



**HAL**  
open science

**Estudio fitoquímico de tres especies venezolanas  
pertencientes a las familias Burseraceae, Araliaceae y  
Lamiaceae y de dos cultivares de la familia  
Pittosporaceae**

Mayra Graciela Rengifo Carrillo

► **To cite this version:**

Mayra Graciela Rengifo Carrillo. Estudio fitoquímico de tres especies venezolanas pertenecientes a las familias Burseraceae, Araliaceae y Lamiaceae y de dos cultivares de la familia Pittosporaceae. *Phytopathology and phytopharmacy*. Université Bourgogne Franche-Comté; Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela). Facultad de Ciencias, 2017. Español. NNT : 2017UBFCE020 . tel-01865406

**HAL Id: tel-01865406**

**<https://theses.hal.science/tel-01865406>**

Submitted on 31 Aug 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
PREPAREE A L'Université de Bourgogne Franche-Comté et l'Universidad de Los Andes**

Ecole doctorale n°554

École Doctorale ES

Doctorat de Pharmacie

Par

Mlle. Mayra Graciela RENGIFO CARRILLO

**« Étude phytochimique de trois espèces vénézuéliennes appartenant aux familles BURSERACEAE, ARALIACEAE et LAMIACEAE et de deux cultivars de la famille PITTOSPORACEAE »**

Thèse présentée et soutenue à Mérida, le 12 Décembre 2017

Composition du Jury :

M. ROJAS, Luis	Professeur, Universidad de Los Andes	Président
Mme. MICHEL, Sylvie	Professeur, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. CHARRIS, Jaime	Professeur, Universidad Central de Venezuela	Rapporteur
Mme. LACAILLE-DUBOIS, Marie-Aleth	Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté	Examinatrice
M. POUYSÉGU, Laurent	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
Mme. MITAINE-OFFER, Anne-Claire	Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté	Directrice de thèse
M. ROSQUETE, Carmelo	Professeur, Universidad de Los Andes	Codirecteur de thèse





Universidad de Los Andes  
Facultad de Ciencias  
Postgrado Interdisciplinario en Química Aplicada (PIQA)  
Laboratorio de Productos Naturales

*“Estudio fitoquímico de tres especies venezolanas pertenecientes a las familias Burseraceae, Araliaceae y Lamiaceae y de dos cultivares de la familia Pittosporaceae”*

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

Lcda. Mayra G. Rengifo Carrillo

*Tutor:* Dr. Carmelo Rosquete Porcar  
*Co-tutor:* Dra. Anne-Claire Mitaine-Offer

Diciembre, 2017

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A mis **padres y hermanos**... Gracias por su apoyo constante e incondicional. Por estar siempre a mi lado y levantarme el ánimo siempre que lo he necesitado, por esas palabras de aliento y los consejos que me dieron siempre que alguna situación me desbordaba.*
- ❖ *Al **Dr. Carmelo Rosquete**, mi tutor... Profe mil gracias por todo los momentos compartidos, por los conocimientos transmitidos y por guiarme y formarme profesionalmente todos estos años. Gracias también por su amistad y confianza, trabajar con usted ha sido un honor y placer, ha sido una muy linda experiencia que repetiría con gusto.*
- ❖ *Madame **Anne-Claire Mitaine-Offer**, mon co-directeur de Thèse et Mme. **Marie-Alleth Lacaille-Dubois** ... Mon plus profond remerciement à vous pour l'opportunité de travailler au sein de son équipe pendant la durée de ce projet, je vous remercie également pour votre générosité, pour m'enseigner beaucoup des choses nouvelles, vraiment merci beaucoup.*
- ❖ *Al profesor **Luis Rojas**... Mis más sinceros agradecimientos por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo así como por su amistad y confianza. No tengo palabras para agradecerle todo lo que hizo para hacer realidad este proyecto que fue una de las mejores etapas de mi vida. ¡Mil gracias!*
- ❖ *A los profesores **Enrique Gámez (Kike)** y **José Guevara (Coco)** de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la ULA, así como a la profesora **Mercedes Castro** de la Facultad de Agronomía de la UCV, por su ayuda con la recolección e identificación de las especies venezolanas estudiadas en este proyecto*
- ❖ *A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales: **Ana, Gema, Karla, Betanía, Pablo, Carolina, Roger, Freddy, Darío**... Gracias a todos por su apoyo, por los momentos que compartimos y por todas sus enseñanzas...*
- ❖ *A **Luis**, mi amigo y compañero de PCP... Gracias por todas las horas y momentos compartidos a lo largo de todo el PCP, disfrute bastante trabajar contigo en el laboratorio, así como todo lo vivido con los viajes y las estancias en Dijon.*

- ❖ *Au tous mes amis et collègues de l'équipe du Laboratoire de Pharmacognosie: **Mahenina, Maleck, Stéphanie, Anne-Sophie et David**... merci pour les conseils, enthousiasme et pour les amusantes heures de travail au laboratoire... Mais surtout, merci pour votre chaleureuse amitié, vous me manquent beaucoup.*
- ❖ *Al Programa Cooperativo de Postgrado (PCP) Francia-Venezuela, al FONACIT, al Ministère des Affaires Etrangères por el financiamiento otorgado para este proyecto.*
- ❖ *Al CDCHTA-ULA, por el financiamiento otorgado para este proyecto con el código C-1927-15-08-Ed.*
- ❖ *A todas aquellas otras personas que de un modo u otro me ayudaron a que esto fuese posible.*

## Résumé

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR des Sciences de santé, au sein de l'Université de Bourgogne Franche-Comté et du Laboratoire de Produits Naturels de la Faculté de Sciences, au sein de l'Universidad de Los Andes (Venezuela). Elle vise essentiellement l'étude phytochimique de cinq plantes tropicales qui sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce contexte, trois espèces vénézuéliennes ont été choisies : *Bursera inversa* (Burseraceae), *Hydrocotyle multifida* (Araliaceae) et *Lepechinia bullata* (Lamiaceae) et deux cultivars de *Pittosporum tenuifolium* : 'Variegatum' et 'Gold Star'. Ces espèces ont été sélectionnées par chimiotaxonomie, en raison de la grande diversité de composés biologiquement actifs qui ont été isolés de ces genres lors d'études antérieures.

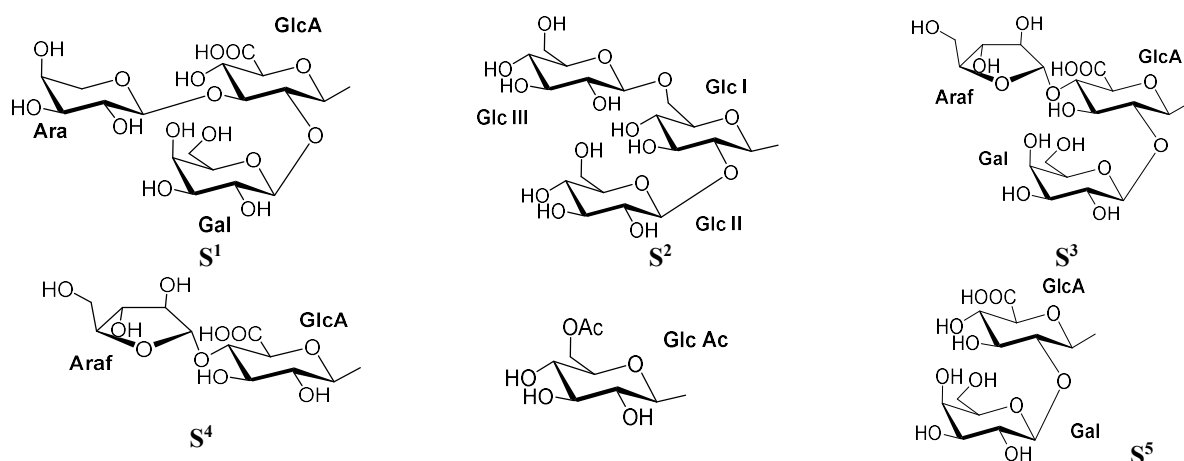
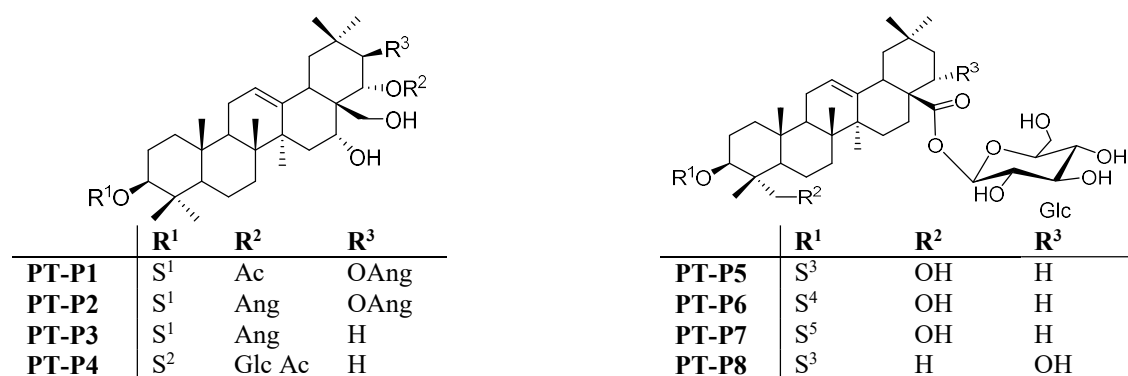
### ***Pittosporum tenuifolium* Banks y Sol. ex Gaertn: cultivars 'Variegatum' et 'Gold Star'**

Le genre *Pittosporum* est composé par plus de 200 espèces d'arbres et arbustes, qui sont distribués principalement dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, Australie et Nouvelle-Zélande. Ce genre est connu pour ses huiles essentielles, résines et métabolites secondaires comme les flavonoïdes, saponines et lignanes (Bäcker *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2011; Weston, 2004). Quelques espèces de *Pittosporum* ont montré une activité antibactérienne (Mananjarasoa *et al.*, 1998) et cytotoxique (Seo *et al.*, 2002).

*Pittosporum tenuifolium* est une espèce naturelle de Nouvelle-Zélande d'arbustes et de petits arbres avec une grande diversité de cultivars disponibles en jardinerie.

Notre étude phytochimique a été réalisée sur les feuilles et les tiges de *P. tenuifolium* 'Variegatum', et sur les tiges de *P. tenuifolium* 'Gold Star'. Les tiges et feuilles de *P. tenuifolium* 'Variegatum' ont été soumises à une extraction par ultrason avec de l'éthanol à 70%. Par contre, une extraction par microondes a été employée avec les tiges de *P. tenuifolium* 'Gold Star'. Les trois extraits bruts ont été fractionnés par VLC, suivies de différents techniques de chromatographie : MPLC en phase normale (silice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) et en phase inverse (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O), Colonne de Sephadex (Sephadex LH-20; MeOH). Cette étude a conduit à l'obtention de huit glycosides naturels et ces structures ont été élucidées principalement par des techniques spectroscopiques de RMN-1D et -2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit de sept nouvelles saponines triterpéniques de type oleanane : 3-*O*-β-*D*-galactopyranosyl-(1→2)-[α-*L*-arabinopyranosyl-(1→3)]-β-*D*-glucuronopyranosyl-21-*O*-angeloyl-22-*O*-acetyl barringtogenol C (PT-P1) et 3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→2)-[β-*D*-glucopyranosyl-(1→6)]-β-

*D*-glucopyranosyl-22-*O*-[(6-*O*-acetyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl]camelliagenin A (**PT-P4**) obtenus des tiges de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’; 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopyranosyl-21,22-di-*O*-angeloylbarringtonenol C (**PT-P2**) et 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopyranosyl-22-*O*-angeloylcamelliagenin A (**PT-P3**) isolés des feuilles de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’; 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopyranosyl-22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid 28-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl ester (**PT-P8**) obtenu des tiges de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’; les composés 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopyranosylhederagenin 28-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl ester (**PT-P5**) et 3-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -*D*-glucuronopyranosylhederagenin 28-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl ester (**PT-P6**) isolés des tiges de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ et *P. tenuifolium* ‘Gold Star’. De plus, un glycoside déjà décrit dans la littérature a été identifié comme étant l’udosaponin F (**PT-P6**) des tiges de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’.



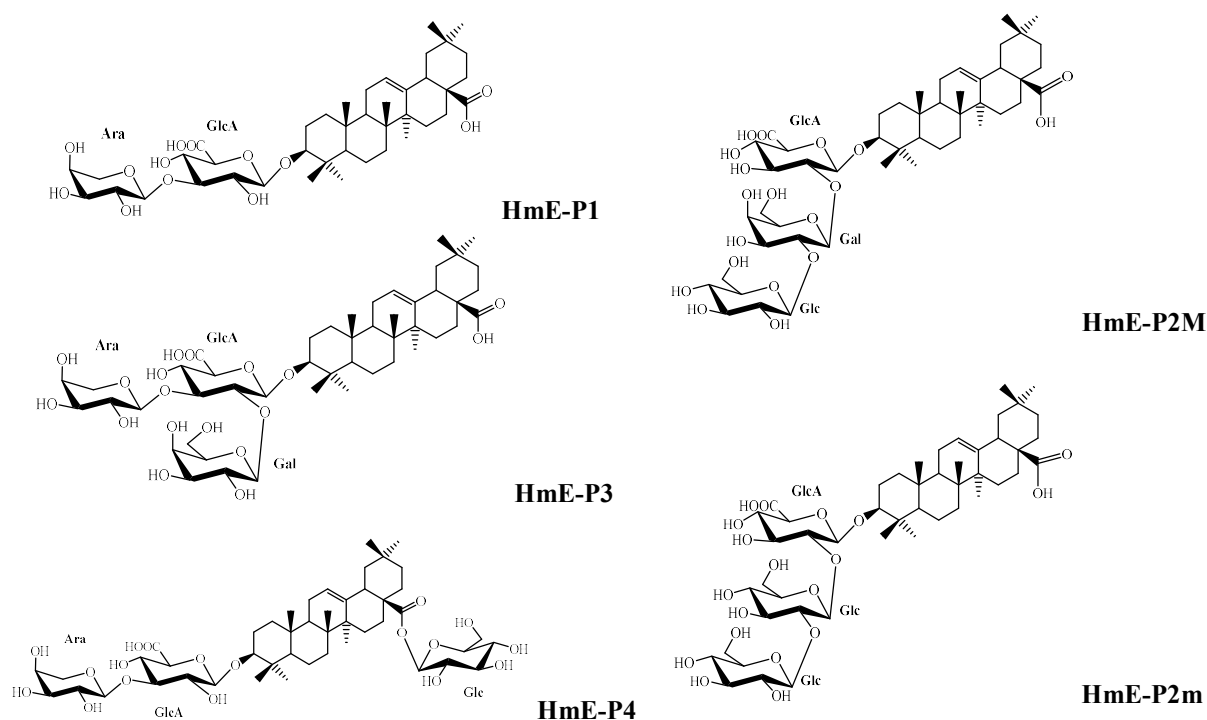
### *Hydrocotyle multifida* A. Rich

Les plantes du genre *Hydrocotyle* sont des herbes aquatiques et il y a plus de 130 espèces classifiées dans ce genre. Elles sont distribuées autour du monde dans les régions tropicales et elles sont très employées en médecine traditionnelle chinoise (Hong *et al.*, 2015). Les propriétés

pharmacologiques de ces espèces sont attribuées aux métabolites secondaires présents dans ces plantes, comme terpènes, saponines, flavonoïdes et lignanes (Huong *et al.*, 2009; Maulidiani *et al.*, 2014; Tabopda *et al.*, 2012).

Au Venezuela, on peut trouver 13 espèces différentes du genre *Hydrocotyle* dont *H. multifida*. Cette espèce est distribuée en Colombie et Venezuela, principalement dans forêts andines, steppes, environnements humides et dans les terrains marécageux.

Notre étude phytochimique a été réalisée sur la plante *H. multifida*. Elle a été soumise à une extraction par soxhlet, successivement avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et de l'éthanol au 70%. L'extrait brut éthanolique a été fractionné par VLC en phase normale (silice ; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) suivie par une VLC en phase inverse (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O). Les fractions d'intérêt obtenues ont été soumises à un fractionnement par différents techniques chromatographiques : MPLC normale (silice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) et phase inverse (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O), et HPLC (ACN/H<sub>2</sub>O). Cette étude a conduit à l'obtention de cinq glycosides naturels et leurs structures ont été élucidées principalement par les techniques spectroscopiques de RMN-1D et -2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit de deux nouvelles saponines triterpéniques de type oleanane : 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (**HmE-P2m**) et 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-oleanolic acid (**HmE-P3**). Trois saponines connues ont également été identifiées : momordin I (**HmE-P1**), sandrosaponin X (**HmE-P2M**) et hemsloside Ma1 (**HmE-P1**).



### ***Bursera inversa* Daly**

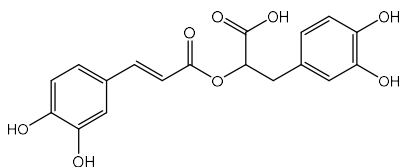
Avec plus de 130 espèces, le genre *Bursera* est localisé principalement en Amérique du Sud et ces plantes sont très connues pour leurs résines et autres substances aromatiques volatiles. L'espèce *B. inversa* est trouvée seulement dans quelques régions de Colombie, Panama et Venezuela. En général dans le genre *Bursera* les principaux métabolites secondaires sont les terpènes, quelques flavonoïdes, lignanes, etc (Becerra *et al.*, 2001). Des espèces du genre *Bursera* présentent une grande activité anti-inflammatoire in vitro. Des agents anti-tumoraux in vivo ont également été trouvés dans plusieurs espèces de *Bursera*.

Notre étude phytochimique a été réalisée sur les fruits de *Bursera inversa*, lesquels ont été soumis à une extraction par ultrasons avec de l'hexane. L'extrait a ensuite été fractionné plusieurs fois avec des techniques de chromatographie de colonne et chromatographie préparative en couche mince. Cette étude a conduit à l'obtention de trois composés purs et de quatre fractions d'intérêt. Les produits purs et les fractions ont été caractérisés par GC-MS. Il s'agit principalement d'alcane à longue chaîne et esters d'acides gras.

### ***Lepechinia bullata* (Kunth) Epling**

Dans le genre *Lepechinia*, il y a plus de 42 espèces et elles se trouvent distribuées principalement en Amérique du Sud, dans les forêts sèches et les savanes. Quelques espèces de *Lepechinia* sont utilisées pour leurs propriétés anti-tumorales (Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998) ou pour le traitement des infections urinaires (Delgado *et al.*, 1994). Au Venezuela, on trouve quatre espèces du genre *Lepechinia*. L'espèce *L. bullata* est l'une d'entre eux, présente dans les régions d'Anzoátegui, Lara, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira et Trujillo (Meier, 2005).

Notre étude phytochimique a été réalisée sur les branches de *Lepechinia bullata*, laquelle a été soumise à une extraction par microondes avec de l'éthanol à 75%. L'extrait brut éthanolique a été fractionné par VLC phase inverse (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O) et la fraction d'intérêt a été fractionnée plusieurs fois sur une colonne de Sephadex (Sephadex LH-20; MeOH). Cette étude a conduit à l'obtention d'un produit majoritaire qui est un dérivé de l'acide caféique. La structure du composé a été élucidée principalement par les techniques spectroscopiques de RMN-1D et -2D, et de spectrométrie de masse. Il s'agit du composé déjà connu, l'acide rosmarinique (**LB-T1**).



**LB-T1**

## *RESUMEN*

Este trabajo se presenta bajo la forma de secciones, donde en primer lugar se expone una breve introducción acerca de los géneros de interés para este estudio, como son *Bursera* (Burseraceae), *Hydrocotyle* (Araliaceae), *Lepechinia* (Lamiaceae) y *Pittosporum* (Pittosporaceae); así como los motivos que llevaron a la realización de este estudio fitoquímico. Cada género es tratado en un capítulo diferente, que abarca una revisión bibliográfica extensa (considerando los aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos) del género, seguida por el procedimiento experimental llevado a cabo en cada especie analizada y por último el análisis de los resultados obtenidos.

Los compuestos aislados de cultivares de *Pittosporum tenuifolium* estudiados: ‘Variegatum’ y ‘Gold Star’ se encuentran descritos en el primer capítulo entre los que se encuentran ocho nuevas saponinas triterpénicas tipo-oleanano: **PT-P1** y **PT-P4** de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’, **PT-P2** y **PT-P3** de las hojas de este mismo cultivar, **PT-P7** y **PT-P8** de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ y por último, **PT-P5** y **PT-P6** aisladas de los tallos de ambos cultivares. Además también se describe el compuesto ya conocido, udosaponina F (**PT-P9**), identificado en los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.

De la especie *Hydrocotyle multifida* se aislaron cinco saponinas triterpénicas, descritas en el segundo capítulo, las cuales tienen al ácido oleanólico como genina. Dos de las cinco saponinas son productos naturales nuevos, **HmE-P3** y **HmE-P2 minoritario**; las otras tres saponinas son compuestos ya conocidos, momordin I (**HmE-P1**), sandrosaponina X (**HmE-P2 mayoritario**) y hemslósido Ma1 (**HmE-P4**)

En el tercer capítulo que abarca al género *Bursera*, incluye los resultados del estudio fitoquímico de las semillas de *Bursera inversa*, entre los que se puede mencionar la identificación de 45 compuestos en las semillas de esta planta.

El último capítulo contiene la descripción del compuesto mayoritario, aislado de las ramas de *Lepechinia bullata* e identificado como el ácido rosmarínico (**LB-T1**).



## ABSTRACT

This research thesis is presented in five sections. The first of them, the Prologue, contains a short introduction about the genus includes in this study [*Bursera* (Burseraceae), *Hydrocotyle* (Araliaceae), *Lepechinia* (Lamiaceae) and *Pittosporum* (Pittosporaceae)]. This section also comprises the motivation and objectives for the phytochemical study realized.

Each analyzed specie is placed in one different chapter. In every chapter, it is include a wide review of the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects of the genus. Later, the experimental procedure is described and finally the results of the analyzed plant are presented.

The first chapter contains the phytochemical analysis of *Pittosporum* cultivars: *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ and *P. tenuifolium* ‘Gold Star’. The results describe the characterization of eight new olenane-type triterpenic saponins: **PT-P1** and **PT-P4** from *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ branches, **PT-P2** and **PT-P3** from leaves of *P. tenuifolium* ‘Variegatum’, **PT-P7** and **PT-P8** find in branches of *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ and the compounds **PT-P5** y **PT-P6** isolated from both cultivars branches. In addition, Udosaponin F (**PT-P9**) was identified in the branches of *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.

From *Hydrocotyle multifida*, second chapter, five triterpenic saponins are described. The genin of these saponins is oleanolic acid. Only two isolated compounds are new natural products: **HmE-P3** and **HmE-P2 minoritario**. The other three saponins are already known, they were identified as momordin I (**HmE-P1**), sandrosaponin X (**HmE-P2 mayoritario**) and hemsloside Ma1 (**HmE-P4**).

The third chapter is dedicated to *Bursera inversa* specie. The most significant results are the identification of 45 compounds in seeds of *B. inversa*, almost of them characterized as long-chain hydrocarbons and fatty acid esters.

The last chapter is about *Lepechinia bullata* specie. In the results section, the isolated majority compound from *L. bullata* is described and characterized as rosmarinic acid (**LB-T1**).

*ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES*

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Ang	Ácido angélico o angeloil
Ac	Ácido acético o acetilo
Ara	Arabinopiranososa o arabinopiranosilo
Araf	Arabinofuranosa o arabinofuranosilo
<i>br s</i>	Broad singlet / singulete ancho
<sup>13</sup> C	Isótopo de carbono con una masa de 13 uma
Caf	Ácido caféico o cafeoil
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CCFP	Cromatografía de Capa Fina Preparativa
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetro
COSY	<b>C</b> ORrelated <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>
δ	Desplazamiento químico respecto al TMS medido en ppm
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete de dobletes
DEPT	<b>D</b> istorsionless <b>E</b> nhancement by <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfert
EC <sub>50</sub>	<b>C</b> oncentración <b>E</b> fectiva media
ED <sub>50</sub>	<b>D</b> osis <b>E</b> fectiva media
E <sub>max</sub>	<b>E</b> fectividad máxima
ESI	<b>E</b> lectro <b>S</b> pray <b>I</b> onization
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
eV	Electrón-voltio
FAB	<b>F</b> ast <b>A</b> tom <b>B</b> ombardment
GC	<b>G</b> as <b>C</b> hromatography
Gal	Galactosa o galactopiranosilo
Glc	Glucosa o glucopiranosilo
GlcA	Ácido glucorónico o glucoronopiranosilo
GlcAc	6-acetoxiglucosa o 6-acetoxiglucosilo
<sup>1</sup> H	Hidrógeno (protio)
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple- <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation Spectroscopy
HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
HR-ESI	<b>H</b> igh <b>R</b> esolution- <b>E</b> SI
HSQC	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence Spectroscopy

Hz	Herzios
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media
ID <sub>50</sub>	Dosis Inhibitoria media
IR	Espectroscopia Infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
μg	Microgramo
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MBC	Concentración Mínima Bactericida
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
mm	Milímetro
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
<i>m / z</i>	Relación masa / carga elemental del ion
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OH	Hidróxilo
<i>p</i> -cum	<i>p</i> -Cumarilo
ppm	Partes por millón
Rha	Rhamnosa o rhamnopiranosilo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	Reversed Phase
Rut	Rutina o rutinósilo
<i>s</i>	Singulete
Si	Sílica
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
VLC	Vacuum Liquid Chromatography
Xyl	Xilosa o xilopiranosilo

## CONTENIDO GENERAL

PRÓLOGO.....	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	3
II. HIPÓTESIS .....	11
III. OBJETIVOS .....	11
III.A. Objetivo General .....	11
III.B. Objetivos Específicos .....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
IV.A. Métodos cromatográficos .....	12
IV.A.1. Cromatografía de Capa Fina (TLC o CCF) y Cromatografía de Capa Fina Preparativa (CCFP).....	12
IV.A.2. Cromatografía de Exclusión Molecular .....	12
IV.A.3. Cromatografía Líquida al Vacío (VLC).....	13
IV.A.4. Cromatografía Líquida de Mediana Presión (MPLC).....	13
IV.A.5. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).....	14
IV.A.6. Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS) .....	15
IV.B. Determinación estructural .....	15
IV.B.1. Métodos espectroscópicos .....	15
IV.B.1.1. Espectroscopia Infrarroja (IR).....	15
IV.B.1.2. Espectrometría de masas .....	16
IV.B.1.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	16
CAPÍTULO I. PITTOSPORACEAE .....	19
I. INTRODUCCIÓN .....	21
I.A. Usos etnobotánicos del género <i>Pittosporum</i> .....	21
I.B. Fitoquímica reportada para especies del género <i>Pittosporum</i> .....	22
I.B.1. Aceites esenciales .....	22
I.B.2. Terpenoides.....	23
I.B.2.1. Mono- y sesqui-terpenoides.....	23
I.B.2.2. Diterpenoides y carotenoides.....	25
I.B.3. Triterpenos y saponinas triterpénicas.....	25
I.B.4. Compuestos fenólicos .....	28
I.B.4.1. Flavonoides .....	28
I.B.4.2. Lignanos .....	30
I.B.4.3. Ftalidas .....	30
I.B.4.4. Cumarinas.....	30
I.B.4.5. Otros compuestos fenólicos.....	30
I.C. Actividades biológicas del género <i>Pittosporum</i> .....	34
I.D. RMN de saponinas .....	37
II. PARTE EXPERIMENTAL .....	39
II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica .....	39
II.B. Tratamiento del material vegetal.....	39
II.B.1. <i>Pittosporum tenuifolium</i> ‘Variegatum’ .....	40
II.B.2. <i>Pittosporum tenuifolium</i> ‘Gold Star’ .....	42
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	44
III.A. <b>Compuesto PT-P1:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-22-acetoxi- 21-angeloxibarringtonol C.....	44
III.B. <b>Compuesto PTV-P2:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-21,22-diangeloxibarringtonol C.....	56
III.C. <b>Compuesto PTV-P3:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A .....	66

III.D. <b>Compuesto PTV-P4:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucopiranosil-22- <i>O</i> -(6-acetoxi)- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucopiranosilcameliagenina A.....	76
III.E. <b>Compuesto PT-P5:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucuronopiranosil-hederageninoato de <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucopiranosilo.....	86
III.F. <b>Compuesto PT-P6:</b> 3- <i>O</i> -[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucuronopiranosil hederageninoato de <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucopiranosilo.....	97
III.G. <b>Compuesto PT-P7:</b> Udosaponina F .....	108
III.H. <b>Compuesto PT-P8:</b> 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucuronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroxiolean-12-en-28-oato de <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucopiranosilo.....	118
CAPÍTULO II. ARALIACEAE.....	129
I. INTRODUCCIÓN.....	131
I.A. Usos etnobotánicos del género <i>Hydrocotyle</i> .....	131
I.B. Fitoquímica reportada para las especies de <i>Hydrocotyle</i> .....	132
I.B.1. Aceites esenciales .....	132
I.B.2. Terpenoides.....	133
I.B.2.1. Mono- y sesqui-terpenoides.....	133
I.B.2.2. Triterpenos y esteroides.....	134
I.B.3. Saponinas triterpénicas y esteroidales.....	135
I.B.4. Flavonoides, lignanos y derivados fenólicos .....	137
I.B.4.1. Flavonoides .....	137
I.B.4.2. Lignanos y otros derivados fenólicos .....	140
I.B.5. Otros compuestos.....	141
I.B.5.1. Alcaloides.....	141
I.B.5.2. Otros .....	141
I.C. Actividades biológicas de las especies de <i>Hydrocotyle</i> .....	145
II. PARTE EXPERIMENTAL .....	148
II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica .....	148
II.B. Tratamiento del material vegetal.....	148
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	150
III.A. <b>Compuesto HmE-P1:</b> Momordin I. ....	150
III.B. <b>Compuesto HmE-P2 mayoritario:</b> Sandrosaponina X.....	162
III.C. <b>Compuesto HmE-P2 minoritario:</b> ácido 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> - glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucuronopiranosiloleanólico.....	174
III.D. <b>Compuesto HmE-P3:</b> ácido 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil- (1 $\rightarrow$ 3)]- <i>\beta</i> - <i>D</i> -glucuronopiranosiloleanólico.....	186
III.E. <b>Compuesto HmE-P4:</b> Hemlósido Ma1 .....	197
CAPÍTULO III. BURSERACEAE .....	209
I. INTRODUCCIÓN.....	211
I.A. Usos etnobotánicos del género <i>Bursera</i> .....	211
I.B. Fitoquímica reportada para especies de <i>Bursera</i> .....	213
I.B.1. Aceites esenciales y componentes volátiles .....	213
I.B.2. Di- y tri-terpenoides.....	217
I.B.3. Flavonoides.....	220
I.B.4. Lignanos .....	221
I.B.5. Otros compuestos fenólicos .....	223
I.C. Actividad biológica en el género <i>Bursera</i> .....	228
II. PARTE EXPERIMENTAL .....	231
II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica .....	231
II.B. Tratamiento del material vegetal.....	231
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	233

CAPÍTULO IV. LAMIACEAE .....	239
I. INTRODUCCIÓN .....	241
I.A. Usos etnobotánicos del género <i>Lepechinia</i> .....	241
I.B. Fitoquímica reportada para las especies de <i>Lepechinia</i> .....	242
I.B.1. Aceites esenciales .....	242
I.B.2. Terpenoides .....	243
I.B.2.1. Diterpenoides .....	244
I.B.2.2. Triterpenoides y esteroides .....	246
I.B.3. Flavonoides y derivados fenólicos .....	247
I.C. Actividad biológica de las especies de <i>Lepechinia</i> .....	251
II. PARTE EXPERIMENTAL .....	253
II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica .....	253
II.B. Tratamiento del material vegetal .....	253
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	255
III.A. <b>Compuesto LB-T1: Ácido rosmarínico</b> .....	255
CONCLUSIONES .....	261
GLOSARIO .....	267
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	273
ANEXOS .....	293

## TABLAS

Tabla 1. Distribución de las especies de <i>Bursera</i> en Venezuela.....	6
Tabla 2. Aplicaciones de las especie de <i>Pittosporum</i> en la medicina tradicional.....	21
Tabla 3. Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género <i>Pittosporum</i> .....	32
Tabla 4. Actividad biológica del género <i>Pittosporum</i> .....	34
Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P1 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	48
Tabla 6. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P2 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	58
Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P3 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	68
Tabla 8. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P4 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	78
Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P5 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	89
Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P6 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	100
Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P7 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	110
Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto PT-P8 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	121
Tabla 13. Usos etnobotánicos registrados para diversas especies del género <i>Hydrocotyle</i> .....	131
Tabla 14. Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género <i>Hydrocotyle</i> .....	143
Tabla 15. Actividad biológica del género <i>Hydrocotyle</i> .....	145
Tabla 16. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto HmE-P1 en CD <sub>3</sub> OD.....	153
Tabla 17. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) de HmE-P2 mayoritario en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	164
Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) de HmE-P2 minoritario en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	176
Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto HmE-P3 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	188
Tabla 20. Desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto HmE-P4 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	199
Tabla 21. Aplicaciones de las especies de <i>Bursera</i> en la Medicina Tradicional.....	211
Tabla 22. Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género <i>Bursera</i> .....	225
Tabla 23. Actividad biológica del género <i>Bursera</i> .....	228
Tabla 24. Compuestos detectados por GC-MS en subfracciones obtenidas de las semillas de <i>Bursera inversa</i> .....	236
Tabla 25. Usos etnobotánicos registrados para diversas especies del género <i>Lepechinia</i> .....	241
Tabla 26. Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género <i>Lepechinia</i> .....	249
Tabla 27. Actividad biológica del género <i>Lepechinia</i> .....	251
Tabla 28. Bandas de absorción significativas en el IR (KBr) de del compuesto LB-T1.....	255
Tabla 29. Valores de los desplazamientos químicos de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto LB-T1 en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N.....	258

## FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la familia Araliaceae (izq.) y del género <i>Hydrocotyle</i> (der.).....	4
Figura 2. Diversas especies de <i>Hydrocotyle</i> .....	5
Figura 3. Distribución geográfica de las Burseraceae (izquierda) y del género <i>Bursera</i> (derecha). ....	6
Figura 4. Estructuras morfológicas del género <i>Bursera</i> . ....	6
Figura 5. Distribución geográfica de la familia Lamiaceae. ....	7
Figura 6. Diversas especies de <i>Lepechinia</i> .....	8
Figura 7. Distribución geográfica de la familia Pittosporaceae (izq.) y del género <i>Pittosporum</i> (der.).....	9
Figura 8. Cultivares de <i>Pittosporum tenuifolium</i> . ....	10
Figura 9. Terpenoides hallados en los aceites esenciales de <i>Pittosporum</i> . ....	24
Figura 10. Mono-, sesqui- y di-terpenoides aislados en el género <i>Pittosporum</i> . ....	25
Figura 11. Triterpenoides aislados en el género <i>Pittosporum</i> . ....	26
Figura 12. Saponinas triterpénicas aisladas en las especies de <i>Pittosporum</i> . ....	29
Figura 13. Compuestos fenólicos en el género <i>Pittosporum</i> . ....	31
Figura 14. Tipos de correlaciones observadas para las saponinas en los diferentes experimentos 2D de RMN.....	38
Figura 15. Espectro HR-ESI-MS < 0 del compuesto PT-P1.....	44
Figura 16. Estructura del compuesto PT-P1: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-22-acetoxi-21-angeloxibarringtonenol C.....	48
Figura 17. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P1. ....	49
Figura 18. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P1.....	50
Figura 19. Espectro de HSQC del compuesto PT-P1.....	51
Figura 20. Espectro de HMBC del compuesto PT-P1.....	52
Figura 21. Espectro de COSY del compuesto PT-P1.....	53
Figura 22. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P1. ....	54
Figura 23. Espectro de NOESY del compuesto PT-P1.....	55
Figura 24. Espectro HR-ESI-MS < 0 (arriba) y HR-ESI-MS > 0 (abajo) del compuesto PT-P2.....	56
Figura 25. Estructura del compuesto PT-P2: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-21,22-diangeloxibarringtonenol C.....	58
Figura 26. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P2. ....	59
Figura 27. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P2.....	60
Figura 28. Espectro de HSQC del compuesto PT-P2.....	61
Figura 29. Espectro de HMBC del compuesto PT-P2.....	62
Figura 30. Espectro de COSY del compuesto PT-P2.....	63
Figura 31. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P2. ....	64
Figura 32. Espectro de NOESY del compuesto PT-P2.....	65
Figura 33. Espectro HR-ESI-MS < 0 (arriba) y HR-ESI-MS > 0 (abajo) del compuesto PT-P3.....	66
Figura 34. Estructura del compuesto PT-P3: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A. ....	68
Figura 35. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P3. ....	69
Figura 36. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P3.....	70
Figura 37. Espectro de HSQC del compuesto PT-P3.....	71
Figura 38. Espectro de HMBC del compuesto PT-P3.....	72
Figura 39. Espectro de COSY del compuesto PT-P3.....	73
Figura 40. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P3. ....	74
Figura 41. Espectro de NOESY del compuesto PT-P3.....	75
Figura 42. Espectro HR-ESI-MS < 0 del compuesto PT-P4.....	76
Figura 43. Estructura del compuesto PT-P4: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosil-22- <i>O</i> -(6-acetoxi)- $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosilcameliagenina A.....	78



Figura 44. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P4. ....	79
Figura 45. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P4.....	80
Figura 46. Espectro de HSQC del compuesto PT-P4.....	81
Figura 47. Espectro de HMBC del compuesto PT-P4.....	82
Figura 48. Espectro de COSY del compuesto PT-P4.....	83
Figura 49. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P4. ....	84
Figura 50. Espectro de NOESY del compuesto PT-P4.....	85
Figura 51. Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto PT-P5.....	86
Figura 52. Estructura del compuesto PT-P5: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosilhedera- geninoato de $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosilo. ....	88
Figura 53. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P5. ....	90
Figura 54. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P5.....	91
Figura 55. Espectro de HSQC del compuesto PT-P5.....	92
Figura 56. Espectro de HMBC del compuesto PT-P5.....	93
Figura 57. Espectro de COSY del compuesto PT-P5.....	94
Figura 58. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P5. ....	95
Figura 59. Espectro de NOESY del compuesto PT-P5.....	96
Figura 60. Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto PT-P6.....	97
Figura 61. Espectro FAB-MS del compuesto PT-P6. ....	98
Figura 62. Estructura del compuesto PT-P6: 3- <i>O</i> -[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil hedera- geninoato de $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosilo. ....	99
Figura 63. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P6. ....	101
Figura 64. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P6.....	102
Figura 65. Espectro de HSQC del compuesto PT-P6.....	103
Figura 66. Espectro de HMBC del compuesto PT-P6.....	104
Figura 67. Espectro de COSY del compuesto PT-P6.....	105
Figura 68. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P6. ....	106
Figura 69. Espectro de NOESY del compuesto PT-P6.....	107
Figura 70. Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto PT-P7.....	108
Figura 71. Estructura del compuesto PT-P7: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil hedera- geninoato de $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosilo (Udosaponina F).....	109
Figura 72. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P7. ....	111
Figura 73. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P7.....	112
Figura 74. Espectro de HSQC del compuesto PT-P7.....	113
Figura 75. Espectro de HMBC del compuesto PT-P7.....	114
Figura 76. Espectro de COSY del compuesto PT-P7.....	115
Figura 77. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P7. ....	116
Figura 78. Espectro de NOESY del compuesto PT-P7.....	117
Figura 79. Espectro ESI-MS < 0 (arriba) y ESI-MS > 0 (abajo) del compuesto PT-P8.....	118
Figura 80. Estructura del compuesto PT-P8: 3- <i>O</i> -[ $\beta$ - <i>D</i> -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ - <i>L</i> -arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ - <i>D</i> -glucuronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ - dihidroxiolean-12-en-28-oato de $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranosilo. ....	120
Figura 81. Espectros de RMN- <sup>13</sup> C y DEPT del compuesto PT-P8. ....	122
Figura 82. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto PT-P8.....	123
Figura 83. Espectro de HSQC del compuesto PT-P8.....	124
Figura 84. Espectro de HMBC del compuesto PT-P8.....	125
Figura 85. Espectro de COSY del compuesto PT-P8.....	126
Figura 86. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P8. ....	127
Figura 87. Espectro de NOESY del compuesto PT-P8. ....	128
Figura 88. Compuestos mayoritarios reportados en los aceites esenciales del género <i>Hydrocotyle</i> . ....	133
Figura 89. Mono y Sesquiterpenoides aislados de los extractos de especies de <i>Hydrocotyle</i> . ....	134

Figura 90. Triterpenoides y esteroides identificados en el género <i>Hydrocotyle</i> .....	135
Figura 91. Saponinas aisladas de las especies de <i>Hydrocotyle</i> .....	138
Figura 92. Flavonoides, lignanos y compuestos fenólicos del género <i>Hydrocotyle</i> .....	140
Figura 93. Otros compuestos hallados en el género <i>Hydrocotyle</i> .....	142
Figura 94. Espectros ESI-MS < 0 del compuesto HmE-P1.....	150
Figura 95. Estructura del compuesto HmE-P1: ácido 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico (Momordin I).....	152
Figura 96. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto HmE-P1.....	154
Figura 97. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto HmE-P1.....	155
Figura 98. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P1.....	156
Figura 99. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P1.....	157
Figura 100. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P1.....	158
Figura 101. Espectro de COSY del compuesto HmE-P1.....	159
Figura 102. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P1.....	160
Figura 103. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P1.....	161
Figura 104. Espectros ESI-MS del compuesto HmE-P2.....	162
Figura 105. Estructura del compuesto HmE-P2 mayoritario: ácido 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico (Sandrosaponina X).....	164
Figura 106. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	165
Figura 107. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	166
Figura 108. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	167
Figura 109. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	168
Figura 110. Espectro de COSY del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	169
Figura 111. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	170
Figura 112. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	172
Figura 113. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P2 mayoritario.....	173
Figura 114. Estructura del compuesto HmE-P2 minoritario: ácido 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico.....	175
Figura 115. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto HmE-P2 minoritario.....	177
Figura 116. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto HmE-P2 minoritario.....	178
Figura 117. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P2 minoritario.....	179
Figura 118. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P2 minoritario.....	180
Figura 119. Espectro de COSY del compuesto HmE-P2 minoritario.....	181
Figura 120. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P2 minoritario.....	182
Figura 121. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P2 minoritario.....	184
Figura 122. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P2 minoritario.....	185
Figura 123. Espectros ESI-MS < 0 del compuesto HmE-P3.....	186
Figura 124. Estructura del compuesto HmE-P3: ácido 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico.....	188
Figura 125. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto HmE-P3.....	189
Figura 126. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto HmE-P3.....	190
Figura 127. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P3.....	191
Figura 128. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P3.....	192
Figura 129. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P3.....	193
Figura 130. Espectro de COSY del compuesto HmE-P3.....	194
Figura 131. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P3.....	195
Figura 132. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P3.....	196
Figura 133. Espectros ESI-MS < 0 del compuesto HmE-P4.....	197
Figura 134. Estructura del compuesto HmE-P4: ácido 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico (Hemlósido MaII).....	199
Figura 135. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto HmE-P4.....	200

Figura 136. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto HmE-P4.....	201
Figura 137. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P4.....	202
Figura 138. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P4.....	203
Figura 139. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P4.....	204
Figura 140. Espectro de COSY del compuesto HmE-P4.....	205
Figura 141. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P4.....	206
Figura 142. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P4.....	207
Figura 143. Monoterpenoides identificados en especies del género <i>Bursera</i> .....	216
Figura 144. Sesquiterpenoides identificados en algunas especies de <i>Bursera</i> .....	216
Figura 145. Diterpenos aislados en el género <i>Bursera</i> .....	218
Figura 146. Triterpenos y esteroides aislados de especies de <i>Bursera</i> .....	219
Figura 147. Flavonoides aislados en el género <i>Bursera</i> .....	221
Figura 148. Lignanos aislados en especies de <i>Bursera</i> .....	223
Figura 149. Otros compuestos fenólicos de <i>Bursera</i> .....	224
Figura 150. Espectros de GC-MS del producto BiSH-P1.....	233
Figura 151. Espectros de GC-MS del producto BiSH-P3.....	234
Figura 152. Espectros de GC-MS del producto BiSH-P5.....	234
Figura 153. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-A de las semillas de <i>B. inversa</i> .....	235
Figura 154. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-B1 de las semillas de <i>B. inversa</i> .....	237
Figura 155. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-BxA de las semillas de <i>B. inversa</i> .....	237
Figura 156. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-D1 de las semillas de <i>B. inversa</i> .....	238
Figura 157. Monoterpenos y sesquiterpenos hallados en los aceites esenciales del género <i>Lepechinia</i> .....	243
Figura 158. Sesquiterpenos aislados de los extractos de <i>Lepechinia urbaniana</i> .....	243
Figura 159. Diterpenoides aislados del género <i>Lepechinia</i> .....	245
Figura 160. Triterpenoides y esteroides identificados en especies de <i>Lepechinia</i> .....	246
Figura 161. Flavonoides y compuestos fenólicos del género <i>Lepechinia</i> .....	248
Figura 162. Espectro IR (KBr) del compuesto LB-T1.....	255
Figura 163. Espectros HR-ESI-MS del compuesto LB-T1. A) ESI-MS < 0, b) ESI-MS > 0.....	256
Figura 164. Estructura del compuesto LB-T1: ácido rosmarínico.....	257
Figura 165. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del compuesto LB-T1.....	258
Figura 166. Espectro RMN- <sup>13</sup> C del compuesto LB-T1.....	259
Figura 167. Espectro de HSQC del compuesto LB-T1.....	259
Figura 168. Espectro de HMBC del compuesto LB-T1.....	260
Figura 169. Espectro de COSY del compuesto LB-T1.....	260

## ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimiento general empleado en el aislamiento, separación y purificación de las saponinas triterpénicas de <i>Pittosporum tenuifolium</i> .....	39
Esquema 2. Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de los tallos de <i>Pittosporum tenuifolium</i> ‘Variegatum’.....	41
Esquema 3. Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de las hojas de <i>Pittosporum tenuifolium</i> ‘Variegatum’.....	42
Esquema 4. Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de los tallos de <i>Pittosporum tenuifolium</i> ‘Gold Star’.....	43
Esquema 5. Aislamiento y purificación de las saponinas de <i>Hydrocotyle multifida</i> .....	149
Esquema 6. Separación y purificación de compuestos de las semillas de <i>Bursera inversa</i> .....	232
Esquema 7. Aislamiento y purificación de los componentes de los tallos de <i>Lepechinia bullata</i> .....	254

# *PRÓLOGO*

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El presente trabajo tiene como finalidad la realización de un estudio fitoquímico de las especies venezolanas *Bursera inversa* Daly (Burseraceae), especie endémica perteneciente a la zona del Sur de Lago de Maracaibo, *Lepechinia bullata* (Lamiaceae) e *Hydrocotyle multifida* (Araliaceae); así como de dos cultivares de la especie neozelandesa *Pittosporum tenuifolium* (Pittosporaceae), *Pittosporum tenuifolium* 'gold star' y *Pittosporum tenuifolium* 'variegatum'. Parte de este estudio contempló una revisión bibliohemerográfica profunda de los reportes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de los género y de las familias a las que pertenecen dichas especies.

La sabiduría popular tiende a detectar con frecuencia y de manera intuitiva las propiedades medicinales de las plantas, las cuales se comprueban la mayoría de las veces por ensayo y error. Ya desde la prehistoria se conocen plantas, que de forma directa o mediante el empleo de sus extractos, han sido usadas en pócimas o para el tratamiento de diversos tipos de afecciones. Esta es la base de la medicina naturista, la cual ha despertado el interés por la utilidad de las plantas en el tratamiento de diversas afecciones; sin embargo, no hay que olvidar que la información sobre los usos populares de las plantas puede resultar no del todo cierta. Es a raíz de esto que en la medicina moderna surgen las investigaciones científicas con la finalidad de corroborar dichas propiedades, determinar los componentes responsables, su potencial como fármaco y establecer su posible toxicidad. Los compuestos sintetizados por las plantas y que son responsables de las diversas actividades biológicas atribuidas a las plantas se conocen como metabolitos secundarios, los cuales son producidos en enorme cantidad y se denominan así porque no todas las plantas los contienen, no son esenciales para el funcionamiento de las plantas y en la mayoría de los casos no se les ha encontrado un rol o función definido (Gottlieb, 1990). A pesar de eso, el hombre ha utilizado estos metabolitos como productos medicinales, colorantes, perfumes, venenos, somníferos, impermeabilizantes, taquificantes y alucinógenos, entre otros muchos usos, desde antes de conocer su naturaleza química (Macías *et al.*, 2007).

La familia Araliaceae son plantas leñosas o raramente herbáceas, a menudo lianas, que se encuentran ampliamente distribuidas, sobre todo en zonas tropicales húmedas, aunque algunas se desarrollan en regiones secas con marcada estacionalidad así como en las zonas templadas de ambos hemisferios. Esta familia comprende 43 géneros y alrededor de 1450 especies, donde los géneros más importantes son *Schefflera*, *Polyscias*, *Oreopanax*, *Hydrocotyle* y *Aralia*.

El género *Hydrocotyle* es un conjunto de plantas acuáticas que comprende más de 130 especies las cuales se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y templadas del mundo (Díaz-Pita, 2011; The Plant List, 2013). Estas plantas se reconocen por ser hierbas acuáticas flotantes perennes con tallos largos y trepadores, raíces nudosas y hojas simples con forma de riñón y bordes redondeados (Díaz-Pita, 2011; Nicolas y Plunkett, 2009). La primera clasificación de las especies de *Hydrocotyle* fue hecha por el francés Tournefort en 1700, ubicando al género dentro de la familia Apiaceae (anteriormente Umbelliferae) (Díaz-Pita, 2011; Mathias, 1936). Estudios recientes de ADN y filogenética (basados en data molecular) muestran que el género *Hydrocotyle* tiene una gran similitud con las especies pertenecientes a la familia Araliaceae, por lo que el género fue movido a esta familia (Nicolas y Plunkett, 2009).



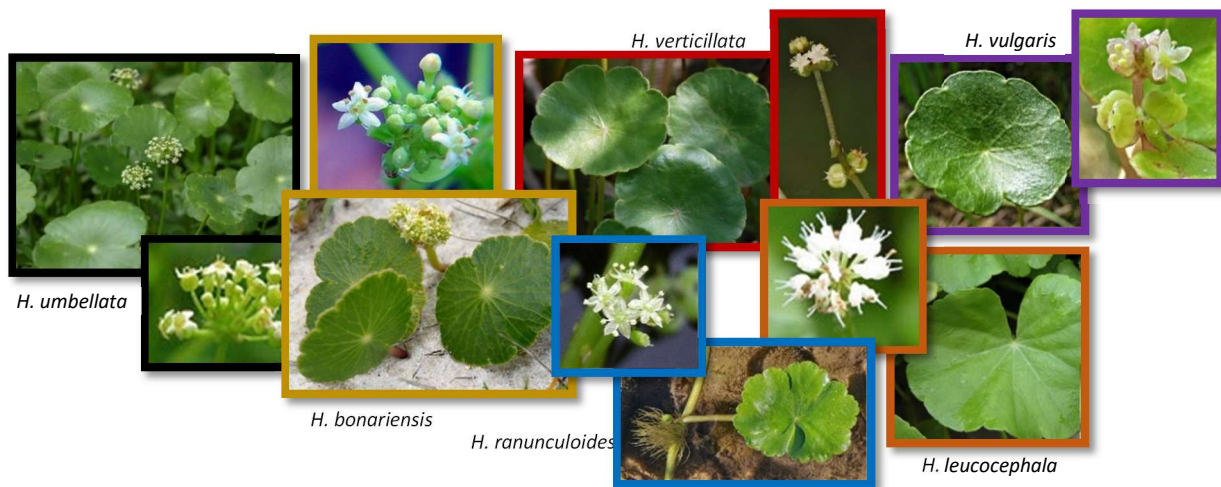
**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia Araliaceae (izq.) y del género *Hydrocotyle* (der.).

En algunas poblaciones de Asia y África las especies del género *Hydrocotyle* son consideradas como alimento (Baruah y Borah, 2009; Saikia y Deka, 2013), sin embargo, también son ampliamente empleadas alrededor del mundo para el tratamiento de diferentes enfermedades y síntomas, en especial en la medicina tradicional china (Choudhury *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2015). Las propiedades farmacológicas de estas especies pueden explicarse y comprobarse mediante el estudio de la composición química de las plantas del género *Hydrocotyle*, los cuales han demostrado que las especies de este género son una fuente prometedora de metabolitos secundarios biológicamente activos como terpenoides, saponinas, flavonoides y lignanos (Huong *et al.*, 2009; Maulidiani *et al.*, 2014; Tabopda *et al.*, 2012).

En Venezuela, han sido reportadas hasta ahora 13 especies de *Hydrocotyle*: *H. aconitifolia*, *H. aristeguietae*, *H. bonplandii*, *H. dominguensis*, *H. gunnerifolia*, *H. hederacea*, *H. multifida*, *H. nixoides*, *H. peltata*, *H. ranunculoides*, *H. umbellata*, *H. venezuelensis* y *H. verticillata* (Briceño y Morillo, 2002; Díaz-Pita, 2011; Mathias, 1936). La especie *Hydrocotyle multifida* A. Rich., fue descrita por primera vez en 1820 por Richard, se distribuye en Colombia



y Venezuela, se encuentra principalmente en bosques andinos y páramos, en ambientes húmedos, al borde de quebradas y en terrenos pantanosos (Díaz-Pita, 2011).

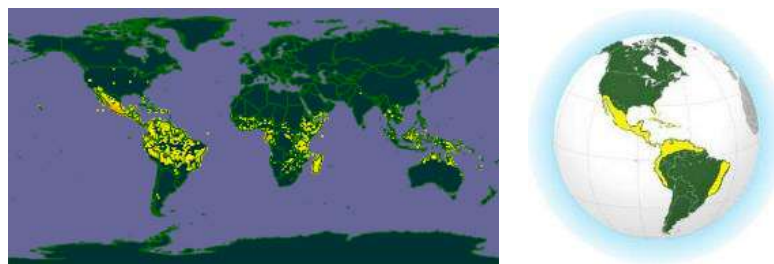


**Figura 2.** Diversas especies de *Hydrocotyle*.

La familia Burseraceae, dentro de la que se encuentra clasificado el género *Bursera*, está conformada por unos 18 géneros y más de 640 especies de árboles y/o arbustos de mediano tamaño provistos de resinas y a menudo aceites esenciales en casi todos los órganos (De la Cerda-Lemus, 2011; The Plant List, 2013); así mismo esta familia se distribuye ampliamente por todo el Mundo, en especial en las zonas tropicales, y con una mayor concentración en África, Malasia, Centro- y Sur-América (Case *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 2002). Las especies pertenecientes a Burseraceae se caracterizan por exudar aceites esenciales y oleorresinas aromáticas que a lo largo de la historia han sido usadas mayormente con fines litúrgicos, terapéuticos y cosméticos, entre otros (Case *et al.*, 2003).

El género *Bursera* agrupa alrededor de 120 especies de plantas leñosas, cuya distribución se restringe al Continente Americano extendiéndose desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos (Rzedowski *et al.*, 2004; The Plant List, 2013). Las plantas pertenecientes a este género son típicamente árboles bajos o de estatura mediana (5-15 m de altura), que constituyen un elemento característico de los bosques tropicales caducifolios, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1.800 msnm. La mayoría de las especies se destacan por sus resinas y sustancias aromáticas volátiles de olores más o menos agradables, la corteza de los troncos suele ser delgada y con frecuencia exfoliante (Rzedowski *et al.*, 2004).





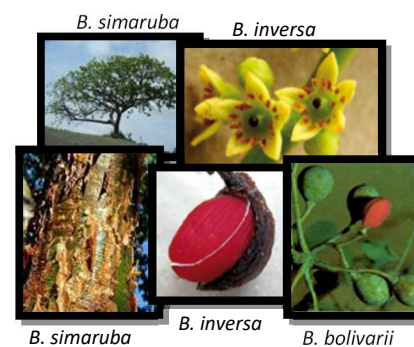
**Figura 3.** Distribución geográfica de las Burseraceae (izq.) y del género *Bursera* (der.).

Las especies de este género son ampliamente incluidas dentro de la medicina tradicional o popular debido a sus propiedades como antiinflamatorio, antibacteriana e insecticida. Estas propiedades han sido reconocidas y atribuidas a sus aceites esenciales, así como a los diterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides y lignanos aislados de las especies de *Bursera* (Becerra *et al.*, 2001). En Venezuela, se ha señalado la presencia de seis especies, ubicadas en distintos grupos: *B. karsteniana*, *B. inversa* y *B. simaruba*, las cuales se encuentran dentro del sub-género *Bursera*, y las tres especies restantes se agrupan dentro del subgénero *Elaphrium*, *B. glabra*, *B. graveolens* y *B. tomentosa* (Castro-Laportte, 2013).

**Tabla 1.** Distribución de las especies de *Bursera* en Venezuela.

Especie	Distribución
<i>B. simaruba</i>	Amazonas, Aragua, Barinas, Bolívar, Carabobo, Cojedes, Falcón, Lara, Mérida, Miranda, Monagas, Nueva Esparta, Portuguesa, Vargas, Yaracuy, Zulia
<i>B. glabra</i>	Lara, Mérida, Zulia
<i>B. graveolens</i>	Mérida, Trujillo
<i>B. inversa</i>	Zulia, Mérida
<i>B. karsteniana</i>	Anzoátegui, Aragua, Falcón, Miranda, Nueva Esparta, Sucre, Vargas,
<i>B. tomentosa</i>	Aragua, Bolívar, Carabobo, Falcón, Guárico, Lara, Sucre, Zulia

La especie *B. inversa* es descrita por primera vez en la revisión hecha por Daly en 1993, como una especie que crece en las selvas húmedas bajas de unas pocas áreas subcosteras de Suramérica cercanas al Mar Caribe, principalmente en la esquina noroeste de Suramérica, existen reportes de esta especie en Colombia, Panamá y Venezuela. Esta especie suelen ser árboles resinosos de 18-25 metros de altura, su corteza es rojiza y se exfolia en láminas delgadas, las hojas son folioladas y los frutos son de verde oscuro a marrón y con forma ovoide, la semilla de consistencia ósea es ovoide y totalmente cubierta por un pseudoarilo carnoso de color rojo. (Castro-Laportte, 2013; Daly, 1993).



**Figura 4.** Estructuras morfológicas del género *Bursera*.

La familia Lamiaceae (antiguamente Labiatae) son plantas con flores, leñosas o herbáceas, que comprenden unas 7900 especies taxonómicamente aceptadas incluidas en 245 géneros, lo que hace de esta familia uno de los grupos más grandes del actual Reino Vegetal (The Plant List, 2013). Son generalmente hierbas perennes (o anuales), aunque también se encuentran arbustos y muy infrecuentemente enredaderas y árboles. Esta familia presenta una distribución mundial, sobre todo en el Mediterráneo; muchas de las especies de esta familia contienen esencias aromáticas y bastantes de ellas se cultivan como especias culinarias como el tomillo, la albahaca, el orégano, el romero, entre otras. Así mismo, muchas de estas especies son conocidas por sus propiedades antioxidantes (Jayasinghe *et al.*, 2003; Pizzale *et al.*, 2002), las cuales son atribuidas a la presencia de diterpenos fenólicos, como el ácido carnósico y el carnosol, y otras sustancias fenólicas como el ácido rosmarínico y ácidos hidroxicinámicos (Exarchou *et al.*, 2002; Maleni *et al.*, 2000).

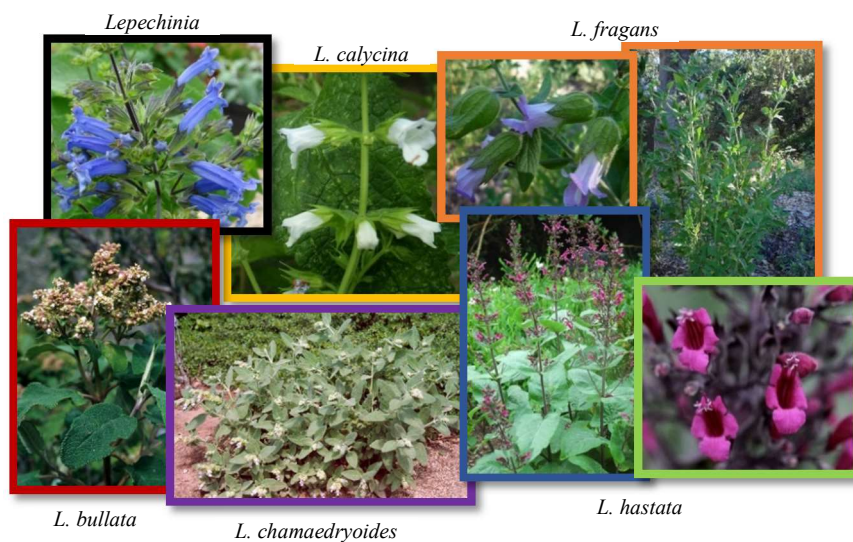


**Figura 5.** Distribución geográfica de la familia Lamiaceae.

Uno de los géneros que conforman la familia Lamiaceae es el género *Lepechinia*, el cual incluye 42 especies aceptadas (The Plant List, 2013). Popularmente las especies de este género son conocidas con nombres como: salvia, salvia negra, bretónica, manrubio, chicura de la Sierra, lengua de buey, casa-casa, entre otros. El género *Lepechinia* es un género predominante del Nuevo Mundo distribuido desde el sureste de los Estados Unidos hasta Chile y es nativo de bosques secos, sabanas y laderas rocosas. Las especies de este género son en su mayoría hierbas bajas y perennes, a veces arbustos e incluso árboles, las hojas suelen ser de mediano tamaño, anchas o estrechas y los frutos ovalados, lisos y de color negro (Epling, 1948; Standley y Williams, 1973). Algunas de estas plantas son usadas por sus propiedades antitumorales, insulino-miméticas (Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998), para tratar infecciones urinarias o calmar dolores de estómago (Delgado *et al.*, 1994).

En Venezuela la familia Lamiaceae consta de unos 26 géneros y alrededor 120 especies (Velazquez *et al.*, 1995) y se han reportado hasta ahora solo cuatro especies de *Lepechinia*: *L. bullata*, *L. schiedana*, *L. salviaefolia* y *L. conferta* (Borges *et al.*, 2006). La especie *L. bullata*, de interés para este estudio, es una planta arbustiva de hasta 4 metros de altura con hojas

aserradas y fragantes y flores pequeñas de color blanco (Cegarra *et al.*, 2006). En Venezuela la especie *L. bullata* ha sido reportada en los estados Anzoátegui, Distrito Federal, Lara, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Trujillo, en bosques nublados, subpáramos y páramos, lugares intervenidos, con un rango altitudinal entre 1.900 y 3.400 msnm (Meier, 2005).



**Figura 6.** Diversas especies de *Lepechinia*.

La familia Pittosporaceae es una familia compuesta por 9 géneros y más de 350 especies subtropicales de árboles, arbustos y enredaderas ampliamente distribuidas en las Islas del Pacífico y las regiones tropicales de África (figura 7 izquierda), sin embargo no se encuentran presentes de forma natural en el Continente Americano (El Dib *et al.*, 2015; Weston, 2004). Las especies más conocidas de esta familia son las pertenecientes a los géneros *Hymenosporum* y *Pittosporum*, las cuales son usadas como plantas ornamentales.

El género *Pittosporum* está conformado por alrededor de 200 especies de árboles y arbustos encontradas principalmente zonas tropicales y sub-tropicales de África, Asia y Oceanía (figura 7 derecha) (Feng *et al.*, 2010; Manase *et al.*, 2013). Además de su valor como planta ornamental, las especies de *Pittosporum* son usadas como fuente de madera para hogueras y para trabajos artesanales (Swamy *et al.*, 2014). Las semillas de algunas especies, son conocidas como “Shanzhiren” y son usadas en la medicina tradicional china por sus efectos sedativos y antitusígenos (El Dib *et al.*, 2015). Adicional a esto, algunas especies de *Pittosporum* son usadas como agentes antiinflamatorios, antimicrobianos y antiespasmódicos (Manase *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Distribución geográfica de la familia Pittosporaceae (izq.) y del género *Pittosporum* (der.).

El género *Pittosporum* es conocido por ser una buena fuente de aceites esenciales, resinas y de metabolitos secundarios activos como sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides, lignanos, saponinas triterpénicas y carotenoides, entre otros (Bäcker *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2011). En cuanto a la actividad farmacológica de las especies pertenecientes a este género, algunas especies han demostrado tener actividad antibacteriana contra algunas cepas de estreptococos, estafilococos y pseudomonas (Mananjarasoa *et al.*, 1998). También se ha demostrado su citotoxicidad sobre células cancerígenas (Seo *et al.*, 2002).

*Pittosporum tenuifolium*, conocido también como *P. nigracans*, es una especie nativa de Nueva Zelanda y ha sido naturalizada en algunas regiones de Australia y Estados Unidos (Hosking *et al.*, 2007). Las especies de *Pittosporum tenuifolium* son arbustos o árboles pequeños que pueden crecer hasta los 10 m de altura en sus lugares de origen, sin embargo en los climas mediterráneos, donde se encuentra ampliamente extendida, raramente supera los 2 m de altura (Elicriso, 2016). En cuanto a sus características morfológicas, esta especie tiene un porte muy ramificado, las ramas tienen la corteza de color rojo oscuro con hojas verdes y brillantes. Las flores son pequeñas, muy perfumadas, de color marrón oscuro y aparecen al final de la primavera, mientras que los frutos maduran a partir del mes de agosto (Elicriso, 2016). Existen numerosos cultivares, entre los que se pueden mencionar: *Pittosporum tenuifolium* “*purpureum*” con las hojas de color bronceo que se vuelven de color púrpura en la madurez; *Pittosporum tenuifolium* “*Garnettii*” con las hojas gris-verdoso con los márgenes de color blanca crema; *Pittosporum tenuifolium* “*Silver Queen*” con las hojas jaspeadas de plata; *Pittosporum tenuifolium* ‘*Variegatum*’ con las hojas agudas de color verde claro con los márgenes blanquecinos.





**Figura 8.** Cultivares de *Pittosporum tenuifolium*.

Al considerar la gran diversidad de propiedades medicinales que se atribuyen en la Medicina Tradicional a las especies pertenecientes a los géneros *Bursera*, *Lepechinia*, *Hydrocotyle* y *Pittosporum*, así como las distintas actividades farmacológicas confirmadas y los numerosos metabolitos aislados de las especies de los ya mencionados géneros, surge entonces el interés de realizar el estudio fitoquímico de las especies *Bursera inversa* Daly, *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling, *Hydrocotyle multifida* A. Rich. y los cultivares de la especie *Pittosporum tenuifolium* Banks y Sol. ex Gaertn (*P. tenuifolium* ‘Gold Star’ y *P. tenuifolium* ‘Variegatum’). Dicho interés nace de que para estas especies los reportes sobre sus composiciones químicas son muy pocos, y en algunos casos inexistentes.

## II. HIPÓTESIS

Considerando que generalmente las especies de los géneros *Bursera*, *Hydrocotyle*, *Lepechinia* y *Pittosporum* biosintetizan metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides, saponinas, entre otros, se puede esperar que:

- ✓ Se aislen compuestos similares en los extractos obtenidos a partir de diversas estructuras morfológicas de las especies *Bursera inversa*, *Hydrocotyle multifida*, *Lepechinia bullata*, *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’ y *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’.
- ✓ Algunas de las sustancias responsables de las actividades farmacológicas atribuidas a los géneros *Bursera*, *Hydrocotyle*, *Lepechinia* y *Pittosporum* pueden estar presentes en las diferentes estructuras morfológicas de las especies a estudiar.

## III. OBJETIVOS

### III.A. Objetivo General

De manera de demostrar lo propuesto en la hipótesis se plantea como objetivo general:

- ✓ Aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de *Bursera inversa*, *Hydrocotyle multifida*, *Lepechinia bullata*, *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’ y *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’.

### III.B. Objetivos Específicos

- ✓ Aislar y purificar las saponinas mayoritarias presentes en los extractos etanólicos de:
  - Los tallos y hojas de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’
  - Los tallos de *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’.
  - La planta entera *Hydrocotyle multifida*
- ✓ Aislar y purificar los diferentes metabolitos secundarios presentes en:
  - El extracto apolar de los frutos de *Bursera inversa*.
  - El extracto etanólico de las ramas de *Lepechinia bullata*.
- ✓ Caracterizar las sustancias aisladas mediante las diferentes técnicas de espectroscopia y espectrometría [espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia ultravioleta (UV), espectrometría de masas (EM), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)].

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.A. Métodos cromatográficos

#### IV.A.1. Cromatografía de Capa Fina (TLC o CCF) y Cromatografía de Capa Fina Preparativa (CCFP)

La técnica de cromatografía en capa fina es una técnica analítica que sirve para controlar el grado de separación y de purificación en una mezcla de compuestos. Por su parte la CCFP permite separar y purificar compuestos presentes en una mezcla empleando una pequeña cantidad de solventes.

#### *Condiciones cromatográficas*

**Fase estacionaria:** Para CCF y CCFP se utilizaron placas de 0,25 y 0,5 mm de espesor, respectivamente, sobre las que se depositó el gel de sílice Merck HF 254 (10 a 40  $\mu$ ). También se utilizaron placas Merck para Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC, F254, 60 Å).

**Fase móvil:** La fase móvil para CCF se escogió por tanteo, mientras que para CCFP se utilizó el sistema de separación más adecuado de acuerdo con lo que se observó en CCF.

**Revelado:** Las placas fueron observadas con una lámpara de UV a 254 y 366 nm antes de revelarlas. El revelado de las placas se realizó utilizando una solución de óleum ( $H_2O-H_2SO_4-AcOH$  8:2:40 v/v) o una solución de vainillina sulfúrica (50 mL de vainillina al 1% en etanol + 1 mL ácido sulfúrico 95%) (Hiai *et al.*, 1976) con calentamiento posterior de las placas durante unos segundos.

#### IV.A.2. Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular es una técnica cromatográfica que permite la separación de las diversas sustancias presentes en una mezcla en función de su tamaño molecular (Braithwaite y Smith, 1999). La capacidad separadora depende de las esferas porosas que conforman el gel (fase estacionaria), de manera que cuanto mayor es una molécula menos capacidad tiene de acceder al interior de las esferas del gel y por consiguiente eluiran primero, mientras que las moléculas de menor tamaño molecular pueden penetrar dentro de las esferas porosas por lo que son retenidas durante mayor tiempo en la columna.

En este caso esta técnica cromatográfica nos permite separar moléculas grandes como las saponinas de otras más pequeñas como flavonoides, taninos, alcaloides, etc.; también puede ser utilizada para separar las clorofilas presentes en las hojas de los compuestos de interés.

**Condiciones cromatográficas**

**Fase estacionaria:** Como fase estacionaria se utilizó Sephadex® LH-20 (Pharmacia) que es un polímero lineal de glucosa (dextrano) hidroxipropilado.

**Fase móvil:** La fase móvil empleada varió en función de las moléculas a separar, para la separación de saponinas se utilizó MeOH 100%, mientras que en los casos en los que se quería eliminar las clorofilas se utilizó una mezcla de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 2:1:1 o 2:2:1

## IV.A.3. Cromatografía Líquida al Vacío (VLC)

La cromatografía líquida al vacío (VLC por sus siglas en inglés) es una técnica preparativa que utiliza el vacío para agilizar el paso de solvente por la muestra, y se emplea para obtener un fraccionamiento preliminar de los extractos de las plantas (Hostettmann *et al.*, 1998). Esta técnica se utiliza normalmente antes de fases de separación y purificación más exhaustivas como MPLC y HPLC. Para esta técnica se coloca la fase estacionaria en un embudo de placa porosa (de diámetro y altura de acuerdo a la cantidad de muestra) unido a un kitasato que está conectado a una línea de vacío.

**Condiciones cromatográficas**

**Fase estacionaria:** Para la cromatografía en fase normal se empleó Sílice (60 Å, 60–200 µm, Silicycle), mientras que para fase reversa se utilizó Sílice RP-18 Spherical C18 (300 Å, 75–200 µm, Silicycle).

**Fase móvil:** En los casos de VLC en fase normal se utilizó una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:30:5 y/o 60:32:7. Con estas condiciones los taninos quedan retenidos en la sílice y los compuestos de interés son eluidos. Para VLC en fase reversa se utilizó sucesivamente H<sub>2</sub>O (100%), MeOH-H<sub>2</sub>O (30:70, 50:50 y 70:30) y MeOH (100%), de manera que se pudieron eliminar los azúcares con la fase acuosa; los otros compuestos (saponinas, flavonoides, terpenos, etc.) son arrastrados en las soluciones metanólicas.

## IV.A.4. Cromatografía Líquida de Mediana Presión (MPLC)

La Cromatografía Líquida de Mediana Presión (MPLC por las siglas en inglés) permite la separación y purificación de los compuestos presentes en una mezcla.

**Condiciones cromatográficas**

**Materiales:** Para la MPLC se utilizaron columnas de separación de sílice (460 x 15 mm y 230 x 15 mm) con una pre-columna (110 x 15 mm). Las bombas utilizadas fueron una HPLC pump



426 (Alltech) para MPLC en fase normal y para MPLC en fase reversa (RP-18) una bomba Büchi Manager C-605 y el Modulo C-601 (Büchi). Adicionalmente se empleó un colector de fracciones C-600 (Büchi).

**Fase estacionaria:** Sílice para fase normal (60 Å, 15–40 µm, Merck) y sílice para fase reversa RP-18 Spherical C18 (300 Å, 75–200 µm, Silicycle).

**Fase móvil:** Generalmente los sistemas de solvente se componen de una mezcla binaria o ternaria dependiendo de la fase estacionaria empleada:

- Fase normal: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O; 80:20:2, 70:30:5 y/o 60:32:7.
- Fase reversa: diferentes gradientes de MeOH-H<sub>2</sub>O.

#### IV.A.5. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Presión (MPLC por las siglas en inglés) permite la separación y purificación de los compuestos presentes en una mezcla.

#### *Condiciones cromatográficas*

**Materiales:** El equipo de HPLC utilizado fue un HP Agilent 1260 Infinity conformado por una bomba cuaternaria (código G1311C) y un detector de UV (código G1314F), el cual se configuró una longitud de onda de 210 nm. Las muestras fueron disueltas en una solución de TFA 0.01%-ACN 70:30 en una proporción de 1 mg de muestra por 0,1 mL de solución. Para la columna analítica (desarrollo del método) se realizaron inyecciones de 10 µL, mientras que en la columna semipreparativa (separación de compuestos) se inyectaron volúmenes 350 µL. Para la separación de los compuestos, se realizaron tantas inyecciones consecutivas como fuese necesario de acuerdo con la cantidad de muestra disponible. Las fracciones fueron colectadas manualmente en tubos de ensayos.

#### **Fase estacionaria:**

- Columna analítica: Phenomenex Luna 5µ (250 x 4.6 mm, C18(2), 100Å).
- Columna semipreparativa: Phenomenex Luna 5µ (250 x 10 mm, C18(2), 100Å).

**Fase móvil:** gradiente de ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 0.01 %-acetonitrilo (ACN); desde 30 % hasta 70 % de ACN en 20 min.

- Columna analítica: flujo de 1 mL/min.
- Columna semipreparativa: flujo de 3 mL/min.

#### IV.A.6. Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS)

En la cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, y la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. La cromatografía de gases masas combina la capacidad de separación de GC con la sensibilidad y selectividad del detector de masas. Esta técnica es de gran utilidad para la separación de compuestos volátiles y semivolátiles.

##### *Condiciones cromatográficas*

**Materiales:** Se utilizó un sistema de cromatografía de gases Hewlett Packard (HP-6890), acoplado con un inyector automático Hewlett Packard (HP-6890) y un detector de masas selectivo Hewlett Packard (HP-5973) a 70 eV. Para la comparación los espectros de masas e identificación de los compuestos se empleó la librería Wiley MS Data Library (6° ed.). Para los análisis por GC/MS se utilizó una columna cromatográfica: columna capilar 5% polisiloxano fenilmetílico (HP-5M, Hewlett Packard, USA) de 30 m x 0.25 mm y un grosor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ .

**Condiciones de operación:** Como gas portador se empleó helio con un flujo a 1.0 mL/min. Para las muestras, los programas usados fueron:

- **Programa A:** Se utilizó una temperatura de inyección de 300 °C y el detector se mantuvo a 350 °C. El horno se programó desde una temperatura inicial de 150 °C (1,0 min) hasta 300 °C (40 min) elevando la temperatura a razón de 10 °C/min. Se inyectó una muestra de 1,0  $\mu\text{L}$  al 2% de la muestra en éter con reparto de 20:1.

#### IV.B. Determinación estructural

##### IV.B.1. Métodos espectroscópicos

##### IV.B.1.1. Espectroscopia Infrarroja (IR)

La espectroscopia infrarroja es la rama de la espectroscopia que trata de la interacción entre una molécula y la región infrarroja (4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) del espectro electromagnético. Las bandas que se observan en los espectros infrarrojo, se relacionan con los cambios de los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces químicos presentes en la molécula. En términos generales el espectro IR puede dividirse en dos regiones: la región de grupos funcionales (4.000-1.000  $\text{cm}^{-1}$ ) y la región de la huella dactilar (1.000-400  $\text{cm}^{-1}$ ); esta última es única para cada compuesto, excepto que se trate de enantiómeros (Stuart, 2004). Por lo tanto, la utilidad de un espectro de infrarrojo reside en que no solo indica la presencia o ausencia de grupos

funcionales en la molécula, sino que también puede confirmar la identidad de un compuesto si se compara con el espectro de una muestra patrón conocida.

**Material:** Los espectros infrarrojos fueron realizados en pastillas de KBr (1 mg de compuesto por cada 100 mg de KBr) en un espectrofotómetro Perkin–Elmer modelo FT-1725X.

#### IV.B.1.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas, EM (MS por sus siglas en inglés), proporciona la masa molecular además de información importante sobre la fórmula molecular; con la espectrometría de masas de alta resolución (EMAR o HRMS) se puede obtener la fórmula molecular real de un compuesto utilizando una pequeña cantidad del mismo.

La EM es diferente a la espectroscopia, ya que esta implica la absorción (o emisión) de luz en un intervalo de longitudes de onda, mientras que la espectrometría de masas rompe la molécula en varios fragmentos (neutros o iónicos) al hacer incidir partículas de alta energía sobre la misma. Los fragmentos con carga se registran en el espectro de masas según la relación unidad de masa/número de cargas ( $m/z$ , donde  $z=1$  generalmente) (Gross, 2004).

Las moléculas pueden ser ionizadas principalmente por 2 tipos de fuentes, de ionización blanda y de ionización dura. Las fuentes de ionización blandas no producen muchos fragmentos y son especialmente útiles para los análisis cuantitativos y para la determinación del peso molecular de un compuesto; entre estas técnicas tenemos el bombardeo con átomos rápidos (FAB) y la ionización por electro-nebulización (ESI) que son las técnicas empleadas en este trabajo para la identificación de los peso moleculares de los compuestos aislados. Entre las fuentes de ionización duras, el impacto electrónico fue utilizado en los análisis de GC-MS

**Materiales:** para los espectros de HR-ESI-MS (ion positivo e ion negativo) se usó un Q-TOF 1-Micromass spectrometer; para los espectros FAB-MS (ion negativo) un instrumento JEOL SX 102.

#### IV.B.1.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN es la herramienta más poderosa de la que se dispone para la determinación de una estructura orgánica. Esta técnica se basa en la medición de la energía que absorben los núcleos sometidos a un campo magnético y pueden analizarse una amplia variedad de núcleos, sin embargo los más estudiados en Química Orgánica son  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  (0-20 ppm) y de  $^{13}\text{C}$  (0-200 ppm) dan información acerca del entorno de los hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales,

vecinales y/o unidos a heteroátomos, etc.) y de los carbonos (en dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc.). Existen diversos experimentos de RMN, los cuales pueden ser en una o dos dimensiones (1D o 2D), con estos últimos pueden observarse correlaciones homonucleares (entre dos núcleos iguales) o heteronucleares (entre dos núcleos diferentes)

**Material:** Los espectros de RMN se registraron en su mayoría con la ayuda de un espectrómetro UNITY-600 / Varian INOVA 600 equipado con un sistema SUN4 L-X DIM con una frecuencia de funcionamiento de 600 MHz. En este equipo los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron a 600 MHz, mientras que los de  $^{13}\text{C}$  se realizaron a 150 MHz; el solvente utilizado para la realización de los espectros fue la piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). También se utilizó un espectrómetro JEOL Eclipse GSX-270. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron a 270 MHz, usando como solvente  $\text{CDCl}_3$  y reportados en ppm, empleando como estándar interno  $\text{CHCl}_3$  residual.

#### *IV.B.1.3.1. Espectros RMN unidimensionales (1D)*

**RMN  $^1\text{H}$ :** este tipo de espectro da información sobre el número y los tipos de hidrógenos presentes en la molécula. El desplazamiento químico (posición en el espectro) indica el entorno químico del núcleo y permite obtener información sobre los grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca.

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** al igual que en  $^1\text{H}$  el desplazamiento químico da información de los grupos funcionales (espectro de banda ancha, BB por sus siglas en inglés “broad band”). Dependiendo del tipo de experimento realizado se puede obtener información del número de hidrógenos unidos a cada carbono. Uno de estos experimentos es el **DEPT**, que es un técnica que permite aumentar la sensibilidad con núcleos poco sensibles que estén acoplados con otro núcleo activo de mayor sensibilidad ( $^1\text{H}$  generalmente). Así, para  $^{13}\text{C}$  se hace posible discriminar entre  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  y los C cuaternarios (no aparecen en el DEPT) se deducen por diferenciación con el espectro de banda ancha.

#### *IV.B.1.3.2. Espectros RMN bidimensionales (2D)*

Muchas veces cuando las moléculas son muy grandes, y poseen una gran variedad de hidrógenos y carbonos, los experimentos de RMN unidimensionales no son suficiente para realizar la determinación estructural de la molécula, es por esto que se recurre a los experimentos bidimensionales (2D). Los experimentos 2D más utilizados son aquellos que dan información sobre los acoplamientos entre los hidrógenos de la molécula ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H}$ -

$^1\text{H}$  TOCSY) y sobre los acoplamientos entre los carbonos e hidrógenos de la misma ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC).

**HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence):** en este experimento se observan las correlaciones entre los carbonos y sus respectivos hidrógenos, es decir los acoplamientos H-C directos ( $^1J_{\text{H-C}}$ ).

**HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation):** este experimento 2D permite tener información sobre las correlaciones H-C a través de dos o tres enlaces ( $^2J_{\text{H-C}}$  y  $^3J_{\text{H-C}}$ ). En ocasiones se puede llegar a observar correlaciones hasta cuatro enlaces. Los carbonos cuaternarios pueden ser difíciles de observar en el espectro 1D por su baja sensibilidad; para estos casos, el HMBC es una alternativa mucho más sensible que permite observar y asignar correlaciones de carbonos cuaternarios que tengan 1 protón a dos o tres enlaces.

**COSY (CORrelated SpectroscopY):** con los experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY se pueden observar los acoplamientos entre hidrógenos vecinales ( $^2J_{\text{H-H}}$ ) y geminales y ( $^3J_{\text{H-H}}$ ).

**TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY):** permite conectar todos los protones mutuamente apareados con el mismo sistema de spin, además verifica las correlaciones de los protones establecidos mediante el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

**NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY):** Fundamentalmente, el espectro en dos dimensiones de NOESY muestra todas las combinaciones posibles de protones en la molécula. Un cruce de picos indica que la pareja de protones está separada por menos de 5Å, mientras que la ausencia de pico indica una distancia mayor.

*CAPÍTULO I.*  
*PITTOSPORACEAE*

*P*ittosporum tenuifolium 'Variegatum'

*P*ittosporum tenuifolium 'Gold Star'

## I. INTRODUCCIÓN

### I.A. Usos etnobotánicos del género *Pittosporum*

Las especies de *Pittosporum* tienen un gran valor como plantas ornamentales, ya que son valoradas por sus bellas y fragantes flores. Estas plantas también son usadas como fuente de madera para hogueras y para trabajos artesanales (Ferreira *et al.*, 2007), en algunas regiones los frutos son consumidos como alimentos (Cock y van Vuuren, 2015), mientras que en Etiopía las ramas de *P. abyssinicum* se usan como cepillos de dientes y para hacer fogatas (Bussmann *et al.*, 2011b). Además de estos usos, las plantas pertenecientes a este género han sido usadas en la Medicina Tradicional para el tratamiento de diversas afecciones como, fiebres, resfriados, tos, problemas gastrointestinales y como antiinflamatorio y analgésico, entre otros. En la tabla 2, se muestran algunos de los usos medicinales que se reportan para las especies de *Pittosporum* en la Medicina Tradicional.

**Tabla 2.** Aplicaciones de las especie de *Pittosporum* en la medicina tradicional.

Especie	Usos / aplicaciones	Forma de utilización	Referencia
<i>P. angustifolium</i>	Para el eczema, la tos y los resfriados	Uso tópico: para el eczema. Uso oral: tratamiento de la tos y el resfriado	(Sadgrove y Jones, 2013)
<i>P. dasycaulon</i>	Antibacteriano y antifúngico	Se emplea la corteza	(Khare, 2007)
<i>P. floribundum</i> (sin. <i>P. napaulense</i> )	Tratamiento del asma	Se ingiere la corteza pulverizada	(Savithramma <i>et al.</i> , 2007)
	Antiinflamatorio, narcótico, antiespasmódico, para la bronquitis, reumatismo	Se emplean diversas preparaciones de la corteza para tratar estas afecciones	(Khare, 2007)
<i>P. neelgherrense</i> (sin. <i>P. brevicalyx</i> )	Mordedura de serpiente y desórdenes hepáticos	Pasta hecha con la corteza y agua	(Binu y Nayar, 2005)
<i>P. sinuatum</i>	Afecciones gastrointestinales	Decocción hecha con las hojas	(Jorim <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. verticillatum</i>	Tratamiento de malaria y adhesión de la placenta	Se emplean infusiones de las hojas y/o corteza	(Razafindraibe <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. viridiflorum</i>	Dolores abdominales	---	(Adebayo <i>et al.</i> , 2015)
	Dolores de espalda, estómago, pecho y abdominal	Se utiliza la corteza de las ramas	(Iwalewa <i>et al.</i> , 2007; Stark <i>et al.</i> , 2013)
	Para tratar la malaria y la fiebre	Se hacen infusiones con la corteza	(Muthaura <i>et al.</i> , 2007)
	Tratamiento de infecciones fúngicas en personas con VIH	Infusiones preparadas con la planta	(Otang <i>et al.</i> , 2012)
	Tratamiento de inflamación dolor y fiebre	---	(Cock y van Vuuren, 2015)
	Usado como afrodisíaco	Suelen emplearse la corteza y/o las raíces	(Abdillahi y Van Staden, 2012)

## I.B. Fitoquímica reportada para especies del género *Pittosporum*

Si bien el género *Pittosporum* está comprendido por alrededor de unas 200 especies, hasta el momento solo se ha analizado la composición química de unos 20 especímenes pertenecientes a este género. Estos estudios se han centrado principalmente en determinar la composición de los aceites esenciales así como en la separación e identificación de los triterpenos, saponinas triterpénicas, flavonoides, lignanos y ftalidas presentes en las especies de *Pittosporum*.

### I.B.1. Aceites esenciales

Los estudios de los aceites esenciales de las especies de *Pittosporum* muestran la presencia de hidrocarburos alifáticos de cadena corta y sus derivados (alcoholes, ácidos y aldehídos) en proporciones significativas además de los habituales mono- y sesqui-terpenoides. Esto es un rasgo distintivo de los aceites esenciales de las especies de este género (Salgues, 1954; Weston, 2004; Yaacob y Ariffin, 2000).

El estudio realizado por Shanshi, 2013, sobre el aceite esencial de las hojas de seis especies de *Pittosporum*, muestra que en las seis especies estudiadas (*P. cornifolium*, *P. crassifolium*, *P. eugenioides*, *P. kirkii*, *P. tenuifolium* y *P. umbellatum*), los componentes mayoritarios en el aceite de cada espécimen es un sesquiterpeno (Shanshi, 2013). Sin embargo en otro estudio sobre el aceite de las hojas de 7 especies japonesas, cuatro de las especies analizadas (*P. crassifolium*, *P. fairchildii*, *P. tenuifolium* y *P. umbellatum*) contenían una mayor proporción de sesquiterpenos que de monoterpenos; mientras que las otras tres especies (*P. anomalum*, *P. eugenioides* y *P. dallii*) presentaron una composición única y diferente cada una (Weston, 2004).

*P. undulatum* es la especie con más reportes sobre la composición química de sus aceites esenciales. Para especímenes brasileños (colectados en Sao Paulo) los componentes mayoritarios son los terpenos (+)-limoneno [P1], espatulenol [P2] y 4-terpineol [P3] junto con los compuestos alifáticos 2-heptanona, 3-metil-4-heptanona y *n*-heptanol (Lago *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2011). Los ejemplares colectados en Lisboa, poseen sabineno [P4], limoneno [P1] y 4-terpineol [P3] como componentes mayoritarios (Ferreira *et al.*, 2007). Las muestras de Las Azores, además los tres terpenos predominantes en los especímenes de Lisboa presentan en algunos casos los sesquiterpenos calameneno [P5], farnesol [P6], espatulenol [P2] y  $\beta$ -selineno [P7] y el diterpeno (8 $\beta$ ,13 $\beta$ )-kaur-16-eno [P8] (Medeiros *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2011). Por su parte en los frutos de esta especie se han encontrado los monoterpenos



limoneno [P1] y  $\alpha$ -pineno [P9] como componentes mayoritarios (Nemethy y Calvin, 1980; Power y Tutin, 1906).

El aceite esencial de las flores *P. tobira* contiene como componentes mayoritarios los monoterpenos: limoneno [P1],  $\alpha$ -pineno [P9], mirceno [P10] y (*E*)- $\beta$ -ocimeno [P11]; los sesquiterpenos:  $\alpha$ -muuroleno [P12], farnesol [P6], germacreno D [P13], (*E*)-nerolidol [P14] y viridiflorol [P15] y los compuestos alifáticos: nonano, undecano, 3-metil-1-butanol y decanal (Loukis y Hatzioannou, 2005; Ogihara *et al.*, 1989; Rodrigues *et al.*, 2007).

En las especies de *Pittosporum* encontradas en Madagascar, se han reportado mirceno [P10],  $\beta$ -pineno [P16],  $\alpha$ -pineno [P9],  $\delta$ -cadineno [P17],  $\alpha$ -cadinol [P18] y  $\alpha$ -muurolol [P19] en el aceite esencial de las hojas de *P. balfourii* (Gurib-Fakim y Demarne, 1994), *P. senacia* (Mananjara *et al.*, 1998) y *P. viridiflorum* (Ramanandraibe *et al.*, 2000).

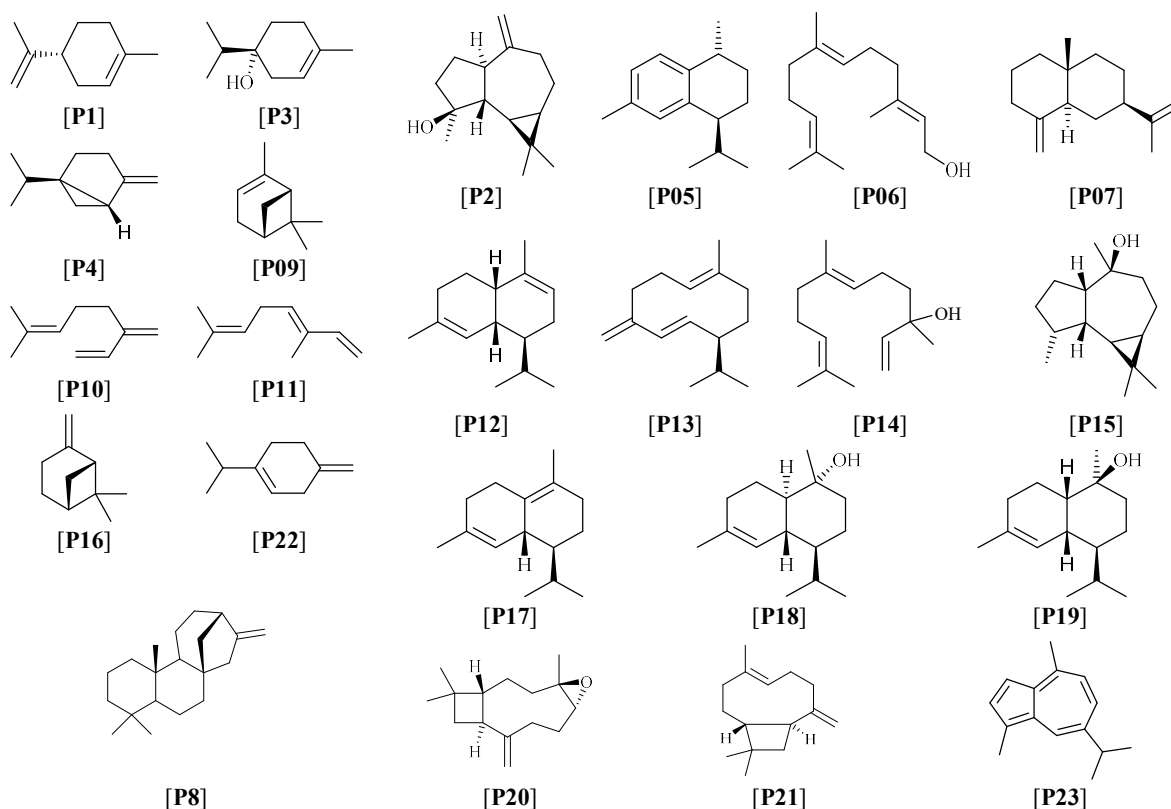
También se ha estudiado el aceite esencial de las hojas y frutos de las especies halladas en la India, *P. neelgherrense* y *P. viridulum*; para la primera especie, se reportan undecano, óxido de cariofileno [P20] y  $\beta$ -cariofileno [P21] como compuestos mayoritarios de las hojas y  $\beta$ -selineno [P7], undecano, nonano y  $\alpha$ -pineno [P9] en los frutos (John *et al.*, 2008). Mientras que para la segunda especie los componentes en mayor proporción son espatulenol [P2], óxido de cariofileno [P20] y  $\alpha$ -cadinol [P18] en el aceite de las hojas y germacreno D [P13],  $\delta$ -cadineno [P17] y  $\alpha$ -cadinol [P18] en los frutos (John *et al.*, 2007).

La especie de Nueva Zelanda *P. eugenoides* contiene sabineno [P4] y limoneno [P1] como componentes mayoritarios en el aceite esencial de las hojas (Carter y Heazlewood, 1949). Mientras que *P. tenuifolium* los compuestos presentes en mayor proporción en el aceite de las hojas son *d*- $\alpha$ -pineno [P9], *d*- $\beta$ -pineno [P16], mirceno [P10], limoneno [P1],  $\beta$ -terpineno [P22] y guaiazuleno [P23] (Calder y Carter, 1949).

## I.B.2. Terpenoides

### I.B.2.1. Mono- y sesqui-terpenoides

Además de los monoterpenos y sesquiterpenos hallados en los aceites esenciales también se han aislado compuestos de este tipo glicosidados en los extractos de varias especies de *Pittosporum*. En los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *P. venulosum* se identificaron cuatro monoterpenos glicosidados llamados venulósidos A-D [P24-P27] (Grkovic *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).



**Figura 9.** Terpenoides hallados en los aceites esenciales de *Pittosporum*.

En la corteza de *P. pancheri*, el extracto de MeOH contiene dos sesquiterpenos glicosidados de farnesol, nombrados como pancherina A y B [P28 y P29] (Éparvier *et al.*, 2007). El extracto de cloroformo de las *P. pentandrum*, los sesquiterpenos glicosidados hallados poseen el esqueleto del eudesmano,  $4\alpha$ -*O*- $\beta$ -*D*-(3-senecioiloxi)-6-deoxiglucopiranosil eudesm-11-eno [P30] y  $4\alpha$ -*O*- $\beta$ -*D*-(3-tigloiloxi)-6-deoxiglucopiranosileudesm-11-eno (2) [P31] (Ragasa *et al.*, 1997).

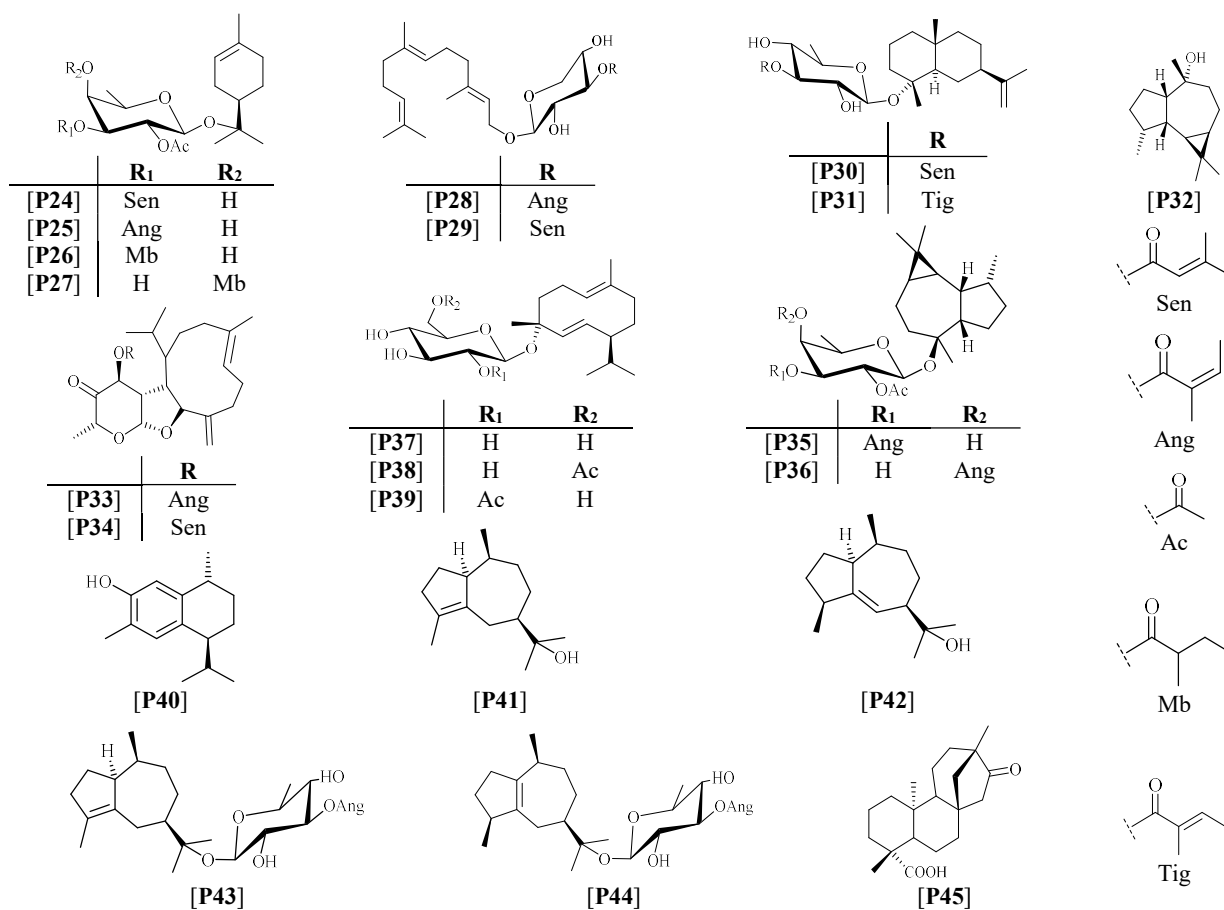
En *P. tobira*, del extracto metanólico de las flores (Ogihara *et al.*, 1989; Suga *et al.*, 1988) se aisló el sesquiterpeno ledol [P32] junto con dos sesquiterpenos glicosidados identificados como pittosporatobirasidos A y B [P33 y P34], que poseen un esqueleto tipo germacreno. Estos mismos glicósidos también fueron encontrados en el extracto de MeOH de las hojas (Munesada *et al.*, 1991), mientras que en el extracto de acetona se encontraron dos glicósidos del viridiflorol, nombrados pittosporanósidos A1 y A2 [P35 y P36] (Takaoka *et al.*, 1986).

En el caso de *P. viridiflorum* en el extracto de acetona de las hojas también se aislaron glicósidos de germacreno, identificados como  $4$ -*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosilgermacra-1(10),5-dieno [P37],  $4$ -*O*- $\beta$ -*D*-(6'-acetoxi)-glucopiranosilgermacra-1(10),5-dieno [P38] y  $4$ -*O*- $\beta$ -*D*-(2'-acetoxi)-glucopiranosilgermacra-1(10),5-dieno [P39] (Ramanandraibe *et al.*, 2001).

Los frutos de *P. undulatum* que fueron extraídos con MeOH, mostraron la presencia de sesquiterpenos tipo calameneno (7-hidroxicalameneno [P40]) y guaiano (4-guaien-11-ol [P41] y 5-guaien-11-ol [P42]) así como los glicósidos de guaiano, los undulatumósidos A y B [P43 y P44] (Mendes *et al.*, 2013).

### I.B.2.2. Diterpenoides y carotenoides

Además de los monoterpenos y sesquiterpenos glicosidados, también se han identificado diterpenos y carotenoides en las especies de *Pittosporum*. El diterpeno isosteviol [P45] fue aislado del extracto de Hex-AcOEt-CHCl<sub>3</sub> de las hojas de *P. tetraspermum* (Abdullah Al-Dhabi *et al.*, 2015). En el extracto metanólico de las semillas de *P. tobira* se han hallado una serie de carotenoides identificados como tobioxantinas A1-A3, B, C y D (Fujiwara *et al.*, 2002; Moon y Park, 2010), pittosporumxantinas A1-A4, B1, B2, C1 y C2 (Fujiwara y Maoka, 2001; Maoka *et al.*, 2008), entre otros (Fujiwara *et al.*, 2001; Maoka *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Mono-, sesqui- y di-terpenoides aislados en el género *Pittosporum*.

### I.B.3. Triterpenos y saponinas triterpénicas

Los metabolitos de mayor interés dentro de las especies de *Pittosporum* han sido los triterpenos y en especial las saponinas o compuesto glicosidados de los triterpenos; esto debido

al potencial que tienen las saponinas como antiinflamatorios, antivirales, hemolíticos, anticancerígenos y antitumorales, entre otros (Lacaille-Dubois y Wagner, 2000, 1996; Podolak *et al.*, 2010; Sparg *et al.*, 2004).

En el extracto metanólico de las hojas de *P. tobira* se aislaron los triterpenos barrigenol-R1 [P46], 21-*O*-angeloilbarrigenol-R1 [P47] y 21-*O*-angeloilbarringtogenol C [P48] (Oh *et al.*, 2014; Yosioka *et al.*, 1972, 1968).

En la especie *P. undulatum* se encontraron los triterpenos 22-*O*-(2-metilbutirol)-barrigenol-A<sub>1</sub> [P49], 22-*O*-senecioilbarrigenol-A<sub>1</sub> [P50] y 16-*O*-acetilcameliagenina A [P51] (Higuchi *et al.*, 1983b) en el extracto de MeOH de las hojas, mientras que en el extracto metanólico de los frutos se reportó el esteroide  $\beta$ -sitosterol [P52] (Mendes *et al.*, 2013).

Las hojas y corteza de *P. brevicalyx*, extraídas con EtOH al 95% permiten la obtención de ácido oleanólico [P53], hederagenina [P54], barringtogenol C (theasapogenina D) [P55], barrigenol-R1 [P46], 21-*O*-angeloil-22-*O*-acetilbarrigenol-R1 (pittobrevigenina) [P56] y 21-*O*-senecioilbarrigenol-R1 [P57] (Feng *et al.*, 2010; Hongtong *et al.*, 1986).

En la especie australiana *P. phillyraeoides*, se aislaron los triterpenos barrigenol-R1 [P46], barringtogenol C [P55], dihidropriverogenina A (cameliagenina A) [P58], 16-desoxibarringtogenol C [P59], phillyrigenina [P60], 27-desoxiphillyrigenina [P61] y 23-hidroxiphillyrigenina [P62] del extracto de EtOH de las hojas (Errington y Jefferies, 1988).

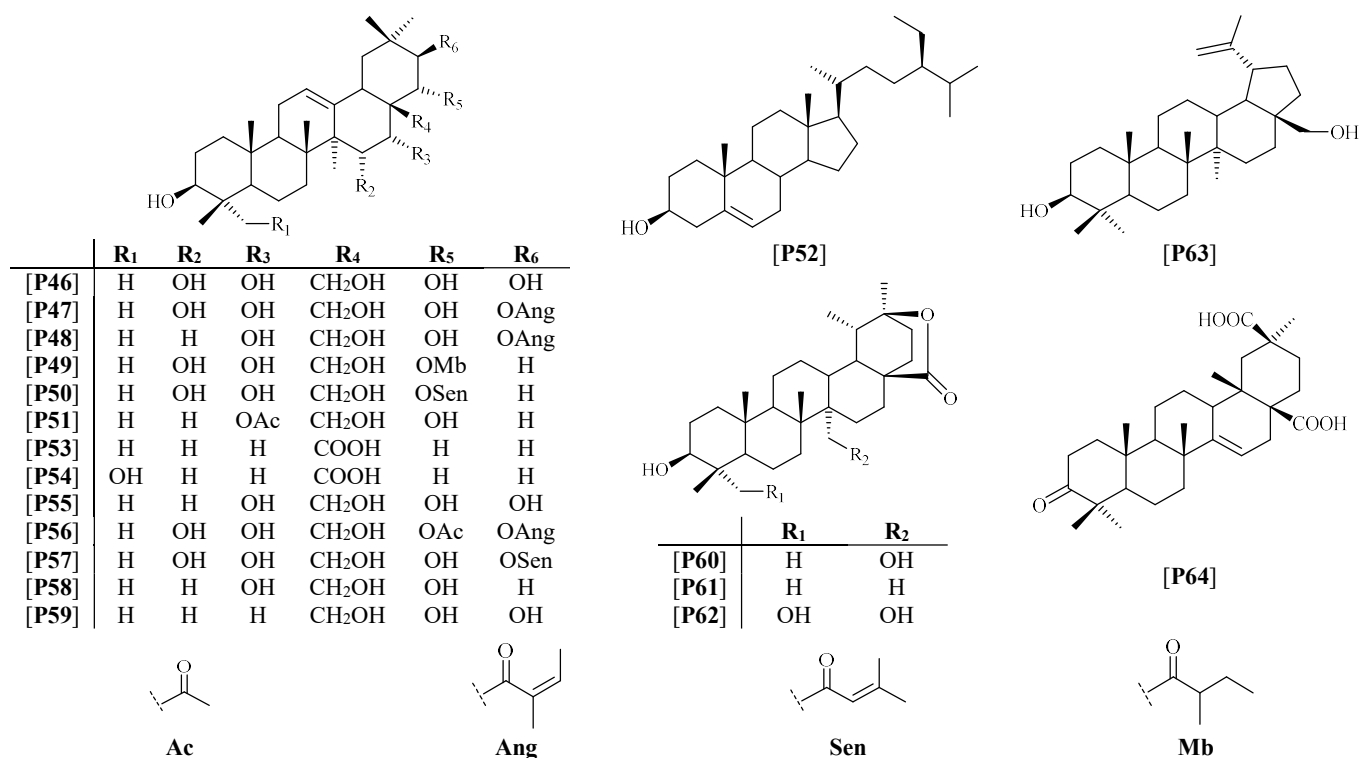


Figura 11. Triterpenoides aislados en el género *Pittosporum*.

Los otros dos triterpenos hallados dentro del género *Pittosporum* corresponden al betulinol [P63], aislado del extracto de cloroformo de la hojas de *P. pentandrum* (Ragasa *et al.*, 1997), y el ácido 3-oxo-20-demetilisoaleuritolic-14(15)-eno-28,30-dioico [P64], obtenido del extracto de MeOH de las raíces de *P. illicioides* (Xiao *et al.*, 2015a).

Por otra parte, hasta el momento se han aislado más de 45 saponinas en el género *Pittosporum*, la mayoría de ellas con esqueletos triterpénicos del tipo oleanano, donde los azúcares más comúnmente encontrados son glucosa (Glc), galactosa (Gal), ácido glucorónico (GlcA) arabinopiranososa (Ara), arabinofuranosa (Araf) y los sustituyentes predominantes son los ácidos acético (Ac), angélico (Ang), seneciólico (Sen), 2-metilbutírico (Mb) y 2-acetoxi-2-metilbutírico (AcMb).

Del extracto de MeOH de las hojas de la especie *P. undulatum* colectada en Australia, se aislaron las saponinas 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-*O*-(2-metilbutirol)barrigenol-A<sub>1</sub> [P65], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-*O*-seneciobarrigenol-A<sub>1</sub> [P66], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-*O*-(2-metilbutirol)barrigenol-A<sub>1</sub> [P67], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-*O*-seneciobarrigenol-A<sub>1</sub> [P68] (Higuchi *et al.*, 1983a).

De las especies encontradas en Madagascar *P. viridiflorum*, *P. senacia* y *P. verticillatum* también han sido aisladas diversas saponinas. Del extracto de MeOH de *P. viridiflorum* se obtuvo el pittoviridósido [P69] (Seo *et al.*, 2002); mientras que en el extracto de las ramas de *P. senacia* con MeOH al 70% se encontraron los senaciapittósidos A y B [P70 y P71] (Linnek *et al.*, 2012). En el caso de *P. verticillatum*, del extracto de EtOH de la corteza de las raíces se aislaron el senaciapittósido B [P71], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-21-*O*-(2-acetoxi-2-metilbutanoil)-barrigenol-R1 [P72], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-21-*O*-(2-acetoxi-2-metilbutanoil)-28-*O*-acetil barrigenol-R1 [P73] y 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-21-*O*-seneciobarrigenol-R1 [P74] (Manase *et al.*, 2013).

D'Acquarica y colaboradores, encontraron en el extracto de EtOH al 95% de los frutos de *P. tobira* cuatro saponinas derivadas del barrigenol-R1, designadas como saponina IIIA2

[P75], saponina IIIA3 [P76], saponina IIIB2 [P77] y saponina IIIC4 [P78] (D'Acquarica *et al.*, 2002). En el extracto de las hojas (MeOH 80%) de esta misma especie se aislaron: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1→3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1→4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-21-(2-acetoxi-2-metilbutanoil)-22-senecioilbarrigenol-R1 [P79], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1→3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1→4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-21-(2-acetoxi-2-metilbutanoil)-22-angeloil-28-acetilbarrigenol-R1 [P80] y saponina IIIA2 [P75] (El Dib *et al.*, 2015).

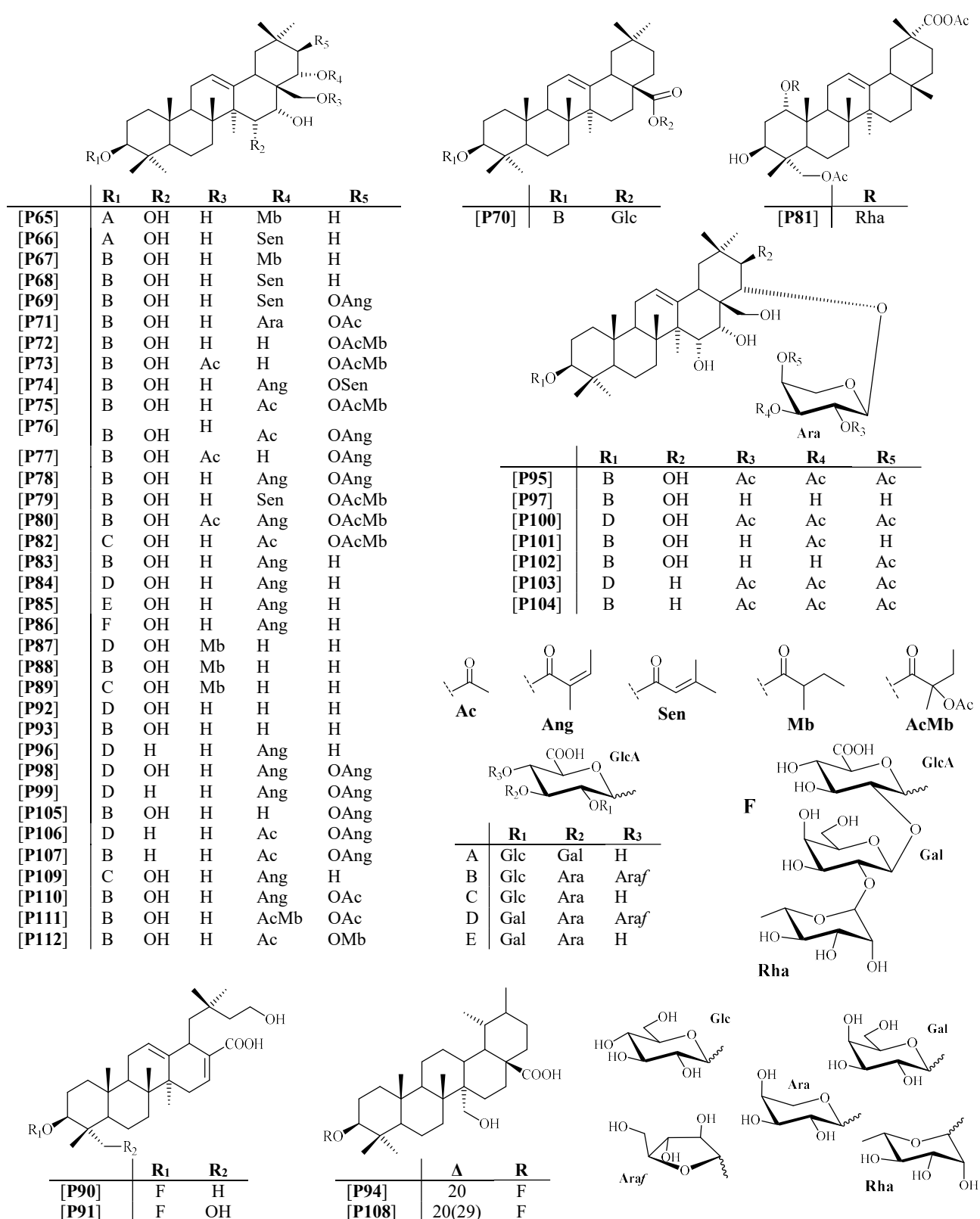
El espécimen de *P. manii* (sin. *P. viridiflorum*) colectado en Camerún, contiene la saponina 1-*O*-[ $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosil]-23-acetoxiimberbato de metilo [P81] en el extracto de MeOH de la corteza (Nyongbela *et al.*, 2013). Para *P. illicioides* se aisló la hacquetiasaponina 4 [P82] en el extracto de EtOH de las raíces (Xiao *et al.*, 2015a).

*P. angustifolium* es la especie de la que han sido aisladas la mayor cantidad de saponinas, hasta el momento se han reportado 30 compuestos diferentes del extracto etanólico de sus hojas y otros 4 de sus frutos. Las saponinas encontradas en las hojas de esta planta han sido identificadas como pittangretósidos A-M [P83-P95], Q-Z [P96-P105], A1 [P106], B1 [P107], C1 [P108], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-22-*O*-angeloilbarrigenol-R1 [P109], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1→3)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1→4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-22-*O*-(2-metilbutiroil)-barrigenol-A<sub>1</sub> [P67], saponina IIIA3 [P76] y saponina IIIC4 [P78] (Bäcker *et al.*, 2015, 2013, 2014b). Las saponinas encontradas en los frutos fueron identificadas como pittangretósidos N-P [P110-P112] junto con las saponinas [P67], [P76], [P78] y [P109] (Bäcker *et al.*, 2014b).

#### I.B.4. Compuestos fenólicos

##### I.B.4.1. Flavonoides

Solo en dos especies de *Pittosporum* se han reportado flavonoides. En las hojas de *P. angustifolium* se aislaron isoquercitrina [P113], rutina [P114] y 6''-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-isoquercitrina [P115] al realizar una extracción con EtOH 80% (Bäcker *et al.*, 2014a). Mientras que en el extracto de EtOH (95%) de las hojas y corteza de *P. brevicalyx* se obtuvieron 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosilquercetina (isoquercitrina) [P113], rutina [P114] y 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-pinocebrina [P116] (Feng *et al.*, 2010).


 Figura 12. Saponinas triterpénicas aisladas en las especies de *Pittosporum*.



#### I.B.4.2. Lignanós

Otro tipo de compuestos fenólicos aislados en el género *Pittosporum* son los lignanos. En los extracto de EtOH de las hojas y corteza de *P. brevicalyx* se hallaron los lignanos 4'-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(+)-syringaresinol [P117] y 4',4''-di-(*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-(+)syringaresinol (liriodendrina) [P118] (Feng *et al.*, 2010).

En *P. glabratum*, del extracto etanólico (95%) de las raíces, se obtuvieron los neolignanós pittogósido A [P119] y pittogósido B [P120] (Zhao *et al.*, 2012).

Los lignanos syringaresinol [P121] y zhebeiresinol [P122] se encontraron en el extracto de EtOH (Xiao *et al.*, 2015a).

En las raíces de *P. glabratum* se aislaron los lignanos 3  $\alpha$ -*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(+)-lyoniresinol [P123], 3  $\alpha$ -*O*-(6''-3-metoxi-4-hidroxibenzoil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(+)-lyoniresinol [P124], 3  $\alpha$ -*O*-(6''-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(+)-lyoniresinol [P125], 3  $\alpha$ -*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil(-)-4-*epi*-lyoniresinol [P126] y liriodendrina [P118] en el extracto de etanol (Nie *et al.*, 2011).

#### I.B.4.3. Ftalidas

De los extractos alcohólicos (MeOH y EtOH) de las raíces de *P. illicioides* se obtuvieron 7 ftalidas identificadas como (*S*)-3-etil-7-hidroxi-6-metoxiftalida [P127], (*S*)-3-etil-7-hidroxi-5,6-dimetoxiftalida [P128], (*S*)-3-etil-5,6,7-trimetoxiftalida [P129], (*R*)-3-etil-7-hidroxi-6-metoxiftalida [P130], (*Z*)-3-etilidene-7-hidroxi-6-metoxiftalida [P131], (*Z*)-3-etilidene-6,7-dimetoxiftalida [P132] y (*S*)-3-etil-4,7-dimetoxiftalida [P133] (Chou *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2015b).

#### I.B.4.4. Cumarinas

También se han hallado cumarinas en especies de *Pittosporum*, como los son 6,7-dimetoxicumarina [P134] y 7-hidroxi-6-metoxicumarina [P135] en las raíces de *P. illicioides* (Xiao *et al.*, 2015a) y 6,7-dimetilesculetina [P134] en las hojas y corteza de *P. brevicalyx* (Feng *et al.*, 2010).

#### I.B.4.5. Otros compuestos fenólicos

Además de los ya mencionados compuestos fenólicos, también se han aislado iridoides, derivados del ácido caféico, entre otros. En el extracto etanólico de las raíces de *P. glabratum* se hallaron los iridoides 6  $\alpha$ -hidroxigenipósido [P136] y 10-*O*-cafeoildeacetildafilósido [P137] (Nie *et al.*, 2011).

En las hojas de *P. angustifolium* aislaron los compuestos ácido 3,4-dicafeoilquínico [P138] y ácido 4,5-dicafeoilquínico [P139] (Bäcker *et al.*, 2014a). El extracto metanólico de



los frutos de *P. undulatum* contiene eugenol [P140], *p*-anisaldehído [P141] (Mendes *et al.*, 2013).

De las raíces de *P. illicioides* se obtuvo el ácido siringico [P142] (Xiao *et al.*, 2015a) y de las hojas y corteza de *P. brevicalyx* el 1-*O*-[ $\beta$ -*D*-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-3,4,5-trimetoxifenol [P143] (Feng *et al.*, 2010).

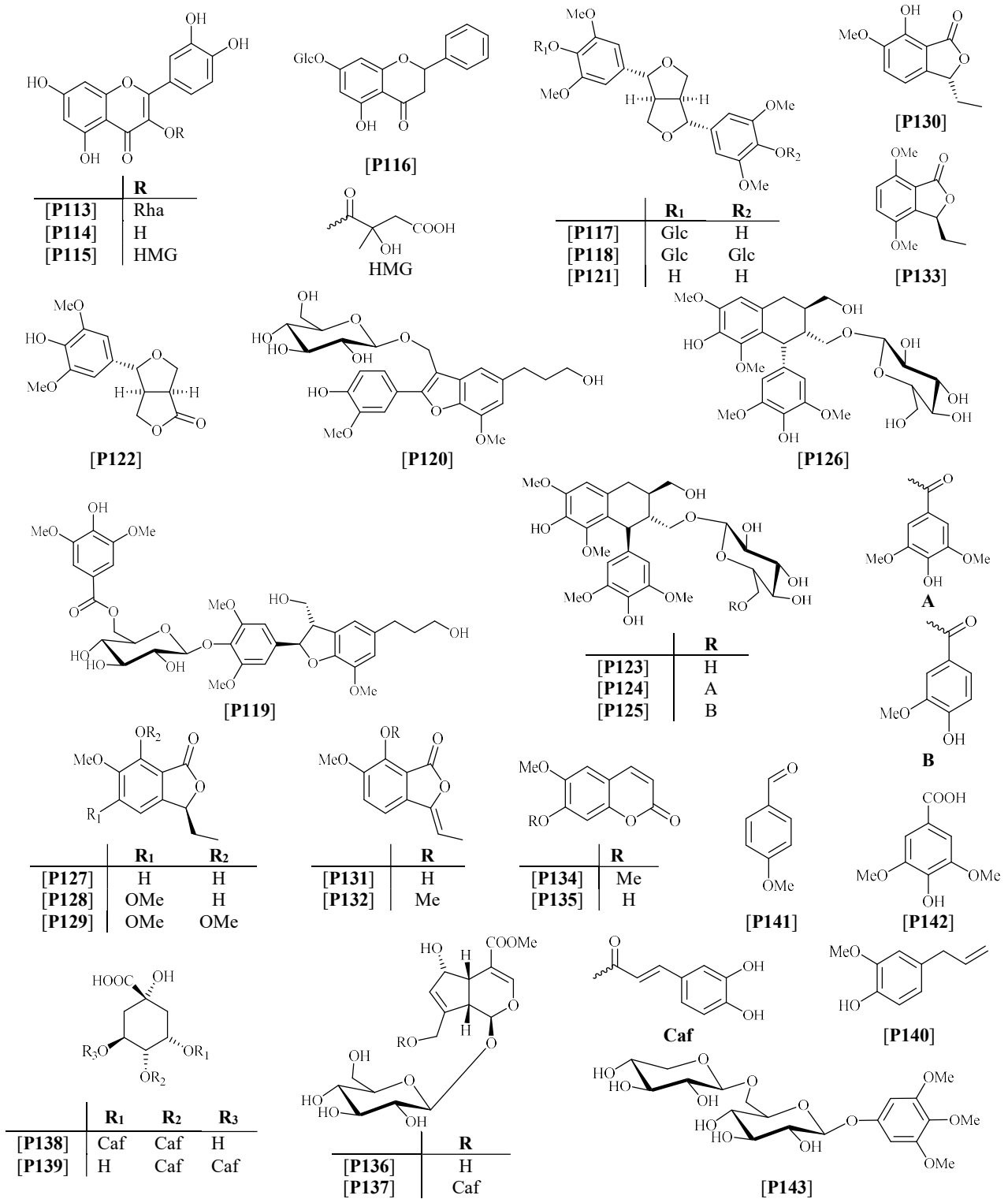


Figura 13. Compuestos fenólicos en el género *Pittosporum*.

**Tabla 3.** Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género *Pittosporum*.

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
1906	<i>P. undulatum</i>	Aceite esencial de los frutos	Monoterpenos	(Power y Tutin, 1906)
1949	<i>P. eugenoides</i>	Aceite esencial de las hojas	Parafinas, monoterpenos y sesquiterpenos	(Carter y Heazlewood, 1949)
	<i>P. tenuifolium</i>	Aceite esencial de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Calder y Carter, 1949)
1968	<i>P. buchanani</i>	Raíces. Extracto de éter	Poliacetilenos	(Bohlmann y Rode, 1968)
	<i>P. tobira</i>	Hojas. Extracto de MeOH	Triterpenos	(Yosioka <i>et al.</i> , 1968)
1972	<i>P. tobira</i>	Hojas. Extracto de MeOH	Triterpenos	(Yosioka <i>et al.</i> , 1972)
1975	<i>P. buchanani</i>	Raíces. Extracto de éter	Poliacetilenos	(Bohlmann y Zdero, 1975)
1982	<i>P. resiniferum</i>	Aceite esencial de los frutos	Monoterpenos	(Nemethy y Calvin, 1980)
	<i>P. undulatum</i>			
1983	<i>P. undulatum</i>	Hojas. Extracto de MeOH	Triterpenos y saponinas triterpénicas	(Higuchi <i>et al.</i> , 1983a, 1983b)
1986	<i>P. brevicalyx</i>	Corteza	Triterpenos	(Hongtong <i>et al.</i> , 1986)
	<i>P. tobira</i>	Hojas. Extracto de acetona	Sesquiterpenos glicosidados	(Takaoka <i>et al.</i> , 1986)
1988	<i>P. phillyraeoides</i>	Hojas. Extracto EtOH	Triterpenos	(Errington y Jefferies, 1988)
	<i>P. tobira</i>	Flores. Extracto de MeOH	Sesquiterpenos glicosidados	(Suga <i>et al.</i> , 1988)
1989	<i>P. tobira</i>	Flores Extracto de MeOH y aceite esencial	Ext. MeOH: sesquiterpenos glicosidados. Aceite esencial: mono- y sesqui-terpenos	(Ogihara <i>et al.</i> , 1989)
1991	<i>P. tobira</i>	Hojas. Extracto de MeOH	Glicósidos de sesquiterpenos	(Munesada <i>et al.</i> , 1991)
1994	<i>P. balfourii</i>	Aceite esencial de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Gurib-Fakim y Demarne, 1994)
1995	<i>P. tobira</i>	Frutos	Glicolípido	(Barone <i>et al.</i> , 1995)
1997	<i>P. pentandrum</i>	Hojas. Extracto de CHCl <sub>3</sub>	Sesquiterpenos glicosidados y triterpenos	(Ragasa <i>et al.</i> , 1997)
1998	<i>P. senacia</i>	Aceite esencial de las hojas	Sesquiterpenos mayormente	(Mananjarasoa <i>et al.</i> , 1998)
2000	<i>P. viridiflorum</i>	Aceite esencial de las hojas y frutos	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Ramanandraibe <i>et al.</i> , 2000)
2001	<i>P. tobira</i>	Semillas. Extracto MeOH	Carotenoides	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2001; Fujiwara y Maoka, 2001)
	<i>P. viridiflorum</i>	Hojas. Extracto de acetona	Sesquiterpenos glicosidados	(Ramanandraibe <i>et al.</i> , 2001)
2002	<i>P. tobira</i>	Frutos. Extracto EtOH 95%	Saponinas triterpénicas	(D'Acquarica <i>et al.</i> , 2002)
		Semillas. Extracto MeOH	Carotenoides	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. viridiflorum</i>	Toda la planta. Extracto de MeOH	Saponina triterpénica	(Seo <i>et al.</i> , 2002)
2003	<i>P. undulatum</i>	Aceite esencial de las hojas	Alcanos, mono-, sesqui- y di-terpenos	(Medeiros <i>et al.</i> , 2003)
2004	6 especies de <i>Pittosporum</i>	Aceites esenciales de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Weston, 2004)
2005	<i>P. tobira</i>	Aceite esencial de las flores	Compuestos alifáticos, mono- y sesqui-terpenos	(Loukis y Hatziiannou, 2005)
2006	<i>P. tobira</i>	Semillas. Extracto de MeOH	Carotenoides	(Maoka <i>et al.</i> , 2006)
	<i>P. undulatum</i>	Aceite esencial de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Lago <i>et al.</i> , 2006)

**Tabla 3.** ...continuación...

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
2007	<i>P. pancheri</i>	Corteza. Extracto EtOH	Glicósidos de farnesilo	(Éparvier <i>et al.</i> , 2007)
	<i>P. tobira</i>	Aceite esencial de hojas, flores y frutos	Monoterpenos, sesquiterpenos y alcanos	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2007)
	<i>P. undulatum</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Ferreira <i>et al.</i> , 2007)
	<i>P. viridulum</i>	Aceite esencial de las hojas y de los frutos	Monoterpenos y sesquiterpenos	(John <i>et al.</i> , 2007)
2008	<i>P. illicioides</i>	Raíces. Extracto de MeOH	Ftalidas	(Chou <i>et al.</i> , 2008)
	<i>P. neelgherrense</i>	Aceite esencial de las hojas y de los frutos	Compuestos alifáticos, mono- y sesqui-terpenos	(John <i>et al.</i> , 2008)
	<i>P. tobira</i>	Semillas. Extracto de MeOH	Carotenoides	(Maoka <i>et al.</i> , 2008)
2010	<i>P. brevicalyx</i>	Hojas y corteza. Extractos de EtOH 95%	Triterpenos, lignanos, flavonoides	(Feng <i>et al.</i> , 2010)
	<i>P. tobira</i>	Semillas. Extracto de MeOH	Carotenoides	(Moon y Park, 2010)
2011	<i>P. glabratum</i>	Raíces. Extracto de EtOH 75%	Iridoides y lignanos	(Nie <i>et al.</i> , 2011)
	<i>P. undulatum</i>	Aceite esencial de las hojas Aceite esencial de las hojas	Mono y sesquiterpenos Alcanos, mono- y sesqui-terpenos	(Mendes <i>et al.</i> , 2011) (Medeiros <i>et al.</i> , 2011)
2012	<i>P. glabratum</i>	Raíces. Extracto EtOH 75%	Neolignanos	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
	<i>P. senacia</i>	Ramas. Extracto MeOH 70%	Saponinas triterpénicas	(Linnek <i>et al.</i> , 2012)
2013	6 especies de <i>Pittosporum</i>	Aceites esenciales de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Shanshi, 2013)
	<i>P. angustifolium</i>	Hojas. Extracción con EtOH al 80%	Saponinas triterpénicas	(Bäcker <i>et al.</i> , 2013)
	<i>P. manii</i> (sin. <i>P. viridiflorum</i> )	Corteza. Extracto de MeOH	Saponinas triterpénicas	(Nyongbela <i>et al.</i> , 2013)
	<i>P. undulatum</i>	Frutos. Extracto de MeOH	Sesquiterpenos, esteroides, compuestos fenólicos	(Mendes <i>et al.</i> , 2013)
	<i>P. verticillatum</i>	La corteza de las raíces. Extracto de EtOH	Saponinas triterpénicas	(Manase <i>et al.</i> , 2013)
2014	<i>P. angustifolium</i>	Hojas y frutos. Extracción con EtOH al 80%	Saponinas triterpénicas. Flavonoides y otros compuestos fenólicos	(Bäcker <i>et al.</i> , 2014a, 2014b, 2014c)
	<i>P. tobira</i>	Toda la planta. Extracto de EtOH	Triterpenos	(Oh <i>et al.</i> , 2014)
	<i>P. venulosum</i>	Planta. Extractos de Hexano, CHCl <sub>2</sub> y MeOH	Monoterpenos glicosidados	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
2015	<i>P. angustifolium</i>	Hojas. Extracción con EtOH al 80%	Saponinas triterpénicas	(Bäcker <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. illicioides</i>	Raíces. Extracto EtOH	Ftalidas, triterpenos, cumarinas, compuestos fenólicos, saponinas	(Xiao <i>et al.</i> , 2015a, 2015b)
	<i>P. tetraspermum</i>	Hojas. Extracción con Hex:AcOEt:CHCl <sub>3</sub>	Diterpenos	(Abdullah Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. tobira</i>	Hojas. Extracto MeOH 80%	Saponinas triterpénicas	(El Dib <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. venulosum</i>	Planta. Extractos de Hexano, CHCl <sub>2</sub> y MeOH	Monoterpenos glicosidados	(Grkovic <i>et al.</i> , 2015)

### I.C. Actividades biológicas del género *Pittosporum*

En algunas especies de *Pittosporum* se han hecho ensayos con la finalidad de determinar la actividad farmacológica y confirmar los diversos efectos atribuidos por la Medicina Tradicional a dichas especies. En la tabla 4 se describen varias de las actividades comprobadas.

Los ensayos de actividad biológica más realizados en el género *Pittosporum* y los compuestos aislados de sus especies son para probar sus propiedades como agentes anticancerosos, antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, entre otros.

**Tabla 4.** Actividad biológica del género *Pittosporum*.

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Antibacteriana	<i>P. neelgherrense</i>	El aceite de las hojas muestra una buena actividad contra las bacterias Gram positivas <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> y contra las Gram negativas <i>Escherichia coli</i> y <i>Serratia marcescens</i> . Por su parte, el aceite de los frutos solo es activa contra <i>B. subtilis</i> .	(John <i>et al.</i> , 2008)
	<i>P. senacia</i>	El aceite esencial de las hojas muestra un efecto inhibitorio sobre <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> con valores de MIC de 2 y 64 µg/mL respectivamente.	(Mananjarasoa <i>et al.</i> , 1998)
	<i>P. tobira</i>	El extracto de <i>n</i> -butanol de las hojas ejerce una actividad antimicrobiana moderada contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	(El Dib <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. viridiflorum</i>	El extracto de EtOH de las hojas <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y <i>Bacillus cereus</i> .	(Swamy <i>et al.</i> , 2014)
	<i>P. viridulum</i>	Los aceites de los frutos y las hojas son activos contra las bacterias Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella typhi</i> .	(John <i>et al.</i> , 2007)
Antibacteriana y antimicrobiana	<i>P. tetraspermum</i>	El isosteviol [P45] exhibe actividad significativa contra las bacterias <i>Staphylococcus epidermidis</i> (125 µg/mL), <i>S. aureus</i> (125 µg/mL) y <i>Klebsiella pneumoniae</i> (62,5 µg/mL). Así mismo el compuesto inhibe la formación de biopelículas en los organismo <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	(Abdullah Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2015)
Anticancerosa	<i>P. angustifolium</i>	Algunos de los compuestos aislados muestran citotoxicidad <i>in vitro</i> contra las células cancerosas humanas de vejiga urinaria con valores de IC <sub>50</sub> de 2,4 a 17,9 µM.	(Bäcker <i>et al.</i> , 2013)
	<i>P. illicioides</i>	El compuesto [P64] aislado en el extracto de EtOH de las raíces posee una potente actividad contra las células A549 (cáncer de pulmón) con un IC <sub>50</sub> de 18,2 µg/mL.	(Xiao <i>et al.</i> , 2015a)
	<i>P. pancheri</i>	El extracto de EtOH de la corteza inhibe en un 60 % el crecimiento de las células KB (carcinoma epidermoide humano de boca) a 1 µg/mL. Los productos aislados, pancherinas A y B, también muestran una citotoxicidad <i>in vitro</i> significativa contra esta línea celular (IC <sub>50</sub> = 3,5 x 10 <sup>-7</sup> M y 5,1 x 10 <sup>-6</sup> M).	(Éparvier <i>et al.</i> , 2007)
	<i>P. tetraspermum</i>	El compuesto obtenido de las hojas, isosteviol [P45], exhibe una potente actividad inhibitoria contra las líneas de células cancerígenas MCF7 y Vero, con valores de IC <sub>50</sub> de 2,5 y 2,8 µg/mL. El compuesto demostró no ser tóxico a muy bajas concentraciones.	(Abdullah Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2015)

**Tabla 4.** ...continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Anticancerosa	<i>P. tobira</i>	La evaluación <i>in vitro</i> de la citotoxicidad del extracto de n-butanol de las hojas presenta una fuerte actividad contra las líneas celulares de carcinoma de seno (MCF-7), carcinoma hepato celular (HepG2) y carcinoma de colon (HCT).	(El Dib <i>et al.</i> , 2015)
		El extracto de MeOH de los pericarpios exhibe una buena actividad contra las células MT-1 y MT-2 de leucemia de células T adultas.	(Nakano <i>et al.</i> , 2011)
	<i>P. verticillatum</i>	La saponina aislada [P74] exhibe una citotoxicidad moderada hacia la línea celular SW480 (adenocarcinoma colorectal humano) y una actividad leve sobre las células H9c2 (cardiomiblastos de ratones).	(Manase <i>et al.</i> , 2013)
Antiespasmódico	<i>P. manii</i> (sin. <i>P. viridiflorum</i> )	El extracto acuoso de la corteza posee efectos antiespasmódicos y espasmolíticos a bajas concentraciones.	(Joseph <i>et al.</i> , 2015)
Antifúngica	<i>P. tetraspermum</i>	El isosteviol [P45] aislado de las hojas posee actividad contra los hongos <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> con valores de MIC de 62,5; 125 y 500 µg/mL respectivamente. Además muestra una inhibición significativa de biomasa para <i>P. chrysogenum</i> y <i>F. oxysporum</i> .	(Abdullah Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. undulatum</i>	El aceite esencial de las hojas inhibe la producción de la aflatoxina B1 por parte de <i>Aspergillus flavus</i> .	(Medeiros <i>et al.</i> , 2011)
Antiinflamatoria	<i>P. undulatum</i>	Los compuestos aislados presentan actividad antiinflamatoria con valores de IC <sub>50</sub> en el rango de 7,2-16,4 µM.	(Mendes <i>et al.</i> , 2013)
	<i>P. viridiflorum</i>	En el modelo de inhibición inflamatoria de la enzima 15-lipoxigenasa, la planta muestra una actividad antiinflamatoria con un IC <sub>50</sub> de 30-40 µg/mL.	(Adebayo <i>et al.</i> , 2015)
Antimicrobiana	<i>P. tobira</i>	El extracto de EtOH exhibe un efecto antibacteriano significativo contra las tres bacterias periodontofáticas <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> . El principal compuesto responsable de esta actividad es el R1-Barrigenol [P46].	(Oh <i>et al.</i> , 2014)
	<i>P. viridiflorum</i>	Los aceites esenciales de las hojas y frutos presentan una potente actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> .	(Ramanandraibe <i>et al.</i> , 2000)
Antinociceptiva	<i>P. tobira</i>	El extracto de MeOH de las hojas muestra una inhibición <i>in vivo</i> significativa de las contorsiones abdominales en ratones inducidas por ácido acético.	(El Dib <i>et al.</i> , 2015)
Antiparasitaria	<i>P. manii</i> (sin. <i>P. viridiflorum</i> )	El extracto de MeOH de la corteza es activo contra la cepa resistente a la cloroquina K1 (IC <sub>50</sub> = 4,3 µg/mL) y contra el macrófago <i>Leishmania donovani</i> (IC <sub>50</sub> = 8,6 µg/mL). El compuesto [P81] es activo contra los parásitos <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>L. donovani</i> (IC <sub>50</sub> = 1,02 y 1,80 µg/mL respectivamente).	(Nyongbela <i>et al.</i> , 2013)

**Tabla 4.** ...continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
<b>Antioxidante</b>	<i>P. dayscaulon</i>	Los extractos metanólico y acuoso de la corteza de los tallos poseen una actividad antioxidante comparable a la del ácido ascórbico.	(Mani y Dennis, 2014)
	<i>P. manii</i> (sin. <i>P. viridiflorum</i> )	El extracto de AcOEt exhibe una alta actividad antioxidante con un IC <sub>50</sub> de 177,74 µg/mL.	(Momeni <i>et al.</i> , 2010)
	<i>P. tobira</i>	Para las hojas, el extracto de <i>n</i> -butanol muestra una actividad antioxidante <i>in vitro</i> con un IC <sub>50</sub> (7,3 µg/mL) más bajo que el del control positivo (ácido ascórbico, 11,2 µg/mL) en el test de DPPH.	(El Dib <i>et al.</i> , 2015)
<b>Antiplasmódica</b>	<i>P. viridiflorum</i>	El extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la planta presenta actividad <i>in vitro</i> contra la cepa D10 de <i>Plasmodium falciparum</i> con un valor de IC <sub>50</sub> de 3,0 µg/mL.	(Clarkson <i>et al.</i> , 2004)
<b>Antitrombótica</b>	<i>P. undulatum</i>	El extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> presenta actividad antitrombótica en un 64 % respecto a una solución blanco.	(De Medeiros <i>et al.</i> , 2000)
		El aceite esencial de las hojas muestra una actividad antitrombótica del 93 %.	(Medeiros <i>et al.</i> , 2003)
<b>Antituberculósica</b>	<i>P. brevicalyx</i>	El extracto crudo presenta actividad antituberculosa en ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<b>Antitumoral</b>	<i>P. tobira</i>	El glicolípido CIDI encontrado en los frutos, presenta actividad <i>in vivo</i> significativa contra los modelos murinos de Sarcoma 180 (SA 180) y carcinoma de pulmón de Lewis (LLC), en ambos casos la actividad es dependiente de la dosis.	(Barone <i>et al.</i> , 1995)
<b>Hepatoprotectiva</b>	<i>P. neelgherrense</i>	El extracto de MeOH de la corteza exhibe un efecto hepatoprotector <i>in vivo</i> contra las lesiones de hígado inducidas en ratas por tres toxinas diferentes.	(Shyamal <i>et al.</i> , 2006)
<b>Inhibición de enzimas del ADN</b>	<i>P. angustifolium</i>	Saponinas aisladas de esta planta muestran ser inhibitorias de la enzima del ADN humano, topoisomerasa I, con valores de IC <sub>50</sub> en el rango de 2,8 a 46,5 µM.	(Bäcker <i>et al.</i> , 2016)
<b>Inhibición del transporte de aminoácidos tipo L</b>	<i>P. venulosum</i>	Los venulósidos [P24-P27] aislados inhibe el transporte de leucina en las células LNCaP (cáncer de próstata) con valores de IC <sub>50</sub> en el rango de 8,12 a 39,73 µM.	(Grkovic <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2014)
<b>Neuroprotectora</b>	<i>P. tobira</i>	El extracto acuoso de las semillas inhibe de una forma dosis-dependiente la toxicidad inducida por glutamato en células corticales de ratas. El efecto neuroprotector puede deberse en parte a los carotenoides presentes.	(Moon y Park, 2010)

#### I.D. RMN de saponinas

Como el principal objetivo en el análisis de los dos cultivares de *Pittosporum* es el aislamiento e identificación de saponinas, es importante recordar que las técnicas espectroscópicas de RMN tienen una especial importancia para la elucidación estructural de este tipo de compuestos, ya que las diversas técnicas uni- y bi-dimensionales aportan toda la información necesaria para poder identificar tanto la genina o aglicón de la molécula y los diferentes azúcares que la conforman, así como también la secuencia de enlace de las moléculas de azúcares presentes.

En el caso de la técnica de RMN-<sup>1</sup>H, una saponina presenta tres zonas de resonancia (Massiot y Lavaud, 1995):

- De 0,5 a 3,0 ppm: los hidrógenos de la genina, en particular los metilos.
- De 3,0 a 4,5 ppm: los hidrógenos de los azúcares excepto los anoméricos, así como aquellos hidrógenos de la genina ubicados en carbonos con grupos oxigenados.
- De 4,5 a 6,0 ppm: los hidrógenos anoméricos de los azúcares en forma de singuletes anchos o dobletes y los hidrógenos olefínicos del aglicón.

Para carbono RMN-<sup>13</sup>C las zonas observadas son las siguientes (Massiot y Lavaud, 1995):

- Zona del aglicón: comprendida de 10 a 68 ppm se ubican los carbonos de la genina.
- Zona de los azúcares: entre 60 y 90 ppm se localizan los carbonos correspondientes a alcoholes primarios y secundarios de los azúcares así como del aglicón.
- Zona anomérica: después de 90 ppm se encuentran principalmente los carbonos anoméricos de los azúcares (90-111 ppm) y los carbonos olefínicos y carbonilos del aglicón.

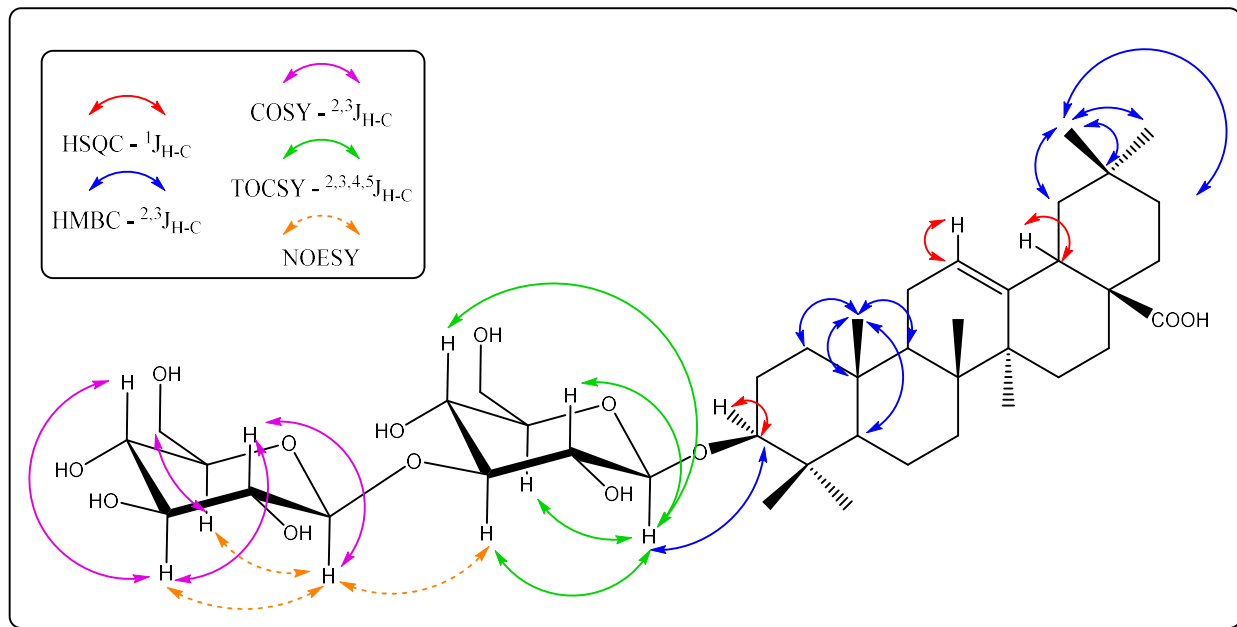
Las técnicas de RMN bidimensionales proporcionan el resto de la información necesaria para la elucidación de las saponinas. El HMQC y HSQC permiten identificar todos los carbonos y sus correspondientes hidrógenos tanto de la genina como de los azúcares.

Tal y como se describe en el trabajo de Massiot y Lavaud (1995) sobre la elucidación estructural de saponinas, el HMBC es crucial en la determinación de la estructura del aglicón en las saponinas y además permite determinar la secuencia de los azúcares y los puntos de unión entre el aglicón y las cadenas glicosídicas.

El COSY es utilizado para determinar el orden de los hidrógenos en un esqueleto de un azúcar, mientras que el TOCSY permite observar e identificar la resonancia de otros hidrógenos en un azúcar, permitiendo de esta manera establecer el tamaño del anillo glicosídico entre otras características.



Por último el ROESY y el NOESY tienen como objeto determinar la estereoquímica de los carbonos asimétricos del aglicón, la secuencia de los azúcares y la posición de los enlaces glicósido-genina.



**Figura 14.** Tipos de correlaciones observadas para las saponinas en los diferentes experimentos 2D de RMN.



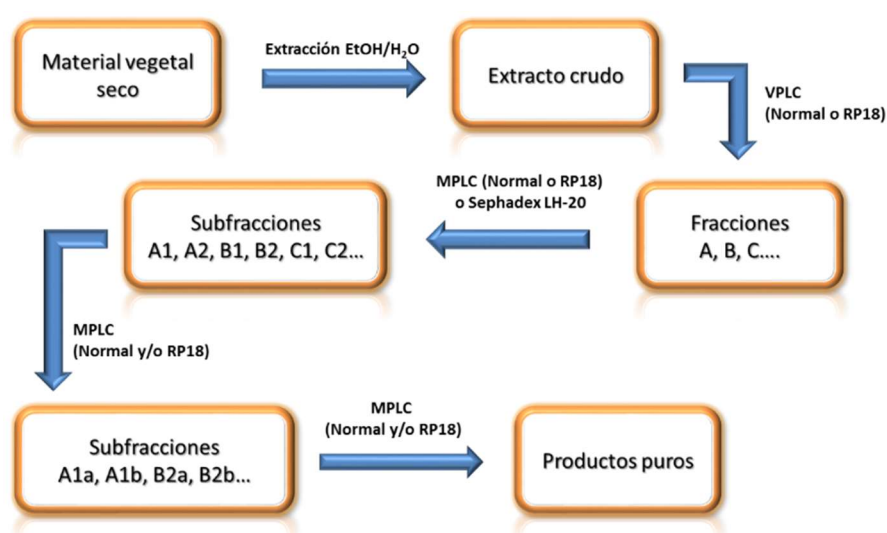
## II. PARTE EXPERIMENTAL

### II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica

Los tallos y hojas de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’ así como los tallos de *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’ utilizados para el estudio fueron suministrados por la Dra. Anne Claire Mitaine Offer de l’Université de Bourgogne (Dijon, Francia). Las dos especies de *Pittosporum* fueron adquiridas en una tienda de jardinería de la ciudad de Dijon.

### II.B. Tratamiento del material vegetal

Los tallos secos de las dos especies de *Pittosporum* ya mencionadas fueron molidos y extraídos por separado usando una mezcla de etanol-agua; las disoluciones obtenidas de las extracciones fueron filtradas y concentradas al vacío hasta sequedad en un rotavapor a 50 ° C. Para la obtención de los productos puros (saponinas triterpénicas) se siguió el procedimiento general mostrado en el esquema 1.



**Esquema 1.** Procedimiento general empleado en el aislamiento, separación y purificación de las saponinas triterpénicas de *Pittosporum tenuifolium*.

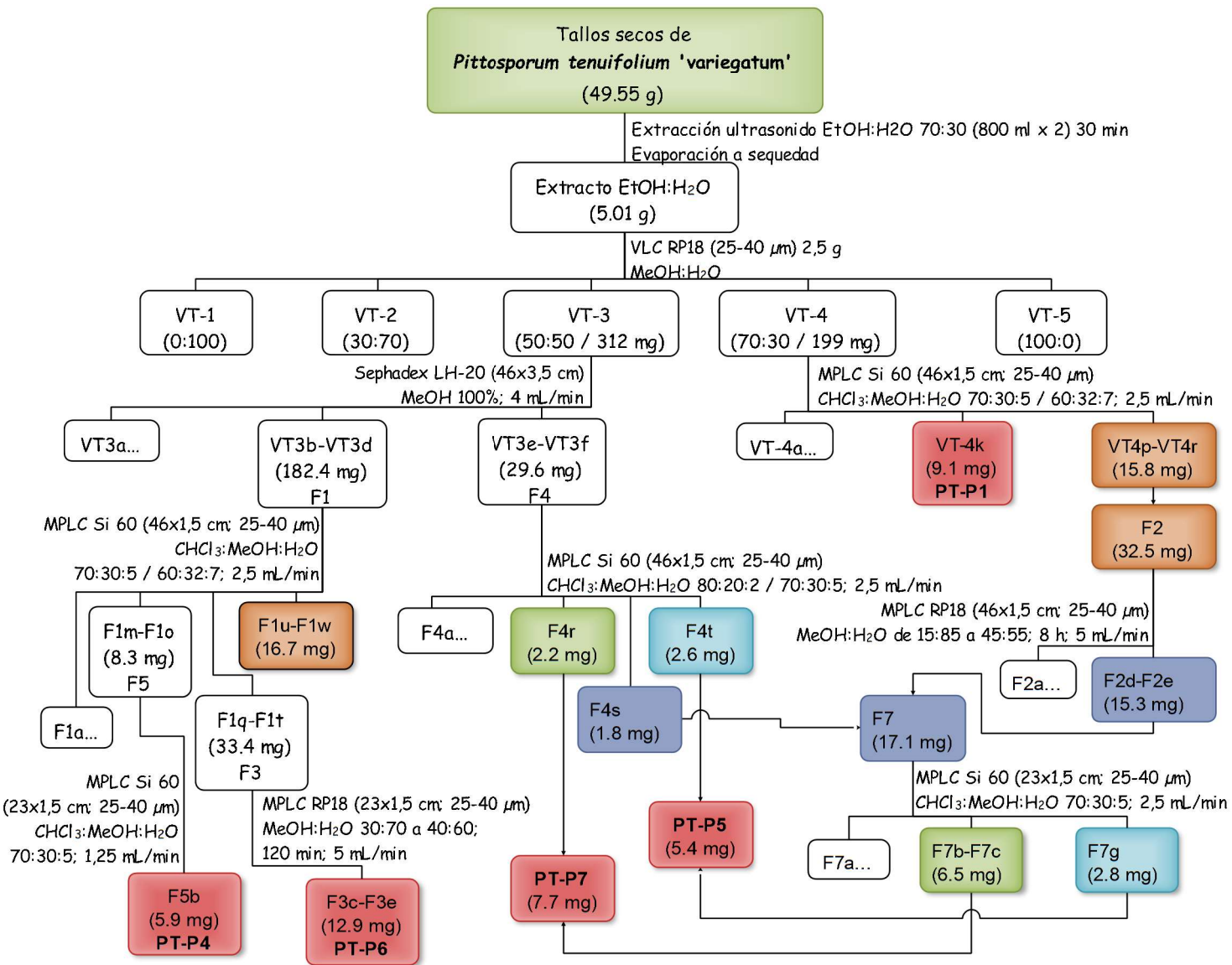
Una determinada cantidad de cada extracto fue sometida a una cromatografía líquida de vacío (VLC) en fase normal o en fase reversa dependiendo del extracto utilizado. Posteriormente una o varias de las fracciones obtenidas por VLC fueron sometidas a diversos procesos de fraccionamiento y separación empleando las técnicas de cromatografía líquida de mediana presión (MPLC) en fase normal y reversa así como también la técnica de exclusión molecular en Sephadex LH-20. Estos procesos de separación y fraccionamiento se repitieron hasta obtener los diferentes productos puros, siendo todos identificados como saponinas triterpénicas. Esta parte experimental se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la

Facultad de Farmacia, Université de Bourgogne Franché-Comte - Francia (Responsable: Dra. Anne Claire Mitaine Offer).

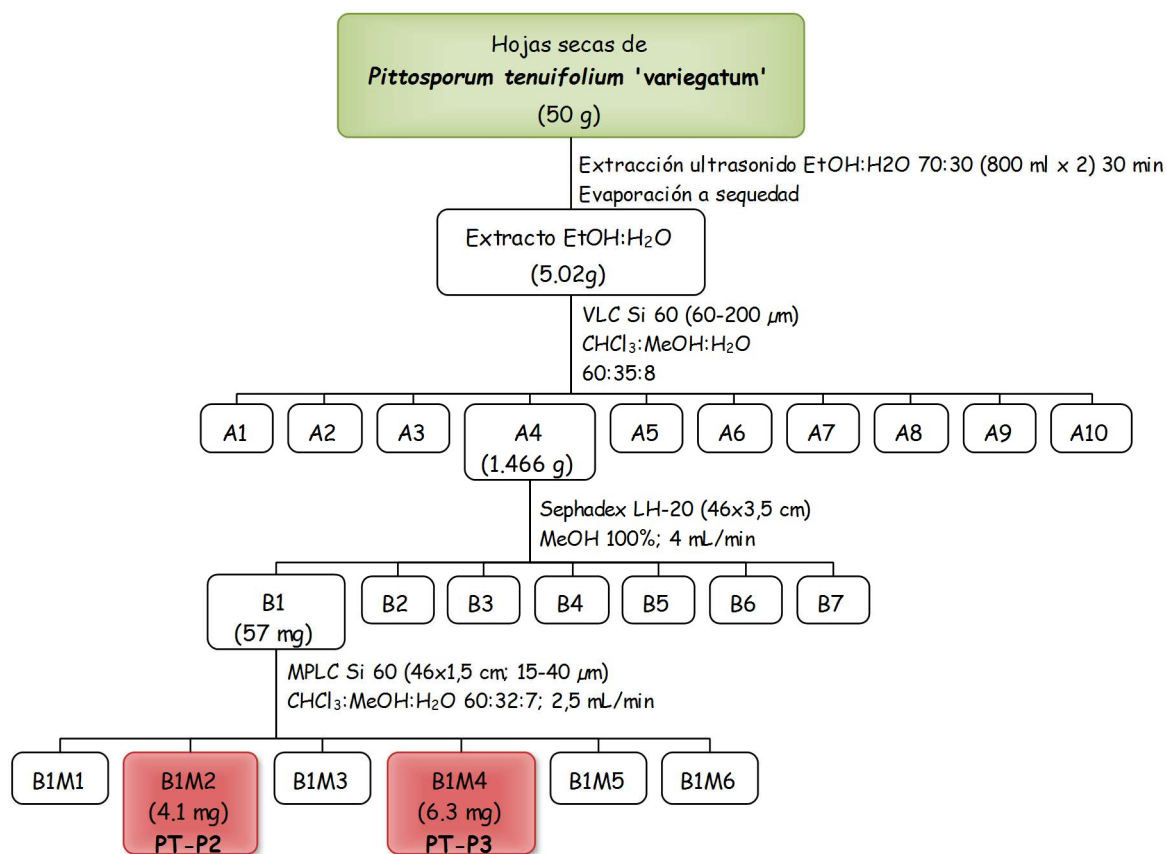
II.B.1. *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’

**Tallos:** 49.55 g de tallos secos de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’ fueron extraídos dos veces consecutivas mediante ultrasonido y una mezcla de etanol-agua 70:30 (800 mL x ciclo de 30 min). Los extractos obtenidos en cada ciclo fueron reunidos y concentrados al vacío a una temperatura de 50 ° C, obteniéndose un extracto bruto con una masa de 5,01 g. Posteriormente, 2,5 g de dicho extracto fueron sometidos a VLC en fase reversa [RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O (0:100; 30:70; 50:50; 70:30; 100:0)], obteniéndose 2 fracciones de interés (VT-3 y VT-4), las cuales fueron fraccionadas de acuerdo a las características presentadas mediante las técnicas de MPLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) y en fase reversa (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O) y cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20; MeOH) indicadas en el esquema 2. Se lograron aislar 5 compuestos puros, **PT-P1** (9,1 mg), **PT-P4** (5,9 mg), **PT-P5** (5,4 mg), **PT-P6** (12,9 mg) y **PT-P7** (7,7 mg).

**Hojas:** 50 g de hojas secas de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’ fueron extraídas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para los tallos de este cultivar, obteniéndose un extracto bruto con una masa de 5,02 g. Posteriormente, este extracto se fraccionó mediante VLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 60:35:8), obteniéndose una fracción de interés, A4 (1,466 g), la cual fue luego fraccionada empleando las técnicas de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20; MeOH) y MPLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 60:32:7) tal como se muestra en el esquema 3, lográndose aislar 2 compuestos puros, **PT-P2** (4,1 mg) y **PT-P3** (6,3 mg).



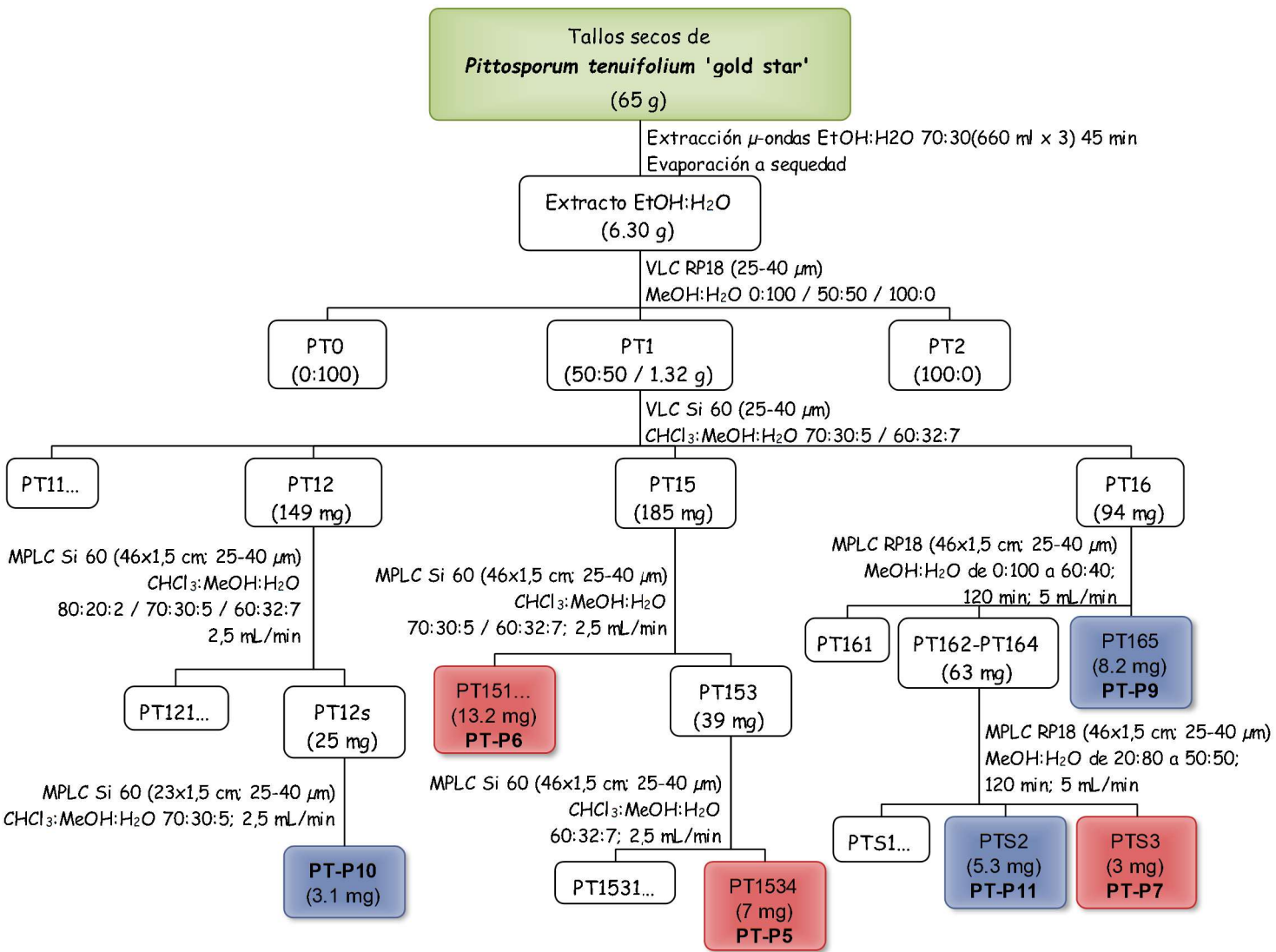
Esquema 2. Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de los tallos de *Pittosporum tenuifolium* 'Variegatum'.



**Esquema 3.** Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de las hojas de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’.

### II.B.2. *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’

**Tallos:** 65 g de tallos secos de *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’ fueron extraídos tres veces consecutivas con un extractor de microondas con una mezcla de etanol-agua 70:30 (660 mL x ciclo de 45 min). Los extractos obtenidos en cada ciclo fueron reunidos y concentrados al vacío a una temperatura de 50 °C, obteniéndose un extracto bruto con una masa de 6,30 g. Posteriormente, este extracto fue sometido a VLC en fase reversa [RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O (0:100; 50:50; 100:0)], obteniéndose una fracción de interés (PT-1), la cual fue fraccionada una vez más en este caso mediante VLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O), donde se obtuvieron tres sub-fracciones de interés (PT12, PT15, PT16) las cuales de acuerdo a las características presentadas fueron sometidas a las técnicas de MPLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) y en fase reversa (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O) indicadas en el esquema 4, hasta lograr separar 6 compuestos puros, **PT-P5** (7,0 mg), **PT-P6** (13,2 mg), **PT-P8** (3,0 mg), **PT-P9** (8,2 mg), **PT-P10** (3,1 mg) y **PT-P11** (5,3 mg).



**Esquema 4.** Aislamiento y purificación de saponinas triterpénicas de los tallos de *Pittosporum tenuifolium* 'Gold Star'.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A partir de los extractos de EtOH/H<sub>2</sub>O de tallos y hojas de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ y de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ se logró aislar un total de 11 productos puros (PT-P1 - PT-P11) siguiendo una metodología específica para la obtención de saponinas. Dichos productos obtenidos se esperaba que fuesen saponinas triterpénicas ya que en presencia de vainillina sulfúrica los compuestos se tornan de color azul-morado, lo que es característico para triterpenos glicosidados revelados con este reactivo (Hiai *et al.*, 1976).

Los productos **PT-P1**, **PT-P4** y **PT-P7** fueron aislados solo de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’, **PT-P2** y **PT-P3** de las hojas de este mismo cultivar, mientras que **PT-P8**, **PT-P9**, **PT-P10** y **PT-P11** se encontraron en los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’. Los compuestos **PT-P5** y **PT-P6** fueron encontrados tanto en los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ como en los de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’. Las estructuras de los compuestos **PT-P9**, **PT-P10** y **PT-P11** no son incluidas en la presente discusión de resultados ya que no se lograron elucidar por completo debido a que resultaron ser mezclas de varias saponinas.

#### III.A. Compuesto **PT-P1**: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-22-acetoxi-21-angeloxibarringtogenol C.

De la fracción VT-4K de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ se consiguió aislar un sólido blanco con una masa de 9,1 mg (esquema 2), cuyo espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo negativo (HR-ESI-MS < 0) (figura 15) muestra un ion molecular a 1.083,5738 m/z ([M-H]<sup>-</sup>) consistente con la fórmula molecular C<sub>54</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub> (calc. 1.084,54542).

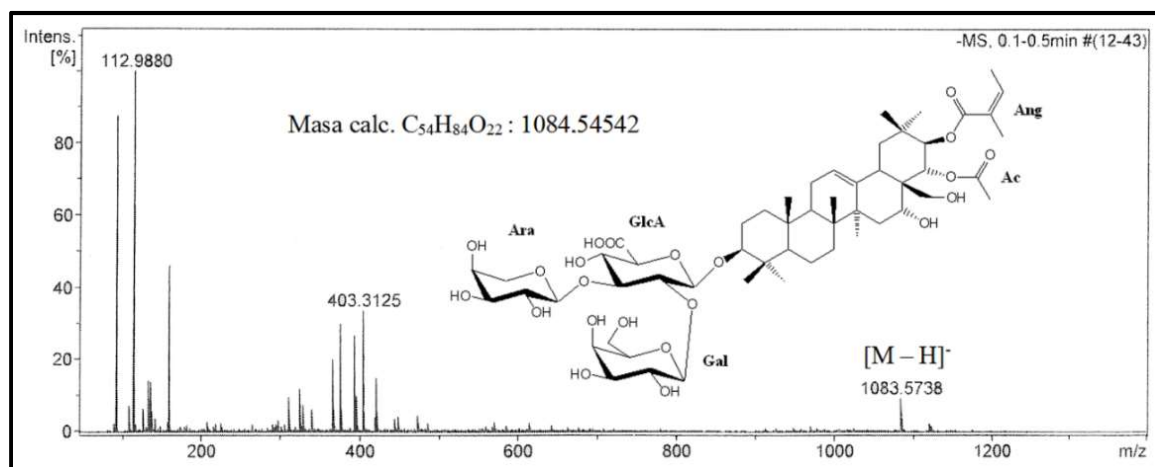


Figura 15. Espectro HR-ESI-MS < 0 del compuesto **PT-P1**.

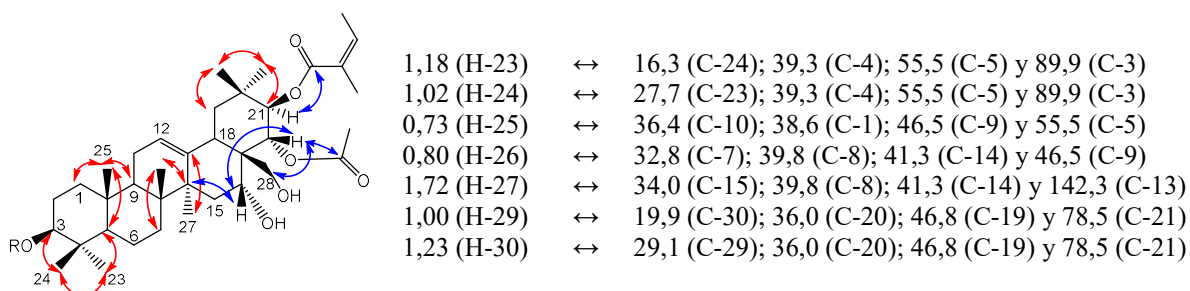


El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (figura 17) del compuesto revela la presencia de 54 carbonos, por lo que puede suponerse que se trata de un triterpenoide sustituido con moléculas de azúcares, grupos hidroxilos y/o ácidos orgánicos. Con los experimentos de RMN-1D (RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT y RMN- $^1\text{H}$ ) y el HSQC (figura 19) se identificaron las siguientes señales:

- Zona de la genina: 10 metilos, 7 metilenos, 3 metinos y 6 carbonos cuaternarios.
- Zona de los azúcares: 3 metilenos unidos a un oxígeno y 15 metinos oxigenados.
- Zona de los anómeros: 5 metinos, de los cuales dos tienen hibridación  $sp^2$  y los otros tres están unidos a oxígenos; también se observan 2 carbonos cuaternarios  $sp^2$  y 3 carbonos cuaternarios carbonilos.

### Identificación del aglicón:

Con los espectros de HSQC (figura 19) y HMBC (figura 20) del compuesto se estableció la correlación de cada hidrógeno con su carbono y las siguientes correlaciones de los grupos metilos:



Estas correlaciones demuestran que el aglicón posee un esqueleto del tipo oleanano. La presencia de un carbono metínico  $sp^2$  y un carbono cuaternario  $sp^2$ , permiten suponer la presencia de un doble enlace C-C en la estructura, la ubicación del mismo entre las posiciones 12 y 13 de la genina se demuestra con las correlaciones en HMBC (figura 20) del protón a  $\delta_{\text{H}}$  5,39 (H-12) con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  46,5 (C-9) y 41,3 (C-14) y la del protón metílico a  $\delta_{\text{H}}$  1,72 (H-27) con el carbono a  $\delta_{\text{C}}$  142,3 (C-13).

Adicionalmente, pueden ubicarse 5 funciones oxigenadas sobre el triterpeno del compuesto **PT-P1**, la primera de ellas se ubica en la posición C-3 del aglicón como se deduce de las correlaciones observadas en HMBC (figura 20) para los protones metílicos geminales a  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (H-23) y 1.02 (H-24) con el carbono a  $\delta_{\text{C}}$  89.9 (C-3), junto con las interacciones en COSY (figura 21) y TOCSY (figura 22) entre el protón a  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (H-3) y los protones metilénicos H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  1,86/2,27) y H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  0,78/1,32). Un segundo grupo hidroxilo se coloca sobre la posición 16 gracias a la correlación del HMBC (figura 20) a  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4,43/41,3 (H-16/C-14) y la del COSY (figura 21) a  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$  4,43/1,78 (H-16/H-15). Otros dos grupos

oxigenados pueden ubicarse en los carbonos C21 y C22 del triterpeno mediante las interacciones en HMBC (figura 20) de los hidrógenos metílicos H-29 y H-30 ( $\delta_H$  1,00 y 1,23 respectivamente) con el carbono a  $\delta_C$  78,5 (C-21) y del protón H-21 ( $\delta_H$  6,46) con el carbono a  $\delta_C$  74,2 (C-22), así como la correlación entre  $\delta_H$  6,46 (H-21) y 6,08 (H-22) en el espectro COSY (figura 21). El último grupo hidroxilo se localiza sobre el C-28 de la genina como lo demuestra la correlación entre el hidrógeno H-22 ( $\delta_H$  6,08) con el carbono a  $\delta_C$  63,5 (C-28).

La estereoquímica del triterpeno se establece con el espectro NOESY (figura 23), ubicando en posición  $\alpha$  los protones H-3 ( $\delta_H$  3,20) y H-21 ( $\delta_H$  6,46) y en posición  $\beta$  a los hidrógenos H-16 ( $\delta_H$  4,43) y H-22 ( $\delta_H$  6,08) por medio de las siguientes correlaciones observadas:

H-3:	$\delta_H/\delta_H$ 3,20/0,65 (H-3/H-5) y 3,20/1,18 (H-3/H-23)
H-16:	$\delta_H/\delta_H$ 4,43/0,80 (H-16/H-26)
H-21:	$\delta_H/\delta_H$ 6,46/1,00 (H-21/H-29)
H-22:	$\delta_H/\delta_H$ 6,08/1,23 (H-22/H-30)

La comparación de los desplazamientos químicos con los reportados en la literatura y las correlaciones observadas en RMN permiten establecer la identidad del triterpeno como un esqueleto del tipo oleanano pentahidroxilado, conocido como **barringtogenol C** (Pal *et al.*, 1994). En los espectros de RMN del compuesto encontramos junto con el triterpeno, la presencia de un grupo acetoxi y un grupo angeloxi, como lo demuestran las correlaciones en HMBC (figura 20) para las señales a  $\delta_C$  171,2 (Ac-C1) y 20,6 (Ac-C2) en el caso del acetoxi (Manase *et al.*, 2013) y a  $\delta_C$  167,9 (Ang-C1); 128,5 (Ang-C2); 137,2 (Ang-C3); 15,6 (Ang-C4) y 20,7 (Ang-C5) para el angeloxi (Bäcker *et al.*, 2013). La ubicación de ambos grupos en los carbonos C-21 y C-22 del triterpeno se realizó mediante las correlaciones  $\delta_H/\delta_C$  6,46/167,9 (H-21/Ang-C1) y 6,08/171,2 (H-22/Ac-C1) del HMBC (figura 20). Por tanto la genina de **PT-P1** puede identificarse como **22-acetoxi-21-angeloxibarringtogenol C**.

### Identificación de los azúcares:

En el espectro HSQC (figura 19) del compuesto **PT-P1** se observa la presencia de 3 hidrógenos anoméricos localizados a  $\delta_H$  5,40 (doblete,  $J = 7,6$  Hz), 5,25 (doblete,  $J = 6,0$  Hz) y 4,75 (doblete,  $J = 7,4$  Hz) correlacionados con los carbonos ubicados a  $\delta_C$  103,7; 104,0 y 104,6 respectivamente, lo que indica la presencia de tres moléculas de azúcares.

La asignación completa del sistema de hidrógenos de cada monosacárido se realizó con los espectros COSY (figura 21) y TOCSY (figura 22) del compuesto, los átomos de carbono para cada azúcar se asignaron con los espectros HSQC (figura 19) y HMBC (figura 20) y por



último la estereoquímica de cada glicósido se determinó con el NOESY (figura 23). La comparación de la data reportada en la bibliografía con los valores de los desplazamientos químicos obtenidos para los monosacáridos del compuesto **PT-P1** permitió identificar las tres unidades de azúcar como **ácido  $\beta$ -D-glucorónico** (GlcA),  **$\beta$ -D-galactosa** (Gal) y  **$\alpha$ -L-arabinopiranososa** (Ara) (Agrawal, 1992; Bäcker *et al.*, 2013). Para determinar el sitio de unión de los azúcares se utilizaron los espectros de HMBC (figura 20) y NOESY (figura 23). Para los hidrógenos anoméricos de cada unidad de azúcar se pueden observar las siguientes correlaciones:

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H/\delta_C$ )
GlcA:	4,75 (GlcA-H1) / 3,20 (Gen-H3)	4,75 (GlcA-H1) / 89,9 (Gen-C3)
Gal:	5,40 (Gal-H1) / 4,40 (GlcA-H2)	5,40 (Gal-H1) / 78,8 (GlcA-C2)
Ara:	5,25 (Ara-H1) / 4,28 (GlcA-H3)	5,25 (Ara-H1) / 84,5 (GlcA-C3)

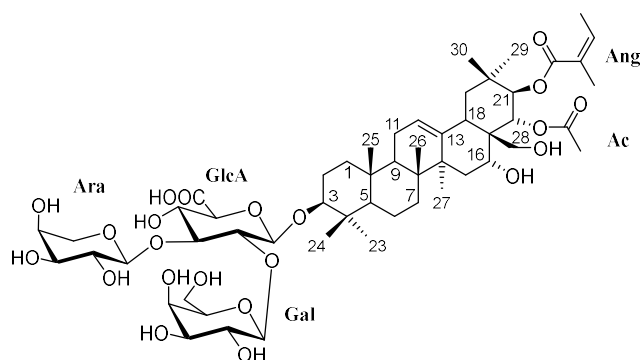
Estas correlaciones indican que el ácido  $\beta$ -D-glucoronopiranosilo (GlcA) está unido a la genina por el carbono C-3 ( $\delta_C$  89,9) de la misma, mientras que las moléculas de  $\beta$ -D-galactosa y  $\alpha$ -L-arabinopiranososa se encuentran unidas al ácido glucorónico en las posiciones 2 y 3 respectivamente. De esta manera la secuencia glicosídica queda determinada como

[Gal-(1 $\rightarrow$ 2)]-[Ara-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA, la cual está unida al aglicón en la posición C-3.

### Conclusión:

Todos los datos permitieron determinar la estructura del compuesto **PT-P1** como **3-O- $[\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $[\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucorono piranosil-22-acetoxi-21-angeloxibarringtogenol C** (figura 16). Es la primera vez que se aísla como producto natural a esta saponina derivada del barringtogenol C con un grupo acetoxi en C-22 y uno angeloxi en C-21 como sustituyentes.

Saponinas derivadas del Barringtogenol C son comunes dentro del género *Pittosporum* y han sido reportadas en algunas especies como, como *P. angustifolium* (Bäcker *et al.*, 2014c), *P. brevicalyx* (Feng *et al.*, 2010) y *P. tobira* (Oh *et al.*, 2014). En cuanto a la secuencia glicosídica de **PT-P1** es igual a la descrita para la especie *P. angustifolium* (Bäcker *et al.*, 2014c, 2013).



**Figura 16.** Estructura del compuesto **PT-P1**: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-acetoxi-21-angeloxibarringtogenol C.

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **PT-P1** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares y ácidos orgánicos			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,78 1,32	<b>Ang en C-21</b>			
2	26,0	-CH <sub>2</sub> -	1,86 2,27	1	167,9	-COOR	-----
3	89,9	-CHOH-	3,20 <i>dd</i> (12,0; 3,5)	2	128,5	=C<	-----
4	39,3	>C<	-----	3	137,2	=CH-	5,96 <i>q</i> (6,8)
5	55,5	>CH-	0,65 <i>br d</i> (10,7)	4	15,6	-CH <sub>3</sub>	2,03 <i>d</i> (6,8)
6	18,1	-CH <sub>2</sub> -	1,19 1,38	5	20,7	-CH <sub>3</sub>	1,94 <i>s</i>
7	32,8	-CH <sub>2</sub> -	1,22 1,48	<b>Ac en C-22</b>			
8	39,8	>C<	-----	1	171,2	-COOR	-----
9	46,5	>CH-	1,60 <i>dd</i> (13,8; 6,9)	2	20,6	-CH <sub>3</sub>	1,94 <i>s</i>
10	36,4	>C<	-----	<b>3-<i>O</i>-GlcA</b>			
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,75 – 1,80	1	104,6	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,75 <i>d</i> (7,4)
12	123,5	=CH-	5,39 <i>br s</i>	2	78,8	-CHOR-	4,40
13	142,3	=C<	-----	3	84,5	-CHOR-	4,28
14	41,3	>C<	-----	4	71,4	-CHOH-	4,15
15	34,0	-CH <sub>2</sub> -	1,58 1,78	5	76,3	-CHOH-	4,22 <i>d</i> (8,8)
16	67,7	-CHOH-	4,43 <i>d</i> (4,0)	6	175,1	-COOH	-----
17	47,6	>C<	-----	<b>Gal-(1<math>\rightarrow</math>2)-GlcA</b>			
18	39,7	>CH-	2,96	1	103,7	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,40 <i>d</i> (7,6)
19	46,8	-CH <sub>2</sub> -	1,36 2,98	2	73,0	-CHOH-	4,34
20	36,0	>C<	-----	3	73,9	-CHOH-	4,04
21	78,5	-CHOR-	6,46 <i>d</i> (10,0)	4	69,6	-CHOH-	4,36
22	74,2	-CHOR-	6,08 <i>d</i> (10,0)	5	76,5	-CHOH-	3,84 <i>m</i>
23	27,7	-CH <sub>3</sub>	1,18 <i>s</i>	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,24 4,35
24	16,3	-CH <sub>3</sub>	1,02 <i>s</i>	<b>Ara-(1<math>\rightarrow</math>3)-GlcA</b>			
25	15,3	-CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	1	104,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,25 <i>d</i> (6,0)
26	16,4	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>	2	72,3	-CHOH-	4,37
27	27,1	-CH <sub>3</sub>	1,72 <i>s</i>	3	74,5	-CHOH-	4,04
28	63,5	-CH <sub>2</sub> OH	3,32 <i>d</i> (10,1) 3,55 <i>d</i> (10,1)	4	69,0	-CHOH-	4,17 <i>m</i>
29	29,1	-CH <sub>3</sub>	1,00 <i>s</i>	5	66,8	-CH <sub>2</sub> OH	3,64 <i>dd</i> (11,6; 1,8) 4,28
30	19,9	-CH <sub>3</sub>	1,23 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

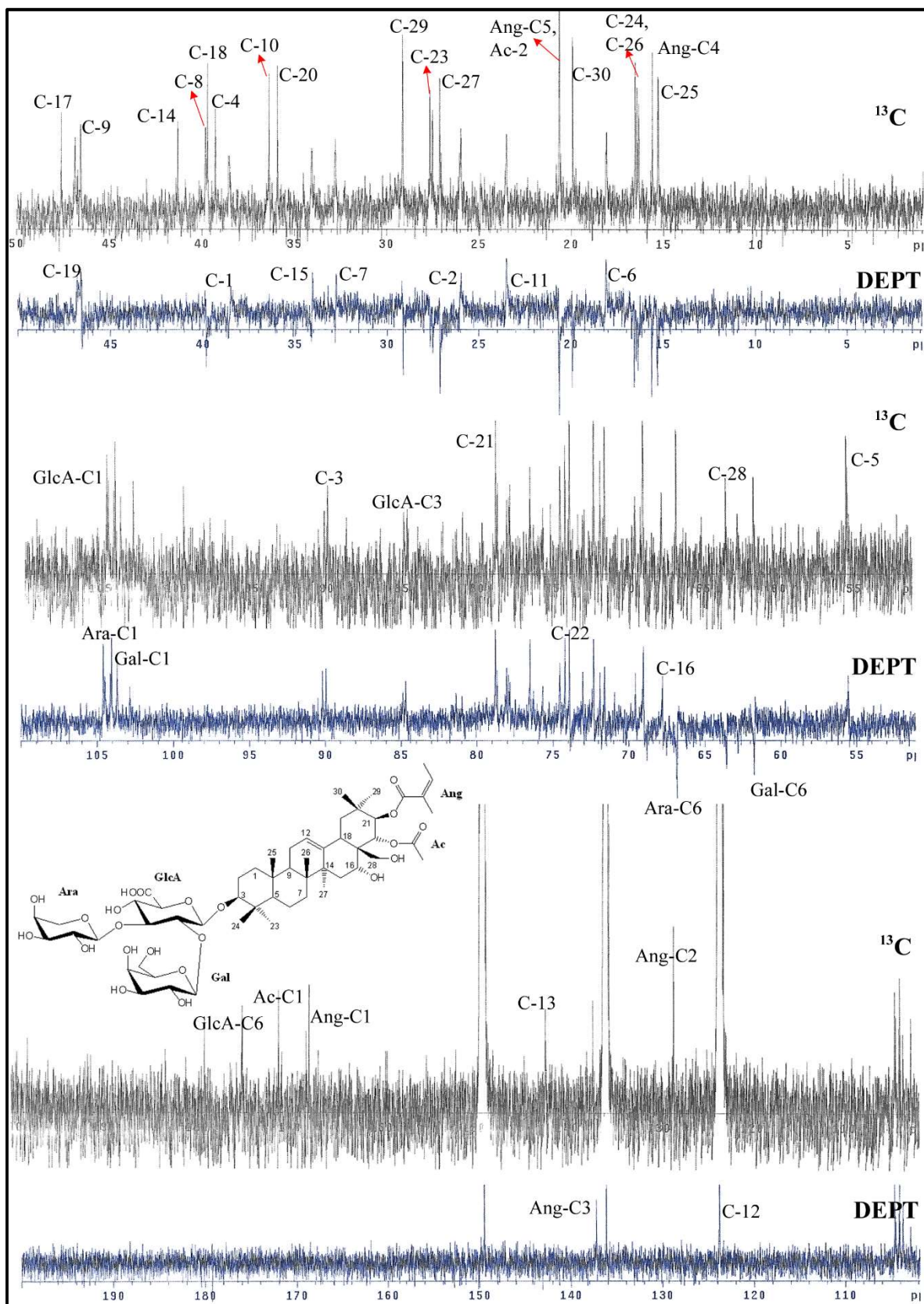


Figura 17. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P1.

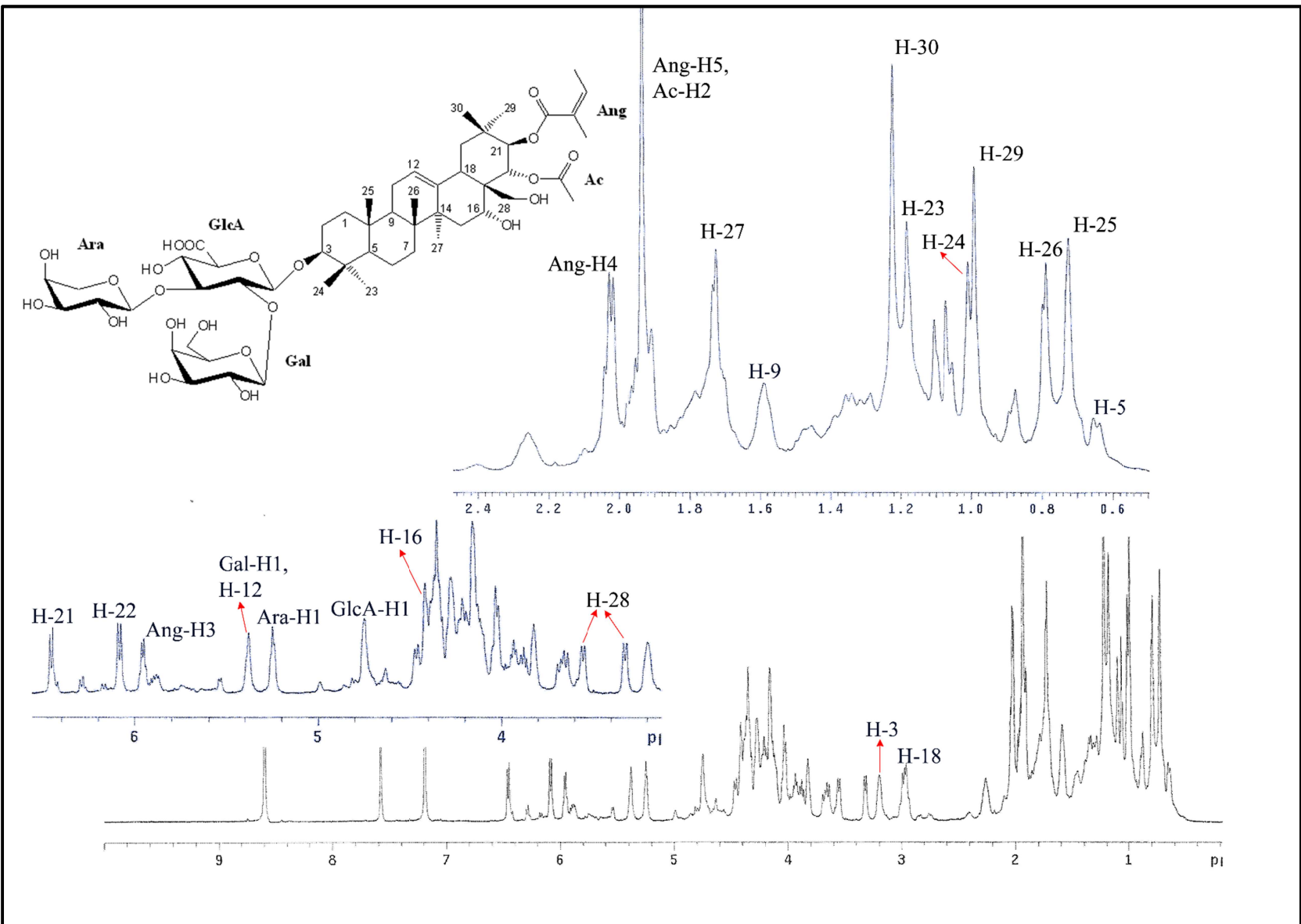


Figura 18. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P1.



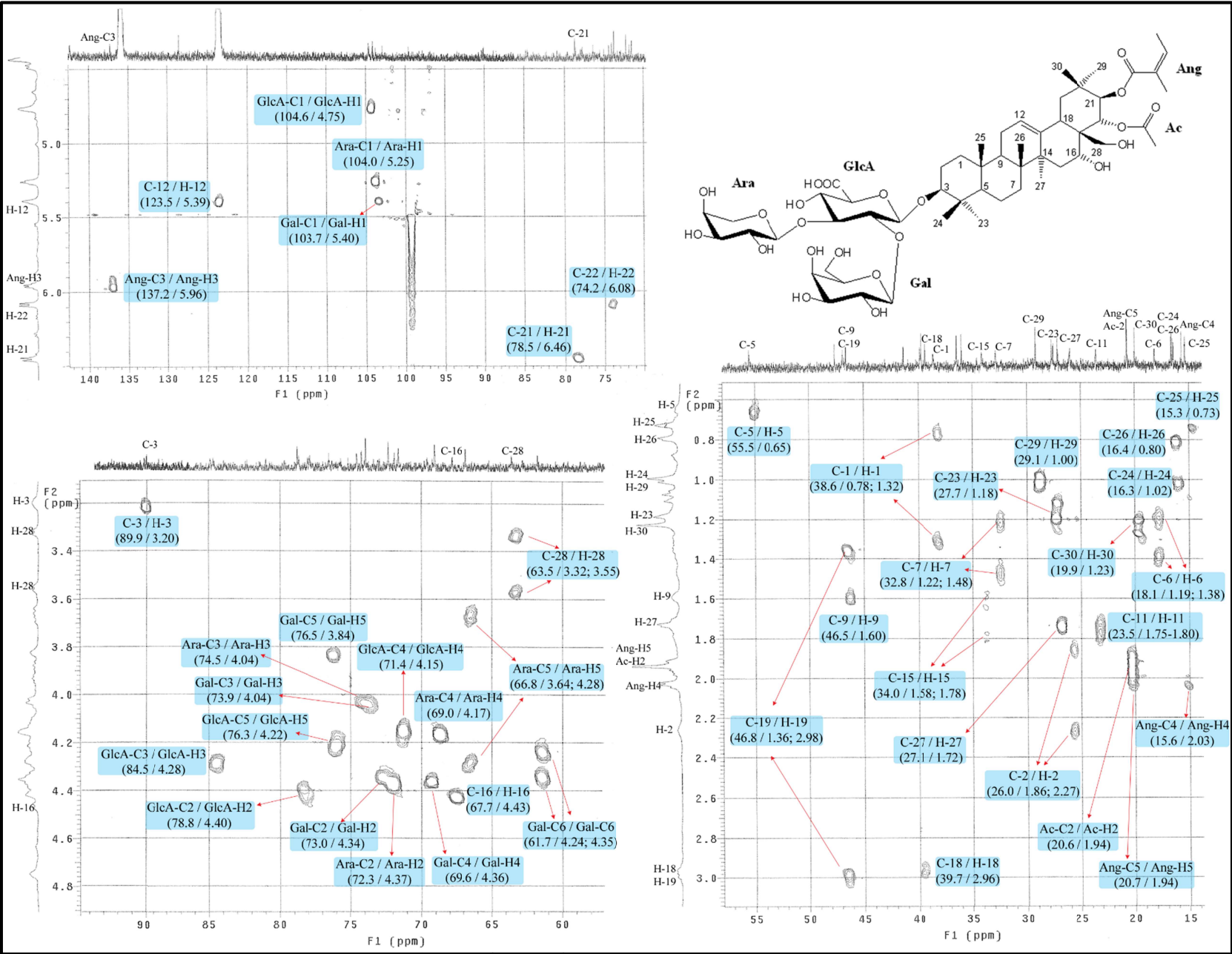


Figura 19. Espectro de HSQC del compuesto PT-P1.

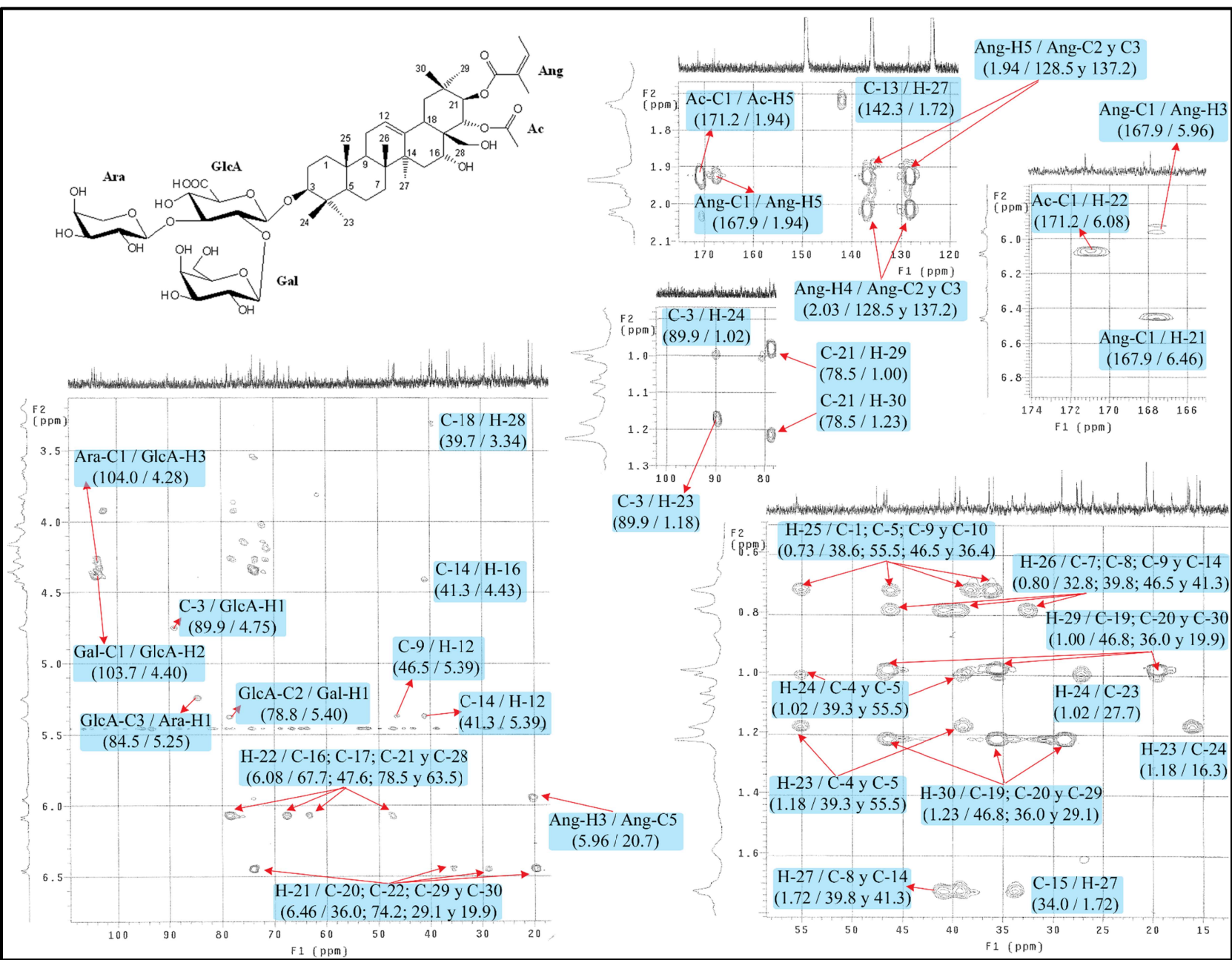


Figura 20. Espectro de HMBC del compuesto PT-1.

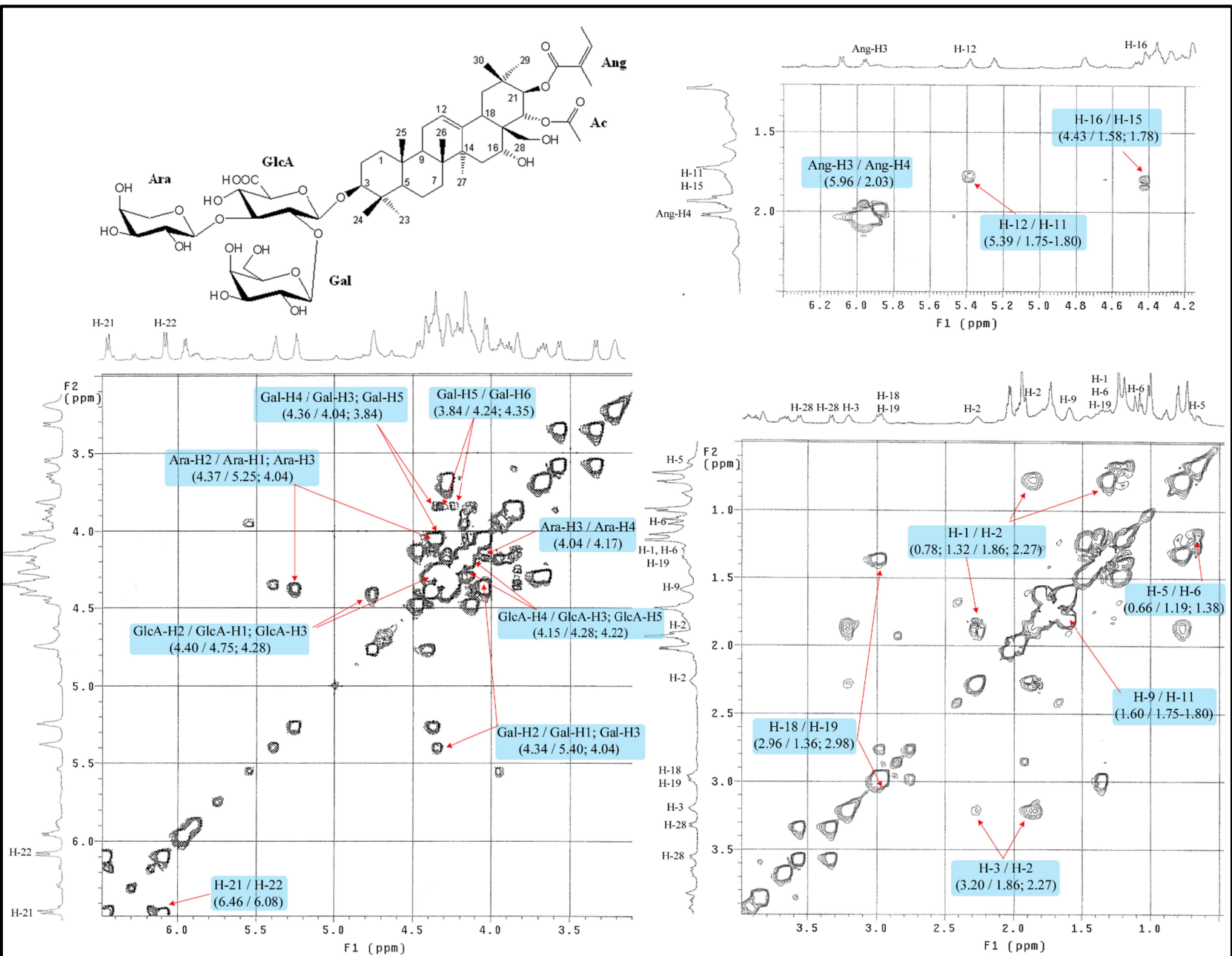


Figura 21. Espectro de COSY del compuesto PT-P1.



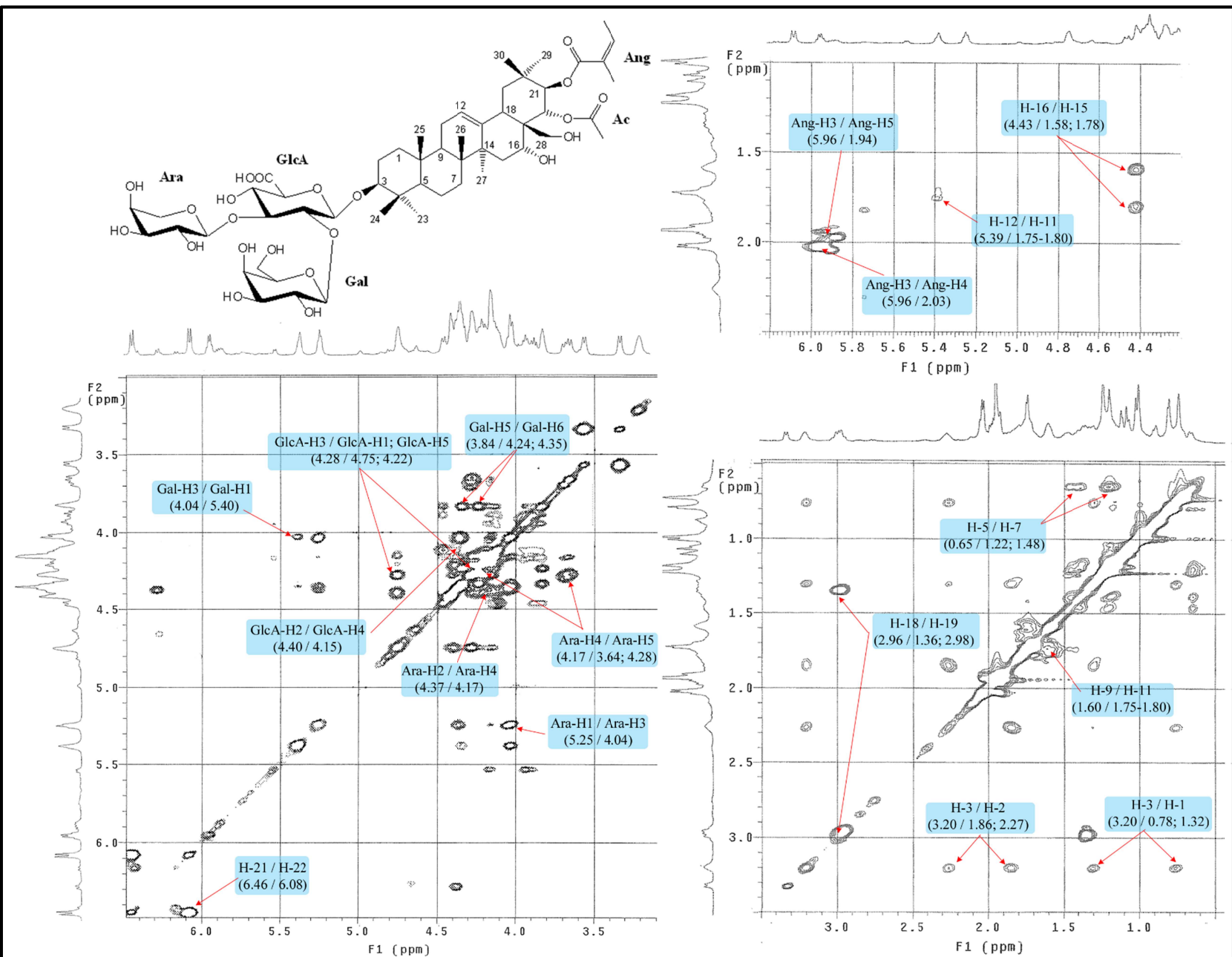


Figura 22. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P1.



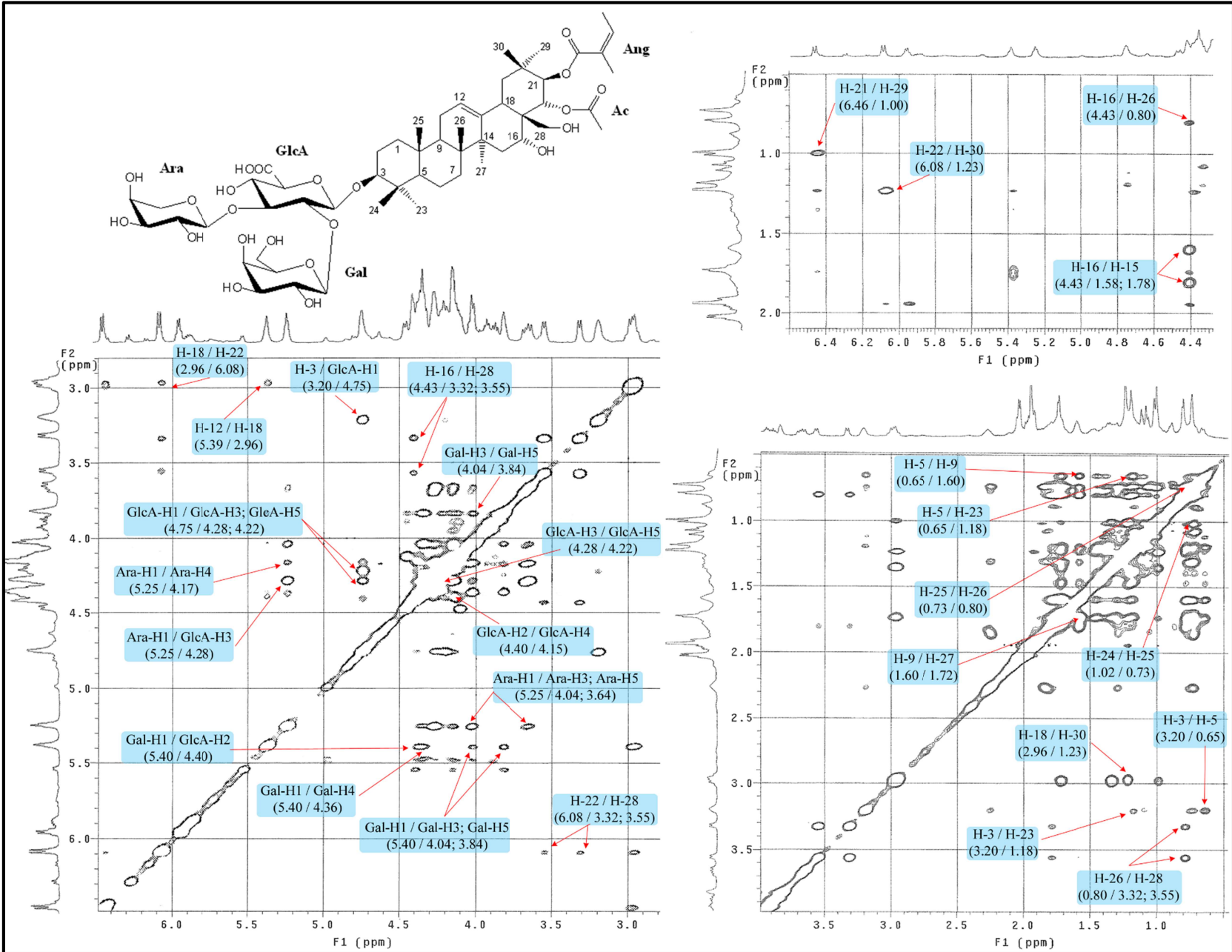
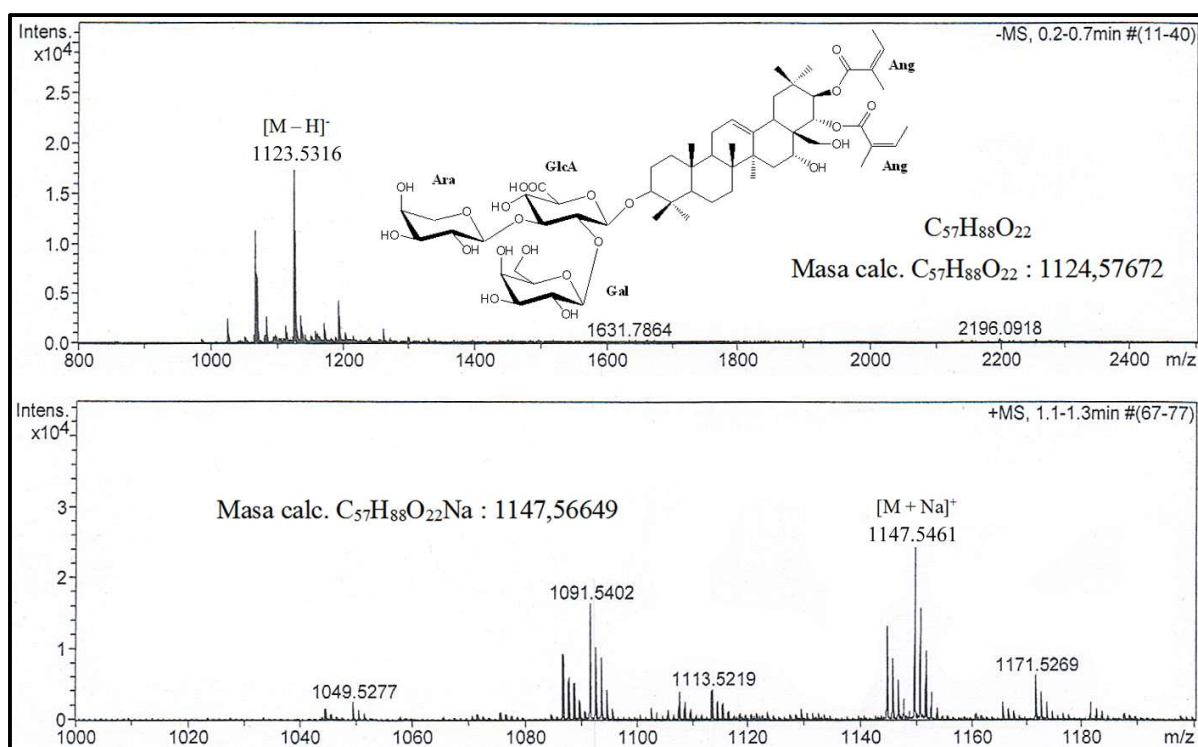


Figura 23. Espectro de NOESY del compuesto PT-P1.

**III.B. Compuesto PTV-P2:** 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-21,22-diangeloxibarringtogenol C.

De la fracción B1M2 de las hojas de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ se aislaron 4,1 mg de un sólido blanco (esquema 3) y los espectros de masas de alta resolución por electronebulización en modo negativo y en modo positivo de este compuesto muestran un ion molecular a 1.123,5316 m/z ( $[M-H]^-$ ) y a 1.147,5461 m/z ( $[M+Na]^+$ ) respectivamente. Estos iones moleculares son consistente con las fórmulas moleculares  $C_{57}H_{88}O_{22}$  (calc. 1.124,57672) y  $C_{57}H_{88}O_{22}Na$  (calc. 1.147,56649).



**Figura 24.** Espectro HR-ESI-MS  $< 0$  (arriba) y HR-ESI-MS  $> 0$  (abajo) del compuesto **PT-P2**.

El espectro de RMN- $^{13}C$  (figura 26) del compuesto revela la presencia de 56 carbonos, por lo que puede suponerse que se trata de un triterpenoide con unidades de monosacáridos y/o otros grupos como sustituyentes. Igual que para el compuesto anterior se utilizaron los experimentos RMN-1D y HSQC (figura 28) para identificar las siguientes señales: 11 metilos, 7 metilenos, 3 metinos, 6 carbonos cuaternarios, 21 grupos oxigenados (3 metileno y 18 metinos), 6 carbonos con hibridación  $sp^2$  (tres carbonos cuaternarios y tres metinos) característicos de dobles enlaces C-C y 2 carbonos carbonilos.

**Identificación del aglicón:**

Igual que para el compuesto **PT-P1**, se emplearon los espectros de RMN-2D para establecer las correlaciones de cada hidrógeno con su carbono y para identificar el esqueleto triterpénico del aglicón del compuesto **PT-P2**. Los desplazamientos químicos y las correlaciones encontradas en los experimentos de RMN, así como la comparación con los desplazamientos químicos de **PT-P1**, permiten demostrar que ambos compuestos tienen el mismo triterpeno, el **barringtogenol C** (Pal *et al.*, 1994). Adicionalmente, se encontró la presencia de dos grupos angeloxi, los cuales fueron identificados por las correlaciones observadas en el espectro HMBC (figura 29) del compuesto (Bäcker *et al.*, 2013). Estos grupos angeloxi fueron ubicados en las posiciones C-21 y C-22 del triterpeno por medio de las interacciones  $\delta_H/\delta_C$  6,47/169,5 (H-21/Ang I-C1) y 6,10/169,5 (H-22/Ang II-C1) del HMBC (figura 29). En consecuencia, el esqueleto del aglicón del compuesto **PT-P2** se queda identificado como **21,22-diangeloxibarringtogenol C**.

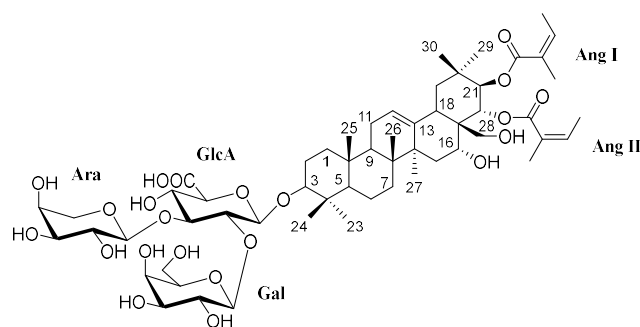
**Identificación de los azúcares:**

Igual que para el compuesto **PT-P1**, el espectro HSQC (figura 28) del compuesto **PT-P2** muestra la presencia de 3 hidrógenos anoméricos localizados a  $\delta_H$  5,36 (doblete,  $J = 7,4$  Hz), 5,31 (doblete,  $J = 6,7$  Hz) y 4,76 (doblete,  $J = 7,4$  Hz) correlacionados con los carbonos anoméricos ubicados a  $\delta_C$  103,7; 103,9 y 104,7 respectivamente, esto es indicativo de la presencia de tres moléculas de azúcares. Utilizando la información proporcionada por los diferentes espectros de RMN-2D, se estableció que las 3 unidades de azúcares y la cadena glicosídica del compuesto **PT-P2** es igual a la del compuesto **PT-P1**, es decir, [Gal-(1→2)]-[Ara-(1→3)]-GlcA. De igual manera, dicha cadena está unida al aglicón de **PT-P2** en la posición C-3.

**Conclusión:**

Toda la información colectada permitió identificar la estructura del compuesto **PT-P2** como **3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -D-glucorono piranosil-21,22-diangeloxibarringtogenol C** (figura 25). Es la primera vez que esta saponina, derivada del barringtogenol C y con dos grupos angeloxi como sustituyentes, es aislada como producto natural.

La secuencia glicosídica observada ha sido reportada en otras especies de este género, así como también el esqueleto del barringtogenol C y/o derivados del mismo (Bäcker *et al.*, 2014c, 2013).



**Figura 25.** Estructura del compuesto **PT-P2**: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-21,22-diangeloxibarringtogenol C.

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **PT-P2** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares y ácidos orgánicos			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,3	-CH <sub>2</sub> -	0,81 1,32	<b>21-O-Ang I</b>			
2	26,1	-CH <sub>2</sub> -	1,79 2,33	1	169,5	-COOR	-----
3	89,8	-CHOH-	3,24 <i>dd</i> (12,1; 3,2)	2	128,2	=C<	-----
4	39,0	>C<	-----	3	136,5	=CH-	5,89 <i>q</i> (6,4)
5	55,0	>CH-	0,62 <i>br d</i> (11,4)	4	15,6	-CH <sub>3</sub>	2,02 <i>d</i> (6,4)
6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,21 1,41	5	20,4	-CH <sub>3</sub>	1,93 <i>s</i>
7	32,5	-CH <sub>2</sub> -	1,23 1,48	<b>22-O-Ang II</b>			
8	39,8	>C<	-----	1	169,5	-COOR	-----
9	46,0	>CH-	1,63	2	128,2	=C<	-----
10	36,6	>C<	-----	3	136,5	=CH-	5,94 <i>q</i> (6,4)
11	23,1	-CH <sub>2</sub> -	1,75 – 1,78	4	15,6	-CH <sub>3</sub>	2,02 <i>d</i> (6,4)
12	124,0	=CH-	5,36 <i>br s</i>	5	20,4	-CH <sub>3</sub>	1,93 <i>s</i>
13	142,2	=C<	-----	<b>3-O-GlcA</b>			
14	41,3	>C<	-----	1	104,7	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,76 <i>d</i> (7,4)
15	33,6	-CH <sub>2</sub> -	1,55 1,78	2	79,7	-CHOR-	4,34
16	69,7	-CHOH-	4,57 <i>d</i> (4,1)	3	84,2	-CHOR-	4,33
17	47,6	>C<	-----	4	71,6	-CHOH-	4,17
18	38,7	>CH-	2,96 <i>dd</i> (11,5; 3,0)	5	75,9	-CHOH-	4,20 <i>d</i> (9,1)
19	46,6	-CH <sub>2</sub> -	1,34 2,98	6	n.d.,	-COOH	-----
20	36,0	>C<	-----	<b>Gal-(1<math>\rightarrow</math>2)-GlcA</b>			
21	78,4	-CHOR-	6,47 <i>d</i> (10,4)	1	103,7	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,36 <i>d</i> (7,4)
22	72,5	-CHOR-	6,10 <i>d</i> (10,4)	2	72,5	-CHOH-	4,37
23	27,0	-CH <sub>3</sub>	1,20 <i>s</i>	3	73,8	-CHOH-	4,03 <i>dd</i> (9,1; 3,1)
24	16,1	-CH <sub>3</sub>	1,03 <i>s</i>	4	68,9	-CHOH-	4,24
25	15,3	-CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	5	76,6	-CHOH-	3,83 <i>m</i>
26	16,4	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	6	61,9	-CH <sub>2</sub> OH	4,24 4,33
27	27,1	-CH <sub>3</sub>	1,73 <i>s</i>	<b>Ara-(1<math>\rightarrow</math>3)-GlcA</b>			
28	63,5	-CH <sub>2</sub> OH	3,32 <i>d</i> (10,7) 3,54 <i>d</i> (10,7)	1	103,9	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,31 <i>d</i> (6,7)
29	29,8	-CH <sub>3</sub>	0,99 <i>s</i>	2	72,1	-CHOH-	4,38
30	19,9	-CH <sub>3</sub>	1,24 <i>s</i>	3	73,8	-CHOH-	4,02
				4	68,7	-CHOH-	4,15 <i>m</i>
				5	66,7	-CH <sub>2</sub> OH	3,63 <i>dd</i> (11,2; 2,0) 4,22

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

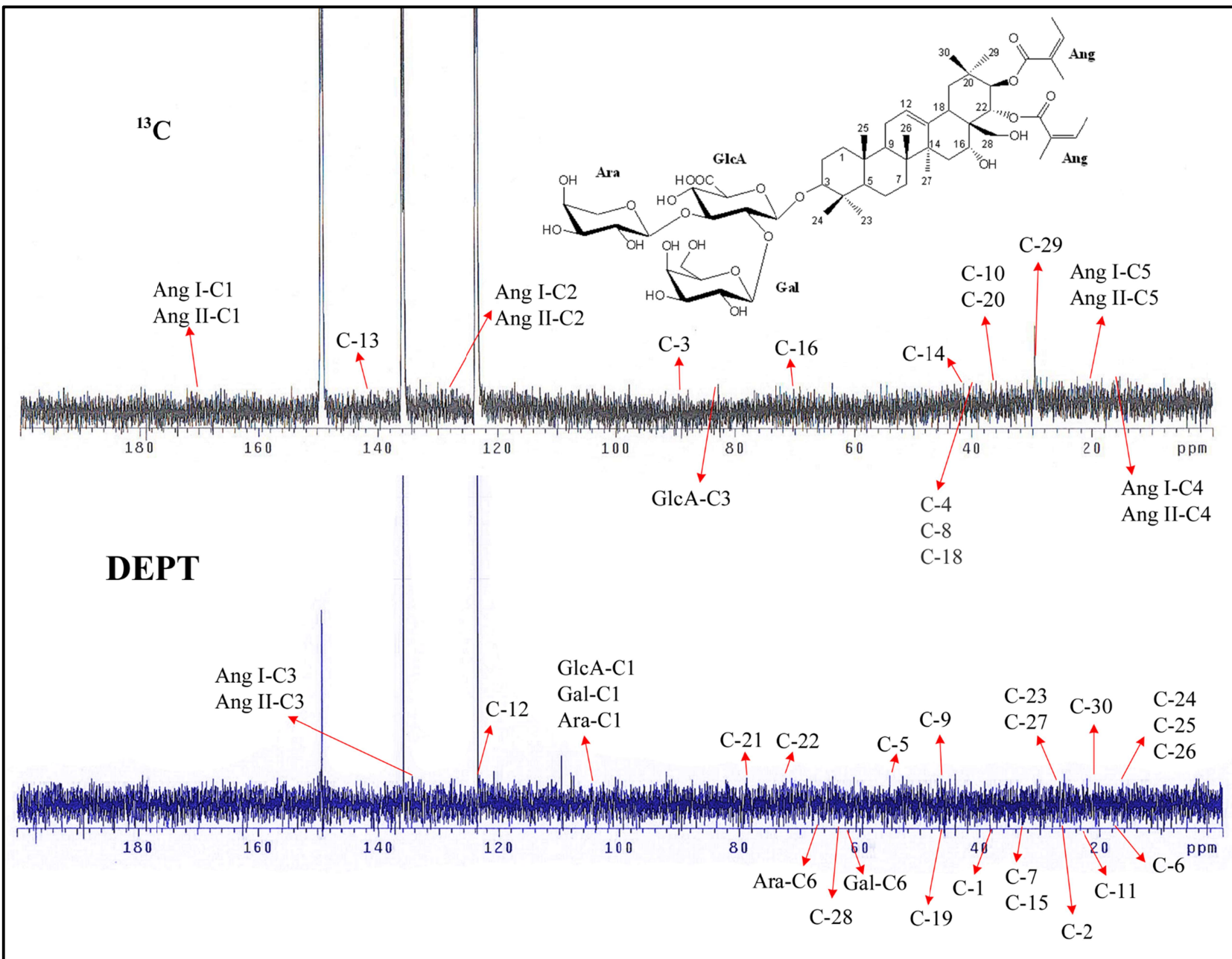


Figura 26. Espectros de RMN-<sup>13</sup>C y DEPT del compuesto PT-P2.



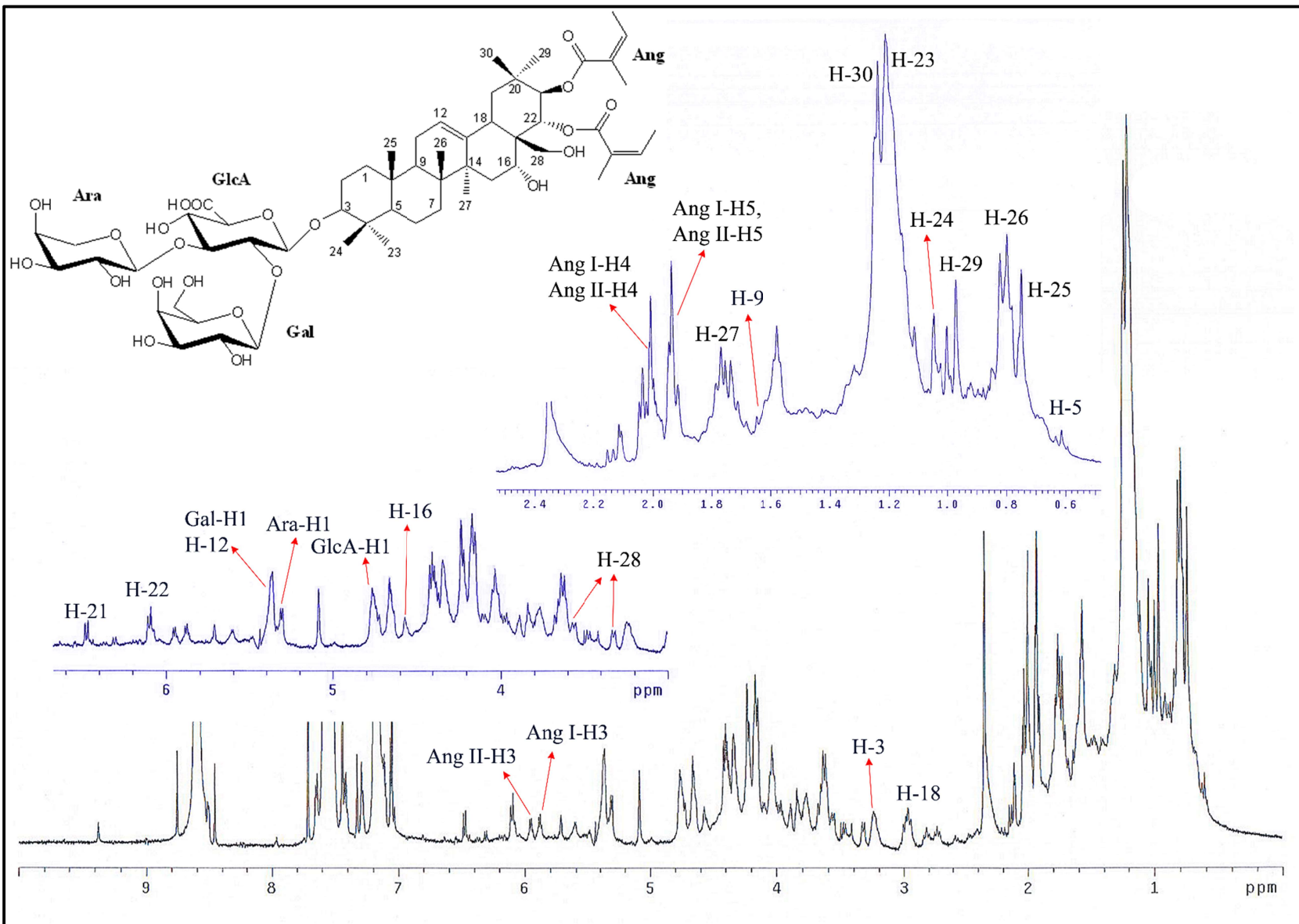


Figura 27. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P2.

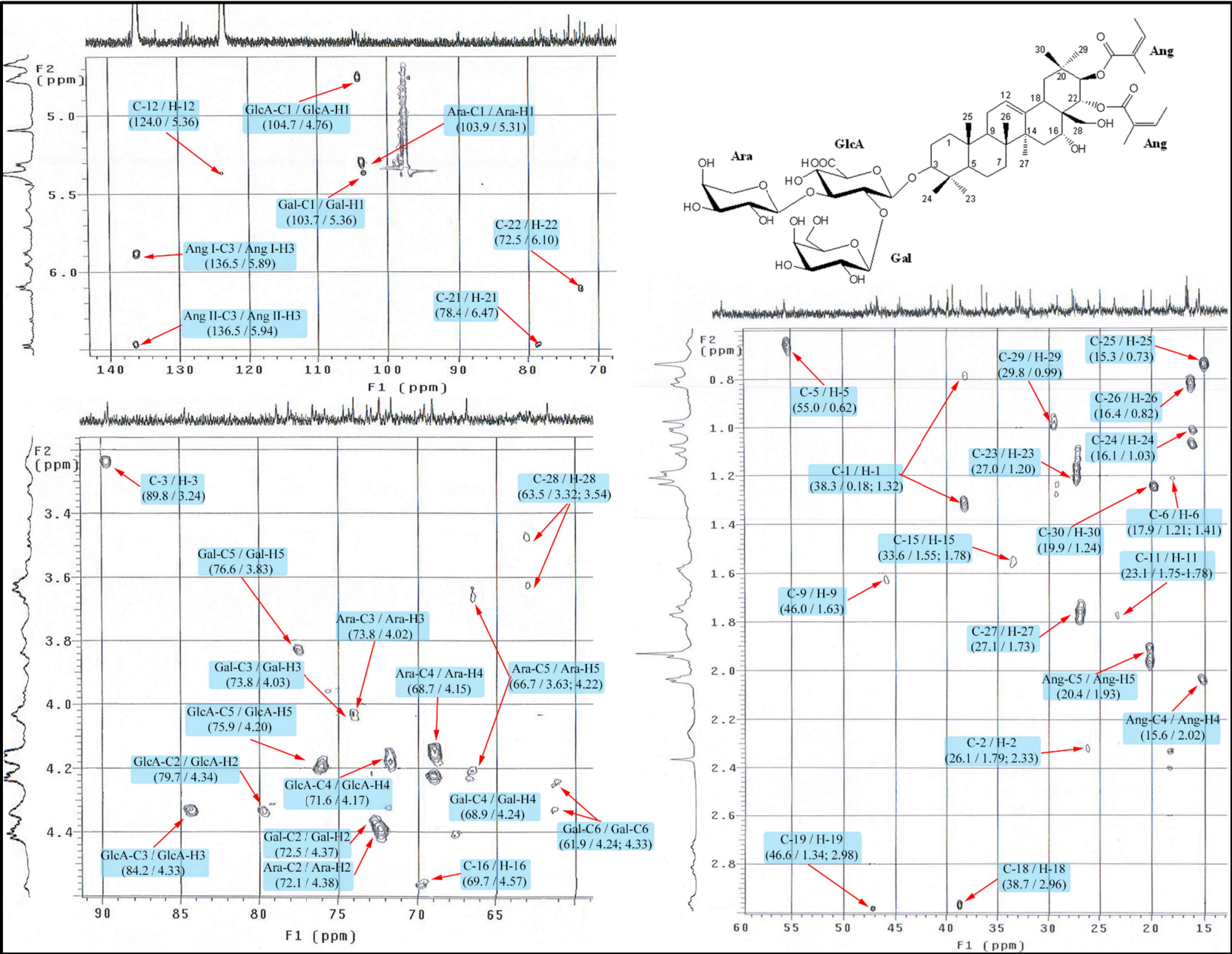


Figura 28. Espectro de HSQC del compuesto PT-P2.



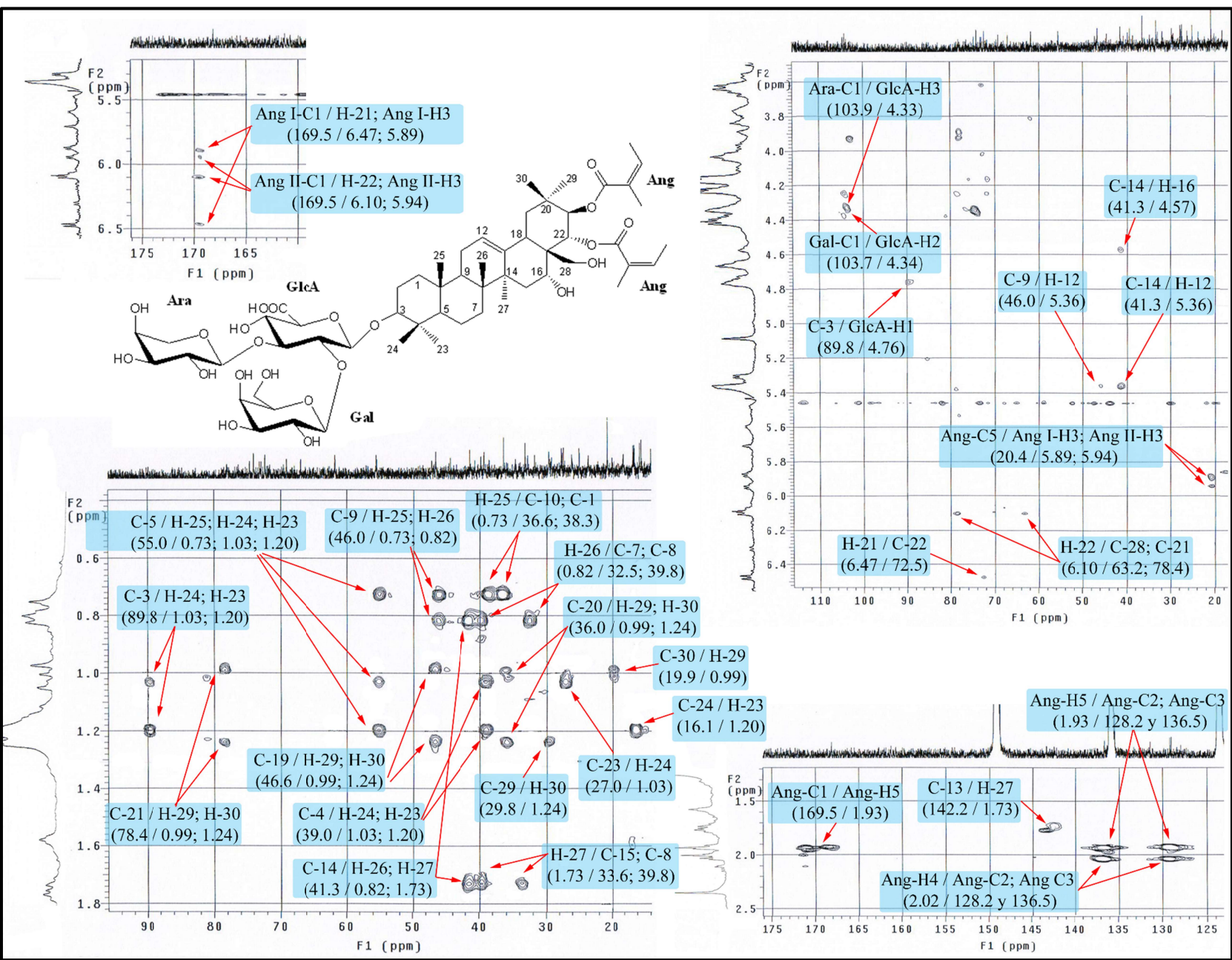


Figura 29. Espectro de HMBC del compuesto PT-1-2.



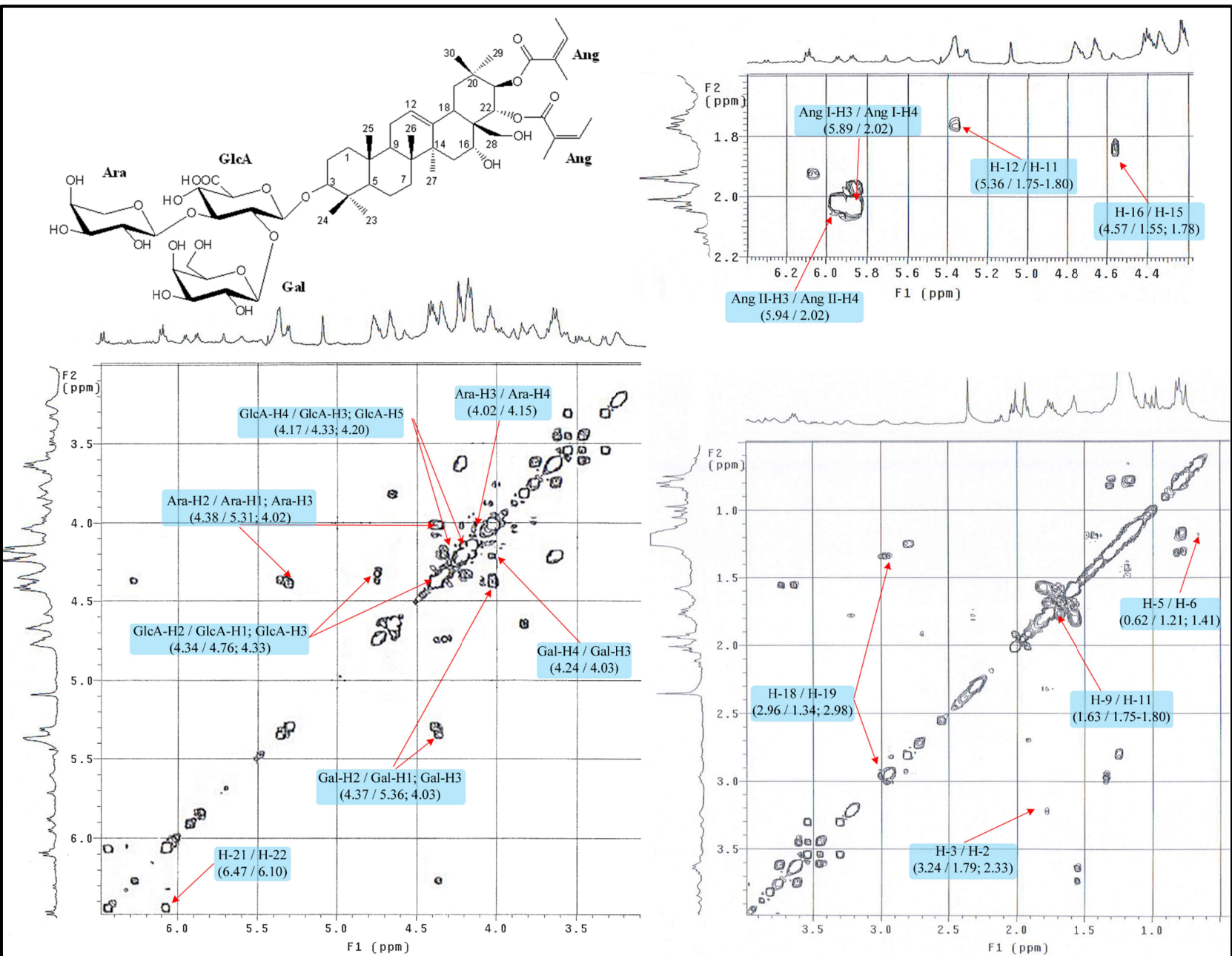


Figura 30. Espectro de COSY del compuesto PT-P2.

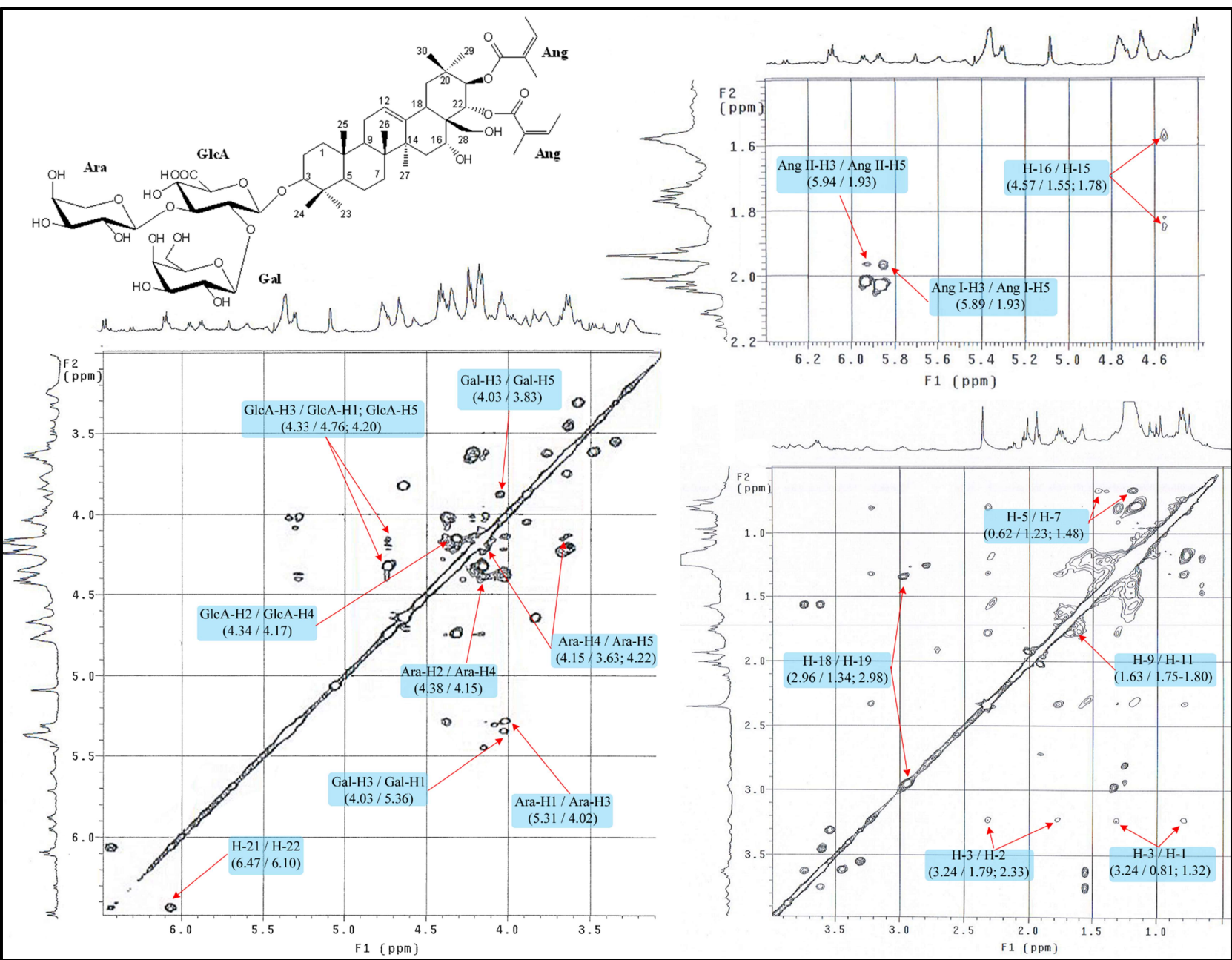


Figura 31. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P2.

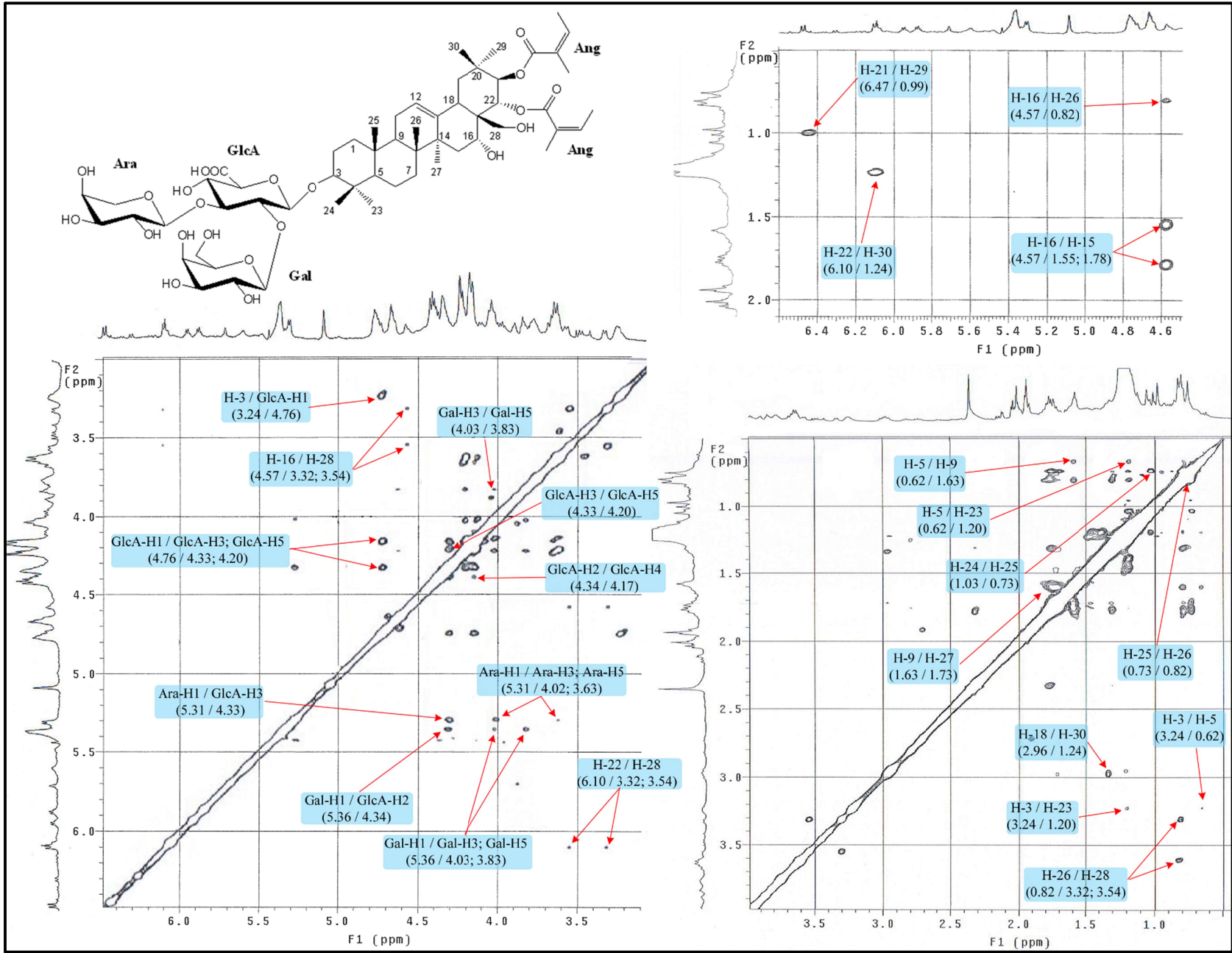
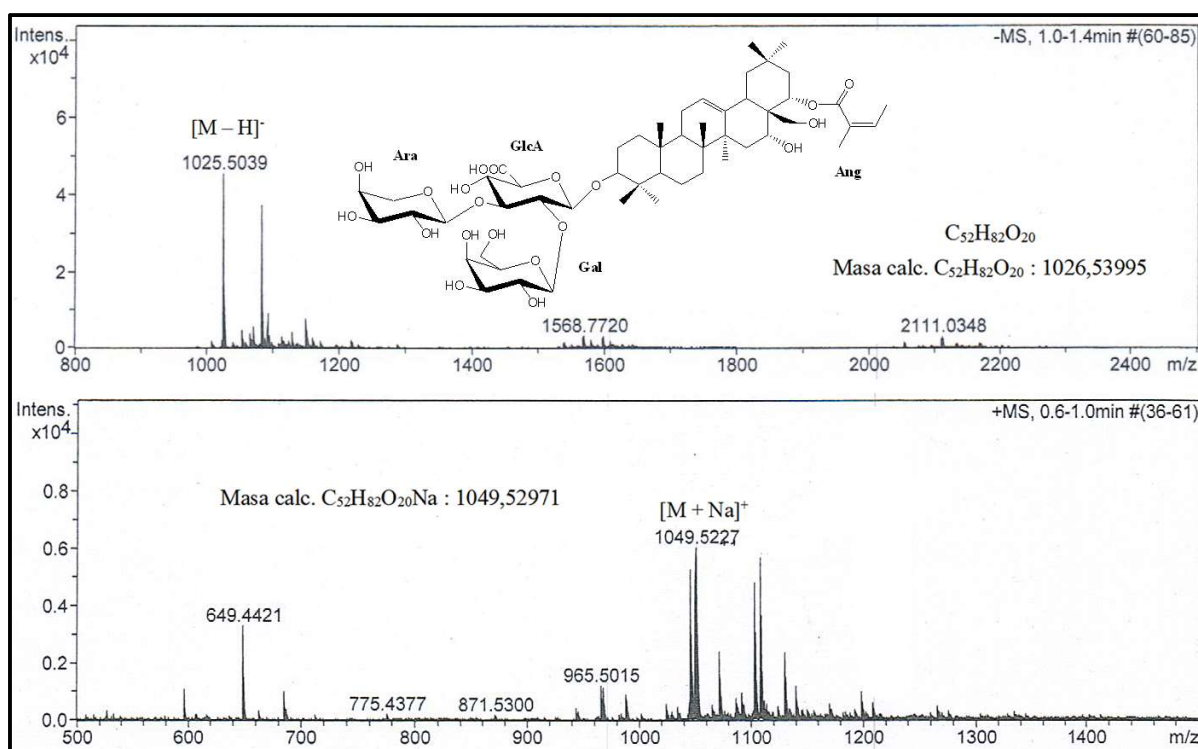


Figura 32. Espectro de NOESY del compuesto PT-P2.



**III.C. Compuesto PTV-P3:** 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A.

Fue aislado como un sólido blanco con una masa de 6,3 mg de la fracción B1M4 de las hojas de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ (esquema 3). Los espectros de masas de alta resolución por electronebulización en modo negativo (HR-ESI-MS  $< 0$ ) y en modo positivo (HR-ESI-MS  $> 0$ ) de este compuesto muestran unos iones moleculares a 1.025,5039 m/z ( $[M-H]^-$ ) y 1.049,5227 m/z ( $[M+Na]^+$ ) respectivamente, los cuales se corresponden a las fórmulas moleculares  $C_{52}H_{82}O_{20}$  (calc. 1.026,53995) y  $C_{52}H_{82}O_{20}Na$  (calc. 1.049,52971).



**Figura 33.** Espectro ESI-MS  $< 0$  (arriba) y ESI-MS  $> 0$  (abajo) del compuesto **PT-P3**.

En el espectro de RMN- $^{13}C$  (figura 35) se observan 51 carbonos, por lo que puede suponerse que se trata de un triterpenoide con moléculas de azúcares y/o otros sustituyentes. Los espectros de RMN-1D permitieron identificar las siguientes señales: 9 metilos, 8 metilenos, 3 metinos, 6 carbonos cuaternarios, 20 grupos oxigenados (3 metilenos y 17 metinos), 4 carbonos de dobles enlaces C-C con hibridación  $sp^2$  (dos metinos y dos C cuaternarios) y 1 carbono carbonilo.

**Identificación del aglicón:**

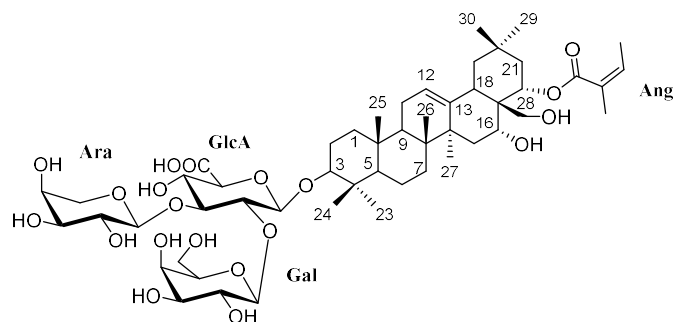
El análisis de los espectros de RMN-2D permitió demostrar que el esqueleto triterpénico de **PT-P3** es muy similar a los de los productos ya descritos (**PT-P1** y **PT-P2**). La diferencia con respecto a dichos compuestos se observa en el carbono C-21 de la genina, ya que en **PT-P3** no hay una función oxigenada en dicho carbono, sino que C-21 es un metileno ( $\delta_C/\delta_H$  41,4/1,93; 2,75), esto se comprueba con las correlaciones observadas en el HMBC (figura 38) para los protones metílicos H-29 ( $\delta_H$  0,97) y H-30 ( $\delta_H$  1,20) con el carbono a  $\delta_C$  41,4 (C-21), así como la interacción entre los protones de H-21 ( $\delta_H$  1,93/2,75) y H-22 ( $\delta_H$  6,09) en los espectros COSY (Figura 39) y TOCSY (figura 40). Por lo tanto, el esqueleto triterpénico encontrado es del tipo oleanano y es conocido como **cameliagenina A** o barrigenol A2 (Rumampuk *et al.*, 2012). Al igual que para el compuesto **PT-P2**, la correlación en el HMBC (figura 38) entre H-22 ( $\delta_H$  6,09) y el carbono carbonilo de un angeloiolo a  $\delta_C$  168,1 (Ang-C1) ubica un grupo angeloxi como sustituyente en el C-22 de la genina. De esta forma, se establece el esqueleto de la genina de **PT-P3** como **22-angeloxicameliagenina A**.

**Identificación de los azúcares:**

En el HSQC (figura 37) se observan tres protones anoméricos a  $\delta_H$  5,39 (doblete,  $J = 7,7$  Hz), 5,26 (doblete,  $J = 6,4$  Hz) y 4,76 (doblete,  $J = 7,3$  Hz) correlacionados con los carbonos a  $\delta_C$  103,8; 104,1 y 104,7 respectivamente, lo que indica que el compuesto contiene tres moléculas de azúcar. La revisión de los espectros de RMN-2D demuestra que el compuesto **PT-P3** tiene la misma secuencia de monosacáridos unida al C-3 del triterpeno que los compuestos ya descritos, es decir, [Gal-(1→2)]-[Ara-(1→3)]-GlcA.

**Conclusión:**

El estudio de los espectros de RMN y masas permiten identificar la estructura del compuesto **PT-P3** como **3-O-[\beta-D-galactopiranosil-(1→2)]-[\alpha-L-arabinopiranosil-(1→3)]-\beta-D-glucoronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A** (figura 34). Es la primera vez que esta saponina derivada de la cameliagenina A es aislada como producto natural. La cameliagenina A es poco usual en el género *Pittosporum* y solo existen unos pocos reportes de glicósidos de este triterpeno es especies de *Pittosporum*, como en *P. angustifolium* (Bäcker *et al.*, 2014c), *P. undulatum* (Higuchi *et al.*, 1983b) y *P. phillyraeoides* (Errington y Jefferies, 1988).



**Figura 34.** Estructura del compuesto **PT-P3**: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A.

**Tabla 7.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **PT-P3** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares y ácidos orgánicos			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,75 1,30	<b>Ang en C-22</b>			
2	26,1	-CH <sub>2</sub> -	1,81 2,28	1	168,1	-COOR	-----
3	89,8	-CHOH-	3,21 <i>dd</i> (12,0; 3,4)	2	129,1	=C<	-----
4	39,0	>C<	-----	3	136,6	=CH-	5,88 <i>q</i> (7,1)
5	55,6	>CH-	0,66 <i>br d</i> (10,0)	4	15,6	-CH <sub>3</sub>	2,04 <i>d</i> (7,1)
6	18,1	-CH <sub>2</sub> -	1,18 1,25	5	20,7	-CH <sub>3</sub>	1,92 <i>s</i>
7	32,8	-CH <sub>2</sub> -	1,36 1,45	<b>3-O-GlcA</b>			
8	39,3	>C<	-----	1	104,7	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,76 <i>d</i> (7,3)
9	46,6	>CH-	1,60 <i>dd</i> (13,3; 6,8)	2	78,8	-CHOR-	4,40
10	36,4	>C<	-----	3	84,6	-CHOR-	4,28
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,78 - 1,80	4	71,6	-CHOH-	4,17
12	123,2	=CH-	5,36 <i>br s</i>	5	76,2	-CHOH-	4,21 <i>d</i> (9,1)
13	144,1	=C<	-----	6	174,9	-COOH	-----
14	41,3	>C<	-----	<b>Gal-(1<math>\rightarrow</math>2)-GlcA</b>			
15	34,7	-CH <sub>2</sub> -	1,58 1,83	1	103,8	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,39 <i>d</i> (7,7)
16	69,8	-CHOH-	4,57 <i>br s</i>	2	73,1	-CHOH-	4,35
17	44,5	>C<	-----	3	74,6	-CHOH-	4,03
18	40,7	>CH-	2,97 <i>dd</i> (12,8; 3,1)	4	69,6	-CHOH-	4,38
19	47,2	-CH <sub>2</sub> -	1,24 2,80 <i>dd</i> (13,8; 12,8)	5	76,5	-CHOH-	3,83 <i>m</i>
20	31,8	>C<	-----	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,25 4,33
21	41,4	-CH <sub>2</sub> -	1,93 2,75	<b>Ara-(1<math>\rightarrow</math>3)-GlcA</b>			
22	72,4	-CHOR-	6,09 <i>dd</i> (11,9; 6,0)	1	104,1	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,26 <i>d</i> (6,4)
23	27,7	-CH <sub>3</sub>	1,19 <i>s</i>	2	72,8	-CHOH-	4,38
24	16,5	-CH <sub>3</sub>	1,08 <i>s</i>	3	74,0	-CHOH-	4,05
25	15,4	-CH <sub>3</sub>	0,73 <i>s</i>	4	69,1	-CHOH-	4,16 <i>m</i>
26	16,6	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	5	66,9	-CH <sub>2</sub> OH	3,66 <i>dd</i> (12,6; 1,9) 4,28
27	27,3	-CH <sub>3</sub>	1,77 <i>s</i>				
28	63,4	-CH <sub>2</sub> OH	3,48 <i>d</i> (10,7) 3,63 <i>d</i> (10,7)				
29	33,2	-CH <sub>3</sub>	0,97 <i>s</i>				
30	24,9	-CH <sub>3</sub>	1,20 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

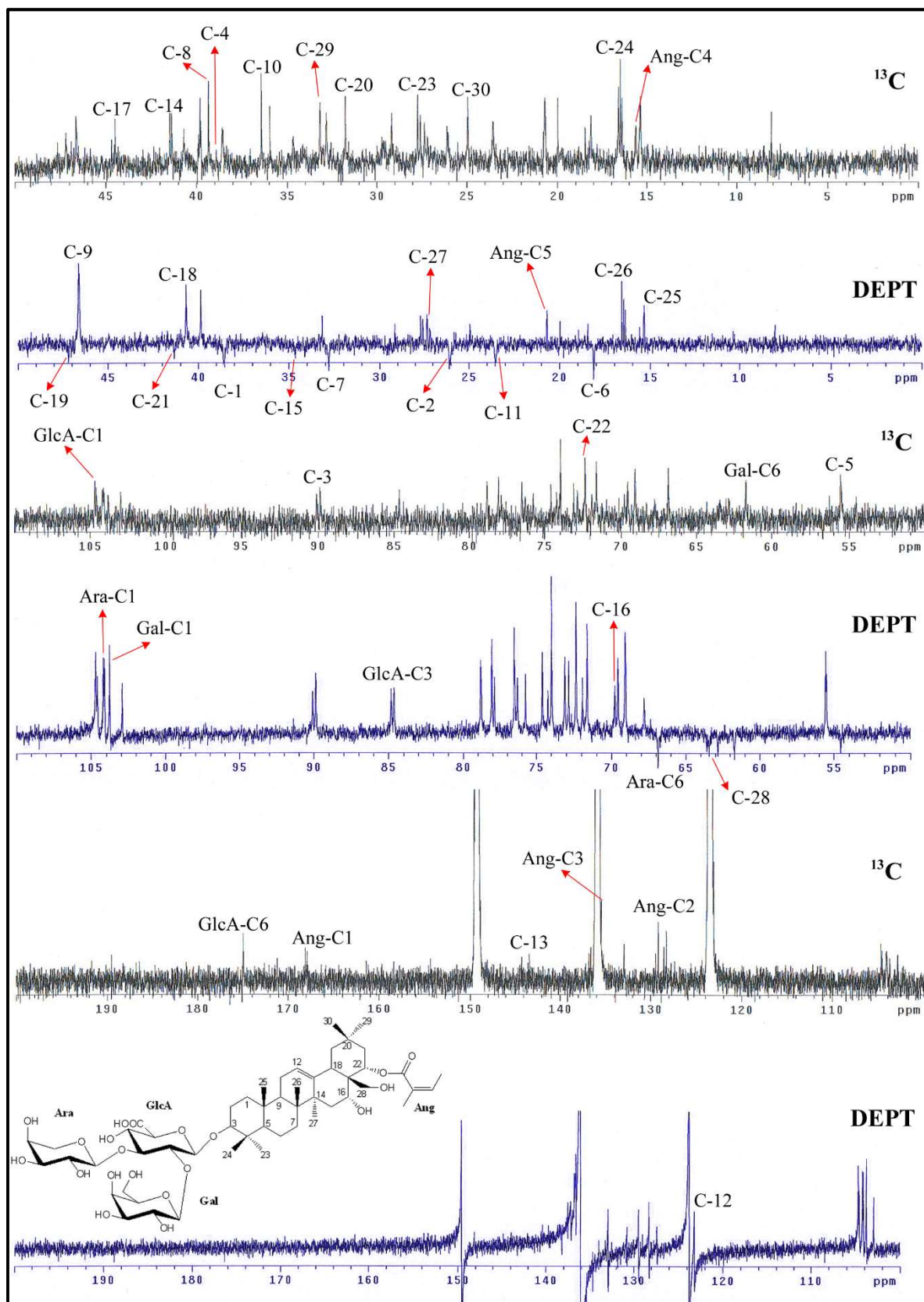


Figura 35. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P3.

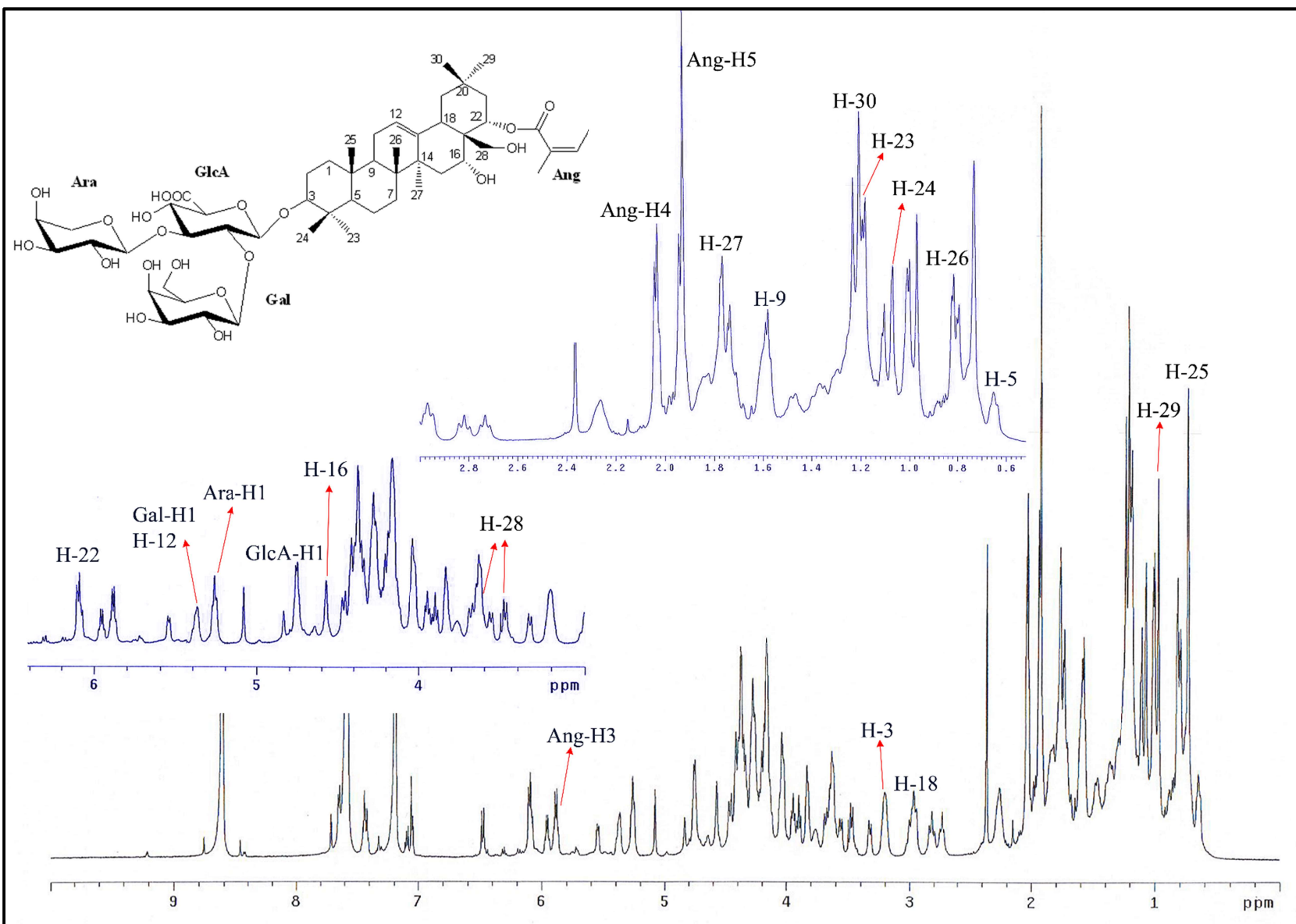


Figura 36. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P3.



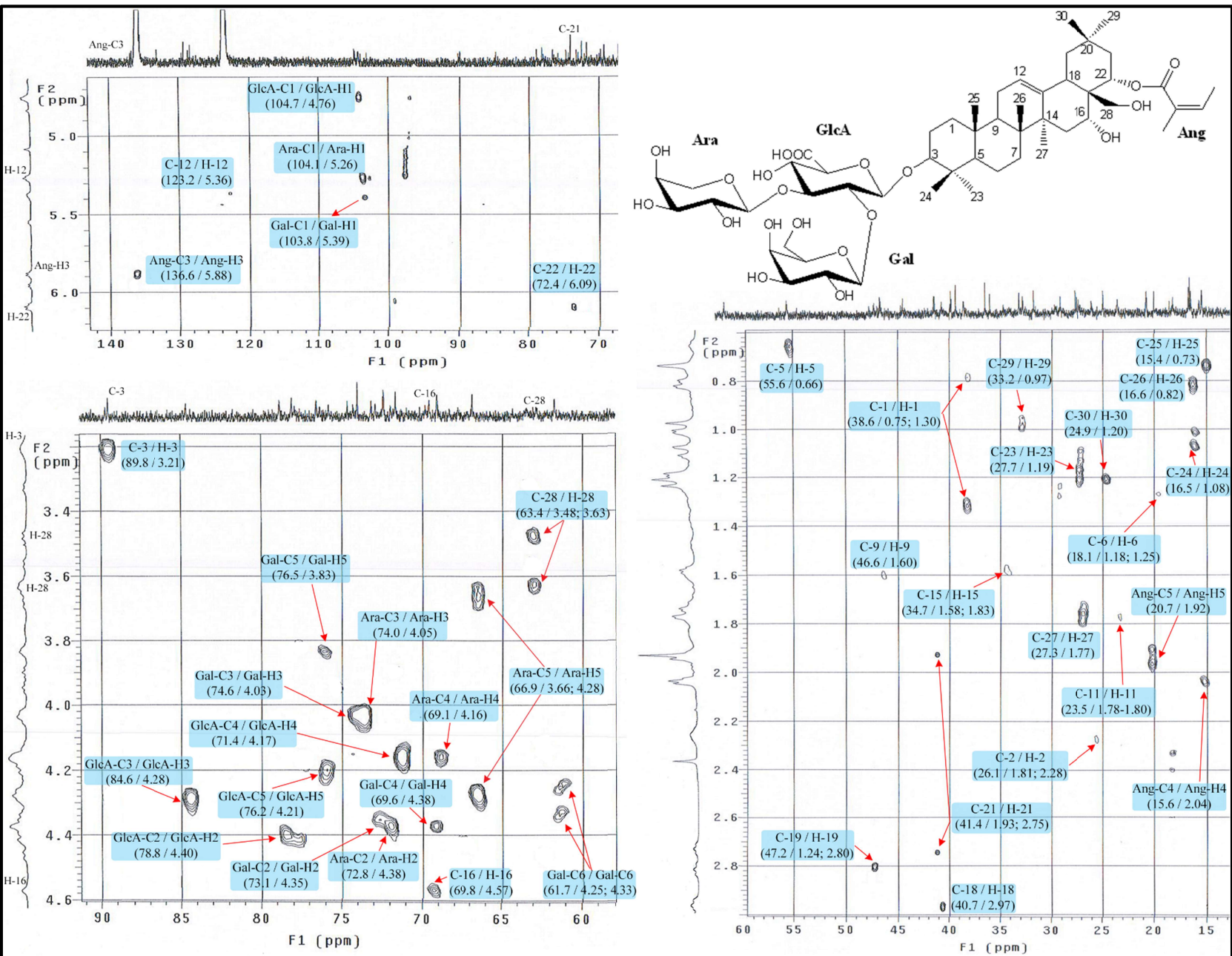


Figura 37. Espectro de HSQC del compuesto PT-P3.

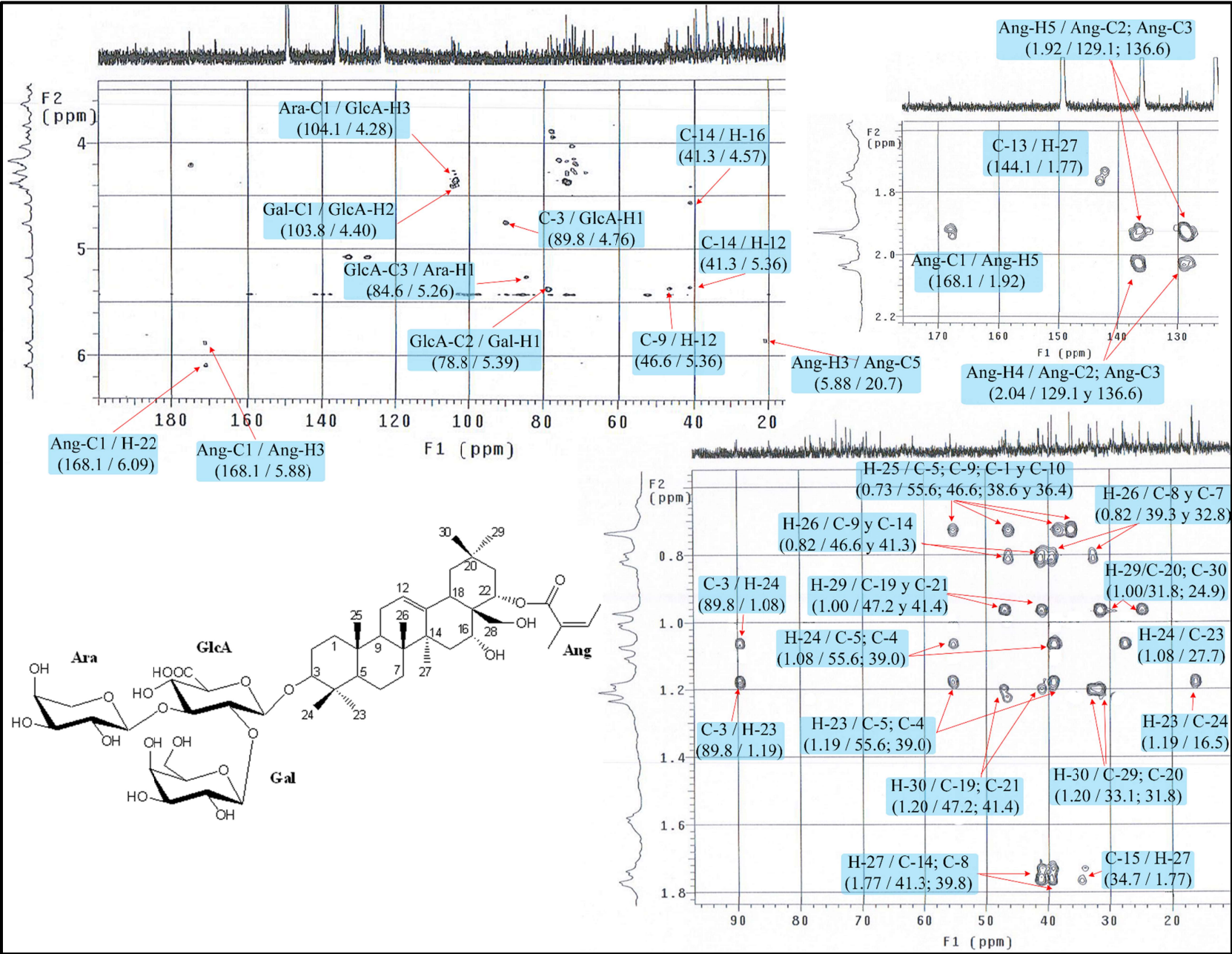


Figura 38. Espectro de HMBC del compuesto PT-P3.



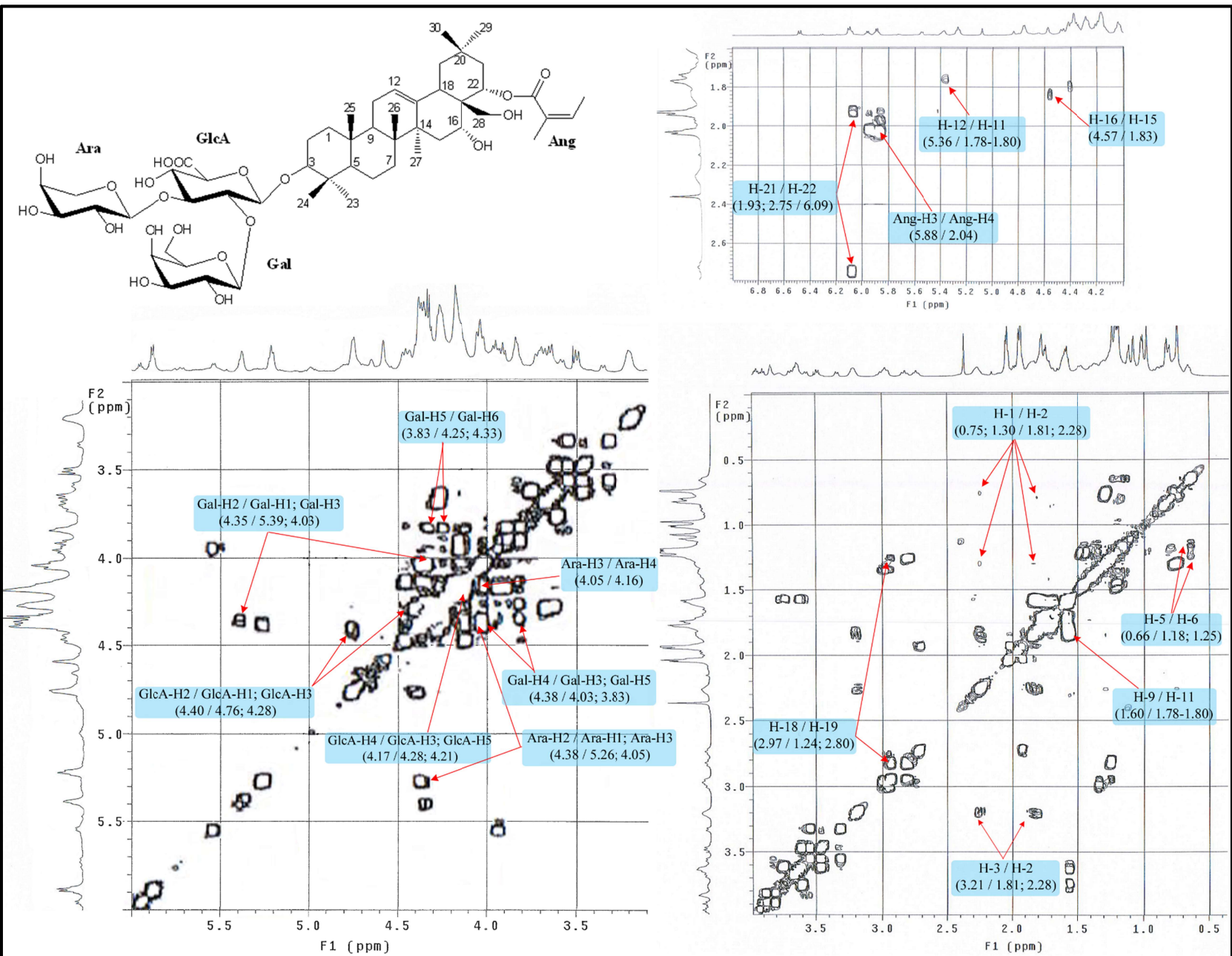


Figura 39. Espectro de COSY del compuesto PT-P3.

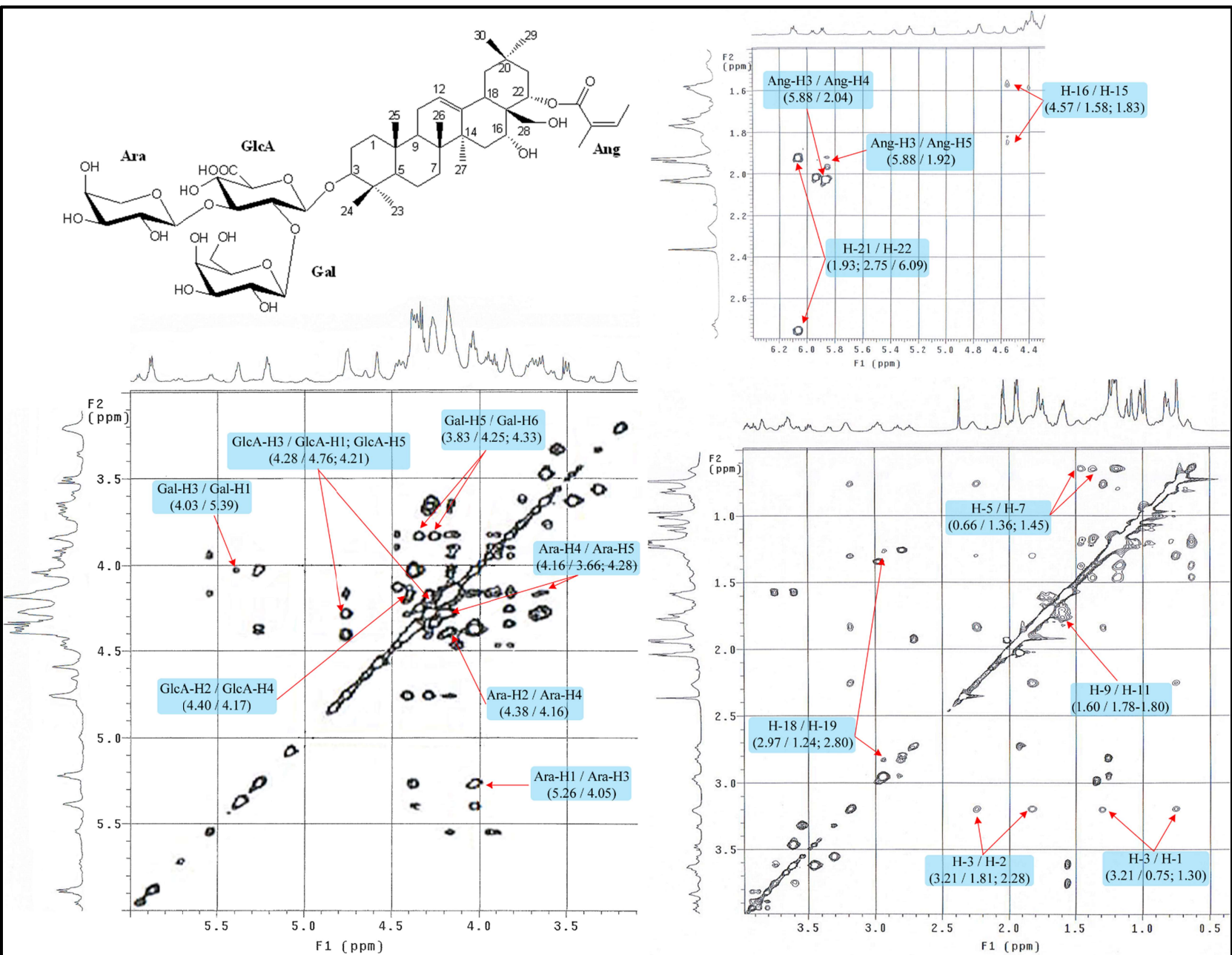


Figura 40. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P3.

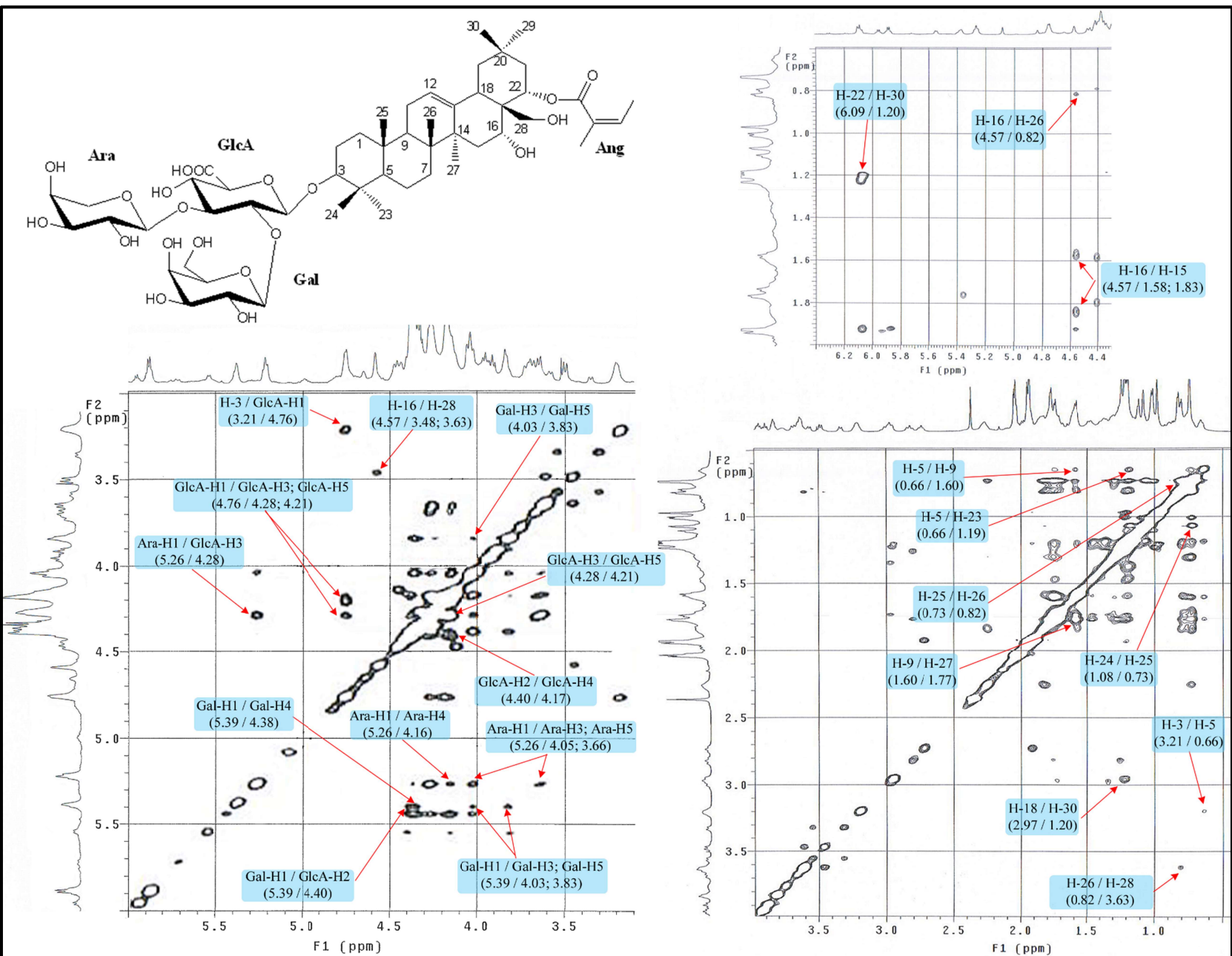
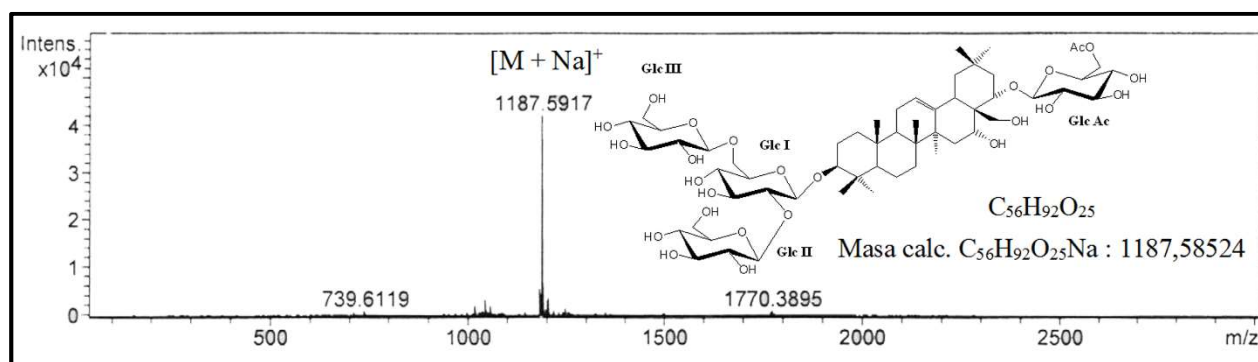


Figura 41. Espectro de NOESY del compuesto PT-P3.



**III.D. Compuesto PTV-P4:** 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosil-22-O-(6-acetoxi)- $\beta$ -D-glucopiranosilcameliagenina A.

Un sólido blanco con una masa de 5,9 mg fue aislado de la fracción F5 (reunión de las subfracciones F1m a F1o) de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ (esquema 2). El espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo positivo (HR-ESI-MS > 0) de este compuesto muestra un ion molecular a 1.187,5914 m/z ( $[M+Na]^+$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{56}H_{92}O_{25}Na$  (calc. 1.187,58254).



**Figura 42.** Espectro HR-ESI-MS < 0 del compuesto **PT-P4**.

Los espectros de RMN-1D y el HSQC (figura 46) permiten identificar 56 carbonos, que de acuerdo con los desplazamientos y las correlaciones observadas pueden agruparse en: 8 metilos, 8 metilenos, 3 metinos, 6 carbonos cuaternarios, 28 carbonos oxigenados (cinco metilenos y veintitrés metinos), 1 carbonilo y 2 carbonos con hibridación  $sp^2$  (uno metino y uno cuaternario) que indican un doble enlace C-C.

**Identificación del aglicón:**

La comparación de la data de los espectros RMN del compuesto con los desplazamientos químicos de **PT-P3** muestra que ambos compuestos tiene valores son muy similares en cuanto al triterpeno por lo que se puede identificar al aglicón de **PT-P4** como **cameliagenina A**. Esto fue comprobado con las correlaciones observadas en los espectros de RMN-2D del compuesto.

**Identificación de los azúcares:**

Los hidrógenos anoméricos y sus correspondientes carbonos fueron ubicados con el espectro HSQC (figura 46) del compuesto **PT-P4**, hallándose que dicho compuesto posee 4 moléculas de azúcar con los siguientes anómeros:  $\delta_C/\delta_H$  104,3/5,02 (doblete,  $J = 7,2$  Hz);

104,6/4,71 (doblete,  $J = 8,1$  Hz); 105,2/4,91 (doblete,  $J = 8,3$  Hz) y 105,8/5,12 (doblete,  $J = 6,7$  Hz).

La identificación de las cuatro unidades de monosacáridos se realizó con la data proporcionada por los espectros de RMN-1D y 2-D del compuesto, encontrándose que la estructura posee **tres unidades de  $\beta$ -D-glucosa** (Glc I, Glc II y Glc III) y **una unidad de 6-acetoxi- $\beta$ -D-glucosa** (Glc Ac) (Agrawal, 1992; Mitaine-Offer *et al.*, 2010). La secuencia glicosídica se determinó con los espectros de HMBC (figura 47) y NOESY (figura 50), en los cuales se puede observar las siguientes correlaciones para los hidrógenos anóméricos:

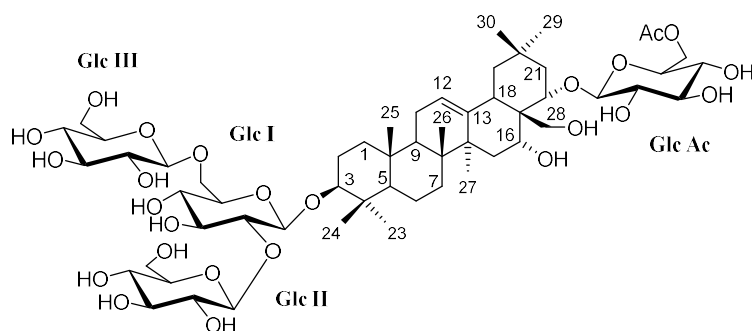
	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H/\delta_C$ )
Glc I:	4,71 (Glc I-H1) / 3,13 (Gen-H3)	4,71 (Glc I-H1) / 89,4 (Gen-C3)
Glc II:	5,12 (Glc II-H1) / 3,94 (Glc I-H2)	5,12 (Glc II-H1) / 83,1 (Glc I-C2)
Glc III:	4,91 (Glc III-H1) / 4,18; 4,66 (Glc I-H6)	4,91 (Glc III-H1) / 69,6 (Glc I-C6)
Glc Ac:	5,02 (Glc Ac-H1) / 4,52 (Gen-H22)	5,02 (Glc Ac-H1) / 84,8 (Gen-C22)

Estas correlaciones indican que en el carbono C-3 ( $\delta_C$  89,4) se encuentran enlazadas tres unidades de  $\beta$ -D-glucosa mediante la secuencia [Glc II-(1 $\rightarrow$ 2)]-[Glc III-(1 $\rightarrow$ 6)]-Glc I donde Glc I está unido al C-3 de la genina; mientras que la cuarta unidad de glucosa, la 6-acetoxi- $\beta$ -D-glucosa (Glc Ac), se encuentra unida al triterpeno en la posición C-22 ( $\delta_C$  84,8).

### Conclusión:

Todos los datos permitieron determinar que la estructura del compuesto **PT-P4** era el **3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopiranosil-22-O-(6-acetoxi)- $\beta$ -D-glucopiranosilcameliagenina A** (figura 43). Esta es la primera vez que se aísla esta saponina triterpénica como producto natural.

Cabe destacar que en las saponinas derivadas de la cameliagenina A, el carbono C-22 del triterpeno suele estar sustituido generalmente por un grupo angeloxi o dimetilacriloxi, por lo que la presencia de una unidad de glucosa acetilada en dicha posición es inusual. Adicionalmente, la secuencia de oligosacáridos de este compuesto en C-3 no ha sido descrita con anterioridad dentro del género *Pittosporum*, ya que en este género las geninas suelen estar glicosidadas en C-3 con una unidad de GlcA la cual a su vez suele estar sustituida en las posiciones 2 (por Glc o Gal), 3 (por Ara) y/o 4 (por Araf).



**Figura 43.** Estructura del compuesto **PT-P4**: 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-22-*O*-(6-acetoxi)- $\beta$ -*D*-glucopiranosilcameliagenina A.

**Tabla 8.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **PT-P4** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares y ácidos orgánicos			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,88	<b>22-O-Glc Ac</b>			
			1,49	1	104,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,02 <i>d</i> (7,4)
2	26,3	-CH <sub>2</sub> -	1,79	2	75,1	-CHOH-	3,94
			2,19	3	77,8	-CHOH-	4,17
3	89,4	-CHOH-	3,13 <i>dd</i> (12,4; 3,5)	4	71,0	-CHOH-	4,07
4	39,3	>C<	-----	5	74,6	-CHOH-	3,85 <i>m</i>
5	55,6	>CH-	0,58 <i>br d</i> (11,2)	6	64,5	-CH <sub>2</sub> OR	4,60 <i>dd</i> (11,9; 3,1)
6	18,2	-CH <sub>2</sub> -	1,15				4,73 <i>dd</i> (11,9; 1,6)
			1,34	<b>OAc-(1<math>\rightarrow</math>6)-Glc Ac</b>			
7	32,7	-CH <sub>2</sub> -	n.d.,	1	171,8	-COOR	-----
8	39,6	>C<	-----	2	20,7	-CH <sub>3</sub>	2,01 <i>s</i>
9	46,7	>CH-	1,59	<b>3-O-Glc I</b>			
10	36,6	>C<	-----	1	104,6	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,71 <i>d</i> (8,1)
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,72	2	83,1	-CHOR-	3,94
			1,78	3	77,7	-CHOH-	4,18
12	122,9	=CH-	5,26 <i>br s</i>	4	71,2	-CHOH-	3,99 <i>t</i> (8,8)
13	143,7	=C<	-----	5	76,0	-CHOH-	3,94 <i>m</i>
14	41,4	>C<	-----	6	69,6	-CH <sub>2</sub> OR	4,18
15	33,9	-CH <sub>2</sub> -	1,52				4,66 <i>dd</i> (11,9; 1,7)
			1,95 <i>br d</i> (14,5)	<b>Glc II-(1<math>\rightarrow</math>2)-Glc I</b>			
16	68,8	-CHOH-	4,95 <i>br s</i>	1	105,8	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,12 <i>d</i> (6,7)
17	n.d.,	>C<	-----	2	74,8	-CHOH-	3,92
18	41,8	>CH-	2,46 <i>dd</i> (12,6; 3,0)	3	77,2	-CHOH-	4,08 <i>t</i> (9,2)
19	47,2	-CH <sub>2</sub> -	1,14	4	71,2	-CHOH-	3,96
			2,70	5	77,6	-CHOH-	3,83 <i>m</i>
20	31,5	>C<	-----	6	62,0	-CH <sub>2</sub> OH	4,19
21	44,1	-CH <sub>2</sub> -	2,14				4,32 <i>dd</i> (11,8; 1,8)
			2,68	<b>Glc III-(1<math>\rightarrow</math>6)-Glc I</b>			
22	84,8	-CHOR-	4,52 <i>dd</i> (11,9; 5,8)	1	105,2	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,91 <i>d</i> (8,3)
23	27,7	-CH <sub>3</sub>	1,10 <i>s</i>	2	74,6	-CHOH-	3,90
24	16,4	-CH <sub>3</sub>	0,96 <i>s</i>	3	77,6	-CHOH-	4,10
25	15,4	-CH <sub>3</sub>	0,77 <i>s</i>	4	71,2	-CHOH-	3,98
26	16,5	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	5	77,7	-CHOH-	3,80 <i>m</i>
27	27,1	-CH <sub>3</sub>	1,68 <i>s</i>	6	62,2	-CH <sub>2</sub> OH	4,12
28	67,9	-CH <sub>2</sub> OH	3,62 <i>d</i> (11,0)				4,34 <i>dd</i> (11,4; 2,1)
			3,92 <i>d</i> (11,0)				
29	33,3	-CH <sub>3</sub>	0,87 <i>s</i>				
30	24,9	-CH <sub>3</sub>	1,07 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.



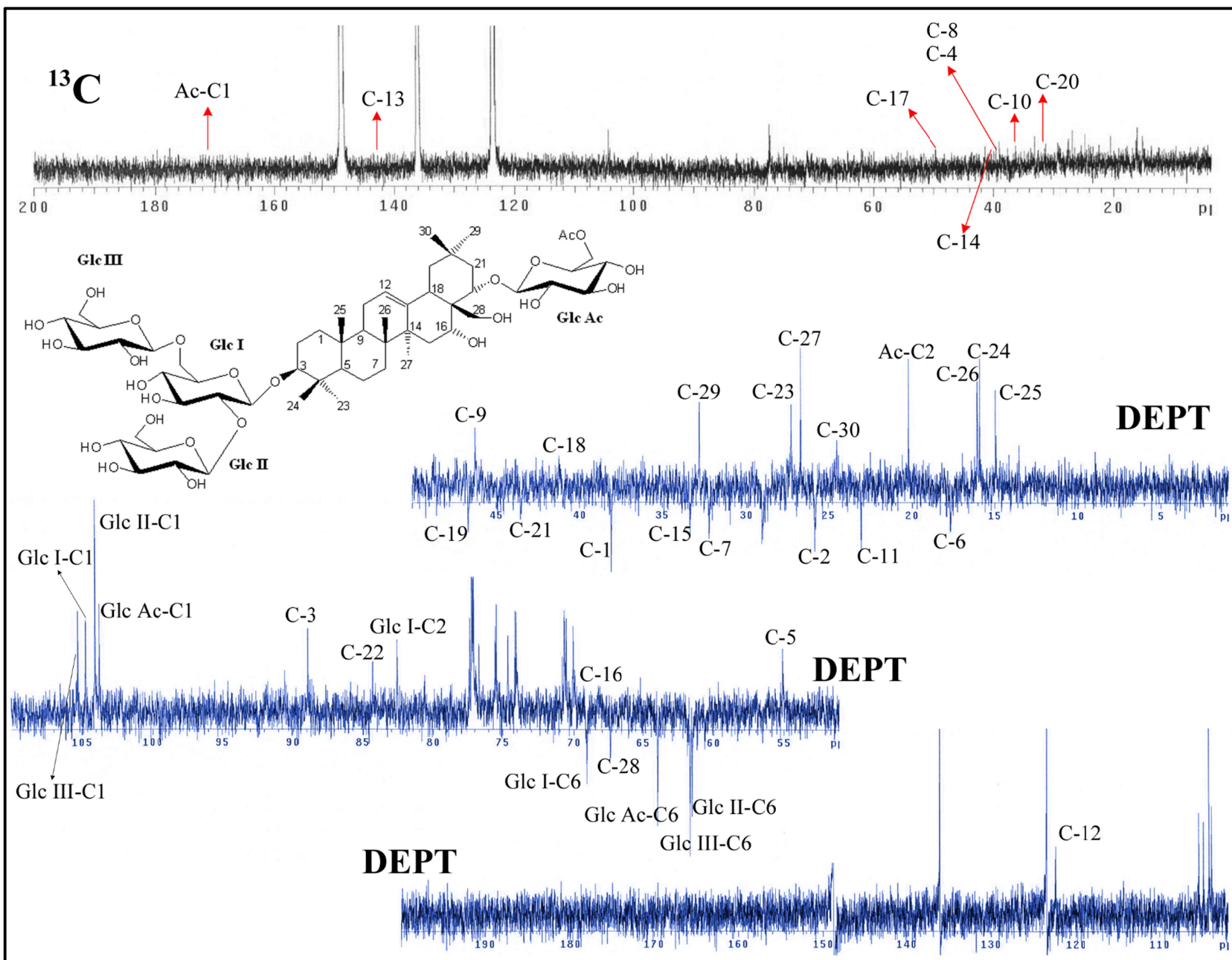


Figura 44. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P4.

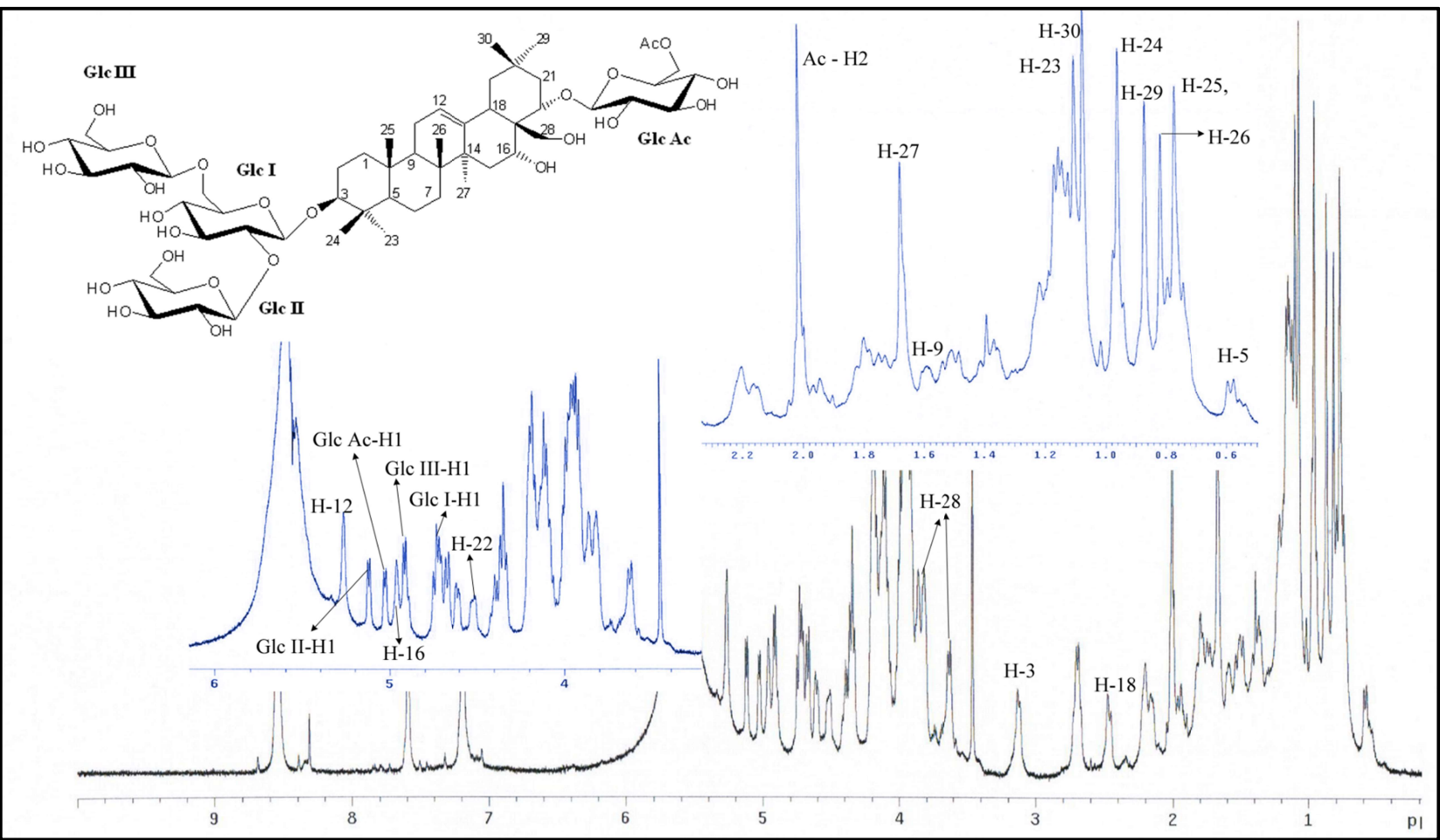


Figura 45. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P4.

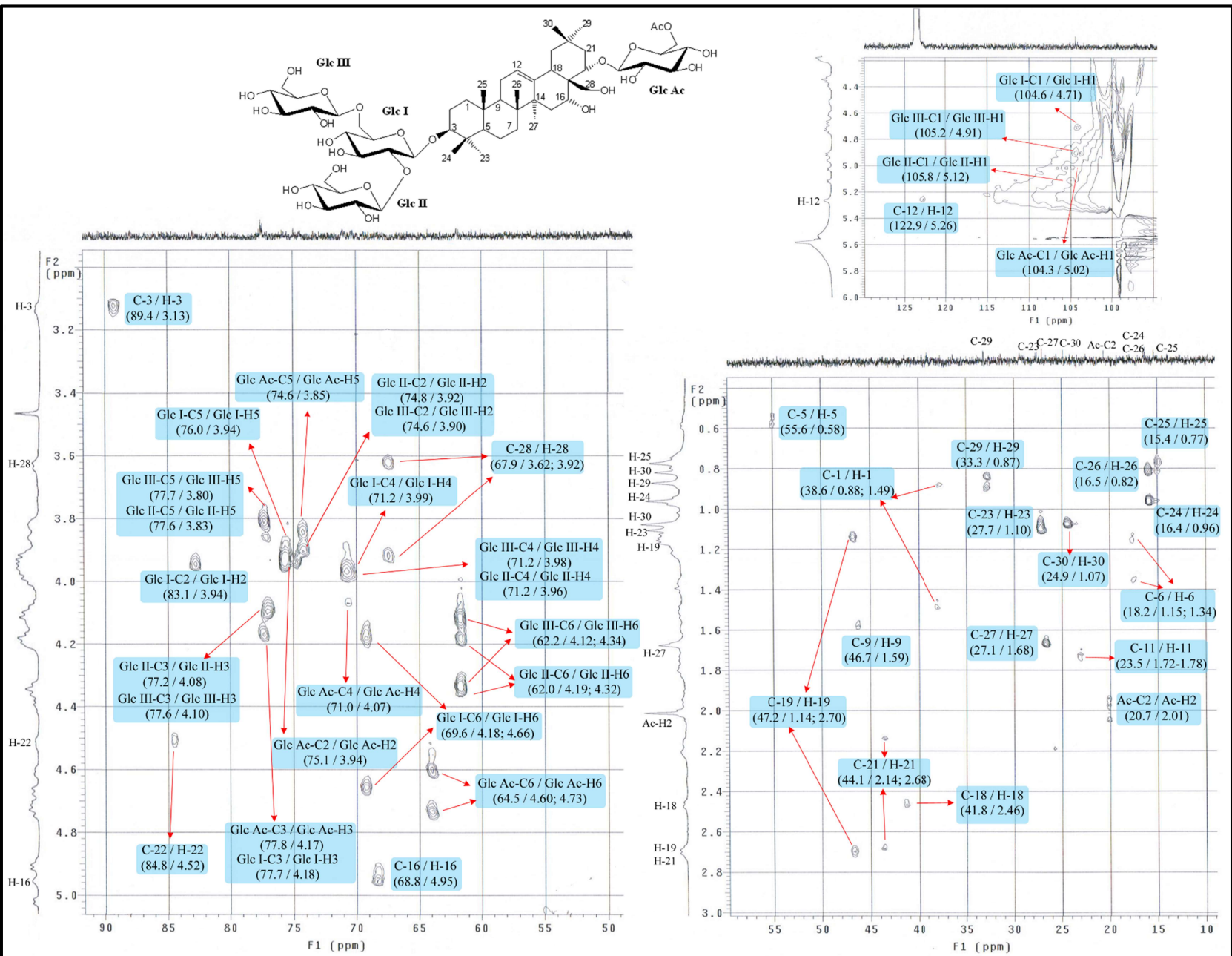


Figura 46. Espectro de HSQC del compuesto PT-P4.



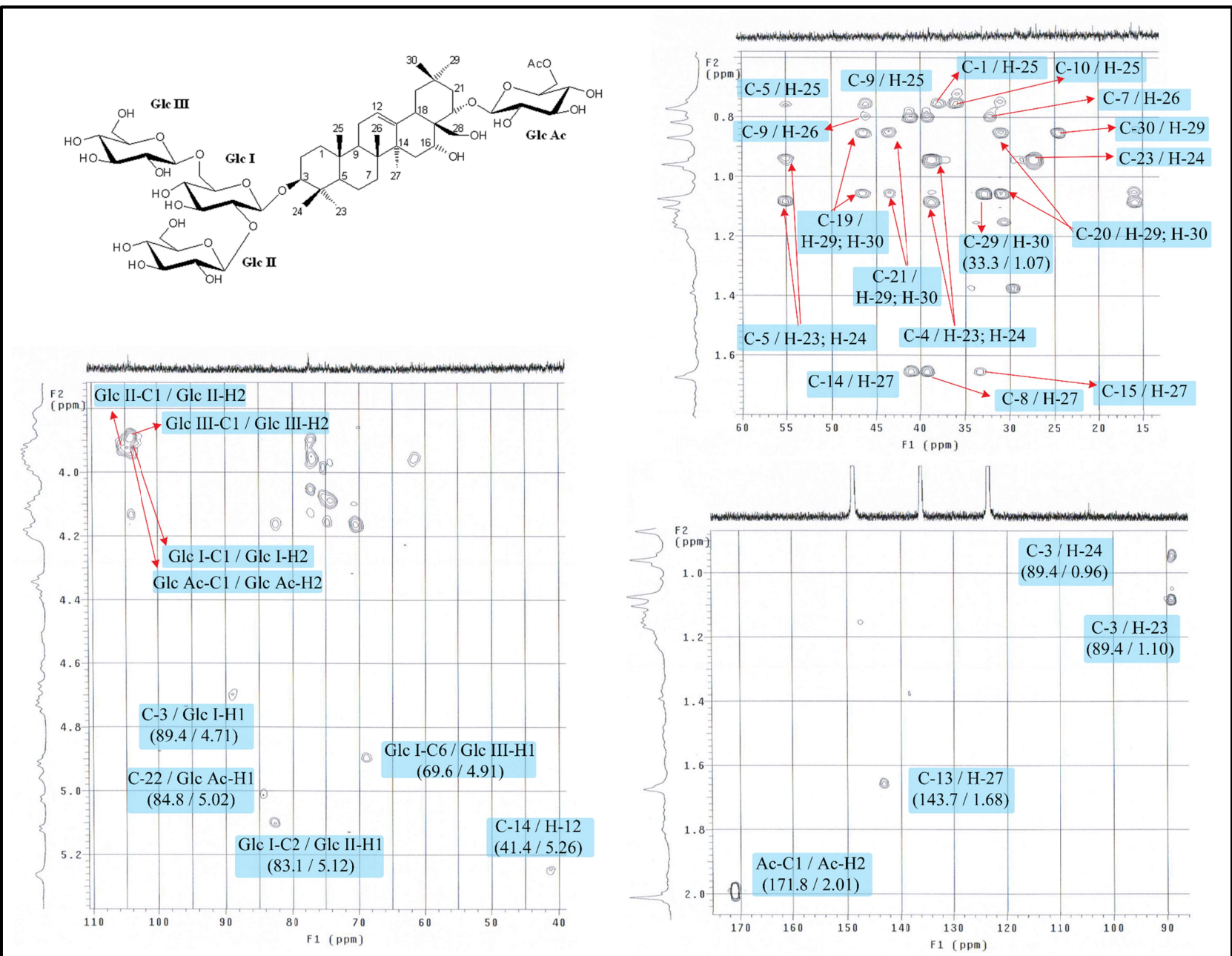


Figura 47. Espectro de HMBC del compuesto PT-P4.

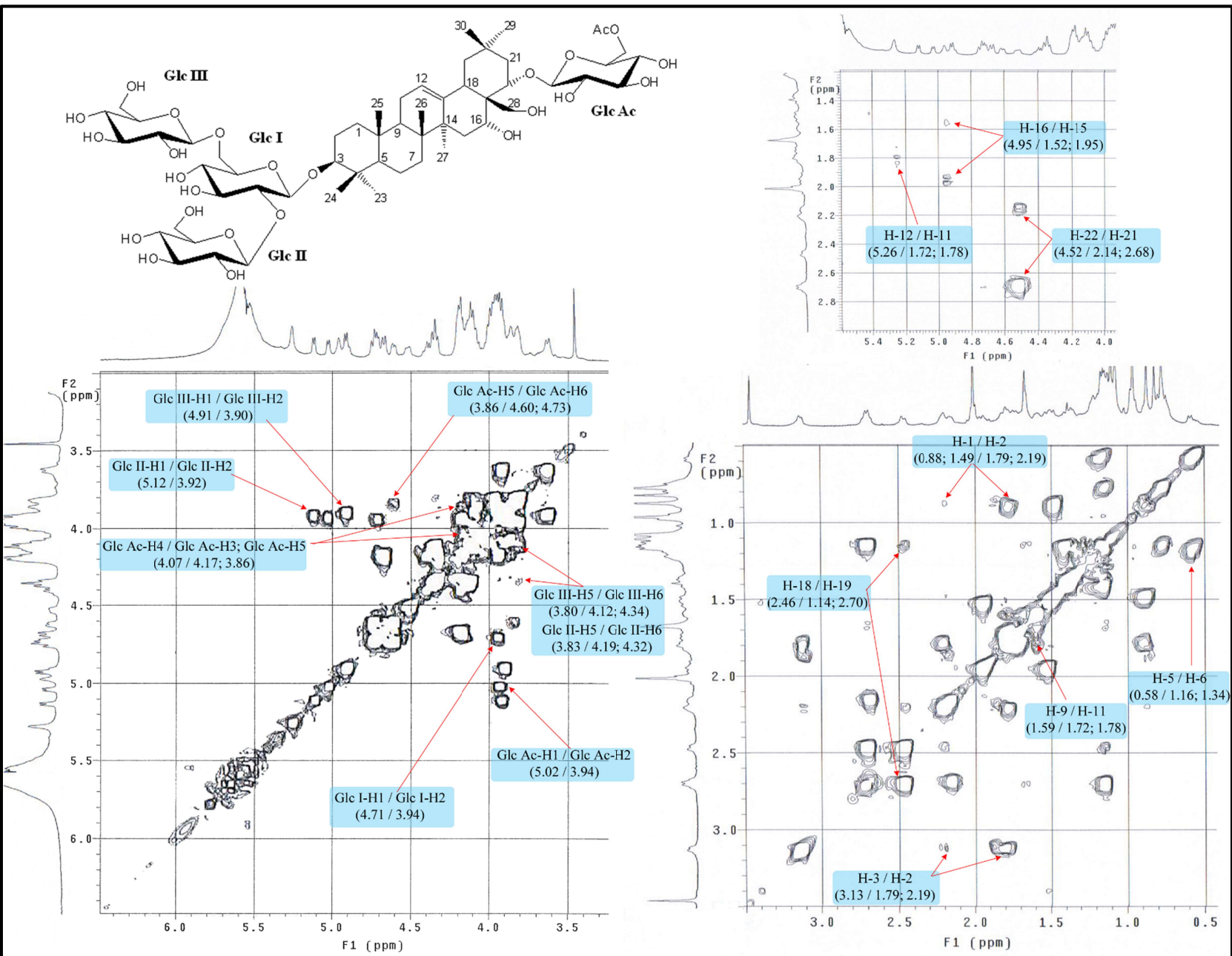


Figura 48. Espectro de COSY del compuesto PT-P4.

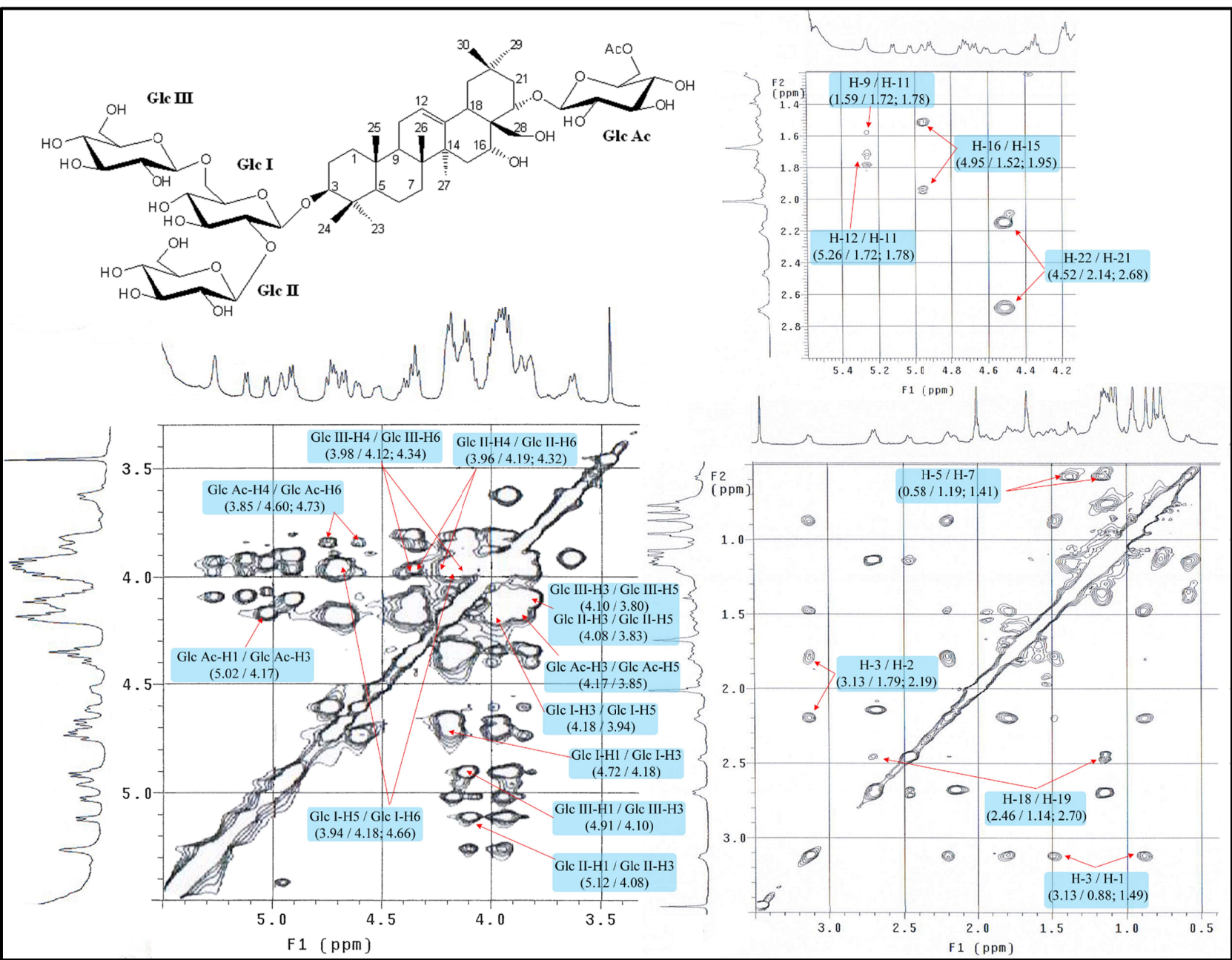


Figura 49. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P4.



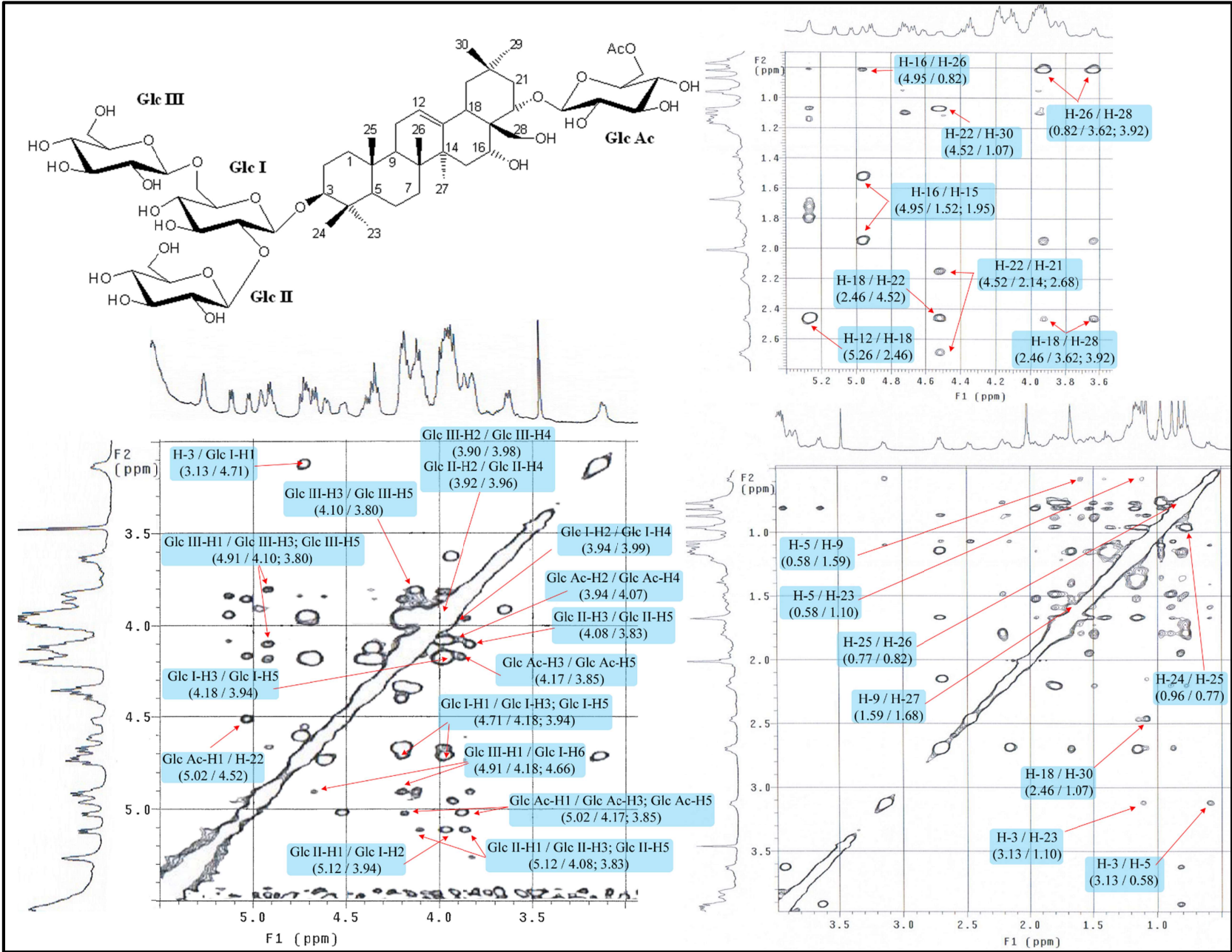
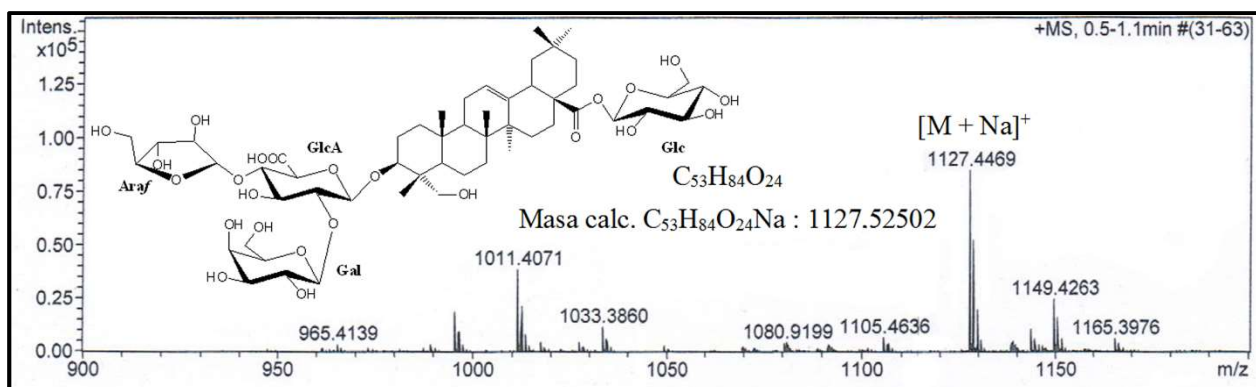


Figura 50. Espectro de NOESY del compuesto PT-P4.



**III.E. Compuesto PT-P5:** 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosilhederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo.

El compuesto **PT-P5**, sólido blanco, se obtuvo en la fracción PT1534 (7 mg) de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ a partir de la separación hecha por MPLC a la fracción PT153 (esquema 4); mientras que 5,4 mg de este compuesto fueron encontrados en la fracción F4t de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ (esquema 2). El espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo positivo (HR-ESI-MS > 0) presenta un ion molecular a 1.127,4469 m/z ( $[M+Na]^+$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{53}H_{84}O_{24}Na$  (calc. 1.127,52502).

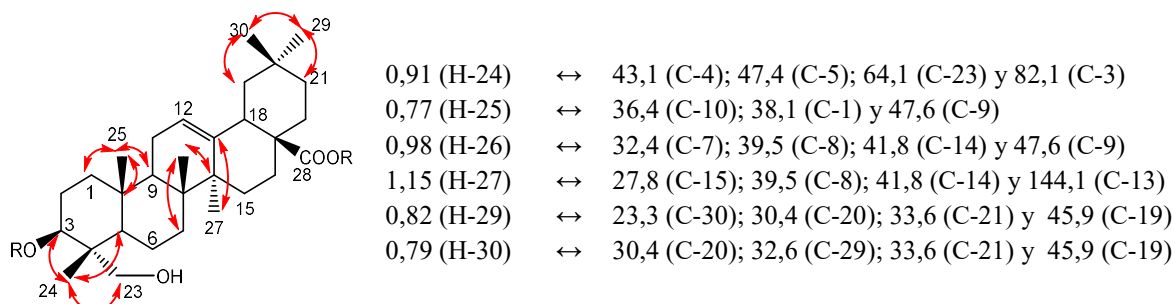


**Figura 51.** Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto **PT-P5**.

La revisión del espectro de los espectros de RMN-1D y del HSQC (figura 55) indicó que se trata de un compuesto con 53 carbonos, que pueden ser agrupados de la siguiente manera: 1 carbonilo, 2 carbonos  $sp^2$  correspondientes a un doble enlace C-C (uno metino y uno cuaternario), 24 grupos oxigenados (4 metilenos y 20 metinos), 6 metilos, 10 metilenos, 3 metinos y 6 carbonos cuaternarios.

**Identificación del aglicón:**

El esqueleto triterpénico pudo ser identificado como un derivado del oleanano con la data proporcionada por los espectros HSQC (figura 55) y HMBC (figura 56), ya que se pudieron establecer las siguientes correlaciones para los grupos metilo de la genina:



El enlace olefínico se fijó entre las posiciones C-12 y C-13 debido a la correlación en HMBC del hidrógeno a  $\delta_H$  1,15 (H-27) con el carbono cuaternario  $sp^2$  a  $\delta_C$  144,1 (C-13) y a las correlaciones del COSY (figura 57) y TOCSY (figura 58) de los hidrógenos en la posición H-11 ( $\delta_H$  1,76-1,79) con H-09 ( $\delta_H$  1,59) y H-12 ( $\delta_H$  5,34).

La correlación del metilo a  $\delta_H$  0,91 (H-24) con el carbono a  $\delta_C$  82,1 (C-3) permite ubicar una función oxigenada en el carbono C-3, esto se confirma también con las correlaciones observadas en los espectros COSY (figura 57) entre  $\delta_H$  4,01 (H-3) y los hidrógenos H-2 (1,82; 2,13) y en TOCSY (figura 58) entre H-3 ( $\delta_H$  4,01) y H-1 (0,68; 1,23). Adicionalmente, la correlación de los protones metílicos H-24 ( $\delta_H$  0,91) con los carbono a  $\delta_C$  64,1 (C-23) y la interacción entre C-3 ( $\delta_C$  82,1) y los hidrógenos metilénicos a  $\delta_H$  3,53/4,24 (H-23) indican que en la posición 23, que debería ser un metilo, se encuentra sustituida con un grupo hidroxilo.

Por último, se empleó el espectro NOESY (figura 59), para obtener la estereoquímica del esqueleto triterpénico, ubicando al protón H-3 ( $\delta_H$  4,01) y al metilo C-23 ( $\delta_C$  64,1) con orientación  $\alpha$  mediante las correlaciones observadas a  $\delta_H/\delta_H$  4,01/1,43 (H-3/H-5) y 4,01/3,53; 4,24 (H-5/H-23). El análisis detallado de los espectros bidimensionales de RMN y la comparación de los desplazamientos químicos con la bibliografía permitieron establecer el esqueleto triterpénico del compuesto **PT-P5** como el ácido  $3\beta,23\alpha$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico, conocido comúnmente con el nombre de **hederagenina** (Abe *et al.*, 1996).

### Identificación de los azúcares:

El análisis del espectro HSQC (figura 55) muestra la presencia de cuatro carbonos anoméricos que indican la presencia de 4 moléculas de glicósidos en la estructura. Los hidrógenos anoméricos se localizan a  $\delta_H$  4,94 (doblete,  $J = 7,4$  Hz); 5,16 (doblete,  $J = 7,6$  Hz); 6,02 (singulete ancho) y 6,15 (doblete,  $J = 8,3$  Hz), y se correlacionan con los carbonos anoméricos ubicados a  $\delta_C$  103,0; 105,5; 108,5 y 95,3 respectivamente.

La identificación de los azúcares empleando los espectros de RMN-2D permitió establecer la identidad de las moléculas de azúcar del compuesto **PT-P5** como **ácido  $\beta$ -D-glucorónico** (GlcA),  **$\beta$ -D-glucosa** (Glc),  **$\alpha$ -L-arabinofuranosa** (Araf) y  **$\beta$ -D-galactosa** (Gal) (Agrawal, 1992; Bäcker *et al.*, 2013).

Al observar los desplazamientos químicos del carbono anomérico de Glc ( $\delta_C/\delta_H$  95,3/6,15) se observa que los mismos son valores característicos de cuando un azúcar esta enlazada por una unión tipo éster (Elbandy *et al.*, 2004; Haddad *et al.*, 2004), por lo que este monosacárido estaba unido al esqueleto triterpénico por una unión tipo éster con el C-28.

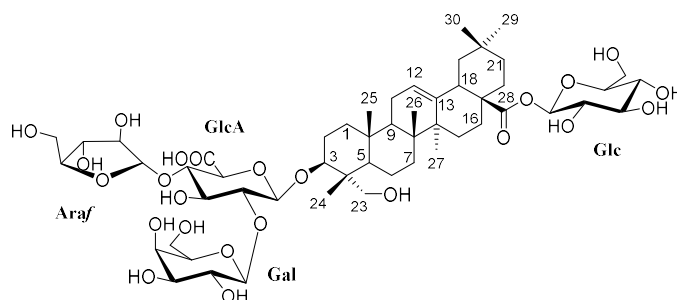
Esto fue confirmado con la correlación en el espectro HMBC (figura 56) entre el protón anomérico de la glucosa a  $\delta_H$  6,15 (*d*,  $J = 8,3$  Hz) y el carbono C-28 ( $\delta_C$  176,6) del aglicón. Por su parte, la secuencia glicosídica ubicada en el C-3 de la genina se estableció como [Gal-(1→2)]-[Araf-(1→4)]-GlcA mediante las correlaciones de los anómeros en HMBC (figura 56) y NOESY (figura 59) siguientes:

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H/\delta_C$ )
GlcA:	4,94 (GlcA-H1) / 4,01 (Gen-H3)	4,94 (GlcA-H1) / 82,1 (Gen-C3)
Gal:	5,16 (Gal-H1) / 4,12 (GlcA-H2)	5,16 (Gal-H1) / 82,4 (GlcA-C2)
Araf:	6,05 (Araf-H1) / 4,49 (GlcA-H3)	4,49 (GlcA-H4) / 108,5 (Araf-C1)

### Conclusión:

Los datos obtenidos en los experimentos de RMN 1D y 2D permitieron determinar que la estructura del compuesto **PT-P5** es el **3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1→4)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-hederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo** (figura 52).

El esqueleto triterpénico hederagenina ha sido reportado previamente en *P. brevicalyx* (Hongtong *et al.*, 1986), sin embargo es la primera vez que se reporta un glicósido de hederagenina dentro del género *Pittosporum*. La secuencia glicosídica es similar a la reportada para las especies de *P. angustifolium* (Bäcker *et al.*, 2014c) y *P. senacia* (Linnek *et al.*, 2012).



**Figura 52.** Estructura del compuesto **PT-P5**: 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1→2)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1→4)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosilhederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo.

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto **PT-P5** en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Aglicón				Azúcares																																																																																																																																																																																																																																	
Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]																																																																																																																																																																																																																														
1	38,1	-CH <sub>2</sub> -	0,68	28- <i>O</i> -Glc	1	95,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,15 <i>d</i> (8,3)																																																																																																																																																																																																																													
			1,23						2	25,3	-CH <sub>2</sub> -	1,82	2	73,5	-CHOH-	4,10	2,13	3	82,1	-CHOH-	4,01	3	78,1	-CHOH-	4,21	4	43,1	>C<	-----	4	70,6	-CHOH-	4,21	5	47,4	>CH-	1,43 <i>br d</i> (11,0)	5	78,8	-CHOH-	3,95 <i>m</i>	6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,19	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,25	1,60	7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,23	3- <i>O</i> -GlcA	1	103,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,94 <i>d</i> (7,4)	1,55	8	39,5	>C<	-----	2	82,4	-CHOR-	4,25	9	47,6	>CH-	1,59	3	75,8	-CHOH-	4,11	10	36,4	>C<	-----	4	78,1	-CHOR-	4,49	11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,76 - 1,79	5	77,5	-CHOH-	4,27 <i>d</i>	12	122,6	=CH-	5,34 <i>br s</i>	6	n.d.	-COOH	-----	13	144,1	=C<	-----	Gal(1→2)-GlcA	1	105,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,16 <i>d</i> (7,6)	14	41,8	>C<	-----	15	27,8	-CH <sub>2</sub> -	1,09	2	73,5	-CHOH-	4,41 <i>dd</i> (7,6; 6,4)	2,18	16	23,0	-CH <sub>2</sub> -	1,86	3	74,4	-CHOH-	4,01	1,98 <i>dd</i> (12,4; 11,9)	17	46,7	>C<	-----	4	69,2	-CHOH-	4,45 <i>dd</i> (3,0; 1,6)	18	41,4	>CH-	3,08 <i>dd</i> (12,4; 3,4)	5	76,5	-CHOH-	3,91	19	45,9	-CH <sub>2</sub> -	1,16	6	61,2	-CH <sub>2</sub> OH	4,33 <i>dd</i> (11,4; 5,0)	1,66 <i>dd</i> (12,4; 12,1)	20	30,4	>C<	-----	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>	21	33,6	-CH <sub>2</sub> -	1,00	22	32,3	-CH <sub>2</sub> -	1,24	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>	1,63	23	64,1	-CH <sub>2</sub> OH	1,71	3	77,8	-CHOH-	4,55 <i>m</i>	3,53 <i>d</i> (10,7)	24	13,1	-CH <sub>3</sub>	0,91 <i>s</i>	4	85,9	-CHOH-	4,78 <i>q</i>	4,24 <i>d</i> (10,7)	25	15,7	-CH <sub>3</sub>	0,77 <i>s</i>	5	62,3	-CH <sub>2</sub> OH	4,00	26	17,2	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>	27	25,8	-CH <sub>3</sub>	1,15 <i>s</i>	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>	28	176,6	-COOR	-----	29	32,7	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>
2	25,3	-CH <sub>2</sub> -	1,82	2	73,5	-CHOH-	4,10																																																																																																																																																																																																																														
			2,13					3	82,1	-CHOH-	4,01	3	78,1	-CHOH-	4,21	4	43,1	>C<	-----	4	70,6	-CHOH-	4,21	5	47,4	>CH-	1,43 <i>br d</i> (11,0)	5	78,8	-CHOH-	3,95 <i>m</i>	6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,19	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,25	1,60	7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,23	3- <i>O</i> -GlcA	1	103,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,94 <i>d</i> (7,4)	1,55	8	39,5	>C<	-----	2	82,4	-CHOR-	4,25	9	47,6	>CH-	1,59	3	75,8	-CHOH-	4,11	10	36,4	>C<	-----	4	78,1	-CHOR-	4,49	11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,76 - 1,79	5	77,5	-CHOH-	4,27 <i>d</i>	12	122,6	=CH-	5,34 <i>br s</i>	6	n.d.	-COOH	-----	13	144,1	=C<	-----	Gal(1→2)-GlcA	1	105,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,16 <i>d</i> (7,6)	14	41,8	>C<	-----	15	27,8	-CH <sub>2</sub> -	1,09	2	73,5	-CHOH-	4,41 <i>dd</i> (7,6; 6,4)	2,18	16	23,0	-CH <sub>2</sub> -	1,86	3	74,4	-CHOH-	4,01	1,98 <i>dd</i> (12,4; 11,9)	17	46,7	>C<	-----	4	69,2	-CHOH-	4,45 <i>dd</i> (3,0; 1,6)	18	41,4	>CH-	3,08 <i>dd</i> (12,4; 3,4)	5	76,5	-CHOH-	3,91	19	45,9	-CH <sub>2</sub> -	1,16	6	61,2	-CH <sub>2</sub> OH	4,33 <i>dd</i> (11,4; 5,0)	1,66 <i>dd</i> (12,4; 12,1)	20	30,4	>C<	-----	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>	21	33,6	-CH <sub>2</sub> -	1,00	22	32,3	-CH <sub>2</sub> -	1,24	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>	1,63	23	64,1	-CH <sub>2</sub> OH	1,71	3	77,8	-CHOH-	4,55 <i>m</i>	3,53 <i>d</i> (10,7)	24	13,1	-CH <sub>3</sub>	0,91 <i>s</i>	4	85,9	-CHOH-	4,78 <i>q</i>	4,24 <i>d</i> (10,7)	25	15,7	-CH <sub>3</sub>	0,77 <i>s</i>	5	62,3	-CH <sub>2</sub> OH	4,00	26	17,2	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>	27	25,8	-CH <sub>3</sub>	1,15 <i>s</i>	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>	28	176,6	-COOR	-----	29	32,7	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>	30	23,3	-CH <sub>3</sub>	0,79 <i>s</i>	3	77,8	-CHOH-	4,55 <i>m</i>		
3	82,1	-CHOH-	4,01	3	78,1	-CHOH-	4,21																																																																																																																																																																																																																														
4	43,1	>C<	-----	4	70,6	-CHOH-	4,21																																																																																																																																																																																																																														
5	47,4	>CH-	1,43 <i>br d</i> (11,0)	5	78,8	-CHOH-	3,95 <i>m</i>																																																																																																																																																																																																																														
6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,19	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,25																																																																																																																																																																																																																														
			1,60																																																																																																																																																																																																																																		
7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,23	3- <i>O</i> -GlcA	1	103,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,94 <i>d</i> (7,4)																																																																																																																																																																																																																													
			1,55																																																																																																																																																																																																																																		
8	39,5	>C<	-----	2	82,4	-CHOR-	4,25																																																																																																																																																																																																																														
9	47,6	>CH-	1,59	3	75,8	-CHOH-	4,11																																																																																																																																																																																																																														
10	36,4	>C<	-----	4	78,1	-CHOR-	4,49																																																																																																																																																																																																																														
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,76 - 1,79	5	77,5	-CHOH-	4,27 <i>d</i>																																																																																																																																																																																																																														
12	122,6	=CH-	5,34 <i>br s</i>	6	n.d.	-COOH	-----																																																																																																																																																																																																																														
13	144,1	=C<	-----	Gal(1→2)-GlcA	1	105,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,16 <i>d</i> (7,6)																																																																																																																																																																																																																													
14	41,8	>C<	-----																																																																																																																																																																																																																																		
15	27,8	-CH <sub>2</sub> -	1,09	2	73,5	-CHOH-	4,41 <i>dd</i> (7,6; 6,4)																																																																																																																																																																																																																														
			2,18																																																																																																																																																																																																																																		
16	23,0	-CH <sub>2</sub> -	1,86	3	74,4	-CHOH-	4,01																																																																																																																																																																																																																														
			1,98 <i>dd</i> (12,4; 11,9)																																																																																																																																																																																																																																		
17	46,7	>C<	-----	4	69,2	-CHOH-	4,45 <i>dd</i> (3,0; 1,6)																																																																																																																																																																																																																														
18	41,4	>CH-	3,08 <i>dd</i> (12,4; 3,4)	5	76,5	-CHOH-	3,91																																																																																																																																																																																																																														
19	45,9	-CH <sub>2</sub> -	1,16	6	61,2	-CH <sub>2</sub> OH	4,33 <i>dd</i> (11,4; 5,0)																																																																																																																																																																																																																														
			1,66 <i>dd</i> (12,4; 12,1)																																																																																																																																																																																																																																		
20	30,4	>C<	-----	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>																																																																																																																																																																																																																													
21	33,6	-CH <sub>2</sub> -	1,00																																																																																																																																																																																																																																		
22	32,3	-CH <sub>2</sub> -	1,24	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>																																																																																																																																																																																																																														
			1,63																																																																																																																																																																																																																																		
23	64,1	-CH <sub>2</sub> OH	1,71	3	77,8	-CHOH-	4,55 <i>m</i>																																																																																																																																																																																																																														
			3,53 <i>d</i> (10,7)																																																																																																																																																																																																																																		
24	13,1	-CH <sub>3</sub>	0,91 <i>s</i>	4	85,9	-CHOH-	4,78 <i>q</i>																																																																																																																																																																																																																														
			4,24 <i>d</i> (10,7)																																																																																																																																																																																																																																		
25	15,7	-CH <sub>3</sub>	0,77 <i>s</i>	5	62,3	-CH <sub>2</sub> OH	4,00																																																																																																																																																																																																																														
26	17,2	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>																																																																																																																																																																																																																																		
27	25,8	-CH <sub>3</sub>	1,15 <i>s</i>	Araf-(1→4)-GlcA	1	108,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,00 <i>br s</i>																																																																																																																																																																																																																													
28	176,6	-COOR	-----																																																																																																																																																																																																																																		
29	32,7	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>	2	82,1	-CHOH-	4,80 <i>br s</i>																																																																																																																																																																																																																														
30	23,3	-CH <sub>3</sub>	0,79 <i>s</i>	3	77,8	-CHOH-	4,55 <i>m</i>																																																																																																																																																																																																																														

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

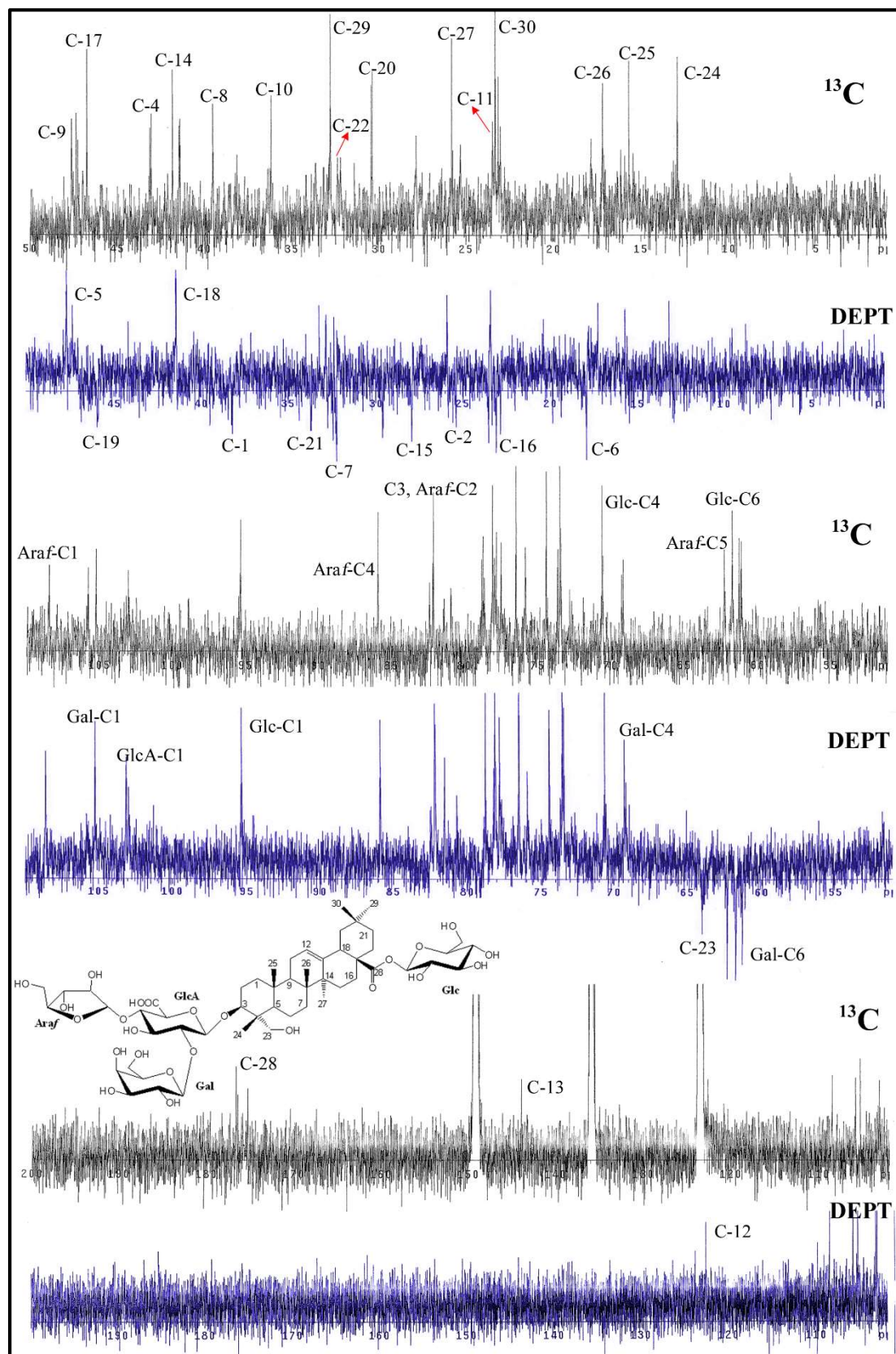


Figura 53. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P5.



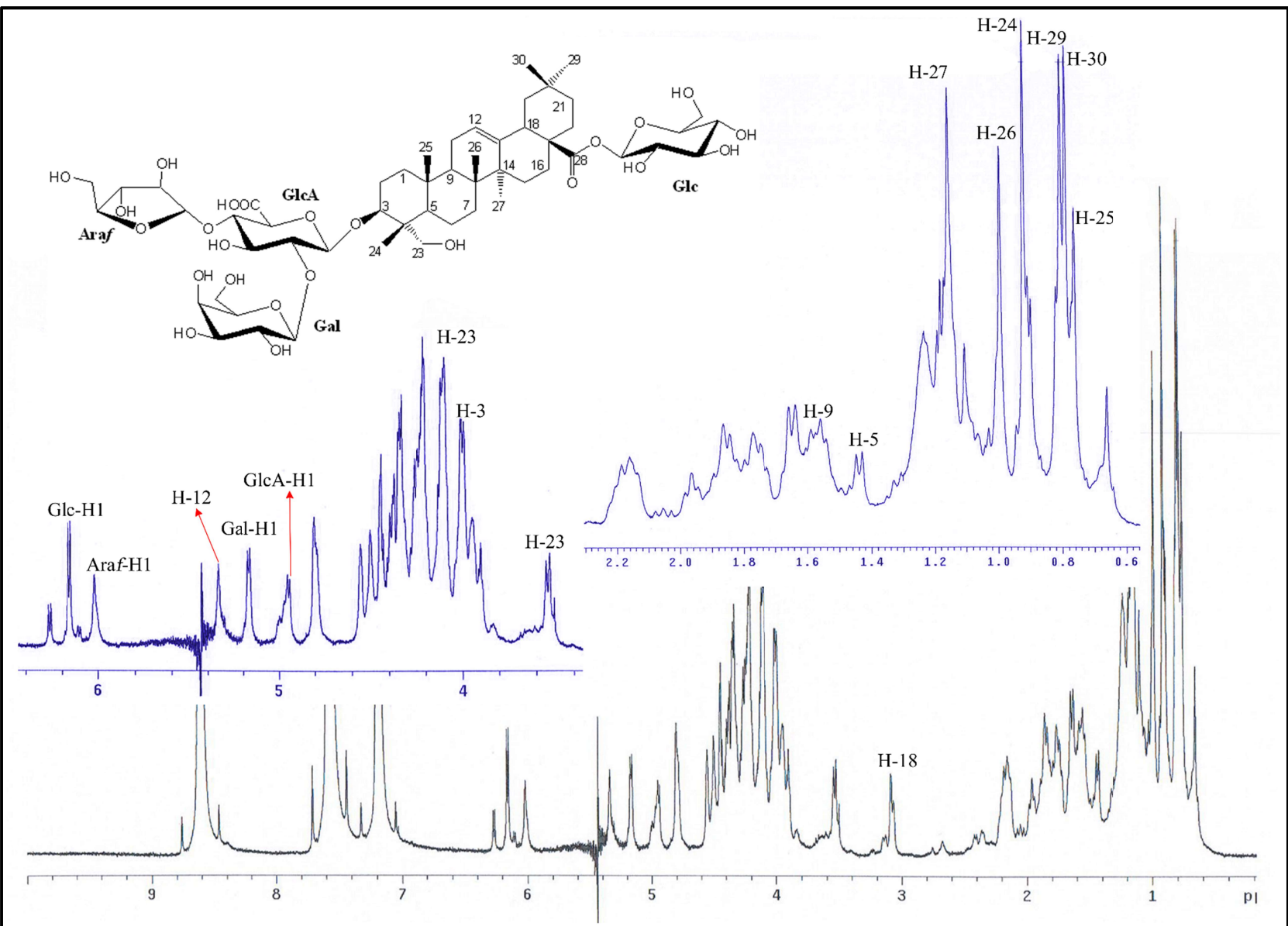
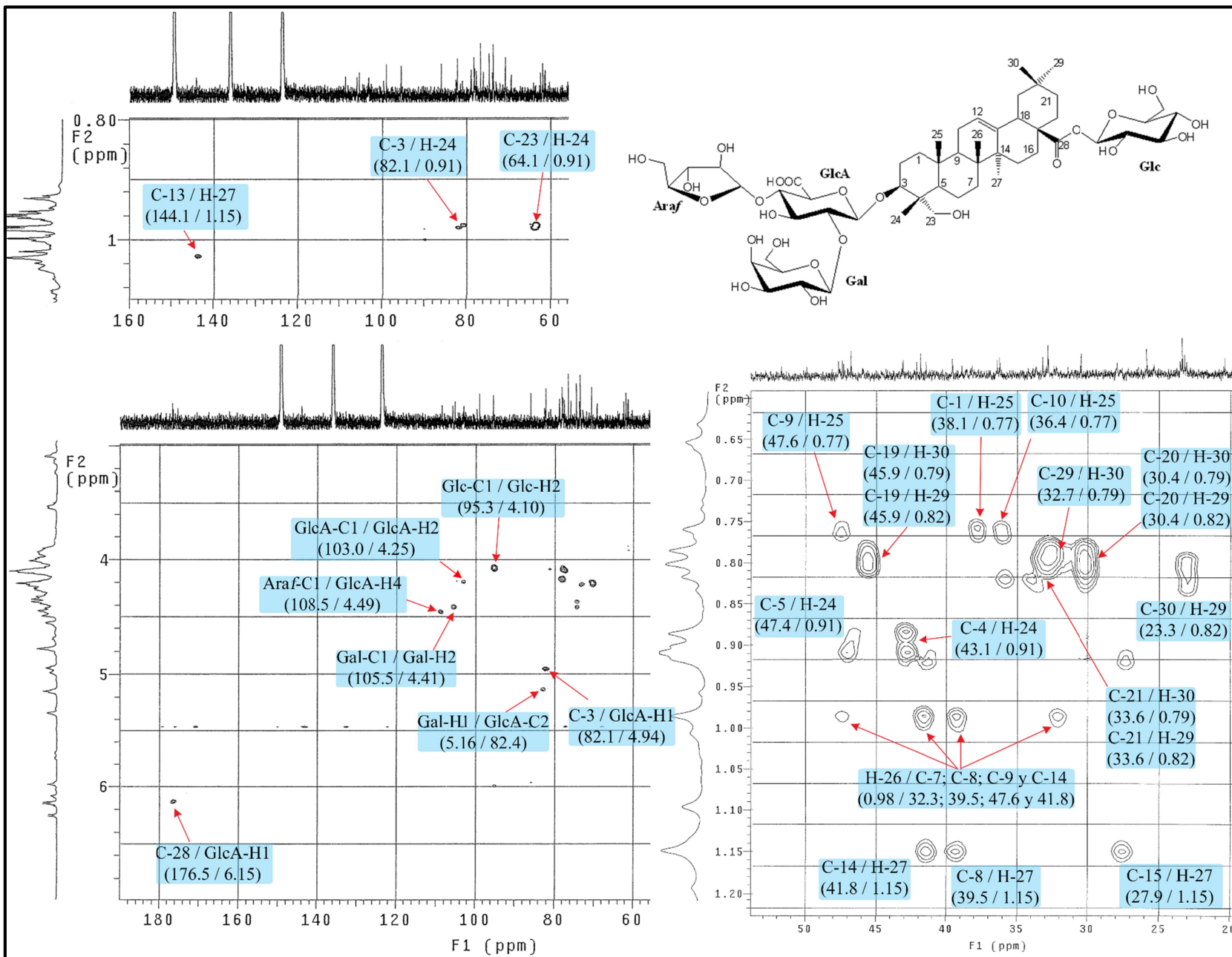


Figura 54. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P5.







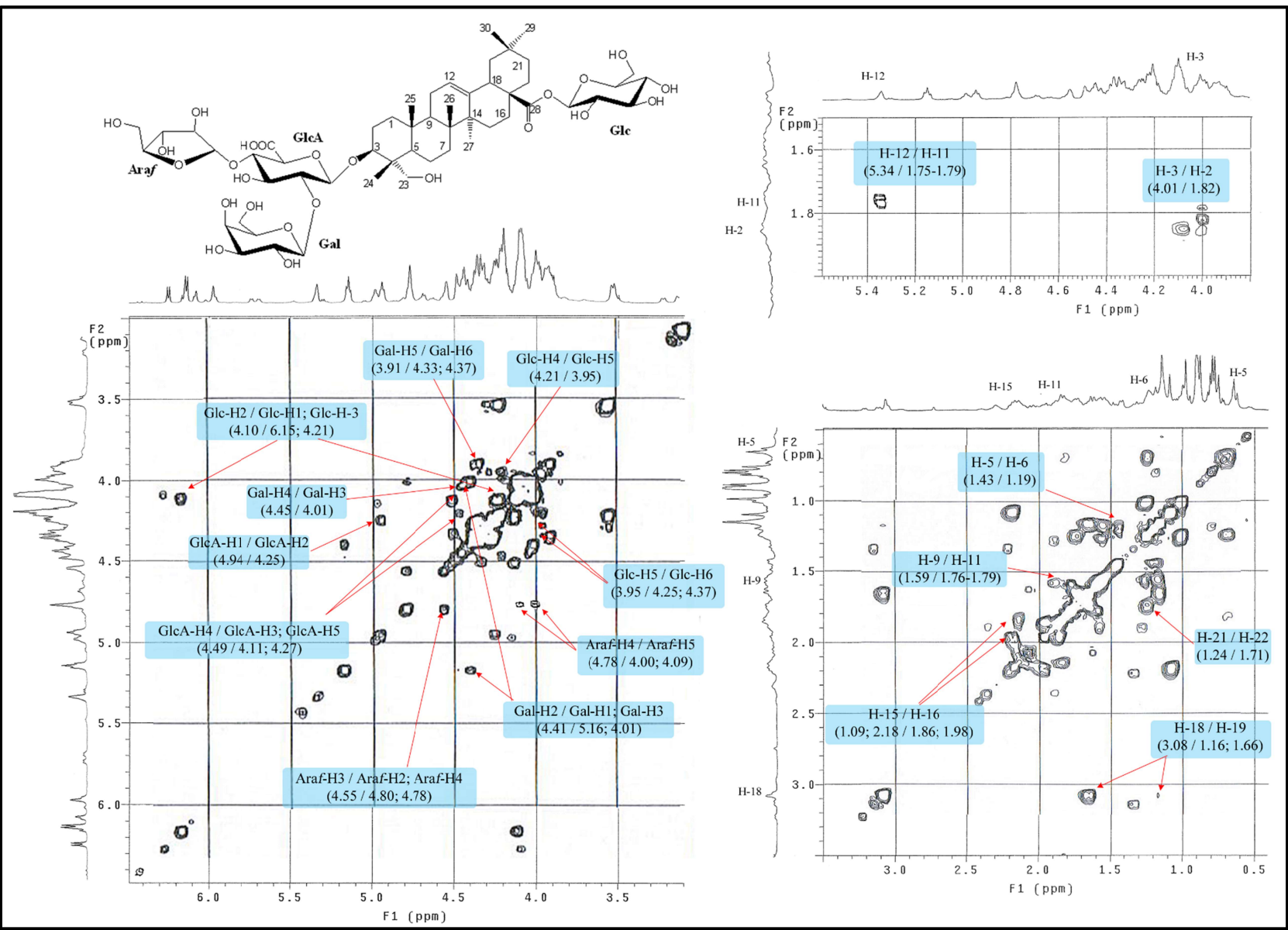


Figura 57. Espectro de COSY del compuesto PT-P5.

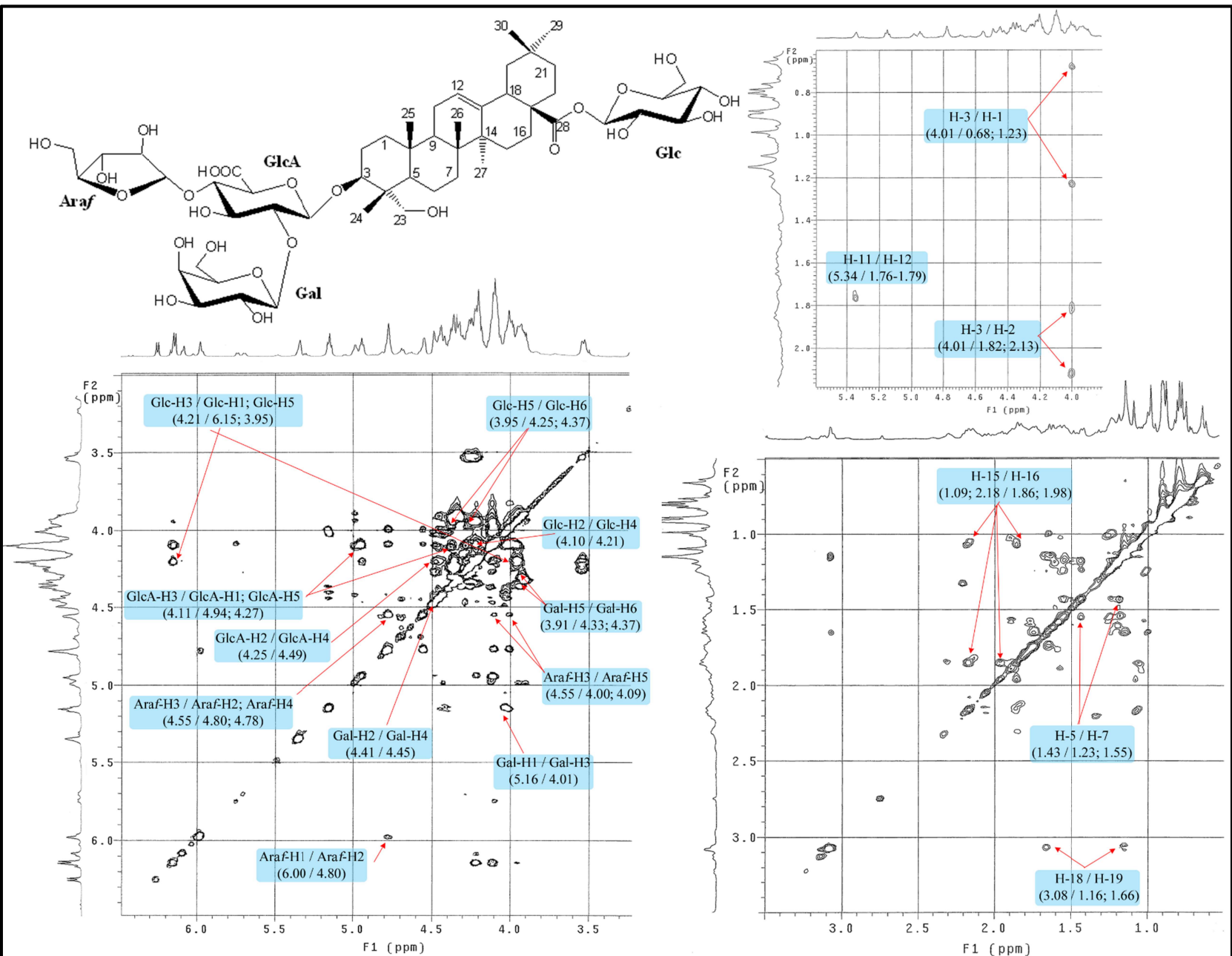


Figura 58. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P5.

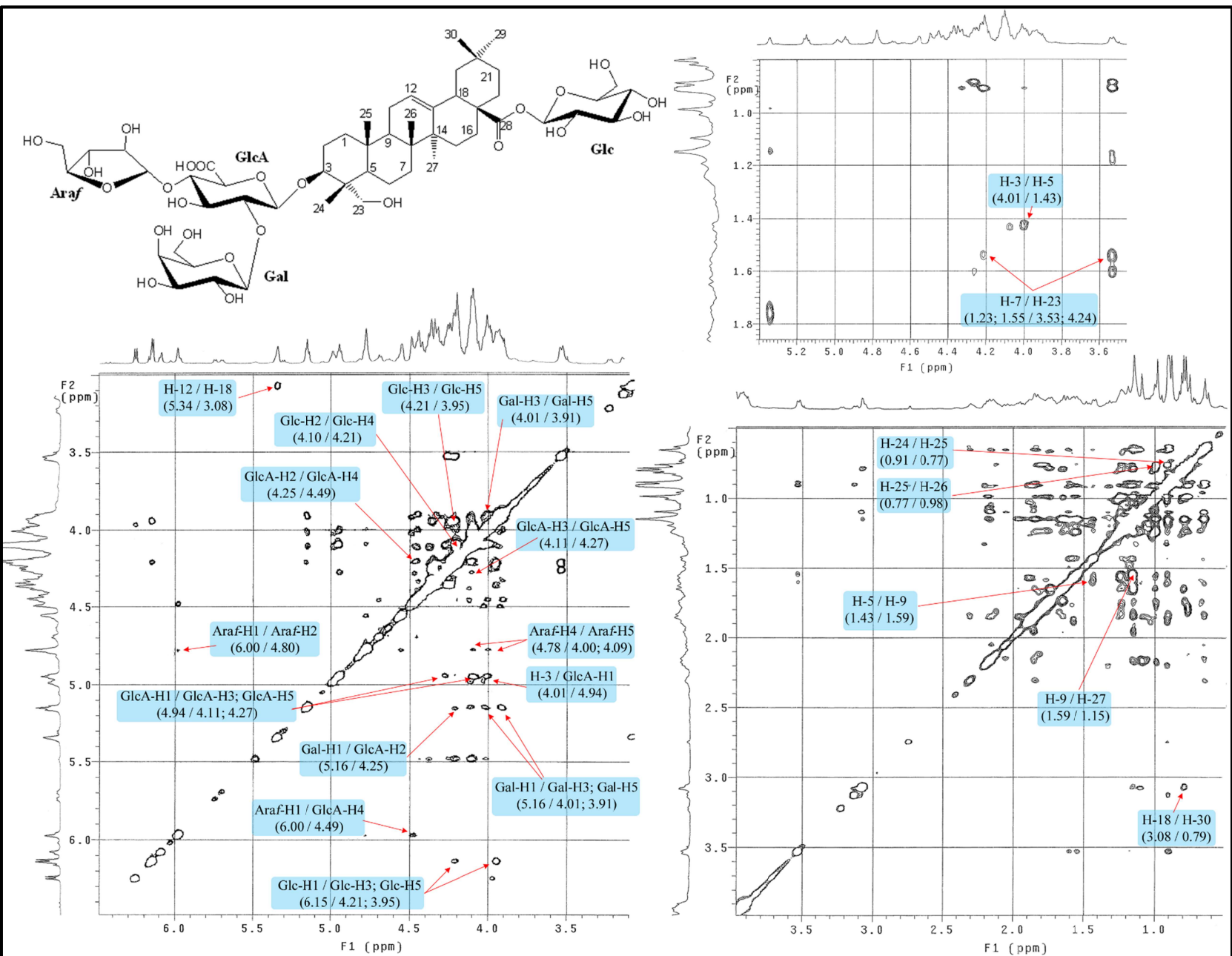


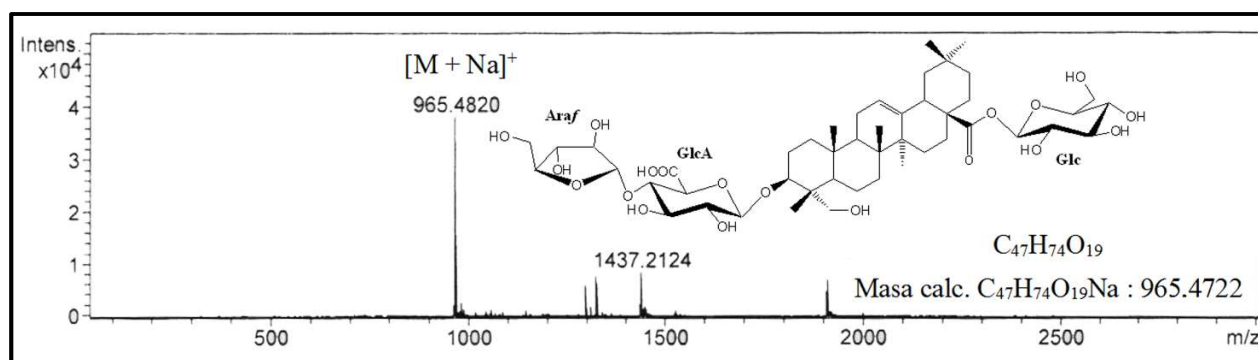
Figura 59. Espectro de NOESY del compuesto PT-P5.



**III.F. Compuesto PT-P6:** 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-hederageninoato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo.

El compuesto **PT-P6**, un sólido blanco, fue aislado tanto en los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ como de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’. En *P. tenuifolium* ‘Variegatum’, se obtuvieron 12,9 mg a partir de las fracciones F3c-F3e (esquema 2) y de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ se aislaron 13,2 mg en la fracción PT151 (esquema 4) obtenidas luego de varios fraccionamientos hechos al extracto bruto.

El espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo positivo (HR-ESI-MS > 0) de este compuesto muestra un ion molecular a 965,4820 m/z ( $[M+Na]^+$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{47}H_{74}O_{19}Na$  (calc. 965,4722). El análisis del espectro de masas FAB-MS (figura 61) en modo negativo muestra un ion molecular a m/z 941  $[M-H]^-$ , lo que indica una masa molecular de 942. Otras señales observadas en el espectro son los iones a m/z 809  $[(M-H)-132]^-$ , 779  $[(M-H)-162]^-$  y 647  $[(M-H)-132-162]^-$  correspondientes a la pérdida de una pentosa y de una hexosa (Cabrera, 2006).



**Figura 60.** Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto **PT-P6**.

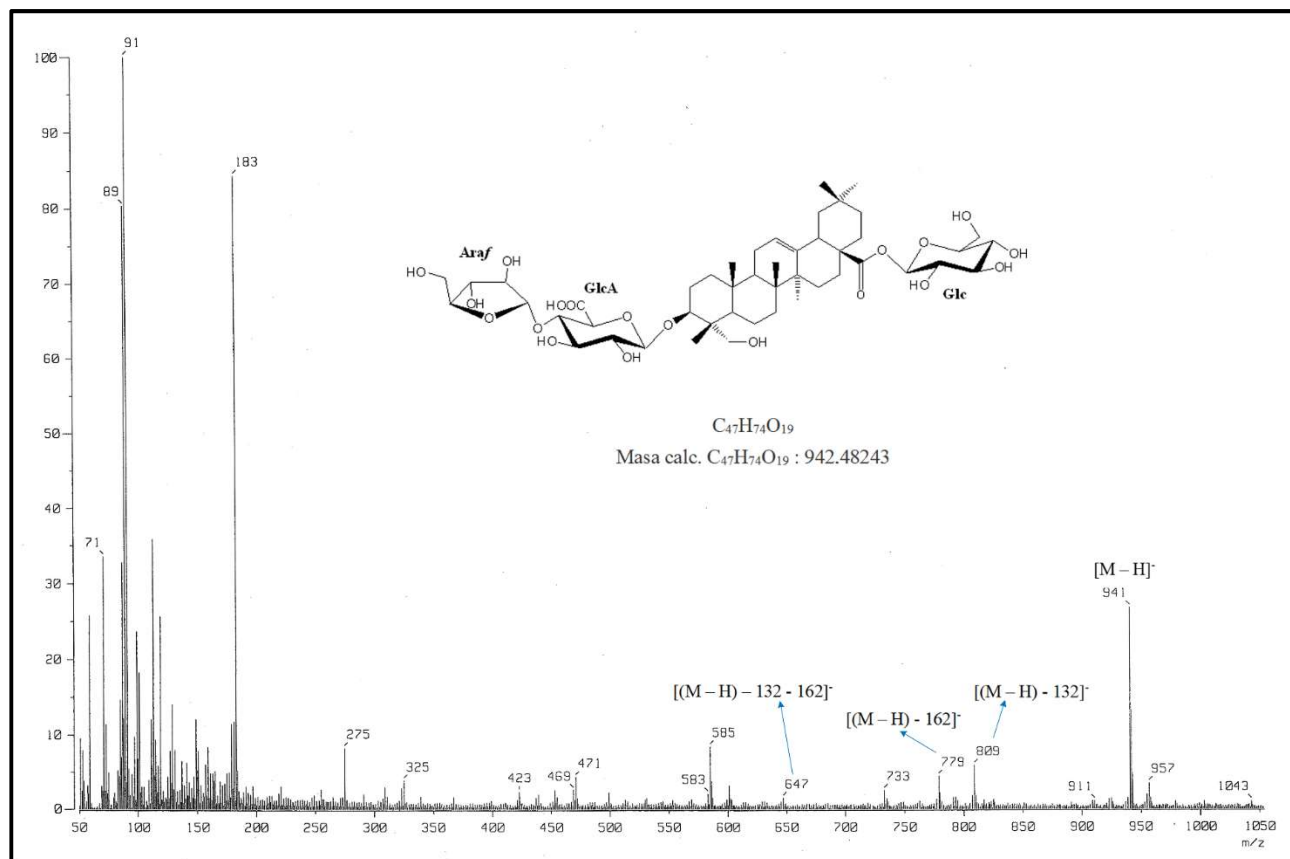
Para este compuesto, se observan 46 carbonos en los espectros RMN-1D y HSQC (figura 65) que pueden clasificarse como: 6 metilos, 10 metilenos, 3 metinos, 6 carbonos cuaternarios, 18 grupos oxigenados (3 metilenos y quince metinos), 2 carbonos  $sp^2$  de un doble enlace C-C (uno cuaternario y uno metino) y 1 carbono carbonilo. La data de los espectros RMN-1D junto con la diferencia de 162 unidades m/z menos en el ion molecular  $[M+Na]^+$  respecto a **PT-P5** indican que en este caso la saponina debe poseer dos unidades de hexosa y una de pentosa.

**Identificación del aglicón:**

Luego de establecer la correlación de cada hidrógeno con su carbono con el espectro HSQC (figura 65) se pudo observar que los desplazamientos químicos de carbonos e hidrógenos correspondientes al aglicón eran muy similares a los reportados para el compuesto **PT-P5**, por



lo que se puede suponer que el esqueleto triterpénico para el compuesto **PT-P6** es la **hederagenina**. Esto se comprobó con las correlaciones observadas en los espectros de RMN-2D del compuesto.



**Figura 61.** Espectro FAB-MS del compuesto **PT-P6**.

### Identificación de los azúcares:

Los carbonos y los hidrógenos anoméricos se identificaron con el espectro HSQC (figura 65), encontrándose tres carbonos anoméricos que indican la presencia de 3 moléculas de azúcares en la estructura a  $\delta_C$  95,4, 104,6 y 108,3 y que se correlacionan con los hidrógenos a  $\delta_H$  6,15 (doblete,  $J = 8,3$  Hz), 4,99 (doblete,  $J = 7,4$  Hz) y 6,03 (singulete ancho) respectivamente. Con los espectros bidimensionales de RMN se estableció la identidad de los monosacáridos de **PT-P6** como ácido  $\beta$ -D-glucorónico (GlcA),  $\beta$ -D-glucosa (Glc) y  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (Araf) (Agrawal, 1992; Bäcker *et al.*, 2013).

Al igual que para el compuesto anterior, la unidad de Glc también se encuentra unida al triterpeno en la posición C-28 a través de una unión tipo éster, como lo demuestran los desplazamientos químicos de la posición anomérica del azúcar ( $\delta_C/\delta_H$  95,4/6,15) y la correlación en el HMBC (figura 66) entre el protón anomérico de la glucosa a  $\delta_H$  6,15 (*d*,

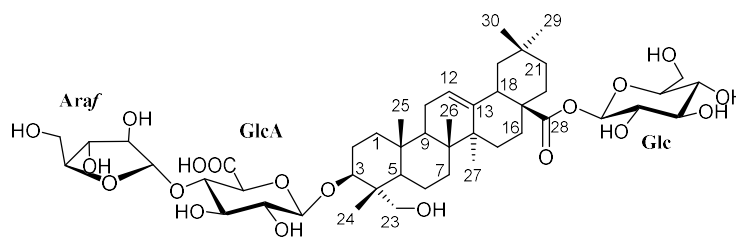
$J = 8,3$  Hz) y el carbono C-28 ( $\delta_C$  176,5) del aglicón. En cuanto a los dos azúcares restantes (GlcA y Araf), forman la secuencia glicosídica [Araf-(1 $\rightarrow$ 4)]-GlcA, la cual se encuentra unida al C-3 de la genina como lo demuestran las correlaciones en HMBC (figura 66) y NOESY (figura 69):

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H/\delta_C$ )
GlcA:	4,99 (GlcA-H1) / 4,08 (Gen-H3)	4,99 (GlcA-H1) / 81,0 (Gen-C3)
Araf:	6,05 (Araf-H1) / 4,49 (GlcA-H4)	4,49 (GlcA-H4) / 108,3 (Araf-C1)

### Conclusión:

La data de los espectros de RMN y masas permite caracterizar la estructura del compuesto **PT-P6** como el **3-O-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosil hederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo** (figura 62). Es la primera vez que se aísla la hederagenina con esta combinación de azúcares en C-3 y C-28 como producto natural.

Como ya se mencionó para el compuesto anterior el esqueleto triterpénico de la hederagenina, no es usual dentro del género *Pittosporum*, sin embargo, cabe destacar que para ambas especies este compuesto fue aislado en una mayor cantidad que cualquiera de los otros productos obtenidos, por lo que quizás **PT-P6** pudiese servir como indicador quimiotaxonómico para los cultivares de *P. tenuifolium*, sin embargo habría que realizar un estudio con muchos más cultivares de esta especie para poder establecer una conclusión al respecto.



**Figura 62.** Estructura del compuesto **PT-P6**: 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosilhederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo.

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto PT-P6 en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Aglicón				Azúcares			
Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,2	-CH <sub>2</sub> -	0,74 1,27	<b>28-O-Glc</b>			
2	25,4	-CH <sub>2</sub> -	1,82 2,12	1	95,4	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,16 <i>d</i> (8,3)
3	81,0	-CHOH-	4,08	2	73,5	-CHOH-	4,11
4	43,0	>C<	-----	3	78,2	-CHOH-	4,22
5	47,1	>CH-	1,49 <i>br d</i> (11,6)	4	70,7	-CHOH-	4,21
6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,20 1,58	5	78,8	-CHOH-	3,95
7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,25 1,58	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,26 <i>dd</i> (11,7; 4,3) 4,35 <i>dd</i> (11,7; 1,4)
8	39,6	>C<	-----	<b>3-O-GlcA</b>			
9	47,7	>CH-	1,62	1	104,6	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,99 <i>d</i> (7,4)
10	36,5	>C<	-----	2	74,4	-CHOH-	4,01
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,79 – 1,82	3	76,0	-CHOH-	4,10
12	122,6	=CH-	5,35 <i>br s</i>	4	78,2	-CHOR-	4,49 <i>dd</i> (9,0; 8,8)
13	144,0	=C<	-----	5	77,8	-CHOH-	4,38 <i>d</i> (9,0)
14	41,9	>C<	-----	6	n.d.	-COOH	-----
15	27,9	-CH <sub>2</sub> -	1,12 2,20 <i>dd</i> (13,5; 11,5)	<b>Araf-(1→4)-GlcA</b>			
16	23,1	-CH <sub>2</sub> -	1,88 1,98 <i>dd</i> (13,3; 11,5)	1	108,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,03 <i>br s</i>
17	46,8	>C<	-----	2	82,1	-CHOH-	4,81 <i>br s</i>
18	41,4	>CH-	3,08 <i>dd</i> (11,2; 3,0)	3	77,9	-CHOH-	4,58
19	45,9	-CH <sub>2</sub> -	1,15 1,66	4	86,2	-CHOH-	4,83 <i>q</i> (3,8)
20	30,4	>C<	-----	5	62,4	-CH <sub>2</sub> OH	4,00 4,10
21	33,7	-CH <sub>2</sub> -	n.d.,				
22	32,2	-CH <sub>2</sub> -	1,63 1,71				
23	63,9	-CH <sub>2</sub> OH	3,51 <i>d</i> (11,0) 4,12 <i>d</i> (10,7)				
24	13,3	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>				
25	15,8	-CH <sub>3</sub>	0,79 <i>s</i>				
26	17,2	-CH <sub>3</sub>	1,00 <i>s</i>				
27	25,9	-CH <sub>3</sub>	1,17 <i>s</i>				
28	176,5	-COOR	-----				
29	32,8	-CH <sub>3</sub>	0,81 <i>s</i>				
30	23,4	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

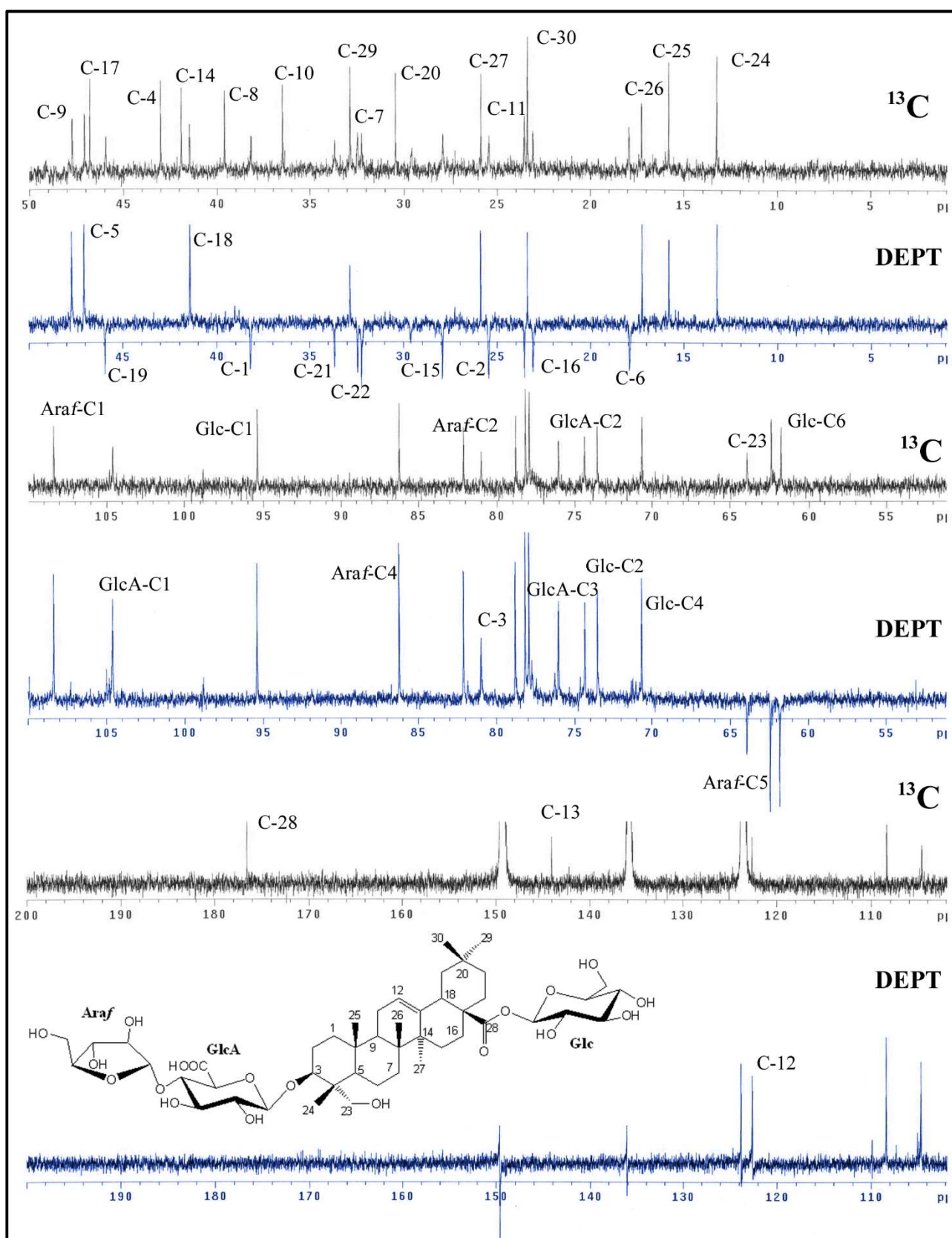


Figura 63. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P6.

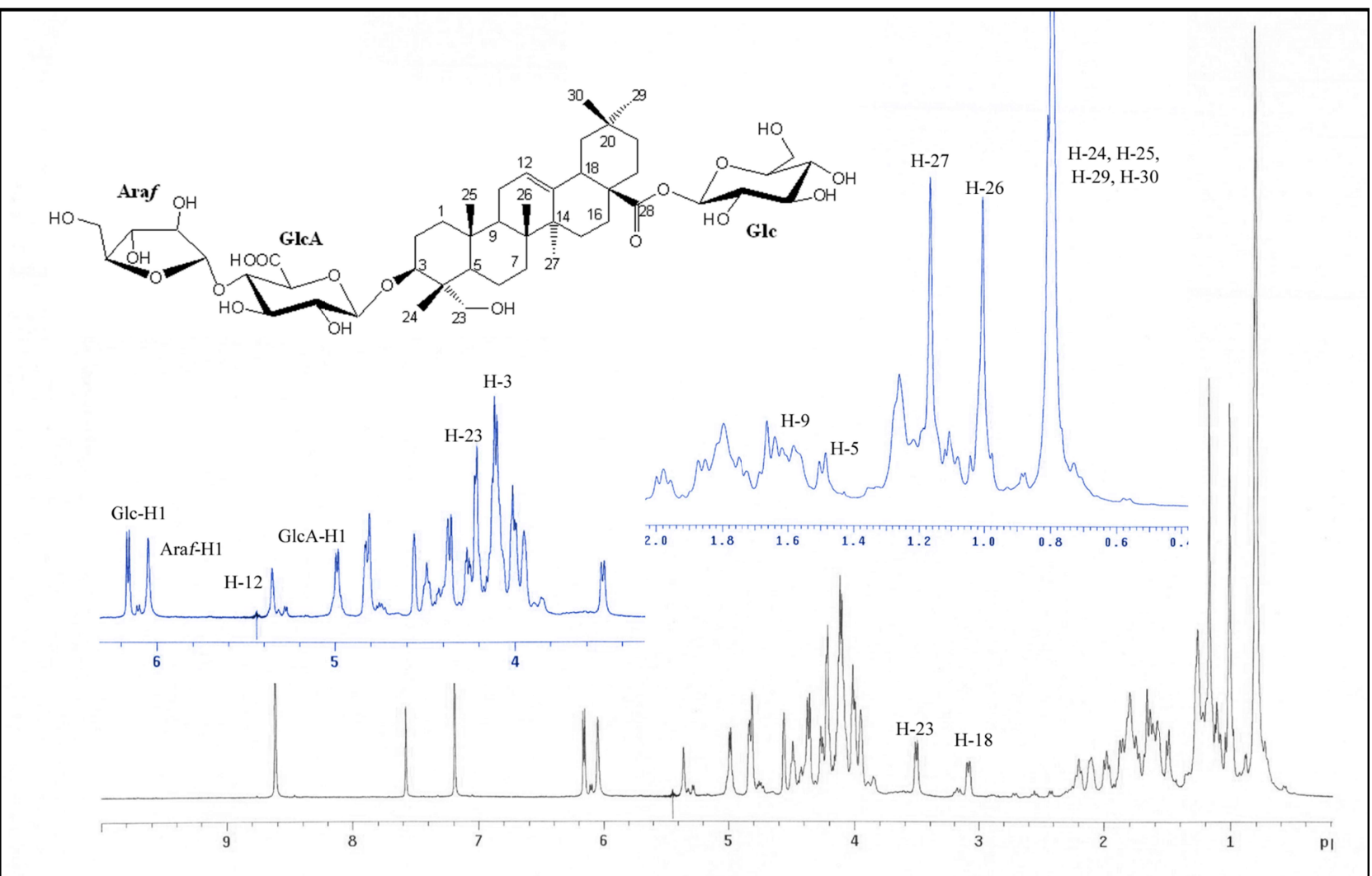


Figura 64. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto PT-P6.



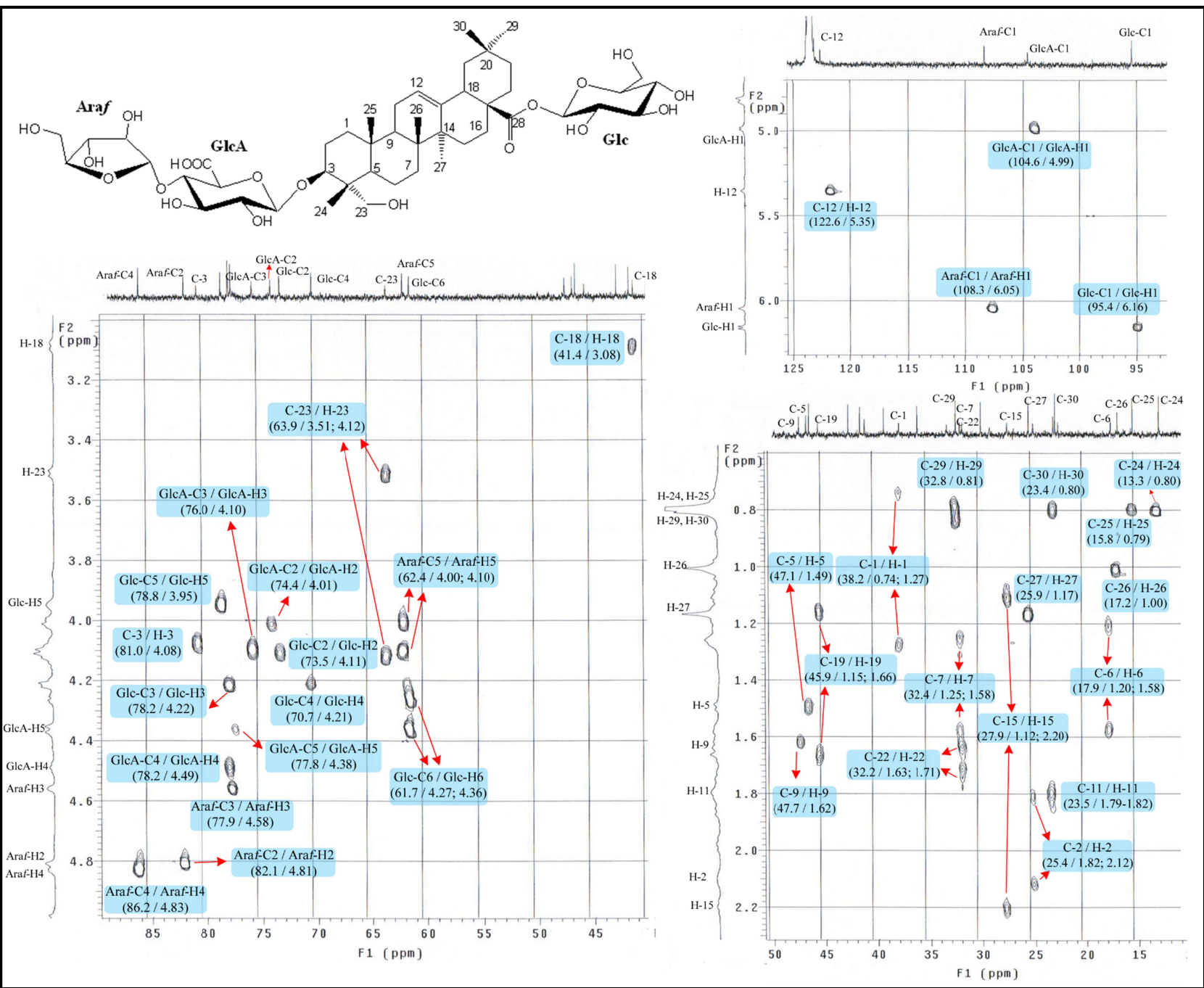


Figura 65. Espectro de HSQC del compuesto PT-P6.

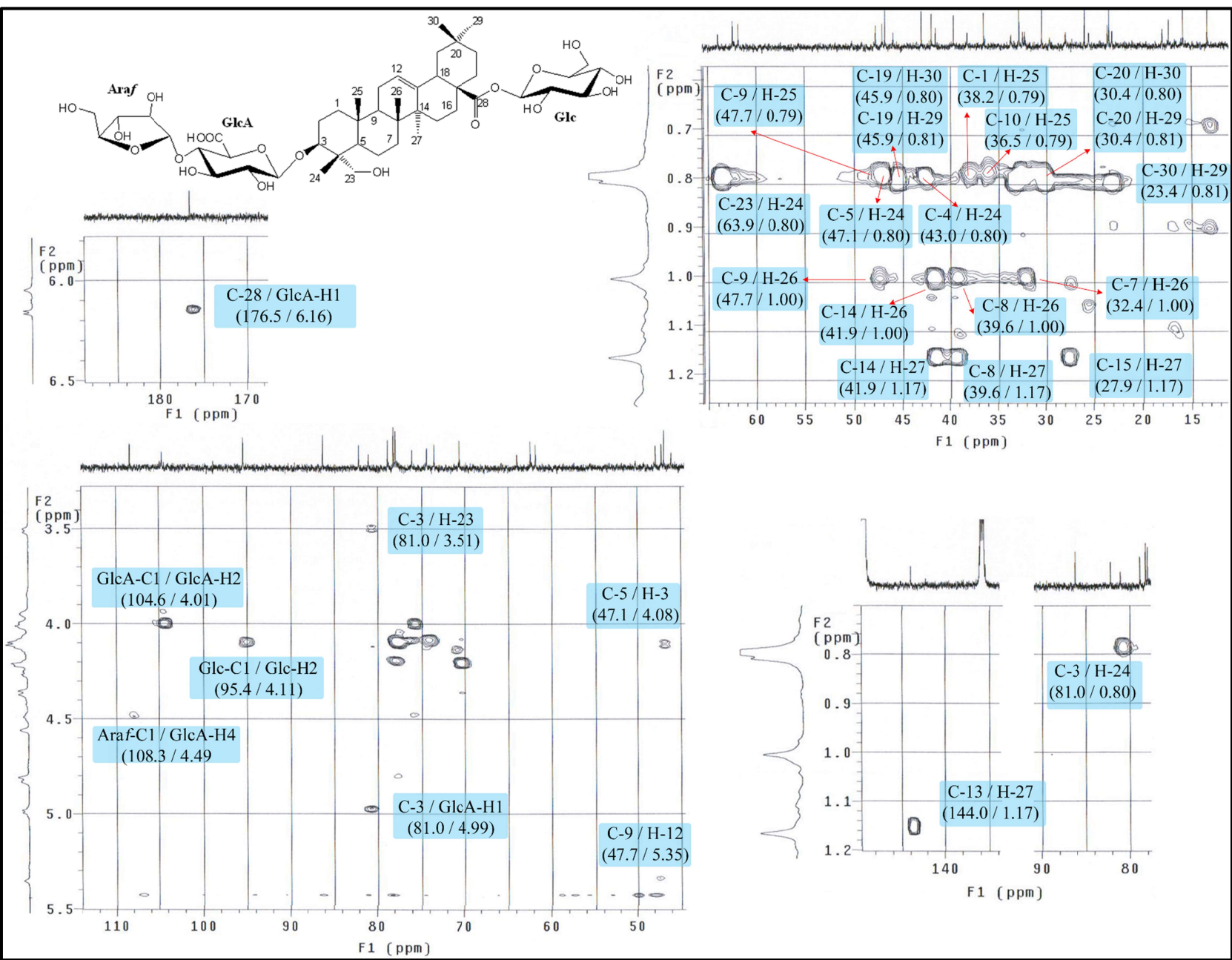


Figura 66. Espectro de HMBC del compuesto PT-P6.





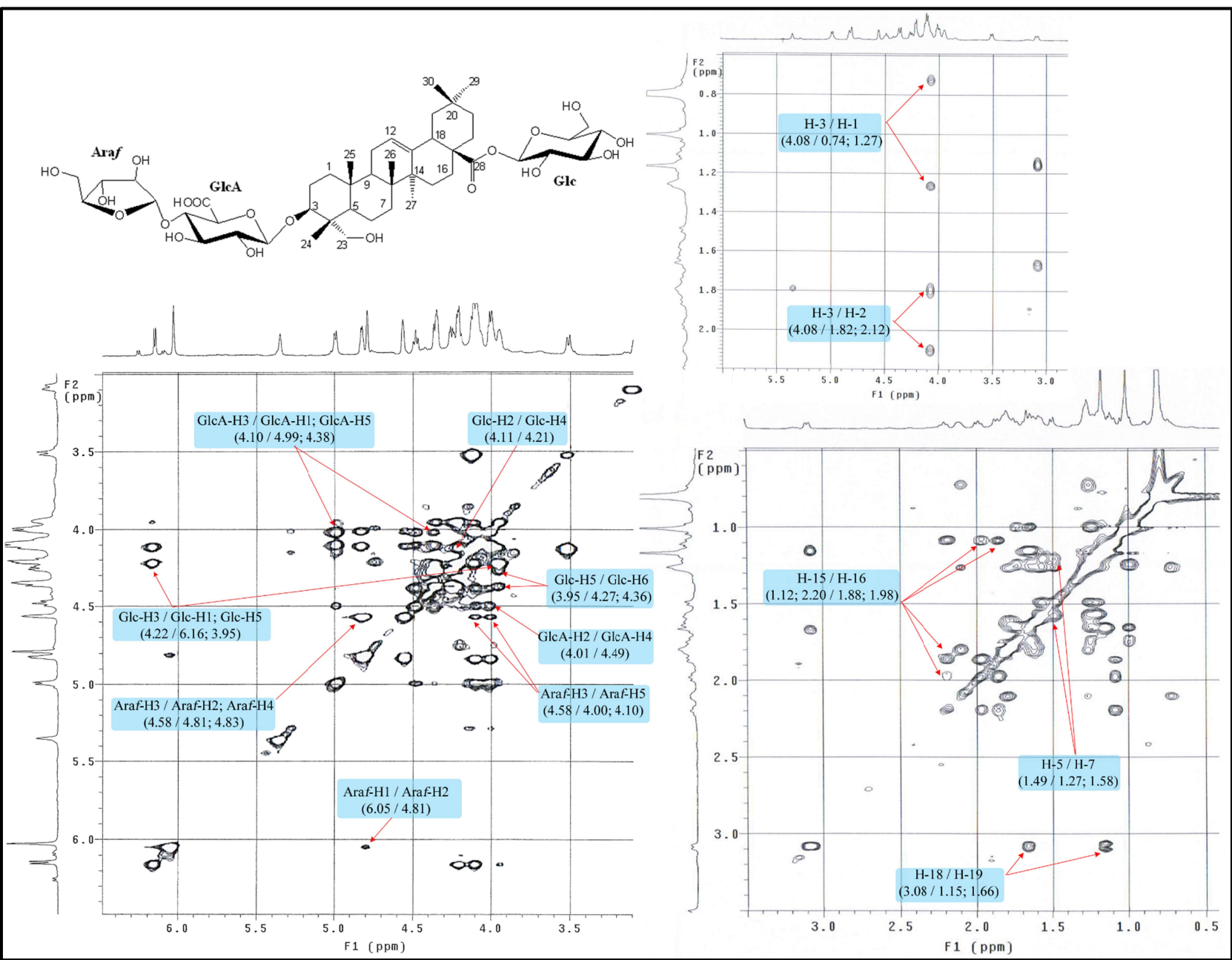


Figura 68. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P6.

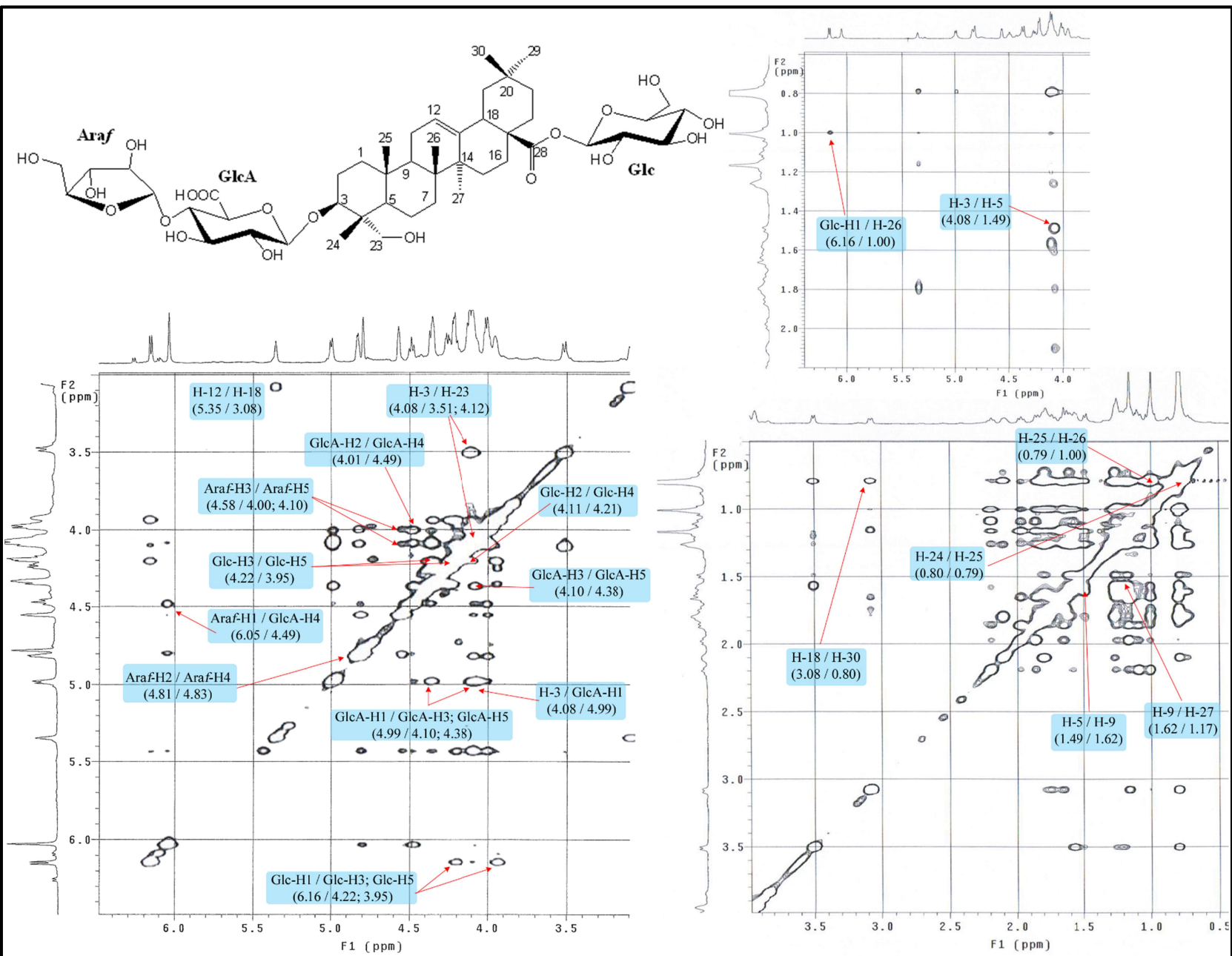
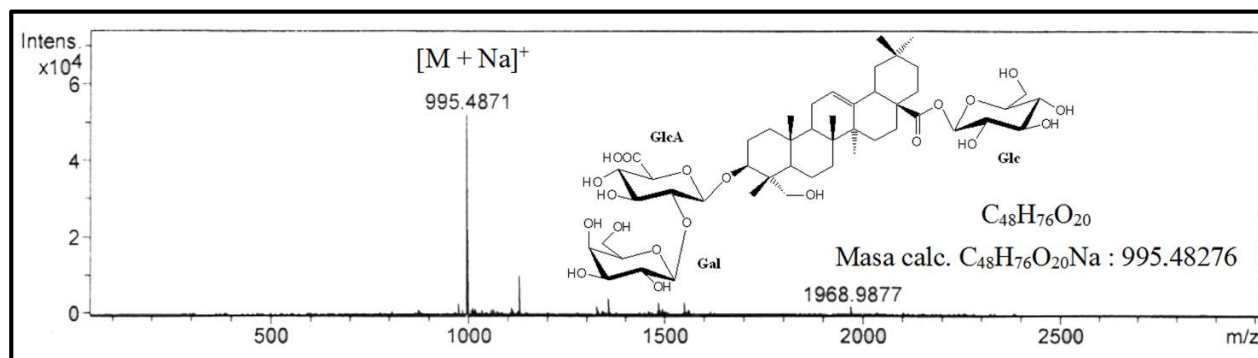


Figura 69. Espectro de NOESY del compuesto PT-P6.



**III.G. Compuesto PT-P7: Udosaponina F.**

El compuesto **PT-P7** se obtuvo de la combinación de las fracciones F4r, F7b y F7c de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ (esquema 2). De este compuesto (sólido blanco) se aislaron 7,7 mg. El espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo positivo (HR-ESI-MS > 0) de este compuesto muestra un ion molecular a 995,4871 m/z ( $[M+Na]^+$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{48}H_{76}O_{20}Na$  (calc. 995,48276).



**Figura 70.** Espectro HR-ESI-MS > 0 del compuesto **PT-P7**.

La revisión de los espectros unidimensionales de RMN y el HSQC (figura 74) revelan la presencia de 47 carbonos, es decir un carbono más que para el compuesto **PT-P6**. Esto junto con el hecho de que el ion molecular  $[M+Na]^+$  del compuesto tiene 30 unidades m/z más que el **PT-P6** y 132 unidades m/z menos que el de **PT-P5** indica que para esta saponina podría tener tres hexosas. Así mismo, los espectros RMN-1D muestran que la mayoría de las señales eran superponibles a las reportadas en el compuesto **PT-P6**, a excepción de unas pocas señales en la zona de los azúcares y de los anómeros.

**Identificación del aglicón:**

En los espectros de RMN unidimensionales y el espectro HSQC (figura 74), se puede observar que los desplazamientos químicos de los carbonos e hidrógenos correspondientes a la genina son prácticamente iguales a los reportados para los dos compuestos (**PT-P5** y **PT-P6**) y a los reportados en la bibliografía (Abe *et al.*, 1996), por lo que se puede identificar el esqueleto triterpénico del compuesto **PT-P7** como **hederagenina**. Esto se comprobó con las correlaciones que aparecen en los espectros de RMN bidimensional del compuesto.

**Identificación de los azúcares:**

El compuesto **PT-P7** posee tres unidades de azúcar en su estructura, tal como se demuestra por los tres carbonos anoméricos que aparecen en el espectro HSQC (figura 74).

Estos carbonos se encuentran ubicados a  $\delta_C$  95,3, 102,9 y 105,6 y se correlacionan en el HMBC con los hidrógenos a  $\delta_H$  6,14 (doblete,  $J = 8,3$  Hz), 4,96 (doblete,  $J = 7,4$  Hz) y 5,17 (doblete,  $J = 7,7$  Hz). Siguiendo el procedimiento ya descrito para la identificación de los azúcares se encontró que las tres unidades de monosacáridos son **ácido  $\beta$ -D-glucorónico (GlcA)**,  **$\beta$ -D-glucosa (Glc)** y  **$\beta$ -D-galactosa (Gal)** (Agrawal, 1992; Bäcker *et al.*, 2013).

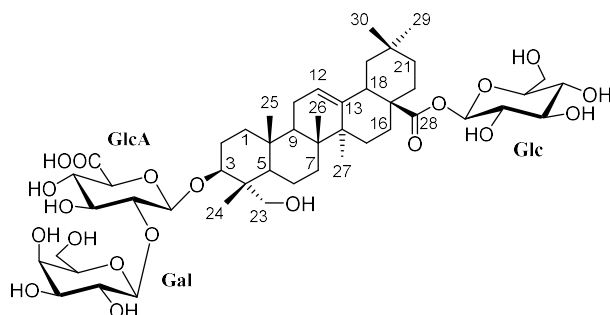
Igual que en los compuestos **PT-P5** y **PT-P6**, la unidad de Glc [ $\delta_C/\delta_H$  95,3/6,14] se encuentra unida al carbono C-28 de la genina por una unión tipo éster. En cuanto a los dos monosacáridos restantes, GlcA y Gal, las correlaciones en el HMBC (figura 75) y NOESY (figura 78) para ambos azúcares muestran que la secuencia unida al C-3 de la genina es [Gal-(1 $\rightarrow$ 2)]-GlcA.

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H/\delta_C$ )
GlcA:	4,96 (GlcA-H1) / 4,16 (Gen-H3)	4,96 (GlcA-H1) / 81,3 (Gen-C3)
Gal:	5,18 (Gal-H1) / 4,14 (GlcA-H2)	5,18 (Gal-H1) / 82,2 (GlcA-C2)

### Conclusión:

Todos los datos obtenidos para el aglicón y los azúcares permitieron identificar al compuesto **PT-P7** como el **3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosil hederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo** (figura 71) o Udosaponina F.

Si bien este compuesto ha sido aislado con anterioridad en las especies *Ilex rotunda* (Aquifoliaceae) (Amimoto *et al.*, 1993) *Aralia cordata* (Araliaceae) (Kawai *et al.*, 1989), *Aralia continentalis* (Araliaceae) (Kim y Kang, 1998) y *Meryta lanceolata* (Araliaceae) (Melek *et al.*, 2004) es la primera vez que se aísla esta saponina triterpénica en la familia *Pittosporaceae* y en particular en el género *Pittosporum*.



**Figura 71.** Estructura del compuesto **PT-P7**: 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosilhederageninoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo (Udosaponina F).

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto PT-P7 en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Aglicón				Azúcares			
Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,4	-CH <sub>2</sub> -	0,86 1,38	<b>28-O-Glc</b>			
2	25,4	-CH <sub>2</sub> -	1,98 2,40	1	95,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,14 <i>d</i> (8,3)
3	81,3	-CHOH-	4,16	2	73,5	-CHOH-	4,10
4	43,1	>C<	-----	3	78,1	-CHOH-	4,21
5	47,2	>CH-	1,50 <i>br d</i> (11,6)	4	70,6	-CHOH-	4,19
6	17,9	-CH <sub>2</sub> -	1,18 1,58	5	78,7	-CHOH-	3,94 <i>m</i>
7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,23 1,58	6	61,7	-CH <sub>2</sub> OH	4,24 4,38
8	39,6	>C<	-----	<b>3-O-GlcA</b>			
9	47,7	>CH-	1,61	1	102,9	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,96 <i>d</i> (7,4)
10	36,4	>C<	-----	2	82,2	-CHOR-	4,14
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,77 – 1,81	3	77,6	-CHOH-	4,09
12	122,6	=CH-	5,33 <i>br s</i>	4	72,8	-CHOH-	4,08
13	143,9	=C<	-----	5	75,7	-CHOH-	4,00 <i>d</i> (9,1)
14	41,8	>C<	-----	6	n.d.	-COOH	-----
15	27,9	-CH <sub>2</sub> -	1,08 2,18 <i>dd</i> (13,1; 12,5)	<b>Gal(1→2)-GlcA</b>			
16	23,1	-CH <sub>2</sub> -	1,88 1,98 <i>dd</i> (13,1; 12,5)	1	105,6	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,17 <i>d</i> (7,7)
17	46,7	>C<	-----	2	73,5	-CHOH-	4,43 <i>dd</i> (7,9; 6,8)
18	41,3	>CH-	3,07 <i>dd</i> (12,4; 3,2)	3	74,4	-CHOH-	4,01
19	45,9	-CH <sub>2</sub> -	1,14 1,65	4	69,2	-CHOH-	4,48
20	30,4	>C<	-----	5	76,5	-CHOH-	3,92 <i>m</i>
21	33,6	-CH <sub>2</sub> -	n.d.	6	61,1	-COOH	4,32 4,37
22	32,2	-CH <sub>2</sub> -	1,62 1,70				
23	63,8	-CH <sub>2</sub> OH	3,56 <i>d</i> (10,2) 4,26 <i>d</i> (10,2)				
24	13,2	-CH <sub>3</sub>	0,94 <i>s</i>				
25	15,8	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>				
26	17,2	-CH <sub>3</sub>	1,00 <i>s</i>				
27	25,8	-CH <sub>3</sub>	1,13 <i>s</i>				
28	176,2	-COOR	-----				
29	32,9	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>				
30	23,3	-CH <sub>3</sub>	0,79 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

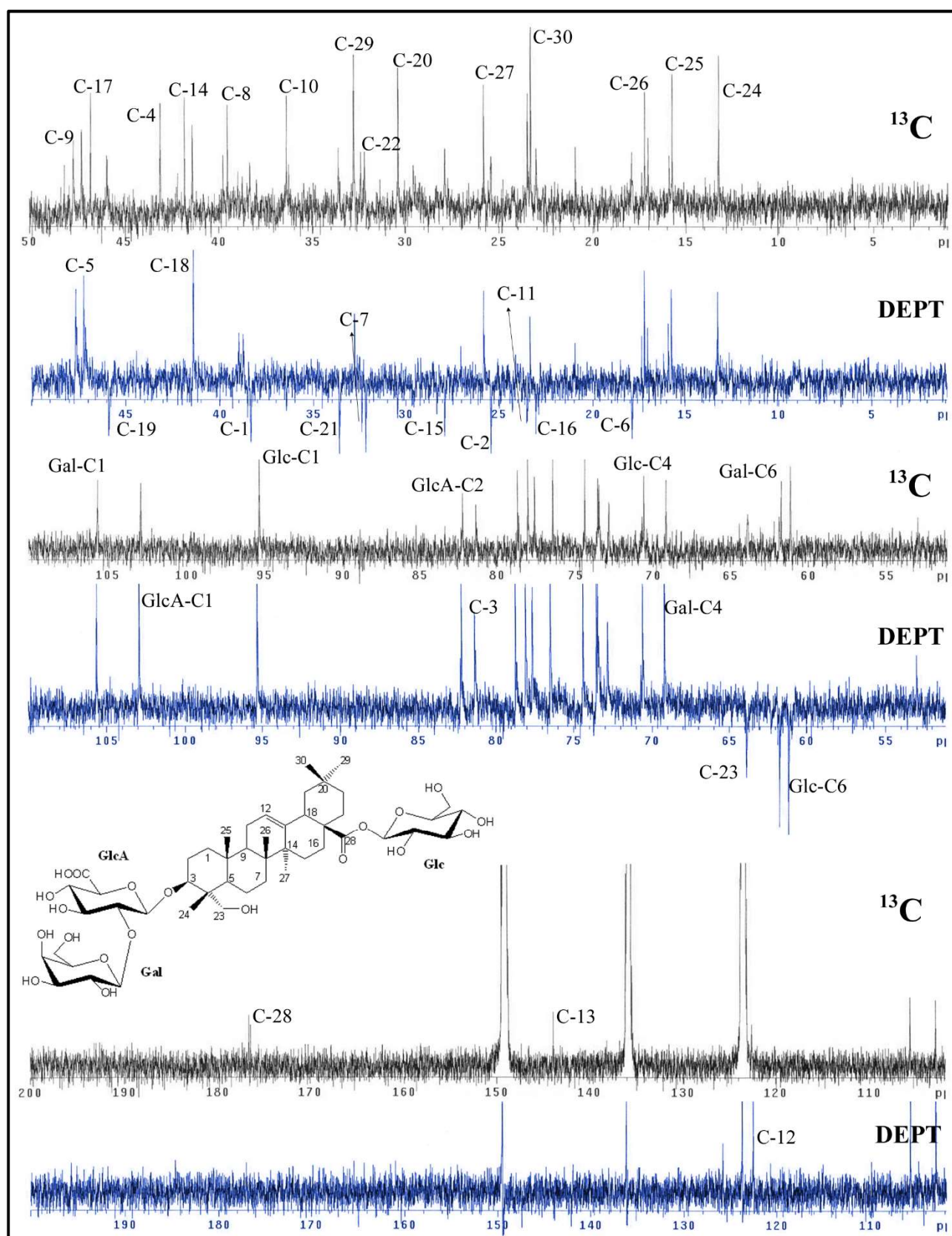


Figura 72. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P7.

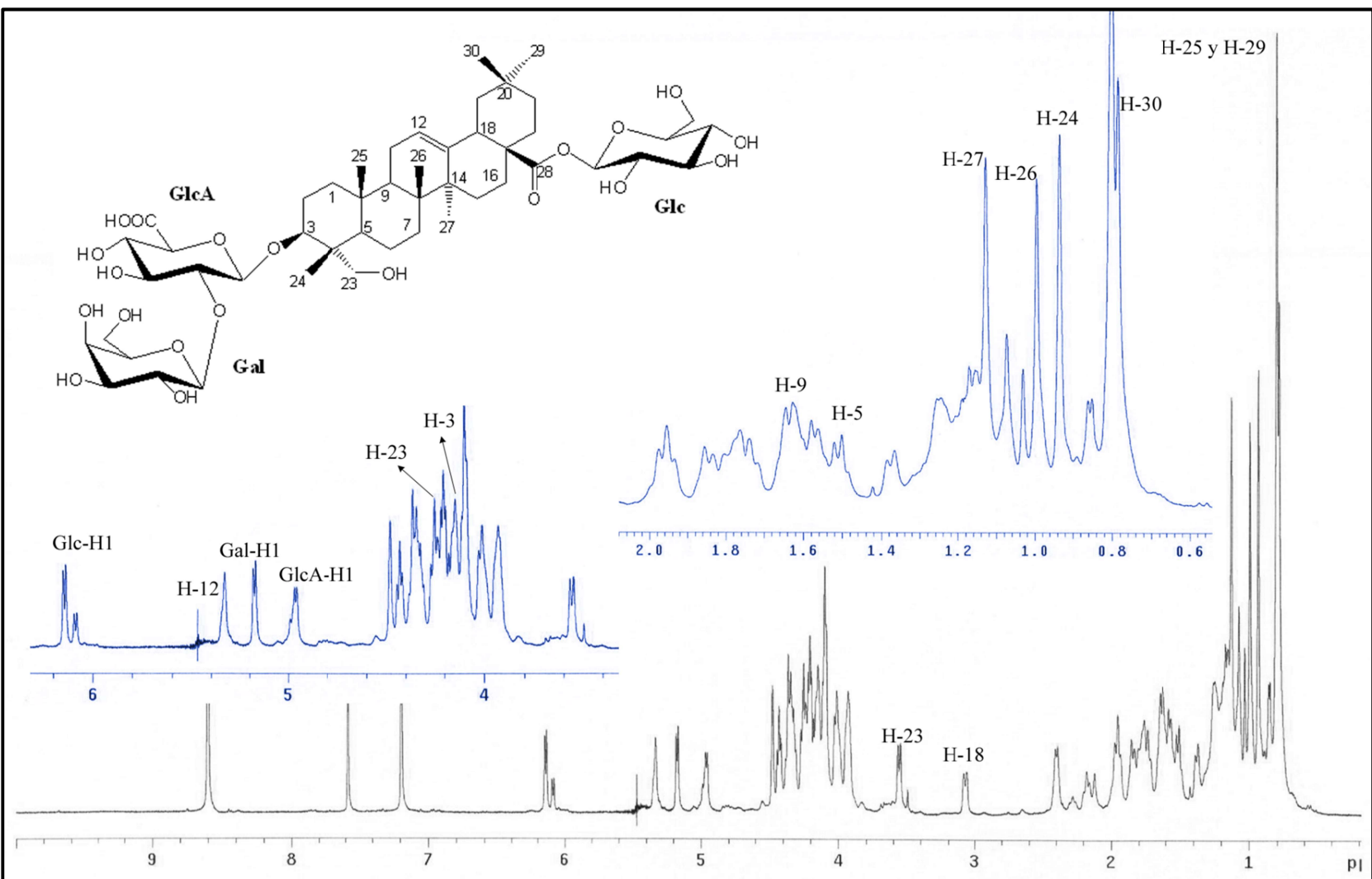


Figura 73. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto PT-P7.



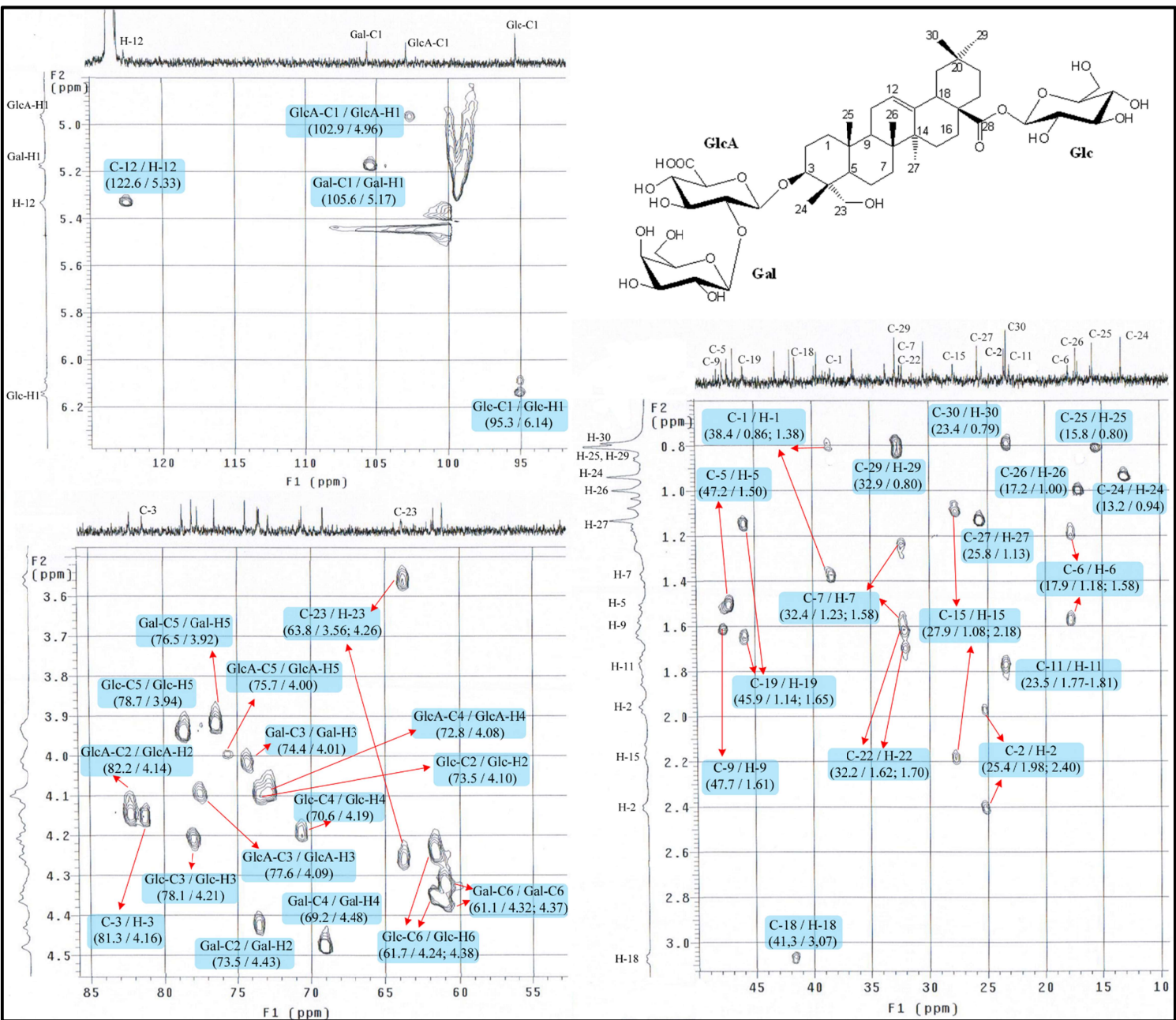


Figura 74. Espectro de HSQC del compuesto PT-P7.

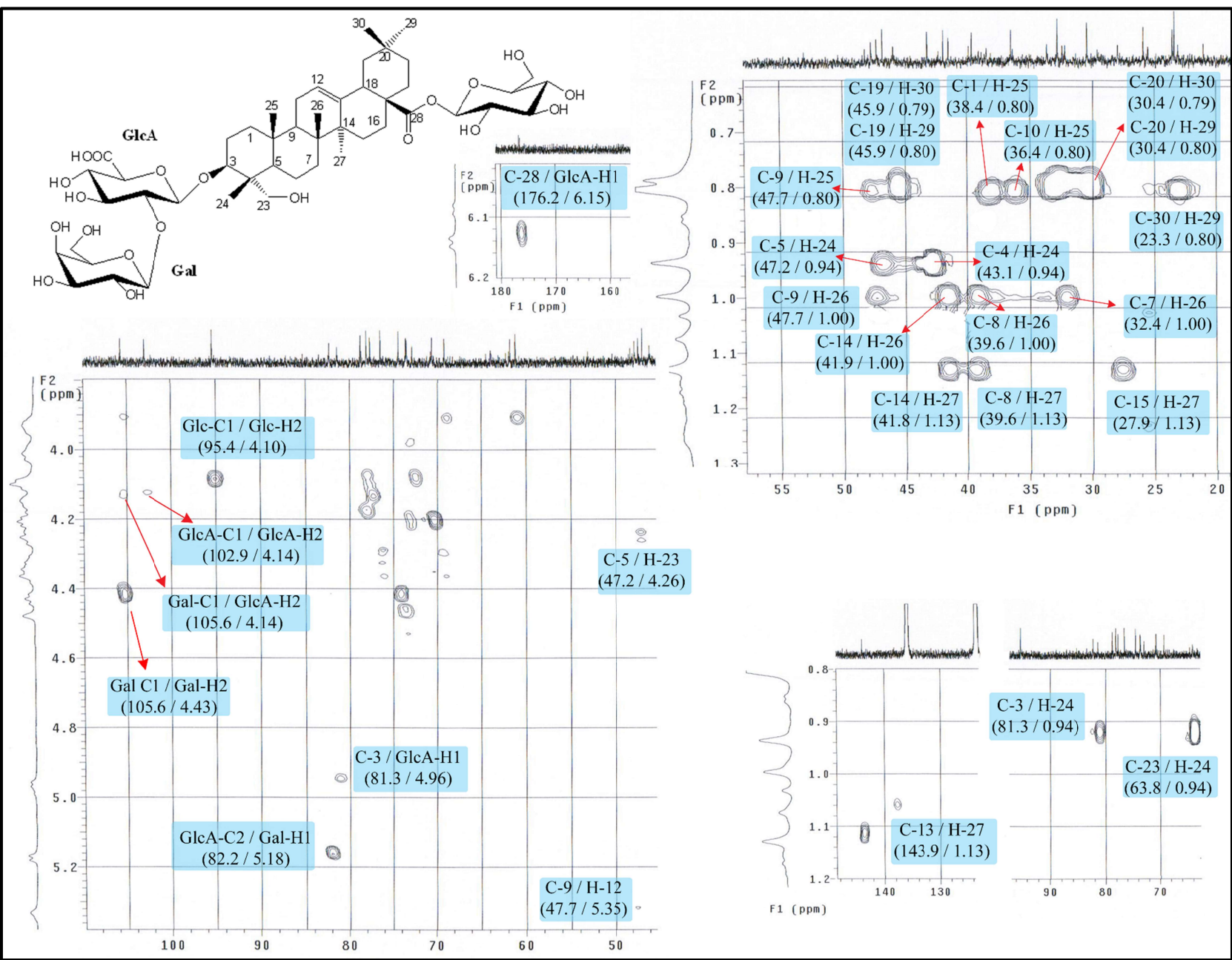


Figura 75. Espectro de HMBC del compuesto PT-P7.

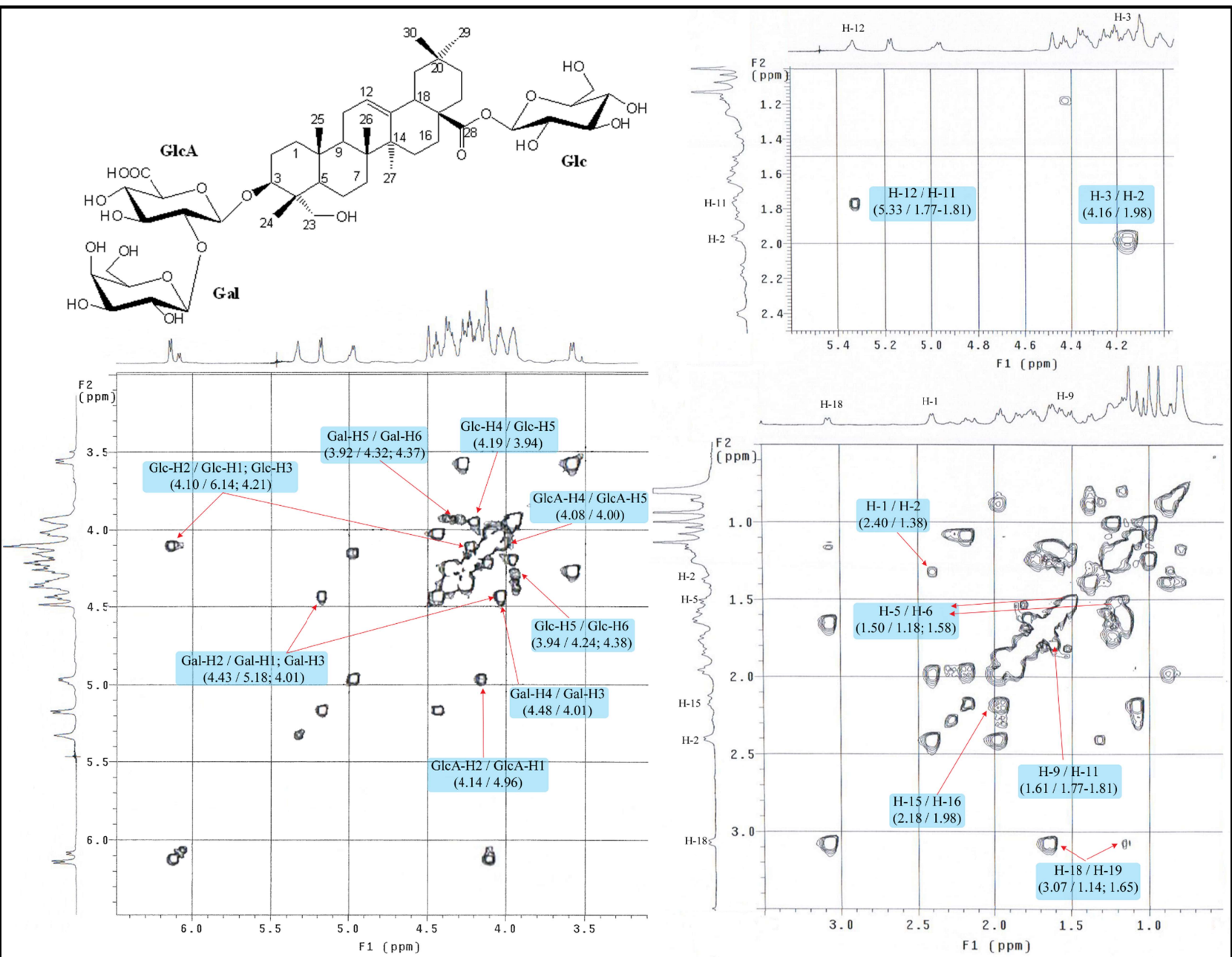


Figura 76. Espectro de COSY del compuesto PT-P7.



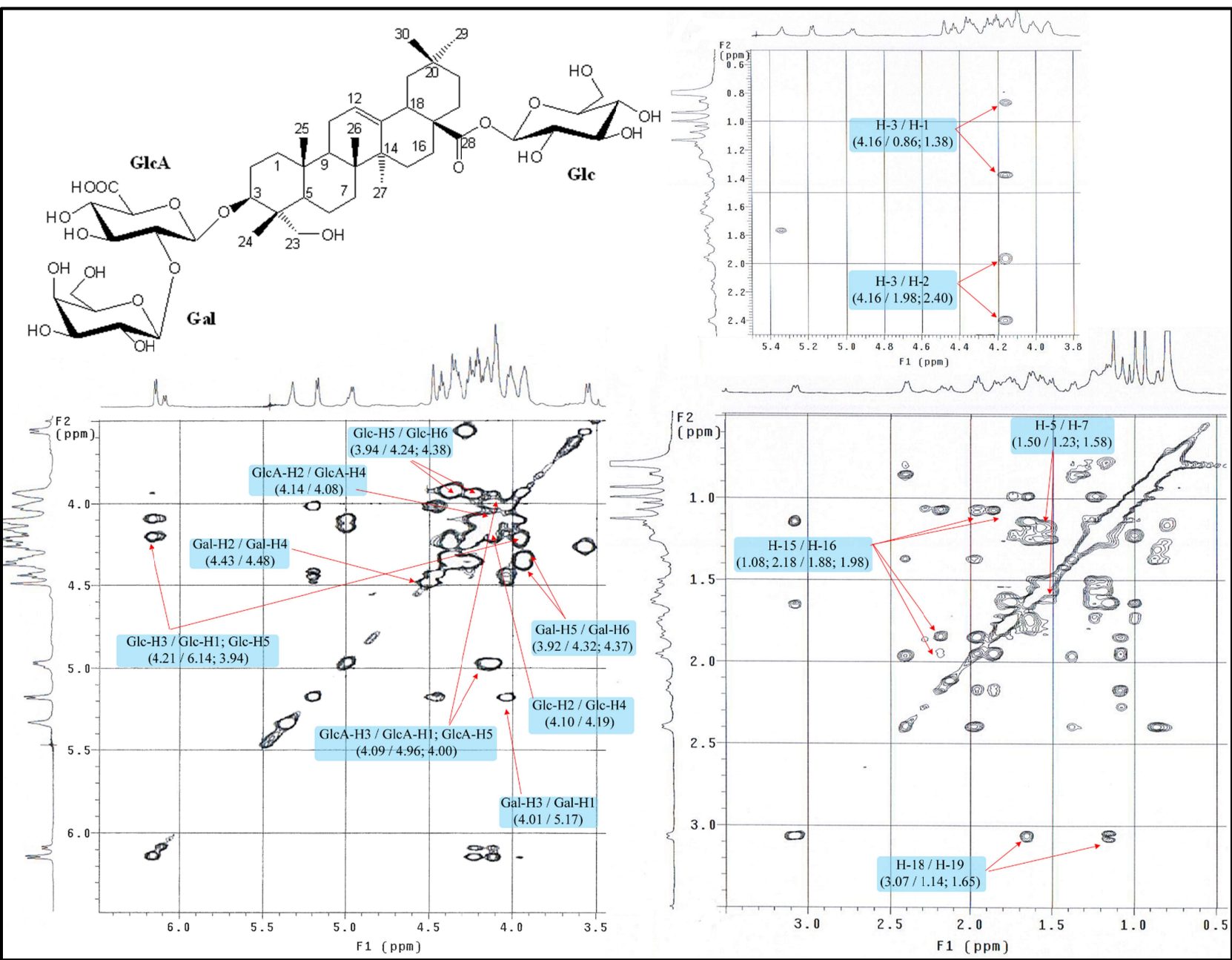


Figura 77. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P7.

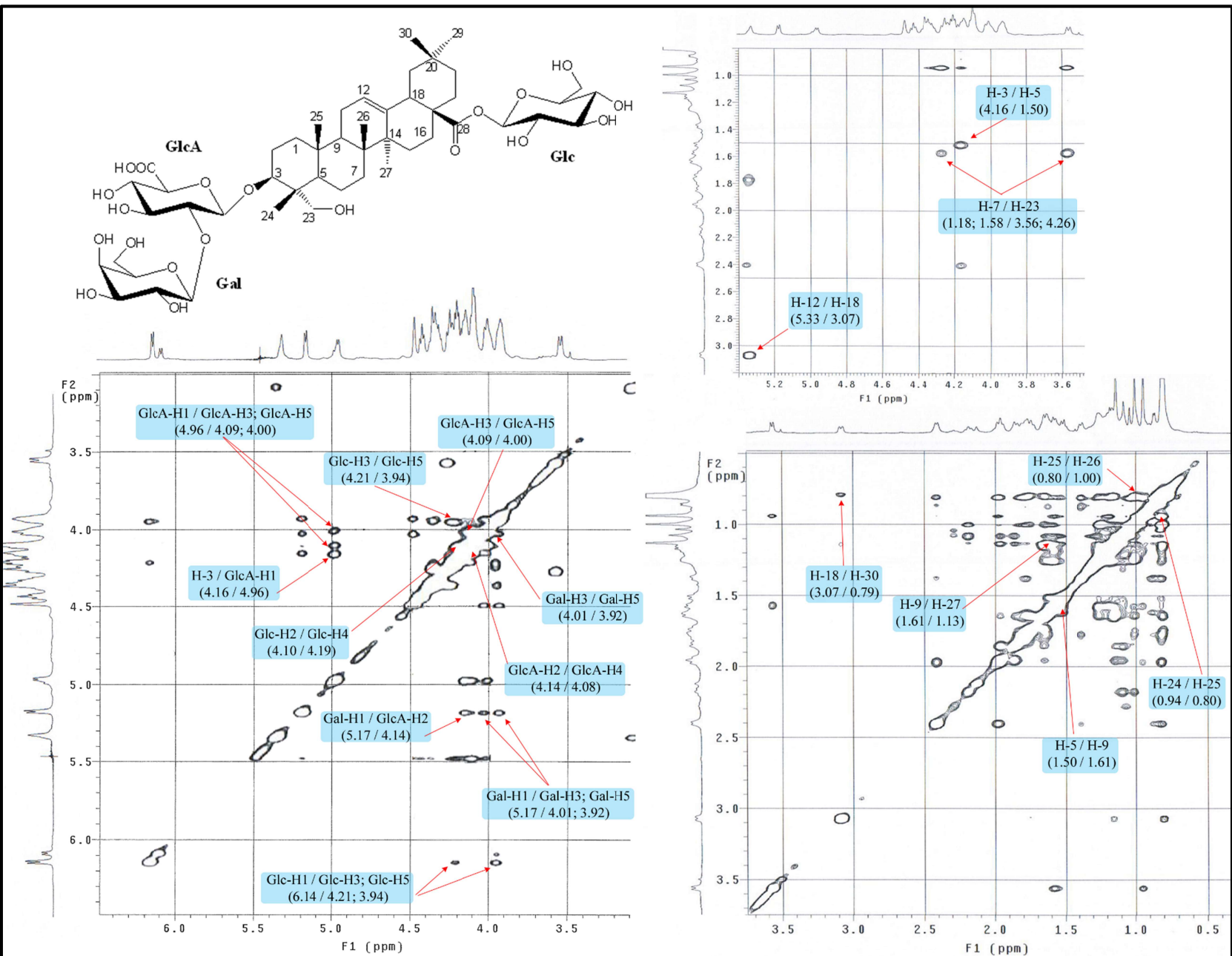
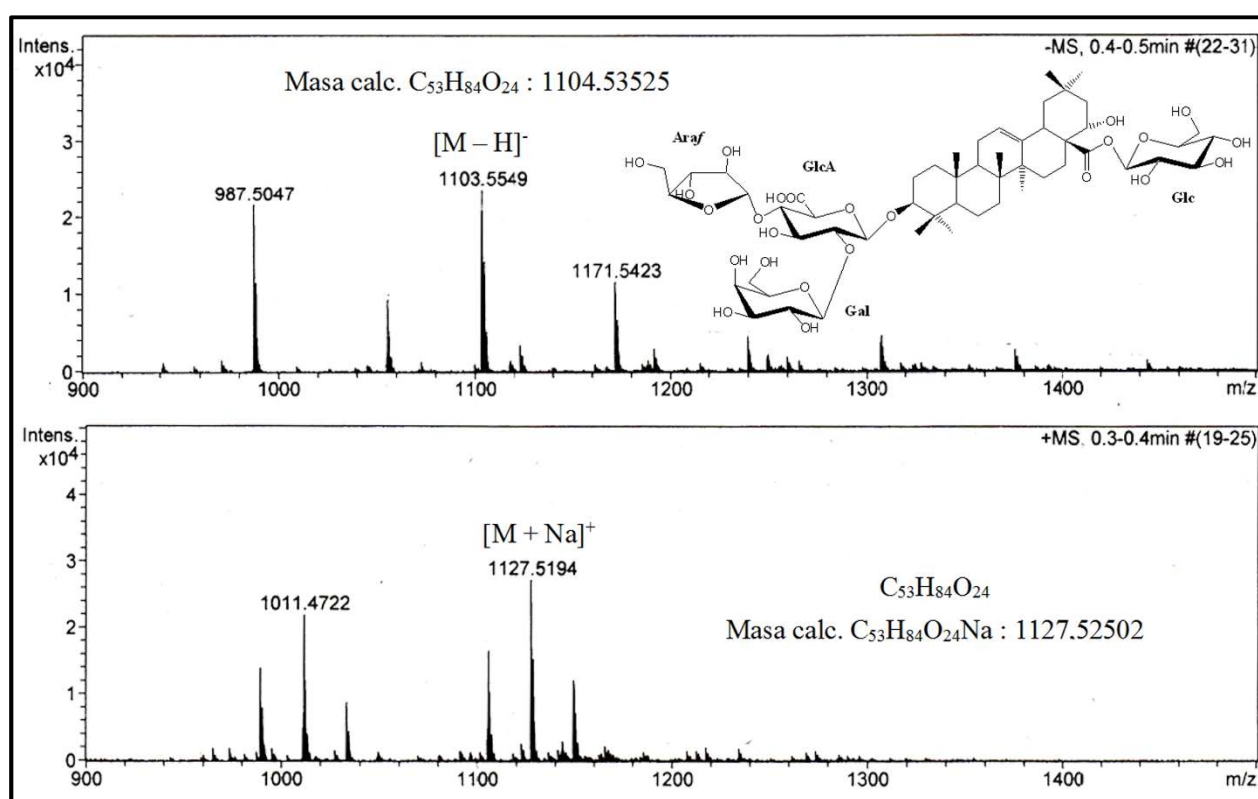


Figura 78. Espectro de NOESY del compuesto PT-P7.



**III.H. Compuesto PT-P8:** 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroxiolean-12-en-28-oato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo.

De los sucesivos fraccionamientos hechos por MPLC a la fracción PT16 de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’, se aislaron 3 mg de un sólido color blanco (**PT-P8**), cuyo espectro de masas de alta resolución por electronebulización en modo negativo (HR-ESI-MS < 0) muestra un ion molecular a 1.103,5549 m/z ( $[M-H]^-$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{53}H_{84}O_{24}$  (calc. 1.104,53525); mientras que el espectro de masa en modo positivo (HR-ESI-MS > 0) presenta un ion molecular a 1.127,5194 m/z ( $[M+Na]^+$ ) consistente con la fórmula molecular  $C_{53}H_{84}O_{24}Na$  (calc. 1.127,52502).



**Figura 79.** Espectro ESI-MS < 0 (arriba) y ESI-MS > 0 (abajo) del compuesto **PT-P8**.

Los espectros unidimensionales de RMN y el HSQC revelan la presencia de 53 carbonos, y los desplazamientos químicos de carbonos e hidrógenos (tabla 12) indican que se trata de un compuesto similar a **PT-P5**.

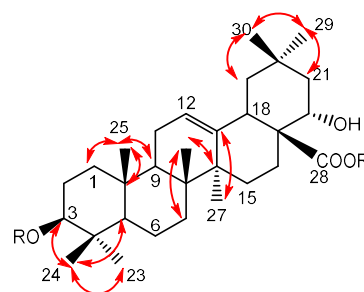
#### Identificación del aglicón:

Los desplazamientos químicos de los carbonos e hidrógenos en la zona de la genina son muy similares a los reportados para el compuesto **PT-P5**, por lo que se puede suponer que el

esqueleto triterpénico para el compuesto **PT-P8** es también un derivado del ácido oleanólico. La diferencia entre estos dos compuestos radica en que para **PT-P8** no se observan las señales de los metilenos que aparecen en **PT-P5** a  $\delta_C/\delta_H$  64,1/3,53 y 4,24 (C-23/H-23) y 32,3/1,62 y 1,70 (C-22/H-22), sino que en cambio se encuentran unas señales nuevas correspondientes a un metino oxigenado a  $\delta_C/\delta_H$  69,4/4,42 y un metilo a  $\delta_C/\delta_H$  27,7/1,10, con lo que el triterpeno de **PT-P8** tendría 7 grupos metilos. Con estas diferencias se puede suponer que el grupo hidroxilo ubicado en C-23 de la genina en el compuesto **PT-P5**, se encuentra en este caso ubicado en otra posición.

El análisis de los espectros bidimensionales de RMN permitió establecer la genina como el **ácido 22  $\alpha$ -hidroxioleanólico**, en base a las siguientes correlaciones observadas:

- Las correlaciones cruzadas en el HMBC (figura 84) para C24/H23 ( $\delta_C/\delta_H$  16,3/1,10) y para H24/C23 ( $\delta_H/\delta_C$  0,98/27,7) confirman que la posición en C-23 es un metilo.
- La correlación en COSY (figura 85) y TOCSY (figura 86) entre uno de los protones de H-21 ( $\delta_H$  1,65) y el protón a  $\delta_H$  4,42 (H-22) de un metino oxigenado, demuestran la presencia de un grupo hidroxilo en C-22.
- Las correlaciones en el NOESY (figura 87) de H-3 ( $\delta_H$  3,00) con H-23 ( $\delta_H$  1,10) y H-5 ( $\delta_H$  0,55) y la interacción de H-22 ( $\delta_H$  4,42) con H-30 ( $\delta_H$  0,90) y H-18 ( $\delta_H$  3,20) confirman la orientación  $\beta$  del grupo hidroxilo en C-3 y  $\alpha$  en el caso del hidroxilo en C-22.



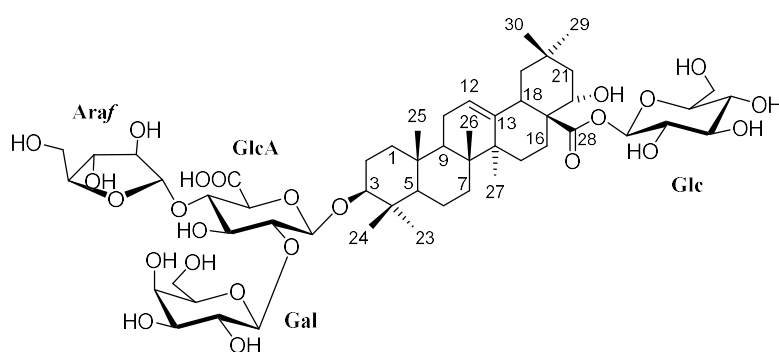
### Identificación de los azúcares:

El espectro HSQC (figura 83) muestra cuatro carbonos anoméricos a  $\delta_C$  95,6, 102,9, 104,2 y 107,5 que se correlacionan con los hidrógenos a  $\delta_H$  6,18 (doblete,  $J = 7,6$  Hz), 5,72 (doblete,  $J = 7,9$  Hz), 4,71 (doblete,  $J = 7,2$  Hz) y 6,10 (singulete ancho). Los espectros RMN-2D demuestran que los azúcares y las secuencias glicosídicas que conforman el compuesto **PT-P8** son iguales que las de **PT-P5**, es decir que hay una unidad de Glc unida al carbono C-28 de la genina por una unión tipo éster y que la secuencia formada por los otros tres azúcares, [Gal-(1 $\rightarrow$ 2)]-[Araf-(1 $\rightarrow$ 4)]-GlcA, esta enlazada al C-3 del esqueleto triterpénico.

**Conclusión:**

Todos los datos obtenidos en los experimentos de RMN 1D y 2D para el aglicón y los azúcares permitieron determinar que la estructura del compuesto **PT-P8** corresponde a **3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroiolean-12-en-28-oato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo** (figura 80).

Este compuesto también puede considerarse inusual dentro del género *Pittosporum*, ya que aunque el esqueleto triterpénico, ácido 22 $\alpha$ -hidroxioleanólico, es bien conocido, es la primera vez que se aísla dentro de este género, así como tampoco hay reportes sobre glicósidos del ácido 22 $\alpha$ -hidroxioleanólico dentro del género *Pittosporum*.



**Figura 80.** Estructura del compuesto **PT-P8**: 3-O-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroiolean-12-en-28-oato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo.

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto **PT-P8** en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Aglicón				Azúcares				
Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>c</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	
1	38,1	-CH <sub>2</sub> -	0,56	28- <i>O</i> -Glc	1	95,6	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,18 <i>d</i> (7,6)
			1,12					
2	26,6	-CH <sub>2</sub> -	1,68	3	77,9	-CHOH-	4,18	
			2,00	4	70,7	-CHOH-	4,15	
3	89,9	-CHOH-	3,00 <i>dd</i> (13,3; 3,0)	5	78,4	-CHOH-	3,93	
4	39,1	>C<	-----	6	61,8	-CH <sub>2</sub> OH	4,23	
5	55,4	>CH-	0,55 <i>br d</i> (10,5)				4,31 <i>dd</i> (11,4; 1,6)	
6	18,2	-CH <sub>2</sub> -	1,13	3- <i>O</i> -GlcA	1	104,2	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,71 <i>d</i> (7,2)
			1,32					
7	32,4	-CH <sub>2</sub> -	1,25	3	74,9	-CHOH-	4,65 <i>t</i> (9,0)	
			1,36	4	78,8	-CHOR-	4,66	
8	39,8	>C<	-----	5	77,6	-CHOH-	4,41	
9	47,5	>CH-	1,43 <i>dd</i> (13,9; 6,8)	6	171,8	-COOH	-----	
10	36,4	>C<	-----	Gal(1→2)-GlcA	1	102,9	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,72 <i>d</i> (7,9)
11	23,5	-CH <sub>2</sub> -	1,71					
12	122,8	=CH-	5,35 <i>br s</i>	3	74,4	-CHOH-	4,05 <i>dd</i> (9,5; 3,0)	
			-----	4	70,6	-CHOH-	4,42	
13	142,9	=C<	-----	5	76,8	-CHOH-	3,89 <i>m</i>	
14	42,1	>C<	-----	6	61,4	-CH <sub>2</sub> OH	4,14	
			1,15				4,27 <i>dd</i> (11,6; 6,0)	
15	27,5	-CH <sub>2</sub> -	2,42 <i>dd</i> (13,4; 12,6)	Araf-(1→4)-GlcA	1	107,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,10 <i>br s</i>
			1,90 <i>dd</i> (13,3; 12,6)					
16	23,4	-CH <sub>2</sub> -	2,60 <i>dd</i> (13,3; 3,8)	3	78,6	-CHOH-	4,42 <i>m</i>	
			1,18	4	86,6	-CHOH-	4,98 <i>q</i> (3,8)	
17	53,6	>C<	-----	5	62,1	-CH <sub>2</sub> OH	3,89	
18	42,8	>CH-	3,20 <i>dd</i> (12,6; 3,0)				3,92	
19	45,4	-CH <sub>2</sub> -	1,82 <i>dd</i> (13,4; 12,6)					
			-----					
20	31,1	>C<	-----					
21	42,7	-CH <sub>2</sub> -	1,65					
			n.d.					
22	69,4	-CHOH-	4,42					
23	27,7	-CH <sub>3</sub>	1,10 <i>s</i>					
24	16,3	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>					
25	15,1	-CH <sub>3</sub>	0,68 <i>s</i>					
26	17,3	-CH <sub>3</sub>	1,00 <i>s</i>					
27	26,3	-CH <sub>3</sub>	1,22 <i>s</i>					
28	175,8	-COOR	-----					
29	32,9	-CH <sub>3</sub>	0,87 <i>s</i>					
30	24,7	-CH <sub>3</sub>	0,90 <i>s</i>					

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete, n.d = no detectado.

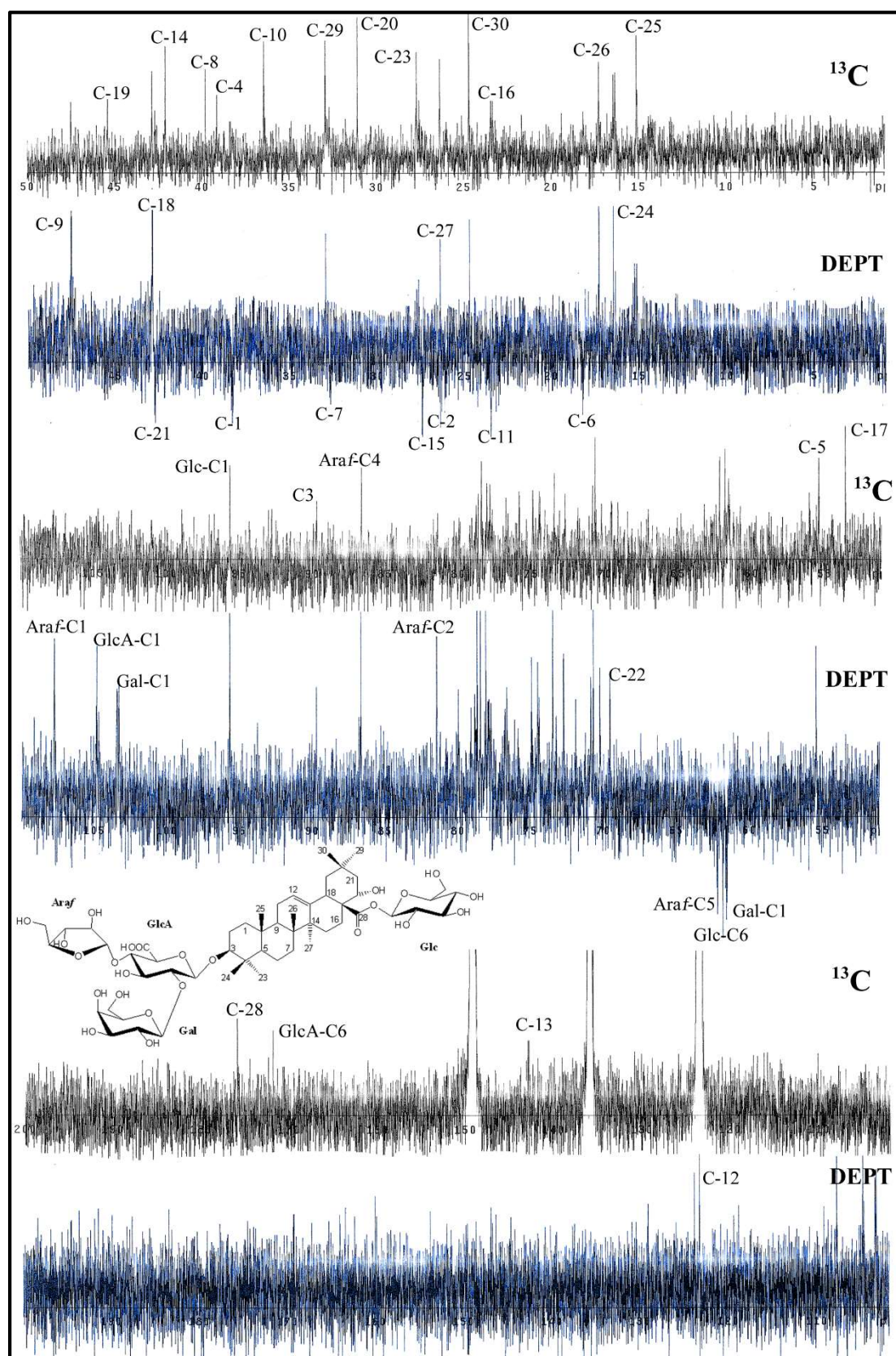


Figura 81. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT del compuesto PT-P8.



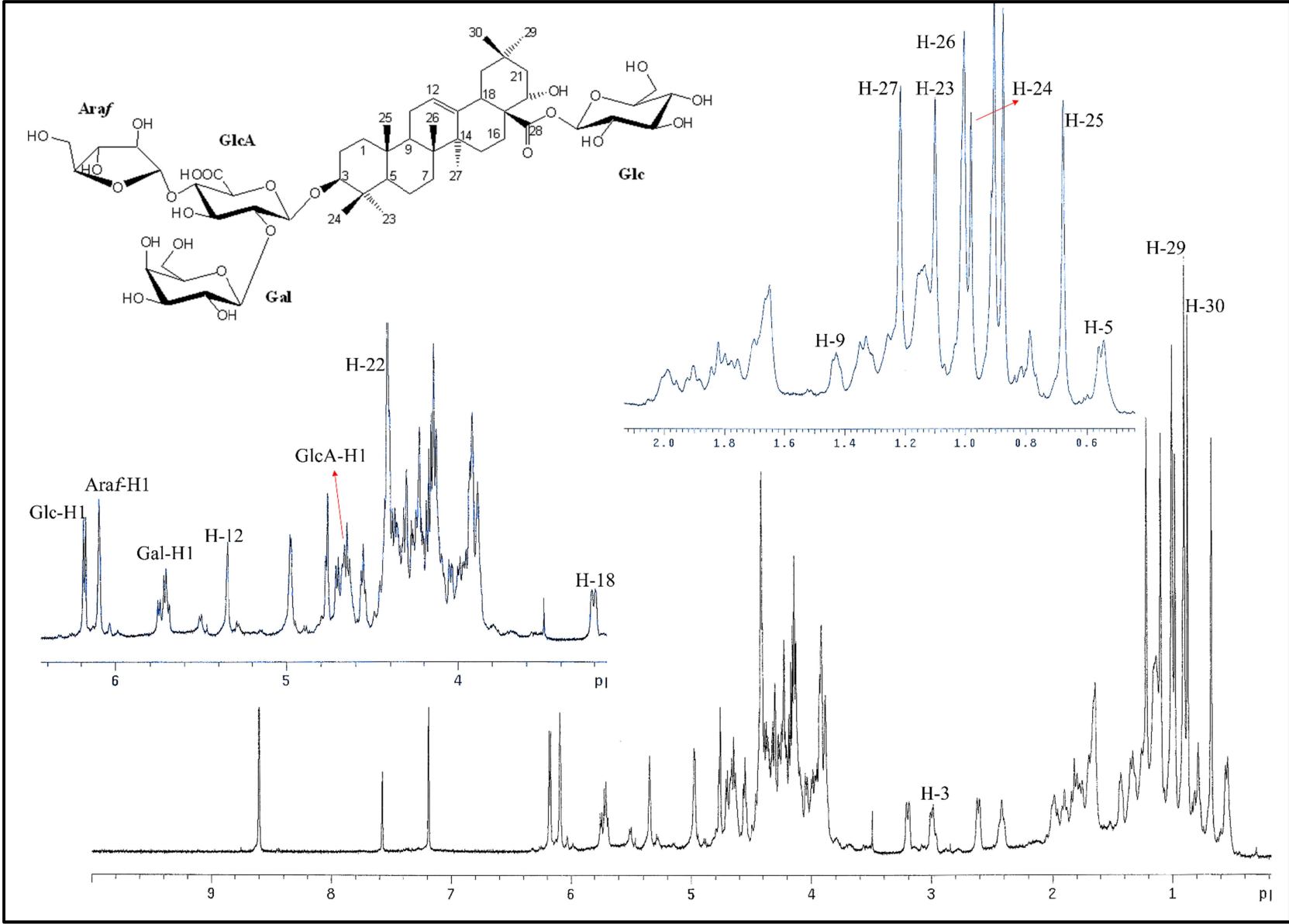


Figura 82. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **PT-P8**.

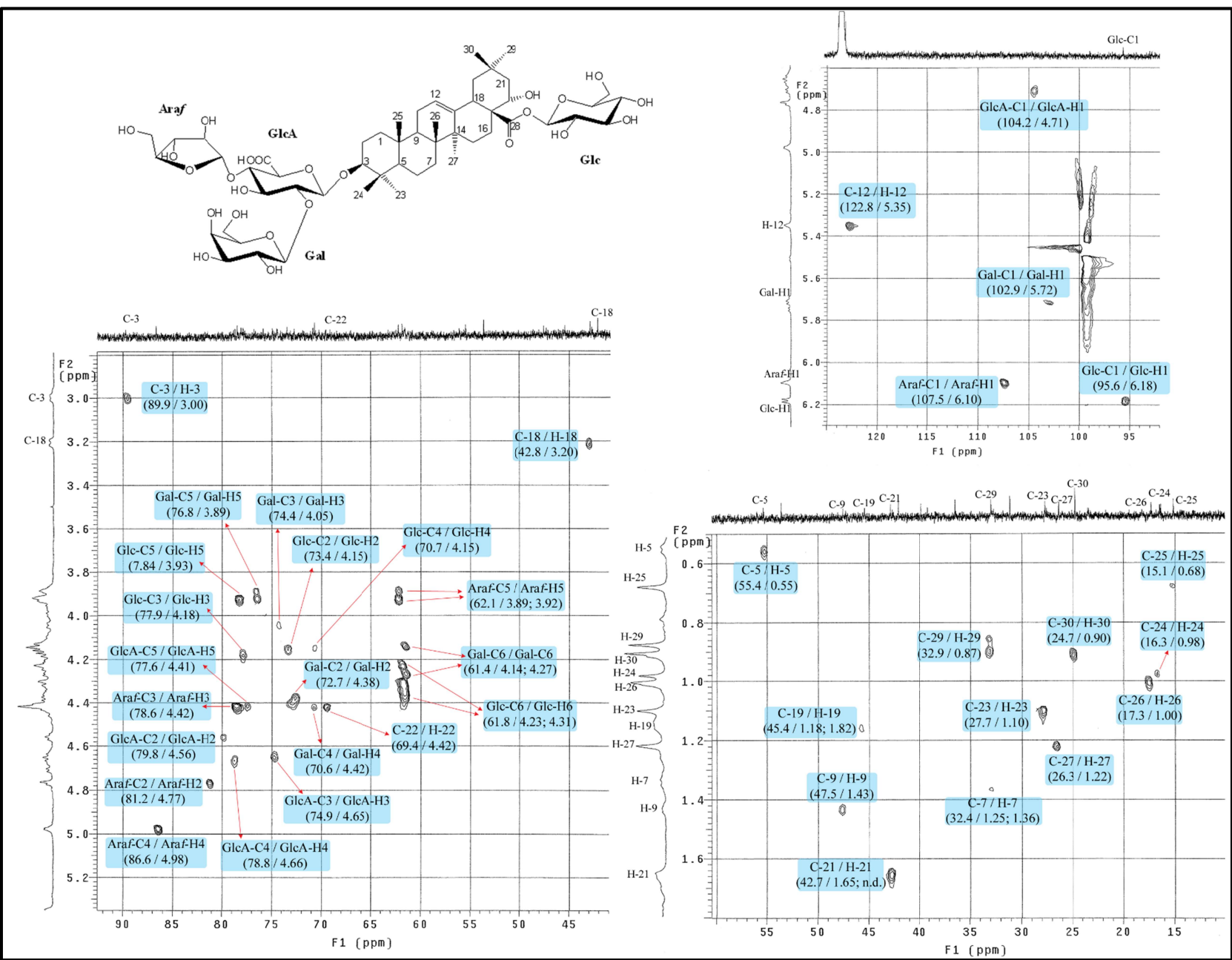


Figura 83. Espectro de HSQC del compuesto PT-P8.

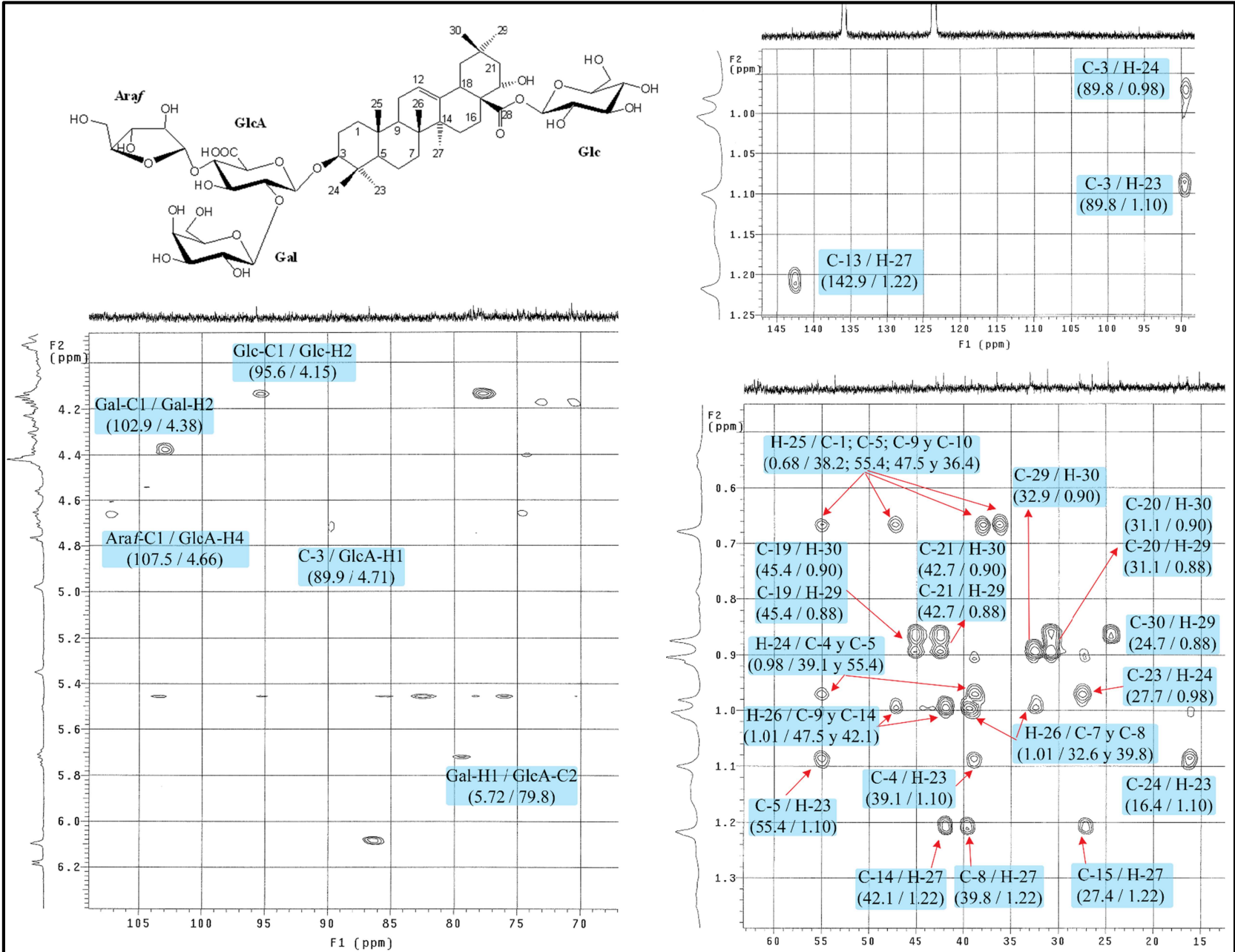


Figura 84. Espectro de HMBC del compuesto PT-P8.

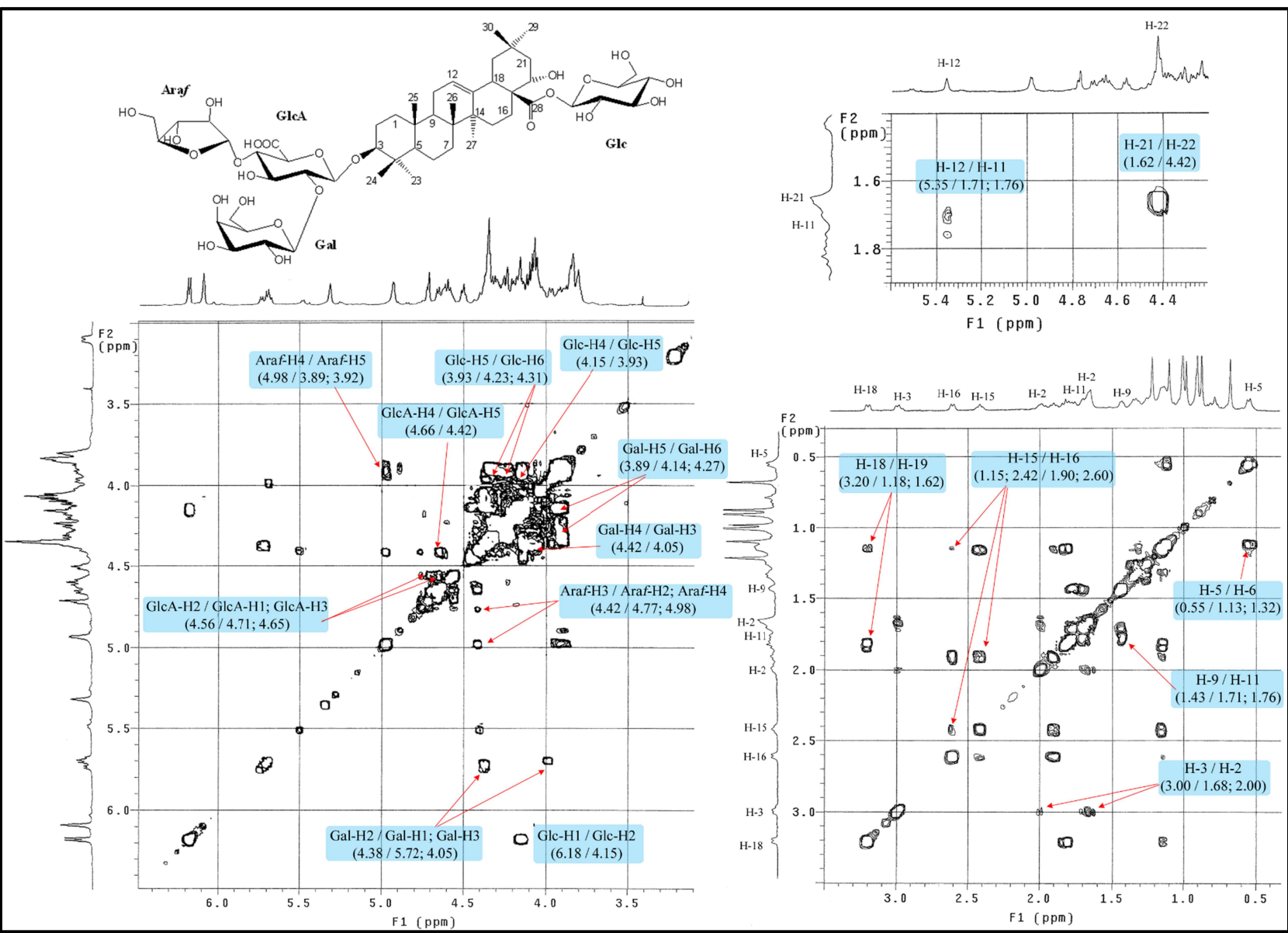


Figura 85. Espectro de COSY del compuesto PT-P8.



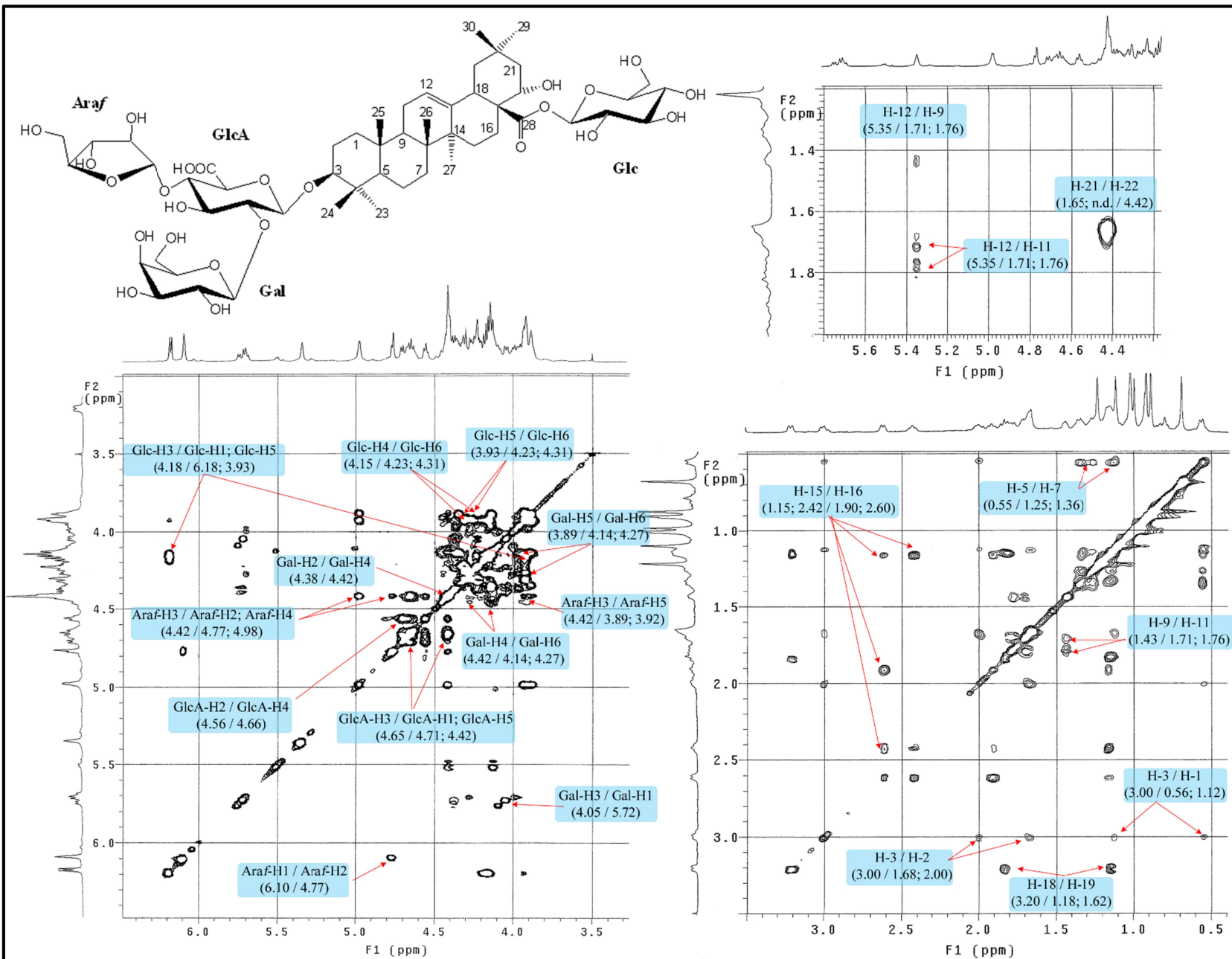


Figura 86. Espectro de TOCSY del compuesto PT-P8.



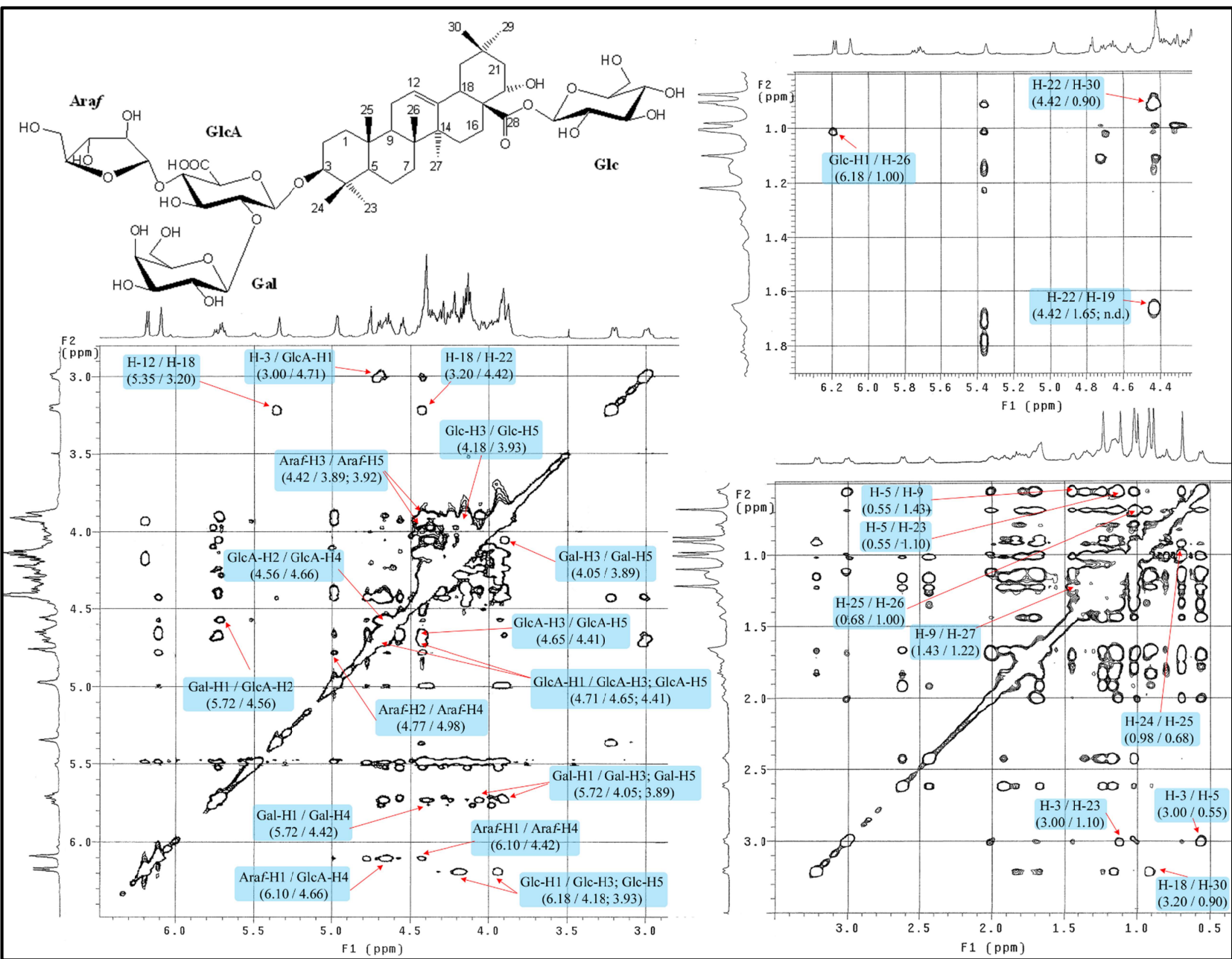


Figura 87. Espectro de NOESY del compuesto PT-P8.

*CAPÍTULO II.*  
*ARALIACEAE*

*Hydrocotyle multifida*

## I. INTRODUCCIÓN

### I.A. Usos etnobotánicos del género *Hydrocotyle*

Como ya se mencionó anteriormente las especies pertenecientes al género *Hydrocotyle* son usadas en algunas regiones como alimento; así, las especies *H. javanica*, *H. rotundifolia* y *H. sibthorpioides* se consideran alimentos en diversas regiones de África y Asia (Baruah y Borah, 2009; Bussmann *et al.*, 2011b; Saikia y Deka, 2013). Sin embargo su principal uso alrededor del mundo es dentro de la medicina tradicional destacando su uso para el tratamiento de afecciones intestinales, fiebre, tos, resfriados, como diurético, e incluso como potenciador de la memoria. En la tabla 13 se muestra los usos terapéuticos que se les dan a distintas especies de *Hydrocotyle*.

**Tabla 13.** Usos etnobotánicos registrados para diversas especies del género *Hydrocotyle*

Especie	Usos / aplicaciones	Forma de utilización	Referencia
<i>H. bonariensis</i>	Emético y para afecciones hepáticas	Se utilizan las ramas y las hojas	(Goleniowski <i>et al.</i> , 2006; Zanon <i>et al.</i> , 1999)
	Diurético, obstrucciones hepáticas	Las raíces	(Silva <i>et al.</i> , 2010)
<i>H. exigua</i>	Tos y bronquitis	Infusión hecha con las hojas	(Di Stasi <i>et al.</i> , 2002)
<i>H. himalaica</i>	Neumonía y afecciones de garganta	Planta entera	(Lepcha y Das, 2011)
	Gárgaras para tratar amigdalitis	Decocción de hojas	(Saha <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. javanica</i> o <i>H. nepalensis</i> (sin.)	Sarpullidos	Linimento de las hojas	(Inta <i>et al.</i> , 2008)
<i>H. mannii</i>	Dolor de estómago, disentería, tuberculosis, cólera, problemas gástricos	Jugo de la planta	(Dutta, 2014)
	Para potenciar la memoria	Planta entera	(Kawalekar, 2011)
<i>H. ranunculoides</i>	Infecciones oculares	Aplicación local de las hojas	(Giday <i>et al.</i> , 2010)
	VIH y SIDA	Planta entera	(Lamorde <i>et al.</i> , 2010)
<i>H. rotundifolia</i>	Emético y afecciones hepáticas	Se prepara un bebedizo con las hojas	(Goleniowski <i>et al.</i> , 2006; Hajdu y Hohmann, 2012)
	Disentería, problemas de hígado y estómago, desordenes nerviosos, inducir el apetito, mejorar la memoria, purificador de sangre	Toda la planta	(Baishya <i>et al.</i> , 2013; Sikdar y Dutta, 2008)
<i>H. sibthorpioides</i>	Anti-diabético	Toda la planta	(Mondal <i>et al.</i> , 2013)
	Problemas gastrointestinales, desordenes hepáticos, tónico de memoria. Externamente para cortes y heridas.	Partes aéreas	(Pegu <i>et al.</i> , 2014)
<i>H. umbellata</i>	Ansiolítico, estimulante de memoria, úlceras de piel, diurético, anti-hipertensivo, dermatitis	Toda la planta	(Florentino <i>et al.</i> , 2013)

### I.B. Fitoquímica reportada para las especies de *Hydrocotyle*

La determinación de la composición química de las especies de *Hydrocotyle* abarca hasta el momento solo 17 especies, de las 130 aceptadas dentro de este género. Los estudios fitoquímicos realizados para estas especies incluyen el análisis de sus aceites esenciales, pero sobre todo la identificación de metabolitos secundarios tales como triterpenos, esteroides, flavonoides y sobre todos los glicósidos de estos metabolitos, es decir saponinas triterpénicas esteroidales y glicósidos de flavonoides.

#### I.B.1. Aceites esenciales

Dentro de la familia Araliaceae, son varios los géneros que contienen especies que producen aceites esenciales, los cuales han demostrado tener una gran y variada actividad farmacológica. Las especies de *Hydrocotyle* se encuentran dentro de este grupo, sin embargo a pesar de haberse identificado hasta ahora alrededor de 130 especies diferentes de *Hydrocotyle*, solo cuatro especies de *Hydrocotyle* han sido analizadas con la finalidad de determinar la composición química de sus aceites esenciales.

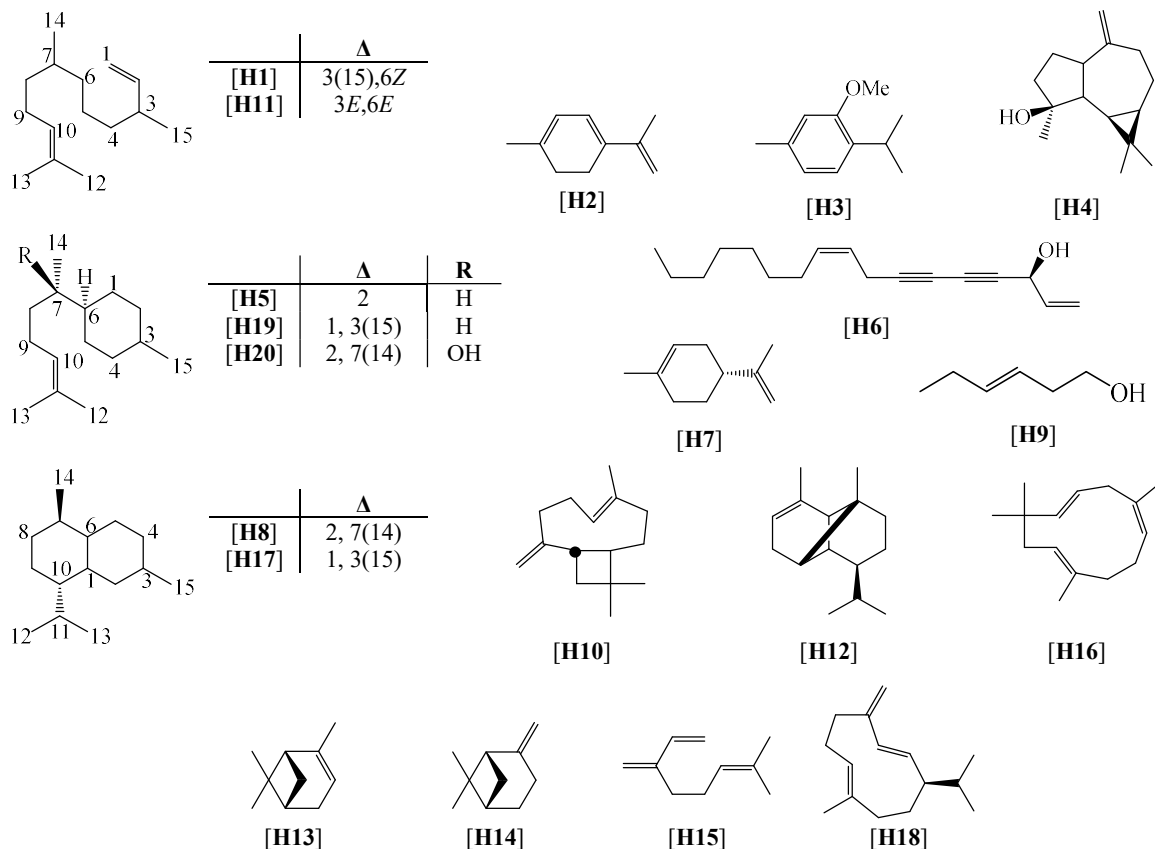
El primer reporte sobre el aceite esencial de una especie perteneciente a este género fue realizado por Asakawa y colaboradores en 1982 con las especies *H. sibthorpioides* y *H. maritima*; para ambas especies el componente mayoritario fue el *trans*- $\beta$ - farneseno [H1], aunque para *H. maritima* también se reportan el  $\alpha$ -terpineno [H2] y el éster metílico del timol [H3] en cantidades apreciables (Asakawa *et al.*, 1982).

Para la especie *H. sibthorpioides* el primer estudio sobre la composición química de su aceite esencial data de 2004, realizado por Mu y colaboradores, donde fueron identificados 38 compuestos (Mu *et al.*, 2004). Un año después, Chou analizó el aceite esencial proveniente de las hojas de esta misma especie, identificando 34 compuestos, principalmente mono y sesquiterpenoides (Chou, 2005). El reporte más reciente sobre el aceite esencial de esta especie, es del 2008, realizado por Zhang y Zhang, donde los componentes mayoritarios identificados fueron los sesquiterpenos (-)-espatulenol [H4] y  $\alpha$ -bisabolol [H5] junto con el compuesto falcarinol [H6] (Zhang y Zhang, 2008).

Para la especie *H. bonariensis*, existen dos reportes sobre el aceite esencial de sus hojas (Huong *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009) y de sus flores (Huong *et al.*, 2009), donde Silva y colaboradores identificaron al monoterpeno (+)-limoneno [H7] y el sesquiterpeno  $\gamma$ -muuroleno [H8] como los componentes mayoritarios de las hojas. En el análisis de Huong y colaboradores encontraron que en los tallos-hojas los componentes principales eran (*Z*)-3-hexen-1-ol [H9],

*trans*-cariofileno [H10],  $\alpha$ -farneseno [H11] y  $\alpha$ -copaeno [H12], mientras que en las flores los compuestos mayoritarios eran  $\alpha$ -pineno [H13],  $\beta$ -pineno [H14],  $\beta$ -mirceno [H15], (+)-limoneno [H7],  $\alpha$ -humuleno [H16], *epi*-biciclosesquifelandreno [H17] (ver figura 88).

Los otros dos reportes existentes hasta el momento para especies de *Hydrocotyle* son de la especie *H. wilfordii* (Hu *et al.*, 2008) y de las partes aéreas de *H. umbellata* (Rojas *et al.*, 2009). En el aceite esencial de la especie *H. umbellata*, fueron identificados 21 componentes, donde los mayoritarios fueron los sesquiterpenos germacreno D [H18],  $\beta$ -sesquifelandreno [H19] y  $\beta$ -bisaboleno [H20] (Rojas *et al.*, 2009).



**Figura 88.** Compuestos mayoritarios reportados en los aceites esenciales del género *Hydrocotyle*.

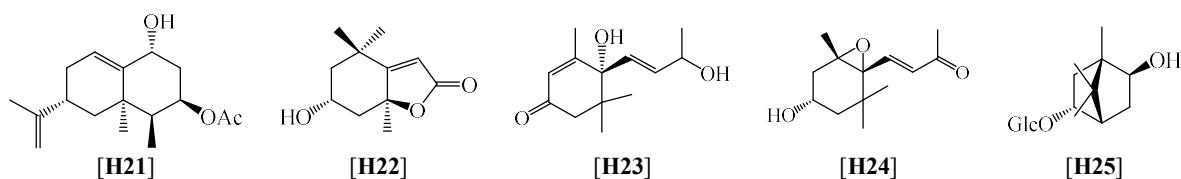
## I.B.2. Terpenoides

### I.B.2.1. Mono- y sesqui-terpenoides

Adicionalmente a los monoterpenos y sesquiterpenos reportados en los aceites esenciales de las especies de *Hydrocotyle*, algunos de estos compuestos han obtenidos en los extractos alcohólicos de las especies, como en el caso de *H. ramiflora* (Kwon *et al.*, 1998), *H. leucocephala* (Ramos *et al.*, 2006) y *H. sibthorpioides* (Pu *et al.*, 2010).



En el extracto metanólico de la especie *H. ramiflora* se aisló el sesquiterpeno capsidiol con uno de sus grupos hidroxilos acetilados [H21] (Kwon *et al.*, 1998). Mientras que del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. leucocephala* se encontraron el monoterpeno loliolido [H22] y así como el dehidrovomifoliol [H23] y la 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-7-megaestigmen-9-ona [H24], que son sesquiterpenos degradados (Ramos *et al.*, 2006). Por último, un monoterpeno glicosidado, 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil(-)-angelicoidenol [H25], fue aislado del extracto etanólico de *H. sibthorpiodes* (Pu *et al.*, 2010).



**Figura 89.** Mono y Sesquiterpenoides aislados de los extractos de especies de *Hydrocotyle*.

#### I.B.2.2. Triterpenos y esteroides

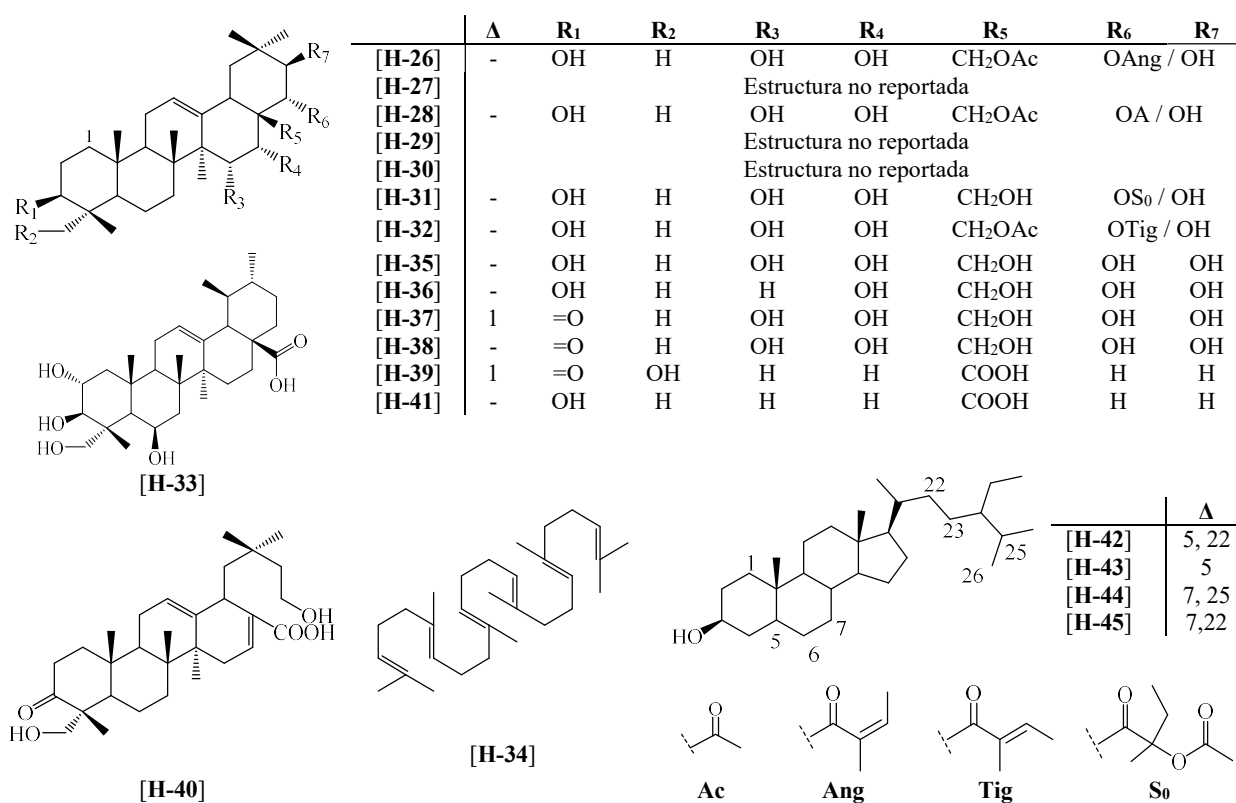
El estudio de la composición química de las especies de *Hydrocotyle* ha permitido la obtención de 16 esqueletos triterpénicos diferentes y 4 esteroidales; los triterpenos aislados son en su mayoría derivados del oleanano y algunos de ellos han sido obtenidos de forma directa, mientras que el resto se obtuvo mediante la hidrólisis ácida de triterpenos glicosidados.

La especie *H. vulgaris* es para la que existe un mayor reporte de esqueletos triterpénicos, los cuales fueron obtenidos por la hidrólisis de los respectivos glicósidos (Hiller *et al.*, 1971; Keipert *et al.*, 1975; Tomei *et al.*, 1989). Estos estudios son los primeros que se realizaron sobre triterpenos dentro del género *Hydrocotyle*. Hiller y colaboradores, en 1971, así como Keipert y colaboradores, en 1975, aislaron e identificaron 7 triterpenos de *H. vulgaris*, las hydrocotylegeninas A-F [H26-H31] y la hydrocotylegenina A' [H32], aunque para estos triterpenos las sustituciones en los carbonos C-21 y C-22 no fue resuelta. En el caso de Tomei y colaboradores, consiguieron aislar el ácido madecásico [H-33] de esta especie de *Hydrocotyle*.

Otra especie de la que han sido aislados un número importante de triterpenos es *H. ranunculoides*, ya que del extracto metanólico de esta especie se obtuvieron 6 esqueletos triterpénicos: ácido 17,22-*seco*-3-oxo-22,23-dihidroxi- $\Delta^{12,16}$ -oleanólico [H-34], R<sub>1</sub>-barrigenol [H-35], barringtogenol C [H-36], 3-oxo-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,21 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,28-pentahidroxi- $\Delta^{1,12}$ -oleanano [H-37], 3-oxo-15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,21 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,28-pentahidroxi- $\Delta^{12}$ -oleanano [H-38] y ácido hederagénico [H-39] (Della Greca *et al.*, 1993).

Los otros dos triterpenos reportados dentro del género *Hydrocotyle* son el escualeno [**H-40**] y el ácido oleanólico [**H-41**], obtenidos de los extractos etanólicos de *H. bonariensis* (Huong *et al.*, 2009) y *H. sibthorpioides* (Pu *et al.*, 2010).

En cuanto a los esteroides, el estigmasterol [**H-42**] y el  $\beta$ -sitosterol [**H-43**] fueron aislados del extracto etanólico de *H. sibthorpioides* (Asakawa *et al.*, 1982; Pu *et al.*, 2010; Zhang y Zhang, 2007). Sin embargo el estigmasterol [**H-42**] también fue hallado en el extracto de etanol de la especie *H. umbellata*, junto con el estigmasta-7,25-dien-3-ol [**H-44**] (Chavasiri *et al.*, 2005). Un cuarto esteroide, el  $\alpha$ -espinasterol [**H-45**], fue encontrado en el extracto metanólico de *H. ramiflora* (Kwon *et al.*, 1998) y en el extracto de MeOH de las partes aéreas de *H. leucocephala* (Ramos *et al.*, 2006).



**Figura 90.** Triterpenoides y esteroides identificados en el género *Hydrocotyle*.

### I.B.3. Saponinas triterpénicas y esteroidales

En la familia Araliaceae, en algunas especies de *Cussonia* (Ponou *et al.*, 2014) y *Schefflera* (Tapondjou *et al.*, 2006) se han reportado la presencia de saponinas triterpénicas tipo oleanano. Dentro del género *Hydrocotyle*, se han reportadas hasta ahora 37 saponinas, 33 de las cuales poseen una genina triterpénica y las 4 restantes son esteroidales. Todos estos compuestos

han sido aislado principalmente de cuatro especies: *H. ranunculoides*, *H. sibthorpioides*, *H. bonariensis* y *H. umbellata*.

La mayoría de las saponinas triterpénicas reportadas en especies de *Hydrocotyle* tienen el esqueleto R1-barrigenol (derivado hexahidroxilado del oleanano) como base de la genina, en varios casos con grupos acilo en los carbonos C21, C22 y C28 del triterpeno. También se han aislado saponinas con esqueletos triterpénicos derivados del A1-barrigenol, barringtogenol C, ácido oleanólico, así como algunos esqueletos tipo ursano. Las unidades glicosídicas que conforman las saponinas halladas en este género, suelen ser principalmente glucosa, ácido glucorónico, arabinopiranososa y/o galactosa.

El primer reporte de saponinas en el género *Hydrocotyle* fue hecha en 1981, cuando Hiller y colaboradores aislaron el 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-21 o 22-*O*-(2-acetoxi-2-metilbutanoil)-R1-barrigenol [**H46**] de *H. vulgaris*, es de resaltar que no fue resuelta la posición del sustituyente, 2-acetoxi-2-metilbutanoil, pudiendo estar en C-21 o C-22 (Hiller *et al.*, 1981).

Para la especie *H. ranunculoides*, se aislaron en 1994 una serie de 6 saponinas a partir del extracto de MeOH, llamadas ranuncósidos I-VI [**H47-H52**] (Della Greca *et al.*, 1994). Un año más tarde, Corsaro y colaboradores aislaron otra saponina del extracto metanólico de esta especie, 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-13 $\beta$ ,28-epoxiolean-11-eno-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,21 $\beta$ ,22 $\alpha$ -pentol [**H53**] (Corsaro *et al.*, 1995).

Otras 16 saponinas triterpénicas han sido halladas en los extractos de *H. sibthorpioides*. En 2004, Matsushita y colaboradores, aislaron del extracto de MeOH de la planta los hydrocotylósidos I-VII [**H54-H60**] junto con la udosaponina B [**H61**] (Matsushita *et al.*, 2004). Los hydrocotylósidos II y III [**H55** y **H-56**] fueron encontrados nuevamente en esta especie años más tarde en el extracto de EtOH al 70% (Maulidiani *et al.*, 2012). Esta especie también fue estudiada por Huang y colaboradores en 2008, y del extracto de EtOH se aislaron las hydrocosisaponinas A-F [**H62-H67**] junto con el hydrocotilósido VII [**H60**] (H.C. Huang *et al.*, 2008). Las otras dos saponinas encontradas en *H. sibthorpioides* son el asiaticósido [**H68**] (Huang *et al.*, 2013b; Lin *et al.*, 2013) y el madecasósido [**H69**] (Lin *et al.*, 2014), aislados ambos de extractos etanólicos.

Otra especie en la que se han reportado saponinas triterpénicas es *H. bonariensis*, de la cual fueron aislados los bonarienósidos A-E [**H70-H74**] y el saniculósido-R<sub>1</sub> [**H75**] del extracto metanólico de las partes subterráneas (Tabopda *et al.*, 2012). En esta especie también fueron

hallados los ranuncósidos I [H47], II [H48], IV [H50] y V [H51] en el extracto etanólico de la planta (Maulidiani *et al.*, 2014).

Por último de la especie *H. umbellata* fueron aislados los umbellatósidos A y B [H76 y H77] del extracto etanólico de las hojas (Sosa *et al.*, 2011), así como el éster metílico del ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosiloleanólico [H78] en el extracto de EtOH de la planta (Chavasiri *et al.*, 2005).

En cuanto a saponinas esteroidales, las 4 saponinas halladas en especies de *Hydrocotyle* son el daucosterol [H79] aislada de *H. sibthorpioides* (Zhang y Zhang, 2007); y las otras tres halladas en la especie *H. umbellata* son el 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosilestigmasterol [H80] del extracto de EtOH de la planta y los umbellatósidos C y D [H81 y H82] del extracto etanólico de las hojas (Sosa *et al.*, 2011).

#### I.B.4. Flavonoides, lignanos y derivados fenólicos

##### I.B.4.1. Flavonoides

Existen diversos estudios que reportan la presencia de flavonoides y sus glicósidos dentro de la composición química de diferentes especies de *Hydrocotyle*, y hasta ahora se han identificado 24 de estos compuestos, 17 de los cuales son flavonoides glicosidados.

Uno de los primeros reportes sobre flavonoides en el género *Hydrocotyle* fue hecho por Crowden y colaboradores en 1969, donde analizaron las hojas de 9 especies de *Hydrocotyle* (*H. americana*, *H. bonariensis*, *H. centella*, *H. interrupta*, *H. javanica*, *H. prolifera*, *H. ranunculoides*, *H. umbellata* y *H. vulgaris*) hallándose en todas ellas la presencia del flavonol kaempferol [H83] (Crowden *et al.*, 1969). Este flavonoide también fue encontrado en el extracto etanólico de la especie *H. sibthorpioides* (Andarwulan *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2010).

Otros 6 flavonoides fueron hallados en los extractos etanólicos y metanólicos de la especie *H. sibthorpioides*. Estos compuestos fueron identificados como: los flavonoles quercetina [H84] (Andarwulan *et al.*, 2012; Pu *et al.*, 2010; Shigematsu *et al.*, 1982), miricetina [H85] (Andarwulan *et al.*, 2012) y isorhamnetina [H86] (Pu *et al.*, 2010); la flavona apigenina [H87] (Pu *et al.*, 2010) y las isoflavonas daidzeína [H88] (Zhang y Zhang, 2007) y genisteína [H89] (Huang *et al.*, 2013a; Zhang y Zhang, 2007).

La quercetina [H84] también ha sido aislada en las especies *H. vulgaris* (Rzadkowska y Olechnowicz, 1974), *H. bonariensis* (Da Silva *et al.*, 2013) y en 4 de las especies (*H. batrachium*, *H. himalaica*, *H. nepalensis* y *H. wilfordii*) analizadas por Dong y colaboradores (Dong *et al.*, 2008).

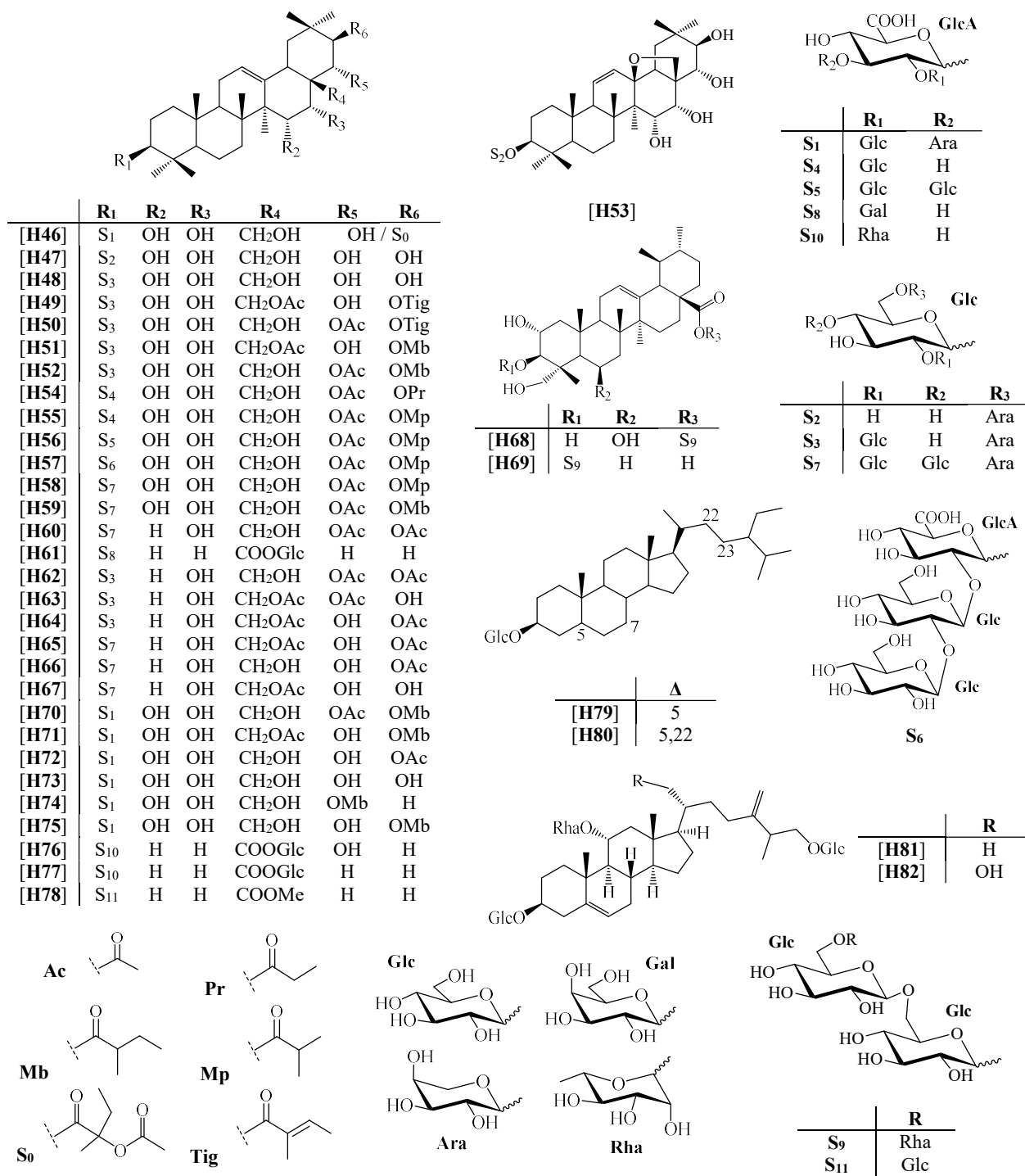


Figura 91. Saponinas aisladas de las especies de *Hydrocotyle*.

Como se mencionó anteriormente se ha identificado 17 glicósidos de flavonoides dentro del género, la mayoría de los cuales tienen como base el kaempferol [H83] o la quercetina [H84] y los azúcares más comunes son la glucosa, la galactosa, la rhamnosa y la arabinopiranososa. El primer reporte de un flavonoide glicosidado data de 1960, cuando Nakaoki y Morita, aislaron la 3-O-β-galactopiranosilquercetina [H90] de *H. wilfordii* (Nakaoki y Morita, 1960). Posteriormente, este glicósido ha sido hallado en otras especies de *Hydrocotyle*



como *H. vulgaris* en 1974 (Hiller *et al.*, 1979; Rzadkowska y Olechnowicz, 1974; Voigt *et al.*, 1981), *H. sibthorpioides* en 1982 (Pu *et al.*, 2010; Shigematsu *et al.*, 1982), *H. umbellata* en 1989 (Adams *et al.*, 1989) y *H. leucocephala* en 2006 (Ramos *et al.*, 2006).

El estudio realizado a 9 especies de *Hydrocotyle* por Crowden y colaboradores en 1969 reporta la presencia de 3-*O*- $\beta$ -glucopiranosilquercetina [H91] en las hojas de las especies *H. americana*, *H. bonariensis*, *H. centella*, *H. interrupta*, *H. javanica*, *H. prolifera*, *H. ranunculoides*, *H. umbellata* y *H. vulgaris* (Crowden *et al.*, 1969).

Entre 1974 y 1981, fueron aislados 5 glicósidos de flavonoides de la especie *H. vulgaris*, que fueron identificados como 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-galactopiranosido de quercetina [H92] (Rzadkowska y Olechnowicz, 1974; Voigt *et al.*, 1981), 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-galactopiranosilquercetina [H93] (Hiller *et al.*, 1979; Voigt *et al.*, 1981), 3-*O*- $\beta$ -galactopiranosido de kaempferol [H94], 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-galactopiranosil kaempferol [H95] y 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-galactopiranosilkaempferol [H96] (Voigt *et al.*, 1981).

Para la especie *H. sibthorpioides* se han aislado 7 glicósidos de flavonoides, el primero de ellos, 3-*O*-(6''-cafeoilgalactosil)-quercetina [H97], por Shigematsu y colaboradores en 1982 del extracto metanólico de la planta (Shigematsu *et al.*, 1982). Los otros 6 glicósidos fueron hallados en el extracto etanólico por Maulidiani y colaboradores e identificados como: 3-*O*- $\beta$ -glucopiranosilkaempferol [H98], 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosilkaempferol [H99], 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosilquercetina [H100], 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosido de quercetina [H101], rutina [H102] y el compuesto [H91] (Maulidiani *et al.*, 2014, 2012).

Maulidiani y colaboradores también analizaron el extracto etanólico de la especie *H. bonariensis* para la cual aislaron los flavonoides glicosidados [H102], [H91] [también hallado en los frutos (Harborne y Williams, 1972)] y 3-*O*- $\beta$ -glucopiranosil-7-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopiranosido de kaempferol [H103] (Maulidiani *et al.*, 2014, 2012).

El flavonoide rutina [H102] también fue aislado en otras dos especies de *Hydrocotyle*, del extracto acuoso de *H. batrachium* (S.S. Huang *et al.*, 2008b) y del extracto etanólico de *H. nepalensis* (S.S. Huang *et al.*, 2008a).

Del extracto metanólico de las partes aéreas de la especie *H. leucocephala* se aislaron los flavonoides [H94], 3-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopiranosido de kaempferol [H104] y 3-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil quercetina [H105] (Ramos *et al.*, 2006).

El único glicósido de isorhamnetina [H86] hallado dentro del género es el 3-*O*- $\beta$ -galactopiranosido de isorhamnetina [H106], aislado en la especie *H. japonica* en 1988 por Cho y Kim (Cho y Kim, 1988).

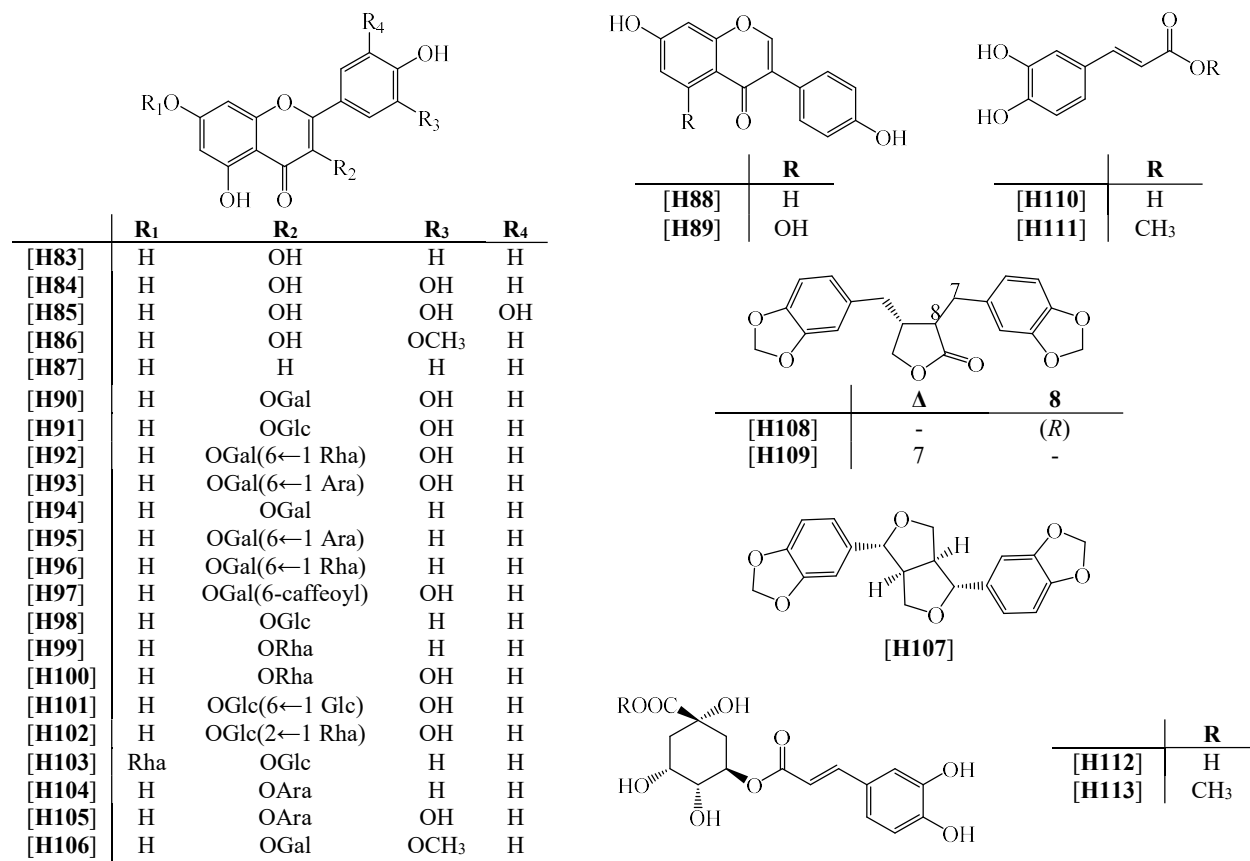


Figura 92. Flavonoides, lignanos y compuestos fenólicos del género *Hydrocotyle*.

#### I.B.4.2. Lignanos y otros derivados fenólicos

Junto con los flavonoides y sus glicósidos, también se han aislado otros compuestos fenólicos como lignanos y algunos derivados fenólicos dentro del género *Hydrocotyle*. En cuanto a los lignanos se han reportado tres compuestos, la *l*-sesamina [H107] en el extracto metanólico de *H. sibthorpioides*, la hinokinina [H108] en el extracto metanólico de las partes aéreas de *H. leucocephala* (Ramos *et al.*, 2006) y en el extracto etanólico de *H. bonariensis* (Huong *et al.*, 2009), y por último la  $\alpha$ -[3,4-metilendioxfenilmetiliden]- $\beta$ -[3,4-metilendioxfenilmetil]- $\gamma$ -butirolactona [H109] en el extracto etanólico de *H. bonariensis* (Huong *et al.*, 2009).

Los derivados fenólicos aislados hasta los momentos en especies de *Hydrocotyle* provienen todos de la especie *H. sibthorpioides*, estos compuestos son el ácido caféico [H110] (Andarwulan *et al.*, 2012), el éster metílico del ácido caféico [H111] (aislado del extracto de

MeOH) (Shigematsu *et al.*, 1982), el ácido clorogénico [H112] (Andarwulan *et al.*, 2012; Maulidiani *et al.*, 2014) y su éster metílico [H113] (Pu *et al.*, 2010), los dos últimos hallados en el extracto etanólico.

#### I.B.5. Otros compuestos

##### I.B.5.1. Alcaloides

Hasta a hora solo se ha reportado la presencia de 4 alcaloides en el género *Hydrocotyle*, los cuales fueron hallados por Yu y colaboradores en 2007 en el extracto etanólico de la especie *H. sibthorpioides*. Los alcaloides fueron identificados como 2-metil-3-(*o*-tolil)-6-hidroxi-4(3H)-quinazolinona [H114], 3-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-2-metil-4(3H)-quinazolinona [H115], 2-etilacridina [H116] y demecolcina [H117] (Yu *et al.*, 2007).

##### I.B.5.2. Otros

Además de los compuestos mencionados hasta ahora, también se han reportado dentro del género *Hydrocotyle* una serie de derivados de hidrocarburos no-terpenoides denominados leucoceramidas y leucocerebrósidos. Este estudio fue realizado por Ramos y colaboradores en 2006, los cuales obtuvieron del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. leucocephala* las leucoceramidas A-G [H118-H124], los leucocerebrósidos A-F [H125-H130], el 8-acetilheptadec-1-eno-4,6-diino-3,9,10-triol [H131], 9-acetilheptadec-1-en-4,6-diino-3,8,10-triol [H132] y el 4-hidroxi-4-(1-hidroxi-1-metiletil)-ciclohex-2-en-1-ona [H133] (Ramos *et al.*, 2006).

Otros derivados de hidrocarburos presentes en especies de *Hydrocotyle* son los ésteres de glicerol obtenidos en el extracto metanólico de la especie *H. ramiflora*, 7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoato de [3-(*O*- $\beta$ -galactopiranosil)]-(2*S*)-gliceroilo [H134] y 9Z,12Z-octadecadienoato de [3-(*O*- $\beta$ -galactopiranosil)]-(2*S*)-glicéroilo [H135] (Kwon *et al.*, 1998).

Por último los compuestos 9,10-dihidro-9,9,10-trimetilantraceno [H136] (Yu *et al.*, 2007), 5-hidroximaltol [H137] (Pu *et al.*, 2010) y ácido ascórbico [H138] (Andarwulan *et al.*, 2012) hallados en los extractos etanólicos de la especie *H. sibthorpioides*

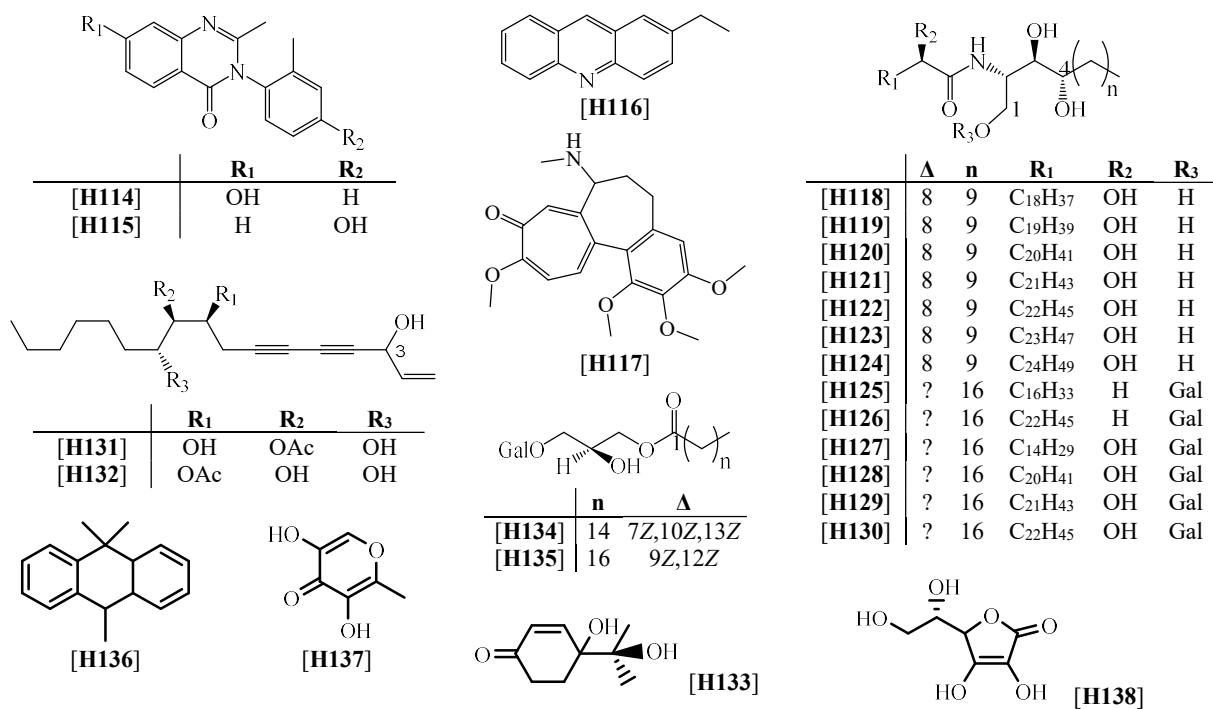


Figura 93. Otros compuestos hallados en el género *Hydrocotyle*.

**Tabla 14.** Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género *Hydrocotyle*.

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
1960	<i>H. wilfordii</i>	Planta entera	Flavonoide	(Nakaoki y Morita, 1960)
1969	9 especies de <i>Hydrocotyle</i>		Flavonoides	(Crowden <i>et al.</i> , 1969)
1971	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Triterpenos	(Hiller <i>et al.</i> , 1971)
1972	<i>H. bonariensis</i>	Frutos, extracto EtO <sub>2</sub>	Flavonoide	(Harborne y Williams, 1972)
1974	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Flavonoides	(Rzadkowska y Olechnowicz, 1974)
1975	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Triterpenos	(Keipert <i>et al.</i> , 1975)
1979	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Flavonoides	(Hiller <i>et al.</i> , 1979)
1981	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Saponina triterpénica	(Hiller <i>et al.</i> , 1981)
			Flavonoides	(Voigt <i>et al.</i> , 1981)
1982	<i>H. maritima</i>	Aceite esencial, hojas, tallos y flores	Mono-, sesqui- y di-terpenos, esteroide	(Asakawa <i>et al.</i> , 1982),
	<i>H. sibthorpioides</i>	Aceite esencial.	Mono-, sesqui- y di-terpenos, esteroide	(Asakawa <i>et al.</i> , 1982),
		Planta entera:	Flavonoides	(Shigematsu <i>et al.</i> , 1982)
		extracto MeOH		
1987	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera:	Lignano	(Ina <i>et al.</i> , 1987)
		extracto MeOH		
1988	<i>H. javanica</i>	Planta entera	Flavonoide	(Cho y Kim, 1988)
1989	<i>H. umbellata</i>	Partes aéreas:	Flavonoide	(Adams <i>et al.</i> , 1989)
		extracto MeOH 80%		
	<i>H. vulgaris</i>	Planta entera	Triterpeno	(Tomei <i>et al.</i> , 1989)
1991	<i>H. javanica</i>	Planta entera	Carotenoide	(Tee y Lim, 1991)
1993	<i>H. ranunculoides</i>	Planta entera:	Triterpenos	(Della Greca <i>et al.</i> , 1993)
		extracto MeOH		
1994	<i>H. ranunculoides</i>	Planta entera:	Saponinas triterpénicas	(Della Greca <i>et al.</i> , 1994)
		extracto MeOH.		
1995	<i>H. ranunculoides</i>	Planta entera:	Saponina triterpénica	(Corsaro <i>et al.</i> , 1995)
		extracto MeOH		
1998	<i>H. ramiflora</i>	Planta entera:	Sesquiterpeno, esteroide, otros	(Kwon <i>et al.</i> , 1998)
		extracto MeOH		
2004	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera:	Saponinas triterpénicas	(Matsushita <i>et al.</i> , 2004)
		extracto MeOH		
		Aceite esencial	Mono, sesqui- y di-terpenos, hidrocarburos de cadena larga y derivados	(Mu <i>et al.</i> , 2004)
2005	<i>H. sibthorpioides</i>	Aceite esencial.	Mono-, sesqui- y di-terpenos	(Chou, 2005)
		Hojas		
	<i>H. umbellata</i>	Planta entera:	Saponina triterpénica, esteroides	(Chavasiri <i>et al.</i> , 2005)
		extracto EtOH 95%		
2006	<i>H. leucocephala</i>	Partes aéreas:	Monoterpeno, esteroide, terpenoides, ceramidas, cerebrósidos, flavonoides	(Ramos <i>et al.</i> , 2006)
		extracto MeOH		
2007	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera:	Alcaloides	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
		extracto EtOH 75%		
		Planta entera	Esteroides, flavonoides	(Zhang y Zhang, 2007)
2008	5 especies de <i>Hydrocotyle</i>		Flavonoides	(Dong <i>et al.</i> , 2008)
	<i>H. batrachium</i>	Planta entera, extracto acuoso	Flavonoide	(S.S. Huang <i>et al.</i> , 2008b)
	<i>H. nepalensis</i>	Planta entera, extracto EtOH 95%	Flavonoide	(S.S. Huang <i>et al.</i> , 2008a)



**Tabla 14.** ...continuación...

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
2008	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera, extracto EtOH	Saponinas triterpénicas	(H.C. Huang <i>et al.</i> , 2008)
		Aceite esencial.	Mono, sesqui- y di-terpenos, hidrocarburos de cadena larga y derivados	(Zhang y Zhang, 2008)
	<i>H. wilfordii</i>	Aceite esencial	Mono, sesqui- y di-terpenos, hidrocarburos de cadena larga y derivados	(Hu <i>et al.</i> , 2008)
2009	<i>H. bonariensis</i>	Aceite esencial, hojas	Mono- y sesqui-terpenos	(Silva <i>et al.</i> , 2009)
		Aceite esencial, flores, hojas, tallos	Mono- y sesqui-terpenos, hidrocarburos de cadena larga y derivados	(Huong <i>et al.</i> , 2009)
		Planta entera: extracto EtOH 95%	Triterpeno, lignanos,	(Huong <i>et al.</i> , 2009)
	<i>H. umbellata</i>	Aceite esencial, partes aéreas	Mono- y sesqui-terpenos	(Rojas <i>et al.</i> , 2009).
2010	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera: extracto EtOH 70%	Triterpeno, esteroide, flavonoides	(Pu <i>et al.</i> , 2010)
2011	<i>H. umbellata</i>	Hojas: extracto EtOH 70%	Saponinas triterpénicas y esteroidales	(Sosa <i>et al.</i> , 2011)
2012	<i>H. bonariensis</i>	Planta entera: extracto EtOH 70%	Saponinas triterpénicas, flavonoides	(Maulidiani <i>et al.</i> , 2012)
		Partes subterráneas: extracto MeOH 70%	Saponinas triterpénicas	(Tabopda <i>et al.</i> , 2012)
	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera: extracto EtOH 70%	Saponinas triterpénicas, flavonoides	(Maulidiani <i>et al.</i> , 2012)
		Planta entera	Carotenoide, flavonoides	(Andarwulan <i>et al.</i> , 2012)
2013	<i>H. bonariensis</i>	Planta entera: extracto acuoso	Flavonoide	(Da Silva <i>et al.</i> , 2013)
	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera: extracto EtOH 80%	Saponina triterpénica	(Lin <i>et al.</i> , 2013)
		Planta entera: extracto EtOH 95%	Saponina triterpénica	(Huang <i>et al.</i> , 2013b)
		Planta entera: extracto EtOH 95%	Flavonoide	(Huang <i>et al.</i> , 2013a)
2014	<i>H. bonariensis</i>	Planta entera: extracto EtOH 70%	Saponinas triterpénicas	(Maulidiani <i>et al.</i> , 2014)
	<i>H. sibthorpioides</i>	Planta entera: extracto EtOH 70%	Saponina triterpénica	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
			Saponinas triterpénicas, flavonoides	(Maulidiani <i>et al.</i> , 2014)

### I.C. Actividades biológicas de las especies de *Hydrocotyle*

Al igual que para las especies anteriores, en el caso de las pertenecientes al género *Hydrocotyle*, también se han realizado ensayos a los compuestos aislados y a los extractos de estas especies que permitan corroborar las propiedades médicas que le son atribuidas. En la tabla 15 se presenta un resumen de los ensayos de actividad biológica realizados en especies pertenecientes al género *Hydrocotyle*, donde destacan principalmente los estudios de citotoxicidad así como los de actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatoria y analgésica.

Entre los ensayos realizados, también destacan los de actividad antiofídica, ya que hay plantas que tienen la habilidad para neutralizar el veneno de las serpientes gracias a la presencia de metabolitos secundarios (flavonoides, quinoides, xantenos, polifenoles y terpenoides) capaces de combinarse con las proteínas presentes en el veneno e inhibir su actividad enzimática (Asuzu y Harvey, 2003).

Además de las pruebas de actividad farmacológica, las especies de *Hydrocotyle* también presentan actividad alelopática y propiedades de fitoremediación. La alelopatía es el fenómeno mediante el cual sustancias naturales de las plantas (ej. los metabolitos secundarios) son liberadas en el ambiente y ejercen un impacto negativo o positivo en los organismos vivos circundantes (Chavasiri *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2001).

**Tabla 15.** Actividad biológica del género *Hydrocotyle*.

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Alelopática	<i>H. bonariensis</i>	Los bioensayos para evaluar la germinación y crecimiento de lechuga, tomate, cebolla y trigo demuestran que el extracto crudo de <i>H. bonariensis</i> y sus fracciones (hexano, AcOEt y EtOH/H <sub>2</sub> O) inhiben la germinación de todas las especies estudiadas.	(Silva <i>et al.</i> , 2010)
	<i>H. dichondroides</i>	El ensayo <i>in vitro</i> con los extractos etanólicos y acuosos de muestras secas de <i>H. dichondroides</i> demuestra actividad de inmovilización > 90 % sobre el nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> , por lo que el extracto de la planta seca puede ser usado para controlar biológicamente este nematodo.	(Taba <i>et al.</i> , 2008)
	<i>H. umbellata</i>	El extracto de cloroformo presenta valores de actividad inhibitoria > 80 % contra el crecimiento de las raíces y “shoot” de <i>Mimosa pigra</i> , <i>Dactyloctenium aegyptium</i> y <i>Bidens pilosa</i> . La actividad se atribuye a la saponina [H78].	(Chavasiri <i>et al.</i> , 2005)
Antimicrobiana y antifúngica	<i>H. javanica</i> y <i>H. rotundifolia</i>	El ensayo <i>in vitro</i> demuestra que <i>H. javanica</i> presenta una inhibición efectiva contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; mientras que <i>H. rotundifolia</i> presenta inhibe el crecimiento de <i>Proteus mirabilis</i> y <i>Candida albicans</i> .	(Sood y Yadav, 2014)
	<i>H. bonariensis</i>	El aceite esencial presenta una buena actividad inhibitoria con valores de MIC 100 µg/mL contra <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> , y de 200 µg/mL contra <i>P. aeruginosa</i> .	(Huong <i>et al.</i> , 2009)

**Tabla 15.** ...continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
<b>Antimicrobiana y antifúngica</b>	<i>H. vulgaris</i>	El ensayo <i>in vitro</i> de las saponinas sugieren una contribución positiva luego de cortos períodos de exposición en la liberación de lisozima (antibiótico “natural”) de células humanas monocíticas (HTP-1) y epiteliales (HT-29).	(Helal y Melzig, 2011)
<b>Antimalárica</b>	<i>H. javanica</i>	Diversos extractos de las hojas (hexano, CHCl <sub>3</sub> , AcOEt, acetona y MeOH) presentan una alta mortalidad larvaria para el vector de la malaria, <i>Anopheles stephensi</i> (68-100 %) y para el vector de la filariasis linfática, <i>Culex quinquefasciatus</i> (71-100 %) a 1.000 ppm. El extracto de AcOEt (mortalidad del 100 %) presenta valores de LC <sub>90</sub> de 560,75 y 303.20 ppm para <i>A. stephensi</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> respectivamente.	(Kamaraj <i>et al.</i> , 2010; Venkatachalam y Jebanesan, 2001)
<b>Antidiarreica</b>	<i>H. javanica</i>	El extracto de MEOH de las hojas demostró ser activo en la inhibición de diarrea inducida por MgSO <sub>4</sub> en ratones así como reducción de la movilidad gastrointestinal.	(Kumarappan <i>et al.</i> , 2005)
<b>Antiinflamatoria y analgésica</b>	<i>H. bonariensis</i>	La infusión y el extracto de MeOH de las partes aéreas inhiben el edema de oreja en ratones en un 30 y 58% respectivamente.	(Ouviña <i>et al.</i> , 2009)
	<i>H. batrachium</i>	La especie inhibe la respuesta de retorcimientos en ratones así como también inhibe el grado de dolor (inducido por formalina) en la última fase.	(S.S. Huang <i>et al.</i> , 2008b)
	<i>H. umbellata</i>	El extracto de EtOH presenta actividad antiinflamatoria y analgésica en diferentes modelos experimentales.	(Florentino <i>et al.</i> , 2013)
<b>Antioxidante</b>	<i>H. batrachium</i> , <i>H. nepalensis</i> , <i>H. setulosa</i> <i>H. sibthorpioides</i>	Los extractos acuosos y etanólicos presentan una alta actividad antioxidante atribuida a los polifenoles y flavonoides detectados en los extractos, entre ellos el rutin [ <b>H102</b> ]. Para los extractos acuoso la actividad en orden descendiente es: <i>H. nepalensis</i> > <i>H. setulosa</i> > <i>H. batrachium</i> > <i>H. sibthorpioides</i> .	(S.S. Huang <i>et al.</i> , 2008a)
<b>Antiofídica</b>	<i>H. javanica</i>	Podría ser usada como adyuvante en el tratamiento de mordeduras de serpientes, ya que los extractos de esta especie presentan un 80 % de protección para ratones tratados con la mínima dosis letal (LD <sub>99</sub> ) del veneno de <i>Naja nigricollis</i> . Así mismo, la planta produce cambios significativos en la estabilización de glóbulos rojos humanos expuestos a una hemólisis hipo-salina inducida.	(Kumarappan <i>et al.</i> , 2011)
	<i>H. vulgaris</i>	El extracto de CHCl <sub>3</sub> presenta una actividad mayor que la Zarparrilla y similar a las raíces de Senega, dos plantas conocidas por su uso para mordeduras de serpientes. La actividad de <i>H. vulgaris</i> puede atribuirse a las saponinas presentes, las cuales también poseen actividad.	(Mink, 1956)
<b>Antiviral</b>	<i>H. sibthorpioides</i>	El asiaticósido [ <b>H68</b> ] aislado de esta especie fue evaluado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra el virus de hepatitis B mostrando que efectivamente suprime los niveles de los antígenos de este virus de forma intracelular y extracelular; la saponina también reduce marcadamente la transcripción y replicación del virus.	(Huang <i>et al.</i> , 2013b)
		Los extractos metanólicos y acuosos de esta especie fueron evaluados <i>in vitro</i> para determinar el potencial efecto en la replicación del virus del dengue, hallándose efectos variables dependiendo del tratamiento y las líneas celulares utilizadas.	(Husin <i>et al.</i> , 2015)

**Tabla 15.** ...continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
<b>Antiviral</b>	<i>H. bonariensis</i>	El extracto etanólico y la infusión de esta especie presentan actividad contra el virus de diarrea bovina tipo 1 (BVDV-1) con un EC <sub>50</sub> de 47,4 y 90,0 µg/mL respectivamente.	(Ruffa <i>et al.</i> , 2004)
<b>Ansiolítica</b>	<i>H. umbellata</i>	La evaluación en ratones del extracto metanólico muestra que el extracto induce efectos ansiolíticos en los diferentes ensayos realizados	(Rocha <i>et al.</i> , 2011)
<b>Tratamiento de cataratas</b>	<i>H. bonariensis</i>	El extracto acuoso de las hojas ofrece protección contra la cataratas inducida en ratas, así como también disminuye la progresión de las cataratas luego del comienzo de la misma.	(Ajani <i>et al.</i> , 2012, 2011, 2009)
<b>Prevención del déficit cognitivo</b>	<i>H. sibthorpioides</i>	La administración de asiaticósido [H68] y madecasósido [H69] puede prevenir el declive en la memoria y la orientación espacial mediante la regulación de enzimas antioxidantes, mejorando plasticidad la sináptica y revirtiendo cambios anormales en los niveles de acetilcolina.	(Lin <i>et al.</i> , 2014, 2013)
<b>Citotóxica y antitumoral</b>	<i>H. sibthorpioides</i>	Los resultados muestran que las saponinas aisladas que poseen 4 unidades de azúcar exhiben un citotoxicidad moderada contra los carcinomas humanos epidermíode (KB), medular (Daoy) y de colon (WiDr).	(H.C. Huang <i>et al.</i> , 2008)
	<i>H. bonariensis</i>	EL aceite esencial de hojas y tallos presenta actividad citotóxica <i>in vitro</i> contra las células de rabdomyosarcoma (cáncer muscular, IC <sub>50</sub> 16,1 µg/mL) y carcinoma hepatocelular (IC <sub>50</sub> 19,9 µg/mL).	(Huong <i>et al.</i> , 2009)
		Dos de las saponinas aisladas del extracto MeOH/H <sub>2</sub> O, [H70] y [H71], presentan una citotoxicidad débil contra las líneas de cáncer de colon HCT 116 y HT-29.	(Tabopda <i>et al.</i> , 2012)
	<i>H. batrachium</i> , <i>H. nepalensis</i> , <i>H. setulosa</i> y <i>H. sibthorpioides</i>	El estudio <i>in vitro</i> de los extractos acuosos y metanólicos de las especies sobre células humanas de hepatoma Hep3B muestran que pueden tener efectos significativos como antioxidantes y anticancerosos.	(S.S. Huang <i>et al.</i> , 2008a)
<b>Tratamiento enfermedades hepáticas</b>	<i>H. sibthorpioides</i>	La genisteína [H89] aislada demostró que ejerce un efecto preventivo en lesiones del hígado y de fibrosis hepática inducidas por la administración crónica de alcohol en ratas.	(Huang <i>et al.</i> , 2013a)

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica

El material vegetal fue recolectado por el Prof. Enrique Gámez de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela) a 4.270 msnm en el Alto de la Cruz, vía el Santo Cristo, en el municipio Rangel del Estado Mérida. Las coordenadas geográficas donde fue localizada y colectada la muestra son: 8°37'37.92" N y 70°55'56.16" W.

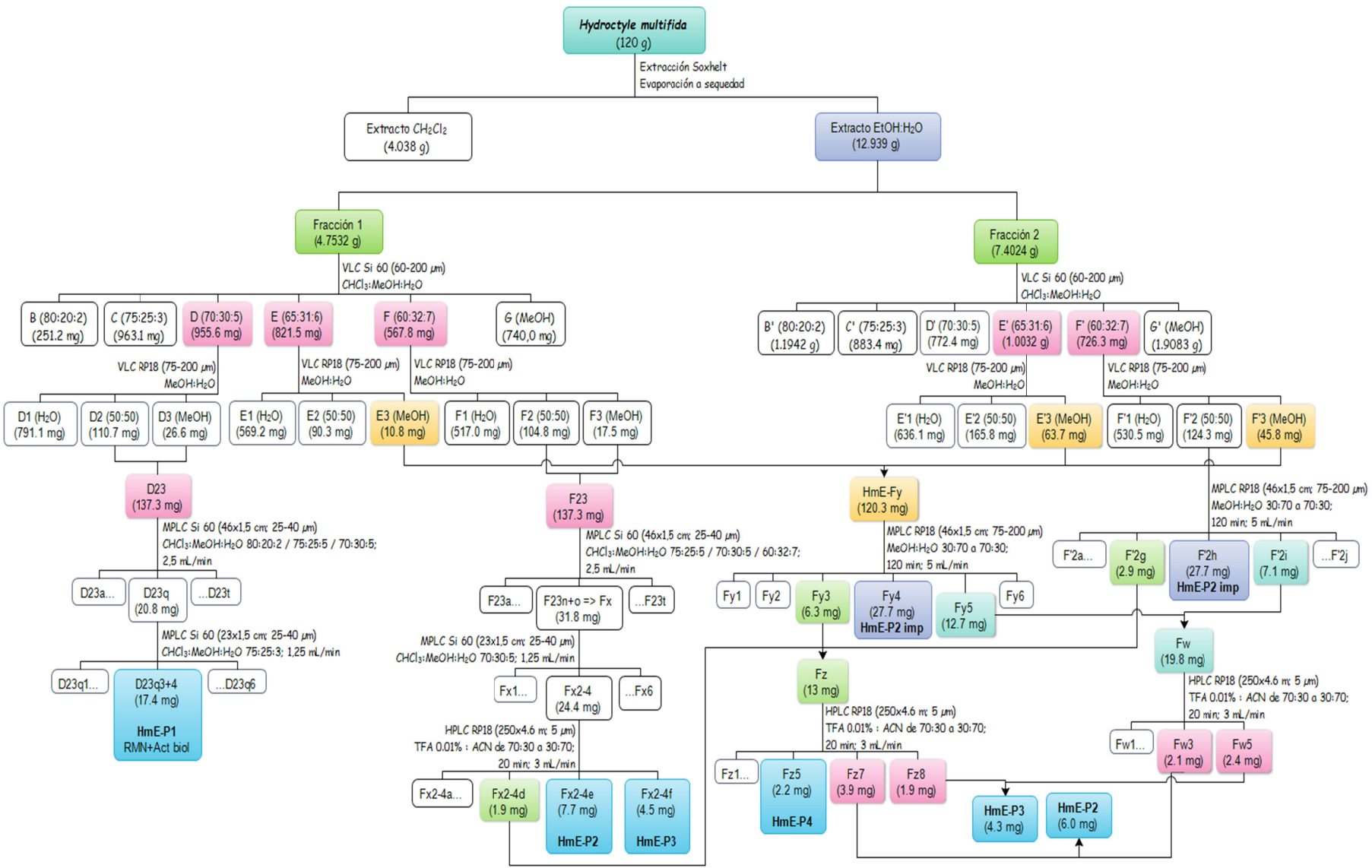
La determinación botánica fue realizada también por el Prof. Gámez, la especie fue identificada como *Hydrocotyle multifida* A. Rich, y un voucher fue guardado en la colección del Prof. Gámez bajo el N° 1.866.

### II.B. Tratamiento del material vegetal

Esta parte experimental se realizó en conjunto ente el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ULA-Venezuela (Responsable: Dr. Carmelo Rosquete Porcar) y el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la UBFC-Francia (Responsable: Dra. Anne Claire Mitaine Offer).

Se utilizaron 120 g de la planta entera ya secada y molida para realizar dos extracciones consecutivas con soxhlet. La primera de ellas se realizó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, el extracto obtenido fue concentrado al vacío a una temperatura de 40 ° C, obteniéndose un extracto bruto con una masa de 4,038 g. La segunda extracción se realizó con una mezcla etanol:agua 70:30, luego de concentrar el extracto de esta etapa se obtuvieron 12,939 g. Este extracto fue dividido en dos partes, una de 4,7532 g y la otra de 7.4024 g, cada una de las cuales fueron sometidas a VLC en fase normal [gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20:2; 75:25:3; 70:30:5; 65:31:5 y 60:32:7] y posteriormente a VLC en fase reversa [RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O (0:100; 50:50; 00:0)], obteniéndose diversas fracciones de interés, las cuales en base a las características presentadas fueron fraccionadas mediante las técnicas de MPLC y HPLC en fase normal (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) y en fase reversa (RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O) indicadas en el esquema 5. De la primera parte (4,7532 g) se lograron aislar 3 compuestos puros, **HmE-P1** (17,4 mg), **HmE-P2** (7,7 mg) y **HmE-P3** (4,5 mg). De la segunda parte (7,4024 g) se obtuvo el producto **HmE-P4** (2,2 mg) así como 6,0 y 4,3 mg adicionales de los productos **HmE-P2** y **HmE-P3** respectivamente.





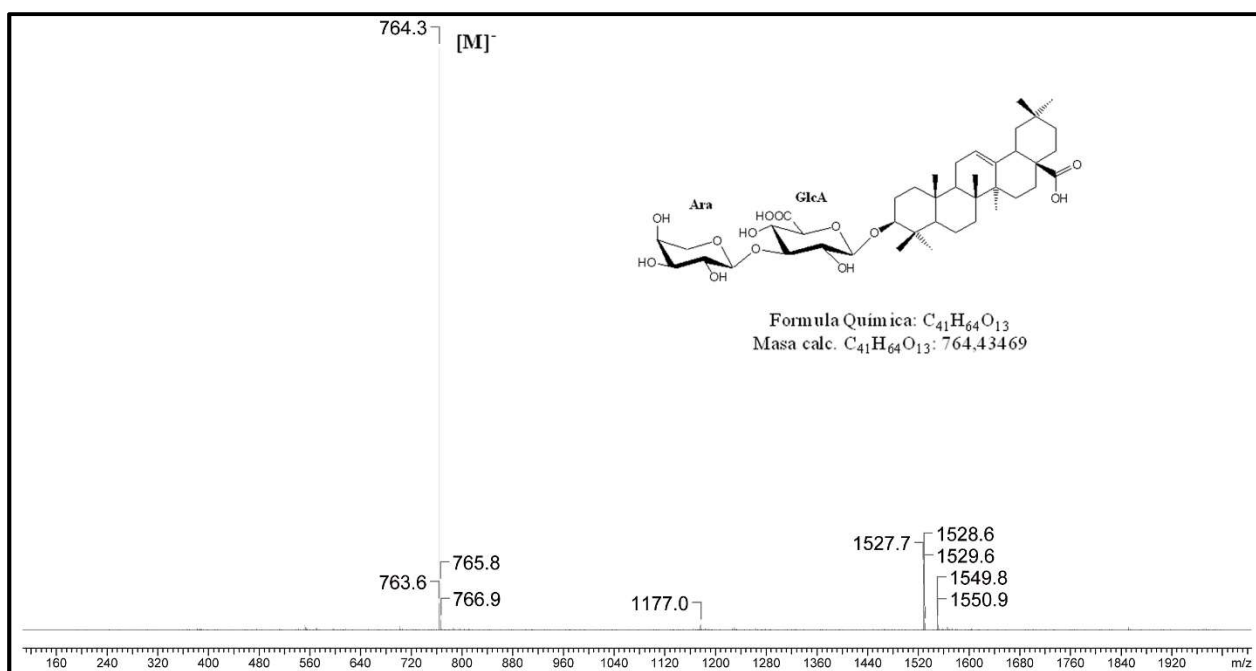
Esquema 5. Aislamiento y purificación de las saponinas de *Hydrocotyle multifida*.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Del extracto de EtOH/H<sub>2</sub>O de *Hydrocotyle multifida* se logró aislar un total de 3 productos puros (**HmE-P1**, **HmE-P3** y **HmE-P4**) y una mezcla resoluble de dos compuestos (**HmE-P2**) siguiendo una metodología específica para la obtención de saponinas. Dichos productos obtenidos se esperaba que fuesen saponinas triterpénicas ya que en presencia de vainillina sulfúrica los compuestos se tornan de color azul-morado, lo que es característico para triterpenos glicosidados con este reactivo (Hiai *et al.*, 1976).

#### III.A. Compuesto HmE-P1: Momordin I.

El compuesto **HmE-P1** fue aislado en las fracciones 1D23q3 y 1D23q4 de *H. multifida* (esquema 5), obteniéndose 17,4 mg del mismo. El espectro de masas del compuesto muestra un ion molecular [M]<sup>-</sup> a 764,3 m/z que corresponde a la fórmula molecular C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub> (calc. 764,43469).

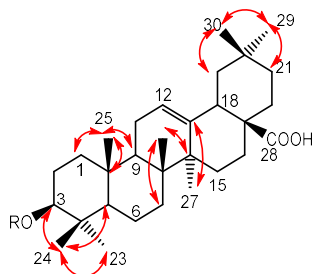


**Figura 94.** Espectros ESI-MS < 0 del compuesto **HmE-P1**.

La revisión de los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (figura 97) y RMN-DEPT (figura 98) revela la presencia de 41 carbonos: 2 carbonos de grupos carboxílicos, 2 carbonos con configuración *sp*<sup>2</sup> (uno metínico y uno cuaternario) característicos de un doble enlace, 7 grupos metilos, 10 grupos metilos, 3 grupos metinos, 6 carbonos cuaternarios y 11 grupos oxigenados (1 metileno y 10 metinos). Esto parece indicar la presencia de un triterpeno y dos unidades de monosacáridos.

**Identificación del aglicón:**

Las correlaciones observadas en los espectros HSQC (figura 99) y HMBC (figura 100) permiten la identificación del esqueleto de la genina como un oleanano, al establecer las siguientes correlaciones para los grupos metilos:



H-23 (1,03)	↔	C-24 (17,0); C-4 (40,2); C-5 (57,0) y C-3 (90,7)
H-24 (0,82)	↔	C-23 (28,5); C-4 (40,2); C-5 (57,0) y C-3 (90,7)
H-25 (0,92)	↔	C-10 (37,9); C-1 (39,8); C-9 (49,1) y C-5 (57,0)
H-26 (0,80)	↔	C-7 (34,0); C-8 (40,5); C-14 (42,9) y C-9 (49,1)
H-27 (1,14)	↔	C-15 (28,9); C-8 (40,5); C-14 (42,9) y C-13 (145,3)
H-29 (0,89)	↔	C-30 (24,0); C-20 (31,6); C-21 (35,0) y C-19 (47,3)
H-30 (0,92)	↔	C-20 (31,6); C-29 (33,6); C-21 (35,0) y C-19 (47,3)

El enlace olefinico se fijó entre los carbonos C12 y C13 debido a la correlación en HMBC (figura 100) de los carbonos  $sp^2$  a hidrógeno a  $\delta_C$  123,6 (C-12) y 145,3 (C-13) con el protón a  $\delta_H$  2,84 (H-18), así como la correlación entre el carbono a  $\delta_C$  144,1 (C-13) con el protón metílico en H-27 ( $\delta_H$  1,14). Las correlaciones del COSY (figura 101) H-12/ H-11 ( $\delta_H/\delta_H$  5,22/1,85-1,89) y H11/H9 ( $\delta_H/\delta_H$  1,85-1,89/1,57) junto como la interacción TOCSY (figura 102) H11/H9 ( $\delta_H/\delta_H$  5,22/1,57) terminan de confirmar la ubicación del doble enlace entre C-12 y C-13.

La correlación en HMBC (figura 100) de los protones metílicos H-23 ( $\delta_H$  1,03) y H-24 ( $\delta_H$  0,82) con el carbono a  $\delta_C$  90,7 (C-3), la cual se corrobora con las interacciones en el espectro COSY (figura 101) entre H-3 ( $\delta_H$  3,17) y los protones metilénicos H-2 ( $\delta_H$  1,65 y 1,64) y en TOCSY (figura 102) con la correlación H3/H1 ( $\delta_H/\delta_H$  3,17/0,96 y 3,17/1,57). Adicionalmente, la interacción en HMBC (figura 100) entre el carbono carbonílico a  $\delta_C$  182,3 (C-28) con los hidrógenos metilénicos H-15 ( $\delta_H$  1,98) y H-16 ( $\delta_H$  1,73) permiten ubicar un grupo –COOH en la posición C-28.

La estereoquímica del esqueleto triterpénico, se determinó mediante el espectro ROESY (figura 103), ubicando en posición  $\alpha$  al protón H-3 ( $\delta_H$  3,17) y a los metilo en C-23 ( $\delta_C$  28,5), C-27 ( $\delta_C$  26,4) y C-29 ( $\delta_C$  33,6), mientras que los metilos en C-24 ( $\delta_C$  17,0), C-25 ( $\delta_C$  16,0), C-26 ( $\delta_C$  17,8) y C-24 ( $\delta_C$  24,0) se encuentran en posición  $\beta$ . El análisis detallado de los espectros bidimensionales de RMN y la comparación de los desplazamientos químicos con la bibliografía permitieron establecer el esqueleto triterpénico del compuesto **HmE-P1** como el **ácido oleanólico**.

**Identificación de los azúcares:**

El espectro HSQC muestra la presencia de dos carbonos anoméricos lo que indican la presencia de 2 unidades de glicósidos en la estructura. Los hidrógenos anoméricos se localizan

a  $\delta_H$  4,36 (doblete,  $J = 8,0$  Hz) y 4.56 (doblete,  $J = 7,2$  Hz) y se correlacionan con los carbonos ubicados a  $\delta_C$  106,4 y 105,3 respectivamente. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la identificación de los azúcares en las saponinas halladas en los cultivares de *P. tenuifolium* se encontró que para **HmE-P1** las dos unidades de monosacáridos son **ácido  $\beta$ -D-glucorónico (GlcA)** y  **$\alpha$ -L-arabinopiranososa (Ara)** (Agrawal, 1992).

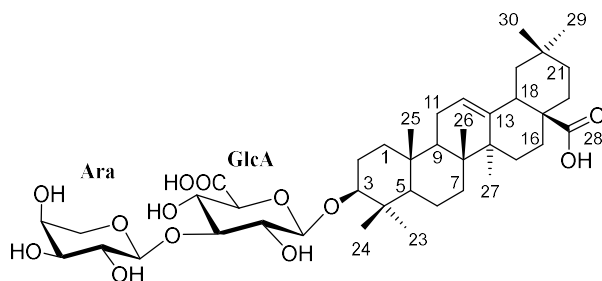
Las correlaciones carbono/hidrógeno del HMBC (figura 100) junto con las interacciones en ROESY (figura 103) permiten establecer la unión secuencia glicosídica a la genina en la posición C-3, así como determinar la secuencia como [Ara(1→3)]-GlcA.

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_C/\delta_H$ )
GlcA:	4.36 (GlcA-H1) / 3.17 (Gen-H3)	106.4 (GlcA-C1) / 3.17 (Gen-H3) 90.7 (Gen-C3) / 4.36 (GlcA-H1)
Ara:	4.56 (Ara-H1) / 3.57 (GlcA-H3)	105.3 (Ara-C1) / 3.57 (GlcA-H3) 85.7 (GlcA-C3) / 4.56 (Ara-H1)

### Conclusión:

Todos los datos obtenidos para el aglicón y los azúcares permitieron identificar al compuesto **HmE-P1** como el **ácido 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosiloleanólico** (figura 95) conocido también como Momordin I aislado con anterioridad en las raíces de la especie *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) (Iwamoto *et al.*, 1985).

A pesar de ser un compuesto conocido es la primera vez que este compuesto es reportado dentro de la familia Araliaceae. Adicionalmente, es la primera vez que se reporta esa secuencia glicosídica dentro del género *Hydrocotyle*. En cuanto a la genina, aunque se han reportado algunas saponinas con el esqueleto triterpénico del ácido oleanólico (Chavasiri *et al.*, 2005; Matsushita *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2011), lo más común dentro del género *Hydrocotyle* suelen ser esqueletos triterpénicos derivados del barrigenol.



**Figura 95.** Estructura del compuesto **HmE-P1**: ácido 3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -D-glucuronopiranosiloleanólico (Momordin I).

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto **HmE-P1** en CD<sub>3</sub>OD.

Aglicón				Azúcares			
Pos.	δ <sub>C</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>C</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	39,8	-CH <sub>2</sub> -	0,96 1,57	<b>3-O-GlcA</b>			
2	26,8	-CH <sub>2</sub> -	1,65 1,94	1	106,4	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,36 <i>d</i> (8,0)
3	90,7	-CHOH-	3,17 <i>dd</i> (12,2; 3,2)	2	75,1	-CHOR-	3,42
4	40,2	>C<	-----	3	85,7	-CHOH-	3,57
5	57,0	>CH-	0,77 <i>br d</i> (11,6)	4	72,1	-CHOR-	3,54
6	19,3	-CH <sub>2</sub> -	1,98 1,54	5	76,8	-CHOH-	3,58
7	34,0	-CH <sub>2</sub> -	1,28 1,48	6	176,1	-COOH	-----
8	40,5	>C<	-----	<b>Ara-(1→3)-GlcA</b>			
9	49,1	>CH-	1,57	1	105,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,56 <i>d</i> (7,2)
10	37,9	>C<	-----	2	72,6	-CHOH-	3,64
11	24,5	-CH <sub>2</sub> -	1,85 - 189	3	74,2	-CHOH-	3,54
12	123,6	=CH-	5,22 <i>br s</i>	4	69,7	-CHOH-	3,80 <i>m</i>
13	145,3	=C<	-----	5	67,4	-CH <sub>2</sub> OH	3,58
14	429,0	>C<	-----				3,92 <i>dd</i> (12,6; 2,4)
15	28,9	-CH <sub>2</sub> -	1,04 1,77				
16	24,1	-CH <sub>2</sub> -	1,58 1,98				
17	47,7	>C<	-----				
18	42,8	>CH-	2,84 <i>dd</i> (13,2; 3,6)				
19	47,3	-CH <sub>2</sub> -	1,11 1,68				
20	31,6	>C<	-----				
21	35,0	-CH <sub>2</sub> -	1,18 1,37				
22	33,9	-CH <sub>2</sub> -	1,52 1,73				
23	28,5	-CH <sub>3</sub>	1,03 <i>s</i>				
24	17,0	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>				
25	16,0	-CH <sub>3</sub>	0,92 <i>s</i>				
26	17,8	-CH <sub>3</sub>	0,80 <i>s</i>				
27	26,4	-CH <sub>3</sub>	1,14 <i>s</i>				
28	182,3	-COOH	-----				
29	33,6	-CH <sub>3</sub>	0,89 <i>s</i>				
30	24,0	-CH <sub>3</sub>	0,92 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete



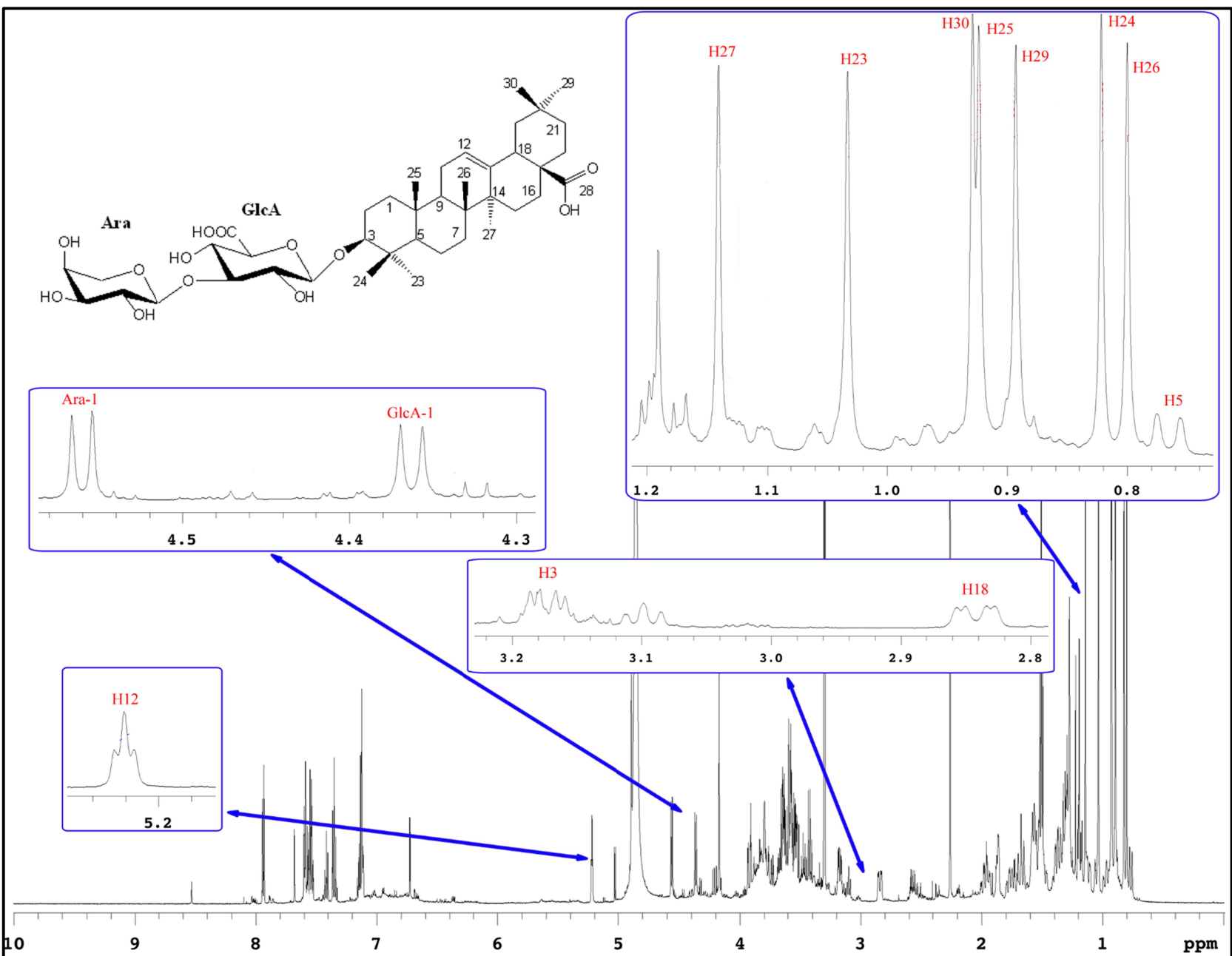


Figura 96. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HmE-P1.

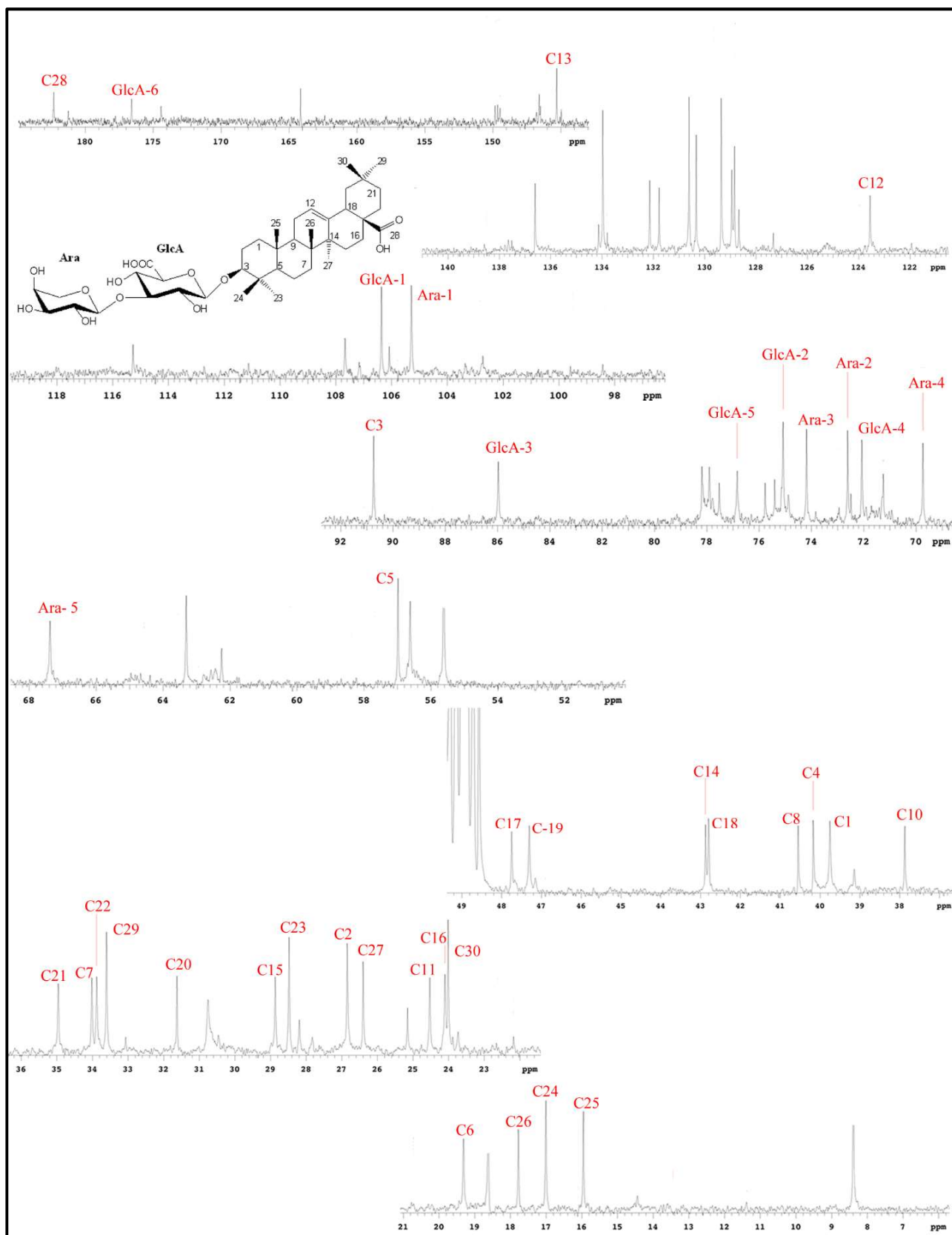


Figura 97. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto HmE-P1.

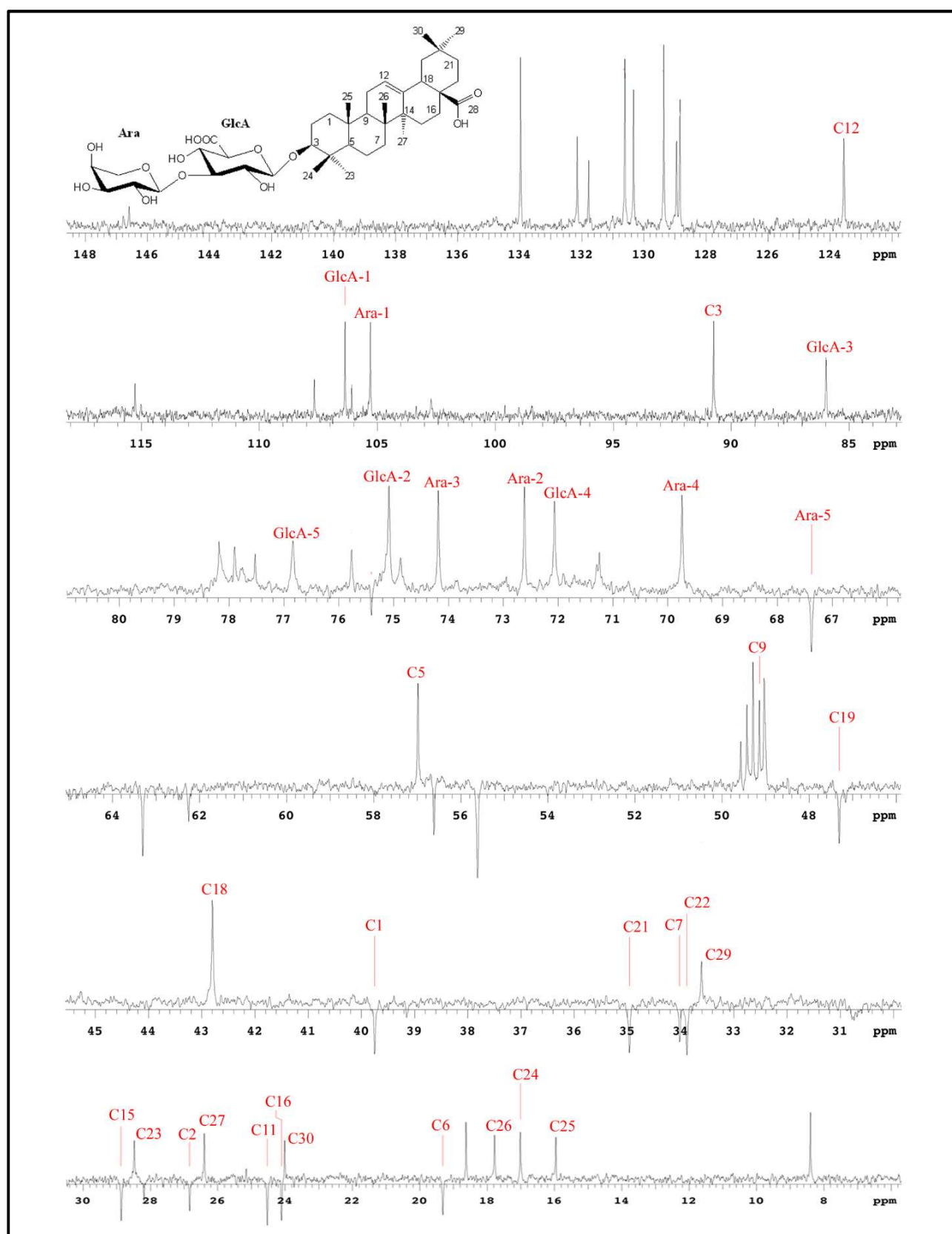


Figura 98. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P1.

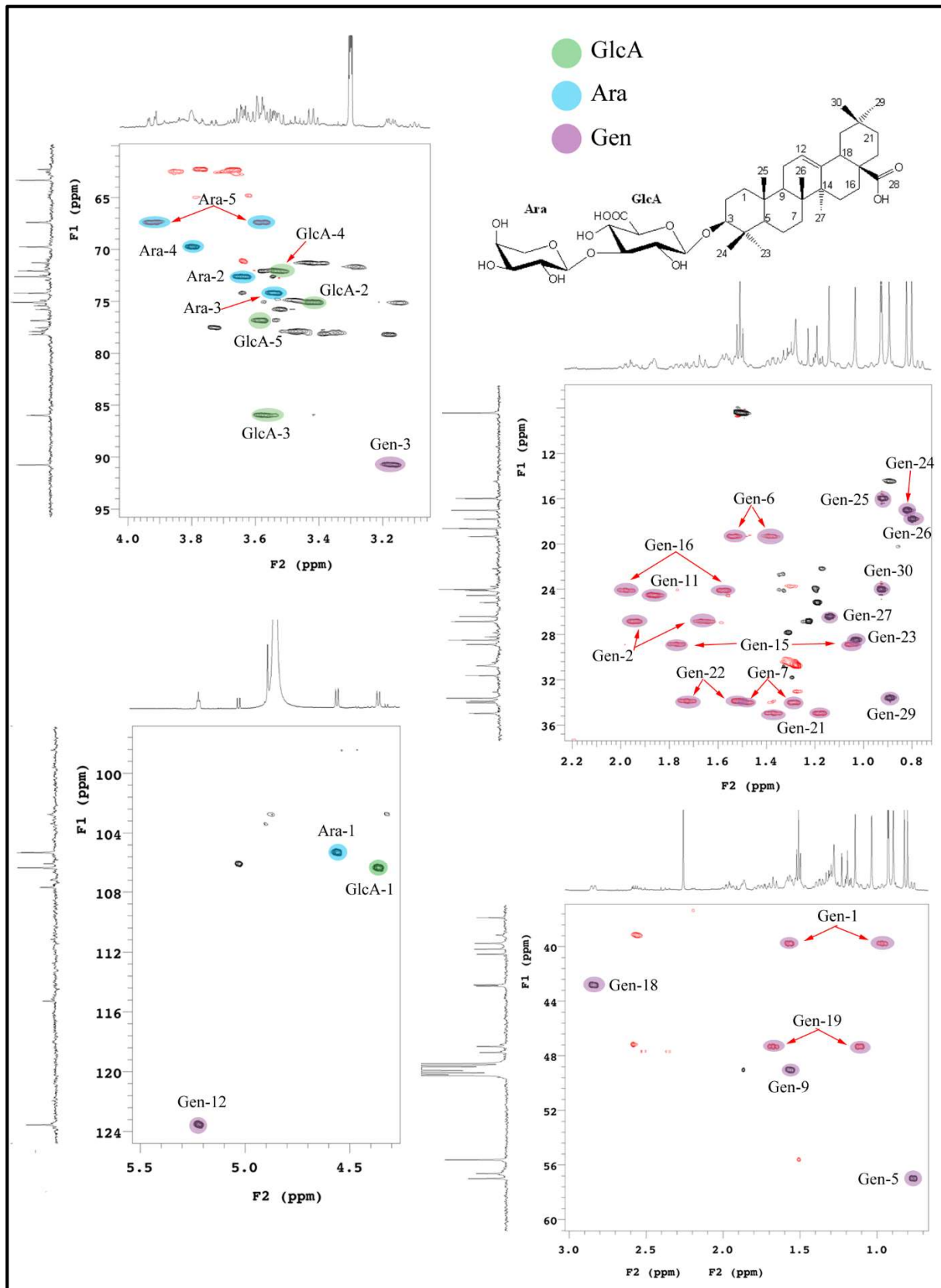


Figura 99. Espectro de HSQC del compuesto HmeE-P1.

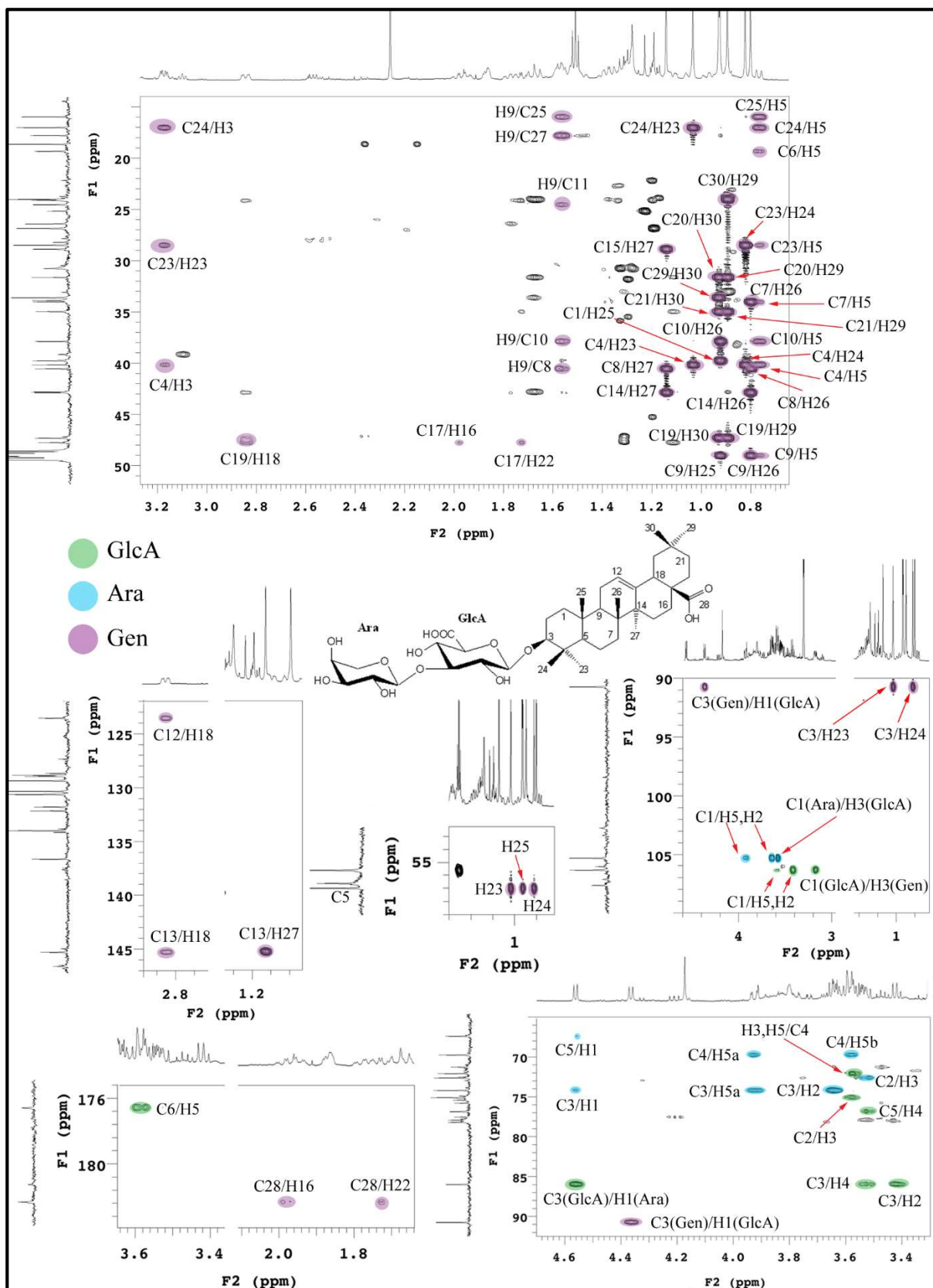


Figura 100. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P1.



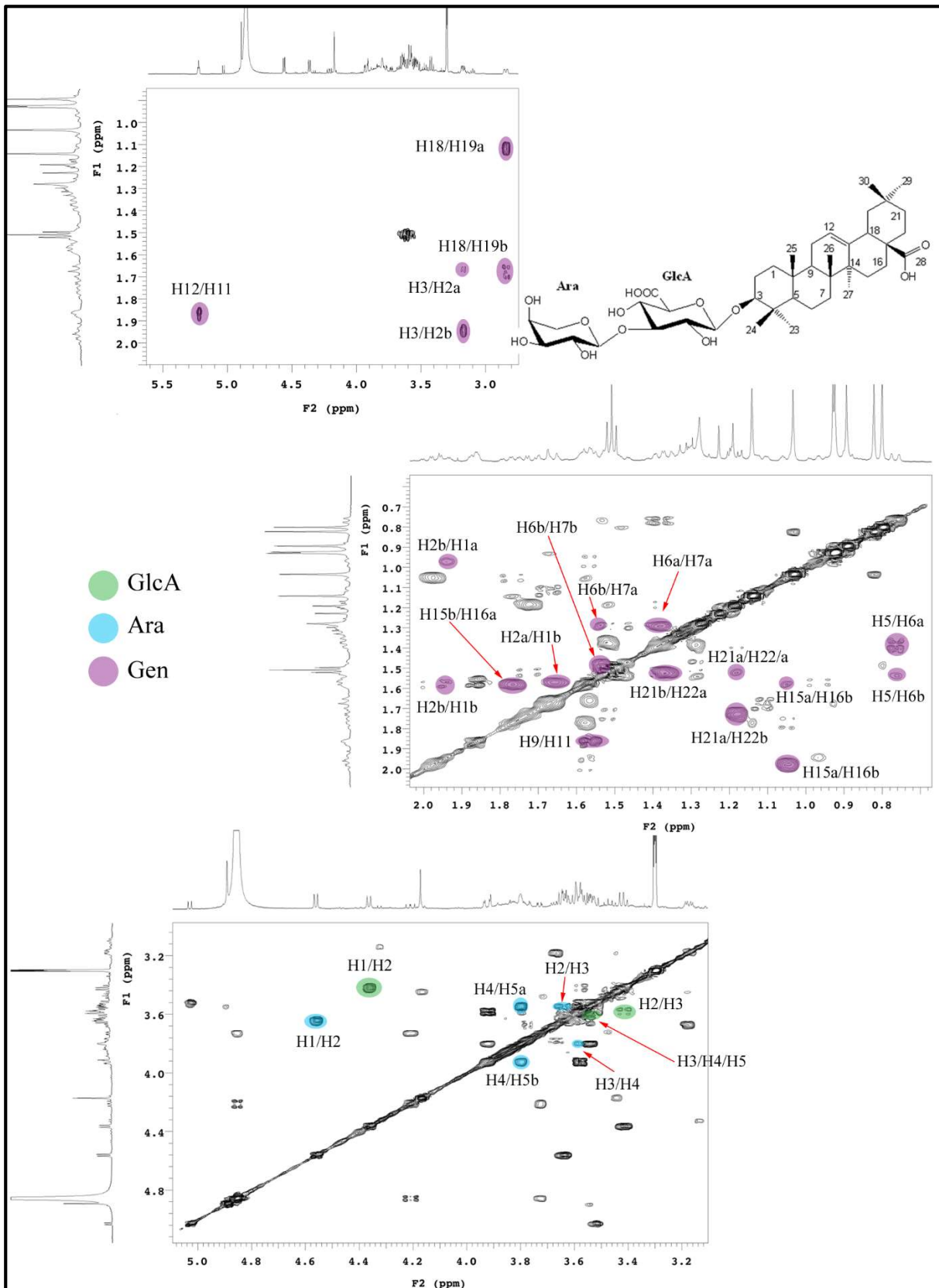


Figura 101. Espectro de COSY del compuesto HmE-P1.

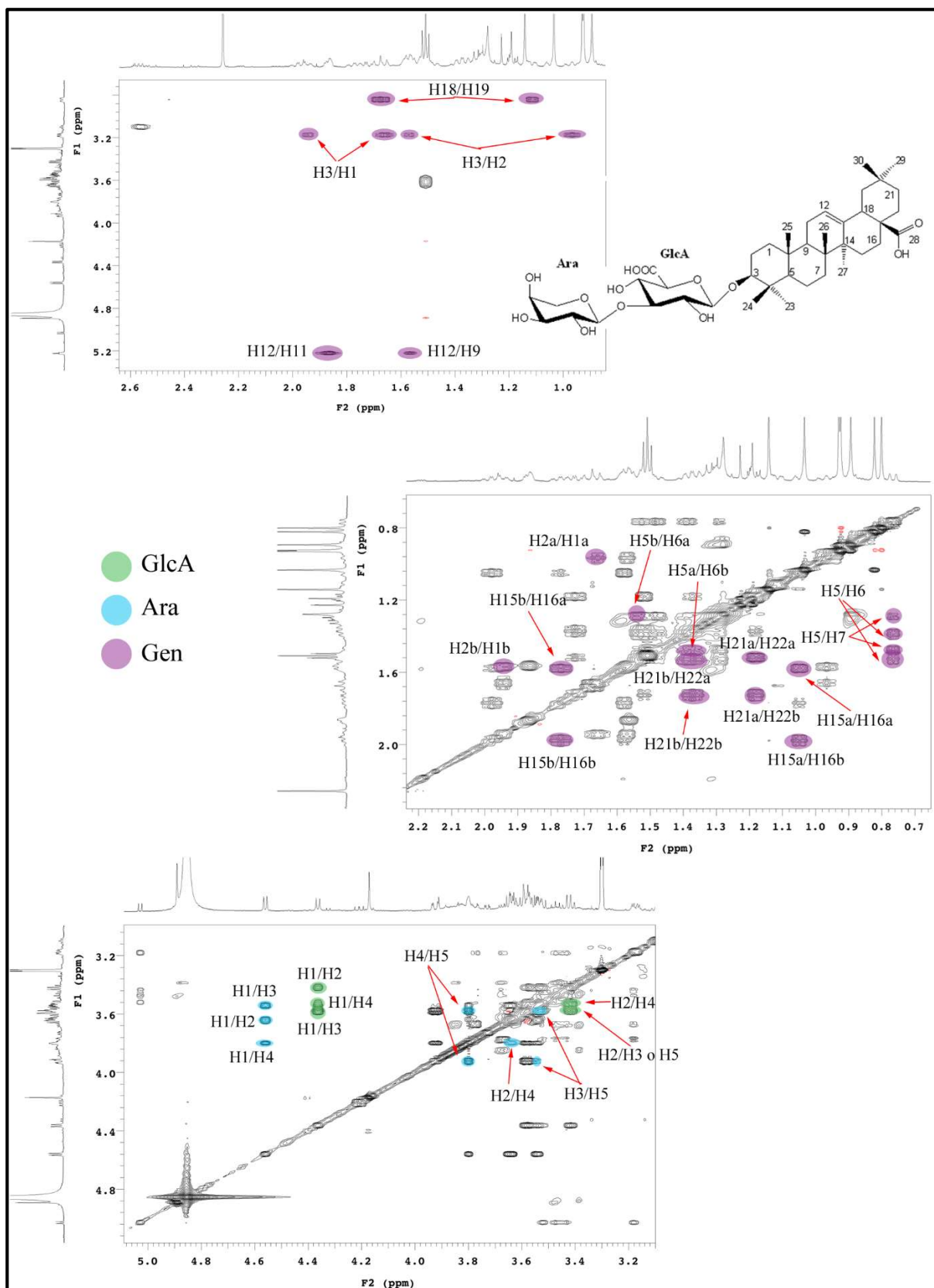


Figura 102. Espectro de TOCSY del compuesto **HmE-P1**.

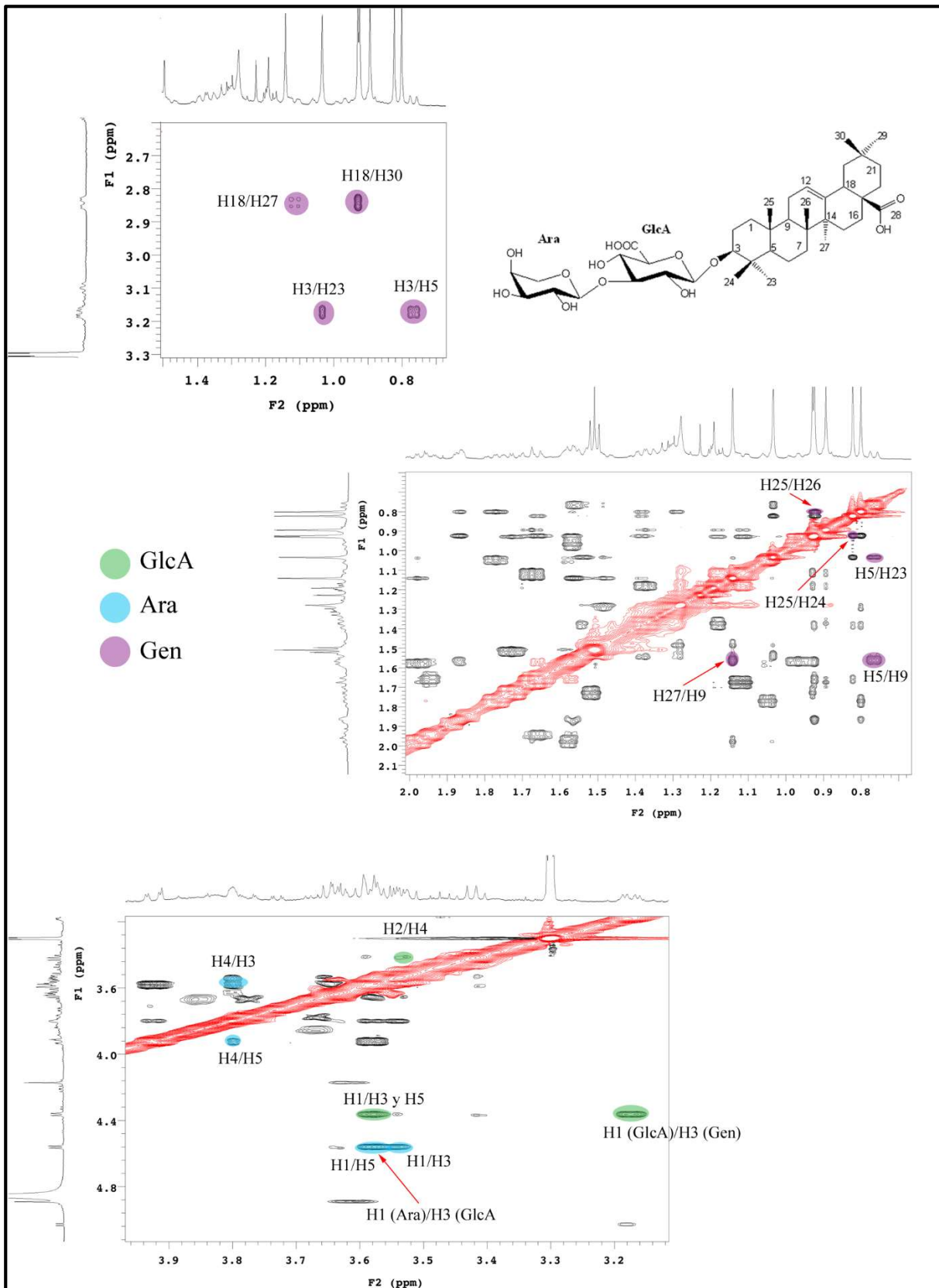
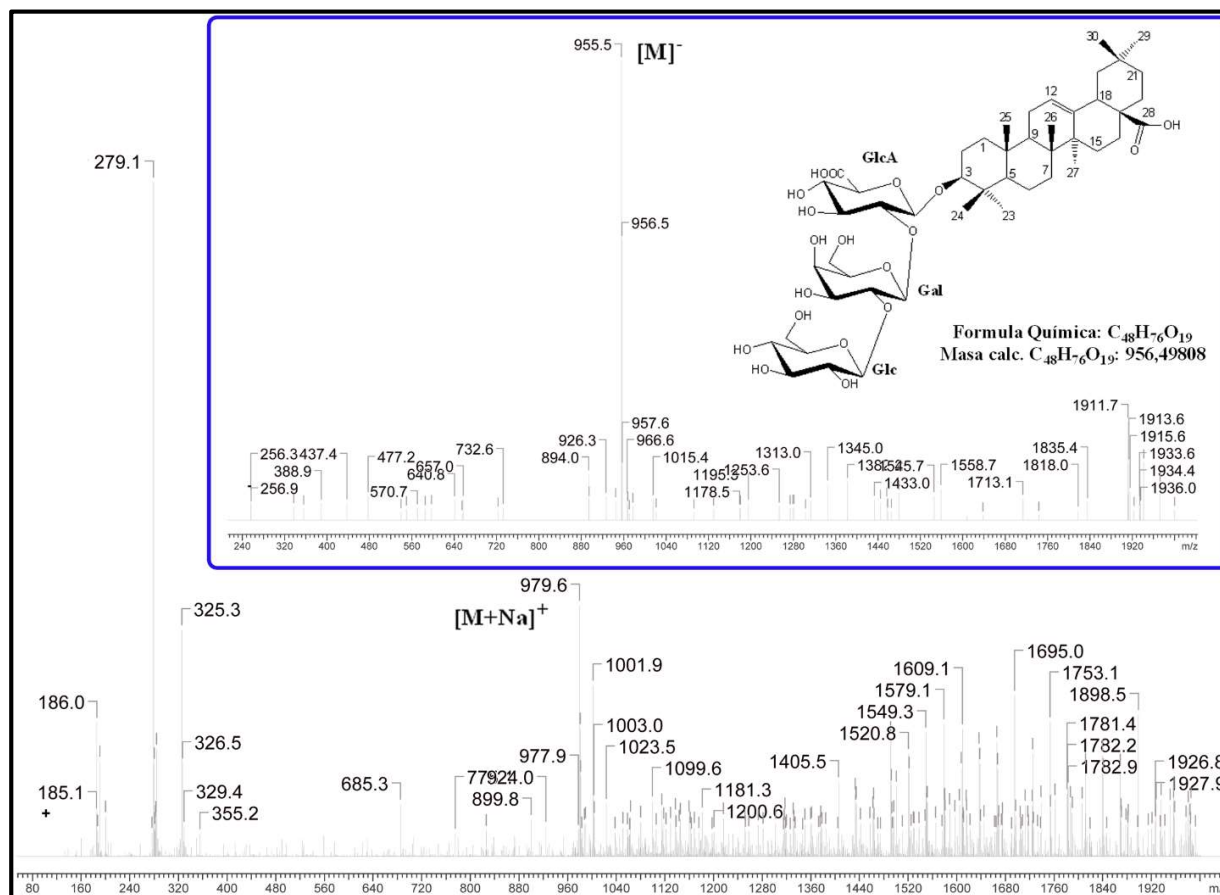


Figura 103. Espectro de ROESY del compuesto **HmE-P1**.

### III.B. Compuesto HmE-P2 mayoritario: Sandrosaponina X.

El compuesto **HmE-P2** fue aislado de las subfracciones Fx2-4e (7,7 mg), Fz7 (3,9 mg) y Fw3 (2,1 mg) de *H. multifida* (esquema 5), obteniéndose un total de 13,7 mg del compuesto. Los espectro de masa del compuesto muestran un ion molecular  $[M]^-$  a 955,5 m/z en modo negativo y un ion molecular  $[M+Na]^+$  a 979,6 m/z en modo positivo, esto equivale a un compuesto con fórmula molecular  $C_{41}H_{64}O_{13}$  (calc. 956,49808).



**Figura 104.** Espectros ESI-MS del compuesto **HmE-P2**.

Los espectros de RMN unidimensionales revelan la presencia de 48 carbonos: 2 carbonos de grupos carboxílicos, 2 carbonos  $sp^2$  de un enlace  $C=C$  (uno metínico y uno cuaternario, 7 grupos metilos, 10 grupos metilos, 3 grupos metinos, 6 carbonos cuaternarios y 18 grupos oxigenados (2 metilenos y 16 metinos). En comparación con **HmE-P1**, en este caso se puede suponer la presencia de una tercera unidad de azúcar. La revisión de los espectros del compuesto **HmE-P2** muestra que se trata realmente de una mezcla de dos productos, uno mayoritario y otro minoritario. Ambos compuestos pudieron ser elucidados mediante las correlaciones de los espectros de RMN.

**Identificación del aglicón:**

Los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT) del compuesto **HmE-P2 mayoritario** en la zona de la genina, resultan ser prácticamente superponibles con los del compuesto **HmE-P1**, lo que permite suponer que ambos compuestos tienen el mismo esqueleto triterpénico, es decir, el **ácido oleanólico**. Esto fue comprobado mediante el análisis de las correlaciones de los espectros RMN bidimensionales del compuesto.

**Identificación de los azúcares:**

Para el **HmE-P2 mayoritario** se distinguen tres carbonos anoméricos en el espectro HSQC (figura 109) que confirman la existencia de tres unidades glicosídicas. Los hidrógenos anoméricos se localizan a  $\delta_{\text{H}}$  5,03 (doblete,  $J = 7,6$  Hz), 5,19 (doblete,  $J = 7,6$  Hz) y 5,34 (doblete,  $J = 7,6$  Hz) y se correlacionan con los carbonos ubicados a  $\delta_{\text{C}}$  104,9; 106,5 y 104,3 respectivamente.

Siguiendo el procedimiento ya descrito para la elucidación de los azúcares, al examinar los espectros de RMN-2D, se identificaron los monosacáridos como una unidad de **ácido  $\beta$ -D-glucorónico** (GlcA),  **$\beta$ -D-galactosa** (Gal) y  **$\beta$ -D-glucosa** (Glc) (Agrawal, 1992). Las correlaciones de los anómeros en el HMBC (figura 111) y el espectro ROESY (figura 113) establecen la secuencia glicosídica unida al C3 de la genina como [Glc(1 $\rightarrow$ 2)-Gal(1 $\rightarrow$ 2)]-GlcA.

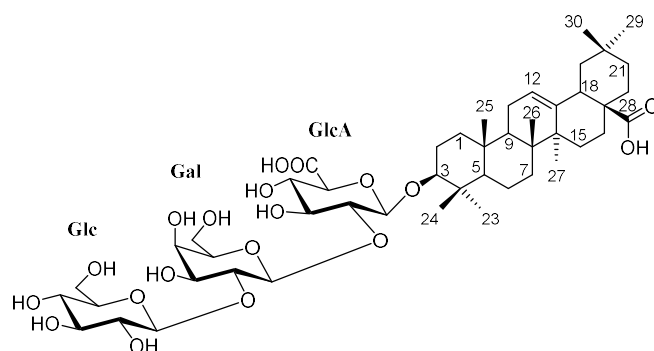
	NOESY ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ )	HMBC ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ )
GlcA:	5,03 (GlcA-H1) / 3,27 (Gen-H3)	104,9 (GlcA-C1) / 3,27 (Gen-H3) 89,5 (Gen-C3) / 5,03 (GlcA-H1)
Gal:	5,34 (Gal-H1) / 4,12 (GlcA-H2)	104,3 (Gal-C1) / 4,12 (GlcA-H2) 83,8 (GlcA-C2) / 5,34 (Gal-H1)
Glc:	5,19 (Glc-H1) / 4,59 (Gal-H2)	106,5 (Glc-C1) / 4,59 (Gal-H2) 84,4 (Gal-C2) / 5,19 (Glc-H1)

**Conclusión:**

Los datos obtenidos permitieron identificar al compuesto **HmE-P2 mayoritario** como el **ácido 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucorono piranosiloleanólico** (figura 105) conocido también como sandrosaponina X, la cual fue reportada por primera vez para la especie *Bupleurum rigidum* (Apiaceae) (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000).

Al igual que para el compuesto **HmE-P1**, aunque la sandrosaponina X es un compuesto conocido es la primera vez se reporta dentro de la familia Araliaceae. Así mismo, esta secuencia de monosacáridos, no había sido reportada con anterioridad dentro del género *Hydrocotyle*.





**Figura 105.** Estructura del compuesto **HmE-P2 mayoritario**: ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico (sandosaponina X).

**Tabla 17.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de **HmE-P2 mayoritario** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,80 1,34	<b>3-<i>O</i>-GlcA</b>			
2	26,5	-CH <sub>2</sub> -	1,84 2,17	1	104,9	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,03 <i>d</i> (7,6)
3	89,5	-CHOH-	3,27	2	83,8	-CHOR-	4,12
4	39,6	>C<	-----	3	77,6	-CHOH-	4,59
5	55,8	>CH-	0,71 <i>br d</i> (11,2)	4	72,2	-CHOR-	4,50
6	18,5	-CH <sub>2</sub> -	1,25 1,46	5	77,6	-CHOH-	4,60
7	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,25 1,42	6	172,8	-COOH	-----
8	39,7	>C<	-----	<b>Gal-(1<math>\rightarrow</math>2)-GlcA</b>			
9	47,9	>CH-	1,58 <i>dd</i> (13,7; 6,8)	1	104,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,34 <i>d</i> (7,6)
10	36,9	>C<	-----	2	84,4	-CHOH-	4,59
11	23,6	-CH <sub>2</sub> -	1,83-1,86	3	74,9	-CHOH-	4,19
12	122,5	=CH-	5,42 <i>br s</i>	4	69,0	-CHOH-	4,61
13	144,8	=C<	-----	5	76,3	-CHOH-	3,94 <i>m</i>
14	42,1	>C<	-----	6	61,4	-CH <sub>2</sub> OH	4,37 <i>dd</i> (10,4; 5,2) 4,50
15	28,3	-CH <sub>2</sub> -	1,16 2,12	<b>Glc-(1<math>\rightarrow</math>2)-Gal</b>			
16	23,6	-CH <sub>2</sub> -	1,93 2,09	1	106,5	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,19 <i>d</i> (7,6)
17	46,6	>C<	-----	2	76,6	-CHOH-	4,03
18	42,0	>CH-	3,25	3	77,7	-CHOH-	4,10
19	46,5	-CH <sub>2</sub> -	1,26 1,80	4	71,1	-CHOH-	4,08
20	30,9	>C<	-----	5	79,1	-CHOH-	3,84 <i>m</i>
21	34,2	-CH <sub>2</sub> -	1,19 1,43	6	62,4	-CH <sub>2</sub> OH	4,28 <i>dd</i> (11,6; 4,8) 4,51
22	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,80 2,02				
23	28,3	-CH <sub>3</sub>	1,29 <i>s</i>				
24	16,9	-CH <sub>3</sub>	1,10 <i>s</i>				
25	15,4	-CH <sub>3</sub>	0,78 <i>s</i>				
26	17,4	-CH <sub>3</sub>	0,95 <i>s</i>				
27	26,2	-CH <sub>3</sub>	1,27 <i>s</i>				
28	180,1	-COOH	-----				
29	33,2	-CH <sub>3</sub>	0,94 <i>s</i>				
30	23,7	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete

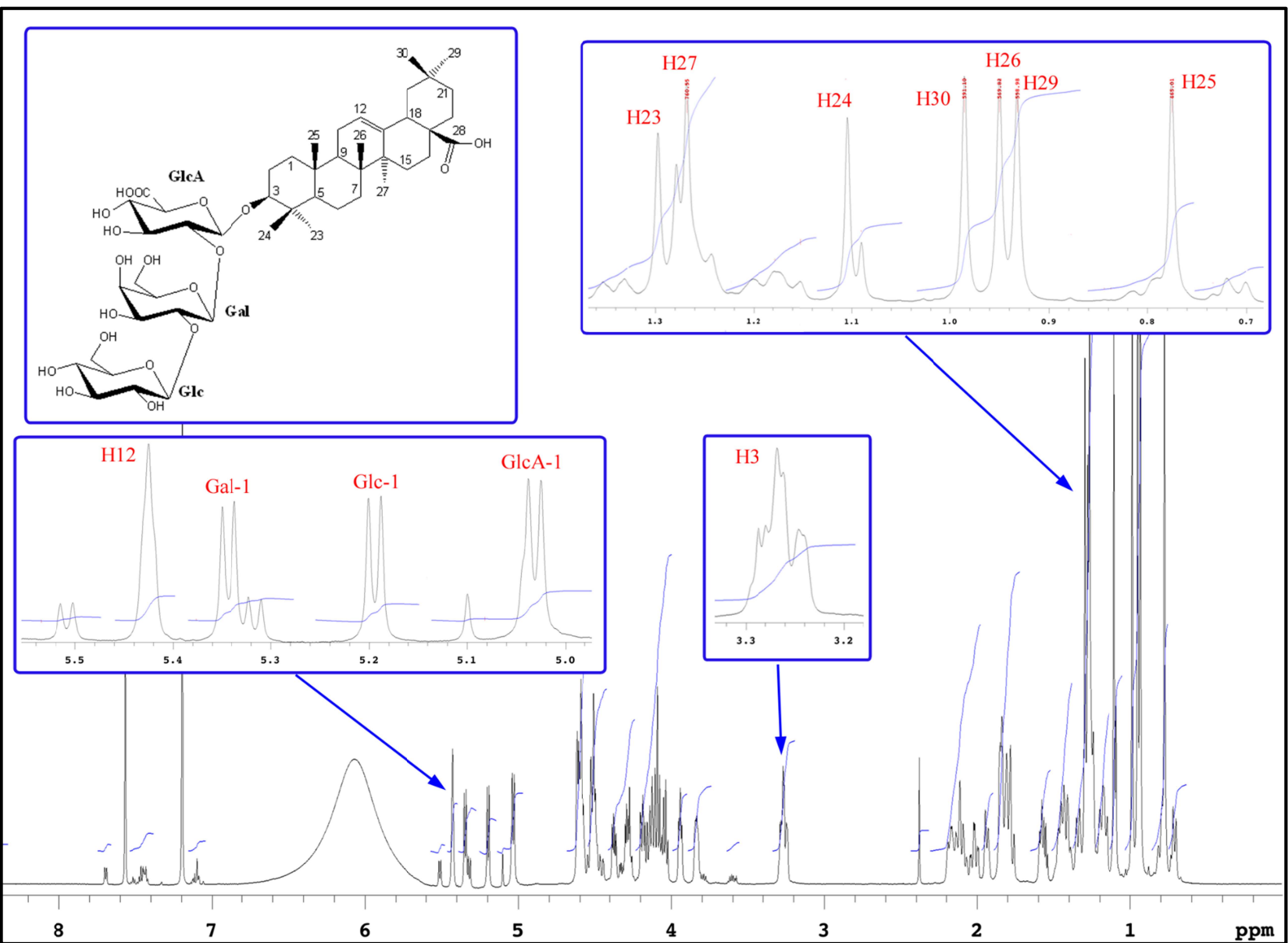


Figura 106. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HmE-P2 mayoritario.

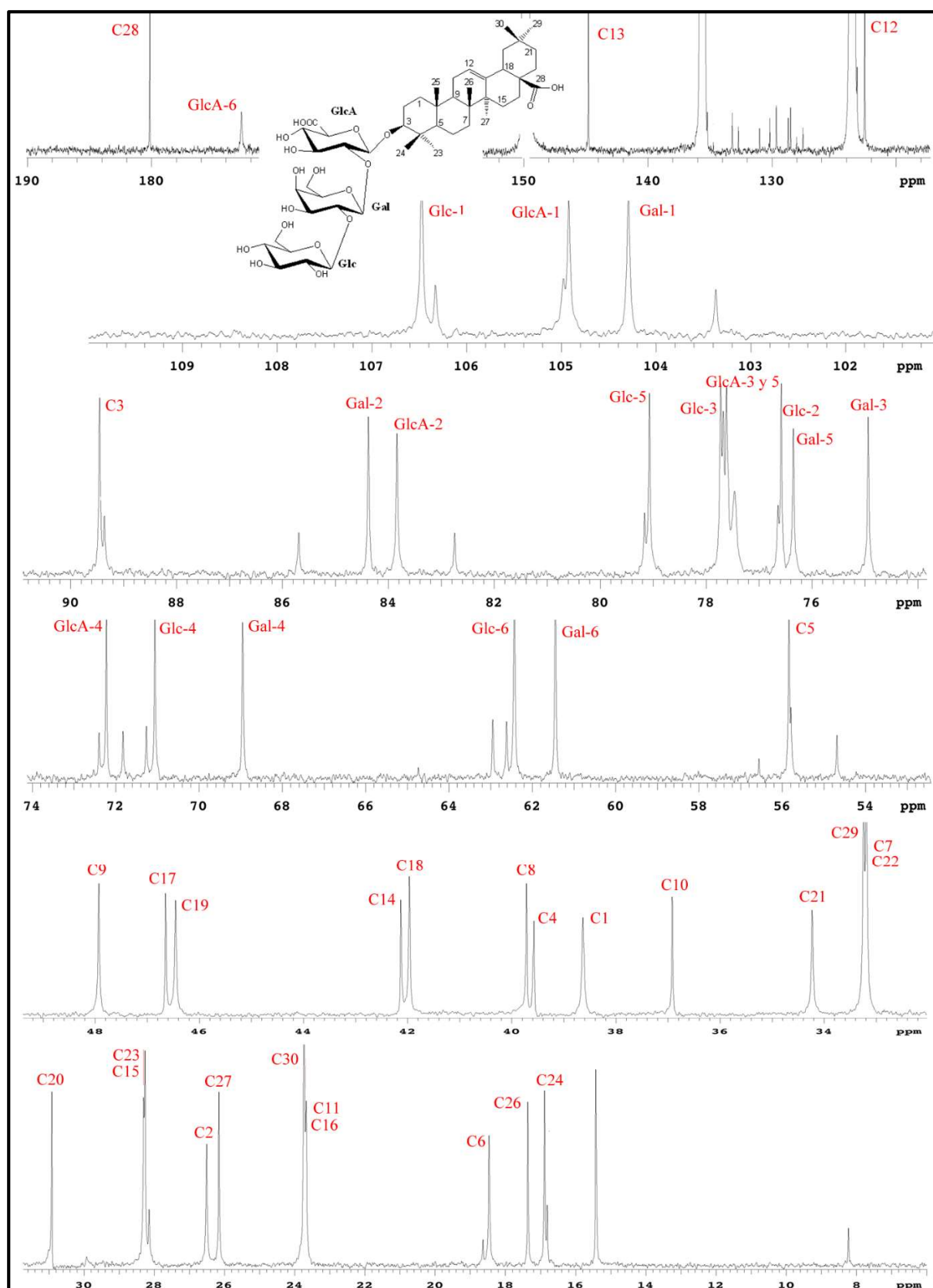


Figura 107. Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto HmE-P2 mayoritario.

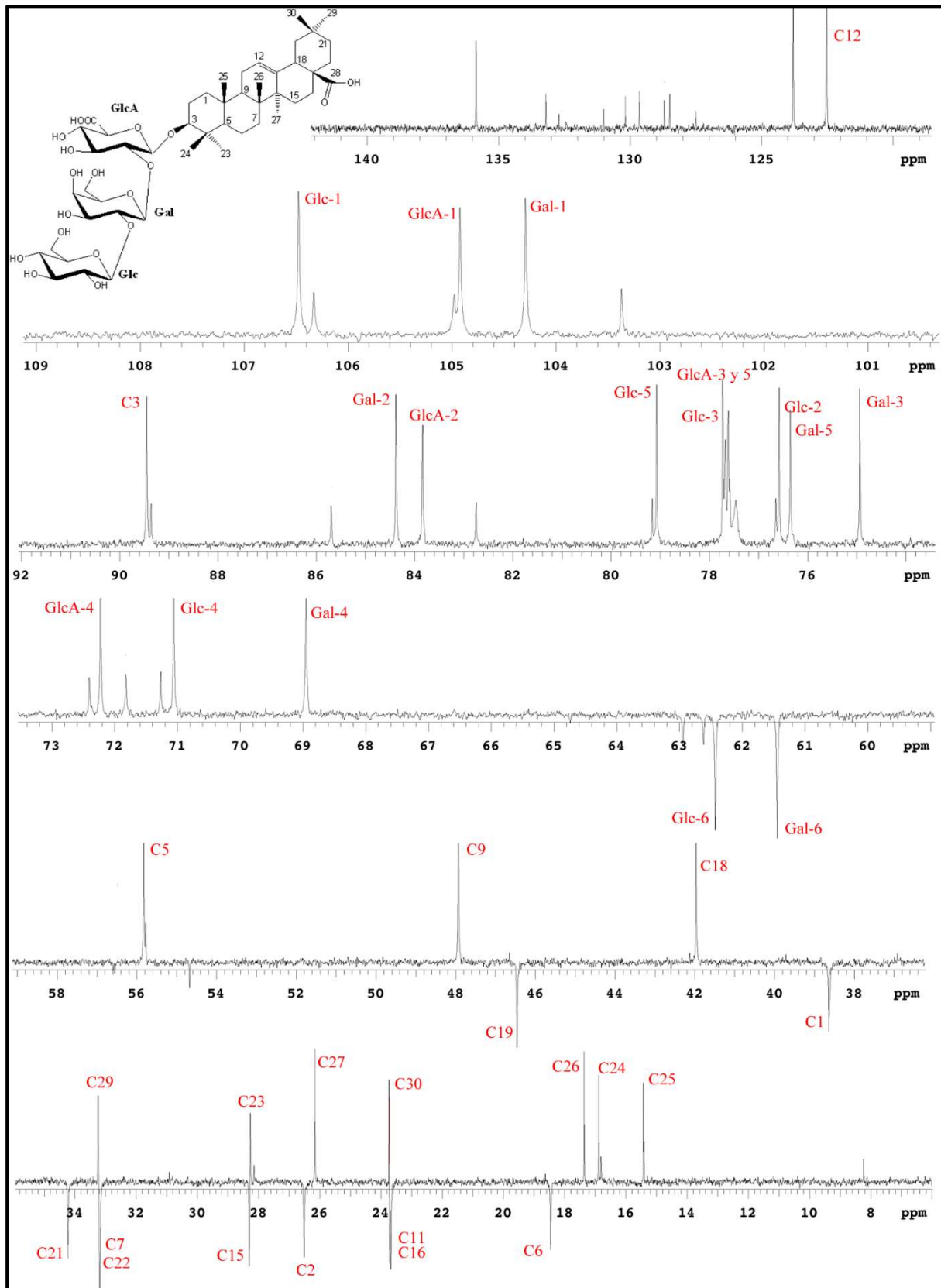


Figura 108. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P2 mayoritario.

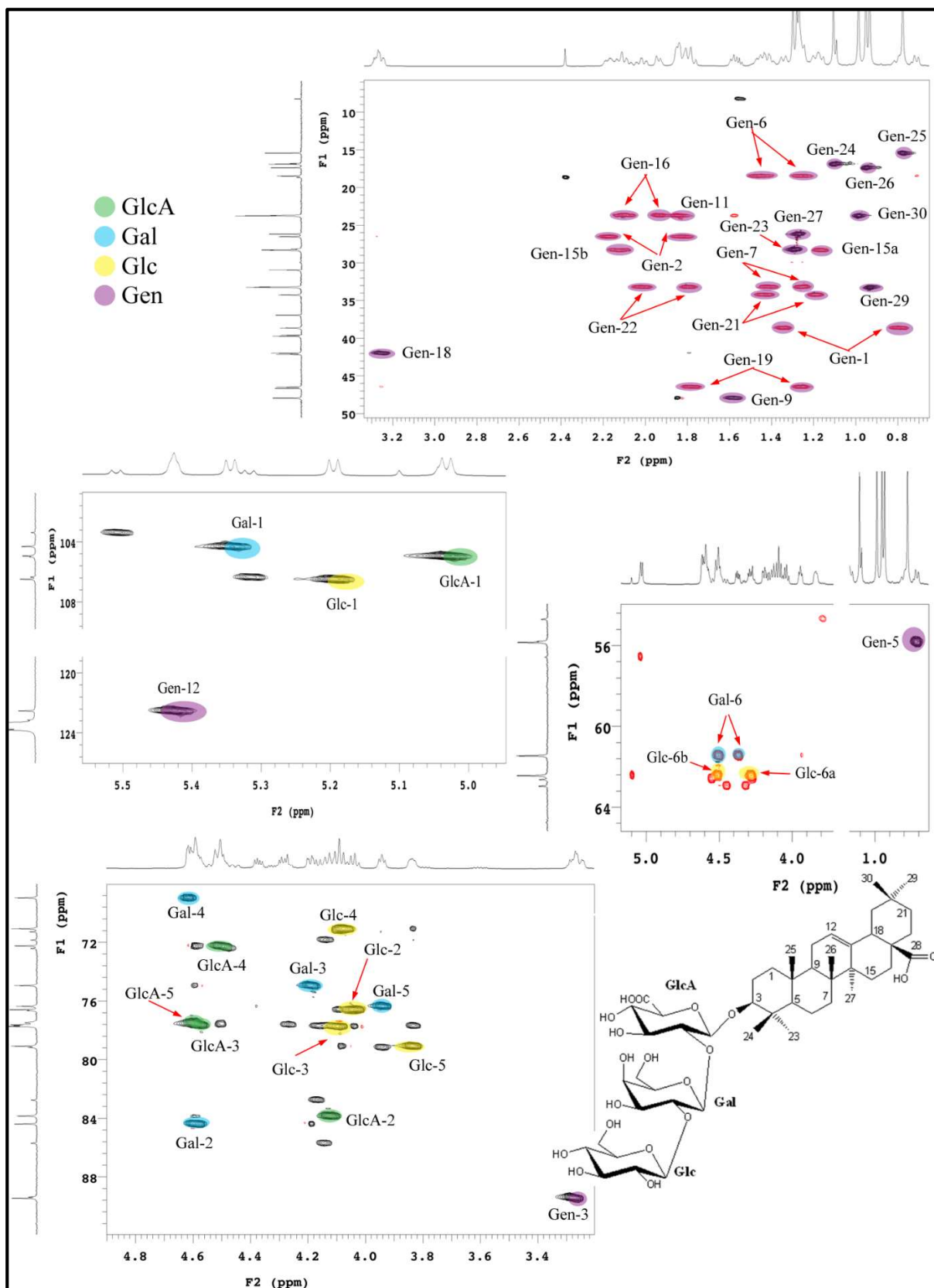


Figura 109. Espectro de HSQC del compuesto **HmE-P2** mayoritario.



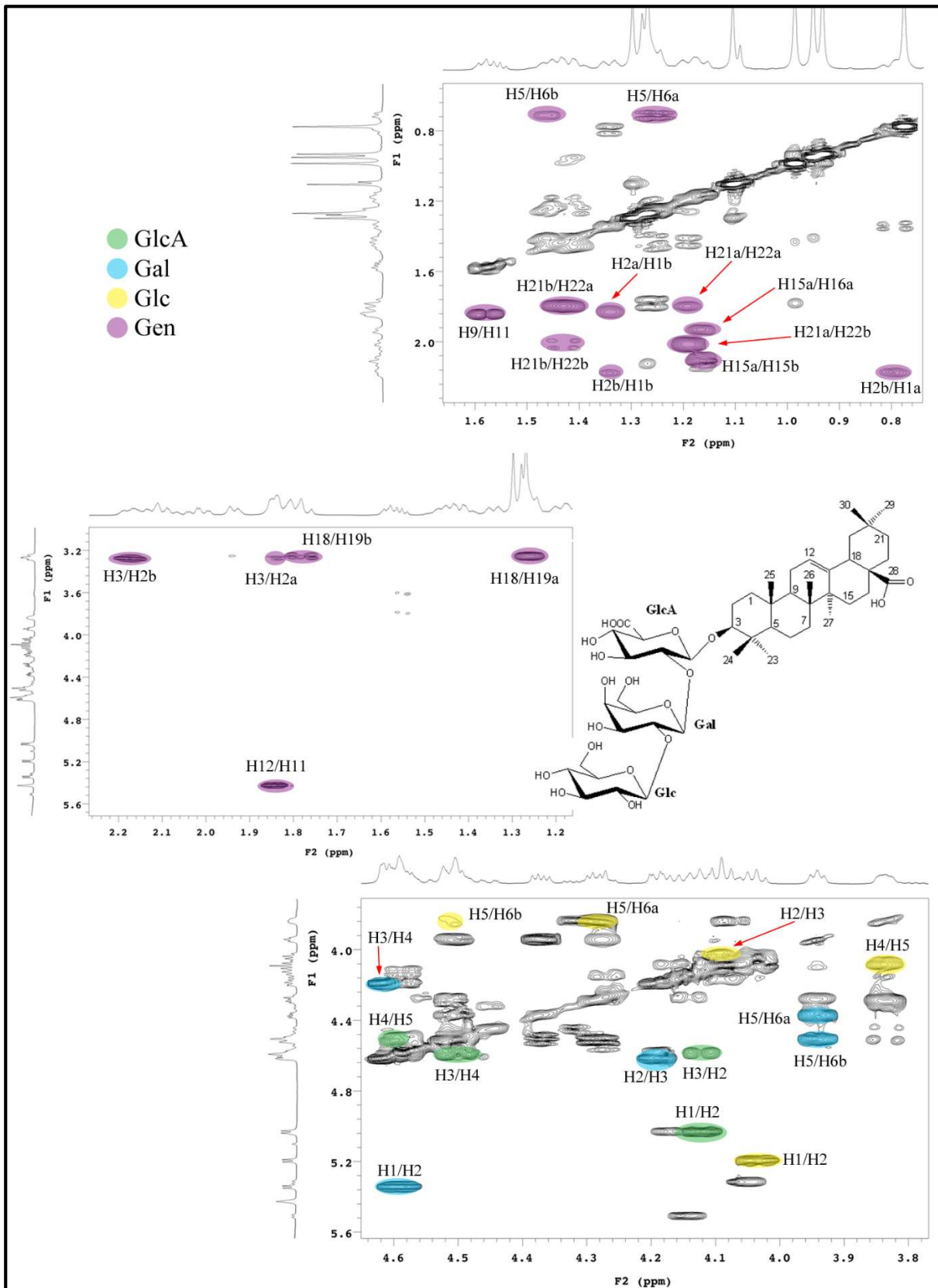


Figura 110. Espectro de COSY del compuesto **HmE-P2** mayoritario.

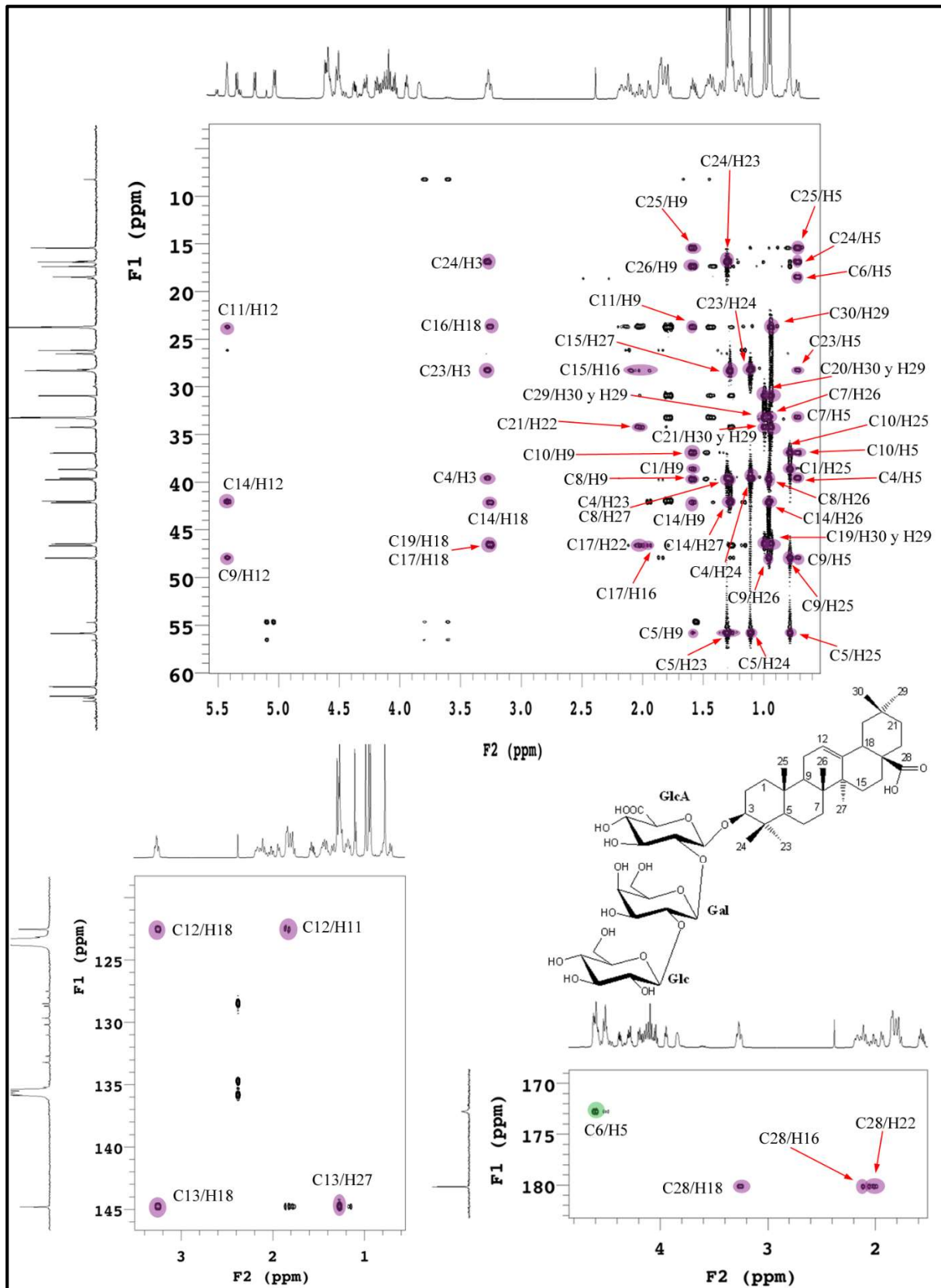


Figura 111. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P2 mayoritario.

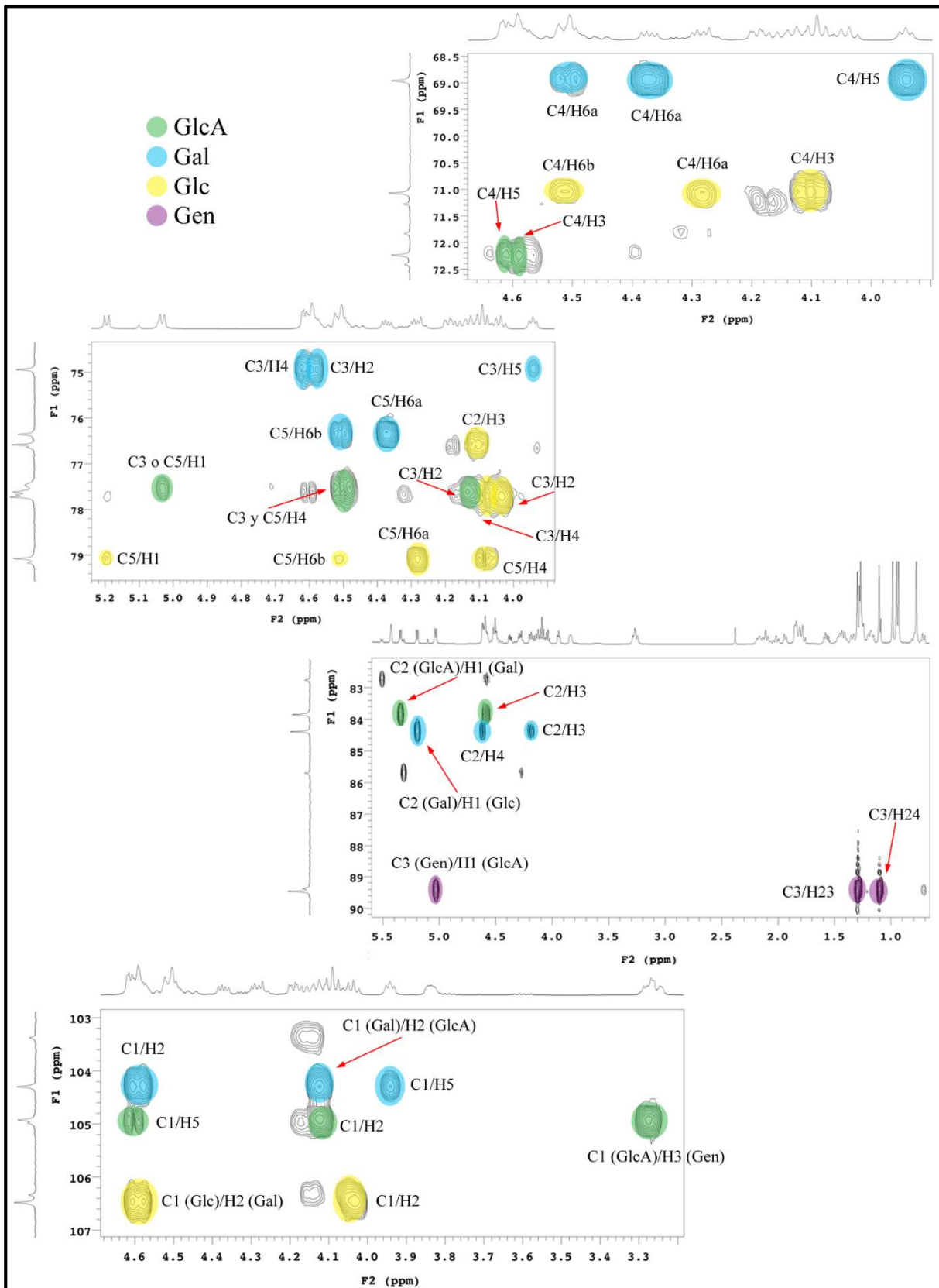


Figura 111. ...continuación...

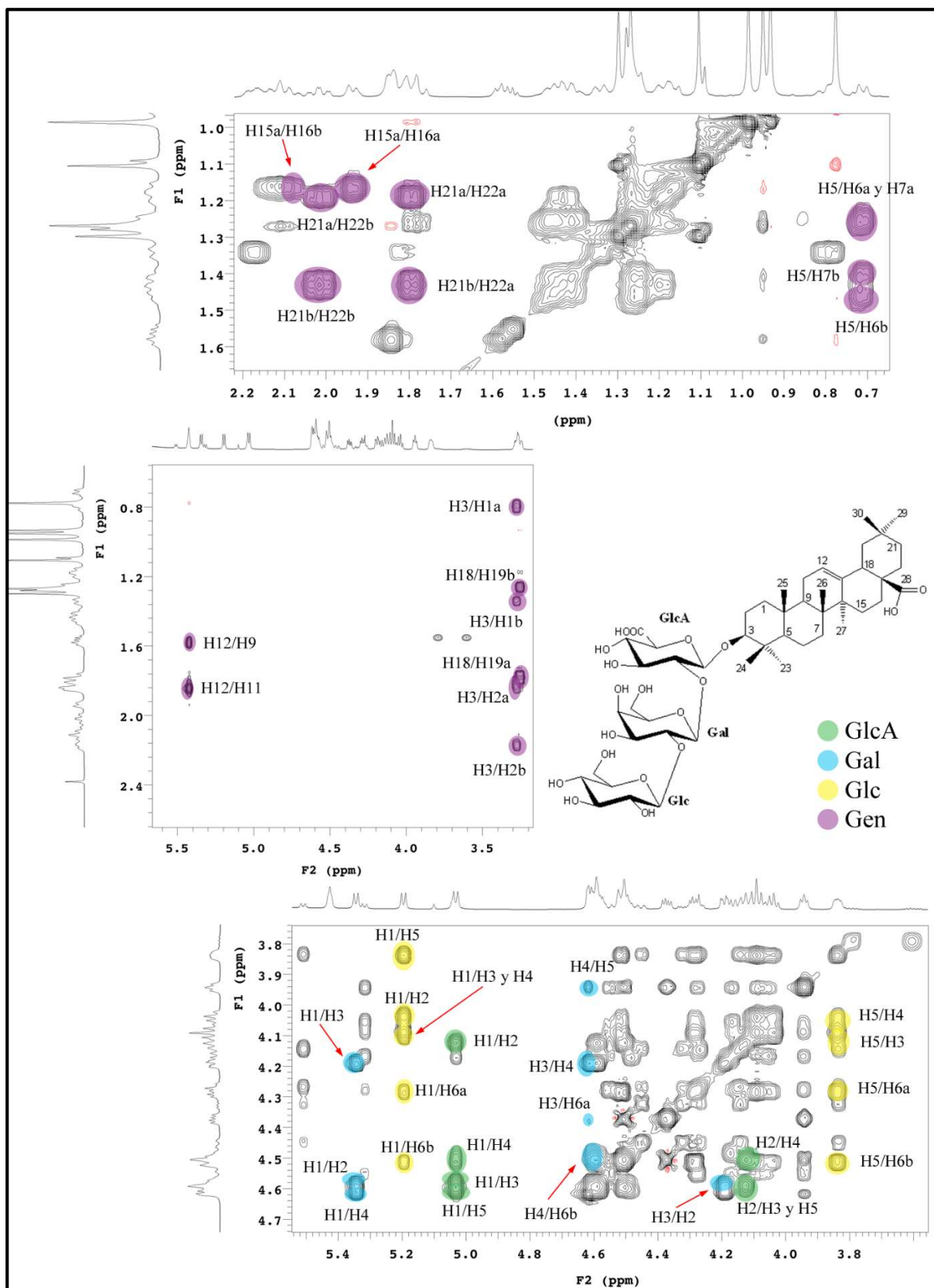


Figura 112. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P2 mayoritario.

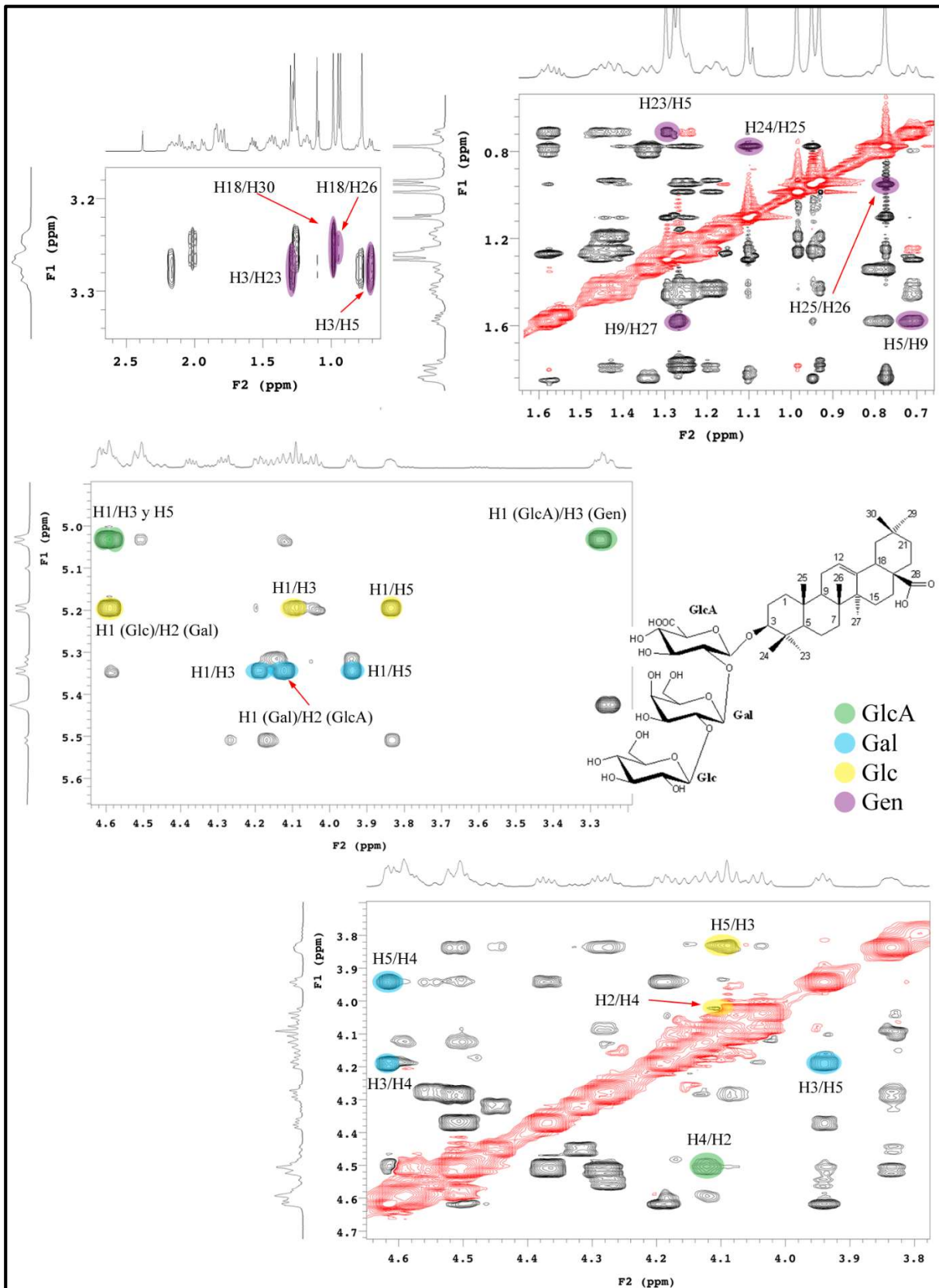


Figura 113. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P2 mayoritario.



**III.C. Compuesto HmE-P2 minoritario:** ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico.

Como se mencionó anteriormente el compuesto **HmE-P2** del que se obtuvieron en total 13,7 mg (esquema 5), resulto ser una mezcla de dos compuestos, uno mayoritario y uno minoritario. El compuesto **HmE-P2 minoritario** presenta los mismo iones moleculares en el espectro de masas que el compuesto mayoritario (figura 104), es decir, un ion molecular  $[M]^-$  a 955,5 m/z en modo negativo y un ion molecular  $[M+Na]^+$  a 979,6 m/z en modo positivo, esto equivale a un compuesto con fórmula molecular  $C_{41}H_{64}O_{13}$  (calc. 956,49808).

**Identificación del aglicón:**

Al observar los espectros RMN-1D y 2D del compuesto **HmE-P2**, se observa que las señales en la zona de la genina corresponden a un solo esqueleto triterpénico, lo que significa que ambos compuestos, el mayoritario y el minoritario, poseen la misma genina, el **ácido oleanólico**.

**Identificación de los azúcares:**

La diferencia entre el compuesto mayoritario y el minoritario se encuentra al analizar la zona de los azúcares y de los anómeros, donde se observa la presencia de tres carbonos anoméricos minoritarios a  $\delta_C$  103,4; 105,0 y 106,3 en los espectros RMN-13C (figura 116). Estos carbonos se relacionan en el HSQC con sus hidrógenos anoméricos de la siguiente forma:  $\delta_C/\delta_H$  103,4/5,51 (doblete,  $J = 7,6$  Hz), 105,0/5,04 (doblete,  $J = 7,6$  Hz) y 106,3/5,32 (doblete,  $J = 8,0$  Hz).

Las unidades de azúcar fueron caracterizadas como una unidad de **ácido  $\beta$ -*D*-glucorónico** (GlcA) y dos unidades de  **$\beta$ -*D*-glucosa** (Glc) mediante los espectros RMN-2D del compuesto. En el HMBC (figura 120) y el ROESY (figura 122) se pueden observar las siguientes correlaciones:

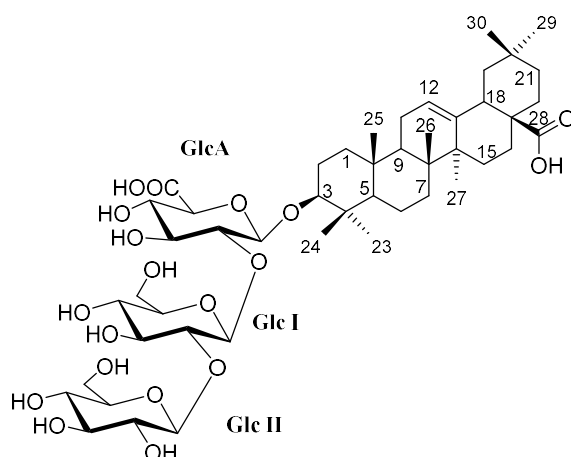
	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_C/\delta_H$ )
GlcA:	5,04 (GlcA-H1) / 3,28 (Gen-H3)	105,0 (GlcA-C1) / 3,28 (Gen-H3) 89,5 (Gen-C3) / 5,04 (GlcA-H1)
Glc I:	5,51 (Glc I-H1) / 4,17 (GlcA-H2)	103,4 (Glc I-C1) / 4,17 (GlcA-H2) 82,7 (GlcA-C2) / 5,51 (Glc I-H1)
Glc II:	5,32 (Glc II-H1) / 4,14 (Glc I-H2)	106,3 (Glc II-C1) / 4,14 (Glc I-H2) 85,7 (Glc I-C2) / 5,32 (Glc II-H1)

Con estas correlaciones puede determinarse la secuencia de monosacáridos en la posición C-3 de la genina como [Glc II(1 $\rightarrow$ 2)-Glc I(1 $\rightarrow$ 2)]-GlcA.

**Conclusión:**

Los datos obtenidos a partir de los espectros de RMN permitieron identificar al compuesto **HmE-P2 minoritario** como el **ácido 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosiloleanólico** (figura 114). No existen reportes previos de este compuesto en la literatura, por lo que es la primera vez que se aísla como producto natural a esta saponina del ácido oleanólico.

La secuencia de azúcares de este compuesto ha sido reportada anteriormente dentro del género *Hydrocotyle*, con el hydrocotylósido IV hallado en el extracto metanólico de *H. sibthorpioides* (Matsushita *et al.*, 2004) .



**Figura 114.** Estructura del compuesto **HmE-P2 minoritario**: ácido 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosiloleanólico.

**Tabla 18.** Desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) de **HmE-P2** minoritario en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Aglicón				Azúcares				
Pos.	δ <sub>C</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	δ <sub>C</sub> (ppm)	Tipo	δ <sub>H</sub> (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,80	3-O-GlcA	1	105,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,04 <i>d</i> (7,6)
			1,34					
2	26,5	-CH <sub>2</sub> -	1,84	2	82,7	-CHOR-	4,17	
			2,17					
3	89,5	-CHOH-	3,28	3	77,6	-CHOH-	4,59	
4	39,6	>C<	-----	4	72,4	-CHOR-	4,48	
5	55,8	>CH-	0,71 <i>br d</i> (11,2)	5	77,6	-CHOH-	4,60	
6	18,5	-CH <sub>2</sub> -	1,25	6	172,8	-COOH	-----	
			1,46					
7	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,25	Glc I-(1→2)-GlcA				
			1,42	1	103,4	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,51 <i>d</i> (7,6)	
8	39,7	>C<	-----	2	85,7	-CHOH-	4,14	
			1,58 <i>dd</i> (13,7; 6,8)					
9	47,9	>CH-	1,58 <i>dd</i> (13,7; 6,8)	3	77,6	-CHOH-	4,27	
10	36,9	>C<	-----	4	71,1	-CHOH-	4,08	
11	23,6	-CH <sub>2</sub> -	1,83-1,86	5	77,7	-CHOH-	3,83 <i>m</i>	
			5,42 <i>br s</i>					
12	122,5	=CH-	5,42 <i>br s</i>	6	62,9	-CH <sub>2</sub> OH	4,32 <i>dd</i> (12,0, 5,6)	
13	144,8	=C<	-----					4,45 <i>dd</i> (12,0; 2,8)
14	42,1	>C<	-----	Glc II-(1→2)-Glc I				
15	28,3	-CH <sub>2</sub> -	1,16	1	106,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,32 <i>d</i> (8,0)	
			2,12					
16	23,6	-CH <sub>2</sub> -	1,93	2	76,6	-CHOH-	4,05	
			2,09					
17	46,6	>C<	-----	3	77,7	-CHOH-	4,16	
			3,25					
18	42,0	>CH-	3,25	4	71,3	-CHOH-	4,08	
19	46,5	-CH <sub>2</sub> -	1,26					5
			1,80					
20	30,9	>C<	-----	6	62,6	-CH <sub>2</sub> OH	4,28 <i>dd</i> (11,6; 4,8)	
21	34,2	-CH <sub>2</sub> -	1,19					4,56
22	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,43	1	106,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,32 <i>d</i> (8,0)	
			1,80					
23	28,3	-CH <sub>3</sub>	1,29 <i>s</i>	2	76,6	-CHOH-	4,05	
			2,02					
24	16,9	-CH <sub>3</sub>	1,10 <i>s</i>	3	77,7	-CHOH-	4,16	
25	15,4	-CH <sub>3</sub>	0,78 <i>s</i>					4
26	17,4	-CH <sub>3</sub>	0,95 <i>s</i>	5	79,2	-CHOH-	3,94 <i>m</i>	
27	26,2	-CH <sub>3</sub>	1,27 <i>s</i>					6
28	180,1	-COOH	-----	4,56				
29	33,2	-CH <sub>3</sub>	0,94 <i>s</i>		1	106,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,32 <i>d</i> (8,0)
30	23,7	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>	2				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete

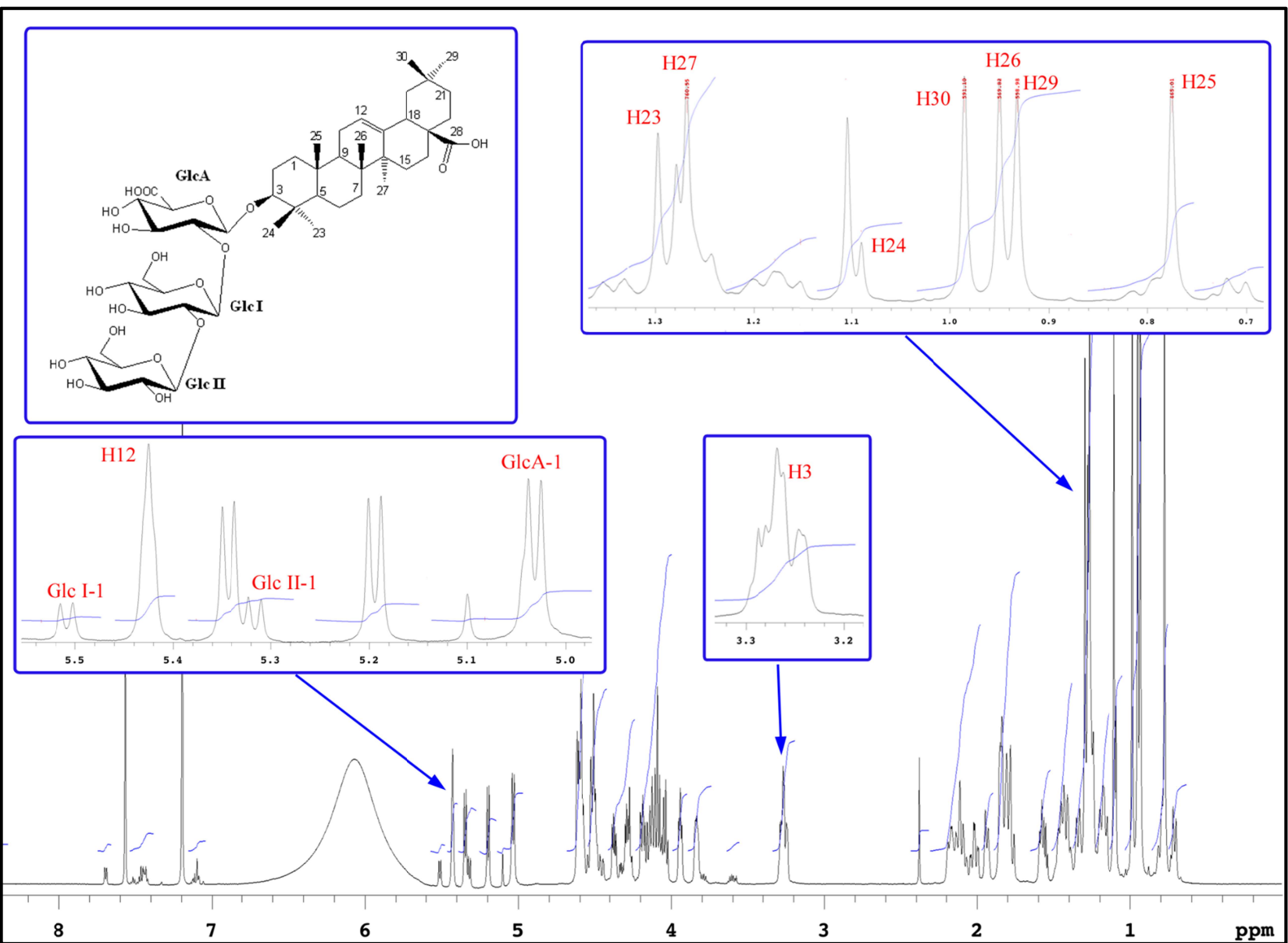


Figura 115. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HmE-P2 minoritario.

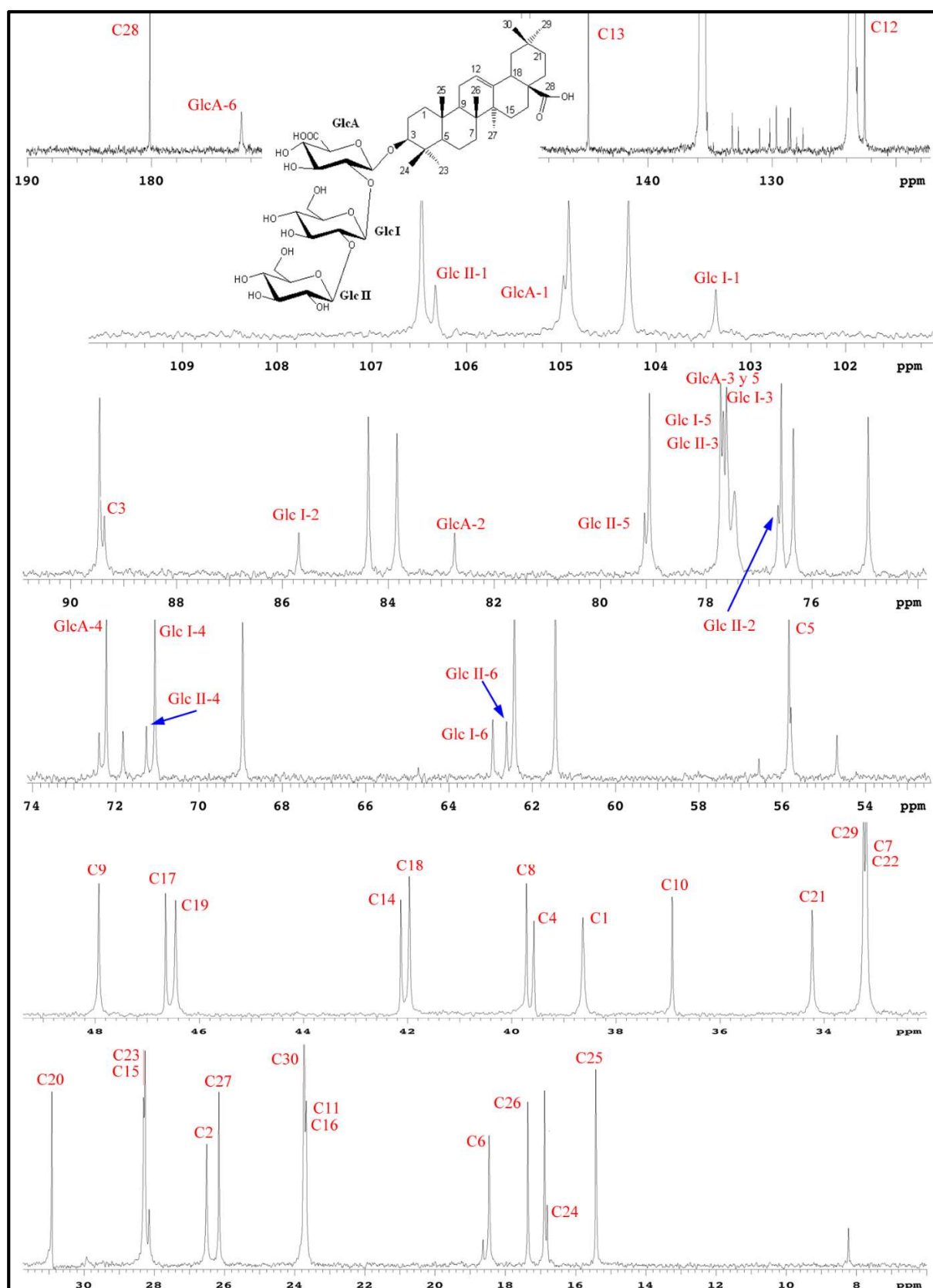


Figura 116. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto HmE-P2 minoritario.



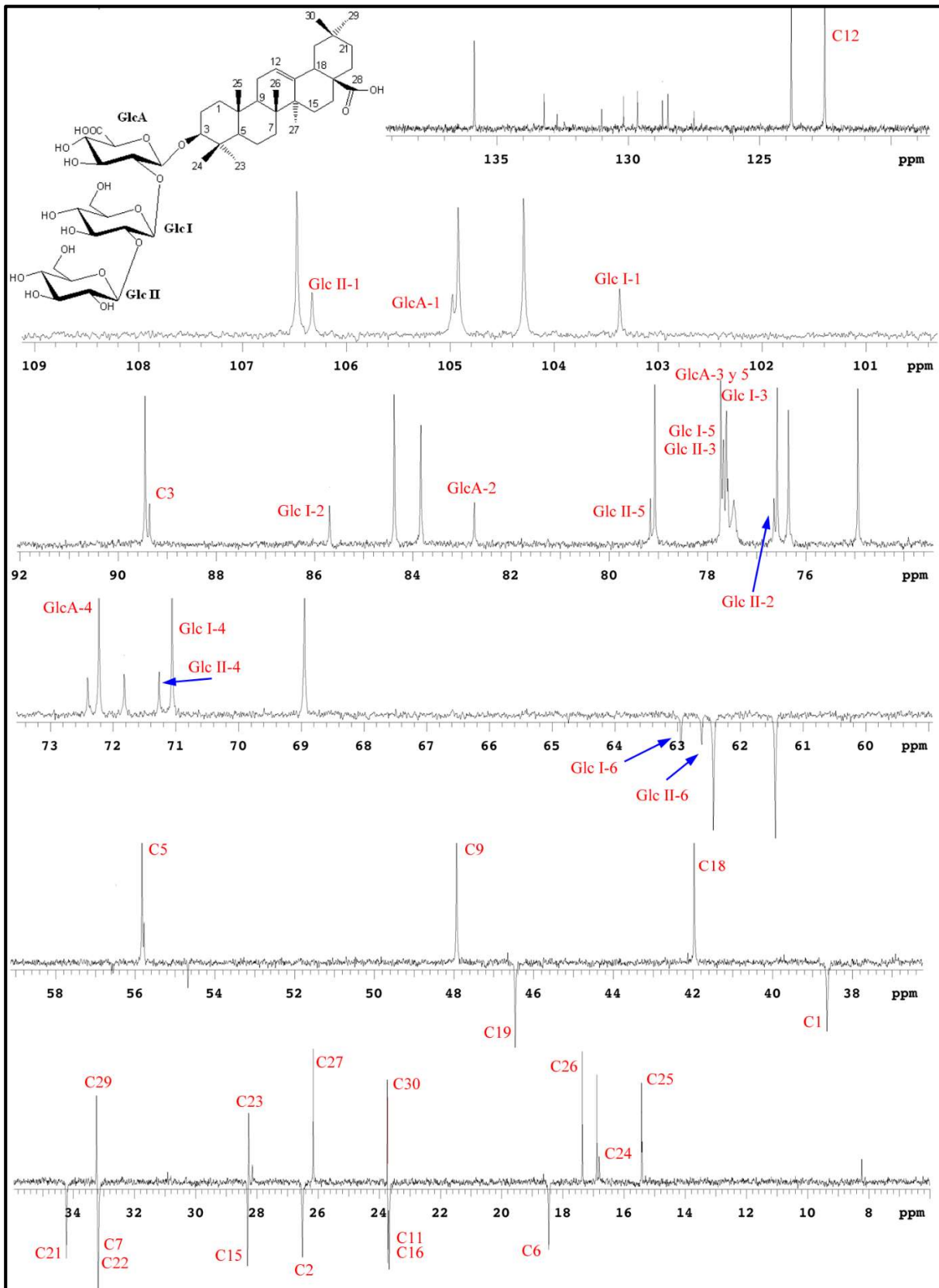


Figura 117. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P2 minoritario.

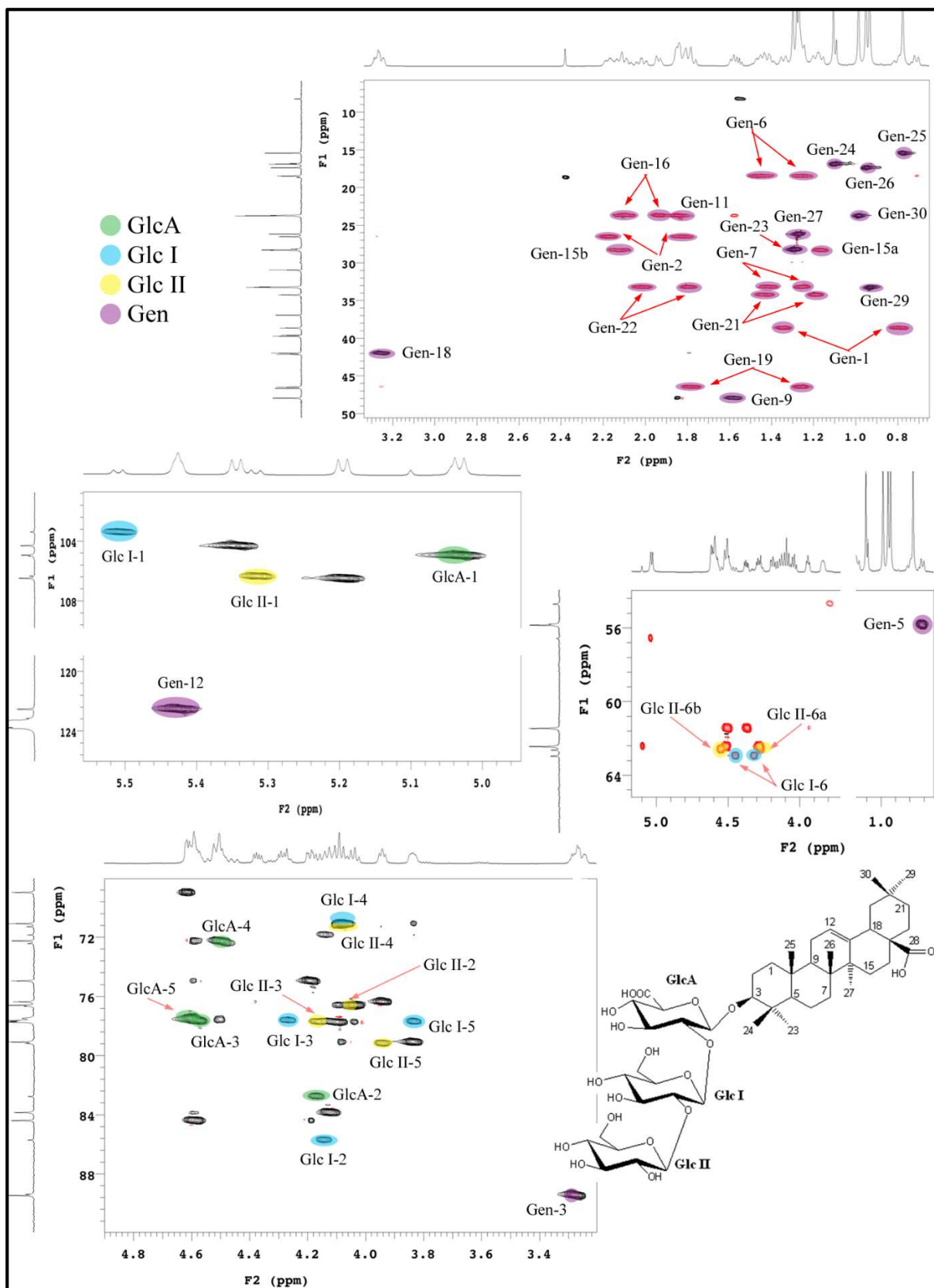


Figura 118. Espectro de HSQC del compuesto **HmE-P2** minoritario.



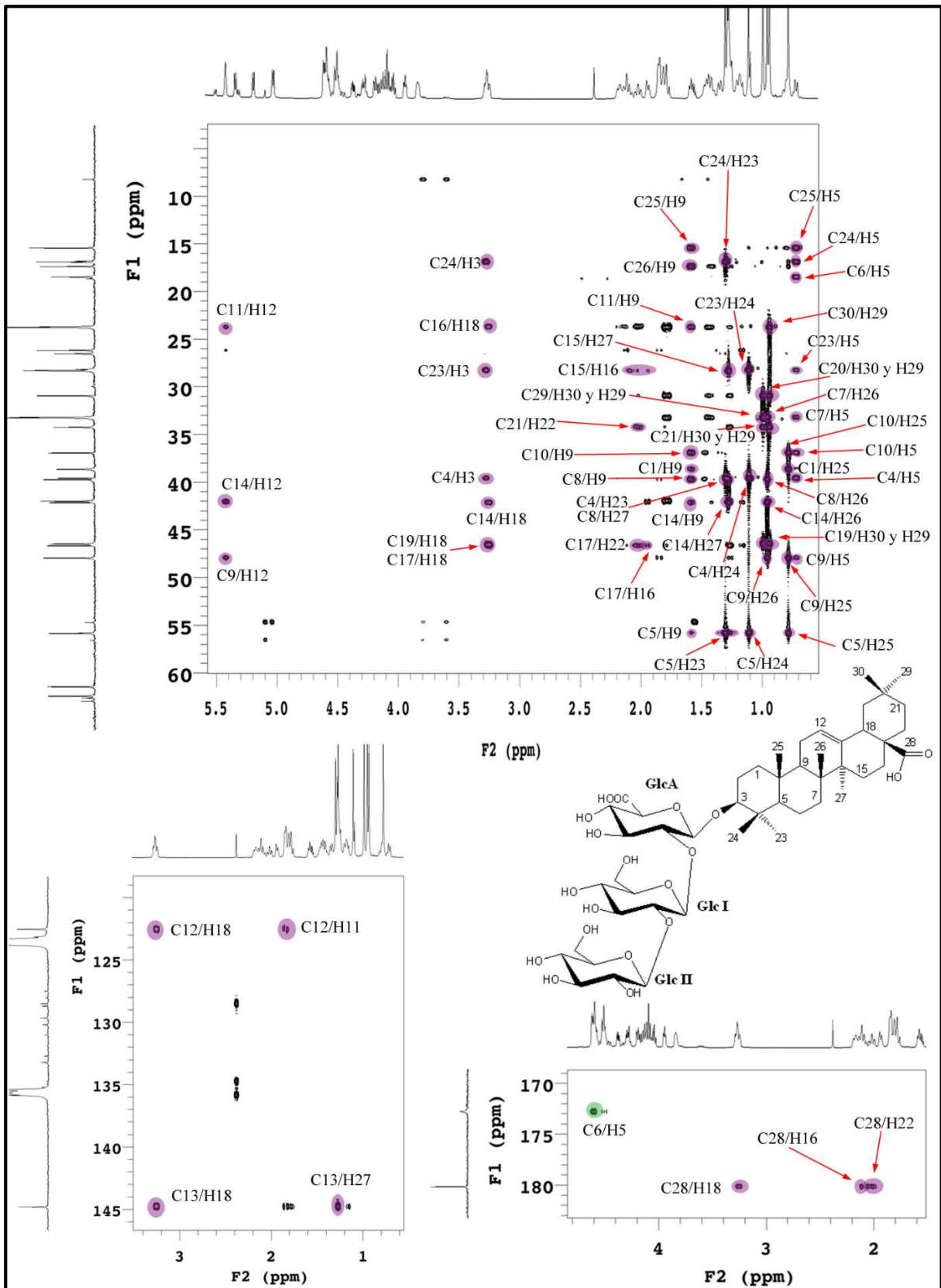


Figura 120. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P2 minoritario.

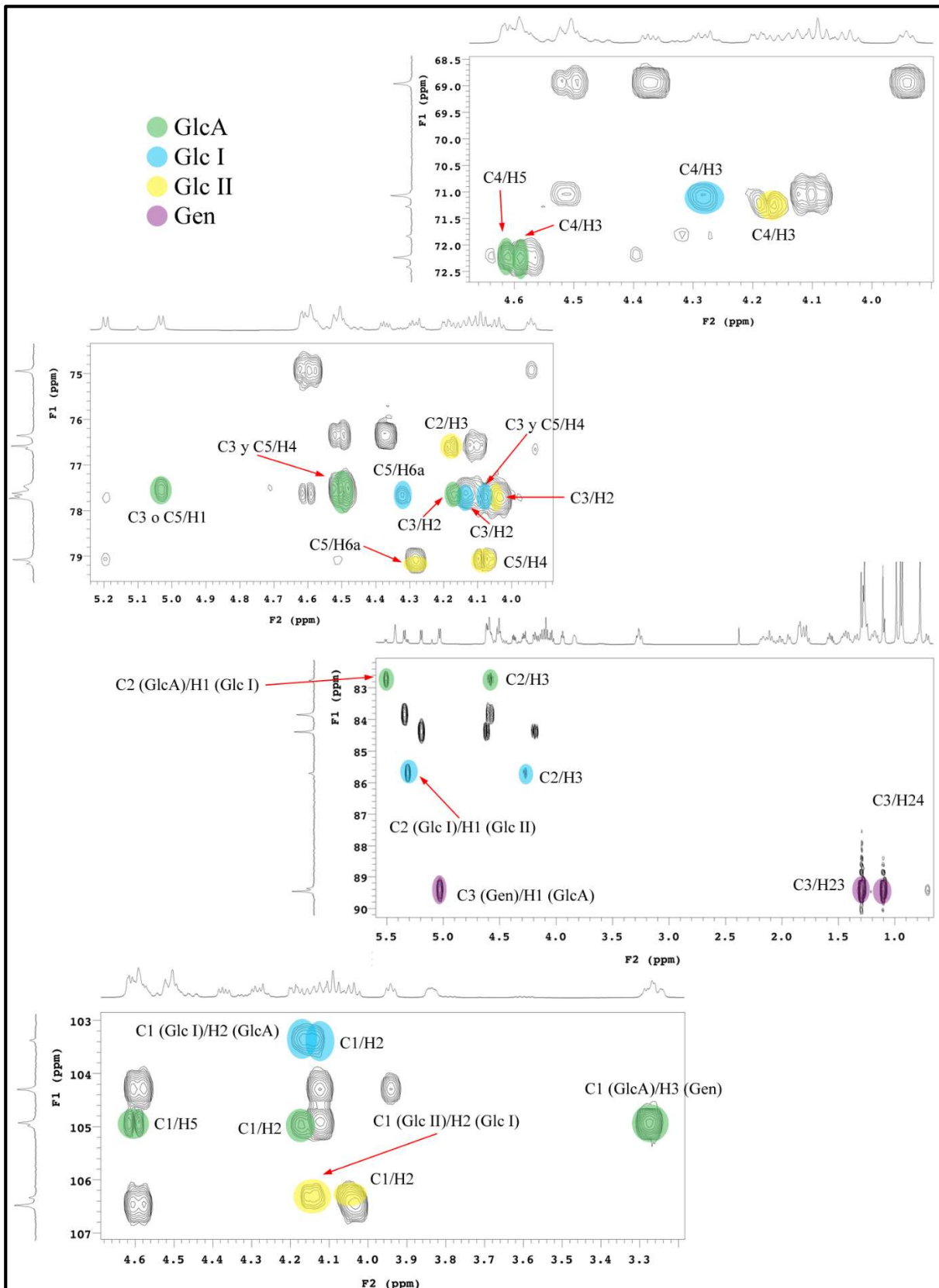


Figura 120. ...continuación...



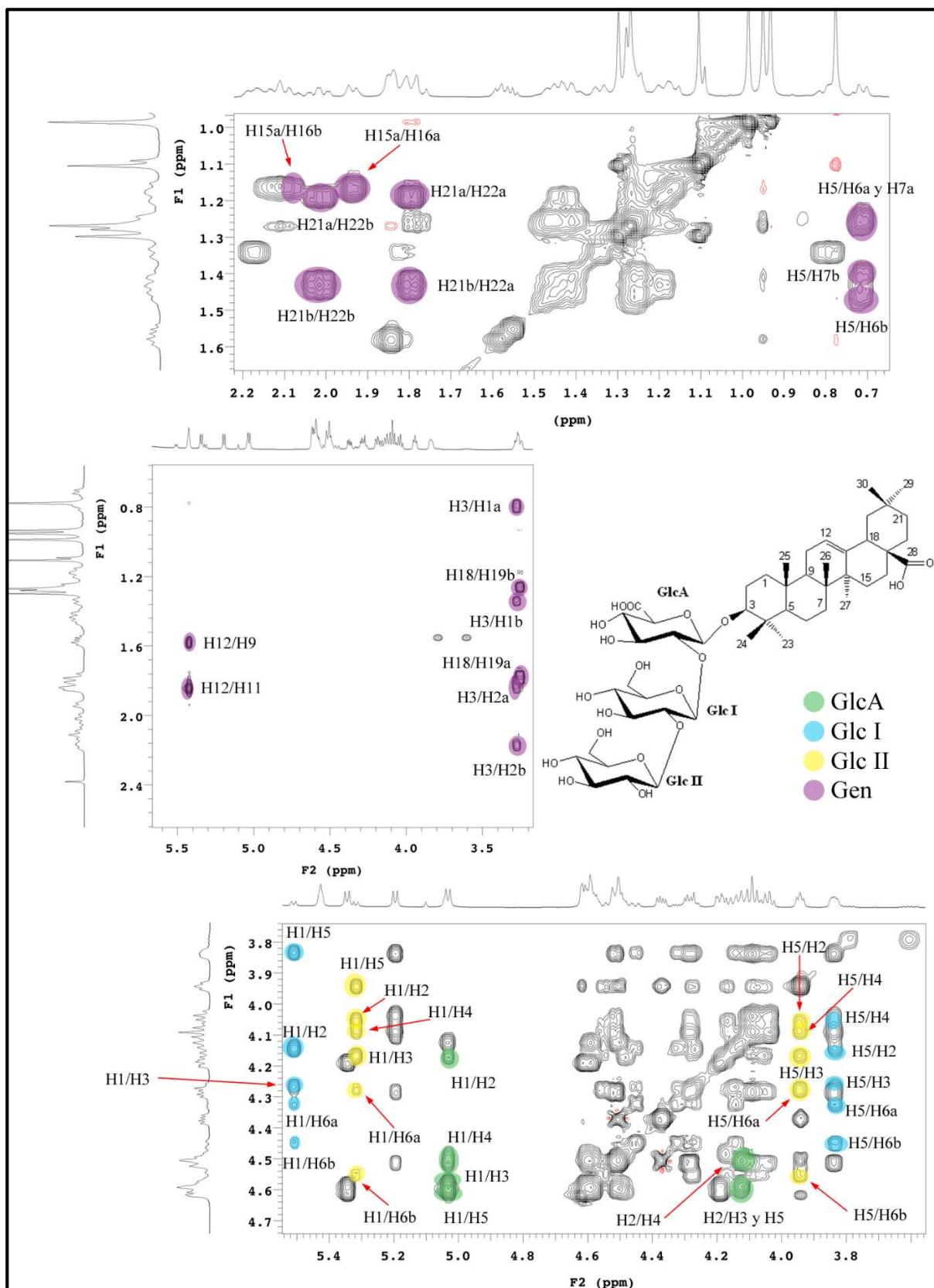


Figura 121. Espectro de TOCSY del compuesto **HmE-P2** minoritario.



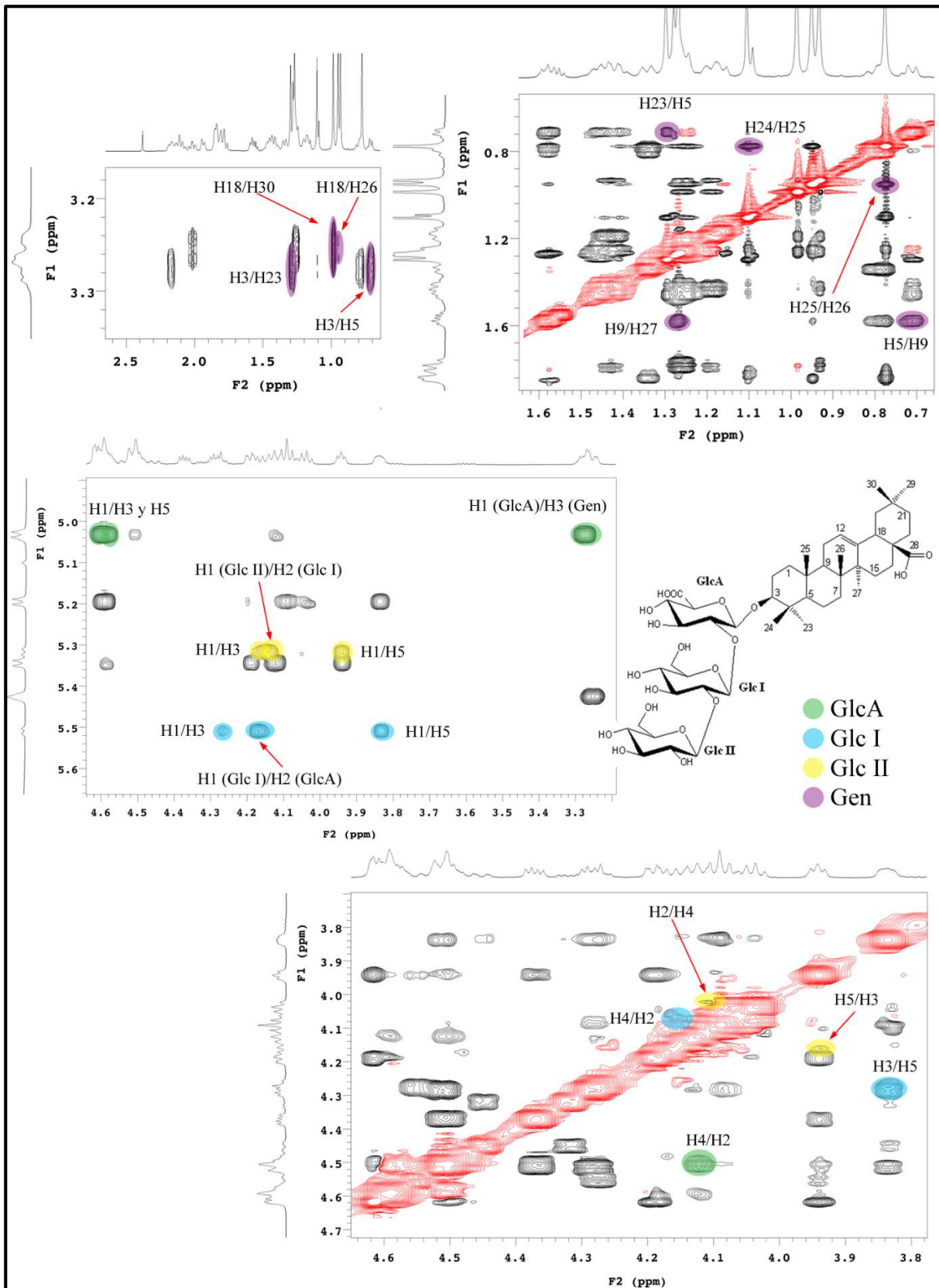
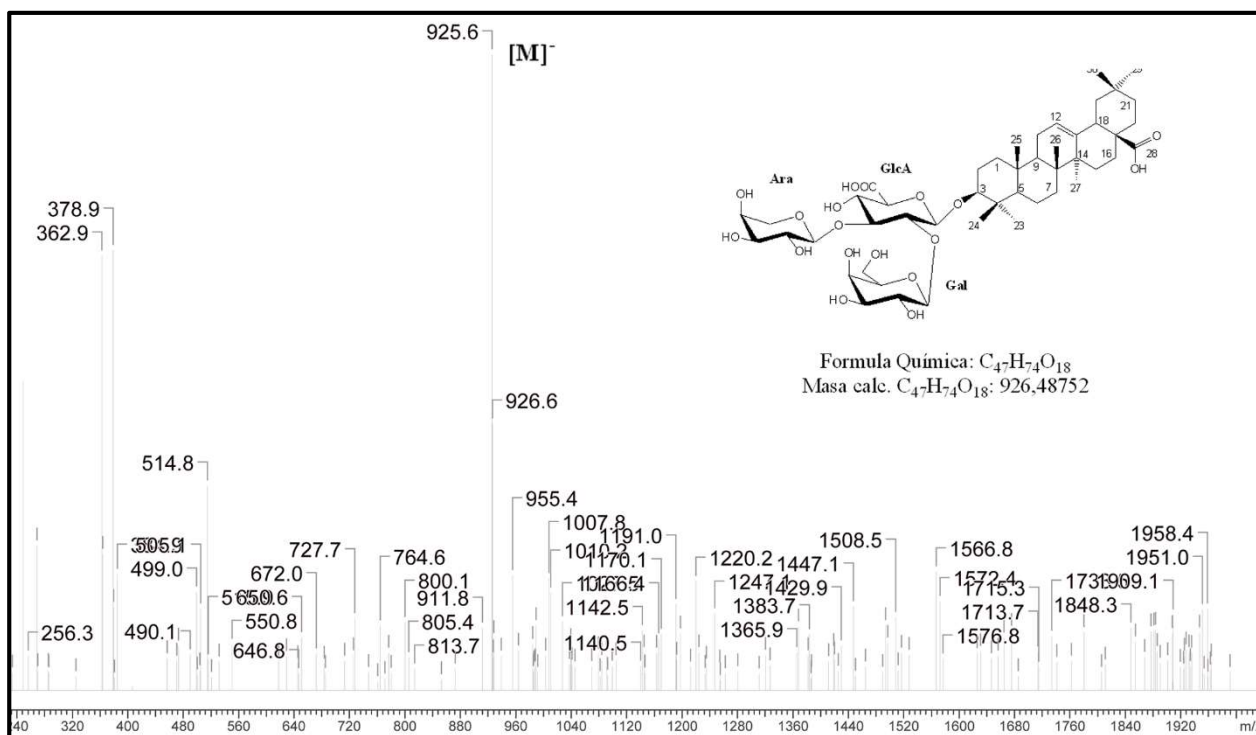


Figura 122. Espectro de ROESY del compuesto **HmE-P2** minoritario.

**III.D. Compuesto HmE-P3:** ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico.

A partir de la fracción Fx2-4 de *H. multifida* (esquema 5) se logró aislar 4,5 mg del compuesto **HmE-P3** en la subfracción Fx2-4f. El espectro de masas del compuesto muestra un ion molecular  $[M]^-$  a 925,6 m/z que corresponde a una fórmula molecular  $C_{47}H_{74}O_{18}$  (calc. 926,48752). La diferencia de 162 y 30 unidades m/z menos con respecto a **HmE-P1** y **HmE-P2** permiten suponer que el compuesto posee tres unidades de azúcares, dos hexosas y una pentosa.



**Figura 123.** Espectros ESI-MS  $< 0$  del compuesto **HmE-P3**.

La revisión de los espectros de RMN- $^{13}C$  (figura 126) y RMN-DEPT (figura 127) revela la presencia de 46 carbonos: 1 carbonos de grupos carboxílicos, 2 carbonos con configuración  $sp^2$  (uno metínico y uno cuaternario) característicos de un doble enlace, 17 grupos oxigenados (2 metilenos y 15 metinos), 7 grupos metilos, 10 grupos metilos, 3 grupos metinos y 6 carbonos cuaternarios. Esto coincide con lo propuesto a partir del espectro de masas sobre la presencia de un triterpeno y tres unidades de monosacáridos.

**Identificación de la genina:**

Para el compuesto **HmE-P3**, los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN-1D ( $^1H$ ,  $^{13}C$  y DEPT) y HSQC (figura 128) en la zona de la genina, son muy similares

a los observados en los compuestos **HmE-P1** y **HmE-P2**, por lo que podría tratarse del mismo esqueleto triterpénico. Al analizar las correlaciones en los espectros de RMN-2D (HMBC, COSY, TOCSY y ROESY) se obtiene que en efecto, el esqueleto triterpénico para **HmE-P3** es el **ácido oleanólico**.

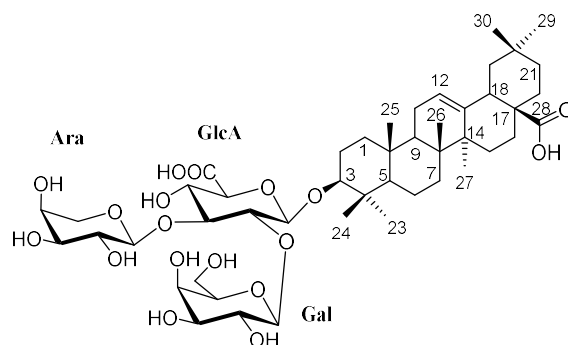
### Identificación de los azúcares:

En el espectro HSQC (figura 128) pueden observarse, en la zona de los azúcares y anómeros, tres carbonos anoméricos a  $\delta_C$  104,4: 105,0 y 105,3 que se correlacionan con los hidrógenos anoméricos a  $\delta_H$  5,50 (doblete,  $J = 7,6$  Hz), 5,23 (doblete,  $J = 6,8$  Hz) y 4,92 (singulete ancho) respectivamente. Con ayuda de los espectros de RMN-2D del compuesto, los azúcares fueron caracterizados como una unidad de **ácido  $\beta$ -D-glucorónico** (GlcA),  **$\beta$ -D-galactosa** (Gal) y  **$\alpha$ -L-arabinopiranososa** (Ara) (Agrawal, 1992). Las correlación en ROESY (figura 132) y HMBC (figura 129) de los anómeros indican que la secuencia de monosacáridos unida al carbono C-3 de la genina es [Gal-(1→2)]-[Ara-(1→3)]-GlcA.

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_C/\delta_H$ )
GlcA:	4,92 (GlcA-H1) / 3,28 (Gen-H3)	105,3 (GlcA-C1) / 3,28 (Gen-H3) 89,7 (Gen-C3) / 4,92 (GlcA-H1)
Gal:	5,50 (Gal-H1) / 4,44 (GlcA-H2)	104,4 (Gal-C1) / 4,44 (GlcA-H2) 79,5 (GlcA-C2) / 5,50 (Gal-H1)
Ara:	5,23 (Ara-H1) / 4,34 (GlcA-H3)	85,9 (GlcA-C3) / 5,23 (Ara-H1)

### Conclusión:

Los espectros de RMN-1D y 2D del compuesto **HmE-P3** permitieron caracterizarlo como una saponina, nombrada, **ácido 3-O- $[\beta$ -D-galactopiranosil-(1→2)]- $[\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosiloleanólico** (figura 124). Es la primera vez que se aísla este compuesto como producto natural, ya que no existen reportes previos en la literatura donde sea descrita esta estructura. Así mismo, es la primera vez que esta secuencia de monosacáridos ([Gal-(1→2)]-[Ara-(1→3)]-GlcA) es reportada dentro del género *Hydrocotyle*.



**Figura 124.** Estructura del compuesto **HmE-P3**: ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico.

**Tabla 19.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **HmE-P3** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [ $J_{\text{H-H}}$ ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [ $J_{\text{H-H}}$ ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,81 1,36	<b>3-<i>O</i>-GlcA</b>			
2	26,5	-CH <sub>2</sub> -	1,79 2,14	1	105,3	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,92 <i>d</i>
3	89,7	-CHOH-	3,28 <i>dd</i>	2	79,5	-CHOR-	4,44
4	39,6	>C<	-----	3	85,9	-CHOH-	4,34
5	55,8	>CH-	0,74 <i>br d</i> (12,0)	4	71,5	-CHOR-	4,40
6	18,5	-CH <sub>2</sub> -	1,26 1,48	5	77,0	-CHOH-	4,52
7	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,28 1,45	6	n.d.	-COOH	-----
8	39,7	>C<	-----	<b>Gal-(1<math>\rightarrow</math>2)-GlcA</b>			
9	47,9	>CH-	1,61	1	104,4	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,50 <i>d</i> (7,6)
10	36,9	>C<	-----	2	73,8	-CHOH-	4,49
11	23,7	-CH <sub>2</sub> -	1,86-1,88	3	75,2	-CHOH-	4,15
12	122,5	=CH-	5,45 <i>br s</i>	4	69,8	-CHOH-	4,58
13	144,8	=C<	-----	5	76,5	-CHOH-	3,91 <i>m</i>
14	42,1	>C<	-----	6	61,6	-CH <sub>2</sub> OH	4,36 4,46
15	28,3	-CH <sub>2</sub> -	1,18 2,14	<b>Ara-(1<math>\rightarrow</math>3)-GlcA</b>			
16	23,7	-CH <sub>2</sub> -	1,96 2,13	1	105,0	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,23 <i>d</i> (6,8)
17	46,7	>C<	-----	2	72,8	-CHOH-	4,44
18	42,0	>CH-	3,28 <i>dd</i>	3	74,6	-CHOH-	4,06
19	46,5	-CH <sub>2</sub> -	1,28 1,81	4	69,6	-CHOH-	4,22 <i>m</i>
20	30,9	>C<	-----	5	67,7	-CH <sub>2</sub> OH	3,73 <i>dd</i> (12,0) 4,28
21	34,2	-CH <sub>2</sub> -	1,21 1,45				
22	33,2	-CH <sub>2</sub> -	1,82 2,04				
23	28,0	-CH <sub>3</sub>	1,30 <i>s</i>				
24	16,7	-CH <sub>3</sub>	1,10 <i>s</i>				
25	15,4	-CH <sub>3</sub>	0,78 <i>s</i>				
26	17,4	-CH <sub>3</sub>	0,97 <i>s</i>				
27	26,2	-CH <sub>3</sub>	1,30 <i>s</i>				
28	180,2	-COOH	-----				
29	33,2	-CH <sub>3</sub>	0,96 <i>s</i>				
30	23,7	-CH <sub>3</sub>	1,01 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete

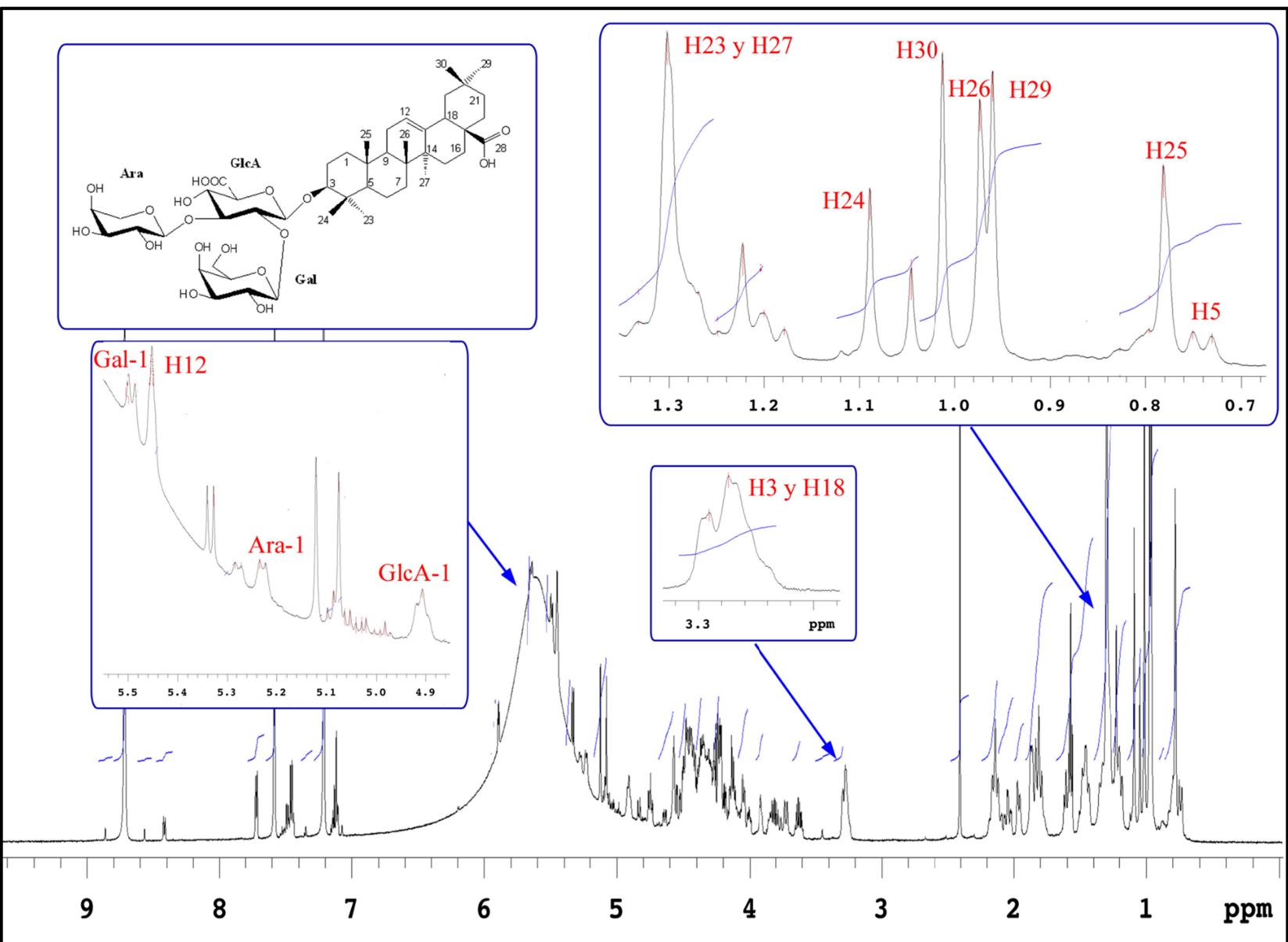


Figura 125. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HmE-P3.





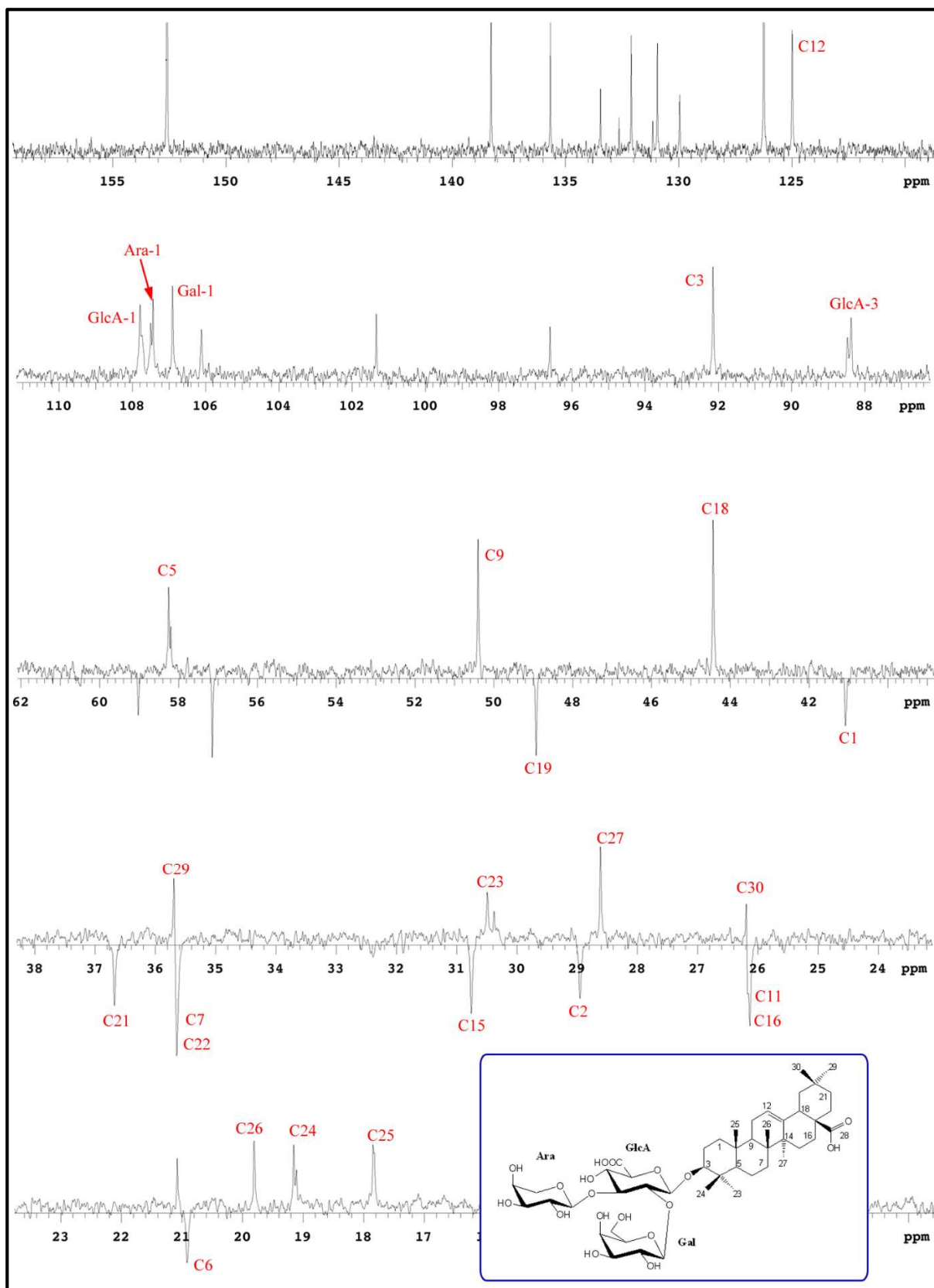


Figura 127. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P3.

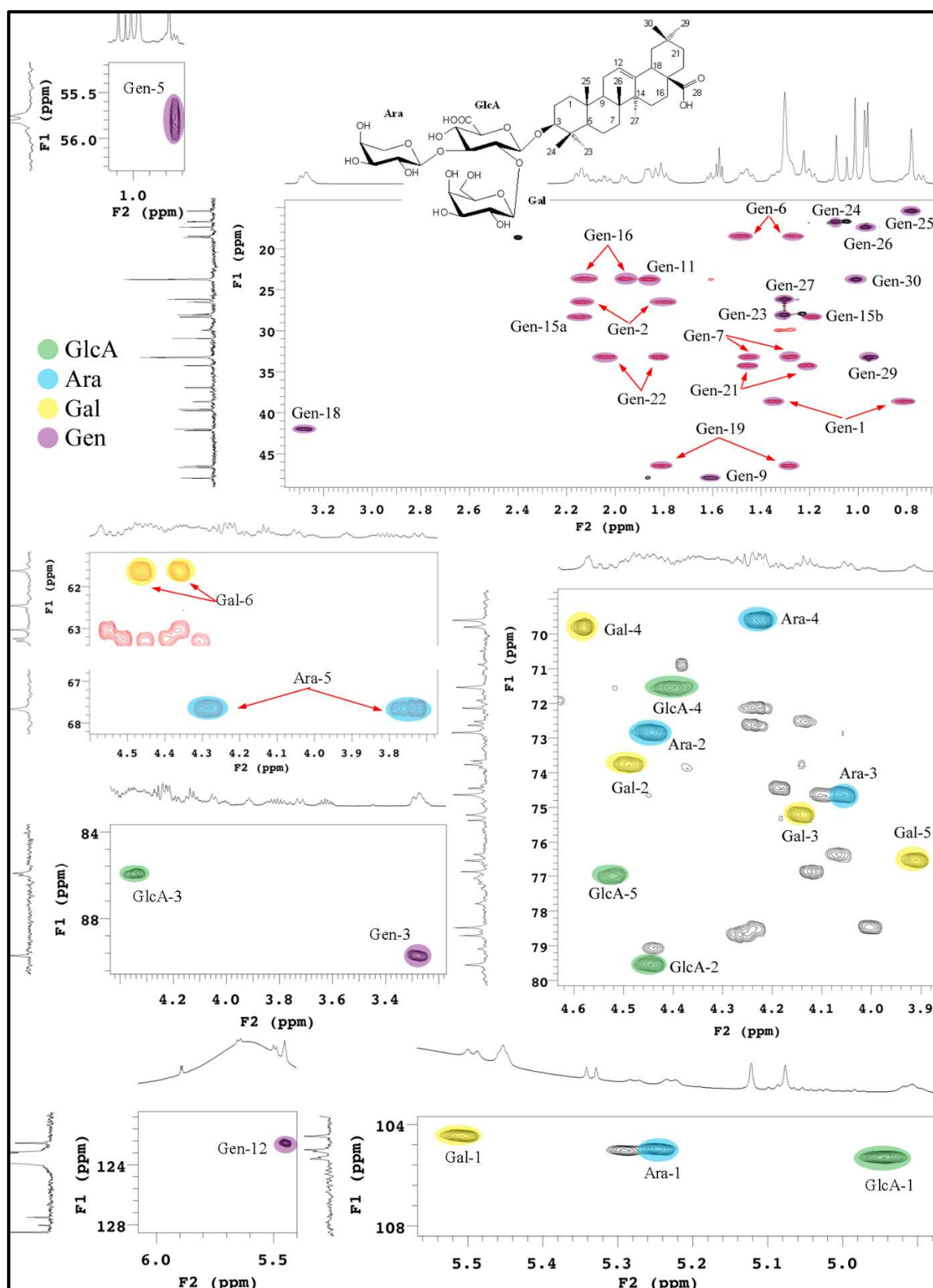


Figura 128. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P3.



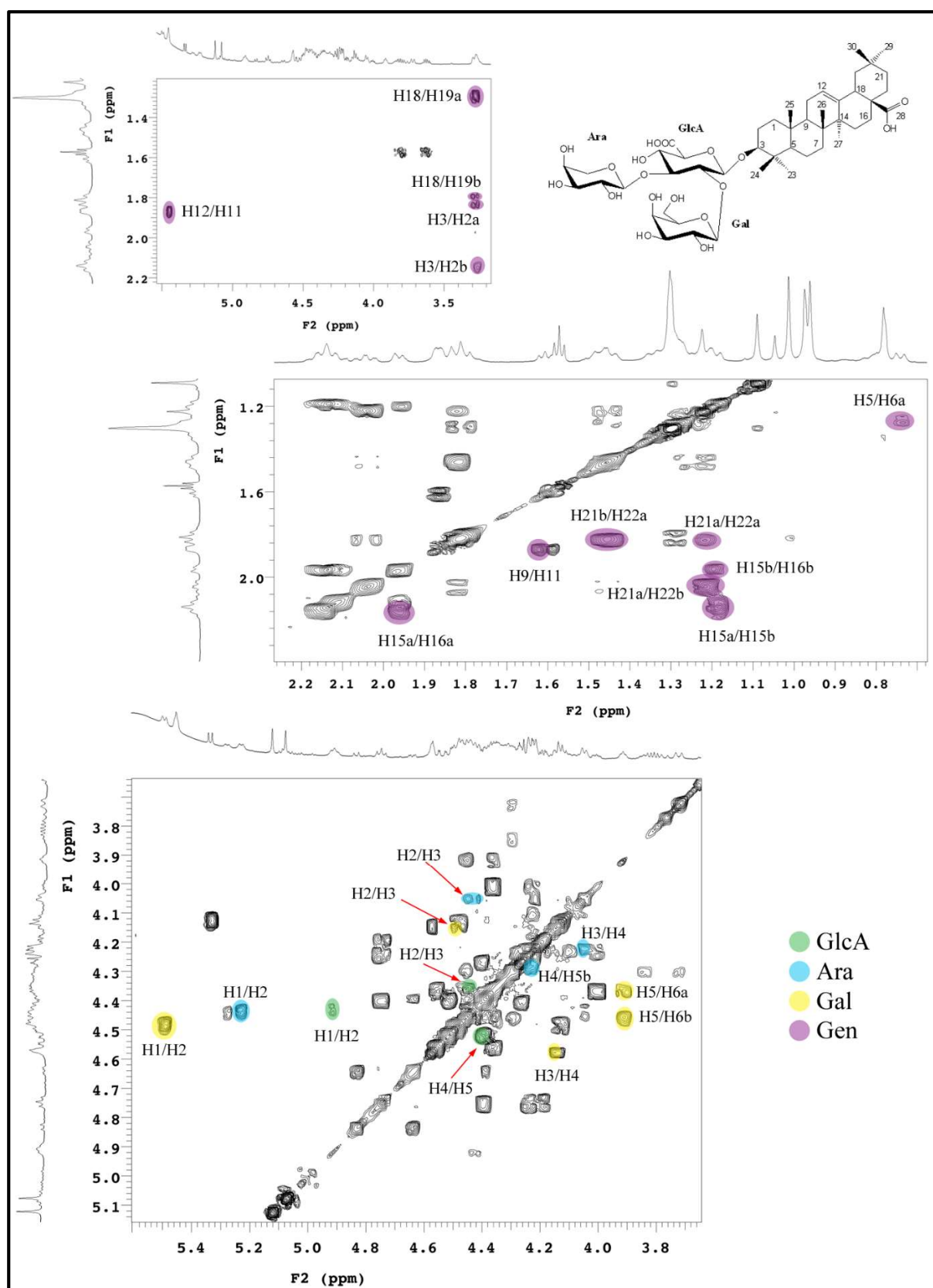


Figura 130. Espectro de COSY del compuesto HmE-P3.







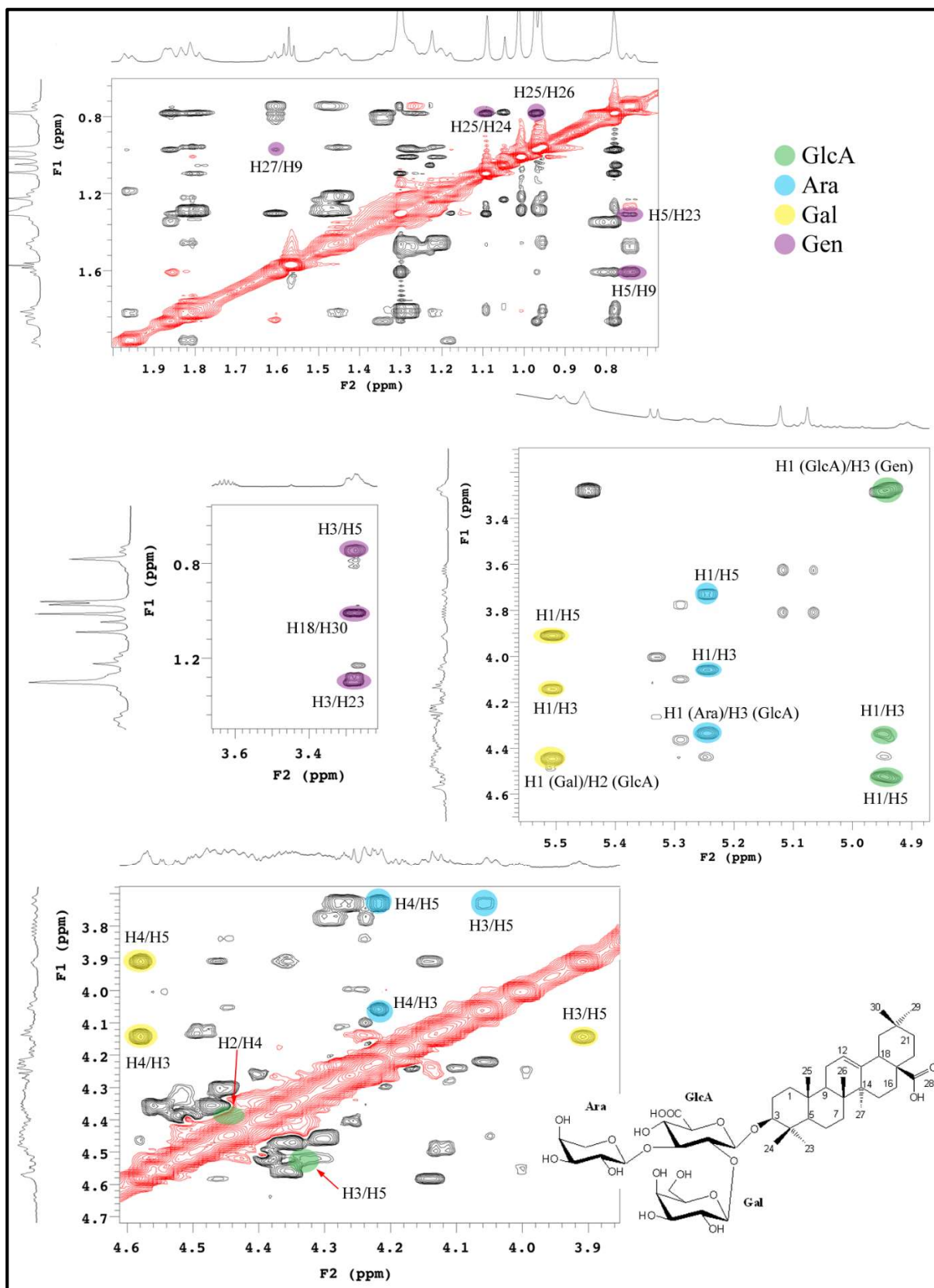


Figura 132. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P3.

### III.E. Compuesto HmE-P4: Hemlósido Ma1.

Del compuesto **HmE-P4** se aislaron 2,2 mg, este compuesto se encontró en la fracción Fz5 del extracto de *H. multifida* (esquema 5). Los espectro de masa del compuesto muestran un ion molecular  $[M]^-$  a 927,1 m/z en modo negativo y un ion molecular  $[M+Na]^+$  a 949,7 m/z en modo positivo, esto equivale a un compuesto con formula molecular  $C_{47}H_{74}O_{18}$  (calc. 926,48752).

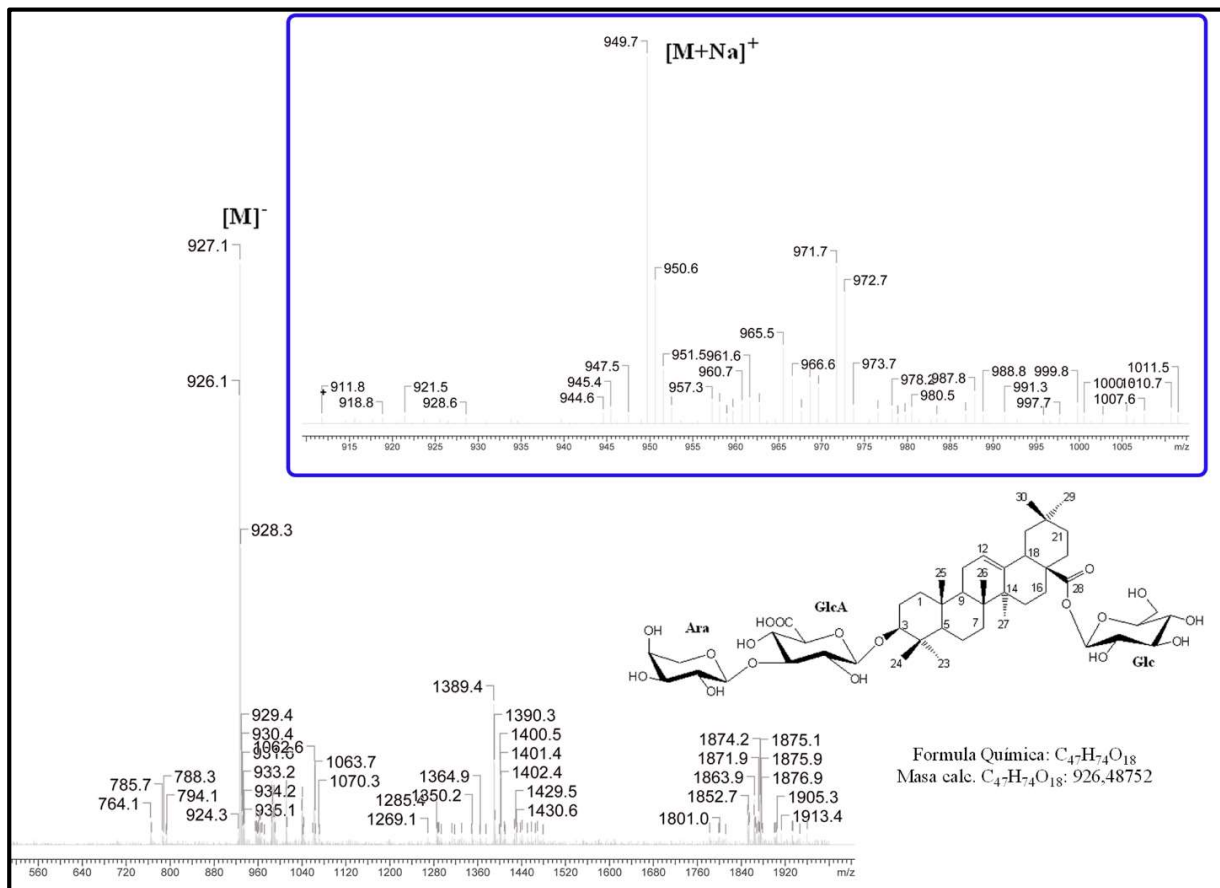


Figura 133. Espectros ESI-MS < 0 del compuesto **HmE-P4**.

Los espectros de RMN- $^{13}C$  (figura 136) y RMN-DEPT (figura 137) muestran que al igual que **HmE-P3**, el compuesto **HmE-P4** posee una estructura de 47 carbonos, probablemente un triterpeno con tres unidades de monosacáridos; esto se infiere del tipo de carbonos observados: 2 carbonos de grupos carboxílicos, 2 carbonos con configuración  $sp^2$  (uno metínico y uno cuaternario) característicos de un doble enlace, 17 grupos oxigenados (2 metilenos y 15 metinos), 7 grupos metilos, 10 grupos metilos, 3 grupos metinos y 6 carbonos cuaternarios.

#### Identificación de la genina:

Al revisar los desplazamientos químicos de carbonos e hidrógenos de este compuesto en los espectros de RMN-1D y las correlaciones presentadas en el HSQC (figura 138), se observa

que los valores correspondientes a la zona de la genina son superponibles a los ya reportados para los otros compuestos aislados de *H. multifida* (**HmE-P1**, **HmE-P2** y **HmE-P3**), por lo que puede considerarse que en este caso, el esqueleto triterpénico de esta saponina es el **ácido oleanólico**. Esto se ve confirmado mediante el análisis de los espectros de RMN-2D para este compuesto.

La única diferencia observable con respecto a los compuestos ya descritos, es que en este caso el carbono C-28 tiene un desplazamiento a  $\delta_C$  176,5, es decir, a campo más alto, lo que indica que el grupo carboxilo en C-28 debe estar esterificado, probablemente con un monosacárido.

### Identificación de los glicósidos:

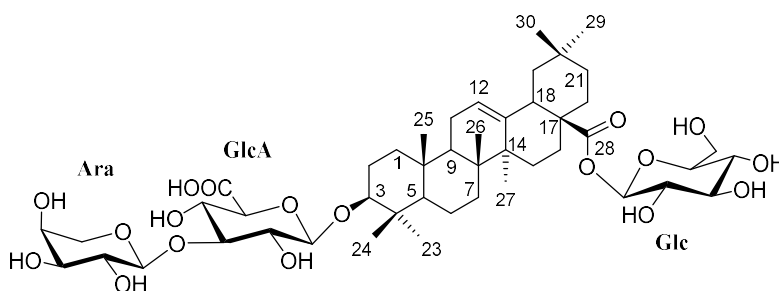
Para el compuesto **HmE-P4** pueden observarse en el espectro HSQC (figura 138) la correlación de los tres carbonos anoméricos a  $\delta_C$  95,8, 105,8 y 106,7 con los hidrógenos anoméricos a  $\delta_H$  6,30 (doblete,  $J = 8,0$  Hz), 5,33 (doblete,  $J = 6,8$  Hz) y 4,98 (doblete,  $J = 7,6$  Hz) respectivamente. Con los espectros de RMN-2D, los tres azúcares fueron identificados como **ácido  $\beta$ -D-glucorónico** (GlcA),  **$\beta$ -D-glucosa** (Glc) y  **$\alpha$ -L-arabinopiranososa** (Ara) (Agrawal, 1992).

La correlación en HMBC (figura 139) entre el protón anomérico de la unidad de Glc a  $\delta_H$  6,30 con el carbono a  $\delta_C$  176,5 (Gen-C28) demuestra que el grupo carboxilo de la genina ubicado en la posición 28 se encuentra esterificado por una glucosa. En el caso de la secuencia glicosídica ubicada en el C-3 del esqueleto triterpénico, la misma fue identificada como [Ara(1→3)]-GlcA

	NOESY ( $\delta_H/\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_C/\delta_H$ )
GlcA:	4,98 (GlcA-H1) / 3,36 (Gen-H3)	106,7 (GlcA-C1) / 3,36 (Gen-H3) 89,3 (Gen-C3) / 4,98 (GlcA-H1)
Ara:	5,33 (Ara-H1) / 4,36 (GlcA-H3)	105,8 (Ara-C1) / 4,36 (GlcA-H3) 85,8 (GlcA-C3) / 5,33 (Ara-H1)

### Conclusión:

El análisis de los espectros de RMN permitieron caracterizar al compuesto **HmE-P4** como **3-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1→3)]- $\beta$ -D-glucoronopiranosiloleanoato de  $\beta$ -D-glucopiranosilo** (figura 134) o Hemslosido Ma1, aislado por primera vez en los extractos etanólicos de *Hemsleya macrosperma* y *H. chinensis* (Curcubitaceae) (Nie *et al.*, 1984). Es la primera vez que este compuesto es reportado dentro del género *Hydrocotyle* y la familia Araliaceae.



**Figura 134.** Estructura del compuesto **HmE-P4**: 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosiloleanoato de  $\beta$ -*D*-gluco piranosilo (Hemlósido Ma1).

**Tabla 20.** Desplazamientos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) del compuesto **HmE-P4** en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Aglicón				Azúcares y ácidos orgánicos			
Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]	Pos.	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	38,6	-CH <sub>2</sub> -	0,84 1,38	<b>28-O-Glc</b>			
2	26,5	-CH <sub>2</sub> -	1,82 2,16	1	95,8	-CH(O-) <sub>2</sub>	6,30 <i>d</i> (8,0)
3	89,3	-CHOH-	3,36 <i>dd</i> (11,8; 4,0)	2	74,1	-CHOH-	4,19
4	39,5	>C<	-----	3	78,8	-CHOH-	4,27
5	55,7	>CH-	0,79 <i>br d</i> (12,0)	4	71,2	-CHOH-	4,32
6	18,5	-CH <sub>2</sub> -	1,29 1,48	5	79,3	-CHOH-	4,02 <i>m</i>
7	33,1	-CH <sub>2</sub> -	1,34 1,48	6	62,3	-CH <sub>2</sub> OH	4,38 4,44 <i>dd</i> (11,9; 2,4)
8	39,9	>C<	-----	<b>3-O-GlcA</b>			
9	48,0	>CH-	1,62 <i>dd</i> (10,4; 7,2)	1	106,7	-CH(O-) <sub>2</sub>	4,98 <i>d</i> (7,6)
10	36,9	>C<	-----	2	74,7	-CHOR-	4,12
11	23,8	-CH <sub>2</sub> -	1,86 - 1,91	3	85,8	-CHOH-	4,36
12		=CH-	5,42 <i>br s</i>	4	71,4	-CHOR-	4,51
13	122,9	=C<	-----	5	77,4	-CHOH-	4,63 <i>d</i> (9,6)
14	144,1	>C<	-----	6	172,3	-COOH	-----
15	42,2	-CH <sub>2</sub> -	1,19	<b>Ara(1<math>\rightarrow</math>3)-GlcA</b>			
	28,3		2,33	1	105,8	-CH(O-) <sub>2</sub>	5,33 <i>d</i> (6,8)
16		-CH <sub>2</sub> -	1,97	2	72,8	-CHOH-	4,52
	23,4		2,10	3	74,4	-CHOH-	4,18
17		>C<	-----	4	69,2	-CHOH-	4,30 <i>m</i>
18	47,0	>CH-	3,18 <i>dd</i> (13,7; 4,0)	5	67,1	-CH <sub>2</sub> OH	3,80 <i>dd</i> (12,4; 1,8) 4,37
19	41,8	-CH <sub>2</sub> -	1,25 1,76				
20		>C<	-----				
21	30,8	-CH <sub>2</sub> -	1,10 1,36				
22		-CH <sub>2</sub> -	1,75 1,84				
23		-CH <sub>3</sub>	1,29 <i>s</i>				
24	28,1	-CH <sub>3</sub>	0,98 <i>s</i>				
25	16,9	-CH <sub>3</sub>	0,82 <i>s</i>				
26	15,5	-CH <sub>3</sub>	1,08 <i>s</i>				
27	17,5	-CH <sub>3</sub>	1,28 <i>s</i>				
28	26,1	-COOH	-----				
29	176,5	-CH <sub>3</sub>	0,91 <i>s</i>				
30	33,1	-CH <sub>3</sub>	0,89 <i>s</i>				

\**d* = doblete, *dd* = doblete de dobletes, *br d* = doblete ancho, *s* = singulete, *br s* = singulete ancho, *m* = multiplete

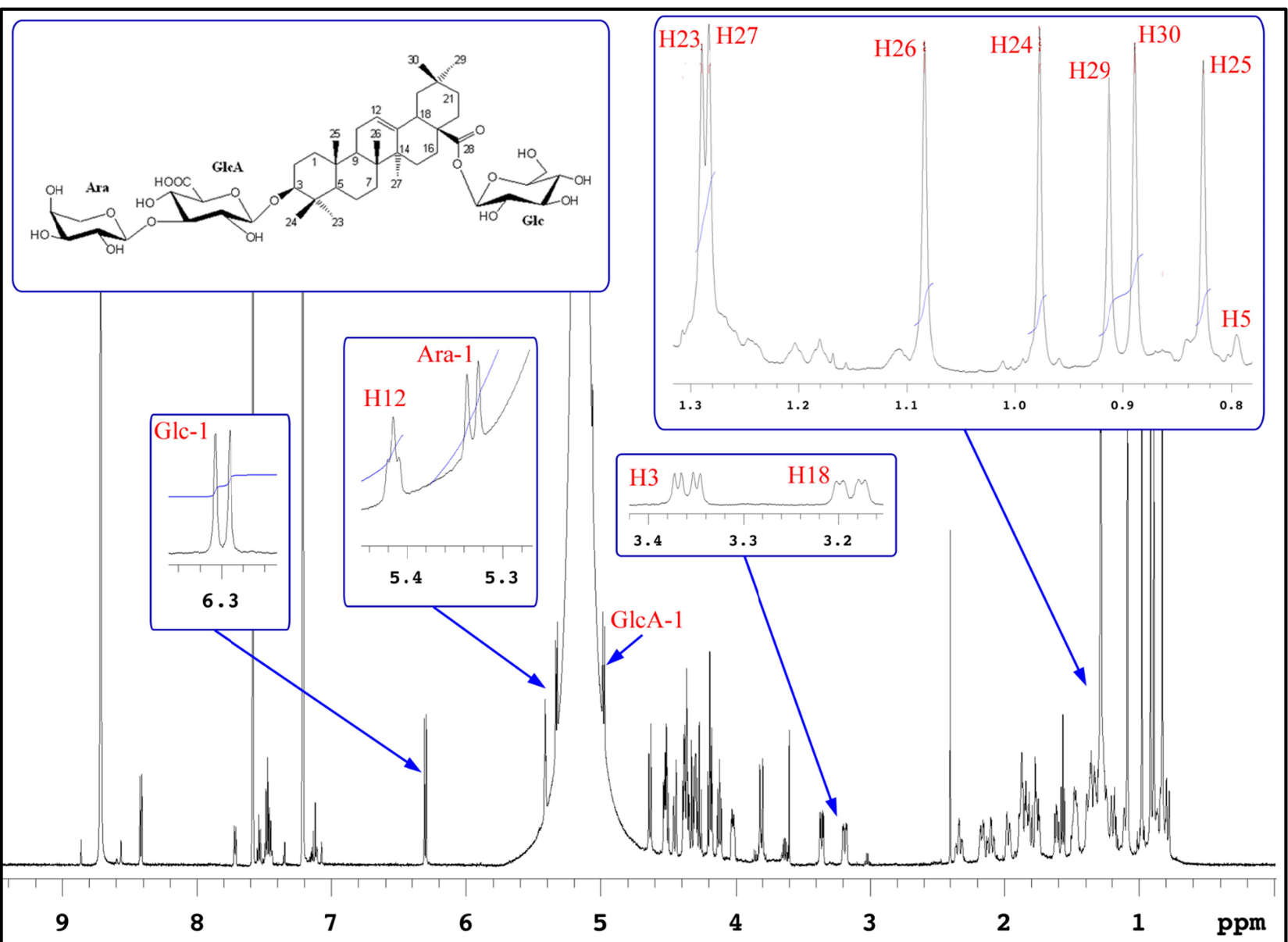


Figura 135. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HmE-P4.



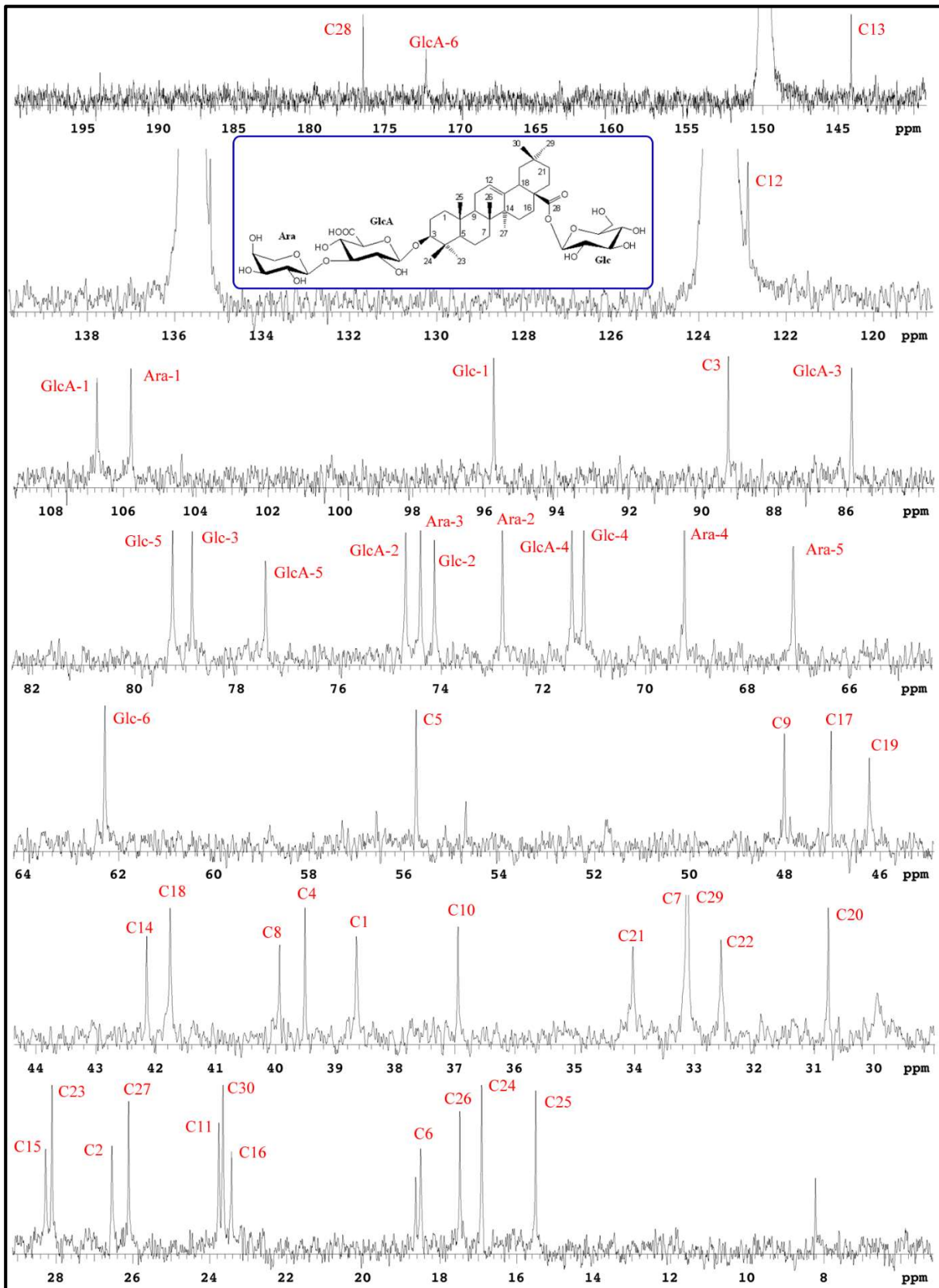


Figura 136. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto HmE-P4.

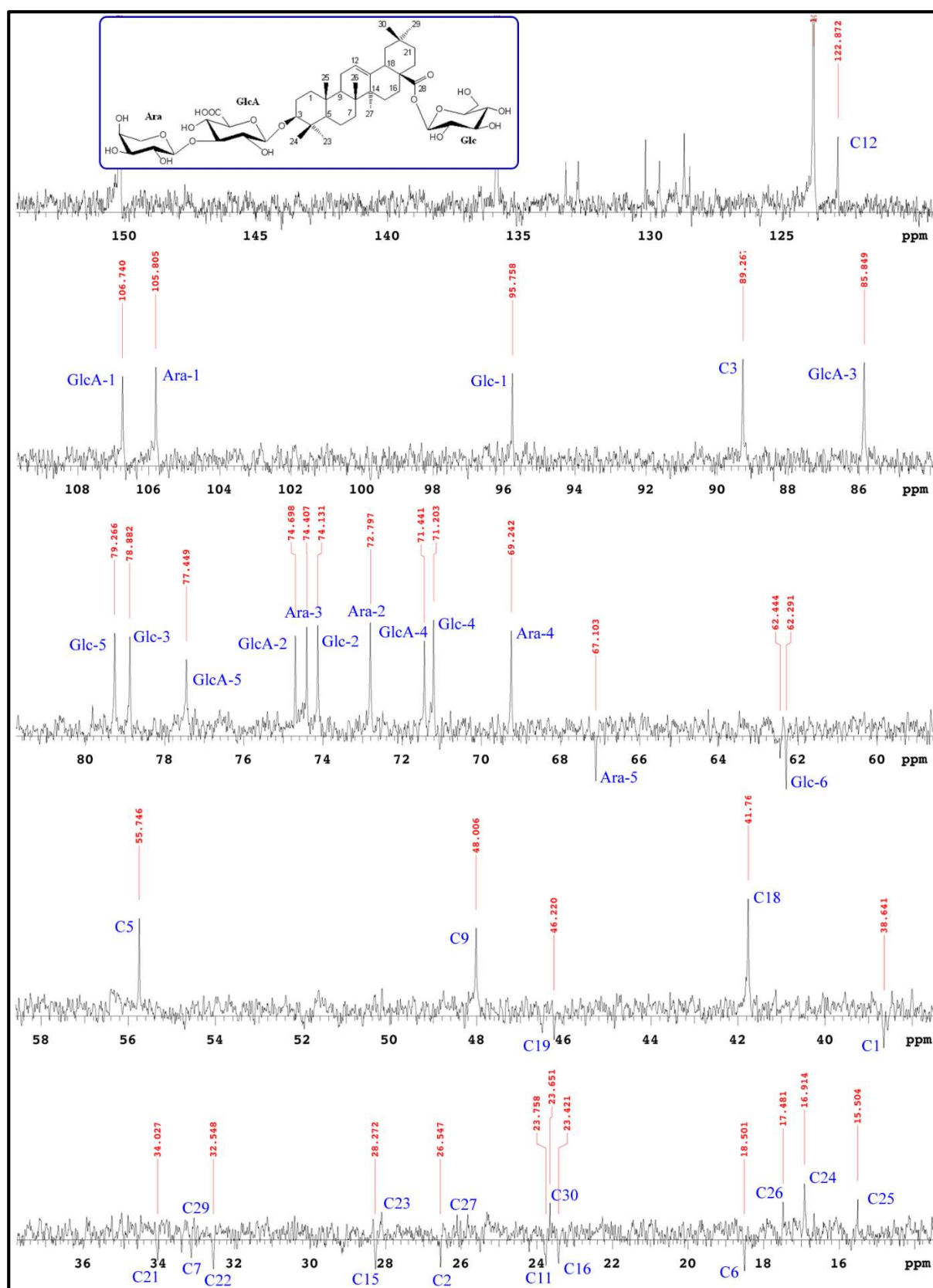


Figura 137. Espectro RMN-DEPT del compuesto HmE-P4.

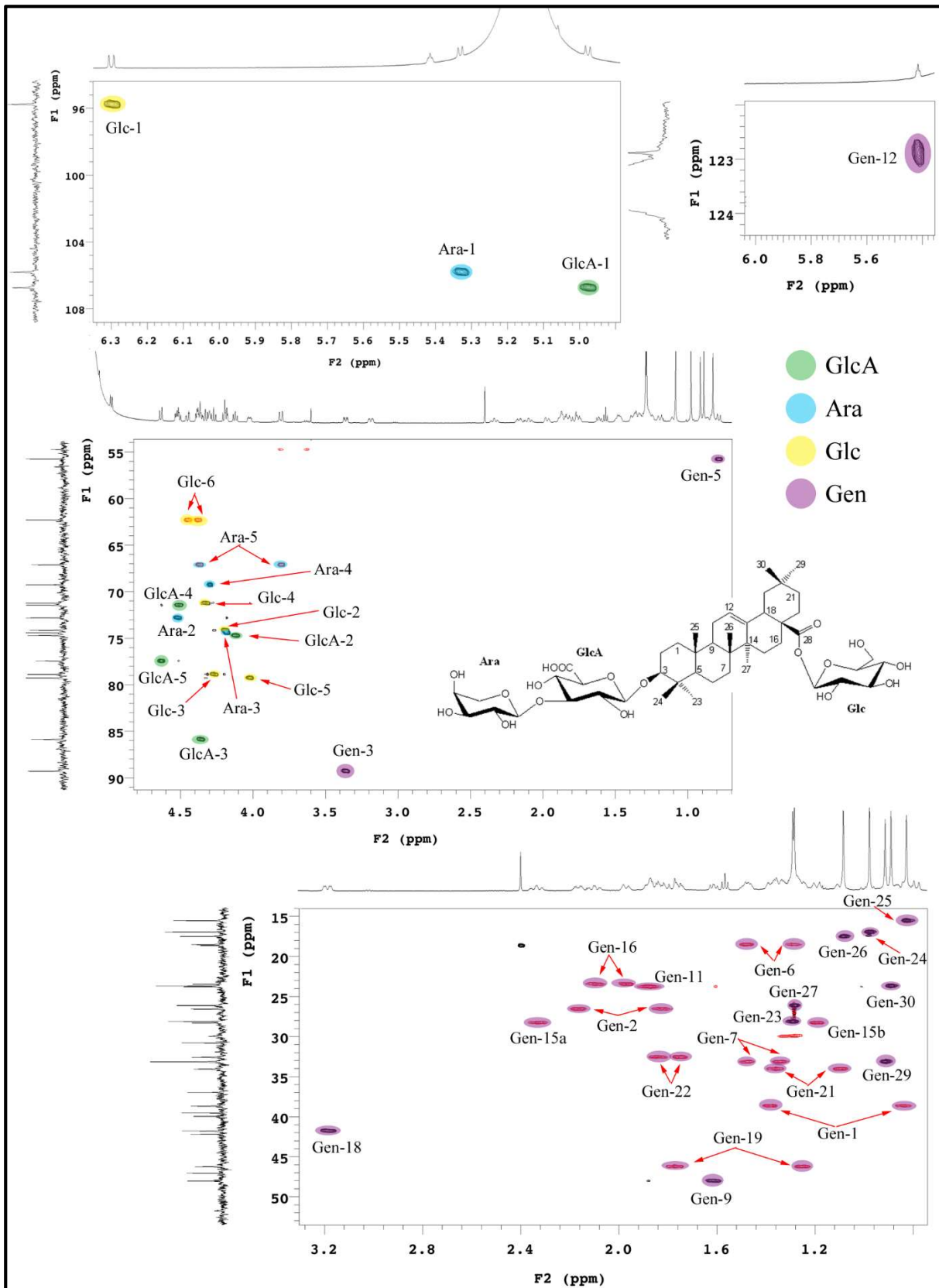


Figura 138. Espectro de HSQC del compuesto HmE-P4.

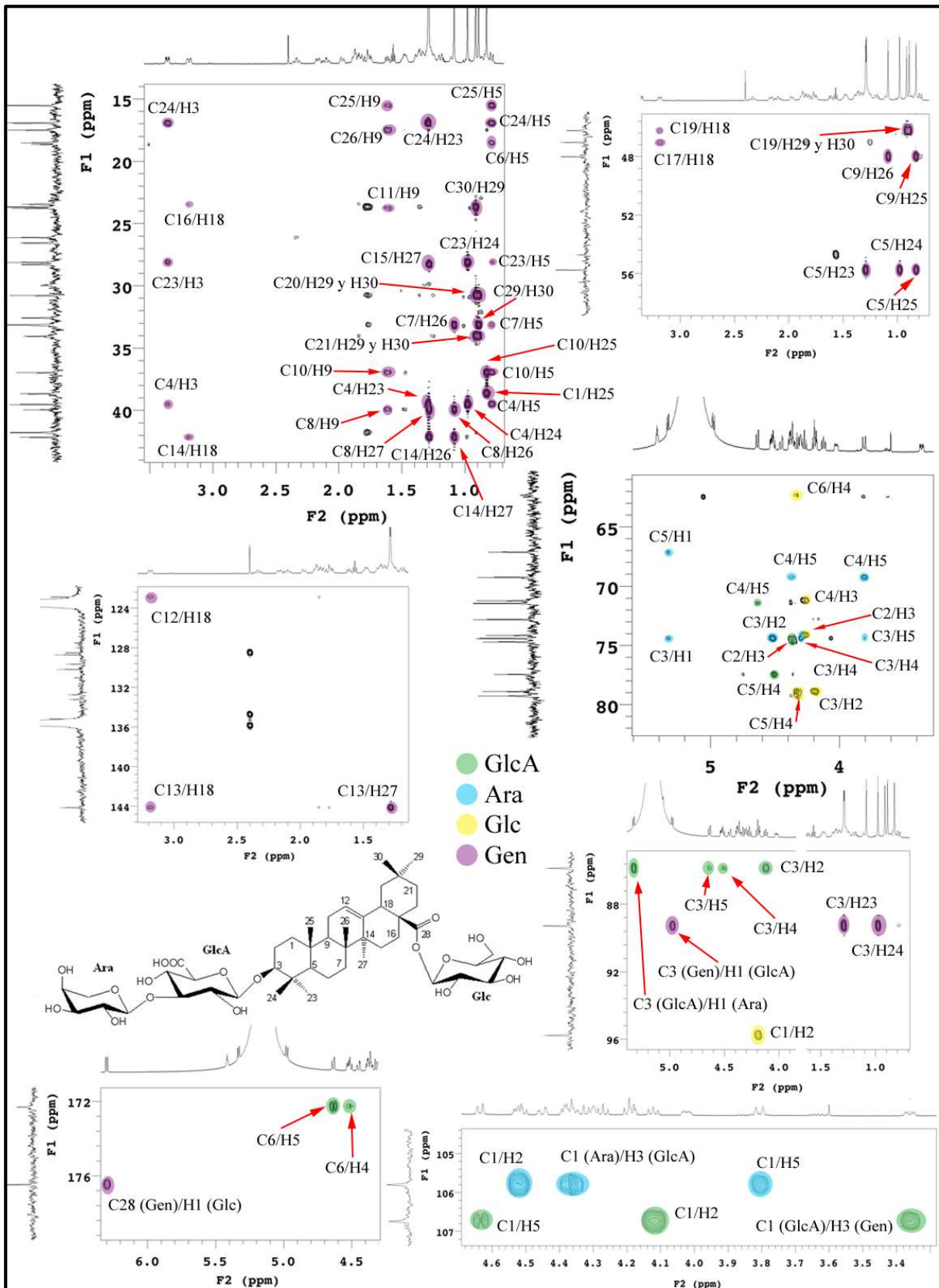


Figura 139. Espectro de HMBC del compuesto HmE-P4.

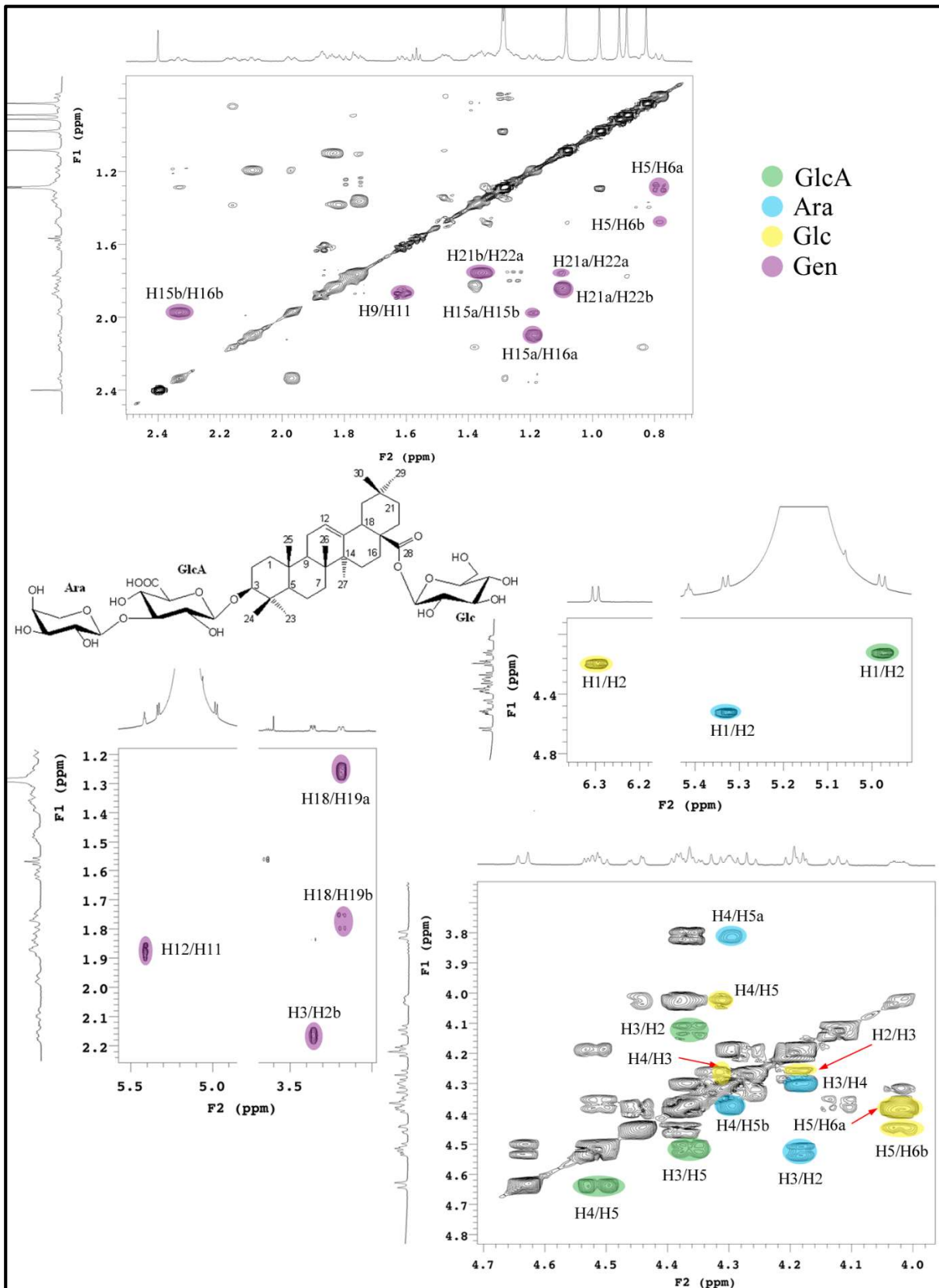


Figura 140. Espectro de COSY del compuesto HmE-P4.



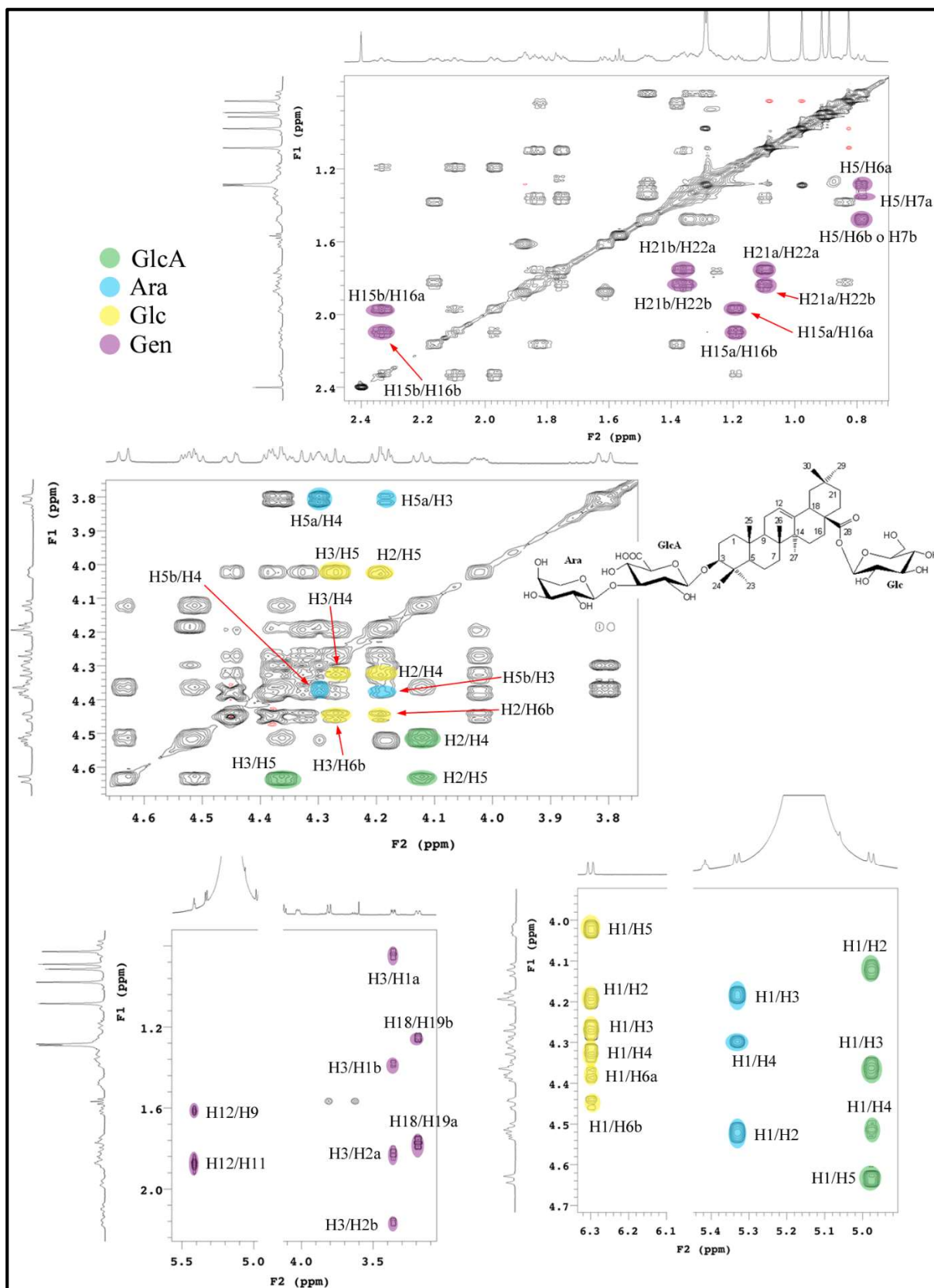


Figura 141. Espectro de TOCSY del compuesto HmE-P4.



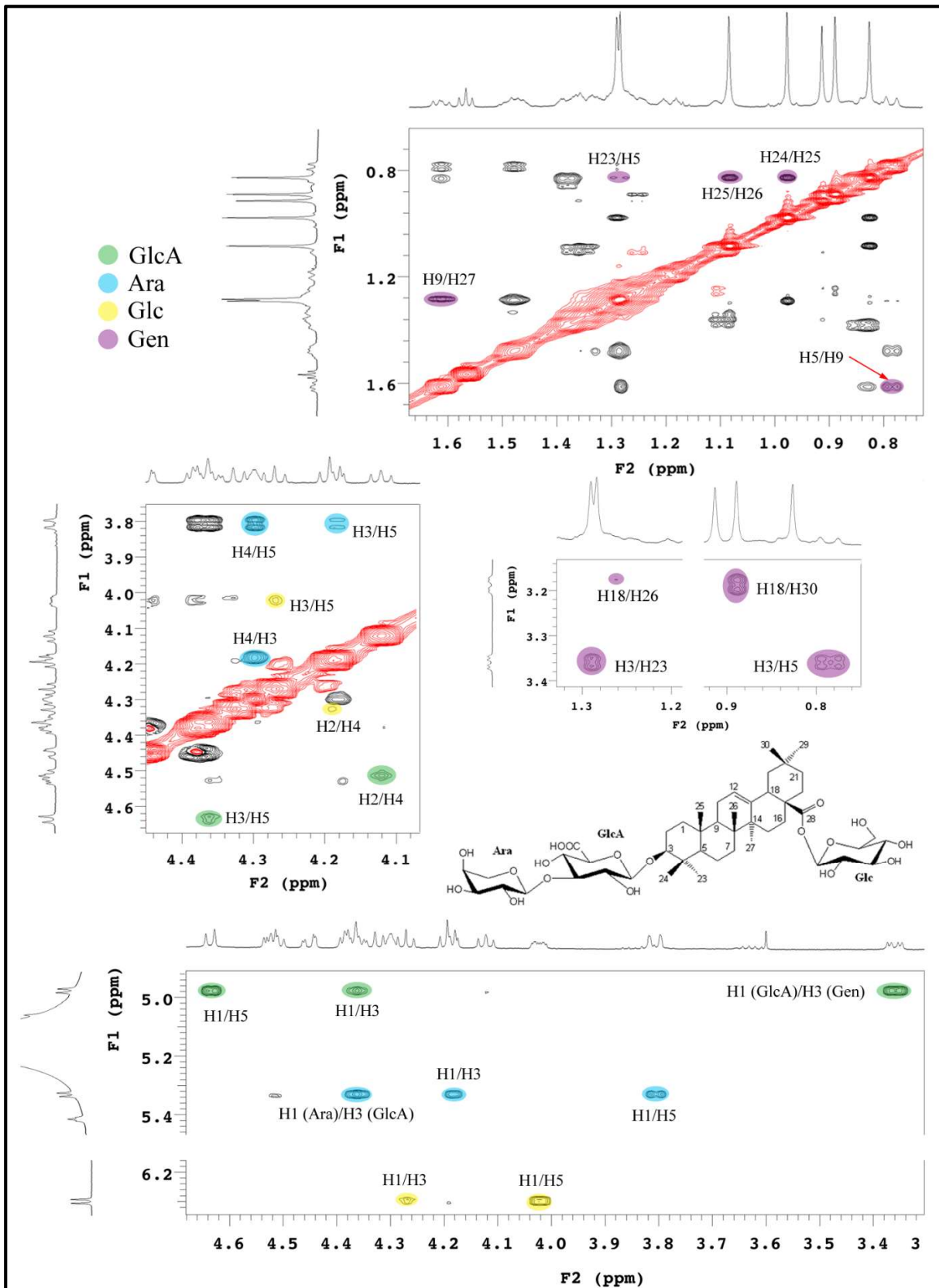


Figura 142. Espectro de ROESY del compuesto HmE-P4.

*CAPÍTULO III.*  
*BURSERACEAE*

*Bursera inversa*

## I. INTRODUCCIÓN

### I.A. Usos etnobotánicos del género *Bursera*

Diversas especies de *Bursera* han sido explotadas comercialmente, principalmente debido al alto porcentaje aceites esenciales aromáticos en la madera y las frutas, y también en menor medida por sus resinas, las cuales son de valor para la manufactura de barnices (Bullock, 1936). Son diversos los usos que se les ha dado a las especies de *Bursera*, entre los que destacan, medicinales, artesanales, cosméticos, etc. (Becerra y Noge, 2010; Case *et al.*, 2003; Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992). Hasta que llegaron los chicles de resina sintética, en algunos pueblos de México, el copal se usaba como goma de mascar.

Las especies de *Bursera* han sido empleadas en la medicina popular para el tratamiento: de enfermedades uterinas, dolor de cabeza, expectorante para bronquitis, diurético, diarrea, fiebre, reumatismo, erupciones, úlceras, asma, dolores de muela, molestias urinarias y problemas circulatorios, entre otros (De la Cerda-Lemus, 2011; Mitchell y Ahmad, 2006). En la tabla 21 se muestran los diferentes usos que se les han dado a las especies de este género en la medicina tradicional.

**Tabla 21.** Aplicaciones de las especies de *Bursera* en la Medicina Tradicional.

Especie	Usos / aplicaciones	Forma de utilización	Referencia
<i>B. aloexylon</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	Picaduras de escorpión	Gotas del aceite esencial	(Becerra, 1993)
<i>B. arida</i>	Heridas, erupciones de piel, manchas	El látex obtenido de la planta es aplicado directamente en el área afectada	(Canales <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. bipinnata</i>	Problemas de hernias	Se utiliza la resina para la preparación de emplastos	(De la Cerda-Lemus, 2011)
<i>B. fagaroides</i>	Para el tratamiento de golpes y tumores	Se emplea la corteza y/o exudados de la planta	(Mojica <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. filicifolia</i>	Neumonía, heridas, tos, úlceras estomacales, úlceras en la piel	---	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1998b)
<i>B. graveolens</i>	Analgésico, diaforético, para aliviar el reumatismo	Se emplea la resina como analgésico, la corteza hervida como diaforético y el extracto alcohólico para aliviar el reumatismo	(Carmona <i>et al.</i> , 2009)
	Insecticida, para curar dermatitis	<u>Insecticida:</u> quema de las hojas y/o corteza. <u>Dermatitis:</u> Infusiones acuosas de la corteza y/o las hojas	(Tene <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. hindsiana</i>	Para curar la disnea	Té preparado a partir de virutas de la madera	(Felger y Moser, 1973)
<i>B. jorullensis</i> (sin. <i>B. copallifera</i> )	Enfermedades uterinas	Pomada preparada a partir de la resina	(Becerra, 1993)
<i>B. laxiflora</i>	Dolores de garganta, resfriados y picaduras de animales	Té preparado con la corteza	(Felger y Moser, 1973)

**Tabla 21.** ...continuación...

Especie	Usos / aplicaciones	Forma de utilización	Referencia
<i>B. microphylla</i>	Dolores de estómago, heridas, moretones, úlceras en la piel	---	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1998b)
	Enfermedades venéreas	Infusión de la corteza	(Becerra, 1993)
	Tratamiento de heridas y dolores de cabeza	Decocción preparada con las hojas y/o la corteza	(Felger y Moser, 1973)
<i>B. morelensis</i>	Enfermedades venéreas	Decocción de la corteza	(Becerra, 1993)
	Mitigar dolores, tratamiento de moretones y heridas superficiales	Infusiones de corteza y resina	(Carrera-Martínez <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. simaruba</i>	Aliviar la fiebre y tratar la varicela	Se usa el extracto acuoso de la corteza como té, aplicaciones rectales y lavados	(Bork <i>et al.</i> , 1996)
	Antiinflamatorio y para la artritis	Se preparan pomadas con las hojas	(Abad <i>et al.</i> , 1996)
	Caries, enfermedades de las encías, antiinflamatorio	Infusiones o decocciones de los tallos y/o corteza	(Rosas-Piñón <i>et al.</i> , 2012)
	Hipoglicémico	---	(Román-Ramos <i>et al.</i> , 1992)
	Infecciones del tracto urinario	Té preparado con la corteza	(Noguera <i>et al.</i> , 2004)
	Infecciones internas, fiebres, enfermedades del tracto urinario, golpes de calor, resfriados	La decocción es tomada como un té	(Camporese <i>et al.</i> , 2003)
	Para aliviar heridas, urticarias y picaduras de insectos	---	(Camporese <i>et al.</i> , 2003)
	Para el tratamiento de resfriados, diarrea, heridas, hipertensión y como diurético	---	(Mitchell y Ahmad, 2006)
	Problemas en la piel, analgésico, antipirético, infecciones urinarias, tratamiento de heridas	Decocciones y emplastos preparados con las hojas	(Álvarez <i>et al.</i> , 2015)
	Purgante	Infusión preparada con las hojas	(Becerra, 1993)
Tratamiento de desórdenes gastrointestinales: diarrea, cólicos, dolor de estómago, gastritis y pérdida de apetito	Se emplean la corteza, frutos hojas y/o resinas	(Caceres <i>et al.</i> , 1990)	

**I.B. Fitoquímica reportada para especies de *Bursera***

Existe un gran número de estudios sobre la composición química de las especies pertenecientes a este género, lo cuales se centran en su mayoría en la composición de los aceites esenciales y los componentes volátiles de las diversas estructuras de estas plantas (hojas, frutos, ramas, corteza). A pesar de ser un género que cuenta con unas 120 especies botánicamente aceptadas (The Plant List, 2013), solo se ha estudiado la composición química de unas 40 especies de este género, siendo *B. graveolens*, *B. simaruba*, *B. fagaroides*, *B. microphylla* y *B. linanoe* las especies más estudiadas fitoquímicamente. Esto nos demuestra que son muchas las especies de *Bursera* de las que aún se desconoce su composición no solo en cuanto a los aceites esenciales sino también a otros metabolitos que pueden estar presente y que han sido reportados en algunas especies del género como triterpenos, flavonoides, cumarinas, etc.

**I.B.1. Aceites esenciales y componentes volátiles**

Para el género *Bursera* existe una gran variedad de reportes sobre la composición química de los aceites esenciales y los componentes volátiles de las hojas, frutos, tallos y corteza. Los metabolitos hallados en los aceites y las fracciones volátiles de las especies de *Bursera* suelen ser monoterpenos, sesquiterpenos y en algunos casos hidrocarburos de cadena larga.

Una de las especies más estudiadas es *B. graveolens*, para la cual se ha estudiado el aceite esencial de las hojas (Carmona *et al.*, 2009), del duramen (Crowley, 1964), de las ramas (Santana *et al.*, 2009) y de los tallos (Young *et al.*, 2007). Además de los aceites esenciales también se han estudiado las fracciones volátiles de hojas, ramas, corteza, frutos inmaduros y resina de *B. graveolens* colectada en Colombia (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2013) y de la madera de especímenes encontrado en Perú (Yukawa *et al.*, 2006, 2005, 2004a, 2004b; Yukawa y Iwabuchi, 2003). Estos estudios demuestran la presencia en *B. graveolens* de los monoterpenos: limoneno [**Bm1**],  $\alpha$ -terpineol [**Bm2**], (*E*)- $\beta$ -ocimeno [**Bm3**], mentofuranona [**Bm4**], 3-hidroximentofuranona [**Bm5**], (-)-isomentalactona [**Bm6**], 2,3-didehidromentalactona [**Bm7**], 1-acetil-4-isopropenil-1-ciclopenteno [**Bm8**] y 5-isopropenil-2-metil-1-ciclopenten-1-carbaldehído [**Bm9**]; así como los sesquiterpenos:  $\beta$ -elemeno [**Bs1**],  $\alpha$ -cadinol [**Bs2**], germacreno D [**Bs3**], *trans*- $\beta$ -cariofileno [**Bs4**], viridiflorol [**Bs5**], (-)-dihidro- $\alpha$ -agarofurano [**Bs5**], (-)-5,11-epoxi-4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,10 $\alpha$ -eudesm-1-eno [**Bs7**], (-)-4 $\alpha$ -hidroxidihidroagarofurano [**Bs8**], (-)-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -oxidoagarofurano [**Bs9**], (-)-10-*epi*- $\gamma$ -eudesmol [**Bs10**], (-)-juneol [**Bs11**], dihidrojuneol [**Bs12**], 6 $\beta$ -hidroxi-4(15)-eudesmen-1-ona [**Bs13**], 6 $\beta$ -hidroxinoreudesman-4-



ona [Bs14], 6,10-epoxi-7(14)-isodaucano [Bs15] y 10-hidroxi-6,10-epoxi-7(14)-isodaucano [Bs16].

En la especie *B. microphylla* se han analizado el aceite esencial de las hojas (Bradley y Haagen-Smit, 1951) y de la resina (Mooney y Emboden Jr., 1968; Tucker *et al.*, 2009), donde se han hallado los monoterpenos  $\alpha$ -pineno [Bm10],  $\beta$ -pineno [Bm11], 1,8-cineol [Bm12],  $\beta$ -mirceno [Bm13],  $\alpha$ -felandreno [Bm14],  $\beta$ -felandreno [Bm15], felandral [Bm16] y limoneno [Bm1], así como el sesquiterpeno *trans*- $\beta$ -cariofileno [Bs4].

La composición química del aceite esencial de las hojas (Junor *et al.*, 2008b; Sylvestre *et al.*, 2007), la corteza (Junor *et al.*, 2008b) y de los frutos (Junor *et al.*, 2008b; Rosales y Ciccio, 2002) de *B. simaruba* han reportado la presencia de los monoterpenos  $\alpha$ -terpineno [Bm17],  $\gamma$ -terpineno [Bm18], 4-terpineol [Bm19], *p*-cimeno [Bm20], sabineno [Bm21],  $\alpha$ -pineno [Bm10],  $\beta$ -pineno [Bm11], mirceno [Bm13] y limoneno [Bm1]; junto con los sesquiterpenos *trans*- $\beta$ -cariofileno [Bs4], viridoflorol [Bs5], germacreno D [Bs3],  $\alpha$ -humuleno [Bs17],  $\beta$ -selineno [Bs18] y óxido de cariofileno [Bs19].

Zuñiga y colaboradores (2005) analizaron las fracciones volátiles (obtenidas por destilación con arrastre con vapor y posterior fraccionamiento con éter etílico) de la madera de ocho especies de *Bursera* (*B. grandifolia*, *B. lancifolia*, *B. morelensis*, *B. aptera*, *B. glabrifolia*, *B. velutina*, *B. aloexylon* (sinónimo de *B. linanoe*) y *B. submoniliformis*) colectadas en los Estados de Puebla y Guerrero (México). Entre los compuestos mayoritarios identificados se encuentran los monoterpenos:  $\alpha$ -tujeno [Bm22], linalool [Bm23], limoneno [Bm1],  $\alpha$ -terpineol [Bm2] y 4-terpineol [Bm19]; los sesquiterpenos:  $\beta$ -eudesmol [Bs20] y espatulenol [Bs21]; así como los alcanos de cadena larga heptadecano y docosano (Zuñiga *et al.*, 2005).

Por su parte, en el estudio realizado por Noge y Becerra (2009) se analizaron los componentes volátiles de las hojas 5 especies de *Bursera* (*B. copallifera*, *B. excelsa*, *B. mirandae*, *B. ruticola* y *B. fagaroides*) extraídos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; encontrándose los monoterpenos  $\alpha$ -pineno [Bm10],  $\beta$ -pineno [Bm11],  $\alpha$ -felandreno [Bm14] y los sesquiterpenoides *trans*- $\beta$ -cariofileno [Bs4],  $\alpha$ -humuleno [Bs17], germacreno D [Bs3] y biciclogermacreno [Bs22] entre los metabolitos mayoritarios (Noge y Becerra, 2009).

El aceite esencial de las hojas de *B. linanoe* (Queiroga *et al.*, 2007) y el estudio de sus componentes volátiles (Noge *et al.*, 2010) indica la presencia de los monoterpenos linalool [Bm23], alcanfor [Bm24], acetato de linalool [Bm25] y el sesquiterpeno germacreno D [Bs3].

En el caso del *B. aromática*, el aceite esencial de hojas, corteza y frutos están compuesto predominantemente por el alcano nonano, los monoterpenos limoneno [**Bm1**] y  $\beta$ -pineno [**Bm11**] así como los sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno [**Bs23**],  $\delta$ -cadineno [**Bs24**], *trans*- $\beta$ -cariofileno [**Bs4**], viridoflorol [**Bs5**] (Junor *et al.*, 2010b).

En el aceite esencial de las hojas y corteza de *B. hollicki* (Jamaica) los monoterpenos representan los componentes mayoritarios con  $\alpha$ -pineno [**Bm10**],  $\beta$ -pineno [**Bm11**] y  $\alpha$ -terpineol [**Bm2**]; de los sesquiterpenos, los componentes predominantes son el *trans*- $\beta$ -cariofileno [**Bs4**] y  $\alpha$ -humuleno [**Bs17**] (Junor *et al.*, 2008a).

Para la especie encontrada en Jamaica de *B. lunanii*, los principales metabolitos de los aceites esenciales de las hojas, frutos y corteza son los monoterpenos  $\alpha$ -pineno [**Bm10**],  $\alpha$ -terpineol [**Bm2**], verbenona [**Bm26**], *cis*-pinanediol [**Bm27**], *trans*-verbenol [**Bm28**] y mirtenal [**Bm29**] y los sesquiterpenos *trans*- $\beta$ -cariofileno [**Bs4**] y óxido de cariofileno [**Bs19**] (Junor *et al.*, 2010a).

La fracción volátil (obtenida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) de las hojas de *B. velutina* (Noge *et al.*, 2011) y el aceite esencial de las partes aéreas de *B. tonkinensis* (Hoi *et al.*, 2004) poseen principalmente los monoterpenos  $\alpha$ -pineno [**Bm10**],  $\alpha$ -felandreno [**Bm14**],  $\beta$ -felandreno [**Bm15**]. Por su parte en el aceite esencial de la partes aéreas de *B. morelensis* se han encontrado estos mismos compuestos junto con el sesquiterpeno *trans*- $\beta$ -cariofileno [**Bs4**] (Carrera-Martínez *et al.*, 2014).

En el caso de la especie de *B. tomentosa* recogida en el Estado Lara (Venezuela) el aceite esencial de los frutos contiene *cis*-ocimeno [**Bm30**], germacreno D [**Bs3**] y *n*-nonano (Moreno *et al.*, 2010a); mientras que el aceite de la corteza posee *n*-nonano, *cis*-ocimeno [**Bm30**], espatulenol [**Bs21**], biciclogermacreno [**Bs22**], *epi*- $\alpha$ -cadinol [**Bs25**], globulol [**Bs26**] y  $\beta$ -selineno [**Bs18**] (Moreno *et al.*, 2010b).

La hojas de *B. chemapodicta* tienen un aceite esencial rico en compuestos no terpenoides, principalmente alcanos de cadena corta y derivados de alcanos, cuyo componente mayoritario es el *n*-heptano. (Evans y Becerra, 2006).

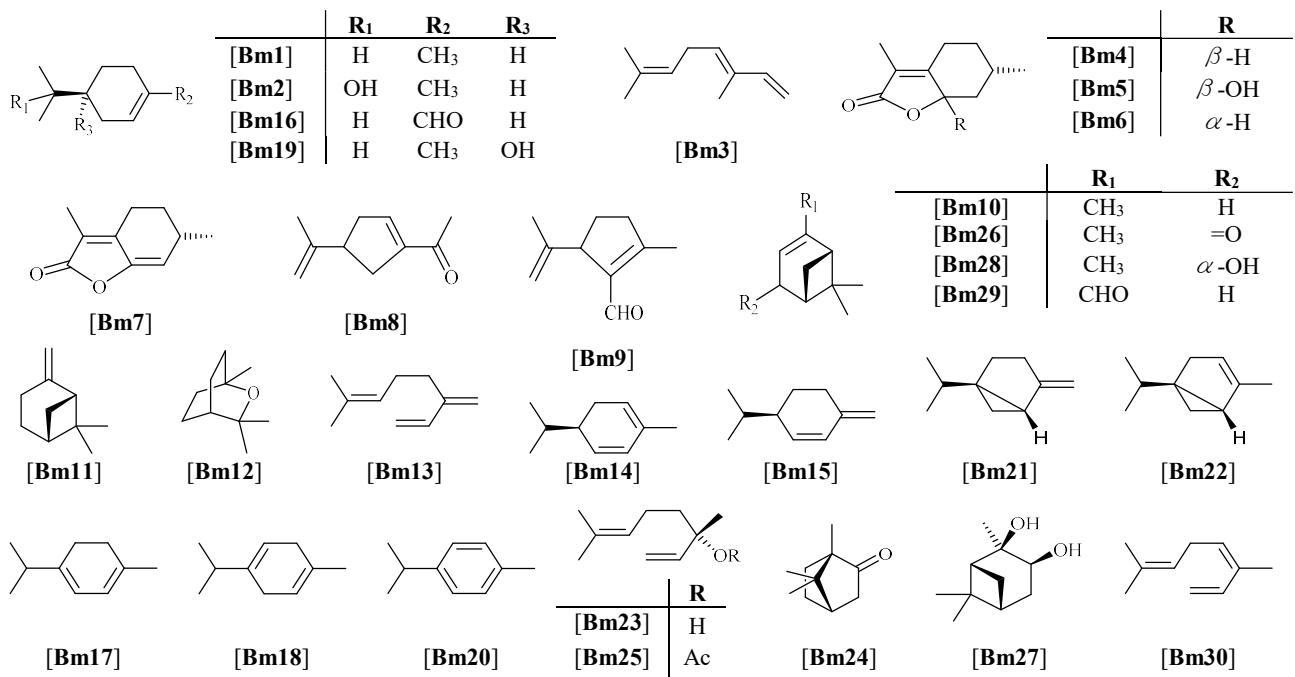


Figura 143. Monoterpenoides identificados en especies del género *Bursera*.

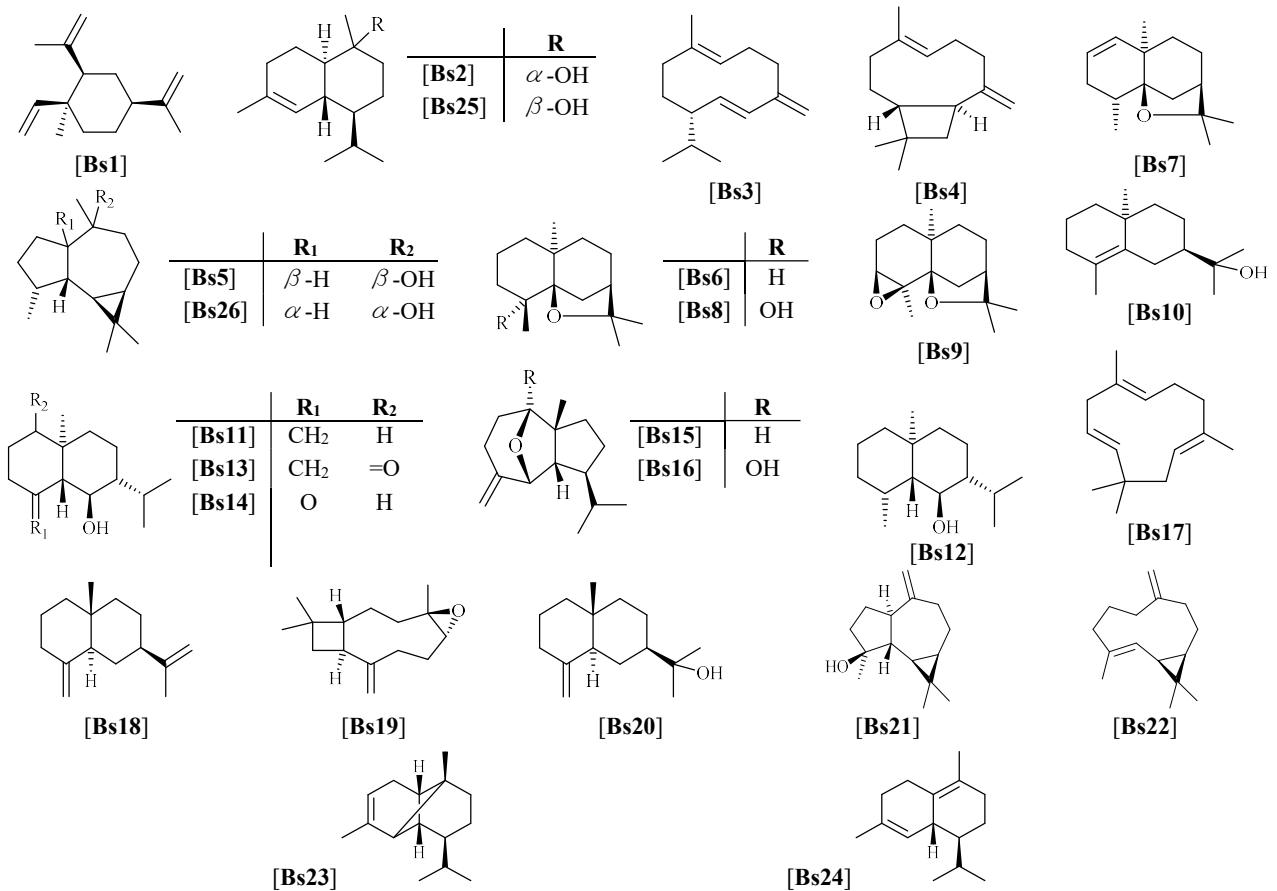


Figura 144. Sesquiterpenoides identificados en algunas especies de *Bursera*.

## I.B.2. Di- y tri-terpenoides

Adicionalmente a los mono- y sesqui-terpenoides hallados en los aceites esenciales y las fracciones volátiles de las especies de *Bursera*, también han sido aislados e identificados otros terpenoides tales como diterpenos, triterpenos y esteroides en las fracciones no volátiles de las plantas pertenecientes a éste género. Los terpenoides son compuestos basados en unidades de isopreno, cuatro unidades en el caso de los diterpenos y seis unidades en el caso de los triterpenos.

Hasta la fecha solo se han encontrado reportes de diterpenos en cuatro especies de *Bursera* y todos ellos poseen el mismo esqueleto base, el del verticilano. En los tallos de *B. kerberi* colectada en México se aislaron 4 diterpenos de este tipo en el extracto de hexano, (1*S*,3*E*,7*E*,11*R*)-(+)-verticila-3,7,12(18)-trieno [**Bd1**], (1*R*,3*E*,7*E*,11*R*,12*Z*)-(+)-verticila-3,7,12-trieno [**Bd2**], (1*R*,7*E*,11*Z*)-(-)-verticila-4(20),7,11-trieno [**Bd3**] y *ent*-5-*epi*-verticilol [(1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*R*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol] [**Bd4**] (Hernández *et al.*, 2005).

El extracto de hexano de *B. suntui* contiene los diterpenos [**Bd1**], [**Bd2**], [**Bd3**], (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol [**Bd5**], (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticilla-3,7-dieno-12,20-diol [**Bd6**], (1*S*,3*Z*,7*S*,8*S*,11*S*,12*S*)-(+)-7,8-epoxiverticil-3-eno-12,20-diol [**Bd7**], (1*S*,3*Z*,7*S*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,8(19)-dien-7,12,20-triol [**Bd8**] y los acetato de [**Bd6**], [**Bd7**] y [**Bd8**] ([**Bd9**], [**Bd10**] y [**Bd11**] respectivamente) (García-Gutiérrez *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2005).

Las otras dos especie de *Bursera* en la que se han reportado diterpenos son: el extracto metanólico de la resina de *B. microphylla*, en la cual se aislaron microphyllanina [**Bd12**], verticileno [**Bd13**] y *ent*-5-*epi*-verticilol [**Bd4**] (Messina *et al.*, 2015); y en los tallos de *B. multijuga* donde se identificaron el cembreno A [**Bd14**], cembrenol [**Bd15**], (-)-(1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol [**Bd16**] y su acetato [**Bd17**] (Hernández *et al.*, 2014).

En cuanto a los triterpenos, la especie con mayor cantidad de reportes de este tipo de compuestos es *B. graveolens*, para la cual en el extracto de EtOH de la corteza de un espécimen colombiano se reportan los compuestos ácido  $\beta$ -elemónico [**Bt1**], ácido  $\alpha$ -elemónico [**Bt2**] y ácido 3 $\alpha$ -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico [**Bt3**] (Robles *et al.*, 2005). Adicionalmente en el extracto metanólico de las virutas de duramen de una especie encontrada en Venezuela se encontró la presencia del ácido 2,3-seco-oleana-12-eno-2,3,28-trioico [**Bt4**] (Crowley, 1964). En los tallos, el lupeol [**Bt5**] y epilupeol [**Bt6**] fueron identificados en el extracto de MeOH (Nakanishi *et al.*, 2005), mientras que en el extracto metanólico de las hojas se aisló la

$\alpha$ -amirina [**Bt7**] y el esteroide 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -sitosterol [**Bt8**] (Nakanishi *et al.*, 2003).

Para *B. simaruba* en los extracto de hexano de las hojas de especies encontradas en La Habana (Cuba) y Caracas (Venezuela) se identificaron los triterpenos (3 $\beta$ ,18 $\beta$ )-lupa-5,20(29)-dien-3-ol [**Bt9**], (3 $\beta$ ,18 $\beta$ )-lupa-12,20(29)-dien-3-ol [**Bt10**], betulinol [**Bt11**] y  $\alpha$ -amirina [**Bt7**] junto con los esteroides  $\beta$ -sitosterol [**Bt12**], campesterol [**Bt13**] y (24S)-estigmasta-5,22(E)-dien-3 $\beta$ -ol (estigmasterol) [**Bt14**] (Álvarez *et al.*, 2015; Carretero *et al.*, 2008). En el extracto de cloroformo de la resina se hallaron los triterpenos  $\alpha$ -amirina [**Bt7**],  $\beta$ -amirina [**Bt15**], epiglutinol [**Bt16**], lupeol [**Bt5**], epilupeol [**Bt6**] y lup-20(29)-eno-3 $\beta$ ,23-diol [**Bt17**] (Peraza-Sánchez *et al.*, 1995).

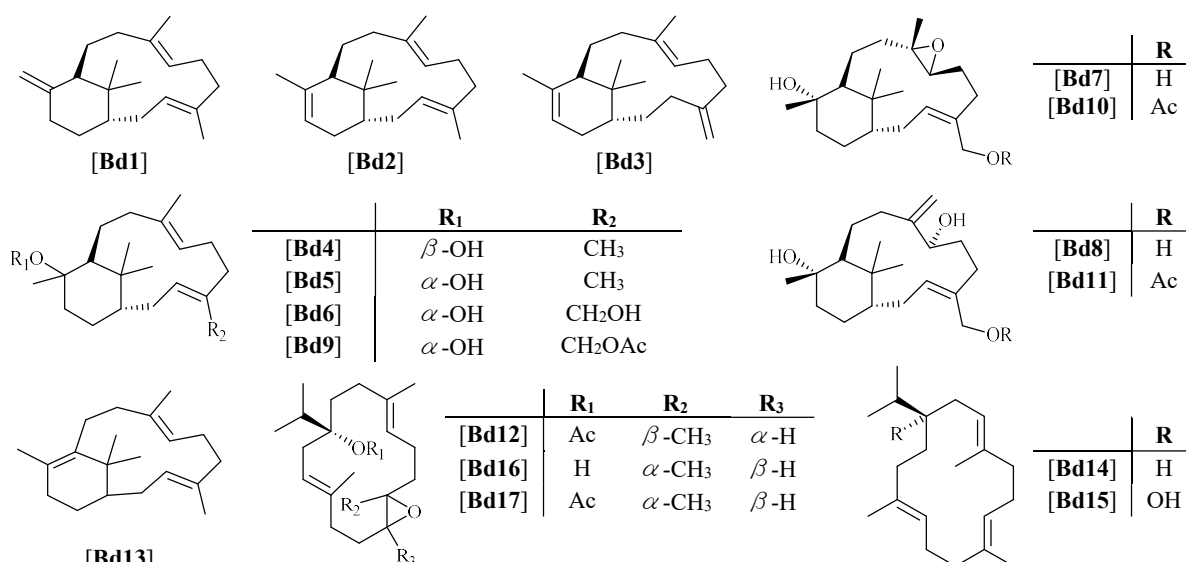


Figura 145. Diterpenos aislados en el género *Bursera*.

La especie de *B. delpechiana* (sinónimo de *B. linanoe*) recolectada en Bangalore posee los triterpenos  $\alpha$ -amirina [**Bt7**], ácido ursólico [**Bt18**], ácido ursónico [**Bt19**], ácido acetilursólico [**Bt20**], ácido 11-oxoursólico [**Bt21**], ácido 11-oxo-acetilursólico [**Bt22**], 3 $\beta$ -acetoxiurs-11-en-28,13-olida [**Bt23**], 3 $\beta$ -acetoxi-11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -epoxiursan-28,13-olida [**Bt24**] y 3 $\beta$ -acetoxi-12 $\beta$ -hidroxiursan-28,13-olida [**Bt25**] en el extracto de MeOH de la resina (Syamasundar *et al.*, 1991; Syamasundar y Mallavarapu, 1995).

El extracto de MeOH de *B. microphylla* (Messina *et al.*, 2015) reporta la presencia del ácido oleanónico [**Bt26**], ácido betulónico [**Bt27**], mansumbinona [**Bt28**], malabaricatrienona [**Bt29**], malabaricatrienol [**Bt30**] y 16,20-dihydroxidammarenona [**Bt31**]; mientras que en el extracto de éter etílico de los tallos (Bianchi *et al.*, 1968) se aisló el  $\beta$ -sitosterol [**Bt12**].

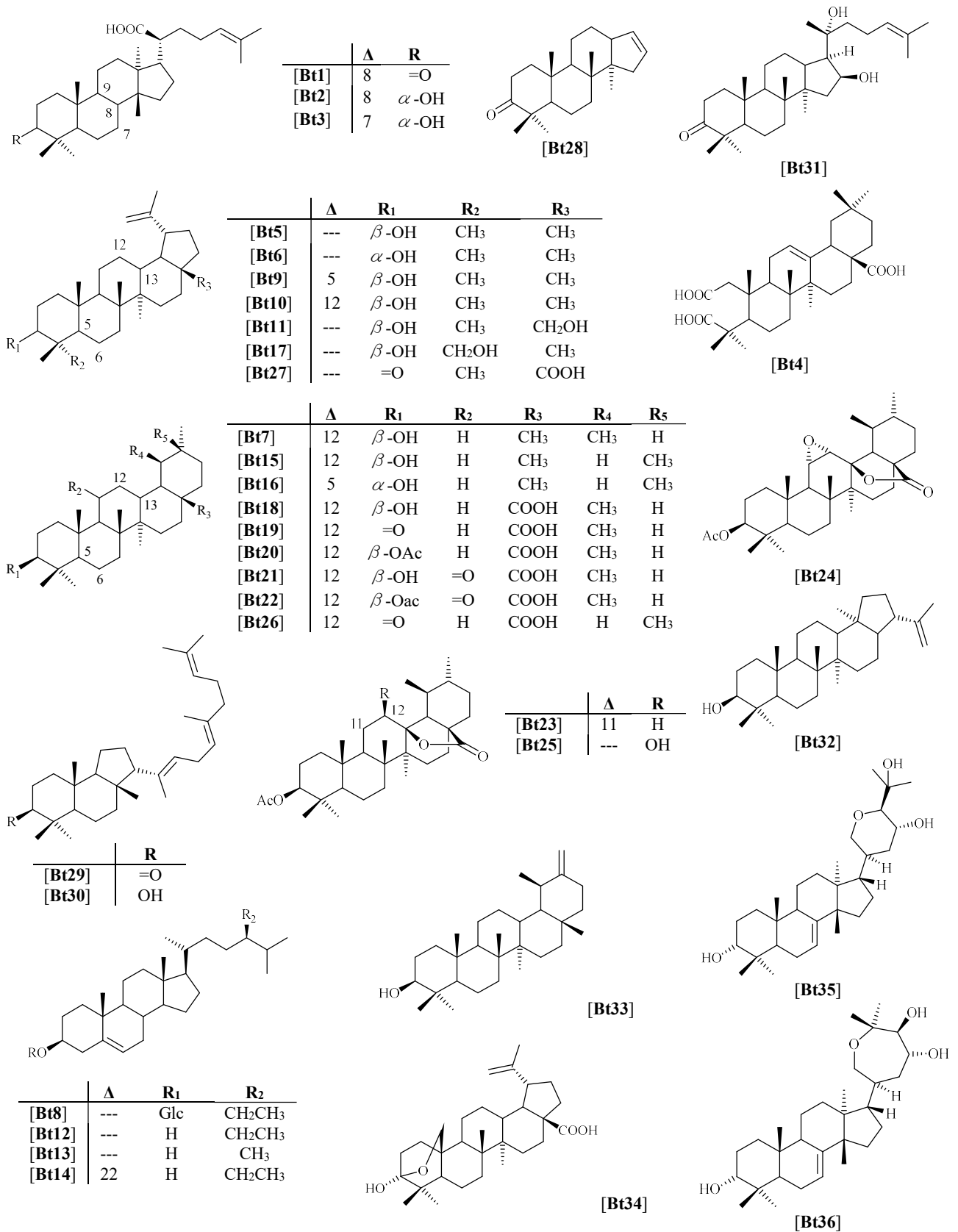


Figura 146. Triterpenos y esteroides aislados de especies de *Bursera*.





trihidroxi flavonol [Bf14], 8-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalil)-5,7,4'-trihidroxi dihidroflavonol [Bf15], 6'',6''-dimetildihidropiran (2'',3''':7,8)-5,4'-dihidroxi flavonol [Bf16], 6'',6''-dimetildihidropiran (2'',3''':7,8)-5,4'-dihidroxi dihidroflavonol [Bf17] y 5''-isopropenildihidrofuran-(2'',3''':7,8)-5,4'-dihidroxi dihidroflavonol [Bf18] (Souza *et al.*, 1989).

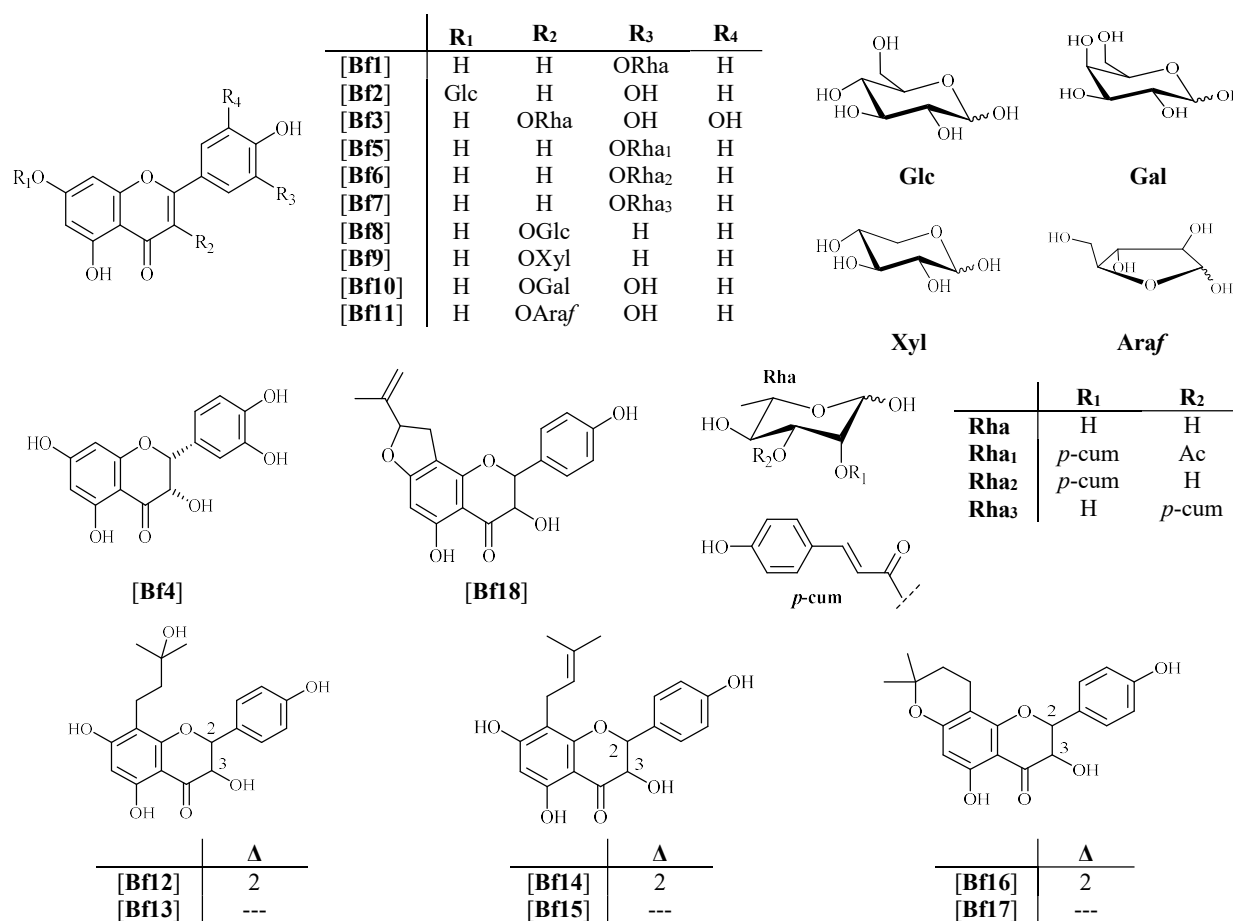


Figura 147. Flavonoides aislados en el género *Bursera*.

#### I.B.4. Lignanos

Entre los lignanos aislados de *B. fagaroides* se encuentra en el extracto de cloroformo metil- $\beta$ -peltatina A [B11] y 5'-desmetoxi-metil- $\beta$ -peltatina A [B12] (Bianchi *et al.*, 1969); así como los lignanos aislados del extracto de MeOH de los tallos (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012): podofilotoxina [B13], 5'-desmetoxi-metil- $\beta$ -peltatina A [B12], metil- $\beta$ -peltatina A [B11], 5'-desmetoxyateina [B14], deoxipodofilotoxina [B15], burseranina [B16] y acetilpodofilotoxina [B17]. También se encuentra el estudio realizado por Velázquez-Jiménez y colaboradores, en 2011, sobre el extracto metanólico del exudado en el cual se encontraron los lignanos deoxipodofilotoxina [B15], 5'-desmetoxyateina [B14], yateina [B18] y morelensina [B19] (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2011). Así mismo en el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la corteza también se

han hallado compuestos de este tipo: 7',8'-dehidropodofilotoxina [B110], 7',8'-dehidroacetilpodofilotoxina [B111], acetilpicropodofilotoxina [B112], hinokinina [B113] y 7',8'-dehidro-*trans-p*-cumarilpodofilotoxina [B114] junto con los ya mencionados [B12], [B13], [B16] y [B17] (Mojica *et al.*, 2016). Por último, del extracto de cloroformo de la resina se obtuvieron 9-acetil-9'-pentadecanoildihidroclusina [B115], los mono- y di-acetato de 2,3-desmetoxi-*seco*-isolintetralina [B116 y B117] y de dihidroclusina [B118 y B119] (Morales-Serna *et al.*, 2013).

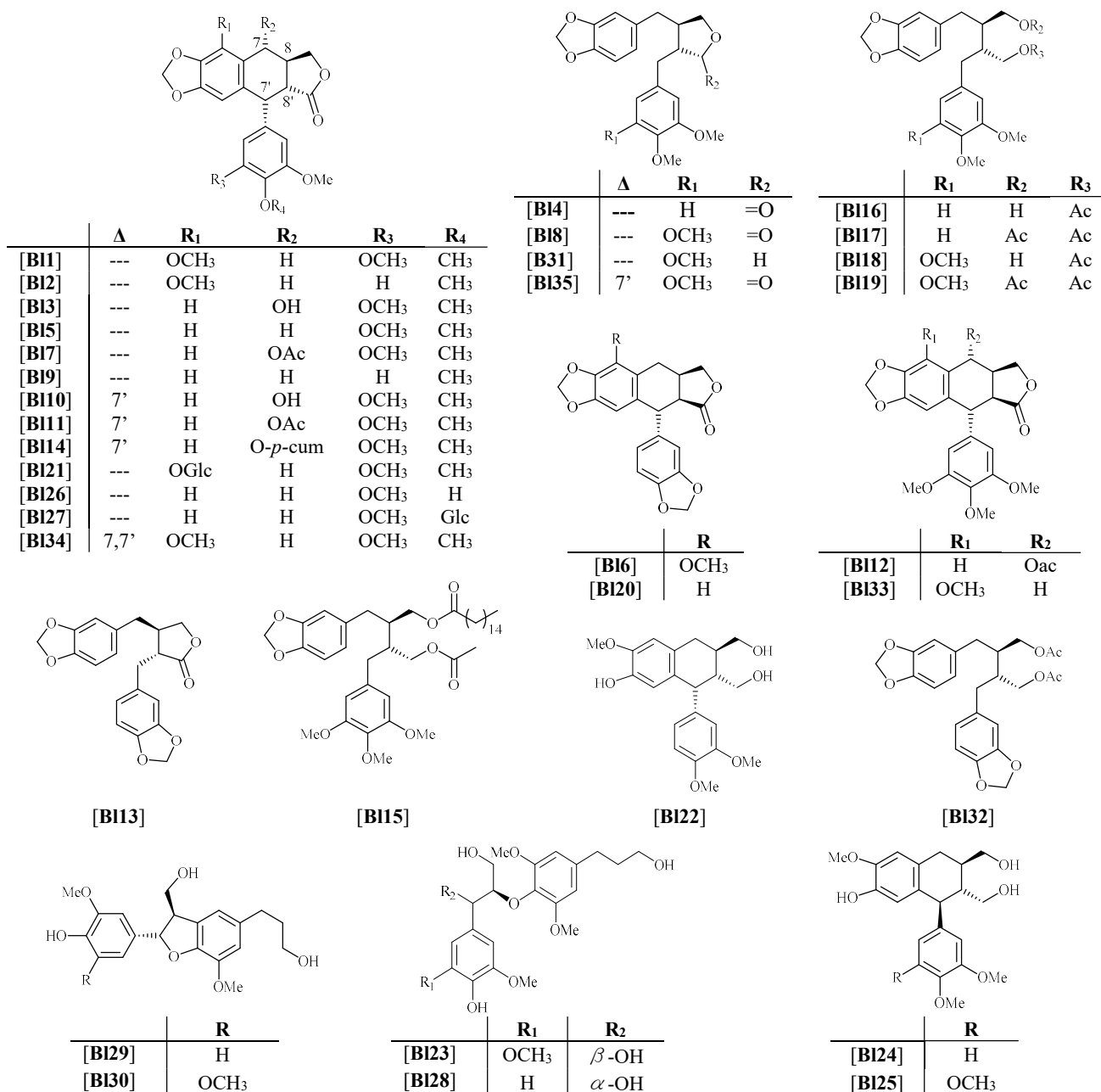
De *B. simaruba* se han aislado metil- $\beta$ -peltatina A [B11] del extracto de hexano de las hojas (Noguera *et al.*, 2006, 2004); picropoligamaina [B120] del extracto de CHCl<sub>3</sub> de la resina (Peraza-Sanchez y Pena-Rodriguez, 1992) y yateina [B18], *O*- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -peltatina A [B121], hinokinina [B113] y bursehernina (5'-desmetoxyateina) [B14] en el extracto de MeOH de la corteza (Maldini *et al.*, 2009b).

En las raíces de *B. tonkinensis* se encontraron el burselignano [B122], burseneolignano [B123], (+)-isolariciresinol [B124], 5-metoxi-(+)-isolariciresinol [B125], 4'-desmetil desoxipodofilotoxina [B126], 4-*O*- $\beta$ -D-glucósido de 4'-desmetildesoxipodofilotoxina [B127], 1-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-[4''-(3-hidroxipropil)-2'',6''-dimetoxifenoxi]-propano-1,3-diol [B128], dihidrodehidrodiconiferol [B129] y 5-metoxi-*trans*-dihidrodehidrodiconiferol [B130] (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005).

Para *B. microphylla* se obtuvo deoxipodofilotoxina [B19] (Bianchi *et al.*, 1968) y burserano [B131] (Cole *et al.*, 1969; Trumbull y Cole, 1969) del extracto de éter etílico de los tallos. En el extracto de MeOH de la resina se aislaron ariensina [B132], burseranina [B16], burserano [B131] y diacetato de dihidroclusina [B119] (Messina *et al.*, 2015).

Los tallos de *B. permollis* colectada en Guatemala presentan deoxipodofilotoxina [B15], metil- $\beta$ -peltatina A [B11], picro-metil- $\beta$ -peltatina A [B133], dehidro-metil- $\beta$ -peltatina A [B134] y nemerosina [B135] en el extracto de MEOH (Wickramaratne *et al.*, 1995).

En el extracto de acetona del exudado de *B. ariensis* se halló ariensina [B132] (Hernández *et al.*, 1983); mientras que del extracto de MeOH del exudado de *B. morelensis* se aislaron deoxipodofilotoxina [B15] y 5'-desmetoxideoxipodofilotoxina (morelensina) [B19] (Jolad *et al.*, 1977b). Para *B. graveolens* se obtuvieron burseranina [B16] y picropoligamaina [B120] del extracto de MeOH de los tallos (Nakanishi *et al.*, 2005). Así mismo, en el extracto de cloroformo de las hojas y tallos de *B. schlechtendalii* se encontraron los lignanos yateina [B18] y 5'-desmetoxyateina (bursehernina) [B14] (McDoniel y Cole, 1972).



**Figura 148.** Lignanos aislados en especies de *Bursera*.

### I.B.5. Otros compuestos fenólicos

Adicional a los flavonoides y lignanos, se han encontrado otros tipos de compuestos fenólicos como por ejemplo, la cumarina escopoletina [Bx1], que ha sido aislada en extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la corteza de *B. fagaroides* (Mojica *et al.*, 2016), del extracto de MeOH de las raíces de *B. tonkinensis* (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005) y del extracto hidroalcohólico de la corteza de *B. grandiflora* (Aguilar Santamaría *et al.*, 2012).

En el extracto de MeOH de las raíces de *B. tonkinensis* colectada en Vietnam se obtuvo el fenilpropano, bursefenilpropano [Bx2] (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005). En cambio para

*B. simaruba* además de la escopoletina, del extracto metanólico de la corteza se han aislado varios compuestos fenólicos, algunos de ellos azufrados: 1-*O*- $\beta$ -(6-sulfo)-glucopiranosil-3,4-dimetoxifenilo [**Bx3**], 1-*O*- $\beta$ -(6-sulfo)-glucopiranosil-3,4,5-trimetoxifenilo [**Bx4**], 1-*O*- $\beta$ -(6-sulfo)-glucopiranosil-3,4-dihidroxyfeniletanol [**Bx5**], 4-neohesperidosilfloroacetofenona [**Bx6**], 1-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-4-acetil-3,5-dihidrossifenilo [**Bx7**] y picraquassiócido D [**Bx8**] (Maldini *et al.*, 2009b).

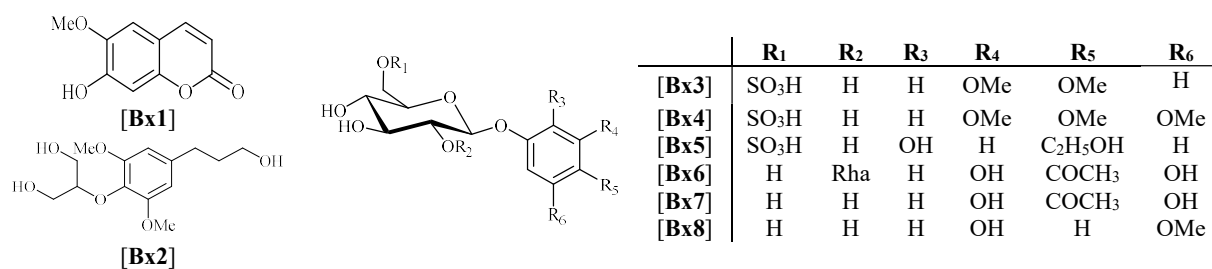


Figura 149. Otros compuestos fenólicos de *Bursera*.

**Tabla 22.** Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género *Bursera*.

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
1951	<i>B. microphylla</i>	Aceite esencial de las hojas	Mono y sesquiterpenos	(Bradley y Haagen-Smit, 1951)
1961	4 especies de <i>Bursera</i>	Exudado y látex. Extracto de hexano	Triterpenos	(Tursch y Tursch, 2010)
1964	<i>B. graveolens</i>	Virutas de duramen y su aceite esencial. Extracto de EtOH	Terpenoides	(Crowley, 1964)
1968	<i>B. microphylla</i>	Tallos. Extracto de éter etílico	Esteroides, lignanos	(Bianchi <i>et al.</i> , 1968)
		Resina	Principalmente monoterpenos	(Mooney y Emboden Jr., 1968)
1969	<i>B. fagaroides</i>	Extracto cloroformo	Lignanos	(Bianchi <i>et al.</i> , 1969)
	<i>B. microphylla</i>	Tallos. Tallos. Extracto de éter etílico	Lignanos	(Cole <i>et al.</i> , 1969)
1972	<i>B. schlechtendalii</i>	Hojas y Tallos. Extracto de CHCl <sub>3</sub>	Lignanos y triterpenos	(McDoniel y Cole, 1972)
1973	21 especies de <i>Bursera</i>	Evaluación fitoquímica de las partes aéreas de 21 especies	Detección de esteroides, diterpenoides, triterpenoides, taninos y carbohidratos	(Dominguez <i>et al.</i> , 1973)
1977	<i>B. arida</i>	Tallos. Extracto de cloroformo	Triterpeno	(Ionescu <i>et al.</i> , 1977)
	<i>B. klugii</i>	Hojas. Extracto de etanol	Triterpenos	(Jolad <i>et al.</i> , 1977a)
	<i>B. morelensis</i>	Exudado. Extracción con MeOH	Lignanos	(Jolad <i>et al.</i> , 1977b)
1983	<i>B. ariensis</i>	Exudado. Extracto de acetona	Lignano	(Hernández <i>et al.</i> , 1983)
1989	<i>B. leptophloeos</i>	Ramas. Extracto de EtOH	Flavonoides	(Souza <i>et al.</i> , 1989)
1991	<i>B. delpechiana</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	Resina. Extracto MeOH	Triterpenoides	(Syamasundar <i>et al.</i> , 1991)
1992	<i>B. simaruba</i>	Resina. Extracto CHCl <sub>3</sub>	Lignanos	(Peraza-Sanchez y Pena-Rodriguez, 1992)
1995	<i>B. delpechiana</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	Resina. Extracto MeOH	Lactonas triterpénicas	(Syamasundar y Mallavarapu, 1995)
	<i>B. permollis</i>	Tallos. Extracto de MeOH	Lignanos	(Wickramaratne <i>et al.</i> , 1995)
	<i>B. simaruba</i>	Resina. Extracto CHCl <sub>3</sub>	Triterpenos	(Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 1995)
1996	<i>B. leptophloeos</i>	Corteza. Extracto metanólico	Furanosesquiterpeno	(Barreira <i>et al.</i> , 1996)
2002	8 especies de <i>Bursera</i>	Hojas. Extracción con MeOH	Flavonoides glicosidados	(Hernández <i>et al.</i> , 2002)
	<i>B. simaruba</i>	Aceite esencial de los frutos	Monoterpenos	(Rosales y Cicció, 2002)
2003	<i>B. graveolens</i>	Hojas. Extracto de MeOH	Flavonoides, triterpenos y esteroides	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2003)
		Madera. Extracto de éter etílico	Monoterpenos	(Yukawa y Iwabuchi, 2003)
2004	<i>B. graveolens</i>	Madera. Extracto de éter etílico	Sesquiterpenos	(Yukawa <i>et al.</i> , 2004a, 2004b)
	<i>B. simaruba</i>	Hojas. Extracto de hexano	Lignano	(Noguera <i>et al.</i> , 2004)
	<i>B. tonkinensis</i>	Aceite esencial de partes aéreas	15 compuestos identificados. Mayormente monoterpenos.	(Hoi <i>et al.</i> , 2004)
2005	8 especies de <i>Bursera</i>	Corteza. Fracción volátil (éter etílico)	Mono y sesquiterpenos, hidrocarburos de cadena larga	(Zúñiga <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. cuneata</i>	Resina	Terpenoides	(De la Cruz-Cañizares <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. graveolens</i>	Tallos. Extracto MeOH	Lignanos y triterpenos	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2005)
		Corteza. Extracto EtOH	Triterpenos	(Robles <i>et al.</i> , 2005)
		Madera. Extracto de éter etílico	Mono y sesquiterpenos	(Yukawa <i>et al.</i> , 2005)



**Tabla 22.** ...continuación...

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
2005	<i>B. suntu</i> , <i>B. kerberi</i>	Tallos. Extracto de hexano	Diterpenoides tipo verticilanos.	(Hernández <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. tonkinensis</i>	Raíces. Extracto MeOH	Lignanos, cumarinas y fitosteroles	(Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005)
2006	<i>B. chemapodicta</i>	Aceite esencial de las hojas	Alcanos de cadena corta y derivados	(Evans y Becerra, 2006)
	<i>B. cuneata</i>	Resina	Triterpenoides	(Doménech-Carbó <i>et al.</i> , 2006)
	<i>B. graveolens</i>	Madera. Extracto de éter etílico	Mono y sesquiterpenos	(Yukawa <i>et al.</i> , 2006)
2007	<i>B. aloexylon</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	Aceite esencial de las hojas	Monoterpenos	(Queiroga <i>et al.</i> , 2007)
	<i>B. graveolens</i>	Aceite esencial de los tallos	Mayormente monoterpenos	(Young <i>et al.</i> , 2007)
2008	<i>B. hollickii</i>	Aceite esencial de hojas y corteza	Principalmente monoterpenos	(Junor <i>et al.</i> , 2008a)
	<i>B. simaruba</i>	Hojas. Extracto de hexano	Terpenos y esteroides	(Carretero <i>et al.</i> , 2008)
		Aceite esencial de hojas, corteza y frutos	Predominan sesquiterpenos en hojas y monoterpenos en corteza y frutos.	(Junor <i>et al.</i> , 2008b)
<i>B. suntu</i>	Tallos. Extracto de hexano	Diterpenos tipo verticilano	(García-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2008)	
2009	5 especies de <i>Bursera</i>	Hojas. Extracto en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mono y sesquiterpenos	(Noge y Becerra, 2009)
	<i>B. graveolens</i>	Aceite esencial de las hojas	97 compuestos identificados. Mono y sesquiterpenos	(Carmona <i>et al.</i> , 2009)
		Aceite esencial de las ramas	Mayormente sesquiterpenos	(Santana <i>et al.</i> , 2009)
	<i>B. microphylla</i>	Aceite esencial de la oleoresina	26 compuestos identificados. Mono y sesquiterpenos	(Tucker <i>et al.</i> , 2009)
	<i>B. simaruba</i>	Corteza. Extracto de MeOH	Lignanos, compuestos fenólicos, flavonoides y evidencias de proantocianidinas	(Maldini <i>et al.</i> , 2009a, 2009b)
Aceite esencial de las hojas		38 compuestos identificados. Mono y sesquiterpenos	(Sylvestre <i>et al.</i> , 2007)	
2010	<i>B. aromatica</i>	Aceite esencial de hojas, corteza y frutos	Principalmente sesquiterpenos	(Junor <i>et al.</i> , 2010b)
	<i>B. delpechiana</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	Hojas y ramas. Extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Monoterpenos	(Becerra y Noge, 2010)
	<i>B. linanoe</i>	Hojas. Extracto en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mono- y sesquiterpenos	(Noge <i>et al.</i> , 2010)
	<i>B. lunanii</i>	Aceite esencial de hojas, corteza y frutos	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Junor <i>et al.</i> , 2010a)
	<i>B. simaruba</i>	Exudado	Monosacáridos y taninos	(Noriega-Ramos <i>et al.</i> , 2010)
2010	<i>B. tomentosa</i>	Aceite esencial de los frutos	9 compuestos identificados. Alcanos, mono- y sesquiterpenos	(Moreno <i>et al.</i> , 2010a)
		Aceite esencial de la corteza	28 componentes identificados. Mayormente sesquiterpenos	(Moreno <i>et al.</i> , 2010b)
2011	<i>B. fagaroides</i>	Exudado. Extracto de MeOH	Lignanos	(Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. velutina</i>	Hojas. Extracto en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Alcanos, mono- y sesquiterpenos	(Noge <i>et al.</i> , 2011)
2012	<i>B. fagaroides</i>	Tallos. Extracto de MeOH	Lignanos	(Rojas-Sepúlveda <i>et al.</i> , 2012)
	<i>B. grandiflora</i>	Corteza. Extracto hidroalcohólico	Cumarina	(Aguilar Santamaría <i>et al.</i> , 2012)

**Tabla 22.** ...continuación...

<b>Año</b>	<b>Especie</b>	<b>Análisis</b>	<b>Tipo de Compuestos</b>	<b>Referencia</b>
<b>2013</b>	<i>B. fagaroides</i>	Resina. Extracto de CHCl <sub>3</sub>	Lignanos	(Morales-Serna <i>et al.</i> , 2013)
	<i>B. graveolens</i>	Frutos, hojas, ramas, corteza y resina. Fracciones volátiles (CHCl <sub>3</sub> )	Benzofuranos: ramas, resina y corteza. Sesquiterpenos: hojas. Monoterpenos: frutos y resina	(Muñoz-Acevedo <i>et al.</i> , 2013)
<b>2014</b>	<i>B. morelensis</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	17 compuestos identificados. Mono y sesquiterpenos	(Carrera-Martínez <i>et al.</i> , 2014)
	<i>B. multijuga</i>	Tallos	Diterpenos	(Hernández <i>et al.</i> , 2014)
<b>2015</b>	<i>B. microphylla</i>	Resina. Extracto de MeOH	Terpenoides y lignanos	(Messina <i>et al.</i> , 2015)
	<i>B. simaruba</i>	Hojas. Extracto de hexano	Triterpenos	(Álvarez <i>et al.</i> , 2015)
<b>2016</b>	<i>B. fagaroides</i>	Corteza. Extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Lignanos y cumarinas	(Mojica <i>et al.</i> , 2016)

### I.C. Actividad biológica en el género *Bursera*

El estudio de las propiedades farmacológicas atribuidas a las especies del género *Bursera* así como de la composición química de las diversas estructuras morfológicas (tallos, hojas, corteza), aceites esenciales y resinas han permitido confirmar muchas de las atribuciones hechas por la medicina tradicional sobre las especies que conforma este género.

Los ensayos de actividad biológicas más realizados en las *Bursera* y los metabolitos secundarios aislados de ellas son para probar su actividad antiinflamatoria, antibacteriana y anticancerosa. Sin embargo, también se ha detectado que algunas especies de este género poseen propiedades como anticonceptivos, antiespasmolítico, para el tratamiento de la obesidad y en algunos casos pueden ser usadas como agentes antitumorales y antivirales. En la tabla 23 se presenta un resumen sobre los distintos tipos de ensayos biológicos realizados con especies de *Bursera* y/o de los compuestos obtenidos a partir de ellas.

**Tabla 23.** Actividad biológica del género *Bursera*

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Antibacteriana y Antimicrobiana	<i>B. arida</i>	El extracto de hexano presenta actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	(Canales <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. simaruba</i>	Los extractos de MeOH de las hojas y tallos presentan una alta actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> con valores de MIC 8 y 64 µg/mL respectivamente.	(Yasunaka <i>et al.</i> , 2005)
		Los extractos acuosos y etanólicos presentan actividad contra <i>Streptococcus mutans</i> con valores de MIC de 100 y 62,5 µg/mL respectivamente.	(Rosas-Piñón <i>et al.</i> , 2012)
	<i>B. tomentosa</i>	El aceite esencial presenta actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Salmonella typhi</i> , con valores MIC de 80 µg/mL, 120 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente.	(Moreno <i>et al.</i> , 2010a)
	<i>B. aloexylon</i> (sin. <i>B. linanoe</i> )	El aceite esencial de las hojas es un inhibidor efectivo contra <i>Rhodococcus equi</i> (0,60 mg/mL) y <i>Staphylococcus epidermidis</i> (0,15 mg/mL).	(Queiroga <i>et al.</i> , 2007)
	<i>B. simaruba</i>	El extracto alcohólico de la corteza presenta actividad inhibitoria contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Micrococcus luteus</i> con valores de MIC de 25 mg/mL.	(Rojas Hernández y Rodríguez Uramis, 2008)
Anticonceptiva	<i>B. schlehtendalii</i> y <i>B. fagaroides</i>	Extractos acuosos de los tallos presenta un alto grado de aglutinamiento de los espermatozoides, los resultados indican que las proteínas presentes en los extractos son las responsables de la actividad.	(Serrano y García-Suarez, 2001)
Anticancerosa	<i>B. fagaroides</i>	Los lignanos aislados [B110], [B111] y [B114] muestran diferentes gados de citotoxicidad contra las células humanas de cáncer nasofaríngeo (KB), de colon (HF-6), de seno (MCF-7) y de próstata (PC-3) con valores de IC <sub>50</sub> de 1,49 a 1,0x10 <sup>-5</sup> µM.	(Mojica <i>et al.</i> , 2016)
	<i>B. graveolens</i>	Los lignanos aislados [B16] y [B120] y el lupeol [Bt5] presentan actividad inhibitoria contra las células cancerígenas HT1080 (fibrosarcoma humano) con valores de ED <sub>50</sub> de 5,5; 1,9 y 16,7 µg/mL respectivamente.	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 23. Continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Anticancerosa	<i>B. klugii</i>	La fracción en cloroformo del extracto etanólico de las hojas mostró actividad contra dos sistemas: leucemia linfática P-388 (3PS) y carcinoma humano epidermoide de nasofaringe (9KB). La actividad contra el sistema PS es debida a los triterpenos aislados ([Bt35] y [Bt36]).	(Jolad <i>et al.</i> , 1977a)
	<i>B. microphylla</i>	Los compuestos ariensina [B132], burserano [B131] y diacetato de dihidroclusina [B119] fueron efectivos contra la línea celular RAW264.7 (cáncer murino) con valores de IC <sub>50</sub> en el rango micromolar.	(Messina <i>et al.</i> , 2015)
	<i>B. morelensis</i>	La deoxipodofilotoxina [B15] muestra actividad contra los sistemas PS (leucemia linfática P-388) y KB (carcinoma humano epidermoide de nasofaringe) mientras que morelensina [B19] solo presenta actividad contra el sistema PS.	(Jolad <i>et al.</i> , 1977b)
	<i>B. simaruba</i>	El aceite esencial de las hojas es activo contra las células tumorales A-549 (cáncer de pulmón) y DLD-1 (adenocarcinoma de colon) con valores de GI <sub>50</sub> de 42 ± 2 y 48 ± 2 µg/mL respectivamente. La evaluación indica que el α-humuleno [Bs17] es el posible responsable de la actividad.	(Sylvestre <i>et al.</i> , 2007)
	<i>B. tonkinensis</i>	El extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de las raíces exhibe una citotoxicidad contra las células de KB con un valor de IC <sub>50</sub> de 4,1 µg/mL. Además el compuesto aislado 4'-demetildesoxipodofilotoxina [B126] exhibe actividad significativa contra las líneas celulares KB, Col2 y LNCaP (IC <sub>50</sub> 17,7; 23,1 y 10,0 ng/mL respectivamente).	(Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2005)
Anticancerosa y antitumoral	<i>B. fagaroides</i>	El extracto de EtOH de la corteza posee citotoxicidad contra las células de linfoma en ratones murinos L-5178Y con un valor de ED <sub>50</sub> de 20 µg/mL. El ensayo <i>in vivo</i> muestran que la actividad es dependiente d la dosis y la vía de administración usada.	(Puebla-Pérez, 1999; Puebla-Pérez <i>et al.</i> , 1998)
Antiinflamatoria	<i>B. graveolens</i>	El extracto hidroalcohólico de las ramas inhibe en un 88.23 % la inflamación producida por aceite de crotón en la oreja de ratón.	(Santana <i>et al.</i> , 2009)
	<i>B. morelensis</i>	El aceite esencial presenta una un comportamiento antiinflamatorio positivo con el modelo de edema plantar inducido por carragenina.	(Carrera-Martínez <i>et al.</i> , 2014)
	<i>B. simaruba</i>	El extracto de CHCl <sub>3</sub> de la corteza demostró una actividad inflamatoria tópica sobre los edemas inducidos por aceite de crotón en las orejas de ratón con un valor de ID <sub>50</sub> 143 µg/cm <sup>2</sup> (Control: indometacina: 93 µg/cm <sup>2</sup> ). El extracto de hexano de las hojas y algunas fracciones inhiben la inflamación inducida por la carragenina en el test de edema plantar. Uno de los principales metabolitos involucrados en esta actividad es la metil-β-peltatina A [B11].	(Sosa <i>et al.</i> , 2002) (Noguera <i>et al.</i> , 2006, 2004)
Antimicrobiana y Anticancerosa	<i>B. odorata</i> (sin. <i>B. fagaroides</i> )	El extracto de EtOH presenta actividad inhibitoria contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (responsable de la mayoría de los casos de tuberculosis) en un 67 % a 100 µg/mL. El extracto también es citotóxico para las células HCT-116 (cáncer colorrectal humano) con un IC <sub>50</sub> < 0,076 µg/mL.	(Murillo-Alvarez <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla 23.** ...continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
<b>Antifúngica</b>	<i>B. simaruba</i>	El extracto de CHCl <sub>3</sub> del tronco muestra actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> (100 µg) y <i>Cladosporium cucumerium</i> (50 µg). Por su parte el extracto de CHCl <sub>3</sub> de la corteza solo es activo frente a <i>C. albicans</i> (100 µg).	(Rahalison <i>et al.</i> , 1993)
<b>Antitumoral</b>	<i>B. fagaroides</i>	Los resultados sugieren que no se combine la ingestión de algún tipo de té o brebaje preparado con dicha planta cuando se administre difluorometilornitina (DFMO), dado que este procedimiento podría favorecer el desarrollo neoplásico, en lugar de deprimirlo.	(Reynoso-Orozco <i>et al.</i> , 2008a, 2008b)
<b>Antiviral</b>	<i>B. simaruba</i>	Los compuestos triterpénicos aislados [ <b>Bt9-Bt11</b> ] mostraron ser activos contra con los virus de herpes HSV-1 y HSV-2.	(Álvarez <i>et al.</i> , 2015)
<b>Espasmolítico</b>	<i>B. filicifolia</i> y <i>B. microphylla</i>	El extracto etanólico de <i>B. filicifolia</i> presenta una moderada inhibición de la actividad de contracción de los músculos lisos, mientras que <i>B. microphylla</i> muestra una inhibición débil.	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1998b)
<b>Insecticida</b>	<i>B. hollicki</i>	El aceite exhibe actividad tóxica contra <i>Cylas formicarius elegantulus</i> , que es el mayor responsable de las batatas ( <i>Ipomoea batatas</i> ). No se observa actividad antioxidante en el aceite con el ensayo de DPPH.	(Junor <i>et al.</i> , 2008a)
<b>Molusquicida</b>	<i>B. simaruba</i>	El extracto metanólico de la corteza presenta actividad molusquicida contra <i>Biomphalaria glabrata</i> (uno de los huéspedes intermedios de la esquistosomiasis) con un valor de 400 ppm en 24 horas.	(Marston <i>et al.</i> , 1996)
<b>Toxicidad</b>	<i>B. graveolens</i>	El ensayo de toxicidad aguda con camarones muestra que el extracto acuoso no es tóxico (LC <sub>50</sub> > 10000 µg/mL) mientras que el extracto etanólico posee una elevada toxicidad (LC <sub>50</sub> = 139 µg/mL).	(Bussmann <i>et al.</i> , 2011a)
<b>Tratamiento de obesidad</b>	<i>B. grandiflora</i>	Los animales (ratones) tratados con un extracto hidroalcohólico de <i>B. grandiflora</i> registraron una disminución de los triglicéridos. Las evaluaciones de toxicología revelaron que la administración del extracto no produjo muertes en los animales de experimentación, ni cambios orgánicos o de comportamiento.	(Aguilar Santamaría <i>et al.</i> , 2012)

## II. PARTE EXPERIMENTAL

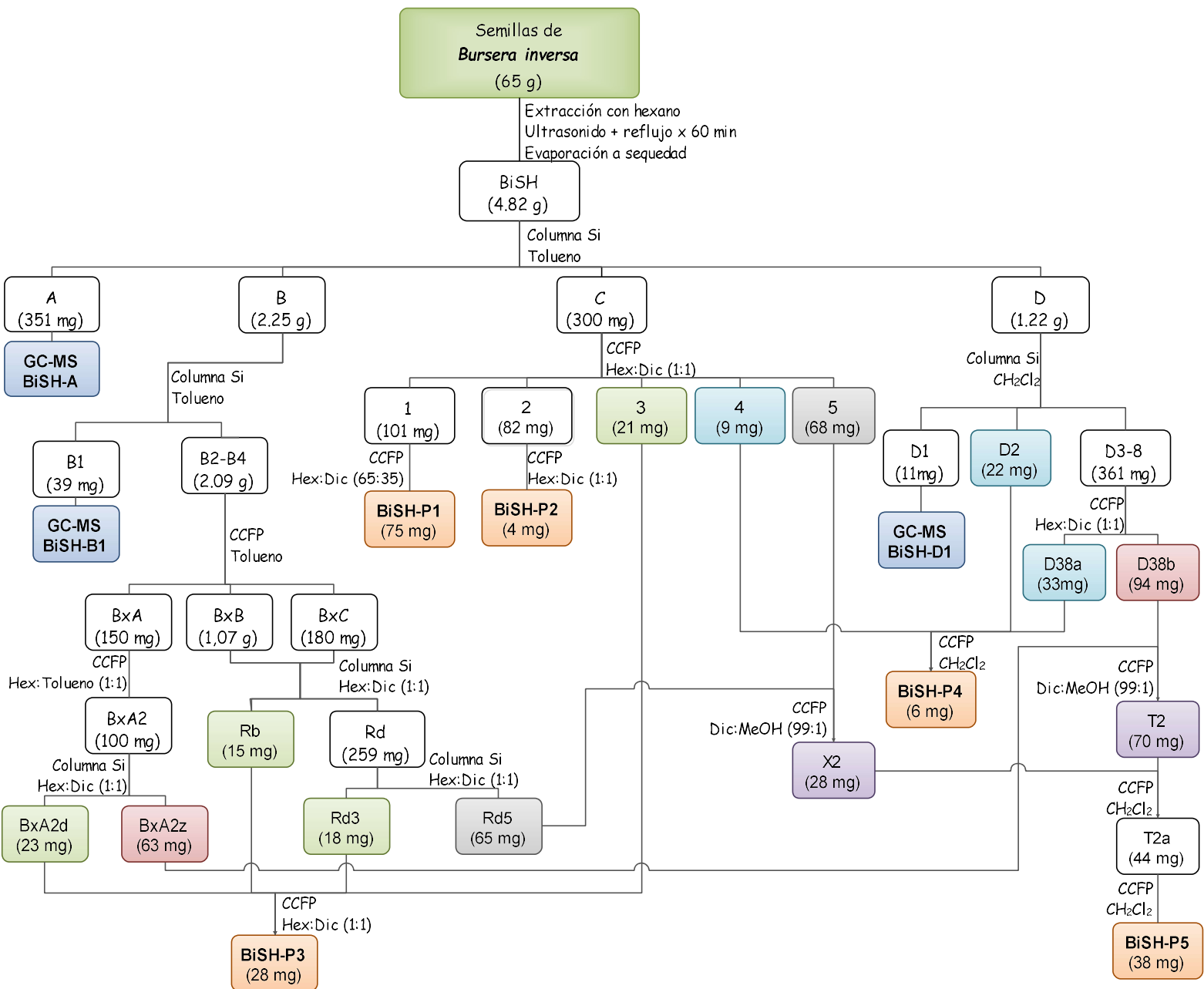
### II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica

La recolección de los frutos de *Bursera inversa* se realizó en noviembre del 2012 en el Estado Zulia, Municipio Colón, en la zona de La Bancada (Venezuela), entre El Corali y Puerto Concha, en la hacienda Bella Vista. Para la clasificación de la especie se prepararon muestras testigo (voucher) siguiendo el método de prensado y secado, las cuales se depositaron en el Herbario MER de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes (Mérida) y en el herbario “Víctor Manuel Badillo” de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Maracay). La identificación fue hecha por los profesores José Guevara de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes y Mercedes Castro de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

### II.B. Tratamiento del material vegetal

Las semillas de *Bursera inversa* fueron extraídas con hexano, mediante reflujo y ultrasonido por 60 minutos. El extracto obtenido se evaporó a sequedad, obteniéndose 4,82 g. Este extracto fue sometido a una columna cromatográfica de sílice usando tolueno como solvente. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a diversos procesos de purificación, empleando técnicas de cromatografía en columna y cromatografía preparativa de capa fina como se describe en el esquema 6. Cada subfracción obtenida fue sometida a TLC para identificar la pureza de los productos presentes. Luego de diversos fraccionamientos y purificaciones se lograron aislar 5 compuestos identificados como **BiSH-P1** (75 mg), **BiSH-P2** (4 mg), **BiSH-P3** (28 mg), **BiSH-P4** (6 mg), **BiSH-P5** (38 mg). Algunas fracciones fueron sometidas a un análisis de GC-MS de manera de identificar los compuestos menos polares del extracto. Esta parte experimental se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).



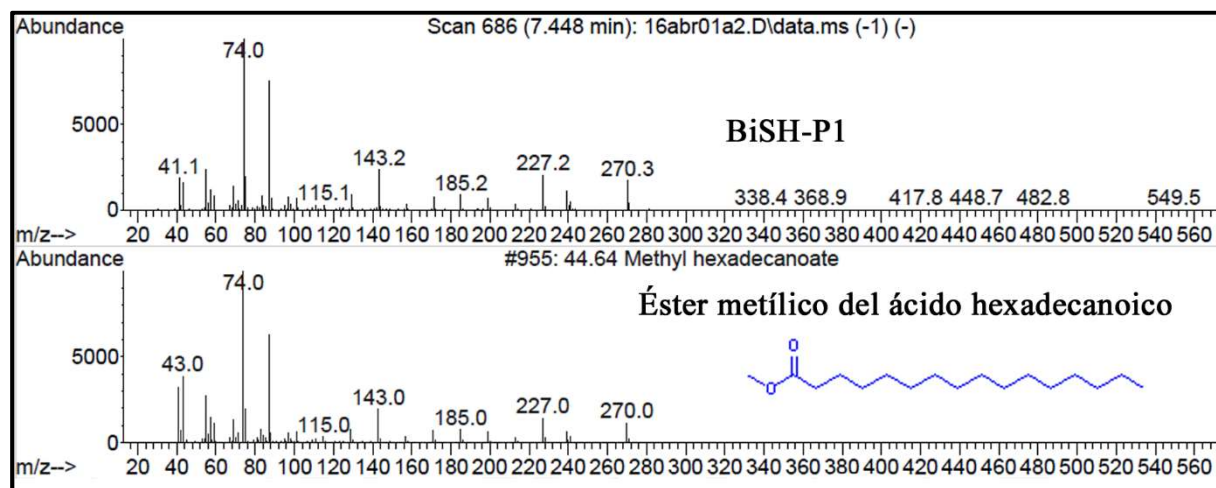


Esquema 6. Separación y purificación de compuestos de las semillas de *Bursera inversa*.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los 5 compuestos aislados de las semillas de *B. inversa* fueron analizados por GC-MS para su identificación. Para establecer la identidad de los compuestos se emplearon las bibliotecas disponibles para el cromatógrafo de gases (Wiley MS Data Library, 6<sup>o</sup> ed.) y la biblioteca de lípidos de la AOCS (The American Oil Chemists' Society, 2015).

El producto **BiSH-P1**, un líquido aceitoso de color amarillo pálido del que se obtuvieron 75 mg; fue aislado al fraccionar BiSH-C obtenida del extracto crudo de las semillas de *B. inversa*. La comparación entre el espectro de GC-MS con la biblioteca disponible para el cromatógrafo de gases y la biblioteca de lípidos de la AOCS (The American Oil Chemists' Society, 2015) permitió identificar el compuesto como el éster metílico de ácido hexadecanoico (éster metílico del ácido palmítico).



**Figura 150.** Espectros de GC-MS del producto BiSH-P1.

El compuesto **BiSH-P3** fue obtenido luego de varias CCFP del extracto crudo con tolueno, hexano y/o diclorometano. De este compuesto, un líquido aceitoso de color amarillo pálido, se aislaron 28 mg los cuales fueron analizados por GC-MS para identificar su estructura. La comparación entre el espectro de masa obtenido y la base de datos del GC-MS permitió identificar el producto como 9(*Z*)-octadecenoato de metilo (éster metílico del ácido oleico). El mismo resultado se obtiene al comparar el espectro de masas con la biblioteca de lípidos de la AOCS (The American Oil Chemists' Society, 2015).

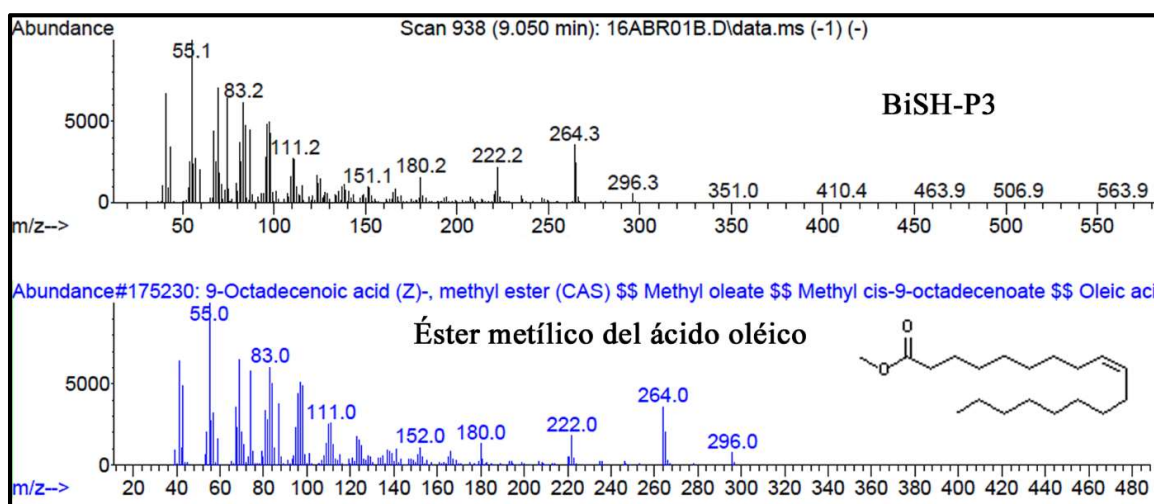


Figura 151. Espectros de GC-MS del producto BiSH-P3.

El producto **BiSH-P5**, un líquido aceitoso incoloro, del que se obtuvieron 38 mg fue aislado luego de varias purificaciones de la fracción D del extracto crudo de las semillas de *B. inversa*. El análisis de GC-MS permitió identificar el compuesto como 9,12-octadeca dienoato de metilo (éster metílico del ácido linoleico) a través de la comparación del espectro de masas con la biblioteca disponible para el cromatógrafo de gases y la biblioteca de lípidos de la AOCS (The American Oil Chemists' Society, 2015).

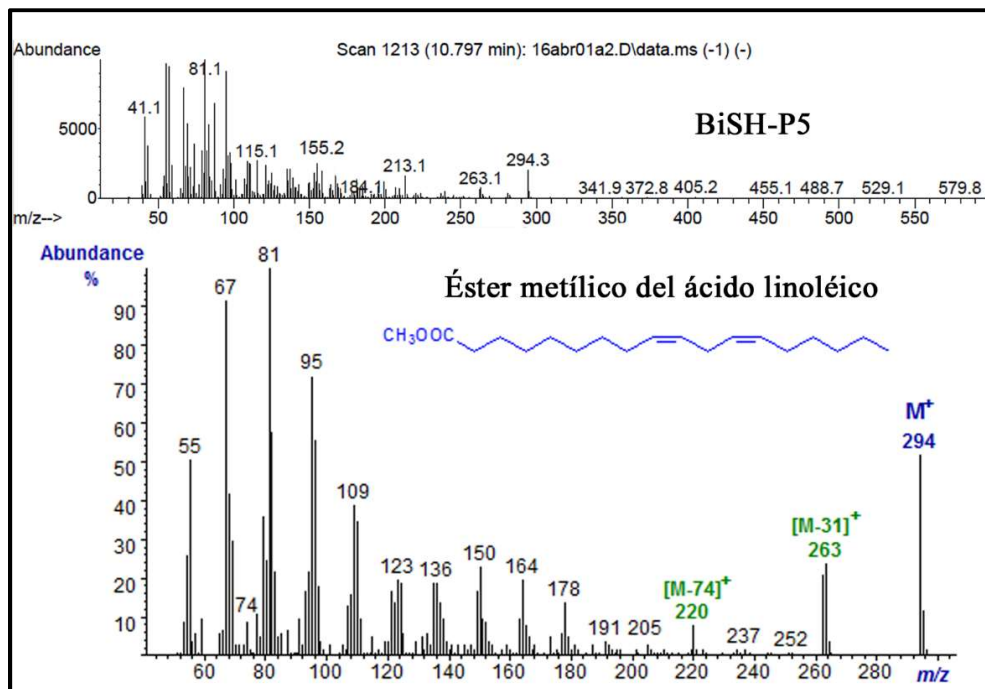


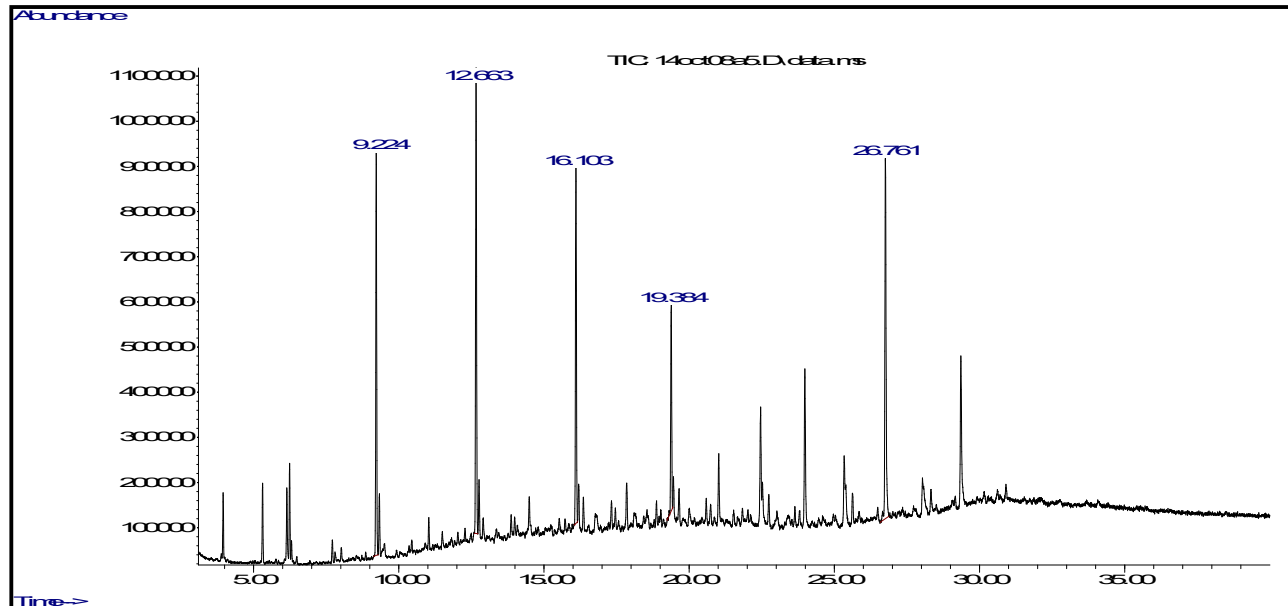
Figura 152. Espectros de GC-MS del producto BiSH-P5.

Las cuatro subfracciones de los semillas de *B. inversa* fueron analizadas por GC-MS y la identificación de los compuestos se realizó por comparación con las bases de datos disponibles.

En la tabla 24 se muestran todos los compuestos identificados en las subfracciones analizadas; en dicha tabla se puede observar que para las semillas de *B. inversa* la composición química está conformada en su mayoría por ésteres de ácidos grasos e hidrocarburos y alcoholes de cadena larga. Al igual que en las hojas, los frutos también suelen poseer ceras cuticulares (superficiales), donde hidrocarburos de cadena larga como el heptacosano, el nonacosano y hentriacontano suelen recubrir la superficie de los frutos (Cseke *et al.*, 2006).

Adicionalmente, en muchas plantas los frutos suelen estar compuestos principalmente por hidrocarburos y alcoholes de cadena larga, ácidos grasos y sus ésteres, ejemplo de ello son los frutos de *Mandragora autumnalis* (Solanaceae) (Hanus *et al.*, 2006), de *Brucea javanica* (Simarubaceae) (Su *et al.*, 2013) y los frutos de *Olea europea* que dan origen al aceite de oliva (Dell'agli y Bosisio, 2002).

En consecuencia, puede establecerse que las semillas de *B. inversa* están constituidas principalmente por compuestos alifáticos (alcanos, ácidos grasos, alcoholes) con cadenas de carbono que van desde C14 hasta C30, donde los componentes mayoritarios fueron aislados e identificados como ácido hexadecanoico (BiSH-P1 – 75 mg), éster metílico del ácido oleico (BiSH-P3 – 28 mg) y éster metílico del ácido linoleico (BiSH-P5 – 38 mg).



**Figura 153.** Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-A de las semillas de *B. inversa*.

**Tabla 24.** Compuestos detectados por GC-MS en subfracciones obtenidas de las semillas de *Bursera inversa*.

	TR (min)	Compuesto	BiSH-A	BiSH-B1	BiSH-BxA	BiSH-D1
1	3,89	Tetradeceno	---	5,11	1,2	---
2	3,95	Tetradecano	2,02	7,50	1,88	---
3	4,10	Tetradecanol	---	2,79	---	---
4	4,72	3-Tridecanona	---	1,32	0,44	1,74
5	4,90	5-Tridecanona	---	1,83	0,64	---
6	5,76	Hexadecanol	---	2,49	---	---
7	5,96	Desconocido 1	---	---	---	2,08
8	6,15	1-Hexadeceno	2,45	5,69	1,46	---
9	6,24	Hexadecano	2,67	2,48	0,74	---
10	7,40	Desconocido 2	---	2,41	0,54	---
11	9,23	1-Octadeceno	13,44	8,90	2,52	---
12	9,33	Octadecano	1,98	---	---	---
13	11,50	Éster metílico del ácido hexadecanoico	---	3,78	3,47	19,96
14	12,66	1-Eicoseno	17,49	9,12	---	---
15	12,76	Eicosano	2,08	---	---	---
16	12,96	Desconocido 3	---	2,43	0,75	---
17	14,39	Desconocido 4	---	5,24	1,74	---
18	14,55	Éster metílico del ácido 9(z)-octadecenoico	---	6,76	12,66	1,99
19	14,65	Éster metílico del ácido 8(E)-octadecenoico	---	---	0,97	---
20	14,97	Éster metílico del ácido octadecanoico	---	---	0,54	3,05
21	15,69	Éster etílico del ácido 9-octadecanoico	---	---	4,54	---
22	16,10	1-Docoseno	12,72	6,09	1,76	---
23	17,58	Desconocido 5	---	---	---	15,49
24	18,79	Desconocido 6	---	---	---	9,85
25	18,80	Éster butílico del ácido linoleico	---	---	1,37	---
26	18,88	Éster butílico del ácido oleico	---	---	27,67	---
27	18,99	Éster butílico del ácido octadecenoico	---	---	2,97	---
28	19,28	Éster butílico del ácido octadecanoico	---	---	0,73	---
29	19,38	1-Tetracoseno	7,36	3,61	0,92	---
30	19,81	Éster pentílico del ácido oleico	---	---	0,39	---
31	21,02	Tetracosano	2,57	---	---	---
32	21,90	Éster hexílico del ácido oleico	---	---	1,4	---
33	22,46	1-Hexacoseno	3,03	1,20	0,73	---
34	23,93	Desconocido 7	---	---	---	18,52
35	23,99	Heptacosano	6,73	---	---	---
36	25,34	1-Octacoseno	0,47	0,36	---	---
37	25,88	Escualeno	---	10,67	---	---
38	26,76	Nonacosano	15,64	2,95	---	---
39	26,76	Desconocido 8	---	---	---	18,52
40	27,31	Desconocido 9	---	1,06	---	---
41	28,08	Triacotano	---	1,17	---	---
42	29,36	Hentriacontano	7,88	2,31	---	---

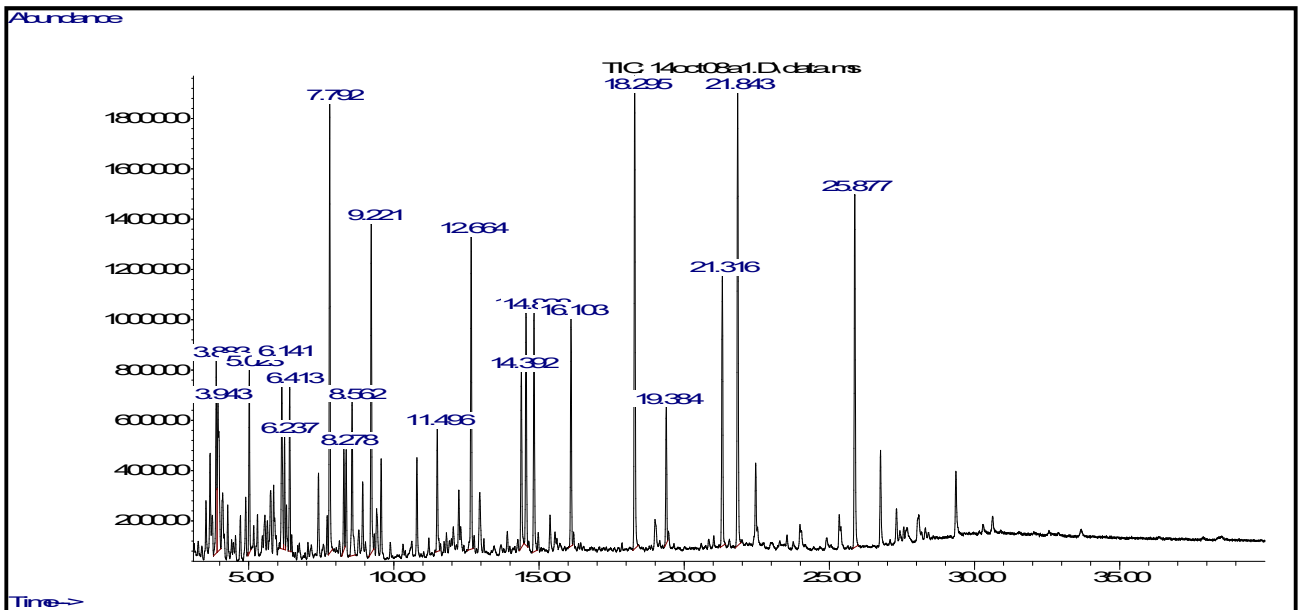


Figura 154. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-B1 de las semillas de *B. inversa*.

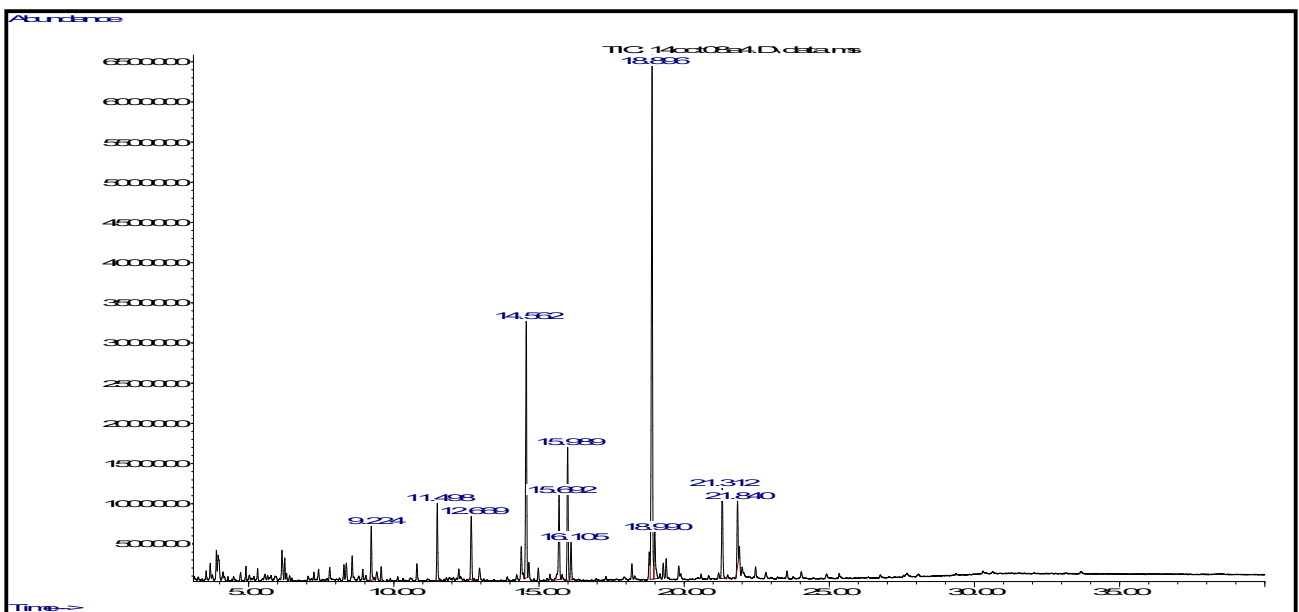
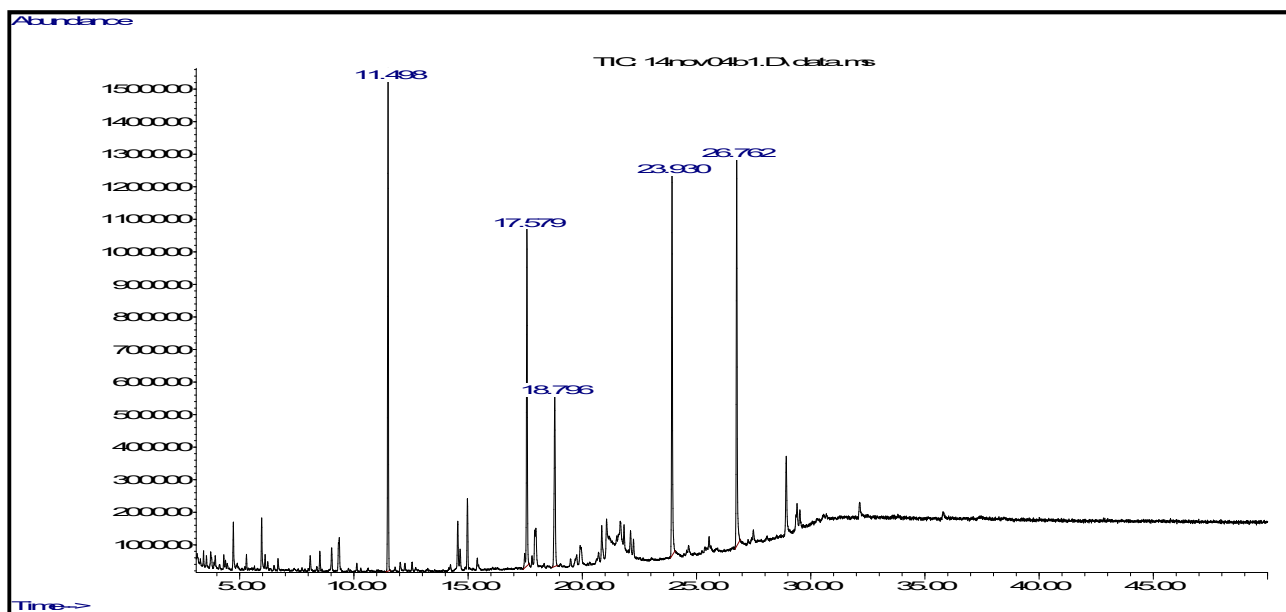


Figura 155. Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-BxA de las semillas de *B. inversa*.





**Figura 156.** Cromatograma de GC-MS de la fracción BiSH-D1 de las semillas de *B. inversa*.

*CAPÍTULO IV.*

*LAMIACEAE*

*Lepechinia bullata*

## I. INTRODUCCIÓN

### I.A. Usos etnobotánicos del género *Lepechinia*

Las especies del género *Lepechinia* son utilizadas por diversas poblaciones de Centro y Suramérica para el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente afecciones gastro-intestinales y como emenagogo (provocar la menstruación). Estas especies suelen utilizarse en la Medicina Tradicional en forma de decocciones o infusiones. En la tabla 25 se presentan las diferentes propiedades medicinales que se le atribuyen a las especies de este género.

**Tabla 25.** Usos etnobotánicos registrados para diversas especies del género *Lepechinia*

Especie	Usos / aplicaciones	Forma de utilización	Referencia
<i>L. caulescens</i>	Hipertensión, enfermedades renales, tratamiento de diarrea y vómito	Decocción de las hojas, semillas y/o partes aéreas	(Monroy-Ortíz y Castillo España, 2007)
	Infecciones gastro-intestinales intensas	Decocción preparada con las hojas	(Avila Acevedo <i>et al.</i> , 1993)
	Diabetes, hipertensión, infecciones gastrointestinales, dismenorrea y abortifaciente	Decocciones	(Perez-Hernandez <i>et al.</i> , 2008)
	Tratamiento de diarrea, vómito y dismenorrea	---	(Rodríguez-López <i>et al.</i> , 2003)
<i>L. schiedeana</i>	Dolor de estómago e infecciones de riñón	Decocción	(Ciccio <i>et al.</i> , 1999)
<i>L. hastata</i>	Infecciones uterinas	Decocción de las raíces	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1991, 1987)
<i>L. spicata</i> (sin. <i>L. caulescens</i> )	Tumores uterinos	---	(Graham <i>et al.</i> , 2000)
<i>L. caulescens</i> , <i>L. chamaedryoides</i> , <i>L. salviae</i> y <i>L. spicata</i>	Antidiabéticos, tumores uterinos y para provocar la menstruación (dismenorrea)	Decocciones y/o extractos calientes	(Parejo <i>et al.</i> , 2004)
<i>L. meyenii</i>	Tratar enfermedades respiratorias, tos e infecciones bacterianas	---	(Vila <i>et al.</i> , 2009)
	Tratamiento de tos, diarrea y antiespasmódico	---	(Rojas <i>et al.</i> , 2003)
<i>L. chamaedryoides</i>	Emenagogo y antiinflamatorio	Infusión	(Suazo F. <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. paniculata</i>	Tratamiento de dolores de cabeza	Los capullos son usados por aplicación directa	(Valarezo <i>et al.</i> , 2012)
	Afecciones del sistema nervioso	Infusiones de las flores	

### I.B. Fitoquímica reportada para las especies de *Lepechinia*

Hasta el momento, de las 42 especies aceptadas para el género *Lepechinia*, solo se han encontrados reportes fitoquímicos para 15 de dichas especies. Lo que significa que se desconoce la composición química de más de la mitad de las plantas que conforman de este género de las Lamiaceae. La mayoría de estos estudios fitoquímicos existentes son sobre los aceites esenciales de hojas, flores y/o partes aéreas de las especies de *Lepechinia*. Adicional a los reportes sobre los aceites esenciales se encuentra una variedad de investigaciones de extractos de diversa índole (MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona, éter de petróleo, etc.) obtenidos de especies de este género, entre los que se reportan compuestos como flavonoides, triterpenos, esteroides, derivados del ácido hidroxicinámico, sesquiterpenos, y sobre todo, diterpenos del tipo abietano.

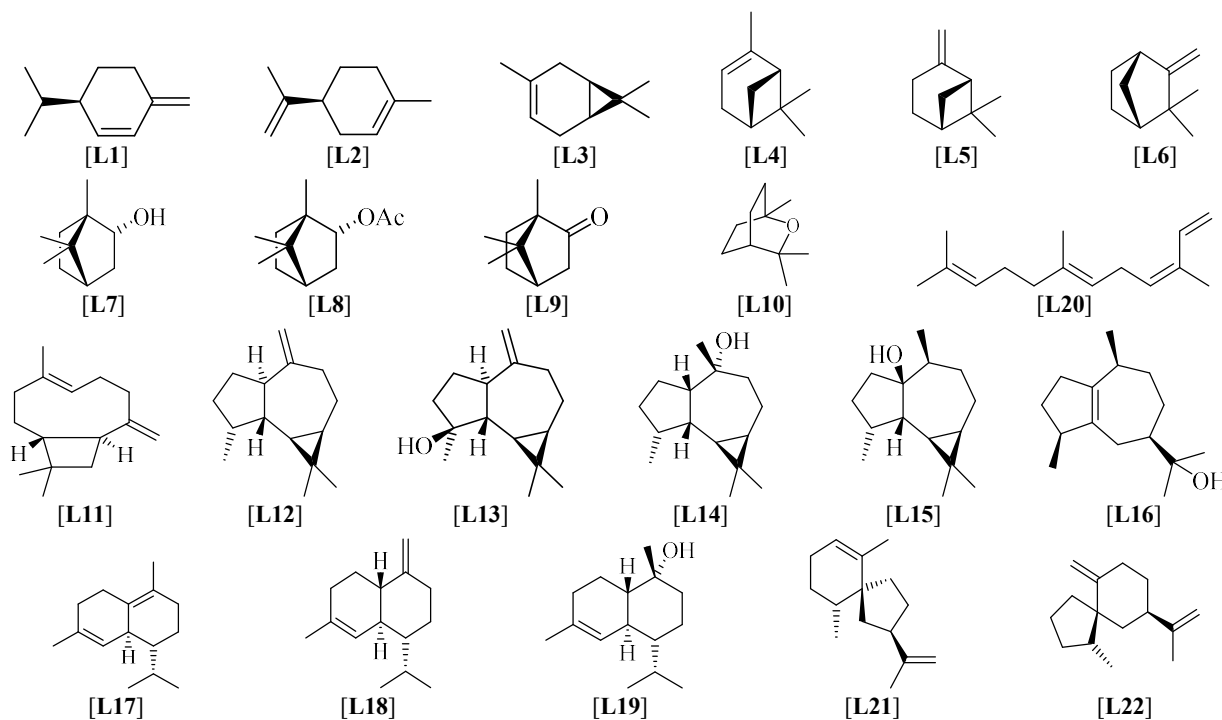
#### I.B.1. Aceites esenciales

Los estudios fitoquímicos sobre los aceites esenciales de las especies pertenecientes al género *Lepechinia*, muestran que estos están constituidos en su mayoría por monoterpenos y sesquiterpenos, algunos de ellos oxigenados. En algunas especies de *Lepechinia* se reporta un alto contenido de monoterpenos (hidrocarburos y oxigenados) y un porcentaje mucho menor de sesquiterpenos, un ejemplo de esto son los reportes existentes para el aceite esencial de las partes aéreas de *L. meyenii*, donde el porcentaje de monoterpenos encontrados va desde el 40 % (Arze *et al.*, 2009) hasta el 83.3 % (Vila *et al.*, 2009); también para *L. mutica* se encuentra que su aceite esencial contiene principalmente monoterpenos (72.3%) (Malagón *et al.*, 2003). Mientras que para otras especies, los metabolitos secundarios mayoritarios en los aceites esenciales son los sesquiterpenos, como en el caso de *L. conferta*, con un 57.5 % de sesquiterpenos en las flores y un 53.5 % en las hojas (Borges *et al.*, 2006); *L. graveolens* con un 61 % (Arze *et al.*, 2009) y *L. paniculata* con 52% (Valarezo *et al.*, 2012).

Entre los compuestos más reportados dentro de los aceites esenciales del género *Lepechinia* se encuentran los monoterpenos:  $\beta$ -felandreno [L1], limoneno [L2],  $\delta$ -3-careno [L3],  $\alpha$ -pineno [L4],  $\beta$ -pineno [L5], canfeno [L6], borneol [L7], bornil acetato [L8], alcanfor [L9] y 1,8-cineol [L10]; mientras que los sesquiterpenos más comunes en los aceites esenciales de *Lepechinia* son: *trans*- $\beta$ -cariofileno [L11], aromadendreno [L12], espatulenol [L13], ledol [L14], palustrol [L15], guaiol [L16],  $\delta$ -cadineno [L17],  $\gamma$ -cadineno [L18],  $\tau$ -cadinol [L19], (*Z,E*)- $\alpha$ -farneseno [L20] y (-)-premnaspirodieno [L21].

Para *L. bullata* se han reportado dos sesquiterpenos como principales componentes del aceite esencial de las hojas, el mayoritario es el (-)-premnaspirodieno [L21] que corresponde a

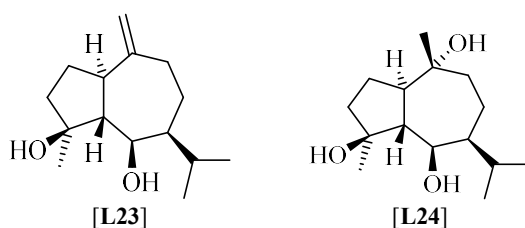
un 45% de la composición del aceite y un 20 % de (-)-espirolepechineno [L22], que es un espirosesquiterpeno (Eggers *et al.*, 1999).



**Figura 157.** Monoterpenos y sesquiterpenos hallados en los aceites esenciales del género *Lepechinia*.

### I.B.2. Terpenoides

En especies de *Lepechinia* se han aislados sesquiterpenos, ácidos triterpénicos, esteroides y principalmente diterpenoides del tipo abietano. Además de los sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) hallados en los aceites esenciales se ha reportado la presencia de espatulenol [L13] en el extracto de éter de petróleo de las partes aéreas de *L. chamaedryoides* colectada en la región de Chovellen (Chile) (Areche *et al.*, 2009) y en el extracto de hexano de las hojas de *L. caulescens* encontrada en Hidalgo (México) (Perez-Hernandez *et al.*, 2008). También se aislaron dos sesquiterpenos del tipo guaiano, tecladiol [L23] y teucatriol [L24], en el extracto de Et<sub>2</sub>O/MeOH/éter de petróleo de las partes aéreas de *L. urbaniana* colectada en República Dominicana (Ahmed *et al.*, 1996).



**Figura 158.** Sesquiterpenos aislados de los extractos de *Lepechinia urbaniana*.

I.B.2.1. **Diterpenoides**

La mayor parte de los terpenos reportados para el género *Lepechinia* corresponden a diterpenos (C<sub>20</sub>) del tipo abietano; entre las diversas especies estudiadas se han identificado un total de 25 esqueletos diterpénicos de este tipo. La especie en la que se ha aislado una mayor variedad de diterpenos es *L. chamedryoides*, donde Areche y colaboradores reportaron en el 2009 un total de 10 diterpenos del tipo abietano aislados del extracto de éter de petróleo de las partes aéreas de esta especie encontrada en Chile; estos diez compuestos fueron identificados como: 6,7-dehidroroyleanona [L25], royleanona [L26], taxoquinona [L27], horminona [L28], 7,20-epoxiroyleanona [L29], ferruginol [L30]; carnosol [L31]; deoxocarnosol [L32]; 7-oxo-11,12,14-trihidroxi-8,11,13-abietatrien-20-al [L33] y 6-oxo-7 $\alpha$ ,11,12-trihidroxi-8,11,13-abietatrien-20-al [L34] (Areche *et al.*, 2009).

En el caso de la especie *L. caulescens*, los estudios sobre su composición química llevados a cabo por Delgado y colaboradores, en 1992 y 1994, con especímenes recolectados en diferentes regiones de México (Veracruz, Michoacán y Durango) y extraídos con acetona permitieron la identificación de 4 diterpenos en esta especie: ácido dehidroabiético [L35], ácido 7 $\alpha$ -hidroxidehidroabiético [L36], ácido 8 $\alpha$ (9 $\alpha$ ),13 $\alpha$ (14 $\alpha$ )-diepoxiabietan-18-oico [L37], ácido 9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -endoperoxi-7 $\beta$ -hidroxiabieta-8(14)-en-18-oico [L38] (Delgado *et al.*, 1994, 1992). Por su parte Pérez-Hernández y colaboradores, en el 2008, identificaron los diterpenos ácido dehidroabiético [L35], alcohol 9 $\alpha$ -hidroxidehidroabietílico [L39] y éster metílico del ácido 9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -epidioxiabiet-8(14)-en-18-oico [L40], en los extractos de hexano y de acetato de etilo de las hojas de esta especie encontrada en Hidalgo (México) (Perez-Hernandez *et al.*, 2008).

Para el extracto etanólico de la especie *L. meyenii* colectada en Perú, se han identificado 6 diterpenoides con esqueleto del abietano en el extracto de acetona, pisiferol [L41], rosmanol [L42], ácido carnósico [L43], salvicanol [L44], isosalvicanol [L45], éster metílico del ácido 12-formil-11-hidroxi-8,11,13,abietatrien-2-oico [L46] (Bruno *et al.*, 1991). El carnosol [L31] también ha sido aislado de esta especie (Castillo y Lock, 2005).

Para la especie peruana *L. hastata* se aisló la presencia de ácido carnósico [L43] en el extracto de acetona de las partes aéreas (Bruno *et al.*, 1991), mientras que en especímenes mexicanos se encontró carnosol [L31] en las partes aéreas extraídas con cloroformo (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1991), y una concentración mayor de este compuesto en la extracción realizada con éter de petróleo (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1998a).



En la especie *L. bullata* colectada en Colombia y analizada por Jonathan y colaboradores en 1989, se aislaron los diterpenos 6,7-dehidroroyleanona [L25], horminona [L28] y 7-O-metilhorminona [L47] en el extracto metanólico de las partes aéreas (Jonathan *et al.*, 1989); por otra parte el estudio de la composición química sobre esta misma especie colectada en Mérida (Venezuela) mostró la presencia de carnosol [L31] en el extracto de hexano de las hojas de la mencionada especie (Pérez-Colmenares *et al.*, 2014).

La extracción con Et<sub>2</sub>O/MeOH/éter de petróleo de las partes aéreas de la especie encontrada en República Dominicana, *L. urbaniana*, permitió aislar los diterpenos carnosol [L31], 6β-hidroxycarnosol [L48], rosmanol [L42], 7-O-metilrosmanol [L49] y 7-O-etilrosmanol [L50] (Ahmed *et al.*, 1995).

En *L. graveolens* (sin. *L. vesiculosa*) se identificaron el carnosol [L31], el rosmanol [L42] y el éster metílico del ácido carnósico [L51] en el extracto metanólico de dicha planta colecta en la región de Cochabamaba (Bolivia) (Parejo *et al.*, 2004).

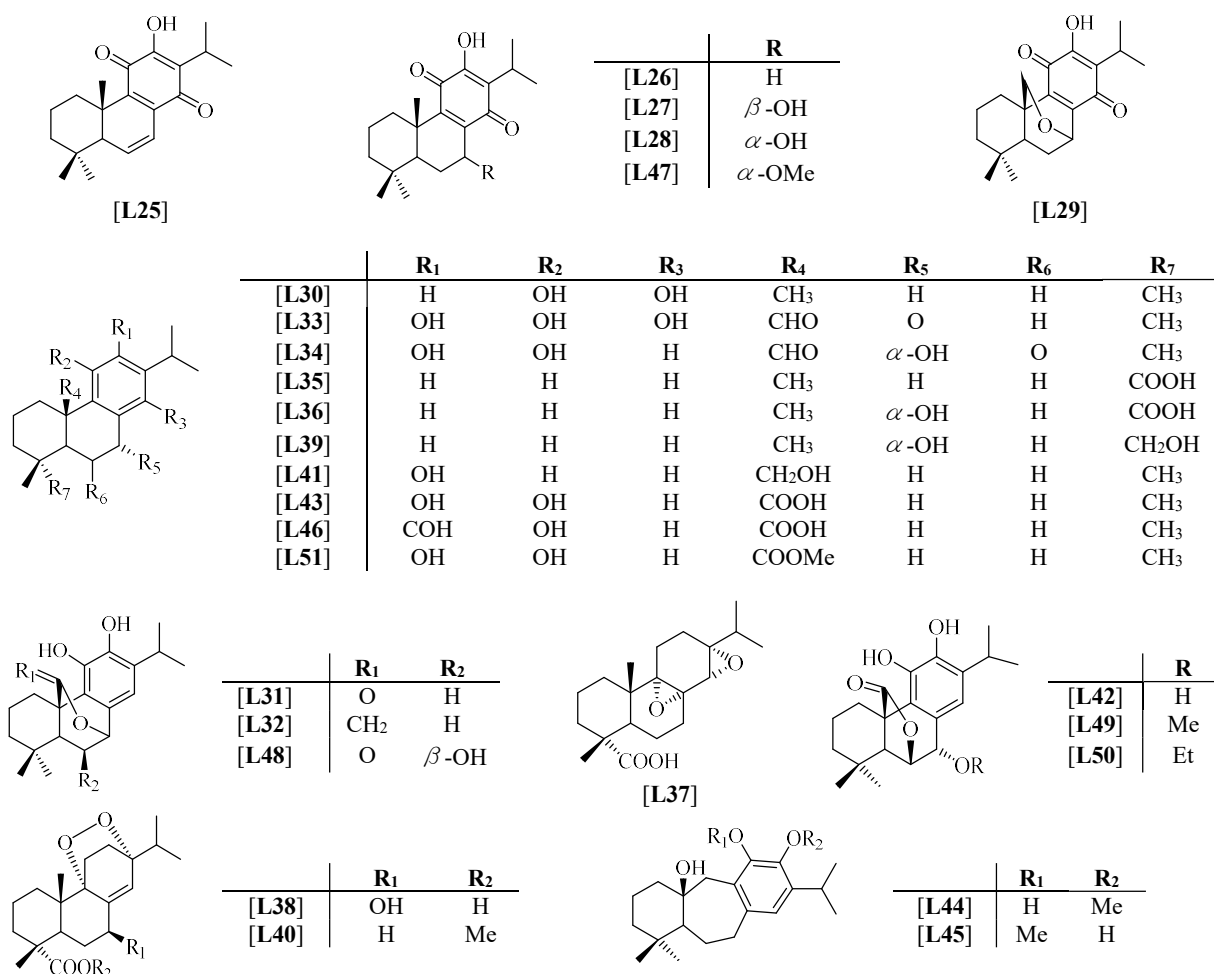


Figura 159. Diterpenoides aislados del género *Lepechinia*.

### I.B.2.2. Triterpenoides y esteroides

Además de los sesquiterpenos y diterpenos ya mencionado, los estudios sobre la composición química del género *Lepechinia* también indican que en estas especies también se pueden hallar triterpenos, principalmente derivados de los ácidos ursólico y oleanólico. El primer estudio encontrado en el que se aislaron terpenos es el realizado por Silva en 1968, en el cual se obtuvieron dos ácidos triterpenos, el ácido ursólico [L52] y el ácido betulínico [L53] del extracto de éter de petróleo de *L. chamaedryoides* colectada en Concepción (Chile) (Silva, 1968).

Los trabajos de Delgado y colaboradores, en 1992 y 1994, muestran la presencia de seis ácidos triterpénicos y de dos esteroides en los extractos de acetona de las hojas y tallos de *L. caulescens* (colectada en México en las poblaciones de Veracruz, Michoacán y Durango); estos compuestos fueron identificados como: ácido ursólico [L52], ácido betulínico [L53], ácido oleanólico [L54], ácido 2 $\alpha$ -hidroxioleanólico [L55], ácido 2 $\alpha$ -hidroxiursólico [L56], ácido euscáfico [L57], estigmasterol [L58] y 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosilsterol [L59] (Delgado *et al.*, 1994, 1992). En 2006, Aguirre-Crespo y colaboradores reportan nuevamente la presencia del ácido ursólico [L52], pero esta vez en el extracto metanólico de las partes aéreas de un espécimen de *L. caulescens* ubicado en Morelos (México) (Aguirre-Crespo *et al.*, 2006).

Las otras dos especies de *Lepechinia* en donde se ha aislado el ácido ursólico [L52] son la especie *L. meyenii*, en el extracto etanólico (Castillo y Lock, 2005), y el extracto de acetona obtenido de las hojas de *L. bullata* (Pérez-Colmenares *et al.*, 2014).

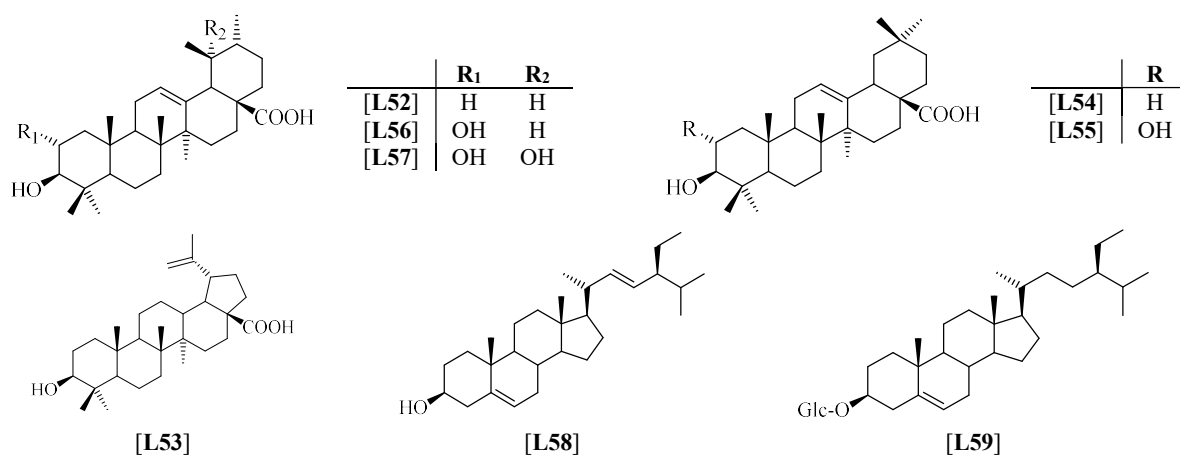


Figura 160. Triterpenoides y esteroides identificados en especies de *Lepechinia*.

## I.B.3. Flavonoides y derivados fenólicos

Además de los terpenos, en las especies del género *Lepechinia* también han sido aislados flavonoides, glicósidos de flavonoides y otros compuestos fenólicos tales como derivados del ácido hidroxicinámico y del ácido caféico, entre otros. *L. caulescens* es una de las especies de *Lepechinia* en la que se han reportado flavonoides, en este caso en el extracto de acetona de las hojas y tallos colectados en Veracruz (México); entre los flavonoides aislados se encuentran la salvigenina [L60] y la cirsimarina [L61] (Delgado *et al.*, 1992).

Para *L. urbaniana*, una especie *Lepechinia* encontrada en República Dominicana, se han identificado dos flavonoides en el extracto de Et<sub>2</sub>O/MeOH/éter de petróleo de las partes aéreas, esto son la artemetina [L62] y la santina [L63] (Ahmed *et al.*, 1996).

En el caso de especies de *Lepechinia* encontradas en Suramérica, se tiene que para el extracto etanólico de *L. meyenii* colectada en Perú se aisló la diosmetina [L64] (Castillo y Lock, 2005); mientras que en las partes aéreas de la especie ubicada en Chovellen (Chile), *L. chamaedryoides*, se identificaron la pinocembrina [L65] y la 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona [L66] en el extracto de éter de petróleo (Areche *et al.*, 2009).

También se han aislados varios flavonoides glicosidados en el extracto metanólico de la especie *L. graveolens* (sin. *L. vesiculosa*) colectada en Bolivia, 7-*O*-glucoronopiranosil-luteolina [L67], 7-*O*-rutinil-luteolina [L68], 7-*O*-rutinileriodictiol [L69], 7-*O*-rutinilepicatequina [L70] y 7-*O*-rutinil-apigenina [L71] (Parejo *et al.*, 2004).

Aparte de los flavonoides, se han identificado varios compuestos fenólicos en este género como son los reportados para el extracto etanólico de *L. meyenii* encontrada en Perú: ácido caféico [L72], ácido 2-hidroxicaféico [L73], éster metílico del ácido 2-hidroxicaféico [L74] y éster etílico del ácido 2-hidroxicaféico [L75] (Castillo y Lock, 2005). Así como los compuestos aislados en el extracto metanólico de *L. graveolens*: ácido siríngico [L76], ácido clorogénico [L77], ácido 4-cafeoilquínico [L78], ácido neoclorogénico [L79], ácido rosmarínico [L80], éster metílico del ácido rosmarínico [L81], glicósidos del ácido caféico y del ácido ferúlico [L82] y derivados trihidroxilados del ácido cinámico (Parejo *et al.*, 2004). También se ha reportado la presencia de verbascósido [L83] en *L. speciosa* (Martins *et al.*, 2009) y de ácido rosmarínico [L80] en los extractos de acetato de etilo y de MeOH de las hojas de *L. caulescens* (Perez-Hernandez *et al.*, 2008).

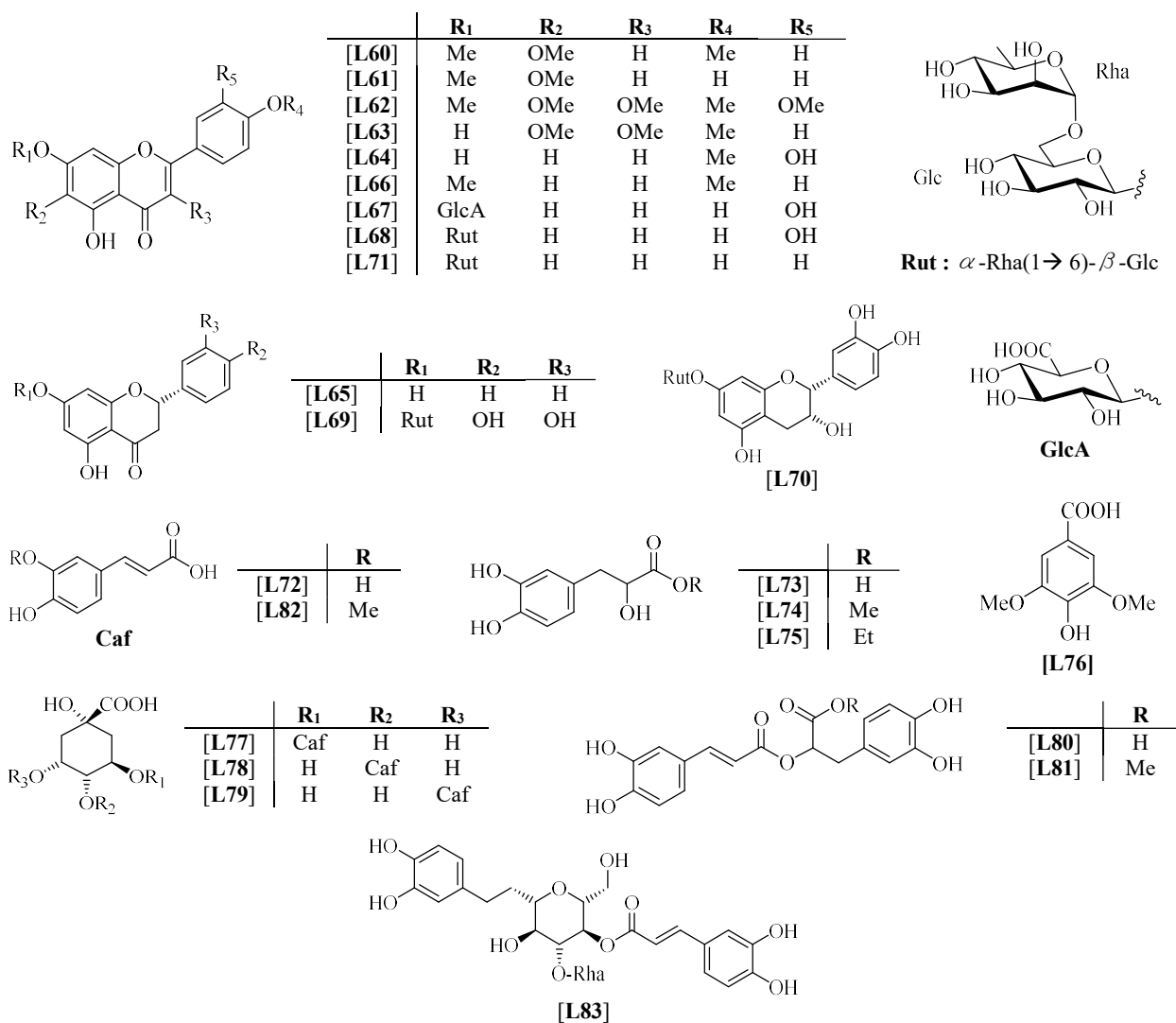


Figura 161. Flavonoides y compuestos fenólicos del género *Lepechinia*.

**Tabla 26.** Resumen de los antecedentes fitoquímicos para el género *Lepechinia*

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
1968	<i>L. chamaedryoides</i>	Extracto de éter de petróleo	Triterpenos	(Silva, 1968)
1979	<i>L. calycina</i>	Aceite esencial	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Lawrence y Morton, 1979)
1989	<i>L. bullata</i>	Partes aéreas. Extracto MeOH	Quinonas diterpénicas	(Jonathan <i>et al.</i> , 1989)
1991	<i>L. hastata</i>	Partes aéreas. Extracto acetona	Diterpeno del tipo abietano	(Bruno <i>et al.</i> , 1991)
		Partes aéreas. Extracto CHCl <sub>3</sub>	Diterpeno del tipo abietano	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1991)
	<i>L. meyeri</i>	Partes aéreas. Extracto acetona	Diterpenos del tipo abietano	(Bruno <i>et al.</i> , 1991)
	<i>L. urbanii</i>	Aceite esencial de las hojas	Se identificaron 59 compuestos. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Zanoni y Adams, 1991)
1992	<i>L. caulescens</i>	Hojas y tallos. Extracto acetona	Flavonoides, triterpenos, diterpenos tipo abietano	(Delgado <i>et al.</i> , 1992)
	<i>L. chamaedryoides</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Se identificaron 65 compuestos. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Valenzuela <i>et al.</i> , 1992)
1994	<i>L. caulescens</i>	Hojas y tallos. Extracto acetona	Diterpenos tipo abietano, triterpenos, esteroides y saponinas esteroidales	(Delgado <i>et al.</i> , 1994)
	<i>L. floribunda</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Se identificaron 37 compuestos. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 1994)
1995	<i>L. urbaniana</i>	Partes aéreas. Extracto Et <sub>2</sub> O/MeOH/éter de petróleo	Diterpenos del tipo abietano	(Ahmed <i>et al.</i> , 1995)
1996	<i>L. urbaniana</i>	Partes aéreas. Extracto Et <sub>2</sub> O/MeOH/éter de petróleo	Sesquiterpenos y flavonoides	(Ahmed <i>et al.</i> , 1996)
1998	<i>L. hastata</i>	Partes aéreas. Extracto éter de petróleo	Diterpeno del tipo abietano	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1998a)
1999	<i>L. bullata</i>	Aceite esencial de las hojas	Sesquiterpenos	(Eggers <i>et al.</i> , 1999)
	<i>L. schiedeana</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	51 compuestos identificados. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Ciccio <i>et al.</i> , 1999)
		Aceite esencial Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenoides y fitoesteroles	(Stashenko <i>et al.</i> , 1999)
2001	<i>L. salviaefolia</i>	Aceite esencial de las hojas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Eggers <i>et al.</i> , 2001)
2002	<i>L. schiedeana</i>	Aceite esencial	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Puertas-Mejía <i>et al.</i> , 2002)
2003	<i>L. mutica</i>	Aceite esencial de las hojas	Principalmente monoterpenos y en un menor porcentaje sesquiterpenos	(Malagón <i>et al.</i> , 2003)
2004	<i>L. graveolens</i>	Extracto MeOH	Flavonoides glicosidados, diterpenos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico,	(Parejo <i>et al.</i> , 2004)
	<i>L. schiedeana</i>	Aceite esencial de las hojas	30 compuestos identificados. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Rojas <i>et al.</i> , 2004)
2005	<i>L. caulescens</i>	Aceite esencial de hojas e inflorescencias	16 compuestos identificados. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Avila Acevedo <i>et al.</i> , 2005)
	<i>L. meyerii</i>	Planta entera Extracto etanólico	Derivados del ácido caféico, diterpenos del tipo abietano, triterpenos y flavonoides	(Castillo y Lock, 2005)
2006	<i>L. caulescens</i>	Partes aéreas. Extracto MeOH	Triterpenos	(Aguirre-Crespo <i>et al.</i> , 2006)

**Tabla 26.** ...continuación...

Año	Especie	Análisis	Tipo de Compuestos	Referencia
2006	<i>L. conferta</i>	Aceite esencial de flores	46 compuestos identificados. Principalmente sesquiterpenos, en menor porcentaje monoterpenos	(Borges <i>et al.</i> , 2006)
		Aceite esencial de hojas	42 compuestos identificados. Principalmente sesquiterpenos y un porcentaje menor de monoterpenos	(Borges <i>et al.</i> , 2006)
2008	<i>L. caulescens</i>	Hojas. Extractos de hexano y AcOEt	Sesquiterpenos, diterpenos del tipo abietano y ácido rosmarínico	(Perez-Hernandez <i>et al.</i> , 2008)
2009	<i>L. chamaedryoides</i>	Partes aéreas. Extracto de éter de petróleo	Diterpenos del tipo abietano, sesquiterpeno y flavonoides	(Areche <i>et al.</i> , 2009)
	<i>L. floribunda</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Principalmente sesquiterpenos y un porcentaje menor de monoterpenos	(Arze <i>et al.</i> , 2009)
	<i>L. graveolens</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Principalmente sesquiterpenos	(Arze <i>et al.</i> , 2009)
	<i>L. meyenii</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Principalmente monoterpenos y un porcentaje menor de sesquiterpenos	(Arze <i>et al.</i> , 2009)
		Aceite esencial hojas y tallos	63 compuestos identificados, alto contenido de monoterpenos	(Vila <i>et al.</i> , 2009)
<i>L. speciosa</i>	----	Derivados del ácido caféico	(Martins <i>et al.</i> , 2009)	
2010	<i>L. meyenii</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	Monoterpenos y sesquiterpenos	(Collin <i>et al.</i> , 2010)
2012	<i>L. paniculata</i>	Aceite esencial de las partes aéreas	34 compuestos identificados. Principalmente sesquiterpenos, en menor proporción monoterpenos	(Valarezo <i>et al.</i> , 2012)
2014	<i>L. bullata</i>	Hojas. Extractos de hexano y acetona	Diterpenos tipo abietano, triterpenos	(Pérez-Colmenares <i>et al.</i> , 2014)
2016	<i>L. salviiifolia</i>	Aceite esencial	22 compuestos identificados. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Brand <i>et al.</i> , 2016)
	<i>L. vulcanicola</i>	Aceite esencial	55 compuestos identificados. Monoterpenos y sesquiterpenos	(Brand <i>et al.</i> , 2016)



### I.C. Actividad biológica de las especies de *Lepechinia*

Para algunas especies del género *Lepechinia* se han realizado estudios para determinar su actividad biológica y confirmar o descartar las propiedades atribuidas por la Medicina Tradicional a dichas especies. En la tabla 27 se describen varias de las actividades comprobadas.

Entre las actividades biológicas más comunes que se reportan para los aceites esenciales y los extractos de las diferentes estructuras morfológicas de las especies pertenecientes a este género se encuentran la antibacteriana, antimicrobiana, antioxidante y antiviral. En algunos casos las propiedades observadas para las diversas especies de *Lepechinia* han podido ser atribuidas a algunos de los compuestos aislados en los extractos y/o aceites esenciales analizados.

**Tabla 27.** Actividad biológica del género *Lepechinia*

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Antibacteriana	<i>L. bullata</i>	El carnosol [L31] y el ácido ursólico [L52] aislados presentaron actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> a un MIC de 10 µg/mL. El ácido ursólico mostró además actividad contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> con una MIC de 10 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente.	(Pérez-Colmenares <i>et al.</i> , 2014)
	<i>L. caulescens</i>	El extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> mostró una actividad inhibitoria significativa frente a <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(Estrada-Soto <i>et al.</i> , 2007)
	<i>L. meyenii</i>	Se registró actividad del extracto de MeOH de las partes aéreas contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(Rojas <i>et al.</i> , 2003)
Anticancerosa	<i>L. bullata</i>	El extracto metanólico y los diterpenos 6,7-dehidroroyleanona [L25], horminona [L28] y 7-O-metilhorminona [L47] presentaron actividad contra las células P-388 (leucemia en roedores murinos).	(Jonathan <i>et al.</i> , 1989)
	<i>L. chamaedryoides</i>	Los terpenoides aislados (L13, L26, L28, L29 y L33) probaron ser citotóxicos contra las células cancerosas MRC-5 (fibroblastos pulmonares) y AGS (adenocarcinoma gástrico) con valores de IC <sub>50</sub> en el rango de 11-67 µM.	(Areche <i>et al.</i> , 2009)
Antimicótica	<i>L. schiedeana</i>	El aceite de las hojas presenta una inhibición significativa ante <i>Candida albicans</i> .	(Rojas <i>et al.</i> , 2004)
Antimicrobiana	<i>L. caulescens</i>	El aceite esencial de hojas e inflorescencias presenta actividad <i>in vitro</i> contra algunas cepas de <i>Vibrio cholerae</i> con un MIC 4 µL/mL y un MBC de 6 µL/mL.	(Avila Acevedo <i>et al.</i> , 2005)
	<i>L. hastata</i>	Los extractos de éter de petróleo, etanol y cloroformo mostraron actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> . La actividad en el extracto de cloroformo es debida probablemente al carnosol [L31].	(Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 1998a, 1991)

**Tabla 27.** Continuación...

Propiedad	Especie	Resultados	Referencia
Antioxidante	<i>L. graveolens</i>	El extracto acuoso de esta especie exhibió una buena actividad antioxidante debida probablemente a la presencia ácido rosmarínico [L80] y su éster metílico [L81], flavonoides y diterpenos fenólicos.	(Parejo <i>et al.</i> , 2004)
	<i>L. meyenii</i>	EL método de DPPH mostró que los compuestos aislados del extracto etanólico (derivados del ácido caféico y diterpenos) poseen una alta capacidad antioxidante.	(Castillo y Lock, 2005)
Antiviral	<i>L. salviifolia</i>	El aceite esencial de la planta es moderadamente activo ( $IC_{50} = 231,7 \pm 18,1 \mu\text{g/mL}$ ) contra los virus de herpes humano HHV-1 y HHV-2. También muestra actividad inhibitoria en etapas tempranas de la infección $EC_{50} = 68,8 \pm 3,36 \mu\text{g/mL}$ (HHV-1) y $81,91 \pm 2,82 \mu\text{g/mL}$ (HHV-2)).	(Brand <i>et al.</i> , 2016)
	<i>L. speciosa</i>	La especie presenta actividad <i>in vitro</i> contra los virus de herpes HSV-1 y HSV-2, el compuesto responsable de esta actividad es el verbacósido [L83].	(Martins <i>et al.</i> , 2009)
Espasmolítico	<i>L. caulescens</i>	Los terpenos aislados (L13, L35, L36 y L39) del extracto de hexano demostraron ser potentes agentes espasmolíticos al relajar de forma significativa la contracción inducida por KCl (60 nM) en anillos obtenidos úteros de ratas. Los extractos de AcOEt y MeOH solo muestran una ligera actividad relajante debida al ácido rosmarínico [L80].	(Perez-Hernandez <i>et al.</i> , 2008)
Gastroprotección	<i>L. chamaedryoides</i>	Los diterpenos aislados (L25-L29, L31 y L33) muestran un efecto gastroprotectivo en lesiones gástricas inducidas en ratones entre el 35.8 % y el 70.8 %. El carnosol [L31] muestra un efecto mayor que el producido por lansoprazol (control).	(Areche <i>et al.</i> , 2009)
Hipoglicémico	<i>L. caulescens</i>	El estudio de la actividad hipoglicemica en conejos, muestra un efecto similar a la tolbutamida (control) en conejos con hiperglicemia temporal y con diabetes moderada. La prueba de varios extractos, (hexano, diclorometano, metanol y agua) muestra que solo el extracto acuoso reduce significativamente la glucosa en sangre.	(Román-Ramos <i>et al.</i> , 2001, 1992, 1991)
Insecticida	<i>L. chamaedryoides</i>	El aceite esencial de las hojas en concentraciones superiores a 0,727 % v/v presenta actividad insecticida en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> en condiciones de laboratorio	(Suazo F. <i>et al.</i> , 2012)
Vasodilatación	<i>L. caulescens</i>	El extracto metanólico de las partes aéreas produce un efecto vasodilatador significativo ( $IC_{50} = 4,10 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ y $E_{\text{max}} = 90,17 \pm 4,68 \%$ ) dependiente de la concentración y del endotelio en anillos hechos con aortas de ratas Wistar. Uno de los metabolitos responsables de la actividad es el ácido ursólico [L52]	(Aguirre-Crespo <i>et al.</i> , 2006, 2005)

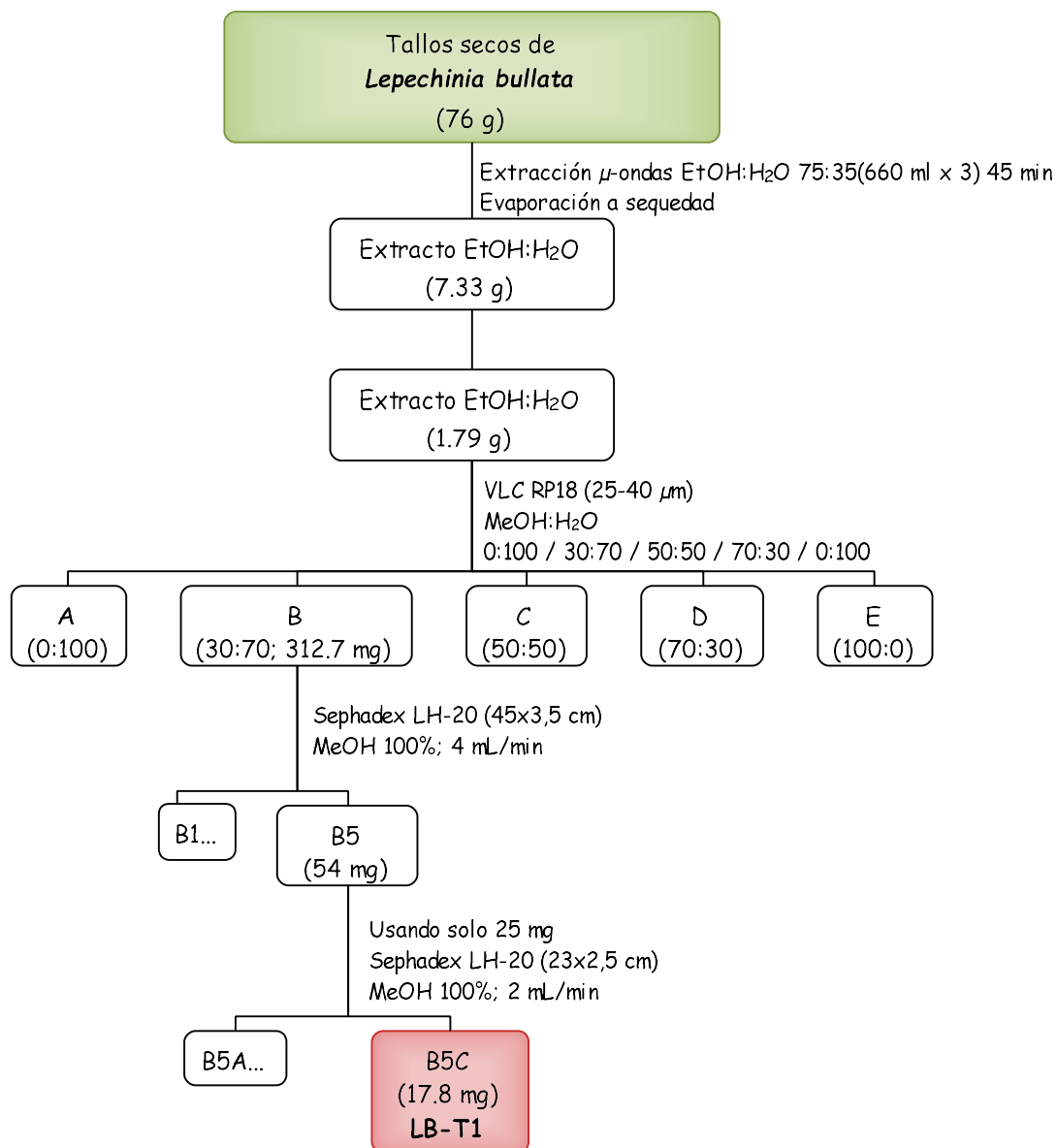
## II. PARTE EXPERIMENTAL

### II.A. Recolección y confirmación de la determinación botánica

Los tallos de *Lepechinia bullata* utilizados para el estudio fueron suministrados por la Dra. Alida Pérez, profesora de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela). La planta fue recolectada en Enero de 2008, en el Páramo de la Culata por encima de los 2500 msnm, a pocos kilómetros de la ciudad de Mérida-Venezuela. La especie fue determinada como *Lepechinia bullata* por el Ing. For. Juan Carmona del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela). Una muestra testigo fue depositada en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, voucher N° LR002.

### II.B. Tratamiento del material vegetal

76 g de tallos secos de *Lepechinia bullata* fueron extraídos tres veces consecutivas con un extractor por microondas con una mezcla de etanol-agua 75:35 (660 mL x ciclo de 45 min). Los extractos obtenidos en cada ciclo fueron reunidos y concentrados al vacío a una temperatura de 50 °C, obteniéndose un extracto bruto con una masa de 7,33 g. Posteriormente, 1,79 g de este extracto fueron sometidos a VLC en fase reversa [RP-18; MeOH/H<sub>2</sub>O (0:100; 30:70; 50:50; 70:30; 100:0)], obteniéndose una fracción de interés (B), la cual fue fraccionada varias veces más mediante las técnicas de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20; MeOH) para obtener el producto puro **LB-T1** (17,8 mg).



**Esquema 7.** Aislamiento y purificación de los componentes de los tallos de *Lepechinia bullata*.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

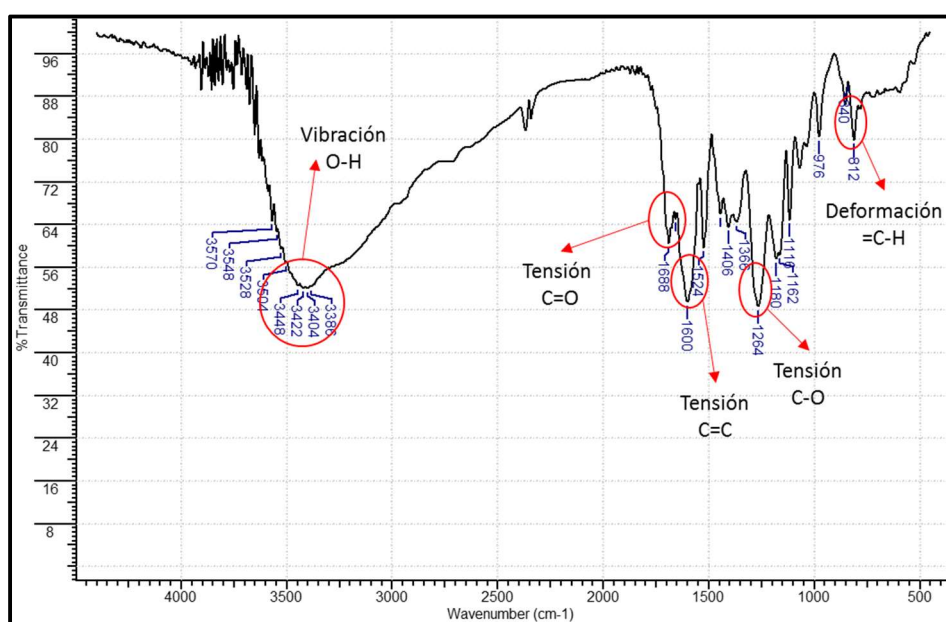
#### III.A. Compuesto LB-T1: **Ácido rosmarínico**

De la fracción B5 obtenida luego de diversos fraccionamientos realizados al extracto de EtOH/H<sub>2</sub>O de los tallos de *Lepechinia bullata* se obtuvieron 17,8 mg de un sólido color crema con un punto de fusión de 171° C.

El espectro IR del compuesto (figura 162) muestra bandas de tensión O-H a 3.442 cm<sup>-1</sup> correspondientes a hidroxilos fenólicos, así como bandas de tensión del grupo carbonilo C=O a 1.688 cm<sup>-1</sup>. También se pueden observar bandas de tensiones de carbonos sp<sup>2</sup> C=C a 1.600 cm<sup>-1</sup>, bandas de vibraciones de tensión C-O a 1.264 cm<sup>-1</sup> y bandas de deformación =C-H fuera del plano a 812 cm<sup>-1</sup>.

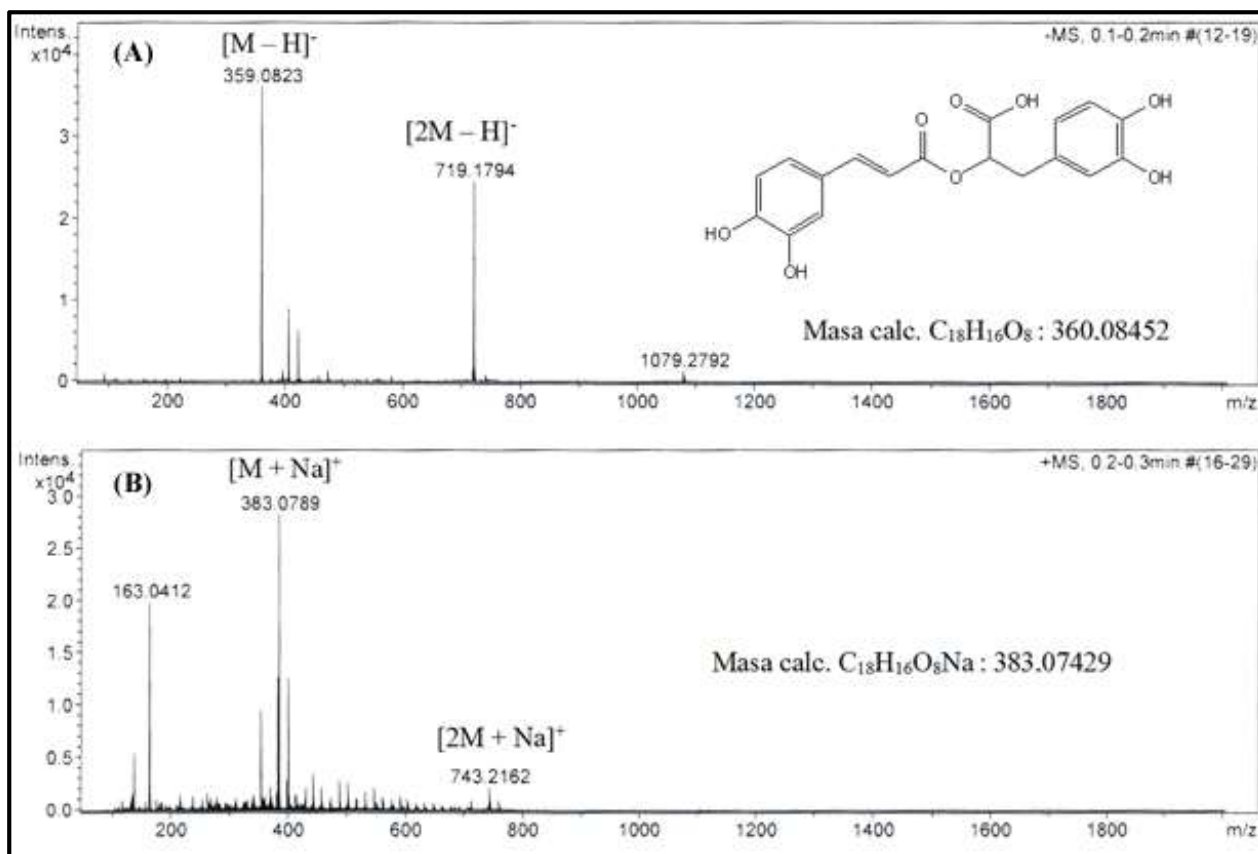
**Tabla 28.** Bandas de absorción significativas en el IR (KBr) de del compuesto **LB-T1**.

N <sub>max</sub> (cm <sup>-1</sup> )	3.442	1.688	1.600	1.264	812
Bandas	t O-H	t C=O	t C=C	t C-O	dfp =C-H



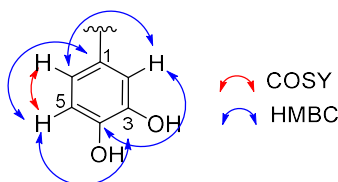
**Figura 162.** Espectro IR (KBr) del compuesto **LB-T1**.

El espectro de masas de alta resolución en modo negativo (figura 163a) del compuesto **LB-T1** muestra un ion molecular de 359,0823 m/z ([M – H]<sup>-</sup>), consistente con la fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> (calc. 360,08452), además se observa un fragmento a 719,1794 m/z ([2M – H]<sup>-</sup>). El ion molecular del HR-ESI en modo positivo (figura 163b) con un valor de 383,0789 m/z ([M + Na]<sup>+</sup>) y el fragmento a 743,2162 m/z ([2M + Na]<sup>+</sup>) indican una masa molecular de 360 y confirma el resultado del modo negativo.



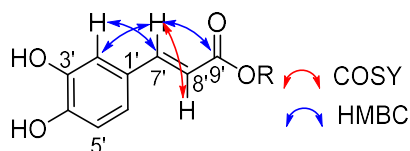
**Figura 163.** Espectros HR-ESI-MS del compuesto **LB-T1**. A) ESI-MS  $< 0$ , b) ESI-MS  $> 0$ .

Los espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 166) y  $^1\text{H}$  (figura 165) del compuesto **LB-T1** muestran la presencia de carbonos e hidrógenos aromáticos así como la presencia de carbonos aromáticos oxigenados. Una vez establecida la correlación entre los hidrógenos y sus carbonos con el experimento HSQC (figura 167), se utilizaron los espectros de HMBC (figura 168) y COSY (figura 169) con los que se pudieron ensamblar dos subunidades de anillos aromáticos mediante las correlaciones observadas:

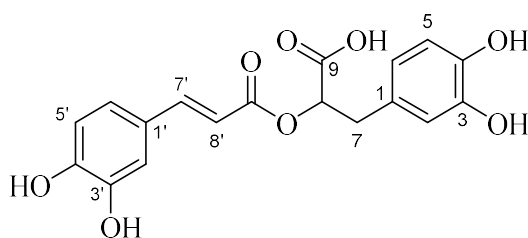


Una vez armadas las dos subunidades, se encontró que el hidrógeno H-2' a  $\delta_{\text{H}}$  7,40 ( $\delta_{\text{C}}$  115,4) se correlacionaba en el HMBC con el carbono olefínico a  $\delta_{\text{C}}$  145,2 (C-7') y que el hidrógeno correspondiente a ese carbono, es decir, H-7' [ $\delta_{\text{H}}$  7,79 (doblete,  $J = 15$  Hz)] tenía correlación en HMBC con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  115,4 (C-2') y 167,5 (C-9'). Estas correlaciones junto la observada en el espectro COSY para los hidrógenos a  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$  7,79 / 6,53 (H-7' / H-8') permitieron ensamblar una de las subunidades aromáticas, de la siguiente manera:





Para terminar de ensamblar la molécula se recurrió a la bibliografía (Claire *et al.*, 2005; Dapkevicius *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2012), donde la comparación de los valores de punto de fusión y la data espectroscópica de los espectros de RMN e IR permitió identificar el compuesto como el **ácido rosmarínico** (figura 164).



**Figura 164.** Estructura del compuesto **LB-T1**: ácido rosmarínico.

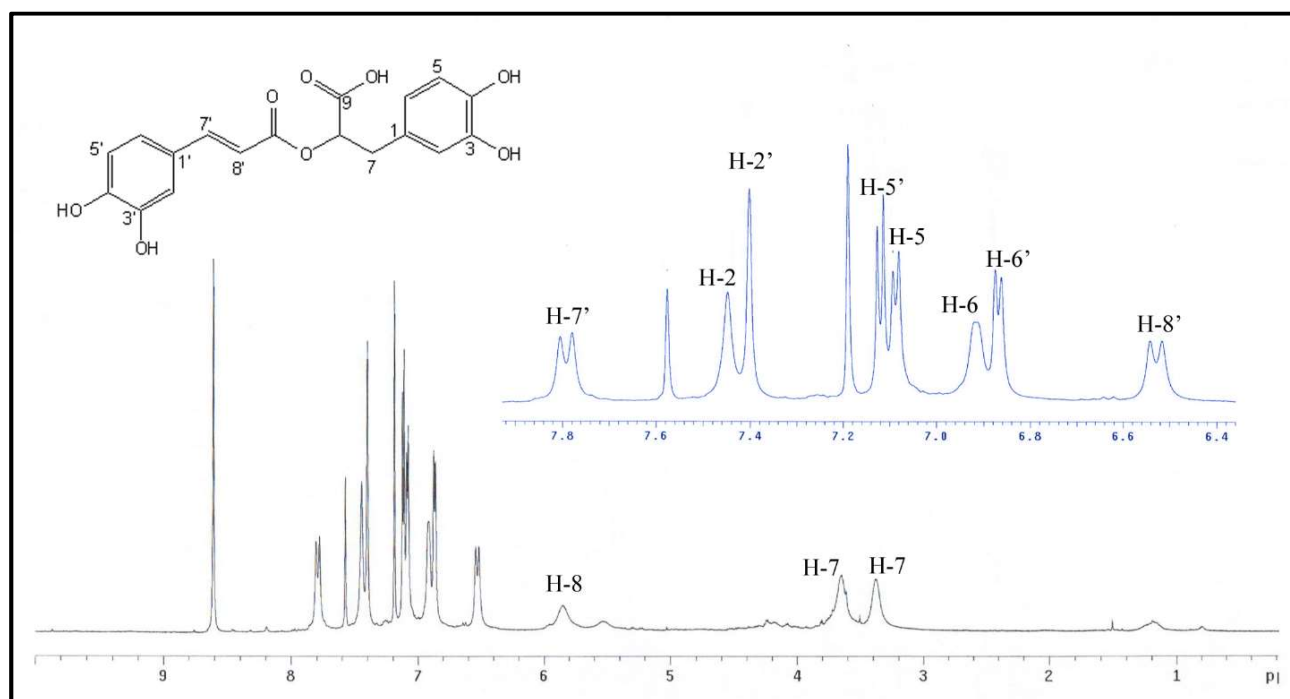
Estudios sobre las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del ácido rosmarínico demuestran que este compuesto exhibe importantes actividades biológicas como lo son antioxidante, anti-carcinogénica, antiviral, antialérgica, antibacteriana, antiinflamatoria y antidepresiva entre otras (Al-dhabi *et al.*, 2014; Bhatt *et al.*, 2013; Iswandana *et al.*, 2016; Parejo *et al.*, 2004; Perez-Hernandez *et al.*, 2008; Usha *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014).

Aunque el ácido rosmarínico es un compuesto bastante conocido y estudiado y ha sido aislado en otras especies de *Lepechinia*, como lo son *L. graveolens* (Parejo *et al.*, 2004) y *L. caulescens* (Perez-Hernandez *et al.*, 2008) esta es la primera vez que se reporta su presencia en la especie *Lepechinia bullata*.

**Tabla 29.** Valores de los desplazamientos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y <sup>13</sup>C (150 MHz) del compuesto **LB-T1** en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

Pos.	$\Delta_c$ (ppm)	Tipo	$\delta_H$ (ppm) [J <sub>H-H</sub> ]
1	130,6	=C<	-----
2	117,5	=CH-	7,45
3	146,2	=COH-	-----
4	144,9	=COH-	-----
5	116,0	=CH-	7,09 <i>d</i> (7,8)
6	120,6	=CH-	6,92
7	38,1	-CH <sub>2</sub> -	3,37 / 3,62
8	n.d.	>CH-	5,83
9	n.d.	-COOH	-----
1'	126,7	=C<	-----
2'	115,4	=CH-	7,40
3'	146,8	=COH-	-----
4'	148,0	=COH-	-----
5'	116,2	=CH-	7,12 <i>d</i> (8,4)
6'	121,6	=CH-	6,87 <i>d</i> (7,8)
7'	145,2	=CH-	7,79 <i>d</i> (15)
8'	115,5	=CH-	6,53 <i>d</i> (15,6)
9'	167,5	-COOR	-----

\**d* = doblete, n.d. = no detectado



**Figura 165.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **LB-T1**.

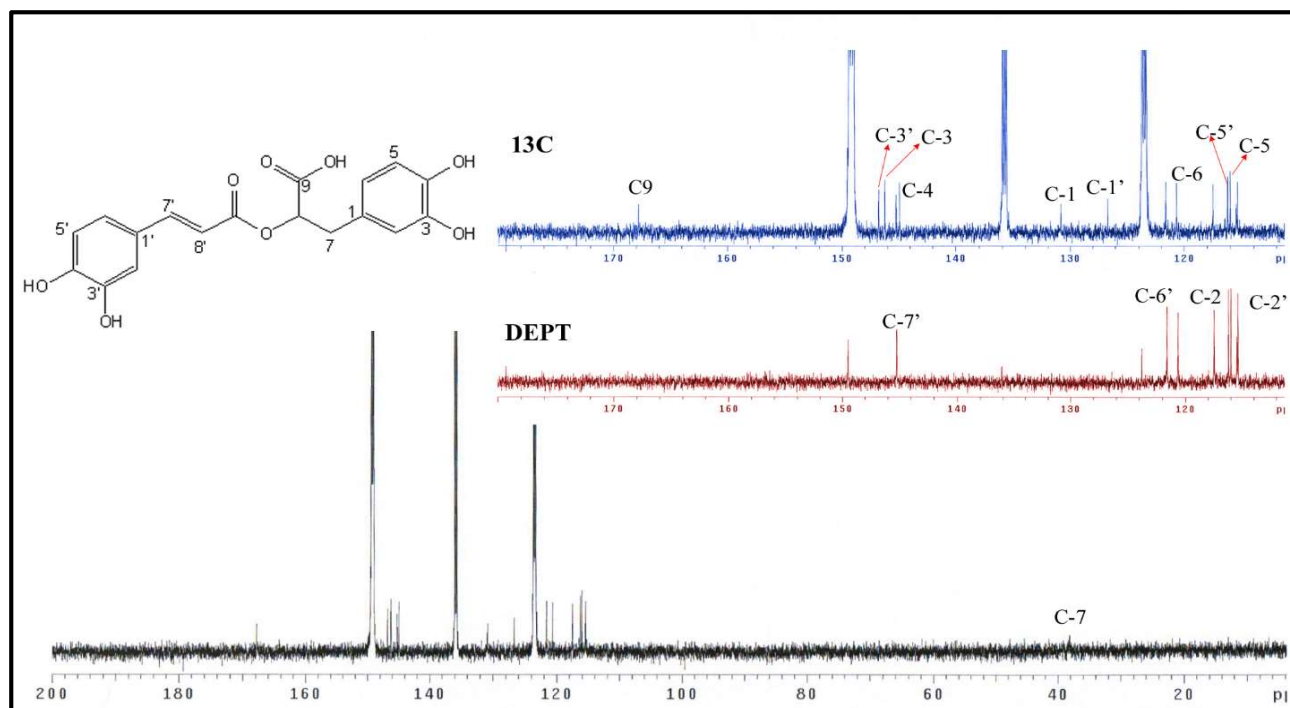


Figura 166. Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto LB-T1.

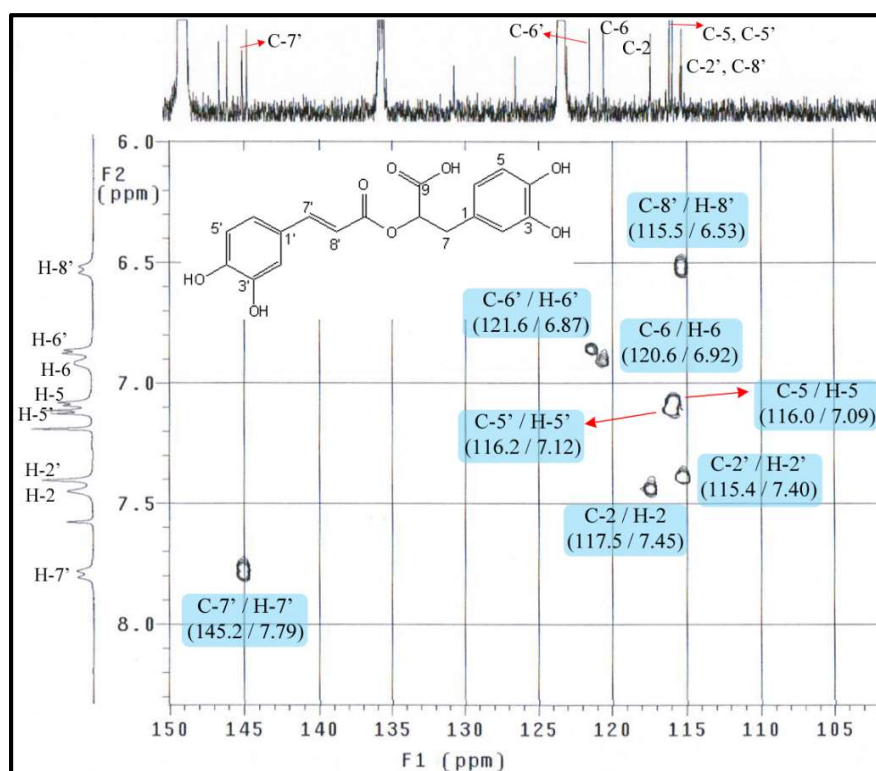


Figura 167. Espectro de HSQC del compuesto LB-T1.

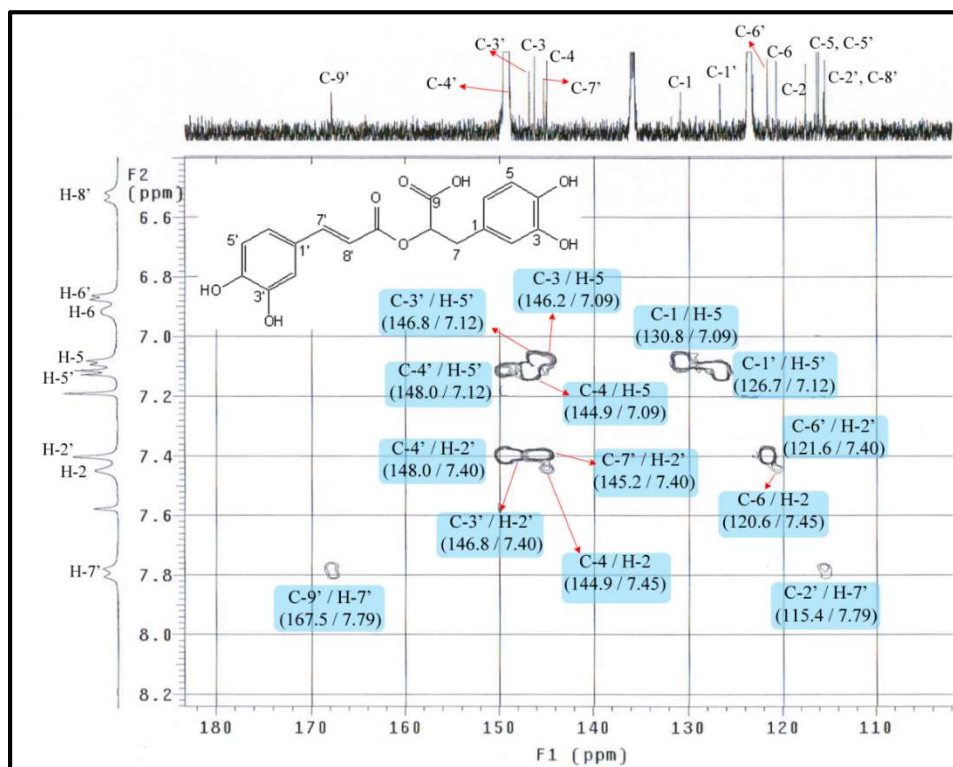


Figura 168. Espectro de HMBC del compuesto LB-T1.

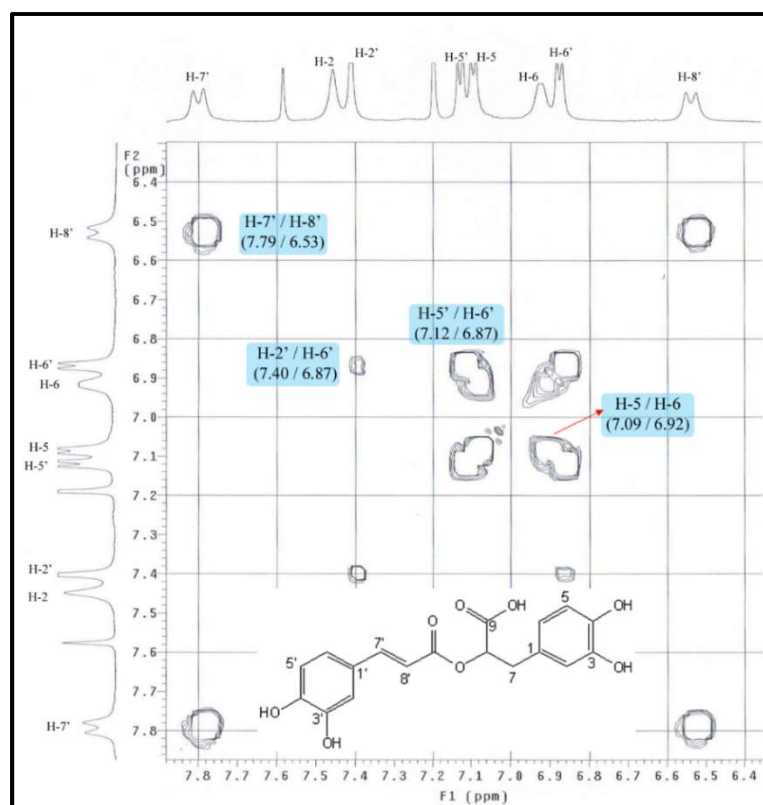


Figura 169. Espectro de COSY del compuesto LB-T1.

# *CONCLUSIONES*

En el transcurso del presente trabajo, se realizó un estudio fitoquímico sobre tres especies de diferentes familias pertenecientes a la flora venezolana y dos especies originarias de Nueva Zelanda adquiridas en la ciudad de Dijon, Francia. Dichas especies son *Bursera inversa* (Burseraceae), *Lepechinia bullata* (Lamiaceae), *Hydrocotyle multifida* (Araliaceae), *Pittosporum tenuifolium* ‘Gold Star’ (Pittosporaceae) y *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’ (Pittosporaceae). La escogencia de las especies se basó en una revisión bibliográfica hecha a profundidad la cual mostró sin lugar a dudas los diferentes metabolitos presentes en otras especies pertenecientes al mismo género y la diversidad en cuanto a efectos farmacológicos que han demostrado tener dichos metabolitos.

El estudio fitoquímico realizado permitió la identificación de más de 50 compuestos mediante el análisis por GC-MS, así como la separación, purificación de 17 compuestos diferentes mediante el empleo de diversas técnicas cromatográficas y su posterior identificación con técnicas espectroscópicas (RMN 1D y 2D) y espectrométricas (espectrometría de masas). Los compuestos aislados en las especies venezolanas resultaron ser hidrocarburos de cadena larga en *B. inversa*, un derivado del ácido caféico en *L. bullata* y cinco saponinas triterpénicas en *H. multifida*, mientras que en los cultivares neozelandeses de *P. tenuifolium* los compuestos fueron caracterizados saponinas triterpénicas.

El análisis fitoquímico de los tallos de *Pittosporum tenuifolium* ‘Variegatum’ y *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ permitió la obtención de 7 nuevos productos naturales, todos ellos saponinas triterpénicas derivadas del oleanano:

- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-22-acetoxi-21-angeloxibarringtogenol C (**PT-P1**) obtenido de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.
- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-21,22-diangeloxibarringtogenol C (**PT-P2**) obtenido de las hojas de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.
- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-22-angeloxicameliagenina A (**PT-P3**) obtenido de las hojas de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.
- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-22-*O*-(6-acetoxi)- $\beta$ -*D*-glucopiranosilcameliagenina A (**PT-P4**) aislado de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’.



- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil hederageninoato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P5**) aislado de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ y *P. tenuifolium* ‘Gold Star’.
- 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosilhederageninoato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P6**) obtenido de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ y *P. tenuifolium* ‘Gold Star’.
- 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroxiolean-12-en-28-oato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P8**) obtenido de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’.

La diferencia visual entre los dos cultivares de *P. tenuifolium*: ‘Variegatum’ y ‘Gold Star’ también se traduce en una diferencia en la composición química de ambos, ya que los compuestos encontrados en los tallos son diferentes para los dos cultivares, con excepción del producto mayoritario 3-*O*-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil hederageninoato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P6**), y del compuesto 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosil hederageninoato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P5**) que son los únicos compuesto en común en los tallos de ambos cultivares.

Desde el punto de vista quimiotaxónomico, no sorprende encontrar saponinas con esqueletos triterpénicos derivados del barringtogenol C o la cameliagenina A (compuestos de **PT-P1** a **PT-P4**) en *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ y *P. tenuifolium* ‘Gold Star’, ya que estos esqueletos han sido reportados con anterioridad en otras especies de *Pittosporum*, como *P. angustifolium* y *P. phillyraeoides*. Así mismo, los azúcares y las secuencias glicosídicas encontradas en la mayoría de las saponinas reportadas en este trabajo son similares a las descritas para las especies *P. angustifolium* y *P. senacia*.

El compuesto 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-22-*O*-(6-acetoxi)- $\beta$ -*D*-glucopiranosilcameliagenina A (**PT-P4**) a pesar de poseer un esqueleto triterpénico común dentro del género *Pittosporum* puede considerarse como una saponina inusual, debido a la presencia de una unidad de glucosa acetilada en C-22, así como por la secuencia de oligosacáridos de este compuesto en C-3, [Glc-(1 $\rightarrow$ 2)]-[Glc-(1 $\rightarrow$ 6)]-Glc, la cual no ha sido descrita con anterioridad dentro del género *Pittosporum*.

Las saponinas de **PT-P5** a **PT-P7** presentan un esqueleto triterpénico (hederagenina) poco común dentro del género *Pittosporum*, sin embargo el hecho de que dos de estos

compuestos (**PT-P5** y **PT-P6**) hayan sido aislados tanto de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’ como de *P. tenuifolium* ‘Gold Star’ parece indicar que los glicósidos de hederagenina podrían ser un marcador quimiotaxonómico de la especie *P. tenuifolium*.

El compuesto 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -*D*-glucuronopiranosil-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -dihidroxiolean-12-en-28-oato de  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo (**PT-P8**) también puede considerarse inusual dentro del género *Pittosporum*, ya que es la primera vez que se reporta la presencia del ácido 22 $\alpha$ -hidroxioleanólico en una especie de este género.

Es la primera vez que se aísla en la familia Pittosporaceae la udosaponina F (**PT-P7**), obtenida de los tallos de *P. tenuifolium* ‘Variegatum’. Anteriormente se ha aislado este compuesto en las familias Araliaceae y Aquifoliaceae.

Los resultados obtenidos indican que se debería dar continuidad al estudio de las saponinas triterpénicas presentes en los diferentes cultivares de *Pittosporum tenuifolium* y en las otras especies pertenecientes a este género.

El análisis fitoquímico de *Hydrocotyle multifida* permitió la obtención de 2 nuevos productos naturales, ambos saponinas triterpénicas del ácido oleanólico:

- Ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico (**HmE-P2 minoritario**).
- Ácido 3-*O*-[ $\beta$ -*D*-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -*L*-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -*D*-glucoronopiranosiloleanólico (**HmE-P3**).

Los compuestos momordin I (**HmE-P1**), sandrosaponina X (**HmE-P2 mayoritario**) y hemslósido Ma1 (**HmE-P4**), son compuestos conocidos, sin embargo es la primera vez que se reportan dentro del género *Hydrocotyle* y la familia Araliaceae.

Las cinco saponinas aisladas para *H. multifida* presentan un esqueleto triterpénico (ácido oleanólico) poco usual dentro del género *Hydrocotyle*, por lo que tal vez podrían ser un marcador quimiotaxonómico de la especie.

Los resultados obtenidos indican que se debería continuar el estudio de composición química de las especies de *Hydrocotyle*.

El ácido rosmarínico (**LB-T1**) es reportado por primera vez para la especie *Lepechinia bullata*; este compuesto ha sido obtenido previamente de otras especies del género *Lepechinia*.

Considerando la variedad de metabolitos presentes que pueden conseguirse en las especies de *Lepechinia* de acuerdo con lo encontrado en la revisión bibliográfica se debería continuar el estudio fitoquímico de *Lepechinia bullata*, de manera de determinar la composición química de las otras estructuras morfológicas de la planta.

Las semillas de *Bursera inversa* están compuestas principalmente por alcanos de cadena de larga, alquenos, alcoholes y ácidos grasos y sus ésteres. Se identificaron más de 40 compuestos diferentes en el análisis de GC-MS. Los componentes mayoritarios de las semillas que fueron aislados y purificados se identificaron como ésteres metílicos de los ácidos palmítico, oleico y linoleico.

Los resultados obtenidos demuestran que se debería continuar el estudio fitoquímico de *Bursera inversa*, de manera de determinar la composición química de la resina así como de las otras estructuras morfológicas de la planta como hojas, ramas, frutos, etc.

# *GLOSARIO*

## A

**Arilo:** envoltura, casi siempre carnosa y de colores vivos, que tienen algunas semillas.

## B

**Biosintetizar:** Proceso celular mediante el cual los organismos vivos elaboran sustancias químicas complejas a partir de otras más sencillas, con el consecuente gasto de energía metabólica.

**Biopelículas:** ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.

## C

**Caducifolio (plantas):** hace referencia a los árboles o arbustos que pierden su follaje durante una parte del año, la cual coincide en la mayoría de los casos con la llegada de la época desfavorable.

**Canales resiníferos:** tipo de tejido secretor que se hallan en las plantas superiores. Son canales que secretan resinas cuya función es la de proteger o defender a las plantas del ataque de insectos fitófagos y hongos.

**Cromóforo:** cualquier grupo de átomos que absorben luz independientemente de que presente color o no.

**Cultivar:** población de plantas que son cultivadas para mantener una determinada característica: ser muy grande, no tener semillas, tener un color muy intenso, etc. Todos los ejemplares de un cultivar deben mantener esa característica común que les hace diferentes del resto de ejemplares de otras poblaciones y, además, deben ser capaces de traspasar esa característica a sus descendientes, bien de forma sexual, o bien de forma asexual.

## D

**Decocción:** preparado que se realiza hirviendo el agua y la planta al mismo tiempo. Normalmente se usa esta técnica para las raíces, corteza, tallos o semillas que son partes más duras. Tiene que hervir a fuego lento, y el tiempo de ebullición dependerá de la dureza de lo que se utilice.

**Dismenorrea:** complicación de la función menstrual, caracterizada por períodos dolorosos que aparecen con la menstruación.

## *E*

**Emenagogo:** se utiliza para referirse a los principios activos, medicamentos o remedios a base de hierbas, que pueden estimular el flujo sanguíneo en el área de la pelvis y el útero, y en algunos casos, fomentar la menstruación.

**Endotelio:** tejido formado por una sola capa de células que recubre la zona interna todos los vasos sanguíneos, incluido el corazón.

**Etnobotánica:** estudia las relaciones entre los grupos humanos y su entorno vegetal, es decir el uso y aprovechamiento de las plantas en los diferentes espacios culturales y en el tiempo.

**Exocarpo:** capa externa de las tres que forman el pericarpio de los frutos, como la piel del melocotón.

**Exudado:** Cualquiera de las sustancias secretadas a través de los poros de los tejidos enfermos o dañados de las plantas. Las resinas, gomas, aceites y lacas son ejemplos de exudados que se extraen con fines industriales.

## *F*

**Foliolos:** cada una de las piezas separadas en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja.

## *G*

**Género:** es una categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie; así, un género es un grupo de organismos que a su vez puede dividirse en varias especies.

## *I*

**Inflorescencia:** forma en que aparecen colocadas las flores en las plantas.

**Infusión:** preparado en el que se hierve primero el agua, y una vez que esta alcanza el punto de ebullición se introducen las flores o las hojas desmenuzadas de la planta. No hace falta hervir la planta porque se usan las partes más tiernas.



***L***

**Látex:** suspensión compuesta de grasas, ceras y diversas resinas gomosas obtenida a partir del citoplasma de las células laticíferas presentes en algunas plantas angiospermas y hongos. Es frecuentemente blanco, aunque también puede presentar tonos anaranjados, rojizos o amarillentos dependiendo de la especie, y de apariencia lechosa.

***M***

**Mesocarpio (o pseudoarilo):** capa media de las tres que forman el pericarpio de los frutos, como la parte carnosa del melocotón.

***O***

**Oleorresina:** mezcla más o menos fluida de resina y aceite esencial, como por ejemplo la trementina de pino.

***P***

**Pantropical:** para que una distribución de un taxón sea pantropical, debe aparecer en regiones tropicales en todos los continentes mayores.

**Pentámera (flor):** flor compuesta de corola y de cáliz integrados por 5 pétalos y 5 sépalos respectivamente.

**Perenne (botánica):** planta de hoja perenne es aquella que tiene hojas vivas (que no se caen) a lo largo de todo el año.

**Pericarpio:** parte del fruto que recubre la semilla y consiste en el ovario fecundado. En el pericarpio pueden distinguirse tres capas, de fuera a dentro son: el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio.

**Pireno (o endocarpio):** capa interna de las tres que forman el pericarpio de los frutos, que puede ser de consistencia leñosa, como el hueso del melocotón.

**Pubescencia (flores):** hoja que presenta una superficie cubierta de pelillos que retienen el rocío matutino.

***R***

**Raquis:** estructuras lineales que forman el eje de una inflorescencia en forma de espiga o de una hoja compuesta.

**Resina:** sustancia sólida o de consistencia pastosa, insoluble en el agua, soluble en el alcohol y en los aceites esenciales, y capaz de arder en contacto con el aire, obtenida naturalmente como producto que fluye de varias plantas.

### *T*

**Taxonomía (botánica):** parte de la Botánica que trata de la ordenación de las plantas en grupos de parentesco.

**Tribu:** es una categoría taxonómica optativa, intermedia entre la familia y el género (o los sub- o super- correspondientes que existan), empleada para organizar las familias que contienen muchos géneros.

### *V*

**Valvas:** cada una de las partes de la cáscara de un fruto.

### *X*

**Xerófilos:** se dice de todas las plantas y asociaciones vegetales adaptadas a la vida en un medio o un ambiente seco.

*REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

**381 referencias citadas:**

- Abad, M.J.; Bermejo, P.; Carretero, E.; Martínez-Acitores, C.; Noguera, B.; Villar, A. (1996). Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(1): 63–68.
- Abdillahi, H.S.; Van Staden, J. (2012). South African plants and male reproductive healthcare: Conception and contraception. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2): 475–480.
- Abdullah Al-Dhabi, N.; Valan Arasu, M.; Rejiniemon, T.S. (2015). *In vitro* antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, and anticancer properties of isosteviol isolated from endangered medicinal plant *Pittosporum tetraspermum*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 1–11.
- Abe, F.; Yamauchi, T.; Shibuya, H.; Kitagawa, I. (1996). Triterpenoid glycosides from bark of *Meliosma lanceolata*. *Phytochemistry*, 42(3): 809–814.
- Adams, A.A.; Norris, J.A.; Mabry, T. J. (1989). A flavonoid from *Hydrocotyle umbellata* L. (Umbelliferae, Hydrocotyleae). *Revista Latinoamericana de Química*, 20(2): 67–68.
- Adebayo, S.A.; Dzoyem, J.P.; Shai, L.J.; Eloff, J.N. (2015). The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1): 159.
- Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10): 3307–3330.
- Aguilar Santamaría, L.; Romero Cerecero, O.; González Cortazar, M.; Tortoriello, J. (2012). Efecto de *Bursera grandiflora* sobre el peso corporal y lipemia en ratones obesos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2): 138–146.
- Aguirre-Crespo, F.; Castillo-España, P.; Villalobos-Molina, R.; López-Guerrero, J.J.; Estrada-Soto, S. (2005). Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmaceutical Biology*, 43(6): 540–546.
- Aguirre-Crespo, F.; Vergara-Galicia, J.; Villalobos-Molina, R.; López-Guerrero, J.J.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, 79(11): 1062–1068.
- Ahmed, A.; Ela, M.; Adams, A.A.; Mabry, T. (1996). Sesquiterpenes from *Lepechinia urbaniana*. *Planta Medica*, 62(4): 385–386.
- Ahmed, A.; Hussein, N.S.; De Adams, A.A.; Mabry, T.J. (1995). Abietane diterpenes from *Lepechinia urbaniana*. *Pharmazie*, 50(4): 279–280.
- Ajani, E.O.; Salako, A.A.; Sharlie, P.D.; Akinleye, W.A.; Adeoye, A.O.; Salau, B.A.; Adebawo, O.O. (2009). Chemopreventive and remediation effect of *Hydrocotyl bonariensis* Comm. Ex Lam (Apiaceae) leave extract in galactose-induced cataract. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1): 134–142.
- Ajani, E.O.; Salau, B.A.; Adebayo, O.L.; Adegbesan, B.O.; Odufuwa, K.T. (2012). Administration of *Hydrocotyle bonariensis* aqueous leaves extract regulates cardiovascular disease risk factors in galactose model of experimental cataractogenesis. *Scientific Research and Essays*, 7(14): 1527–1530.
- Ajani, E.O.; Salau, B.A.; Olooto, E.W.; Adebayo, O.L.; Adenuga, G.A. (2011). Toxicological implications of continuous administration of aqueous leaves extract of *Hydrocotyle bonariensis* in rats. *Archives of Applied Science Research*, 3(5): 471–478.
- Al-dhabi, N.A.; Arasu, M.V.; Park, C.H.; Park, S.U. (2014). Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*, 13: 1192–1195.
- Alarcon-Aguilara, F.J.; Roman-Ramos, R.; Perez-Gutierrez, S.; Aguilar-Contreras, A.; Contreras-Weber, C.C.; Flores-Saenz, J.L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2): 101–110.
- Álvarez, Á.L.; Habtemariam, S.; Parra, F. (2015). Inhibitory effects of lupene-derived pentacyclic triterpenoids from *Bursera simaruba* on HSV-1 and HSV-2 in vitro replication. *Natural Product Research*, 29(24): 2322–7.
- Amimoto, K.; Yoshikawa, K.; Arihara, S. (1993). Triterpenoid saponins of Aquifoliaceae plants. XII. Ilexosides XLVI-LI from the leaves of *Ilex rotunda* Thunb. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(1): 77–80.
- Andarwulan, N.; Kurniasih, D.; Apriady, R.A.; Rahmat, H.; Roto, A.V.; Bolling, B.W. (2012). Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 339–347.

- Areche, C.; Schmeda-Hirschmann, G.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J.A. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(12): 1689–1697.
- Arze, J.B.L.; Collin, G.; Garneau, F.X.; Jean, F.I.; Gagnon, H. (2009). Essential oils from Bolivia. VI. Lamiaceae: *Lepechinia graveolens* (Reg.) Epling, *L. floribunda* (Benth.) Epling, and *L. meyeri* (Walp.) Epling. *Journal of Essential Oil Research*, 21(1): 36–40.
- Asakawa, Y.; Matsuda, R.; Takemoto, T. (1982). Mono- and sesquiterpenoids from *Hydrocotyle* and *Centella* species. *Phytochemistry*, 21(10): 2590–2592.
- Asuzu, I.U.; Harvey, A.L. (2003). The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. *Toxicon*, 42(7): 763–768.
- Avila Acevedo, J.G.; Muñoz López, J.L.; Martínez Cortés, A.; García Bores, A.M.; Martínez Cortés, G.; Peñalosa Castro, I. (2005). *In vitro* anti-*Vibrio cholerae* activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. *Fitoterapia*, 76(1): 104–107.
- Avila Acevedo, J.G.; Muñoz López, J.L.; Martínez Cortés, G. (1993). *In vitro* antimicrobial activity of various plant extracts used by Purépecha against some Enterobacteriaceae. *Pharmaceutical Biology*, 31(1): 61–64.
- Bäcker, C.; Drwal, M.N.; Preissner, R.; Lindequist, U. (2016). Inhibition of DNA-topoisomerase I by acylated triterpene saponins from *Pittosporum angustifolium* Lodd. *Natural Products and Bioprospecting*, 6(2): 141–147.
- Bäcker, C.; Jenett-Siems, K.; Bodtke, A.; Lindequist, U. (2014a). Polyphenolic compounds from the leaves of *Pittosporum angustifolium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55: 101–103.
- Bäcker, C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Niedermeyer, T.H.J.; Wurster, M.; Bodtke, A.; Lindequist, U. (2015). Taraxastane-type triterpene saponins isolated from *Pittosporum angustifolium* Lodd. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 70(6): 403–408.
- Bäcker, C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Wurster, M.; Bodtke, A.; Chamseddin, C.; Crüsemann, M.; Lindequist, U. (2013). Triterpene glycosides from the leaves of *Pittosporum angustifolium*. *Planta Medica*, 79(15): 1461–1469.
- Bäcker, C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Wurster, M.; Bodtke, A.; Lindequist, U. (2014b). Cytotoxic saponins from the seeds of *Pittosporum angustifolium*. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 69 C(5–6): 191–198.
- Bäcker, C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Wurster, M.; Bodtke, A.; Niedermeyer, T.H.J.; Lindequist, U. (2014c). New mono- and bisdesmosidic triterpene glycosides from *Pittosporum angustifolium* Lodd. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 69b(9–10): 1026–1044.
- Baishya, R.A.; Sarma, J.; Begum, A. (2013). Forest-based medicinal plants rendering their services to the rural community of Assam, India. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4(4): 10–20.
- Barone, D.; Salvetti, L.; Guarnieri, D.; D'Arrigo, C. (1995). *In vivo* antitumor activity of CIDI, a glycolipide from *Pittosporum tobira*. *Pharmacological Research*, 31: 137.
- Barreira, E.S.; Queiroz Monte, F.J.; Braz-Filho, R. (1996). A new furanosesquiterpene from *Bursera leptophloeos* Marth. *Natural Product Letters*, 8(4): 285–289.
- Baruah, A.M.; Borah, S. (2009). An investigation on sources of potential minerals found in traditional vegetables of North-East India. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S4): 111–115.
- Becerra, A.V. (1993). Medicinal Flora of Mexico. *Journal of Herbs, Spices y Medicinal Plants*, 2(1): 55–91.
- Becerra, J.X.; Noge, K. (2010). The Mexican roots of the Indian lavender tree. *Acta Botánica Mexicana*, 91(1): 27–36.
- Becerra, J.X.; Venable, D.L.; Evans, P.H.; Bowers, W.S. (2001). Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist*, 41(4): 865–876.
- Bhatt, R.; Mishra, N.; Bansal, P.K. (2013). Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(2): 28–34.
- Bianchi, E.; Caldwell, M.E.; Cole, J.R. (1968). Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and characterization of deoxy podophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(4): 696–697.

- Bianchi, E.; Sheth, K.; Cole, J.R. (1969). Antitumor agents from *Bursera fagaroides* (Burseraceae): ( $\beta$ -peltatin-A-methylether and 5'-desmethoxy- $\beta$ -peltatin-A-methylether). *Tetrahedron Letters*, 10(32): 2759–2762.
- Binu, S.; Nayar, T.S. (2005). *Pittosporum neelgherrense* (Wight y Arnott) [Pittosporaceae] in treatment of snake bite. *Economic Botany*, 59: 295.
- Bohlmann, F.; Rode, K.M. (1968). Polyacetylenverbindungen, 150. Notiz über die Polyine aus *Pittosporum buchanani* Hook. fil. *Chemische Berichte*, 101(5): 1889–1891.
- Bohlmann, F.; Zdero, C. (1975). Ein neues polyin aus *Centella*-Arten. *Chemische Berichte*, 108(2): 511–514.
- Borges, R.; Rojas, L.B.; Cegarra, J.A.; Usbillaga, A. (2006). Study of the essential oils from the leaves and flowers of *Lepechinia conferta* (Benth) Epl. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1): 155–157.
- Bork, P.M.; Schmitz, M.L.; Weimann, C.; Kist, M.; Heinrich, M. (1996). Nahua Indian medicinal plants (Mexico): Inhibitory activity on NF- $\kappa$ B as an anti-inflammatory model and antibacterial effects. *Phytomedicine*, 3(3): 263–269.
- Bradley, C.E.; Haagen-Smit, A.J. (1951). The essential oil of *Bursera microphylla*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 40(11): 591–592.
- Braithwaite, A.; Smith, F.J. (1999). *Chromatographic Methods*, 5<sup>o</sup> ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 559 p.
- Brand, Y.M.; Roa-Linares, V.C.; Betancur-Galvis, L.A.; Durán-García, D.C.; Stashenko, E. (2016). Antiviral activity of Colombian Labiatae and Verbenaceae family essential oils and monoterpenes on Human Herpes viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 28(2): 130–137.
- Briceño, B.; Morillo, G. (2002). Catálogo abreviado de las plantas con flores de los páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledóneas (Magnoliopsida). *Acta Botánica Venezolánica*, 25(1): 1–46.
- Bruno, M.; Savona, G.; Piozzi, F.; de la Torre, M.C.; Rodríguez, B.; Marlier, M. (1991). Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry*, 30(7): 2339–2343.
- Bullock, A.A. (1936). Contributions to the flora of tropical America: XXVII. Notes on the Mexican species of the genus *Bursera*. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)*, 1936(6): 346–387.
- Bussmann, R.W.; Malca, G.; Glenn, A.; Sharon, D.; Nilsen, B.; Parris, B.; Dubose, D.; Ruiz, D.; Saleda, J.; Martínez, M.; Carillo, L.; Walker, K.; Kuhlman, A.; Townesmith, A. (2011a). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1): 121–140.
- Bussmann, R.W.; Swartzinsky, P.; Worede, A.; Evangelista, P. (2011b). Plant use in Odo-Bulu and Demaro, Bale region, Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7(1): 28–48.
- Cabrera, G.M. (2006). Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. *Phytochemistry: Advances in Research*, 66(2): 1–22.
- Caceres, A.; Cano, O.; Samayoa, B.; Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against Enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30(1): 55–73.
- Calder, J.; Carter, C.L. (1949). The essential oil of *Pittosporum tenuifolium*. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 68: 355–356.
- Camporese, A.; Balick, M.J.; Arvigo, R.; Esposito, R.G.; Morsellino, N.; De Simone, F.; Tubaro, A. (2003). Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1): 103–107.
- Canales, M.; Hernández, T.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3): 429–439.
- Carmona, R.; Quijano-Celís, C.E.; Pino, J.A. (2009). Leaf oil composition of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5): 387–389.
- Carrera-Martínez, C.A.; Rosas-López, R.; Rodríguez-Monroy, M.A.; Canales-Martínez, M.M.; Román-Guerrero, A.; Jiménez-Alvarado, R. (2014). Chemical composition and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5): 758–768.
- Carretero, M.E.; López-Pérez, J.L.; Abad, M.J.; Bermejo, P.; Tillet, S.; Israel, A.; Noguera-P, B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1): 11–15.



- Carter, C.L.; Heazlewood, W.V. (1949). Essential oil of *Pittosporum eugenoides*. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 68: 34–36.
- Case, R.J.; Tucker, A.O.; MacIarello, M.J.; Wheeler, K.A. (2003). Chemistry and ethnobotany of commercial incense copals, copal blanco, Copal Oro, and Copal Negro, of North America. *Economic Botany*, 57(2): 189–202.
- Castillo, P.; Lock, O. (2005). Compuestos con actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* Walp. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 71(4): 227–236.
- Castro-Laportte, M. (2013). Estudio taxonómico del género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) en Venezuela. *Ernstia*, 23(2): 125–169.
- Cegarra, J.A.; Soriano, P.; Costa, M.; Lluch, A.; Martínez-Solís, I. (2006). Especies medicinales y tóxicas del género *Lepechinia* Willd. (Labiatae) en Venezuela. *Revista de Fitoterapia*, 6(2): 155–159.
- Chavasiri, W.; Prukchareon, W.; Sawasdee, P.; Zungsontiporn, S. (2005). Allelochemicals from *Hydrocotyle umbellata* Linn, in: Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, “Establishing the Scientific Base.” pp. 339–342.
- Cho, E.H.; Kim, I.H. (1988). Studies on the pharmaco-constituents of *Hydrocotyle japonica* (L). *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea*, 32(4): 281–286.
- Chou, T.H.; Chen, I.S.; Hwang, T.L.; Wang, T.C.; Lee, T.H.; Cheng, L.Y.; Chang, Y.C.; Cho, J.Y.; Chen, J.J. (2008). Phthalides from *Pittosporum illicioides* var. *illicioides* with inhibitory activity on superoxide generation and elastase release by neutrophils. *Journal of Natural Products*, 71(10): 1692–1695.
- Chou, Y.K. (2005). Studies on the essential oil constituent from the *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. and biological assays. Chung Yuan Christian University, Taiwan. 108 p.
- Choudhury, M.D.; Bawari, M.; Singha, L.S. (2010). Some antipyretic ethno-medicinal plants of Manipuri community of Barak Valley, Assam, India. *Ethnobotanical Leaflets*, 14: 21–28.
- Ciccio, J.F.; Soto, V.H.; Poveda, L.J. (1999). Essential oil of *Lepechinia schiedeana* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 47(3): 373–375.
- Claire, E.L.; Schwaiger, S.; Banaigs, B.; Stuppner, H.; Gafner, F. (2005). Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11): 4367–4372.
- Clarkson, C.; Maharaj, V.J.; Crouch, N.R.; Grace, O.M.; Pillay, P.; Matsabisa, M.G.; Bhagwandin, N.; Smith, P.J.; Folb, P.I. (2004). *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2–3): 177–191.
- Clarkson, J.J.; Chase, M.W.; Herley, M.M. (2002). Phylogenetic relationships in Burseraceae based on plastid rps16 Intron Sequences. *Kew Bulletin*, 57(1): 183–193.
- Cock, I.E.; van Vuuren, S.F. (2015). South African food and medicinal plant extracts as potential antimicrobial food agents. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11): 6879–6899.
- Cole, J.R.; Bianchi, E.; Trumbull, E.R. (1969). Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) II: Isolation of a new lignan-burseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(2): 175–176.
- Collin, G.; Garneau, F.-X.; Gagnon, H.; Pichette, A.; Lavoie, S. (2010). Analysis of cymenes in essential oils: the case of *Lepechinia meyeri* (Walp.) Epling. *Journal of Essential Oil Research*, 22(4): 310–313.
- Corsaro, M.M.; Della Greca, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Previtera, L. (1995). Ranuncoside VII - A new oleanane glycoside from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Natural Product Letters*, 6(2): 95–102.
- Crowden, R.K.; Harborne, J.B.; Heywood, V.H. (1969). Chemosystematics of the Umbelliferae - A general survey. *Phytochemistry*, 8(1969): 1963–1984.
- Crowley, K.J. (1964). Some terpenic constituents of *Bursera graveolens* (H. B. K.) Tr. et Pl. var. *villosula* Cuatr. *Journal of the Chemical Society*, IV(4254): 4254–4256.
- Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.L.; Duke, J.A.; Brielmann, H.L. (2006). Natural Products from Plants, 2° ed. Taylor y Francis Group, LLC, Florida, USA. 555 p.
- D’Acquarica, I.; Di Giovanni, M.C.; Gasparrini, F.; Misiti, D.; D’Arrigo, C.; Fagnano, N.; Guarnieri, D.; Iacono, G.; Bifulco, G.; Riccio, R. (2002). Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* AIT. *Tetrahedron*, 58: 10127–10136.
- Da Silva, D.X.; De Souza, M.W.; Corrêa, C. d. S.; Moya, H.D. (2013). A critical study of use of the Fe(II)/3-hydroxy-4-nitroso-2,7-naphthalenedisulfonic acid complexes in the quantification of polyphenols in medicinal plants. *Food Chemistry*, 138(2–3): 1325–1332.

- Daly, D.C. (1993). Notes on *Bursera* in South-America, including a new species. Studies in neotropical Burseraceae VII. *Brittonia*, 45(3): 240–246.
- Dapkevicius, A.; van Beek, T.A.; Lelyveld, G.P.; van Veldhuizen, A.; de Groot, A.; Linssen, J.P.H.; Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6): 892–896.
- De la Cerda-Lemus, M.E. (2011). La familia Burseraceae en el estado de Aguascalientes, México. *Acta Botánica Mexicana*, 94(1): 1–25.
- De la Cruz-Cañizares, J.; Doménech-Carbó, M.-T.; Gimeno-Adelantado, J.-V.; Mateo-Castro, R.; Bosch-Reig, F. (2005). Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1093(1–2): 177–194.
- De Medeiros, J.M.R.; Macedo, M.; Contancia, J.P.; Nguyen, C.; Cunningham, G.; Miles, D.H. (2000). Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1–2): 157–165.
- Delgado, G.; Hernández, J.; Chávez, M.I.; Alvarez, L.; Gonzaga, V.; Martínez, E. (1994). Di- and triterpenoid acids from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry*, 37(4): 1119–1121.
- Delgado, G.; Sánchez, E.; Hernández, J.; Isabel Chávez, M.; Alvarez, L.; Martínez, E. (1992). Abietanoid acid from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry*, 31(9): 3159–3161.
- Dell'agli, M.; Bosisio, E. (2002). Minor polar compounds of olive oil: Composition, factors of variability and bioactivity, in: Atta-Ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier Science B.V., pp. 697–734.
- Della Greca, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Previtera, L. (1994). Oleanane glycosides from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Phytochemistry*, 36(6): 1479–1483.
- Della Greca, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Previtera, L. (1993). Polyoxygenated oleanane triterpenes from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Phytochemistry*, 35(1): 201–204.
- Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, 73(1): 69–91.
- Díaz-Pita, M.P. (2011). Revisión Taxonómica del género *Hydrocotyle* L. (Apiaceae) para Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 129 p.
- Doménech-Carbó, M.T.; Kuckova, S.; de la Cruz-Cañizares, J.; Osete-Cortina, L. (2006). Study of the influencing effect of pigments on the photoageing of terpenoid resins used as pictorial media. *Journal of Chromatography A*, 1121(2): 248–258.
- Dominguez, X.A.; Rzedowski, J.; Gutierrez, M.; Gomez, M. (1973). A phytochemical survey of 21 species of the genus *Bursera* (Burseraceae) natives of Mexico. *Revista Latinoamericana de Química*, 4: 108–121.
- Dong, G.T.; Song, L.K.; Li, X.F.; Dai, C.C.; Zhang, L.; Tang, H. (2008). Content determination of quercetin in *Hydrocotyle sibthorpioides* and closely related species. *Anhui Nongye Kexue*, 38(10): 5101–5103.
- Dutta, A.C. (2014). Ethnomedicinal practices among the Sonowal Kacharis of Assam. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 1(3): 88–94.
- Eggers, M.D.; Orsini, G.; Stahl-Biskup, E. (2001). Composition and chemical variation of the essential oil of *Lepechinia salviaefolia* (Kunth) Epl. from Venezuela. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1): 1–4.
- Eggers, M.D.; Sinnwell, V.; Stahl-Biskup, E. (1999). (-)-Spirolepechinene, a spirosesterterpene from *Lepechinia bullata* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 51(8): 987–990.
- El Dib, R.A.; Eskander, J.; Mohamed, M.A.; Mohammed, N.M. (2015). Two new triterpenoid estersaponins and biological activities of *Pittosporum tobira* “Variegata” (Thunb.) W. T. Aiton leaves. *Fitoterapia*, 106: 272–279.
- Elbandy, M.; Miyamoto, T.; Delaude, C.; Lacaille-Dubois, M.A. (2004). New acylated presenegenin saponins from two species of *Muraltia*. *Helvetica Chimica Acta*, 87(2): 340–348.
- Elicriso (2016). *Pittosporum* más conocido como Pitosporo [Contenido Web]. URL: [www.elicriso.it/es/como\\_cultivar/pittosporum/](http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/pittosporum/) (consultado el 21/03/16).
- Encarnación-Dimayuga, R.; Almada, G.; Virgen, M.A. (1998a). Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepichinia hastata* (Lamiaceae). *Phytomedicine*, 5(4): 301–305.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Altamirano, L.; Maki, K. (1998b). Screening of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico) by their effects on smooth muscle contractility. *Pharmaceutical Biology*, 36(2): 124–130.

- Encarnación-Dimayuga, R.; García, S.K.; Nielsen, P.H.; Christophersen, C. (1991). Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) III. Carnosol: A diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(1): 43–48.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Murillo, R.F.; Pantoja, M.L. (1987). Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) II. *Journal of Ethnopharmacology*, 20(3): 209–222.
- Éparvier, V.; Thoison, O.; Bousserouel, H.; Guéritte, F.; Sévenet, T.; Litaudon, M. (2007). Cytotoxic farnesyl glycosides from *Pittosporum pancheri*. *Phytochemistry*, 68(5): 604–608.
- Epling, C. (1948). A synopsis of the tribe Lepechinieae (Labiatae). *Brittonia*, 6(3): 352–364.
- Errington, S.G.; Jefferies, P.R. (1988). Triterpenoid sapogenins of *Pittosporum phillyraeoides*. *Phytochemistry*, 27(2): 543–545.
- Estrada-Soto, S.; Rodríguez-Avilez, A.; Castañeda-Ávila, C.; Castillo-España, P.; Navarrete-Vázquez, G.; Hernández, L.; Aguirre-Crespo, F. (2007). Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3): 364–370.
- Evans, P.H.; Becerra, J.X. (2006). Non-terpenoid essential oils from *Bursera chemapodicta*. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(4): 616–618.
- Exarchou, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Gerothanassis, I.P.; Troganis, A.; Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19): 5294–5299.
- Felger, R.S.; Moser, M.B. (1973). Seri Indian pharmacopoeia. *Economic Botany*, 28(4): 415–436.
- Feng, C.; Li, B.G.; Gao, X.P.; Qi, H.Y.; Zhang, G.L. (2010). A new triterpene and an antiarrhythmic lirioidendrin from *Pittosporum brevicalyx*. *Archives of Pharmacal Research*, 33(12): 1927–1932.
- Ferreira, N.J.; Meireles de Sousa, I.G.; Luís, T.C.; Currais, A.J.M.; Figueiredo, A.C.; Costa, M.M.; Lima, A.S.B.; Santos, P.A.G.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Scheffer, J.J.C. (2007). *Pittosporum undulatum* Vent. grown in Portugal: secretory structures, seasonal variation and enantiomeric composition of its essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(1): 1–9.
- Florentino, I.F.; Nascimento, M.V.M.; Galdino, P.; De Brito, A.F.; Da Rocha, F.F.; Tonussi, C.R.; De Lima, T.C.M.; De Paula, J.R.; Costa, E.A. (2013). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acaricoba) in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3): 987–997.
- Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Manabe, K.; Maoka, T. (2002). Structures of tobiraxanthins A1, A2, A3, B, C and D, new carotenoids from the seeds of *Pittosporum tobira*. *Tetrahedron Letters*, 43(24): 4385–4388.
- Fujiwara, Y.; Maoka, T. (2001). Structure of pittosporumxanthins A1 and A2, novel C69 carotenoids from the seeds of *Pittosporum tobira*. *Tetrahedron Letters*, 42(14): 2693–2696.
- Fujiwara, Y.; Maruwaka, H.; Toki, F.; Hashimoto, K.; Maoka, T. (2001). Structure of three new carotenoids with a 3-methoxy-5-keto-5,6-seco-4,6-cyclo- $\beta$  end group from the seeds of *Pittosporum tobira*. *Chemical y Pharmaceutical Bulletin*, 49(8): 985–987.
- García-Gutiérrez, H.A.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Hernández-Hernández, J.D.; Román-Marín, L.U.; Joseph-Nathan, P. (2008). Oxygenated verticillene derivatives from *Bursera suntui*. *Phytochemistry*, 69(16): 2844–2848.
- Giday, M.; Asfaw, Z.; Woldu, Z. (2010). Ethnomedicinal study of plants used by Sheko ethnic group of Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1): 75–85.
- Goleniowski, M.E.; Bongiovanni, G.A.; Palacio, L.; Nuñez, C.O.; Cantero, J.J. (2006). Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 324–341.
- Gottlieb, O.R. (1990). Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry*, 29(6): 1715–1724.
- Graham, J.G.; Quinn, M.L.; Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R. (2000). Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3): 347–377.
- Grkovic, T.; Pouwer, R.H.; Wang, Q.; Guymmer, G.P.; Holst, J.; Quinn, R.J. (2015). LAT transport inhibitors from *Pittosporum venulosum* identified by NMR fingerprint analysis. *Journal of Natural Products*, 78(6): 1215–1220.
- Gross, J.H. (2004). Mass spectrometry. Springer-Verlag, Alemania. 1-15 p.
- Gurib-Fakim, A.; Demarne, F.E. (1994). Constituents of the essential oil of the leaves of *Pittosporum balfourii* growing in Rodrigues. *Planta Medica*, 60(6): 584–585.

- Haddad, M.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M.A. (2004). New triterpenoidal saponins acylated with monoterpenic acid from *Albizia adianthifolia*. *Helvetica Chimica Acta*, 87(5): 1228–1238.
- Hajdu, Z.; Hohmann, J. (2012). An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3): 838–857.
- Hanus, L.O.; Dembitsky, V.M.; Moussaieff, A. (2006). Comparative study of volatile compounds in the fresh fruits of *Mandragora autumnalis*. *Acta Chromatographica*, (17): 151–160.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (1972). Flavonoid patterns in the fruits of the umbelliferae. *Phytochemistry*, 11(5): 1741–1750.
- Helal, R.; Melzig, M.F. (2011). *In vitro* effects of selected saponins on the production and release of lysozyme activity of human monocytic and epithelial cell lines. *Scientia Pharmaceutica*, 79(2): 337–349.
- Hernández, J.D.; García-Gutiérrez, H.A.; Román-Marín, L.U.; Torres-Blanco, Y.I.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Joseph-Nathan, P. (2014). Absolute configuration of cembrane diterpenoids from *Bursera multijuga*. *Natural Product Communications*, 9(9): 1249–52.
- Hernández, J.D.; García, L.; Hernández, A.; Alvarez, R.; Román, L.U. (2002). Glicósidos de luteolina y miricetina de Burseraceae. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(4): 295–300.
- Hernández, J.D.; Román-Marín, L.U.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Joseph-Nathan, P. (2005). Verticillane derivatives from *Bursera suntu* and *Bursera kerberi*. *Journal of Natural Products*, 68(11): 1598–1602.
- Hernández, J.D.; Román, L.; Espiñeira, J.; Joseph-Nathan, P. (1983). Ariensin, a new lignan from *Bursera ariensis*. *Planta Medica*, 47(4): 215–217.
- Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. (1976). Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(2): 116–122.
- Higuchi, R.; Fujioka, T.; Iwamoto, M.; Komori, T.; Kawasaki, T.; Lassak, E.V. (1983a). Triterpenoid saponins from leaves of *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, 22(11): 2565–2569.
- Higuchi, R.; Komori, T.; Kawasaki, T.; Lassak, E.V. (1983b). Triterpenoid saponins from leaves of *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, 22(5): 1235–1237.
- Hiller, K.; Keipert, M.; Pfeifer, S. (1971). Saponins of *Hydrocotyle vulgaris*. *Pharmazie*, 26(12): 780.
- Hiller, K.; Voigt, G.; Doehnert, H. (1981). Structure of the main saponin from *Hydrocotyle vulgaris* L. *Pharmazie*, 36(12): 844–846.
- Hiller, K.; Voigt, G.; Koeppel, H.; Otto, A. (1979). Isolation of quercetin-3-O-(6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside, a new flavonoid from *Hydrocotyle vulgaris* L. *Pharmazie*, 34(3): 192–193.
- Hoi, T.M.; Thai, T.H.; Lesueur, D.; Bighelli, A.; Casanova, J. (2004). Volatile components of *Bursera tonkinensis* Guill. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 7(3): 228–231.
- Hong, L.; Guo, Z.; Huang, K.; Wei, S.; Liu, B.; Meng, S.; Long, C. (2015). Ethnobotanical study on medicinal plants used by Maonan people in China. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1): 32.
- Hongtong, Y.; Yushu, C.; Jiamin, X.; Shunian, Z. (1986). Studies on chemical constituents of *Pittosporum bervicalyx* (Oliv) Gagnep. *Acta Chimica Sinica*, 44(9): 946–950.
- Hosking, J.R.; Conn, B.; Lepischi, J.; Barker, C.H. (2007). Plant species first recognised as naturalised for New South Wales in 2002 and 2003, with additional comments on species recognised as naturalised in 2000–2001. *Cunninghamia*, 10: 139–166.
- Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M. (1998). Preparative Chromatographic Techniques: application in natural product isolation, 2<sup>o</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin. 244 p.
- Hu, Y.; Ye, Z.; Chen, W.; Long, C.; Li, H. (2008). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and component analysis of essential oil from *Hydrocotyle wilfordii* and preliminary study of its insecticidal activity. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao*, 17(4): 27–30.
- Huang, H.C.; Liaw, C.C.; Zhang, L.J.; Ho, H.U.; Kuo, L.M.Y.; Shen, Y.C.; Kuo, Y.H. (2008). Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry*, 69(7): 1597–1603.
- Huang, Q.; Huang, R.; Zhang, S.; Lin, J.; Wei, L.; He, M.; Zhuo, L.; Lin, X. (2013a). Protective effect of genistein isolated from *Hydrocotyle sibthorpioides* on hepatic injury and fibrosis induced by chronic alcohol in rats. *Toxicology Letters*, 217(2): 102–110.



- Huang, Q.; Zhang, S.; Huang, R.; Wei, L.; Chen, Y.; Lv, S.; Liang, C.; Tan, S.; Liang, S.; Zhuo, L.; Lin, X. (2013b). Isolation and identification of an anti-hepatitis B virus compound from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2): 568–575.
- Huang, S.S.; Huang, G.J.; Ho, Y.L.; Lin, Y.H.; Hung, H.J.; Chang, T.N.; Chang, M.J.; Chen, J.J.; Chang, Y.S. (2008a). Antioxidant and antiproliferative activities of the four *Hydrocotyle* species from Taiwan. *Botanical Studies*, 49(4): 311–322.
- Huang, S.S.; Huang, G.J.; Peng, W.H.; Ho, Y.L.; Chang, M.J.; Hung, H.J.; Chang, T.N.; Chang, Y.S. (2008b). Analgesic and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Hydrocotyle batrachium* hance in mice. *Mid-Taiwan Journal of Medicine*, 13(4): 179–185.
- Huong, T.N.L.; Phung, N.K.P.; Suong, N.N. (2009). Chemical examination of *Hydrocotyle bonariensis* L. (Apiaceae). *Vietnam Journal of Chemistry*, 47(2): 542–546.
- Husin, F.; Chan, Y.Y.; Gan, S.H.; Sulaiman, S.A.; Shueb, R.H. (2015). The effect of *Hydrocotyle sibthorpioides* lam. Extracts on *in vitro* dengue replication. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 1–9.
- Ina, H.; Asai, A.; Iida, H.; Ushida, T. (1987). Chemical investigation of *Hydrocotyle Sibthorpioides*. *Planta Medica*, 53(2): 228.
- Inta, A.; Shengji, P.; Balslev, H.; Wangpakapattanawong, P.; Trisonthi, C. (2008). A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence? *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3): 508–517.
- Ionescu, F.; Jolad, S.D.; Cole, J.R.; Arora, S.K.; Bates, R.B. (1977). The structure of benulin, a new pentacyclic triterpene hemiketal isolated from *Bursera arida* (Burseraceae). *The Journal of Organic Chemistry*, 42(9): 1627–1629.
- Iswandana, R.; Pham, B.T.; van Haften, W.T.; Luangmonkong, T.; Oosterhuis, D.; Mutsaers, H.A.M.; Olinga, P. (2016). Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicology in Vitro*, 32: 261–268.
- Iwalewa, E. pO.; McGaw, L.J.; Naidoo, V.; Eloff, J.N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25): 2868–2885.
- Iwamoto, M.; Okabe, H.; Yamamuchi, T. (1985). Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. II. Isolation and characterization of the root saponins, Momordins I, II and III. *Chemical y Pharmaceutical Bulletin*, 33(1): 1–7.
- Jayasinghe, C.; Gotoh, N.; Aoki, T.; Wada, S. (2003). Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15): 4442–4449.
- John, A.J.; George, V.; Pradeep, N.S.; Sethuraman, M.G. (2008). Composition and antibacterial activity of the leaf and fruit oils of *Pittosporum neelgherrense* Wight et Arn. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4): 380–382.
- John, A.J.; Karunakaran, V.P.; George, V.; Pradeep, N.S.; Sethuraman, M.G. (2007). Constituents and antibacterial activity of the essential oils from the leaves and fruits of *Pittosporum viridulum*. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6): 591–593.
- Jolad, S.D.; Wiedhopf, R.M.; Cole, J.R. (1977a). Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: Isolation of sapelins A and B. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6): 889–890.
- Jolad, S.D.; Wiedhopf, R.M.; Cole, J.R. (1977b). Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6): 892–893.
- Jonathan, L.T.; Che, C.T.; Pezzuto, J.M.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R. (1989). 7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinones from *Lepechinia bullata*. *Journal of Natural Products*, 52(3): 571–575.
- Jorim, R.Y.; Korape, S.; Legu, W.; Koch, M.; Barrows, L.R.; Matainaho, T.K.; Rai, P.P. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the eastern highlands of Papua New Guinea. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8(1): 47–63.
- Joseph, N.; Tom, N.L.; Télesphore, N.; Paul, D.D.; Oumarou, A.; Théophile, D.; Pierre, K. (2015). Effects of the aqueous extract of *Pittosporum mannii* Hook. f. (Pittosporaceae) stem barks on spontaneous and spasmogen-induced contractile activity of isolated rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, 172: 1–9.

- Junor, G.A.O.; Porter, R.B.; Yee, T.; Williams, L.A. (2008a). Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils from *Bursera hollickii* (Britton) found in Jamaica. *Journal of Essential Oil Research*, 20(6): 560–565.
- Junor, G.A.O.; Porter, R.B.R.; Yee, T.H. (2010a). Chemical composition of essential oils from the aerial parts of Jamaican *Bursera lunanii* Spreng. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6): 602–605.
- Junor, G.A.O.; Porter, R.B.R.; Yee, T.H. (2008b). The chemical composition of the essential oils from the leaves, bark and fruits of *Bursera simaruba* (L) Sarg. from Jamaica. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5): 426–429.
- Junor, G.A.O.; Porter, R.B.R.; Yee, T.H.; Waugh, T. (2010b). The volatile constituents from the leaves, bark and fruits of *Bursera aromatica* (Proctor) found in Jamaica. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1): 19–22.
- Jutiviboonsuk, A.; Zhang, H.; Tan, G.T.; Ma, C.; Hung, N.V.; Cuong, N.M.; Bunyapraphatsara, N.; Soejarto, D.D.; Fong, H.H.. (2005). Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*, 66(23): 2745–2751.
- Kamaraj, C.; Abdul Rahman, A.; Bagavan, A.; Abdur Zahir, A.; Elango, G.; Kandan, P.; Rajakumar, G.; Marimuthu, S.; Santhoshkumar, T. (2010). Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine*, 27(2): 211–9.
- Kawai, H.; Nishida, M.; Tashiro, Y.; Kuroyanagi, M.; Ueno, A.; Satake, M. (1989). Studies on the structures of udosaponins A, B, C, D, E and F from *Aralia cordata* Thunb. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(9): 2318–2321.
- Kawalekar, J.S. (2011). Medicinal plants used by local vaidyas in Gavanal village , At Hukkeri Taluk, Belgaum district. *International Journal of Phytotherapy Research*, 1(1): 1–7.
- Keipert, M.; Schneider, G.; Hiller, K.; Pfeifer, S.; Toekes, L.; Nelson, J. (1975). Structures of hydrocotylenins C and F. *Pharmazie*, 30(9): 619–620.
- Khare, C.P. (Ed.) (2007). *Indian Medicinal Plants: An illustrated dictionary*. Springer New York, Nueva York, USA. 496–497 p.
- Kim, J.S.; Kang, S.S. (1998). Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Natural Product Sciences*, 4(1): 45–50.
- Kumarappan, C.; Jaswanth, A.; Kumarasunderi, K. (2011). Antihemolytic and snake venom neutralizing effect of some Indian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9): 743–747.
- Kumarappan, C.T.; Kumara Sunderi, S.K.; Nagalakshmi, G.; Chidambaram, M.S. (2005). Study of antidiarrheal activity of *Hydrocotyle javanica* in mice. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2): 31–34.
- Kwon, H.C.; Zee, O.P.; Lee, K.R. (1998). Two new monogalactosylacylglycerols from *Hydrocotyle ramiflora*. *Planta Medica*, 64(5): 477–479.
- Lacaille-Dubois, M.A.; Wagner, H. (2000). Bioactive saponins from plants: An update. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21(PART B): 633–687.
- Lacaille-Dubois, M.A.; Wagner, H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2(4): 363–386.
- Lago, J.H.G.; Fávero, O.A.; Romoff, P. (2006). Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7): 1334–1338.
- Lamorde, M.; Tabuti, J.R.; Obua, C.; Kukunda-Byobona, C.; Lanyero, H.; Byakika-Kibwika, P.; Bbosa, G.S.; Lubega, A.; Ogwal-Okeng, J.; Ryan, M.; Waako, P.J.; Merry, C. (2010). Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1): 43–53.
- Lawrence, B.M.; Morton, J.K. (1979). Volatile constituents of *Lepechinia calycina*. *Phytochemistry*, 18(11): 1887.
- Lepcha, S.R.; Das, A.P. (2011). Ethno-medicobotanical exploration along the international borders to Tibet Autonomous Region of China and the kingdom of Bhutan with special reference to the Pangolakha Wildlife Sanctuary, East Sikkim, in: Ghosh, C., Das, A.P. (Eds.), *Recent Studies in Biodiversity and Traditional Knowledge in India*. Gour College, Malda, pp. 257–270.
- Lin, X.; Huang, R.; Zhang, S.; Wei, L.; Zhuo, L.; Wu, X.; Tang, A.; Huang, Q. (2013). Beneficial effects of asiaticoside on cognitive deficits in senescence-accelerated mice. *Fitoterapia*, 87(1): 69–77.



- Lin, X.; Zhang, S.; Huang, R.; Wei, L.; Tan, S.; Liang, C.; Lv, S.; Chen, Y.; Liang, S.; Tian, Y.; Lu, Z.; Huang, Q. (2014). Protective effect of madecassoside against cognitive impairment induced by d-galactose in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124: 434–442.
- Linnek, J.; Mitaine-Offer, A.C.; Paululat, T.; Lacaille-Dubois, M.A. (2012). Two new triterpenoid saponins from *Pittosporum senacia* Putterlick (Pittosporaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50(12): 798–802.
- Loukis, A.; Hatzioannou, C. (2005). Volatile constituents of *Pittosporum tobira* (Thunb.) Aiton fil cultivated in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2): 186–187.
- Macías, F.A.; Molinillo, J.M.G.; Varela, R.M.; Galindo, J.C.G. (2007). Allelopathy—a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63(4): 327–348.
- Malagón, O.; Vila, R.; Iglesias, J.; Zaragoza, T.; Cañigüeral, S. (2003). Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6): 527–531.
- Maldini, M.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C. (2009a). ESI-MS, ESI-MS/MS fingerprint and LC-ESI-MS analysis of proanthocyanidins from *Bursera simaruba* Sarg bark. *Natural Product Communications*, 4(12): 1671–1674.
- Maldini, M.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C. (2009b). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70(5): 641–649.
- Maleni, D.; Gai, O.; Popovi, M.; Boa, P. (2000). Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. *Phytotherapy Research*, 14(7): 546–548.
- Mananjarasoa, E.; Rakotovo, M.; Ramanoelina, A.R.P.; Andriantsiferana, M.H.; Ravaonindrina, N. (1998). Composition and antimicrobial activity of leaf oil of *Pittosporum senacia* var. *coursii* Cufodontis. *Journal of Essential Oil Research*, 10(4): 459–462.
- Manase, M.J.; Mitaine-Offer, A.C.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Delemeasure, S.; Dutartre, P.; Lacaille-Dubois, M.A. (2013). New triterpenoid estersaponins from the root barks of *Pittosporum verticillatum* subsp. *verticillatum* and evaluation of cytotoxicities. *Fitoterapia*, 91: 231–235.
- Mani, B.; Dennis, T. (2014). Evaluation of the antioxidant potential of *Pittosporum dasycaulon* Miq. stem bark. *Food Science and Biotechnology*, 23(2): 539–545.
- Maoka, T.; Akimoto, N.; Kuroda, Y.; Hashimoto, K.; Fujiwara, Y. (2008). Pittosporumxanthins, cycloaddition products of carotenoids with  $\alpha$ -tocopherol from seeds of *Pittosporum tobira*. *Journal of Natural Products*, 71(4): 622–627.
- Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Akimoto, N. (2006). 5-Hydroxy-seco-carotenoids from *Pittosporum tobira*. *Phytochemistry*, 67(19): 2120–2125.
- Marston, A.; Dudan, G.; Gupta, M.P.; Solis, P.N.; Correa, M.D.; Hostettmann, K. (1996). Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(1): 15–18.
- Martins, F.O.; Esteves, P.F.; Mendes, G.S.; Barbi, N.S.; Menezes, F.S.; Romanos, M.T.V. (2009). Verbascoside isolated from *Lepechinia speciosa* has inhibitory activity against HSV-1 and HSV-2 *in vitro*. *Natural Product Communications*, 4(12): 1693–1696.
- Massiot, G.; Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins. *Studies in Natural Products Chemistry*, 15(Parte C): 187–224.
- Mathias, M.E. (1936). The genus *Hydrocotyle* in northern South America. *Brittonia*, 2(3): 201–237.
- Matsushita, A.; Sasaki, Y.; Warashina, T.; Miyase, T.; Noguchi, H.; Vander Velde, D. (2004). Hydrocotylosides I-VII, new oleanane saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Journal of Natural Products*, 67(3): 384–388.
- Maulidiani, H.; Khatib, A.; Shaari, K.; Abas, F.; Shitan, M.; Kneer, R.; Neto, V.; Lajis, N.H. (2012). Discrimination of three pegaga (*Centella*) varieties and determination of growth-lighting effects on metabolites content based on the chemometry of 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1): 410–417.
- Maulidiani, Abas, F.; Khatib, A.; Shaari, K.; Lajis, N.H. (2014). Chemical characterization and antioxidant activity of three medicinal Apiaceae species. *Industrial Crops and Products*, 55: 238–247.
- McDoniel, P.B.; Cole, J.R. (1972). Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): Isolation and structure determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(12): 1992–1994.

- Medeiros, J.R.; Campos, L.B.; Mendonça, S.C.; Davin, L.B.; Lewis, N.G. (2003). Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, 64(2): 561–565.
- Medeiros, R.T.S.; Gonçalves, E.; Felício, R.C.; Felício, J. (2011). Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1): 71–76.
- Meier, W. (2005). Aspectos de la flora y vegetación del monumento natural cerro Platillón (Juan Germán Roscio), Estado Guárico, Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*, 28(1): 39–62.
- Melek, F.R.; Miyase, T.; Ghaly, N.S.; Yousif, M.F. (2004). Further saponins from *Meryta lanceolata*. *Phytochemistry*, 65(7): 909–914.
- Mendes, M.D.; Lima, A.S.; Trindade, H.; Correia, A.I.D.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Figueiredo, A.C. (2011). ISSR molecular characterization and leaf volatiles analysis of *Pittosporum undulatum* Vent. naturalized in the Azores archipelago (Portugal). *Industrial Crops and Products*, 33(3): 710–719.
- Mendes, S.A.C.; Mansoor, T.A.; Rodrigues, A.; Armas, J.B.; Ferreira, M.J.U. (2013). Anti-inflammatory guaianene-type sesquiterpenes from the fruits of *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, 95: 308–314.
- Messina, F.; Curini, M.; Di Sano, C.; Zadra, C.; Gigliarelli, G.; Rascón-Valenzuela, L.A.; Robles Zepeda, R.E.; Marcotullio, M.C. (2015). Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*, 78(5): 1184–1188.
- Mink, C.J.K. (1956). Contribution to the knowledge of the haemolytic activity of *Hydrocotyle Vulgaris* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(1): 1155–1162.
- Mitaine-Offer, A.C.; Pérez, N.; Miyamoto, T.; Delaude, C.; Mirjolet, J.F.; Duchamp, O.; Lacaille-Dubois, M.A. (2010). Acylated triterpene saponins from the roots of *Securidaca longepedunculata*. *Phytochemistry*, 71(1): 90–94.
- Mitchell, S.A.; Ahmad, M.H. (2006). A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948 – 2001. *West Indian Medical Journal*, 55(876): 243–269.
- Mojica, M.A.; León, A.; Rojas-Sepúlveda, A.M.; Marquina, S.; Mendieta-Serrano, M.A.; Salas-Vidal, E.; Villarreal, M.L.; Alvarez, L. (2016). Aryldihydronaphthalene-type lignans from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* and their antimetabolic mechanism of action. *RSC Advances*, 6(6): 4950–4959.
- Momeni, J.; Ntchatchoua, W.P.D.; Fadimatou; Akam, M.T.; Ngassoum, M.B. (2010). Antioxidant activities of some cameroonian plants extracts used in the treatment of intestinal and infectious diseases. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(1): 140–144.
- Mondal, P.; Bhuyan, N.; Das, S.; Kumar, M.; Borah, S.; Mahato, K. (2013). Herbal medicines useful for the treatment of diabetes in North-East India: A review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3(1): 575–589.
- Monroy-Ortíz, C.; Castillo España, P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, 2º ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 405 p.
- Moon, H.I.; Park, W.H. (2010). Four carotenoids from *Pittosporum tobira* protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced toxicity. *Phytotherapy Research*, 24: 625–628.
- Mooney, H.A.; Emboden Jr., W.A. (1968). The relationship of terpene composition, morphology, and distribution of populations of *Bursera microphylla* (Burseraceae). *Brittonia*, 20(1): 44–51.
- Moraes, C.S.S.; Bara, M.T.; Paula, J.R.; Conceição, E.C. (2012). Detection methods for rosmarinic acid in *Ocimum gratissimum* L. extracts, in: XXII Simposio de Plantas Mediciniais Do Brasil.
- Morales-Serna, J.A.; Cruz-Galicia, E.; García-Ríos, E.; Madrigal, D.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Salmón, M. (2013). Three new diarylbutane lignans from the resin of *Bursera fagaroides*. *Natural Product Research*, 27(9): 824–829.
- Moreno, J.; Aparicio, R.; Velasco, J.; Rojas, L.B.; Usubillaga, A.; Lue-Meru, M. (2010a). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from fruits of *Bursera tomentosa*. *Natural Product Communications*, 5(2): 311–313.
- Moreno, J.; Rojas, L.B.; Aparicio, R.; Marcó, L.M.; Usubillaga, A. (2010b). Chemical composition of the essential oil from the bark *Bursera tomentosa* (Jacq) Tr y Planch. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(6): 491–494.

- Mu, S.; Wang, Y.; Hao, X. (2004). Study on chemical constituents of volatile oil from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. *Natural Product Research and Development*, 16(3): 215–217.
- Munesada, K.; Ogihara, K.; Suga, T. (1991). Absolute configurations of pittosporatobiraside A and B from *Pittosporum tobira*. *Phytochemistry*, 30(12): 4158–4159.
- Muñoz-Acevedo, A.; Serrano-Urbe, A.; Parra-Navas, X.J.; Olivares-Escobar, L.A.; Niño-Porras, M.E. (2013). Análisis multivariable y variabilidad química de los metabolitos volátiles presentes en las partes aéreas y la resina de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana y Planch. de Soledad (Atlántico, Colombia). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(3): 322–337.
- Murillo-Alvarez, J.I.; Encarnación, D.R.; Franzblau, S.G. (2001). Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology*, 39(6): 445–449.
- Muthaura, C.N.; Rukunga, G.M.; Chhabra, S.C.; Omar, S.A.; Guantai, A.N.; Gathirwa, J.W.; Tolo, F.M.; Mwitari, P.G.; Keter, L.K.; Kirira, P.G.; Kimani, C.W.; Mungai, G.M.; Njagi, E.N.M. (2007). Antimalarial activity of some plants traditionally used in Meru district of Kenya. *Phytotherapy Research*, 21(9): 860–867.
- Nakanishi, T.; Inatomi, Y.; Arai, S.; Yamada, T.; Fukatsu, H.; Murata, H.; Inada, A.; Matsuura, N.; Ubukata, M.; Murata, J.; Iinuma, M.; Perez Farrea, M.A.; Tanaka, T. (2003). New luteolin 3'-O-acylated rhamnosides from leaves of *Bursera graveolens*. *Heterocycles*, 60(9): 2077–2083.
- Nakanishi, T.; Inatomi, Y.; Murata, H.; Shigeta, K.; Iida, N.; Inada, A.; Murata, J.; Farrera, M.A.P.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Tajima, S.; Oku, N. (2005). A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. *Chemical y Pharmaceutical Bulletin*, 53(2): 229–231.
- Nakano, D.; Ishitsuka, K.; Hatsuse, T.; Tsuchihashi, R.; Okawa, M.; Okabe, H.; Tamura, K.; Kinjo, J. (2011). Screening of promising chemotherapeutic candidates against human adult T-cell leukemia/lymphoma from plants: Active principles from *Physalis pruinosa* and structure-activity relationships with withanolides. *Journal of Natural Medicines*, 65(3–4): 559–567.
- Nakaoki, T.; Morita, N. (1960). Studies on the medicinal resources. XVI. Flavonoids of the leaves of *Castanea pubinervis* Schneid., *Hydrocotyle Wilfordii* Maxim., *Sanguisorba hakusanensis* Makino., *Euptelaea polyandra* Sieb. et Zucc., *Carthamus tinctoria* L., *Lactuca repens* Maxim., *Daucus carota* L. var. *sativa* DC, *Ilex integra* Thunb., *Smilax china* L., and *Smilax medica* Schl. et Cham. *Yakugaku Zasshi*, 80(10): 1473–1475.
- Nemethy, E.K.; Calvin, M. (1980). Terpenes from Pittosporaceae. *Phytochemistry*, 21(12): 2981–2982.
- Nicolas, A.N.; Plunkett, G.M. (2009). The demise of subfamily Hydrocotyloideae (Apiaceae) and the re-alignment of its genera across the entire order Apiales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1): 134–151.
- Nie, R.-L.; Morita, T.; Kasai, R.; Zhou, J.; Wu, C.-Y.; Tanaka, O. (1984). Saponins from chinese medicinal plants. (1). Isolation and structures of Hemslosides. *Planta Medica*, 50(4): 322–327.
- Nie, T.T.; Zhao, H.X.; Bai, H. (2011). Chemical constituents of *Pittosporum glabratum*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(3): 180–184.
- Noge, K.; Becerra, J.X. (2009). Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*, 14(12): 5289–5297.
- Noge, K.; Shimizu, N.; Becerra, J.X. (2010). (R)-(-)-linalyl acetate and (S)-(-)-germacrene D from the leaves of Mexican *Bursera linanoe*. *Natural Product Communications*, 5(3): 351–4.
- Noge, K.; Venable, D.L.; Becerra, J.X. (2011). 2-Phenylethanol in the leaves of *Bursera velutina* Bullock (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*, 97: 9–16.
- Noguera, B.; Díaz, E.; García, M.V.; Feliciano, A.S.; López-Pérez, J.L.; Israel, A. (2004). Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1): 129–133.
- Noguera, B.; López-Pérez, J.L.; San Feliciano, A.; Díaz, E.; García, M.V.; Israel, A. (2006). Actividad antiinflamatoria de la metil-β-peltatina A aislada de la hoja de la sp. *Bursera simaruba* (L.). *Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela*, 69(1–2): 28–33.
- Noriega-Ramos, O.A.; Regalado-Méndez, A.; Ramírez-Mares, J.M.V.; Báez-González, J.G. (2010). Caracterización fisicoquímica del exudado de palo mulato y su potencial como aditivo en alimentos, in: XII Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos. p. 6.
- Nyongbela, K.D.; Lannang, A.M.; Ayimele, G.A.; Ngemenya, M.N.; Bickle, Q.; Efange, S. (2013). Isolation and identification of an antiparasitic triterpenoid estersaponin from the stem bark of *Pittosporum mannii* (Pittosporaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(5): 389–392.

- Ogihara, K.; Munesada, K.; Suga, T. (1989). Sesquiterpene glycosides and other terpene constituents from the flowers of *Pittosporum tobira*. *Phytochemistry*, 28(11): 3085–3091.
- Oh, J.H.; Jeong, Y.J.; Koo, H.J.; Park, D.W.; Kang, S.C.; Khoa, H.V.B.; Le, L.B.; Cho, J.H.; Lee, J.Y. (2014). Antimicrobial activities against periodontopathic bacteria of *Pittosporum tobira* and its active compound. *Molecules*, 19(3): 3607–3616.
- Otang, W.M.; Grierson, D.S.; Ndip, R.N. (2012). Phytochemical studies and antioxidant activity of two South African medicinal plants traditionally used for the management of opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 43–49.
- Ouviña, A.; Gorzalczy, S.; Acevedo, C.; Ferraro, G. (2009). Actividad antiinflamatoria tópica de extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Apiaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(6): 941–944.
- Pal, B.C.; Chaudhuri, T.; Yoshikawa, K.; Arihara, S. (1994). Saponins from *Barringtonia acutangula*. *Phytochemistry*, 35(5): 1315–1318.
- Parejo, I.; Caprai, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Jáuregui, O.; Codina, C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1): 175–184.
- Pegu, R.; Tamuli, A.K.; Teron, R. (2014). Diversity of medicinal plants in Poba Reserved Forest, Dhemaji district, Assam, India. *Pleione*, 8(2): 462–474.
- Peraza-Sanchez, S.R.; Pena-Rodriguez, L.M. (1992). Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 55(12): 1768–1771.
- Peraza-Sánchez, S.R.; Salazar-Aguilar, N.E.; Peña-Rodríguez, L.M. (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 58(2): 271–274.
- Pérez-Colmenares, A.; Vivas-Guerrero, K.; Rojas-Fermín, L.; Usubillaga, A.; Chataing, B. (2014). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (kunth) Epling. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 56(1): 40–45.
- Perez-Hernandez, N.; Ponce-Monter, H.; Medina, J.A.; Joseph-Nathan, P. (2008). Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1): 30–35.
- Pizzale, L.; Bortolomeazzi, R.; Vichi, S.; Überegger, E.; Conte, L.S. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14): 1645–1651.
- Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochemistry Reviews*, 9(3): 425–474.
- Ponou, B.K.; Nono, R.N.; Teponno, R.B.; Tapondjou, A.L.; Lacaille-Dubois, M.A.; Quassinti, L.; Bramucci, M.; Barboni, L. (2014). Bafouoside C, a new triterpenoid saponin from the roots of *Cussonia bancoensis* Aubrev. y Pellegr. *Phytochemistry Letters*, 10: 255–259.
- Power, F.B.; Tutin, F. (1906). CX - The constituents of the essential oil from the fruit of *Pittosporum undulatum*. *Journal of the Chemical Society, Transaction*, 89: 1083–1092.
- Pu, S.C.; Guo, Y.; Gao, W.Y. (2010). Chemical constituents of *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Zhongcaoyao*, 41(9): 1440–1442.
- Puebla-Pérez, A.M. (1999). Actividad citotóxica, antitumoral e inmunológica de extractos obtenidos de *Bursera fagaroides*. Universidad de Guadalajara. 94 p.
- Puebla-Pérez, A.M.; Huacuja-Ruiz, L.; Rodríguez-Orozco, G.; Villaseñor-García, M.M.; Miranda-Beltrán, M.L.; Celis, A.; Sandoval-Ramírez, L. (1998). Cytotoxic and antitumour activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Research*, 12(8): 545–548.
- Puertas-Mejía, M.; Hillebrand, S.; Stashenko, E.; Winterhalter, P. (2002). *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5): 380–384.
- Queiroga, C.L.; Teixeira Duarte, M.C.; Baesa Ribeiro, B.; de Magalhães, P.M. (2007). Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 78(4): 327–328.
- Ragasa, C.Y.; Rideout, J.A.; Tierra, D.S.; Coll, J.C. (1997). Sesquiterpene glycosides from *Pittosporum pentandrum*. *Phytochemistry*, 45(3): 545–547.
- Rahalison, L.; Hamburger, M.; Hostettmann, K.; Monod, M.; Frenk, E.; Gupta, M.P.; Santana, A.I.; Correa, M.D.; Gonzalez, A.G. (1993). Screening for antifungal activity of Panamanian Plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(1): 68–76.



- Ramanandraibe, V.; Rakotovao, M.; Andriamaharavo, R.N.; Bessière, J.M.; Ravaonindrina, N.; Ramanoelina, A.R.P. (2000). Composition and antimicrobial activity of the leaf and fruit essential oil of *Pittosporum viridiflorum* Culofondis var. *viridiflorum*. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5): 650–652.
- Ramanandraibe, V.; Rakotovao, M.; Frappier, F.; Martin, M.T. (2001). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR structure determination of new sesquiterpene glycosides isolated from *Pittosporum viridiflorum viridiflorum*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39(12): 762–764.
- Ramos, F.; Takaishi, Y.; Kawazoe, K.; Osorio, C.; Duque, C.; Acuña, R.; Fujimoto, Y.; Sato, M.; Okamoto, M.; Oshikawa, T.; Ahmed, S.U. (2006). Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. *Phytochemistry*, 67(11): 1143–1150.
- Razafindraibe, M.; Kuhlman, A.R.; Rabarison, H.; Rakotoarimanana, V.; Rajeriarison, C.; Rakotoarivelo, N.; Randrianarivony, T.; Rakotoarivony, F.; Ludovic, R.; Randrianasolo, A.; Bussmann, R.W. (2013). Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(1): 73–85.
- Reynoso-Orozco, R.; Delgado-Saucedo, J.I.; Puebla-Pérez, A.M.; Calvo-Méndez, C.; Carr, D.; Velázquez-Magaña, S.; Santerre, A. (2008a). Difluorometil ornitina y el extracto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178y en ratones BAB/C: comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Revista de Salud Animal*, 30(2): 128–132.
- Reynoso-Orozco, R.; Santerre, A.; Delgado-Saucedo, J.I.; Solís, J.C.; Velázquez-Magaña, S.; Puebla-Pérez, A.M. (2008b). Polyamines as biomarkers of the antitumoral activity of *Bursera fagaroides*. *Interciencia*, 33(5): 384–388.
- Robles, J.; Torrenegra, R.; Gray, A.I.; Piñeros, C.; Ortiz, L.; Sierra, M. (2005). Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4): 283–286.
- Rocha, F.F.; Almeida, C.S.; dos Santos, R.T.; Santana, S.A.; Costa, E.A.; de Paula, J.R.; Vanderlinde, F.A. (2011). Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* extract in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(1): 115–120.
- Rodrigues, F.S.L.M.; Antunes, L.C.S.; Figueiredo, A.C.; Costa, M.; Pereira, J.D.S.; Colaço, R.D.R.; Miranda, H.H.S.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Scheffer, J.J.C. (2007). Composition of the leaf, flower and fruit volatile oils of *Pittosporum tobira* (Thunb.) W. T. Aiton grown in three locations in Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(4): 311–316.
- Rodríguez-López, V.; Salazar, L.; Estrada, S. (2003). Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia*, 74(7–8): 725–728.
- Rojas-Sepúlveda, A.M.; Mendieta-Serrano, M.; Mojica, M.Y.A.; Salas-Vidal, E.; Marquina, S.; Villarreal, M.L.; Puebla, A.M.; Delgado, J.I.; Alvarez, L. (2012). Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*, 17(8): 9506–9519.
- Rojas, L.B.; Usubillaga, A.; Cegarra, J.A.; Borregales, E.; Carrero, S. (2004). Composición química y actividad antimicótica de el aceite esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht) Vatke. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 46(1): 27–30.
- Rojas, L.B.; Usubillaga, A.; Rondón, J.; Vit, P. (2009). Essential oil composition of *Hydrocotyle umbellata* L. from Venezuela. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3): 253–254.
- Rojas, R.; Bustamante, B.; Bauer, J.; Fernández, I.; Albán, J.; Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2–3): 199–204.
- Rojas Hernández, N.M.; Rodríguez Uramis, M. (2008). Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L. f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg. y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4): 0–0.
- Román-Ramos, R.; Contreras-Weber, C.C.; Nohpal-Grajeda, G.; Flores-Saenz, J.L.; Alarcon-Aguilar, F.J. (2001). Blood glucose level decrease caused by extracts and fractions from *Lepechinia caulescens* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*, 39(4): 317–321.
- Román-Ramos, R.; Flores-Sáenz, J.L.; Partida-Hernández, G.; Lara-Lemus, A.; Alarcón-Aguilar, F. (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica*, 22(1): 87–93.
- Román-Ramos, R.; Lara Lemus, A.; Alarcón Aguilar, F.; Flores Saenz, J.L. (1992). Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archives of Medical Research*, 23(3): 105–109.

- Rosales, K.; Ciccío, J.F. (2002). The volatile oil of the fruits of *Bursera simaruba* (L.), Sarg. (Burseraceae) from Costa Rica. *Ingeniería y Ciencia Química*, 20: 60–61.
- Rosas-Piñón, Y.; Mejía, A.; Díaz-Ruiz, G.; Aguilar, M.I.; Sánchez-Nieto, S.; Rivero-Cruz, J.F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3): 860–865.
- Ruffa, M.J.; Wagner, M.L.; Suriano, M.; Vicente, C.; Nadinic, J.; Pampuro, S.; Salomón, H.; Campos, R.H.; Cavallaro, L. (2004). Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. *Antiviral Chemistry y Chemotherapy*, 15(3): 153–159.
- Rumampuk, R.J.; Pongoh, E.J.; Tarigan, P.; Herlt, A.J.; Mander, L.N. (2012). Complete assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the camelliagenin A and A1-barrigenol from the seed of *Barringtonia asiatica*. *The Open Natural Products Journal*, 5: 7–12.
- Rzadkowska, H.; Olechnowicz, W. (1974). Flavonoid compounds in herb pennywort (*Hydrocotyle vulgaris*). *Herba Polonica*, 20(3): 243–246.
- Rzedowski, J.; Guevara-Féfer, F. (1992). Burseraceae. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*, 3: 1–46.
- Rzedowski, J.; Lemus, R.M.; Rzedowski, G.C. (2004). Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*, 66: 23–151.
- Sadgrove, N.J.; Jones, G.L. (2013). Chemical and biological characterisation of solvent extracts and essential oils from leaves and fruit of two Australian species of *Pittosporum* (Pittosporaceae) used in aboriginal medicinal practice. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(3): 813–821.
- Saha, J.; Sarkar, P.K.; Chattopadhyay, S. (2011). A survey of ethnomedicinal plants of Darjeeling hills for their antimicrobial and antioxidant activities. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(4): 479–492.
- Saikia, P.; Deka, D.C. (2013). Mineral content of some wild green leafy vegetables of North-East India. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(3): 117–121.
- Salgues, R. (1954). Etudes sur les Pittosporacees I. Les huiles essentielles de *Pittosporum*. *Materiae Vegetabiles*, 1(4): 340–358.
- Sánchez-Contreras, S.; Díaz-Lanza, A.M.; Bernabé, M. (2000). Four new triterpenoid saponins from the roots of *Bupleurum rigidum*. *Journal of Natural Products*, 63(11): 1479–1482.
- Santana, P.M.; Miranda, M.; Gutiérrez, Y.; García, G.; Orellana, T.; Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana y Planch. (palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3): 45–53.
- Savithamma, N.; Sulochana, C.; Rao, K.N. (2007). Ethnobotanical survey of plants used to treat asthma in Andhra Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1): 54–61.
- Seo, Y.; Berger, J.M.; Hoch, J.; Neddermann, K.M.; Bursuker, I.; Mamber, S.W.; Kingston, D.G.I. (2002). A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products*, 65(1): 65–68.
- Serrano, H.; Garcia-Suarez, M.D. (2001). Sperm aggregation by water extracts from two *Bursera* species. *Archives of Andrology*, 46(1): 15–20.
- Shanshi, Y. (2013). Characterisation of volatile compounds from the leaves of six *Pittosporum* species; an instrumental and sensory evaluation. Auckland University of Technology. 85 p.
- Shigematsu, N.; Kouno, I.; Kawano, N. (1982). Quercetin 3-(6"-caffeoyl)galactoside) from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry*, 21(8): 2156–2158.
- Shyamal, S.; Latha, P.G.; Shine, V.J.; Suja, S.R.; Rajasekharan, S.; Ganga Devi, T. (2006). Hepatoprotective effects of *Pittosporum neelgherrense* Wighty Arn., a popular Indian ethnomedicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1): 151–155.
- Sikdar, M.; Dutta, U. (2008). Traditional phytotherapy among the Nath people of Assam. *Studies on Ethno Medicine*, 2(1): 39–45.
- Silva, C.B.; Cândido, A.C.S.; Simionatto, E.; Faccenda, O.; Scalón, S.P.Q.; Peres, M.T.L.P. (2010). Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). *Acta Scientiarum - Technology*, 32(4): 413–420.
- Silva, C.B.; Simionatto, E.; Hess, S.C.; Peres, M.T.L.P.; Simionatto, E.L.; W. Júnior, A.; Poppi, N.R.; Faccenda, O.; Cândido, A.C.S.; Scalón, S.P.Q. (2009). Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (araliaceae). *Química Nova*, 32(9): 2373–2376.



- Silva, M. (1968). Triterpenic constituents of *Lepechinia chamaedryoides*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(5): 864–865.
- Sood, K.; Yadav, R.N.S. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activity of four members of family Apiaceae. *International Journal of Phytomedicine*, 6: 232–236.
- Sosa, A.; Rosquete, C.; Rojas, L.; Pouységu, L.; Quideau, S.; Paululat, T.; Mitaine-Offer, A.C.; Lacaille-Dubois, M.A. (2011). New triterpenoid and ergostane glycosides from the leaves of *Hydrocotyle umbellata* L. *Helvetica Chimica Acta*, 94(10): 1850–1859.
- Sosa, S.; Balick, M.J.; Arvigo, R.; Esposito, R.G.; Pizza, C.; Altinier, G.; Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2): 211–215.
- Souza, M.P.; Machado, M.I.L.; Braz-Filho, R. (1989). Six flavonoids from *Bursera leptophloeos*. *Phytochemistry*, 28(9): 2467–2470.
- Sparg, S.G.; Light, M.E.; Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3): 219–243.
- Standley, P.C.; Williams, L.O. (1973). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(Part IX (3–4)): 262–264.
- Stark, T.D.; Mtui, D.J.; Balemba, O.B. (2013). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of gastrointestinal pain, inflammation and diarrhea in Africa: Future perspectives for integration into modern medicine. *Animals*, 3(1): 158–227.
- Stashenko, E.E.; Cervantes, M.; Combariza, Y.; Fuentes, H.; Martínez, J.R. (1999). HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22(6): 343–349.
- Stuart, B.H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley. 203 p.
- Su, Z.; Huang, H.; Li, J.; Zhu, Y.; Huang, R.; Qiu, S.X. (2013). Chemical composition and cytotoxic activities of petroleum ether fruit extract of fruits of *Brucea javanica* (Simarubaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5): 735–742.
- Suazo F., G.; González M., F.; Urbina P., A.; Pastene N., E.; Sáez C., K.; Serri G., H.; Chávez E., R. (2012). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling en *Drosophila melanogaster*. *Gayana Botánica*, 69(2): 256–266.
- Suga, T.; Munesada, K.; Ogihara, K.; Morita, T.; Shirai, T. (1988). The structure of a new sesquiterpene glycoside from the flowers of *Pittosporum tobira*. *Chemistry Letters*, (3): 445–448.
- Swamy, A.; Obey, J.K.; Kipngetich, T.E.; Edwin, M. (2014). *In vitro* antibacterial activity of ethanolic extract of *Pittosporum viridiflorum* leaves extract against laboratory strains of selected microorganisms. *International Journal of Bioassay*, 3(10): 3388–3394.
- Syamasundar, K.V.; Mallavarapu, G.R. (1995). Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*, 40(1): 337–339.
- Syamasundar, K.V.; Mallavarapu, G.R.; Krishna, E.M. (1991). Triterpenoids of the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*, 30(33): 362–363.
- Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Legault, J. (2007). Volatile leaf constituents and anticancer activity of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. essential oil. *Natural Product Communications*, 2(12): 1273–1276.
- Taba, S.; Sawada, J.; Moromizato, Z.I. (2008). Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Plant and Soil*, 303(1–2): 207–216.
- Tabopda, T.K.; Mitaine-Offer, A.C.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Mirjolet, J.F.; Duchamp, O.; Ngadjui, B.T.; Lacaille-Dubois, M.A. (2012). Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochemistry*, 73: 142–147.
- Takaoka, D.; Kawahara, H.; Ochi, S.; Hiroi, M.; Nozaki, H.; Nakayama, M.; Ishizaki, K.; Sakata, K.; Ina, K. (1986). The structures of sesquiterpenes glycosides from *Pittosporum tobira* Ait. *Chemistry Letters*, 15(7): 1121–1124.
- Tapondjou, L.A.; Mitaine-Offer, A.C.; Miyamoto, T.; Lerche, H.; Mirjolet, J.F.; Guilbaud, N.; Lacaille-Dubois, M.A. (2006). Triterpene saponins from *Schefflera abyssinica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(12): 887–889.
- Tee, E.; Lim, C.L. (1991). Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. *Food Chemistry*, 41(3): 309–339.

- Tene, V.; Malagón, O.; Finzi, P.V.; Vidari, G.; Armijos, C.; Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1): 63–81.
- The American Oil Chemists' Society (2015). AOCs Lipid Library [Contenido Web]. URL: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.cfm> (consultado el 12/06/16).
- The Plant List (2013). The Plant List: A working list of all plant species [Contenido Web]. URL: <http://www.theplantlist.org> (consultado el 15/05/16).
- Tomei, P.E.; Cioni, P.L.; Morelli, I. (1989). Geobotanical and phytochemical reflexions on *Hydrocotyle vulgaris* L., *Hydrocotyle ranunculoides* L. and *Centella asiatica* (L.) Urban. *Medicinales et Phytotherapie*, 23(1): 38–45.
- Trumbull, E.R.; Cole, J.R. (1969). Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) III: Synthesis of burseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(2): 176–178.
- Tucker, A.O.; Maciarello, M.J.; Brown, R.C.; Landrum, L.R.; Lafferty, D. (2009). Essential oils from the oleo-gum-resins of elephant tree or torote (*Bursera microphylla* A. Gray, Burseraceae) from Arizona. *Journal of Essential Oil Research*, 21(1): 57–58.
- Tursch, B.; Tursch, E. (2010). Triterpènes du latex de *Bursera*. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 70(9–10): 585–591.
- Usha, T.; Middha, S.; Bhattacharya, M.; Lokesh, P.; Goyal, A. (2014). Rosmarinic acid, a new polyphenol from *Baccaurea ramiflora* Lour. leaf: A probable compound for its anti-inflammatory activity. *Antioxidants*, 3(4): 830–842.
- Valarezo, E.; Castillo, A.; Guaya, D.; Morocho, V.; Malagón, O. (2012). Chemical composition of essential oils of two species of the Lamiaceae family: *Scutellaria volubilis* and *Lepechinia paniculata* from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 24(1): 31–37.
- Valenzuela, L.; Vila, R.; Canigueral, S.; Adzet, T. (1992). The essential oil of *Sphacele chamaedryoides*. *Planta Medica*, 58(3): 273–274.
- Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M.J.; Esteban, J.L.; Guzmán, C.A.; Zygadlo, J.A.; Ariza-Espinar, L. (1994). Essential oil of *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epl. *Journal of Essential Oil Research*, 6(5): 539–540.
- Velázquez-Jiménez, R.; Torres-Valencia, J.M.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Hernández-Hernández, J.D.; Román-Marín, L.U.; Manríquez-Torres, J.J.; Gómez-Hurtado, M.A.; Valdez-Calderón, A.; Motilva, V.; García-Mauriño, S.; Talero, E.; Ávila, J.; Joseph-Nathan, P. (2011). Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, 72(17): 2237–2243.
- Velazquez, D.; Arrijoa, E.; Tillett, S. (1995). Usos populares de Lamiaceae en Venezuela. *Acta Botánica Venezolana*, 18(1/2): 5–20.
- Venkatachalam, M.R.; Jebanesan, A. (2001). Larvicidal activity of *Hydrocotyle javanica* Thumb. (Apiaceae) extract against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Experimental Zoology of India*, 4: 99–101.
- Vila, R.; Vercheval, C.; Carhuapoma, M.; Casanova, J.; Cañigueral, S. (2009). Composition of the essential oil from aerial parts of *Lepechinia meyenii*. *Planta Medica*, 75(9).
- Voigt, G.; Hiller, K.; Franke, P. (1981). Structure of flavonoids from *Hydrocotyle vulgaris* L. *Pharmazie*, 36(5): 377–379.
- Wang, Q.; Grkovic, T.; Font, J.; Bonham, S.; Pouwer, R.H.; Bailey, C.G.; Moran, A.M.; Ryan, R.M.; Rasko, J.E.J.; Jormakka, M.; Quinn, R.J.; Holst, J. (2014). Monoterpene glycoside ESK246 from *Pittosporum* targets LAT3 amino acid transport and prostate cancer cell growth. *ACS Chemical Biology*, 9(6): 1369–1376.
- Weston, R.J. (2004). Composition of essential oils from the leaves of seven New Zealand species of *Pittosporum* (Pittosporaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 16(5): 453–458.
- Wickramaratne, D.B.M.; Mar, W.; Chai, H.; Castillo, J.J.; Farnsworth, N.R.; Soejarto, D.D.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica*, 61(1): 80–81.
- Wu, G.D.; Qian, Z.Q.; Dai, J. (2007). Experimental study on antituberculous activities of *Pittosporum brevicalyx* (Oliv.) Gagnep. *Journal of the Chinese Antituberculosis Association*, 29: 41–43.
- Wu, H.; Haig, T.; Pratley, J.; Lemerle, D.; An, M. (2001). Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in shoot tissues. *Journal of Chemical Ecology*, 27(1): 125–135.

- Xiao, B.K.; Yang, J.Y.; Liu, Y.R.; Dong, J.X.; Huang, R.Q. (2015a). Chemical constituents of *Pittosporum illicoides*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(6): 1126–1129.
- Xiao, B.K.; Yang, J.Y.; Liu, Y.R.; Dong, J.X.; Huang, R.Q. (2015b). A New phthalide from *Pittosporum illicoides*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(4): 634–636.
- Yaacob, K.B.; Ariffin, S. (2000). Volatile constituents of the fruit oil of *Pittosporum* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2): 205–206.
- Yasunaka, K.; Abe, F.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Pérez, L.; López-Villafranco, E.; Muñoz, E.E.; Aguilar, A.; Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2): 293–299.
- Yosioka, I.; Hino, K.; Matsuda, A.; Kitagawa, I. (1972). Saponin and sapogenol. VI. Sapogenol constituents of leaves of *Pittosporum tobira* AIT. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 20(7): 1499–1506.
- Yosioka, I.; Kitagawa, I.; Hino, K.; Matsuda, A.; Nakagawa, Y. (1968). The sapogenol constituents of the leaves of *Pittosporum tobira* Ait. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16(1): 190–193.
- Young, D.G.; Chao, S.; Casablanca, H.; Bertrand, M.C.; Minga, D. (2007). Essential oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6): 525–526.
- Yu, F.; Yu, F.; McGuire, P.M.; Li, R.; Wang, R. (2007). Effects of *Hydrocotyle sibthorpioides* extract on transplanted tumors and immune function in mice. *Phytomedicine*, 14(2–3): 166–171.
- Yukawa, C.; Imayoshi, Y.; Iwabuchi, H.; Komemushi, S.; Sawabe, A. (2006). Chemical composition of three extracts of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(2): 234–238.
- Yukawa, C.; Iwabuchi, H. (2003). Terpenoids in volatile oil from *Bursera graveolens*. *Journal of Oleo Science*, 52(9): 483–489.
- Yukawa, C.; Iwabuchi, H.; Kamikawa, T.; Komemushi, S.; Sawabe, A. (2004a). Terpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6): 565–570.
- Yukawa, C.; Iwabuchi, H.; Komemushi, S.; Sawabe, A. (2005). Mono- and sesquiterpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6): 653–658.
- Yukawa, C.; Iwabuchi, H.; Komemushi, S.; Sawabe, A. (2004b). Eudesmane-type sesquiterpenoids in the volatile oil from *Bursera graveolens*. *Journal of Oleo Science*, 53(7): 343–348.
- Zanon, S.M.; Ceriatti, F.S.; Rovera, M.; Sabini, L.J.; Ramos, B.A. (1999). Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(2): 59–62.
- Zanoni, T.A.; Adams, R.P. (1991). Essential oils of plants from Hispaniola: 5. The volatile leaf oil of *Lepechinia urbanii* (briq.) Epling (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 6(1): 75–77.
- Zhang, L.; Zhang, D. (2008). Analysis of chemical constituents of the essential oil from *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by GC-MS. *Guangdong Yaoxueyuan Xuebao*, 24(1): 35–36.
- Zhang, L.; Zhang, D. (2007). Identification of the chemical constituents from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Guangdong Yaoxueyuan Xuebao*, 23(5): 494–495.
- Zhao, H.; Nie, T.; Guo, H.; Li, J.; Bai, H. (2012). Two new neolignan glycosides from *Pittosporum glabratum* Lindl. *Phytochemistry Letters*, 5(2): 240–243.
- Zhu, F.; Asada, T.; Sato, A.; Koi, Y.; Nishiwaki, H.; Tamura, H. (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4): 885–892.
- Zúñiga, B.; Guevara-Fefér, P.; Herrera, J.; Contreras, J.L.; Velasco, L.; Pérez, F.J.; Esquivel, B. (2005). Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. *Planta Medica*, 71(9): 825–828.

# *ANEXOS*



## Oleanane-type glycosides from *Pittosporum tenuifolium* “variegatum” and *P. tenuifolium* “gold star”



Mayra Rengifo Carrillo <sup>a,d</sup>, Anne-Claire Mitaine-Offier <sup>a</sup>, Tomofumi Miyamoto <sup>b</sup>, Chiaki Tanaka <sup>b</sup>, Laurent Pouységu <sup>c</sup>, Stéphane Quideau <sup>c</sup>, Luis B. Rojas <sup>d</sup>, Carmelo Rosquete Porcar <sup>d</sup>, Marie-Aleth Lacaille-Dubois <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, PEPITE EA 4267, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, 7, Bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>b</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

<sup>c</sup> Institut des Sciences Moléculaires, CNRS–UMR 5255 & Institut Européen de Chimie et Biologie, Université de Bordeaux, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France

<sup>d</sup> Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 December 2016

Received in revised form

13 April 2017

Accepted 18 April 2017

Available online 10 May 2017

#### Keywords:

*Pittosporum tenuifolium* “variegatum”

*Pittosporum tenuifolium* “gold star”

Pittosporaceae

Oleanane-type glycosides

NMR

### ABSTRACT

The phytochemical study of two cultivars of *Pittosporum tenuifolium* Banks & Sol. ex Gaertn, “variegatum” and “gold star”, led to the isolation of eight oleanane-type glycosides: seven previously undescribed and a known one. Their aglycons are oxygenated oleanane derivatives as barringtogenol C, camelliagenin A, hederagenin, and 22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid. Their structures were established by 2D NMR spectroscopic techniques and mass spectrometry as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O-angeloyl-22-O-acetylbarrittogenol C, 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21,22-di-O-angeloylbarrittogenol C, 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22-O-angeloylcamelliagenin A, 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-22-O-[(6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]camelliagenin A, 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, and the known ilexoside XLIX. These results represent a significative contribution to the chemotaxonomy of the genus *Pittosporum*, highlighting hederagenin-type saponins as chemotaxonomic markers of *P. tenuifolium* cultivars.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Pittosporum*, belonging to the Pittosporaceae family, is formed by around 200 species found in tropical and subtropical areas of Africa, Asia, Australia and New Zealand. In traditional medicine, the species are used in numerous countries as in China as antitussive and sedative (El Dib et al., 2015), or in the south-east of Madagascar for multiple cases (Beaujard, 1988). This genus is known as a good source of active specialised metabolites as

saponins (Xiao et al., 2013). Most of the isolated glycosides possessed acylated and hydroxylated oleanane-type aglycons such as barringtogenol C, camelliagenin A, A1-barrigenol or R1-barrigenol (Bäcker et al., 2014; D'Acquarica et al., 2002; El Dib et al., 2015; Linnek et al., 2012; Manase et al., 2013). Among all the species of *Pittosporum*, *P. tenuifolium* Banks & Sol. ex Gaertn., native from New Zealand, and its cultivars, are very appreciated in horticulture for a garden use. As part as our phytochemical study of the *Pittosporum* genus, two horticultural species, *P. tenuifolium* “variegatum” and “gold star”, were studied. In this article, we describe the isolation by successive chromatographic methods of eight saponins: four previously undescribed (1,4–6), together with a known one, from *P. tenuifolium* “variegatum” branches, and two

\* Corresponding author.

E-mail address: [m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr](mailto:m-a.lacaille-dubois@u-bourgogne.fr) (M.-A. Lacaille-Dubois).



(**2,3**) from the leaves; from *P. tenuifolium* “gold star” branches, three previously undescribed saponins (**5–7**). A chemotaxonomic study of the genus *Pittosporum* was tentatively evaluated.

## 2. Results and discussion

The aqueous ethanol extracts obtained from *P. tenuifolium* “variegatum” and from *P. tenuifolium* “gold star”, were fractionated by vacuum-liquid chromatography (VLC) and purified by repeated medium-pressure liquid chromatography (MPLC) on normal- and RP-18 silica gel. The chromatographic methods yielded compounds **1, 4–6** and the known ilexoside XLIX (Amimoto et al., 1993) from the branches of *P. tenuifolium* “variegatum”, and **2 and 3** from the leaves. From the branches of *P. tenuifolium* “gold star”, compounds **5–7** were isolated. Their structures were established by a detailed analysis of their spectral data mainly by 600 MHz 2D NMR experiments (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), and mass spectrometry (Fig. 1). Ilexoside XLIX was previously isolated from *Ilex rotunda* (Amimoto et al., 1993), and was identified by comparison of spectroscopic data with literature values.

All the saponins were isolated as white amorphous powders. Acid hydrolysis and GC analysis (Hara et al., 1987; see section 3.4.), and NMR analysis of COSY, TOCSY, NOESY and HSQC spectra, allowed the full identification of the sugar units as  $\beta$ -D-glucuronopyranosyl (GlcA),  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (Ara),  $\beta$ -D-

galactopyranosyl (Gal) for **1–3**;  $\beta$ -D-glucopyranosyl (Glc) for **4**;  $\beta$ -D-glucuronopyranosyl,  $\beta$ -D-glucopyranosyl,  $\beta$ -D-galactopyranosyl,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (Araf) for **5** and **7**;  $\beta$ -D-glucuronopyranosyl,  $\beta$ -D-glucopyranosyl,  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl for **6**.

The HRESIMS of compound **1** established its molecular formula as  $C_{54}H_{84}O_{22}$ . Its ESIMS (negative-ion mode) displayed a quasi-molecular ion peak  $[M - H]^-$  at  $m/z$  1083, indicating a molecular weight of 1084.

The  $^{13}C$  NMR and DEPT spectra of **1** (Table 1) indicated the presence of 54 carbons, among them 10 methyls, 10 methylenes, 23 methines and 11 quaternary carbons. Besides carbons assigned to the aglycon part (30), the other 24 remaining carbons corresponded to three sugar units and two substituents. The  $^1H$  NMR spectrum (Table 1) displayed signals assignable to seven angular methyl groups as singlets at  $\delta_H$  0.73 (H<sub>3</sub>-25), 0.80 (H<sub>3</sub>-26), 1.00 (H<sub>3</sub>-29), 1.02 (H<sub>3</sub>-24), 1.18 (H<sub>3</sub>-23), 1.23 (H<sub>3</sub>-30) and 1.72 (H<sub>3</sub>-27), one olefinic proton at  $\delta_H$  5.39 (*t*-like) (H-12), four oxygen-bearing methine protons at  $\delta_H$  3.20 (*dd*,  $J = 12.0, 3.5$  Hz) (H-3), 4.43 (*d*,  $J = 4.0$  Hz) (H-16), 6.08 (*d*,  $J = 10.0$  Hz) (H-22) and 6.46 (*d*,  $J = 10.0$  Hz) (H-21), and one primary alcoholic function at  $\delta_H$  3.32 (*d*,  $J = 10.1$  Hz), 3.55 (*d*,  $J = 10.1$  Hz) (H<sub>2</sub>-28). The HMBC correlations between angular methyl groups at  $\delta_H$  1.18 (*s*) (H<sub>3</sub>-23) and 1.02 (*s*) (H<sub>3</sub>-24) and  $\delta_C$  89.9 (C-3), allowed the location of one secondary alcoholic function at C-3. This was confirmed by a COSY correlation between  $\delta_H$  3.20 (H-3) and  $\delta_H$  1.86, 2.27 (H<sub>2</sub>-2). A second secondary alcoholic function was located at C-16, through a HMBC correlation at  $\delta_H$  4.43 (H-16)/ $\delta_C$  41.3 (C-14) and a COSY cross-peak at  $\delta_H$  4.43 (H-16)/ $\delta_H$  1.78 (H-15). HMBC cross-peaks at  $\delta_H$  1.00 (*s*) (H<sub>3</sub>-29)/ $\delta_C$  78.5 (C-21),  $\delta_H$  1.23 (*s*) (H<sub>3</sub>-30)/ $\delta_C$  78.5 (C-21),  $\delta_H$  6.46 (H-21)/ $\delta_C$  74.2 (C-22), and a COSY correlation between  $\delta_H$  6.46 (H-21) and 6.08 (H-22), confirmed the position of the last two secondary alcoholic functions at C-21 and C-22. Two oxygen-bearing methylene protons at  $\delta_H$  3.32, 3.55 (H<sub>2</sub>-28) in comparison with a free methyl group, suggested a primary alcoholic function at the C-28 position. This was confirmed by a HMBC correlation between  $\delta_H$  6.08 (H-22) and  $\delta_C$  63.5 (C-28). The configurations of C-3, C-16, C-21, and C-22 of the aglycon were determined by the interactions observed in the NOESY spectrum between H-3  $\alpha$ -axial and H<sub>3</sub>-23  $\alpha$ -equatorial, H-16  $\beta$ -equatorial and H<sub>3</sub>-26  $\beta$ -axial, H-21  $\alpha$ -axial and H<sub>3</sub>-29  $\alpha$ -equatorial and between H-22  $\beta$ -axial and H<sub>3</sub>-30  $\beta$ -axial. Moreover, the multiplicity and the coupling constant of the H-21 at  $\delta_H$  6.46 and the H-22 at  $\delta_H$  6.08, as a doublet ( $J = 10.0$  Hz), suggested an axial/axial coupling, with a  $\beta$ -axial orientation of the H-22 and a  $\alpha$ -axial orientation of the H-21. The structure of the aglycon of **1** was thus recognized to be the triterpene barringtogenol C and was in full agreement with literature data (Table 1) (Pal et al., 1994).

The deshielded chemical shift of H-21 at  $\delta_H$  6.46 and H-22 at  $\delta_H$  6.08, suggested that the C-21 and C-22 position were acylated. This was confirmed by the HMBC cross-peaks at  $\delta_H$  6.46 (H-21)/ $\delta_C$  167.9 (Ang-1) and  $\delta_H$  6.08 (H-22)/ $\delta_C$  171.2 (Ac-1). At the C-21 position, the substituent was composed by two vinylic methyl groups at  $\delta_H$  1.94 (*s*) and 2.03 (*d*,  $J = 6.8$  Hz), which correlated in the HMBC spectrum with one ethylenic quaternary carbon at  $\delta_C$  128.5 and an ethylenic methine carbon at  $\delta_C$  137.2. These data revealed an angeloyl group acylating the C-21 position (Table 1) (D'Acquarica et al., 2002). Furthermore, the acetylation of the C-22 position was proved by the HMBC correlation at  $\delta_H$  6.08 (H-22)/ $\delta_C$  171.2 (Ac-1). The structure of the acylated aglycon was thus established as 21-O-angeloyl-22-O-acetylbarrittogenol C (Bäcker et al., 2014).

In the osidic region, the HSQC spectrum of **1** showed signals of three anomers at  $\delta_H$  4.75 (*d*,  $J = 7.4$  Hz)/ $\delta_C$  104.6,  $\delta_H$  5.25 (*d*,  $J = 6.0$  Hz)/ $\delta_C$  104.0, and  $\delta_H$  5.40 (*d*,  $J = 7.6$  Hz)/ $\delta_C$  103.7. By a 2D NMR and a GC analysis (see Experimental), the sugar moieties were identified as one GlcA, one Gal, and one Ara units (Table 2). The relatively large  $^3J_{H-1,H-2}$  value of the GlcA, Gal and Ara (6.0–7.6 Hz)

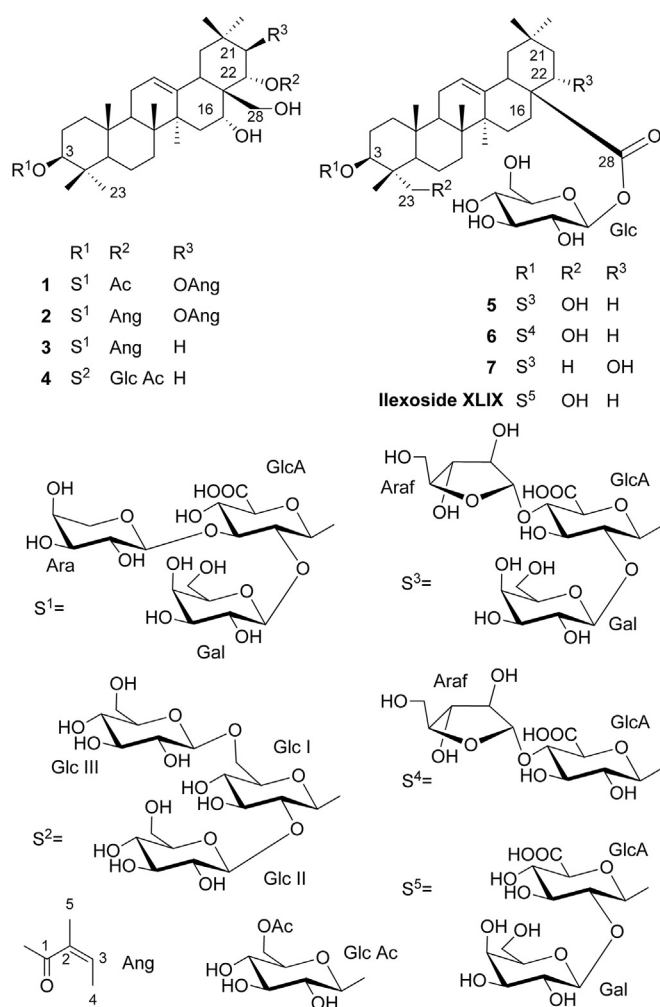


Fig. 1. Structures of compounds **1–7** and ilexoside XLIX.





	Ac at C-22	Ang at C-22	Ang at C-22
1	171.2	169.5	168.1
2	20.6	128.2	129.1
3	1.94 s	136.5	136.6
4		5.94 q (6.4)	5.88 q (7.1)
5		15.6	15.6
		2.02 d (6.4)	2.04 d (7.1)
		20.4	20.7
		1.93 s	1.92 s

n.d.: not determined.

<sup>a</sup> Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.

in their pyranose form indicated a  $\beta$  anomeric orientation for GlcA and Gal, and an  $\alpha$  anomeric orientation for Ara (Mimaki et al., 2004). The same protocol was used for identification of the monosaccharides of **2–7**.

The HMBC cross-peak at  $\delta_{\text{H}}$  4.75 (GlcA-1)/ $\delta_{\text{C}}$  89.9 (C-3),  $\delta_{\text{H}}$  5.40 (Gal-1)/ $\delta_{\text{C}}$  78.8 (GlcA-2), and  $\delta_{\text{H}}$  5.25 (Ara-1)/ $\delta_{\text{C}}$  84.5 (GlcA-3), revealed the glycosidic sequence 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl, linked to aglycon at the C-3 position. This was confirmed by the NOESY correlations at  $\delta_{\text{H}}$  4.75 (GlcA-1)/ $\delta_{\text{H}}$  3.20 (H-3),  $\delta_{\text{H}}$  5.40 (Gal-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.40 (GlcA-2), and  $\delta_{\text{H}}$  5.25 (Ara-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.28 (GlcA-3). On the basis of the above data, the structure of **1** was elucidated as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O-angeloyl-22-O-acetylbarrotoigenol C.

The HRESIMS of compound **2** established its molecular formula as  $\text{C}_{57}\text{H}_{88}\text{O}_{22}$ . Its ESIMS displayed a quasi-molecular ion peak  $[(\text{M} - \text{H})]^-$  at  $m/z$  1123 in a negative ion-mode. These data indicated a molecular weight of 1124.

The NMR signals of compound **2** sugar portion were superimposable to those of **1** (Table 2). The structural analysis also revealed that the aglycon of **2** is almost similar to **1**. They differed only by the C-22 acetyl group in **1**, which is replaced by an angeloyl group in **2** (Table 1). Thus, the structure of **2** is elucidated as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21,22-di-O-angeloylbarrotoigenol C.

The HRESIMS of compound **3** established its molecular formula as  $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{O}_{20}$ . Its ESIMS displayed, in a negative ion-mode, a quasi-molecular ion peak  $[(\text{M} - \text{H})]^-$  at  $m/z$  1025, which indicated a molecular weight of 1026.

The NMR signals of the aglycon part and the oligosaccharidic chain of compound **3** are almost similar to **2** excepted at the C-21 position of the aglycon (Tables 1 and 2). The deshielded chemical shift at  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (*dd*,  $J = 11.9, 6.0$  Hz) (H-22) and a HMBC correlation at  $\delta_{\text{H}}$  6.09/ $\delta_{\text{C}}$  168.1 (H-22/Ang-1), confirmed the acylation by an angeloyl group of the C-22 position as in **2**. On the other hand, a COSY correlation between  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (H-22) and  $\delta_{\text{H}}$  1.93/2.75 (H<sub>2</sub>-21) revealed a methylene group at the C-21 position. Thus the aglycon of **3** was identified as olean-12-ene-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -28-tetrol named camelliagenin A and was in full agreement with literature data (Chakravarty et al., 1987).

The structure of compound **3** was thus established as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22-O-angeloylcamelliagenin A.

Compound **4** exhibited in the HRESIMS (positive-ion mode) a pseudo-molecular ion peak at  $m/z$  1187.5917  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. 1187.5825) consistent with a molecular formula of  $\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{O}_{25}\text{Na}$ .

The NMR signals of the aglycon part were in accordance with those of camelliagenin A (Table 1), and differed by the chemical shift of C-22/H-22 suggesting a substitution at this position. In the sugar region, four anomeric proton signals were observed in <sup>1</sup>H-NMR at  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (*d*,  $J = 8.1$  Hz), 4.91 (*d*,  $J = 8.3$  Hz), 5.02 (*d*,  $J = 7.4$  Hz), and 5.12 (*d*,  $J = 6.7$  Hz). These signals were correlated by HSQC with carbons at  $\delta_{\text{C}}$  104.6 (Glc I-1), 105.2 (Glc III-1), 104.3 (GlcAc-1), and 105.8 (Glc II-1), respectively. By an extensive 2D NMR spectroscopic analysis, three Glc units and one (6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl (GlcAc) moiety were identified (Table 2). The HMBC cross-peaks at  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (Glc I-1)/ $\delta_{\text{C}}$  89.4 (C-3),  $\delta_{\text{H}}$  5.12 (Glc II-1)/ $\delta_{\text{C}}$  83.1 (Glc I-2), and  $\delta_{\text{H}}$  4.91 (Glc III-1)/ $\delta_{\text{C}}$  69.6 (Glc I-6), and the NOESY correlations at  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (Glc I-1)/ $\delta_{\text{H}}$  3.13 (*dd*,  $J = 12.4, 3.5$  Hz) (H-3),  $\delta_{\text{H}}$  5.12 (Glc II-1)/ $\delta_{\text{H}}$  3.94 (Glc I-2), and  $\delta_{\text{H}}$  4.91 (Glc III-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.18/4.66 (*dd*,  $J = 11.9, 1.7$  Hz) (Glc I-6), revealed the structure of the oligosaccharidic chain linked to the aglycon at the C-3 position as 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl. Signals of the last sugar unit, GlcAc, remained. A HMBC correlation between  $\delta_{\text{H}}$  5.02 (GlcAc-1) and  $\delta_{\text{C}}$  84.8 (C-22) and a NOESY cross-

**Table 2**  
NMR spectroscopic data of the sugar moieties for compounds **1–7** in C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N ( $\delta$  in ppm, *J* in Hz)<sup>a</sup>.

No	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
	<b>3-O-GlcA</b>		<b>3-O-GlcA</b>		<b>3-O-GlcA</b>		<b>3-O-Glc I</b>		<b>3-O-GlcA</b>		<b>3-O-GlcA</b>		<b>3-O-GlcA</b>	
1	104.6	4.75 <i>d</i> (7.4)	104.7	4.76 <i>d</i> (7.4)	104.7	4.76 <i>d</i> (7.3)	104.6	4.71 <i>d</i> (8.1)	103.0	4.94 <i>d</i> (7.4)	104.6	4.99 <i>d</i> (7.4)	104.2	4.71 <i>d</i> (7.2)
2	78.8	4.40	79.7	4.34	78.8	4.40	83.1	3.94	82.4	4.11	74.4	3.99	79.8	4.56 <i>dd</i> (8.3, 7.2)
3	84.5	4.28	84.2	4.33	84.6	4.28	77.7	4.18 <i>t</i> (8.8)	75.8	4.10	76.0	4.09	74.9	4.65 <i>t</i> (9.0)
4	71.4	4.15	71.6	4.17	71.6	4.17	71.2	3.99 <i>t</i> (8.8)	78.0	4.47	78.2	4.48 <i>dd</i> (9.0, 8.8)	78.8	4.66
5	76.3	4.22 <i>d</i> (8.8)	75.9	4.20 <i>d</i> (9.1)	76.2	4.21 <i>d</i> (9.1)	76.0	3.94 <i>m</i>	77.5	4.24 <i>d</i> (8.3)	77.8	4.35 <i>d</i> (9.0)	77.6	4.41
6	175.1	–	n.d.	–	174.9	–	69.6	4.18 4.66 <i>dd</i> (11.9, 1.7)	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	<b>Gal</b>		<b>Gal</b>		<b>Gal</b>		<b>Glc II</b>		<b>Gal</b>		<b>Gal</b>		<b>Gal</b>	
1	103.7	5.40 <i>d</i> (7.6)	103.7	5.36 <i>d</i> (7.4)	103.8	5.39 <i>d</i> (7.7)	105.8	5.12 <i>d</i> (6.7)	105.8	5.14 <i>d</i> (7.6)	102.9	5.72 <i>d</i> (7.9)	102.9	5.72 <i>d</i> (7.9)
2	73.0	4.34	72.5	4.37	73.1	4.35	74.8	3.92	73.6	4.42 <i>dd</i> (7.6, 6.4)	72.7	4.38	72.7	4.38
3	73.9	4.04	73.8	4.03 <i>dd</i> (9.1, 3.1)	74.6	4.03	77.2	4.08 <i>t</i> (9.2)	74.4	4.01	74.4	4.05 <i>dd</i> (9.5, 3.0)	74.4	4.05 <i>dd</i> (9.5, 3.0)
4	69.6	4.36	68.9	4.24	69.6	4.38	71.2	3.96	69.2	4.45 <i>dd</i> (3.0, 1.6)	70.6	4.42	70.6	4.42
5	76.5	3.84 <i>m</i>	76.6	3.83 <i>m</i>	76.5	3.83 <i>m</i>	77.6	3.83 <i>m</i>	76.5	3.91 <i>m</i>	76.8	3.89 <i>m</i>	76.8	3.89 <i>m</i>
6	61.7	4.24 4.35	61.9	4.24 4.33	61.7	4.25 4.33	62.0	4.19 4.32 <i>dd</i> (11.8, 1.8)	61.2	4.32 <i>dd</i> (11.4, 5.0) 4.37 <i>dd</i> (11.4, 6.4)	61.4	4.14 4.27 <i>dd</i> (11.6, 6.0)	61.4	4.14 4.27 <i>dd</i> (11.6, 6.0)
	<b>Ara</b>		<b>Ara</b>		<b>Ara</b>		<b>Glc III</b>		<b>Araf</b>		<b>Araf</b>		<b>Araf</b>	
1	104.0	5.25 <i>d</i> (6.0)	103.9	5.31 <i>d</i> (6.7)	104.1	5.26 <i>d</i> (6.4)	105.2	4.91 <i>d</i> (8.3)	108.4	5.98 <i>br s</i>	108.3	6.03 <i>br s</i>	107.5	6.10 <i>br s</i>
2	72.3	4.37	72.1	4.38	72.8	4.38	74.6	3.90	82.1	4.78 <i>br s</i>	82.1	4.79 <i>br s</i>	81.2	4.77 <i>br s</i>
3	74.5	4.04	73.8	4.02	74.0	4.05	77.6	4.10	77.8	4.55 <i>m</i>	77.9	4.57 <i>m</i>	78.6	4.42 <i>m</i>
4	69.0	4.17 <i>m</i>	68.7	4.15 <i>m</i>	69.1	4.16 <i>m</i>	71.2	3.98	85.9	4.77 <i>q</i> (4.5)	86.2	4.82 <i>q</i> (4.1)	86.6	4.98 <i>q</i> (3.8)
5	66.8	3.64 <i>dd</i> (11.6, 1.8) 4.28	66.7	3.63 <i>dd</i> (11.2, 2.0) 4.22	66.9	3.66 <i>dd</i> (12.6, 1.9) 4.28	77.7	3.80 <i>m</i>	62.3	3.99 4.09	62.4	4.00 4.10	62.1	3.89 3.92
									<b>28-O-Glc</b>		<b>28-O-Glc</b>		<b>28-O-Glc</b>	
1									95.3	6.14 <i>d</i> (8.3)	95.4	6.15 <i>d</i> (8.3)	95.6	6.18 <i>d</i> (7.6)
2									73.5	4.09	73.5	4.11	73.4	4.15
3									78.1	4.21	78.2	4.22	77.9	4.18
4									70.6	4.19	70.7	4.21	70.7	4.15
5									78.8	3.95 <i>m</i>	78.8	3.95 <i>m</i>	78.4	3.93 <i>m</i>
6									61.7	4.24 4.34 <i>dd</i> (11.4, 2.1)	61.7	4.25 <i>dd</i> (11.7, 4.3) 4.36 <i>dd</i> (11.7, 1.4)	61.8	4.23 4.31 <i>dd</i> (11.4, 1.6)
									<b>22-O-GlcAc</b>					
1									104.3	5.02 <i>d</i> (7.4)				
2									75.1	3.94				
3									77.8	4.17				
4									71.0	4.07				
5									74.6	3.85 <i>m</i>				
6									64.5	4.60 <i>dd</i> (11.9, 3.1) 4.73 <i>dd</i> (11.9, 1.6)				
1'									171.8	–				
2'									20.7	2.01 <i>s</i>				

n.d.: not determined.

<sup>a</sup> Overlapped proton NMR signals are reported without designated multiplicity.

peak at  $\delta_{\text{H}}$  5.02 (GlcAc-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.52 ( $dd$ ,  $J = 11.9, 5.8$  Hz) (H-22), proved the linkage of the GlcAc moiety at the C-22 of the aglycon. On the basis of the above data, the structure of **4** was determined as 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-22-O-[(6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]camelliagenin A.

For compound **5**, the HRESIMS established its molecular formula as  $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{24}$ . Its ESIMS displayed a quasi-molecular ion peak  $[(\text{M} - \text{H})]^-$  at  $m/z$  1103 in a negative ion-mode, which indicated a molecular weight of 1104.

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the aglycon part of **5** displayed six angular methyl groups as singlets at  $\delta_{\text{H}}$  0.76 (H<sub>3</sub>-25), 0.79 (H<sub>3</sub>-30), 0.82 (H<sub>3</sub>-29), 0.90 (H<sub>3</sub>-24), 0.98 (H<sub>3</sub>-26) and 1.15 (H<sub>3</sub>-27), one olefinic proton at  $\delta_{\text{H}}$  5.34 ( $t$ -like) (H-12), one oxygen-bearing methine protons at  $\delta_{\text{H}}$  4.00 (H-3) and one primary alcoholic function at  $\delta_{\text{H}}$  3.53 ( $d$ ,  $J = 10.7$  Hz), 4.24 ( $d$ ,  $J = 10.7$  Hz) (H<sub>2</sub>-23). The HMBC cross-peaks between H<sub>3</sub>-24 ( $s$ ) at  $\delta_{\text{H}}$  0.90 and C-3 at  $\delta_{\text{C}}$  82.1 and C-23 at 64.1, allowed the location of the secondary alcoholic function at C-3 and the primary alcoholic function at C-23, respectively. This was confirmed by the HMBC connectivity between  $\delta_{\text{H}}$  3.53, 4.24 (H<sub>2</sub>-23) and  $\delta_{\text{C}}$  82.1 (C-3). The deshielded chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  82.1 (C-3) and the shielded chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  176.6 (C-28) suggested that **5** was a bidesmosidic saponin. The aglycon of **5** was identified as 3 $\beta$ ,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid named hederagenin, and was in full agreement with literature data (Table 1) (Rezgui et al., 2016).

Four monosaccharides units were detected by HSQC correlations in the sugar region between protons at  $\delta_{\text{H}}$  4.94 ( $d$ ,  $J = 7.4$  Hz), 5.14 ( $d$ ,  $J = 7.6$  Hz), 5.98 ( $br\ s$ ) and 6.14 ( $d$ ,  $J = 8.3$  Hz), and carbons at  $\delta_{\text{C}}$  103.0, 105.8, 108.4 and 95.3, respectively. A 2D NMR analysis allowed the identification of sugar moieties as GlcA, Gal, Glc and Araf (Table 2). The multiplicity of the anomeric proton as a broad singlet ( $br\ s$ ), and a comparison of the chemical shifts with the literature data (Bäcker et al., 2014), indicated an  $\alpha$  anomeric orientation of the L-arabinofuranose. The osidic sequence linked at the C-3 position of the aglycon was identified as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl, by means of NOESY correlations  $\delta_{\text{H}}$  4.94 (GlcA-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.00 (H-3),  $\delta_{\text{H}}$  5.14 (Gal-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.11 (GlcA-2), and  $\delta_{\text{H}}$  5.98 (Araf-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.47 (GlcA-4). For the  $\beta$ -D-glucopyranosyl unit, the chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  95.3 (Glc-1) suggested an ester linkage with C-28 of the aglycon (Rezgui et al., 2016), which was confirmed with the HMBC correlation between  $\delta_{\text{H}}$  6.14 (Glc-1) and  $\delta_{\text{C}}$  176.6 (C-28).

Compound **5** was thus elucidated as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound **6** established its molecular formula as  $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{19}$ , indicating a molecular weight of 942, differing from compound **5** by 162 amu. Its FABMS (negative-ion mode) showed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  941  $[(\text{M} - \text{H})]^-$ , and fragment ion peaks at  $m/z$  809  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ , 647  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 162]^-$ , 471  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 162 - 176]^-$ , due to the successive loss of one pentosyl, one hexosyl, and one hexosyluronic acid moieties.

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **6** assigned by a 2D NMR analysis allowed the identification of hederagenin as its aglycon (Table 1). As in compound **5**, the deshielded chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  81.0 (C-3) and the shielded chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  176.5 (C-28) are classical values of a bidesmosidic saponin.

The HSQC spectrum of **6** showed anomeric signals of three monosaccharidic moieties at  $\delta_{\text{H}}$  4.99 ( $d$ ,  $J = 7.4$  Hz)/ $\delta_{\text{C}}$  104.6 (GlcA-1),  $\delta_{\text{H}}$  6.03 ( $br\ s$ )/ $\delta_{\text{C}}$  108.3 (Araf-1), and 6.15 ( $d$ ,  $J = 8.3$  Hz)/ $\delta_{\text{C}}$  95.4 (Glc-1). The correlations of HMBC experiment at  $\delta_{\text{H}}$  4.99 (GlcA-1)/ $\delta_{\text{C}}$  81.0 (C-3) and 4.48 ( $dd$ ,  $J = 9.0, 8.8$  Hz) (GlcA-4)/108.3 (Araf-1), and the NOESY correlations at  $\delta_{\text{H}}$  4.99 (GlcA-1)/ $\delta_{\text{H}}$  4.08 (H-3) and 6.03 (Araf-1)/4.48 (GlcA-4), established the sequence linked to C-3 of the

aglycon as 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl. For the last sugar unit, the chemical shift at  $\delta_{\text{C}}$  95.4 of its anomeric carbon, suggested an ester linkage at C-28, which was confirmed with the HMBC correlation between  $\delta_{\text{H}}$  6.15 (Glc-1) and  $\delta_{\text{C}}$  176.5 (C-28). The structure of **6** was thus elucidated as 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

The HRESIMS of compound **7** established its molecular formula as  $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{24}$ . Its ESIMS (negative ion-mode) displayed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  1103  $[(\text{M} - \text{H})]^-$  indicating a molecular weight of 1104, as for compound **5**.

The 2D NMR analysis showed that compounds **5** and **7** differed only in the aglycon part at C-22 and C-23 positions (Tables 1 and 2). At the C-22 position, the methylene signal at  $\delta_{\text{H}}$  1.62, 1.70/ $\delta_{\text{C}}$  32.3 in **5** was substituted by a secondary alcoholic function at  $\delta_{\text{H}}$  4.42/ $\delta_{\text{C}}$  69.4 in **7**. This substitution was established by a COSY correlation between  $\delta_{\text{H}}$  4.42 (H-22) and  $\delta_{\text{H}}$  1.65 (H-21). The configuration of C-22 was determined by the NOESY correlations between H-22  $\beta$ -axial and H<sub>3</sub>-30  $\beta$ -axial. Moreover, the primary alcoholic function at  $\delta_{\text{H}}$  3.53 ( $d$ ,  $J = 10.7$  Hz), 4.24 ( $d$ ,  $J = 10.7$  Hz)/ $\delta_{\text{C}}$  64.1 (CH<sub>2</sub>-23) in **5** was replaced by an angular methyl group at  $\delta_{\text{H}}$  1.10 ( $s$ )/ $\delta_{\text{C}}$  27.7 (CH<sub>3</sub>-23) in **7**. This was confirmed by a HMBC correlation between  $\delta_{\text{H}}$  0.98 ( $s$ ) (H<sub>3</sub>-24)/ $\delta_{\text{C}}$  27.7 (C-23), and the reverse one, between  $\delta_{\text{H}}$  1.10 ( $s$ ) (H<sub>3</sub>-23)/ $\delta_{\text{C}}$  16.3 (C-24). The aglycon was thus determined as the known 22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid (Wang et al., 2014). The structure of **7** was elucidated as 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

From a chemotaxonomic point of view, the Pittosporaceae family is rich in hydroxylated and acylated oleanane-type glycosides, especially derivatives of R1-barrigenol and A1-barrigenol in *P. angustifolium* (Bäcker et al., 2013, 2014), *P. tobira* (D'Acquarica et al., 2002), *P. verticillatum* subsp. *verticillatum* (Manase et al., 2013), *P. senacia* (Linnek et al., 2012), *P. undulatum* (Higuchi et al., 1983), and *P. viridiflorum* (Seo et al., 2002). However, aglycons such as barringtogenol C and camelliagenin A have also been reported from various species of *Pittosporum*, as *P. angustifolium* (Bäcker et al., 2014), and *P. phillyraeoides* (Errington and Jefferies, 1988). Then, it was not surprising to find these aglycons in saponins isolated from *P. tenuifolium* "variegatum". Other aglycons were described from this genus as taraxastane-type triterpenes in *P. angustifolium* (Bäcker et al., 2015) and *P. phillyraeoides* (Errington and Jefferies, 1988), oleanolic acid in *P. senacia* (Linnek et al., 2012), and 17,22-seco-backbone of oleanolic acid in *P. angustifolium* (Bäcker et al., 2013). In our study, two unusual aglycons for this genus were found, hederagenin from *P. tenuifolium* "variegatum" and "gold star", and 22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid only from "gold star". Therefore, hederagenin-type saponins could be used as chemotaxonomic markers of *P. tenuifolium* cultivars.

Moreover, all these aglycons were often acylated at the C-21, C-22 and/or C-28 position by acetyl, dimethylacryloyl, angeloyl, 2-acetoxy-2-methylbutyryl (Manase et al., 2013), 2-methylbutyryl (Bäcker et al., 2013), and seneciyl (Seo et al., 2002) groups. A glycosylation by an acetylated glucopyranosyl moiety at the C-22 position of camelliagenin A, in compound **4**, was previously undescribed.

For the saccharidic part, the saponins of *Pittosporum* are mostly glycosylated compounds at C-3 position of the aglycon by a glucuronopyranosyl unit. The GlcA can be substituted in position 2 by Glc or Gal, in position 3 by Ara, and/or in position 4 by Araf. The oligosaccharidic chains found in *P. tenuifolium* "variegatum" and *P. tenuifolium* "gold star" saponins are very similar to those previously described. Although, to the best of our knowledge, the sequence 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl of compound **4**, is described for the

first time in this genus.

### 3. Experimental

#### 3.1. General experimental procedures

Optical rotations values were recorded on an AA-10R automatic polarimeter. IR spectra (KBr disk) were recorded on a Perkin-Elmer 281 spectrophotometer. NMR spectra were performed using a Varian INOVA 600 (Agilent Technologies) at the operating frequency of 600 MHz. The operating conditions were as follows:  $^1\text{H}$ : frequency, 600 MHz; sweep width, 8 kHz; sampling point, 66 k; spectral width, 7804 Hz, accumulation, 32 pulses; temperature, 304 K.  $^{13}\text{C}$ : frequency, 150 MHz; sweep width, 32 kHz; sampling point, 160 k; spectral width, 30,000 Hz, accumulation, 8000 pulses; temperature, 304 K. Each sample was dissolved in  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  (200  $\mu\text{L}$ ) using 5 mm micro-sample tube (SHIGEMI Co., Ltd., Japan). Chemical shifts were referenced to solvent signal ( $\delta_{\text{H}}$  7.22,  $\delta_{\text{C}}$  123.87). Conventional pulse sequences were used for gMQF-COSY, TOCSY, NOESY, gHSQC, and gHMBC. The mixing time in the NOESY experiment was set to 500 ms. TOCSY spectra were acquired using the standard MLEV17 spin-locking sequence and 60 ms mixing time. TOCSY, NOESY and HSQC spectra were recorded using phase-sensitive mode. The size of the acquisition data matrix was 2048  $\times$  256 words in f2 and f1, respectively, and zero filling up to 2k in f1 was made prior to Fourier transformation. Sine-bell or Shifted sine-bell window functions, with the corresponding shift optimized for every spectrum, were used for resolution enhancement and baseline correction was applied in both dimensions. FABMS data (negative-ion mode) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. HRESIMS (positive-ion mode) and ESIMS (positive- and negative-ion mode) were carried out on a Bruker microTOF mass spectrometer. For the extractions, a R.E.U.S ultrasonic apparatus (US frequency 24 KHz, Power 200 W), and a MARS 6 microwave apparatus (CEM) were used. Isolations of compounds were carried out using column chromatography (CC) on Sephadex LH-20 (550 mm  $\times$  20 mm, GE Healthcare Bio-Sciences AB), and vacuum liquid chromatography (VLC) on reversed-phase RP-18 silica gel (75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle) and silica gel 60 (Merck, 60–200  $\mu\text{m}$ ). Medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was performed on reversed-phase RP-18 silica gel (75–200  $\mu\text{m}$ , Silicycle) and silica gel 60 (Merck, 15–40  $\mu\text{m}$ ), with a Gilson M 305 pump (25 SC head pump, M 805 manometric module), a Büchi glass column (230 mm  $\times$  15 mm and 460 mm  $\times$  15 mm), and a Büchi precolumn (110 mm  $\times$  15 mm). Thin-layer chromatography (TLC, Silicycle) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC, Merck) were carried out on precoated silica gel plates 60F<sub>254</sub>. The spray reagent for saponins was vanillin reagent (1% vanillin in EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50:1).

#### 3.2. Plant material

The cultivars “variegatum” and “gold star” of *Pittosporum tenuifolium* Banks & Sol. ex Gaertn. (Pittosporaceae), were purchased in 2011 from Botanic<sup>®</sup> (Quétigny, France). A voucher specimen (NO. 20111004) was deposited in the herbarium of the Laboratory of Pharmacognosy, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

#### 3.3. Extraction and isolation

Dried powdered branches of *P. tenuifolium* “variegatum” (49.5 g) were submitted to ultrasound-assisted extraction (UAE) at room temperature (24 KHz, 200 W, two extraction cycles, each 30 min, EtOH–H<sub>2</sub>O 70:30, 800 ml  $\times$  2). After evaporation of the solvent

under vacuum, 5.0 g of the EtOH extract were obtained. An aliquot (2.5 g) of this extract was submitted to VLC on RP-18 (MeOH–H<sub>2</sub>O, 0:100; 30:70; 50:50; 70:30; 100:0) to give 5 fractions (Fr1–Fr5), with Fr4 and Fr3 rich in saponins. Fr4 (199.0 mg) was thus purified by MPLC (2.5 ml/min) over silica gel using CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O (70:30:5; 60:32:7) as eluent to give **1** (9.1 mg). Fr3 (312 mg) was subjected to column chromatography (Sephadex LH-20) eluted with MeOH to afford five subfractions, Fr31–Fr35. The saponin-containing fractions Fr32 (182.4 mg) and Fr33 (46.3 mg) were further separated by successive MPLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O 70:30:5; 60:32:7) and reversed-phase silica gel RP-18, (MeOH–H<sub>2</sub>O 30–50%), giving compounds **4** (5.9 mg) and **6** (12.9 mg) from Fr32, and compounds **5** (5.4 mg) and ilexoside XLIX (7.7 mg) from Fr33.

The protocol for extraction of leaves of *P. tenuifolium* “variegatum” (50 g) was the same as previously described for the branches. The resulting EtOH extract (5.0 g) was submitted to VLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 60:35:8). After evaporation, 11 fractions were obtained (R1–R11). Fraction R4 (1.5 g) was further separated by column chromatography (Sephadex LH-20, MeOH) and MPLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 60:32:7) to obtain compounds **2** (4.1 mg) and **3** (6.3 mg).

Dried powdered branches of *P. tenuifolium* “gold star” (50 g) were submitted to microwave-assisted extraction (MAE) (75 °C, 270 W, three extraction cycles, each 45 min, EtOH–H<sub>2</sub>O 70:30, 700 ml  $\times$  3). After evaporation of the solvent under vacuum, 6.3 g of resulting extract was fractionated by VLC on RP-18 (MeOH–H<sub>2</sub>O, 0:100; 50:50; 100:0) to give 3 fractions (Fr.A–C). Fr.B (1.3 g) was subjected to VLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 70:30:5; 60:32:7; 0:100:0) to afford seven fractions Fr.B1–Fr.B7. The saponin-containing Fr.B5 (185.0 mg) was further purified by successive MPLC on silica gel (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 80:20:2; 70:30:5; 60:32:7), giving compounds **5** (7.0 mg) and **6** (13.2 mg). The fraction Fr.B6 (94 mg) was separated by successive MPLC on RP-18 (MeOH–H<sub>2</sub>O, 0–60%), to yield compound **7** (3.0 mg).

##### 3.3.1. 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21-O-angeloyl-22-O-acetylbarrotingenol C (**1**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -23.6$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\text{max}}$  3416, 1730, 1680, 1648, 1080  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (negative-ion mode)  $m/z$  1083 [M – H]<sup>–</sup>, HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1107.5365 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub>Na, 1107.5352).

##### 3.3.2. 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-21,22-di-O-angeloylbarrotingenol C (**2**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -19.8$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\text{max}}$  3414, 1730, 1686, 1648, 1078  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (negative-ion mode)  $m/z$  1123 [M – H]<sup>–</sup>, HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1147.5561 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>57</sub>H<sub>88</sub>O<sub>22</sub>Na, 1147.5665).

##### 3.3.3. 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22-O-angeloylcamelliagenin A (**3**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -14.2$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\text{max}}$  3420, 1720, 1687, 1647, 1078  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (negative-ion mode)  $m/z$  1025 [M – H]<sup>–</sup>, HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1049.5227 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>52</sub>H<sub>82</sub>O<sub>20</sub>Na, 1049.5297).



### 3.3.4. 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-22-O-[(6-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]camelliagenin A (**4**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} = -14.7$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  3420, 1720, 1660, 1155  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1 and 2; HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1187.5917  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{O}_{25}\text{Na}$ , 1187.5825).

### 3.3.5. 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**5**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} = -19.7$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  3420, 1730, 1719, 1650, 1038  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (negative-ion mode)  $m/z$  1103  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1127.5227  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{24}\text{Na}$ , 1127.5250).

### 3.3.6. 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucuronopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**6**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} = -9.4$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  3430, 1726, 1719, 1650, 1038  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1 and 2; FABMS (negative-ion mode)  $m/z$  941  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 809  $[(\text{M} - \text{H}) - 132]^-$ , 647  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 162]^-$ , 471  $[(\text{M} - \text{H}) - 132 - 162 - 176]^-$ , HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  965.4820  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{19}\text{Na}$ , 965.4722).

### 3.3.7. 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-22 $\alpha$ -hydroxyoleanolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**7**)

White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} = -28.1$  ( $c = 0.10$ , MeOH); IR  $\nu_{\max}$  3420, 1730, 1720, 1647, 1040  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 150 MHz), see Tables 1 and 2; ESIMS (negative-ion mode)  $m/z$  1103  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , HRESIMS (positive-ion mode)  $m/z$  1127.5194  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{53}\text{H}_{84}\text{O}_{24}\text{Na}$ , 1127.5250).

## 3.4. Acid hydrolysis and GC analysis

Each compound (3 mg) was hydrolyzed with 2N aq.  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (5 mL) for 3 h at 95  $^\circ\text{C}$ . After extraction with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 5$  mL), the aq. layer was repeatedly evaporated to dryness with MeOH until neutral, and then analyzed by TLC over silica gel ( $\text{CHCl}_3$ –MeOH– $\text{H}_2\text{O}$  8:5:1) by comparison with authentic samples. Furthermore, the residue of sugars was dissolved in anhydrous pyridine (100  $\mu\text{L}$ ), and L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.06 mol/L) was added. The mixture was stirred at 60  $^\circ\text{C}$  for 1 h, then 150  $\mu\text{L}$  of HMDS-TMCS (hexamethyldisilazane–trimethylchlorosilane 3:1) was added, and the mixture was stirred at 60  $^\circ\text{C}$  for another 30 min. The precipitate was centrifuged off, and the supernatant was concentrated under a  $\text{N}_2$  stream. The residue was partitioned between  $n$ -hexane and  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL each), and the hexane layer (1  $\mu\text{L}$ ) was analyzed by GC (Hara et al., 1987). The absolute configurations were determined by comparing the retention times with thiazolidine derivatives prepared in a similar way from standard sugars (Sigma-Aldrich). Identification of L-arabinose, D-glucuronic acid,

and D-galactose was carried out for **1–3**, giving peaks at 11.8, 15.5, and 19.5 min, respectively. Identification of D-glucose was carried out for **4**, giving a peak at 18.6 min. Identification of L-arabinose, D-glucuronic acid, D-glucose and D-galactose was carried out for **5** and **7**, giving peaks at 11.8, 15.5, 18.6 and 19.5 min, respectively. Identification of L-arabinose, D-glucuronic acid and D-glucose was carried out for **6** giving peaks at 11.8, 15.5 and 18.6 min, respectively.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support of P.C.P. Pays-Andins/RU21.

## References

- Amimoto, K., Yoshikawa, K., Arihara, S., 1993. Triterpenoid saponins of aquifoliaceous plants. XII. Ilexosides XLVI–LI from the leaves of *Ilex rotunda* Thunb. Chem. Pharm. Bull. 41, 77–80.
- Bäcker, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Wurster, M., Bodtke, A., Chamseddin, C., Crüsemann, M., Lindequist, U., 2013. Triterpene glycosides from the leaves of *Pittosporum angustifolium*. Planta Med. 79, 1461–1469.
- Bäcker, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Wurster, M., Bodtke, A., Niedermeyer, T.H.J., Lindequist, U., 2014. New mono- and bisdesmosidic triterpene glycosides from *Pittosporum angustifolium* Lodd. Z. Naturforsch. 69b, 1026–1044.
- Bäcker, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Niedermeyer, T.H.J., Wurster, M., Bodtke, A., Lindequist, U., 2015. Taraxastane-type triterpene saponins from *Pittosporum angustifolium* Lodd. Z. Naturforsch. 70b, 403–408.
- Beaujard, P., 1988. Plantes et médecine traditionnelle dans le Sud-Est de Madagascar. J. Ethnopharmacol. 23, 165–265.
- Chakravarty, A.K., Das, B., Pakrashi, S.C., 1987. Triterpenoid prosaponins from leaves of *Maesa chisia* var. *angustifolia*. Phytochemistry 26, 2345–2349.
- D'Acquarica, I., Di Giovanni, M.C., Gasparrini, F., Misiti, D., D'Arrigo, C., Fagnano, N., Guarnieri, D., Iacono, G., Bifulco, G., Riccio, R., 2002. Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* Ait. Tetrahedron 58, 10127–10136.
- El Dib, R.A., Eskander, J., Mohamed, M.A., Mohammed, N.M., 2015. Two new triterpenoid estersaponins and biological activities of *Pittosporum tobira* «Varietata» (Thunb.) W. T. Aiton leaves. Fitoterapia 106, 272–279.
- Errington, S.G., Jefferies, P.R., 1988. Triterpenoid saponins of *Pittosporum phyllaryaeoides*. Phytochemistry 27, 543–545.
- Hara, S., Okabe, H., Mihashi, K., 1987. Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(R)-carboxylates. Chem. Pharm. Bull. 35, 501–506.
- Higuchi, R., Fujioka, T., Iwamoto, M., Komori, T., Kawasaki, T., Lassak, E.V., 1983. Triterpenoid saponins from leaves of *Pittosporum undulatum*. Phytochemistry 22, 2565–2569.
- Linnek, J., Mitaine-Offer, A.-C., Paululat, T., Lacaille-Dubois, M.-A., 2012. Two new triterpenoid saponins from *Pittosporum senacia* Putterlick (Pittosporaceae). Magn. Reson. Chem. 50, 798–802.
- Manase, M.J., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.-A., 2013. New triterpenoid estersaponins from the root barks of *Pittosporum verticillatum* subsp. *verticillatum* and evaluation of cytotoxicities. Fitoterapia 91, 231–235.
- Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., Sashida, Y., 2004. Triterpene saponins from the roots of *Clematis chinensis*. J. Nat. Prod. 67, 1511–1516.
- Pal, B.C., Chaudhuri, T., Yoshikawa, K., Arihara, S., 1994. Saponins from *Barringtonia acutangula*. Phytochemistry 35, 1315–1318.
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., Lacaille-Dubois, M.A., 2016. Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*. Phytochemistry 123, 40–47.
- Seo, Y., Berger, J.M., Hoch, J., Neddermann, K.M., Bursuker, I., Mamber, S.W., Kingston, D.G.I., 2002. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest. J. Nat. Prod. 65, 65–68.
- Wang, C.-Q., Wang, Y., Wang, W.-J., Wang, L., Ye, W.-C., 2014. New oleanane saponins from *Schefflera kwangsiensis*. Phytochem. Lett. 10, 268–271.
- Xiao, B.-K., Huang, R.-Q., Yang, J.-Y., Dong, J.-X., Zhen, B., Liu, S.-C., 2013. Research process on chemical constituents and pharmacology of *Pittosporum*. Shizhen Guoyi Guoyao 24, 854–856.