de especies del género *Vismia* (Cont.)

Especie	Sustancia	Microorganismos [Presencia de Halo/CMI ($\mu\text{g/mL}$)]												Referencia					
		<i>C. freundii</i>	<i>E. aerogens</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. typhi</i>		<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>S. enterica</i>	
<i>V. rubescens</i>	Fisión									+12									Tamokou et al., 2009
	Extracto metanólico corteza									+1000									
	1,4,8-dihidroxi xantona									+50									
	1,7dihidro-xi xantona									+6,2									
	Friedelina									+100									
	Friedelanol									+50									
<i>V. baccifera</i>	Aceite esencial frutos				+18	+9				+9									Rojas et al., 2011
<i>V. guianensis</i>	Extracto etanólico de hojas				.	.				.									Camelo et al., 2011
	Aceite esencial de frutos				.	.				.									Silvestre et al., 2012
<i>V. baccifera</i>	Extracto acuoso de planta				.	.				.									Lizcano et al., 2012

2.5.- Evaluaciones antifúngicas en el género *Vismia*

Estudios de susceptibilidad antifúngica reportados utilizando sustancias obtenidas a partir de especies del género *Vismia*, realizados con la finalidad de determinar si las mismas tienen alguna actividad contra diferentes microorganismos pertenecientes al reino de los hongos se pueden resumir en la tabla N°4.

Tabla N° 4. Estudios de susceptibilidad antifúngica de sustancias provenientes de especies del género *Vismia*

Especie	Sustancia	Microorganismos							Referencia
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>M. audouinii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
		Halo de inhibición CMI (µg/mL)							
<i>V. macrophylla</i>	Extracto etanólico de corteza	-	-						López et al., 2001
	Extracto etanólico de raíces	-	-						
<i>V. laurentii</i>	Laurentixantona A	+	+						Nguemevin g et al., 2006
	Laurentixantona B	+	+						
	Extracto metanólico de hojas	+	+						Kuele et al., 2007
	Extracto metanólico de ramas	+	+						
	Extracto etanólico de raíces	+	+						
	Vismiaquinona C	-	-						
	Vismiaquinona	+	+						
		78,12	2,44						
		19,53	0,61						
		312,5	78,5						
		312,5	78,5						
		312,5	78,5						
		2,44	2,44						

Tabla N° 4. Estudios de susceptibilidad antifúngica de sustancias provenientes de especies del género *Vismia* (Cont.)

Especie	Sustancia	Microorganismos							Referencia	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>M. audouinii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>
		Halo de inhibición CMI (µg/mL)								
<i>V. laurentii</i>	Friedelina	+	+						Kwete et al., 2007	
	2,44	4,88								
	Kaempferol	+	+							
	>78,12	2,44								
	Bivismiaquinona	+	+							
	2,44	2,44								
	3-geranyloxy-6-metil-1,8-dihidroxy antraquinona	-	-							
-	-									
1,8 dihidroxy-6-metoxi-3-metil antraquinonas	-	-								
-	-									
O ¹ demetil-3'4'dioxi psropermin 3'4'diol	+	+								
>78,12	1,22									
6-deoxijacareubina	-	-								
-	-									
<i>V. guineensis</i>	Extracto etanólico de hojas	+	+	+	+	+			Mbaveng et al., 2008	
	78,12	156	NE	39,0	39,0					
	Extracto etanólico de corteza	+	+	+	+	+				
	78,12	156	NE	39,0	78,1					
	Extracto etanólico de raíces	+	+	+	+	+				
	78,12	156	NE	39,0	78,1					
	Vismiaquinona	+	+	+	+	+				
39,06	39,0	NE	39,0	39,0						
Ácido betulínico	+	-	-	-	+					
39,06	NE	NE	NE	19,5						
Caloxantona	+	-	+	+	+					
39,06	-	19,5	19,5	39,0						
1,7 -dihidroxixantona	+	+	+	+	+					
39,06	9,76	39,0	19,5	4,88						

NE= No Ensayado

Tabla N° 4. Estudios de susceptibilidad antifúngica de sustancias provenientes de especies del género *Vismia* (Cont.)

Especie	Sustancia	Microorganismos							Referencia	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>M. audouinii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. neoformans</i>
		Halo de inhibición CMI (µg/mL)								
<i>V. laurentii</i>	Friedelina	+	+							Kueete et al., 2007
	2,44	4,88								
	1,7- dihidroxixantona	-					+	+	+	
	6,25	6,25	3,12							
	Fisción	-					+	+	+	
100	25	12,5								
<i>V. rubescens</i>	Friedelina	-					-	-	-	Tamokou et al., 2009
	-									
<i>V. rubescens</i>	Extracto metanólico de la corteza del tallo	+					+	+	+	Camelo et al., 2011
	500	1000	500	500						
<i>V. guianensis</i>	1,4,8 – trihidroxixantona	-					-	+	+	Silvestre et al., 2012
	-							50	12,5	
<i>V. guianensis</i>	Extracto etanólico de hojas	+					+	-		Silvestre et al., 2012
	NE						NE	NE		
<i>V. guianensis</i>	Aceite esencial de hojas	+					+	+		Silvestre et al., 2012
	NE						NE	NE		

NE= No Ensayado

2.6.-Evaluaciones de la actividad antioxidante en el género *Vismia*

Son bien conocidas las innumerables reacciones bioquímicas, que ocurren en el organismo vivo, generando especies reactivas radicalarias, las cuales son capaces de dañar biomoléculas cruciales; estas especies son captadas por constituyentes celulares, pudiendo ocasionar diferentes patologías (Halliwell, 1991). No obstante, la acción de los radicales libres puede ser bloqueada por sustancias antioxidantes, las cuales detoxifican el organismo previniéndolo de enfermedades neurodegenerativas (Gerber *et al.*, 2002), cardiovasculares (Kris-Etherton *et al.*, 2002) y cancerígenas (Serafini *et al.*, 2002).

Una de las áreas más relevantes en las ciencias de la salud es la búsqueda de nuevos antioxidantes naturales para el control de enfermedades que implican daño oxidativo, en este sentido, las sustancias provenientes de plantas medicinales han demostrado ser una fuente importante de compuestos con marcada actividad antioxidante, permitiendo el crecimiento acelerado de investigaciones en esta área (Bergman *et al.*, 2001).

El género *Vismia* no se escapa de ser objeto de estudio de posibles fuentes con poder antioxidante, ya que, se han reportado publicaciones acerca del tema, como lo fue una investigación sobre los frutos de *Vismia baccifera* var. *ferruginea* y *Vismia guianensis* extraídos mediante percolación sucesiva con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol, mostrando capacidad captadora de radicales frente al DPPH•, observándose la mayor actividad en el extracto de acetato de etilo seguido por el de éter de petróleo; estableciendo claramente a estos extractos como potenciales antioxidantes. Los extractos mostraron IC₅₀ comprendidas entre 3,72 y 7,04 µg/mL. Esta actividad posiblemente esté asociada con las propiedades químicas de los metabolitos aislados, ya reportados en publicaciones anteriores, como los antranoides prenilados ferruginina A, γ-hidroxiferruginina y la antraquinona vismiaquinona A (Álvarez *et al.*, 2008).

Así mismo, los extractos de las hojas *Vismia magnoliifolia* fueron probados frente a la especie radicalaria DPPH•, sustancia muy conveniente para el cribado de un gran número de muestras de diferente polaridad a causa de su alto rendimiento. La especie de *Vismia* en este ensayo no mostró la capacidad de los antioxidantes para secuestrar los radicales libres probablemente porque dentro

de los metabolitos presentes en el extracto no existían especies capaces de donar hidrógeno a los radicales libres. (Elita *et al.*, 2012)

2.7.- Evaluaciones de la actividad insecticida en el género *Vismia*

El papel de los compuestos secundarios de plantas superiores, en la defensa de las plantas contra los insectos y hongos se ha reconocido cada vez más en los últimos años, una serie de investigaciones se han realizado para dilucidar la base química de la resistencia de la planta. Unos 10.000 de estos compuestos son conocidos, con una amplia distribución entre las plantas superiores, a veces con compuestos comunes ó diferentes en muchas plantas; familias; un género específico o a una sola especie vegetal. (Simmonds *et al.*, 1985).

Una nueva clase de antranoides lipofílicos, entre ellos vismionas y ferrugininas, se han descubierto en plantas de la tribu Vismiae (Marini Bettolo *et al.*, 1978; Delle Monache *et al.*, 1983), las pruebas preliminares sugieren que estos compuestos pueden desempeñar un papel en la protección de plantas del género *Vismia* contra insectos. Por lo tanto, los mismos se sometieron a pruebas biológicas, donde se encontró que inhiben la alimentación en larvas de especies de *Spodoptera*, *Heliothis*, y *Locusta migratoria*. (Simmonds *et al.*, 1985).

Lepidóptera, polilla guatemalteca o *Tecia solanivora*, perteneciente a la familia Gelechiidae, es considerada como una de las plagas más perjudiciales al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), las larvas al alimentarse dañan los tubérculos tanto en campo como en el almacén, haciendo galerías superficiales -bajo la epidermis- o profundas, causando la pudrición e inclusive pueden causar pérdidas de hasta el 100% de la producción. (Dominguez *et al.*, 2009).

Estas larvas están ampliamente distribuidas en latinoamérica, y se ha encontrado en ellas un virus isométrico pequeño de tubérculos recogidos en el Ecuador, el mismo fue designado como el virus Anchilibi (AnchV). Además de causar alta virulencia hacia su huésped original, AnchV también causó gran mortalidad en las larvas de otros dos especies de papa, polilla *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema plaesiosema* (tangolias) (Turner) por lo que estas larvas no solo representan un fenómeno perjudicial sino que también se convierten –al aislar el virus- en una alternativa para proteger al tubérculo de otras especies de polilla (Zeddám *et al.*, 2008).

Aunque la *Tecia solanivora* es una plaga presente en la mayoría de cultivos de papa, la misma se puede controlar, así lo enfocó un estudio realizado en Colombia, que muestra un efecto sinérgico entre dos estímulos que controla el daño herbívoro y aumenta el rendimiento de la papa, a pesar del hecho de que cada estímulo, por sí solo no tiene ningún efecto; también, se comparó la eficacia de estos tratamientos a los sistemas de gestión convencionales que emplean insecticidas, demostrando que el uso simultáneo de los extractos de pimienta-ajo y cultivos intercalados con *S. tuberosum* y *Roja nariño* son una estrategia efectiva para el manejo de *T. solanivora*. Esta estrategia mantiene la productividad alcanzada con las prácticas de gestión convencionales, pero sin los costos sanitarios, medioambientales y ecológicos asociados al uso de insecticidas (Jiménez *et al.*, 2009).

Otra de las estrategias de control de esta plaga es colocar trampas de agua con feromonas para la captura de machos adultos. Para el control biológico en condiciones de almacenamiento, además de los mencionados anteriormente, se han desarrollado de igual forma, productos a base de granulovirus como el denominado "*Baculovirus Corpoica*", único registrado en Colombia (Quiroga *et al.*, 2011).

Como esta plaga es común en cultivos de papa, en la República Bolivariana de Venezuela se ha encontrado ciertos focos de la misma en la zonas frías productoras de *Solanum tuberosum*, representando una plaga de cultivo que es controlada por los agricultores de las distintas zonas del estado Mérida con insecticidas comerciales como Lormax®, Arrivo® y Furadan®, por lo que se consideró probar las sustancias extraídas de la especie de *Vismia baccifera var. dealbata* en este estudio, como una alternativa de insecticidas naturales, y utilizando como referencia una investigación previa que evaluó el efecto de seis insecticidas comerciales con diferentes principios activos, sobre larvas de *T. solanivora* criadas artificialmente en el estado Mérida (Domínguez *et al.*, 2009).

3.- HIPÓTESIS

Estudios previos realizados a las hojas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* permitieron aislar compuestos con actividad antibacteriana y Citotóxica, de manera que, al realizar estudios en la corteza y frutos de esta misma especie se esperarían encontrar sustancias con potencial actividad biológica.

4.- OBJETIVOS

Tomando en cuenta la importancia química y farmacológica del género *Vismia*, para la presente investigación se proponen los siguientes objetivos:

4.1.- Objetivo general

Determinar la composición química de la corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* y explorar la bioactividad de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de ambas partes de la especie.

4.2.- Objetivos específicos

Aislar y purificar los compuestos químicos mayoritarios presentes en la corteza y frutos de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata* a través de técnicas cromatográficas.

Caracterizar los compuestos aislados mediante las técnicas espectroscópicas Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H uni y bidimensional y RMN-¹³C) y Espectrometría de masas (EM).

Extraer el aceite esencial de la corteza y frutos de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata* por hidrodestilación y determinar los principales constituyentes del mismo por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Determinar los índices de Kovats y compararlos con los reportados en las referencias.

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de la corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de la corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* contra diferentes levaduras.

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de la corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* mediante el test del 1,1- difenil- 2-picrilhidrazil.

Evaluar la actividad insecticida de los extractos, aceites esenciales y compuestos aislados de la corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* contra larvas de *Tecia solanivora*.

www.bdigital.ula.ve

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección del material botánico

Para el estudio fitoquímico de los frutos y corteza de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata*, la misma fue recolectada en Octubre del 2007, en la finca "Los Topes", del propietario Dr. Antonio Morales (Figura. N° 1) Aldea San Juanito, Parroquia Chiguará, Municipio Sucre, altitud 1250 m.s.n.m., Mérida-Venezuela. Una muestra del material recogido luego de su identificación, fue depositada en el herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes bajo el número JR-21. Por otra parte, para la obtención de los aceites esenciales, la especie bajo estudio fue recolectada en el mismo sitio en Julio del 2011.



Figura N° 1. Sitio de Recolección de *V. baccifera* var. *dealbata*.

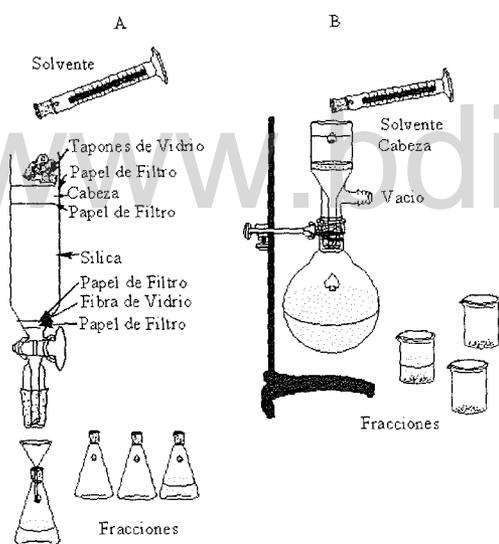
5.2.- Extracción del material botánico

El material botánico recolectado (frutos y corteza) se colocó en un horno a 40 °C para ser secado durante dos días en el Lab. de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la ULA. Una vez seco, se trituró para hacerlo lo más fino posible y se colocó (por separado) en una malla de nylon para realizar la extracción por maceración con hexano y metanol, durante cinco días para cada solvente, a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor bajo presión

reducida a una temperatura máxima de 50 °C. Una vez concentrados fueron pesados y una pequeña cantidad de cada extracto fue almacenado en frascos ámbar en la nevera hasta la realización de las pruebas biológicas, el resto se utilizó para la separación y purificación de los componentes presentes.

5.3.- Separación purificación e identificación de los componentes presentes en el extracto

Los extractos crudos de la planta fueron fraccionados mediante cromatografía líquida de columna abierta en el Lab. C de Productos Naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA (IIFFB), para la cual se utilizó sílica gel 60 de 0,04-0,06mm (230-400 mesh ASTM) Scharlau®, Papel de filtro Watman® N°1 de diferentes diámetros y fibra de vidrio Fibraca®.



Para este procedimiento, los extractos secos se mezclaron con gel de sílice en un mortero y se colocó como cabeza de la cromatografía en columna, tal como se muestra en la figura anexa al texto, donde el procedimiento A, implicó que el líquido se desplazó por gravedad (Columnas I, II, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII y XIV) mientras que en el procedimiento B, los líquidos eluyeron bajo presión. (Columnas III, IV y V). Todas las columnas fueron eluidas con hexano, mezclas de hexano-diclorometano en orden de polaridad creciente, diclorometano-metanol y finalmente metanol; en la

figura N° 10 y 11, se muestran el número de columnas realizadas en las separación de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*.

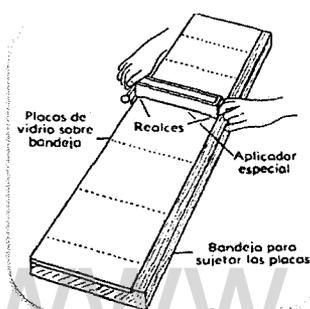
5.3.1- Cromatografía de capa fina (TLC)

Esta técnica analítica, sirvió para monitorear las separaciones realizadas en la cromatografía de columna abierta y al vacío; se utilizaron placas de gel de sílice sobre soporte de aluminio de la casa

Merck® HF 254 (0,25mm de espesor) y otras elaboradas manualmente a 0,20mm en placas de 20 x 20 mm con sílica (230-400 mesh ASTM) Scharlau®. Las placas se desarrollaron en los sistemas de eluyente adecuados y se revelaron en ácido sulfúrico (Merck®) al 10%, calentándolas en corriente de aire por varios minutos hasta la aparición de las manchas.

5.3.2.- Cromatografía de capa preparativa

La cromatografía preparativa se realizó para la purificación de los compuestos (4) y (5). A las placas de vidrio de 20 x 20 cm se les depositó sílica (230-400 mesh ASTM) Scharlau® preparada a razón



de 100mL de agua por cada 300g de sílica, con un espesor de 0,5 mm, a través de un dispositivo tal como lo muestra la figura adjunta (Gibaja, 2010), las placas se desarrollaron en los sistemas de eluyente adecuados y se revelaron en ácido sulfúrico (Merck®) al 10%, calentándolas sobre plancha metálica a 40°C por varios minutos, hasta la aparición de las manchas, para este procedimiento

también se utilizó lámpara ultravioleta Modelo FAR17-255.

5.3.3.-Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM)

Las esencias obtenidas tanto en corteza como fruto y algunas fracciones eluidas en columna abierta fueron separadas e identificadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con el propósito de obtener mayor información de composición química de la especie bajo estudio, para ello se utilizó un cromatógrafo de gases ubicado en el IIFFB y se contó con la tutoría de los Drs. Alfredo Usubillaga, Luis Rojas y Rosa Aparicio, utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a un detector de masas Hewlett-Packard modelo 5973.

En todos los estudios realizados por CG-SM se utilizó la columna capilar de sílice fundida HP-5MS de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro y 0,25 μ m de espesor de película, manteniendo la temperatura del inyector en 200 °C.

Se utilizó el programa ACEITE-B para aceites esenciales, el cual inició en 60 °C hasta 260 °C con incremento de 4 °C/min; utilizando soluciones de 20 µL de esencia en 1 mL de n-heptano, por otra parte para las fracciones -purificadas previamente por cromatografía líquida de columna- se usaron los programas:

- METESTER-TRITER inicia en 100 °C hasta 300 °C con incremento de 8 °C/min.
- GRASOSME inicia en 150 °C hasta 300 °C con incremento de 5 °C/min.

Estos programas se inyectaron en el equipo con un volumen de 1 µL, a partir de una solución preparada con éter. Si se trató de una muestra líquida, se tomaron 20 µL en 1 mL de éter y si el análisis era para un sólido se prepararon 3 mg en 1 mL de éter.

Los espectros de masas obtenidos, mostraron información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos computarizada Wiley y Ms. (Sexta Ed.).

5.3.4.-Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución para la identificación de los compuestos (1) y (2), ubicado en el Lab. de Revestimientos Andinos C.A. Sede Florida-Miami- Estados Unidos, se contó con la supervisión del Sr. Rafael A. Peña. El cromatógrafo empleado fue Alliance 2695 (Waters, USA), la columna utilizada para la determinación de los analitos por HPLC fue de fase inversa sobre Zorbax Eclipse XDB C8, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent, USA) con detector PDA 2996 a 205 nm.

La fase móvil estuvo compuesta por una solución de metanol:agua (95:5), la velocidad de flujo fue de 0,7 ml/min y la temperatura de la columna se estableció a 35 °C, se contó con un volumen de inyección de 10 µl. Los datos fueron recolectados y evaluados por software Empower (Waters, USA). Los blancos comerciales utilizados como patrones de comparación: Estigmasterol, β -Sitosterol, (Green Health Botanical Products Co., Ltd.®), 23-etilcolestan-5-en-3 β -ol y 22,24-

dimetilcolesta-5en-3 β -ol estos dos últimos donados por el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Houston.

5.3.5.-Espectroscopia Infrarroja (IR)

La espectroscopia infrarroja permitió identificar los grupos funcionales de los compuestos aislados en base a la longitud de onda de absorción, característica de cada grupo, el equipo que se utilizó fue un espectrofotómetro con Transformada de Fourier PERKIN-ELMER modelo LAMBDA 3, donde se trabajó con pastillas de KBr para 1% de muestra sólida, el cual está situado en el Lab. de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ULA, bajo la supervisión del MsC. Willian Velásquez y la Lic. Karina Zavala

5.3.6.-Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C (RMN)

Los espectros de Resonancia magnética nuclear tomados en el Lab. de Resonancia Magnética Nuclear de la Facultad de Ciencias de la ULA bajo la Tutoría de los Drs. Ali Bashas, Sonia Koteich y Marcela Torres, se corrieron en un equipo Bruker-Advance DRX 400, a 400 y 100 MHz, en tubos de 5 mm. Se utilizó cloroformo deuterado para los compuestos.

5.3.7.-Punto de Fusión

La determinación del punto de fusión de las sustancias identificadas, se realizó a través de un fusiómetro Fisher Jonhs del IIFFB de la ULA.

5.4.-Obtención de los Aceites Esenciales

La Obtención de los aceites esenciales se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo la supervisión del Dr. Luis B. Rojas, Profesor del Postgrado en Química de Medicamentos.

Los frutos y la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata* fueron sometidos a un proceso de hidrodestilación por 4 horas, para la obtención de los componentes volátiles, el vapor fue producido directamente en el recipiente de destilación, calentando el agua hasta su punto de ebullición en presencia de la parte de la planta a ser destilada y los mismos se recogieron utilizando una trampa de Clevenger, los cuales se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se guardaron en frasco ámbar a temperatura entre 4 y 6 °C.

La esencia obtenida se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6890, con columna capilar HP-5 de 30 metros de largo y equipado con un detector de masa marca Hewlett-Packard modelo 5973. El espectro de masas obtenido, mostró información sobre el patrón de fraccionamiento del compuesto, su masa molecular y el porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos Wiley Ms. Para el análisis se preparó una solución 1:20 esencia : *n*-heptano. Para cada muestra se inyectó 1 µL. El programa de temperatura utilizado inició en 60 °C, luego se incrementó a razón de 4 °C/min hasta . El inyector se mantuvo a 200 °C. La relación de reparto fue 1:100.

Se calcularon los índices de Kovats (Kovats, 1958) obtenidos en los cromatogramas de ambos aceites en relación a los tiempos de retención de los componentes de cada aceite con una serie de *n*-parafinas (C₉ – C₂₇) (Lamparsky, 1987). Los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura (Adams, 2007) seguido de los espectros de masas de la Librería Wiley MS data. La Figura N° 2 resume el esquema experimental utilizado en la obtención de los aceites esenciales de corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* y la determinación de sus componentes químicos.

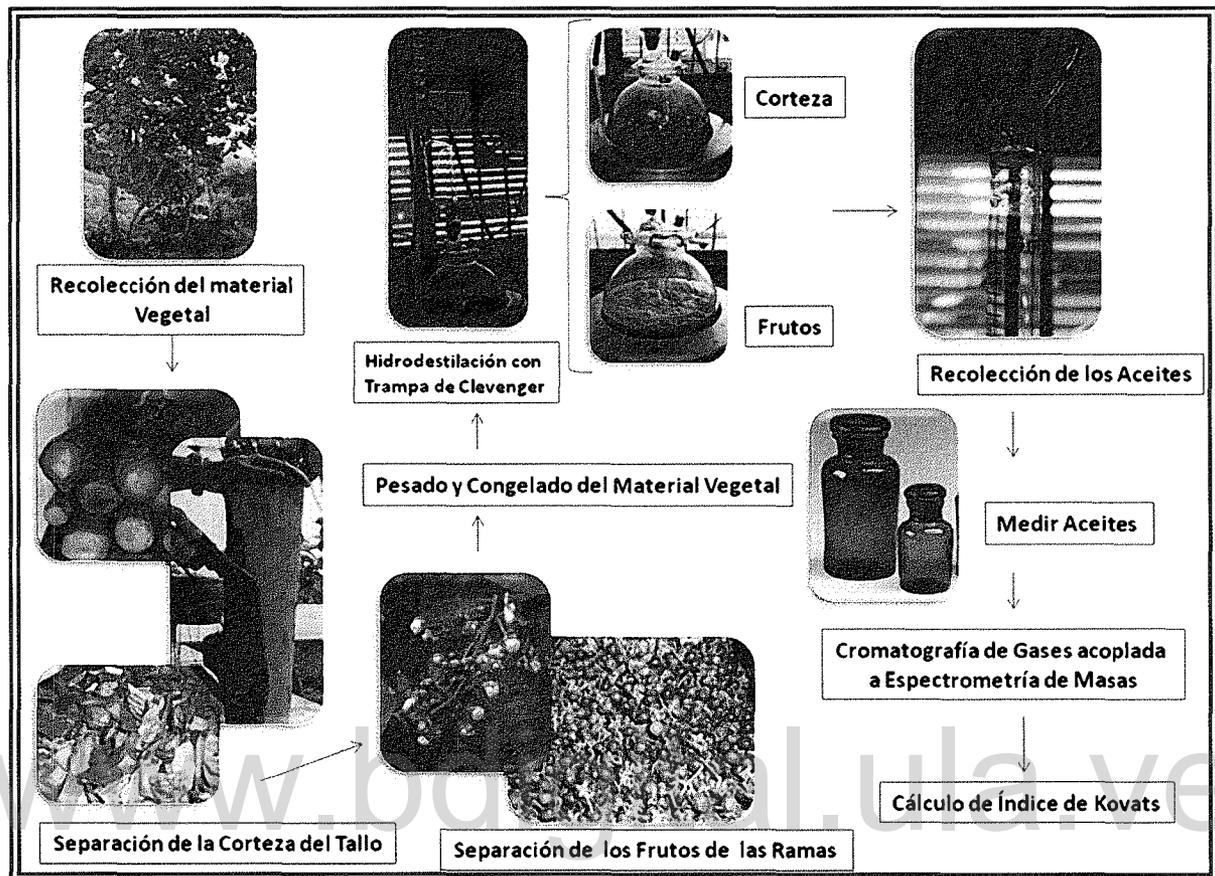


Figura N° 2. Esquema experimental utilizado en la obtención de aceites esenciales de corteza y fruto de *Vismia baccifera* var. *dealbata*.

5.5.-Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Esta evaluación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes bajo la Supervisión del Dr. Gerardo Medina Profesor del Postgrado de Química de Medicamentos. Se utilizaron once (11) sustancias procedentes de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata*: Extracto hexanólico de corteza (**EHC**), extracto metanólico de corteza (**EMC**), extracto hexanólico de frutos (**EHF**), extracto metanólico de frutos (**EMF**), aceite esencial de corteza (**AC**), aceite esencial de frutos (**AF**), mezcla de esteroides de núcleo estigmastano; β -sitosterol: Estigmasterol (70:30) (**1 y 2**), Lupeol (**3**), Friedelina (**4**), Epifriedelinol (**5**) y Vismiaquinona (**6**).

En el ensayo cualitativo, cada una de las sustancias sólidas se prepararon en Dimetil Sulfóxido (DMSO), a una concentración de 1000µg/mL, mientras los aceites esenciales se ensayaron sin diluir.

5.5.1.-Microorganismos y Sustancias de Referencia

En este ensayo se probó la susceptibilidad de trece (13) especies de microorganismos, de las cuales cinco (5) cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis*, ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Bacillus megaterium* ATCC 14581 y *Bacillus subtilis* ATCC 19639) y siete (7) cepas fueron Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25992, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 y *Vibrio alginolyticus* ATCC 33787). Para este ensayo se utilizó como control positivo Gentamicina Sulfato® LCH (Laboratorio Chile S.A.) y como control negativo se usó Dimetil sulfóxido® (DMSO) grado HPLC (Scharlau Chemie S.A.).

5.5.2.-Medios de Cultivo

- Agar Tripticasa de Soya: medio utilizado para el repique de las cepas, preparado con 24h de anticipación al ensayo. Este medio está compuesto por 40g de Agar Tripticasa de Soya® (Flash Chemical S.A.) disueltos en un litro de agua destilada y mezclado constantemente bajo calor. Fué esterilizado en autoclave a 121 °C por quince minutos.
- Müeller-Hinton Modificado: utilizado como medio de crecimiento de las cepas en los ensayos de la actividad antibacteriana. Para la preparación del mismo se siguieron las instrucciones del fabricante, Agar Müeller-Hinton BBL™ (Becton Dickinson and Company®) 38g del sólido por cada litro de agua destilada. A la mezcla anterior se le adicionó una solución madre de Azul de Metileno DIFCO® (100mg de azul de metileno en 20 mL de agua destilada). Este medio se sirvió en tubos a razón de 12 mL por tubo. Se esterilizó por quince minutos a 121°C. Se dejaron solidificar formando taco y bisel.

5.5.3.-Ensayo Cualitativo

Se repicaron las cepas de referencia en el medio Agar Tripticasa de Soya y se conservaron a temperatura de 37°C, por 24 h. El día del ensayo, se preparó el inóculo de la cepa, diluyendo la misma en solución salina fisiológica al 5%, ajustando la turbidez a un patrón 0,5 Mac Farland, equivalente a una concentración entre 10⁶ y 10⁸ UFC/mL. Posterior a ello, se tomaron 12mL de medio Müeller Hinton modificado, al cual se le agregó 240µL del inóculo de la cepa preparada y se mezcló con movimientos rotativos; luego se vertió en la placa de Petri y se dejó solidificar.

Una vez solidificado el medio en la placa, se colocaron los discos de papel de filtro (de 6mm de diámetro, Watman® N° 1) dispuestos, según el esquema de distribución de sustancia en la placa, previamente dibujado en un papel y colocado debajo del fondo de la placa. Posteriormente, se impregnaron los discos de papel de filtro con 15 µL de cada una de las sustancias a ensayar (incluyendo los controles) diluidas en DMSO a una concentración de 1000 µg/mL. Las placas se incubaron en la estufa a 37 °C, por un período de 24 h. En la lectura de los ensayos, se registró la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición alrededor de los discos. Este ensayo se realizó por triplicado. La Figura N° 3 muestra de manera esquemática los pasos efectuados durante la realización del ensayo cualitativo, utilizando en la prueba de susceptibilidad antibacteriana, el método de ensayo en disco de difusión conocido como el método de Kirby-Baüer desarrollado en 1966. (Bauer et al., 1966).

5.5.4.-Ensayo Cuantitativo

Se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sólo a las sustancias que resultaron con actividad antibacteriana en el ensayo antimicrobiano cualitativo. Para el ensayo cuantitativo se realizó el método de difusión con disco realizado anteriormente, en el cual, se repicaron las bacterias de referencia en el medio Agar Tripticasa de Soya y se conservaron a temperatura de 4°C, por 24 h. El día del ensayo, se preparó el inóculo de la cepa, diluyendo la misma en solución salina fisiológica al 5%, ajustandola a un patrón de turbidez 0,5 Mac Farland,

equivalente a una concentración entre 10^6 y 10^8 UFC/mL. En 12 mL del medio Mueller Hinton modificado, se le agregaron 240 μ L del inóculo de la cepa preparada y se mezcló con movimientos rotativos; luego se vertió en la placa de Petri y se dejó solidificar. Una vez solidificado el medio en la placa, se procedió a colocar 9 discos de papel de filtro por placa. Se colocaron 15 μ L de cada una de las ocho (8) concentraciones diferentes, comprendidas entre (1000 y 0,001) μ g/mL. Para ello se realizaron diluciones seriadas en DMSO de las sustancias a ensayar, comenzando con una solución madre a una concentración de 1000 μ g/mL. El noveno disco correspondió al control negativo (DMSO). Las placas de Petri se incubaron a temperatura de 37°C por 24 horas, para su lectura e interpretación. Se registró la presencia del halo mas cercano al disco como concentración mínima inhibitoria. Este ensayo se realizó por triplicado (Figura N° 4).

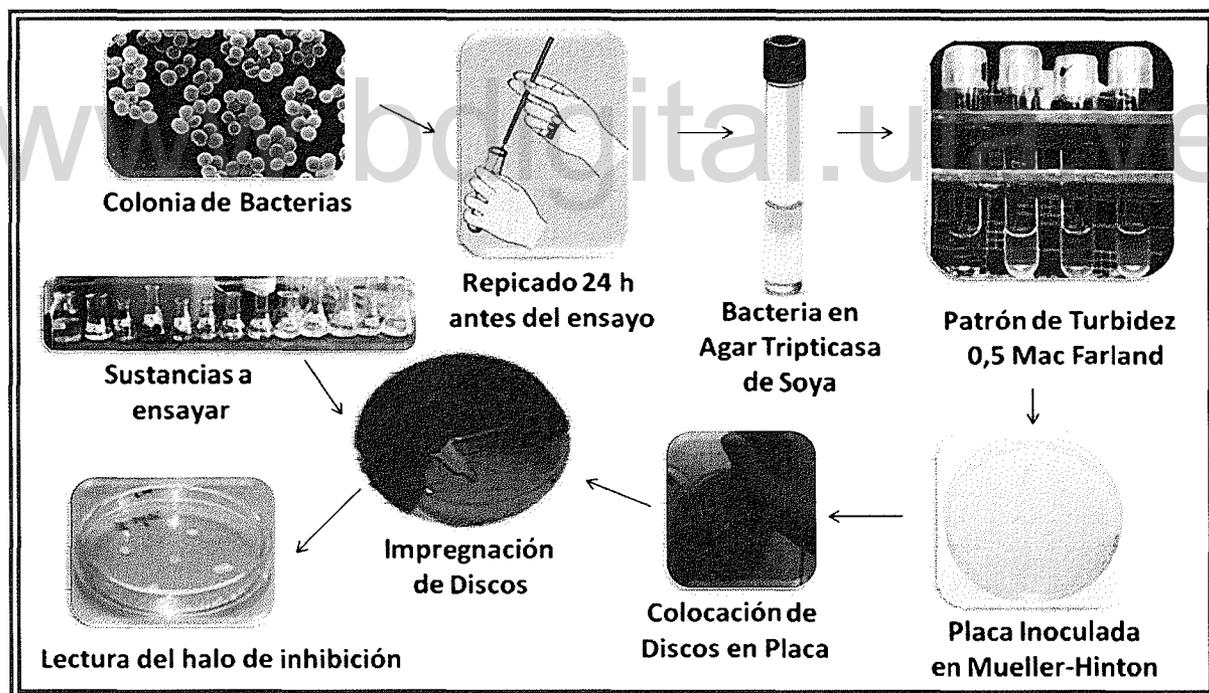


Figura N° 3. Esquema del ensayo cualitativo Antibacteriano.

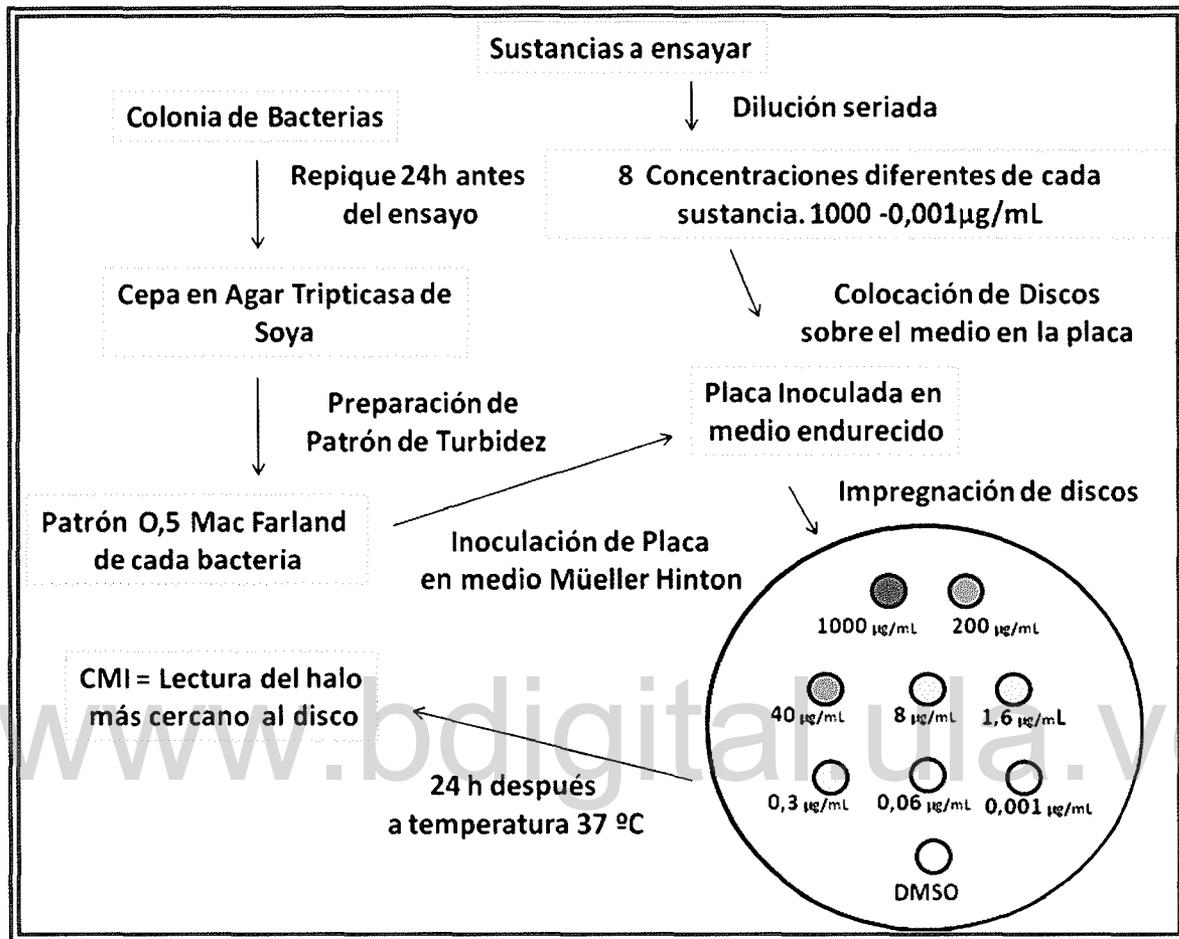


Figura N° 4. Esquema del ensayo cuantitativo Antibacteriano.

5.6.-Evaluación de la Actividad Antifúngica

Esta evaluación se realizó en el Laboratorio de Micología ubicado en el Edificio "Gonzalo González" de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Celina Pérez de Salazar. Once (11) sustancias fueron evaluadas Extractos hexanólicos y metanólicos de corteza y fruto (EHC, EHF, EMC, EMF) además de aceites esenciales obtenidos de los frutos y corteza (AC y AF) y la mezcla de dos esteroides de núcleo Estigmastano (30:70) Estigmasterol/ β -Sitosterol (1 y 2) junto con las sustancias puras Lupeol (3), Friedelina (4), Epifriedelinol (5) y Vismiaquinona (6).

Cada una de las sustancias sólidas, fué preparada con $\approx 20 \mu\text{L}$ de dimetil sulfóxido (DMSO) grado HPLC (Scharlau Chemie S.A.®), con la finalidad de obtener una solución saturada de cada una de ellas. Los aceites esenciales se ensayaron sin diluir.

5.6.1.-Microorganismos y Sustancias de Referencia

Se utilizaron un total de seis (6) especies de levaduras para este estudio, las cuales fueron: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 50658, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Cryptococcus neoformans* (aislado clínico).

Para el ensayo cualitativo se usó como control positivo discos de referencia de Fluconazol de 25 μg y Ketoconazol de 25 μg (Oxide Basingstoke®) y para el ensayo cuantitativo soluciones a diferentes concentraciones de Fluconazol y Ketoconazol Calox®. En ambos estudios, el control negativo usado fue dimetil sulfóxido (DMSO)

5.6.2.-Medios de Cultivo

- Agar sabouraud dextrosa con antibiótico: medio utilizado para el repique de las cepas 48h de anticipación al ensayo. Este medio está compuesto por agar sabourad dextrosa BBL™, (Becton Dickinson and Company®) (65 g) y Cloranfenicol Colmed Internacional® (250 mg) disueltos en agua destilada (1 L). Fue mezclado constantemente bajo calor y distribuido en tubos a razón de 6 mL, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por quince minutos. Se dejaron solidificar formando taco y bisel.
- Müeller-Hinton Modificado: utilizado como medio de crecimiento de la cepa en los ensayos de la actividad antifungica. Para la preparación del mismo se siguieron las instrucciones del fabricante, Agar Müeller -Hinton BBL™ (Becton Dickinson and Company®) de 38 g del sólido, por cada litro de agua destilada. A la mezcla anterior se le adicionó Glucosa anhidrida® (20g) y 100 μL de una solución madre de Azul de metileno DIFCO® (100mg de

azul de metileno en 20 mL de agua destilada). Este medio se sirvió en tubos a razón de 20 mL por tubo. Se esterilizó por quince minutos a 121°C. Se dejaron solidificar formando taco.

5.6.3.-Ensayo Cualitativo

Se repicaron las levaduras de referencia en el medio agar sabourad dextrosa con antibiótico y se conservaron a temperatura ambiente, por 48 h. El día del ensayo, se preparó el inóculo de la cepa, diluyendo la misma en solución salina fisiológica, ajustandola a un patrón de turbidez 0,5 Mac Farland, equivalente a una concentración entre 1×10^6 y 5×10^6 UFC/mL. Posterior a ello, se diluyó el medio Müeller Hinton modificado, al cual se le agregó 1mL del inóculo de la cepa preparada y se mezcló con movimientos rotativos; luego se vertió en la placa de Petri y se dejó solidificar.

Una vez solidificado el medio en la placa, se colocaron los discos de papel de filtro (de 6mm de diámetro, Watman® N° 1) distribuidos según el patrón, previamente dibujado en un papel y colocado debajo del fondo de la placa. Posteriormente, se impregnaron los discos de papel de filtro con 10 μ L de cada una de las sustancia a ensayar. Las placas se incubaron en la estufa a 37 °C, por un periodo de 48 h.

En la lectura de los ensayos, se registró la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos, cuyos diámetros se expresaron en milímetros. Este ensayo se realizó por triplicado (Figura N° 5).

La Figura N° 5, muestra de manera esquemática los pasos efectuados durante la realización del ensayo cualitativo, utilizado en la prueba de susceptibilidad antifúngica, basado en el método de ensayo difusión con disco, recomendado por el "Instituto Pasteur de Paris" (Drouhet *et al.*, 1986), para estudios microbiológicos con levaduras.

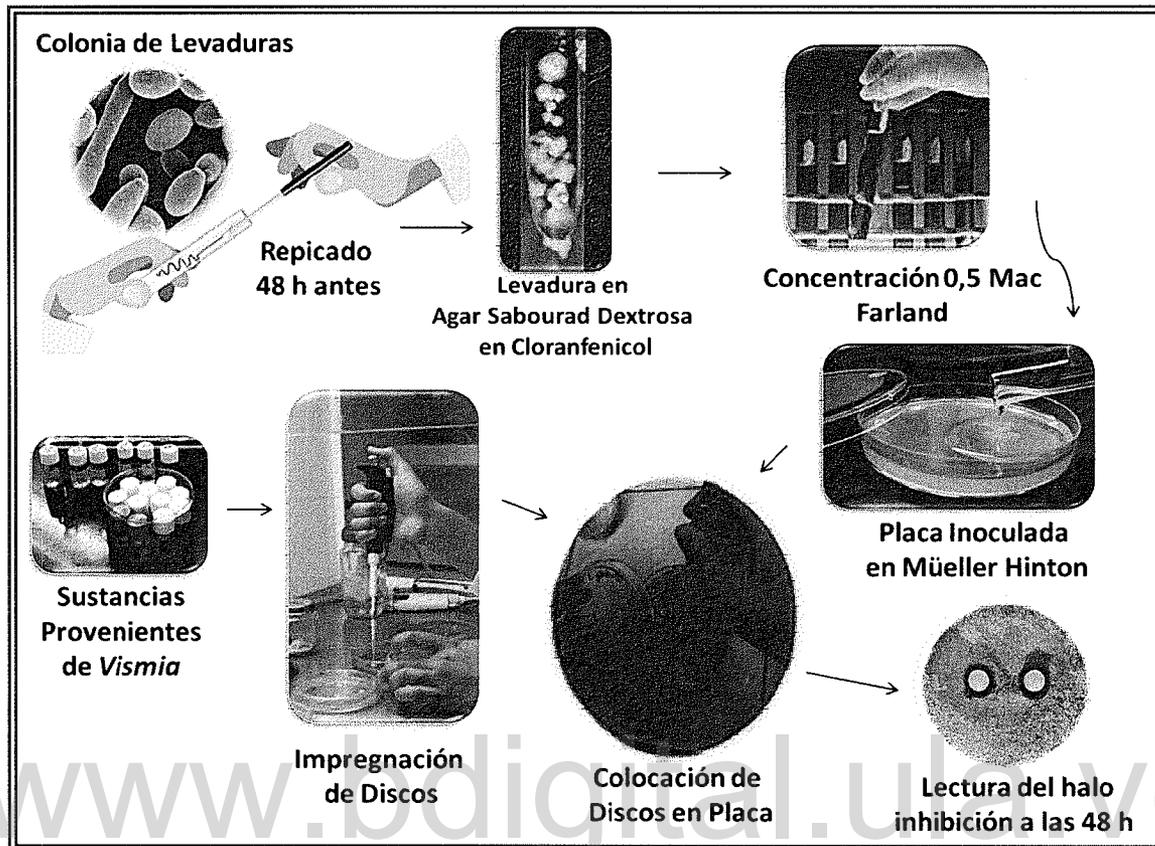


Figura Nº 5. Esquema del ensayo cualitativo Antifúngico.

5.6.4.-Ensayo Cuantitativo

Se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) solo a las sustancias que en el ensayo cualitativo presentaron una zona de inhibición.

Para esta prueba, se repicaron las levaduras en el medio agar sabourad dextrosa con antibiótico y se conservaron a temperatura ambiente, por 48 h. El día del ensayo, se preparó el inóculo de la cepa, diluyendo la misma en solución salina fisiológica, ajustandola a un patrón de turbidez 0,5 Mac Farland, equivalente a una concentración entre 10^6 y 10^8 UFC/mL. Se diluyó el medio Mueller Hinton modificado, al cual se le agregó 1 mL del inóculo de la cepa preparada y se mezcló con movimientos rotativos; luego se vertió en la placa de Petri y se dejó solidificar.

Una vez solidificado el medio de cultivo en la placa, se procedió a realizar la técnica de difusión, en la cual se colocó una microgota de la sustancia a evaluar, aplicada directamente sobre la superficie del medio (Lizcano *et al.*, 2012). De cada una de las sustancias se evaluaron ocho (8) concentraciones diferentes, comprendidas entre (1000 y 0,001) $\mu\text{g/mL}$. Para ello se realizaron diluciones seriadas en DMSO de las sustancias a ensayar, comenzando con la solución madre (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Las placas de Petri se incubaron a temperatura ambiente (20°C) por 48 horas, para su lectura e interpretación. Se registró la presencia de halos de inhibición hasta un 50% de inhibición del crecimiento de la levadura, en el sitio donde fue colocada la gota de la sustancia a evaluar o en su defecto la ausencia de dicho halo. Este ensayo se realizó por triplicado (Figura N° 6).

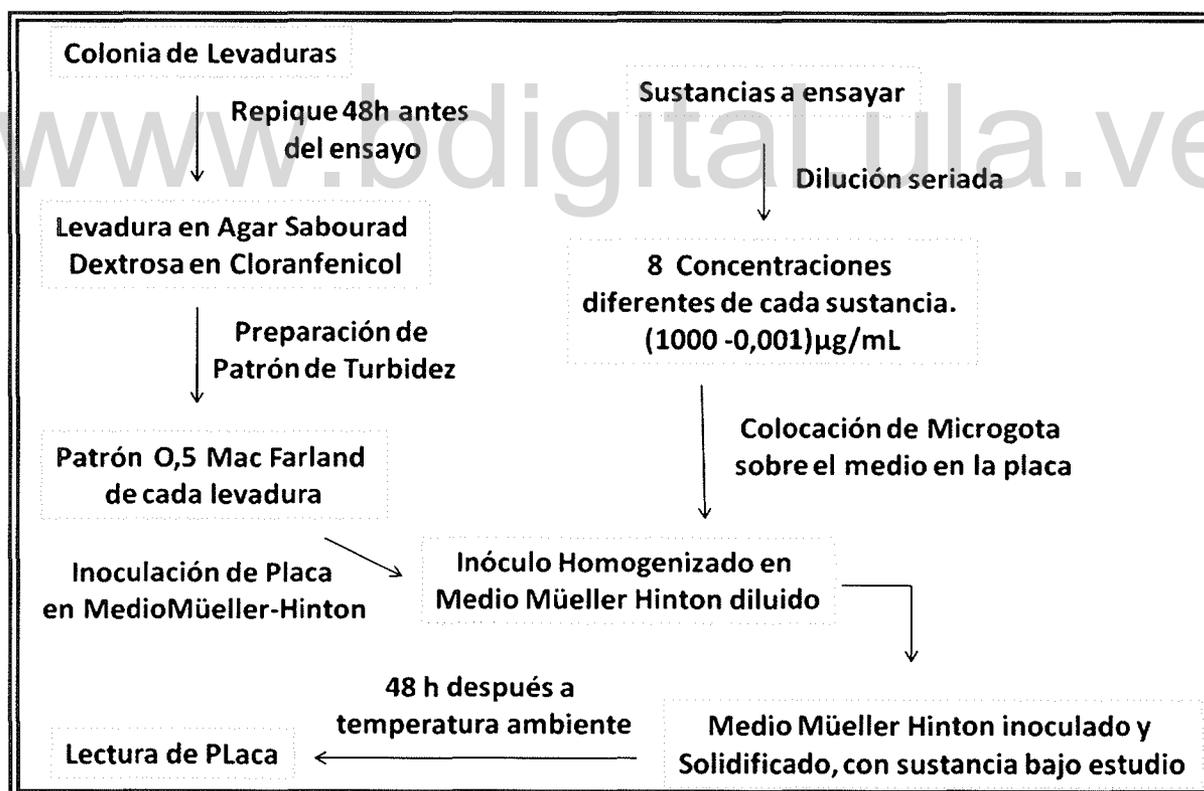


Figura N° 6. Esquema del ensayo cuantitativo antifúngico.

5.7.- Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación cualitativa de este ensayo se realizó en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo la supervisión de la Dra. Lorena Díaz de Torres, profesora de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, por otra parte la evaluación cuantitativa se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del decanato de Investigación de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET) bajo la supervisión de la Lic. Tibisay Ramírez especialista en gestión ambiental y Profesora Asistente de la cátedra de Química ambiental.

5.7.1.-Materiales y métodos

Tanto en el análisis cualitativo como en el cuantitativo se midió la capacidad secuestrante de radicales libres utilizando el test de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) en donde se aprovechan las propiedades cromáticas del radical según el protocolo propuesto por Goupy y colaboradores en 1999 (Goupy et al. 1999). El equipo para medir la absorbancia de la mezcla de reacción fue un espectrofotómetro Genesys 5 Milton Roy® y celdas de vidrio Fisher Scientific®, así como un agitador de Vórtice Whirlimixer® y Micropipetas de 200 µL y 5 mL Diamond™.

5.7.2.-Sustancias a ensayar

En el ensayo cualitativo se evaluaron once (11) sustancias procedentes de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata*: EHC, EMC, EHF, EMF, AC, AF, 1 - 2, 3, 4, 5 y 6 junto con el testigo.

5.7.3.-Sustancias de referencia

El reactivo empleado fue 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) perteneciente a la casa comercial Sigma®, se utilizó ácido ascórbico (Bayer®) como testigo y el solvente para todas las sustancias fue metanol grado analítico al 98% (Merck®)

5.7.4.-Ensayo experimental

Tanto para la evaluación cualitativa como para la cuantitativa, se preparó una solución patrón de 0,6 mM del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•) en metanol grado analítico, la cual se almacenó a 0 °C, en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio para mayor protección contra luz. Para efectos de esta evaluación se prepararon soluciones de 1mg/mL de cada una de las sustancias a ensayar y la solución de trabajo de DPPH• se preparó diariamente a partir de la solución patrón almacenada con el volumen a usar a una concentración de 0,06mM tal como lo establece el protocolo, así como también la solución de ácido ascórbico a una concentración de 1 mM.

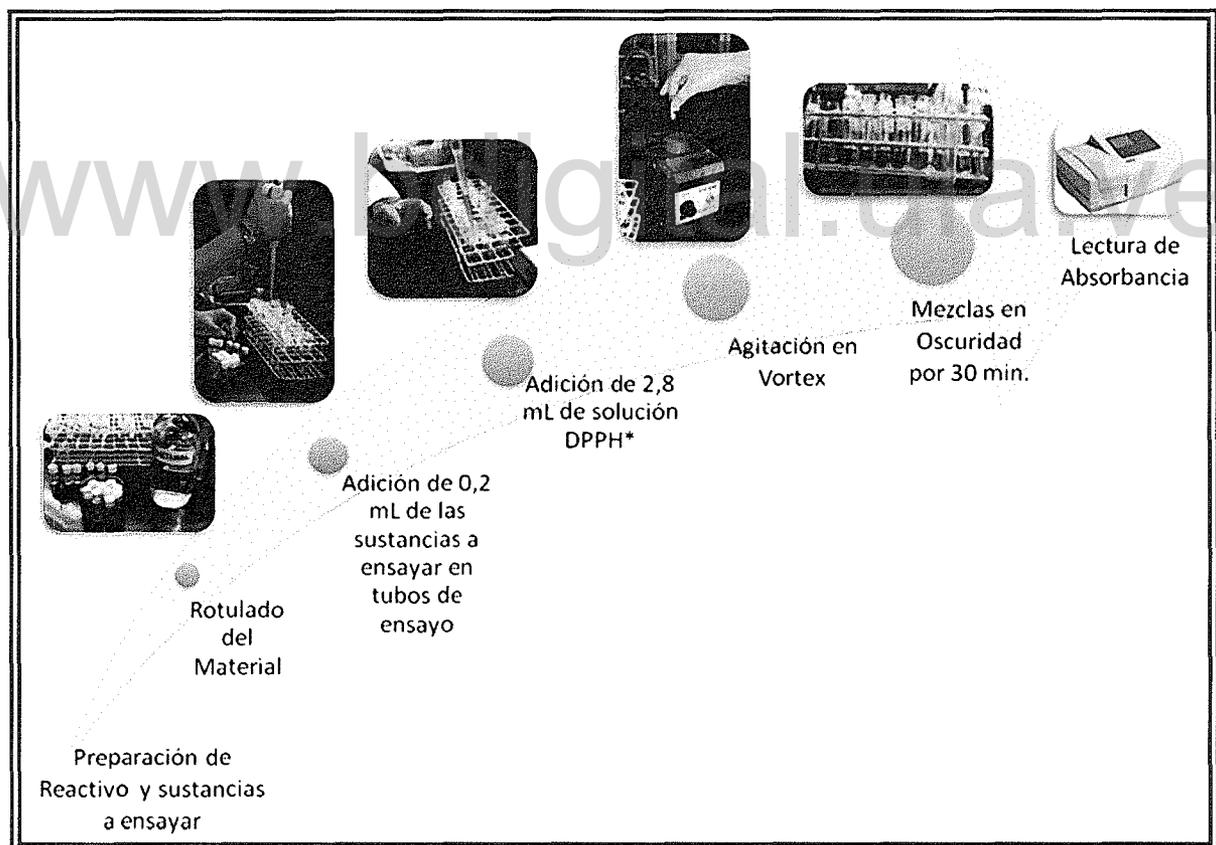


Figura N° 7. Esquema de la evaluación de la actividad antioxidante.

A los tubos de ensayo previamente estériles y rotulados se les añadió 200 μ L de la solución a ensayar, luego a cada tubo se le adicionó 2,8 mL de la solución de DPPH• incluyendo al testigo y el tubo de grupo control –Tubo solo con DPPH•-, posteriormente se agitaron en vórtice y se colocaron en la oscuridad por treinta (30) minutos.

Para la medición de las absorbancias a una longitud máxima de 517 nm, se ajustó el blanco de metanol a cero, luego se midió la absorbancia del DPPH• que se encuentra reportada a 0,600 para esa concentración y luego la del ácido ascórbico que se localiza según el protocolo alrededor de 0,018, por último, se realizan las mediciones de todas las sustancias.

Las muestras que en este ensayo resultaron con un cambio considerable en absorbancia y según el cálculo arrojaban un resultado cerca o superior al 50% de reducción de DPPH• fueron evaluadas de forma cuantitativa, es decir, a diferentes concentraciones (1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, μ g/mL) con el objetivo de calcular los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones, y determinar el índice de inhibición medio (IC₅₀) o la concentración en la cual el porcentaje de reducción del radical es del 50%, las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. El esquema de este ensayo se resume en la Figura N° 7.

5.8.-Evaluación de la actividad insecticida sobre larvas de *Tecia solanivora*

Esta evaluación se realizó en el Laboratorio de Entomología, de la Universidad Politécnica Territorial del estado Mérida "Kleber Ramírez", bajo la supervisión del T.S.U. José Márquez y con la colaboración del Ing. Wuilson Ramírez del Laboratorio de Entomología, y Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes.

El análisis estadístico se realizó bajo la supervisión del Dr. Argenis Mora Profesor de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Escuela de Ingeniería Forestal en las asignaturas

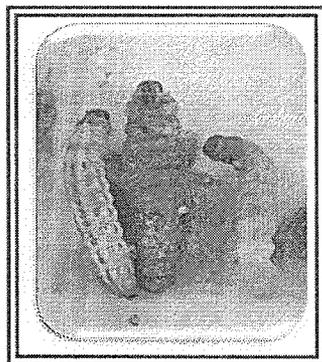
Estadística 11, Tópicos avanzados en diseño de experimentos forestales, Estadística básica y muestreo; de la Universidad de Los Andes.

5.8.1.-Sustancias a ensayar

En la evaluación de la actividad insecticida se utilizaron seis (06) sustancias procedentes de la especie bajo estudio: **EHC, EMC, EHF, EMF, 5 y 6** disueltos en Diclorometano. con la cantidad suficiente para este tipo de prueba.

5.8.2.-Organismos y sustancias de referencia

Para la evaluación de las sustancias se utilizaron larvas de *Tecia solanivora* de la primera crianza artificial, en sus tres últimos instares, que son fácilmente diferenciables por el color tal como se muestra en la (Figura. N° 8). En el primer instar la larva es color blanquecina, en el segundo instar es color amarillenta, en el tercer instar es rosada en el dorso y verde en el vientre y en el cuarto instar es rosada en el dorso y morada en el vientre.



Para esta prueba no se diferenció el sexo de las mismas, ya que un estudio reportado por la Unidad de Cría y Producción de Insectos del Centro de Investigación Tibaitatá –Corpoica-. El sexo solo se logra determinar en el estado de pupa a través de una abertura genital –en el octavo segmento abdominal para las hembras o en el noveno para los machos–, (Rueda & Lopez-Avila, 2004).

Figura. N° 8. Segundo, tercer y cuarto instar de larvas *Tecia*

solanivora

La sustancia evaluada como control positivo en este ensayo fue Alsystin® 480SC de Bayer, una suspensión concentrada a 480 g/L, que tiene como principio activo el Triflumurum que posee el grupo químico, Benzoil fenilurea. Alsystin® 480SC es un insecticida que actúa principalmente por ingestión e interfiere en el proceso de síntesis de la quitina en los insectos. Es recomendado para el

cultivo fitosanitario de papa y posee una dosis letal cincuenta DL_{50} = dermal >10.416 mg/kg y oral >10.146 mg/kg.

5.8.3.-Recolección del insecto

Se cosecharon papas tipo Granola sin ningún insecticida, fungicida, ni protector para evitar la quema; solo se utilizó la aporca como práctica de cultivo, la cosecha fue infectada intencionalmente con *Tecia solanivora* y recolectada en Diciembre de 2011, en donde se recogieron 40 Kg del tubérculo infectado en el sector La Cebada, Aldea Las Playitas, Parroquia Bailadores, Municipio Rivas Dávila, Estado Mérida Venezuela, a una altitud aproximadamente de 1754 m.s.n.m. con una temperatura de 18 °C y una humedad relativa promedio del 43%.

5.8.4.-Ensayo experimental

Una vez recolectada la especie *Solanum tuberosum* infectada con *Tecia solanivora*, las mismas se colocaron en recipientes de polietileno con tierra cernida como base, dichos recipientes se colocaron en jaulas de cría de (50 x 30) cm en el lugar con menos luz solar del Laboratorio de Entomología.

Siete sustancias fueron evaluadas, seis extraídas de la especie bajo estudio y un control positivo, Benzoil fenilurea. Alsystin® 480 SC, los cuales ejercieron ingestión en el insecto a través del contacto y la posterior deglución.

La aplicación de las sustancias a ensayar, se llevó a cabo en placas de Petri estériles, donde se colocó dentro de estas, círculos de papel de filtro Whatman® N° 1 de 9 cm de diámetro, que posteriormente fueron impregnados con la solución previamente preparada. Para cada sustancia probada se dispuso de ocho concentraciones diferentes comprendidas entre (5×10^4 – 5×10^{-10}) µg/mL. Las soluciones de las sustancias bajo estudio fueron diluidas en diclorometano, por lo que, una vez impregnado el papel de filtro, la placa de petri se dejó abierta para evaporar por un tiempo aproximado a una o dos horas, de manera de asegurar la evaporación del solvente en la totalidad

del papel. Una vez seco el papel con la sustancia adherida, se le añadió 1 mL de agua en forma de espiral, para luego colocar las respectivas larvas –el agua sirvió como vehículo, para que la larva absorbiera el extracto.- Para la aplicación de los tratamientos se utilizó la técnica de exposición a superficies tratadas con insecticidas formulados, siguiendo el protocolo de WHO descrita en 1976. (WHO, 1976).

Se colocaron diez larvas por placa, realizando cinco repeticiones por cada concentración de modo de apreciar variabilidad entre las concentraciones, el tiempo de observación fue 24 horas, en el cual se realizó el conteo de larvas muertas por placa, y se consideró como criterio de muerte a la larva sobre el papel de filtro que no tuviera actividad locomotora propia, ya fuera en forma espontánea o al ser estimulada con un pincel o una pinza según lo establecido por el protocolo de evaluación de la actividad insecticida de la organización mundial de la salud.

Los datos de mortalidad obtenidos de la dosis respuesta en los bioensayos fueron analizados estimando la mortalidad y usando el análisis para un diseño completamente aleatorio, con el paquete estadístico R Development Core Team (R, 2008) para Windows, con el fin de determinar las diferencias significativas de las sustancias ensayadas. El esquema de trabajo experimental para la evaluación insecticida se resume en la Figura N° 9.

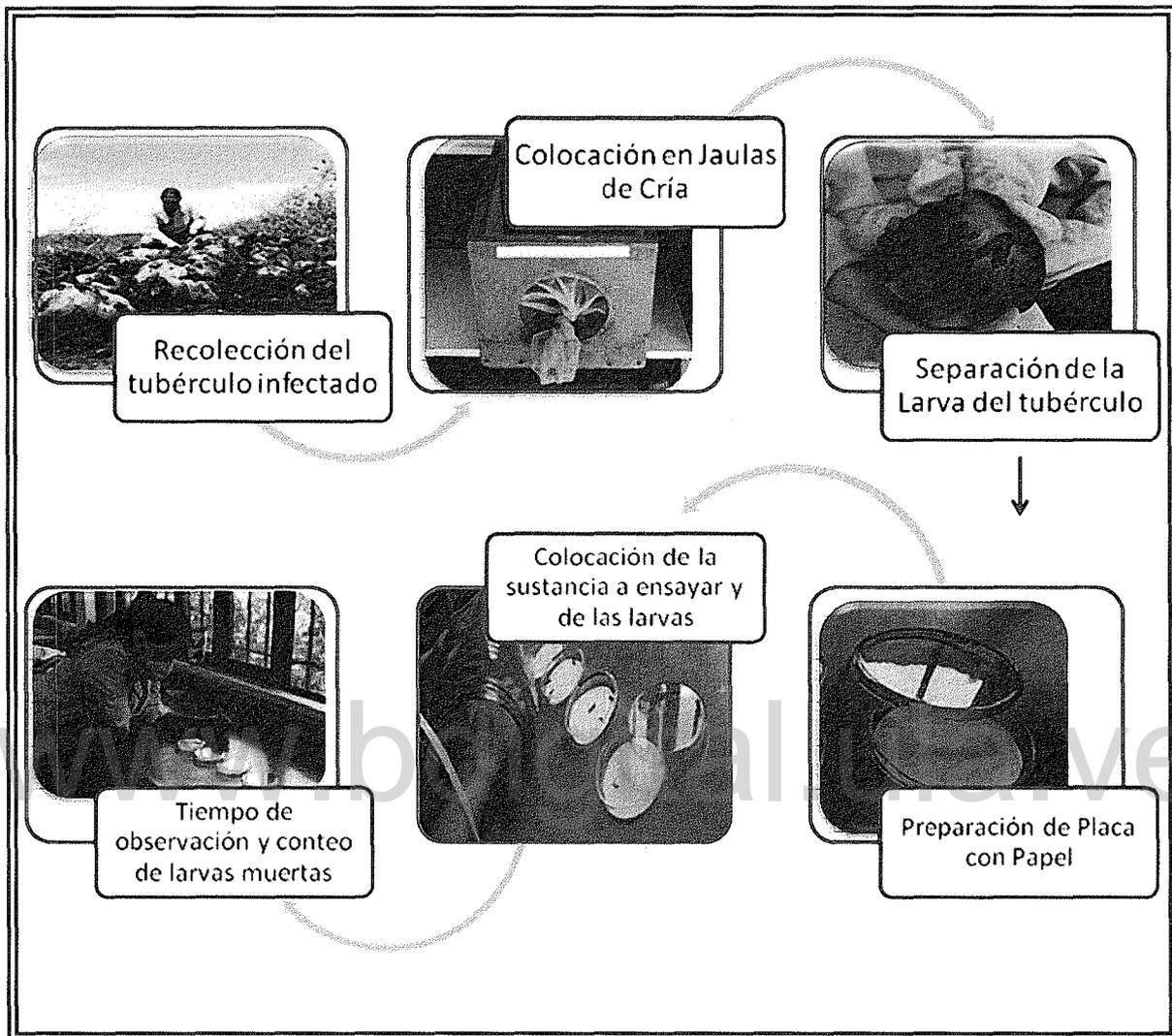


Figura Nº 9. Esquema de Ensayo de la evaluación insecticida.

6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Proceso experimental para la fitoquímica de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*

Luego de la recolección del material botánico, tanto los frutos como la corteza de la especie *Vismia baccifera* var. *dealbata* fueron sometidos a los procesos propios de la separación de las partes exclusivas –objeto de estudio- de la planta, donde se pudo notar claramente que mientras el material esté fresco, la corteza es mas facil de separar del tallo que cuando la misma lleva dias recolectada. Las Figuras N° 10 y 11 describen en gran parte los procedimientos llevados a cabo en la fitoquímica realizada en esta investigación.

6.2.- Identificación de sustancias químicas presentes en corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

De las fracciones provenientes de la cromatografía general y otros procedimientos de recromatografía de los extractos en hexano y metanol de la corteza y frutos de la planta recolectada, se identificaron un total de 71 compuestos presentes en la especie, descripción que se hace a detalle en la Tabla N° 5, bajo esquema experimental resumido en las figuras N° 10 y 11, donde se agrupan los componentes químicos reconocidos por cromatografía de gases acoplada a un espectrometro de masas, bajo los siguientes criterios:

- Se analizaron fracciones donde el TLC mostraba un número menor a 5 manchas.
- Se reportan compuestos con un porcentaje mayor al 1 % en la fracción estudiada.
- Se reportan compuestos donde el espectro de masas coincidía con el reportado en la librería del cromatografo, en un porcentaje mayor o igual al 97 %.

En la técnica descrita, los programas cromatograficos utilizados fueron: METESTER-TRITER para la columna VI y para el resto de este tipo de análisis GRASOSME. Los compuestos identificados fueron agrupados por núcleo químico y por número ascendente de carbonos, donde se identificaron (8) ocho núcleos, siendo los ácidos grasos y los alcanos



Figura N° 10. Procedimiento empleado en la fitoquímica de la corteza de *V. baccifera* var. *dealbata*.

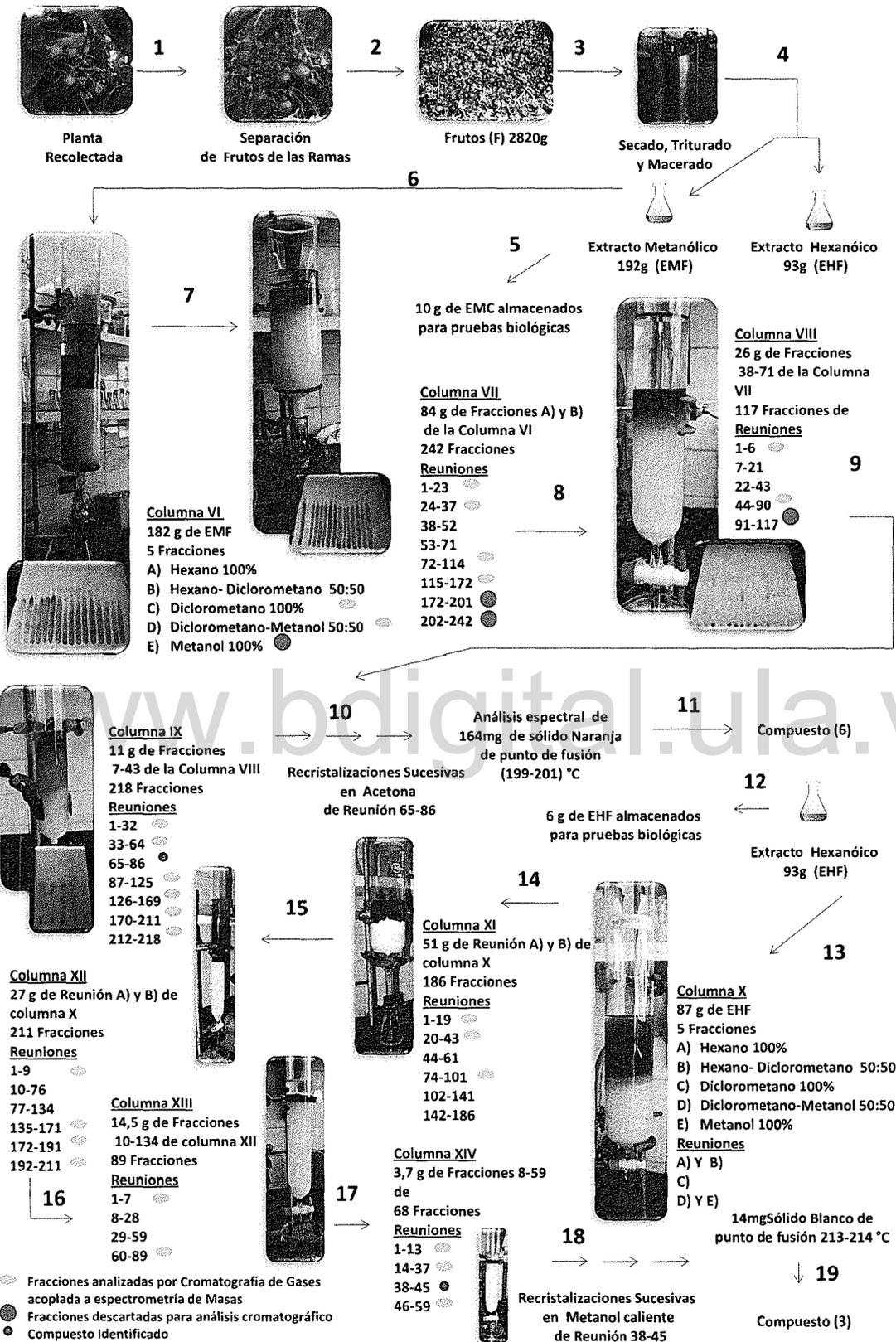


Figura N° 11. Procedimiento empleado en la fitoquímica de los frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*.

Tabla N° 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Núcleo	Reunión / Columna	Compuesto	Estructura	% en (E) Extracto (C) Corteza Fruto(F) (H)Hexano (M) Metanol
Aldehídos	134-148/III	Octenal		ECH=0,0024
	134-148/III	Undecanal		ECH=0,0020
	112-133/III	Ciclopropil undecanal		ECH= 0,0031
	134-148/III	Ciclopropil undecanal		ECH= 0,0034
Cetonas	112-133/III	Undecanona		ECH=0,0008
	9-23/III	2-pentadecanona		ECH=0,0071
Alcanos	9-23/III	Ácido nonanóico metil ester		ECH=0,0009
	50-60/IV 1-23/VI	Dodecano		ECH=0,0003 EFM=0,0097
	1-8/III 50-60/IV 1-8/V	Octadecano		ECH=0,0033 ECH=0,0021 ECH=0,0061
	1-20/II 1-8/V 1-23/VI	Nonadecano		ECM=0,0001 ECH=0,0003 EFM=0,0073
	61-79/IV	Eicosano		ECH=0,0084
	1-23/VI	Ciclo eicosano		EFM=0,0031
	1-23/VI	Heneicosano		ECH=0,0097
	61-79/IV 1-6/VIII	Docosano		ECH=0,0077 EFM=0,0930
	1-20/II 1-8/V 1-23/VI 1-6/VIII	Tricosano		ECM=0,0860 ECH=0,0003 EFM=0,0014 EFM=0,0081
	1-8/V	Hexacosano		ECH=0,0094
	24-37/VI	Heptacosano		EFM=0,0741
	24-37/VI	Octacosano		EFM=0,0081
	24-37/VI	Nonacosano		EFM=0,0003

Tabla N° 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (Cont.)

Núcleo	Reunión / Columna	Compuesto	Estructura	% en (E)Extracto (C)Corteza (F)Fruto (H)Hexano (M) Metanol
Ácidos Grasos	1-8/III	10-metil undecanoato		ECH=0,0031
	1-8/IV	Ácido dodecanóico		ECH=0,0067
	72-114/VII			EFM=0,0094
	115-172/VII			EFM=0,0033
	1-6/VIII			EFM=0,0140
	1-6/VIII	Ácido dodecanóico metil ester		EFM=0,0008
	1-20/II	Ácido tridecanóico		ECM=0,0007
	72-114/VII			EFM=0,0009
	115-172/VII			EFM=0,0483
	44-90/VIII			EFM=0,0761
	44-90/VIII	Ácido tetradecanóico		EFM=0,0337
	1-20/II	Ácido pentadecanóico		ECM=0,0486
	1-21/IV	Ácido hexadecanóico		ECH=0,0444
	72-114/VII			EFM=0,0033
	115-172/VII			EFM=0,0009
	44-90/VIII			EFM=0,0007
	1-32/IX	Ácido 7-hexadecenóico		EFM=0,0032
	1-32/IX	Ácido 9-hexadecenóico		EFM=0,0541
	1-20/II	Ácido hexadecanóico metil ester		ECM=0,0042
	21-23/II			ECM=0,0567
	72-114/VII			EFM=0,0871
	1-32/IX			EFM=0,0741
	33-64/IX			EFM=0,2345
	1-32/IX			EFM=0,0368
	33-64/IX	Acido hexadecanóico 3-metil propil ester		EFM=0,9876
	33-64/IX	Isopropil palmitato		EFM=0,6543

Tabla Nº 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (Cont.)

Núcleo	Reunión/ Columna	Compuesto	Estructura	% en (E) Extracto (C)Corteza (F)Fruto (H)Hexano (M) Metanol
Ácidos Grasos	72-114/VII	Ácido heptadecanóico		EFM=0,789
	21-23/II	Ácido octadecanóico		ECM=0,8743
	72-114/VII			EFM=0,0087
	33-64/IX			EFM=0,0098
	1-32/IX			EFM=0,0019
	72-114/VII	Ácido octadecanóico metil ester		EFM=0,0043
	1-32/IX			EFM=0,0456
	33-64/IX	Ácido octadecanóico acetil ester		EFM=0,0876
	1-8/III	Metil octadecanoato		ECH=0,0087
	1-32/IX			EFM=0,0348
	9-23/III	Etil octadecanoato		ECH=0,0021
	33-64/IX	Ácido octadecanóico isopropil ester		EFM=0,0091
	24-35/II	Ácido oléico		ECM=0,0005
	72-114/VII	Acido oleico isopropil ester		EFM=0,0045
	81-1117/III	Ácido 9-octadecenoico metil ester		ECM=0,0981
	33-64/IX	Ácido 9,12-octadecadienóico		EFM=0,0471
	33-64/IX	Ácido -13-octdecenoico metil ester		EFM=0,0784
	33-64/IX	Ácido octadecanóico acetil ester		EFM=0,0078

Tabla N° 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (Cont.)

Núcleo	Reunión / Columna	Compuesto	Estructura	% (E) Extracto (C)Corteza (F)Fruto (H)Hexano (M) Metanol
Ácidos Grasos	87-125/IX	Metil linoleato		EFM=0,0643
	126-169/IX	Ácido eicosanóico		EFM=0,0382
	1-21/IV	Ácido 11-eicosenoico metil ester		ECH=0,0045
	126-169/IX	Ácido eicosanóico metil ester		EFM=0,0976
	72-114/VII	Ácido docosanóico		EFM=0,0982
	1-8/III	Ácido docosanóico metil ester		ECH=0,2390
	1-21/IV	Ácido tricosenoico		EFM=0,9872
	126-169/IX	Acido tetraecosanóico		EFM=0,001
	50-60/IV	Ácido tetraecosanóico metil ester		EFM=0,0567
Sesquiterpenos	D/VI	1,8-cineole		EFM=0,0453
	D/VI	Aristolona		EFM=0,0871
	D/VI	7,11-epoxiisogermacreno		EFM=0,1100
	D/VI	Oxido de cariofileno		EFM=0,0039

Tabla N° 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (Cont.)

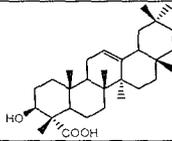
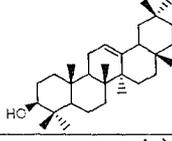
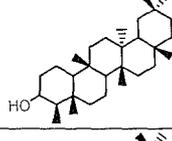
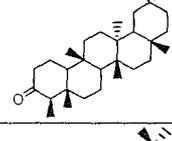
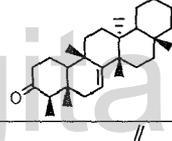
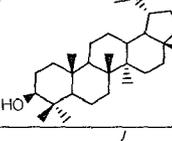
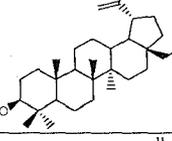
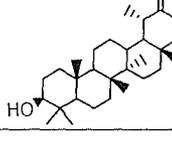
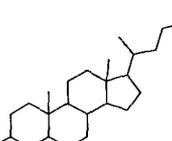
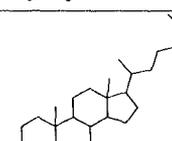
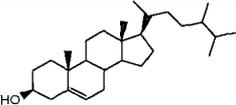
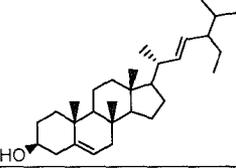
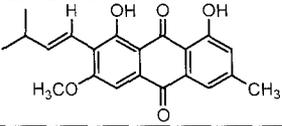
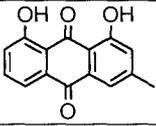
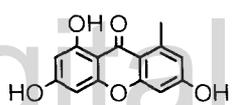
Núcleo	Reunión / Columna	Compuesto	Estructura	% (E) Extracto (C)Corteza (F)Fruto (H)Hexano (M) Metanol
Triterpenos	D,M/VI	Ácido urs-12-en-24-oico		EFM=0,0022
	D,M/VI	Urs-12-en-3-ol		EFM=0,0056
	1-19/XI	3-epifriedelinol		EFH=0,0093
	87-125/IX			EFM=0,0083
	36-54/II	3-friedelanona		ECM=0,0054
	1-19/XI			EFH=0,0345
	1-19/XI	Friedelan-7-en-3-ona		EFH=0,0089
	24-35/II	Lup-20(29)-en-3-ol		ECM=0,0032
	20-43/XI			EFH=0,0234
	1-13/XIV	Betulenol		EFH=0,0056
	1-7/XIII			ECH=0,0671
	1-13/XIV	Taraxasterol		EFH=0,0081
Esteroles	135-171/XII	Epiergostanol		EFH=0,0045
	135-171/XII	Ergost-5-en-3-ol		EFH=0,0038

Tabla N° 5. Composición química de los extractos de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* por cromatografía de gases/espectrometría de masas. (Cont.)

Núcleo	Reunión / Columna	Compuesto	Estructura	% en extracto (C)Corteza (F)Fruto (H)Hexano (M) Metanol
Esteroles	60-89/XIII	Campesterol		EFH=0,0491
	46-59/XIV	Estigmasterol		EFH=0,0034
Antraquinonas	135-171/XII	Vismiaquinona		EFM=0,0672
	135-171/XII	Crisofanol		EFM=0,0034
	172-191/XII			EFM=0,0078
Xantona	1-7/XIII	3,6,8 trihidroxi-metil-xantona		EFH=0,0619
	192-211/XII			EFM=0,0391

los más abundantes, ya que aparecen con mayor frecuencia en las fracciones de los extractos analizados. Estas sustancias lipídicas representan un resultado esperado, en virtud del material analizado -corteza y frutos- que suelen estar constituidos en su parte más externa, por este tipo de sustancias hidrofóbicas, que se encargan de proveer a la planta un soporte estructural, conducir nutrientes y ofrecer protección contra insectos taladradores.

El porcentaje de aldehídos y cetonas determinados bajo esta técnica fue bajo, incluso inusual para la especie, no obstante el porcentaje de terpenos, quinonas y xantonas, además de ser bajo representan marcadores sistemáticos del género de la especie lo que las hace distintivas frente a otros géneros de la misma familia.

Especial análisis merece, para futuras investigaciones, la presencia del ácido hexadecanóico o comúnmente llamado ácido palmítico, ya que el mismo y sus derivados se reportan como los

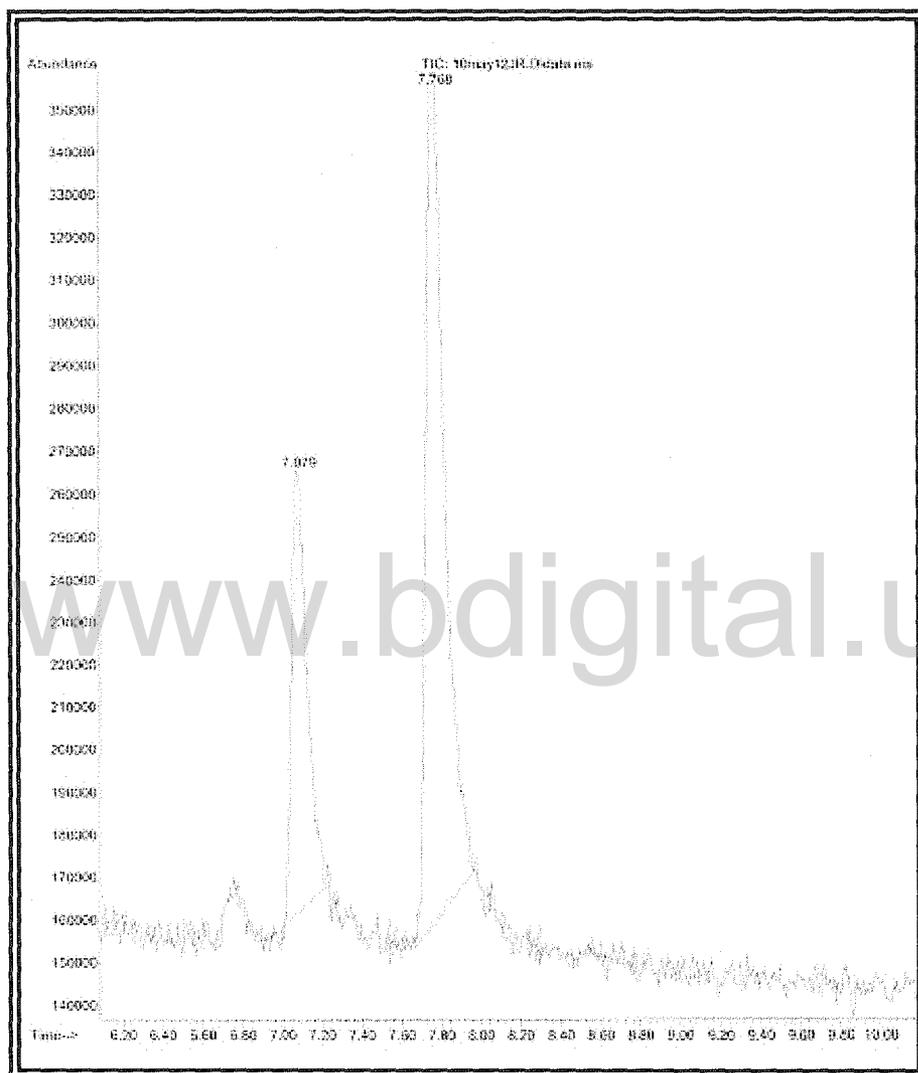
mayores constituyentes en este estudio bajo la técnica utilizada (en capítulos posteriores se revela como uno de los mayoritarios en el aceite esencial de los frutos), lo que debería profundizarse en virtud de una fuente de producción de ácidos grasos.

Finalmente debe reconocerse el alcance y limitaciones de las cromatografías como técnica de separación e identificación, que particularmente en esta parte de la investigación se contó con una columna de baja polaridad (HP-5SM) que implica un fácil reconocimiento de sustancias como las que se reflejan en la tabla N° 5; por ende este estudio no descarta que con diferentes columnas u otras técnicas cromatográficas estos resultados podrían no solo confirmarse sino ampliarse, pudiéndose evidenciar un mayor número de componentes.

www.bdigital.ula.ve

6.3.-Caracterización por IR, MS y RMN de sustancias aisladas de corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*

6.3.1.-Compuestos (1) y (2). Mezcla 30:70 Estigmasta-5,22-dien-3 β -ol) (Estigmasterol) y (Estigmasta-5-en-3 β -ol) (β -Sitosterol).



Del extracto metanólico de corteza de *V. baccifera* var. *dealbata* se obtuvo 74 mg de la fracción esterólica 55-88, de la columna II, eludida con una mezcla 65:35 CH_2Cl_2 : CH_3OH , y recristalizada en metanol caliente, (Figura N° 10) la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Figura N° 12. Cromatograma de los compuestos (1) y (2).

El cromatograma (Figura N° 12) de esta fracción reveló la presencia de dos compuestos, el primer pico con un tiempo de retención de 7,079 min y un porcentaje de pureza de 28,853% y el segundo pico –el cual solo difiere en siete segundos de diferencia- con tiempo de retención de 7,768 min y un porcentaje de pureza de 71,147 %. La mezcla de presentó un punto de fusión de (135-137) °C y ambas sustancias presentaron un peso molecular en el cual difieren en 2 unidades de masa

atómica. La Figura N° 13, modela los espectros de masas para ambos compuestos, donde se observa claramente el pico ión molecular $M^+ = 412,4$ para el compuesto (1) y $M^+ = 414,4$ para el compuesto (2). Al comparar los espectros de masas de los picos del cromatograma, la librería del cromatógrafo de gases sugirió una serie de fitosteroles de núcleo estigmastano, colestano y androstano que coincidían con los pesos moleculares proyectados en los espectros de masa como pico ión molecular.

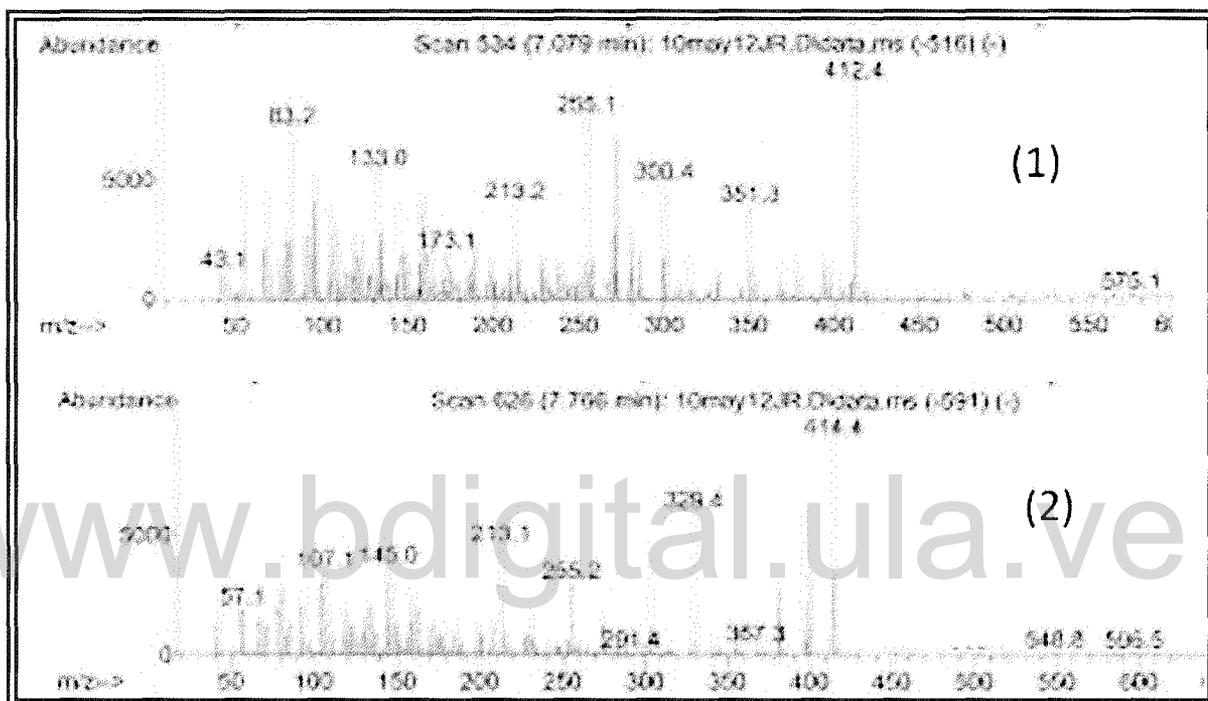


Figura N° 13. Espectros de masas de los compuestos (1) y (2).

Debido al peso molecular de las sustancias presentes en la muestra, se infiere que la mezcla está compuesta de esteroides, por lo que la misma se analizó por cromatografía de alta resolución (HPLC) utilizando un patrón de comparación de blancos comerciales y sintéticos Estigmasterol®(I), 23-etilcolestano-5-en-3 β -ol(II), β -Sitosterol®(III), y 22,24-dimetilcolestano-5-en-3 β -ol(IV). En la Figura N° 14 se muestran los cromatogramas realizados; la imagen (A) corresponde a las señales de los blancos mencionados; (B) la muestra obtenida de los compuestos (1) y (2); y (C) los blancos I y III en conjunto con la muestra, encontrándose que los tiempos de retención, coinciden con el Estigmasterol para el compuesto (1) y β -Sitosterol para el compuesto (2).

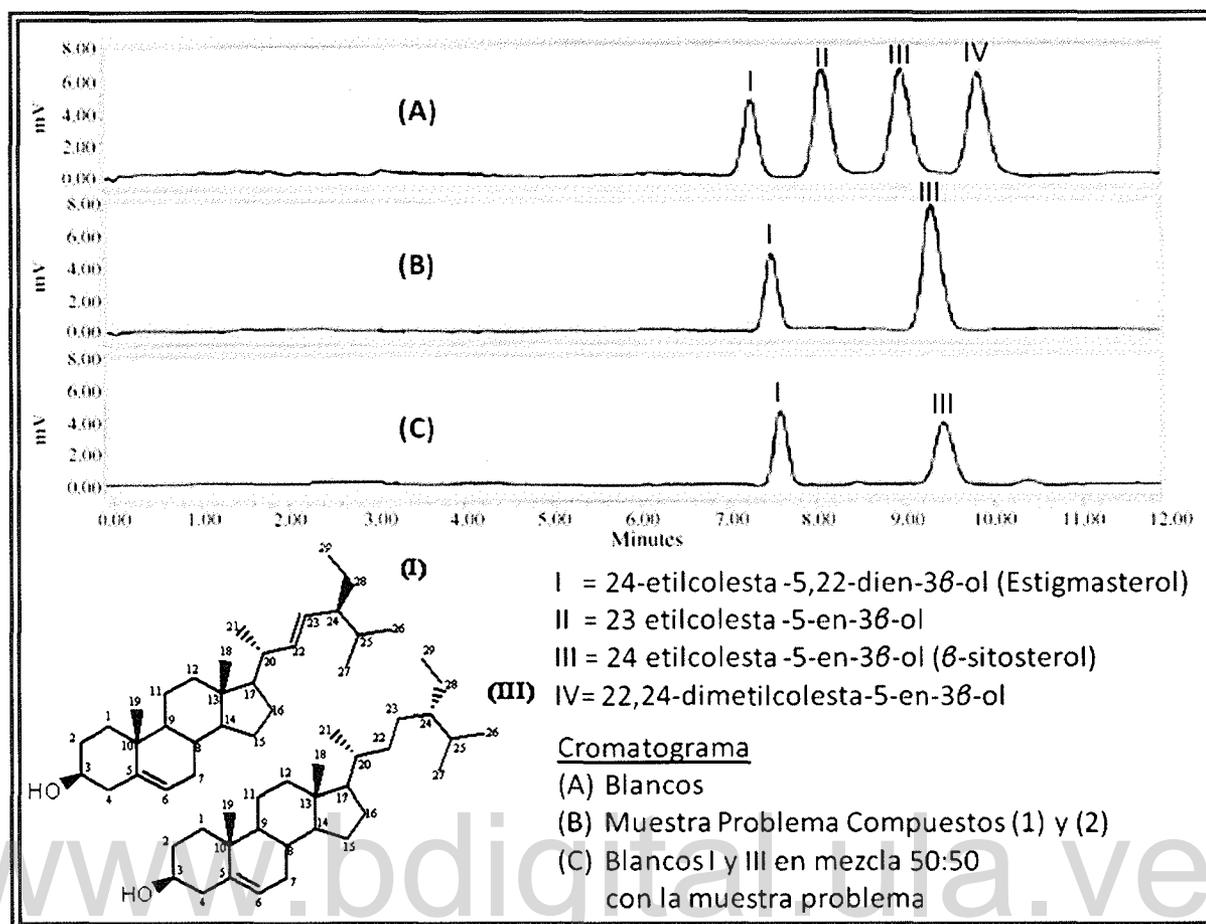


Figura N^o 14. Cromatogramas líquidos de alta resolución de productos comerciales y mezcla de compuestos (1) y (2).

Dicho sólido al ser analizado por cromatografía de capa fina, presentó una mancha alargada de color morado al revelar con solución acuosa de H₂SO₄ al 10% v/v, y la interpretación de los diferentes datos espectrales confirmó las estructuras químicas de los compuestos presentes en la mezcla.

En el espectro infrarrojo (Figura N^o 15) de la mezcla de las sustancias, se puede observar las señales de la mayoría de esteroides naturales que son similares a los alcoholes alifáticos saturados o insaturados. En 3417 cm⁻¹ hay una banda de tensión O-H, correspondiente al grupo hidroxilo, así como también las bandas de tensión de enlaces C-H saturados alrededor de 2937 cm⁻¹ e insaturados a 2868 cm⁻¹, bandas de tensión de enlaces C=C olefínico alrededor de 1465 cm⁻¹ -generalmente es una banda débil que a veces no se observa- en este caso se observa, ya que el compuesto (2) minoritario, presenta una insaturación adicional entre los carbonos 22 y 23. La Tabla N^o 4, muestra la comparación de este espectro con las bandas de absorción reportadas para el

colesterol, ya que, esta sustancia es una estructura contenida en los compuestos presentes en la mezcla.

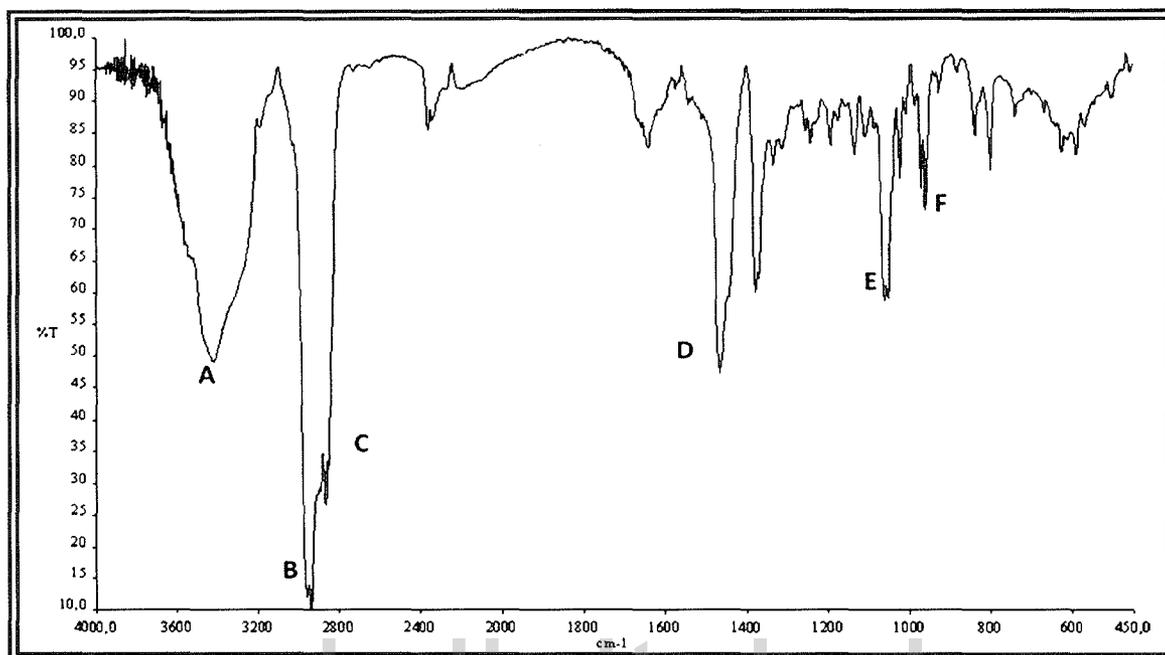


Figura N° 15. Espectro Infrarrojo de la Mezcla 30:70 de Compuestos (1) y (2)

Tabla N° 4. Bandas de absorción del espectro infrarrojo de la mezcla de Compuestos (1) y (2) y datos reportados en la bibliografía para el colesterol.*

Señal	$U_{max.} (cm^{-1})$ Mezcla (1) y (2)	T%	Asignación	$U_{max.} (cm^{-1})^*$ Colesterol	T%
A	3417	49	Tensión O-H	3437	37
B	2937	9	Tensión C-H Alifático	2933	4
C	2868	27	Tensión =C-H	2860	16
D	1465	48	Tensión C=C Alifático	1467	43
E	1023	78	Tensión C-O	1023	62
F	959	73	Deformación =C-H	927	65

*Datos reportados: Colesterol en pastillas de KBR en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS N° 887) Cas 57-88-5.

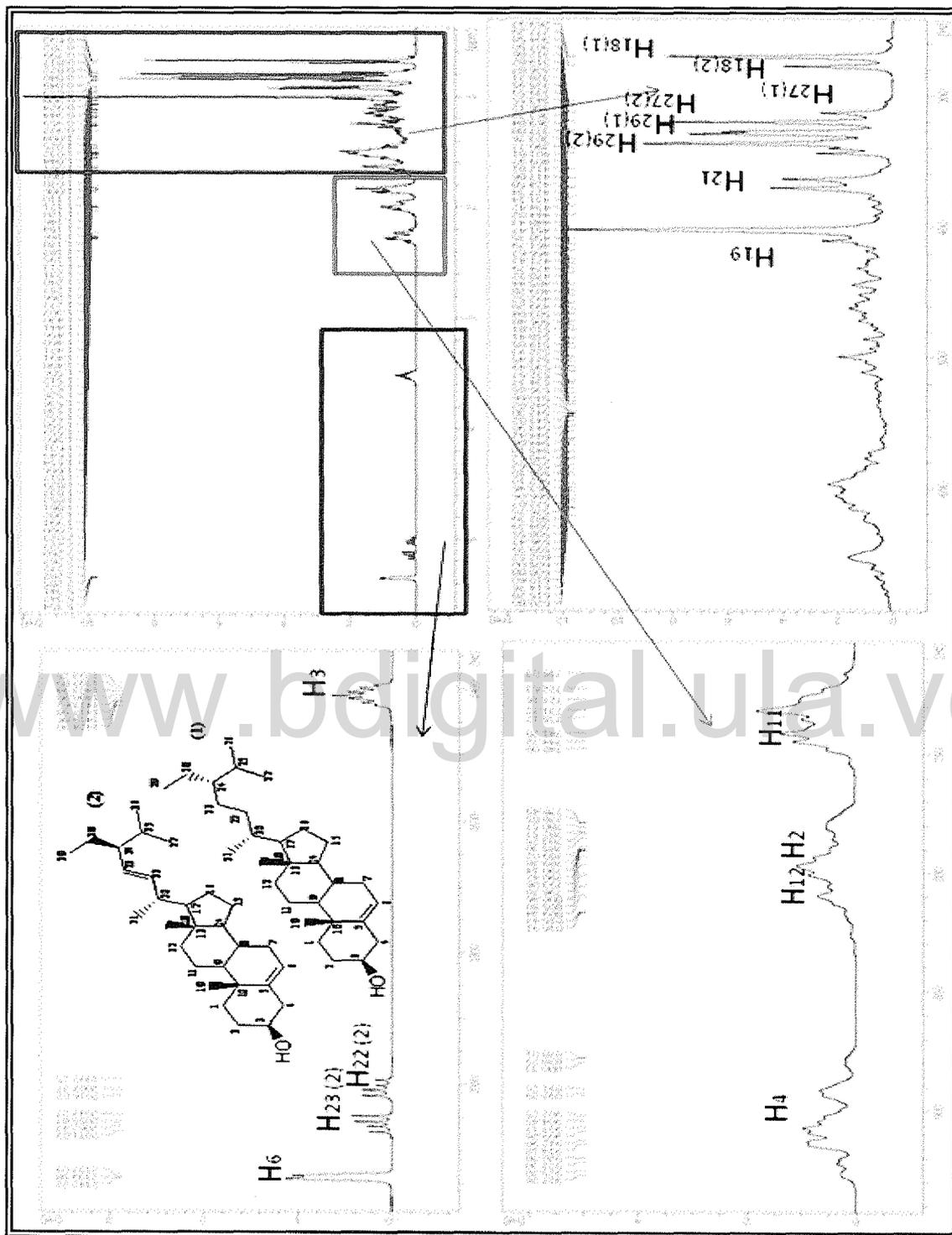


Figura N° 16. Espectro RMN- ¹H de la mezcla de los compuestos (1) y (2).

En el espectro de resonancia magnética nuclear protónica de la mezcla de las sustancias (1) y (2) (Figura N° 16, Tabla N° 7) se observan las señales de protones metílicos en la región de 0-1 ppm pudiendo asignar los hidrógenos de los metilos angulares 18 y 19 como las señales más intensas a campo alto en 0,68 y 1,01 respectivamente, con constantes de acoplamiento indeterminadas debido a la complejidad de las señales superpuestas de los dos compuestos presentes en la mezcla.

Tabla N° 7. Desplazamientos químicos (δ), en el espectro RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de los hidrógenos de la mezcla de compuestos (1) y (2).

Hidrógeno	δ ppm	Multiplicidad/ J (Hz)	δ ppm *Estigmasterol	δ ppm β - *sitosterol
H ₃	3,53	m	3,5	3,53
H ₆	5,34	-	5,31	5,36
H ₁₈	0,67-0,68	s	0,71	0,68
H ₁₉	1,02	s	1,03	1,01
H ₂₂	5,16	dd	4,98	-
H ₂₃	5,04	dd	5,14	-
H ₂₁	0,92	d 6,08	0,91	0,93
H ₂₉	0,82-0,84	-	0,83	0,84
H ₂₇	0,78-0,80	d	0,80	0,83

*(Chaturvedula y Prakash 2012) Hidrógenos en común (1) y (2), Hidrógenos del compuesto (1), Hidrógenos del compuesto (2).

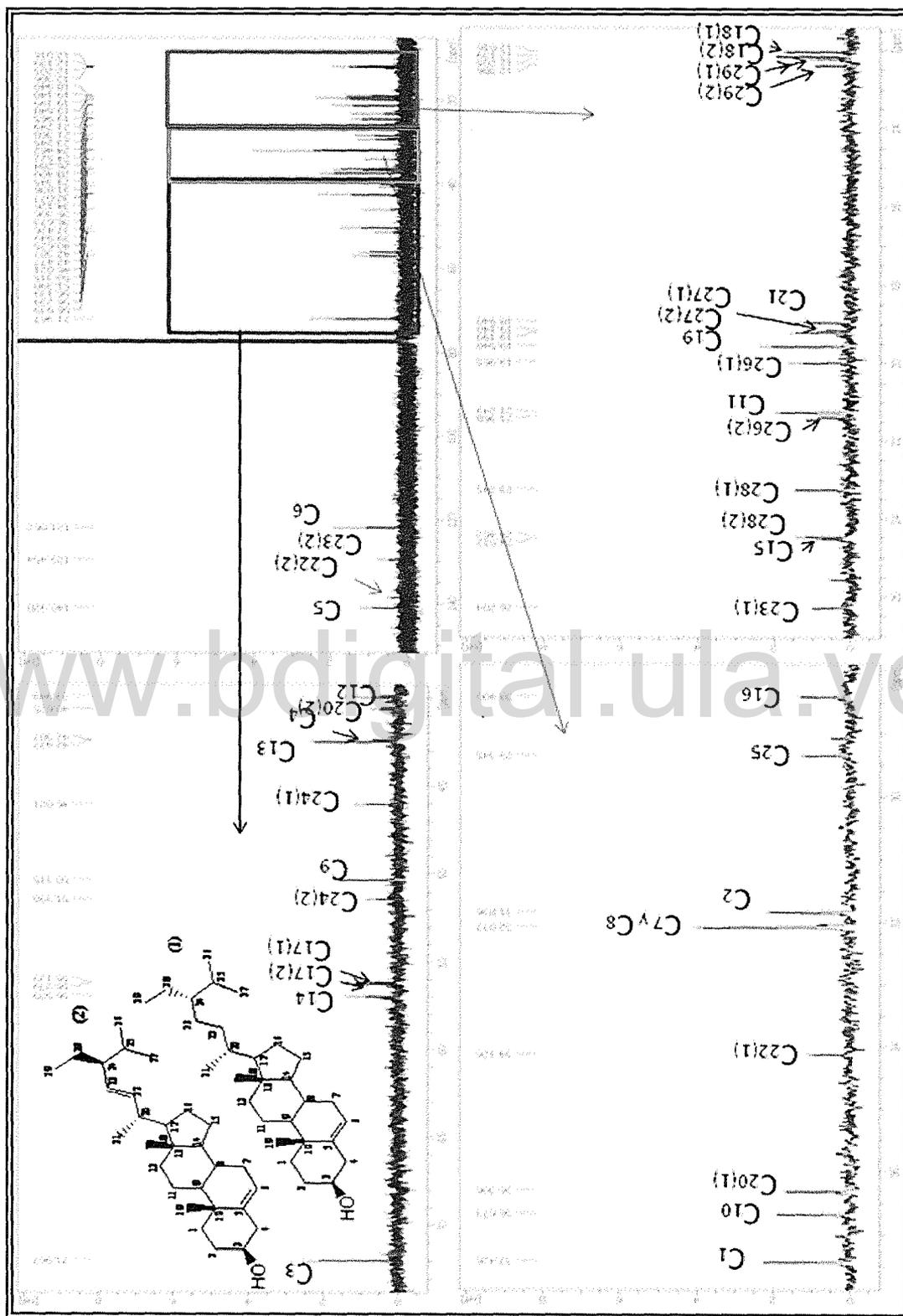
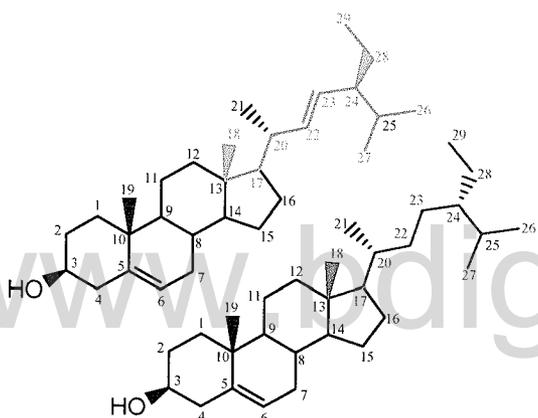


Figura N°17. Espectro RMN- ^{13}C (100Hz, CDCl_3) de la mezcla de los compuestos (1) y (2).

Tanto la sustancia (1), como la (2) presentan un doble enlace sobre los C₅ y C₆, el protón sobre el C₆ es la señal a campo más bajo 5,35 ppm, junto con los dobles de dobles que son los protones vinílicos del compuesto (2) sobre el C₂₂ (5,16 ppm) y C₂₃ (5,04 ppm). La integración de estos protones olefinicos confirman la información del espectro de masas de que dicha mezcla es 70:30.

Adicionalmente, con los datos aportados por los espectros RMN-¹³C (Figura N° 17, Tabla N° 8) y DEPT 135° (Figura N° 18) se confirma la presencia de una mezcla por observarse 37 átomos de carbono, las asignaciones de los desplazamientos y estereoquímica de los átomos de carbono se realizó por análisis comparativo detallado, con los espectros de los esteroides reportados en la bibliografía.



En estos espectros, aparecen 19 carbonos en común para ambas estructuras (color negro) pertenecientes al núcleo androstano –ver figura adjunta al texto- incluyendo el doble enlace entre los carbonos 5 y 6; además aparecen 10 señales únicas para cada compuestos (color naranja y color verde), que son particularmente diferentes debido a que los esteroides se diferencian estructuralmente en la cadena sobre el carbono 17, ya que, el compuesto

minoritario incluye un doble enlace, haciendo que los carbonos cercanos se desplacen a campo más bajo.

Estas estructuras a su vez, presentan un par de carbonos equivalentes, es decir, los dos carbonos vecinales en posición 7 y 8 resuenan a la misma frecuencia y dan una sola señal en 32,077 ppm. La diferencia entre los carbonos alifáticos de la cadena sobre el carbono 17 es minúscula pero observable, excepto para los carbonos 22 y 23 que en el compuesto mayoritario corresponde a carbonos secundarios 34,126 y 26,284 ppm respectivamente, mientras que para el compuesto minoritario, dichos carbonos son primarios y la señal aparece a campo más bajo, 138,331 y 129,454 ppm.

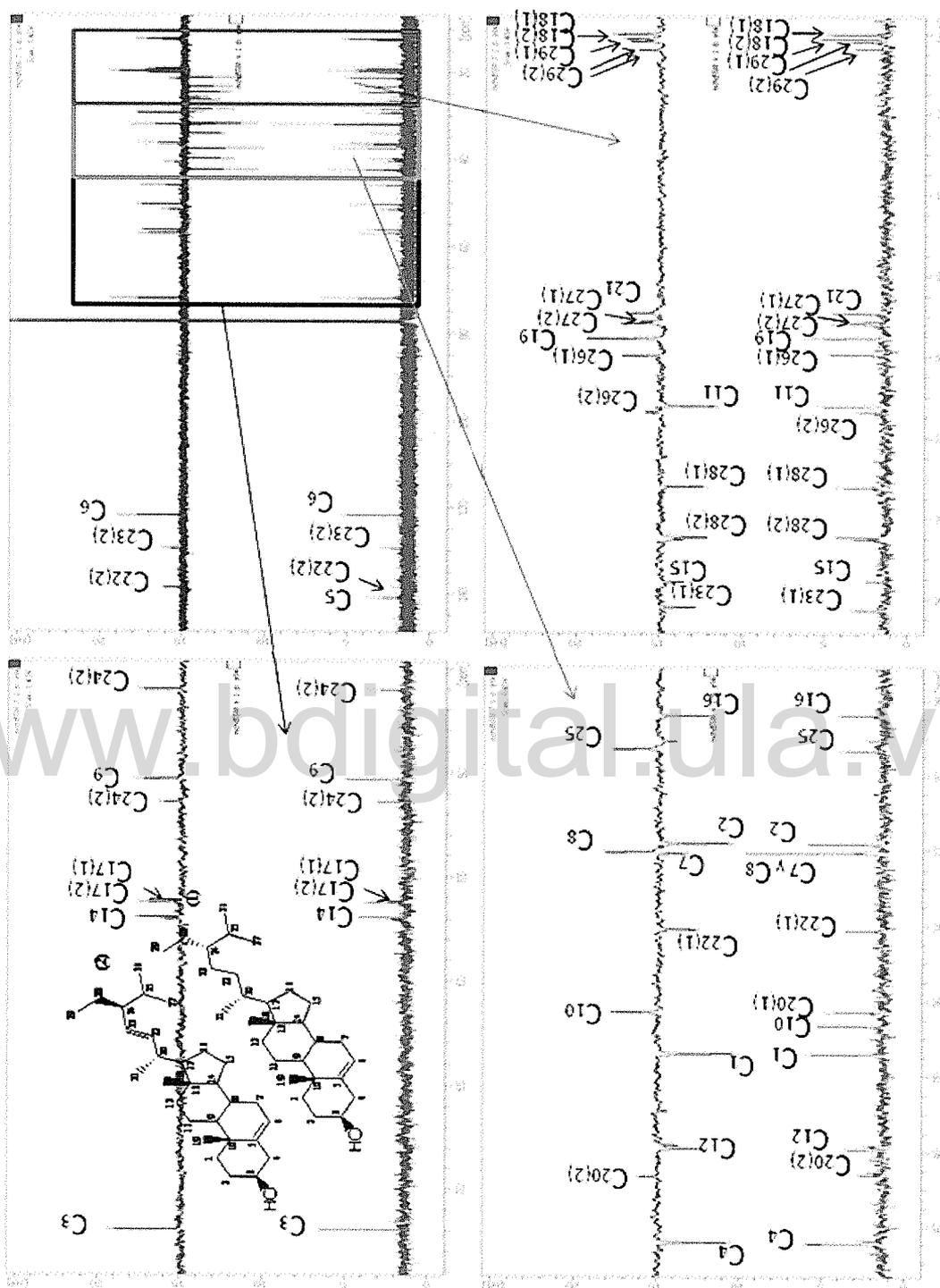


Figura N° 18. Espectro y ampliaciones de DEPT 135 (100Hz, CDCl₃) de los compuestos (1) y (2).

Tabla N° 8. Desplazamientos químicos de espectros RMN-¹³C (100Hz, CDCl₃) y asignación de carbonos a partir de espectros DEPT-135 de los compuestos (1), (2) y compuestos de referencia.

N°	Tipo de Carbono	δ (ppm) (2)	δ (ppm) (*) Estigmasterol	N°	Tipo de Carbono	δ(ppm) (1)	δ (ppm) (*) β-Sitosterol
C ₁		37,426	37,31	C ₁		37,426	37,31
C ₂		31,836	31,69	C ₂		31,836	31,57
C ₃		71,967	71,81	C ₃		71,967	71,69
C ₄		42,387	42,35	C ₄		42,387	42,25
C ₅		140,928	140,80	C ₅		140,928	140,76
C ₆		121,862	121,69	C ₆		121,862	121,59
C ₇		32,077	31,94	C ₇		32,077	31,92
C ₈		32,077	31,94	C ₈		32,077	31,92
C ₉		50,315	50,20	C ₉		50,315	50,17
C ₁₀		36,673	36,56	C ₁₀		36,673	36,51
C ₁₁		21,249	21,11	C ₁₁		21,249	21,11
C ₁₂		39,949	39,74	C ₁₂		39,949	39,81
C ₁₃		42,477	42,35	C ₁₃		42,477	42,33
C ₁₄		56,939	56,91	C ₁₄		56,939	56,79
C ₁₅		24,522	24,39	C ₁₅		24,522	24,32
C ₁₆		28,400	28,96	C ₁₆		28,400	28,26
C ₁₇		56,239	56,06	C ₁₇		56,139	56,11
C ₁₈	-CH ₃	12,139	12,07	C ₁₈	-CH ₃	12,016	11,87

(*) (Wright *et al.*, 1978). Carbonos en común (1) y (2), Carbonos del compuesto (1), Carbonos del compuesto (2).

Tabla N° 8. Desplazamientos químicos de espectros RMN-¹³C (100Hz, CDCl₃) y asignación de Carbonos a partir de espectros DEPT-135 de los compuestos (1), (2) y compuestos de referencia. (Cont.)

N°	Tipo de Carbono	δ (ppm) (2)	δ (ppm) (*) Estigmasterol	N°	Tipo de Carbono	δ(ppm) (1)	δ (ppm) (*) β-Sitosterol
C ₁₉	-CH ₃	19,548	19,42	C ₁₉	-CH ₃	19,548	19,40
C ₂₀		40,625	40,54	C ₂₀		36,306	36,29
C ₂₁	-CH ₃	18,940	21,11	C ₂₁	-CH ₃	18,940	18,82
C ₂₂		138,331	138,37	C ₂₂		34,126	33,95
C ₂₃		129,454	129,32	C ₂₃		26,284	26,43
C ₂₄		51,398	51,29	C ₂₄		46,021	46,07
C ₂₅		29,345	31,94	C ₂₅		29,345	28,98
C ₂₆	-CH ₃	21,368	21,26	C ₂₆	-CH ₃	19,965	19,07
C ₂₇	-CH ₃	19,199	19,02	C ₂₇	-CH ₃	19,140	19,62
C ₂₈	-CH ₃	24,462	25,44	C ₂₈	-CH ₃	23,245	23,09
C ₂₉	-CH ₃	12,205	12,27	C ₂₉	-CH ₃	12,386	12,32

(*) (Wright et al., 1978). Carbonos en común (1) y (2), Carbonos del compuesto (1), Carbonos del compuesto (2).

En el espectro de masa de cada uno de los compuestos de la mezcla (Figura N° 13), se puede observar fragmentos comunes, típicos de los esteroides libres con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno y con cadena lateral saturada, como $M^+ - H_2O$ ($m/z=396$ y 394), respectivamente, así como también, la pérdida de la cadena sobre el carbono 17 que genera una ruptura tipo McLafferty formando la señal en $m/z=255$, seguida de la pérdida del anillo ciclopentano, del núcleo ciclo pentano perhidrofenantreno de los esteroides en $m/z = 213$. (Martínez, 2002).

Ahora bien, con respecto a las señales únicas para cada esteroide, el compuesto (1) presenta ruptura del grupo isopropilo terminal acompañada de un metilo angular ($m/z=357$), así como para el compuesto (2) la señal en $m/z=300$ es correspondiente de esteroides Δ^5 -3-hidroxiandrosteno, con una insaturación en el carbono 22, tal como se indica en la Figura N°19 (Budzikiewicz et al., 1964) de la misma forma las Figuras N° 20 y 21 (Tabla N° 9) muestra las propuestas de los patrones de fragmentación de los compuestos (1) y (2).

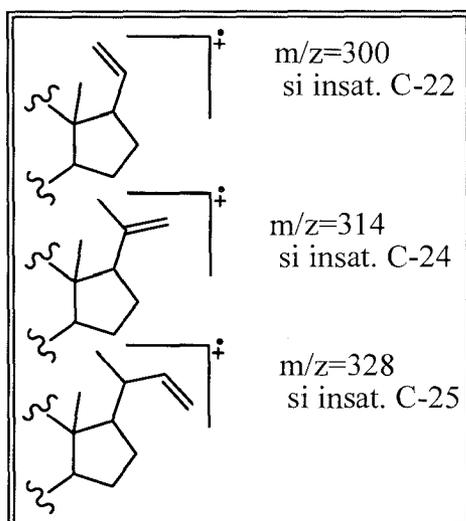


Figura N° 19. Fragmentos producidos en la cadena lateral de los esteroides de núcleo estigmastano indicando el doble enlace.

Tabla N° 9. Información de los espectros de masas de los compuestos (1) y (2) y de los datos reportados en la bibliografía del espectro de masas

Señal	m/z Compuesto (1)	m/z* Estigmasterol	m/z Compuesto (2)	m/z* β -Sitosterol
1	412.4	412.0	414.4	414.0
2	394.3	394.0	396.0	396.0
3	379,3	379,0	357.3	-
4	351.3	351.0	329.4	339.0
5	300.4	300.0	255.1	255.0
6	255.1	255.0	213.1	213.0
7	213.2	213.0	145.0	145.0

*(Chaturvedula y Prakash, 2012).

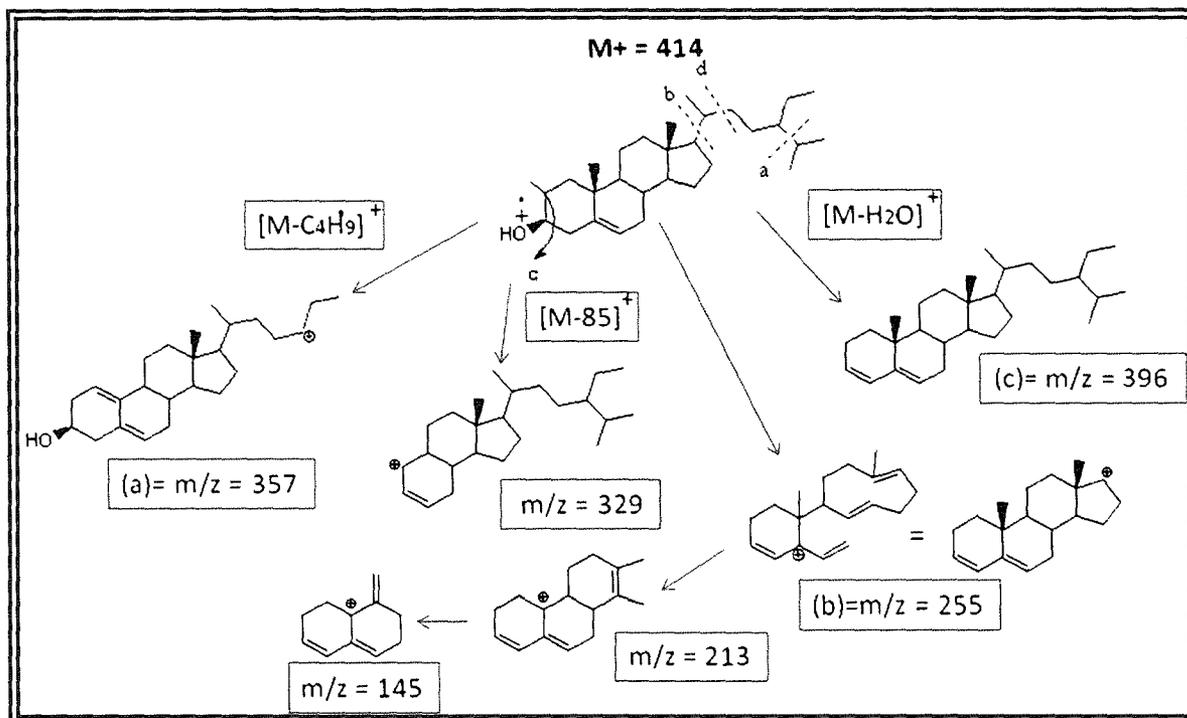


Figura N° 20. Propuesta de patrón de fragmentación del compuesto (1).

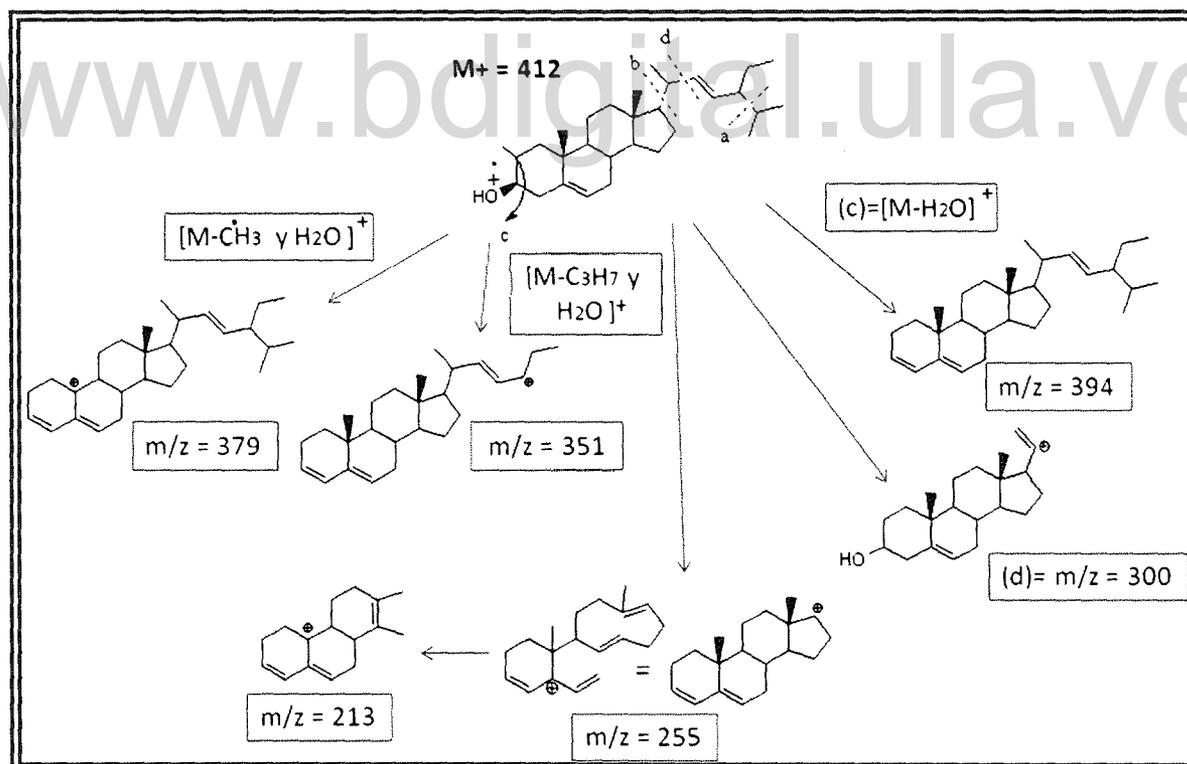


Figura N° 21. Propuesta de patrón de fragmentación del compuesto (2).

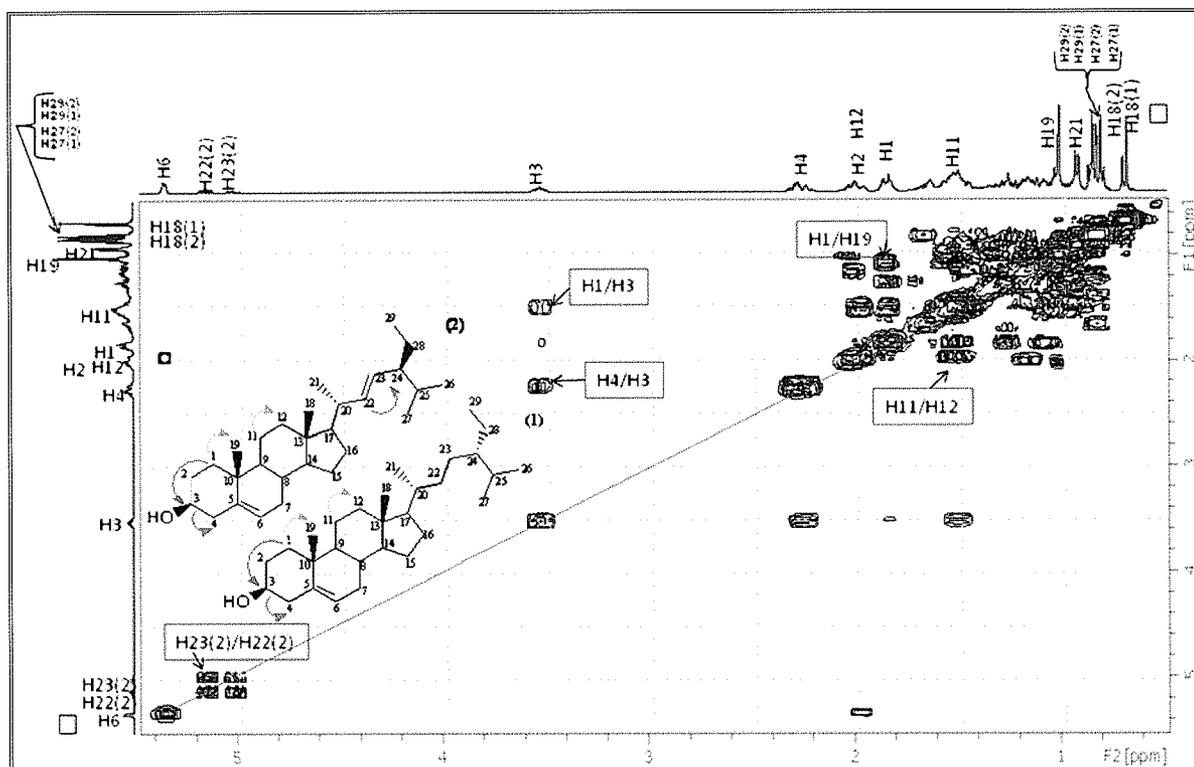


Figura N° 22. Espectro COSY ^1H - ^1H (CDCl_3) de la mezcla de compuestos (1) y (2).

De manera complementaria, el espectro COSY 90° (Figura N° 22) muestra un sistema de acoplamiento homonuclear ^1H - ^1H entre hidrógenos vecinales como H_3 - H_4 ; H_{11} - H_{12} ; $\text{H}_{22(2)}$ - $\text{H}_{23(2)}$ y acoplamientos de hidrógenos a larga distancia como H_1 - H_{19} y H_1 - H_3 ; mientras que el espectro HSQC expone correlaciones heteronucleares ^{13}C - ^1H a un enlace, como las que se presentan en la Figura N° 23, que permitieron ubicar hidrógenos en el RMN- ^1H , a partir de los carbonos ya asignados en el espectro RMN- ^{13}C , como lo son los $\text{H}_{22(1)}$, $\text{H}_{23(1)}$ quienes están sobre los carbonos que marcan la única diferencia estructural entre ambas sustancias.

De igual forma, las señales del espectro HMBC, correlaciones heteronucleares ^{13}C - ^1H a múltiples enlaces (Figura N° 24) coordinan de forma exacta con las asignaciones realizadas mediante las técnicas RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , para todos los carbonos hidrogenados de cada una de las molécula.

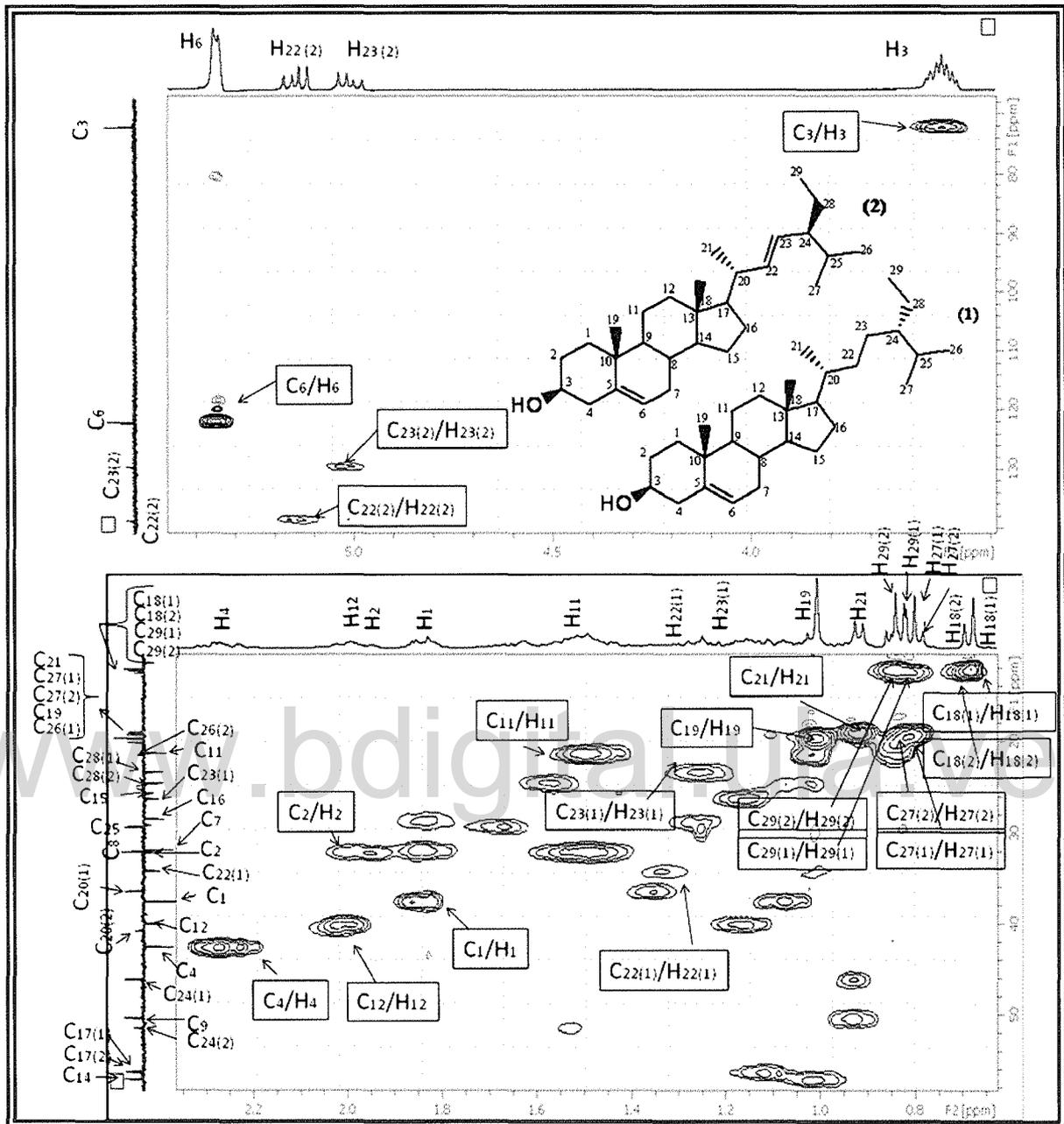


Figura N° 23. Ampliaciones del espectro HSQC de la mezcla de compuestos (1) y (2).

Por otra Parte, el punto de fusión reportado para la mezcla es mucho más bajo que el reportado para los compuestos por separado, lo cuales difieren en 20°C entre ellos, tal como se muestra en la tabla adjunta al texto, la cual corresponde con la teoría propuesta para mezclas homogéneas, donde la presencia de un

Pf Estigmasterol	(144-146)°C
Pf β-Sitosterol	(162-164)°C
Pf (mezcla (1 y 2))	(135-137)°C

soluto en mezcla disminuye el punto de fusión del compuesto mayoritario. (Chaturvedula y Prakash, 2012).

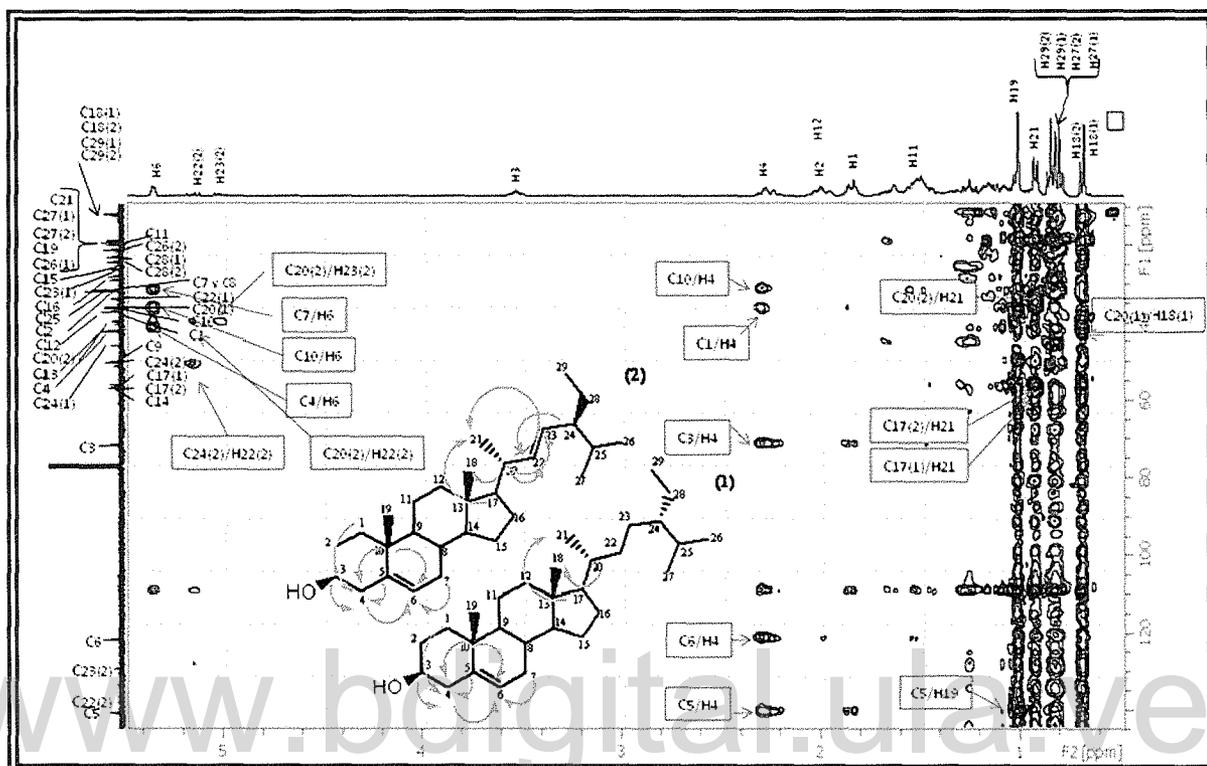


Figura N° 24. Espectro HMBC de la mezcla de compuestos (1) y (2).

Se han reportado estudios de especies de diferentes géneros donde, la separación lipídica de los compuestos, es complicada por su parecido en propiedades fisicoquímicas, por lo que la cromatografía líquida de alta presión y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas son útiles en la identificación de estas mezclas esteroidales, a partir de sus tiempos de retención tabulados para una columna y del patrón de fraccionamiento de los espectros de masas. (Moreno *et al.*, 2011), (Santafé *et al.*, 2005), (Martínez & Cuca, 1984) y (Macías & Cuca, 2007).

El compuesto (1), identificado como estigmasta-5-en-3 β -ol o comúnmente llamado β -Sitosterol,; fue reportado en *V. cayenensis* (Miraglia *et al.*, 1981), *V. japurensis* (Simmonds *et al.*, 1985), *V. guaramirangae* (Camele *et al.*, 1982), *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997), y *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990) mientras que el compuesto (2), Estigmasta-5,22-dien-3 β -ol o Estigmasterol fue reportado en el 2006 en *V. laurentii* (Nguemaving *et al.*, 2006).

Es común encontrar mezclas de esteroides en plantas de la medicina tradicional, así lo evidencian diversos estudios fitoquímicos, donde es usual conseguir el Estigmasterol de forma aislada, pero es poco común aislar β -sitosterol de forma única, es más frecuente conseguirlo en mezcla (Moreno *et al.*, 2011), (Santafé *et al.*, 2005), (Martínez & Cuca, 1984) y (Macías & Cuca, 2007). También se han reportado a los esteroides, incluso a mezclas de esteroides de núcleo Estigmastano con potente actividad antimalárica, antituberculósica (Macías & Cuca, 2007), así como también son ampliamente usados en la medicina china tradicional en la preparación de compresas de hierbas. (Moreno *et al.*, 2011).

www.bdigital.ula.ve

6.3.2.-Compuesto (3). Lup-20(29)en-3 β -ol. (Lupeol).

La reunión de las fracciones 8-44 eluidas de la columna V (Figura N° 10) del tratamiento del extracto Hexanóico de la corteza de la especie, con Hexano:Diclorometano 80:20, y recristalizadas en metanol caliente, proporcionaron 38 mg de un sólido blanco con punto de fusión 212-214°C.

El sólido mencionado anteriormente es soluble en solventes de baja polaridad y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, dicho análisis arrojó el cromatograma que se muestra en la Figura N° 25, el cual revela la presencia de un compuesto mayoritario en 91,24% de pureza; con un tiempo de retención igual a 17,925min. El estudio de los diferentes datos espectrales conllevó a la determinación de su estructura química tipo triterpeno de núcleo lupano (Lup-20(29)en-3 β -ol).

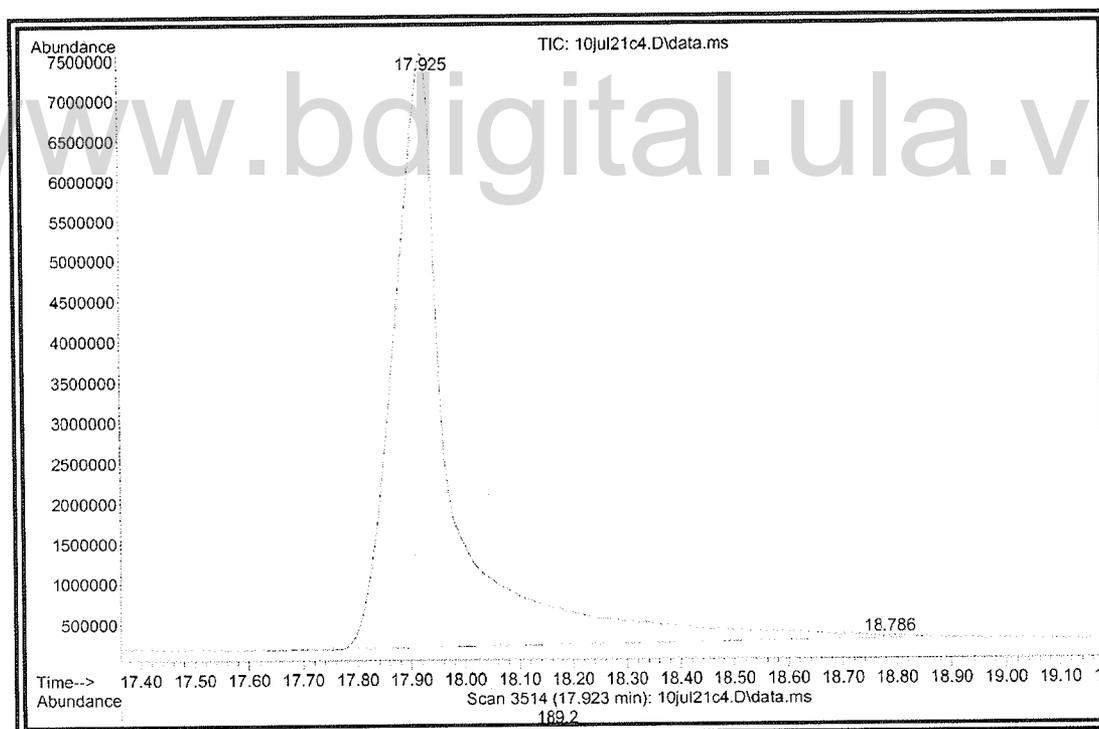


Figura N° 25. Cromatograma del compuesto (3).

En el espectro IR del compuesto (3) (Figura N° 26, Tabla N° 10), se aprecian bandas de absorción, propias de grupos hidroxilos, y carbonos sp² y sp³, así como las señales en 3442 cm⁻¹ (Tensión

OH); 1046 cm^{-1} (Tensión C-O); 2860 cm^{-1} (Tensión C-H); 1639 cm^{-1} (C=C); y 872 cm^{-1} (Deformación C-H).

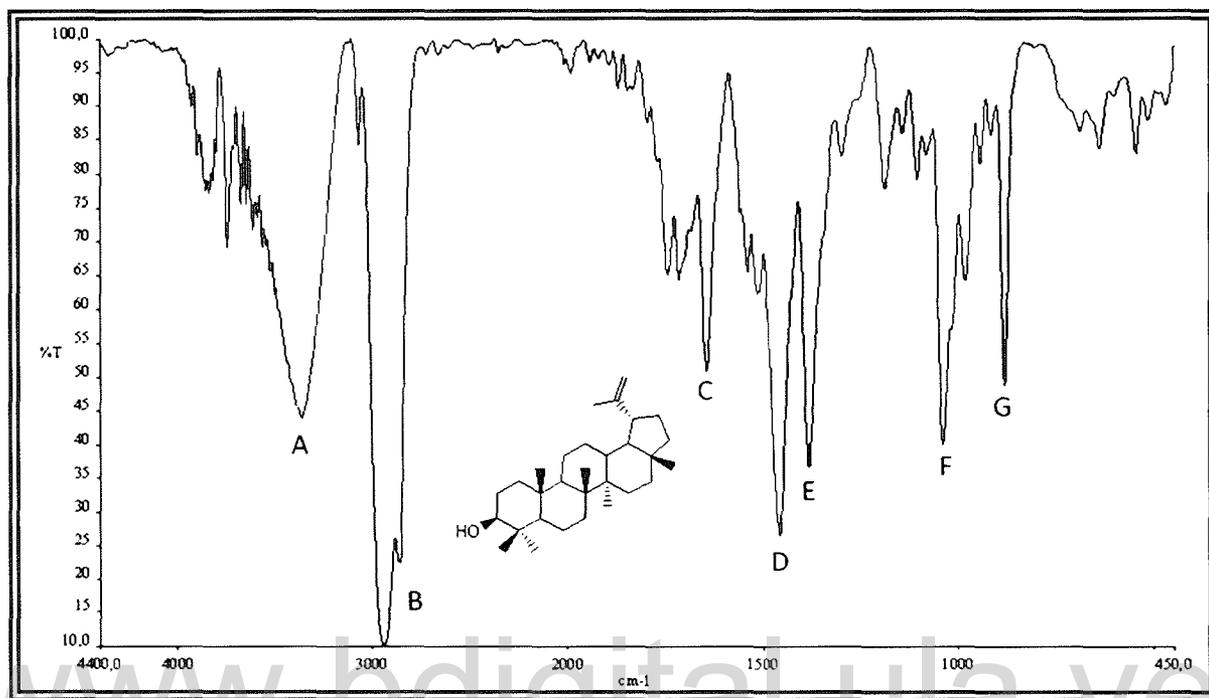


Figura N° 26. Espectro infrarrojo (KBr) del compuesto (3).

Tabla N° 10. Bandas de absorción significativas en el espectro IR (KBr) del compuesto (3).

Espectro	Compuesto (3)						
Señal	A	B	C	D	E	F	G
$U_{\text{max. cm}^{-1}}$	3442	2860	1639	1454	1372	1046	872
Asignación	Tensión O-H	Tensión C-H	Tensión C=C	Deformación C-H		Tensión C-O	Deformación C-H

En el marco de lo expuesto anteriormente, se estudió la representación gráfica del espectro RMN- ^1H (Figura N° 27, Tabla N° 11), en el cual se muestran varias señales de alta intensidad entre 0,67 y 1,68 ppm asignadas a hidrógenos –en su mayoría– metílicos, dentro de este rango la señal a campo más bajo corresponde al metilo sobre el carbono sp^2 (H_{30}). La señal a 3,19 ppm,

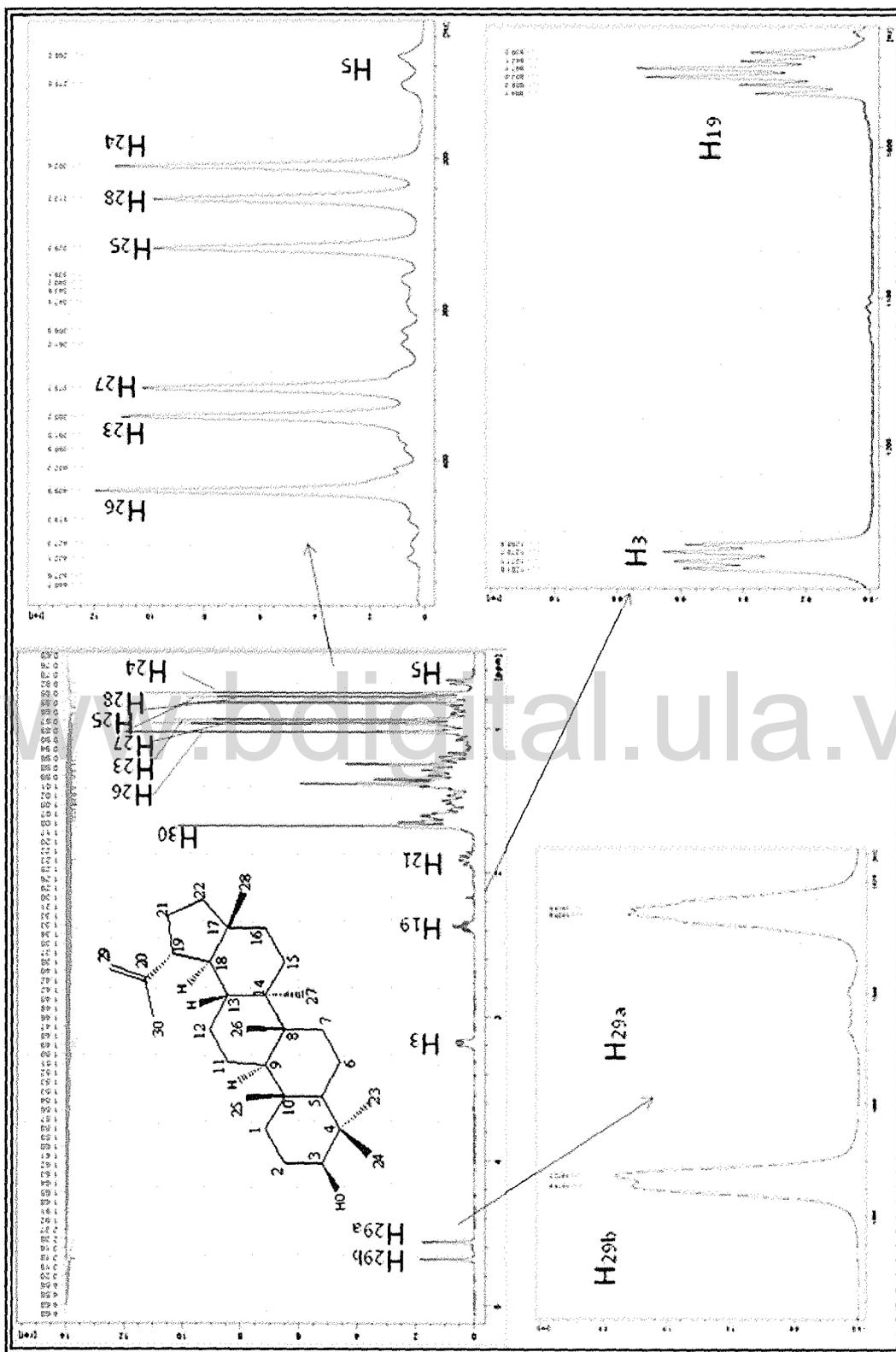


Figura N° 27. Espectro RMN-¹H del compuesto (3).

Tabla N° 11. Información de espectro RMN ¹H del compuesto (3) y datos reportados en la bibliografía para el Lupeol.

δ (ppm) (3)	Integral	Multiplicidad J, (Hz)	Asignación	δ (ppm) Lupeol ^(a) J, (Hz)
4,68	1	d(J=1Hz)	H _{29b}	4,67 (J=2Hz)
4,56	1	d(J=1,9Hz)	H _{29a}	4,55 (J=2Hz)
3,19	1	q(J=11,2 y 4,8Hz)	H ₃	3,20 (J=10,89 y 5,3Hz)
2,38	1	m(J=11 y 5,8Hz)	H ₁₉	2,4 (J=11,01 y 5,7Hz)
1,91	2	m	H ₂₁	1,94
1,68	3	s	H ₃₀	1,67
1,38	2	s	H ₆	-
1,25	1	s	H ₉	-
1,02	3	s	H ₂₆	1,02
0,96	3	s	H ₂₃	0,95
0,94	3	s	H ₂₇	0,93
0,82	3	s	H ₂₅	0,86
0,78	3	s	H ₂₈	0,81
0,76	3	s	H ₂₄	0,77
0,69	1	d	H ₅	-

^(a)Ticona et al., 2006.

un multiplete integrando para un protón corresponde al hidrógeno geminal a la función oxigenada, mientras que las señales cuyos desplazamientos químicos corresponden a 4,56 y 4,68 ppm forman un sistema AB de metileno terminal, reconocido por las constantes de acoplamiento entre ambos y por la señal que genera el espectro de correlación ¹H, ¹H-COSY (H_{29a}↔H_{29b}), (Figura N° 32), con un de J= 2Hz, este espectro también muestra correlaciones entre el (H₃↔H_{2a}) y (H₃↔H_{2b}).

El análisis detallado del espectro de RMN-¹³C del compuesto (3), Figura N° 28, Tabla N° 12, presenta señales para 30 carbonos; las que aparecen a 151,32 y 109,67 ppm corresponden a carbonos sp², debajo de 100 ppm se encuentran 28 carbonos saturados, el carbono de desplazamiento 79,36 ppm, se asignó a un átomo geminal a un hidroxilo.

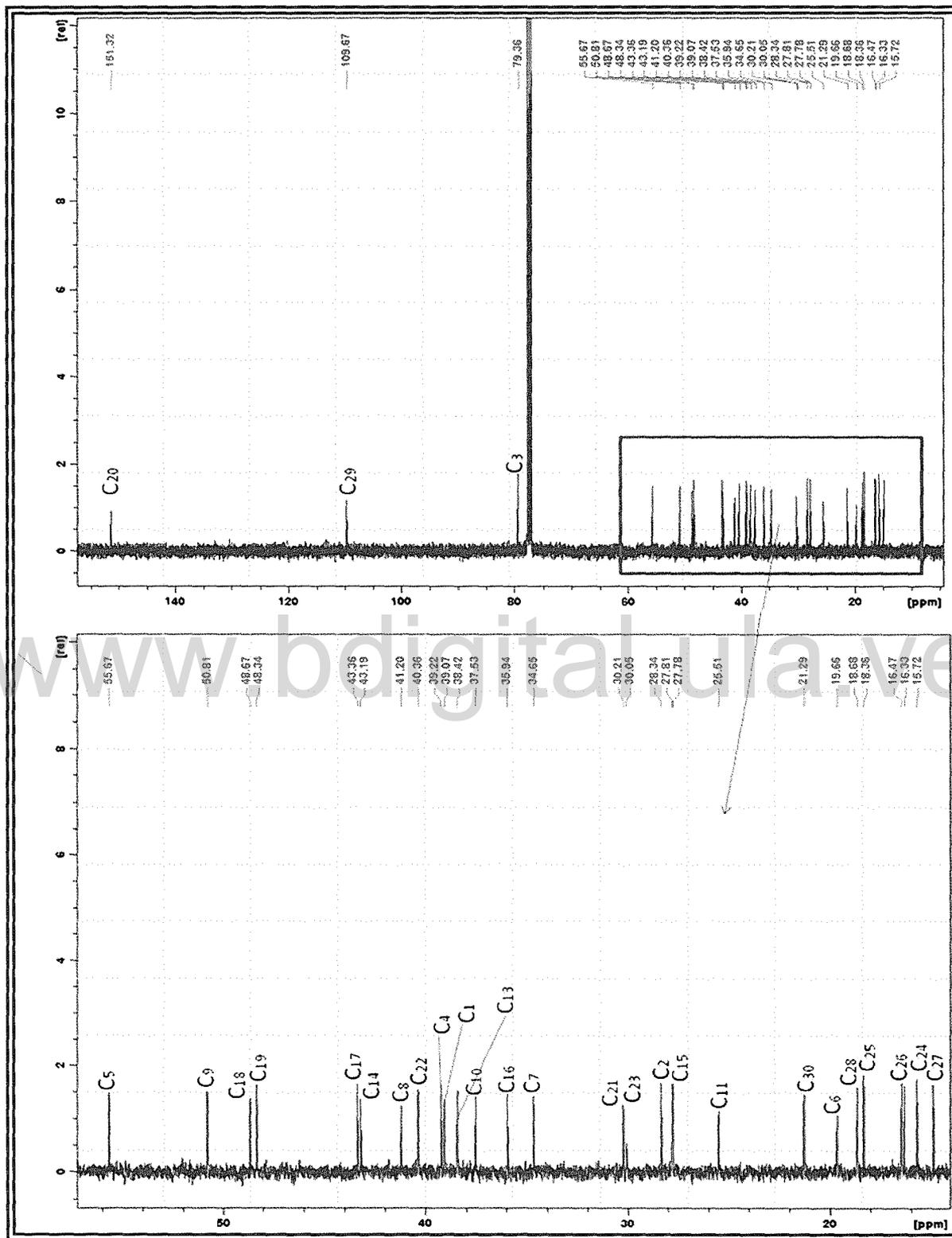


Figura N° 28. Espectro RMN-¹³C del compuesto (3).

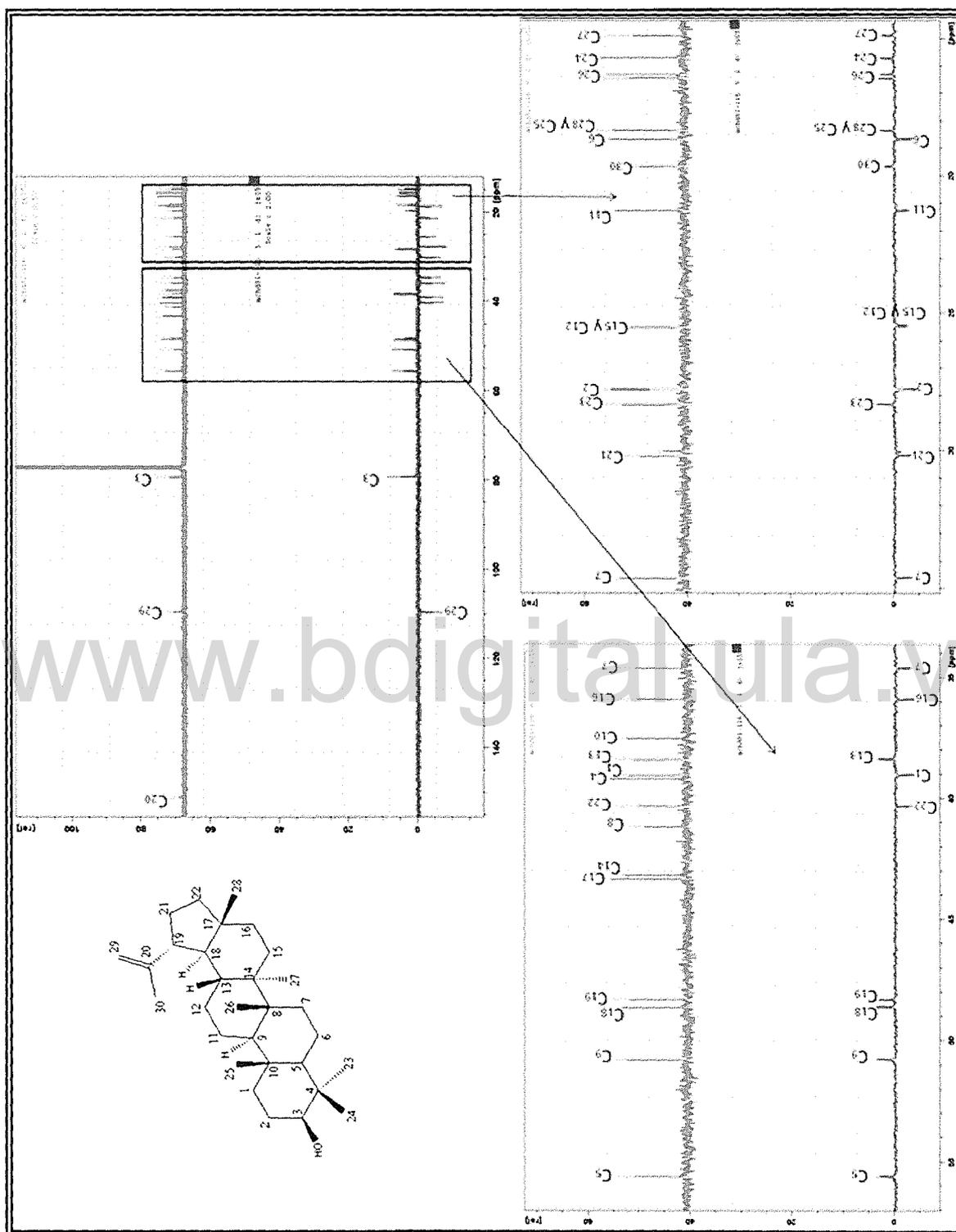


Figura N° 29. Espectro RMN-¹³C/DEPT-135 del compuesto (3).

Tabla N° 12. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C (100Hz, CDCl₃) y asignación del tipo de carbono a partir de espectros DEPT-135 del compuesto (3) y comparación con el Lupeol.

N° C	Tipo de Carbono	δ (ppm) (3)	δ (ppm) (a) Lupeol	N° C	Tipo de Carbono	δ (ppm) (3)	δ (ppm) (a) Lupeol
C ₁		39,07	38,7	C ₁₆		35,94	35,9
C ₂		28,34	27,5	C ₁₇		43,36	43,2
C ₃		79,36	79,3	C ₁₈		48,67	48,5
C ₄		39,22	39,1	C ₁₉		48,34	47,8
C ₅		55,67	55,5	C ₂₀		151,32	151,2
C ₆		19,66	19,0	C ₂₁		30,21	30,1
C ₇		34,67	34,2	C ₂₂		40,36	40,3
C ₈		41,20	41,1	C ₂₃	-CH ₃	30,05	28,4
C ₉		50,81	50,9	C ₂₄	-CH ₃	16,33	15,6
C ₁₀		37,53	37,2	C ₂₅	-CH ₃	18,35	16,2
C ₁₁		25,51	21,2	C ₂₆	-CH ₃	16,47	16,1
C ₁₂		27,78	25,3	C ₂₇	-CH ₃	15,72	14,8
C ₁₃		38,42	38,5	C ₂₈	-CH ₃	18,68	18,1
C ₁₄		43,19	42,8	C ₂₉		109,67	109,5
C ₁₅		27,81	27,2	C ₃₀	-CH ₃	21,29	19,8

(a) (Mouffok et al., 2012)

En el espectro RMN-¹³C desacoplado DEPT -135 (Figura N° 29) se observan 11 señales para carbonos secundarios, 7 señales para carbonos metílicos, 6 señales para carbonos terciarios y la presencia de 6 carbonos cuaternarios, lo que en conjunto daría una fórmula molecular (C₃₀H₄₉OH) junto con el hidroxilo que reveló en el espectro infrarrojo, para dar un total de seis insaturaciones, donde una corresponde a los carbonos sp² que aparecen a campo alto, por lo que se puede establecer que las 5 insaturaciones restantes corresponden a 5 ciclo alcanos y por ende el

compuesto es pentacíclico. Además de la información alcanzada, se halló, al explorar la literatura que los datos espectroscópicos de RMN-¹H obtenidos para el compuesto (3) coinciden en su totalidad con los conseguidos para el triterpeno Lup-20(29)en-3β-ol, tal como se muestra en la Tabla N° 13, también fue posible asignar los desplazamientos de los 30 átomos de carbono para el Lupeol, en el RMN-¹³C y compararlos con los reportados en la bibliografía para dicho triterpeno reportados (Mouffok *et al.*, 2012). (Tabla N° 12).

Finalmente, y en otra dirección, la señal a campo más alto en el RMN-¹H -doblete ancho- fue asignada al hidrógeno sobre el carbono cinco, a través del espectro HSQC del compuesto (3) (Figura N° 33) que permitió encontrar correlaciones de carbono e hidrógeno confirmando las asignaciones atribuidas en el ¹H, ¹H-COSY

En el estudio de los espectros de masas, el ión molecular es quizás considerado, la señal más importante del espectro, ya que no solo proporciona el peso molecular del compuesto, sino que sirve como punto de partida para el estudio de los fragmentos generados y para elucidación estructural en general. El espectro reportado por la base de datos espectral para compuestos orgánicos (SDBS) (<http://sdbs.riondb.aist.go.jp>) muestra el ión molecular del Lupeol con una abundancia del 5%, en el espectro de masas del compuesto (3) (Figura N° 30), dicho pico no se observa, lo que es propio para alcoholes, donde el pico es muy pequeño o sencillamente no se ve, debido a la pérdida inmediata de una molécula de agua. En los espectros de derivados de núcleos lupanos, se observa una fragmentación típica que caracteriza a los sustituyentes sobre el anillo A; (Budzikiewicz *et al.*, 1964) pero en general los lupanos hidroxilados muestran fragmentos característicos, tal como se puede apreciar en la (Figura N° 31), donde se observan los fragmentos producidos para triterpenos entre los carbonos 9-11 y los carbonos 8 y 14, produciendo señales $m/z=218$ y $m/z=207$, como también $m/z=393$ y $m/z=370$ que corresponden a los fragmentos emanados por las pérdidas de metilo- agua y metilo e isoprenilo, respectivamente.

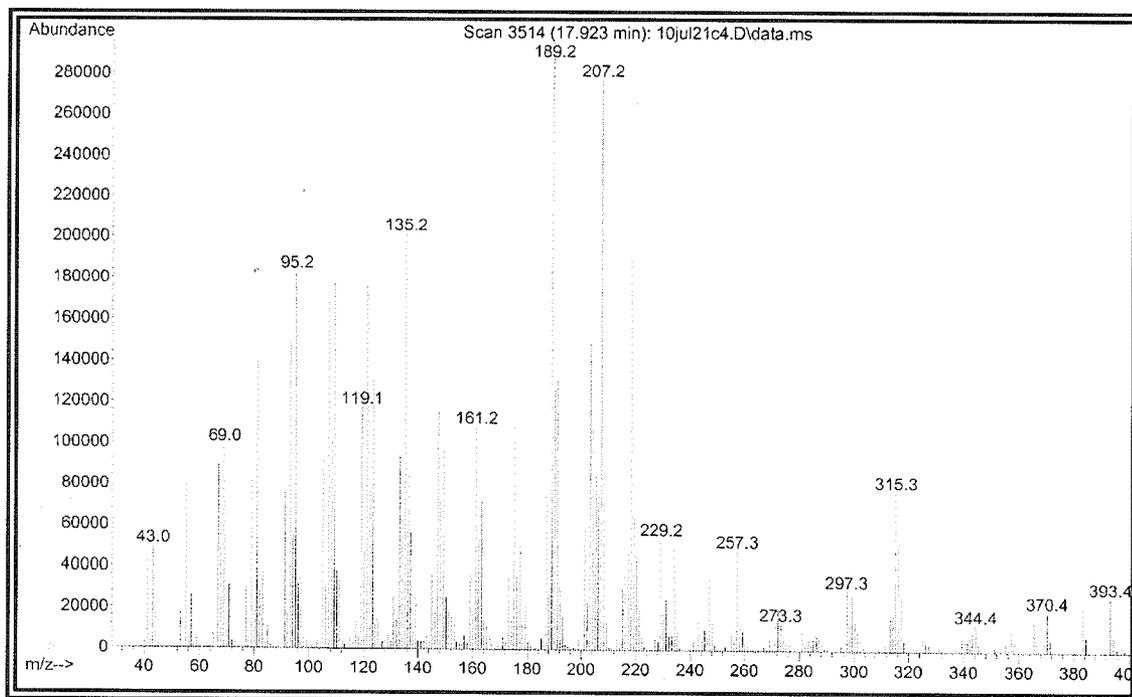


Figura N° 30. Espectro de masas del compuesto (3).

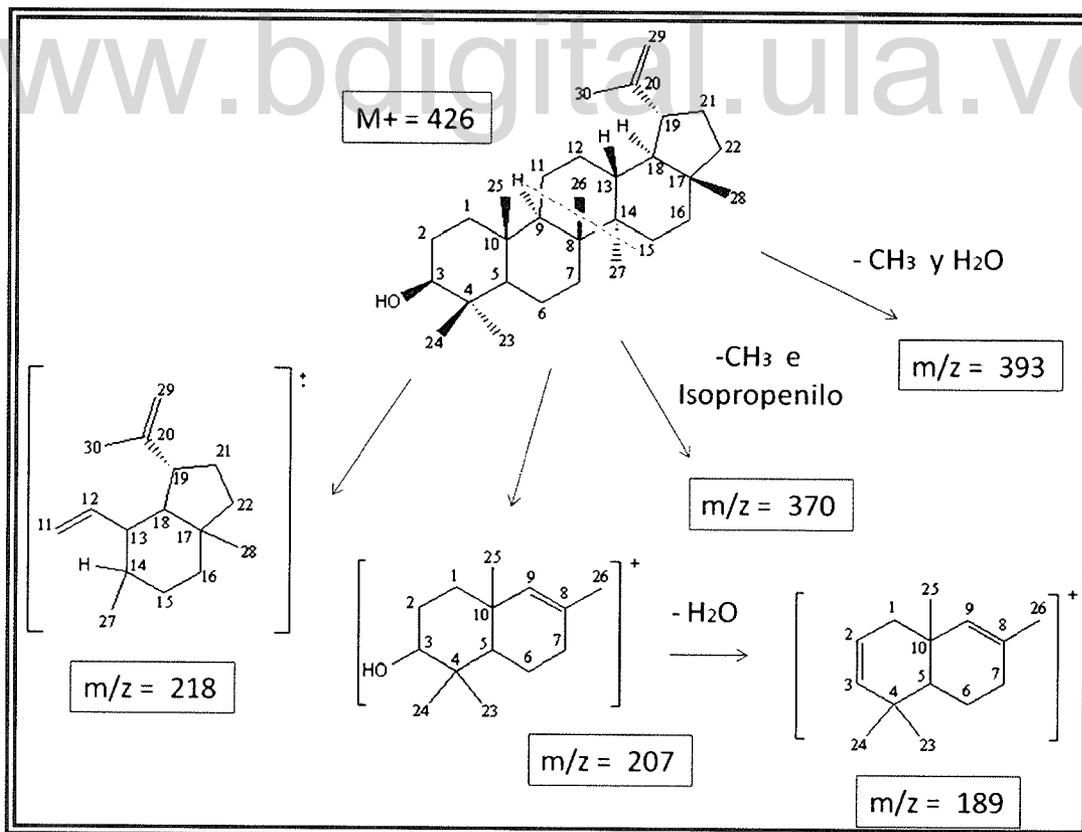


Figura N° 31. Propuesta de patrón de fragmentación del compuesto (3).

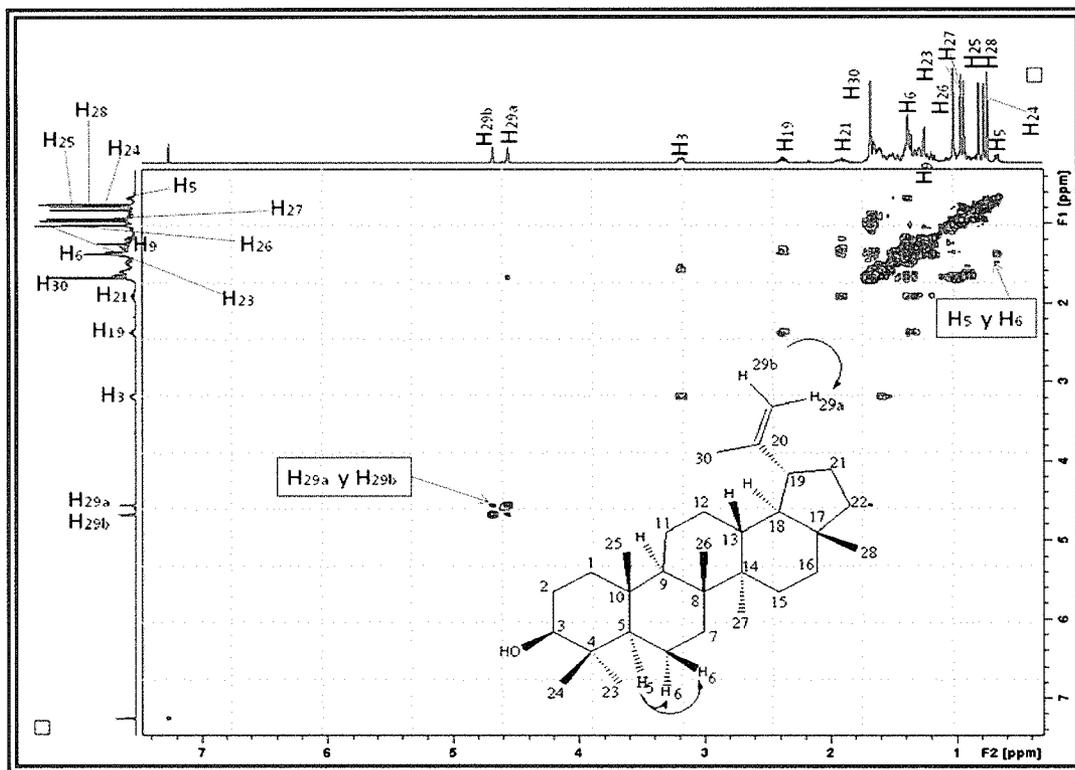


Figura N° 32. Espectro ¹H, ¹H COSY del compuesto (3).

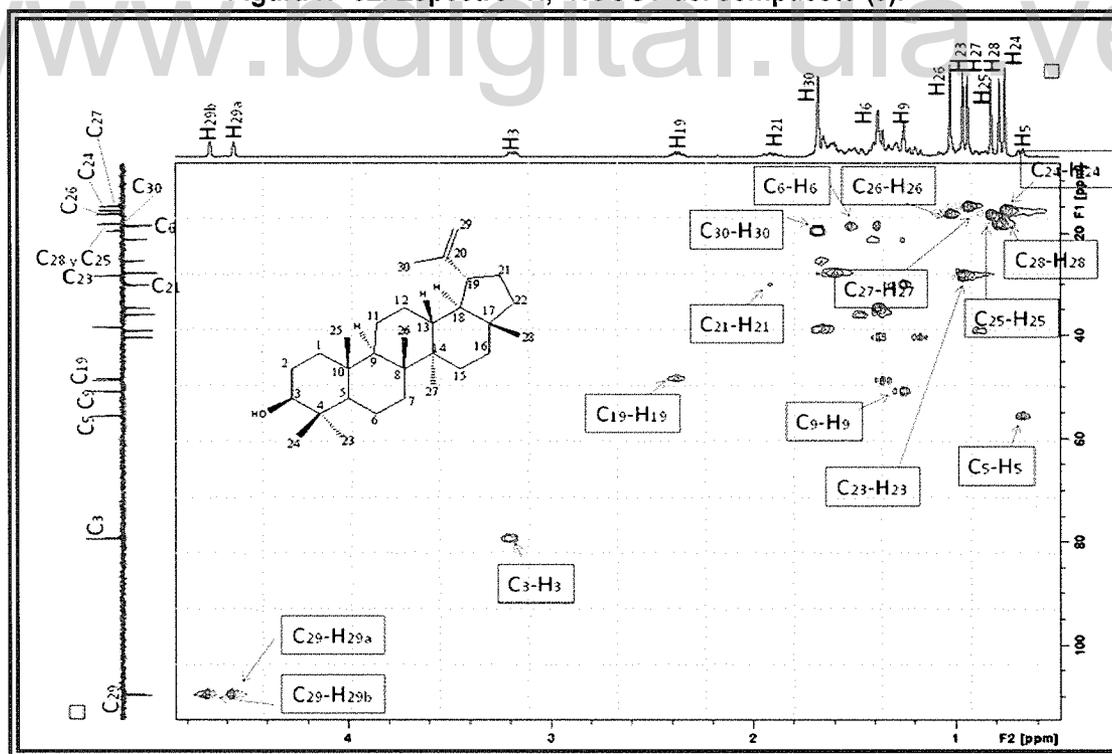


Figura N° 33. Espectro HSQC del compuesto (3).

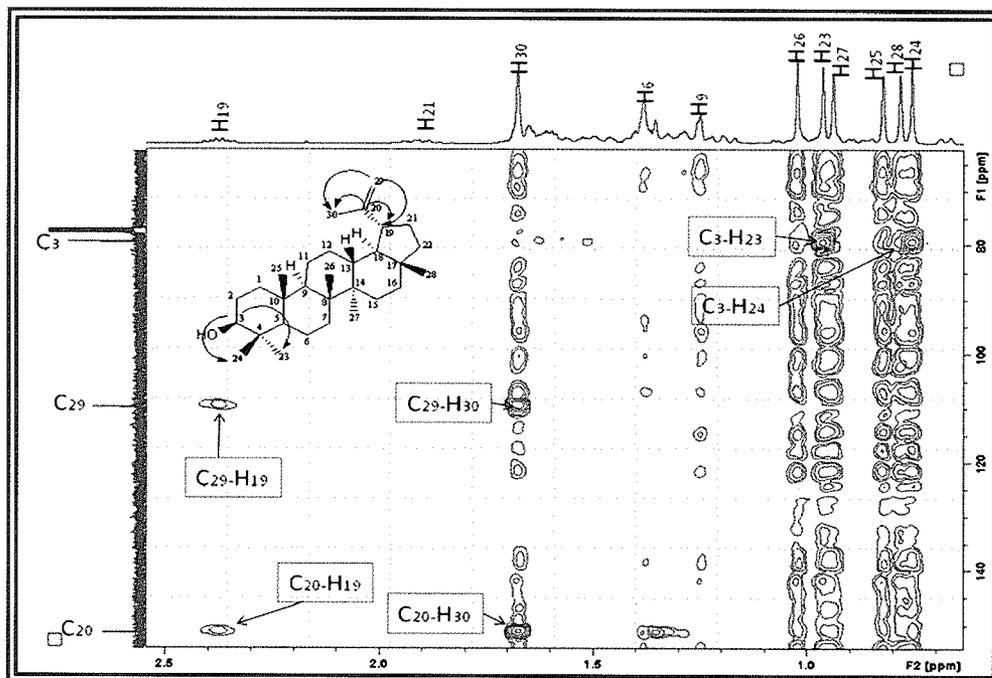


Figura N° 34. Ampliación del Espectro HMBC del compuesto (3) para los carbonos a situados a campo bajo.

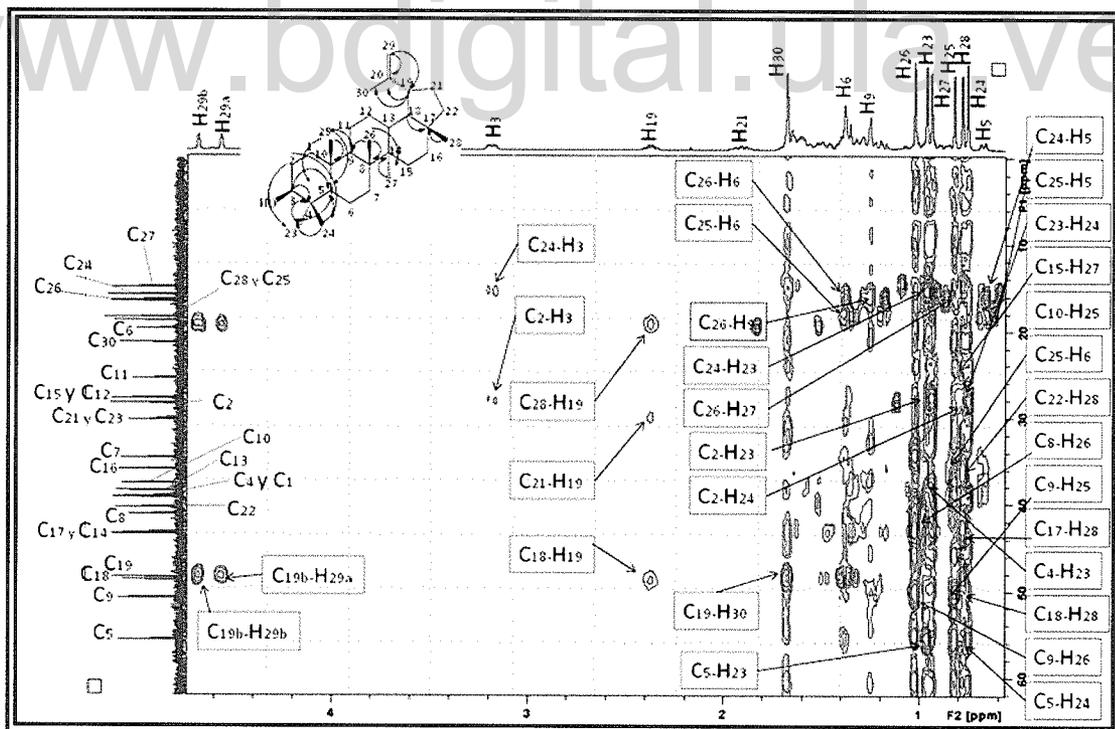


Figura N° 35. Ampliación del Espectro HMBC del compuesto (3) para los carbonos a situados a campo alto.

Con el espectro HMBC del compuesto (3) fue posible confirmar la estructura propuesta para el Lupeol; este se logró con las correlaciones $C_3 \leftrightarrow H_{23}$; $C_3 \leftrightarrow H_{24}$; $C_5 \leftrightarrow H_{24}$; $C_3 \leftrightarrow H_{23}$; $C_{10} \leftrightarrow H_{25}$; $C_8 \leftrightarrow H_{26}$; $C_{29} \leftrightarrow H_{30}$; $C_{20} \leftrightarrow H_{19}$; $C_{19} \leftrightarrow H_{29}$; $C_{29} \leftrightarrow H_{19}$; $C_{17} \leftrightarrow H_{28}$; $C_{20} \leftrightarrow H_{30}$; $C_{19} \leftrightarrow H_{29a}$; $C_{19} \leftrightarrow H_{29b}$, que son mostradas en las ampliaciones de dicho espectro en las figuras N° 34 y 35. En base a la información presentada y por comparación con datos bibliográficos, (Ticona et al., 2006) se propone la estructura del compuesto (3) como la del Lupeol.

Es importante indicar, que de la reunión de las fracciones 35-48 de la columna XIV del extracto Hexanóico de frutos, se aisló 18 mg del compuesto (3), ya aislado previamente, el cual fue analizado por cromatografía de gases, análisis espectroscópico y punto de fusión; todos los estudios fueron sometidos a comparación exhaustiva con el compuesto aislado en corteza, por lo que la capa fina demostró igual tiempo de retención, implicando que este triterpeno se encontró en los extractos hexanóicos, tanto de fruta como de corteza.

Dentro de los estudios fitoquímicos de las especies del género *Vismia*, se reporta que el Lupeol fue extraído de *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997); y una revisión realizada en años recientes acerca de las actividades biológicas del mencionado triterpeno, recopiló información sobre el mismo, consiguiendo que este triterpeno, posee actividad antiprotozoaria, antiinflamatoria, antitumoral, nutraceutica, antimicrobiana, así como también es un inhibidor enzimático, participante en la composición de un antialérgico, previene la formación de cálculos renales, entre otras. (Gallo & Serachine, 2009).

6.3.3.-Compuestos (4) y (5). Triterpenos de núcleo Friedelano. Friedelan-3-ona (4) (Friedelina) y Friedelan-3- β -ol (5) (Epifriedelanol).

Los compuestos (4) y (5) se obtuvieron de las reuniones 8-44 y 45-80 eludidas en hexano:diclorometano 85:15 y 70:30, derivados de la columna V del extracto de hexano de corteza de la especie (Figura N° 10), después de varios procesos de recristalización en metanol caliente se aisló cada uno de estos compuestos por cromatografía de capa preparativa en una mezcla de solvente 60:40 hexano:diclorometano.

- Del sólido (4) de color blanco y punto de fusión 250-253 °C, se recogieron 27 mg
- Del sólido (5) de color blanco y punto de fusión 287-289 °C, se recogieron 19,9 mg

Ambas sustancias solubles en solventes de polaridad media como acetona y diclorometano se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los cromatogramas de las sustancias extraídas (Figura N° 36) revelaron la presencia de un compuesto mayoritario en 81,53% en fracción; con un tiempo de retención igual a 20,126 min para el compuesto (4) y el un compuesto mayoritario en 91,33% con un tiempo de retención 19,666 min para el compuesto (5).

Los espectros de masas de dichos picos mostraron coincidencia con los espectros de masas de triterpenos de núcleo friedelano almacenados en la librería Wiley 275.L; sugiriendo a la Friedelan-3-ona para el compuesto (4) y el friedelan-3 α -ol para el compuesto (5) en porcentaje de similitud 40 y 53%, por lo que se procedió a indagar los demás datos espectroscópicos para la elucidación estructural de las dos sustancias.

Los espectros infrarrojos de los compuestos (4) y (5) mostrados en la Figura N° 37 destacan bandas similares (A y C) de tensión C-H (2927 y 2926 cm^{-1}) y de deformación C-H alifático, (1385 y 1369 cm^{-1}), pero difieren en la banda (B); puesto que para el compuesto (4) corresponde tensión C=O en 1716 cm^{-1} y para el compuesto (5) corresponde a tensión O-H 3487 cm^{-1} , por lo tanto ambos compuestos presentan dentro de su estructura carbonos alifáticos, pero en (4) se observa la presencia de al menos un carbonilo y en (5) la presencia de uno o más grupos hidroxilos. Esta información es abreviada en la Tabla N° 13.

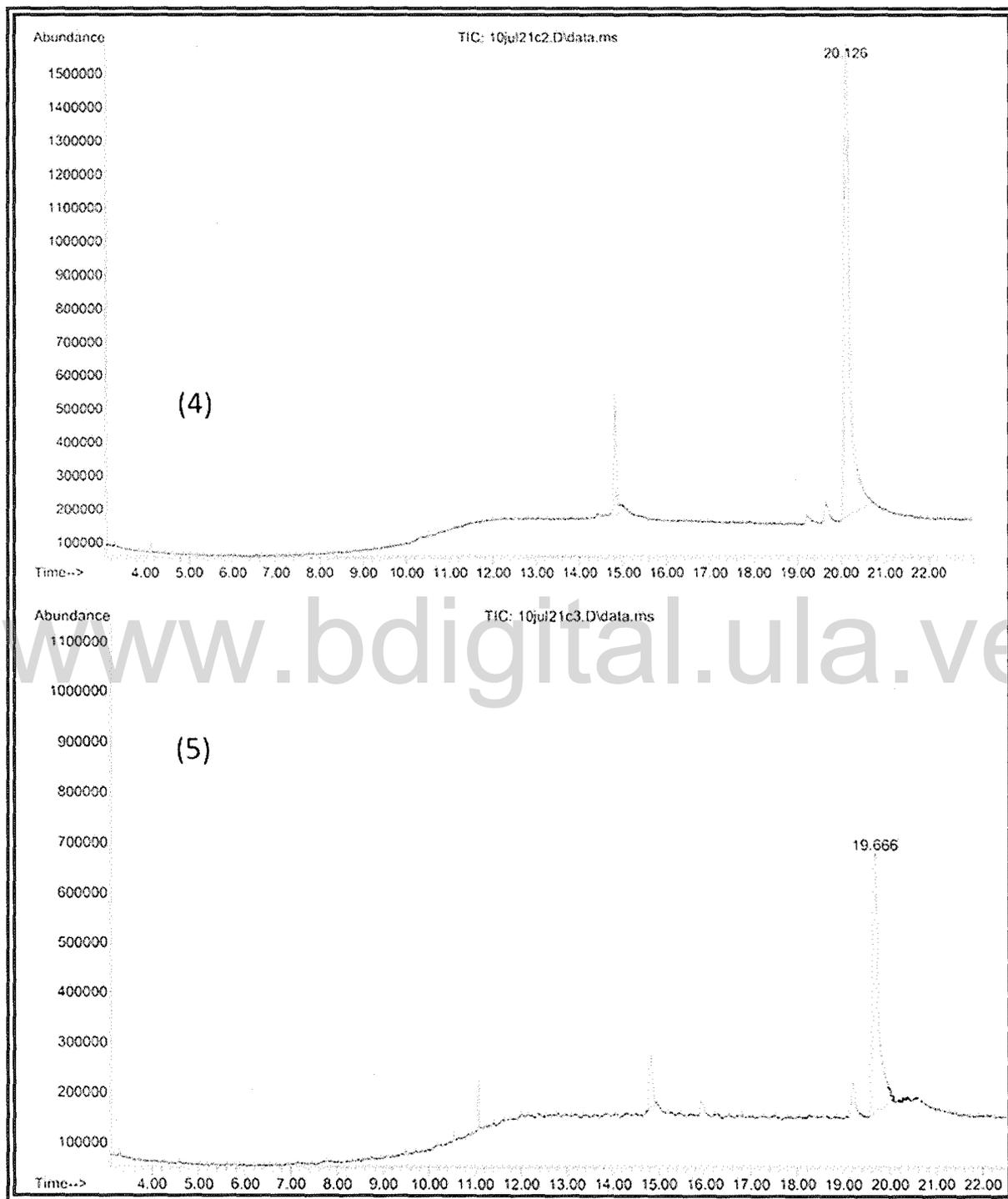


Figura N° 36. Cromatogramas de los compuestos (4) y (5).

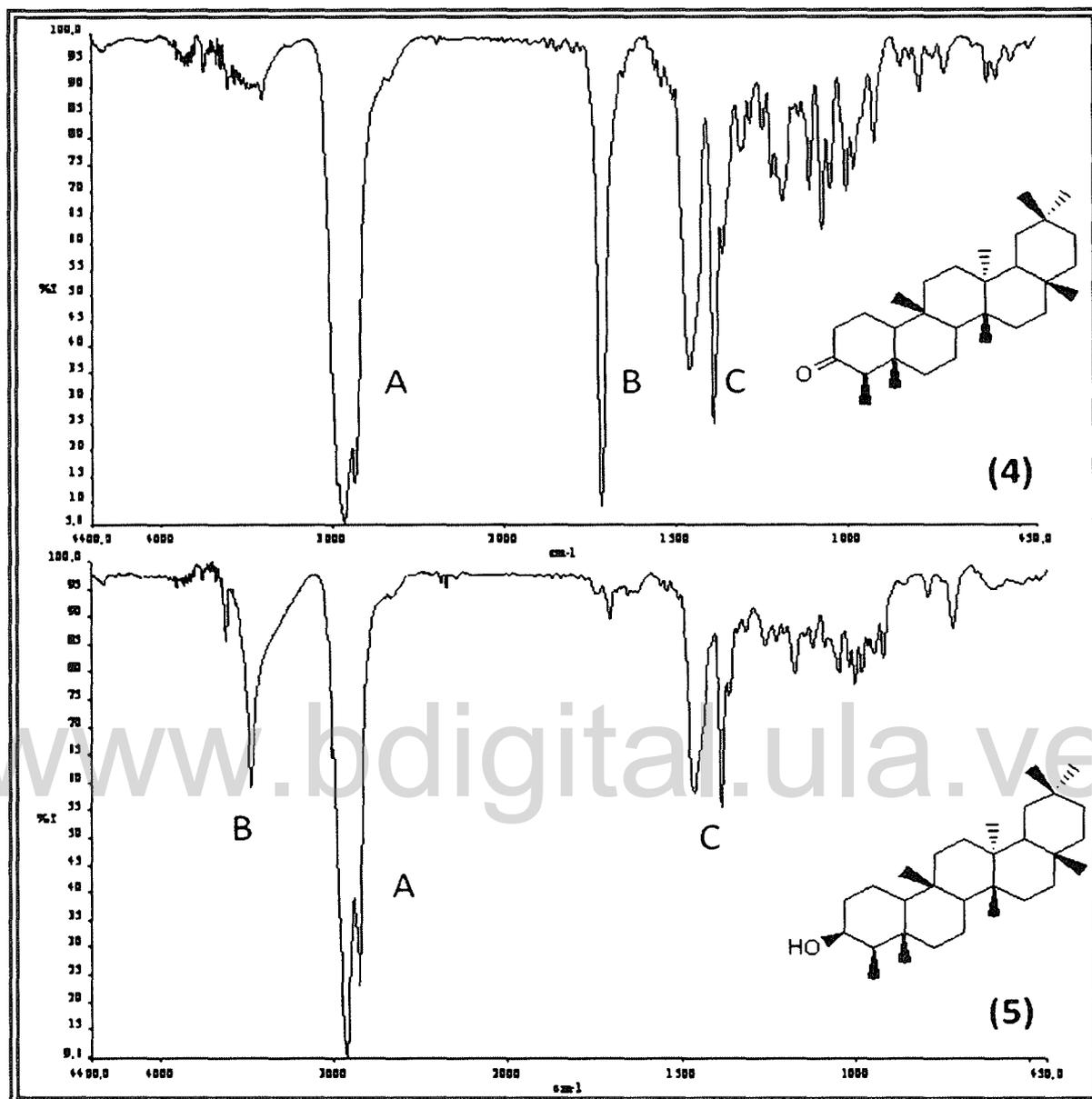


Figura N° 37. Espectros infrarrojos (film en KBr) de los compuestos (4) y (5).

Tabla N° 13. Bandas de absorción significativas en el espectro IR (KBr) de los compuestos (4) y (5).

Espectro	(4)			(5)		
	A	B	C	A	B	C
ν_{max} , cm^{-1}	2927	1716	1385	2926	3487	1369
Asignación	Tensión C-H	Tensión C=O	Deformación C-H	Tensión C-H	Tensión O-H	Deformación C-H

Se valoraron las señales de los espectros RMN- ^1H (Figura N° 38) en donde se pueden observar similitudes entre ambos, en la región entre 0,85 y 2 ppm, indicando que los compuestos son hidrocarburos saturados. También existe una marcada diferencia en campo alto de los hidrógenos cercanos al grupo funcional que ya han sido elucidados por Infrarrojo. En el espectro RMN- ^1H , del compuesto (4) a campo más alto se observan dos señales, cuartete a 2,26 ppm y un multiplete a 2,38 ppm, correspondientes a hidrógenos cercanos al grupo cetona.

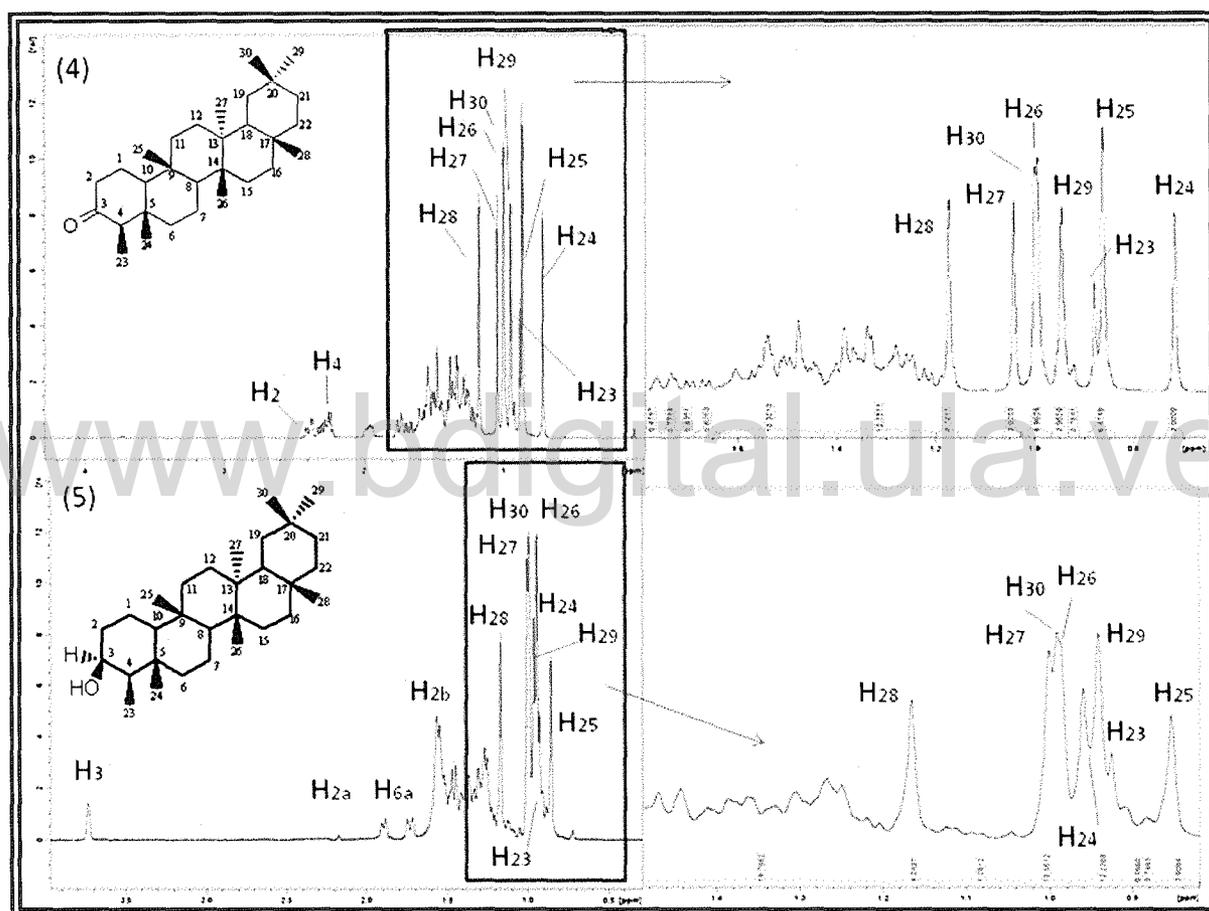


Figura N° 38. Espectros ^1H -RMN y ampliaciones (400MHz, CDCl_3) de los compuestos (4) y (5).

Por otra parte, en el espectro RMN- ^1H , del compuesto (5) la señal que aparece a campo más alto corresponde al hidrogeno que se encuentra sobre el mismo carbono que el grupo hidroxilo, también se puede observar a un desplazamiento de 1,90 ppm un multiplete correspondiente a uno de los hidrógenos en el carbono dos, vecinal al grupo alcohólico. A campo más alto también se observan

singletes asignados a los metilos angulares de los triterpenos. Los espectros de ambos compuestos fueron comparados con los desplazamientos químicos (Tabla N° 14) reportados para los triterpenos friedelan-3-ona y el friedelan-3 β -ol por Van Minh *et al.*, 2005 y Almeida *et al.*, 2011, mostrando claramente profundas coincidencias en las señales de los mencionados espectros.

Tabla N° 14. Desplazamientos químicos en los espectros ¹H-RMN (400Hz, CDCl₃) de los compuestos (4) y (5) y datos reportados en la bibliografía.

N° H	δ (ppm) (4)	δ (ppm) (multiplicidad) ^(a) friedelan-3-ona	N° H	δ (ppm) (5)	δ (ppm) ^(b) (multiplicidad) friedelan-3 β -ol
H ₂	2,38 (m)	2,36 (m)	H ₃	3,73 (m)	3,73 (m)
H ₄	2,26(q) ³ J=6,6Hz	2,24 (q) J=6,4Hz	H _{2a}	1,90 (dt) J=(9,4-2,9)Hz	1,90 (dt) J=(10-2,3)Hz
H ₂₈	1,17	1,16 (s)	H _{6a}	1,74 (dt) J=(11-3)Hz	1,74 (dt) J=(10-3)Hz
H ₂₇	1,04	1,03 (s)	H _{2b}	1,57 (m)	1,57 (m)
H ₃₀	1,00	0,99 (s)	H ₂₈	1,17 (s)	1,17 (s)
H ₂₆	1,00	0,99 (s)	H ₂₇	1 (s)	1,01 (s)
H ₂₉	0,95	0,94 (s)	H ₃₀	0,99 (s)	1 (s)
H ₂₃	0,88(d) ³ J=6,8Hz	0,87 (d) J=6,4Hz	H ₂₆	0,99 (s)	0,99 (s)
H ₂₅	0,86	0,85 (s)	H ₂₄	0,96 (s)	0,97 (s)
H ₂₄	0,72	0,71 (s)	H ₂₉	0,94 (s)	0,95 (s)
			H ₂₃	0,93 (s)	0,93 (s)
			H ₂₅	0,85 (s)	0,85 (s)

^(a)Van Minh *et al.*, 2005. ^(b) Almeida *et al.*, 2011.

Adicionalmente, el espectro de RMN- ¹³C Figura N° 39 dejar ver que el compuesto (4) presenta 30 átomos de carbono, por la región de las señales en el espectro, las mismas corresponden a carbonos saturados; la señal que aparece a 213,63 ppm corresponde a un carbono carbonílico tal como lo había sugerido la espectroscopia infrarroja. Los datos de RMN- ¹³C espectroscópicos sugieren que dicho compuesto es un triterpeno.

Dentro de la elucidación estructural, la determinación de la fórmula molecular juega un papel muy importante ya que a partir de ella se puede calcular el número de insaturaciones presente en la molécula -entre otras cosas-, lo que contribuye a la precisión en el esclarecimiento estructural; en el caso de las sustancias (4) y (5) la asignación de cada uno de los átomos de carbono se estableció a través de los análisis de los espectros de correlación DEPT-135 en los cuales se muestra que el compuesto (4) (Figura N° 40), contiene 8 metilos, 11 metilenos, 4 metinos y 7 carbonos cuaternarios lo que registra 30 Carbonos y 50 hidrógenos ($C_{30}H_{50}$), y para el compuesto (5) (Figura N° 41) 8 metilos, 11 metilenos, 5 metinos y 6 carbonos cuaternarios lo que a su vez anota 30 Carbonos y 51 hidrógenos ($C_{30}H_{51}$). Por otra parte, en ambos casos la bandas "B" de los espectros infrarrojos de mencionados compuestos (Figura N° 37) revelan grupos funcionales oxigenados, tensión C=O (1716 cm^{-1}) para (4) y tensión O-H (3487 cm^{-1}) para (5) hecho que se confirma con los datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C en donde (4) posee un carbono carbonílico en 213,63 ppm y (5) posee una que señal en 72,91 ppm correspondiente al carbono que ostenta el hidroxilo revelado en el infrarrojo.

En base a la analogía anterior, los compuestos (4) y (5) poseen fórmula molecular ($C_{30}H_{50}O$) y ($C_{30}H_{51}OH$) respectivamente lo que registra 6 insaturaciones para (4) y 5 para (5), las cuales concuerdan con lo hasta ahora elucidado, cinco de las insaturaciones de ambos compuestos pertenecen a la estructura pentacíclica de los triterpenos y en el caso del compuesto (4) la sexta insaturación pertenece al doble enlace carbonílico. Además de la información adquirida, se acertó, al revisar la literatura que los datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C obtenidos para el compuesto (4) coinciden totalmente con los reportados por Van Minh *et al.*, 2005 para el triterpeno friedelan-3-ona, tal como se muestra en la Tabla N° 17.

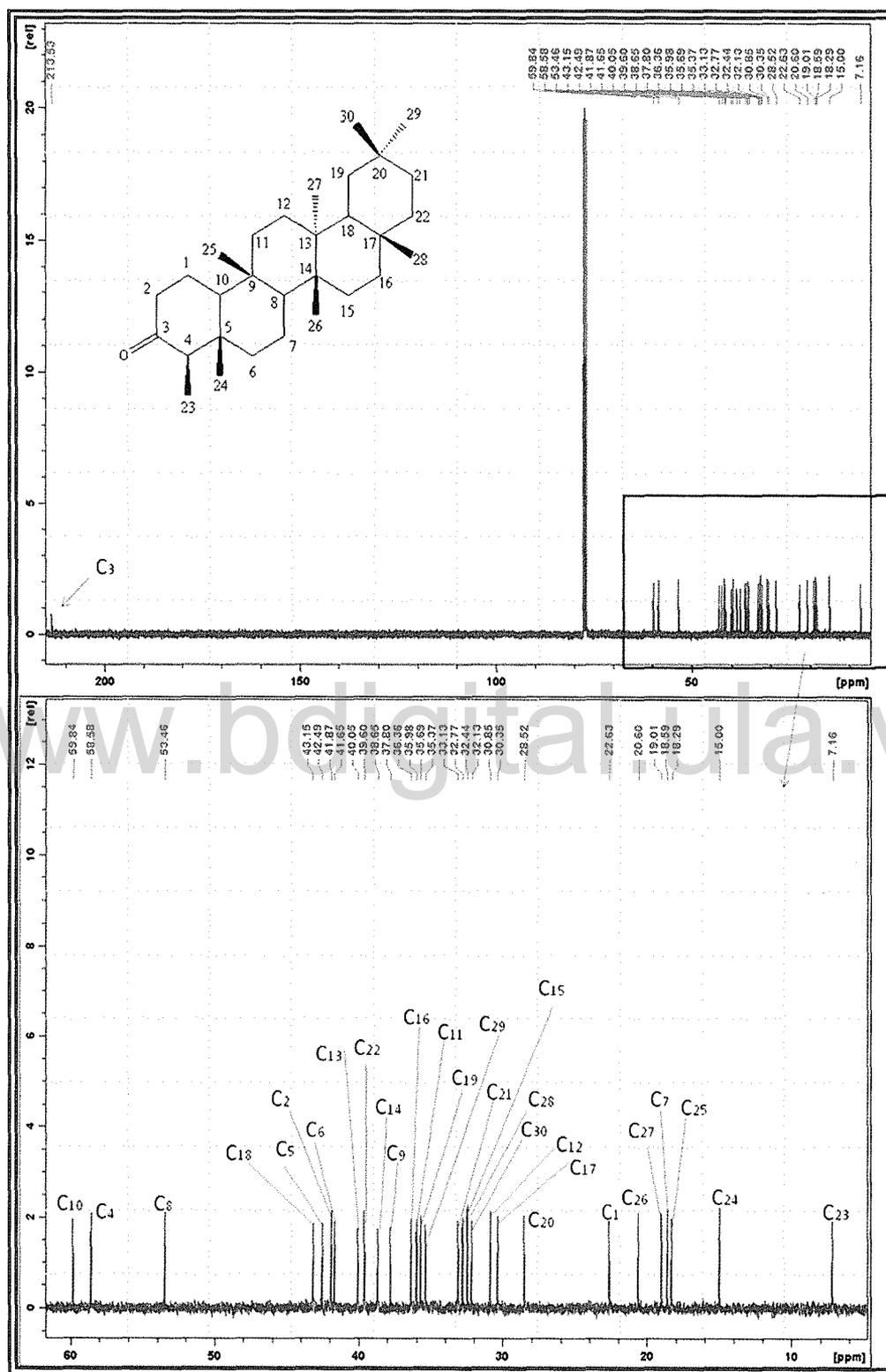


Figura N° 39. Desplazamientos químicos y ampliación del espectros ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3) del compuesto (4).

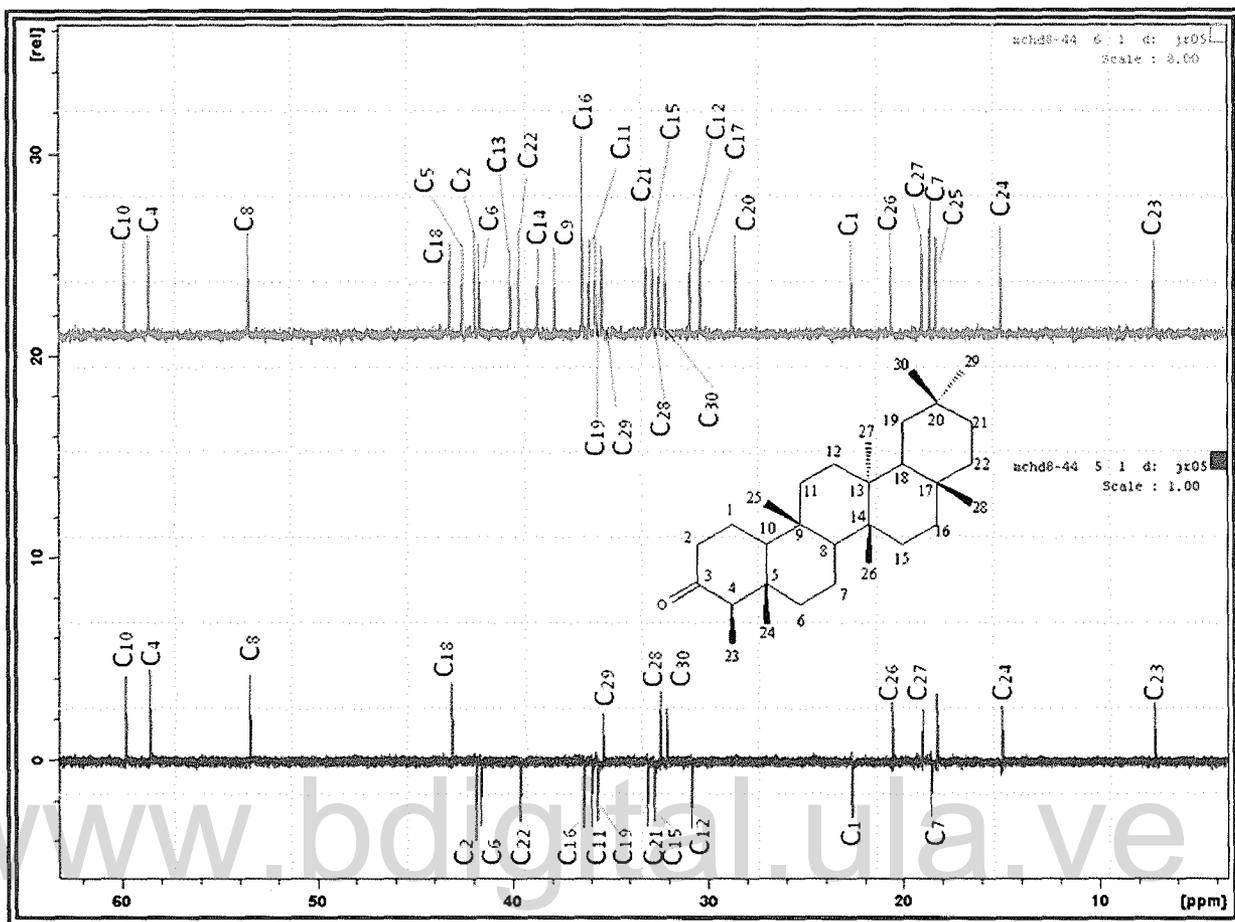


Figura N° 40. Espectro RMN- ^{13}C /DEPT-135 del compuesto (4).

De igual manera, se realizó un proceso similar, para la orientación de la elucidación estructural del compuesto (5), donde el espectro RMN- ^{13}C Figura N° 41, dejar ver que dicho compuesto, presenta 30 átomos de carbono. En la región de las señales correspondientes a carbonos alifáticos saturados; la señal que aparece a 72,91 ppm es producida por el átomo de carbono unido directamente al oxígeno (C-O) del grupo OH.

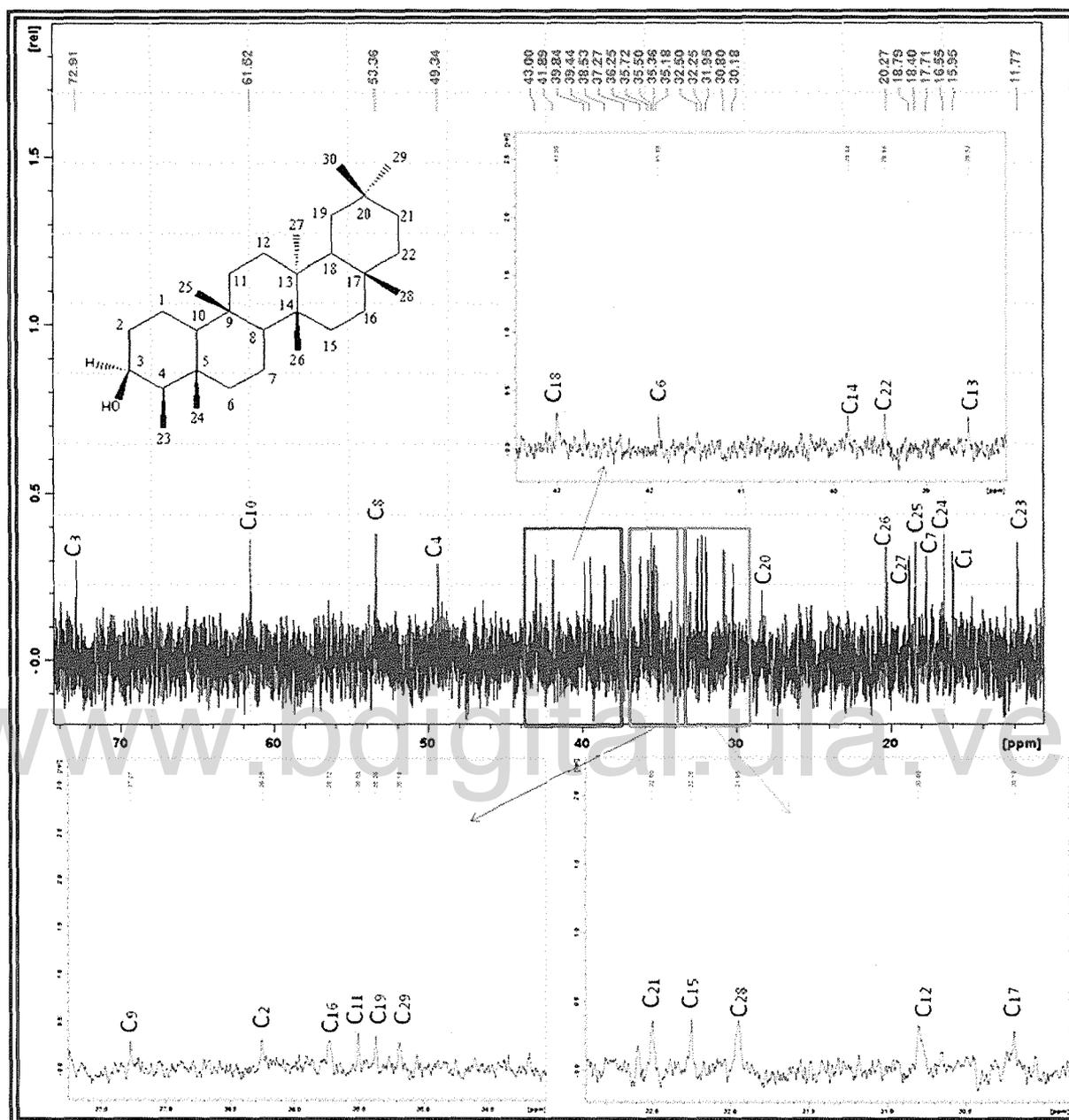


Figura N° 41. Desplazamientos Químicos y ampliación del espectros ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3) del compuesto (5).

Conjuntamente con la información adquirida, se encontró, al revisar la bibliografía que los datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C obtenidos para el compuesto (5) coinciden mayoritariamente con los reportados por Almeida *et al.*, 2011 para el triterpeno friedelan- 3β -ol, esta información se presenta en la Tabla N° 15, lo cual ubicó la indagación estructural a aserir, si la estructura del compuesto (5) corresponde al friedelan- 3β -ol, tal como en un principio había sugerido el espectro de masas del pico correspondiente en el cromatograma para dicho compuesto.

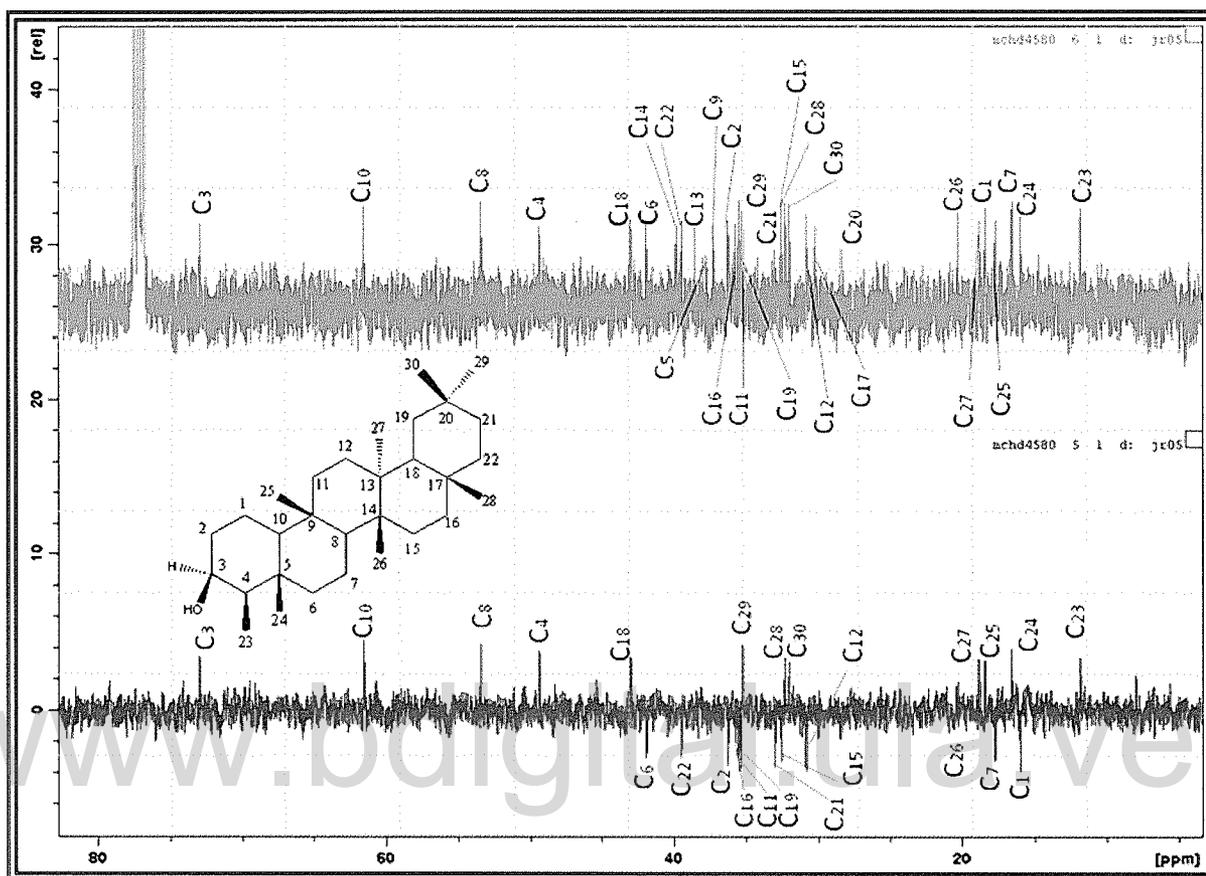


Figura N° 42. Espectro RMN- ^{13}C /DEPT-135 del compuesto (5)

Tabla N° 15. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C (100Hz, CDCl₃) y asignación del tipo de carbono a partir de DEPT-135 de los compuestos (4) y (5) y de friedelina y epifriedelinol.

N° Carbono	Tipo de Carbono	δ (ppm) (4)	δ (ppm) (a) friedelina	Tipo de Carbono	δ (ppm) (5)	δ (ppm)(b) β-friedelanol
C ₁		22,63	22,6		15,95	15,8
C ₂		41,87	41,9		36,25	36,3
C ₃		213,53	213,4		72,91	72,9
C ₄		58,58	58,6		49,34	49,4
C ₅		42,49	42,5		38,10	38,1
C ₆		41,65	41,7		41,89	41,9
C ₇		18,59	18,6		17,71	17,6
C ₈		53,46	53,5		53,36	53,4
C ₉		37,80	37,8		37,27	37,4
C ₁₀		59,84	59,9		61,52	61,6
C ₁₁		35,98	36,0		35,50	35,6
C ₁₂		30,85	30,9		30,80	30,6
C ₁₃		40,05	40,1		38,53	38,6
C ₁₄		38,65	38,7		39,84	39,9
C ₁₅		32,77	32,8		32,25	32,3
C ₁₆		36,36	36,4		35,72	35,8
C ₁₇		30,35	30,4		30,18	30,0

(a) Van Minch et al., 2005; (b) Almeida et al., 2011

Tabla N° 15. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C (100Hz, CDCl₃) y asignación del tipo de carbono a partir de DEPT-135 de los compuestos (4) y (5) y de friedelina y epifriedelinol (Cont.)

N° Carbono	Tipo de Carbono	δ (ppm) (4)	δ (ppm) (a) friedelina	Tipo de Carbono	δ (ppm) (5)	δ (ppm)(b) β-friedelanol
C ₁₈		43,15	43,2		43,00	43,1
C ₁₉		36,69	35,7		35,36	35,4
C ₂₀		28,52	28,5		28,22	28,2
C ₂₁		33,13	33,1		32,50	32,8
C ₂₂		39,60	39,6		39,44	39,5
C ₂₃	-CH ₃	7,16	7,1	-CH ₃	11,77	11,6
C ₂₄	-CH ₃	15,00	15,0	-CH ₃	16,55	16,4
C ₂₅	-CH ₃	18,29	18,3	-CH ₃	18,40	18,2
C ₂₆	-CH ₃	20,60	20,6	-CH ₃	20,27	20,1
C ₂₇	-CH ₃	19,01	19,0	-CH ₃	18,79	18,6
C ₂₈	-CH ₃	32,44	32,4	-CH ₃	31,95	32,1
C ₂₉	-CH ₃	35,37	35,4	-CH ₃	35,18	35,2
C ₃₀	-CH ₃	32,13	32,1	-CH ₃	31,81	31,8

(a) Van Minch *et al.*, 2005; (b) Almeida *et al.*, 2011

Por otra parte, es de especial atención recordar que los patrones de fraccionamiento en los espectros de masas de una molécula policíclica hidrocarbonada que contiene un carbonilo o un hidroxilo son muy sensibles a los cambios estructurales, en el caso de triterpenos saturados el problema radica en la localización de los grupos funcionales (Budzikiewicz *et al.*, 1964). Sin embargo, se ha demostrado claramente a través de los espectros de resonancia de los compuestos (4) y (5) aislados, que los triterpenos de núcleo friedelano contienen el grupo funcional sobre el carbono tres.

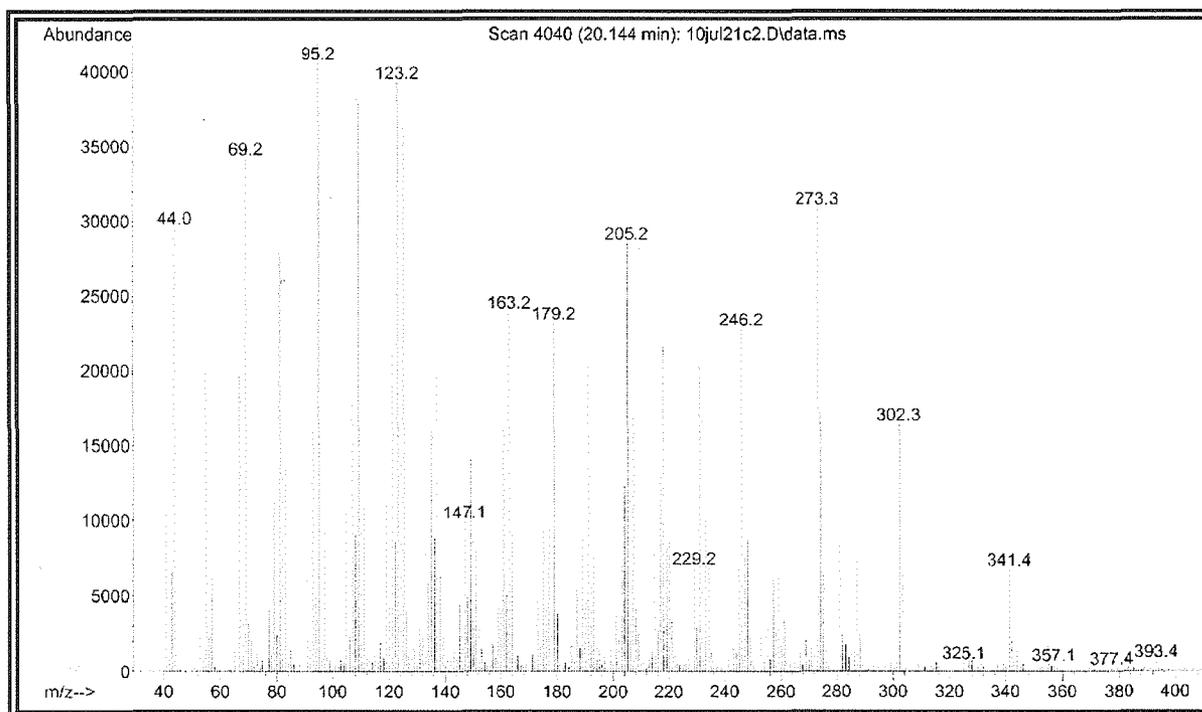


Figura N° 43. Espectros de masas del compuesto (4).

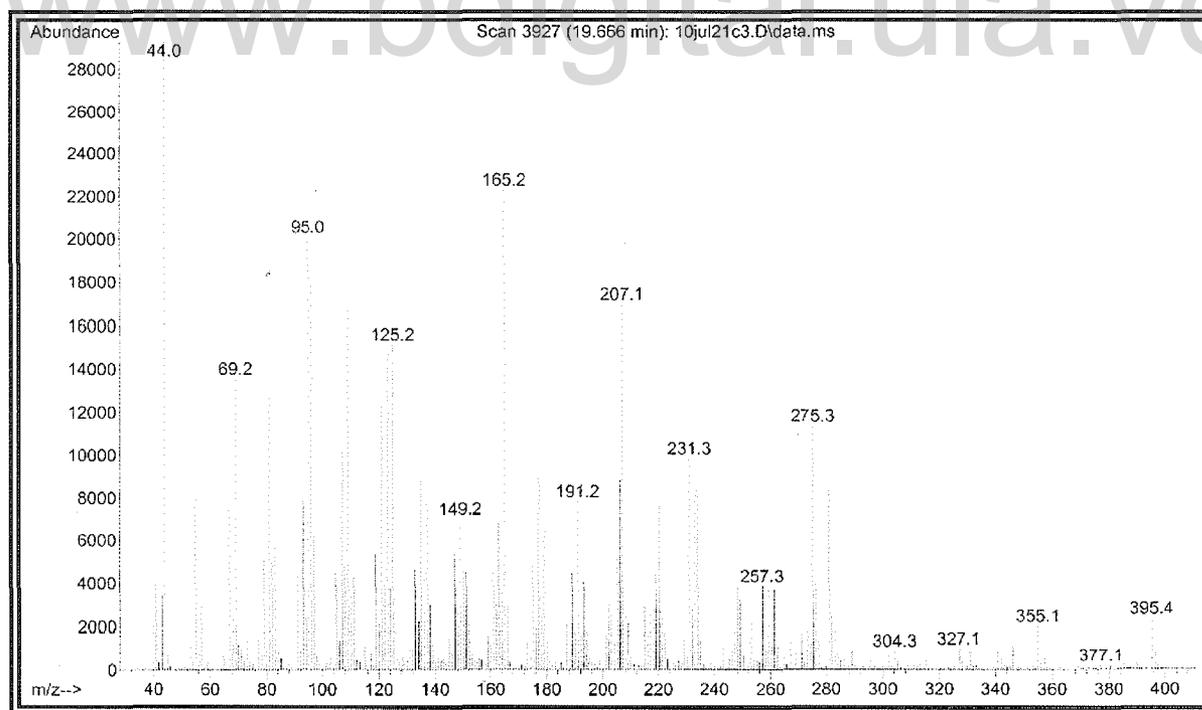
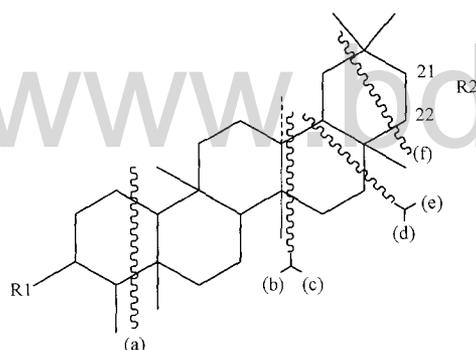


Figura N° 44. Espectros de masas del compuesto (5).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear mostró que las formulas de los compuestos de núcleo friedelano que muestran coincidencia con los espectros estudiados, incluyendo los espectros de masas, conciernen a una formula molecular de $C_{30}H_{50}O$ y $C_{30}H_{52}O$ como se mencionó anteriormente, dichas formulas –que difieren en dos unidades de peso- corresponden a masas moleculares de 426 y 428g/mol, los espectros de masas correspondientes a los compuestos (4) y (5) son mostrados en las figuras N° 43 y 44, donde se nota claramente la ausencia de dicha señal, es decir, en ambos espectros no se observa el pico ion molecular (M^+), donde se presume que este podría ser el motivo por el cual la librería del espectrómetro de masas y el espectro de masas de los compuestos presentaron un bajo porcentaje en coincidencia con los compuestos sugeridos por el patrón de fraccionamiento descrito.

Es importante agregar que en la literatura de elucidación de productos naturales por espectrometría de masas se afirma que los iones producidos en los espectros de masas de los derivados del



friedelano, presentan rupturas típicas para este tipo de triterpeno, tal como se muestra en la imagen adjunta. El primer punto a observar es que en toda fragmentación de friedelanos, la ruptura (d) ocurre con la pérdida de un átomo de hidrógeno a partir de las especies cargadas, rompiendo dos enlaces, produciendo valores impares de m/z . En segundo lugar, la hendidura (b) se

observa en los espectros de todos los compuestos, mientras que (d) y (f) ocurren en solo algunos de los compuestos y finalmente los iones (a), (c) y (e) se encuentran en sólo dos derivados funcionales. (Budzikiewicz et al., 1964).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, se propone un patrón de fraccionamiento para los compuestos (4) y (5) en la Figura N° 45, que corresponden a los fraccionamientos esperados para los espectros de masas de la friedelan-3-ona y friedelan-3(ξ)-ol, en estos patrones se observan que ambos compuestos poseen las rupturas (B) y (D) características de todos los friedelanos pero coinciden en peso cuando los sustituyentes R atañen a un grupo cetona y un grupo hidroxilo ($m/z=273, 275$ y $302, 304$) se puede notar que los mismos difieren en dos unidades de masa atómica.

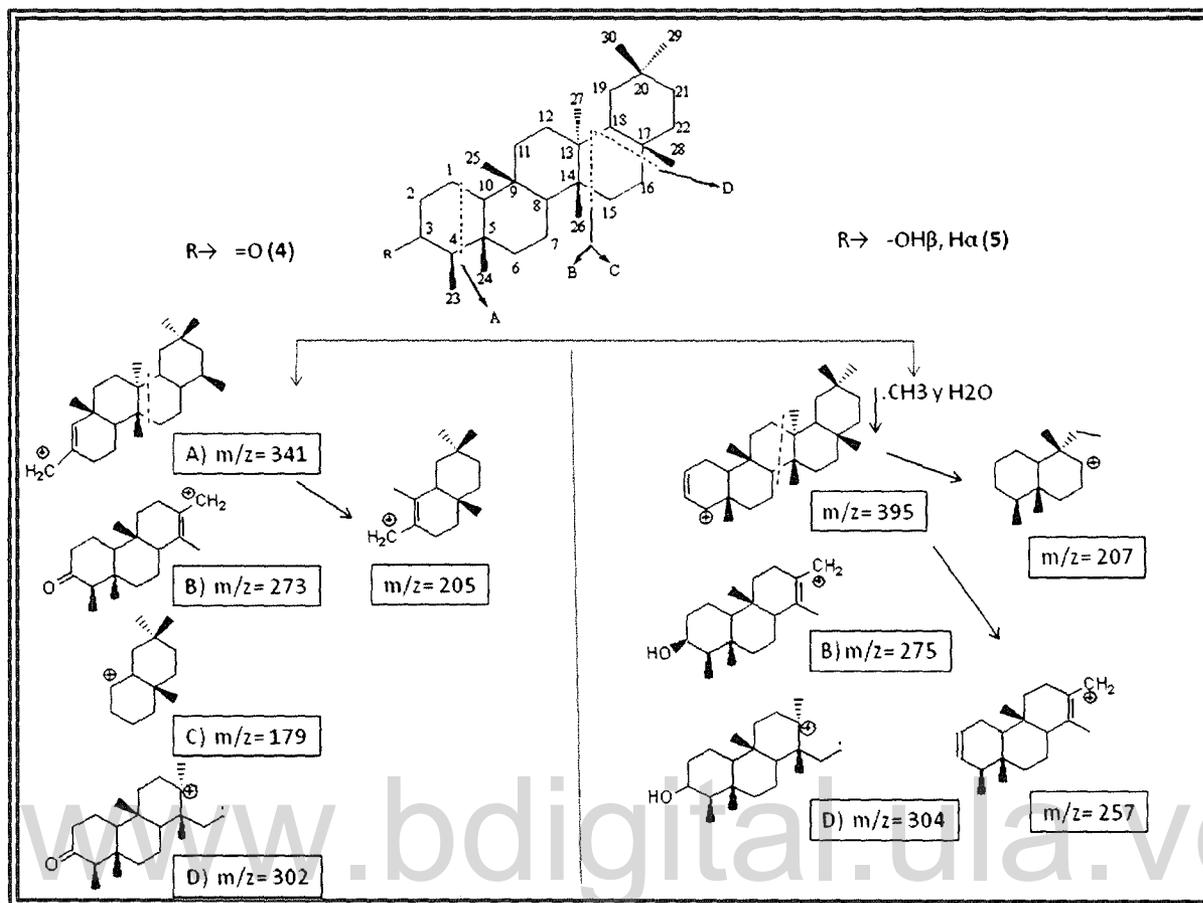


Figura N° 45. Propuesta de patrones de fragmentación de los triterpenos de núcleo friedelano. Compuestos (4) y (5).

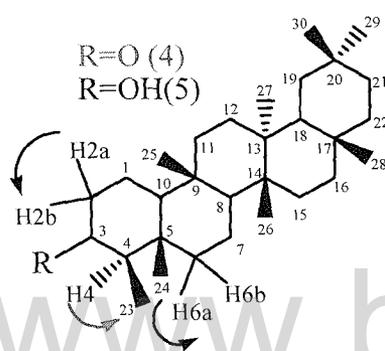
En otro orden de ideas, el compuesto (4) presentó las escisiones (A) ($m/z=341$) y (C) ($m/z=179$) típicas de los friedelan-x-ona (Budzikiewicz et al., 1964). Mientras que el compuesto (5) presenta la relación masa carga correspondiente a la pérdida de agua y metilo en conjunto, que son propios de los friedelanos hidroxilados. La bibliografía reporta que los triterpenos de este núcleo con sustituyentes hidroxilos presentan dificultad en mostrar el ión molecular por lo que comúnmente el mismo, se acetila con anticipación y se procesa el espectro de masa, apareciendo como pico ión molecular una señal de mayor masa (Salama, 1986); inclusive es común utilizar el método FAB-MS (Bombardeo de átomos rápidos-Espectro de masas) (Van Minh et al., 2005) para superar estos inconvenientes que se presentan en compuestos que pierden agua con facilidad.

La asignación de la configuración del carbono tres se realizó en función de los desplazamientos químicos en RMN- ^{13}C que establece al compuesto (5) con configuración β –ambos isómeros

Sustancia	Punto de Fusión
β -friedelinol	(288-289) °C
α -friedelinol	(301-303) °C
Compuesto (5)	(287-289) °C

difieren un poco más de un ppm-, también, se recurrió a la gran diferencia entre el punto de fusión de los dos epímeros, (Ver tabla adjunta al texto) lo que a simple vista corresponde al isómero β quien difiere aproximadamente en 15 grados centígrados del isómero α (Salama, 1986).

Es conveniente señalar, que con todas las coincidencias reportadas hasta ahora la espectroscopia bidimensional para ambos compuestos confirma la indagación adquirida en este estudio para los



compuestos (4) y (5). Los espectros ^1H , ^1H -COSY de ambos compuestos (Figura N° 46.) muestran los acoplamientos ya reportados por RMN- ^1H , en función de las constantes de acoplamiento, tal como se muestra en la figura adjunta, para el compuesto (4) se observan las correlaciones $\text{H}_4 \leftrightarrow \text{H}_{23}$, acoplamiento a dos enlaces y para el compuesto (5) se muestran las correlaciones $\text{H}_{2a} \leftrightarrow \text{H}_{2b}$, acoplamiento geminal

$\text{H}_{6a} \leftrightarrow \text{H}_{24}$ que es un acoplamiento a mayor número de enlaces.

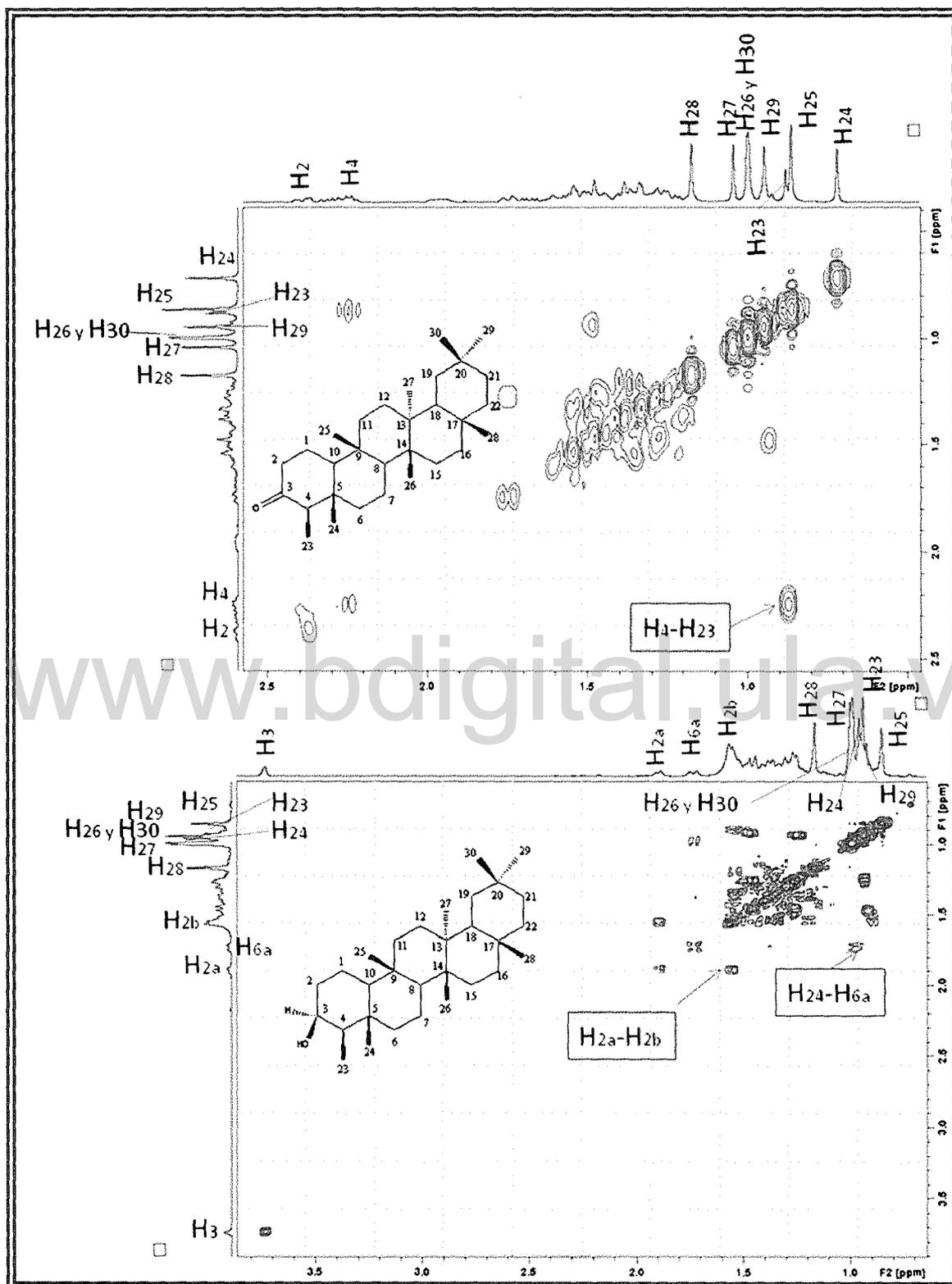


Figura N° 46. Espectros ^1H , ^1H -COSY de los compuestos (4) y (5).

Los experimentos de heterocorrelación de ^1H - ^{13}C HSQC (Figuras N° 47 y 48), fueron útiles en el proceso de identificación y asignación de los hidrógenos sobre los respectivos carbonos, ya que para triterpenos, en los espectros RMN- ^1H se observan con claridad las señales a campo muy bajo y los hidrogenes singletes a campo alto, pero en la zona de metinos y metilenos ubicada entre 1,5 y 2 ppm las señales se superponen y muestran multiplicidad con poca definición, sin embargo fue posible la asignación de los protones a campo alto sobre sus respectivos carbonos.

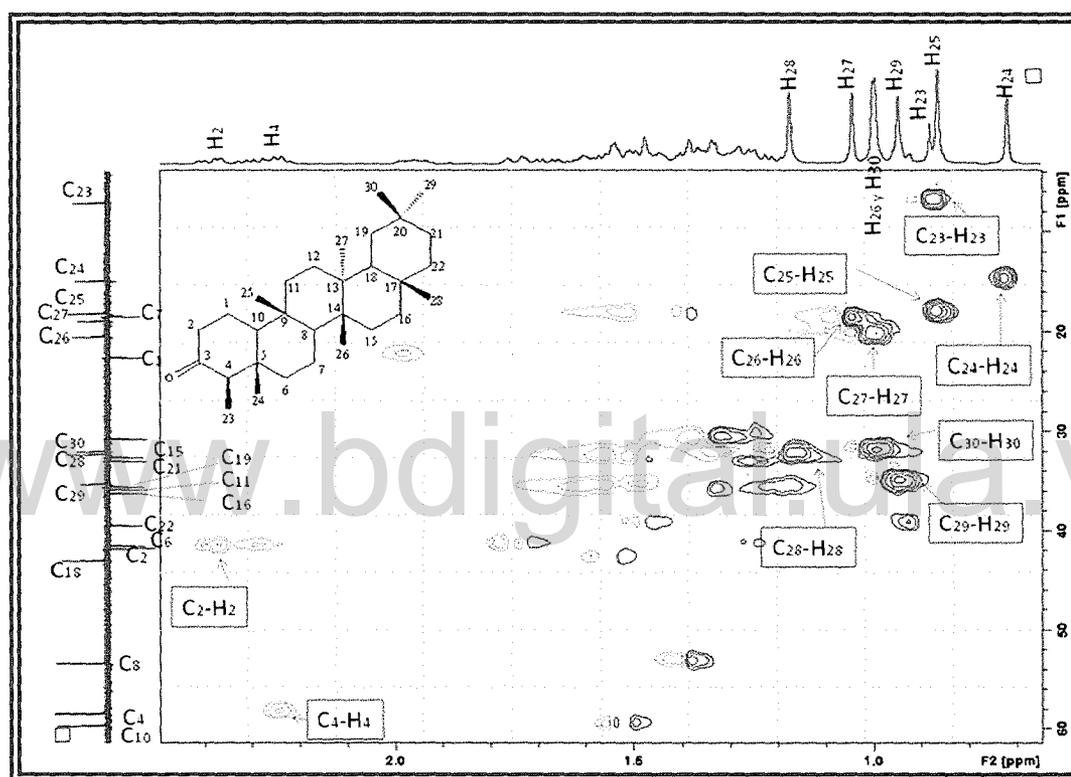
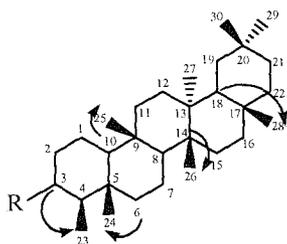


Figura N° 47. Espectro HSQC del compuesto (4).

De igual manera, los espectros de correlación HMBC de los compuestos (4) y (5) muestran las señales de los grupos metilos presentes en los compuestos triterpenos de núcleo friedelano, tal como se muestra en la figura adjunta, las correlaciones en común para ambos compuestos independiente de la sustitución sobre el carbono tres son: $\text{C}_3 \leftrightarrow \text{H}_{23}$, $\text{C}_6 \leftrightarrow \text{H}_{24}$, $\text{C}_{10} \leftrightarrow \text{H}_{25}$, $\text{C}_{14} \leftrightarrow \text{H}_{26}$, $\text{C}_{18} \leftrightarrow \text{H}_{28}$.



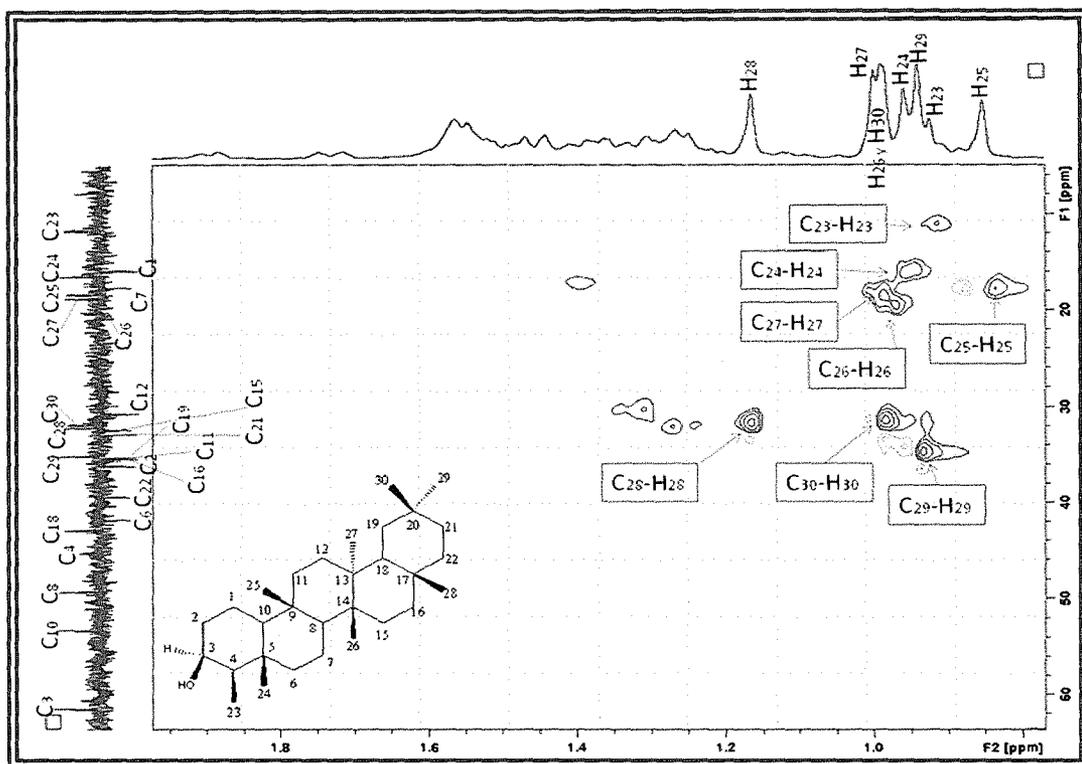


Figura N° 48. Espectro HSQC del compuesto (5).

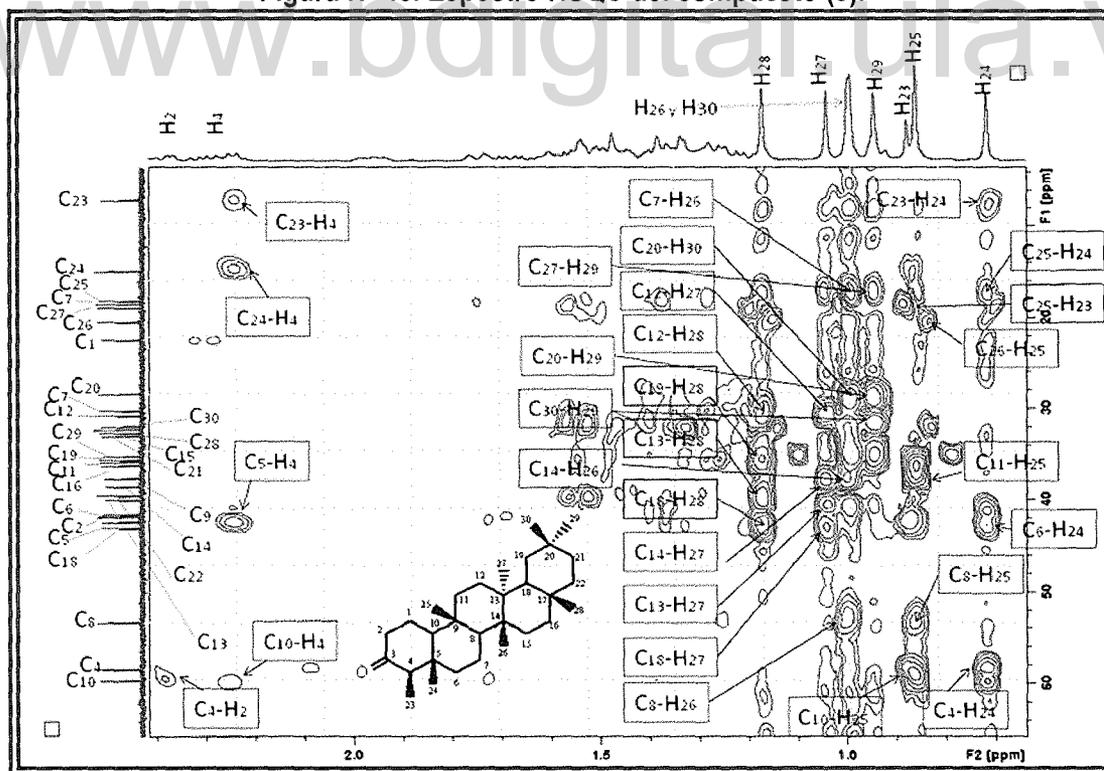


Figura N° 49. Espectro HMBC del compuesto (4).

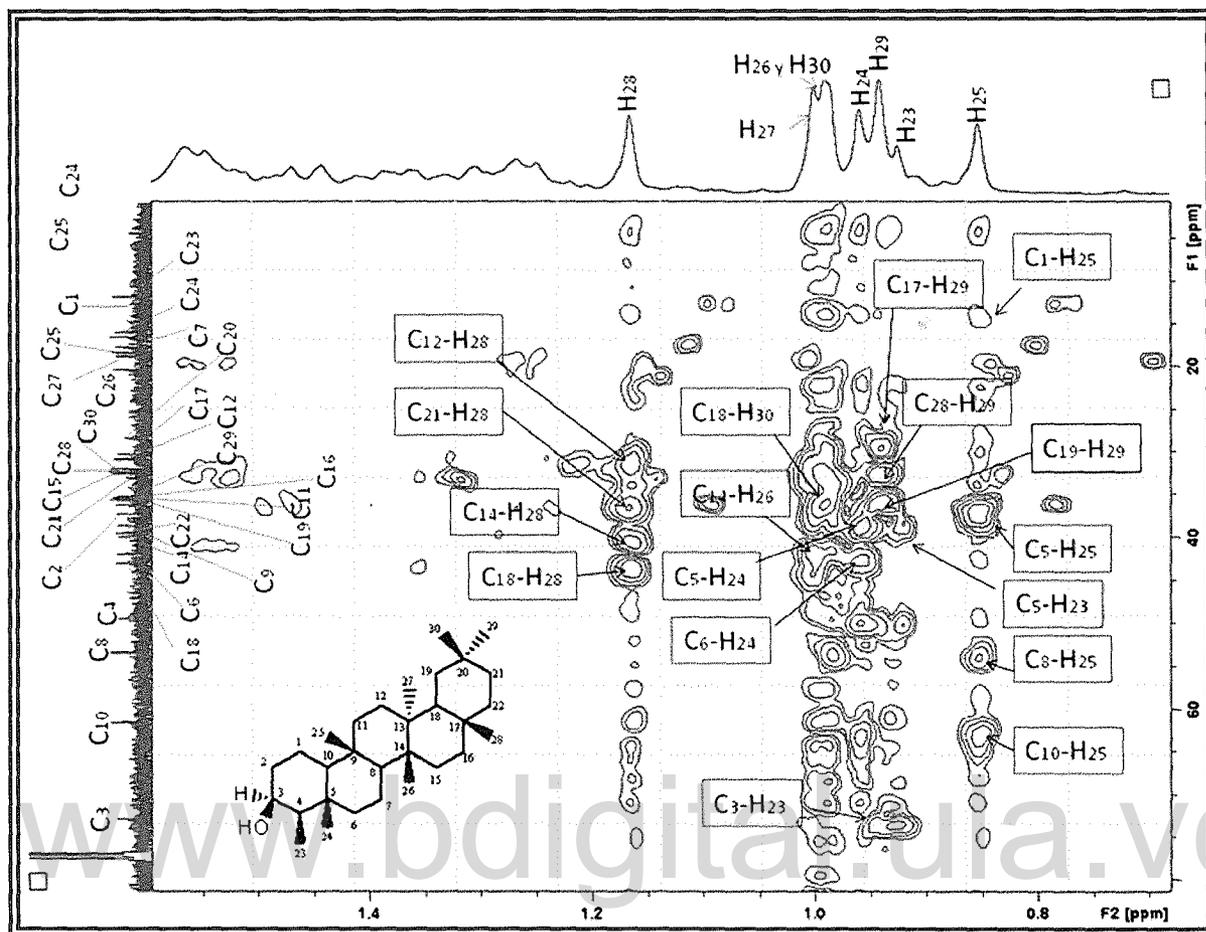
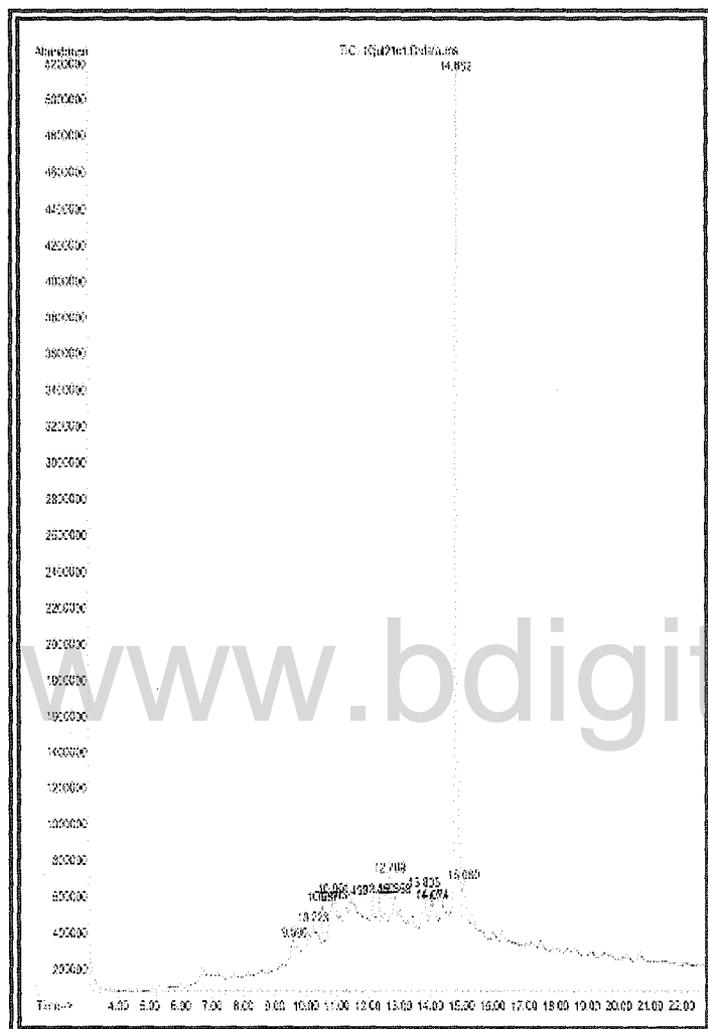


Figura N° 50. Espectro HMBC del compuesto (5).

Los compuestos (4) y (5) han sido reportados en diferentes especies de este género, el friedelan-3-ona se ha obtenido en *V. japurensis* (Miraglia *et al.*, 1981), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesus, 1990), *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997), *V. laurentii* (Kuede *et al.*, 2007), *V. rubescens* (Tamokou *et al.*, 2009), y *V. baccifera var. dealbata* (Salas *et al.*, 2008), y por su parte el friedelan-3 β -ol en *V. rubescens* (Tamokou *et al.*, 2009), *V. laurentii* (Nguemaving *et al.*, 2006) y *V. japurensis* (Miraglia *et al.*, 1981; a estos compuestos se les ha determinado propiedades antimicrobianas (Salas *et al.*, 2008) y antitumorales (Kundu *et al.*, 2000).

6.3.4.-Compuesto (6). {1,8-dihidroxi-3-metil-7-(4'-metil-1-pentenil)-6-metoxi-antraquinona} (Vismiaquinona).



Luego de sucesivas recristalizaciones en acetona, de las fracciones 65 a la 86, eluidas con mezcla de solvente hexano - diclorometano 65:45 y 70:30 provenientes de la columna IX se obtuvo 164 mg de un sólido de color anaranjado cuyo punto de fusión fue (199-201)°C. El material, se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El cromatograma (Figura N° 51) reveló la presencia de un compuesto mayoritario con 88,495 % de pureza y un tiempo de retención igual a 14,862 min. El espectro de masas de dicho pico mostró un 95 % de coincidencia con el espectro de masas de la Vismiaquinona almacenado en la librería Wiley 275.L.

Figura N° 51. Cromatograma del compuesto (6).

En la figura N° 52 se observan ambos espectros de masas, el superior corresponde al compuesto aislado y el inferior a la Vismiaquinona que reporta la librería, con los picos correspondiente a los pesos de los fragmentos de masa (m/z) donde se muestra claramente la coincidencia entre ambos, junto a sus respectivas abundancias.

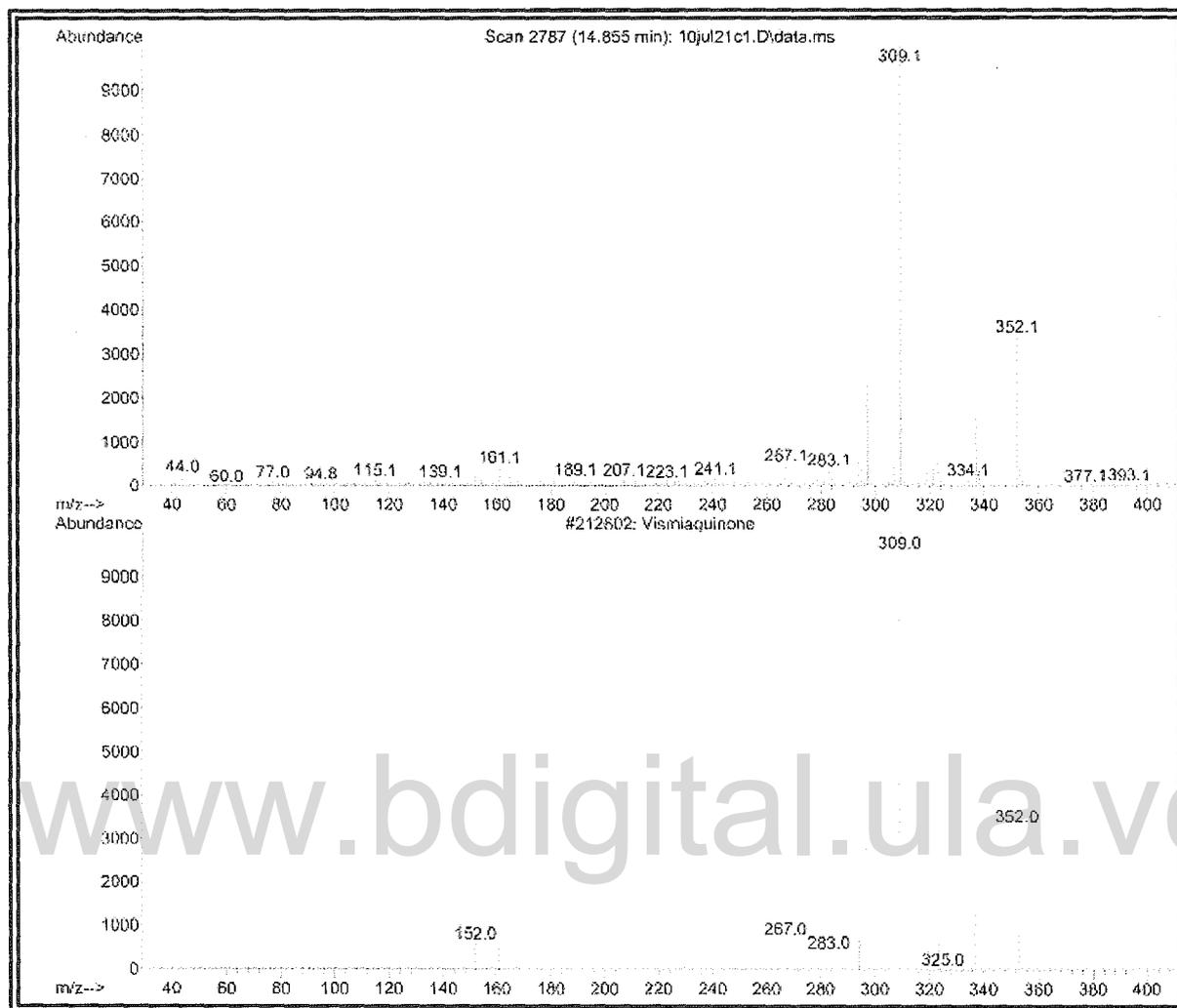


Figura N° 52. Espectro de masas del compuesto (6) y el de la Vismiaquinona.

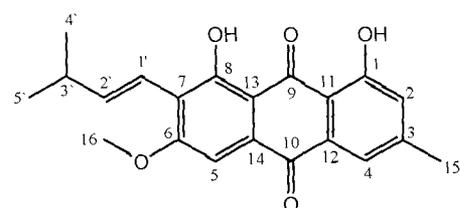
Una vez, que el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, sugirió, la presencia de esta antraquinona dihidroxilada, se comparó la información de los fragmentos de masas producidos del mencionado espectro con los reportados en la bibliografía para dicho compuesto. Esta indagación se resume en la tabla N° 16 para Vismiaquinonas aisladas de *V. japurensis* y *V. reichardtiana*, la cual muestra coincidencia total con los reportados por Goncalvez *et al* 1981 y Miraglia *et al* 1981 orientando la investigación a corroborar si la estructura del compuesto (6) correspondía con el {1,8-dihidroxi-3-metil-7-(4'-metil-1-pentenil)-6-metoxi-antraquinona} (Vismiaquinona).

Tabla N° 16. Información de espectro de masas del compuesto (6) y datos reportados en la bibliografía para la Vismiaquinona.

Señal	m/z Compuesto (6)	Abund.	m/z (a) Vismiaquinona <i>V. reichardiana</i>	Abund. (a)	m/z (b) Vismiaquinona <i>V. japurensis</i>	Abund. (b)
1	352	34	352	33	352	9
2	334	11	337	13	337	5
3	323	5	323	6	323	22
4	309	100	309	100	309	100
5	297	28	297	28	297	30
6	295	6	295	6	295	7
7	294	5	294	7	294	8
8	283	5	283	4	283	5
9	267	8	267	7	267	11
10	161	13	161	5	161	37
11	115	5	152	6	115	33

Datos Reportados en: (a) Goncalvez *et al* 1981 (b) Miraglia *et al* 1981

En el espectro de masas del compuesto (6) se observó claramente el ión molecular (M^+) con relativa estabilidad respecto al pico base en $m/z=352$, correspondiente al peso Molecular de la



Vismiaquinona de formula molecular $C_{21}H_{20}O_5$. Este espectro de masas presenta el Pico $M+1$ en $m/z=353$; el patrón de fraccionamiento propuesto para este compuesto se presenta en la Figura N° 53, en el cual se muestran fragmentos de masas producidos a partir del ión molecular

correspondiente a la perdida de carbonilos CHO (M^+-29) y 2CHO (M^+-58) del grupo quinónico, y a la perdida de agua H_2O (M^+-18) que normalmente ocurre en los fenoles.

El pico más estable $m/z=309$ corresponde a la ruptura del enlace entre los carbonos 2' y 3', adyacente al doble enlace de la cadena alquílica que se encuentra en el carbono 7 del centro antraquinónico, tipo dantrona (1,8-dihidroxi-antraquinona), correspondiente a la perdida de $C_3H_7^+$. Las quinonas se caracterizan por fragmentarse entre los carbonos α,β a los carbonilos, es decir la antraquinona produce segmentos estables, cuando se fracciona por impacto electrónico entre los enlaces comprendidos entre los carbonos 11-1; 12-4, y 13-8; 5-14, representados en la figura N° 53

por colores rojos y azules, los cuales generan picos en el espectro de masas con $m/z=161$ y 267 , respectivamente.

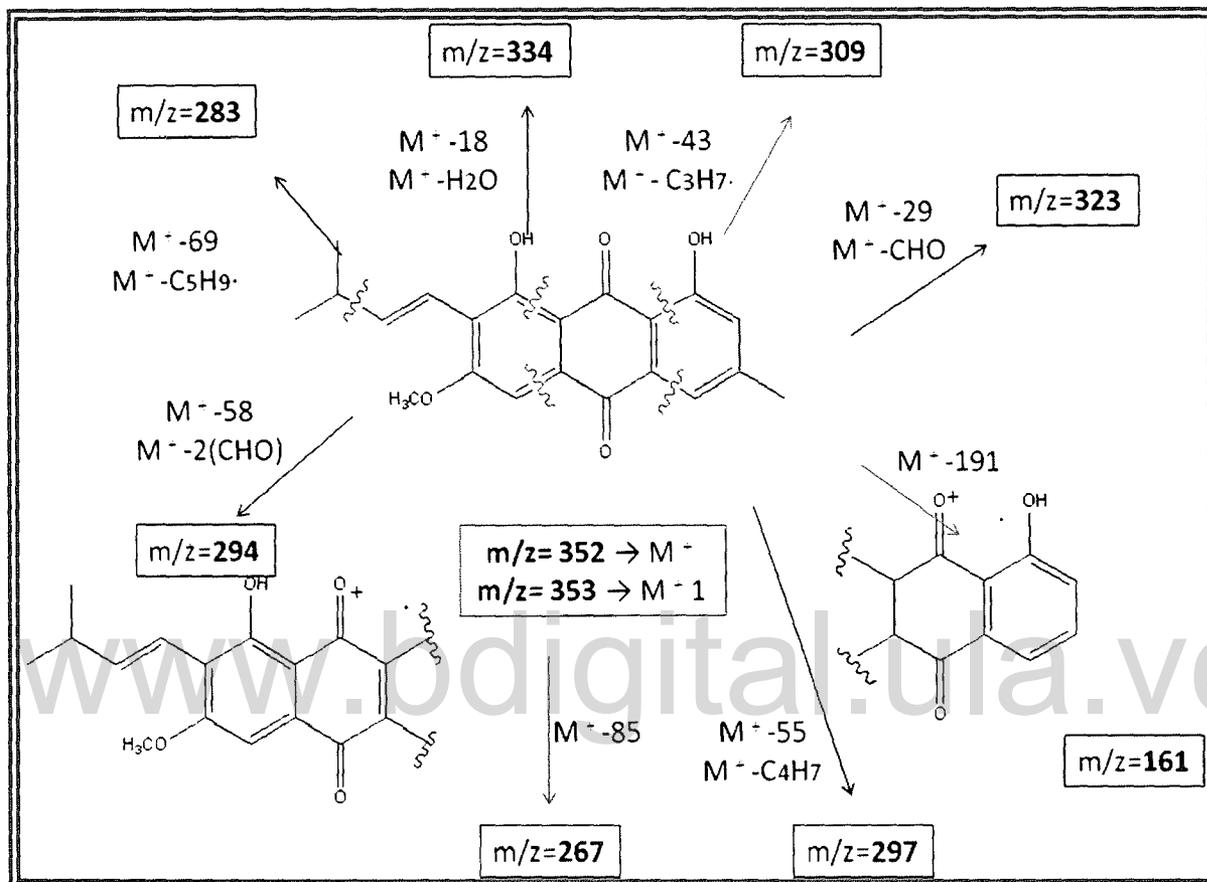


Figura N° 53. Propuesta de patrón de fragmentación del compuesto (6).

El espectro infrarrojo (IR) del compuesto (6) presentó bandas de absorción típicas de tensión O-H (3441cm^{-1}), =C-H (2953cm^{-1}), C=O (1627cm^{-1}), C=C (1627cm^{-1}), C-O-C simétrica (1220cm^{-1}) y asimétrica C-O-C (1034cm^{-1}). Las señales presentadas en la Tabla N° 19, indican la presencia de un carbonilo conjugado, ya que la banda de tensión C=O se desplaza a número de onda más bajo, el espectro también refleja al menos un doble enlace C=C, la presencia de carbonos aromáticos y las dos bandas representativas que indican la presencia de un grupo etéreo. La Tabla N° 17 resume la información del espectro Infrarrojo del compuesto (6) y de los datos reportados en la bibliografía para la Vismiaquinona aislada de *V. reichardtiana* (Goncalvez et al., 1981) y *V. japurensis* (Miraglia

et al., 1981), mostrando profundas similitudes en los números de onda reportado para las señales de cada uno de los espectros.

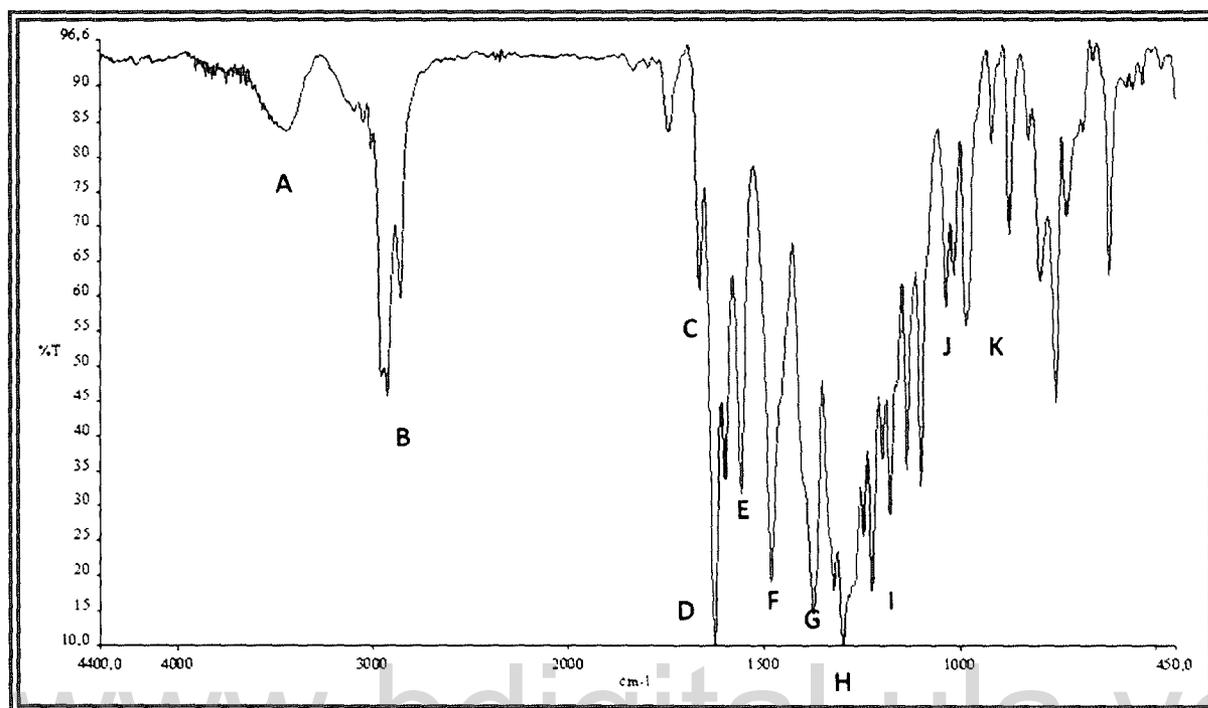


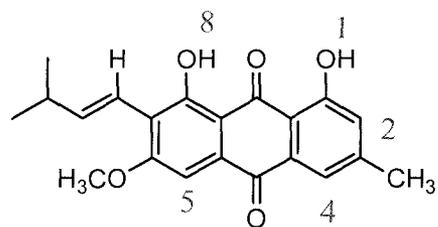
Figura N° 54. Espectro infrarrojo (KBr) del compuesto (6).

Tabla N° 17. Información de espectro infrarrojo del compuesto 6 y datos reportados en la bibliografía para la Vismiaquinona

Señal	T%	Asignación	$U_{max.}$ (6)(cm^{-1})	$U_{max.}(cm^{-1})(a)$ Vismiaquinona <i>V. reichardtiana</i>	$U_{max.}(cm^{-1})(b)$ Vismiaquinona <i>V. japurensis</i>
A	84	Tensión O-H	3441	3400	-
B	47	Tensión C-H	2953	2932	-
C	60	-	1651	1667	1667
D	10	Tensión C=O	1627	1622	1625
E	29	Tensión C=C Aromático	1558	1558	1556
F	14	Deformación C-H Alcano	1470	1471	1475
G	13	-	1372	-	1372
H	14	Tensión Asimétrica C-O-C	1220	1220	1220
I	29	Tensión C-O	1174	1174	-
J	55	Tensión Simétrica C-O-C	1034	1031	1030
K	61	Deformación =C-H	961	971	969

Datos Reportados en: (a) Goncalvez et al 1981 (b) Miraglia et al 1981

El espectro ^1H -RMN del compuesto (6) (Figura N° 55) muestra dos señales singletes a campo bajo (12,95 y 12,10) ppm integrando para un hidrógeno cada una, correspondientes a los hidrógenos



hidroxílicos unidos a los carbonos 1 y 8 del núcleo antraquinona. El núcleo con mayor desplazamiento corresponde al hidrógeno sobre el carbono ocho, ya que, alfa a este carbono se encuentra una cadena alifática (grupo activante débil, dador por inducción) convirtiendo este centro

con mayor densidad electrónica que el carbono uno y por ende, frente a un campo magnético la señal aparecería a campo más bajo; sin embargo, la señal correspondiente al protón del hidroxilo sobre el carbono uno, no aparece muy lejos del desplazamiento anterior, pero ambos son diferentes en ambiente químico.

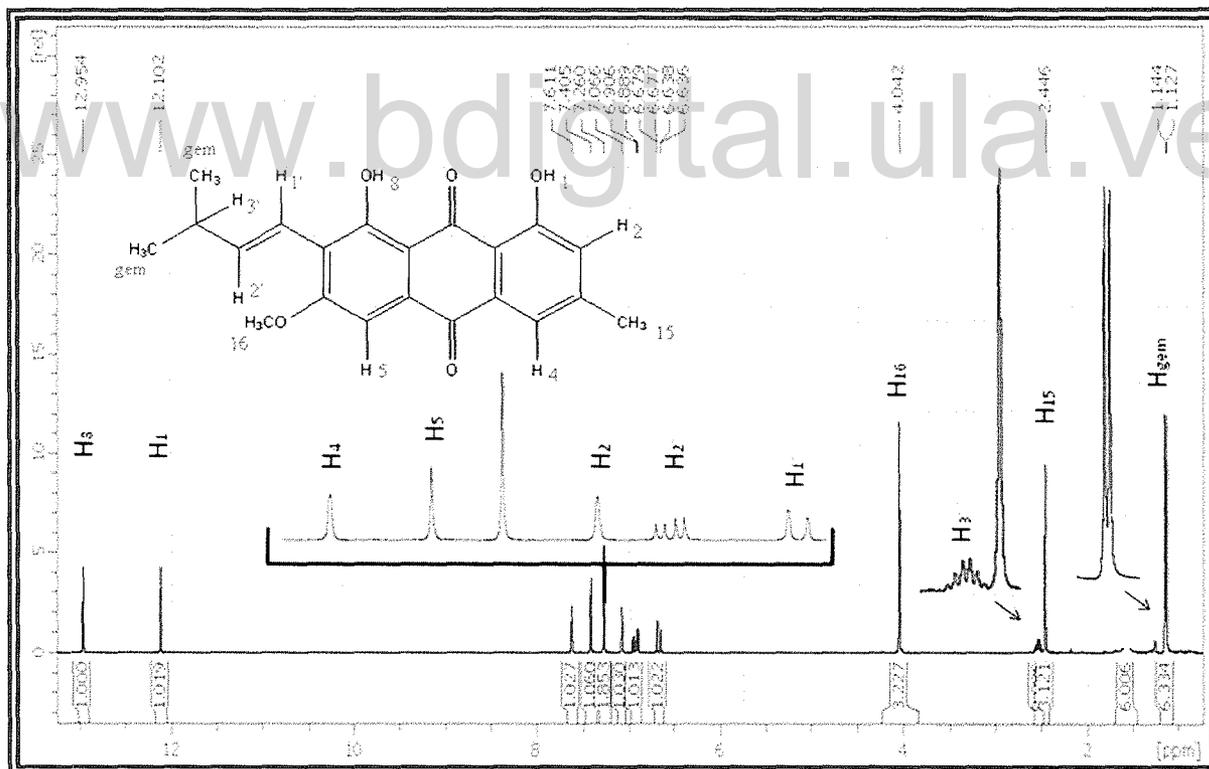
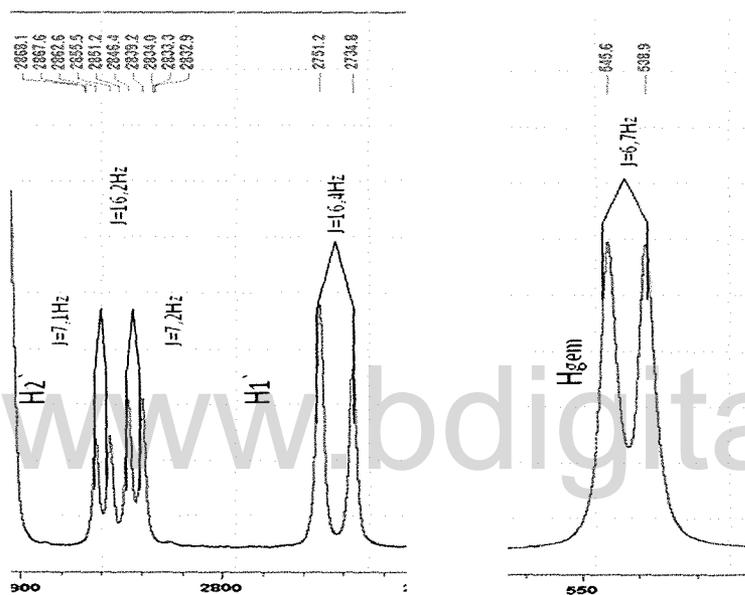


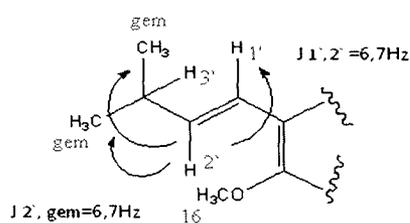
Figura N° 55. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto (6).

La tabla N° 18 resume los desplazamientos para cada hidrógeno junto a su multiplicidad, integral, constantes de acoplamiento y respectiva asignación para la molécula {1,8-dihidroxi-3-metil-7-(4'-metil-1-pentenil)-6-metoxi-antraquinona} o comúnmente llamada Vismiaquinona. Tres singletes aparecen en la zona de hidrógenos aromáticos (7,61; 7,41 y 7,07) ppm asignados a los hidrógenos sobre el carbono 4, 5 y 2, metinos aromáticos correspondientes a los dos anillos bencénicos que conforman el núcleo antraquinona.



Así mismo, en (7,10 y 6,88) ppm se encuentran dos señales respectivamente acopladas entre sí, doblete ($J= 16,4 \text{ Hz}$) y un doblete de doblete ($J= 7,2 \text{ Hz}$ y $J=16,2 \text{ Hz}$) que integra para los protones olefínicos de la cadena alifática que se encuentra sobre el carbono siete, particularmente los hidrogenos 1' y 2', lo que conforma un sistema típico AB propio de un par de hidrogenos vecinales acoplados, similar a esto

ocurre con una señal de doblete a campo alto (1,14ppm) integrando para seis hidrógenos pertenecientes a dos metilos geminales (H_{gem}) con una constante de acoplamiento $J=6,7 \text{ Hz}$.



La señal que se observa a un desplazamiento de 4,25 ppm concierne con protones que están muy cerca o son geminales a un grupo desapantallante, el cual fue asignado a un metóxilo sobre el C_6 aromático. Las señales a campo alto (2,48 y 2,42) ppm corresponden a un multiplete que se asume es H_3 vecino a los hidrogenos olefínicos de la cadena alquílica, y un singlete asignado a un metilo aromático sobre el carbono tres (H_{15}).

Tabla N° 18. Información de espectro ^1H -RMN del compuesto (6) y datos reportados en la bibliografía para la Vismiaquinona

δ (ppm)											
Compuesto 6	12,95	12,10	7,61	7,41	7,07	6,90	6,66	4,04	2,48	2,42	1,14
Integral	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	6
Multiplicidad	s	s	s	s	s	dd	d	s	m	s	d
J, Hz						16,2-7	16,4				7
Asignación	H ₈	H ₁	H ₄	H ₅	H ₂	H _{2'}	H _{1'}	H ₁₆	H _{3'}	H ₁₅	H _{gem}
δ (ppm) (a) Vismiaquinona <i>V. reichardtiana</i>	12,84	12,02	7,56	7,34	7,03	6,95 16-6,5	6,6 16	4,02	2,48	2,42	1,14 6,5
δ (ppm) (b) Vismiaquinona <i>V. japurensis</i>	12,87	12,07	7,55	7,34	7,02	6,95 16-6,5	6,61 16	4,0	2,6	2,41	1,13 7
δ (ppm) (c) Vismiaquinona <i>V. parviflora</i>	12,80	11,96	7,46	7,24	6,93	6,85 16,2-7	6,50 16,2	3,93	2,40	2,34	1,05 7
δ (ppm) (d) Vismiaquinona <i>V. guianensis</i>	12,89	12,06	7,55	7,46	7,00	6,81 16-7,2	6,59 16,3	3,98	2,40	2,38	1,07 6,7

Datos Reportados en: (a) Goncalvez et al 1981 (b) Miraglia et al 1981 (c) Nagen et al 1997 (d) Álvarez et al 2008.

El espectro ^1H , ^1H COSY, mostrado en la Figura N° 56 corrobora los acoplamientos establecidos entre los hidrógenos $\text{H}_{2'} \leftrightarrow \text{H}_{1'}$, $\text{H}_{2'} \leftrightarrow \text{H}_{\text{gem}}$ a través de sus constantes de acoplamientos y a su vez muestran las correlaciones $\text{H}_{2'} \leftrightarrow \text{H}_3$ junto con $\text{H}_{16} \leftrightarrow \text{H}_{\text{gem}}$.

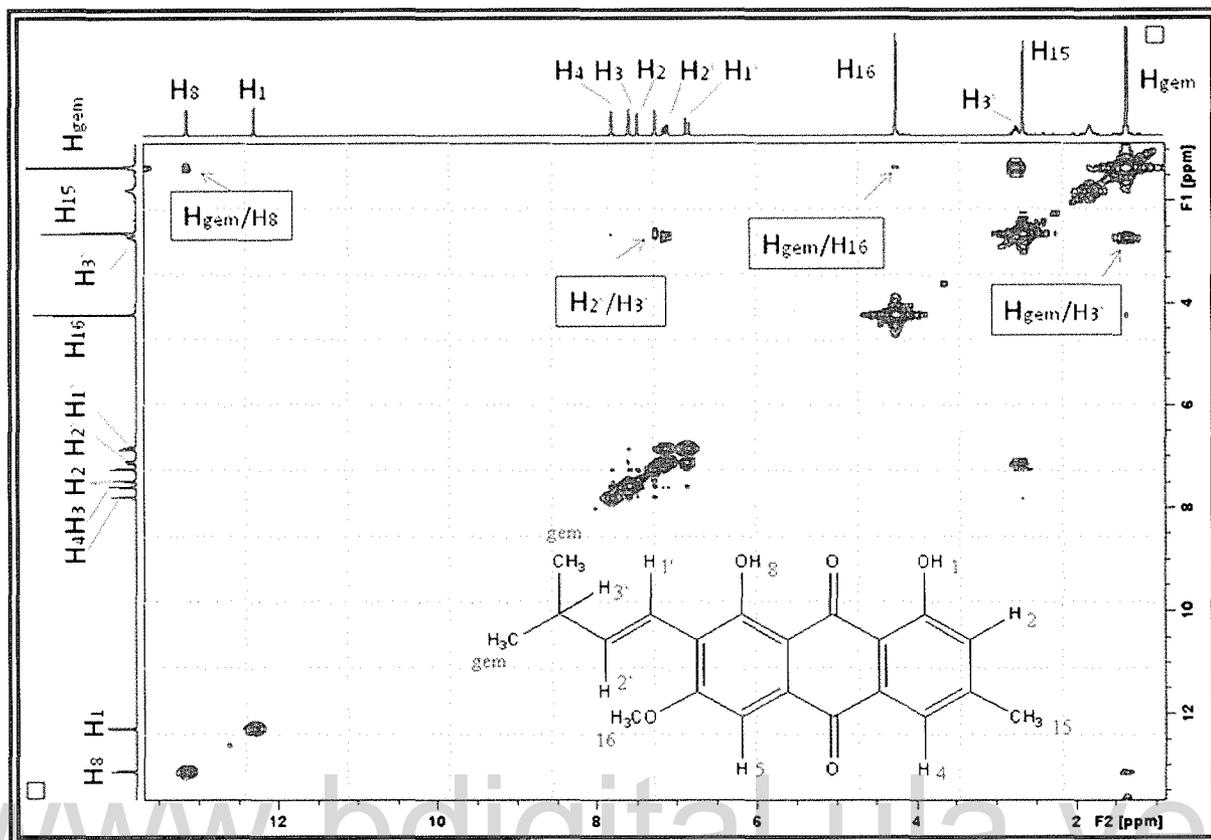


Figura N° 56. Espectro ^1H , ^1H COSY (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto (6).

En el espectro ^{13}C -RMN del compuesto (6) (Figura N° 57) de banda ancha, se perciben un total de 20 señales, cuyos desplazamientos químicos fueron comparados con los reportados por, Goncalvez *et al* 1981, Salas 2006, Nagen *et al* 1997 y Álvarez *et al* 2008; para la vismiaquinona aislada de *V. reichardtiana*, *V. baccifera* var. *dealbata*, *V. parviflora* y *V. guianensis* respectivamente y están resumidos en la tabla N° 19.

La información proporcionada por el espectro de RMN- ^{13}C junto con el DEPT-135 (Figura N° 58) se desglosa de la siguiente manera: tres señales de carbonos metílicos [δ 22.48 (C-15), δ 22,80 (C $_4$ y C $_5$) y δ 56,64 (C-16)], los dos primeros metilos geminales de una cadena alifática y el tercero como sustituyente aromático; seis carbonos terciarios [δ 147.08 (C-2'), δ 124,73 (C-2) y δ 121,43 (C-4), δ 116,16 (C-1') δ 103,72 (C-5) y δ 33,73 (C-3')] dos olefinicos, uno alifático y tres aromáticos; y once carbonos cuaternarios [δ 191.73 (C-9), δ 182,16 (C-10), δ 163,33 (C-1), δ 162.81 (C-6), δ 16.42 (C-

8), δ 148.75 (C-3), δ 133.56 (C-14), δ 132.41 (C-12), δ 120.37 (C-7), δ 114.07 (C-11), δ 110.80 (C-13)] dos carbonílicos, dos hidroxílicos y siete aromáticos.

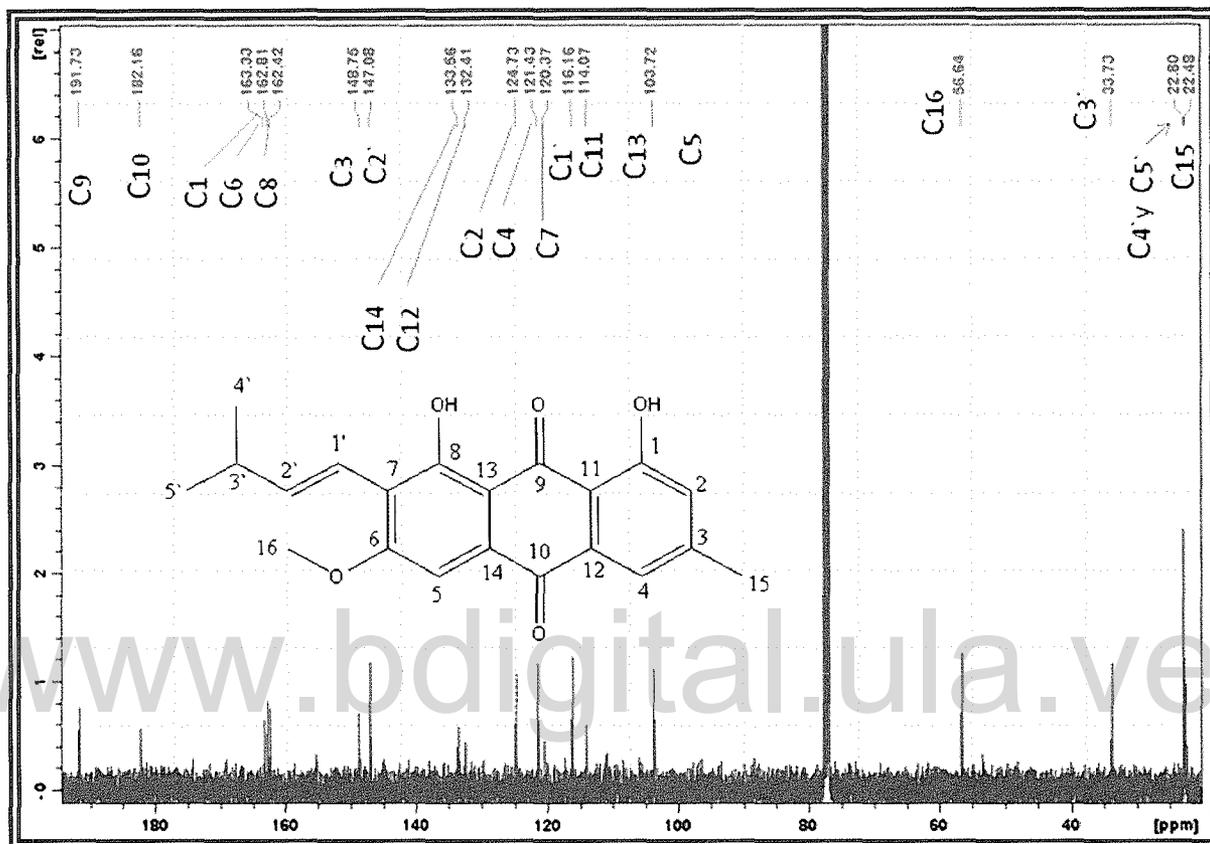


Figura N° 57. Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto (6).

Tal como se esperaba en el espectro DEPT-135 del compuesto (6) no se observan metilenos y las correlaciones $\text{C} \leftrightarrow \text{H}$ fueron corroboradas con el espectro HSQC (Figura N° 59) donde cada carbono está relacionado con su(s) respectivo(s) hidrogeno(s), confirmando la estructura propuesta para el compuesto como la vismiaquinona.

Tabla N° 19. Información de espectro RMN ¹³C del compuesto 6 (Vismiaquinona) y datos reportados en la bibliografía

N°	Carbono	δ (ppm)	Tipo de Carbono	Asignac.	δ (ppm) (a) Vismiaquinona <i>V. reichardtiana</i>	δ (ppm) (b) Vismiaquinona <i>V. baccifera</i> var. <i>dealbata</i>	δ (ppm) (c) Vismiaquinona <i>V. parviflora</i>	δ (ppm) (d) Vismiaquinona <i>V. guianensis</i>
1		163,33		C ₁	162,68	162,6	162,8	163,10
2		124,73		C ₂	124,19	124,6	124,3	124,80
3		148,75		C ₃	148,10	148,5	148,3	148,90
4		121,43		C ₄	120,88	121,3	121,0	121,50
5		103,72		C ₅	103,10	103,5	103,0	103,00
6		162,81		C ₆	162,20	163,2	161,9	162,90
7		120,37		C ₇	119,79	120,2	120,1	120,00
8		162,42		C ₈	161,80	162,2	162,3	162,50
9		191,73		C ₉	191,00	191,6	191,2	182,60
10		182,16		C ₁₀	181,40	182,0	181,7	191,11
11		114,07		C ₁₁	113,50	113,9	115,7	110,40
12		132,41		C ₁₂	131,72	133,4	132,0	131,90
13		110,80		C ₁₃	110,30	110,7	110,4	110,30
14		133,56		C ₁₄	132,90	132,2	133,0	133,00
15		22,48	-CH ₃	C ₁₅	22,10	22,3	22,2	22,60
16		56,64	OCH ₃	C ₁₆	56,20	56,5	56,2	56,70
17		116,16		C _{1'}	115,68	115,0	114,0	116,20
18		147,08		C _{2'}	146,48	145,9	146,6	147,20
19		33,73		C _{3'}	33,37	33,5	33,4	33,80
20y21		22,80	2xCH ₃	C _{4y5'}	22,46	22,6	22,7	22,82

Datos Reportados en: (a) Goncalvez *et al* 1981 (b) Salas 2006 (c) Nagen *et al* 1997 (d) Álvarez *et al* 2008.

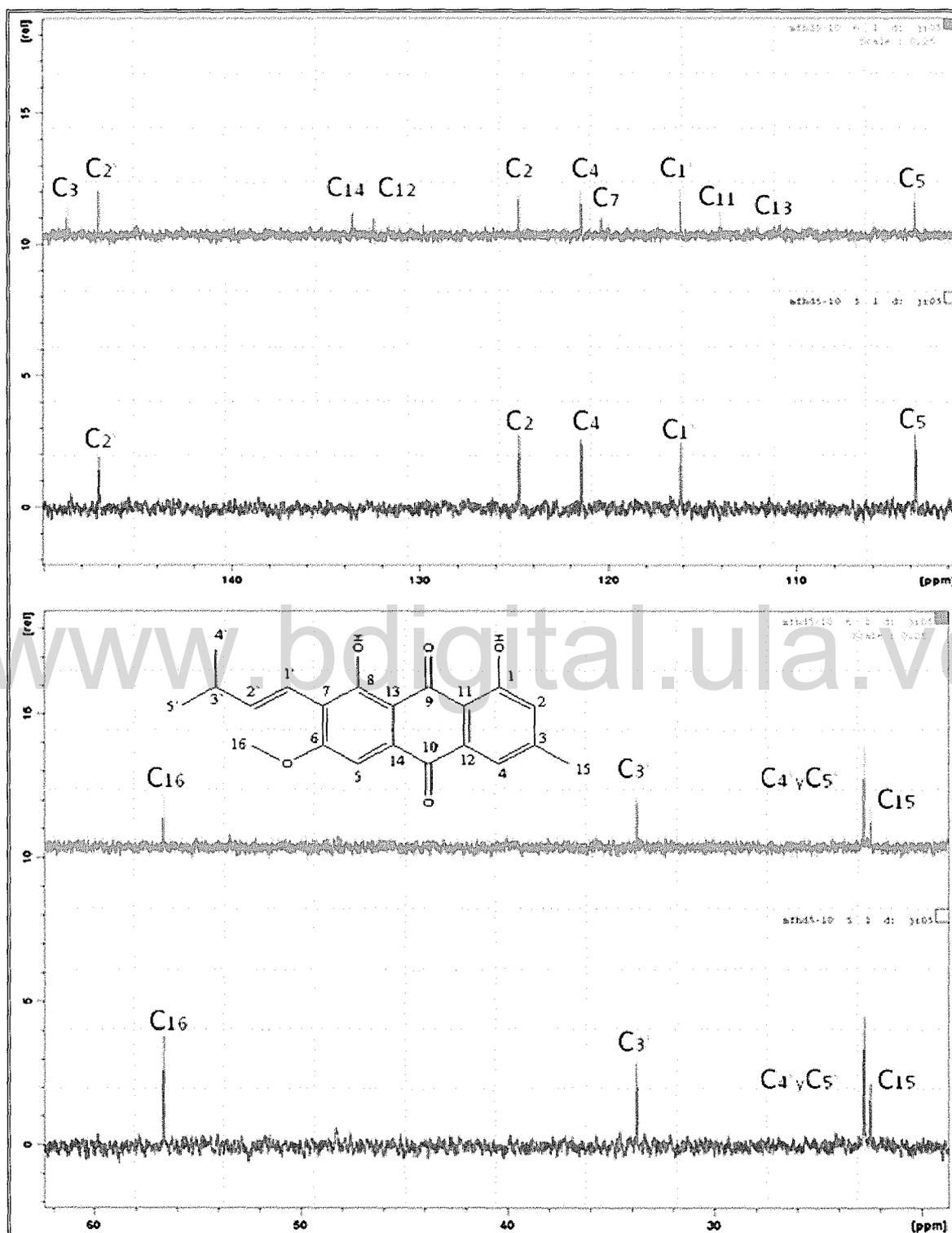


Figura N° 58. Espectro RMN- ^{13}C /DEPT-135 del compuesto (6)

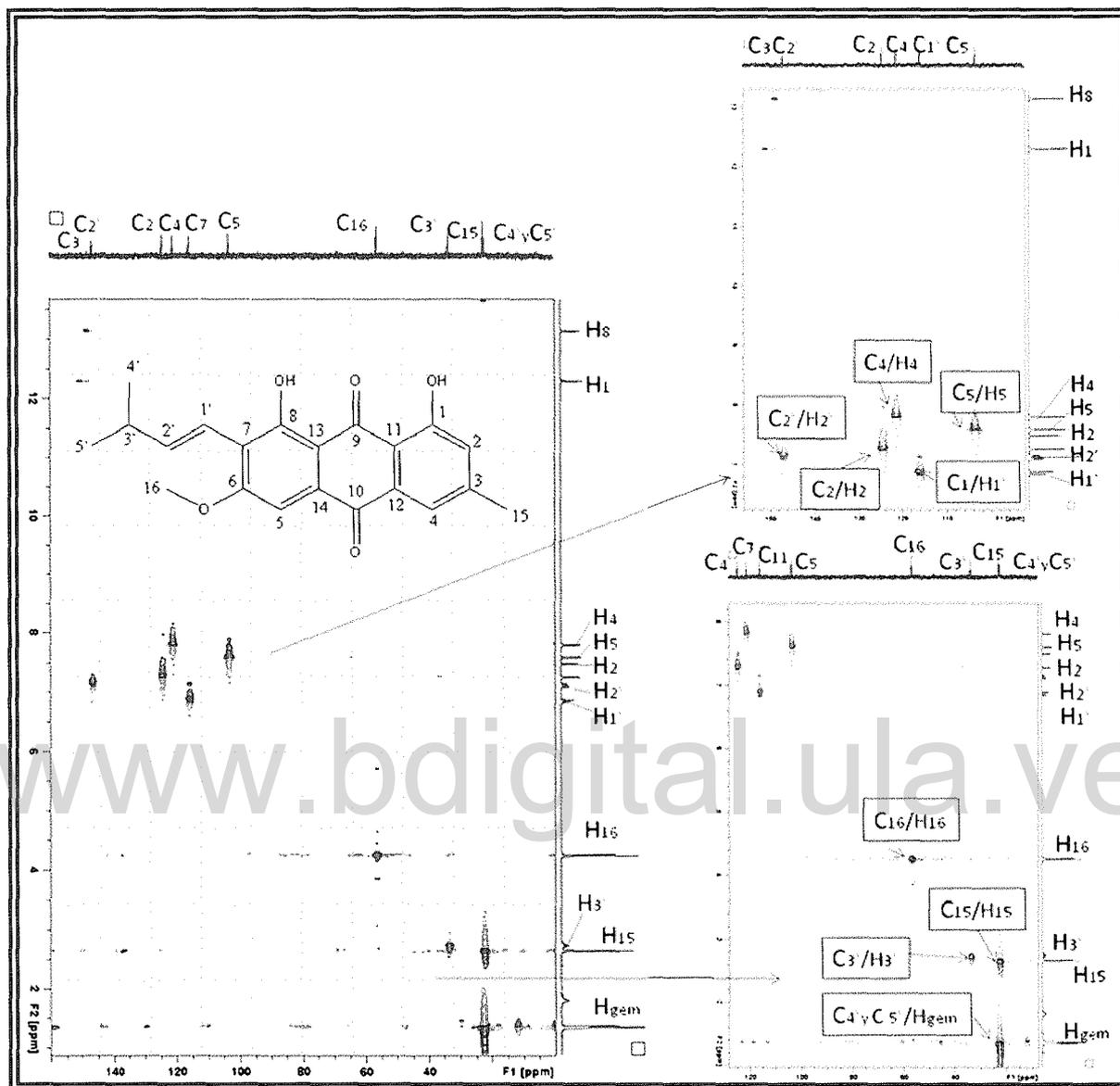


Figura N° 59. Espectro y ampliaciones HSQC (CDCl_3) del compuesto (6).

En el espectro HMBC del compuesto (6), (Figura N° 60) se pueden observar las correlaciones más importantes en la unión de un anillo antraquinónico como la posición de los grupos hidroxílicos sobre los carbonos 1 y 8 a través de las señales $\text{C}_1 \leftrightarrow \text{H}_1$ y $\text{C}_8 \leftrightarrow \text{H}_8$, de igual manera las señales que unen a los anillos aromáticos a través del carbono carbonílico 10 como lo son: $\text{C}_{10} \leftrightarrow \text{H}_5$ y $\text{C}_{10} \leftrightarrow \text{H}_4$.

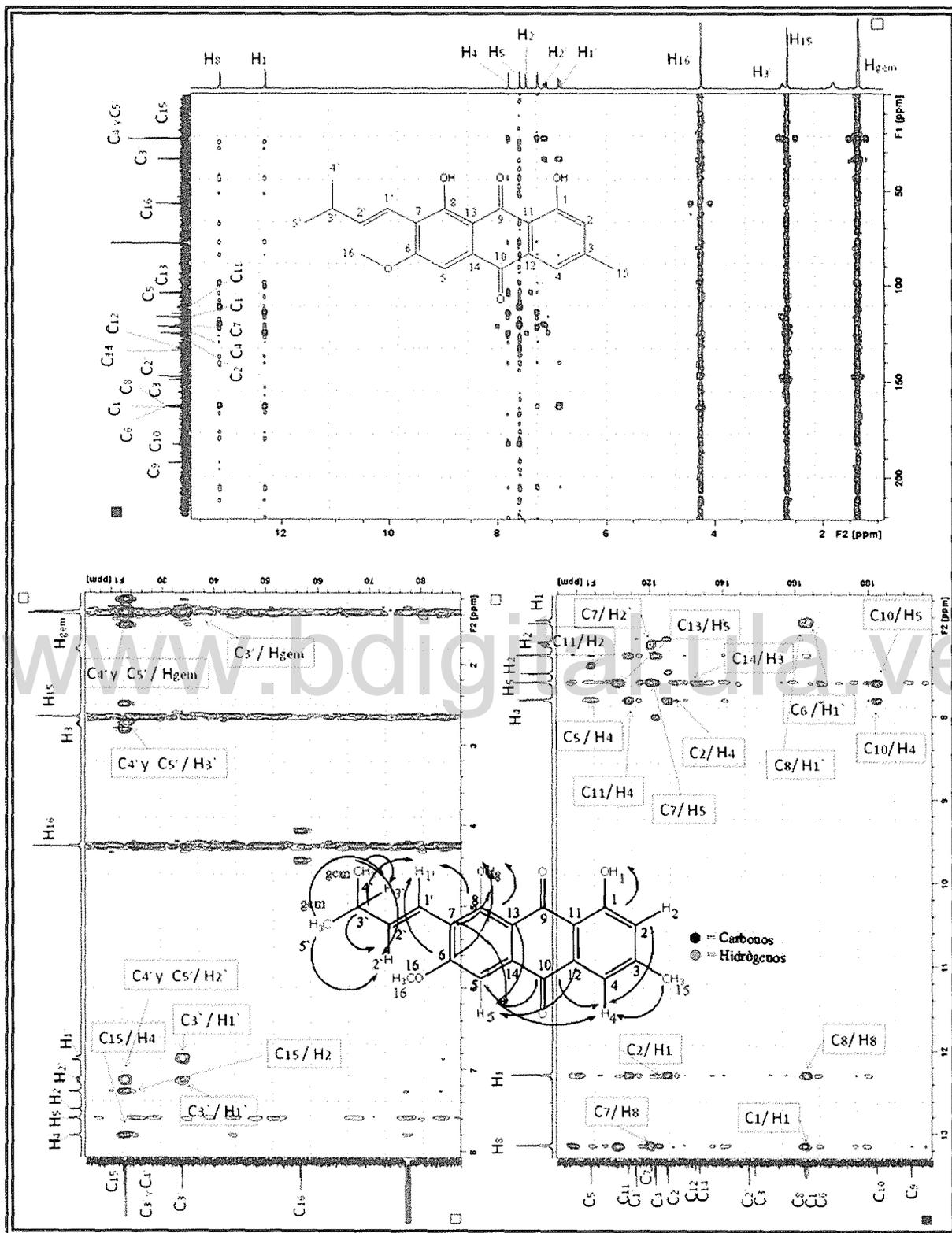


Figura Nº 60. Espectro HMBC y ampliaciones (CDCl₃) del compuesto (6).

Así mismo, se corroboró la posición de los sustituyentes de los carbonos 3,6 y 7 (metilo, metóxilo y cadena olefínica) a través de las correlaciones en el espectro HMBC del compuesto (6) como lo son: $C_{15} \leftrightarrow H_4$, $C_{15} \leftrightarrow H_2$, $C_6 \leftrightarrow H_{16}$ y $C_7 \leftrightarrow H_2$. El análisis y la interpretación de los espectros de Masas, IR, RMN- 1H y RMN- ^{13}C uni y bidimensionales, indican que el compuesto (6) aislado de los frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* es la antraquinona {1,8-dihidroxi-3-metil-7-(4'-metil-1-pentenil)-6-metoxi-antraquinona} o de nombre popular Vismiaquinona por ser un compuesto aislados del género *Vismia*.

Las Dantronas o 1,8 dihidroxiantraquinonas son de color amarillo claro y cuando están sustituidas por grupos auxocromicos, en una o más de sus ocho posiciones disponibles, especialmente las cuatro posiciones alfa a los carbonilos, se produce un incremento en la intensidad del color, el cual se desplaza de rojo intenso hasta negro cuanto mayor es el numero de grupos sustituyentes donadores de electrones, más profundo e intenso será el color. La sustitución en la posición alfa da más color que en la posición beta, debido a la interacción de un par de electrones no compartidos del grupo auxocromo quinónico, en este grupo se encuentra el Crisofanol, la Abeeemodina, el Ácido Parietínico y la Fisciona. (González et al; 1972). Por lo mencionado anteriormente, la Vismiaquinona posee en sus posiciones 1 y 8 dos grupos hidroxílicos que poseen electrones no compartidos dándole al núcleo quinónico mayor característica resonante por los dobles enlaces conjugados, este compuesto posee coloración naranja oscuro.

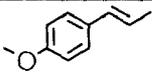
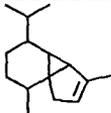
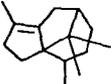
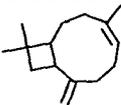
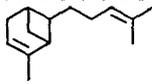
La Vismiaquinona fue aislada anteriormente en el género, en las especies de *V. reirchartiana* (Goncalves y Mors, 1981), *V. japurensis* (Miraglia et al., 1981), *V. martiana* (Nagen y Faria de Jesús, 1990), *V. parviflora* (Nagen y Faustino, 1997), *V. baccifera* (Hussein et al., 2003), *V. laurentii* (Nguemeving et al., 2006) y *V. baccifera* var. *dealbata* (Salas et al., 2008) por lo que era de esperarse encontrar tan popular pigmento dentro del género, en la especie bajo estudio; compuesto al que se le ha reportado propiedades antimicrobianas (Hussein et al., 2003 y Salas et al., 2008).

6.4.-Aceites esenciales

En la obtención de los aceites esenciales de corteza y frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, se produjo un rendimiento de 1,7mL (0,011%) para la corteza y 0,8mL (0,007%) para los Frutos. Los cuales fueron analizados utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

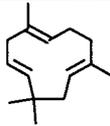
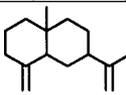
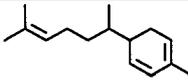
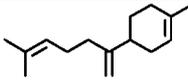
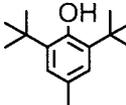
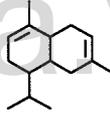
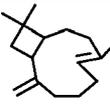
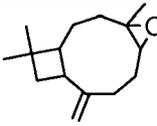
En los cromatogramas obtenidos se exteriorizaron (14) catorce componentes para la corteza y (56) cincuenta y seis componentes para los frutos. En la Tabla N° 20 se muestran las catorce sustancias reportadas por el cromatograma y listados de acuerdo al orden de elución, del aceite esencial obtenido de la corteza con sus respectivos índices de Kovats, que fueron calculados por comparación de los tiempos de retención de dichos componentes con los de una serie patrón de *n*-parafinas. También se muestran los valores publicados en la literatura (Adams, 2007) para confirmar la identificación por comparación de dichos compuestos.

Tabla N° 20. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*.

N°	Nombre	TR (min)	% en Mezcla	IK Calc.	IK Teórico	Estructura
1	trans- anetol	15,322	1,13	1295	1283	
2	α - cubebeno	18,213	1,35	1378	1351	
3	Cipereno	18,969	3,82	1397	1398	
4	β - cariofileno	19,581	26,45	1420	1418	
5	α - bergamoteno	20,049	2,34	1437	1436	

*(Adams, 2007)

Tabla N° 20. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Cont.)

N°	Nombre	TR (min)	% en Mezcla	IK Calc.	IK Teórico	Estructura
6	α - humuleno	20,619	5,68	1457	1454	
7	β - selineno	21,615	2,54	1491	1485	
8	α - zingibereno	21,830	12,56	1498	1498	
9	β - bisaboleno	22,257	2,86	1512	1509	
10	3,5- dibutil -4-hidroxi- tolueno	22,375	2,26	1516	1512	
11	β - cadineno	22,704	1,70	1527	1524	
12	trans- cariofileno	23.574	2,21	1554	1557	
13	óxido de cariofileno	24,464	31,40	1581	1581	
14	espiro [4.5] decano	25.212	3,71	1604	-	

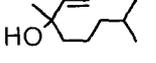
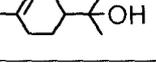
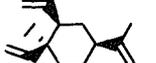
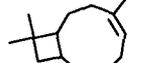
*(Adams, 2007)

Las catorce sustancias volátiles mostradas en la Tabla N° 20, representan el 100% del aceite en su totalidad. Para cada uno de estos componentes se obtuvo un espectro de masas donde se compararon los fragmentos de las masas generadas por impacto electrónico, los cuales fueron cotejados con los que se encuentran en la librería digital Wiley, junto con los índices de Kovats, fue así como se logró la identificación de todos los componentes que conforman dicho aceite.

La composición química del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata* está basada en sesquiterpenos a excepción del alcano espiro [4.5] decano que se encuentra en menor proporción. Tres de los catorce componentes se encuentran mayoritariamente, dos de ellos de núcleo cariofilano como lo son, óxido de cariofileno 31,40% y β - cariofileno 26,45% y en menor porcentaje el α - zingibereno 12,56%; estas sustancias representan el 70,41% de la totalidad del aceite.

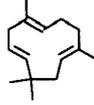
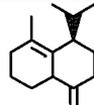
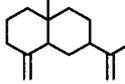
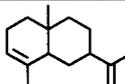
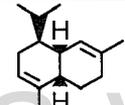
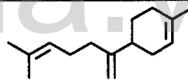
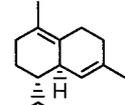
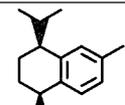
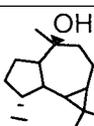
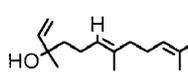
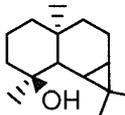
El aceite esencial de los frutos fue caracterizado de igual manera que el aceite esencial de corteza (Tabla N° 21). La composición química del aceite esencial de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, comprende cincuenta y seis (56) componentes reportados por el cromatograma y enumerados de acuerdo al orden de elución de la columna cromatográfica, junto con sus respectivos índices de Kovats, que confirmaron la identificación por comparación de cuarenta y seis (46) compuestos correspondientes al 86,21% de la totalidad del aceite.

Tabla N° 21. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*.

N°	Nombre	TR(min)	% en Mezcla	IK Cal.	IK* Teórico	Estructura
1	linalol	9,335	0,23	1100	1098	
2	α -terpineol	12,205	0,63	1190	1189	
3	β -elemeno	18,630	0,27	1389	1391	
4	β -cariofileno	19,491	0,78	1416	1404	
5	α -bergamoteno	19,968	0,30	1434	1436	

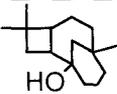
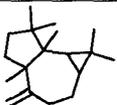
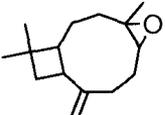
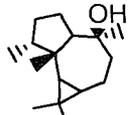
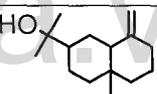
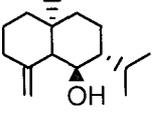
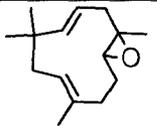
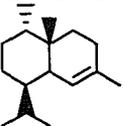
*(Adams, 2007)

Tabla N° 21. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Cont.)

N°	Nombre	TR(min)	% en Mezcla	IK Cal.	IK* Teórico	Estructura
6	α - humeleno	20,533	0,49	1454	1454	
7	γ -muuroleno	21,226	1,19	1478	1477	
8	β -selineno	21,529	2,10	1488	1485	
9	α -selineno	21,795	0,84	1497	1494	
10	α -muuroleno	21,943	0,77	1502	1499	
11	β -bisaboleno	22,175	0,56	1510	1509	
12	t-cadinene	22,353	1,12	1516	1513	
13	calameneno	22,618	0,78	1524	1532	
15	epiglobulol	23,686	0,35	1557	1552	
16	e- Nerolidol	23,775	0,30	1560	1561	
17	maaliol	23,914	0,95	1564	1566	

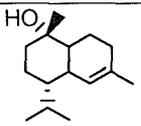
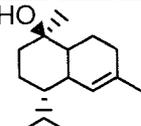
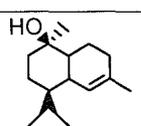
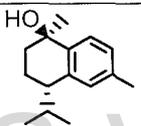
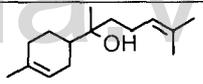
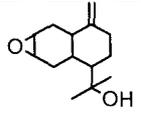
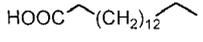
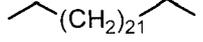
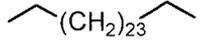
*(Adams, 2007)

Tabla N° 21. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Cont.)

N°	Nombre	TR(min)	% en Mezcla	IK Cal.	IK* Teórico	Estructura
18	alcohol de α -cariofileno	23,999	0,85	1567	1568	
20	(+) espatulenol	24,244	1,69	1574	1576	
21	(-) óxido de cariofileno	24,412	17,86	1579	1581	
22	viridiflorol	24,640	3,00	1586	1590	
23	β -eudesmol	24,919	1,06	1594	1594	
24	junenol	24,970	0,87	1599	1618	
25	1,5,5,8 tetrametil 12 oxabicyclo [9.1.0] dodeca 3,7 dieno	25,138	3,49	1601	1607	
26	epóxido de humuleno II	25,240	1,89	1605	1608	
27	fonenol	25,392	1,65	1612	1617	-
28	epi- α -cubenol	25,653	2,21	1623	1627	

*(Adams, 2007)

Tabla N° 21. Composición química e índices de Kovat (IK) del aceite esencial extraído de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Cont.)

N°	Nombre	TR(min)	% en Mezcla	IK Cal.	IK* Teórico	Estructura
31	τ -muurolol	26,054	9,52	1640	1641	
32	δ -cadinol	26,164	2,77	1644	1642	
33	α -cadinol	26,422	14,67	1655	1653	
34	cis-calamenen-10-ol	26,514	0,68	1659	1660	
38	α -bisabolol	27,156	0,45	1685	1683	
51	3 α -4 α -epoxi muurolanen -10- ol	33,344	1,05	1910	-	
53	ácido palmítico	34,319	7,06	1952	1950	
54	ácido oléico	38,295	0,79	2144	2141	
55	pentacosano	45,750	1,40	2502	2500	
56	heptacosano	49,456	1,59	2700	2705	

*(Adams, 2007).

Los compuestos identificados mostrados en la Tabla N° 21, para el aceite de frutos de la especie de *Vismia* en estudio, son óxido de cariofileno (17,86%), α -cadinol (14,67%), τ -muurolol (9,52%) y ácido palmítico (7,06%) correspondiente al 49,11% de la totalidad del aceite. A discrepancia del aceite de corteza, el aceite de frutos está constituido por diferentes familias químicas dentro de su composición, pero el grupo químico predominante sigue siendo el de los sesquiterpenos, seguidos

por derivados ácidos de cadenas largas y en menor número alcanos lineales de más de veinte carbonos.

Tal como se esperaba para ambos aceites y acorde a la bibliografía reportada en la Tabla N° 1, los compuestos mayoritarios en ambos aceites son sesquiterpenos de núcleo cariofilano, los dos aceites coinciden en la presencia de solo cinco compuestos sesquiterpenicos (óxido de cariofileno, β - cariofileno, α -bergamoteno, α -humuleno y β - bisaboleno) en porcentajes diferentes, esto sugiere que las plantas del género *Vismia* pueden requerir metabolitos secundarios similares para su interacción ecológica, posiblemente debido a factores ambientales comunes como temperatura, presión, depredadores y nutrientes, entre otros.

La obtención de ambos aceites constituye un aporte a la búsqueda de metabolitos para ser aplicados a la criterios de quimiotaxonomía, ya que la composición química de ambos aceites, son hasta la fecha estudiados por primera vez, lo que afinan la información disponible para pronosticar marcadores sistemáticos del género, herramienta útil en el área de fitoquímica, especialmente porque conduce a una comprensión más profunda de los factores fundamentales del desarrollo y diferenciación de las plantas.

6.5.-Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana observada por la prueba de difusión en agar con disco a través del método de Kirby-Bauer, fue confirmada por la prueba de determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), para la cual se realizó una expansión del método cualitativo a diferentes concentraciones. Los resultados se muestran claramente para ambos ensayos en las Tablas N° 22 y 23.

Tabla N° 22. Resultados de la susceptibilidad antibacteriana de las sustancias provenientes de la corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*.

Microorganismos	Extractos				Aceites		Compuestos Identificados					Controles	
	EHC	EMC	EHF	EMF	AC	AF	1 y 2	3	4	5	6	DMSO®	Gentamicina®
Gram Positivas													
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19639	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Gram Negativas													
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 33787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(-) Ausencia de halo de inhibición, (+) Presencia de halo de inhibición, (EHC) Extracto hexanólico de corteza, (EMC) Extracto metanólico de corteza, (EHF) Extracto hexanólico de frutos, (EMF) Extracto metanólico de frutos, (1 y 2) Mezcla 70:30 de estigmastanos, (3) Lupeol, (4) Friedelina, (5) Epifriedelinol y (6) Vismiaquinona

Tabla N° 23. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de las sustancias provenientes de la corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*.

Microorganismos	Extractos				Aceites		Compuestos Identificados					Control
	EHC	EMC	EHF	EMF	AC	AF	1 y 2	3	4	5	6	Gentamicina®
Gram Positivas												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	40	40	200	-	8	40	40	1,6
<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	1,6
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	1000	1000	200	200	1,6	8	8	-	-	-	-	0,06
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	-	-	-	-	40	200	200	-	-	-	-	0,3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19639	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	0,3
Gram Negativas												
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	200	40	-	-	-	-	-	1,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	0,06
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	200	1000	200	200	8	40	-	-	-	-	8	0,3
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	200	1000	200	200	40	40	-	-	-	-	-	0,3
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	200	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 33787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8

(-) No actividad, (EHC) Extracto hexanólico de corteza, (EMC) Extracto metanólico de corteza, (EHF) Extracto hexanólico de frutos, (EMF) Extracto metanólico de frutos, (1 y 2) Mezcla 70:30 de estigmasteranos, (3) Lupeol, (4) Friedelina, (5) Epifriedelinol y (6) Vismiaquinona

Las sustancias en las que con mayor frecuencia se observó alguna actividad antibacteriana fueron los aceites esenciales –obtenidos por primera vez- y los extractos, en comparación con las sustancias puras obteniéndose una concentración mínima inhibitoria cercana al control positivo. Entre los extractos crudos la menor CMI fue de $200\mu\text{g}/\text{ml}$ y entre los compuestos identificados la

menor CMI exhibió un valor de 8 µg/ml, la cual fue observada al evaluar, Friedelina y Vismiaquinona contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* respectivamente. Aunque los ensayos se realizaron por triplicado la concentración correspondiente al halo más cercano al disco siempre resultó ser la misma, por lo que la desviación estándar, fue igual a cero.

La existencia de reportes de actividades antibacterianas de algunos compuestos obtenidos a partir del género *Vismia* confirman la evaluación realizada en el presente estudio, tal es el caso de la Friedelina y Vismiaquinona contra *Staphylococcus aureus* (Salas *et al.*, 2006, Kuete *et al.*, 2007 y Tamokou *et al.*, 2009) extraídos de hojas *V. baccifera* var. *dealbata*, *V. laurentii* y *V. rubescens* y la actividad de aceites esenciales extraídos del género con una composición química similar en sesquiterpenos de frutos de *V. baccifera* y *V. guianensis* (Rojas *et al.*, 2011, Silvestre *et al.*, 2012).

Los mecanismos de acción antimicrobianos conocidos, asociados a cada uno de los grupos químicos a los que pertenecen los compuestos aislados, podrían explicar la potencia antimicrobiana de las sustancias bajo estudio que mostraron halo de inhibición alrededor del disco. La disrupción de la membrana podría ser sugerida como uno de los probables mecanismos de acción para compuestos que pertenecen a la familia de los triterpenos (Cowan, 1999; Arvindet *al.*, 2004). Por otra parte las xantonas y antraquinonas son conocidas por acomplejar irreversiblemente a nucleófilos aminoácidos en las proteínas, que conduce a la inactivación de las mismas y a la pérdida de sus funciones (Stern *et al.*, 1996).

El hecho de que *Vismia baccifera* var. *dealbata* contenga de forma natural una amplia gama de principios activos que podrían explicar el importante espectro antimicrobiano de las diferentes sustancias extraídas de la corteza y frutos de esta especie, proporcionan una base importante para el uso de las mismas en el tratamiento de las infecciones asociadas a los microorganismos estudiados en esta evaluación. Los extractos crudos así como los aceites esenciales y los compuestos aislados podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se requerirían de nuevos estudios farmacológicos y de toxicidad.

6.6.-Evaluación de la actividad antifúngica

En los ensayos antifúngicos cualitativos realizados tanto con los extractos hexanólicos y metanólicos, como con las seis (6) sustancias identificadas puras y en mezcla (mezcla de estigmastanos (30:70) estigmasterol/ β -sitosterol (1 y 2) junto con las sustancias puras lupeol (3), friedelina (4), epifriedelinol (5) y vismiaquinona (6)) no se observó presencia de zona de inhibición alrededor del disco, con lo cual se demuestra que no tienen actividad antifúngica contra las especies de levaduras evaluadas. El hecho de no observar actividad antifúngica con las sustancias friedelina (4) y epifriedelinol (5), era un resultado de esperar, debido a que esta observación ya ha sido reportada anteriormente por Tamokou *et al.*, 2009. Al evaluar dichas sustancias extraídas a partir de *V. guineensis*. Tampoco hubo actividad antifúngica con sustancias como la vismiaquinona (6) y algunos extractos alcohólicos, aunque era de esperarse alguna actividad antifúngica, ya que esta ha sido reportada en el 2008 para *V. guineensis* (Mbaveng *et al.*, 2008). Además, en el presente estudio, tampoco se observó actividad antifúngica con lupeol (3) y la mezcla de esteroides (1 y 2).

Tabla N° 24. Actividad antifúngica de los aceites esenciales de la corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*.

Micro-organismo	Ensayo Cualitativo				Ensayo Cuantitativo			
	Zona de inhibición (mm)				CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	Aceites esenciales		Controles Positivos		Aceites esenciales		Controles Positivos	
	Corteza	Fruto	Fluconazol®	Ketocanazol®	Corteza	Fruto	Fluconazol®	Ketocanazol®
<i>C. albicans</i>	8,3 \pm 0,6	-	53 \pm 1	51 \pm 1	1000	-	1,6	1,6
<i>C. glabrata</i>	11,7 \pm 0,6	-	20,6 \pm 1,2	36 \pm 1	200	-	0,32	1,6
<i>C. tropicalis</i>	8 \pm 0	9,7 \pm 1,5	41,7 \pm 2,1	49,3 \pm 1,2	>1000	200	1,6	8
<i>C. krusei</i>	9,3 \pm 1,3	10 \pm 1,0	49,7 \pm 0,6	44,3 \pm 0,6	1,6	8	8	8
<i>C. parapsilosis</i>	11,3 \pm 0,6	-	23,7 \pm 2,5	32,7 \pm 1,5	>1000	-	8	1,6
<i>C. neoformans</i>	10,3 \pm 2,1	8,3 \pm 0,6	39 \pm 1	49 \pm 0	>1000	200	0,32	1,6

Estos resultados se pudieran explicar a través de varios factores como pueden ser: el grado de pureza de los compuestos aislados, diferencias en la composición química de los extractos obtenidos en el presente estudio con respecto a los reportados y por último, a diferencias en los métodos de evaluación utilizados.

En este trabajo, al evaluar los aceites esenciales provenientes de la corteza y de los frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* (AC y AF), en su mayoría, mostraron tener alguna actividad inhibitoria contra las cepas de referencia; tal como se puede observar en la tabla N° 24 en cuyo ensayo cualitativo los halos de inhibición estuvieron comprendidos entre 8 y 12 mm de diámetro.

Existen diversos reportes de la actividad antifúngica que presentan los aceites esenciales, extraídos de diversas fuentes, contra cepas del reino Fungi (Wilson *et al.*, 1997, Gogoi *et al.*, 1997, Pitarokili *et al.*, 1999, Barrera *et al.*, 2008). No obstante, uno de los primeros reportes de aceite esencial con actividad antifúngica, extraído a partir de especies del género *Vismia* fue el realizado por Silvestre y colaboradores en el año 2012. En el mismo, dichos autores extrajeron el aceite esencial a partir de las hojas de *V. guianensis*, por la técnica de hidrodestilación; encontrando que dicho aceite tenía actividad contra las levaduras de las especies *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Este aceite posee componentes sesquiterpénicos, dentro de los cuales los que se presentan en mayor proporción son del núcleo cariofilano y cadinano (β -cariofileno y γ -cadineno), al igual que los evaluados en el presente estudio donde los mayoritarios son óxido de cariofileno (24,46%) y β -cariofileno (19,58%) para corteza y óxido de cariofileno (17,86%) y α -cadinol (14,67%) para los frutos.

La actividad antifúngica observada con los aceites esenciales podría deberse a la mayoría de los componentes comunes mencionados anteriormente para los aceites esenciales obtenidos a partir del género *Vismia*. Se podría decir que posiblemente esté presente una actividad sinérgica, por tratarse de una mezcla de compuestos de sustancias presentes en la mezcla volátil, en este caso, obtenida tanto para la corteza como los frutos. Sin embargo, como se puede observar en los resultados presentados en la tabla, en los ensayos cualitativos los aceites esenciales presentan un halo de inhibición considerablemente cercano al diámetro del disco y menor que los antifúngicos de referencia. Este hecho promovió que en el desarrollo del ensayo cuantitativo no se impregnaran discos de papel de filtro, por el contrario se colocó una microgota directamente sobre la superficie del medio de Müller Hinton modificado, tal como lo realizó Lizcano *et al.*, 2012 por el método que denominaron "Spot on a law".

Como se puede observar, en el caso del aceite esencial de la corteza contra *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. neoformans*, la CMI resultó ser mayor que la mayor concentración ensayada en este estudio (>1000 µg/mL), concentración que se encuentra fuera de los rangos comúnmente establecidos para actividad de aceites extraídos de plantas.

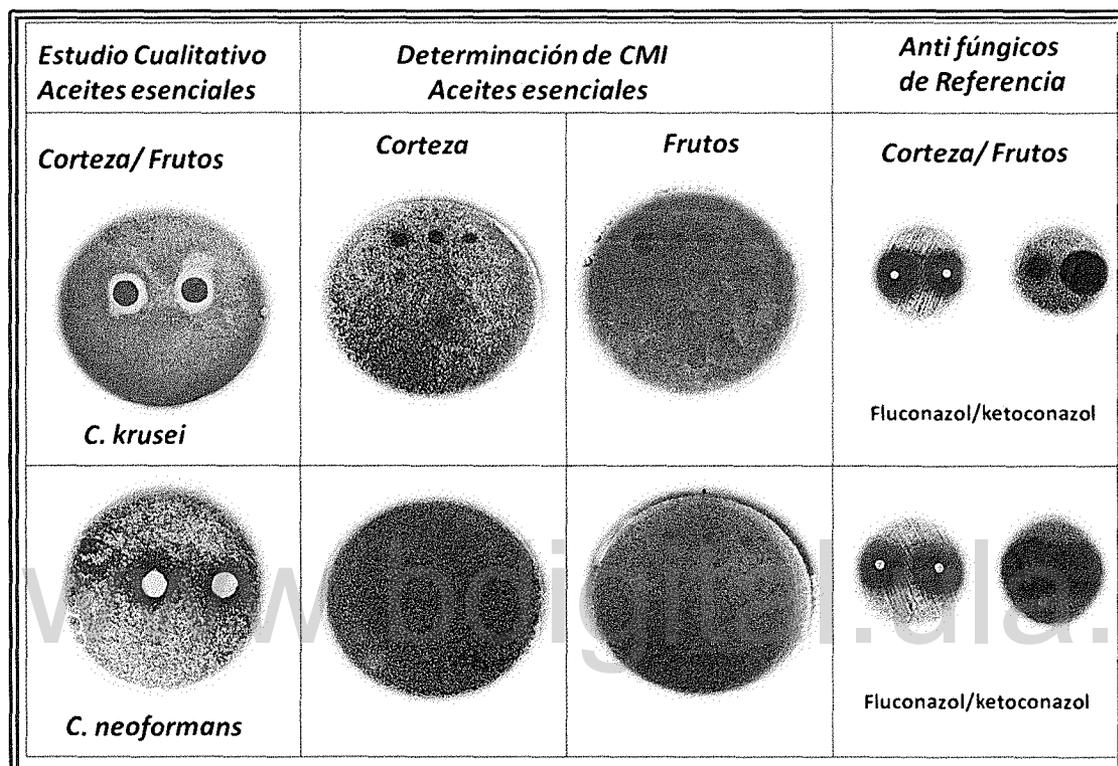


Figura N° 61. Resultados del ensayo antifúngico.

Por otra parte, se puede ver en la tabla N° 26, la menor CMI obtenida con los aceites esenciales de corteza y de frutos, fue contra *C. krusei* (1,6 y 8) µg/mL, respectivamente, con una concentración similar a la ensayada con los antifúngicos de referencia, Fluconazol® y Ketoconazol® (Figura N° 61). Este resultado representa una derivación importante ya que el desarrollo de resistencia a los azoles es un fenómeno bien conocido en los hongos del género *Candida* y muy en particular, la presencia de resistencia intrínseca de *Candida krusei* a este tipo de antifúngicos. (Bedout et al., 2003)

Cabe mencionar que dentro del género *Vismia*, se ha realizado un estudio cualitativo de la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Vismia guianensis* (Lizcano et al., 2012),

encontrándose cierta actividad contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* y *C. neoformans*, este estudio compone el primero reportado, convirtiendo recientemente a los aceites del género en una fuente de estudios para esta rama biológica, por su parte, dentro de los aceites de la especie, los presentados en esta investigación constituyen los primeros con evaluación antimicrobiana pertenecientes al reino fungí, que es más complejo que el reino de las bacterias, siendo estos aceites los primeros en ser evaluados como antifúngicos dentro de la especie, representando un aporte inestimable en cuanto a actividades biológicas de productos naturales.

Por lo antes expuesto en el presente trabajo y debido a los múltiples estudios que se han reportado en los últimos años con respecto a la aparición de cepas de levaduras resistentes a los antifúngicos comunes, como los azoles, se podría decir que los aceites esenciales extraídos a partir de la corteza y del fruto de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, alcanzarían a constituir una alternativa en la búsqueda de tratamientos para infecciones fúngicas producidas por levaduras del género *Candida*.

www.bdigital.ula.ve

6.7.-Evaluación de la actividad antioxidante

El método utilizado en este ensayo se basó en la reducción de la absorbancia de la solución en metanol de DPPH• en presencia de las sustancias extraídas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* quienes de ser o poseer sustancias capaces de donar hidrógeno y generar la forma no radicalaria DPPH-H, se considerarían sustancias con actividad antioxidante. La tabla N° 25 muestra los cambios en absorbancia por triplicado, de cada una de las sustancias evaluadas a 1000 µg/mL, así como también el porcentaje de capacidad secuestrante de radicales libres promedio junto con su desviación estándar.

Tabla N° 25. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de la capacidad secuestrante de radicales libres (CSRL) para las sustancias obtenidas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* a 1000µg/mL.

Determinación de la Capacidad Secuestrante de Radicales Libres (CSRL).			
Muestra	Absorbancia a los 30 min	CSRL (%)	(CSRL _{Promedio} ±σ)%
EHC	0,366	26,21	26,27 ± 0,91
	0,361	27,21	
	0,370	25,40	
EMC	0,161	67,54	67,74 ± 0,20
	0,159	67,94	
	0,160	67,74	
EHF	0,409	17,54	16,53 ± 1,01
	0,419	15,52	
	0,414	16,53	
EMF	0,247	50,20	51,07 ± 0,81
	0,239	51,81	
	0,242	51,20	
AC	0,390	21,37	20,89 ± 1,00
	0,398	19,75	
	0,389	21,57	
AF	0,430	13,30	13,44 ± 0,62
	0,426	14,11	
	0,432	12,90	
(1 y2)	0,472	4,83	5,71 ± 0,91
	0,468	5,65	
	0,463	6,65	
(3)	0,455	8,26	6,99 ± 1,71
	0,458	7,66	
	0,471	5,04	

Extracto hexanóico de corteza (EHC), Extracto metanólico de corteza (EMC), Extracto hexanóico de frutos (EHF), Extracto metanólico de frutos (EMF), Aceite esencial de corteza (AC), Aceite esencial de frutos (AF), mezcla de esteroides de núcleo estigmastano(70:30) (1 y 2), lupeol (3), friedelina (4), epifriedelinol (5) y vismiaquinona (6)

Tabla N° 25. Evaluación de la Actividad Antioxidante y Determinación de la Capacidad Secuestrante de Radicales libres (CSRL) para las sustancias obtenidas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* a 1000µg/mL. (Cont.)

Determinación de la Capacidad Secuestrante de Radicales Libres (CSRL).			
Muestra	Absorbancia a los 30 min	CSRL (%)	(CSRL _{Promedio} ±σ)%
(4)	0,454	8,47	6,72 ± 1,93
	0,473	4,64	
	0,461	7,06	
(5)	0,473	4,64	4,83 ± 0,93
	0,476	4,03	
	0,467	5,85	
(6)	0,455	8,27	6,92 ± 1,83iu
	0,458	7,66	
	0,472	4,84	
Acido Ascórbico ®	0,018	96,37	96,37 ± 0
	0,018	96,37	
	0,018	96,37	
DPPH•	0,496	-	-

Extracto hexanólico de Corteza (EHC), Extracto Metanólico de Corteza (EMC), Extracto Hexanoico de Frutos (EHF), Extracto Metanólico de Frutos (EMF), Aceite esencial de Corteza (AC), Aceite esencial de frutos (AF), mezcla de esteroides de núcleo Estigmastano(70:30) (1 y 2), Lupeol (3), Friedelina (4), Epifriedelinol (5) y Vismiaquinona (6)

Tal como muestra la tabla N° 25, las sustancias con mayor participación de capacidad secuestrante de radicales libres, corresponden a los extractos metanólicos de corteza y fruto, seguido por los extractos hexanólicos, los aceites esenciales y el menor porcentaje a las sustancias puras. Estos resultados son predecibles tanto para las sustancias puras como para los aceites esenciales donde se conoce la composición química de los mismos en gran parte, pues la mezcla de esteroides, los terpenos de núcleo friedelano, el lupeol y la vismiaquinona no muestran una excelente actividad inhibidora del radical DPPH• por tanto las especies no son consideradas agentes reductores, ya que dentro de su estructura química no poseen electrones donantes a la especie radicalaria utilizada en el estudio.

Por otra parte en los extractos, la actividad antioxidante es más difícil de predecir, debido a que la misma podría estar constituida por las actividades individuales de cada uno de los compuestos presentes en dicho extracto o inhibida bajo el mismo concepto. Los compuestos proporcionan sus efectos antioxidantes, a través de diferentes mecanismos tales como la captación de radicales, la actividad quelante de metales, la inhibición de lípidos, peroxidación o enfriamiento rápido de oxígeno singlete.(Bergman *et al.*, 2001).

Los resultados usando este ensayo, mostraron una propiedad antioxidante en los extractos metanólicos tanto de corteza como de frutos a la concentración bajo estudio, cerca del 50%, por lo que se procedió a medir la absorbancia a concentraciones superiores e inferiores a 1000 µg/mL, para realizar un estudio de porcentaje de reducción de la especie DPPH• en función de la concentración de ambos extractos obtenidos de la especie de *Vismia* y así determinar gráficamente la concentración en µg/ml de la muestra requerida para inhibir la formación de radicales DPPH• en un 50%. En la Tabla N° 26, se registran las absorbancias por triplicado, de los extractos metanólicos a diferentes concentraciones, así como también el porcentaje de capacidad secuestrante de radicales libres promedio junto con su desviación estándar para los mencionados extractos.

Tabla N° 26. Determinación de la capacidad secuestrante de radicales libres (CSRL) para los extractos metanólicos de corteza y frutos obtenidos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* a diferentes concentraciones.

Cantidad (µg/mL)	Absorbancia de EMF	Absorbancia de EMC	CSRL% de EMF	CSRL% de EMC	(CSRL _{Promed±σ})%EMF	(CSRL _{Promed±σ})%EMC
1200	0,199	0,091	59,87	81,65	61,09±1,22	82,53±1,18
	0,187	0,089	62,30	82,06		
	0,193	0,080	61,09	83,87		
1100	0,201	0,117	59,47	76,41	58,33±1,03	77,21±0,92
	0,211	0,114	57,46	77,01		
	0,208	0,108	58,06	78,22		
1000	0,251	0,162	49,40	67,34	49,73±0,38	67,74±0,40
	0,250	0,158	49,60	68,15		
	0,247	0,160	50,20	67,74		
900	0,291	0,199	41,33	59,87	42,27±1,02	61,09±1,21
	0,287	0,187	42,14	62,30		
	0,281	0,193	43,35	61,09		
800	0,309	0,241	37,70	51,41	39,96±0,95	50,26±2,2
	0,311	0,259	37,30	47,78		
	0,318	0,249	35,89	51,61		
700	0,352	0,311	29,03	37,30	27,75±1,22	37,03±1,22
	0,364	0,307	26,61	38,10		
	0,359	0,319	27,62	35,69		
Acido Ascórbico®	0,018		96,37		96,37±0	
	0,018		96,37			
	0,018		96,37			
DPPH•	0,496		-		-	

Extracto metanólico de corteza (EMC), Extracto metanólico de frutos (EMF), Capacidad secuestrante de radicales libres (CSRL).

Los compuestos presentes en los extractos estudiados fueron buenos donantes de electrones, y según lo expuesto por el protocolo, son capaces de terminar la reacción en cadena por radicales mediante la conversión en productos más estables. De la tabla N° 26 se deduce que mientras la concentración va en aumento el porcentaje de reducción es mayor. La Figura N° 62 pauta los porcentajes de reducción del radical DPPH• a diferentes concentraciones donde los puntos describen una trayectoria lineal con pendiente positiva y donde se consiguió determinar gráficamente la concentración a la cual los extractos inhiben la formación de radicales en un 50%.

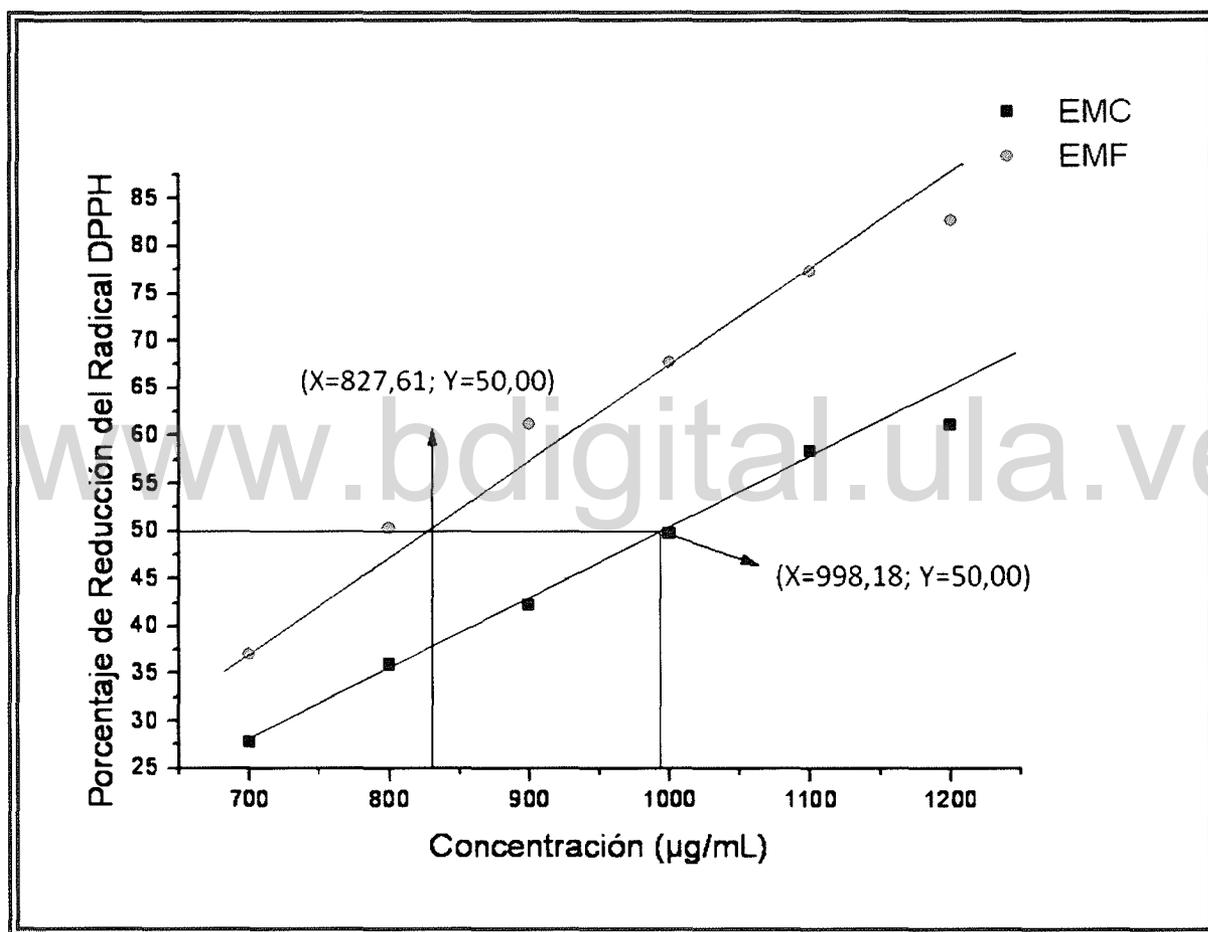


Figura N° 62. Determinación del porcentaje de reducción medio del DPPH• (IC₅₀) para EMC y EMF.

La Tabla N° 27 reúne los datos obtenidos del análisis de regresión lineal del estudio de las rectas visualizadas en la Figura grafica N° 62 en donde se determina a través de una extrapolación al eje X de concentraciones, que la magnitud a la cual el extracto metanólico de corteza y el extracto metanólico de frutos es capaz de inhibir el 50% de los radicales DPPH• es (998,18±187)µg/mL y (827,61±187)µg/mL respectivamente, concentraciones superiores a las reportadas para el extracto

metanólico de *Vismia guianensis*. (Álvarez et al., 2008) las cuales superan considerablemente al testigo, Acido ascórbico®.

Tabla Nº 27. Datos obtenidos del análisis de regresión lineal en la determinación gráfica del porcentaje de reducción medio del DPPH• (IC₅₀) para EMC y EMF

Determinación Gráfica del Porcentaje de Reducción medio del DPPH• (IC ₅₀) para EMC y EMF		
Regresión Lineal	EMC	EMF
Punto de Corte	-22,86 %	-15,71%
Pendiente	0,09(%/µgxmL ⁻¹)	0,07(%/µgxmL ⁻¹)
Dispersión	0,99	0,98
(σ x)	187(%/µgxmL ⁻¹)	187(%/µgxmL ⁻¹)
(σ y)	17%	12,45%
Ecuación de Línea Recta	Y= -22,86+0,09X	Y= -15,71+0,07X
IC ₅₀	998,18	827,61
(IC ₅₀ ± σ)	(998,18±187)µg/mL	(827,61±187)µg/mL

Extracto metanólico de corteza (EMC), Extracto metanólico de frutos (EMF), IC₅₀ = Porcentaje de reducción medio del DPPH• (σ X) = Desviación estándar para valores de X en µg/mL (σ Y)= Desviación estándar para valores de Y en %.

Las plantas que poseen propiedades antioxidante y otras propiedades farmacológicas comúnmente se les relaciona con la presencia de compuestos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos y flavonoides (Fabri et al., 2009). Aunque dentro del género *Vismia* aun no se han reportado ácidos fenólicos, si se han reportado compuestos polifenólicos como gutiferas, antranoides prenilados, algunas antraquinonas e incluso flavonoides (Vizcaya et al., 2011). La actividad antioxidante de los polifenoles fue atribuida a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y oxígeno singlete, así como sus capacidades de metales quelantes (Vladimir-Knezevic et al., 2011). La mayoría de los investigadores en el área de la fitoquímica asociada al campo de reacciones con radicales libre manifiestan que si una muestra exhibe una elevada actividad con un método, probablemente no muestre resultados similares con métodos desiguales; por lo que es esencial evaluar muestras con precisión por varios procedimientos que incluyan diferentes especies radicalarias. (Goupy et al., 1999). Cabe destacar que la evaluación realizada, establece una contribución importante en la búsqueda de metabolitos secundarios para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la producción de radicales libres que comienzan reacciones en cadenas, ya que para la fecha no se han reportado estudios de actividad antioxidante de la especie bajo estudio, ni de los compuestos ensayados, por lo que representa un aporte significativo tanto en el área fitoquímica como en el área de la salud y prevención de enfermedades.

6.8.-Evaluación de la actividad insecticida

Se evaluó la acción insecticida de un total de seis (6) sustancias extraídas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* contra larvas de *Tecia solanivora* a ocho diferentes concentraciones comprendidas entre 5×10^4 y 5×10^{-10} µg/mL cuyos resultados son mostrados en la tabla N° 28.

Tabla N° 28. Resultados de la evaluación de la actividad insecticida de sustancias provenientes de *Vismia baccifera* var. *dealbata*

		Número de larvas muertas por placa (Población = 10 Larvas)						
Repeticiones de la experiencia para cada concentración	Sustancia	EHC	EHF	EMC	EMF	(5)	(6)	Alsystin®
	Concentración (µg/mL)							
	5,00E+04	5	4	8	10	0	10	10
		4	3	7	9	1	9	10
		3	2	9	9	0	9	10
		5	4	8	10	2	9	10
		5	2	8	10	0	9	10
	5,00E+02	4	4	9	10	1	9	10
		5	3	7	10	1	10	10
		4	3	6	8	0	9	10
		3	3	8	8	1	8	10
		3	3	8	8	1	8	10
	5,00E+00	1	3	3	10	0	10	10
		0	2	4	10	0	9	10
		1	2	4	9	0	8	10
		2	3	2	10	0	7	10
		0	1	1	7	0	7	10
	5,00E-02	1	3	2	10	0	9	7
		0	2	1	8	0	8	7
		0	3	1	10	0	9	8
		0	2	0	10	0	8	8
		0	2	0	7	0	7	9
5,00E-04	0	1	0	9	0	9	7	
	0	0	0	9	0	7	6	
	0	2	1	9	0	8	7	
	0	1	0	9	0	8	7	
	0	0	0	9	0	7	8	

EHC= Extracto hexanóico de corteza, EHF= Extracto hexanóico de frutos, EMC= Extracto metanóico de corteza, EMF= Extracto metanóico de frutos (5)= epifriedelinol y (6)= Vismiaquinona

Tabla N° 28. Resultados de la evaluación de la actividad insecticida de sustancias provenientes de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. (Cont.)

Número de larvas muertas por placa (Población = 10 Larvas)									
Repeticiones de la experiencia para cada concentración	Sustancia	EHC	EHF	EMC	EMF	(5)	(6)	Alsystin®	
	Concentración								
	5,00E-06		0	2	0	9	0	6	7
			0	1	0	8	0	8	6
			0	1	0	9	0	8	6
			0	1	0	7	0	6	8
			0	1	0	7	0	6	7
	5,00E-08		0	0	0	8	0	6	3
			0	1	0	7	0	7	3
			0	1	0	7	0	7	4
		0	0	0	5	0	5	3	
		0	0	0	7	0	7	3	
5,00E-10		0	0	0	5	0	6	5	
		0	0	0	7	0	5	4	
		0	1	0	6	0	6	3	
		0	0	0	7	0	4	4	
		0	1	0	5	0	5	2	

EHC= Extracto hexanóico de corteza, EHF= Extracto hexanóico de frutos, EMC= Extracto metanóico de corteza, EMF= Extracto metanóico de frutos (5)= epifriedelinol y (6)= vismiaquinona

Una vez registrados los valores del número de larvas muertas a diferentes concentraciones para los tratamientos aplicados, se empleó el programa estadístico para el promedio total de la mortalidad de las larvas en proporción versus el logaritmo neperiano de la concentración, modelo de ensayo para evaluaciones con alto rango de concentraciones, estos resultados se ilustran en la Figura N° 63, donde se puede apreciar claramente el efecto de las sustancias en los tratamientos aplicados a las larvas de *Tecia solanivora*.

El gráfico muestra diferencias significativas entre las sustancias evaluadas, con una dispersión menor al 3%, pudiendo congregarse en dos conjuntos a las mismas. El primer grupo corresponde a las sustancias ensayadas, extractos hexanóicos, tanto de corteza como de frutos, y epifriedelinol, (EHC, EHF y (5)) los cuales tuvieron un comportamiento similar, es decir, en la mayor concentración para cada una, no alcanzaron el cincuenta por ciento de la mortalidad de las larvas, ubicando a

estas sustancias con una actividad larvicida muy baja o totalmente nula, ya que presentaron una mortalidad muy diferente al testigo.

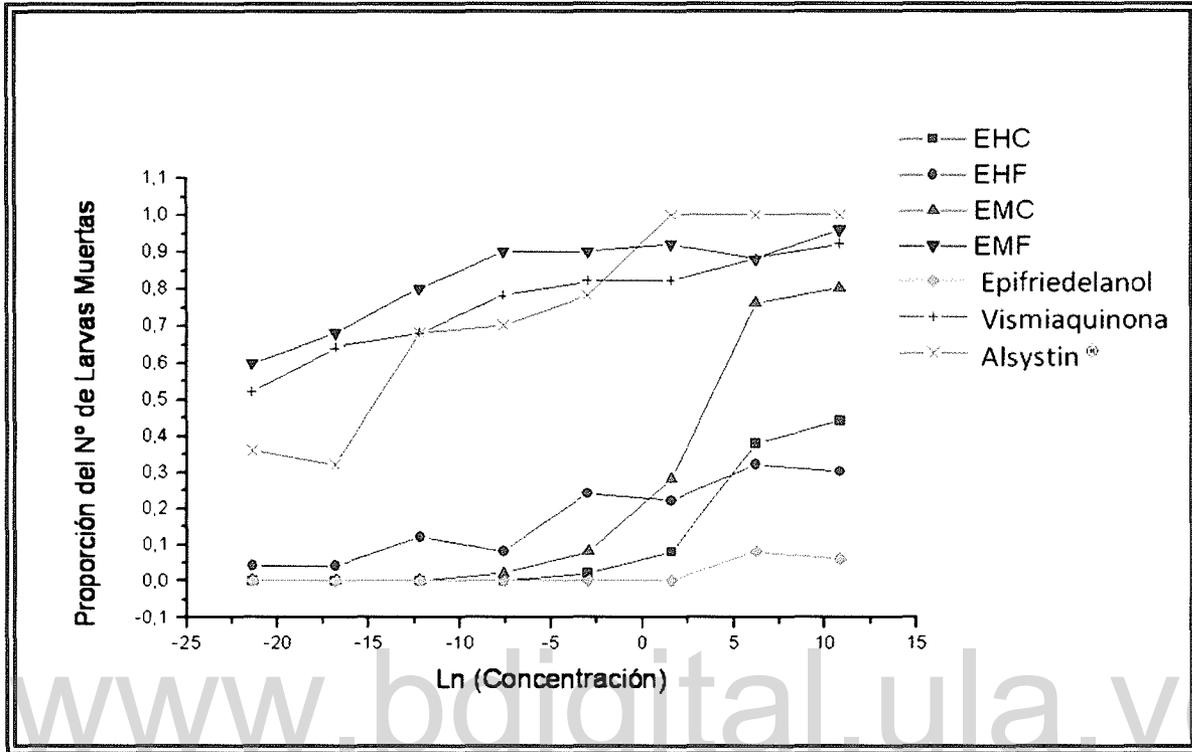


Figura Nº 63. Efectos de las sustancias en los tratamientos aplicados a larvas de *Tecia solanivora*

El segundo grupo corresponde a las sustancias que presentaron actividad como lo son la vismiaquinona, el extracto metanólico de frutos y el extracto metanólico de corteza (6), EMF y EMC) ubicando a las dos primeras sustancias mencionadas con un comportamiento similar al testigo Alystin® en cuanto a los índices de mortalidad, y con mayor efectividad "in vitro" contra las larvas bajo estudio. Por su parte el extracto metanólico de corteza (EMC) registró la menor actividad ya que sólo fue efectivo a las dosis más altas ensayadas.

Esta evaluación se realizó con cuatro extractos y dos de los metabolitos más abundantes en la especie de *Vismia* bajo estudio, sobre un número pequeño de larvas de *Tecia Solanivora*, en donde la posibilidad de encontrar que estas sustancias sean biológicamente activas es poco común tal como lo menciona Jones y Firn, para compuestos secundarios (Jones y Firn, 1991), en donde se

expresa que la única manera de incrementar dicha probabilidad, es evaluar la mayor cantidad de compuestos posibles en una amplia gama de organismos, aunque en este estudio, algunas sustancias no mostraron actividad, es posible que la mismas revelen mortalidad hacia otros insectos patógenos de importancia económica en la agricultura.

A nivel general, estos resultados se podrían corroborar con ensayos de campo resaltando que los extractos de metanol fueron los más tóxicos al igual que la vismiaquinona. De igual manera, a través de estos resultados se pudo deducir que los extractos preparados con hexano y el epifridelinol fueron los que provocaron menor mortalidad.

Este estudio constituye una participación substancial en la búsqueda de metabolitos secundarios de plantas superiores, en la defensa de las plantas contra los insectos, ya que para la fecha no se han reportado investigaciones de actividad insecticida de la especie bajo estudio, ni de los compuestos ensayados, por lo que representa un aporte importante tanto en el área fitoquímica como en el área de insecticidas.

www.bdigital.ula.ve

7.- CONCLUSIONES

- Se aislaron de los extractos de Corteza y frutos de *V. baccifera* var. *dealbata* cuatro compuestos, tres de naturaleza triterpénica y una antraquinona; identificados como lupeol, friedelina, β -friedelinol, vismiaquinona y a su vez una mezcla de esteroides 70:30 β -sitosterol/Estigmasterol.
- Se identificaron 71 compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en Corteza y Frutos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, siendo los más abundantes los ácidos grasos y los alcanos lineales.
- Se identificaron 14 componentes en el aceite esencial extraído de la corteza de *V. baccifera* var. *dealbata*, siendo los mayoritarios: óxido de cariofileno 31,40%, β - cariofileno 26,45% y α – zingibereno 12,56%.
- Se identificaron 46 componentes en el aceite esencial extraído de los frutos de *V. baccifera* var. *dealbata*, siendo los mayoritarios: óxido de cariofileno 17,86%, α – cadinol 14,67%, τ – muurolol 9,52% y ácido palmítico 7,06% .
- Los extractos hexanólicos, metanólicos y aceites esenciales, obtenidos de la corteza y fruto de *Vismia baccifera* var. *dealbata* son activos contra *Salmonella typhi* *Proteus vulgaris*, y *Listeria monocytogenes*, mientras que los compuestos resultaron inactivos contra las cepas ensayadas a excepción de la Vismiaquinona que mostró actividad contra *Salmonella typhi* y *Enterococcus faecalis* al igual que la mezcla de esteroides β -sitosterol/estigmasterol 70:30.
- Los aceites esenciales de corteza y fruto obtenidos de *Vismia baccifera* var. *dealbata*, presentaron actividad antifúngica *in vitro* contra levaduras del género *Candida* y contra el *Cryptococcus neoformans*, mientras que, los extractos hexanólicos y metanólicos de ambas partes de esta especie junto con los compuestos identificados por separado y en mezcla en este estudio son inactivos a las levaduras ensayadas.

- Los extractos metanólicos de corteza y frutos obtenidos de *Vismia baccifera* var. *dealbata* exhibieron actividad antioxidante frente al radical DPPH• con $IC_{50} = (998,18 \pm 187) \mu\text{g/mL}$ y $(827,61 \pm 187) \mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- El extracto metanólico de frutos y la vismiaquinona mostraron actividad insecticida contra larvas de *Tecia solanivora* similar a la producida por el Alsystin® a dosis comprendidas 5×10^4 y $5 \times 10^{-10} \mu\text{g/mL}$ causando la mortalidad entre (100 y 50) % de la población de larvas evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Adams, R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass spectrometry. 4th Ed. *New South Wales* Australia, Pp viii-804.
- 2.Albuquerque, U. Monteiro, J. Ramos, M. Cavalcanti, E. 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 76 – 91
- 3.Almeida, M. De Melo, A. Pinheiro, M. Silva, J. De Souza, A. Barison, A. Campos, F. Amaral, A. Machado, G., Leon, M. 2011. Constituintes Químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Quimica Nova*, 34: (7) 1182-1187
- 4.Álvarez, E. Jiménez, O. Posada, C. Rojano, B. Gil, J. García, C. Durango, D. 2008. Actividad Antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *VITAE. Revista de la Facultad de química farmacéutica de la Universidad de Antioquía Medellín- Colombia*. 15:165-172.
- 5.Araujo, F. Souza. M, Filho. R, 1990. Vismiaefolic acid, a new triterpene from *Vochysia Vismiaefolia*. *Journal Natural Products* 53: 1436 - 1440.
- 6.Arvind, S. Reg, F. Enzo, A. 2004. Identification of antimicrobial component of an Ethanollic extract of the Australian medicinal plant, *Eremophila duttonii*. *Phytotherapy Research* 18: 615–618.
- 7.Bauer, AW. Kirby, WM. Sherris, JC. Turck, M. 1966 Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
- 8.Barrera, L. García, L. 2008 Actividad antifúngica y aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Carica papaya*). *UDO agrícola* 8 (1): 33-41.
- 9.Bedout, C. Ayabaca, J. Vega, R. Méndez, M. Santiago, A. Pabón, M. Tabares, A. Arango, M. Restrepo, A. Neweil, V. 2003 Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al Fluconazol por el método de difusión en disco. *Biomédica* 23: 31-37
- 10.Bergman, M. Varshavsky, L. Gottlieb, HE. Grossman, S. 2001 The antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Etnopharmacology*. 58: 143-152
- 11.Bonte, F y Meybeck, A. 1997. Composición cosmética o farmacéutica, particularmente dermatológica que contiene un extracto de *Vismia*. Oficina española de patentes y marcas. N° 2102818. Madrid – España.

12. Botta, B. Delle Monache, G. Delle Monache, F. Bettolo, M. Oguakwa, U. 1983. 3-geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone and Vismiones C, D and E from *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry* 22: 539 - 542.
13. Botta, B. Delle Monache, F. Delle Monache, G. Bettolo, M. Menichini, F. 1986. Vismione H and prenilated Xanthonones from *Vismia guineensis*. *Phytochemistry* 25: 1217 - 1219.
14. Budzikiewicz, H. Djerassi, C. Williams, D. 1964 Structure elucidation of natural Products by mass spectrometry. II. Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes. Primera Edición. Holden-Day INC. USA pp 94-134
15. Broussalis, A. Ferraro, G. Martino, V. Pizon, R. Cousson, J. Alvarez, J. 1999. Argentine plants as potencial source of insecticide compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 219-223.
16. Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia. Zaragoza, España
17. Buitrago, A. Rojas, L. Rojas, J. Buitrago, D. Usubullaga, A. Morales A. 2009 Comparative Studie of The Chemical Composition of the Essential Oil of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) Collected in two Different Locations in Merida. Venezuela. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 12: 651-655.
18. Cámara, D. Lemos, V. Santos, M. Nagem, T. Cortes, S. 2010. Mechanism of the vasodilator effect of Euxanthone in rat small mesenteric arteries. *Phytomedicine* 17: 690 - 692.
19. Camele, G. Delle Monache, F. Delle Monache, G. Martini Bettolo, B. Alves de Lima, R. 1982. 2-isoprenylemodin and 5,5'-dimethoxysesamin from *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*. 21: 417-419.
20. Camelo, S. Costa, R. Ribeiro-Costa, R. Barbosa, W. Vasconcelos, F. Vieira, J. Junior J. 2011 Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) choisy *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2 (12): 3224-3229.
21. Cañigual, S. Dellacassa, E. Bandone, A. 2003. Plantas Medicinales y Fitoterapia ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense* 22 (3): 265-78
22. Cardona, M. Fernández, I. Pedro, J. Seoane, E. Vidal R. 1986. Additional new xanthonones and xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*. *Journal Natural Products* 49: 95 - 100.

23. Cassinelli, G. Geroni, C. Botta, B. Delle Monache, G. Delle Monache, F. 1986. Cytotoxic and antitumor activity of Vismiones isolated from Vismieae. *Journal Natural Products* 49: 929 - 931.
24. Chaturvedula V. y Prakash I. (2012) Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 1(9): 239-242.
25. Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review* 12: 564-582. Delle Monache F, Marquina M, Ferrari F, Martini-Bettolo G. 1979. Ferruginin A and B and Ferruanthrone, New triprenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. *Tetrahedron* 35: 2143 - 2149.
26. Delle Monache, F. Marquina, M. Ferrari, F. Martini-Bettolo, G. 1979. Ferruginin A and B and Ferruanthrone, New triprenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. *Tetrahedron*. 35: 2143-2149
27. Delle Monache, G. Gonzales, J. Delle Monache, F. Marini, G. 1980. Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. *Phytochemistry* 19: 2025 - 2028.
28. Delle Monache, F. Marquina, M. Delle Monache, G. Marini, G. De Lima, A. 1983. Xanthonas, xanthololignoids and others constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry* 22: 227 - 232.
29. Delle Monache, F. Delle Monache, G. Marini Bettolo, G. Lyra, D. Lwande, W. 1984. Two benzophenones with lavandulyl side Cain from *Tovomita mangle* G. mariz (Guttiferae). *Gazzeta Chimal Italy* 114: 55 - 60
30. Delle Monache, F. Botta, B. Delle Monache, G. Marini Bettolo, G. 1985. Prenilated antranoids from *Psorospermum* species. *Phytochemistry* 24: 1855 - 1856.
31. Delle Monache, F. 1985. Chemical and biological activity of the secondary metabolites of Vismieae. *Revista Latinoamericana de Química* 16: 5 - 15
32. Dimayuga, R. y Garcia, S. 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 181 - 182
33. Doriguetto, A. Santos, M. Ellena, J. Nagen, T. 2001. 6-deoxyjacareubin. *Acta Crystallographyc* 57: 1095 - 1097.
34. Dos Santos, M. Nagem, T. Da Silva, M. Silva, L. 2000. Xanthonas from *Vismia latifolia*. *Journal Brazzil Chemical Society* 11: 537 - 539.

35. Domínguez, I. Carrero, C. Ramírez, W. Segovia, Y. Pino, H. 2009. Evaluación del efecto de insecticidas sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Agricultura Andina*. 17: 61-73
36. Drouhet, E. Dupont, B. Improvisi, L. Viviani, MA. Tortorano, AM. Disc agar diffusion and microplate automatized techniques for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi. En: Iwata K, Vanden Bossche H, eds. *In vitro and in vivo* evaluation of antifungal agents, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986:31-49.
37. Elita, S. Renata, F. Mendes, E. Motta, P. Bellozi, D. Aragão, J. Rodrigo. L. Jussara, R. Isabel, V. Bouzada, M. 2012 Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. *Phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. Capítulo 2. Editorial Venketeshwer Rao, Pp 22-42.
38. Epifano, F. Genovese, S. Menghini, L. Curini, M. 2007. Chemistry and Pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68: 939 - 953.
39. Estévez, Y. Castillo, D. Pisango, M. Arévalo, J. Rojas, R. Alban, J. Deharo, E. Bourdy, G. Sauvain, M. 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 254 - 259.
40. Ewan, J. 1962. The South American Species of *Vismia* (Guttiferae). U.S. Nat. Museum, Contribution from de National Herbarium 35: 293-361.
41. Fabri, R. Nogueira, M. Braga, F. Coimbra, E. Scio 2009. *Mitracarpus frigidus* Aerial Parts Exhibited potent Antimicrobial, Antileishmanial and Antioxidant Effects. *Bioresource Technology*, 100(1): 428-433
42. Ferrari, F. Bettolo, M. Maxfield, P. Cerrini, S. Fedeli, W. Gavuzzo, E. Vaciago, A. 1979. Vismiones from *Vismia baccifera* var. dealbata. *Gazzeta Chimical Italiana* 109: 301-310.
43. Fuller, R. Westergaard, C. Collins, J. Cardellina, J. Boyd, M. 1999. Vismiaphenones D-G from *Vismia cayennensis*. *Journal Natural Products*. 62: 57-69
44. García, H. 1992. Flora medicinal de Colombia. Tomo II. Editorial Tercer Mundo. Bogotá, Colombia.
45. Gallo, M. y Sarachine, M. 2009. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3: 46-66.
46. Gerber, M, Boutron-Ruault, M. Hercberg, S. Riboli, E. Scalbert, A. Siess, M. 2002. State of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer. Food Cancer* (89): 293-312.

47. Gibaja, S. 2010 Productos Naturales Quinónicos. Universidad Nacional mayor de San Marcos, Fondo editorial UNMSS. Primera edición España Pp 149-150.
48. Gogoi, R. Barvah, P. Nath, S. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea Cubeba* Pers. *Journal Essential Oil Research*. 9: 213-21.
49. González, A. Freire, R. Salazar, J. Suárez, E. 1972. Quinonas Naturales. Antraquinonas de *Isoplexis sceptrum* *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química* 68: (1) 53-68
50. Gonzales, J. Delle Monache, G. Delle Monache, F. Martini, G. 1980. Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. *Phytochemistry* 19: 2025 - 2028.
51. Goncalves, M. Mors, W. 1981. Vismiaquinone, A Δ^1 isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana*. *Phytochemistry*. 20: 1947-1950.
52. Goupy, P. Hugues, M. Boivin, P. Amiot, M.J. 1999. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the science of food and agriculture*. 79: 1625-1634.
53. Hussein, A. Bozzi, B. Correa, N. Capson, T. Kursar, T. Coley, P. Solis, P. Gupta, M. 2003. Bioactive constituents from three *Vismia* species. *Journal Natural products*. 66: 858-860.
54. Jansen, O. Angenot, L. Tits, M. Nicolas, J. De Mol, P. Nikiéma, J. Frédérich, M. 2010. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *Journal Ethnopharmacology* 130: 143 - 150.
55. Jiménez, O. Meneses, E. García, C. Durango, D. 2007. Caracterización de las propiedades y estabilidad del color de soluciones de los antranoides prenilados Ferruginina A y γ -hidroxiferruginina A. *Revista colombiana de Química*, 36 (2): 227-242.
56. Jones, C. Firn, R. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 333: 273-280.
57. Khan, M. Ather, A. Thompson, K. Gambari, R. 2005. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 67: 107-119.
58. Kovats, E. (1958). Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*. 41: 1915-1932.
59. Kuete, V. Nguemaving, J. Beng, V. Azebaze, A. Etoa, F. Meyer, M. Bodo, B. Nkengfack, A. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 372-379.

60. Kundu, J. Rouf, A. Nazmul, M. Hasan, C. Rashid, M. 2000. Antitumoral activity of Epifriedelanol from *Vitis Trifolia*. *Fitoterapia* 71, 577-579.
61. Lamparsky, D. 1987. Fingerprints in essential oil analysis. In *Capillary gas chromatography in essential oil analysis*, P. Sandra and C. Bicchi, eds (Heidelberg- Alemania) pp 155-213.
62. Lizcano, L. Bakkali, F. Ruiz-Larrea, M. Ruiz-Sanz, J. 2010 Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*. 119: 1565-1570.
63. Lizcano, L. Vilorio-Bernal, M. Vicente, F. Berrueta, L. Gallo, B. Martínez-Cañamero, M. Ruiz-Larrea, M. Ruiz-Sanz, J. 2012. Lipid Oxidation Inhibitory Effects and Phenolic Composition of Aqueous Extracts from Medicinal Plants of Colombian Amazonia. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 5454-5467.
64. Lopez, A. Hudson, J. Towers, G. 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 189-196.
65. Magassouba, F. Diallo, A. Kouyaté, M. Mara, F. Mara, O. Bangoura, O. Camara, A. Traoré, S. Diallo, A. Zaoro, M. Lamah, K. Diallo, S. Cámara, G. Traoré, S. Keita, A. Camara, M. Barry, M. Kéita, S. Oularé, K. Barry, M. Donzo, M. Cámara, K. Tote, K. Berghe, D. Totté, J. Pieteres, L. Vlietinck, A. Baldé, A. 2007. Ethnobotanical Survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean Traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 44 – 53
66. Macías, V. y Cuca, L. 2007. Mezcla de esteroides aislada del extracto Etanólico de *Zantophyllum caribaeum* y actividad antituberculosis y antimalárica del extracto Etanólico. *Scientia Et Technica*. 33: 189-190.
67. Martínez, A. 2002. Guía de Esteroides. Facultad de Química Farmacéutica Universidad de Antioquia. Medellín- Colombia. Pp 1-37.
68. Martínez, J. y Cuca, L., 1984. Esteroides de *Virola Calophylloidea* (Markgraf) *Revista Colombiana de Química* 13: 109-118.
69. Mbaveng, A. Kuete, V. Nguemaving, J. Beng, V. Nkengfack, A. Meyer, M. Lall, N. Krohn, K. 2008. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 3 (6) 211-223.
70. Meepagala, K. Sturtz, G. Wedge, P. 2002. Antifungal Constituents of the essential oil fraction of *Artemisia drancunculus* L. var. *drancunculus*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 50: 6989-6992.

71. Ménan, H. Banzouzi, J. Hocquette, A. Pélissier, Y. Koné, M. Mallié, M. Assi, L. Valentin, A. 2006. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in west african traditional medicine for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 131 - 136.
72. Miraglia, M. Mesquita, A. Varejão, M. Gottlieb, O. Gottlieb. 1981. Anthraquinones from *Vismia* Species. *Phytochemistry*. 20: 2041-2042.
73. Mouffok, S. Haba, H. Lavaud, C. Long, C. Benkhaled, M. 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Records of Natural Products*. 6: (3) 292-295
74. Moreno, H. Martínez, A. Fujimoto, Y. 2011. Aislamiento e identificación de dos esteroides y un triterpeno del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia *VITAE*. 18: (1) 11-15.
75. Monacelli, B. Pasqua, G. Cuteri, A. Vitali, A. 1999. *In Vitro* plants regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 58: 81 - 85.
76. Nagen, J. Faria de Jesús, T. 1990. Quinoids and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry*. 29: 3362-3364.
77. Nagen, J. Faustino, F. 1997. Xanthones and Other Constituyentes of *Vismia parviflora*. *Journal Brazil Chemical Society*. 8: 505-508.
78. Nguemaving, J. Azebaze, A. Kuete, V. Carly, N. Beng, P. Meyer, M. Blond, A. Bodo, B. Nkengfack, A. 2006. Laurentixanthonones A and B, antimicrobial xanthonones from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*. 67: 1341-1346.
79. Nougoue, D. Antheaume, C. Chaabi, M. Ndjakou, B. Ngoule, S. Lobstein, A. Tsamo, E. 2008. Anthraquinone from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*. 69: 1024-1028.
80. Nougoue, D. Chaabi, M. Nouguela, S. Antheaume, C. Boyom, F. Gut, J. Rosenthal, P. Lobstein, A. Tsamo, E. 2009 Antimalarial Compounds from the Stem Bark of *Vismia laurentii*. *Zeitschrift Naturforsch*. 64: 210-214.
81. Nougoue, D. Antheaume, C. Chaabi, M. Ndjakou, B. Ngoule, S. Lobstein, A. Tsamo, E. 2008. Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry* 69: 1024 - 1028.
82. Nougoue, D. BreLOT, M. Antheaume, C. Nouguela, S. Lobstein, A. 2008. Methyl 5,7 - dihydroxy - 2, 2,9 - trimethyl - 6,11 - dihydro - 2H - anthra - [2,3-b] pyran -8- carboxylate. *Acta Crystallography* 64: 2414 - 2415.
83. Peres A. 1978. Plantas útiles de Colombia 4th ed. Litografía Arco. Bogota, Colombia.

84. Peres, V. Nagem, T. 1997. Trioxxygenated naturally occurring xanthonnes. *Phytochemistry* 44: 191 - 214.
85. Peres, V. Nagem, T. Faustino, F. 2000. Tetraoxxygenated naturally occurring xanthonnes. *Phytochemistry* 55: 683 - 710.
86. Pinheiro, R. Mac-Quhae, M. Bettolo, M. Delle Monache, F. 1984. Prenylated antranoids from *Vismia species*. *Phytochemistry* 23: 1737 - 1740.
87. Pitarikili, D. Tzakou, O. Couladis, M. Verikokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *Calycina* growing wild in greece *Journal essential oil Research*. 11:655-659.
88. R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
89. Reyes, R. Huerta, M. 2009. Compuestos Naturales de Plantas de la Familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia* 34: 385 - 392.
90. Rojas, J. Buitrago, A. Rojas, L. Morales, A. 2010. Essential Oil Composition of *Vismia macrophylla* Leaves (Guttiferae) *Natural Product Communications*. 6: 85-86
91. Rojas, J. Buitrago, A. Rojas, L. Morales, A. Lucena, M. Baldovino, S. 2011. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Vismia baccifera* Fruits Collected from Mérida, Venezuela *Natural Product Communications*. 6: 699 – 700.
92. Rueda, D. y López-Ávila, A. 2004. Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora* (Povolný) (Lepidoptera: Gelechiidae) *CORPOICA*. 5 1: 41-42.
93. Ruyschaert, S. Andel, T. Van de Putte, K. Van Damme, P. 2009. Bathe the baby to make it Strong and healthy: Plant use and child care among saramaccan maroons in Suriname. *Journal of Ethnopharmacol* 121: 148 - 170.
94. Sadaquat, A. Goundar, R. Sotheeswaran, S. Beaulieu, C. Spino, C. 2000. Benzophenones of *Garcinia pseudoguttifera* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 53: 281 - 284.
95. Santafé, G. Vargas, Y. Hoyos, L. Torres, O. Zuloaga, Juan. 2005. Estudio Químico de las fracciones lipídicas de esponjas marinas de Córdoba (Colombia) *Actualidades Biológicas* 27: (1) 95-100.
96. Salas, F. 2006. Composición química, análisis antibacteriano, actividad analgésica y citotoxicidad aguda de las hojas de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. Tesis de grado para

- optar por el título de Magister. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. Mérida –Venezuela.
- 97.Salas, F. Velasco, J. Rojas, J. Morales, A. 2006. Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) Collected in Venezuela. Natural Product Communications. 2: 185-188.
- 98.Salas, F. Ciangherotti, C. Salazar-Bookaman, M. Rojas, J. Morales, A. 2007. Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación. Revista de la Facultad de Farmacia de ULA Mérida, Venezuela. 49: 5-9.
- 99.Salas, F. Rojas, J. Morales, A. Ramos-Nino, M. 2008. In vitro Cytotoxic Activity of Sesamin Isolated from *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch (Guttiferae) Collected from Venezuela. 2008. Natural Product Communications. 3 (10): 1705-1708.
- 100.Salama, A. 1986. Aislamiento e identificación de friedelina y friedelinol de la corteza de *Clusia ellepticifolia*. Revista Colombiana De Ciencias Químico Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia 15: 99-104.
- 101.Sanz-Biset, J. Campo de la Cruz, J. Epiquien, M. Cañigüeral, S. 2009. A First Survey on the medicinal Plants of the chazuta valley (Peruvian –Amazonan). Journal of Ethnopharmacology 122: 333 - 362.
- 102.Serafini, M. Bellico, R. Wolk, A. Ekstrom, AM. 2002. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology 123: 985-991.
- 103.Seo, E. Wani, M. Wall, M. Navarro, H. Mulkherjee, R. Farnsworth, N. Kinghorn, D. 2000. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. Phytochemistry 55: 35 - 42.
- 104.Sibanda, S. Nyanyira, C. Nicoletti, M. Galeffi, C. 1993. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. Phytochemistry 24: 1650 - 1652.
- 105.Silvestre, R. Moraes, M. Lins, A. Ralph, M. Lima-Filho, J. Camara, C. Silva, T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. African Journal of Biotechnology 11(41) 9888-9893.
- 106.Simmonds, M. Blaney. W. Delle Monache, M. Mac-quae, M, Bettolo, M. 1985. Insect antifeedant propierties of anthanoids from the genus *Vismia*. Journal of chemical ecology. 11: 1593.

107. Suffredini, I. Paciencia, M. Varela, A. Younes, R. 2007. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia* 78: 223 - 226.
108. Schultes, R. 1993. Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 38: 139 - 135.
109. Stern, J. Hagerman, A. Steinberg, P. Mason, P. 1996. Phorotannin- protein interactions. *Journal of Chemical Ecology* 22:1887-1899.
110. Tala, M. Krohn, K. Hussain, H. Kouam, S. Wabo, H. Tane, P. Schulz, B. Hu, Q. 2007. Laurentixanthone C: A New Antifungal and Algicidal Xanthone from Stem Bark of *Vismia laurentii*. *Zeitschrift Naturforsch.* 62b: 565-568.
111. Tamokou, J. Tala, M. Wabo, H. Kuate, J. Tane, P. 2009. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of ethnopharmacology*. 124:571-575
112. Tarekegn, G. Djerassi, C. 1984. Synthesis and stereochemical assignment of (22R, 24S)- (22R,24R)-(22S,24R)-and (22S,24S)- 22,24-dimethylcholesterol. *Journal Organic of Chemistry*. 49: (6) 987-991.
113. Ticona, J. Gutiérrez, D. Salamanca, E. Ruiz, G. Paredes, C. Udaeta, E. Rodríguez, N. García, G. López, I. Jiménez, A. Alvarado, P. Chuqui, R. Flores, N. Giménez, A. (2006). Estudio Fitoquímico de las hojas de *Bowdichia Virgiliodes*. *Revista Boliviana de Química*. 3: (1) 34-39.
114. Van Minch, C. Van Kiem, P. Thah Houn, H. Tien Dat, N. Hoai Nam, N. Joon Lee, J. Ho Kim, Y. 2005. Chemical investigations and biological studies of *Mallotus apelta* L.- Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. *Journal of chemistry* 43: (2) 235-239.
115. Valadeau, C. Pabón, A. Deharo, E. Albán, J. Estévez, Y. Lores, F. Rojas, R. Gamboa, D. Sauvain, M. Castillo, D. Bourdy, G. 2009. Medicinal Plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 413 - 422.
116. Valadeau, C. Castillo, J. Sauvain, M. Lores, A. Bourdy, G. 2010. The rainbow hurts my skin: Medicinal Concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), and Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 175 - 192.

117. Vladimir-Knezević, S. Blazeković, B. Stefan, M.B. Alegro, A. Koszegi, T. Petrik, J. (2011). Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected Micromeria Species from Croatia. *Molecules*, 16 (2): 1454-1470,
118. Vizcaya, M. Morales, A. Rojas, J. Nuñez, R. 2012 Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae) Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 11 (1): 12-34
119. Wilson, C. Solar, J. El Ghaouth, A. Wisniewski, M. 1997. Rapid Evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 204-210.
120. WHO. (World Health Organization) 1976. Insecticides. 22 nd. World Health Organization technical. Report Series. No 585.
121. Wright, J. McInness, A, Shimizu, S. Smith, D. Walter, J. Idler, D. Khalil, W. (1978). Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*. 56: 1898-1903.
122. Zacaria, H. Apers, S. Moshi, M. Kapingu, M. Van Miert, S. Claeys, M. Brun, R. Cos, P. Pieters, L. Vlietinck, A. 2004. Anthranoids compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. *Planta Medica* 70: 706 - 710.