

**CONTRIBUCIÓN AL ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Vismia lauriformis*
(CLUSIACEAE) Y SU CONTENIDO DE MACRO Y MICRONUTRIENTES DEL
SUELO DE COLECTA**

**JORGE ENRIQUE ORTEGA ORTEGA
JURY ALEXANDER CADENA RODRÍGUEZ**

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

**CONTRIBUCIÓN AL ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Vismia lauriformis*
(CLUSIACEAE) Y SU CONTENIDO DE MACRO Y MICRONUTRIENTES DEL
SUELO DE COLECTA**

**JORGE ENRIQUE ORTEGA ORTEGA
JURY ALEXANDER CADENA RODRÍGUEZ**

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director:

**FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO, Ph. D.
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

Asesores:

**ISABEL DEL SOCORRO BRAVO REALPE, M. Sc.
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**RICARDO REYES CHILPA, Ph. D.
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO**

**LUIS FERNANDO ECHEVERRY, Ph. D.
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**LUIS FERNANDO TORRES, Ph. D.
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

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

2010

Nota de aceptación:

Director _____
Ph. D. Fabio Antonio Cabezas Fajardo

Jurado _____
M. Sc. Juan Carlos Argoti

Jurado _____
M. Sc. Iván Paz

Popayán, Agosto 27 del 2010

A Dios por la realización de este trabajo, a nuestras familias y a todas aquellas personas que contribuyeron en nuestra formación académica, en especial al grupo de docentes de Química de la Universidad del Cauca, a los diferentes grupos de investigación, que muy amablemente nos prestaron incondicionalmente su colaboración.

AGRADECIMIENTOS

*A nuestros padres, por ser quienes lucharon día a día y nos formaron para ser lo que somos.
A nuestras familias y hermanos por confiar en nosotros.*

A los profesores Fabio Cabezas, Juan Carlos Argoti, Isabel Bravo muchas gracias por sus colaboraciones, consejos y paciencia que nos tuvieron.

A nuestros compañeros y amigos de los Grupos de Compuestos Bioactivos, Agroquímica y Catálisis por su gran apoyo incondicional.

Muchas gracias a nuestros buenos y grandes amigos: Andres Yanza, Yesenia Silva, Helberth Llantén, Farid Peña, Juan Carlos Muñoz, Luís , Carlos, Sebastián, Lesly, Maritza Samara, Lisbeth, Vicky, Carolina, Mónica, Diana, Lila, Elizabeth, Marcela, Zully, Leidy, Johana, Cristina, Alejandra, Sonia, Manuel, Jhon Erick, Arcadio, William, Rodrigo, Mónica, Marisol, Sandra, Jackeline, Ana Maria, Maricela, Isabel, Claudia, Jhovany y muchos más...., donde sin cada uno de ellos no habiéramos obtenido este gran logro.

A cada uno de los profesores del Departamento de Química por ayudarnos en nuestra formación profesional y personal.

A los profesores Luís Fernando Echeverri y Luís Fernando Torres de la Universidad de Antioquia como al profesor Ricardo Reyes Chilpa de la Universidad Autónoma de México por el apoyo, colaboración y amistad ofrecida para la realización de este trabajo.

Agradecemos a las diferentes personas que de una u otra forma nos dieron consejos y colaboración directa e indirecta para el desarrollo del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	16
1 INTRODUCCION	17
2 JUSTIFICACION	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	22
4.1 GENERALIDADES	22
4.3 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA FAMILIA Clusiaceae	22
4.3.1 Género <i>Vismia</i>	23
4.3.2 <i>Vismia lauriformis</i>	25
4.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	26
4.5 MACRO Y MICRONUTRIENTES	26
4.5.1 Macronutrientes	27
4.5.2 Micronutrientes	29
5 METODOLOGIA	31
5.1 RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	31
5.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	32
5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL VIH-1	33
5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	34
5.4.1 Determinación de alcaloides	34
5.4.2 Determinación de glicósidos cardiotónicos y azucares	34
5.4.3 Determinación de cumarinas	35
5.4.4 Determinación de flavonoides	35

5.4.5	Determinación de taninos	35
5.4.6	Determinación de terpenos y esteroides	36
5.4.7	Determinación de saponinas	36
5.4.8	Determinación de gomas y mucílagos	36
5.4.9	Determinación de lípidos y ceras	36
5.4.10	Determinación de antraquinonas	36
5.5	FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS	37
5.5.1	Fraccionamiento del extracto hexánico	38
5.5.1.1	Fraccionamiento del extracto hexánico fracción A	38
5.5.1.2	Fraccionamiento del extracto hexánico fracción B	39
5.5.2	Fraccionamiento del extracto Acetónico	41
5.5.3	Fraccionamiento del extracto Etanólico	43
5.6	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL SUELO DE COLECTA	44
5.6.1	Determinación de humedad de campo	45
5.6.2	Determinación de textura	45
5.6.3	Determinación de pH	46
5.6.4	Determinación de materia orgánica	47
5.6.5	Determinación de nitrógeno	47
5.6.6	Determinación de acidez titulable	48
5.6.7	Determinación de la capacidad de intercambio catiónico	49
5.6.8	Determinación de las bases intercambiables	49
5.6.9	Determinación de fósforo	50
5.6.10	Determinación de microelementos	52
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS	53
6.1	RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS	53
6.2	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE DE LA ENZIMA REVERSA TRANSCRIPTASA ASOCIADA AL VIH-1 APARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO	53

6.3	ANÁLISIS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS	53
6.4	Rf DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	57
6.5	PUNTO DE FUSIÓN Y SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	57
6.6	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO VL2	57
6.7	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO VL3	64
6.8	ANALISIS DE LA MUESTRA DE SUELO ASOCIADO A LA ESPECIE EN ESTUDIO	75
7	CONCLUSIONES	81
8	BIBLIOGRAFÍA	83
	ANEXOS	89

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Vismia lauriformis</i>	26
Tabla 2	Resultados del tamizaje fitoquímico de los cuatro extractos obtenidos	55
Tabla 3	Resultados del tamizaje fitoquímico de los compuestos aislados	56
Tabla 4	Datos de RMN- ¹ H, JMOD, COSY, HMQC, HMBC del compuesto VL2	61
Tabla 5	Datos de referencia de la friedelina RMN- ¹³ C (75.4 MHz, CDCl ₃) vs JMOD del compuesto VL2 (300 MHz, CDCl ₃)	63
Tabla 6	Datos de RMN- ¹ H, JMOD, COSY, HMQC, HMBC del compuesto VL3	71
Tabla 7	Datos de referencia del β,2,3',4,4',6-hexahidroxi-α-(α-L-ramnopiranosil) dihidrochalcona RMN- ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) vs JMOD del compuesto VL3 (300 MHz, CDCl ₃).	73
Tabla 8	Datos de referencia del β,2,3',4,4',6-hexahidroxi-α-(α-L-ramnopiranosil) dihidrochalcona RMN- ¹ H (CD ₃ OD) vs RMN- ¹ H del compuesto VL3 (DMSO)	74
Tabla 9	Análisis preliminar de la muestra de suelo asociada a <i>Vismia lauriformis</i>	75
Tabla 10	Características físicas de la muestra de suelo	76
Tabla 11	Análisis físicos y químicos preliminares de la muestra de suelo asociada a <i>Vismia lauriformis</i>	77
Tabla 12	Análisis físicos y químicos de la muestra de suelo	77
Tabla 13	Contenido de bases de cambio y saturación de la muestra de suelo asociada a <i>Vismia lauriformis</i>	78
Tabla 14	Contenido de micronutrientes de la muestra de suelo asociada a <i>Vismia lauriformis</i>	78

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Vereda la Rejoya (Zona de muestreo)	
Figura 2 Zona de recolección	
Figura 3 Cromatografía de capa delgada (CCD)	43
Figura 4 Toma de muestra del suelo	45
Figura 5 Determinación de textura del suelo por método de Bouyoucos	46
Figura 6 Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl	47
Figura 7 Determinación de bases intercambiables. Equipo Absorción Atómica	50
Figura 8 Determinación de fósforo. Espectrofotómetro ultravioleta	51
Figura 9 Estructura propuesta para el compuesto VL2	63
Figura 10 Correlación de señales de la ramnosa. Espectro COSY	68
Figura 11 Correlación de señales de la forma básica del flavonoide. Espectro COSY	69
Figura 12 Correlación de señales del flavonoide y la ramnosa. Espectro COSY.	69
Figura 13 Correlación de señales ^1H - ^{13}C a corta distancia. Espectro HMQC para el compuesto VL2	70
Figura 14 Correlación de señales ^1H - ^{13}C larga distancia. Espectro HMBC para el compuesto VL2	71
Figura 15 Estructura propuesta para el compuesto VL3: β ,2,3',4,4',6-hexahidroxil- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona	73

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1	Recolección de muestras del suelo y de la parte aérea de <i>Vismia lauriformis</i>	33
Esquema 2	Fraccionamiento del extracto hexánico obtenido de la hoja de <i>Vismia lauriformis</i>	38
Esquema 3	Fraccionamiento del extracto hexánico fracción A obtenido de la hoja de <i>Vismia lauriformis</i>	39
Esquema 4	Fraccionamiento del extracto hexánico fracción B obtenido de la hoja de <i>Vismia lauriformis</i>	40
Esquema 5	Fraccionamiento del extracto acetónico obtenido de la hoja de <i>Vismia lauriformis</i>	42
Esquema 6	Fraccionamiento del extracto etanólico obtenido de la hoja de <i>Vismia lauriformis</i>	44

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Espectro Infrarrojo del compuesto VL2	89
Anexo 2	Espectro RMN ¹ H del compuesto VL2	90
Anexo 3	Espectro JMOD del compuesto VL2	91
Anexo 4	Espectro DEPT del compuesto VL2	92
Anexo 5	Espectro COSY del compuesto VL2	93
Anexo 6	Espectro HMQC del compuesto VL2	94
Anexo 7	Espectro HMBC del compuesto VL2	95
Anexo 8	Espectro HMBC del compuesto VL2 (Expansión)	96
Anexo 9	Espectro Infrarrojo del compuesto VL3	97
Anexo 10	Espectro RMN ¹ H del compuesto VL3	98
Anexo 11	Espectro JMOD del compuesto VL3	99
Anexo 12	Espectro DEPT del compuesto VL3	100
Anexo 13	Espectro COSY del compuesto VL3	101
Anexo 14	Espectro HMQC del compuesto VL3	102
Anexo 15	Espectro HMBC del compuesto VL3	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
AcONH ₄	Acetato de Amonio
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
C	Carbono cuaternario
Ca	Calcio
CAUP	Herbario de la Universidad del Cauca
CC	Cromatografía de Columna
CCD	Cromatografía de Capa delgada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH	Grupo metilínico
CH ₂	Grupo metileno
CH ₃	Grupo metilo
CMS	Caracterización de los metabolitos secundarios
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
COSY	Correlation Spectroscopy ¹ H- ¹ H
C=O	Grupo carbonilo
d	Doblete
dd	Doble doblete
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DTPA	ácido etilendiaminopentacético
EA	Extracto Acetónico
EE	Extracto Etanólico
EH	Extracto Hexánico

EtOH	Etanol
FFP	Farnesilpirofosfato
FM	Fase móvil
FS	Fase estacionaria
HCl	Acido clorhídrico
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IPP	Isopentenilpirofosfato
IR	Espectroscopia infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
J.B.	Jardín Botánico Álvaro José Negret
m	Multiplete
MBC	Concentración mínima bactericida
meq	Miliequivalente
MIC	Mínima concentración inhibitoria
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida fosfato
OMS	Organización mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética nuclear
RMN 2D	Espectroscopia bidimensional
RT	Reversa transcriptasa
s	Singulete
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T°	Temperatura

TEA	Trietanolamina
UV	Ultravioleta
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana -1
VL1,VL2, VL3, VL4	Código de los compuestos aislados de los extractos de las hojas de la <i>Vismia lauriformis</i>
ZM	Zona de muestreo
%SB	Porcentaje de saturación de bases
δ	Desplazamiento químico

RESUMEN

El análisis fitoquímico realizado a la especie *Vismia lauriformis*, permitió identificar cualitativamente diferentes metabolitos secundarios: glucósidos cardiotónicos y/o azúcares, cumarinas, flavonoides, terpenos y/o esteroides, saponinas, gomas y/o mucílagos, lípidos y/o ceras y antraquinonas. No se encontró presencia de alcaloides y taninos. Se determinó que el extracto etanólico tiene un efecto de inhibición del 58.7% sobre la enzima Reversa Transcriptasa asociada al virus del VIH-1. Mediante diferentes técnicas espectroscópicas unidimensionales: IR, RMN ¹H, JMOD, DEPT y bidimensionales: COSY, HMQC, HMBC; se proponen dos posibles estructuras para dos compuestos aislados (codificados VL2 y VL3): Friedelina y β ,2,3',4,4',6-Hexahidroxi- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona. El análisis fisicoquímico del suelo de colecta nos indica un contenido bajo en micronutrientes, alto contenido de nitrógeno, fósforo y potasio. El suelo de textura arenosa-franca presentó un alto contenido de materia orgánica, acidez media, alta capacidad de intercambio catiónico y capacidad de intercambio catiónico efectiva baja.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores han servido a la humanidad como fuentes de agentes terapéuticos desde los comienzos de la historia. La medicina folclórica en diferentes etnias ha proporcionado plantas líderes por sus propiedades medicinales y en las dos últimas décadas se han aislado de los productos naturales compuestos con una actividad biológica tal, que representan la mitad de las drogas que existen actualmente como uso clínico.

La palabra “natural” por definición es un adjetivo para referirse a algo producido por la naturaleza (microbios, plantas o animales) y no es realizado por el hombre. Todos los seres vivos producen en su metabolismo una gran cantidad de sustancias químicas que se han denominado metabolitos, con diferente complejidad tanto química como biológica los cuales se clasifican en primarios y secundarios:

Los metabolitos primarios son compuestos que se encuentran en toda la célula y juegan un rol central en el metabolismo y reproducción de las células. Esos compuestos incluyen los ácidos nucleicos, los aminoácidos y los azúcares comunes. Los metabolitos secundarios son característicos de un limitado rango de especies, usualmente clasificados por sus vías biosintéticas y para estos se consideran en diferentes clases de metabolitos: alcaloides, glicósidos cardiotónicos y azúcares, lactonas, quinonas, saponinas, esteroides, lignanos, cumarina, terpenos y flavonoides¹.

En los últimos años, ha resurgido el interés científico por el papel fundamental que juegan las plantas en muchas comunidades, incluyendo su uso con propósitos medicinales. Este resurgir se debe principalmente a la pérdida acelerada de

biodiversidad vegetal, posible fuente de fármacos en el futuro, y por la necesidad de una medicina alternativa para la población que no tiene acceso a la medicina occidental, generalmente, por razones económicas. Los remedios en la medicina tradicional se presentan como extractos polares totales, infusiones y/o vaporizaciones preparados a partir de sustancias naturales, animales y vegetales. La correcta preparación de las drogas vegetales es de gran importancia ya que se consideran ineficaces a no ser que se hayan tratado previamente de la manera prescrita. Estos remedios pueden ser masticados, frotados, vertidos en heridas, hervidos e inhalados como vapores, rociados (salpicados) en los ojos, fumados en pipas o esnifados como rapé. A pesar del escepticismo de los médicos y científicos occidentales sobre el valor de la información resultante de estos sistemas, la medicina tradicional cubre actualmente las necesidades sanitarias primarias de un alto porcentaje de la población del mundo y ello no debe ser ignorado en ningún programa de desarrollo racional para el uso de drogas de origen vegetal.

El 80% de la población mundial vive en países en vías de desarrollo y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, aproximadamente el 80% de esa población dispone casi exclusivamente de la medicina tradicional para cubrir sus necesidades sanitarias primarias. Dado que las plantas medicinales constituyen la “espinas dorsal” de la medicina tradicional, mas de 4000 millones de personas de los países en desarrollo utilizan plantas medicinales de forma regular. Así, para este segmento de la población mundial, que generalmente son incapaces de pagar el coste de las drogas occidentales, existe la necesidad de estudiar estas plantas para regular su seguridad y eficacia y para desarrollar productos farmacéuticos normalizados.

El interés por el estudio sistemático de medicinas indígenas y plantas medicinales asociadas resurge en los años setenta y este fenómeno mundial fue alentado por la OMS, estimulada a su vez por el impacto de la “experiencia china” en la

medicina occidental mundial en esa década. Apartir de los años noventa ha surgido, una vez más, un cambio creciente de interés; las plantas están emergiendo como un recurso esencial de nuevos fármacos. Las industrias están interesadas en explorar partes del mundo donde las plantas medicinales permanecen como forma fundamental de combatir las enfermedades. Así, por ejemplo, las junglas y bosques húmedos de Sudamérica contienen una increíble diversidad de especies de plantas, la mayoría únicas, no descritas y potencialmente útiles como recursos medicinales².

Por lo tanto, es importante en este trabajo identificar cualitativamente algunos metabolitos secundarios que componen cada extracto, y evaluar su actividad biológica, basados en los estudios realizados a diferentes especies del género *vismia*. Así mismo conocer las características fisicoquímicas del suelo para el desarrollo de esta especie.

Las técnicas analíticas son de gran importancia en el desarrollo investigativo de los productos naturales, como son las técnicas de espectroscopia unidimensional (IR, RMN-¹H, JMOD, DEPT) y bidimensional (COSY, HMQC, HMBC) que facilitan la elucidación estructural de compuestos presentes en extractos de plantas de interés farmacológico.

2. JUSTIFICACIÓN

Entre los factores que han contribuido a la investigación de los productos naturales, podemos citar el recelo suscitado por el uso de drogas sintéticas en medicina, agricultura y veterinaria por sus efectos secundarios; el interés despertado en el hombre por los movimientos ecologistas hacia la naturaleza que le rodea; el desarrollo explosivo de la tecnología que permite el uso de equipos muy sofisticados que facilitan al investigador aislar y analizar con facilidad un producto, por complejo que sea; así como el desarrollo de la biotecnología que permite el cultivo “*in vitro*” de tejidos o células vegetales y obtener un compuesto activo difícil de conseguir en las cantidades necesarias directamente de la planta. Por otro lado, la puesta en boga en la industria farmacéutica de ensayos altamente automatizados y sensibles para la determinación de actividades biológicas con nuevos mecanismos de acción como principal estrategia en el descubrimiento de drogas, ha renovado el interés en el estudio de compuestos bioactivos de fuentes vegetales.

La presente investigación se enfoca en descubrir el potencial farmacológico de una especie endémica (*Vismia lauriformis*) de Suramérica (Venezuela, Colombia, Ecuador y, Perú), basado en los antecedentes de esta familia como fuente de medicamentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Realizar el tamizaje fitoquímico de la planta *Vismia lauriformis*, para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en esta especie. Complementariamente llevar a cabo un estudio del suelo de colecta para identificar las condiciones fisicoquímicas en las cuales se desarrolla esta especie nativa de Suramérica.

3.2. Objetivos específicos:

- Evaluar la actividad inhibitoria sobre la enzima reversa transcriptasa del VIH-1, del extracto etanólico de la parte aérea de la planta *Vismia lauriformis*.
- Aislar e identificar cualitativamente los diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos hexánico, acetónico y etanólico de la parte aérea.
- Proponer las estructuras de dos metabolitos secundarios aislados de los extractos hexánico, acetónico y etanólico, con base en técnicas espectroscópicas mono y bidimensionales.
- Determinar las características fisicoquímicas del suelo, físicas (humedad de campo, humedad relativa, textura), químicas (pH, materia orgánica, nitrógeno, acidez intercambiable, CIC, fósforo, elementos mayores y menores) para contribuir al entendimiento del medio de desarrollo de la planta.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 GENERALIDADES

La familia botánica **Clusiaceae** tiene una gran distribución geográfica, con poblaciones en Europa, parte de Asia, sur África, parte de Norteamérica, Centro y Suramérica. Colombia por su ubicación en el trópico ecuatorial presenta una gran diversidad botánica dentro de las cuales se incluye la familia Clusiaceae, la cual es conocida por la presencia de varios metabolitos secundarios que tienen actividad antiviral y antimicrobiana.

La especie *Vismia lauriformis* es perteneciente a la familia clusiaceae presente en Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú. Luego de una búsqueda bibliográfica se encontraron reportes de estudios en ecología y botánica^{3,4}, pero no se encontraron reportes de estudios fitoquímico, agroquímico preliminares en esta especie.

4.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA FAMILIA CLUSIACEAE

Las Clusiaceas sinónimo Guttiferae, son árboles y arbustos, rara veces hierbas, con jugos resinosos o glándulas oleosas amarillentas o verdosas. Hojas opuestas o verticiladas, simples, a menudo engrosadas, generalmente siempre verdes, enteras, sin estipulas, flores regulares bisexuales o unisexuales en plantas separadas. Tienen 2-14 sépalos, 2-14 pétalos y numerosos estambres libres o ligeramente unidas a la base en 2-5 haces. Fruto baciforme, drupáceo o capsular, con semillas a veces aladas. Esta constituida por más de 50 géneros y alrededor de 1.200 especies. En general se compone de plantas de interés económico por la producción de frutos comestibles, maderas, drogas y tintes¹⁶.

En cuanto a la actividad biológica, de algunos géneros de la familia Clusiaceae se han aislado diversos metabolitos secundarios a los que se les ha encontrado una variedad de aplicaciones de interés farmacológico. Varios de ellos presentan actividad antibacteriana Gran-negativa (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y Gran-positiva (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*)¹⁷, otras presentan actividad antiplasmodio¹⁸, actividad antiprotozoaria¹⁹, antipirético²⁰ e inhibición de la enzima Reversa Transcriptasa (RT) asociada al virus del VIH-1 como por ejemplo el género *Calophyllum brasiliense*, cuyo metabolito secundario aislado llamado Calanólido A se encuentra en una segunda fase clínica con un potencial de ser convertido en medicamento para el tratamiento del VIH-1²¹.

4.2.1 Género Vismia

Es conformado por noventa y siete especies. Las cincuenta y cinco principales especies de este género consiste en arbustos, pequeños o grandes árboles que crecen en las regiones tropicales del mundo. Son usadas en la medicina popular como agentes purgativos, tónico o antifebril y también para el tratamiento de enfermedades de la piel²².

Investigaciones fitoquímicas de algunas especies de vismias ha permitido el aislamiento de benzofenonas, xantonas, antraquinonas y triterpenos; como se describe a continuación en algunas de ellas:

*V. guaramirangae*²³ se han identificado xantonas, xantonalignoides y otros constituyentes de las raíces, estos compuestos tienen significancia biogénica.

De *V. parviflora*²⁴ se aislaron sitosterol, ácido betulínico, lupeol, friedelina, β -friedelinol, ácido shikímico, ácido 3,4 dihidroxibenzoico, quercetina y antraquinonas como madagascina, ácido crisofánico, vismiaquinona-A y vismiaquinona-C, xantonas 1,7-dihidroxixantona y 1,5-dihidroxi-8-metoxixantona.

De las frutas de *V. laurentii*²⁵ se aislaron cinco compuestos estructuralmente relacionados. Tres de ellos son aislados por primera vez: laurentiquinona A (metil 1,6,8-trihidroxi-3-metil-7-(3-metilbut-2-enil)-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2-carboxilato), laurentiquinona B (metil 5,7-dihidroxi-2,2,9-trimetil-6,11-dioxo-6,11-dihidro-2H-antra [2,3-b] piran-8-carboxilato) y laurentiquinona C (metil 9-(etanoiloximetil)-5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-6,11-dioxo-6,11-dihidro-2antra[2,3]piran-8-carboxilato), y los compuestos emodin e isoxantorin. Los extractos de hexano y acetato de etilo mostraron actividad anti-plasmodio contra el *Plasmodium falciparum*.

De las hojas de *V. latifolia*²⁶ se aisló e identificó una nueva xantona: 1,4,8-trihidroxi-9*H*-xanten-9-ona. De las raíces se aislaron otras cuatro xantonas conocidas: 1,5-dihidroxi-8-metoxixantona, 1,7-dihidroxixantona, 1,6-dihidroxi-7-metoxixantona y 1,3,5,6-tetrahidroxixantona, siendo estas dos últimas aisladas por primera vez para el género *Vismia*.

De *V. guianensis*²⁷ se aislaron e identificaron nuevos compuestos aromáticos bioactivos, cinco benzofenonas, vismiaguianonas A-E, y dos benzocumarinas vismiaguianinas A y B, las cuales fueron aisladas del extracto clorofórmico de las raíces.

En la *V. macrophylla*²⁸ se realizaron pruebas antibacterianas y fitoquímicas. Los resultados de tamizaje fitoquímico indican que tienen abundantes fenoles, cianidinas, taninos, esteroides y antraquinonas. Carecen de alcaloides, y presentó actividad frente a 3 de las 6 cepas evaluadas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

De *V. laurentii*²⁹ se aislaron e identificaron compuestos antimaláricos aislados de la corteza del tallo. Uno de ellos el triterpeno tetracíclico, tirucala-7,24-dien-3ona y otros siete compuestos conocidos 3-geraniloxiemodin, vismiaquinona A,

vismiaquinona B, bivismiaquinona, epifriedelinol, ácido betulínico y estigmasta-7,22-dien-3-ol.

De *V. martiana*³⁰ hojas y tallos sitosterol, damaradienol, ácido betulínico, friedelina, euxantona, ácido crisofánico, madagascina, vismiaquinona B, vismiaquinona, y sus isómeros llamados vismiaquinona C, 1,1', 8,8'-tetrahidroxi-3,3'-dimetil-6,6'-dimetoxi-7,7'-(trans-3-metil-1-butenil)- 10,10'-biantrona.

Extractos y metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Vismia* han presentado un alto grado de inhibición de la enzima Reversa Transcriptasa del VIH-1, por ejemplo De *V. cayennensis* fueron aisladas cuatro nuevas benzofenonas prenilatadas, vismiafenonas D-G, donde solo la vismiafenona D exhibió actividad inhibitoria del VIH-1³¹. De los extractos etanólicos de *V. camparaguey*, *V. mexicana* y *V. baccifera* presentan un porcentaje de inhibición de la enzima Reversa Transcriptasa del VIH-1 del 72.9%, 70.8% y 57.8% respectivamente, cuyo control positivo se estableció con Nevirapina, un inhibidor no nucleosido de la enzima Reversa Transcriptasa del VIH-1³².

4.3.2 *Vismia lauriformis*

Árbol que alcanza una altura de 4-15 m; corteza de color castaño - café, pecíolo; hoja 10-20 cm. de largo, pétalos de 9 - 10 mm. de largo, al desprender alguna parte de la planta esta libera un látex de color anaranjado. La tabla 1, muestra la clasificación taxonómica que le corresponde a esta especie. Presenta hojas opuestas con color verde en el haz y café en el envés y frutos verdes que al madurar toman color marrón. Se encuentran a una altitud de 900-1850m en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú³³.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Vismia lauriformis*.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Familia	Clusiaceae
Género	Vismia
Especie	<i>lauriformis</i>
Nombre botánico	<i>Vismia lauriformis</i>

4.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico consiste en el estudio químico sistemático de las plantas el cual se realiza mediante una serie de reacciones analíticas encaminadas a poner de manifiesto de forma cualitativa (cambio de color, formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas) la presencia de varias clases de sustancias vegetales presentes en ellas como son los alcaloides, glicósidos cardiotónicos y azúcares, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenos y esteroides, saponinas, gomas y mucílagos, antraquinonas, lípidos y ceras. Las que con mayor frecuencia se ha comprobado están relacionadas con actividades biológicas específicas, o se utilizan como materias primas para el desarrollo de productos farmacéuticos comerciales³⁴.

4.5 MACRO Y MICRONUTRIENTES

La importancia del conocimiento del contenido de los macro y micronutrientes se hace fundamental para relacionar en un eventual futuro un posible cultivo productivo de esta especie. El conocimiento de estas demandas permitirá diseñar un abono convencional u orgánico.

4.5.1 Macronutrientes

Son nutrientes que la planta necesita en altas cantidades para favorecer su desarrollo, ellos son: el nitrógeno, el fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre^{35,36}.

Nitrógeno. Es uno de los cuatro elementos que conforman la mayor parte de la biomasa en las plantas y después del fósforo, es el que más limita la producción agrícola en suelos. En la capa arable, se encuentra casi en su totalidad en forma orgánica. Hace parte de un gran número de compuestos como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, alcaloides y hormonas. En la biosíntesis de metabolitos vegetales el nitrógeno a través de las rutas de acetogeninas, ácido mevalónico y ácido shikímico, dan origen a los alcaloides entre otros metabolitos. Las plantas, como todos los organismos, requieren nitrógeno para su crecimiento y su reproducción. El nitrógeno es un constituyente de proteínas, enzimas y de muchos productos metabólicos intermedios.

Fósforo. Elemento esencial para las plantas, hace parte de estructuras como ácidos nucleicos: ADN y ARN. Se encuentra en el suelo como ortofosfato: H_2PO_4^- , siendo un derivado del ácido fosfórico H_3PO_4 . El fósforo hace parte de estructuras que almacenan energía como ATP, el cuál proviene de la fotosíntesis (fosforilación) y producción de intermediarios metabólicos importantes como la fosfoenol piruvato, el cual junto con fragmentos carbonados del ciclo de Krebs en la biogénesis del ácido mevalónico, dan origen a la producción de alcaloides. En general la disponibilidad de fósforo, como hemos visto, disminuye con la acidez del suelo. Existen evidencias de que un exceso de aluminio en solución, en suelos fuertemente ácidos, causa deficiencia de fósforo en la planta por la formación de compuestos insolubles o por inactivación del fósforo absorbido por la raíz. A medida que el pH aumenta ($\text{pH} > 5.5$), el aluminio es precipitado en el suelo como $\text{Al}(\text{OH})_3$ y no ocurre la inactivación del fósforo en la planta.

Potasio. Es uno de los principales elementos consumidos por las plantas, junto con el nitrógeno y el calcio; es indispensable para la resistencia de las enfermedades y para la salud vegetal, se encuentra en el suelo de forma inorgánica, cumple funciones de regulación y neutralización. Promueve o favorece el incremento en las proteínas de los granos y aceites esenciales.

La forma disponible del potasio en el suelo es el estado iónico K^+ , el cual es fácilmente almacenado en la fase intercambiable.

En Colombia el potasio no es un elemento limitante, la mayoría de las pruebas de fertilidad han demostrado que aunque las plantas extraen grandes cantidades de potasio, la fertilización con fuentes de potasio ha tenido moderada a baja respuesta. Las funciones generales del potasio en la planta parecen ser más bien de tipo catalítico.

Calcio y Magnesio. Se encuentran en forma iónica Ca^{2+} y Mg^{2+} . En el tejido vegetal se encuentran como iones libre, pero más frecuentemente como sulfatos, carbonatos, fosfatos, oxalatos de calcio en las vacuolas de las células foliares y en la semillas como sales de ácidos fítico o fitína.

La función estructural central del calcio es dar firmeza, dureza y estabilidad a la pared celular dando resistencia a la planta del ataque de insectos; actúa como modulador de varias enzimas mediante procesos de fosforilación, desfosforilación; regula el contenido de agua, participa en la división celular.

El magnesio hace parte de la molécula de clorofila, participando en el proceso de la fotosíntesis, interviene en el metabolismo energético, participa en la unión y estabilización de las subunidades del Ribosoma, en la biosíntesis de proteínas y en la transcripción del mensaje genético.

4.5.2 Micronutrientes

Estos elementos son tan importantes para las plantas como los nutrientes primarios y secundarios, pero se requieren en cantidades bajas^{35,36}.

Hierro. Participa en el sistema enzimático encargado de la síntesis de la clorofila regulando la síntesis de clorofila ácido delta aminolevulínico, precursor de las porfirinas; actúa como componente integral de la ferredoxina y participa en la reducción de nitratos, sulfatos y en la asimilación de N_2 . El contenido de Fe soluble en la solución del suelo es muy bajo; las formas iónicas más comunes son Fe^{3+} , $Fe(OH)_2^+$, Fe^{2+} , $Fe(OH)_3^-$, $Fe(OH)_4^-$. En suelos bien aireados se favorece la conversión de Fe^{2+} a Fe^{3+} y en suelos inundados se favorece el proceso contrario aumentando en este caso la disponibilidad de Fe para la planta, ambos procesos son en general desarrollados por microorganismos.

Manganeso. Participa en la fotólisis del agua; en la activación de arginasa, una enzima del ciclo de la urea; en la activación de varias enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, ciclo de ácidos tricarbóxicos y fosforilación oxidativa. Participa con superóxido dismutasa, enzima la cual tiene como propósito destruir los peligrosos y reactivos superóxidos muy tóxicos para las membranas celulares, en esta función participa junto con otros cationes (Fe, Cu y Zn).

Cobre. Se une a una proteína, plastocianina, la cual participa en el transporte de electrones en el proceso de la fotosíntesis. Hace parte del complejo enzimático de la fenolasa que oxida fenoles y se relaciona con la síntesis de lignina, puesto que genera algunos de sus precursores. Hace parte de la citocromooxidasa, que contiene Cu y Fe y cambia su estado de oxidación de Cu^{2+} a Cu^{1+} .

Zinc. Se requiere para la actividad de al menos 80 sistemas enzimáticos, normalmente formando parte de la estructura de enzimas. Ejemplos NADH

deshidrogenasa; alcohol deshidrogenasa; anhidrasa carbónica; aldolasas; peptidasas. Participa en la estabilidad del ribosoma y en la actividad del RNA polimerasa que lo convierte en un elemento regulador de la expresión genética. Se requiere para la síntesis del aminoácido triptófano, que es uno de los precursores de alcaloides a través de la vía del ácido shikímico de la biosíntesis de metabolitos vegetales. El Zn posee una movilidad muy limitada en los suelos. Se pone en contacto con las raíces por flujo de masa y difusión (este último es el más común).

5. METODOLOGÍA

En el desarrollo de los procesos enmarcados en la metodología propuesta se utilizaron reactivos y solventes de grado reactivo para la extracción y análisis de las muestras de los extractos hexánico, acetónico y etanólico de la parte aérea de *Vismia lauriformis*.

5.1 RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Con previa verificación de los investigadores e identificación botánica del material vegetal estudiado (*Vismia lauriformis*), se colectó la parte aérea (hojas) y las muestras de suelo de forma manual en la Finca “Jardín Botánico Álvaro José Negret” ubicada en la Vereda La Rejoja, municipio de Popayán (Departamento del Cauca), a 3 Kilómetros de la Ciudad de Popayán, vía variante, (Figuras 1 y 2). La zona de recolección se encuentra a 1780 msnm, cuenta con una temperatura promedio de 17 °C y con una precipitación de 1700-2000 mm/año.

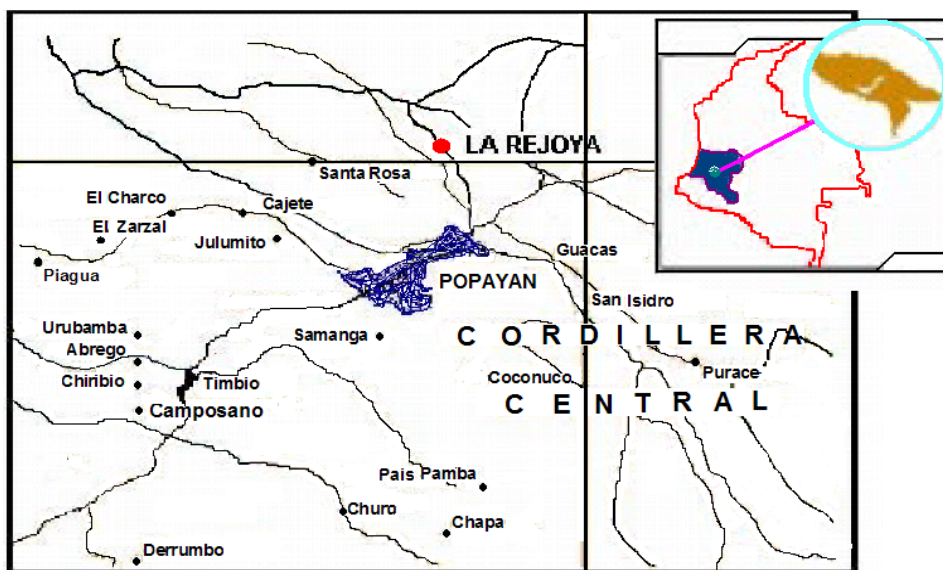


Figura 1. Vereda la Rejoja (Zona de muestreo).



Figura 2. Zona de recolección

La especie *Vismia lauriformis* fue clasificada por el Mg. Bernardo Ramírez, Universidad del Cauca. Ejemplar de esta especie se encuentra en el Herbario (CAUP), bajo el número de colección E. Muñoz 277.

5.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Las hojas de *V. lauriformis* (6,9 kg. hoja fresca), se cortaron, se secaron a temperatura ambiente por 5 días, se molieron obteniéndose 2,0 kg. de material seco. El material seco se sometió a extracción a temperatura ambiente en un frasco de vidrio de 4,0 L con n-hexano (96%, Merck), acetona (99.6%, Fischer Scientific), etanol (99.9%, Merck) Esquema 1. Cada extracto (hexánico, acetónico, etanólico) se concentró a presión reducida (Rotavac Heidolph) hasta la mitad de su volumen. El extracto hexánico dentro de las primeras 72 horas presentó la formación de un precipitado. Luego de filtrar, se obtienen dos fracciones (al filtrado se le asigna el nombre de fracción A y al sólido fracción B). Los extractos se llevaron a sequedad a temperatura ambiente. Una muestra del extracto etanólico

(5,0 g), se envió a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Química, Laboratorio de Productos Naturales, (Doctor Ricardo Reyes Chilpa) donde se le realizó una prueba biológica para determinar el porcentaje de inhibición que tiene el extracto sobre la enzima Reversa Transcriptasa del VIH-1, como se indica a continuación.



Esquema 1. Recolección de muestras

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL VIH-1

La actividad inhibitoria sobre la RT VIH-1 se realizó mediante el kit Lenti-RT (Cavidi-Tech), método propuesto por Shao et al.³⁷. Evaluación realizada en la Universidad Autónoma de México al extracto etanólico de la hoja de *Vismia lauriformis*.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

A los extractos hexánico (fracción A y B), acetónico y etanólico de las hojas de *V. lauriformis* se le realizaron las siguientes pruebas. Simultáneamente a cada una de las pruebas se les realizó un blanco³⁸.

5.4.1 Determinación de alcaloides

Revelador de Dragendorff. Se disuelven 8,0 g. de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (98.7% Mallinckrodt) en 20 mL de HNO_3 (30%, Fischer) y 27,2 g de KI (99.5%, J.T. Baker) en 50 mL de H_2O . Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 mL. Se usa sobre los extractos acidulados con HCl 1% (37%, Merck) directamente en tubos capilares, se interpreta positivo cuando hay un precipitado castaño-rojizo; y en placas de Sílica gel 60/F254 con una fase móvil de cloroformo-metanol (9:1), es positivo cuando se presenta una coloración rojo-naranja.

5.4.2 Determinación de glicósidos cardiotónicos y azúcares

En una placa de Sílica gel 60/F254 se le agrega el extracto y se eluye con acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10). Se rocían los cromatófolios con el reactivo de Baljet. Se calienta a 100 °C por 6 min., luego se observa inmediatamente al UV-365 nm. Es positiva si se observa una coloración roja.

El reactivo de Baljet, consiste en una solución A: 1,0 g de ácido pícrico (99.9 %, Merck) en 100 mL de etanol; (99.9 %, Merck); solución B: 10 g de hidróxido de sodio (97%, Carlo Erba) en 100 mL de H_2O .

Se mezclan en volúmenes iguales la solución A y B antes de usarse.

Prueba de Molish. A 0,5 mL del extracto contenido en un tubo de ensayo se le dejan resbalar por las paredes 2 gotas de solución etanólica α -naftol (10%, Fischer), 0,5 mL de H_2SO_4 concentrado (97%, Fischer), formándose dos capas. Se interpreta positivo si aparece en la interfase un anillo de color violeta.

5.4.3 Determinación de cumarinas

Se añade 1,0 mL del extracto en un tubo de ensayo, el cual se cubre con un trozo de papel filtro previamente impregnado con una solución diluida de KOH (10% Baker Analyzed). Se calienta al baño de María durante 10-15 min. La presencia de cumarinas volátiles se pone de manifiesto por la fluorescencia azulada del papel filtro a la luz UV.

A 1,0 mL del extracto se le agrega 0,5 mL del reactivo de Emerson [Na_2CO_3 (0.5%, Merck), 4-aminoantipiridina (0.9%, Fischer Scientific), Ferrocianuro de Potasio (5.4%, Merck) en agua]. Se considera positivo si se colorea.

5.4.4 Determinación de flavonoides

Prueba de Shinoda. Se añade 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, el cual se le adicionan 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado (37%, Merck) y un fragmento de cinta de Magnesio. Es positiva si presenta un color anaranjado, rojo, rojo azulado o violeta.

5.4.5 Determinación de taninos

Se añaden a 1,0 mL del extracto, 2 o 3 gotas de solución acuosa al de FeCl_3 (1%, Carlo Erba). Se interpreta positivo si hay coloración azul o verde.

A 1,0 mL del extracto se le agregan 0,5 mL de H_2SO_4 (97%, Fischer). Es positivo si presenta un color rojo.

5.4.6 Determinación de terpenos y esteroides

Prueba de Liebermann-Burchard. Se parte de 1 mL del extracto, al que se le adiciona 1,0 mL de anhídrido acético (99%, J.T Baker) y H₂SO₄ concentrado (97%, Fischer) dejándolo resbalar suavemente por las paredes del tubo. Es positiva si presenta un color verde.

5.4.7 Determinación de saponinas

Se parte de 1,0 mL del extracto, al que se le adiciona 1,0 mL de NaOH (3%, Carlo Erba), el cual se agita vigorosamente durante 1 minuto con la consiguiente formación de espuma. Se repite el procedimiento reemplazando la base por HCl 3% (37%, Merck) Se considera positiva cuando dicha espuma persiste transcurrido 30 minutos.

5.4.8 Determinación de gomas y mucílagos

A 1,0 mL del extracto, se le adiciona un exceso de Etanol (99.8%, Carlo Erba). Se interpreta positivo si hay formación de precipitado floculante.

5.4.9 Determinación de lípidos y ceras

A un 1 mL del extracto, se le añade 1 mL de molibdato de sódio 1% (90%, Baker Analyzed) en H₂SO₄ concentrado (97%, Fischer) (Reactivo de Serger). Se considera positivo cuando la capa inferior se colorea de gris azulado.

5.4.10 Determinación de antraquinonas

Se añaden a 1 mL del extracto, 1 mL de NaOH (3% Carlo Erba) y se agita, se deja en reposo. La reacción es positiva si aparece una coloración amarilla.

Se repite el procedimiento reemplazando la base por 1 mL de H₂SO₄ 3% (97%, Fischer). La reacción es positiva si aparece una coloración amarilla debida a las sales de los compuestos 1,8-dihidroxi-antraquinónicos

5.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

A los extractos hexánico, acetónico y etanólico de las hojas de la *V. lauriformis* se le realizan diferentes procedimientos y/o metodologías con el fin de aislar los diferentes metabolitos secundarios presentes.

5.5.1 Fraccionamiento del extracto hexánico

Se dejó en reposo por 72 horas el extracto hexánico, del cual se obtuvo un precipitado, asignándole el nombre de fracción B del extracto hexánico; se filtró y se llevó a sequedad, realizando el mismo procedimiento al extracto hexánico sin precipitar al cual se le asignó el nombre de fracción A. Esquema 2.



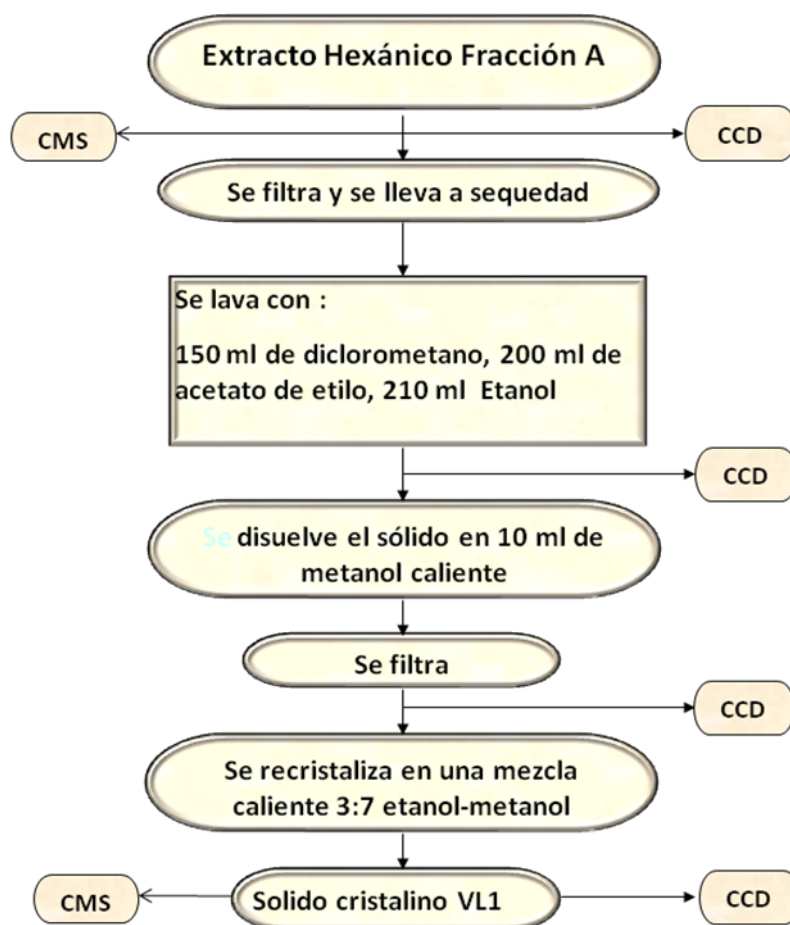
Esquema 2. Extracto hexánico

5.5.1.1 Fraccionamiento del extracto hexánico fracción A

Una parte del extracto hexánico fracción A (8,6 g) se filtró en embudo buchner con 150 mL de diclorometano (99.9%, Fischer), luego con 200 mL de acetato de etilo (99.8%, Fischer) y 210 mL de etanol (99.9%, Merck). Posteriormente se disolvió con metanol caliente (99.9%, Fischer), se filtró, luego se recogió el filtrado y se concentró, obteniéndose un sólido cristalino. Posteriormente se disolvió en 10mL de una solución caliente de etanol (99.8% Carlo Erba) - metanol (99.9%, Fischer) en una proporción 3:7 con el fin de recrystalizar, se filtró y se obtuvo un sólido al cual se le asigna el nombre VL1 (10.2 mg).

A cada una de las fracciones y al compuesto obtenido (VL1), se les realizó cromatografía de placa delgada (C.C.D.), usando cromatofolios de sílica gel

(Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2mm de espesor con soporte de aluminio) revelada con lámpara ultravioleta (UV, GL-58, handheld) 254/365 nm, yodo sólido y H₂SO₄ concentrado (97%, Fischer). Ver esquema 3.

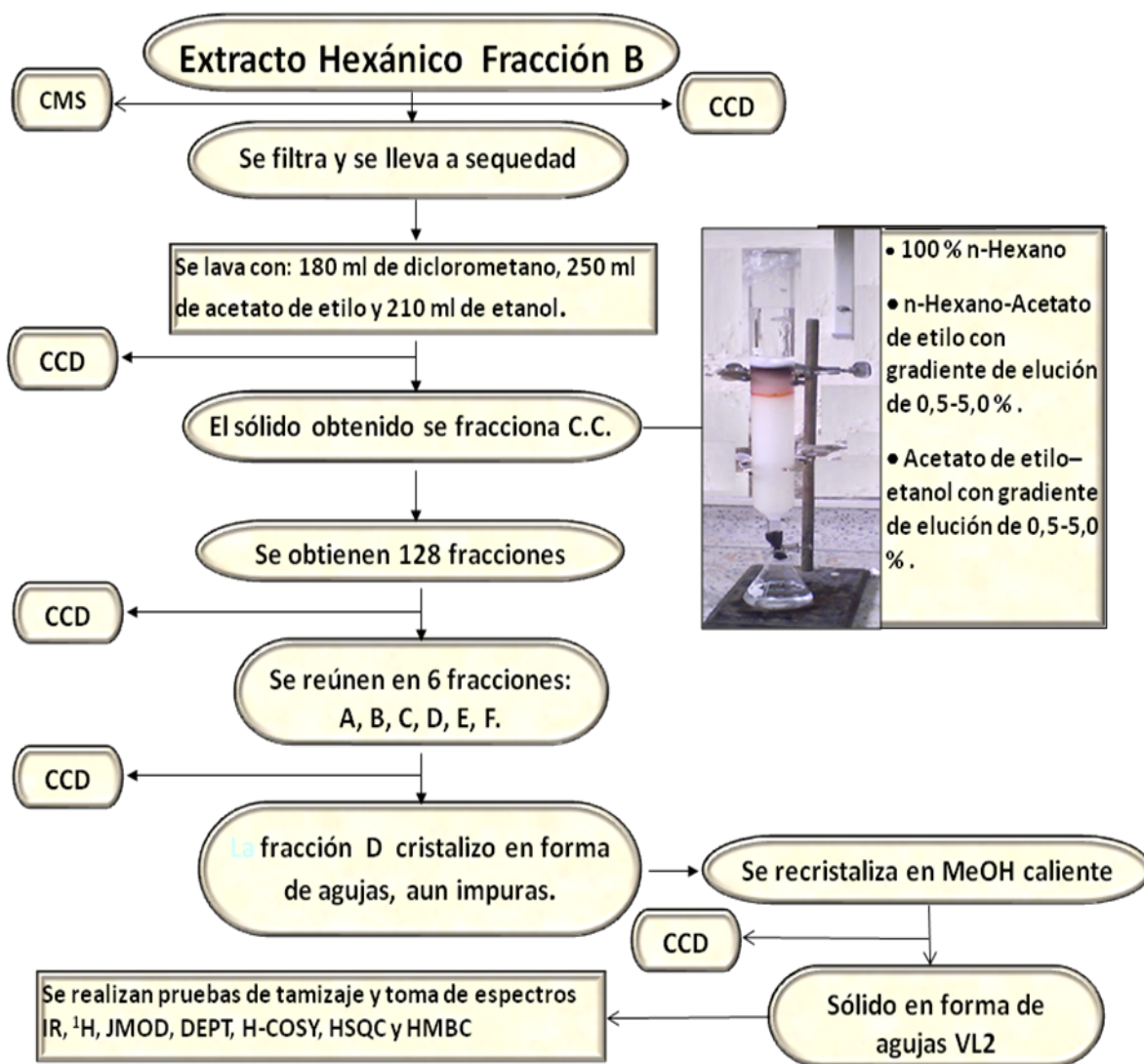


Esquema 3. Extracto hexánico fracción A

5.5.1.2 Fraccionamiento del extracto hexánico fracción B

El extracto hexánico fracción B (28.6 g) se filtró en embudo buchner con 180 mL diclorometano (99.9%, Fischer), 250 mL acetato de etilo (99.9%, Mallinckrodt), y 210 mL etanol (99.9%, Merck); el sólido obtenido (4.9 g) luego de filtrar se fraccionó por Cromatografía en columna (CC) (Sílica gel 70-230 mesh, Fischer y 230-400 mesh, Fischer), se comenzó la elución con 100% n-hexano (96%, Merck), luego se eluyó en diferentes proporciones (inicialmente con un gradiente de

elución de 0.5% al 5%) n-hexano – acetato de etilo, hasta el 100% de acetato de etilo y finalmente se incremento progresivamente la cantidad de etanol hasta el 100%. Se obtienen 128 fracciones de 10 mL cada una, que al ser analizadas por cromatografía de placa delgada (C.C.D.), usando cromatofolios de Sílica gel (Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2mm de espesor con soporte de aluminio) Se reúnen en 6 fracciones marcadas como A, B, C, D, E, F; de la fracción D se obtuvo un sólido en forma de agujas blancas impuro que se disolvió en MeOH caliente, se filtró y al recrystalizarse se obtuvo un sólido puro en forma de agujas blancas (8.6 mg), al cual se le asigna el nombre VL2. Ver esquema 4.

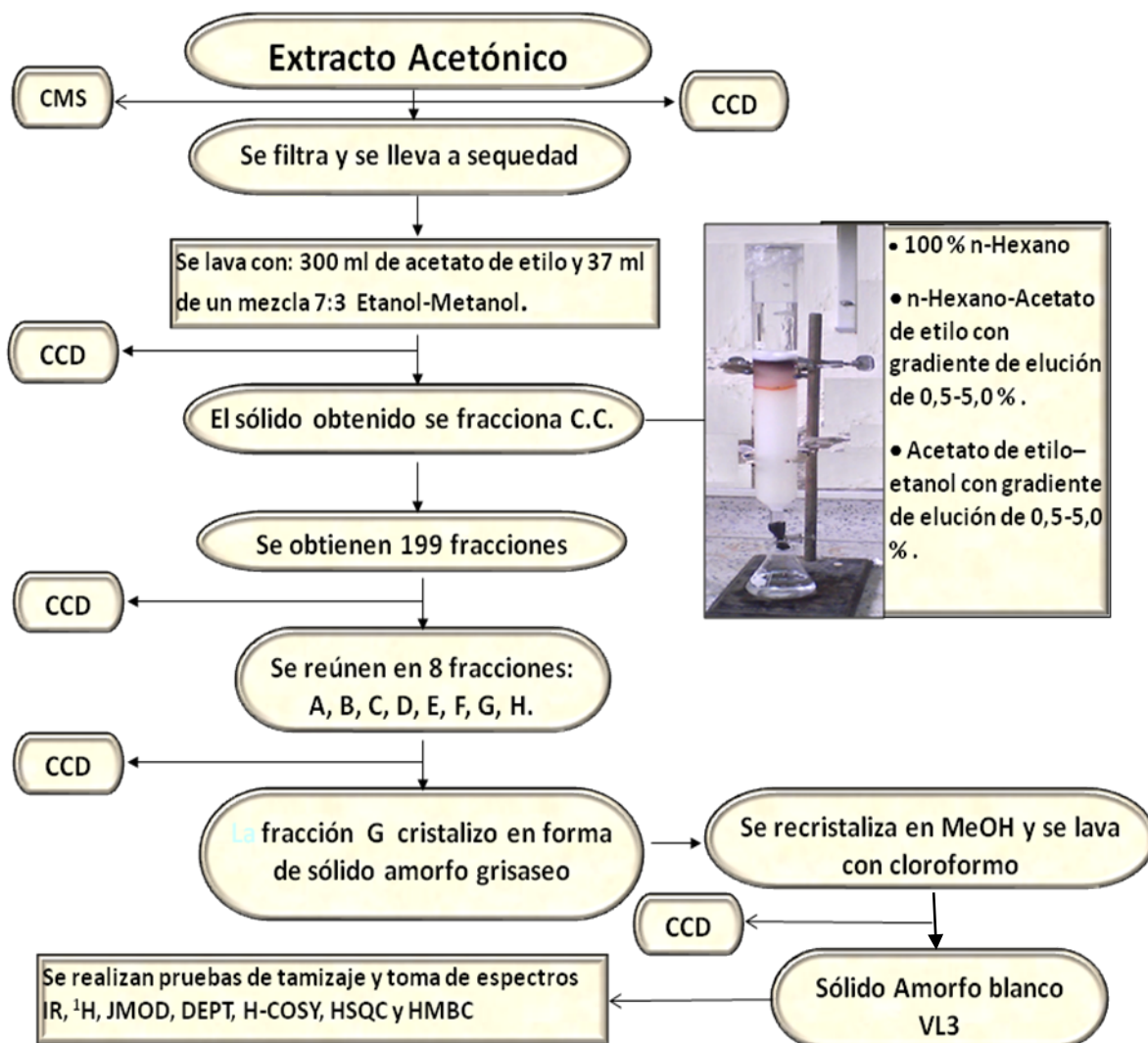


Esquema 4. Extracto hexánico fracción B

A cada una de las fracciones y al compuesto obtenido (VL2), se les realizó cromatografía en placa delgada C.C.D. usando cromatofolios de Sílica gel (Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2mm de espesor con soporte de aluminio) revelada con lámpara ultravioleta (UV, GL-58, handheld) 254/365 nm, yodo sólido y H₂SO₄ concentrado (97% Fischer). Se toma el espectro Infrarrojo y se envía el compuesto a la Universidad de Antioquia, donde se toman los espectros RMN unidimensionales y bidimensionales: ¹H, JMOD, DEPT, H-COSY, HMQC y HMBC, ver anexos.

5.5.2 Fraccionamiento del extracto acetónico

Una parte del extracto acetónico (10 g) se filtró en embudo buchner con 300 mL de acetato de etilo (99.9%, Mallinckrodt) y con 37 mL de una mezcla 7:3 de etanol (99.9%, Merck)-metanol (99.9%, Fischer), luego del filtrado se obtuvo un sólido de color amarillo (5.3 g) que se fraccionó por cromatografía en columna (Sílica gel 70-230 mesh, Fischer y 230-400 mesh, Fischer), se comenzó la elución con n-hexano 100%, luego se comenzó la elución en diferentes proporciones n-hexano – acetato de etilo (99.9%, Mallinckrodt), (inicialmente con un gradiente de elución de 0.5% al 5%) hasta el 100% de acetato de etilo y finalmente se incremento progresivamente la cantidad de etanol hasta el 100%. Se obtuvieron 199 fracciones de 10 mL cada una, que al ser analizadas por cromatografía de placa delgada (C.C.D.), usando cromatofolios de Sílica gel (Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2 mm de espesor con soporte de aluminio), Se reunieron en 8 fracciones recolectadas, marcadas como A, B, C, D, E, F, G, H, de la fracción G se obtuvo un sólido de color blanco grisáceo que se disolvió con metanol (99.9 % Fischer) en un vaso de precipitados, obteniéndose un precipitado, un sólido de color blanco que se filtró en embudo de gravedad con cloroformo (100% Mallinckrodt) para obtener un sólido puro de color blanco (12.6mg) que se identifico como VL3. Esquema 5.



Esquema 5. Extracto acetónico

A cada una de las fracciones y al compuesto obtenido se les realizó cromatografía de placa delgada (C.C.D.), usando cromatofolios de Sílica gel (Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2 mm de espesor con soporte de aluminio), revelada con lámpara ultravioleta (UV, GL-58 handheld) 254/365 nm, yodo sólido y H₂SO₄ concentrado (97%, Fischer). Se toma el espectro infrarrojo y se envía el compuesto a la Universidad de Antioquia donde se toman los espectros RMN unidimensionales y bidimensionales: ¹H, JMOD, DEPT, H-COSY, HMQC y HMBC, ver anexos.

5.5.3 Fraccionamiento del extracto etanólico

Una parte del extracto etanólico (9.6 g) se filtró en embudo buchner con 220 mL de una mezcla diclorometano (99.9%, Fischer)-acetato de etilo (99.9%, Mallinckrodt) en una proporción 9:1, luego se fraccionó (4.8 g del extracto) por cromatografía en columna (CC) (Sílica gel 70-230 mesh, Fischer y 230-400 mesh, Fischer), se comenzó la elución al 100% de n-hexano (96%, Merck), luego se eluyó en diferentes proporciones n-hexano (96%, Merck)– acetato de etilo, hasta el 100% de acetato de etilo (inicialmente con un gradiente de elución de 0.5% al 5%) y finalmente un gradiente de etanol (99.9% Merck) hasta el 100%. De esta forma se obtuvieron 100 fracciones de 10 mL cada una, que al ser analizadas por cromatografía de placa delgada (Sílica gel F₂₅₄), permitieron reunir 4 fracciones recolectadas marcadas como A, B, C, y D, de la fracción C se obtuvo un sólido de color café el cual se recrystalizó en 78 mL de una mezcla 8:2 de etanol (99.9%, Merck) – metanol (99.9%, Merck), el compuesto de la fracción C (9.3 mg), se le asigna el nombre VL4. Ver esquema 6. A cada una de las fracciones y al compuesto obtenido (VL4) se les realizó cromatografía de placa delgada (C.C.D.), usando cromatofolios de Sílica gel (Merck 60 F₂₅₄ 3 x 6 cm, 0.2 mm de espesor con soporte de aluminio), (Figura 3), revelada con lámpara ultravioleta (UV, GL-58 handheld) 254/365 nm, yodo sólido y ácido sulfúrico concentrado (97% Fischer).



Figura 3. Cromatografía de capa delgada (CCD)

Esquema 6. Extracto etanólico.

5.6 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL SUELO DE COLECTA

Los análisis físicos y químicos, se realizaron con la metodología establecida en el manual de prácticas de química agrícola de la Universidad del Cauca³⁹.

Las muestras de suelo (6 muestras) se toman en las áreas de mayor concentración radicular (6 Kg) a una profundidad de 30 a 40 cm, mediante una pala, se embala en bolsas plásticas negras y es transportado al laboratorio donde después del cuarteo se le realizaron las siguientes determinaciones físicas y químicas (Figura 4). (La época de recolección tanto de las muestras de hojas

como de suelo fue a mediados de julio época en la cual el árbol se encuentra en floración).



Figura 4. Toma de muestra

5.6.1 Determinación de humedad de campo

En una cápsula de porcelana previamente tarada se pesaron 10 g de suelo, luego se procedió llevarla a la estufa por 24 horas a 105 °C. Con la diferencia de pesos (muestra inicial-muestra final) se determinó la humedad de la muestra.

5.6.2 Determinación de textura

Método de Bouyoucos, se pesaron 50 g de suelo previamente pasado por malla de 2 mm, en base seca y se colocó en un erlenmeyer de 250 mL; se le adicionó 160 mL de agua destilada, se mezcló y se le agregaron 10 mL de solución dispersante (hexametáfosfato de sodio 35,7 g (100%, Mallinckrodt) y carbonato de sodio 50 g, (99.9% Merck), en un litro de agua destilada), se dejó reposar por unos minutos y se agitó la solución del suelo durante dos horas, se vertió la suspensión a un cilindro de bouyoucos, completando con agua destilada hasta la primera línea del cilindro, se agitó fuertemente por 30 segundos, se introdujo el hidrómetro y a los 40 segundos, se tomó la primera lectura. La segunda lectura se realizó a las dos horas. (Figura 5).



Figura 9. Determinación de textura del suelo por método de Bouyoucos.

5.6.3 Determinación de pH (potenciométrico)

pH Método Suelo Agua 1:1

Se pesaron 20 g de suelo y se les adicionó 20 mL de agua destilada (1:1). Se agitó periódicamente durante 1 hora y luego se midió el valor de pH con el pHmetro (AB 15. pHmeter).

pH Relación Suelo Agua 1:2,5

Se pesaron 20 g de suelo en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregaron 50 mL de agua destilada. Se agitó durante una hora intermitentemente y se midió el pH.

pH Relación suelo:KCl 1:1 (Método de Puri)

Se pesaron 20 g de suelo en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregaron 20 mL de KCl 1N. Se agitó durante una hora intermitentemente y se midió el pH.

5.6.4 Determinación de Materia Orgánica

Se realizó mediante el método de Walckley – Black. Se pesaron 0,1g de suelo, se le agregaron 10 mL de dicromato de potasio 1N (99.9%, J.T.Baker), se agitó y se le adicionó 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (97% Fisher). Se agitó fuertemente por un minuto y se dejó enfriar sobre una lámina de asbesto (30 minutos). Una vez frío se diluyó en 150 mL de agua, se le agregó inmediatamente antes de la titulación 10 mL de ácido fosfórico (86.4%, Fischer Scientific), 3 gotas de ferroína (0,025 M, Mol Labs) y se valoró el exceso de dicromato de potasio con solución ferrosa 0,5 N llevando un blanco para cada serie de muestras. Patrón glucosa (99.9%, Merck).

Se preparó la solución ferrosa 0.5N: disolviendo 139 g de sulfato ferroso heptahidratado (98%, Fischer Scientific) en 800 mL de agua destilada que contenía 40 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%, Fisher), se dejó enfriar y se diluyó a 1L.

5.6.5 Determinación de Nitrógeno



Figura 6. Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl

Método de Kjeldahl. Se pesó aproximadamente 5,0 g de suelo, se pulverizó finamente y se pasó por tamiz de malla 80. Se pesó 0,3 g de suelo, una vez transferido a los balones Kjeldahl, se le agregó 1 g de catalizador tabletas Kjeldahl (99.9%, Merck) y 12 mL de ácido sulfúrico concentrado (97%, Merck), se llevó al equipo de digestión (BUCHI B-426) y destilación (BUCHI K-314), (Figura 6). Se tituló el destilado con HCl 0,01 N (37%, Merck). Patrón glicina (99.9 %, Mallinckrodt)

5.6.6 Determinación de la Acidez Titulable

Se preparó la solución extractora, constituida por una solución amortiguadora de pH 8.2 y una solución desplazante de cloruro de bario 0.5N.

Solución amortiguadora; se diluyó 100 mL de trietanolamina 8N (35%, Baker Analyzed) con 850 mL de agua, se agregó HCl concentrado (37%, Merck) hasta ajustar el pH a 8.2, se aforó a 2 L. Se preparó una solución desplazante número 1, de cloruro de bario 0.5N (75%, Carlo Erba) pesando 250 g de cloruro de bario dihidratado (98%, Carlo Erba), se aforó a 2,0 L. Se mezclan en proporciones iguales. Se preparó la solución desplazante número 2 elaborada así: 250 g de cloruro de bario dihidratado (98%, Carlo Erba), diluido en 2,0 L de agua destilada, se le adicionó 20 mL de solución extractora, se agitó y se aforó a un volumen de 4,0 L con agua destilada,

Se pesó 5,0 g de suelo en un erlenmeyer de 125 mL, se le agregó 15 mL de la solución extractora. Se tapó y se dejó en reposo 30 minutos, agitando ocasionalmente. Se usó 35 mL de solución extractora para transferir la suspensión del suelo a los embudos de filtración. Se filtró el suelo en los embudos buchners con 100 mL de solución desplazante número 2 en pequeñas proporciones sin permitir que el suelo se seque. Se llevó un blanco mezclando 100 mL de la solución desplazante y 50 mL de solución extractora; se le agregó 2 gotas de

verde bromocresol y 10 gotas de indicador mixto. Se titulo el blanco con HCl 0.2N (37%, Merck), se repitió el procedimiento para el filtrado del suelo.

5.6.7 Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

Se preparó la solución extractora en un balón aforado de 1 L. Se mezclaron 500 mL de hidróxido de amonio concentrado ($d=0.9$ Fisher) con 57 mL de ácido acético glacial (99,8% Productos Químicos de Monterrey) los cuales se diluyeron casi hasta la marca, antes de llevarlo a volumen se ajusta el pH a 7.0 con hidróxido de amonio.

Se pesó 10 g de suelo en erlenmeyers de 100 mL, se le agregaron 25 mL de solución extractora, se agitó durante 15 minutos, dejando en reposo un cuarto de hora, para filtrar la solución en embudos, aplicando poca succión y lavando 3 veces con porciones de 25 mL de acetato de amonio (99.9% Mallinckrodt), se reunió esta solución con la anterior. Dicha solución se llama solución de acetatos. Se filtro en embudo cuantitativamente el suelo 10 veces con porciones de 5 mL de etanol (99.9%, Merck), descartando el filtrado. Se sustituyen los erlenmeyers en que recibe el filtrado por otros limpios. Se Lixivió el suelo con una solución de cloruro de sodio al 10% (Fischer) en 5 porciones de 10 mL cada una. Agregando al filtrado desplazado con cloruro de sodio, 20 mL de formaldehído al 40% (99%, Fischer Scientific), se titulo con hidróxido de sodio 0.2N (30%, Carlo Erba), en presencia de fenolftaleina. Blanco 50 mL de cloruro de sodio al 10% y 20 mL de formaldehído.

5.6.8 Determinación de las bases intercambiables

Corresponden al Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio.

Sodio y potasio. La solución de acetatos obtenida en el procedimiento anterior se lleva a un volumen de 100 mL con agua desionizada. Se determinó por

espectrofotometría de llama, (Figura 13) (Absorción Atómica THERMO Electron-Corporation Series A.A. Spectrometer), interpolando la lectura en una curva de calibración para cada elemento, la cual fue elaborada a partir de soluciones patrón de tritsoles de Na y K.

Calcio y magnesio. Se preparó la solución de óxido de lantano al 1% pesando 1 g de óxido de lantano (99.5%, Merck) en 50 mL de agua desionizada, se le agregó 25 mL de ácido clorhídrico 6N (37%, Merck) poco a poco hasta que se disolvió totalmente, se aforó a 100 mL

Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución de acetatos que ha sido llevada a 100 mL, se le agregó 10 mL de solución de óxido de lantano al 1% y se llevó a un volumen de 50 mL, se tomó la lectura en absorción atómica (Absorción Atómica THERMO Electron-Corporation Series A.A Spectrometer) (Figura 7), y se interpoló en las respectivas curvas de calibración para cada elemento, la cual fue elaborada a partir de soluciones patrón de tritsoles de Ca y Mg.



Figura 7. Determinación de bases intercambiables. Equipo Absorción Atómica.

5.6.9 Determinación de Fósforo

Se preparó la solución extractora disolviendo 1.11 g de fluoruro de amonio y 25 mL de HCl 4N (37%, Merck), se aforó a un litro.

Se preparó la solución A disolviendo 60 g de molibdato de amonio tetrahidratado (99%, Carlo Erba) en 200 mL de agua, se añade 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio, se disolvió y se agregó lentamente con agitación 700 mL de ácido sulfúrico concentrado (97% Fischer), se dejó enfriar y se aforó a un litro. Para la solución B se disolvió 61 g de ácido ascórbico en agua, se aforó a 500 mL.

La solución coloreadora a partir de las soluciones A y B, se tomó 25 mL de la solución A y se le adicionaron 800 mL de agua, se agitó para luego añadir 10 mL de la solución B y se aforó a un litro.

Se preparó una solución estándar de 50 ppm de fósforo disolviendo 0,2g de fosfato monopotásico (100.1%, Mallinckrodt) previamente secado por dos horas a 105 °C. Se diluyó con agua y se aforo a un litro, a partir de esta solución se prepararon los patrones 0.5, 1, 2, 5, 10, y 15 ppm.

Se midió en tubos de ensayo 2 mL de las soluciones patrones de 0.5, 1, 2, 5, 10 y 15 ppm, se le agregó 18 mL de solución coloreadora con dispensador, después de 15 minutos, luego se tomo la lectura en el espectrofotómetro (Espectrofotómetro ultravioleta visible Spectronic 20 Genesys) a 660 nm (Figura 8)



Figura 8. Determinación de fósforo. Espectrofotómetro ultravioleta visible.

Se pesaron 2,85 g de suelo y se transfirió a los frascos de extracción, se colocaron en el agitador, para agregarle 20 mL de solución extractora. Se agitó por 40 segundos y se filtró inmediatamente, luego se tomó 2 mL de extracto, se le adicionó 18 mL de solución coloreadora, se espero 15 minutos y se procedió a realizar la lectura a 660 nm en el espectrofotómetro.

5.6.10 Determinación de Microelementos.

Para la cuantificación del Fe, Mn, Cu, Zn

Solución extractora DTPA (ácido dietilentriaminopentacético). En un balón aforado de un litro se le adicionó 600 mL de agua desionizada, se le agregó 14,9 g de trietanolamina (99.9% Merck) y se disolvió. Se le agregó 1,9 g de DTPA (99.6%, Fischer Scientific), y nuevamente se disolvió. Se agregaron 1,5 g de cloruro de calcio (99%, Biocroma) disuelto y se llevó a un volumen de 970 mL con agua desionizada, se ajustó el pH a 7,3 con HCl 6N, luego se aforó a 1000 mL.

Se colocaron en los frascos de extracción, 10 g de suelo secado al aire. Se le agregaron 20 mL de solución extractora, se tapó y posteriormente se agitó por dos horas, se filtró el extracto. La determinación se llevó a cabo por absorción atómica (Absorción Atómica THERMO electrón-Corporation Series A.A Spectrometer) y se interpoló en las respectivas curvas de calibración para cada elemento, la cual fue elaborada a partir de soluciones patrón de tritsoles de Fe, Cu, Mn y Zn.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS

Los rendimientos en base seca de los extractos fueron: 4.47% n-hexánico, 6.4% extracto acetónico y 5.2% extracto etanólico.

Los rendimientos de los compuestos aislados en base a los extractos son: 0.12% VL1, 0.03% VL2, 0.13% VL3 y 0.1% VL4.

6.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA REVERSA TRANSCRIPTASA ASOCIADA AL VIH-1 APARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El porcentaje de inhibición del extracto etanólico sobre la enzima reversa transcriptasa del VIH-1 fue del 58.7%. Este porcentaje es alto pero no es óptimo hacia la inhibición de la actividad enzimática, por lo que se podría considerar a futuro un estudio más a fondo del extracto etanólico, con el fin de identificar el o los metabolitos encargados de este porcentaje de inhibición enzimático, ya que según Tan G.T., Pezzuto J.M. y Kinghorn A.D.⁴⁰, para considerar los extractos activos contra el VIH-1, estos deben presentar un porcentaje de inhibición > 70%.

6.3 ANÁLISIS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS

La identificación cualitativa de los metabolitos presentes en los extractos n-hexánico (fracción A y B), acetónico y etanólico se resume en la Tabla 2.

Las pruebas del tamizaje fitoquímico en el extracto hexánico fracción A presenta un elevado contenido de lípidos y ceras; moderado en saponinas, glicósidos cardiotónicos y azúcares. Baja presencia de flavonoides, gomas, mucílagos,

terpenos y esteroides. Negativa para cumarinas, alcaloides, taninos y antraquinonas.

La fracción B del extracto hexánico presenta un alto contenido de terpenos y esteroides. Una mediana presencia de flavonoides, glicósidos cardiotónicos y azúcares. Un contenido bajo de gomas y mucílagos. Negativo para lípidos, ceras, antraquinonas, saponinas, taninos, cumarinas y alcaloides. Las diferencias con la fracción A, es la ausencia de lípidos, ceras y saponinas además una mayor presencia de flavonoides, terpenos y esteroides. Por lo tanto, la existencia del precipitado (fracción B) del extracto hexánico (fracción A) se debe a la diferencia en la composición cualitativa de los metabolitos secundarios presentes como se observa en cada una de estas fracciones. En el extracto acetónico se observa una mediana presencia de glicósidos cardiotónicos, saponinas y antraquinonas, un alto contenido de terpenos, esteroides y flavonoides. Ausencia de alcaloides, cumarinas, taninos, gomas y lípidos.

En el extracto etanólico se obtuvo una baja cantidad de glicósidos cardiotónicos, cumarinas, saponinas, gomas y mucílagos. Alto contenido de flavonoides, terpenos, esteroides y antraquinonas. No se encuentra presencia de alcaloides, taninos y lípidos. La información anteriormente reportada es valiosa ya que si se requiere aislar un tipo de metabolito secundario específico, con certeza se puede escoger el extracto que lo contenga en un mayor cantidad, a su vez el tiempo requerido para el aislamiento se reduce ostensiblemente.

De acuerdo a lo anterior, se afirma que la especie *Vismia lauriformis* presenta un elevado contenido de lípidos, ceras, terpenos, esteroides, flavonoides y antraquinonas según en cada uno de los extractos analizados y la ausencia de alcaloides y taninos. Aunque las cumarinas se encuentran solamente en el extracto etanólico en un bajo contenido, se resalta su presencia debido a la variedad de aplicaciones farmacológicas⁴⁸ encontradas en los últimos años.

Tabla No 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de los cuatro extractos obtenidos.

NUCLEOS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS Y/O REACTIVOS	EXTRACTO HEXANICO <i>Mimosa lauriformis</i>	PRECIPITADO EXTRACTO HEXANICO <i>Mimosa lauriformis</i>	EXTRACTO ACETONICO <i>Mimosa lauriformis</i>	EXTRACTO ETANOLICO <i>Mimosa lauriformis</i>
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos y azúcares	Reactivo de Baljet	++	++	++	+
	Prueba de Molish	++	++	++	+
Cumarinas	Reactivo Emelson	-	-	-	+
Flavonoides	KOH, lámpara UV	-	-	-	+
	Shinoda	+	++	+++	+++
Taninos	FeCl ₃ /EtOH	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-
Terpenos y esteroides	Liebermann- Burchard	+	+++	+++	+++
	Acido(Espuma)	++	-	++	+
Saponinas	Base (Espuma)	++	-	++	+
	EtOH 90°	+	+	-	+
Gomas y mucílagos	Reactivo de Serger	+++	-	-	-
	NaOH	-	-	++	+++
Lípidos y ceras	H ₂ SO ₄	-	-	++	+++

Tamizaje fitoquímico. Convenciones:

Presentes en abundancia (+++)

Presentes en mediana cantidad (++)

Presentes en pequeña cantidad (+)

Ausentes (-)

Los resultados del tamizaje fitoquímico para los compuestos aislados (Tabla 3) indican que el compuesto codificado VL1 es un tipo de glicósido cardiotónico, el compuesto VL2 es un terpeno o esteroide, los compuestos VL3 y VL4 son flavonoides.

Tabla No 3. Resultados del tamizaje fitoquímico de los compuestos aislados.

NUCLEOS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS Y/O REACTIVOS	COMPUESTO AISLADO VL1	COMPUESTO AISLADO VL2	COMPUESTO AISLADO VL3	COMPUESTO AISLADO VL4
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos y azúcares	Reactivo de Baljet	+++	-	-	-
	Prueba de Molish	+++	-	-	-
Cumarinas	Reactivo Emerson	-	-	-	-
Flavonoides	KOH, lámpara UV	-	-	-	-
	Shinoda	-	-	+++	+++
	FeCl ₃ /EtOH	-	-	-	-
Taninos	H ₂ SO ₄	-	-	-	-
Terpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	-	+++	-	-
	Ácido(Espuma)	-	-	-	-
	Base (Espuma)	-	-	-	-
Gomas y mucílagos	EtOH 90°	-	-	-	-
	Lípidos y ceras	-	-	-	-
	Antraquinonas	-	-	-	-
	NaOH	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-	-

Tamizaje fitoquímico. Convenciones:

Presente (+++)

Ausente (-)

6.4 R_f DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Debido a que a cada uno de los compuestos obtenidos se les determinó su pureza mediante cromatografía de placa delgada, se pudo determinar el R_f como se presenta a continuación:

Para el VL1 se utilizaron los disolventes cloroformo-etanol (8:2) con R_f: 0.42, en el VL2 se utilizaron los disolventes hexano-acetato de etilo (4:6) con R_f: 0.63, para el VL3 se utilizaron los disolventes acetona-metanol (7:3) con R_f: 0.51 y para el VL4 se utilizaron los disolventes acetato de etilo-metanol (6:4) con R_f: 0.47.

6.5 PUNTO DE FUSIÓN Y SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

La caracterización fisicoquímica en cuanto al punto de fusión (sin rectificar) y solubilidad para cada uno de ellos es el siguiente:

VL1: 273°C, soluble en dimetilsulfoxido; VL2: 258°C, soluble en cloroformo; VL3:178°C, soluble en etanol; VL4:264°C, soluble en etanol.

Las técnicas espectroscópicas IR, RMN ¹H, JMOD, COSY, HMBC, HMQC, DEPT, se utilizaron para elucidar las estructuras de los compuestos aislados⁴¹, denominados VL2 y VL3.

6.6 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO VL2

El tamizaje fitoquímico indica que el compuesto VL2 es un terpeno o esteroide.

En el espectro IR (KBr), las señales más representativas son: 2930.2 cm⁻¹, correspondiente a enlaces saturados carbono-hidrogeno, grupo carbonilo a 1713.2 cm⁻¹, 1457.3 cm⁻¹ correspondiente a un grupo metileno alfa al grupo carbonilo (CH₂-C=O), a 1388.70 cm⁻¹ >C-(CH₃)₂, 1132.78 cm⁻¹ (C-H flexión). Indicando que el compuesto no presenta bandas de anillo aromático, ni banda de grupo hidroxilo característica de los alcoholes, ni la presencia de dobles enlaces correspondiente a los alquenos si no que al contrario es una estructura carbono-hidrógeno

saturada. La señal del grupo carbonilo se presenta debido al grupo funcional cetona o aldehído en la estructura molecular, ya que se descarta su procedencia de un ácido carboxílico debido a la ausencia de la banda ancha (OH), característica de este grupo funcional $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ y de un éster ya que no aparecen las dos bandas intensas de alargamiento del C-O en la región de $1050-1300\text{ cm}^{-1}$ de las que se distingue de la cetona.

En el espectro RMN ^1H (δ ppm, 300 MHz, CDCl_3), las señales más significativas aparecen en los siguientes valores de: 0.72 (3H, s, H24), 0.83 (3H, s, H25), 0.93 (1H, d, H22a), 0.95 (3H, d, H23), 0.96 (1H, d, H22b), 0.97 (3H, s, H29), 1.01 (3H, s, H30), 1.02 (3H, s, H27), 1.08 (3H, s, H26), 1.18 (1H, d, H12b), 1.2 (3H, s, H28), 1.25 (1H, s, H12a), 1.26 (2H, d, H19), 1.3 (2H, d, H21), 1.37 (2H, m, H16), 1.38 (1H, d, H8), 1.39 (1H, m, H6a), 1.4 (1H, m, H7a), 1.5 (1H, m, H7b), 1.52 (1H, d, H15b), 1.54 (1H, d, H15a), 1.55 (1H, d, H10), 1.58 (1H, d, H18), 1.66 (1H, d, H11a), 1.67 (1H, H11b), 1.72 (1H, m, H1a), 1.75 (1H, m, H6b), 2.0 (1H, m, H1b), 2.25 (1H, m, H4), 2.3 (1H, dd, H2a), 2.4 (1H, dd, H2b). La integración total del espectro es para 50 hidrógenos.

Los desplazamientos no indican la presencia de protones aromáticos, debido a la ausencia de señales en la región de 6-8.5 ppm, por lo tanto corrobora lo descrito anteriormente con respecto al espectro infrarrojo. A su mismo la ausencia de señales en el espectro RMN ^1H a campo bajo, en la región 9-10 ppm descarta la presencia del grupo funcional aldehído (RCHO), por consiguiente el carbonilo presentado en el espectro infrarrojo se debe al grupo funcional cetona. Los desplazamientos de las señales del espectro RMN ^1H a campo alto de 0.72 ppm a 2.4 ppm, infiere que los protones que hacen parte de la molécula sean alifáticos.

El espectro de RMN- ^1H muestra señales para ocho metilos como singuletes a 0.72 ppm, 0.83 ppm, 0.97 ppm, 1.02 ppm, 1.08 ppm, 1.1 ppm, 1.2 ppm y uno

como doblete a 0.95 ppm el cual interactúa con un protón metínico como multiplete a 2.25 ppm con una constante de acoplamiento $J=6.8$ Hz. Las señales asignadas se corroboran con el espectro cosy.

En el espectro JMOD (δ ppm, 300 MHz, CDCl_3); hay señales en la fase positiva indicando dieciocho carbonos entre cuaternarios (C) y metilénicos (CH_2) con los siguientes desplazamientos δ (ppm): 18.69, 22.72, 28.61, 30.44, 30.94, 32.86, 33.21, 35.78, 36.07, 36.45, 37.19, 37.89, 38.74, 39.69, 40.14, 41.73, 41.97, 212.73 y en la fase negativa se indican doce carbonos metínicos (CH) y metílicos (CH_3) con los siguientes desplazamientos δ (ppm): 7.28, 15.11, 18.68, 19.40, 20.69, 32.22, 32.23, 35.47, 43.23, 53.55, 58.67, 59.93.

La señal a campo bajo con desplazamiento de 212.73 ppm, confirma una vez más la presencia del grupo carbonilo (C=O).

En el espectro DEPT (δ ppm, 300 MHz, CDCl_3): Se observan señales en la fase positiva correspondientes a doce carbonos entre metínicos (CH) y metílicos (CH_3) con los siguientes desplazamientos δ (ppm): 7.28, 15.11, 18.68, 19.40, 20.69, 32.22, 32.23, 35.47, 43.23, 53.55, 58.67 y 59.93; en la fase negativa correspondientes a once carbonos metilénicos (CH_2) con los siguientes desplazamientos δ (ppm): 18.69, 22.72, 30.44, 32.86, 33.21, 35.78, 36.07, 36.45, 38.74; 40.14; 41.97. Al comparar las señales del espectro dept con las señales del espectro jmod hay ausencia de 7 señales, δ (ppm): 28.61, 30.94, 37.19, 37.89, 39.69, 41.73, 212.73 (C=O), indicando que estas señales corresponden a carbonos cuaternarios (C).

En el espectro COSY sobresalen algunas señales que indican el acoplamiento entre protones δ (ppm): 2.25-1.7, 0.95 (CH_3)-2.25, 1.72-2.3, 1.72-2.4, 1.72-2.0, 1.7-1.4, 1.7-1.75, 1.7-1.55, 1.4-1.37, 1.37-1.67, 1.67-1.18, 0.97-1.01, 1.25-1.58.

Hay un solo metilo que correlaciona con un grupo metino como lo es a 0.95 ppm con 2.25 ppm. Los demás metilos (0.72, 0.83, 0.97, 1.01, 1.02, 1.08, 1.20 ppm) no muestran correlación ni con metilenos (CH₂) ni con metinos (CH) por lo que se interpreta que estos metilos (CH₃) se enlazan a carbonos cuaternarios (C).

Del análisis del espectro HMQC, se establece que para los ocho metilos del espectro RMN-¹H δ (ppm): 0.72 ppm, 0.83 ppm, 0.95 ppm, 0.97 ppm, 1.01 ppm, 1.02 ppm, 1.08 ppm y 1.2 ppm correlacionan con los carbonos 15.11 ppm, 18.68 ppm, 7.28 ppm, 35.47 ppm, 32.22 ppm, 20.69 ppm, 19.40 ppm, 32.23 ppm respectivamente. Por lo tanto las señales obtenidas del espectro jmod que relacionan para cuatro grupos metínicos (CH) son δ (ppm): 43.23, 53.55, 58.67, 59.93 las cuales correlacionan para las señales de un protón 1.58 ppm, 1.37 ppm, 2.25 ppm, 1.55 ppm respectivamente. Las señales de los once carbonos metilénicos (CH₂) δ ppm: 18.69, 22.72, 30.44, 32.86, 33.21, 35.78, 36.07, 36.45, 38.74; 40.14; 41.97 correlacionan con sus protones correspondientes a δ ppm: 1.4-1.5, 1.72-2.0, 1.18-1.25, 1.3, 1.52-1.54, 1.67, 1.37, 1.25, 0.93-0.97, 1.7-1.75, 2.3-2.4.

Por medio del espectro HMBC, se determina la posición del grupo carbonílico debido a la correlación entre la señal del protón 0.95 ppm con el carbono metínico a 58.67 ppm y el carbono cuaternario a 212.73 ppm.

La información obtenida del tamizaje fitoquímico y de los espectros anteriores se resume (Tabla 4) que la estructura buscada consta de treinta carbonos, conformados de la siguiente manera: siete carbonos cuaternarios (C) uno de ellos un grupo carbonílico, ocho metilos (CH₃) y once metilenos (CH₂) y cuatro metínicos (CH). De cincuenta protones, distribuidos en los carbonos anteriormente mencionados. De los ocho metilos hay un solo metilo que aparece unido a un carbono metínico, el resto de los metilos están unidos a carbonos cuaternarios.

Tabla 4. Datos de RMN-¹H, JMOD, COSY, HMQC y HMBC del compuesto VL2 (CDCl₃)

Posición	¹ H	COSY	JMOD, HMQC	HMBC
1 _a	1.72 (1H,m)	2.3, 2.4,		41.97,
1 _b	2.0 (1H, m)	1.55	22.72	59.93
2 _a	2.3 (1H, dd)	1.72, 2.0, 2.25		22.72, 2.22,
2 _b	2.4 (1H, dd)		41.97	59.93,58.67
3	-	-	(212.73)	22.72, 41.97, 7.28
4	2.25 (1H, m)	2.3, 2.4, 0.95	58.67	7.28, 15.11, 32.22,41.97
5	-	-	(41.73)	58.67, 15.11
6 _a	1.39 (1H, m)	1.4, 1.5, 1.55		
6 _b	1.75 (1H, m)		40.14	53.55, 59.93
7 _a	1.40 (1H, m)	1.39,1.75, 1.38		
7 _b	1.50 (1H, m)		18.69	35.78
8	1.38 (1H, d)	1.40,1.50	53.55	18.69,35.78, 43.23
9	-	-	(37.19)	18.69, 18.68
10	1.55 (1H, d)	17.2,2.0,1.39,1.75	59.93	15.11,18.69, 22.72
11 _a	1.66 (1H,d)	1.18, 1.25		
11 _b	1.67 (1H,d)		35.78	53.55
12 _a	1.25 (1H, s)	1.66, 1.67		
12 _b	1.18 (1H, d)		30.44	19.40
13	-	-	(37.89)	19.40
14	-	-	(39.69)	20.69, 33.21
15 _a	1.54 (1H, d)	1.37		

15_b	1.52 (1H, d)		33.21	20.69, 32.23
16	1.37 (2H, m)	1.52, 1.54, 1.58	36.07	19.40, 33.21
17	-	-	(30.94)	43.23, 36.07, 32.23, 38.74
18	1.58 (1H, d)	1.37, 1.26	43.23	15.11, 19.40, 38.74
19	1.26 (2H, d)	1.58	36.45	32.86, 32.22
20	-	-	(28.61)	36.45, 35.47, 32.22
21	1.30 (2H, d)	0.93, 0.96	32.86	32.22, 36.45
22_a	0.93 (1H, d)	1.30	38.74	32.23
22_b	0.96 (1H, d)			
23	0.95 (3H, d)	0.72, 2.25	7.28	58.67, 32.22
24	0.72 (3H, s)	0.95, 0.97, 1.01	15.11	41.97, 18.69
25	0.83 (3H, s)	1.20	18.68	35.78, 59.93
26	1.08 (3H, s)	1.02	19.40	30.44, 43.23
27	1.02 (3H, s)	1.08	20.69	33.21, 53.55
28	1.20 (3H, s),	0.83	32.23	36.07, 38.74
29	0.97 (3H, s)	0.72	35.47	36.45, 32.86
30	1.01 (3H, s).	0.72	32.22	36.45, 32.86

^a Los valores entre paréntesis corresponde a carbonos cuaternarios.

Teniendo en cuenta todos los datos anteriores se modelaron diferentes estructuras de la cuales la que presenta la mayor concordancia entre los desplazamientos calculados y los datos experimentales es la siguiente (Figura 9):

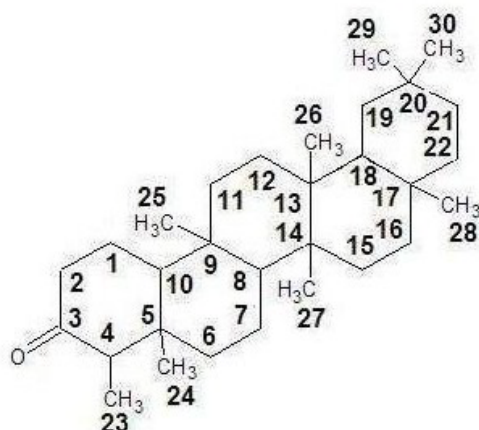


Figura 9. Estructura propuesta para el compuesto VL2

Un triterpeno, conocido como Friedelina (Tabla 5) cuyo punto de fusión es de 261-262°C, el cual se reporto por primera vez en la especie *Harungana madagacariensis* (Clusiaceae)⁴². No se tiene reporte o conocimiento de que hubiese sido aislada anteriormente en la especie *Vismia lauriformis*.

Tabla 5. Datos de referencia de la friedelina ¹³C RMN (75.4 MHz, CDCl₃) vs JMOD del compuesto VL2 (300 MHz, CDCl₃).

Posición ¹³ C	Friedelina	Compuesto VL2 JMOD
1	21.90 (CH2)	22.72
2	41.17 (CH2)	41.97
3	(212.73) *	(212.73)
4	57.90 (CH)	58.67
5	(41.79) *	(41.73)
6	41.00 (CH2)	40.14
7	17.89 (CH2),	18.69
8	52.79 (CH)	53.55
9	(37.15) *	(37.19)
10	59.20 (CH)	59.93

11	35.72 (CH2)	35.78
12	29.31 (CH2)	30.44
13	(38.00) *	(37.89)
14	(39.39) *	(39.69)
15	32.52 (CH2)	33.21
16	35.30 (CH2)	36.07
17	(29.67) *	(30.94)
18	42.55 (CH)	43.23
19	35.03 (CH2)	36.45
20	(27.81) *	(28.61)
21	32.11 (CH2)	32.86
22	38.93 (CH2)	38.74
23	6.42 (CH3)	7.28
24	14.28 (CH3)	15.11
25	17.57 (CH3)	18.68
26	18.26 (CH3)	19.40
27	19.88 (CH3)	20.69
28	31.77 (CH3)	32.23
29	34.67 (CH3)	35.47
30	31.47 (CH3)	32.22

* Los valores corresponden a carbonos cuaternarios.

Si bien estos datos no son concluyentes se puede apreciar una alta coincidencia en ambos espectros, lamentablemente en la bibliografía consultada no se reportan los datos del espectro protónico.

6.7 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL COMPUESTO VL3

El tamizaje fitoquímico del compuesto VL3 señala un metabolito tipo flavonoide.

En el espectro IR hay bandas que indican la presencia de los siguientes grupos funcionales: alcohol (OH) a 3406.3 cm^{-1} , anillo aromático (C-H) a 3150 cm^{-1} banda solapada con el OH, carbono-hidrogeno saturado (C-H) a 2930.5 cm^{-1} , grupo carbonilo (C=O) a 1643.1 cm^{-1} el cual puede provenir de un aldehído o cetona o ácido carboxílico, se confirma la presencia de C-H a 1472.4 cm^{-1} . Hay presencia del grupo fenol (Ar-OH) a 1294.1 cm^{-1} , del grupo funcional éter (C-O-C) a 1075.8 cm^{-1} .

En el espectro RMN- ^1H (δ ppm, 300 MHz, CDCl_3), los desplazamientos de las señales mas representativas son los siguientes: 6.95 (1H, s), 6.81 (1H, d), 6.80 (1H, d), 5.88 (1H, d), 5.90 (1H, d), 5.10 (1H, d), 4.55 (1H, d), 4.30 (1H, m), 4.10 (1H, s), 3.70 (1H, m), 3.55 (1H, s), 3.30 (1H, m), 1.18 (3H, d). Los valores a campo bajo comprendidos entre la región de 5.9 a 7 ppm indican la presencia de protones aromáticos. Se descarta que la presencia del grupo carbonilo presentado en el espectro infrarrojo provenga tanto de un aldehído como de un ácido carboxílico debido a la ausencia de señales de protón en la región de 9-10 ppm (RCHO) y 10.5-12 ppm (RCOOH), característico para este tipo de grupos funcionales. Por lo tanto se debe su presencia al grupo funcional cetona. A campo alto hay una señal singulete intensa con un desplazamiento de 1.18 ppm e integra para tres protones, mostrando así la presencia de un grupo metilo (CH_3). Para cada una de las señales con desplazamientos entre 3.3 ppm a 4.3 ppm, existe una integración de un protón, por lo que indica la presencia de protones metínicos (CH). En cuanto a las señales a 3.3 ppm, 3.70 ppm y 4.3 ppm son multipletes, lo cual hace inferir que son protones con un alto grado de interacción.

A través de la bibliografía consultada^{43,44}, se determinó que las señales en 1.18 ppm (CH_3) y de 3.3 a 4.3 ppm (CH) corresponden a un glicósido denominado ramnosa. Hay dos señales dobletes en 4.6 ppm y 5.1 ppm, con integración para cada señal de un protón, indicando la presencia de protones metínicos (CH) que

presentan interacción entre si ya que la constante de acoplamiento de $J = 10.74$ Hz, así lo indica.

A campo bajo hay presencia de dos señales singuletes muy similares y cercanas entre si, con una integración entre ambas señales de dos protones, con desplazamientos a 5.85 ppm y 5.9 ppm los cuales hacen parte de la región aromática debido a la presencia del fenol (banda infrarrojo a 1294.1 cm^{-1}) y ya que la constante de acoplamiento $J = 2.1$ Hz se establece que es un fenol con dos protones en posición meta.

A campo un poco mas bajo se infiere la presencia de otro fenol con presencia de tres protones, por las siguientes razones: Hay tres señales singuletes que hacen parte de la región aromática con desplazamientos a 6.8 ppm, 6.81 ppm y 6.95 ppm; las dos primeras señales muy similares entre si y con base en su integración corresponden a dos protones, los cuales están ubicados en posición orto debido a su constante de acoplamiento $J = 8.2$ Hz. Con relación a la señal de 6.95 ppm hay integración para un protón y se encuentra en posición meta respecto al protón cuya señal tiene un desplazamiento de 6.8 ppm ya que tiene una constante de acoplamiento $J = 2.7$ Hz.

Las señales de la fase positiva del espectro JMOD (δ ppm, 300 MHz, MeOH) indican los carbonos cuaternarios (C) y metilenos (CH_2) los cuales tienen los siguientes desplazamientos: 196.42 (C), 169.04 (C), 165.94 (C), 164.53 (C), 147.80 (C), 146.97 (C), 129.61 (C), 102.57 (C); los carbonos metínicos y metílicos tienen los siguientes desplazamientos: 120.91 (CH), 116.74 (CH), 115.90 (CH), 102.57 (CH), 97.80 (CH), 96.68 (CH), 84.39 (CH), 78.99 (CH), 74.23 (CH), 72.59 (CH), 72.20 (CH), 70.99 (CH), 18.28 (CH_3). Por lo tanto hay presencia de siete carbonos cuaternarios (C), doce carbonos metínicos (CH) y un carbono metílico (CH_3).

La señal a campo alto, de desplazamiento a 18.28 ppm corresponde a un grupo metilo (CH_3) y las señales de desplazamiento entre 70 y 75 ppm corresponden a cuatro carbonos metínicos (CH); señales provenientes de la estructura molecular del glicósido ramnosa, ya que son bastantes característicos este tipo de desplazamiento. En el espectro cosy se discute la relación entre ellos.

La señal a 102.57 ppm correspondiente al otro carbono de la ramnosa, se ha desplazado a un campo bajo con relación a los anteriores protones de la ramnosa debido a que este carbono es aquel que se enlaza por medio de un enlace éter (banda infrarrojo a 1075.8cm^{-1}) con el flavonoide; ya que en los O-glicósidos este tipo de carbono resuena alrededor de 100 ppm mientras que en los C-glicósidos resuena alrededor de 75 ppm.

Con respecto al espectro dept hay ausencia de señales en la parte de abajo de la línea base, indicando así que la molécula a elucidar no tiene metilenos (CH_2), por consiguiente las señales en el espectro jmod de la parte superior de la línea base de este espectro corresponden a ocho carbonos cuaternarios (C).

Debido a lo anterior, se analiza lo siguiente con base al espectro jmod:

La señal a 196.42 ppm carbono cuaternario (C) corresponde a un grupo carbonilo, proveniente de la cetona (ver discusión del espectro RMN ^1H), así esta señal confirma la banda presentada a 1643.1cm^{-1} en el espectro infrarrojo.

Las señales que corresponden al grupo fenol se tienen unos desplazamientos a 169.04 ppm, 165.94 ppm y 164.53 ppm correspondientes cada uno a un carbono cuaternario (C) por lo tanto se deduce que es un anillo trisustituido por hidroxilos, mientras que el otro fenol cuyas señales están a 147.8 ppm y 146.97 ppm corresponden cada uno a carbonos cuaternarios (C), por consiguiente se infiere que es un anillo trisustituido por hidroxilos.

En el espectro cosy se comenzó asignar las señales desde campo alto a campo bajo donde hay acoplamiento ^1H - ^1H vecinal entre las señales del glicósido ramnosa como se describe a continuación: a 1.18 ppm protones del metilo (CH_3) correlaciona con la señal a 4.3 ppm protón metino (CH). A su vez, esta señal tiene conectividad con una nueva señal a 3.3 ppm protón metino (CH). Este metino correlaciona con las señales a 3.7 ppm protón metino (CH) y 4.6 ppm protón metino (CH). La señal a 3.7 ppm tiene conectividad con la señal a 3.55 ppm protón metino (CH). (Figura 10).

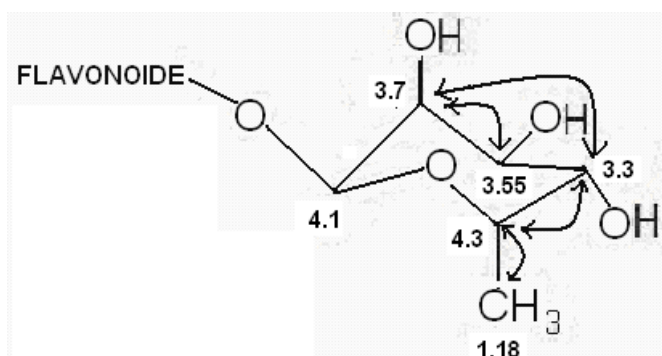


Figura 10. Correlación de señales de la ramnosa. Espectro COSY.

Para la estructura básica del flavonoide ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$) se tienen las siguientes señales: La señal a 4.6 ppm protón metino (CH) correlaciona con la señal a 5.1 ppm protón metino (CH), confirmando lo descrito anteriormente en el espectro RMN ^1H en cuanto a estas dos señales.

La señal a 5.85 ppm protón metino (CH) correlaciona con la señal a 5.9 ppm protón metino (CH).

Existe correlación entre si de las señales a 6.8 ppm protón metino (CH), 6.81 ppm protón metino (CH) y 6.95 protón metino (CH). (Figura 11)

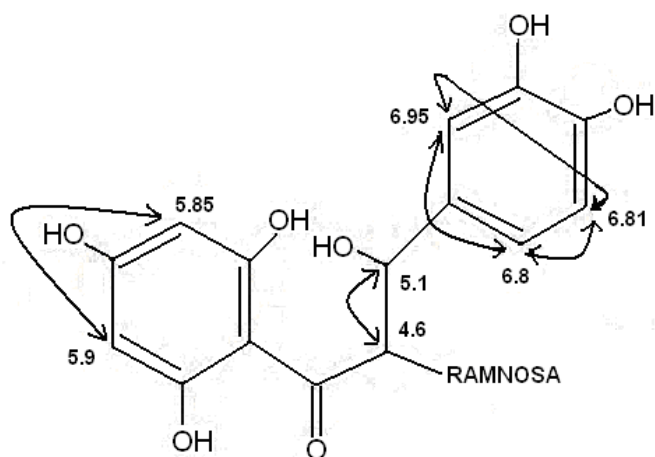


Figura 11. Correlación de señales del flavonoide. Espectro COSY.

Por último, se define la correlación existente entre la señal a 4.1 ppm protón metino (CH) perteneciente a la estructura básica del glicósido y 4.6 ppm protón metino (CH) perteneciente a la estructura básica del flavonoide; esta conectividad se deba tal vez al ángulo formado entre ambas estructuras básicas ya que se encuentra el oxígeno como enlace y por lo tanto hay un cambio en la estructura tridimensional del compuesto. (Figura 12)

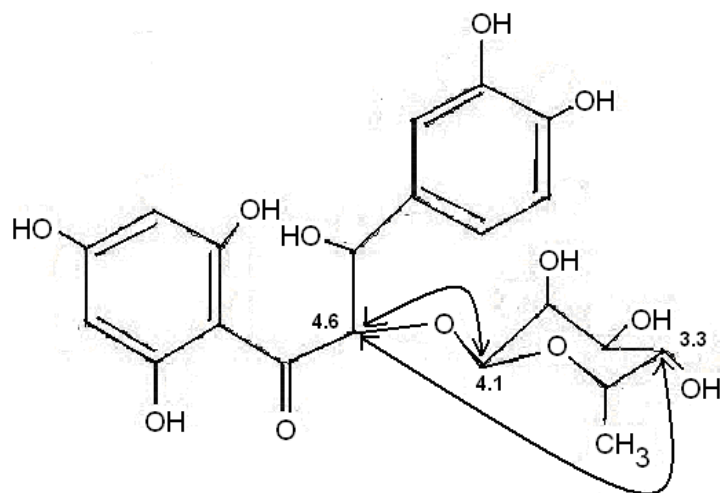


Figura 12. Correlación de señales del flavonoide y la ramnosa. Espectro COSY.

El espectro HMQC indica las relaciones existentes entre carbono y protón correspondiente, como se indican a continuación:

Según las discusiones con respecto a los espectros ^1H y jmod, indica la presencia de un metilo (CH_3) debido a la ramnosa ya que las señales de 1.18 ppm y 18.28 ppm respectivamente se correlacionan entre si.

En cuanto a los carbonos metínicos (CH) del glicósido, se indica la relación entre los protones desde 3.3 ppm hasta 4.3 ppm del ^1H y desde 70.99 ppm hasta 74.23 ppm ^{13}C , donde cabe resaltar la relación entre la señal de 4.1 ppm ^1H y 102.57 ppm ^{13}C correspondiente al carbono anómero del glicósido (leer discusión jmod).

Debido a la relación obtenida entre la señal 4.1 y 4.6 ppm en el espectro cosy y la relación entre 4.6 ppm ^1H y 102.57 ppm ^{13}C (carbono metínico (CH), estructura básica del flavonoide), confirma que este es aquel que se enlaza por medio del oxígeno (enlace éter) al glicósido.

Se confirma la presencia de fenoles, donde uno de ellos tiene dos protones por la relación de dos señales entre (^1H - ^{13}C) 5.85 ppm-96.68 ppm y 5.9 ppm-97.8 ppm; y el otro fenol tiene tres protones por la relación de tres señales entre (^1H - ^{13}C) 6.8 ppm-116.74ppm, 6.81 ppm-120.91 y 6.95 ppm-115.9 ppm. (Figura 13)

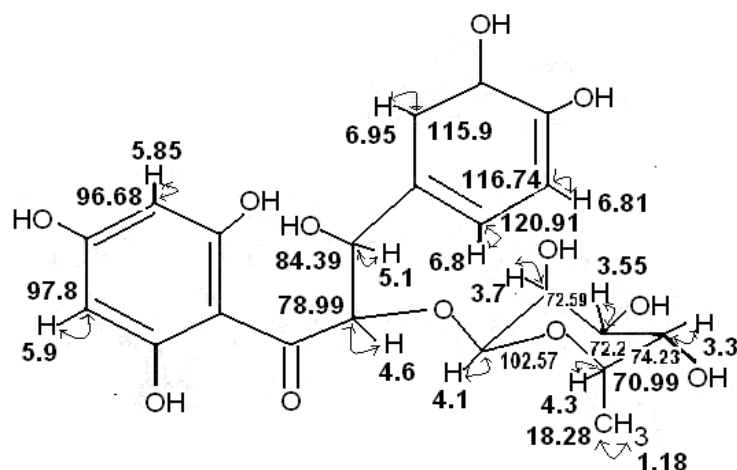


Figura 13. Correlación de señales ^1H - ^{13}C corta distancia. Espectro HMQC.

En el espectro HMBC, se destaca la relación entre la señal (^{13}C - ^1H) a 196.42 ppm-4.6 ppm y 196.42 ppm-5.1 ppm indicando que hay interacción entre el carbonilo y dos protones metinos (CH). (Figura 14)

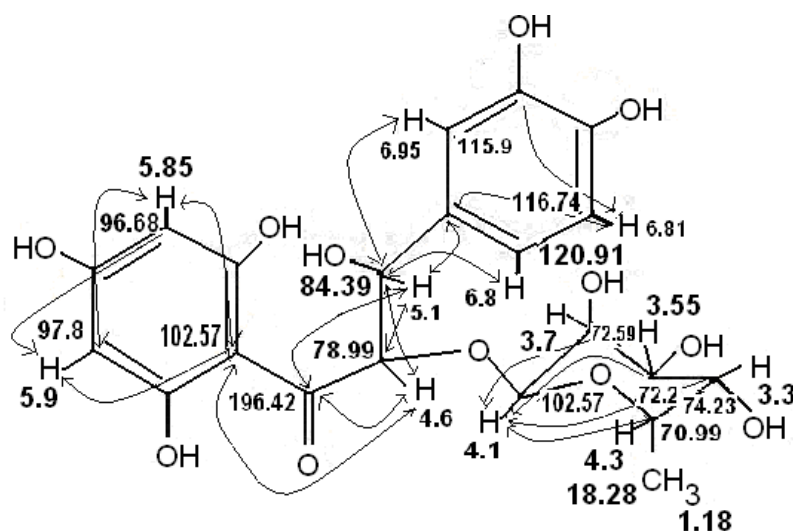


Figura 14. Correlación de señales ^1H - ^{13}C . Espectro HMBC.

Luego del respectivo análisis a cada uno de los espectros, en la Tabla 6 se resumen los datos espectroscópicos de RMN- ^1H , JMOD, COSY, HMQC y HMBC.

Tabla 6. Datos de RMN- ^1H , JMOD y RMN-2D del compuesto VL3 (CDCl_3)

Posición	^1H	COSY	JMOD, HMQC	HMBC
1	-	-	(102.57) *	-
2	-	-	(165.94) *	-
3	5.90 (1H, d)	5.88	97.80	96.68, 102.57, 164.53, 165.94, 169.04
4	-	-	(169.04) *	-
5	5.88 (1H, d)	5.90	96.68	97.80, 102.57, 164.53, 165.94, 169.04

6	-		(164.53) *	-
1'	-		(129.61) *	-
2'	6.95 (1H,s)	6.80, 6.81	115.90	84.39, 120.91, 147.80
3'	-	-	(146.97) *	-
4'	-	-	(147.80) *	-
5'	6.81 (1H,d)	6.80, 6.95	116.74	129.61, 146.97
6'	6.80 (1H,d)	6.81, 6.95	120.91	129.61, 146.97
α	4.55 (1H,d)	3.30, 4.10, 5.10	78.99	84.39, 102.57, 129.61, 196.42
β	5.10 (1H,d)	4.55	84.39	78.99, 115.90, 120.91, 129.61, 196.42
1''	4.10 (1H,s)	4.55	102.57	70.99, 78.99, 84.39
2''	3.70 (1H,m)	3.30, 3.55	72.59	
3''	3.55 (1H,s)	3.70	72.20	
4''	3.30 (1H,m)	3.70, 4.30	74.23	18.28, 70.99
5''	4.30 (1H,m)	1.18, 3.30	70.99	
6''	1.18 (3H,d)	4.30	18.28	70.99, 72.20, 72.59, 74.23, 102.57, 116.74
C=O	-	-	(196.42) *	-

(^o)* Los valores corresponden a carbonos cuaternarios.

Los datos y análisis anteriormente descritos, se propone la estructura del compuesto aislado con la siguiente nomenclatura:

β,2,3',4,4',6-hexahidroxí-α-(α-L-ramnopiranosil) dihidrochalcona, (Figura 15), con punto de fusión de 150—152 °C y un R_f de 0.52 (hexano-acetato de etilo (75:25)),

compuesto que se reporto en Octubre de 2008 en la especie *Psorospermum androsaemifolium* (Clusiaceae)⁴⁵ (Tabla 7 y 8). Para la especie en estudio: *Vismia lauriformis* se reporta por primera vez su aislamiento, ya que no se tiene conocimiento de algún reporte previo a este trabajo.

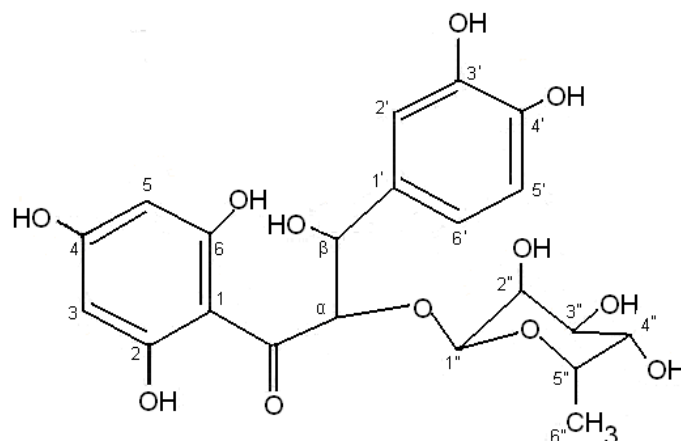


Figura 15. Estructura propuesta para el VL3:

$\beta,2,3',4,4',6$ -hexahidroxi- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona

Tabla 7. Datos de referencia del $\beta,2,3',4,4',6$ -hexahidroxi- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) v/s JMOD del compuesto VL3 (300 MHz, CDCl_3).

Posición ^{13}C	^{13}C -RMN $\beta,2,3',4,4',6$ -hexahidroxi- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona	Compuesto VL3 JMOD
1	102.6 (s)	(102.57)
2	165.5 (s)	(165.94)
3	97.7 (d)	97.80
4	168.7 (s)	(169.04)
5	96.3 (d)	96.68
6	164.1(s)	(164.53)
1'	129.2 (s)	(129.61)
2'	115.5 (d)	115.90

3'	146.7 (s)	(146.97)
4'	147.4 (s)	(147.80)
5'	116.3 (d)	116.74
6'	120.5 (d)	120.91
α	78.6 (d)	78.99
β	84.0 (d)	84.39
1''	102.2 (d)	102.57
2''	70.5 (d)	72.59
3''	71.1 (d)	72.20
4''	71.2 (d)	74.23
5''	73.8 (d)	70.99
6''	17.9 (q)	18.28
C=O	196.0 (s)	(196.42)

*Los valores entre paréntesis corresponde a carbonos cuaternarios

Tabla 8. Datos de referencia del β,2,3',4,4',6-hexahidroxi-α-(α-L-ramnopiranosil) dihidrochalcona ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) v/s ¹H-RMN del compuesto VL3 (300 MHz, DMSO).

Posición	¹H-RMN β, 2,3',4,4',6 -hexahidroxi-α-(α-L-ramnopiranosil) dihidrochalcona	Compuesto VL3
¹H		¹H-RMN
1	-	-
2	-	-
3	5.89 (1H, d)	5.90 (1H, d)
4	-	-
5	5.91 (1H, d)	5.88 (1H, d)
6	-	-
1'	-	-
2'	6.80 (1H, d)	6.95 (1H,s)

3'	-	-
4'	-	-
5'	6.95 (1H, d)	6.81 (1H,d)
6'	6.78 (1H, dd,)	6.80 (1H,d)
α	5.09 (1H,d)	4.55 (1H,d)
β	4.58 (1H, d)	5.10 (1H,d)
1''	5.34 (1H, d)	4.10 (1H,s)
2''	3.65 (1H, dd)	3.70 (1H,m)
3''	3.55 (1H, dd)	3.55 (1H,s)
4''	3.40 (1H, dd)	3.30 (1H,m)
5''	3.35 (1H, m)	4.30 (1H,m)
6''	1.19 (3H, d).	1.18 (3H,d)
C=O	-	-

*Los valores entre paréntesis corresponde a carbonos cuaternarios

6.8 ANALISIS DE LA MUESTRA DE SUELO ASOCIADO A LA ESPECIE EN ESTUDIO

Para la interpretación de los análisis físicos y químicos de este suelo se tiene en cuenta las tablas de referencia bibliográficas⁴⁶. Los resultados son el promedio de tres réplicas. (Tablas 9-14).

Tabla 9. Análisis preliminar de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

Muestra	Origen	Parámetro	Caracterización Organoléptica
Suelo	Jardín Botánico Álvaro José Negret	Color	Oscuro
		Olor	Suelo

Tabla 10. Características físicas de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

CONSISTENCIA	Pegajosidad y plasticidad	Baja
	Compactación del suelo	Baja
TEXTURA		Arenosa
ESTRUCTURA	Migajosa	Los suelos con esta estructuras son permeables, muy bien aireados y no obstaculizan el desarrollo de las raíces de las plantas.
GRADO DE AGREGACIÓN	Estructura fuerte	Tiene mucha más resistencia a la deformación
CLASE	Medio	diámetro de la partícula es de 2 a 5 mm

Tabla 11. Análisis físicos y químicos preliminares de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

Muestra	Origen	Caracterización	Valor (Base seca)	
Suelo	Jardín Botánico Álvaro José Negret. (J.B.)	Humedad de Campo	74.05 %	
		Humedad Higroscópica	18,6%	
		Conductividad eléctrica	0.19 mS	
		pH en Pasta Saturada	5.51	
		pH en Relación muestra: agua (1:1)	5.27	
		pH en Relación muestra: agua (1:2.5)	5.38	
		Determinación del pH en Relación Suelo: KCl 1:1	4.40	
		Textura (Método de Bouyoucos)	Arena Total	80.24%
			Arcilla	5.95%
Limos	13.81%			

Tabla 12. Análisis físicos y químicos de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

ZM	J.B.
Humedad	18.6
Textura	Arenoso-franco
C:E mS/cm	0.19
pH	5.51
C.I.C. meq/100g	88.31
C.I.C. Efect. meq/100g	1.94
Acidez Interc. meq/100g	1.16
Al meq/100g	0.59
H meq/100g	0.57
C.O. %	4.78
M.O. %	8.24
N Total %	0.62
C/N	7.71
P Disp. mgP/Kg suelo	52.44

ZM: zona de muestreo; **Textura:** Bouyucos; **pH:** relación suelo:agua (1:1); **Acidez Intercambiable:** método volumétrico; **Materia Orgánica:** Wakley Black; **CIC:** Método volumétrico.

Tabla 13. Contenido de Bases de Cambio y saturación de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

Bases de Cambio						
ZM	Ca meq 100g	Mg meq 100g	K meq 100g	Na meq 100g	Ca/Mg	Ca +Mg/K
J.B.	0.42	0.09	0.25	0.02	4.67	2.04
% Saturación de Bases y de Al						
	% SB	% SCa	% SMg	% S K	% SNa	% SAl
J.B.	40.21	21.65	4.64	12.89	1.03	30.41

ZM: Zona de muestreo, **J.B:** Jardín Botánico **ppm:** partes por millón, **%S:** porcentaje de saturación, **meq:** mili equivalentes

Tabla 14. Contenido de micronutrientes de la muestra de suelo asociada a *Vismia lauriformis*

Muestra	Origen	Fe Ppm	Cu ppm	Mn ppm	Zn ppm
Suelo	Jardín Botánico Álvaro José Negret.	3.90	0.35	1.58	0.65

El suelo bajo estudio presenta una textura arenosa franca, en donde predomina el contenido de arenas con un valor muy alto, el contenido de arcillas es bajo, (inferior al 10%,) y el de limos también es bajo, indicando una pérdida de los

materiales grumosos y por tanto posible erosión. El porcentaje de retención de humedad es alto para este tipo de textura, se puede atribuir al alto contenido de materia orgánica (MO).

El valor de pH indica una acidez media, atribuible al alto contenido de MO principalmente, puesto que el Al se encuentra en un nivel bajo y por lo tanto no presentaría toxicidad a las plantas. Sin embargo, su porcentaje de saturación corresponde a un nivel medio indicando que reduce moderadamente crecimiento y desarrollo de las plantas y como consecuencia se tiene una fuerte deficiencia de Ca y Mg ya que tanto sus niveles como saturaciones son bajos. La relación Ca/Mg es apropiada.

El Potasio se encuentra en un nivel medio proviniendo del tipo de arcillas presentes en este suelo. Su saturación es muy alta indicando este suelo tendrían poca capacidad de fijación de este elemento y que el complejo coloidal está saturado principalmente por este nutriente, esto se evidencia en la muy baja relación Ca+Mg/K.

El nivel de Na y su saturación son bajos, propio de suelos ácidos.

Los contenidos de N y de P son altos y se atribuyen al alto contenido de MO. Es posible que estén influenciados por arrastre o lixiviación de cultivos ubicados en la parte alta, los cuales son abonados frecuentemente. Sin embargo, la baja relación C/N indica una fuerte mineralización de la MO que conlleva a una posible erosión manifestada en la textura de este suelo

La muy elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC) se atribuye al alto contenido de MO presente en este suelo, sin embargo, la CIC efectiva es inferior a 4, por esto hay un fuerte lavado de bases de cambio evidenciado en sus bajos

niveles como se manifestó anteriormente. Además hay pérdida de micronutrientes, ya que existe una fuerte deficiencia de Mn, Cu, Fe y Zn.

7. CONCLUSIONES

- A través del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos hexánico, acetónico, etanólico y precipitado del extracto hexánico de la parte aérea de *Vismia lauriformis* indica la presencia de glucósidos cardiotónicos y/o azúcares, cumarinas, flavonoides, terpenos y/o esteroides, saponinas, gomas y/o mucílagos, lípidos y/o ceras y antraquinonas. No se encuentra presencia de alcaloides y taninos. Si bien no se determinó cuantitativamente la composición de cada uno de los metabolitos en los extractos, la identificación cualitativa de ellos es un aporte al descubrimiento del potencial farmacológico de las especies nativas.
- Se determina el porcentaje de inhibición del extracto etanólico sobre la enzima reversa transcriptasa del VIH-1 que fue del 58,7 %. Aunque el porcentaje de inhibición fue bueno, no se considera óptimo. Sin embargo abre una ventana para descubrir el o los compuestos que causan la inhibición.
- De los extractos (hexánico, acetónico, etanólico y precipitado del extracto hexánico) obtenidos de la parte aérea de la planta *Vismia lauriformis*, se aíslan 4 compuestos por el método tradicional, codificados como VL1, VL2, VL3, VL4, de los cuales, se proponen inicialmente dos estructuras debido al tamizaje fitoquímico y técnicas espectroscópicas para los compuestos VL2 y VL3, las estructuras propuestas son la Friedelina y $\beta,2,3',4,4',6$ -hexahidroxi- α -(α -L-ramnopiranosil) dihidrochalcona respectivamente. Si bien los datos del análisis espectroscópico no son concluyentes en la determinación final de la estructura molecular, dan una buena idea de la estructura buscada.
- El análisis del suelo de colecta, muestra un suelo pobre en micronutrientes, con alto contenido de materia orgánica, de acidez media, de textura arenoso franco con indicios de erosión, con un alto contenido de N, P, K, debido

posiblemente a fertilizantes lixiviados de la parte superior de la ladera, la cual es zona de cultivo con frecuente fertilización. El fin del análisis del suelo de colecta no es otro que comprender las condiciones fisicoquímicas del suelo en que se desarrolla la especie *Vismia lauriformis*, como un punto de partida en una posible optimización del cultivo de esta planta.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S. and Gontier, G. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001, 161, 839-85.
2. Rodriguez, P. Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae. Trabajo de investigación (Licenciado en Química Orgánica). Universidad de la Laguna. Facultad de Química Orgánica. España. 2004, 246.
3. Asanza, M.; Freire, A.; Nelly, D.; Sandoval, S. and Welling, J. La botánica en el Nuevo milenio. Resúmenes del tercer congreso ecuatoriano de botánica. Quito. 2000, 89.
4. Reich, P.; Walters, M. and Ellsworth, D. Photosynthesis-nitrogen relations in Amazonian tree species. *Oecología*. 1994, 97, 62-72.
5. Abe, I.; Rohmer, M. and Prestwich, G. Enzymatic cyclation of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenos. *Rev. Chem*. 1993, 93 (2), 189-206.
6. Wendt, K.; Schulz, G.; Corey, E. and Liu, D. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Ang. Chemistry. Int*. 2000, 39 (2), 812-833.
7. Nozaki, H.; Matsura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J. and Lee, K. Friedelane Triterpenoids from *Maytenus macrocarpa*. *Journal the Product Natural*. 1990, 53, 1039.
8. Tane, P.; Tsopmo, A.; Ngnokam, D.; Ayaford, J.F. and Sterner, O. New Friedelane Triterpenes from *Lepidobotrys staudtii*. *Tetrahedron*. 1996, 47 (14), 1989

9. Kuo, Y. and Yang-kio, I. Antitumor and anti-aids triterpenes from *Celastrus hindis*. *Phytochemistry*. 1997, 44, 1257.
10. Dewick, P. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. *John Wiley & Sons*. 2002, 167-219.
11. Corsino, J.; Carvalho, P.; Kato, M.; Latorre, L.; Oliveira, O.; Araujo A. Bolzani, V.; Pereira, A. and Furlan, M. Biosynthesis of friedelano and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquilum* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry*. 2000, 55, 741-748.
12. Nuñez J. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus Chiapensis* y *Crossopetalum Uragoga*. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna. Facultad de Química Orgánica. Instituto Universitario de Bio-Organica. España. 2004. 17-53.
13. Martínez, A. Flavonoides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. 2005, 2-15, 37- 47.
14. Winkel, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*. 2003, 12 (6), 485-493.
15. Martínez, A. Flavonoides. Op cit. 15-16.
16. Buitron, X. Estudios taxonómicos de las familias Clusiaceae e Hyperaceae, en informe técnico final del proyecto estudios botánicos sobre la taxonomía del bosque montano CONUEP-PUCE. Quito. 1989, 337-359

17. Pinheiro, L.; Nakamura, C.; Dias, B.; Ferreira, A.; Marx, M. and García, D. Antibacterial Xanthonenes from *Kielmeyera variabilis* Mart. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* . 2003, 98 (4), 549-552
18. Arango, E.; Trujillo, S.; Saez, J. and Mesa, A. Actividad antiplasmodial de extractos de la planta *Callophyllum lucidum* (Clusiaceae). *Scientia Et Technica.* [fecha de consulta: 25 de mayo de 2010]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/artPdfRed.jsp?iCve=84903357>
19. Osorio E. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Clusiaceae). Tesis doctoral. Barcelona. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia. Departamento de productos naturales, biología vegetal y edafología. 2008, 217.
20. Lorenzana, L. Actividad biocida de seis plantas de uso medicinal del municipio de Tacana. Tesis de graduación. San Carlos. Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2003, 53.
21. Reyes, R.; Huerta, M. Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia.* 2009, 34. (6), 385-392.
22. Macfoy, C. and Sama, A. Medicinal plants in Pejehun district of Sierra Leone. *J. Ethnopharmacology.* 8, 215-223
23. Delle, F.; Marquina, M.; Delle, G.; Marini, G. and Alves, R. Xanthonenes, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry.* 1983, 22 (1), 227-232.

24. Nagem, T. and Oliveira, F. Xanthonones and other constituents of *Vismia parviflora*. *J. Braz. Chem. Soc.* 1997, 8 (5), 505-508.
25. Nguemeving, J.; Blaise, A.; Kuete V.; Eric N.; Penlap, V.; Meyer, M.; Blond, A.; Bodo, B. and Nkengfack. A. Laurentixanthonones A and B, antimicrobial xanthonones from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*. 2006, 67, 1341-1346.
26. Dos Santos, M.; Nagemb, T; Silva, M. and Silva, L. Xanthonones of *Vismia latifolia*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11 (5), 537-539.
27. Bilia, R.; Yusuf, A.; Braca, A.; Keita, A. and Morelli, I. New prenylated anthraquinones and xanthonones from *Vismia guineensis*. *Journal of natural products*. 2000, 63 (1), pp 16-21
28. Pino N.; Cordoba Y. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdó Choco. *Scientia et Technica*. 2007, 33 (13), 387-390
29. Diderot T.; Chaabib M.; Ngouelaa C.; Antheaume S.; Boyomd F.; Gute J.; Philip J.; Lobsteind A. and Tsamo E. Antimalarial Compounds from the Stem Bark of *Vismia laurentii*. *Naturforsch*. 2008. 64 (9). pp 210-214
30. Nagem T.; Faria T. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry-Oxford*. 2001, 29 (10), 3362-3364.
31. Fuller R.; Westergaard C.; Collins J.; Cardellina J.; Boyd M. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *Journal of natural products*. 1999, 62 (1), 67-69.
32. Reyes-Chilpa R. Comunicación personal. Universidad Nacional Autónoma

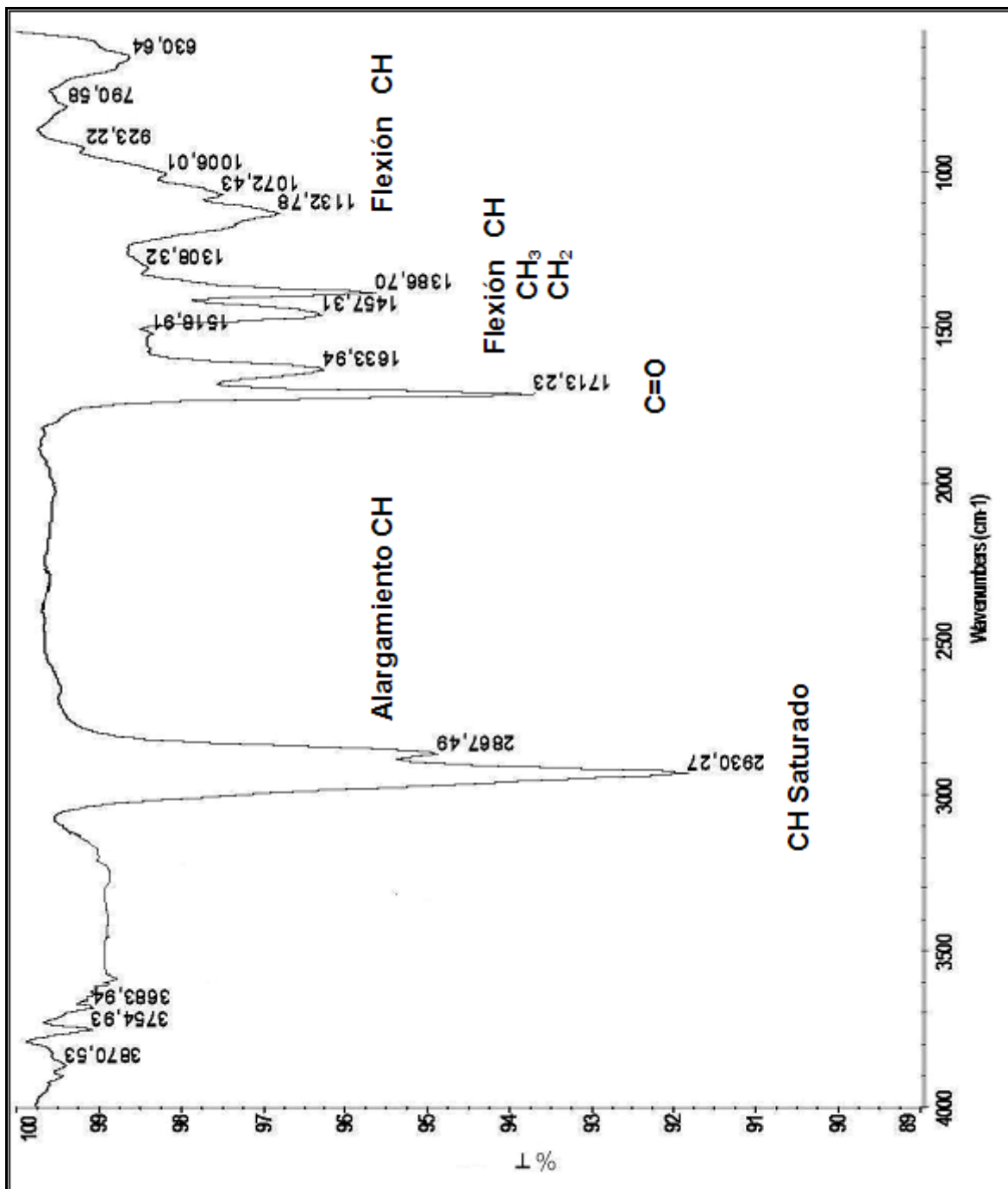
de México.

33. Robson, B. Monografía de *Vismia lauriformis*. [Fecha de consulta: Mayo 23 del 2010]. Disponible en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia.html>.
34. López-casamayor, E.; Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección plintine del genero *Arenaria* (Carophyllaceae). Tesis doctoral. Granada. Departamento de productos naturales 2007, 27-69.
35. Giraldo E. Agroquímica. Un estudio de los nutrientes esenciales en la producción agrícola. Sociedad colombiana de suelos. 2002, 76-299.
36. Castro, H. Fundamentos para el conocimiento y manejo de suelos agrícolas, Instituto Universitario Juan de Castellanos. Tunja. *Produmedios*. 1998, 188.
37. Shao X. A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay based on immobilised template for screening of RT inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antiviral Chemical Chemotherapy*. 1997, 8, 149-159.
38. Domínguez X. "Métodos de Investigación Fitoquímica". México. Edit. Limusa. 1973, 67-256.
39. Bravo I.; Giraldo E. Manual de Química Agrícola. Análisis de Suelo. Universidad del Cauca. 2003, 1-27.
40. Tan G., Pezzuto J. Kinghom A. Evaluation of natural products as inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (VIH-1). Reverse Transcriptase.

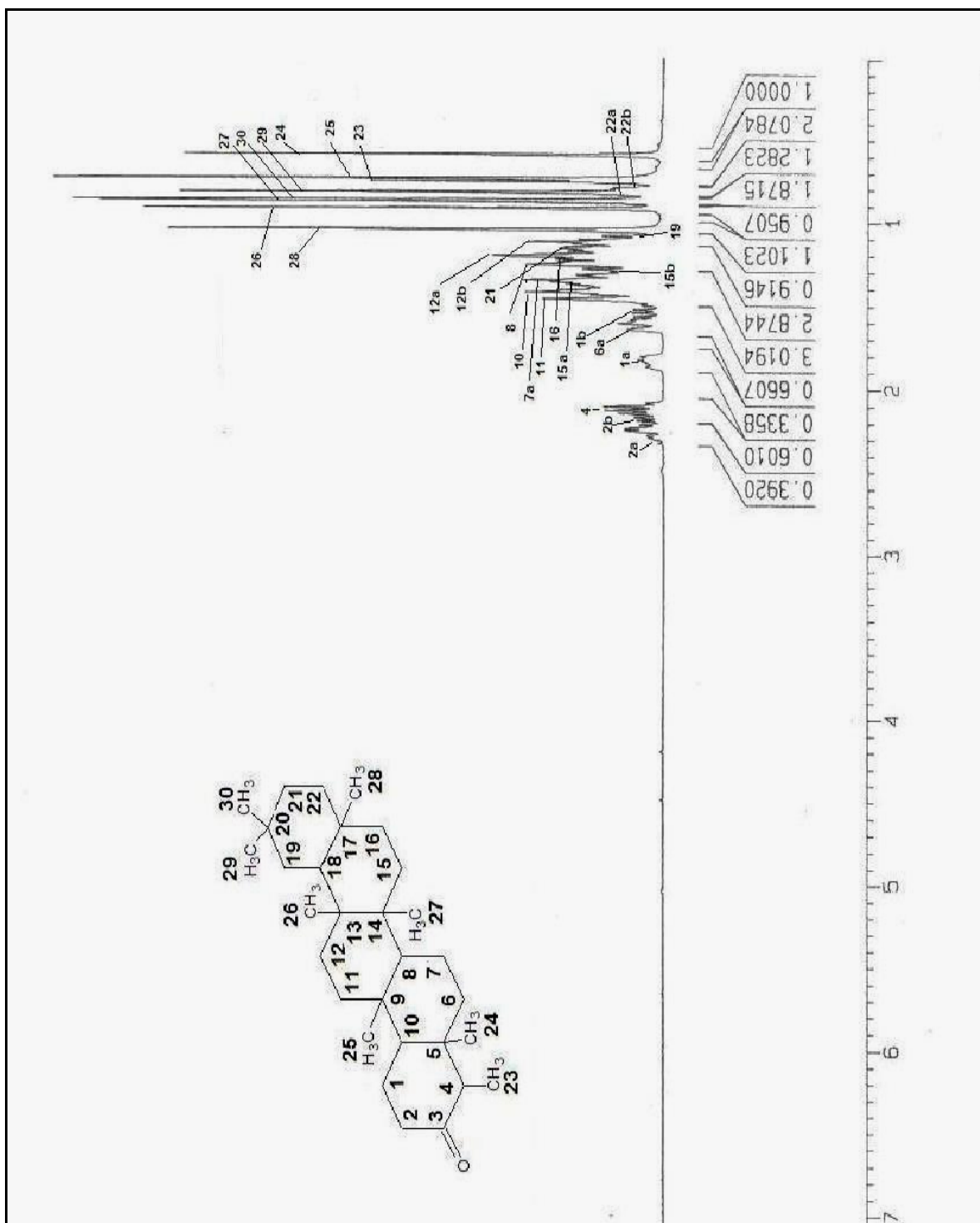
Journal Natural Product. 1991, 54 (1), 143-154.

41. Silverstein, R.; Webster, F. and Kiemle, D. Spectrometric identification of organic compounds. 7^a edición. *Jhon Wiley and son*, inc. New York. 2005. 72- 338
42. Queiroga, C.; Faira, G.; Correa, P.; Possenti, A. and Carvalho, J. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal de Ethnopharmacology.* 2000, 72, 465-468.
43. Martínez, A. Flavonoides. Op cit. 25-27.
44. Reyes-Chilpa, R. Comunicación personal. Op cit.
45. Poumale, H.; Randrianasolo, R.; Rakotoarimanga, J.; Raharisololalao, A.; Krebs, H.; Tchouankeu, J and Ngadjui, B. Flavonoid Glycosides and Other Constituents of *Psorospermum androsaemifolium* BAKER (Clusiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 2008, 56(10), 1428—1430.
46. Silva, M.F. Fertilidad de suelos. Diagnostico y Control. SCCS, Segunda Edición. Bogotá. 2001,13-14, 113-116,155-217.

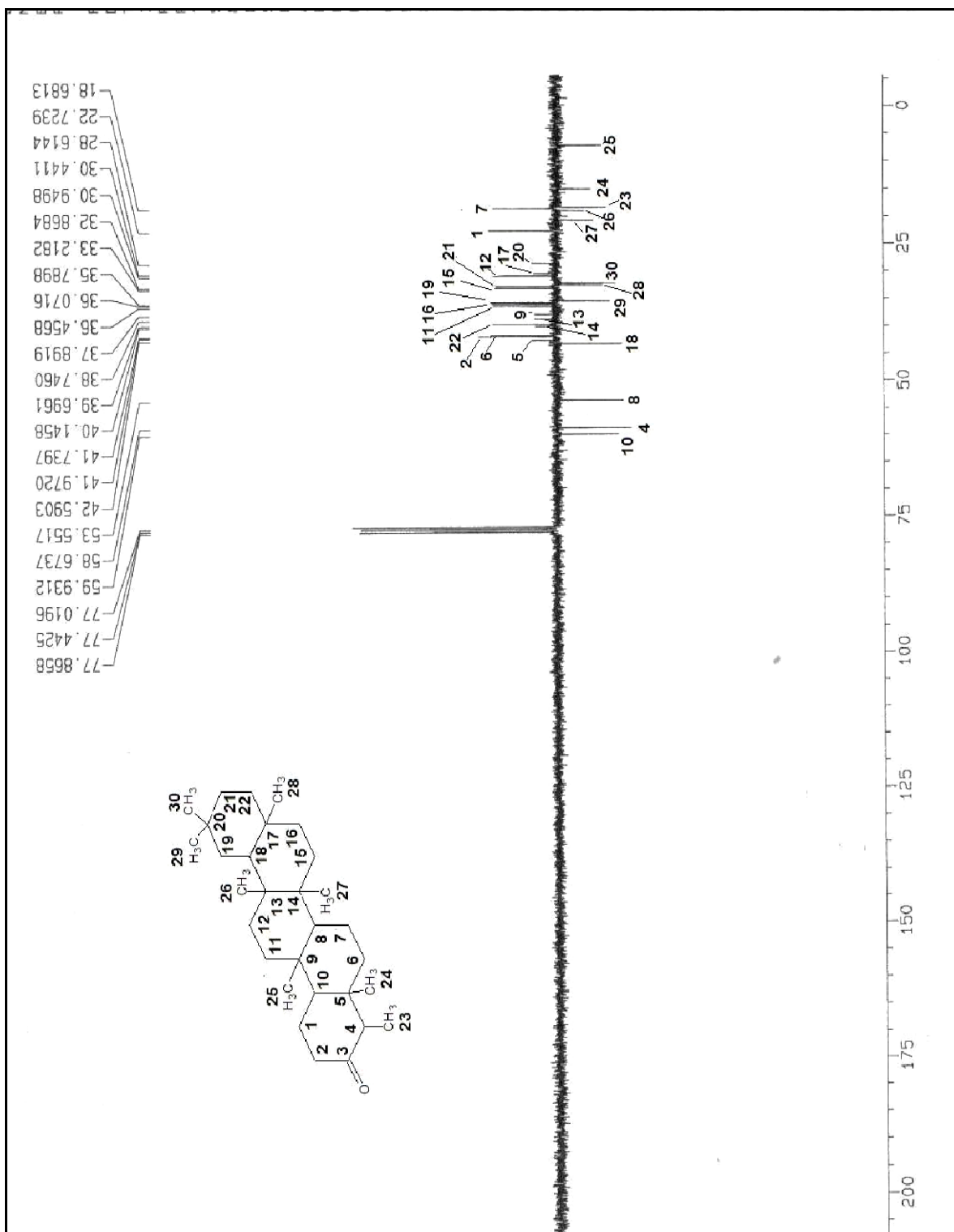
ANEXOS



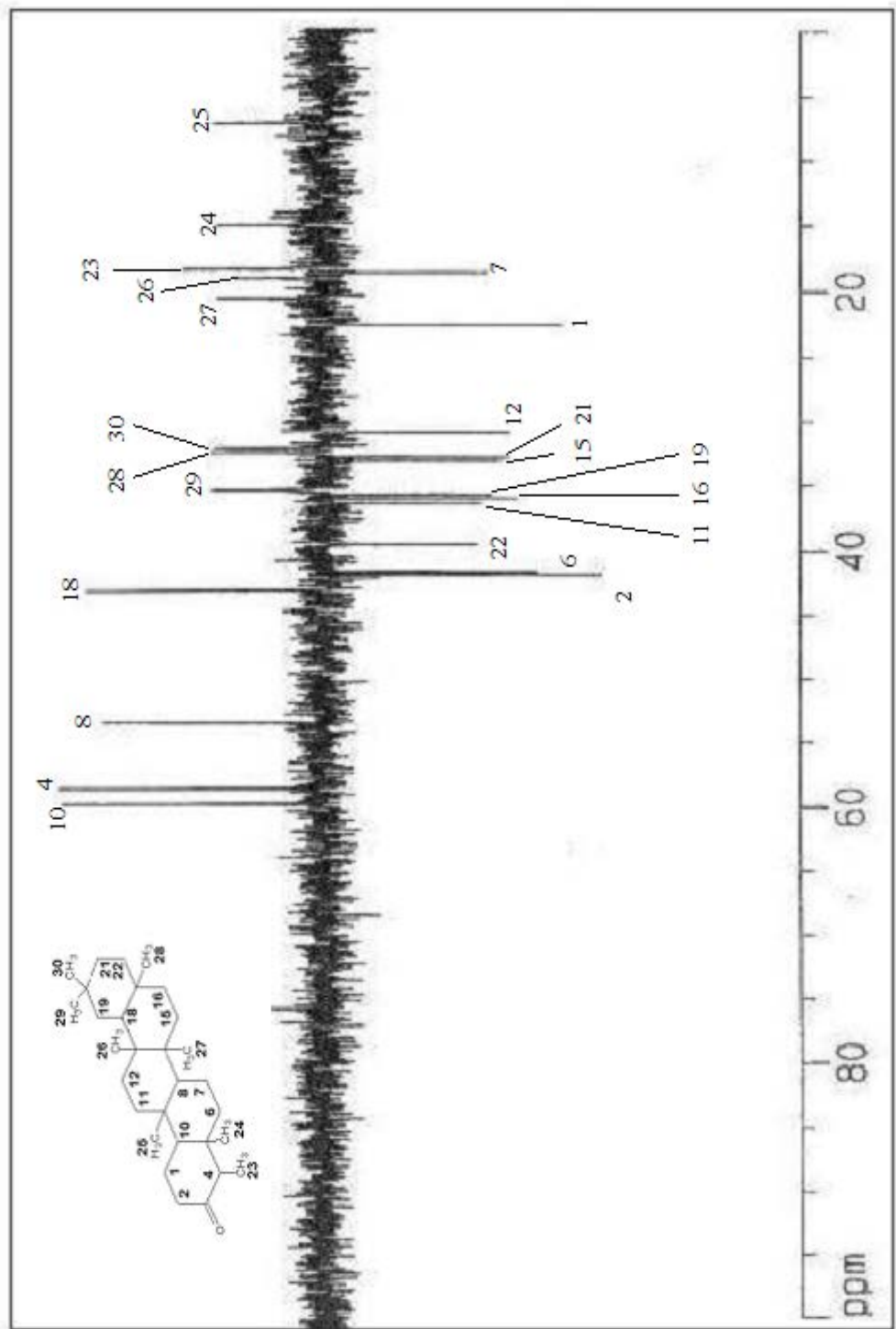
Anexo 1. Espectro IR del VL2



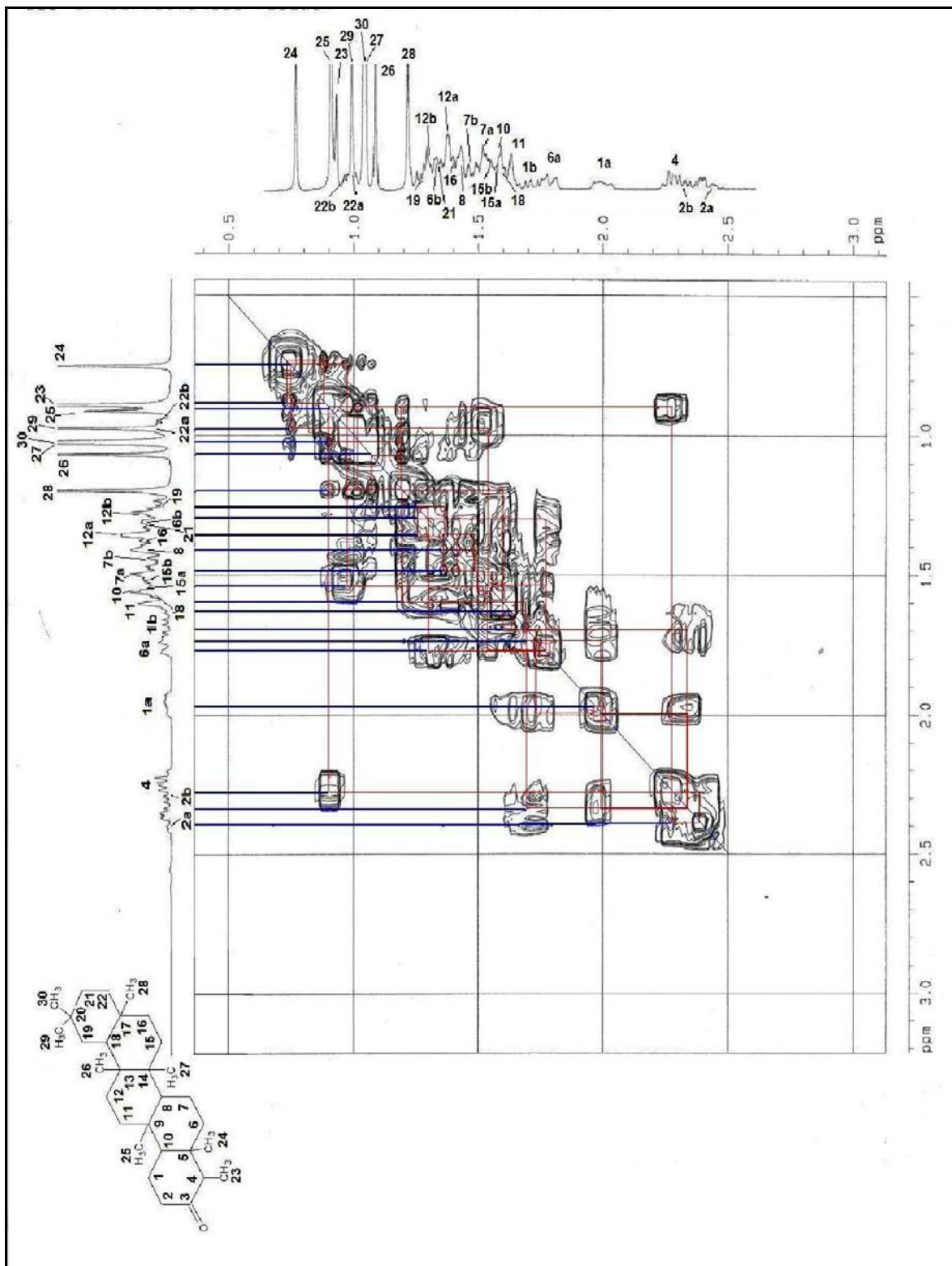
Anexo 2. Espectro RMN ¹H del VL2



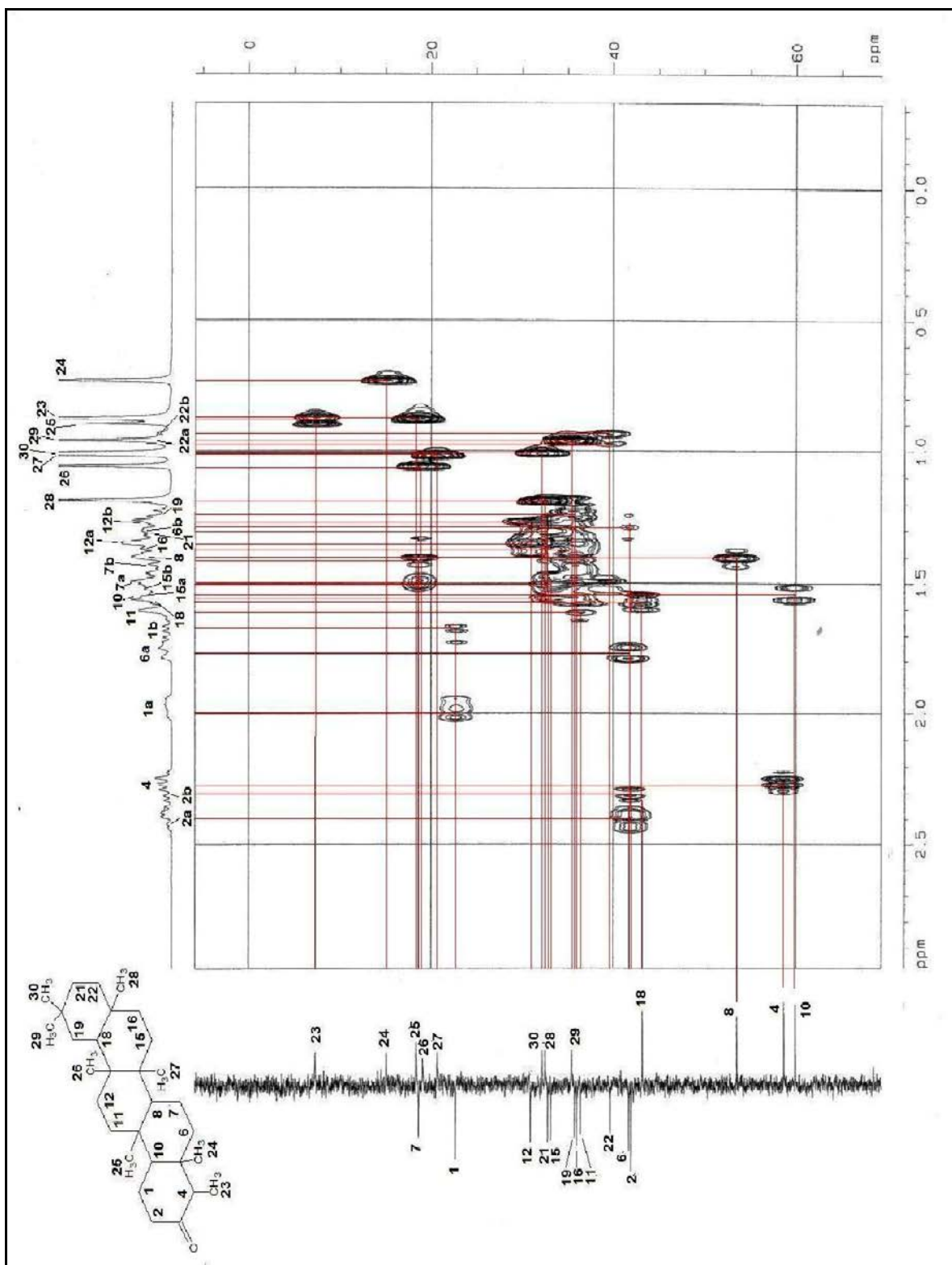
Anexo 3. Espectro JMOD del VL2



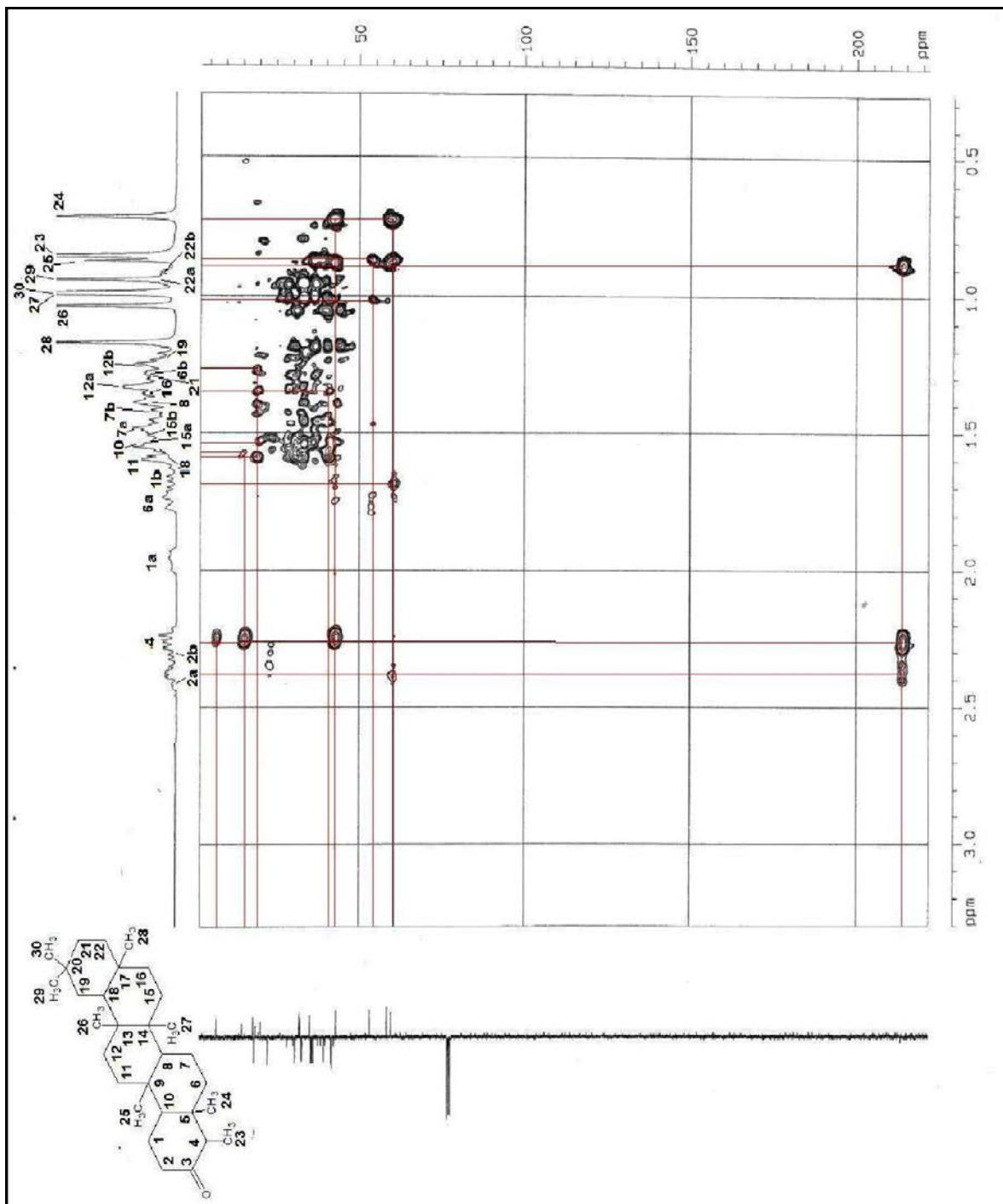
Anexo 4. Espectro DEPT del VL2



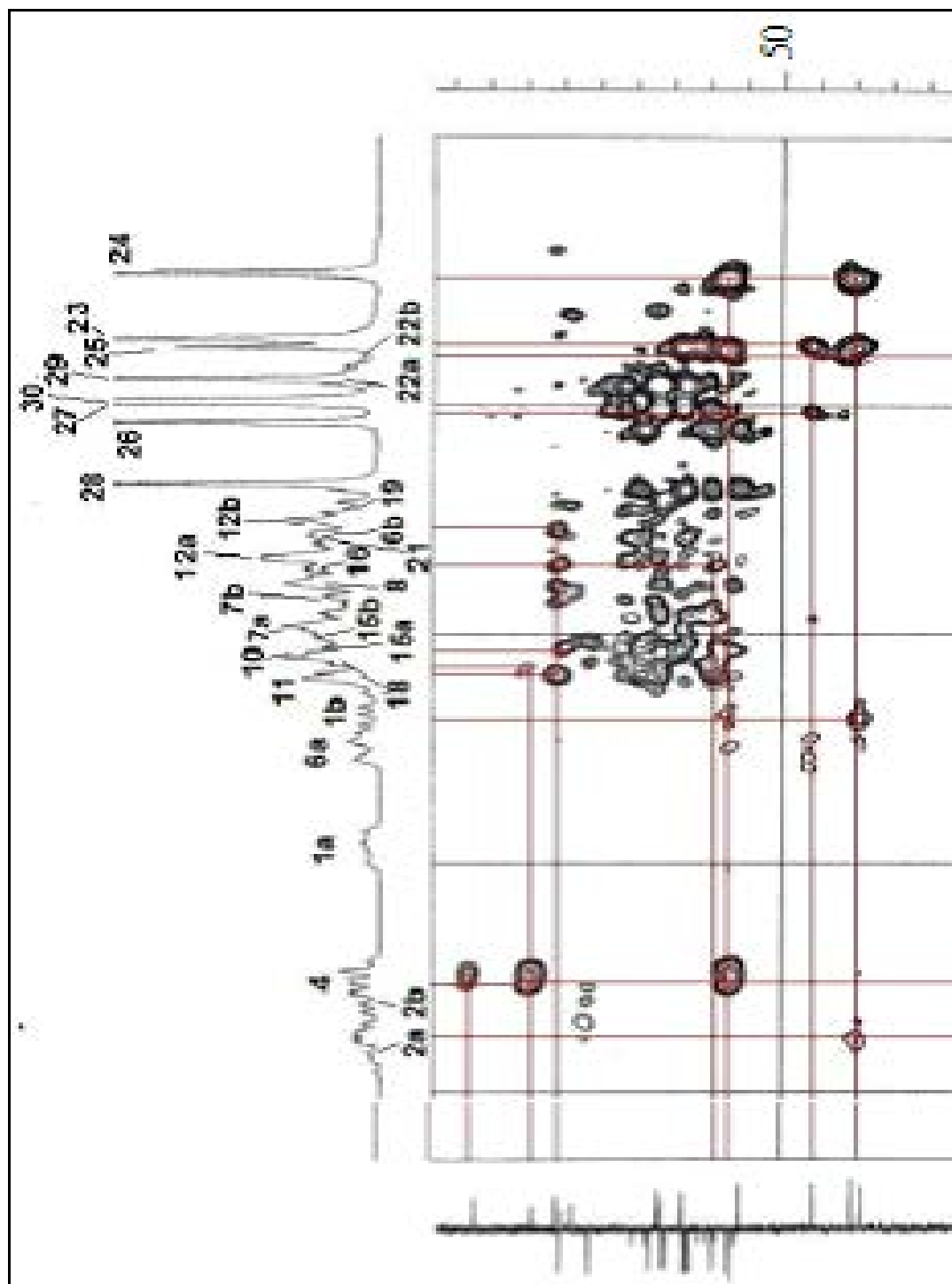
Anexo 5. Espectro COSY del VL2



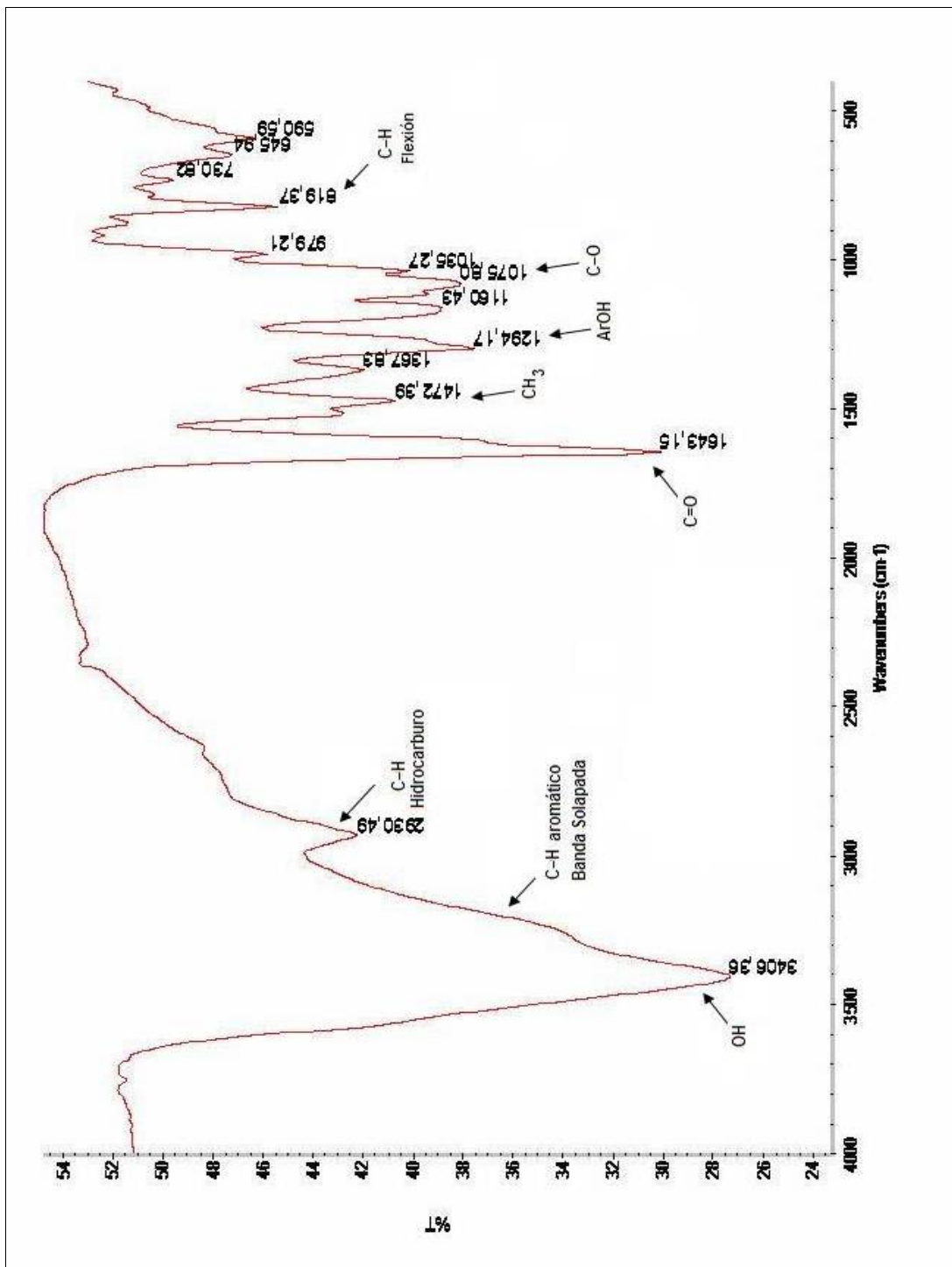
Anexo 6. Espectro HMQC del VL2



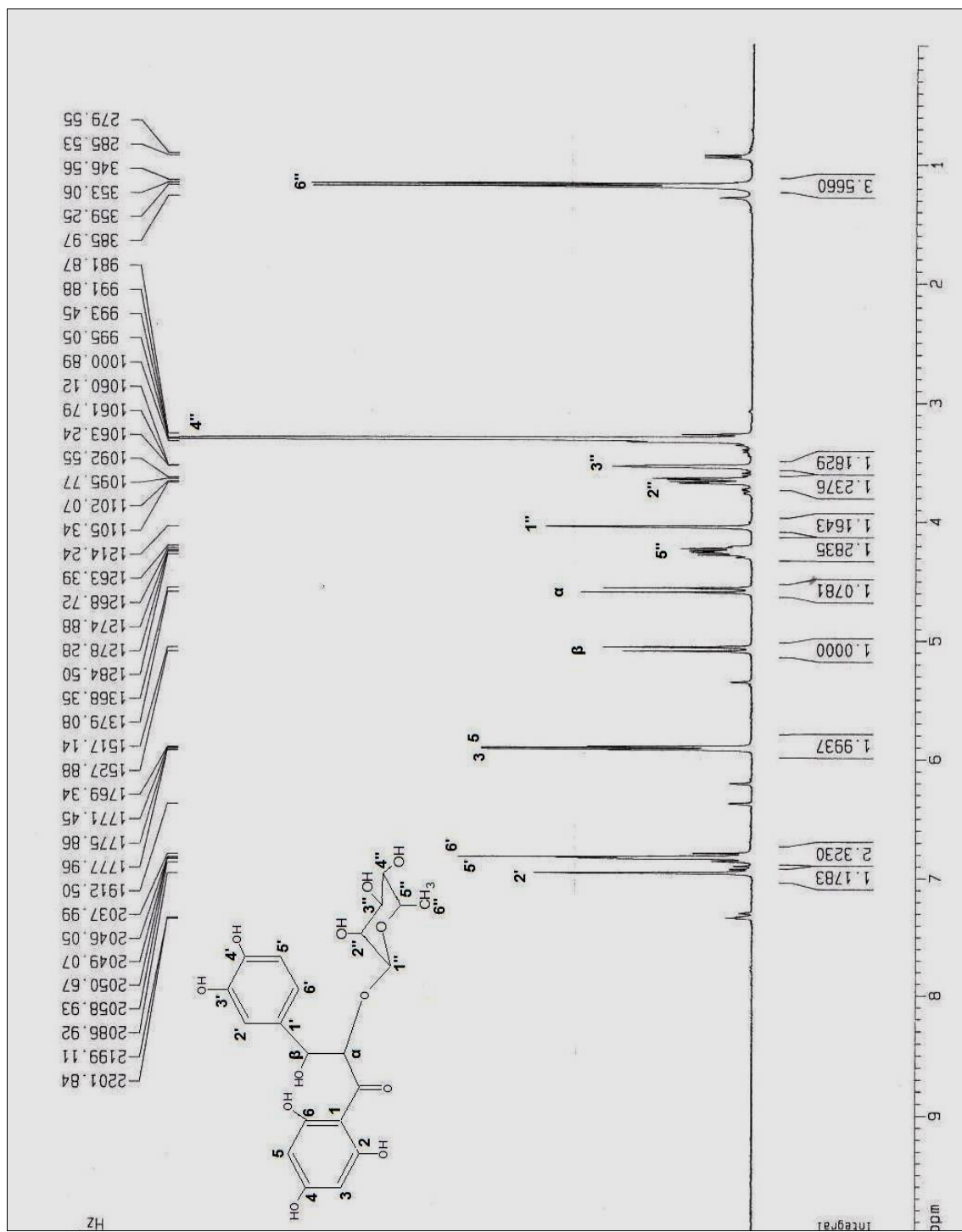
Anexo 7. Espectro HMBC VL2



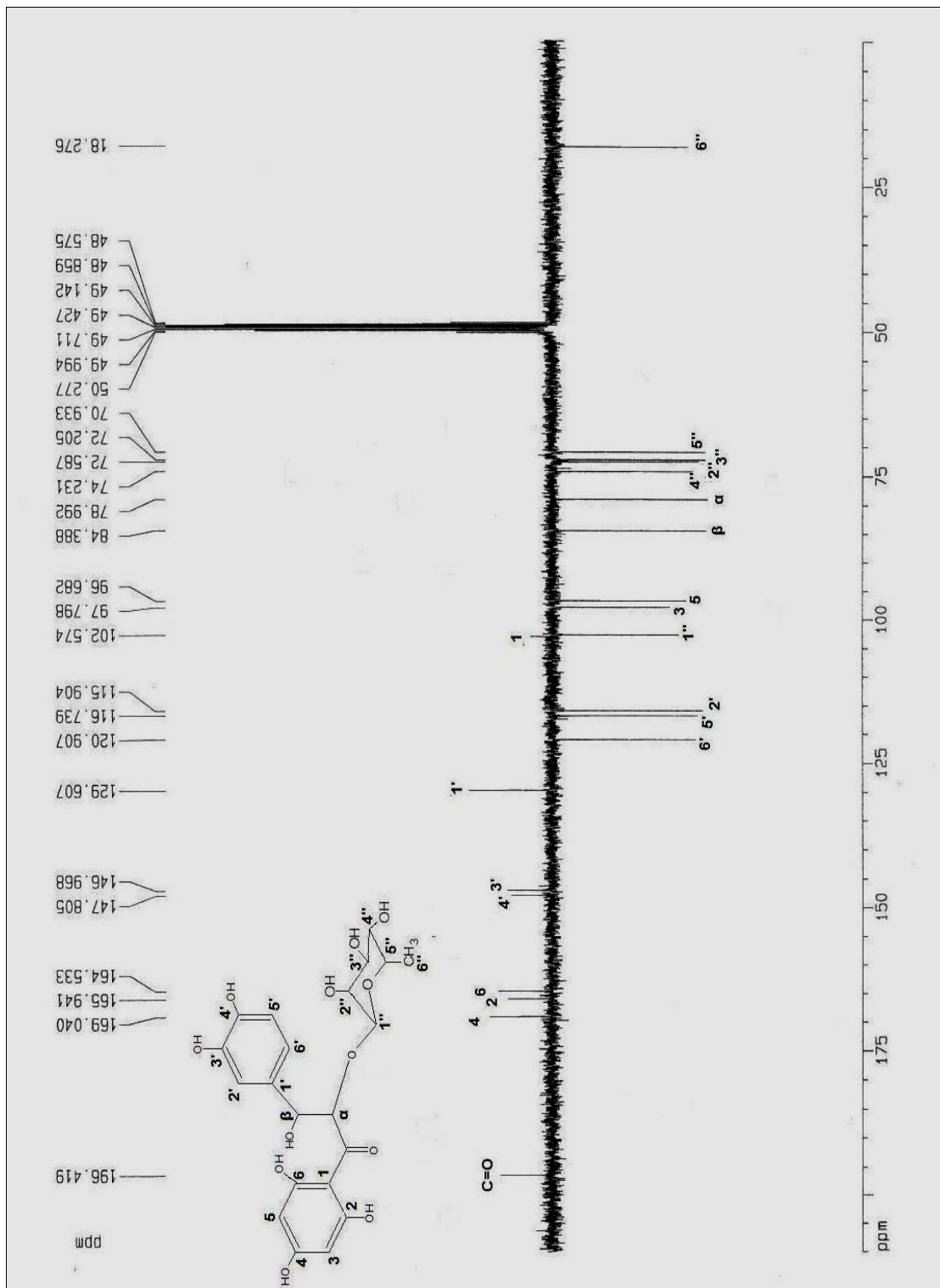
Anexo 8. Espectro HMBC VL2 (Expansión)



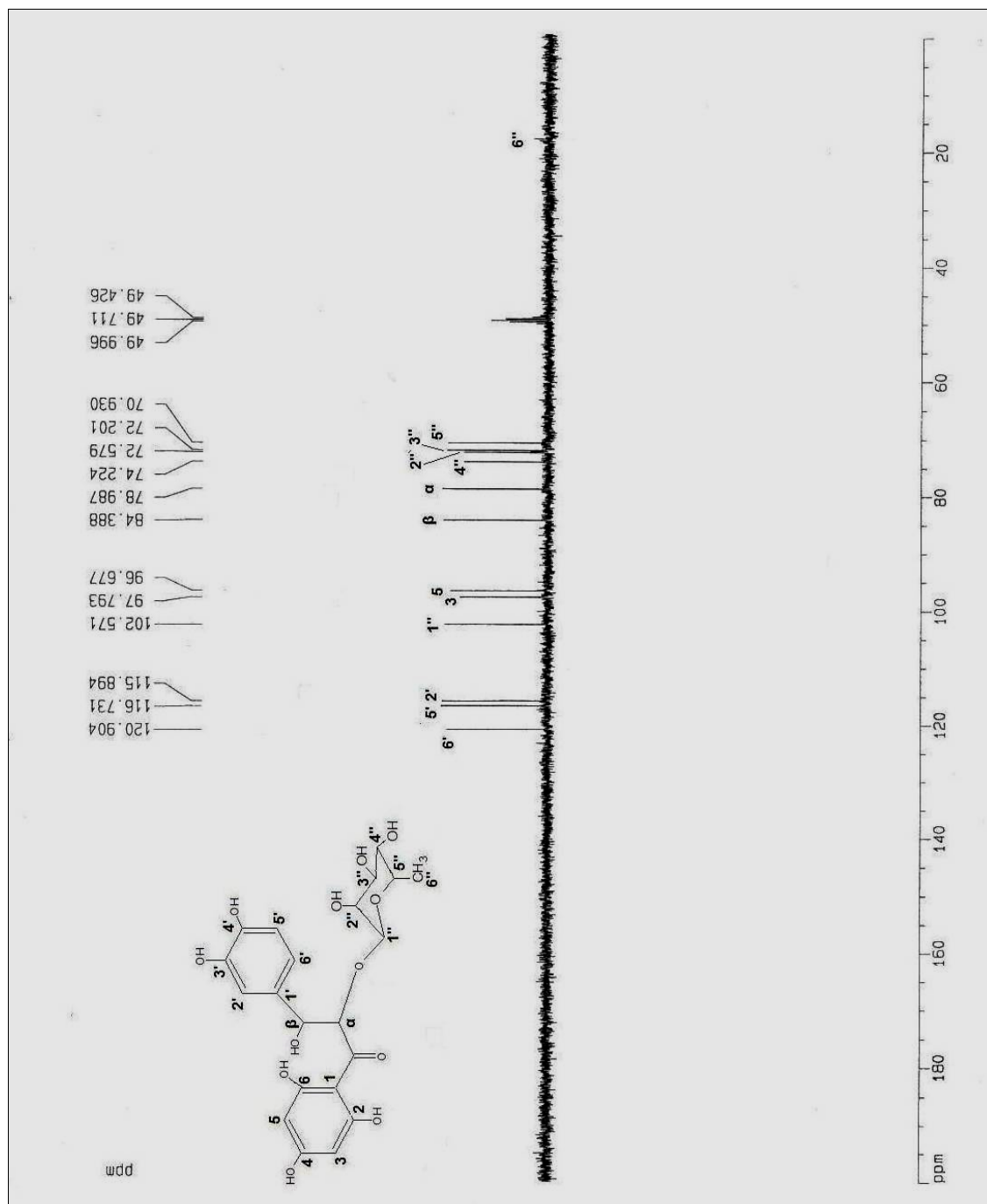
Anexo 9. Espectro IR del VL3



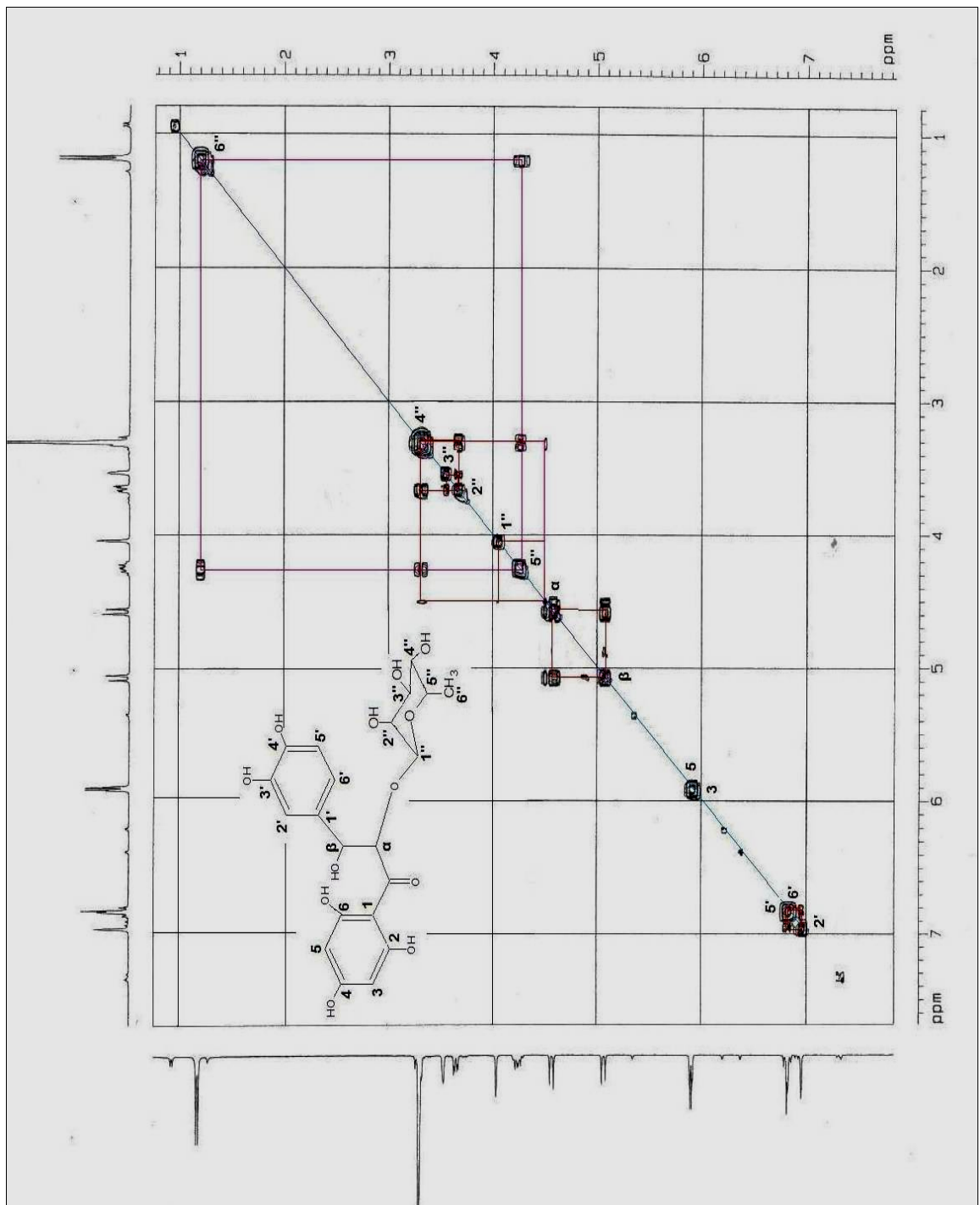
Anexo 10. Espectro RMN ¹H del VL3



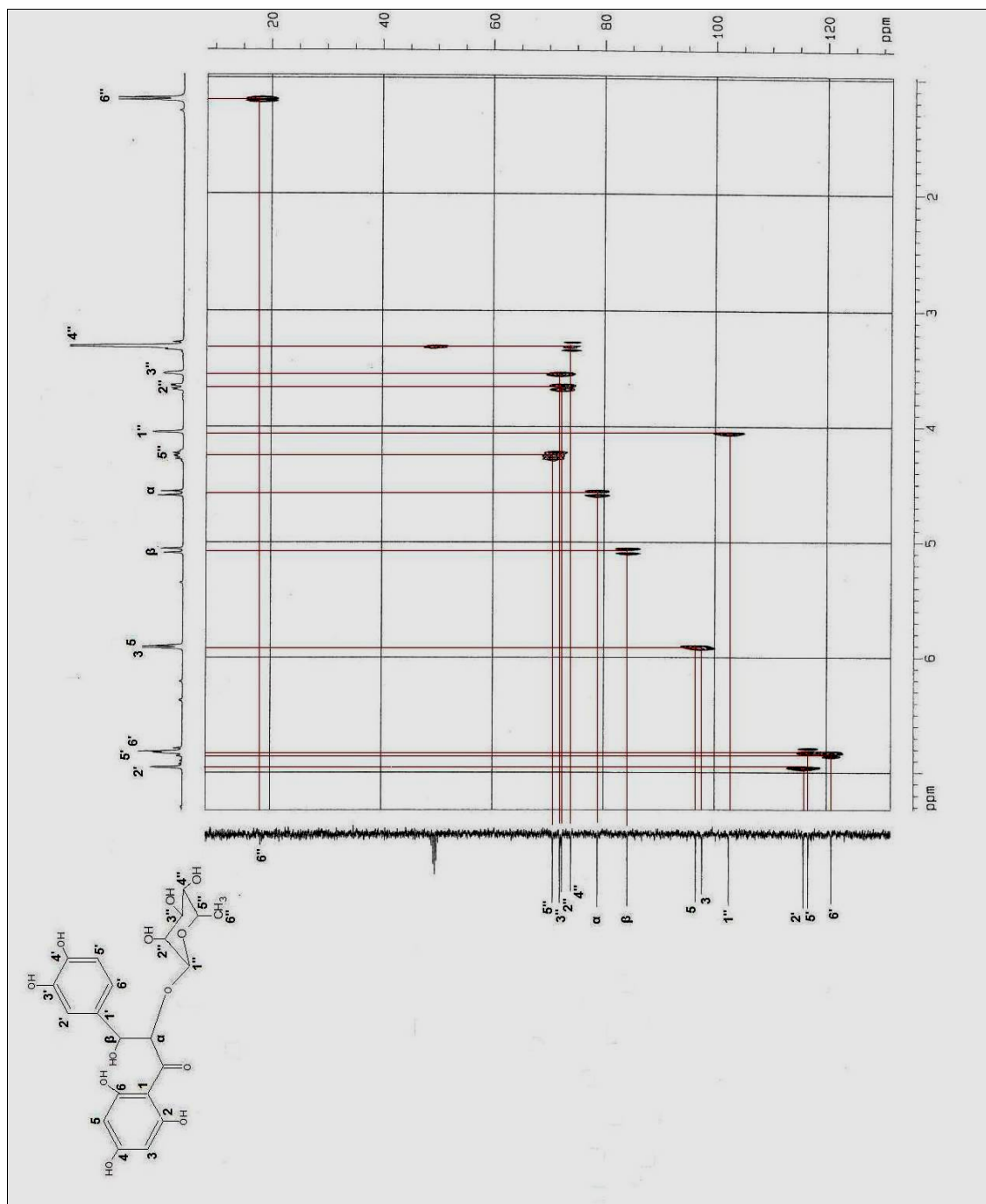
Anexo 11. Espectro JMOD del VL3



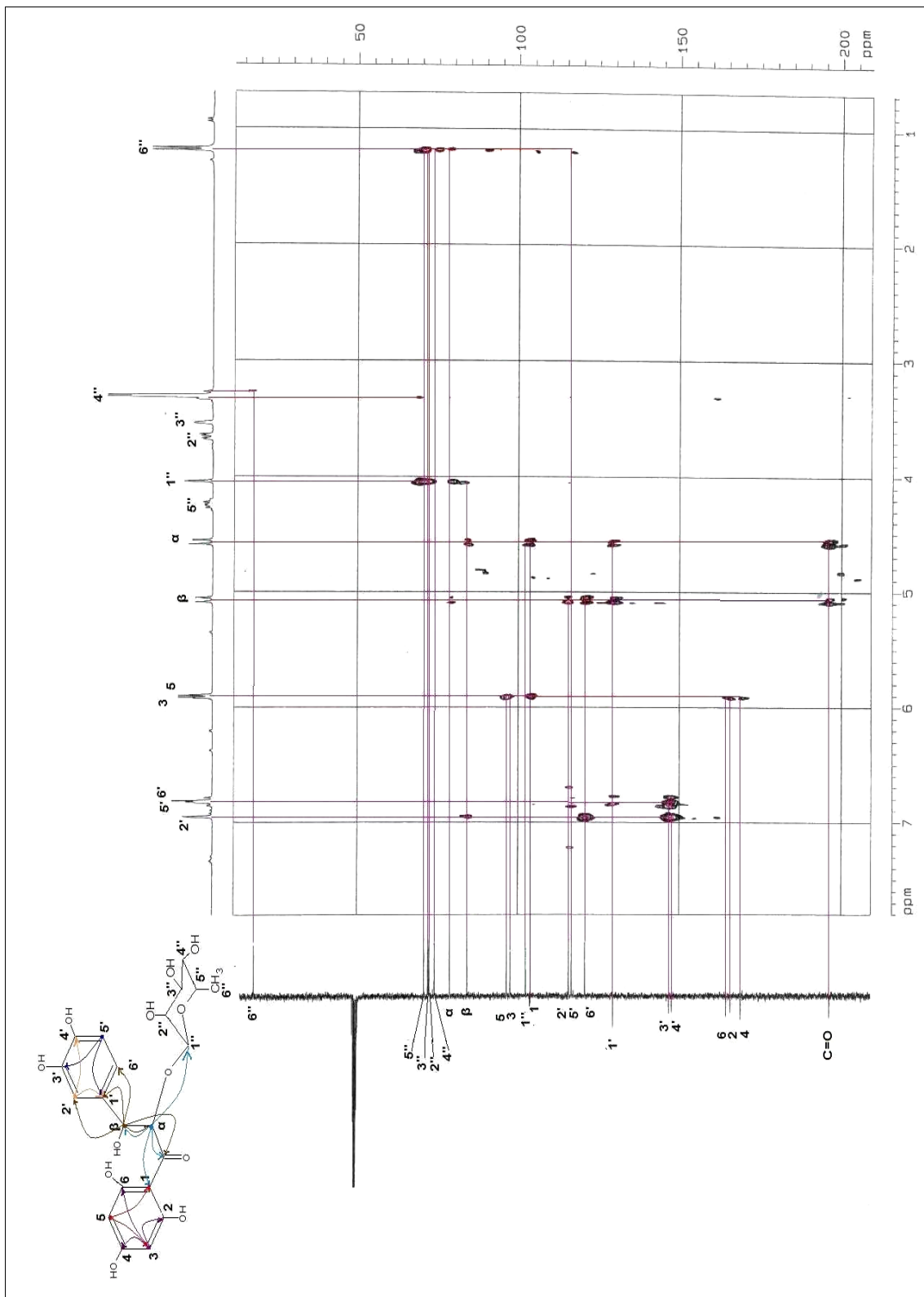
Anexo 12. Espectro DEPT del VL3



Anexo 13. Espectro COSY del VL3



Anexo 14. Espectro HMQC del VL3



Anexo 15. Espectro HMBC del VL3