

**DETERMINACIÓN DE LAS SEÑALES CARACTERÍSTICAS DEL NÚCLEO  
ESTRUCTURAL DITERPÉNICO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN, EN  
FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL LÁTEX DE  
*Euphorbia laurifolia* (EUPHORBIACEAE).**

**LUIS ALBERTO GONZÁLEZ LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2010**

**DETERMINACIÓN DE LAS SEÑALES CARACTERÍSTICAS DEL NÚCLEO  
ESTRUCTURAL DITERPÉNICO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN, EN  
FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL LÁTEX DE  
*Euphorbia laurifolia* (EUPHORBIACEAE).**

**LUIS ALBERTO GONZÁLEZ LÓPEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de Químico**

**Director.**

**FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO**

**Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2010**



## 1. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación fue desarrollado un estudio fitoquímico parcial del látex de *Euphorbia laurifolia* (EUPHORBIACEAE), asociado al análisis preliminar de actividad biológica correspondiente a una de las fracciones del látex obtenida por extracción en acetato de etilo (AcOEt). Este estudio se realizó considerando la acción biológica mostrada de los compuestos terpénicos presentes en el látex de varias euphorbias, los que revelan una marcada capacidad antiviral<sup>8,9,18,11</sup>, además de un estudio preliminar de la *E. laurifolia* en donde se muestra la actividad biológica de la planta frente a diferentes tipos de virus.

En el mencionado estudio fueron aislados dos compuestos diterpénicos de la fracción en AcOEt, los cuales mostraron una actividad biológica sobre el VIH y el virus de la influenza<sup>2,11</sup>. El material vegetal Lechero de Cerca (*E. laurifolia*), 500 mL, fue colectado en zona rural del municipio de Popayán, Cauca, en el kilometro 5 salida al Huila, y dirigido al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos (QCB), de la Universidad del Cauca, en donde se procedió a fraccionar en AcOEt de acuerdo a estudios preliminares que revelan un efecto de esta fracción sobre la bioquímica del ciclo viral del VIH y el virus de la influenza<sup>2</sup>. La fracción obtenida se concentró a presión reducida y se desarrolló el Tamizaje Fitoquímico (TF), bajo la metodología del laboratorio Biotecnología y Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira (BPN-UTP), logrando la detección de los núcleos estructurales correspondientes a los distintos metabolitos constituyentes del látex<sup>6</sup>.

Una vez obtenidos estos resultados se fraccionó el extracto (AcOEt) por técnicas tradicionales de cromatografía líquida (columna y capa delgada) y se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C), con lo cual se detectó la presencia del núcleo estructural diterpénico bajo las señales características de dicho núcleo estructural, de acuerdo con la metodología del laboratorio de

Química Orgánica de Productos Naturales (QOPN), de la Universidad de Antioquia.

Posteriormente el estudio se orientó a la refinación de las fracciones por cromatografía en capa delgada preparativa, y se determinaron mediante espectros de RMN mono y bidimensionales señales que evidenciaron la presencia de nuevos compuestos diterpénicos, los cuales fueron purificados y se obtuvo el estudio espectral correspondiente, constituido por los espectros de:  $^1\text{H}$ -RNM,  $^{13}\text{C}$ -NMR, *J*-MOD, COSY, HMBC, HMQC, que nos permitió proponer de manera preliminar una posible estructura de dichos compuestos, a partir de los cuales, en posteriores estudios se pretende ampliar el conocimiento de la actividad biológica desarrollada por este tipo de moléculas.

## 2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de los notables avances en las investigaciones sobre enfermedades humanas y animales de importancia epidemiológica y económica, generadas por virus ampliamente estudiados, no se cuenta aun con tratamientos satisfactorios de efectos adversos mínimos y con un costo accesible a la población más vulnerable<sup>5</sup>. Por lo anterior, considerando además la crisis económica que sobrellevan los países latinoamericanos, y dada la biodiversidad vegetal de nuestro país es necesario caracterizar los compuestos presentes en los recursos naturales, en la búsqueda de nuevos medicamentos con capacidad antiviral promisoria.

Colombia presenta amplia variedad de su flora nativa, sobre la cual se encuentran hoy día un gran número de investigadores interesados en definir su potencial biológico y aprovechar esta herramienta como control de las diferentes enfermedades que deterioran día a día la calidad de la salud de la población y afectan las condiciones de vida digna en nuestro país. Sin embargo, la familia de las Euphorbiaceae aun permanece en gran parte desconocida y amerita que se desarrollen diferentes trabajos que se centren en la investigación de sus propiedades, considerando que existe una limitada bibliografía en donde se reporten estudios acerca de su actividad biológica o características quimiotaxonomicas<sup>13</sup>.

Con látex de varias especies de la familia Euphorbiaceae, en particular de especies del genero *Euphorbia*, se vienen realizando estudios dirigidos en detectar extractos con propiedades antivirales, citotóxicas e inmunomoduladoras, como nuevas alternativas farmacológicas contra infecciones causadas por diferentes tipos de virus, tales como influenza y rinovirus<sup>18,11,17</sup>. La familia Euphorbiaceae comprende 8000 especies, muchas de las cuales han sido de gran utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades<sup>19</sup>, por lo que varios estudios se han

enfocado en la evaluación de sus efectos, demostrando su potencial antiviral, antitumoral, antibacteriano y antioxidante.

Entre los estudios fitoquímicos en la familia Euphorbiaceae, se han reportado varios compuestos con capacidad antiviral reguladora del ciclo celular y de las funciones celulares, por ejemplo una de estas moléculas, Prostantin presenta efecto sobre formas latentes del virus del VIH<sup>21</sup>, otros trabajos reportan que extractos de látex y hojas de plantas (látex de *Euphorbia láctea* y *Euphorbia laurifolia*) frente a células infectadas latentemente con VIH activaron significativamente el ciclo replicativo del virus<sup>11</sup>. Estos estudios son de marcada importancia, ya que la identificación de la latencia del VIH-1 es uno de los principales retos científicos que ha llevado a coordinar proyectos que tiene como objetivo profundizar en los mecanismos de este almacenamiento del virus y analizar los efectos de nuevos compuestos sobre estos pro-virus.

Considerando los resultados mencionados de la capacidad de activación de fracciones del látex de *Euphorbia laurifolia* (EUPHORBIACEAE) sobre formas latentes del virus del VIH, es necesario aprovechar la abundancia de *Euphorbia laurifolia*, en la región Caucana, especialmente en la ciudad de Popayán para continuar estudios orientados en desarrollar la búsqueda de compuestos constituyentes de las fracciones que presentan la actividad biológica mencionada.

### 3. ANTECEDENTES

Varias especies de plantas de la familia Euphorbiaceae han mostrado un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas. El género *Croton*, uno de los más representativos de la familia Euphorbiaceae, ha sido motivo de estudios fitoquímicos debido principalmente a las posibilidades terapéuticas que fueron identificadas en estas plantas<sup>7</sup>.

En el mundo existen diferentes estudios que describen la química y actividad biológica en Euphorbias, los cuales coinciden en reportar marcada capacidad antiviral de sus extractos y algunos de sus metabolitos, por ejemplo hojas de las plantas *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* se recolectaron en la ciudad de Medellín (Colombia), para determinar la actividad biológica (actividad citotóxica [AC] y antiviral [AAV]) de cuatro extractos de éstas (hexánico, acetato de etilo, metanólico y acuoso), los resultados sugieren que pueden existir compuestos en el extracto hexánico de *H. crepitans* con una actividad promisoriosa anti Herpes Virus Bovino tipo 1 (BHV-1B). Este estudio es pionero en demostrar actividad antiviral de extractos de plantas de la especie Euphorbiaceae contra BHV-1B<sup>1,20</sup>. Otros extractos de especies de la familia Euphorbiaceae fueron sometidos a evaluación de su actividad antiviral frente al virus de la influenza A/PR/8/34 y rinovirus humano. La fracción metanólica del látex de *Codiaeum variegatum* mostró ser altamente activa y no citotóxica frente al primero de ellos. Por otro lado, del látex de *Euphorbia tirucalli* se aisló un triterpeno, el cual presentó actividad frente a rinovirus<sup>14,10</sup>. Se reporta también que en plantas de Euphorbias colectadas en la provincia de Azarbaijan en la parte noroeste de Irán presentan algunos diterpenoides con esqueleto carbonado myrsinane inhibidores de enzimas tales como  $\alpha$ -Glicosidasa, Ureasa, HIV-1 transcriptasa reversa y propil endopeptidasa<sup>12</sup>. Algunos extractos de plantas usados en la medicina tradicional de Egipto se evaluaron por sus posibles propiedades anti-VIH y se reporta que esteres de phorbol fueron aislados del extracto metanólico de *Croton tiglium* (Euphorbuaceae) con capacidad anti VIH-1. El 12-O-Acetylphorbol-13-decanoate y



el 12-O-decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate) efectivamente inhiben el efecto citopático de VIH-1, pero aunque estos compuestos presentan el mencionado efecto bioquímico, pueden desarrollar una habilidad como promotores de tumores, lo que genera una limitación en su utilidad<sup>15</sup>.

En Colombia, se ensayaron extractos de látex y hojas de siete plantas frente a células Jurkat Lat GFP infectadas latentemente con VIH y se observó que el extracto y las fracciones del látex de *Euphorbia láctea* y *Euphorbia laurifolia* activaron significativamente el ciclo replicativo del virus. Posteriormente, mediante fraccionamientos biodirigidos se obtuvieron tres compuestos tipo diterpeno, de los cuales uno presentó un porcentaje de activación mayor al 80%. Estos resultados evidenciaron la capacidad antiviral de varias plantas colombianas y su acción sobre el ciclo replicativo del VIH, también demuestran el potencial farmacológico de la familia Euphorbiacea, su potencial uso en la investigación y desarrollo de antivirales<sup>2,11</sup>, por tal motivo se convierten en el punto de partida para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Caracterización preliminar de sustancias con núcleo estructural diterpénico en fracciones del látex de *Euphorbia laurifolia* (EUPHORBIACEAE) con actividad biológica.

### 4.2 Objetivos específicos

- Tamizaje fitoquímico del látex total obtenido de *E. laurifolia*.
- Fraccionamiento del látex de *E. laurifolia* y seguimiento de perfiles cromatográficos por Cromatografía en Capa Delgada, (C.C.D).
- Análisis preliminar de actividad antiviral de las fracciones obtenidas
- Determinación del núcleo estructural diterpénico por espectroscopia de RMN de las fracciones obtenidas.
- Refinación de fracciones por cromatografía preparativa y determinación de características estructurales de diterpenos potencialmente activos mediante espectroscopia de RMN mono y bidimensionales.

## 5. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 5.1 Familia Euphorbiaceae

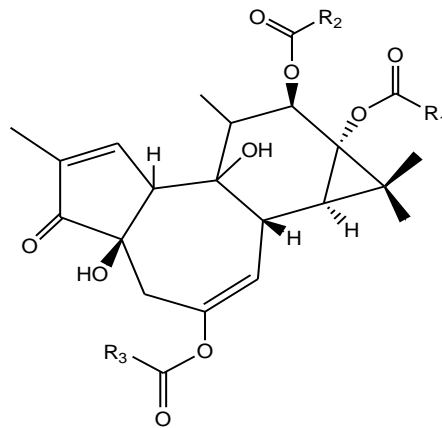
Euphorbiaceae es una familia muy variable morfológicamente, comprende árboles, arbustos, lianas e hierbas; muchas de sus especies son componentes de bosques poco perturbados, pero también las hay de zonas altamente intervenidas y sólo *Phyllanthus fluitans* es acuática. Esta familia se caracteriza por presentar látex o exudado coloreado y estípulas de diversas formas; las hojas son simples, espiraladamente dispuestas y sólo en algunas especies de *Euphorbia* son opuestas; generalmente presentan glándulas de diversas formas en la lámina y a veces sobre el pecíolo. Las flores generalmente están arregladas en inflorescencias muy variadas; presentándose pseudantos en *Dalechampia*, *Pera* y *Euphorbia*; en éste último se conoce como ciatio. Las flores son unisexuales y generalmente apétalas; el ovario es súpero, sincárpico y en la mayoría de géneros formado por tres carpelos, que contienen uno o dos óvulos. El fruto es una cápsula esquizocárpica con dehiscencia explosiva; que deja una columela central, y sólo se presentan drupas en *Drypetes*, *Hieronyma* y *Richeria*. La semilla tiene un rafe muy notorio y generalmente presenta carúncula o arilo.

La familia Euphorbiaceae está representada en Colombia por 78 géneros, 390 especies con 12 subespecies y 9 variedades. Las Euphorbiaceae están ampliamente distribuidas en todas las regiones naturales de Colombia. El mayor número de especies se encuentra en la región andina (210 spp.), de las cuales 83 son exclusivas para esta región; le sigue la región amazónica con 129 spp., (71 exclusivas), la región caribe con 114 spp. (36 exclusivas), la región pacífica con 110 spp. (14 exclusivas) y la orinoquia con 88 spp. (9 exclusivas). En cuanto a la distribución altitudinal, la familia se encuentra principalmente en zonas bajas, el 63% sólo crece en alturas menores que 1500 m, mientras que el 8.5% crece a más de 1500 m. *Euphorbia orbiculata* y *Dysopsis paucidentata* son las únicas especies que pueden alcanzar alturas superiores a los 3500 m<sup>2</sup>.

## 5.2 Familia Euphorbiaceae, química y actividad biológica.

Muchas euforbiáceas poseen látex que contiene caucho, aceites, resinas y sustancias gomosas. Sin embargo, en algunos casos el látex es venenoso e irritante, y entre los principales constituyentes están los triterpenos y ésteres de triterpenos. La savia de muchas especies de euforbiáceas poseen estos compuestos altamente irritantes para la piel y las membranas mucosas. Esto se limita no solo a la savia, sino que también se observa a menudo en otras partes de dichas plantas<sup>7</sup>. El género *Euphorbia* (con aproximadamente 1600 especies) es el que ha llamado más la atención y ha sido estudiado precisamente por su contenido en diterpenos biológicamente activos. En el género *Croton* se reportan compuestos con actividad promotora de tumores, entre los que se localizan los ésteres de fórbol (Fig. 1)

Figura. 1. Estructura base de un éster de fórbol.



Este tipo de ésteres se encuentran generalmente en forma de los diésteres  $R_1CO_2$ ,  $R_2CO_2$ . Los triésteres son conocidos como irritantes crípticos, debido a que no exhiben actividad a menos que ocurra la hidrólisis del éster en  $R_3CO_2$ .

Algunas especies de esta familia son usadas ampliamente en medicina popular por sus múltiples efectos. Varias especies del género *Croton* han sido

tradicionalmente usadas en América Latina como remedios locales para una gran variedad de enfermedades y dolores. Estas plantas son utilizadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos. Las aplicaciones específicas forman parte del acervo cultural de cada región<sup>2</sup>.

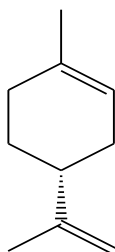
### 5.3 Terpenos

Los metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos son de gran interés debido a su amplia variedad estructural y diversidad funcional. Los terpenos representan una de la mayor diversidad de clases de metabolitos secundarios. Estos existen en múltiples de formas químicas en una línea de hidrocarburos funcionalizados, esqueletos con diferentes modificaciones químicas tales como grupos hidroxilo, carbonilo, cetona, aldehído y grupos peróxido, etc.

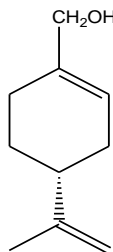
Mediante investigaciones en la actividad biológica de los terpenoides se encuentran reportadas varias aplicaciones en campos como: Medicina, agricultura y la industria. Diferentes moléculas de terpenoides tienen actividad anti-microbial, anti-fúngica, anti-parasitaria, anti-viral, anti-alérgica, anti-inflamatorio, quimioterapéutico, etc. A continuación se muestran algunas estructuras asociadas a actividades biológicas para el tratamiento de enfermedades.

Figura 2. Terpenoides como agentes anti-cáncer

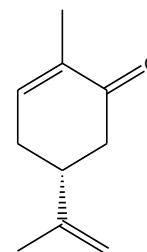
D-limonene



(+)-perillyl alcohol



R-(-)-caravone



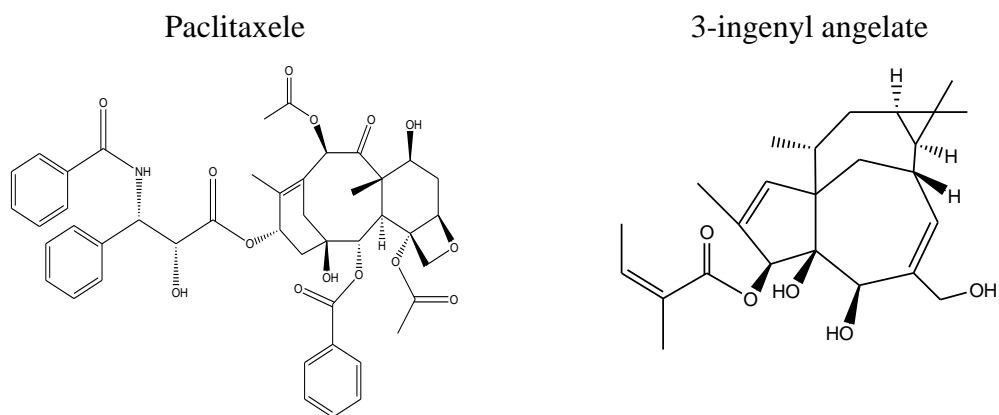
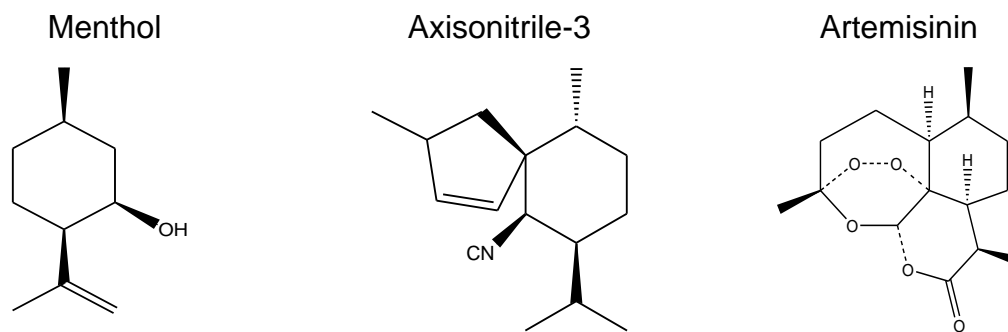


Figura 3. Terpenos con actividad anti-inflamatoria



#### 5.4 Diterpenos de Euphorbiaceae

Diferentes estudios reportan que el látex de Euphorbiaceae es constituido por compuestos irritantes y promotores de tumores, en particular los diterpenoides.

Los diterpenos son compuestos tetracíclicos, como los ester de fórbol presentes en los látex de estas plantas, y han resultado ser los responsables del efecto irritante de la piel y de la actividad promotora de tumores, también exhiben un amplio rango de propiedades bioquímicas, por ejemplo inducen alteraciones en la morfología celular, mitosis en leucocitos y agregación plaquetaria, eleva los niveles de GMP cíclico, activa la ornitina descarboxilasa y la ruta de la proteína quinasa C (PKC). Desde el aislamiento de los ester de forbol del aceite de croton, muchos otros forboles biológicamente activos se han aislado de plantas de la familia Euphorbiaceae y Thymelaceae, los diterpenos irritantes de la piel y

promotores de tumores están basados en esqueletos carbonados del tipo tigliano, daphnano e ingenano y muchos más han sido descubiertos gracias a diversos estudios de fraccionamientos guiados por bioensayo, Ospina A. Liliana. 2008.

En general, estos compuestos derivados del isopreno, tienen muchas funciones. Primero, en el metabolismo ellos funcionan como constituyentes de membranas, pigmentos fotosintéticos y transportadores de electrones, etc. También presentan una función en el metabolismo secundario, la mayoría de los diterpénos están presentes en resinas, látex y aceites, encargándose de hacer tóxicas o indigestibles a las plantas como medida de defensa contra herbívoros, actúan como antibióticos para proteger a las plantas de microorganismos patógenos, muchos diterpénos son formados en respuesta a infecciones por bacterias u hongos. Algunas plantas sintetizan los diterpénos para la inhibición de la germinación de plantas competentes.

### **5.5 Tamizaje fitoquímico**

Con el tamizaje fitoquímico se obtiene la caracterización de extractos vegetales mediante pruebas químicas que consisten en reacciones que producen la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un producto o de un complejo, que origina un cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas; es posible entonces detectar la presencia de metabolitos como: Flavonoides, alcaloides, quinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, taninos, etc. Cada uno de los anteriores núcleos mencionados contiene grupos funcionales característicos de sus estructuras químicas, por consiguiente es posible reconocerlos mediante reacciones coloridas, algunas de estas son: Lieberman, Dragendorff, Mayer, Vasler, reinekato de amonio, gelatina sal, hemólisis, Keller, cianidina, etc<sup>1,7,11</sup>.

## 5.6 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear, abreviada RMN, es probablemente la técnica espectroscópica que más suministra información para la determinación de la estructura de un compuesto orgánico, a diferencia de otras técnicas como la Espectroscopia Infrarrojo (IR), cuya mayor utilidad es la determinación de los grupos funcionales, el método RMN permite determinar con buena aproximación el esqueleto hidrocarbonado de una molécula.

Un espectro de RMN para núcleos de protones o carbonos informa:

- Por el desplazamiento químico de los carbonos o protones.
- Cuántos tipos de estos átomos hay.
- La interacción de sus bandas de absorción.
- La relación que hay entre los protones o carbonos de cada tipo.
- Por los acoplamientos de spin-spin (multiplicidad de las señales),
- El número de protones contiguo.

La muestra requerida para realizar un espectro de RMN, es de 1-10 mg, esta técnica es no destructiva y pueden tomarse varios espectros con el objetivo de mejorar la relación señal/Ruido.



## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Material vegetal

El látex de *Euphorbia laurifolia* fue colectado en zona rural del municipio de Popayán, Cauca, a la altura del kilómetro 5 salida al Huila, y un ejemplar de este espécimen fue depositado en el herbario de la Universidad del Cauca. El látex fue refrigerado hasta su posterior extracción.

### 6.2 Extracción y fraccionamiento

El látex de *Euphorbia laurifolia* fue extraído con acetato de etilo y concentrado a presión reducida en rota-evaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001. Estos extractos fueron fraccionados en una columna de sílica gel 60 con una mezcla de hexano:AcOEt de polaridad creciente (100:0, 90:10, 80:20..., 0:100 v/v).

### 6.3 Ensayos biológicos

El presente trabajo hace parte de estudios complementarios del proyecto titulado Actividad de plantas colombianas frente al VIH y al Virus de la Influenza, adelantado por el laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales (QOPN), de la Universidad de Antioquia, en donde fue evaluada la actividad biológica de fracciones del látex de *E. laurifolia* en los siguientes ensayos<sup>2,11</sup>.

#### 6.3.1 Ensayo antiinfluenza

En este ensayo se usaron células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) y virus FLUAV (A/PR/8/34.H1N1). La citotoxicidad y la actividad antiviral fueron evaluadas mediante el método colorimétrico de MTT y el ensayo virucida se realizó según la metodología propuesta por Cheng, 2004.

#### 6.3.2 Ensayos sobre la latencia del VIH

En este trabajo se ensayaron extractos de látex y hojas de siete plantas frente a células Jurkat Lat GFP infectadas latentemente con VIH<sup>10, 16</sup>.

#### **6.4 Aislamiento y purificación de compuestos**

Las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica se reunieron según su perfil C.C.D., y se concentraron a presión reducida para la purificación de los compuestos constituyentes mediante Cromatografía de Capa Preparativa (C.C.P.). Se empleó como eluente la relación de solventes hexano:acetona:AcOEt (1:0.1:0.2), y fueron hechos 3 recorridos antes de la extracción de los compuestos. Para cada placa preparativa utilizada se aplicaron cerca de 40 mg, obteniendo entre 3 y 5 mg de fracciones refinadas. Cada compuesto aislado se resuspendió en cloroformo deuterado para ser sometido a análisis de RMN.

#### **6.5 Análisis espectroscópico**

Los espectros  $^1\text{H}$  NMR de las fracciones y compuestos aislados de *E. laurifolia* fueron registrados a 300 MHz y  $^{13}\text{C}$  NMR mono y bidimensionales, y *J*-mod a 75 MHz en un espectrómetro Bruker AMX 300.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Colecta del material vegetal

El látex de Lechero de Cerca (*E. laurifolia*), fue colectado en zona rural del municipio de Popayán, Cauca, a la altura del kilometro 5 salida al Huila. A partir de plantas adultas, en perfecto estado de desarrollo sin señales de acción de plagas ni exposición a insecticidas, fungicidas o sustancias químicas de acción biológica aplicadas a cultivos de la zona. La obtención se realizó por cortes profundos a lo largo del tallo de la planta, colectando el látex directamente en recipientes de vidrio, figura 4.

Figura 4. Extracción del Látex de *E. laurifolia*



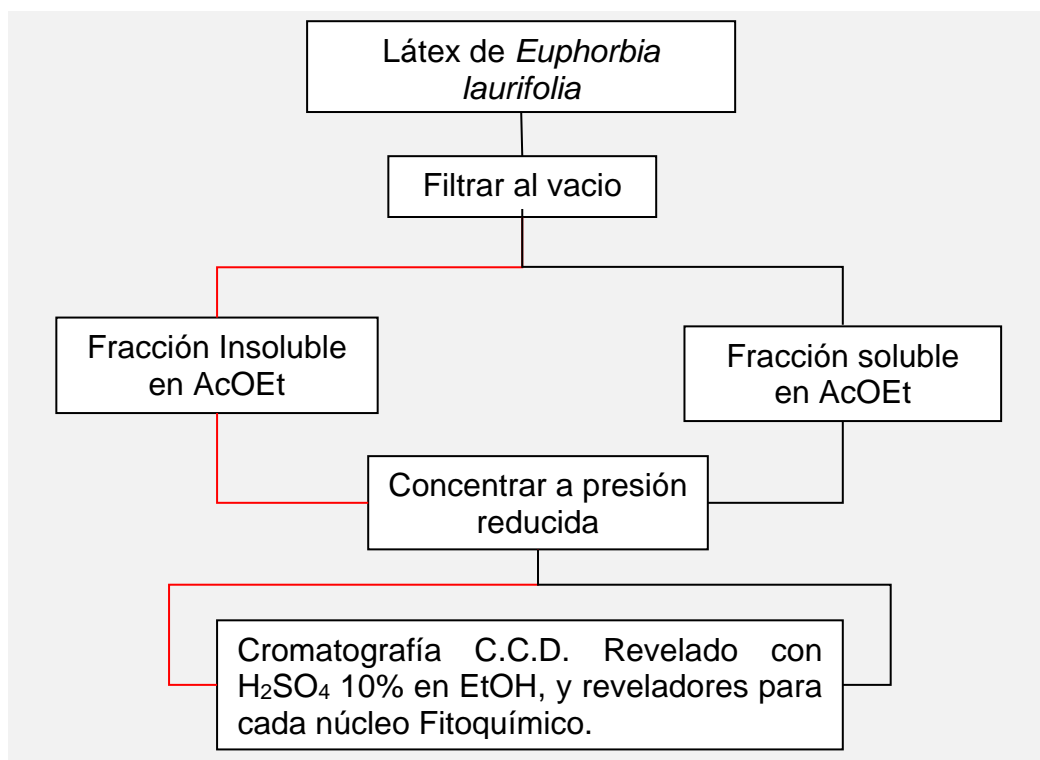
Las muestras (500 ml del látex), fueron dirigidas al laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca, para los respectivos análisis de acuerdo con las metodologías establecidas en el laboratorio, y al herbario de la Universidad del Cauca para efecto de referencia Botánica<sup>6</sup>.

### 7.2 Fraccionamiento del látex por extracción sucesiva líquido-líquido y seguimiento de perfiles cromatográficos por C.C.D.

Con el látex total de *E. laurifolia*, se desarrolló un fraccionamiento por extracción líquido-líquido utilizando como solvente AcOEt, el cual permite la obtención de una

fracción que contiene principalmente los compuestos minoritarios constituyentes del látex, figura 5.

Figura 5. Diagrama de flujo, extracción líquido-líquido.



El fraccionamiento permitió obtener un extracto verde amarillo (EVA) en AcOEt, figura 4, con el que se desarrolló un seguimiento por perfiles en cromatografía de capa delgada (C.C.D.). El revelado de cada placa obtenida fue hecho con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% en EtOH), figura 6.

Figura 6. Extracción líquido-Líquido



### 7.3 Tamizaje fitoquímico. Pruebas de precipitación y por cambio de color.

Mediante marchas fitoquímicas empleadas en el laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira, se realizó la detección de algunos núcleos estructurales de metabolitos secundarios constituyentes del látex de *E. laurifolia*.

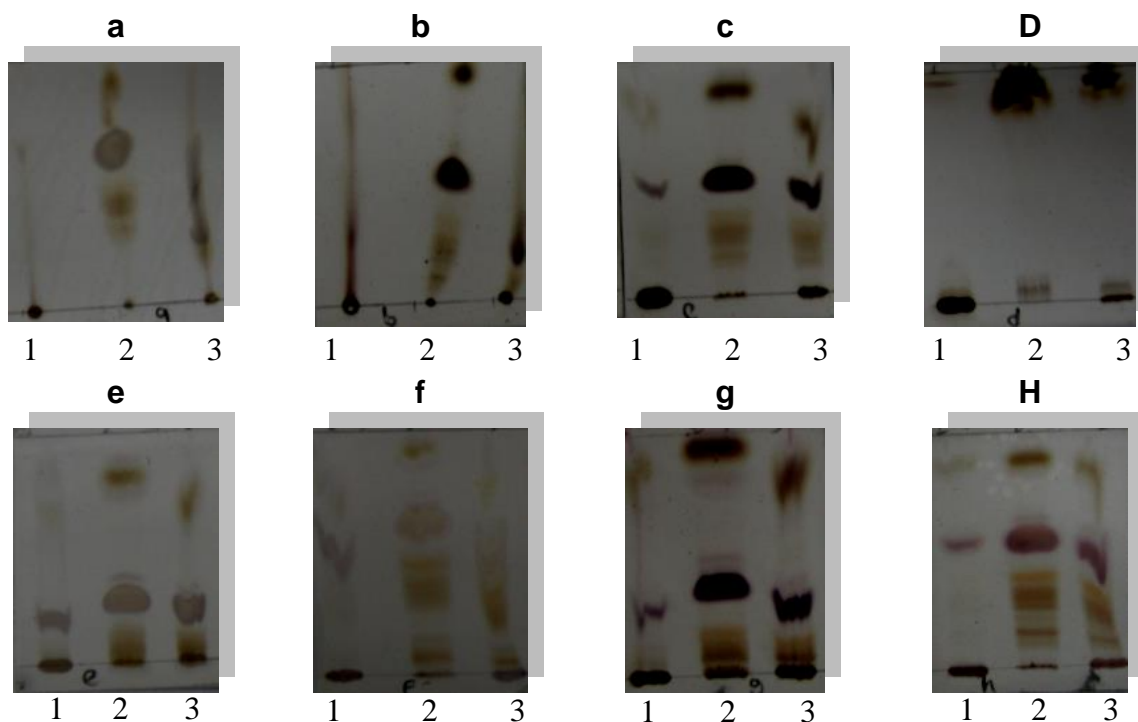
Para el desarrollo del tamizaje correspondiente, inicialmente el látex se eluyó mediante C.C.D., hasta obtener un sistema de elusión adecuado, figura 7, Se utilizaron mezclas de solventes entre Hexano-Acetona-AcOEt, con variación de la polaridad según el aumento o disminución en la proporción de los solventes en cada sistema empleado, como se muestra en la tabla 1, los sistemas de mejor resolución de bandas fueron los siguientes:

Tabla 1. Sistemas de elusión

<b>Sistema</b>	<b>Hexano (mL)</b>	<b>Acetona (mL)</b>	<b>AcEtOH (mL)</b>
<b>a</b>	10	4	0
<b>b</b>	10	2	0
<b>c</b>	10	3	0
<b>d</b>	5	5	0
<b>e</b>	10	10	0
<b>f</b>	10	0	3
<b>g</b>	10		1
<b>h</b>	10	1	2

A continuación, en la figura 7, observamos las placas cromatográficas obtenidas en la búsqueda del mejor sistema de elusión.

Figura 7. Placas cromatográficas obtenidas en la búsqueda del mejor sistema de elusión.



1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.

2= extracto verde amarillo (EVA), ó extracto en AcOEt del Látex.

3= extracto total (ET), Látex total.

Se nota que hay con una mejor resolución en la fracción EVA, se eligió el sistema de elusión **h** de la tabla 1 y figura 5, para el desarrollo de la detección de los núcleos fitoquímicos.

En la detección de los núcleos, cada placa cromatográfica obtenida se reveló con reactivos de identificación por cambio de color mediante aspersion del reactivo. Lo anterior permitió la detección preliminar de algunos de los metabolitos constituyentes del látex<sup>4,1,6</sup>.

### 7.3.1 Detección de **alcaloides**.

Prueba de Dragendorff: La presencia de manchas rojo-naranja sobre el fondo de la cromatoplaaca es considerado como prueba positiva. En este caso el alcaloide Papaverina se utilizó como control positivo (CP). Figura 8.

Figura 8. Detección de compuestos nitrogenados. Dragendorff



1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.

2= extracto verde amarillo (EVA), ó extracto en AcOEt del Látex.

3= extracto total (ET), Látex total.

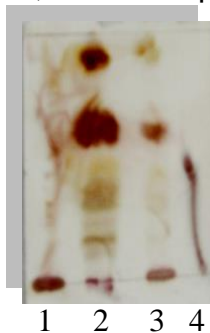
4= Control positivo.

Se detecto dos bandas de elusión en la fracción de EVA y ET, las cuales revelan color naranja frente al reactivo de Dragendorff, figura 8, lo que permite considerar la presencia del núcleo estructural alcaloidal o compuestos nitrogenados, dentro de los metabolitos constituyentes del látex. Es importante tener en cuenta que con el sistema de elusión empleado Hexano-Acetona-AcOEt (10:2:1) los alcaloides revelados son los metabolitos de mayor polaridad presentes en la fracción EVA.

### 7.3.2 Detección de **terpenos y similares**.

Prueba de Liebermann-Burchard: Permite la detección del núcleo estructural propio de esteroides, terpenos y similares, la presencia de manchas verde, rojo, amarillo fluorescentes es tomado como prueba positiva. Se utilizó el compuesto Estigmasterol como control positivo. Figura 9.

Figura 9, detección positiva de terpenos y similares. Liebermann-Burchard



1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.

2= extracto verde amarillo (EVA), ó extracto en AcOEt del Látex.

3= extracto total (ET), Látex total.

4= Control positivo.

En esta prueba se obtuvo un resultado positivo, figura 9, en donde se aprecia un revelado color rojo y amarillo tenue en la mayoría de bandas de elusión de la cromatopla. Por lo anterior se considera que los sistemas PB, EVA, ET, están constituidos principalmente por compuestos de núcleo tipo terpénicos.

### 7.3.3 Detección de **esteroles**.

La prueba de anisaldehido- $H_2SO_4$ : detecta también el núcleo estructural terpenico. La presencia de manchas verde-rojo-amarillo-purpura, fluorescentes es tomada como prueba positiva. En este caso se utilizó como control positivo el compuesto Hecogenina. Figura 10.

Figura 10. Detección positiva de esteroles y terpenos. anisaldehido



1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.

2= extracto verde amarillo (EVA), ó extracto en AcOEt del Látex.

3= extracto total (ET), Látex total.

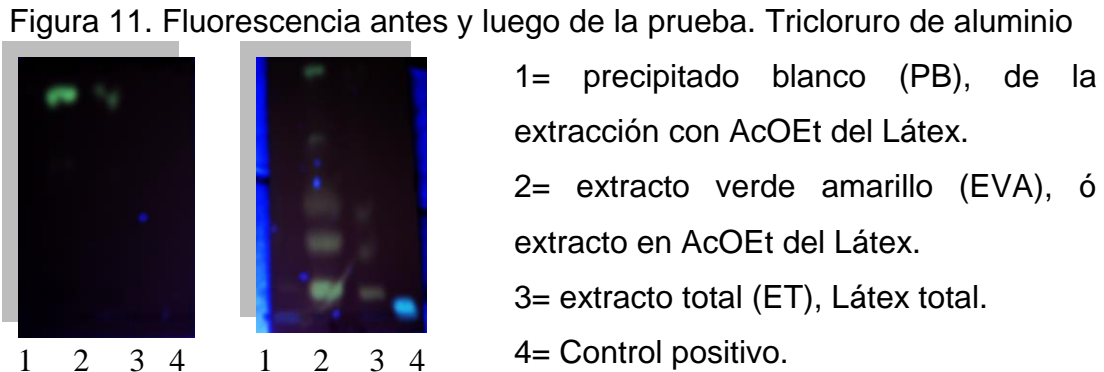
4= Control positivo.

En el revelado de la cromatopla se obtuvo luego de someterla al calentamiento que la mayoría de las bandas en las fracciones eluidas se tornaron color azul, el cual gradualmente cambio a purpura intenso y algunas bandas tomaron coloración verde o rojo. Figura 10.



### 7.3.4 Detección de flavonoides.

La prueba de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ): Detecta presencia de flavonoides por la fluorescencia color amarillo bajo luz de longitud de onda larga de 360nm. Se utilizo como control positivo, quercitina. Figura 11.

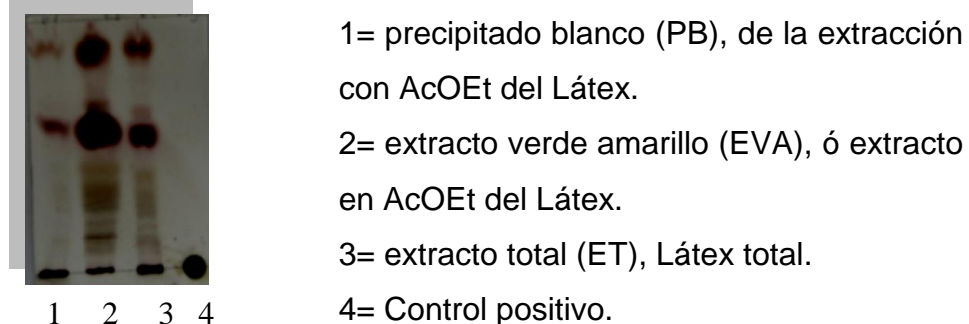


En esta prueba se obtuvo un resultado positivo en las fracciones EVA y ET, en las cuales se observa luego del revelado con  $\text{AlCl}_3$ , la fluorescencia (bajo la luz de 360nm de longitud de onda), de algunas bandas a lo largo de la cromatoplaqa.

### 7.3.5 Detección de saponinas.

Prueba de  $\text{NH}_4\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ : La presencia de manchas rojo, amarillo fluorescentes, sobre el fondo de la cromatoplaqa es considerado como prueba positiva. Figura 12.

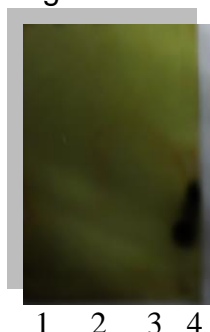
Figura 12. Prueba positiva en la detección de Saponinas.  $\text{NH}_4\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$



### 7.3.6 Detección de **fenoles y taninos**.

**Prueba de  $\text{FeCl}_3$ :** La presencia de manchas azul oscuro sobre el fondo de la cromatoplaaca es considerado como prueba positiva. En este caso la prueba fue negativa para todas las muestras, solo se observa coloración en el control positivo. Figura 13.

Figura 13. Prueba negativa para detección de taninos.  $\text{FeCl}_3$



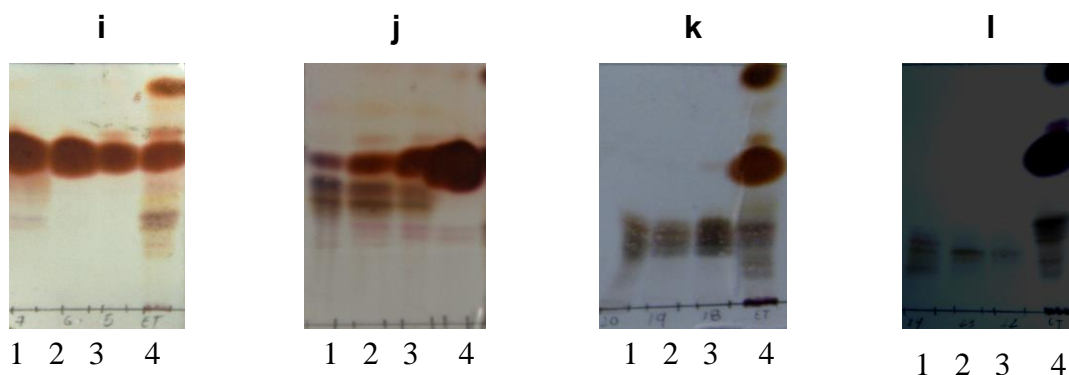
- 1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó extracto en AcOEt del Látex.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

### 7.4 Extracción de metabolitos por cromatografía de columna.

La fracción de AcOEt, 10 g secos, fue eluida en una columna de Silica Gel 60, empleando como fase móvil mezcla de solventes de Hexano-AcOEt-Metanol, en aumento gradual de la polaridad. Se obtuvieron 27 fracciones con las cuales se realizó un seguimiento de perfiles en C.C.D., reuniendo las fracciones de perfil similar, que posteriormente fueron sometidas a espectros RMN para la detección de la presencia del núcleo diterpénico del tipo Ingol figura 16. Se consideró este tipo de núcleo debido a que dos diterpenos aislados anteriormente de *E. laurifolia*, figura 32, presentan este esqueleto carbonado con algunos sustituyentes tales como acetoxilo, isobutirilo e hidroxilo.

En la siguiente gráfica, se observan cuatro cromatoplaacas (i, j, k, l), que contienen cada una tres fracciones (1, 2, 3), con perfiles similares en C.C.D. y una fracción que corresponde al extracto total (4).

Figuras 14. Cromatoplasmas de fracciones con perfiles C.C.D. similares.

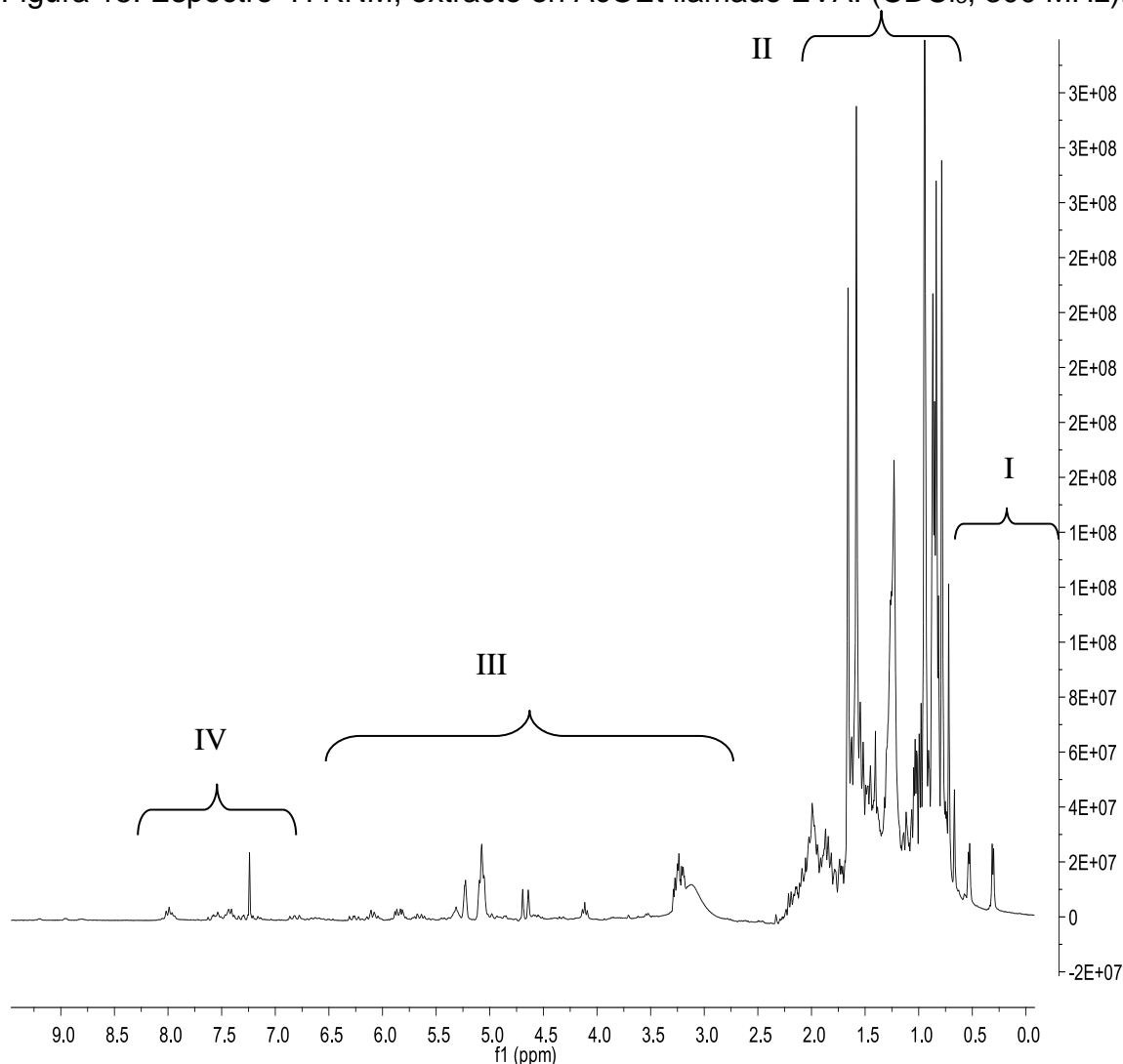


1, 2, 3 = Fracciones de la columna con perfiles similares en cada C.C.D.

4= Extracto en AcOEt

### 7.5 Análisis de preliminar de espectros RMN.

Una vez las fracciones fueron reunidas por su perfil C.C.D., se disolvieron en cloroformo deuterado y se sometieron a experimentos preliminares por  $^1\text{H}$  RNM y  $^{13}\text{C}$  RMN. Los espectros obtenidos permitieron evidenciar la presencia del núcleo diterpénico tipo ingol, por las señales de hidrógenos y carbonos característicos y otras señales que sugieren nuevos sustituyentes, lo cual puede convertirse en características relevantes en la actividad biológica del núcleo objeto de estudio. Inicialmente se examinó el extracto EVA, cuyo espectro  $^1\text{H}$  RNM se exhibe en la figura 15.

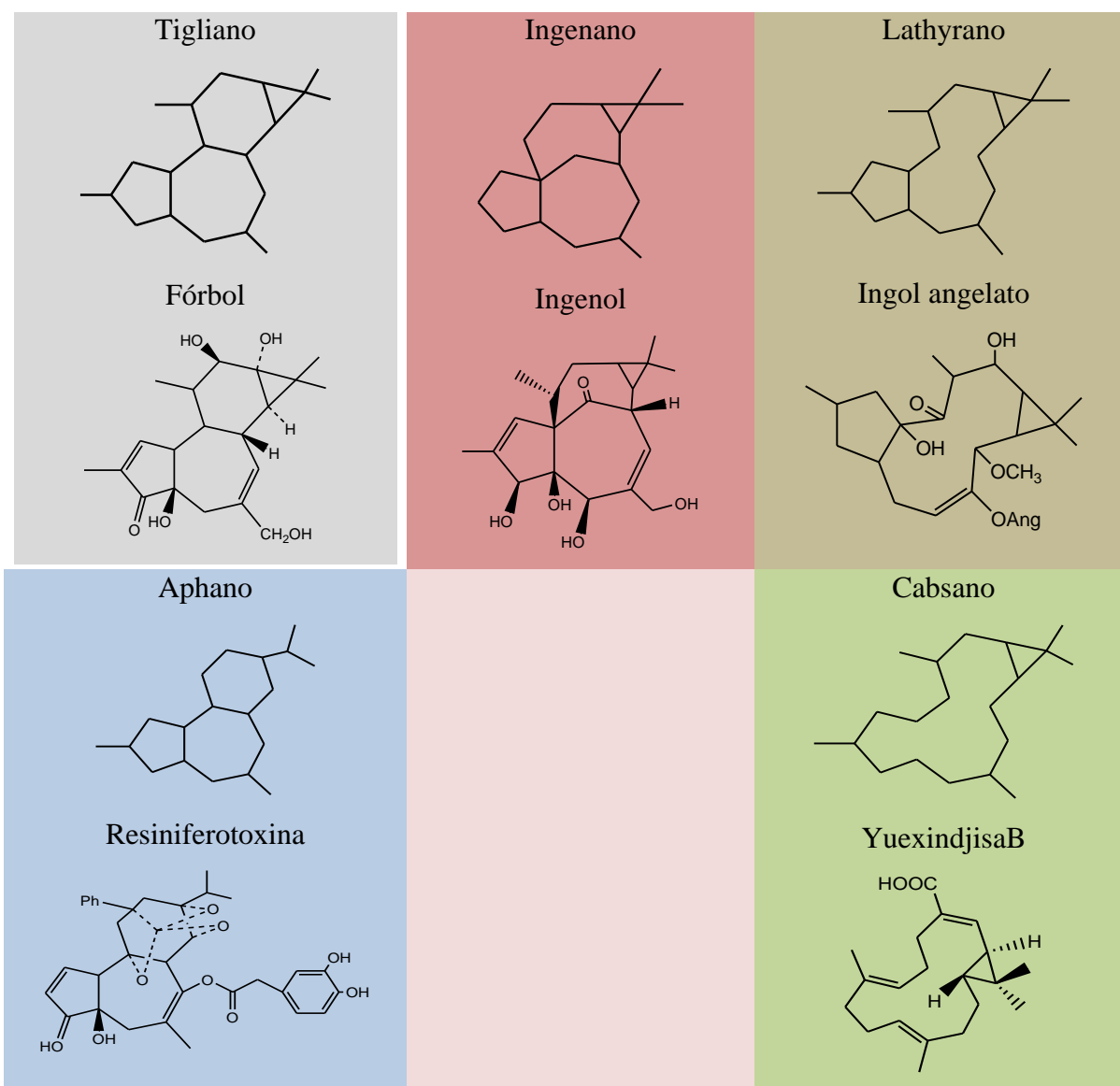
Figura 15. Espectro  $^1\text{H}$  RNM, extracto en AcOEt llamado EVA. ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

El análisis preliminar fundamentado en, una región por debajo de 1.0 ppm, donde se encuentran varias señales atribuibles a metilos, evidenciaron el esqueleto de diterpenos aislados de diferentes Euphorbiaceae, con presencia de grupos ciclopropilo que muestran dos dobletes característicos, comunes. La región entre 0.98 ppm y 2.50 ppm, muestra señales que pueden ser atribuibles a grupos metilo, permitiendo suponer la presencia de grupos acetilo. Las señales en la región 5.50 ppm y 6.50 corresponden a protones probablemente asociados a dobles enlaces. Igualmente es probable que estas señales correspondan a protones enlazados a carbonos asociados directamente a funciones oxigenadas tipo ester, éter, e hidrocarburo. Finalmente la región más desplazada a campo bajo está asociada a

protones aromáticos compuesta entre 7 ppm y 9.5 ppm, lo cual permite suponer la presencia de grupos aromáticos unidos al núcleo diterpénico.

La siguiente gráfica muestra la diversidad estructural de diterpenos macrocíclicos aislados de Euphorbiaceae. Tales compuestos son relacionados biogénicamente a los forboles tipo tigliano, daphnano e ingenano. Dentro de estos se encuentran los del tipo lathyrano y casbano<sup>2</sup>.

Figura16. Núcleos diterpénicos. Ospina. A. 2008.



Se reunieron las fracciones 1, 2, 3 para cada cromatoplaque (i, j, k l), de la figura 12. Y, en los anexos 3-6, se muestra los espectros  $^1\text{H}$  RMN obtenidos. El examen de cada espectro pretendió una mejor definición de señales para contrastar con los desplazamientos característicos encontrados en estructuras de diterpenos aislados de diferentes Euphorbiaceae.

En tal sentido se analizaron las señales con desplazamientos menores a 1 ppm, que fueron asociadas a protones de grupos ciclopropilo. Los resultados encontrados y el tamizaje fitoquímico permitieron suponer una buena aproximación al esqueleto diterpénico en las fracciones obtenidas. En consecuencia, se procedió a seleccionar las fracciones con menos manchas en la cromatoplaque y el espectro protónico mejor definido.

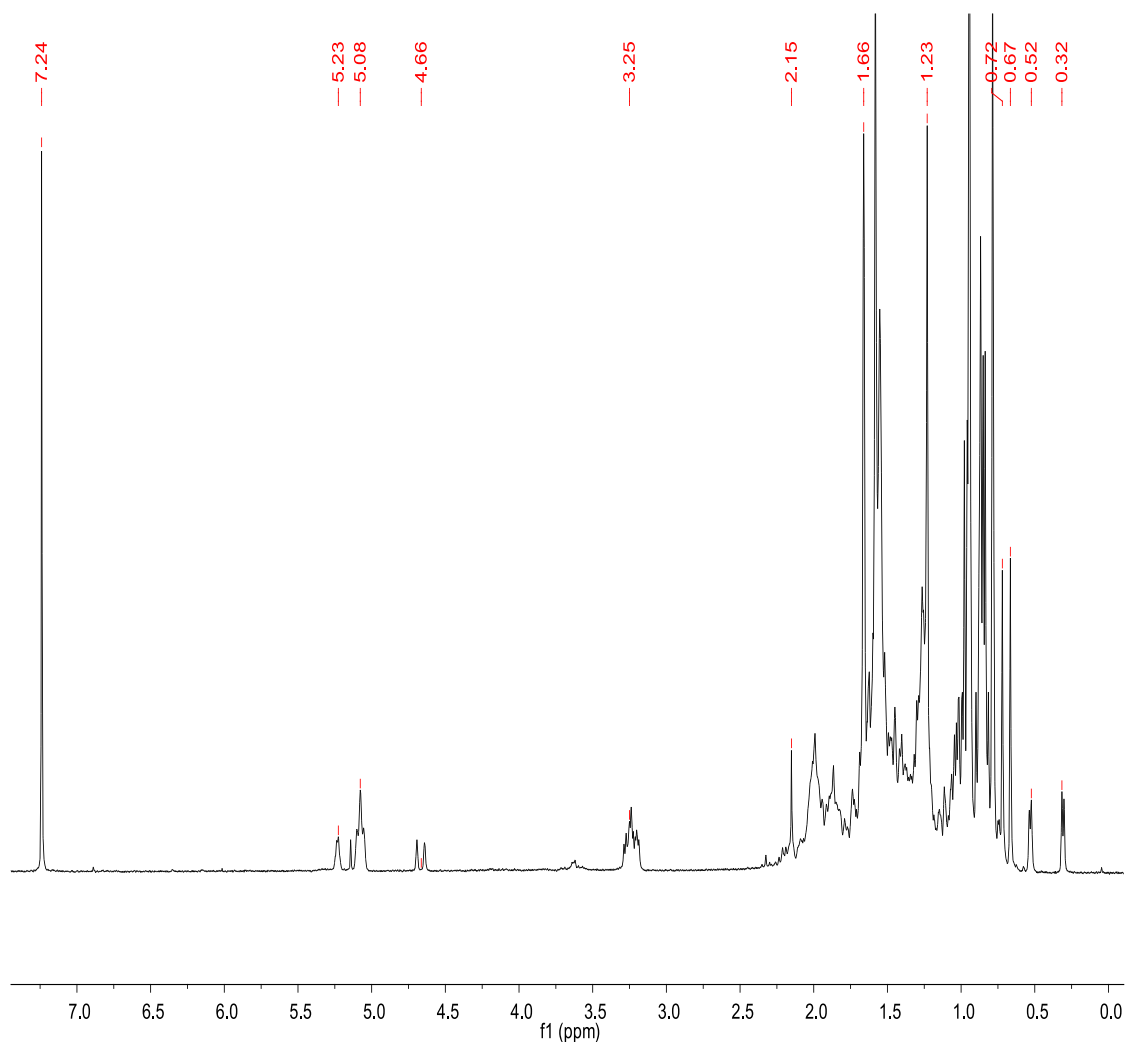
## **7.6 Espectros de RMN mono y bidimensionales.**

El espectro  $^1\text{H}$  RMN de fracciones reunidas (1, 2, 3) para las cromatoplacas i y l, estas son las de mayor interés, por ello se procedió a una nueva purificación por cromatografía en capa delgada preparativa para la obtención de los espectros RMN mono y bidimensionales tales como  $^1\text{H}$  RNM,  $^{13}\text{C}$  RMN, *J*-MOD, COSY, HMBC, HMQC.

### **7.6.1 Purificación de compuestos fracciones 1, 2 y 3 de cromatoplaque i.**

La refinación de la fracción obtenida al reunir las fracciones 1, 2, 3, permitió además de aumentar la intensidad de las señales  $^1\text{H}$  RNM, eliminar algunas y definir la multiplicidad de otras. A continuación se observa el espectro obtenido luego de la refinación. Figura 17.

Figura 17. Espectro  $^1\text{H}$  RNM, refinación de fracciones 1, 2 y 3 de cromatoplaca i. ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



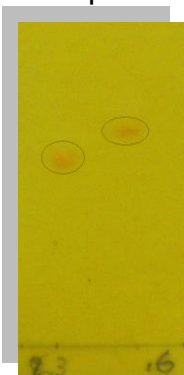
La refinación se efectuó por cromatografía de capa delgada preparativa utilizando como eluente la mezcla Hexano-AcOEt en proporción 10:1, con triple elusión. En esta oportunidad no fue posible obtener un compuesto totalmente refinado, debido a la poca diferencia en los  $R_f$  de todas las manchas observadas.

### 7.6.2 Purificación de compuestos fracciones 1, 2 y 3 de cromatoplaca I.

La colección de las fracciones 1, 2 y 3, de la cromatoplaca I, fue refinada por cromatografía en capa delgada preparativa y se utilizó como sistemas de elusión la mezcla Hexano-Acetona-AcOEt (10:1:2). El revelado se hizo por aspersion del

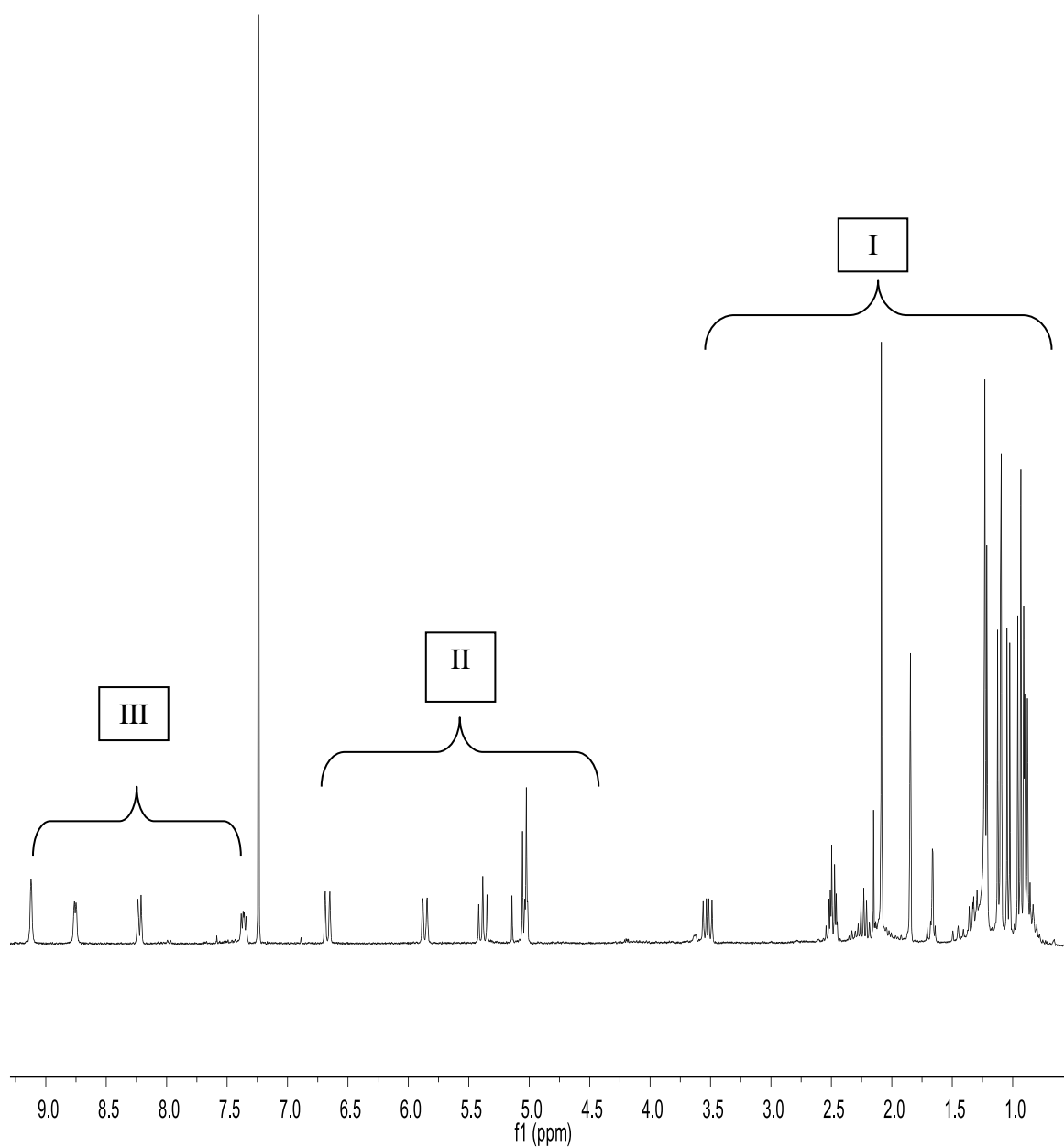
reactivo de Dragendorff. Se confirmó la presencia de dos compuestos nitrogenados, figura 18. Se obtuvo aproximadamente 3 mg en apariencia correspondiente a cada compuesto, con esta cantidad se realizó el estudio espectral, se expone a continuación.

Figura 18. Compuestos aislados.



En el estudio espectral se tuvo en cuenta la literatura científica reportada en investigaciones del látex de varias especies de *Euphorbia*, sobre el aislamiento e identificación de diterpenos<sup>8,9,20,10,15</sup>, y particularmente el estudio preliminar de la *E. laurifolia*, sobre aislamiento de dos compuestos diterpénicos de la fracción en AcOEt, reportados por L. Avila<sup>2,11</sup>. En la figura 19 se muestra el espectro <sup>1</sup>H RMN de la fracción LAG-S6, el cual fue dividido en tres secciones para facilitar su análisis, de acuerdo a las señales reportadas sobre núcleos diterpénicos de estudios anteriores de *Euphorbia* (tablas 9,10 y figura 32).



Figura 19. Espectro  $^1\text{H}$  RNM, compuesto Aislado LAG- S6.

La región I, comprende las señales con desplazamientos entre 0.89 ppm y 3.5 ppm, los cuales al compararse con los encontrados en la tabla 9, figura 32, son atribuibles a grupos metilos ubicados a 0.89 ppm, 0.93 ppm, 1.04 ppm, 1.11 ppm, 1.22 ppm, 1.85 ppm. El singlete a 2.09 ppm, propone la presencia de grupos acetoxilo, y los multipletes con desplazamientos a 1.32 ppm, 1.45 ppm, 1.66 ppm,

2.23 ppm, 2.51 ppm y 3.51 ppm, reflejan hidrógenos pertenecientes a carbonos terciarios del núcleo estructural y de los sustituyentes.

La región II, comprende absorciones entre 5.0 ppm y 6.75 ppm. En este rango las señales con desplazamientos en 5.85 ppm (d, 1H) y 6.67 ppm (d, 1H), fueron asociados con protones de carbonos vinílicos. Mientras que las señales con desplazamientos en 5.02 ppm, 5.06 ppm y 5.38 ppm (t, 1H), corresponden a protones enlazados a carbonos asociados directamente a funciones electroatrayentes probablemente oxigenadas, la identidad de estas señales se definió preliminarmente con los datos encontrados en la tabla 9, página 32.<sup>1,10,16.</sup>

Por último la región III, comprende absorciones entre 7.25 ppm y 9.25 ppm. En este intervalo las señales con desplazamientos en 7.37 ppm (dd, 1H), 8.21 ppm (d, 1H), 8.75 ppm (d, 1H) y 9.12 ppm (s, 1H), no se observan en los espectros de los compuestos aislados de *E. laurifolia* descritos en la tabla 9, pero se pueden asociar comúnmente con protones de sustituyentes del núcleo diterpéno presente en compuestos aislados de otras especies de *Euphorbia*<sup>14,16</sup>, figura 32.

La tabla 2, muestra los desplazamientos de carbonos e hidrógenos obtenidos del espectro, HMQC, figuras 20 y 21, del compuesto aislado (LAG-S6).

Tabla 2. Señales  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuestos aislado (LAG-S6).

Señal	Compuesto LAG-S6		Sustituyentes	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1 $\alpha$	3.52 dd (13.90, 7.96)	44.41	8-IB IB = isobutirato	
1 $\beta$	1.45 (12.95, 13.23)		H-21, 2.50 m	C-21, 34.56
2	2.09	38.03	H-22, 2.23 m	C-22, 34.76
3	5.02 (3.95)	80.19	H-23, 0.95 m	C-23, 18.75
4	2.50, m	50.71	H-24, 1.04 d (6.96)	C-24, 19.06
5	5.86, dd (10.91, 1.202)	123.93	H-25, 2.50 d (7.05)	C-25, 34.56
6		137.5	15-Ac <sub>1</sub>	
7 $\beta$	5.06	79.18	2.09	170.0 22.0
7 $\alpha$			7-Nic Nic: nicotinato	
8	5.38, dd (10.4)	72.61	9.12 s	152.0
9	1.32	34.09	8.76 d, (4.07)	154.0
10		25.24	8.22 d, (7.91)	137.0
11	1.66	30.35	7.36 dd, (5.01, 2.63)	124.0
12	6.67, d (11.4)	144.06		164.95
13		134.0		
14		194.38		
15		95.0		
16	0.89,	14.8		
17	1.66	18.0		
18	1.11	16.56		
19	1.22	29.23		
20	1.85, s	12.70		

Figura 20. Espectro HMQC, compuesto LAG-S6.

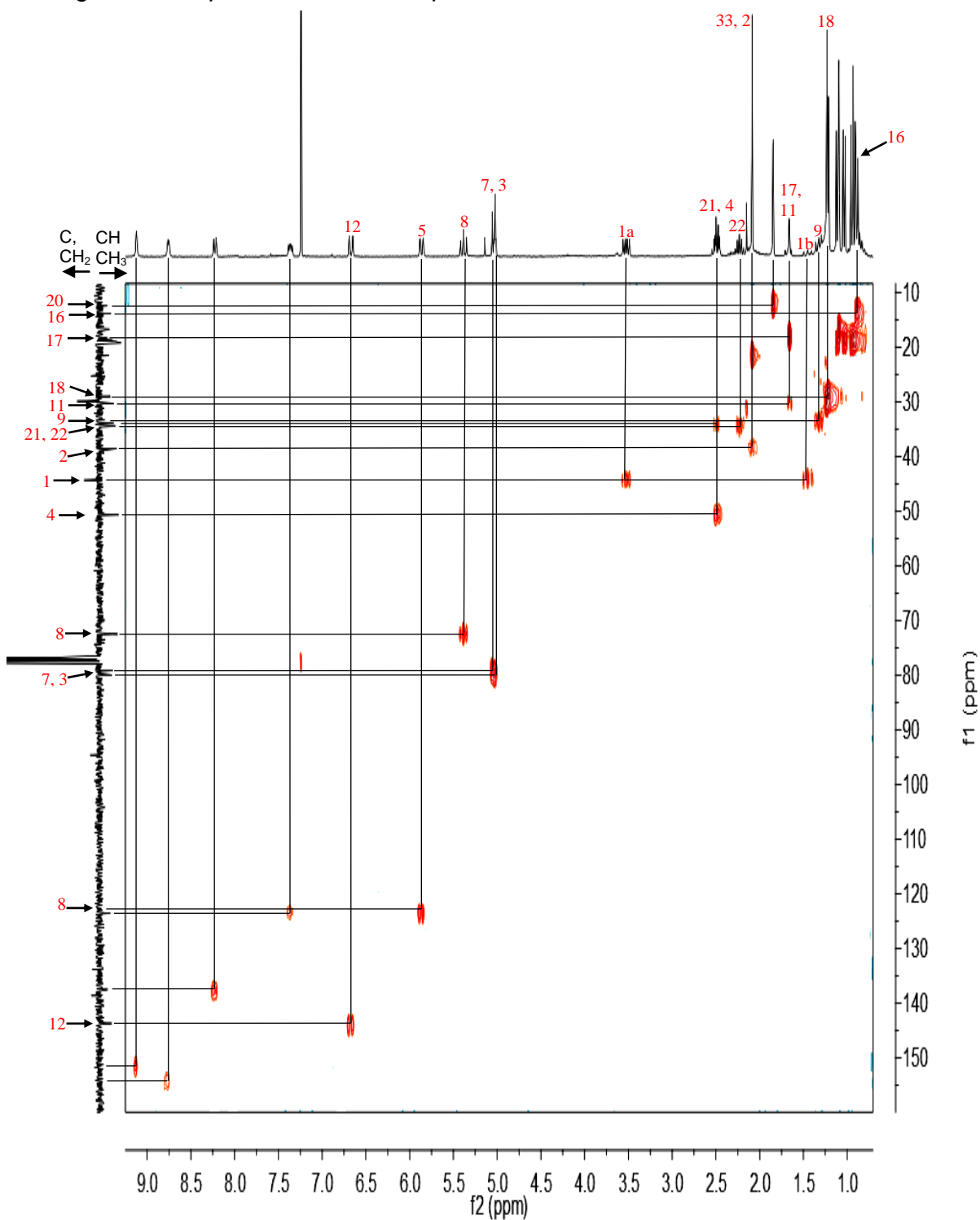
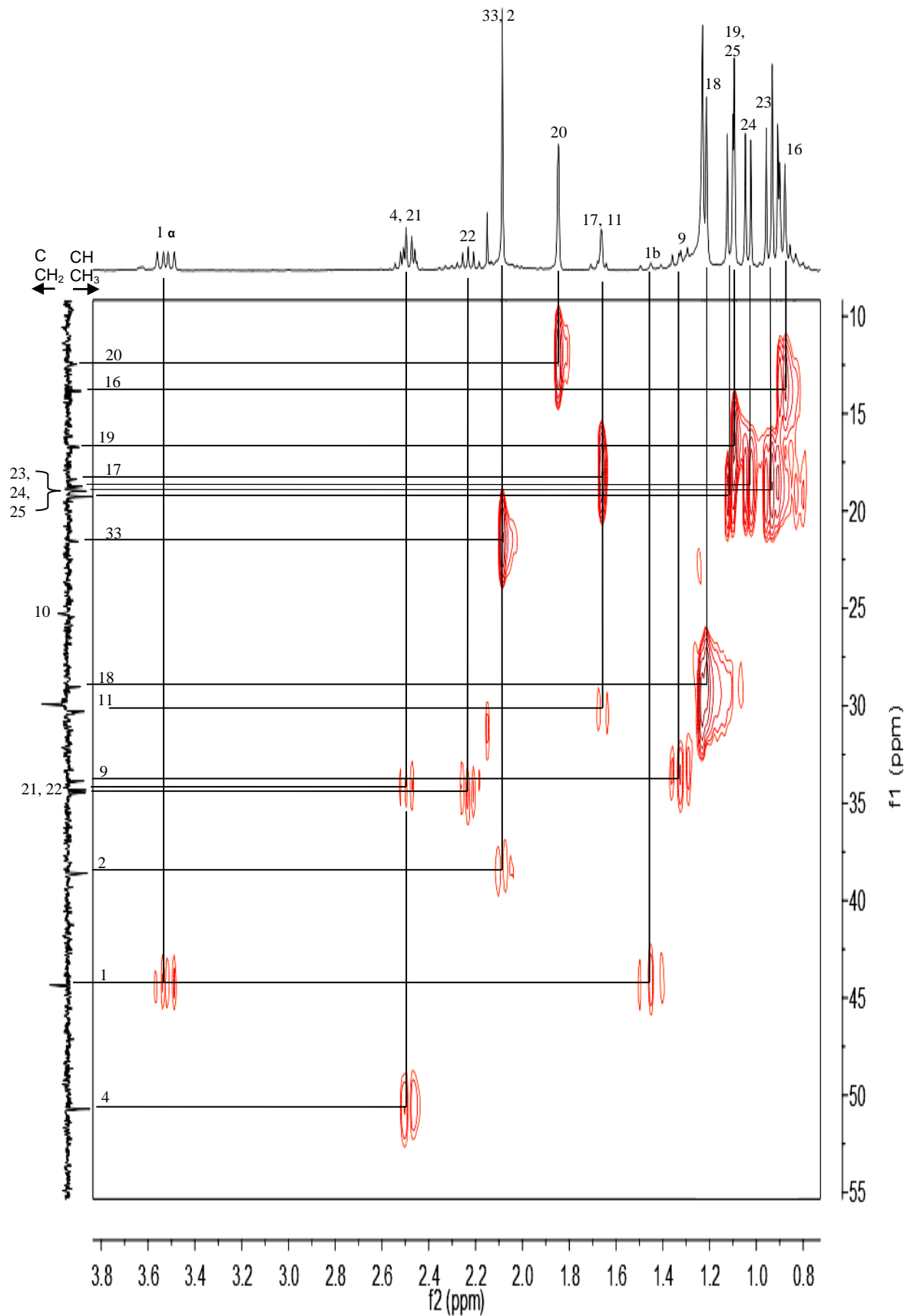


Figura 21. Ampliación HMQC, compuesto LAG-S-6.



Los espectros bidimensionales homonucleares (COSY), de esta fracción permitieron definir parcialmente fragmentos de la estructura del compuesto aislado, que se unieron aprovechando las correlaciones a larga distancia de espectros heteronucleares (HMBC). De esta manera se obtuvo la estructura preliminar del compuesto asociado con la fracción LAG-S6. A su vez cada protón se asocio al respectivo carbono mediante análisis del espectro heteronuclear a corta distancia (HMQC), exhibido en la figura 21 y ampliado en la figura 22, los datos respectivos son presentados en las tablas 2, 9 y 10.

### 7.6.3 Análisis de los espectros bidimensionales de la fracción LAG-S6:

Mediante el espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de la figura 25 y 26, se estableció preliminarmente el núcleo estructural del compuesto LAG-S6, con base en los acoplamientos de las señales que hacen parte de este núcleo. El análisis se inicia con: El doblete a 6.67 ppm, asociado con H-12, se acopla con el multiplete en  $\delta=1.66$  ppm, atribuido a H-11. Este último a su vez acoplado con el multiplete en  $\delta=1.32$  ppm, reconocido como H-9. De igual modo se observa un acoplamiento de H-9, con el triplete de H-8, ubicado a 5.38 ppm. Este protón se encuentra también acoplado con la señal en  $\delta=5.06$  ppm, correspondiente a H-7. Ver Tabla 3.

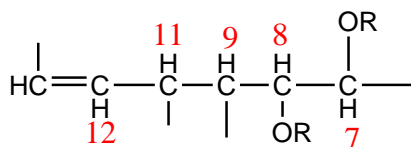
Tabla 3. Correlaciones COSY fragmento I.

SEÑAL	H $\delta$	COSY	Fragmento
H-7	5.06, d	H-8	
H-8	5.38, t	H-9, H-7	
H-9	1.32, m	H-11, H-8	
H-11	1.66, m	H-12, H-9	
H-12	6.67, d	H-11	

La identidad de cada protón se logró definir al tener en cuenta las correlaciones del espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, figuras 21 y 22, con las cuales se identifica que

señales a 5.06 ppm y 5.38 ppm, corresponden a protones enlazados a carbonos asociados directamente con funciones oxigenadas (HC-OR). Y, los dobletes en  $\delta=5.86, 6.67$  ppm, (H-5, H-12), corresponden a hidrógenos enlazados a carbonos olefínicos (-C=CH-). Por lo tanto se propone un primer fragmento del núcleo estructural, así. Figura 22.

Figura 22. Fragmento I del núcleo estructural del compuesto LAG-S6



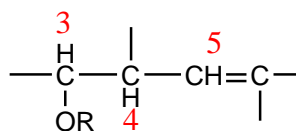
El análisis del espectro  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY condujo al fragmento II, obtenido a partir de la correlación del doblete de H-5 ( $\delta=5.86$  ppm), con el multiplete a 2.5 ppm que integra para dos protones, uno de ellos identificado como H-4, responsable del doblete asignado a H-5. La señal a 2.5 ppm también está correlacionada con el multiplete a 5.06 ppm que integra para dos protones, siendo uno de ellos H-3. Ver Tabla 4.

Tabla 4. Correlaciones COSY del fragmento II.

SEÑAL	H $\delta$	COSY	Fragmento II
H-3	5.06	H-4	$\begin{array}{c} \text{3} \quad \text{4} \quad \text{5} \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \text{---C---C---C---} \\   \quad   \quad   \end{array}$
H-4	2.50, m	H-5, H-3	
H-5	5.86, d	H-4	

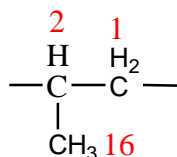
Mediante el espectro  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMQC, se estableció la identidad de los átomos de carbono correspondientes a los protones de este fragmento. Con base a el desplazamiento químico se determinó que el protón H-3 está enlazado a un carbono asociado con funciones oxigenadas y que el protón H-5 es vinílico. Bajo estas consideraciones se construyó el fragmento II, mostrado a continuación:

Figura 23. Fragmento II del núcleo estructural del compuesto LAG-S6



De otra parte, el fragmento III, se construyó a partir de la correlación débil de la señal a  $\delta = 2.09$  ppm, correspondiente a H-2, con el dd en  $\delta = 1.45$  ppm, del H-1b, y la correlación débil también de H-2 con el dd de H-1a en  $\delta = 3.52$  ppm. De igual modo se correlaciona con el doblete del protón H-16 localizado a 0.89 ppm. Ver figura 26. Al definir la identidad de cada uno de los protones por el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, y ensamblar los átomos de carbono se tiene. Figura 24:

Figura 24. Fragmento III del núcleo estructural del compuesto LAG-S6



En la figura 33 y 34, se observan las correlaciones en el espectro COSY, que permitieron proponer los anteriores fragmentos estructurales.



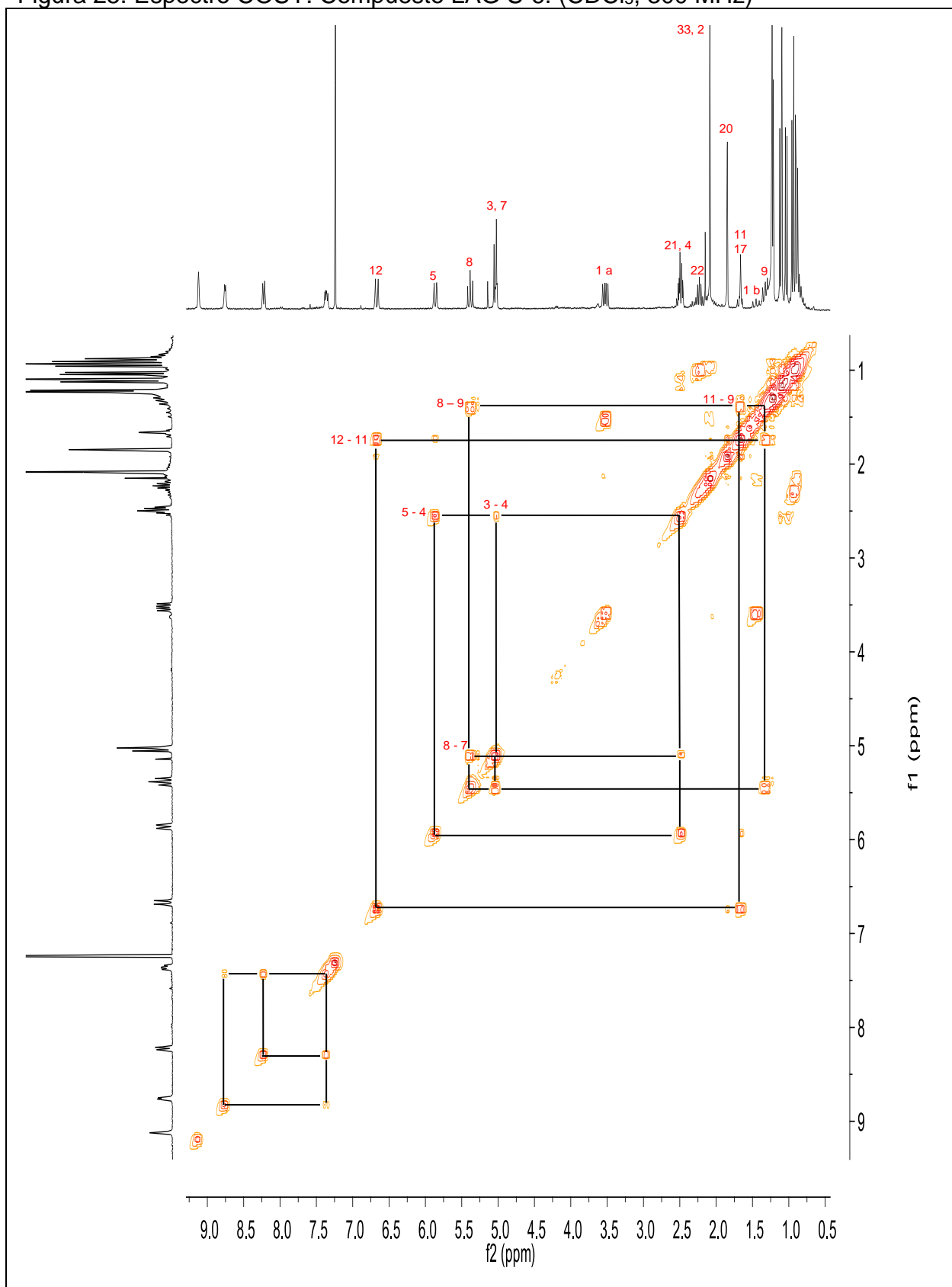
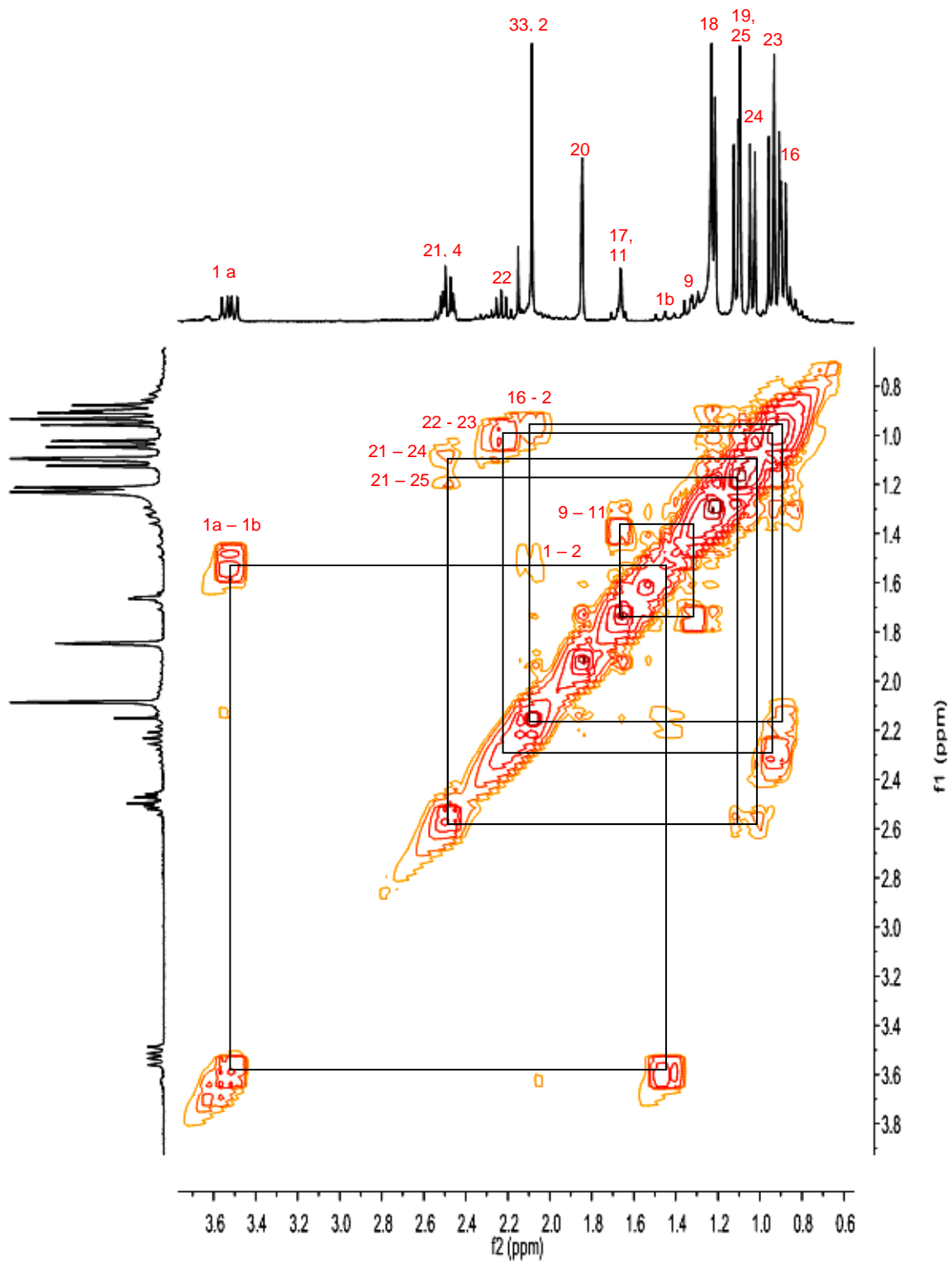
Figura 25. Espectro COSY. Compuesto LAG S-6. (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

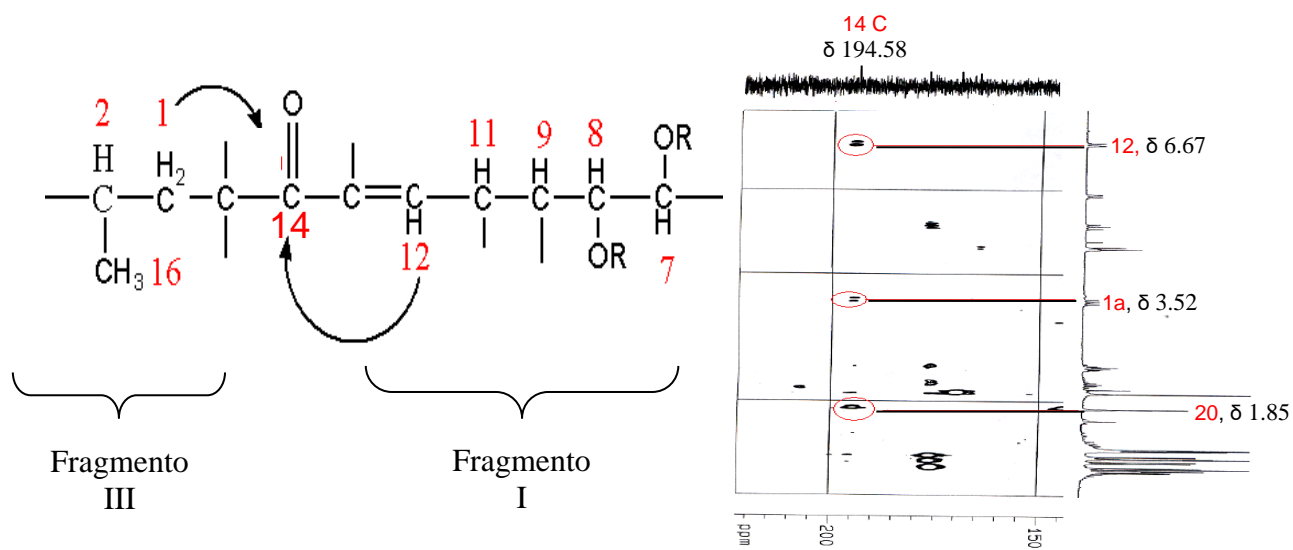
Figura 26. Ampliación COSY, compuesto LAG-S6. (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

#### 7.6.4 Estructura preliminar del compuesto LAG-S6:

La estructura preliminar del compuesto fue establecida uniendo los fragmentos obtenidos con base en el análisis de correlaciones escalares a larga distancia visualizados en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, figura 31, y espectros a corta distancia  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, Así:

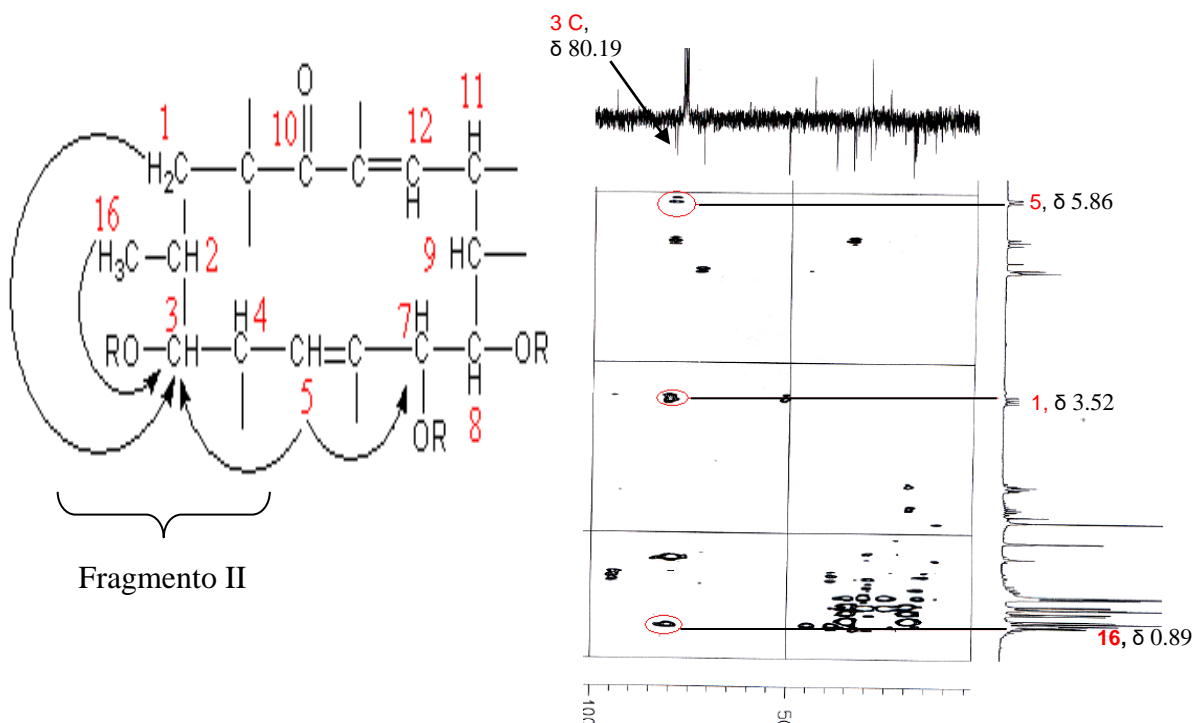
Inicialmente con el fin de asociar los fragmentos I y III se consideró la absorción del carbonilo C-14 con  $\delta = 194.58$  ppm, que presenta dos acoplamientos  $J$ -3 en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, con las señales de los protones H-12 y (H-1a, con  $\delta = 6.67$  ppm y  $\delta = 3.52$  ppm respectivamente, figura 27.

Figura 27. Unión de fragmentos I y III al C-14



Los extremos libres de los fragmentos III y I, forman un sistema cíclico estructurado con base en la correlación en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, de la absorción del carbono metínico C-3 a  $\delta = 80.19$  ppm del fragmento II, con las señales de los protones H-1a con  $\delta = 3.52$  ppm y H-16 a  $\delta = 0.89$  ppm del fragmento número III, por su parte la señal H-5 a  $\delta = 5.86$  ppm, del fragmento número II muestra acoplamiento con C-7 del fragmento I. De igual modo se afirma el anillo con la secuencia C<sub>5</sub>-C-C-H<sub>7</sub>. El sistema propuesto es:

Figura 28. Fragmentos I, II, III

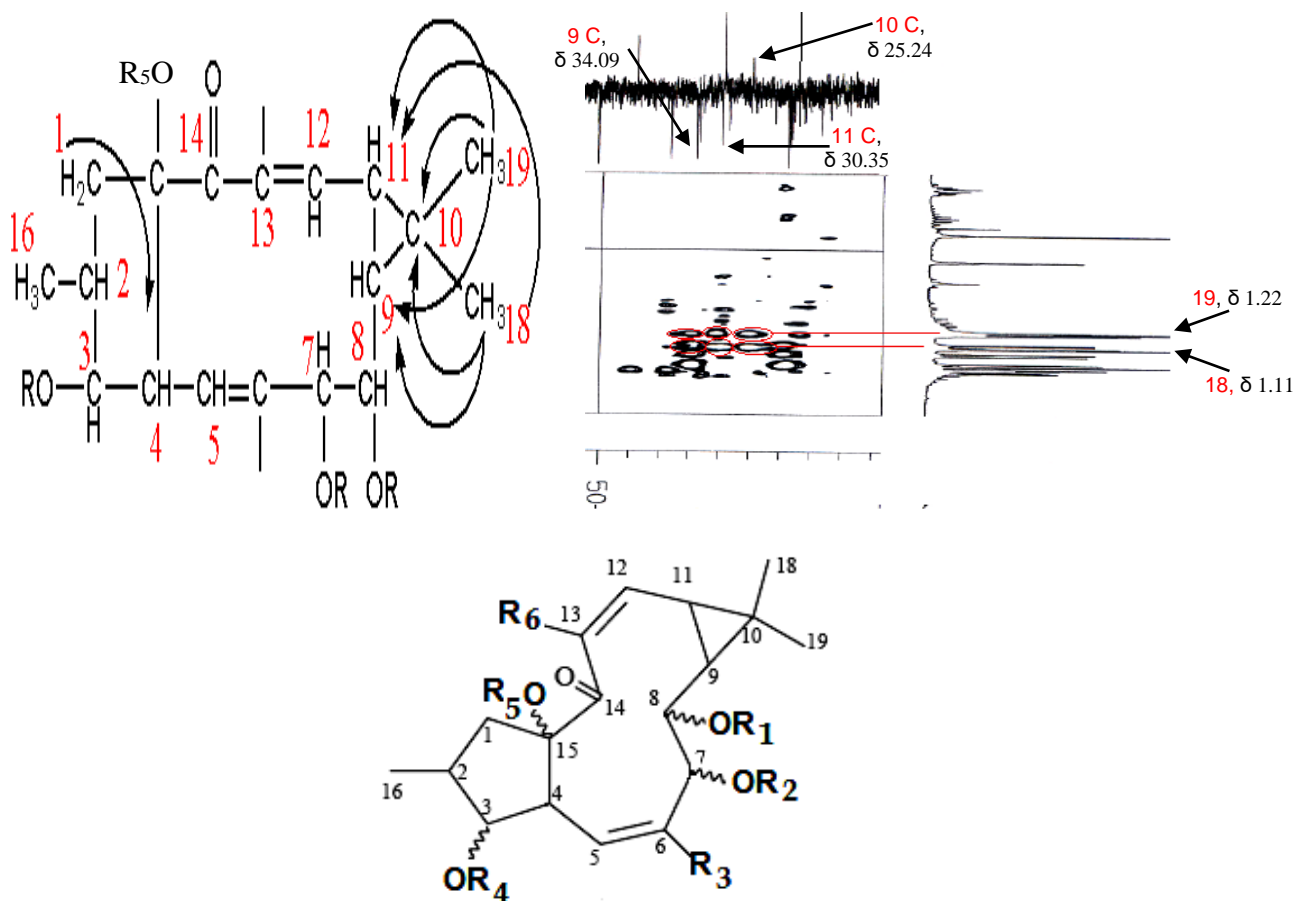


El sistema macrocíclico construido se ajusto a partir de: Las señales de los carbonos C-9 y C-11 a 30.35 ppm y 34.09 ppm respectivamente, acoplados  $J$ -3 con la señal H-18 a  $\delta$ = 1.22 ppm y la señal H-19 a 1.11 ppm, que de acuerdo al  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC fueron asignadas a grupos metilos, además presentan correlación  $J$ -3 con la con la absorción del carbono cuaternario a 25.24 ppm, característico del grupo ciclopropilo del sistema diterpénico identificado como C-10 (Tabla 5).

Tabla 5. Correlaciones HMBC del ciclopropilo.

SEÑAL	$^1\text{H } \delta$	$^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC	Fragmento
H-9	1.32		34.09	H-18, H-19	
H-10			25.24	H-18, H-19	
H-11	1.66		30.35	H-18, H-19	
H-18	1.11	C-9, C-10, C-11	16.56		
H-19	1.22	C-9, C-10, C-11	29.23		

Otro de los ajustes en el sistema fue la correlación  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMBC, de la señal para el carbono C-4 a  $\delta = 50.71$  ppm, con la señal para el protón H-1a a  $\delta = 3.52$  ppm, que genera un nuevo ciclo de cinco miembros dentro del sistema macrocíclico. Finalmente se propone el núcleo estructural siguiente. Figura 29.

Figura 29. Sistema macrocíclico, correlaciones  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HMBC

Para completar la estructura del metabolito acorde con las señales referidas, se procedió a establecer la identidad y posición de los sustituyentes mediante el siguiente análisis:

La correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, de la señal del protón H-8 con  $\delta = 5.38$  ppm, con la señal atribuible a un carbonilo en  $\delta = 176.20$  ppm, permite definir en la estructura la posición del sustituyente **OR**<sub>1</sub>, correspondiente a un grupo 2,3-metilbutirato, identificado por las correlaciones de esta última señal con tres señales para metilos en 0.95 ppm, 1.04 ppm, 1.11 ppm, (H-23, H-24, H-25), y con dos señales para protones de multipletes en 2.23 ppm, 2.50 ppm, (H-22, H-21). El sustituyente **OR**<sub>2</sub>, se identificó como un grupo Nicotinato (Nic.), en donde la señal para un carbonilo en 164.53 ppm, presenta una correlación en  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, con la señal del protón H-7 en 5.02 ppm, que define su posición en la estructura. Además de la correlación con la señal en 8.22 ppm, que corresponde a un protón del anillo aromático sustituyente del carbonilo. La asignación del resto de sustituyentes se hizo de manera similar por los acoplamientos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, mostrados en la figura 30 y 31.

Figura 30. Asignación de sustituyentes, correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

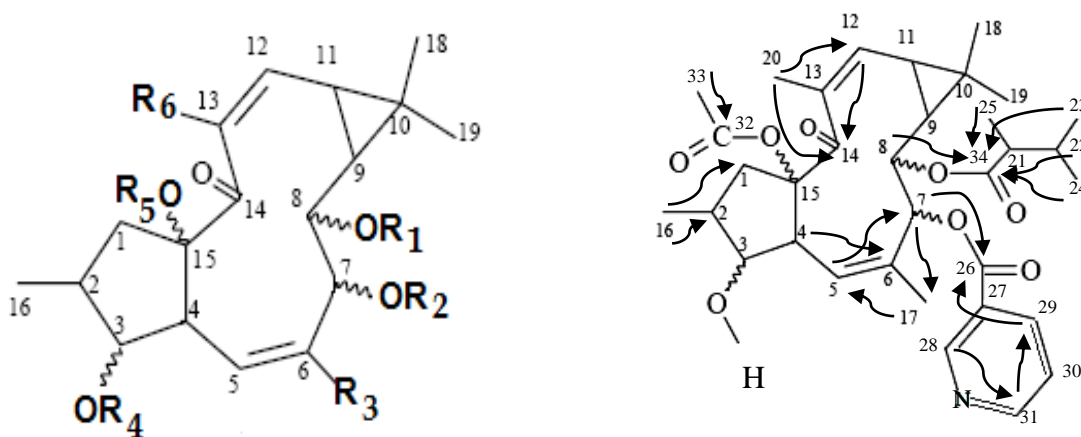
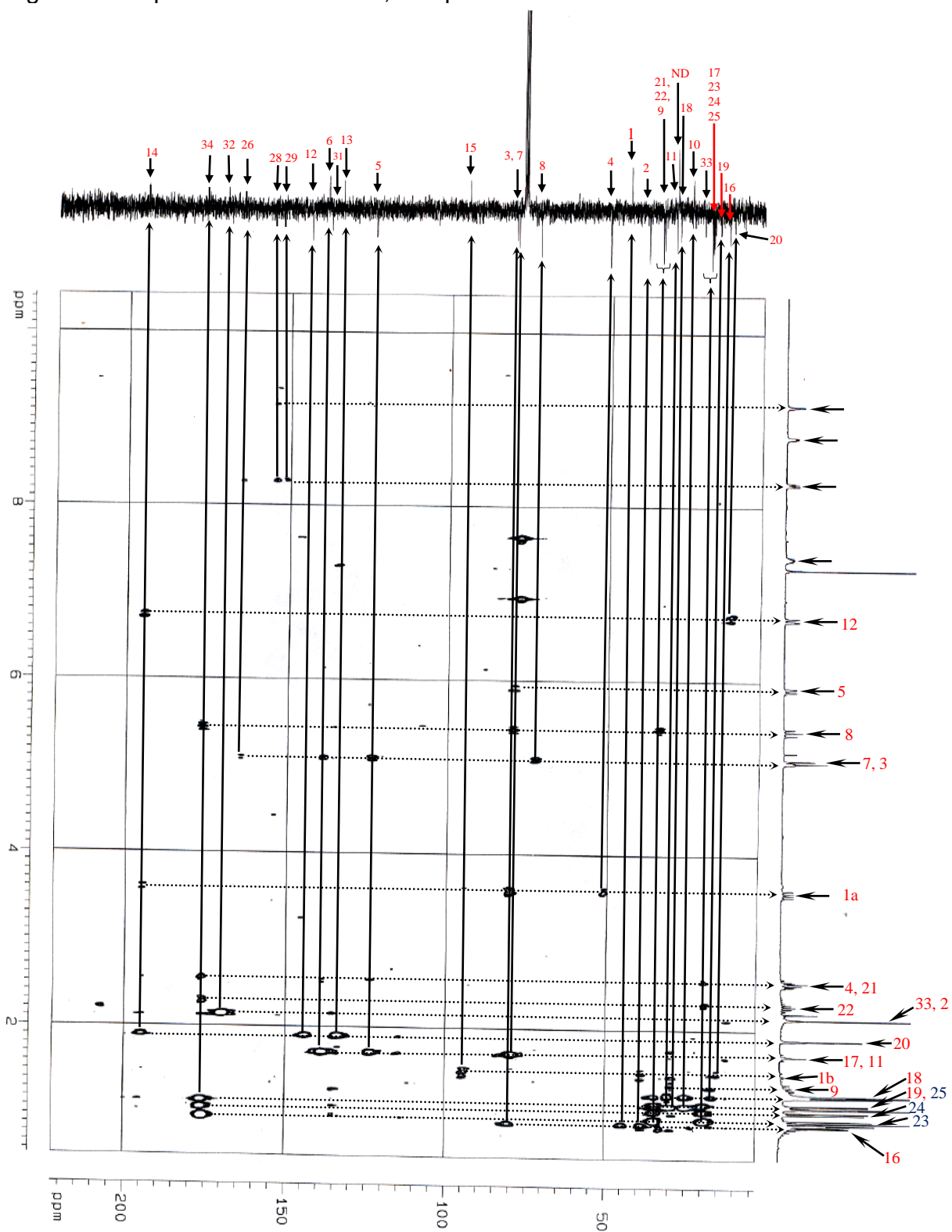


Figura 31. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, compuesto LAG-S6

En la propuesta del esqueleto carbonado del compuesto aislado, se consideró que el sustituyente **OR**<sub>4</sub>, es equivalente a un grupo hidroxilo (-OH), debió a que este tipo de sustitución proporciona un desplazamiento al grupo metino (-CH), enlazado, similar a los desplazamientos para el grupo -CH, en el compuesto 3, extraído de la tabla 9, y mostrado a continuación, en la tabla 6. Con base en el espectro HMQC se descarta otro tipo de sustituyentes como grupos acetilo, debido a la falta de señales características de este tipo de sustitución.

Tabla 6. Comparación desplazamientos del -CH.

Señal	Compuesto LAG-S6		Compuesto 3	
	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>13</sup> C
3	5.02	80.19	4.53 dd,	79.0

Con la asignación de los sustituyentes se propone una estructura para el compuesto llamado LAG-S6 que corresponde a la mostrada en figura 32, la cual presenta como núcleo estructural un esqueleto diterpénico al igual que los compuestos E. 1 y E. 2 mostrados en la tabla 9 y 10, obtenidos en estudios previos realizados con *E. laurifolia*, los cuales permitieron finalmente obtener una comparación de los desplazamientos de carbonos y protones del compuesto LAG-S6, análogos a los encontrados en los compuestos E. 1 y E. 2. Como se muestra a continuación:

Por ejemplo, la siguientes tabla 7 y 8, obtenidas de la tablas 9 y 10, muestra los desplazamientos <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC, de la señal 8 presente en los compuestos E. 1 y E. 2, aislados de *E. laurifolia* en anteriores estudios, y los desplazamientos para el compuesto LAG-S6 aislado en el presente estudio. Al comparar los desplazamientos para hidrógenos y carbonos, se tiene que existe solo alguna diferencia en la magnitud de los desplazamientos. Por lo cual se propone de manera preliminar que la identidad de esta señal en el compuesto LAG-S6, corresponde a un carbono asociado directamente a una función oxigenada (HC-OR), al igual que en los compuestos E. 1 y E. 2.



Tabla 7. Comparación desplazamientos de hidrógenos señal 8.

<b>Compuesto</b>					
	<b>LAG-S6</b>	<b>E. 1</b>	<b>E. 2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>H-8</b>	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>1</sup> H
	5.38, dd	4.94, dt	4.97 dt	5.10	6.22

Tabla 8. Comparación desplazamientos de carbonos señal 8.

<b>Compuesto</b>					
	<b>LAG-S6</b>	<b>E. 1</b>	<b>E. 2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>C-8</b>	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>13</sup> C
	72.61	74.98	74.83	69.9	121.9

A continuación se muestra la tabla 9, en la que puede observarse la comparación de las señales para compuestos reportados en la literatura y los desplazamientos encontrados para el compuesto LAG-S6. En esta tabla, se puede comprobar la similitud en el valor de los desplazamientos de carbonos e hidrógenos, lo cual nos permitió definir con mayor seguridad la identidad de cada átomo de la estructura, como también la posición de los sustituyentes.

Tabla 9. Señales  $^1\text{H}$  de compuestos reportados en la literatura y compuesto aislado (LAG-S6).<sup>1,10,16</sup>

	Compuesto LAG-S6	Compuesto E. 1	Compuesto E. 2	Compuesto 3	Compuesto 4
	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (J/Hz)
1 $\alpha$	3.52 dd	3.53 dd (14.1, 8.3)	2.17 dd (14.6, 7.1)	2.93 d (15.7)	3.52 dd
1 $\beta$	1.45	1.47dd (14.1, 8.3)	2.61 dd (14.6, 9.0)	2.27 d (15.7)	1.44 dd
2	2.09	2.15 m	2.26 (m)		2.20 ddd
3	5.02	5.22 t (3.5)	4.78 dd (7.5, 5.4)	4.53 dd (9; 44)	5.24 t
4	2.50, m	2.48, dd (10.6, 3.5)	2.80 dd (10.5, 7.5)	3.19 dd (4.4; 2)	5.29 dd
5	5.86, d	5.56, ddq (10.9, 1.3, 1.6)	5.50 dq (10.5, 7.5)	5.39 br s	6.10 d
6					
7 $\beta$	5.06	2.63, m	2.63 (m)	5.36 s	5.17 d
7 $\alpha$		1.94, dd (12.5, 11.2)	1.94 dd (12.5, 11.3)		
8	5.38, t (10.4)	4.94, dt (10.9, 3.8)	4.97 dt (11.3, 3.6)	5.10s	6.22 d
9	1.32	1.24	1.24 dd (11.3, 8.6)	490 s	5.93 dd
10					
11	1.66	1.59, dd (11.5, 8.3)	1.60 dd (11.5, 8.6)	5.72 d (15.7)	3.37 dd
12	6.67, d (11.4)	6.66, dd (11.5, 1.3)	6.58 dd (11.5, 1.2)	5.46 dd (15.7;9.5)	3.26 d
13				3.26 dq (9.5;7)	
14					
15					
16	0.89, (6.69)	0.95, d (6.7)	1.07 d (6.9)	1.85 s	0.88 d
17	1.66	1.44 d (1.6)	1.42 d (1.3)	5.29 br s 5.12 br s	4.0 d 3.66 d
18	1.11	1.05 s	1.06 s	0.85 br s	4.80 br s 4.84 br s
19	1.22	1.19 s	1.19 s	1.26 br s	1.75 s
20	1.85, s	1.83,d (1.3)	1.83 d (1.2)	1.19 d	1.58 s
	8- $\beta$ IB = isobutirato	8-Ac <sub>2</sub>	8-Ac <sub>2</sub>	3/5-OH	Propionil= 1' 2' 3' COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> =OR <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>
	21 = 2.50 m	2.06	2.06	3.35 d	1' =
	22 = 2.23 m			15-OH	2' = $\delta$ 2.24
	23 = 0.95 m			4.35 s	3' = $\delta$ 1.04
	24 = 1.04 m	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OAc	

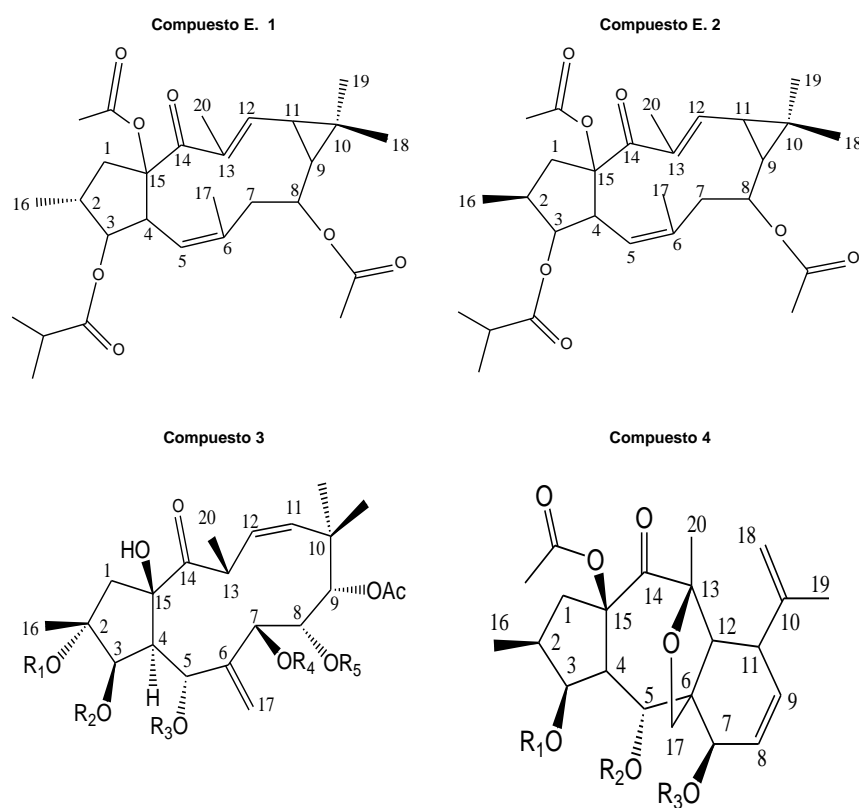
	25 = 1.11, m	2.66 m	2.58 sep (7.0)	2.13 s 2.05 s 2.00	
	15-Ac <sub>1</sub>	15-Ac <sub>1</sub>	15-Ac <sub>1</sub>		
	2.09	2.07	2.07 s		
		COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OMB	
		1.25 1.28	1.17 1.18	2.36 tq 1.68 m 1.45 m 1.13 d 0.88 t	
	7-Nic Nic: nicotinato			1-Nic Nic: nicotinato	7-Nic Nic: nicotinato
	9.12 s			9.40 br s	2'' = δ 9.16 d
	8.76 s			8.78 br s	3'' = δ
	8.22 d			8.46 br s	4'' = δ 8.29 dd
	7.36 m			7.40 br t	5'' = δ 7.39 dd
					6'' = δ 8.76 dd
					7'' = δ

Tabla 10. Señales  $^{13}\text{C}$  de compuestos reportados en la literatura y compuesto aislado (LAG-S6).<sup>1,10,16</sup>

	Compuesto LAG-S6	Compuesto E. 1	Compuesto E. 2	Compuesto 3	Compuesto 4
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1 $\alpha$	44.41	40.21, t	40.83 t	50.5	42,2
1 $\beta$	44.41				42,2
2	38.03	38.78, d	38.12 d	91.8	36.6
3	80.19	80.58, d	82.03 d	79.0	77.2
4	50.71	51.48, d	48.19 d	47.5	52.9
5	123.93	122.14,	122.27 d	68.3	66.7
6	137.5	137.51, s	137.52 s	144.5	55.5
7 $\beta$	79.18	43.22, t	43.27 t	68.8	66.2
7 $\alpha$					
8	72.61	74.98, dd	74.83 d	69.9	121.9
9	34.09	36.44, d	36.48 d	80.3	135.1
10	25.24	25.07, s	24.88 s	40.8	146.3
11	30.35	29.15, d	30.00 d	137.4	41.8
12	144.06	144.64, d	144.33 d	129.5	42.9
13	134.0	133.59,s	133.80 s	44.1	90.6
14	194.38	195.28 s	195.22 s	211.2	202.9
15	95.0		95.51 s	88.5	90.1
16	6	16.48, q	16.45 q	20.3	14.3
17	18.0	20.55 q	20.31 q	11.5	70.0
18	16.56	19.46 q	19.38 q	26.0	113.5
19	29.23	29.14 q	29.15 q	22.9	21.1
20	12.70	12.62, q	12.56 q	19.6	
	8- $\text{IB}$ IB = isobutirato	8-Ac <sub>2</sub>	8-Ac <sub>2</sub>	3/5-OH	Propionil= 1' 2' 3' COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> = OR <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>
	34.56	171.22 s	171.22 s		1' $\delta$ 173
	34.76	21.80 q	21.80 q		2' $\delta$ 27.6
	18.75				3' $\delta$ 8.7
	19.06				
	19.37				
		COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OAc	
		34.60 d	34.65 d	169.6	
				169.5	
				169.4	
	15-Ac <sub>1</sub>	15-Ac <sub>1</sub>	15-Ac <sub>1</sub>		
	170.0	171.35 s	171.35 s		
	22.0	21.80 q	21.80 q		
		COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OMB	
		176.83 s	175.26 s	174.2	
		19.74 q	19.72 q	41.3	
		20.55 q	20.08 q	26.4	

				16.3	
				11.5	
	7-Nic Nic: nicotinato				7-Nic Nic: nicotinato
	152.0				150.7
	154.0				126.5
	137.0				137.5
	124.0				123.2
	164.95				153.1
					164.4

Figura 32. Compuestos Euphorbiaceae<sup>10,15,19</sup>.



$R_1 = \text{Nic}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{MB}$ ,

$R_4 = \text{Ac}$ ,  $R_5 = \text{Ac}$ .

MB: 2-metilbutirato

1' 2' 3'

Propionil =  $\text{COCH}_2\text{CH}_3 =$

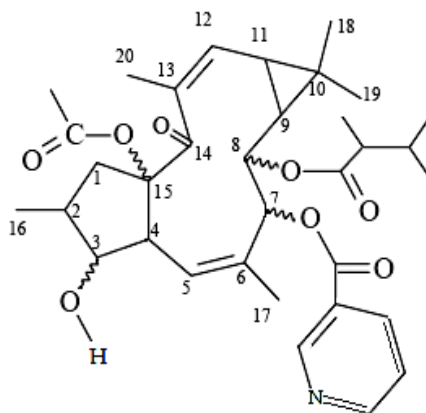
$\text{OR}_1$ ,  $\text{OR}_2$

Nicotinato = Nic =  $R_3$

Es importante considerar que la estructura propuesta no ha sido reportada en la literatura, y presenta como novedad en este tipo de compuestos, dos sustituyentes voluminosos adyacentes (posición 8 y 7), por consiguiente amerita ampliar el estudio y corroborar la estructura por diferentes técnicas como RX, espectros de Masas, Análisis Elemental, para confirmar características tales como la sustitución  $-OR_4$ , la cual no presenta una señal en el espectro RMN que identifique este sustituyente. Además es necesario espectros que permitan consolidar la estereoquímica del compuesto, como por ejemplo espectros ROESY, NOE, etc.

En los espectros RMN obtenidos se observa una señal No Definida (ND), Figura 39, espectro HMBC, para  $^{13}C$  en  $\delta=30$  ppm, y para  $^1H$  en  $\delta=1.21$ ppm, la cual presenta una intensidad sobresaliente, superior a la intensidad de las señales identificadas para el compuesto elucidado. La señal, según el espectro  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC, no correlaciona con ninguna otra, por lo cual se puede suponer que no hace parte o proviene del esqueleto carbonado del compuesto elucidado, se propone que esta señal puede deberse a impurezas dentro de la muestra, o solvente de redilución. Y su marcada intensidad es debida a la poca cantidad de sustancia aislada y utilizada para los espectros RMN.

Figura 33. Estructura propuesta para el compuesto aislado LAG-S6



Debido a la falta de un espectro de masas que permitiera corroborar el peso molecular de la estructura propuesta, y además definir la presencia de diferentes características estructurales como las sustituciones del núcleo estructural, se empleo el espectro HMQC para realizar el conteo de carbonos, hidrógenos y oxígenos, correspondientes a la estructura, y proponer una formula estructural.

Tabla. 11. conteo de carbonos, hidrógenos y oxígenos, identificados por HMQC.

<b>Señales</b>	<b>Número de átomos</b>	
<b>CH<sub>3</sub>= 9</b>	9 C	27 H
<b>CH<sub>2</sub>= 1</b>	1 C	2 H
<b>CH= 13</b>	13 C	13 H
<b>CO= 1</b>	1 C	1 O
<b>CO<sub>2</sub>= 3</b>	3 C	6 O

De la anterior tabla se deduce la siguiente formula C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>, a la cual se le adiciona un nitrógeno del sustituyente nicotinato identificado, y un hidrógeno de la función –OH propuesta como sustitución OR<sub>4</sub>, por lo cual se obtiene como formula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>O<sub>7</sub>N.

Entre algunas de las propiedades determinadas se encuentra que: El compuesto presenta una apreciable solubilidad en los solventes acetona y acetato de etilo, es incoloro, y puede emplearse como solvente de redilución para espectroscopia RMN, cloroformo deuterado.

En este estudio fueron aislados dos compuestos llamados LAG-S6 y LG-FR-A, como se muestra en el perfil C.C.D., de la figura 30, este último parece ser un isómero del primero, debido a que presenta el mismo patrón espectral, como se observa en los Anexos 8, 9 y 10. Por la poca cantidad obtenida en la purificación, se deja para continuar los estudios espectrales en posteriores investigaciones.

## 8. CONCLUSIONES

- En el presente estudio fueron aislados dos compuestos del látex de *E. laurifolia*, el primero de ellos llamado LAG-S6, presenta un esqueleto del tipo diterpénico, y muestra diferentes características estructurales no observadas en los estudios reportados para diterpenos aislados de EUPHORBIACEAE, el otro compuesto LAG-Fr-A, parece ser un isómero del primero, según los espectros RMN mono y bidimensionales obtenidos. Se propone ampliar el estudio espectral y definir las características estructurales no establecidas en su totalidad.
- La estructura propuesta mantiene el patrón de esqueleto carbonado diterpénico aislado previamente (Compuestos E.1 y E.2, tabla 2), por lo cual se obtiene una ampliación y mejoramiento del perfil espectral que poseen este tipo de compuestos aislados de *E. laurifolia*, lo cual permite generar una base de datos de señales RMN características de dicho núcleo estructural, que facilitaría la identificación estructural de nuevos compuestos que se podrían aislar del látex mencionado.
- Con el Tamizaje Fitoquímico realizado se puede considerar que existen varios núcleos estructurales constituyentes del látex, lo cual puede convertirse en el objetivo de próximas investigaciones, que busquen la obtención de diferentes metabolitos, no solo de naturaleza diterpénica.



## SUGERENCIAS

- En anteriores trabajos realizados con el latex de *E. laurifolia* se determinó que algunas fracciones cromatográficas obtenidas promueven el ciclo replicativo del VIH y actúan a través de procesos dependientes de protein kinasa C., lo cual fue el punto de partida de este trabajo, no obstante al obtener dos compuestos purificados y con el análisis espectral correspondiente, debe ampliarse el estudio con el objetivo de evaluar la mencionada actividad replicativa de ambos compuestos.

**BIBLIOGRAFIA**

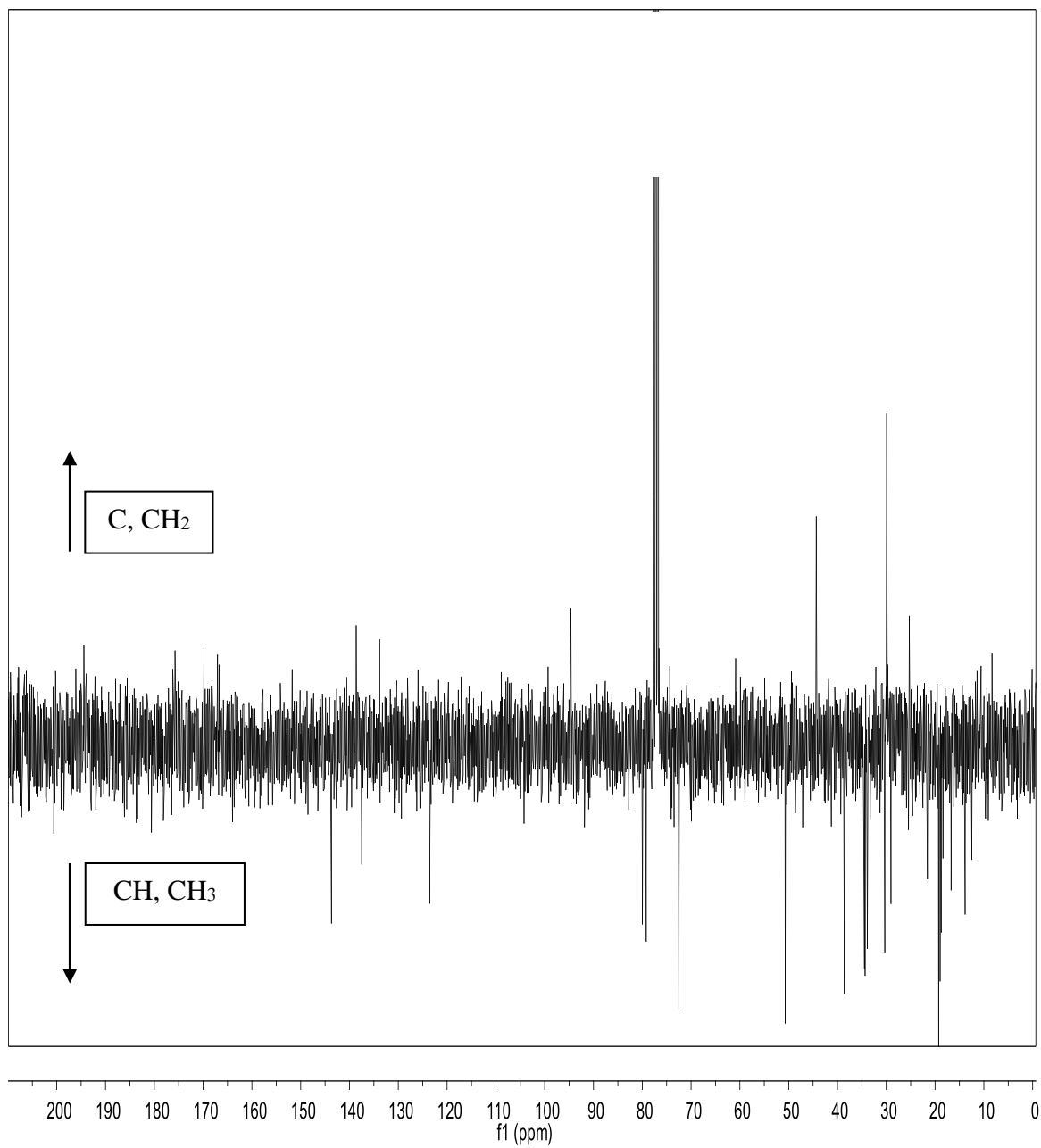
1. Arboleda David; Cañas Ana L.; López H. Albeiro y Forero Jorge E. 2007. Evaluation of the *in vitro* antiviral activity of four extracts from the species *Caryodendron orinocense* and *Phyllanthus niruri* from *Euphorbiaceae* family against herpes simplex virus type 2 and bobine herpes virus type 1. Revista de la facultad de química farmaceutica. Vol. 14, No 1. 55-60.
2. Avila Liliana; Perez Moises; Sanchez Gonzalo; Hernández Rosario; Muñoz Eduardo; Cabezas Fabio; Quiñones Winston; Torres Fernando; Echeverri Fernando. 2010. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry* 71, 243-248.
3. Bittner M.; Alarcón J.; Aqueveque P.; Becerra J.; Hernández V.; Hoeneisen M.; Silva M. 2001. Estudio químico de especies de la familia *Euphorbiaceae* en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, Vol.46. No.4.
4. Bilbao M.R. 2000. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Armenia. pp. 181.
5. Cheng Hua Y.; Lin Ta; Yang Chien; Wang Kuo; Lin Liang; Lin Chun. 2004. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplexvirus type 2 in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 577-583.
6. Dominguez Xorge. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. pp. 217-219

7. Fuentes J. C.; Castro V.; Jakupovic J.; Murillo R. 2004. Diterpenos y otros constituyentes de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae). Rev. Biol. Trop. 52(1): 269-285.
8. Galvis Liliana A.; Forero Jorge. 2002, Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. Mem Inst Oswaldo Cruz; 97:541-546.
9. Gunjan Goel; Makkar Harinder S.; Francis George; Becker Klaus. 2007. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. International Journal of Toxicology, 26: 297- 288.
10. Oksuz Sevil; Gurek Fal; Gil Roberto; Pengsuparp Thitima; Pezzuto John; Cordell, G. 1995. Four diterpene esters from *Euphorbia myrsinitis*. Phytochemistry, 38, 1457-1462.
11. Ospina A. Liliana. 2008, Actividad de plantas Colombianas frente al VIH y al virus de la Influenza. Trabajo de Posgrado en Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín.
12. Reza Amir. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran. Phytochemistry ,67, 1977–1984
13. Salamanca G. Guillermo. 2000. La Familia Euphorbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. Facultad de Ciencias - Departamento de Química, Universidad del Tolima. Ibagué Tolima Colombia.
14. Skoog; West and Holler; 1995. Química analítica. Sexta edición. McGraw-Hill. México. pp .491.

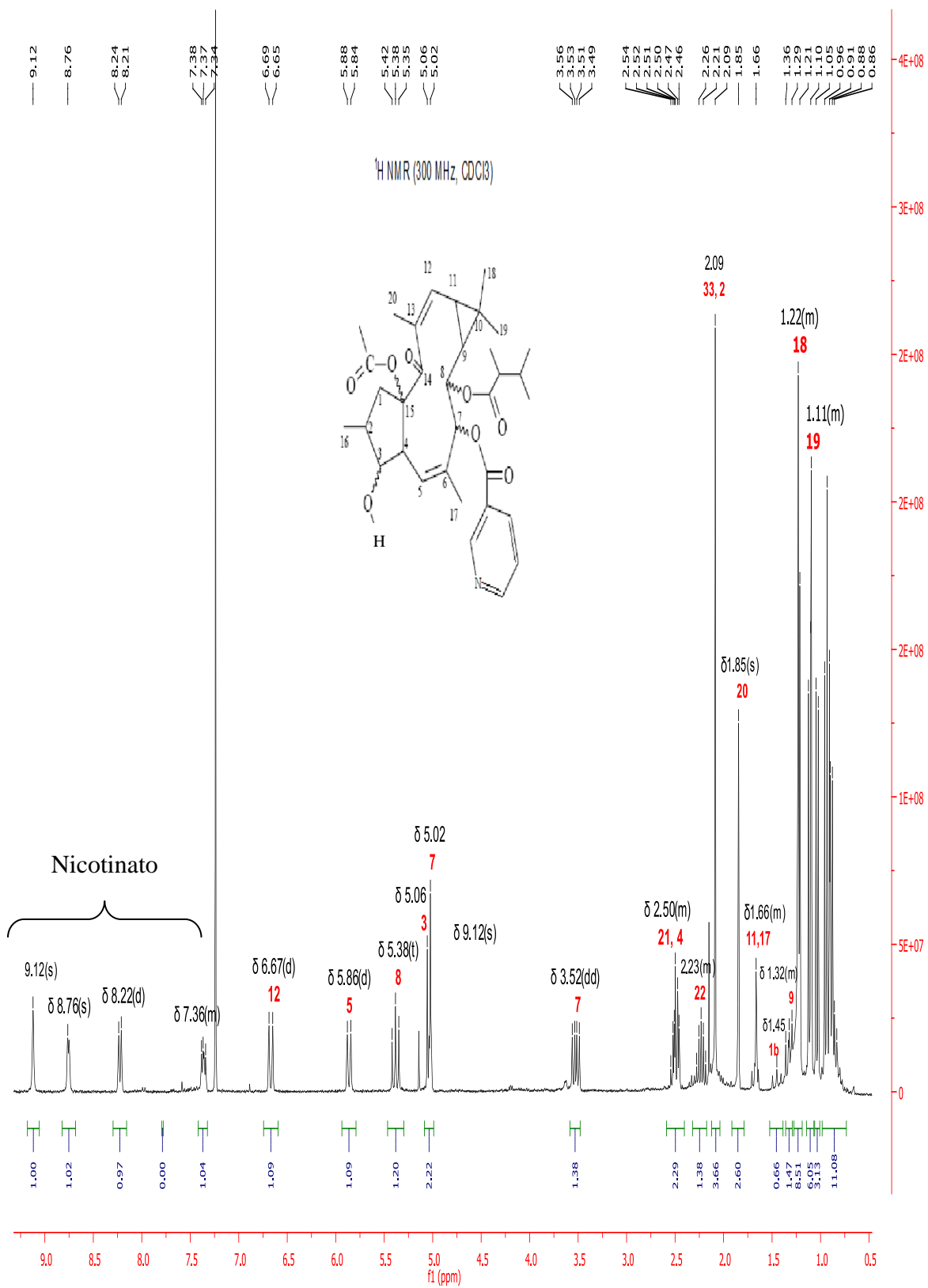
15. Sahar El-Mekawy; Meselhy Meselhy; Norio Nakumura; Masao Hatori; Takuya Kawahata; Toru Okate. 2000. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 53, 457-464.
16. Sanz Cervera; Marco Alberto; Javier F. Checa; Palomares Emilo. 1999. Jatrophone and tigliane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry*, 52, 479-485.
17. Tabares Paula; Avila Liliana; Torres Fernando; Cardona Diana; Quiñones Winston; Forero Jorge E; Rugeles María T.; Echeverri Fernando. 2007. Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. *Scientia et Technica*, Vol. XIII, No 33, 107-110.
18. Taborda Natalia A.; Acevedo Liliana Y.; Patiño Claudia P; Forero Jorge E.; Herrera Albeiro L. 2007. In vitro antiviral activity of extracts from *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* on bovine herpes virus type-1 and vesicular stomatitis virus replication. *Rev Col Cienc Pec*; 20:241-249.
19. Iarra Francisco; del Barrio Gloria. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol*; 72:317-322.
20. Murillo Jose. 2004. Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana* 5, 183-200.
21. Kulkosky Joseph; Culnen Derek; Roman Jeanette; Geethanjali Dornadula. Schnell, M., Boyd, M., Pomenrantz, R. (2001). Prostratin: activación de latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HARRT. *Blood* 98, 3006-3015.
22. Walsh Christopher; Clardy Jhon. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829–837.

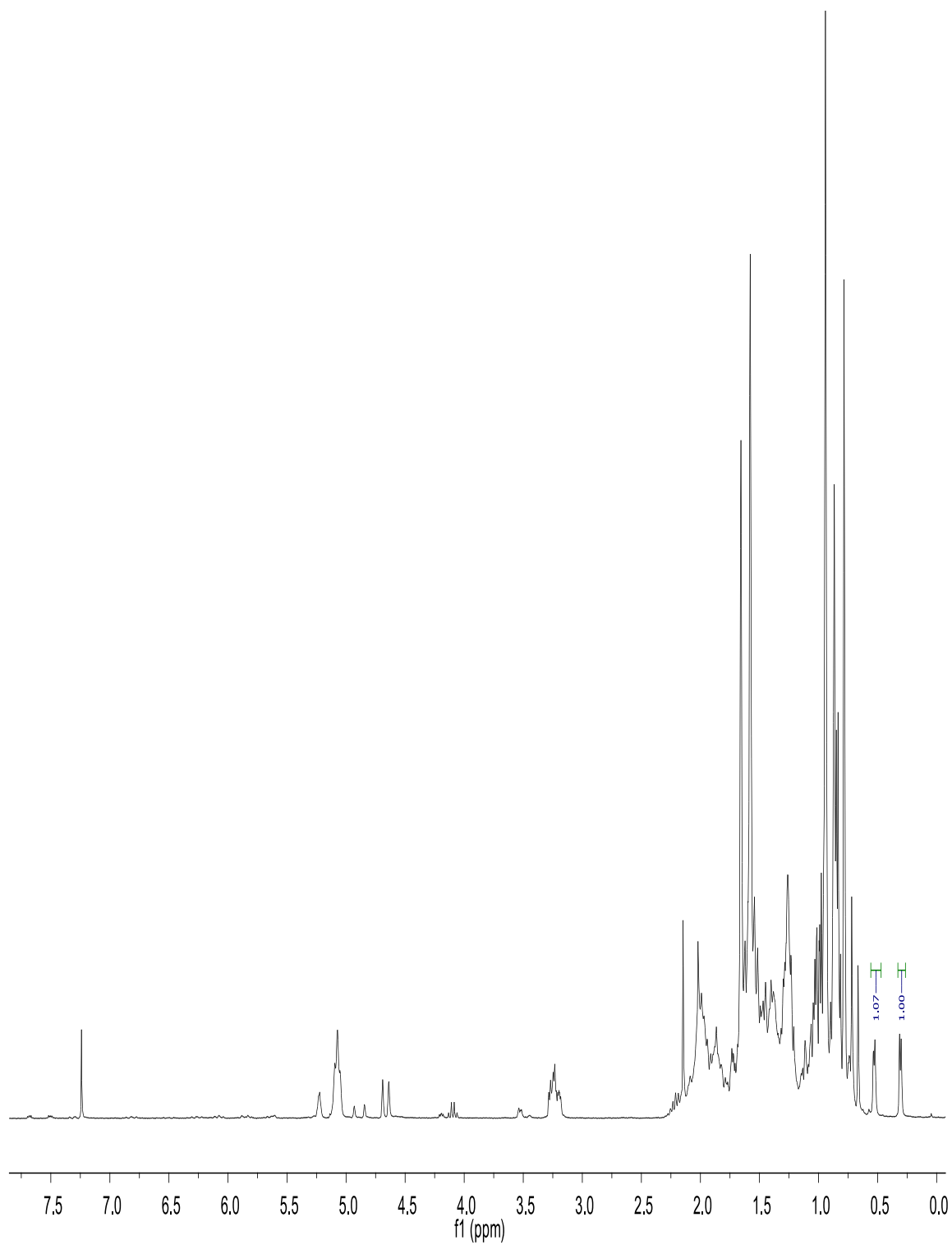
## ANEXOS

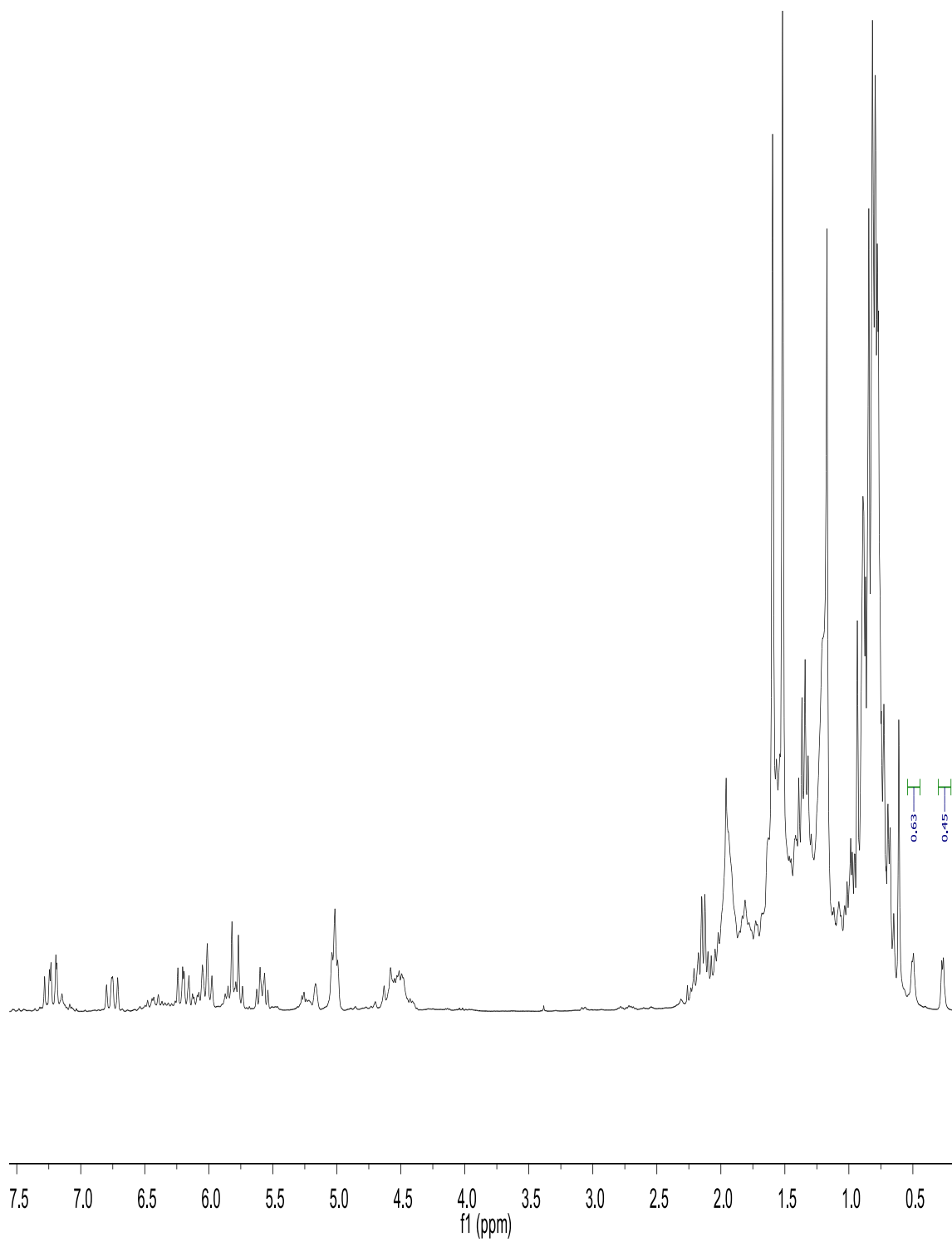
## ANEXO 1: Espectro JMOD, compuesto LAG-S6.



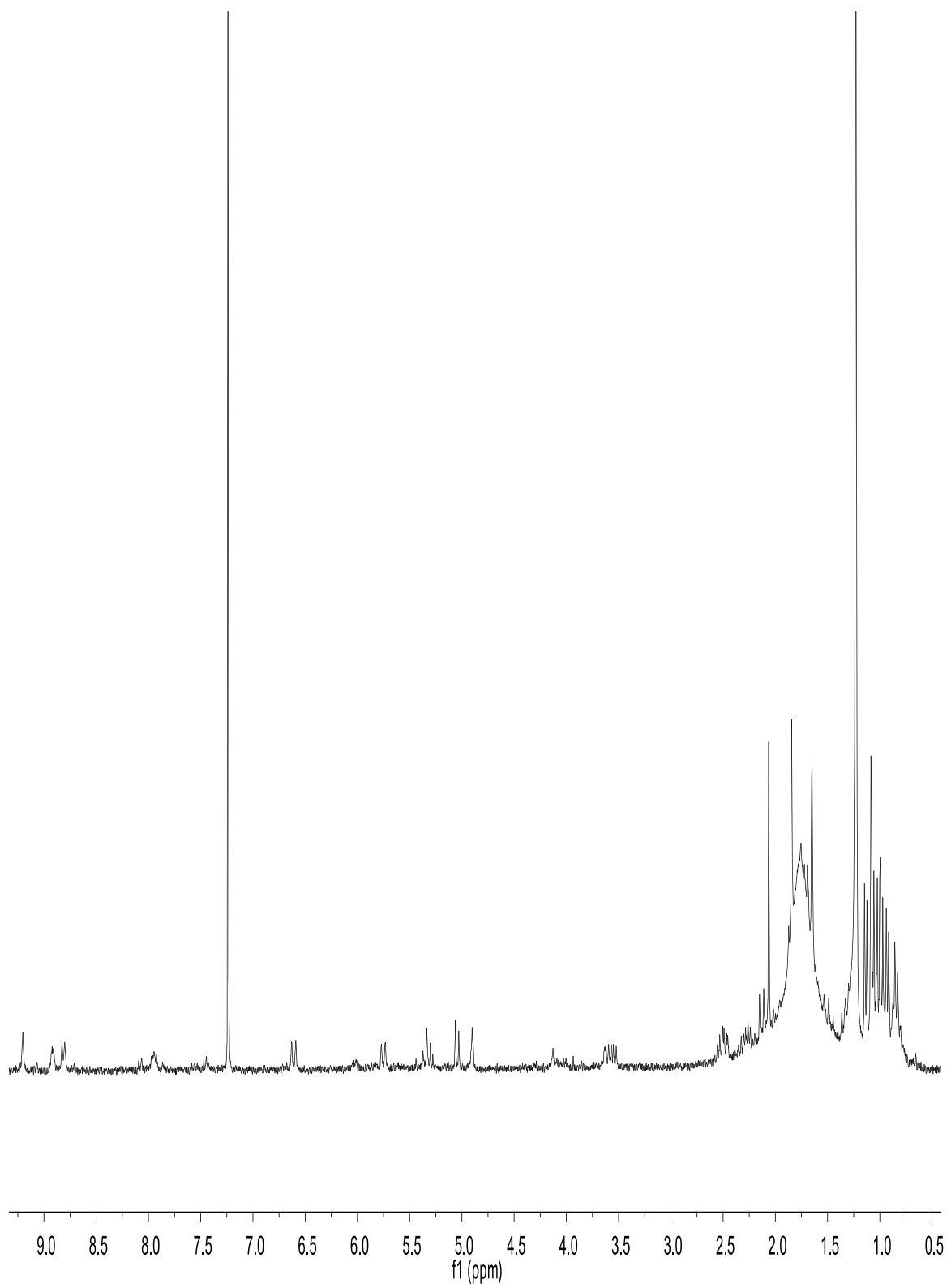
## ANEXO 2: Espectro 1H-RMN, compuesto LAG-S6.

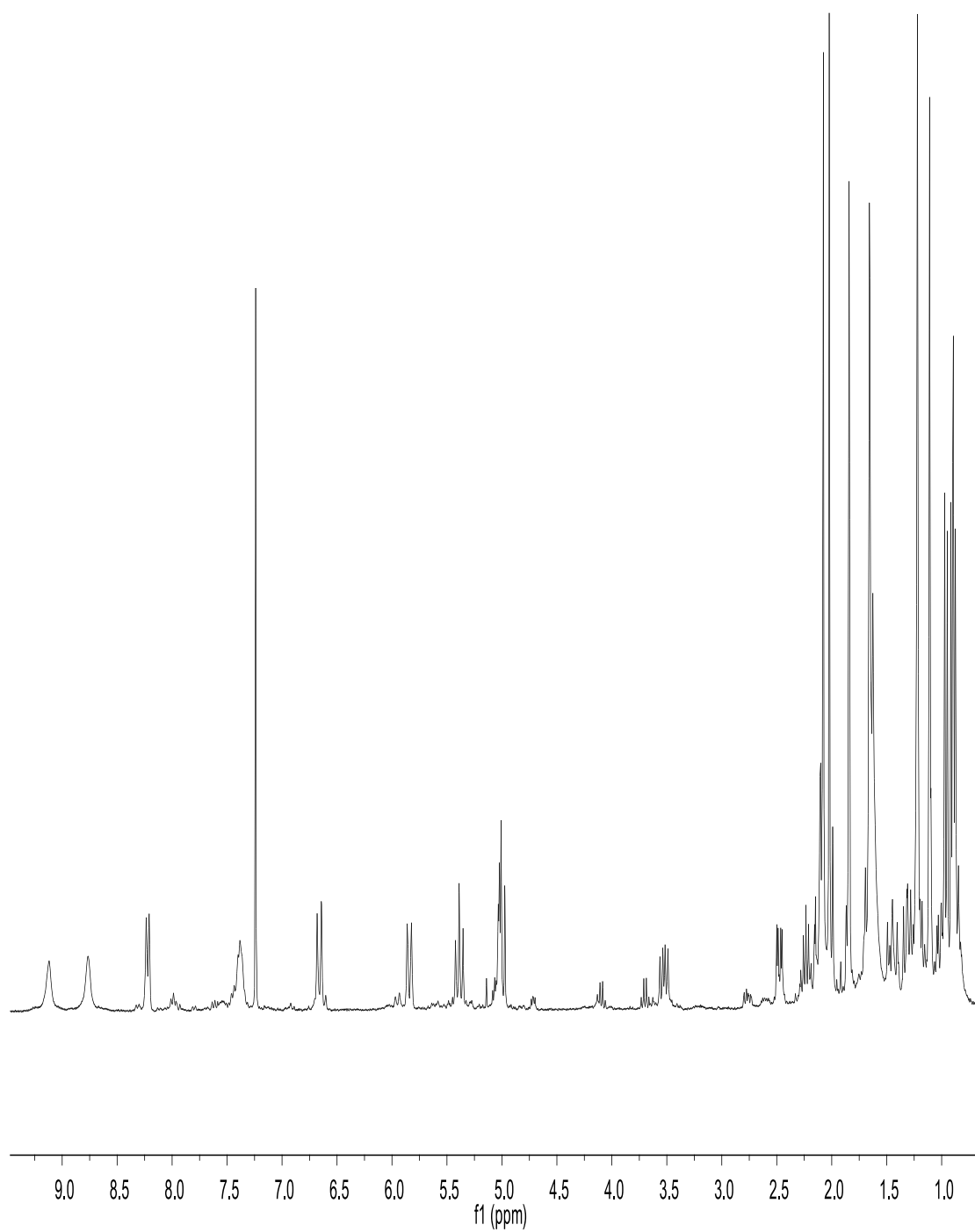


**ANEXO 3:** Espectro  $^1\text{H}$  RNM, cromatoplaca figura 19 i

**ANEXO 4.** Espectro  $^1\text{H}$  RNM, Cromatoplaca figura 20 j



**ANEXO 5.** Espectro  $^1\text{H}$  RNM, Cromatoplaca figura 21 k.

**ANEXO 6.** Espectro  $^1\text{H}$  RNM, Cromatopluca figura 22 l.

**ANEXO 7.**

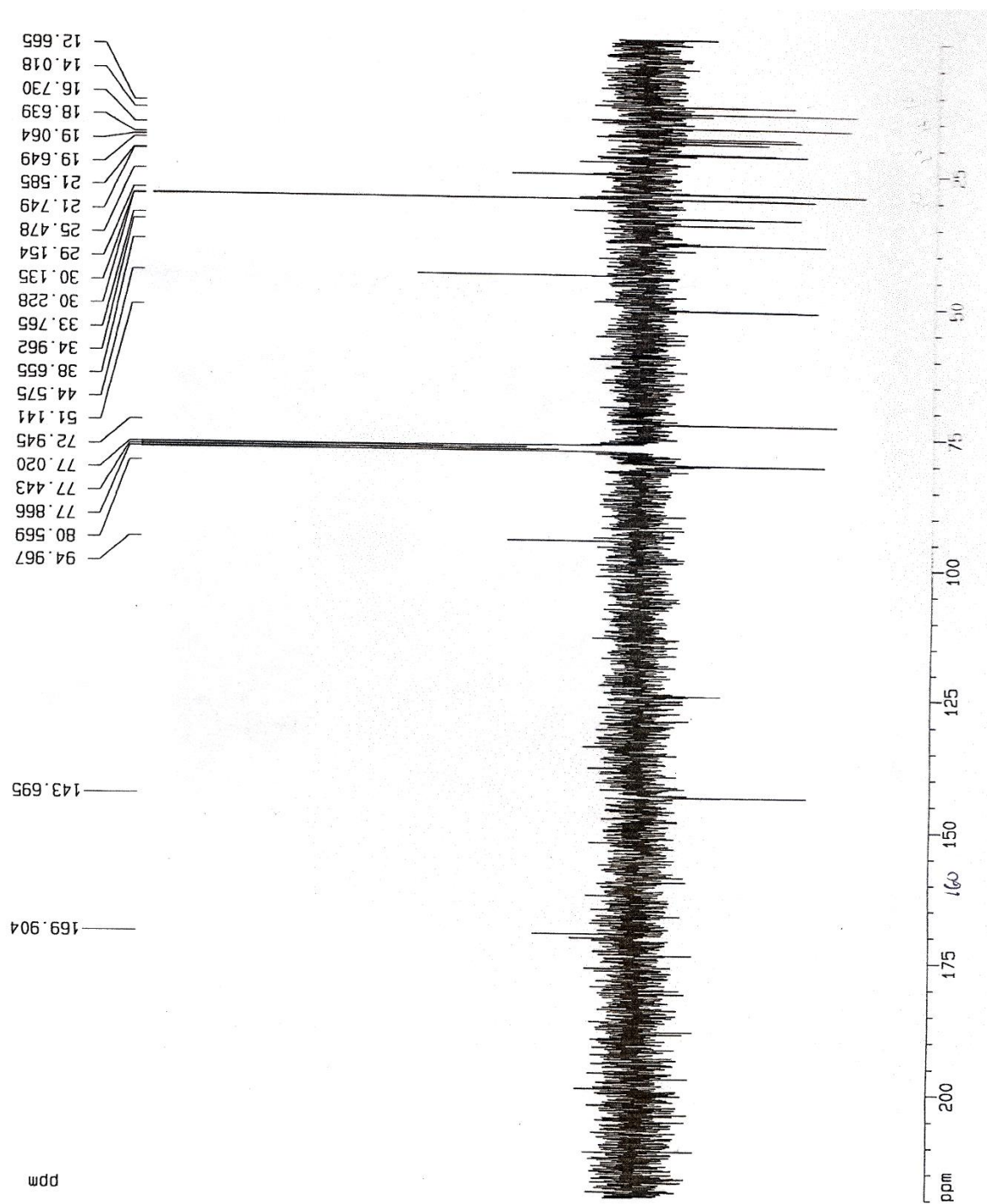
## Correlaciones COSY.

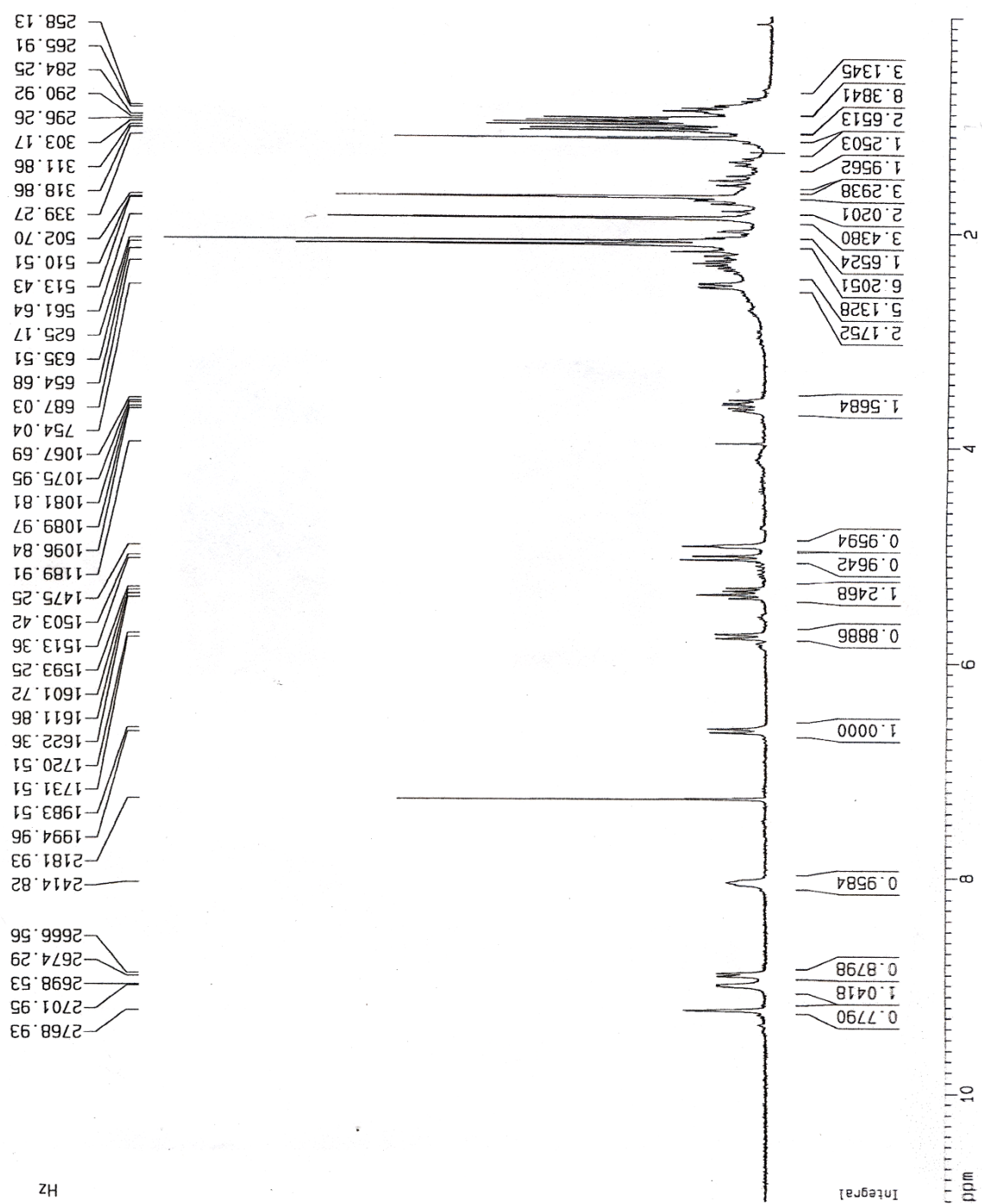
<b>ATOMO</b>	<b><sup>1</sup>H δ (J in Hz)</b>	<b>COSY</b>
1 $\alpha$	<b>3.52 dd</b>	H-2,H-1 $\alpha$
1 $\beta$	<b>1.45</b>	
2	<b>2.09</b>	H-16,H-1 $\beta$
3	<b>5.02</b>	
4	<b>2.50, m</b>	H-5,H-3
5	<b>5.86, d</b>	H-4
7	<b>5.06</b>	H-8
8	<b>5.38, t (10.4)</b>	H-9, H-7
9	<b>1.32</b>	H-11,H-8
11	<b>1.66</b>	H-12, H-9
12	<b>6.67, d (11.4)</b>	H-11
16	<b>0.89</b>	H-2

## Resultados del Tamizaje Fitoquímico

<b>NUCLEO</b>	<b>PB</b>	<b>EVA</b>	<b>ET</b>
Alcaloides (Dragendorf)	-	+	+
Terpenos y similares (Liebermann-Burchard)	+	+	+
Esteroles, terpenos (Anisaldehido-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	+	+	+
Flavonoides (tricloruro de aluminio (AlCl <sub>3</sub> ))	-	+	+
Saponinas (NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	+	+	+
Fenoles y taninos (FeCl <sub>3</sub> )	-	-	-

## ANEXO 8: Espectro JMOD, compuesto LG-FR-A.



ANEXO 9: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN, compuesto LG-FR-A.

## ANEXO 10: Espectro COSY, compuesto LG-FR-A

