

POTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA  
SUBFRACCIÓN DE LAS HOJAS DE *Iseria laevis* (*Rubiáceas*) CON ACTIVIDAD  
ANTICARIOGÉNICA

DIRECTORA: ALBA NOHEMÍ TELLEZ ALFONSO Dr. Sc.  
ASESOR: FREDY GAMBOA

ESTUDIANTE: JOHN JAIRO ROJAS RUIZ

TESIS

Presentada como requisito parcial  
Para optar al título de  
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ENFASIS  
PRODUCTOS NATURALES

BOGOTÁ D.C. 2010

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA  
SUBFRACCIÓN DE LAS HOJAS DE *Iseria laevis* (*Rubiáceas*) CON ACTIVIDAD  
ANTICARIOGÉNICA

JOHN JAIRO ROJAS RUIZ

APROBADO

---

ALBA NOHEMÍ TELLEZ ALFONSO Dra. Sc  
DIRECTORA

---

RODRIGO RODRÍGUEZ Ph.D.  
JURADO

---

JORGE ROBLES Ph.D.  
JURADO

---

JULIO PEDROZO Ph.D.  
JURADO

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA  
SUBFRACCIÓN DE LAS HOJAS DE *Iseria laevis* (*Rubiáceas*) CON ACTIVIDAD  
ANTICARIOGÉNICA

JOHN JAIRO ROJAS RUIZ

APROBADO

MANUEL ANTONIO FRANCO  
MD. Ph.D  
DIRECTOR DE POSGRADOS  
FACULTAD DE CIENCIAS

INGRID SCHULER  
Biol. Ph.D  
DECANA ACADÉMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo al Dios de mi corazón por colocarme retos y mostrarme que la mejor compañía para afrontarlos es y será mi familia.

A Gabriela mi hijita y mi mayor pensamiento

A mi esposa por su constante apoyo ayuda y paciencia durante este tiempo.

A mi mamá, por su amor incondicional, apoyo y preocupación.

A la memoria de Ercilia Ruiz, la mujer que me enseñó desde pequeño para que sirva cada "mata".

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución No 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Alba Nohemí Téllez, quien me enseñó a aprehender y sacarle gusto a este trabajo, también por su colaboración y paciencia durante la realización del mismo.

Al Dr. Freddy Gamboa, por su colaboración y explicaciones en ese mundo de la microbiología.

A Mayra Alejandra Téllez, por su ayuda y amistad en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Jorge Robles, Elizabeth Gil, Rubén Torrenegra, Alix Loaiza por su atenta ayuda, disposición, recomendaciones, durante este tiempo.

A mi esposa Sandra, un especial agradecimiento por su preocupación, aporte de ideas, escucha y corrección durante el desarrollo de este trabajo.

A las Directivas de la *Fundación Colegio Anglo Colombiano* y el comité SMT por su apoyo en mi desarrollo profesional. Como también a los profesores Keith Rigby y James Atkinson por su apoyo y corrección de texto respectivamente.

A Diana, Camilo, Felipe e Iván por su amistad e inyección de risa y optimismo cada tarde.

A mis compañeros de trabajo Milton Solarte, Sherie Cañon y Elsa Gómez por su apoyo, escucha y sus siempre sabios consejos.

Un especial agradecimiento a la futura médico Angie Rincón por su ayuda desde Calí en la toma de espectros de RMN para este trabajo.

## ABSTRACT

In the joint-project carried out by the “Grupo de Investigación en Fitoquímica” and the “Centro de Investigaciones Odontológicas” from “Pontificia Universidad Javeriana”, we characterized three compounds with biological anticariogenic<sup>1</sup> activity, from *Rubiáceas Isertia laevis* (Triana Boom). leaf extracts and sub fractions.

The antibacterial activity was determined by bioassay obtained using on *S. mutans* and *S. sobrinus* microorganisms associated with caries cavity. These biological activities are recorded in the papers of undergraduate and master's thesis developed within the aforementioned project. (ALVARADO A., 2006), y (TELLEZ M., 2009)

The components from the active fraction were isolated and purified and their chemical structures were determined using spectroscopic and spectrometric methods such as RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization (HPLC-ESI-MS).

The study of the anticariogenic subfraction were three components were found. These belonged to the glycoside triterpenoid type, similar to molecules isolated from the *Rubiaceae* family species and its gender by Aquino, R. in 1997, and Hietzman, M. in 2005.

---

<sup>1</sup> Anticariogenic refers biological inhibition activity over caries cavity..

## RESUMEN

Dentro del proyecto 001926 desarrollado entre el grupo de fitoquímica y el Centro de Investigaciones Odontológicas ambos de la Pontificia Universidad Javeriana, se caracterizan tres compuestos a partir de la fracción con actividad *anticariogénica*<sup>2</sup> obtenida a partir de las hojas de *Isertia laevis* (Triana, Boom)

Se determina la actividad anticariogénica por bioensayos de las fracciones obtenidas usando *S. mutans* y *S. sobrinus*, microorganismos relacionados con la caries dental. Estas actividades biológicas se registran en los trabajos de grado y tesis de maestría desarrolladas dentro del proyecto mencionado. ALVARADO y TELLEZ *et.al.* 2009

Se realiza entonces la separación e identificación de los componentes de la fracción anticariogénica, el aislamiento y se realiza su elucidación química estructural por medio de métodos espectroscópicos como RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS).

Del estudio de la subfracción activa anticariogénica, se encontraron tres compuestos del tipo triterpeno glicosilado. Compuestos similares y con actividad biológica han sido reportados entre el género *Isertia* y la familia *Rubiáceas* por Aquino, R., en 1997, y Hietzman, M., en 2005.

---

<sup>2</sup> Anticariogénico concepto utilizado por CHUNG, J., en 2006 para designar la actividad inhibitoria de extractos sobre bacterias asociadas a la caries dental.



## INDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt	:	Acetato de Etilo
Ac	:	Radical Acetil
Api	:	B-D-apiosa (furanosa)
ATCC	:	American Type Culture Collection
CC	:	Cromatografía en Columna
CHCl <sub>3</sub>	:	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	:	Diclorometano
ESI	:	Ionización por Electrospray
ESI <sup>+</sup>	:	Ionización por Electrospray modo positivo
ESI <sup>-</sup>	:	Ionización por Electrospray modo negativo
EtOH	:	Etanol
Glc	:	D-Glucosa
H <sub>2</sub> O	:	Agua
HPLC	:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
m.s.n.m.	:	Metros sobre el nivel del mar
MeOH	:	Metanol
MS	:	Espectrometría de Masas
MS <sup>n</sup>	:	Espectrometría de Masas tándem ó secuencial
Petrol	:	Eter de Petróleo
P.f.	:	Punto de Fusión en °C

R <sub>f</sub>	:	Cociente entre Desplazamiento de la muestra y el frente de solvente.
RMN <sup>13</sup> C	:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN <sup>1</sup> H	:	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno.
RP-18	:	Fase reversa de 18 Carbon
Sephadex	:	Cromatografía de Inclusión Exclusión con adsorbente Sephadex® LH-20
TLC	:	Cromatografía en Capa Fina
VCC	:	Cromatografía en Columna al Vacío

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>DEDICATORIA</b>	4
	<b>NOTA DE ADVERTENCIA</b>	5
	<b>AGRADECIMIENTOS</b>	6
	<b>ABSTRACT</b>	7
	<b>RESUMEN</b>	8
	<b>ABREVIATURAS</b>	9
	<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	11
	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	13
	<b>INDICE DE TABLAS</b>	15
1.	<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN</b>	16
1.1	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.2	JUSTIFICACIÓN	18
1.3	OBJETIVOS	19
1.3.1	Objetivo General	19
1.3.2	Objetivos Específicos	19
2.	<b>CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO</b>	20
2.1	De las <i>Rubiáceas</i>	20
2.1.1	Morfología General de las Rubiáceas	20
2.1.2	Inflorescencias y Flores	21
2.1.3	Las Estipulas	22
2.1.4	Frutos	22
2.1.5	Usos	22
2.1.6	Química de las Rubiáceas y Quimiotaxonomía	23
2.2	Del Género <i>Isertia</i>	26
2.3	<i>Isertia laevis</i> (Triana) Boom	28
2.3.1	Morfología de la <i>Isertia laevis</i>	30
2.3.1.1	Estipulas y Coléteres	31
2.3.1.2	Hojas de <i>Isertia laevis</i>	32
2.3.1.3	Inflorescencias y flores <i>Isertia laevis</i>	32

2.3.1.4	Frutos <i>Isertia laevis</i>	33
2.3.2	Química de la <i>Isertia laevis</i>	33
2.3.3	Actividad Biológica	35
2.4	Caracterización Estructural	36
2.4.1	Cromatografía Líquida de alta Eficiencias Acoplada a Espectrometría de masas.	36
3	CAPITULO III: PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1	Recolección y tratamiento del material vegetal	40
3.2	Obtención de extractos y fracciones activas	41
3.3	Ensayos Químicos preliminares	47
3.4	Preparación de las Subfracciones Activas para Ensayos espectrométricos y espectroscópicos.	48
3.5	Purificación de la muestra para RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$	49
4.	CAPITULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1	De la Recolección del Material Vegetal	52
4.2	De la Obtención de Fracciones y Subfracciones	52
4.3	De los Ensayos Químicos Preliminares	53
4.4	De los ensayos Espectrometricos Mediante HPLC-ESI-MS	54
5	CAPITULO V: CONCLUSIONES	67
6	SUGERENCIAS	69
7	BIBLIOGRAFÍA	70
8	ANEXOS	78

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Características del ovario en Rubiáceas. Mendoza, H. 2004	22
FIGURA 2	Fotografía de la <i>Isertia laevis</i> (Rubiáceas) Autor, 2010	29
FIGURA 3	Hojas y flores de <i>Isertia haenkeana</i> e <i>Isertia laevis</i> . Taylor C. Missouri Botanical Garden. Versión Web	30
FIGURA 4	Estipulas de la <i>Isertia laevis</i> . Autor, 2010	31
FIGURA 5	Hojas de <i>Isertia laevis</i> . Autor, 2010	31
FIGURA 6	Inflorescencia, flor, y botón floral en <i>Isertia laevis</i>	32
FIGURA 7 (a)	Estructuras de ovario y estambres Lóculos del ovario Autor, 2010	32
FIGURA 7 (b)	Estambres y pistilo. Autor, 2010	32
FIGURA 8 (a)	Fruto de la <i>Isertia laevis</i>	33
FIGURA 8 (b)	Corte transversal del fruto de <i>I. laevis</i>	33
FIGURA 9	Proceso esquemático de la ionización por electrospray	37
FIGURA 10	Medición de condiciones ambientales por medio de sensores de humedad relativa, luminosidad, pH de suelo, temperatura ambiental y de suelo	41
FIGURA 11 (a)	Cromatografía en Columna al vacío (CCV).	43
FIGURA 11 (b)	Rotavaporador	43
FIGURA 12	Hidrólisis de un compuesto glicosilado y posterior conversión del azúcar en furfural	54
FIGURA 13	Cromatograma de la fracción activa desarrollado en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010	54
FIGURA 14	Espectro de masas a tiempo de retención 2,12 minutos modo negativo	55
FIGURA 15	Espectro de masas a tiempo de retención 2,12 minutos modo positivo	55
FIGURA 16	Posible secuencia de azúcares para el compuesto	56

	eluido a 2.12 minutos	
FIGURA 17	iones huella digital del compuesto con tiempo de retención 2.12 min en modo positivo y negativo	57
FIGURA 18	Fragmentación propuesta para el compuesto con tiempo de retención 2.12 minutos	57
FIGURA 19	Espectro de masas a tiempo de retención 41,985 minutos modo negativo	58
FIGURA 20	Espectro de masas a tiempo de retención 41,985 minutos modo positivo	58
FIGURA 21	Rompimiento propuesto para el triterpeno presente en el compuesto a tiempo de retención de 41.985 minutos.	59
FIGURA 22	Estructura propuesta para el compuesto eluido a 41,985 min en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010	60
FIGURA 23	Espectro de masas a tiempo de retención 45,451 minutos modo negativo	60
FIGURA 24	Espectro de masas a tiempo de retención 45,451 minutos modo positivo	60
FIGURA 25	Espectro de RMN $^1\text{H}$ compuesto fracción 10 tomado en $\text{CDCl}_3$	61
FIGURA 26	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto fracción 10 tomado en $\text{CDCl}_3$	62
FIGURA 27	Ampliación del espectro RMN $^{13}\text{C}$ compuesto fracción 10	63
FIGURA 28	Espectro DEPT 135 ampliado de la fracción 10, análisis CH, CH <sub>3</sub>	64
FIGURA 29	Espectro DEPT 135 ampliado de la fracción 10, análisis CH <sub>2</sub>	64
FIGURA 30	Espectro COSY de la fracción 10.	65

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Compuestos aislados y elucidados de la familia <i>Rubiáceas</i>	24
TABLA 2	Compuestos aislados y elucidados del género <i>Isertia</i>	27
TABLA 3	Clasificación taxonómica de la <i>Isertia laevis Triana Boom</i>	29
TABLA 4	Datos obtenidos del cromatograma GC-MS de la subfracción activa 9	34
TABLA 5	Presencia de Alcaloides en Especies de Rubiáceas en Panamá. Tomado y adaptado de	34
TABLA 6	Halos de inhibición en mm presentados por <i>S. mutans</i> ATCC 25175 y <i>S. salivarius</i> NCTC 8606 (ALVARADO, 2007)	35
TABLA 7	Halos de inhibición en mm presentados por los microorganismos asociados a caries dental (ALVARADO, 2007)	36
TABLA 8	Compuestos químicos cuyas estructuras son determinadas por ESI-MS en modo negativo	38
TABLA 9	Fragmentos característicos de azúcares perdidos. (CABRERA, G.)	39
TABLA 10	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ y/o $^{13}\text{C}$	51
TABLA 11	Datos de Campo registrados en el lugar de recolección.	52
TABLA 12	Ensayos Químicos preliminares en TLC y en tubos de ensayo.	53
TABLA 13	Resumen de las Estructuras obtenidas en la subfracción con actividad anticariogénica de <i>Isertia laevis</i> .	66

## INTRODUCCIÓN

Peter Atkins en su libro *Cómo Crear el Mundo*, (2003) hace una ejemplificación del como están hechas las cosas. Dice concienzudamente que un elefante esta hecho de moléculas, y que estas moléculas están hechas por átomos los cuales guardan cada una su propia sensibilidad para unirse unos con otros y así formar el mencionado elefante. Pero para saber que moléculas son, como están relacionadas entre sí y qué función tienen es necesario hacer caso a la curiosidad científica que embarga al hombre.

Es así como la araña *Filistata hibernalis* (araña de telas eléctricas) frota con sus patas la telaraña para polarizarla, con el fin de poder atrapar al *Triatomino* *hematófagos* vehículo del *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad tropical del Chagas-Mazza. Una planta, o cualquier organismo sin importar su ecosistema guardan un arsenal de moléculas dispuestas a utilizar contra sus depredadores o atraer polinizadores para el caso particular de las dicotiledóneas. Sin embargo, es de esperar que esta quimiodiversidad dispuesta en la biodiversidad de una región, hoy en día se encuentra casi en la mano del hombre para aplicarlas en el desarrollo de medicamentos, venenos, alimentos, colorantes, fibras, saborizantes y también para atacar los microorganismos de la cavidad bucal relacionados con la caries.

El grupo de las plantas Rubiáceas es uno de los más numerosos en cuanto a especímenes a escala mundial. La utilización de algunas especies de esta familia ha conformado las bases económicas y farmacológicas de diferentes países, como es el caso de la planta de café, *Coffea arabica* y *canephora*, en Colombia antes de la década de los 90'. Pero estudios al interior de las plantas, contando también otros organismos, han encontrado la presencia de metabolitos secundarios que presentan alguna actividad biológica aplicable a solucionar problemáticas de la vida humana y en el peor de los casos a crear otras nuevas.



Se ha encontrado ejemplares como la planta de uña de Gato, *Uncaria tomentosa* (*Rubiáceas*), donde su historia etnobotánica es esencialmente medicinal para una docena de tratamientos. No obstante, no es la única especie con actividad biológica reconocida, la ya mencionada planta del café, donde se ha determinado su bioactividad inhibitoria frente a bacterias asociadas a la caries dental como la *S. mutans* y *S. sanguinis*. Actividad relacionada por su alta cantidad de polifenoles cuyas propiedades biológicas han descrito también actividad antioxidante, anti-cáncer, y efectos anti-inflamatorios (FERRAZZANO G. *et al*, 2009).

La *Isertia laevis* es una *Rubiácea* presente a la altura de los 500 m.s.n.m., conocida en la región de Medina (Cundinamarca Colombia) como *Palo Santo* y es utilizada con fines medicinales (García Barriga, 2000). Esta planta al igual que *Elaegia utilis* han sido el objeto de estudio por parte del Grupo de Investigación en Fitoquímica (GIFUJ) y el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana dentro del proyecto 001926 en donde sus fracciones y subfracciones obtenidos a partir de sus hojas, se ha evaluado diferentes actividades biológicas como inhibitoria frente a bacterias de la cavidad bucal asociadas a la caries dental (TÉLLEZ M., *et.al* 2009) (ALVARADO A., 2007) y citotóxica.

Esta investigación, por lo tanto busca profundizar en la caracterización por medios espectroscópicos como RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y espectrométricos como HPLC-ESI-MS, la fracción con actividad anticariogénica encontrada a partir de las hojas de *Isertia laevis*.

# FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

## 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Caracterizar por análisis espectroscópico los compuestos presentes en la subfracción con actividad anticariogénica obtenida a partir de las hojas de la *Rubiácea Isertia laevis*.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Cerca del 60% de los medicamentos, y otro porcentaje de pigmentos, saborizantes, que se encuentran en el mercado provienen de fuentes naturales. Estas moléculas provienen de diferentes métodos de obtención, extracción a partir de fuentes naturales, semi-síntesis, y síntesis. Para todos estos casos es necesario conocer la estructura química del compuesto con actividad biológica, ya que el cambio de un grupo metil en diferentes posiciones puede hacer variar la actividad farmacológica ó toxicológica de un producto natural.

Entre el Centro de Estudios Odontológicos y el Grupo de Investigación en Fitoquímica, ambos de la Pontificia Universidad Javeriana, han desarrollado varios estudios alrededor de la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos y fracciones obtenidos de 2 especies de la familia *Rubiáceas*: *Isertia laevis* y *Eleagia utilis* sobre bacterias asociadas a la caries dental.

Para esta investigación y como sugerencias de autores inscritos en el proyecto 00198, se enfocó al aislamiento y caracterización de los compuestos activos presentes en la fracción de las hojas de *Isertia laevis* con actividad biológica anticariogénica.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué compuestos activos están presentes en la fracción de las hojas de *Isertia laevis* con actividad biológica anticariogénica?

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fitoquímicamente los compuestos con actividad anticariogénica presentes en la subfracción de las hojas de la *Rubiácea Isertia laevis*.

### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un método de extracción y purificación de los compuestos activos presentes en las hojas de *Isertia laevis* con actividad anticariogénica.
- Por medio de ensayos preliminares con reveladores sobre cromatografía en capa fina y constantes físicas determinar qué tipo de sustancias están presentes en la subfracción con actividad anticariogénica.
- Determinar las estructuras químicas correspondientes a los compuestos de la subfracción inhibitoria de bacterias asociadas a caries dental (anticariogénica) obtenidos a partir de las hojas de la *Rubiácea Isertia laevis*, desde la interpretación de los resultados espectroscópicos y espectrométricos
- Desde las relaciones quimiotaquonomías establecer una relación preliminar entre las *Rubiáceas Elaegia Utilis* e *Isertia laevis* basados en los compuestos de las subfracciones activas estudiados por cromatografía en capa fina (TLC) y la aplicación e interpretación de reveladores químicos.

## CAPITULO 2: MARCO TEORICO

### 2.1 De Las Rubiáceas

Las *Rubiáceas* son una familia vascular importante por su diversidad con 10700 especies distribuidas en 637 géneros, los cuales generalmente se encuentran sobre regiones tropicales y subtropicales (neotropicales) pero no en zonas árticas. Por la cantidad de especies se considera entre las más diversas a nivel mundial, después de las Asteraceae, Orchidaceae y Poaceae (MENDOZA, H., 2000).

El 68% y 27% de esta numerosa familia de angiospermas se encuentran presentes principalmente como arbustos, árboles y herbáceos respectivamente, comunes entre los 300 y 2500 m.s.n.m. en América Central, Norte América, Sur América y muy pocas especies en África. Sin embargo, presentan mayor densidad de especímenes en los países de Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Solo un 5% son trepadoras o bejucos como *Hillia*, *Uncaria*, *Schradera* y *Malanea*. (MENDOZA H, 2004)

#### 2.1.1. Morfología General de las Rubiáceas

Como se mencionó anteriormente, el 95% de las especies está entre árboles, hierbas y arbustos. No obstante, dentro de esta familia se encuentran lianas, epífitas o hemiepífitas. Una característica notoria del grupo es que sus especímenes suelen ser bisexuales, monoicas y dioicas

Entre las características morfológicas principales de las *Rubiáceas*, son la presencia de 3 a 5 hojas opuestas o verticiladas con peciolo alargado por cada nudo sin presencia de rafidios. Presentan regularmente anisofilia marcada. Los tamaños de hojas desarrolladas varían de longitudes desde 1 centímetro o menos en *Arcytophyllum* y *Nertera*, en *Isertia laevis* llega hasta 30 centímetros y las hojas

de *Pentagonia* hasta 80 cm longitud. Las hojas según la especie pueden tener diferentes tamaños entre los que se prevalecen, elíptica, ovalada y obovada. La colocación de venas es pinnada o foliolos. Algunas especies poseen raramente mimercodomacios como la *Duroia hirsuta* o arcarodomacios por el envés de las hojas. Sus tallos pueden ser lisos, teretes de color grisáceo o verde claro con una corteza delgada.

### **2.1.2. Inflorescencias Y Flores**

En las Rubiáceas son mayoritariamente plurifloras, mixtas, cimosas principalmente. Aunque es común encontrar las inflorescencias del tipo brácteas pequeñas dado por la inflorescencia racemosa con cimosas secundarias.

En cuanto a la flor de las Rubiáceas es prevalente la presencia de flores pequeñas y medianas, entre los 0,4 y los 5 cm, con simetría bilateral, es prevalente la flor actinomorfas, bisexuales, monoicas y dioicas

La corola es gamopétala en su gran mayoría, es decir los sépalos o pétalos están fusionados parcial o completamente,

El cáliz en *Rubiáceas* es yuxtapuesto con el ovario. La cantidad de lóculos en el ovario son cualidades taxonómicas para hacer diferenciaciones entre especies, se pueden encontrar monoloculares y multiloculares de 1 a 8 lóculos entre géneros respectivamente.

El gineceo contiene un anillo nectarífero denominado disco basal FIGURA 1. En esta familia el ovario es ínfero excepto en *Pagamea* donde es súpero.



FIGURA 1. Características del ovario en *Rubiáceas*. Fuente: Mendoza, H. 2004

### 2.1.3. Las Estipulas

Las Rubiáceas son generalmente estipulíferas, se encuentran entre dos o cuatro laterales por nudo las cuales comúnmente son estípulas interpeciolares o intraxilares.

Esta morfología particular en el género es variada, permitiendo generar una característica de clasificación taxonómica o de reconocimiento del espécimen. Es así que se reportan estipulas como *Alibertia*, *Elaegia*, *Uncaria*, *Isertia*, *Chomelia* entre muchas otras. Mendoza, en *Rubiáceae de Colombia*, reporta 125 estipulas diferentes para las Rubiáceas

### 2.1.4. Frutos

Los frutos en *Rubiáceas* son principalmente de dos (2) tipos. El primero y más frecuente son los carnosos tipo bayas; y el segundo son secos dehiscentes. Aunque también se cuenta con drupáceos con 1 ó 2 semillas, este tipo de fruto es evidente en el café *C. coffea*.

### 2.1.5. Usos

Las *Rubiáceas* son una familia con valor económico. Un caso significativo son las especies de *Coffea*, cuyas semillas tostadas se realizan para la producción de café. Las que son de tipo arbustivo como *Elaegia*, *Isertia* son utilizadas como maderables. No obstante, son usadas por sus propiedades farmacológicas a partir

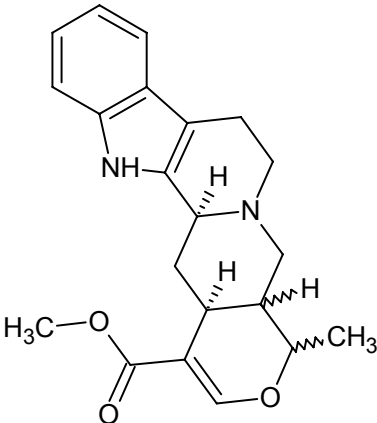
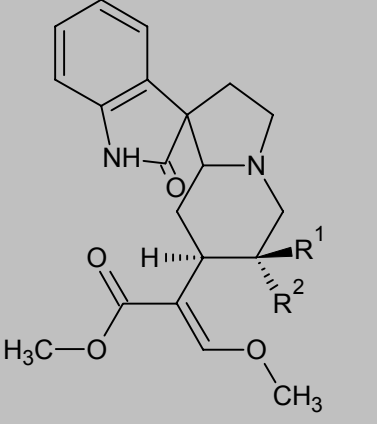
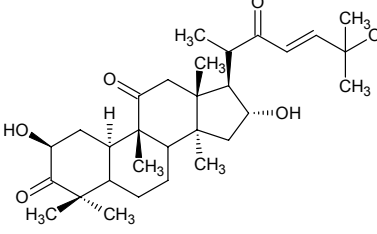
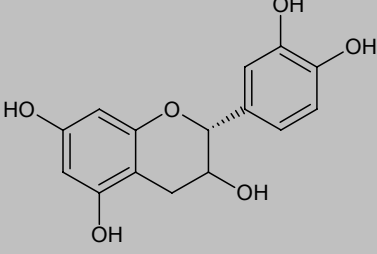
del saber tradicional. Es pertinente mencionar que las *Rubiáceas* sirven como indicadores de biodiversidad.

### **2.1.6 Química de las *Rubiáceas* y Quimiotaxonomía**

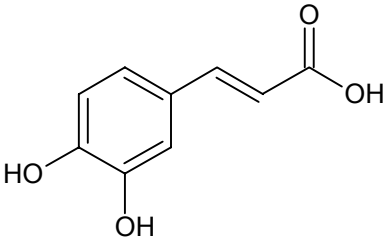
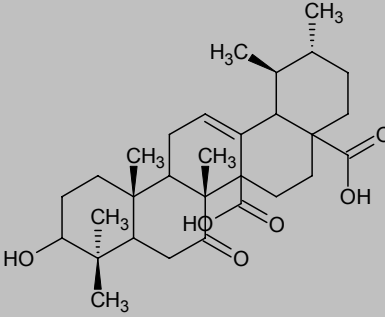
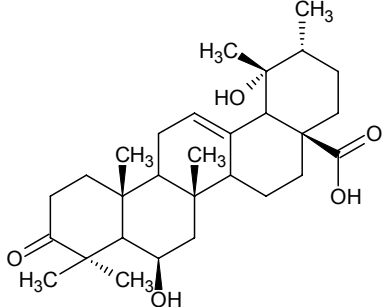
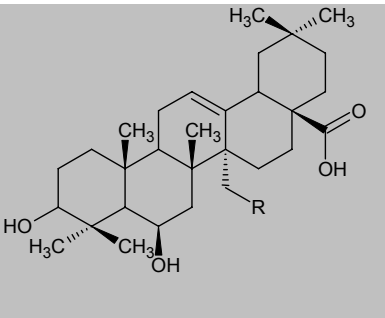
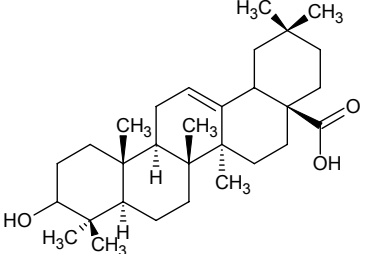
De las rubiáceas existen gran número de estudios y publicaciones acerca de la química del grupo, relaciones quimiotaxonómicas (MONGRAND S., et.al 2005) y actividad biológica como antiinflamatoria (NAZARI, A. et.al 2006) antibacteriano (MOSQUERA, et.al 2004) (KHAN M, et.al 2003) (PARTHASARATHY S, et.al 2009), antifúngico (ANNAPURNA J, et.al 2003) inmunoestimulante, citotóxica, (HEITZMAN, M et.al 2005), antioxidante (PARTHASARATHY S, et.al 2009) disminuye desórdenes metabólicos en el hígado (LIU J, et.al 1995), efectos anticariogénicos (FERRAZZANO G, et.al 2009).

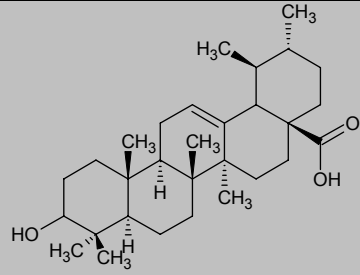
De la química del grupo son mayoritarios la presencia de alcaloides, de estos se han encontrado del tipo purínico (cafeína) isoquinolinos monoterpénicos, indoloterpénicos (Soto, 2001). Otros metabolitos secundarios aislados, son taninos, cumarinas, fenoles, polifenoles, saponinas, triterpenos glicosilados (SPARG S, 2004), (Arraiga J., 1990) y ácidos grasos. De estos últimos, se han identificado diferentes ácidos grasos comunes en las hojas entre esta familia, como lo publica Mongrand, (2005) donde la composición y presencia de ácidos grasos 14:0, 16:0, 16:1 $\Delta$ 9-cis, 18:3 $\Delta$ 9,12,15 entre otros como tejidos fotosintéticos sirven como herramienta quimiotaxonómica para la especie. (MONGRAND S., 2005.). La gran cantidad de subfamilias ha permitido la realización de diferentes estudios, los cuales desde su quimiotaxonomía permite agilizar la identificación de nuevos productos naturales.

TABLA 1. Compuestos aislados y elucidados de la familia *Rubiáceas*

Compuesto	Estructura	Nombre	Referencia
Alcaloide		Ajmalicina: Me-20, H-20	HEITZMAN (2005)
Alcaloide		Rincofillina: R1= H; R2= Et Corinoxina B: R1= Et; R2= H Corinoxeina B: R1= H; R2= CH=CH <sub>2</sub>	HEITZMAN, (2005)
Triterpeno		Cucurbitacin D	DINAN L, 2001
Flavonol		(+) catequina	ARBAIN, D., 1998



<p><b>Ácido Cinámico</b></p> 	<p>Ácido Caféico</p>	<p>HEITZMAN (2005)</p>
<p><b>Triterpeno glicosilado</b></p> 	<p>Ácido 7-oxo-3-hidroxi-12-en-27, 28-dioico</p>	<p>HEITZMAN (2005)</p>
<p><b>Triterpeno glicosilado</b></p> 	<p>Ácido 3-oxo-6, 19-dihidroxi-12-en-28-oico</p>	<p>HEITZMAN (2005)</p>
<p><b>Triterpeno</b></p> 	<p>Ácido Uncarinico A R= E-feruloi. Ácido Uncarinico B R= Z-feruloi. Ácido Uncarinico C R= E-coumaroil</p>	<p>HEITZMAN (2005)</p>
<p><b>Triterpeno</b></p> 	<p>Acido oleanolico Acido 3β-hidroxi-olea-12-en-28-oico</p>	<p>LIU J, 1995</p>

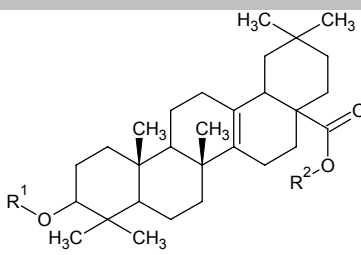
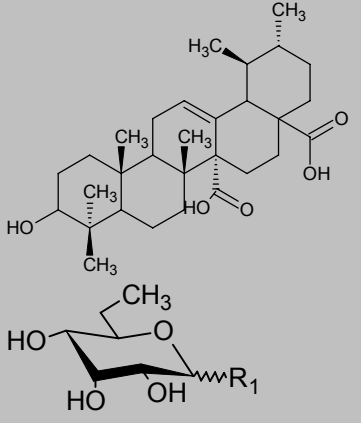
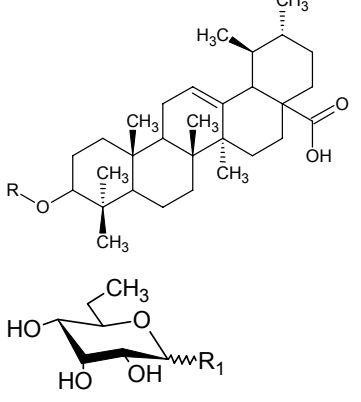
<p><b>Triterpeno</b></p> 	<p>Ácido Ursólico      LIU J, 1995  Ácido 3-β-hidroxi-  olea- 12-en-20 ico</p>
--	--

Dentro de las rubiáceas sobresale la *Uncaria tomentosa* (Cat's claw ó uña de gato) por sus propiedades farmacológicas, de la cual se han determinado un amplio número de sustancias químicas. Cincuenta y tres (53) moléculas desde 1978, como alcaloides, terpenos, flavonoides y ácidos quinóicos glicosilados (HEITZMAN M, 2005). Este amplio espectro de sustancias químicas brinda al espécimen reconocidas y diferentes actividades biológicas como antiinflamatorios, efecto en enfermedades vasculares, citotoxicidad, antifúngico, antibacteriano entre otros.

## 2.2 Del Género *Iseritia*

Dentro de lo particular, el género *Iseritia* presentan al igual que la familia contenidos mayoritarios en alcaloides (SOTO-SOBENIS A, 2001). Sin embargo, a partir de la extracción con solventes polares como metanol (MeOH) de las hojas de la especie *Iseritia haenkeana* se han aislado también triterpenos glicosilados, nor-triterpenos glicosilados, esteres ácidos quinicos, ácido cincholíco (RUMBERO A, 1991, ARRAIGA-RUMBERO, 1990). Otra especie de la cual se ha aislado otros metabolitos secundarios en esta misma polaridad es de *Iseritia pittieri* de la cual se obtuvo una saponina glicosilada. (UM, R. 2001). Ver tabla 2.

TABLA 2. Compuestos aislados y elucidados del género *Isertia*

Compuestos	Estructuras	Nombre	Referencia
<b>Triterpeno glicosilado</b>		acido Picrocinolico 3β- O-D- quinovopiranosil- 28-[β-D- glucopiranosil (1→6)-β-D- glucopiranosil ester	UM, RYUNG HUN (2001)
<b>Triterpeno glicosilado</b>		Acido Picrocinolico 3β- O-β-6-deoxi-D- glucopiranosido- 28- O-β-D - glucopiranosido	RUMBERO, 1991
<b>Triterpeno glicosilado</b>		3β-O-6-deoxi-D- glucopiranosido- 28-O-β -D- glucopiranosido	ARRAIGA, 1990

Sin embargo, los estudios publicados en cuanto su actividad biológica no son tan numerosos hasta la fecha, cabe nombrar la actividad antimicrobial realizada por Mayra Téllez y Margarita Perdomo en 2009, sobre diferentes cepas asociadas a la caries dental, el cual es base de esta investigación.

### 2.3 *Isertia laevis* (Triana) Boom

El género de *Isertia* ha sido estudiado desde 1775, donde Aublet realizó las primeras descripciones de este género. En 1806 fue descrita por Humboldt y Bonpland basados en el género *Cassupa* de acuerdo a *C. verrucosa* y las similitudes entre ambas. Este último, Bonpland, registró diferencias en sus ovarios biloculados.

Hasta 1930 Paul C. Standley publica en su libro *Rubiáceas of Colombia* las diferencias entre *Isertia* y *Cassupa*, pero deja los dos géneros como sinónimos por su apariencia similar. En esta misma publicación el autor, Standley, describe un nuevo género *Creatantha* de acuerdo con *Cassupa peruviana*, sinónimo de *Isertia laevis* (Triana). En 1936, Standley registra a *Creatantha peruviana* como sinónimo de *Isertia alba* que es igual a *I. laevis*.

Un estudio taxonómico exhaustivo basado en la morfología al estereoscopio muestra que la cantidad de cavidades o lobulos en la bayas son imbricadas en la corola y poseen de 4 y 6, para *Isertia* y de 2 para *Cassupa*. Por lo tanto se considera desde entonces que son dos géneros diferentes. (BOOM, 1984)



FIGURA 2. Fotografía de la *Isertia laevis* (Rubiáceas) Fuente: Autor, 2010

La especie *Isertia laevis* se encuentra clasificada taxonómicamente de la siguiente manera (Triana) Boom

TABLA 3. Clasificación taxonómica de la *Isertia laevis* (BOOM, 1984)

<b>Reino</b>	<b><i>Plantae</i></b>
<b>División</b>	<b><i>Magnoliophyta</i></b>
<b>Clase</b>	<b><i>Magnoliopsida</i></b>
<b>Subclase</b>	<b><i>Asteride</i></b>
<b>Orden</b>	<b><i>Rubiales</i></b>
<b>Familia</b>	<b><i>Rubiáceas</i></b>
<b>Subfamilia</b>	<b><i>Cinchonoideae</i></b>
<b>Tribu</b>	<b><i>Isertiae</i></b>
<b>Género</b>	<b><i>Isertia</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>Isertia laevis</i></b>

Cuenta con las sinonimias *Cassupa laevis*, *Cassupa jurana*, *Cassupa alba*, *Cassupa panamenis*, *Isertia weberbaveri*, *Isertia parvifolia*, *Isertia spraguei*, *Creatantha peruviana*, *Isertia alba*, *Isertia panamenis* entre otros. (Herbario Nacional de Colombia)

La distribución de *Isertia laevis* esta ente los 500 y 2000 m.s.n.m. Se encuentra en Panamá, Costa Rica (Centro América), Colombia, Ecuador, Bolivia, Brasil y Venezuela principalmente.

Para Colombia, según Mendoza H, 2000, *I. laevis* está distribuida en Colombia en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. Sin embargo Jiménez L. (2002) y el *Herbario Nacional de Colombia* complementa con los siguientes sitios donde *I. laevis* también es reportada: Amazonas, Chocó, Meta, Antioquia, Caldas, Huila, Casanare, Putumayo y Caquetá.

### 2.3.1 Morfología de la *Isertia laevis*

Habito arbustos o árboles medianos, *Isertia laevis* es diferenciada dentro del grupo de las *Isertias* o *Cassupas* por las diferencias en flores y frutos, de acuerdo con el numero de lóculos en el ovario y numero de lóbulos en el estigma, debido a que un examen preliminar de *I. laevis* comparte semejanzas con *I. haenkeana* presentándose confusiones.



*I. haenkeana*



*I. laevis*

FIGURA 3. Hojas y flores de *Isertia haenkeana* e *Isertia laevis*. Fuente: Taylor C. Missouri Botanical Garden. Versión Web

#### 2.3.1.1 Estípulas y Coléteres

Las estípula en este espécimen es del tipo *Isertia*, interpeciolar libre de los peciolos. Es lobulada con 4 por nudo. El colétere es de la forma tricoma puntiagudo.



FIGURA 4. Estipulas de la *Isertia laevis*. Fuente: Autor, 2010

### 2.3.1.2 Hojas

Las hojas son opuestas, con peciolo, lámina elíptica, grandes (26 a 30 cm) cuando ya son maduras. Presenta venas medias, secundaria paralelas entre si, oblicuas a la vena media y las terciarias formando retículos. Presenta ausencia de anisofilia, y cuenta con dos hojas (2) por nudo. No presenta mimercodomacios o acarodomacios.



FIGURA 5. Hojas de *Isertia laevis*. Fuente: Autor, 2010

### 2.3.1.3 Inflorescencia y flores

La inflorescencia es bracteosa, cimosa de cima compuesta no sésil constando de un pedúnculo. La flor es mediana de tipo valvar en estado de prefloración. Presenta estructuras reproductivas conocidas.



FIGURA 6. Inflorescencia, flor, y botón floral en *Isertia laevis*. Fuente: Autor, 2010

La corola es hipocrateriforme ya desarrollada, aunque puede presentar flores atrofiadas, los estambres son inclusos, al igual que el estilo. Es ínfero ovárica, presenta 6 lóculos, con disposición en péndulo para los rudimentos seminales.



(a)



(b)

FIGURA 7. Estructuras de ovario y estambres (a) Lóculos del ovario, (b) estambres y pistilo. Fuente: Autor, 2010

#### 2.3.1.4 Frutos de la *Isertia laevis*

Los frutos de *Isertia laevis* son pequeños, carnosos del tipo baya, están entre 1 y 1,5cm de diámetro.



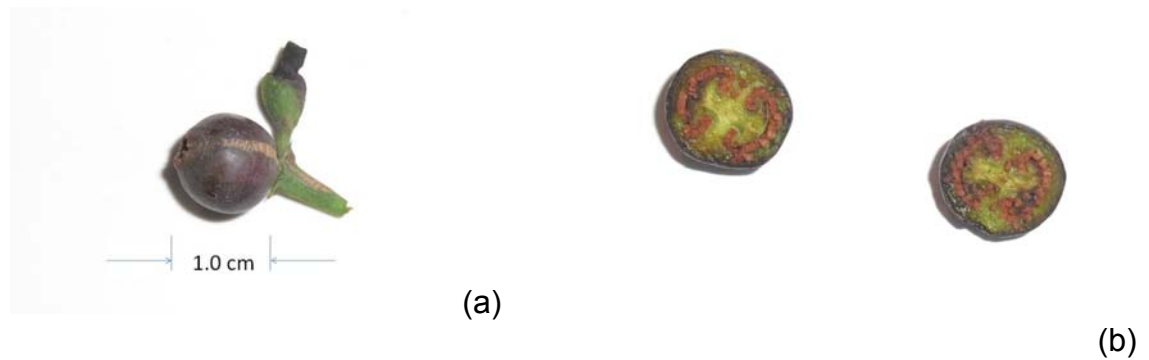


FIGURA 8. (a) Fruto *Isertia laevis* (b) Corte transversal del fruto de *Isertia laevis*  
Fuente: Autor, 2010

### 2.3.2 Química de la *Isertia laevis*

El estudio de la composición química de la *Isertia laevis* esta referenciado a la fracción activa como anticariogénica, de donde se reconoce la presencia de 8 (ocho) compuestos presentados en la tabla 4.

Sin embargo, las Rubiáceas es una familia que tiene por excelencia la presencia de alcaloides, así es como en los géneros *Gonzalagunia*, *Raritebe* e *Isertia*, en lo particular *Isertia laevis*, *Isertia haenkeana* y otras más, se ha cuantificado la presencia de alcaloides indólicos. (SOTO-SOBENIS., 2001)

TABLA 4. Datos obtenidos del cromatograma GC-MS de la subfracción activa 9.  
Fuente: (ALVARADO, 2007)

Tiempo Retención	Area %	Compuesto	m/z	% <sup>3</sup>
3,515	3,6	2, 2, 4 - trimetil- 1,3 pentanodiol	103	83
4,642	17,2	2,3-dihidrobenzofurano	120	78
6,399	7,75	2,2,4 – Trimetil-1,3-pentanediol diisobutirato	173	42
6,658	8,64	2 metil propanoato de -3 hidroxi 2,4,4 – trimetil pentano	173	90
13,27	1,76	n-Acido hexadecanoico	256,2	87
17,792	2,5	Acido hexadecanoico, 2-(acetiloxi)-1-[(acetiloxi)methi] etil ester	257,1	40
18,101	9,14	Acido1,2-Bencenedicarboxilico mono (2- etilhexyl) ester	279,1	91
20,771	49,31	Hop-22 (29)-en-3.beta.-ol	425,3	52

TABLA 5. Presencia de Alcaloides en Especies de Rubiáceas en Panamá.  
Tomado y adaptado de Fuente: (SOTO-SOBENIS et al 2001)

Especie	Parte de la Planta	Colección	Fecha de recolección	Alcaloides	Indoles
<i>Isertia haenkeana</i>	Hojas y flores	Lombardo 15	10/14/72	++++	+
<i>Isertia hypoleluca</i>	Hojas y flores	Lao y Holdridge 10	04/13/71	++++	+
<i>Isertia laevis</i>	Hojas y flores	Miller, Hamilton, Kraeger	07/25/83	++++	+

<sup>3</sup> %= Porcentaje de coincidencia del compuesto detectado con la base de datos del espectrómetro de masas.

### 2.3.3 Actividad Biológica

Se han desarrollado estudios de actividad biológica anticariogénica de los extractos y subfracciones de *Iserfia laevis*, mostrando resultados favorables reportados por Alvarado (2007) y por Téllez *et. al.* (2009) de la Pontificia Universidad Javeriana. Cuyos trabajos de tesis y de grado, respectivamente, se enfocaron a estudiar la actividad biológica de las fracciones de las hojas de esta especie sobre bacteria asociadas a la caries dental, principalmente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (*S. mutans*) y *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*). Ambos estudios usaron técnicas diferentes para identificar la subfracción con la actividad buscada.

De estos ensayos se obtuvo que la subfracción 9 o denominada en este estudio como la fracción con actividad anticariogénica es la que presenta actividad inhibitoria frente a *S. mutans* y *S. sobrinus* comparado con Vancomicina y dimetil sulfoxido (DMSO) como se presenta en las tablas 6 y 7.

TABLA 6. Halos de inhibición en m.m. presentados por *S. mutans* ATCC 25175 y *S. salivarius* NCTC 8606. Tomado y adaptado de ALVARADO, 2007

	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. salivarius</i> NCTC 8606
<b>Fracción 1</b>	0	0
<b>Fracción 2</b>	0	0
<b>Fracción 3</b>	0	0
<b>Fracción 4</b>	0	0
<b>Fracción 5</b>	0	0
<b>Fracción 6</b>	0	0
<b>Fracción 7</b>	0	0
<b>Fracción 8</b>	0	8
<b>Fracción 9</b>	12	13
<b>Vancomicina</b>	19	20

TABLA 7. Halos de inhibición en m.m. presentados por los microorganismos asociados a caries dental. Tomado y adaptado de ALVARADO, 2007

BACTERIA	SUBFRACCIÓN 9	VANCOMICINA	DMSO
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0	18,3	0
<i>S. mutans</i> ATCC 31989	8	17,6	0
<i>S. mutans</i> Ingbritt	8,6	20	0
<i>S. mutans</i> 35FS1	8,2	18,3	0
<i>S. mutans</i> 35FS3	8	18,6	0
<i>S. sobrinus</i>	8,1	19	0
<i>S. salivarius</i> NCTC 8606	8,8	15,3	0
<i>S.mitis</i> 804 NCTC 3165	8,7	17	0
<i>L. casei</i> 475	0	19	0
<i>L. plantarum</i> 748	8,2	19	0
<i>L. acidophilus</i> 903 ATCC 4365	0	19,3	0
<i>Act. odontolitycus</i>	8	18	0

También ha recibido importancia en el estudio de la actividad biológica como citotóxica, en líneas tumorales, donde se demostró esta actividad. (CASTRO S., 2006)

## 2.4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Los productos naturales de relativo peso molecular alto requieren la articulación técnicas como RMN, MS, IR, ensayos químicos preliminares, la obtención de derivados, una amplia revisión bibliográfica de compuestos en busca de espectros que puedan servir como *finger – prints* para el caso de MS y RMN.

### 2.4.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada A Espectrometría De Masas

La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas acoplada con ionizador de electrospray (en adelante HPLC-ESI-MS),

son unas técnicas desarrolladas conjuntamente para determinar principalmente el peso molecular de un compuesto hasta hace más de una década (MANISALI, I., 2006), (CABRERA, G., 2006).

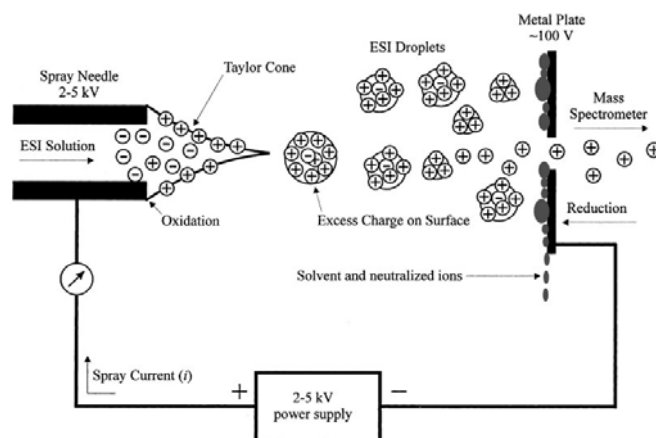


FIGURA 9. Proceso esquemático de la ionización por electro spray. Tomado y adaptado de CECH, *et. al.*, 2001

La HPLC-ESI-MS puede ser utilizada para la caracterización de compuestos naturales, el cual ofrece ser una técnica específica, rápida, sensitiva y no requiere pasos de purificación de las muestras. Esta metodología se puede articular con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de UV, o trabajar por separado por medio de un equipo de masas tándem (HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>) para designar iones moleculares característicos *finger-print* y que sean repetibles para la identificación de un compuesto posteriormente. (MAURI, P., *et. al.* 2000), (HA, Y., *et. al.*, 2010) (JANSSEN, 2008).

En el estudio de productos naturales por HPLC-ESI-MS, es común el uso de técnicas validadas en las que se adiciona un catión como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$  en forma de sales, Ácido fórmico, Hidróxido o cloruro de amonio entre otros reactivos para aumentar el ion molecular o para trabajar en un rango de acidez o basicidad durante el proceso de separación en el HPLC. (Cabrera, G., 2006). Sin embargo, la utilización de sales en solución adicionadas a la muestra, buffers u otros

fosfatos generan deterioro en la Unidad de Espectrometría de Masas (CECH and ENKE, 2001).

TABLA 8. Compuestos químicos cuyas estructuras son determinadas por ESI-MS en modo negativo. Fuente: (CABRERA, G. 2006)

<b>Antraquinonas</b>	Qu, J. <i>et.al.</i> (2004) Anal. Chem. 76: 2239
<b>Cumarinas</b>	Qu, J. <i>et.al.</i> (2004) Anal. Chem. 76: 2239
<b>Iridoides</b>	Wang, S-C., (2007) J. Chromatogr. B 812: 193
<b>Aromáticos</b>	Parejo, I., (2004) J. Agric. Food Chem. 52: 3679
<b>Triterpenos</b>	Qu, J. <i>et.al.</i> (2004) Anal. Chem. 76: 2239 Peifeng, H. <i>et. al.</i> J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11:200

La técnica de ESI-MS es utilizada en modo negativo para determinar la estructura de diferentes compuestos glicosidicos como los que se encuentran en la tabla 8. Sin embargo, en modo positivo son analizados estos mismos compuestos cuando el método de fragmentación sea ionización por bombardeo de átomos acelerados (FAB), Ionización líquida secundaria (LSI-MS), ionización líquida secundaria por flujo continuo (CF-LSI-MS).

Según Cabrera (2006) apoyada en los trabajos de Cuyckens, el uso de la espectrometría de masas, para la elucidación estructural puede ser realizada siguiendo los siguientes parámetros: (1) determinar el tipo de glucósido presente, (2) determinar la secuencia de los monosacáridos, (3) enlaces interglucosidicos (4) configuración estereoquímica de los azúcares presentes. La técnica permite hallar el número y tipo de monosacáridos ya sean estos pentosas, hexosas, desoxiglucosas, como la asignación de los enlaces glucosidicos (1→1), (1→2), (1→3), (1→4) y (1→6) realizado por características de los fragmentos, criterios empíricos (Cabrera, G., 2006) y reportados en la literatura.

TABLA 9. Fragmentos característicos de azúcares perdidos. Fuente: (CABRERA, G., 2006)

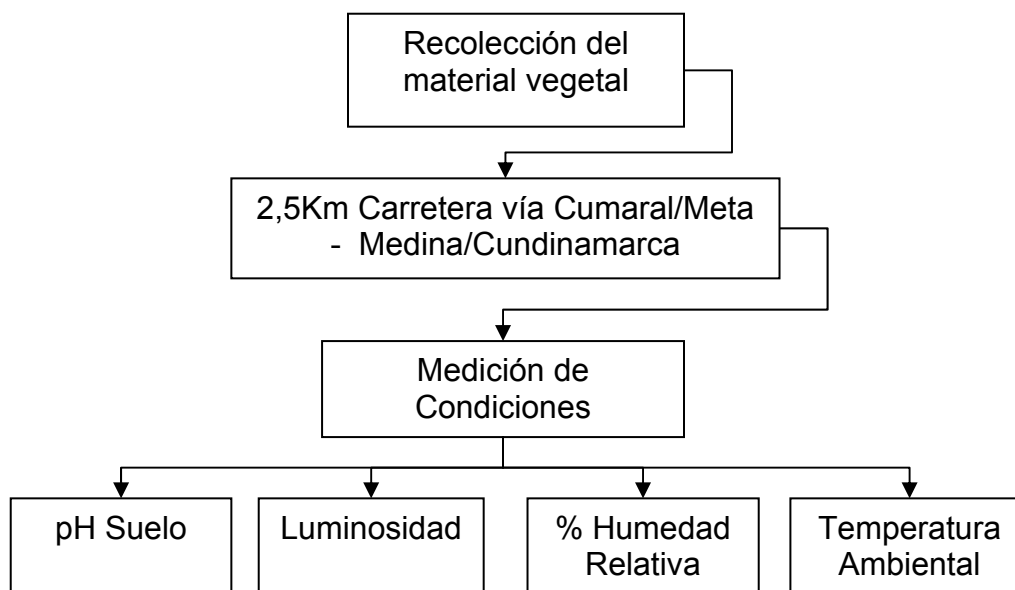
<b>PRESENCIA DE:</b>	<b>MASA MOLECULAR</b>	<b>FRAGMENTO PERDIDO</b>	<b>FRAGMENTO [M-H-Azúcar]<sup>+</sup> ó [M-H-Azúcar]<sup>-</sup></b>
<b>HEXOSA</b>	180	162	[M-162] <sup>+/-</sup>
<b>PENTOSA</b>	150	132	[M-132] <sup>+/-</sup>
<b>DESOXIHEXOSA</b>	164	146	[M-146] <sup>+/-</sup>
<b>DIDESOXIHEXOSA</b>	148	130	[M-130] <sup>+/-</sup>
<b>DISESOXI-OCH<sub>3</sub>-HEXOSA</b>	162	144	[M-144] <sup>+/-</sup>
<b>ACIDO GLUCORICO</b>	194	176	[M-176] <sup>+/-</sup>
<b>AMINODESOXI HEXOSA</b>	179	161	[M-161] <sup>+/-</sup>

### 3. CAPITULO III: PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Recolección y tratamiento del material vegetal

El material vegetal, hojas, fue recolectado en el Departamento de Cundinamarca a 2,5Km de recorrido por la carretera entre Cumaral (Meta) y Medina (Cundinamarca), a una altura de 550 m.s.n.m.

Las condiciones ambientales registradas del lugar de recolección que se midieron fue: Luminosidad  $L_x$ :  $lm/m^2$ , humedad relativa, pH de Suelo, temperatura ambiental y temperatura de suelo. Los datos recolectados se midieron por medio de un humidmetro YK-80HT con sensor de temperatura ambiental, la luminosidad se midió con un Ligth-Meter LX107 de Digital Instruments. El registro de pH del suelo y temperatura se realizo por medio de una interfase LabQuest Vernier® con sensor de temperatura y pH.



La lectura de pH del suelo se realizó de acuerdo al método que indica el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.



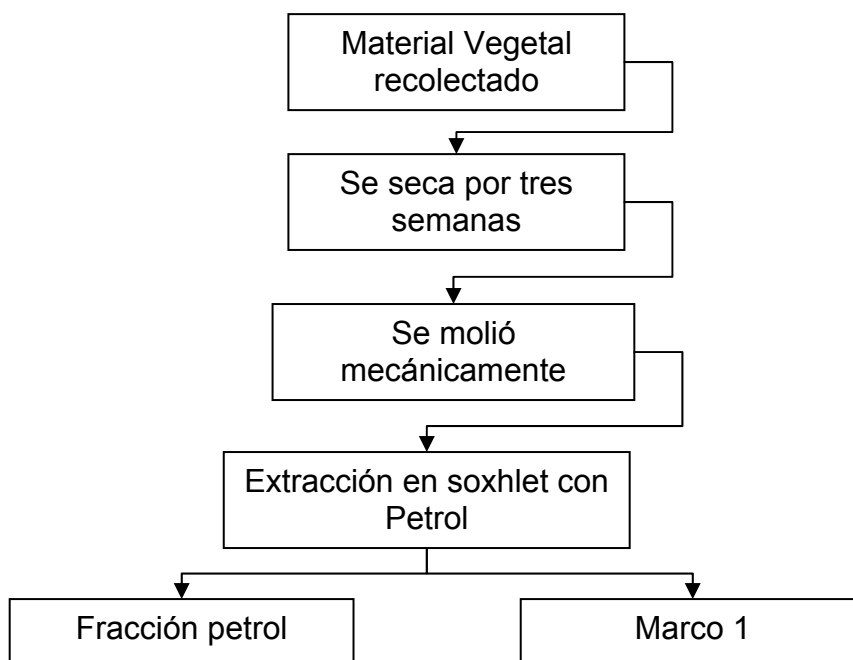


FIGURA 10. Medición de condiciones ambientales por medio de sensores de humedad relativa, luminosidad, pH de suelo, temperatura ambiental y de suelo. Fuente: Autor, 2010

La clasificación taxonómica de la planta fue realizada por el Dr. M. Gutiérrez del *Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia* quien determinó que el espécimen corresponde a *Isertia laevis* (Triana) B. M. Boom, de la familia Rubiácea. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano con el No. COL 506495 y en la colección del Jardín Botánico de Bogotá con el numero COL 000152114 Colección 85/1973-10-00.

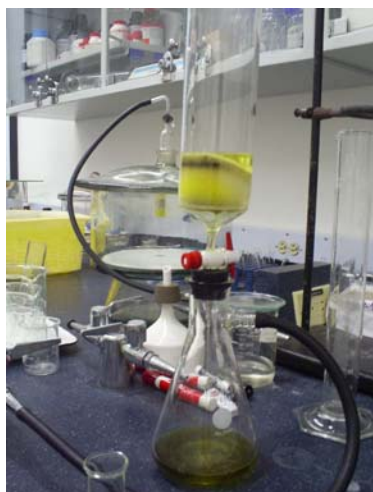
### **3.2 Obtención de extractos y fracciones activas.**

El material vegetal recolectado fue secado a la sombra en un lugar aireado por 3 semanas. Luego se molió y se colocó a extracción en un equipo de Soxhlet usando como solvente éter de petróleo grado analítico (en lo adelante *Petrol*) por 72 horas. El marco 1, previamente desengrasado, se le realizó una extracción por maceración a temperatura ambiente con etanol (en lo adelante EtOH) por un tiempo de 24 horas. Este extracto se concentro en un rotavaporador a 40°C y a presión reducida obteniéndose 18g del extracto.

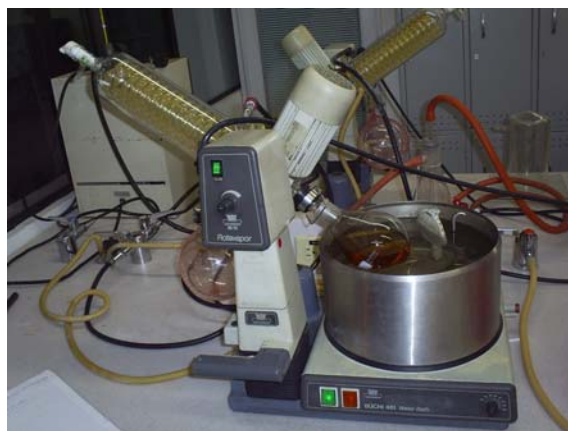


Se pesaron 5,5850g del extracto EtOH, el cual se trató bajo las siguientes condiciones cromatográficas, la muestra se disolvió en una mezcla de solventes metanol:agua (en lo adelante MeOH:H<sub>2</sub>O), 9:1. La muestra disuelta se integró en 0,50g de adsorbente RP-18, para luego ser añadida a una columna de 5cm de diámetro y una longitud de 5cm. El extracto se sometió a una percolación en columna al vacío (en lo adelante CCV) usando como adsorbente RP-18 y como eluyente 500mL de cada una de las siguientes mezclas: MeOH:H<sub>2</sub>O, 9:1, metanol, metanol:diclorometano, 1:1, (en adelante MeOH y MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, respectivamente) y por último se eluyó con diclorometano (en adelante CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Este procedimiento se repitió con 14,4355g de este mismo extracto con la intencionalidad de obtener la suficiente cantidad de fracciones para los ensayos de actividad biológica y los espectroscópicos.



(a)



(b)

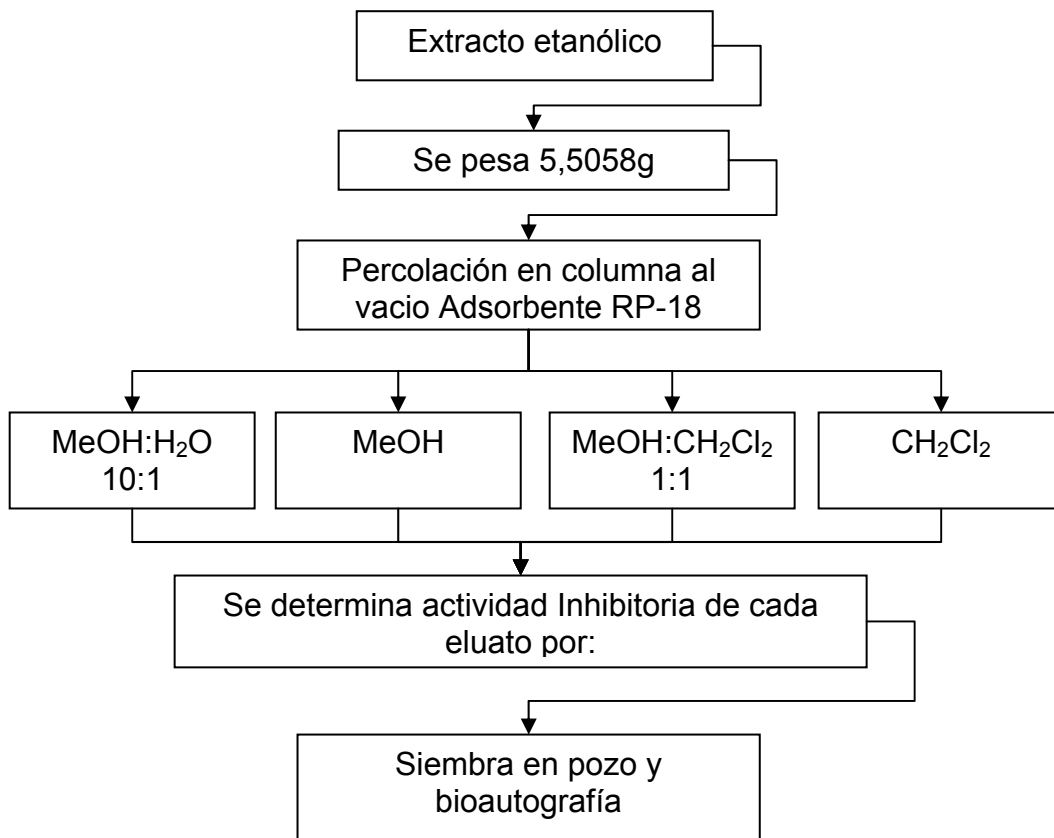
FIGURA 11. (a) Cromatografía en Columna al vacío (CCV). (b) Rotavaporador a presión reducida. Autor 2010

Cada una de las fracciones obtenidas se concentró y llevo a sequedad a una temperatura de 40°C y presión reducida en rotavaporador.

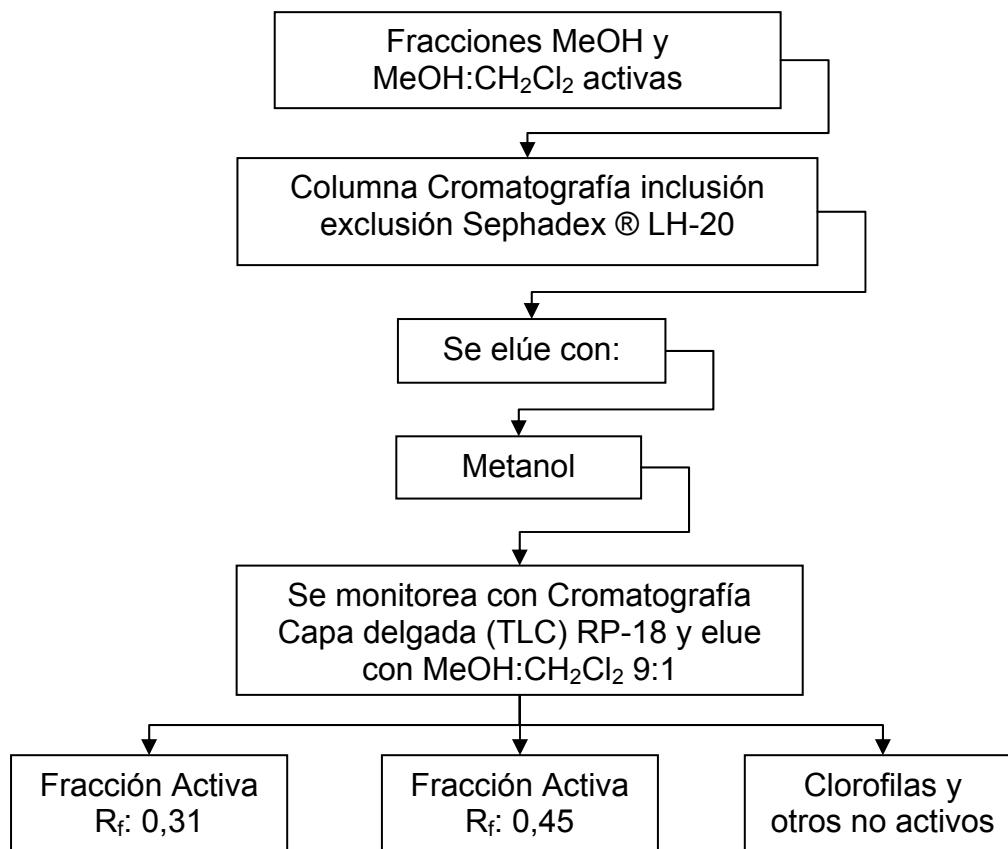
Las fracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía en capa delgada (en adelante TLC) usando como absorbente RP-18 y fase móvil MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, donde se detectan los compuestos activos frente a *S. mutans* que encontró Tellez *et.al* , 2009 en la fracción MeOH.

El método utilizado para evaluar la actividad biológica anticariogénica de las fracciones y subfracciones activas obtenidas a partir de las hojas de *Iseritia laevis* frente a bacterias asociadas a la caries dental, se realizó por el método de bioensayo mediante la técnica de bioautografía y siembra en pozo (CHOMA I, 2005). Estos trabajos de ensayos y la obtención de la fracción activa se realizó en conjunto con otros trabajos de grado y tesis de maestría desarrollados dentro del proyecto (TÉLLEZ, 2009) (ALVARADO, 2007).

Los cromatogramas en TLC se revelaron mediante la aspersion de una solución acuosa al 20%v/v de Ácido Perclórico HClO<sub>4</sub>. La placa de cromatografía RP-18 se calienta posteriormente a 100°C en campana extractora hasta la aparición de color. Este revelador universal se utiliza especialmente para esteroides y triterpenos (GIBBONSAND & GRAY, 1998, p221).

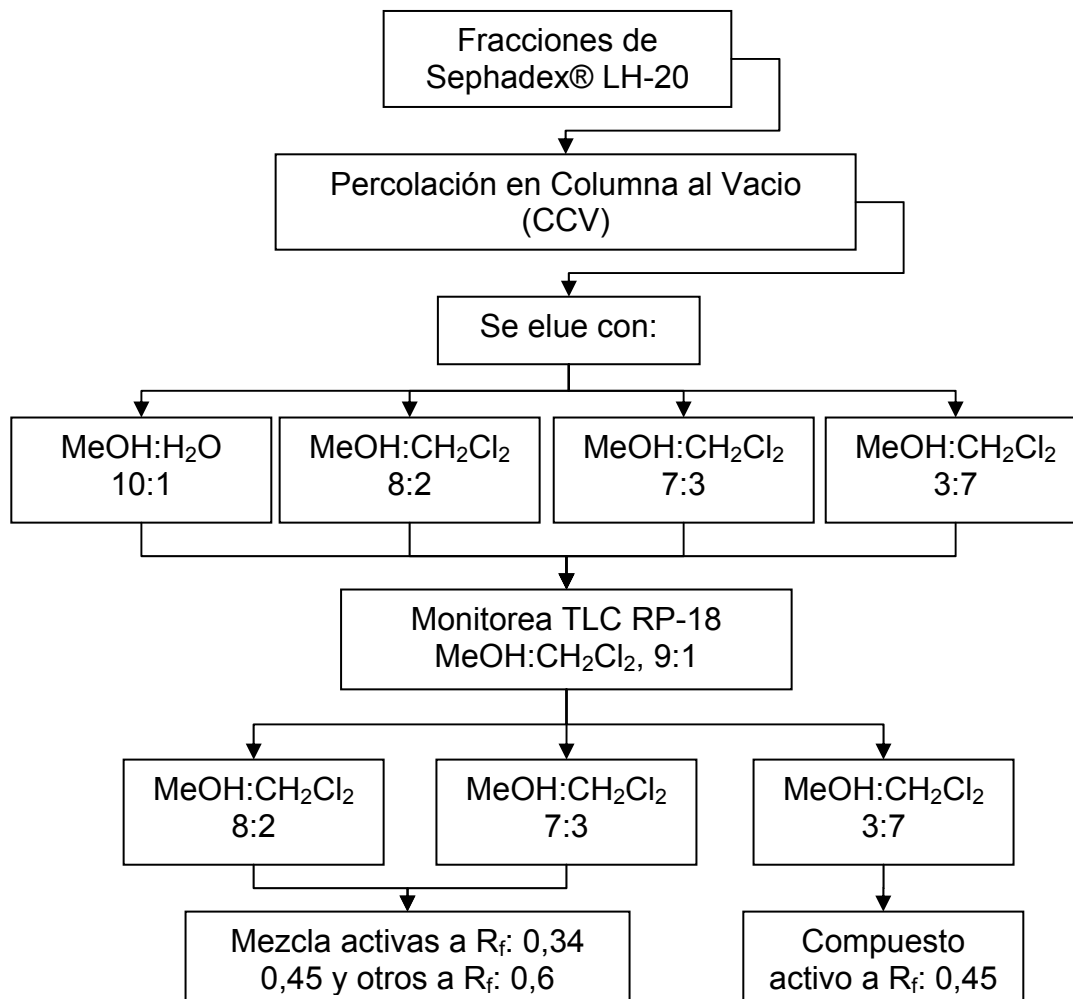


La presencia de los compuestos biológicamente activos como anticariogénicos se encontró en la fracción MeOH. Por la alta cantidad de clorofilas presentes en esta fracción, se usa una cromatografía de columna por exclusión-Inclusión, usando como adsorbente Sephadex LH-20® y eluente MeOH. Las fracciones de esta columna se recogen cada 5mL y se monitorean por medio de TLC RP-18 MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, usando como revelador la aspersion de ácido perclórico 20%v/v sobre la placa cromatográfica (TLC) para detectar la presencia de los eluatos de interés.



Las fracciones provenientes de la columna de Sephadex 20® que presentan la presencia de los compuestos activos monitoreados a  $R_f$ : 0,3 y 0,45 en RP-18 MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1 se reúnen (3,0063g) y se pasan por una columna cromatografica al vacío CCV usando como adsorbente RP-18 y eluente las siguientes mezclas de solvente: MeOH:H<sub>2</sub>O, 10:1, MeOH, MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 y 3:7.

Al monitorear las fracciones por medio de TLC RP-18 usando como eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, y revelando con ácido perclórico al 20% v/v se observó la presencia de los compuestos activos en las subfracciones MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 8:2, y MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7:3 y en la subfracción MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3:7 de acuerdo al  $R_f$  de los posibles compuestos o mezclas. Sin embargo, la presencia fue comprobada por bioautografía (TELLEZ et. al 2009).



Las subfracciones MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 8:2, y MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7:3 se reúnen (250mg) y se tratan por cromatografía en columna (en adelante CC) de diámetro 2,5cm y una altura de 12cm usando como adsorbente RP-18 y como eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10:1 y se obtienen treinta y dos subfracciones de 2mL cada una.

Las subfracciones obtenidas se comparan por TLC RP-18 usando como eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1. De este resultado se determina que las fracciones 9 al 12, presentan la mezcla de compuestos de interés a R<sub>f</sub>: 0,50 y 0,40.

### 3.3 Ensayos químicos preliminares.

Los ensayos de identificación que usaron inicialmente fueron aplicación del reactivo revelador en espray sobre el cromatograma en capa fina (TLC) usándose los siguientes reactivos reveladores:

*Ácido perclórico al 20%v/v:* Diluir en 100mL de agua destilada 27mL de ácido perclórico  $\text{HClO}_4$  al 72% p/v. Sumergir o aplicar por aspersion en la placa. Da reacción coloreada, rosado, positiva para esteroides, triterpenos luego de calentar progresivamente de 80 a 105°C. en cabina extractora.

*Molibdato de Amonio (IV):* Disolver 10g de molibdato de amonio en 100mL de ácido Sulfúrico concentrado. Calentar a 70°C y agitar con precaución en la cabina de extracción hasta disolver completamente. Da reacción positiva para diterpenos y triterpenos al aplicar en espray sobre la TLC y calentando suavemente de 80 a 100°C hasta la aparición de color azul.

*Vainillina en Ácido Sulfurico 98%p/v:* Disolver 4g de vainillina en 100mL de ácido sulfúrico concentrado. Este procedimiento debe realizarse en la cabina de extracción. Aplicar por aspersion sobre la placa cromatografica ya desarrollada y calentar progresivamente de 80 a 105°C en la cabina extractora.

*Reactivo de Borntrager:* Disolver de 5 a 10g de Hidróxido de Potasio (KOH) en 100mL de Etanol o Metanol. Aplicar sobre la placa en aspersion y en la cabina extractora. La aparición de color amarillo indica la presencia de quinonas y cumarinas.

*Cloruro Férrico:* Disolver 5g de hierro (II) Cloruro en 100mL de 0,5N de HCl. Aplicar por aspersion y calentar progresivamente de 70 a 105°C

También se realizaron microensayos preliminares como alfa naftol en ácido sulfúrico para la ausencia-presencia de azúcares.

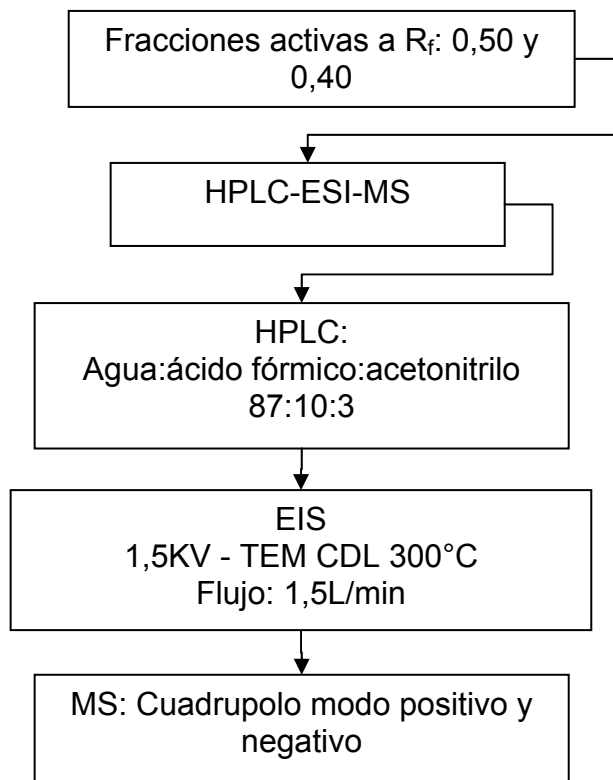
*Ensayo de Molish.* A 1,5 mg de la muestra se coloca en un tubo de ensayo, y se aplica 0,1mL de alfa naftol disuelto previamente en etanol. Agitar y dejar caer por las paredes 1mL de Ácido Sulfúrico 98%p/v.

*Ensayo de Lieberman-Bürchard.* Realizar una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico 3:1. Este procedimiento debe realizarse en la cabina de extracción. Aplicar por aspersion sobre la placa cromatográfica ya desarrollada y calentar progresivamente de 80 a 105°C en la cabina extractora. Una coloración rojo-rosado es positiva para triterpenos, azul para esteroides y una coloración amarilla es positiva para esteroides o triterpenos saturados.

### **3.4 Preparación de las Subfracciones Activas para Análisis espectrométricos y espectroscópicos.**

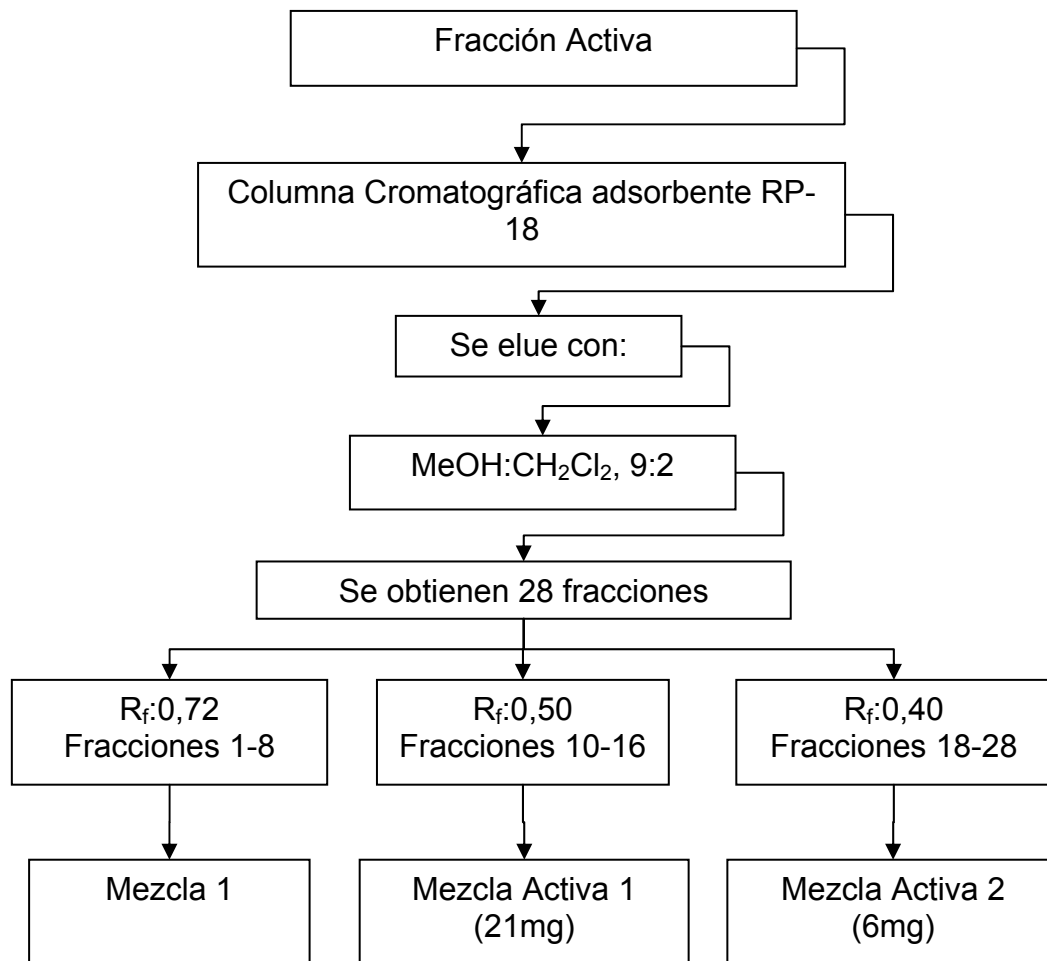
La subfracción 9 obtenida en la columna de cromatografía usando como eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1 se inyecta a un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) con ionizador de muestra por electroespay (EIS), (en adelante HPLC-ESI-MS) en la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá



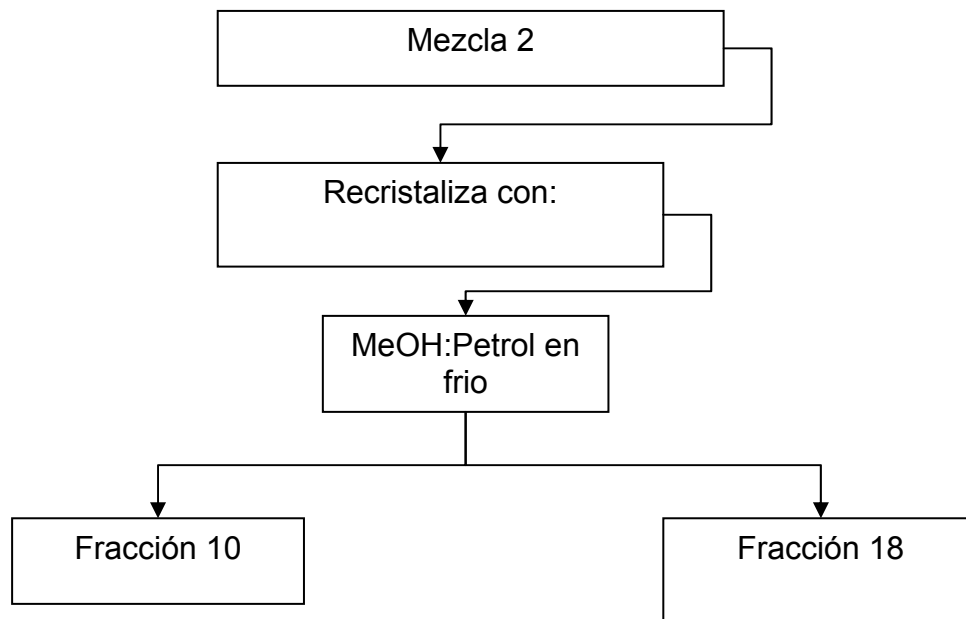


### 3.5 Purificación de la muestra para RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C

A 70mg de la fracción biológicamente activa como anticariogénica y analizada por HPLC-ESI-MS, se tratan por medio de una cromatografía en columna (CC.) de 15cm de altura y diámetro de 2,5cm, usando como adsorbente RP-18 y eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1. Se obtienen 28 fracciones las cuales se monitorean por TLC RP-18, MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1. y se detecta la presencia de los compuestos de la mezcla activa mediante el monitoreo de las fracciones por TLC RP-18 usando como fase móvil MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1. Se usa la aspersion del revelador ácido perclórico y vainillina en ácido sulfúrico concentrado para detectar la presencia de los metabolitos e indicar preliminarmente el tipo de compuesto presente. Estos compuestos desarrollados por TLC eran monitoreados con la fracción anticariogénica en una misma placa usando RP-18 y MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, revelando con ácido perclórico



La fracción con un  $R_f$  de 0,50 se purificó mediante la mezcla MeOH:Petrol 1:4 en frío. Obteniéndose dos compuestos denominados fracción 10 y fracción 18 solubles en cloroformo deuterado y metanol deuterado respectivamente.



La muestra fracción 10 se envió al Laboratorio de Análisis Industrial de la Universidad del Valle para ser estudiado mediante resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  incluyendo DEPT 135, HMBC, COSY. La fracción 18 fue analizada en este mismo lugar usando solamente  $\text{RMN}^1\text{H}$

TABLA 10. Análisis efectuados por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y/o  $^{13}\text{C}$

Fracciones	Fracción 10	Fracción 18
<b>RMN <math>^1\text{H}</math></b>	Si	Si
<b>RMN <math>^{13}\text{C}</math></b>	Si	No
<b>COSY</b>	Si	No
<b>HMBC</b>	Si	No
<b>DEPT 135</b>	Si	No

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 De la Recolección del Material Vegetal

El material vegetal fue recolectado en estado de floración en el Departamento de Cundinamarca, a 2,5 Km de recorrido por la carretera entre los municipios de Medina y Cumaral a una altura de 550 m.s.n.m.

Se midieron las siguientes condiciones ambientales *in situ* del lugar de recolección registrándose los siguientes datos.

Tabla 11. Datos de Campo registrados en el lugar de recolección. Fuente Autor, 2010

<b>pH (suelo)</b>	<b>Luminosidad Lux 10X3</b>	<b>Humedad %Hum. R.</b>	<b>Temperatura Ambiente/Suelo</b>
6,34	1107	62,2%	35°C/32°C

### 4.2 De las Obtención de Fracciones y Subfracciones

Las fracciones como subfracciones obtenidas eran de mediana y alta polaridad, por lo tanto el tratamiento para extracción y aislamiento de los compuestos con actividad anticariogénica se realizó por medio de la utilización de adsorbentes de Fase Reversa como el RP-18. Estos procedimientos realizados fueron también observados en reportes realizados por Jimeno M, y otros autores que han trabajado en compuestos de esta polaridad con actividad anticariogénica.

### 4.3 De los Ensayos Químicos Preliminares

Los resultados de la aspersion de reactivos sobre las placas de cromatografía de capa fina con los compuestos ya desarrollados y ensayos químicos preliminares, se reportan en la siguiente tabla.

Tabla 12. Ensayos Químicos preliminares de la fracción anticariogénica. Fuente: Autor 2010

<b>Ácido Perclórico 20%</b>	<b>Molibdato de Amonio (IV)</b>	<b>Vainillina en Ácido</b>	<b>Reactivo de Borntrager</b>	<b>Cloruro Ferrico</b>	<b>Ensayo de Molish</b>
Coloración rosado fuerte	Coloración azul	Coloración Morada	No se observa cambio	No se observa Cambio	Se genera anillo morado.

Del análisis de estos resultados se observa la presencia de un compuesto formado por una aglicona y al menos un azúcar, es decir un compuesto glicosilado.

La aglicona de acuerdo a la coloración obtenida por el reactivo de molibdato de amonio (azul), la vainillina en ácido sulfúrico (morado) y el ácido perclórico (rosado), se afirma la presencia de un triterpeno.

El ensayo de Molish permite deducir que el triterpeno sea posiblemente glicosilado, por la reacción de deshidratación del azúcar, convirtiendo el carbohidrato en furfural o un derivado de este compuesto, cuya identificación es realizada mediante el alfa naftol (MARTÍNEZ, J. 1984). De acuerdo a lo anterior se puede tratar de un triterpeno glicosilado o saponina.

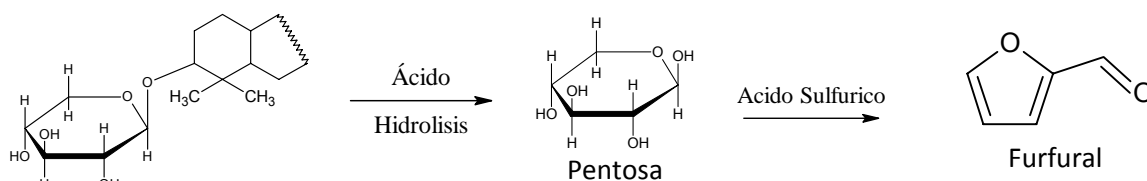


FIGURA 12. Hidrólisis de un compuesto glicosilado y posterior conversión del azúcar en furfural. Fuente: MARTÍNEZ, J. 1984

#### 4.4 De los Análisis Espectrométricos Mediante HPLC-ESI-MS

La fracción activa fue analizada en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con ionizado de spray acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-ESI-MS). Del análisis por HPLC con detector de UV se observó la presencia de tres compuestos con los siguientes tiempos de retención 2.12, 41.98 y 45. Las rutas de fragmentación están en los Anexos C, D.

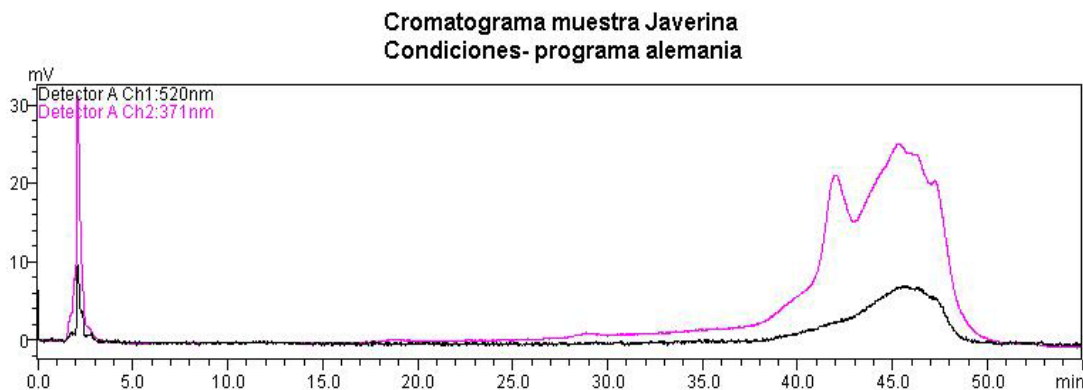


FIGURA 13. Cromatograma de la fracción activa desarrollado en un HPLC-ESI-MS Shimadzu QP2010

De los tres (3) metabolitos obtenidos por HPLC fueron analizados por espectrometría de masas con interfase de electrospray del cual se obtuvo espectros en modo positivo y negativo de cada compuesto detectado.

Los ensayos químicos preliminares, los datos obtenidos por GC-MS por Alvarado en 2006 indican la presencia de compuestos triterpenicos glicosilados pentaciclicos lo cual explica la abundancia de picos de  $m/z$  relativamente altos superiores a 1000  $m/z$  lo que ratifica la presencia de compuestos glicosilados, los cuales han sido detectados en la familia de las *Rubiáceae* y en el género *Iserfia* en esta polaridad (UM, R., *et. al* 2002).

Del análisis de generación de iones pseudomoleculares se realiza la siguiente interpretación para el compuesto eluído a un tiempo de retención 2,12.

espectro de masas a T.R 2.12 Modo negativo

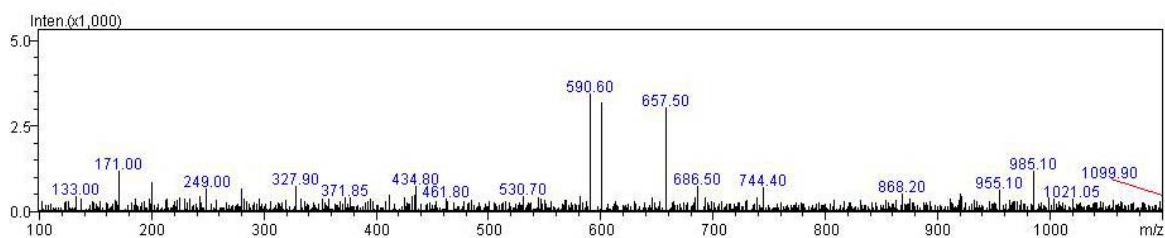


FIGURA 14. Espectro de masas a tiempo de retención 2,12 minutos modo negativo obtenido en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

espectro de masas a T.R 2.12 Modo positivo

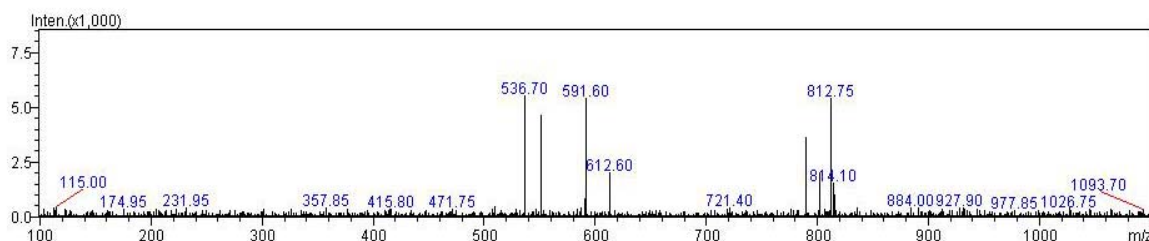


Figura 15. Espectro de masas a tiempo de retención 2,12 minutos modo positivo HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

Del espectro de masas de modo negativo se determina la masa molecular del compuesto es de 1099  $m/z$   $[M-H]^-$ . La secuencia de los azúcares se realiza relacionando los iones producidos en modo positivo (CABRERA G., 2006).

El espectro muestra una pérdida de 144  $m/z$  que hace referencia al rompimiento de enlace entre el carbono anomérico de un azúcar del tipo 2-6 dideoxiglucosa y el oxígeno del enlace glicosídico que esta forma. Un nuevo rompimiento está dado por el ion presente en 812  $m/z$   $[M+H-143-144]$  y deshidratación por reacomodación de la molécula. El rompimiento hace referencia a otra unidad de 2-6 desoxiglucosa y agua  $[M+H-144-143-18]$

El ion de 554  $m/z$ , representa la pérdida adicional de dos unidades de pentosa, representadas en el siguiente fraccionamiento  $[M+H-144-13-18-132-132]$ . Dado que este es el rompimiento más frecuente, hace la relación de la unión de 4 unidades de azúcar a la aglicona, ya sea por oxígeno del carbono 3, o por el carbono 28 para dar una aglicona de 554  $m/z$ .

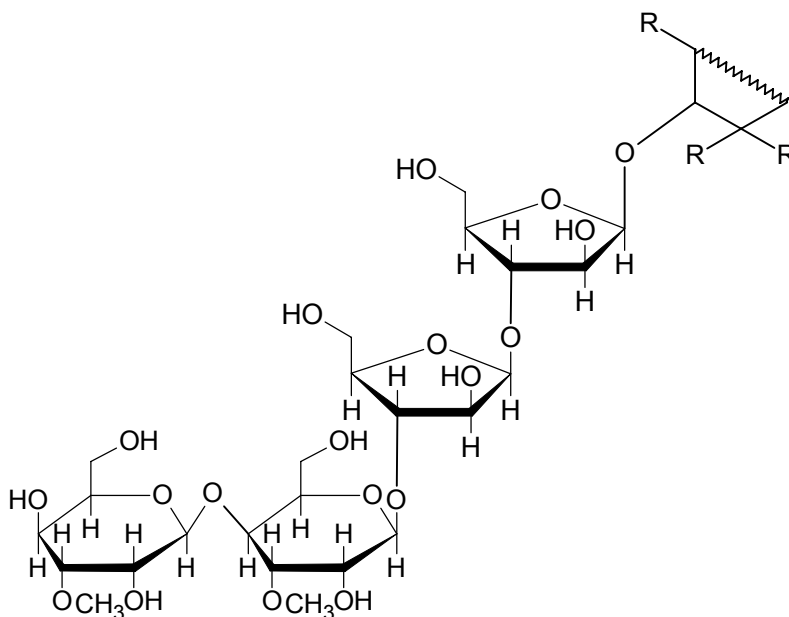


FIGURA 16. Posible secuencia de azúcares para el compuesto eluido a 2.12 minutos obtenido mediante HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

La señal presente en 590  $m/z$  hace referencia a la aglicona unida por un fragmento de azúcar.



Para este compuesto se observa la presencia de dos iones moleculares presentes en modo positivo y modo negativo que corresponden a  $591m/z$  y  $590m/z$  respectivamente, los cuales por su intensidad son abundantes y pueden catalogarse como iones moleculares de huella digital para este compuesto bajo esta técnica y que corresponden al rompimiento del tipo  $^{5,3}X$  por el azúcar próximo a la aglicona.

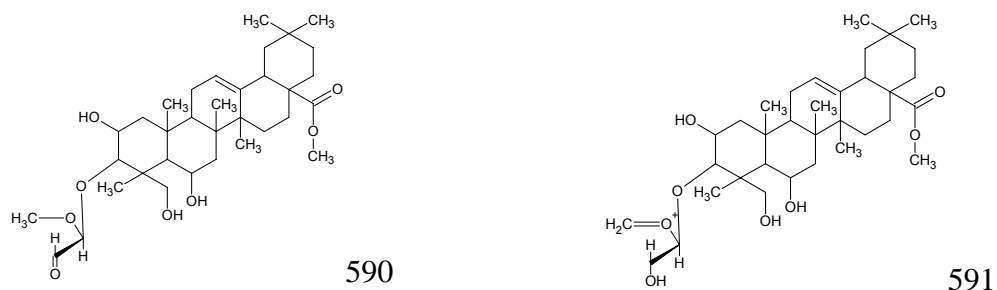


FIGURA 17. Iones huella digital del compuesto con tiempo de retención 2.12 min en modo positivo y negativo

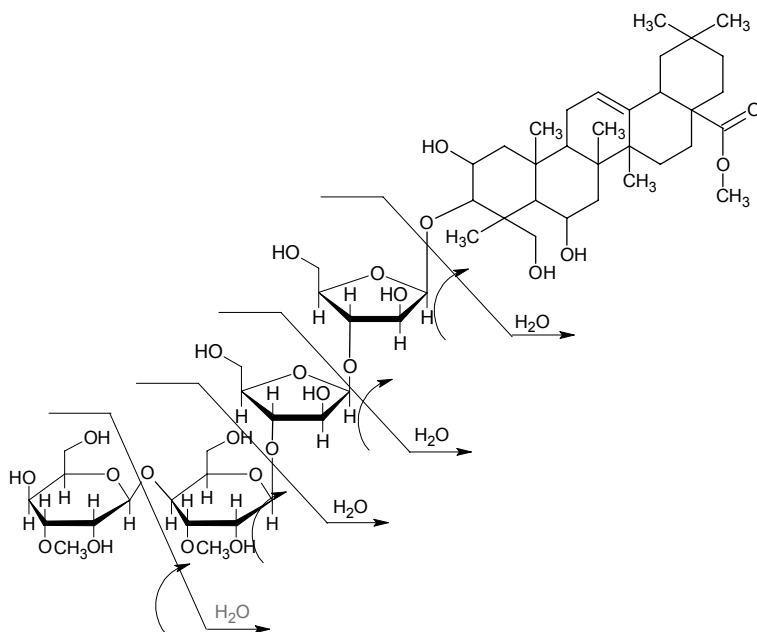


FIGURA 18. Fragmentación propuesta para el compuesto con tiempo de retención 2.12 minutos obtenido en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

Del análisis de estos fragmentos se deduce que el compuesto puede corresponder al 3-O-{Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→3) –Arabinofuranosil (1 → 3)} – Oleano 2,6,24 trihidroxi -12 eno-28-metil ester ó 3-O-{Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→3) –Arabinofuranosil (1 → 3)} Ursano -2,6,24 trihidroxi -12 eno-28-metil ester

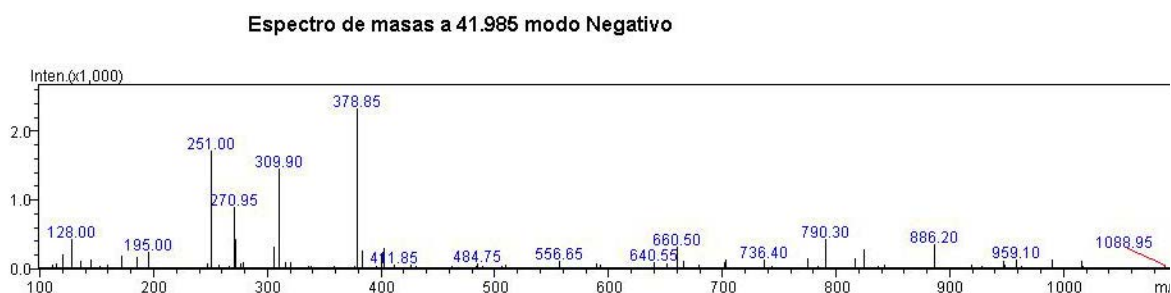


FIGURA 19. Espectro de masas a tiempo de retención 41,985 minutos modo negativo en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

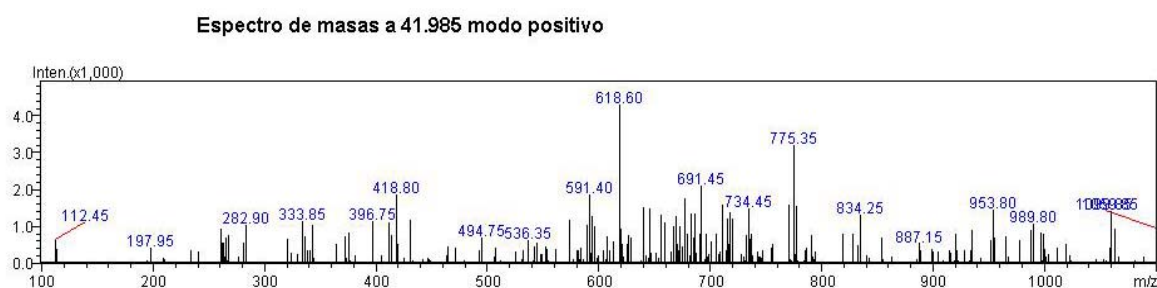


FIGURA 20. Espectro de masas a tiempo de retención 41,985 minutos modo positivo obtenido en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

Del compuesto eluído a un tiempo de retención de 41,985 minutos, se determina el peso molecular basado en el ión molecular de 1088  $m/z$   $[M-H]^-$  del espectro en modo negativo. A partir de este hay una pérdida inicial de 134  $m/z$  indicando la presencia de una glucosa con un rompimiento muy común  $^{1,5}X$ . Una segunda pérdida está relacionada con el ion a 775  $m/z$ , correspondiente a la pérdida de otra unidad de glucosa esta vez cercana al carbono anomérico entre el enlace  $^{0,1}X$ .

Un ion de alta abundancia está presente en 618  $m/z$  correspondiente a una unidad de glucosa  $[M+H-470]$  con un rompimiento  $^{0,1}X$ .

El ión presente a 834  $m/z$  corresponde a una unidad de 2-6desoxiglucosa con una fragmentación de  $CO_2$  que corresponde a un carbono carbonilo en C-28. El ion presente a 396  $m/z$  corresponde a un fragmento de la aglicona, triterpeno, por el enlace eno del carbono 12 y 13.

El ión molecular se encuentra dado en el espectro en modo positivo a 649  $m/z$  con reacomodamiento del oxígeno que une la aglicona con los monosacáridos, El ión correspondiente al triterpeno libre de monosacáridos corresponde al ion 426  $m/z$

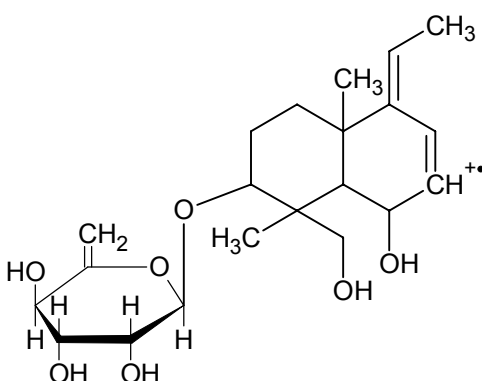


FIGURA 21. Rompimiento propuesto para el triterpeno presente en el compuesto a tiempo de retención de 41.985 minutos.

El compuesto hace referencia al 3-O- {Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→4) 2-desoxiglucopiranosil } ursan -19,24 dihidroxi -12 eno-28-Glucopiranosil ester ó 3-O- {Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→4) 2-desoxiglucopiranosil } olen -19,24 dihidroxi -12 eno-28-Glucopiranosil ester

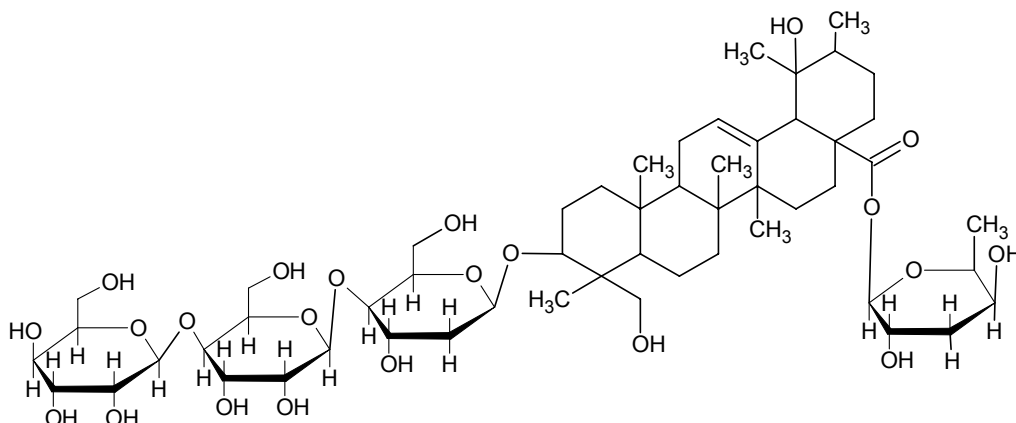


FIGURA 22. Estructura propuesta para el compuesto eluido a 41,985 min en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

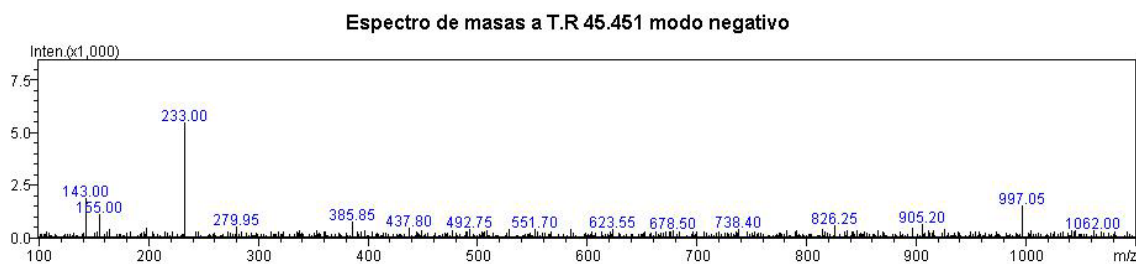


FIGURA 23. Espectro de masas a tiempo de retención 45,451 minutos modo negativo obtenido en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

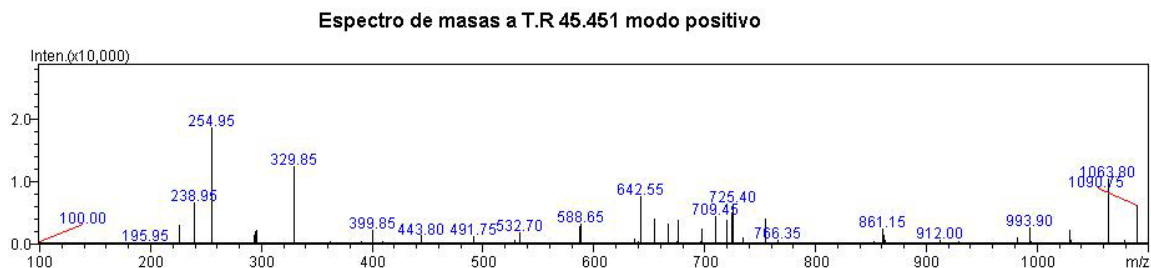


FIGURA 24. Espectro de masas a tiempo de retención 45,451 minutos modo positivo obtenido en un HPLC-ESI- MS Shimadzu QP2010

Del análisis de este espectro no se observan rompimiento clásicos para compuestos glucosídicos como los reportados por CABRERA, G. (2006). Ya que solo se tiene el peso molecular y no hay información espectroscópica no se puede asegurar a qué tipo de compuesto corresponde este espectro.

## De los Espectros De RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

La fracción analizada por HPLC-ESI-MS fue separada utilizando una columna de RP-18, de esta fracción se obtienen dos compuestos por recristalización tras previa separación por una columna cromatografica abierta de RP-18 usando MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1.

Una de estas fracciones obtenidas se analizó por RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ . Del espectro de Hidrógeno (en adelante RMN $^1\text{H}$ ) se observa inicialmente una señal fuerte en 7,5 ppm correspondiente al desplazamiento químico de las impurezas del solvente deuterado (CDCl<sub>3</sub>). La señal de multiplete en 5,5 ppm hace referencia a un carbono  $\text{sp}^2$  el cual corresponde al carbono 13, ya sea unido a C-12 ó C-14. En el anexo B se coloca figura de desplazamiento químico en RMN $^1\text{H}$  Y  $^{13}\text{C}$  típicos para triterpenos glicosilados.

La señal en 3,2 ppm corresponde a un hidrogeno unido a un carbono y a un oxígeno el cual desplaza la señal a un campo alto.

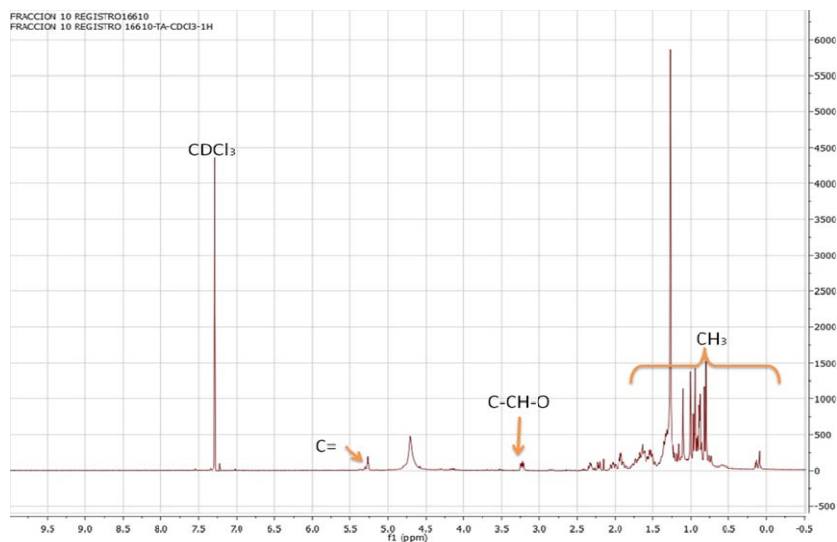


FIGURA 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto fracción 10. Tomado a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>

Del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan 36 señales para carbono, de las cuales la de 78 ppm corresponde al solvente, y las señales restante (35) para el compuesto de formula  $\text{C}_{35}\text{H}_{72}\text{O}_7$ . Las señales de 138ppm y 126ppm corresponden carbono 12 y 13 respectivamente cuya configuración es del tipo  $\text{sp}^2$ . La señal a 81 ppm corresponde al carbono C-3, el cual está unido por un oxígeno a un azúcar, el cual tiene señales a 78 ppm.

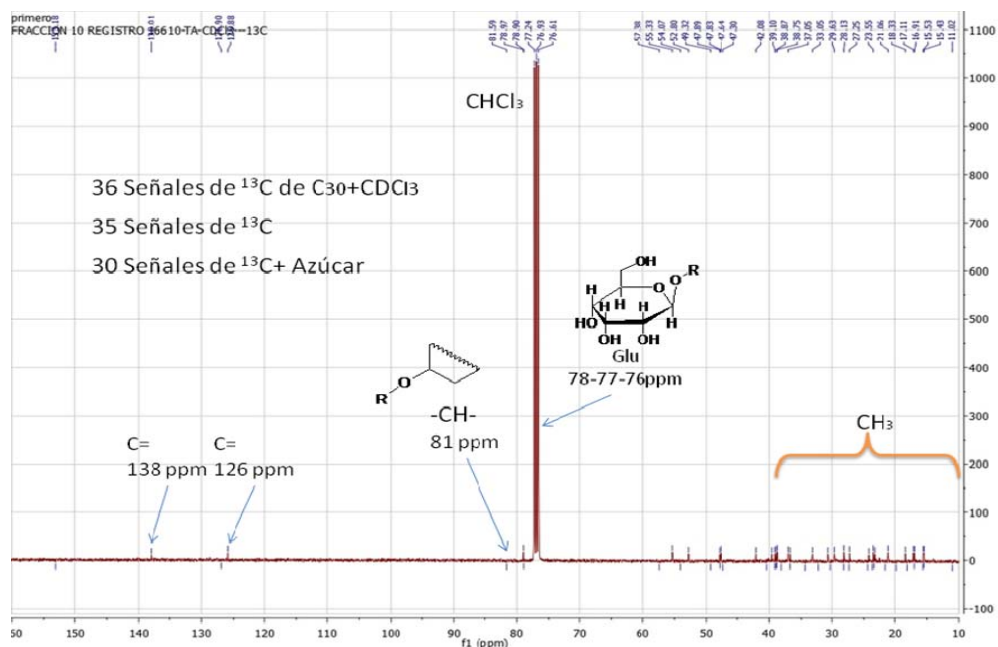


FIGURA 26. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto fracción 10, Tomado a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$

Al realizar ampliación del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se mejoran las señales, se hace notoria las señales de 76, 77, 78 ppm para la glucosa. Las señales en 57 ppm es característica para un CH correspondiente para el C-14 y confirmado por el espectro de DEPT 135 en zona positiva. La señal en 54ppm corresponde a un CH que para este caso es el C-5 del común en el anillo A y B del Triterpeno.

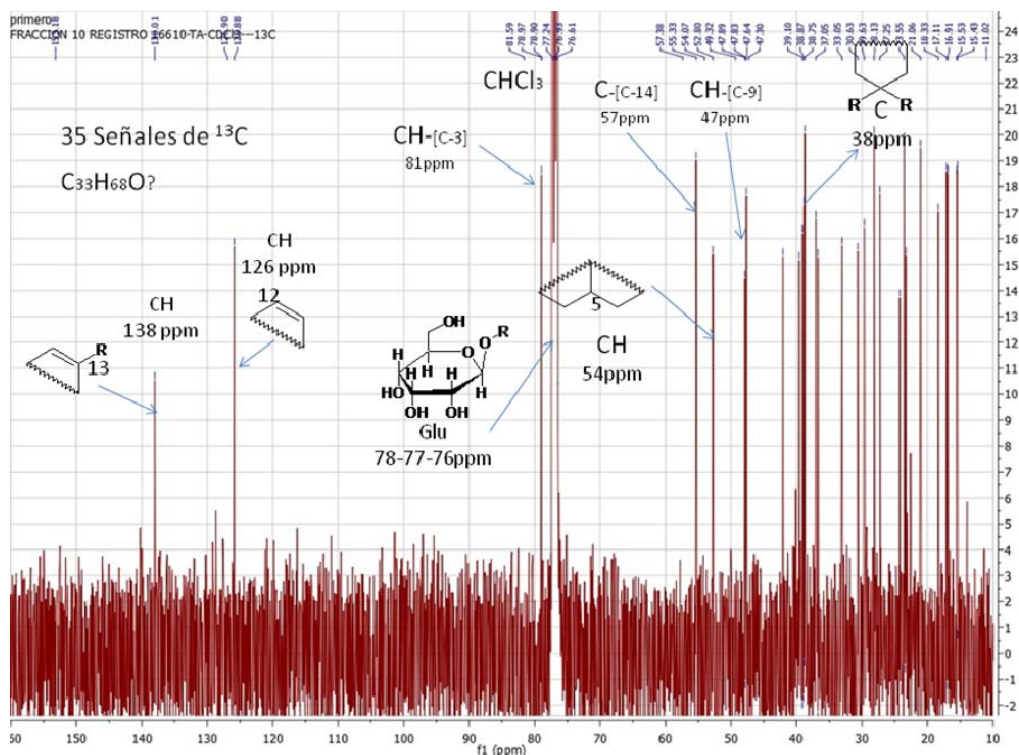


FIGURA 27. Ampliación del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto fracción 10 de la fracción activa. Tomado a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$

Del espectro en DEPT 135 se separan en positivo la presencia de  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}-$ . La región comprendida entre 33 y 11 ppm hacer referencia a grupos metil en la molécula para una contabilización de 7  $-\text{CH}_3$ . Las señales en 39 y 20 ppm corresponden a los carbonos C-19 y C-20, por el desplazamiento de C-19, y por estar en fase positiva se deduce que es un  $-\text{CH}-$ , el cual ofrece que el compuesto tratado sea un triterpeno ursano y no oleano, ya que no hay presencia de  $-\text{CH}_2-$  en el carbono 20.

Es importante mencionar que los ensayos preliminares de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se descarta la presencia de un compuesto ácido o la presencia de un grupo aldehído dentro de la molécula, por la ausencia de señales de desplazamientos químicos superiores a 8,5ppm lo cual correspondería a un ácido quinóico o aldehído en posición C-24, lo que descarta una gran cantidad de compuestos posibles.





Del espectro de COSY se observa cercanía entre H11-H12, explicaría la multiplicidad en 5,5 ppm, en el espectro de RMN<sup>1</sup>H asegurando que se trata de un triterpeno del tipo Ursano. Para H2-H3, hay correlación o cercanía omitiendo la presencia de OH en el C-2.

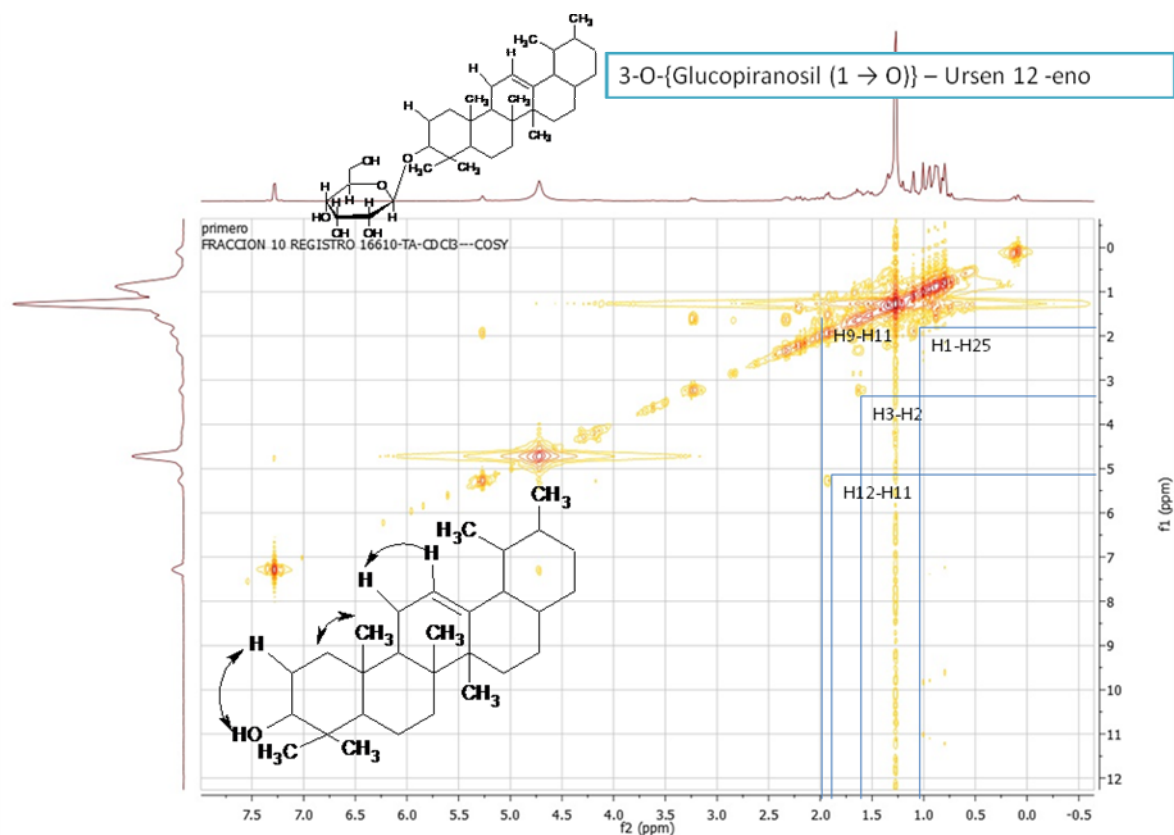


FIGURA 30. Espectro COSY de la facción 10. Tomado a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub>

Por lo tanto se determina la presencia por el análisis espectroscópico el compuesto 3-O-{Glucopiranosil (1 → O)} – Ursen 12 -eno.

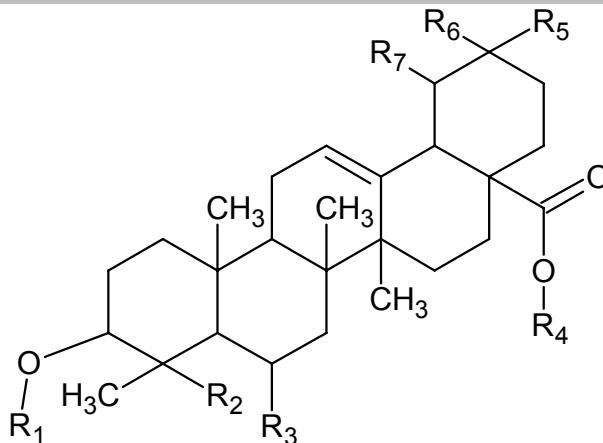
La tabla 12 resume estructuralmente los compuestos aislados de la subfracción con actividad anticariogénica estudiada por TÉLLEZ 2009 y ALVARADO 2007.

La familia de las *Rubiáceae*, cuenta con una amplia gama de compuestos químicos, algunos de los cuales poseen propiedades farmacológicas y para el caso de

ácidos grasos ha permitido realizar relaciones quimiotaxonomicas entre géneros y especies. Un grupo de compuestos mayoritarios en la fracción metanólica de la *Isertia pitteri* e *Isertia haenkeana* corresponde a triterpenos glicosilados, molécula que ha sido estudiada su actividad biológica como anticariogénica para el caso de *I. pitteri*. Sin embargo, la actividad biológica de estos compuestos esta dado por la posición de grupos funcionales sustituyentes en la molécula relacionado con el grupo hidroxilo del carbono C-23. Grupo que se observa en las estructuras encontradas.

TABLA 13. Resumen de las estructuras obtenidas en la subfracción con actividad anticariogénica de *Isertia laevis*.

COMPUESTO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>Compuesto 1</b> <b>Tr-2.12</b>	Gen	CH <sub>2</sub> OH	OH	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	H
<b>Compuesto 2</b> <b>Tr-41.9</b>	Gen	CH <sub>3</sub> -	OH	Glc	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	H
<b>Compuesto 3</b>	Glu	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -	-	CH <sub>3</sub> -	-	CH <sub>3</sub> -
	Gen:	L-Glucosa ;		Glu:	Glucosa		



## 5. CONCLUSIONES

Del espécimen recolectado del género de *Isertia*, el examen morfológico de esta planta se realiza mediante la disección de la corola y cáliz al estereoscopio de donde se reporta fotografías a magnitud 2X para soporte de trabajos posteriores de reconocimiento.

El proceso de extracción de la fracción con actividad anticariogénica ofreció un porcentaje de 0,031% de peso en seco de fracción a partir de las hojas recolectadas de *Isertia laevis*. Esto indica que es pertinente

De esta fracción asilada de caracterizan los siguientes 3 compuestos: 3-O-{Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→4) 2-desoxiglucopiranosil } ursan -19,24 dihidroxi -12 eno-28-Glucopiranosil ester, 3-O-{Glucopiranosil (1→4) glucopiranosil (1→3) –Arabinofuranosil (1 → 3)} – Oleano 2,6,24 trihidroxi -12 eno-28-metil y el 3-O-{Glucopiranosil (1 → O)} – Ursen 12 -eno

Una limitación de esta técnica es la ubicación exacta de el enlace  $sp^2$  entre C-12 y C-13 ó C-13 y C-14 en los triterpenos glicosilados. También presenta dificultad y poca claridad para determinar la presencia de radicales  $-CH_3$  y  $-OH$  en las posiciones C-20 y C-19. Por lo tanto para ratificar estas posiciones es necesario recurrir a técnicas como la resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ , como los análisis de correlaciones que el equipo pueda ofrecer excepto para el compuesto 3-O-{Glucopiranosil (1 → O)} – Ursen 12 –eno, cuyo análisis incluyo RMN $^1H$  y  $^{13}C$ .

Un ensayo preliminar en TLC usando como adsorbente RP-18 y fase móvil MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1 se compararon las fracciones con actividad anticariogénica de *Isertia laevis* y *Eleaegia utilis* se observó al revelar con HClO<sub>4</sub> que ambos compuestos tiene un mismo R<sub>f</sub> de 0,45 y 0,6, que da una coloración rosada que indica la presencia de compuestos triterpenoides en la misma fracción para cada

especie donde el proyecto general ha demostrado que tienen actividad biológica las fracciones de cada espécimen.

Se desarrolla un documento con fotografías de las características morfológicas a estereoscopio de la *Isertia laevis*, para posteriores estudios.

## 6. SUGERENCIAS

Realizar un estudio para obtener la fracción anticariogénica por medio de la extracción en un medio alcalino débil como  $\text{HCO}_3^{1-}$ . Ya que se obtuvieron 0,031% en peso seco de la fracción activa.

Evaluar la actividad anticariogénica de otras especies del género *Isertia*. El cual tenga un componente morfológico que permita adquirir fotografías de estructuras al estereoscopio de las especies estudiadas.

Evaluar la actividad biológica antibacteriano sobre otros microorganismos asociados a la cavidad bucal, ya que esa evaluación permitiría estudiar la relevancia de aplicar esta fracción como un producto natural anticariogénico.

Efectuar estudios de la acción biológica de las fracción anticariogénica sobre otras bacterias asociadas como *Helicobacter pylori*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 ANNAPURNA, J. (2003) *Antimicrobial activity of Ixora coccinea leaves*. *Fitoterapia* 74: 291-293
- 2 ACKLOO, S., et. al. (2000) *Characterization of ginseng saponins using electrospray mass spectrometry and collision-induced dissociation experiments of metal-attachment ions*. *The Analyst* 125, pp591-97
- 3 ALVARADO, A., (2007) *Actividad Antmicrobiana De Extractos, Fracciones Y Subfracciones Obtenidas A Partir De Hojas De Isertia Laevis Sobre Bacterias Asociadas A Caries Dental*. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de Maestría
- 4 American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 19ed., New York, 1995. pp 4-65 a 4-69.
- 5 AQUINO, R. (1997) *Triterpenes and Quinovic Acid glycosides from Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 45 (5): 1035- 1040
- 6 ARBAIN, D., et. al. (1998). *The alkaloids of Uncaria cf. glabrata*. *Australian Journal of Chemistry* 51, 961–964.
- 7 ARRAIGA, J. RUMBERO, A., VAZQUEZ, . (1990) *Two triterpene glycoside from Isertia haenkeana*. *Phytochemistry* 29, (19) pp 209-13
- 8 BIALY, Z., et. al. (1999) *Saponins in Alfalfa (Medicago sativa L.) Root and Their Structural Elucidation*. *Journal Agricultural Chemistry*, 47, pp 3185 - 3192
- 9 BOOM, B. (1984) *A Revision of Isertia (Iserttia: Rubiaceae)*. *Brittonia* 36, (4), pp 425-54.
- 10 CABRERA G, (2006) *Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides* . *Phytochemistry Advances in Research* 37 (2) pp 1-22
- 11 CASTRO, S. (2006). *Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de Isertia laevis empleando líneas celulares derivadas de*

tumores. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.

- 12 CECH, N., et. al. (2001) *Practical implications of some recent studies in elctrospray ionization fundamentals*. Mass Spectrometry Reviews 20, pp 362-87
- 13 CHAVEZ-ENG, C., et. al (1999) *Determination of a cyclic hexapeptide, a novel antifungal agent, in human plasma by high-performance liquid chromatography with ionspray and turbo ion spray tandem mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography B, 721, 229–238
- 14 CHEN, L., et. al. (2009) *Identification and determination of the major constituents in Traditional Chinese Medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC–DAD–ESI-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50, pp127–137
- 15 CHENG, Z., (2002) *27-Nor-triterpenoid glycosides from Mitragyna inermis*. Phytochemistry 61, pp 379-82
- 16 CHOMA, I. (2005) *The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis*. LC GC Europe pp 482-88
- 17 CHUNG, J., (2006) *Anticariogenic activity of macelignan isolated from Myristica fragrans (nutmeg) against Streptococcus mutans*. Phytomedicine 13: 261–266
- 18 COLE, R., (2000) *Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometer. 35: 763 - 772.
- 19 DE LEO, M., (2006) *Triterpenoid saponins from Pteleopsis suberosa stem bark*. Phytochemistry 67: 2623 - 29
- 20 DINAN, L., (2001) *Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids*. Journal of Chromatography A, 935:105–123
- 21 DJOUKENG, J.D., et.al. (2005). *Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae)* J. Ethno-Pharmacology, 101:283-286
- 22 DUQUE, C. (-) *La Cromatografía Herramienta Esencial en la Búsqueda de Compuestos Bioactivos de Origen Natural*. 4° Congreso Colombiano de Cromatografía. Universidad Nacional de Colombia.

- 23 FERRAZZANO, et. al. (2009), Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 80, pp 255-62
- 24 FUZZATI, N., (1999) *Liquid chromatography–electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in Panax ginseng roots*. *Journal of Chromatography A*, 854 (1999) 69–79.
- 25 GAMBOA, F. et al. (2004) *Control microbiológico sobre S. Mutans y su acción acidogénica*. *Universitas scientiarum*. 9, 45-55.
- 26 GARCIA B.H. (1996). *Flora medicinal de Colombia. Botánica médica*. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional Colombia.
- 27 GERSHENZON, J. (2007) *The function of terpene natural products in the natural world*. *Nature Chemical Biology* 3 (7): 408 - 414
- 28 Gibbons and Gray, 1998, *Insolation by planer Chromatography*, p221
- 29 GOTTLIEB, H., et. al. (1997) *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities*. *Journal of Organic Chemistry* 62, pp 7512 - 15
- 30 GUO, S., (2000) Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry* 55: 419 - 428
- 31 HA, Y., (2006) *Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in Platycodi Radix by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1135, 27–35
- 32 HÄKKINEN S., (1998) *High performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries*. *Journal of Chromatography A*, 829, pp 91-100
- 33 HE, Z., (1996) 27-NOR-Triterpenoid glycosides from *Adina rubella*. *Phytochemistry*, 42 (5) pp. 1391- 93,
- 34 HEITZMAN, M.,(2005) *Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae)* *Phytochemistry* 66: 5–29



- 35 HOLCAPEK, M., (2007) *Effects of functional groups on the fragmentation of dyes in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectra*. *Dyes and Pigments* 75, pp156 - 65
- 36 JANSSEN, H., et. al. (2008) *Quantification of appetite suppressing steroid glycosides from Hoodia gordonii in dried plant material, purified extracts and food products using HPLC-UV and HPLC-MS methods*. *Analytica Chimica Acta*. 617 pp 200-207
- 37 JIMENO M. et al. 1995, H and C Spectra of pyrocincholic acid. *Phytochemistry* 40 (3) pp899-901.
- 38 JIMENO M. et. al. (1995) *<sup>1</sup>H AND <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pyrocincholic acid*. *Phytochemistry*, Vol. 40 (3) pp. 899-901, 1995
- 39 KHAN, et. al. (2003) *Antimicrobial activity of extractives of Sarcocephalus coadunatus*. *Fitoterapia* 74, pp 695-98
- 40 KHAN, et: al. (2001), *Antimicrobial activity of Psychotria microlabastra*. *Fitoterapia* 70, pp 818-821
- 41 KITAJIMA, M., HASHIMOTO, K., YOKOYA, M., TAKAYAMA, H., AIMI, N. (2000) *Two new 19-hydroxyursolic acid-type triterpene from Peruvian "Uña de gato" (Uncaria tomentosa)*. *Tetrahedron* 56, 547-52.
- 42 LAMIDI, M., et. al. (1995) *Quinovic Acid Glycoside from Nauclea diderrichii*. *Phytochemistry* 38, (1), pp. 209-212, 1995
- 43 LEO, et. al, (1990) *Prevalence of Streptococcus mutans and dental decay in schoolchildren living in Genoa Italy*. *European Journal of Epidemiology*, 6, (2) pp 166-74
- 44 LIU, J. (1995) *Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid*. *Journal of Ethnopharmacology* 49 57-68
- 45 LIU, J. (2005) *Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives*. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 92–94
- 46 LIU, J. et. al (2008) *Cholestane and spirostane glycosides from the rhizomes of Dioscorea septemloba*. *Phytochemistry* 69 1411– 18
- 47 LU, J., (2009) *Structure elucidation of two triterpenoid saponins from rhizome of Anemone raddeana Regel*. *Fitoterapia* 80: 345–348

- 48 MALIK, A., et. al. (2010) *Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety*. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 4018–40
- 49 MANISALI, I., et.al. (2006). *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometric: past, present and future*. Trends in Analytical Chemistry. 25 (3) pp243-256
- 50 MARTÍNEZ, J. (1984) *Análisis Organico Cualitativo*. Universidad Nacional de Colombia.
- 51 MAURI, P., et.al. (2000) *Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23, pp 61-68
- 52 MENDOCA, J., (2008) *Chemical characterisation of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)* Food Chemistry 111 pp 490-97
- 53 MENDOZA, H, RAMIREZ R., JIMENEZ,L. (2004) *Rubiaceae de Colombia, guia ilustrada de géneros*. Bogotá D.C, Colombia: Instituto de Investigación Alexander Von Humboldt 351p
- 54 MENDOZA, H. (2000) *Las Especies de Rubiaceae del Flanco Oriental de la Cordillera Oriental, Norte de Los Andes, Colombia*. Biota Colombiana 1 (2): 224 - 229
- 55 MONGRAND, S., et. al. (2005) Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. Phytochemistry 66: 549 - 559
- 56 MONTE & KINTZINGER, J. 1998, Complete H y C resonance assignment of triterpedoids. Braz. Chem. Soc. 9, (1) pp 23-9
- 57 MOSQUERA, O., (2004) *Antibacterial Activity of Some Andean Colombian Plants* Pharmaceutical Biology 42 (7): 499 - 503
- 58 MUTHAURA, et. al. (2007), Traditional phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru district of Kenya. South African Journal of Botanic 73, , pp 402-11
- 59 NAZARI, A., (2006) Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of *Randia hebecarpa* and Major Constituents. Pharmaceutical Biology 44 (1): 7-9

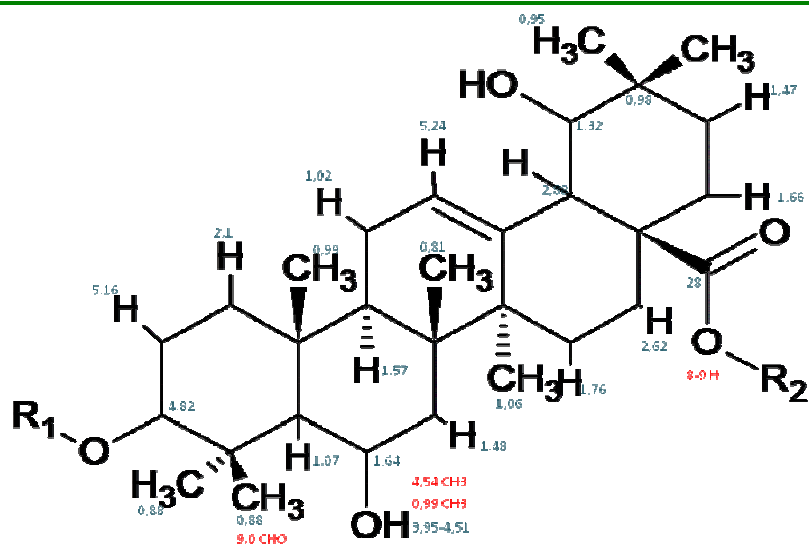
- 60 NIÑO, J. et. al. (2003) *Antimycotic Activity of 20 Plants from Colombian Flora*. *Pharmaceutical Biology* 41 (7) pp 491-96
- 61 OLESZEK, WA., (2002) *Chromatographic determination of plant saponins*. *Journal of Chromatography A*, 967 147-62
- 62 OLESZEK, WA., (2006) *Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005)* . *Journal of Chromatography A*, 1112 78-91
- 63 PAREJO I, et.al. (2004) *Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (Foeniculum vulgare) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *J Agric Food Chem* 52: 3679-3687
- 64 PARTHASARATHY, S., et. al. (2009) *Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from Mitragyna Speciosa (Rubiaceae Family) Leaves*. *Molecules* 14: 3964-3974
- 65 POPOVA, M. CHINOU, I., MAREKOV, I., BANKOVA, V., (2009) *Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis*. *Phytochemistry* 70, 1262-71.
- 66 POPOVA. et al. 2009, *Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis*. *Phytochemistry* 70, pp 1262-71
- 67 Qu J; Liang Q; Luo G; Wang Y.(2004) *Screening and identification of glycosides in biological samples using energy-gradient neutral loss scan and liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Anal. Chem.* 76: 2239-47 .
- 68 RIVERO-CRUZ, F., et. al. (2008) *Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (Vitis vinifera) against selected oral pathogens*. *Phytochemistry Letters* 1 pp 151-54
- 69 Rumbero-Sanchez, A., Vazquez, P., (1991). *A nor-triterpene glycoside from Isertia haenkeana and a <sup>13</sup>C NMR study of cincholic acid*. *Phytochemistry* 30, 623–626.

- 70 SCHNEIDER, P., et. al. (2009) *Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents*. *Phytochemistry Letters* 2, pp85-87
- 71 SOTO-SOBENIS, A. (2001) *Alkaloid screening of herbarium Samples of Rubiaceae from Panamá*. *Pharmaceutical Biology*. 39, (3) 161-69.
- 72 SPARG, S., et. al. (2004) *Biological activities and distribution of plant saponins*. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219–243
- 73 TELLEZ, M., PERDOMO, M., (2009) *Evaluación de la actividad antimicrobial de la fracción activa de Isertia laevis obtenida de dos metodologías de extracción sobre Strptococcus mutans y Streptococcus sobrinus*. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- 74 TONG, H., (2008) *Physical characterization of oleanolic acid nonsolvate and solvates prepared by solvent recrystallization*. *International Journal of Pharmaceutics* 355, 195–202
- 75 UM, R., et. al. (2001) *Triterpenoids Saponins from Isertia pittieri*. *Journal of Natural Products* 64: 1588 - 1589
- 76 UM, R., et. al. (2002) *A new dicaffeoylquinic acid butyl ester from Isertia pittieri*. *Fitoterapia* 73: 550 – 552
- 77 VALGAS, C., *Screening to determine antibacterial activity of natural products*. *Brazilian Journal of Microbiology* 38 pp 369 - 380
- 78 VIANA, et. al (2004) *Triterpenoid saponins fom Stem Bark of Pentaclethra macroloba*. *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (4) pp 595-602
- 79 VINCKEN, J., HENG L., GROOT., GRUPPEN. (2007) *Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom*. *Phytochemistry* 68, 275-97
- 80 VOUTQUENNE, L., *Oleanolic glycosides from Pometia ridleyi*. *Phytochemistry* 64 781–789
- 81 Wan Ha, Y., et. al. (2010) *Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51, pp 202-209

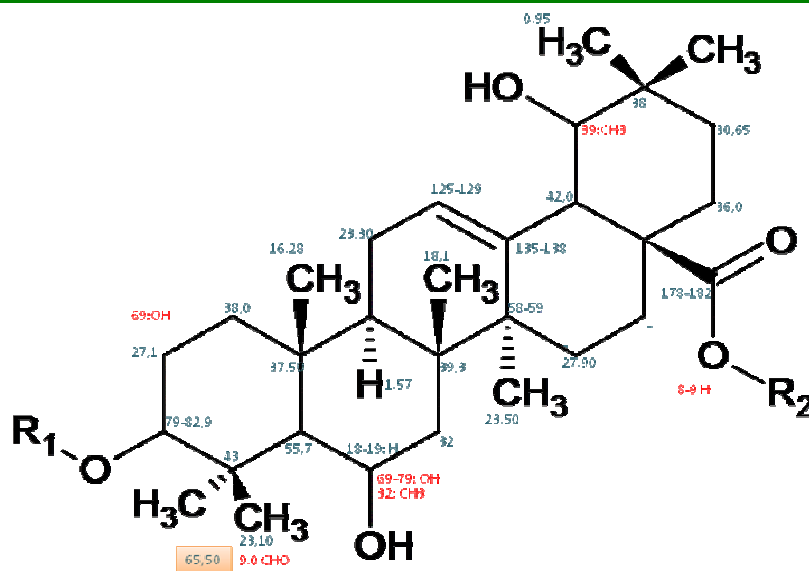
- 82 WANG, S-C et.al (2007) *Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B* 812: 193
- 83 WOLFF, D. 2003) *Nocturnal Versus Diurnal Pollination Success in Isertia laevis (Rubiaceae): A Sphingophilous Plant Visited by Hummingbirds*
- 84 YOKOSUKA, A., (2008) *Steroidal glycosides from the underground parts of Trillium erectum and their cytotoxic activity. Phytochemistry* 69: 2724 - 2730
- 85 YUE, Q., (2010) *Effects of triterpenes from Ganoderma lucidum on protein expression profile of He La cell. Phytomedicine* 16, pp 1-8

## 8. ANEXO A

### 8.1. Desplazamientos de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ típicos para triterpenos $\text{C}_{30}$ .



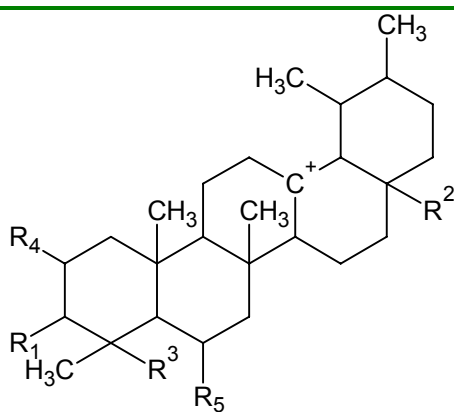
Desplazamientos químicos en ppm para  $^1\text{H}$  en un triterpeno. Fuente: MONTE &KINTZINGER, J. 1998,



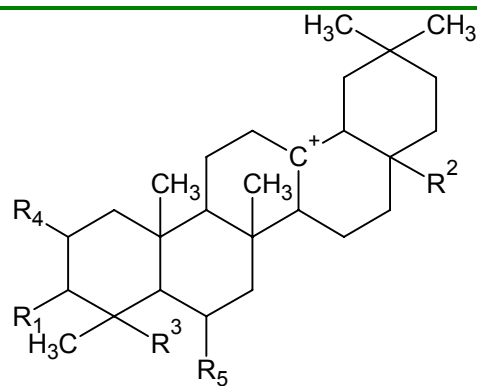
Desplazamientos químicos en ppm para  $^{13}\text{C}$  en un triterpeno. Fuente: MONTE &KINTZINGER, J. 1998,

## ANEXO B

### Estructura básica de los triterpenos tipo Oleananos y Ursanos



Estructura típica de un Ursano



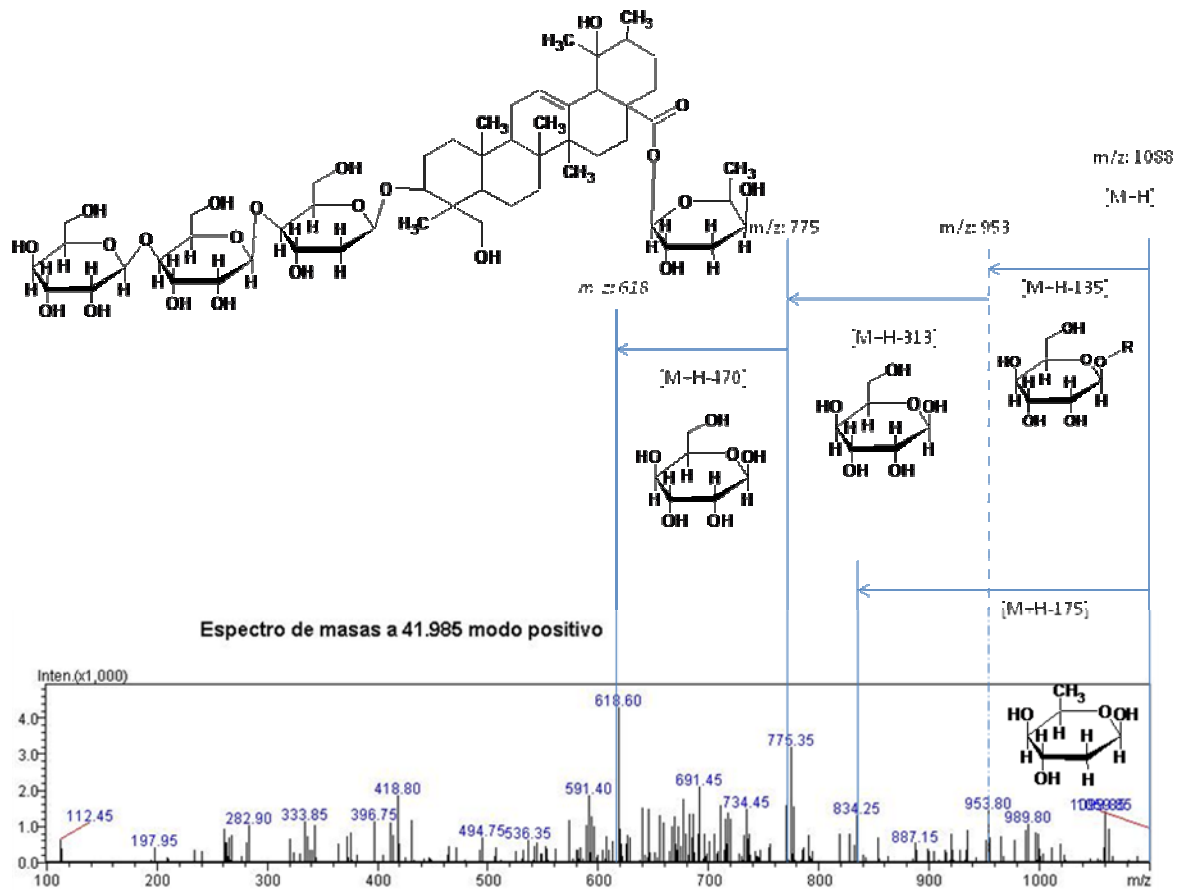
Estructura típica de un Oleanano

#### Características estructurales y de extracción de los triterpenos

Triterpeno	R1*	R2*	R3	R4	R5	Fracción
URSANO	OH;	COOH; CO-R	OH; CH <sub>2</sub> OH	H; OH	CH <sub>3</sub> ; OH	MeOH:CHCl <sub>3</sub>
OLEANO	OH;	COOH	OH; CH <sub>2</sub> OH	H; OH	CH <sub>3</sub> ; OH	MeOH:CHCl <sub>3</sub>

## Anexo C

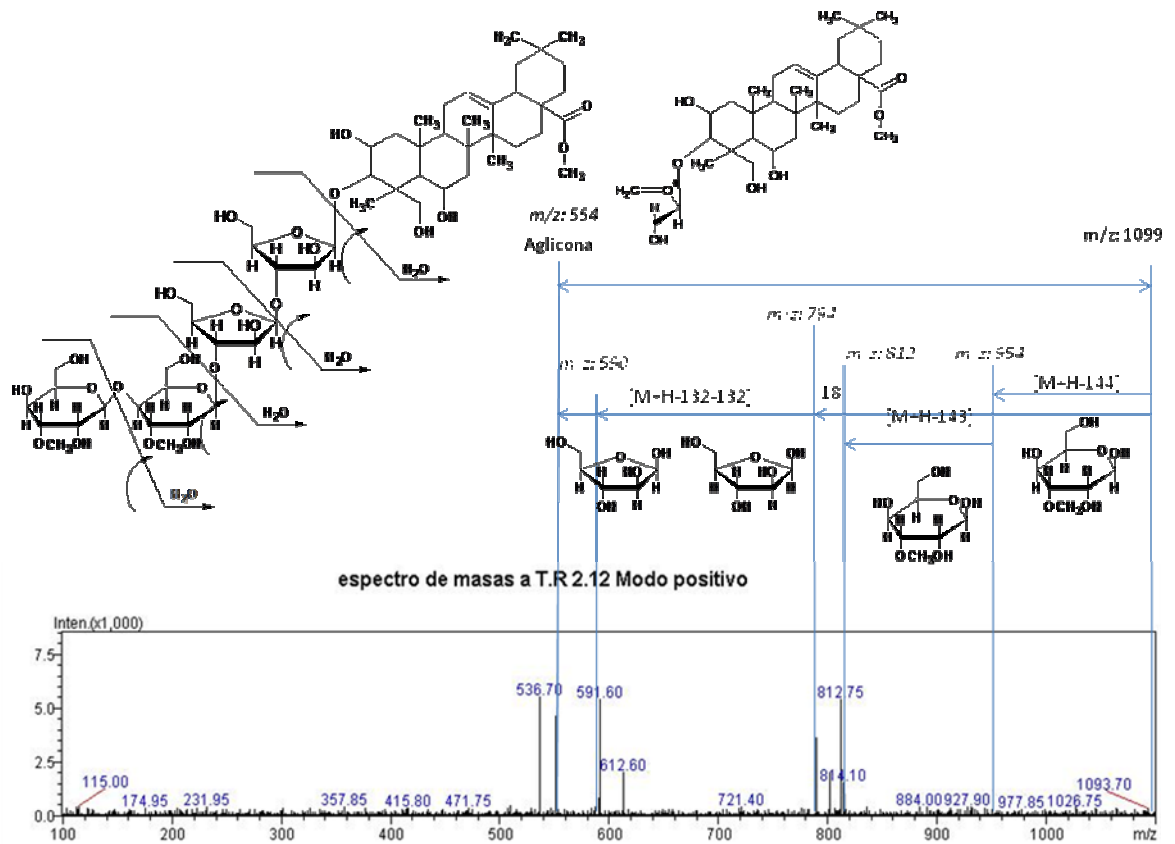
Ruta de fragmentación propuesta para el compuesto eluido a tiempo de retención de 2,12 minutos.





## Anexo D

Ruta de fragmentación propuesta para el compuesto eluido a tiempo de retención de 41.985 minutos



## COMUNICACIÓN BREVE

### **CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE UNO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA SUBFRACCIÓN DE LAS HOJAS DE *ISERTIA LAEVIS* (TRIANA) BOOM CON ACTIVIDAD ANTICARIOGÉNICA**

PHYTOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF ONE COMPOUND PRESENT IN THE SUBFRACTION OF LEAVES OF *ISERTIA LAEVIS* (TRIANA) BOOM WITH ANTICARIOGENIC ACTIVITY

O DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE COMPOSTOS PRESENTES NA SUBFRAÇÃO LAEVIS *ISERTIA* FOLHAS (TRIANA) COM ATIVIDADE ANTICARIOGÉNICA

JOHN JAIRO ROJAS RUIZ<sup>4</sup>

<sup>(1)</sup>Grupo de Investigación en fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana

PALABRAS CLAVE: *Isertia laevis*, anticariogénica, RMN, Triterpeno Glicosilado.

KEY WORDS: *Isertia laevis*, anticariogenic, NMR, triterpeno glycosides,

Palavras-chave: *Isertia laevis*, anticariogénico, ressonância magnética nuclear.

#### RESÚMEN

De las hojas de *Isertia laevis* se obtuvo un compuesto de la fracción etanólica previamente desengrasada. Esta fracción fue estudiada por el método de bioensayos por difusión en pozo sobre bacterias asociadas a la caries dental, demostró su actividad biológica inhibitoria (Télez et al, 2009), dentro del proyecto entre GIFUJ y el Centro de Estudios Odontológicos de la Universidad Javeriana. El compuesto aislado se le realizaron ensayos preliminares con reveladores sobre Cromatografía en Capa Fina (TLC), y elucidación estructural por RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fue completada por comparación en literatura especializada.

#### ABSTRACT

The leaves of *Isertia laevis* were used to isolated one compounds in the first stage the leaves were defatted and ethanoic fractions created. This fraction was studied by bioassays using diffusion wells on bacteria associated with dental cavities. This showed inhibitory biological activity (Tellez et al, 2009), this was a joint project between GIFUJ and Dental Research Center of the Universidad Javeriana. The compound were then stained and subjected to Thin Layer Chromatography (TLC). and the structural elucidation by RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C were completed through the use of literature.

#### SUMÁRIO

---

<sup>4</sup> Email: [jrojas@anglocolombiano.edu.co](mailto:jrojas@anglocolombiano.edu.co)

Das folhas de laevis *Isertia* rendeu um composto previamente desengordurado fração de etanol. Esta fração foi estudada pelo método de difusão em bioensaios bem sobre as bactérias associadas com a cárie dental, demonstrou a sua atividade inibitória biológicos (Tellez e col, 2009), no âmbito do projecto entre GIFUJ eo Centro de Estudos em Odontologia da Universidad Javeriana. Os compostos isolados foram realizados testes preliminares com os desenvolvedores de cromatografia de camada delgada (TLC), e RMN<sup>1</sup>H elucidación estructural e <sup>13</sup>C foi concluída pela literatura de comparação.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Isertia laevis* es una especie perteneciente a la familia de las *Rubiácea* la cual ha sido objeto de estudio entre el grupo de Fitoquímica y el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana. Cuyos resultados preliminares por bioensayo sobre bacterias asociadas a la caries dental han mostrado actividad anticariogénica.

El interés en esta investigación es determinar el tipo de compuestos presentes en la fracción anticariogénica obtenida a partir de las hojas de *Isertia laevis*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Hojas de *Isertia laevis*, recolectadas (2,6Kg) en la carretera vía Cumaral/Meta y Medina/Cundinamarca, (Col) se desengrasaron con Petrol por soxhlet. Posteriormente se obtuvo la fracción etanol por en maceración exhaustiva en frío por 72 horas. El extracto fue secado rotavaporador a presión reducida (18g).

El extracto se percoló por cromatografía en columna al vacío, usando los siguientes eluentes: MetOH:H<sub>2</sub>O 10:1, MetOH, MetOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se usa aspersion en placa de diferentes reactivos para determinar el tipo de compuesto(s) presente(s).

Las fracciones obtenidas y posteriormente subfracciones fueron evaluadas por bioautografía y siembra en pozo por Téllez et. al, 2009, para estudiar su actividad biológica frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*. Se retiran clorofilas usando Sephadex LH-20 como adsorbente en una columna cromatográfica abierta. Se monitorea por TLC RP-18 MetOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1 y se pasan por una columna abierta con RP-18 TLC RP-18 MetOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1 de 15cm y Diámetro 2,5cm. Se monitorean en CIO por Téllez et. al. Las fracciones obtenidas luego de ser monitoreadas se purifica por medio de una CC con RP-18 MetOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9:1, obteniéndose 32 subfracciones. De estas la fracción 10 se recristaliza con MeOH:Petrol 1:4 obteniéndose 2 compuestos los cuales analizados por RMN <sup>1</sup>H Y <sup>13</sup>C en un equipo de 400 MHz en la Universidad del Valle (Col)

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del extracto etanólico y fracciones obtenidas MeOH y MetOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, se determino por el método de bioensayo y siembra en pozo los compuestos con actividad anticariogénica a 0,4mg/pozo Téllez et.al . Las cuales aparecen a un R<sub>f</sub> de 0,3 y 0,5 en una placa de cromatografía RP-18, usando como eluyente MetOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1.

De los ensayos realizados sobre la aplicación de reactivos reveladores como ácido perclórico revelado y molibdato de amonio sobre TLC, como microensayos en capilar, se determina que se tratan de triterpenos glicosilados. Un ensayo posterior de hemolisis indica la presencia de saponinas.

Los ensayos de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C la señal de multiplete en 5,5 ppm hace referencia a un carbono sp<sup>2</sup> el cual corresponde al C-13, ya sea unido a C-12 ó C-14. La señal en 3,2 ppm corresponde a un hidrogeno unido a un carbono y a un oxígeno el cual desplaza la señal a un campo alto. Del espectro de RMN <sup>13</sup>C se observan 36, de las cuales la de 78 ppm corresponde al solvente, y las señales restante (35) para el compuesto de formula C<sub>35</sub>H<sub>72</sub>O<sub>7</sub>. Las señales de 138ppm y 126ppm corresponden a C-12 y C-13 respectivamente del tipo sp<sup>2</sup>. La señal a 81 ppm corresponde al carbono C-3, el cual está unido por un oxígeno al azúcar, (señales a 78 ppm).

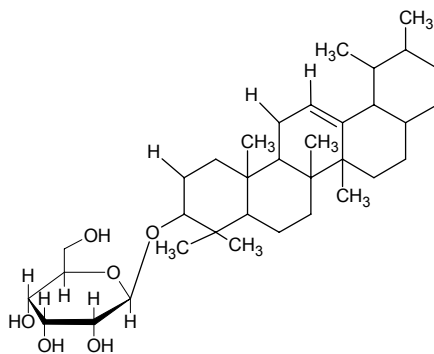
La ampliación del espectro de RMN<sup>13</sup>C se hace notoria las señales de 76, 77, 78 ppm típica para la glucosa. Las señales en 57 ppm es característica para un CH correspondiente para C-14 y confirmado por el espectro de DEPT 135. La señal en 54 ppm corresponde al CH de C-5, común en el anillo A y B del Triterpeno

La región comprendida entre 33 y 11 ppm hacer referencia a grupos metil -CH<sub>3</sub> en el compuesto para una contabilización de 7 -CH<sub>3</sub>. Las señales en 20 y 39 ppm corresponden a los carbonos C-19 y C-20, el desplazamiento de C-19 en fase positiva de deduce que es un -CH-, tratandose de un triterpeno ursano.

Es importante mencionar que los ensayos preliminares de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se descarta la presencia de un compuesto ácido o grupo aldehído. Una aplicación al espectro DEPT 135 permite definir los carbonos desplazados a 16, 21 y 22 ppm, correspondientes a un -CH<sub>2</sub>- cada señal. Del espectro de COSY se observa cercanía entre H11-H12, explicaría la multiplicidad en 5,5 ppm, en el espectro de RMN<sup>1</sup>H asegurando que se trata de un triterpeno del tipo Ursano. Para H2-H3, hay correlación o cercanía omitiendo la presencia de OH en el C-2.

## CONCLUSIONES

La familia de las Rubiácea, cuenta con una amplia gama de compuestos químicos, algunos de los cuales poseen propiedades farmacológicas y para el caso de ácidos grasos ha permitido realizar relaciones quimiotaxonomicas entre géneros y especies. Un grupo de compuestos mayoritarios en la fracción metanólica de la *Isertia pitteri* e *Isertia haenkeana* corresponde a triterpenos glicosilados, molécula que ha sido estudiada su actividad biológica como anticariogénica para el caso de *I. pitteri*. Se determina la presencia por el análisis fitoquímico y espectroscópico el compuesto 3-O-{D-Glucopiranosil (1 → O)} – Ursen 12 -eno.



**3-O-{-D-Glucopiranosil (1 → O)} – Ursen 12 -eno.**

## BIBLIOGRAFÍA

1. ANNAPURNA, J. (2003) Antimicrobial activity of *Ixora coccinea* leaves. *Fitoterapia* 74: 291-293
2. CASTRO, S. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Ixertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.
3. DE LEO, M., (2006) Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry* 67: 2623 – 29
4. FERRAZZANO, et. al. (2009), Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 80, pp 255-62
5. HEITZMAN, M.,(2005) Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae) *Phytochemistry* 66: 5–29
6. KHAN, et. al. (2003) Antimicrobial activity of extractives of *Sarcocephalus coadunatus*. *Fitoterapia* 74, pp 695-98
7. LIU, J. (2005) Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 92–94
8. LU, J., (2009) Structure elucidation of two triterpenoid saponins from rhizome of *Anemone raddeana* Regel. *Fitoterapia* 80: 345–348
9. MENDOZA, H, RAMIREZ R., JIMENEZ,L. (2004) Rubiaceae de Colombia, guía ilustrada de géneros. Bogotá D.C, Colombia: Instituto de Investigación Alexander Von Humboldt 351p

10. MONTE & KINTZINGER, J. 1998, Complete H y C resonance assignment of triterpedoids. Braz. Chem. Soc. 9, (1) pp 23-9
11. OLESZEK, WA., (2002) Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A, 967 147-62
12. OLESZEK, WA., (2006) Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005) . Journal of Chromatography A, 1112 78-91
13. PARTHASARATHY, S., et. al. (2009) Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules* 14: 3964-3974
14. SPARG, S., et. al. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219–243
15. TELLEZ, M., PERDOMO, M., (2009) Evaluación de la actividad antimicrobial de la fracción activa de *Isertia laevis* obtenida de dos metodologías de extracción sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. **Trabajo de Grado**. Pontificia Universidad Javeriana.
16. TONG, H., (2008) Physical characterization of oleanolic acid nonsolvate and solvates prepared by solvent recrystallization. *International Journal of Pharmaceutics* 355, 195–20
17. UM, R., et. al. (2001) Triterpenoids Saponins from *Isertia pittieri*. *Journal of Natural Products* 64: 1588 – 1589
18. VIANA, et. al (2004) Triterpenoid saponins *from Stem Bark of Pentaclethra macroloba*. J. Braz. Chem. Soc. 15 (4) pp 595-602
19. VINCKEN, J., HENG L., GROOT., GRUPPEN. (2007) *Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom*. *Phytochemistry* 68, 275-97
20. YUE, Q., (2010) *Effects of triterpenes from Ganoderma lucidum on protein expression profile of He La cell*. *Phytomedicine* 16, pp 1-8