

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES DEL LÁTEX DE *ASCLEPIAS*
CURASSAVICA POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹H Y ¹³C.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARVIN ALBERTO RAMÍREZ ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

MSc. BESSY EVELYN GÁLVEZ CARDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES DEL LÁTEX DE *ASCLEPIAS*
CURASSAVICA POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ^1H Y ^{13}C .**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARVIN ALBERTO RAMÍREZ ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

MSc. BESSY EVELYN GÁLVEZ CARDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES DEL LÁTEX DE *ASCLEPIAS*
CURASSAVICA POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹H Y ¹³C.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARVIN ALBERTO RAMÍREZ ALAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TRIBUNAL EVALUADOR:

Dr. GUILLERMO DÍAZ Crespín _____

Licda. MARÍA TRINIDAD TRIGUEROS DE CASTRO _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2020

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES:

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

RECTOR

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

SECRETARIO GENERAL

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FISCAL GENERAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

Lic. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA

DECANO

Lic. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

SECRETARIO

Lic. NELSON MAURICIO COTO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

DEDICATORIA

A mi madre.

Con todo mi cariño, admiración y respeto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de El Salvador, por darme los medios y recursos necesarios para una formación profesional.

A mis asesores: Dr. Alex Adonai Osorio y MSc. Bessy Evelyn Gálvez, por la asesoría brindada en la elaboración de esta tesis, por guiarme en esta investigación y el interés que muestran en la superación de sus estudiantes.

Al Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, por la valiosa colaboración en la realización de experimentos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C , que dieron resultados importantes a esta investigación.

A los miembros del tribunal calificador: Dr. Guillermo Díaz Crespín y Licda. María Trinidad Trigueros de Castro, por sus comentarios y sugerencias durante la conclusión de esta tesis.

*Al Jardín Botánico de La Laguna, por colaborar en la identificación de *Asclepias curassavica* L.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mi madre Antonia Cecilia Alas y mi hermana Tania Vanessa, por su apoyo, paciencia y compañía. Gracias por siempre creer y confiar en mí.

A mi novia Jennifer Zamora, por su apoyo, comprensión y cariño, que es muy importante para mí

A mis amigos, y todas las personas que hicieron grata esta etapa de mi vida.

Índice de contenidos.

	Pág.
Resumen.	1
Capítulo I.	
1. Introducción.	2
Capítulo II.	
2. Objetivos.	6
2.1 Objetivo general.	7
2.2 Objetivos específicos.	7
Capítulo III.	
3. Marco teórico.	8
3.1 Generalidades de los esteroides.	9
3.2 Biosíntesis de los esteroides.	12
3.3 Generalidades de <i>Asclepias curassavica L.</i>	15
3.3.1 Información botánica.	16
3.3.2 Origen y distribución.	16
3.3.3 Descripción botánica.	17
3.3.4 Hábitat.	18
3.3.5 Composición.	18
3.3.6 Usos de <i>Asclepias curassavica</i> .	20
3.4 Método de obtención e identificación de esteroides.	20
3.4.1 Extracción.	20
3.4.1.1 Maceración.	21
3.4.1.2 Extracción líquido-líquido.	21
3.4.1.3 Eliminación de disolvente por destilación al vacío con rotavapor.	22
3.4.2 Cromatografía.	23
3.4.2.1 Cromatografía en capa fina analítica.	24
3.4.2.2 Cromatografía en capa fina preparativa.	25
3.4.2.3 Cromatografía en columna.	26

3.4.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño.	27
3.5 Espectroscopia de RMN ^1H y ^{13}C .	29
Capítulo IV.	
4 Metodología.	36
4.1 Tipo de estudio.	37
4.2 Investigación bibliográfica.	37
4.3 Investigación de laboratorio.	37
4.3.1 Recolección e identificación de las muestras de <i>Asclepias curassavica</i> .	37
4.3.2 Preparación de las muestras de <i>Asclepias curassavica</i> .	38
4.3.3 Maceración con etanol de las partes aeróbicas de <i>Asclepias curassavica</i> .	38
4.3.4 Obtención del extracto etanólico por destilación a presión reducida con rotavapor.	38
4.3.5 Eliminación del agua en el extracto por extracción líquido-líquido (diclorometano/agua).	39
4.3.6 Cromatografías en capa fina del extracto diclorometánico con diclorometano/metanol y ciclohexano/acetato de etilo.	40
4.3.7 Cromatografía A.	41
4.3.8 Cromatografía B.	44
4.3.9 Cromatografía B1.	45
4.3.10 Cromatografía B1A.	48
4.3.11 Cromatografía B1A1 y B1A2.	49
4.3.12 Cromatografía B1B y B1C.	52
4.3.13 Cromatografía B2.	53
4.3.14 Cromatografía en capa fina con ciclohexano/acetona a todos los compuestos obtenidos y prueba con reactivo de Baljet.	55
4.3.15 Identificación de los metabolitos secundarios por RMN ^1H y ^{13}C .	56
4.3.16 Esquema del procedimiento experimental para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Asclepias curassavica</i> .	58
Capítulo V.	

5. Resultados y discusión.	59
5.1 Compuestos aislados.	60
5.2 Selección de los compuestos por análisis de espectros de RMN ^1H .	60
5.3 Elucidación de estructuras por el análisis de espectros de RMN ^1H y ^{13}C .	62
5.3.1 Compuesto B1A1b.	62
5.3.2 Compuesto B1A2c.	68
5.3.3 Compuesto B1B2.	74
5.3.4 Compuesto B2C.	80
Capítulo VI.	
6. Conclusiones.	86
Capítulo VII.	
7. Recomendaciones.	88
Capítulo VIII.	
8. Referencias bibliográficas.	90
Capítulo IX.	
9. Anexos.	97
Glosario	102

Índice de figuras.

	Pág.
Figura 1. Gráfica del porcentaje de drogas de productos naturales y sus derivados versus los años en que fueron aprobados.	3
Figura 2. Esquema general de las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas.	5
Figura 3. Estructura general y nombre de algunos esteroides.	10
Figura 4. Tipos de sistemas de anillos que presentan los esteroides	11
Figura 5. Estructura esteroidal de las hormonas sexuales.	12
Figura 6. Formación del intermediario 2,3-Oxidoscualeno	12
Figura 7. Esquema biosintético para formación de lanosterol y cicloartenol.	14
Figura 8. Formación del doble enlace C5-C6 en el colesterol.	15
Figura 9. Distribución mundial de <i>Asclepias curassaviaca L.</i>	16
Figura 10. Detalles de hojas, tallos, flores y semillas de <i>Asclepias curassavica L.</i>	17
Figura 11. Estructura de algunos esteroides de <i>Asclepias curassavica L.</i>	19
Figura 12. Mariposa monarca.	20
Figura 13. Balones con muestra vegetal en proceso de maceración.	21
Figura 14. Extracción líquido – líquido.	22
Figura 15. Sistema rotavapor.	23
Figura 16. Cromatografía en capa fina.	25
Figura 17. Cromatografía en placa fina preparativa.	26
Figura 18. Cromatografía en columna de sílica gel.	27
Figura 19. Cromatografía de exclusión por tamaño.	28
Figura 20. Espectrómetro de RMN.	31
Figura 21. Espín nuclear.	31
Figura 22. Estados de energía α y β de los núcleos con espín-1/2 en presencia de un campo magnético B_0 .	32
Figura 23. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del 2,4-dimetilpentano.	34
Figura 24. Las áreas relativas del multiplete n+1 dadas por el triángulo de Pascal.	35

Figura 25.	Muestra de <i>Asclepias curassavica</i> seca.	38
Figura 26.	Balón con extracto etanólico de <i>Asclepias curassavica</i> .	39
Figura 27.	Eliminación del agua en el extracto etanólico de <i>Asclepias curassavica</i> .	39
Figura 28.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención del extracto diclorometánico de <i>Asclepias curassavica</i> .	40
Figura 29.	TLC analítica del extracto diclorometánico con fase móvil de CH ₂ Cl ₂ /MeOH.	40
Figura 30.	TLC analítica del extracto diclorometánico con fase móvil de Cy/AcOEt.	41
Figura 31.	Columna de sílica gel y las 82 fracciones obtenidas.	42
Figura 32.	Cromatografía en capa fina a las 82 fracciones de la cromatografía A.	43
Figura 33.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de la reunión de la fracción 22 a la 44 resultado de la cromatografía A.	44
Figura 34.	Columna de sephadex LH-20.	44
Figura 35.	Cromatografía en capa fina a las 38 fracciones de la cromatografía B.	45
Figura 36.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 4 a la 24 y la de la fracción 25 a la 30 que resultaron de la cromatografía B.	45
Figura 37.	Columna de sílica gel y las 63 fracciones obtenidas.	46
Figura 38.	Cromatografía en capa fina a las 63 fracciones de la cromatografía B1.	47
Figura 39.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 4 a la 28, de la fracción 35 a la 42 y la de la fracción 43 a la 54 que resultaron de la cromatografía B1.	47
Figura 40.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 7 a la 18 y la de la fracción 19 a la 34 que resultaron de la cromatografía B1A.	48
Figura 41.	Hoja de cromatografía en capa fina en la que se desarrolló la cromatografía B1A1.	49
Figura 42.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1A1a, B1A1b, B1A1c, B1A1d y B1A1e.	50

Figura 43.	Hoja de cromatografía en capa fina en la que se desarrolló la cromatografía B1A2.	51
Figura 44.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1A2a, B1A2b, B1A2c, B1A2d y B1A2e.	52
Figura 45.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1B1 y B1B2.	52
Figura 46.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1C1 y B1C2.	53
Figura 47.	Desarrollo de la cromatografía B2.	54
Figura 48.	Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B2A, B2B y B12C.	55
Figura 49.	Revelación de manchas con reactivo de Oleum y Baljet.	56
Figura 50.	Viales con los metabolitos secundarios aislados del extracto diclorometánico de <i>Asclepias curassavica</i> .	57
Figura 51.	Resumen del procedimiento experimental para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Asclepias curassavica</i> L.	58
Figura 52.	Apilamiento de los espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de los compuestos B1A1a, B1A1b, B1A2d, B1B1 y B2B.	61
Figura 53.	Apilamiento de los espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de los compuestos B1A1d, B1A2b, B1A2c, B1A2e, B1B2 y B1C1.	62
Figura 54.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A1b.	63
Figura 55.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A1b.	64
Figura 56.	Apilamiento del espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A1b y el espectro de RMN ^1H simulado para el dodecanoato de etilo.	66
Figura 57.	Apilamiento del espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A1b y el espectro de RMN ^{13}C simulado para el dodecanoato de etilo.	66
Figura 58.	Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto B1A1b.	68
Figura 59.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A2c.	69
Figura 60.	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A2c.	70

Figura 61.	Apilamiento del espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de B1A2c y el espectro de RMN ¹ H simulado para el estigmasterol.	73
Figura 62.	Apilamiento del espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 151 MHz) de B1A2c y el espectro de RMN ¹³ C simulado para el estigmasterol.	73
Figura 63.	Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto B1A2c.	74
Figura 64.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de B1B2.	75
Figura 65.	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 151 MHz) de B1B2.	76
Figura 66.	Apilamiento del espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de B1B2 y el espectro de RMN ¹ H simulado para el β -sitosterol.	79
Figura 67.	Apilamiento del espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 151 MHz) de B1B2 y el espectro de RMN ¹³ C simulado para el β -sitosterol.	79
Figura 68.	Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto B1B2.	80
Figura 69.	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de B2C.	81
Figura 70.	Estructura de las posibles identidades del triterpeno B2C.	82
Figura 71.	Apilamiento del espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de B2C y los espectros de RMN ¹ H simulados para el ácido morólico y ácido oleanólico.	84
Figura 72.	Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ¹ H para el compuesto B2C.	85
Figura 73.	Bandeja de ChemBioDraw Ultra 14.0.	99
Figura 74.	Bandeja de ACD/NMR Processor Academic Edition 12.0.	99
Figura 75.	Bandeja de MestReNova 6.0.2.	100
Figura 76.	Bandeja de NMR Predict.	100

Índice de tablas.

	Pág.
Tabla 1. Núcleos activos en Resonancia Magnética Nuclear.	29
Tabla 2. TLC analítica del extracto con Cy/AcOEt.	41
Tabla 3. TLC analítica del extracto con CH ₂ CL ₂ /MeOH.	41
Tabla 4. Cromatografía A: Cromatografía en columna de sílica gel.	42
Tabla 5. TLC analítica de las 82 fracciones con Cy/AcOEt.	44
Tabla 6. Cromatografía B: Cromatografía de exclusión por tamaño.	45
Tabla 7. Cromatografía B1: Cromatografía en columna de sílica gel.	46
Tabla 8. Cromatografía B1A: Cromatografía en columna de sílica gel.	48
Tabla 9. Cromatografía B1A1: Cromatografía en capa fina preparativa.	50
Tabla 10. Cromatografía B1A2: Cromatografía en capa fina preparativa.	51
Tabla 11. Cromatografía B1B: Cromatografía en capa fina preparativa.	52
Tabla 12. Cromatografía B1C: Cromatografía en capa fina preparativa.	53
Tabla 13. Cromatografía B2: Cromatografía en capa fina preparativa.	54
Tabla 14. Cromatografía en capa fina analítica de todos los compuestos con Cy/Ace.	56
Tabla 15. Compuestos aislados del extracto diclorometánico de <i>Asclepias curassavica</i> <i>L.</i>	57
Tabla 16. Datos generales de los compuestos aislados.	60
Tabla 17. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ¹ H y ¹³ C del dodecanoato de etilo.	65
Tabla 18. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ¹ H y ¹³ C del estigmasterol.	71
Tabla 19. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ¹ H y ¹³ C del β -sitosterol.	77
Tabla 20. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ¹ H del ácido morólico y ácido oleanólico.	82

Anexos.		Pág.
Anexo 1.	Constancia de identificación de <i>Asclepias curassavica</i> L.	98
Anexo 2.	Plataformas del software utilizado para procesar los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los metabolitos secundarios de <i>Asclepias curassavica</i> .	99
Anexo 3.	Preparación de reactivos reveladores.	101

Abreviaturas.

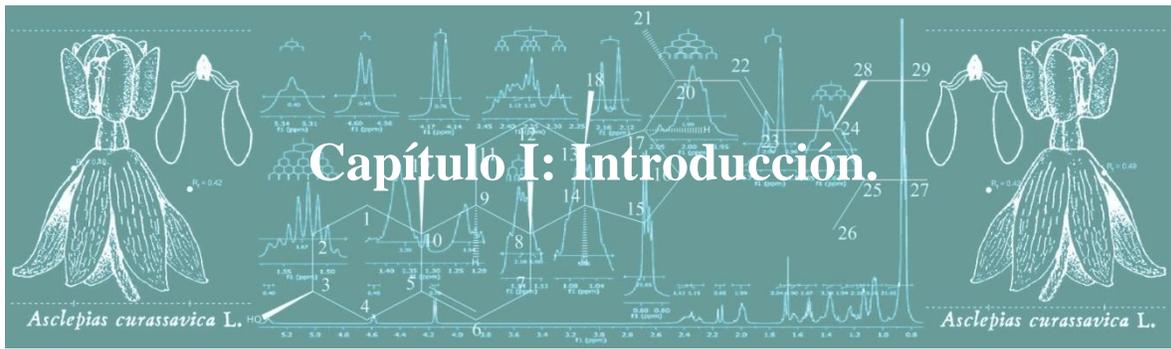
Ace	Acetona (del inglés: Acetone).
AcOEt	Acetato de etilo (del inglés: Ethyl acetate).
Cy	Ciclohexano (del inglés: Cyclohexane).
CoA	Coenzima A.
DRX	Difracción de Rayos X
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido o Dinucleótido de Flavina y Adenina (del inglés: Flavin Adenine Dinucleotide).
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (del inglés: Food and Drug Administration).
FID	Decaimiento de Inducción Libre (del inglés: Free Induction Decay).
GFC	Cromatografía de Filtración en Gel (del inglés: Gel Filtration Chromatography).
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel (del inglés: Gel Permeation Chromatography).
IR	Radiación Infrarroja (del inglés: Infrared Radiation).
MS	Espectrometría de Masas (del inglés: Mass Spectrometry).
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (del inglés: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate).
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
SEC	Cromatografía de Exclusión por Tamaño (del inglés: Size-Exclusion Chromatography).
TLC	Cromatografía en Capa Fina (del inglés: Thin Layer Chromatography).
TMS	Tetrametilsilano (del inglés: Tetramethylsilane).
UCR	Universidad de Costa Rica.
UES	Universidad de El Salvador.
UV	Ultravioleta (del inglés: Ultraviolet).

Resumen.

El presente trabajo trata acerca de la extracción de esteroides de *Asclepias curassavica* L. El aislamiento de cada uno de los metabolitos secundarios se realizó por técnicas cromatográficas a partir del extracto etanólico de la especie vegetal. Las técnicas cromatográficas que se utilizaron son: cromatografía en columna, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía en capa fina preparativa. El método de extracción de esteroides se tuvo que investigar, ya que en la Universidad de El Salvador (UES) no se tenían los disolventes necesarios para llevar a cabo el proceso de extracción recomendado en la bibliografía, por lo que se hicieron cromatografías en capa fina analítica antes de llevar a cabo cada etapa de extracción y fue con el fin de determinar las mezclas de disolventes disponibles que resultaran adecuadas como fase móvil en cada una de las cromatografías antes mencionadas. Las cromatografías en capa fina analítica también implicaron revelar los compuestos no coloreados, por lo que se utilizaron reactivos indicadores como el reactivo de Oleum y el reactivo de Baljet, y una lámpara ultravioleta (UV).

El resultado final de la extracción fueron 17 compuestos, de los cuales se caracterizaron 13 por RMN ^1H (Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1) y en base a los resultados obtenidos, se seleccionaron 3 compuestos para caracterizarlos por RMN ^{13}C (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13). Todos los compuestos se caracterizaron con equipos de RMN ^1H y ^{13}C de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Los programas que se utilizaron para la elucidación de las estructuras de los tres compuestos fueron mnova 10.0, ACD/1D NMR Processor 12.0, ChemBioDraw Ultra 12.0 y el simulador NMR Predict. Además de las tablas de RMN que proporciona la bibliografía.



1. Introducción.

Los productos naturales son compuestos orgánicos complejos producidos por sistemas vivos. La elucidación de sus estructuras y su química, síntesis y biosíntesis, son ámbitos principales de la química orgánica.¹ Estos compuestos han demostrado ser de mucha utilidad para combatir enfermedades a lo largo de la historia. En la antigüedad se desconocía de la composición química de las plantas, sin embargo, por experimentación, el ser humano logró reconocer sus propiedades medicinales y supo aprovecharlas. En la actualidad se conocen productos naturales de diversas fuentes tales como la penicilina que producen los hongos del género *penicilium* y que sirve para evitar infecciones, entre otros que también tienen actividad biológica en el organismo.² David Newman *et al*, han llevado un registro de nuevas drogas aprobadas como medicamentos en diversos países, principalmente los registrados por la FDA de Estados Unidos, desde 1981 hasta el 2014. La figura 1, que fue tomada del registro, evidencia la influencia de las drogas naturales y sus derivados, ya que los años en que más productos naturales se aprobaron fueron 1985, 1987, 2001 y 2010. Durante esos años el porcentaje de productos naturales aprobados fueron aproximadamente del 45%. En el registro de David Newman también se mencionan las fuentes principales de productos naturales y la necesidad de investigar nuevas drogas para aumentar la disponibilidad de medicamentos.³

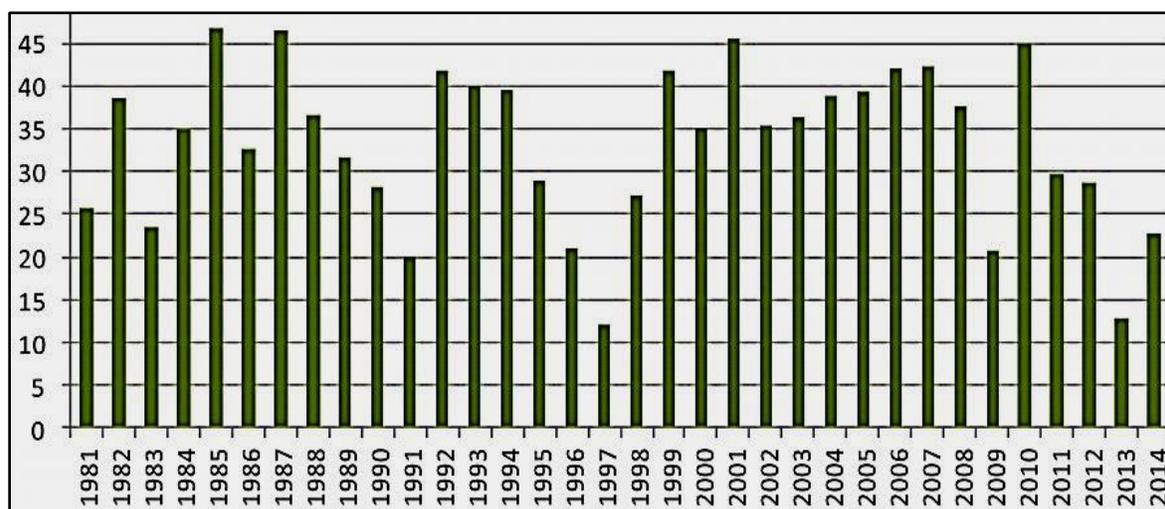


Figura 1. Gráfica del porcentaje de drogas de productos naturales y sus derivados versus los años en que fueron aprobados. Newman, D. J.; Gragg, G. M. *Natural Products as Source of New Drugs from 1982 to 2014*. *J. Nat. Prod.* 2016. 79. pp 629-661.

Los productos naturales pueden dividirse en tres grandes categorías:

- Metabolitos primarios. Son aquellos compuestos que están presentes en todas las células y juegan un papel central en el metabolismo y la reproducción de las células. Estos compuestos incluyen ácidos nucleicos, aminoácidos y azúcares comunes.⁴
- Material polimérico de alto peso molecular. Estos son compuestos como la celulosa, las ligninas y las proteínas que forman las estructuras celulares.⁴
- Metabolitos secundarios. Son compuestos característicos de un rango limitado de especies que han atraído el interés debido a su efecto biológico en otros organismos.⁴ Las clases de metabolitos secundarios son: Policétidos, ácidos grasos, terpenoides, esteroides, fenilpropanoides, alcaloides, aminoácidos especializados, péptidos especializados y carbohidratos especializados.⁴

Los productos naturales de interés en esta investigación, están clasificados en la categoría de metabolitos secundarios, por lo que es necesario abordar brevemente aspectos generales como su estructura y las bases con las que se inicia cada ruta biosintética. Por ejemplo, la estructura de los policétidos se forma por la combinación lineal de unidades de acetato (etanoato) derivadas del bloque de construcción acetil coenzima A (figura 2). Los terpenoides y esteroides se ensamblan a partir de isoprenoides derivados del pirofosfato de isopentenilo (3-metilbut-3-en-1-ilo). Los aminoácidos son los bloques de construcción de péptidos y proteínas. Aunque los aminoácidos se consideran normalmente como metabolitos primarios, hay algunos aminoácidos inusuales que tienen una reducida presencia. Algunos antibióticos, como la antes mencionada penicilina, se forman a partir de pequeños péptidos. Los alcaloides son un grupo estructuralmente diverso de productos naturales que contienen nitrógeno. Las porciones nitrogenadas de los alcaloides se derivan de aminoácidos tales como ornitina, lisina, tirosina o triptófano.⁴

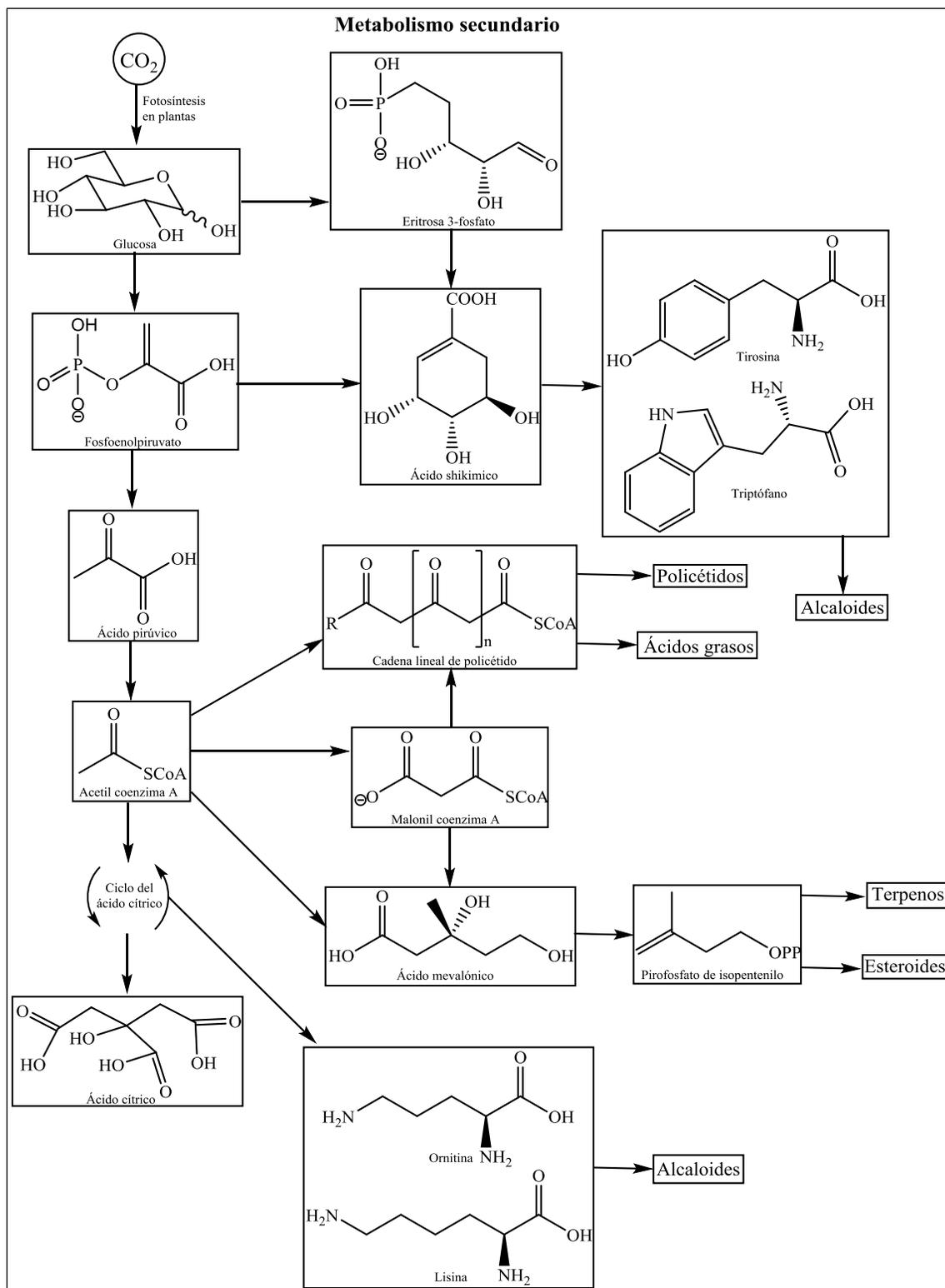
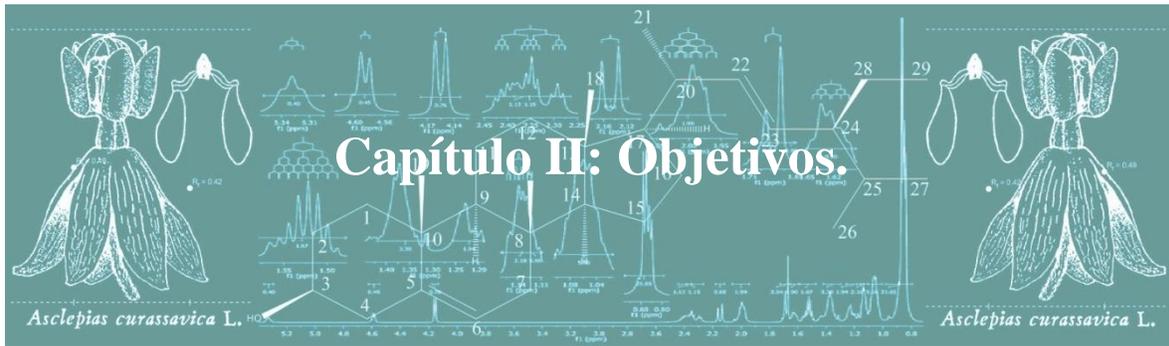


Figura 2. Esquema general de las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Natural Products. Organic Chemistry*. 2nd Ed. Oxford University Press. United States of America. 2004.



2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

- Identificar esteroides de *Asclepias curassavica L.*

2.2 Objetivos específicos.

- Obtener el extracto etanólico de *Asclepias curassavica L.*
- Aislar metabolitos secundarios del extracto por técnicas cromatográficas.
- Identificar los esteroides aislados del extracto etanólico de *Asclepias curassavica L.* mediante RMN ^1H y ^{13}C .



3. Marco teórico.

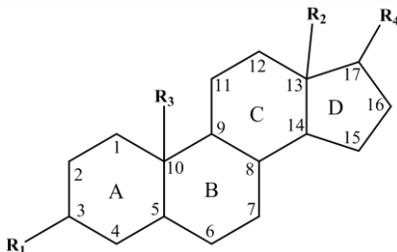
3.1 Generalidades de los esteroides.

Los esteroides son metabolitos secundarios que presentan una diversa variedad estructural, pero todos tienen en común un sistema de ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 3). El sistema consiste en cuatro anillos denominados como A, B, C y D. Los anillos A, B y C tienen seis miembros y D tiene cinco. La numeración de las posiciones de los carbonos inicia en el anillo A hasta llegar a D y luego se continúa la numeración de acuerdo a los radicales R₁, R₂, R₃ y R₄. El número total de carbonos varía entre los esteroides, por ejemplo, el gonano presenta 17 carbonos y otros esteroides pueden llegar a tener hasta 30.⁶

El gonano es el único esteroide que presenta átomos de hidrógeno en R₁, R₂, R₃ y R₄, mientras que el R₁ de los cardenólidos y bufadienólidos generalmente es un hidroxilo. A partir del estrano, el R₂ y R₃ son metilos, a los que se les asignan las posiciones 18 y 19, respectivamente.⁷

Lo que define la identidad de un esteroide y lo diferencia de los demás, es el radical R₄. Para el gonano, estrano y androstano, el R₄ es un átomo de hidrógeno y para el pregnano, colano, colestano, ergostano, estigmastano y poriferastano, son cadenas carbonadas que van aumentando el número de carbonos en el respectivo orden en que se han mencionado. En otros esteroides se presenta una lactona (radical R₄) unida al C17 del núcleo esteroideal y ésta define a los dos subgrupos: cardenólidos con un anillo insaturado de butirolactona y los bufadienólidos con una α -pirona.⁸ Otros de los compuestos que presentan anillos adicionales a los del sistema ciclopentanoperhidrofenantreno son espirostando y furostando. En otros casos se pueden presentar insaturaciones entre los anillos A, B y C del ciclopentanoperhidrofenantreno y en algunas cadenas carbonadas radicales R₄.⁷

La forma del sistema ciclopentanoperhidrofenantreno depende de la isomería entre las fusiones de los anillos (figura 4). Generalmente, los anillos A/B y C/D presentan fusión -cis y los anillos B/C están fusionados en -trans; mientras que los cardenólidos producidos por plantas de *Asclepiadaceae*, presentan anillos A/B con fusión -trans.⁸



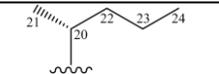
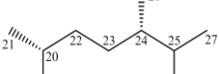
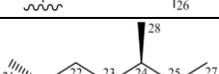
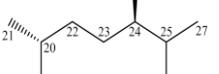
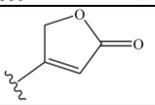
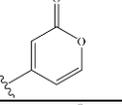
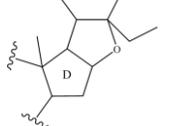
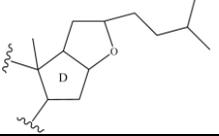
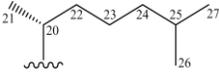
Nombre del esteroide	Sustituyentes			
	-R ₁	-R ₂	-R ₃	-R ₄
Gonano	-H	-H	-H	-H
Estrano	-H	-CH ₃	-H	-H
Androstano	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H
Pregnano	-H	-CH ₃	-CH ₃	-C ₂ H ₅
Colano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Colestano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Ergostano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Campestano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Estigmastano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Poriferastano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Cardenólido	-OH	-CH ₃	-CH ₃	
Bufadienólido	-OH	-CH ₃	-CH ₃	
Espirostano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Furostano	-H	-CH ₃	-CH ₃	
Colesterol (Δ^5)	-OH	-CH ₃	-CH ₃	

Figura 3. Estructura general y nombre de algunos esteroides. Jaeger, M. *Steroids and NMR. Annu. Rep. NMR Spectro.* 77. 2012. pp 115-258.

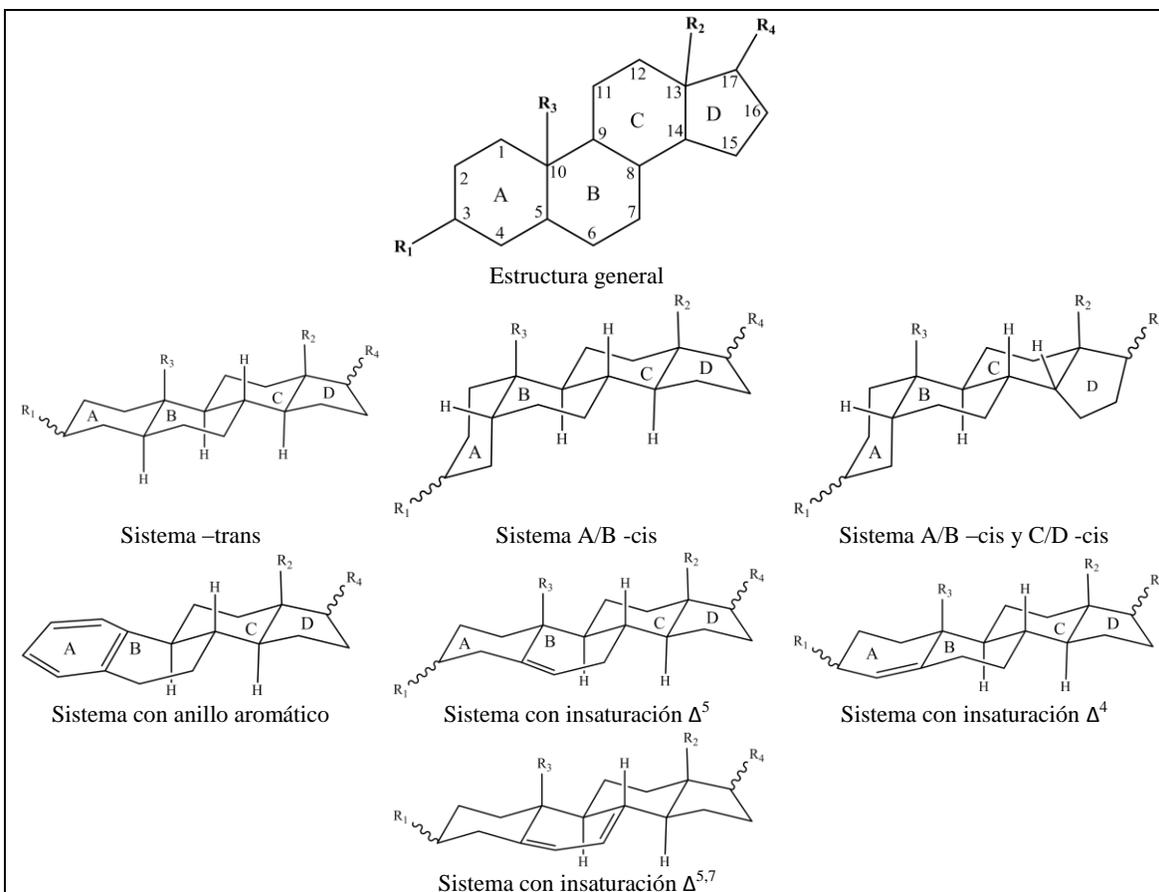


Figura 4. Tipos de sistemas de anillos que presentan los esteroides. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3rd Ed. Wiley-Blackwell. Oxford. United Kingdom. 2009.

La disponibilidad, la cristalinidad y la conformación bien definida de los esteroides, los convierte en sustratos adecuados para investigar la influencia de los factores estéricos en la velocidad de los mecanismos de reacción. El colesterol forma un constituyente importante de las membranas lipídicas, y es típico encontrarlo en mamíferos, mientras que el ergosterol en las plantas y hongos.⁸ Entre las hormonas esteroidales, los progestágenos (por ejemplo, progesterona) y los estrógenos (por ejemplo, estradiol) son hormonas femeninas responsables de las características sexuales femeninas, para el mantenimiento del embarazo y para el control del ciclo menstrual. Los estrógenos y progestágenos modificados se usan en los anticonceptivos orales. Algunos cánceres de seno son dependientes de estrógenos.⁸ El sistema de enzimas aromatasa, que cataliza la conversión de testosterona a estradiol, es objeto de estudio para la quimioterapia contra el cáncer.⁸ Los andrógenos como la testosterona son hormonas sexuales masculinas (figura 5). Una de las propiedades que tienen los andrógenos es el efecto estimulante sobre el desarrollo de los músculos (efecto

anabólico). Los esteroides anabólicos se han utilizado para estimular el crecimiento de la carne del ganado.¹⁰

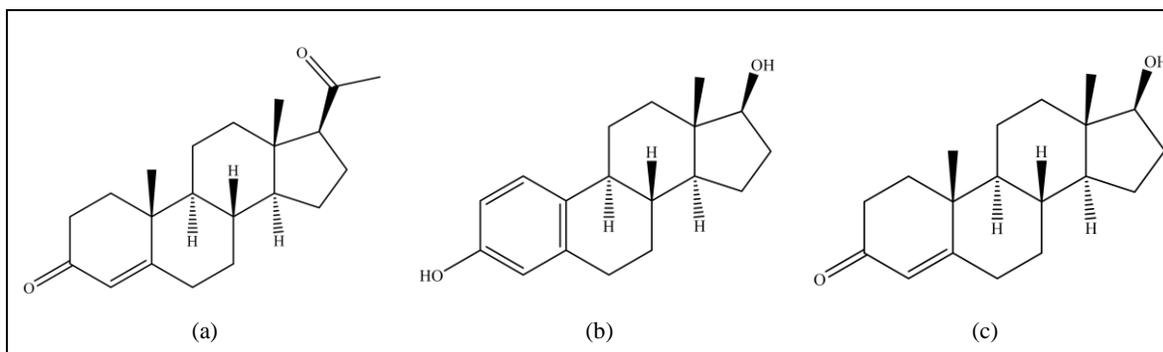


Figura 5. Estructura esteroidal de las hormonas sexuales. (a) Progesterona. (b) Estradiol. (c) Testosterona. Bennet, R. N.; Wallsgrove, R. M. *Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. New Phytol.* 1994. 127. pp 617-633.

3.2 Biosíntesis de los esteroides.

Los esteroides son triterpenos que carecen del gem-dimetilo situado sobre C4 y el metilo sobre C14, lo que los diferencia de otros triterpenos.⁹

En la ruta biosintética de los esteroides, la ciclación del escualeno se efectúa vía el intermediario 2,3-oxidoscualeno en una reacción de protonación y apertura del anillo epóxido, catalizada por la enzima escualeno epoxidasa (figura 6). La serie de triterpenos policíclicos que se forman en esta ruta, pueden racionalizarse como un conjunto de ciclaciones y migraciones concertadas tipo Wagner-Meerwein de grupos metilo e hidruro, a través de la formación de carbocationes.⁹

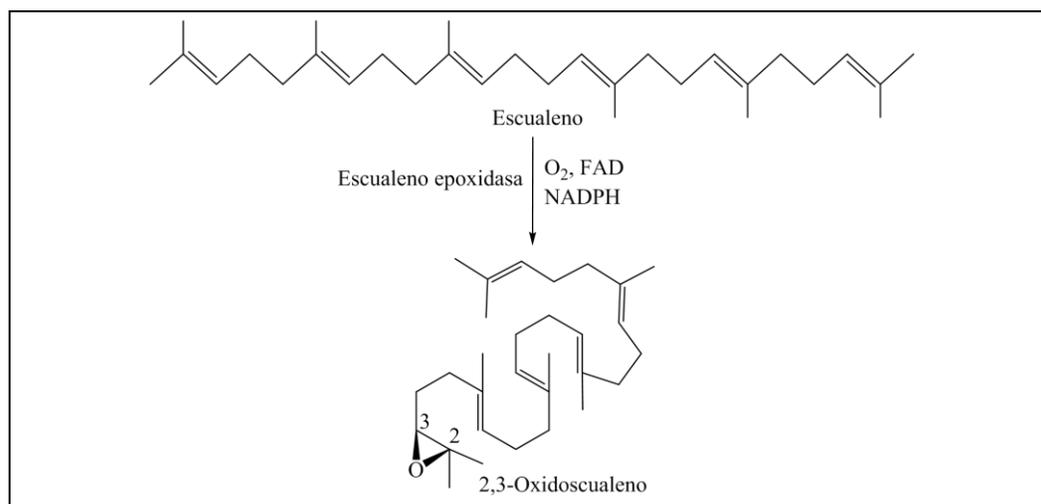


Figura 6. Formación del intermediario 2,3-Oxidoscualeno. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach.* 3rd Ed. Wiley-Blackwell. Oxford. United Kingdom. 2009.

Así, el proceso iniciado con la protonación y apertura del epóxido del 2,3- oxidoescualeno, origina carbocationes terciarios, lo que facilita la adición electrofílica a los dobles enlaces hasta la formación del catión protosterilo, a partir del que se biosintetiza, por un lado lanosterol en animales y hongos (figura 7a) y, por otro cicloartenol en plantas y algas (figura 7b).¹¹

Cabe mencionar así que, los primeros pasos en la biosíntesis de esteroides en plantas y animales son comunes, a excepción de que en las plantas el lanosterol es sustituido por el cicloartenol, que contiene un anillo de tres miembros (C9, C10, C19) en lugar del doble enlace presente en el lanosterol.¹¹

El siguiente paso en la biosíntesis de esteroides en plantas, es la transformación del cicloartenol en colesterol, la cual transcurre a través de la pérdida del metilo en C14, pérdida del gem-dimetilo en C4 por descarboxilación oxidativa y finalmente, apertura del anillo de ciclopropano, formando el doble enlace C8-C9 que, posteriormente, migra a C5-C6 (figura 8). Esta secuencia de reacciones involucra una isomerización alílica, una deshidrogenación y una reducción de doble enlace, conduciendo a la formación de colesterol. A pesar que la mayoría de los tejidos vegetales contienen sólo trazas de colesterol, este esterol es el precursor biogénico de esteroides en plantas, tales como sapogeninas, glicósidos y alcaloides.¹¹

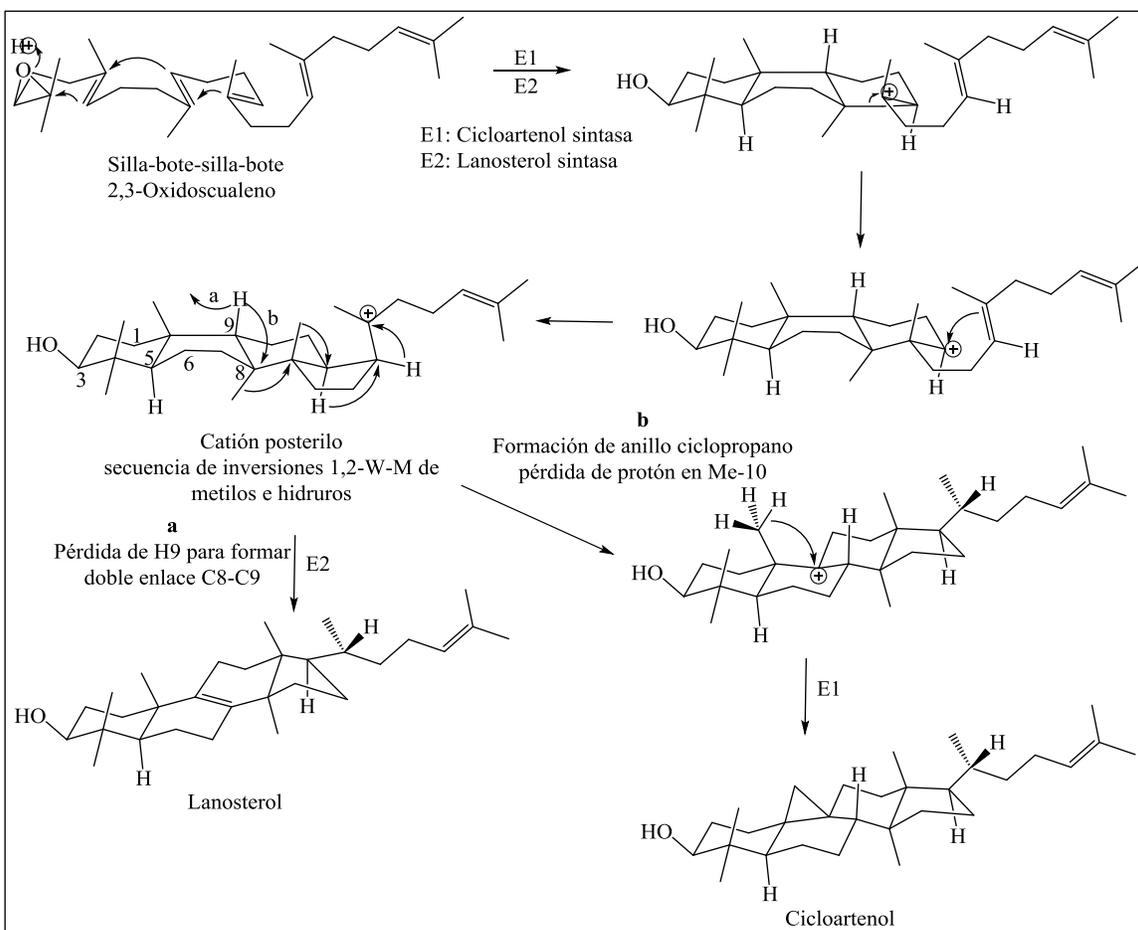


Figura 7. Esquema biosintético para la formación de lanosterol y cicloartenol. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3rd Ed. Wiley-Blackwell. Oxford. United Kingdom. 2009.

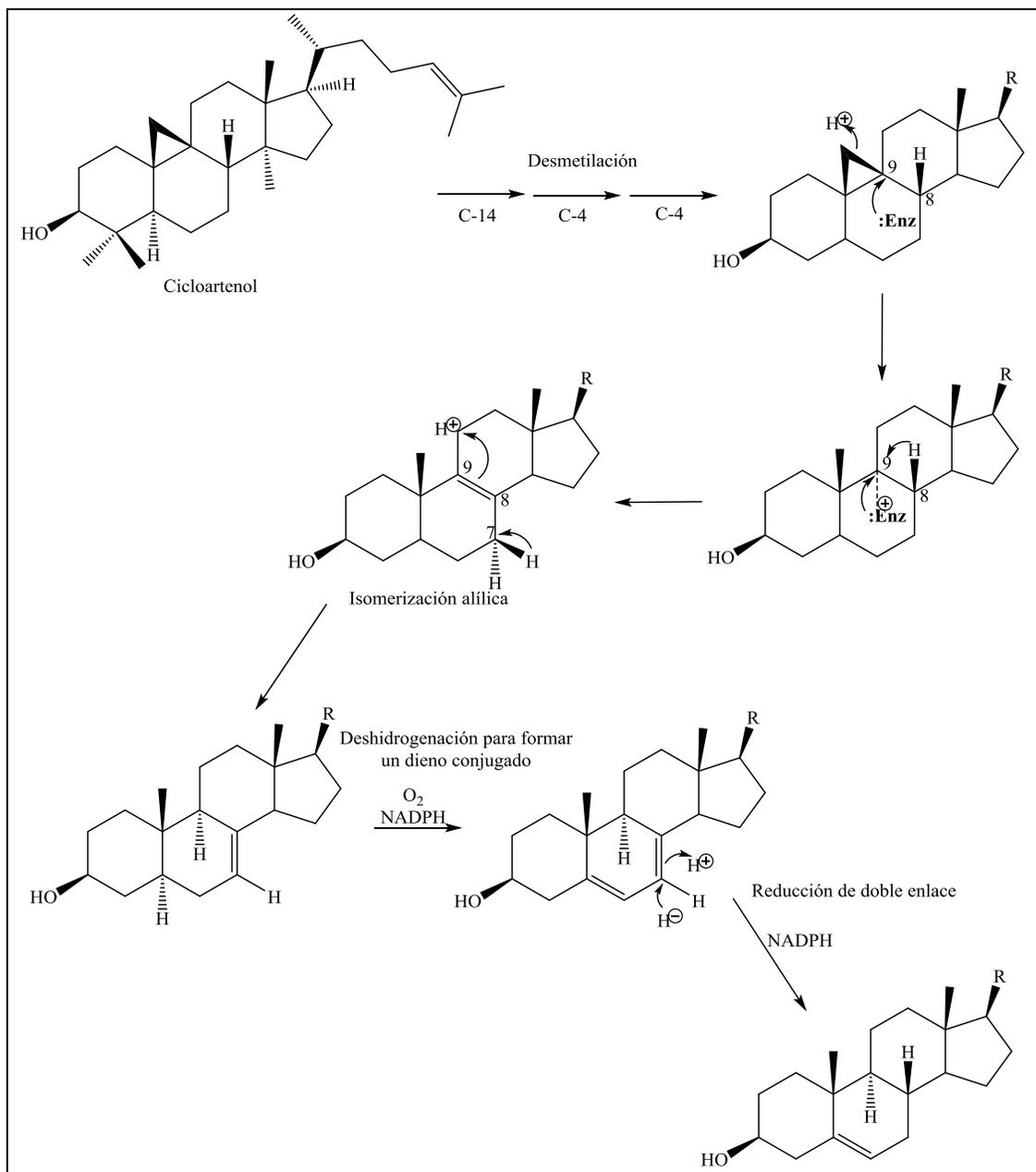


Figura 8. Formación del doble enlace C5-C6 en el colesterol. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 3rd Ed. Wiley-Blackwell. Oxford. United Kingdom. 2009.

3.3 Generalidades de *Asclepias curassavica* L.

La *Asclepias curassavica* L. es una especie vegetal muy conocida en El Salvador y fue descrita en el libro “Especies Útiles de la Flora Salvadoreña” del Dr. David J. Guzmán. A nivel mundial adopta muchos nombres, pero en el país se le conoce comúnmente como Señorita o Viborana.¹² En los apartados siguientes se da a conocer información más detallada de la especie vegetal.

3.3.1 Información botánica.

Nombre común: Algodoncillo, Bandera española, Bencenuco, Calerona, Corcalito, Flor de agua, Flor anaranjada, Flor de la reina, Flor de sangre, Flor de sapo, Flor de seda, Flor de muerte, Hierba de la víbora, Lechosilla, Mal cascada, Marianilla, Mata caballo, Niño muerto, Oficial de sala, Platanillo, Quita solimán, Sangría, Señorita, Viborana, Vivorana, Yerba de la calentura y Yuquillo.¹³

Nombre científico: *Asclepias curassavica* Linnaeus, 1,753.¹³

Familia: *Asclepiadaceae*.^{13, 14}

Referencia del herbario: Jardín Botánico de La Laguna, Antigua Cuscatlán.

J. Monterrosa 2010 (LAGU), Metapán, Santa Ana.

3.3.2 Origen y distribución.

La *Asclepias curassavica* L. está tan extendida y resulta familiar a alrededor del mundo, ya que está naturalizada en muchas regiones tropicales y subtropicales de las Américas, Australia y Asia, y menos frecuentemente en África. También fue ampliamente introducida en los trópicos de Europa (figura 9). El origen preciso de la *Asclepias curassavica* es desconocido, pero se piensa que es Sudamérica, Centroamérica o las Antillas.¹⁵

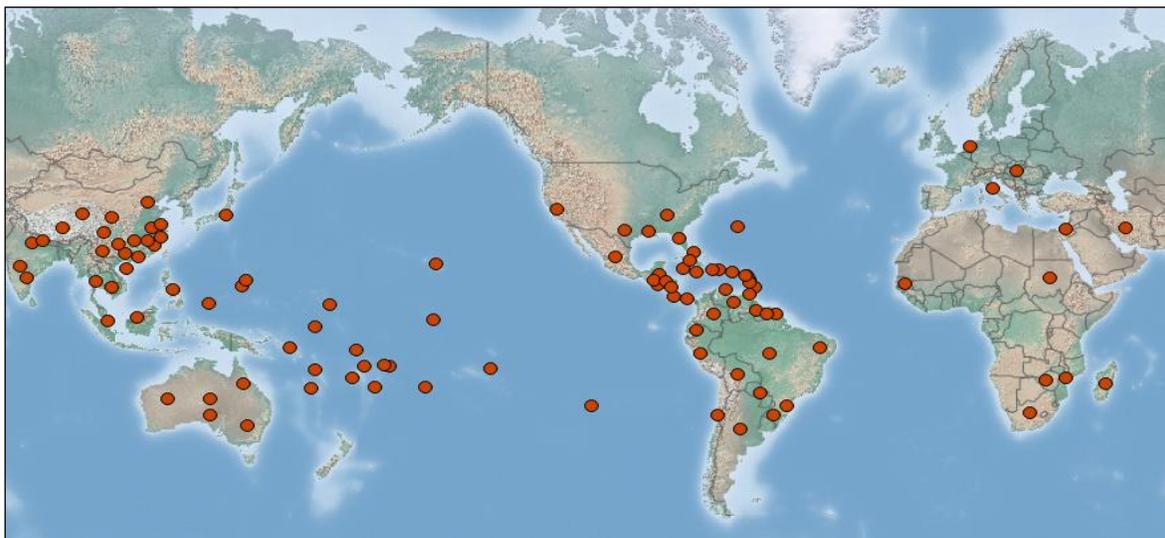


Figura 9. *Distribución mundial de Asclepias curassavica L. La especie vegetal se distribuye mayoritariamente en las zonas tropicales. Su amplia distribución se debe a que en muchos países ha sido introducida y todavía continúa en expansión. CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International).*

3.3.3 Descripción botánica.

La planta presenta tallos de 3-12 dm de altura, con frecuencia tiene una base leñosa, que puede ser simple o ramificada, minuciosamente aracnoidea tomentosa cuando es joven, pronto glabra.¹⁵

Las hojas son opuestas, pecioladas, elípticas-lanceoladas, agudas a acuminadas, la base es aguda a obtusa, mide 5-12 cm de largo, 1-3 cm de ancho, minuciosamente pilosas cuando la planta es muy joven, pronto se ponen glabras y finamente membranáceas; los pecíolos son de 0.5-1.0 cm de largo. Inflorescencias solitarias en los nodos superiores, pueden tener muchos floridos; los pedúnculos tienen de 3-6 cm de largo y los pedicelos de 1-2 cm de largo. Las flores son bastante grandes y vistosas (figura 10); lóbulos del cáliz estrechamente lanceolados, de 2-3 mm de largo; las corola o pétalos suelen ser brillantes carmesí, raramente amarillos o blancos, los lóbulos 5-10 mm de largo; ginostegio pedunculado, amarillo intenso, la columna puede ser cilíndrica o cónica, 2-3 milímetros de largo y 1 milímetro de ancho en la base, las capuchas, distintamente pedunculadas, ampliamente oblongadas, redondeadas en la extremidad, tienen de 3-5 milímetros de largo, el cuerno basal, estrechamente acicular, de 4-5 mm de largo, ligeramente escarlata-carmesí sobre la cabeza de la antera; la cabeza antera cilíndrica tiene de 2 -3 mm de largo y 1.5-2.5 mm de ancho.^{15, 16}

Los folículos se presentan erectos sobre pedicelos erectos, estrechamente fusiformes de 6-10 cm largo, liso, glabro; semillas ampliamente ovales de 5-7 mm de largo, el coma blanco de 2-3 cm de largo.¹⁶



Figura 10. Detalles de hojas, tallos, flores y semillas de Asclepias curassavica L. Esta especie, que es nativa de la América tropical, actualmente se encuentra naturalizada en muchas otras partes del mundo y florece esporádicamente durante todo el año. Natural Resources Conservation Services.

3.3.4 Hábitat.

Están presentes en las zonas trópicas y subtropicales de América, frecuentemente se encuentran en lugares bastante húmedos y con una elevación de hasta 2,000 m sobre el nivel del mar.¹⁶

3.3.5 Composición.

Dos tipos de componentes químicos se han detectado en esta planta, alcaloides y esteroides. De estos últimos, la asclepina, la calactina y la calotropina se han identificado en la planta completa, además de alcaloides derivados de la 2-metoxi-pirazina (figura 11). De las hojas se han aislado los esteroides cardiotónicos calotropagenina y uzarigenina. Del látex se han aislado la uscaradina y uscarina.^{14, 18, 19, 22, 23}

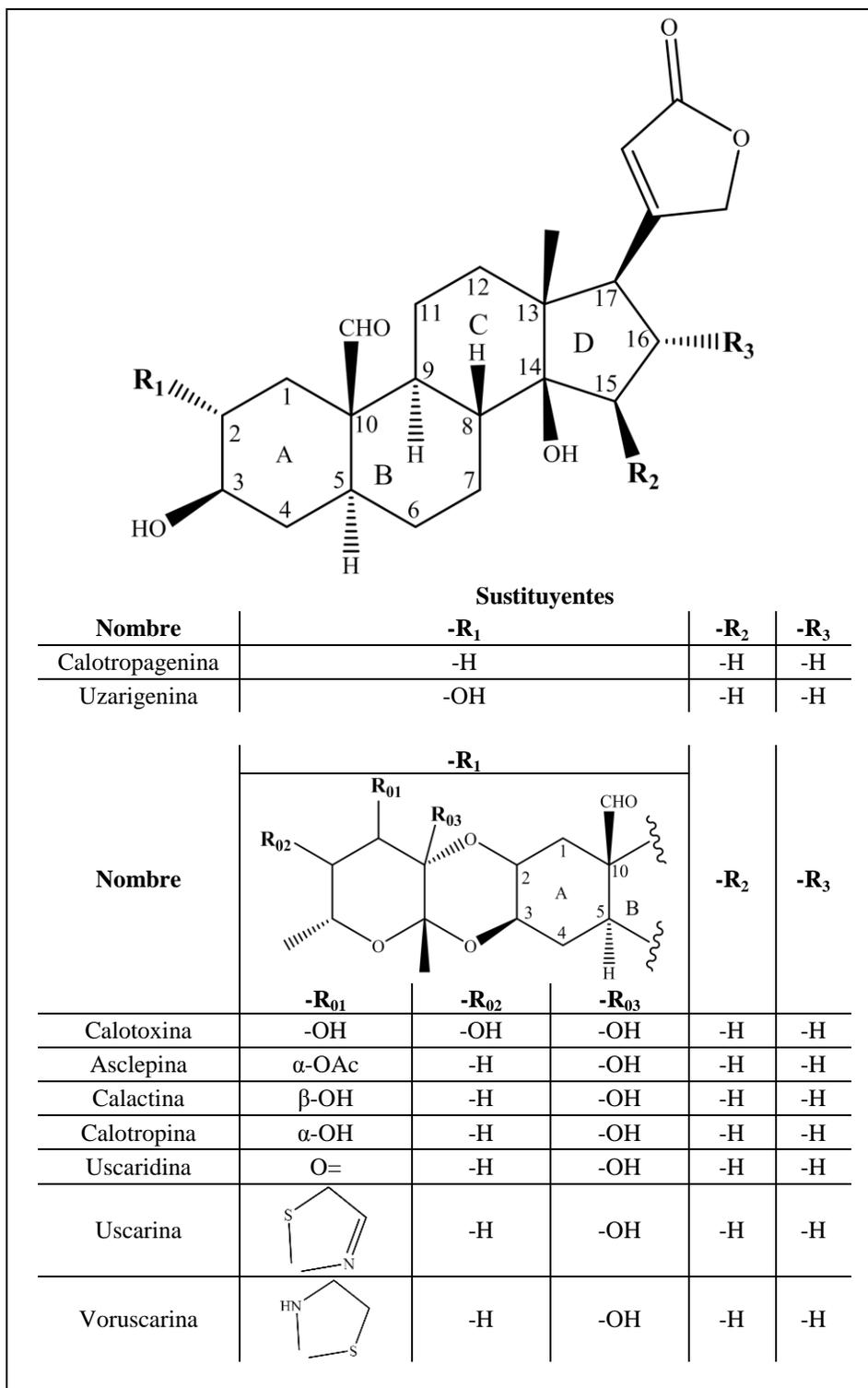


Figura 11. Estructura de algunos esteroides de *Asclepias Curassavica* L. Roy, M.; Chang, F.; Huang, H.; Chiang, M.; Wu, Y. Cytotoxic Principles from the Formosan Milkweed, *Asclepias curassavica*. *J. Nat. Prod.* 68. 2005. pp 1494-1499.

3.3.6 Usos de *Asclepias curassavica*.

Las flores de *Asclepias curassavica* son grandes y vistosas, por lo que es muy apreciada como planta ornamental para jardines. La especie vegetal es la principal fuente alimenticia de las larvas de mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.), ya que, además de aportarles nutrientes, les provee de cardenólidos (figura 11). Los cardenólidos son compuestos de sabor amargo y resultan ser venenosos para los mamíferos. Por eso las larvas de mariposa monarca los utilizan en su mecanismo de defensa contra los depredadores (figura 12).^{14, 24} En cuanto a aplicaciones médicas, los cardenólidos de *Asclepias curassavica* son de mucha importancia para el tratamiento de la hidropesía o insuficiencia cardiaca congestiva y el cáncer. También a la planta se le atribuyen propiedades como quiebra muelas, ya que al aplicar un poco del látex en una muela con caries, ésta se fragmenta a la vez que ayuda a calmar el dolor y a tratar la infección. Otra propiedad medicinal que se ha reportado al látex de la planta es la mejora en la visión por la disminución en la presión ocular. A las mezclas de la planta con otras especies vegetales las utilizan para tratar trastornos digestivos y cicatrizar, debido a las cisteínas proteasas presentes en el látex.^{14, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26}

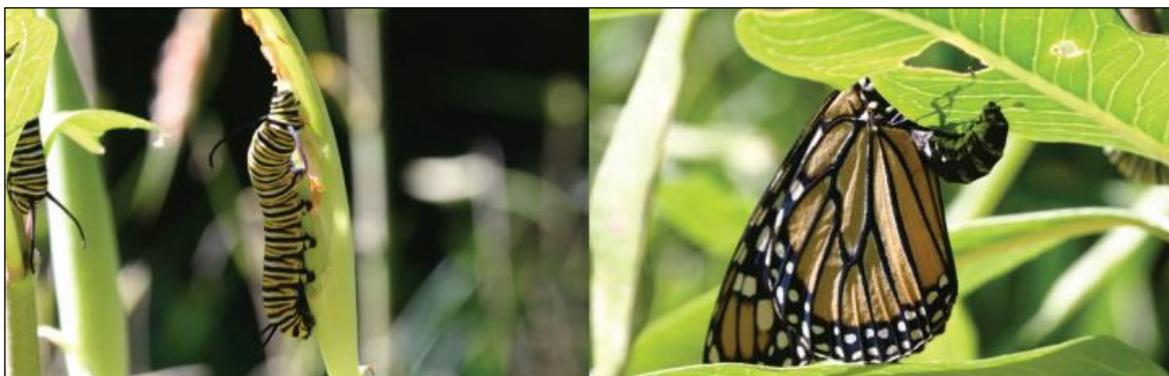


Figura 12. Mariposa monarca. Larva de Danaus plexippus alimentándose de frutos de Asclepias curassavica y una hembra de mariposa de la misma especie poniendo un huevo en el revés de una hoja de Asclepias curassavica. Fernández Haeger, J.; Jordano Barbudo, D. La Mariposa Monarca Danaus plexippus (L., 1758) en el Estrecho de Gibraltar (Lepidoptera: Danaidae). SHILAP Revta. lepid. 37 (148). 2009. pp 421-438.

3.4 Método de obtención e identificación de esteroides.

3.4.1 Extracción.

La extracción se puede definir como la separación de un componente (del seno de una mezcla), por la acción de un solvente que lo disuelve selectivamente.²⁷ Las técnicas de extracción que se abordarán en este apartado son la maceración y la extracción líquido-

líquido, ya que son las de mayor importancia en el método de obtención de esteroides en esta investigación.

3.4.1.1 Maceración.

La muestra vegetal cruda, previamente fragmentada o triturada, se pone en contacto con suficiente volumen de disolvente, en un recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta agotamiento (figura 13). Puede utilizarse agitación. Posterior a la maceración, la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto por evaporación a presión reducida.²⁸

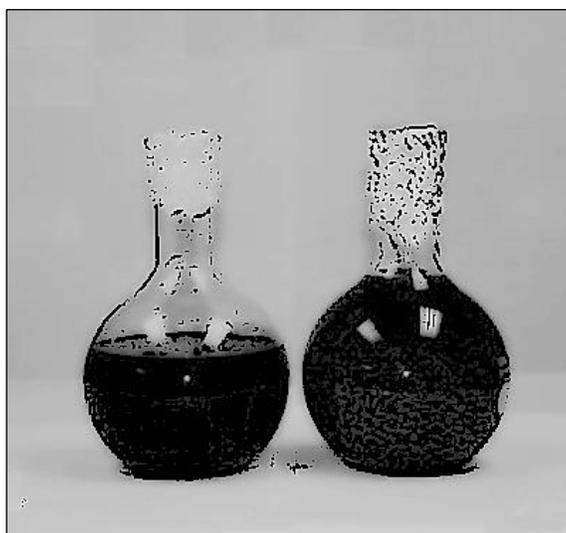


Figura 13. Balones con muestra vegetal en proceso de maceración. Puma Araujo, A. C. Tesis de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador. 2013.

3.4.1.2 Extracción líquido-líquido.

Si un sistema de dos fases líquidas inmiscibles o muy poco miscibles, se le agrega una cantidad de un tercer componente, soluble en ambas fases, éste se distribuirá en cada fase, de tal forma que el cociente que resulta de dividir las concentraciones logradas en cada fase será una constante, que solo dependerá de la temperatura. Se asume que el estado molecular de la sustancia en cuestión es el mismo en ambas fases, aunque a veces puede cambiar, en este caso no se consideran asociaciones ni disociaciones.²⁷

Si C_A y C_B son las concentraciones de la sustancia en las fases líquidas A y B, entonces, a una temperatura dada se cumple que:

$$\frac{C_A}{C_B} = K_D^{27}$$

K_D es la constante de coeficiente de partición o distribución.²⁷

Las extracciones líquido-líquido se realizan en ampollas de separación (figura 14). Para ello se agita la ampolla y se distribuye el tercer componente entre las dos fases. Quedará en mayor concentración, en la fase líquida en la que resulte ser más soluble y siempre en la proporción que cumpla con K_D .²⁷

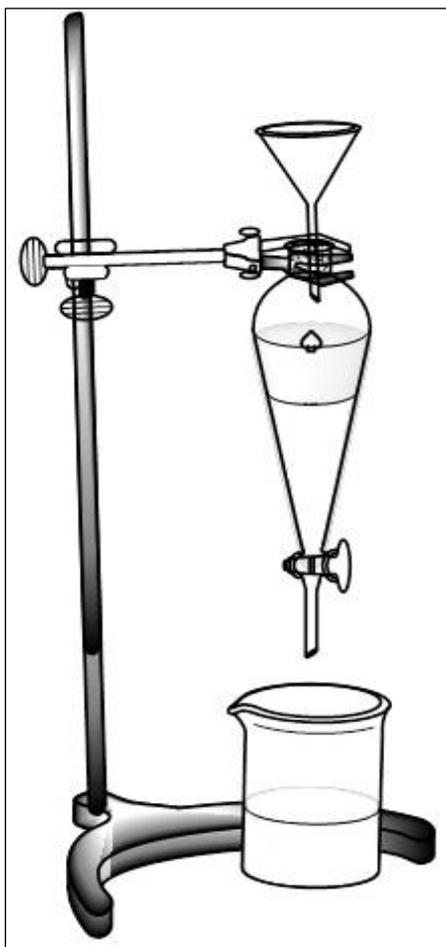


Figura 14. Extracción líquido – líquido.

3.4.1.3 Eliminación de disolvente por destilación al vacío con rotavapor.

La eliminación rápida de una gran cantidad de solvente volátil de una disolución de un compuesto orgánico (es decir, que puede ser resultado de un proceso de extracción con solvente) se efectúa convenientemente usando un rotavapor. En este sistema la evaporación se realiza a presión reducida (utilizando una bomba de vacío) y, por lo tanto, a temperaturas

relativamente bajas. El matraz de fondo redondo evaporador se calienta a la temperatura apropiada en un baño de agua y se gira durante la evaporación: Esto asegura una mezcla homogénea, evita golpes y hace que la fuerza centrífuga y la fuerza de fricción entre la pared del matraz giratorio y la muestra líquida den como resultado la formación de una película delgada de disolvente caliente que se extiende generando una mayor superficie. El disolvente destilado de la superficie de evaporación, es condensado por un condensador en espiral y finalmente se deposita en el matraz de fondo redondo receptor.²⁹

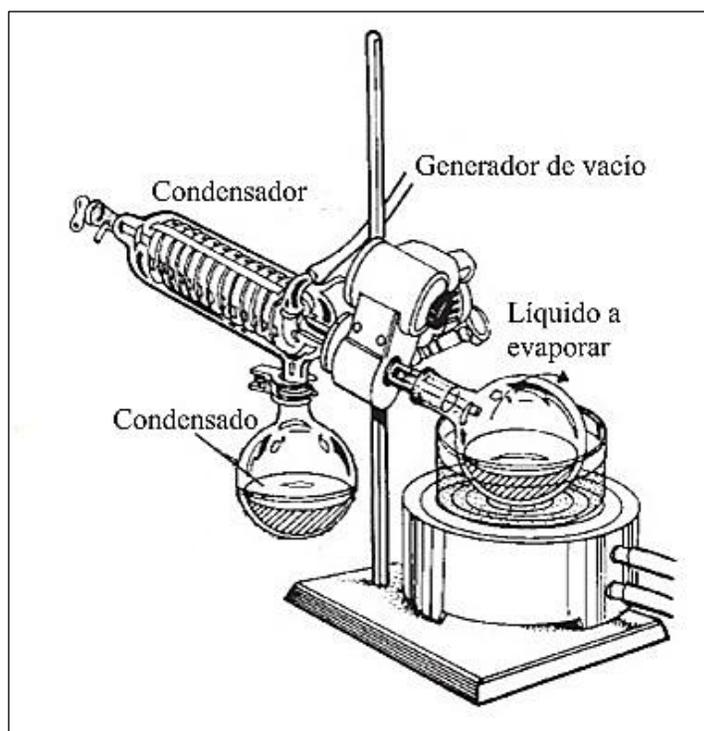


Figura 15. Sistema rotavapor. Williamson, K. Techniques. Macroscale and Microscale Organic Experiments. 6th Ed. Brooks/Cole, United States of America. 2011.

3.4.2 Cromatografía.

La cromatografía se utiliza para la purificación de pequeñas cantidades de mezclas orgánicas complejas, ya que se basa en la distribución diferencial de los diversos componentes de una mezcla entre la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria es un sólido o un líquido.³⁰

Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas se pueden mencionar la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía en papel que forman parte de la cromatografía planar.

La TLC es el más simple de todos los métodos cromatográficos ampliamente utilizados. El mecanismo de separación de la cromatografía en capa fina, al igual que la cromatografía en columna, es por adsorción de los componentes de una mezcla que pasan a través de la fase estacionaria sólida. Por otro lado, cuando el mecanismo de separación se da por la distribución de tamaño del poro de la fase estacionaria, los solutos se separan por diferencias de tamaño, a esta técnica se le puede denominar cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de filtración en gel (GFC) o cromatografía de permeación en gel (GPC).³¹

3.4.2.1 Cromatografía en capa fina analítica.

La cromatografía en capa fina es una técnica de partición sólido-líquido. La fase líquida en movimiento asciende por una fina capa del adsorbente que recubre un soporte. El soporte más típico es un material plástico, pero también se utilizan otros materiales. Se extiende la capa delgada del adsorbente (0.1-0.2 mm) sobre la placa y se deja secar. A la placa recubierta y secada se le denomina placa de capa delgada o lámina de capa delgada.³²

Previo al desarrollo de una TLC, se debe trazar una línea base con lápiz en la placa fina y con la ayuda de un capilar se aplica disolución de la muestra como un pequeño punto sobre la línea trazada. A esta técnica se le denomina manchado. Luego del manchado, la placa fina se coloca en la cámara cromatográfica con fase móvil en su interior y posteriormente se tapa. Lo que se observará después de colocar la placa fina con muestra, es el ascenso del disolvente en la placa. Durante el ascenso capilar, la muestra se reparte entre la fase líquida en movimiento y la fase estacionaria. Por lo que se separarán los compuestos de la muestra. La separación se basa en los muchos equilibrios que los solutos experimentan entre la fase en movimiento y la estacionaria (figura 16). Por la naturaleza de la fase estacionaria, las sustancias menos polares avanzan más rápido que las sustancias más polares y resulta de las diferencias en las velocidades a las que los componentes individuales de la mezcla avanzan hacia arriba en la placa. En una mezcla están presentes dos o más sustancias, cada una presenta su propia solubilidad y adsorción característica, dependiendo de los grupos funcionales en su estructura.³²

Cuando se ha desarrollado la placa de capa delgada, se retira del depósito de revelado y se deja secar hasta que esté libre de disolvente. Habrá una serie vertical de puntos en la placa.

Cada mancha corresponde a un componente o compuesto separado de la mezcla original. Si los componentes de la mezcla son sustancias coloreadas, los diversos puntos serán claramente visibles después del desarrollo, sin embargo, es muy frecuente que las "manchas" no sean visibles porque corresponden a sustancias incoloras. Si las manchas no son evidentes, sólo pueden hacerse visibles si la placa de capa delgada se mantiene bajo luz ultravioleta o se puede usar algún reactivo revelador en forma de aerosol.³²

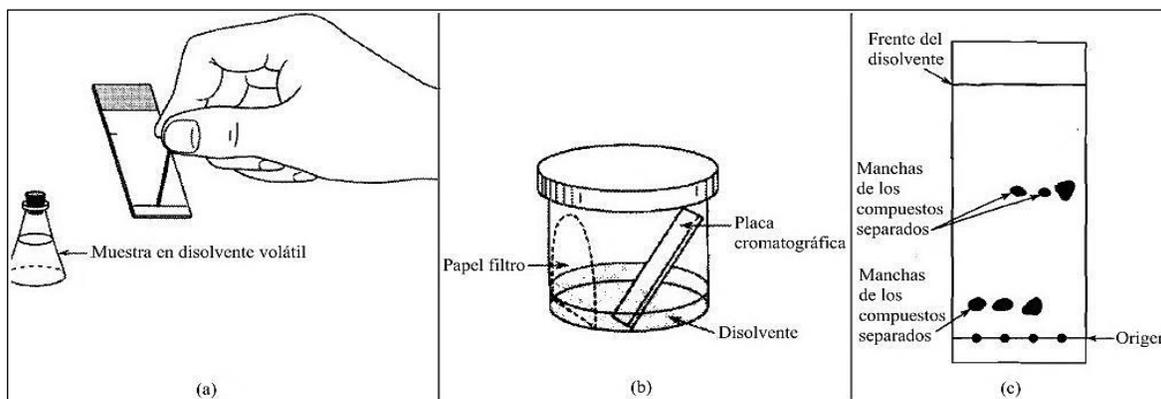


Figura 16. Cromatografía en capa fina. (a) Proceso de manchado de la placa fina con disolución de la muestra a analizar. (b) Desarrollo de la placa fina, en la que se separan los componentes de la muestra. (c) El desarrollo de la placa deja cada uno de los componentes separados y se les puede determinar el Rf. Shriner R.; Hermann C.; Morrill T.; Curtin D.; Fuson R. Separation of Mixtures. The Systematic Identification of Organic Compounds. 8th Ed. John Wiley & Sons. United States of America. 2004. pp 65-109.

Siempre que las condiciones experimentales sean reproducibles, el movimiento de cualquier sustancia con respecto al frente del disolvente en un sistema cromatográfico dado es constante y característico de la sustancia. La constante es el valor Rf y se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Las fases estacionarias más utilizadas, que están disponibles en grados especialmente preparados para el uso en TLC, incluyen gel de sílice, alúmina y polvo de celulosa; muchos de ellos están disponibles con compuestos fluorescentes incorporados con el fin de facilitar la detección de los componentes resueltos de la mezcla y posteriormente se visualizan las placas bajo luz ultravioleta.³⁵

3.4.2.2 Cromatografía en capa fina preparativa.

La cromatografía en capa fina preparativa es una técnica que se realiza con el fin de aislar compuestos en cantidades de 10-100 mg para la identificación de compuestos por

espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), difracción de rayos X (DRX), etc. También para diversos fines analíticos, o para la determinación de la actividad biológica (figura 17). Es un valioso método de purificación de muestras con fines preparativos y aislamiento.³⁶

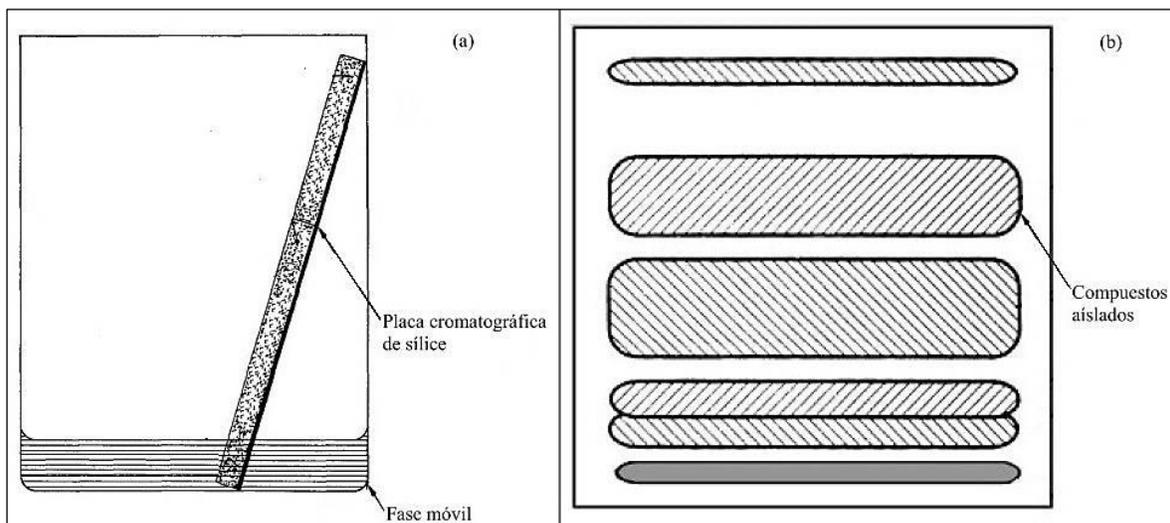


Figura 17. Cromatografía en capa fina preparativa. (a) La cromatografía en placa fina preparativa se desarrolla en una placa de sílica gel de 20 x 20 cm. (b). Los componentes de la muestra se aíslan para posteriores análisis. Zubric, J. *Thin-Layer Chromatography. The Organic Chem Lab Survival Manual.* John Wiley & Sons. United States of America. 1988. pp 197-208.

3.4.2.3 Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna está basada en los mismos principios de la cromatografía en placa fina, a diferencia de que la fase móvil desciende por gravedad a través de una columna y no por ascenso capilar a través de una superficie plana. En la cromatografía en columna también se utiliza la sílica gel como fase estacionaria y se empaqueta con fase móvil hasta quedar bien envasada en la columna de vidrio, la cual finaliza en una llave para controlar el paso de sustancias al exterior de la columna (figura 18). Seguidamente la mezcla orgánica a separar se deposita por la parte superior de la fase estacionaria y así la fase móvil podrá ir atravesando el sistema. Los compuestos arrastrados por el disolvente se colocan en recipientes separados. Luego se analizan las fracciones por TLC.³⁸

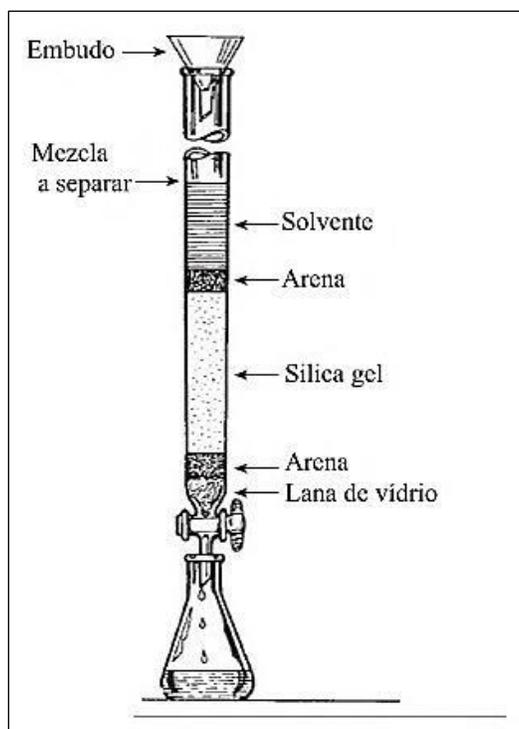


Figura 18. Cromatografía en columna de sílica gel. Williamson, K. Techniques. Macroscale and Microscale Organic Experiments. 6th Ed. Brooks/Cole, United States of America. 2011.

3.4.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño.

La cromatografía de exclusión por tamaño se conoce también como cromatografía de filtración en gel o cromatografía en tamiz molecular. En este método, las perlas finas y porosas se envasan en una columna para cromatografía (figura 19). Las perlas están compuestas de polímeros de dextrano (Sephadex), agarosa (Sephacryl o BioGel P). Los tamaños de poro de estas perlas se aproximan a las dimensiones de las macromoléculas. El volumen total de la columna de cromatografía empaquetada, V_t , es la suma del volumen fuera de las perlas porosas (V_o), más el volumen dentro de las perlas (V_i) y el volumen realmente ocupado por el material de la perla (V_g): $V_t = V_o + V_i + V_g$. (V_g es típicamente menos del 1% de V_t y puede ser convenientemente ignorarlo en la mayoría de las aplicaciones).³⁹

A medida que se pasa una disolución de moléculas a través de la columna, las moléculas se distribuyen pasivamente entre V_o y V_i , dependiendo de su capacidad para entrar en los poros (es decir, su tamaño). Si una molécula es demasiado grande como para entrar en los

poros de la fase estacionaria, está totalmente excluida de V_i y emerge primero de la columna a un volumen de elución, V_e , igual a V_o .³⁹ Si una molécula particular puede entrar en los poros del gel, su distribución está dada por el coeficiente de distribución, K_D :

$$K_D = (V_e - V_o) / V_i^{39}$$

Donde V_e es el volumen de elución característico de la molécula. La cromatografía se completa cuando un volumen de disolvente igual a V_t ha pasado a través de la columna.³⁹

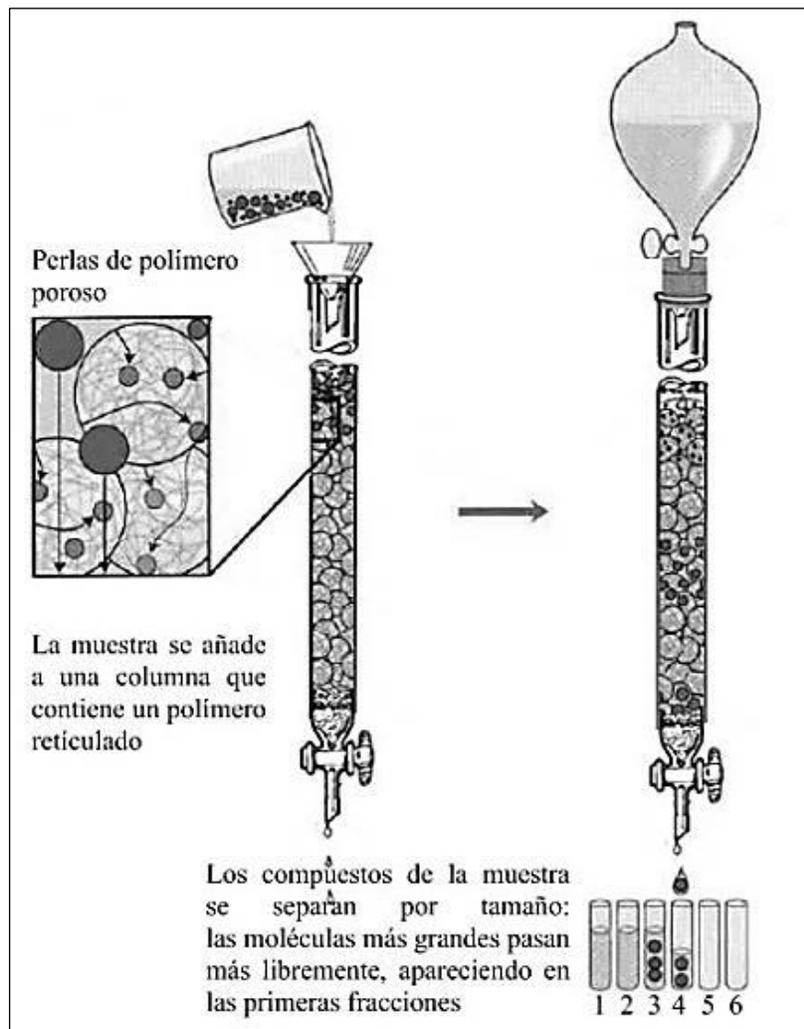


Figura 19. Cromatografía de exclusión por tamaño. Esquema de la columna de cromatografía por exclusión de tamaño y su relleno poroso. Nelson, D.; Cox M. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 5th Ed. W. H. Freeman and Company. United States of America. 2008.

3.5 Espectroscopia de RMN ^1H y ^{13}C .

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es una técnica en la que una muestra se coloca en un campo magnético homogéneo (constante), se irradia y se detecta una radiofrecuencia. El bombardeo de fotones a la muestra hace que los núcleos de ésta experimenten transiciones entre estados (resonancia). La perturbación de la población de núcleos en equilibrio se le llama excitación. Los núcleos excitados emiten una señal magnética llamada decaimiento de inducción libre (FID, del inglés: Free Induction Decay) que se detecta electrónicamente y se captura digitalmente. Los FID digitalizados se procesan usando métodos computacionales para revelar información significativa sobre la muestra.⁴¹

La observación de la señal de RMN requiere una muestra que contenga isótopos de átomos con un número atómico específico, es decir, un núcleo específico tal como protio, el isótopo más ligero y abundante del hidrógeno. En la tabla 1 se pueden observar núcleos magnéticamente activos con dos estados de espín nuclear permitidos.⁴¹

Tabla 1. Núcleos activos en Resonancia Magnética Nuclear.⁴¹

Núcleo	Elemento -isótopo	Espín	Abundancia natural (%)	Frecuencia relativa a ^1H
^1H	Hidrógeno – 1	$\frac{1}{2}$	99.985	1.00000
^{13}C	Carbono – 13	$\frac{1}{2}$	1.108	0.25145
^{15}N	Nitrógeno – 15	$\frac{1}{2}$	0.37	0.10137
^{19}F	Flúor – 19	$\frac{1}{2}$	100	0.94094
^{31}P	Fosforo – 31	$\frac{1}{2}$	100	0.40481

Al colocar una muestra en el equipo de RMN, ésta se somete a un campo magnético de muy alta intensidad (figura 20). La aplicación del campo magnético a la muestra hará que los momentos nucleares magnéticos se alineen, ya sea parcialmente en paralelo (estado de espín α) o antiparalelo (estado de espín β) a la dirección del campo magnético. La alineación de los dos estados de espín permitidos para un núcleo de espín- $\frac{1}{2}$ es análoga a la alineación de una aguja de brújula con el campo magnético de la Tierra (figura 21).⁴²

En la figura 22 se observa que las energías de los estados de espín paralelos y antiparalelos de un núcleo de espín- $\frac{1}{2}$, divergen linealmente con el aumento del campo magnético. A una intensidad de campo magnético determinada, cada núcleo activo en RMN exhibe una diferencia de energía única entre sus estados de espín. El hidrógeno tiene la segunda mayor pendiente para la divergencia de energía (solo superada por su otro raro isótopo, tritio, ^3H o

³T). Ésta pendiente se expresa a través de la relación giromagnética, γ , que es una constante única para cada núcleo activo en RMN. La razón giromagnética indica cuántas rotaciones por segundo (giros) por unidad de campo magnético aplicado. La ecuación siguiente muestra cómo la brecha de energía entre los estados (ΔE) de un núcleo de espín- $1/2$ varía con la intensidad del campo magnético aplicado B_0 (en Tesla). Las unidades de γ son Joules por Tesla.^{41, 42}

$$\Delta E = \gamma B_0$$

Para inducir transiciones entre los estados de espín permitidos de un núcleo activo en RMN, deben aplicarse fotones con su energía ajustada al espacio entre los dos estados de espín.^{41, 42}

$$\Delta E = h\nu$$

Donde h es la constante de Planck en Joules·segundo, ν es la frecuencia en ciclos por segundo.^{41, 42}

De las ecuaciones anteriores podemos calcular la frecuencia de RMN de cualquier núcleo activo. Para el hidrógeno, γ es 2.675×10^8 radianes/Tesla/segundo, por lo que la frecuencia es:

$$\nu = \gamma B_0 / h^{41}$$

Así un equipo de RMN que opera a un campo magnético de 11.74 Tesla requiere una frecuencia de 500 MHz.⁴¹

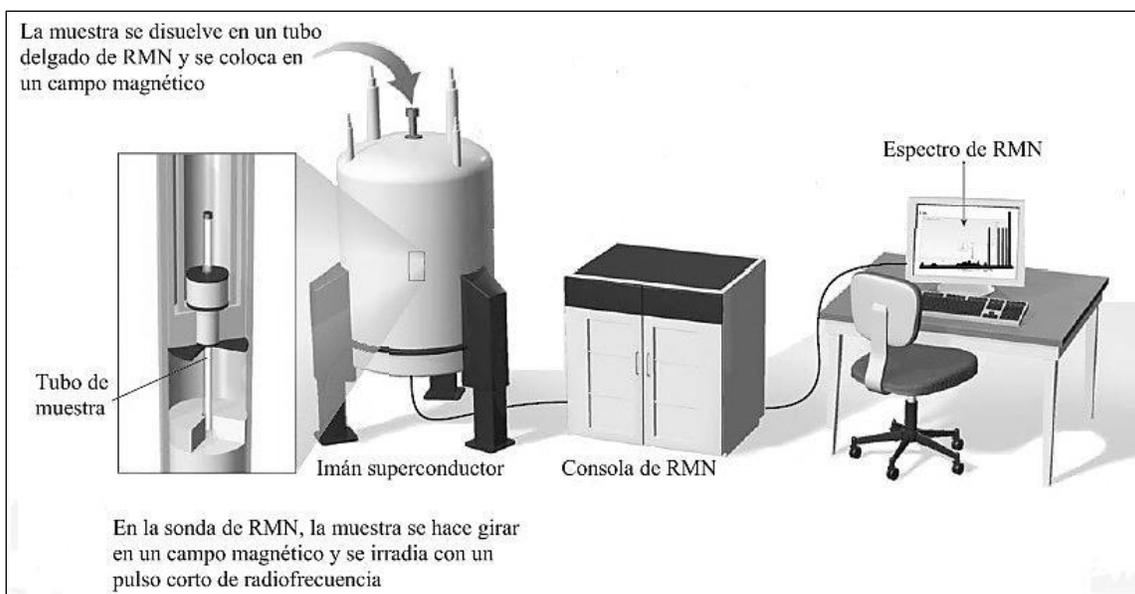


Figura 20. Espectrómetro de RMN. Smith, J. G. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Organic Chemistry. 3rd Ed. McGraw-Hill. United States of America. 2008. pp 494-537.

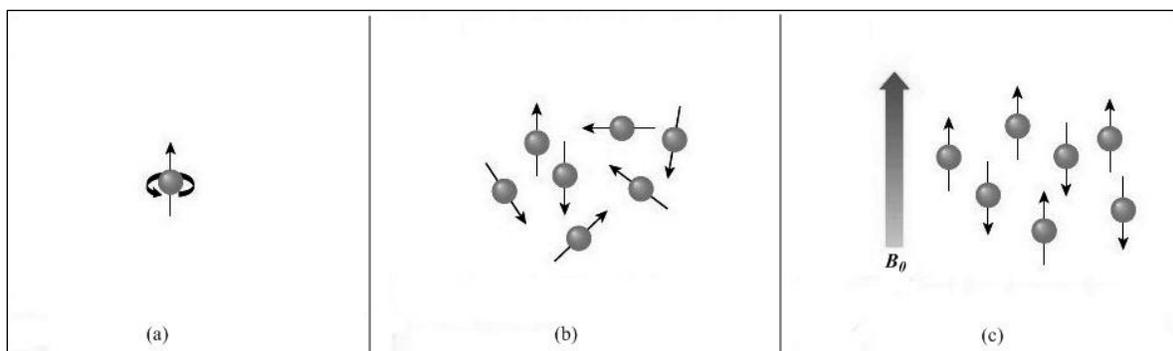


Figura 21. Espín nuclear. (a) El movimiento de la carga del protón genera un campo magnético (espín nuclear). (b) Sin un campo magnético externo, los espines nucleares se orientan aleatoriamente. (c) En un campo magnético B_0 , los espines nucleares se orientan en sentido de B_0 o contra B_0 . Smith, J. G. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Organic Chemistry. 3rd Ed. McGraw-Hill. United States of America. 2008. pp 494-537.

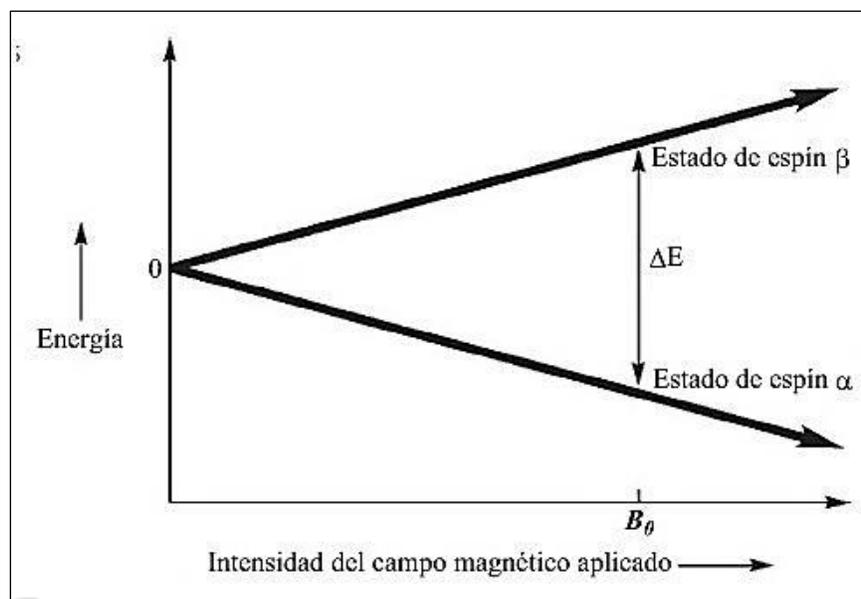


Figura 22. Estados de energía α y β de los núcleos con espín-1/2 en presencia de un campo magnético B_0 . Simpson, J. H. *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*. 1st Ed. Academic Press. United States of America. 2008.

La frecuencia de resonancia exacta de un tipo de núcleo determinado depende de una forma característica de su entorno. La intensidad del campo magnético efectivo que actúa sobre el núcleo se diferencia de B_0 en la magnitud del campo inducido σB_0 .⁴³

$$B_{ef} = B_0 - \sigma B_0$$

La constante de apantallamiento σ es adimensional y aparece e influye en la condición de resonancia.⁴³

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi (1 - \sigma)$$

Cuánto más apantallado se encuentra un núcleo, mayor es σ y menor B_{ef} ; esto significa así mismo que, a frecuencia constante, mayor deberá ser el campo magnético aplicado B_0 para lograr la resonancia del núcleo. Un razonamiento análogo, muestra que, a campo B_0 constante, la frecuencia ν disminuye al aumentar el apantallamiento.⁴³

Debido a que la frecuencia está en función del campo magnético aplicado, la posición de las absorciones en RMN no se puede definir mediante una escala absoluta de frecuencia o de campo magnético aplicado. En lugar de ello, la posición de la señal se establece respecto de un compuesto de referencia.⁴³ En este caso, el tetrametilsilano (TMS, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) se ha

impuesto como como tal en la espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C . Para la diferencia de posición entre las señales del núcleo considerado X y la de TMS, para un valor de la frecuencia de medida ν , se obtiene:

$$\Delta B = B(X) - B(\text{TMS})^{43}$$

y el valor correspondiente relativo a la escala de frecuencias en Hz:

$$\Delta\nu = \nu(X) - \nu(\text{TMS}) = \gamma \Delta B / 2\pi^{43}$$

El espectrómetro de RMN detecta señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN (figura 23). En consecuencia, para la determinación de señales en un espectro, se define como desplazamiento químico (chemical shift) δ de un núcleo X al valor de:

$$\delta(X) = 10^6 (\Delta\nu/\nu) \text{ donde } \delta(\text{TMS}) = 0^{43}$$

El desplazamiento químico es una magnitud adimensional, característica para el núcleo considerado y su entorno es independiente a la medida y de la intensidad del campo magnético. En los espectros se utiliza el factor 10^6 para expresar el valor de δ en ppm (partes por millón). La amplitud de la escala de δ alcanza un valor aproximado de 10 en resonancia de protón y de alrededor de 200 ppm en la resonancia de carbono. Dependiendo del número de señales se habla de un singulete, doblete, triplete, cuartete, etc, en general: multiplete. A la variedad de estas señales se le conoce como multiplicidad (figura 24) y la causa de ello es la interacción con los núcleos vecinos que poseen momento magnético. Este acoplamiento espín-espín aparece entre núcleos del mismo tipo (homonuclear) y entre núcleos de elementos diferentes (heteronuclear).⁴³ Ejemplo, en la figura 23 se observan los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del 2,4-dimetilpentano. En el espectro de protón se puede observar un doblete generado por los cuatro CH_3 - equivalentes, un triplete generado por el $-\text{CH}_2-$ y el multiplete generado por los dos $-\text{CH}-$ equivalentes. En el espectro de carbono se observan los singuletes generados por los tres tipos de carbonos en la estructura.

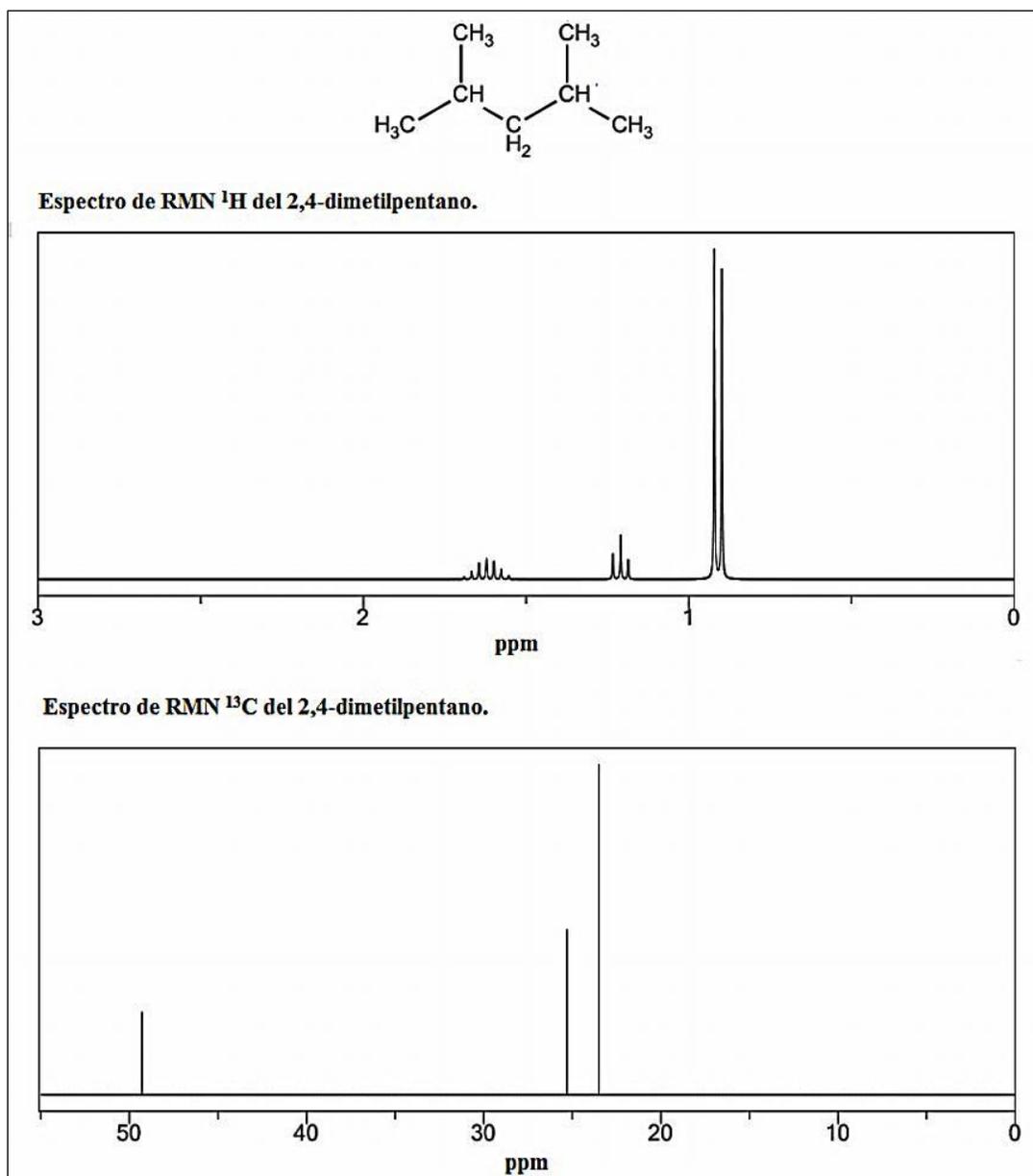


Figura 23. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del 2,4-dimetilpentano.

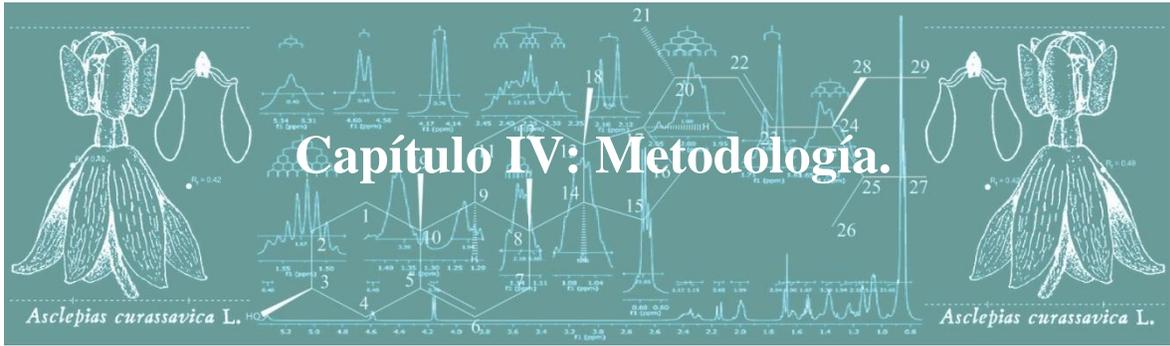
Parte de la información más útil para determinar la estructura en un espectro RMN unidimensional proviene de las constantes de acoplamiento, que son magnitudes de valores independientes de la magnitud del campo magnético externo aplicado B_0 , lo que posee una especial relevancia. Dos líneas de resonancia que aparecen en un espectro pueden ser debidas a dos señales singuletes procedentes de dos núcleos no acoplados, con diferente desplazamiento químico, o bien un doblete correspondiente a un núcleo que forma un sistema con otro acoplado a él (figura 24). La diferenciación es muy sencilla mediante el registro de dos espectros con diferentes frecuencias de medida. Si la separación entre líneas

permanece constante, se trata de un fenómeno de acoplamiento; si la separación (en Hz) aumenta al hacerlo la frecuencia de medida, entonces se consideran como dos singuletes. En la escala δ , la separación es independiente de la frecuencia de medida.⁴³

Con base a lo abordado, es posible generalizar la señal de RMN de un núcleo acoplado a n hidrógenos equivalentes, ya que se dividirá en una señal multiplete con un número de líneas determinado por la fórmula $n + 1$. La intensidad relativa de las líneas en un multiplete, estarán dadas por los coeficientes binomiales de orden " n ".⁴⁴

n	Multiplicidad	Intensidad relativa	Espines	Patrón de acoplamiento
1	Singlete	1		
2	Doblete	1 1	n = 1 ↓ ↑	J
3	Triplete	1 2 1		J J
4	Cuartete	1 3 3 1	n = 2 ↓ ↓ ↑ ↑	J J J J
5	Quintete	1 4 6 4 1		J J J J J
6	Sextete	1 5 10 10 5 1		J J J J J J
7	Septete	1 6 15 20 15 6 1	n = 3 ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ ↑	J J J J J J J
8	...	1 7 21 35 35 21 7 1		J J J J J J J J

Figura 24. Las áreas relativas del multiplete $n+1$ dadas por el triángulo de Pascal. La división de una señal de RMN revela la cantidad de protones no equivalentes cercanos. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th Ed. John Wiley & Sons. United States of America. 2005.



4. Metodología.

4.1 Tipo de estudio.

Este trabajo es de tipo experimental, con el propósito de extraer e identificar metabolitos secundarios de *Asclepias curassavica* L., mediante técnicas físicas. Los resultados requirieron de un análisis teórico detallado con aplicación práctica. Se considera que los metabolitos secundarios aislados e identificados a partir de la especie vegetal, pueden dar lugar a posteriores investigaciones.

4.2 Investigación bibliográfica.

La investigación requirió la consulta de libros especializados, artículos científicos, tesis y páginas de internet en las áreas de fitoquímica, espectroscopia y otros aspectos generales de la química orgánica.

4.3 Investigación de laboratorio.

La parte experimental, se llevó a cabo en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de investigación de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.
- Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

4.3.1 Recolección e identificación de las muestras de *Asclepias curassavica*.

Las partes aeróbicas de *Asclepias curassavica* se colectaron de la zona de Chanmico en San Juan Opico, La Libertad (figura 25). Previo a la labor de recolección, se llevó una muestra de la especie vegetal al Jardín Botánico de La Laguna para identificarla (J. Monterrosa 2010 (LAGU), Metapán, Santa Ana).



Figura 25. Muestra de *Asclepias curassavica* seca.

4.3.2 Preparación de las muestras de *Asclepias curassavica*.

En primer lugar, las partes aéreas de *Asclepias curassavica*, fueron fragmentadas y secadas a la sombra durante cinco días.

4.3.3 Maceración con etanol de las partes aeróbicas de *Asclepias curassavica*.

Se pesaron 1.95 kg de fragmentos de la planta y luego se colocaron en un balón de 4L con etanol al 90 % para dejarlos macerando durante 5 días.

4.3.4 Obtención del extracto etanólico por destilación a presión reducida con rotavapor.

El extracto etanólico fue destilado a presión reducida, obteniéndose un extracto acuoso, por lo que fue necesario eliminar el agua (figura 26).



Figura 26. Balón con extracto etanólico de Asclepias curassavica.

4.3.5 Eliminación del agua en el extracto por extracción líquido-líquido (diclorometano/agua).

El agua se eliminó mediante una partición líquido-líquido con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (figura 27). La fase orgánica se destiló, obteniendo un extracto diclorometánico con una masa de 46.90 g (figura 28). La fase acuosa se almacenó en el laboratorio de investigación de la Escuela de Química.



Figura 27. Eliminación del agua en el extracto etanólico de Asclepias curassavica.

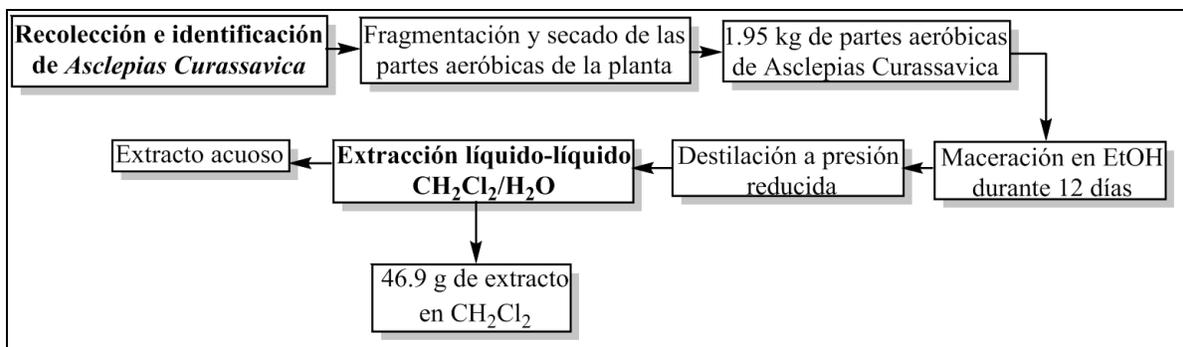


Figura 28. Esquema del procedimiento experimental para la obtención del extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica*.

4.3.6 Cromatografías en capa fina del extracto diclorometánico con diclorometano/metanol y ciclohexano/acetato de etilo.

A pequeñas porciones del extracto diclorometánico se le realizaron cromatografías en capa fina analítica utilizando como fase móvil la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ a concentraciones de 10, 40 y 80% (figura 29). También se realizaron cromatografías en capa fina con Cy/AcOEt a concentraciones ascendentes de 10 en 10 hasta el 50% (figura 30). Luego a todas las placas finas se les roció reactivo de Oleum (ver la preparación del reactivo en los anexos) para revelar las manchas no visibles y se determinó que el eluyente más adecuado era la mezcla Cy/AcOEt al 20%. En las tablas 2 y 3 se presentan las características de las cromatografías en placa fina realizadas.



Figura 29. TLC analítica del extracto diclorometánico con fase móvil de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Las manchas fueron reveladas con reactivo de Oleum.

Tabla 2. TLC analítica del extracto diclorometánico con CH₂CL₂/MeOH.

Características	
Tamaño de la placa:	7.50x3.50 cm.
Grosor de la capa:	20 µm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/MeOH 10, 40 y 80%
Volumen de fase móvil:	5.00 mL
Número de manchas observadas:	3

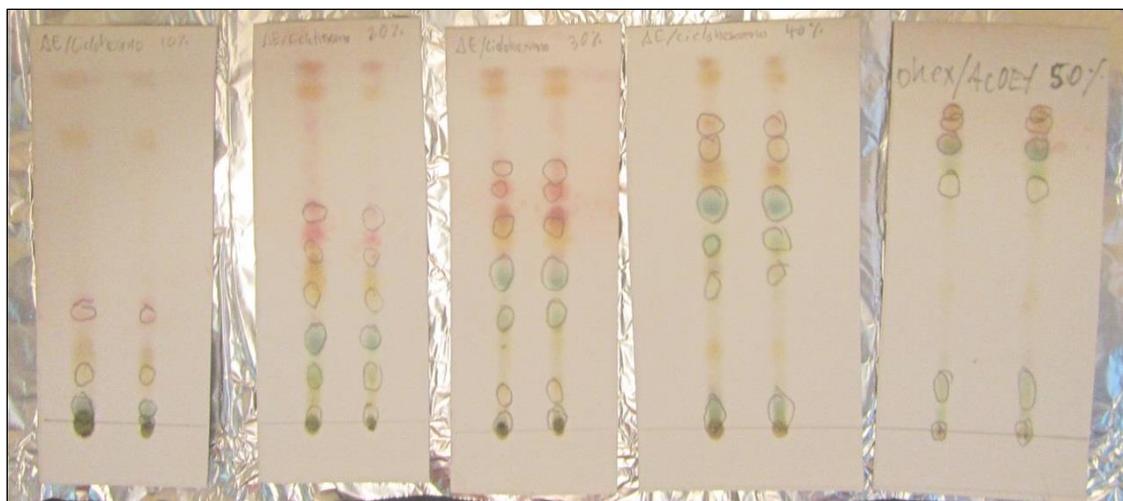


Figura 30. TLC analítica del extracto con fase móvil de Cy/AcOEt. Las manchas fueron reveladas con reactivo de Oleum.

Tabla 3. TLC analítica del extracto diclorometánico con Cy/AcOEt.

Características	
Tamaño de la placa:	7.50x3.50 cm
Grosor de la capa:	20 µm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 10, 20, 30, 40 y 50%
Volumen de fase móvil:	5.00 mL
Número de manchas observadas:	7

4.3.7 Cromatografía A.

Una vez determinado el eluyente más adecuado, se llevó a cabo una cromatografía en columna de sílica gel a 5.00 g del extracto diclorometánico (figura 31). De esta cromatografía se colectaron 82 fracciones y la columna tenía las características dadas en la tabla 4.

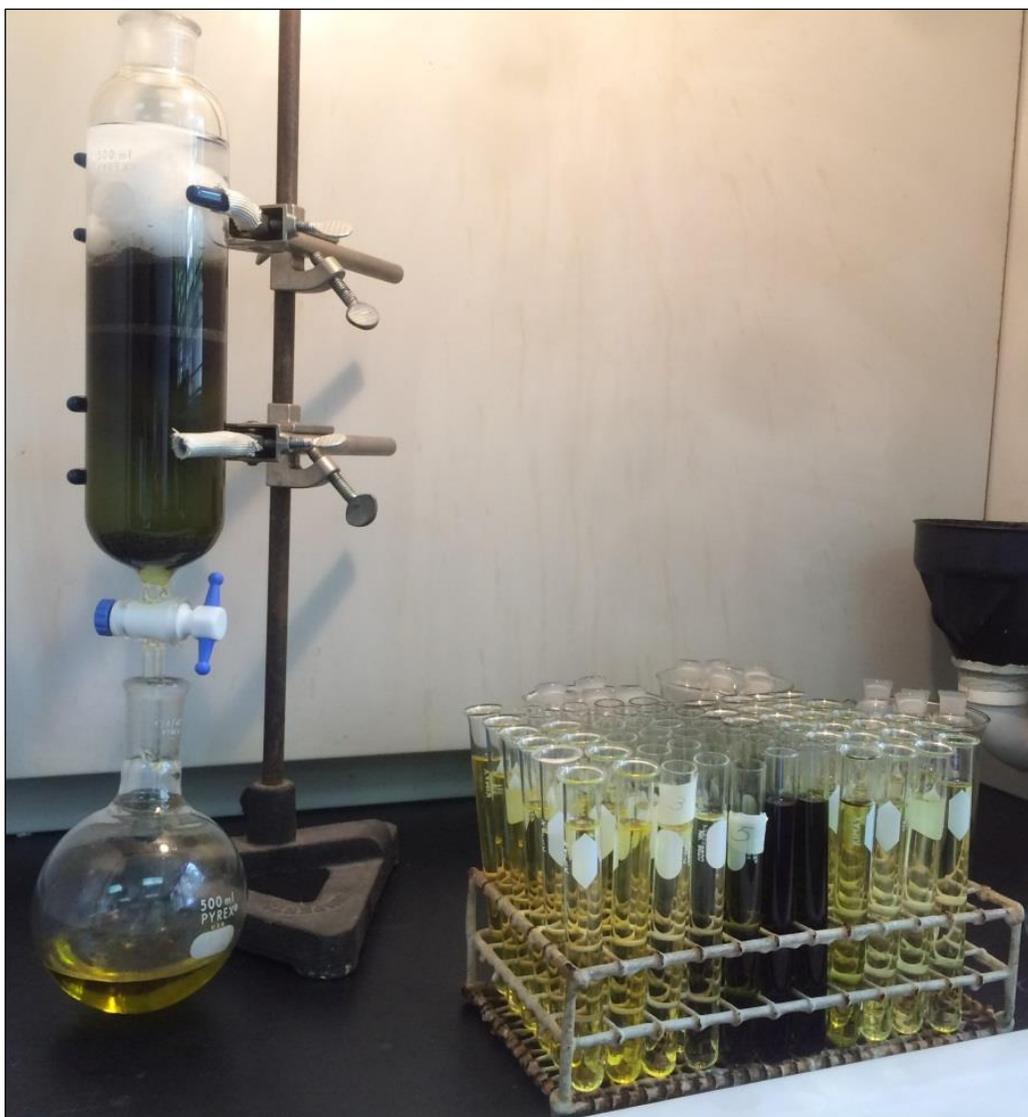


Figura 31. Columna de sílica gel y las 82 fracciones obtenidas.

Tabla 4. Cromatografía A: Cromatografía en columna de sílica gel.

Características	
Diámetro de columna:	6.40 cm
Altura de columna:	12 cm
Fase estacionaria:	Sílice 60
Fase móvil:	Cy/AcOEt
Gradiente:	2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 y 30 %
Volumen de fase móvil:	200 mL
Masa de extracto:	5.00 g
Número de fracciones colectadas:	82

A las 82 fracciones colectadas en la cromatografía A, se les realizó una cromatografía en capa fina analítica (figura 32) y después se utilizó el reactivo de Oleum y una lámpara UV,

que revelaron las manchas para hacer una reunión de la fracción 22 a la 44 (figura 33). La cromatografía en capa fina tenía las características especificadas en la tabla 5.

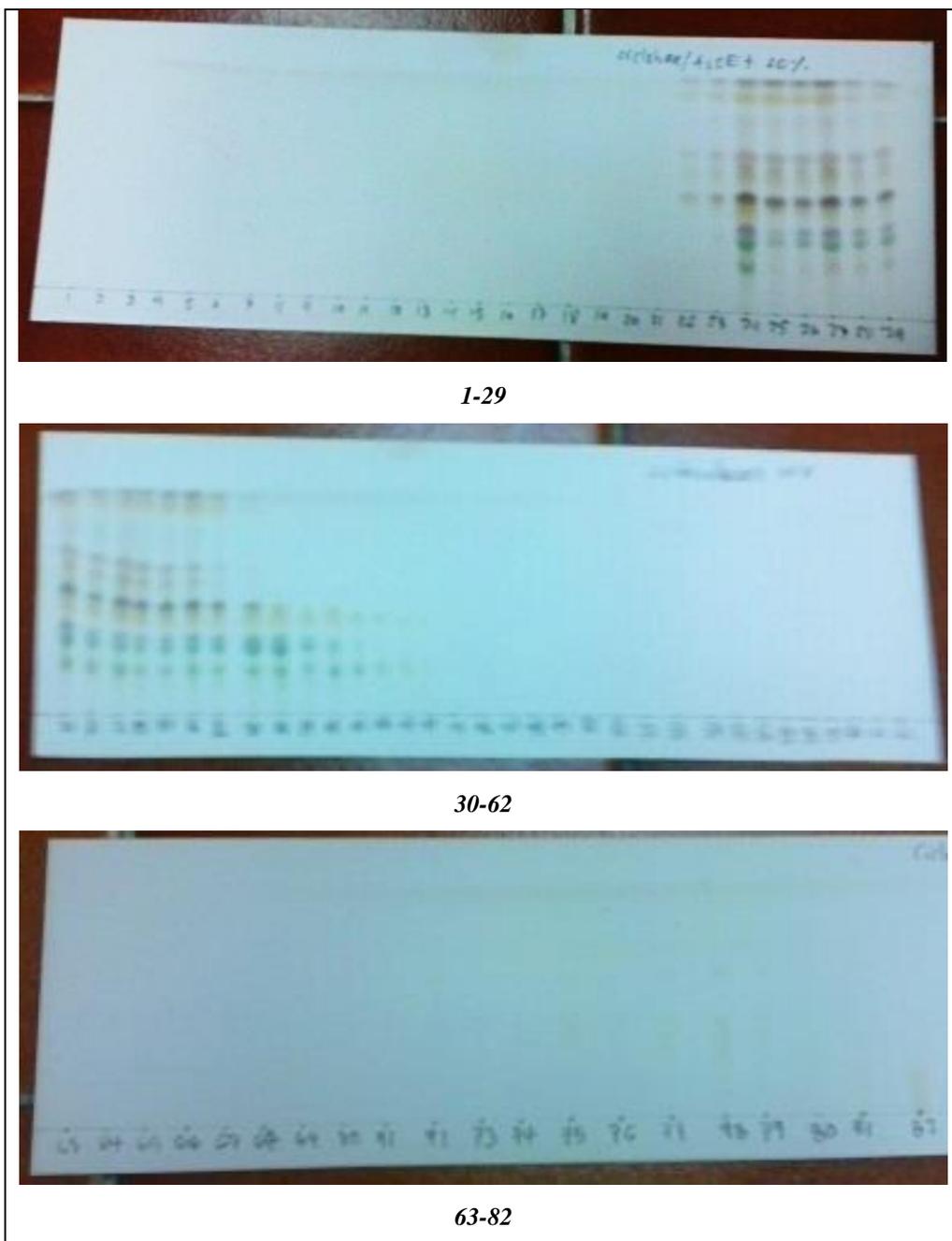


Figura 32. Cromatografía en capa fina a las 82 fracciones de la cromatografía A. Las manchas fueron reveladas con el reactivo de Oleum.

Tabla 5. TLC analítica de las 82 fracciones con Cy/AcOEt.

Características	
Tamaño de la placa:	20x7 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 20%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL

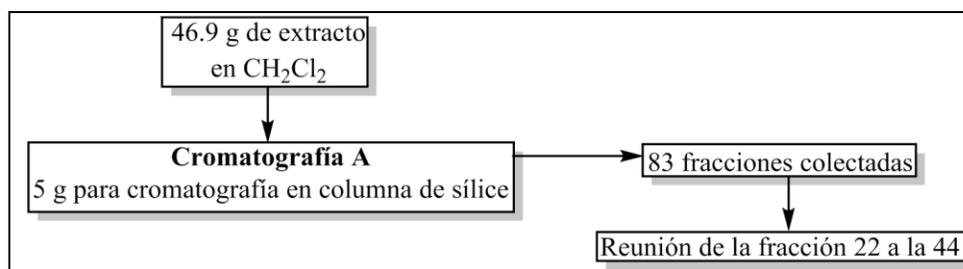


Figura 33. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de la reunión de la fracción 22 a la 44 resultado de la cromatografía A.

4.3.8 Cromatografía B.

La masa de la reunión de las fracciones 22 a 44, que resultó de la cromatografía A, fue de 1.17 g y se sometió a una cromatografía por exclusión de tamaño en sephadex LH-20 (figura 34). De la cromatografía se colectaron 38 fracciones. Las especificaciones de la columna para la cromatografía de exclusión por tamaño que se llevó a cabo se presentan en la tabla 6.

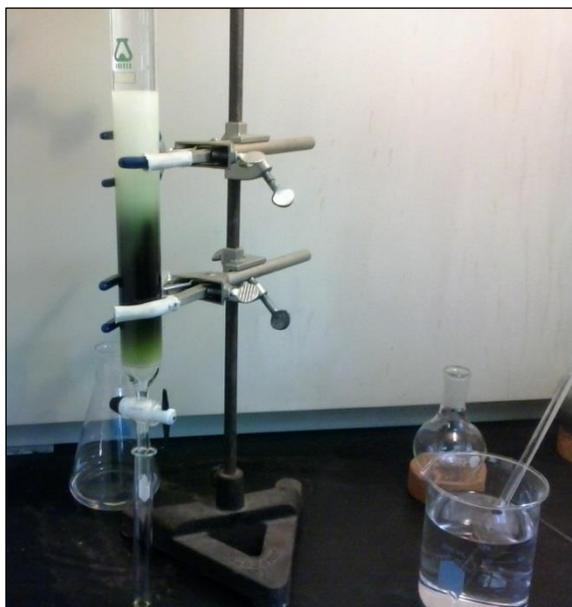


Figura 34. Columna de sephadex LH-20.

Tabla 6. Cromatografía B: Cromatografía de exclusión por tamaño.

Características	
Diámetro de columna:	3.30 cm
Altura de columna:	20 cm
Fase estacionaria:	Sephadex LH-20 (dextrano)
Fase móvil:	Hx/MeOH/CHCl ₃ (2/1/1)
Volumen de fase móvil:	171.00 mL
Masa de la reunión:	1.17 g (22-44A)
Número de fracciones colectadas:	38

Al conjunto de 38 fracciones obtenidas en la cromatografía B, se les realizó una cromatografía en capa fina analítica (figura 35) y, con la ayuda del reactivo de Oleum y la lámpara UV, se hicieron dos reuniones: La reunión de la fracción 4 a la 24 y la reunión de la fracción 25 a la 30 (figura 36). La cromatografía en placa fina tenía las mismas características que la realizada anteriormente y especificada en la tabla 5.

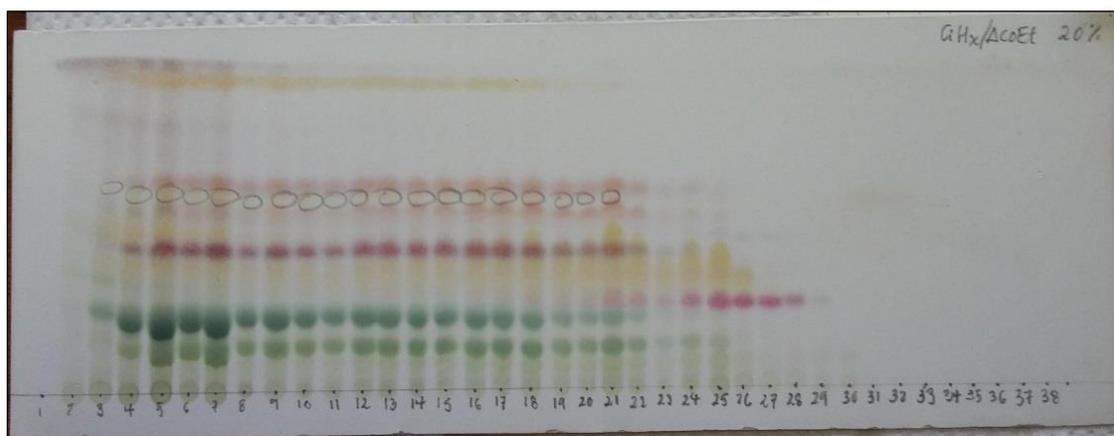


Figura 35. Cromatografía en capa fina a las 38 fracciones de la cromatografía B. Las manchas fueron reveladas con el reactivo de Oleum.

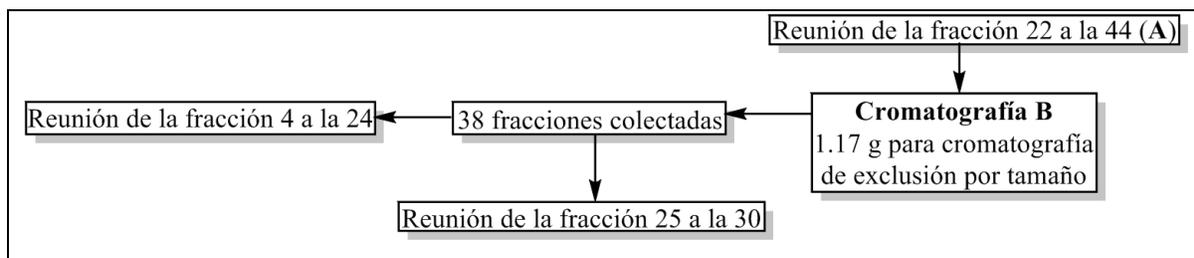


Figura 36. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 4 a la 24 y la de la fracción 25 a la 30 que resultaron de la cromatografía B.

4.3.9 Cromatografía B1.

La reunión de la fracción 4 a la 24, que se obtuvo de la cromatografía B, tenía una masa de 853.50 mg y se sometió a una cromatografía en columna de sílica gel (figura 37). El

resultado fue de 63 fracciones colectadas. En la tabla 7 se da la información de la cromatografía en columna de sílice que se desarrolló.

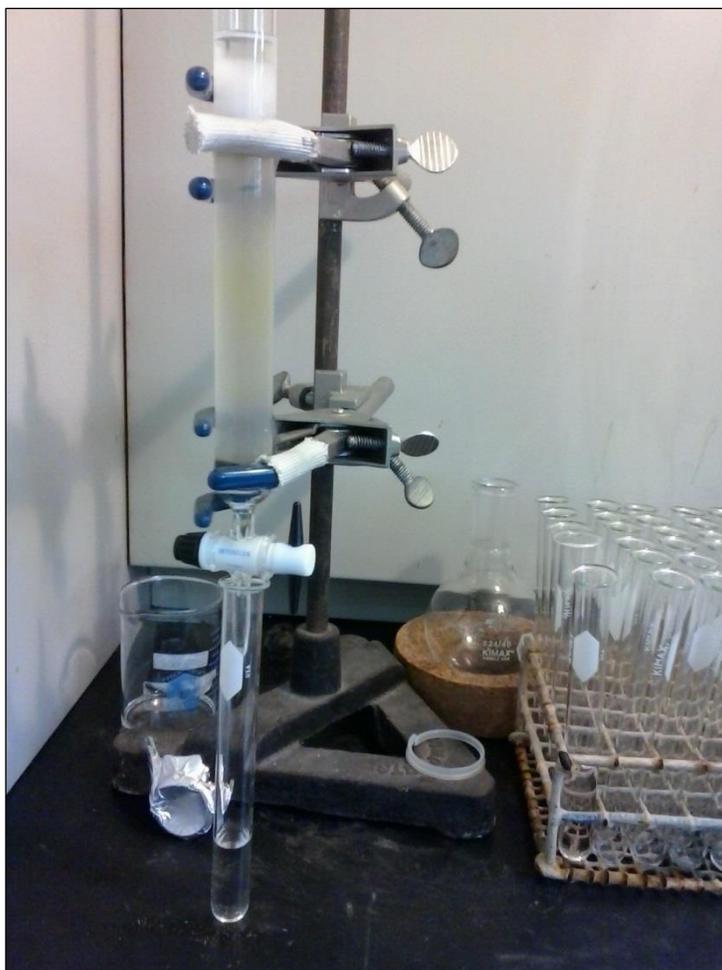


Figura 37. Columna de sílica gel y las 63 fracciones obtenidas.

Tabla 7. Cromatografía B1: Cromatografía en columna de sílica gel.

Características	
Diámetro de columna:	3.30 cm
Altura de columna:	10 cm
Fase estacionaria:	Sílice 60
Fase móvil:	Cy/AcOEt
Gradiente:	5, 7, 9, 12, 15, 18, 21, 25, 30 y 50%
Volumen de fase móvil:	70.00 mL
Masa de la reunión:	853.50 mg (4-24B)
Número de fracciones colectadas:	63

Después de que se llevó a cabo una cromatografía en capa fina analítica (figura 38) y, el revelado con reactivo de Oleum y la lámpara UV, se hicieron tres reuniones de las 63 fracciones colectadas: La reunión de la fracción 14 a la 28, la reunión de la fracción 35 a la

42 y la reunión de la fracción 43 a la 54 (figura 39). Las características de la cromatografía en capa fina son similares a las dos realizadas anteriormente y especificadas en la tabla 5.

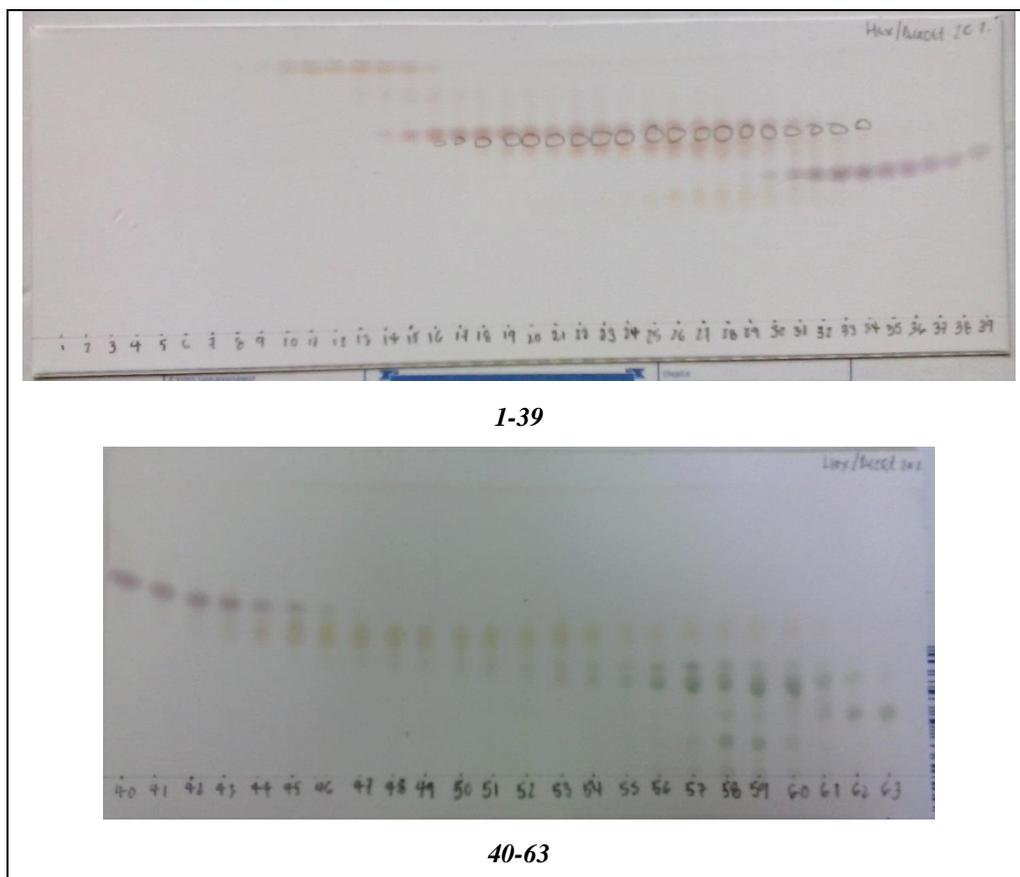


Figura 38. Cromatografía en capa fina a las 63 fracciones de la cromatografía B1. Las manchas fueron reveladas con el reactivo de Oleum.

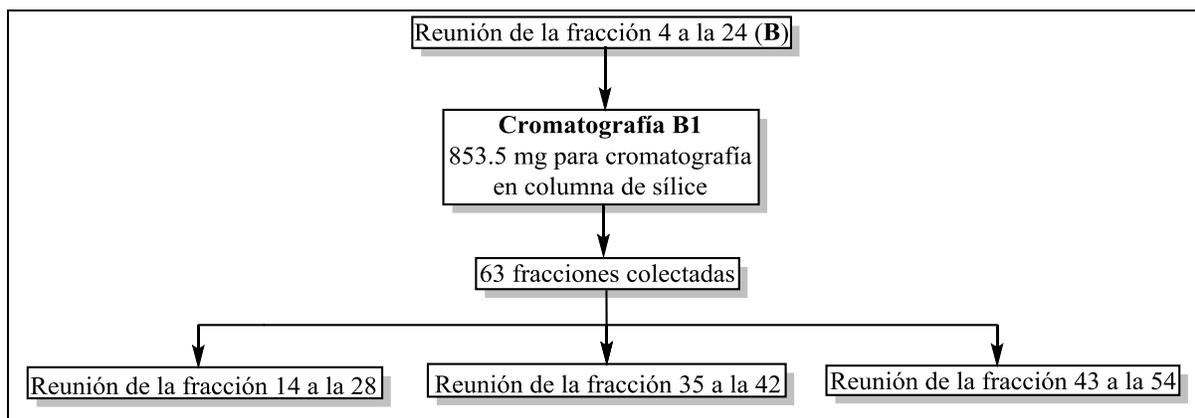


Figura 39. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 4 a la 28, de la fracción 35 a la 42 y la de la fracción 43 a la 54 que resultaron de la cromatografía B1.

4.3.10 Cromatografía B1A.

La masa de la reunión de las fracciones 14 a 28, obtenida en la cromatografía B1, fue de 118.40 mg. Ésta masa se sometió a una cromatografía en columna de sílica gel y se lograron coleccionar 36 fracciones (figura 40). En la tabla 8 se muestran las condiciones de la cromatografía que se llevó a cabo.

Tabla 8. Cromatografía B1A: Cromatografía en columna de sílica gel.

Características	
Diámetro de columna:	1.20 cm
Altura de columna:	10 cm
Fase estacionaria:	Sílice 60
Fase móvil:	Cy/AcOEt
Gradiente:	5, 7, 9, 12, 15, 18, 21, 25, 30 y 50 %
Volumen de fase móvil:	25.00 mL
Masa de la reunión:	118.40 mg (14-28B1)
Número de fracciones coleccionadas:	36

Al igual que en las ocasiones anteriores se desarrolló una cromatografía en capa fina analítica y, posterior revelado con reactivo de Oleum y la lámpara UV a las 36 fracciones obtenidas de la cromatografía B1A. De acuerdo a las manchas reveladas se obtuvieron dos reuniones: La reunión de la fracción 7 a la 18 y la reunión de la fracción 19 a la 34. La cromatografía en capa fina se realizó en las mismas condiciones que se llevaron a cabo para las fracciones obtenidas en las cromatografías A, B y B1. También se detallan las especificaciones en la tabla 5.

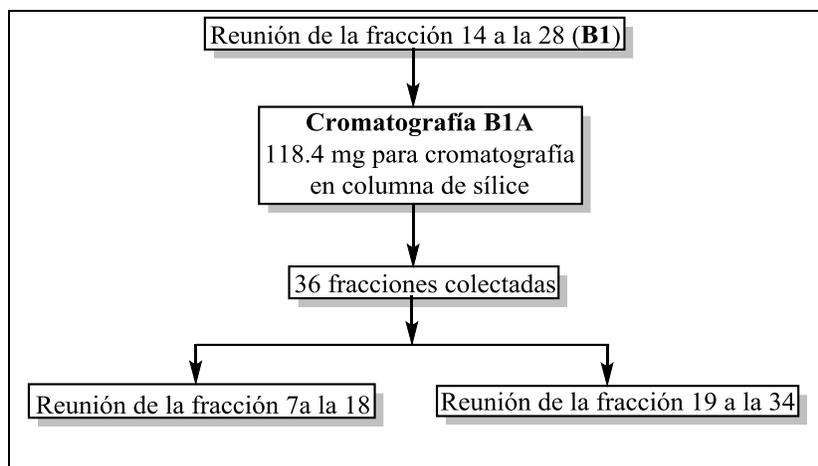


Figura 40. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de las reuniones de la fracción 7 a la 18 y la de la fracción 19 a la 34 que resultaron de la cromatografía B1A.

4.3.11 Cromatografía B1A1 y B1A2.

- La masa de la reunión de la fracción 7 a la 18, que resultó de la cromatografía B1A, pesó 22.50 mg (figura 41). A ésta masa se le realizó una cromatografía en capa fina preparativa con 50.00 mL de Cy/AcOEt al 20% y se lograron separar cinco compuestos. La cromatografía en capa fina preparativa se denominó B1A1 y de ella se obtuvieron 2.80 mg del compuesto B1A1a, 11.40 mg de B1A1b, 1.10 mg de B1A1c, 6.60 mg de B1A1d y 3.40 mg de B1A1e (figura 42). Las condiciones de la cromatografía se muestran en la tabla 9.

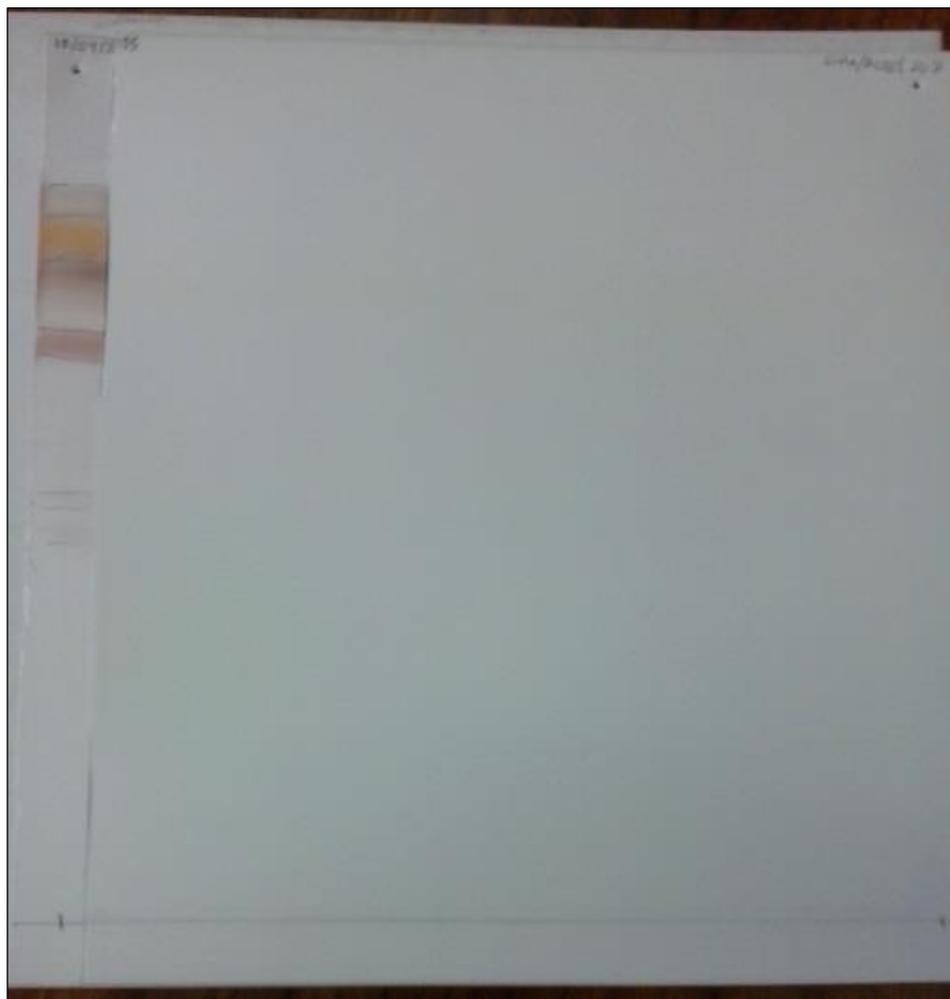


Figura 41. Hoja de cromatografía en capa fina en la que se desarrolló la cromatografía B1A1. Las manchas fueron reveladas por el reactivo de Oleum.

Tabla 9. Cromatografía B1A1: Cromatografía en capa fina preparativa.

Características	
Tamaño de la placa:	20x20 cm
Grosor de la capa:	20 µm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 20%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL
Masa de la reunión:	22.50 mg (7-18B1A)
Compuestos aislados:	B1A1a, B1A1b, B1A1c, B1A1d y B1A1e

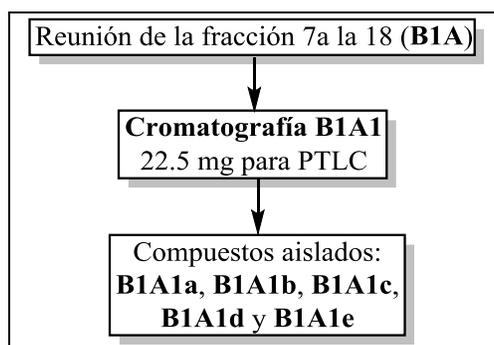


Figura 42. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1A1a, B1A1b, B1A1c, B1A1d y B1A1e.

- En el caso de la reunión de las fracciones 19 a la 34, obtenida también de la cromatografía B1A, la masa fue de 23.10 mg y se sometió a una cromatografía en placa fina preparativa (figura 43). La cromatografía se llevó a cabo con 50.00 mL de Cy/Ace al 15% y se separaron cinco compuestos. A la cromatografía se le asignó el código B1A2 y como resultado de su desarrollo, se obtuvieron 2.70 mg del compuesto B1A2a, 3.80 mg de B1A2b, 7.50 mg de B1A2c, 3.50 mg de B1A2d y 5.60 mg de B1A2e (figura 44). Las condiciones de la cromatografía se muestran en la tabla 10.

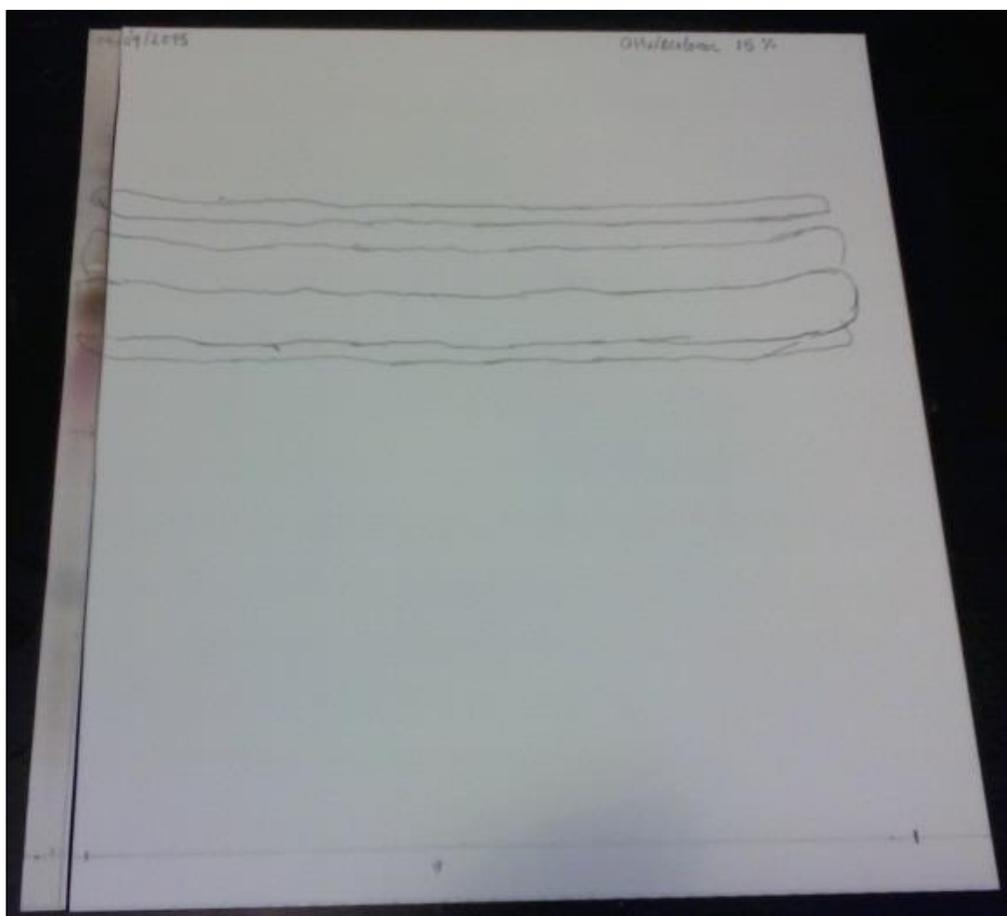


Figura 43. Hoja de cromatografía en capa fina en la que se desarrolló la cromatografía B1A2. Las manchas fueron reveladas por el reactivo de Oleum.

Tabla 10. Cromatografía B1A2: Cromatografía en capa fina preparativa.

Características	
Tamaño de la placa:	20x20 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/Ace 15%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL
Masa de la reunión:	23.10 mg (19-34B1A)
Compuestos aislados:	B1A2a, B1A2b, B1A2c, B1A2d y B1A2e

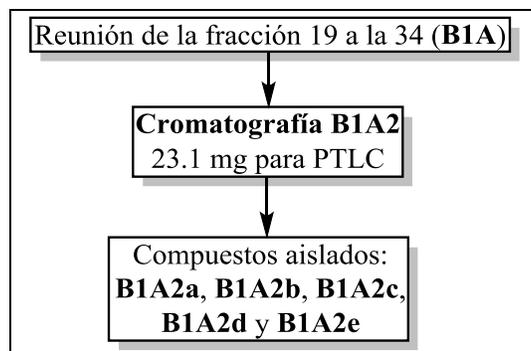


Figura 44. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1A2a, B1A2b, B1A2c, B1A2d y B1A2e.

4.3.12 Cromatografía B1B y B1C.

- De la cromatografía B1 se obtuvo la reunión de las fracciones 35 a la 42, que pesó 53.10 mg. Con ésta masa se desarrolló una cromatografía en capa fina preparativa en 50.00 mL de Cy/AcOEt al 20%. El código asignado a la cromatografía fue B1B y cuando se llevó a cabo se obtuvieron 3.70 mg del compuesto B1B1 y 22.30 mg de B1B2. Las condiciones de la cromatografía preparativa se dan en las tablas 11.

Tabla 11. Cromatografía B1B: Cromatografía en capa fina preparativa.

Características	
Tamaño de la placa:	20x20 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 20%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL
Masa de la reunión:	53.10 mg (35-42B1)
Compuestos aislados:	B1B1 y B1B2

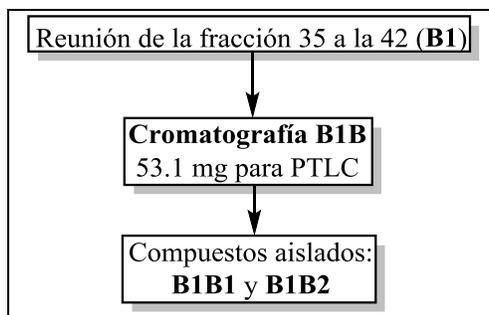


Figura 45. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1B1 y B1B2.

- La masa de 23.40 mg de la reunión de las fracciones 43 a 54, también obtenida en la cromatografía B1, se sometió a una cromatografía en capa fina preparativa en las mismas condiciones que la cromatografía B1B. A dicha cromatografía se le denominó B1C y se obtuvieron 7.90 mg del compuesto B1C1 y 10.00 mg de B1C2 (figura 46). Las condiciones de la cromatografía preparativa se dan en las tablas 12.

Tabla 12. Cromatografía B1C: Cromatografía en capa fina preparativa.

Características	
Tamaño de la placa:	20x20 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 20%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL
Masa de la reunión:	23.40 mg (43-54B1)
Compuestos aislados:	B1C1 y B1C2

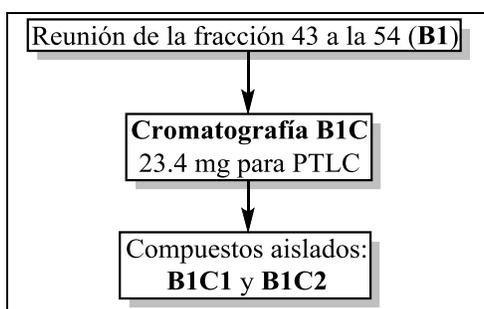


Figura 46. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B1C1 y B1C2.

4.3.13 Cromatografía B2.

La cromatografía en capa fina preparativa B2 se llevó a cabo con los 14.10 mg de masa reunida de las fracciones 25 a la 30 obtenidas en la cromatografía B (figura 47). Los compuestos que se lograron separar fueron tres. Se obtuvieron 0.85 mg del compuesto B2A, 4.00 mg de B2B y 11.50 mg de B2C (figura 48). Las condiciones de la cromatografía son las mismas que las dos anteriores y se muestran la tabla 13.

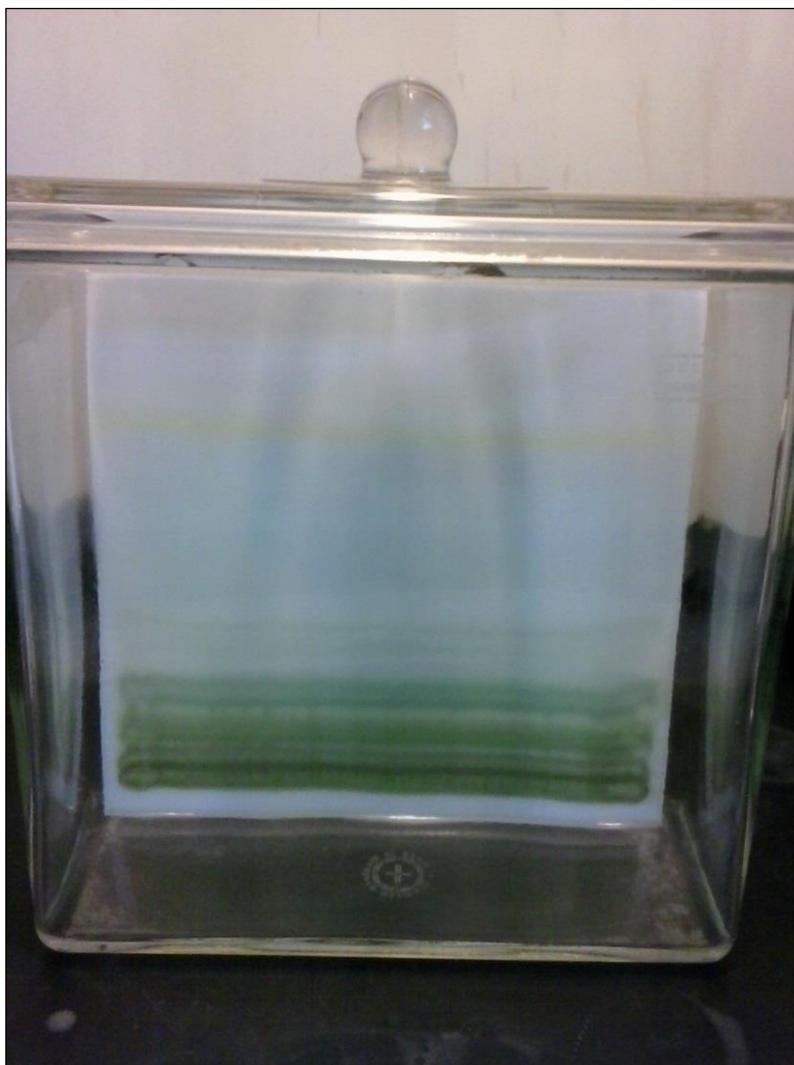


Figura 47. Desarrollo de la cromatografía B2.

Tabla 13. Cromatografía B2: Cromatografía en capa fina preparativa.

Características	
Tamaño de la placa:	20x20 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 Å
Fase móvil:	Cy/AcOEt 20%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL
Masa de la reunión:	14.10 mg (25-30B)
Compuestos aislados:	B2A, B2B y B2C

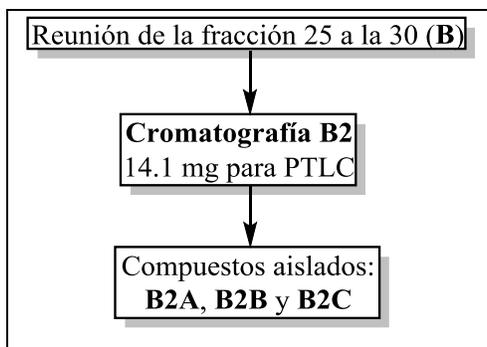


Figura 48. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de los compuestos B2A, B2B y B2C.

4.3.14 Cromatografía en capa fina con ciclohexano/acetona a todos los compuestos obtenidos y prueba con reactivo de Baljet.

A una pequeña porción de los 17 compuestos se les hicieron dos cromatografías en capa fina analítica con Cy/Ace al 30%. Posteriormente a una de las placas se le roció reactivo de Oleum y a la otra reactivo de Baljet para identificar lactonas (ver la preparación del reactivo en los anexos). Ninguna de las manchas dio resultado positivo para Baljet (figura 49), luego se seleccionaron algunos compuestos para realizarles análisis RMN ^1H y confirmar los resultados que se obtuvieron del reactivo de Baljet. Las condiciones para cada cromatografía en capa fina analítica se muestran en la tabla 14.

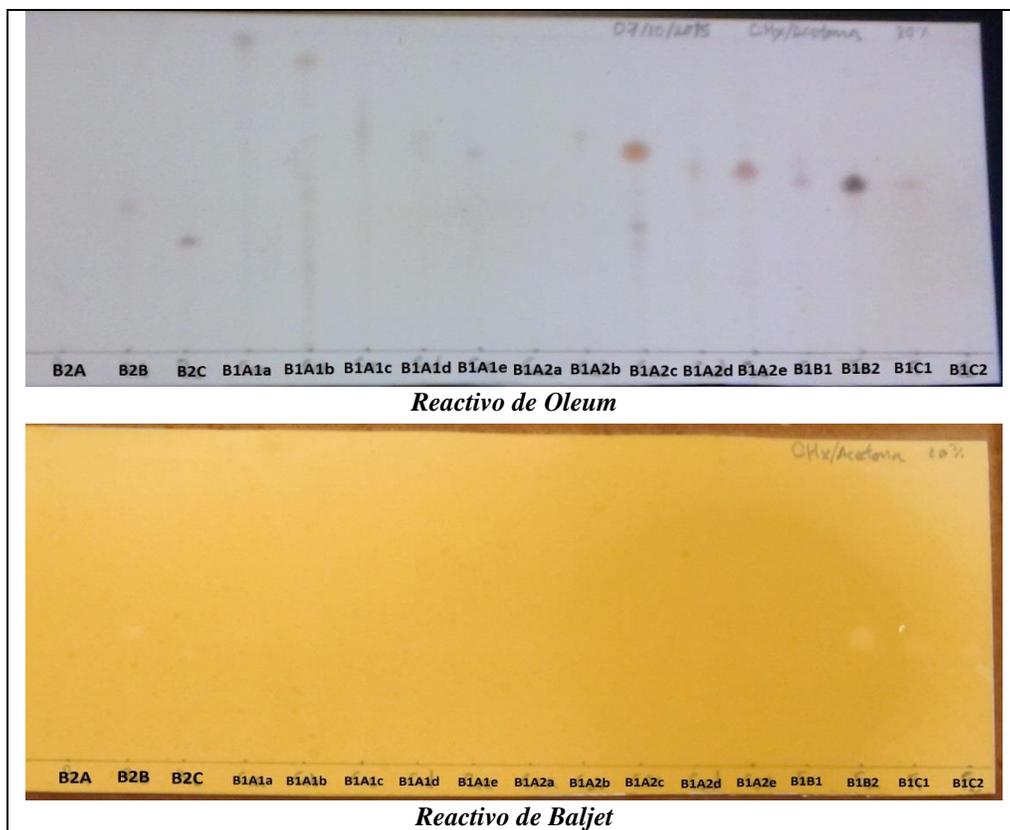


Figura 49. Revelación de manchas con reactivo de Oleum y Baljet.

Tabla 14. Cromatografía en capa fina analítica de todos los compuestos con Cy/Ace.

Características	
Tamaño de la placa:	20x7 cm
Grosor de la capa:	20 μm
Fase estacionaria:	Sílice
Tamaño de poro:	60 \AA
Fase móvil:	Cy/Ace 30%
Volumen de fase móvil:	50.00 mL

4.3.15 Identificación de los metabolitos secundarios por RMN ^1H y ^{13}C .

De los 17 compuestos obtenidos, se seleccionaron 13 para realizarles análisis de RMN ^1H en la Universidad de Costa Rica. Los compuestos seleccionados fueron B1B1, B1B2, B1C1, B1A1a, B1A1b, B1A1c, B1A1d, B1A2b, B1A2c, B1A2d, B1A2e, B2B y B2C (figura 50). Luego de Obtener los espectro RMN ^1H se seleccionaron los compuestos B1A1b, B1A2c y B1B2 para análisis de RMN ^{13}C (tabla 15).

Los espectros RMN ^1H y ^{13}C fueron realizados en un instrumento Bruker Ascend 600 (600 y 151 MHz para los núcleos de ^1H y ^{13}C , respectivamente). Los desplazamientos químicos se reportan relativos al tetrametilsilano (TMS) para los núcleos de ^1H y ^{13}C con

unidades de partes por millón (ppm), utilizando como referencia el CHCl_3 , 7.26 y 77 ppm, respectivamente.



Figura 50. Viales con los metabolitos secundarios aislados del extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica*.

Tabla 15. Compuestos aislados del extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica* L.

Código del compuesto	Masa (mg)	Análisis espectroscópico.	
		RMN ^1H	RMN ^{13}C
B1A1a	2.80	✓	-
B1A1b	11.40	✓	✓
B1A1c	1.10	✓	-
B1A1d	6.60	✓	-
B1A1e	3.40	-	-
B1A2a	2.70	-	-
B1A2b	3.80	✓	-
B1A2c	7.50	✓	✓
B1A2d	3.50	✓	-
B1A2e	5.60	✓	-
B1B1	3.70	✓	-
B1B2	22.30	✓	✓
B1C1	7.90	✓	-
B1C2	10.00	-	-
B2A	0.85	-	-
B2B	4.00	✓	-
B2C	11.50	✓	-

El signo “✓” indica que se realizó el análisis espectroscópico y “-” indica que no se llevó a cabo.

4.3.16 Esquema del procedimiento experimental para la extracción de metabolitos secundarios de *Asclepias curassavica*.

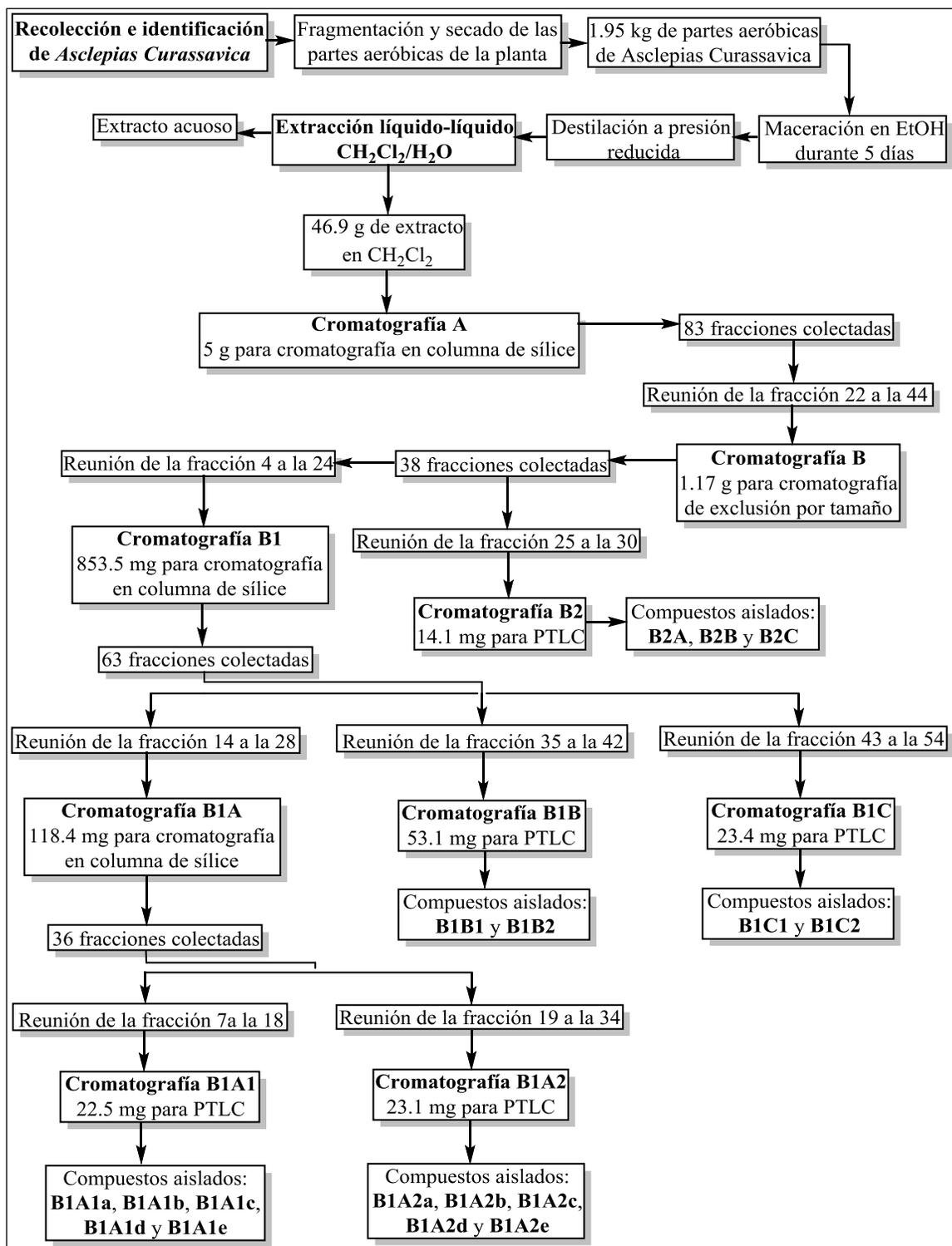


Figura 51. Resumen del procedimiento experimental para la extracción e identificación de metabolitos secundarios de *Asclepias curassavica* L.

5. Resultados y discusión.

5.1 Compuestos aislados.

Las continuas cromatografías al extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica* L., permitieron aislar 17 compuestos. A continuación se presenta una tabla de los compuestos con una breve descripción:

Tabla 16. Datos generales de los compuestos aislados.

Código	Masa (mg)	Rf (Cy/Ace 20 %)	Descripción	Análisis espectroscópico	
				RMN ¹ H	RMN ¹³ C
B1A1a	2.80	-	Aceite de aspecto amarillento traslúcido.	✓	-
B1A1b	11.40	0.43	Masa aceitosa color blanco amarillento.	✓	✓
B1A1c	1.10	0.32	Masa aceitosa blanca amarillenta.	-	-
B1A1d	6.60	0.95	Aceite amarillento traslúcido.	✓	-
B1A1e	3.40	0.88	Aceite color amarillo traslúcido.	✓	-
B1A2a	2.70	-	Aceite amarillento traslúcido.	-	-
B1A2b	3.80	0.66	Aceite color amarillo traslúcido.	✓	-
B1A2c	7.50	0.60	Masa color blanco amarillento.	✓	✓
B1A2d	3.50	0.66	Aceite color amarillo traslúcido.	✓	-
B1A2e	5.60	0.60	Aceite amarillo traslúcido.	✓	-
B1B1	3.70	0.60	Masa aceitosa color blanco amarillento.	✓	-
B1B2	22.30	0.57	Sólido color blanco.	✓	✓
B1C1	7.90	0.57	Compuesto color blanco cristalino.	✓	-
B1C2	10.00	0.54	Sólido aceitoso color blanco amarillento.	-	-
B2A	0.85	0.54	Aceite color amarillo traslúcido.	-	-
B2B	4.00	0.52	Aceite color amarillo traslúcido.	✓	-
B2C	11.50	-	Compuesto color blanco cristalino.	✓	-

El signo “✓” indica que se realizó el análisis espectroscópico y “-” indica que no se llevó a cabo.

Para el procesamiento de muestras en el equipo de RMN ¹H, se seleccionaron los 13 compuestos a los que se logró aislar en mayor masa y aparentaban estar más puros. Los compuestos seleccionados fueron B1A1a, B1A1b, B1A1d, B1A1e, B1A2b, B1A2c, B1A2d, B1A2e, B1B1, B1B2, B1C1, B2B y B2C.

5.2 Selección de los compuestos por análisis de espectros de RMN ¹H.

Los espectros de RMN ¹H obtenidos de los 13 compuestos seleccionados, se analizaron con la ayuda de programas informáticos procesadores de espectros de RMN tales como mnova 10.0, ACD/1D NMR Processor 12.0, ChemBioDraw Ultra 12.0 y el simulador en línea NMR Predict. Resultó que la mayoría de compuestos presentaron señales características de protones esteroidales y otros compuestos presentan señales de protones de ácido graso esterificado.

El compuesto B1A1b presentó un espectro de RMN ^1H con señales definidas y características de éster (RCH_2COOR a δ 2.31 ppm y RCOOCH_2R a δ 4.12 ppm⁴⁸), al igual que los compuestos B1A1a, B1A2d, B1B1 y B2B, pero a diferencia que estos últimos compuestos no mostraban las señales con una buena resolución. En la figura 52 se muestra el apilamiento de los espectros de los compuestos B1A1a, B1A1b, B1A2d, B1B1 y B2B. Las señales en los espectros indican que se trata del mismo tipo de compuesto, pero por la poca resolución que algunos espectros de RMN ^1H presentan, no es posible definir si algunos o todos los espectros corresponden a un mismo compuesto o si todos son diferentes entre sí, sin embargo, es claro que todos los compuestos son ácidos grasos esterificados y que por tener mejor resolución el espectro de RMN ^1H del compuesto B1A1b, se seleccionó para realizarle un segundo análisis y determinar el espectro de RMN ^{13}C . En apartados posteriores se detalla el análisis de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A1b.

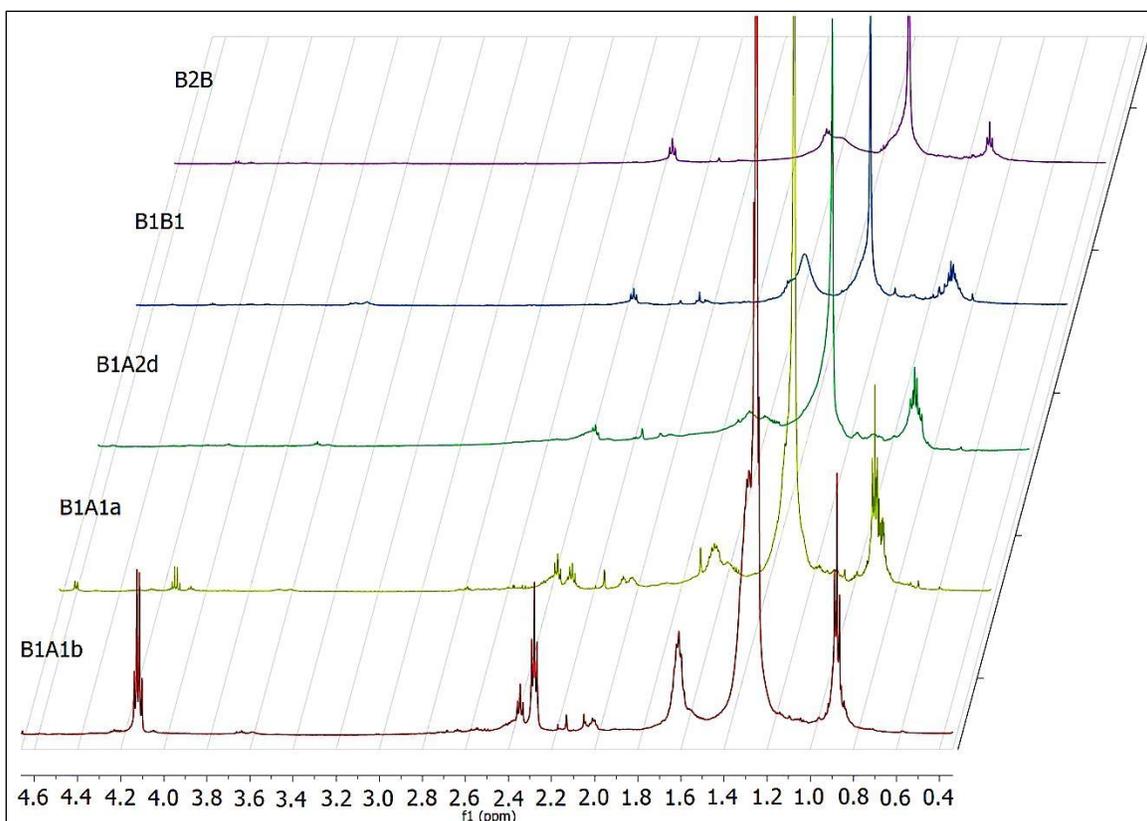


Figura 52. Apilamiento de espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de los compuestos B1A1a, B1A1b, B1A2d, B1B1 y B2B.

El compuesto B1B2 presentó un espectro de RMN ^1H con señales características de un compuesto esteroidal ($\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ a δ 5.35 ppm y R_2CHOH a δ 3.53 ppm⁴⁹), al igual que los

espectros de los compuestos B1A1d, B1A2b, B1A2c, B1A2e y B1C1. En este caso, el apilamiento de los espectros en la figura 53 también indica que corresponden a un mismo tipo de compuesto y el más puro es B1B2. Se puede decir que todos son compuestos esteroidales, pero por la baja resolución de los espectros de B1A1d, B1A2b, B1A2c, B1A2e y B1C1 no se puede definir si todos los esteroides son diferentes entre sí o si todos son el mismo compuesto. Los compuestos B1A2c y B1B2 fueron seleccionados para procesarlos y obtener los espectros de RMN ^{13}C . El análisis completo se detalla posteriormente en otro apartado de esta discusión.

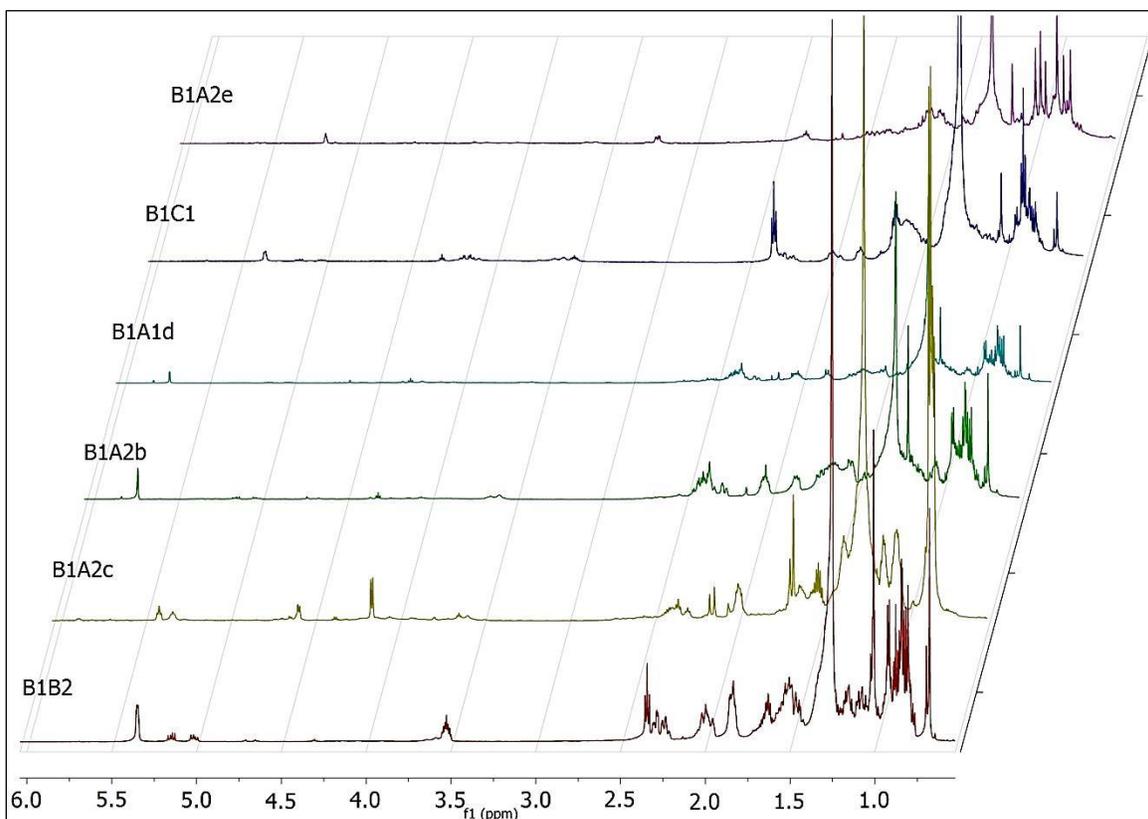


Figura 53. Apilamiento de espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de los compuestos B1A1d, B1A2b, B1A2c, B1A2e, B1B2 y B1C1.

En total fueron 3 compuestos los seleccionados para procesarlos y obtener los espectros de RMN ^{13}C (B1A1b, B1A2c y B1B2).

5.3 Elucidación de estructuras por análisis de espectros de RMN ^1H y ^{13}C .

5.3.1 Compuesto B1A1b.

El compuesto denominado B1A1b, aislado como una masa aceitosa color blanco amarillento, cuyo espectro de protón, presenta las siguientes señales:

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 4.12 (c, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.31 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.24-1.29 (m, 19H), 0.88 (t, $J=7.0$ Hz, 3H).

En primer lugar, se observa una señal a δ 4.12 ppm como un cuartete ($J=7.1$ Hz), que integra para dos protones (figura 54). Seguido, se observa una señal de triplete a δ 2.28 ppm ($J=7.1$ Hz) que también integra para dos protones. A δ 1.61 ppm aparece un multiplete que integra para dos protones. En la zona δ 1.24-1.29 ppm se observa un multiplete ancho que integra para 19 protones y que se corresponde con señales de metileno de una cadena alifática. A campo alto δ 0.88 ppm aparece un triplete ($J=7.0$ Hz) que integra para tres protones y que corresponde a un metilo terminal.

De acuerdo a las señales presentadas por el compuesto B1A1b, se puede decir que se trata de un compuesto alifático de cadena abierta, ya que presenta varias señales de grupos metileno. En este orden, existe al menos un carbono unido a un heteroátomo, que se evidencia por los desplazamientos químicos a campo bajo de tres grupos de estas señales.

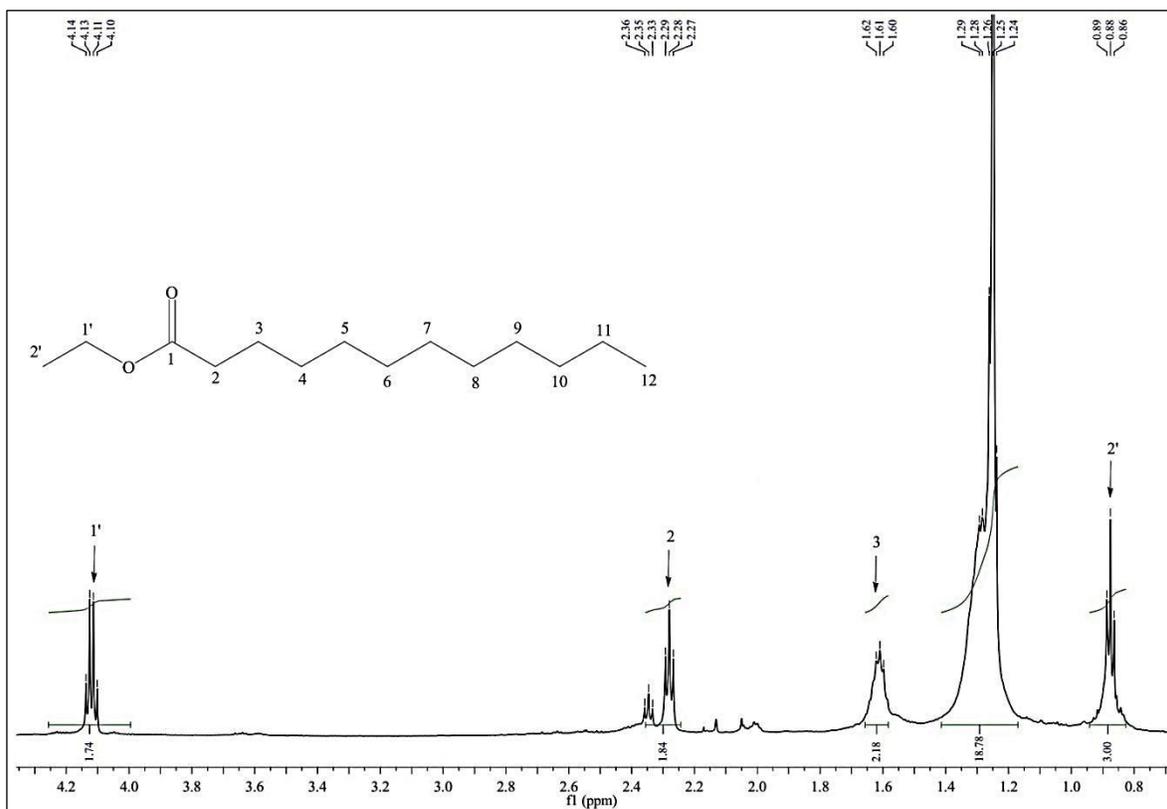


Figura 54. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A1b.

El espectro de RMN ^{13}C , mostró las siguientes señales:

RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 174.0 (C1), 60.17 (C1'), 34.4 (C2), 31.9 (C10), 29.5 (C4, C5, C6, C7, C8, C9), 25.0 (C3), 22.7 (C11), 14.2 (C2', C12).

Las ocho señales corresponden a 14 carbonos, destacando la que aparece a δ 174.0 ppm, la cual corresponde a un grupo carbonilo de éster (figura 55). Así también un carbono a δ 60.17 ppm, que es un carbono unido a oxígeno. En la zona de δ 22.7 ppm a δ 34.4 ppm se observan señales para 10 carbonos alifáticos y a campo alto existen dos carbonos que se corresponden con grupos metilo, siendo dos metilos terminales.

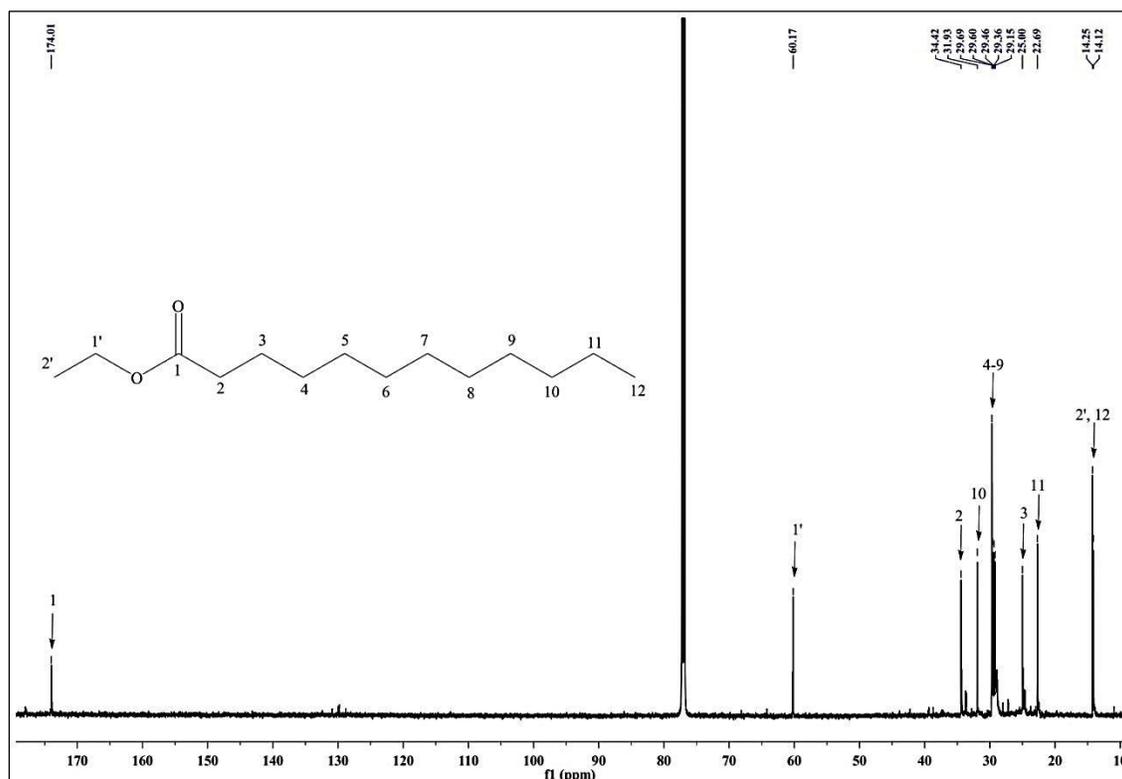


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A1b.

Después de revisar las señales, tanto de RMN ^1H como de RMN ^{13}C , se establece que el compuesto B1A1b es un éster de ácido graso, confirmado por la señal en el espectro de ^{13}C , de grupo carbonilo de éster, a δ 174.0 ppm; y además, la señal del carbono unido a oxígeno a δ 60.17 ppm. De tal forma que el éster posee una cadena alifática de ácido graso de 12 carbonos, unida por heteroátomo a una cadena de alcohol de dos carbonos, tal como se observa en el espectro de ^1H a δ 4.12 ppm.

A partir de los datos descritos, las simulaciones en NMR Predict⁵⁰ y, la comparación con los datos aportados en la literatura⁴⁸ (tabla 17), permitieron confirmar la estructura de B1A1b como **dodecanoato de etilo** o **laurato de etilo** (C₁₄H₂₈O₂).

Tabla 17. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ¹H y ¹³C del dodecanoato de etilo.^{48, 50}

Posición	Protón			Carbono		
	Desplazamientos químicos [δ ¹ H (ppm)]			Desplazamientos químicos [δ ¹³ C (ppm)]		
	Experimental 600 MHz	Bibliográfico 89.56 MHz	Simulado 600 MHz	Experimental 151 MHz	Bibliográfico 25.16 MHz	Simulado 150 MHz
1	-	-	-	174.0	173.76	172.97
2	2.31 t (J=7.6 Hz)	2.27 t	2.25 t	34.4	34.39	34.36
3	1.61 m	1.61 m	1.55 q	25.0	25.04	25.27
4	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.66 ^a	29.36 ^a
5	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.66 ^a	29.36 ^a
6	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.52	29.36 ^a
7	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.39 ^b	29.21 ^b
8	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.39 ^b	29.21 ^b
9	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	29.5 ^a	29.22	28.95
10	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	31.9	31.97	32.41
11	1.24-1.29 ^a m	1.04-1.52 ^a m	1.23-1.26 ^a m	22.7	22.74	22.62
12	1.24-1.29 ^a m	1.251 t	1.15 t (J=6.8 Hz)	14.2 ^b	14.09	13.99
1'	4.12 c (J=7.1 Hz)	4.119 c (J=7.19 Hz)	4.12 c (J=7.3 Hz)	60.17	60.08	60.67
2'	0.88 t (J=7.0 Hz)	0.88 t	0.87 t	14.2 ^b	14.24	14.14

Los superíndices "a" y "b" indican las señales que se traslapan en los espectros descritos en cada columna.

La figura 56 muestra el apilamiento de los espectros de protón de B1A1b y el espectro simulado para el dodecanoato de etilo. Se puede observar que hay mucha semejanza en ambos espectros, lo que hace inferir acerca de la identidad del compuesto B1A1b. Las mismas semejanzas se pueden observar en los espectros de carbono apilados (figura 57).⁵⁰

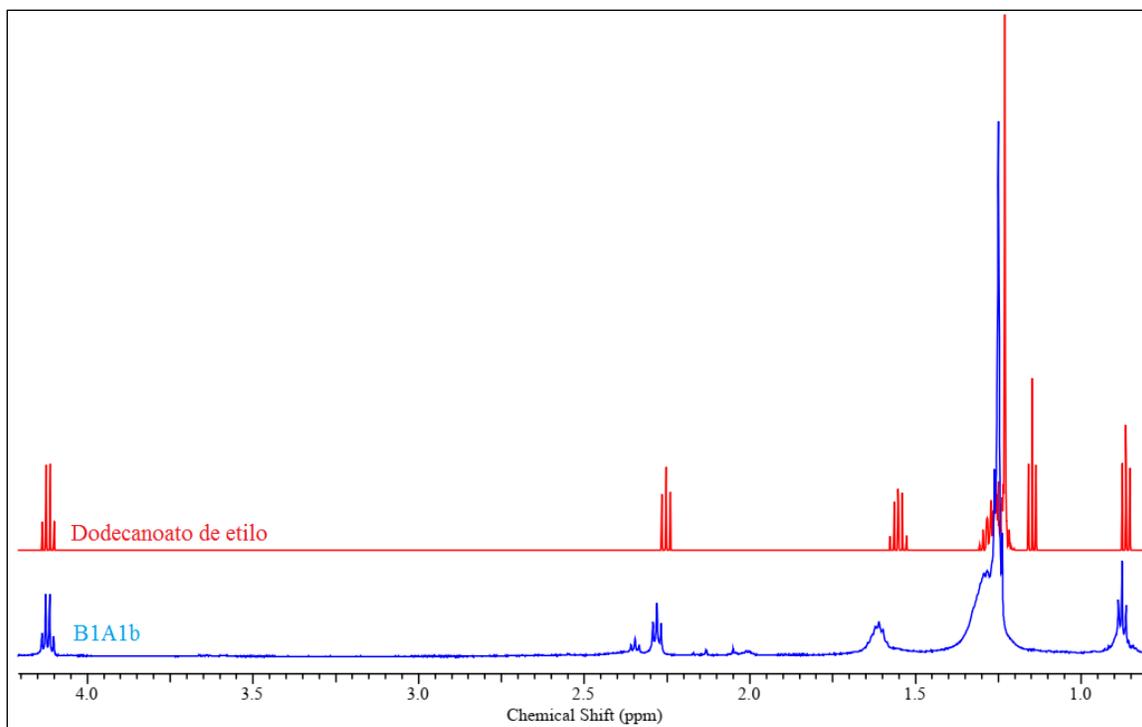


Figura 56. Apilamiento del espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A1b y el espectro de RMN ^1H simulado para el dodecanoato de etilo. NMRDB.ORG.

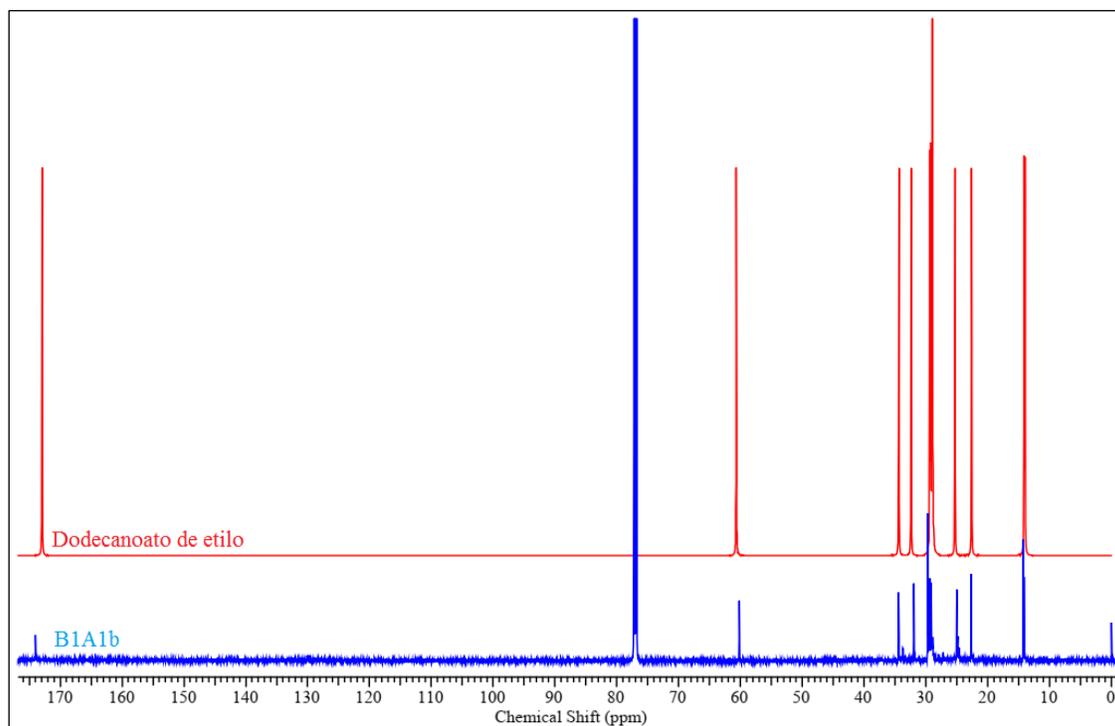


Figura 57. Apilamiento del espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A1b y el espectro de RMN ^{13}C simulado para el dodecanoato de etilo. NMRDB.ORG.

En la identificación de los metabolitos secundarios extraídos del extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica*, no se han podido emplear otras técnicas como espectroscopia de RMN bidimensional, espectroscopia infrarrojo o espectrometría de masas, sin embargo, se han hecho análisis comparando datos experimentales y datos computacionales de RMN ^1H y ^{13}C . En dicho análisis se grafican los desplazamientos químicos experimentales contra los desplazamientos químicos simulados por computadora para una estructura propuesta. Se debe tomar en consideración que la gráfica será de utilidad si solamente se comparan datos experimentales de protón con datos simulados de protón ($\delta\text{H}_{\text{Exp}}$ vs $\delta\text{H}_{\text{Calc}}$) y lo mismo en el caso de los datos de carbono ($\delta\text{C}_{\text{Exp}}$ vs $\delta\text{C}_{\text{Calc}}$). Luego se determina una ecuación de correlación lineal ($Y = aX+b$) y si los datos se ajustan al modelo lineal a partir del coeficiente de determinación (R^2). Es importante saber que el resultado del coeficiente de determinación oscila entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 se sitúe su valor, mayor será el ajuste del modelo a la variable que estamos intentando explicar. De forma inversa, cuanto más cerca de cero, menos ajustado estará el modelo y, por tanto, menos fiable será.^{51, 52} La fórmula para calcular el coeficiente de determinación es:

$$R^2 = \frac{S_{xy}^2}{S_x^2 S_y^2}$$

Donde:

R^2 es el coeficiente de determinación.

S_x^2 es la varianza de la variable X.

S_y^2 es la varianza de la variable Y.

S_{xy} : es la covarianza (X, Y).

Mediante correlación lineal se determinó que los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A1b y los simulados en la plataforma NMR Predict para el dodecanoato de etilo dan como resultado los coeficientes de determinación de 0.9997 y 0.9999, para protón y carbono, respectivamente (figura 58). Los datos de los coeficientes de determinación que resultaron son cercanos a 1, por lo que podemos concluir que los datos se ajustan al modelo lineal y que los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A1b son semejantes a los del dodecanoato de etilo. Por lo que es evidencia que refuerza que el compuesto B1A1b es el dodecanoato de etilo.⁵⁰

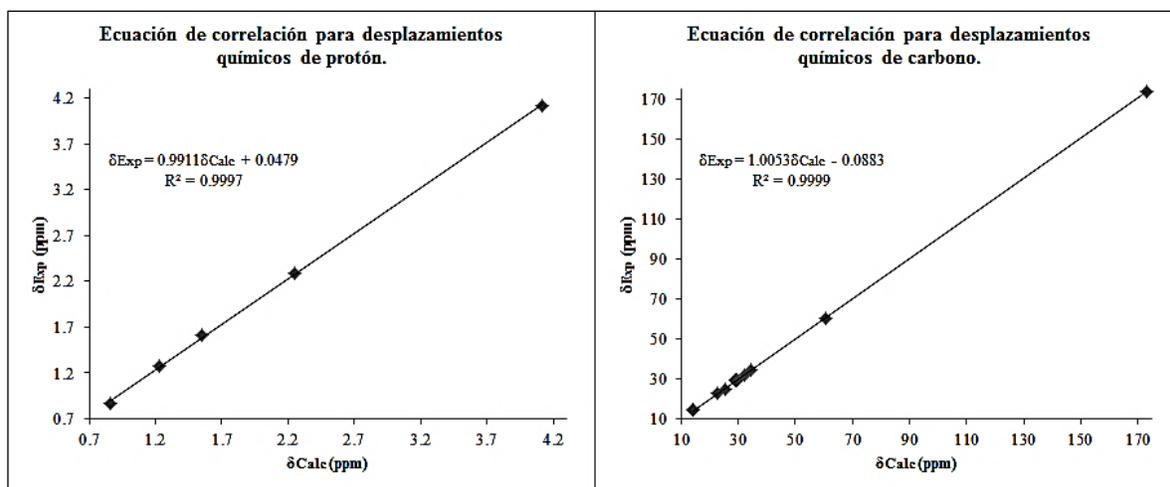


Figura 58. Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto B1A1b.

5.3.2 Compuesto B1A2c.

El compuesto B1A2c, se aisló como un sólido color blanco amarillento y de su espectro de protón se registraron las siguientes señales:

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 5.35 - 5.31 (m, 1H), 4.15 (s, 1H), 2.43 - 2.28 (m, 2H), 2.15 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 1.99 (m, $J = 13.3, 5.6$ Hz, 2H), 1.69 - 1.49 (m, 20H), 1.25 (m, 4H), 1.16 - 1.04 (m, 4H), 0.86 (m, $J = 18.7, 12.1$ Hz, 11H).

De acuerdo a la bibliografía química, las señales de protón sugieren que se trata de un compuesto esteroidal, por lo que se puede observar un triplete a δ 5.41 ppm, el cual corresponde a un protón unido a un carbono con hibridación sp^2 , que se le atribuye a un sistema $\text{RC}=\text{CHR}$, en específico, a un protón en la posición 6 de un esteroide insaturado (figura 59).^{49,53,54} Otra de las señales características de esteroides es el singulete a δ 4.15 ppm, que corresponde a un protón geminal al grupo hidroxilo en la posición 3 del sistema de anillos fusionados en los esteroides. El multiplete que aparece entre δ 5.35 ppm y δ 5.31 ppm corresponden a protones de doble enlace en las posiciones 22 y 23. Finalmente se observan señales características de metilos y metilenos en la zona entre δ 0.84 ppm y δ 2.43 ppm, estas se encuentran solapadas.^{49,53,54}

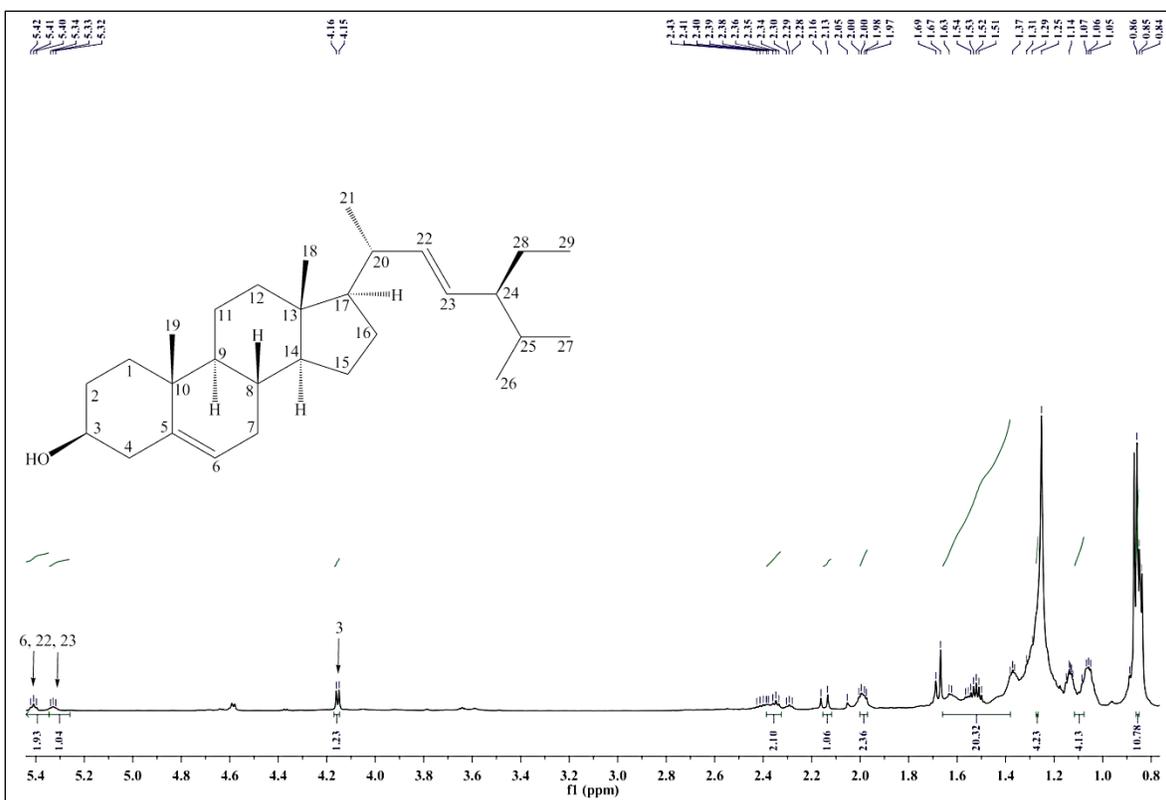


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A2c.

En su espectro de RMN ^{13}C , el compuesto B1A2c presentó las siguientes señales:

RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 140.29 (C5, C22), 128.1 (C23), 123.02 (C6), 78.83 (C3), 61.78 (C14), 59.44 (C17), 54.95 (C9, C24), 47.61 (C4, C13), 45.43 (C20), 39.88 (C12), 37.3 (C1), 36.67 (C10), 33.69 (C7), 32.8 (C8), 32.7 (C25), 31.94 (C2), 28.1 (C16), 25.14 (C28), 24.81 (C15), 22.73 (C19, C21, C26), 22.64 (C11), 19.76 (C27), 15.52 (C29), 14.13 (C18).

La señal que aparece a δ 140.29 ppm, corresponde a una señal solapada de dos carbonos con hibridación sp^2 , los cuales son 5 y 22 en el sistema de anillos fusionados en los esteroides. Mientras que las señales a δ 128.1 ppm y δ 123.02 ppm corresponden a otros dos carbonos sp^2 y estos son los de las posiciones 23 y 6, respectivamente. Un carbono unido a un heteroátomo aparece a δ 78.83 ppm, correspondiente al carbono en la posición 3. En la zona de δ 14.13 ppm a δ 61.78 ppm aparecen señales de metilos y metilenos, tal como se observa en el espectro de la figura 60.

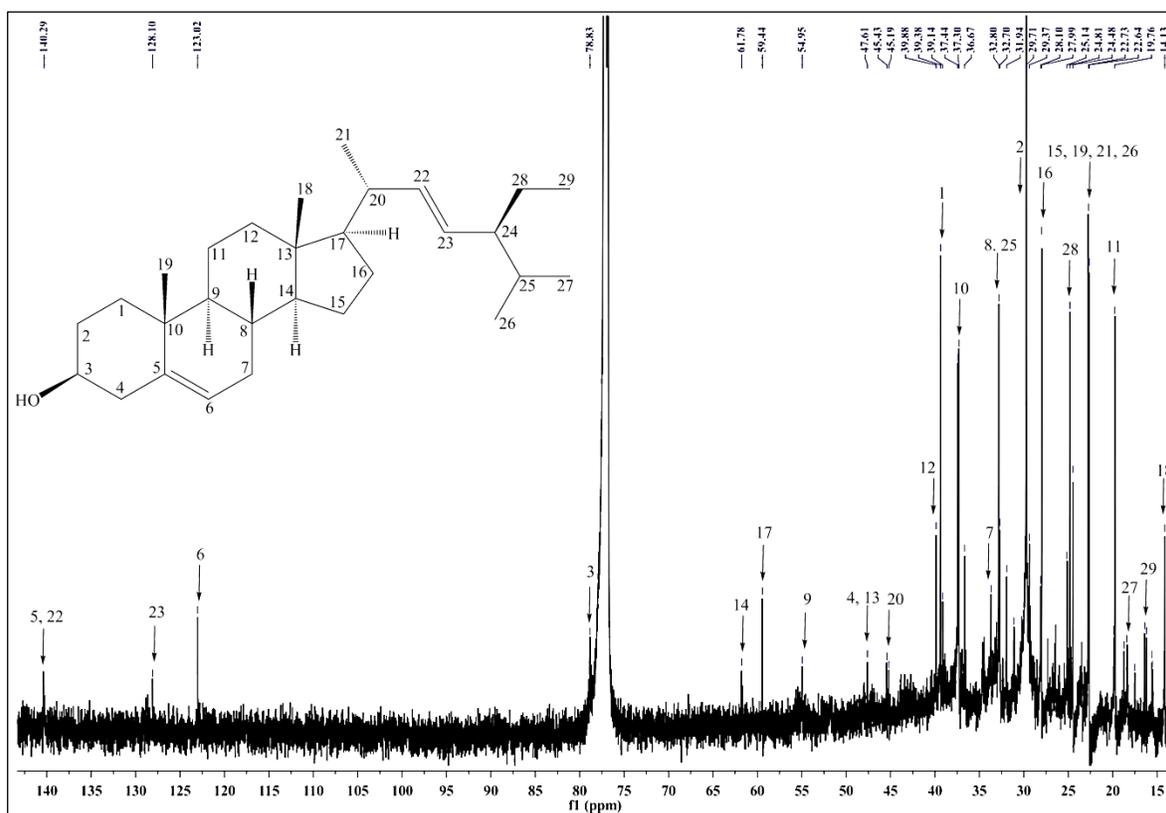
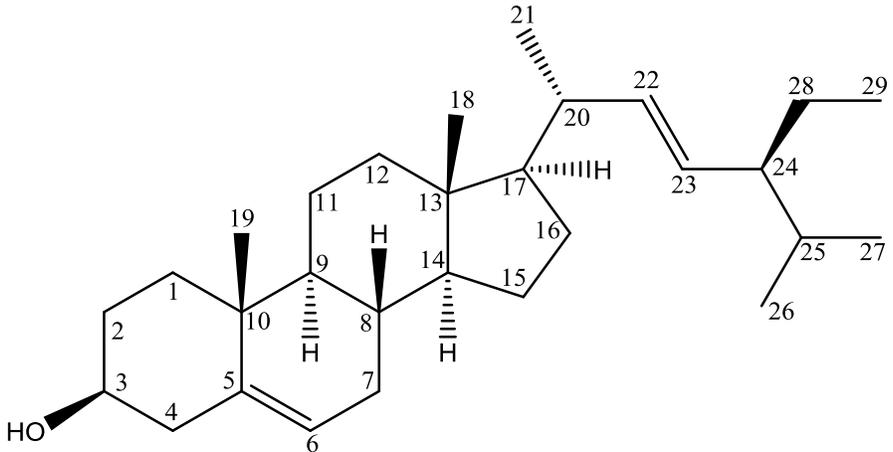


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A2c.

Los datos que se obtuvieron de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A2c, se han comparado con datos de la literatura⁵⁴ (tabla 18) y de simulaciones en NMR Predict⁵⁰. El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C ha conducido a proponer el esqueleto del **estigmasterol** ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$)⁵⁴, cuyo nombre IUPAC es **(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5S,E)5-etil-6-metil-hept-3-en-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1Hciclopenta[α]fenantren-3-ol**.

Tabla 18. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ^1H y ^{13}C del estigmasterol.^{49, 50, 54}



Posición	Protón			Carbono		
	Desplazamientos químicos [δ ^1H (ppm)] Experimental 600 MHz	Bibliográfico 400 MHz	Simulado 600 MHz	Desplazamientos químicos [δ ^{13}C (ppm)] Experimental 151 MHz	Bibliográfico 150 MHz	Simulado 150 MHz
1	-	-	1.411-1.866 ^a m	37.30	37.3	37.2
2	-	-	1.411-1.866 ^a m	31.94	31.6	32.4
3	4.15 m	3.52 m	4.27 m	78.83	71.8	71.2
4	-	-	2.56 m (J = 16.8, 15.3, 4.4 Hz)	47.61 ^a	42.3 ^a	41.2
5	-	-	-	140.29 ^b	140.8	140.5
6	5.32-5.41 ^a m (J=6.9)	5.357 s	5.405 m	123.02	121.7	121.9
7	-	-	2.102 ^b m (J=13.87, 7.19, 3.29)	33.69	31.9 ^b	31.9
8	-	-	1.411-1.866 ^a m	32.80	31.9 ^b	32
9	-	-	1.411-1.866 ^a m	54.95	51.2 ^c	50.2
10	-	-	-	36.67	36.5	36.6
11	-	-	1.411-1.866 ^a m	22.64	21.1	21
12	-	-	1.411-1.866 ^a m	39.88	39.7	40.4
13	-	-	-	47.61 ^a	42.3 ^a	43.2
14	-	-	1.411-1.866 ^a m	61.78	56.9	56.8
15	-	-	1.411-1.866 ^a m	24.81	24.4	24.7
16	-	-	1.411-1.866 ^a m	28.10	28.4	26.2 ^a
17	-	-	1.411-1.866 ^a m	59.44	56.1	56.2
18	0.84 s	0.699 s	0.73-0.89 ^c m	14.13	11	12.7
19	1.06 m	1.01 s	1.224 s	22.73 ^c	21.2 ^d	18.3
20	-	-	2.04 m (J =	45.43	40.5	40.6

			10.7, 7.1 Hz)			
21	1.14 m	1.02 d (J=7.5 Hz)	1.129 d (J=6.4 Hz)	22.73 ^c	21.2 ^d	20.4
22	5.32-5.41 ^a m (J=6.9)	-	5.396-5.414 ^d m (J=15.5, 7.12 Hz)	140.29 ^b	138.3	134.2
23	5.32-5.41 ^a m (J=6.9)	-	5.396-5.414 ^d m (J=15.5, 7.12 Hz)	128.10	129.3	134.6
24	-	-	2.102 ^b m (J=13.87, 7.19, 3.29)	54.95	51.2 ^c	41.1
25	-	-	1.411-1.866 ^a m	32.70	31.9 ^b	32.1
26	0.85 s	0.795 d (J=6.5 Hz)	0.73-0.89 ^c m	22.73 ^c	21.2 ^d	19.7 ^b
27	0.87 s	0.846 d (J=6.5 Hz)	0.73-0.89 ^c m	19.76	19	19.7 ^b
28	-	-	1.411-1.866 ^a m	25.14	25.4	26.2 ^a
29	0.86 m (J=18.7, 12.1 Hz)	0.804 t (J=7.5 Hz)	0.73-0.89 ^c m	15.52	12.1	11.6

Los superíndices “a”, “b”, “c” y “d” indican las señales que se traslapan en los espectros descritos en cada columna.

La figura 61 muestra el apilamiento de los espectros de protón de B1A2c y el simulado para el estigmasterol. La comparación de espectros permite conocer la similitud entre ambos y sirve como una evidencia acerca de la identidad de B1A2c. Las mismas similitudes se pueden observar en el apilamiento de sus espectros de carbono (figura 62). El apilamiento de espectros resulta útil para descartar estructuras y se vuelve una herramienta muy potente si se cuenta con una amplia base de espectros.

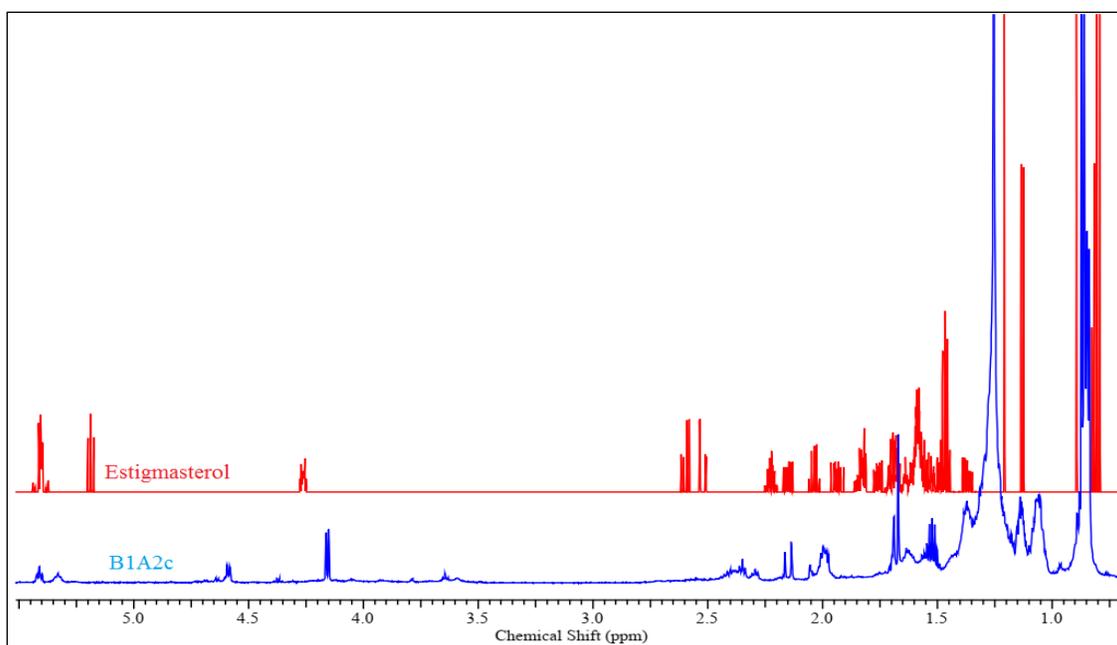


Figura 61. Apilamiento del espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1A2c y el espectro de RMN ^1H simulado para el estigmasterol. NMRDB.ORG.

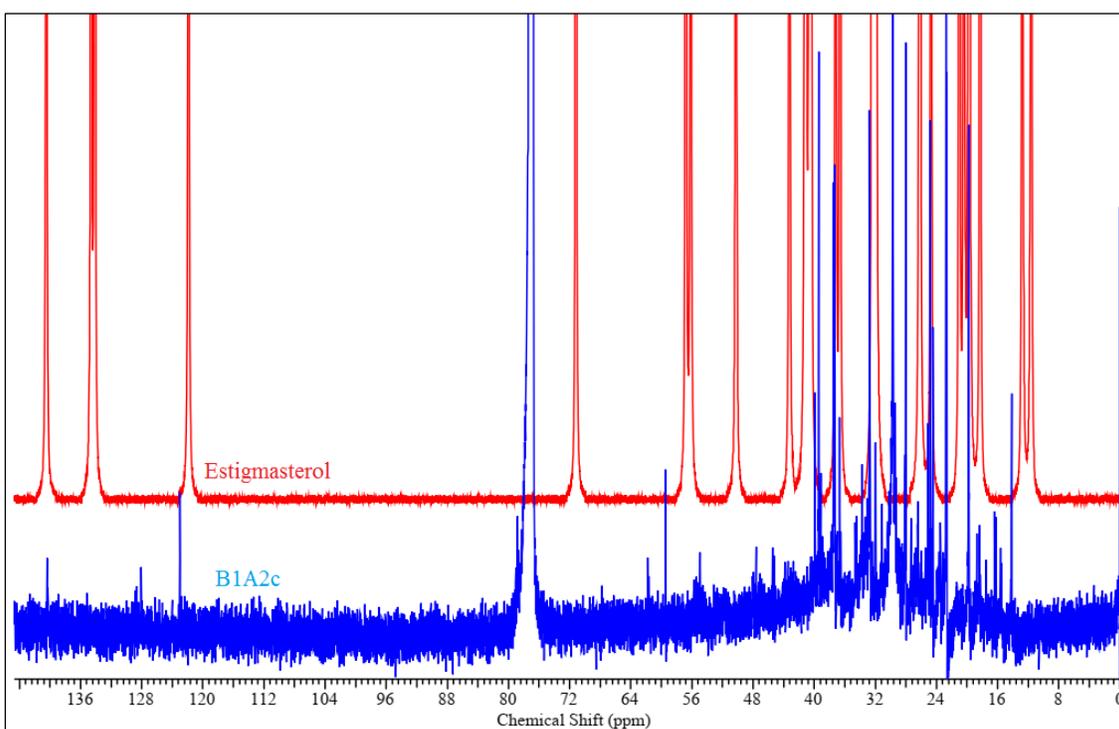


Figura 62. Apilamiento del espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1A2c y el espectro de RMN ^{13}C simulado para el estigmasterol. NMRDB.ORG.

La correlación lineal de los datos experimentales y simulados para protón y carbono fue muy útil para reforzar la evidencia de la identidad del compuesto en el apartado 5.3.1 y en

este apartado, no será la excepción. Para este caso, los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A2c y los simulados en la plataforma NMR Predict para el estigmasterol dan como resultado los coeficientes de determinación de 0.9964 y 0.9907, para protón y carbono, respectivamente (figura 63). Esta vez también se puede apreciar que los datos de los coeficientes de determinación que resultaron, son cercanos a 1, por lo que podemos concluir que los datos se ajustan al modelo lineal y que los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1A2c son semejantes a los del estigmasterol. Esto ha dado una evidencia útil que refuerza que el compuesto B1A2c es el estigmasterol.⁵⁰

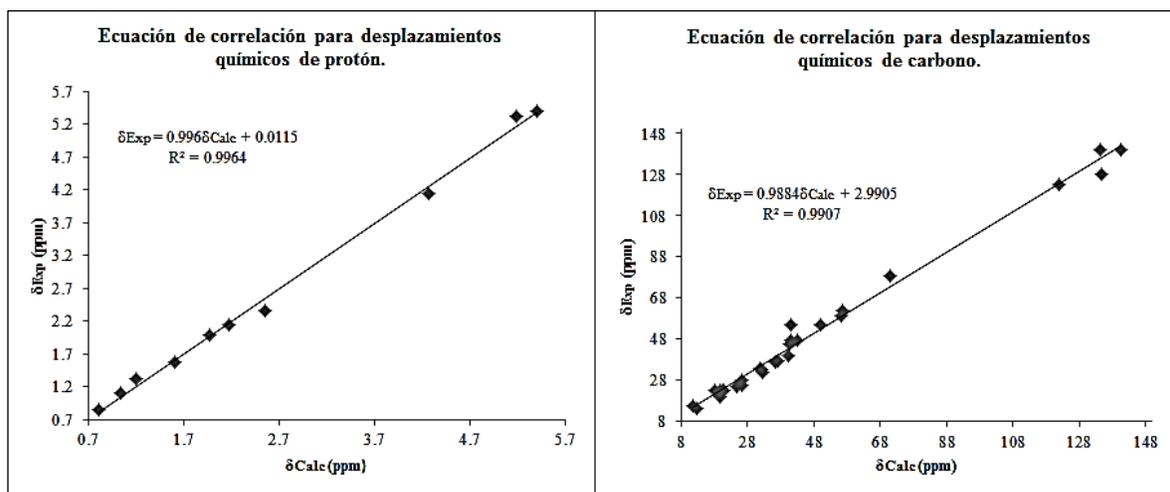


Figura 63. Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto B1A2c.

5.3.3 Compuesto B1B2.

El compuesto B1B2 presentó cristales color blanco y de acuerdo a sus datos espectroscópicos, al igual que el compuesto B1A2c, su esqueleto es esterooidal. En su espectro de RMN ^1H se observaron las siguientes señales (figura 64):

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.35 (s, 1H), 3.53 (m, J = 15.7, 11.0, 4.5 Hz, 1H), 2.40 - 2.19 (m, 4H), 2.08 - 1.92 (m, 3H), 1.84 (m, J = 15.2, 5.2 Hz, 3H), 1.75 - 1.39 (m, 9H), 1.25 (s, 6H), 0.88 (m, J = 34.5, 28.1, 22.7 Hz, 19H), 0.69 (d, J = 11.0 Hz, 3H).

El singulete en δ 5.35 ppm se le atribuye al protón vinílico en la posición 6 y el multiplete en δ 3.53 ppm corresponde al protón geminal al hidroxilo en la posición 3 del sistema de anillos fusionados. De δ 0.68 ppm a δ 2.35 ppm aparecen las señales solapadas de los metilos y metilenos. Entre δ 5.02 ppm y δ 5.37 ppm se observan señales que no logran

integrar para un protón y se le atribuyen al compuesto B1A2c, es decir, en el espectro aparecen señales del estigmasterol, muy similar estructuralmente a este compuesto.⁵⁵

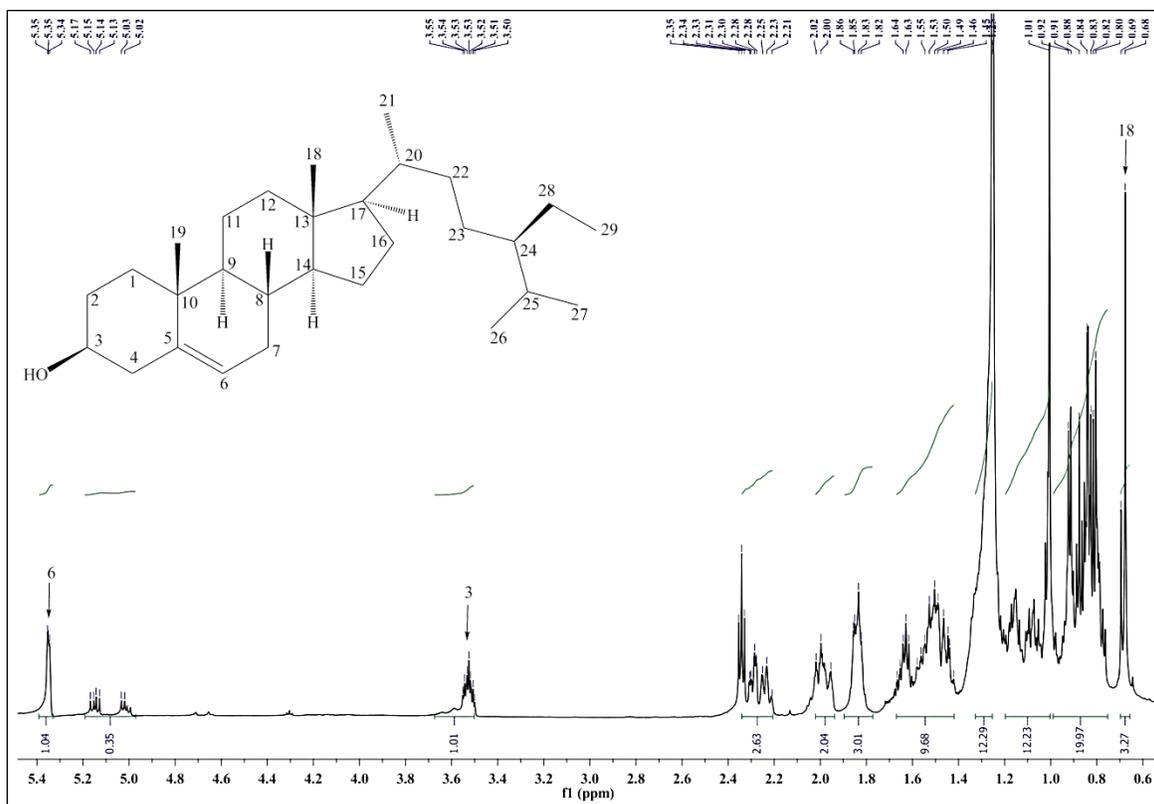


Figura 64. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) de B1B2.

El espectro de RMN ¹³C del compuesto B1B2 presentó las siguientes señales (figura 65):

RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃): δ_C (ppm) 140.74 (C5), 121.75 (C6), 71.85 (C3), 56.77 (C17), 56.05 (C14), 50.13 (C9), 45.84 (C24), 42.27 (C13), 40.51 (C4), 39.78 (C12), 38.84 (C1), 37.25 (C10), 36.51 (C20), 33.82 (C22), 32.43(C2, C8), 31.91 (C7), 29.7 (C25), 28.93 (C16), 26.06 (C23), 24.72 (C15), 23.07 (C28), 21.22 (C11), 19.83 (C27), 19.41 (C26), 18.79 (C21), 18.26 (C19), 12.26 (C29), 12.05 (C18).

El carbono en la posición 5 se evidencia por la señal δ 140.74 ppm y el carbono 6 en δ 121.75 ppm. El carbono 3 está unido a un heteroátomo y le corresponde la señal en δ 71.85 ppm. Las señales de los metilos y metilenos aparecen entre δ 11.87 ppm y δ 56.77 ppm. En δ 129.28 ppm y δ 138.33 ppm aparecen las respectivas señales de los carbonos 22 y 23 de B1A2c (estigmasterol), debido a la mezcla de ambos compuestos.⁵⁵

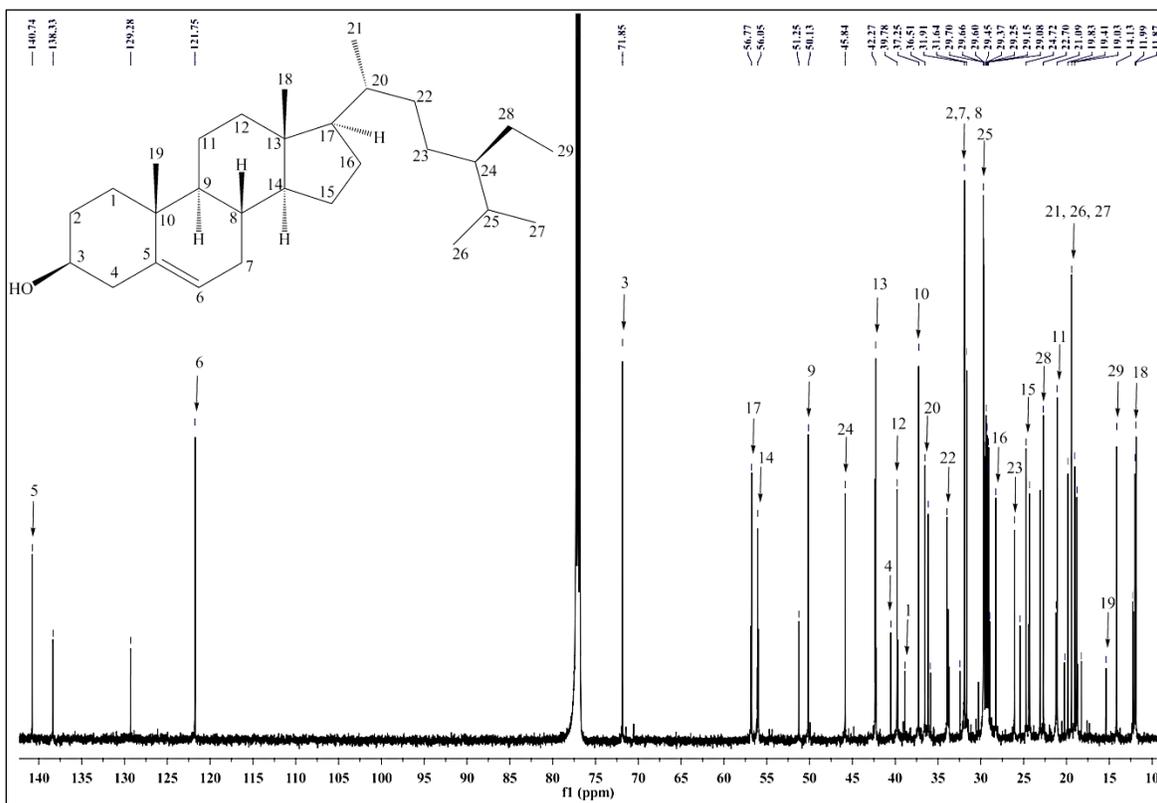
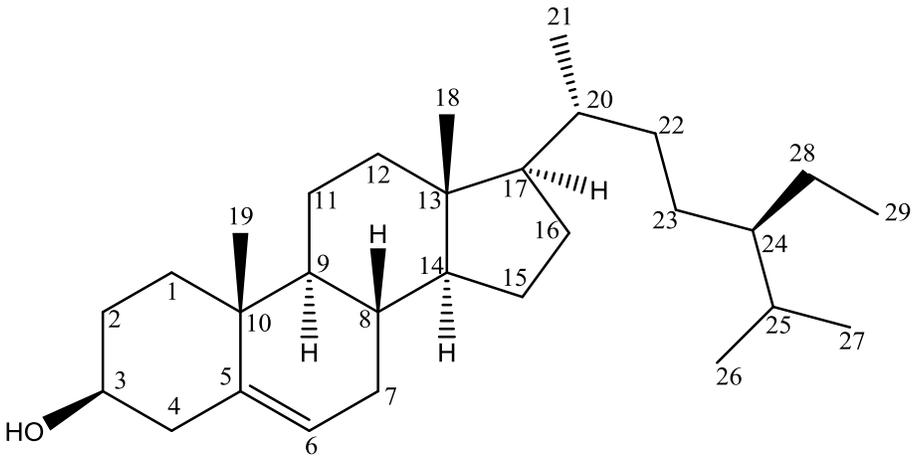


Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1B2.

El análisis de la información de los espectros de RMN, apuntó que el compuesto B1B2 y B1A2c se encuentran mezclados, por lo que se observan señales de este último en los espectros RMN ^1H y ^{13}C de B1B2. Sin embargo, eso no ha sido impedimento para lograr identificar al compuesto B1B2. En este caso también se hicieron comparaciones de señales de los espectros de RMN de la literatura⁵⁶ (tabla 19) y con los espectros simulados⁵⁰. Se ha llegado a determinar que la estructura del compuesto B1B2 corresponde al **β -sitosterol** ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$)⁵⁷, cuyo nombre IUPAC es **(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-etil-6-metilheptan-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[α]fenantren-3-ol**.

Tabla 19. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ^1H y ^{13}C del β -sitosterol.^{50,56}



Posición	Protón			Carbono		
	Desplazamientos químicos [δ ^1H (ppm)] Experimental 600 MHz	Bibliográfico 400 MHz	Simulado 600 MHz	Desplazamientos químicos [δ ^{13}C (ppm)] Experimental 151 MHz	Bibliográfico 150 MHz	Simulado 150 MHz
1	-	-	1.31-1.92 ^a m	38.84	37.3	37.2
2	-	-	1.31-1.92 ^a m	32.43 ^a	31.6	32.4
3	3.53 m (J = 15.7, 11.0, 4.5 Hz)	3.52 m	3.609 m (J=10.21, 3.33, 2.42 Hz)	71.85	71.8	71.2
4	-	-	2.33-2.49 m (J = 14.5, 10.2 Hz)	40.51	42.2	41.2
5	-	-	-	140.74	140.8	140.5
6	5.35 s	5.358 s	5.24 m (J = 7.2, 6.9 Hz)	121.75	121.7	121.9
7	-	-	1.84-2.10 m (J = 13.2, 7.2, 3.3 Hz)	31.91	31.9 ^a	31.9
8	-	-	1.366-2.10 ^a m	32.43 ^a	31.9 ^a	32
9	-	-	1.31-1.92 ^a m	50.13	51.2	50.2
10	-	-	-	37.25	36.5	36.6
11	-	-	1.31-1.92 ^a m	21.22	21.1	21
12	-	-	1.31-1.92 ^a m	39.78	39.8	40.4
13	-	-	-	42.27	42.3	43.1
14	-	-	1.31-1.92 ^a m	56.05	56.8	56.8
15	-	-	1.31-1.92 ^a m	24.72	24.3	24.7
16	-	-	1.31-1.92 ^a m	28.93	28.3	28.8
17	-	-	1.31-1.92 ^a m	56.77	56	56.9

18	0.69 d (J=11.0 Hz)	0.680 s	0.685 m	12.05	11.9	12.7
19	0.80-1.01 ^a m (J=34.5, 28.1, 22.7 Hz)	1.01 s	1.17-1.25 q (J = 6.6 Hz)	18.26	19.4	18.3
20	-	-	1.31-1.92 ^a m	36.51	36.2	35.4
21	0.80-1.01 ^a m (J=34.5, 28.1, 22.7 Hz)	0.92 d (J= 6.4 Hz)	0.947 d (J=6.80 Hz)	18.79	18.8	18.9
22	-	-	0.685-0.86 ^b m (J=7.71, 7.14 Hz)	33.82	33.9	33.8
23	-	-	0.685-0.86 ^b m (J=7.71, 7.14 Hz)	26.06	26.1	26.3
24	-	-	1.20 m (J = 7.1, 6.7, 6.6 Hz)	45.84	45.9	46.1
25	-	-	1.31-1.92 ^a m	29.7	29.2	29
26	0.80-1.01 ^a m (J=34.5, 28.1, 22.7 Hz)	0.814 d (J=6.5 Hz)	0.685-0.86 ^b m (J=7.71, 7.14 Hz)	19.41	19.8	19.8 ^a
27	0.80-1.01 ^a m (J=34.5, 28.1, 22.7 Hz)	0.833 d (J=6.5 Hz)	0.685-0.86 ^b m (J=7.71, 7.14 Hz)	19.83	19.3	19.8 ^a
28	-	-	1.195-1.223 m	23.07	23.1	23
29	0.80-1.01 ^a m (J=34.5, 28.1, 22.7 Hz)	0.845 t (J=7.5 Hz)	0.685-0.86 ^b m (J=7.71, 7.14 Hz)	12.26	12.2	12.2

Los superíndices "a" y "b" indican las señales que se traslapan en los espectros descritos en cada columna.

Los apilamientos de los espectros de RMN ¹H y ¹³C del compuesto B1B2 y los simulados para β-sitosterol permiten ver con claridad la identidad de B1B2 (figuras 66 y 67). Ésta evidencia es útil desde un principio, aunque no suficiente, pero facilita en gran medida el trabajo de búsqueda, ya que el β-sitosterol es un metabolito secundario muy común en la naturaleza.

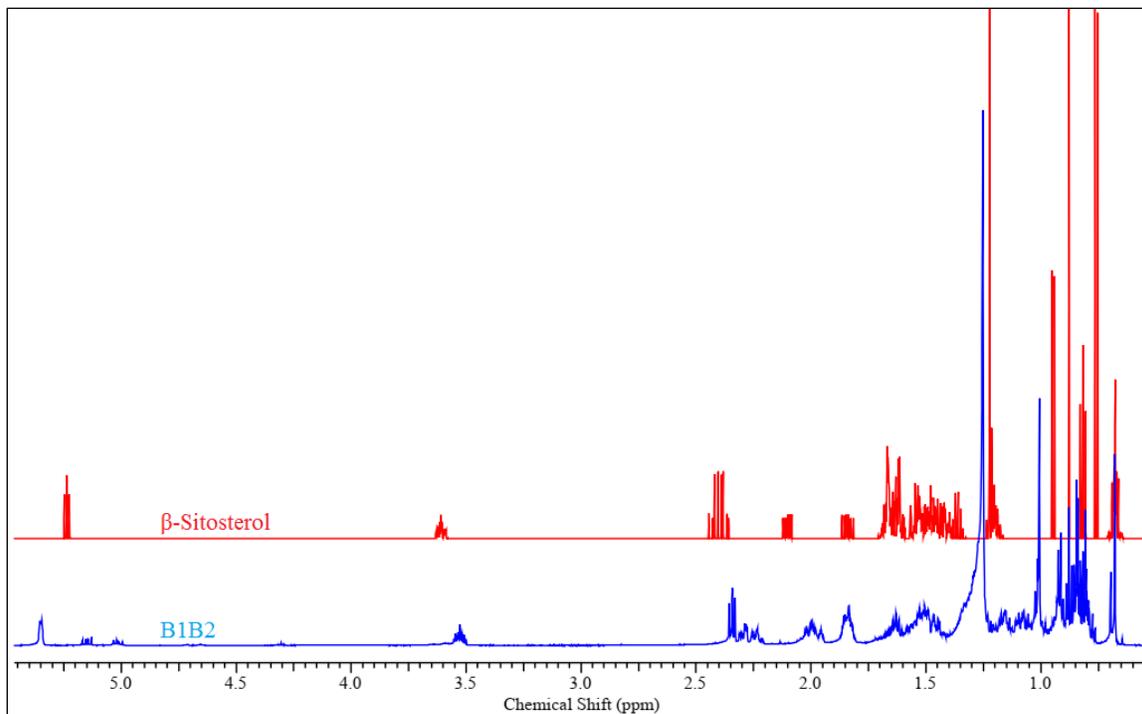


Figura 66. Apilamiento del espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B1B2 y el espectro de RMN ^1H simulado para el β -sitosterol. NMRDB.ORG.

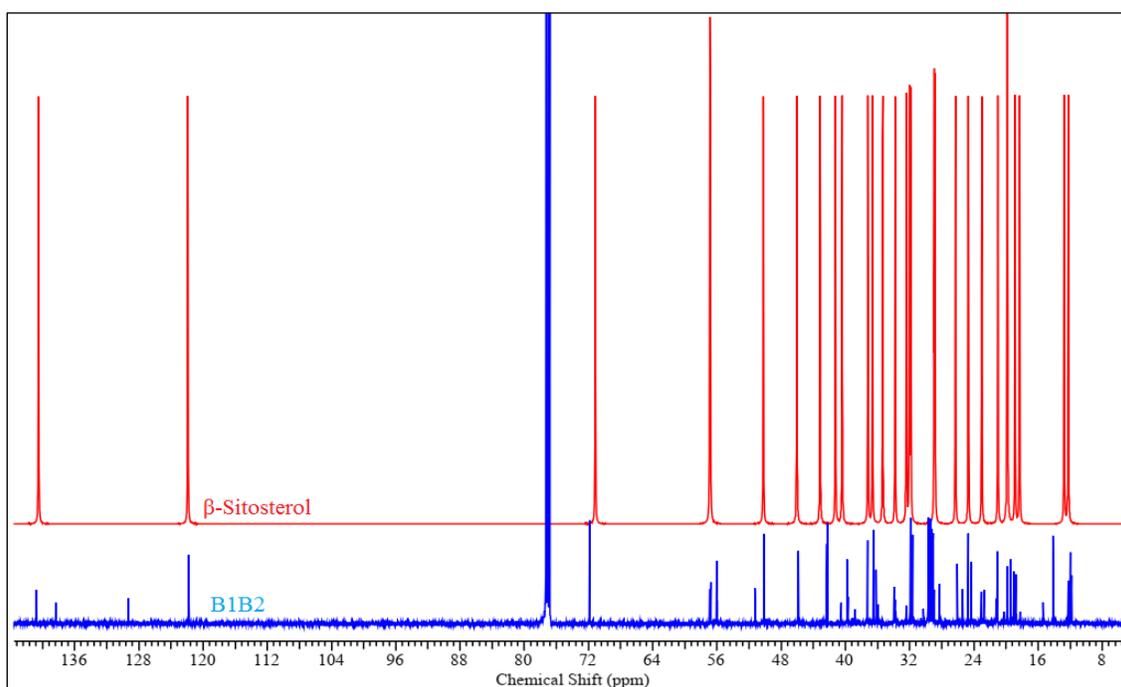


Figura 67. Apilamiento del espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz) de B1B2 y el espectro de RMN ^{13}C simulado para el β -sitosterol. NMRDB.ORG.

Los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1B2 y los simulados en la plataforma NMR Predict para el β -sitosterol dan como resultado los coeficientes de determinación de 0.9973

y 0.9996, para protón y carbono, respectivamente (figura 68). Se puede apreciar que los datos de los coeficientes de determinación que resultaron, son cercanos a 1, por lo que podemos concluir que los datos se ajustan al modelo lineal y que los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto B1B2 son semejantes a los del β -sitosterol. Esto ha dado una evidencia útil que refuerza que el compuesto B1B2 es el β -sitosterol.⁵⁰

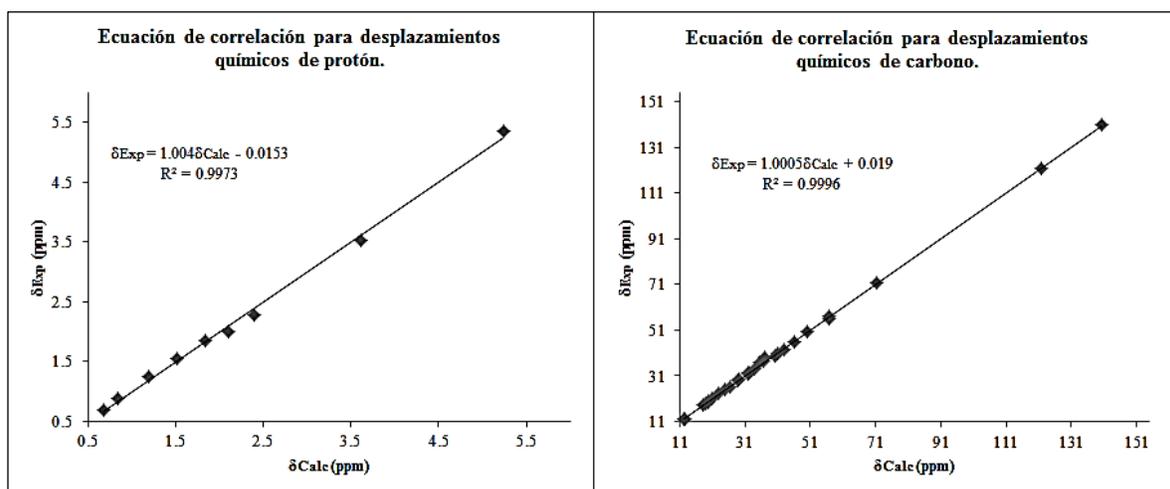


Figura 68. Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto B1B2.

5.3.4 Compuesto B2C.

El compuesto B2C se aisló como un sólido color blanco cristalino. En su espectro de RMN ^1H presentó las siguientes señales (figura 69):

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.29 (s, 1H), 3.22 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.03 (s, 1H), 2.82 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 2.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 2.03 - 1.76 (m, 7H), 1.56 (m, $J = 69.9, 59.0, 28.7$ Hz, 22H), 1.40 - 1.20 (m, 16H), 1.17 - 1.02 (m, 6H), 0.99 (s, 4H), 0.91 (m, $J = 16.6, 13.6$ Hz, 8H), 0.81 - 0.68 (m, 6H).

Los datos espectroscópicos indican que es un triterpeno pentacíclico (tabla 20), entre los cuales es muy probable que se trate de los compuestos: ácido morólico ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$)^{50, 58} o ácido oleanólico ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$).^{50, 59} No obstante, a falta de datos de RMN ^{13}C , en el presente trabajo no se puede concluir la identidad definitiva de este triterpeno. La identificación que se ha presentado está basada únicamente en su espectro de protón y su comparación con los datos encontrados en la bibliografía química.^{50, 59}

El ácido morólico es un triterpeno pentacíclico Δ^{18} , que en sus espectros de protón presenta un singlete en 5.28 ppm (figura 70), el cual corresponde al protón vinílico en la posición 19 en su estructura. A pesar de las similitudes de los espectros del ácido morólico y el espectro de RMN ^1H del compuesto B2C, no es posible distinguir entre las señales, ya que no se cuenta con la información suficiente para definir las, sin embargo, es evidente que de 1.94 ppm a 0.68 ppm se encuentran siete señales de protón de metilos, metilenos y metinos solapados, las mismas que se presentan en los triterpenos antes mencionadas.^{58, 59}

El espectro del ácido oleanólico presenta una señal a 5.19 ppm que corresponde al protón de doble enlace en la posición 12 y la señal del protón geminal en la posición 3 aparece a 3.34 ppm en la estructura del triterpeno pentacíclico Δ^{12} . También presenta siete señales de protones de metilo y metilenos solapados. El espectro de protón de este compuesto coincide en las señales mencionadas con las del espectro de protón del compuesto B2C, pero como en el caso anterior, hace falta información para confirmar la identidad de B2C.^{59, 60}

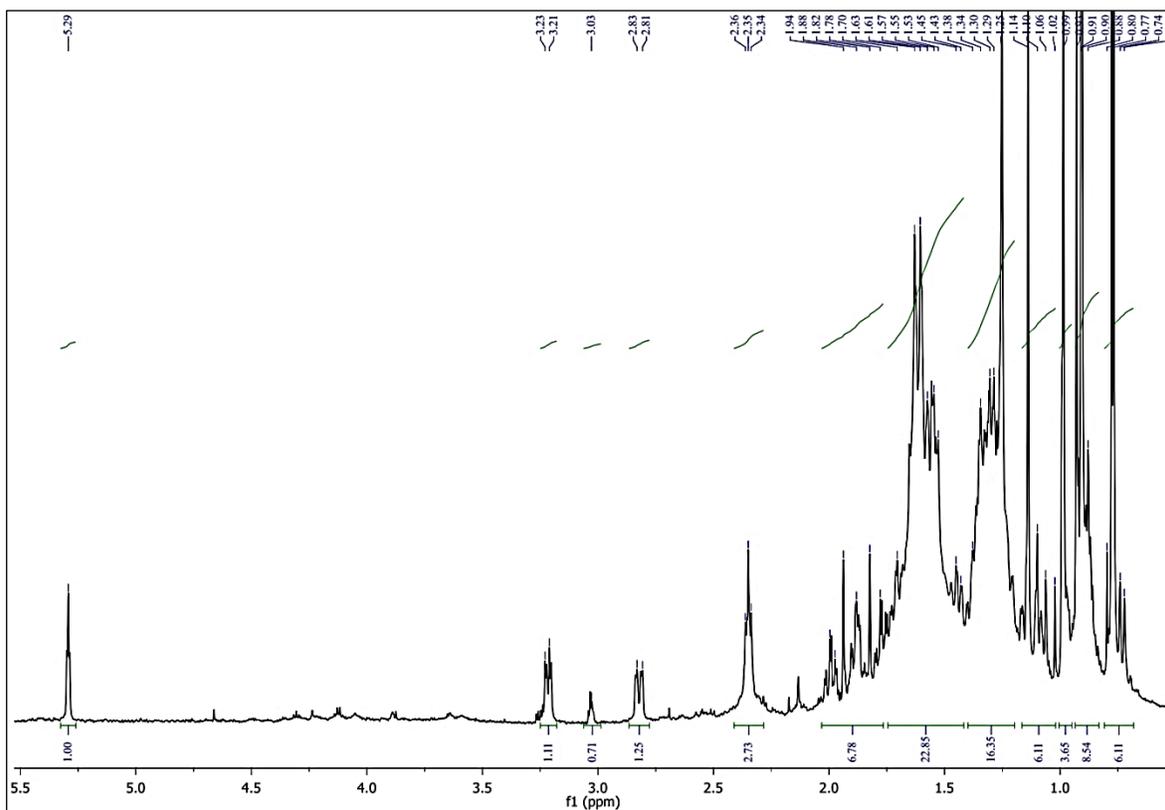


Figura 69. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B2C.

Los triterpenos petacíclicos: ácido morólico y ácido oleanólico son propuestas de la posible identidad del triterpeno pentacíclico B2C y que futuros estudios fitoquímicos a la especie *Asclepias curassavica*, pueden ayudar a elucidar la estructura y revelar su identidad.

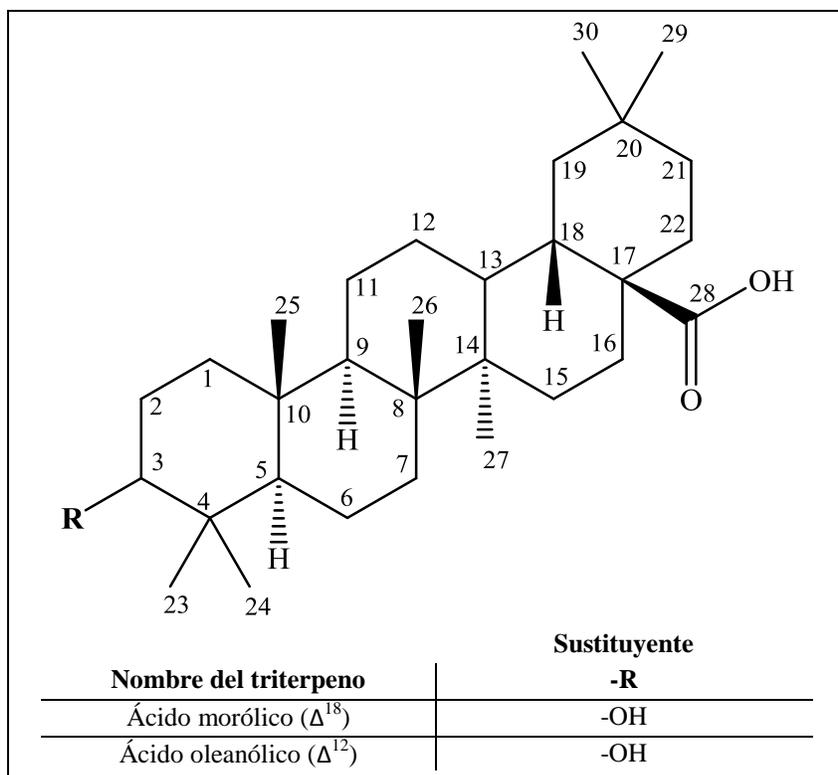


Figura 70. Estructura de las posibles identidades del triterpeno B2C. [1] Zhang, Pu; Hao, Jia; Liu, Jun; Zhang, Luyong; Sun, Hongbin. *Efficient Synthesis of Morolic Acid and Related Triterpenes Starting from Betulin*. *Tetrahedron*. 65. 2009. pp. 4304–4309. [2] Rodríguez Díaz, Maité. *Tesis Doctoral*. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 2011.

Tabla 20. Valores experimentales, bibliográficos y simulados de RMN ^1H del ácido morólico y ácido oleanólico.^{50, 59, 60}

Posición	Protón			
	Desplazamientos químicos [δ ^1H (ppm)]			
	Ácido morólico		Ácido oleanólico	
	Bibliográfico 300 MHz	Simulado 600 MHz	Bibliográfico 300 MHz	Simulado 600 MHz
1	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m ($J = 13.1, 5.5, 1.5$ Hz) ^a
2	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m ($J = 13.1, 5.5, 1.5$ Hz) ^a
3	3.20 m ($J = 5.4, 10.9$ Hz)	3.45 m ($J = 10.2, 3.2$ Hz)	3.22 s	3.46 m ($J = 3.4, 2.4$ Hz)
4	-	-	-	-
5	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.29-1.36 m (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz) ^b
6	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m ($J =$

		(13.2, 10.3 Hz) ^a		13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
7	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
8	-	-	-	-
9	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
10	-	-	-	-
11	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	2.94 m (<i>J</i> = 13.7, 10.3 Hz)
12	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	5.27 t (<i>J</i> =2.7 Hz)	5.26 m (<i>J</i> = 8.2, 6.4 Hz)
13	0.67–2.24 m ^a	2.09 m (<i>J</i> = 10.2, 3.2 Hz)	-	-
14	-	-	-	-
15	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
16	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
17	-	-	-	-
18	-	-	2.81 m (<i>J</i> =10.5 Hz)	2.52 m (<i>J</i> = 10.1, 2.1 Hz)
19	5.16 s	5.50 s	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
20	-	-	-	-
21	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
22	0.67–2.24 m ^a	1.28-2.93 m (13.2, 10.3 Hz) ^a	0.74-1.2 m ^a	1.32-1.93 m (<i>J</i> = 13.1, 5.5, 1.5 Hz) ^a
23	0.78 s	0.93 s ^b	0.74-1.2 m ^a	0.93 s ^c
24	0.78 s	0.93 s ^b	0.74-1.2 m ^a	0.90 s
25	0.76 s	0.88 s	0.74-1.2 m ^a	0.89 s ^c
26	0.97 s	1.04 s	0.74-1.2 m ^a	1.05 s
27	0.86 s	1.03 s	0.74-1.2 m ^a	1.29-1.36 m (dd, <i>J</i> = 10.0, 2.0 Hz) ^b
28	-	-	-	-
29	0.98 s	1.09 s ^c	0.74-1.2 m ^a	0.93 s ^c
30	1.00 s	1.09 s ^c	0.74-1.2 m ^a	0.93 s ^c

Los superíndices “a”, “b” y “c” indican las señales que se traslapan en los espectros descritos en cada columna.

La figura 71 muestra el apilamiento del espectro de protón de B2C y los espectros simulados para el ácido morólico y ácido oleanólico. En este caso no se puede confirmar la identidad del compuesto B2C, pero en los espectros de protón se observan ciertas semejanzas.⁵⁰

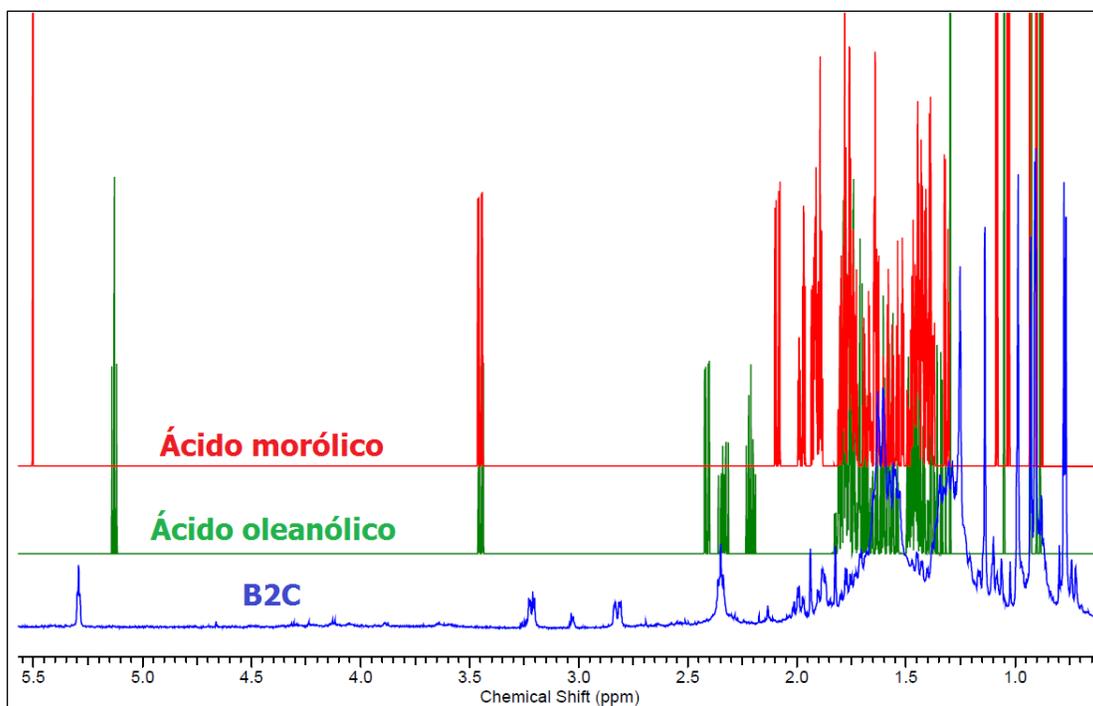


Figura 71. Apilamiento del espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de B2C y los espectros de RMN ^1H simulados para el ácido morólico y ácido oleanólico. NMRDB.ORG.

La correlación lineal entre los datos de RMN ^1H del compuesto B2C y los simulados en la plataforma NMR Predict para el ácido morólico y el ácido oleanólico dan como resultado los coeficientes de determinación de 0.9338 y 0.9666 (figura 72). Se puede apreciar que los datos de los coeficientes de determinación que resultaron, son cercanos a 1, por lo que podemos concluir que los datos se ajustan a los modelos lineales, pero los que mejor se ajustan son los del ácido oleanólico.

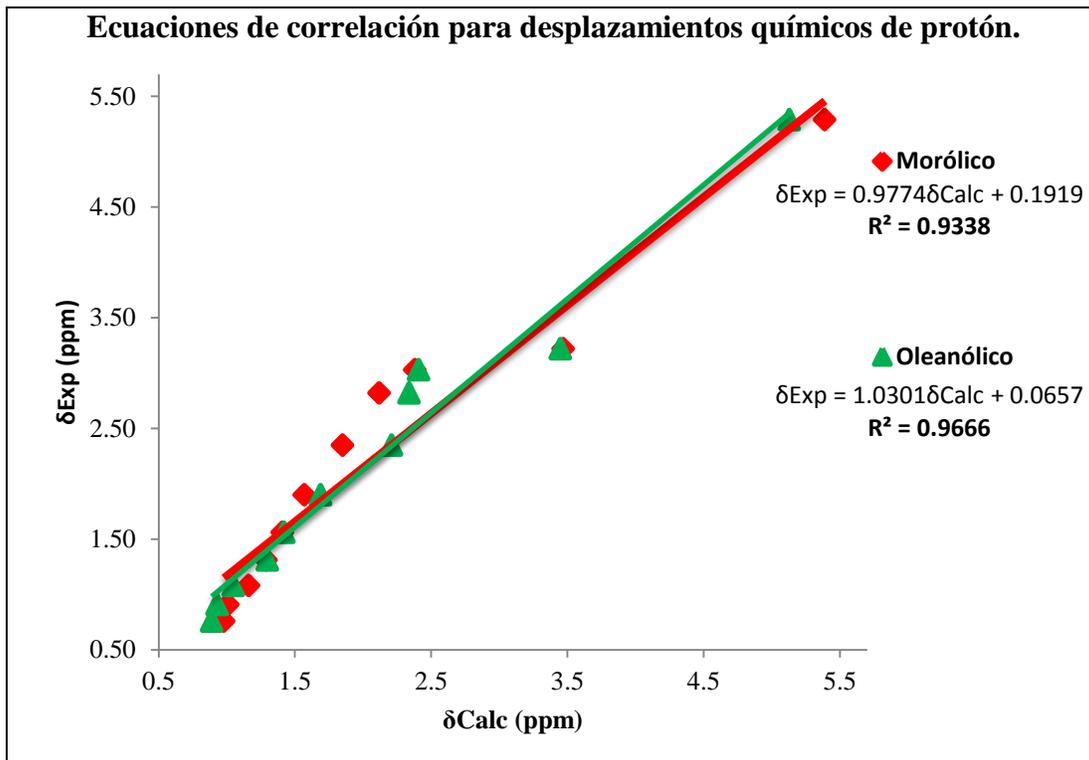
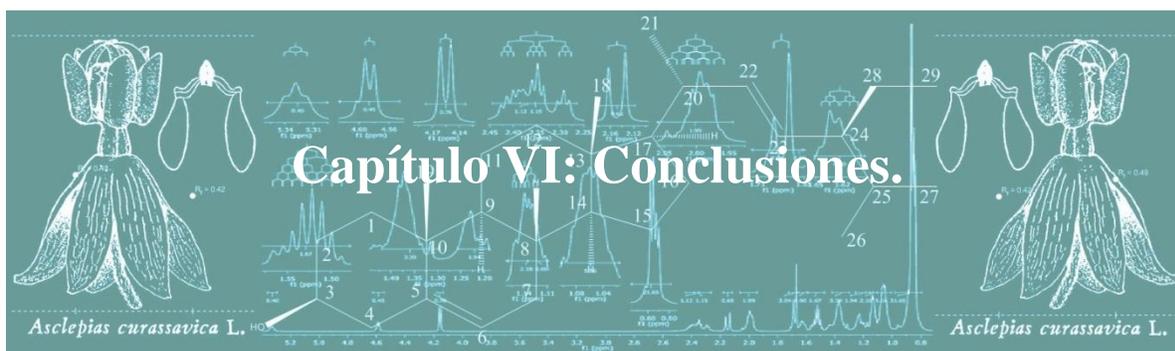


Figura 72. Correlaciones lineales entre los datos experimentales y simulados de RMN 1H para el compuesto B2C. NMRDB.ORG.



6. Conclusiones.

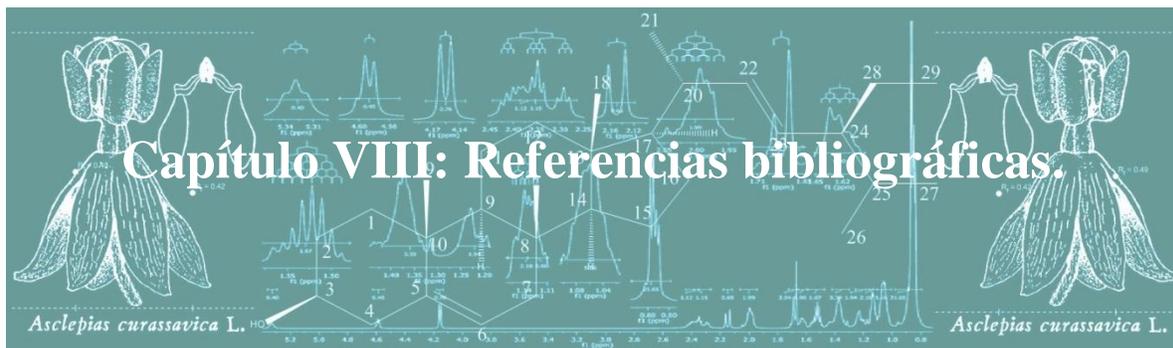
- Se cumplió uno de los principales objetivos al obtener un extracto etanólico a partir de 1.95 kg de *Asclepias curassavica*, que al ser sometido a destilación al vacío con rotavapor y a una extracción líquido-líquido con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, dio un extracto diclorometánico de 46.9 g.
- En concordancia con los objetivos, a partir de 5 g de extracto diclorometánico de *Asclepias curassavica*, se aislaron un total de 17 metabolitos secundarios por cromatografía en columna de sílica gel, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía en capa fina preparativa.
- Al revisar los espectros de RMN ^1H de doce metabolitos secundarios aislados, se determinó que 5 de ellos presentaban señales características de ácido graso o éster de ácido graso, 6 presentaban señales que indicaron estructura de esteroide. Además, se obtuvo un espectro que indicaba señales para un triterpeno.
- Con base a los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , se identificaron tres metabolitos secundarios: un éster de ácido graso identificado como dodecanoato de etilo y dos esteroides identificados como estigmasterol y β -sitosterol.
- En cuanto al metabolito secundario con espectro de protón para triterpeno, se ha propuesto que se trata de un triterpeno pentacíclico con insaturación en Δ^{18} o con insaturación en Δ^{12} , entre los compuestos que cumplen dichas características se proponen al ácido morólico y ácido oleanólico. En este trabajo no se logró determinar completamente la estructura del metabolito secundario, por no disponer de más experimentos de RMN. Las propuestas están basadas solamente en su espectro de RMN ^1H comparado con los datos encontrados en la bibliografía química.
- El espectro del β -sitosterol presentó señales características del estigmasterol, por lo que se ha llegado a la conclusión de que están mezclados y además las estructuras apenas difieren en un enlace π presente en el estigmasterol (entre las posiciones 22 y 23). La poca diferencia en las estructuras también se nota en los valores de los R_f de la cromatografía en capa fina analítica con Cy/Ace 20% que se llevó a cabo ($\Delta R_f = 0.03$). La poca diferencia en los R_f hace que sea difícil lograr separarlos por completo.



7. Recomendaciones.

Después de concluir este trabajo de graduación, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Durante el proceso de extracción etanólica del material vegetal seco de *Asclepias curassavica*, es más conveniente utilizar un equipo Soxhlet, dado que al calentar el disolvente, se aumenta la solubilidad de los metabolitos secundarios, permitiendo un mejor rendimiento y mayor diversidad estructural de metabolitos secundarios extraídos.
- Realizar ensayos biológicos de interés a los metabolitos secundarios obtenidos, y a los extractos etanólico y diclorometánico.
- Se recomienda analizar el extracto acuoso de *Asclepias curassavica*, obtenido de la extracción líquido-líquido con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, mediante una cromatografía en capa fina analítica y reactivo revelador, ya que es posible encontrar otros metabolitos secundarios.
- Realizar el estudio fitoquímico de las raíces de *Asclepias curassavica*, para determinar el tipo de metabolitos secundarios que puedan almacenar.
- Completar la serie de experimentos de RMN ^{13}C y RMN 2D tanto homo, como heteronuclear a fin de sustentar por completo, la propuesta de estructura de todos los metabolitos secundarios aislados y los que se presentan en este trabajo.



8. Referencias bibliográficas.

1. Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck, P. R.; Rahman, S. K. Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *J. Nat. Prod.* **1989**. 52. pp 1189-1208.
2. Ramachandra, S.; Ravishankar, G. A. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2002**. 20. pp 101-153.
3. Newman, D. J.; Gragg, G. M. Natural Products as Source of New Drugs from 1982 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**. 79. pp 629-661.
4. Hanson, J. R. The Classes of Natural Product and Their Isolation. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 17. United Kingdom. 2003. pp 1-30.
5. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. Natural Products. *Organic Chemistry*. 2nd Ed. Oxford University Press. United States of America. 2004.
6. Jaeger, M. Steroids and NMR. *Annu. Rep. NMR Spectro.* 77. **2012**. pp 115-258.
7. Nicolaou, K. C.; Montagnon, T. Steroids & the Pill. In *Molecules That Changed the World*. Wiley-VCH. 1st Ed. Weinheim. 2008. pp 79-90.
8. Osorio, A. A.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L. M.; Rodríguez, M. L.; Bazzocchi, I. L. *Elaeodendron Orientale* as a Source of Cytotoxic Cardenolides. *Phytochemistry*. 105. **2014**. pp 60-67.
9. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 3rd Ed. Wiley-Blackwell. Oxford. United Kingdom. 2009.
10. Bennet, R. N.; Wallsgrove, R. M. Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. *New Phytol.* **1994**. 127. pp 617-633.
11. Osorio, A. A. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. La Laguna. España. 2012.

12. Gúzman, D. J. *Especies Útiles de la Flora Salvadoreña*. Tomo I. 3^{ra} Ed. El Salvador. 1975.
13. CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International).
<http://www.cabi.org/isc/datasheet/7248> (acceso el lunes 5 de junio del 2017).
14. Roy, M.; Chang, F.; Huang, H.; Chiang, M.; Wu, Y. Cytotoxic Principles from the Formosan Milkweed, *Asclepias curassavica*. *J. Nat. Prod.* 68. **2005**. pp 1494-1499.
15. Gilman, E. *Asclepias curassavica* Butterfly Weed, Milkweed, Silkweed. *EDIS UF/IFAS*. [Online]. 49. **1999**.
<http://edis.ifas.ufl.edu/fp049> (acceso el viernes 9 de septiembre del 2016).
16. Woodson, R.; *et al.* The North American Species of *Asclepias* L. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 41. **1954**. pp 1-211.
17. Natural Resources Conservation Services.
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ASCU> (acceso el martes 11 de julio del 2017).
18. Li, J.; Liu, H.; Lin, Y.; Hao, X.; Ni, W.; Chen, C. Six New C₂₁ Steroidal Glycosides from *Asclepias curassavica* L. *Steroids*. 73. **2008**. pp 594-600.
19. Ramesh, L.; Muniswamy, D.; Veerabhadrapa, A.; Sreedevi, K.; Madhavachetty, K. Comparative Pharmacognostical Studies of *Asclepias curassavica* Used in Ayurvedic Drug “Kakanasa” with its Adulterant *Trichosanthes Cucumerina*. *Arch. of Pharm. and Bio Sci.* 1. **2013**. pp 85-93.
20. Obregón, W.; Liggieri, C.; Trejo, S.; Avilés, F.; Vairo, S.; Priolo, N. Characterization of Papain-like Isoenzymes from Latex of *Asclepias curassavica* by Molecular Biology Validated by Proteomic Approach. *Biochimie*. 91. **2009**. pp 1457-1464.
21. Groeneveld, H.; Den, B.; Elings, J.; Seykens, D. Cardenolide Biosynthesis from Malonate in *Asclepias curassavica*. *Phytochemistry*. 29. **1990**. pp 2479-3486.

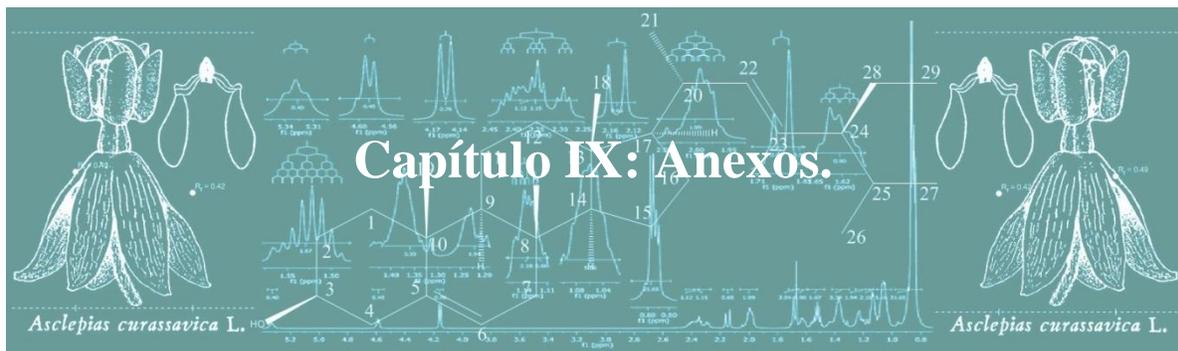
22. Biblioteca Digital de la Medicina Nacional Mexicana.
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Quiebra_muelas&id=7442 (acceso el viernes 28 de agosto del 2015).
23. Li, J.; Qing, C.; Chen, C.; Hao, X.; Liu, H. Cytotoxicity of Cardenolides and Cardenolide Glycosides from *Asclepias curassavica*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 19. **2009**. pp 1956-1959.
24. Chakraborty, S.; Siegenthaler, J.; Büchi, E.; Corneal Edema Due to *Asclepias curassavica*. *Arch. Ophthalmol.* 113. **1995**. pp 974-975.
25. Shivaprasad, H. V.; Rajesh, R.; Nanda, B. L.; Dharmappa, K. K.; Vishwanath, B. S. Thrombin Like Activity of *Asclepias curassavica* L. Latex: Action of Cysteine Proteases. *J. Ethnopharmacol.* 123. **2009**. pp 106-109.
26. Fernández Haeger, J.; Jordano Barbudo, D. La Mariposa Monarca *Danaus plexippus* (L., 1758) en el Estrecho de Gibraltar (*Lepidoptera: Danaidae*). *SHILAP Revta. lepid.* 37 (148). **2009**. pp 421-438.
27. Galagosky L. R. Extracción. *Química Orgánica: Fundamentos Teórico-Prácticos para el Laboratorio*. 5ta Edición. EUDEBA. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 1995. pp 107-124.
28. Puma Araujo, A. C. Tesis de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador. 2013.
29. Williamson, K. Techniques. *Macroscale and Microscale Organic Experiments*. 6th Ed. Brooks/Cole, United States of America. 2011. pp 41-292.
30. Armarego, W.; Li, C. Chromatography. *Purification of Laboratory Chemicals*. 5th Ed. Butterworth-Heinemann. United States of America. 2003. pp 17-25.
31. Poole C. *The Essence of Chromatography*. 1st Ed. Elsevier Science B. V. The Netherlands. Amsterdam. 2003.

32. Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G. Thin-Layer Chromatography. *Microscale and Macroscale: Techniques in the organic Laboratory*. 1st Ed. Thomson Learning. United States of America. 2002. pp 313-326.
33. Shriner R.; Hermann C.; Morrill T.; Curtin D.; Fuson R. Separation of Mixtures. *The Systematic Identification of Organic Compounds*. 8th Ed. John Wiley & Sons. United States of America. 2004. pp 65-109.
34. Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P.; Tatchell, A. R. Experimental Techniques. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5th Ed. John Wiley & Sons. United States of America. 1989. pp 26-250.
35. Thin-Layer (Planar) Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*. 1st Ed. Academic Press. Lublin. Poland. 2000. pp 1956-1973.
36. Preparative Thin-Layer (Planar) Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*. 1st Ed. Academic Press. Budakalász. Hungary. 2000. pp 888-899.
37. Zubric, J. Thin-Layer Chromatography. *The Organic Chem Lab Survival Manual*. John Wiley & Sons. United States of America. 1988. pp 197-208.
38. Jork, H.; Funk, W.; Fisher, W.; Wimmer, H. *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detections Methods*. VCH Verlagsgesell. Germany. 1990. Vol. 1.
39. Garret, R.; Grisham, C. Isolation/Purification of Macromolecules. *Biochemistry*. 4th Ed. Brooks/Cole. United States of America. 2010.
40. Nelson, D.; Cox M. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 5th Ed. W. H. Freeman and Company. United States of America. 2008.
41. Simpson, J. H. *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*. 1st Ed. Academic Press. United States of America. 2008.
42. Smith, J. G. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Organic Chemistry*. 3rd Ed. McGraw-Hill. United States of America. 2008. pp 494-537.

43. Hesse, M.; Meir, H.; Zeeh, B. *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica* (Trad. Herrera Hernández, A.; Martínez Álvarez, R.; Sölhubem Kretzer, M.). 2^{da} Edición. Editorial Síntesis. España. 2005.
44. Field, L. D.; Sternhell, S.; Kalman, J. R. *Organic Structures from Spectra*. 4rd Ed. John Wiley & Sons. England. 2008.
45. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th Ed. John Wiley & Sons. United States of America. 2005.
46. Fontúrbel Rada, F. E.; Achá Cordero, Dario; Mondaca Gutierrez, D. A. *Manual de Introducción de la Botánica*. 2da Edición. Publicaciones Integrales. La Paz. Bolivia. 2007.
47. Lock Ugaz, O. *Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. 2da Edición. Editorial de la Pontífica Universidad Católica de Perú. Lima. Perú. 1994.
48. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS.
https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (acceso domingo 11 de agosto del 2019).
49. Prabakaran, M.; Kim, S.; Sasireka, A.; Hemapriya, V.; Chung, M. β -Sitosterol Isolated from Rice Hulls as an Efficient Corrosion Inhibitor for Mild Steel in Acidic Environments. *NEW J CHEM*. **2017**. pp 1-29.
50. NMRDB.ORG.
http://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.87.7 (acceso domingo 11 de agosto del 2019).
51. Altun, A.; Ok, S. NMR Analyses and Diffusion Coefficient Determination of Minor Constituents of Olive Oil: Combined Experimental and Theoretical Studies. *J. Chem. Eng. Data*. **57**. **2012**. pp 2619–2624.

52. J. Domínguez, H.; Díaz Crespín, G.; Santiago Benítez, A.; *et al.* Stereochemistry of Complex Marine Natural Products by Quantum Mechanical Calculations of NMR Chemical Shifts: Solvent and Conformational Effects on Okadaic Acid. *Mar. Drugs*. 12. **2014**. pp. 176-192.
53. Thompson, M. J.; Dutky, R. S. NMR Spectra of C-24 Isomeric Sterols. *Phytochemistry*. 11. **1972**. pp 1781-1790.
54. Pateh, U. U.; Haruna, A. K.; Garba, M.; Iliya, I.; Sule, I. M.; Abubakar, M. S.; Ambi, A.A. Isolation of Stigmasterol, β -sitosterol and 2- hydroxyhexadecanoic Acid Methyl Ester from the Rhizomes of *Stylochiton Lancifolius* Pyer and Kotchy (*Araceae*). *Nig. Journ. Pharm. Sci.* 8 (1). 2009. pp 19-25.
55. Forgo, P.; Kövér, K. E. Gradient Enhanced Selective Experiments in the ^1H NMR Chemical Shift Assignment of the Skeleton and Side-chain Resonances of Stigmasterol, a Phytosterol Derivative. *Steroids*. 69. **2004**. pp 43-50.
56. Prakash Chaturvedula, V. S.; Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the Dichloromethane Extract of *Rubus Suavissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.* 1(9). **2012**. pp 239-242.
57. Najmuldeen, I. A.; Ketuly, K. A.; Hamid, A.; Hadi, A. Phenolic Compound, Triterpene and Steroids from the Leaves and Bark of *Dysoxylum Macrocarpum*. *JUOZ*. 1. **2013**. pp 227-245.
58. Zhang, Pu; Hao, Jia; Liu, Jun; Zhang, Luyong; Sun, Hongbin. Efficient Synthesis of Morolic Acid and Related Triterpenes Starting from Betulin. *Tetrahedron*. 65. **2009**. pp. 4304–4309.
59. Rodríguez Díaz, Maité. Tesis Doctoral. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 2011.

60. Augustin, J. M. *et al.* UDP-Glycosyltransferases from the UGT73C Subfamily in *Barbarea vulgaris* Catalyze Sapogenin 3-O-Glucosylation in Saponin-Mediated Insect Resistance. *Plant Physiol.* 160. **2012**. pp. 1881–1895.



9. Anexos.

9.1 Constancia de identificación de *Asclepias curassavica* L.



Asociación Jardín Botánico La Laguna

Antiguo Cuscatlán, 27 de enero de 2016

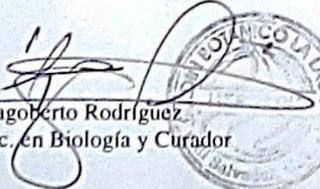
A quien interese.

Por medio de la presente nota, hago del conocimiento que el bachiller **Marvín Alberto Ramírez** con carnet RA10021, estudiante de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas de La Universidad de El Salvador, quien se hizo presente al Herbario LAGU de nuestra institución este día, con una muestra botánica seca para el análisis y clasificación sistemática, la cual se sometió a revisión de literatura y comparación con imágenes de especies tipo para poder clasificarle, resultando ser: *Asclepias curassavica* L., y que pertenece a la familia (ASCLEPIADACEAE).

Con el resultado anterior el estudiante manifiesta que la especie será utilizada con fines de elaboración de tesis de grado denominada: "Identificación de Cardenólidos de látex de *Asclepias curassavica*, por RMN ¹H y ¹³C".

Se extiende la siguiente nota, para que el interesado haga buen uso, y para lo que estime conveniente dentro del trabajo de grado.

Atte.


Dagoberto Rodríguez
Lic. en Biología y Curador



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel.(503) 2243 - 7970 / 2243 - 7968
Email: jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv Sitio Web: www.jardinbotanico.org.sv

9.3 Preparación de reactivos reveladores.

9.3.1 Reactivo de Oleum.

Mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}$ (4:1:20). Recomendado para azúcares y compuestos que se pueden deshidratar.⁴³

9.3.2 Reactivo de Baljet.

1 g de ácido pícrico en EtOH 95% + 10 g de NaOH en 100 mL H_2O . Rojo claro a oscuro para lactonas α , β -insaturadas.⁴⁷

Glosario.^{11, 46}

- **Antera:**

Parte del estambre de las flores, en forma de saquito, donde se encuentra el polen.

- **Aracnoidea:**

En botánica se emplea para denominar plantas cubiertas con largos y delicados pelos o fibras.

- **Cáliz:**

Conjunto de sépalos, normalmente de tono verdoso, que forman el envoltorio de una flor a la que protegen antes de abrirse.

- **Corola:**

Es el órgano floral accesorio compuesto por los pétalos

- **Efecto anabólico:**

Estimulación del crecimiento y aumento en el volumen del tejido muscular por efecto de la testosterona natural en el organismo.

- **Escualeno:**

Triterpeno cuya estructura consta de 30 átomos de carbono, los cuales provienen de seis unidades de isopreno. Se aisló por vez primera del aceite de hígado de tiburón. Biosintéticamente, se considera el precursor de los triterpenos tetracíclicos y de los esteroides.

- **Folículo:**

Fruto sencillo y seco que se abre solamente por un lado y tiene una sola cavidad que, generalmente, encierra varias semillas.

- **Ginestegio:**

En las flores, dicese de cualquier órgano protector del gineceo distinto del perianto. Es típico de las *Asclepiadaceas*.

- **Glabra:**

Que está desprovisto de pelos y glándulas.

- **Hidropesia:**

Acumulación anormal de líquido en alguna cavidad o tejido del organismo.

- **Oblongado:**

Más largo que ancho, y con los bordes convergentes.

- **Pecíolo:**

El pecíolo es la parte de la planta que une a la hoja con la base foliar, rama o tallo. Es una estructura delgada, de forma cilíndrica, algunas veces acanalada y otras planas.

- **Pedicelo o pedúnculo:**

Presentando la misma estructura del tallo, el pedicelo o pedúnculo es la rama o rabillo que sostiene la flor solitaria o inflorescencia de una planta. También se conoce por pedicelo la extensión del tallo de la que penden los frutos. A las flores que carecen de esta estructura se les llama apedunculadas, sésiles o sentadas.

- **Pilosidad:**

En botánica, es el conjunto de pelos de un órgano o de una planta.

- **Tomentosa:**

Es un término utilizado para describir los pelos de plantas que se doblan y son enmarañados, formando capas de lana. A menudo, los pelos son de color plata o gris.