

QK, 495
R. 9853e



Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Postgrado Interdisciplinario en Química Aplicada
(P.I.Q.A)

Estudio Fitoquímico de Plantas de los Andes Venezolanos:

Zanthoxylum rhoifolium LAM (Rutaceae) y *Bulnesia arborea* Cl. Gay
(Zygophyllaceae).

www.bdigital.ula.ve

Tesis de grado para optar al grado académico de Doctora en Química Aplicada

Por: Lcda. Laura Vanessa Santiago Brugnoli



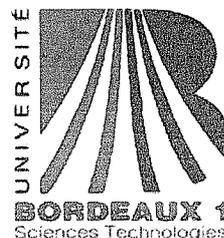
Tutor: Dr. Carmelo Rosquete Porcar

Co-Tutor: Laurent Pouységu

Mérida-Venezuela

Julio, 2011

DONACION



THÈSE en Cotutelle

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Laura Vanessa SANTIAGO BRUGNOLI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ORGANIQUE**

**Etude Phytochimique de Plantes Médicinales des Andes
Vénézuéliennes : *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) et
Bulnesia arborea Cl. Gay (Zygophyllaceae)**

Directeur de recherche : Dr. Laurent Pouységou

Soutenue le : 22 juillet 2011

Après avis de :

Mme RODRIGUEZ, María
M. CHARRIS, Jaime

Professeur, Universidad Central de Venezuela
Professeur, Universidad Central de Venezuela

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme RODRIGUEZ, María
M. CHARRIS, Jaime
M. ROJAS, Luis
M. POUYSEGU, Laurent
M. ROSQUETE, Carmelo
M. QUIDEAU, Stéphane
Mme ROJAS, Janne

Professeur, Universidad Central de Venezuela
Professeur, Universidad Central de Venezuela
Professeur, Universidad de Los Andes
Maître de Conférences, Université Bordeaux 1
Professeur, Universidad de Los Andes
Professeur, Université Bordeaux 1
Professeur, Universidad de Los Andes

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Examineur
Membre invité

Université Bordeaux 1

Les Sciences et les Technologies au service de l'Homme et de l'environnement

A la memoria de mi amadísima nonna Bruna de Brugnoli

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

-A Dios, la Santísima Virgen y al Santo Niño sobre todas las cosas.

-A mi madre Rossela, mamita linda.gracias por tu apoyo siempre, por levantarme el ánimo cuando estaba a punto de dejarlo todo, tus oraciones, por saber siempre que lo lograría ¡Te amo mami!

-A mi padre, Iván, gracias papito bello.por siempre confiar en mí, apoyándome en todas mis decisiones.siempre tomando mi mano en todo lo que hago y deshago, por saber esperar ¡Te amo papi!

-A mi hermano, Iván Ricardo, gracias por trasnocharte conmigo.acompañándome en el momento justo, como siempre, desde niños, sin ti y sin tu apoyo nunca hubiese terminado. ¡Te amo sshoo!

-A mi esposo, mi amor Carlos, gracias por tu paciencia, tu compañía, tú ayuda, tu apoyo incondicional, eternamente a mi lado, gracias por escogerme. ¡Te amo gordo!

-Al Dr. Carmelo Rosquete, gracias por todos estos años que trabajamos juntos, por compartir sus conocimientos, por formarme profesionalmente, por brindarme su amistad y confianza, por darme la oportunidad de trabajar en este hermoso proyecto, mi agradecimiento por siempre. ¡Lo voy a extrañar un montón!

*-A todos los profes del Grupo del Laboratorio de Productos Naturales: Paulino Delgado, Andrés Abad, Sonia Koteich y Juan Manuel Amaro, gracias por todos estos años que pasé junto a ustedes que hicieron de mi vida una época muy especial y al Técnico **Ciro Rodríguez** gracias por toda tu ayuda **negrito**.*

-A los panitas del Laboratorio de Productos Naturales: Pablo, José Adolfo, Nydian, Gabriela, Carolina, Elier, Roger y Dario compañeros de rumbas, tragos, de trabajo. ...¡en fin! apoyándonos unos a otros y dándonos ánimos cuando ya no aguantamos más.lo resolvemos solo con "dos".

-Al Dr. Luis B. Rojas, gracias por todo el apoyo, ayuda, la confianza que tuvo en mí para la realización de este trabajo, por su bella amistad, por permitirme conocer otras culturas y abrir mi mente a cosas nuevas, lo disfruté mucho, desde el principio hasta el final.eternamente agradecida.

-Al Dr. Ali Bahasas, profe.gracias por su apoyo incondicional, por sus excelentes consejos, por dedicarme horas de su ocupada vida para ayudarme y escucharme.mi agradecimiento por siempre.

-Al Dr. Laurent Pouységu, no tengo palabras para agradecerle todo lo que hizo para hacer realidad este proyecto, hoy culminado. Fue un gran placer para mí trabajar con usted en esta experiencia Francovenezolana, fue una de las mejores etapas de mi vida. ¡Mil gracias!

-Au Dr. Stiephane Quideau, le remercie pour la confiance et pour me permettre travailler dans son groupe de recherche, ça a été une expérience inoubliable à Bordeaux, avec tout mon coeur, merci beaucoup.

-Au mes collègues du groupe Quideau: Mélanie M., Céline, Marion, Delphine, Gildas, Tahiri, Mélanie D., Tony, Gaëlle, Stefan Chassaing et Rémi, toujours la mémoire.merci à tous!

-Al profe Dr. Jaime Charris, que fue mi compañero y amigo de laboratorio en el IECB y jurado evaluador de este trabajo, muchas gracias profe por todo y por los buenos momentos en Bordeaux.

-A los chicos del IECB, que siempre llevo en mi corazón Vania, Marisa, Anna y Pierre que hicieron de mi estancia en Bordeaux divertida y me hicieron sentir como en casa. ¡Muchas gracias amigos!

- Mon plus profond remerciement à Dra. Marie Allet Lacaille-Dubois, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant six mois dans son laboratoire, pour votre générosité, merci pour m'enseigner des choses nouvelles, vraiment merci beaucoup.

-Au tout le équipe du Laboratoire de Pharmacognosie, UMI8 : Clemence, Aymen, Deb, Jens, Gaoussou, Guy, Stéphanie et Nathalie, merci pour faire lâches heures de travaille amusantes à Dijon, ils me manquent.

-A mis amigas de siempre: Florida, Wendy, Iraida, Carolina y Maricarmen, que fueron, son y serán de gran apoyo para mi en esta dura etapa ya culminada, estando lejos y cerca, gracias "jamigas" por estar siempre ahí. ¡Las adoro!

-A Adakarfeny, compañera de viajes y aventuras, emprendimos este reto juntas, sin saber a qué nos enfrentaríamos y aquí está.lo culminamos juntas, gracias vieja por todo. Te quiero mucho.

-Al Programa Cooperativo Postgraduado (PCP) Francia-Venezuela, FONACIT- 46.255 por el financiamiento otorgado para este proyecto.

-Al FONACIT, en el marco de la Misión Ciencia, por los financiamientos otorgados a través del contrato N° 200601418.

-Al CDCHTA, por el financiamiento otorgado a través del proyecto N° C-1732-11-08-EV.

- Y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto ¡muchas gracias!

Vane.

www.bdigital.ula.ve

Résumé

Ces travaux de thèse concernent l'étude phytochimique de deux plantes médicinales et plus particulièrement deux espèces que l'on trouve dans la zone des Andes Vénézuéliennes : *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) et *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae). L'intérêt d'étudier ces espèces a été guidé par la grande diversité de composés isolés antérieurement et par les activités pharmacologiques précédemment décrites, aussi bien pour le genre *Zanthoxylum* que pour la famille Zygophyllaceae.

a) *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae)

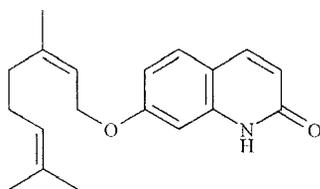
Avec près de 250 espèces distribuées dans les régions chaudes et tropicales du monde, principalement en Afrique, en Amérique du Nord et du Sud, en Asie et en Australie, *Zanthoxylum* est le genre le plus abondant dans la famille des Rutaceae. Au Venezuela, 22 espèces de *Zanthoxylum* ont été répertoriées et elles sont largement distribuées dans tout le pays.

Le genre *Zanthoxylum* est très connu dans la médecine populaire pour ses propriétés curatives; certaines de ses espèces sont surtout utilisées par les populations autochtones, qui vivent dans des zones où ces plantes abondent, pour soulager et calmer, entre autres choses, les rages de dents, la toux, la diarrhée, les douleurs liées à l'audition, les vomissements et les douleurs d'estomac dues à des vers intestinaux. Il a également été démontré que certaines espèces possèdent des propriétés pharmacologiques d'intérêt parmi lesquelles figurent des activités antitumorales, antileucémiques, antimicrobiennes (de Moura *et al.*, 1997 ; Nissanka *et al.*, 2001), antibactériennes (Abreu *et al.*, 2003a,b), anti-HIV (Cheng *et al.*, 2005), antipaludiques (Jullian *et al.*, 2006 ; Kirira *et al.*, 2006), antifongiques (Bafi-Yeboha *et al.*, 2005), amœbicides, anti-giardiasis (Arrieta *et al.*, 2001), trypanocides (Ferreira *et al.*, 2007), anti-leishmaniennes (Ahua *et al.*, 2007) ou encore une utilisation comme répulsif anti-moustique (Das *et al.*, 2003). Les extraits de ces plantes du genre *Zanthoxylum* sont utilisés commercialement comme colorants pour les tissus (Cuca *et al.*, 1998) et comme épices piquantes dans certaines recettes de cuisine (Xiong *et al.*, 1995). Du point de vue de la phytochimie, le genre *Zanthoxylum* a été largement étudié depuis le début du XX^{ème} siècle ; plusieurs espèces ont ainsi été explorées en raison de la grande variété de squelettes structuraux présents dans la famille Rutaceae et de la diversité des

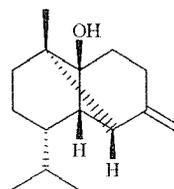
métabolites secondaires (alcaloïdes, amides, lignanes, flavonoïdes, terpènes...) biosynthétisés par ces espèces végétales.

Notre étude phytochimique a été réalisée sur les feuilles fraîches de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) que nous avons soumises à des extractions successives, réalisées à chaud à l'aide d'un appareil Soxhlet (Natori *et al.*, 1981), avec des solvants de polarité croissante (hexane, acétone et méthanol) jusqu'à "épuisement" du matériel végétal (Natori *et al.*, 1981). L'extrait acétonique (52,30 g), préalablement absorbé sur gel de silice, a ensuite été soumis à un processus de fractionnement et de séparation en utilisant plusieurs techniques chromatographiques sur gel de silice, sur support Sephadex[®] LH-20 et sur couche préparative (Coll & Bowden, 1986 ; Henke, 1995 ; Mikes, 1979 ; Natori *et al.*, 1981; Simpson, 1976 ; Sjövall *et al.*, 1968 ; Snyder & Kirkland, 1974 ; Stahl, 1969). Cette étude a conduit à l'isolement et à l'identification d'un nouvel alcaloïde monoterpénique de type quinoline, la 7-O-néryyl-7-hydroxy-2-quinolone o zathoxyfoline [1], d'un sesquiterpène de type ylangane, β -hydroxy- β -ylangane [2], d'un diterpène de la série des labdanes, le 13(S)-8 α -13-époxyabd-14-ène [3] et d'un composé aromatique méthoxylé, le 4,6-diméthoxybenzofurane [4]. Ces structures chimiques ont été élucidées grâce à l'analyse des spectres RMN (RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, COSY, HMBC et NOESY), infrarouge et de masse.

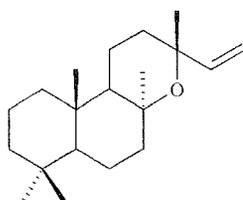
Composés isolés à partir de l'extrait acétonique des feuilles de *Z. rhoifolium*.



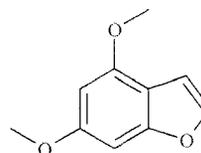
[1]



[2]



[3]



[4]

b) *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae)

Le genre *Bulnesia* est endémique d'Amérique du Sud et appartient à la famille des Zygophyllaceae. Au Venezuela, cette famille est représentée seulement par quatre genres (*Bulnesia*, *Guaiacum*, *Kallstroemia* et *Tribulus*) qui sont distribués dans les zones arides et sèches du territoire national (Lasser, 1971). Le genre *Bulnesia* est constitué de neuf espèces réparties dans deux sous-genres, *Gonopterodendron* et *Bulnesia* (Comas *et al.*, 1998), mais très peu d'études phytochimiques ont été décrites jusqu'ici.

Certains genres appartenant à la famille Zygophyllaceae sont connus pour leurs activités pharmacologiques et ethnobotaniques. Dans le genre *Fagonia* par exemple, l'extrait eau/éthanol (60:40) de *F. mollis*, qui contient un mélange de saponines, a montré des activités anti-inflammatoire et antipyrétique, ainsi qu'un faible effet analgésique (Melek *et al.*, 1996). Dans la médecine traditionnelle chinoise, *Tribulus terrestris* est utilisée pour le traitement du "mal d'oeil", des œdèmes, des douleurs abdominales, du vitiligo, pour traiter un foie abîmé, les douleurs de poitrine, la mammite, la conjonctivite, les maux de tête et les vertiges ; des activités anti-hypertensive, antimicrobienne, diurétique et stimulante de la spermatogenèse ont également été décrites (Wang *et al.*, 1997 ; Wu *et al.*, 1999). Les parties aériennes de *Zygophyllum gaetulum* ont aussi de nombreuses utilisations traditionnelles dans la médecine marocaine, notamment comme agent antispasmodique, anti-eczéma, pour le traitement du diabète, de l'estomac et des douleurs hépatiques (Bellakhadar *et al.*, 1991). Il en est de même pour *Z. decumbens*, dont l'extrait aqueux a montré des propriétés hypotensives, des activités antipyrétique, spasmolytique et diurétique, ainsi qu'un effet anesthésique local (Pöllmann *et al.*, 1998). Comme mentionné précédemment, il n'existe que peu d'études phytochimiques du genre *Bulnesia*, mais depuis le milieu du XX^{ème} siècle, la famille des Zygophyllaceae a fait l'objet de nombreuses études ; ces dernières ont montré que ces plantes biosynthétisent des métabolites secondaires majoritaires variés parmi lesquels figurent des alcaloïdes, des terpènes, des flavonoïdes, mais aussi des saponines triterpéniques et stéroïdiques.

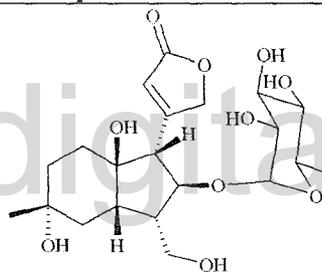
Nos travaux sur les feuilles et les tiges de *Bulnesia arborea* ont été basés sur la méthodologie mise au point pour l'obtention des saponines (Haddad *et al.*, 2004a,b ; Acharya *et al.*, 2008) puisque la famille Zygophyllaceae est connue pour sa richesse en ce type de composés. Le matériel végétal, une fois séché et broyé, a ainsi été soumis à une

extraction au reflux d'un mélange méthanol/eau (70:30), pendant approximativement 50 minutes, avant d'être filtré et évaporé sous vide. Le résidu a ensuite été extrait à quatre reprises au *n*-butanol saturé en eau afin d'obtenir l'extrait butanolique.

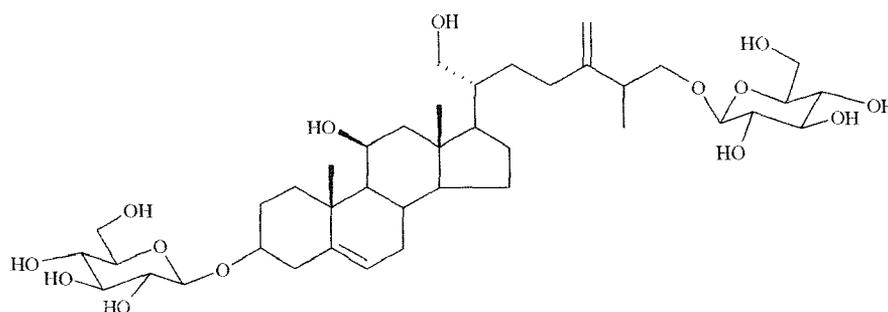
b.1) Feuilles de *Bulnesia arborea*

L'étude phytochimique que nous avons réalisée sur les feuilles de *B. arborea* a conduit à la séparation et à l'identification d'une nouvelle lactone sesquiterpénique glycosylée que nous avons appelée le bulnéarboréanoside I [5] et de deux nouvelles saponines de la série ergostane : le 3,21-bis[*O*- β -D-glucopyranosyl]-ergosta-5,24(28)-diéno-(3 β ,11 α ,21,26)-tétrol [6] et le 11 α -acétyl-3 β -*O*- β -D-xylosyl-23-*O*- β -D-rhamnosyl-ergosta-5,24(28)-diéno-3 β ,11 α ,21,26-tétrol [7]. Ces structures chimiques ont été élucidées grâce aux analyses spectroscopiques RMN (spectres RMN-¹H et RMN-¹³C, expériences COSY, HSQC, HMBC TOCSY et ROESY).

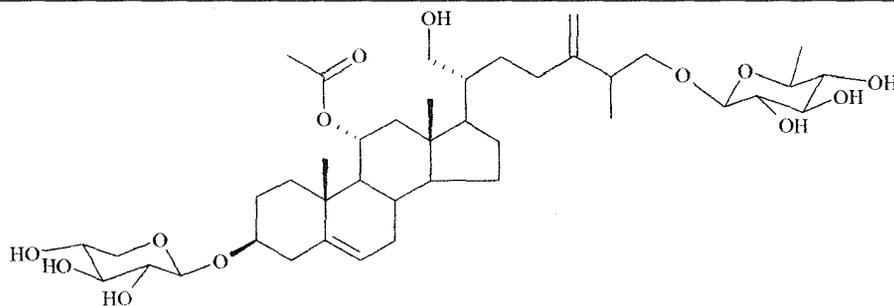
Composés isolés à partir des feuilles de *B. arborea*.



[5]



[6]

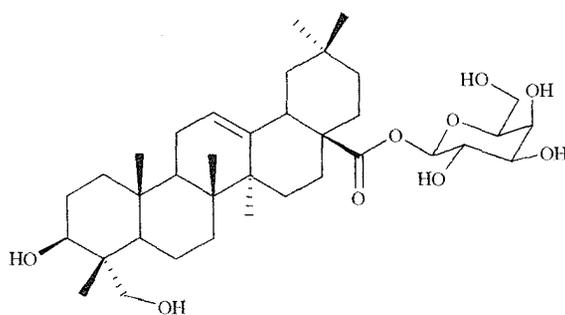


[17]

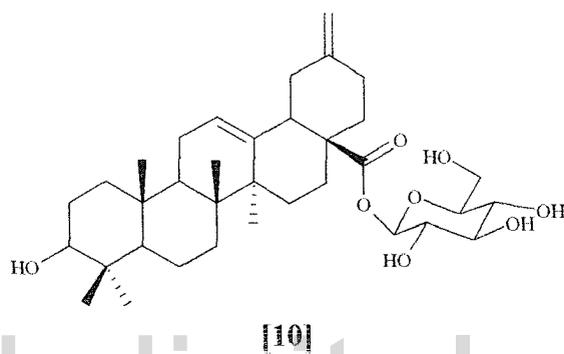
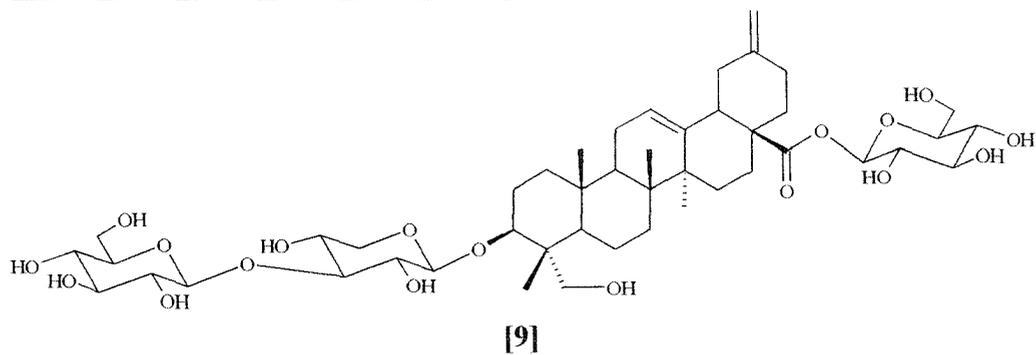
b.2) Tiges de *Bulnesia arborea*

Nos travaux ont permis d'isoler trois nouvelles saponines triterpéniques [8-10] à partir des tiges de *B. arborea*. Il s'agit du 3 β ,24-dihydroxyoléan-12-én-28-oate de β -D-galactopyranosyle [8], du 3-O-[β -D-xylosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-3 β ,24-dihydroxy-30-nor-oléan-12,20(29)-dién-28-oate de β -D-glucopyranosyle [9] et du 3 β ,24-dihydroxy-30-nor-oléano-12,20(29)-dién-28-oate de β -D-glucopyranosyle [10]. Ces structures chimiques ont été élucidées grâce à une combinaison des techniques d'analyse spectroscopique IR et RMN (spectres RMN-¹H et RMN-¹³C, expériences HSQC, COSY, HMBC, TOCSY et ROESY).

Composés isolés à partir des tiges de *B. arborea*.



[8]



www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El estudio fitoquímico de las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae), proporcionó el aislamiento del nuevo alcaloide: Zanthoxyfolina, además de tres nuevos compuestos reportados por primera vez para el género: el 1 β -hidroxi- β -ylangeno, el óxido de 8,13-*epi*-manoil 14-eno y el 4,6-dimetoxibenzofurano. Conjuntamente, el primer estudio fitoquímico realizado a la especie *Bulnesia arborea* (Zygophyllaceae), la cual, condujo el aislamiento, de las hojas, una nueva lactona sesquiterpénica glicosilada: bulnearboreanósido I, dos nuevas saponinas de la serie del ergostano 3, 21-*bis*[*O*- β -D-glucopiranosilo] de ergosta- 5,24 (28)-dieno-(3 β ,11 α ,21,26)- tetrol y 11 α - acetil3 β -*O*-D-xilosil-23-*O*- β -D- ramnosil- ergosta- 5,24(28)- dieno-3 β , 11 α , 21, 26-tetrol y de los tallos, tres nuevas saponinas de la serie del oleanano: 3 β ,24-dihidroxiolean-12-en-28-oato de β -galactopiranosilo, 3-*O*-[β -xilosil(1 \rightarrow 3)glucopiranosil]-3 β ,24- dihidroxi-30-*nor*- olean - 12,20(29)- dien-28-oato de β -glucopiranosilo, 3 β , 24-dihidroxi-30-*nor*-oleano-12,20(29)- dien-28-oato de β -gluco-piranosilo. Ambas especies recolectadas en el Estado Mérida, (Venezuela). Todos los compuestos obtenidos fueron caracterizados sobre la base de estudios espectroscópicos incluyendo técnicas uni- y bi- dimensionales de RMN.

ÍNDICE GENERAL

Presentación.....	i
Acta Université de Bordeaux 1.....	v
Acta Universidad de Los Andes.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Agradecimientos.....	x
Résumé.....	xiii
Resumen.....	xix
Índice de figuras.....	xxii
Índice de tablas.....	xxv
Índice de diagramas.....	xxvii
I. Introducción.....	1
II. <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM (Rutaceae).....	7
II.1. Fitoquímica del género <i>Zanthoxylum</i>	8
II.1.a. Alcaloides.....	8
II.1.b. Amidas.....	26
II.1.c. Lignanos.....	31
II.1.d. Cumarinas y cromonas.....	37
II.1.f. Flavonoides.....	42
II.1.g. Terpenoides.....	44
III. <i>Bulnesia arborea</i> Cl. Gay.....	48
III.1. Fitoquímica de la familia Zygophyllaceae.....	49
III.1.a. Alcaloides.....	49
III.1.b. Amidas.....	50
III.1.c. Flavonoides.....	51
III.1.d. Saponinas.....	55
III.1.e. Terpenoides.....	70
III.1.f. Lignanos.....	73
III.1.g. Cumarinas.....	74
III.1.h. Otros compuestos.....	74
IV. Hipótesis.....	75
V. Objetivos.....	77
VI. Resultados y discusiones.....	79
VI.1. <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM (Rutaceae).....	82
VI.1.a. 7- <i>O</i> -neril éter de 2-quinolona o zanthoxyfolina [1].....	82
VI.1.b. 1 β -Hidroxi- β -ylangeno [2].....	101
VI.1.c. Óxido de 8,13- <i>epi</i> -manoil-14-eno ó 13(<i>S</i>)-8 α -13-epoxilabd-14-eno [3]...	111
VI.1.d. 4,6-dimetoxibenzofurano [4].....	123
VI.2. <i>Bulnesia arborea</i> Cl. Gay (Zygophyllaceae).....	130
VI.2.1. Hojas.....	130
VI.2.1.a. (5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>R</i>)-,3 α , 9 β , 14-trihidroxi-7-ramnosilbulnearborean-10-en-12,13-olido ó bulnearboreanósido I [5].....	133

VI.2.1.b.	3,21- bis[O-β-d- Glucopiranosilo] de ergosta- 5, 24(28)- dieno- 3β, 11α, 21, 26-tetrol [6].....	151
VI.2.1.c.	11α-acetil-3β-O-d- xilosil-23-O-d- ramnosil- ergosta- 5,24(28)- dieno- 3β, 11α, 21, 26-tetrol [7].....	167
VI.2.2.	Tallos.....	179
VI.2.2.a.	3β, 24-dihidroxi-olean-12-en-28-oato de β-galactopiranosilo [8].....	181
VI.2.2.b.	3-O- [β-xilosil (1→3) glucopiranosil]- 3β,24- dihidroxi- 30- nor- oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β-glucopiranosilo [9].....	194
VI.2.2.c.	3β, 24- dihidroxi- 30-nor- oleano- 12, 20 (29)- dien- 28- oato de β- glucopiranosilo [10].....	207
VII.	Parte experimental.....	219
VII.1.	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM (Rutaceae).....	220
VII.1.a.	Técnicas generales aplicadas.....	220
VII.1.b.	Recolección del material vegetal.....	221
VII.1.c.	Extracción del material vegetal bruto.....	221
VII.1.d.	Cromatografía general de los extractos de acetona.....	221
VII.2.e.	Resultados de la cromatografía general de los extractos de acetona.....	221
VII.1.f.	Aislamiento y purificación de los productos.....	222
VII.2.	<i>Bulnesia arborea</i> Cl. Gay. (Zygophyllaceae).....	225
VII.2.a.	Técnicas generales aplicadas.....	225
VII.2.b.	Recolección y preparación del material vegetal.....	225
VII.2.c.	Extracción del material vegetal bruto.....	226
VII.2.d.	Cromatografía general de los extractos de BuOH de las hojas y los tallos.....	226
VII.2.e.	Resultados de la cromatografía general de los extractos de BuOH de las hojas y tallos.....	226
VII.2.f.	Aislamiento y purificación de los productos de las hojas y los tallos.....	228
VIII.	Conclusiones.....	232
IX.	Referencias bibliohemerográficas.....	235

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución geográfica de la familia Rutaceae.....	2
Figura 2	Ejemplar de un árbol del género <i>Zanthoxylum</i>	3
Figura 3	Flores y hojas de un ejemplar del género <i>Zanthoxylum</i>	4
Figura 4	Frutos de un ejemplar del género <i>Zanthoxylum</i>	4
Figura 5	Distribución geográfica de la familia Zygophyllaceae.....	5
Figura 6	Espectro Infrarrojo (KBr) de [1].....	82
Figura 7	Espectro de masas y fórmula molecular de [1].....	85
Figura 8	Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) [1].....	86
Figura 9	Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) de [1].....	87
Figura 10	Espectro y ampliaciones de ¹ H, ¹ H COSY (CDCl ₃ , 400MHz) de [1]...	88
Figura 11	Espectro y ampliaciones de HSQC de [1].....	89
Figura 12	Espectro HMBC (CDCl ₃) de [1].....	90
Figura 12.1	Ampliaciones del espectro HMBC (CDCl ₃) de [1].....	91
Figura 13	Estructura molecular de [1]. Diagrama tipo ORTEP mostrando las elipsoides de desplazamiento para los átomos no-hidrógenos (las elipsoides al 30% de probabilidad) y la numeración de los átomos y de los anillos.....	99
Figura 14	Empaquetamiento cristalino de [1] a lo largo del plano <i>ac</i>	100
Figura 15	Espectro Infrarrojo (película líquida NaCl) de [2].....	101
Figura 16	Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de [2].....	104
Figura 17	Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz), de [2].....	105
Figura 18	Espectro y aplicación de HSQC (CDCl ₃) de [2].....	106
Figura 19	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H COSY (CDCl ₃) de [2].....	107
Figura 20	Ampliaciones del espectro de HMBC (CDCl ₃) de [2].....	108
Figura 21	Espectro y ampliación de NOESY de (CDCl ₃) de [2].....	110
Figura 22	Espectro Infrarrojo de (KBr) [3].....	111
Figura 23	Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de [3].....	115
Figura 24	Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) de [3].....	116
Figura 25	Espectro y ampliaciones de HSQC (CDCl ₃) de [3].....	117
Figura 26	Espectro y ampliaciones de ¹ H, ¹ H COSY (CDCl ₃) de [3].....	118
Figura 27	Espectro y ampliaciones de HMBC (CDCl ₃) de [3].....	119
Figura 27.1	Ampliaciones del espectro HMBC (CDCl ₃) de [3].....	120
Figura 28	Espectro y ampliaciones de NOESY (CDCl ₃) de [3].....	122
Figura 29	Espectro Infrarrojo de (KBr), de [4].....	123
Figura 30	Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz), de [4].....	125
Figura 31	Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) de [4].....	126
Figura 32	Espectro y ampliación de HSQC (CDCl ₃) de [4].....	127
Figura 33	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H-COSY (CDCl ₃) de [4].....	128
Figura 34	Espectro y ampliación de HMBC (CDCl ₃) de [4].....	129
Figura 35	Espectro de RMN- ¹³ C (C ₃ D ₃ N, 150 MHz) de [5].....	137
Figura 36	Espectro RMN- ¹³ C/DEPT-135 de [5].....	138

Figura 37	Espectro de RMN- ¹ H (C ₅ D ₅ N, 600MHz) de [5].....	139
Figura 38	Espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [5].....	140
Figura 38.1	Ampliación del espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N,) de [5].....	141
Figura 38.2	Ampliación del espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N,) de [5].....	142
Figura 39	Espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [5].....	143
Figura 39.1	Ampliaciones del espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [5].....	144
Figura 40	Espectro de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [5].....	146
Figura 40.1	Ampliaciones del espectro de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [5].....	147
Figura 41	Espectro de ¹ H, ¹ H-COSY (C ₅ D ₅ N) de [5].....	148
Figura 41.1	Ampliación del espectro de ¹ H, ¹ H-COSY (C ₅ D ₅ N) de [5].....	149
Figura 42	Espectro de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [5].....	150
Figura 43	Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz, C ₅ D ₅ N) de [6].....	155
Figura 44	Espectro de RMN- ¹³ C /DEPT-135 (C ₅ D ₅ N) de [6].....	156
Figura 45	Espectro de RMN- ¹ H (600MHz, C ₅ D ₅ N) de [6].....	157
Figura 46	Espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [6].....	158
Figura 46.1	Ampliaciones del espectro HSQC (C ₅ D ₅ N) de [6].....	159
Figura 47	Espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [6].....	160
Figura 47.1	Ampliaciones del espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [6].....	161
Figura 48	Espectro y ampliación de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [6].....	163
Figura 49	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H-COSY(C ₅ D ₅ N) de [6].....	164
Figura 50	Espectro de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [6].....	165
Figura 50.1	Ampliaciones del espectro de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [6].....	166
Figura 51	Espectro de RMN- ¹ H (C ₅ D ₅ N, 600MHz) de [7].....	169
Figura 52	Espectro de RMN- ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 150 MHz) de [7].....	170
Figura 53	Ampliación del espectro HSQC (C ₅ D ₅ N) de [7].....	171
Figura 53.1	Ampliación del espectro HSQC (C ₅ D ₅ N) de [7].....	172
Figura 54	Ampliación del espectro HMBC (C ₅ D ₅ N) del [7].....	173
Figura 54.1	Ampliaciones del espectro HMBC (C ₅ D ₅ N) de [7].....	174
Figura 55	Espectro y ampliaciones del TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [7].....	176
Figura 56	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H- COSY (C ₅ D ₅ N) de [7].....	177
Figura 57	Espectro y ampliación de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [7].....	178
Figura 58	Espectro de RMN- ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 150 MHz) de [8].....	184
Figura 59	Espectro de RMN- ¹³ C/DEPT-135 (C ₅ D ₅ N) de [8].....	185
Figura 60	Espectro de RMN- ¹ H (C ₅ D ₅ N, 600 MHz) de [8].....	186
Figura 61	Espectro y ampliación de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [8].....	187
Figura 61.1	Ampliación del espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [8].....	188
Figura 62	Espectro y ampliaciones de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [8].....	189
Figura 63	Espectro y ampliación de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [8].....	191
Figura 64	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H-COSY (C ₅ D ₅ N) de [8].....	192
Figura 65	Espectro y ampliación de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [8].....	193
Figura 66	Espectro de RMN- ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 150 MHz) de [9].....	197
Figura 67	Espectro de RMN- ¹³ C, DEPT-135, (C ₅ D ₅ N) de [9].....	198
Figura 68	Espectro de RMN- ¹ H (C ₅ D ₅ N, 600 MHz) de [9].....	199

Figura 69	Espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [9].....	200
Figura 69.1	Ampliaciones del espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [9].....	201
Figura 70	Espectro y ampliación de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [9].....	202
Figura 70.1	Ampliaciones del espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [9].....	203
Figura 71	Espectro y ampliación de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [9].....	204
Figura 72	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H-COSY (C ₅ D ₅ N) de [9].....	205
Figura 73	Espectro y ampliación de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [9].....	206
Figura 74	Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz, C ₅ D ₅ N) de [10].....	209
Figura 75	Espectro de RMN- ¹³ C /DEPT-135 (C ₅ D ₅ N) de [10].....	210
Figura 76	Espectro de RMN- ¹ H (600MHz, C ₅ D ₅ N) de [10].....	211
Figura 77	Espectro de HSQC (C ₅ D ₅ N) de [10].....	212
Figura 78	Espectro y ampliación de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [10].....	213
Figura 78.1	Ampliaciones del espectro de HMBC (C ₅ D ₅ N) de [10].....	214
Figura 79	Espectro y ampliación de TOCSY (C ₅ D ₅ N) de [10].....	215
Figura 80	Espectro y ampliación de ¹ H, ¹ H-COSY (C ₅ D ₅ N) de [10].....	216
Figura 81	Espectro de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [10].....	217
Figura 81.1	Ampliaciones del espectro de ROESY (C ₅ D ₅ N) de [10].....	218

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Bandas de absorción significativas en el IR (KBr) de [1].....	82
Tabla 2	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [1].....	86
Tabla 3	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>M</i>) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN- ¹ H de [1].....	87
Tabla 4	Datos cristalográficos y condiciones experimentales para [1].....	93
Tabla 5	Distancias de enlace (Å) de [1].....	94
Tabla 6	Ángulos de enlace (°) de [1].....	95
Tabla 7	Ángulos de Torsión (°) de [1].....	97
Tabla 8	Enlaces de hidrógenos presentes en [1].....	99
Tabla 9	Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (película líquida NaCl) de [2].....	101
Tabla 10	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [2].	104
Tabla 11	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN- ¹ H de [2].....	105
Tabla 12	Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (KBr) de [3].....	111
Tabla 13	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [3].....	115
Tabla 14	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN- ¹ H de [3].....	116
Tabla 15	Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (KBr) de [4].....	123
Tabla 16	Desplazamientos químicos (δ) y tipo de carbono en el espectro de RMN- ¹³ C de [4].....	125
Tabla 17	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN- ¹ H de [4].....	126
Tabla 18	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [5].....	137
Tabla 19	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento (<i>J</i> Hz) en el espectro de RMN- ¹³ C de [5].....	139
Tabla 20	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [6].....	155
Tabla 21	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento (<i>J</i> Hz) en el espectro de RMN- ¹ H de [6].....	157
Tabla 22	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento (<i>J</i> Hz) en el espectro de RMN- ¹ H de [7].....	169
Tabla 23	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [7].....	170
Tabla 24	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [8].....	184
Tabla 25	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidades (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento (<i>J</i> Hz) en el espectro de RMN- ¹ H de [8].....	186
Tabla 26	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [9].....	197
Tabla 27	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidades (<i>m</i>) y constantes de acoplamiento (<i>J</i> Hz) en el espectro de RMN- ¹³ C de [9].....	199
Tabla 28	Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹³ C de [10].....	209

Tabla 29	Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN- ^1H [10].....	211
Tabla 30	Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de acetona	222
Tabla 31	Fracciones obtenidas de la cromatografía general de la columna VLC del extracto de BuOH.....	227
Tabla 32	Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de la fracción BuBa2, columna (46cm x 2,2cm) MPLC (sílice 15-40 μm).....	227
Tabla 33	Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de BuOH, columna de Sephadex LH-20.....	227
Tabla 34	Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de BuOH, columna (43cm x 1,5 cm) MPLC en sílice de fase reversa RP18.....	228

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [1].....	92
Diagrama 2	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [2].....	109
Diagrama 3	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [3].....	121
Diagrama 4	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [5].....	145
Diagrama 5	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro de HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [6].....	162
Diagrama 6	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [7].....	175
Diagrama 7	Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [8].....	190

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

I.-INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de investigación, se realizó el estudio fitoquímico de dos especies de plantas, *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) y *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae), para ello se efectuó una revisión exhaustiva de la fitoquímica de ambas especies, con la finalidad de conocer los metabolitos secundarios que ellas biosintetizan, su abundancia, los usos etnobotánicos y las actividades farmacológicas reportadas en los últimos años.

El género *Zanthoxylum* pertenece a la familia Rutaceae, comprende alrededor de 1.900 especies en aproximadamente 160 géneros. Su distribución geográfica se ubica principalmente en los trópicos y regiones templadas, específicamente en América, África, Australia y en el sur de Europa y Asia (figura 1) (Aristeguieta, 1973).

La familia Rutaceae está compuesta por plantas con flores, en su mayor parte arbustos y árboles y en ocasiones se encuentran como plantas herbáceas siempreverdes, a veces espinosas, de fuerte olor y se caracterizan por la presencia de puntos diáfanos dispersados (cavidades secretoras contenidas con aceites etéreos) en casi todas la especies, exclusivamente en las hojas (Pan, 2010).

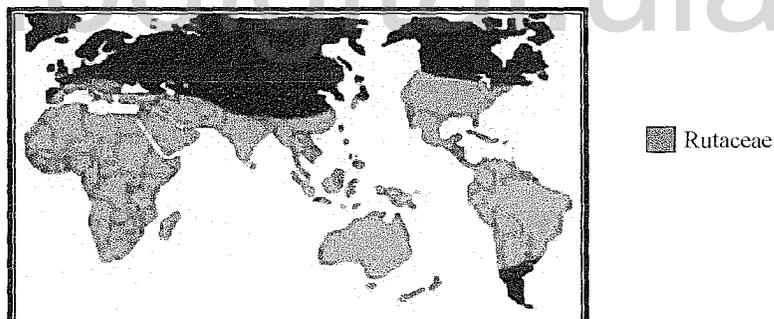


Figura 1. Distribución geográfica de la familia Rutaceae

Muchos géneros pertenecientes a esta familia son ampliamente conocidos, entre ellos se encuentran las distintas especies del género *Citrus* (naranja, limón, mandarina, entre otros) cuyo cultivo y selección de variedades es realizado en muchas partes del mundo, lo que hace que sea de gran importancia económica (Ozkan *et al.*, 2007), así como también las especies de los géneros *Flindersia*, producen apreciadas maderas duras usadas en ebanistería (Brown *et al.*, 2004); otra, como *Murraya paniculata* conocido como “jasmín naranja”, se cultiva como planta ornamental (Damsteegt *et al* 2010).

Otros géneros, son populares por sus propiedades medicinales: por ejemplo, en las especies del género *Zanthoxylum* se han reportado actividades farmacológicas tales como: analgésicas, antimicrobiales, antiespasmódicas y antitumorales, entre otras (De Moura *et al.*, 1997; Nissanka *et al.*, 2001), las hojas de *Agathosma betulina* (buchú) como diurético (Moolla y Viljoen, 2008) y la *Ruta graveolens* (ruda) indicada como abortiva y fortalecedora de los capilares sanguíneos (Gonçalves *et al.*, 2005). El género más abundante dentro de la familia Rutaceae, es el *Zanthoxylum* con unas 250 especies, distribuidas en las regiones cálidas y tropicales del mundo principalmente en África, norte y sur de América, Asia y Australia; constituyendo en Venezuela unas 22 especies ampliamente distribuidas en todo el país (Aristeguieta, 1973).

Este género se caracteriza por ser árboles de 3 a 13 metros de alto, aromáticos y armados (figura 2) de hojas alternas, simples o pinnado-compuestas, de folíolos enteros o crenulados y el raquiz a menudo alado. Las flores son pequeñas, hermafroditas y unisexuales, formando plantas polígamo-dioicas de cáliz de 3-5 lobulado o ausentes en las flores femeninas, el gineceo es formado por 1-5 carpelos ligeramente unidos en la base, sobre un corto ginoforo, 2 óvulos en cada carpelo, los estilos son cortos de estigmas capitados (figura 3) y los frutos de 1-5 folículos, bivalvados (figura 4) (Aristeguieta, 1973).

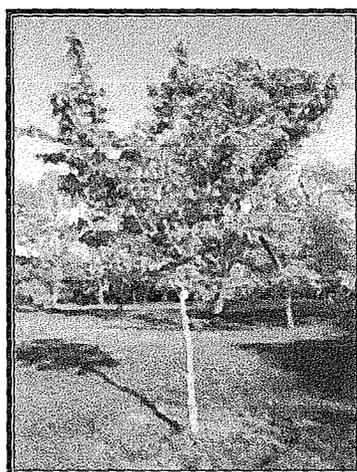


Figura 2. Ejemplar de un árbol del género *Zanthoxylum*.

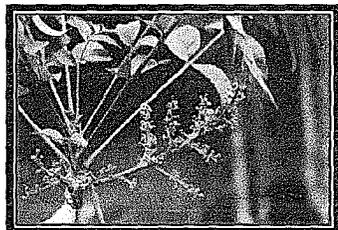


Figura 3. Flores y hojas de un ejemplar del género *Zanthoxylum*.



Figura 4. Frutos de un ejemplar del género *Zanthoxylum*.

Anteriormente el género *Zanthoxylum* se dividió en dos taxones: *Zanthoxylum* y *Fagara*, en base a la morfología del perianto (Stermitz *et al.*, 1980), la cual es la que designa el aparato involucral de la flor formado por uno o varios verticilos de hojas más o menos modificados (Aristeguieta, 1973). Sin embargo, otros investigadores consideran a *Fagara* como un subgénero de *Zanthoxylum* (Yasuda *et al.*, 1982; Dreyer y Brenner, 1980).

Este género es muy conocido dentro de la medicina popular por sus propiedades curativas; algunas de sus especies son usadas, mayormente por los nativos, para calmar el dolor de muelas, la tos, la diarrea, el dolor de oídos, el vómito y el dolor de estómago producidos por parásitos intestinales, entre otras. También se ha comprobado que poseen actividades farmacológicas tales como: antitumorales, antileucémicas, antimicrobianas (De Moura *et al.*, 1997; Nissanka *et al.*, 2001), antibacterianas (De Abreu *et al.*, 2003a,b), anti-VIH (Cheng *et al.*, 2005), antimaláricas (Jullian *et al.*, 2006; Kirira *et al.*, 2006), antifúngicas (Bafi-Yeboah *et al.*, 2005), amebocidas, giardicidas (Arrieta *et al.*, 2001), tripanocidas (Ferreira *et al.*, 2007), antileishmánicas (Ahua *et al.*, 2007) y como repelente contra mosquitos (Das *et al.*, 2003). Comercialmente se utilizan como colorantes para telas (Cuca *et al.*, 1998), como sazoadores y picantes para las comidas (Xiong *et al.*, 1995).

Por otro lado, el género *Bulnesia*, es un género suramericano que está constituido por nueve especies, distribuidas dentro de dos subgéneros *Gonopterodendron* y *Bulnesia* (Comas *et al.*, 1998). Dicho género pertenece a la familia Zygophyllaceae y existen muy pocos estudios fitoquímicos reportados acerca del mismo.

La familia Zygophyllaceae, según su clasificación taxonómica, se encuentra dentro del reino Plantae, en la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Rosidae y orden Sapindales. Esta familia abarca aproximadamente 250 especies distribuidas en 33

géneros y está restringida a los trópicos y subtropicos del globo terráqueo, con escasa representación en las zonas templadas (figura 4) (Hunziker *et al.*, 1978).



Figura 5. Distribución geográfica de la familia Zygophyllaceae.

En Venezuela, esta familia está representada solo por cuatro géneros: *Bulnesia*, *Guaiacum*, *Kallstroemia* y *Tribulus* distribuidos en las zonas áridas y secas del territorio nacional (Lasser, 1971). Por lo general, las Zygophyllaceas son plantas herbáceas o raramente leñosas, a menudo xerófilas y halófilas (plantas que crecen en ambientes salinos), de hojas opuestas o alternas, pinnaticompuestas o pinnatiséptas, estipuladas. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, pentámeras o tetrámeras, solitarias o dispuestas en cimas. Los frutos son capsulares, esquizocárpicos o carnosos (Lasser, 1971).

Algunos géneros pertenecientes a la familia Zygophyllaceae han presentado actividad farmacológica y etnobotánica. En el género *Fagonia*, por ejemplo, el extracto agua/etanol 60:40 de *F. mollis*, el cual contenía una mezcla de saponinas, mostró actividad antiinflamatoria y antipirética y un débil efecto analgésico (Melek *et al.*, 1996). Por otro lado, *F. indica* es usada en la medicina folklórica para aliviar las lesiones en la piel en Egipto y Pakistán, adicionalmente se ha afirmado que esta planta puede ser utilizada para el tratamiento contra algunos tipos de cáncer en las primeras etapas (Shaker *et al.*, 1999).

En la medicina China tradicional, *Tribulus terrestris* se utiliza para el tratamiento contra el “mal de ojo”, edemas, dolor abdominal, vitiligo, para restaurar el hígado dañado, dolor de pecho, mastitis, conjuntivitis, dolor de cabeza y vértigo; también se ha reportado que posee actividad antihipertensiva, antimicrobiana, diurética y estimulante de la espermatogénesis (Wang *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1999). Recientemente también se ha reportado que una infusión preparada con esta planta posee un efecto afrodisíaco, esto es debido, probablemente, a su propiedad de incrementar los niveles de andrógeno

(Adaikan *et al.*, 2000; Gauthaman *et al.*; 2002). Por otra parte, los frutos de *T. alantus* son usados en Pakistán para aliviar desórdenes urinarios y para la tos (Temraz *et al.*, 2006).

La *Spinal-Z*, que es una mezcla de las semillas secas y pulverizadas de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) y de las hojas de *Dracocephalum kotschyii* (Labiatae), fue utilizada durante muchos años como brebaje en la etnomedicina iraní para el tratamiento de varios tipos de cáncer en humanos, especialmente contra la leucemia (Jahaniani *et al.*, 2005); sin embargo, también se ha comprobado la actividad citotóxica de *P. harmala* contra una serie de células tumorales (Lamchouri *et al.*, 2000). Igualmente, un estudio farmacológico a la fracción básica del extracto de *P. nigellastrum* también reveló una potente actividad antitumoral (Xiao *et al.*, 1988).

Las partes aéreas de *Zygophyllum gaetulum* presenta gran variedad de usos en el sistema de medicina indígena marroquí, tales como antiespasmódico, antieccema, para la diabetes, para el estómago y para dolor hepático (Bellakhadar *et al.*, 1991), al igual que *Z. decumbens*, su extracto acuoso, mostró una actividad hipotensora, antipirética, espasmolítico, diurética y un efecto anestésico local (Pöllmann *et al.*; 1998).

Larrea divaricata, es empleada en la medicina popular en Suramérica, para tratar tumores, infecciones y enfermedades inflamatorias. En un estudio reciente del extracto acuoso de esta especie se determinó su actividad inmunomoduladora por primera vez en ratones (Davicino *et al.*, 2007). En la medicina folklórica del suroeste de América, *L. tridentada* es aprovechada como remedio para la diabetes tipo II (insulino no dependientes) (Reed *et al.*, 1999).

El interés de estudiar estas especies, se debe a la gran diversidad de compuestos con actividad farmacológica que han sido reportados tanto para el género *Zanthoxylum* como para la familia Zygophyllaceae, con la finalidad de la búsqueda de nuevos productos naturales que posean actividad biológica. Posteriormente, se presentará de manera resumida, algunos metabolitos secundarios que han sido reportados para el género *Zanthoxylum* y la familia Zygophyllaceae, así como también, el razonamiento de los resultados obtenidos del estudio fitoquímico realizado a las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) y a las hojas y tallos de *Bulnesia arborea* (Zygophyllaceae) y finalmente, la metodología empleada para el aislamiento de los productos obtenidos.

II. Zanthoxylum rhoifolium LAM. (RUTACEAE)

www.bdigital.ula.ve

II.1 FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *ZANTHOXYLUM*

Desde el punto de vista fitoquímico, el género *Zanthoxylum* ha sido estudiado ampliamente desde principios del siglo XX, muchas especies se han explorado químicamente por la gran variedad de esqueletos estructurales presentes en la familia Rutaceae (Talapatra *et al.*, 1973) y por la diversidad de metabolitos secundarios que biosintetizan las especies de este género (Della Casa *et al.*, 1972), como alcaloides, amidas, lignanos, flavonoides y terpenoides.

II.1.a- ALCALOIDES.

Este género se caracteriza por ser rico en alcaloides, los cuales han sido aislados de la mayoría de las especies que han sido estudiadas fitoquímicamente, siendo el más abundante los del tipo benzofenantridinico. Entre las características físicas más resaltantes de los alcaloides, es que son sólidos cristalinos casi incoloros, ópticamente activos, generalmente levorrotatorios y en los cuales el nitrógeno forma parte de uno o varios ciclos, (Marcano y Hasegawa, 1991).

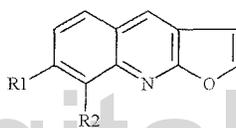
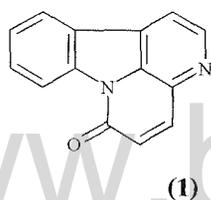
A continuación se describen algunos de los alcaloides representativos que han sido aislados dentro del género *Zanthoxylum*.

Fagara mayu (*Zanthoxylum mayu*) es el árbol más alto y abundante en los bosques lluviosos de la Isla Robinson Crusoe del Archipiélago Juan Fernández en Chile. Morfológicamente esta especie parece estar algo distante del resto de este género, por lo que el botánico Engler creó una sección monotípica *Mayu* para diferenciarla de las grandes secciones *Macqueria* y *Blackburnia* (Torres y Cassels, 1978).

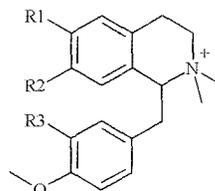
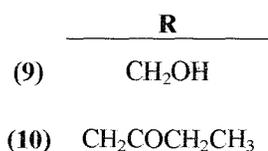
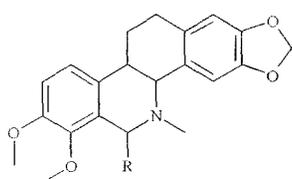
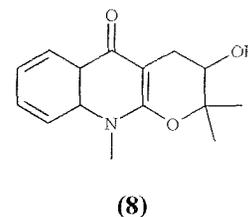
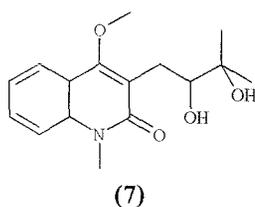
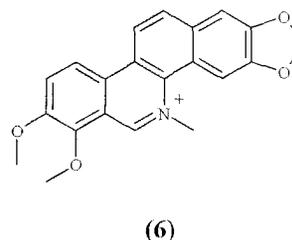
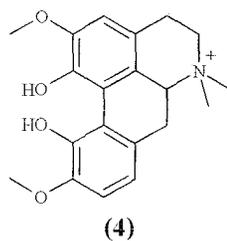
La primera exploración química realizada a esta especie ocurrió en 1974, donde se estudió el extracto de metanol de la corteza seca y pulverizada. En dicha investigación, se hallaron los alcaloides: cantin-6-ona (1), dictamina (2), γ -fagarina (3), magnoflorina (4), skimmianina (5) y cheleritrina (6) (Benages *et al.*, 1974). Otro estudio realizado a los extractos de éter de petróleo y metanol de las hojas de esta especie, reportó una pequeña cantidad de alcaloides (0,1%), donde se logró separar e identificar los alcaloides: skimmianina (5), (-)-edulicina (7) y ribalina (8) (Torres y Cassels, 1978).

La (-)-edulinina (7), ya había sido descrita anteriormente para *Casimiroa edulis*, por Boyd y Grundon en 1970, pero con la sospecha de que se trataba de una transformación durante el proceso de separación. Tomando esto en cuenta, después de la identificación y separación de la (-)-edulinina (7) en *F. mayu* en un extracto a pH 10, se repitió su extracción sin alcalinización y se extrajo a pH 7, aislándose de nuevo la (-)-edulinina (7), lo que demostró que dicho alcaloide es un producto natural y no un artefacto del proceso de separación. Otros alcaloides encontrados en este extracto fueron, bocconolina (9), tembetarina (11) y la base 1-benciltetrahidroisoquinolínica (12) (Aseem *et al.*, 1983).

Durante una investigación de los constituyentes químicos de algunas especies de *Fagara* en Suramérica, del extracto metanólico de las cortezas de *F. mayu*, fue aislado con muy bajo rendimiento (0,001%) una nueva base de alcaloide tipo benzofenantridinico 1, 2, 8, 9- tetrasustituído, el 11-(2'-cetobutano)- dihidrocheleritrina (10) (Assem *et al.*, 1979).



	R1	R2
(2)	H	H
(3)	OCH ₃	H
(5)	OCH ₃	OCH ₃



	R1	R2	R3
(11)	H	OH	OH
(12)	OH	OCH ₃	OCH ₃

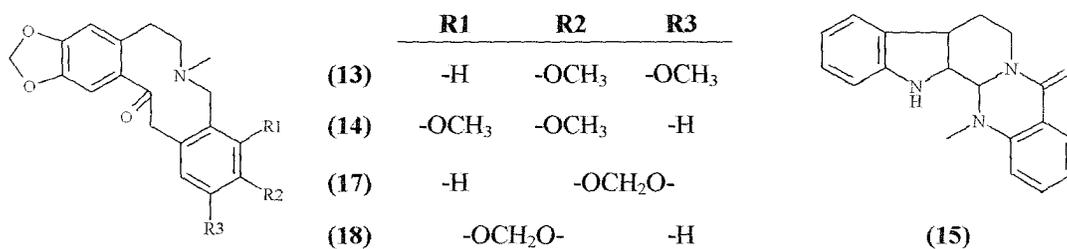
Los estudios de los alcaloides de *Fagara mayu* han demostrado que tienen la particularidad de biosintetizar compuestos mediante dos rutas, una es mediante el ácido antranílico la cual produce cantin-6-ona (**1**) a través del triptofano y la otra es por medio de la quinolina, dando una quinolina 3-sustituida como la (-)-edulinina (**7**) y las furanoquinolinas tales como: dictamina (**2**), γ -fagarina (**3**), skimmianina (**5**), esta especie junto con el *Z. belizense*, son la excepción de exclusividad mutua de cantinonas y furanoquinolinas (Aseem *et al.*, 1983).

Zanthoxylum coco (*F. coco*) es un árbol que crece en el oeste del Gran Chaco en Bolivia, extendiéndose al sur por dentro de las Sierras de Córdoba en Argentina. Su morfología y ecología la aparta de la mayoría de sus congénitos de Suramérica ya que crece en zonas tropicales o subtropicales, tanto en bosques lluviosos como nublados. Los alcaloides que se encuentran en la corteza y en las hojas de esta especie han sido estudiados por más de cincuenta años (Muñoz *et al.*, 1982). Stuckert, en 1925, fue el primero en comenzar la separación y aislamiento de alcaloides de las hojas y ramas tiernas del *F. coco*, donde obtuvo varias sustancias cristalinas, de las cuales, tres de ellas fueron completamente caracterizadas: α -fagarina, β -fagarina y γ -fagarina (**3**), que para la época fueron considerados como compuestos abstractos. Años más tarde, en los laboratorios de Merck en Darmstadt, Alemania, llevaron a cabo subsecuentemente, el aislamiento de alcaloides de *F. coco* en gran escala y reportaron solo dos compuestos: fagarina I y fagarina II (**13**). La fagarina I, fue identificada como α -fagarina, sin embargo, la fagarina II (**13**) hipotéticamente, era un nuevo alcaloide del tipo protopinas (Redemann *et al.*, 1949). Años después, Deulofeu *et al.*, (1942), encontraron de nuevo las α -, β - y γ -fagarina (**3**) en una muestra de *F. coco* suministrada por Stuckert, en este estudio se descubrió que la β -fagarina era idéntica a skimmianina (**5**), aislada por primera vez de *Skimmia japonica*, cuya estructura fue establecida por Honda en 1904, quien mostró que este alcaloide es un derivado metoxilado de la dictamina (**2**) por lo tanto, el nombre de β -fagarina fue eliminado y se sustituyó por la ya conocida skimmianina (**5**) (Deulofeu *et al.*, 1942) y la γ -fagarina (**3**) se identificó como una 8-metoxidictamina, que aparentemente no ha sido descrita con otro nombre, siendo muy similar a skimmianina (**5**), con la única discrepancia que γ -fagarina (**3**) tiene un metoxilo menos (Redemann *et al.*, 1949). Con respecto a la α -fagarina, que es una

sustancia muy similar a la fagarina II (**13**), la cual, Stuckert la designó con la fórmula molecular provisional: $C_{18}H_{20}NO_4$, hasta que Deulofeu determinó que la fórmula molecular era realmente $C_{21}H_{23}NO_5$ (Deulofeu *et al.*, 1942) y luego se encontró que era idéntica a α -allocriptopina (**14**) (Comín *et al.*, 1985), este compuesto ya había sido encontrado por Jowett y Pyman en 1913 en especies relacionadas de *Fagara* y en *Zanthoxylum brachyacanthum* (Redemann *et al.*, 1949).

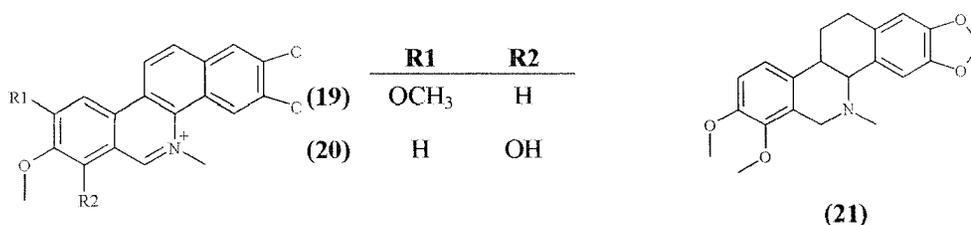
En una investigación de las cortezas de *Zanthoxylum rhetsa* recolectadas en Kerala, al suroeste de la India, se confirmó la presencia de (\pm)-evodiamina (**15**) (Gopinath *et al.*, 1960). Un estudio más reciente a los extractos de éter de petróleo de las cortezas del tronco de esta especie se aisló un nuevo alcaloide, 8-metoxi-*N*-metilflindersina (**16**) que mostró actividad citotóxica frente a *Artemia salina* (Ahsan *et al.*, 2000).

Zanthoxylum conspersipunctatum es una de las especies del género más común en Nueva Guinea, especialmente en los bosques montañosos del Distrito de las Tierras Altas Orientales y está relacionada con las especies del oriente de Australia. Del extracto metanólico de la corteza seca de dicha especie se aisló un nuevo alcaloide isomérico de la protopina 2-3,10-11-dimetilenodioxiprotopina (**17**), que está estrechamente relacionado con la muy conocida protopina (**18**) y cuyo patrón de sustitución de los oxígenos de dicho alcaloide es análogo a la fagarina II (**13**) (Jhons *et al.*, 1969). Años más tarde, dicho alcaloide isomérico fue sintetizado, confirmando así su estructura y se sugirió el nombre de pseudotopina por su base natural (Sotelo y Giacopello, 1972).



Fagara vitiensis (*Zanthoxylum vitiensis*) es una especie que ha sido poco estudiada, es un árbol pequeño o arbusto, nativo de las Islas Fiji. El primer estudio hecho a esta especie fue en 1972, hasta esa fecha no había datos etnobotánicos o químicos disponibles para dicha especie. La extracción con éter de petróleo a las cortezas de las raíces, produjo

dos alcaloides benzofenantridínicos: cheleritrina (6) y nitidina (19) junto con a una base terciaria perteneciente al grupo de las protopinas: 2-3, 10-11-dimetilenodioxiprotopina (17) (Fish y Waterman, 1972). El *F. zanthoxyloides* es un árbol que crece al oeste de África y es muy usado en medicina tradicional (Couillerot *et al.*, 1994), de las cortezas secas de las raíces se aislaron: un nuevo alcaloide fenólicobenzofenantridínico, denominado fagaridina (20), además de skimmianina (5), cheleritrina (6) y dihidrocheleritrina (21) (Torto y Mensah, 1973).

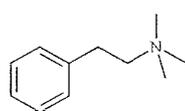


De un estudio realizado al corazón de la madera de *Zanthoxylum cuspidatum* (*Fagara cuspidata*), se aislaron alcaloides conocidos como: dictamina (2), γ -fagarina (3) y skimmianina (5) (Ishii y Ishikawa, 1973), al igual que en las cortezas de las raíces y de los tallos, del *Z. ovalifolium*, un arbusto pequeño y espinoso, que crece aproximadamente entre 8.000-9.000 pies de altura en el Distrito de Darjeeling en el Himalaya al norte de la India, ambas dieron como resultado el aislamiento de cantin-6-ona (1) (Talapatra *et al.*, 1973).

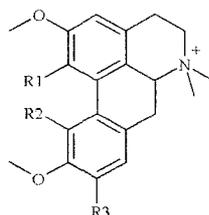
Zanthoxylum fagara es un arbusto pródigamente distribuido en el continente Suramericano y se encuentra particularmente en las regiones tropicales desde de Florida hasta Guatemala, también se encuentra en las zonas semidesérticas, como Texas y Nuevo León. Los extractos de esta planta son usados por los nativos por sus propiedades sudoríficas y como calmante. El primer estudio realizado a esta especie fue a la resina colectada en Valle Alto, después de Monterrey, y se encontró el alcaloide magnoflorina (4) ya reportado para este género (Dominguez *et al.*, 1974).

Z. fagara, en 1896 era denominado como *F. pterota*, por lo tanto el primer estudio fue hecho bajo este nombre, en esa oportunidad se encontraron los alcaloides: candicina (22), tembetarina (11), magnoflorina (4), *N*-metilisocoridina (23), laurifolina (24), chelereritrina (6) y trazas de nitidina (19) (Kuck *et al.*, 1967) y en estudios posteriores, ya

con el nombre de *Z. fagara* se hallaron de nuevo estos mismos alcaloides (Dreyer y Brenner, 1980). En las hojas de esta especie igualmente han localizado skimmianina (5) y laurifolina (24) pero solo en extractos de baja polaridad (Stermitz *et al.*, 1980).



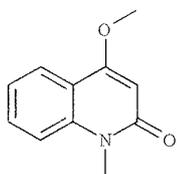
(22)



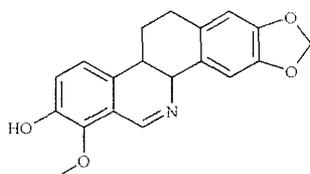
	R1	R2	R3
(23)	OCH ₃	OH	H
(24)	OH	H	OH

Zanthoxylum decaryi es un árbol espinoso que crece al sur de Madagascar. De las cortezas secas y molidas del tallo se aislaron cuatro alcaloides, entre ellos tres conocidos: dictamina (2), skimmianina (5) y 4-metoxi-1-metil-2-quinolina (25), éste último fue encontrado anteriormente en el *Z. ailanthoides* (Ishii *et al.*, 1972) y un nuevo alcaloide que lleva por nombre decarina (26), la cual cristalizó en finas agujas de color naranja (Vaquette *et al.*, 1974).

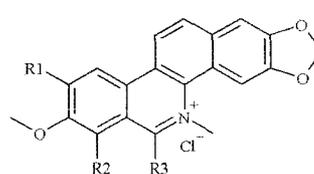
Zanthoxylum rubescens (*Fagara rubescens*), al igual que otras especies, es muy abundante en el oeste de África. Las cortezas de esta especie son usadas en la medicina tradicional como remedio para el dolor de muelas. En un estudio fitoquímico realizado al extracto de éter de petróleo de las cortezas de las raíces se logró la identificación algunos compuestos minoritarios entre las cuales destaca la dihidrocheleritrina (21) (Fish *et al.*, 1974). En un trabajo más completo, se encontró que las hojas de esta especie poseen un alto contenido de magnoflorina (4), y que dicho compuesto está ausente en las cortezas y en las raíces, ya que ahí solo se encontraron, la cloronitidina (27) y la 9-metoxicloro-queletrina (28), ésta última se sospecha que posiblemente sea un artefacto de la cheleritrina (6) (Moody y Sofowora, 1984).



(25)

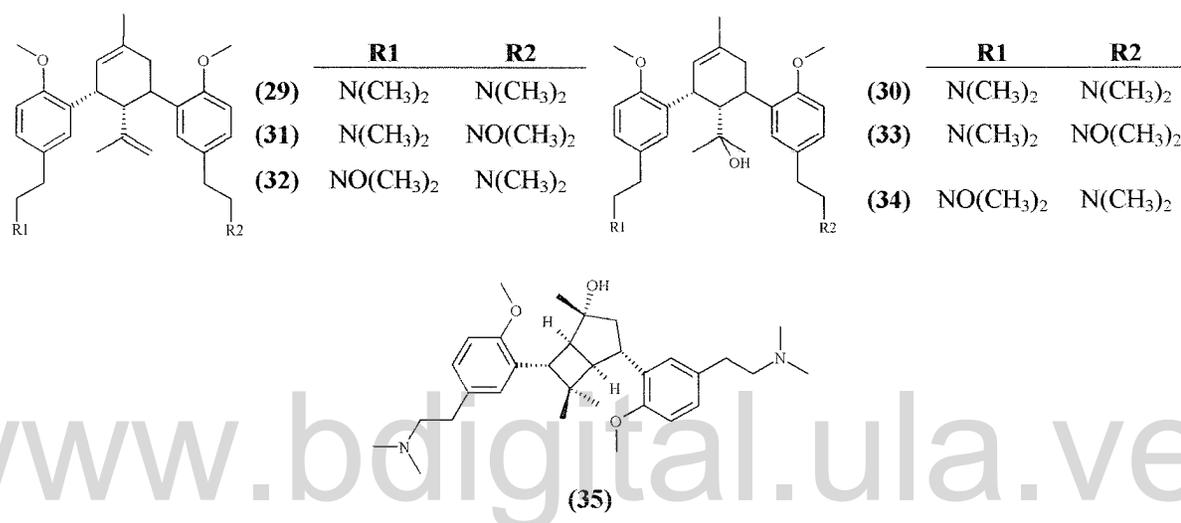


(26)



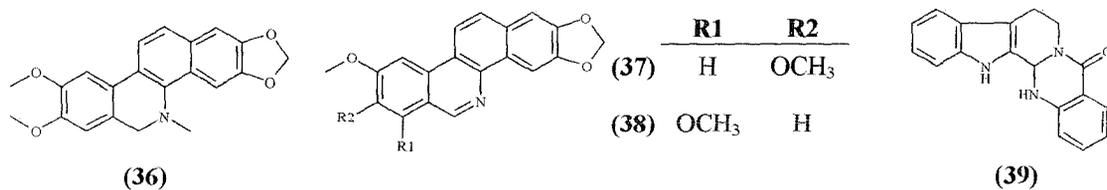
	R1	R2	R3
(27)	OCH ₃	H	H
(28)	H	OCH ₃	OCH ₃

Zanthoxylum avicennae, crece al norte y sur de Vietnam, Camboya y Laos. La decocción de los tallos son usados en la medicina tradicional como tonificante para el estómago y para las mordeduras de serpiente. Las hojas de esta especie fueron extraídas con 95% de metanol a temperatura ambiente, de ellas se aislaron compuestos ópticamente activos tales como dos alcaloides terpenos bishordenilos, (-)-culantramina (**29**) y (-)-culantraminol (**30**) y tres nuevos alcaloides, *N*-óxido (-)-culantramina (**31+32**), *N*-óxido (-)-culantraminol (**33+34**) y avicennamina (**35**) (Thuy *et al.*, 1999).



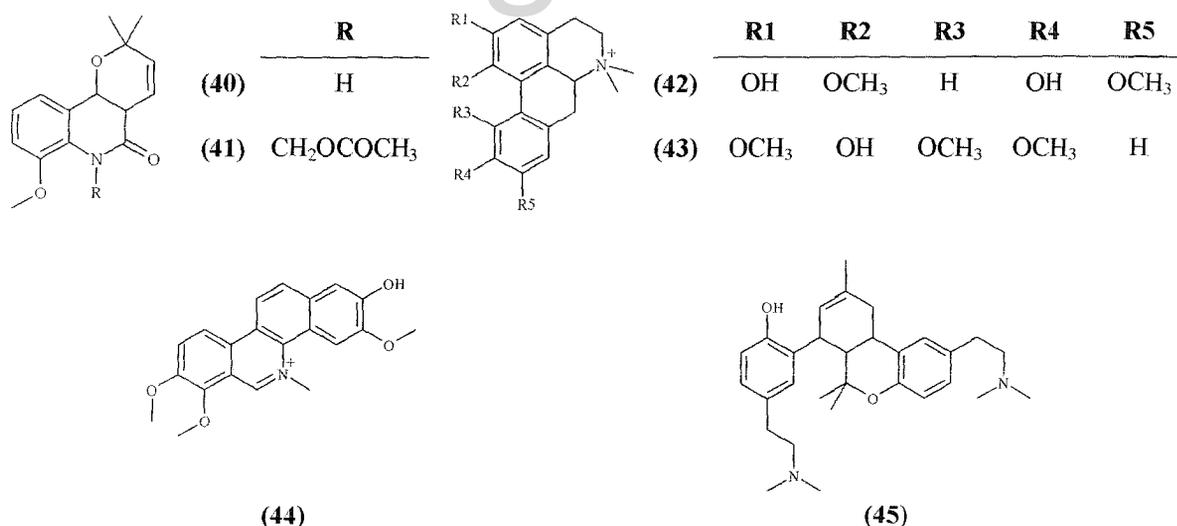
De muestras de cortezas de raíces de *Zanthoxylum myriacanthum*, recogidas en las Tierras Altas en Pahang, Malasia, se encontró un alcaloide del tipo benzofenantridínico, la dihidronitidina (**36**) y trazas de alcaloides cuaternarios como la magnoflorina (**4**) y la tembetarina (**11**) (Waterman, 1975). En estudios más recientes de esta especie se encontraron dos nuevos alcaloides la 7,9-dimetoxi-2,3-metilendioxi-benzofenantridina (**37**) y la *N*-nortidina (**38**), que fueron aislados de la corteza del tallo (Sukari *et al.*, 1999).

Zanthoxylum flavum (*F. flava*) abunda en la cima de La Cuesta, Provincia de Santiago, República Dominicana. De las cortezas de las raíces de esta especie extraídas con éter de petróleo se encontró un nuevo alcaloide del tipo β-indolquinazolina, la dihidrorutaecarpina (**39**) (Waterman, 1976).



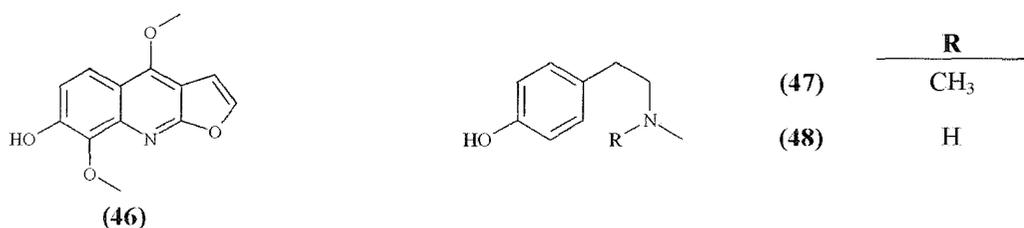
Las ramas y los tallos de *Zanthoxylum monophyllum* fueron extraídas sucesivamente con éter de petróleo, diclorometano y metanol. Del extracto de diclorometano, se aislaron los alcaloides 8-metoxiflindersina (40) y zanthofillina (41) (Stermits y Sharifi, 1977), y en una de las fracciones del extracto de metanol, además de aislar los alcaloides antes mencionados, se hallaron trazas de una aporfina, 1,2,9,10-tetrasustituída (42) (Stermits *et al.*, 1980).

Zanthoxylum punctatum es una especie conocida popularmente en Puerto Rico como “el árbol del dolor de muelas”, porque al masticar su corteza, causa un entumecimiento en la boca. Ésta contiene algunos alcaloides tales como: *N*-metilisocoridina (43), magnoflorina (4), punctatina (44) (Stermits y Sharifi, 1977) y un nuevo alcaloide, la alfileramina (45), el prefijo de “alfiler” se debe a las espinas afiladas que poseen las ramas de esta especie (Caolo y Stermits, 1979).



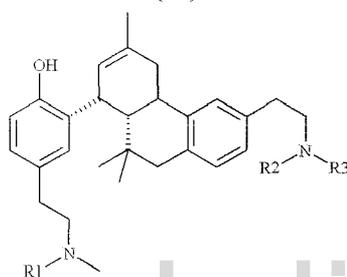
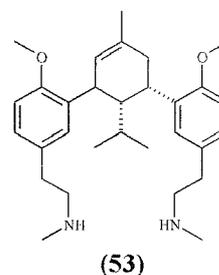
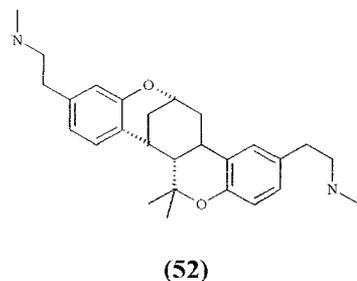
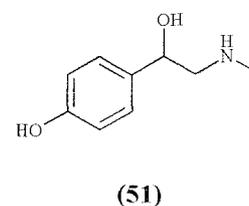
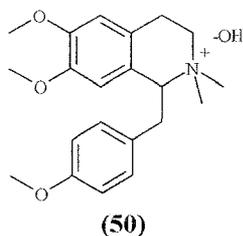
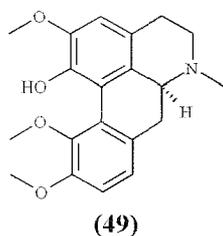
En una búsqueda de alcaloides de origen natural, con actividad antitumoral u otra actividad biológica, se extendieron las investigaciones a especies tropicales americanas. El estudio de la madera del *Zanthoxylum microcarpum*, una especie oriunda de Puerto Rico,

muy diversa y heterogénea, conllevó al aislamiento y caracterización de alcaloides ya conocidos: magnoflorina (4), haplopina (46), hordenina (47), decarina (26), *N*-norditidina (38) y *N*-metilamina (48). Hordenina (47) es un constituyente muy común en las especies de Centroamérica y del Caribe, mientras que haplopina (46) se encuentra generalmente en las especies del género *Haplophyllum* y sólo en las especies asiáticas del género *Zanthoxylum* (Boulware y Stermitz, 1981).



Zanthoxylum oxyphyllum es una planta medicinal usada para el tratamiento de varias dolencias en el subcontinente Asiático. De esta especie fueron aislados, de la raíz, dos alcaloides: la zanthofillina (41) y la coridina (49) y uno nuevo llamado zanoxylina (50) (Tiwari y Masood, 1979).

Zanthoxylum culantrillo es conocido por los indígenas de Honduras como “duerme lengua” ya que al masticar las cortezas o las hojas producen esa sensación. *Z. coriaceum*, que es común en Las Bahamas, tiene un efecto similar a éste, así como también, las raíces cocidas son usadas contra la diarrea y como antihemorrágico y los extractos de las hojas son usadas en Venezuela para el dolor de oídos; por estas razones se realizó un sondeo a constituyentes de ambas especies. De la raíz de *Z. culantrillo*, fueron identificados los alcaloides: *N*-metilisocoridina (43), candicina (22), sinefina (51), magnoflorina (4) y tembetarina (11). El contenido de alcaloides en las hojas fue muy bajo en comparación con el del tallo y en *Z. coriaceum*, se encontraron algunos alcaloides conocidos: dihidrocheleritina (21), *N*-metilisocoridina (43) y nuevamente la alfileramina (45) (Swinehart y Stermitz, 1980). En otro estudio realizado a las hojas de esta misma especie, su extracto de metanol mostró la presencia de alcaloides del tipo “terpenos bishoderninilos”: *N,N'*-dimetilisalfileramina (52), *N,N'*-dimetilculantramina (53), *N,N'*-desmetilalfileramina (54), *N'*-desmetilalfileramina (55) y finalmente la *N*-desmetilalfileramina (56) (Marcos *et al.*, 1990b).



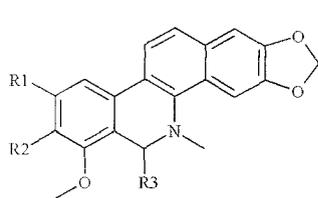
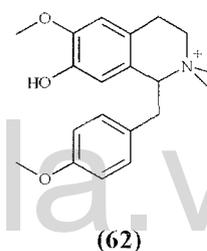
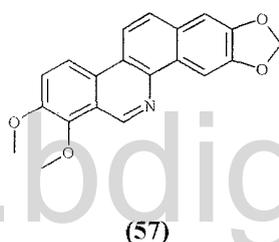
	R1	R2	R3
(54)	H	H	CH ₃
(55)	CH ₃	CH ₃	H
(56)	H	CH ₃	CH ₃

Por otro lado, *Zanthoxylum spinosum*, un árbol o arbusto pequeño, muy común en las zonas áridas y en numerosas Islas del Caribe y del cual se dice, que es muy difícil diferenciarla de *Z. coriaceum* por sus grandes similitudes botánicas. En un estudio realizado a varios extractos de las cortezas de los tallos, de *Z. spinosum*, recolectada en la Isla Gran Caimán, al noroeste de Jamaica, se encontró en el extracto de éter de petróleo una pequeña cantidad de alcaloides tipo benzofenanthridínicos, como la norcheleritrina (57) y la dihidrocheleritrina (21). En el extracto de acetato de etilo, se aislaron los dos anteriores nuevamente, además de decarina (26), oxicheleritrina (58), 6-acetonildihidrocheleritrina (59) y 6-carboximetildihidrocheleritrina (60). Finalmente, en el extracto de metanol se aisló de igual manera norcheleritrina (57), decarina (26), oxicheleritrina (58), 6-acetonildihidrocheleritrina (59) y 6-carboximetildihidrocheleritrina (60) (Ng *et al.*, 1987).

En una exploración a las cortezas del tronco de *Zanthoxylum thomense*, originario del oeste Ecuatorial de África, del extracto neutro de cloroformo se aislaron tres alcaloides conocidos del tipo benzofenanthridínicos: decarina (26), norcheletrina (57) y angolina (61) (Simeray *et al.*, 1985).

En Nueva Caledonia, territorio de ultramar de Francia situada al suroeste del océano Pacífico al este de Australia, predomina *Zanthoxylum sarasinii*, tanto las hojas como las cortezas del tronco, se extrajeron con éter de petróleo, cloroformo y etanol. De las cortezas se identificaron dos alcaloides: la tembetarina (**11**) y la colletina (**62**), éste último se aisló en gran cantidad. De las hojas, sólo se comprobó y en poca cantidad la existencia de skimmianina (**5**) (Simeray *et al.*, 1988).

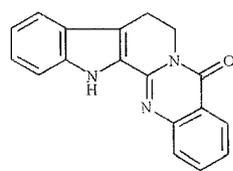
En 1971, Wall y colaboradores, presentaron por primera vez, un informe preliminar de los componentes del *Z. macrophylla.*, donde encontraron varios alcaloides en las cortezas del tallo, este extracto también reflejó tener una potente actividad contra la leucemia, lo que produjo el estudio de los alcaloides relacionados con dicha actividad: cloronitidina (**27**), 6-oxinitidina (**63**) y 6-metoxi-5,6-dihidronitidina (**64**) (Wall *et al.*, 1987).



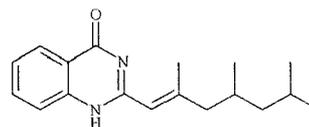
	R1	R2	R3
(58)	H	OCH ₃	=O
(59)	H	OCH ₃	CH ₂ (C=O)CH ₃
(60)	H	H	CH ₃
(61)	H	OCH ₃	OCH ₃
(63)	OCH ₃	OCH ₃	=O
(64)	OCH ₃	OCH ₃	H

Zanthoxylum budrunge es un arbusto de tamaño mediano que abunda en Bangladesh, India, Malasia y en algunas otras partes del Sur de Asia (Rahman *et al.*, 2005). Sus frutos son muy conocidos por sus usos medicinales, como por ejemplo, para el tratamiento de la bronquitis, asma y muchas otras enfermedades, también tiene propiedades estimulantes. Las raíces poseen baja actividad antifúngica y antiinflamatoria (Ahmad *et al.*, 2003). Del extracto de éter de petróleo de los frutos y las semillas, se consiguió un alcaloide del tipo indolopiridoquinazolina, la rutaecarpina (**65**), siendo el primer reporte para la especie. Éste alcaloide ya había sido aislado previamente de *Z. pluviatile* (Banerjee *et al.*,

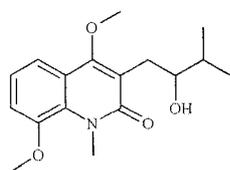
1989). En el primer estudio a los extractos de las hojas de *Z. budrunga* se detectó un nuevo alcaloide: 2-(2',4',6'-trimetilheptenil)-4-quinazolona **(66)** y lunacridina **(67)** (Ahmad *et al.*, 2003). En los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y metanol de las cortezas del tallo, fueron encontrados varios alcaloides: *N*-metilflindersina **(68)**, zanthobungeanina **(69)**, γ -fagarina **(3)**, dictamina **(2)**, cantin-6-ona **(1)**, rutaecarpina **(65)**, (\pm)-evodiamina **(15)** y skimmianina **(5)** éste fue el primer reporte para la especie (Rahman *et al.*, 2005).



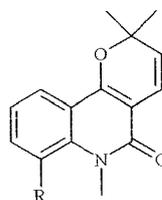
(65)



(66)



(67)



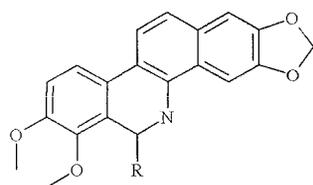
(68)

(69)

R
H
OCH ₃

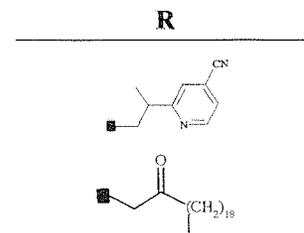
www.bdigital.ula.ve

De *Zanthoxylum ailanthoides* ha sido descrito un nuevo alcaloide separado de las cortezas del tallo, la ailanthoidina **(70)**, esta estructura fue comparada con la dihidrocheleritrina **(21)**, ya que los esqueletos son bastante similares, pero en el caso de la ailanthoidina **(70)**, en el carbono seis (C-6) posee un sustituyente con un heterociclo aromático (Ishii *et al.*, 1991). Otro caso similar a éste, es el del *Z. integrifolium*, que abunda en el Norte de Filipinas y ocasionalmente en el este de Taiwán, en el extracto de etanol frío de las cortezas secas se ha encontrado un alcaloide tipo benzofenenantridina, tridecanoncheleritrina [6-(2'-oxotridecil) dihidrocheleritrina] **(71)**, el cual sobre el carbono seis (C-6) ostenta una cadena larga (C-6) (Jen *et al.*, 1993).

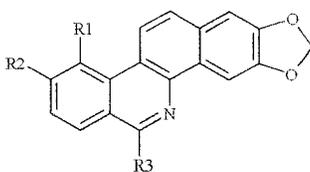
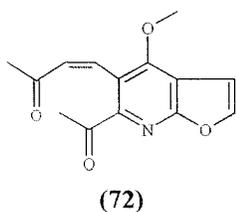


(70)

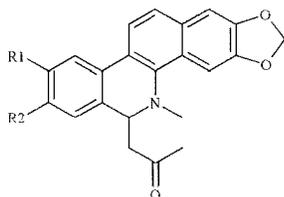
(71)



Zanthoxylum rhoifolium, se encuentra mayormente en Suramérica, principalmente en Brasil, Uruguay, Paraguay y Argentina y es conocida popularmente en Brasil como “*mamica-de-porca*” o “*jujevê*” (de Abreu *et al.*, 2003a), donde es usada como té o infusión contra enfermedades inflamatorias. Se dice que las propiedades farmacológicas que se atribuyen a esta especie: antileucémica, antitumoral, antiinflamatoria y antimicrobial, se deben a los alcaloides tipo benzofenantridínicos que ella biosintetiza (de Moura *et al.*, 1997). En un estudio etnofarmacológico hecho en la Guayana Francesa, una zona endémica de malaria, los nativos hierven las cortezas por largo rato y la utilizan como remedio para combatirla (Jullian *et al.*, 2006). En un estudio realizado a las hojas, frutos y cortezas, de esta especie recolectada en Anchieta, Brasil, se encontró un nuevo alcaloide, tipo *secofuroquinolina*, *Z*-dimetilrhoifolinata (72), además de los alcaloides ya conocidos skimmianina (5) y haplopina (46) (Arruda *et al.*, 1992a). Un nuevo alcaloide del tipo benzofenantridínico, fue aislado de las cortezas, denominado como zanthoxylina (73), así como también la nitidina (19) y la 6-oxinitidina (63) (de Abreu *et al.*, 2003a). De las cortezas de las raíces fue obtenido el alcaloide 6-acetonildihidroavicina (74), encontrado anteriormente en *Z. tetraspermun* (Nissanka *et al.*, 2001) cuya estructura se determinó mediante análisis cristalográfico; también se identificaron los alcaloides 6-acetonildihidrocheleritrina (59) y 6-acetonildihidronitidina (75) (Morel *et al.*, 2002). De las cortezas secas y pulverizadas se obtuvieron dos nuevos alcaloides del tipo dihidrobenzofenantridinas: rhoifolina A (76) y rhoifolina B (77), junto con los alcaloides anteriormente mencionados para esta especie (De Abreu, *et al.*, 2003b).

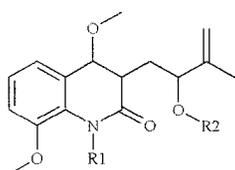


	R1	R2	R3
(73)	OCH ₃	OH	H
(76)		-OCH ₂ O-	OCH ₃
(77)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

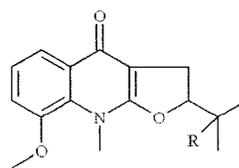


	R1	R2
(74)		-OCH ₂ O-
(75)	OCH ₃	OCH ₃

Zanthoxylum acutifolium es un árbol pequeño que crece en los bosques tropicales de Minas Gerais y de São Pablo, Brasil; sus hojas fueron extraídas con diclorometano y metanol de donde se lograron aislar e identificar cinco nuevos alcaloides quinolínicos: acutifolina (78), acutifolidina (79), *O*-metilacutifolina (80), palmitato de acutifolina (81) y neoacutifolina (82). El alcaloide, acutifolina (78), se comparó con los datos espectrales de lucradina (67), que fue previamente encontrada en *Lunasia amara* y en *L. costulata* (Brown *et al.*, 1980), y en la estructura de neoacutifolina (82), se notó que posee una estrecha relación con balfourodina (83) aislada de *Balfourodendron rieldeliamum* y en *Ptelea trifoliata*, siendo también estos géneros pertenecientes a la familia Rutaceae (Arruda *et al.*, 1992b).



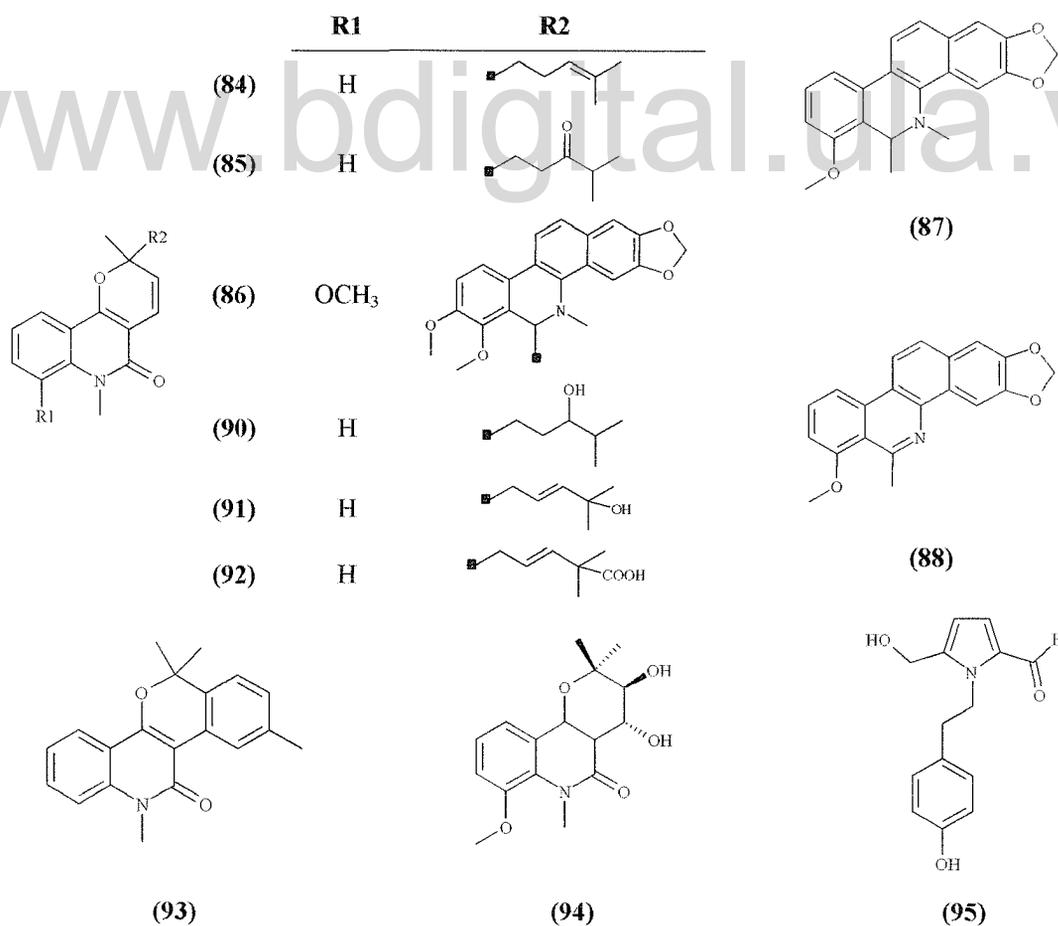
	R1	R2
(78)	CH ₃	H
(79)	H	H
(80)	CH ₃	CH ₃
(81)	CH ₃	CO(CH ₂) ₁₄ CH ₃



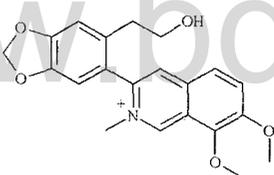
	R
(82)	H $\Delta^{3,4}$
(83)	OH

Zanthoxylum simulans es un arbusto espinoso que se distribuye en el centro y norte de Taiwán y China. Esta especie ha sido muy estudiada por la variabilidad de compuestos que biosintetiza. En las cortezas de las raíces se identificaron alcaloides ya conocidos como: cheleritrina (6), norcheleritrina (57), boccolina (10), 8-metoxi-*N*-metilflindersina (16), skimmianina (5) y decarina (26), también reportaron tres nuevos alcaloides 2-quinolonas: zanthosimulina (84), huajiaosimulina (85) y simulanoquinolina (86), éste

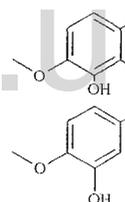
último es bastante interesante ya que es un alcaloide dímero entre dihidrobenzofenantridina y 2-quinolona unidos mediante un enlace simple carbono-carbono (C-C) (Wu y Chen, 1993). Unos años más tarde, se aislaron e identificaron dos nuevos alcaloides tipo benzofenantridínicos de las cortezas de las raíces de esta especie, 6-metildihidrocheletrina **(87)** y 6-metilnorcheleritrina **(88)** (Chen *et al.*, 1994). En la madera también se encontraron dos nuevos alcaloides, *N*-acetildehidroanonaina **(89)** y simulansina **(90)** (Chen *et al.*, 1996). En el extracto de metanol de las cortezas secas del tronco se encontraron tres nuevos alcaloides del tipo piranoquinolinas: simulenolina **(91)**, peroxisimulenolina **(92)** y benzosimulina **(93)**, además de la ya conocida zanthodiolina **(94)**; en ese artículo fue reportada por primera vez su estereoquímica (Chen *et al.*, 1997). Por otro lado, de la madera recolectada en T'aichung Conti, Taiwán, fueron aislados unos cristales incoloros en forma de agujas identificados como un alcaloide del tipo pirrol y fue llamado pirrolezanthina **(95)** (Yang *et al.*, 2002).



En un estudio consumado a *Zanthoxylum usambarense*, un árbol altamente ramificado y conocido por los nativos como “Muguchwa”, “Muvu”, “Mulasi” o “Sagawita”, cuya madera es usada para la construcción de casas y para mueblería y cuyas cortezas y las raíces son usadas en la medicina tradicional como remedio para la tos y las cortezas en decocción como bebida para el reumatismo, como emético y también contra la malaria, fueron aislados de las fracciones del extracto de diclorometano de las raíces y cortezas: cantin-6-ona (**1**), oxicheleritrina (**58**) y norcheleritrina (**57**) (He *et al.*, 2002). Por otro lado, tanto las hojas de *Z. usambarense* como las de *Z. chalybeum* son usadas en Kenya para dolores de muela y dolor de estómago. Cromatográficamente, estas dos especies son muy parecidas y por esa razón fueron comparadas y examinadas por HPLC, y se observó que poseen alcaloides muy similares. Este estudio reportó para *Z. chalybeum*: cheleritrina (**6**), skimmianina (**5**) y dihidrocheleritrina (**21**) y para *Z. usambarense*, isotembetarina (**96**), magnoflorina (**4**), cheleritrina (**6**) y un nuevo alcaloide denominado (-)-usambarina (**97**) (Kato *et al.*, 1996).



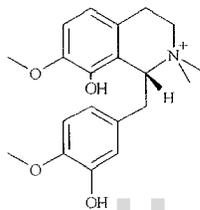
(96)



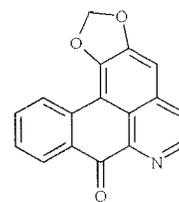
(97)

Zanthoxylum nitidum es una especie morfológicamente muy variable, puede encontrarse como liana en bosques lluviosos y como arbusto en zonas secas, se encuentra extensamente distribuido en India, China, al norte de Queensland, Australia. En esta especie se encontraron alcaloides como dihidrocheleritrina (**21**), norcheleritrina (**57**) y decarina (**26**), lo que indica que a pesar de ser una especie variable morfológicamente no escapa de biosintetizar compuestos que son comunes para el género *Zanthoxylum* (Deyun *et al.*, 1996). En otra investigación realizada a esta especie mediante HPLC se encontró gran cantidad de alcaloides tales como: cheleritrina (**6**), oxinitidina (**63**), oxicheleritrina (**56**), bocconolina (**10**), α -allocriptina (**14**), skimmianina (**5**), magnoflorina (**4**) y el alcaloide cuaternario (+)-usambarina (**98**). Recientemente, en China el extracto acuoso de esta

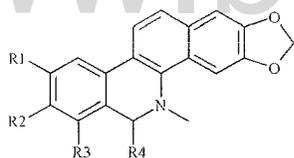
especie, es adicionada a la pasta dental debido a que posee alcaloides con alta actividad antibacterial (Moriyasu *et al.*, 1997). Adicionalmente, en un estudio más reciente se encontraron alcaloides, que son típicos tanto en la familia Rutaceae, como en el género *Zanthoxylum*, tales como: rhoifolina A (76), nitidina (19), liriodenina (99), dihidrocheleritrinil-8-acetaldehido (100), oxiavicina (101), coptisina (102), 8-hidroxi-dihidrocheleritrina (103), 8-metoxi-dihidrocheleritrina (104), sanguinarina (105) y berberrubina (106), por lo tanto se asume que la actividad farmacológica de esta especie se debe a la alta cantidad de alcaloides del tipo benzofenantridínicos que en ella se encuentran (Hu *et al.*, 2007).



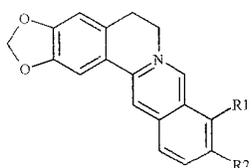
(98)



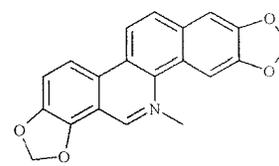
(99)



	R1	R2	R3	R4
(100)	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ CHO
(101)	-OCH ₂ O-		H	=O
(103)	H	OCH ₃	OCH ₃	OH
(104)	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃



	R1	R2
(102)	-OCH ₂ O-	
(106)	OH	OCH ₃



(105)

En la búsqueda de los constituyentes biológicamente activos relacionados con las especies de Sri Lanka se hizo una investigación a los extractos de las cortezas del tronco de *Zanthoxylum caudatum*, una rara y frecuente especie de ese lugar, al igual que *Z. tetraspermun*, éstos son aprovechados por los indígenas para el tratamiento de dispepsia, reumatismo y diarrea. Se reportó la elucidación y la evaluación antimicrobial, resultando

activos los alcaloides: 6-actonildihidroavicina (**74**) y 6-actonildihidronitidina (**75**) (Nissanka *et al.*, 2001).

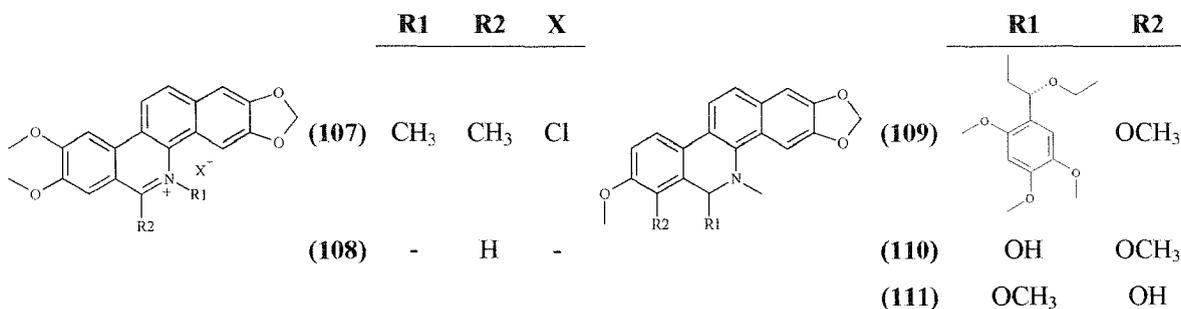
Zanthoxylum heitzii es una planta medicinal usada en África central para el tratamiento de muchas enfermedades; por ejemplo, en Gabón es usada contra el reumatismo. De las raíces pulverizadas se obtuvo skimmianina (**5**) y un nuevo alcaloide: cloro-6-metilnitidina (**107**), siendo éste el primer reporte de este tipo de compuesto como producto natural (Bongui *et al.*, 2005).

Zanthoxylum madagascariense, como su nombre lo indica, es oriundo de Madagascar. De las cortezas del tronco se aislaron los alcaloides del tipo benzofenantridínicos dihidrocheleritrina (**21**), norcheleritrina (**57**), *nor*-nitidina (**108**) y decarina (**26**), a pesar de que estos alcaloides son bastantes conocidos en el género, fue la primera vez que se reportaron para esa especie (Martin *et al.*, 2005).

En una investigación sobre plantas medicinales de Camerún se estudió *Zanthoxylum buesgenii* que es muy abundante en ese país y es usado en la medicina tradicional para el dolor de muelas y para el tratamiento de convulsiones. En los extractos de las cortezas del tronco se halló un nuevo alcaloide denominado buesgeniina (**109**), así como también decarina (**26**), (Tane *et al.*, 2005).

Zanthoxylum davyi es un árbol de mediano a alto (8 a 30 m) que se encuentra comúnmente en montañas y en los bosques costeros de Kwa Zulu Natal y Tanskei, extendiéndose hacia el norte a través de Mpumalanga, Swazilandia y Zimbabwe. En la medicina tradicional es usado para el tratamiento de mordeduras de serpientes, para la tos y algunos resfriados. Los agujijones del tronco son usados para heridas infectadas, las hojas para dolores de pecho, las cortezas del tronco hervidas para la pleuritis y dolor de muelas y las raíces para úlceras en la boca, dolor de garganta y como afrodisiaco. Se realizó una investigación para determinar si los constituyentes que se encuentran en las cortezas están relacionados con los usos etnofarmacológicos; de ahí se aislaron cinco alcaloides ya reportados: cheleritrina (**26**), dihidrocheleritrina (**21**), boccolina (**10**), 6-hidroxi-dihidro-cheleritrina (**110**) y 6-metoxi-7-demetildihidro-cheleritrina (**111**), este tipo de alcaloides por lo general poseen actividad antimicrobial (Mitscher *et al.*, 1978; Caolo y Stermitz, 1979) lo que concuerda con los usos en la medicina popular. Otro estudio reportó otro alcaloide

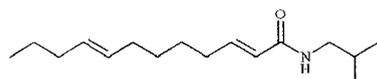
conocido del tipo 2-hidroxiquinolina: 4-metoxi-1-metil-2-quinolinona **(25)** (Tarus *et al.*, 2006).



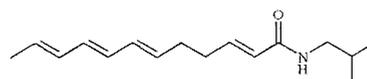
II.1.b- AMIDAS.

El género *Zanthoxylum*, además de alcaloides, también biosintetiza amidas que en su mayoría se encuentran en los frutos, cortezas y en aceites esenciales. El aislamiento de este tipo de compuestos es quimotaxonómicamente importante, ya que están estructuralmente relacionados con los alcaloides (Kalia *et al.*, 1999). A continuación se describen algunas amidas aisladas en el género.

Zanthoxylum clava-herculis es un árbol muy espinoso, las cortezas poseen una potente sustancia insecticida, aislada por primera vez por Jacobson en 1948, denominada herculina **(112)**. Años más tarde se encontró una sustancia muy similar y se le dio el nombre de *neo-herculina* **(113)**, la cual resultó ser altamente tóxica para la *Musca domestica* (mosca común) y para *Tenebrio molitor* (escarabajo del gusano de la harina) (Crombie, 1954).



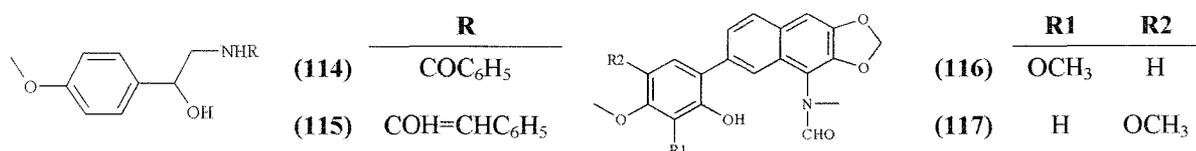
(112)



(113)

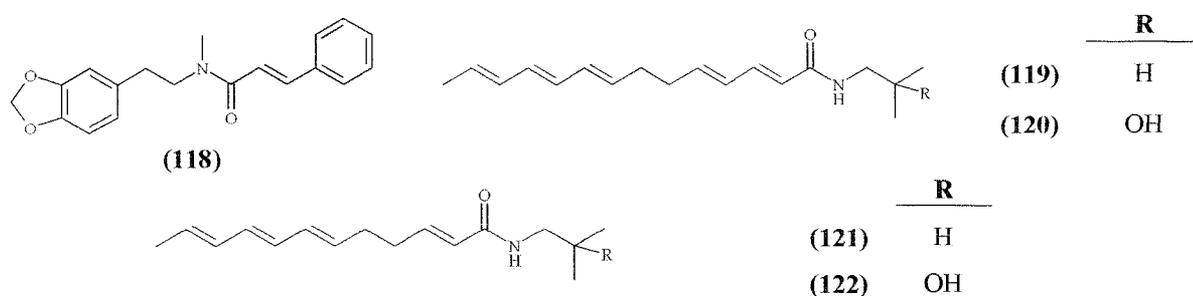
De una extracción con benceno a las cortezas de *Zanthoxylum ocumarensis*, recolectado cerca de la región central de las costas de Venezuela, se hallaron dos amidas aromáticas: (±)-*N*-benzoil-[2-hidroxi-2(4'-metoxifenil)] etilamina, llamada como tembamida **(114)** y (±)-*N*-cinnamoil-[2-hidroxi-2(4'-metoxifenil)] etilamina, denominada

como aegelina **(115)** (Della Casa *et al.*, 1972). También se hallaron dos constituyentes isoméricos que contienen nitrógeno en las cortezas de *Z. cuspidatum*, pero en pequeña cantidad. Afortunadamente, en una investigación realizada a las cortezas de *Z. arnottianum* se logró llegar a las estructuras de ambos isómeros y fueron llamados: arnottiamida **(116)** e isoarnottiamida **(117)** (Ishii y Ishikawa, 1976).

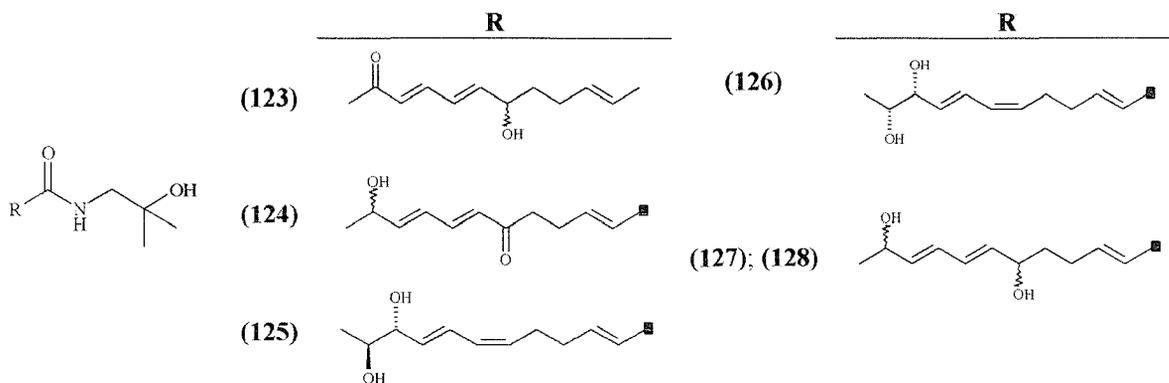


En el oeste de África Ecuatorial abunda *Zanthoxylum thomense* el cual se caracteriza por ser un árbol leñoso. De las cortezas de esta especie encontraron una nueva amida: zanthomamida **(118)** (Simeray *et al.*, 1985).

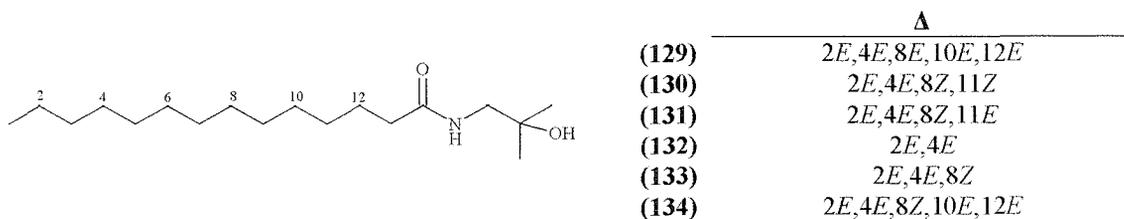
En busca del componente picante de los pericarpios de *Zanthoxylum alanthoides*, una especie japonesa, describieron dos nuevas amidas alifáticas ácidas insaturadas, nombradas como: γ -sanshoöl **(119)** e hidroxio- γ -sanshoöl **(120)**, que son las responsables del sabor picante (Yasuda *et al.*, 1981). Por otra parte, de las cortezas frescas y los pericarpios de *Z. piperitum* fueron aisladas independientemente cuatro amidas alifáticas: γ -sanshoöl **(119)**, hidroxio- γ -sanshoöl **(120)**, α -sanshoöl **(121)**, y una nueva amida hidroxio- α -sanshoöl **(122)**, la cual, es un derivado hidroxílico del α -sanshoöl **(121)** (Yasuda *et al.*, 1982).



De *Z. piperitum* se dice en Asia que ha sido usado como antihelmíntico y para el tratamiento de desórdenes estomacales. Los pericarpios de los frutos fueron nuevamente estudiados y del extracto de metanol de los pericarpios secos se obtuvieron seis amidas: ZP-amida A **(123)**, ZP-amida B **(124)**, ZP-amida C **(125)**, ZP-amida D **(126)**, ZP-amida E **(127)** y ZP-amida F **(128)**, siendo éstos dos últimos diastereoisómeros (Hatano *et al.*, 2004).

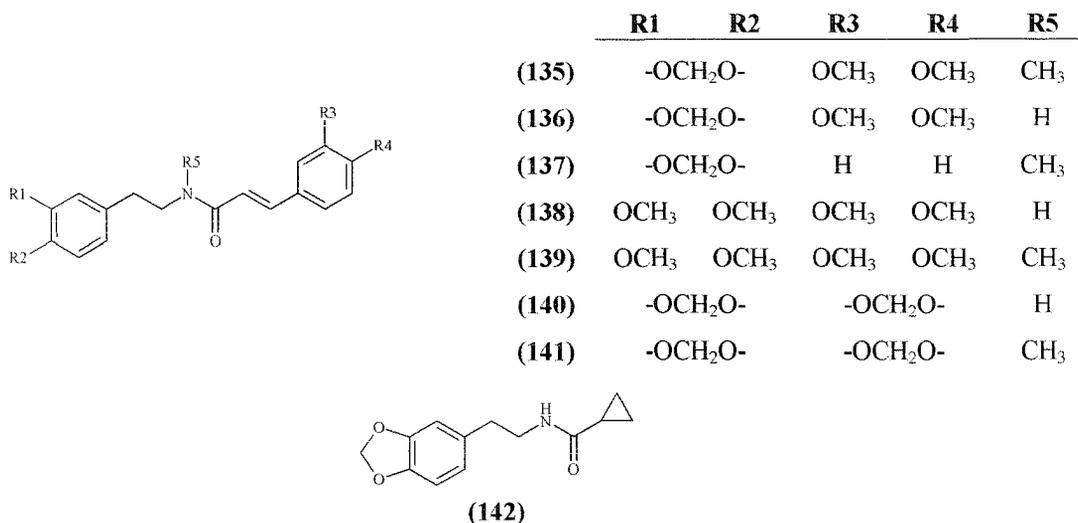


Los pericarpios de *Zanthoxylum bungeanum* que crece en Sicuani, China, son utilizados como picante para las comidas y también son aprovechados para el tratamiento de vómito, dolor de muelas, dolor de estómago y dolor abdominal causado por parásitos intestinales. En los pericarpios frescos se encontraron nuevamente: hidroxí- γ -sanshoöl (120), hidroxí- α -sanshoöl (122) y las nuevas amidas: hidroxí- γ -isosanshoöl (129) bungeanool e isobungeanool (130 y 131) siendo estos dos últimos isómeros geométricos (Mizutani *et al.*, 1988). De la misma forma se aislaron tres nuevas alquilamidas insaturadas: tetrahidrobungeanool (132), dihidrobungeanool (133) y por último dehidro- γ -sanshoöl (134) (Xiong *et al.*, 1997).



Zanthoxylum rubescens es conocido por sus compuestos picantes y aromáticos. En la medicina tradicional es usado para tratar el dolor de muelas y como expectorante. Por lo general, las amidas encontradas en otras especies se destacan por su acción antibacteriana, anticonvulsiva y antiepiléptica (Sengupta y Ray, 1987). Estas propiedades biológicas han estimulado la búsqueda de más principios activos, por esa razón, se estudiaron las cortezas del tallo, de las cuales se aislaron tres novedosas amidas cuyas estructuras fueron confirmadas mediante síntesis: rubescenamida (135), rubescenamina (136) y zanthosina (137) (Adesina, 1989). Durante otro estudio realizado a las cortezas del tallo y raíces de

esta especie se aislaron cuatro nuevas estructuras; en el extracto de metanol: rubemamina (138), rubemamida (139), dioxamina (140), dioxamida (141) y rubesamida (142), aislada por primera vez por Dadson y Minta (1976). Todas las estructuras fueron corroboradas mediante síntesis (Adesina y Reish, 1989).

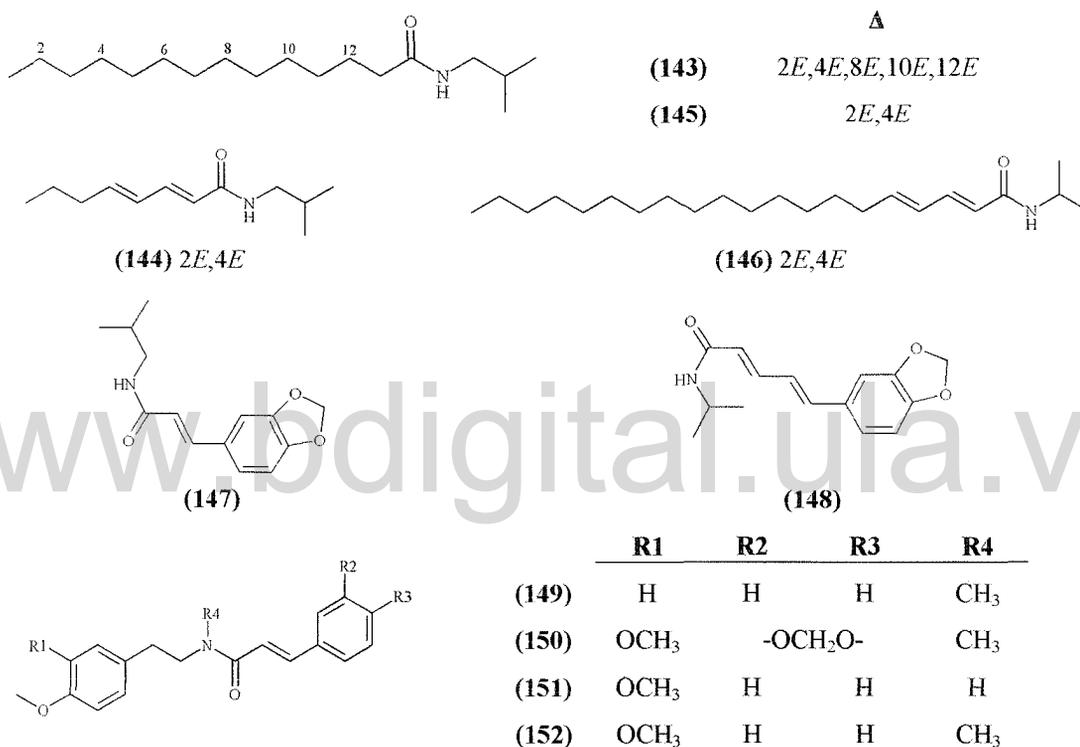


Los frutos de varias especies de *Zanthoxylum* son usados como estomáquicos aromáticos y como especias para la comida en Japón. Los pericarpios maduros son vendidos en el mercado Japonés, entre ellos los más populares son los de *Z. piperitum*, aunque actualmente en la mayoría de los mercados se vende es el *Budo-Zanthoxylum*, conocido como “*Budo-Zansho*”. Estos frutos son cultivados en una zona limitada de la Prefectura de Wakayama en el sur de la isla Honshû, en Japón. Las amidas presentes en el fruto del *Budo-Zanthoxylum* fueron estudiadas. En un extracto de cloroformo se obtuvo como resultado el aislamiento de una nueva amida: *N*-isobutil-2,4,8,10,12-tetradecapentaenamida (143), conjuntamente con las amidas: γ -sanshoöl (119), hidroxí- γ -sanshoöl (120), α -sanshoöl (121) e hidroxí- α -sanshoöl (122) (Kashiwada *et al.*, 1997).

Zanthoxylum lemairie es una planta medicinal de tamaño variable, que puede ser un árbol pequeño o muy grande dependiendo de la edad o del lugar donde se desarrolla. En los bosques tropicales del oeste de África abunda esta especie, y como algunos de los tipos de las especies de *Zanthoxylum*, al masticar las raíces produce un sabor muy picante, y por ende, produce una salivación abundante, por lo general, son masticadas por los ancianos para aliviar las llagas en las encías. En un estudio a los extractos de cloroformo de las raíces

y cortezas aislaron las amidas: *N*-isobutil-2,4-octadienamida (**144**), *N*-isobutil-2,4-tetradecadienamida (**145**), *N*-isobutil-2,4-eicosadienamida (**146**), γ -sanshoöl (**120**) y seis amidas aromáticas: fagaramida (**147**), piperlonguminina (**148**), herclavina (**149**), zanthomamida (**119**), arnottianamida (**117**) y zanthosinamida (**150**) (Adesina *et al.*, 1997a).

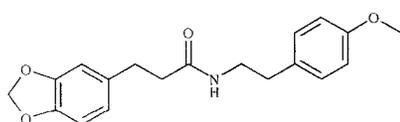
De la misma forma, en el extracto de cloroformo de los pericarpios, dos nuevas amidas aromáticas fueron obtenidas: lemairamina (**151**) y lemairamida (**152**) (Adesina *et al.*, 1997b).



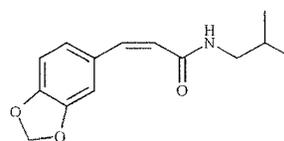
Zanthoxylum armatum es extensamente usado en la medicina tradicional de la India, como carminativo, antihelmíntico y para calmar el dolor de estómago. Las cortezas son picantes, y las ramas son preparadas en infusión para el dolor de muelas. Los frutos y semillas, son empleadas como tónico aromático para la fiebre, dispepsia y para expulsar lombrices intestinales. Las cortezas fueron extraídas con metanol a temperatura ambiente, de donde se aisló un compuesto cristalino que resultó ser una nueva amida aromática (*trans*-cinnamoilamida): armatamida (**153**) (Kalia *et al.*, 1999).

En una investigación realizada con el objetivo de determinar los constituyentes químicos y los principios de agregación plaquetaria, se estudiaron los frutos de *Zanthoxylum integrifolium*. Del extracto de metanol se aislaron tres nuevas isobutilamidas: lanyuamida I (154), lanyuamida II (155) y lanyuamida III (156) (Chen *et al.*, 1999a).

Zanthoxylum schinifolium es un arbusto con ramas encorvadas y espinosas que se encuentra en China, Corea, Japón y en los bosques montañosos de Taiwán. De una exploración hecha a las hojas de esta especie se aisló un nuevo producto natural: *cis*-fagaramida (157) (Cheng *et al.*, 2002).

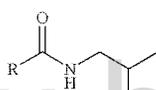


(153)



(157)

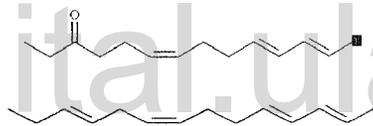
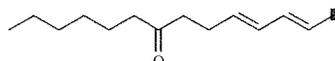
R



(154)

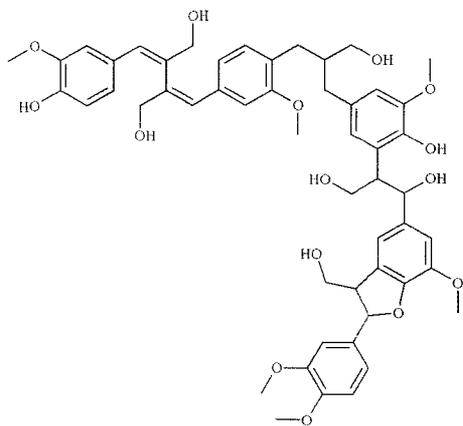
(155)

(156)

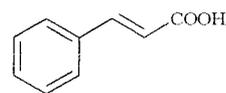


II.1.c- LIGNANOS

Las plantas pertenecientes al género *Zanthoxylum*, también biosintetizan algunos lignoides, este tipo de productos naturales se presentan en plantas vasculares; éstas a su vez poseen tejidos enriquecidos con lignina. La mayoría de los lignoides son dímeros, que se forman por la condensación oxidativa de dos moléculas de alcoholes cinamílicos entre sí o con ácidos cinámicos, el resultado se conoce como lignanos. Los neolignanos se forman por condensación de dos unidades de fenilarilcarbinoles y propenilfenoles. Por esta razón los carbonos γ de las cadenas laterales son oxigenados en los lignanos y no oxigenados en los neolignanos (Marcano y Hasegawa, 1991). A continuación se describen algunos lignoides que se han encontrado en el género.

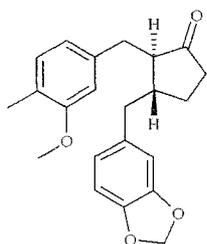


Lignina

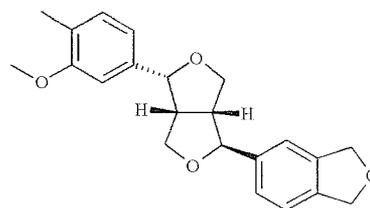


Ácido *trans*-cinámico

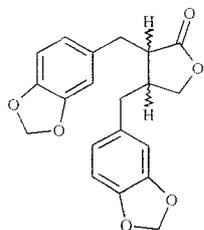
En un estudio fitoquímico a las especies australianas de *Zanthoxylum*, específicamente a las cortezas del tallo de *Z. pluviatile*, un árbol que alcanza aproximadamente 35 m de alto y crece en las montañas de los bosques lluviosos al este de Nueva Guinea, incluyendo las Islas Solomon, se aislaron dos nuevos lignanos: pluviatolida **(158)** y pluviatilol **(159)**, y junto a ellos hinokinina **(160)** y isohinokinina **(161)**. De la misma forma, de una fracción fenólica se determinó la estructura de otra nueva sustancia llamada pluviatida **(162)**, que puede tratarse de un derivado de la pluviatilol **(159)**. Todas las estructuras, para la época fueron propuestas por consideraciones espectroscópicas (Corrie *et al.*, 1970).



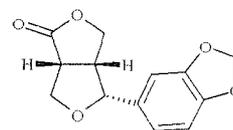
(158)



(159)



(160) *trans*
(161) *cis*

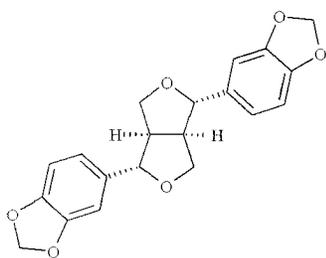


(162)

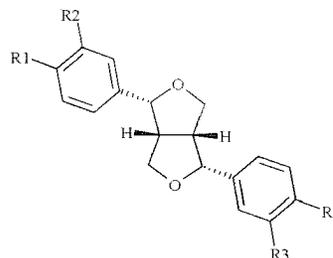
En el extracto de éter de petróleo de las cortezas de dos especies africanas de *Zanthoxylum*, *Z. chalybeum* y *Z. capense*, se aisló: (+)-sesamina (**163**), éste producto natural, al parecer, es muy común en especies del género, ya que también se localizó previamente en *Z. senegalense* y en *Z. viride* (Fish *et al.*, 1973).

Las cortezas del tronco de *Zanthoxylum piperitum* fueron examinadas y se determinaron cinco nuevos lignanos: xanthoxylol (**164**), piperitol (**165**), sus γ,γ -dimetilalil éteres (**166** y **167**) y sanshodiol (**168**), además se detectaron lignanos ya conocidos tales como (-)-asarinina (**169**), (+)-sesamina (**163**) y pluviatilol (**159**) (Abe *et al.*, 1974).

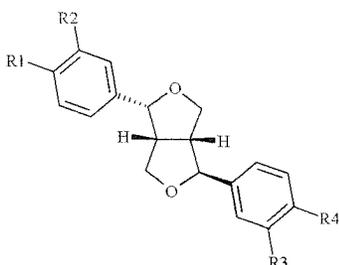
En un estudio realizado a las fracciones apolares de las hojas de *Zanthoxylum culantrillo* se aislaron y caracterizaron dos lignanos: la (-)-eudesmina (**170**) y la (+)-epieudesmina (**171**), estos compuestos al parecer ya habían sido encontrados en algunas especies asiáticas (Swinehart y Stermits, 1980). En años recientes, en los extractos etanólicos de las hojas de esta especie se encontró un nuevo lignano tetrahidrofuranico: 3,4-dimetoxi-3',4'-metilendioxi-7,9'-epoxilignano-9-ol (**172**), cuya estructura fue elucidada mediante técnicas espectroscópicas (Cuca *et al.*, 1998).



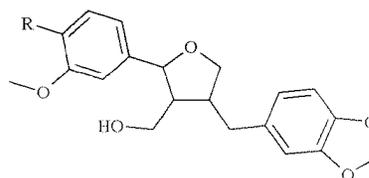
(163)



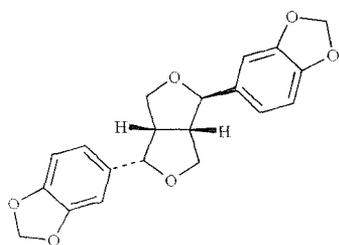
(164) R1= OH; R2= OCH₃; R3+R4= OCH₂O
(166) R1=OCH₂CH=C(CH₃)₂;R2=OCH₃;R3+R4=OCH₂O



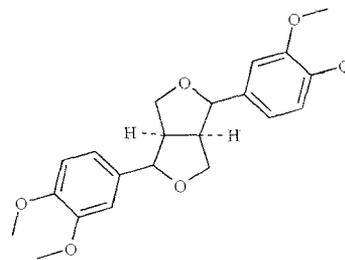
(165) R1=OH; R2=OCH₃; R3+R4=OCH₂O
(167) R1=OCH₂CH=C(CH₃)₂;R2=OCH₃;R3+R4=OCH₂O



(168) R=OH
(172) R= OCH₃



(169)

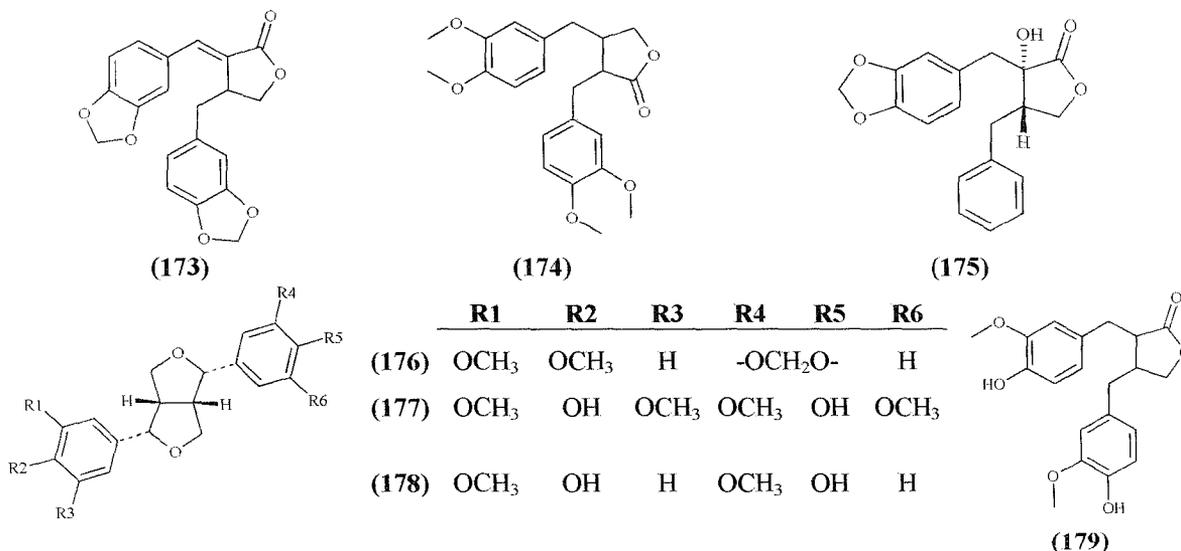


(170) Anillos arílicos *cis*
(171) Anillos arílicos *trans*

El *Zanthoxylum tessmannii* es considerado por algunos botánicos como sinónimo de *Z. gillettii*; sin embargo, otros los consideran como especies diferentes. En los extractos de las cortezas de las raíces solo se aislaron lignanos comunes para el género como (+)-sesamina (163), savinina (173) y el éter metílico de arctigenina (174) (Foyere *et al.*, 1984).

De las hojas y cortezas secas de *Zanthoxylum fagara* se obtuvo un nuevo lignano denominado meridinol (175), el nombre de este compuesto se debe a que la muestra fue recolectada en Lagunillas, Estado Mérida, en Venezuela. La determinación de la estructura se evidenció por espectroscopia y rayos-X, siendo el primer reporte de un lignano en esta especie (Amaro *et al.*, 1988).

En un estudio efectuado a los componentes de cuatro especies de *Zanthoxylum* (estas especies se encuentran en peligro de extinción por la expansión de la agricultura): *Z. setulosum*, *Z. valens*, *Z. kellermanii* y *Z. fagara* que se encuentran en el centro y sur de América se encontró: en las hojas de *Z. fagara* recolectada en Cali, Colombia, (+)-eudesmina (170) y (+)-epieudesmina (171); de las cortezas de *Z. valens* recogida en Tocache, Perú, (-)-kobusina (176), (-)-asarina (169) y (+)-sesamina (163); de la madera de *Z. setulosum*, recogida en San José de Costa Rica, (+)-sesamina (163) y (+/-)-siringaresinol (177); en la cáscara de la semilla de *Z. kellermanii* cosechado en Rio Nanay, cerca de Tampoto, Perú, (-)-pinoresinol (178) y mataresinol (179) (Marcos *et al.*, 1990a). Este último compuesto también fue hallado en *Z. schinifolium* (Chang *et al.*, 1997).



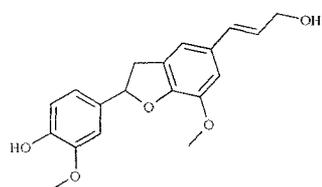
De las fracciones solubles en cloroformo de la madera de *Zanthoxylum ailanthoides* colectada en San-Ti-Men, Taiwán, se determinó un nuevo *nor*-lignano: ailanthoidol (**180**). Las hojas y las cortezas de esta especie son usadas en la medicina folklórica para el tratamiento del resfriado común y las mordeduras de serpiente (Sheen *et al.*, 1994).

En una investigación hecha a las plantas medicinales de Camerún, se reportaron y caracterizaron para *Zanthoxylum heitzii* dos nuevos lignanos: *meso*-2,3-*bis*(3,4,5-trimetoxibencil)-1-butanol (**181**) y 4-acetoxy-2,3-*bis*(3,4,5-trimetoxibencil)-1-butanol (**182**); también se encontraron lignanos ya conocidos como: el éter metílico de arctigenina (**174**) y (+)-sesamina (**163**). Todos fueron aislados de las cortezas del tronco (Ngouela *et al.*, 1994).

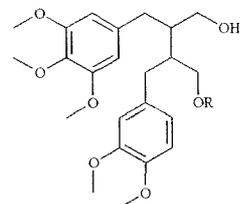
Por otro lado, como parte de una investigación a la composición química de las plantas brasileñas se determinó en las hojas de *Zanthoxylum petiolare* un lignano furofurano (**183**), así como también, nuevamente (+)-sesamina (**163**) y piperitol (**165**) (Arruda *et al.*, 1994).

De los pericarpios de los frutos de *Zanthoxylum lemaire* de Nigeria se aislaron y confirmaron mediante síntesis, una serie de lignanos: savinina (**173**), hinokinina (**160**) 2,3-di-(3,4-metilenodioxibencil)-2-buteno-4-olida (**184**), metil éter de arctigenina (**174**), guayadenina (**185**), metiltrachelogenina (**186**) (+)-sesamina (**163**) y 2-veratrilmetil-3-piperonil- γ -butirolactona (**187**) (Adesina *et al.*, 1997a).

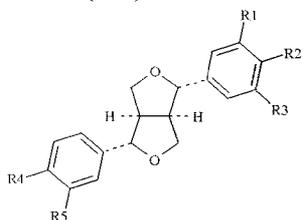
De igual forma, en un estudio a los constituyentes del extracto de metanol de los frutos secos de *Zanthoxylum integrifolium* fueron aislados dos nuevos lignanos: el éter di-(3,3'-dimetilalílico) de (+)-pinoresinol (**188**) y el éter 3-dimetilalílico de (+)-pinoresinol (**189**) (Chen *et al.*, 1999b).



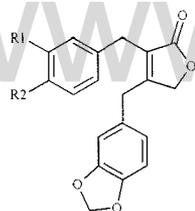
(180)



	R
(181)	H
(182)	Ac



	R1	R2	R3	R4	R5
(183)	H		OCH ₃	-OCH ₂ O-	
(188)	OCH ₃		H		OCH ₃
(189)	OCH ₃		H	OH	OCH ₃



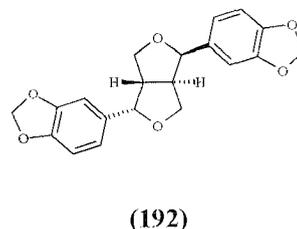
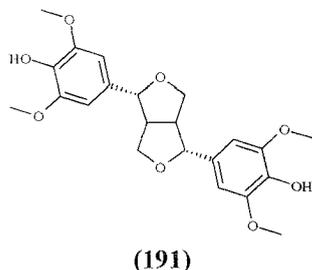
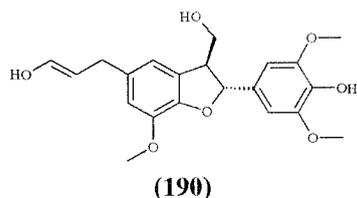
(184)

(185)

	R1	R2	R3
(184)	-OCH ₂ O-		
(186)	OCH ₃	OCH ₃	OH
(187)	-OCH ₂ O-		H

De las cortezas del tronco de *Zanthoxylum simulans* se aisló un lignano de nombre (-)-simulanol (**190**) (Yang, *et al.*, 2002). Del *Zanthoxylum usambarense* se aislaron: éter di-(3,3'-dimetilalílico) de (+)-pinoresinol (**188**) y (+)-sesamina (**163**) (He *et al.*, 2002).

En el extracto de acetato de etilo de las cortezas secas de *Zanthoxylum budruga* se aislaron: (+) sesamina (**163**) y (-)-siringaresinol (**191**), que para esa oportunidad fue reportado por primera vez en la especie a pesar de ser muy común en la familia Rutaceae (Rahman *et al.*, 2005). Finalmente, de las cortezas del tronco de *Zanthoxylum davyi*, (*F. davyi*) recolectado en Mpumalanga, al sur de África, se encontró un lignano: meso-sesamina (**192**) (Tarus *et al.*, 2006).



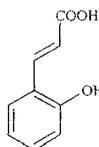
II.1.d.- CUMARINAS Y CROMONAS

Las α -pironas que se generan por la lactonización del ácido *o*-cumárico se conocen como cumarinas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. La estructura más simple, es la cumarina misma, y es utilizada como aromatizante en confitería.

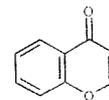
Las cumarinas se encuentran en su mayoría oxigenadas en el C7, y presentan a menudo una o varias unidades de isopreno en posiciones *orto* al oxígeno fenólico, que puede a su vez formar, por degradación de la cadena, furocumarinas lineales o angulares. Son compuestos altamente fluorescentes bajo luz UV y aun en la región visible, particularmente cuando se rocían con ácido sulfúrico. Las isocumaronas son estables en medio ácido y existen pocos ejemplos de las mismas. Las cromonas poseen un núcleo benzo- γ -pirona y presentan un máximo de absorción en UV muy intenso a 240-250 nm, mientras que las cumarinas presentan un mínimo en esa región (Marcano y Hasegawa, 1991).



α -pirona



Ácido *o*-cumárico



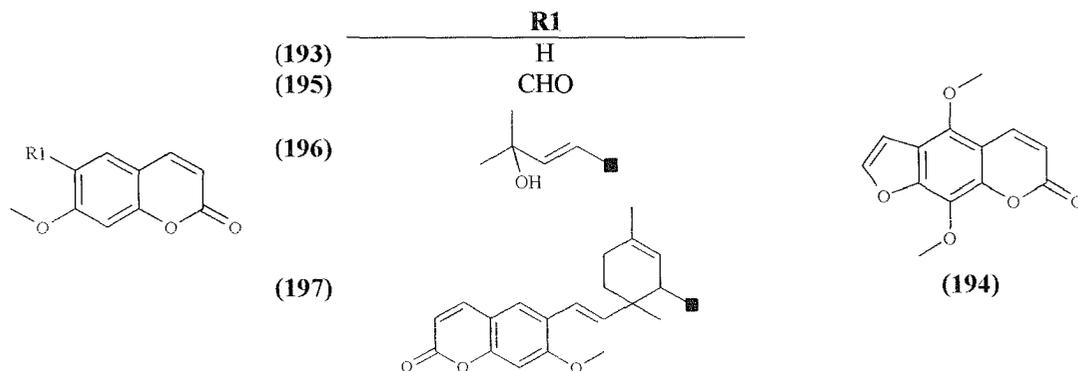
Cromona

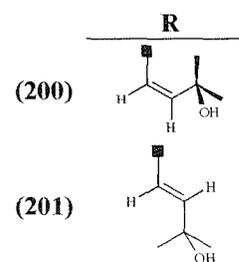
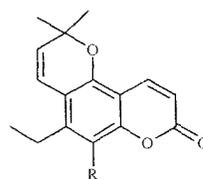
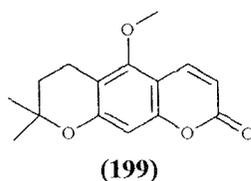
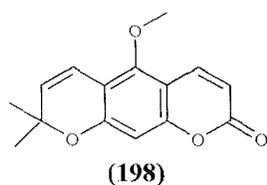
Algunas especies del género *Zanthoxylum* presentan estos tipos de productos naturales y a continuación se describen algunos de ellos.

De la corteza de *Zanthoxylum dominianum* se aisló la cumarina de nombre suberosina (**193**), aislada por primera vez del *Z. suberosum*; aunque, en una revisión parcial del género publicada por Hartley en 1966, expresa que *Z. suberosum*, *Z. dominianum* y *Z. ovalifolium* son la misma especie y que el nombre preferido es el último. Sin embargo, al examinar el material se identificó como *Z. dominianum*, recolectado en Nueva Guinea. En este mismo estudio, también se aislaron otras cumarinas: isopimpinellina (**194**), 7-metoxicumarina-6-aldehído (**195**) y dos nuevas: suberenol (**196**) y ciclobisubero dieno (**197**) (Guise *et al.*, 1967).

Del extracto de éter de petróleo de las cortezas pulverizadas de *Zanthoxylum elephantiasis*, se hallaron en grandes cantidades: xanthoxyletina (**198**) y dihidroxanthoxyletina (**199**); ambas cumarinas fueron identificadas por sus propiedades físicas y técnicas espectroscópicas (Tomko *et al.*, 1968).

Xanthoxyletina (**199**), asimismo, fue encontrada en un estudio de las cortezas del tallo de *Zanthoxylum sarasinii* (Simeray, *et al.*, 1988). Años más tarde fue aislada una piranocumarina de las cortezas de las raíces de *Z. elephantiasis* y fue identificada como *cis*-avicennol (**200**) la cual anteriormente había sido aislada de *Z. avicennae* (Gray *et al.*, 1975), de *Z. dipelatum* (Fish *et al.*, 1975a) y en la misma especie *Z. sarasinii* (Fish *et al.*, 1976a); de igual manera, se encontró una piranocumarina angular que denominaron como avicennol (**201**), este producto natural solo se encuentra en las especies de la familia Rutaceae y por lo general en este género. La identificación fue confirmada por comparación de los datos espectrales obtenidos previamente para el *cis*-avicennol (**200**) (Gray *et al.*, 1977).





De *Zanthoxylum arnottianum* se aisló una nueva cumarina fenólica de nombre arnottinina (**202**) y cuya estructura fue establecida mediante datos espectrales (Ishii y Ishikawa, 1975).

En el extracto de éter de petróleo de las cortezas del tallo de *Zanthoxylum dipelatum* aislaron una nueva piranocumarina y le dieron el nombre de dipelactona (**203**) y un posible contaminante, otra piranocumarina, la dipetalina (**204**). Estas estructuras se confirmaron mediante síntesis (Fish *et al.*, 1976b).

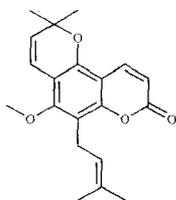
Del extracto de hexano de la madera de *Zanthoxylum procerum* de Costa Rica, obtuvieron un óptimo rendimiento de la cumarina: 6,7,8-trimetoxicumarina (**205**) (Boulware y Stermitz, 1981). Años más tarde, este producto también lo aislaron del *Z. lemairie* (Adesina *et al.*, 1997a).

De los extractos de los frutos de *Zanthoxylum fagara* de Méjico precipitó un sólido de color naranja-rojizo cuyo análisis espectroscópico mostró que se trataba de una nueva bi-isocumarina, la cual llamaron: castanaguyona (**206**) (Snyder *et al.*, 1981).

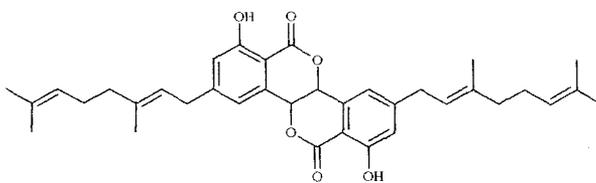
De la misma manera, cuatro cumarinas conocidas fueron halladas en las raíces de *Zanthoxylum usambarense*: toddaculina (**207**), fellopterina (**208**), isopimpinellina (**194**) y toddalolactona (**209**), y una nueva cumarina natural: *O*-metilcedrelopsina (**210**) (Kokwaro *et al.*, 1983).

	R1	R2	R3	R4
(202)	H	H	OH	
(205)	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
(207)	OCH ₃		OCH ₃	H
(209)	OCH ₃		OCH ₃	H
(210)	H	OCH ₃	OCH ₃	

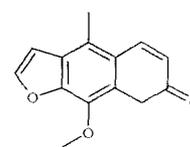
(203)



(204)



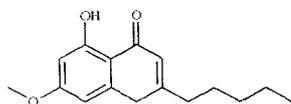
(206)



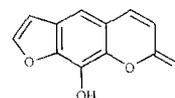
(208)

El estudio de los constituyentes químicos de las especies americanas de *Zanthoxylum*, aislaron una nueva cromona: 5-hidroxi-7-metoxi-2-pentilcromona (**211**) del extracto de éter de petróleo de las cortezas de *Z. valens* y de *Z. microcarpum*, siendo ésta la primera cromona que se ha aislado con un grupo pentilo sobre C2 (Jiménez *et al.*, 1989). De las hojas, frutos y cortezas de *Z. rhoifolium* se aislaron seis cumarinas las cuales identificaron como: isopimpinellina (**194**), fellopterina (**208**), imperatonina (**212**), auraptena (**213**), umbelliferona (**214**) y 5-hidroxiauraptena (**215**) (Arruda *et al.*, 1992a).

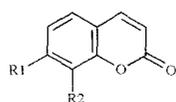
El estudio del extracto de cloroformo de la corteza de *Zanthoxylum schinifolium* permitió el aislamiento de dos nuevas terpenilcumarinas: 7-(5',6'-dihidroxi-3',7'-dimetilocta-2',7'-dieniloxi)-cumarina (**216**) y 7-(5',6'-dihidroxi-3',7'-eniloxi)-8-metoxicumarina (**217**), además de las conocidas anisocumarina (**218**) y collinina (**219**) (Chang *et al.*, 1997). Otro reporte realizado de las cortezas de las raíces condujo al descubrimiento de ocho nuevas cumarinas: metilschinilenol (**220**), 8-metoxianisocumarina (**221**), schinitrienina (**222**), hidroxiepoxicollinina I (**223**), hidroxiepoxicollinina II (**224**), schininallilona (**225**), isoschinilenol (**226**) e hidroxischininallioliol (**227**) (Tsai *et al.*, 2000).



(211)



(212)



	R1	R2
(213)		H
(214)	OH	H
(215)		H
(216)		H
(217)		OCH ₃
(218)		H
(219)		OCH ₃
(220)		OCH ₃
(221)		OCH ₃
(222)		OCH ₃
(223)		OCH ₃
(224)		OCH ₃
(225)		OCH ₃
(226)		OCH ₃
(227)		OCH ₃

II.1.e.- FLAVONOIDES

Los flavonoides (figura 5), sin ser metabolitos primarios, se encuentran en la mayoría de los vegetales superiores. Su estructura por lo general, comprende un anillo A derivado de la cadena policétida, un anillo B, con sustitución en posición 4 (*para*) y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, que son los que corresponden a la parte alquílica del fenilpropano. Los representantes más abundantes de los flavonoides naturales son las flavonas y los flavonoles. En la naturaleza se encuentran tanto libres como formando glicósidos (Marcano & Hasegawa, 1991).

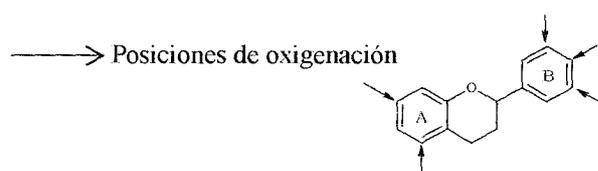


Figura 5. Estructura general de los flavonoides.

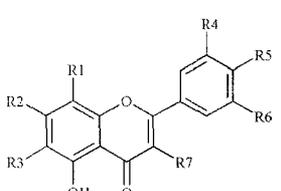
Existen pocos reportes acerca de este tipo de producto natural dentro del género *Zanthoxylum*; seguidamente se describen algunos de ellos.

Zanthoxylum acanthopodium y *Z. alatum* son especies muy conocidas en la India. Bose y Bose en 1939, aislaron dos flavonoides: *tambulina* y *tambulol* de *Z. acanthopodium*; las estructuras fueron asignadas como *5,7-dihidroxi-3,8,3'-trimetoxiflavona* y *5,7-dihidroxi-6,8,4'-trimetoxiflavona*, respectivamente. Años más tarde, Balakrishna y Seshadri en 1947, aislaron un flavonol: *tambuletina* (**228**), en lugar de *tambulina* y *tambulol*, de algunas plantas y la caracterizaron como *8-O-metilherbacetina*. Luego, Harborne en 1971, demostró que la *tambuletina* (**228**) aislada por Balakrishna y Seshadri era un glicósido, *3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxi-8-O-glucosilflavona*. Sin embargo, en un estudio hecho al extracto de metanol de las semillas de estas especies, se logró aislar de nuevo la *tambuletina* (**228**), confirmando su verdadera estructura como *3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxi-8-O-β-D-glucopiranosilflavona* (Ramachandran *et al.*, 1982).

Zanthoxylum alatum, también se conoce como *Z. armatum* o *Z. planispinum*, se caracteriza por ser un árbol siempre verde con un follaje bastante denso y crece en las altitudes entre 1000-2100 msnm en los valles del Himalaya. En un estudio efectuado a las

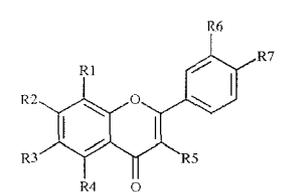
semillas de esta especie se aislaron dos nuevos flavonoides: zanthoxylflavona (**229**) y geranioloxialatumflavona (**230**) (Ramidi & Ali, 1999).

De *Zanthoxylum rhoifolium* del sur de Brasil también se han encontrado flavonoides como: vitexina (**231**), isovitexina (**232**) y hesperidina (**233**) (Arruda, et al., 1992a). Éste último también fue aislado de las raíces del *Z. avicennae* (Fish *et al.*, 1975b).

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	(228)	Glc	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	H OH
	(229)	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OH	H OH
	(230)	H	OCH ₃	OCH ₃	OH		H OH
	(231)	Glc	OH	H	H	OH	H H
	(232)	H	OH	Glc	H	OH	H H
	(233)	H	ORut	H	H	OCH ₃	OH OH

De un extracto preparado con 95% de etanol y consecuentemente separado con hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol de los pericarpios de *Zanthoxylum bungeanum*, se identificaron nueve flavonoides: hiperina (**234**), quercetina (**235**), quercitrina (**236**), foeniculina (**237**), rutina (**238**), 7-glucósido de isorhamnetina (**239**), 3,5,6-trihidroxí-7,4'-dimetoxiflavona (**240**), 7-glucósido de 3',4'-dimetil éter de quercetina (**241**) y 3,7-bis-glucósido de tamarixetina (**242**) que fueron verificadas por comparación con datos espectroscópicos descritos en la literatura (Xiong *et al.*, 1995).

De los frutos de *Zanthoxylum integrifolium* se encontró un nuevo flavonoide: 3,5-diacetiltambulina (**243**), en la fracción soluble en cloroformo (Chen *et al.*, 1999b).

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	(234)	H	OH	H	OH	β-Gal	OH OH
	(235)	H	OH	H	OH	OH	OH OH
	(236)	H	OH	H	OH	α-Ram	OH OH
	(237)	H	OH	H	OH	α-Ara	OH OH
	(238)	H	OH	H	OH	α-Ram(1→6)β-Glc	OH OH
	(239)	H	β-Glc	H	OH	OH	OCH ₃ OH
	(240)	H	β-Glc	H	OH	OH	OCH ₃ OCH ₃
	(241)	H	β-Glc	H	OH	β-Glc	OH OCH ₃
	(242)	H	OCH ₃	OH	OH	OH	H OCH ₃
	(243)	OCH ₃	OCH ₃	H	OAc	OAc	H OAc

II.1.f.- TERPENOIDES

La variedad estructural de los terpenoides dificulta el resumen de las características comunes de estos compuestos, pues no solamente se trata de los grupos funcionales, sino además del número de átomos de carbono que conforman el esqueleto. Los terpenoides están distribuidos ampliamente en el reino vegetal, su frecuencia y abundancia están ligadas a factores climáticos y genéticos. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como la *regla del isopreno*, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpenoide es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno (figura 6). Por ejemplo, los *monoterpenos* poseen dos unidades de isopreno, o sea diez átomos de carbono, los *sesquiterpenos* contienen quince átomos de carbono, los *diterpenos* veinte átomos de carbono, los *triterpenos* treinta átomos de carbono, y así sucesivamente (Marcano & Hasegawa, 1991).

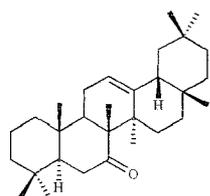


Figura 6. Unidad de isopreno

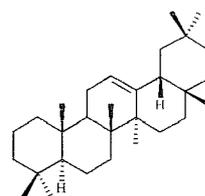
La mayoría de los terpenoides que se encuentran en el género *Zanthoxylum* están ubicados en los aceites esenciales de las hojas o los frutos, y al igual que los flavonoides existen pocos reportes acerca de estos tipos de metabolitos secundarios; a continuación se presentan algunos de ellos.

Zanthoxylum rhetza se encuentra mayormente distribuido en la India, éste ha exhibido propiedades antibióticas y es prescrita para la dispepsia y para la diarrea. Los frutos son aromáticos y son usados como estimulante y sus extractos son activos contra varios microorganismos patógenos (Mathur *et al.*, 1967). Del extracto de éter de petróleo, de las cortezas de esta especie se aisló un nuevo triterpenoide cetopentacíclico y le dieron el nombre de xanthoxylona (**244**) o 7-ceto- β -amireno. Su estructura y estereoquímica fueron determinadas por comparación siguiendo los datos espectrales del β -amireno (**245**) (Chatterjee *et al.*, 1974). Los aceites esenciales de los frutos de esa especie tienen como componente mayoritario el mullilamdiol (**246**); éste fue identificado mediante

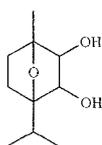
espectroscopia IR y RMN (Mathur *et al.*, 1967). En el más reciente estudio de esta especie encontraron un nuevo compuesto, el alcohol 3,5-dimetoxi-4-geraniloxicinnamílico (247) (Ahsan *et al.*, 2000).



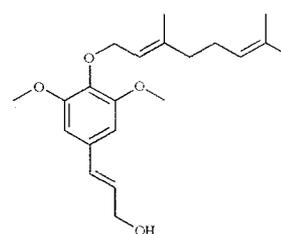
(244)



(245)

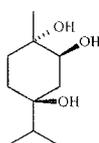


(246)

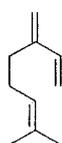


(247)

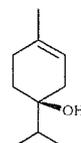
Aunque, algunos dioles y diol-éteres han sido aislados de fuentes naturales, como en el caso anterior, también se han aislado compuestos trióxidos que son bastantes raros; sin embargo, en una investigación de los aceites de los frutos de *Zanthoxylum budrunga* se aisló un extraño y nuevo monoterpeno triol (248); su estructura fue confirmada por medio de síntesis (Thappa *et al.*, 1976). Otro estudio por espectroscopia de gases-masas y por métodos olfatorios de aceites esenciales realizado a las hojas de *Z. gillettii* de Camerún dio como resultado principalmente terpenos, algunos de ellos fueron: mirceno (249), terminen-4-ol (250), limoneno (251), canfeno (252), α -pineno (253), β -pineno (254), geraniol (255), ocimeno (256), terpinen-4-ol (257), sabineno (258), linalool (259), β -cariofileno (260), γ -cadieno (261), fenchol (262) y α -terpireno (263) (Jirovetz *et al.*, 1999).



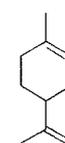
(148)



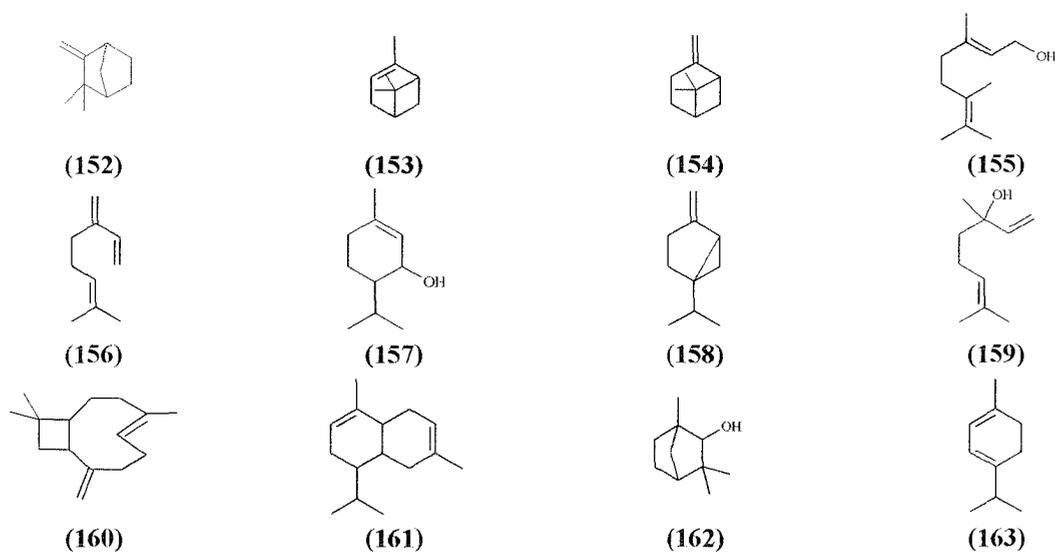
(149)



(150)



(151)

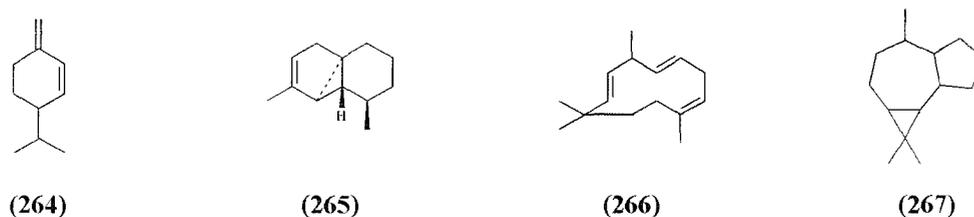


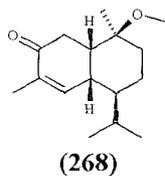
De igual manera, en los aceites esenciales de las hojas de *Zanthoxylum procerum* de Costa Rica se aislaron los mismos terpenoides que en *Z. gillettii*; además de estos, también se aislaron β -fellandreno (**264**), α -cubebano (**265**), humuleno (**266**) y aromadendrano (**267**) (Vila *et al.*, 2002). Resultados semejantes se encontraron en el aceite esencial de los frutos de *Z. rhoifolium*, (de Abreu *et al.*, 2003b) y en el aceite de la semilla de *Z. alatum* (Ramidi *et al.*, 1998).

Por otro lado, de las cortezas de *Zanthoxylum ailanthoides* identificaron dos nuevos sesquiterpenos que fueron caracterizados como: 10β -metoximurolan-4-en-3-ona (**268**) y 10α -metoxicadinan-4-en-3-ona (**269**) (Cheng *et al.*, 2005).

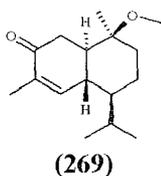
Del extracto hexánico de las hojas frescas *Zanthoxylum rhoifolium* recolectado en Mérida, Venezuela, se reportó por primera vez dos diterpenos: $13(S)$ - $8\alpha,15$ -labdanodiol (**270**) y $13(R)$ - $8\alpha,15$ -labdanodiol (**271**), estas estructuras fueron identificadas por espectroscopia y rotación óptica (Santiago y Rosquete, 2004).

Por último, de las cortezas de *Zanthoxylum sarasinii* se aislaron terpenoides que son muy comunes; estos son: lupeol (**272**) y β -sitosterol (**273**) (Simeray *et al.*, 1988).

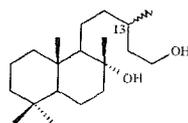




(268)

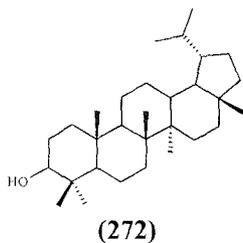


(269)

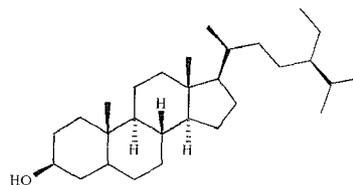


(270) 13(*S*)

(271) 13(*R*)



(272)



(273)

www.bdigital.ula.ve

III. *Bulnesia arborea* Cl. Gay (ZYGOPHYLLACEAE)

www.bdigital.ula.ve

III.1 FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA ZYGOPHYLLACEAE

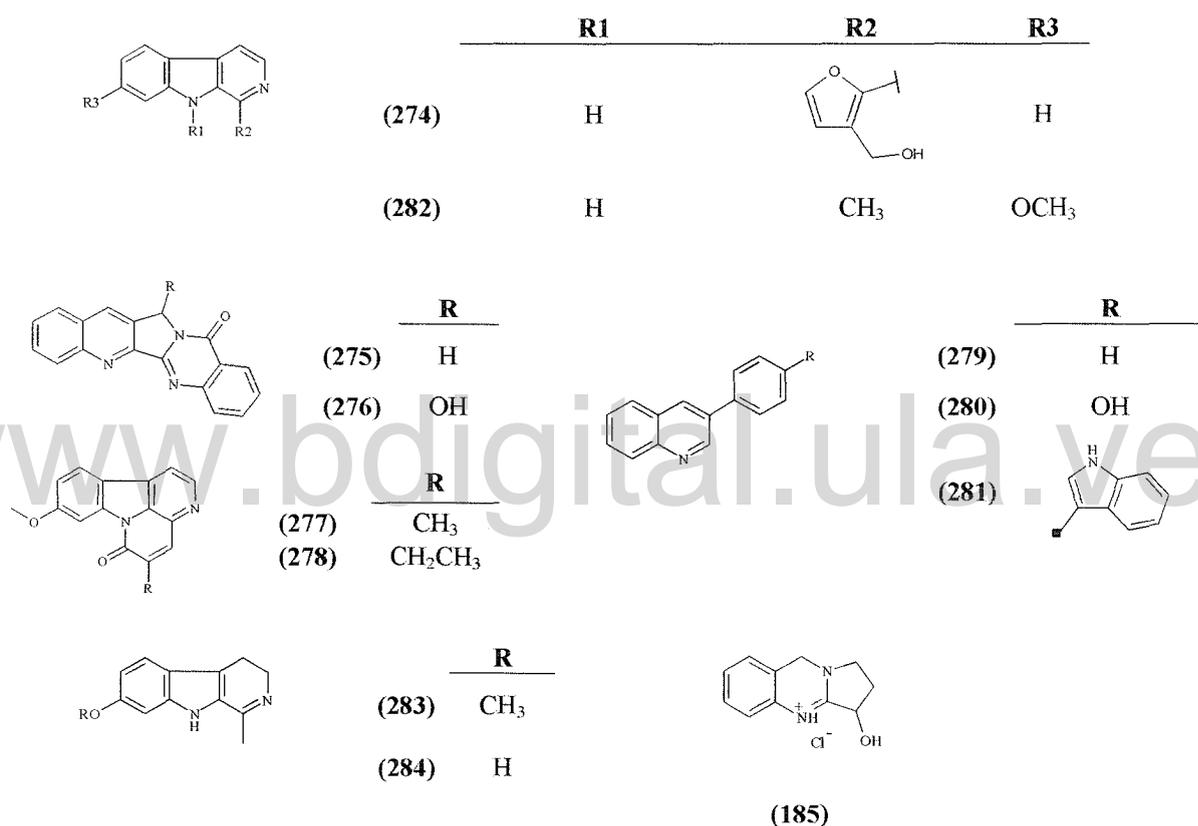
Como se mencionó en la introducción, existen pocos estudios acerca del género *Bulnesia*, por lo que es necesario investigar la fitoquímica reportada de la familia Zygophyllaceae, para conocer de los tipos de metabolitos secundarios que podrían biosintetizar los géneros pertenecientes a esta familia y su abundancia. Varios géneros de la familia Zygophyllaceae han sido explorados fitoquímicamente desde mediados del siglo XX, los cuales han revelado que dicha familia biosintetiza una variedad de metabolitos secundarios mayoritarios, principalmente alcaloides, terpenoides y flavonoides. Adicionalmente, dicha familia se caracteriza por ser rica en saponinas triterpénicas y esteroidales

III.1.a.- Alcaloides

Existen muy pocos reportes acerca de este tipo de compuestos para la familia Zygophyllaceae. Algunos de ellos se encuentran en los frutos de *Tribulus terrestris*, conocidos popularmente en China como “jili” y famosos por su alta actividad farmacológica. Durante la continuación de una investigación de nuevos productos naturales bioactivos, el extracto crudo de los frutos secos de esa planta mostró una actividad antiinflamatoria significativa e inmunosupresora y conllevó al aislamiento de un nuevo alcaloide que llamaron tribulusterina (**274**) (Wu *et al.*, 1999).

Peganum nigellastrum comúnmente está localizado en la región noroeste de China. En la medicina tradicional de ese país es usada para el tratamiento de reumatismos, accesos y enfermedades inflamatorias (Ma *et al.*, 2000). Un estudio farmacológico realizado a esa planta reveló que la fracción básica posee una potente actividad antitumoral. (Xiao *et al.*, 1988). De esa planta se han aislado cuatro alcaloides tipo cantin-6-ona: luotoninas A (**275**) y B (**276**) (Khaliq *et al.*, 2009), luotoninas C (**277**) y D (**278**), tres alcaloides quinolínicos ya conocidos pero aislados por primera vez de esta especie: 3-fenilquinolina (**279**), 3-(4-hidroxifenil)-quinolina (**280**) y 3(1H-indol-3-il)-quinolina (**281**), y un alcaloide β -carbolina: harmina (**282**) (Ma *et al.*, 2000) que también se ha encontrado en *P. harmala* (Al-Shama *et al.*, 1981; Ayoub *et al.*, 1989; Nettleship y Slaytor, 1974).

De esta última especie se han aislado también otros alcaloides de tipo β -carbolinas como harmalina (283) y harmalol (284), estos compuestos al igual que harmina (282) son conocidos por ser estimulantes del sistema nervioso central e inhibidores de aminooxidasas (Ayoub *et al.*, 1989). Una investigación realizada a una sustancia aislada también del *P. harmala*, denominada hidroclorehidro de peganina (285) demostró una fuerte actividad contra amastigotos y promastigotos de *Leishmania donovani* (Khaliq *et al.*, 2009).

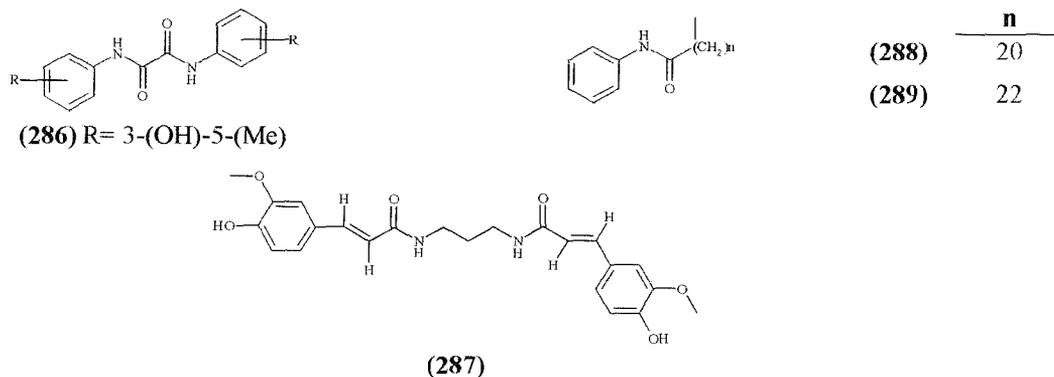


III.1.b.- AMIDAS.

Hasta el momento, no se han encontrado gran variedad de estos compuestos en la familia Zygophyllaceae, solo han sido reportados en las semillas de *P. harmala*, de donde aislaron *N,N'*-[(3-hidroxi-5-metil)-oxamida (286) (Ayoub *et al.*, 1989).

En los frutos de *Tribulus terrestris* determinaron una nueva amida, la terrestribisamina (287). *T. cistoides*, conocida al sur de África, Estados Unidos y se

extiende a lo ancho de América Central, puede ser tóxica para el ganado ovino y en consecuencia causar daños económicos; los nativos de México la llaman “abrojo de tierra caliente” y las infusiones acuosas de las raíces son usadas para los desórdenes en los riñones y en la vejiga, también son usadas contra la malaria. De esta planta aislaron *N*-docosanoiltiramina (**288**) y *N*-tetracosanoiltiramina (**289**) (Achenbach *et al.*, 1994).



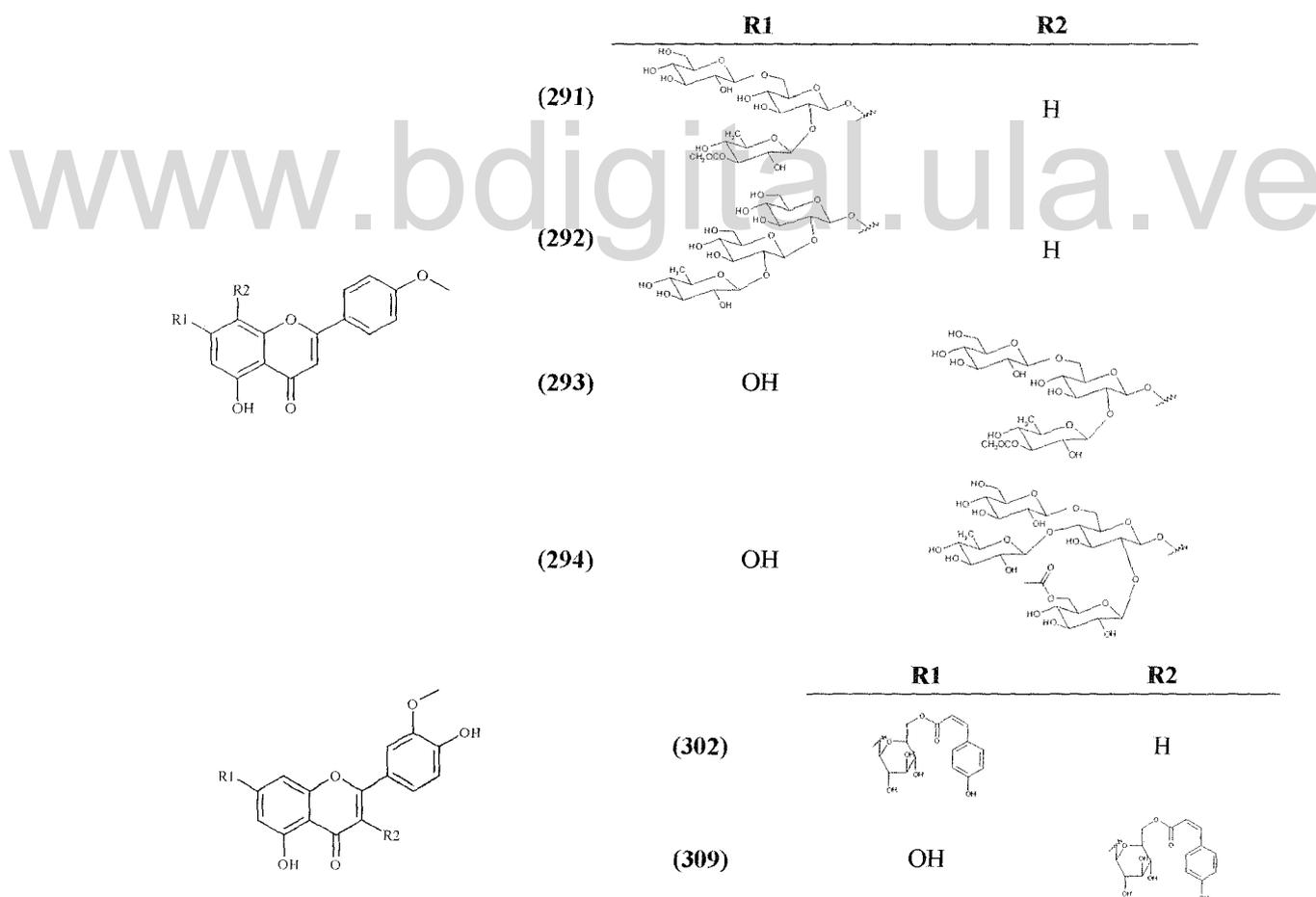
III.1.c.-FLAVONOIDES

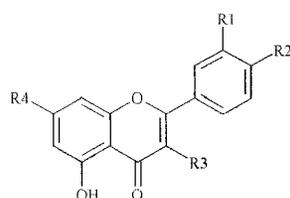
Dentro de la familia Zygophyllaceae se han aislado numerosos flavonoides. Gran parte de la actividad farmacológica que ha sido reportada para los géneros pertenecientes a esta familia se debe a la presencia de estos compuestos. A continuación se muestran algunos de ellos.

Estudios fitoquímicos realizados a *Fagonia sinaica* demostraron la presencia de flavonoides glicosidados como 3,7-*O*-Di-β-D-glucopiranosido de isorhamnetina (**290**) (Al *et al.*, 1988). De *Pegamum harmala* se han aislado algunos flavonoides: 7-*O*-[6''-*O*-glucosil-2''-*O*-(3''''-acetilramnosil)]-glucósido de acetina (**291**), 7-*O*-[2''-*O*-ramnosil-2''glucosil]-glucósido de acetina (**292**), 2''-*O*-ramnosil-2''-*O*-glucosil-citisósido (**293**) (Sharaf *et al.*, 1997) y 7-*O*-[ramnosil-(1-4'')-gluco-(1-6'')-6''''-*O*-acetilsoforósido] de acetina (**294**) (Ahmed y Saleh, 1987; Saleh, 1994).

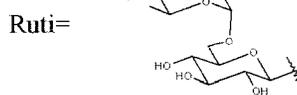
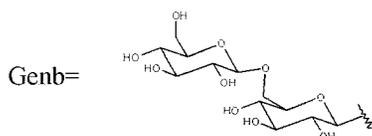
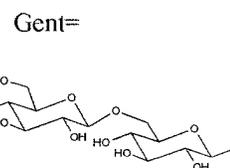
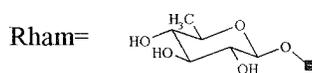
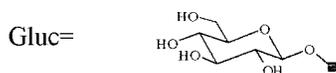
El género *Tribulus* es el mayormente representado dentro de la familia Zygophyllaceae, cuenta con aproximadamente veinticinco especies (Saleh *et al.*, 1982) de las cuales las más comunes en la India son *T. terrestris*, *T. cistoides* y *T. alantus* (Bhutani *et al.*, 1969) y por lo general están distribuidas en zonas áridas y semiáridas del Medio Oriente, África, Asia Menor y Australia (Saleh *et al.*, 1982). De *T. terrestris* se han aislado varios flavonoides tales como: rutina (**295**) (Dinchev *et al.*, 2008), 3-glucósido de

quercetina (296), 7-glucósido de quercetina (297), 3-gentiobiosido de quercetina (298), 3-rutinósido de quercetina (299), 3-gentiotriósido de quercetina (300), 3-gentiobiosido-7-glucósido de quercetina (301), tribulosido (302) (Bhutani *et al.*, 1969), 3-rutinósido de kaempferol (303), 3-gentiobiosido de kaempferol (304), 7-glucósido de kaempferol (305), 3-glucósido de isorhamnetina (306), 3-gentiobiosido de isorhamnetina (307), 3-rutinósido de isorhamnetina (308), 3-*p*-cumaroilglucopiranosido de isorhamnetina (309), 3,7-diglucósido de isorhamnetina (310), 3-gentiobiosido-7-glucósido de isorhamnetina (311), 3-gentiotriósido de isorhamnetina (312), 3-gentiotriósido-7-glucósido de isorhamnetina (313) (Saleh *et al.*, 1982). Todos estos compuestos igualmente fueron aislados de *T. pentandrus*, y además también se encontraron 3,7-diglucósido de quercetina (314), 3-rutinósido-7-glucósido de quercetina (315), 3-glucósido de kaempferol (316), 7-glucósido de kaempferol (317) y 3,7-diglucósido de kaempferol (318) (Saleh *et al.* 1982).





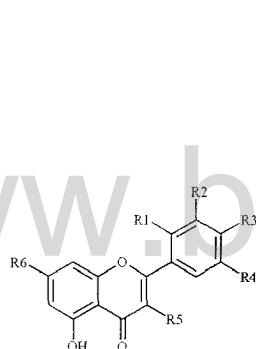
	R1	R2	R3	R4
(290)	OCH ₃	OH	Gluc	Glu
(295)	OH	OH	-β-D-Glc ⁶ -α-L-Rha	OH
(296)	OH	OH	Gluc	OH
(297)	OH	OH	Glu	OH
(298)	OH	OH	Genb	OH
(299)	OH	OH	Ruti	OH
(300)	OH	OH	Gent	OH
(301)	OH	OH	Genb	Gluc
(303)	H	OH	Ruti	OH
(304)	H	OH	Genb	OH
(305)	H	OH	OH	Gluc
(306)	OCH ₃	OH	Gluc	OH
(307)	OCH ₃	OH	Genb	OH
(308)	OCH ₃	OH	Ruti	OH
(310)	OCH ₃	OH	Gluc	Gluc
(311)	OCH ₃	OH	Gluc	Genb
(312)	OCH ₃	OH	Gent	OH
(313)	OCH ₃	OH	Gent	Gluc
(314)	OH	OH	Gluc	Gluc
(315)	OH	OH	Ruti	Gluc
(316)	H	OH	Gluc	OH
(317)	H	OH	OH	Gluc
(318)	H	OH	Gluc	Gluc



El género *Larrea* está compuesto por cinco especies extendidas al norte y sur de América, específicamente en las zonas áridas y semiáridas del continente. Algunas especies como *L. cuneifolia*, *L. nitida* y *L. ameghinoi* son oriundas de Argentina. *L. divaricata* crece principalmente en Argentina y escasamente en pequeñas poblaciones en Perú, Chile y Bolivia y *L. tridentata* se extiende al norte de América. La química de la resina externa de

L. tridentata ha despertado mucho interés debido a su poder antioxidante, ya que aproximadamente un 50 % p/p de los metabolitos secundarios que ella biosintetiza son flavonoides (Sakakibara *et al.*, 1975; 6, Sakakibara y Mabry, 1975; Sakakibara *et al.*, 197).

Algunos estudios de estas especies como *L. cuneifolia* y *L. tridentata* reportaron flavonoides tales como: 3,7,3'-trimetiléter de quercetina (**319**), 7,3',4'-trimetiléter de quercetina (**320**), 3,7,3',4'-tetrametiléter de quercetina (**321**), 3,7-dimetiléter de quercetina (**322**), 7,3'-dimetiléter de quercetina (**323**), 3'-metiléter de quercetina (**324**), 3,3'-dimetiléter de quercetina (**325**), 3,7-dimetiléter de kaempferol (**326**), 3-metiléter de kaempferol (**327**), 7-metiléter de kaempferol (**328**), kaempferol (**329**) (Sakakibara *et al.*, 1976; Valesi *et al.*, 1972), 7,3'-dimetiléter de luteolina (**330**), 3'-metiléter de luteolina (**331**), 7-metiléter de apigenina (**332**), apigenina (**333**), dihidromiricetina 3',5'-dimetiléter (**334**) (Sakakibara *et al.*, 1976).



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
(319)	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
(320)	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
(321)	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
(322)	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
(323)	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH
(324)	H	OCH ₃	OH	H	OH	OCH ₃
(325)	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH
(326)	H	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
(327)	H	H	OH	H	OCH ₃	OH
(328)	H	H	OH	H	OH	OCH ₃
(329)	H	H	OH	H	OH	OH
(330)	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃
(331)	OCH ₃	OH	H	H	H	OH
(332)	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
(333)	H	OCH ₃	H	H	H	OH
(334)	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH

El género *Zygophyllum* está conformado por plantas que crecen al noroeste de África, en la región de Arabia. *Z. simplex* es muy común en Egipto y el jugo de sus hojas es usado como loción limpiadora y para el tratamiento de marcas en la piel ocasionadas por lesiones. Un estudio realizado a esta especie reportó algunos flavonoides conocidos como 3-rutinósido de kaempferol (**303**), 3-glucósido de isorhamnetina (**306**), 7-metiléter de kaempferol (**328**) (Hassanean y Desoky, 1992).

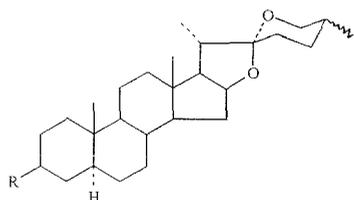
III.1.d.-SAPONINAS

Las saponinas, son un grupo de sustancias glicosídicas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis de una saponina (ácida, microbiológica o enzimática) se obtienen carbohidratos y una aglicona “*sapogenina*”, la cual estructuralmente pueden ser de tipo esteroideal (C27) o triterpenoidal (C30) (Marcano y Hasegawa, 1991).

La familia Zygophyllaceae es muy rica en saponinas, las cuales constituyen un grupo farmacodinámico en los productos naturales por su extenso rango de actividad biológica (Ahmad *et al.*, 1993). Subsiguientemente, se muestran algunos ejemplos de ello.

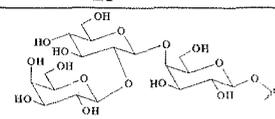
El género *Tribulus* es uno de los más populares dentro de esta familia, pues muchas preparaciones farmacéuticas y suplementos alimenticios están basados en fracciones de saponinas de esta planta y son vendidas mundialmente (Xu *et al.*, 2000). Existen varias investigaciones fitoquímicas dirigidas de *T. terrestris* originario de China, India y Bulgaria, mientras que estudios de esta misma especie pero nativa de otros países como Turquía, Moldava, Suráfrica, Australia y Rumania son muy limitados (Dinchev *et al.*, 2008). En una revisión realizada con el fin de comparar si existen diferencias entre las saponinas aisladas en la misma especie pero recolectada en lugares diferentes conllevó a concluir que: las saponinas fusionadas entre los anillos A y B en posición *cis* solo son encontradas en *T. terrestris* de China, las saponinas tipo *gitogeninas* no están presentes en *T. terrestris* de India y Bulgaria, mientras que las saponinas tipo *tigogeninas*, *gitogeninas* y *hecogeninas* predominan en *T. terrestris* de China, las saponinas tipo *furostanol* y *espirostanol sulfatado* son aisladas de *T. terrestris* de Bulgaria y finalmente la protodioscina (**355**), es considerado como el componente más dominante de *T. terrestris* (Kostova y Dinchev, 2005).

Un estudio fitoquímico realizado a los constituyentes de los frutos de *T. terrestris*, se aislaron cinco nuevas saponinas esteroidales: terrestrosina A (**335**), B (**336**), C (**337**), D (**338**) y E (**339**), junto con cinco saponinas conocidas: desgalactotigonina (**340**), gitonina (**341**), gitonina-F (**342**), desglucolanatigonina (**343**) y 3-O-β-D-xilopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-β-D-glucopiranosil-(1→4)-[α-1-ramnopiranosil(1→2)-β-D-galactopiranosido de tigogenina (**344**) (Wang *et al.*, 1996).



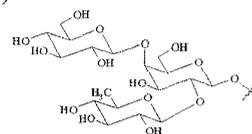
(335)

(25*R,S*)



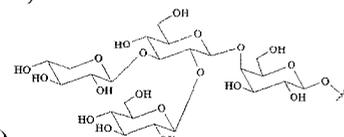
(336)

(25*R*)



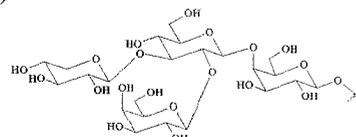
(340)

(25*R*)



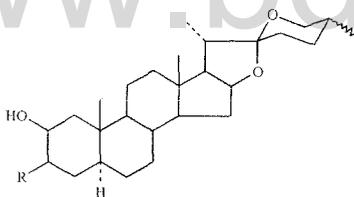
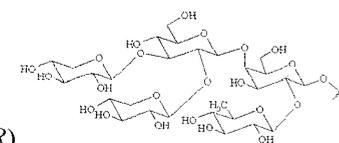
(343)

(25*R*)



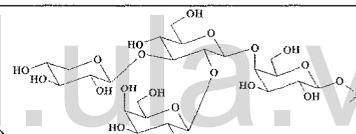
(344)

(25*R*)



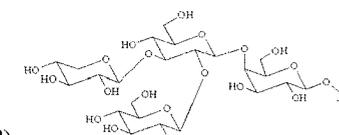
(341)

(25*R*)



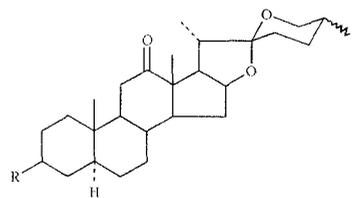
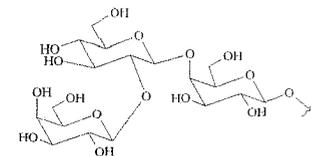
(342)

(25*R*)



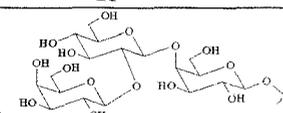
(339)

(25*R*)



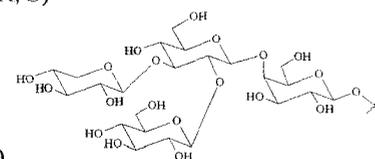
(337)

(25*R,S*)

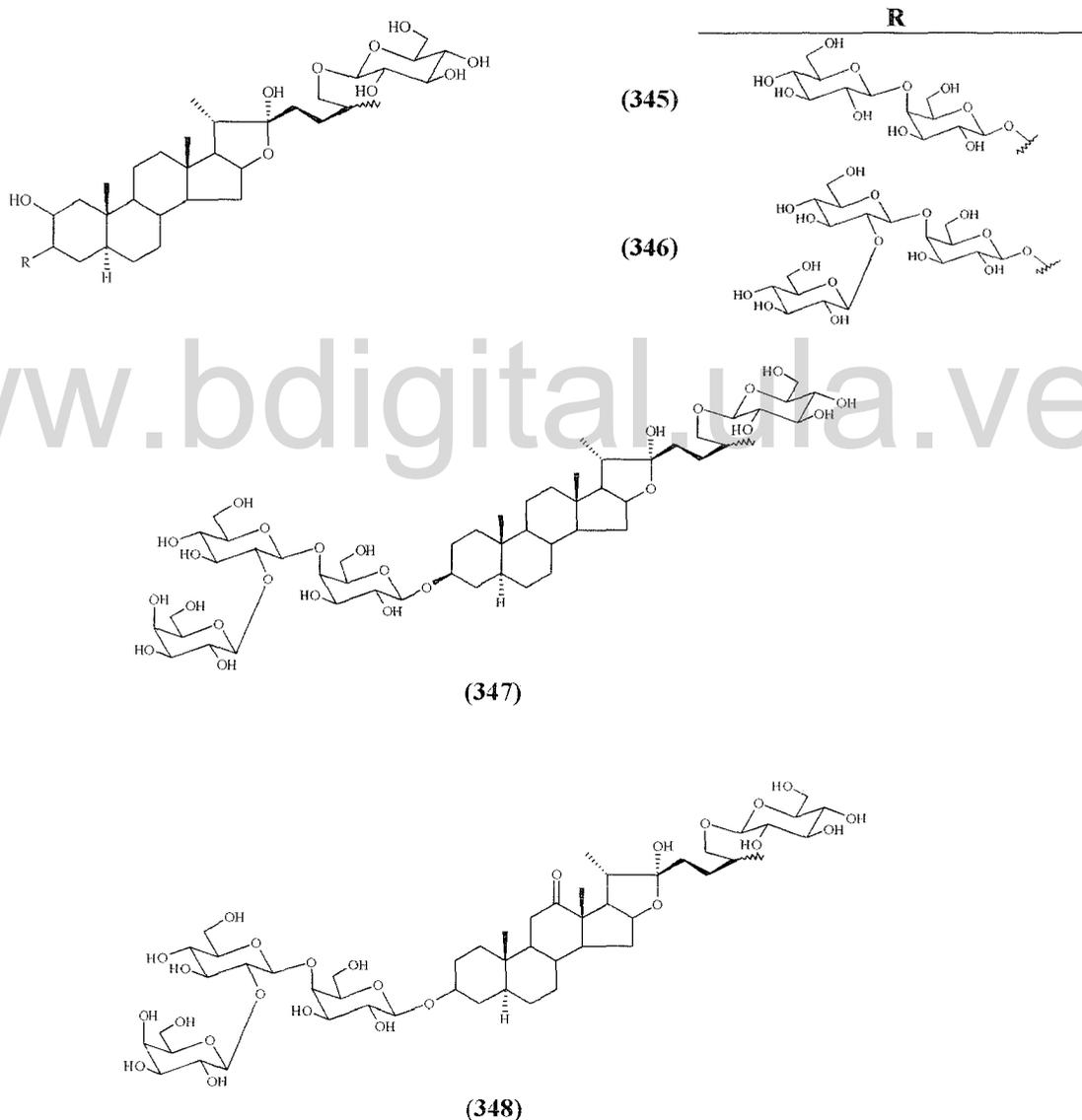


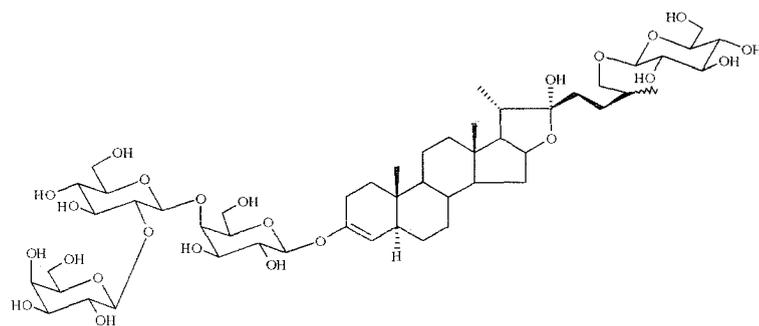
(338)

(25*R,S*)



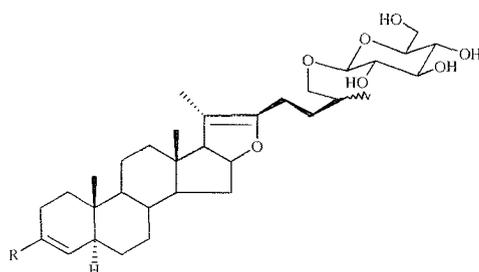
Un estudio posterior a esta misma especie, reveló la presencia de seis nuevas saponinas furostánicas: terrestrosinas F (345), G (346), H (347), I (348), J (349) y K (350) (Wang *et al.*, 1997). Además en otros estudios, también se aislaron saponinas conocidas tipo espirostánicas como, dioscina (351) y tribestrina (352) (Dinchev *et al.*, 2008), hecogenona (353) y (25*R*)-3,6,12-triona-5α de espirostanos (354) (Xu *et al.*, 1998) y tipo furostánicas como, protodioscina (355), prototribestrina (356) y pseudoprotodioscina (357) (Dinchev *et al.*, 2008).



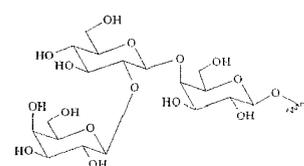


(349)

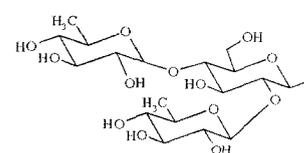
R



(350)

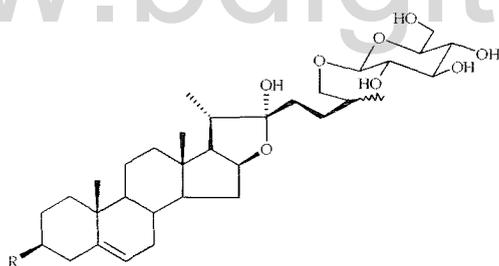


(357)

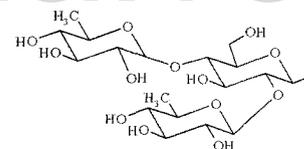


www.bdigital.ula.ve

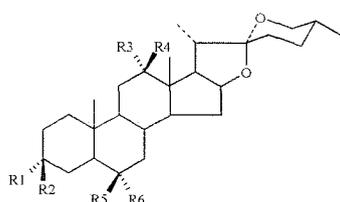
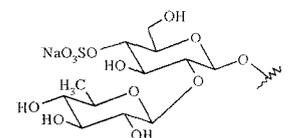
R



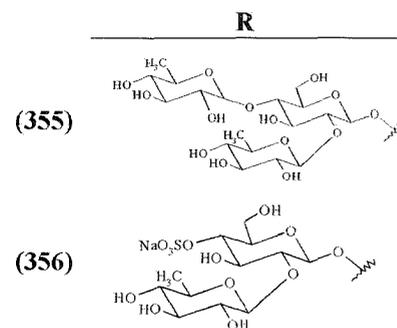
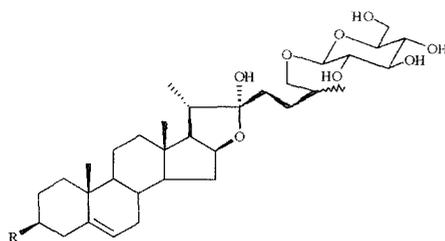
(355)



(356)

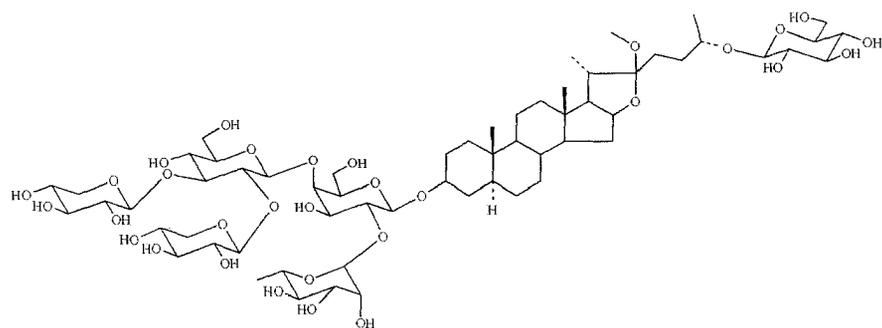


	R1	R2	R3	R4	R5	R6
(353)			=O		H	H
(354)			=O			



De las partes aéreas de *T. cistoides* recolectada en El Cairo, Egipto, se aisló una saponina espirostánica cardiotónica y le dieron el nombre de cistocardina (**358**), al igual que saponina-4 (**359**) y saponina-3 (**360**), asimismo mostraron cardioactividad, junto a ellas, saponina-1 (**361**), tribulosina (**362**), saponina-6 (**363**), saponina-7 (**364**), saponina-8 (**365**) y saponina-9 (**366**) (Achenbach *et al.*, 1994).

Una investigación llevada a cabo al extracto de metanol de las partes aéreas de *T. alatus*, se aislaron seis nuevas saponinas: (25S)- 2 α ,3 β -diol-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido de 5 α -espirostano (**367**), (25S)-3 β -ol-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido de 5 α -espirostano (**368**), (25S)-26-*O*- β -D-Glucopiranosil-3 β ,22 α ,26-triol-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido de 5 α -furostano (**369**), (25S)-26-*O*- β -D-glucopiranosil-3 β ,22 α ,26-triol-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido de 5 α -furostano (**370**), (22S,25S)-16-*O*- β -D-Xilopiranosil-3 β ,16 β ,22,26-tetraol-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosido de 5 α -colestano (**371**), (22S,25S)-4-en-3-ona-16-*O*- β -D-xiopiranosido de 16 β ,22,26-trihidroxicolestano (**372**) (Temraz *et al.*, 2006).



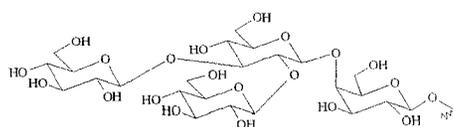
(366)

R1

R2

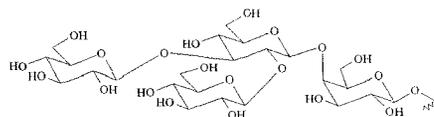
(358)

OH



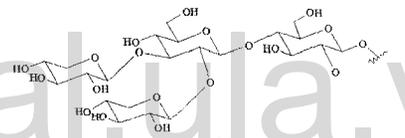
(359)

H



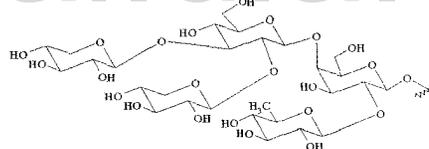
(361)

H



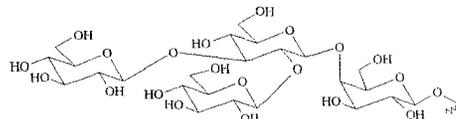
(362)

H



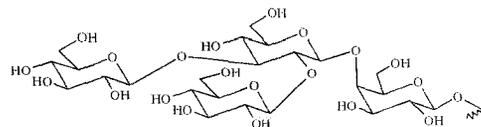
(363)

H



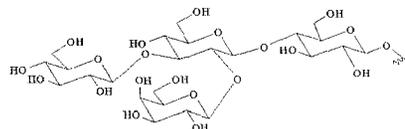
(365)

OH



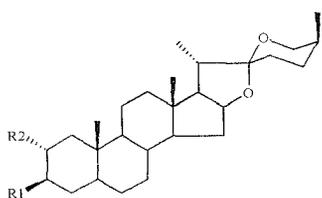
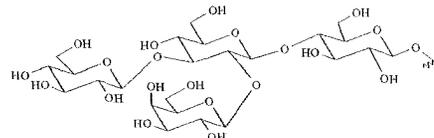
(367)

H

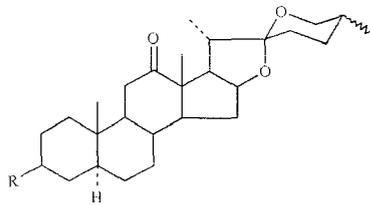


(368)

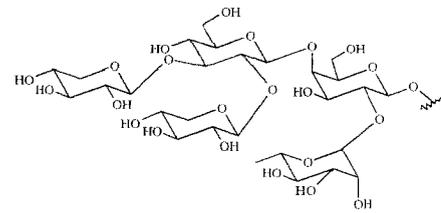
OH



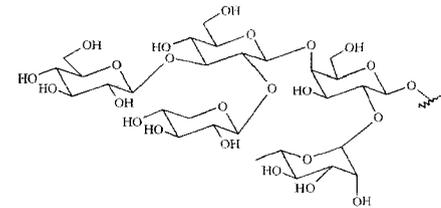
www.bdigitalula.ve



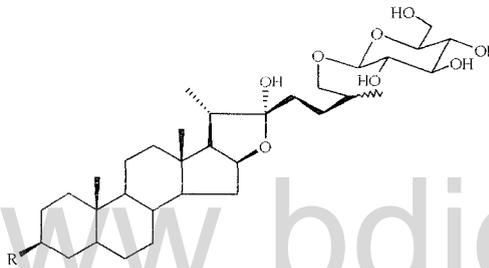
(360)



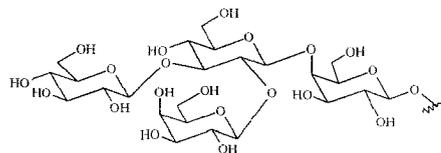
(364)



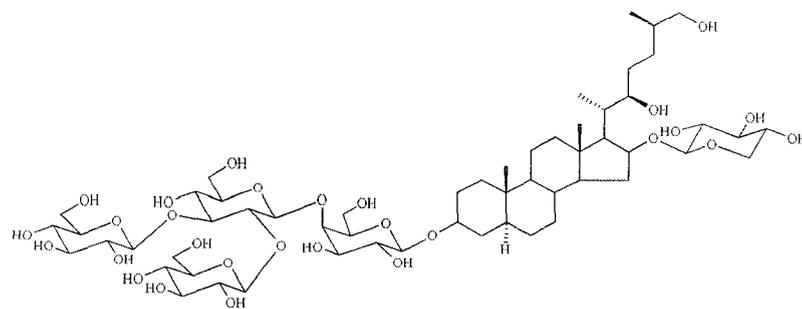
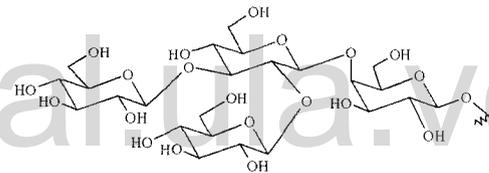
R



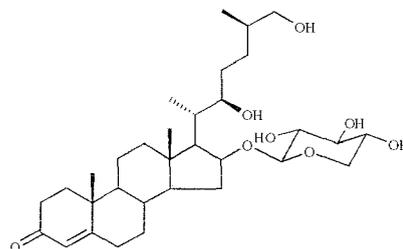
(369)



(370)

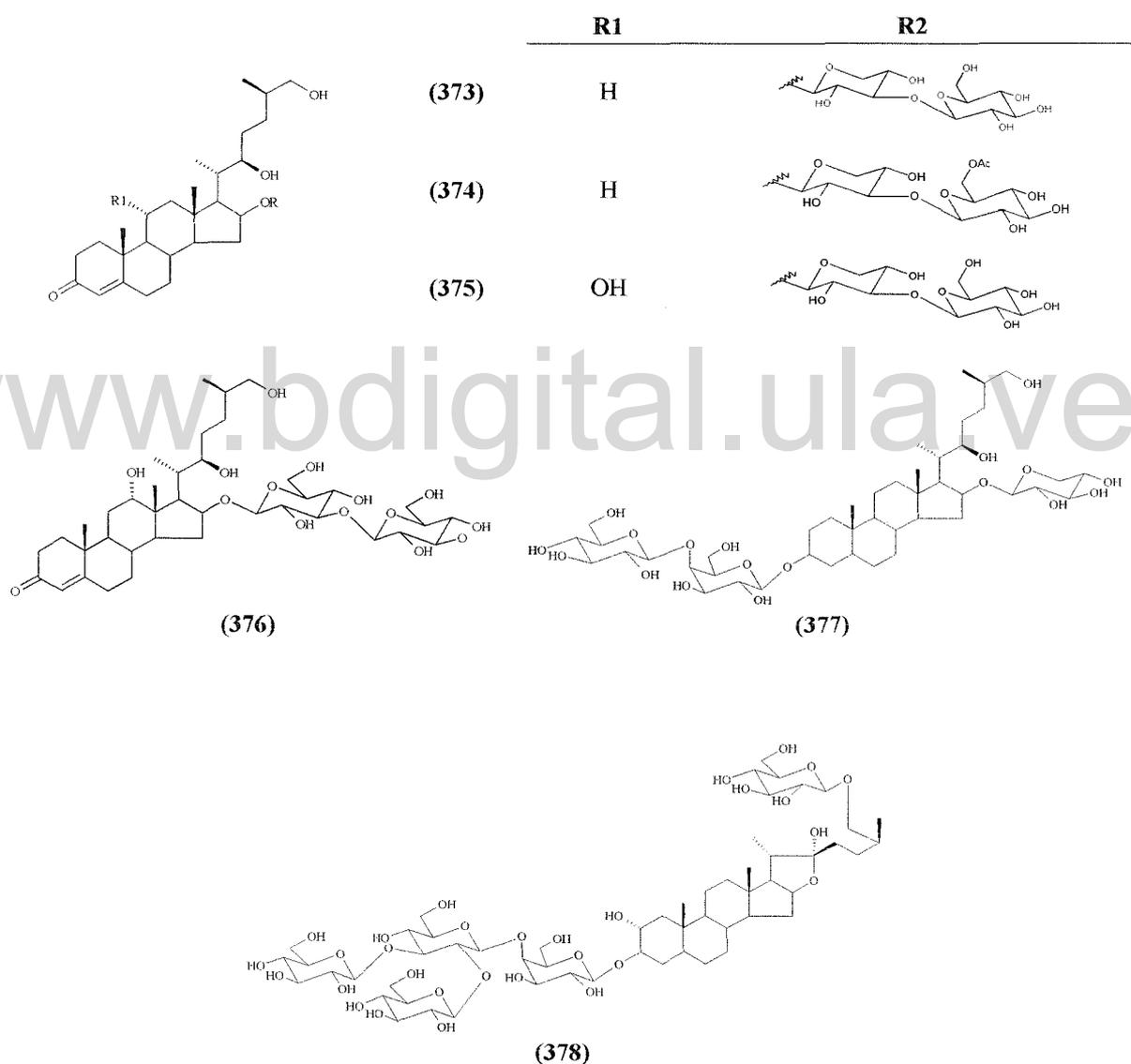


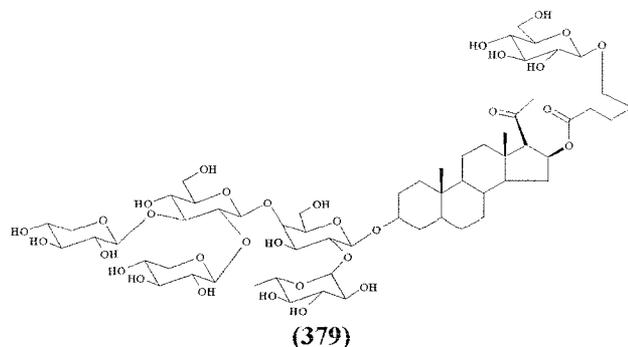
(371)



(372)

Como parte de una investigación a las plantas que crecen en el desierto Egipcio, iniciaron un estudio a las partes aéreas de *T. pentandrus*, basándose en el gran interés de otras especies del mismo género. Del extracto etanólico se aislaron siete nuevas saponinas esteroidales, de las cuales, cinco son colestánicas: pentadrósidos A (373), B (374), C (375), D (376) y E (377), una furostánica: pentadrósido F (378) y un inusual aciloxipregnano: pentadrósido G (379), que probablemente es un derivado de la degradación del esqueleto furostánico (Hamed *et al.*, 2004).

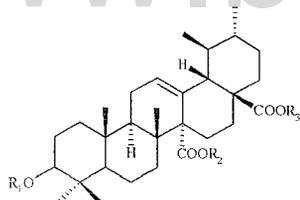
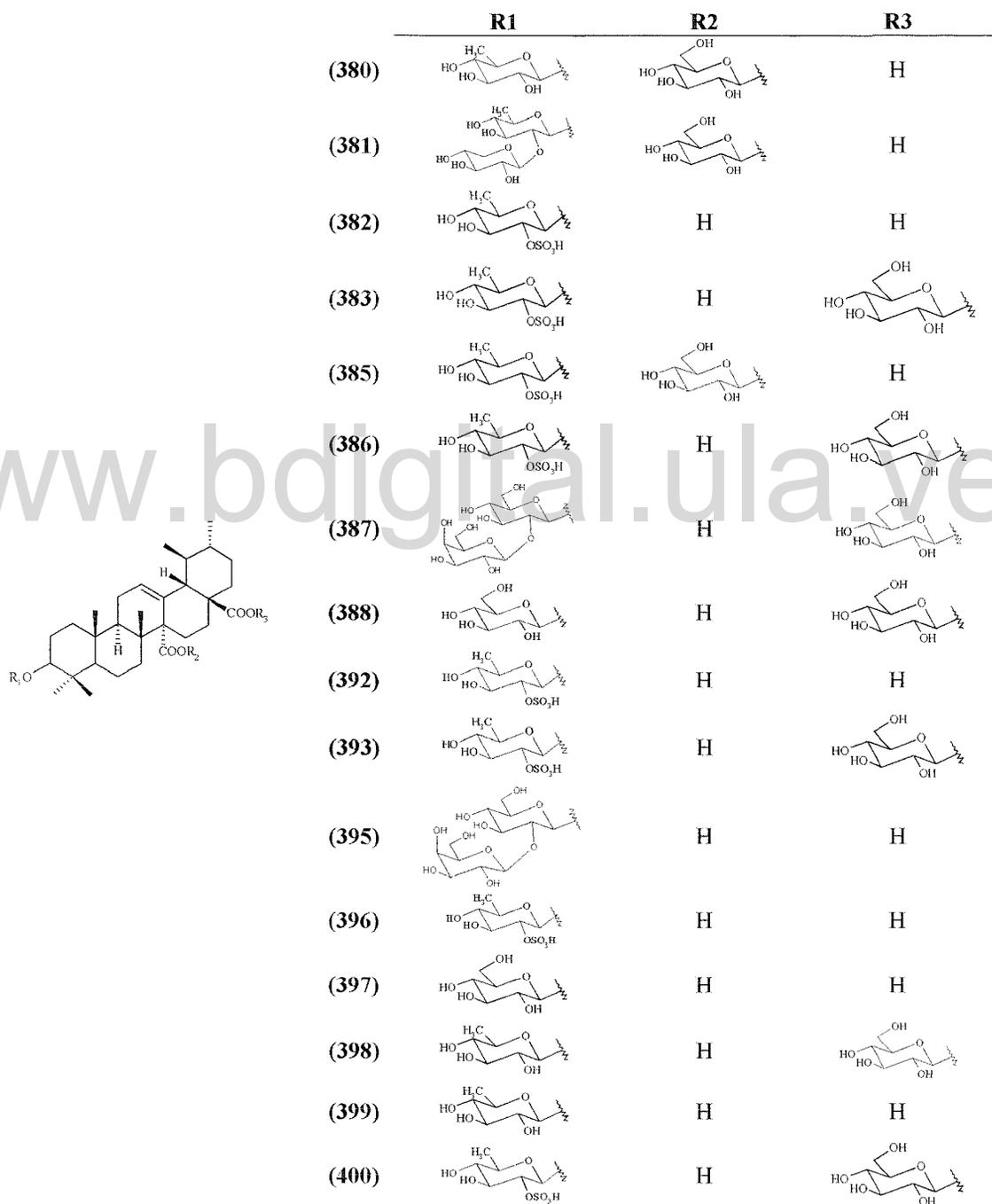


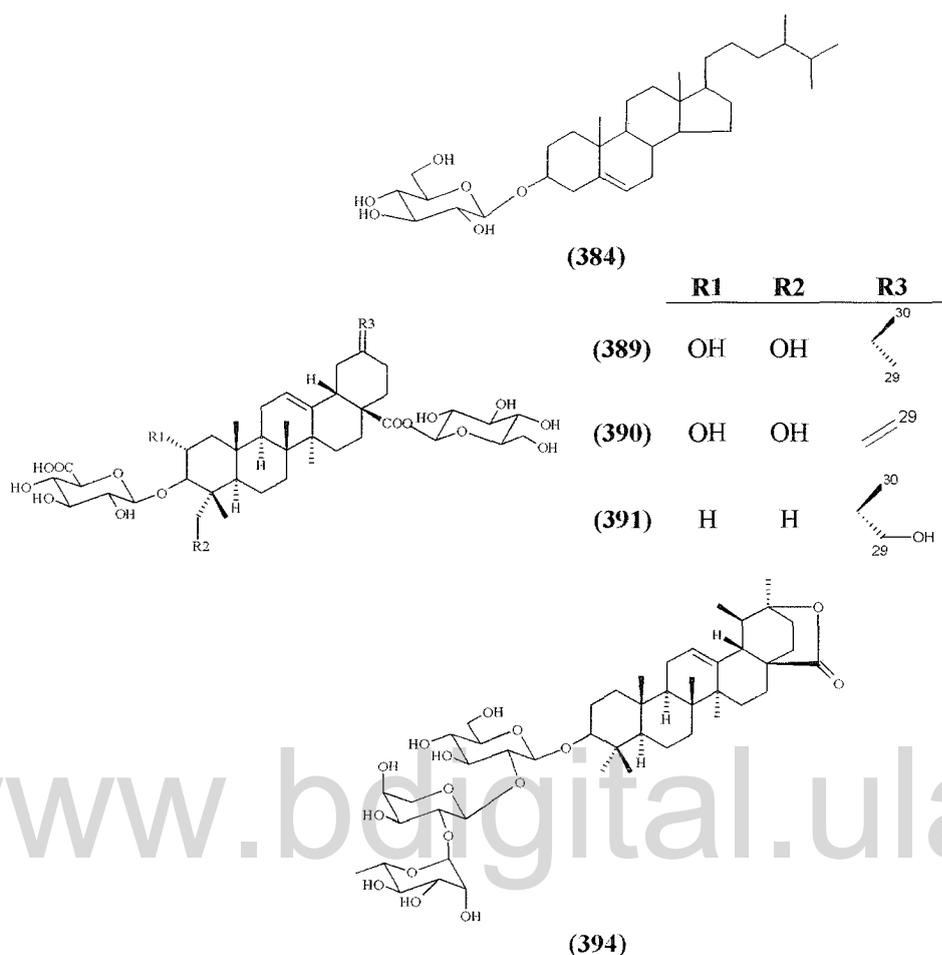


El género emblemático de la familia Zygophyllaceae es el género *Zygophyllum* que abarca aproximadamente 100 especies alrededor del mundo. Varias de sus especies han sido estudiadas fitoquímicamente, ejemplo de ello es *Z. propinquum* de donde se han aislado nuevas saponinas de núcleo ursano como: zygophylósido B (**380**) (Ahmad *et al* 1990), que también ha sido encontrado en otras especies como *Z. coccineum*, *Z. dumosum* y *Z. album* (Elgamal *et al* 1995), zygophylósidos C (**381**), D (**382**) y E (**383**) (Ahmad *et al.*, 1992, Ahmad *et al.*, 1993), y además de estos, una saponina conocida: 3-*O*-β-D-glucopiranosido de β-sitosterol (**384**) (Ahmad *et al.*, 1992a).

En estudios realizados a otras especies de este género han encontrado componentes similares a los ya mencionados, como el zygophylósido F (**385**) aislado de *Z. coccineum*, *Z. dumosum* y *Z. álbum* (Elgamal *et al* 1995), zygophylósidos G (**386**) y H (**387**), y 3-*O*-β-D-glucopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosil éster del ácido quinóvico (**388**) aislados de las especies *Z. coccineum* y *Z. dumosum*, zygophylósidos I (**389**), J (**390**) y K (**391**) encontrados en *Z. decumbens* (Pöllmann *et al.*, 1997, Matos *et al.*, 1986), zygophylósidos O (**392**) y P (**393**) de *Z. fabago* (Feng *et al.*, 2008) y zygophylósido N (**394**) de *Z. gaetulum* (Aquino *et al.*, 2001). De *Z. coccineum* se han obtenido asimismo saponinas conocidas: 3-*O*-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosil éster del ácido quinóvico (**395**) (Ahmad *et al.*, 1990a; Pöllmann *et al.*, 1997), 3-*O*-[β-D-2-*O*-sulfonilquinovopiranosilo del ácido quinóvico (**396**), 3-*O*-β-D-glucopiranosilo del ácido quinóvico (**397**), 3-*O*-β-D-quinovopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosil éster del ácido quinóvico (**398**) (Ahmad *et al.*, 1993; Pöllmann *et al.*, 1997) y 3-*O*-β-D-quinovopiranosil del ácido quinóvico (**399**) (Ahmad *et al.*, 1990a), este último también ha sido aislado en las especies *Z. dumosum* y *Z. propinquum* (Pöllmann *et al.*, 1997; Elgamal *et al.*, 1995) y finalmente el 3-*O*-β-D-2-*O*-sulfonilquinovopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosil éster del ácido quinóvico (**400**) ha sido

aislado de las especies *Z. gaetulum*, *Z. dumosum* y *Z. propinquum* (Ahmad *et al.*, 1993; Pöllmann *et al.*, 1997). Durante una investigación de las plantas medicinales de Argelia, específicamente *Z. gestini*, que es usado como antidiabético en ese país, de las raíces y partes aéreas asilaron los zygophylósidos E (383), G (386) y H (387) y el 3-*O*-β-D-quinovopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosil éster del ácido quinóvico (398) (Smati *et al.*, 2007).

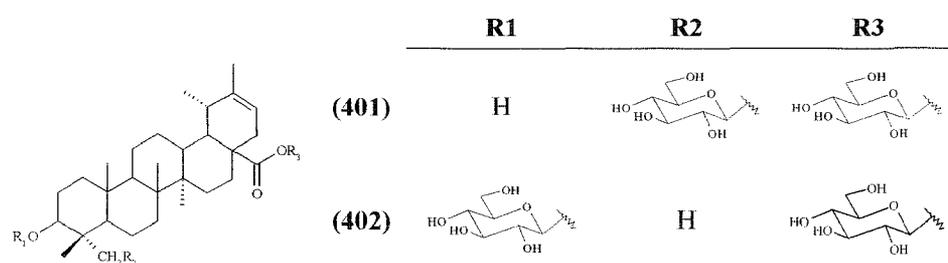




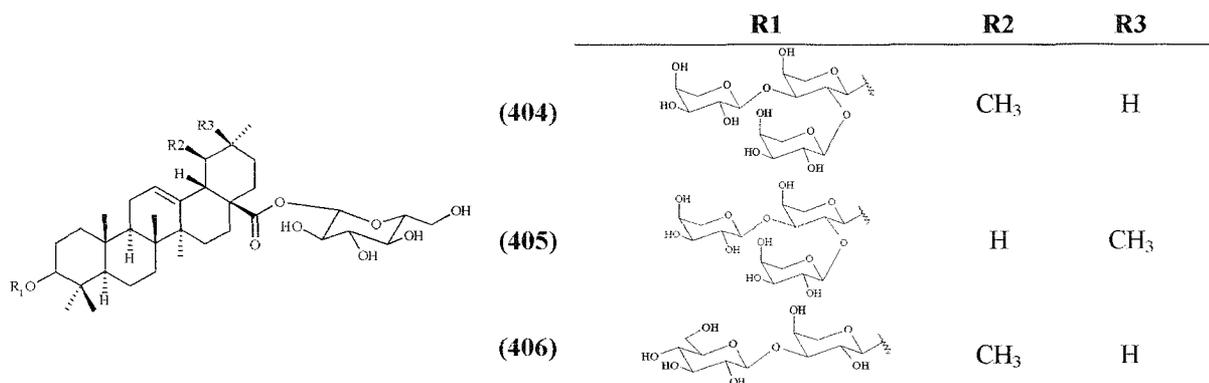
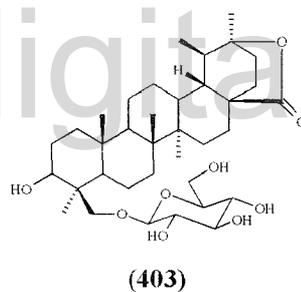
Otro género característico de la familia Zygophyllaceae es el género *Fagonia*, el cual está representado por 18 especies extendidas en Egipto y Pakistán. Las plantas pertenecientes a este género son usadas en la medicina folklórica de esos países para el tratamiento de lesiones en la piel. Adicionalmente, es usada como remedio para el cáncer en sus primeras etapas (Shaker *et al.*, 1999). Algunos estudios farmacológicos preliminares llevados a cabo a estas especies demostraron que las mezclas de saponinas obtenidas del 60% del extracto acuoso de etanol exhiben actividades antiinflamatorias y antipiréticas con un débil efecto analgésico (Mellek *et al.*, 1996).

F. indica se encuentra distribuido ampliamente en Egipto y Pakistán. De los extractos de metanol de las partes aéreas de esta especie, aislaron y elucidaron dos saponinas ursánicas: ácido 23,28-di-*O*-β-D-glucopiranosiltaraxaster-20-en-28-oico

(401) y ácido 3 β , 28-di-O- β -D- glucopiranosil- 23- hidroxitaraxaster- 20-en-28-oico (402) (Ansari *et al.*, 1987). De los extractos de etanol obtuvieron una mezcla de saponinas triterpénicas las cuales fueron acetiladas para luego purificar y caracterizar 21,22 α -epoxi-23-O- β -D-glucopiranosido de nahagenina (403) (Ansari *et al.*, 1987; Ansari *et al.*, 1988). En el año 1999, Shaker y colaboradores detectaron dos nuevas saponinas oleanánicas que fueron llamadas: indicasaponina A (404) e indicasaponina B (405) y una conocida 3-O-[[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil]-28-O-[β -D-glucopiranosil] éster del ácido ursólico (406) (Shaker *et al.*, 1999).

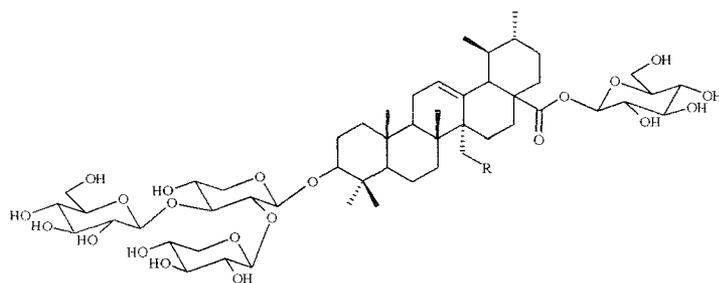


www.bdigital.ula.ve

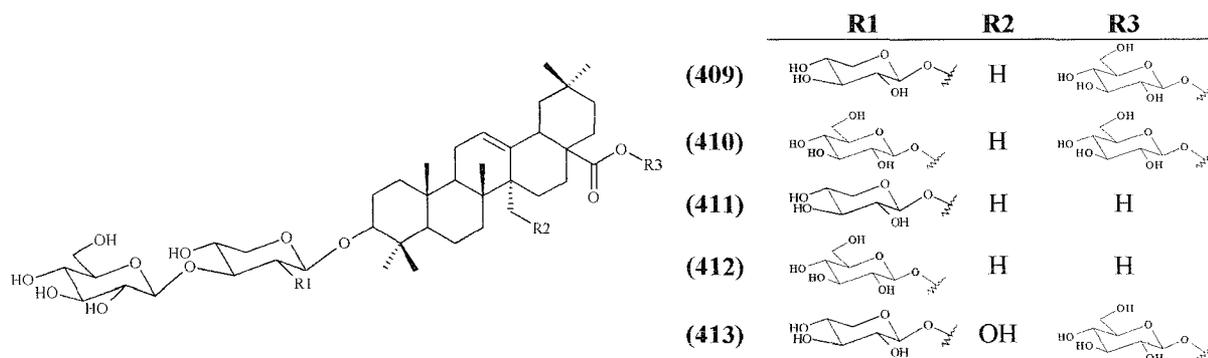


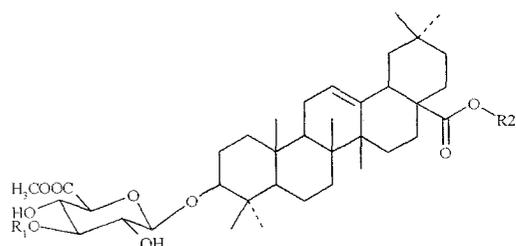
De *F. arabica*, nativa de Egipto se aislaron e identificaron siete nuevas saponinas, dos tipo ursánicas: 3-*O*-β-D-xilopiranosil(1→2)-[β-D-gluco-piranosil(1→3)]-α-L-arabinopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido ursólico (**407**) y 3-*O*-β-D-xilopiranosil (1→2)-[β-D-gluco-piranosil-(1→3)]-α-L-arabinopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido 27-hidroxiursólico (**408**) y cinco oleanánicas: 3-*O*-β-D-xilopiranosil (1→2)-[β-D-gluco-piranosil(1→3)]-α-L-arabinopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido oleanólico (**409**), 3-*O*-β-D-glucopiranosil(1→2)-[β-D-glucopiranosil(1→3)]-α-L-arabinopiranosil-28-*O*-β-D-glucopiranosido del ácido oleanólico (**410**), 3-*O*-β-D-xilopiranosil(1→2)-[β-D-gluco-piranosil(1→3)]-α-L-arabinopiranosilo del ácido oleanólico (**411**), 3-*O*-β-D-glucopiranosil(1→2)-[β-D-gluco-piranosil(1→3)]-α-L-arabinopiranosilo del ácido oleanólico (**412**), 3-*O*-β-D-xilopiranosil(1→2)-[β-D-gluco-piranosil(1→3)]-L-arabinopiranosilo del ácido 27-hidroxioleanólico (**413**) (Miyase *et al.*, 1996).

De los extractos etanólicos de *F. mollis*, recolectada Egipto fueron aisladas tres nuevas saponinas: 3-*O*-6'-*O*-metil-β-D-glucuronopiranosido del ácido oleanólico (**414**), 3-*O*-α-L-ramnopiranosil(1→3)-6'-*O*-metil-β-D-glucuronopiranosido del ácido oleanólico (**415**) y 3-*O*-α-L-ramnopiranosil(1→3)-6'-*O*-metil-β-D-glucuronopiranosido-28-*O*-glucopiranosido del ácido oleanólico (**416**) (Melek *et al.*, 1996).



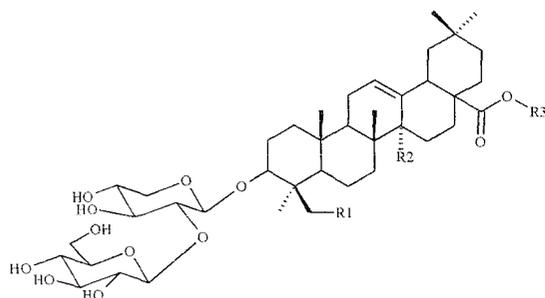
	R
(407)	H
(408)	OH





	R1	R2
(414)	H	H
(415)		H
(416)		

Conjuntamente, las fracciones que contienen saponinas de *F. cretica* mostraron una actividad antiinflamatoria significativa y un considerable efecto analgésico y antipirético (El-Shabrawy *et al.*, 1997). De las partes aéreas de esta especie aislaron cuatro nuevas saponinas oleanánicas y fueron caracterizadas como: 3-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil]-28-*O*-β-D-glucopiranosido de hederagenina (417), 3-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil]-28-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→6)-β-D-glucopiranosido] del ácido oleanólico (418), 3-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil]28-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→6)-β-D-glucopiranosido] del ácido 27-hidroxi-oleanólico (419), 3β-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil]-28-*O*-[β-D-glucopiranosil(1→6)-β-D-glucopiranosido] del ácido olean-12-en-27-al-28-oico (420) (Abdel *et al.*, 2000).

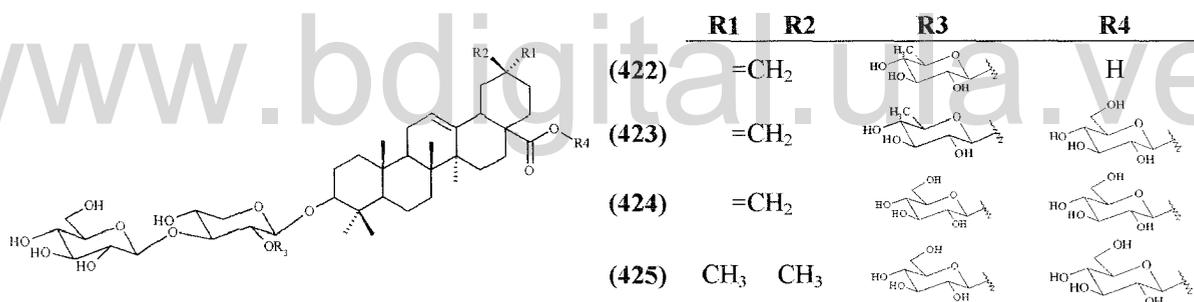
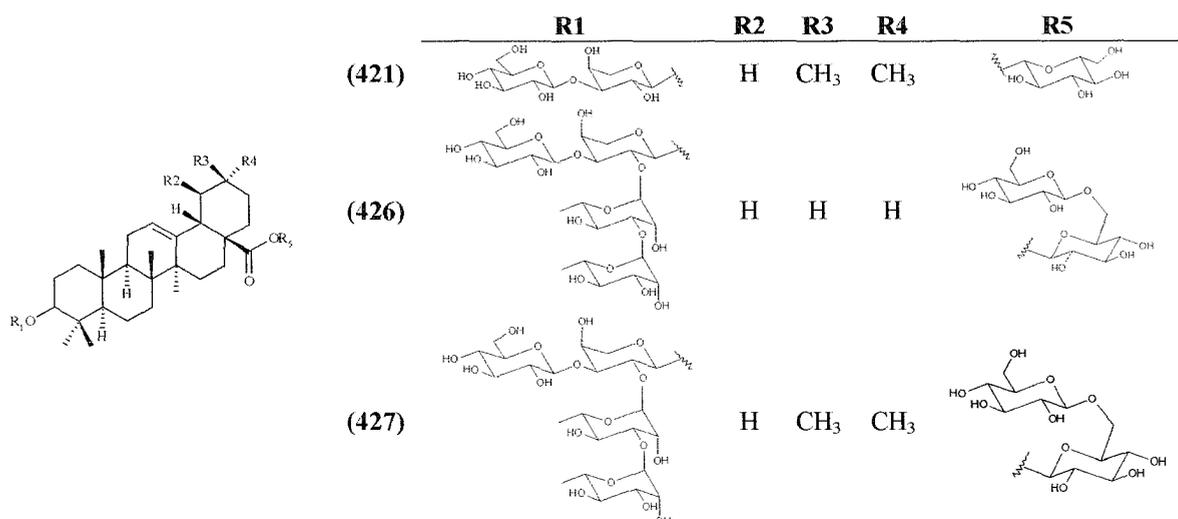


	R1	R2	R3
(417)	OH	CH ₃	Glc
(418)	H	CH ₂ OH	Glc(1→6)Glc
(419)	H	CH ₃	Glc(1→6)Glc
(420)	H	CHO	Glc(1→6)Glc

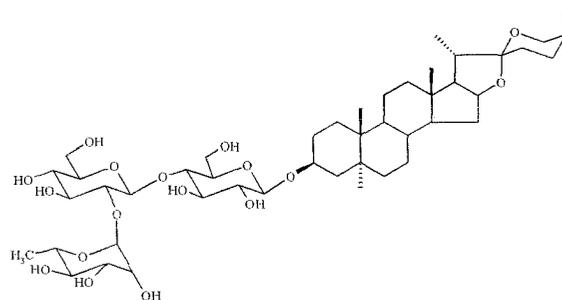
Glc=β-D-glucopiranosil

El género *Guaiacum* es uno de los más populares dentro de la familia Zygophyllaceae, al igual que el género *Tribulus*. La especie más abundante es el *G. officinale* que es una planta ornamental y frecuentemente cultivada en los jardines de Pakistán (Ahmad *et al.*, 1990a). La madera, en infusión, es utilizada como diurética, sudorífica, sialagoga y como enjuague para la boca (Ahmad *et al.*, 1984). De las hojas de esta especie aislaron cuatro saponinas que denominaron guaicinas B (421) (Ahmad *et al.*,

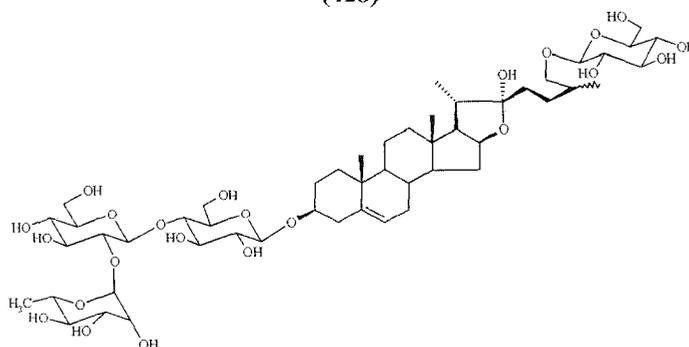
1989a), C (422), D (423), E (424) y F (425) (Ahmad *et al.*, 1990). De los frutos de esa especie fueron aisladas dos nuevas saponinas: guaianinas F (426) y G (427) (Ahmad *et al.*, 1989b).



Para finalizar, el género *Balanites* comprende aproximadamente 34 especies. La especie más conocida es la *B. aegyptiaca* que es un árbol siempreverde y es encontrado en las sabanas de los bosques tropicales y subtropicales (Hardman y Abayomi, 1970). Del extracto metanólico de los frutos se aislaron y caracterizaron la 3-balanitina (428) y la balanitosida (429) (Hosny *et al.*, 1992).



(428)

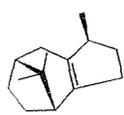


(429)

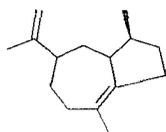
III.1.e.- TERPENOIDES

Dentro de la familia Zygothylaceae solo se han reportado algunos terpenoides, siendo poco comunes en ella. Seguidamente, se muestran algunos ejemplos de estos compuestos.

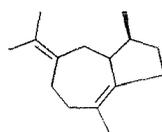
Uno de los pocos estudios hechos del género *Bulnesia*, fue de la especie *B. samientii*, en el año 1962, de donde reportaron la presencia de sesquiterpenoides de la serie del guaiano: β -patchouleno (430), α -bulneseno (431), β -bulneseno (432), *cis*- β -guaiano (433) óxido-guaiano (434), guaiol (435) y bulnesol (436) (Bates y Slagel, 1962).



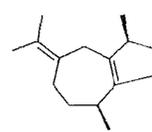
(430)



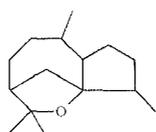
(431)



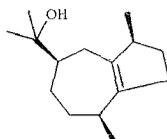
(432)



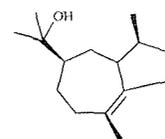
(433)



(434)

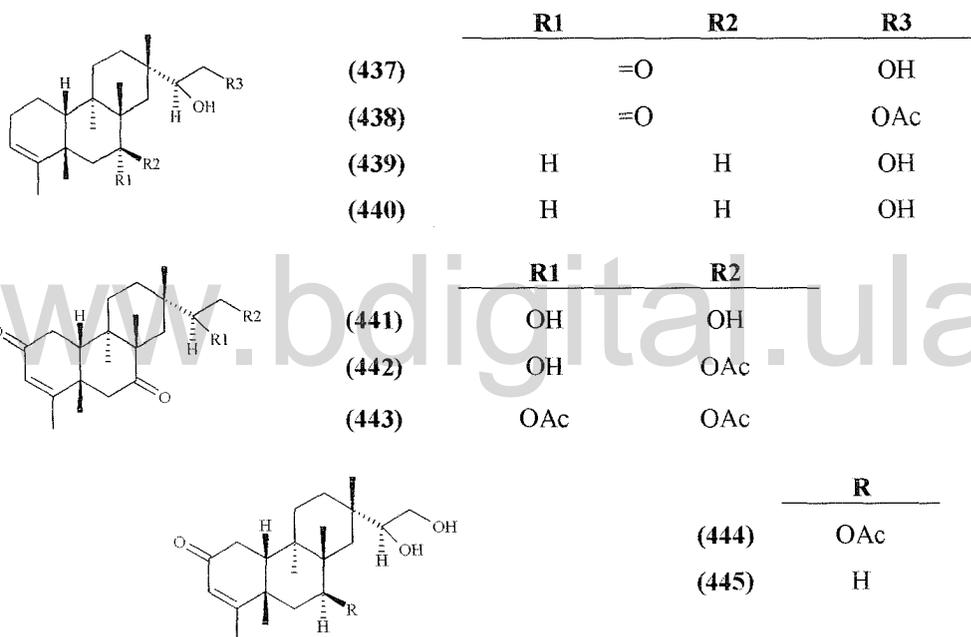


(435)



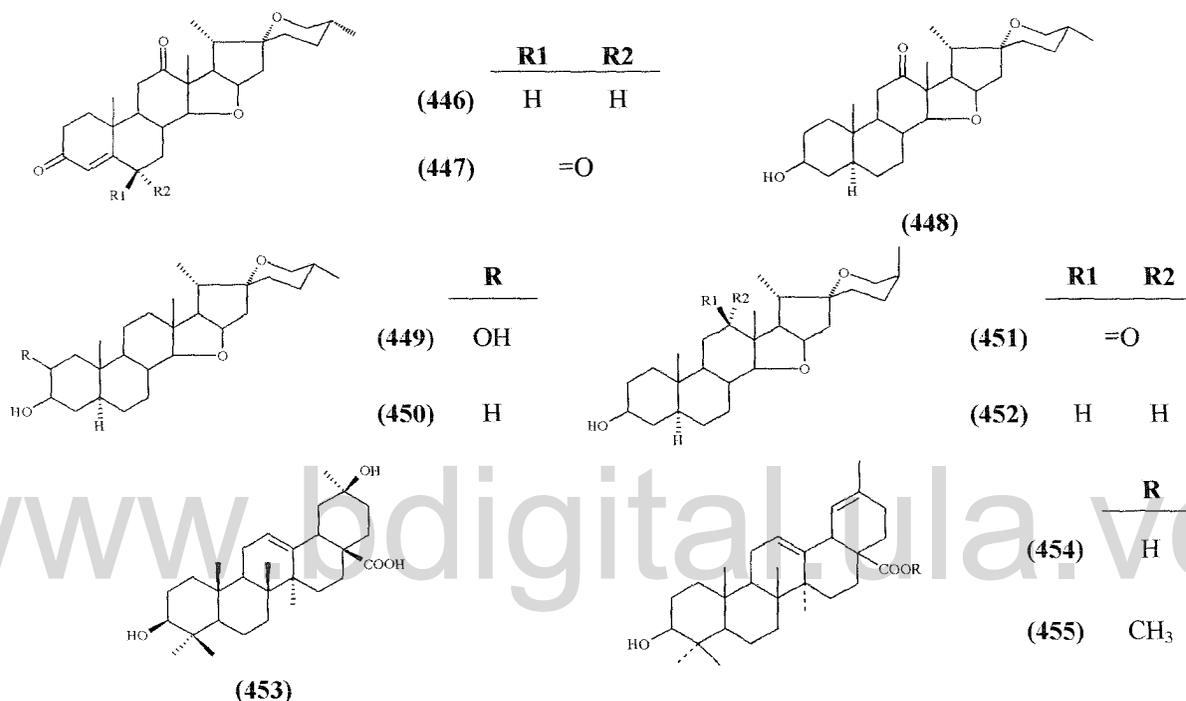
(436)

También se han encontrado diterpenos de la serie del pimarano en el género *Fagonia*, propiamente de las partes aéreas de *F. bruguieri*, los cuales fueron caracterizados como: fagona (**437**), hallada también en la *F. glutinosa* (Abdel *et al.*, 1993), 16-*O*-acetilfagonona (**438**), 7- β -hidroxifagonona (**439**), 7- α -hidroxifagonona (**440**), 2,7-dioxofagonona (**441**), 16-*O*-acetil-2,7-dioxofagonona (**442**), 15,16-di-*O*-acetil-2,7-dioxofagonona (**443**), 7-*O*-acetil-2-oxo-5-*epi*-fagonona (**444**), 2-oxo-5-*epi*-fagonona (**445**) (Abdel *et al.*, 1994). Cabe destacar que anteriormente no habían sido reportados compuestos de este tipo dentro del género *Fagonia* ni en la familia Zygophyllaceae, por el contrario a las flavonas que son consideradas como marcadores taxonómicos de este género (Abdel *et al.*, 1993).



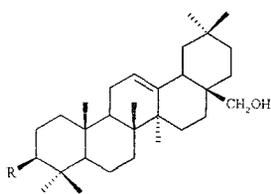
Los esteroides son un poco más abundantes, algunos ejemplos de ellos se han encontrado en el género *Tribulus*, tales como: 25*R*-espirost-4-eno-3,12-diona (**446**), 25*R*-espirost-4-eno-3,6,12-triona (**447**), hecogenina (**448**), gitogenina (**449**), tigogenina (**450**) aisladas del *T. terrestris* (Xu *et al.*, 1998) y *neo*-hecogenina (**451**) y *neo*-tigogenina (**452**) de *T. cistoides* (Achenbach *et al.*, 1994). Tigogenina (**450**) también fue aislada de *Kallstroemia tribuloides* (Barbosa *et al.*, 1989).

De *Guaiacum officinale*, asimismo se aislaron triterpenos conocidos, como el ácido 3β-20ε-dihidroxi-30-nor-olean-12-en-28-oico (**453**), el ácido 3β-hidroxi-30-nor-olean-12,19-dien-28-oico (**454**) y el 3β-hidroxi-30-nor-oleano-12,19-dien-28-oato de metilo (**455**) (Ahmad *et al.*, 1984).

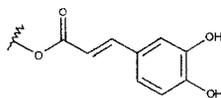


De los géneros *Larrea* y *Fagonia*, han reportado algunos triterpenoides como por ejemplo: 3β-(3,4-dihidroxicinamoil) eritrodioil (**456**) y 3β-(4-hidroxicinamoil) eritrodioil (**457**) de *L. tridentata* (Xue *et al.*, 1988) y un nuevo triterpenoide, larreagenina (**458**) de *L. divaricata* que también fue encontrada en *G. officinale* (Ahmad *et al.*, 1984), ácido oleanólico (**459**) de *F. cretica* (Rimpler y Rizk, 1969), ácido ursólico (**460**) y la hederagenina (**461**) de *F. indica* (Atta-ur *et al.*, 1984).

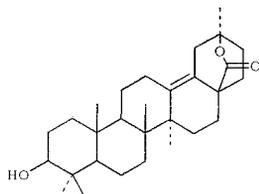
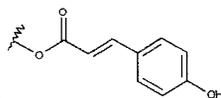
En último lugar, pocos esteroides se han aislado de *Balanites aegyptiaca* uno de ellos es la 6-metildiosgenina (**462**) (Hosny *et al.*, 1992).



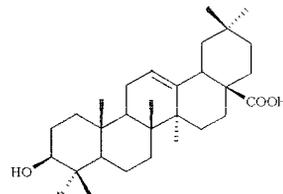
(456) R=



(457) R=

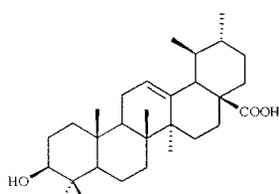


(458)

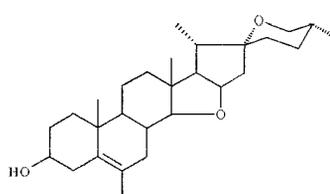


(459) R=CH₃

(460) R=CH₂OH



(461)

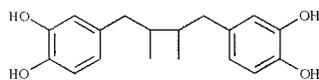


(462)

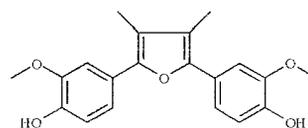
www.bdigital.ula.ve

III.1.f.-LIGNANOS

Hace algunos años, se reportaron para la familia Zygothaceae algunos lignoides. A pesar de esto, no son muy abundantes dentro de ella. Entre ellos se pueden citar los siguientes: el ácido *nor*-dihidroguairético (463), aislado de *L. tridentata* y *L. cuneifolia* (Sakakibara *et al.*, 1976; Valesi *et al.*, 1972; Elakovich y Kennet 1985) y ácido α -guaiacónico (464) (Kratochvil *et al.*, 1971).



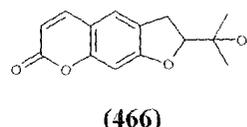
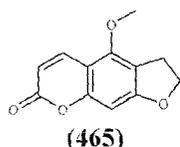
(463)



(464)

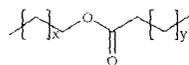
III.1.g.-CUMARINAS

Las cumarinas también forman parte de la fitoquímica de la familia Zygophyllaceae, que al igual que los lignanos, son poco profusos en ella. Uno de los reportes acerca de cumarinas aisladas son bergapteno (465) y marmesina (466) (Ahmed *et al.*, 1981).

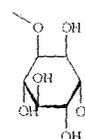


III.1.h.-OTROS COMPUESTOS

En la familia Zygophyllaceae se encontró un éster de cadena larga, tetraoctacontanoato de pentahexilo (467) en *L. divaricata* (Seigler *et al.*, 1974) y un cicloalcano polihidroxilado, pinitol (468) aislado de *F. indica* (Atta-ur *et al.*, 1984), dichos compuestos son poco comunes dentro de la familia; sin embargo, estudios recientes han comprobado que el pinitol (468) tiene una alta actividad antidiabética (Sivakumar y Subramanian, 2009).



(467) X=C₄₈; Y=C₅₆



(468)

IV. HIPÓTESIS.

www.bdigital.ula.ve

- Los géneros de la familia Zygophyllaceae y las especies del género *Zanthoxylum* biosintetizan productos naturales como flavonoides, saponinas, terpenoides, entre otros, por lo que se espera obtener compuestos similares en los diferentes extractos de las hojas y tallos de *Bulnesia arborea* Cl. Gay. y en las hojas de *Z. rhoifolium* Lam.
- Algunas de las sustancias responsables de las actividades farmacológicas atribuidas la familia Zygophyllaceae y al género *Zanthoxylum* pueden estar presentes en los diferentes extractos de las hojas y tallos de *B. arborea* Cl. Gay. y en las hojas de *Z. rhoifolium* Lam.

De acuerdo con las hipótesis formuladas, se plantearon los siguientes objetivos:

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

V. OBJETIVOS.

- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los diferentes extractos de *Bulnesia arborea* Cl. Gay. y de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.
- Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas: infrarrojo (IR), ultravioleta visible (UV), espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) uni- y bidimensional, rotación específica (RE), difracción de rayos-X y transformaciones químicas, de ser necesarias, a las sustancias aisladas.
- Enviar los diferentes extractos y las sustancias aisladas para sus posteriores estudios alguna actividad biológica.

www.bdigital.ula.ve

VI.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

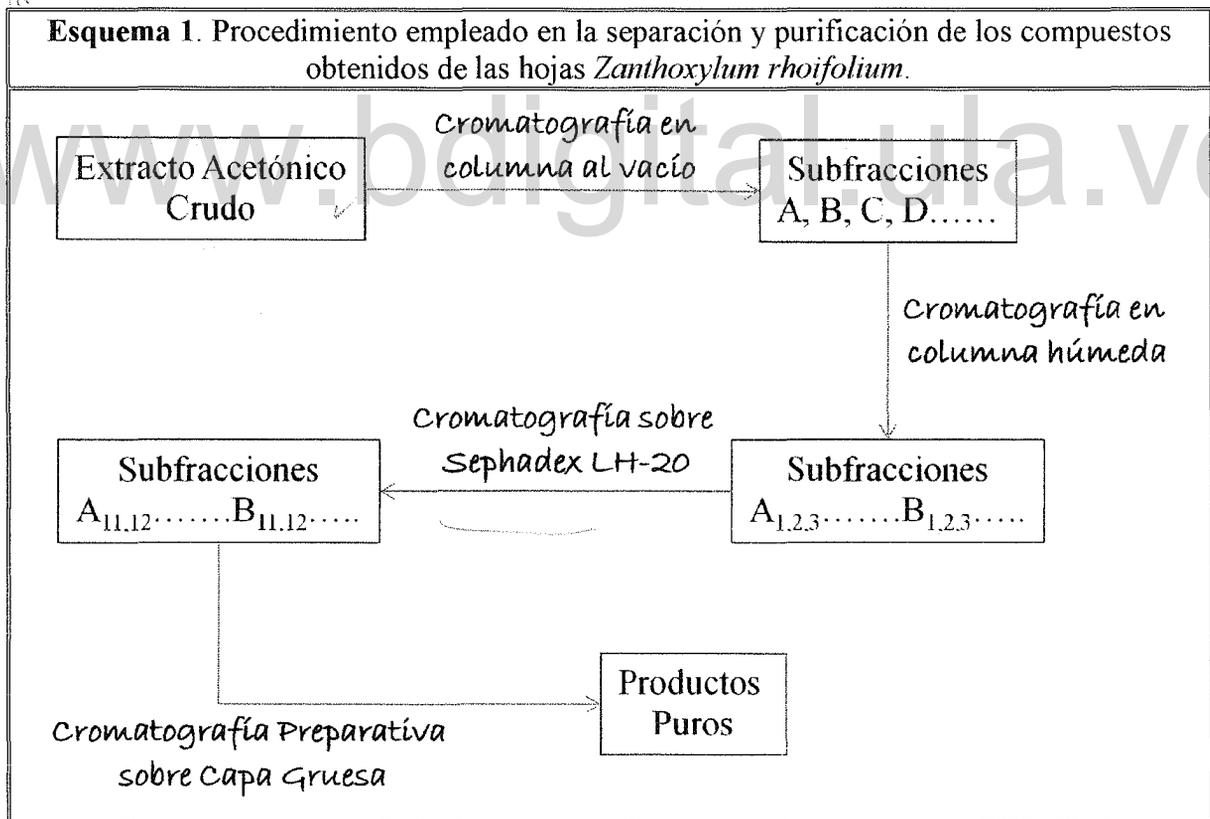
www.bdigital.ula.ve

Bolivia

VI.1.- *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae)

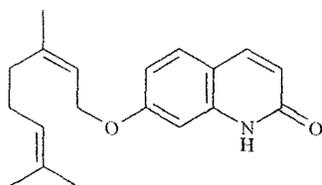
Las hojas frescas de un ejemplar del *Zanthoxylum rhoifolium*, fueron sometidas a extracciones sucesivas, en caliente, con solventes de polaridad creciente (hexano, acetona y metanol) hasta agotamiento, haciendo uso de un soxhlet (Natori *et al.*, 1981). Después de obtenidos los extractos, fueron concentrados al vacío por medio de un rotavapor a una temperatura no mayor de 40 °C.

El extracto acetónico, con peso de 52,30 gramos, fue preabsorbido sobre gel de sílice y posteriormente sometido a diferentes procesos de fraccionamiento y separación (Esquema 1) utilizando varias técnicas cromatográficas, como cromatografía sobre gel de sílice, sobre Sephadex LH-20®, en capa gruesa, entre otras (Coll & Bowden, 1986; Henke, 1995; Mikes, 1979; Natori *et al.*, 1981; Simpson, 1976; Sjövall *et al.*, 1968; Snyder & Kirkland, 1974; Stahl, 1969).

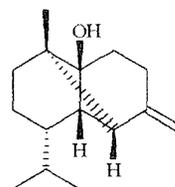


De esta manera se logró aislar un novedoso alcaloide monoterpénico derivado de la quinolina, 7-*O*-neril éter de 2-quinolona [1], un sesquiterpeno de la serie del ylangano, el 1 β -hidroxi- β -ylangano [2], un diterpeno de la serie del labdano, el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno [3] y un compuesto aromático metoxilado, el 4,6-dimetoxibenzofurano [4]. A continuación se describirá en detalle la caracterización estructural de cada compuesto.

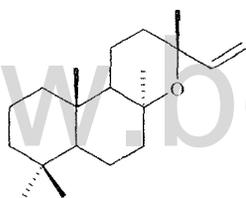
Cuadro 1. Compuestos aislados del extracto de acetona del las hojas de *Z. rhoifolium*.



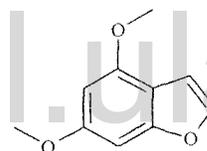
[1]



[2]



[3]



[4]

VI.1.a.- 7-O-neril éter de 2-quinolona o zanthoxyfolina [1]:

De la reunión A [Hex-CH₂Cl₂ (1:1)] obtenida de percolar el extracto en columna de gel de sílice, se aisló, después de repetidos procesos cromatográficos (Sephadex LH-20 y CPCG), un sólido amarillento (82 mg), el cual cristalizó en forma de finas láminas, con punto de fusión (Pf) de 68-69 °C. La presencia en su espectro de masas (Figura 7) de un ion molecular a *m/z* 297, permitió establecer su fórmula molecular C₁₉H₂₃NO₂, la cual resultó coherente con el número de carbonos e hidrógenos observados en sus espectros de RMN-¹³C (Figura 8, Tabla 2) y RMN-¹H (Figura 9, Tabla 3).

En su espectro IR (Figura 6, Tabla 1) se aprecian bandas de absorción, entre las más resaltantes, de amidas primarias [*v*_{max} 3422 cm⁻¹ (N-H)], de carbonilos [*v*_{max} 1728 cm⁻¹ (C=O)] y de aromáticos [*v*_{max} 1614 cm⁻¹ (C=C) y *v*_{max} 833 cm⁻¹ (=C-H)] (Bellamy, 1975).

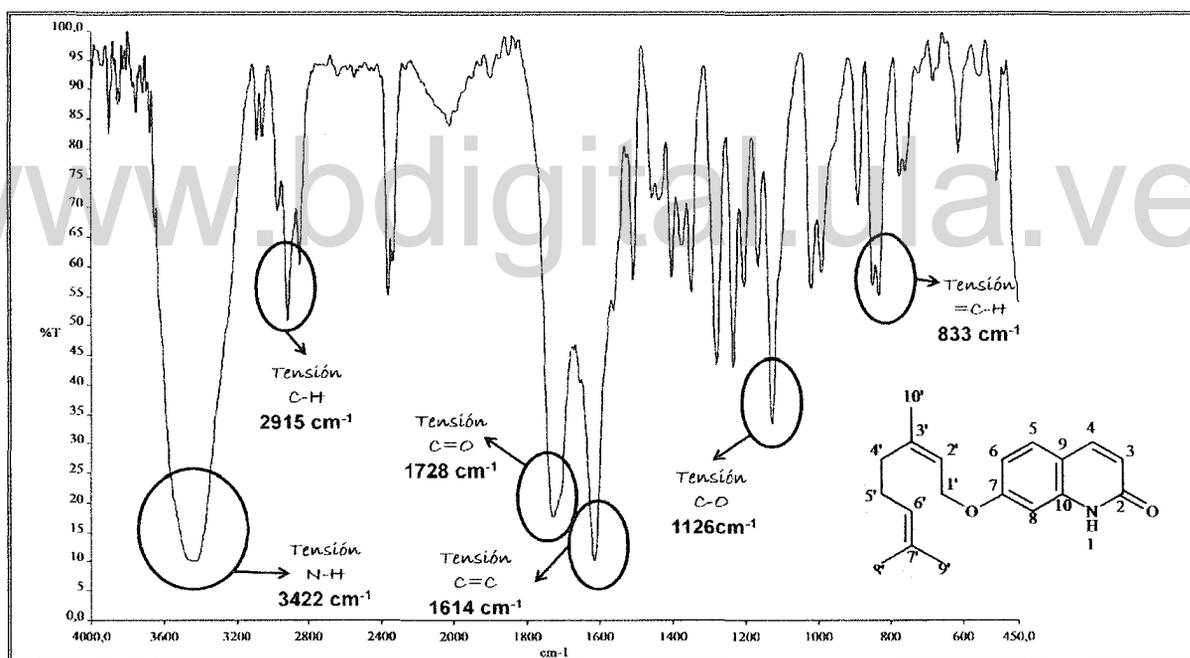
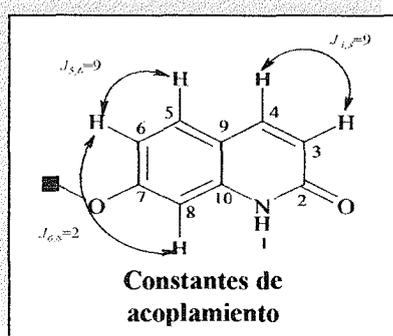


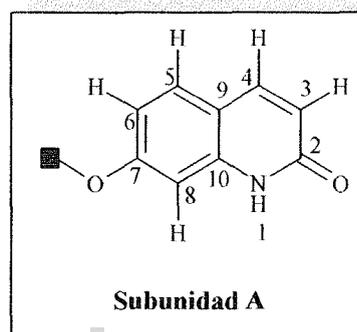
Tabla 1. Bandas de absorción significativas en el IR (KBr) de [1].

<i>v</i> _{max}	3422	2925	1728	1614	1226	833
Asignación	N-H	C-H	C=O	C=C	C-O	=C-H

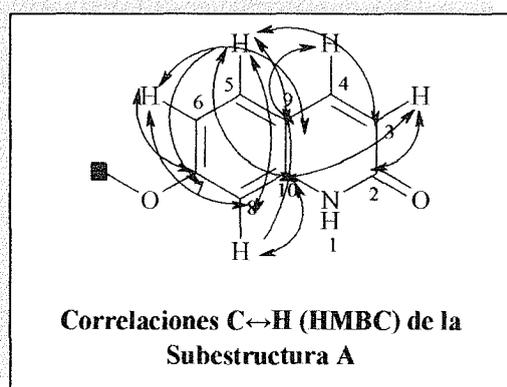


Según su fórmula molecular, $C_{19}H_{23}NO_2$, posee nueve grados de insaturación, en base a esto, en su espectro de RMN- 1H (Figura 9), a campo bajo, se observan dos dobletes en δ 6,21 (H-4); δ 7,59 (H-3), con una constante de acoplamiento, $J=9$ Hz, lo que conforma un sistema típico AB, propio de un par de hidrógenos

“orto” acoplados, similar a esto, ocurre con una señal doblete (*d*) en δ 7,32 (H-5) ($J=9$ Hz), y otra doblete de dobletes (*dd*) en δ 6,80 (H-6) ($J_1=2,0$; $J_2=9,0$ Hz) respectivamente, y un singulete en δ 6,77 (H-8), cuyas constantes de acoplamiento, permiten establecer un sistema ABX. Ambos sistemas se detectan claramente en el espectro $^1H, ^1H$ -COSY (Figura 10). Las señales en el espectro de RMN- ^{13}C (BB y DEPT-135) (Figura 8) de los carbonos que llevan estos hidrógenos, fueron identificadas a δ 112.1 (C-4); δ 143.3 (C-3); δ 128.6 (C-5); δ 113.1 (C-6); δ 101.5 (C-8), a través

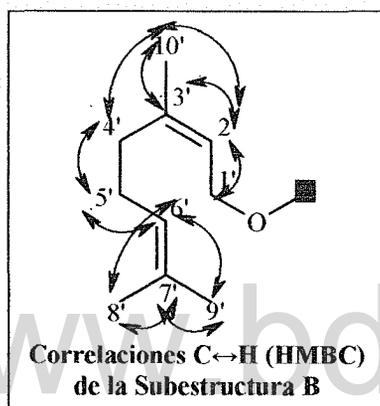
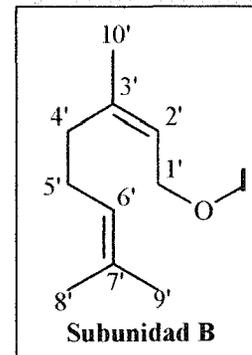


de su espectro HSQC (Figura 11). Estos datos accedieron a caracterizar las subunidad estructural [A], el espectro HMBC (Figura 12 y 12.1; Diagrama 1) confirmó la presencia de un núcleo bencénico 1,2,4-trisustituido, que concierne al sistema ABX anteriormente identificado (correlaciones: C-8 \leftrightarrow H5, C-8 \leftrightarrow H6), donde uno de los sustituyentes, es un grupo que está unido a un oxígeno [δ 162.0 (C-7)], el cual se sitúa “orto” con respecto a (C-6) y a (C-8), al mismo tiempo, establece que dicho sistema esta fusionado con el sistema AB (correlaciones: C-9 \leftrightarrow H-5, C-9 \leftrightarrow H-8, C-9 \leftrightarrow H-4 y C-10 \leftrightarrow H-5, C-10 \leftrightarrow H-3, C-10 \leftrightarrow



H-8), en este caso, uno de los sustituyentes “orto” a (C-3) es un grupo carbonilo [δ 161.1 (C-2) (Correlaciones: C-2 \leftrightarrow H-3 y C-2 \leftrightarrow H-4) y finalmente el otro sustituyente es el grupo -NH referido en el espectro IR (Figura 7), por lo tanto, se corrobora que se trata del núcleo derivado de la 2-isoquinolona.

Por otro lado, en su espectro de RMN-¹H (Figura 9), a campo alto, resaltan tres señales que aparecen como singuletes [δ 1.57 (H-9'), δ 1.63 (H-8') y δ 1.73 (H-10')], propias de metilos. Asimismo, una serie de señales que emergen como multipletes entre δ 2.10 y δ 2.03 que se atribuyen a metilenos [δ 2.10; 2.09 (H-5') y δ 2.04; 2.03 (H-4')]. Además, entre δ 4.50 y δ 5.50, resaltan tres señales: un triplete en δ 5.43 (H-2'), un triplete de dobletes en δ 5.04 (H-6'), que por sus desplazamientos, son protones olefinicos y un doblete en δ 4.57



(H-1') que podría ser un protón unido a una función oxigenada. Dichas señales, se ajustan a lo observado en el experimento DEPT-135 de RMN-¹³C (Figura 8) y con el espectro HSQC (Figura 11) se logró asignar cada señal de protón con su carbono respectivo. Ahora bien, mediante las correlaciones que muestra el espectro de HMBC (Figura 12 y 12.1; Diagrama 1), se consiguió establecer la subunidad estructural B, la cual confirmó ser una cadena alifática de diez carbonos con dos dobles

enlaces, es decir, un monoterpene, esto se estipuló siguiendo las correlaciones a través de los metilos [(C-2')↔(H-10'), (C-3')↔(H-10'), (C-4')↔(H-10')] y [(C-6')↔(H-8'), (C-6')↔(H-9'), (C-7')↔(H-8')], y así sucesivamente.

Al balancear, en referencia la fórmula molecular del compuesto [C₁₉H₂₃NO₂], con los átomos comprometidos con la subunidad A [C₉H₄NO₂] y con la subunidad B [C₁₀H₁₉O], se completan los nueve grados de insaturación que rige la fórmula del compuesto, sin embargo, al haber un oxígeno extra, hace pensar que ambas subestructuras comparten al menos un átomo de oxígeno, esto se ratificó con el espectro HMBC (Figura 12 y 12.1; Diagrama 1) con la correlación [(C-7')↔(H-1')].

En base a todo lo anterior expuesto queda establecida la estructura como 7-O-neril éter-2-quinolona[1].

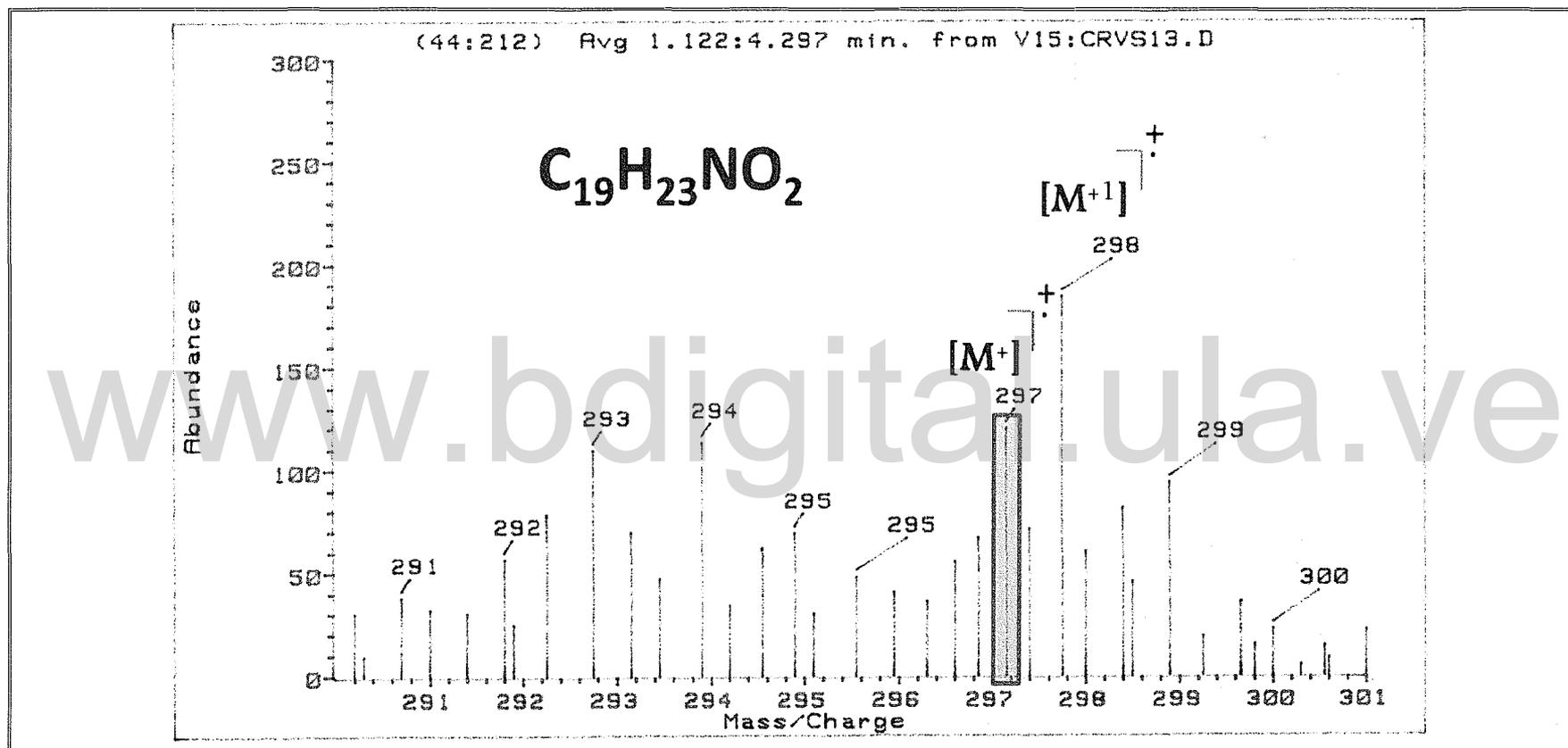


Figura 7. Espectro de masas y fórmula molecular de [1].

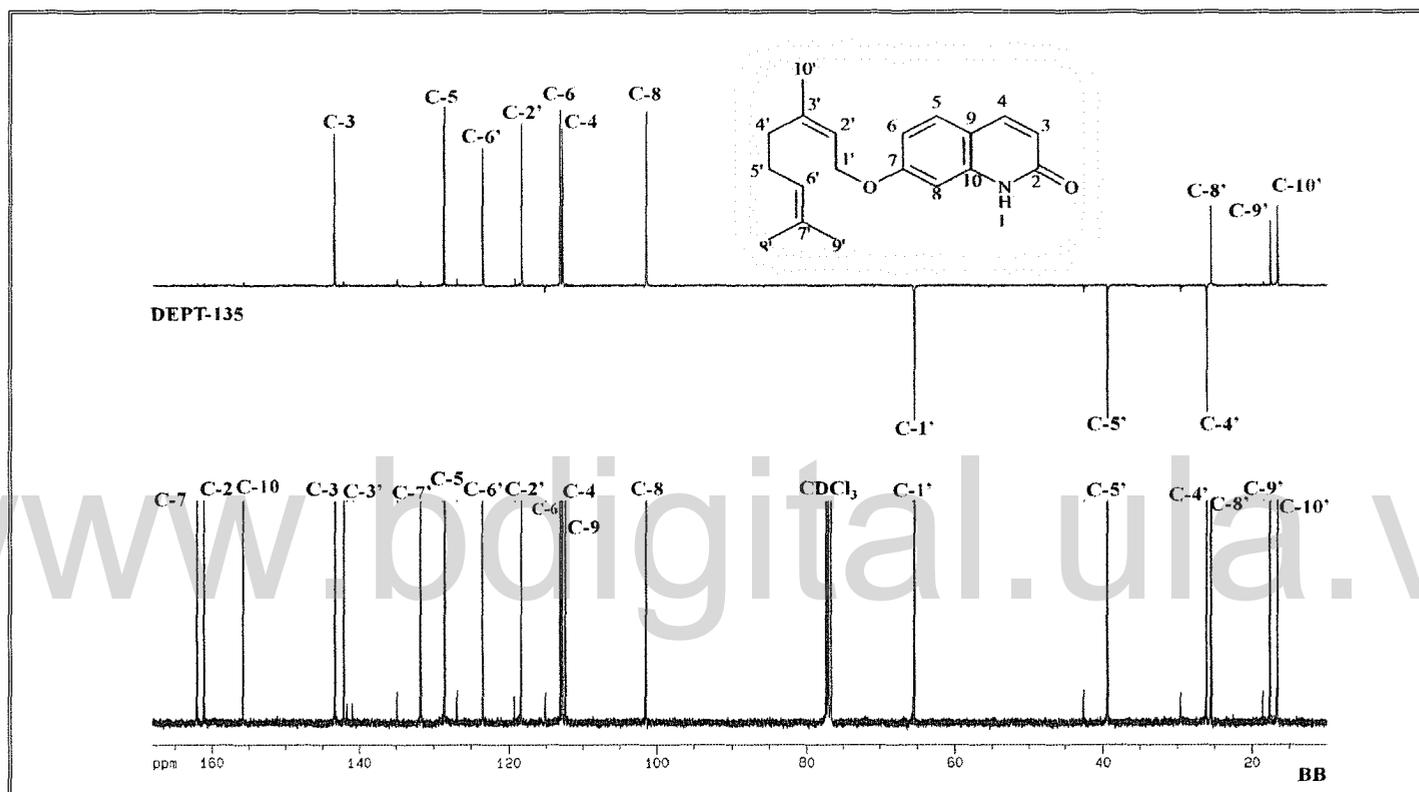


Figura 8. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) [1].

Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [1].

C	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
δ (ppm)	161.1	143.3	112.8	128.6	113.1	162.0	101.5	112.3	155.7	
Tipo	C=O	=CH-	=CH-	=CH-	=CH-	=C<	=CH-	=C<	=C<	
C	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'
δ (ppm)	65.4	118.4	142.1	26.1	39.4	123.5	131.8	25.5	17.6	16.8
Tipo	-CH ₂ O-	=CH-	=C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	=CH-	=C<	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃

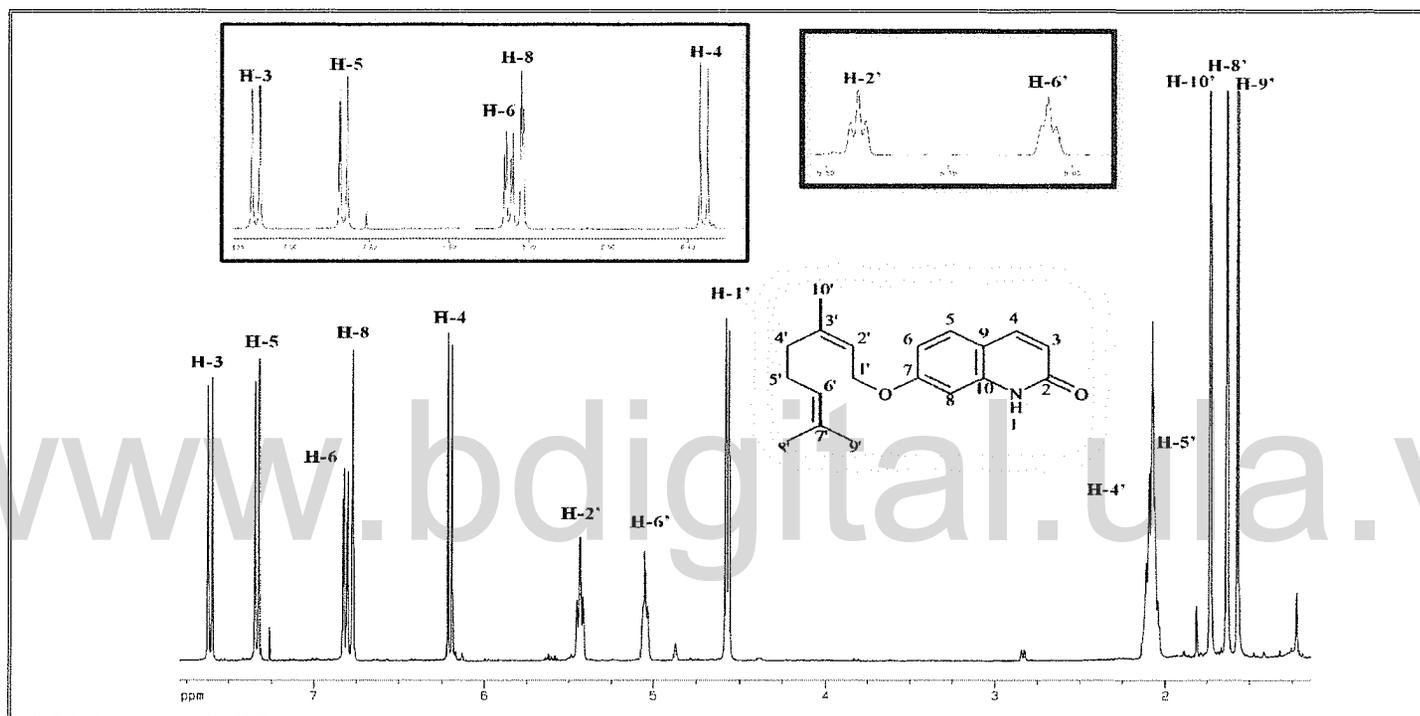


Figura 9. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz) de [1].

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN-¹H de [1].

H	1	3	4	5	6	8	1'
δ (ppm)	-	7.59	6.21	7.32	6.80	6.77	4.57; 4.56
<i>M</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>dd</i>	<i>s</i>	<i>d</i>
<i>J</i> (Hz)	-	9	9	9	9; 2	-	6
H	2'	4'	5'	6'	8'	9'	10'
δ (ppm)	5.43	2.04; 2.03	2.10; 2.09	5.04	1.63	1.57	1.73
<i>M</i>	<i>t</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>td</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	6	-	-	-	-	-	-

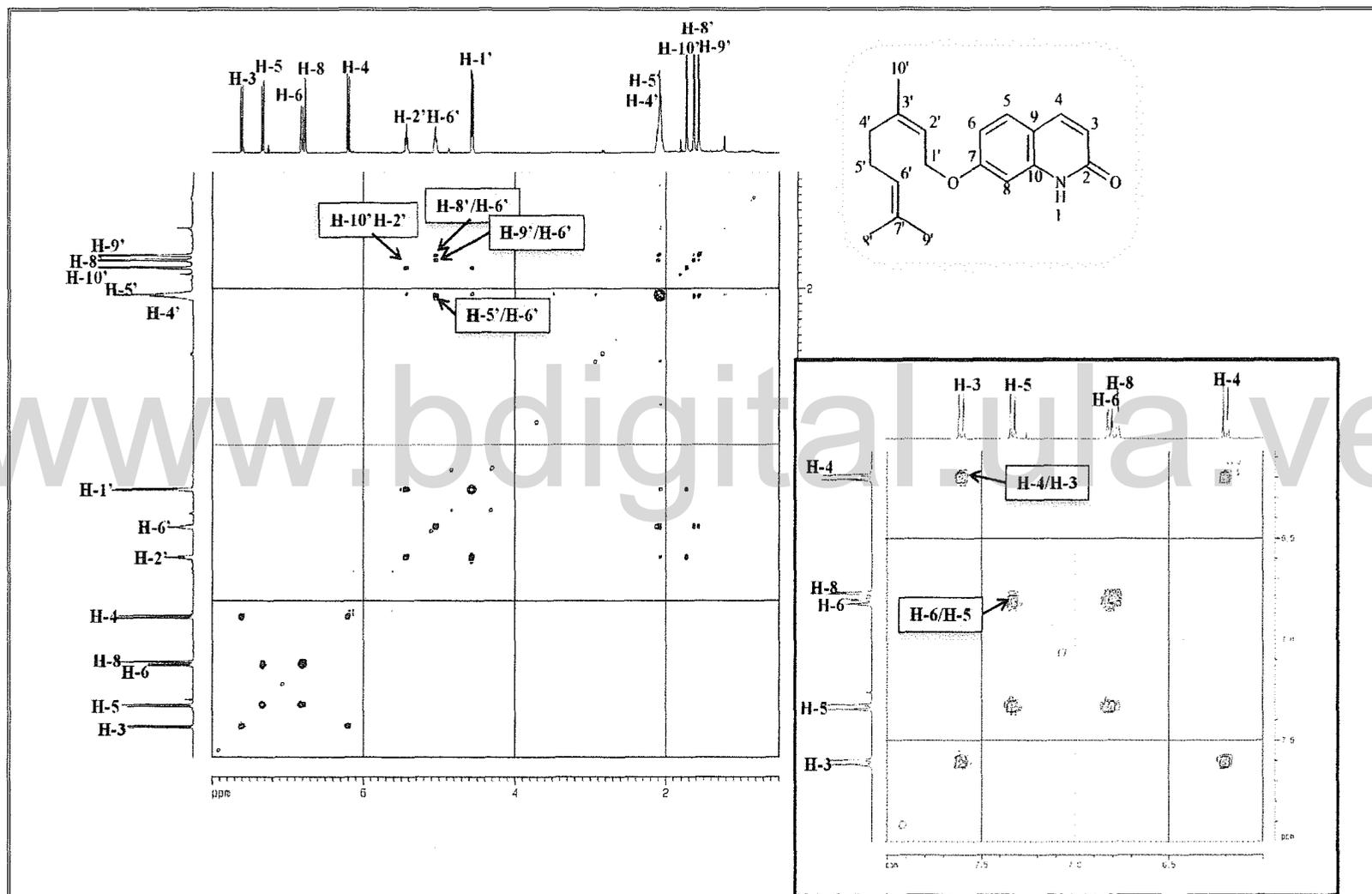


Figura 10. Espectro y aplicaciones ^1H , ^1H COSY (CDCl_3 , 400MHz) de [1].

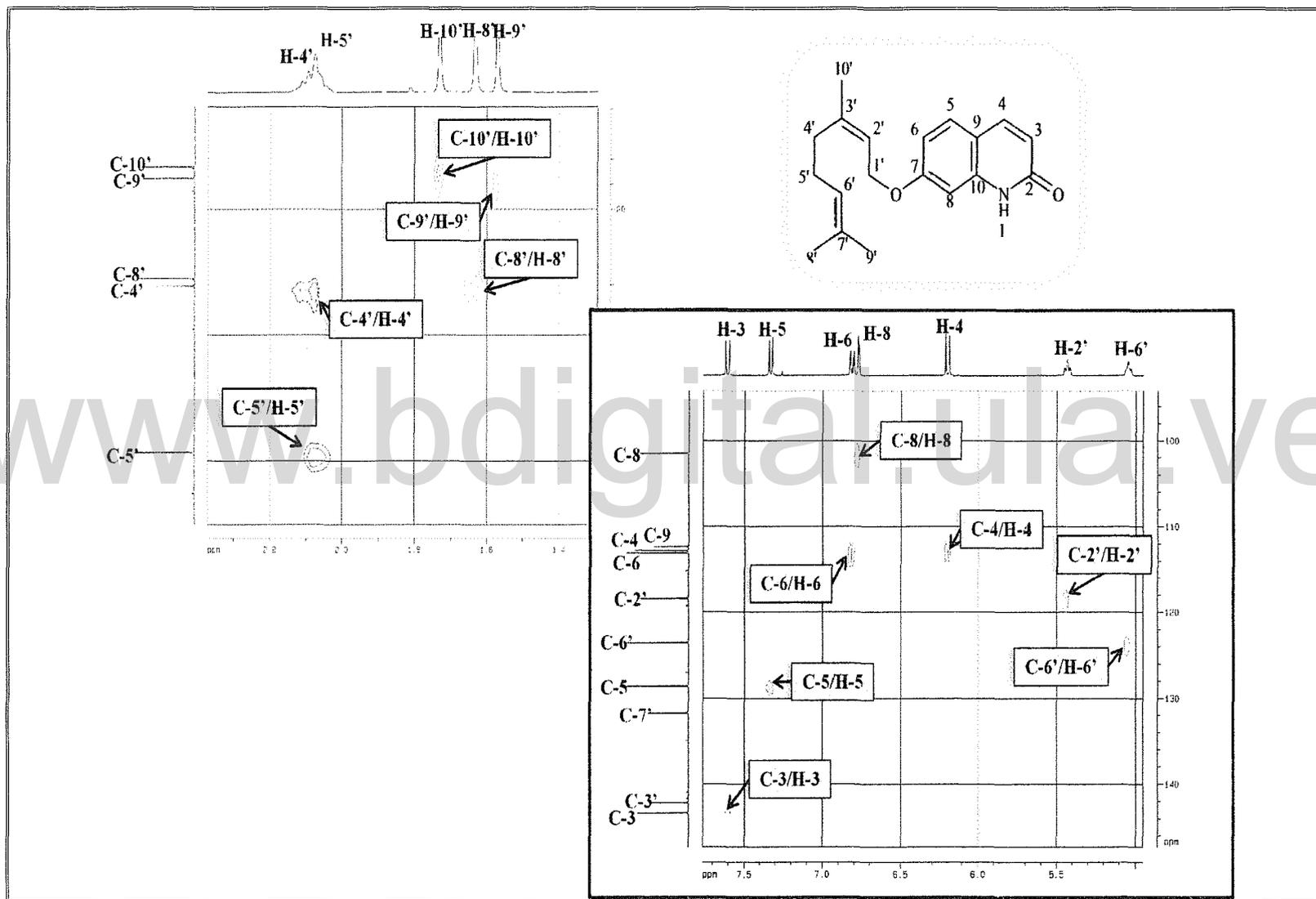


Figura 11. Espectro y ampliaciones de HSQC (CDCl₃) de [1].

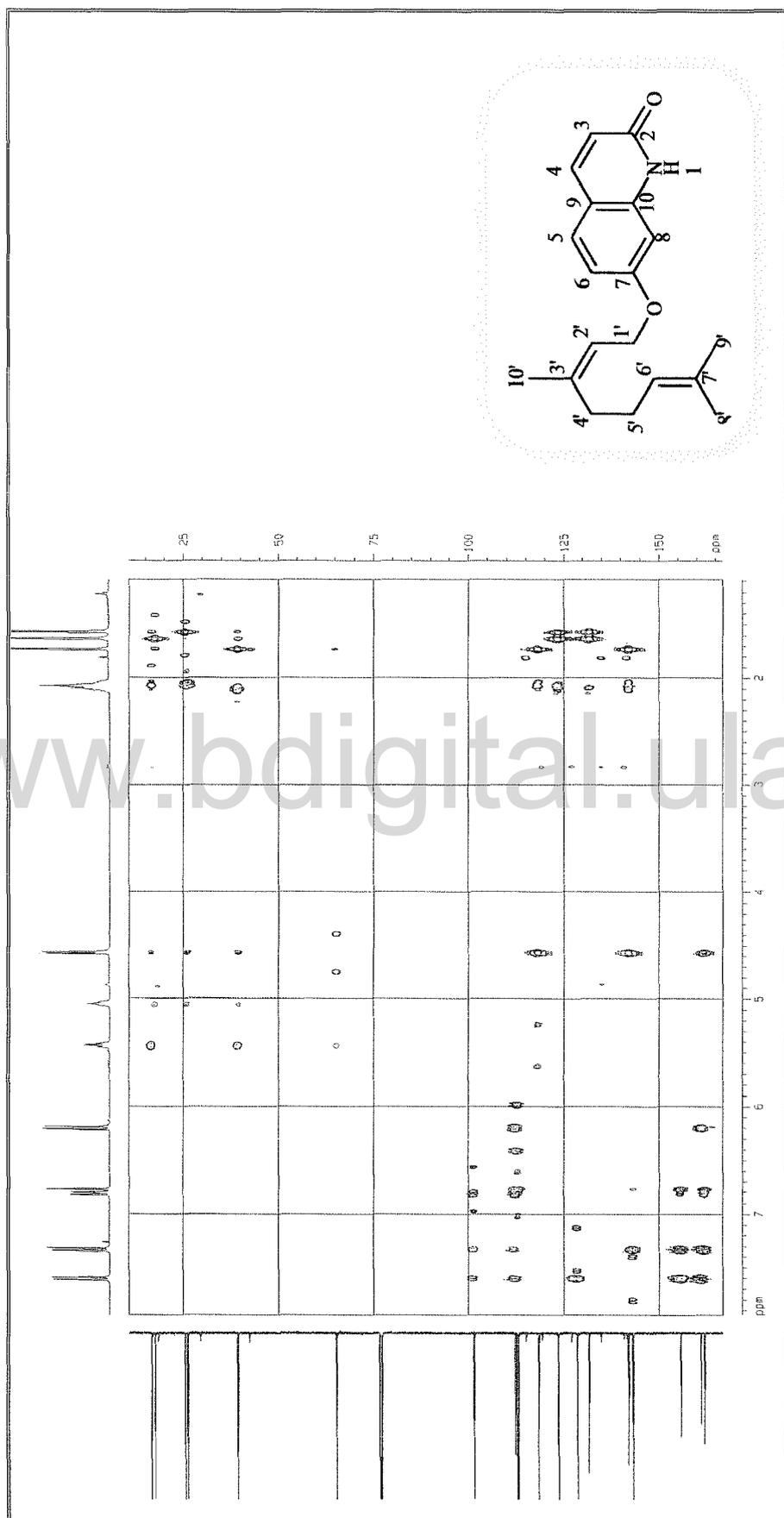


Figura 12. Espectro HMBBC (CDCl₃) de [1].

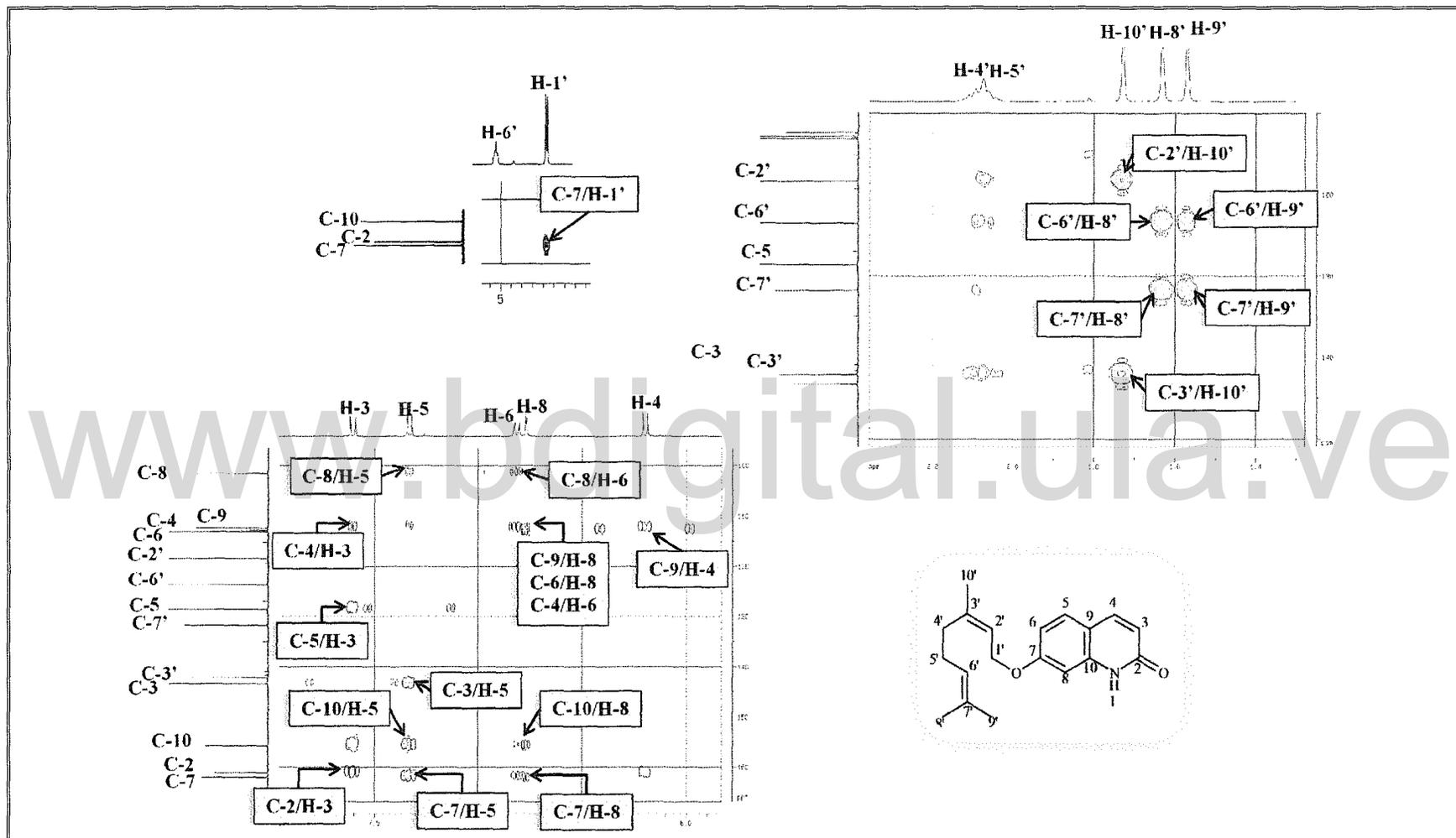
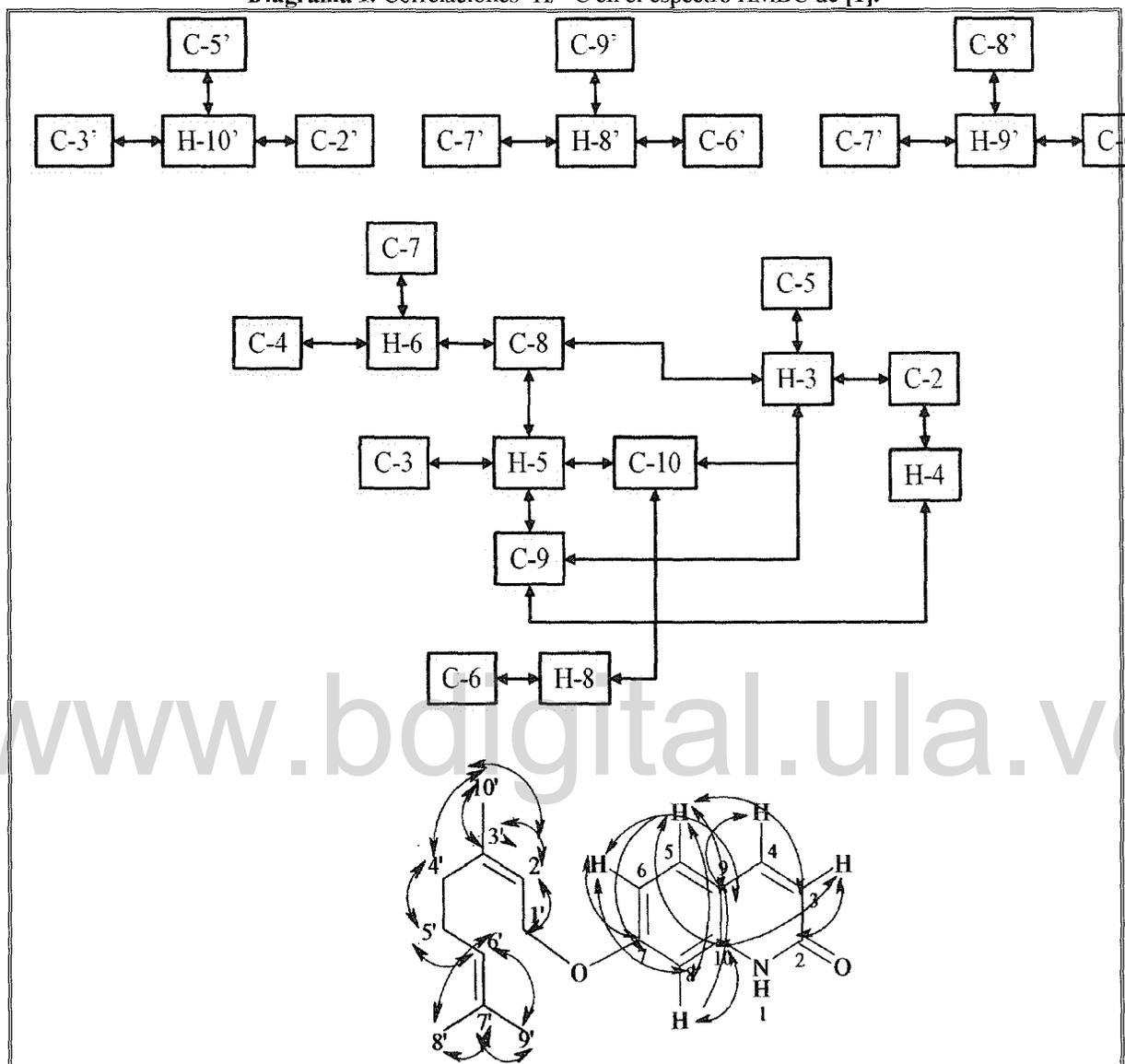


Figura 12.1 Ampliaciones del espectro HMBC (CDCl₃) de [1].

Diagrama 1. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [1].



Luego de tener establecida la estructura del compuesto mediante los estudios de RMN, se procedió a la confirmación de la misma, usando la técnica de difracción de rayos X. El monocristal fue obtenido por cristalización, mediante la evaporación lenta del acetato de etilo en una solución a 4 °C, dando como resultado un monocristal en forma de bloque incoloro. La toma de datos de difracción de rayos-X, se llevó a cabo en un difractómetro Bruker APEX-II y utilizando radiación de Cu-K α ($\lambda=1.54187\text{\AA}$) con monocromador de grafito. La estructura se resolvió por métodos directos y fue refinada con mínimos cuadrados utilizando el programa SHELX-02 (Sheldrick, 2008). La búsqueda realizada en el *Cambridge Structural Database* (CSD) no arrojó resultados, lo que indica que no hay reportes cristalográficos para este compuesto. En la tabla 4, se muestran las condiciones experimentales de la toma de datos, parámetros de celda y parámetros finales de refinamiento y en las tablas 5, 6 y 7 se presentan las distancias, ángulos de enlace y de torsión.

Tabla 4. Datos cristalográficos y condiciones experimentales para [1].

DATOS CRISTALINOS	
Fórmula	C ₁₉ H ₂₃ NO ₂
Peso fórmula	297.38
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c (No. 14)
Parámetros de celda: <i>a, b, c</i> (Å)	36.286(5) 7.1402(12) 13.1416(16)
α, β, γ (°)	90 100.334(6) 90
V (Å ³)	3349.6(8)
Z	8
D(calc) [g cm ⁻³]	1.179
μ (CuK α) [mm ⁻¹]	0.598
Tamaño del cristal (mm)	0.20 x 0.30 x 0.30
TOMA DE DATOS	
Temperatura (K)	571
Radiación (Å) CuK α	1.54178
θ Min-Max (°)	1.2, 67.3
Datos tomados	-43: 42 ; -8: 8 ; -15: 15
Datos totales, únicos, R_{int}	41450, 5847, 0.106
Datos Observados [$I > 2.0 \sigma(I)$]	2795
REFINAMIENTO	
Nref, Npar	5847, 397
R, wR2, S	0.1220, 0.4229, 1.31

Tabla 5. Distancias de enlace (Å) de [1].

O1	-C1C	1.424(6)	C7C	-C8C	1.444(10)
O1	-C7	1.366(6)	C8	-C8A	1.389(7)
O2	-C2	1.206(7)	C1C	-H101	0.9700
O11	-C71	1.369(6)	C1C	-H100	0.9700
O11	-C1B	1.419(6)	C2C	-H97	0.9300
O21	-C21	1.196(7)	C3	-H96	0.9300
N1	-C8A	1.377(6)	C4	-H99	0.9300
N1	-C2	1.388(6)	C4C	-H95	0.9700
N1	-H1	0.8600	C4C	-H94	0.9700
N1A	-C81A	1.350(6)	C5	-H98	0.9300
N1A	-C21	1.384(7)	C5C	-H103	0.9700
N1A	-H1A	0.8600	C5C	-H104	0.9700
C1C	-C2C	1.500(7)	C6	-H102	0.9300
C2	-C3	1.416(9)	C6C	-H105	0.9300
C2C	-C3C	1.304(8)	C8	-H93	0.9300
C3	-C4	1.338(9)	C8C	-H8C1	0.9600
C3C	-C4C	1.498(8)	C8C	-H8C2	0.9600
C3C	-C10C	1.505(8)	C8C	-H8C3	0.9600
C4	-C4A	1.442(8)	C9C	-H9C2	0.9600
C4A	-C8A	1.365(7)	C9C	-H9C1	0.9600
C4A	-C5	1.381(7)	C9C	-H9C3	0.9600
C4C	-C5C	1.517(8)	C10C	-H10B	0.9600
C5	-C6	1.370(8)	C10C	-H10A	0.9600
C5C	-C6C	1.503(8)	C10C	-H10C	0.9600
C6	-C7	1.373(7)	C1B	-C2B	1.497(7)
C6C	-C7C	1.303(9)	C2B	-C3B	1.304(8)
C7	-C8	1.369(7)	C3B	-C4B	1.499(8)
C7C	-C9C	1.512(9)	C3B	-C10B	1.500(9)
C4B	-C5B	1.512(9)	C4B	-H4	0.9700
C5B	-C6B	1.515(8)	C5B	-H12	0.9700
C6B	-C7B	1.294(9)	C5B	-H13	0.9700
C7B	-C8B	1.463(10)	C6B	-H14	0.9300
C7B	-C9B	1.502(10)	C8B	-H8B1	0.9600
C21	-C31	1.434(8)	C8B	-H8B2	0.9600
C31	-C41	1.317(8)	C8B	-H8B3	0.9600
C41	-C41A	1.444(8)	C9B	-H9B1	0.9600
C41A	-C81A	1.380(7)	C9B	-H9B2	0.9600
C41A	-C51	1.378(8)	C9B	-H9B3	0.9600
C51	-C61	1.364(8)	C10B	-H10D	0.9600
C61	-C71	1.385(7)	C10B	-H10E	0.9600
C71	-C81	1.360(7)	C10B	-H10F	0.9600
C81	-C81A	1.393(7)	C31	-H11	0.9300
C1B	-H8	0.9700	C41	-H7	0.9300
C1B	-H9	0.9700	C51	-H6	0.9300
C2B	-H10	0.9300	C61	-H5	0.9300
C4B	-H3	0.9700	C81	-H2	0.9300

Tabla 6. Ángulos de enlace (°) de [1].

C1C	-O1	-C7	117.2(4)	O1	-C7	-C6	116.1(5)
C1B	-O11	-C71	117.2(4)	C6C	-C7C	-C9C	121.3(6)
C2	-N1	-C8A	122.1(4)	C6C	-C7C	-C8C	124.0(6)
C8A	-N1	-H1	119.00	C8C	-C7C	-C9C	114.7(6)
C2	-N1	-H1	119.00	C7	-C8	-C8A	118.3(5)
C21	-N1A	-C81A	123.0(4)	N1	-C8A	-C8	116.2(4)
C81A	-N1A	-H1A	118.00	C4A	-C8A	-C8	123.2(5)
C21	-N1A	-H1A	119.00	N1	-C8A	-C4A	120.6(5)
O1	-C1C	-C2C	108.2(4)	C2C	-C1C	-H101	110.00
N1	-C2	-C3	116.9(5)	O1	-C1C	-H100	110.00
O2	-C2	-C3	127.4(5)	O1	-C1C	-H101	110.00
O2	-C2	-N1	115.6(5)	H100	-C1C	-H101	108.00
C1C	-C2C	-C3C	125.1(6)	C2C	-C1C	-H100	110.00
C2	-C3	-C4	122.0(5)	C1C	-C2C	-H97	118.00
C2C	-C3C	-C4C	125.4(5)	C3C	-C2C	-H97	117.00
C4C	-C3C	-C10C	113.7(5)	C2	-C3	-H96	119.00
C2C	-C3C	-C10C	120.9(5)	C4	-C3	-H96	119.00
C3	-C4	-C4A	120.0(5)	C3	-C4	-H99	120.00
C4	-C4A	-C8A	118.5(5)	C4A	-C4	-H99	120.00
C5	-C4A	-C8A	117.0(5)	C3C	-C4C	-H95	108.00
C4	-C4A	-C5	124.6(5)	C5C	-C4C	-H94	108.00
C3C	-C4C	-C5C	117.3(4)	C3C	-C4C	-H94	108.00
C4A	-C5	-C6	121.1(5)	H94	-C4C	-H95	107.00
C4C	-C5C	-C6C	111.5(5)	C5C	-C4C	-H95	108.00
C5	-C6	-C7	120.7(5)	C4A	-C5	-H98	119.00
C5C	-C6C	-C7C	127.6(6)	C6	-C5	-H98	119.00
O1	-C7	-C8	124.2(5)	C6C	-C5C	-H103	109.00
C6	-C7	-C8	119.7(5)	C4C	-C5C	-H104	109.00
C6C	-C5C	-H104	109.00	C1B	-C2B	-C3B	124.7(5)
H103	-C5C	-H104	108.00	C2B	-C3B	-C4B	124.9(6)
C4C	-C5C	-H103	109.00	C2B	-C3B	-C10B	121.7(5)
C5	-C6	-H102	120.00	C4B	-C3B	-C10B	113.4(5)
C7	-C6	-H102	120.00	C3B	-C4B	-C5B	117.2(5)
C5C	-C6C	-H105	116.00	C4B	-C5B	-C6B	111.8(5)
C7C	-C6C	-H105	116.00	C5B	-C6B	-C7B	128.5(6)
C8A	-C8	-H93	121.00	C6B	-C7B	-C9B	122.5(7)
C7	-C8	-H93	121.00	C6B	-C7B	-C8B	123.1(6)
C7C	-C8C	-H8C1	110.00	C8B	-C7B	-C9B	114.4(6)
C7C	-C8C	-H8C2	110.00	O21	-C21	-C31	127.1(5)
H8C1	-C8C	-H8C3	109.00	O21	-C21	-N1A	116.4(5)
C7C	-C8C	-H8C3	109.00	N1A	-C21	-C31	116.4(5)
H8C1	-C8C	-H8C2	110.00	C21	-C31	-C41	121.8(6)
H8C1	-C8C	-H8C3	109.00	C31	-C41	-C41A	121.8(6)
C7C	-C9C	-H9C2	109.00	C41	-C41A	-C81A	116.8(5)

C7C	-C9C	-H9C3	109.00	C41	-C41A	-C51	125.9(5)
H9C1	-C9C	-H9C2	110.00	C51	-C41A	-C81A	117.3(5)
C7C	-C9C	-H9C1	109.00	C41A	-C51	-C61	121.9(5)
H9C1	-C9C	-H9C3	110.00	C51	-C61	-C71	119.8(5)
H9C2	-C9C	-H9C3	109.00	C61	-C71	-C81	120.2(5)
H10A	-C10C	-H10C	110.00	O11	-C71	-C61	115.2(5)
C3C	-C10C	-H10C	109.00	O11	-C71	-C81	124.6(5)
H10A	-C10C	-H10B	109.00	C71	-C81	-C81A	119.1(5)
C3C	-C10C	-H10A	109.00	C41A	-C81A	-C81	121.8(5)
C3C	-C10C	-H10B	109.00	N1A	-C81A	-C41A	121.0(5)
H10B	-C10C	-H10C	109.00	N1A	-C81A	-C81	117.2(5)
O11	-C1B	-C2B	108.6(4)	O11	-C1B	-H8	110.00
O11	-C1B	-H9	110.00	H8B2	-C8B	-H8B3	110.00
C2B	-C1B	-H8	110.00	C7B	-C9B	-H9B1	109.00
C2B	-C1B	-H9	110.00	C7B	-C9B	-H9B2	110.00
H8	-C1B	-H9	108.00	C7B	-C9B	-H9B3	109.00
C1B	-C2B	-H10	118.00	H9B1	-C9B	-H9B2	109.00
C3B	-C2B	-H10	118.00	H9B1	-C9B	-H9B3	109.00
C3B	-C4B	-H3	108.00	H9B2	-C9B	-H9B3	110.00
C3B	-C4B	-H4	108.00	C3B	-C10B	-H10D	109.00
C5B	-C4B	-H3	108.00	C3B	-C10B	-H10E	109.00
C5B	-C4B	-H4	108.00	C3B	-C10B	-H10F	109.00
H3	-C4B	-H4	107.00	H10D	-C10B	-H10E	110.00
C4B	-C5B	-H12	109.00	H10D	-C10B	-H10F	109.00
C4B	-C5B	-H13	109.00	H10E	-C10B	-H10F	110.00
C6B	-C5B	-H12	109.00	C21	-C31	-H11	120.00
C6B	-C5B	-H13	109.00	C41	-C31	-H11	119.00
H12	-C5B	-H13	108.00	C31	-C41	-H7	119.00
C5B	-C6B	-H14	116.00	C41A	-C41	-H7	119.00
C7B	-C6B	-H14	116.00	C41A	-C51	-H6	119.00
C7B	-C8B	-H8B1	109.00	C61	-C51	-H6	119.00
C7B	-C8B	-H8B2	109.00	C51	-C61	-H5	120.00
C7B	-C8B	-H8B3	109.00	C71	-C61	-H5	120.00
H8B1	-C8B	-H8B2	110.00	C71	-C81	-H2	120.00
H8B1	-C8B	-H8B3	109.00	C81A	-C81	-H2	121.00

Tabla 7. Ángulos de Torsión (°) de [1].

C7	-O1	-C1C	-C2C	-179.2(5)
C1C	-O1	-C7	-C6	179.0(6)
C1C	-O1	-C7	-C8	-0.4(9)
C71	-O11	-C1B	-C2B	-179.3(5)
C1B	-O11	-C71	-C61	179.0(6)
C1B	-O11	-C71	-C81	-0.7(9)
C2	-N1	-C8A	-C8	179.1(6)
C2	-N1	-C8A	-C4A	0.4(9)
C8A	-N1	-C2	-O2	-179.6(6)
C8A	-N1	-C2	-C3	-1.0(10)
C21	-N1A	-C81A	-C41A	-1.3(9)
C81A	-N1A	-C21	-C31	1.1(9)
C21	-N1A	-C81A	-C81	179.1(6)
C81A	-N1A	-C21	-O21	-178.5(6)
O1	-C1C	-C2C	-C3C	178.7(6)
O2	-C2	-C3	-C4	-179.7(8)
N1	-C2	-C3	-C4	-0.4(10)
C1C	-C2C	-C3C	-C10C	1.9(11)
C1C	-C2C	-C3C	-C4C	179.5(6)
C2	-C3	-C4	-C4A	-2.0(11)
C2C	-C3C	-C4C	-C5C	0.9(10)
C10C	-C3C	-C4C	-C5C	-179.2(6)
C3	-C4	-C4A	-C5	-178.5(7)
C3	-C4	-C4A	-C8A	1.3(10)
C4	-C4A	-C5	-C6	179.6(7)
C8A	-C4A	-C5	-C6	-0.1(10)
C5	-C4A	-C8A	-N1	179.3(6)
C4	-C4A	-C8A	-N1	-0.4(10)
C4	-C4A	-C8A	-C8	-179.1(6)
C5	-C4A	-C8A	-C8	0.7(10)
C3C	-C4C	-C5C	-C6C	-178.4(6)
C4A	-C5	-C6	-C7	-0.4(11)
C4C	-C5C	-C6C	-C7C	-166.2(8)
C5	-C6	-C7	-O1	-178.9(6)
C5	-C6	-C7	-C8	0.5(10)
C5C	-C6C	-C7C	-C8C	0.4(14)
C5C	-C6C	-C7C	-C9C	-179.2(8)
O1	-C7	-C8	-C8A	179.4(6)
C6	-C7	-C8	-C8A	0.1(10)
C7	-C8	-C8A	-N1	-179.4(6)
C7	-C8	-C8A	-C4A	-0.7(10)
O11	-C1B	-C2B	-C3B	-179.4(6)
C1B	-C2B	-C3B	-C4B	180.0(6)
C1B	-C2B	-C3B	-C10B	-1.2(10)
C2B	-C3B	-C4B	-C5B	0.2(10)
C10B	-C3B	-C4B	-C5B	-178.7(6)
C3B	-C4B	-C5B	-C6B	-178.1(6)

C4B	-C5B	-C6B	-C7B	-166.1(8)
C5B	-C6B	-C7B	-C8B	-1.1(13)
C5B	-C6B	-C7B	-C9B	178.9(8)
O21	-C21	-C31	-C41	179.8(8)
N1A	-C21	-C31	-C41	0.2(11)
C21	-C31	-C41	-C41A	-1.2(11)
C31	-C41	-C41A	-C51	-178.8(7)
C31	-C41	-C41A	-C81A	1.1(10)
C41	-C41A	-C51	-C61	179.3(7)
C41	-C41A	-C81A	-N1A	0.2(9)
C41	-C41A	-C81A	-C81	179.8(6)
C51	-C41A	-C81A	-N1A	-180.0(6)
C51	-C41A	-C81A	-C81	-0.4(10)
C41A	-C51	-C61	-C71	0.9(11)
C51	-C61	-C71	-O11	-180.0(6)
C51	-C61	-C71	-C81	-0.3(10)
O11	-C71	-C81	-C81A	179.0(6)
C61	-C71	-C81	-C81A	-0.7(10)
C71	-C81	-C81A	-N1A	-179.4(6)
C71	-C81	-C81A	-C41A	1.0(10)

www.bdigital.ula.ve

La estructura molecular de [1], resuelta por difracción de rayos-X se muestra en la figura 13. Esta estructura no posee átomos quirales, y a su vez, la estructura creció en un grupo espacial no-enantiomorfo, $P2_1/c$, por lo tanto, no se requirió el refinamiento de la configuración absoluta del material.

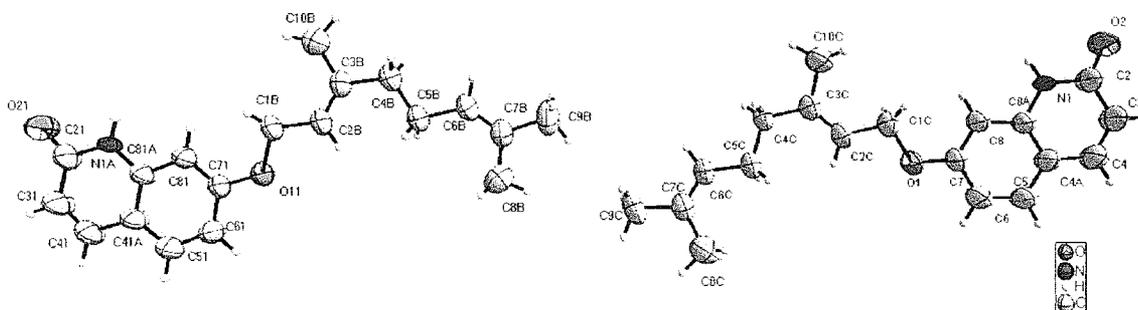


Figura 13. Estructura molecular de [1]. Diagrama tipo ORTEP mostrando las elipsoides de desplazamiento para los átomos no-hidrógenos (las elipsoides al 30% de probabilidad) y la numeración de los átomos y de los anillos.

La estructura presenta seis enlaces de hidrógeno intermoleculares, los cuales se describen en la tabla 8. Dichos enlaces y las interacciones de van de Walls existentes producen un empaquetamiento cristalino en forma de capas en el plano ac con un porcentaje de espacio ocupado de 66.4% como se muestra en la figura 14. Estos estudios fueron realizados con la colaboración de la Licenciada Julia Bruno y la Doctora Graciela Díaz del Laboratorio de Cristalografía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

Tabla 8. Enlaces de hidrógenos presentes en [1].

Enlace	D-H	H-A	D-A	D-H-A	Simetría	Grafo
C51-H6...N1A	0.9300	2.5600	3.479(7)	164.00	$x, 1/2-y, -1/2+z$	C(5) $R_2^2(8)$
C41-H7...O21	0.9300	2.4200	3.325(8)	164.00	$x, 1/2-y, -1/2+z$	C(5)
C31-H11...O2	0.9300	2.4400	3.355(7)	169.00	$-1+x, 1/2-y, -1/2+z$	D(3) $C_2^2(8)$
C3-H96...O21	0.9300	2.4700	3.384(7)	169.00	$1+x, y, z$	D(3)
C5-H98...N1	0.9300	2.5600	3.471(7)	166.00	$x, 1/2-y, -1/2+z$	C(5) $R_2^2(8)$
C4-H99...O2	0.9300	2.4100	3.312(7)	164.00	$x, 1/2-y, -1/2+z$	C(5)

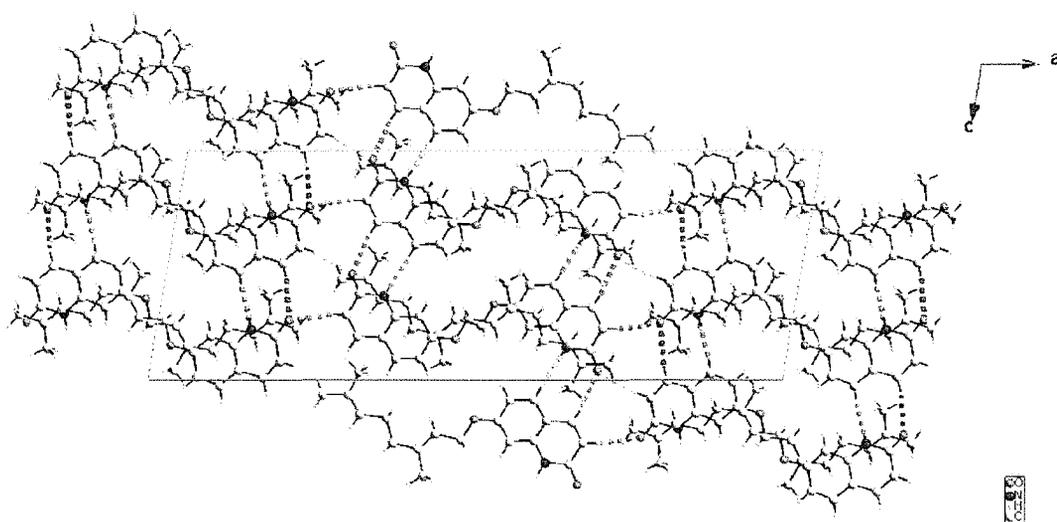
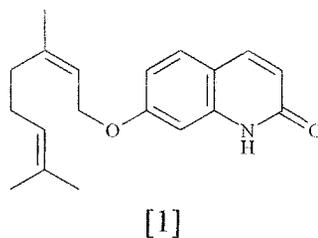


Figura 14. Empaquetamiento cristalino de [1] a lo largo del plano *ac*.

De esta forma quedó, inequívocamente, establecida la estructura de 7-*O*-neril éter de 2-quinolona [1]. Del género *Zanthoxylum*, se han descrito numerosos terpenoides unidos a esqueletos alcaloidales mediante un átomo de carbono, éste es el primer reporte de un monoterpeno unido a un derivado de la 2-quinolona a través de un átomo de oxígeno y se le dio el nombre de *Zanthoxyfolina* [1], como nuevo producto natural.



VI.1.b.- 1 β -Hidroxi- β -ylangeno [2]:

De la misma reunión A [Hex-CH₂Cl₂ (1:1)], tras varios procesos cromatográficos, como columna de sephadex LH20 y cromatografía de capa gruesa, se aisló un aceite color naranja (46mg), con un punto de ebullición (Pe) de 123-124 °C. En su espectro IR (Figura 15, Tabla 9), se destacan bandas de absorción de tensión de alcohol [v_{\max} 3413cm⁻¹ (O-H) y v_{\max} 1374 cm⁻¹ (C-O)], de alcanos [v_{\max} 2926 cm⁻¹ (C-H)] y de alquenos [v_{\max} 1634 cm⁻¹ (C=C) y v_{\max} 887 cm⁻¹ (=C-H)] respectivamente (Bellamy, 1975).

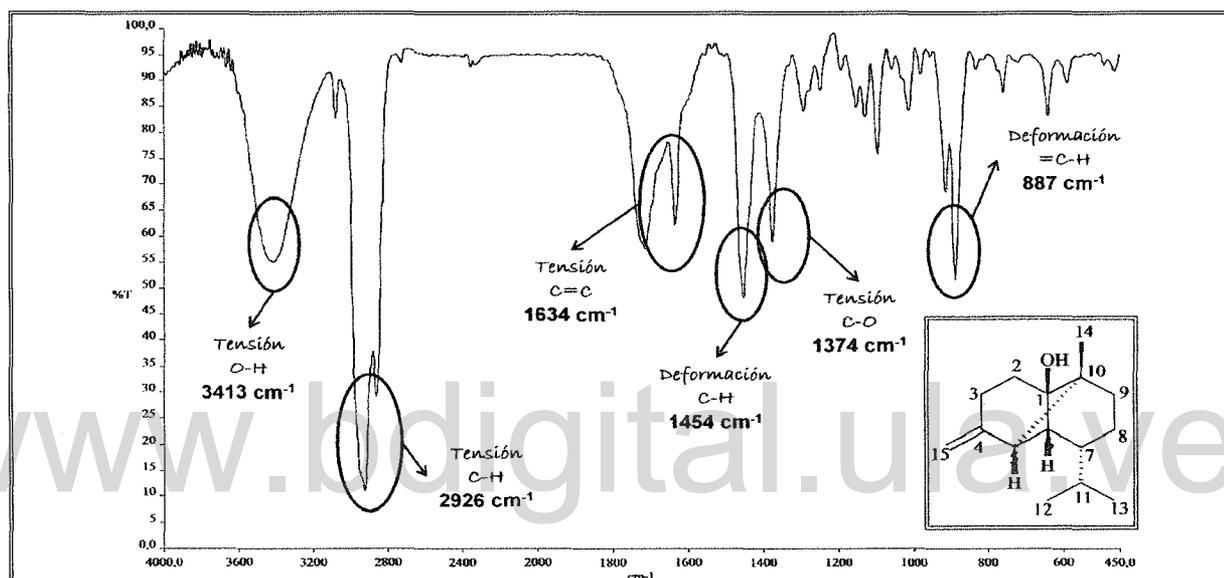


Figura 15. Espectro Infrarrojo (película líquida NaCl) de [2].

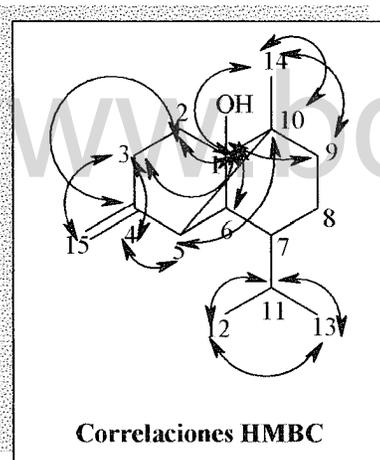
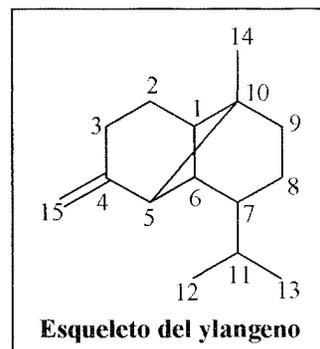
Tabla 9. Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (película líquida NaCl) de [2].

v_{\max}	3413	2925	1634	1454	1374	887
Asignación	O-H	C-H	C=C	C-H	C-O	=C-H

En su espectro RMN-¹³C (Figura 16, Tabla 10) de banda ancha, se perciben un total de quince señales, que según el DEPT-135 (Figura 16, Tabla 10), se desglosan de la siguiente manera: tres carbonos metílicos [δ 15.4 (C-13), δ 26.0 (C-14) y δ 28.6 (C-12)], cuatro carbonos metílicos [δ 26.6 (C-2), δ 38.8 (C-3), δ 24.7 (C-8) y δ 41.7 (C-9)], un carbono metileno olefínico [δ 106.2 (C-15)], cuatro carbonos metínicos [δ 54.3 (C-5), δ 27.4 (C-6), δ 53.3 (C-7) y δ 29.9 (C-11)] y tres carbonos cuaternarios, donde, uno de ellos está unido a un oxígeno [δ 81.0 (C-1)], otro está hibridizado sp² [δ 153.4 (C-4)] y el otro es un carbono sp³ [δ 20.2 (C-10)].

En su espectro RMN-¹H (Figura 17, Tabla 11) resaltan las señales de los protones de los grupos metilos, un singulete [δ 1.27 (H-14)] y un doblete que integra para seis hidrógenos [δ 1.03 (H-12) y δ 1.03 (H-13)] lo que indica que son dos grupos metilos que forman parte de un grupo isopropilo. También se observan grupos de señales que se muestran como multipletes en la zona de metilenos y metinos y un par de siguletes [δ 4.65 y δ 4.68 (H-15)] que integra para dos protones, que por su desplazamiento evidencia ser un par de protones olefinicos terminales.

Con estos datos, se llegó a la fórmula molecular C₁₅H₂₄O, dicha fórmula revela que la molécula posee cuatro grados de insaturación, por lo tanto, hace pensar que se trata de un sesquiterpenoide tricíclico posiblemente de la serie del ylangano, la cual posee en su estructura un doble enlace exocíclico (Westfelt, 1967).

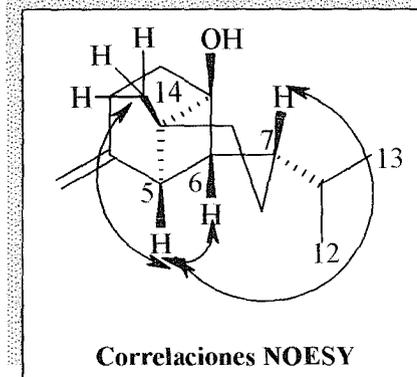


Basándose en esto, y con ayuda del espectro HSQC (Figura 18), se consiguió asignar cada carbono con sus respectivos hidrógenos. Dicho esqueleto se confirmó mediante su espectro ¹H,¹H COSY (Figura 19) con los acoplamientos: (H-11) \leftrightarrow (H-7); (H-11) \leftrightarrow (H-13/H-14); (H-7) \leftrightarrow (H-8) y (H-6) \leftrightarrow (H-7), entre otros, y con el espectro HMBC (Figura 20, Diagrama 2), donde se observan las correlaciones (C-12) \leftrightarrow (H-13); (C-13) \leftrightarrow (H-12) y (C-11) \leftrightarrow (H-12)/(H-13) lo que comprueba la presencia del grupo isopropilo en la molécula. Además, se observan las correlaciones de los protones del metilo [δ 1.27 (H-14)] con los carbonos [(C-1) \leftrightarrow (H-14); (C-9) \leftrightarrow (H-14); (C-10) \leftrightarrow (H-14)] y a su vez fija la ubicación del grupo oxidrilo sobre (C-1) con las correlaciones [(C-1) \leftrightarrow (H-2); (C-1) \leftrightarrow (H-9); (C-1) \leftrightarrow (H-14); (C-1) \leftrightarrow (H-6)], así como también las del doble enlace exocíclico [(C-15) \leftrightarrow (H-3); (C-4) \leftrightarrow (H-3); (C-4) \leftrightarrow (H-2) y (C-4) \leftrightarrow (H-5)] y la unión para formar el tercer anillo se confirma con la correlación [(C-10) \leftrightarrow (H-5)].

Para definir la estereoquímica de la estructura, se recurre al espectro NOESY (Figura 21), allí se contempla la correlación entre los protones [H-5↔H-6], [H-5↔H-14] y [H-5↔H7] por ende, el grupo oxidrilo se encuentra en orientación β debido al anillo tensionado en posición α .

De esta manera, al consultar la bibliografía pudo constarse que la estructura corresponde al 1 β -hidroxi- β -ylangeno [2]. El β -ylangeno fue aislado por primera vez en 1964 en los aceites esenciales de la naranja

(Hunter y Brogden, 1964a), los primeros estudios realizados a su estructura determinaron que el grupo isopropilo está α -orientado y los hidrógenos angulares deben estar β -orientados (Hunter y Brogden, 1964b); para que esto sea así, la biogénesis del β -ylangeno debe tener como precursor la *trans*-decalina (Motl *et al.*, 1965). El β -ylangeno, ha sido encontrado en varias especies del género *Pinus*, sobre todo en los aceites esenciales (Zavarin *et al.*, 1980; Westfelt, 1967 y Snajberk y Zavarin, 1975) y en otras especies como el *Solidago canadensis* (Kasali *et al.*, 2002). Hasta el presente no se ha reportado su presencia en el género *Zanthoxylum*. De igual manera, cabe destacar que esta estructura ha sido confirmada mediante síntesis (Snider y Kulkarni, 1985).



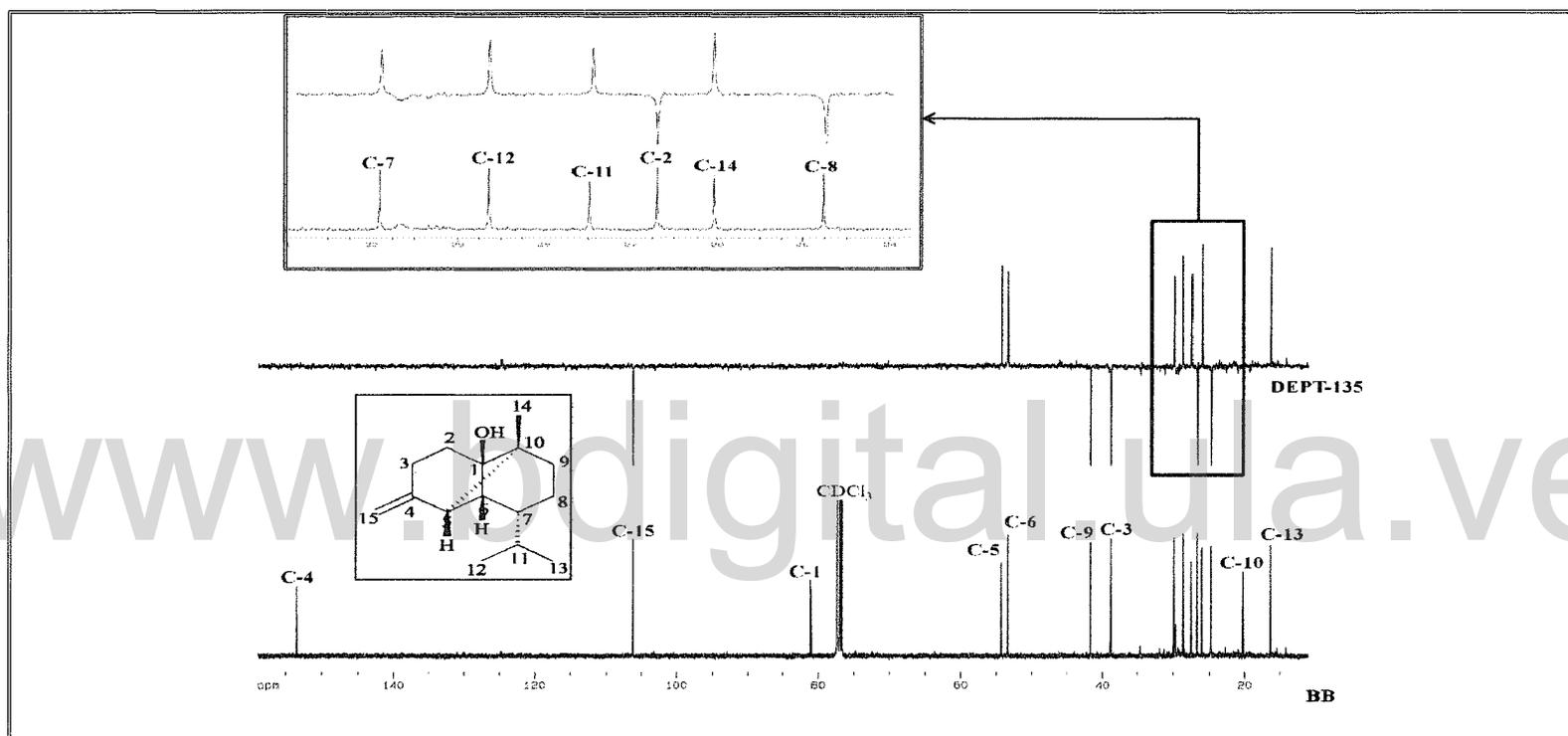


Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de [2].

Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^{13}C de [2].

C	1	2	3	4	5	6	7	8
δ (ppm)	81.0	26.7	38.8	153.4	53.4	54.3	29.9	24.7
Tipo	>CO-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	=C<	-CH<	-CH<	-CH<	-CH ₂ -
C	9	10	11	12	13	14	15	
δ (ppm)	41.7	20.2	27.4	28.6	16.3	26.0	=CH ₂	
Tipo	-CH ₂ -	>C<	-CH<	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	106.2	

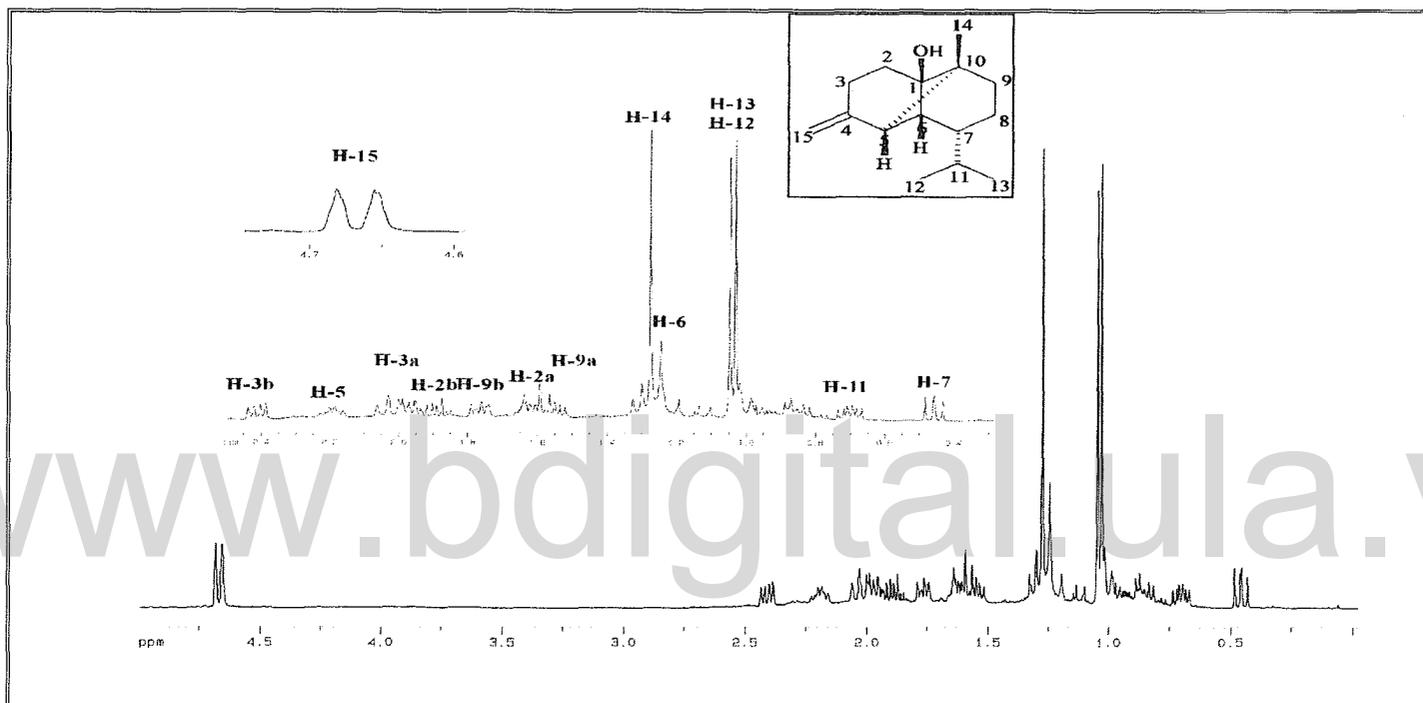


Figura 17. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz), de [2].

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN-¹H de [2].

H	2a,b	3a,b	5	6	7	8
δ (ppm)	1.27; 1.60	2.04; 2.40	1.24	1.27	0.88	1.98; nd
M	m	m	m	m	td	m
J (Hz)	-	-	-	-	-	-
H	9a,b	11	12	13	14	15 a,b
δ (ppm)	1.55; 1.77	0.71	1.03	1.04	1.27	4.68; 4.65
M	m	m	s	s	s	d
J (Hz)	-	-	-	-	-	-

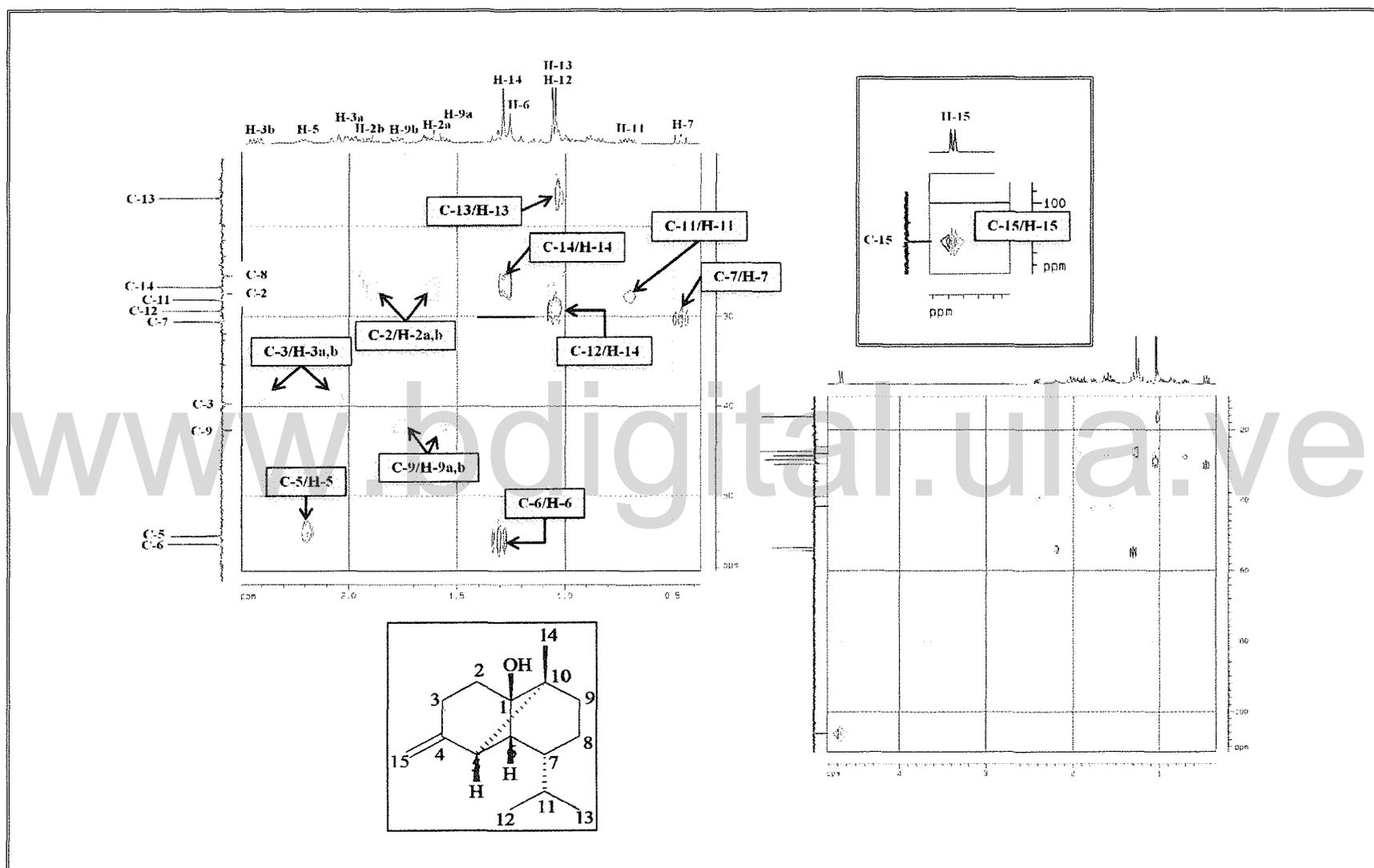


Figura 18. Espectro y ampliación de HSQC (CDCl_3) de [2].

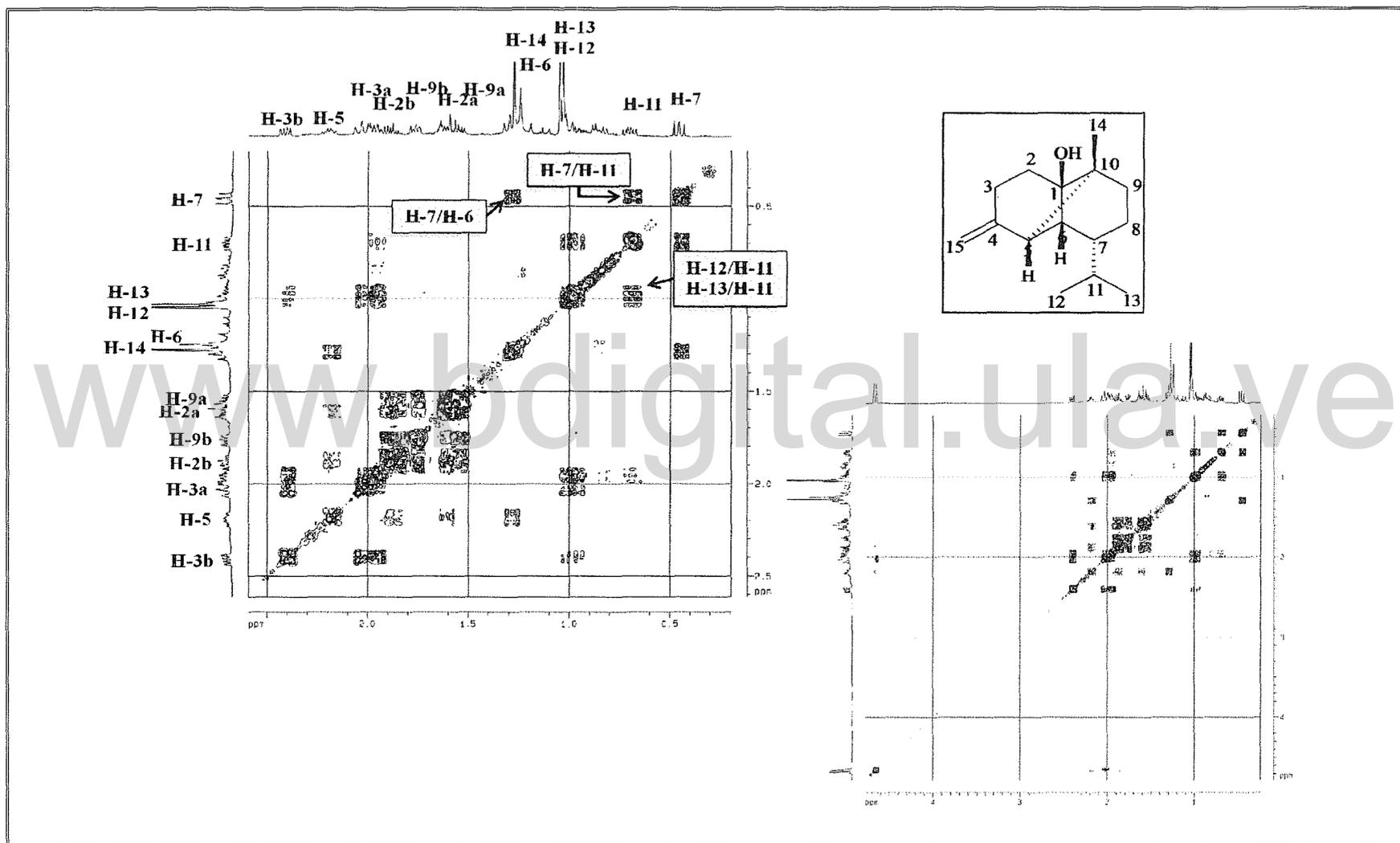


Figura 19. Espectro y ampliación de ^1H , ^1H COSY (CDCl_3 , 400MHz) de [2].

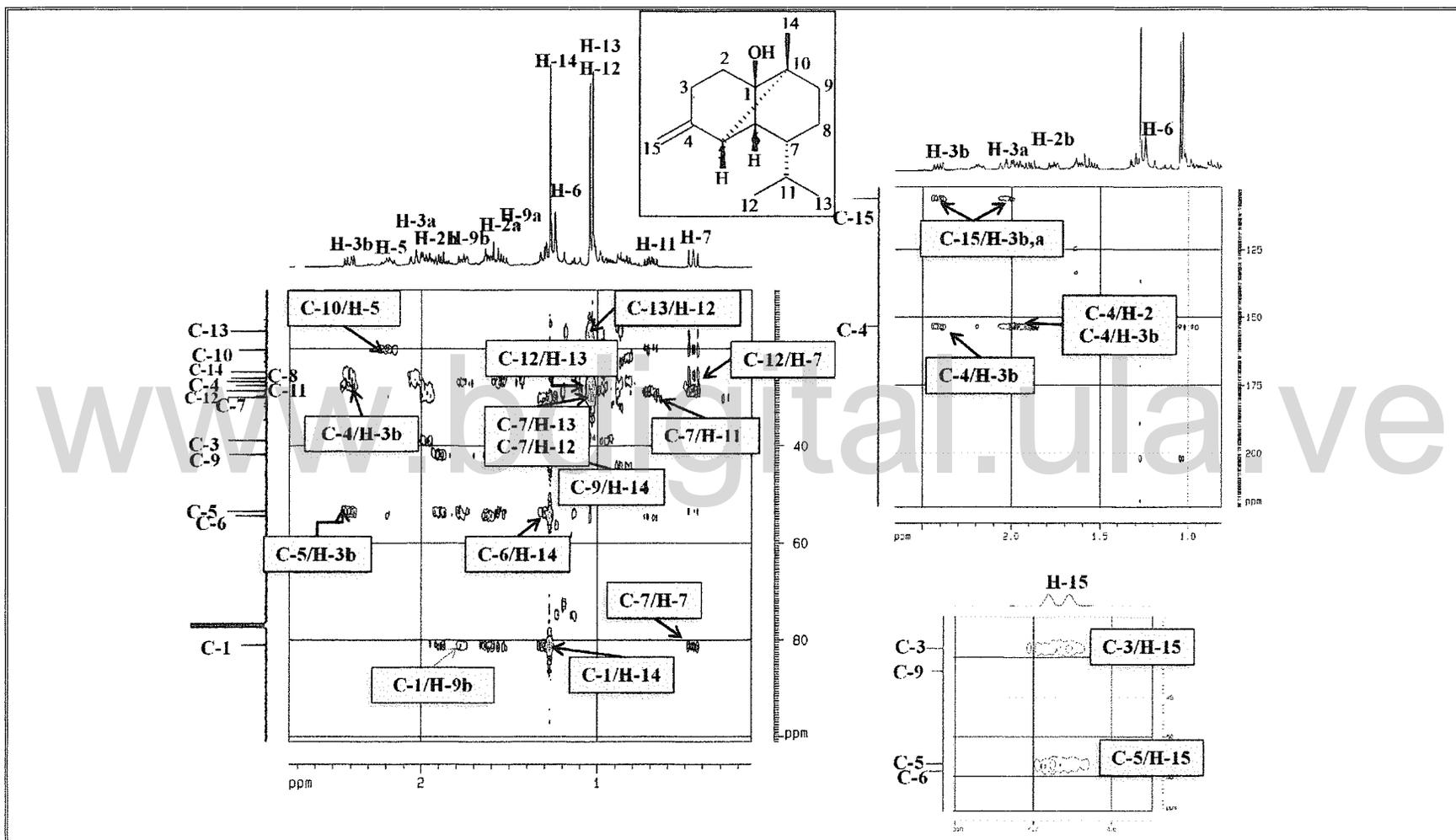
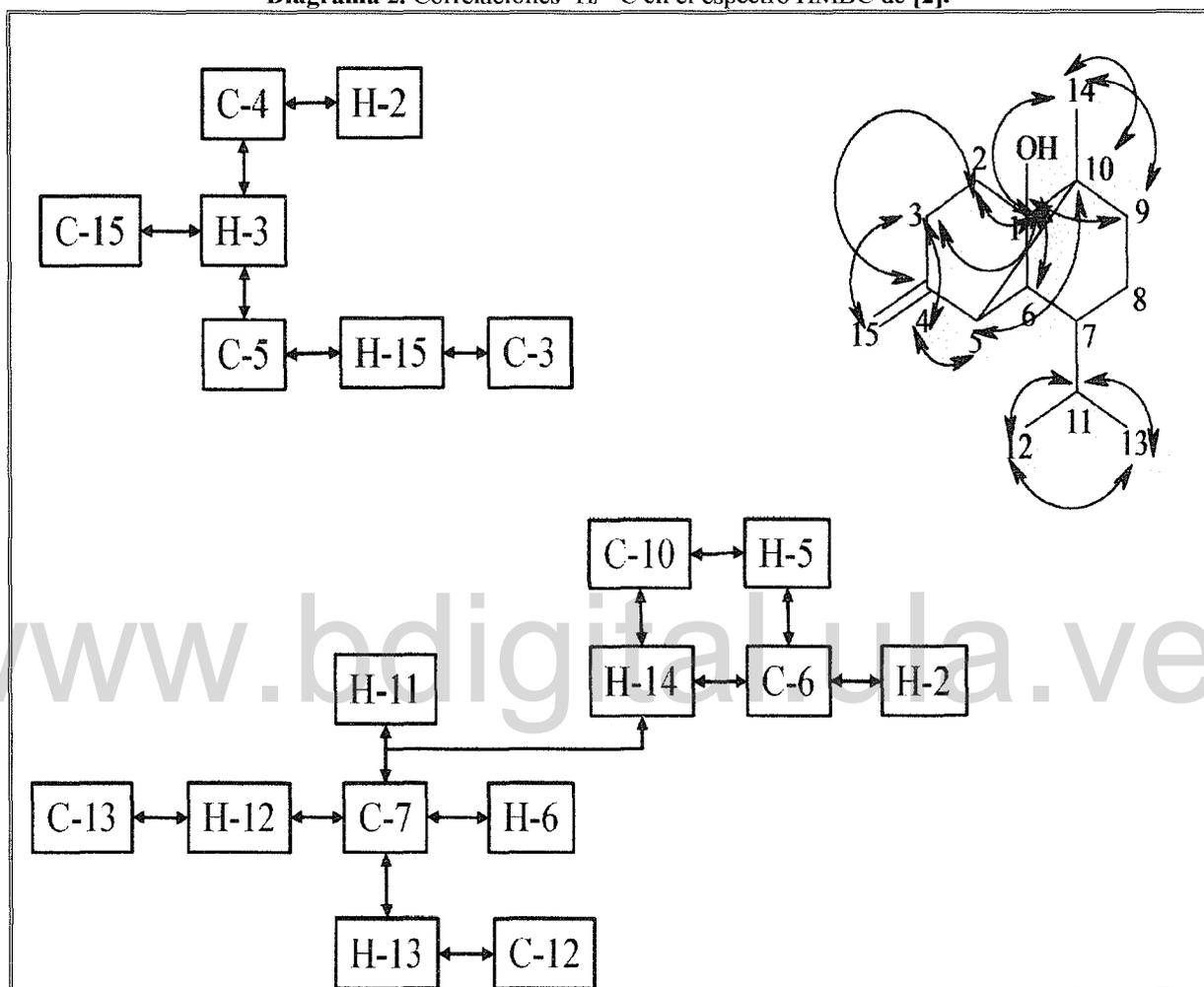


Figura 20. Amplificaciones del espectro de HMBC (CDCl₃) de [2].

Diagrama 2. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [2].



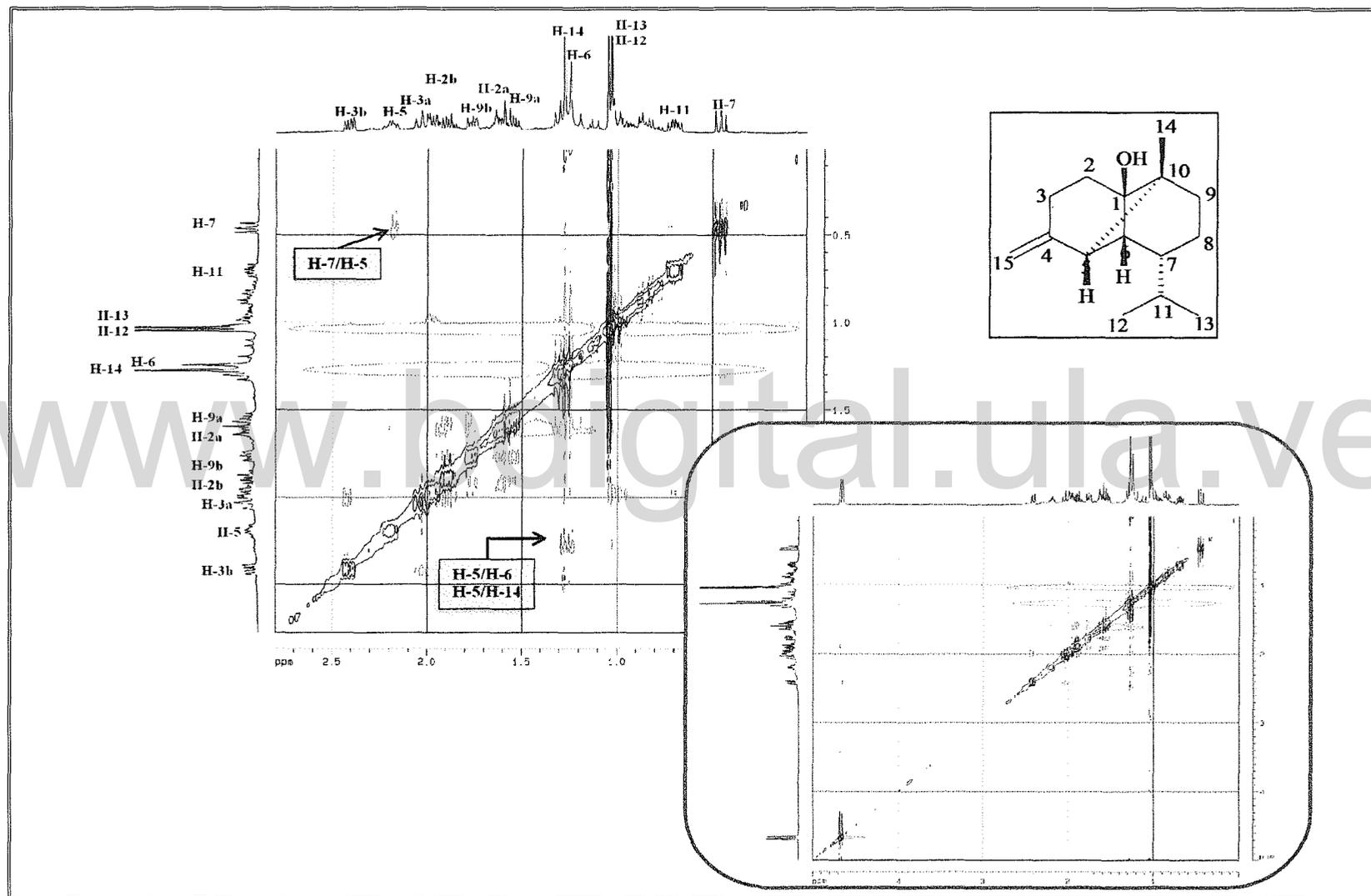


Figura 21. Espectro y ampliación de NOESY (CDCl₃) de [2].

VI.1.c.- Óxido de 8,13-*epi*-manoil-14-eno ó 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno [3]:

De la reunión C de la cromatografía general, eluída en hexano/CH₂Cl₂ (90%), después de varios procesos cromatográficos, se aisló un sólido color blanco (53 mg) con punto de fusión (Pf) de 79-80 °C, que luego de varios procesos cromatográficos, se reveló en cromatografía de capa fina (TLC) como una sustancia homogénea. En su espectro IR (Figura 22, Tabla 12), se aprecian bandas de absorción propias de grupos de carbono-hidrógeno sp³ en ν_{\max} 2.926 y 2865 cm⁻¹, de carbono-oxígeno en ν_{\max} 1.735cm⁻¹ y de carbono doble enlace carbono en 1120 cm⁻¹, entre otras.

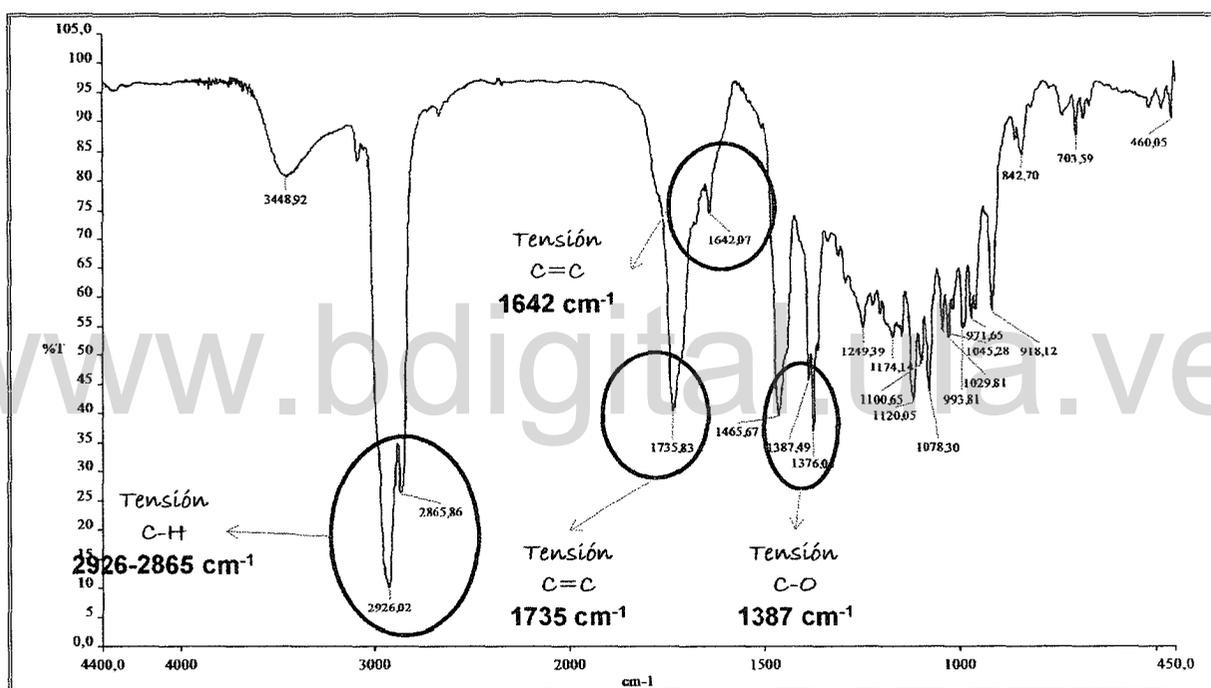
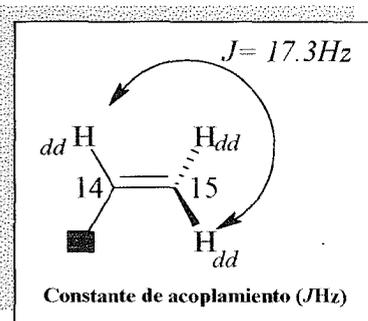


Figura 22. Espectro Infrarrojo de (KBr) [3].

Tabla 12. Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (KBr) de [3].

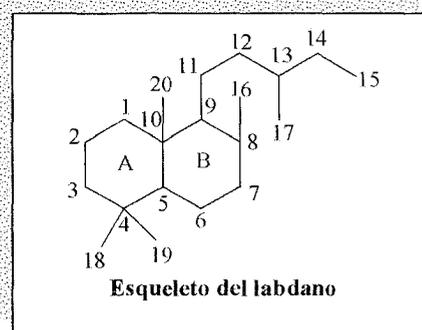
ν_{\max} (cm ⁻¹)	2926	1735	1642	1387	1120
Asignación	Tensión C-H	Tensión C=H	Tensión C=C	Tensión asimétrica C-O	Deformación =CH fuera del plano



El análisis detallado de sus espectros de RMN-¹³C (BB) (Figura 23, Tabla 13) y RMN-¹H (Figura 24, Tabla 12), permitió fijar el número, tipo de hibridación y grado de sustitución de cada uno de los carbonos que conforman la molécula, con ayuda del espectro HMQC (Figura 25), en donde se diferencian veinte carbonos: dos carbonos

cuaternarios sp³ unidos posiblemente a un átomo de oxígeno [δ 74.1 (C-13) y δ 76.0 (C-8)], igualmente, dos carbonos cuaternarios sp³ [δ 39.7 (C-10) y δ 42.8 (C-4)], cinco singuletes observados en RMN-¹H (Figura 24) que corresponden a los carbonos [δ 15.8 (C-20), δ 21.9 (C-18), δ 26.1 (C-16), δ 29.8 (C-17) y δ 33.9 (C-19)], un carbono metileno sp² [δ 111.4 (C-15)] que en su espectro de RMN-¹H (Figura 24) emerge como dos dobletes de dobletes [δ 5.15, δ 5.11, δ 4.91 y δ 4.89 (H-15)], lo que indica que sus protones son diastereotópicos y que está unido a un carbono metínico sp² [δ 149.3 (C-14); $J= 17.3\text{Hz}$], señal que se observa en el espectro de RMN-¹H (Figura 24), como dos dobletes [δ 5.83 y δ 5.90 (H-14)]. Asimismo, se observan dos carbonos metínicos sp³ [δ 56.4 (C-9) y δ 57.2 (C-5)] y las siete señales restantes en el RMN-¹³C (Figura 23) son carbonos metílenos sp³ [δ 37.7 (C-1), δ 19.3 (C-2), δ 34.0 (C-3), δ 20.5 (C-6), δ 44.0 (C-7), δ 15.9 (C-11) y δ 36.6 (C-12)].

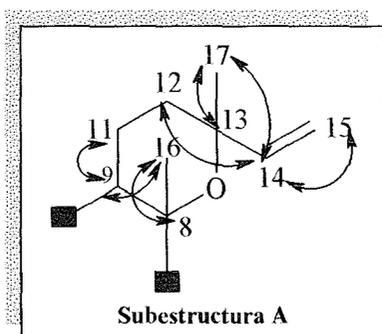
Con todos estos datos, se consiguió llegar a la fórmula molecular C₂₀H₃₄O, la cual corresponde a un compuesto con cuatro insaturaciones. Acorde con esto, se puede pensar, por el número de carbonos, en un diterpeno de la serie del labdano (Dev y Misra, 1986), con un doble enlace terminal, sin embargo, con esta presunción solo se cumpliría con tres grados de insaturación.



En su espectro ¹H, ¹H-COSY (Figura 26) se notan los diferentes acoplamientos de los protones vecinos en la molécula, una de ellas es la correlación [(H-15)↔(H-14)], incluso, en su espectro HMBC (Figuras 27 y 27.1, Diagrama 3) se destaca claramente la correlación [(C-14)↔(H-15)], además de otras correlaciones como: [(C-17)↔(H-14),

(C-12) \leftrightarrow (H-14), (C-13) \leftrightarrow (H-14)] lo que demuestra que la olefina se encuentra, posiblemente, ubicada al final de la cadena lateral del esqueleto.

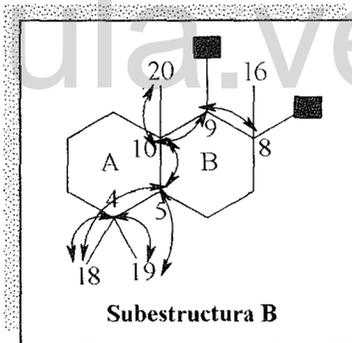
Siguiendo la suposición de que se trata de un diterpeno de la serie del labdano, se procede a verificar la estructura a través de subunidades, partiendo del doble enlace



terminal, que en su espectro de HMBC (Figuras 27 y 27.1; Diagrama 3), se aprecian las correlaciones [(C-14) \leftrightarrow (H-17), (C-13) \leftrightarrow (H-17) y (C-12) \leftrightarrow (H-14)] y por otro lado, las correlaciones [(C-8) \leftrightarrow (H-16), (C-9) \leftrightarrow (H-16), (C-11) \leftrightarrow (H-9)], las cuales orientan que los metilos (H-17) y (H-16), se encuentran ubicados sobre los carbonos cuaternarios oxigenados [(C-13) y (C-8)] y según la fórmula molecular

establecida [C₂₀H₃₄O], evidencia que ambos carbonos deben estar unidos al mismo átomo de oxígeno formando un anillo piránico, lo que completaría la insaturación faltante, quedando así comprobada la subestructura A.

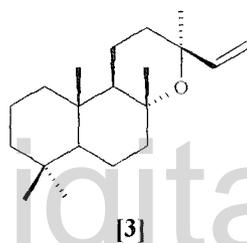
Para la subestructura B, en el espectro de HMBC (Figura 27), se captan las correlaciones [(C-4) \leftrightarrow (H-18) y (C-4) \leftrightarrow (H-19)] que ubican a los metilos (H-18) y (H-19) sobre el mismo carbono (C-4), al mismo tiempo, la correlaciones [(C-5) \leftrightarrow (H-18), (C-5) \leftrightarrow (H-19), (C-5) \leftrightarrow (H-9)]; a su vez, (C-10) \leftrightarrow (H-5), (C-10) \leftrightarrow (H-20), (C-10) \leftrightarrow (H-9) y [(C-8) \leftrightarrow (H-9)] constatan la unión de los anillos A y B, y además, demuestran que ambas subestructuras, comparten los carbonos (C-8) y (C-9),



lo que afirma, que se encuentran unidas a través de éstos. En el espectro NOESY (Figura 28), se verificó igualmente la estereoquímica relativa *homo- β -facial* entre los grupos metilos singuletes [(H-16), (H-18) y (H-20)] y los protones [(H-11) y (H-14)], así como también la estereoquímica *homo- α -facial* de los metilos [(H-17) y (H-19)]. En consecuencia, el enlace C-O de C-8 del anillo piránico se encuentra en posición *alpha*. De esta manera se llegó a que la estructura es el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno [3].

Los diterpenos con esqueletos del labdano, en general, poseen actividad biológica antimutagénica y antiinflamatoria (Kalpoutzakis *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos autores

consideran la actividad antifúngica y antibacteriana, como la menos importante (Singh *et al.*, 1999). Otros estudios han demostrado que los diterpenos que tienen el esqueleto del *ent*-óxido de manoilo y otros derivados hidroxilados, tienen un alto poder antimicrobiano (Chinou *et al.*, 1994). También se ha reportado que posee actividad contra *Leishmania donovani* (García *et al.*, 1997). El óxido de 8 α ,13-*epi*-manoil-14-eno [3], ha sido aislado en otros géneros, como por ejemplo, en varias especies del género *Stachys* (Piozzi y Bruno, 2009). No obstante, en un estudio realizado anteriormente a las hojas de *Z. rhoifolium*, se aislaron del extracto hexánico, dos derivados del labdano: el 13(*S*)-labdano-8 α ,15-diol y el 13(*R*)-8 α -15-diol (Santiago y Rosquete, 2004) dicho estudio fue el primer reporte de diterpenos dentro del género *Zanthoxylum*, siendo éste el segundo de este tipo de compuestos para el género.



www.bdigital.ula.ve

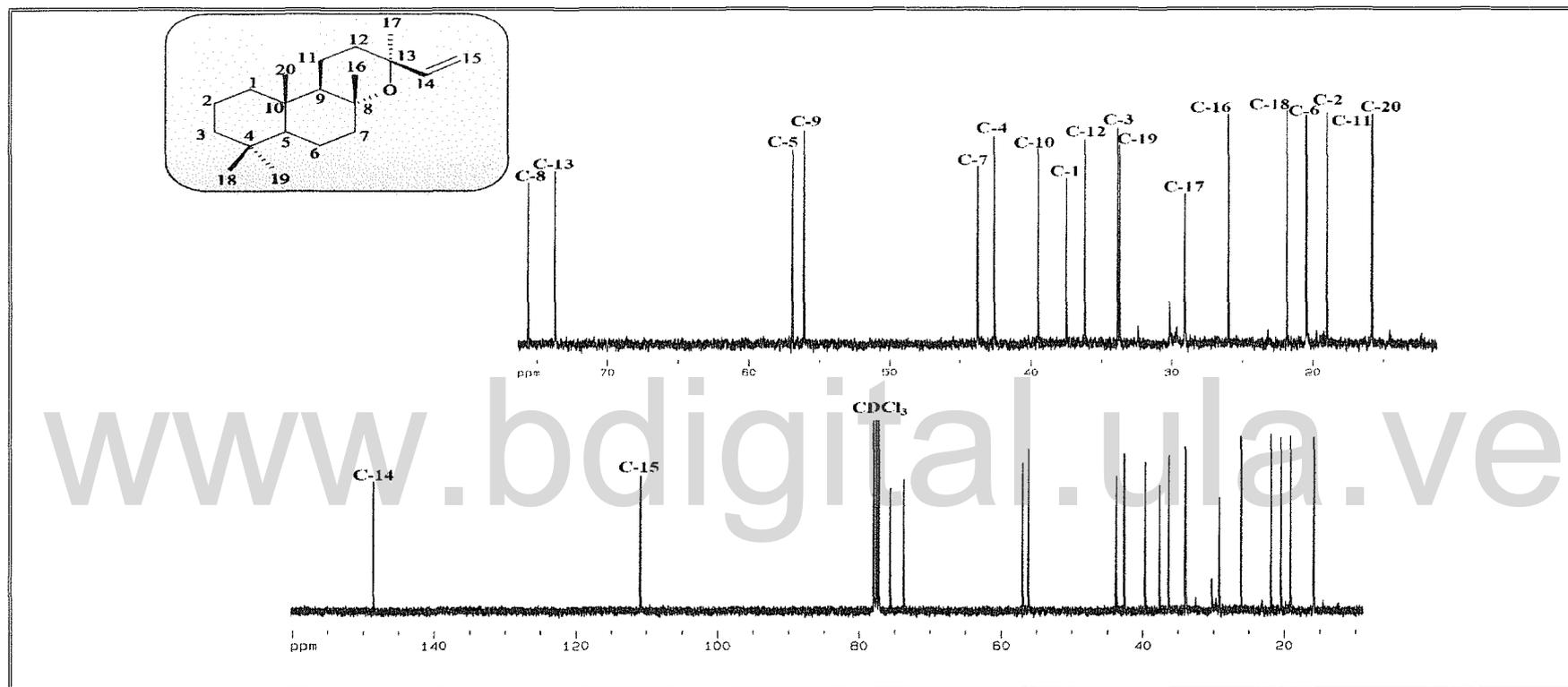


Figura 23. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de [3].

Tabla 13. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [3].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
δ (ppm)	37.7	19.3	34.0	44.0	57.2	20.5	42.8	76.0	56.4	39.0
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	>C<
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
δ (ppm)	15.9	36.3	74.1	149.3	111.4	26.1	29.8	21.9	33.9	15.8
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	=CH-	=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃

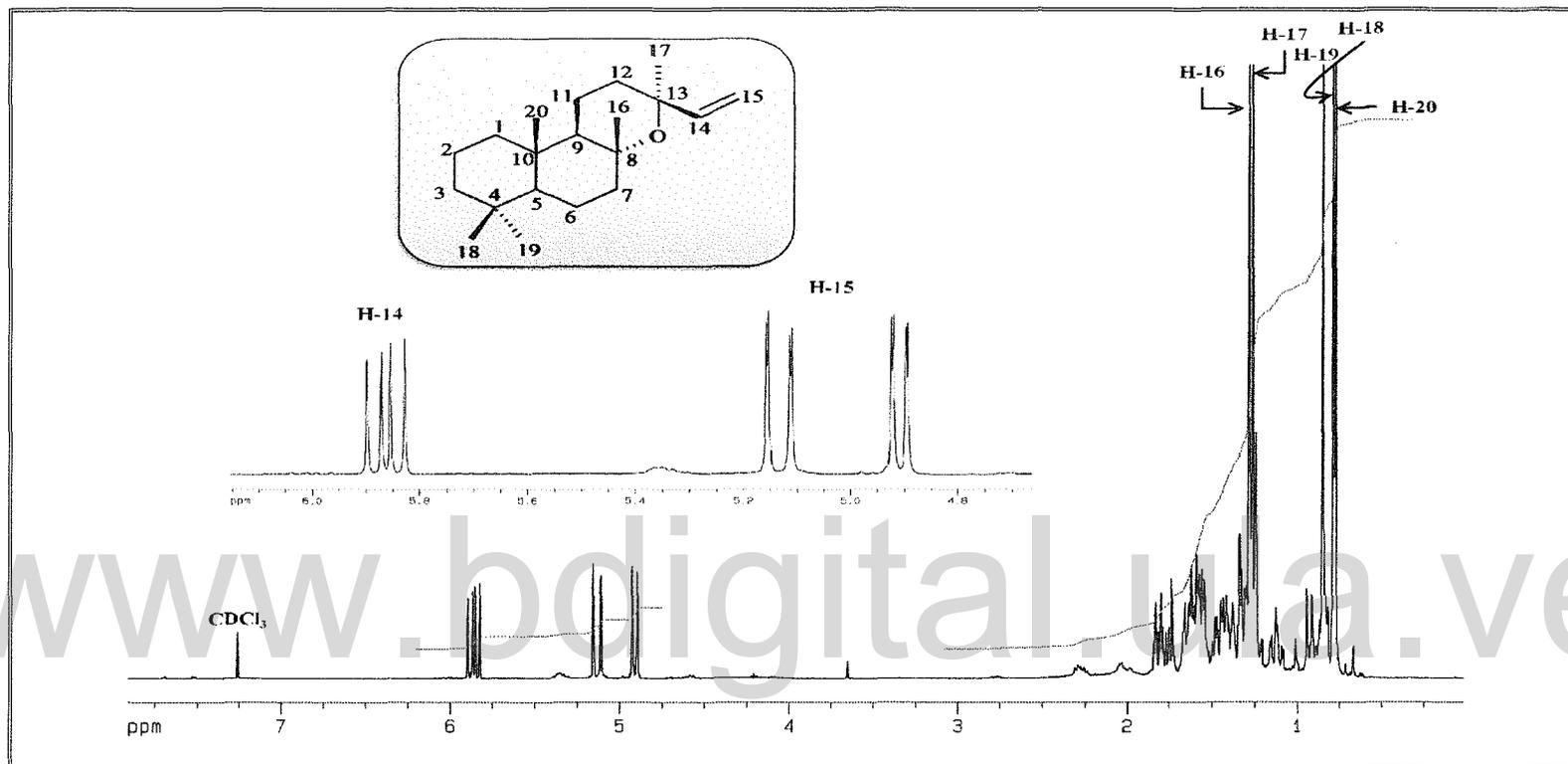


Figura 24. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz) de [3].

Tabla 14. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (*m*) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN-¹H de [3].

H	1	2	3	5	6	7	9	11
δ (ppm)	1.47; 0.78	1.63; nd*	0.79; 0.82	0.92	0.94, nd*	1.83; nd*	1.33	nd*
<i>M</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-
H	12	14	15	16	17	18	19	20
δ (ppm)		5.89; 5.90	4.90; 5.20	1.30	1.24	0.78	0.84	0.77
<i>M</i>	<i>m</i>	<i>dd</i>	<i>ddd</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	-	17.3	1.5; 17.3	-	-	-	-	-

(*) nd= no determinada, solapada con otras señales

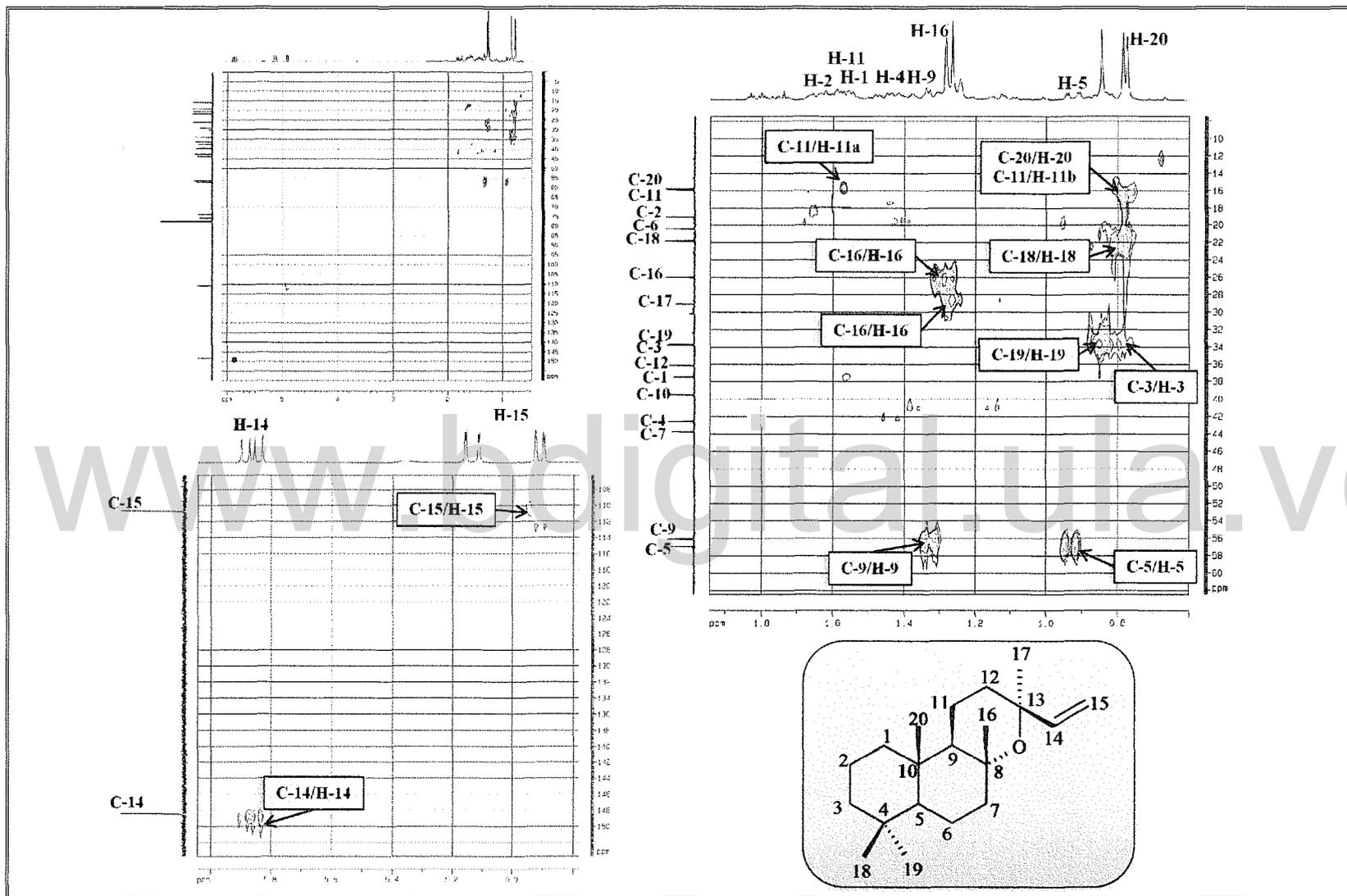


Figura 25. Espectro y ampliaciones de HSQC (CDCl_3) de [3].

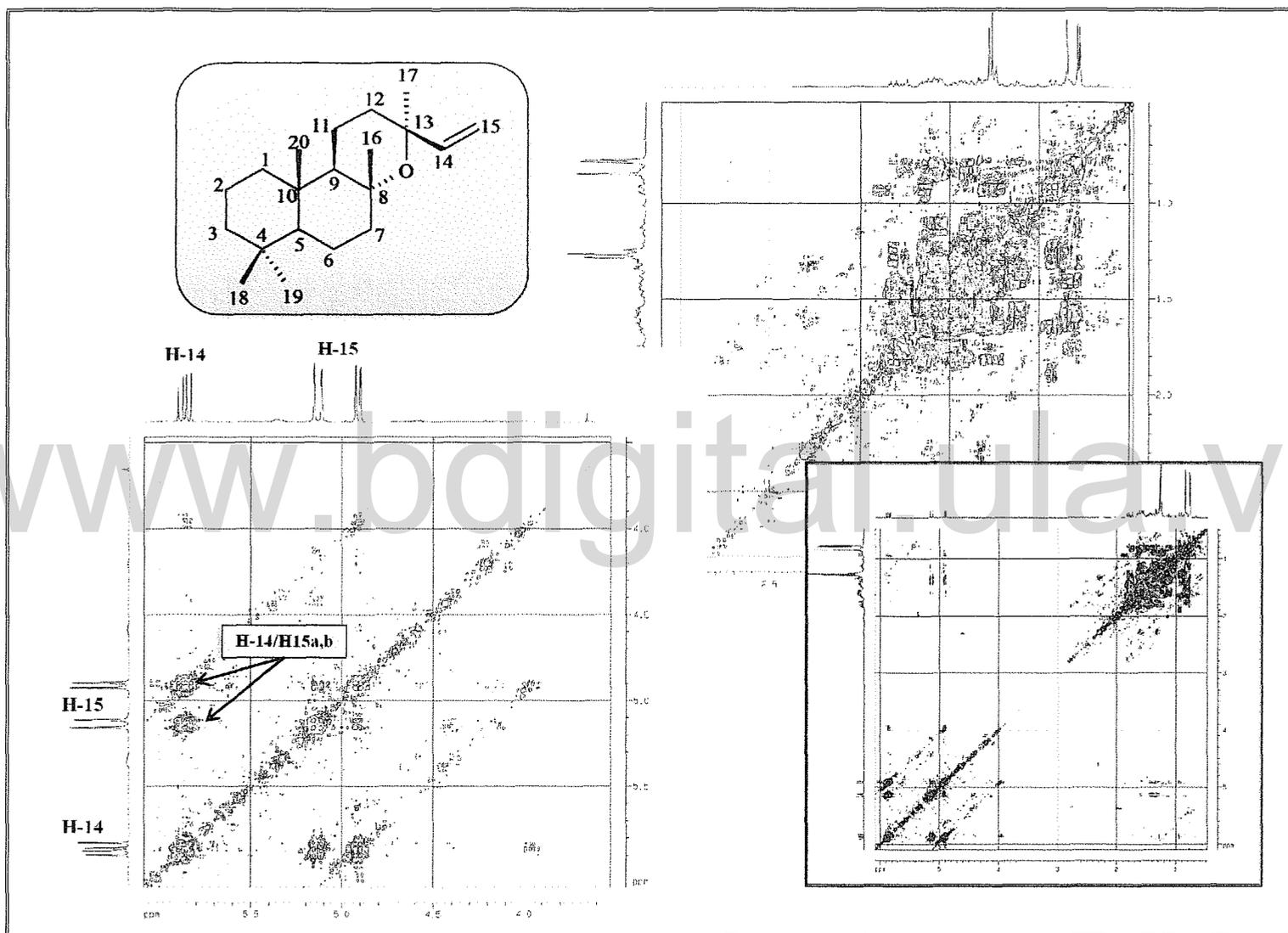


Figura 26. Espectro y ampliaciones de ^1H , ^1H COSY (CDCl_3 , 400MHz) de [3].

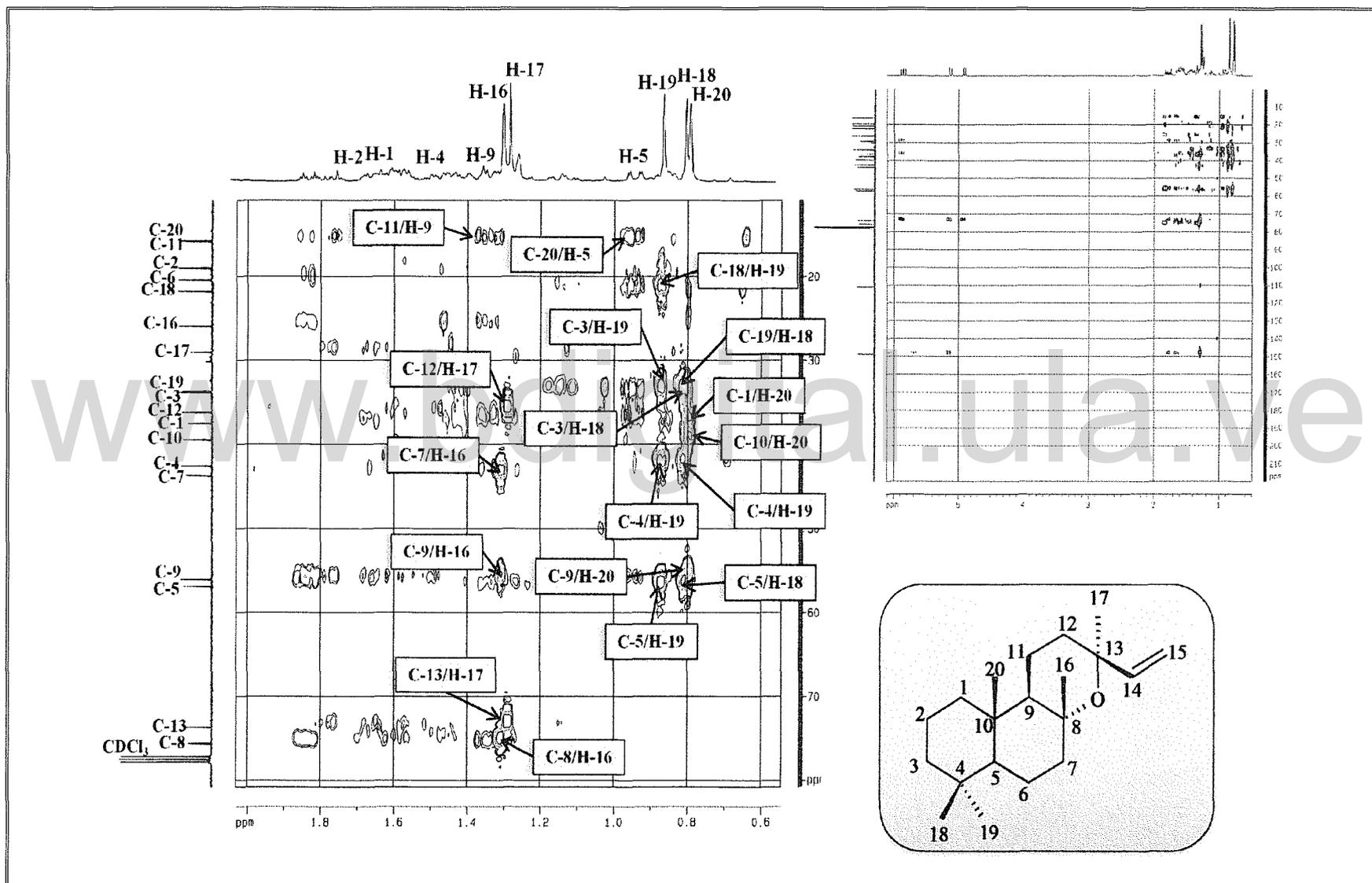


Figura 27. Espectro y ampliaciones de HMBC (CDCl_3) de [3].

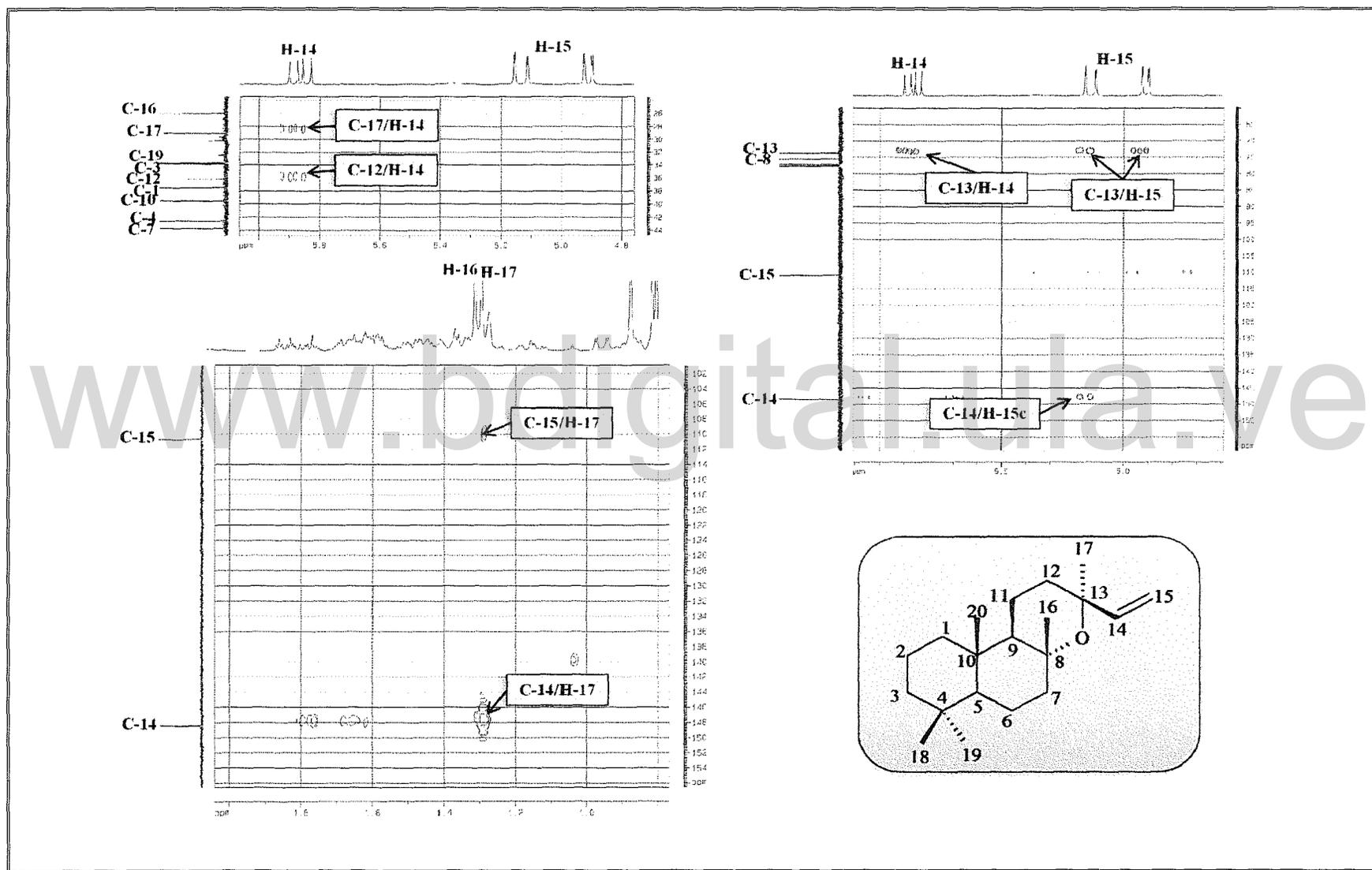
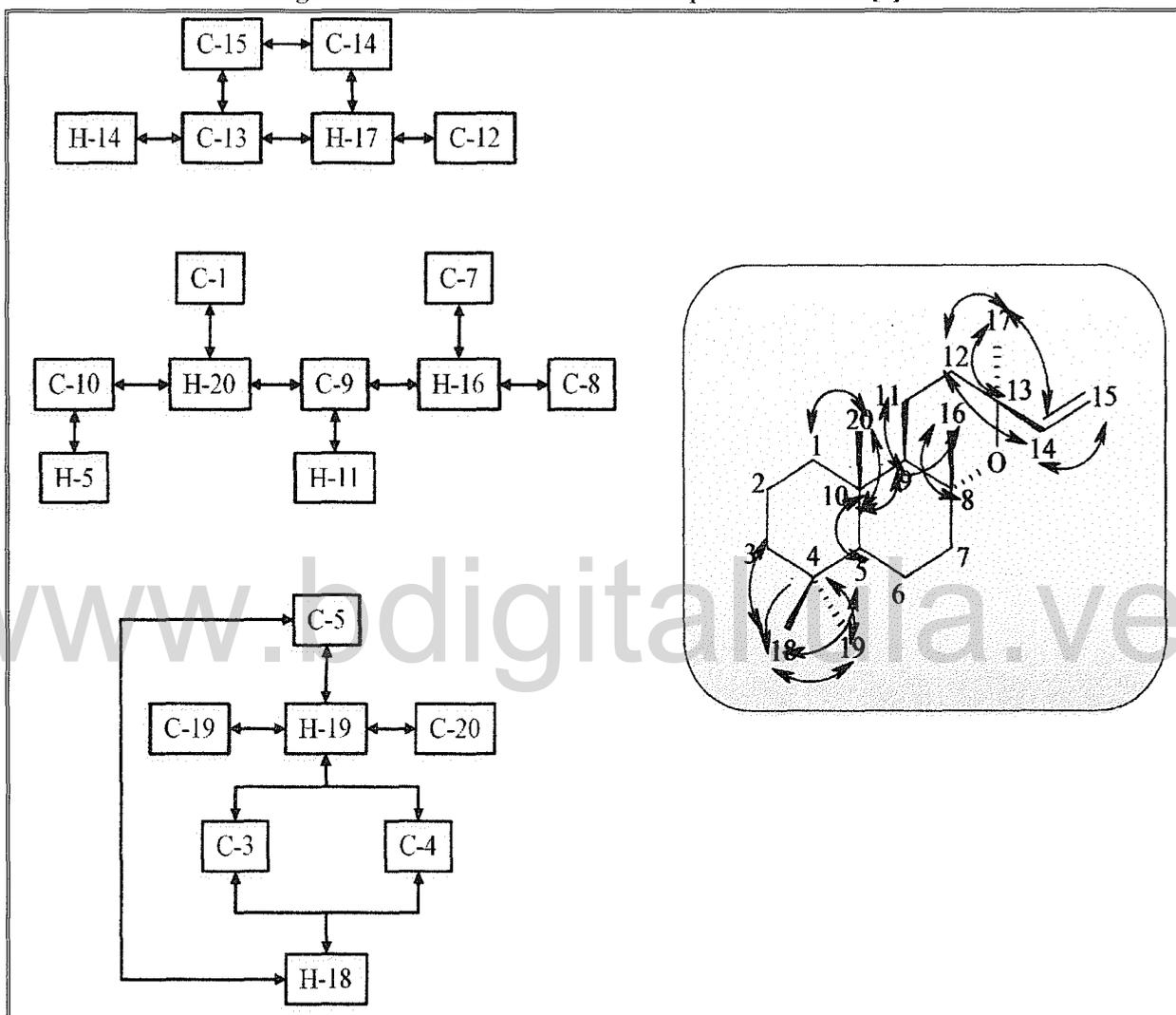


Figura 27.1. Amplificaciones del espectro HMBC (CDCl₃) de [3].

Diagrama3. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC de [3].



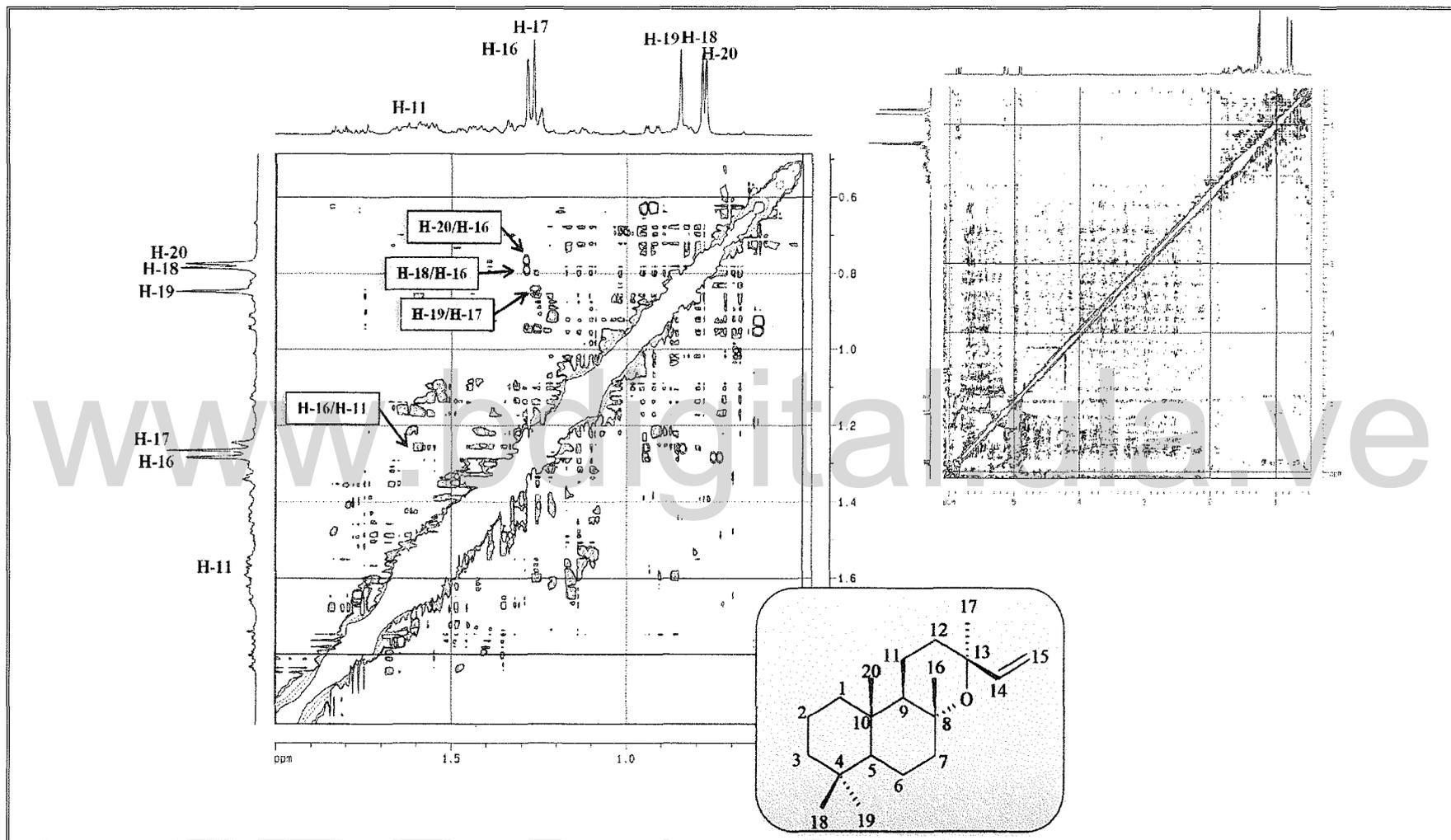


Figura 28. Espectro y ampliaciones de NOESY (CDCl₃) de [3]

VI.1.d.-4,6-dimetoxibenzofurano [4]:

De la reunión F, de la cromatografía general, eluida en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (3%), después de varios procesos cromatográficos, se aisló un sólido color amarillo (58 mg) con punto de fusión (Pf) de 85-86 °C. En el espectro IR (Figura 29, Tabla 15), destacan las bandas de tensión ($\text{C}=\text{C}$) entre 1719cm^{-1} y 1144cm^{-1} de aromáticos y las bandas de deformación ($=\text{C}-\text{H}$) entre 999cm^{-1} y 752cm^{-1} .

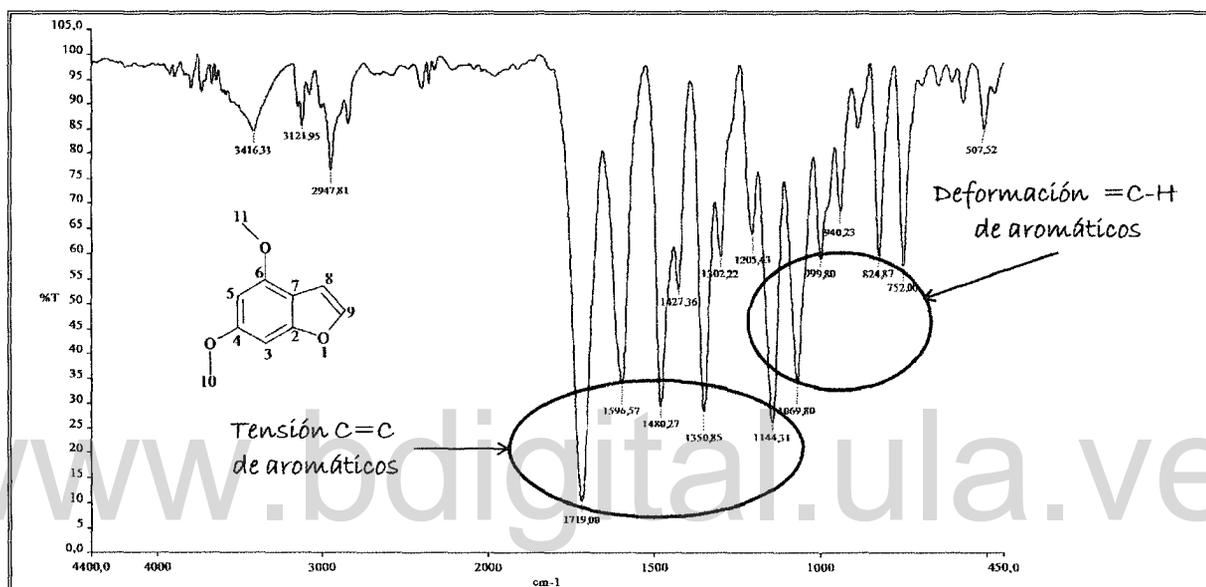


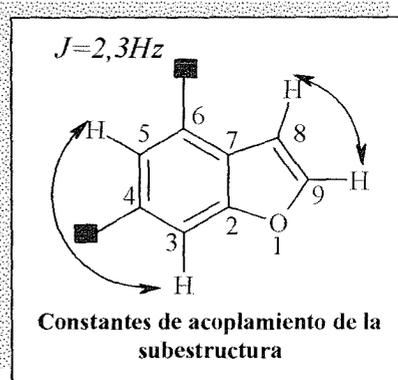
Figura 29. Espectro Infrarrojo de (KBr), de [4].

Tabla 15. Bandas de absorción significativas en el espectro de infrarrojo (KBr) de [4].

ν_{max}	1719	1596	1480	1380	1059	940
Asignación	C=C	C=C	C=C	C-O	=C-H	=C-H

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 30, Tabla 16) muestra un total de diez carbonos, que mediante el DEPT-135 (Figura 30, Tabla 16) se desglosan en: dos metilos, que por su desplazamiento están unidos a átomos de oxígeno [$\delta 61.7$ (H-9) y $\delta 60.9$ (C-10)], cuatro metinos hibridizados sp^2 [$\delta 105.1$ (H-2); $\delta 145.2$ (H-4); $\delta 114.9$ (H-7) y $\delta 139.4$ (H-6)], el resto son carbonos cuaternarios sp^2 .

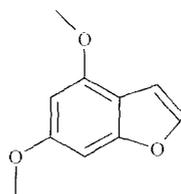
En el espectro de RMN-¹H (Figura 31, Tabla 17), a campo bajo en la zona aromática emergen cuatro señales como dobletes, de las cuales dos [δ 8.25 (H-6); δ 6.26 (H-7)], con una constante de acoplamiento $J=9.8\text{Hz}$, indican un acoplamiento “*orto*” y los otros dos [δ 7.60 (H-4); δ 7.00 (H-2)], cuya constante de acoplamiento es de $J=2,3\text{Hz}$ señala que existe un



acoplamiento “*meta*” y dos singuletes [δ 4.15 (H-9) y δ 4.16 (H-10)], lo que revela claramente que son metilos unidos directamente a un átomo de oxígeno. A través del espectro HMQC (Figura 32), fue posible asignar cada carbono con su respectivo hidrógeno. Con las correlaciones observadas en el espectro ¹H, ¹H-COSY (Figura 33) se constató de la presencia de dos sistemas AB, por lo tanto se puede pensar en un anillo aromático unido a un anillo furánico como subestructura.

Con el espectro HMBC (Figura 34) fue posible confirmar la subestructura con las correlaciones [(C-5) \leftrightarrow (H-8); (C-7) \leftrightarrow (H-3);(C-7) \leftrightarrow (H-5); (C-3) \leftrightarrow (H-5); (C-4) \leftrightarrow (H-3); (C-4) \leftrightarrow (H-5); (C-6) \leftrightarrow (H-8)] como 1,3-metoxi-benzofurano [4].

Hasta ahora, este producto, no ha sido reportado como producto natural.



[4]

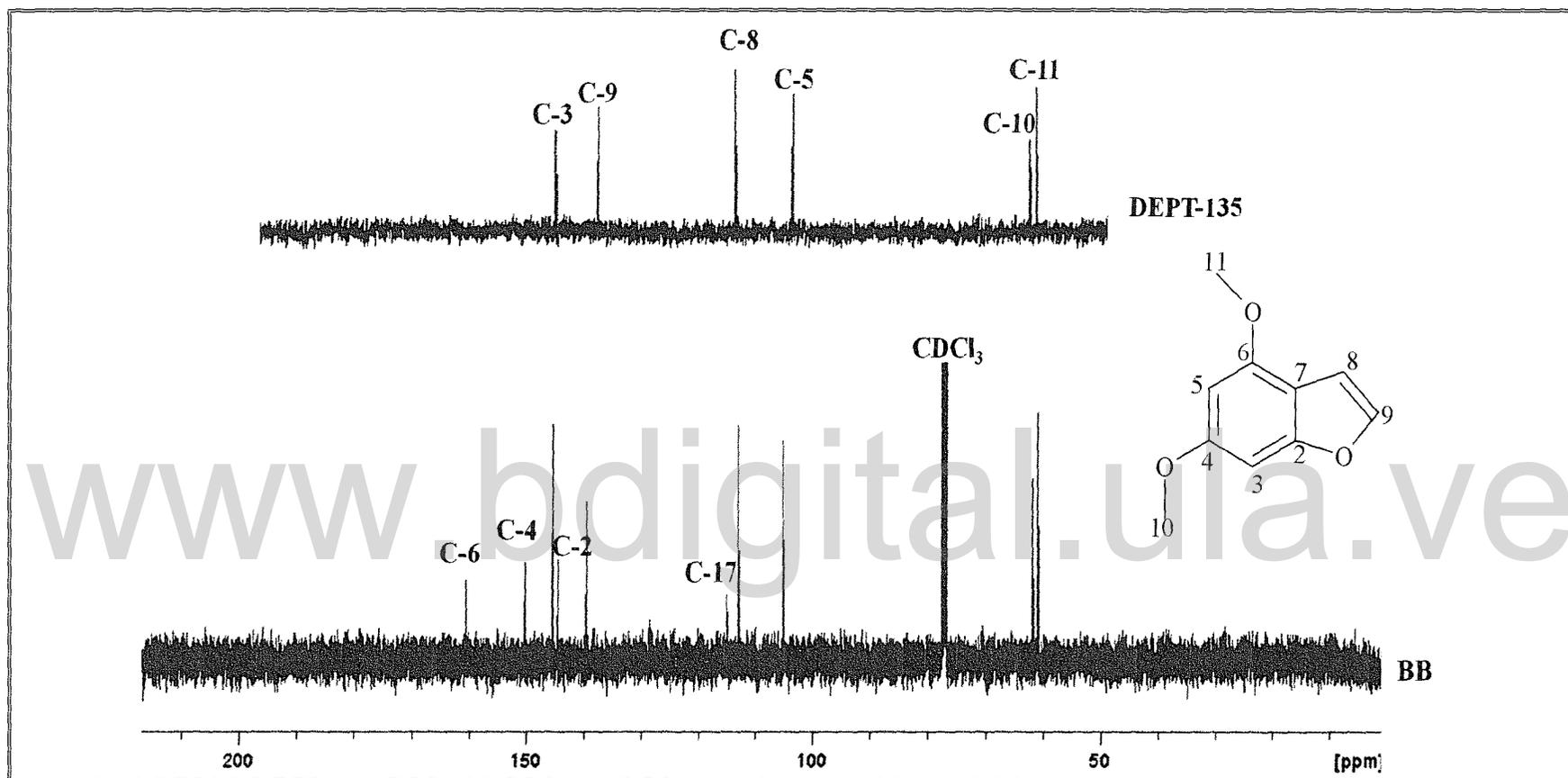


Figura30. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz), de [4].

Tabla 16. Desplazamientos químicos (δ) y tipo de carbono en el espectro de RMN-¹³C de [4]

C	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
δ (ppm)	144.4	145.2	150.1	105.1	160.	117.4	114.9	139.4	61.7	60.9
Tipo	=C<	=CH-	=C<	=CH-	=C<	=C<	=CH-	=CH-	-CH ₃	-CH ₃

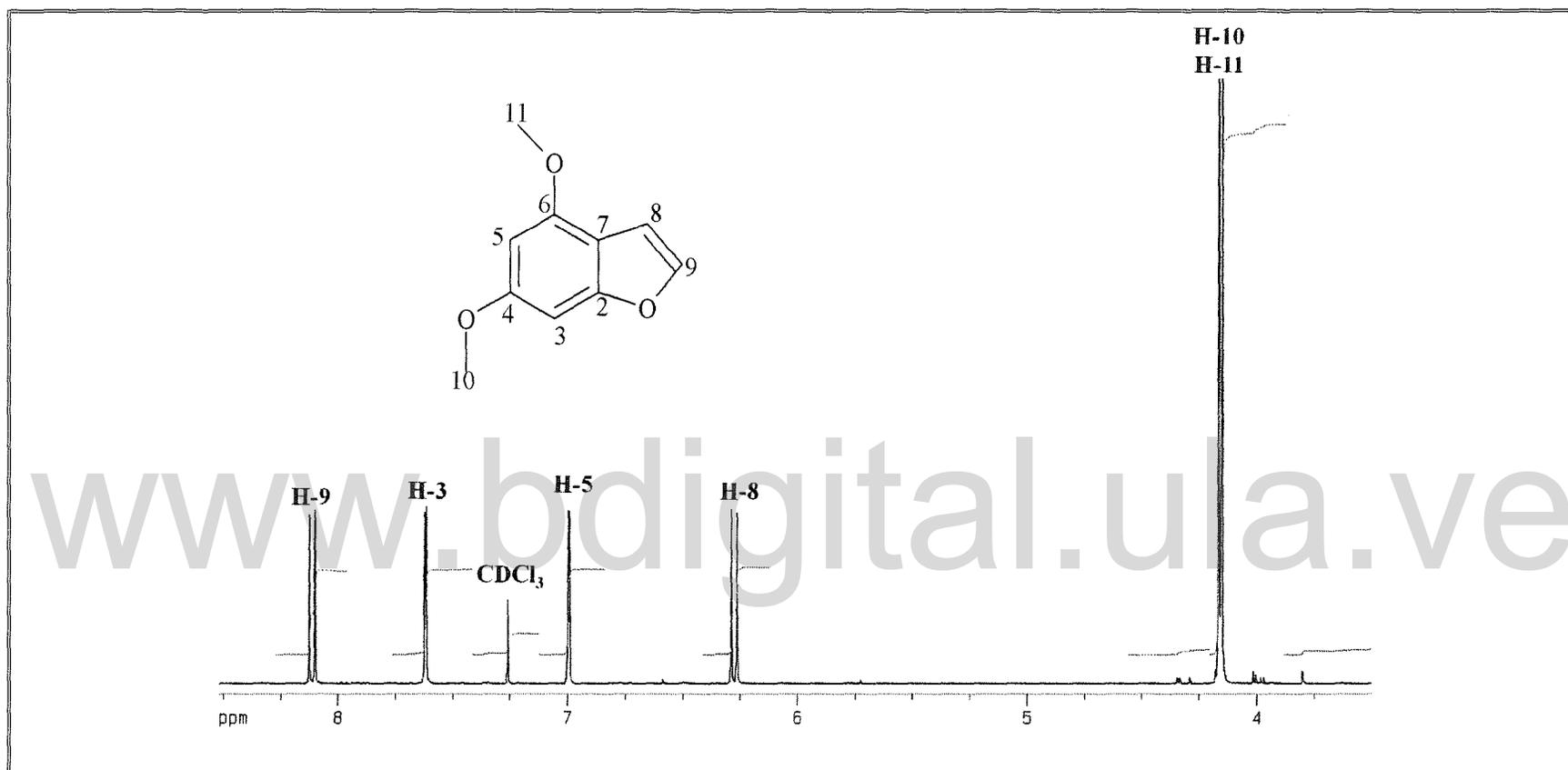


Figura31. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz) de [4].

Tabla 17. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento en el espectro RMN-¹H de [4].

H	3	5	8	9	10	11
δ (ppm)	7.60	7.00	6.26	8.25	4.15	4.16
M	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
J (Hz)	2.3	2.3	9.8	9.8	-	-

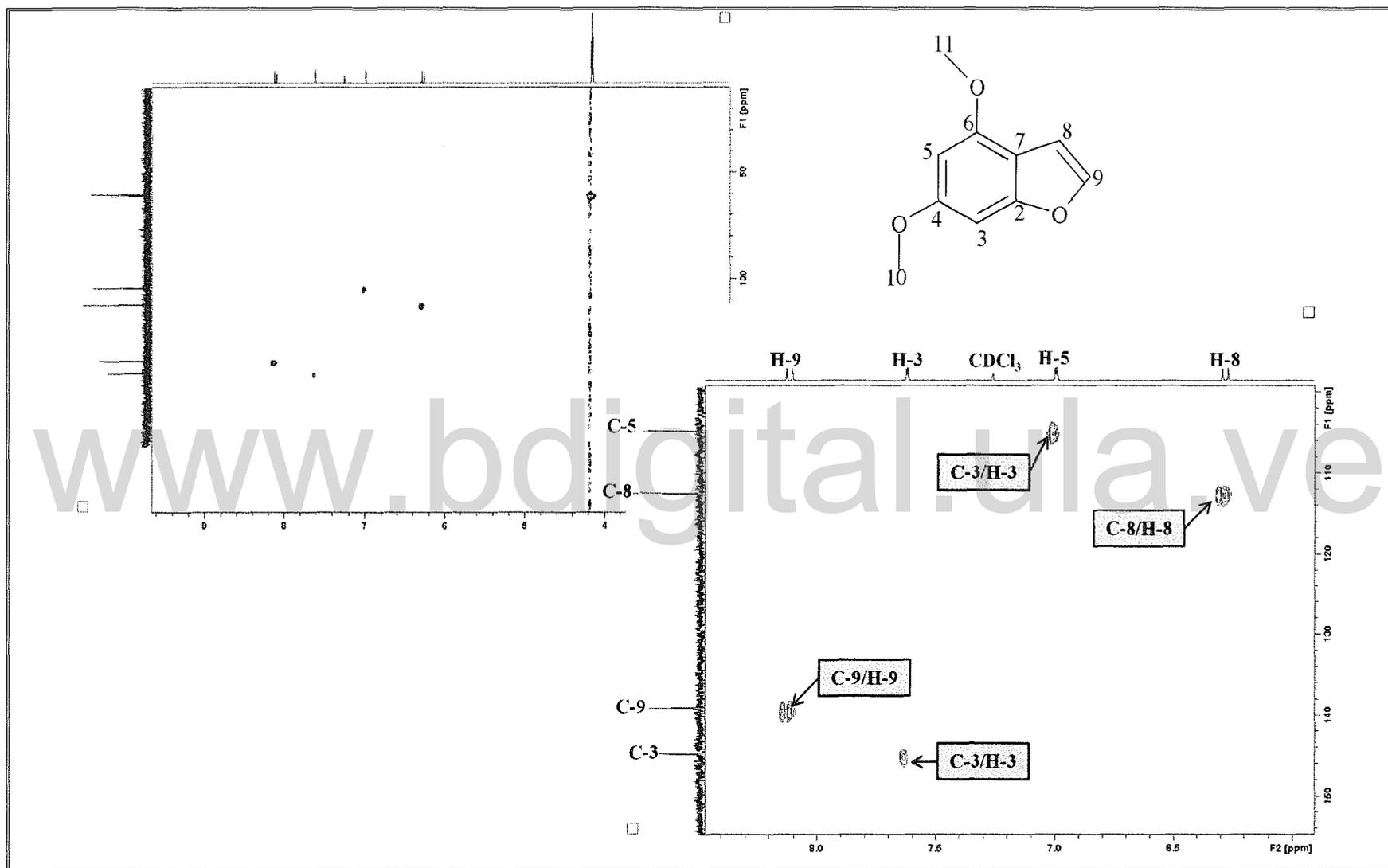


Figura32. Espectro y ampliación de HSQC (CDCl₃) de [4].

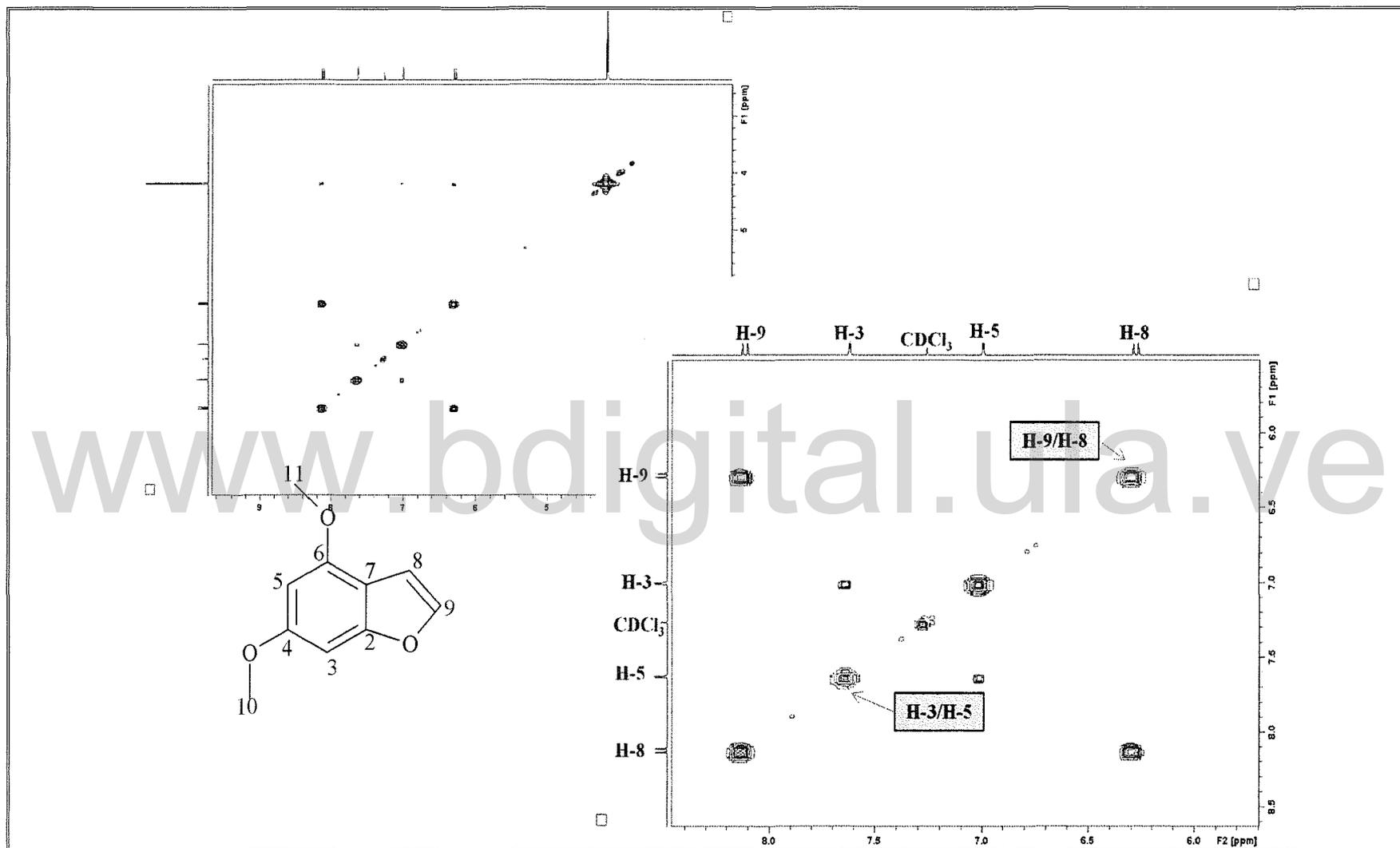


Figura33. Espectro y ampliación de ^1H , ^1H -COSY (CDCl_3) de [4].

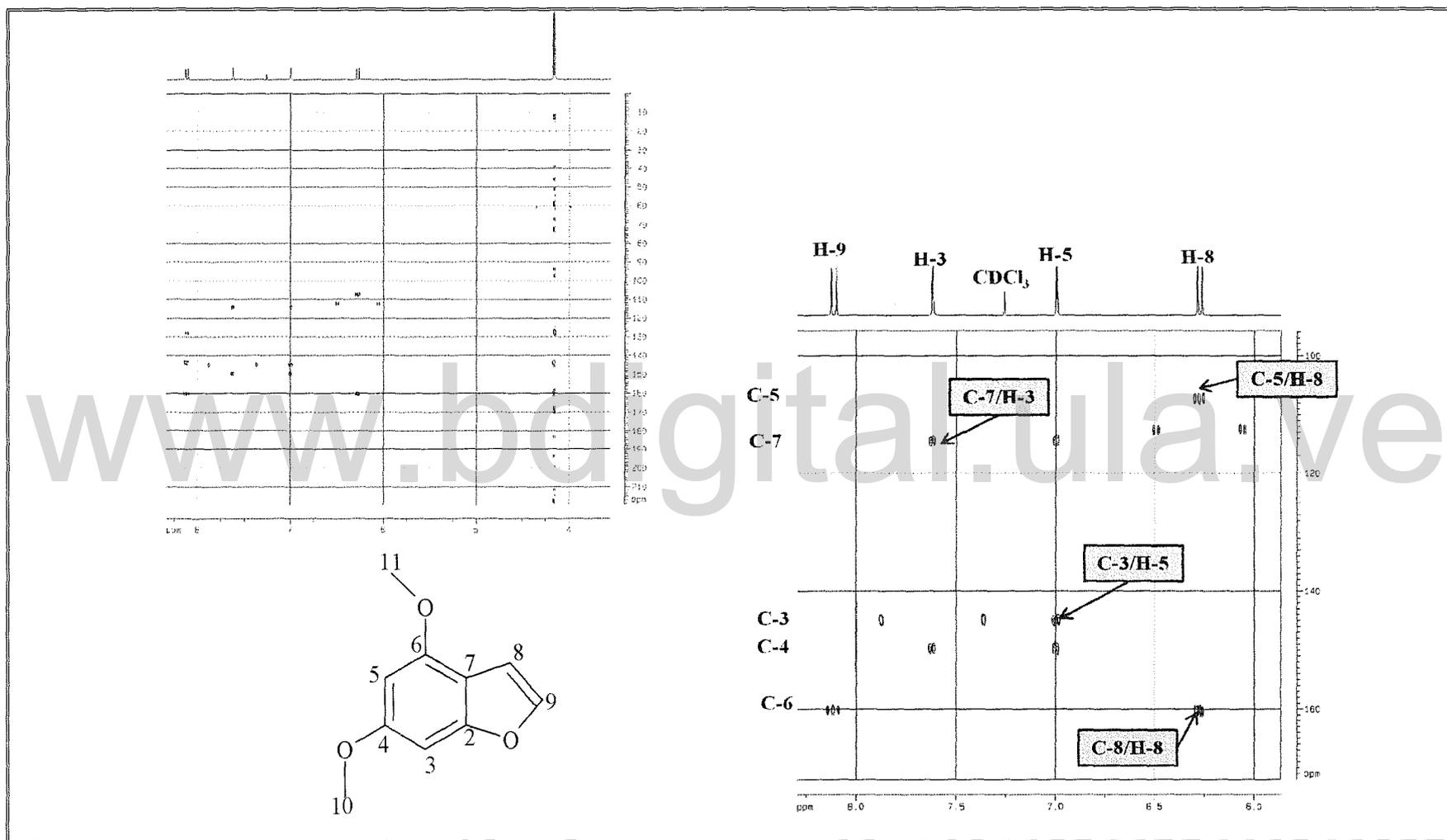


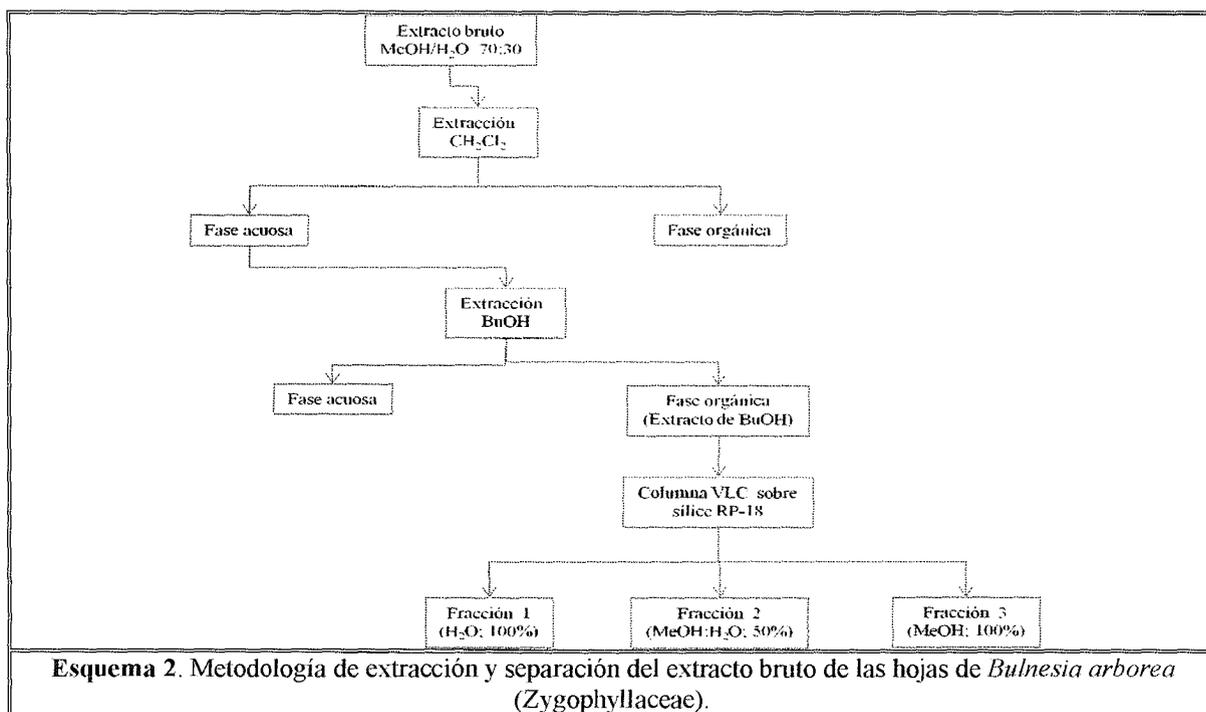
Figura34. Espectro y ampliación de HMBC (CDCl₃) de [4].

VI.2.-*Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae)

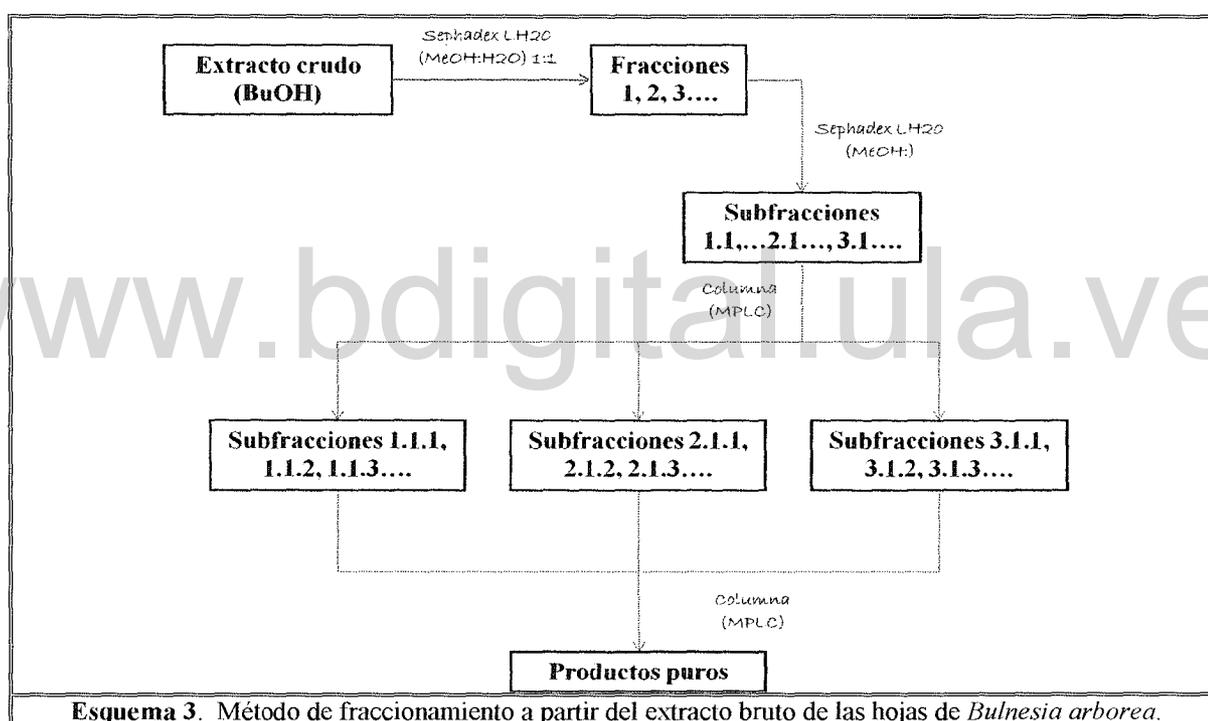
Para el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en *Bulnesia arborea* se empleó la metodología para la obtención de saponinas (Haddad *et al.*, 2004a, 2004b; Acharya *et al.*, 2008), puesto que la familia Zygophyllaceae es rica en este tipo de compuestos.

VI.2.1.- Hojas.

Las hojas secas y molidas (250 g) de un ejemplar de *Bulnesia arborea*, fueron sometidas a una extracción en reflujo durante 50 minutos, aproximadamente, en una mezcla 70:30 metanol/agua, para luego ser filtrado y evaporado al vacío, utilizando un rotavapor a una temperatura no mayor de 40 °C. El residuo, fue extraído con diclorometano (CH₂Cl₂), con la finalidad de eliminar la clorofila. Seguidamente, la fase acuosa fue extraída nuevamente con *n*-butanol (BuOH) saturado con agua, obteniendo 15,5 gramos de extracto butanólico (Haddad *et al.*, 2004). Alrededor de 4 gramos del extracto de BuOH, fue preabsorbido sobre gel de sílice de fase reversa (RP-18) en una columna al vacío (Vacuum-Liquid Chromatography, VLC) utilizando como eluyentes H₂O, MeOH: H₂O (1:1) y MeOH, obteniendo tres extractos (Acharya *et al.*, 2008), con esta metodología también se eliminan los azúcares restantes (Esquema 2).

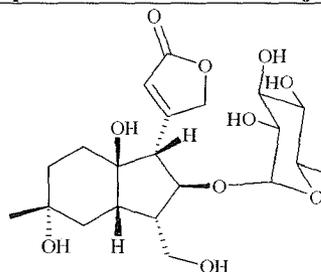


Sin embargo, aplicando esta metodología, se observó en la cromatografía de capa fina (TLC), la descomposición en algunas fracciones, por lo que fue necesario hacer la separación nuevamente, del extracto crudo de BuOH, pero esta vez usando cromatografía por Sephadex LH-20 y como eluyentes MeOH/H₂O (1:1) obteniendo nuevas fracciones (Esquema 3). Las fracciones, fueron separadas mediante cromatografía líquida a presión media (Medium-Pressure Liquid Chromatography, MPLC), sobre gel de sílice (15-40 μ m), usando como sistemas de solventes [CHCl₃:MeOH:H₂O (60:40:6,5)], [CHCl₃:MeOH:H₂O (64:40:8)], [CHCl₃:MeOH:H₂O (65:35:10)]. Todas las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (TLC) y utilizando como revelador para saponinas, *Komarowsky* (2% de 4-hidroxibenzaldehído en MeOH y 50% de H₂SO₄).

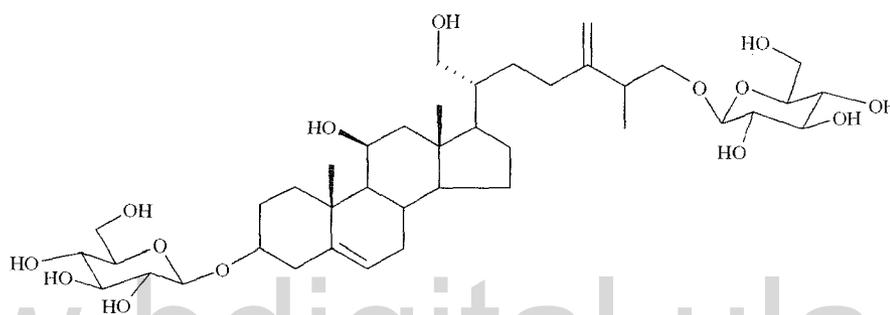


De esta manera se lograron obtener: una nueva lactona sesquiterpénica glicosilada denominada como bulnearboreanósido I [5] y dos nuevas saponinas de la serie del ergostano: 3,21-*bis*[*O*- β -D-glucopiranosilo] de ergosta-5,24(28)-dieno-(3 β ,11 α ,21,26)-tetrol [6] y 11 α -acetil3 β -*O*-D- xilosil-23-*O*-D- ramnosil- ergosta- 5,24(28)- dieno-3 β , 11 α , 21, 26-tetrol [7].

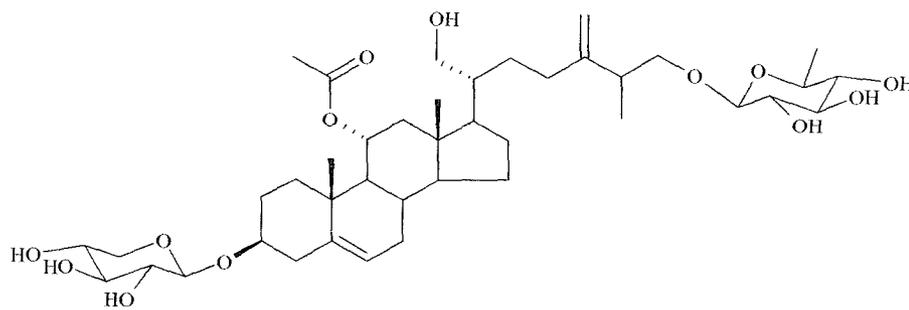
Cuadro 2. Compuestos aislados de las hojas de *B. arborea*.



[5]



[6]



[7]

VI.2.1.a.- (5*R*, 6*R*, 7*R*, 8*R*)-,3*α*, 9*β*, 14-trihidroxi-7-ramnosilbulnearborean-10-en-12,13-olido ó bulnearboreanósido I [5]:

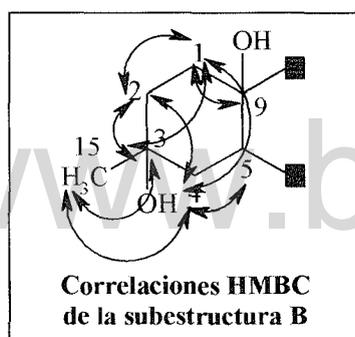
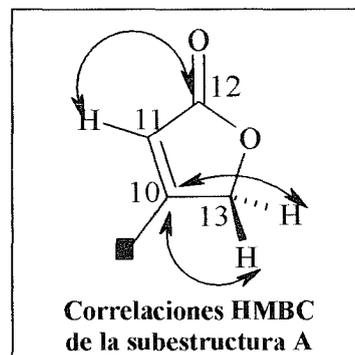
De la fracción 2 [MeOH:H₂O (1:1)], obtenida de la columna VLC y luego de repetidos procesos cromatográficos, MPLC [CHCl₃:MeOH:H₂O (60:32:8) y (65:35:10)], de la reunión BuBa 2.1 (73mg), se aisló un sólido de color amarillo (8.1mg), el cual, en cromatografía de capa fina de alta resolución (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), reveló una mancha única. En su espectro de RMN-¹³C (Figura 35, Tabla 18), se observó un total de veintiuna señales, esto hace pensar, que se trata de un sesquiterpeno unido a una molécula de azúcar. En el DEPT-135 (Figura 36), se logran discriminar las señales de dos carbonos metílicos [δ 17.6 (C-15) y δ 18.6 (C-6')], cinco metilenos, de los cuales, dos están unidos a oxígeno [δ 73.7 (C-13) y δ 62.0 (C-14)], cinco metinos, donde uno de ellos está unido a oxígeno [δ 70.9 (C-7)] y otro está hibridizado sp² [δ 117.7 (C-11)]; también se observan un grupo de señales metínicas en la zona de carbonos oxigenados entre δ 68.9 y δ 75.0 que podrían ser las señales de los carbonos del azúcar. Asimismo, aparecen cuatro carbonos cuaternarios, entre ellos, uno en δ 174.3 (C-12) referido a un carbono carbonílico y en δ 175.3 (C-10) un carbono hibridizado sp² y los dos restantes están unidos a oxígenos [δ 84.7 (C-3) y δ 67.2 (C-9)].

En el espectro de RMN-¹H (Figura 37, Tabla 19) se observan numerosas señales, entre ellas, un singulete [δ 1.18 (H-15)] y un doblete [δ 1.65 (H-6')]. A campo bajo destacan dos singuletes [δ 6.10 (H-11) y δ 5.61 (H-1')], dos dobletes [δ 5.26; δ 5.02 (H-13)] ambos con una constante de acoplamiento *J* de 17.8 Hz, lo que indica que son protones diasterotópicos al igual que el par de dobletes [δ 4.70; δ 5.09 (H-14)] con una constante de acoplamiento 10.5 Hz. Las señales que aparecen entre δ 4.60 y δ 4.10 corresponden, por sus desplazamientos, a protones que están unidos a grupos oxigenados. Además, en la zona de metinos y metilenos, surgen grupos de señales entre δ 1.90 y δ 3.10.

Mediante el espectro de HSQC (Figura 38; 38.1 y 38.2), fue posible asignar los protones pertenecientes a cada carbono. Con esto se constató que los protones que aparecen como dos dobletes [δ 5.26; δ 5.02 (H-13)] están sobre el carbono [δ 73.7 (C-13)], por lo tanto, revela que no se trata de una olefina sino de un metileno unido a un oxígeno, al igual que [δ 4.70; δ 5.09 (H-14)], que se encuentran ubicados sobre el carbono [62.0 (C-14)].

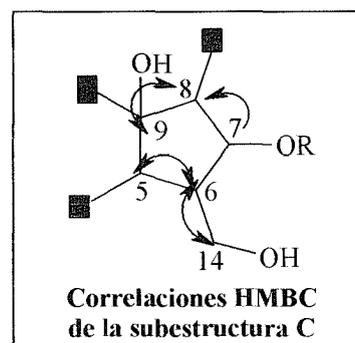
El singulete a δ 6.10 (H-1') pertenece al carbono δ 99.4 (C-1'), por sus desplazamientos y características, señalan que son el carbono y el protón anomérico del azúcar.

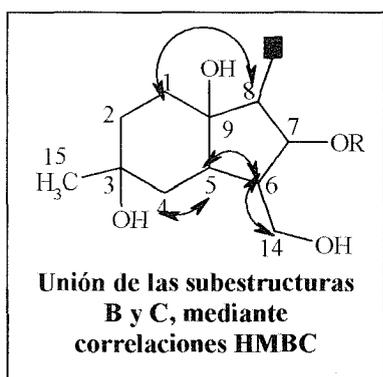
En el espectro HMBC (Figura 39 y 39.1; Diagrama 4), se notan claramente las correlaciones del metilo singulete [(H-15) \leftrightarrow (C-4) y (H-15) \leftrightarrow (C-3)] y las del metilo doblete [(H-6') \leftrightarrow (C-5') y (H-6') \leftrightarrow (C-4')], éstas últimas confirman que dicho metilo forma parte de la estructura del azúcar, lo que significa que el aglicón posee un solo metilo. Ahora bien, el singulete a δ 6.10 (H-11) correlaciona con el carbono a δ 174.3 (C-12) [(H-11) \leftrightarrow (C-12)], a su vez, el doblete a δ 5.02; δ 5.26 (H-13) con el carbono cuaternario a δ 175.3 (C-10), esto implica que [5] posee en su estructura, una γ -lactona, denotada como subestructura A.



Con este análisis, se puede suponer que se trata de una lactona sesquiterpénica, así que de los quince carbonos del sesquiterpeno, falta por asignar once. Si se trabaja en base a esto, recurriendo al HMBC (Figura 39 y 39.1) nuevamente y al espectro COSY (Figura 41 y 41.1), partiendo de las correlaciones de (H-15) y del triplete a δ 3.00 (H-5), que por su multiplicidad podría ser un protón cabeza de puente, por consiguiente, es un indicativo de un biciclo. Con las correlaciones [(H-15) \leftrightarrow (C-4); (H-15) \leftrightarrow (C-3); (H-1) \leftrightarrow (C-3), (H-2) \leftrightarrow (C-3), (H-2) \leftrightarrow (C-4); (H-1) \leftrightarrow (C-9); (H-5) \leftrightarrow (C-4)], entre otras, se logra establecer la subestructura B como un anillo de seis.

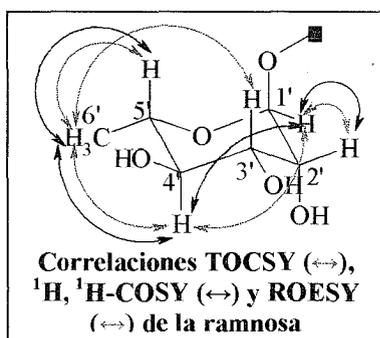
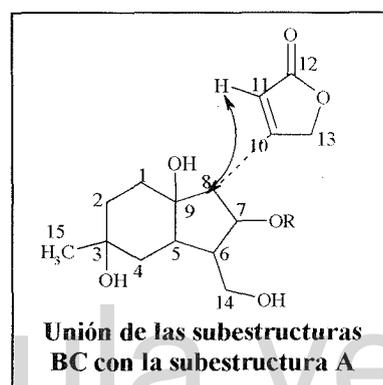
Por otro lado, siguiendo las correlaciones [(H-8) \leftrightarrow (C-7); (H-6) \leftrightarrow (C-5); (H-8) \leftrightarrow (C-9)] se forma un anillo de cinco como subestructura C, con esto se evidencia que ambas subestructuras comparten los carbonos (C-9) y (C-5). Así pues, la unión de las subestructuras B y C se dan mediante las correlaciones [(H-5) \leftrightarrow (C-4); (H-1) \leftrightarrow (C-8); (H-14) \leftrightarrow (C-6)], completando de esta manera los once carbonos restantes.





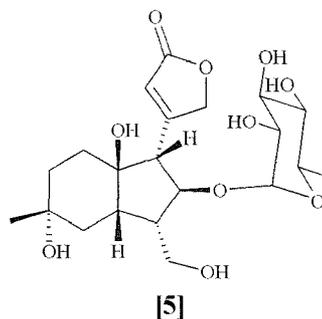
Para las uniones de las subestructuras BC con la A, se ratifican nuevamente las correlaciones en el HMBC (Figura 39 y 39.1), allí se nota la correlación (C-8) \leftrightarrow (H-11), por esta razón la lactona se ubica sobre (C-8) a través del carbono cuaternario sp^2 (C-10). En tal sentido, queda estructurada, de manera inequívoca, el esqueleto de la lactona sesquiterpénica como aglicón. Ya que este esqueleto no ha sido previamente reportado lo llamaremos bulnearboreano.

Para la identificación del azúcar, se examinó el espectro TOCSY (Figura 40 y 40.1), partiendo del protón anomérico δ 5.60 (H-1') se alcanzaron a identificar los protones que forman parte del anillo, con las correlaciones [(H-1') \leftrightarrow (H-4'); (H-1') \leftrightarrow (H-2')] y con las correlaciones del metilo δ 1.65 (H-6'): [(H-6') \leftrightarrow (H-4'); (H-6') \leftrightarrow (H-5'); (H-6') \leftrightarrow (H-3')]. Con ayuda del espectro $^1H, ^1H$ -COSY (Figura 41 y 41.1), se observan dos correlaciones, una con



respecto al protón anomérico [(H-1') \leftrightarrow (H-2')] y la otra con respecto al metilo [(H-6') \leftrightarrow (H-5')], que serían los protones vecinos a éstos. En el espectro ROESY (Figura 42), el protón anomérico (H-1') correlaciona con [(H-1') \leftrightarrow (H-4'); (H-1') \leftrightarrow (H-5')], lo que significa que estos protones se encuentran con la misma orientación, al igual que el metilo (H-6') correlaciona con [(H-6') \leftrightarrow (H-4')] y el metilo (H-15) con el protón cabeza de puente [(H-15) \leftrightarrow (H-5) y (H-15) \leftrightarrow (H-8)]. Con toda esta información y con los valores reportados en la bibliografía (Mitaine *et al.*, 2006), se identificó el azúcar como la ramnosa. La unión de la ramnosa con el aglicón, en este caso con la lactona sesquiterpénica, se hace mediante el espectro HMBC (Figura 39 y 39.1), donde el protón anomérico debe correlacionar con uno de los carbonos pertenecientes al aglicón, y consecuentemente, se consigue la correlación [(H-1') \leftrightarrow (C-7)].

De esta manera queda establecida la estructura de **[5]** como (5*R*, 6*R*, 7*R*, 8*R*)-3 α ,9 β ,14-trihidroxil-7-ramnosilbulnearborean-10-en-12,13-olido ó bulnearboreanósido I.



Este tipo de lactona sesquiterpénica, hasta ahora, no ha sido reportada anteriormente, por lo que éste sería el primer reporte como producto natural.

www.bdigital.ula.ve

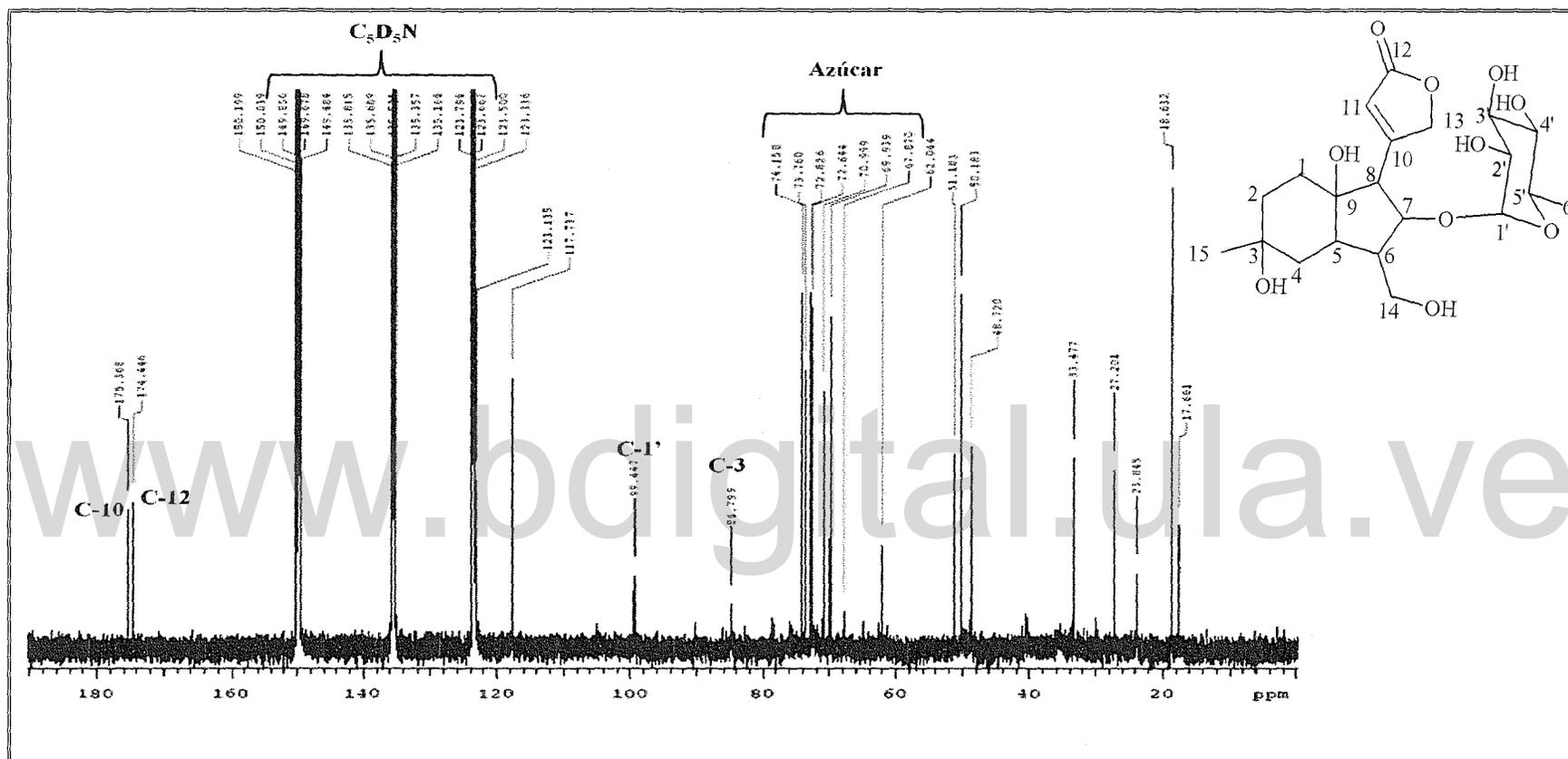


Figura 35. Espectro de RMN- ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150 MHz) de [5].

Tabla 18. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^{13}C de [5].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
δ (ppm)	27.2	33.4	84.7	50.1	51.1	48.7	70.9	51.0	67.2	175.3	117.7
Tipo	$-\text{CH}_2-$	$-\text{CH}_2-$	$>\text{CO}-$	$-\text{CH}_2-$	$>\text{CH}-$	$>\text{CH}-$	$>\text{CHO}-$	$>\text{CH}-$	$>\text{CO}-$	$>\text{C}=\text{}$	$=\text{CH}-$
C	12	13	14	15	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
δ (ppm)	174.3	73.7	62.0	17.6	99.4	72.6	72.8	74.1	69.9	18.6	
Tipo	$>\text{C}=\text{O}$	$-\text{CH}_2\text{O}-$	$-\text{CH}_2\text{O}-$	$-\text{CH}_3$	$-\text{OCHO}-$	$>\text{CHO}-$	$>\text{CHO}-$	$>\text{CHO}-$	$>\text{CHO}-$	$>\text{CHO}-$	

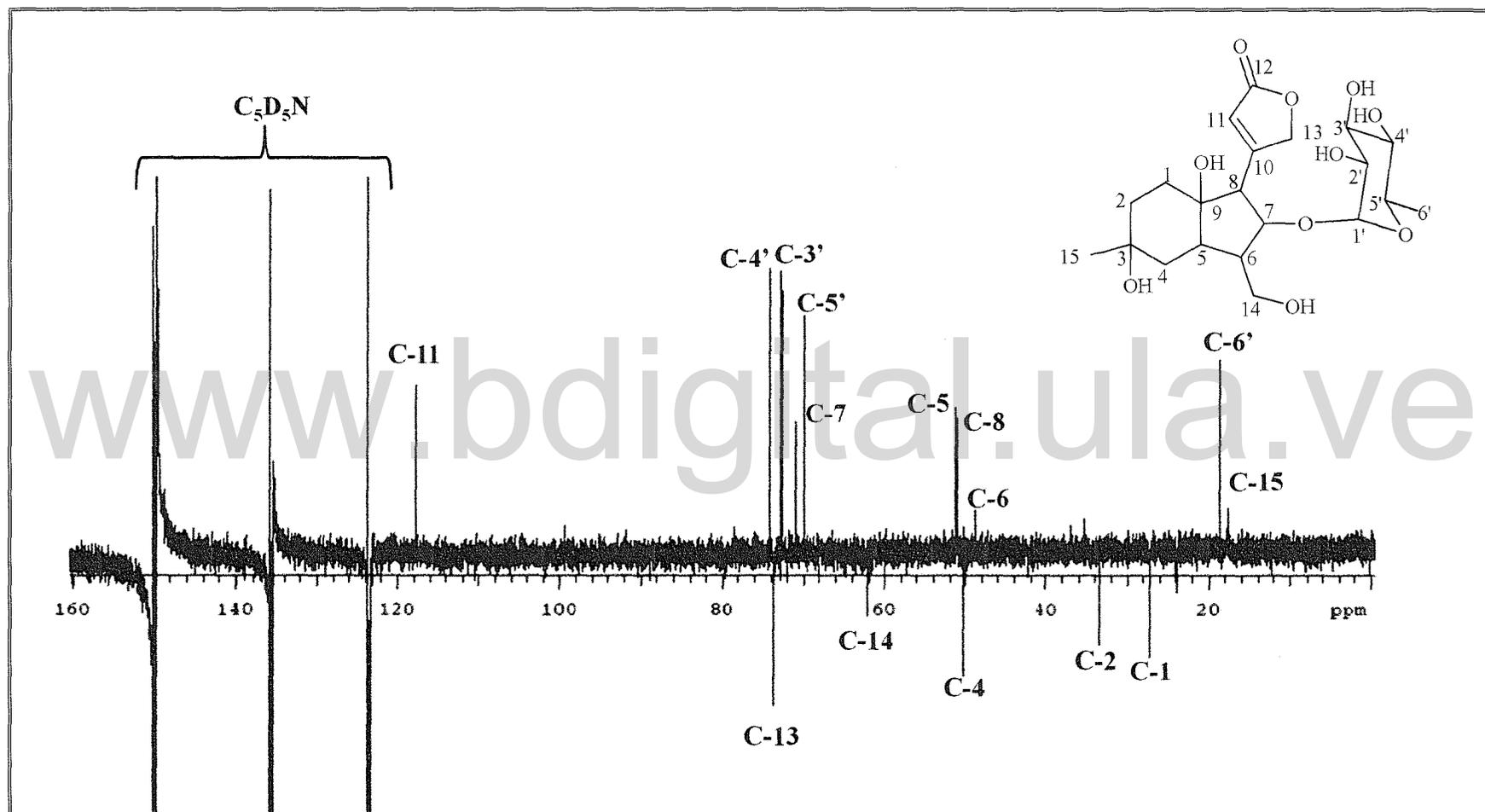


Figura 36. Espectro RMN- ^{13}C /DEPT-135 de [5].

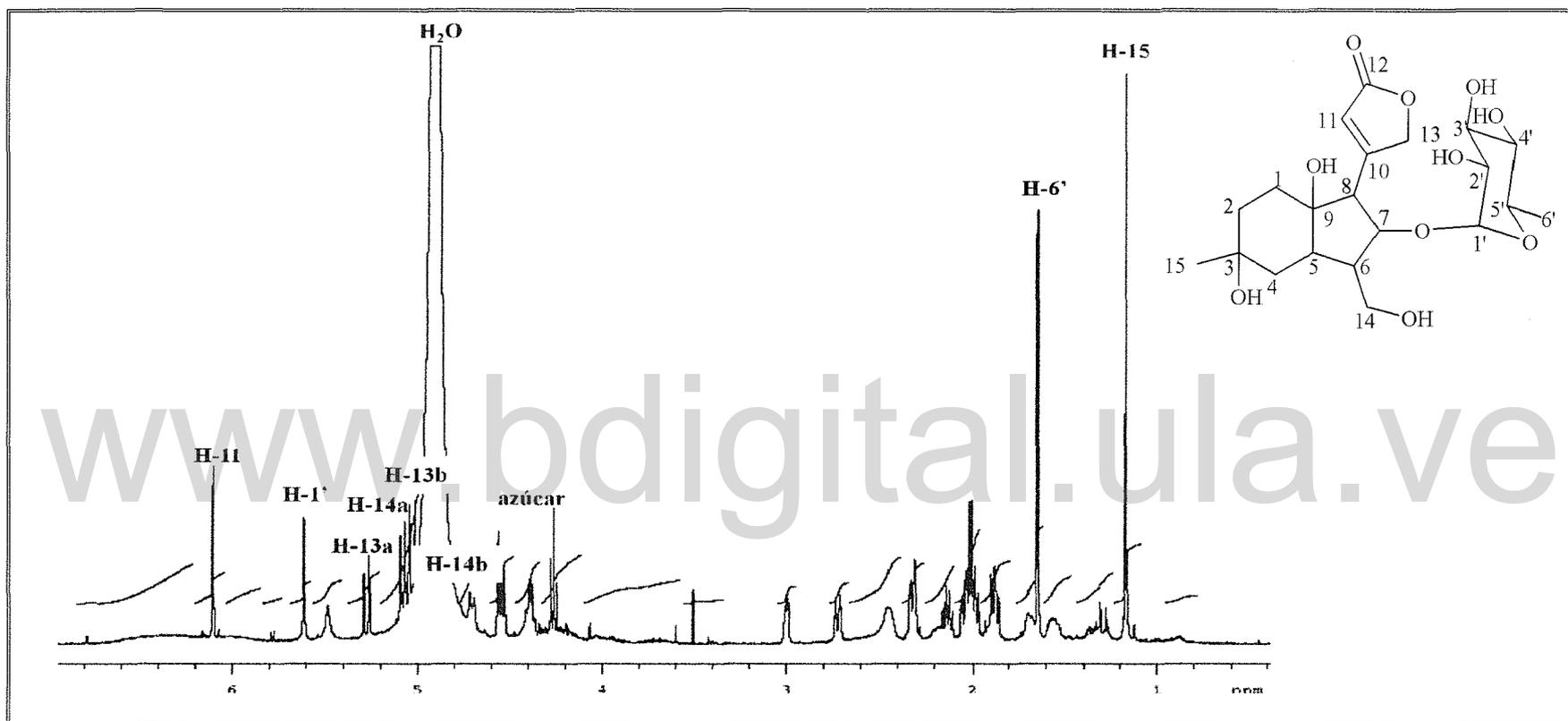


Figura 37. Espectro de RMN-¹H (C₃D₅N, 600MHz) de [5].

Tabla 19. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹³C de [5].

H	1	2	4	5	6	7	8	11	13
δ (ppm)	2.13 ; 2.00	2.00 ; 2.32	2.05 ; 1.87	3.00	2.70	4.40	2.05	6.10	5.26 ; 5.02
J (Hz), m	11, <i>dd</i>	m	m	4.4, <i>t</i>	11, <i>dt</i>	m	m	s	18, <i>dddd</i>
H	14	15	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
δ (ppm)	4.70 ; 5.09	1.18	5.61	4.56	4.54	4.26	4.37	1.65	
J (Hz), m	11, <i>dddd</i>	s	s	3,2 <i>dd</i>	m	9,3 <i>t</i>	m	s	

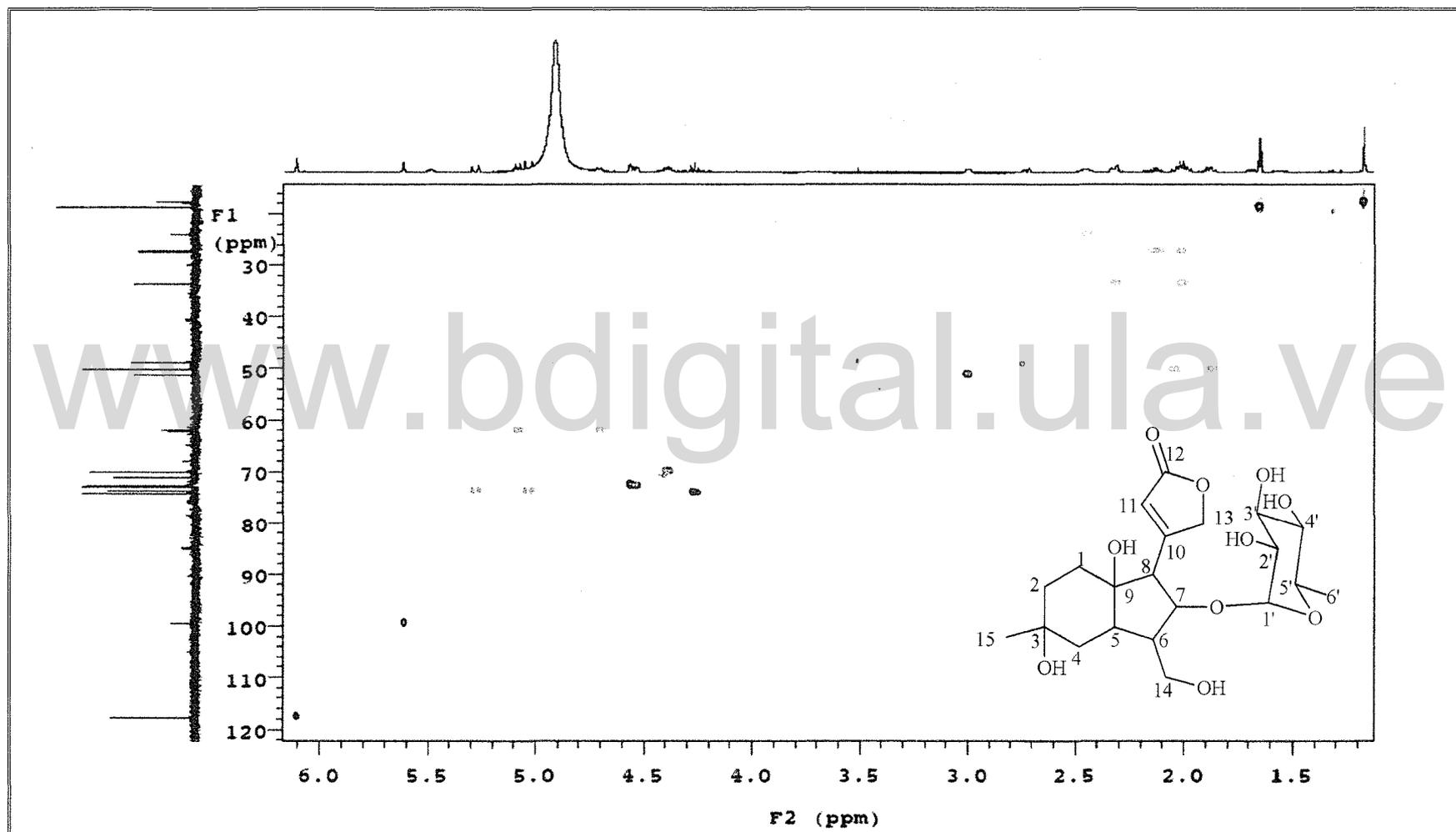


Figura 38. Espectro de HSQC (C_5D_5N) de [5].

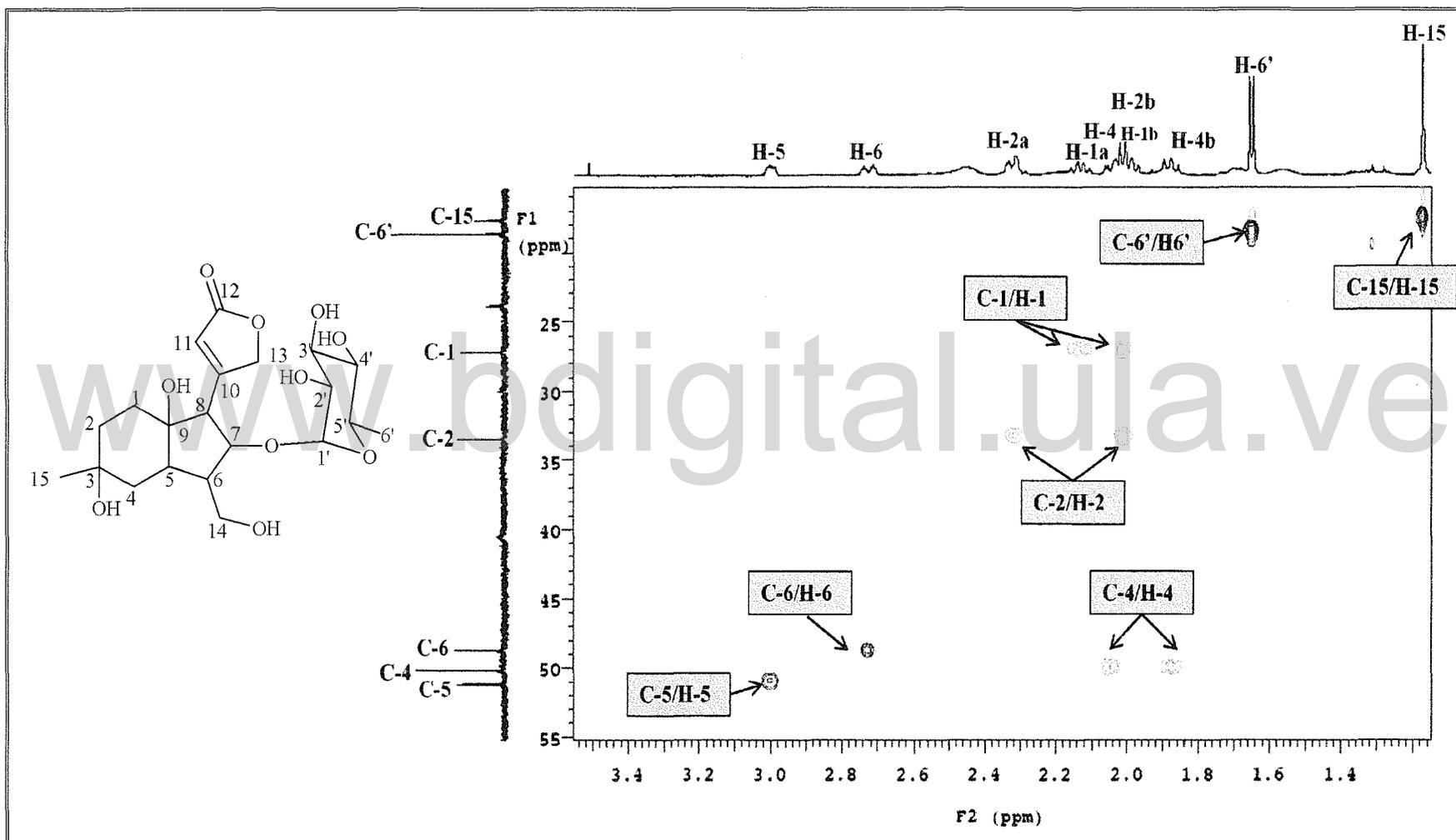


Figura 38.1. Ampliación del espectro de HSQC (C_5D_5N) de [5].

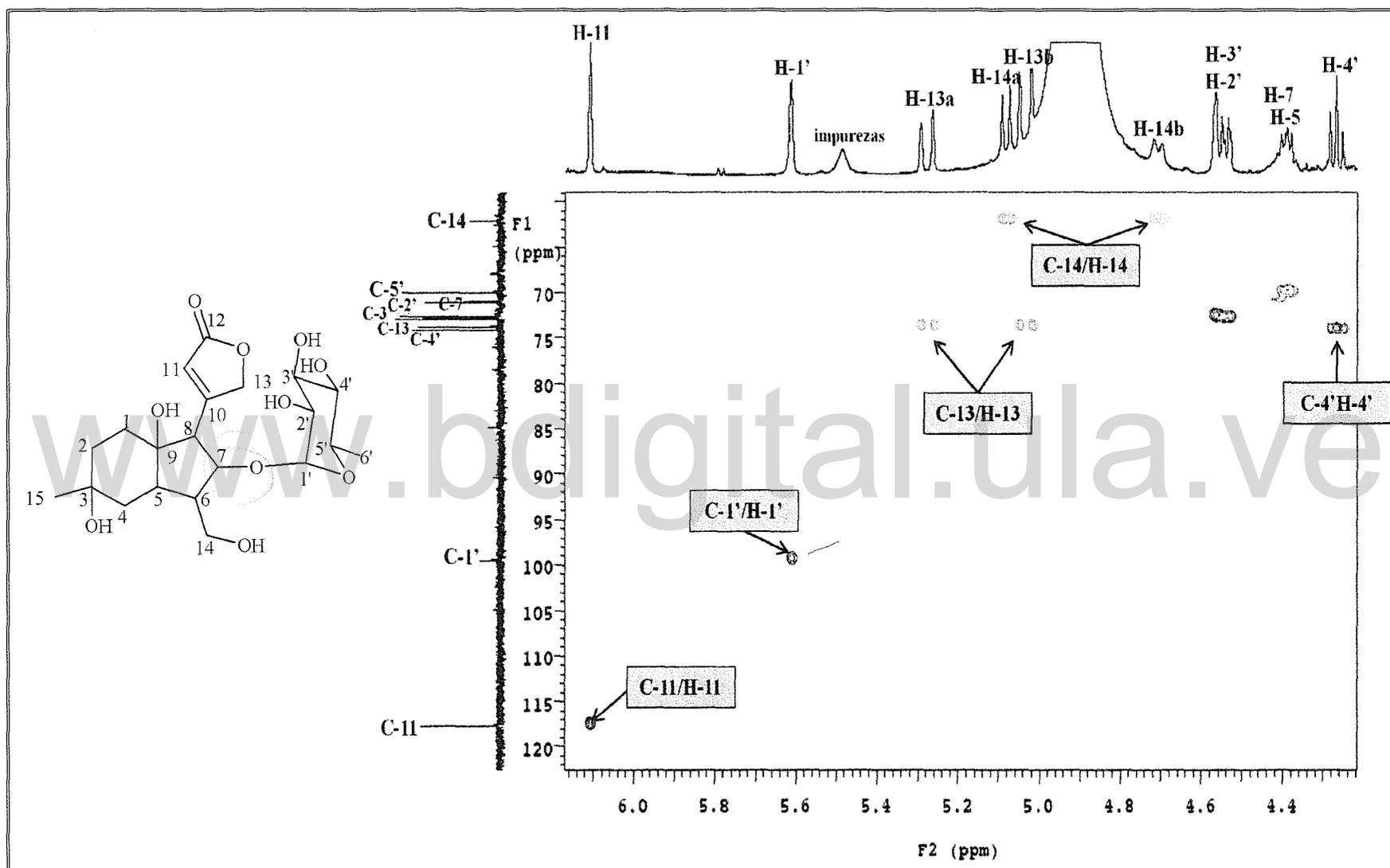


Figura 38.2. Ampliación del espectro de HSQC (C_5D_5N) de [5].

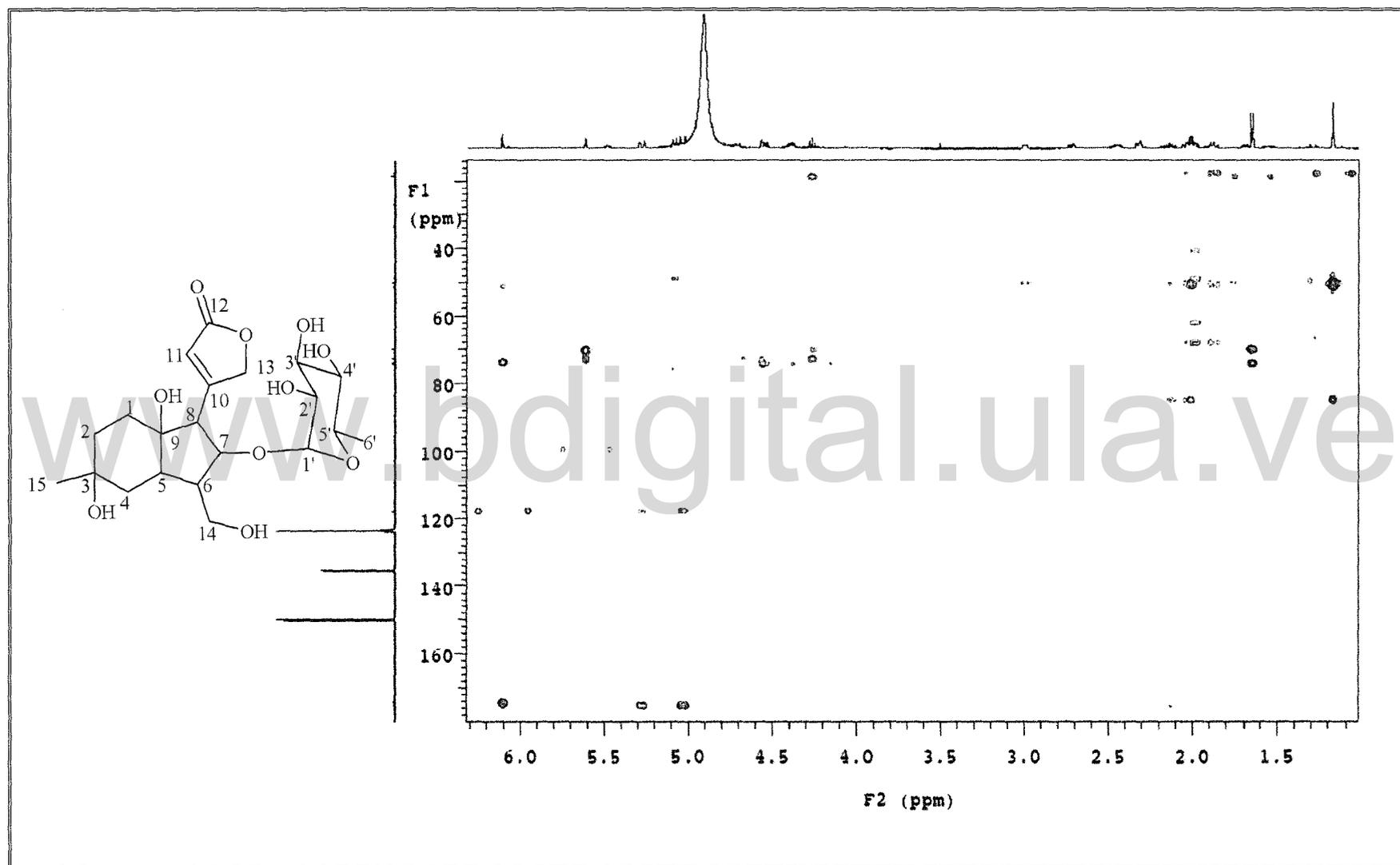


Figura 39. Espectro de HMBC (C_5D_5N) de [5].

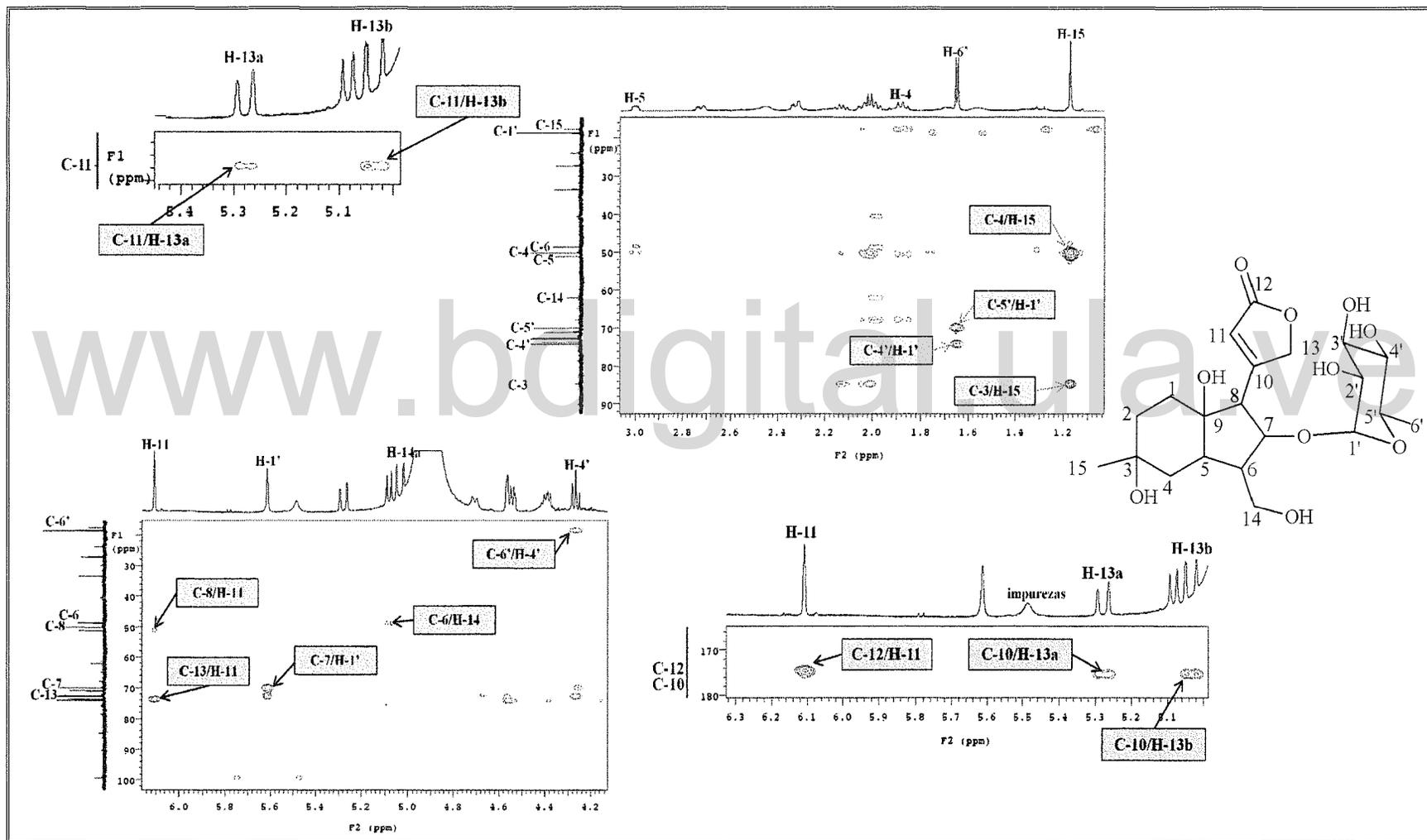
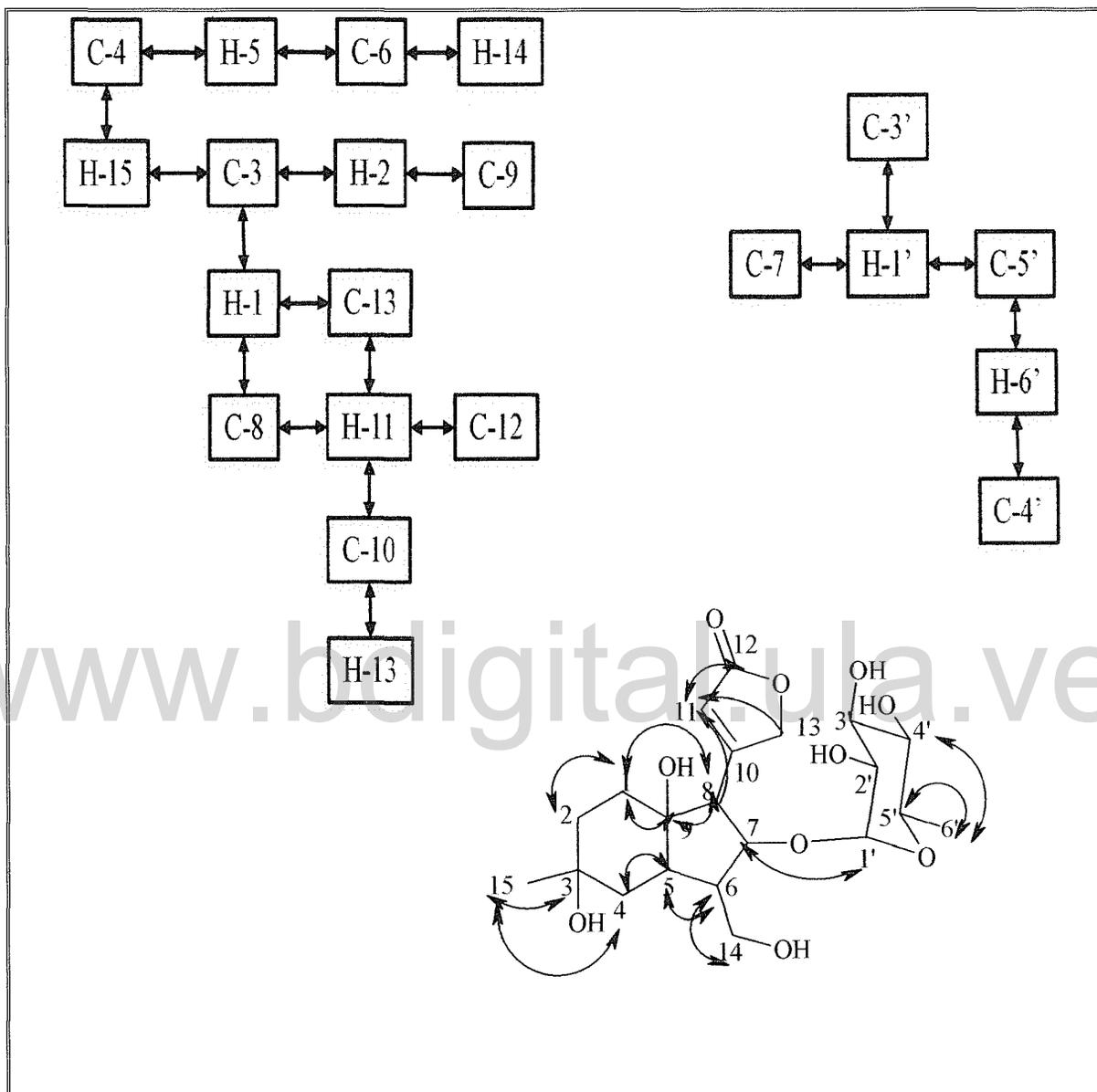


Figura 39.1. Amplificaciones del espectro de HMBC (C_5D_5N) de [5].

Diagrama 4. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [5].



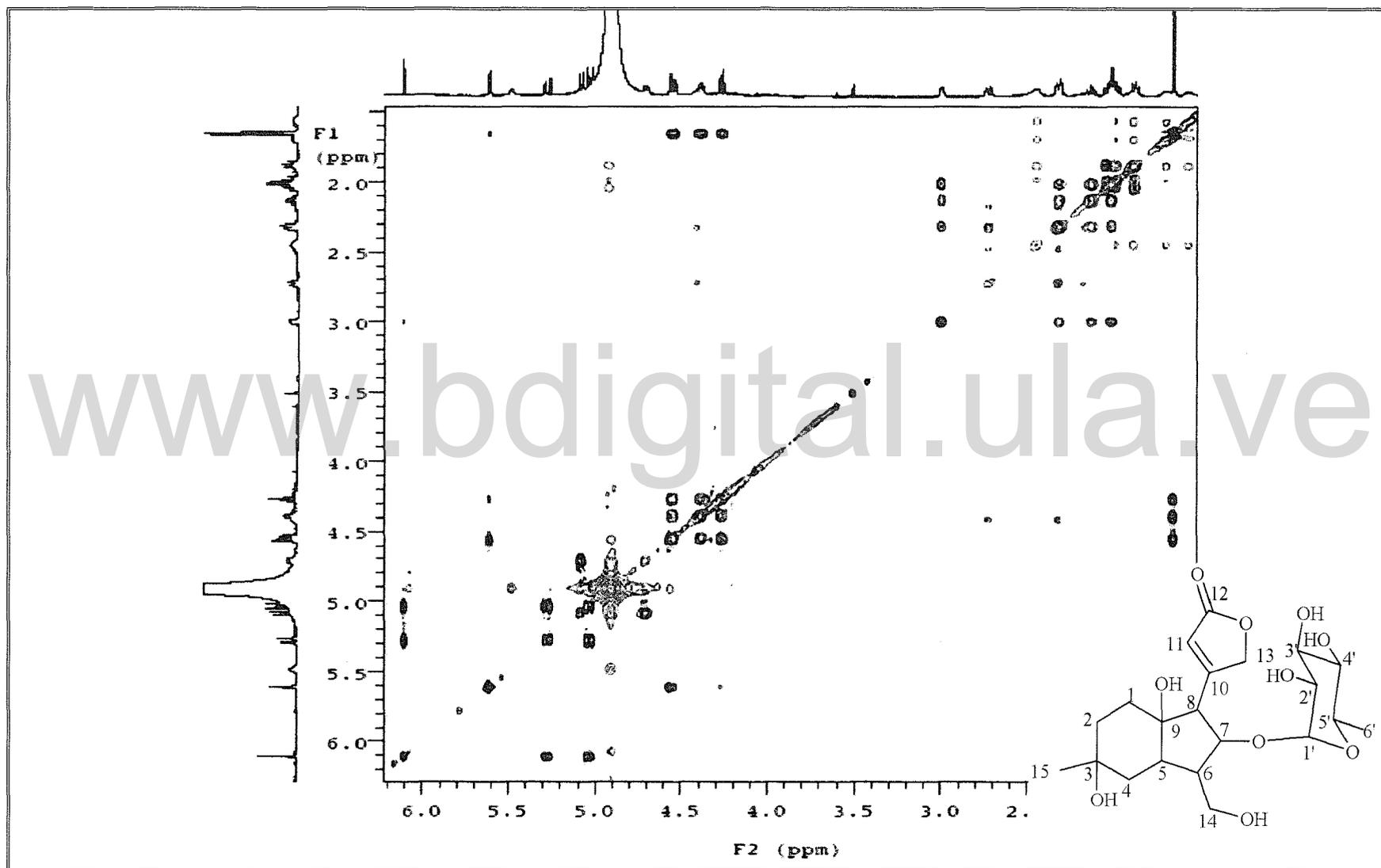


Figura 40. Espectro de TOCSY (C_5D_5N) de [5].

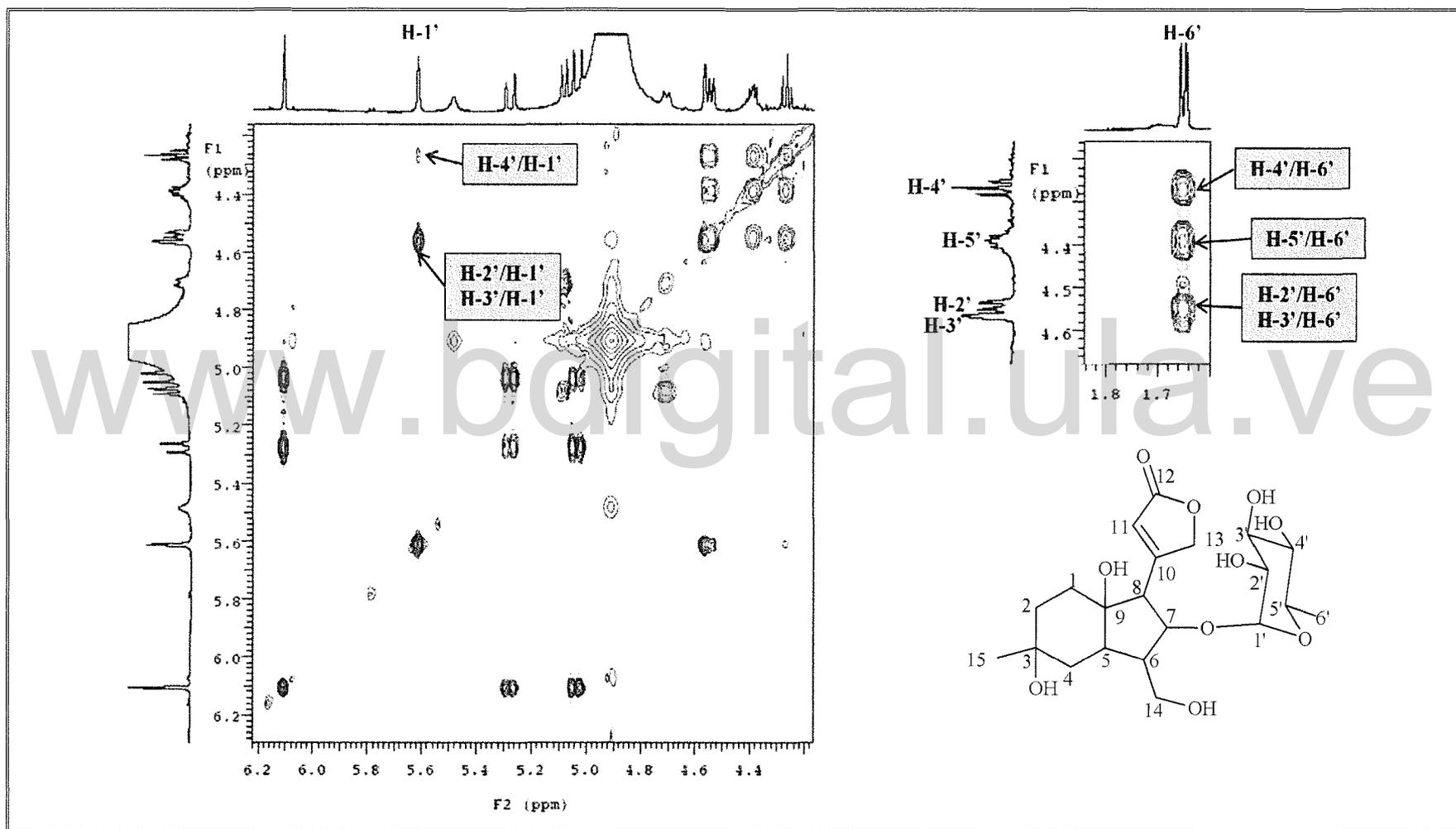


Figura 40.1. Ampliaciones del espectro de TOCSY (C_5D_5N) de [5].

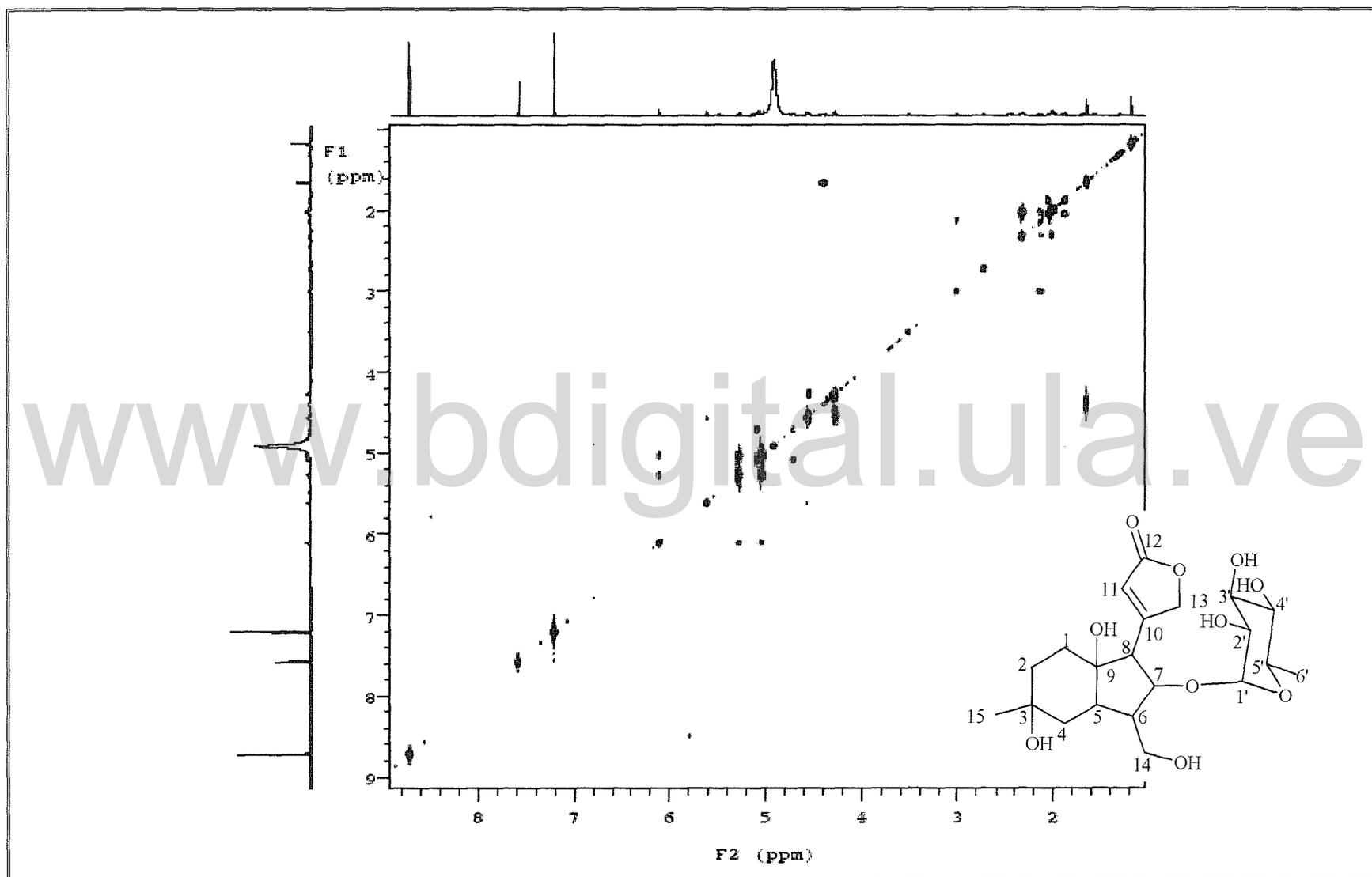


Figura 41. Espectro de ^1H , ^1H -COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [5].

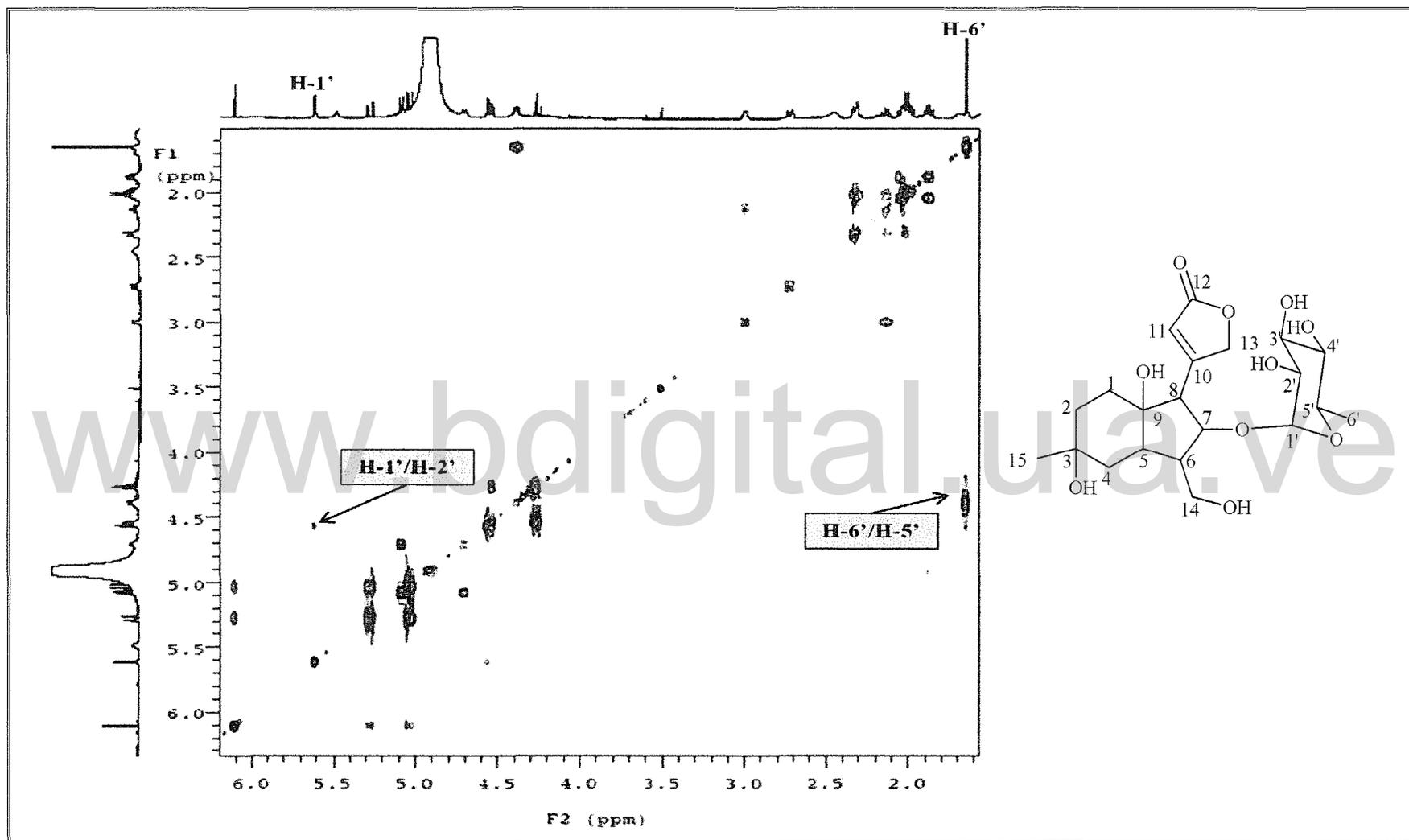


Figura 41.1. Ampliación del espectro de ^1H , ^1H -COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [5].

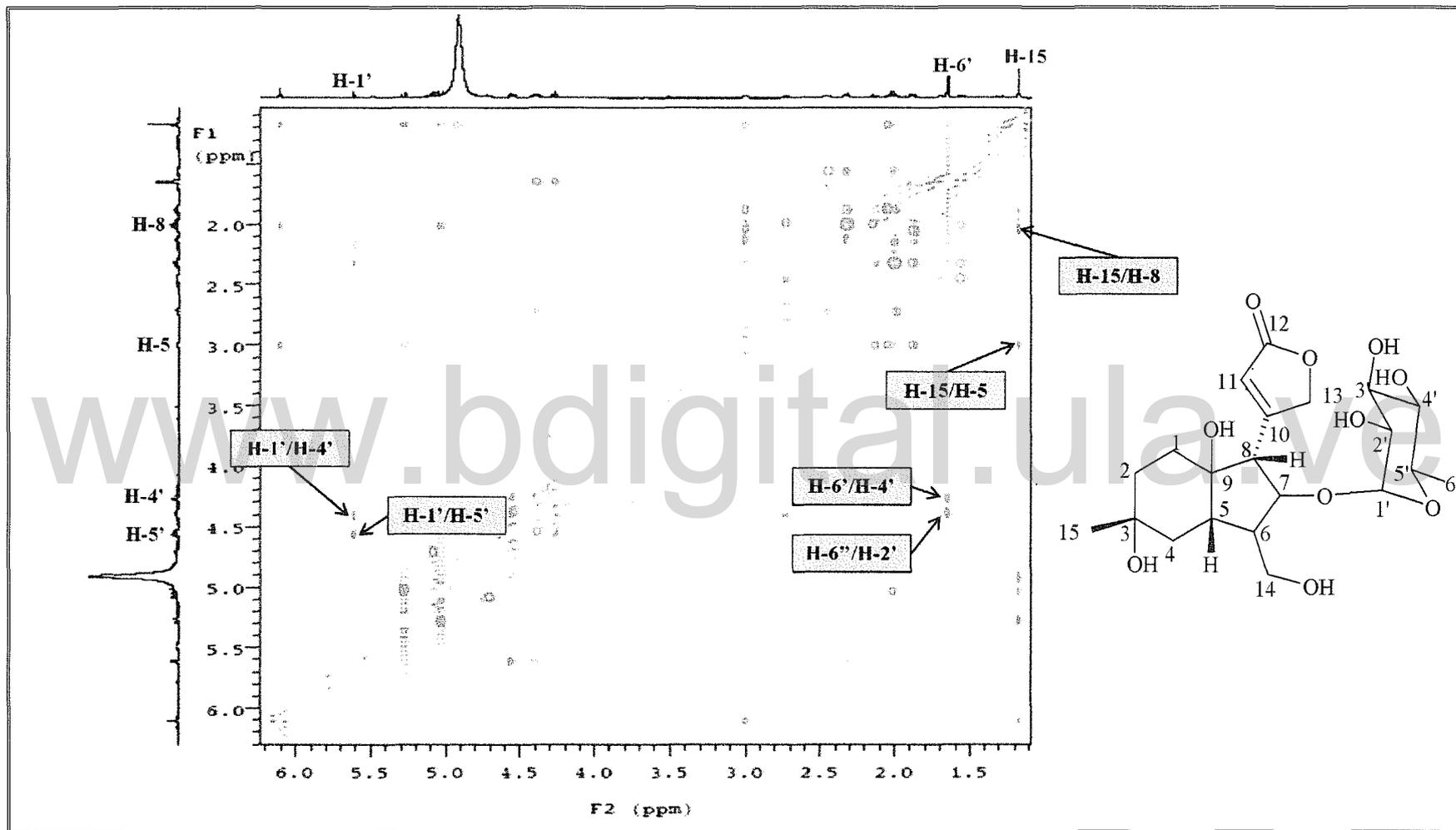


Figura 42. Espectro de ROESY (C_5D_5N) de [5].

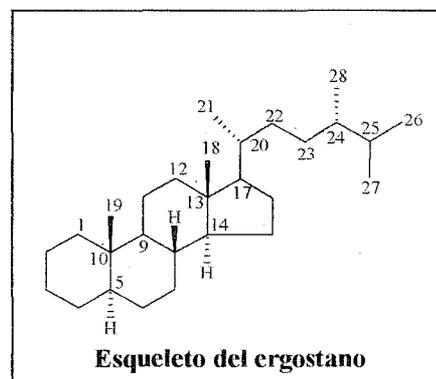
VI.2.1.b.- 3,21-bis[O-β-D-Glucopiranosilo] de ergosta-5,24(28)-dieno-3β,11α,21,26-tetrol [6]:

De la reunión BuBaSx5 y BuBaSx6, obtenida al cromatografiar el extracto de BuOH de las hojas de *Bulnesia arborea*, sobre una columna de Sephadex LH-20 y luego de aplicar repetidas veces cromatografía líquida a presión media (MPLC), sobre gel de sílice (15-40 μm) en un sistema de solvente [CHCl₃:MeOH:H₂O (65:35:10)], se aisló un polvo amorfo (3.2 mg).

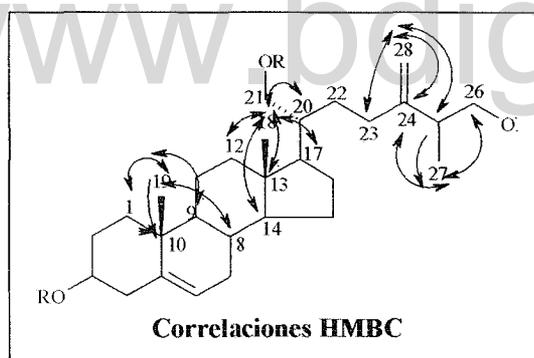
En su espectro de RMN-¹³C (Figura 43, Tabla 20) muestra un total de cuarenta señales, lo que hace pensar que la molécula es una saponina, y efectivamente, se logran distinguir las señales pertenecientes al aglicón y a los azúcares. Por ejemplo, con el DEPT-135 (Figura 44), se alcanzan discriminar las señales del aglicón: tres carbonos metilos [δ 12.8 (C-19), δ 13.4 (C-18) y δ 17.6 (C-27)], doce carbonos metilenos, de los cuales, dos de ellos se encuentran unidos a un átomo de oxígeno [δ 61.9 (C-21) y δ 74.6 (C-26)] y uno con una hibridación sp² [δ 180.9 (C-28)], nueve metinos, dos de ellos unidos a oxígeno [δ 77.0 (C-3) y δ 69.2 (C-11)] y uno hibridizado sp² [δ 119.6 (C-6)] y cuatro carbonos cuaternarios y dos de ellos hibridizado sp² [δ 153.0 (C-24); δ 137.8 (C-5)]. Por otra parte, también se distinguen dos carbonos metínicos [δ 102.1 (C-1') y δ 105.2 (C-1'')], atribuidos a los carbonos anoméricos de los azúcares; además, entre δ 70.0 y δ 80.0 surgen una serie de señales metínicas, que por su desplazamiento se encuentran unidos a átomos de oxígeno. De esta manera se comprueba la presencia de por lo menos dos monosacáridos en la molécula.

En su espectro de RMN-¹H (Figura 45, Tabla 21), se destacan las señales de tres metilos que surgen como dos singuletes [δ 1.04 (H-19) y δ 0.70 (H-18)] y un doblete [δ 1.25 (H-27)]. Una serie de señales en la zona de metilos y metilenos entre δ 1.80 y δ 3.10 y finalmente entre δ 3.60 y δ 4.60 se observan un grupo de señales asignadas a hidrógenos unidos a grupos oxigenados. Con el espectro de HSQC (Figura 46 y 46.1), se logró asignar los protones con sus respectivos carbonos.

La multiplicidad de los metilos y las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 47 y 47.1, Diagrama 5), ayudan a la identificación del esqueleto del aglicón, por ejemplo, [(H-18) \leftrightarrow (C-13); (H-18) \leftrightarrow (C-14); (H-18) \leftrightarrow (C-8); (H-18) \leftrightarrow (C-17)]; [(H-1) \leftrightarrow (C-10); (H-19) \leftrightarrow (C-1); (H-19) \leftrightarrow (C-8); (H-19) \leftrightarrow (C-9)] y por último las correlaciones [(H-27) \leftrightarrow (C-25); (H-27) \leftrightarrow (C-26); (H-27) \leftrightarrow (C-24)], logrando



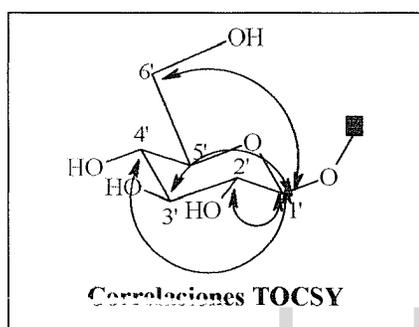
identificarlo como ergostano. Sin embargo, a pesar de que dicho esqueleto posee seis metilos y su espectro de RMN-¹H (Figura 45) solo muestra tres, indica que los otros tres metilos sufrieron algún tipo de transformación. Prueba de ello son las correlaciones [(C-28) \leftrightarrow (H-25); (C-28) \leftrightarrow (H-23), (C-28) \leftrightarrow (H-25); (H-27) \leftrightarrow (C-24); (H-28) \leftrightarrow (C-24)], las cuales, corroboran que el metilo en posición 28 sufrió una deshidratación quedando como un metileno exocíclico sp². De igual manera, la correlación [(C-26) \leftrightarrow (H-27)], denota que



no se trata de metilos geminales, sino que uno de ellos se oxidó quedando como un metileno oxigenado [δ 74.6 (C-26)]. Similarmente, ocurre con el metilo en la posición 21, las correlaciones [(C-21) \leftrightarrow (H-20) y (C-21) \leftrightarrow (H-22)], orientan que es un metileno unido a un grupo oxigenado y no un metilo, por lo que también sufrió un proceso de oxidación. En la mayoría de las saponinas, la posición 3,

se encuentra oxigenada y consecuentemente, se puede verificar mediante las correlaciones [(C-3) \leftrightarrow (H-2) y (C-3) \leftrightarrow (H-1)] respectivamente. Igualmente, la posición 11 se encuentra oxigenada, y se confirma con las correlaciones [(C-11) \leftrightarrow (H-12); (C-11) \leftrightarrow (H-9)]. La ubicación del doble enlace entre la posiciones 5 y 6 se determinó a través del espectro ¹H,¹H-COSY (Figura 49) con la correlación (H-6) \leftrightarrow (H-7) y con los valores reportados en la bibliografía (Mimaki *et al.*, 2008). De esta forma se ratifica que **[6]** posee el esqueleto del ergostano como aglicón.

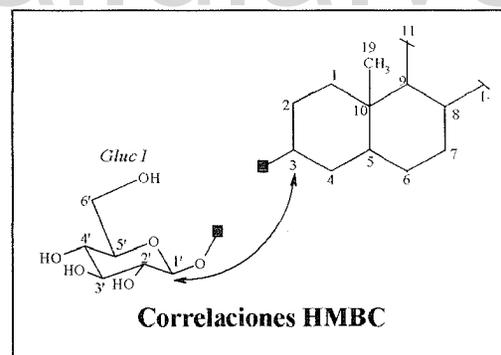
Análogamente, la elucidación de cada uno de los azúcares de [6], se realizó mediante la identificación del protón anomérico en el espectro de RMN-¹H (Figura 45), es decir una vez reconocida la señal del protón, se recurre al espectro TOCSY (Figura 48), donde, por ejemplo, las correlaciones del protón anomérico ubicado en [δ 5.04 (H-1')] son [(H-1')↔(H-2'); (H-1')↔(H-3'); (H-1')↔(H-4'); (H-1')↔(H-6')], de igual manera en su espectro ¹H,¹H COSY (Figura 49,) se contempla la correlación (H-1')↔(H-2') y en el espectro ROESY (Figura 50) se perciben las correlaciones [(H-1')↔(H-3'); (H-1')↔(H-5')], igualmente con el espectro HSQC (Figuras 46 y 46.1) fue posible asignar a cada protón su carbono correspondiente. Con toda esta información y con los valores reportados



en la bibliografía (Zou *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 1991) concuerdan con la glucosa (*Gluc I*). La segunda molécula de azúcar, fue esclarecida de la misma forma, con la ubicación del protón anomérico en δ 4.86 (H-1'') en el espectro de RMN-¹H (Figura 45) ubicando sus correlaciones en los espectros TOCSY (Figura 48), ¹H,¹H-COSY (Figura 49) y ROESY

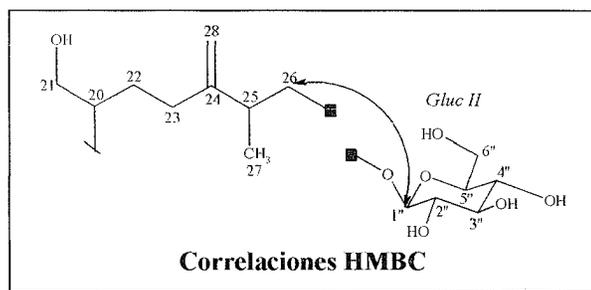
(Figura 50 y 50.1) y con los valores reportados en la bibliografía (Zou *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 1991), aciertan con que es otra glucosa (*Gluc II*).

Para la ubicación de ambas glucosas (*Gluc I* y *Gluc II*) en el esqueleto del ergostano, se halla la correlación del carbono anomérico en el espectro de HMBC (Figura 47 y 47.1) para el caso de *Gluc I*, su carbono anomérico en



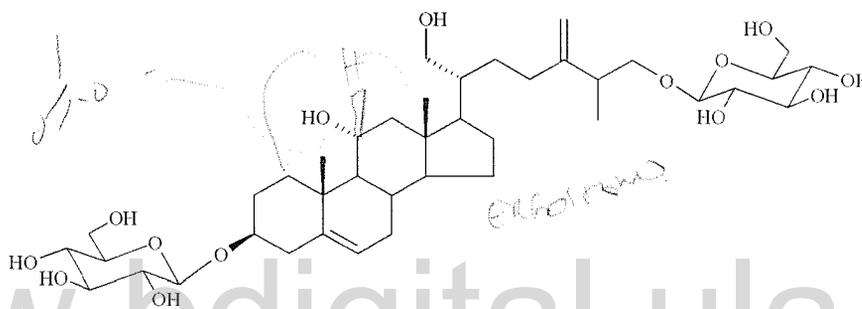
δ 102.1 (C-1') correlaciona con el protón en δ 4.03 (H-3), [(C-1')↔(H-3)], por lo tanto

Gluc I, se encuentra sobre el carbono [δ 77.0 (C-3)]. Similarmente, el carbono anomérico de *Gluc II* en [δ 105.2 (C-1'')] tiene una correlación en HMBC (Figura 47 y 47.1) con el protón [δ 4,29 (H-26)]



[[C-1'')↔(H-3)] evidencia que *Gluc II* se encuentra sobre el carbono metileno [δ 74.6 (C-26)]. Respecto a la estereoquímica en los carbonos en posición 3 y 11, en el espectro ROESY (Figura 50 y 50.1), se observan las correlaciones de los protones metilos (H-18) y (H-19), con el protón (H-11), por lo tanto, el grupo -OH se encuentra en orientación α , mientras que por el contrario, los protones metilos (H-18) y (H-19) no correlaciona con (H-3), por esta razón la glucosa, *Gluc I*, se encuentra en orientación β .

De esta manera quedaron situadas ambas glucosas en el ergostano. Por consiguiente, la estructura [6] quedó constituida como 3,26-bis-[O- β -D-glucopiranosilo] de ergosta-5,24(8)-dieno-(3 β ,11 α ,21,26)-tetrol [6].



Este compuesto, no ha sido reportado anteriormente, lo novedoso es la variación en la cadena lateral con el doble enlace en la posición 24(28) y una glucosa en 26, por lo tanto, éste es el primer reporte como producto natural.

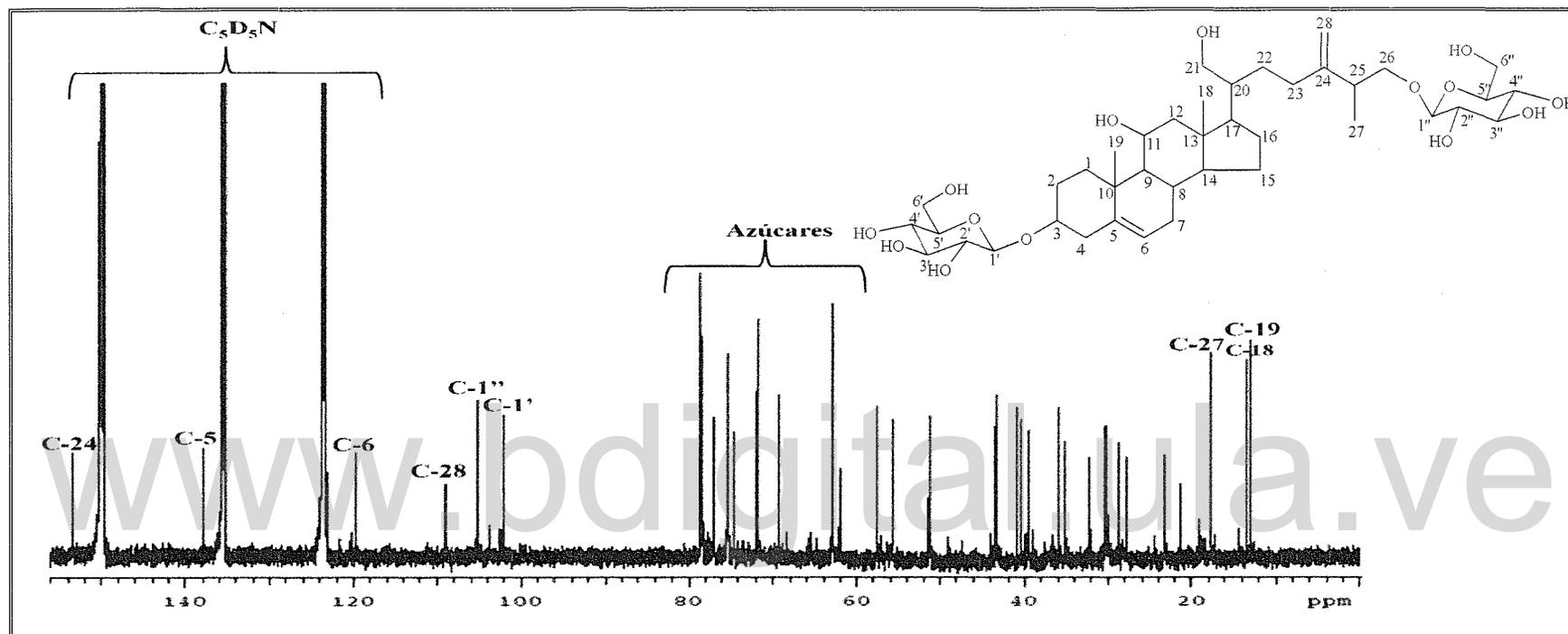


Figura 43. Espectro de RMN-¹³C (150 MHz, C₅D₅N) de [6].

Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [6]

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
δ (ppm)	39.4	28.7	77.0	35.1	137.8	119.6	30.1	40.4	57.6	35.8	69.2	51.2	42.9	55.6
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CHO-	-CH ₂ -	=C<	=CH<	-CH ₂ -	>CH-	>CH-	>C<	-CHO-	-CH ₂ -	>C<	>CH-
C	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
δ (ppm)	23.2	30.3	51.0	13.4	12.8	46.3	61.9	27.7	32.3	153.0	40.8	74.6	17.6	108.9
J(Hz), m	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CH-	-CH ₃	-CH ₃	>CH-	-CH ₂ O-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	=C<	>CH-	>CHO-	-CH ₃	=CH ₂
C	1'	2'	3'	4'	5'	6'		1''	2''	3''	4''	5''	6''	
δ (ppm)	102.1	75.2	78.6	71.8	78.5	62.9		105.2	75.3	78.6	71.7	78.5	62.9	
Tipo	OCHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CH ₂ O-		-OCHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CH ₂ O-

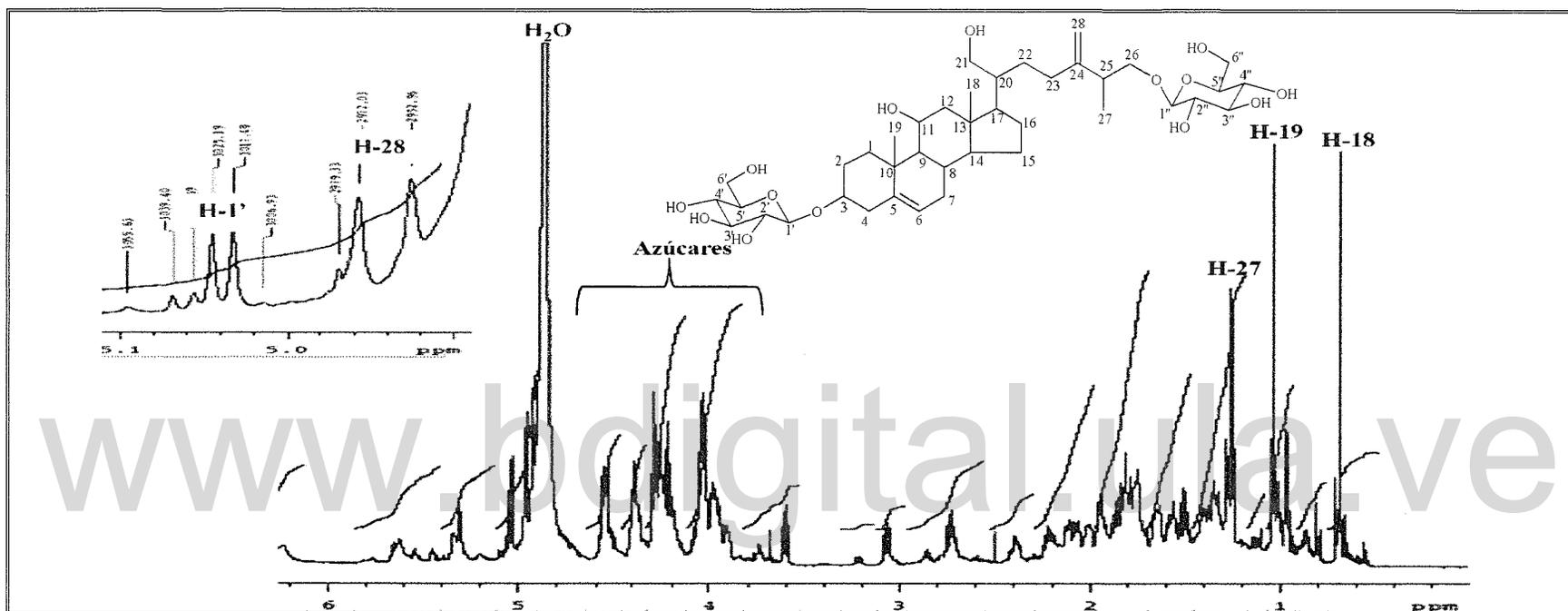


Figura 45. Espectro de RMN-¹H (600MHz, C₅D₅N) de [6].

Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y contantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹H de [6].

H	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	14	15
δ (ppm)	3.06 ; 1.36	1.82 ; nd	4.03	2.08 ; 1.52	5.31	1.76 ; 2.12	2.72	1.95	4.19	2.74 ; 1.80	2.00	1.56;1.50
J (Hz), m	m	m	m	m	d	m	m	m	m	m	m	m
H	16	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28
δ (ppm)	1.76 ; 2.12	1.86	0.70	1.04	1.64	4.04 ; 3.90	1.94 ; 1.41	2.39, 2.22	1.34	3.60	1.25	4.92;4.96
J (Hz), m	m	m	s	s	m	m	m	m	m	9; m	d	d
H	1'	2'	3'	4'	5'	6'	1''	2''	3''	4''	5''	6''
δ (ppm)	5.04	4.04	4.22	4.22	3.96	4.40 ; 4.56	4.86	4.03	4.25	4.21	3.98	4.38; 4.56
J (Hz), m	7.7; d	m	m	m	m	m	nd	m	m	m	m	d

*nd: no determinada

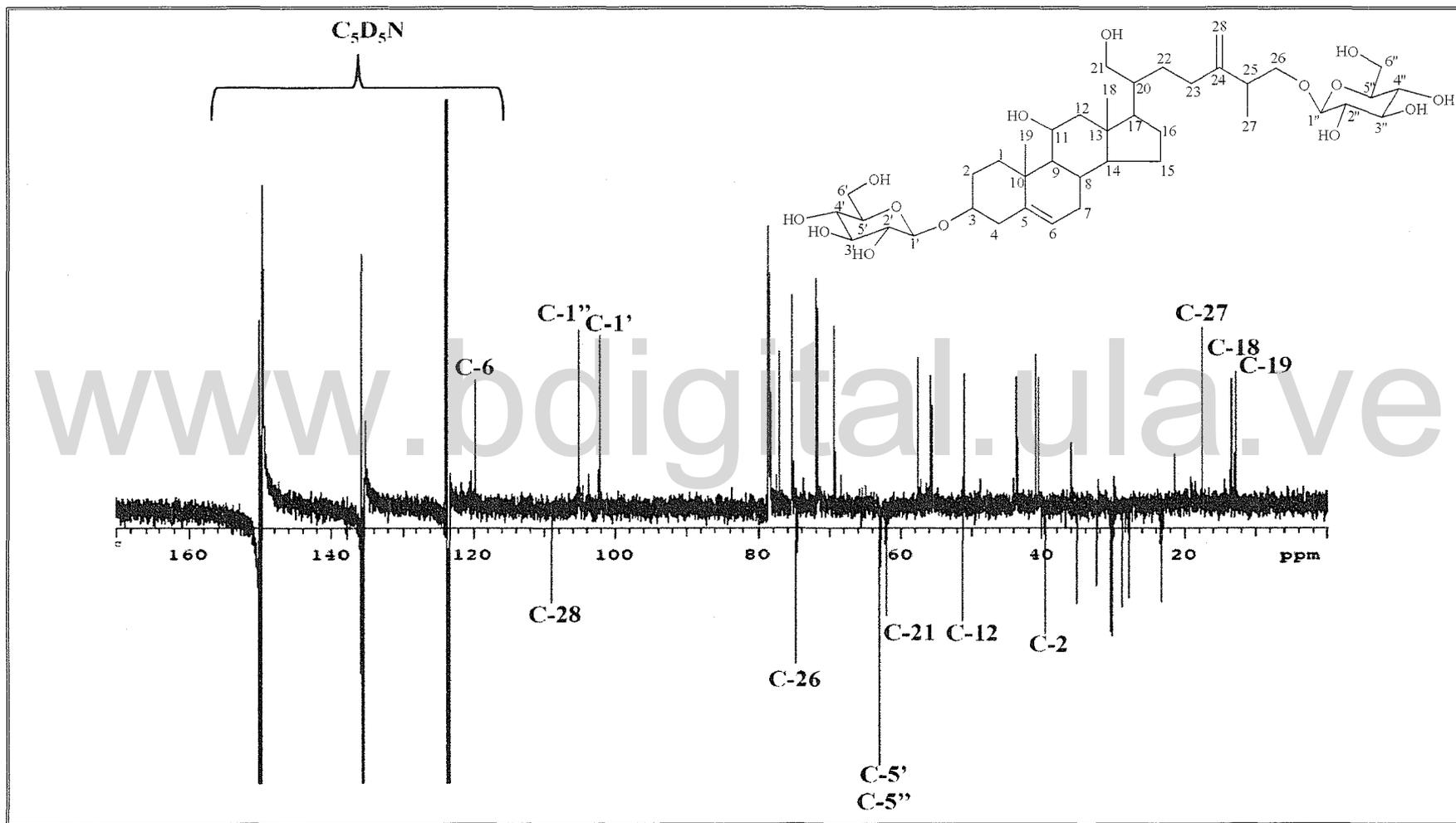


Figura 44. Espectro de RMN-¹³C , DEPT-135 (C₅D₅N) de [6].

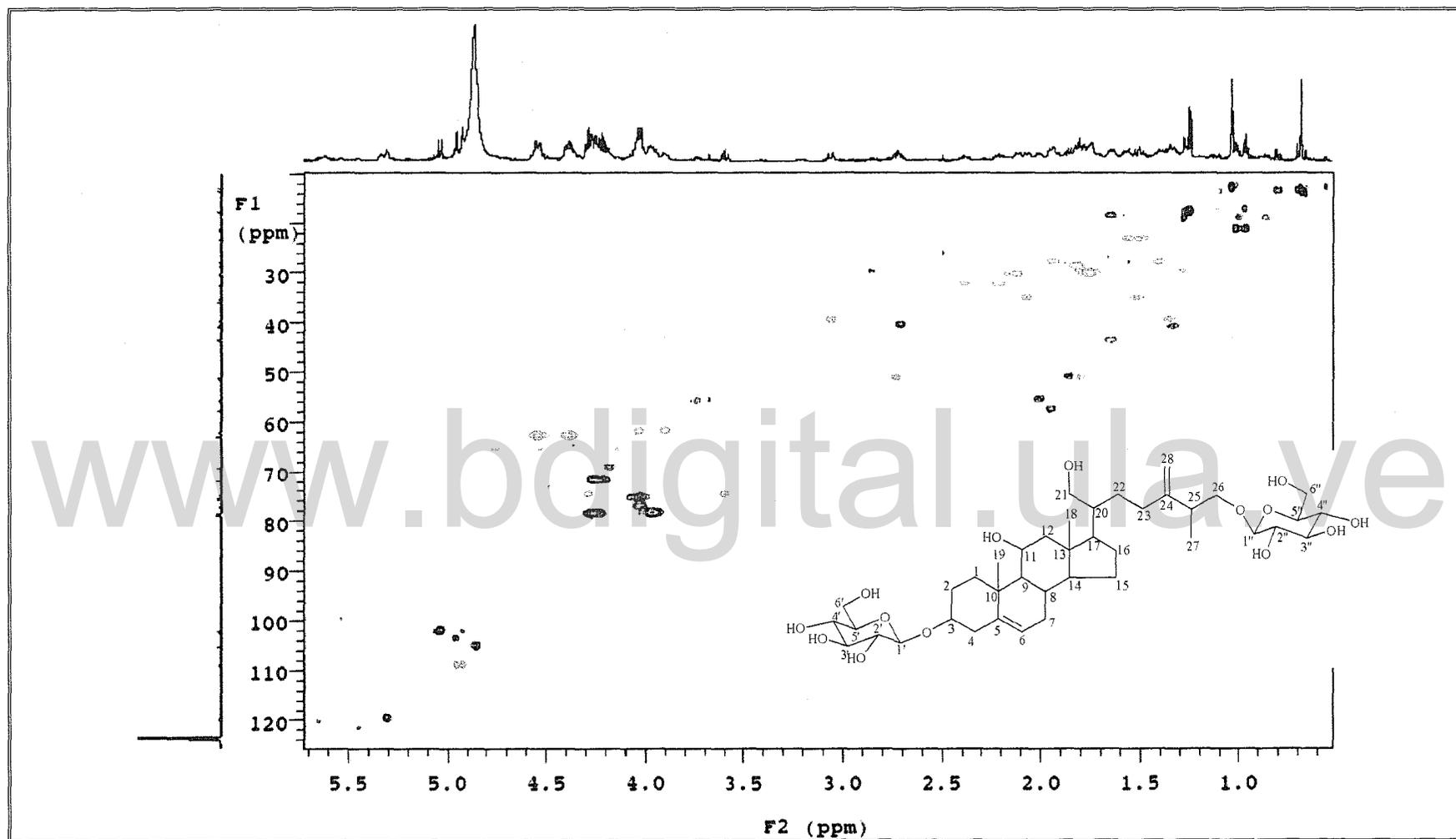


Figura 46. Espectro de HSQC (C_5D_5N) de [6].

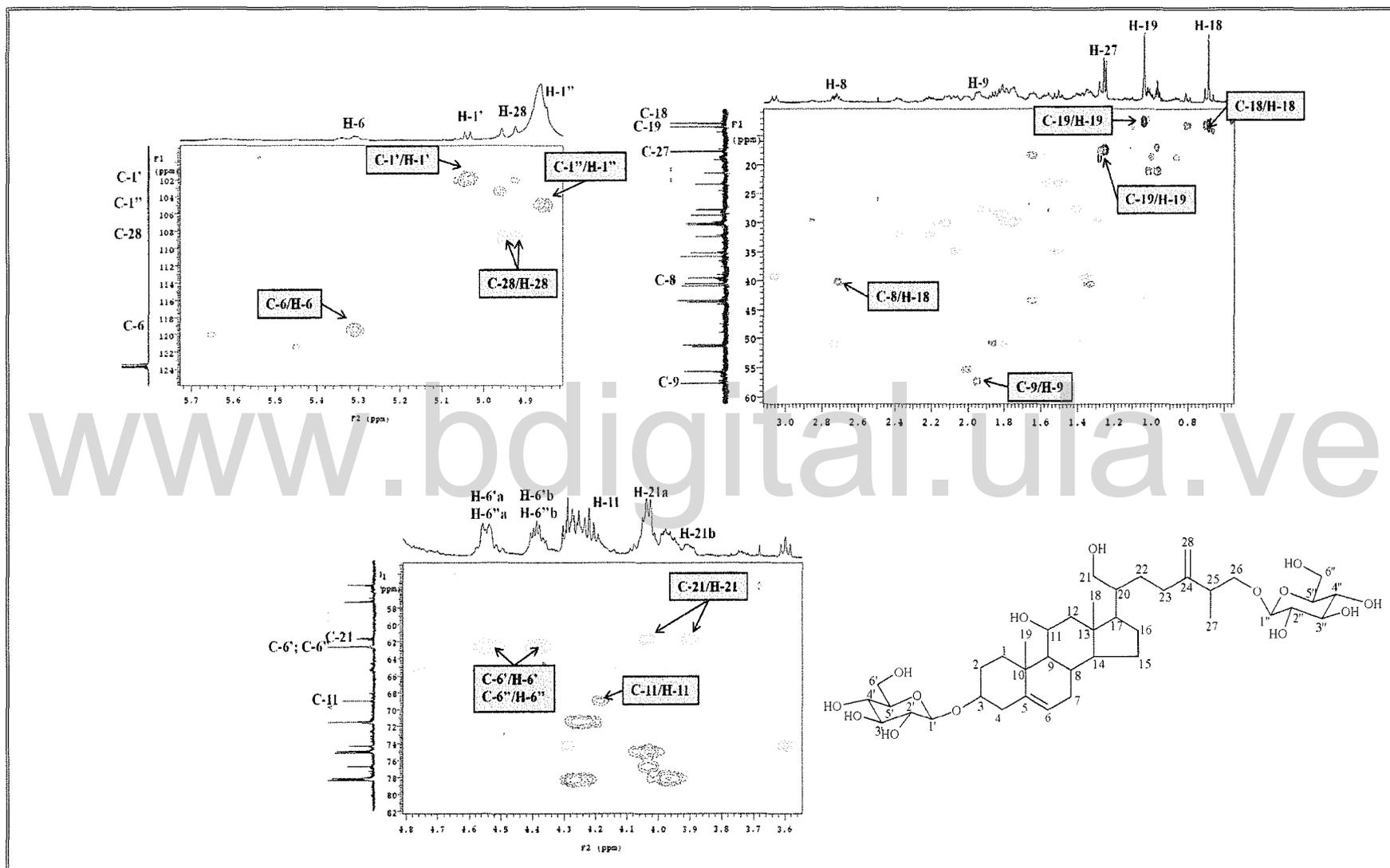


Figura 46.1. Amplificaciones del espectro HSQC (C_5D_5N) de [6].

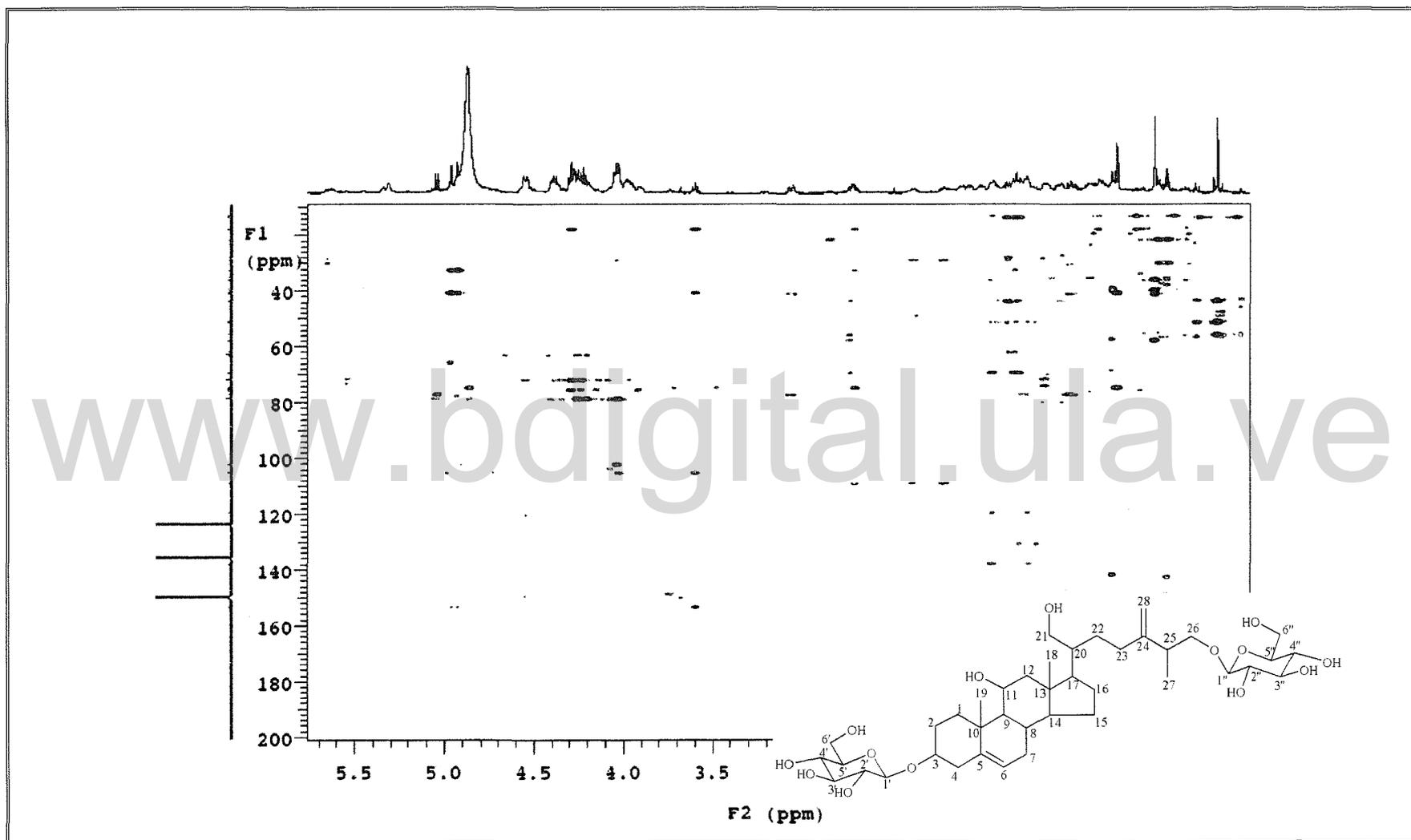


Figura 47. Espectro de HMBC (C₅D₅N) de [6].

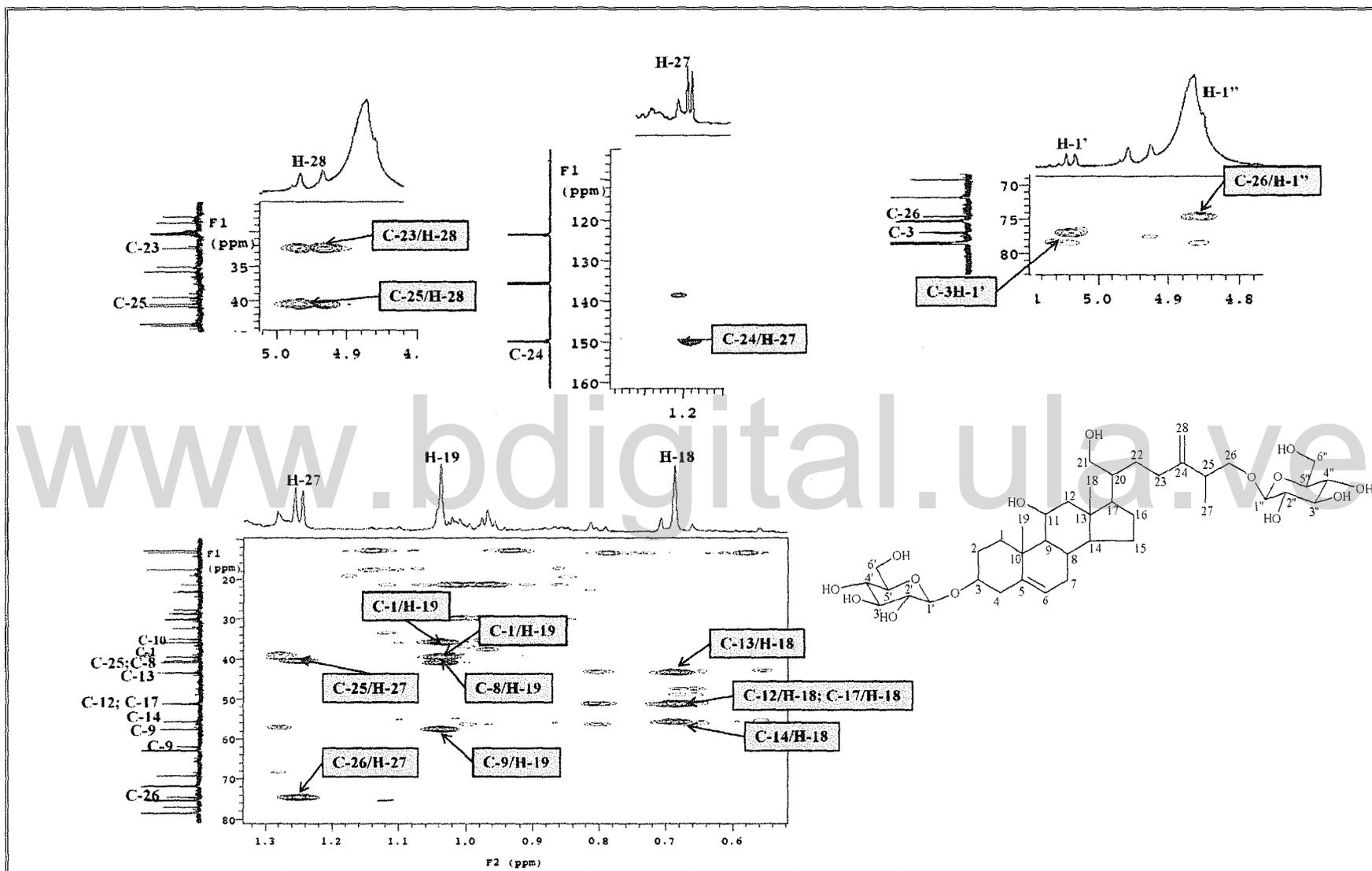
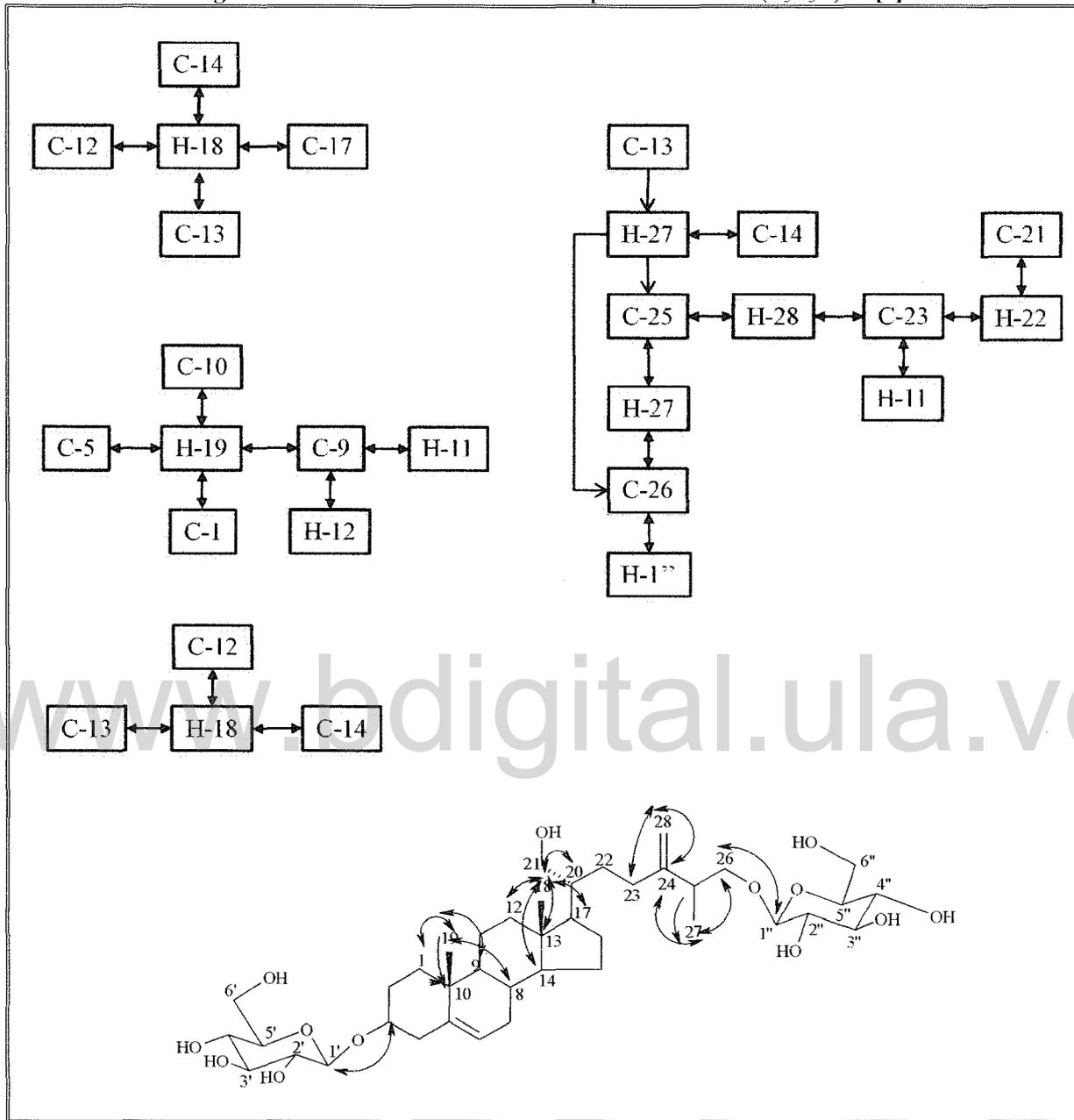


Figura 47.1. Ampliaciones del espectro de HMBC (C_5D_5N) de [6].

Diagrama 5. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en el espectro de HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [6].



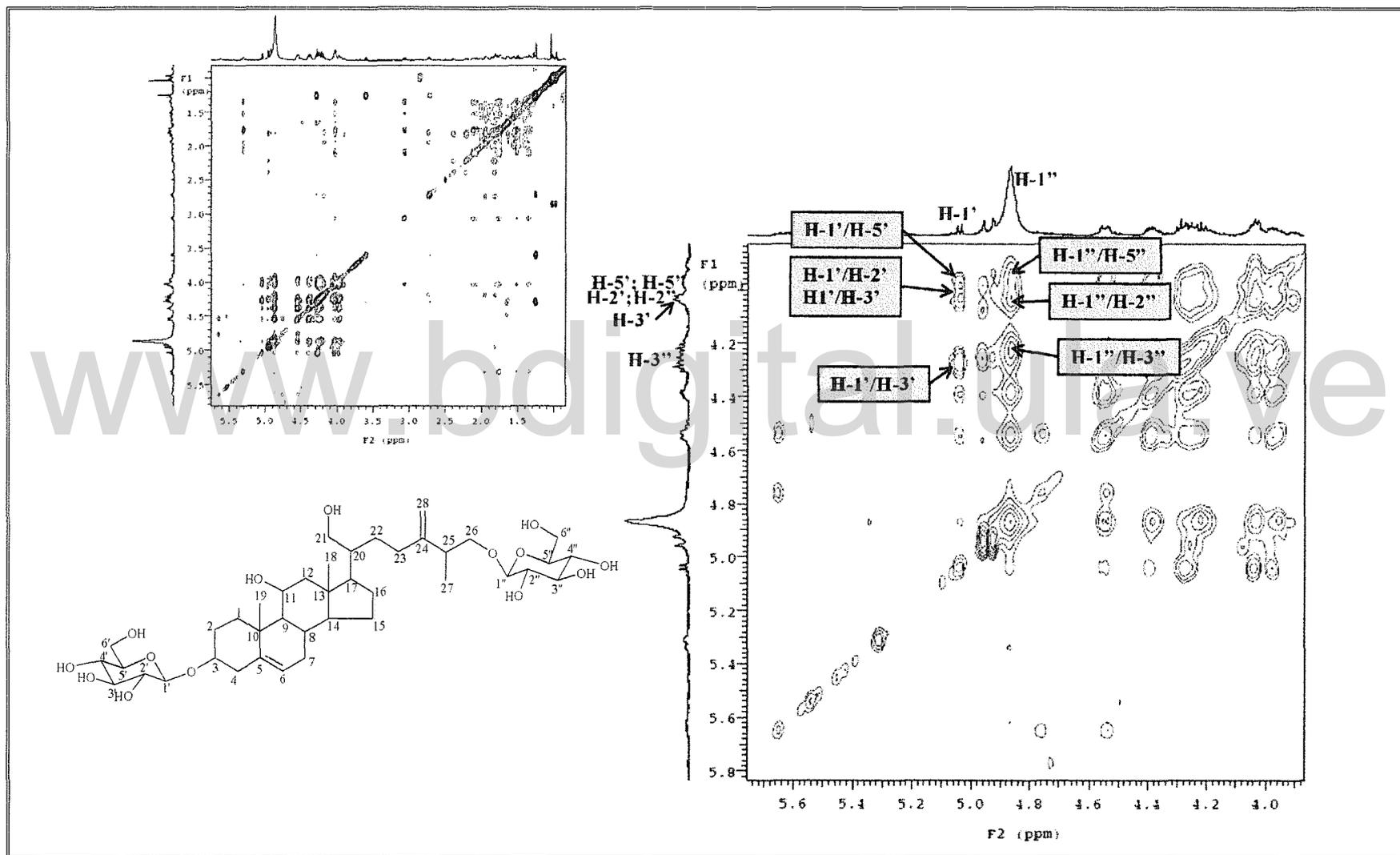


Figura 48. Espectro y ampliación de TOCSY (C_5D_5N) de [6].

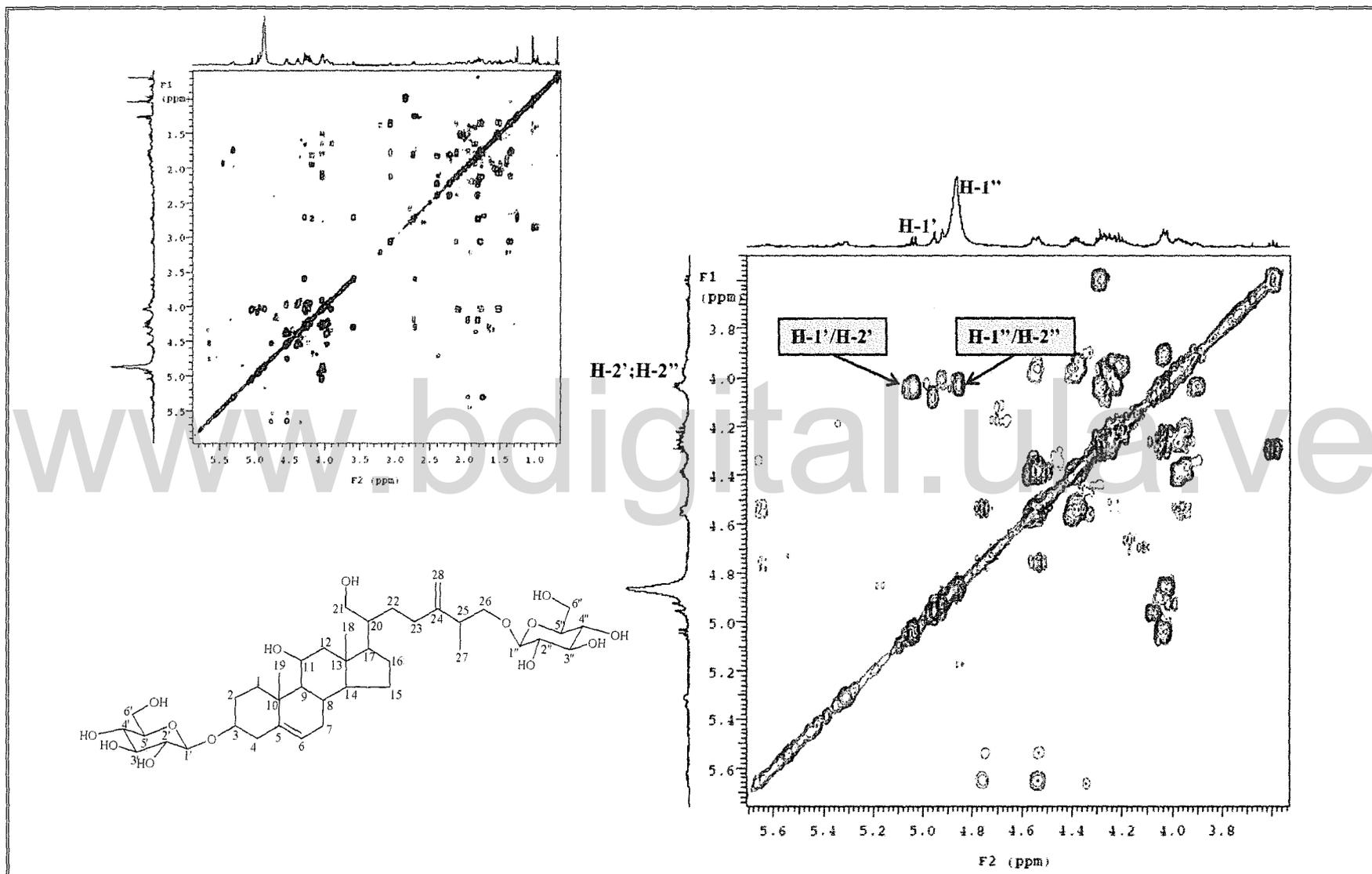


Figura 49. Espectro y ampliación de ^1H , ^1H -COSY($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [6].

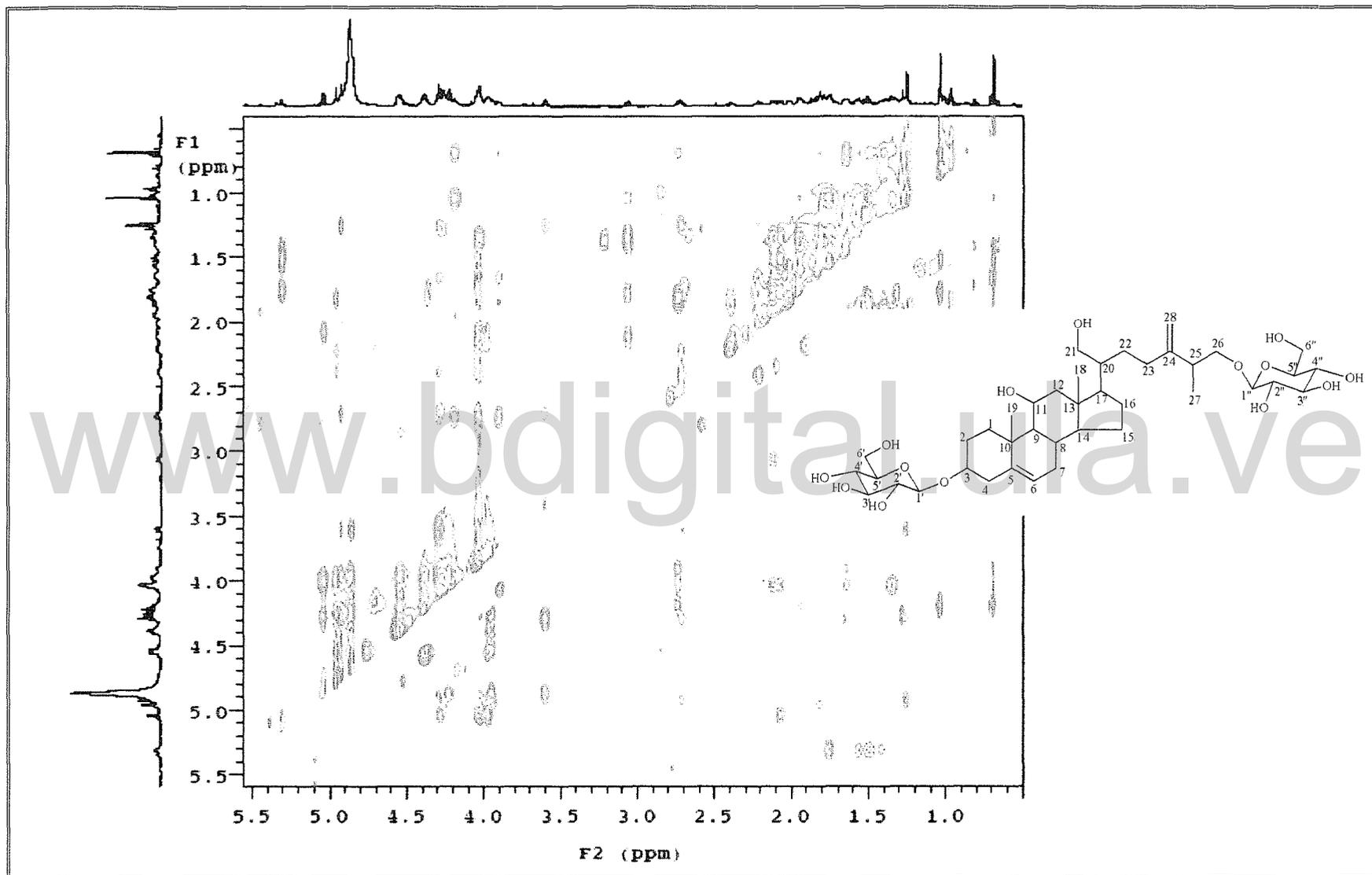


Figura 50. Espectro de ROESY (C_5D_5N) de [6].

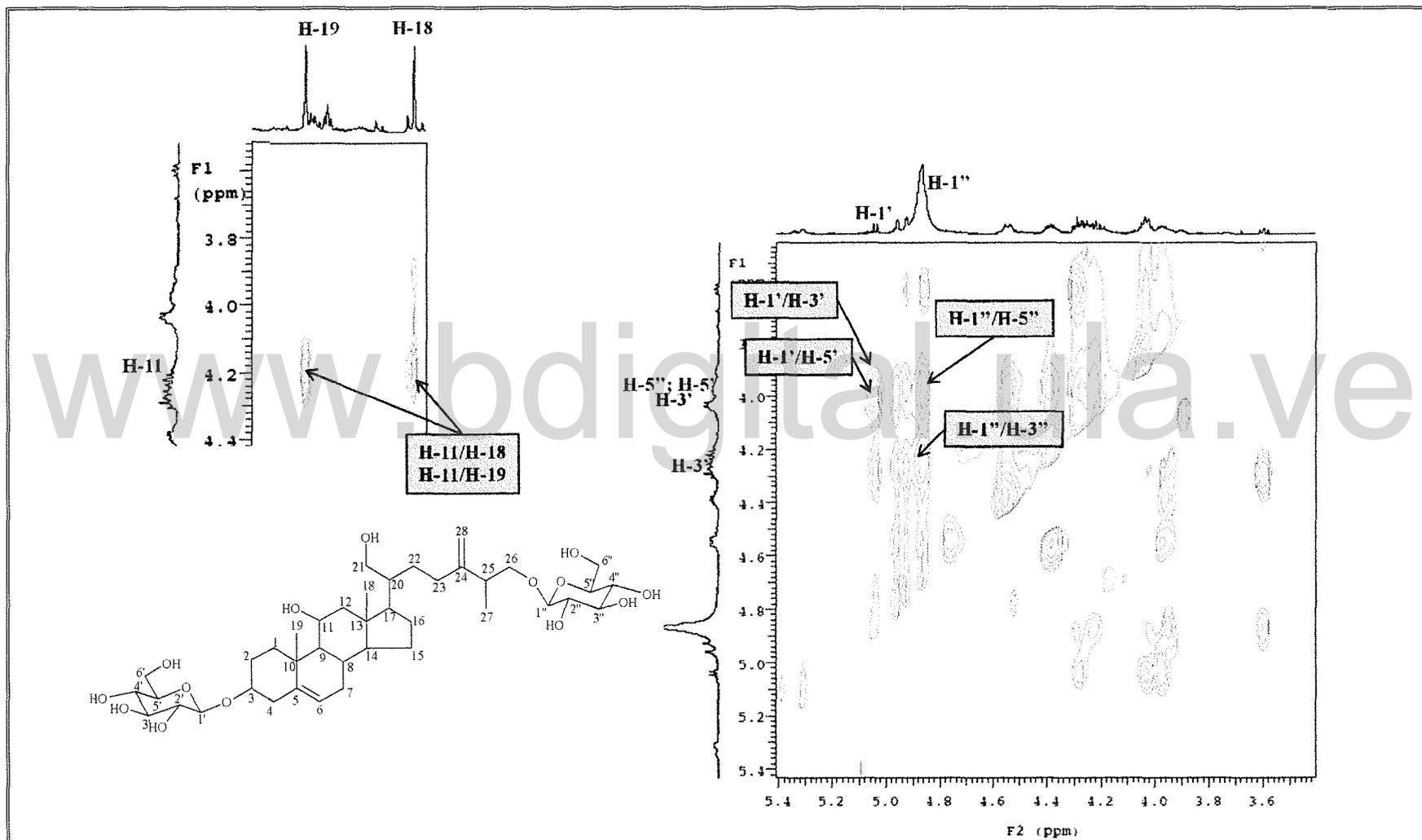


Figura 50.1. Ampliaciones del espectro de ROESY (C_5D_5N) de [6].

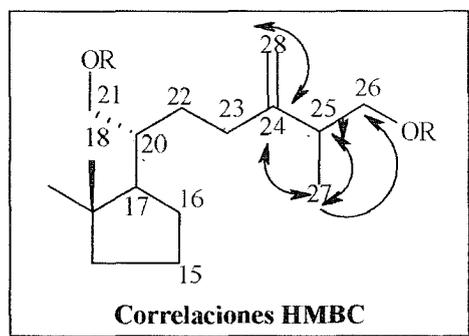
VI.2.1.c. 11 α -acetil-3 β -O-D- xilosil-23-O-D- ramnosil- ergosta- 5,24(28)- dieno-3 β , 11 α , 21, 26-tetrol [7]:

De la reunión BuBaSx12, del extracto de BuOH, que fueron cromatografiadas nuevamente por sephadex LH20 [MeOH: H₂O (1:1)], se aisló un sólido amorfo (1.7mg), el cual, en la placa cromatográfica de HPTLC revelada con *Kumarowsky*, proporcionó una mancha homogénea.

Su espectro de RMN-¹H (Figura 51, Tabla 22), es muy similar al compuesto anterior, la diferencia es que éste muestra cinco metilos, de los cuales, tres son singuletes [δ 1.02 (H-19); δ 0.62 (H-18) y δ 2.12 (H-25)] y dos son dobletes [δ 1.24 (H-21) y δ 1.64 (H-6'')], también se observan una serie de señales en la zona de metilos y metilenos entre δ 1.30 y δ 2.90, de igual forma resaltan las señales entre δ 4.15 y δ 4.60 que son típicas de protones unidos a grupos oxigenados u olefinicos, a campos bajos se observan señales a δ 5.60 (H-1'') y a δ 4.86 (H-1') que podrían ser protones anoméricos.

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 52, Tabla 23) no se aprecian las señales de los carbonos, ya que la muestra resultó ser poca cantidad (> 2 mg), sin embargo con el espectro de HSQC (Figuras 53 y 53.1) y con los valores reportados en la bibliografía (Kim *et al.*, 2003; Orsini *et al.*, 1991) fue posible determinar los desplazamientos químicos y que la estructura posee un total de cuarenta y dos carbonos.

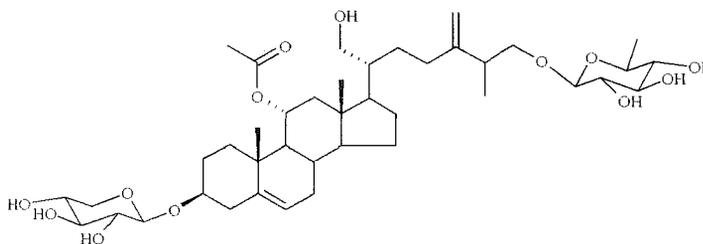
Con el espectro HMBC (Figura 54 y 54.1, Diagrama 6) se constató que el esqueleto del aglicón de [7] es nuevamente el ergostano, solo que con algunas pequeñas variaciones. Las diferencias se encuentran en la existencia de 2 átomos de carbono adicionales, los cuales, en el espectro de HMBC, (Figura 54 y 54.1) resaltan la correlación del carbono



a δ 173.0 (C-25), que se atribuye por su desplazamiento a un carbono carbonilo perteneciente a un grupo éster, con el metilo singulete a δ 2.12 (H-26) lo que indica la existencia de un grupo acetilo esterificando uno de los grupos alcohólicos de la molécula. Conjuntamente, en la cadena lateral se destaca que las correlaciones: el metilo doblete [δ 1.24 (H-27)] con los carbonos [(C-24) \leftrightarrow (H-27); (C-25) \leftrightarrow (H-27); (C-24) \leftrightarrow (H-26)],

donde (C-26) es un carbono oxigenado, (C-25) es un metino y (C-24) es un carbono cuaternario sp^2 coinciden con las del compuesto anterior. La observación en el experimento HMBC (Figura 54 y 54.1) de la interacción entre el carbono carbonilo ($1''''$) del grupo acetilo y el hidrógeno sobre (C-11) ubican a dicho grupo en la posición 11.

Con respecto a los azúcares, en el HSQC (Figura 53 y 53.1), se revelan los carbonos anoméricos con su respectivo protón [δ 105.2 (C-1'); δ 4.88 (H-1'); δ 99.3 (C-1''); δ 5.60 (H-1'')], por lo tanto, [7] posee por lo menos dos moléculas de azúcar en su estructura. En el espectro HMBC (Figura 54 y 54.1), se contemplan las correlaciones del metilo en [δ 1.64 (H-6'')] con los carbonos [(H-6'') \leftrightarrow (C-5''), (H-6'') \leftrightarrow (C-4'')], esto es evidencia de que dicho metilo forma parte de la estructura del azúcar, de hecho, con las correlaciones observadas en el TOCSY (Figura 55), $^1H, ^1H$ -COSY (Figura 56) y ROESY (Figura 57) del metilo y del protón anomérico y con los valores reportados en la bibliografía (Mitaine *et al.*, 2006), se logró verificar que es la ramnosa. De igual forma, se elucidó la segunda molécula de azúcar, partiendo del protón anomérico [δ 4.86 (H-1')] y con las correlaciones observadas en los espectros HMBC (Figura 54 y 54.2), TOCSY (Figura 55), $^1H, ^1H$ -COSY (Figura 56) y ROESY (Figura 57) se determinó que es la xilosa. De la misma manera, para la ubicación de la ramnosa y la xilosa, se recurre al HMBC (Figura 54.1) donde se observa la correlación de los carbonos anoméricos [(C-1') \leftrightarrow (H-3) y (C-1'') \leftrightarrow (H-26)], esto señala que la xilosa está unida a través de (C-3) y la ramnosa en (C-26). La estereoquímica es igual a la del compuesto anterior. Con todos estos datos, se corroboró que la estructura de [7] es 11 α -acetil-23-O-D-ramnosil-3 β -O-D-xilosilergosta-5,24(28)-dieno-3 β ,11 α ,21,26-tetrol [7].



[7]

Al igual que [6], hasta ahora, este producto no ha sido reportado anteriormente, siendo éste el primer reporte como producto natural

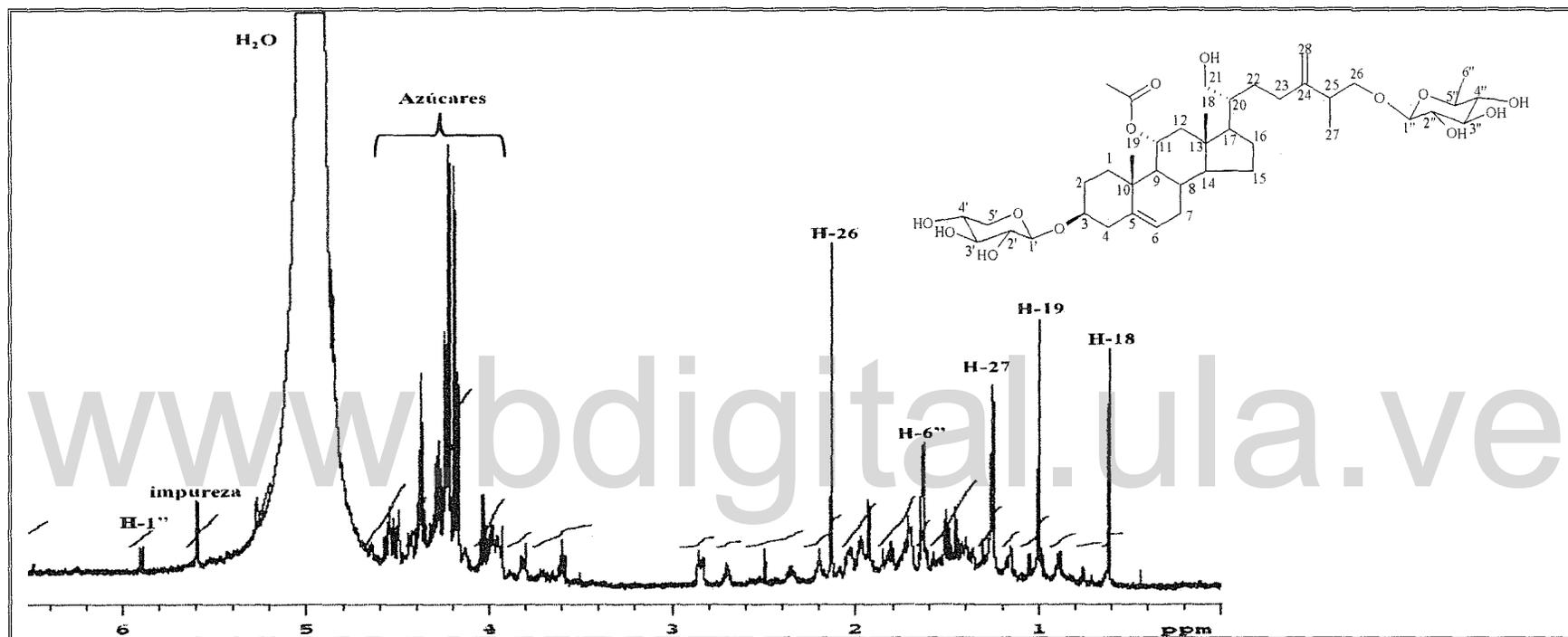


Figura 51. Espectro de RMN-¹H (C₅D₅N, 600MHz) de [7].

Tabla 22. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y contantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹H de [7].

H	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	14	15	
δ (ppm)	3.60 ; 1.16	2.02 ; 1.43	4.10	1.45 ; 1.16	5.27	1.40 ; 1.31	1.64	1.94	4.50	2.83 ; 1.72	1.98	nd*	
J (Hz), m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	
H	16	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	28	1'''
δ (ppm)	1.92 ; 1.73	1.57	0.62	1.02	nd*	4.53 ; 4.38	1.82 ; nd*	2.39, 2.22	1.36	3.60	1.24	4.92, 4.94	1.12
J (Hz), m	m	m	s	s	m	m	m	$g ; t$	m	t	d	s	
H	1'	2'	3'	4'	5'	1''	2''	3''	4''	5''	6''		
δ (ppm)	4.88	4.03	4.22	3.94	4.18 ; 4.23	5.60	4.22	4.30	4.28	4.27	1.64		
J (Hz), m	d	m	m	m	m	d	m	m	m	m	d		

*nd: no determinada por sobre posición de señales; (sl) solapada

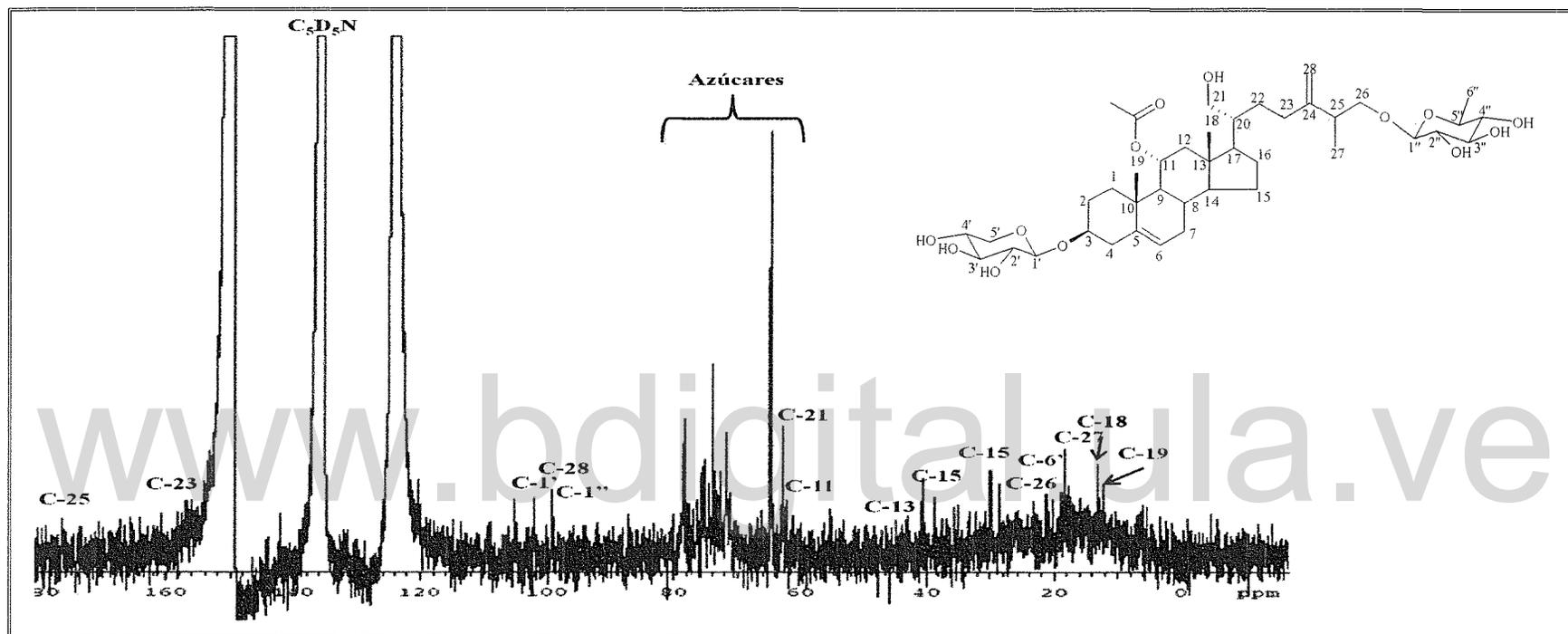


Figura 52. Espectro de RMN-¹³C (C₅D₅N, 150 MHz) de [7].

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [7].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
δ (ppm)	39.4	32.7	78.1	38.2	135.7	120.2	28.5	35.0	54.9	35.6	73.0	55.0	43.1		
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CHO-	-CH ₂ -	=C<	=CH<	-CH ₂ -	>CH-	>CH-	>C<	-CHO-	-CH ₂ -	>C<		
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
δ (ppm)	52.0	23.2	28.5	45.0	13.1	12.3	45.9	62.3	27.9	32.3	153.0	40.1	74.5	17.6	109.0
J (Hz), m	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CH-	-CH ₃	-CH ₃	>CH-	CH ₂ O-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	=C<	>CH-	CHO-	-CH ₃	=CH ₂
C	1'''	2'''	1'	2'	3'	4'	5'	1''	2''	3''	4''	5''	6''		
δ (ppm)	21.3	173.0	105.2	75.1	78.1	70.9	64.7	99.3	71.7	72.8	73.9	71.9	18.4		
Tipo	-CH ₃	>C=O	OCHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CH ₂ O-	-OCHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CHO-	-CH ₃	

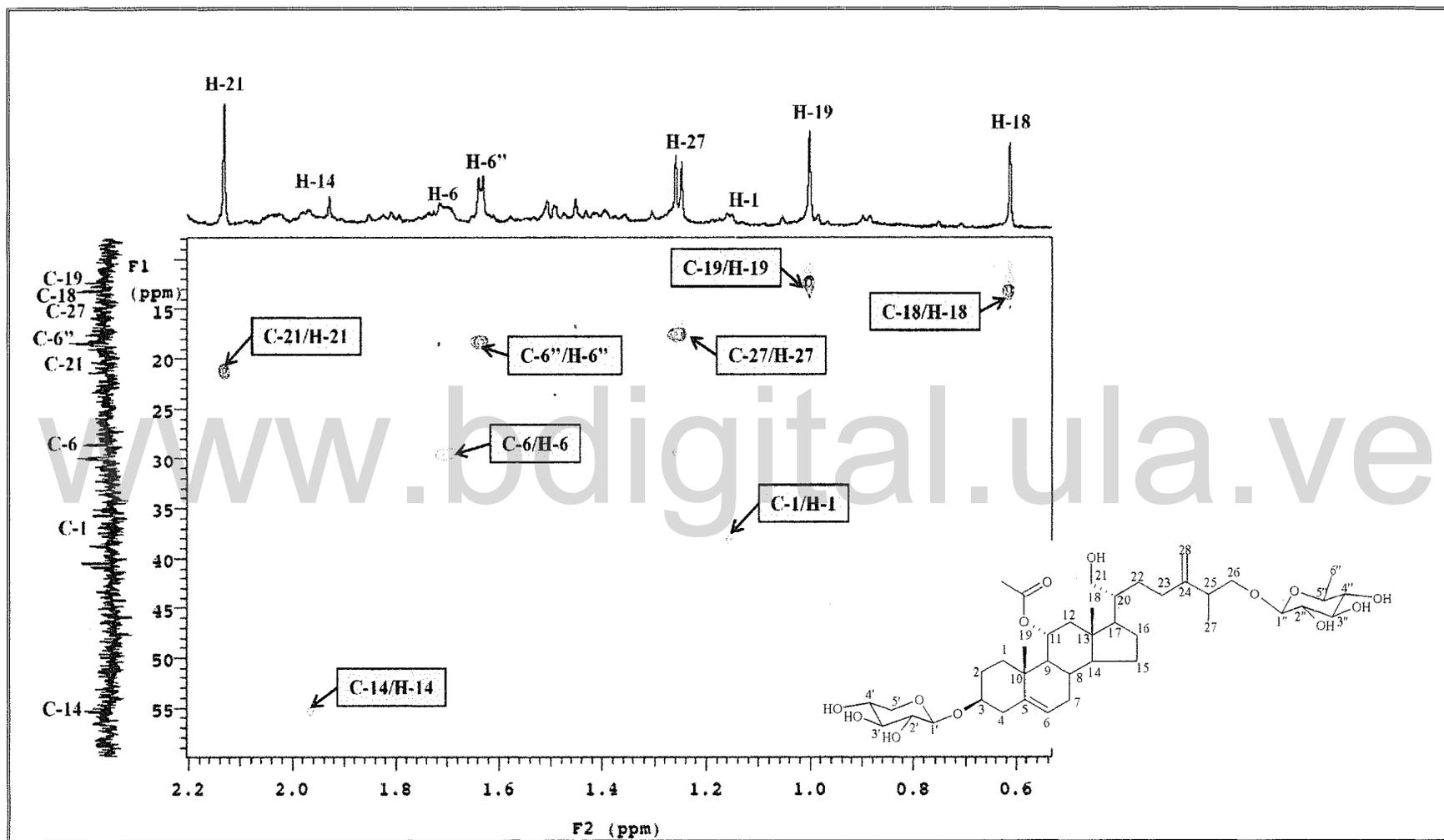


Figura 53. Ampliación del espectro HSQC (C_5D_5N) de [7].

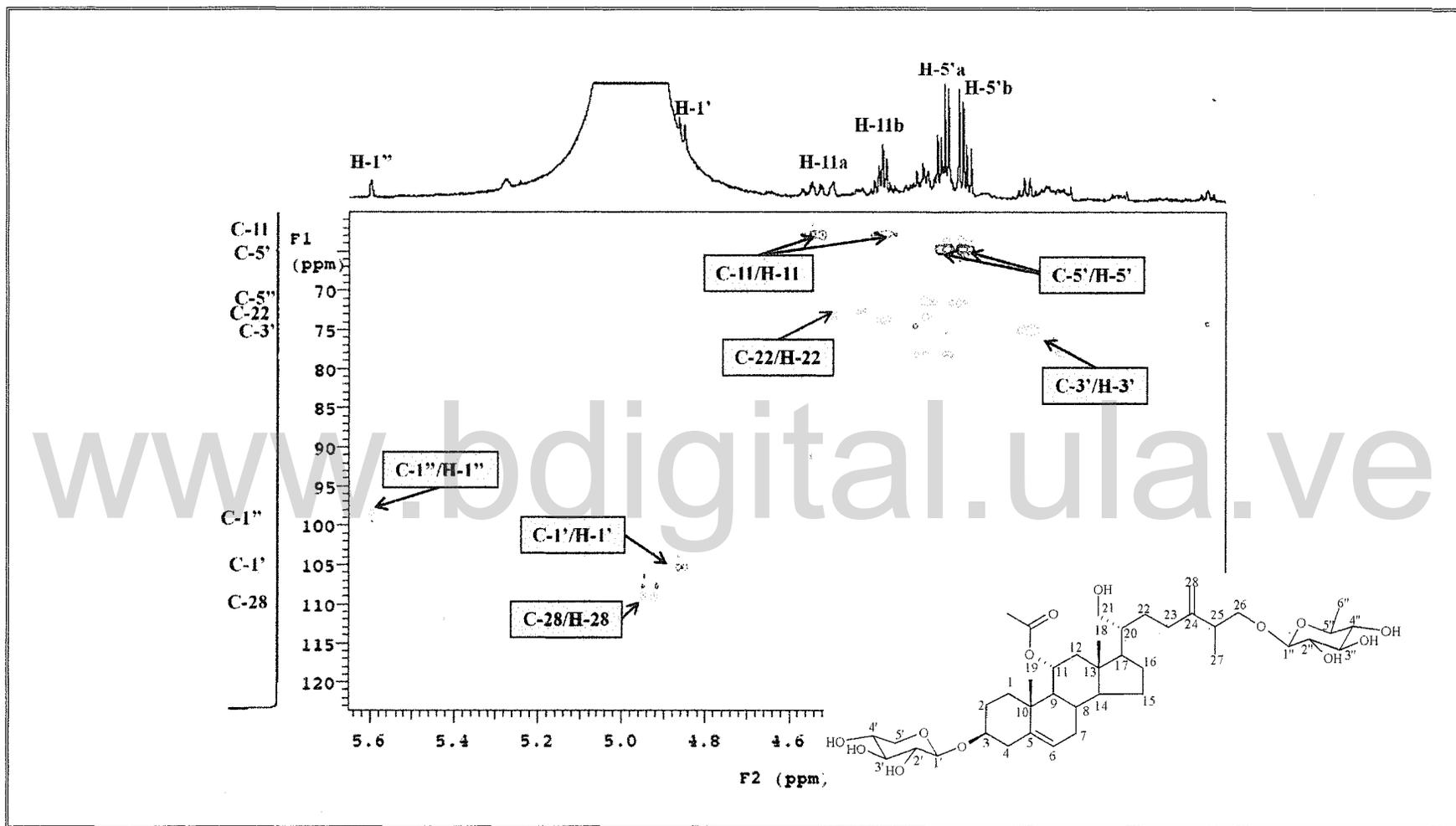


Figura 53.1. Ampliación del espectro HSQC (C_5D_5N) de [7].

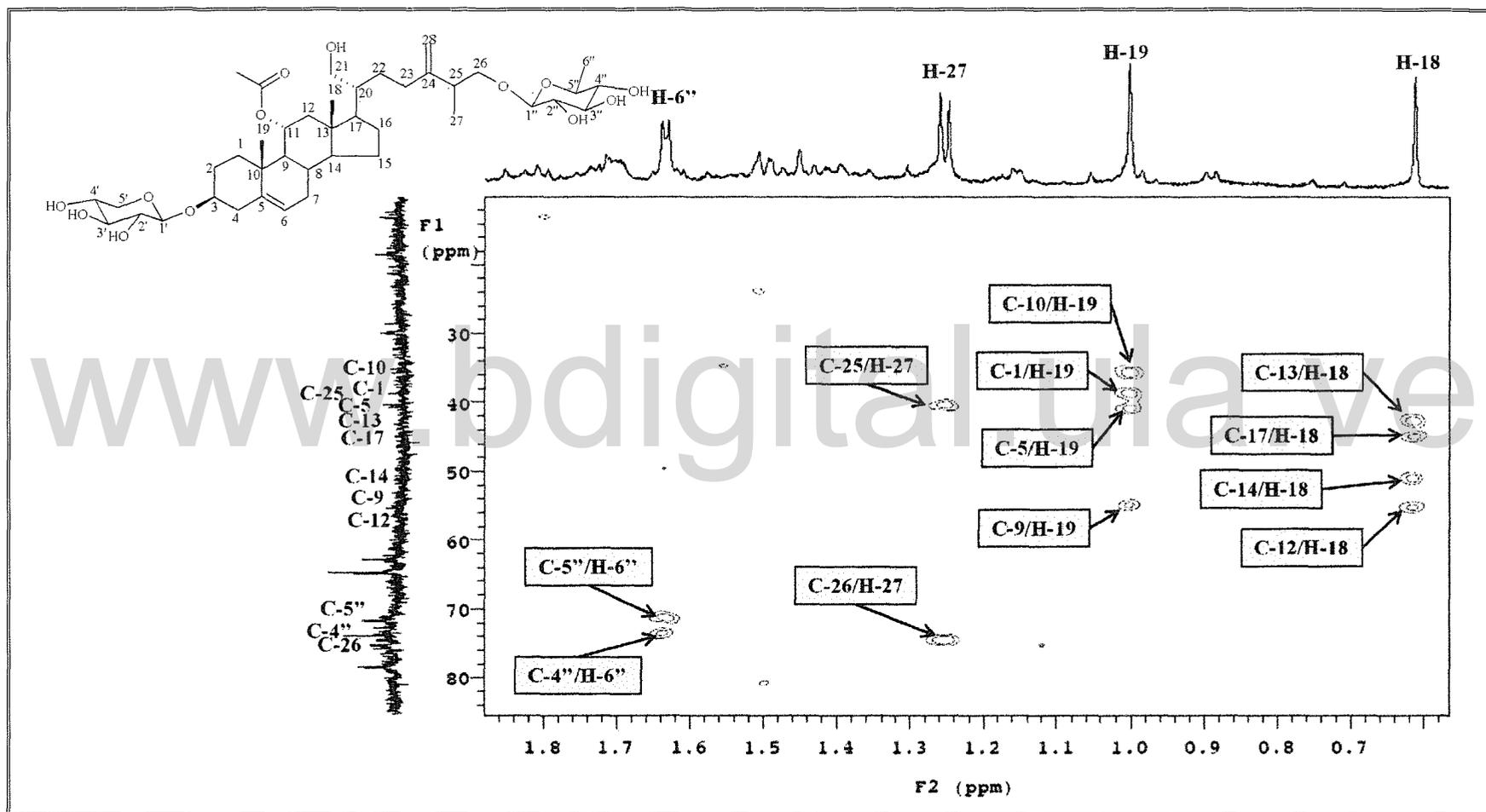


Figura 54. Ampliación del espectro HMBC (C_5D_5N) del [7].

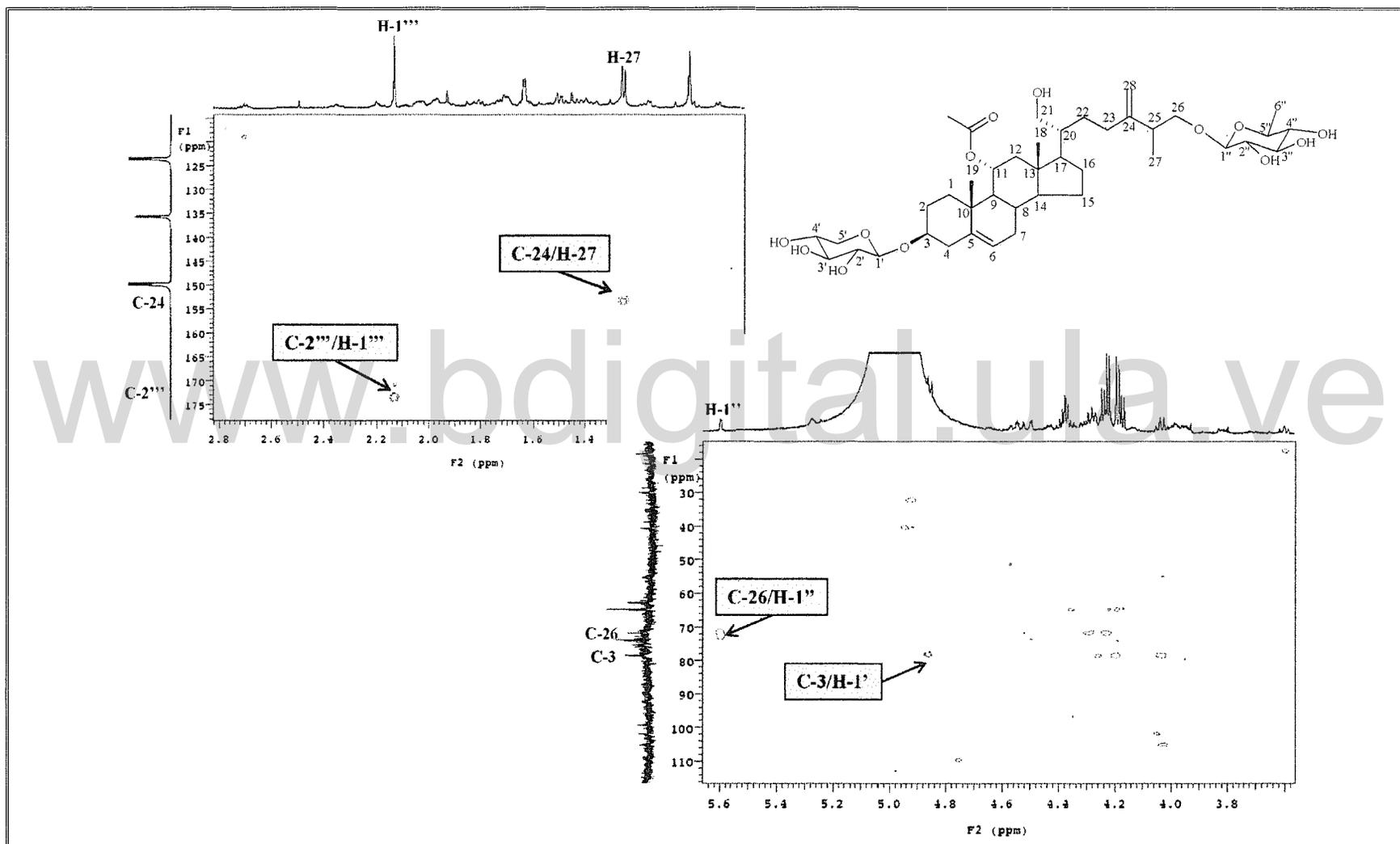
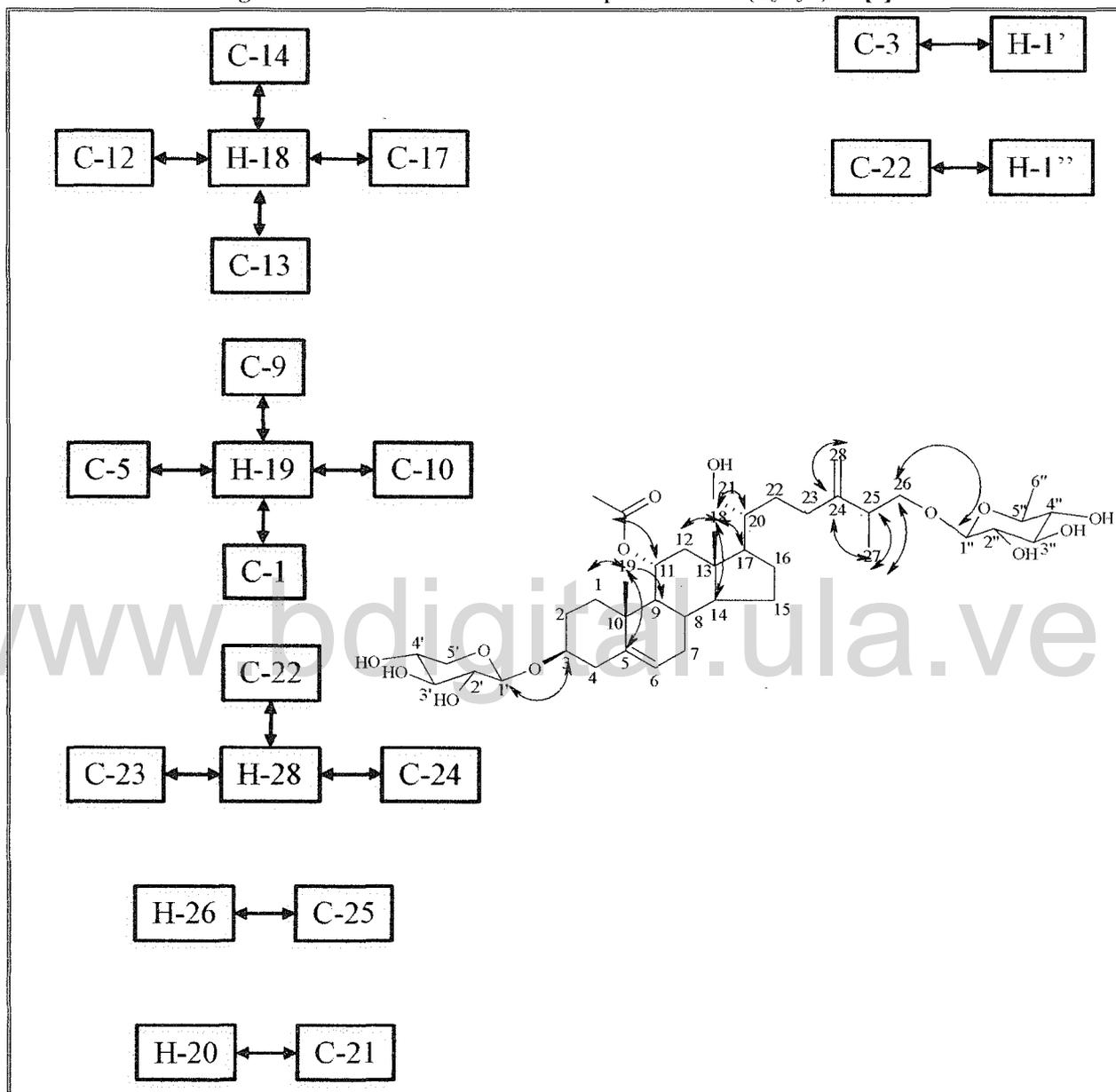


Figura 54.1. Amplificaciones del espectro HMBC (C_5D_5N) de [7].

Diagrama 6. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [7].



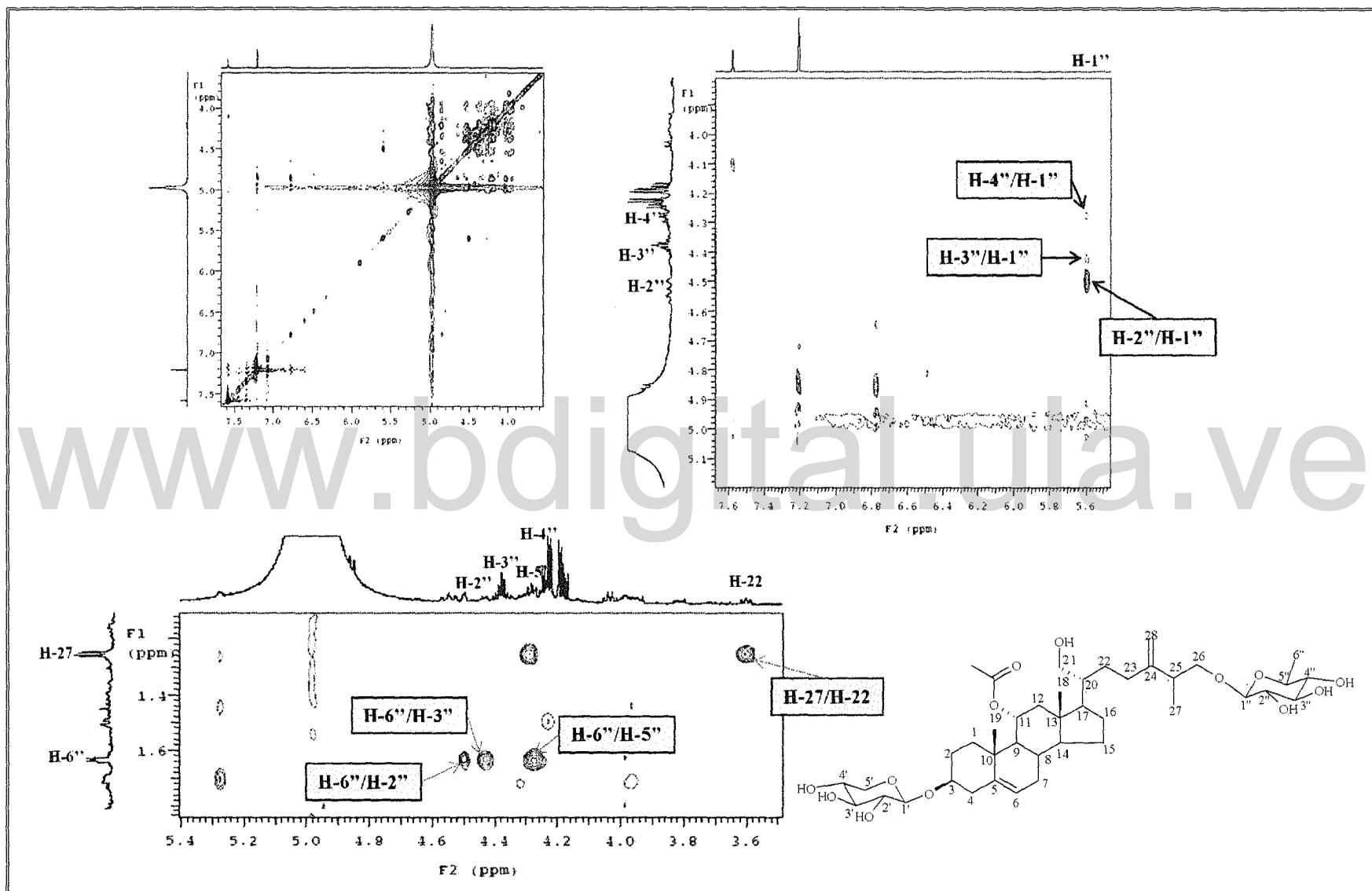


Figura 55. Espectro y ampliaciones del TOCSY (C_5D_5N) de [7].

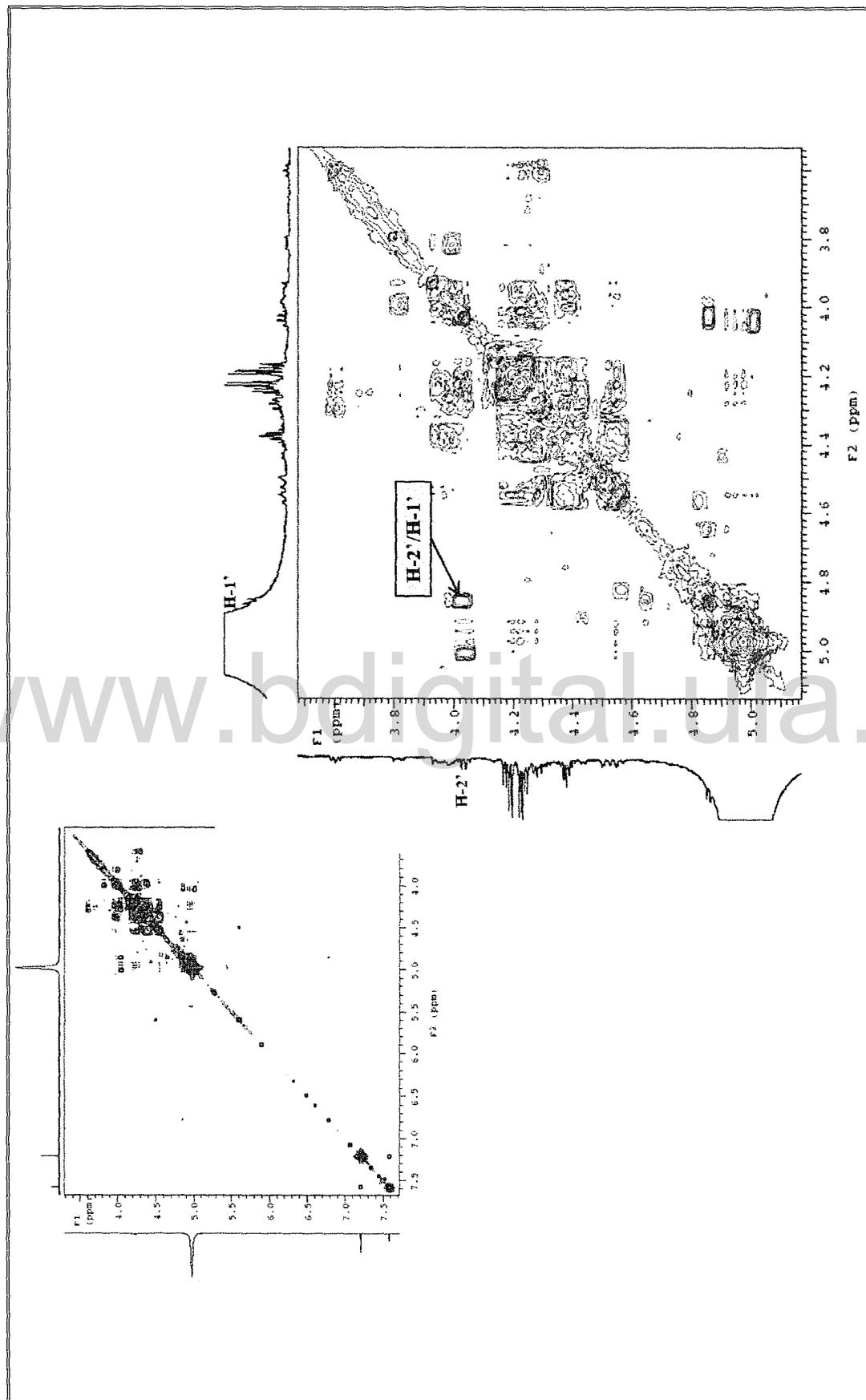


Figura 56. Espectro y ampliación de ^1H -COSY ($\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$) de [7].

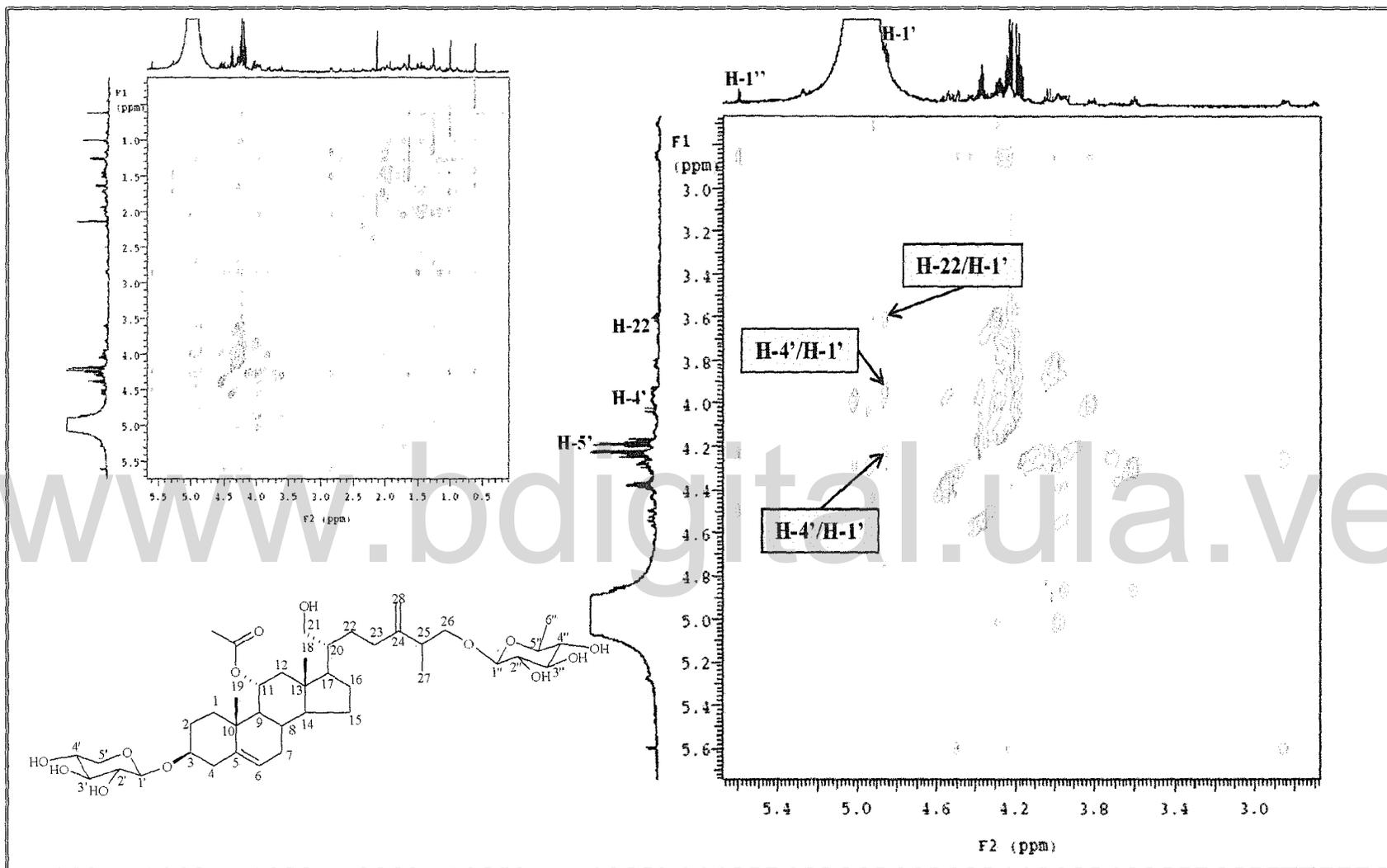
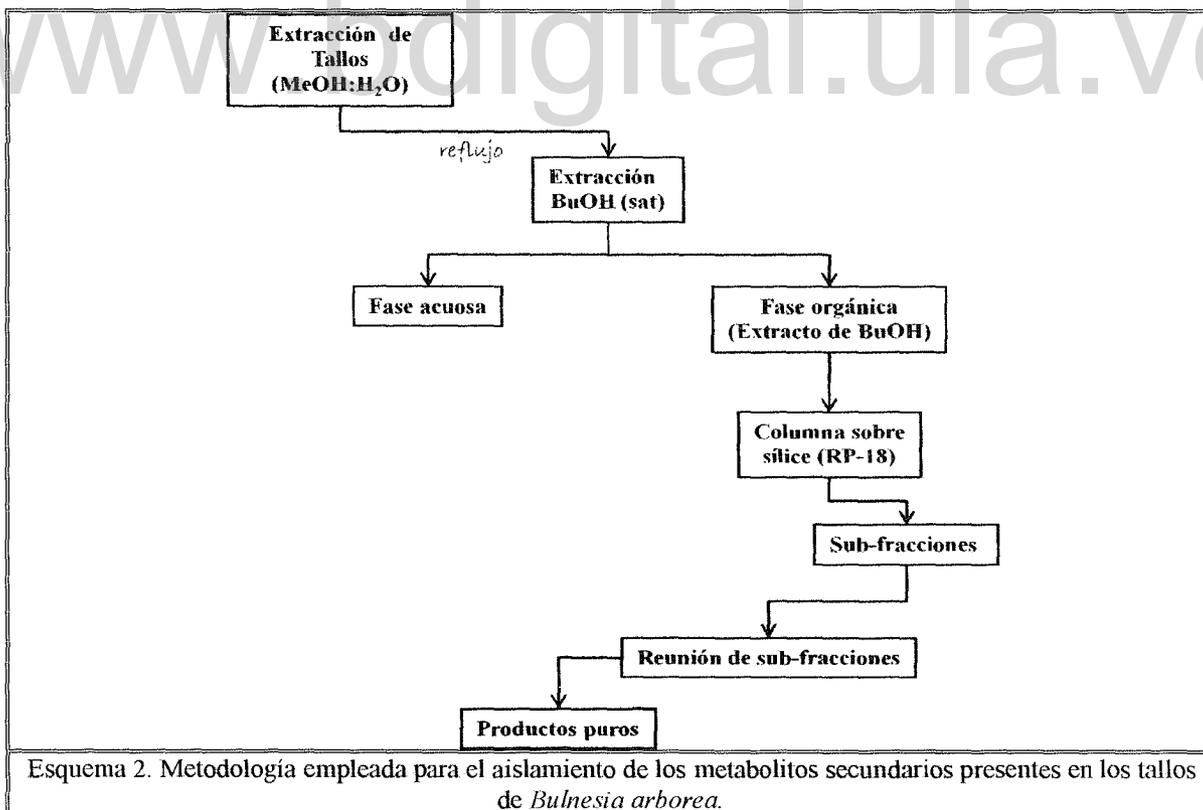


Figura 57. Espectro y ampliación de ROESY (C_5D_5N) de [7]

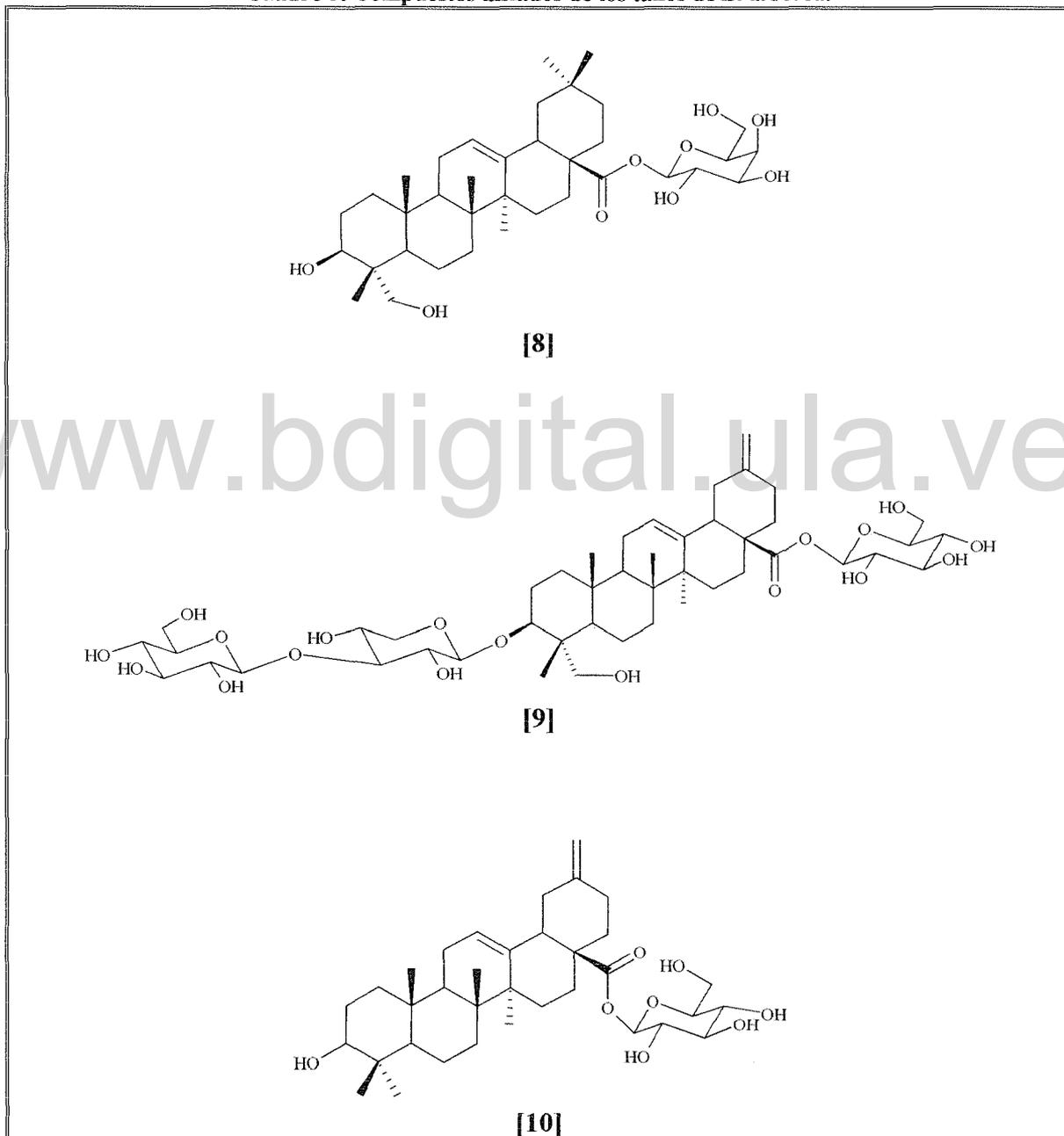
VI.2.2.- Tallos.

La metodología empleada para el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en *Bulnesia arborea* fue dirigida hacia la obtención de saponinas (Haddad *et al.*, 2004a, 2004b; Acharya *et al.*, 2008). Los tallos secos y molidos (250 g) de un ejemplar de *Bulnesia arborea*, fueron sometidos a una extracción en reflujo durante 1 hora, aproximadamente, en una mezcla 70:30 metanol/agua, para luego ser filtrado y evaporado al vacío, utilizando un rotavapor, a una temperatura no mayor de 40 °C. El residuo, fue extraído con *n*-butanol (BuOH) saturado con agua, obteniendo 10,3 gramos de extracto butanólico (Haddad *et al.*, 2004). Alrededor de 200 miligramos del extracto fue pre-absorbido sobre sílica gel de fase reversa (RP-18) utilizando como eluyentes [(MeOH):(H₂O)] en proporciones [(40:60); (50:50); (60:40); (70:30); (80:20); (90:10); (100:0)] (Esquema 2). Todas las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (TLC) y utilizando como revelador para saponinas, *Kumarowsky* (2% de 4-hidroxibenzaldehído en MeOH y 50% de H₂SO₄).



Las reuniones de las fracciones, fueron nuevamente cromatografiadas, de la misma forma y utilizando el mismo sistema, de esta manera se consiguieron aislar tres nuevas saponinas triterpénicas: 3 β ,24-dihidroxiolean-12-en-28-oato de β -galactopiranosilo [8], 3-O-[β -xilosil(1 \rightarrow 3)glucopiranosil]-3 β ,24-dihidroxi-30-nor-olean-12,20(29)-dien-28-oato de β -glucopiranosilo. [9], 3 β ,24-dihidroxi-30-nor-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β -gluco-piranosilo [10]

Cuadro 3. Compuestos aislados de los tallos de *B. arborea*.

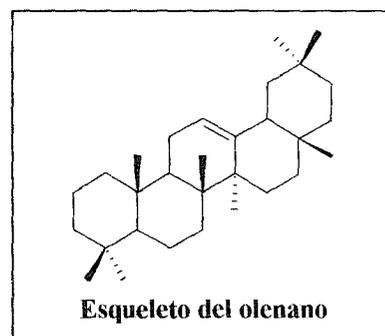


VI.2.2.a.- 3 β , 24-dihidroxiolean-12-en-28-oato de β -galactopiranosilo [8]:

Luego de varios procesos de aislamiento, como la cromatografía en fase reversa, empleando sílice RP-18, se aisló un sólido amorfo (4.5 mg) color blanco, su grado de pureza fue verificado con una placa de cromatografía HPTLC. Su espectro de RMN-¹³C (Figura 58, Tabla 24), revela que la molécula posee treinta y seis carbonos, como la metodología experimental empleada es específica para saponinas, es de pensar que se trata de un triterpeno con una molécula de azúcar y en efecto se logran diferenciar las señales del aglicón y del azúcar. En el DEPT-135 (Figura 59), se observan para el aglicón: seis metilos [δ 13.6 (C-23); δ 16.1 (C-24); δ 17.5 (C-26); δ 26.1 (C-27); δ 33.1 (C-29) y δ 23.3 (C-30)], once metilenos, de los cuales, uno de ellos se encuentra unido a un átomo de oxígeno [δ 62.2 (C-24)], cinco metinos, uno de ellos hibridizado sp² [δ 122.9 (C-12)] y otro oxigenado [δ 77.7 (C-3)] y ocho carbonos cuaternarios, siendo uno de estos un carbonilo [δ 176.4 (C-28)] y otro con hibridación sp² [δ 144.2 (C-13)]. Conjuntamente, se distinguieron las señales pertenecientes al azúcar, donde, el carbono anomérico se ubicó en δ 99.7 (C-1'), además de cuatro señales de metinos y un metileno oxigenados.

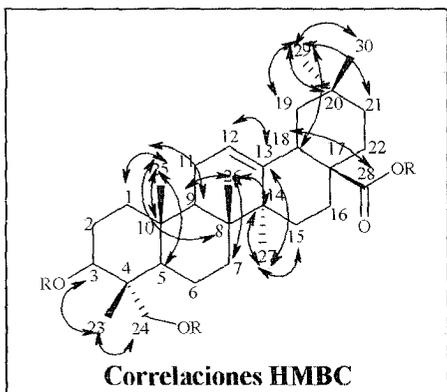
En el espectro de RMN-¹H (Figura 60, Tabla 25), a campo alto, surgen las señales correspondientes a los metilos como singuletes, donde, una de ellas integra para seis protones [δ 0.90 (H-23); (H-29)], las señales entre δ 1.50 y δ 3.50 corresponden a los metilenos y metinos, también, como ya se ha discutido anteriormente, se destacan el grupo de señales típicas de los protones del azúcar en aproximadamente δ 4.00 y δ 4.50. A campo un poco más bajo, resalta un doblete que integra para un hidrógeno [δ 6.29 (H-1')] que podría ser el protón anomérico del azúcar.

Con el espectro HSQC (Figura 61 y Figura 61.1), fue posible distinguir los protones referentes a cada carbono, allí se nota claramente que la señal del metilo en δ 0.90 corresponde a los carbonos δ 13.6 (C-23) y δ 23.6 (C-29) y que el carbono anomérico se encuentra en δ 95.7 (C-1'), entre otras señales. Con esta información y con ayuda a los valores reportados en la bibliografía (Haddad *et al.*, 2004) de los desplazamientos



químicos, se constató de que el esqueleto del aglicón es un triterpeno de la serie del oleanano.

Para verificar esta hipótesis, se recurre al espectro de HMBC (Figura 62, Diagrama 7) que a través de las correlaciones de los metilos [(H-29)↔(C-30); (H-29)↔(C-21);

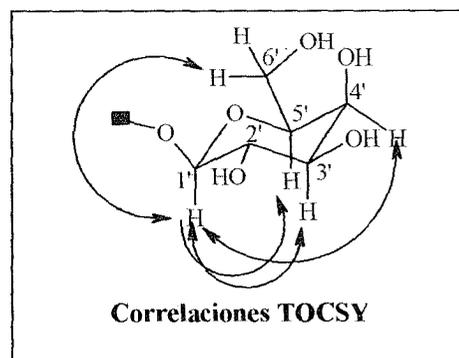


(H-29)↔(C-19), [(H-30)↔(C-29); (H-30)↔(C-18)], [(H-23)↔(C-24); (H-23)↔(C-3)], [(H-25)↔(C-5), (H-25)↔(C-10); (H-25)↔(C-1); (H-25)↔(C-9)], [(H-26)↔(C-9); (H-25)↔(C-7); (H-25)↔(C-14)] y [(H-27)↔(C-14); (H-27)↔(C-13); (H-27)↔(C-18); (H-27)↔(C-15)], queda confirmado el esqueleto. Además, algo que es bastante común en las saponinas triterpénicas de la serie del oleanano, es que el metilo

que se ubica en la posición 28, sufra un proceso de oxidación a un grupo carboxilo, como es el caso de **[8]**, esto se corrobora con la correlación [(C-28)↔(H-18)]. Una variación en el esqueleto del aglicón de **[8]**, es que en la posición 24, que por lo general sitúa un metilo, en este caso, se halla es un metileno oxigenado, con la correlación [(H-23)↔(C-24)], se comprobó, que dicho metilo posiblemente sufrió también un proceso de oxidación. La olefina se confirmó que está entre las posiciones 12 y 13, como era de esperarse, con las correlaciones [(H-27)↔(C-13)↔(H-12)].

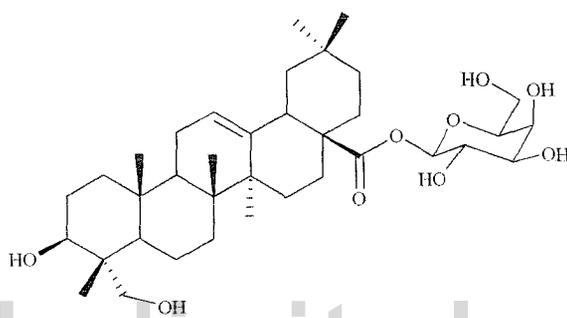
Como ya se ha venido, discutiendo en los compuestos anteriores, para la identificación del azúcar, se hace por razón de las correlaciones dadas del protón anomérico en los espectros TOCSY (Figura 63), ¹H,¹H-COSY (Figura 64), ROESY (Figura 65) y con los valores reportados en la bibliografía.

En el espectro TOCSY (Figura 63) se observan las correlaciones [(H-1')↔(H-2'); (H-1')↔(H-3'), (H-1')↔(H-4'); (H-1')↔(H-5); (H-1')↔(H-6)], en el ¹H,¹H-COSY [(H-1')↔(H-2')] y en el ROESY (Figura 65) [(H-1')↔(H-5'); (H-1')↔(H-4)], con esta indagación se reconoce que es la galactosa (Maillard *et al.*, 1989).



Igualmente, para la ubicación de la galactosa, en el esqueleto del oleanano, se ubica en el espectro HMBC (Figura 62), la correlación del carbonilo [δ 176.4 (C-28)] con el protón anomérico [δ 6.29 (H-1')], es decir, que está unida al grupo acilo.

De esta forma queda establecida la estructura de **[8]** como 3 β ,24-dihidroiolean-12-en-28-oato de β -galactopiranosilo, aunque pareciera ser una saponina triterpénica bastante común, es la primera vez que se aísla el conocido ácido oleanólico con una galactosa esterificando el carbonilo 28, por lo que éste sería el primer reporte como producto natural.



www.bdigital.ula.ve

Algunos estudios de estructuras similares a esta, como la 3-*O*- β -D-glucuronopiranosil-6'-*O*-metilhederagenina, reportan que tiene una actividad inhibitoria hacia la lipasa pancreática (Fang *et al.*, 2011) que también ha sido aislada en varias especies como *Kalopanax septemlobum* (Panov *et al.*, 2006), entre otros.

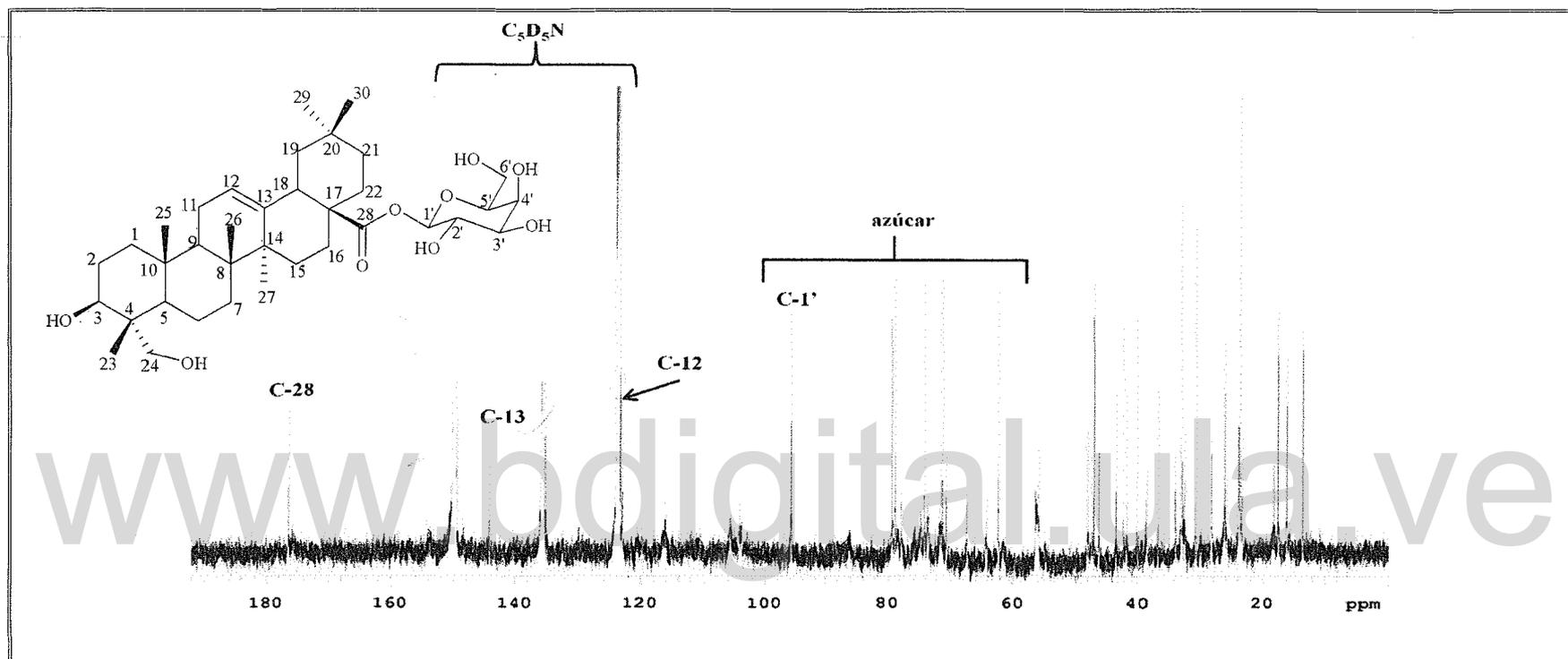


Figura 58. Espectro de RMN- ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150 MHz) de [8].

Tabla 24. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^{13}C de [8].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\delta(\text{ppm})$	37.0	23.8	77.7	47.3	53.3	18.2	32.8	38.6	48.0	36.8	25.8	122.9
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CHO-	>C<	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	>C<	-CH ₂ -	=CH-
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$\delta(\text{ppm})$	144.2	39.9	28.2	23.4	42.1	46.1	43.3	30.7	34.0	32.5	13.6	64.2
J(Hz), m	=C<	>C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH<	-CH ₂ -	>C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₃	-CH ₂ O-
C	25	26	27	28	29	30	1'	2'	3'	4'	5'	6'
$\delta(\text{ppm})$	16.1	17.5	26.1	176.4	33.1	23.6	97.7	74.1	78.8	71.1	79.2	62.2
Tipo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	>C=O	-CH ₃	-CH ₃	-OCHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-

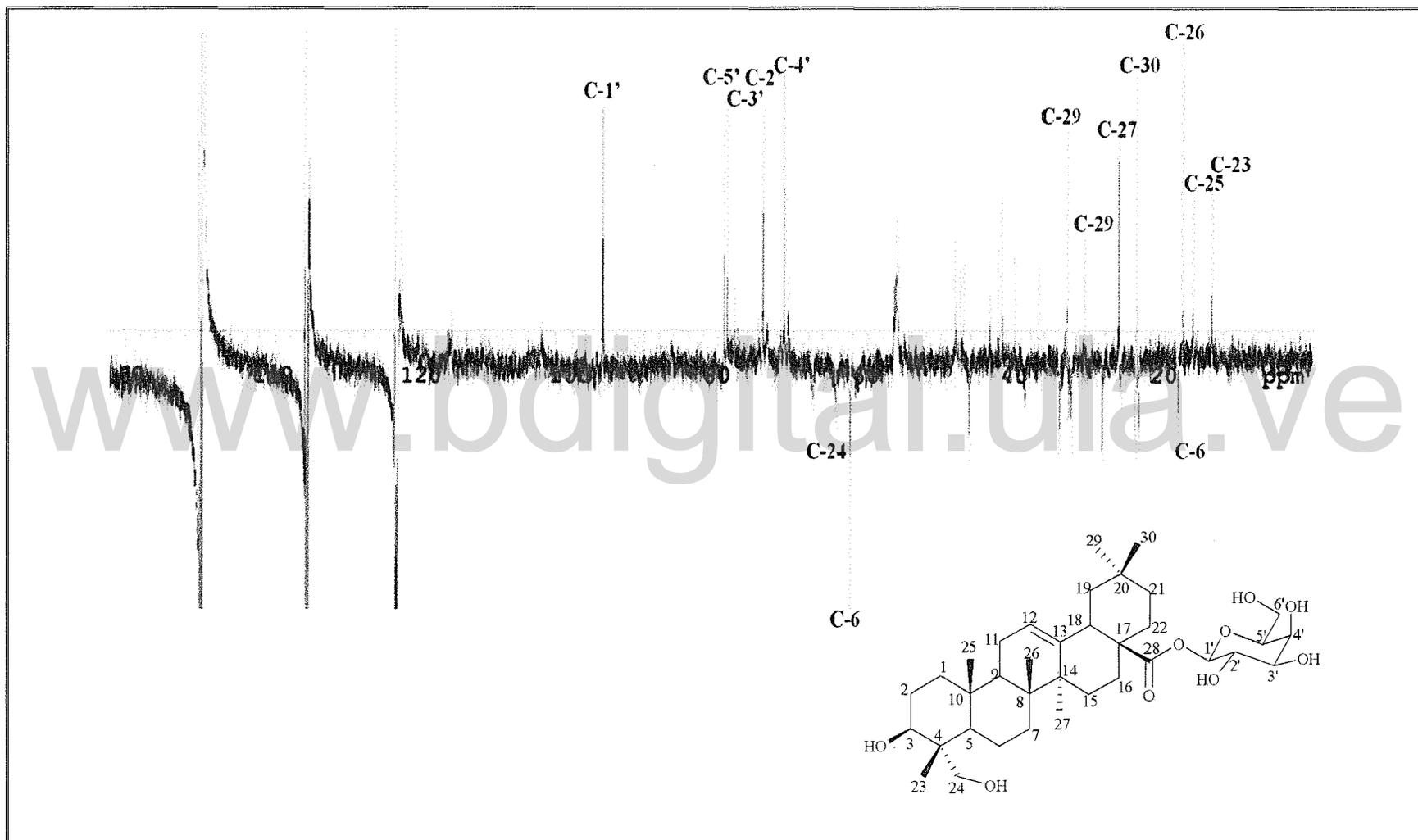


Figura 59. Espectro de RMN- ^{13}C /DEPT-135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [8].

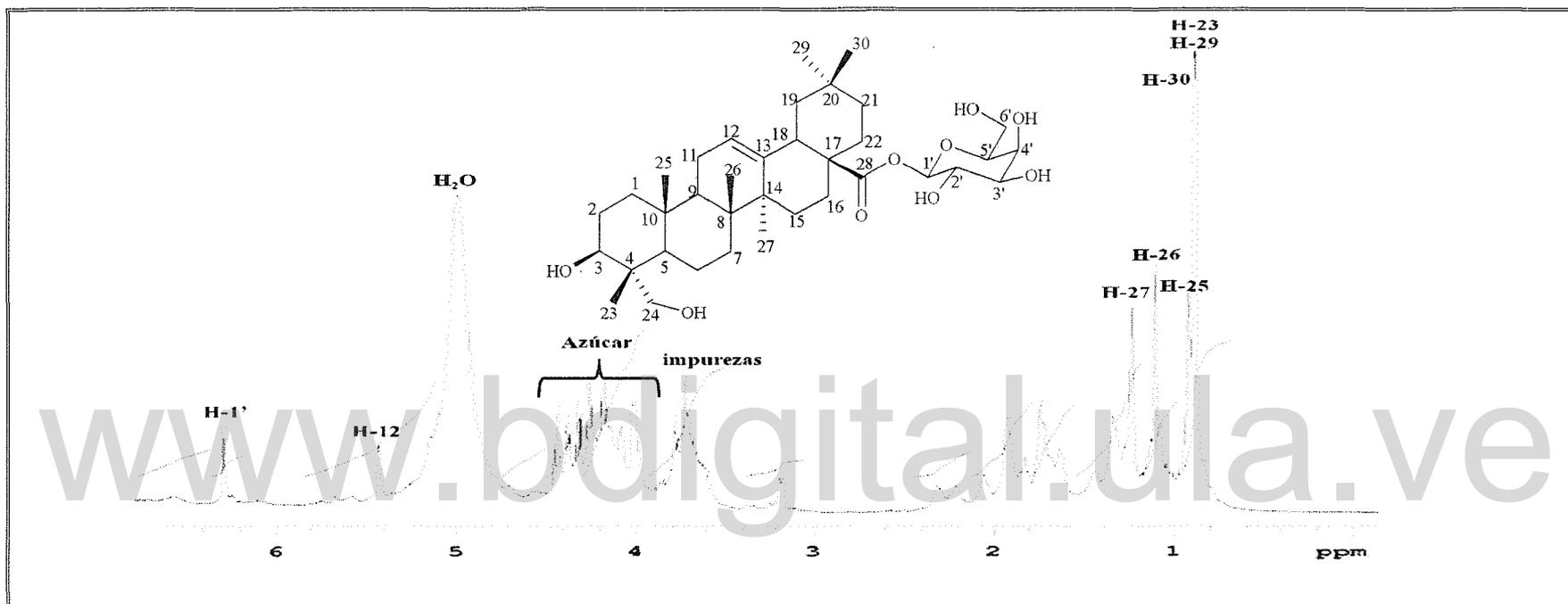


Figura 60. Espectro de RMN-¹H (C₃D₃N, 600 MHz) de [8].

Tabla 25. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidades (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹H de [8].

H	1	2	3	5	6	7	9	11	12	15
δ (ppm)	0.78 ; 1.34	1.84 ; 2.20	4.08	1.26	nd ^{a)}	1.42 ; 1.50	1.18	nd ^{a)}	5.43	nd ^{a)}
J (Hz), m	$b)$	$b)$	$b)$	$b)$	$b)$	$b)$	$b)$	$b)$	s	-
H	16	18	19	21	22	23	24	25	26	27
δ (ppm)	1.45; 1.55	3.20	nd ^{a)}	1.64, 1.12	nd ^{a)}	0.90	4.20; 4.62	0.94	1.10	1.24
J (Hz), m	$b)$	9.7, d	$b)$	$b)$	$b)$	s	$b)$	s	s	s
H	29	30	1'	2'	3'	4'	5'		6'	
δ (ppm)	0.90	0.91	6.29	4.18	4.26	4.32	4.02		4.44; 4.38	
J (Hz), m	s	s	d	t	t	t	dd		dd, td	

^{a)} no determinada, $b)$ por el solapamiento con otras señales fueron reportadas sin su multiplicidad designada.

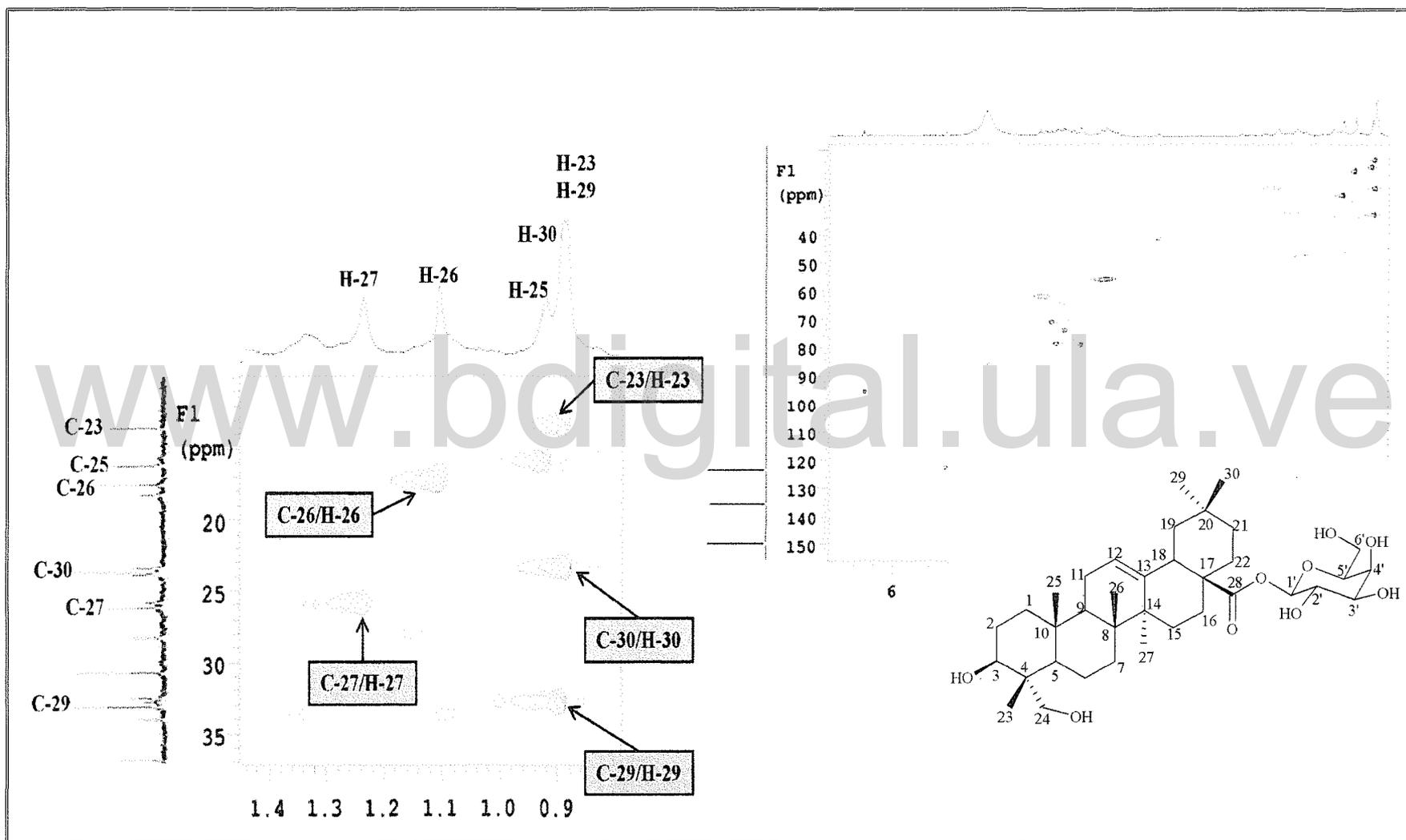


Figura 61. Espectro y ampliación de HSQC (C_5D_5N) de [8].

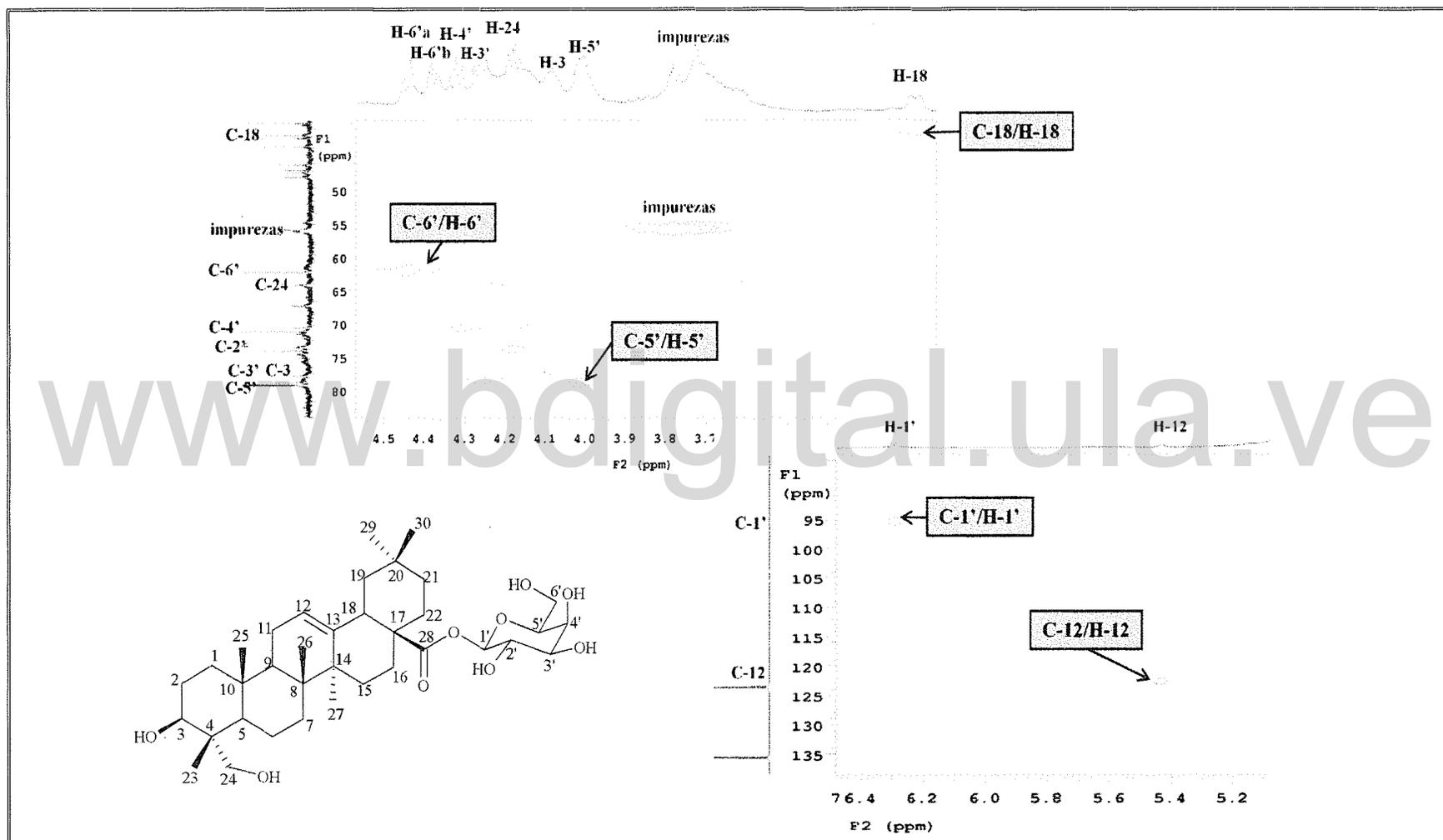


Figura 61.1. Ampliación del espectro de HSQC (C_5D_5N) de [8].

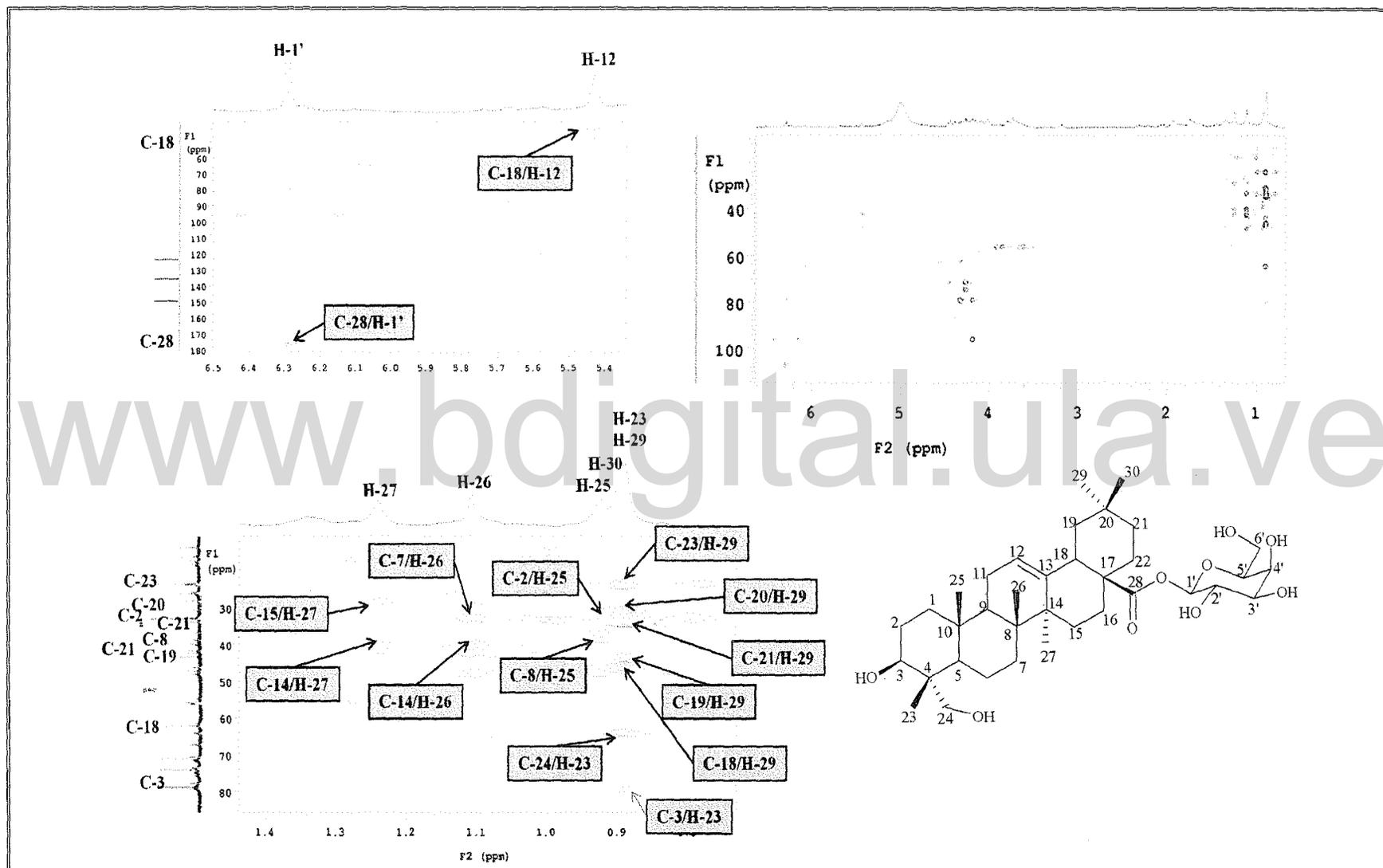
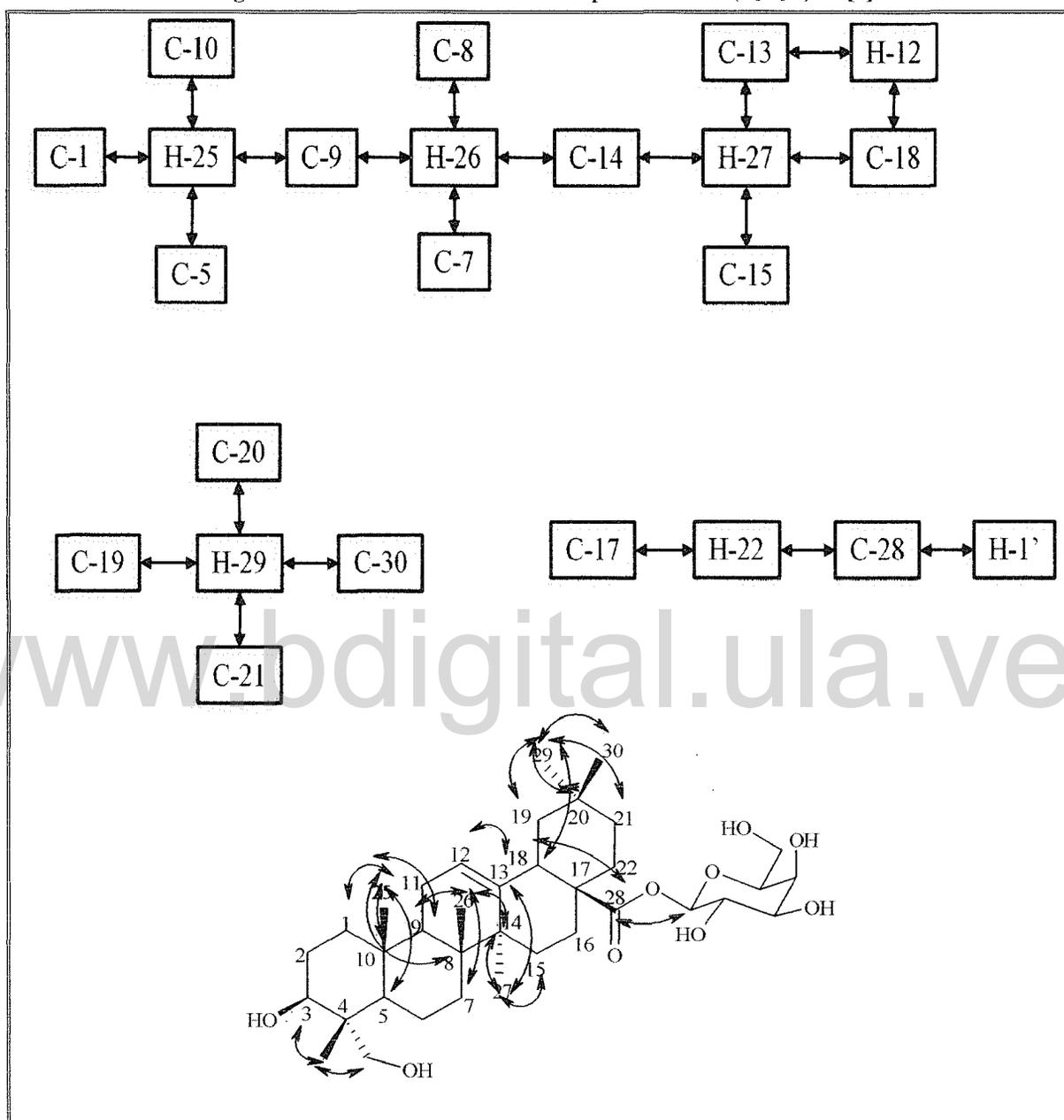


Figura 62. Espectro y ampliaciones de HMBC (C_5D_5N) de [8].

Diagrama 7. Correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ del espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [8].



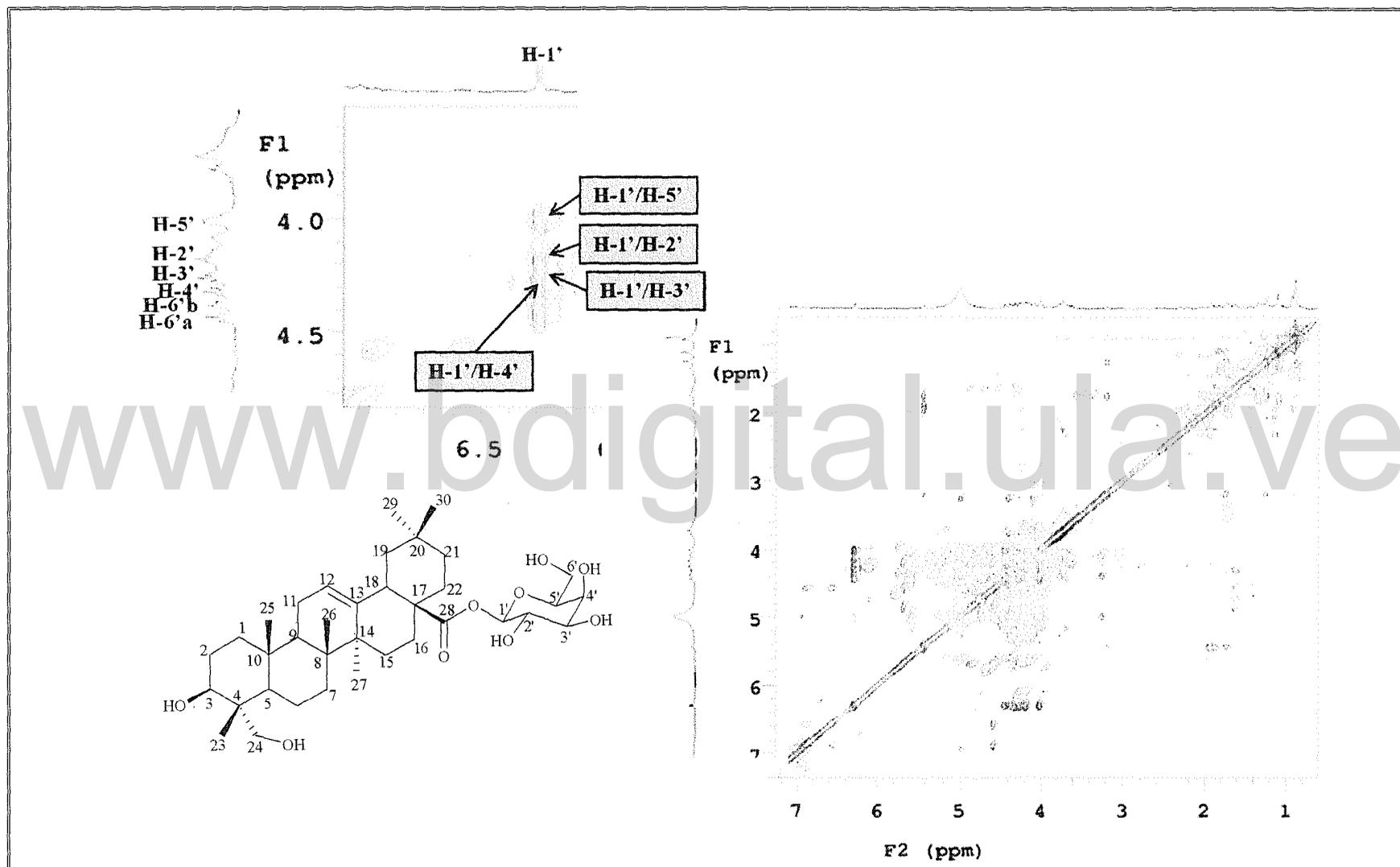


Figura 63. Espectro y ampliación de TOCSY (C_5D_5N) de [8].

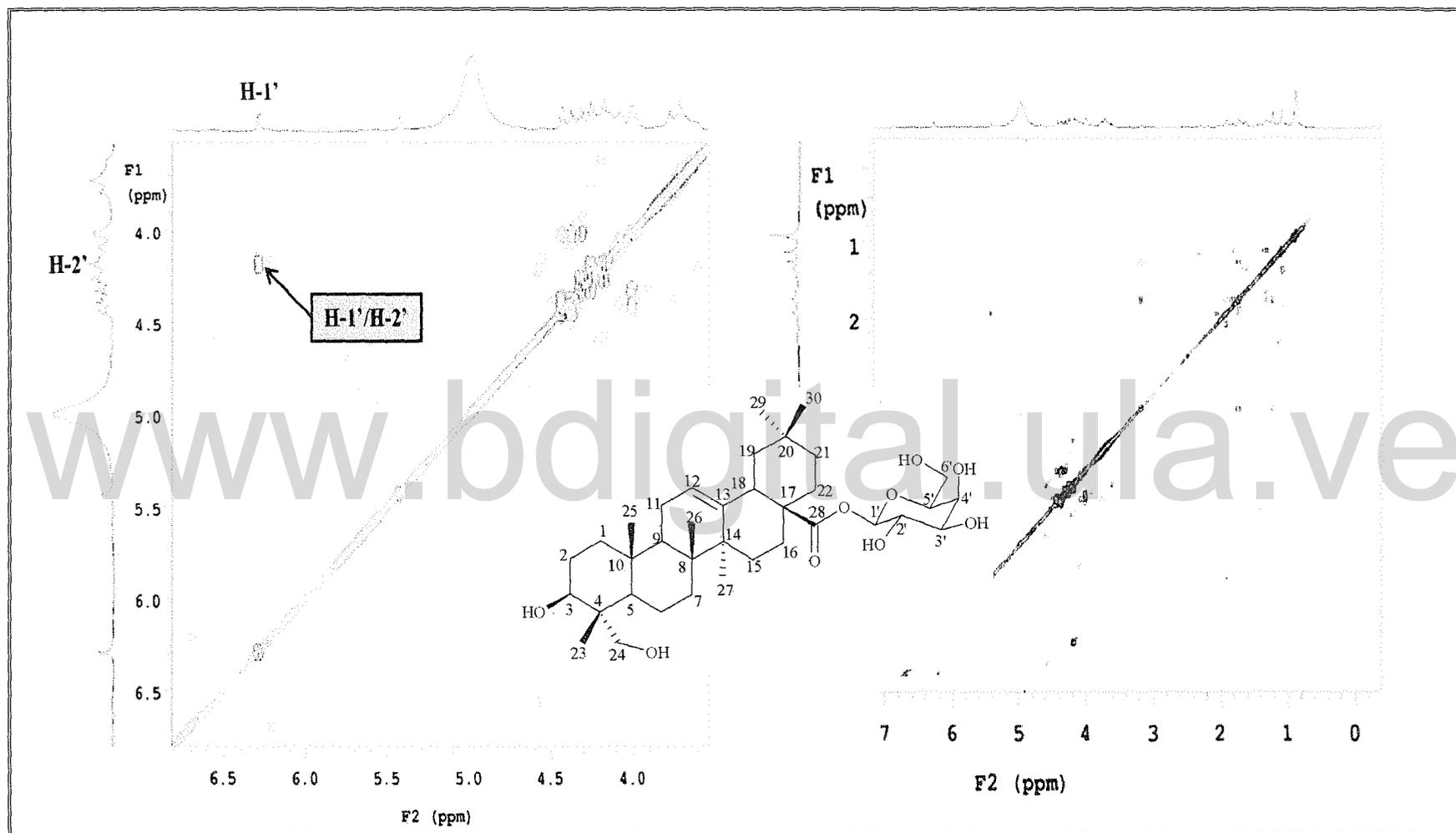


Figura 64. Espectro y ampliación de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [8].

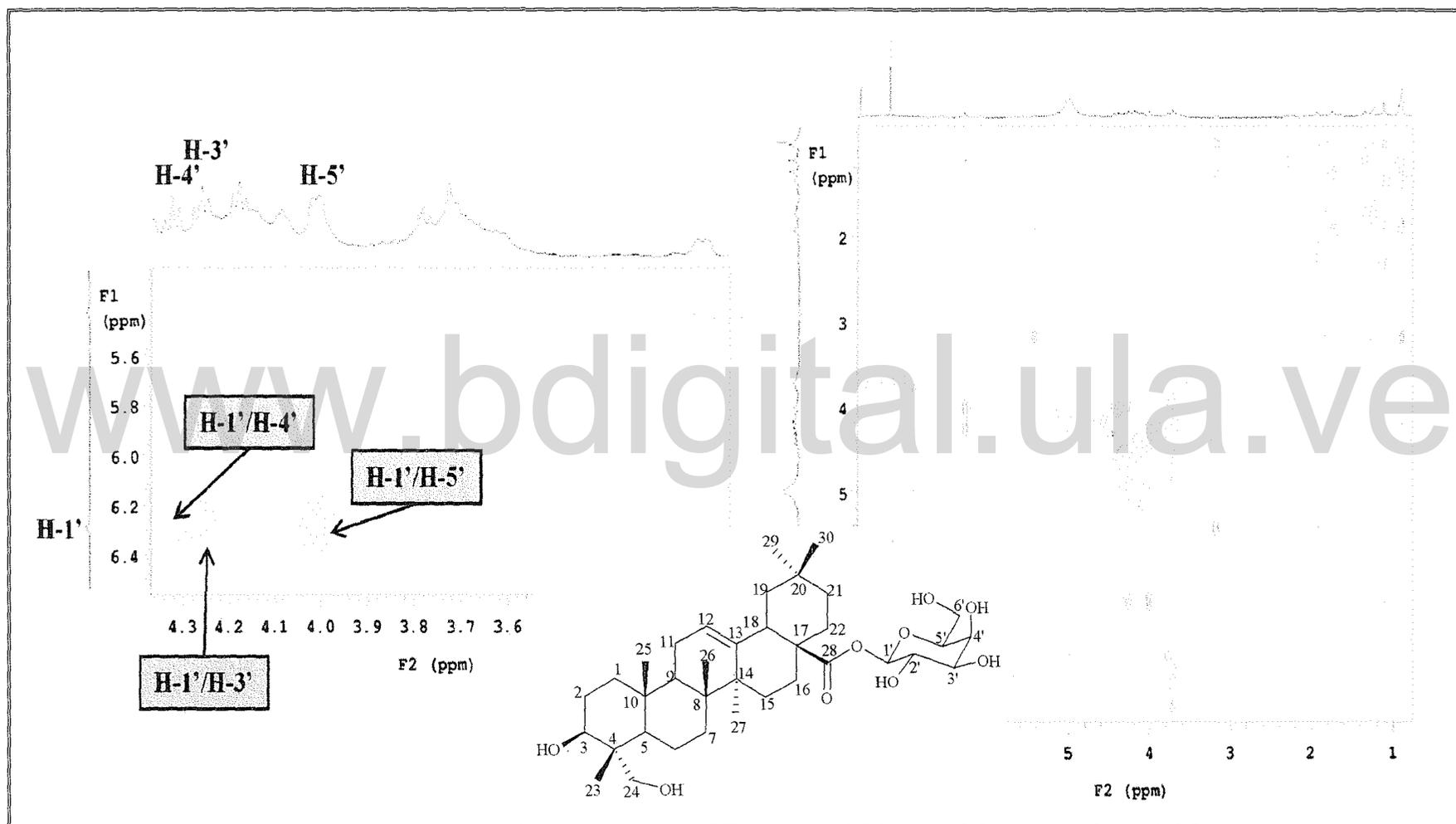


Figura 65. Espectro y ampliación de ROESY (C_5D_5N) de [8].

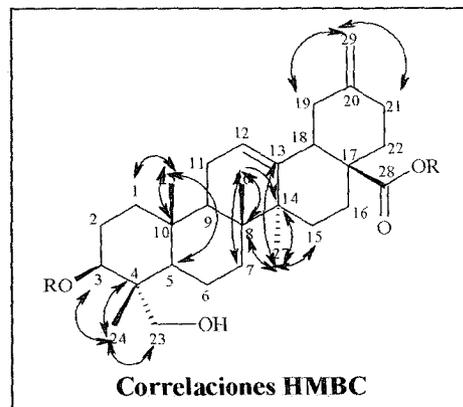
VI.2.2.b.- 3-O-[β-xilosil(1→3)glucopiranosil]-3β,24-dihidroxi-30-nor-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β-glucopiranosilo [9]:

Luego de varios procesos de aislamiento, como la cromatografía en fase reversa, empleando sílice RP-18, se aisló un sólido (3.1 mg) amorfo amarillento, que por su apariencia física y la metodología empleada, es de esperarse que se trate de una saponina. En efecto, en su espectro de RMN-¹³C (Figura 66, Tabla 27), se observa un total de cuarenta y seis carbonos, lo que hace pensar que la estructura es un triterpeno con más de una molécula de azúcar. Ahí se distinguen las señales propias de metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios sp³, también el conjunto de señales que incumben a los carbonos unidos a grupos oxigenados, así como también otras señales que pueden ser atribuidas a carbonos anoméricos y olefínicos y por último una señal que puede corresponder a un carbono carbonílico. Todas estas señales se lograron clasificar, mediante el espectro RMN-¹³C/ (DEPT-135) (Figura 67), de la siguiente forma: cuatro metilos [δ 13.4 (C-23); δ 16.1 (C-25); δ 17.5 (C-26); δ 26.0 (C-27)], doce metilenos, uno de ellos está unido a un átomo de oxígeno [δ 65.3 (C-24)] y otro está hibridizado sp² [δ 107.2 (C-29)], cinco metinos, de las cuales, uno se encuentra hibridizado sp² [δ 123.1 (C-26)] y ocho carbonos cuaternarios, dos con hibridación sp² [δ 143.0 (C-13) y δ 148.5 (C-20)] y un carbono carbonílico [δ 175.7 (C-28)]. Al mismo tiempo, las señales pertenecientes a los azúcares, diferenciándose entre ellas, tres carbonos anoméricos [δ 95.8 (C-1'); δ 104.0 (C-1'') y δ 105.9 (C-1''')] y las respectivas señales de metinos y metilenos oxigenados entre δ 69.0 y δ 83.0.

El espectro de RMN-¹H (Figura 68, Tabla 28), es bastante similar al compuesto anterior, aquí, se notan claramente las cuatro señales de los metilos que salen como singuletes [δ 1.09 (H-23); δ 0.93 (H-25); δ 1.10 (H-26) y δ 1.18 (H-27)], asimismo, las demás señales de los protones metilenos y metinos δ 1.00 y δ 2.60, el grupo de señales de protones con grupos oxigenados y olefínicos entre δ 3.80 y δ 5.80 respectivamente.

Con el espectro HSQC (Figura 69 y 69.1), como ya se ha descrito para los compuestos anteriores, fue posible asignar a cada carbono sus protones correspondientes.

Igualmente que en los compuestos anteriores, aplicando la misma sistemática para identificar el aglicón, se acude al espectro HMBC (Figura 70 y 70.1; Diagrama 8), partiendo de las correlaciones que dan los hidrógenos de los metilos con los carbonos que se encuentran próximos a éstos, y se llegó a la conclusión de que se trata del mismo esqueleto que el compuesto anterior, un triterpeno de la serie del oleanano, con las correlaciones [(H-25) \leftrightarrow (C-10); (H-25) \leftrightarrow (C-1); (H-25) \leftrightarrow (C-5)], [(H-23) \leftrightarrow (C-24); (H-23) \leftrightarrow (C-4); (H-23) \leftrightarrow (C-5); (H-23) \leftrightarrow (C-3)], [(H-26) \leftrightarrow (C-8); (H-26) \leftrightarrow (C-14); (H-26) \leftrightarrow (C-7)], [(H-27) \leftrightarrow (C-15); (H-27) \leftrightarrow (C-8); (H-27) \leftrightarrow (C-8)], con la diferencia de que [9], se encuentra despojado de uno de los 2 metilos unidos al carbono 20, es decir, que hubo una especie de reducción que produjo la pérdida de uno de ellos, esto se hace notar claramente con las correlaciones [(H-29) \leftrightarrow (C-19); (H-29) \leftrightarrow (C-21)] y por comparación con los valores reportados en la bibliografía (Hao *et al.*, 2008).

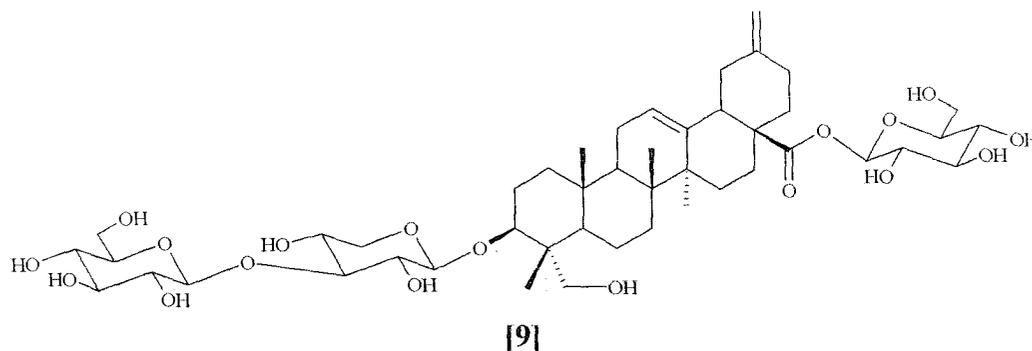


Una vez, con el esqueleto del aglicón identificado, se procede de la misma forma, al esclarecimiento de los azúcares y a la ubicación de las mismas en el aglicón, con ayuda de los espectros TOCSY (Figura 71), $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figura 72), ROESY (Figura 73), HMBC (Figura 70 y 70.1) y con los valores reportados en la bibliografía. A través de los protones anoméricos se logró identificar una glucosa, con las correlaciones TOCSY (Figura 71) [(H-1') \leftrightarrow (H-2'); (H-1') \leftrightarrow (H-3'); (H-1') \leftrightarrow (H-4'); (H-1') \leftrightarrow (H-5'); (H-1') \leftrightarrow (H-6')], por otro lado se comprobó también la presencia de una xilosa con las correlaciones TOCSY (Figura 71) [(H-1'') \leftrightarrow (H-2''); (H-1'') \leftrightarrow (H-3''); (H-1'') \leftrightarrow (H-4'')] y otra glucosa con las correlaciones TOCSY [(H-1''') \leftrightarrow (H-2'''); (H-1''') \leftrightarrow (H-3'''); (H-1''') \leftrightarrow (H-4'''); (H-1''') \leftrightarrow (H-5'''); (H-1''') \leftrightarrow (H-6''')], además de las correlaciones observadas en los espectros $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figura 72) y ROESY (Figura 73).

Para ubicar los azúcares en el esqueleto se verifican, nuevamente, las correlaciones del protón anomérico con alguno de los carbonos del aglicón, en HMBC (Figura 70 y 70.1) se observa una correlación [(H-1') \leftrightarrow (C-28)], la cual ubica una de las glucosas sobre el carbono en posición 28. La xilosa se ubica sobre el carbono en posición 3, esto se corrobora por medio de la correlación [(H-1'') \leftrightarrow (C-3)], ahora bien, existe una conexión entre la

xilosa y la glucosa restante, es decir, por medio de la correlación [(H-1'')↔(C-3'')] indica que la molécula de la glucosa está unida a través el carbono (C-3'') de la xilosa.

De esta forma quedó establecida la estructura como 3-*O*-β-xilosil(1→3) glucopiranosil]-3β,24-dihidroxi-30-*nor*-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β-glucopiranosilo [9].



Este compuesto, no ha sido reportado anteriormente, por lo que éste es el primer reporte como producto natural.

www.bdigital.ula.ve

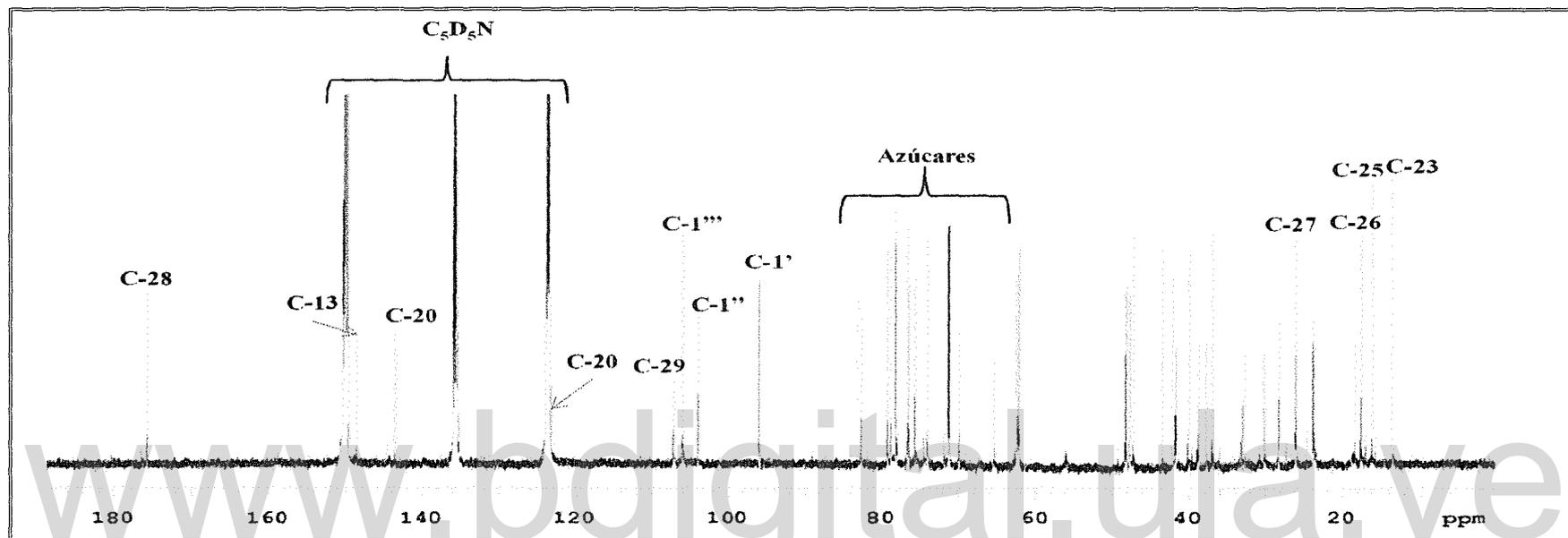


Figura 66. Espectro de RMN-¹³C (C₅D₅N, 150 MHz) de [9].

Tabla 26. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [9].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
δ (ppm)	38.8	25.9	82.9	43.4	48.8	18.2	32.8	39.9	47.2	36.8	23.5	123.1
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CHO-	>C<	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	>C<	-CH ₂ -	=CH-
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
δ (ppm)	143.4	42.1	28.2	23.7	43.4	47.6	41.6	148.5	30.1	37.6	13.4	65.3
<i>J</i> (Hz), <i>m</i>	=C<	>C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	-CH ₂ -	=C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₃	-CH ₂ -
C	25	26	27	28	29	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
δ (ppm)	16.1	17.5	26.0	175.7	107.2	95.8	74.0	78.7	71.2	79.5	62.1	
Tipo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	>C=O	=CH ₂ -	-OCHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CH ₂ O-	
C	1''	2''	3''	4''	5''	1'''	2'''	3'''	4'''	5'''	6'''	
δ (ppm)	104.0	76.1	82.5	69.9	65.3	105.9	75.5	78.1	71.2	76.6	62.4	
Tipo	-OCHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CH ₂ O-	-OCHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CH ₂ O-	

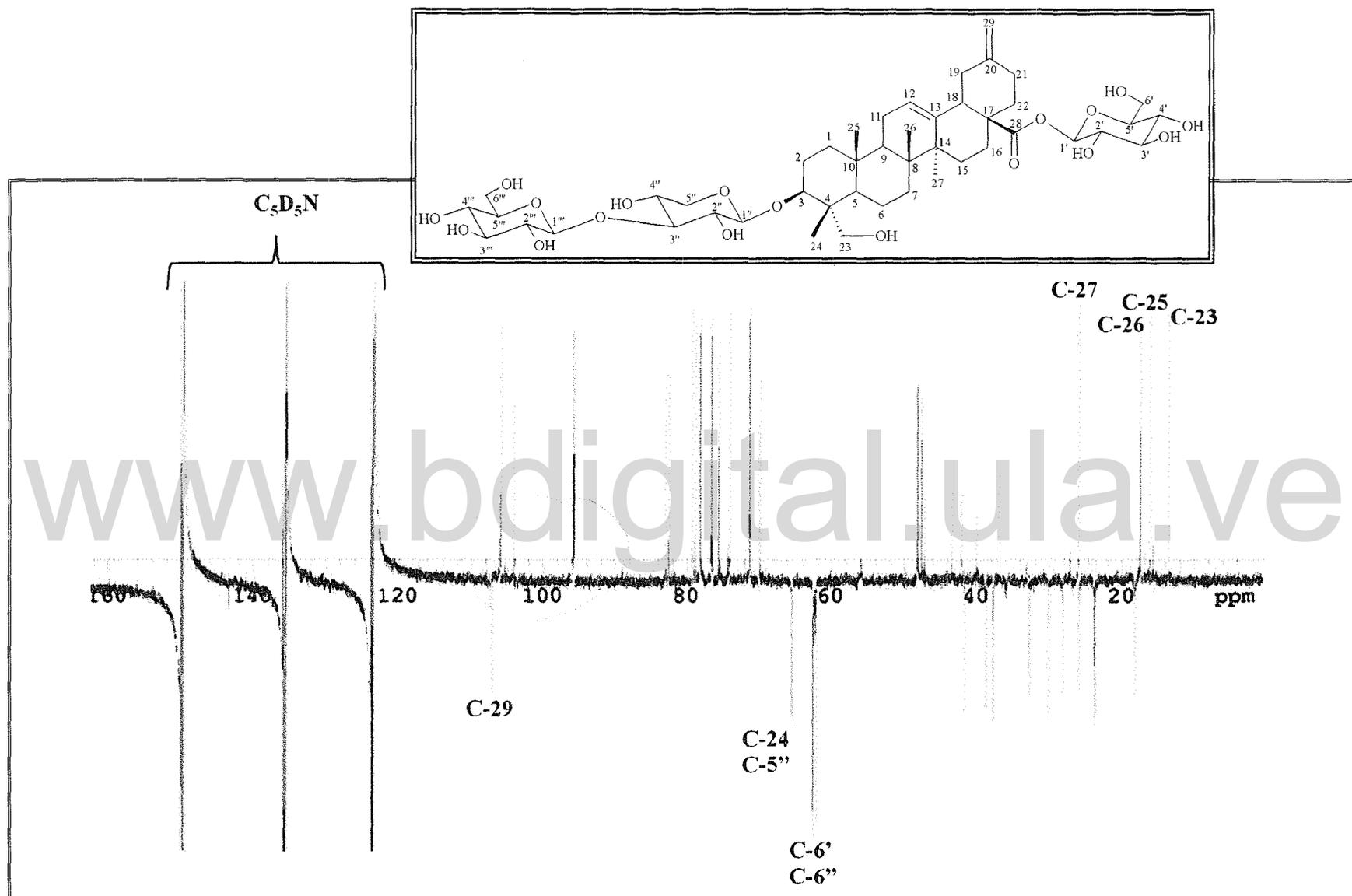


Figura 67. Espectro de RMN- ^{13}C , DEPT-135, ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [9].

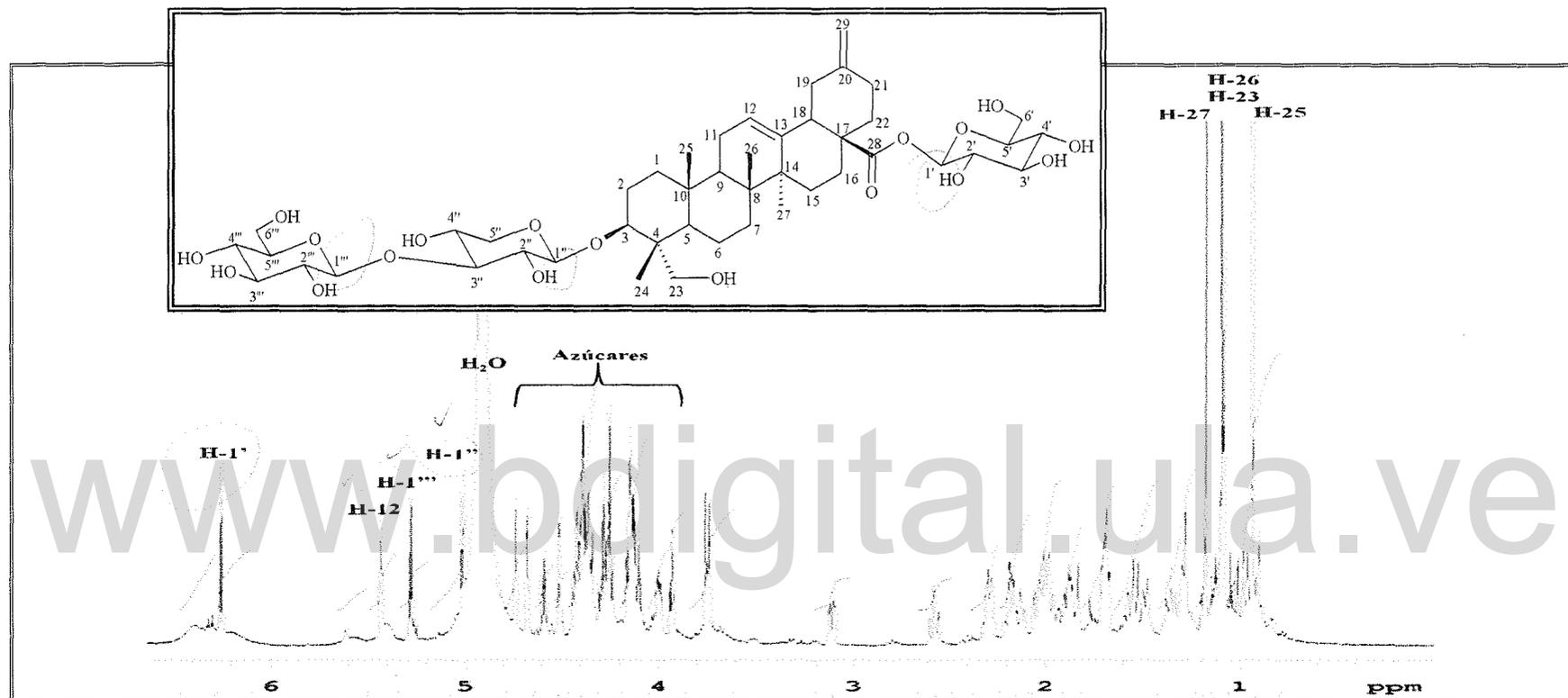


Figura 68. Espectro de RMN-¹H (C₅D₅N, 600 MHz) de [9].

Tabla 27. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidades (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹³C de [9].

H	1	2	3	5	6	7	9	11	12	15	16	18	19
δ (ppm)	1.48;0.66	2.28;1.96	4.14	1.54	1.70;1.35	1.57;1.28	3.10	2.20;2.00	5.42	2.30;1.12	1.90;1.88	1.69	2.58;2.28
J (Hz), m	m	m	m	m	m	m	8;4, dd	m	3, t	m	m	m	12, t
H	21	22	23	24	25	26	27	29	1'	2'	3'	4'	5'
δ (ppm)	2.19;2.06	2.00;1.69	1.09	4.35;3.75	0.93	1.10	1.18	4.94;4.87	6.26	4.15	4.00	4.28	4.25
J (Hz), m	m	m	m	s	s	s	s	d	8, d	m	m	m	m
H	6'	1''	2''	3''	4''	5''	1'''	2'''	3'''	4'''	5'''	6''	
δ (ppm)	4.35 ;nd	5.04	4.10	4.59	4.50	4.35 ;3.75	5.28	4.13	4.15	4.28	3.93	4.35 ;3.75	
J (Hz), m	m	8, d	m	m	m	m	8, d	m	m	m	6, t	m	

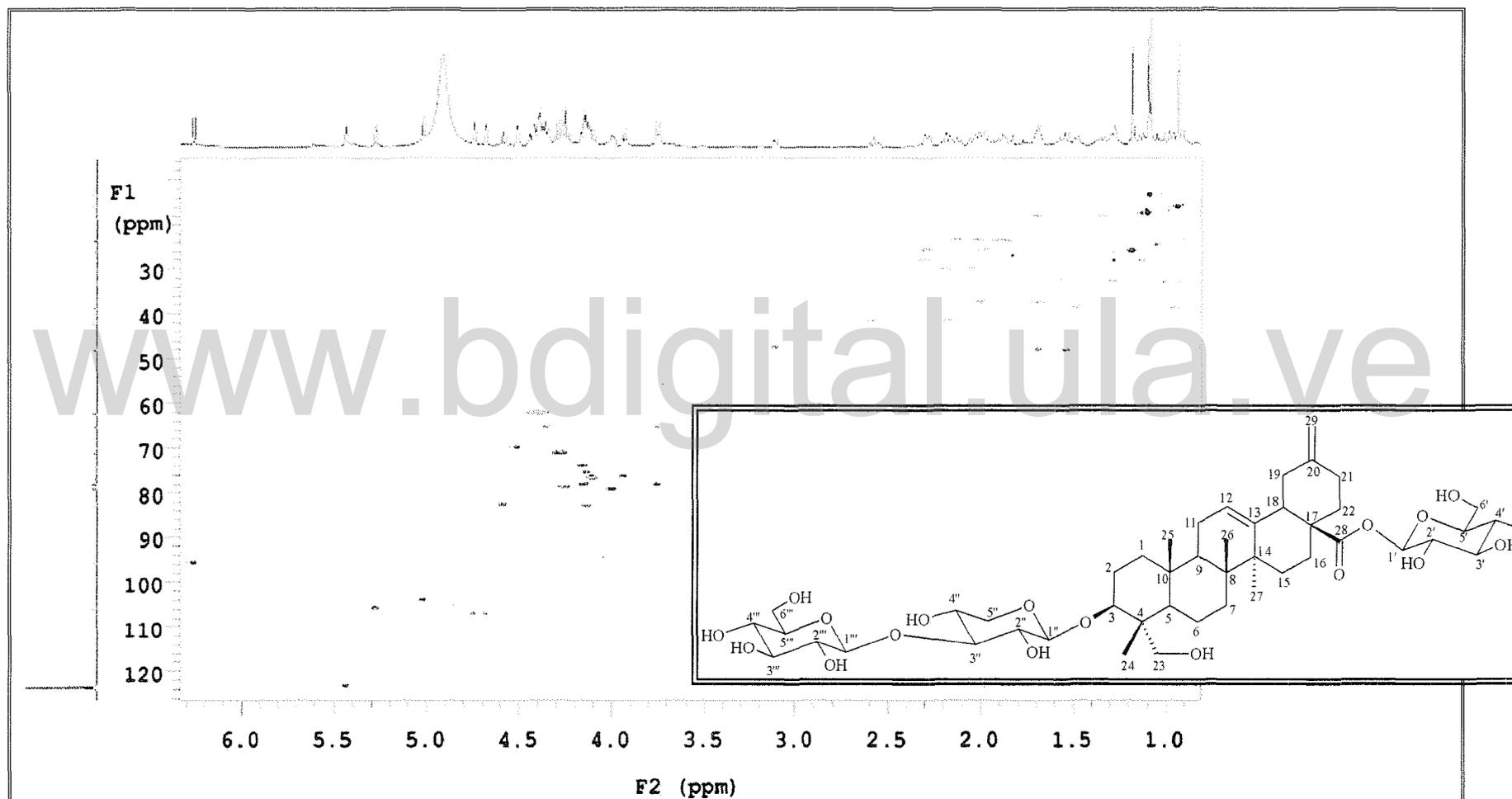


Figura 69. Espectro de HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [9].

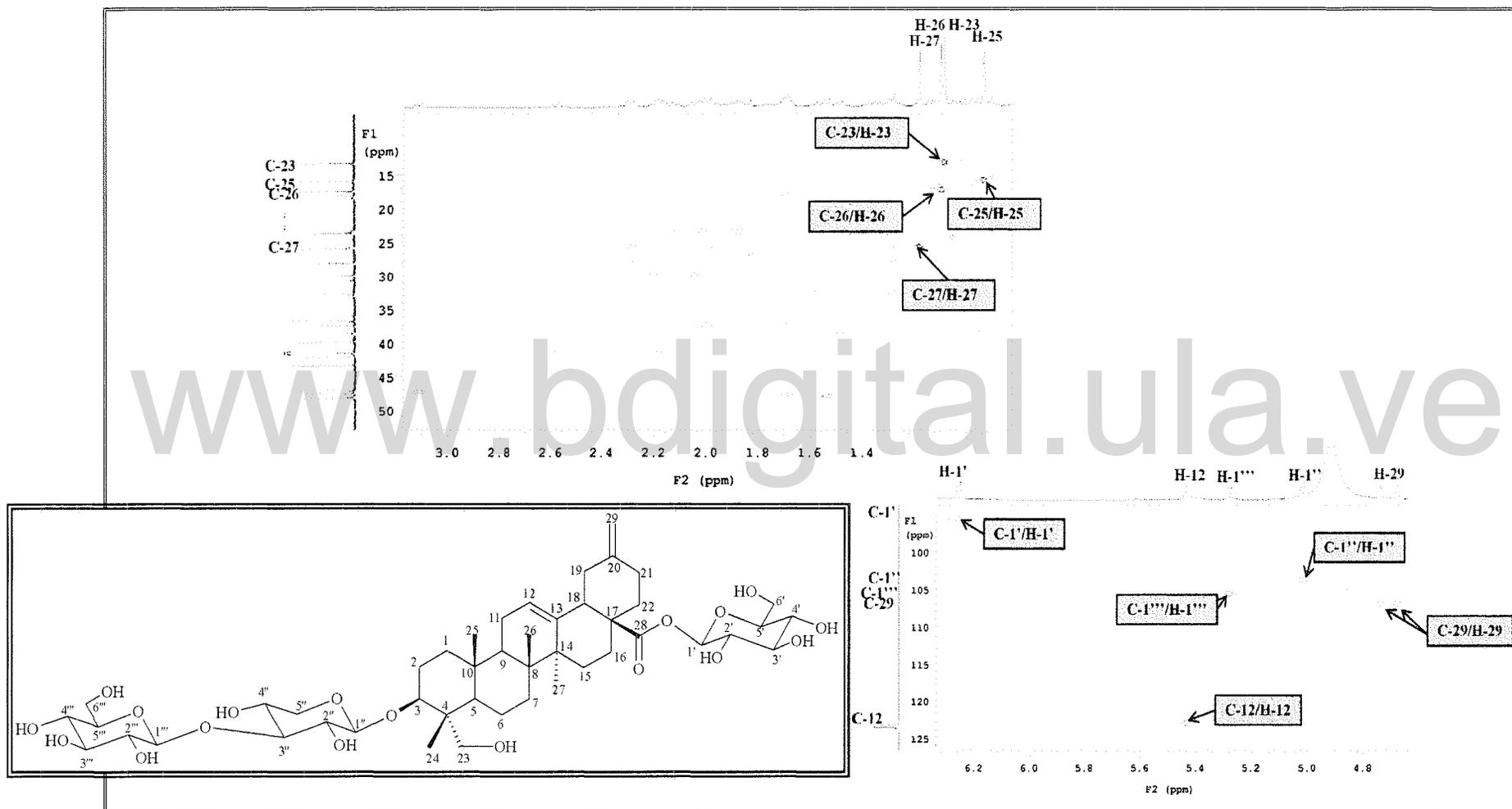


Figura 69.1. Ampliaciones del espectro de HSQC (C₅D₅N) de [9].

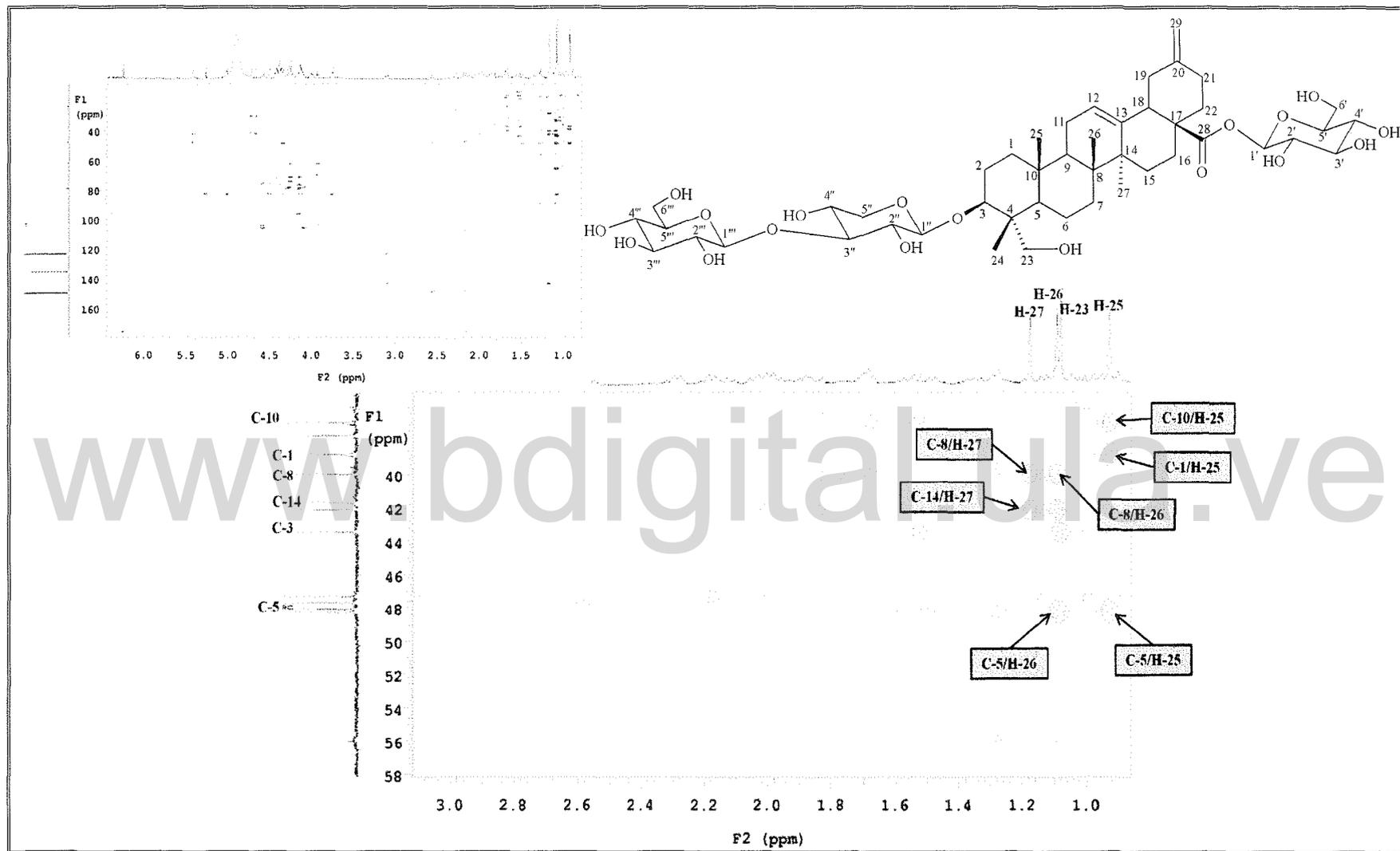


Figura 70. Espectro y ampliación de HMBC(C_5D_5N) de [9]

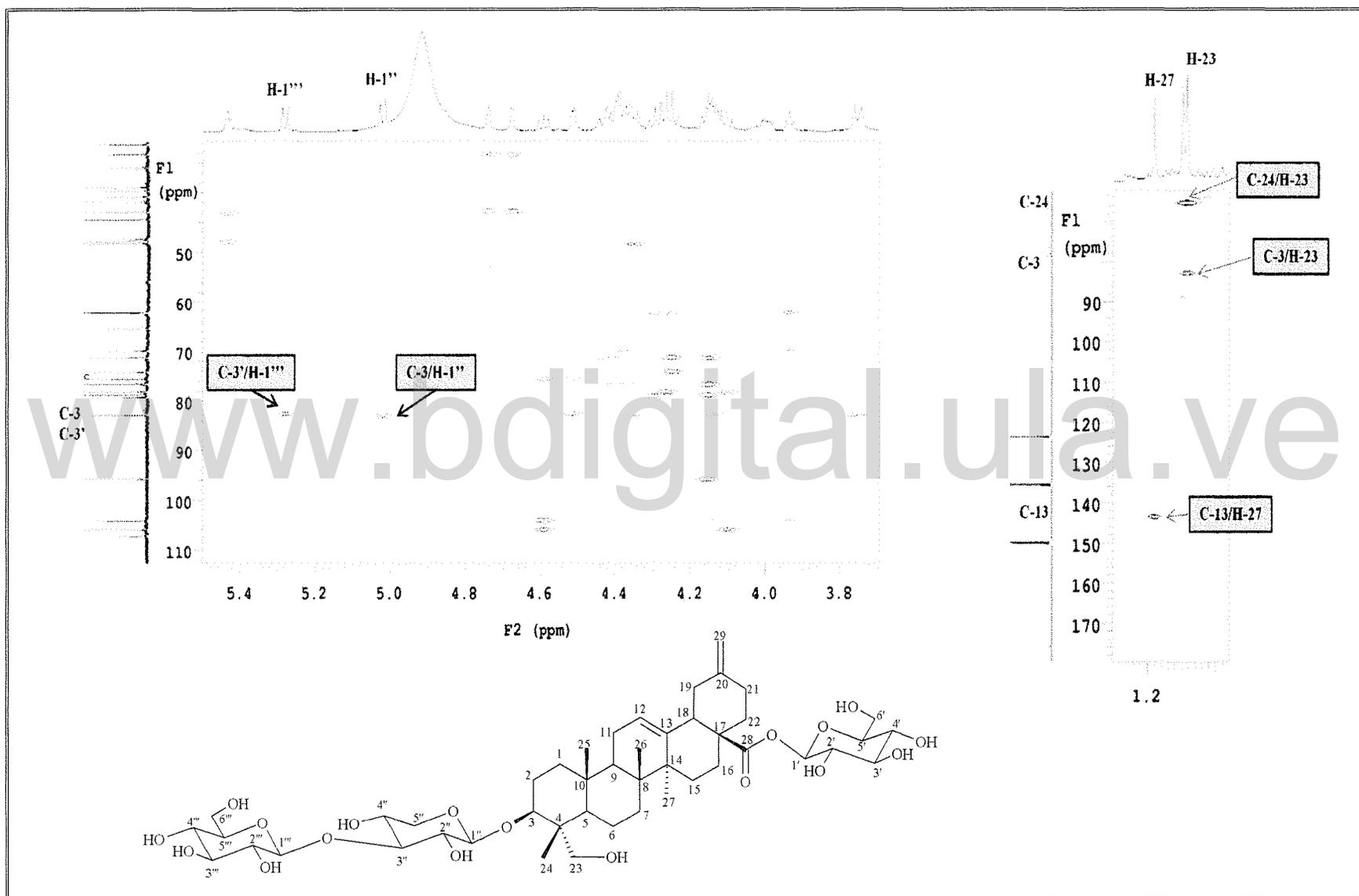


Figura 70.1. Ampliaciones del espectro de HMBC(C_5D_5N) de [9].

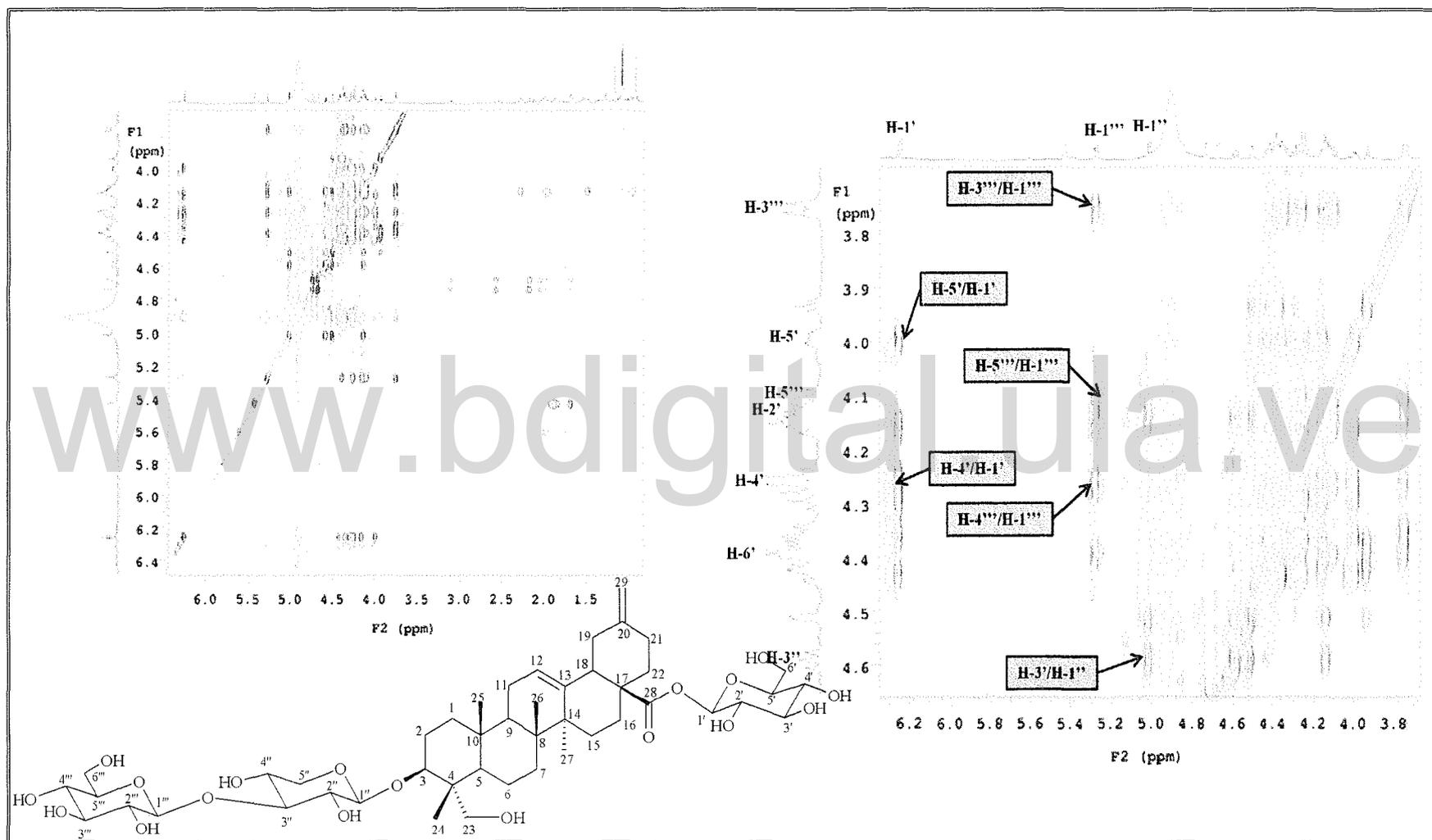


Figura 71. Espectro y ampliación de TOCSY (C_5D_5N) de [9].

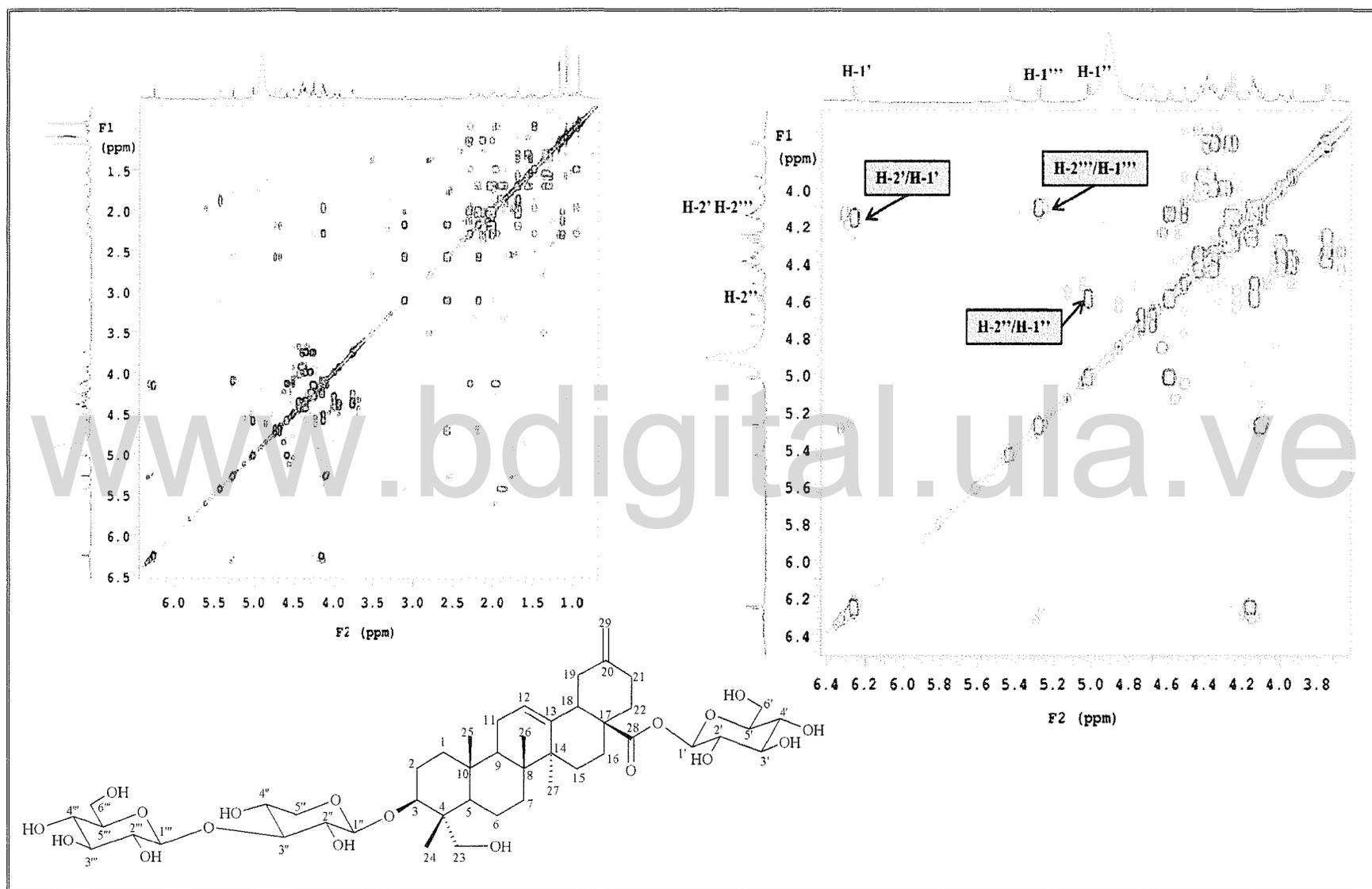


Figura 72. Espectro y ampliación de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [9].

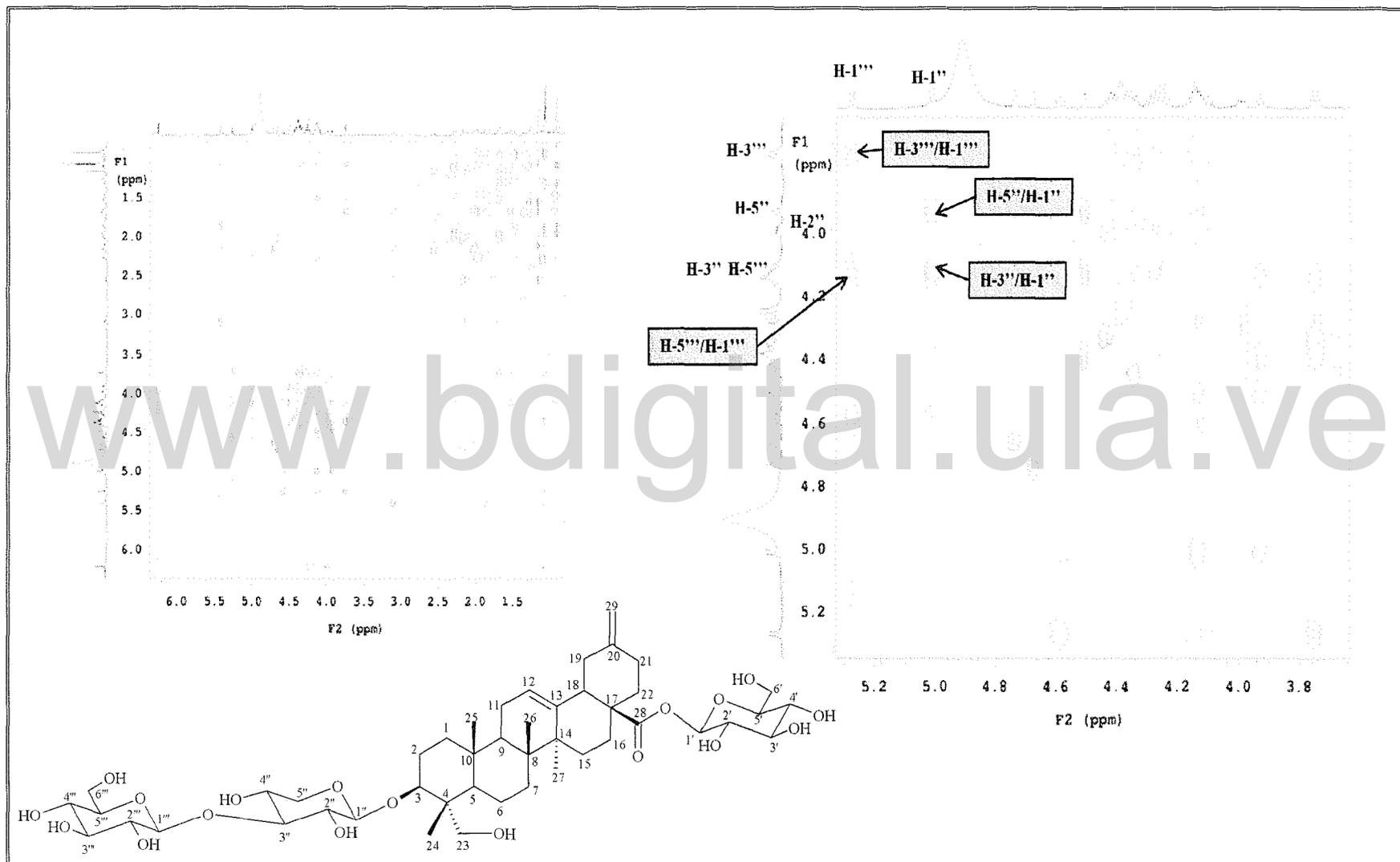


Figura 73. Espectro y ampliación de ROESY (C_5D_5N) de [9]

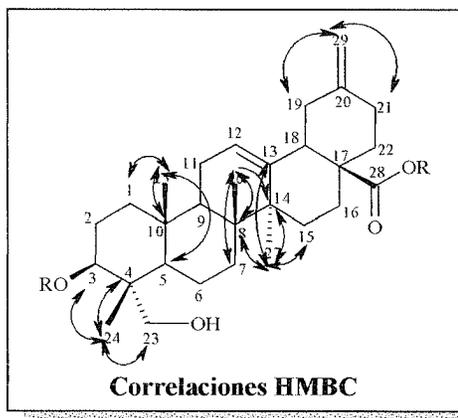
VI.2.2.c.- 3 β ,24-dihidroxi-30-nor-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β -glucopiranosilo [10]:

Igual que los precedentes, utilizando cromatografía en fase reversa, con sílice RP-18, se aisló un sólido amorfo color blanco (3.9 mg). Por la similitud de los compuestos anteriores, puede tratarse de un compuesto análogo.

Justamente, en su espectro de RMN-¹³C (Figura 74, Tabla 29), se observa un total de treinta y cinco carbonos, puede tratarse de un triterpeno con una molécula de azúcar, ya que los desplazamientos químicos de los carbonos son bastantes similares al compuesto anterior. En el espectro RMN-¹³C (DEPT-135) (Figura 75), se discrepan cinco metilos [δ 28.2 (C-23); δ 28.2 (C-24); δ 15.5 (C-25); δ 17.4 (C-26); δ 26.1 (C-27)], significa que el esqueleto de [10] posee un metilo más que [9], por lo tanto, lógicamente [10] debería tener un metileno menos, y consiguientemente se contabilizan once metilenos, uno de ellos hibridizado sp² [δ 107.2 (C-29)], asimismo se observan cinco metinos, de los cuales, uno se encuentra hibridizado sp² [δ 123.1 (C-26)] y otro está unido a un oxígeno [δ 89.3 (C-3)] y finalmente ocho carbonos cuaternarios, dos con hibridación sp² [δ 143.4 (C-13) y δ 148.5 (C-20)] y un carbono carbonílico [δ 175.7 (C-28)]. Conjuntamente, las señales pertenecientes al azúcar, en este caso solo se diferencia un carbono anomérico [δ 95.8 (C-1')] y por su puesto las señales de metinos y metilenos oxigenados entre δ 69.0 y δ 83.0.

El espectro de RMN-¹H (Figura 76, Tabla 30), es prácticamente igual al anterior, diferenciándose en las señales de los metilos que salen como singuletes, donde una de ellas integra para seis protones en [δ 1.30 (H-23) y (H-27)] y las demás integran para tres protones, [δ 0.98 (H-24); δ 0.84 (H-25); δ 1.07 (H-26)], lo que confirma la presencia de los cinco metilos. Equivalentemente surgen las demás señales de los protones metilenos, metinos, el conjunto de señales de protones oxigenados y olefinicos. Con el espectro HSQC (Figura 77), se asignó a cada carbono sus respectivos protones. Por la similitud de los espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H de [10] (Figuras 74 y 76) con los de [9] (Figuras 66 y 68), se propuso el mismo esqueleto de [9] como estructura base. De ahí, con el espectro HMBC (Figura 78 y 78.1; Diagrama 9), se cerciora si se trata del mismo esqueleto, con las correlaciones [(H-24) \leftrightarrow (C-23); (H-24) \leftrightarrow (C-4); (H-24) \leftrightarrow (C-5); (H-24) \leftrightarrow (C-3)], a su vez, [(H-23) \leftrightarrow (C-23); (H-23) \leftrightarrow (C-4); (H-23) \leftrightarrow (C-5); (H-23) \leftrightarrow (C-3)], coinciden en que ambos

metilos se encuentra situados sobre el mismo carbono (C-4). Las demás correlaciones de los otros metilos indican que es el mismo esqueleto con el doble enlace exocíclico en la posición 20.

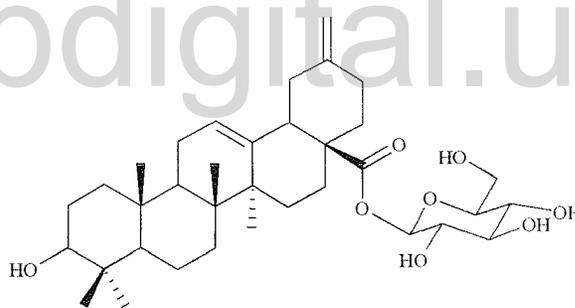


La identificación de la molécula de azúcar y su ubicación, se derivó de la misma forma, con los espectros TOCSY (Figura 79), $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figura 80), ROESY (Figuras 81 y 81.1) y HMBC (Figura 82 y 82.1). El protón anomérico se identificó en δ 6.22 (H-1'), y las correlaciones observadas y con los valores reportados en la bibliografía se identificó como una glucosa y se encuentra situada cercana al

carbonilo, [(H-1') \leftrightarrow (C-28)].

De esta forma queda establecida la estructura como 3 β ,24-dihidroxi-30-*nor*-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β -glucopiranosilo [10].

www.bdigital.ula.ve



[10]

Este compuesto, no ha sido reportado anteriormente, por lo que éste es también el primer reporte como producto natural en la especie *Bulnesia arborea* y para la familia Zygophyllaceae.

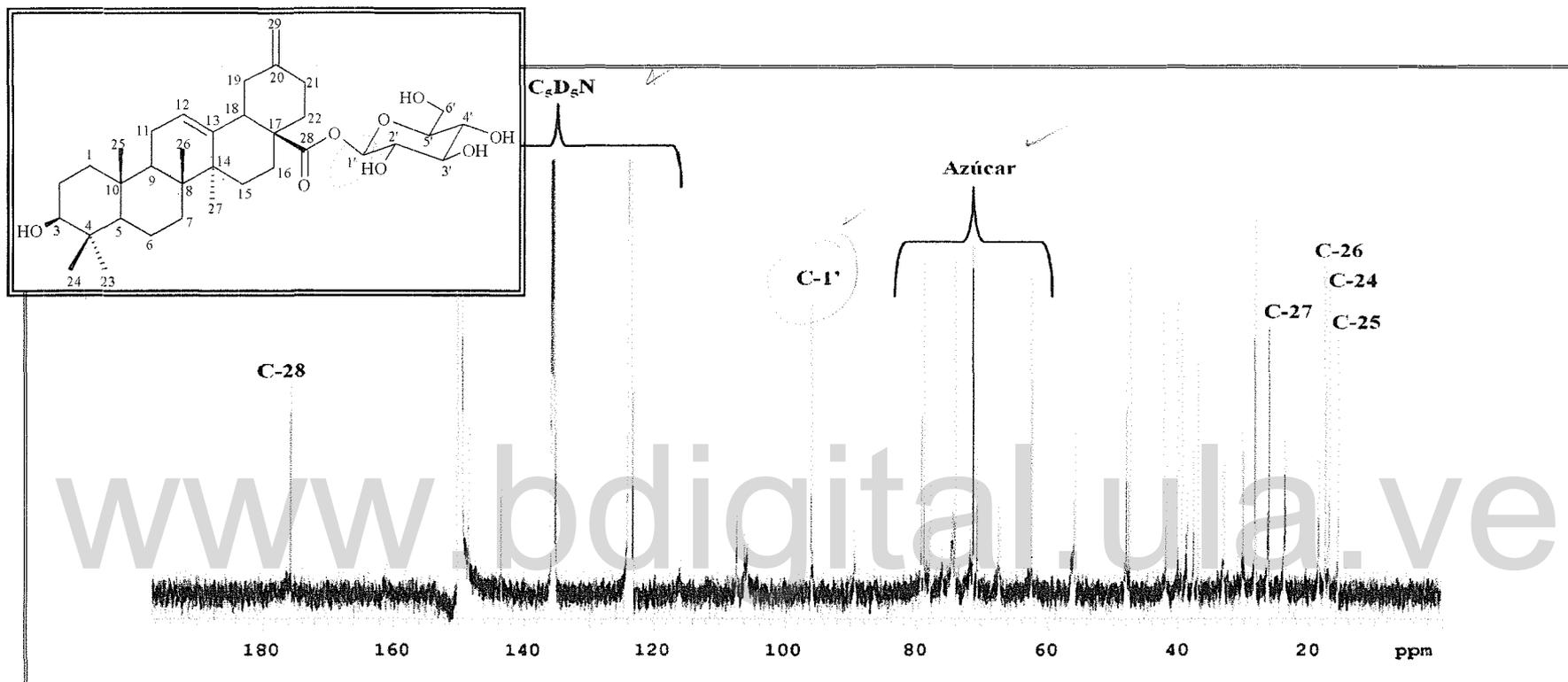


Figura 74. Espectro de RMN-¹³C (C₅D₅N, 150 MHz) de [10].

Tabla 28. Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹³C de [10].

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
δ (ppm)	39.4	26.7	89.3	38.7	55.8	18.5	33.1	39.9	47.3	36.9	23.7	123.1
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>CHO-	>C<	>CH-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	>C<	-CH ₂ -	=CH-
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
δ (ppm)	143.4	42.1	28.2	23.5	42.1	47.6	41.7	148.5	30.1	37.6	17.0	28.2
J(Hz), m	=C<	>C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>C<	>CH-	-CH ₂ -	=C<	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₃	-CH ₃
C	25	26	27	28	29	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
δ (ppm)	15.5	17.4	26.1	175.7	107.2	95.8	74.0	79.2	70.6	78.8	62.3	
Tipo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	>C=O	=CH ₂ -	-OCHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CHO-	>CH ₂ O-	

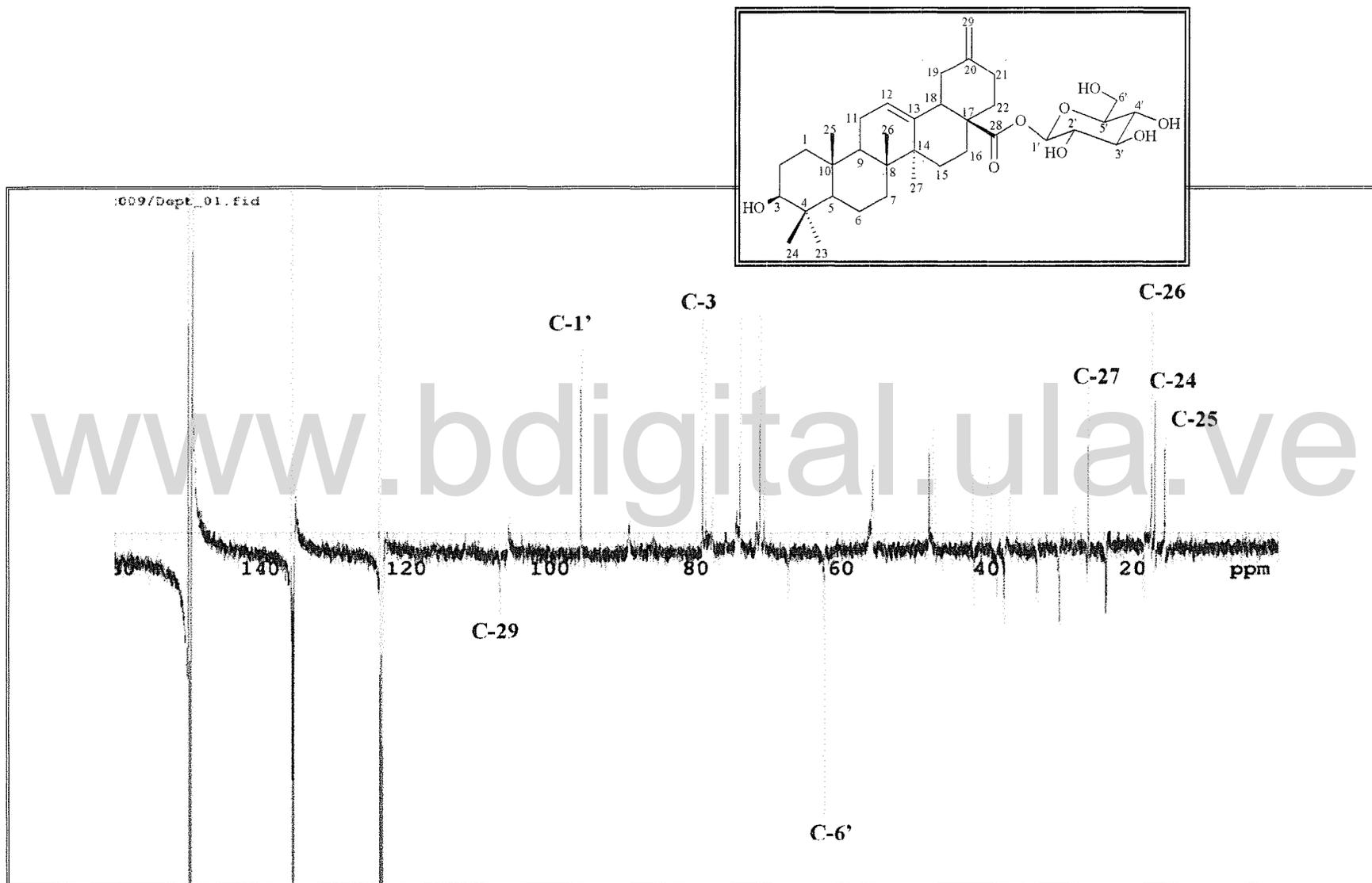


Figura 75. Espectro de RMN- ^{13}C /DEPT-135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [10].

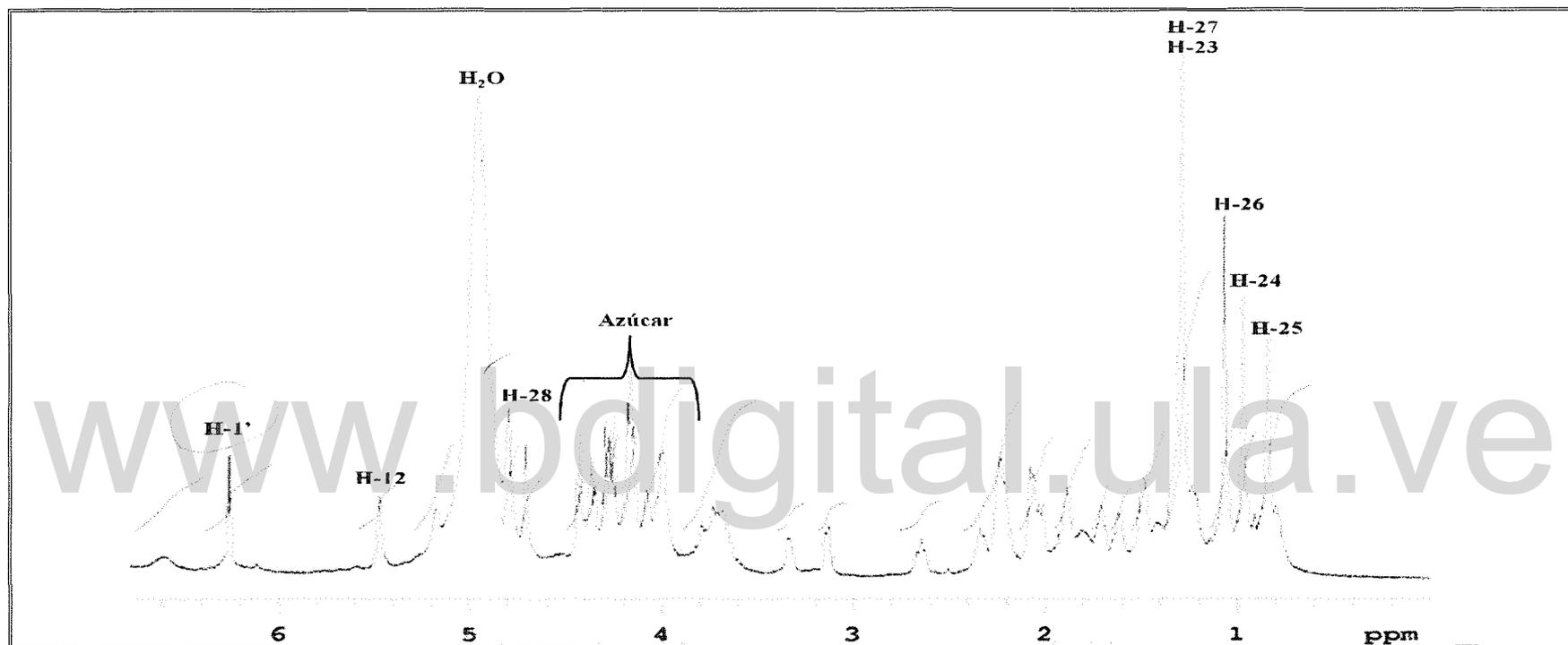


Figura 76. Espectro de RMN-¹H (C₅D₅N, 600 MHz) de [10].

Tabla 29. Desplazamientos químicos (δ), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) en el espectro de RMN-¹H [10].

H	1	2	3	5	6	7	9	11	12	15	16	18	19	
δ (ppm)	1.39;0.62	2.30;1.82	4.20	1.54	1.70;1.35	1.57;1.28	3.06	1.90;1.86	5.35	2.28;1.05	1.87;1.60	1.69	2.63;2.28	
J (Hz), m	m	m	m	m	m	m	8;4, dd	m	3, t	m	m	m	12, t	
H	21	22	23	24	25	26	27	29	1'	2'	3'	4'	5'	6'
δ (ppm)	2.17;2.08	2.30;1.72	1.30	0.98	0.84	1.07	1.30	4.80; 4.72	6.26	4.15	4.00	4.28	4.25	4.35;4.42
J (Hz), m	m	m	m	s	s	s	s	8 d	8, d	m	m	m	m	m

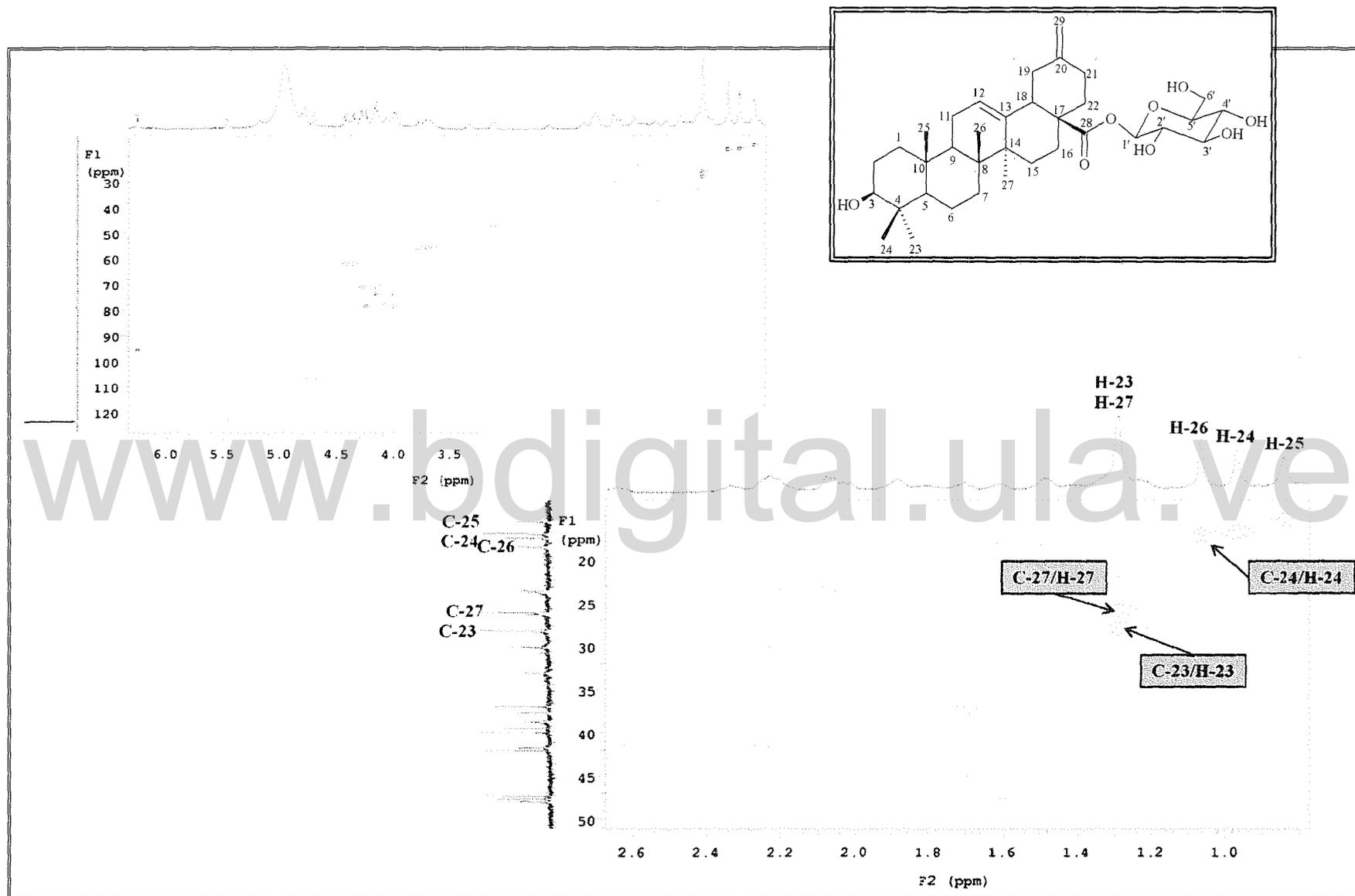


Figura 77. Espectro HSQC (CD_5N) de [10].

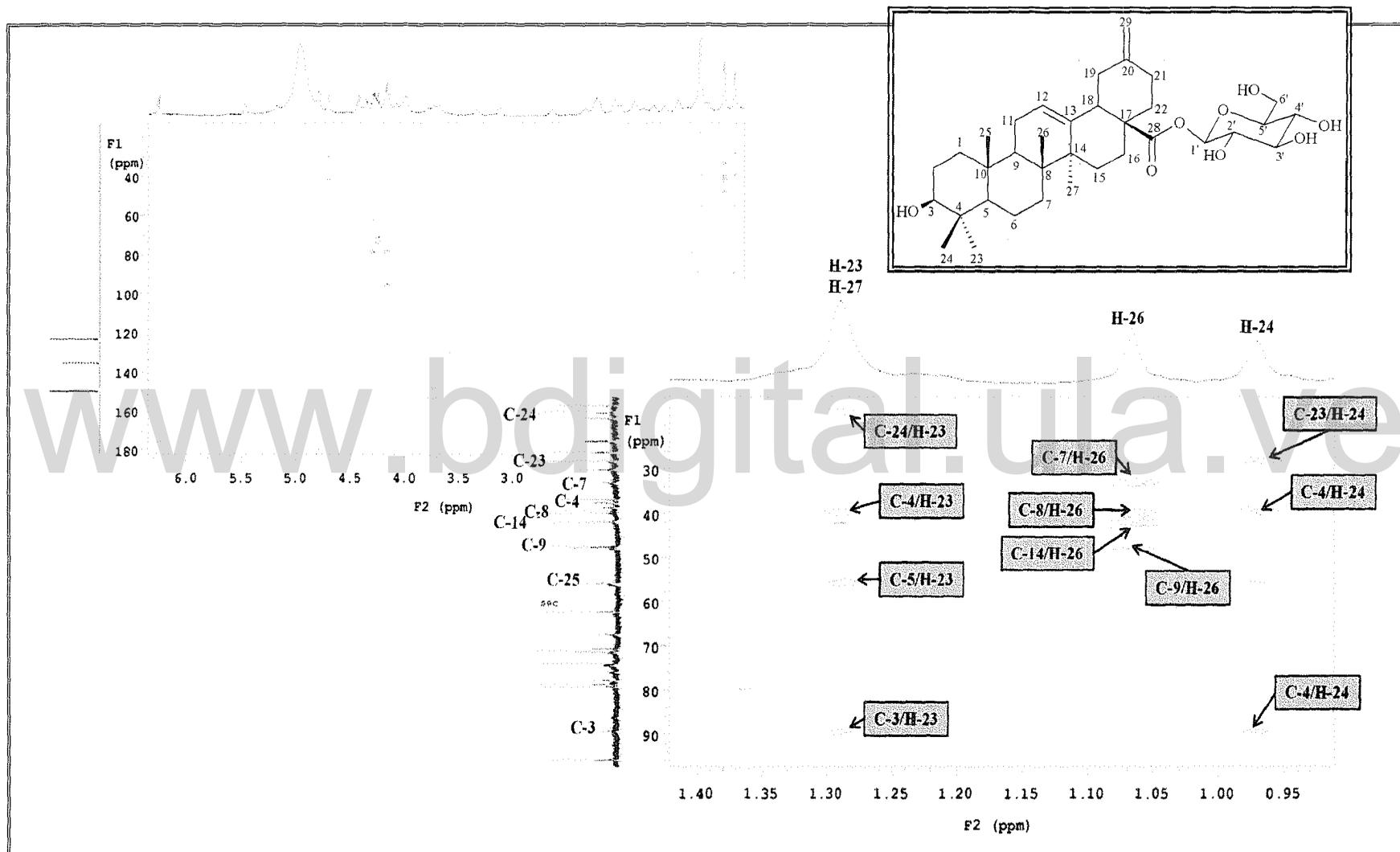


Figura 78. Espectro y ampliación de HMBC (C_5D_5N) de [10].

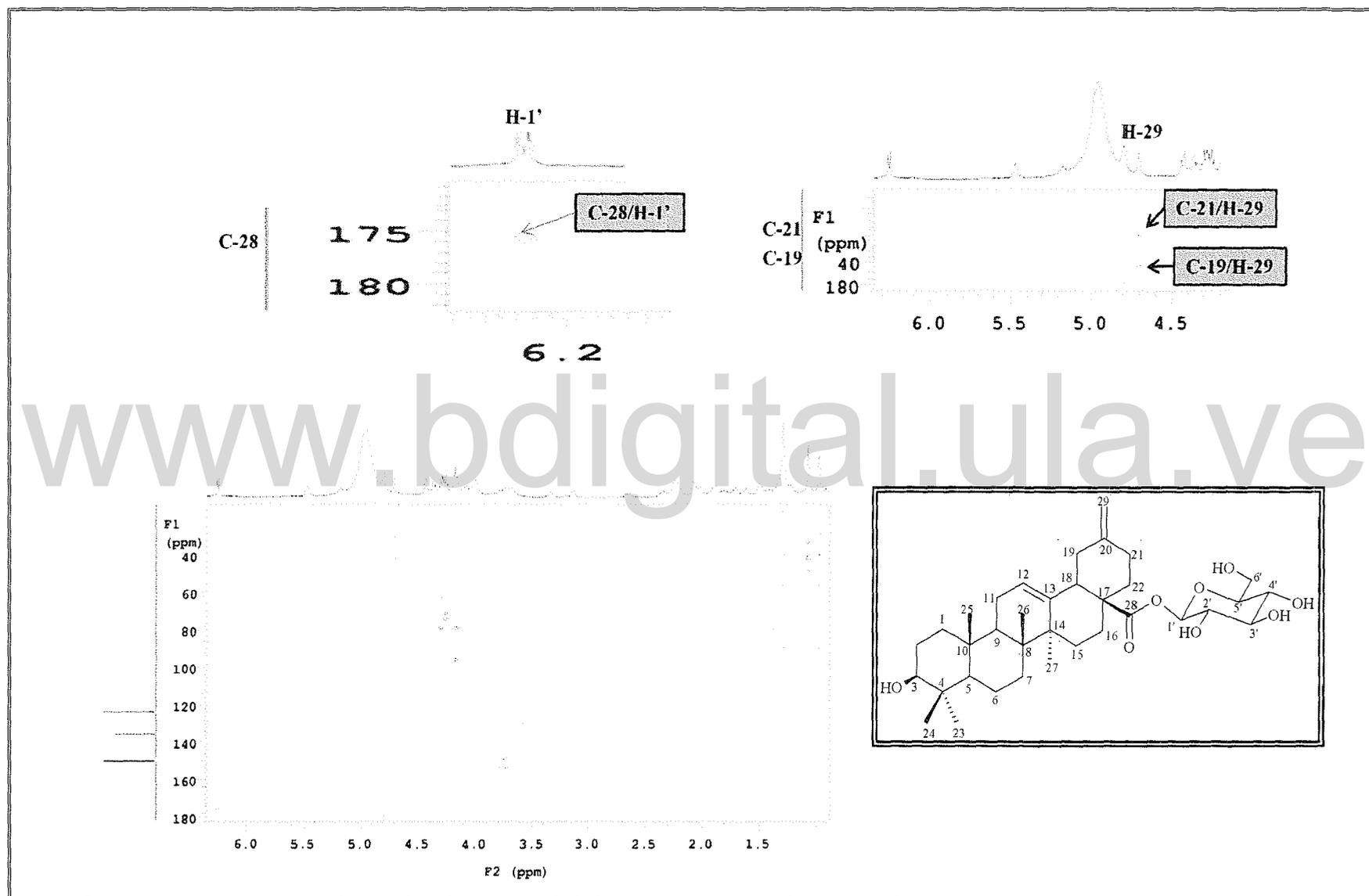


Figura 78. 1. Ampliaciones del espectro HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [10].

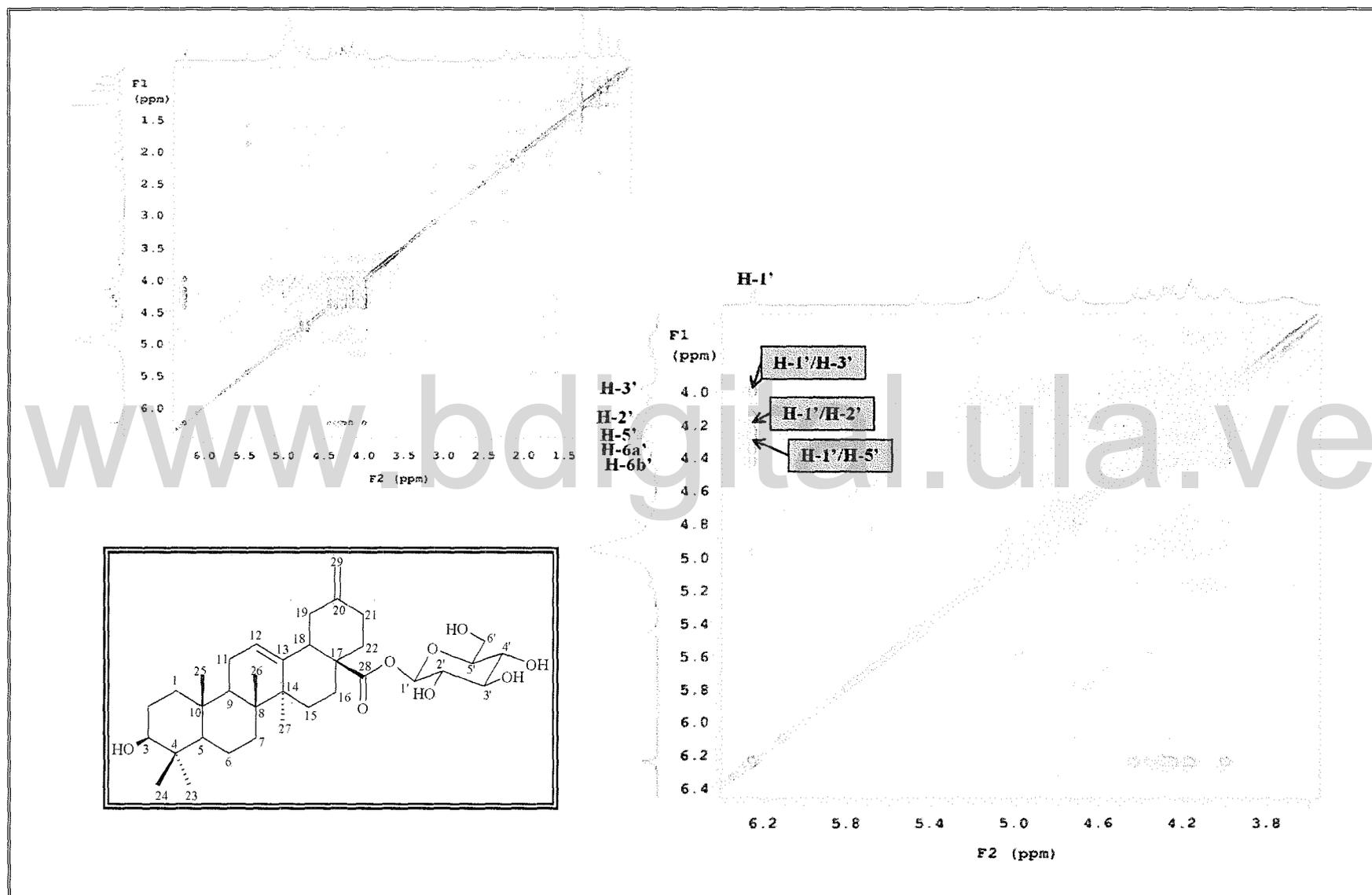


Figura 79. Espectro y ampliación de TOCSY (C_5D_5N) de [10].

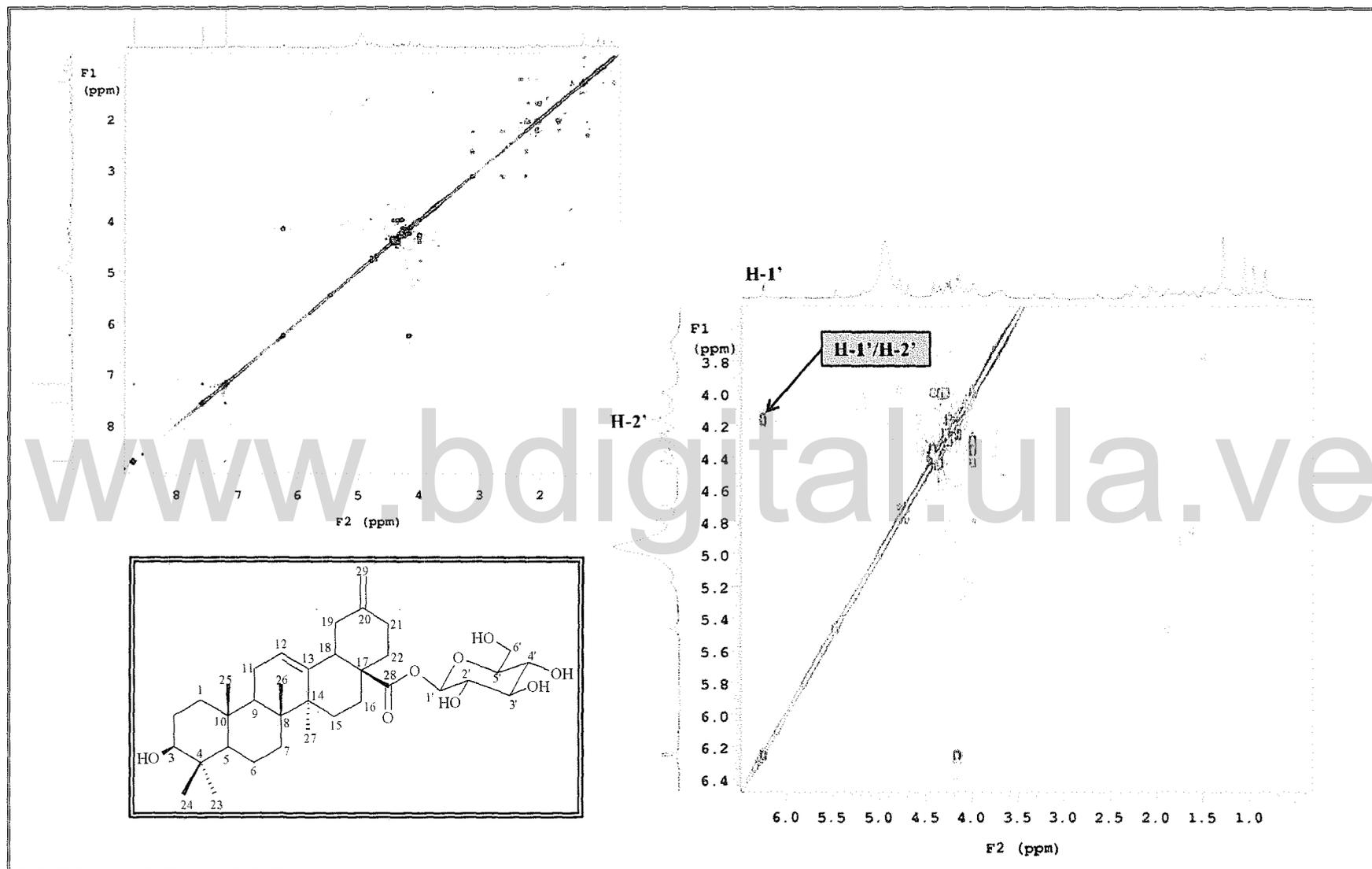


Figura 80. Espectro y ampliación de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de [10].

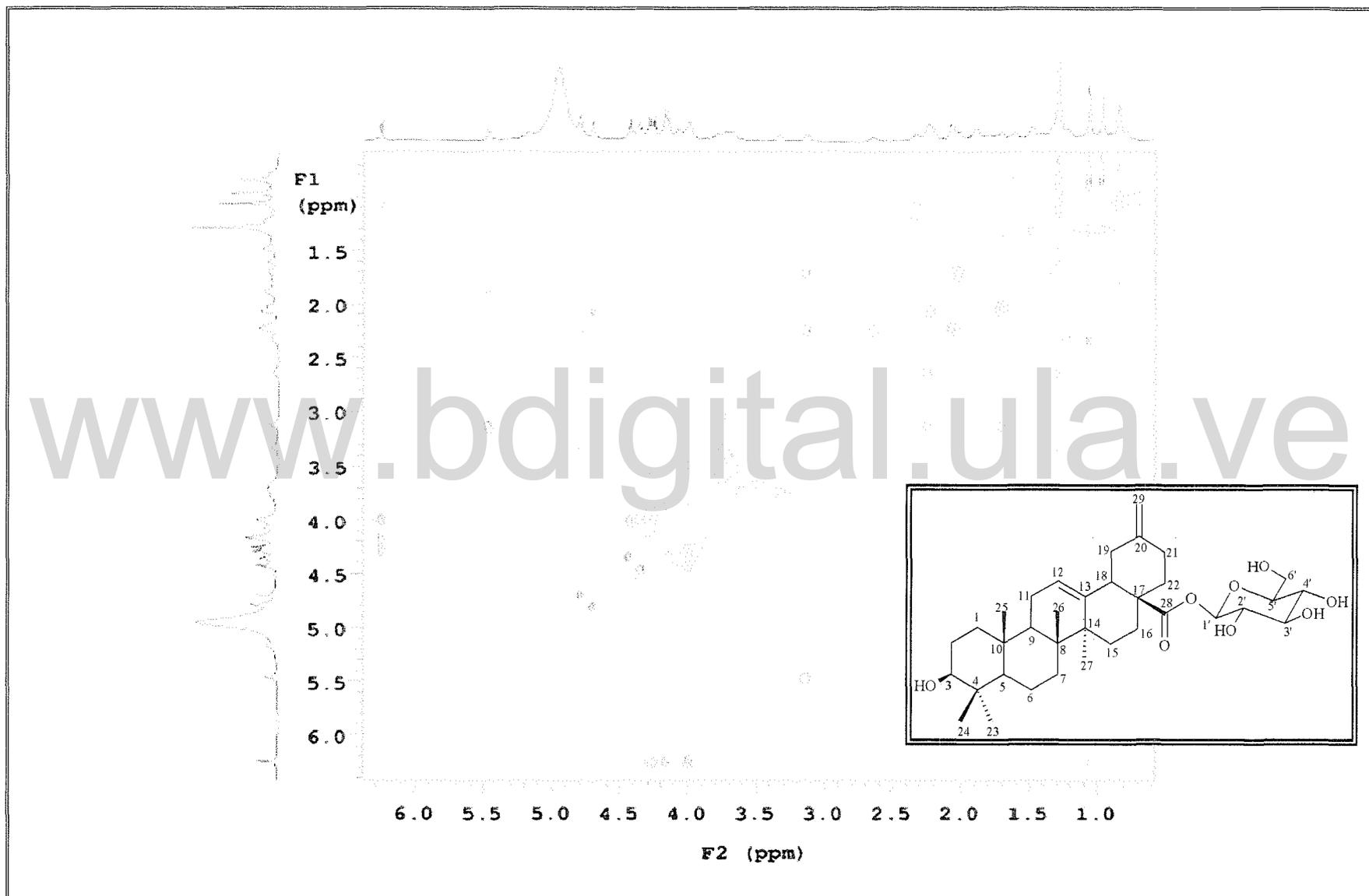


Figura 81. Espectro ROESY (C_5D_5N) de [10].

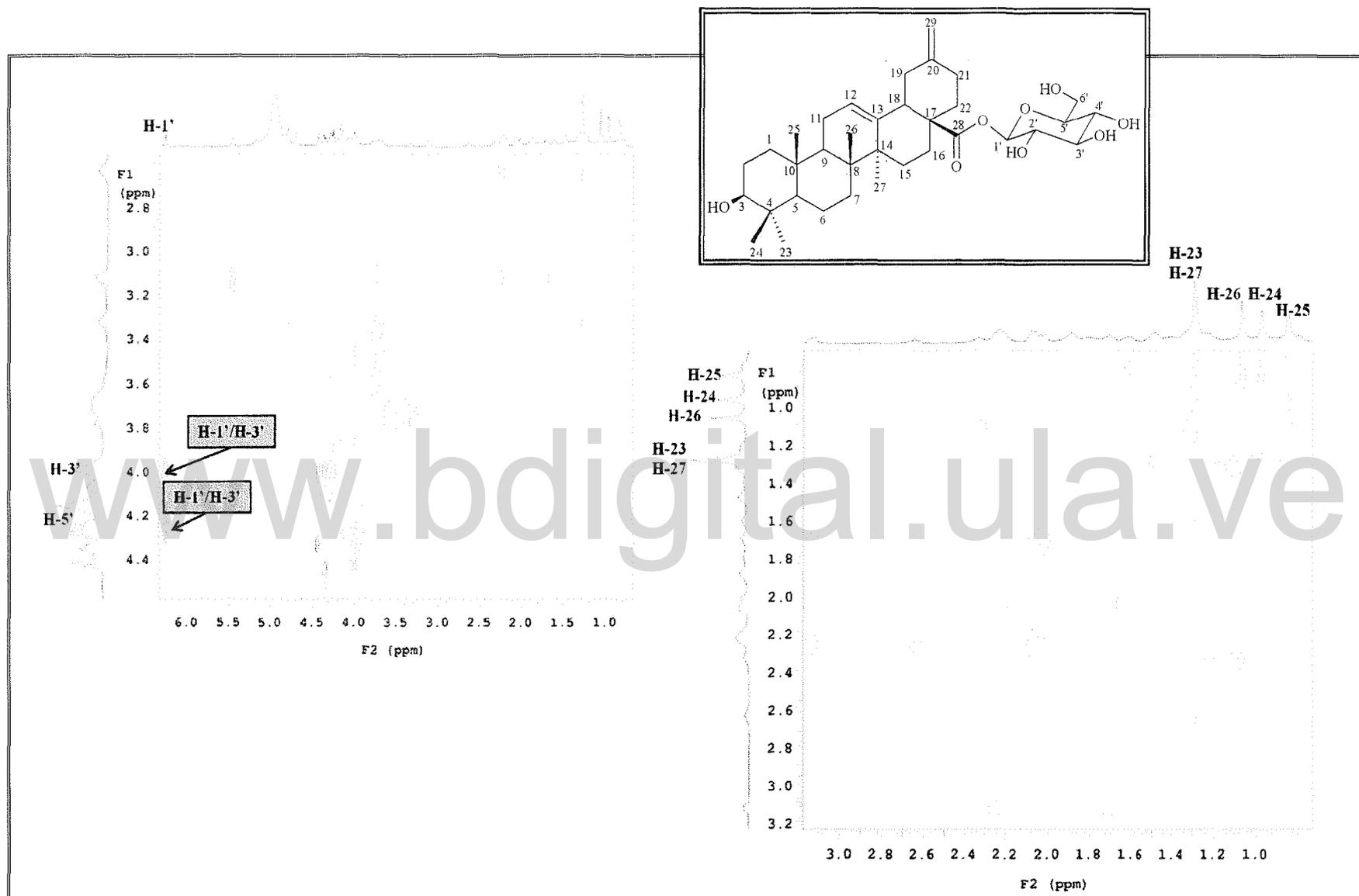


Figura 81.1. Ampliaciones del espectro ROESY (C_5D_5N) de [10].

www.bdigital.ula.ve

VII.-PARTE EXPERIMENTAL

VII.1.-*Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae)

Esta parte experimental fue realizada en el Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela.

VII.1.a.-Técnicas generales aplicadas:

Cromatografías de columnas.- Para las cromatografías en columna se utilizó gel de sílice 60 (Merck, 63 a 200 μ , 70-230 mesh) como adsorbente y montaje húmedo. El criterio para el desarrollo de cada columna dependió de cada muestra en particular (Cassidy, 1966 y Sthalt 1969). La cromatografía en columna de exclusión (Sephadex LH20), se realizó según la metodología descrita por Henke (1995).

Cromatografía de capa fina y capa gruesa.- Para la cromatografía de capa fina (CCF) y capa gruesa (CCGP) se utilizó papilla de sílica gel Merck HF 254 de 0.25 y 0.5 mm, respectivamente, soportada sobre placas de vidrio. Los sistemas de eluyentes fueron escogidos de acuerdo a la separación más adecuada en CCF. Para el revelado de las placas (CCF), éstas fueron rociadas con “oleum” (AcOH/H₂O/H₂SO₄, 20:4:1 v/v) y después calentadas con corriente de aire a 100°C por algunos minutos.

Puntos de fusión y ebullición.- Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer–Johns dotado de plancha de calentamiento para el rango de 20 a 300 °C. Los puntos de ebullición fueron realizados en un tubo de Thiele y corregidos.

Espectros infrarrojos.- Se realizaron en un espectrofotómetro Perkin–Elmer modelo FT-1725X, en pastillas de KBr para los sólidos y como película líquida sobre NaCl para los líquidos.

Espectros de RMN.- Los espectros de RMN uni y bidimensional fueron tomados en un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker–Avance DRX 400 a (400 y 100 MHz), respectivamente. Los disolventes deuterados utilizados fueron escogidos de acuerdo a la solubilidad de los compuestos aislados. Para cada espectro se usó TMS como patrón interno.

Espectros de masas.- Los espectros de masas se realizaron utilizando un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5930 ^a, 70 ev.

VII.1.b.-Recolección del material vegetal:

El material vegetal se recolectó en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela. La muestra botánica de la especie se encuentra depositada en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). La clasificación botánica de la especie la realizó el Ingeniero Forestal Juan Carmona Arzola, Curador del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA).

VII.1.c.-Extracción del material vegetal en bruto:

Consistió, en la extracción sucesiva de las hojas frescas con solventes de polaridad creciente (hexano, acetona, metanol), haciendo uso de un soxhlet y la posterior concentración al vacío (por medio de un rotavapor) a una temperatura no mayor de 40 °C.

VII.1.d.-Cromatografía general de los extractos de acetona:

Los extractos en acetona (35 g) de las hojas fueron redisueltos en el mismo solvente y se le agregó suficiente gel de sílice Merck-60 para formar una pasta homogénea. Posteriormente se eliminó la mayor parte del solvente en un rotavapor y la gel húmeda recuperada en cada caso, se extendió en bandejas y se mantuvo bajo campana de vacío hasta asegurar la completa evaporación del solvente.

Una vez seca la gel de sílice con los extractos preadsorbidos, se homogenizó en un mortero y se tamizó, quedando lista las “cabezas” para la etapa cromatográfica.

Los procesos cromatográficos generales se llevaron a cabo utilizando la técnica de cromatografía en columna al vacío de Coll & Bowden (1986). Las columnas fueron eluidas con mezclas binarias de hexano, diclorometano y metanol en orden de polaridad creciente. Se recogieron fracciones de 250 mL y las mismas se concentraron en un rotavapor, a temperatura inferior a 40 °C, y luego se pesaron.

VII.1.e.-Resultados de la cromatografía general de los extractos de acetona:

Las fracciones concentradas fueron redisueltas en cantidades mínimas de acetona ó diclorometano y luego analizadas por cromatografía de capa fina, usando diferentes

sistemas de elusión; sobre la base de estos análisis, las fracciones fueron adecuadamente reunidas. El resultado de la cromatografía se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de acetona.

Reunión	Fracciones	Eluyentes	Peso (g)	Compuestos
A	2-10	Hex/CH ₂ Cl ₂ (50%)	9, 574	Mezclas + [1] y [2]
B	11-22	Hex/CH ₂ Cl ₂ (70%)	3,241	Mezclas complejas
C	24-26	Hex/CH ₂ Cl ₂ (90%)	1,138	Mezclas + [3]
D	27-38	CH ₂ Cl ₂	3,079	Mezclas complejas
E	39-44	CH ₂ Cl ₂ /MeOH(3%)	1,117	Mezclas complejas
F	45-52	CH ₂ Cl ₂ /MeOH(5%)	5,840	Mezclas + [4]
G	53-60	CH ₂ Cl ₂ /MeOH(10%)	4,097	Mezclas complejas
H	61-74	CH ₂ Cl ₂ /MeOH(50%)	7,038	Mezclas complejas

VII.1.f.-Asilamiento y purificación de los productos.

A) Aislamiento y purificación de Zanthoxyfolina [1]:

Fue aislado de la reunión A por recromatografía por Sephadex[®] LH20, en un sistema [Hexano: CH₂Cl₂: Metanol (1:2:1)], como eluyente, para eliminar la clorofila, y purificado mediante el empleo de cromatografía de capa gruesa preparativa (CCGP), usando una mezcla de [Hex: CH₂Cl₂ (3:2)] como eluyente y cuatro recorridos.

Fórmula molecular: C₁₉H₂₃NO₂ (82 mg).

Pf: 68-69°C.

Peso molecular: 297 g/mol

IR: (ver Figura 7, Tabla 1).

EM: (ver Figura 6).

RMN-¹³C: (ver Figura 8, Tabla 2).

RMN-¹H: (ver Figura 8, Tabla 3).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figura 10).

HSQC: (ver Figura 11).

HMBC: (ver Figuras 12 y 12.1; Diagrama 1).

Rayos-X: (ver Figura 13).

B) Aislamiento y purificación de 1β-hidroxi-β-ylangeno:

Fue aislado de la reunión A por cromatografía de Sephadex[®] LH20, en un sistema [Hexano: CH₂Cl₂: Metanol (1:2:1)], como eluyente, para eliminar la clorofila, y purificado mediante el empleo de cromatografía de capa gruesa preparativa (CCGP), usando una mezcla de [Hex: AcEt (9:1)] como eluyente y tres recorridos.

Fórmula molecular: C₁₅H₂₄O (46 mg).

Pe: 123-124°C.

Peso molecular: 220 g/mol

IR: (ver Figura 15, Tabla 9).

RMN-¹³C: (ver Figura 16, Tabla 10).

RMN-¹H: (ver Figura 17, Tabla 11).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figura 19).

HSQC: (ver Figura 18).

HMBC: (ver Figuras 20; Diagrama 2).

NOESY: (ver Figura 21)

C) Aislamiento y purificación de Óxido de 8,13-*epi*-maoil-14-eno:

Fue aislado de la reunión C por recromatografía por Sephadex[®] LH20, en un sistema [Hexano: CH₂Cl₂: Metanol (1:2:1)], como eluyente, para eliminar la clorofila, y purificado mediante el empleo de cromatografía de capa gruesa preparativa (CCGP), usando una mezcla de [Hex: CH₂Cl₂ (7:4)] como eluyente y tres recorridos.

Fórmula molecular: C₂₀H₃₄O (53 mg).

Pf: 79-80°C.

Peso molecular: 290 g/mol

IR: (ver Figura 22, Tabla 12).

RMN-¹³C: (ver Figura 23, Tabla 13).

RMN-¹H: (ver Figura 24, Tabla 14).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figura 26).

HSQC: (ver Figura 25).

HMBC: (ver Figuras 27 y 27.5; Diagrama 3).

NOESY: (ver Figura 28).

D) Aislamiento y purificación de 4,6-dimetoxifurano:

Fue aislado de la reunión F por recromatografía por Sephadex[®] LH20, en un sistema [Hexano: CH₂Cl₂: Metanol (1:2:1)], como eluyente, para eliminar la clorofila, y purificado mediante el empleo de cromatografía de capa gruesa preparativa (CCGP), usando una mezcla de [Hex: CH₂Cl₂ (3:2)] como eluyente y cinco recorridos.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₀O₃ (58 mg).

Pf: 85-86°C.

Peso molecular: 178 g/mol

IR: (ver Figura 29, Tabla 15).

RMN-¹³C: (ver Figura 30, Tabla 16).

RMN-¹H: (ver Figura 31, Tabla 17).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figura 33).

HSQC: (ver Figura 32).

HMBC: (ver Figura 34; Diagrama 4).

www.bdigital.ula.ve

VII.2.-*Bulnesia arborea* Cl. Gay. (Zygophyllaceae).

Esta parte experimental fue realizada en el Laboratorio de Farmacognosia, Unidad de Moléculas de Interés Biológico (UMIB), Facultad de Farmacia, Universidad de Bourgogne, Dijon-Francia.

VII.2.a.-Técnicas generales aplicadas:

Cromatografías de columnas.- Para la cromatografía líquida en columna a presión media (MPLC) se utilizó gel de sílice 60 (Merck, 15 a 40 μm) y gel de sílice RP18 (Merck, 25 a 40 μm) como adsorbente y montaje húmedo, con una bomba *Gilson* M-305 y pre-columna Büchi (110x15 mm). El criterio y el tamaño de cada columna dependió de cada muestra en particular (Elbandy *et al.*;2007). La cromatografía en columna de exclusión (Sephadex LH20), se realizó según la metodología descrita por Henke (1995).

Cromatografía de capa fina.- Para la cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) se utilizó papilla de sílica gel Merck 60 F₂₅₄, respectivamente, soportada sobre placas de vidrio. Los sistemas de eluyentes para saponinas fueron escogidos de acuerdo a la separación más adecuada en CCF. Para el revelado de las placas (CCF), éstas fueron rociadas con “*Komarowsky*” (mezcla de 5:1 al 2% de 4-hidroxibenzaldehído en MeOH y 50% de H₂SO₄) y después calentadas con corriente de aire a 100°C por algunos minutos.

Espectros de RMN.- Los espectros de RMN uni y bidimensional fueron tomados en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian VNMR-S 600MHz, respectivamente. Utilizando como solvente deuterado piridina-*d*₅. Para cada espectro se usó TMS como patrón interno.

VII.2.b.-Recolección y preparación del material vegetal:

El material vegetal se recolectó en el Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, San Juan de Lagunillas Estado Mérida. La muestra botánica de la especie se encuentra depositada en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). La clasificación botánica de la especie la realizó el Ingeniero Forestal Juan Carmona Arzola, Curador del Herbario MERF de la

Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). Las hojas y tallos, se colocaron dentro de una estufa a 40°C, para acelerar el proceso de secado durante dos días. A continuación se procedió a molerlos separadamente en un molino eléctrico.

VII.2.c.-Extracción del material vegetal en bruto:

Consistió, en la extracción sucesiva, en reflujo, de las hojas (250 g) y los tallos (250 g), por separado, con MeOH:H₂O (70:30), durante 45 minutos, para la posterior concentración al vacío (por medio de un rotavapor) a una temperatura no mayor de 40 °C. Una vez obtenidos ambos extractos, se realizaron repetidas extracciones con *n*-butanol (BuOH) saturado, a cada uno de ellos, para la eliminación de los azúcares en la fase acuosa, obteniendo de esta manera, fase orgánica, el extracto de BuOH, que finalmente se concentró al vacío (por medio de un rotavapor) a una temperatura no mayor de 40 °C.

VII.2.d.-Cromatografía general de los extractos de BuOH de las hojas y tallos:

El extracto de BuOH (4 g) de las hojas, fue preadsorbido sobre gel de sílice de fase reversa RP18 (Merck, 25 a 40 µm). Los procesos cromatográficos generales se llevaron a cabo utilizando la técnica de cromatografía en columna al vacío (VLC), Sephadex LH20, y cromatografía líquida de columna a presión media (MPLC) (Acharya *et al.*, 2008).

El extracto de BuOH, de los tallos (2g), fue preadsorbido sobre gel de sílice de fase reversa RP18 (Merck, 25 a 40 µm) en cromatografía líquida de columna a presión media (MPLC) (Acharya *et al.*, 2008).

VII.1.e.-Resultados de la cromatografía general de los extractos de BuOH de las hojas y tallos:

Las fracciones, concentradas fueron redisueltas en cantidades mínimas de H₂O o MeOH, luego analizadas por cromatografía de capa fina, usando diferentes sistemas de elusión para saponinas, (Elbandy *et al.*, 2007; Acharya *et al.*, 2008); sobre la base de estos análisis, las fracciones fueron adecuadamente reunidas. El resultado de las cromatografías se muestran en las siguientes tablas.

➤ **Hojas**

Tabla 31. Fracciones obtenidas de la cromatografía general de la columna VLC del extracto de BuOH.

Reunión	Fracciones	Eluyentes	Peso (g)	Compuestos
BuBa 1	1-7	H ₂ O	3,7	Mezclas + [5]
BuBa 2	8-15	MeOH:H ₂ O (50:50)	4,5	Mezclas complejas
BuBa 3	16-20	MeOH	5,0	Mezclas complejas

Tabla 32. Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de la fracción BuBa2, columna (46cm x 2,2cm) MPLC (sílice 15-40 µm).

Reunión	Fracciones	Eluyentes	Peso (mg)	Compuestos
BuBa 2.1	1-84	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (60:32:6,5)	73,0	Mezclas + [5]
BuBa 2.2	85-97	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (60:32:6,5)	12,5	Mezclas complejas
BuBa 2.3	98-103	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (60:32:6,5)	4,6	Mezclas complejas
BuBa 2.4	104-107	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (60:32:6,5)	3,1	Mezclas complejas
BuBa 2.5	108-110	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (60:32:6,5)	4,1	Descomposición
BuBa 2.6	111-253	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (64:40:80)	17	Mezclas complejas
BuBa 2.7	254-313	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (64:40:80)	92,0	Descomposición
BuBa 2.8	314-380	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (64:40:80)	336,7	Mezclas complejas
BuBa 2.9	381-400	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (64:40:80)	22	Descomposición

Tabla 33. Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de BuOH, columna de Sephadex LH-20.

Reunión	Fracciones	Eluyentes	Peso (mg)	Compuestos
BuBaSx1	1-19	MeOH:H ₂ O (50:50)	287,1	Mezclas complejas
BuBaSx2	20-22	MeOH:H ₂ O (50:50)	104,0	Mezclas complejas
BuBaSx3	23-24	MeOH:H ₂ O (50:50)	97,0	Mezclas complejas
BuBaSx4	25-29	MeOH:H ₂ O (50:50)	180,0	Mezclas complejas
BuBaSx5	30-33	MeOH:H ₂ O (50:50)	61,1	Mezclas + [6]
BuBaSx6	34-35	MeOH:H ₂ O (50:50)	17,0	Mezclas + [6]
BuBaSx7	36-43	MeOH:H ₂ O (50:50)	17,1	Mezclas complejas
BuBaSx8	44-47	MeOH:H ₂ O (50:50)	40,0	Mezclas complejas
BuBaSx9	48-53	MeOH:H ₂ O (50:50)	38,8	Mezclas complejas
BuBaSx10	54-55	MeOH	28,4	Mezclas complejas
BuBaSx11	56-59	MeOH	52,3	Mezclas complejas
BuBaSx12	60-75	MeOH	175,7	Mezclas + [7]
BuBaSx13	90-95	MeOH	90,5	Mezclas complejas

➤ **Tallos**

Tabla 34. Fracciones obtenidas de la cromatografía general del extracto de BuOH, columna (43cm x 1,5 cm) MPLC en sílice de fase reversa RP18.

Reunión	Fracciones	Eluyentes	Peso (mg)	Compuestos
BuBaT1	1-8	MeOH:H ₂ O (40:60)	4,0	Mezclas
BuBaT2	9-11	MeOH:H ₂ O (40:60)	152,1	Mezclas
BuBaT3	12-26	MeOH:H ₂ O (40:60)	4,5	[8]
BuBaT4	34-43	MeOH:H ₂ O (50:50)	7,7	Mezclas
BuBaT5	44-50	MeOH:H ₂ O (50:50)	32,3	Mezclas
BuBaT6	51-54	MeOH:H ₂ O (60:40)	3,1	[9]
BuBaT7	55-59	MeOH:H ₂ O (60:40)	7,1	Mezclas
BuBaT8	60-63	MeOH:H ₂ O (60:40)	1,6	Mezclas
BuBaT9	64-68	MeOH:H ₂ O (70:30)	1,5	Mezclas
BuBaT10	69-75	MeOH:H ₂ O (70:30)	3,9	[10]
BuBaT11	76-78	MeOH:H ₂ O (70:30)	7,6	Mezclas
BuBaT12	79-80	MeOH:H ₂ O (70:30)	13,5	Mezclas
BuBaT13	81-86	MeOH:H ₂ O (80:20)	3,4	Mezclas
BuBaT14	87-93	MeOH:H ₂ O (80:20)	4,7	Mezclas
BuBaT15	94-97	MeOH:H ₂ O (80:20)	3,9	Mezclas
BuBaT16	98-103	MeOH:H ₂ O (90:10)	5,3	Mezclas

VII.2.f.-Asilamiento y purificación de los productos de las hojas y los tallos:

➤ **Hojas**

A) **Aislamiento y purificación de Bulnearboreanósido I [5]:**

Fue aislado de la reunión BuBa 2.1, mediante una columna (46cm x 1,5cm) MPLC utilizando como eluyentes [CHCl₃:MeOH:H₂O (65:35:10)].

Fórmula molecular: C₂₁H₃₂O₁₀ (8.1 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 444,48 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figuras 35 y 36, Tabla 18).

RMN-¹H: (ver Figura 37, Tabla 19).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 41 y 41.1).

HSQC: (ver Figuras 38; 38.1 y 38.2).

HMBC: (ver Figura 39 y 39.1; Diagrama 5).

TOCSY: (ver Figuras 40 y 40.1).

ROESY: (ver Figura 42).

B) Aislamiento y purificación de de 3,21-bis[O-β-D-glucopiranosilo] de ergosta-5,24(28)-dieno-(3β,11α,21,26)-tetrol [6]:

Fue aislado de la reunión BuBaSx5 y BuBaSx6, luego de cromatografiar nuevamente sobre Sphadex LH20 en un sistema MeOH:H₂O (50:50).

Fórmula molecular: C₄₀H₆₆O₁₃ (3.2 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 754,96 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figuras 43 y 44, Tabla 20).

RMN-¹H: (ver Figura 45, Tabla 21).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 49).

HSQC: (ver Figuras 46 y 46.1).

HMBC: (ver Figuras 47 y 47.1; Diagrama 5).

TOCSY: (ver Figuras 48).

ROESY: (ver Figura 50)

C) Aislamiento y purificación de 11α-acetil3β-O-D-xilosil-23-O-D-ramnosil- ergosta- 5,24(28)- dieno-3β, 11α, 21, 26-tetrol [7].

Fue aislado de la reunión BuBaSx12, luego de cromatografiar nuevamente sobre Sphadex LH20 en un sistema MeOH:H₂O (50:50).

Fórmula molecular: C₄₁H₆₆O₁₃ (1.7 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 766,98 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figura 52, Tabla 23).

RMN-¹H: (ver Figura 51, Tabla 22).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 56).

HSQC: (ver Figuras 53 y 53.1).

HMBC: (ver Figuras 54 y 54.1; Diagrama 6).

TOCSY: (ver Figuras 55).

ROESY: (ver Figura 57)

➤ Tallos

D) **Aislamiento y purificación de 3β, 24- dihidroxiolean- 12-en- 28-oato de β-galactopiranosilo [8].**

Fue aislado de la reunión BuBaT3, empleando una columna (43cm x 1,5 cm) MPLC en sílice de fase reversa RP18 utilizando como eluyentes [MeOH:H₂O], como se muestra en la tabla 34.

Fórmula molecular: C₃₆H₅₈O₉ (4,5 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 634,86 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figuras 58 y 59, Tabla 24).

RMN-¹H: (ver Figura 60, Tabla 25).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 64).

HSQC: (ver Figuras 61).

HMBC: (ver Figuras 62; Diagrama 7).

TOCSY: (ver Figura 63).

ROESY: (ver Figura 65).

E) **Aislamiento y purificación de 3-O-[β-xilosil(1→3)glucopiranosil]-3β,24-dihidroxi-30-nor-olean-12,20(29)-dien-28-oato de β-galactopiranosilo [9].**

Fue aislado de la reunión BuBaT6, empleando una columna (43cm x 1,5 cm) MPLC en sílice de fase reversa RP18 utilizando como eluyentes [MeOH:H₂O], como se muestra en la tabla 34.

Fórmula molecular: C₄₆H₇₂O₁₈ (3,1 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 913,08 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figuras 66 y 67, Tabla 26).

RMN-¹H: (ver Figura 68, Tabla 27).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 72).

HSQC: (ver Figuras 69 y 69.1).

HMBC: (ver Figuras 70 y 70.1).

TOCSY: (ver Figuras 71).

ROESY: (ver Figura 73).

F) Aislamiento y purificación de 3 β , 24-dihidroxi-30-nor-oleano-12,20(29)-dien-28-oato de β -gluco-piranosilo [10].

Fue aislado de la reunión BuBaT10, empleando una columna (43cm x 1,5 cm) MPLC en sílice de fase reversa RP18 utilizando como eluyentes [MeOH:H₂O], como se muestra en la tabla 34.

Fórmula molecular: C₃₅H₅₄O₈ (3,9 mg).

Pf: descomposición.

Peso molecular: 602,82 g/mol

RMN-¹³C: (ver Figuras 74 y 75, Tabla 28).

RMN-¹H: (ver Figura 76, Tabla 29).

¹H, ¹H-COSY: (ver Figuras 80).

HSQC: (ver Figura 77).

HMBC: (ver Figuras 78 y 78.1).

TOCSY: (ver Figura 79).

ROESY: (ver Figuras 81 y 81.1).

VIII.-CONCLUSIONES

www.bdigital.ula.ve

1.-La breve reseña sobre los metabolitos secundarios aislados o identificados e el género *Zanthoxylum* y en la familia Zygophyllaceae, presentada en la primera parte de este trabajo, puso una vez más en evidencia la gran variedad y la particular especificidad de estos metabolitos. De igual manera, este estudio sirvió para ilustrar la importancia que tienen estos metabolitos como sustancias potencialmente activas desde el punto de vista biológico o farmacológico.

2.-Del *Zanthoxylum rhoifolium* LAM, se han reportado varios alcaloides, sin embargo, en este trabajo se logró identificar el nuevo alcaloide Zanthoxyfolina [1], reportado por primera vez como producto natural.

3.- El sesquiterpeno, 1 β -hidroxi- β -ylangeno [2], pesar de ser un compuesto conocido, hasta ahora no había sido reportado en el género *Zanthoxylum*.

4.- La presencia de diterpenos en el género *Zanthoxylum* es escasa, sin embargo en estudios anteriores se han reportado isómeros de diterpenos de la serie del labdano, en este trabajo se reportó un isómero más, el óxido de 8,13-epi-manoil-14-eno [3].

5.- El 4,6-benzofurano [4], es un compuesto conocido desde el punto sintético, a pesar de esto, se asiló como producto natural por primera vez en las hojas del *Zanthoxylum rhoifolium* LAM.

5.- La especie *Bulnesia arborea* Cl. Gay. (Zygophyllaceae), hasta el presente, no había sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico y resultó ser fuente importante de saponinas.

6.- De las hojas de *Bulnesia arborea* Cl. Gay, se lograron aislar, dos nuevas saponinas de la serie del ergostano: 3,21-bis [*O*- β -D- glucopiranosilo] de ergosta-5,24(28)-dieno- (3 β ,11 α ,21,26)-tetrol [6] y 11 α - acetil3 β - *O*-D- xilosil-23-*O*-D- ramnosil- ergosta-5,24(28)- dieno-3 β , 11 α , 21, 26-tetrol [7]. Además de un nuevo esqueleto de una lactona sesquiterpénica glicosidada: bulnearboreanósido I [5].

7.- De los tallos de *Bulnesia arborea* Cl. Gay. se aislaron tres nuevas saponinas triterpénicas de la serie del oleanano: 3 β ,24-dihidroxiolean-12-en-28-oato de β -galactopiranosilo [8], 3-O-[β -xilosil(1 \rightarrow 3)glucopiranosil]-3 β ,24-dihidroxi-30-nor-olean-12,20(29)-dien-28-oato de β -glucopiranosilo [9] y 3 β ,24-dihidroxi-30-nor-olean-12,20(29)-dien-28-oato de β -gluco-piranosilo [10].

8.- Los estudios mediante técnicas bidimensionales de Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^1H -COSY, HSQC, HMBC y ROESY), realizados a los productos aislados, permitieron asignar de manera inequívoca, todas las señales en sus respectivos espectros de RMN, siendo la primera vez que se reporta para los compuestos [1], [5], [6], [7], [8], [9] y [10].

9.- En vista de los reportes que existen en la literatura sobre las actividades de los extractos y compuestos aislados tanto para el género *Zanthoxylum*, como para la familia Zygophyllaceae, es evidente que tanto el *Zanthoxylum rhoifolium* LAM, como la *Bulnesia arborea* Cl. Gay. pueden ser aprovechadas como fuente de productos de potencial actividad biológica o farmacológica.

IX.-REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

www.bdigital.ula.ve

1. ABDEL, M.; OMAR, A.; ABDEL, N.; STERMITZ, F. 1993. Erythroan diterpenes and flavonoids from *Fagonia bruguieri*. **Phytochemistry**, **33**: 718-720.
2. ABDEL, M.; OMAR, A.; ABDEL, N.; STERMITZ, F. 1994. Erythroan diterpenes from *Fagonia* species. **Phytochemistry**, **36**:1431-1433.
3. ABDEL, S.; MIYASE, T.; EL-ASHAAL, H.; MELEK. 2000. Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*. **Phytochemistry**, **54**: 853-859.
4. ABE, F.; YAHARA, S.; KUBO, K.; NONAKA, G.; OKABE, H.; NISHIOKA, I. 1974. *Xanthoxylum* species. II. Constituents of the bark of *Xanthoxylum piperitum*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, **22**(11): 2650-2655.
5. ACHARYA, D.; MITAINE, A.; KAUSHIK, N.; MIYAMOTO, T.; PAULULAT, T.; LACAILLE, M. 2008. Furostane-Type Steroidal Saponins from the Roots the *Chlorophytum borivilianum*. **Helvetica Chimica Acta**, **91**: 2262-2269.
6. ACHENBACH, H.; HÜBNER, H.; BRANDT, W.; REITER, M. 1994. Cardioactive steroid saponins and other constituents from the arterial parts of *Tribulus cistoides*. **Phytochemistry**, **35**: 1527-1543
7. ADAIKAN, P.; GAUTHAMAN, K.; PRASAD, R. 2000. Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum. **Annals of the Academic Medicine of Singapore**, **29**: 22-26.
8. ADESINA, K.; OLUGBADE, TIWALADE A.; AKINWUSI, DOYE D.; VON WILLERT, DIETER J. 1997b. New amides from *Zanthoxylum lemairie* pericarps. **Planta Medica**, **63**(3), 286-287.
9. ADESINA, S. K. 1989. Three new amides from *Zanthoxylum rubescens*. **Planta Medica**, **55** (5): 324-326.
10. ADESINA, S. K.; OLUGBADE, T. A.; AKINWUSI, D. D.; BERGENTHAL, D. 1997a Extractives from *Zanthoxylum lemairie* root and stem. **Pharmazie**, **52**(9), 720-724.
11. ADESINA, S. K.; REISCH, J. 1989. Amides from *Zanthoxylum rubescens*. **Phytochemistry**, **28**(3): 839-842.
12. AHMAD, M. U.; RAHMAN, M.; HUQ, E.; CHOWDHURY, R. 2003. Alkaloids of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, **74**: 191-193.

13. AHMAD, V.; BANO, N.; BANO, S. 1984. Sapogenins from *Guaiacum officinale*. **Phytochemistry**, **23**: 2613-2616.
14. AHMAD, V.; GHAZALA, U. 1992. A triterpenoid saponin from *Zygophyllum propinquum*. **Phytochemistry**, **31**: 1051-1054.
15. AHMAD, V.; GHAZALA, U.; ALI, M. 1993. Saponins from *Zygophyllum propinquum*. **Phytochemistry**, **33**: 453-455.
16. AHMAD, V.; GHAZALA, U.; SHAHEEN, B. 1990a. Saponins from *Zygophyllum propinquum*. **Journal Natural Products**, **53**: 1193-1197.
17. AHMAD, V.; PERVEEN, S.; BANO, S. 1989a. Guaiacin A and B from the leaves of *Guaiacum officinale*. **Planta Medica**, **55**: 307-308.
18. AHMAD, V.; PERVEEN, S.; BANO, S. 1990b. Saponins from the leaves of *Guaiacum officinale*. **Phytochemistry**, **29**: 3287-3290.
19. AHMAD, V.; UDDIN, S.; BANO, S.; FATIMA. 1989b. Two saponins from fruits of *Guaiacum officinale*. **Phytochemistry**, **28**: 2169-2171.
20. AHMED, A.; SALEH, N. 1987. Peganetin, a new branched acetylated tetraglycoside of acacetin from *Peganum harmala*. **Journal of Natural Products**, **50**: 256-258.
21. AHMED, S.; KINGHORN, D.; CORDELL, G.; FARNSWORTH, N. 1981. Isolation of bergapten and marmesin from *Balanites aegyptiaca*. **Planta Medica**, **43**: 92-93.
22. AHSAN, M., AKTER, T.; HASAN, C.; ITO, C., NAZRUL, S. K. 2000. Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhetsa* stem bark. **Fitoterapia**, **71**: 697-700.
23. AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; IOSET, K. N.; DIALLO, D.; MAUËL, J.; HOSTETTSMANN, K. 2007. Antileishmanial activities associated with plants used in the malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, **110**: 99-104.
24. AL, W.; EL, G.; SALEH, N.; 1988. Differences in flavonoid constituents among the species of *Fagonia-sinaica* complex Zygophyllaceae. **Plant Systematics and Evolution**, **161**: 87-90.
25. AL-SHAMMA, S.; DRAKE, D.; FLYNN, L.; MITSCHER, G.; WU, T. 1981. Antimicrobial Agents from Higher Plants. Antimicrobial Agents from *Peganum harmala* Seeds. **Journal of Natural Products**, **44**: 745-747

26. AMARO, J. M.; FRONCZEC, F. R.; MASSANET, G. M.; PANDO, E.; RODRÍGUEZ, F.; WATKINS, F.; ZUBIA, E. 1988. Meridional, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. **Phytochemistry**, **27**(12): 3933-3935.
27. ANSARI, A.; KENNE, L.; RAHMAN, A. 1987. Isolation and characterization of two saponins from *Faginia indica*. **Phytochemistry**, **26**: 1487-1490.
28. ANSARI, A.; KENNE, L.; RAHMAN, A.; WEHLER, T. 1988. Isolation and characterization of a saponin from *Fagonia indica*. **Phytochemistry**, **27**: 3979-3982.
29. AQUINO, R.; TOTORA, S.; FKIH-TETOUANI, S.; CAPASSO, A. 2001. Saponins from the roots of *Zygophyllum gaetulum* and their effects on electrically-stimulated guinea-pig ileum. **Phytochemistry**, **56**: 393-398.
30. ARISTEGUIETA, L. 1973. **Familias y Géneros de los Árboles de Venezuela**. Edición Especial del Instituto Botánico. Caracas, Venezuela.
31. ARRIETA, J.; REYES, B.; CALZADA, F.; CEDILLO, R.; NAVARRETE, A. 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. **Fitoterapia**, **72**: 295-297.
32. ARRUDA, M. S. P.; FERNÁNDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G.; VIEIRA, P. C.; PIRANI, J. R. 1992b. Quinolone alkaloids from *Zanthoxylum acutifolium*. **Phytochemistry**, **31**(10): 3617-3619.
33. ARRUDA, M. S. P.; FERNÁNDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G.; PIRANI, J. R. 1992a. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: a new secofuroquinoline alkaloid. **Biochemistry Systematic and Ecology**, **20**(2): 173-178.
34. ARRUDA, M. S.; FERNÁNDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F.; PIRANI, J. F. 1994. Protolimonoid and lignans from *Zanthoxylum petiolare*. **Phytochemistry**, **36**(5): 1303-1036.
35. ASSEM, E. M.; BENAGES, I.; ALBONICO, S. 1979. A new benzophenanthridine Base from *Fagara mayu*. **Phytochemistry**, **18**(3): 511-512
36. ASSEM, E. M.; BENAGES, I.; ALBONICO, S. 1983. Further alkaloids from bark of *Fagara mayu*. **Planta Medica**. **48**: 77-80.
37. ATTA-UR, A.; AKABAR, A.; KENNE, L. 1984. Hederagenin, ursolic acid, and pinitol from *Fagonia indica*. **Journal of Natural Products**, **47**: 186-187.

38. AYOUB, M.; RASHAN, L.; KHAZRAJI, A.; ADAAY, M. 1989. An oxamide from *Peganum harmala* seeds. **Phytochemistry**, **28**: 2000-2001.
39. BAFI-YEBOA, N. F. A.; ARNASON, J. T.; BAKER, J.; SMITH, M. L. 2005. Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. **Phytomedicine**, **12**: 370-377.
40. BALAKRISHNA, K.; SESHADRI, T. 1947. Couloring matter of tambul seeds. Part III. Synthesis of 3:8:4'-trimetil ether of herbacetin and constitution of tambulin. **Proceedings Mathematical Science**, **26**(3):214-220.
41. BANERJEE, H.; PAL, S.; ADITYACAHUDHURY, N. 1989. Ocurrrence of rutaecarpine in *Zanthoxylum budrunga*. **Planta Medica**, **55**(4): 403.
42. BARBOSA, J.; MEDEIROS, D.; DE FATIMA, M.; BHATTACHARYYA, J. 1989. Spirostanes of *Kallstroemia tribuloides*: Identification of C-25 epimers in mixtures by ¹³C NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, **28**: 1985-1986.
43. BATES, R.; SLAGEL, R. 1962. Terpenoids. VI. β -Bulnesene, α -guaiene, β -patchoulene, and guaioxide in essential oils. **Chemistry & Industry**, **1**: 1715-1716.
44. BELLAKHDAR, J.; CLAISSE, R.; FLEURENTIN, J. ; YOUNOS, C. 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, **35**: 123-143.
45. BELLAMY L. M., 1975. "The Infrared Spectra of Complex Molecules, Vol. 1 and 2." Chapman and Hall. London.
46. BENAGES, I.A.; DE JUAREZ, M.E.A.; ALBONICO, S.M.; URZUA, A.; CASSELS, B.K. 1974. Alkaloids *Fagara mayu* bark. **Phytochemistry**, **13**: 2891-2892.
47. BHUTANI, S.; CHIBBER, S.; SESHADRI, T. 1969. Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris*: Constitution of Tribuloside. **Phytochemistry**, **8**: 299-303.
48. BONGUI, J.; BLANCKAERT, A.; ELOMRI, A.; SEGUIN, E. 2005. Constituents of *Zanthoxylum heitzii* (Rutaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, **33**: 845-847.
49. BOSE, P.; BOSE, J. 1939. Natural flavones. Part III. On the constitution of tambulin. **Journal of the Indian Chemical Society**, **16**: 183.

50. BOULWARE, R.; STERMITZ, F. 1981. Constituents of *Zanthoxylum*. Part 6. Some alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum microcarpum* and *Zanthoxylum procerum*. **Journal of Natural Products**, **44**(2): 200-2005.
51. BOYD, D.; GRUNDON, M. 1970. Quinoline alkaloids Part X. (+). Platydesminium salt and other alkaloids from *Skimmia japonica* Thunb. The synthesis of eduline. **Chemistry of the Society C: Organic**. (4):556-558.
52. BROWN, N. M.; GRUNDON, M. F.; HARRISON, D. M. 1980. Quinoline alkaloids—XXI: The ¹³C NMR spectra of hemiterpenoid quinoline alkaloids and related prenylquinolines. **Tetrahedron**, **36** (24): 3579-3584.
53. CAOLO, M.; STERMITZ, F. 1979. Alfileramine: a new *Zanthoxylum* alkaloid structurally related to tetrahydrocarbinol. **Tetrahedron**, **35**: 1487-1492.
54. CASSYDY, H. 1966. **Fundamentals of Chromatography**. New York. Interscience. 447 p.
55. CHANG, C.; DOONG, S.; TSAI, I.; CHEN, I. 1997. Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, **45**(7), 1419-1422.
56. CHATTERJEE, A.; MUKHERJEE, A.; KUNDY, A. B. 1974. Xanthoxylone. New triterpenoid ketone from *Xanthoxylum* [*Zanthoxylum*] *rhesta*. **Phytochemistry**, **13**(3): 623-625.
57. CHEN, I. S.; WU, S. J.; LEU, Y. L.; TSAI, I. W.; WU, T. S. 1996. Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, **42**(1): 217-219.
58. CHEN, I.; CHEN, T.; CHANG, Y.; TENG, C.; LIN, W. 1999b. Chemical constituents and biological activities of the fruit of *Zanthoxylum integrifolium*. **Journal of Natural Products**, **62**(6), 833-837.
59. CHEN, I.; CHEN, T.; LIN, W.; TSAI, I.; CHEN, Y. 1999a. Isobutylamides from the fruit of *Zanthoxylum integrifolium*. **Phytochemistry**, **52**(2), 357-360.
60. CHEN, I.; TSAI, I.; TENG, C.; CHEN, J.; CHANG, Y.; KO, F.; LU, M.; PEZZUTO, J. 1997. Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, **46**(3): 525-529.
61. CHEN, I.; WU, S.; TSAI, I. 1994. Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. **Journal of Natural Products**, **57**(9): 1206-1211.

50. BOULWARE, R.; STERMITZ, F. 1981. Constituents of *Zanthoxylum*. Part 6. Some alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum microcarpum* and *Zanthoxylum procerum*. **Journal of Natural Products**, **44**(2): 200-2005.
51. BOYD, D.; GRUNDON, M. 1970. Quinoline alkaloids Part X. (+). Platydesminium salt and other alkaloids from *Skimmia japonica* Thunb. The synthesis of edulinine. **Chemistry of the Society C: Organic**. (4):556-558.
52. BROWN, N. M.; GRUNDON, M. F.; HARRISON, D. M. 1980. Quinoline alkaloids—XXI: The ¹³C NMR spectra of hemiterpenoid quinoline alkaloids and related prenylquinolines. **Tetrahedron**, **36** (24): 3579-3584.
53. CAOLO, M.; STERMITZ, F. 1979. Alfileramine: a new *Zanthoxylum* alkaloid structurally related to tetrahydrocarbinol. **Tetrahedron**, **35**: 1487-1492.
54. CASSYDY, H. 1966. **Fundamentals of Chromatography**. New York. Interscience. 447 p.
55. CHANG, C.; DOONG, S.; TSAI, I.; CHEN, I. 1997. Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. **Phytochemistry**, **45**(7), 1419-1422.
56. CHATTERJEE, A.; MUKHERJEE, A.; KUNDY, A. B. 1974. Xanthoxylone. New triterpenoid ketone from *Xanthoxylum* [*Zanthoxylum*] *rhesta*. **Phytochemistry**, **13**(3): 623-625.
57. CHEN, I. S.; WU, S. J.; LEU, Y. L.; TSAI, I. W.; WU, T. S. 1996. Alkaloids from root bark of *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, **42**(1): 217-219.
58. CHEN, I.; CHEN, T.; CHANG, Y.; TENG, C.; LIN, W. 1999b. Chemical constituents and biological activities of the fruit of *Zanthoxylum integrifolium*. **Journal of Natural Products**, **62**(6), 833-837.
59. CHEN, I.; CHEN, T.; LIN, W.; TSAI, I.; CHEN, Y. 1999a. Isobutylamides from the fruit of *Zanthoxylum integrifolium*. **Phytochemistry**, **52**(2), 357-360.
60. CHEN, I.; TSAI, I.; TENG, C.; CHEN, J.; CHANG, Y.; KO, F.; LU, M.; PEZZUTO, J. 1997. Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, **46**(3): 525-529.
61. CHEN, I.; WU, S.; TSAI, I. 1994. Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. **Journal of Natural Products**, **57**(9): 1206-1211.

62. CHENG, M. J.; LEE, K. H.; TSAI, I. L.; CHEN, I. S. 2005. Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **13**: 5915-5920.
63. CHENG, M.; YANG, C.; LIN, W.; LIN, W.; TSAI, I.; CHEN, I. 2002. Chemical constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, **49**(1), 125-128.
64. CHINO, I.; DEMETZOS, C.; HARVALA, C.; ROUSSAKIS, C.; VERBIST, J. F. 1994. Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Cistus incanus* subsp. *Creticus*. **Planta Medica**, **60** (1): 34-36.
65. COLL J. C. and BOWDEN B. F., 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpenes Mixtures. **Journal Natural of Products**. **49**, 934-36.
66. COMAS, C.; CONFALONIERI, V.; HUNZIKER, J. 1998. The genus *Bulnesia* revisited: a cladistic analysis of seed protein data. **Biochemical Systematics and Ecology**, **26**: 611-618.
67. CORRIE, J.; GREEN, G.; RITCHIE, E.; TAYLOR, W. 1970. Chemical constituents of Australian *Zanthoxylum* species. V. Constituents of *Zanthoxylum pluviatile*; the structure of two new lignans. **Australian Journal Chemistry**, **23**(1): 133-145.
68. COUILLEROT, E.; CARON, C.; COMOIE, L., AUDRAN, J.; MOLLINATI, P. ; ZECHES, M.; LE MEN-OLIVIER, L. ; JARDILLER, J. ; CHENIEUX, J., 1994. Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fagara zanthoxyloides* Lam. **Phytochemistry**, **37**(2) : 425-428. Gty6y
69. CROMBIE, L. 1954. Isolation and Structure of Neo-Herculin from *Zanthoxylum clava-herculis* L. **Nature**, **174**: 833.
70. CUCA, L. E.; MARTINEZ, J. C.; DELLE MONACHE, F. 1998. 7,9'-epoxylignan and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo*. **Phytochemistry**, **47**(7): 1437-1439.
71. DADSON, B. A. ; MINTA, A. 1976. Isolation, identification, and synthesis of rubesamide, a new naturally occurring cyclopropanecarboxamide from *Fagara rubescens*, **Journal Chemical**.

72. DAMSTEEGT, V.; POSTNIKOVA, E. STONE, A., KUHLMANN, M., WILSON, C.; SECHLER, A.; SCHAAD, N., BRLANSKY, R. SCHNEIDER, W. 2010. The relevance of *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, casual agent of Huanglongbing, **Plant Disease**, 528-533
73. DAS, N. G.; BARUAH, I.; TALUKDAR, P. K.; DAS, S. C. 2003. Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes. **Journal Vector Borne Diseases**, 40: 49-53.
74. DAVICINO, R.; MATTAR, A.; CASALI, Y.; PORPORATTO, C.; CORREA, S.; MICALIZZI, B. 2007. In vivo immunomodulatory effects of *Larrea divaricata* Cav. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, 29: 351-366.
75. DE ABREU, W.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; DALCOL, I. I.; HOELZEL, S. C. S.; MOREL, A. F. 2003a. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, 63(4): 371-374.
76. DE ABREU, W.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; MACHADO, E. C.; FARIAS, A. 2003b. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, 63(7): 773-775.
77. DE MOURA, N. F.; RIBEIRO, H. B.; MACHADO, E. C. S.; ETHUR, E. M.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. 1997. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, 46(8): 1443-1446.
78. DELLA CASA, D.; HASEGAWA, M.; CASTALDI, A. 1972. Neutral compounds and alkaloids of *Zanthoxylum ocumarensis*. **Phytochemistry**, 11(4): 1531-1532.
79. DEULOFEU, V.; LABRIOLA, R.; DE LANGHE, J. 1942. Studies on Argentinian Plants. V. Identification and Characterization of Some Alkaloids in *Fagara coco*. **Journal American Chemical Society**, 64: 2326-2328.
80. DEYUN, K.; GRAY, A.; HARTLEY, T.; WATERMAN, P. 1996. Alkaloids from an Australian accession of *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 24(1): 87-8.
81. DEV, S. ; MISRA, R. 1986. **CRC Handbook of Terpenoids-Diterpenoids**. Volume III. CRC Press, Inc. Florida:14-15pp.

82. DINCHEV, D.; JANDA, B.; EVSTATIEVA, L.; OLESZEK, W.; ASLANI, M.; KOSTOVA I. 2008. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, **69**: 176-186.
83. DOMINGUEZ, X.; BENAVIDES, L.; BUTRUILLE, D. 1974. Les bases quaternaires de la racine de *Zanthoxylum fagara*. **Phytochemistry**, **13**(2): 680.
84. DREYER, D.; BRENNER, R. C. 1980. Chemaxonomy of the Rutaceae. Part XIII. Alkaloids of some Mexican *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, **19**(5): 935-939.
85. ELAKOVICH, S.; KENNETH, S. 1985. Phytotoxic properties of nordihydroguaiaretic acid, a lignan from *Larrea tridentate* (creosote bush). **Journal of Chemical Ecology**, **11**: 27-33.
86. ELBANDY, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE, M. 2007. New Triterpenoidal Saponins from *Gypsophila repens*. **Helvetica Chimica Acta**, **90**: 260-270.
87. ELGAMAL, M.; SHAKER, K.; PÖLLMANN, K.; SEIFERT, K. 1995. Triterpenoid saponins from *Zygophyllum* species. **Phytochemistry**, **40**: 1233-1236.
88. EL-SHABRAWY, O.A., EL-GINDI, O.D., MELEK, F.R., ABDEL-KHALIK, S.M., HAGGAG, M.Y., 1997. Biological properties of saponin mix-tures of *Fagonia cretica* and *Fagonia mollis*. **Fitoterapia**, **68**: 219-222.
89. FANG, L.; WEI, L.; HONGWEI, F.; QINGBO, Z; KAZUO K. 2007. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from fruits of *Acanthopanax senticosus*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **55**(7): 1087-1089.
90. FENG, Y.; WU, B.; LI, H.; LI, Y.; XU, L.; YANG, S.; KITANAKA, S. 2008. Triterpenoidal Saponins from the Barks of *Zygophyllum fabago* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **56**: 858-860.
91. FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; ROJAS DE ARIAS, A.;SCHININI, A.;VERA DE BILBAO, N.; SERNA, E.;LAGOUTTE, D.;SORIANO-AGAT'ON, F.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. 2007. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperoneon* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **109**: 258-263.
92. FISH, F. and WATERMAN, P.1972. Chloroform-soluble alkaloids of *Fagara vitiensis*. **Phytochemistry**, **11**:1528-1529.

93. FISH, F.; GRAY, A.; WAIGH, R.; WATERMAN, P. 1976b. Dipetalolactone: a novel pyranocoumarins from the root bark of *Zanthoxylum dipelatum*. **Phytochemistry**, **15**(2): 313-316.
94. FISH, F.; GRAY, A.; WATERMAN, P. 1975a. Chemosystematics in the Rutaceae. Alkaloids coumarins, triterpenes and flavanone from the root of *Zanthoxylum dipelatum*. **Phytochemistry**, **14**: 2073.
95. FISH, F.; GRAY, A.; WATERMAN, P. 1975b. Coumarin, alkaloid and flavonoid constituents from the root and stem barks of *Zanthoxylum avicennae*. **Phytochemistry**, **14**: 841-842.
96. FISH, F.; GRAY, A.; WATERMAN, P. 1976a. Alkaloids and coumarins of *Zanthoxylum elephantiasis*. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **28**: 69
97. FISH, F.; GRAY, A.; WATERMAN, P. G. 1974. Further constituents from the root bark of *Zanthoxylum rubescens*. **Planta Medica**, **25** (3): 281-284
98. FISH, F.; WATERMAN, P.; FINKELSTEIN, N. 1973. Sesamin from the bark of two African *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, **12**(10): 2553-2554.
99. FOYERE, A.; NGADJUI, B.; SONDEGAM, B. L.; TSAMO, E. 1984. A contribution of the phytochemistry of *Zanthoxylum tessmannii*. **Planta Medica**, **50**(3): 210-212.
100. GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P.; PRASAD, R. 2002. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sciences**, **71**: 1385-1396.
101. GARCÍA, A.; LIÑÁN, E.; MARTÍNEZ, A.; RIVAS, F.; MESA, C.; CASTILLA, J.; OSUNA, A. 1997. In Vitro Action of *ent*-Manoyl Oxides against *Leishmania donovani*, **Journal of Natural Products**, **60** (1): 13-16.
102. GONÇALVES, T.; MARTINS, P.; MONTANARI, T. 2005. Effect of *Ruda graveolens* L. on pregnant mice. **Contraception**, **71**(1):74-77-
103. GOPINATH, K. W.; GOVINDACHARI, T. R.; RAMADAS, U. 1960. The alkaloids of *Zanthoxylum rhetsa* DC. **Tetrahedron**, **8**: 293-295.
104. GRAY, A.; WAIGH, R.; WATERMAN, P. 1975. Avicennol: a new pyranocoumarin from the root-bark of *Zanthoxylum avicennae*, and its conversion into avicennin. 1975. **Journal Chemical Society, Perkin Transactions**, **1**: 488-491.

105. GRAY, A.; WAIGH, R.; WATERMAN, P. 1977. cis-Avicennol, a new pyranocoumarin from the root bark of *Zanthoxylum elephantiasis*. **Phytochemistry**, **16**(7): 1017-1018.
106. GUISE, G.; RITCHIE, E.; SENIOR, R.; TAYLOR, W. 1967. The chemical constituents of Australian *Zanthoxylum* species. IV. Two new coumarins from *Zanthoxylum suberosum*. **Australian Journal Chemistry**, **20**(11): 2429-2439.
107. HADDAD, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILE, M. 2004a. New Triterpenoidal Saponins Acylated with Monoterpenic Acid from *Albizia adianthifolia*, **Helvetica Chimica Acta**, **87**: 1228-1238.
108. HADDAD, M.; MIYAMOTO, T.; RAMEZANI, M.; LACAILE, M. 2004b. New Triterpene Saponins from *Acanthophyllum pachystegium*. **Helvetica Chimica Acta**, **87**: 73-81.
109. HAO, G.; WANG ZHAO, W.; LEI, Y.; YANG, Y.; ZHI-HONG, Y.; NAI-LI, W.; ZHOU Y.; XIONG, Y.; CAID, W.; XIN, Y. 2008. Five new bidesmoside triterpenoid saponins from *Stauntonia chanensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, **46**: 630-637.
110. HAMED, A.; OLESSZEK, W.; STOCHMAL, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. 2004. Steroidal saponins from the aerial parts of *Tribulus pentandrus* Forsk. **Phytochemistry**, **65**: 2935-2945.
111. HARBORNE, J. B.; LEBRETON, H.; COMBIER, H.; MABRY, T.; HAMMAN, Z. 1971. The structure of tambulin. **Phytochemistry**, **10**(4): 883-885.
112. HARDMAN, R.; ABAYOMI, E. 1970. Changes in the sapogenin and oil content of *Balanites aegyptiaca* seeds during the early stages of germination. **Phytochemistry**, **9**: 791-795.
113. HARTLEY, T. 1966. A revision of the malesian species of *Zanthoxylum* (Rutaceae). **Journal of the Arnold Arboretum**, **47**(3):171-356.
114. HASSANEAN, H.; DESOKY, E. 1992. An acylated isorhamnetin glucoside from *Zygophyllum simplex*. **Phytochemistry**, **31**: 3293-3294.
115. HATANO, T.; INADA, K.; OGAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. 2004. Aliphatic acid amides of fruits of *Zanthoxylum piperitum*. **Phytochemistry**, **65**: 2599-2604.

116. HE, W.; VAN, P.; DE KIMPE, N.; VERBRUGGEN, L.; NTHONNISSEN, K.; VAN DER FLAAS, M.; BOSSELAERS, J.; MATHENGE, S.; MUDIDA, F. 2002. Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarense*. **Phytoterapy Research**, **16**(1): 66-70.
117. HENKE H., 1995. "Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20". Hüthig Verlag. Heildelberg.
118. HOSNY, M.; KHALIFA, T.; ÇALIS, I.; WRIGHT, A.; STICHER, O. 1992. Balanitoside, a furostanol glycoside, and 6-metil-diosgenin from *Balanites aegyptiaca*. **Phytochemistry**, **31**: 3565-3569.
119. HU, J.; ZHANG, W.; SHEN, Y.; ZHANG, C.; XU, L.; LIU, R.; WANG, B.; XU, X. 2007. Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. **Biochemical Systematic and Ecology**, **35**: 114-117.
120. HUNTER, G.; BROGDEN, W. 1964a. B-Ylangene, a New Sesquiterpene Hydrocarbon from Orange oil. **Journal Organic Chemistry**, **29**(7):2100.
121. HUNTER, G.; BROGDEN, W. 1964b. Structure of Ylangene. **Journal Organic Chemistry**, **29**(7): 982-983.
122. HUNZIKER, J.; PALACIOS, R.; DE VALES, A.; POGGIO, L. 1978. Hybridization in *Larrea* (Zygophyllaceae): a morphological, cytogenetic and chemosystematic study. **Boletin de la Academia Nacional de Ciencias**, **52**: 281-314.
123. ISHII, H.; ISHIKAWA, T. 1973. Cuspidol: A new monomeric phenyl propanoid. **Tetrahedron Letters**, **42**: 4189-4192.
124. ISHII, H.; ISHIKAWA, T. 1975. Arnottinin: Estructural Establishment by Chemical Correlation with Osthonol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **23** (4): 934-936.
125. ISHII, H.; ISHIKAWA, T. 1976. Arnottianamide and isoarnottianamide: The structural establishment due to chemical conversion from the known benzo[c]phenanthridine alkaloids by the novel Baeyer-Villiger like oxidation of an immonium grup. **Tetrahedron Letters**, **15**: 1203-1206.
126. ISHII, H.; ISHIKAWA, T.; TAKEDA, S.; MIHARA, M.; KOYAMA, K.; OGATA, K.; HARAYAMA, T. 1991. Ailanthoidine, a novel benzo[c]phenanthridine alkaloid with a cyanopyridine pedant, from a *Xanthoxylum* species. **Chemical Pharmacology Bulletin**, **39**(5): 1340-1342.

127. ISHII, H.; OHIDA, H.; HAGINIWA, J. 1972. The alkaloids of Rutaceae. XVIII. Alkaloids of *Xanthoxylum ailanthoides*. **Yakugaku Zasshi**, **92**(2): 118.
128. JAHANIANI, F.; EBRAHIMI, S.; RAHBAR-ROSHANDEL, N.; MAHMOUDIAN, M. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and potential anti-cancer agent. **Phytochemistry**, **66**: 1581-1592.
129. JEN, C.; TSAI, I.; HORHG, D. J.; CHEN, I. S. 1993. Isolation and structure determination of two new compounds from *Zanthoxylum integrifolium*. **Journal of Natural Products**, **56**(11): 2019-2021.
130. JHONS, S.; LAMBERTON, J.; TWEEDDALE, H.; WILLING, R. 1969. Alkaloids of *Zanthoxylum conspersipunctatum* (Rutaceae): The structure of a new alkaloid isomeric with protopine. **Australian Journal Chemistry**, **22**: 2233-2236.
131. JIMÉNEZ, C.; MARCOS, M.; VILLAVERDE, M.C.; RIGUERA, R.; CASTEDO, L.; STERMITZ, F. 1989. A chromone from *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, **28**(7): 1992-1993.
132. JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; FLEISCHHACKER, W.; NGASSOUM, M. 1999. Analysis of Leaf Volatiles of *Zanthoxylum gillettii* Used in Folk Medicine of Cameroon. **Planta Medica**, **65**: 181-183.
133. JULLIAN, V.; BOURDY, G.; GEORGES, S.; MAUREL, S.; SAUVAIN, M. 2006. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal Ethnopharmacology**, **106**: 348-352.
134. KALIA, N.; SINGH, B.; SOOD, R. 1999. A New Amide from *Zanthoxylum armatum*. **Journal of Natural Products**, **62**(2), 311-312.
135. KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; CHINOU, I., Catherine CHARVALA, C.; SKALTSOUNIS, A. 2001. New Hemisynthetic Manoyl Oxide Derivatives with Antimicrobial Activity. **Chemical Pharmacology and Bulletin**, **49**(7): 814-817. KASALI, A.; EKUNDAYO, O.; PAUL, C.; KÖNI, W. 2002. *epi*-Cubebanes from *Solidago canadensis* **Phytochemistry**, **59** (8): 805-810
136. KIM, H.; YIM, S.; SUNG, C.; JUNG, J.; SHIN, B.; LEE, I. 2003. A new ergostane-type cholesterol biosynthesis inhibitor isolated from *Hormoconis resinae*. **Tetrahedron Letters**, **44**(38): 7159-7162.

137. KASHIWADA, Y.; ITO, C.; KATAGIRI, H.; MASE, I.; KOMATSU, K.; NAMBA, T.; IKESHIRO, Y. 1997. Amides of the fruit of *Zanthoxylum* spp. **Phytochemistry**, **44**(6): 1125-1127.
138. KATO, A.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; NISHIYAMA, Y.; JUMA, F.; NGANGA, J.; MATHENGE, S.; OGETO, J. 1996. Isolation of Alkaloidal Constituents of *Zanthoxylum usambarense* and *Zanthoxylum chaylbeum* Using Ion-Pair HPLC. **Journal of Natural Products**, **59**(3): 316-18.
139. KHALIQ, T.; MISRA, P.; GUPTA, S.; PAPI, K.; KANT, R.; MAULIK, P.; DUBE, A.; NARENDER, T. 2009. Peganine hydrochloride dihydrate an orally active antileishmammal agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **19**: 2585-2586.
140. KIRIRA, P. G.; RUKUNGA, G. M.; WANYONYI, A. W.; MUREGI, F. M.; GATHIRWA, J. W.; MUTHAURA, C. N.; OMAR, S. A.; TOLO, F.; MUNGAI, G. M.; NDIEGE, I. O. 2006. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, **106**: 403-407.
141. KOKWARO, J.; MESSANA, I.; GALEFFI, C.; PATAMITA, M.; BETTOLO, G. 1983. Research of African medicinal plants, V. Coumarins from *Zanthoxylum usambarense*. **Planta Medica**, **47**(4): 257-263.
142. KOSTOVA, I., DINCHEV, D., 2005. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Review**, **4**: 111-137.
143. KRATOCHVIL, J.; BURRIS, R.; SEIKEL, M.; HARKIN, J. 1971. Isolation and characterization of α -guaiaconic acid and the nature of guaiacum blue. **Phytochemistry**, **10**: 2529-2531.
144. KUCK, A.; ALBONICO, S.; DEULOFEVU, V.; ESCALANTE, M. 1967. Alkaloids from Argentine *Fagara* species. **Phytochemistry**, **6**: 1541-1550.
145. LAMCHOURI, F.; SETTAF, A.; CHERRAH, Y.; HASSAR, M.; ZEMZAMI, M.; ATIF, N.; NADORI, E.; ZAID, A.; LYOUSSE, B. 2000. In vitro cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. **Fitoterapia**, **71**: 50-54.
146. LASSER, T. 1971. "Zygophyllaceae", en **Flora de Venezuela**. Volumen III, Primera Parte. Instituto Botánico. Dirección de Recursos Naturales Renovables. Ministerio de Agricultura y Cría-Caracas: 75-89 pp.

147. MA, Z.; HANO, Y.; NOMURA, T.; CHEN, Y. 2000. Alkaloids and phenylpropanoids from *Peganum nigellastrum*. **Phytochemistry**, **53**: 1075-1078.
148. MAILLARD, M., HOSTETTMANN, K., ADEWUNMI, C. 1989. New Triterpenoid *N*-Acetylglycosides with Molluscicidal Activity from *Tetrapleura tetraptera* TAUB. **Helvetica Chimica Acta**, **72**(4):668-674.
149. MARCANO, D.; HASEGAWA, M. 1991. **Fitoquímica Orgánica**. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 588 p.
150. MARCOS, M.; JIMÉNEZ, C.; VILLAVERDE, M. C.; RIGUERA, R.; CASTEDO, L.; STERMITZ, F. 1999a. Lignans and other constituents from South and Central American *Zanthoxylum* species. **Planta Medica**, **56**(1): 89-91.
151. MARCOS, M.; VILLAVERDE, M. C.; RIGUERA, R.; CASTEDO, L.; STERMITZ, F. 1990b. *Zanthoxylum corianum* alkaloids related to bishordeninyl terpenes. **Phytochemistry**, **29**(7): 2315-2319.
152. MARTIN, M. T.; RASOANAIVO, L. H.; RAHARISOLOLALAO, A. 2005. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*. **Fitoterapia**, **76**: 590-593.
153. MATHUR, R.; RAMASWAMY, S.; RAO, A.; BHATTACHARYYA, S. 1967. Terpenoids. CVIII: Isolation of an oxidodiol from *Zanthoxylum rhetsa*. **Tetrahedron**, **23**(5): 2495-2498.
154. MATOS, M.; SOUSA, M.; MACHADO,.; FILHO, R. 1986. Quinovic acid glycosides from *Guettarda angelica*. **Phytochemistry**, **25**: 1419-1422.
155. MELEK, F.; MIYASE, T.; EL-GINDI, O.; ABDEL-KHALIK, S.; HAGGAG, M. 1996. Saponins from *Fagonia mollis*. **Phytochemistry**, **42**: 1405-1407.
156. MITSCHER, L.; PARK, Y.; CLARK, D. 1978. Antimicrobial agents from hither plants. An investigation of *Hummernania fumariaefolia* pseudoalcholates of sanguinarine and cheleritrine. **Lloydia**, **41**: 145-150.
157. MIYASE, T; MELEK, F.; EL-GINDI, O; ABDEL-KHALIK, S.F.; EL-GINDI, M.; HAGGAG, M.; HILAL, S. 1996. Saponins from *Fagonia arabica*. **Phytochemistry**, **41**: 1175-1179.
158. MIZUTANI, K.; FUKUNAGUA, Y.; TANAKA, O.; TAKASUGI, N.; SARUWATARI, Y.; FUWA, T.; YAMAUCHI, T.; WANG, J.; JIA, M. 1988.

- Amides from Haujiao, pericarps of *Zanthoxylum bugeanum* Maxim. **Chemical Pharmacology Bulletin**, **36**(7): 2362-2365.
159. MOODY, J.; SOFOWORA, A. 1984. Leaf Alkaloids of *Zanthoxylum rubescens*. **Planta Medica**, **50**(1):101-103.
160. MOOLLA, A.; VILJOEN, A. 2008. 'Buchú'- *Agathosma batulina* and *Agathosma crenulata* (Rutaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, **119**(3):413-419.
161. MOREL, A. F.; GONZAGA, W. A.; BURROW, R. A.; MAICHLE-MOESSMER, C.; STRAEHLE, J. 2002. 6-Acetyldihydroavicine. **Acta Crystallographica. Section C: Crystal Structure Communications**, **C58** (10): o606-o607.
162. MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; NISHIYAMA, Y.; KATO, A.; WANG, J.; ZHANG, H.; LU, G. 1997. (R)-(+)-Isotembetarine, a Quaternary Alkaloid from *Zanthoxylum nitidium*. **Journal of Natural Products**, **60**(3): 299-301.
163. MUÑOS, M. A.; TORRES, R.; CASSELS, B. 1982. Aurapten and Flindersine from *Zanthoxylum coco*. **Journal of Natural Products**. **45**(3): 367-369.
164. NETTLESHIP, L.; SLAYTOR, M. 1974. Limitations of feeding experiments in studying alkaloid biosynthesis in *Peganum harmala* callus cultures. **Phytochemistry**, **13**: 735-742.
165. NG, K. M.; GRAY, A.; WATERMAN, P. 1987. Benzophenanthridine alkaloids from the ítem bark of *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, **26**(12):3251-3254.
166. NGOUELA, S.; TSAMO, E.; CONNOLLY, J. D. 1994. Lignans and other constituents of *Zanthoxylum heitzii*. **Phytochemistry**, **37**(3): 867-869.
167. NISSANKA, A. P. K.; KARUNARATNE, V.; BANDARA, B. M. R.; KUMAR, V.; NAKANISHI, T.; NISHI, M.; INADA, A.; TILLEKERATNE, L. M. V.; WIJESUNDARA, D. S. A.; GUNATILAKA, A. A. L. 2001. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. **Phytochemistry**, **56**(8): 857-861.
168. OZCAN, B.; AKCAOZ, H.; KARADENIZ, F. 2007. Energy requirement and economic analysis of *Citrus* produccition in Turkey. **Pedosphere**, **18**(2):214-221.
169. PAN, A. 2010. Rutaceae leaf fossils from the Late Oligocene (27.23 Ma) Guang River flora of northwestern Ethiopia. **Review of Palaeobotany and Palynology**. **159**: 188-194.

170. PÖLLMANN, K.; GAGEL, S.; ELGAMAL, M.; SHAKER, K.; SEIFERT, K.; 1997. Terpenoids saponins from the roots of *Zygophyllum* species. **Phytochemistry**, **44**: 485-489.
171. PÖLLMANN, K.; SCHALLER, K.; SCHWEIZER, U.; ELGAMAL, M.; SHAKER, K.; SEIFERT, K. 1998. Triterpenoid saponins from *Zygophyllum decumbens*. **Phytochemistry**, **48**: 875-880.
172. RAHMAN, M.; ISLAM, M.; KHONDKAR, P.; GRAY, A. 2005. Alkaloids and lignans from *Zanthoxylum budrunga* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, **33**: 91-93.
173. RAMACHANDRAN A.; ARAVINDAKSHAN, G.; JOSUA, C. 1982. Confirmation of structure of the flavonol glucoside tambuletin. **Phytochemistry**, **21**(2): 483-485.
174. RAMIDI, R.; ALI, M. 1999. Two new flavonoids from the seeds of *Zanthoxylum alatum* Roxb. **Pharmazie**, **54**(10): 781-782.
175. RAMIDI, R.; ALI, M.; VELASCO, A.; PÉREZ, M. 1998. Chemical constituents Composition of the Seed Oil of *Zanthoxylum alatum* Roxb. **Journal of Essential Oil Research**, **10**: 127-130.
176. REDEMANN, E.; WISEGARVER, B.; ALLES, G. 1949. Characterization of certain alkaloids from *Fagara coco*. **Journal American Chemical Society**, **71**: 1030-1034.
177. REED, M.; MESZAROS, K.; ENTES, L.; CLAYPOOL, M. PINKETT, J.; BRIGNETTI, D.; LUO, J.; KHANDWALA, A.; REAVEN, G. 1999. **Diabetologia**, **42**: 102-106.
178. RIMPLER, H.; RIZK, A. 1969. Isolation of oleanolic acid from *Fagonia cretica*. **Phytochemistry**, **8**: 2269.
179. SAKAKIBARA, M.; DAN, J.; NAKATANI, N.; TIMMERMANN, B.; MABRY, T. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. **Phytochemistry**, **15**: 727-731.
180. SAKAKIBARA, M.; MABRY, T. 1975. A new 8-hydroxiflavonol from *Larrea tridentata*. **Phytochemistry**, **14**: 2097-2098.
181. SAKAKIBARA, M.; TIMMERMANN, B.; NAKATANI, N.; WALDRUM, H.; MABRY, T. 1975. New 8-hydroxiflavonols from *Larrea tridentata*. **Phytochemistry**, **14**: 849-851.

182. SALEH, N. 1994. Recent advances in the flavonoid chemistry of African plants. **Phytochemistry**, **36**: 1109-1115.
183. SALEH, N.; AHMED, A.; ABDALLA, M. 1982. Flavonoid glycosides of *Tribulus pentandrus* and *T. terrestris*. **Phytochemistry**, **21**: 1995-2000.
184. SANTIAGO, L.; ROSQUETE, C. 2004. Estudio fitoquímico de los extractos de baja polaridad de las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Tesis de Grado**. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
185. SEIGLER, D.; JAKUPCAK, J.; MABRY, T. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. **Phytochemistry**, **13**: 983-986.
186. SENGUPTA, S.; RAY, A. B. 1987. The chemistry of piper species: a review. **Fitoterapia**, LVIII: 147.
187. SHAKER, K.; BERNHARDT, M.; ELGAMAL, M.; SEIFERT, K. 1999. Triterpenoid from *Fagonia indica*. **Phytochemistry**, **51**: 1049-1053.
188. SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.; MATLIN, S.; SALEH, N. 1997. Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. **Phytochemistry**, **44**: 533-536.
189. SHEEN, W. S.; TSAI, I.; TENG, C.; CHEN, I. 1994. Nor-neolignan and phenyl propanoid from *Zanthoxylum ailanthoides*. **Phytochemistry**, **36**(1): 213-215.
190. SHELDRIK, G.; 2008. A short history of *SHELLX*. **Acta Crystallographyca**, **A64**, 112-122.
191. SIMERAY, J. CHAUMONT, J. P.; BEVALOT, F.; VAQUETTE, J. 1985. Zanthomamide: an aromatic amide from *Zanthoxylum thomense*. **Phytochemistry**, **24**(11): 2720-2721.
192. SIMERAY, J.; CHAUMONT, J. P.; PUSSET, J.; BEVALOT, F.; VAQUETTE, J. 1988. Plants from New Caledonia: Constituents of *Zanthoxylum sarasinii*. **Planta Medica**, **54**(2): 1989.
193. SIMPSON C. F., 1976. "Practical High Performance Liquid Chromatography". Heyden & Sons. London.
194. SINGH, M; PAL, M; SHARMA, R.1999. Biological Activity of the Labdane Diterpenes, **Planta Medica**, **65**(1):002-008.
195. SJÖVALL J., NYSTRÖM E., HAAHTI E. and FROM E., 1968. Liquid Chromatography on Lipophilic Sephadex, **En**, J. C. GRINDINGS and R. A

- KELLER (Eds.) “**Advances in Chromatography**”. Vol. 6, pág 119-70. Marcel Dekker. New York.
196. SNIDER, B.; KULKARNI, Y. 1995. Simple syntheses of (±) -β-copaene, (±) -β-ylangene and lemnalol. **Tetrahedron Letters**, **26**(46):5675-5676.
 197. SIVAKUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S. 2009. Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozptocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, **622**. 1-3.
 198. SMATI, D.; MITAINE, A., MIYAMOTO, M.; HAMMICHE, V.; LACAILLE, M. 2007. Ursane-Type Triterpene Saponins from *Zygophyllum geslini*. **Helvetica Chimica Acta**, **90**: 712-719.
 199. SNYDER, J.; NAKANISHI, K. 1981. The structure of castanaguyone a bisocoumarin plant product. **Tetrahedron Letters**, **22**(50): 5015-5018.
 200. SNYDER L. R. and KIRKLAND J. J., 1974. “**Introduction to Modern Liquid Chromatography**”. John Wiley. London.
 201. STHALT, E. 1969. **Thin- Layer Chromatography, 2nd Edition**. Springer- Verlag. New York. 1039 p.
 202. SOTELO, R.; GIACOPELLO, D. 1972. Synthesis of pseudoprotopine, an alkaloid from *Zanthoxylum conspersipunctatum* (Rutaceae). **Australian Journal Chemistry**, **25**(2): 385-392.
 203. STERMITZ, F.; CAOLO, M.; SWINEHART, J. 1980. Chemistry of *Zanthoxylum*. Part 4. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williansii*, *Z. monophyllum*, and *Z. fagara*. **Phytochemistry**, **19**(7): 1469-1472.
 204. STERMITZ, F.; SHARIFI, I. A. 1977. Alkaloids of *Zanthoxylum monophyllum* and *Z. punctatum*. **Phytochemistry**, **16**(12): 2003-2006.
 205. STHALT, E. 1969. **Thin- Layer Chromatography, 2nd Edition**. Springer- Verlag Berlin. New York. 1039 p.
 206. STUCKERT, G. 1933. **Investigaciones del Laboratorio de Química Biológica**. Córdoba, Argentina. Vol. I, 109pp.L
 207. SUKARI, M. A.; SALIM, W. S. W.; IBRAHIM, N. H.; RAHMANI, M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. 1999. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. **Fitoterapia**, **70**(2), 197-199.

208. SWINEHART, J.; STERMITZ, F. 1980. Constituents of *Zanthoxylum*. Part 4. Bishordenyl terpene alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo* and *Z. coriaceum*. **Phytochemistry**, **19**(7): 1469-1472.
209. TALAPATRA, S. K.; DUTTA, S.; TALAPATRA, B. 1973. Alkaloids and terpenoids of *Zanthoxylum ovalifolium*. **Phytochemistry**, **12**(3): 729-730.
210. TANE, P.; WABO, H.; CONNOLLY, J. 2005. A new benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum buesgenii*. **Fitoterapia**, **76**: 650-660.
211. TARUS, P.; COOMBES, P.; CROUCH, N.; MULHOLLAND, D. 2006. Benzo[c]phenanthridine alkaloids from stem bark of the Forest Knobwood, *Zanthoxylum davyi* (Rutaceae). **South African Journal of Botany**, **72**: 555-558.
212. TEMRAZ, A.; EL GINDI, O.; KADRY, H.; DE TOMMASI, N.; BRACA, A. 2006. Steroidal saponins from the aerial parts of *Tribulus alatus* Del. **Phytochemistry**, **67**: 1011-1018.
213. THAPPA, R.; DHAR, K.; ATAL, C. 1976. A new monoterpene triol from *Zanthoxylum budrunga*. **Phytochemistry**, **15**: 1569-1569.
214. THUY, T. T.; PORZEL, A.; RIPPERGER, H.; VAN SUNG, T.; ADAM, G. 1999. Bishordeninyl terpene alkaloids from *Zanthoxylum avicennae*. **Phytochemistry**, **50**(5): 903-907.
215. TIWARI, K. P.; MASOOD, M. 1978. Alkaloids of *Zanthoxylum oxyphyllum*. **Phytochemistry**, **17**(6): 1068-1069.
216. TOMKO, J.; AWAD, A.; BEAL, J.; DOSKOTCH, R. 1968. Isolation of candicine chloride, laurifoline chloride, and xanthoxyletin from the bark of *Zanthoxylum elephantiasis*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **57**(2): 329-330.
217. TORRES, R.; CASSELS, B. 1978. Leaf alkaloids of *Fagara mayu*. **Phytochemistry**, **17**(4): 838-839.
218. TORTO, F.; MENSAH, I. 1973. Fagaradine: A phenolic benzophenanthridine alkaloid from *Fagara xanthoxyloides*. **Phytochemistry**, **12**(9): 2315-2317.
219. TSAI, I.; LIN, W.; TENG, C.; ISHIKAWA, T.; DOONG, S.; HUANG, M.; CHEN, Y.; CHEN, I. 2000. Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. **Planta Medica**, **66**(7), 618-623.

220. VALESI, A.; RODRIGUEZ, E.; VANDER, G.; MABRY, T. 1972. Methylated flavonoids in *Larrea cuneifolia*. **Phytochemistry**, **11**: 2821-2826.
221. VAQUETTE, J.; POUSETTE, J.; PARIS, R. ; CAVE, A. 1974. Alkaloids of *Zanthoxylum decaryi*. Decarine, a new alkaloids derived from benzophenanthridine. **Phytochemistry**, **13**(7): 1257-1259.
222. VILA, R.; IGLESIAS, J.; CANIGUERAL, S.; CICCIO, J. 2002. Composition of the essential oil from leaves of *Zanthoxylum procerum* from Costa Rica. **Journal of Essential Oil Research**, **14**(1), 44-46.
223. WALL, M. E.; WANI, M. C.; TAYLOR, H. 1987. Plants antitumor agents, 27. Isolation, structure, and structure activity relationships of alkaloids from *Fagara macrophylla*. **Journal of Natural Products**, **50**(6): 1095-1099.
224. WANG, Y., OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. 1997. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, **45**: 811-817.
225. WANG, Y.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. 1996. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, **42**: 1417-1422.
226. WATERMAN, P. 1975. Alkaloids from the root bark of *Zanthoxylum myriacanthum*. **Phytochemistry**, **14**(11): 2530.
227. WATERMAN, P. 1976. Chemosystematics in the Rutaceae. Part 7: Alkaloids and coumarins from *Zanthoxylum flavum*: dihidrorutecarpine, a novel Inodoloquinazoline alkaloid. **Phytochemistry**, **15**(4): 578-579.
228. WU, S.; CHEN, I.S. 1993. Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, **34**(6): 1659-1661.
229. WU, T.; SHI, L.; KUO, S. 1999. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, **50**: 1411-1415.
230. XIAO, X.; QIU, G.; WANG, H.; LIU, L.; ZHENG, R.; JIA, Z.; DENG, Z. 1988. Effect of alkaloids from *Peganum nigellastrum* on mouse ascitic hepatoma and isolated cells. **Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi**, **2**: 232-234.
231. XIONG, Q.; SHI, D.; MIZUNO, M. 1995. Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. **Phytochemistry**, **39**(3): 723-725.
232. XIONG, Q.; SHI, D.; YAMAMOTO, H.; MIZUNO, M. 1997. Alkylamides from pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. **Phytochemistry**, **46**(6), 1123-1126.

233. XU, Y. ; CHEN, H ; LIANG, H. ; GU, Z. ; LIU, W. ; LEANG, W. ; LI, T. ; 2000. Three new saponins from *Tribulus terrestris*. **Planta Medica**, 66: 545--550.
234. XU, Y.; CHEN, H.; LIU, W.; GU, Z.; LIANG, H. 1998. Two sapogenins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, 49: 199-201.
235. XUE, H.; LU, Z.; KONNO, C.; SOEJARTO, D.; CORDELL, G.; FONG, H.; HODGSON, W. 1988. 3 β -(3,4-dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 β -(4-dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. **Phytochemistry**, 27: 233-235.
236. YANG, Y.; CHENG, M.; CHE, M.; CHANG, Y.; TSAI, I.; CHEN, I. 2002. Chemical and anti-platelet constituents from Formosan *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, 61(5): 567-572.
237. YASUDA, I.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. 1981. Two New Pungent Principles isolated from Pericarps of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, 29(6): 1791-1793.
238. YASUDA, I.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. 1982. Distribution of unsaturated aliphatic acid amides in Japanese *Zanthoxylum* species. **Phytochemistry**, 21(6): 1295-1298.
239. ZAVARIN, E.; SNAJBERK, K.; DEBRY, R. 1980. Terpenoid and morphological variability of *Pinus quadrifolia* and its natural hybridization with *Pinus monophylla* in Northern Baja California and adjoining United States **Biochemical Systematics and Ecology**, 8 (3):225-235.
240. ZOU, K.; TONG, W.; LIANG, H.; CUI, J.; TU, G.; ZHAO, Y. ; ZHANG, R. 2005. Diastereoisomeric saponins from *Albizia julibrissin*. **Carbohydrate Research**, 340(7): 1329-1334.



Zanthoxyfolina, un nuevo meroterpenoide y derivados del labdano aislados de las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae).

Laura Santiago-Brugnoli^{1,2}, Carmelo Rosquete-Porcar^{1*}, Laurent Pouységu², Stéphane Quideau²

1) Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela.

2) Université de Bordeaux I, Institut des Sciences Moléculaires (CNRS-UMR 5255) and Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France.

(*)

Recibido: 18/06/2013

Revisado: 23/08/2013

Aceptado: 28/08/2013

Resumen

Un nuevo meroterpeno derivado de la 2-quinolona el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) y tres derivados del labdano fueron aislados de las hojas secas de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae), dos de ellos epímeros, el (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) y el (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) y un tercero, el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**). Este tipo de compuestos, hasta ahora, no habían sido reportados para el género *Zanthoxylum*. Las estructuras fueron identificadas mediante estudios espectroscópicos (IR, RMN uni y bidimensionales y EM).

Palabras clave: *Zanthoxylum rhoifolium*; 2-quinolona; derivados del labdano

Abstract

A new meroterpene derivated of the 2-quinolone, 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) and three derivates of labdane, have been isolated from the fresh leaves of *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae), two epimers (13*S*)-labdane-8 α ,15-diol (**2**) and (13*R*)-labdane-8 α ,15-diol (**3**) and a third one 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-ene (**4**). These compounds had not been reported before for genus *Zanthoxylum*. Their structures were established by 2D-NMR spectroscopic techniques (IR, NMR one-two dimensional and ME).

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*; 2-quinolone; labdane derivatives.

Introducción

Desde el punto de vista fitoquímico, el género *Zanthoxylum* ha sido estudiado ampliamente desde principios del siglo XX, muchas especies se han explorado químicamente por la gran variedad de esqueletos estructurales presentes en la familia Rutaceae¹. A la infusión preparada de las hojas de *Z. rhoifolium* se le atribuyen actividades desinflamatorias, antitumorales, antileucémicas y antimicrobiales²; también es usada en la Medicina Tradicional en la Guayana Francesa como tratamiento preventivo contra la malaria³. Estudios recientes confirman a los aceites esenciales obtenidos de las hojas y los frutos, actividades bactericidas frente a microorganismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativos (*Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella setubal*)⁴.

Teniendo como objetivo el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de las hojas de *Z. rhoifolium* colectada en el jardín botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, del extracto acetónico, se obtuvo un nuevo

monoterpeno derivado de la 2-quinolona el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) y tres derivados del labdano, dos de ellos epímeros, (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) y (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) y un tercer compuesto, el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**). El aislamiento de dichas sustancias se realizó por técnicas cromatográficas convencionales y la caracterización estructural de la misma se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas IR, RMN (uni y bi-dimensional) y EM.

Parte experimental

Procedimiento experimental general

Los espectros IR fueron realizados en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo FT-1725X en pastillas de KBr y disco de NaCl. Los espectros RMN fueron tomados en un equipo Bruker Avance DRX 400 (400 y 100 MHz) usando CDCl₃ y TMS como patrón interno. Para los espectros de masa se empleó un espectrofotómetro Hewlett-Packard Mass modelo 5930^a (70 eV). Para la cromatografía en capa fina (CCF) y capa gruesa (CCGP) se utilizó papilla de sílica gel Merk HF 254

de 0.25 y 0.5 mm soportadas sobre placas de vidrio y para las cromatografías en columna se utilizó gel de sílice 60 (Merck, 63 a 200 μ , 70-230 mesh) como adsorbente y montaje húmedo⁵ y la cromatografía de exclusión se utilizó Sephadex[®] LH20⁶. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Johns dotado de plancha de calentamiento para el rango de 20 a 300 °C. Los puntos de ebullición fueron realizados en un tubo de Thiele y corregidos.

Material vegetal

Las hojas *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) fueron recolectadas en el jardín botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. La muestra botánica de la especie se encuentra depositada en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). La clasificación botánica de la especie la realizó el Ing. Juan Carmona Arzola, Curador del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA), bajo el voucher N° VS-001.).

Extracción y separación

1 Kg de hojas frescas de *Z. rhoifolium*, fueron extraídas en un soxhlet con *n*-hexano, diclorometano, acetona y metanol, sucesivamente hasta agotamiento. Del extracto de hexano (43g), en las fracciones 21-26 (2,582g), luego de pasarlas por Sephadex LH-20 utilizando la mezcla 2:1:1 de hexano/benceno/metanol, se aislaron dos compuestos, el (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) (46mg) y el (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) (44 mg). De la misma forma, del extracto de acetona (35g) de las fracciones 2-10 (9,574g) (Hex/CH₂Cl₂: 50%), tras varios procesos de cromatografía se logró aislar el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) (82mg), así mismo de las fracciones 24-26 (1,138g) (Hex/CH₂Cl₂: 90%) se aisló el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**) (53mg).

Zanthoxyfolina ó 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (1**):** 82mg. C₁₉H₂₃NO₂, cristales en forma de finas agujas de color blanco, P_f 68-69°C. IR (KBr): ν_{\max} 3422, 2925, 1728, 1226, 1614, 833 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) y RMN ¹³C (CDCl₃, 100MHz): ver Tabla 1. EM *m/z*: [M]⁺ 297.

(13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (2**):** 46mg. C₂₀H₃₈O₂, pasta de color amarillo tenue, P_c 74-75°C, [α]_D²⁰: -4,1° (46mg/5ml de acetona), IR (película líquida en NaCl): ν_{\max} 3388, 2926, 2868, 1716, 1460, 1386, 1082, 936 cm⁻¹. RMN δ_{H} (CDCl₃, 400MHz): 1.59; 1.34 (H_{3_{a,b}}), 1.06 (H₅), 1.35; 1.00 (H_{6_{a,b}}), 2.03; 1.63 (H_{7_{a,b}}), 1.26 (H₉), 1.37; 1.00 (H_{11_{a,b}}), 1.99 (H₁₃), 3.68; 3.63 (H_{15_{a,b}}), 1.03; 0,98 (H_{16_{a,b}}), 1.13 (H₁₇), 0.72 (H₁₈), 0.85 (H₁₉), 0.76 (H₂₀). RMN δ_{C} (CDCl₃, 100MHz): 39.4(C₁, (CH₂)), 18.9 (C₂(CH₂)), 42.3 (C₃(CH₂)), 33.3 (C₄(C)), 56.2 (C₅(CH)), 20.8 (C₆(CH₂)), 44.8 (C₇(CH₂)), 74.2 (C₈(COH)), 61.5 (C₉(CH)), 39.4

(C₁₀(C)), 22.0 (C₁₁(CH₂)), 40.1 (C₁₂((CH₂)), 30.1 (C₁₃(CH)), 40.3 (C₁₄((CH₂)), 61.2 (C₁₅((CH₂)), 20.5 (C₁₆(Me)), 24.3 (C₁₇(Me)), 15.6 (C₁₈(Me)), 33.6 (C₁₉(Me)), 21.7 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 310.

(13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (3**):** 44 mg. C₂₀H₃₈O₂, pasta de color amarillo tenue, P_c 83-84°C (corregido), [α]_D²⁰: -9,7° (46mg/5ml de acetona). IR (película líquida en NaCl) ν_{\max} 3388, 2924, 2867, 1726, 1461, 1385, 1061, 700 cm⁻¹. RMN δ_{H} (CDCl₃, 400MHz): 1.60; 1.35 (H_{3_{a,b}}), 1.08 (H₅), 1.38; 1.01 (H_{6_{a,b}}), 2.08; 1.67 (H_{7_{a,b}}), 0.51 (H₉), 1.40; 1.02 (H_{11_{a,b}}), 1.93 (H₁₃), 3.77; 3.73 (H_{15_{a,b}}), 0.99; 0,98 (H_{16_{a,b}}), 1.16 (H₁₇), 0.73 (H₁₈), 0.86 (H₁₉), 0.77 (H₂₀). RMN δ_{C} (CDCl₃, 100MHz): 39.2(C₁, (CH₂)), 18.2 (C₂(CH₂)), 41.6 (C₃(CH₂)), 32.6 (C₄(C)), 55.4 (C₅(CH)), 20.1 (C₆(CH₂)), 43.8 (C₇(CH₂)), 73.6 (C₈(COH)), 61.8 (C₉(CH)), 38.5 (C₁₀(C)), 22.9 (C₁₁(CH₂)), 40.5 (C₁₂(CH₂)), 30.3 (C₁₃(CH)), 39.2 (C₁₄((CH₂)), 59.8 (C₁₅((CH₂)), 20.9 (C₁₆(Me)), 23.4 (C₁₇(Me)), 14.9 (C₁₈(Me)), 32.8 (C₁₉(Me)), 38.5 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 310.

13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (4**):** 53mg. C₂₀H₃₄O, sólido de color blanco, P_f 79-80°C (corregido). IR (KBr): ν_{\max} 2926, 1735, 1642, 1387, 1120 cm⁻¹. RMN δ_{H} (CDCl₃, 400MHz): 1.47; 0.78 (H_{1_{a,b}}), 1.63; nd* (H₂), 0.79; 0.82 (H_{3_{a,b}}), 2.08; 0.92 (H₅), 0.94, nd* (H₆), 1.83; nd* (H₇), 1.33 (H₉), nd* (H₁₁), nd* (H₁₂), 5.89; 5.90 (H_{14_{a,b}}), 4.90; 5.20 (H_{15_{a,b}}), 1.30 (H₁₆), 1.24 (H₁₇), 0.78 (H₁₈), 0.84 (H₁₉), 0.77 (H₂₀). RMN δ_{C} (CDCl₃, 100MHz): 37.7(C₁, (CH₂)), 19.3 (C₂(CH₂)), 34.0 (C₃(CH₂)), 44.0 (C₄(C)), 57.2 (C₅(CH)), 20.5 (C₆(CH₂)), 42.8 (C₇(CH₂)), 76.0 (C₈(C)), 56.4 (C₉(CH)), 39.0 (C₁₀(C)), 15.9 (C₁₁(CH₂)), 36.3 (C₁₂(CH₂)), 74.1 (C₁₃(C)), 149.3 (C₁₄(=CH)), 111.4 (C₁₅(=CH₂)), 26.1 (C₁₆(Me)), 29.8 (C₁₇(Me)), 21.9 (C₁₈(Me)), 33.9 (C₁₉(Me)), 15.8 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 290. (*) no determinada, solapada con otras señales

Resultados y discusiones.

El compuesto (**1**) mostró en su espectro de masas un ion molecular a *m/z* 297, lo que permitió establecer su fórmula molecular C₁₉H₂₃NO₂, la cual resultó coherente con el número de carbonos e hidrógenos observados en sus espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H (Tabla 1). En su espectro IR, se apreciaron bandas de absorción, entre las más características, de amidas mono-sustituidas [ν_{\max} 3422 cm⁻¹ (N-H)], de carbonilos [ν_{\max} 1728 cm⁻¹ (C=O)] y de aromáticos [ν_{\max} 1614 cm⁻¹ (C=C) y ν_{\max} 833 cm⁻¹ (=C-H)]⁷.

Según su fórmula molecular, C₁₉H₂₃NO₂, posee nueve grados de insaturación, con base a esto, en su espectro de RMN-¹H, a campo bajo, se observan dos dobletes en δ 6,21 (H-4); δ 7.59 (H-3), con una constante de

acoplamiento, $J = 9$ Hz, lo que conforma un sistema típico AB, propio de un par de hidrógenos "orto" acoplados, similar a esto, ocurre con una señal doblete (d) en δ 7.32 (H-5) ($J = 9$ Hz), y otra doblete de dobletes (dd) en δ 6.80 (H-6) ($J_1 = 2.0$; $J_2 = 9.0$ Hz) respectivamente, y un singlete en δ 6.77 (H-8), cuyas constantes de acoplamiento, permiten establecer un sistema ABX. Ambos sistemas se detectan claramente en el espectro ^1H , ^1H -COSY. Las señales en el espectro de RMN- ^{13}C (banda ancha (BB) y DEPT-135) de los carbonos que llevan estos hidrógenos, fueron identificadas a δ 112.1 (C-4); δ 143.3 (C-3); δ 128.6 (C-5); δ 113.1 (C-6); δ 101.5 (C-8), a través de su espectro HSQC. Estos datos accedieron a caracterizar las subunidad estructural [A] (figura 1), el espectro HMBC confirmó la presencia de un núcleo bencénico 1,2,4-trisustituido, que concierne al sistema ABX anteriormente identificado (correlaciones: C-8 \leftrightarrow H5, C-8 \leftrightarrow H6), donde uno de los sustituyentes, es un grupo que está unido a un oxígeno [δ 162.0 (C-7)], el cual se sitúa "orto" con respecto a (C-6) y a (C-8), al mismo tiempo, establece que dicho sistema esta fusionado con el sistema AB (correlaciones: C-9 \leftrightarrow H-5, C-9 \leftrightarrow H-8, C-9 \leftrightarrow H-4 y C-10 \leftrightarrow H-5, C-10 \leftrightarrow H-3, C-10 \leftrightarrow H-8), en este caso, uno de los sustituyentes "orto" a (C-3) es un grupo carbonilo [δ 161.1 (C-2)] (Correlaciones: C-2 \leftrightarrow H-3 y C-2 \leftrightarrow H-4) y finalmente el otro sustituyente es el grupo -NH referido en el espectro IR, por lo tanto, se corrobora que se trata del núcleo derivado de la 2-quinolona⁸.

Por otro lado, en su espectro de RMN- ^1H , a campo alto, resaltan tres señales que aparecen como singletes [δ 1.57 (H-9'), δ 1.63 (H-8') y δ 1.73 (H-10')], propias de metilos. Asimismo, una serie de señales que emergen como multipletes entre δ 2.10 y δ 2.03 que se atribuyen a metilenos [δ 2.10; 2.09 (H-5') y δ 2.04; 2.03 (H-4')]. Además, entre δ 4.50 y δ 5.50, resaltan tres señales: un triplete en δ 5.43 (H-2'), un triplete de dobletes en δ 5.04 (H-6'), que por sus desplazamientos, son protones olefínicos y un doblete en δ 4.57 (H-1') que podría ser un protón unido a una función oxigenada. Dichas señales, se ajustan a lo observado en el experimento DEPT-135 de RMN- ^{13}C y con el espectro HSQC se logró asignar cada señal de protón con su carbono respectivo. Ahora bien, mediante las correlaciones que muestra el espectro de HMBC, se consiguió establecer la subunidad estructural [B] (figura 1), la cual confirmó ser una cadena alifática de diez carbonos con dos dobles enlaces, es decir, un monoterpreno, esto se estipuló siguiendo las correlaciones a través de los metilos [(C-2') \leftrightarrow (H-10'), (C-3') \leftrightarrow (H-10'), (C-4') \leftrightarrow (H-10')] y [(C-6') \leftrightarrow (H-8'), (C-6') \leftrightarrow (H-9'), (C-7') \leftrightarrow (H-8')], y así sucesivamente.

Al balancear, en referencia la fórmula molecular del compuesto [$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$], con los átomos comprometidos

con la subunidad [A] [$\text{C}_9\text{H}_4\text{NO}_2$] y con la subunidad [B] [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}$], se completan los nueve grados de insaturación que rige la fórmula del compuesto, sin embargo, al haber un oxígeno extra, hace pensar que ambas subestructuras comparten al menos un átomo de oxígeno, esto se ratificó con el espectro HMBC, con la correlación [(C-7) \leftrightarrow (H-1')]. De esta manera quedó establecida la estructura de como 7-*O*-neril éter-2-quinolona, un nuevo meroterpenoide, y se le dio el nombre de *Zanthoxyfolina* (1).

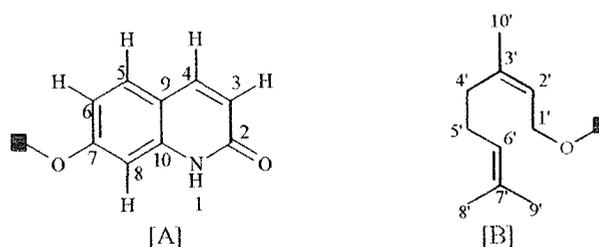
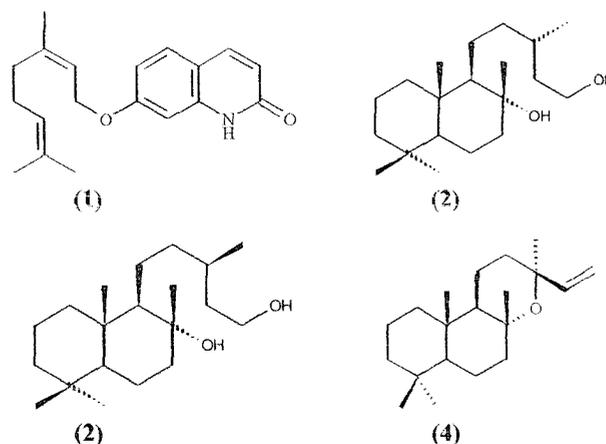


Fig. 1: Sub unidades estructurales [A] y [B] de (1).

Se sabe que los monoterpenos de derivan del (*trans*) geranilpirofosfato o del (*cis*) nerilpirofosfato y que sus funciones oxigenadas se pueden generar de varias maneras, como por ejemplo, oxidación alílica, oxidación vinílica o cicloadiciones del tipo Diels-Alder, por otro lado, los alcaloides quinolínicos pueden tener dos precursores aromáticos como el triptófano y el ácido antranílico⁸. Ahora bien, para proponer una posible ruta biosintética de esta nueva molécula, se puede pensar que su formación viene a partir del geraniol y del 7-hidroxi-2-quinolona, se produzca una deshidratación, se genere el respectivo éter (figura 2)

Los compuestos (2), (3) y (4), presentaron características espectroscópicas similares, conjuntamente, otros datos como rotación óptica ($[\alpha]_D^{20}$), puntos de fusión (P_f °C) y punto de ebullición (P_e °C) y estereoquímica fueron comparados con los reportados en la bibliografía^{9-11,12,14}, quedando sus estructuras establecidas como (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (2), (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (3) y 13(*S*)-8 α -13-cpoxilabd-14-cno (4).



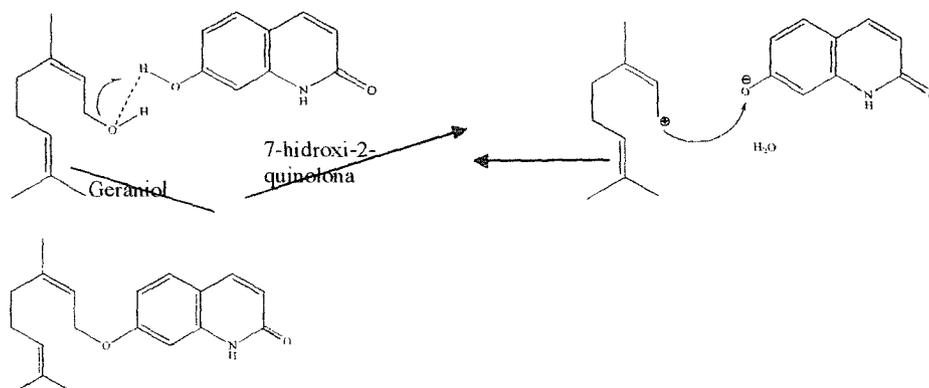


Figura 2. Posible ruta biosintética de (1).

Tabla 1: Datos RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz), ¹³C (CDCl₃, 100MHz) de (1)

(1)		
	δ _c	δ _H , m (JHz)
2	(C=O) 161,1	-
3	(=CH-) 143,3	7,59, d (9)
4	(=CH-) 112,8	6,21, d (9)
5	(=CH-) 128,6	7,32, d (9)
6	(=CH-) 113,1	6,80, dd (9;2)
7	(=C<) 162,0	-
8	(=CH) 101,5	6,77, s
9	(=C<) 112,3	-
10	(=C<) 155,7	-
1 [°]	(-CH ₂ -) 65,4	4,57; 4,56, d (6)
2 [°]	(=CH-) 118,4	5,43, t (6)
3 [°]	(=C<) 142,1	-
4 [°]	(-CH ₂) 26,1	2,04; 2,03, m
5 [°]	(-CH ₂) 39,4	2,10; 2,09, m
6 [°]	(=CH) 123,5	5,04 td
7 [°]	(=C<) 131,8	-
8 [°]	(Me) 25,5	1,63, s
9 [°]	(Me) 17,6	1,57, s
10 [°]	(Me) 16,8	1,73, s

Conclusiones

Del género *Zanthoxylum*, se han descrito numerosos meroterpenoides mediante un átomo de carbono, éste es el primer reporte de un monoterpene unido a un derivado de la 2-quinolona a través de un átomo de oxígeno y se le dio el nombre de Zanthoxyfolina (1), como nuevo producto natural. Además, se aislaron e identificaron tres derivados del labdano (2), (3) y (4), nunca antes descritos para el género *Zanthoxylum*

Referencias.

1. S Talapatra, S Dutta, B Talapatra. Alkaloids and terpenoids of *Zanthoxylum ovalifolium*. *Phytochemistry*, **12**(3), 729-730 (1973).
2. D Della Casa, M Hasegawa, A Castaldi. Neutral compounds and alkaloids of *Zanthoxylum ocumarense*. *Phytochemistry*, **11**(4), 1531-1532 (1972).

3. N De Moura, H Ribeiro, E Machado, E Ethur, N Zanatta, A OREL. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Phytochemistry*, **46**(8), 1443-1446 (1997).
4. V Jullian, G Bourdy, S Georges, S Maurel, M Sauvain. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Journal Ethnopharmacology*, **106**, 348-352 (2006).
5. W De Abreu, A Weber, S Giacomelli, E Simionatto, I Dalcol, E Machado, A Farias. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Medica*, **63**(7), 773-775 (2003).
6. H Cassidy. *Fundamentals of Chromatography*. New York. Interscience, p. 447 (1966).
7. H Henke. *Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20*. Hüthig Verlag, Heidelberg. (1995).
8. L Bellamy. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Vol. 1 and 2. Chapman and Hall. London (1975).
9. S Dev, R Misra. *CRC Handbook of Terpenoids-Diterpenoids*. Volume III. CRC Press, Inc. Florida, pp 14-15 (1986).
10. F Piozzi, M Bruno. Diterpenoids in the Essential Oils from the Genus *Stachys*. *Records of Natural Products*, **3**(3), 120-125 (2009).
11. C Henrick, P Jefferies. The chemistry of the euphorbiace-XI¹. The diterpenes of *Ricinocarpus muricatus* and the stereochemistry of eperuic acid. *Tetrahedron*, **21**, 1175-1190 (1995).
12. A Baker, G Eglinton, A Gonzalez, R Hamilton, R Raphael. A new leaf-gum constituents: Labdane-8 α ,15-diol. *Journal of the Chemical Society*, 4705-4708 (1962).
13. C Demetzos, A Kolocouris, T Anastasaki. A Simple and Rapid Method for the Differentiation of C-13 Manoyl Oxide Epimers in Biologically Important Samples Using GC-MS Analysis Supported with NMR Spectroscopy and Computational Chemistry Results. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **12**, 3605-3609 (2002).