



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Metabolitos secundarios aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae)

Martha Catalina Rozo Lugo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

Año 2015

Metabolitos secundarios aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae)

Martha Catalina Rozo Lugo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Química

Director (a):

Luis Enrique Cuca Suárez

Profesor titular Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de
Colombia

Línea de Investigación:

Productos Naturales Vegetales

Grupo de Investigación:

Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceae y Myristicaceae
Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

Año 2015

Dedicatoria

A mi hija Luciana mi motor y mi luz en todo momento

A mis papas y mis hermanos por apoyarme en todo momento y por animarme a no dejar nunca esta empresa

A mi esposo por la paciencia durante estos años y por acompañarme siempre.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, por ser un espacio dedicado a la investigación que permite nuestra formación integral.

Al profesor Luis Enrique Cuca Suarez, por recibirme en su grupo de investigación, por haber guiado mi trabajo, por todas sus enseñanzas, por su paciencia y colaboración.

A los compañeros del laboratorio de Productos Naturales Vegetales, a los profesores Wilman y Monica, a Andreita, Elisa, Viticor, Juan, y Diego por lo que aprendí de cada uno de ustedes, por hacer agradables los largos días de trabajo, por su amabilidad y su amistad.

A las compañeras del laboratorio de Productos Naturales Marinos a Sandrita M., a Clarita, a Diana M. y a Sandrita N. por su colaboración y también por las carcajadas que compartimos.

Al profesor Ericsson David Coy Barrera, por todos sus valiosos aportes a mi trabajo, por su entusiasmo y por haberme recibido en su grupo durante este tiempo.

A los compañeros del Laboratorio de Química Bioorgánica –UMNG quimioLorena, bioLorena, Camilo, Geraldine, Dianita, Willy y Juanito por hacer tan agradable mi estancia y por toda la colaboración que tuvieron a bien brindarme.

A mis amigos de toda la vida que de una u otra manera me han brindado con su entusiasmo, el apoyo en momentos de crisis, a Susy, Johis, Maria H, Jenuu, Edward, Javier Juan y Edwin que se que están siempre enviándome toda su energía positiva.

A mi familia por su apoyo incondicional, por escucharme, por animarme siempre, a mi papi Jose Luis, por creer siempre en mi y sentirse orgulloso de mis logros, a mi mami por que durante este tiempo fue una mama también para mi hija y no podría haber estado en mejores manos, por no dejar que desfallezca nunca, a mis hermanos “los doctores” por apoyarme en todos los sentidos, por su amistad y compañía.

A mi esposo Oscar y a mi princesa Luciana porque son mi motor, por su compañía invaluable en todo momento y en especial a mi hija porque cada sonrisa suya me levanta el ánimo y me recuerda que este esfuerzo lo hago por ella y por la familia que formamos con su papa.

Resumen

A partir del extracto etanólico de hojas de la especie *Ocotea heterochroma* (Lauraceae) se aislaron dos neolignanos de núcleo furociclohexanona de estructura novedosa denominados heterocromina A y B y siete compuestos conocidos, un neolignano biciclo[3.2.1]octánico (cinerina C), cinco flavonoides de los cuales tres ya han sido elucidados (afzelina, tamarixetina-3-O-ramnósido y 2'-O-(Z-p-coumaroil)astragalina) y un derivado de ácido cinámico conocido como p-hidroxicinamato de etilo. Sus estructuras fueron determinadas mediante el análisis de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C y por EM. Se determinó la presencia de los metabolitos previamente aislados en el extracto de hojas, en los extractos de corteza y madera de la especie objeto de estudio por FR-CLAE-DAD-EM encontrándose que la heterocromina A y la 2'-O-(Z-p-coumaroil)astragalina están presentes tanto en corteza y madera, mientras que el cinnamato de etilo, la cinerina C y la afzelina se presentan en corteza pero no en madera. Los neolignanos novedosos, junto a otros compuestos relacionados estructuralmente de los cuales se conoce su actividad como antagonistas al PAF, se estudiaron por Docking molecular con el fin de establecer el modo de interacción entre estos compuestos y el receptor PAF. Los resultados mostraron una relación proporcional entre los valores de IC_{50} obtenidos en forma experimental con la afinidad calculada, observándose además valores de afinidad para las heterocrominas A y B que permiten considerarlas como promisorias antagonistas al PAF. El presente trabajo corresponde al primer estudio realizado a las hojas de *O. heterochroma*.

Palabras clave: Lauraceae, *Ocotea heterochroma*, neolignanos, flavonoides, CLAE, Docking molecular

Abstract

From the ethanol extract of *Ocotea heterochroma* (Lauraceae) leaves, two novel furocyclohexanone neolignans, called heterochromin A and B, and seven known compounds: a bicyclo[3.2.1]octane neolignan (cinerin C), five flavonoids with three of them possessing elucidated structure (azfelin, tamarixetin 3-O-rhamnoside and 2'-O-(Z-p-coumaroyl)astragalin) and a cinnamic acid derivative known as ethyl ethyl *p*-hydroxycinnamate. Their structures were determined by spectroscopic analysis of ^1H and ^{13}C NMR and MS data. The presence in bark and wood extracts to those metabolites previously isolated in the leaves extract was determined by HPLC-DAD-FR-EM, finding that the heterochromin A and 2'-O-(Z-p-coumaroyl)astragalin are present in bark and wood; whereas ethyl cinnamate, cinerin C and afzelin also occur in bark but in wood don't. The novel neolignans, along with other structurally related compounds with known PAF antagonism, were studied by molecular docking in order to analyze the mode of interaction between these compounds and PAF receptor. The results showed a proportional relationship between the IC_{50} values obtained experimentally with the affinity values calculation. It was also observed that heterochromin's affinity might be considered as promising PAF antagonists. The present work corresponds to the first study performed on *O. heterochroma* leaves.

Key words: Lauraceae, *Ocotea heterochroma*, neolignans, flavonoids, HPLC, Molecular docking

Contenido

Resumen	V
Abstract	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas.....	XIII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción	1
1. Estado actual del tema	5
1.1 Generalidades de la familia Lauraceae.....	5
1.2 Características morfológicas de la familia Lauraceae	7
1.3 Usos Etnobotánicos de la familia Lauraceae	9
1.4 Estudios químicos y de actividad biológica de la familia Lauraceae.....	10
1.4.1 Lignanos.....	11
1.4.2 Neolignanos	12
1.4.3 Flavonoides	14
1.4.4 Alcaloides.....	16
1.4.4.1 Alcaloides bencilisoquinolinicos:	16
1.4.4.2 Alcaloides aporfinicos:	17
1.4.5 Terpenos:	18
1.5 Generalidades del género <i>Ocotea</i>	19
1.6 Características morfológicas del género <i>Ocotea</i>	19
1.7 Usos etnobotánicos del género <i>Ocotea</i>	21
1.8 Estudios químicos y de actividad biológica del genero <i>Ocotea</i>	22
1.8.1 Lignanos.....	22
1.8.2 Neolignanos	23
1.8.3 Flavonoides	24
1.8.4 Alcaloides.....	25

1.8.4.1	Alcaloides bencilisoquinolínicos.....	25
1.8.4.2	Alcaloides aporfinicos	26
1.8.5	Terpenos	27
2.	Metodología.....	28
2.1	Recolección y clasificación del material vegetal.....	28
2.2	Preparación de extractos etanólicos	28
2.3	Análisis fitoquímico preliminar.....	28
2.4	Técnicas cromatográficas convencionales.....	28
2.5	Técnicas cromatográficas instrumentales	29
2.6	Análisis estructural.....	31
2.7	Selección de extracto de trabajo por análisis de perfiles por RP-HPLC-DAD.....	31
2.8	Aislamiento de metabolitos del extracto etanólico de hojas de <i>O. heterochroma</i>	31
2.8.1	Fracciones apolares obtenidas del extracto Ohc H EdP	32
2.8.2	Metabolitos aislados del extracto Ohc H CHCl ₃	33
2.8.3	Metabolitos aislados del extracto Ohc H AcOEt.....	34
2.9	Modelamiento y Docking Molecular de neolignanós	36
2.9.1	Modelamiento molecular a nivel DFT.....	36
2.9.2	Análisis por Docking	36
2.9.3	Modelamiento Farmacofórico	37
3.	Resultados y Discusión.....	38
3.1	Selección del extracto de trabajo	38
3.1.1	Análisis fitoquímico preliminar.....	38
3.1.2	Análisis de extractos etanólicos por FR-CLAE-DAD	40
3.2	Análisis de fracciones apolares por CG-EM.....	42
3.3	Análisis estructural de metabolitos aislados.....	48
3.3.1	Compuesto Ohc H1	48
3.3.2	Compuesto Ohc H2	52
3.3.3	Compuesto Ohc H3	61
3.3.4	Compuesto Ohc H4	66
3.3.5	Compuesto Ohc H5	69
3.3.6	Compuesto Ohc H6	72
3.3.7	Compuesto Ohc H7	74

3.3.8	Compuesto Ohc H8	77
3.3.9	Compuesto Ohc H9	79
3.4	Determinación de la interacción con el receptor PAF a través de Docking molecular de los compuestos Ohc H2 y Ohc H4.	80
3.5	Comparación cromatográfica de los compuestos puros aislados de hojas con los extractos de hojas corteza y madera.....	85
4.	Conclusiones y perspectivas.....	87
Anexos	90
A.	Cromatogramas por CG-EM de mezclas de Ohc AM1-M3y espectros de masas de picos de interés.....	90
B.	Espectros de RMN ¹³ C, experimentos COSY, DEPT, HMBC y HMQC para los compuestos Ohc H1 a Ohc H9.....	92
C.	Tablas de comparación de desplazamientos de RMN ¹³ C para los compuestos aislados con datos de literatura	115
D.	Datos del sistema FR-CLAE-DAD-EM para los compuestos aislados (Ohc H1-Ohc H9) y comparación con extracto de corteza y madera.....	122
5.	Bibliografía.....	123

Lista de figuras

Figura 1-1. Distribución geográfica de la familia Lauraceae	5
Figura 1-2. Clasificación filogenética de la familia Lauraceae	6
Figura 1-3. a) <i>Aniba perutilis</i> . B) <i>Cassytha ciliolata</i> c) <i>Beilshmedia miersii</i>	7
Figura 1-4. Hojas de <i>Nectandra coriacea</i> (a) y de <i>Cinnamomun zeylanicum</i> (b).	8
Figura 1-5. Inflorescencias y flores de <i>Persea americana</i> (a) y (c) y flores de <i>Cinnamomum burmannii</i> (b).....	8
Figura 1-6. Frutos de en <i>Ocotea insularis</i> (a) de <i>Persea americana</i> (var. Hass) (b) y de <i>Laurus nobilis</i> (c).	9
Figura 1-7. Lignanós aislados de tallos de <i>Actinodaphne lancifolia</i>	11
Figura 1-8. Lignanós aislados de tallos de especies de <i>Nectandra</i>	11
Figura 1-9. Lignanós de especies de <i>Litsea</i>	12
Figura 1-10. Neolignanós de <i>Licaria brasiliensis</i>	13
Figura 1-11. Neolignanós de <i>Aniba simulans</i>	13
Figura 1-12. Neolignanós aislados de <i>Nectandra miranda</i> y <i>Nectandra glabrescens</i>	14
Figura 1-13. Neolignanós aislados de <i>Aniba lancifolia</i>	14
Figura 1-14. Flavonoles glicosilados aislados de especies de la familia Lauraceae.....	15
Figura 1-15. Flavanonas y chalconas aisladas de especies de la familia Lauraceae	16
Figura 1-16. Alcaloide aislado de <i>Cryptocarya chinensis</i>	16
Figura 1-17. Alcaloides aporfínicos aislados de especies de la familia Lauraceae.....	17
Figura 1-18. Diterpenos aislados de <i>Persea indica</i>	18
Figura 1-19. Sesquiterpenos aislados de <i>Persea japonica</i>	18
Figura 1-20. Distribución geográfica del género <i>Ocotea</i>	19
Figura 1-21. Hábitat del (a) <i>O. foetens</i> y (b) <i>O. bullata</i>	20
Figura 1-22. Hojas de (a) <i>O. cernua</i> y (b) <i>O. aciphylla</i> , inflorescencias de (c) <i>O. insularis</i> y (d) <i>O. aciphylla</i> y flores de (e) <i>O. foetens</i>	20
Figura 1-23. Frutos de (a) <i>O. tenera</i> , (b) <i>O. benthaminana</i> y (c) <i>O. puberula</i>	21
Figura 1-24. Lignanós aislados de <i>O. duckei</i> y <i>O. foetens</i>	23
Figura 1-25. Neolignanós aislados de especies del género <i>Ocotea</i>	24
Figura 1-26. Flavonoides aislados de especies del género <i>Ocotea</i>	25
Figura 1-27. Alcaloides bencilisoquinolinicos aislados especies del género <i>Ocotea</i>	26
Figura 1-28. Alcaloides aporfínicos aislados especies del género <i>Ocotea</i>	26
Figura 1-29. Terpenos aislados de <i>Ocotea caparrapi</i>	27
Figura 2-1. Perfil de elución en gradiente utilizado en CLAE-DAD y CLAE-MS.....	29
Figura 2-2. Perfil de elución en gradiente utilizado en CLAE-UV semipreparativo	30
Figura 2-3. Fraccionamiento inicial de Ohc H por polaridad	32
Figura 2-4. Diagrama de flujo de fraccionamiento del extracto A.	33
Figura 2-5. Fraccionamiento y purificación de los compuestos Ohc H1 – Ohc H4.	34
Figura 2-6. Fraccionamiento y purificación de los compuestos Ohc H5 – Ohc H9.	35
Figura 3-1. Perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de <i>O. heterochroma</i> por RP-CLAE-DAD.	41
Figura 3-2. Ampliación de los perfiles cromatográficos de hojas, corteza y madera entre 16 y 22 min.	41

Figura 3-3. Estructura de los diterpenos kauren-16-eno y kauren-15-eno.....	43
Figura 3-4. Estructura de isofitol y el γ -tocoferol.....	44
Figura 3-5. Cromatograma del extracto en <i>n</i> -hexano del extracto de corteza de <i>O. heterochroma</i> y estructuras de los compuestos determinados.....	44
Figura 3-6. Cromatograma del extracto en <i>n</i> -hexano del extracto de madera de <i>O. heterochroma</i> y estructuras de los compuestos determinados.....	46
Figura 3-7. Espectro RMN ^1H compuesto Ohc H1	49
Figura 3-8. Estructura del compuesto Ohc H1	49
Figura 3-9. Ampliación del espectro de ^1H del compuesto Ohc H1 desde δ_{H} 6.3 a δ_{H} 7.7 ppm.	50
Figura 3-10. Ampliación del espectro de ^1H del compuesto Ohc H1 de δ_{H} 1.0 a δ_{H} 4.3 ppm.	50
Figura 3-11. Cromatograma en FR-CLAE-DAD de Ohc H1	51
Figura 3-12. Espectro de masas para el compuesto Ohc H1.	51
Figura 3-13. Espectro IR del compuesto Ohc H2.....	52
Figura 3-14. Espectro de RMN ^1H del compuesto Ohc H2.....	53
Figura 3-15. Estructura de la mirandina A.....	54
Figura 3-16. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 6.6- δ_{H} 6.9 ppm).....	54
Figura 3-17. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 3.6 – δ_{H} 3.9 ppm).....	55
Figura 3-18. Subestructura del compuesto Ohc H2 (a)	55
Figura 3-19. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 0.8 – δ_{H} 3.2 ppm).....	56
Figura 3-20. Subestructura del compuesto Ohc H2 (b)	56
Figura 3-21. Ampliaciones del experimento COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	57
Figura 3-22. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 1.65 – δ_{H} 2.55 ppm).....	57
Figura 3-23. Estructura propuesta para el compuesto Ohc H2.....	58
Figura 3-24. Estructura de la armenina B.....	58
Figura 3-25. Compuesto Ohc 2: Configuración para un ciclohexeno.....	59
Figura 3-26. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H2	60
Figura 3-27. Estructura de Ohc H2.	61
Figura 3-28. Espectro de ^1H del compuesto Ohc H3.....	61
Figura 3-29. Estructura de la cinerina A aislada de <i>Pleurothyrium cinereum</i>	62
Figura 3-30. Subestructura del compuesto Ohc H3 (a)	62
Figura 3-31. Sustituyente alílico del compuesto Ohc H3.....	63
Figura 3-32. Subestructura del compuesto Ohc H3 (b)	63
Figura 3-33. Subestructura del compuesto Ohc H3 (c)	64
Figura 3-34. Estructura de la cinerina C.....	64
Figura 3-35. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H3.	65
Figura 3-36. Espectro RMN ^1H del compuesto Ohc H4.....	66
Figura 3-37. Subestructura del compuesto Ohc H4 (a)	67
Figura 3-38. Comparación espectros RMN ^1H de Ohc H2 y Ohc H4 entre δ_{H} 5.6 a δ_{H} 6.9 ppm.	67

Figura 3-39. Comparación espectros RMN ¹ H de Ohc H2 y Ohc H4 entre δ _H 3 y δ _H 4 ppm	68
Figura 3-40. Estructura del compuesto Ohc H4.	69
Figura 3-41. Estructura del compuesto Ohc H5 (afzelina).....	69
Figura 3-42. Espectro RMN ¹ H del compuesto Ohc H5.....	70
Figura 3-43. Ampliación del espectro RMN ¹ H del compuesto Ohc H5 entre δ _H 6.0 y δ _H 8.0 ppm	70
Figura 3-44. Ampliación del espectro RMN ¹ H del compuesto Ohc H5 entre δ _H 0.7 ppm y δ _H 5.6 ppm	71
Figura 3-45. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H5.	72
Figura 3-46. Estructura del compuesto Ohc H6 (tamarixetina-3-O-α-L-ramnosa)	72
Figura 3-47. Espectro RMN ¹ H del compuesto Ohc H6.....	73
Figura 3-48. Comparación espectros RMN ¹ H de Ohc H5 y Ohc H6 entre δ _H 4.0- δ _H 7.5 ppm	73
Figura 3-49. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H6	74
Figura 3-50. Estructura del compuesto Ohc H7 (2''-O-(Z- <i>p</i> -coumaroil)astragalina)	75
Figura 3-51. Espectro RMN ¹ H del compuesto Ohc H7.....	75
Figura 3-52. Comparación espectros RMN ¹ H de Ohc H5 y Ohc H7 entre δ _H 4.0 - δ _H 8.0 ppm	76
Figura 3-53. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H7	77
Figura 3-54. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H8	78
Figura 3-55. Comparación de espectros UV-vis para los compuestos de núcleo flavonoide aislados.	79
Figura 3-56. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H9	80
Figura 3-57. Estructuras de los compuestos utilizados para análisis por Docking molecular.	81
Figura 3-58. Modelo de correlación lineal entre el pIC ₅₀ y pKi.....	83
Figura 3-59. Docking molecular para los neolignan kadsurenona, cinerina C y heterocromina A.	83
Figura 3-60. Análisis farmacofórico de la heterocromina A	85
Figura 3-61. Cromatogramas de los compuestos Ohc H1-Ohc H3 en comparación con el perfil del extracto de corteza (Ohc C) (a) y de madera (Ohc M) (b).....	86
Figura 3-62. Cromatogramas de los compuestos Ohc H5-Ohc H9 en comparación con el perfil del extracto de corteza (Ohc C) (a) y de madera (Ohc M) (b).....	86

Lista de tablas

Tabla 1-1. Géneros pertenecientes al Complejo <i>Ocotea</i>	7
Tabla 1-2. Usos etnobotánicos de la familia Lauraceae.....	9
Tabla 1-2 Usos etnobotánicos de la familia Lauraceae (Continuación).....	10
Tabla 1-3. Alcaloides aporfínicos en especies de la familia Lauraceae.....	17
Tabla 1-4. Usos etnobotánicos de especies del género <i>Ocotea</i>	21
Tabla 1-4. Usos etnobotánicos de especies del género <i>Ocotea</i> (<i>continuación</i>).....	22
Tabla 3-1. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar sobre Ohc H, Ohc C y Ohc M	37
Tabla 3-1. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar sobre Ohc H, Ohc C y Ohc M (Continuación)	38
Tabla 3-2. Resultados del análisis por GC-MS de muestras apolares obtenidas del extracto A	41
Tabla 3-3. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc C.....	44
Tabla 3-4. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc M.	45
Tabla 3-4. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc M(continuación).	46
Tabla 3-5. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H2 y el neolignano armenina.	57
Tabla 3-6. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H3 y el neolignano cinerina C.....	64
Tabla 3-7. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H2 y Ohc H4.	68
Tabla 3-8. Valores de IC ₅₀ y afinidad de neolignanos sometidos a DM	81
Tabla 3-9. Valores de IC ₅₀ calculados a partir del modelo para los neolignanos heterocromina A y B aislados.	82

Lista de símbolos y abreviaturas

(CD ₃) ₂ CO	acetona deuterada
(CH ₃) ₂ CO	acetona
AcOEt	acetato de etilo
AcOiPr	acetato de isopropilo
Ara	arabinosa
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
CF	Cromatografía en columna flash
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLV	Cromatografía líquida al vacío
COSY	Correlation spectroscopy
COX 2	Ciclooxigenasa-2
COX-1	Ciclooxigenasa-1
d	Doblete
DAD	Detector de arreglo de diodos
DC	Dicroísmo circular
dd	Doble doblete
DEPT 135	Distortionless enhancement of polarization transfer
DFT	Density Functional Theory
EdP	éter de petróleo
EM	Espectro de masas
EMAR	Espectro de masas de alta resolución
EtOH	etanol
FR	Fase reversa
Glu	glucosa
HCOOH	ácido fórmico
hept	heptano
hex	hexano
HMBC	Heteronuclear correlation through multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
IES	Ionización por electrospray
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LOX-5	Lipoxigenasa-5
LRI	índice de retención lineal
m	Multiplete
m/z	Relación masa carga
MEK	metiletilcetona
MeOH	metanol

Mp	3-metoxi-4,5-metilendioxibenceno
PAF	Factor activador de plaquetas
q	Cuarteto
Ram	ramnosa
RE-CLAE-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con detector de arreglo de diodos
t	Triplete
tol	tolueno
Tp	3,4,5-trimetoxibenceno
UV-vis	Ultravioleta – visible
Xil	xilosa
δ_c	Desplazamiento químico en RMN ^{13}C
δ_H	Desplazamiento químico en RMN ^1H

Introducción

En los últimos años, el campo de investigación en productos naturales ha visto un aumento en la producción científica debido a la diversidad de enfoques que existen, los cuales abarcan la fitoquímica, la quimiotaxonomía y la actividad biológica, entre otros, observándose que los metabolitos secundarios, aislados de especies vegetales han basado su uso teniendo en cuenta su actividad biológica. La familia Lauraceae, que posee una distribución mundial en zonas tropicales y subtropicales, es rica en metabolitos secundarios especialmente lignanos, neolignanos, alcaloides, terpenos y flavonoides, los cuales resultan importantes desde el punto de vista tanto quimiotaxonómico como de actividad biológica.

Uno de los géneros más abundantes de esta familia corresponde al género *Ocotea*, el cual resultó rico especialmente en neolignanos, alcaloides y terpenos. Los neolignanos presentes en las especies de este género se clasifican en dos clases dependiendo de su estructura, conocidas como de tipo burchellina o de tipo macrofilina; tres neolignanos de tipo macrofilina fueron aislados, por ejemplo, a partir de la *Ocotea bullata*, especie endémica africana, útil etnobotánicamente en el manejo de desórdenes urinarios, dolores de cabeza y de espalda, conocidos como ocobullenona, iso-ocobullenona y sybillenona, esta última demostró tener actividad antiinflamatoria frente a la 5-lipooxigenasa. (Drewes et al., 1995; Sehlapelo, Drewes, & Sandor, 1993; Zschocke et al., 2000) Otros neolignanos de este mismo tipo son los ocofiloles [A - C] aislados de *Ocotea macrophylla* los cuales exhibieron una actividad promisorio contra el factor activador de plaquetas (PAF). (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009c)

Los neolignanos de tipo burchellina presentan una amplia variedad estructural, ejemplo de esto fue el aislamiento de diez de ellos a partir de la corteza de *Ocotea catharinensis* (Ishige, Motidome, Yoshida, & Gottlieb, 1991) entre los que se cuentan las canellinas B - C; y a partir de hojas de *Ocotea aciphylla* (Romoff, Yoshida, & Gottlieb, 1984) de donde fueron aislados siete neolignanos entre ellos

las ferrearinas A y C. Estos compuestos han evidenciado además una importante actividad frente a procesos inflamatorios, específicamente contra el factor PAF, de forma similar a los compuestos de tipo burchellina, ejemplo de ello son la mirandina A, la (+)-denudatina B y la (+)-kadsurenona (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009 c) los cuales presentan un efecto inhibitorio importante frente a este factor plaquetario, incluso similar al patrón utilizado (Ginkgolido B).

Otro tipo de actividad que ha sido reportada corresponde al efecto que poseen este tipo de compuestos contra el trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* encontrándose que la burchellina, aislada de *Ocotea cymbarum*, y la licarina A, aislada de *Nectandra glabresens*, presentan un IC₅₀ de 520 µM y 960 µM respectivamente, inferiores al IC₅₀ de 1229 µM que presenta el medicamento de control conocido como benznidazol (Cabral et al., 2010).

Otro grupo de metabolitos importantes en el género *Ocotea* son los alcaloides, los cuales son generalmente de tipo apórfinico como el caso de la (+)-dicentrina, (+)-nantenina y la didehidroocteina aislados de *Ocotea macrophylla* (Coy-Barrera & Cuca-Suarez, 2009) .Así mismo trece alcaloides relacionados con los alcaloides aporfínicos fueron aislados de *Ocotea lancifolia* entre los que se cuentan la (-)-caaverina, (+)-domesticina y la (+)-nordomesticina los cuales presentaron valores de IC₁₀₀ en µg/mL de 10, 25 y 50 respectivamente frente a tres líneas de promastigotes de *Leishmania*, entre ellas la *L. donovani* considerándose promisorios. (Fournet et al., 2007)

Otro tipo importante de alcaloides presentes en especies del género *Ocotea* son los alcaloides bencilisoquinolínicos cuyos ejemplos más representativos corresponden a la coclaurina y la S-reticulina aisladas ambas de *Ocotea duckei*. La S-reticulina demostró tener actividad vasorelajante sobre anillos de aorta de ratón al parecer por influencia sobre los canales de Ca⁺² evitando contracciones. (Da Silva, Barbosa-Filho, Da Silva, De Lacerda, & Da-Cunha, 2002; Medeiros et al., 2009)

Los flavonoides por su parte, pese a ser considerados como marcadores quimiotaxonómicos de la familia (Gottlieb, 1972) y a estar presentes en diversos géneros como *Litsea*, *Laurus* y *Cinammomum*, no son comunes en este género, existiendo únicamente dos reportes en la literatura que indiquen la presencia de este tipo de compuestos en el género *Ocotea*.

A partir de los frutos de *Ocotea vellosiana*, (Garcez, Yoshida, & Gottlieb, 1995) se aislaron cuatro flavonoles glicosilados, la astragalina, la quercitrina, la hirsutrina y la afzelina así como tres derivados p-coumaroil de la afzelina. Así mismo a partir de las hojas de *Ocotea notata* fueron aislados diez compuestos de núcleo flavonoide, entre ellos se encuentran la isoquercitrina, la afzelina, la quercetina y el kaempferol. (Garrett et al., 2012)

En Colombia, el género *Ocotea* es el género más abundante de la familia Lauraceae ya que representa un 30.4% de las especies de esta familia según lo registrado por el Herbario Nacional Colombiano, encontrándose ampliamente distribuido en todo el territorio nacional. Una de las especies de este género, conocida como *Ocotea heterochroma*, considerada además endémica de los andes colombo-ecuatorianos, y que presenta un único estudio del extracto etanólico de sus frutos de donde fueron aislados dos lignanos, un triterpeno y un neolignano biciclo[3.2.1]octánico (Cuca-Suarez, Leon, & Coy-Barrera, 2009), fue tomada como especie objeto de estudio, considerándose el presente trabajo como el primer estudio fitoquímico de sus hojas.

Para el desarrollo del presente trabajo se planteó como objetivo general, contribuir al estudio químico de la familia Lauraceae mediante el análisis químico de las hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae), y para dar cumplimiento a este objetivo general, se contempló realizar el análisis fitoquímico preliminar y registrar el perfil cromatográfico de los extractos de hojas, corteza y madera, con el fin de seleccionar el extracto de trabajo, para el posterior aislamiento y elucidación

estructural de algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto seleccionado, para luego determinar la presencia de los metabolitos aislados en los extractos de corteza y madera.

1.Estado actual del tema

1.1 Generalidades de la familia Lauraceae

La familia Lauraceae consta de alrededor de 49 a 50 géneros distribuidos en alrededor de 2500 a 3500 especies, algunas de las cuales poseen una reconocida importancia desde el punto de vista económico como la *Persea americana* (Aguacate), *Laurus nobilis* (Laurel) y *Cinnamomum zeylanicum* (Canela de Ceilán) importantes en la industria alimenticia. (Marques, 2001)

Así mismo es representada por especies como la *Aniba rosaeodora* (palisandro de cayena) ampliamente utilizada en perfumería y en actividades de aromaterapia. (Herrera Valencia, Barbosa Sampaio, & Gomes De Souza, 2010)

En cuanto a su distribución geográfica se conoce que esta familia se encuentra presente en los trópicos de América, Asia y África siendo centros de alta densidad de especies las regiones de América del norte y del sur, el sudeste de Asia y Madagascar. Solo pocas especies se encuentran en zonas subtropicales y menos en las zonas templadas (ver Figura 1-1).

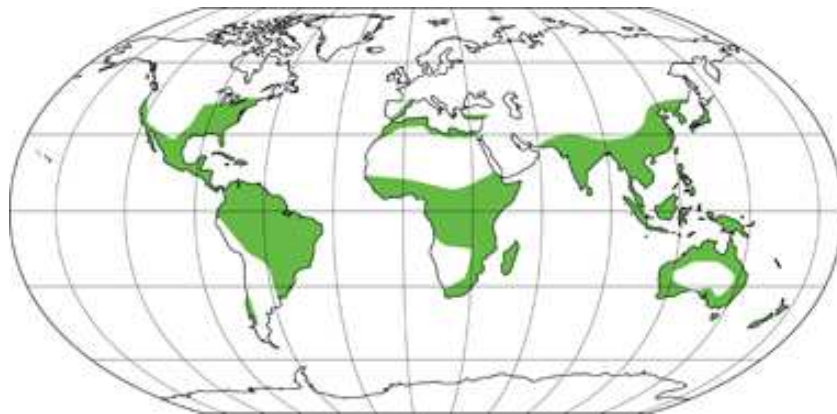


Figura 1-1. Distribución geográfica de la familia Lauraceae

Los géneros más importantes de la familia *Lauraceae* teniendo en cuenta la cantidad de especies reportadas son: *Litsea* (400), *Ocotea* (350), *Cinnamomum* (350), *Cryptocarya* (250) y *Persea* (200) (Laboratorio de sistematica de plantas vasculares).

En Colombia se encuentra distribuida en todo el territorio nacional según la información del Herbario Nacional Colombiano (Herbario Nacional Colombiano) siendo los generos mas reportados *Ocotea* (80), *Nectandra* (41), *Persea* (24), *Endlicheria* (24) y *Aniba* (20). Existen además especies endémicas colombianas como la *Ocotea caparrapi*. (Herbario Nacional Colombiano, 2014)

La familia Lauraceae posee gran cantidad de especies entre las cuales se presentan similitudes morfológicas que dificultan su clasificación taxonómica y han dado lugar a sinonimias taxonómicas, por los que los estudios filogenéticos se presentan como una opción para realizar una clasificación más acertada de las especies, en 2001 se realizó un estudio enmarcado en la filogenia que permitió dividir la familia en cuatro grandes clados denominados: *Perseeae-Laureae*, *Chlorocardium-Mezilaurus*, *Neocinnamomum-Cassytha-Caryodaphnopsis* y *Cryptocaryeae*.

El clado *Perseeae – Laureae* a su vez se divide en 4 grupos (ver Figura 1-2) siendo el grupo Complejo *Ocotea* el grupo al que pertenece la especie objeto de estudio (ver Tabla 1-1). (Chanderbali, van der Werff, & Renner, 2001)

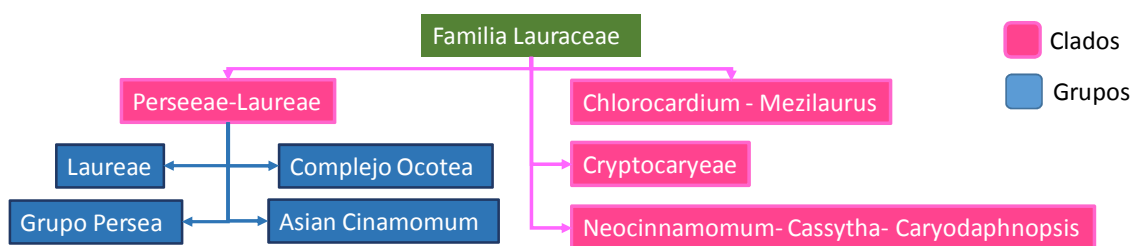


Figura 1-2. Clasificación filogenética de la familia Lauraceae

Complejo Ocotea			
<i>Pleurothyrium</i>	<i>Aniba</i>	<i>Endlicheria</i>	<i>Licaria</i>
<i>Nectandra</i>	<i>Aiouea</i>	Ocotea	<i>Umbellaria</i>
<i>Paraia</i>	<i>Kubitzkia</i>	<i>Rodostemonodaphne</i>	

Tabla 1-1. Géneros pertenecientes al Complejo *Ocotea*

1.2 Características morfológicas de la familia Lauraceae

En cuanto a su morfología, las especies pertenecientes a la familia Lauraceae se caracterizan por ser generalmente árboles o arbustos como la *Aniba perutilis* (Figura1-3(a)) a excepción de las especies del género *Cassytha* que son enredaderas como la *Cassytha ciliolata* (Figura1-3(b)). Estas especies son generalmente perennifolias, pueden ser escandentes o sufrutescentes, poseen una madera de naturaleza desde aromática hasta fétida, glabros o pubescentes como el tronco de *Beilshmedia miersii* (Figura1-3(c)). Se caracterizan por tener un alto contenido de aceite esencial principalmente en las hojas.



Figura 1-3. a) *Aniba perutilis*. B) *Cassytha ciliolata* c) *Beilshmedia miersii*

Las hojas son generalmente alternas u opuestas, más o menos translúcidas, simples y enteras como las de la *Nectandra coriacea* (Figura1-4 (a)) o las de *Cinnamomun zeylanicum* (Figura1-4 (b)) penninervadas o trinervadas, estípulas ausentes.

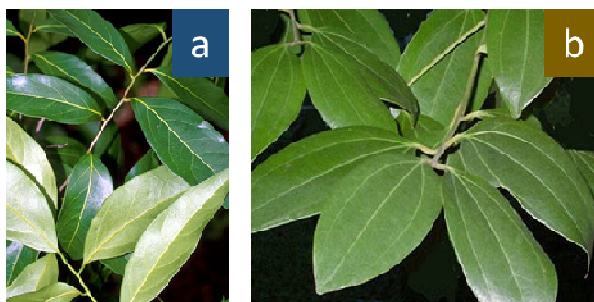


Figura 1-4. Hojas de *Nectandra coriacea* (a) y de *Cinnamomum zeylanicum* (b).

Las especies de esta familia presentan inflorescencias cimosas, paniculadas, capitadas, racemosas axilares o agrupadas en ramillas como las de la *Persea americana* (Figura 1-5 (a)). Las flores son actinomorfas, pequeñas, regulares, perfectas, amarillentas o verdosas, hermafroditas o unisexuales, no se presenta diferenciación entre cáliz y corola, tépalos en dos series, de ovario generalmente supero de ovulo único, como en la *Cinnamomum burmannii* (Figura 1-5 (b)) o la *Persea americana* (Figura 1-5 (c)).



Figura 1-5. Inflorescencias y flores de *Persea americana* (a) y (c) y flores de *Cinnamomum burmannii* (b).

En cuanto al fruto este se presenta generalmente como drupáceo, negro en la madurez y la parte carnosa es verde o amarillo pálido, cúpula (hipanto en el fruto) presente o ausente, como en *Ocotea insularis* (Figura 1-6 (a)) o en *Persea americana* (var. Hass) (Figura 1-6 (b)) en algunos casos como en el *Laurus nobilis* se presentan frutos en forma de baya (Figura 1-6 (c)). (van der Werff & Lorea-Hernández, 1997)



Figura 1-6. Frutos de en *Ocotea insularis* (a) de *Persea americana* (var. Hass) (b) y de *Laurus nobilis* (c).

1.3 Usos Etnobotánicos de la familia Lauraceae

La familia Lauraceae ha reportado una gran variedad de usos etnobotánicos provenientes de la medicina tradicional, en los que se involucra el uso de casi todos los organelos de las plantas, algunos ejemplos y la forma de utilización del material vegetal se presentan en la Tabla 1-2:

Especie	Forma de aplicación	Efecto
<i>Beilshmedia anacardioides</i> (Chouna et al., 2010)	<i>Infusión de la corteza</i>	Curar tumores uterinos, la rubeola, las infecciones genitales femeninas y reumatismos. (Camerun)
<i>Cassytha filiformis</i> (Wu, Chao, Chang, & Chen, 1997)	Infusión	Útil para tratar la gonorrea, desordenes del riñón y como diurético.
Especies del genero <i>Lindera</i> (Zhao, Zhao, & Wang, 2006)	Infusión	Usadas en la medicina tradicional china en el tratamiento de reumas, indigestión, gastroenteritis, diarrea, artritis y urticaria.
<i>Litsea pungens</i> (Jiang, Akhtar, Bradbury, Zhang, & Isman, 2009)	Medicina tradicional China	Contra gripa, dolor de estómago y otras dolencias
<i>Nectandra cuspidata</i> (Valadeau et al., 2009)	Corteza hervida	Dolor de estómago y diarrea
<i>Persea peruviana</i> (Cabral et al., 2010)	Corteza en polvo en forma de yeso	Huesos rotos
Especies del genero <i>Cinnamomum</i> (Benarroz et al., 2008)	Infusión o como condimento	Control de problemas gastrointestinales y pérdida del apetito, útil también como vasodilatador y antimicrobiano

Tabla 1-2. Usos etnobotánicos de la familia Lauraceae.

Especie	Forma de aplicación	Efecto
<i>Actinodaphne lancifolia</i> (M. R. Kim et al., 2002)	Infusión de la raíz	Tratamiento de enfermedades estomacales, artritis, cansancio excesivo y edemas.
<i>Cinnamomum camphora</i> (Hu et al., 2011)	Infusión de hojas	Tratamiento de la inflamación relacionada a diferentes enfermedades como el reumatismo, esguinces bronquitis y dolores musculares.
<i>Laurus nobilis</i> (De Marino et al., 2004)	Infusión de hojas y de frutos	Útil para tratar el reumatismo como carminativo, diaforético y antiséptico.
<i>Litsea glutinosa</i> (Pradeepa et al., 2011)	Infusión de corteza	Útil como emoliente en procesos inflamatorios contra la diarrea y la disentería, facilita el proceso de curación de heridas
	Pasta de hoja	Útil en enfermedades respiratorias y tos y como emoliente.
<i>Persea americana</i> (Adeyemi, Okpo, & Ogunti, 2002)	Infusión o consumo de la parte carnosa	Tratamiento de diversas enfermedades: menorragia hipertensión, dolor de estómago bronquitis, diarrea y diabetes. También para controlar la fiebre
<i>Lindera strychnifolia</i> (Q. Liu et al., 2013)	Infusión de raíz	Útil en deficiencias renales tales como polaquiuria
	Extracto de raíz y hojas.	Efecto antioxidante y antidiabético

Continuación Tabla 1-2. Usos etnobotánicos de la familia Lauraceae.

1.4 Estudios químicos y de actividad biológica de la familia Lauraceae.

La familia Lauraceae ha sido objeto de gran cantidad de estudios químicos y de actividad biológica. Esto es debido a la diversidad de metabolitos aislados de las especies de esta familia así como a su distribución a nivel mundial. Dentro de los metabolitos aislados se encuentran principalmente lignanos, neolignanos, flavonoides, alcaloides y terpenos obtenidos a partir de los diferentes organelos vegetales. En la mayoría de los casos el aislamiento de los metabolitos mencionados va acompañado de la evaluación de su actividad biológica en

función de su estructura. A continuación se describirán los núcleos más representativos de metabolitos aislados de especies de la familia Lauraceae.

1.4.1 Lignanós

Este tipo de compuestos han sido aislados en diferentes géneros como *Actinodaphne*, *Nectandra* y *Litsea*. A partir del extracto de tallos de la especie *Actinodaphne lancifolia* se aislaron 3 lignanos, 2 de núcleo furofuránico y uno de tipo ariltetralina conocidos como (±)-syringaresinol **(1)**, (±)-4'-O-metilmagnolina **(2)** y lyoniresinol **(3)** (M. R. Kim et al., 2002). El lignano (±)-syringaresinol ha sido aislado de diversos géneros dentro de la familia como *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Ocotea*, *Neolitsea* y *Lindera*. (Chang, Chao, Teng, & Wu, 1998)

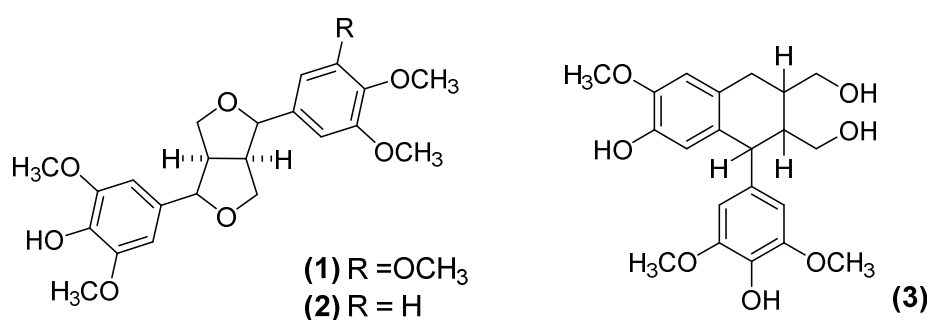


Figura 1-7. Lignanós aislados de tallos de *Actinodaphne lancifolia*

De la especie *Lindera obtusiloba* fueron aislados 5 lignanos entre ellos la actifolina **(4)** y la 5,6-dihidroximatairesinol **(5)** los cuales fueron evaluados como agentes citotóxicos frente a 5 líneas celulares siendo el 5,6-dihidroximatairesinol el más activo frente a SK-MEL 2 con un ED₅₀ = 3.4 µg / mL. XXXX

Dentro de las especies del género *Nectandra*, en el extracto de inflorescencias de *N. amazonum* se encontraron 2 lignanos del tipo furofuránico como la sesamina **(4)** y el o-metilpiperitol **(5)**. (Barbosa-Filho, Yoshida, & Gottlieb, 1989)

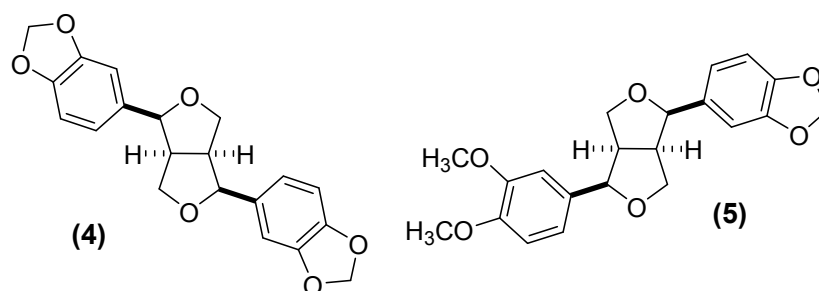
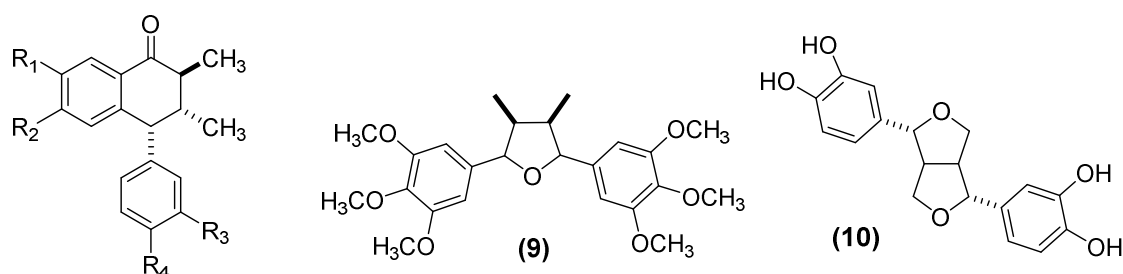


Figura 1-8. Lignanos aislados de tallos de especies de *Nectandra*

En la especie *Litsea chinpingunesis* a partir del extracto etanólico de sus hojas se encontraron 3 derivados de la ariltetralona, la (-)-aristoligona **(6)**, la (-)-aristotetralona **(7)** y la (-)-cagayanona **(8)** este tipo de lignanos han sido aislados en una especie de la familia Myristicaceae, familia relacionada con la familia Lauraceae, conocida como *Virola sebifera* lo cual indica su relación quimiotaxonomica. (Yang et al., 2009) De la especie *Litsea grandis* fueron aislados dos lignanos uno furánico, como la grandisina **(9)** y otro furofuránico, como la eudesmina **(10)**. (Holloway & Scheinmann, 1974)



(6) $R_1=R_2=OCH_3$ $R_3=R_4=H$

(7) $R_1=R_2=OCH_3$ $R_3, R_4=OCH_2O$

(8) $R_1, R_2=OCH_2O$ $R_3, R_4=OCH_2O$

Figura 1-9. Lignanos de especies de *Litsea*

1.4.2 Neolignanos

Los neolignanos resultan ser más comunes en especies de la familia Lauraceae que los lignanos, lo que les otorga importancia quimiotaxonómica. Los metabolitos aislados dentro de este grupo se pueden clasificar en dos subgrupos según su

esqueleto básico: macrofilina y burchellina. (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009c)

Como ejemplo de los neolignanós del primer subgrupo se encuentran los metabolitos aislados a partir del extracto en hexano de la madera de *Licaria brasiliensis*, 4 de ellos conocidos [e. g. **(11)**], así como 6 neolignanós más relacionados estructuralmente [e. g. **(12-13)**] de estructura novedosa, cuya nomenclatura sigue las normas de la IUPAC, e.g. **(12)**: rel-(7S,8R,1'S,4'S,5'R)-4'-hidroxi-3,4,5,3',5'-pentametoxi-6'-oxo- Δ -1,3,5,2',8'-8.1',7.5'-neolignanó. (Guilhon, Conserva, Maia, Yoshida, & Gottlieb, 1992)

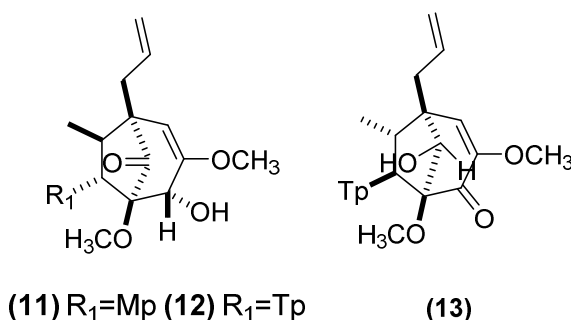


Figura 1-10. Neolignanós de *Licaria brasiliensis*

Dentro de este mismo grupo de neolignanós se encuentran los aislados a partir del extracto en benceno de la madera de la especie *Aniba simulans* e.g. **(14 – 15)**. (De Alvarenga, Castro C., Giesbrecht, & Gottlieb, 1977)

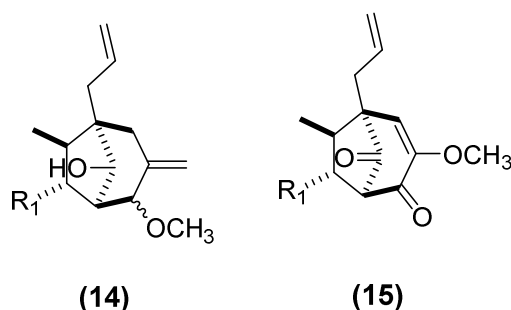


Figura 1-11. Neolignanós de *Aniba simulans*

Dentro de los neolignanós del segundo subgrupo, es decir burchellina se encuentran los neolignanós aislados de *Nectandra miranda* como la mirandina A **(16)** y B **(17)** y la licarina C **(18)**, (C. Aiba, Gottlieb, Pagliosa, Yoshida, & Magalhaes, 1977) así mismo del extracto etanólico de frutos de *N. glabrescens* se aislaron dos neolignanós relacionados con este subgrupo conocidos como licarina A **(19)** y E. Algunos de estos compuestos fueron evaluados por su posible actividad antiinflamatoria encontrándose que solo la mirandina A resulta promisoría por comparación de su IC₅₀ (μM), necesario para la inhibición de las enzimas COX-1, COX-2 y LOX-5, con valores de 77.9, 126 y 13.9 μM respectivamente utilizando como patrón Celecoxib de IC₅₀ de 8.32, 0.113 y 0.62 μM. (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009c)

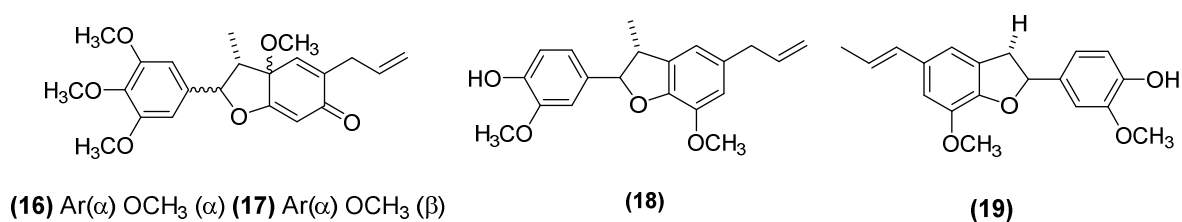


Figura 1-12. Neolignanós aislados de *Nectandra miranda* y *Nectandra glabrescens*

No obstante, se han reportado compuestos con estructura relacionada a los neolignanós del segundo subgrupo tales como aquellos aislados de *Aniba lancifolia* como la lancilina **(20)** y las lancifolinas A **(21)** y B **(22)**. (Diaz D, Massayoshi, & Gottlieb, 1980)

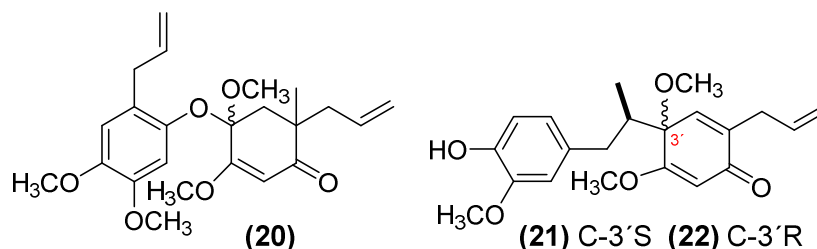
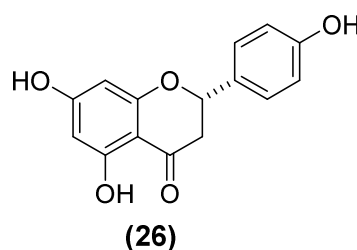
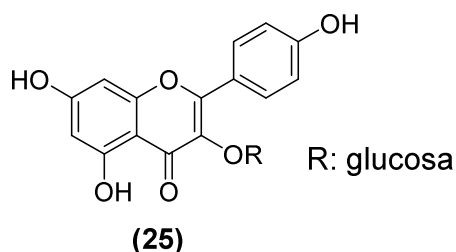
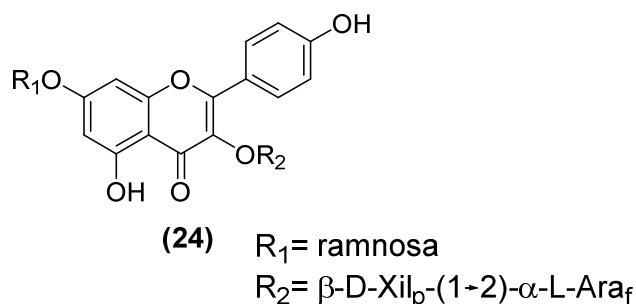
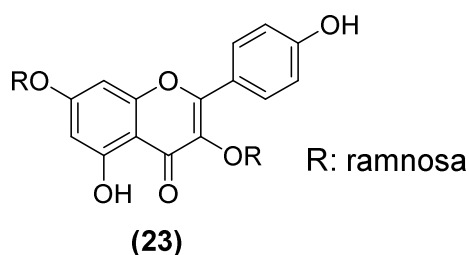


Figura 1-13. Neolignanós aislados de *Aniba lancifolia*.

1.4.3 Flavonoides

Los flavonoides han sido aislados de diferentes especies dentro de la familia Lauraceae, encontrándose más comúnmente flavonoles glicosilados, flavanonas y chalconas. A partir de hojas de *Cinnamomum osmophloeum* fueron aislados nueve glicosidos del kaempferol, tres de ellos derivados de la kaempferitrina **(23)** y dos estructuras diglicosiladas e.g. el kaempferol-3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinofuranosil-7-O- α -L-ramnopiranosido **(24)**, de los cuales solo el kaempferol 7-O- α -L-ramnopiranosido presentó actividad antiinflamatoria frente al lipopolisacrido inductor de óxido nítrico con un IC₅₀ de 42 μ M en comparación con la quercetina utilizado como compuesto patrón que presenta un IC₅₀ de 7.4 μ M, los demás compuestos no presentaron actividad (Fang, Rao, & Tzeng, 2005). De la especie *Litsea fruticosa* fueron aislados ocho flavonoides entre ellos la astragalina **(25)**, la pinocembrina **(26)** y el kaempferol 3,4-di-O-L-ramnopiranosido **(27)** (R. Liu et al., 2013). A partir de hojas de la especie *Laurus nobilis* fueron aislados 4 derivados p-coumaroil de la afzelina e.g. kaempferol-3--(2",4"-di-Z-p-coumaroil)-ramnósido **(28)**. (Fiorini, David, Fourasté, & Vercauteren, 1998)



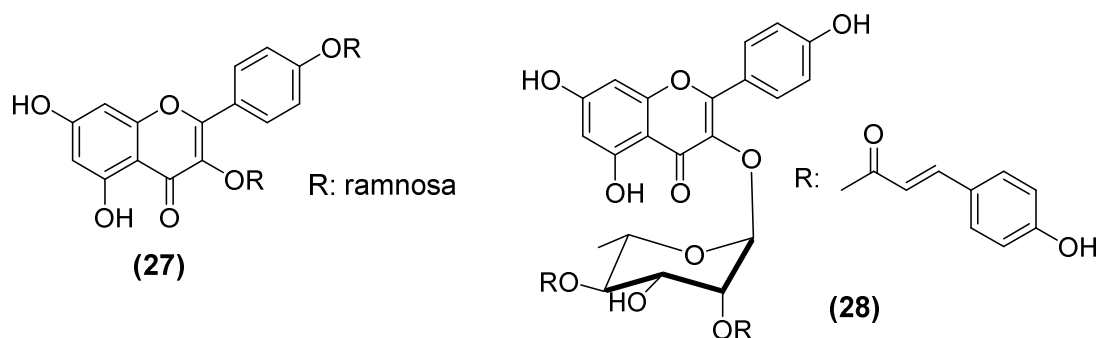


Figura 1-14. Flavonoles glicosilados aislados de especies de la familia Lauraceae

En especies del género *Cryptocarya* también han sido aislados compuestos de núcleo flavonoide pero de tipo chalcona como la chalcocarianona C (29) o de tipo flavanona como las criptogionas A (30) y B (31) aisladas a partir de la *Cryptocarya chingii*. Así mismo y de tipos similares, han sido aisladas la cryptocariona A (32), la cryptocarianona (33) y la bicarianona B (34) a partir del extracto de corteza de *Cryptocarya infectoria*. (Feng et al., 2012) (Dumontet et al., 2001)

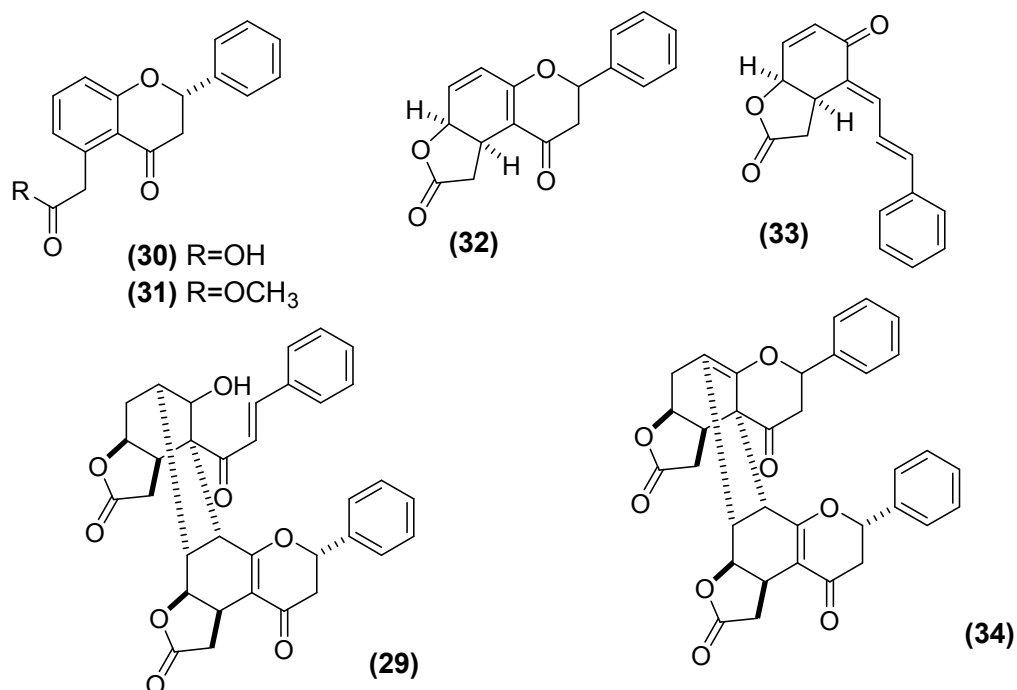


Figura 1-15. Flavanonas y chalconas aisladas de especies de la familia Lauraceae

1.4.4 Alcaloides

1.4.4.1 Alcaloides bencilisoquinolicos:

Actualmente se ha demostrado que este tipo de alcaloides están presentes en los géneros *Cryptocarya* y *Ocotea* siendo más comunes en este último. En la especie *Cryptocarya chinensis* fue aislada de la fracción alcaloidal no fenólica de las hojas la (+)-romneina (**35**): (Lee & Chen, 1993)

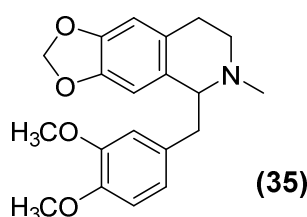


Figura 1-16. Alcaloide aislado de *Cryptocarya chinensis*.

1.4.4.2 Alcaloides aporfinicos:

Estos alcaloides se encuentran ampliamente reportados en especies de la familia, se encuentran presentes en los géneros *Alseodaphne*, *Cassytha*, *Lindera*, *Litsea* y *Actinodaphne* y se han aislado de extractos de diferentes organelos de la planta. Algunos de estos alcaloides fueron aislados de más de una especie como se relaciona en la Tabla 1-3: (Nafiah et al., 2011; Tewari, Bhakuni, & Dhar, 1972; Uprety, Bhakuni, & Dhar, 1972; Wu et al., 1997)

Alcaloide	Especies reportadas	
boldina (36)	<i>Litsea glutenosa</i>	<i>Litsea wightiana</i>
	<i>Lindera strychnifolia</i>	
norboldina (37)	<i>Litsea glutenosa</i>	<i>Litsea wightiana</i>
	<i>Alseodaphne perakensis</i>	
laurotetanina (38)	<i>Litsea glutenosa</i>	<i>Litsea sebifera</i>
	<i>Actinodaphne obovata</i>	
catafilina (39), cataformina (40) y cassitina (41)	<i>Cassytha filiformis</i>	

Tabla 1-3. Alcaloides aporfinicos en especies de la familia Lauraceae

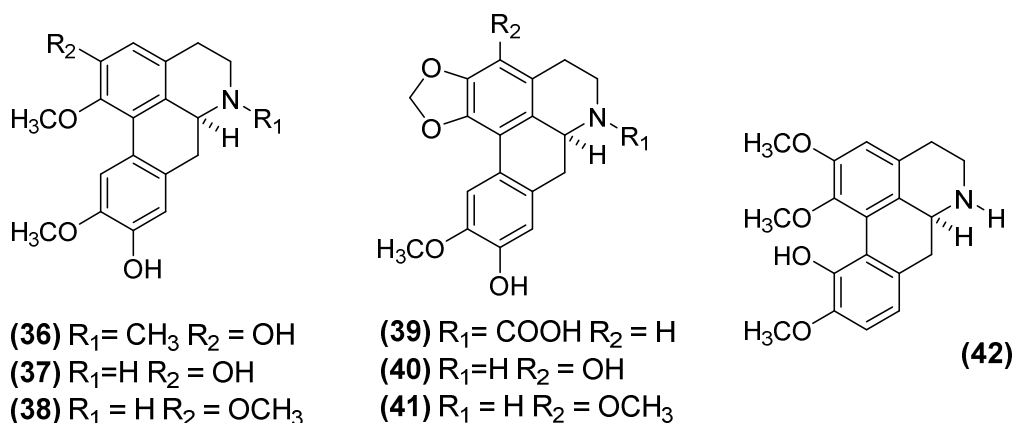


Figura 1-17. Alcaloides aporfinicos aislados de especies de la familia Lauraceae

Algunos de estos alcaloides fueron aislados también de extracto etanólico de raíz de *Lindera angustifolia*, y evaluados como posibles agentes antinociceptivos, (modulación en la respuesta al dolor) encontrándose que la boldina, la norboldina y la laurotetanina presentan una actividad promisor, en términos de porcentaje de inhibición con un 76.3%, 74,6% y 62,3 % respectivamente, para este ensayo se determinó que el compuesto más activo correspondía con el alcaloide norisocodina (**42**) con un 83.5 % de inhibición y se propone que dicha actividad está relacionada con la posición de la sustitución por grupos hidroxilo sobre los anillos del núcleo apórfnico. (Zhao et al., 2006)

1.4.5 Terpenos:

Dentro de este grupo de compuestos han sido reportados del tipo diterpeno, como los presentes en la *Persea indica*, el garajoneno (**43**) y el anhidrocinnzeylanina (**44**) la cual presenta actividad antialimentaria frente a *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata* descrita como dosis efectiva EC_{50} de 0.22 y 2.29 nmol/cm^2 respectivamente. (Fraga, Terrero, Gutiérrez, & González-Coloma, 2001)

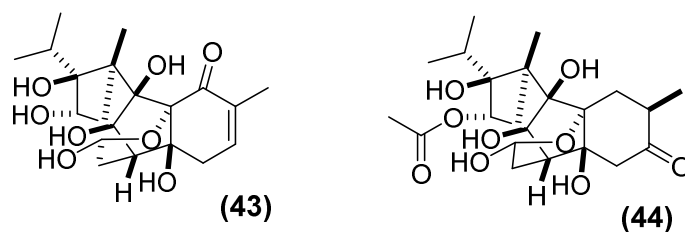


Figura 1-18. Diterpenos aislados de *Persea indica*.

En la *Persea japónica*, un árbol siempre verde común en Taiwán, Corea y Japón fue aislado un sesquiterpenoide novedoso, machikusanol (45) así como el γ -eudesmol (46) y el γ -selineno (47) entre otros. (Wang, Kuoh, & Wu, 1996)

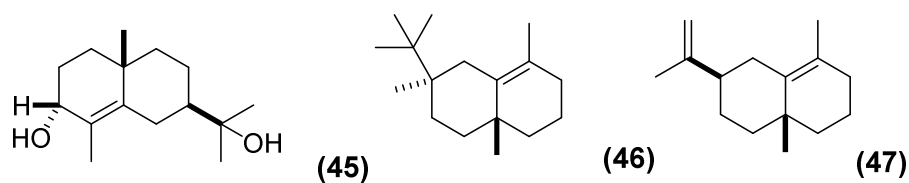


Figura 1-19. Sesquiterpenos aislados de *Persea japonica*

1.5 Generalidades del género *Ocotea*.

Uno de los géneros más importantes dentro de la familia Lauraceae, corresponde al género *Ocotea* que cuenta con alrededor de 350 especies ubicadas principalmente en América del sur y Centroamérica, en África principalmente en Madagascar y con algunos reportes de su presencia en el continente europeo como se observa en la Figura 1-20.

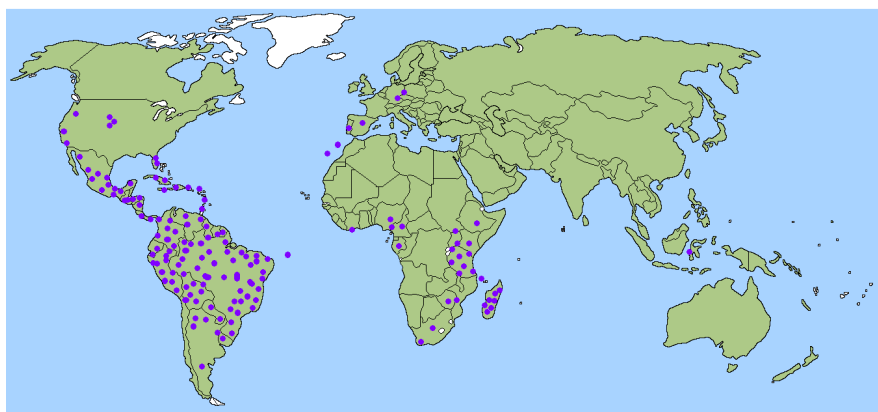


Figura 1-20. Distribución geográfica del género *Ocotea*.

Este género cuenta con alrededor de 200 especies, algunas de ellas son *O. amazónica*, *bofo*, *bernoulliana*, *chiapensis*, *cernua*, *cymbarum*, *elegans*, *glauca*, ***heterochroma***, *insularis*, *longifolia*, *macrophylla*, *odorata*, *puberula*, *serícea*, *tenera*, *tomentosa*, *veraguensis*, *venosa* y *zoque*. (Royal Botanic Gardens & Kew and Missouri Botanical Garden, 2013) En Colombia las especies de este género representan aproximadamente el 30 % del total de la familia, con una distribución en todo el territorio nacional con un total de 80 reportes en el Herbario Nacional Colombiano. (Herbario Nacional Colombiano, 2014)

1.6 Características morfológicas del género *Ocotea*

El género *Ocotea* se presenta en forma de árboles o arbustos como se observa en *O. foetens* (Figura 1-21(a)) o en *O. bullata* (b)).



Figura 1-21. Hábitat del (a) *O. foetens* y (b) *O. bullata*

Por lo general su morfología foliar corresponde a hojas alternas como en la *O. cernua* (Figura 1-22(a)) y rara vez subopuestas pinnanervias generalmente lanceoladas como en la *O. aciphylla* (b), inflorescencias paniculadas como en la *O. insularis* (c) o en la *O. aciphylla* (d). De flores poligamodioicas o bisexuales como se observa en la *O. foetens* (e), posee 6 tépalos en el cáliz, 9 estambres fértiles. El ovario se encuentra dentro del tubo del cáliz y posee un estigma capitado.

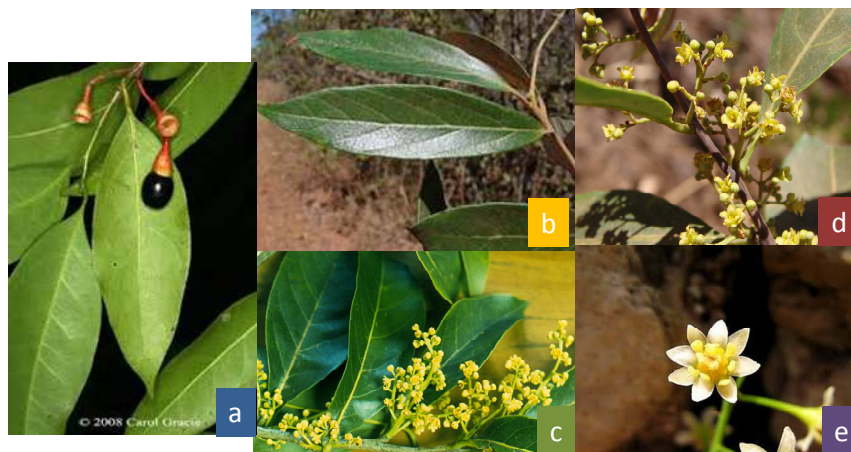


Figura 1-22. Hojas de (a) *O. cernua* y (b) *O. aciphylla*, inflorescencias de (c) *O. insularis* y (d) *O. aciphylla* y flores de (e) *O. foetens*.

El fruto es una baya globosa de cúpula carnosidad en algunos casos endurecida como en la *O. tenera* (ver Figura 1-23 (a)), la *O. benthaminana* (b) y la *O. puberula* (c). (van der Werff & Lorea-Hernández, 1997)



Figura 1-23. Frutos de (a) *O. tenera*, (b) *O. benthamiana* y (c) *O. puberula*.

1.7 Usos etnobotánicos del género *Ocotea*

Este género cuenta con un buen número de usos a nivel etnobotánico desde la medicina tradicional, especies maderables y de carácter ornamental como se observa en la Tabla 1-4:

Especie	Forma de aplicación	Efecto
<i>O. lancifolia</i> (Fournet et al., 2007)	Decocción de las hojas	Antiparasitario
<i>O. bullata</i> (Zschocke et al., 2000)	Infusión de la corteza (utilizado por los Zulu)	Control del dolor de cabeza, y dolores estomacales así como desordenes urinarios
<i>O. caparrapi</i> (Garcia Barriga, 1992)	Aceite extraído directamente de la corteza.	Efectivo contra el hormiguillo en caballos, picaduras de insectos y contra enfermedades como gonorrea, lepra, ulcera y cáncer.
<i>O. veraguensis</i> (Balick, Atha, Canham, & Romero, 2002)	Extracto obtenido en copas talladas de la madera de la especie	Febrífugo
género <i>Ocotea</i> (Brasil) (Morais, Barbosa-Filho, & Almeida, 1998)	Infusión	Dolores, neuralgias, anorexia y dispepsia
<i>O. quixos</i> (Cardenas & Salinas, 2006)	Maderable para tratamiento de la artritis, los resfriados severos y la hidropesía	
<i>O. odorifera</i> (Yamaguchi et al., 2011)		Tratamiento de dermatosis
<i>O. foetens</i> (Lopez & Valera, 1995)		Ebanistería y carpintería

Tabla 1-4. Usos etnobotánicos de especies del género *Ocotea*

Espece	Forma de aplicaci3n	Efecto
<i>O. usambarensis</i> (worldagroforestry, 2009)	Pasta de corteza o raíz	Inflamaciones de garganta
	Interior de la corteza mezclada con caldo de carne	Manejo de abscesos, tos ferina y sarampi3n
	Jugo de raíz	Tratamiento de malaria y dolores de espalda

Continuaci3n de Tabla 1-4. Usos etnobot3nicos de especies del genero *Ocotea*

1.8 Estudios químicos y de actividad biológica del genero *Ocotea*

El género *Ocotea* presenta una gran variedad de metabolitos secundarios reportados pero existen algunos que resultan relevantes a nivel quimiotaxonomico ya que son comunes a muchas de las especies previamente estudiadas a nivel fitoquimico. Dentro de ellos se encuentran lignanos, neolignanos alcaloides bencilisoquinolonicos y aporfínicos, los cuales adem3s muestran una variedad de actividades biológicas.

Los compuestos m3s relevantes de cada uno de los grupos de metabolitos y en algunos casos su posible actividad biológica se describen a continuaci3n.

1.8.1 Lignanos

Estos compuestos han sido aislados en varias especies del género. En *O. duckei* de donde se aisl3 la yangambina (**48**) (Monte Neto et al., 2011) un lignano con una variedad de propiedades farmacológicas entre las que se cuentan antagonismo contra el factor activador de plaquetas PAF, protector cardiovascular y efectos analgésicos y que seg3n el test de Ames adem3s no tiene efectos mutagénicos. (Pereira Marques, Batistuzzo De Medeiros, Da Silva Dias, Barbosa-Filho, & Agnez-Lima, 2003). En *O. foetens* se aisl3 un lignano furánico cuya nomenclatura IUPAC es: 2-(2',5 '-dimetoxifenil) - 3 ,4 -dimetil- 5 - (3", 4", 5" -trimetoxifenil) – tetrahidrofurano (**49**). (Lopez & Valera, 1995)

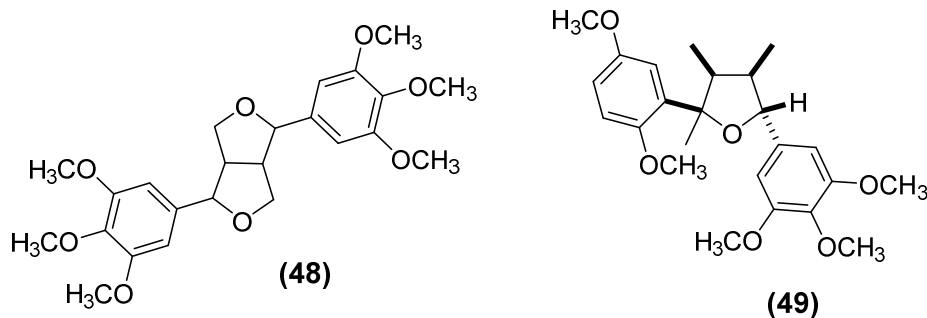


Figura 1-24. Lignanos aislados de *O. duckei* y *O. foetens*

1.8.2 Neolignanos

Estos metabolitos son considerados de gran importancia quimiotaxonómica por que han sido encontrados en gran número de especies y, al igual que las especies de la familia, también son abundantes los neolignanos tanto del subgrupo de la burchellina como de la macrofilina. Del subgrupo burchellina como en *O. cymbarum* de donde se aisló la burchellina misma, para la cual se demostró que tiene actividad importante contra la enfermedad de Chagas como ya se había mencionado¹ (50) (Cabral et al., 2010). A partir de la corteza de *O. porosa* fue aislado un neolignano conocido como porosina (51) (C. J. Aiba, Filho, & Gottlieb, 1973) y a partir de madera de *O. catharinensis* fueron aislados 10 neolignanos de tipo burchellina entre ellos e.g. (7R,8S,1'S)- $\Delta^{2,5,8}$ -3',5'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxi-4'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignano (52) y (7S,8S)- $\Delta^{1,3,5,8}$ -3',5'-metoxi-3,4-metilenodioxi-8.1',7.O.6',4'.O.7'-neolignano (53) (Ishige et al., 1991). Dentro de los neolignanos del tipo macrofilina se encuentran ejemplos como a los aislados a partir de *O. bullata* que corresponde con dos isómeros la ocobullenona (54) y la isoocobullenona (55) los cuales difieren en la posición del metilo en el carbono 7 (Drewes et al., 1995) y de la *O. macrophylla* se aislaron neolignanos biciclo[3.2.1]octánicos de nombres ocofilol A (56), ocofilol B (57) y ocofilol C (58) entre otros, los cuales presentaron una actividad promisoriosa frente al factor activador de plaquetas PAF teniendo en cuenta su valor de IC₅₀ (μ M) de 3.1, 3.0 y 2.3 respectivamente los cuales son cercanos al compuesto control utilizado

¹ Ver página 2

(Ginkgólido B) cuyo IC_{50} es de $0.93 \mu M$. (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009b).

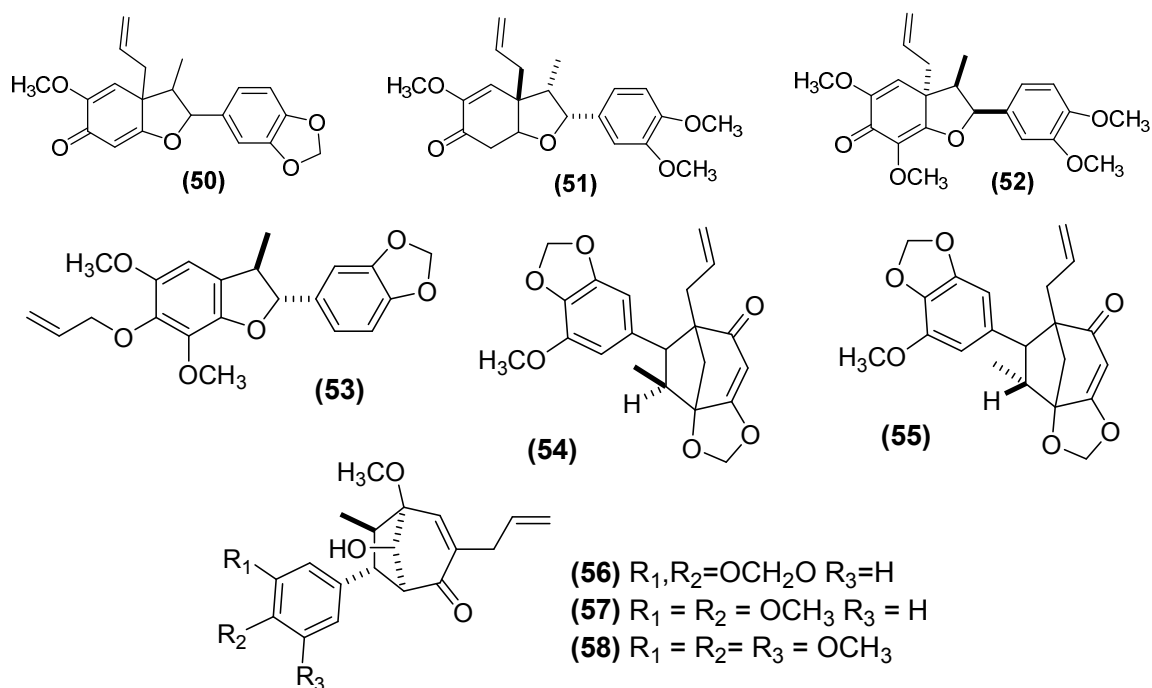


Figura 1-25. Neolignanos aislados de especies del genero *Ocotea*

1.8.3 Flavonoides

Los flavonoides no son considerados como compuestos comunes en las especies del genero *Ocotea* reportándose únicamente en frutos de *O. vellosiana* de donde fueron aislados 4 flavonoides glicosidados tales como la astragalina (59), la afzelina (60), la quercitrina (61) y la hirsutrina (62) y 3 derivados p-coumaroil de la afzelina (63-65). (Garcez et al., 1995)

Así mismo, a partir de hojas de *O. notata* fueron aislados seis compuestos mayoritarios entre ellos isoquercitrina (66) reynoutrina (67) miquelianina (68) quecitrina (61) y afzelina (60) junto con 4 compuestos minoritarios catequina (69), epicatequina (70), quercetina (71) y kaempferol (72). (Garrett et al., 2012)

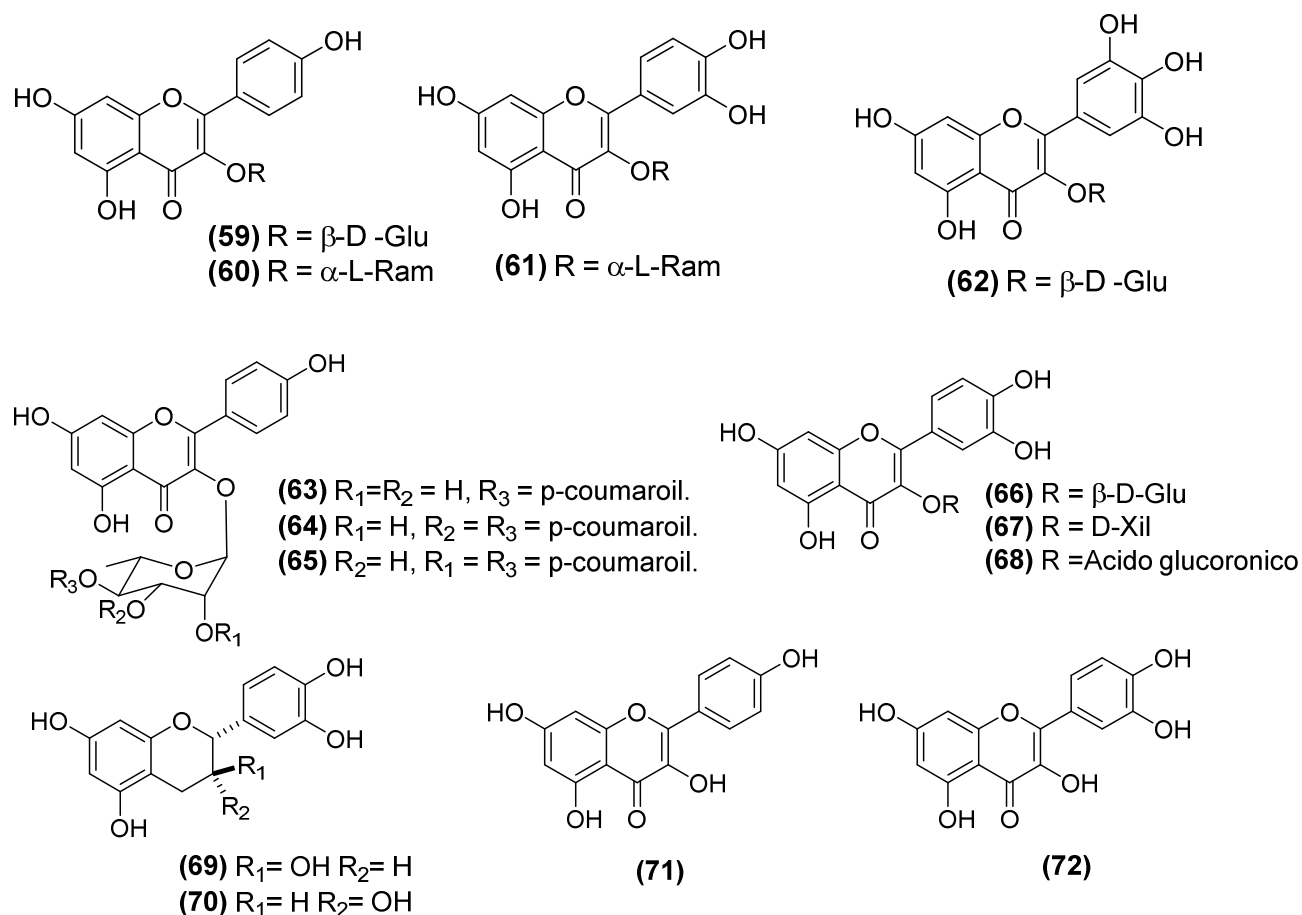


Figura 1-26. Flavonoides aislados de especies del genero *Ocotea*

1.8.4 Alcaloides

Los alcaloides son importantes marcadores quimiotaxonómicos tanto de la familia Lauraceae como del genero *Ocotea* habiendo sido aislados de varias especies, siendo los alcaloides bencilisoquinolínicos y aporfínicos los más representativos.

1.8.4.1 Alcaloides bencilisoquinolínicos

Este tipo de compuestos han sido aislados en los extractos de hojas de *O. duckei*, como la coclaurina (73) siendo el primer y único reporte de aislamiento de este compuesto en el género *Ocotea* (Da Silva et al., 2002) y tanto en *O. duckei* como en *O. vellosiana* se encuentra la reticulina (74) (Garcez et al., 1995). La reticulina demostró en pruebas sobre ratones y ratas un potente efecto sobre el sistema nervioso central, modificando los patrones de comportamiento y reduciendo la

coordinación motora (Morais et al., 1998) y como ya se había mencionado posee actividad vasorelajante².

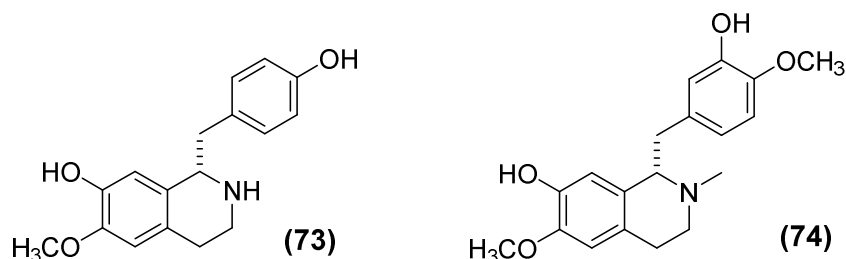


Figura 1-27. Alcaloides bencilisoquinolinicos aislados especies del genero *Ocotea*

1.8.4.2 Alcaloides aporfinicos

Este tipo de compuestos han sido aislados por ejemplo en la *O. macrophylla*. A partir de esta especie han sido aislados varios de estos compuestos como lo son la (+)- nantenina (**75**), la (+) dicentrina (**76**) y la didehidrocoteina. (**77**) (Coy-Barrera & Cuca-Suarez, 2009). A partir de los diferentes organelos hojas, madera, corteza y frutos de *O. vellosiana* se aislaron 12 alcaloides aporfinicos algunos de ellos son la (+)-dicentrina (**76**), la nordicentrina (**78**), la ocoteina (**79**) y la ocopodina (**80**) (Garcez et al., 1995). La (+)-dicentrina ha demostrado tener no solo actividad citotóxica, sino una importante influencia frente al EGFR (Epidermal growth factor receptor) importante factor en la biología del cáncer, dando lugar a rupturas del DNA de la célula infecciosa lo que produce una detención del ciclo celular, se observó además una selectividad hacia ciertas líneas celulares. (Konkimalla & Efferth, 2010)

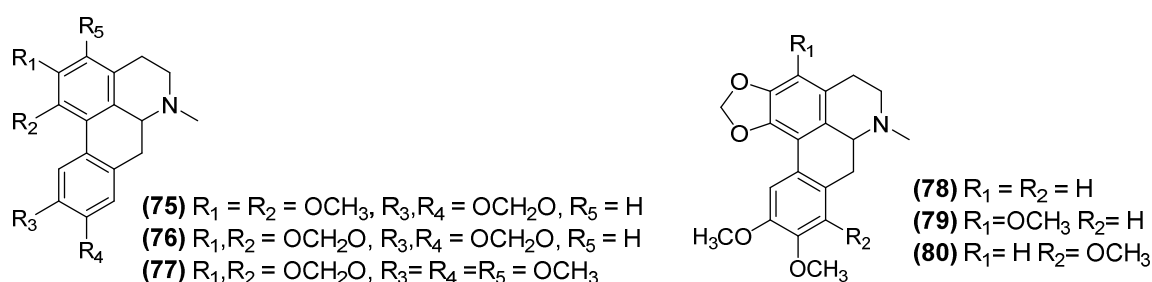


Figura 1-28. Alcaloides aporfinicos aislados especies del genero *Ocotea*

² Ver página 2

1.8.5 Terpenos

Este tipo de compuestos son comunes a los aceites esenciales obtenidos de las especies del género pero también han sido aislados de fracciones apolares de una especie del género que resulta importante actualmente desde el punto de vista de actividad biológica, como lo es la *O. caparrapi*, cuyo aceite obtenido por incisión de la corteza está compuesto en un 70% por el sesquiterpeno nerolidol (**81**), este aceite ha demostrado ser citotóxico contra líneas celulares de leucemia. Otros compuestos presentes en este aceite son el sesquiterpeno caparratrieno (**82**) y los sesquiterpenos oxigenados como el óxido de caparrapi, el caparrapidiol y caparrapitol. (Palomino, Maldonado, Kempff, & Ksebati, 1996)

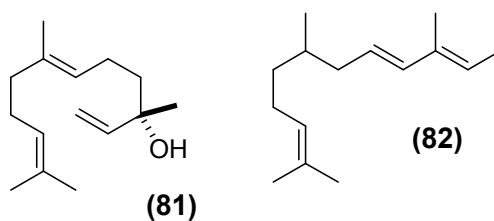


Figura 1-29. Terpenos aislados de *Ocotea caparrapi*

2. Metodología

2.1 Recolección y clasificación del material vegetal

La especie objeto de estudio fue recolectada por parte del Grupo de Investigación de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá en la vía Cota – Tabio. Una muestra fue enviada al Herbario Nacional Colombiano donde el biólogo Adolfo Jara la determino como *Ocotea heterochroma*. Una muestra de la especie reposa bajo el número **COL 563467**.

2.2 Preparación de extractos etanólicos

Los extractos crudos se prepararon a partir de 2140 g de hojas secas por percolación y a partir de 3111 g corteza y 2720 g de madera secas por maceración, utilizando etanol al 95% como solvente de extracción. Los extractos etanólicos totales obtenidos de cada uno de los organelos de la especie objeto de estudio fueron denominados **Ohc H** (Hojas) (100 g), **Ohc C** (Corteza) (140 g) y **Ohc M** (Madera) (210 g) respectivamente.

2.3 Análisis fitoquímico preliminar

Con los extractos etanólicos totales, obtenidos previamente, se realizó un análisis fitoquímico preliminar, teniendo en cuenta el protocolo establecido por Bilbao Rodríguez. Este análisis corresponde a pruebas cualitativas, generalmente de coloración o precipitación que tienen como finalidad inferir la posible presencia de ciertos núcleos propios de metabolitos de origen natural. (Bilbao Rodríguez, 1997)

2.4 Técnicas cromatográficas convencionales

Dentro de las técnicas cromatográficas convencionales utilizadas se encuentran la cromatografía en capa delgada (CCD), para lo cual se utilizaron cromatofolios de silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) utilizado como fases móviles mezclas de solventes como éter de petróleo (EDP), n-hexano (Hex), n-heptano (Hept), tolueno (Tol), acetato

de etilo (AcOEt), acetato de isopropilo (AcOiPr), acetona (Me₂CO), metiletilcetona (MEK), metanol (MeOH) y ácido fórmico (HCOOH). Las placas fueron reveladas utilizando luz UV a 254 y 365 nm, vapores de I₂ y revelador de Hannessian (disolución acuosa de molibdato amónico, sulfato de cerio y H₂SO₄). Para la cromatografía en columna (CC) se utilizó sílica gel 60 (0.063-0.200 mm) (Merck). Para la cromatografía flash (CF) se usó sílica gel 60 (0.04 – 0.063 mm) (Merck). Para la cromatografía líquida al vacío (CLV) se empleó sílica gel 60 HF₂₅₄ (Merck).

2.5 Técnicas cromatográficas instrumentales

Para la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se utilizó un equipo Shimadzu Prominence en fase reversa equipado con una columna Shimadzu Premier C18 de 100 mm x 4.6mm, 5µm con un detector de arreglo de diodos (DAD) y un detector por espectrometría de masas con analizador cuadrupolar y una interfase de ionización por electrospray (ESI). Como fases móviles se usó: (A: Ácido trifluoroacético (TFA) / H₂O MilliQ al 0.005%, B: acetonitrilo (ACN)). Se realizaron diferentes procesos de análisis con el objetivo de optimizar el método cromatográfico. Para el proceso de separación optimizado se utilizó un gradiente de elución como el que se observa en la Figura 2-1.

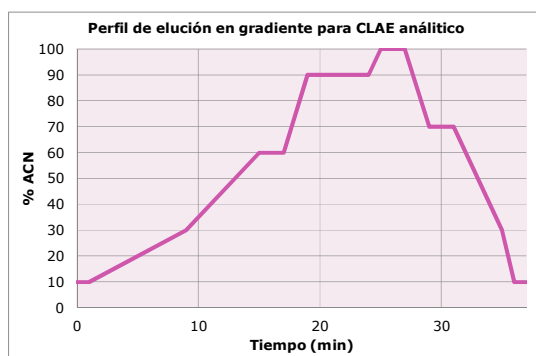


Figura 2-1. Perfil de elución en gradiente utilizado en CLAE-DAD y CLAE-MS

Para la cromatografía de alta eficiencia a nivel semipreparativo se utilizaron como fases móviles A: MeOH y B: H₂O (TFA al 0.005%) con un gradiente de elución

como el que se indica en la Figura 3-2, utilizando una columna Luna C-18 de 150mm x 10mm con un detector UV de λ_{\max} en 270 nm.

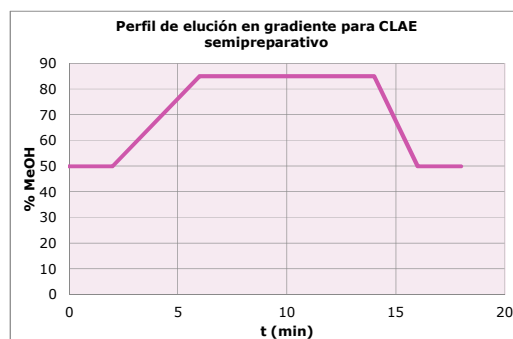


Figura 2-2. Perfil de elución en gradiente utilizado en CLAE-UV semipreparativo

Para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se utilizó un equipo Thermo Scientific Trace 1300 con una columna capilar Restek Rxi 5Sil MS de 60m, 0.25 mm ID y 0.25 μm df con un flujo de gas de arrastre (He) de 1 ml/min, con analizador de masas cuadrupolar.

Para el análisis de los extractos apolares en n-hexano de hojas, corteza y madera se utilizó una rampa de temperatura iniciando en 120°C y manteniéndose esta temperatura durante 2 min luego subió a 10°C/min hasta 220 °C manteniéndose en esta temperatura durante 11 min, luego subió a 16°C/min hasta 280 °C y manteniéndose en esta temperatura durante 6 min. Para el análisis de las fracciones apolares se utilizó una rampa de temperatura iniciando en 50 °C y manteniéndose en esa temperatura durante 2 min luego subió a 10 °C/min hasta 250 °C manteniéndose en esa temperatura 6 min, luego subió a 7.5 °C hasta 280 °C y manteniéndose en esa temperatura 2 min.

La determinación del índice de retención lineal (LRI) tiene en cuenta la ecuación propuesta por H. van den Dool y D.J. Kratz (Stashenko & Martínez, 2010):

$$\text{LRI} = 100n + 100 \frac{t_{\text{Rx}} - t_{\text{Rn}}}{t_{\text{RN}} - t_{\text{Rn}}}$$

Donde: n = es el número de átomos de carbono en la n-parafina que eluye antes del compuesto de interés cuyo tiempo de retención será t_{Rx} , t_{Rn} y t_{RN}

corresponden con los tiempos de retención de las parafinas de n y N átomos de carbono que eluyen inmediatamente antes y después respectivamente.

2.6 Análisis estructural

Para el proceso de elucidación estructural fueron utilizados los espectros de resonancia magnética nuclear tanto de ^1H como de ^{13}C así como los experimentos unidimensionales (DEPT 135) y bidimensionales (COSY, HMQC y HMBC) tomados en un equipo Bruker Avance 400 MHz y un equipo Bruker Avance 300 MHz, utilizando solventes deuterados CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, CD_3OD . Para los compuestos que presentaron centros asimétricos, se estableció la configuración relativa teniendo en cuenta las constantes de acoplamiento así como la comparación con la literatura sobre estructuras similares. Para la configuración absoluta de los neolignanos se utilizó el método quirótico, dicroísmo circular y se comparó con los resultados reportados para estas moléculas o algunas de estructura similar. (Brittain, 2000)

2.7 Selección de extracto de trabajo por análisis de perfiles por RP-HPLC-DAD

Como criterios para la selección del extracto de trabajo se tuvieron en cuenta los resultados del análisis fitoquímico preliminar así como el perfil cromatográfico por RP-CLAE-DAD obtenido para cada uno de los extractos. Después del análisis de la información anterior (ver sección 3.1 Resultados y Discusión) se seleccionó el extracto de hojas (**Ohc H**) como extracto de trabajo del presente estudio.

2.8 Aislamiento de metabolitos del extracto etanólico de hojas de *O. heterochroma*.

Se tomaron 80g del extracto etanólico **Ohc H** y se fraccionaron por polaridad a través de una extracción sólido-líquido en un equipo Soxhlet, utilizando disolventes de polaridad creciente $\text{EtP-CHCl}_3\text{-AcOEt-MeOH}$ hasta extracción exhaustiva y

obteniendo 4 subextractos denominados Ohc H EdP, Ohc H CHCl₃, Ohc H AcOEt y Ohc H MeOH como se muestra en la Figura 2-3.

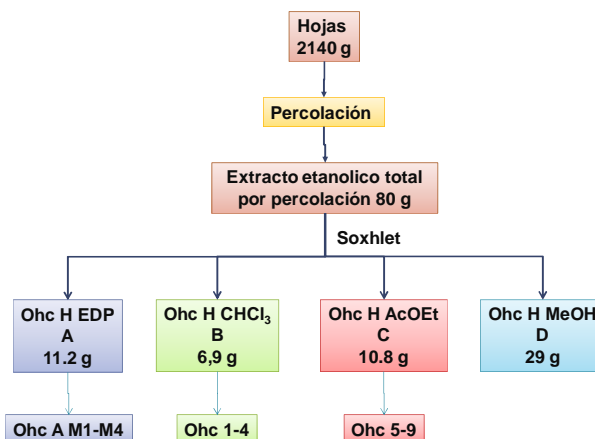


Figura 2-3. Fraccionamiento inicial de Ohc H por polaridad

Posteriormente se realizó un estudio cromatográfico en CCD sobre cada uno de los extractos determinándose las fases móviles así como la metodología a utilizar en cada caso.

2.8.1 Fracciones apolares obtenidas del extracto Ohc H EdP

A partir de los 11.2 g del extracto **Ohc H EdP** (que se denominará subextracto **A**) fueron obtenidas 4 fracciones de carácter apolar, solubles en n-hexano que fueron analizadas por CG-EM. Teniendo en cuenta el estudio cromatográfico en CCD se realizó sobre el extracto **A** un fraccionamiento inicial por medio de una CLV con fase móvil tol y en polaridad creciente con AcOEt hasta 100% de AcOEt, obteniéndose 9 fracciones. La fracción **A1** (1.7 g) fue fraccionada nuevamente por medio de una CC con fase móvil EdP y en polaridad creciente con AcOEt hasta 100% de AcOEt obteniéndose 5 fracciones. A partir de la fracción **A 1.1** (188 mg) por cromatografía sucesiva como se indica en la Figura 2.4 fueron obtenidas 2 fracciones depuradas denominadas **Ohc A M1 – Ohc A M2**.

Así mismo a partir de la fracción **A 1.3** (369.8 mg) por cromatografía sucesiva fue obtenida la fracción **Ohc A M3**. La Figura 2-4 corresponde al diagrama de flujo de

fraccionamiento del extracto **A** y la obtención de las fracciones depuradas denominadas **Ohc A M1- Ohc A M3**.

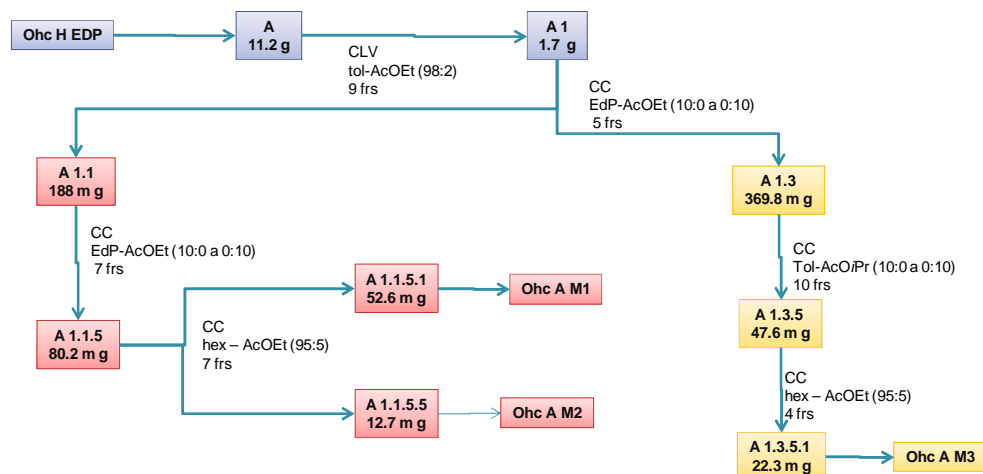


Figura 2-4. Diagrama de flujo de fraccionamiento del extracto **A**.

2.8.2 Metabolitos aislados del extracto Ohc H CHCl₃

A partir del subextracto obtenido en CHCl₃ (denominado **B**) fueron aislados 4 metabolitos denominados **Ohc H1 – Ohc H4**. Teniendo en cuenta el estudio cromatográfico en CCD el extracto **B** se fraccionó inicialmente por medio de una CLV con EdP y en polaridad creciente con AcOEt hasta 100% de AcOEt obteniéndose 21 fracciones.

En la fracción **B2** se observó la presencia de un sólido blanco de 26.4 mg el cual se purificó por CC con diferentes fases móviles hasta obtener el compuesto denominado **Ohc H1**.

La fracción **B4** (516.5 mg) se fraccionó por medio de una CF con fase móvil tol-AcOiPr (9:1) y 4% de MeOH obteniéndose 3 fracciones de la fracción B4.2 (134.3 mg) fue purificada utilizando CC con una fase móvil tol-AcOiPr (95:5) y 4% de MeOH hasta obtener una fracción B4.2 (25 mg) que presenta un compuesto mayoritario denominado **Ohc H4** que fue purificado utilizando un sistema CLAE-semipreparativo, obteniéndose 2 mg de compuesto mayoritario de interés.

La fracción **B7** (324 mg) se fraccionó por medio de una CF con fase móvil EDP: AcOEt (9:1) hasta 100 % de AcOEt obteniéndose 4 fracciones. La fracción **B 7.3** (92.9 mg) fue purificada utilizando CF, CC y CCDP hasta obtener 17.6 mg del compuesto **Ohc H2** y 7.8 mg del compuesto **Ohc H3**. Así mismo la fracción **B 7.4** (102 mg) utilizando CF y CC fue purificada hasta obtener 32.9 mg de un compuesto con Rf y datos espectroscópicos idénticos al compuesto **Ohc H2**. La Figura 2-5 describe el fraccionamiento y purificación de los compuestos **Ohc H1** a **Ohc H4**.

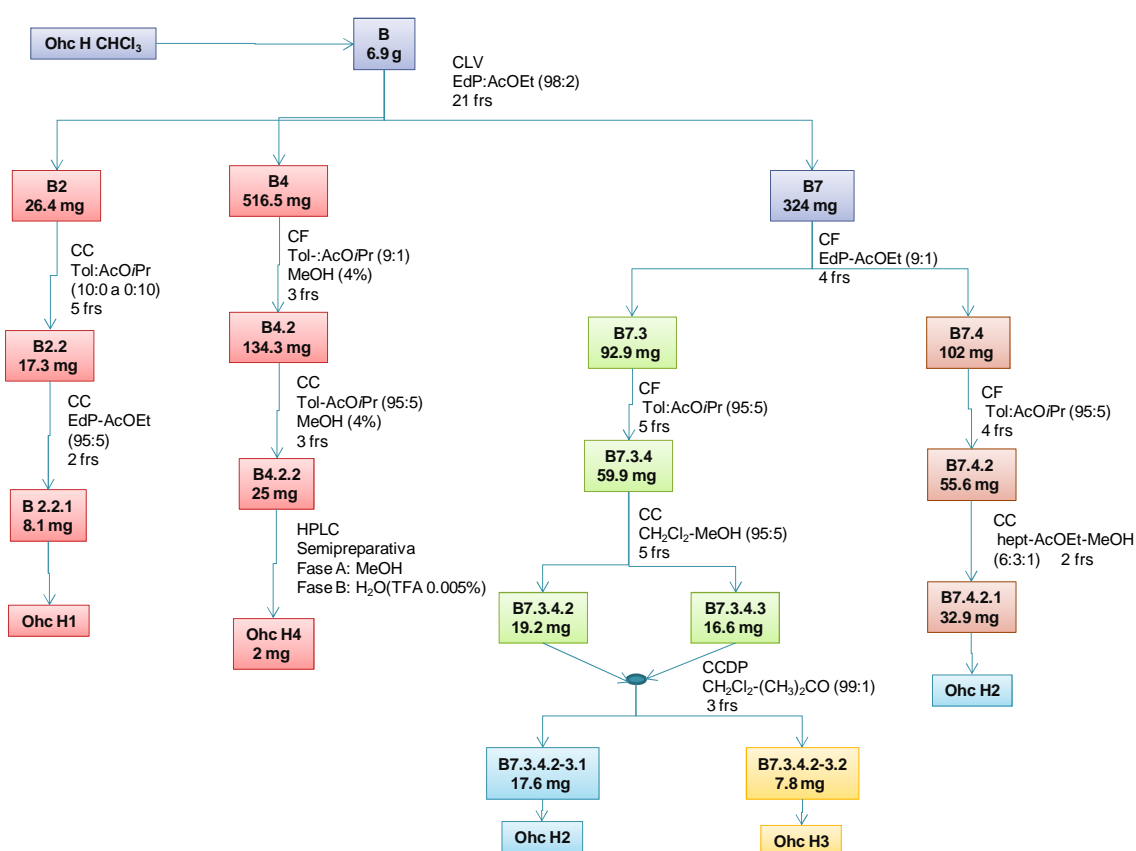


Figura 2-5. Fraccionamiento y purificación de los compuestos Ohc H1 – Ohc H4.

2.8.3 Metabolitos aislados del extracto Ohc H AcOEt

A partir del subextracto obtenido en AcOEt denominado **C** fueron aislados 5 metabolitos denominados **Ohc 5** – **Ohc 9**. Teniendo en cuenta el estudio cromatográfico en CCD se fraccionó inicialmente el extracto **C** por medio de una CLV con fase móvil EdP:AcOEt:AcOiPr (2:1:1) en polaridad creciente hasta 100%

de AcOiPr obteniéndose 7 fracciones. La fracción **C3** con 5.219 g se fraccionó por medio de una CF con fase móvil Hex:AcOEt:MeOH (5:4:1) en polaridad creciente hasta 100% de MeOH obteniéndose 8 fracciones. La fracción **C 3.4** (833.1 mg) fue purificada por CF, CC y CCDP utilizadas en forma sucesiva hasta obtener los compuestos **Ohc 5** (6 mg), **Ohc 6** (9.4 mg) y **Ohc 7** (17 mg). Así mismo la fracción **C 3.5** (1.374 g) fue fraccionada utilizando tanto CF, CC y CCDP obteniéndose los compuestos **Ohc 8** (13.3 mg) y **Ohc 9** (6.2 mg). La Figura 2-6 muestra el procedimiento de fraccionamiento y purificación de los compuestos **Ohc 5- Ohc 9**.

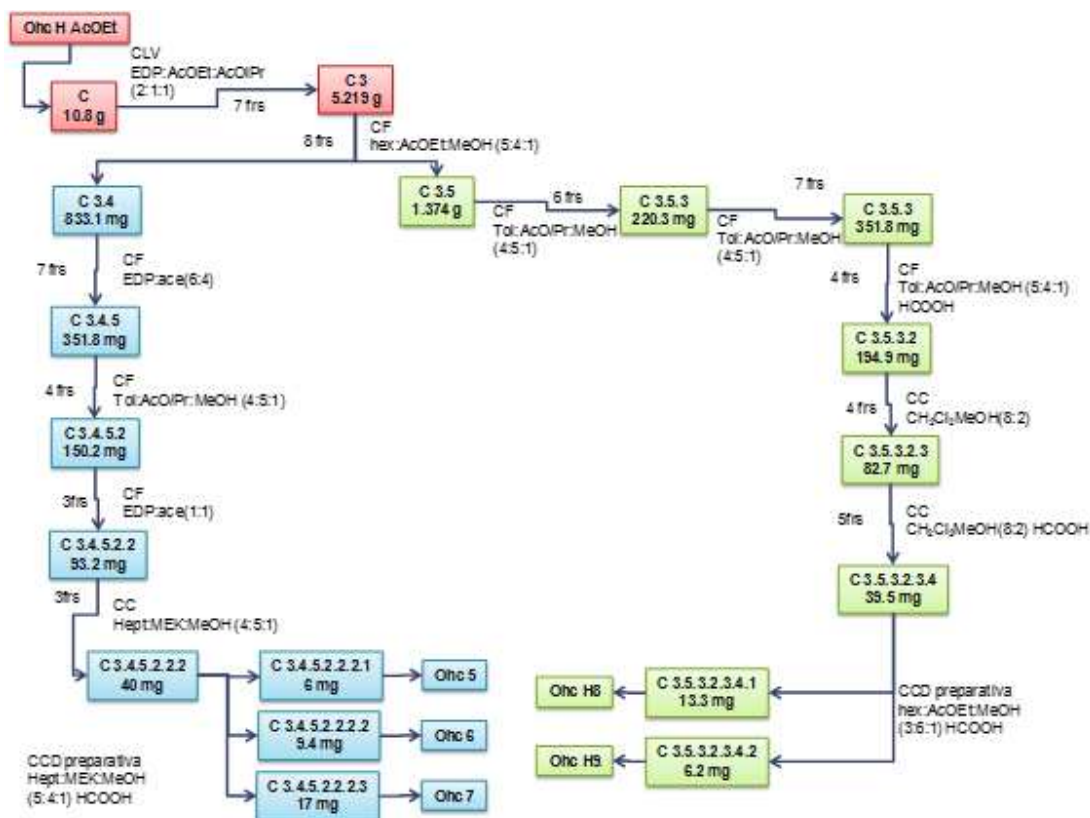


Figura 2-6. Fraccionamiento y purificación de los compuestos Ohc H5 – Ohc H9.

2.9 Modelamiento y Docking Molecular de neolignanós

2.9.1 Modelamiento molecular a nivel DFT

Una búsqueda conformacional aleatoria Monte-Carlo, sin ningún tipo de restricciones geométricas, se hizo mediante parametrización semi-empírica AM1 (Dewar, Zebisch, Healy, & Stewart, 1985) incluido en el software SPARTAN con un límite de 500 conformeros y utilizando el campo de fuerza molecular (MMF) de Merck implementado en el paquete del software.

Los conformeros energéticamente más estables, dentro de un rango energético de 6 kcal/mol, fueron optimizados a nivel DFT mediante el uso de la combinación del funcional B3LYP y el grupo de bases 6-31+G* (Becke, 1993). Después de la optimización DFT, un conjunto de conformaciones (con energías no más de aproximadamente 3 kcal/mol por encima de la estructura energéticamente más baja) se consideraron para el análisis de la población de Boltzmann. Las conformaciones restantes fueron descartadas porque estaban duplicadas o tenían alta energía. Por lo tanto, de acuerdo con el análisis de la población de Boltzmann, se obtuvieron entonces los conformeros más estables.

2.9.2 Análisis por Docking

Los experimentos de docking molecular se realizaron con el *plug-in* Autodock/Vina (1.1.2) para PyMOL (1.3r2) bajo entorno Python 2.5.2 en Windows (Seeliger y de Groot). Las coordenadas de la estructura cristalina de Rayos-X de la enzima objetivo (receptor PAF) se obtuvieron a partir del modelo homólogo reportado de una proteína G (GPCR) importada del Protein Data Bank RCSB (Código PDB: 1L9H). A la enzima se le agregaron los átomos de hidrógeno y las moléculas de agua. Las moléculas de ligando se optimizaron como se describió en la sección anterior. El experimento de acoplamiento en la enzima se llevó a cabo entre el ligando minimizado a través de un cubo en el centro geométrico del ligando nativo presente en la estructura PDB evaluada, con las dimensiones 24x24x24 Å, que

cubre el sitio de unión del ligando con un espaciado de rejilla de 0,375 Å. Las poses de acoplamiento se clasificaron de acuerdo a sus puntajes de docking (como la energía libre de acoplamiento o afinidad) y tanto la lista clasificada de ligandos acoplados y sus correspondientes poses de docking se exportaron como un archivo CSV para su posterior análisis. Cada evaluación se hizo 10 veces. Los valores de RMSD no superaron los 1,2 Å. Como control del estudio *in silico* se utilizó ginkgólido B.

Los datos de acoplamiento molecular y de actividad inhibitoria, fueron correlacionados mediante la construcción de una gráfica con los datos logarítmicos de concentración inhibitoria media (pIC50) con los datos logarítmicos de constante de afinidad (pKi), cuyo valor de Ki fue calculado mediante la ecuación $K_i = e^{(\Delta G/RT)}$, donde R (constante de los gases) es 1.98 cal*(mol*K)⁻¹ y T (temperatura) es 298.15 Kelvin. (Shityakov & Förster, 2014)

2.9.3 Modelamiento Farmacofórico

El modelamiento farmacofórico se realizó en el programa Discovery Studio 2.0 (Accelrys®, San Diego, USA). En este programa las moléculas se importaron separadamente como archivos .mol2 previamente optimizadas a nivel DFT. Una vez importada, se definieron las características moleculares de cada una a través del algoritmo para modelamiento farmacofórico del software, identificando los centros de los farmacóforos posibles. Una vez el modelo fue obtenido, la molécula se acopló nuevamente al sitio activo de la enzima PTR1, para luego identificar si los farmacóforos descritos influían en las interacciones residuales del complejo en ese sitio activo. Además, se utilizó el programa Ligand Scout para analizar tales interacciones para establecer el modelo farmacofórico adecuado.

3. Resultados y Discusión

3.1 Selección del extracto de trabajo

A partir del material vegetal como se indica en el literal 2.3 se obtuvieron los extractos etanólicos totales de los tres organelos a los que se tuvo acceso correspondientes a las hojas, corteza y madera de la especie de interés *Ocotea heterochroma*. Para establecer el extracto de trabajo se tuvieron en cuenta tanto los resultados del análisis fitoquímico preliminar como los del análisis cromatográfico por FR-CLAE-DAD.

3.1.1 Análisis fitoquímico preliminar

El análisis fitoquímico preliminar tiene como finalidad inferir sobre la posible presencia de algunos núcleos típicos de metabolitos de origen natural entre ellos, alcaloides, flavonoides, taninos, etc. Se realizaron por lo tanto pruebas de coloración/precipitación (Bilbao Rodríguez, 1997) sobre los tres extractos etanólicos denominados **Ohc H** (hojas), **Ohc C** (corteza) y **Ohc M** (madera). Los resultados se encuentran relacionados en la Tabla 3-1.

Grupo de compuestos	Prueba	Ohc H	Ohc C	Ohc M
Taninos	FeCl ₃	+	+	+
	Acetato de plomo	+	+	+
	Gelatina – sal	-	+	+
Sesquiterpen lactonas	Hidroxamato férrico	+	+	-
Cumarinas	Erlich	-	-	-
Glicosidos Cardiotónicos	Baljet	+	+	+
	Molish	-	-	+

Tabla 3-1. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar sobre Ohc H, Ohc C y Ohc M

Grupo de compuestos	Prueba	Ohc H	Ohc C	Ohc M
Saponinas	Espuma	+	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
	Rosenhein	-	+	-
Quinonas	Borntrager – Krauss	-	-	-
	Comportamiento como donador de e-	+	-	-
Alcaloides	Valsler	+	-	+
	Mayer	-	-	+
	Dragendorff	-	-	+
	Reinekato de amonio	-	-	+

Resultado (+) indica obtención del precipitado esperado o de la coloración reportada en literatura y (-) indica no reacción o cambio en la muestra analizada

Continuación de Tabla 3-1. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar sobre Ohc H, Ohc C y Ohc M

Como es posible observar en la Tabla 3- existen dentro de estas pruebas de coloración, algunas que corresponden a metabolitos comunes a la gran mayoría de las plantas como saponinas y taninos encontrándose que los extractos evaluados evidencian una respuesta positiva a estas pruebas. Se debe tener en cuenta que la prueba para determinar la posible presencia de taninos corresponde a la reacción con FeCl_3 reactivo que genera una prueba positiva no solo para taninos sino para compuestos polifenólicos en general. Se obtuvieron además pruebas positivas en la reacción de Baljet y la prueba del hidroxamato férrico útiles en la determinación de glicosidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas, respectivamente, lo que indica la posible presencia de metabolitos con anillos tipo lactona en su estructura. En cuanto a la determinación de alcaloides se encontraron pruebas positivas para los diferentes grupos en el extracto de madera, mientras que en el extracto de hojas solo fue positiva la prueba de Draggedorff mientras que todas las pruebas fueron negativas en la corteza, lo que

indica que el único extracto que posiblemente posee este tipo de compuestos es el de madera. Así mismo, se evaluó la presencia de flavonoides, encontrándose pruebas negativas de Shinoda y de Rosenhein en la mayoría de los extractos lo cual puede deberse a que se presenten interferencias en los extractos crudos, lo cual se corroboró al realizar dichas pruebas sobre el subextracto soluble en acetato de etilo [Ohc H AcOEt (**C**)], obteniendo resultados positivos. En este caso, sobre el extracto **C** se realizó además un estudio cromatográfico en CCD revelado con vapores de NH₃ que reaccionó fuertemente. Todas las pruebas realizadas están de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada sobre la familia Lauraceae, esta revisión indica que las especies dentro de ella son generalmente ricas en alcaloides como es el caso de la *Ocotea lancifolia* de donde fueron aislados trece alcaloides becilisoquinolínicos (Fournet et al., 2007), así como en compuestos con anillos tipo lactona como las lactonas aisladas de *Litsea japonica* (Min et al., 2003) o los butanólidos aislados de *Cinnamomum subavenium*. (Chen et al., 2007).

3.1.2 Análisis de extractos etanólicos por FR-CLAE-DAD

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos etanólicos observándose que el extracto **Ohc H**, (correspondiente al extracto de hojas), presenta mayor cantidad de señales cromatográficas y, por lo tanto, se considero un mejor perfil en términos de cantidad de metabolitos detectados en comparación con los extractos de corteza (**Ohc C**) y madera (**Ohc M**) como se observa en la Figura 3-2. Esto puede deberse tanto a la riqueza metabólica en las hojas de la especie como a la presencia de metabolitos que absorben en UV teniendo en cuenta el detector utilizado. Resulta también importante tener en cuenta que el proceso de molienda con las hojas permite tamaños de partícula menores que los obtenidos con la corteza y la madera, debido esto a la naturaleza de la muestra, y el tamaño de partícula interviene directamente en la eficiencia de la extracción. Se observa además que los compuestos presentes en el extracto de hojas, teniendo en cuenta sus valores de tiempo de retención, presentan un rango más amplio de polaridades que los compuestos presentes en el extracto de corteza y, aún más, que los compuestos presentes en el extracto de madera.

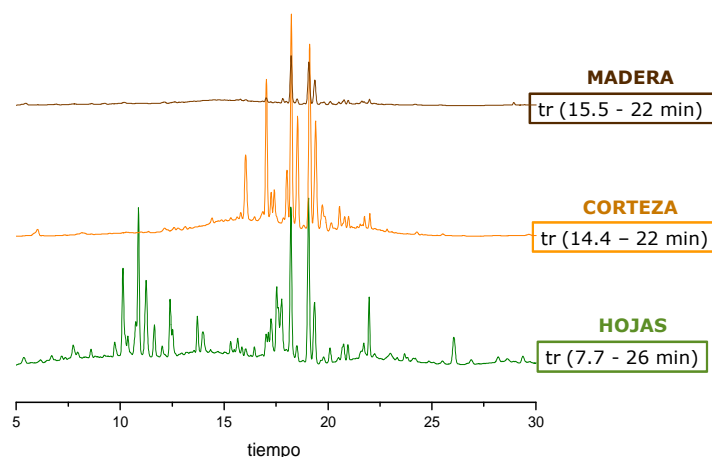


Figura 3-1. Perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de *O. heterochroma* por RP-CLAE-DAD.

Al ampliar la región comprendida entre 16 y 22 min se presentan alrededor de nueve señales comunes a los tres extractos con idéntico tiempo de retención, entre los que se observan tres picos relevantes en tiempo de retención de 18.22 min, 19.08 min y 19.36 min que resultan ser señales mayoritarias en los tres extractos analizados (ver Figura 3-2).

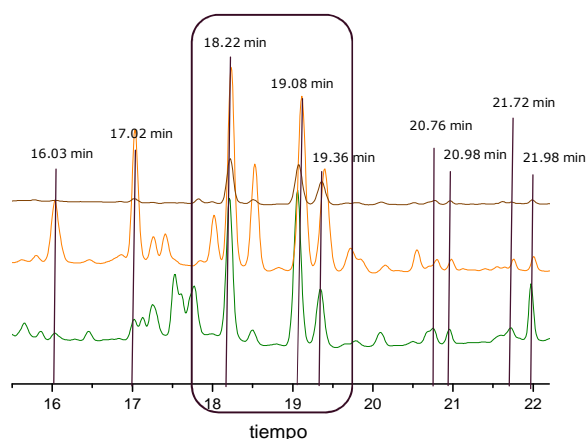


Figura 3-2. Ampliación de los perfiles cromatográficos de hojas, corteza y madera entre 16 y 22 min.

Teniendo en cuenta tanto los resultados del análisis fitoquímico preliminar como los resultados del perfil cromatográfico de cada uno de los extractos se decidió seleccionar como material de trabajo el extracto de hojas (Ohc H) que presenta la

mayor cantidad de metabolitos detectados en comparación, teniendo en cuenta el objetivo general del presente trabajo.

3.2 Análisis de fracciones apolares por CG-EM

Las fracciones provenientes del extracto **A**, denominadas **Ohc A M1- Ohc A M4**, según un estudio cromatográfico previo en CCD y revelado con vapores de I_2 , indicaban relativa complejidad para lograr el aislamiento de los metabolitos por CCDF y además se obtenían pequeñas cantidades, no obstante teniendo en cuenta su alta solubilidad en n-hexano fue posible analizar dichas mezclas por CG-EM, mediante el programa de temperatura descrito en el literal 2.5, correspondiente a las mezclas, obteniéndose los resultados relacionados en la Tabla 3-2:

# pico	T ret (min)	Integración relativa (%)	Iones característicos m/z (int.rel.% experimental)	L.R.I. calc	L.R.I. rep	Determinación
Ohc A M1						
1	33.59	98	151 (100) 416 (54) 150 (24) 191 (21)	-	3036	γ -tocoferol
Ohc A M2						
1	26.86	15	94 (100) 106 (85) 91 (71) 105 (60) 119 (37)	2027	2034	kauren-15-eno
2	27.65	99	91 (100) 105 (88) 79 (61) 81 (65) 257 (52)	2053	2043	kauren-16-eno
Ohc A M3						
1	25.27	96	71 (100) 55 (10) 57 (9,4) 82 (8,3) 69 (7,8) 123 (6,1) 72 (5,3)	1869	1899	Isofitol

Tabla 3-2. Resultados del análisis por GC-MS de muestras apolares obtenidas del extracto **A**

La identificación de los compuestos se realizó teniendo en cuenta la librería interna del equipo (NIST) así como la determinación de su índice de retención lineal (LRI), encontrándose en una de ellas la presencia mayoritaria del diterpeno kauren-16-eno (**82**) aunque en mezcla con su isómero kauren-15-eno (**83**). Este

tipo de compuestos de carácter apolar han sido encontrados previamente en otras especies del género *Ocotea*, en donde se refieren al kaureno en la forma de su isómero más abundante es decir kauren-16-eno. Ejemplo de ello es la *Ocotea floribunda* cuyo aceite esencial está compuesto principalmente de kaureno con aproximadamente un 37% de su composición (Takaku, Haber, & Setzer, 2007). En el caso de *Ocotea acutifolia* se presenta como un componente minoritario con un 1.7 % de su composición (De Lima Silva et al., 2013)

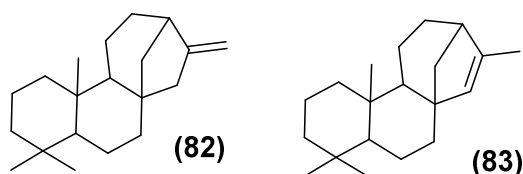


Figura 3-3. Estructura de los diterpenos kauren-16-eno y kauren-15-eno

Los kaurenos son de importancia para la planta por ser intermediarios en la producción de giberelinas, consideradas como hormonas vegetales que inducen el crecimiento (Avalos et al., 1999). Los compuestos derivados de los kaurenos han sido estudiados por su potencial actividad citotóxica especialmente cuando se encuentran oxigenados como es el caso de los compuestos ácido ent-kaur-16-eno-19-oico, el ent-3 β -hidroxikaur-16-eno, ent-kaur-16-en-3 α ,19-diol y el ácido ent-17-hidroxikaur-15-en-19-oico los cuales resultaron promisorios y específicos para algunas de las líneas celulares de cáncer de próstata analizadas teniendo en cuenta sus valores de IC₅₀. (Henry et al., 2006)

De las restantes dos mezclas ambas presentan como característica la presencia de un compuesto mayoritario identificado; en el caso de la **Ohc A M1** corresponde con el γ -tocoferol (**85**), compuesto importante en la dieta humana, presente principalmente en semillas de soya y maíz (Christie, 2014), que presenta potencial acción antiinflamatoria así como una acción citotóxica proapoptótica. (Reiter, Jiang, & Christen, 2007)

En la **Ohc A M3** se encontró el isofitol (**84**), como uno de los compuestos mayoritarios, compuesto que no ha sido previamente aislado o reportado en especies de la familia Lauraceae. Se encuentra presente en las hojas de la especie *Ginkgo Biloba* (Ginkgoaceae) de donde fue aislado junto con otros compuestos conocidos como el nerolidol, linalool y algunos esteroides, encontrándose interacciones sinérgicas en mezcla como antibacteriano frente a *Salmonella entérica*. (Tao, Wang, & Kong, 2013).

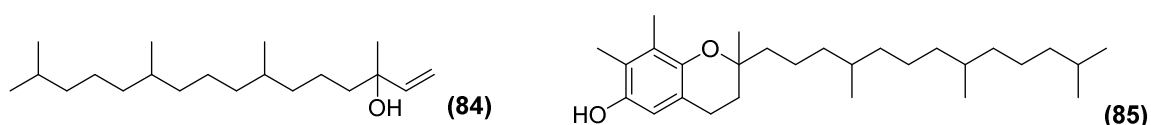


Figura 3-4. Estructura de isofitol y el γ -tocoferol

Los cromatogramas de cada una de las fracciones analizadas así como los respectivos espectros de masas se encuentran en el anexo A. Los extractos etanólicos de corteza (Ohc C) y madera (Ohc M) fueron extraídos con n-hexano asistido con ultrasonido y analizados posteriormente por GC-MS obteniéndose los siguientes resultados:

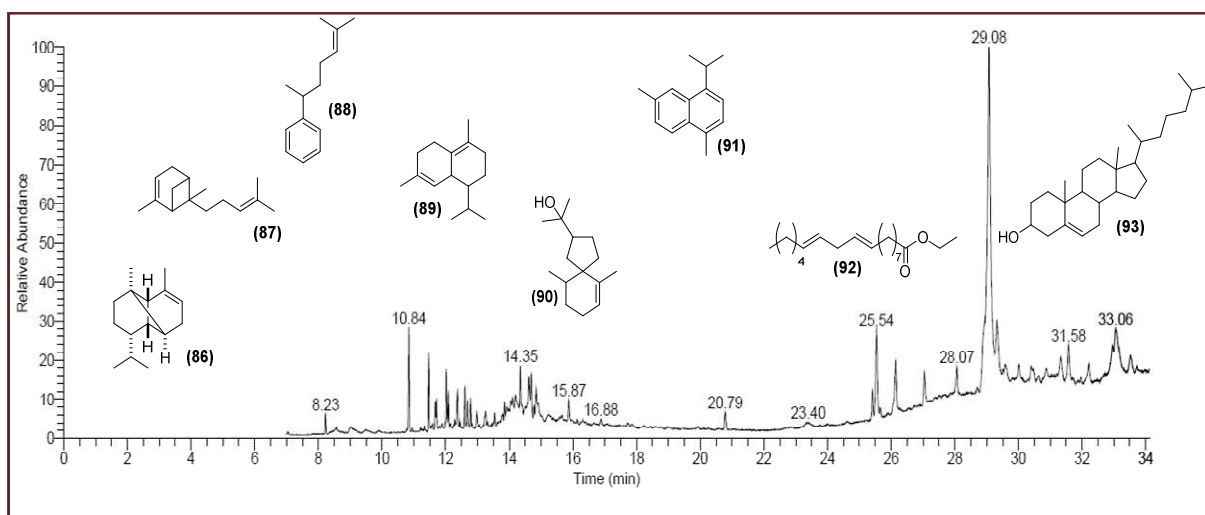


Figura 3-5. Cromatograma del extracto en n-hexano del extracto de corteza de *O. heterochroma* y estructuras de los compuestos determinados.

# pico	T ret (min)	Integración relativa (%)	Iones característicos m/z (int.rel.% experimental)	L.R.I. calc	L.R.I. rep	Determinación
1	10.84	2.20	161(73), 119 (87) 105 (99) 93 (25) 91 (55) 204 (30)	1404	1376	α -copaeno (86)
2	11.47	1.43	93 (100) 119 (90) 69 (50) 77 (33) 91 (30)	1452	1430	trans- α -bergamoteno (87)
3	12.02	1.17	132(100) 119(95) 105 (65) 91(50) 202 (50)	1494	1524	α -curcumeno (88)
4	12.60	0.74	161 (100) 119 (80) 105 (73) 91 (59) 134 (42) 204 (35)	1540	1469	(+)- δ -cadineno (89)
5	14.35	1.99	161 (100) 119 (82) 105 (60) 93 (35) 189 (35) 162 (35)	1632	1598	agarospirol (90)
6	14.84	1.87	183 (100) 168 (48) 198 (41) 153 (27) 152 (21) 81 (21)	1648	1706	cadaleno (91)
7	25.41	0.83	81 (100) 67 (99) 95 (60) 55 (54) 82 (49) 96 (34)	2082	2193	9,12-octadecadienoato de etilo (92)
8	29.07	32.96	105 (100) 107 (81) 91 (77) 95 (77) 81 (68)	2280		sitosterol (93)
Componentes identificados (%)				43.19 %		

Tabla 3-3. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc C.

Como se puede observar, tanto en la Tabla 3-3 y en la Figura 3-3, el compuesto mayoritario del extracto en n-hexano del extracto etanólico de corteza, corresponde al sitosterol (**93**), con un 32 % de la composición del extracto, mientras que los demás componentes identificados corresponden a componentes minoritarios. Entre ellos cinco sesquiterpenos, un sesquiterpeno oxigenado y un derivado de ácido graso.

Para el extracto en n-hexano del extracto etanólico de madera (**Ohc M**) se obtuvieron los siguientes resultados:

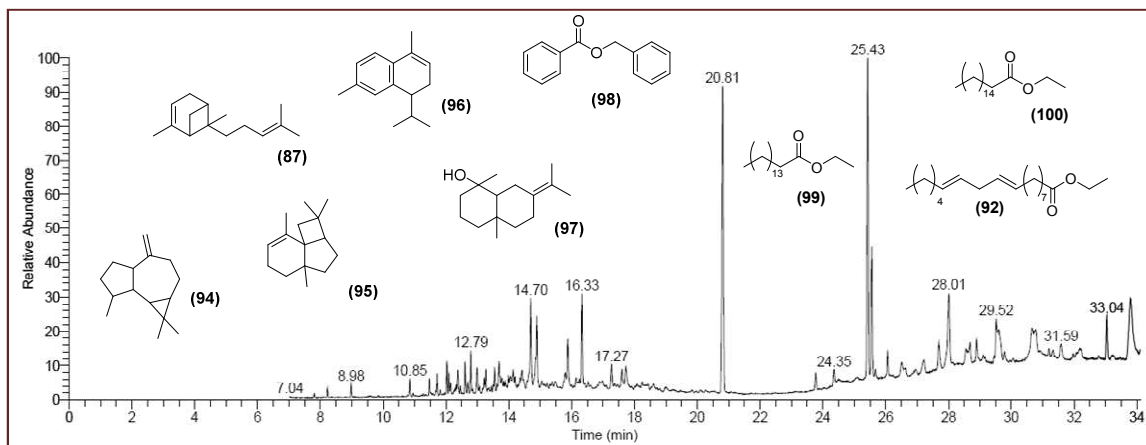


Figura 3-6. Cromatograma del extracto en n-hexano del extracto de madera de *O. heterochroma* y estructuras de los compuestos determinados

# pico	T ret (min)	Integración relativa (%)	Iones característicos m/z (int.rel.% experimental)	L.R.I. calc	L.R.I. rep	Determinación
1	12.03	0.75	91 (100) 105 (90) 79 (59) 93 (59) 107 (51) 55 (41)	1495	1444	Aromadendreno (94)
2	12.61	0.76	93 (100) 119 (86) 91 (44) 69 (40) 107 (34) 77 (31)	1541	1500	trans-β-bergamoteno (87)
3	12.79	1.02	161 (100) 122 (93) 107 (84) 91 (40) 105 (39) 81 (32) 93 (29)	1556	1416	α-panasinsen (95)
4	12.99	0.83	157 (100) 142 (64) 156 (21) 115 (19) 200 (17) 158 (11) 128 (9)	1571	1547	α-calacoreno (96)
5	14.89	4,23	81 (100) 161 (66) 93 (59) 67 (58) 189 (57) 204 (51)	1650	1647	eudesm-7(11)-en-4-ol (97)
6	16.33	3.51	105 (100) 91 (51) 77 (35) 212 (16) 194 (14) 65 (12) 51 (12)	1696	1763	benzoato de bencilo (98)

Tabla 3-4. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc M.

# pico	T ret (min)	Integración relativa (%)	Iones característicos m/z (int.rel.% experimental)	L.R.I. calc	L.R.I. rep	Determinación
7	20.81	13.15	88 (100) 101 (56) 55 (21) 89 (17) 69 (15) 57 (14)	1892	1978	hexadecanoato de etilo (99)
8	23.78	0.64	88 (100) 101 (56) 55 (19) 73 (14) 57 (18) 89 (17) 69 (16)	2051	2077	heptadecanoato de etilo (100)
9	25.43	10.89	67 (100) 81 (96) 95 (74) 55 (50) 82 (45) 68 (33)	2082	2193	9,12-octadecadienoato de etilo (92)
Componentes identificados (%)				35.78 %		

Continuación de Tabla 3-4. Compuestos determinados en el extracto en n-hexano de Ohc M.

Como se puede observar en la Figura 3-4 y en la tabla 3-4, los componentes mayoritarios del extracto en n-hexano del extracto etanólico de madera corresponden a esteres de ácidos grasos. Un 24.04% de la composición se encuentra representada entre el hexadecanoato de etilo y el 9,12-octadecadienoato de etilo. Los restantes componentes identificados son minoritarios, entre los que se encuentran 4 sesquiterpenos, un sesquiterpeno oxigenado, un derivado del ácido benzoico y un éster derivado del ácido graso.

Los extractos analizados presentan como compuestos identificados comunes el sesquiterpeno trans- α -bergamoteno y un derivado del ácido graso, el 9,12-octadecadienoato de etilo. Algunos de los compuestos identificados se han encontrado en fracciones apolares y aceites esenciales de otras especies dentro de la familia Lauraceae y el género *Ocotea*. Tal es el caso del α -copaeno, el cual se ha identificado en el aceite esencial de especies de la familia como *Litsea neesiana* (0.08 %), *Litsea pringlei* (1.44 %), *Cryptocaria mandioccana* (2.87 %). En especies del género, este componente posee mayor porcentaje en la composición, como en el caso de la *O. holdridgeana* (5.2%) y la *O. brenesii* (21.1%). El δ -cadineno también ha sido identificado en hojas y corteza de *Beilshmedia madang* con un 17% y 20.5 %, respectivamente, siendo los compuestos mayoritarios de

dichos aceites. Este mismo comportamiento se presenta en el extracto soluble en n-hexano de las hojas de *Nectandra amazonum* donde el δ -cadineno tiene un 30% de la composición.

Algunos otros componentes que se refieren en la literatura son el aromadendreno, presente en un 0.1 % en el aceite esencial de hojas de *O. whitei*, el α -calacoreno, presente en un 3.8 % en el aceite esencial de hojas de *O. brenessi*. A pesar de que el eudesm-7(11)-en-4-ol no ha sido reportado en aceites esenciales ni extractos de la familia Lauraceae o del género *Ocotea*, si se han encontrado otros derivados como el γ -eudesmol y el β -eudesmol presentes en *O. valeriana* y en una especie de *Ocotea* sp. (Jimenez Perez, Lorea-Hernandez y Jankowski) (Salleh, Ahmad y Yen) (Cuca Suarez, Ramos y Coy Barrera) (Telascrea, de Araujo y Marques) (Cuca-Suarez, Ramos, & Coy-Barrera, 2013; Jiménez-Pérez, Lorea-Hernández, Jankowski, & Reyes-Chilpa, 2011; Salleh, Ahmad, & Yen, 2014; Telascrea et al., 2007)

3.3 Análisis estructural de metabolitos aislados

Los metabolitos aislados se clasificaron en dos grupos, los compuestos **Ohc H1-H4** son neolignanicos o compuestos relacionados, y los compuestos **Ohc H5-H9** son de núcleo flavonoide. Los neolignanicos han sido previamente aislados en diferentes especies tanto del género *Ocotea* como de la familia Lauraceae, mientras que los flavonoides no son típicos en este género, pero presentan estructuras similares a las reportadas previamente (ver literal 1.7.3).

3.3.1 Compuesto Ohc H1

El compuesto **Ohc H1** fue aislado como un sólido blanco soluble en CHCl_3 , que revela con vapores de I_2 . El espectro de RMN ^1H (Figura 3-7) del compuesto presenta señales en la región aromática entre δ_{H} 6.8 ppm y δ_{H} 7.5 ppm correspondientes a protones sobre el anillo aromático y entre δ_{H} 6.2 ppm y δ_{H} 7.8

ppm correspondientes a protones sobre carbonos olefínicos, así como en la región alifática entre δ_H 1.6 ppm y δ_H 4.2 ppm correspondientes a los protones sobre metilo alifático y metileno sobre heteroátomo.

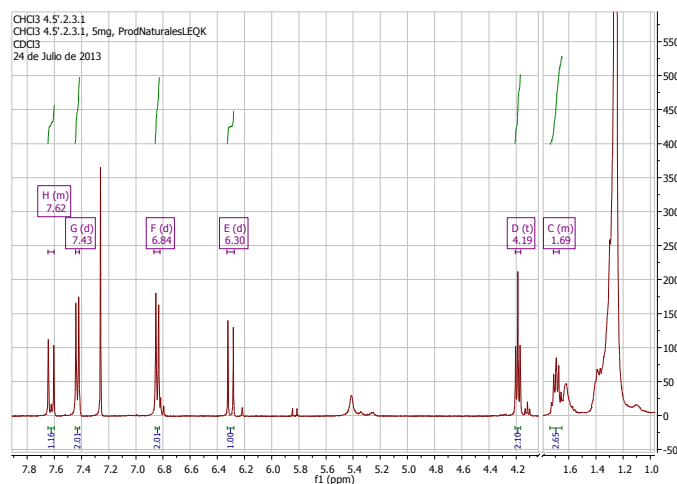


Figura 3-7. Espectro RMN 1H compuesto Ohc H1

La estructura del compuesto **Ohc H1** fue determinada teniendo en cuenta los datos de RMN ^1H y ^{13}C unidimensional, comparación con la literatura y análisis por FR-CLAE-DAD-MS encontrándose que corresponde con el p-hidroxicinamato de etilo (**101**) que comparte junto con los lignanos y los neolignanos un precursor común, el ácido p-hidroxicinnámico (Dewick, 2009). Como producto natural ha sido reportado en especies de familias diferentes a la familia Lauraceae, e.g. en el extracto etanólico de hojas de la especie *Atractylodes macrocephala* (Compositae). (Peng et al., 2011)

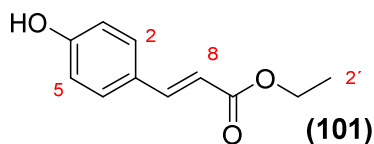


Figura 3-8. Estructura del compuesto Ohc H1

La Figura 3-9 muestra una ampliación del espectro de ^1H del compuesto **Ohc H1**. En la región aromática se observan dos dobletes en δ_H 6.84 ppm (d, $J = 8.6$ Hz,

2H-6,8) y δ_H 7.43 ppm (d, J = 8.6 Hz, 2H-5,9) que corresponden a los hidrógenos aromáticos homotópicos de un anillo aromático disustituido en para. Se observan dos dobletes en δ_H 6.30 ppm (d, J = 16 Hz 1H-8) y δ_H 7.62 ppm (d, J = 16 Hz 1H-7) característicos por su constante de acoplamiento de hidrógenos olefínicos en posición trans.

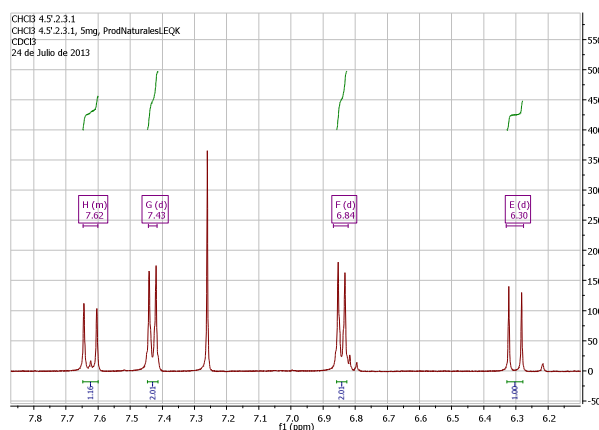


Figura 3-9. Ampliación del espectro de ^1H del compuesto Ohc H1 desde δ_H 6.3 a δ_H 7.7 ppm.

La Figura 3.10 corresponde con una ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto **Ohc H1** en la región alifática donde se observa una señal en δ_H 4.19 ppm (t, J= 6.7 Hz, 2H-1') que corresponde con un metileno unido a un heteroatomo y la señal en δ_H 1.69 (m, 3H-2') correspondientes al metilo alifático del etilo. (Espectro de ^{13}C del compuesto **Ohc H1** ver anexo B.2).

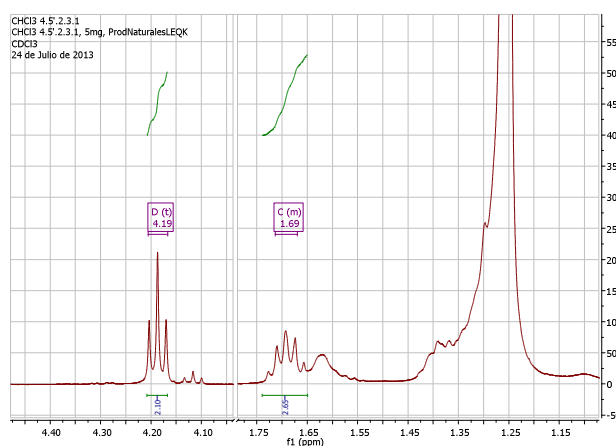


Figura 3-10. Ampliación del espectro de ^1H del compuesto Ohc H1 de δ_H 1.0 a δ_H 4.3 ppm.

Para confirmar la estructura planteada así como analizar la pureza del compuesto se analizó por FR-CLAE-DAD-MS bajo las mismas condiciones cromatograficas utilizadas para realizar los perfiles de los extractos etanólicos totales de hojas, corteza y madera, encontrando que el compuesto **Ohc H1** posee un tiempo de retención de 17.04 min (Figura 3-11).

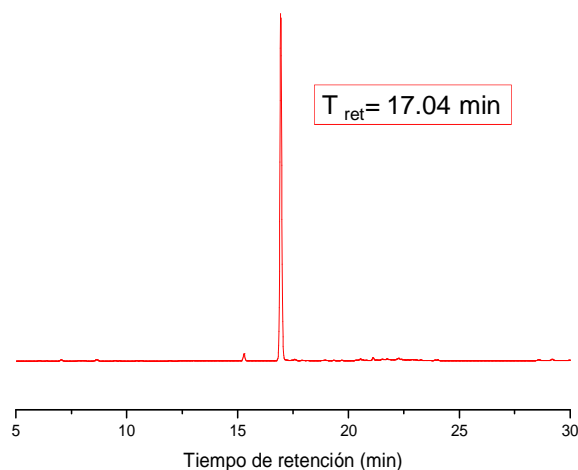


Figura 3-11. Cromatograma en FR-CLAE-DAD de Ohc H1

El espectro de masas correspondiente al pico con tiempo de retención en 17.04 min presenta el ion pseudomolecular esperado en $m/z = 193$.

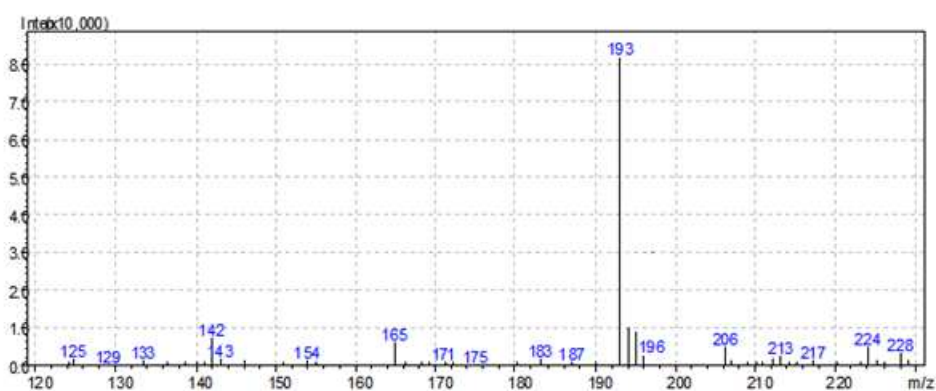
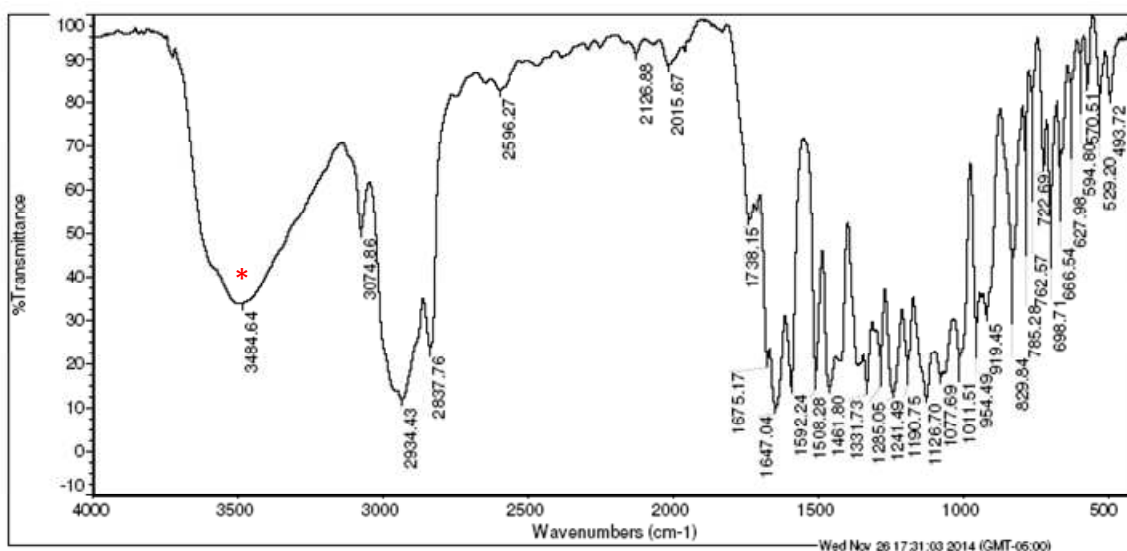


Figura 3-12. Espectro de masas para el compuesto Ohc H1.

3.3.2 Compuesto Ohc H2

El compuesto denominado **Ohc H2** se aisló como un líquido amarillo que revela fuertemente con vapores de I₂ y con revelador de Hannessian (Pirring). El espectro UV-vis de **Ohc H2** indica λ_{\max} en 256 y 285 nm obtenido por medio del detector DAD del sistema CLAE.

El espectro IR tomado en disco de KBr, en un equipo Nicolet iS10 Spectrometer Thermo Fisher Scientific, muestra las bandas características e.g. las bandas en 3074 cm⁻¹ que corresponden con el estiramiento =C-H en alquenos monosustituídos, entre 2850 y 2950 cm⁻¹ estiramiento de enlaces C-H alifático tanto metilos como metilenos, en 1647 cm⁻¹ la señal del carbonilo de cetona y señales alrededor de 1200 cm⁻¹ correspondientes a estiramientos C-O.



* Presencia de MeOH en la muestra.

Figura 3-13. Espectro IR del compuesto Ohc H2

El espectro de RMN ¹H (Figura 3-14) del compuesto **Ohc H2** presenta señales que integran para 30 protones, encontrándose señales características en la región aromática en δ_H 6.78 ppm (s, 2H-2,6) correspondiente a dos protones homotópicos dentro de un anillo aromático tetrasustituido, en la región entre δ_H 5.0 ppm y δ_H 6.0

ppm se encuentran las señales características del vinilo terminal, entre δ_H 3.0 ppm y δ_H 4.0 ppm las señales típicas de grupos metoxilos y la región entre δ_H 1.2 ppm y δ_H 3.0 ppm que corresponde con la región alifática donde se encuentran las señales de los grupos metilo y metileno.

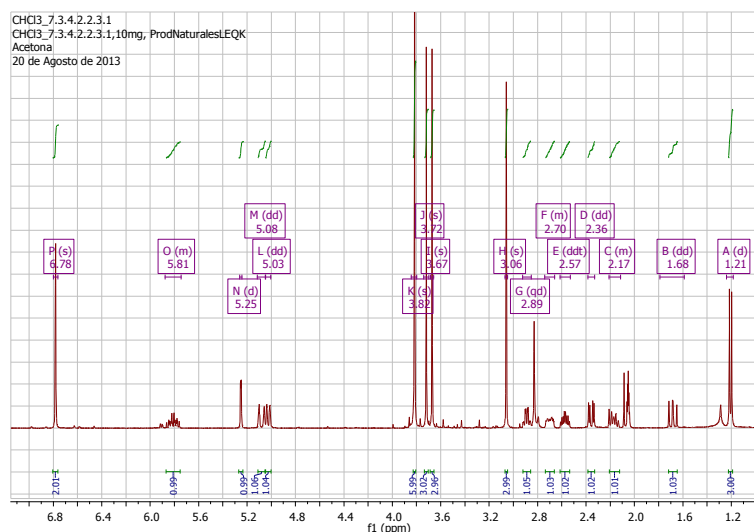


Figura 3-14. Espectro de RMN ^1H del compuesto Ohc H2.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada se sabe que las especies del género *Ocotea* y de la familia Lauraceae son ricas en neolignanos de núcleo burchellina, siendo uno de los núcleos de este tipo de compuestos el conocido como furociclohexanonas, las cuales poseen una estructura base que cuenta generalmente con un anillo de benceno sustituido por grupos metoxilo y/o metilendioxo, presenta sustituyentes alílicos y cetonas cíclicas tanto saturadas como insaturadas, (algunos de estos compuestos se observan en las Figuras 1-12 y 1-23). La estructura del compuesto **Ohc H2** fue determinada por análisis de los datos de RMN ^1H y ^{13}C uni y bidimensional así como la comparación con la literatura encontrándose que corresponde con un neolignano de tipo furociclohexanona de estructura similar a la mirandina A (**16**).

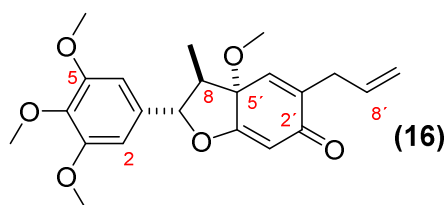


Figura 3-15. Estructura de la mirandina A.

La señal en δ_H 6.78 ppm (s, 2H-**2,6**) mediante el experimento HMBC (ver Figura 3-16) correlacionan con los carbonos aromáticos oxigenados en δ_C 138.6 ppm (**C-4**) y en δ_C 154.3 ppm (**C-3,5**) así como con un carbono alifático oxigenado en δ_C 94.8 ppm (**C-7**).

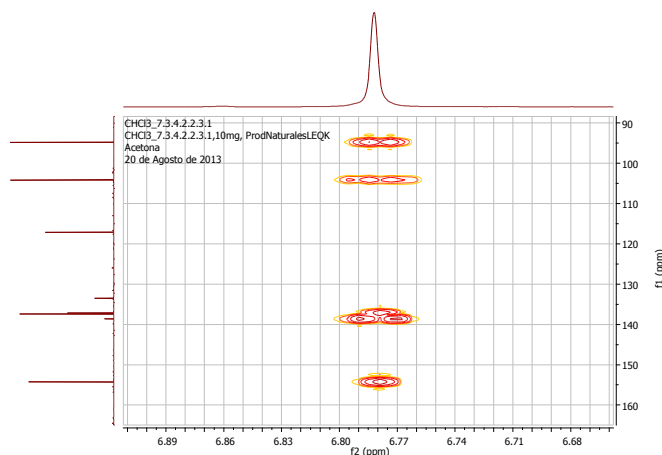


Figura 3-16. Ampliación del experimento HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$) (δ_H 6.6- δ_H 6.9 ppm)

Mediante el experimento HMBC los carbonos aromáticos oxigenados en δ_C 138.6 ppm (**C-4**) y en δ_C 154.3 ppm (**C-3,5**) presentan correlaciones con las señales en δ_H 3.72 ppm (s, 3H-**OCH₃** **4**) y 3.82 ppm (s, 6H-**OCH₃** **3,5**) típicas de metoxilos sobre el anillo aromático (ver Figura 3-17) lo que permite corroborar la presencia de un anillo trimetoxilado como indica la Figura 3-18.

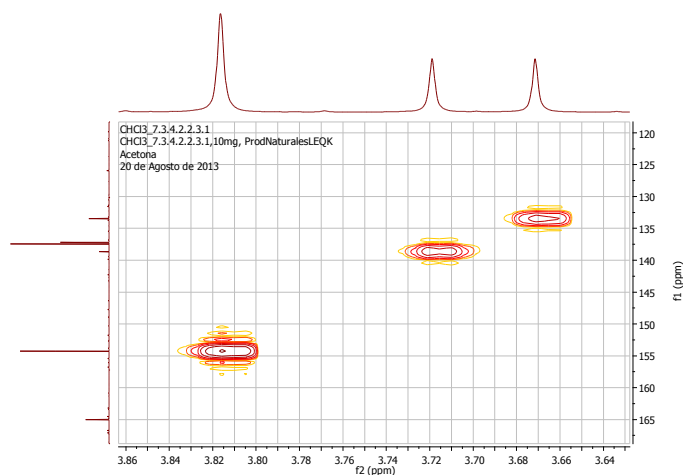


Figura 3-17. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 3.6 – δ_{H} 3.9 ppm)

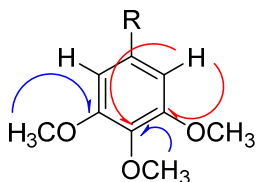


Figura 3-18. Subestructura del compuesto Ohc H2 (a)

El experimento COSY indica la presencia de una correlación entre la señal en δ_{H} 5.25 ppm (d, $J=2\text{Hz}$, 1H-7) típica de metino oxigenado con la señal en δ_{H} 2.89 ppm (dq $J = 7.4, 2 \text{ Hz}$ 1H-8) que corresponde con un metino alifático, y de esta con la señal en δ_{H} 1.21 ppm (d $J=7.4 \text{ Hz}$ 3H-9) y por medio del experimento HMBC se observan correlaciones entre los protones en δ_{H} 1.21 ppm y δ_{H} 2.89 ppm con el carbono alifático cuaternario oxigenado en δ_{C} 85.5 ppm (**C-5'**) así como con los protones en δ_{H} 3.05 ppm (s, 3H-**OCH₃ 5'**) lo que sugiere que la oxigenación de dicho carbono es dada por un metoxilo (ver Figura 3-19). Lo anterior indica la presencia de un anillo furánico metoxilado (ver Figura 3-20)

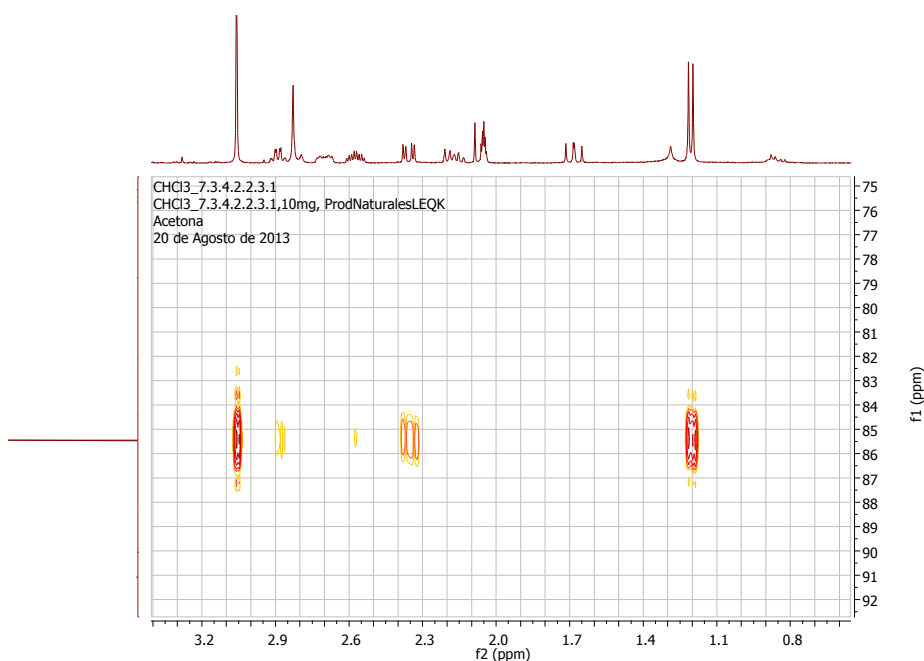


Figura 3-19. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) ($\delta_{\text{H}} 0.8 - \delta_{\text{H}} 3.2$ ppm)

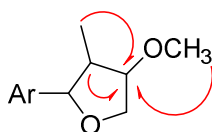


Figura 3-20. Subestructura del compuesto Ohc H2 (b)

En la región entre $\delta_{\text{H}} 5.0$ y $\delta_{\text{H}} 6.0$ ppm se encuentran las señales en $\delta_{\text{H}} 5.03$ (dd, $J = 10.2, 0.9$ Hz, $1\text{H-9}'\text{a}$) y 5.08 (dd, $J = 16.9, 1.6$ Hz, $1\text{H-9}'\text{b}$) típicas de un metileno terminal, las cuales por medio del experimento COSY correlacionan con la señal en $\delta_{\text{H}} 5.81$ ppm (m, $1\text{H-8}'$), la cual a su vez acopla con las señales en $\delta_{\text{H}} 2.17$ ppm (m, $1\text{H-7}'$) y $\delta_{\text{H}} 2.70$ ppm (m, $1\text{H-7}'$) correspondientes a dos hidrógenos diastereotópicos (ver Figuras 3-21) lo que corrobora la presencia del grupo alilo.

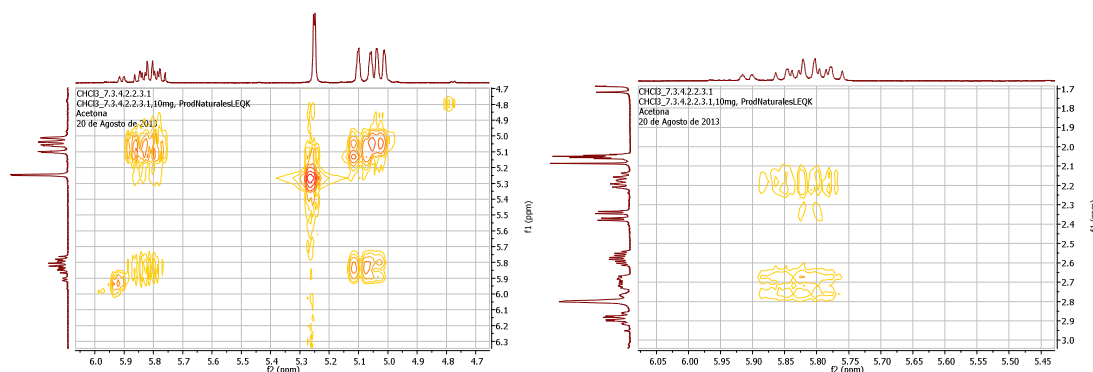


Figura 3-21. Ampliaciones del experimento COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)

Los protones en δ_{H} 2.17 ppm y δ_{H} 2.70 ppm pertenecientes al grupo alilo correlacionan mediante el experimento COSY con un metino alifático en δ_{H} 2.57 ppm (ddt $J=12.4, 8.3, 4.1$ Hz, $1\text{H}-1'$) el cual a su vez acopla con dos señales en δ_{H} 1.68 ppm (dd, $J=14, 12.2$ Hz $1\text{H}-6\text{a}'$) y δ_{H} 2.36 ppm (dd, $J=14, 4.3$ Hz, $1\text{H}-6\text{b}'$) que corresponden a dos hidrógenos diasterotópicos de un metileno alifático en **C-6** que diferencia al compuesto **Ohc H2** de la mirandina A. Tanto estos protones diasterotópicos como el protón en δ_{H} 2.57 ppm correlacionan mediante el experimento HMBC con un carbono en δ_{C} 194.7 ppm (**C-2'**) típico de un carbonilo de cetona así como con el carbono cuaternario oxigenado en δ_{C} 85.5 ppm (**C-5'**) (ver Figura 3-22).

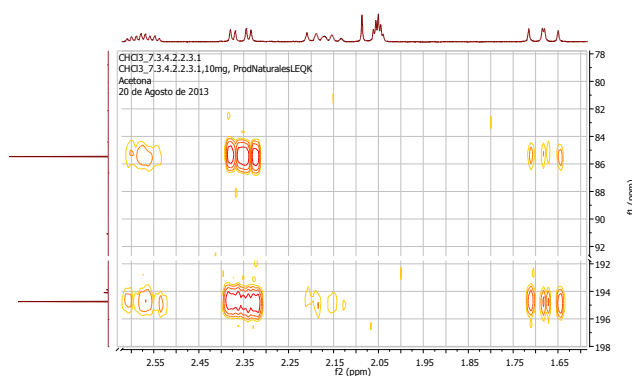


Figura 3-22. Ampliación del experimento HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) (δ_{H} 1.65 – δ_{H} 2.55 ppm)

Con esta información se propone entonces que la estructura del compuesto **Ohc H2** corresponde con la que se presenta en la Figura 3-23. Esta estructura, a diferencia de la mirandina A, está ausente el doble enlace en **C-6'** y está presente un sustituyente metoxilo en la posición **C-3'**, que corresponde con la señal en δ_H 3.67 ppm. Esta señal, mediante el experimento HMQC se observó que correlaciona con el carbono **C-3'** (δ_C 133.5 ppm), típico de carbono olefinico oxigenado:

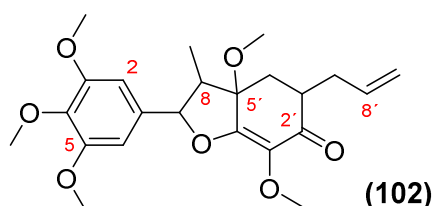


Figura 3-23. Estructura del compuesto Ohc H2.

Esta estructura posee cuatro carbonos quirales en las posiciones **7**, **8**, **1'** y **5'**. La estereoquímica relativa entre las posiciones en **C7** y **C8** es posible establecerla comparando con la literatura (ver Tabla 3-5) con un compuesto relacionado estructuralmente, con el neolignano aislado conocido como armenina B (**103**). (Trevisan, Yoshidaa, & Gottlieb, 1984)

	armenina B (CDCl ₃)	Ohc H2 ((CD ₃) ₂ O)	Ohc H2 (CDCl ₃)
C7	(5.27 d J = 2 Hz)	(5.25 d J = 2Hz)	(5.13 d J= 2.2 Hz)
C8	(2.65 dq J= 2 y 8 Hz)	(2.89 dq J= 2 y 7,4 Hz)	(2.74 dq J=2.2 y 7.4 Hz)

Tabla 3-5. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H2 y el neolignano armenina.

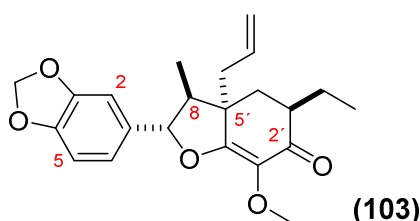


Figura 3-24. Estructura de la armenina B.

La posición relativa del grupo alilo se estableció así mismo por análisis de la constante de acoplamiento del protón en **C1'** (ddt, J= 12.4, 8.3, 4.1 Hz) con relación a los protones diastereotópicos en **C6'** (**H6'a** dd J = 14, 12.2 Hz / **H6'b** dd J

= 14, 4.3 Hz) teniendo en cuenta la Figura 3-25 que corresponde a la configuración de un ciclohexeno. (Eliel & Wilen, 2005)

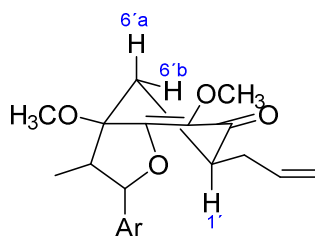
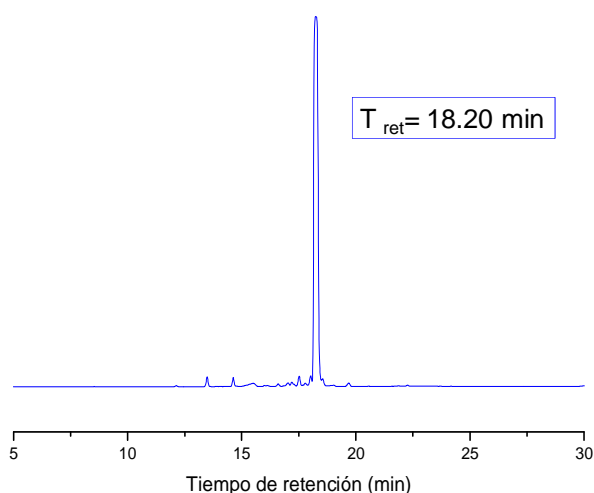


Figura 3-25. Compuesto Ohc 2: Configuración para un ciclohexeno

Dicho modelo permite explicar las constantes de acoplamiento de los protones diasterotópicos, siendo la $J = 14$ Hz presente en ambos la que corresponde con la constante geminal, $J = 12.2$ Hz constante ax-ax entre **H6'a-H1'** y $J = 4.3$ Hz constante ax-eq entre **H6'b-H1'**. La comparación de los datos de ^{13}C , con la literatura utilizando como patrón la mirandina A aislada de *Nectandra miranda* y la asignación total de las señales se encuentra en el anexo C.2. (Wenkert, Gottlieb, Gottlieb, Pereira, & Formiga, 1976)

Para analizar la pureza del compuesto y corroborar la estructura planteada se registro el cromatograma del compuesto por FR-CLAE-DAD-EM obteniéndose los siguientes resultados:



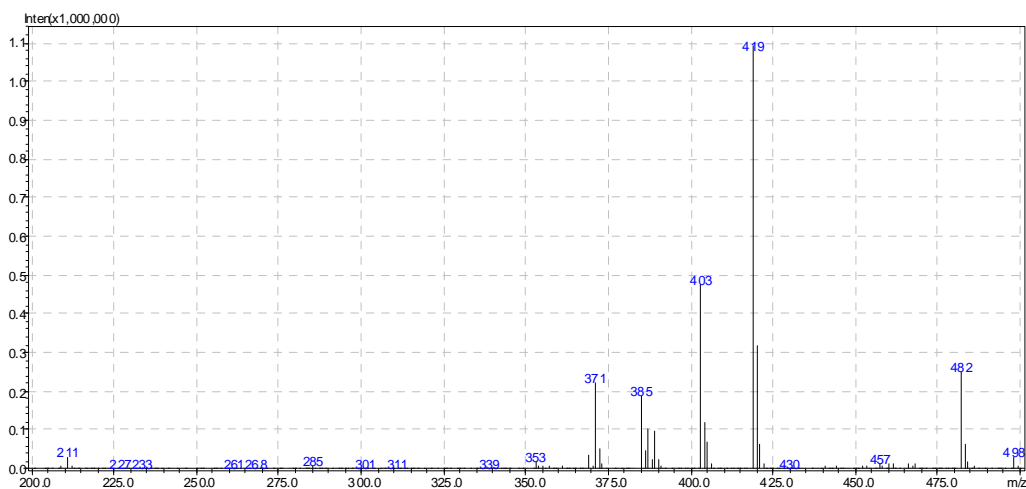


Figura 3-26. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H2

Se obtuvo un ion $[M+H]^+ = 419$ m/z, el cual corresponde con el valor esperado para la estructura planteada. Su fórmula molecular fue además corroborada mediante la determinación de la masa exacta por CLAE-ESI-EM de alta resolución, cuyo valor para el ión pseudomolecular $[M+H]^+$ fue de m/z 419.207 ($C_{23}H_{31}O_7$, requerido m/z 419.2070).

Para establecer la estereoquímica absoluta del compuesto, se realizó el experimento de dicroísmo circular. Su espectro (ver anexo B.24) mostró los efectos cotton negativo y positivo, respectivamente, fueron dados a $[\theta]_{294} -38666$; $[\theta]_{278} 0$; $[\theta]_{332} 16000$ (MeOH, c 0.12), los cuales fueron comparados con los reportados para la armenina A, así como otros compuestos relacionados, lo que permitió concluir que la configuración absoluta del compuesto es similar a la de la armenina A, y se plantea entonces la estructura mostrada en la Figura 3-26. Este compuesto no presenta reportes previos en la literatura, por lo que se considera novedoso y se denominará **heterocromina A**, ((7S,8R,5'S,1'R)-1'-alil-3',5'-dimetoxi-8-metil-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-7,1',5',6'-tetrahydrobenzofuran-2(2H)-ona).

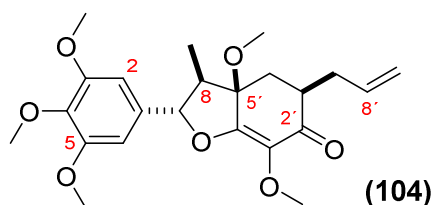


Figura 3-27. Estructura de Ohc H2.

3.3.3 Compuesto Ohc H3

El compuesto **Ohc H3** se aisló como un sólido blanco soluble en CHCl_3 y su estructura fue determinada por análisis de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C y por comparación con la literatura, encontrándose que su esqueleto básico corresponde a un grupo de compuestos previamente aislados de una especie de la misma familia (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009a) conocidas como cinerinas (ejemplo cinerina A **(105)** Figura 3-29) pertenecientes a los neolignan biciclo[3.2.1]octánicos, su espectro de RMN ^1H se observa en la Figura 3-28 con las señales características en la región aromática, señales características de metoxilos alrededor de δ_{H} 3.5 ppm y señales en la región alifática, dichas señales integran para 25 protones.

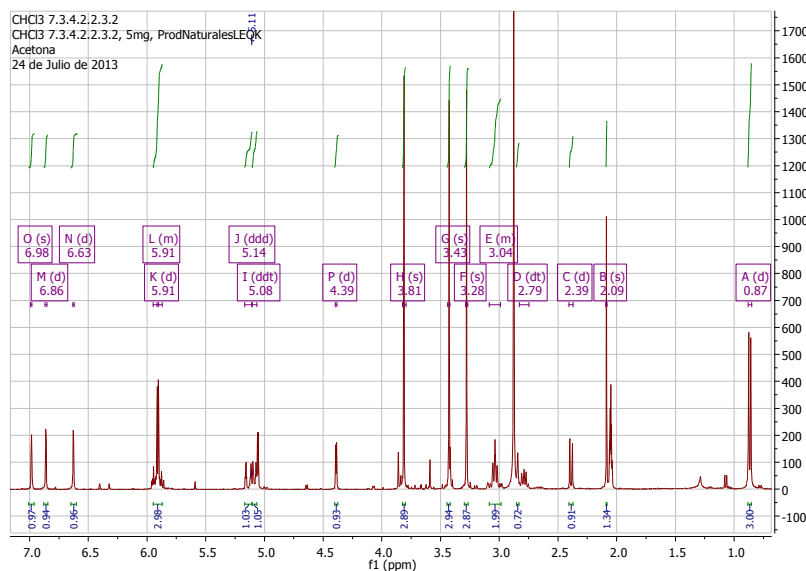


Figura 3-28. Espectro de ^1H del compuesto Ohc H3.

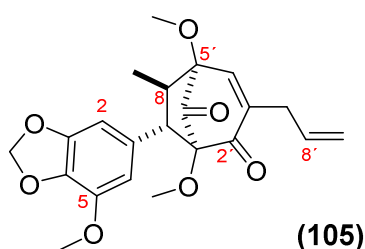


Figura 3-29. Estructura de la cinerina A aislada de *Pleurothyrium cinereum*

En la región aromática se observan dos dobletes en δ_H 6.86 ppm (d, $J=1,4$ Hz 1H-**6**) y δ_H 6.63 ppm (d $J=1,3$ Hz 1H-**2**) que corresponden a los hidrógenos aromáticos en posición meta sobre un anillo tetrasustituido. Estas señales correlacionan en el experimento HMQC con los carbonos en δ_C 134.6 ppm (**C-3**), δ_C 149.3 ppm (**C-4**) y δ_C 143.5 ppm (**C-5**) típicos de carbonos aromáticos oxigenados así como con un carbono en δ_C 57.5 ppm (**C-7**) correspondiente a un metino alifático.

La oxigenación de los carbonos aromáticos se explica con la señal en δ_H 3.81 ppm (s, 3H, **OCH₃ 5**) que correlaciona en el experimento HMQC con el carbono en δ_C 143.5 ppm y corresponde con un metoxilo sobre el anillo aromático así como la señal en δ_H 5.91 ppm (dd $J= 5.1, 1.1$ Hz, 2H-**OCH₂O 3,4**) que correlaciona con los carbonos aromáticos en δ_C 134.5 y δ_C 149.3 y corresponde con un grupo metilenodioxi entre los carbonos **C3** y **C4** sobre el anillo aromático lo que permite corroborar la subestructura correspondiente al anillo aromático tetrasustituido como se indica en la Figura 3-30.

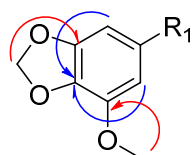


Figura 3-30. Subestructura del compuesto Ohc H3 (a)

En la región entre δ_H 3.0 y δ_H 5.0 ppm se observan las cuatro señales típicas de un sustituyente alílico. En δ_H 5.08 ppm (ddt, $J= 5, 2, 1$ Hz 1H-**9'a**) y δ_H 5.14 ppm (ddd, $J= 17.1, 3.4, 1.5$ Hz, 1H-**9'b**) se encuentran las señales que corresponden a los

hidrógenos diasterotópicos del metileno terminal, la señal en δ_H 5.91 (m, 1H-8') correspondiente a un metino de tipo olefina y la señal en δ_H 3.03 ppm (m, 2H-7') correspondiente a un metileno alifático, el cual, en el experimento HMBC, correlaciona con el carbono olefínico en δ_C 151 ppm (**C-1'**), lo que permite determinar la posición del sustituyente sobre el biciclo como se indica en la Figura 3-31.

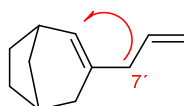


Figura 3-31. Sustituyente alílico del compuesto Ohc H3

En la región alifática se encuentra la señal en δ_H 0.87 ppm (d, $J= 6.9$ Hz, 3H-9) que corresponde con un metilo el cual por el experimento COSY correlaciona con la señal en δ_H 2.79 ppm (dt, $J= 14.5, 7.1$ Hz, 1H-8) correspondiente a un metino alifático, el cual correlaciona a su vez con la señal en δ_H 2.39 ppm (d, $J=8.6$, 1H-7) también de tipo metino alifático, los protones en δ_H 0.87 ppm y δ_H 2.79 ppm, así como la señal en δ_H 3.43 ppm (s, 3H-**OCH₃ 5'**) típica de metoxilo sobre carbono alifático correlacionan en el experimento HMQC con el carbono en δ_C 88.3 ppm (**C-5'**). De forma similar en el experimento HMQC se observan las correlaciones de la señal en δ_H 2.39 ppm así como la señal en δ_H 3.28 ppm (s, 3H-**OCH₃ 3'**) con el carbono alifático oxigenado en δ_C 91.04 ppm (**C-3'**) por lo que la oxigenación de este carbono también viene dada por la presencia de un metoxilo.

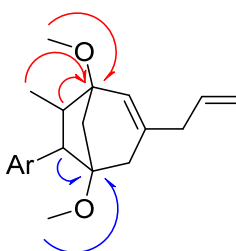


Figura 3-32. Subestructura del compuesto Ohc H3 (b)

La señal en δ_H 4.39 ppm (d, $J = 3.5$, 1H-4') es típica de un hidrógeno sobre carbono de oximetino la cual en el experimento HMQC correlaciona con los

carbonos δ_C 49.4 ppm (**C-8**) y δ_C 57.5 ppm (**C-7**) lo que permite ubicar esta señal en la posición **C4'**. Finalmente la señal en δ_H 6.98 ppm (s, 1H, **H6'**) típica de protones sobre carbonos olefinicos corresponde a la posición **C-6'** del esqueleto básico presentando además en el experimento HMBC una correlación con el carbono en δ_C 199 ppm (**C2'**) típico de cetona.

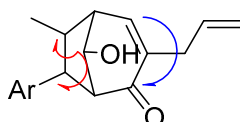


Figura 3-33. Subestructura del compuesto Ohc H3 (c)

La estructura propuesta para el compuesto **Ohc H3** por comparación de los desplazamientos de ^{13}C (ver anexo C.3) con la literatura (Coy-Barrera, Cucca-Suárez, & Sefkow, 2009a) se corresponde a la estructura planteada para la cinerina C (**106**), donde se presentan 4 carbonos asimétricos en las posiciones **7**, **8**, **3'** y **5'**, la estereoquímica relativa en los carbonos 7 y 8 se determinó comparando los datos de RMN 1H con los reportados en literatura encontrándose que se presentan diferencias debido al solvente pero se mantienen las multiplicidades y la constante en el caso del doblete, por lo que es posible afirmar que posee la misma estereoquímica relativa para las posiciones **C7** y **C8**:

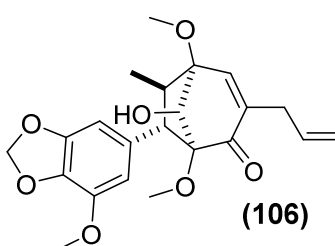


Figura 3-34. Estructura de la cinerina C

H	Cinerina C (CDCl ₃) (400MHz)	Ohc H3 ((CD ₃) ₂ CO (400MHz)
H7	2.43 (1H d 8.5)	2.39 (1H d 8.6)
H8	2.88 (1H m)	2.79 (1H m)

Tabla 3-6. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H3 y el neolignano cinerina C.

Se obtuvo el cromatograma del compuesto **Ohc H3** por FR-CLAE-DAD-MS el cual evidenció la presencia de algunas impurezas y se determinó el pico del ión pseudomolecular $[M+H]^+$ en 403 m/z, que resulta ser el pico mayoritario, lo que permite confirmar la estructura planteada.

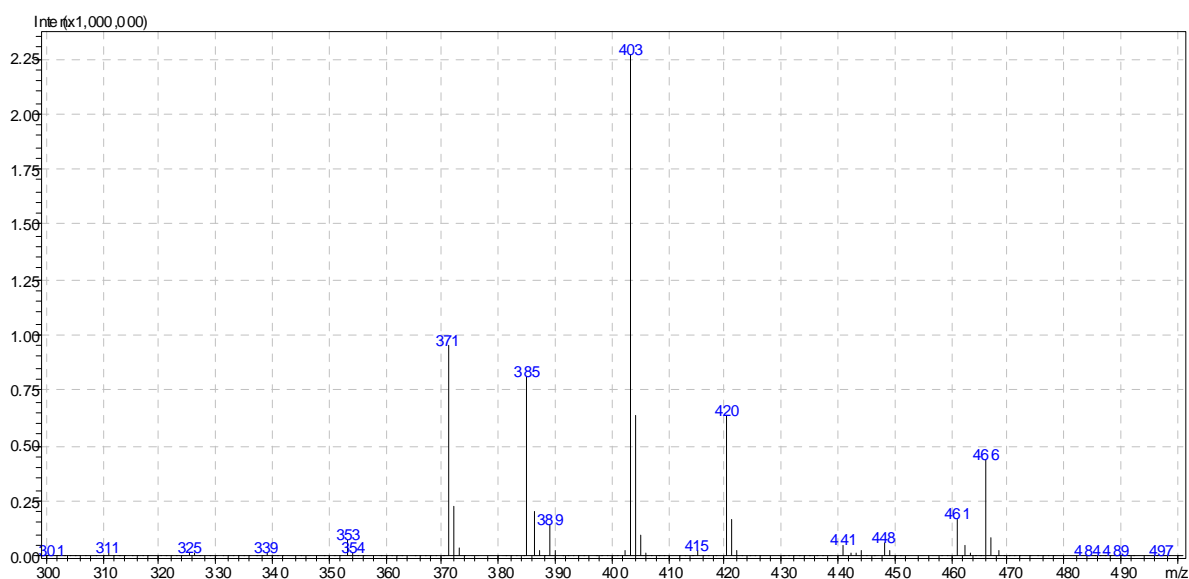
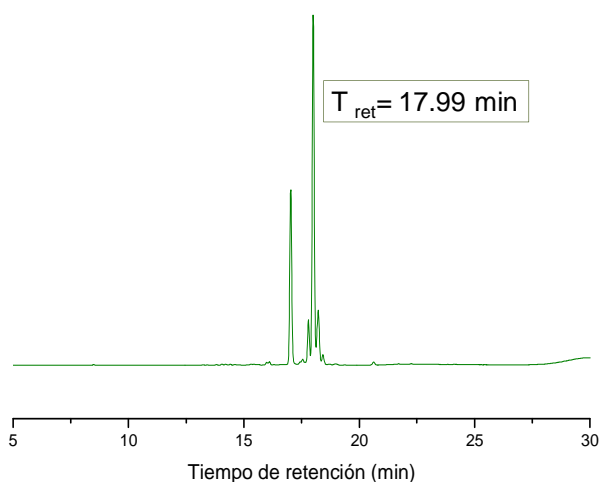


Figura 3-35. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H3.

Se determinó por CLAE-ESI-EM de alta resolución la masa exacta del compuesto **Ohc H3** que corresponde con 402.1679 ($[M+H]$ 403.1768) y por medio del

experimento de DC ($[\theta]_{265} - 16250$; $[\theta]_{331} - 11875$, MeOH, c 0.08) se determinó su configuración absoluta equivalente a la de la cinerina C. (Coy-Barrera, Cucasuárez, & Sefkow, 2009a)

3.3.4 Compuesto Ohc H4

El compuesto denominado **Ohc H4** corresponde al compuesto mayoritario de una mezcla que revela fuertemente con vapores de I_2 y con revelador de Hannessian. Su estructura se determinó por análisis de los datos de RMN 1H y ^{13}C y en comparación con los datos espectroscópicos del compuesto **Ohc H2** ya que presenta una estructura similar. La purificación de dicho compuesto por FR-CLAE-UV en semipreparativa permitió la obtención de 2 mg del compuesto puro cuyo espectro evidencia muchas de las señales esperadas pero que presenta una baja relación señal-ruido, por lo que requiere de un análisis por RMN con aditamento para microsonda. El espectro de RMN 1H (Figura 3-36) del compuesto **Ohc H4** presenta señales que integran para 26 protones.

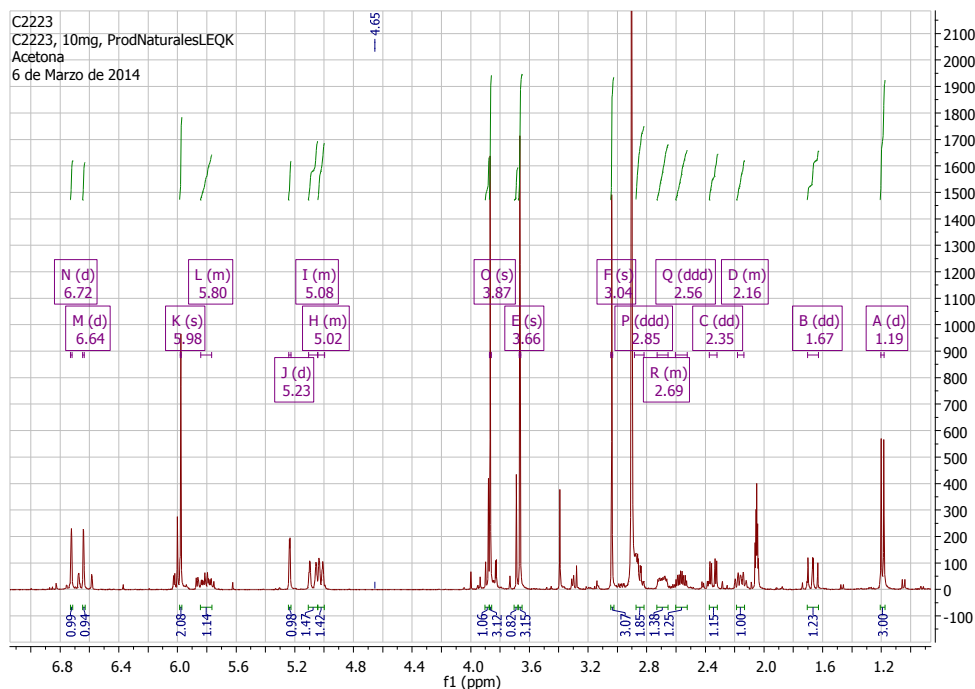


Figura 3-36. Espectro RMN 1H del compuesto Ohc H4

Al comparar los espectros de RMN ^1H del compuesto **Ohc H2** y **Ohc H4** es posible observar que se presentan diferencias en la región entre δ_{H} 5.0 ppm y δ_{H} 7.0 ppm (ver Figura 3-38) donde para el compuesto **Ohc H4** se encuentran dos dobletes en δ_{H} 6.64 ppm (d, $J= 1$ Hz 1H-2) y δ_{H} 6.72 ppm (d, $J= 0.8$ Hz 1H-6) que corresponden a dos protones aromáticos en posición meta. Lo anterior indica que existe una variación en la sustitución del anillo aromático. Se observa además una señal en δ_{H} 5.98 ppm (s, 2H-**OCH₂O** 3,4) correspondiente con un singlete típico de protones de un grupo metilenodioxi, que es común en este tipo de neolignan (ver literal 1.7.2), lo que permite plantear la siguiente subestructura:

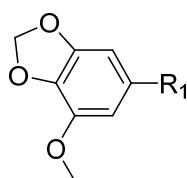


Figura 3-37. Subestructura del compuesto Ohc H4 (a)

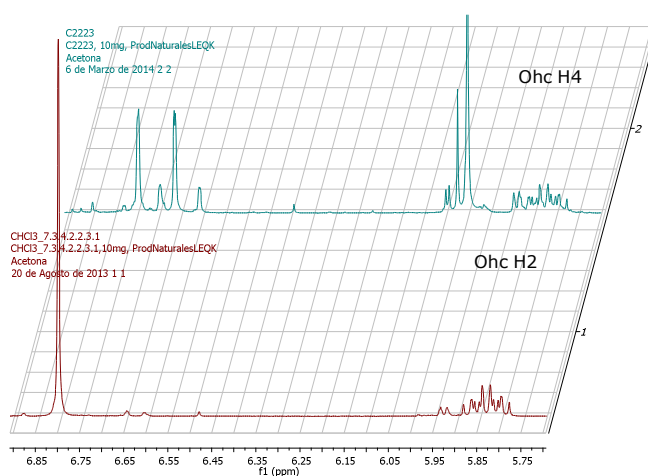


Figura 3-38. Comparación espectros RMN ^1H de Ohc H2 y Ohc H4 entre δ_{H} 5.6 a δ_{H} 6.9 ppm.

Otra región del espectro donde se presentan diferencias entre los compuestos **Ohc H2** y **Ohc H4** es entre δ_{H} 3.0 ppm y δ_{H} 4.0 ppm como se observa en la Figura 3-39.

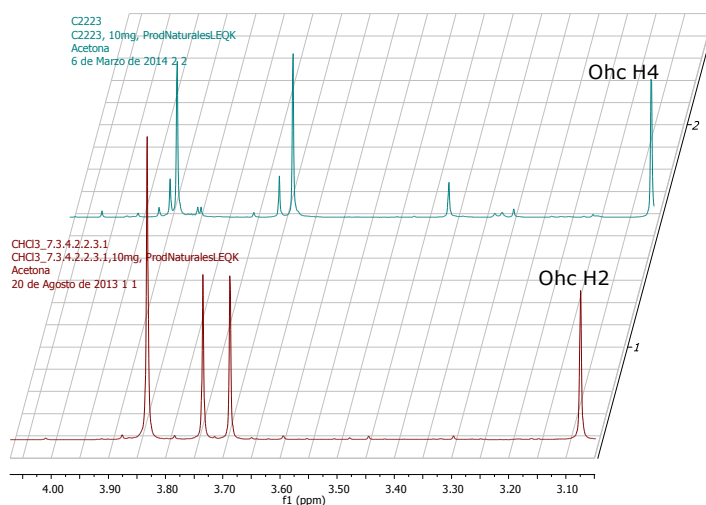


Figura 3-39. Comparación espectros RMN ¹H de Ohc H2 y Ohc H4 entre δH 3 y δH 4 ppm

Para el compuesto **Ohc H4** se presentan en esta región 3 señales típicas de metoxilos en δ_H 3.04 ppm (s 3H-**OCH₃** 3'), δ_H 3.66 ppm (s 3H-**OCH₃** 5'), y δ_H 3.87 ppm (s 3H-**OCH₃** 5). Las restantes señales de **Ohc H4** son comparables con las ya analizadas para **Ohc H2**. En cuanto a su estereoquímica relativa presenta un comportamiento similar al compuesto **Ohc H2** tanto en las posiciones **C7** y **C8** como en la ubicación del sustituyente alílico como se observa en la Tabla 3-7.

C	Ohc H2 ((CD ₃) ₂ O)	Ohc H4 ((CD ₃) ₂ O)
H7	5.25 (d J = 2Hz)	5.23 (d J 2.3 Hz)
H8	2.89 (dq J = 2, 7.4 Hz)	2.85 (dq J = 2, 7.2 Hz)
6'a	1.68 (dd J = 14, 12.2 Hz)	1.67 (dd J= 14, 12.2 Hz)
6'b	2.36 (dd J = 14, 4.3 Hz)	2.35 (dd J = 14, 4.3 Hz)
1'	2.57 (ddd, J= 12.4, 8.3, 4.1 Hz)	2.56 (ddd, J=16.3, 8.4, 4.1 Hz)

Tabla 3-7. Comparación con datos espectroscópicos de Ohc H2 y Ohc H4.

El análisis comparativo realizado permite plantear que la estructura del compuesto **Ohc H4** es:

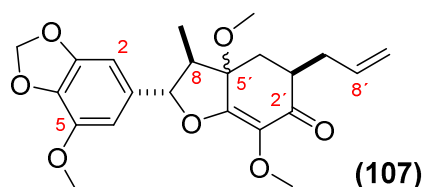


Figura 3-40. Estructura del compuesto Ohc H4.

Para determinar su configuración absoluta se requeriría de un análisis por DC, pero no fue posible realizarlo por la cantidad obtenida del compuesto puro. El compuesto **Ohc H4** no presenta reportes previos en la literatura por lo que se considera novedoso, y debido a la relación estructural que mantiene con el compuesto **Ohc H2**, se denominará **heterocromina B**. ((7S,3R,5R)-1-*alil*-3',5'-dimetoxi-7-(3,4-metilendioxi-5-metoxi)-8-metil-7,1',5',6'-tetrahidrobenzofuran-2'(2H)-ona)

3.3.5 Compuesto Ohc H5

El compuesto **Ohc H5** se aisló como un líquido amarillo que revela con vapores de I₂ y con vapores de NH₃ el cual por comparación de sus datos espectroscópicos con la literatura corresponde con el flavonol 3-O- glicosidado conocido como afzelina (**60**) (kaempferol-3-O- α -L-ramnósido) reportado previamente en el género (literal 1.7.3). (Garcez et al., 1995)

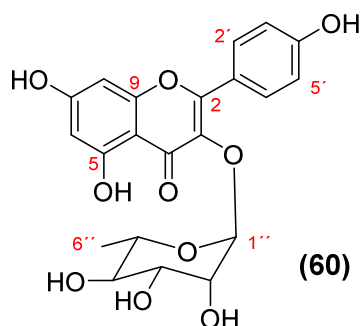


Figura 3-41. Estructura del compuesto Ohc H5 (afzelina)

El espectro de RMN ^1H (Figura 3-42) muestra señales que integran para 14 protones. Tanto los protones de los grupos hidroxilo sobre los anillos aromáticos como aquellos sobre el carbohidrato resultan intercambiables por estar en un disolvente prótico.

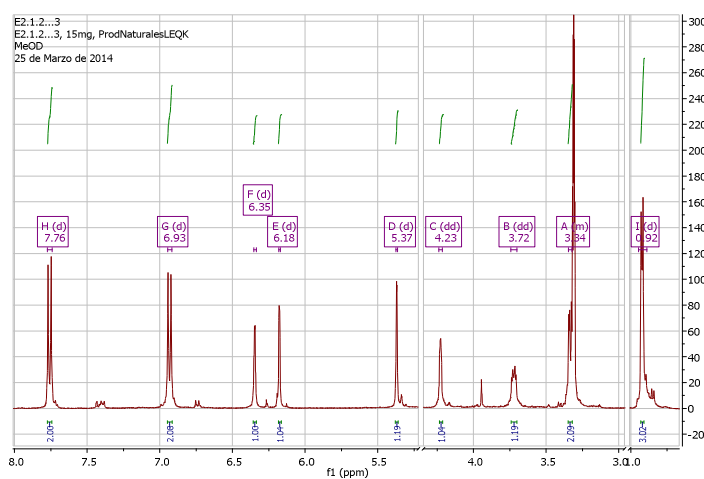


Figura 3-42. Espectro RMN ^1H del compuesto Ohc H5

Las señales características de este compuesto se encuentran para la aglicona en la región aromática entre δ_{H} 6.0 y δ_{H} 8.0 ppm correspondientes a dos dobletes en δ_{H} 7.76 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 2H-2'-6') y δ_{H} 6.93 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 2H-3'-5') típicos de protones en posición relativa orto sobre un anillo aromático disustituido, y dos dobletes en δ_{H} 6,18 ppm (d, $J = 1.7$ Hz, 1H-6) y en δ_{H} 6.35 ppm (d, $J = 1.5$ Hz, 1H-8) característicos de protones en posición meta sobre un anillo tetrasustituido.

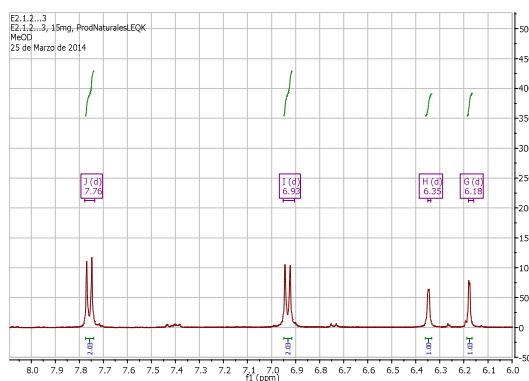


Figura 3-43. Ampliación del espectro RMN ^1H del compuesto Ohc H5 entre δ_{H} 6.0 y δ_{H} 8.0 ppm

Las señales correspondientes al azúcar se encuentran entre δ_H 0.90 ppm y δ_H 5.5 ppm, entre ellas se encuentran la señal característica en δ_H 5.37 ppm (d, J= 1.4 Hz, 1H-1'') típica del protón sobre el carbono anomérico de la ramnosa y la señal en δ_H 0.92 ppm (d, J= 5.6 Hz, 3H-6'') correspondiente al metilo terminal que caracteriza a este deoxiazúcar.

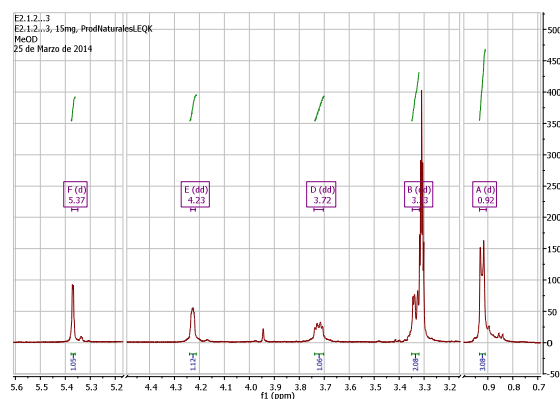
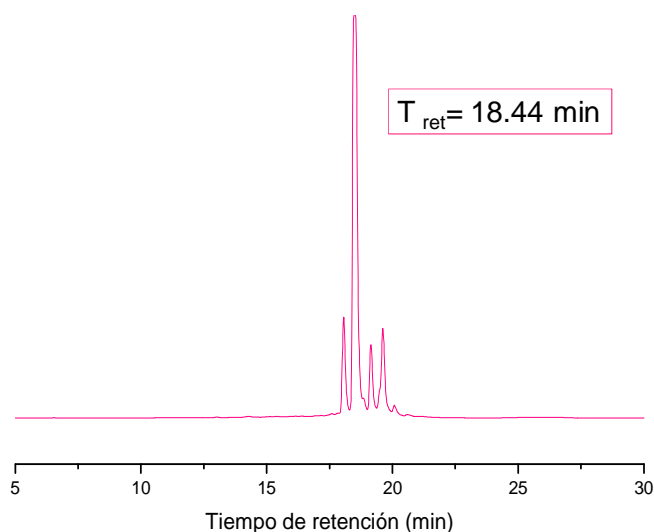


Figura 3-44. Ampliación del espectro RMN 1H del compuesto Ohc H5 entre δ_H 0.7 ppm y δ_H 5.6 ppm

Para confirmar la estructura propuesta y analizar la pureza del compuesto se registró el cromatograma en FR-CLAE-DAD-MS, observándose que presenta algunas impurezas en su cromatograma. En su espectro de masas es posible observar tanto el pico de ion pseudomolecular en $m/z = 433$ así como el pico correspondiente a la aglicona que resulta ser mayoritario en $m/z = 287$.



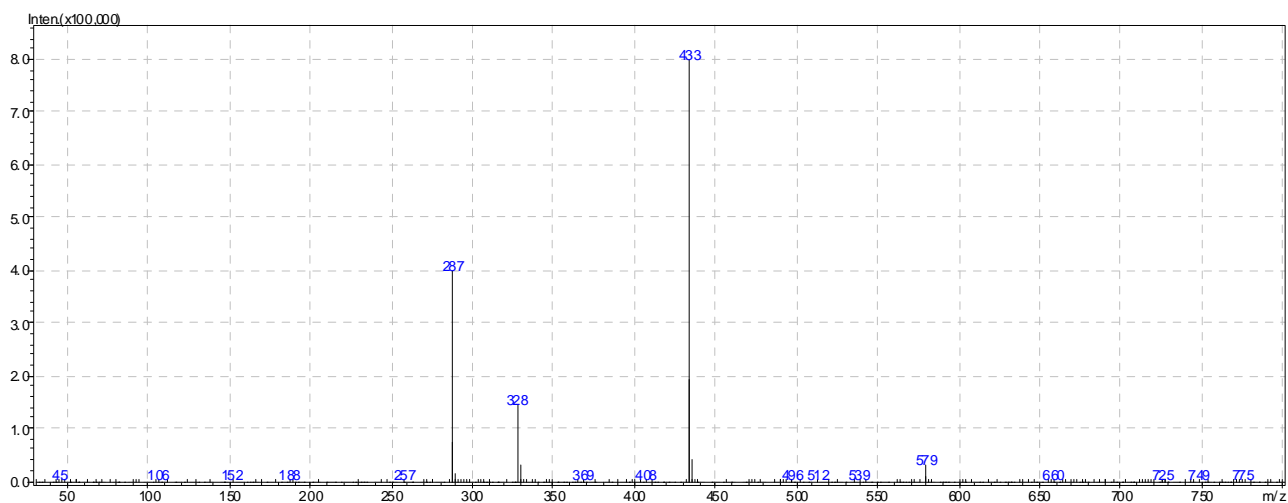


Figura 3-45. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H5.

3.3.6 Compuesto Ohc H6

El compuesto **Ohc H6** se aisló como un líquido amarillo que revela con vapores de I_2 y con vapores de NH_3 . Por comparación de sus datos espectroscópicos con la literatura se estableció que corresponde al flavonol 3-O- glicosidado conocido como tamarixetina 3-O- α -L-ramnosido (**93**) reportado previamente en una especie de la familia conocida como *Lindera glauca*. (Huh et al., 2014). El espectro de RMN 1H del compuesto **Ohc H6** presenta señales que integran para 16 protones.

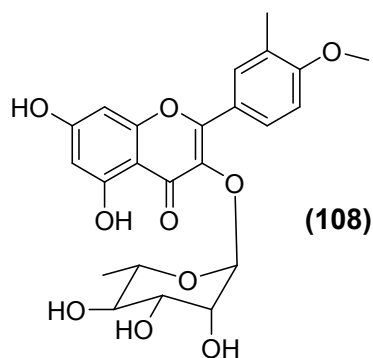


Figura 3-46. Estructura del compuesto Ohc H6 (tamarixetina-3-O- α -L-ramnosa)

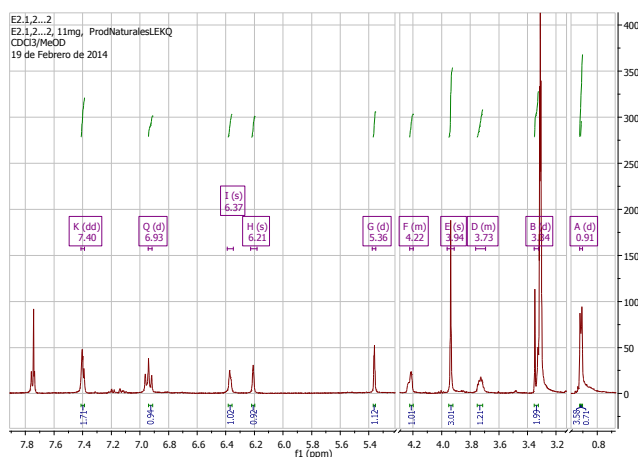


Figura 3-47. Espectro RMN ^1H del compuesto Ohc H6

El compuesto **Ohc H6** presenta una estructura similar al compuesto **Ohc H5**, la diferencias se presentan en δ_{H} 3.94 ppm (s, 3H-**OCH₃ 4'**) señal correspondiente al metoxilo aromático en la posición **C4'**. También hay diferencias en la región aromática donde debido a la modificación en el patrón de sustitución se encuentran las siguientes señales un doblete en δ_{H} 6.93 ppm (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, **H5'**).y en δ_{H} 7.40 ppm (m, 2H, **H2'** y **H6'**) un multiplete donde se encuentran solapadas las señales del protón en **C2'** y **C6'**, que fueron determinadas teniendo en cuenta el experimento HMBC y por comparación de los datos de RMN ^{13}C con la literatura.(ver anexo C.6).

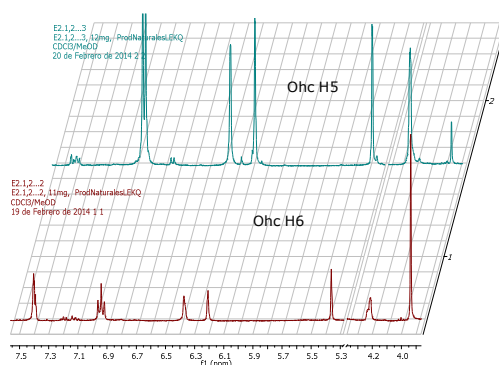


Figura 3-48. Comparación espectros RMN ^1H de Ohc H5 y Ohc H6 entre δ_{H} 4.0- δ_{H} 7.5 ppm

La razón de la superposición de las señales atribuida a la presencia de una impureza fue confirmada por medio del cromatograma por FR-CLAE-DAD-MS. Para el tiempo de retención del compuesto mayoritario se observaron tanto el pico de ion pseudomolecular como el que corresponde a la aglicona como se observa en la Figura 3-49.

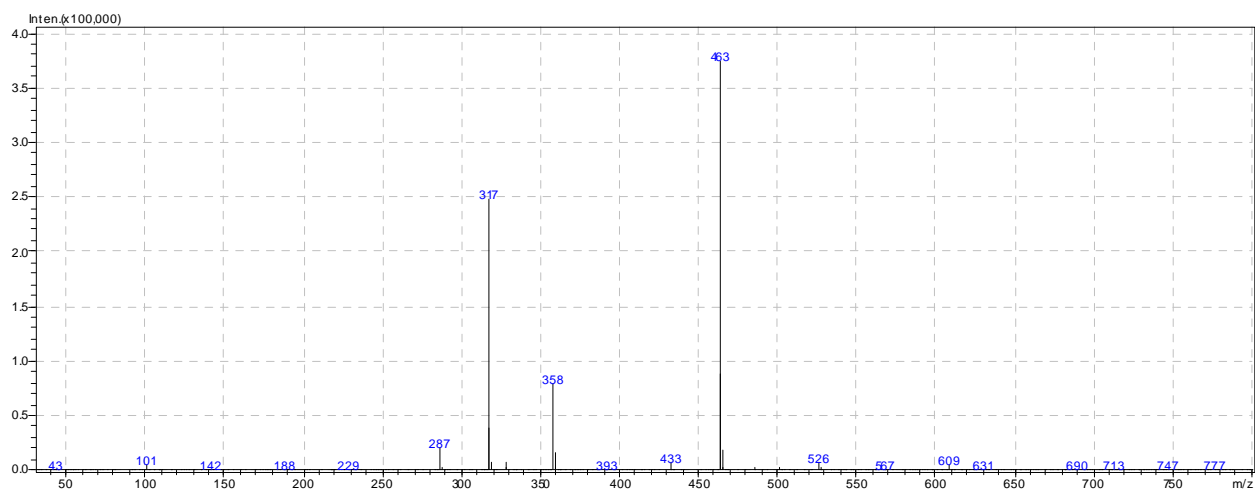
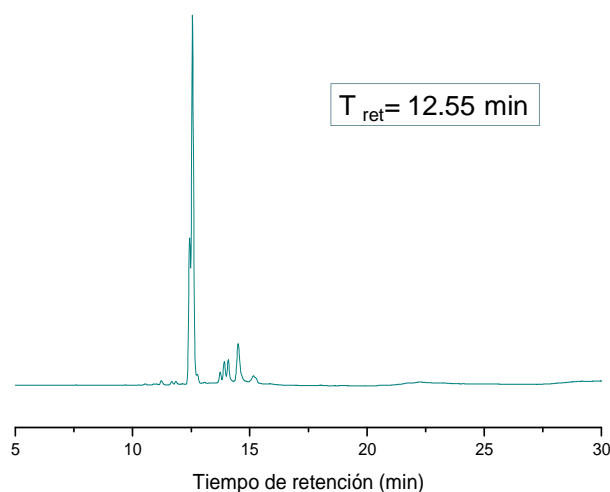


Figura 3-49. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H6

3.3.7 Compuesto Ohc H7

El compuesto **Ohc H7** se aisló como un líquido amarillo que revela con vapores de I₂ y con vapores de NH₃, el cual por comparación de sus datos espectroscópicos

con la literatura corresponde con el flavonol 3-O-glicosidado conocido como 2''-O-(Z-p-coumaroil)astragalina (**94**) reportado previamente en una especie de la familia Rosaceae conocida como *Rubus rigidus*. (Nguelefack et al., 2011) El espectro de RMN ^1H del compuesto Ohc H6 presenta señales que integran para 19 protones.

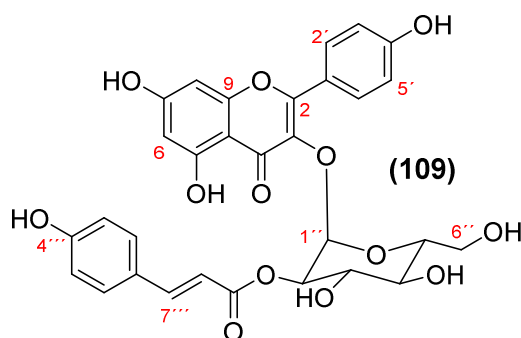


Figura 3-50. Estructura del compuesto Ohc H7 (2''-O-(Z-p-coumaroil)astragalina)

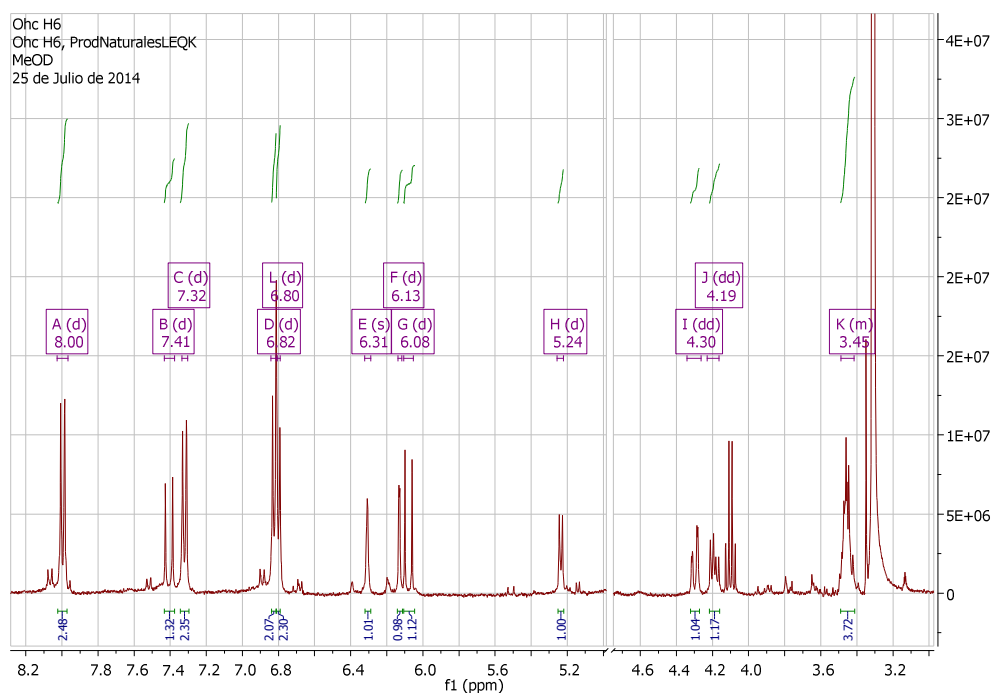


Figura 3-51. Espectro RMN ^1H del compuesto Ohc H7

Los datos espectroscópicos del compuesto **Ohc H7** presentan similitudes con los datos del compuesto **Ohc H5** ya que poseen señales para la misma aglicona. Las señales características que diferencian el compuesto **Ohc H7** se encuentran para

el azúcar en δ_H 4.19 ppm (dd, $J = 11.8, 6.5$ Hz, 1H-6''**a**) y δ_H 4.30 ppm (dd, $J = 11.7, 2$ Hz, 1H-6''**b**) que corresponden con los protones diastereotópicos característicos de la glucosa en la posición **C6''**.

Para el sustituyente p-coumaroil las señales corresponden con dos dobletes en δ_H 6.08 ppm (d, $J = 15.9$, 1H-8''') y en δ_H 7.41 ppm (d, $J = 15.9$, 1H-7''') que por su valor de constante de acoplamiento se asignan a los protones olefínicos de las posiciones **C7'''** y **C8'''** del sustituyente así como dos dobletes en δ_H 7.32 ppm (d, $J = 8.6$ Hz, 2H-2''' - 6''') y δ_H 6.80 ppm (d, $J = 8$ Hz, 2H-3''' - 5''') correspondientes a los protones sobre el anillo aromático.

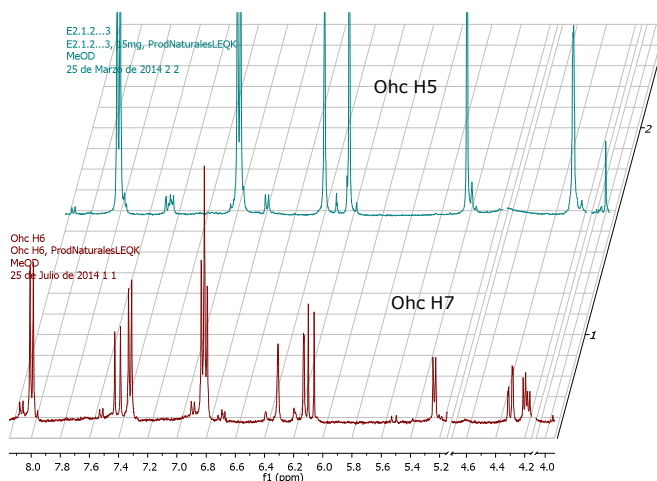


Figura 3-52. Comparación espectros RMN ^1H de Ohc H5 y Ohc H7 entre δ_H 4.0 - δ_H 8.0 ppm

Para confirmar la estructura propuesta y analizar la pureza del compuesto se obtuvo el cromatograma en FR-CLAE-DAD-MS, observándose que presenta algunas impurezas en su cromatograma. En cuanto a su espectro de masas, es posible observar tanto el pico de ion pseudomolecular en $m/z = 595$ así como el pico correspondiente a la aglicona que resulta ser mayoritario en $m/z = 287$.

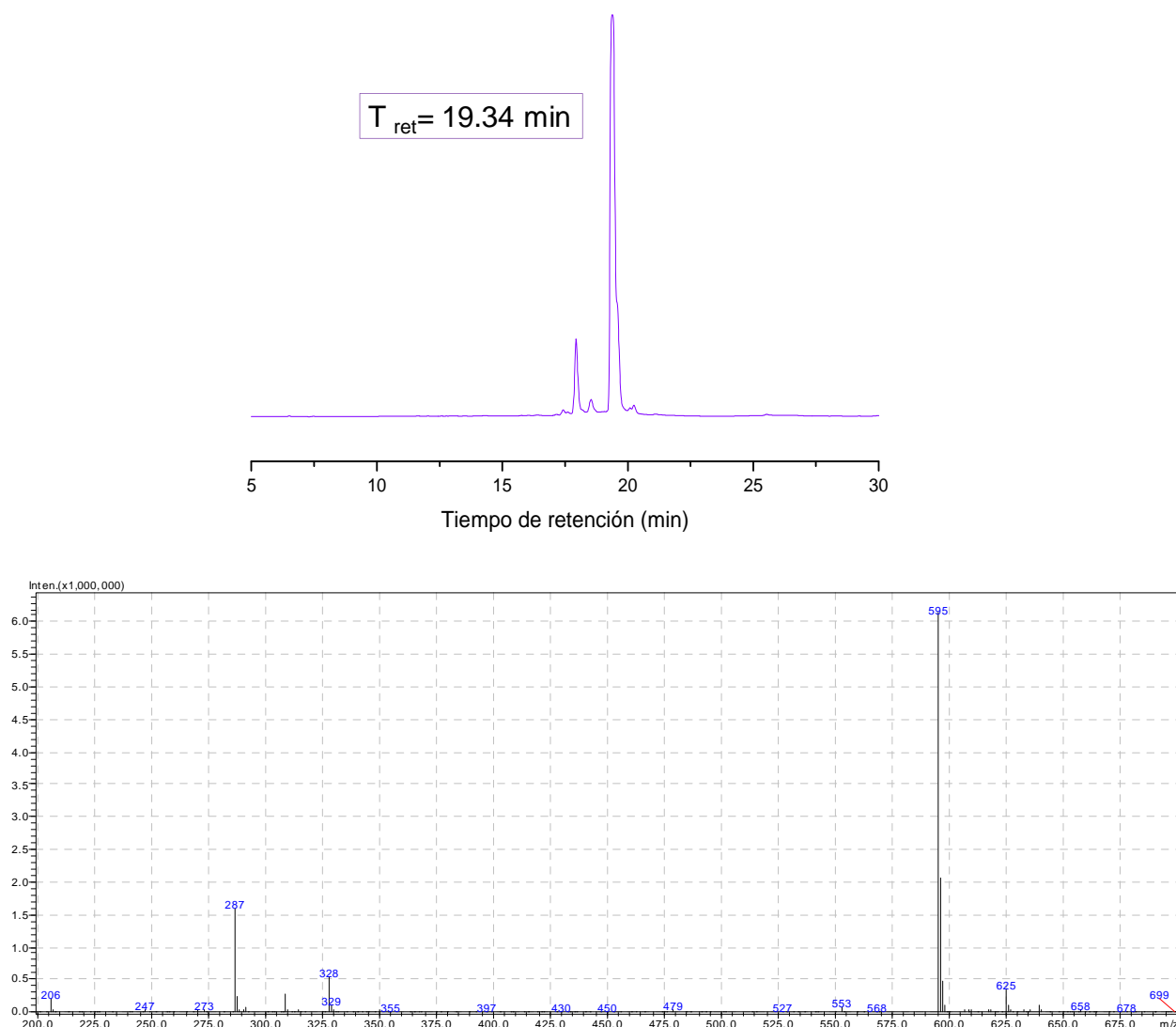


Figura 3-53. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H7

3.3.8 Compuesto Ohc H8

El compuesto **Ohc H8** se aisló como un líquido amarillo que revela con vapores de I_2 y con vapores de NH_3 . Se obtuvo el cromatograma para este compuesto en FR-CLAE-DAD-MS, observándose que su espectro UV-vis es característico para compuestos de núcleo flavonoide. Así mismo, presenta en su espectro de masas un pico en $m/z = 317$ correspondiente con la aglicona, un pico en $m/z = 463$ cuya diferencia de masa sugiere la presencia de un deoxiazúcar que posiblemente corresponde con la ramnosa.

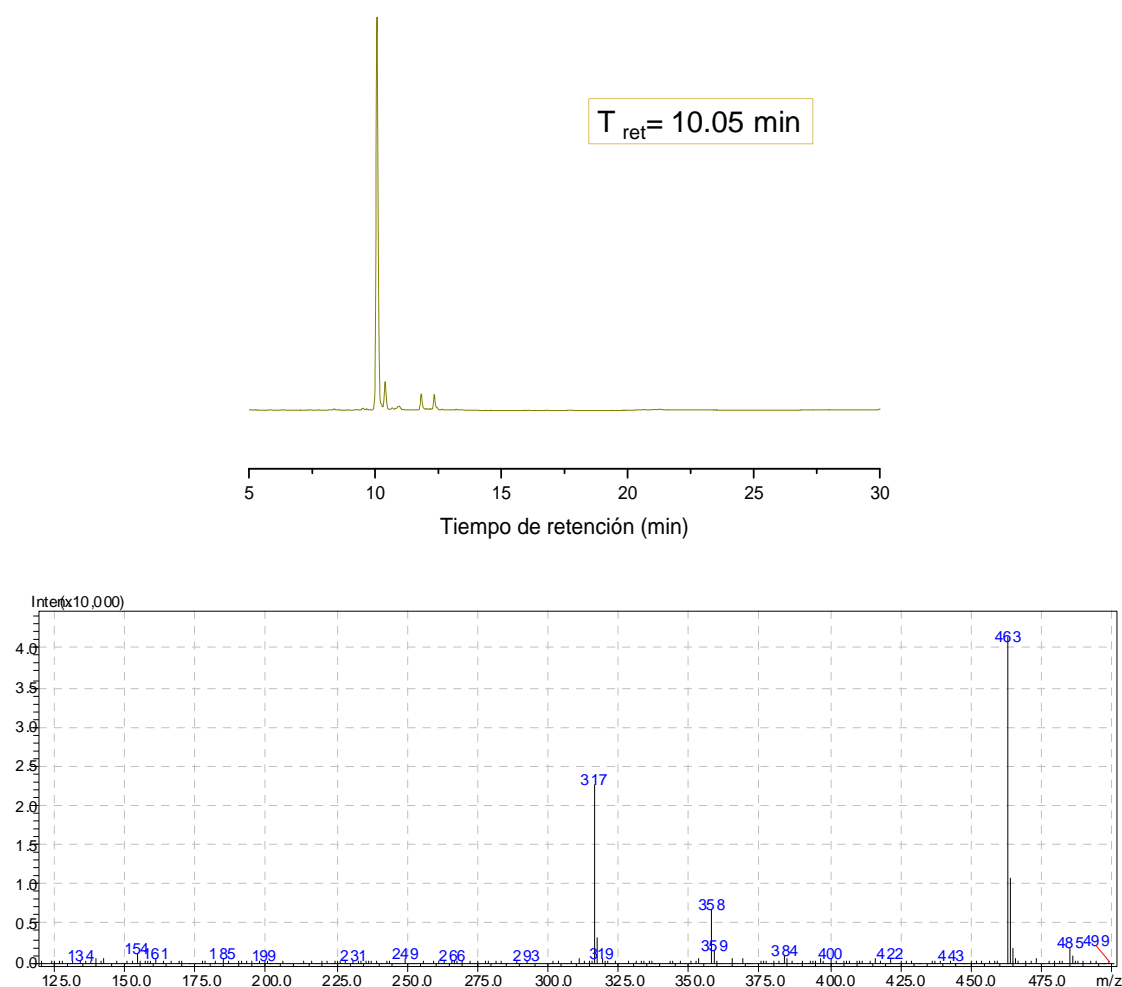


Figura 3-54. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H8

Comparando además los espectros UV-vis de los compuestos **Ohc H5-Ohc H7** con el compuesto **Ohc H8** (ver Figura 3-52) presenta similitudes con el espectro obtenido para la 2'-O-(Z-p-coumaroil)astragalina lo que sugiere además la presencia de un sustituyente p-coumaroil sobre el azúcar. Falta analizar los datos de RMN del compuesto.

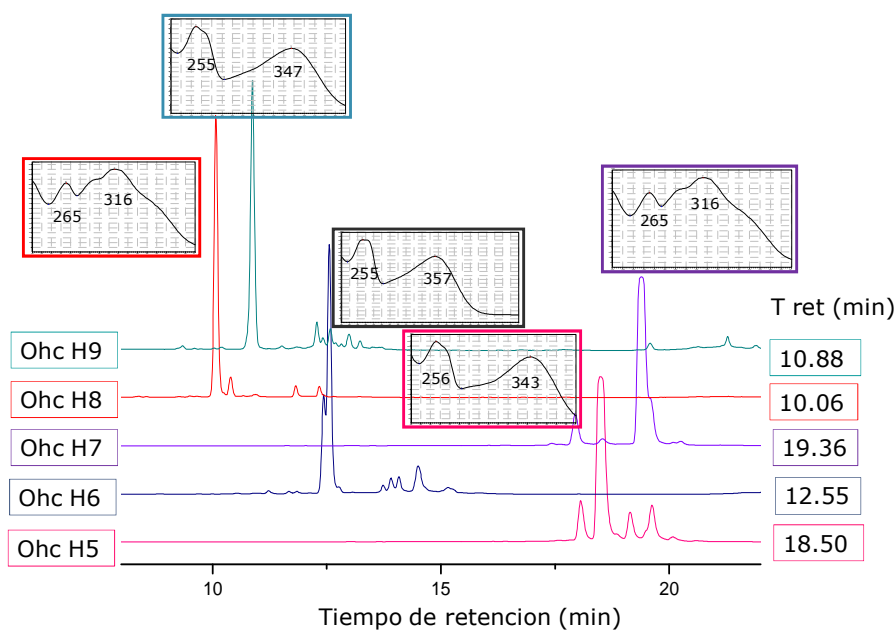
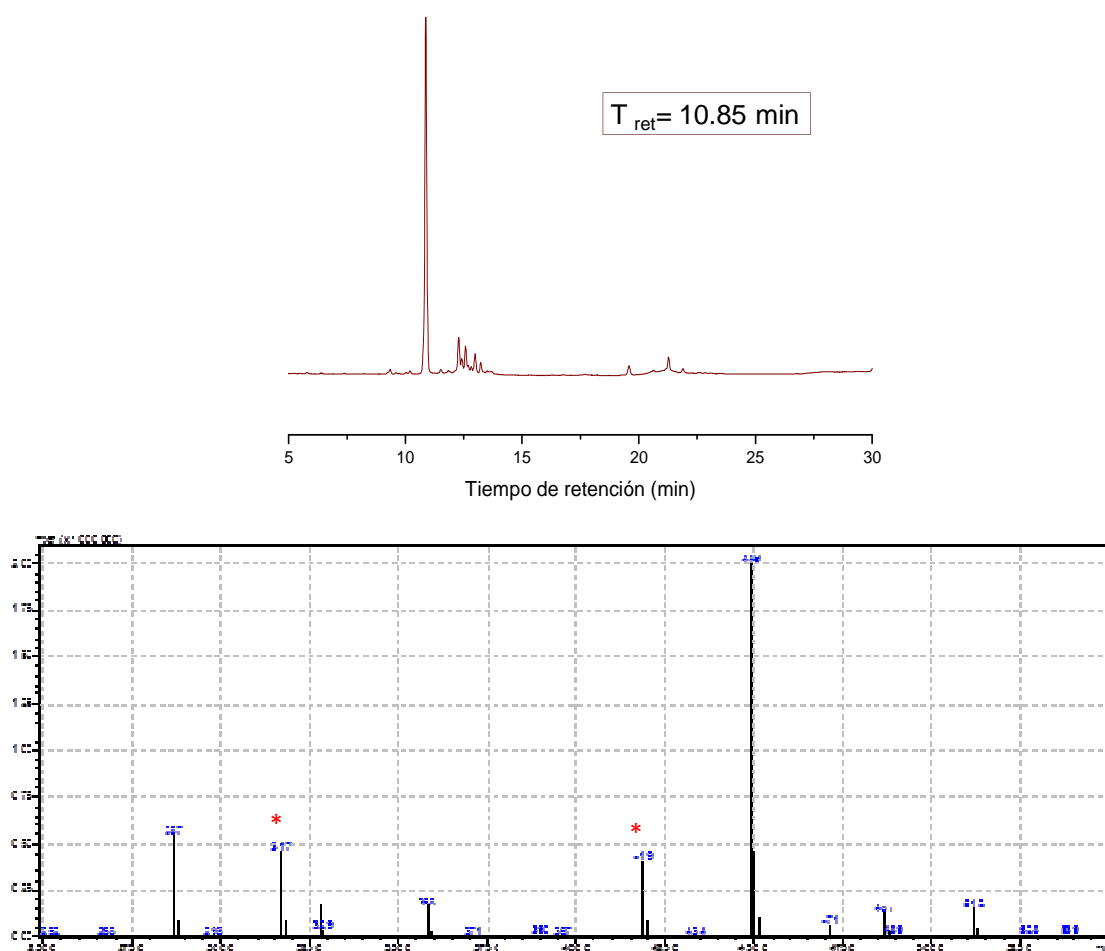


Figura 3-55. Comparación de espectros UV-vis para los compuestos de núcleo flavonoide aislados.

3.3.9 Compuesto Ohc H9

El compuesto Ohc H9 se aisló como un líquido amarillo que revela con vapores de I_2 y con vapores de NH_3 . Se obtuvo el cromatograma para este compuesto en FR-CLAE-DAD-MS, observándose que su espectro UV-vis es característico para compuestos de núcleo flavonoide y teniendo en cuenta además la Figura 3-55 se observa que posee un espectro de UV-vis, similar a los compuestos **Ohc H5** y **Ohc H6** ambos correspondientes a flavonoides glicosilados lo cual es concordante con su espectro de masas donde se observa un pico correspondiente a su ion pseudomolecular en $m/z = 449$ así como un pico en $m/z=287$ correspondiente a la aglicona cuya pérdida en masa sugiere la presencia de una hexosa posiblemente glucosa o galactosa. Falta analizar los datos de RMN del compuesto.



* Iones presentes debido a impurezas

Figura 3-56. Cromatograma por FR-CLAE-DAD-EM y Espectro de masas del compuesto Ohc H9

3.4 Determinación de la interacción con el receptor PAF a través de Docking molecular de los compuestos Ohc H2 y Ohc H4.

La actividad que poseen los neolignanós [que están muy relacionados estructuralmente con los compuestos **Ohc H2** y **Ohc H4** (heterocrominas A y B)], con el receptor PAF ha sido previamente estudiada in vitro, y en dicho estudio fue posible determinar la IC₅₀ (μM) para cada uno de los compuestos analizados, encontrándose que la kadsurenona (**115**) presentó la mejor actividad en comparación con los demás neolignanós, siendo tal actividad mayor a la del

control positivo utilizado (Ginkgolido B **(102)**) (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009c)

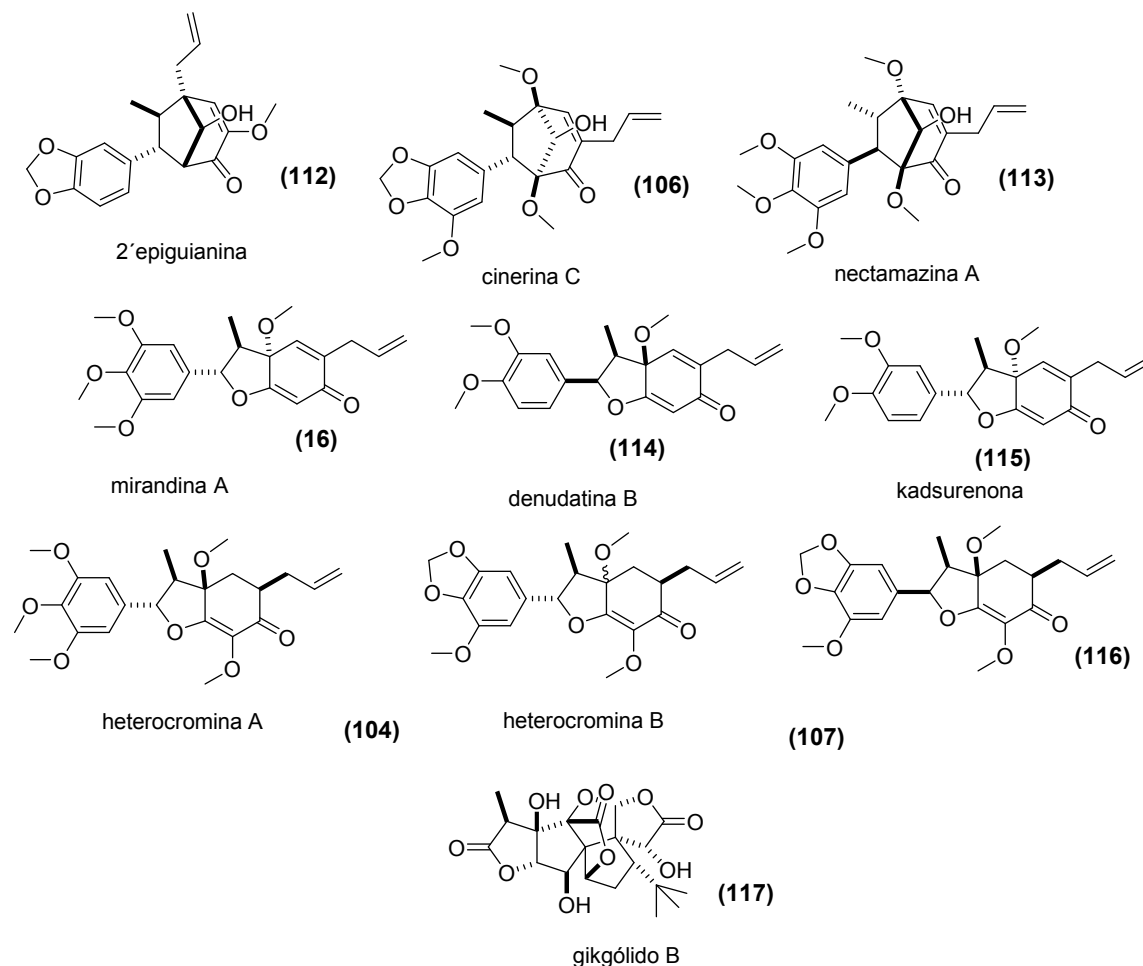


Figura 3-57. Estructuras de los compuestos utilizados para análisis por Acoplamiento molecular.

Con el fin de analizar la posible actividad como antagonistas del PAF de los compuestos aislados, (heterocrominas A y B), se generó la correlación entre los datos de actividad in vitro (en términos de pIC_{50}) obtenidos del trabajo previo, reportado en literatura, con los valores de puntaje expresos como afinidad obtenidos por acoplamiento molecular (AM) entre los ligandos y la proteína (análogo del receptor PAF).

Este análisis arrojó los resultados mostrados en la Tabla 3.8:

Compuesto	IC ₅₀ (mM)	pIC ₅₀ ^a	Afinidad (Kcal/mol)	pKi ^b
ginkgólido B	0.925	6.03	-11.1	8.17
2'-epiguianina	1.61	5.79	-10.7	7.87
cinerina C	1.09	5.96	-10.9	8.02
nectamazina A	1.37	5.86	-10.5	7.72
Mirandina A	3.48	5.48	-10.2	7.50
Denudatina B	75.6	4.12	-9.4	6.92
Kadsurenona	0.153	6.82	-11.2	8.24
Heterocromina A	-		-10.8	7.95
Heterocromina B	-		-10.6	7.80
Isómero de heterocromina B (116)	-		-9.1	6.69

^a Experimental ^b Calculado a partir de los datos de AM

Tabla 3-8. Valores de IC₅₀ y afinidad de neolignanitos sometidos a AM

De la tabla anterior es importante resaltar que teniendo en cuenta los valores de puntaje que el compuesto que presenta mejor afinidad con el sitio activo, de forma similar al control positivo, es la kadsurenona. Este resultado que está de acuerdo con la actividad determinada experimentalmente, donde presenta un valor inferior de IC₅₀ en comparación con el control positivo.

Las heterocrominas, por su parte, poseen valores de afinidad similares a los de los compuestos considerados en la literatura como promisorios antagonistas al PAF (e.g. kadsurenona) y se observa además una dependencia importante en el valor de afinidad con la estereoquímica del compuesto, lo que se evidencia con un aumento en el valor de afinidad del compuesto **(116)** con relación a la energía de su isómero, la heterocromina B.

Los datos de pKi y de pIC₅₀ permitieron, en este caso, obtener un modelo de correlación lineal como se muestra en la siguiente figura a partir del cual es posible inferir el valor de IC₅₀ de las heterocrominas A y B.

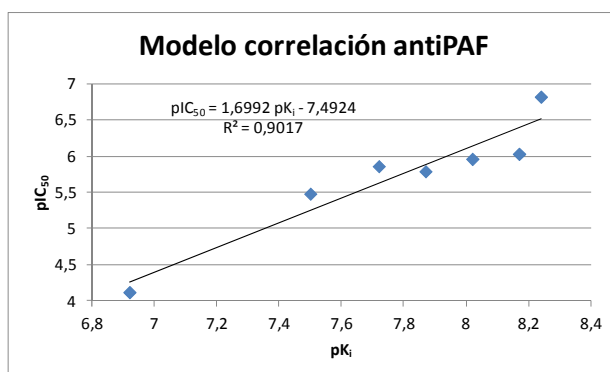


Figura 3-58. Modelo de correlación lineal entre el pIC₅₀ y pK_i

Compuesto	heterocromina A	heterocromina B
IC ₅₀ calculado (μM)	0.963	1.73

Tabla 3-9. Valores de IC₅₀ calculados a partir del modelo para los neolignan heterocromina A y B aislados.

El análisis por Acoplamiento molecular permitió además conocer las posibles interacciones de las moléculas con los residuos de aminoácidos dentro del sitio activo analizado como se muestra en la Figura 3-59.

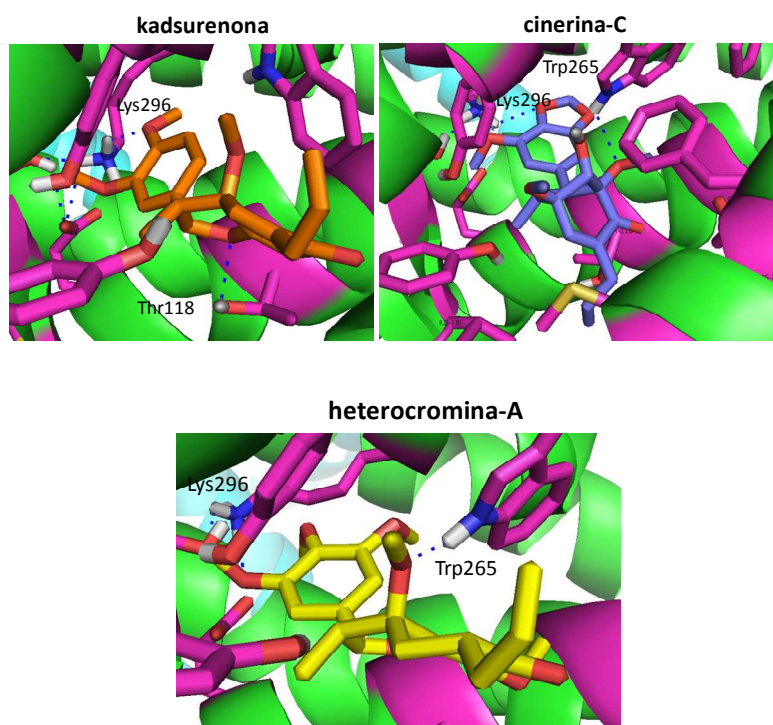


Figura 3-59. Acoplamiento molecular para los neolignanos kadsurenona, cinerina C y heterocromina A.

Este análisis permitió inferir que los residuos críticos involucrados en la interacción con el sitio activo corresponden a Lys296, Trp265 y Thr118. Para profundizar en esta interacción, se realizó un análisis farmacofórico sobre los compuestos aislados. Para el caso de la heterocromina A (Figura 3-57) se pudieron observar diferentes interacciones, tanto polares (tipo puente de hidrogeno generalmente) como apolares, que la molécula presenta con los diferentes residuos de aminoácidos en el receptor, lo que justifica su baja energía de afinidad y por lo tanto su potencial actividad como antagonista al PAF. Este modelo farmacofórico permitió confirmar la importancia de los residuos anteriormente descritos por AM, los cuales se comportan como grupos donores de enlaces de hidrogeno para tres átomos de oxígeno presentes en la molécula, permitiendo así su estabilización a una cara del compuesto, ya que por el otro lado, una serie de aminoácidos estabilizan el complejo receptor-ligando, mediante interacciones apolares.

Los residuos que presentan contactos polares con el ligando están ubicados en las hélices III, VI y VII de la enzima, los cuales están involucrados en el acoplamiento de la cadena alifática del PAF. En otros estudios se ha indicado que la His188, His248, His249 y Asp 289, los cuales también hacen parte del sitio activo, interactúan con el extremo polar (fosfato) del PAF. (Gui et al., 2007) No obstante, nuestros resultados indican que la inhibición del receptor PAF por los neolignanós se da por el acoplamiento al otro extremo del sitio activo, involucrando los aminoácidos Lys296, Trp265 y Thr118.

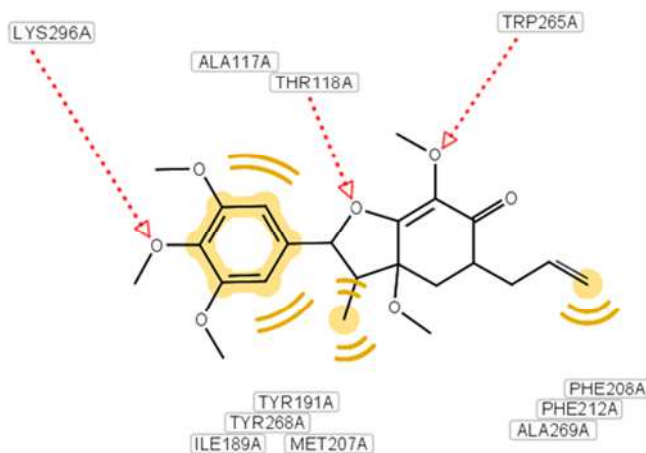


Figura 3-60. Análisis farmacofórico de la heterocromina A

3.5 Comparación cromatográfica de los compuestos puros aislados de hojas con los extractos de hojas corteza y madera

Los metabolitos aislados de las hojas de *Ocotea heterochroma* (**Ohc H1 – Ohc H9**) fueron utilizados como patrones de comparación cromatográfica con el fin de determinar su presencia en los extractos de corteza y madera de la especie objeto de estudio. Como parámetros de comparación se tuvo en cuenta el tiempo de retención así como el espectro de masas de cada uno de ellos.

Para poder observar la comparación realizada los compuestos se separaron en dos grupos, inicialmente los neoliganos y compuestos relacionados (**Ohc H1- Ohc H3**) y en un segundo grupo los compuestos de núcleo flavonoide (**Ohc H5-Ohc H6**). El cromatograma del compuesto **Ohc H4** no fue tomado debido a la cantidad sino que se tomó para la mezcla, por lo que se comparará el tiempo de retención y el espectro de masas pero no se utilizó para las gráficas mostradas a continuación.

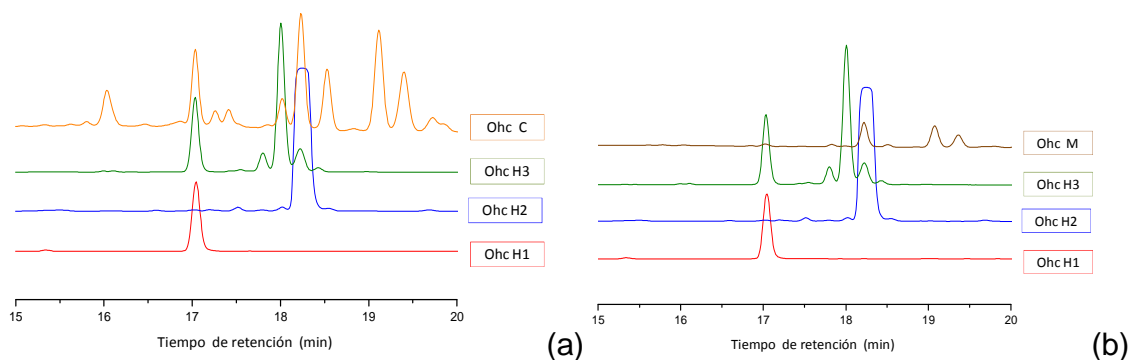


Figura 3-61. Cromatogramas de los compuestos Ohc H1-Ohc H3 en comparación con el perfil del extracto de corteza (Ohc C) (a) y de madera (Ohc M) (b)

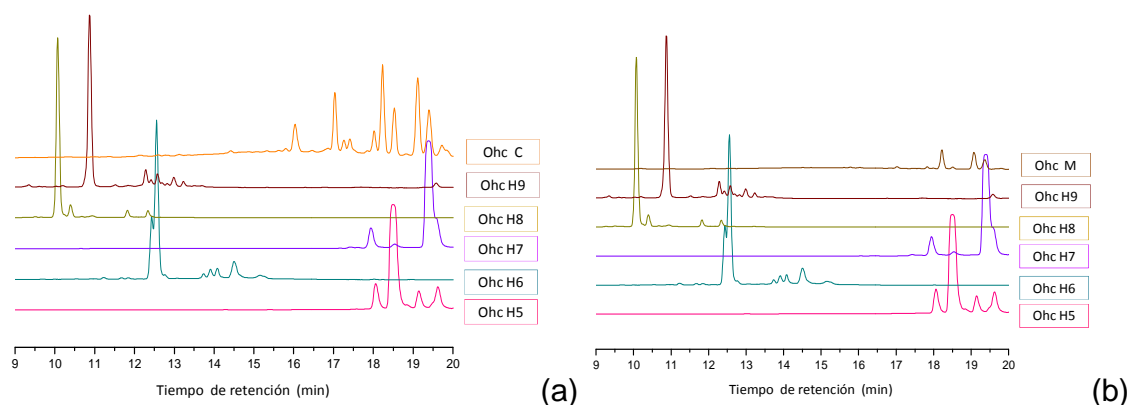


Figura 3-62. Cromatogramas de los compuestos Ohc H5-Ohc H9 en comparación con el perfil del extracto de corteza (Ohc C) (a) y de madera (Ohc M) (b)

Como se puede observar en las Figuras 3-61 y 3-62 los compuestos heterocromina A (**Ohc H2**), y 2'-O-(Z-p-coumaril)astragalina (**Ohc H7**) se encuentran presentes tanto en el extracto de corteza como en el de madera. Este mismo comportamiento se presenta para el compuesto heterocromina B (**Ohc H4**) (tr; 19.07min) no incluido en la grafica. Los compuestos p-hidroxicinamato de etilo (**Ohc H1**), cinerina C (**Ohc H3**) y afzelina (**Ohc H5**) están presentes en el extracto de corteza pero no en el de madera. Los compuestos tamarixetina 3-O-ramnosido (**Ohc H6**) y los flavonoides **Ohc H8** y **Ohc H9** parecen ser exclusivos del extracto de hojas. Los valores de tiempo de retención así como m/z de ión pseudomolecular para cada compuesto se presentan en el anexo **D.1**.

4. Conclusiones y perspectivas.

A partir del extracto etanólico de hojas de *Ocotea heterochroma* especie perteneciente a la familia Lauraceae se aislaron 9 metabolitos, dos de ellos neolignanos de núcleo furociclohexanona, un neolignano biciclo[3.2.1]octánico, cinco flavonoides y un derivado de ácido cinámico.

De los metabolitos aislados, los neolignanos de núcleo furociclohexanona denominados **heterocromina A** y **B** no presentan reportes previos en la literatura, por lo que se consideran estructuras novedosas, pero se encuentran estrechamente relacionados con los compuestos reportados previamente en la especies del género, **e. g.** la especie *Ocotea catharinensis*, de donde fueron aislados diferentes neolignanos entre ellos, un neolignano cuya estructura difiere de las heterocrominas, en la posición de los sustituyentes alilo y metoxilo sobre **C-1'** y **C-5'** respectivamente. (Lacava Lordello & Yoshida, 1997). La presencia de este tipo de neolignanos está de acuerdo entonces con la quimiotaxonomía del género.

Estos compuestos presentan una estereoquímica relativa en las posiciones **C-7** y **C-8**, mostrada por compuestos aislados anteriormente en especies de la familia, como lo es la armenina B, aislada de *Ocotea catharinensis*. (Funasaki et al., 2009) Esta estereoquímica, como se observó en el análisis por Docking molecular, está relacionada con la posible actividad biológica de los metabolitos.

La presencia del neolignano biciclo[3.2.1]octánico conocido como cinerina C, está de acuerdo con la quimiotaxonomía de la familia y del género de donde han sido aislados gran cantidad de este tipo de compuestos, ejemplo de ello son los ocofilales A y B, y los ocofiloles A, B y C aislados previamente de la especie *Ocotea macrophylla*, que dan cuenta de la diversidad estructural que posee este tipo de compuestos. (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009b)

De los cinco flavonoides aislados, fue posible elucidar estructuralmente tres de ellos, los cuales corresponden a la afzelina (kaempferol 3-O-ramnosido) previamente aislada una especie del género *Ocotea*, (Garcez et al., 1995), la tamarixetina 3-O-ramnosido aislada previamente en la especie *Lindera glauca* (Lauraceae) (Huh et al., 2014) y la 2'-O-(Z-p-coumaroil)astragalina (kaempferol-3-O-(2'-O-(Z-p-coumaroil))glucósido) que no ha sido aislada previamente en especies del género *Ocotea* ni de la familia Lauraceae, por lo que se considera este el primer reporte de estos dos últimos flavonoides para el género *Ocotea*.

La presencia de flavonoides en especies del género *Ocotea* presenta pocos reportes en la literatura pese a ser considerados como quimiotaxones de la familia Lauraceae.(Gottlieb, 1972). En el presente estudio se corroboró además que los metabolitos de núcleo flavonoides presentes en el género *Ocotea* corresponden con flavonoles 3-O-glicosidados.

Se determinó por medio de un sistema FR-CLAE-DAD-MS la presencia de señales comunes a los tres extractos analizados (hojas, corteza y madera) de la especie *Ocotea heterochroma* tres de las cuales corresponden algunos de los metabolitos aislados (heterocrominas A y B, 2'-O-(Z-p-coumaril)astragalina) lo que permite conocer en parte la composición química de los extractos de corteza y madera.

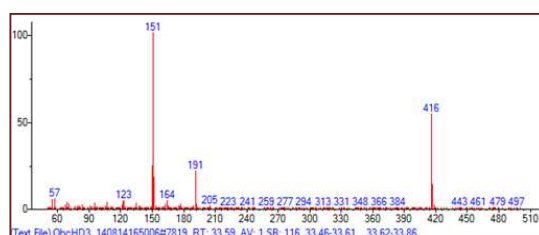
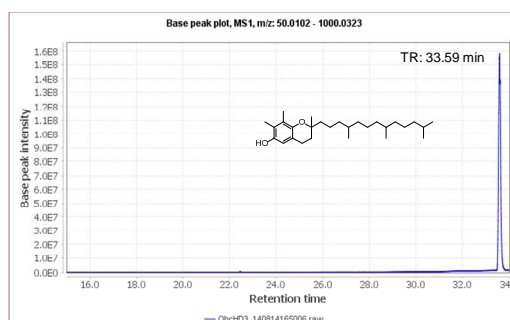
Por medio de un análisis computacional de Docking molecular se estableció una relación proporcional entre los valores de energía (afinidad) determinados computacionalmente y la actividad determinada experimentalmente de una serie de compuestos aislados previamente en el grupo de investigación y relacionados estructuralmente con los neolignan heterocromina A y B, entre ellos la cinerina C también aislada en el presente trabajo. Esta correlación permitió inferir que los compuestos heterocromina A y B pueden considerarse como promisorios antagonistas al PAF, lo que ratifica la aplicabilidad de los análisis computacionales en la búsqueda de compuestos bioactivos, así como al género *Ocotea* como fuente de este tipo de compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo resulta pertinente realizar el estudio químico de los extractos de corteza y madera donde según el análisis por RP-CLAE-EM fue posible observar la presencia de algunos de los metabolitos aislados con el fin de aumentar la cantidad de estos metabolitos, lo que permitiría llevar a cabo estudios de actividad biológica, así como el aislamiento de otros metabolitos presentes en dichos extractos.

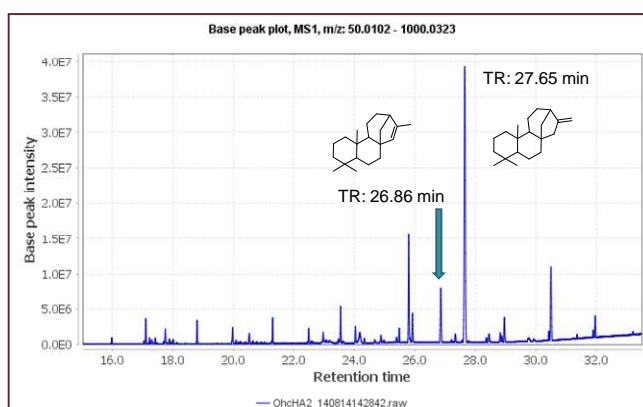
Anexos

A. Cromatogramas por CG-EM de mezclas de Ohc AM1-M3 y espectros de masas de picos de interés.

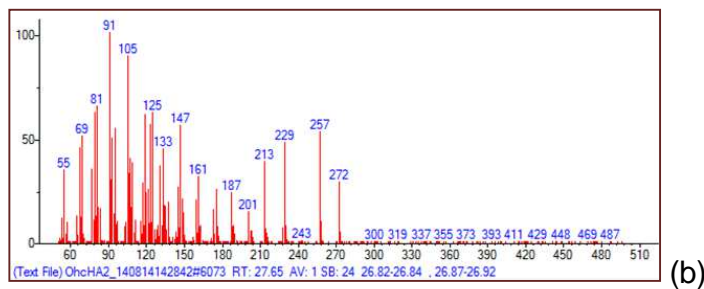
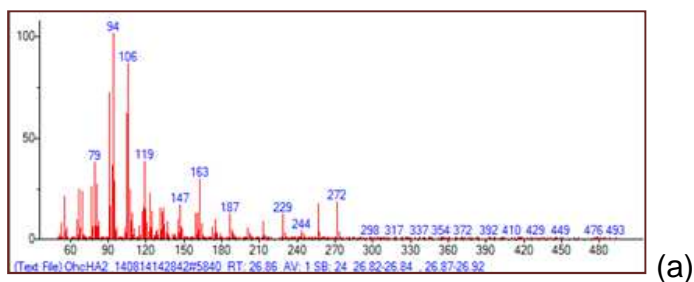
A.1 Cromatograma CG-EM para Ohc AM1 y espectro de masas (compuesto mayoritario γ -tocoferol)



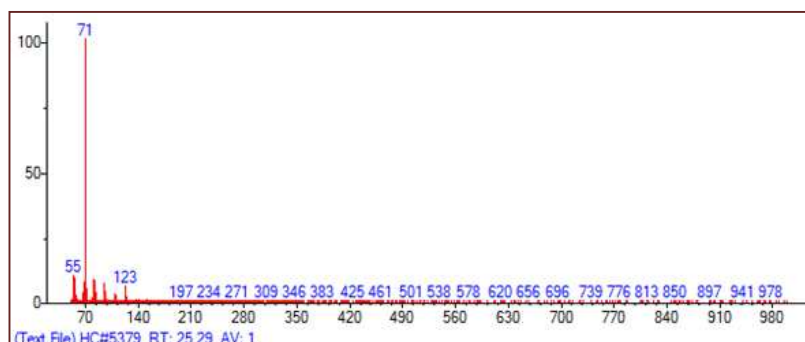
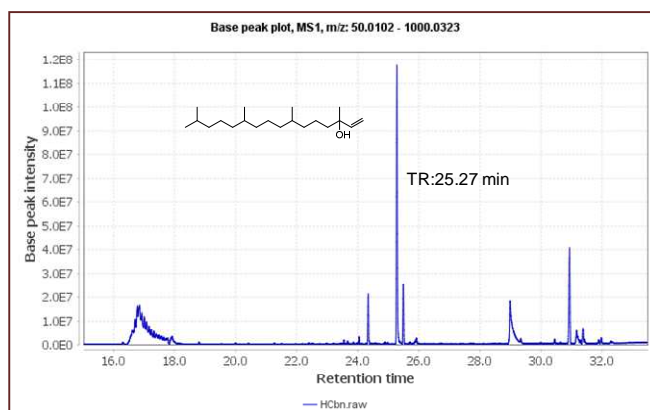
A.2 Cromatograma CG-EM para Ohc AM2 y espectros de masas (compuesto mayoritario kauren-16-eno y minoritario kauren-15-eno)



Para TR: 26.86 min (a) TR: 27.65 min (b)

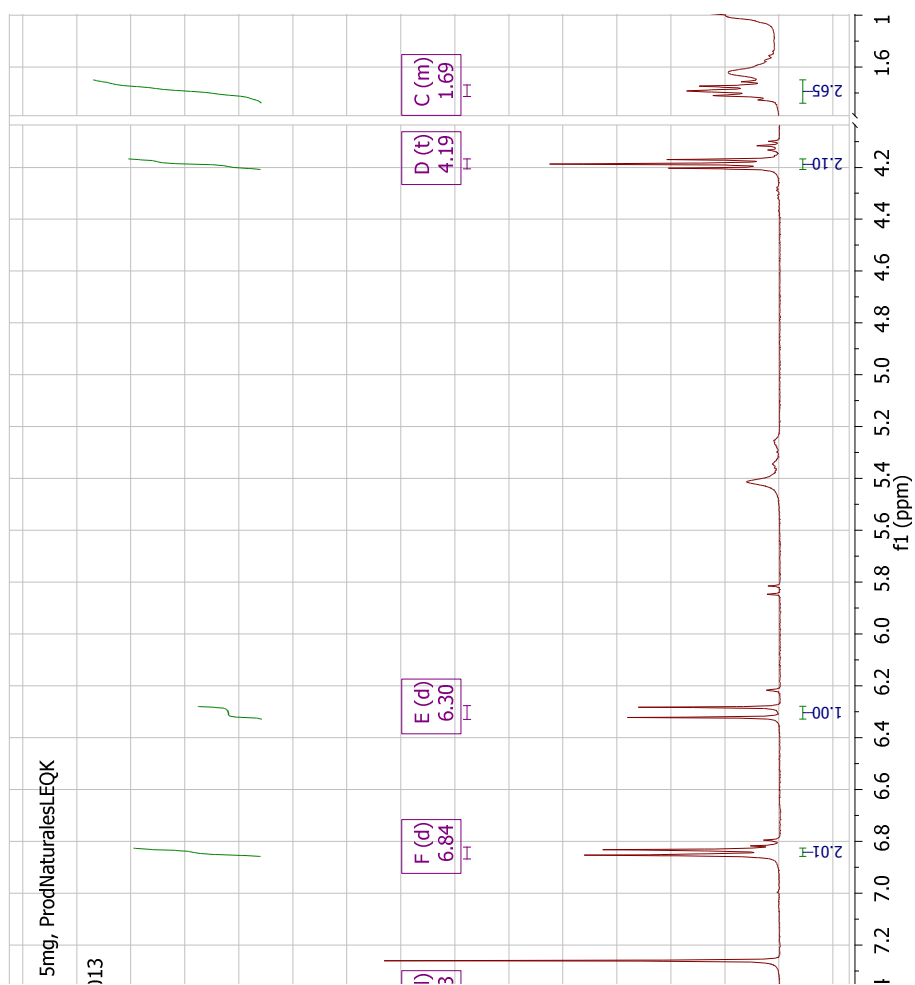


A.3 Cromatograma CG-EM para Ohc AM2 y espectro de masas (compuesto mayoritario determinado isofitol)

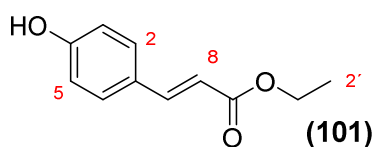
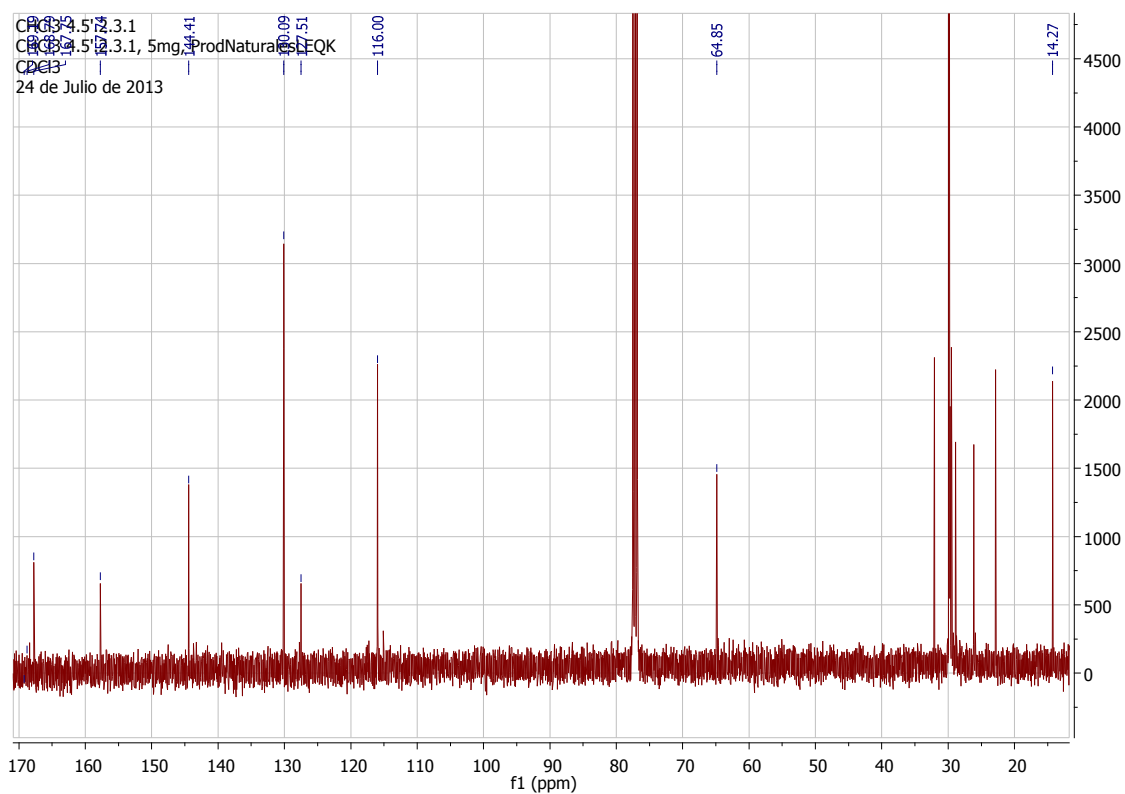


B. Espectros de RMN ^{13}C , experimentos COSY, DEPT, HMBC y HMQC para los compuestos Ohc H1 a Ohc H9

B.1 Espectro de RMN ^1H del compuesto Ohc H1 p-hidroxicinamato de etilo

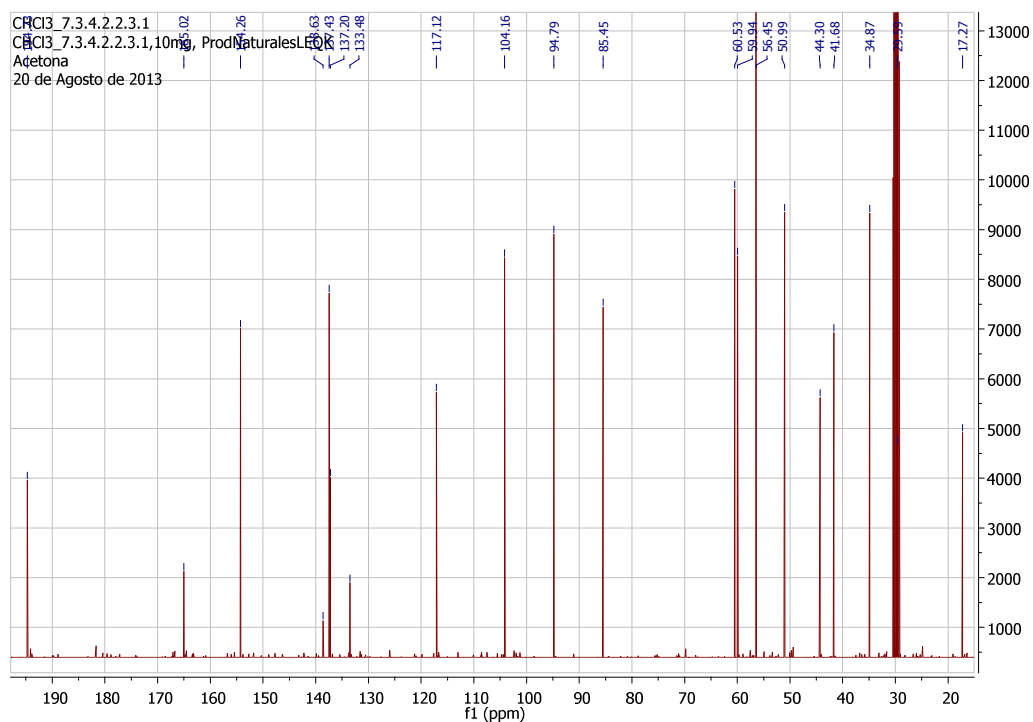


B.2 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto Ohc H1 p-hidroxicinamato de etilo

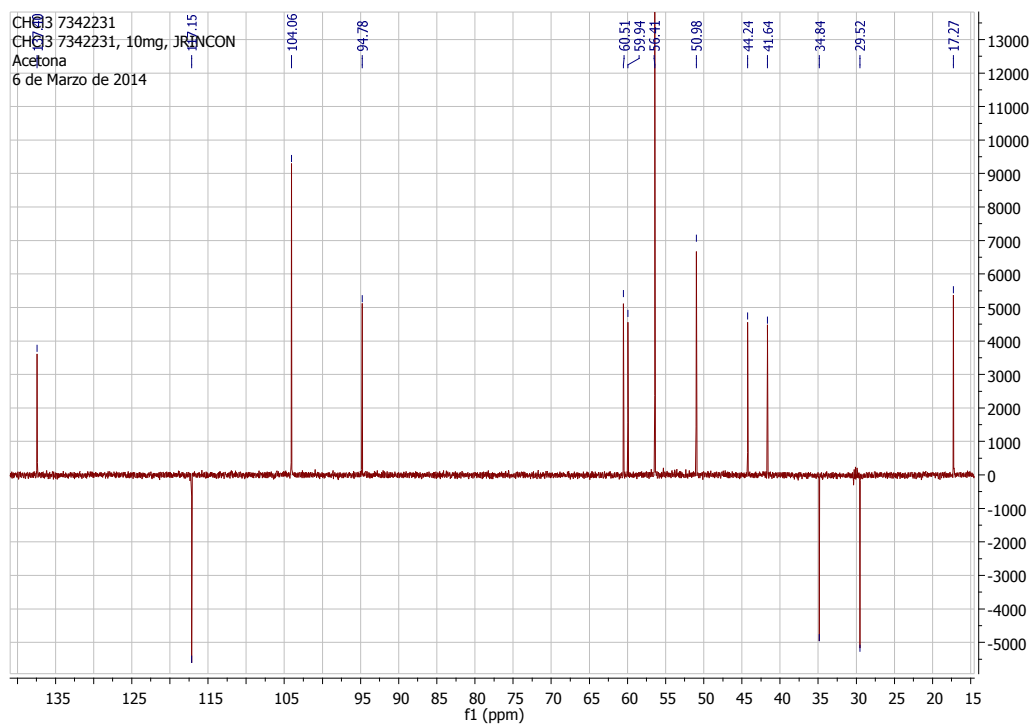


p-hidroxicinamato de etilo (Ohc H1)

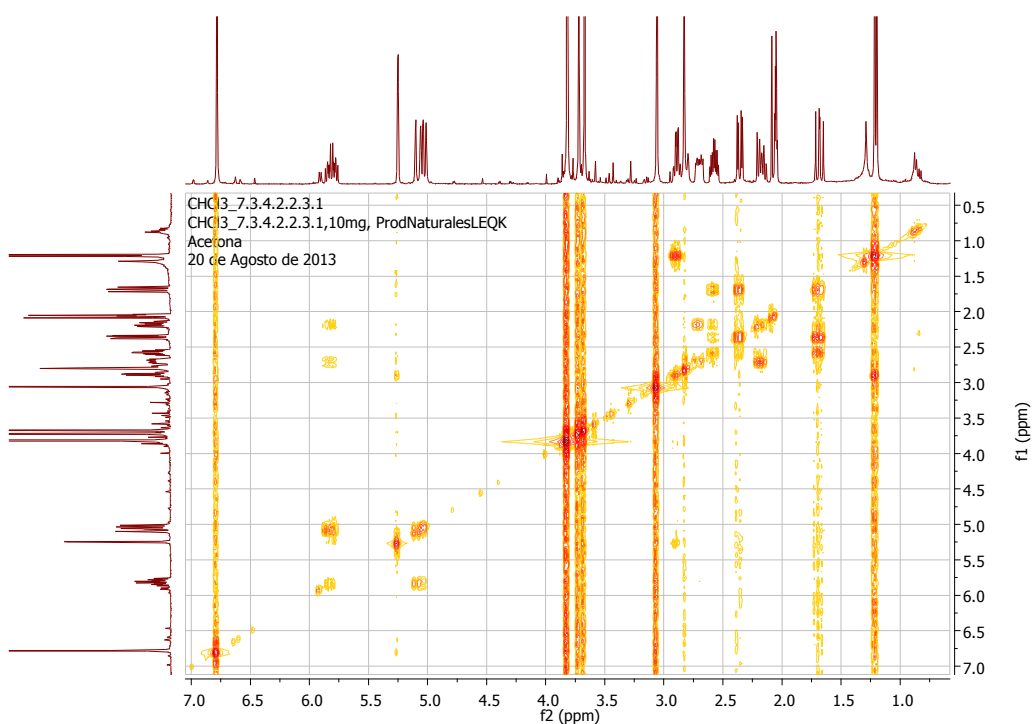
B.3 Espectro de RMN ¹H del compuesto Ohc H2 heterocromina A



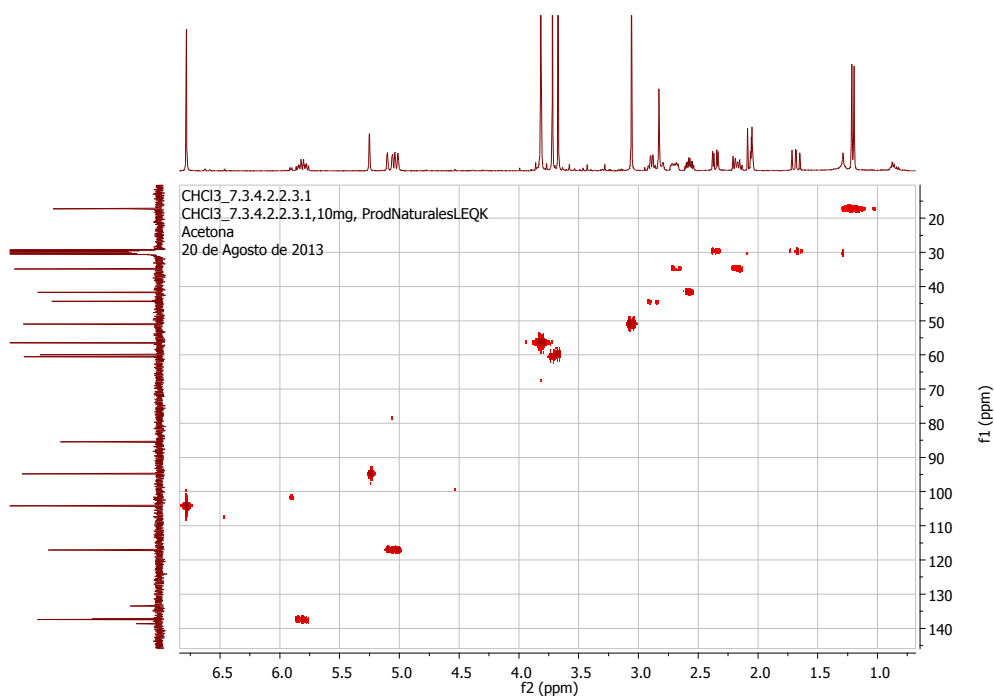
B. 5 Experimento DEPT 135 Compuesto Ohc H2 heterocromina A



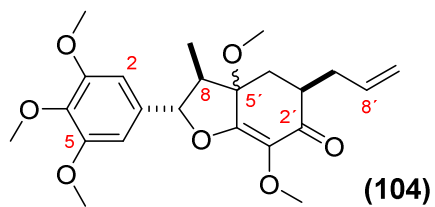
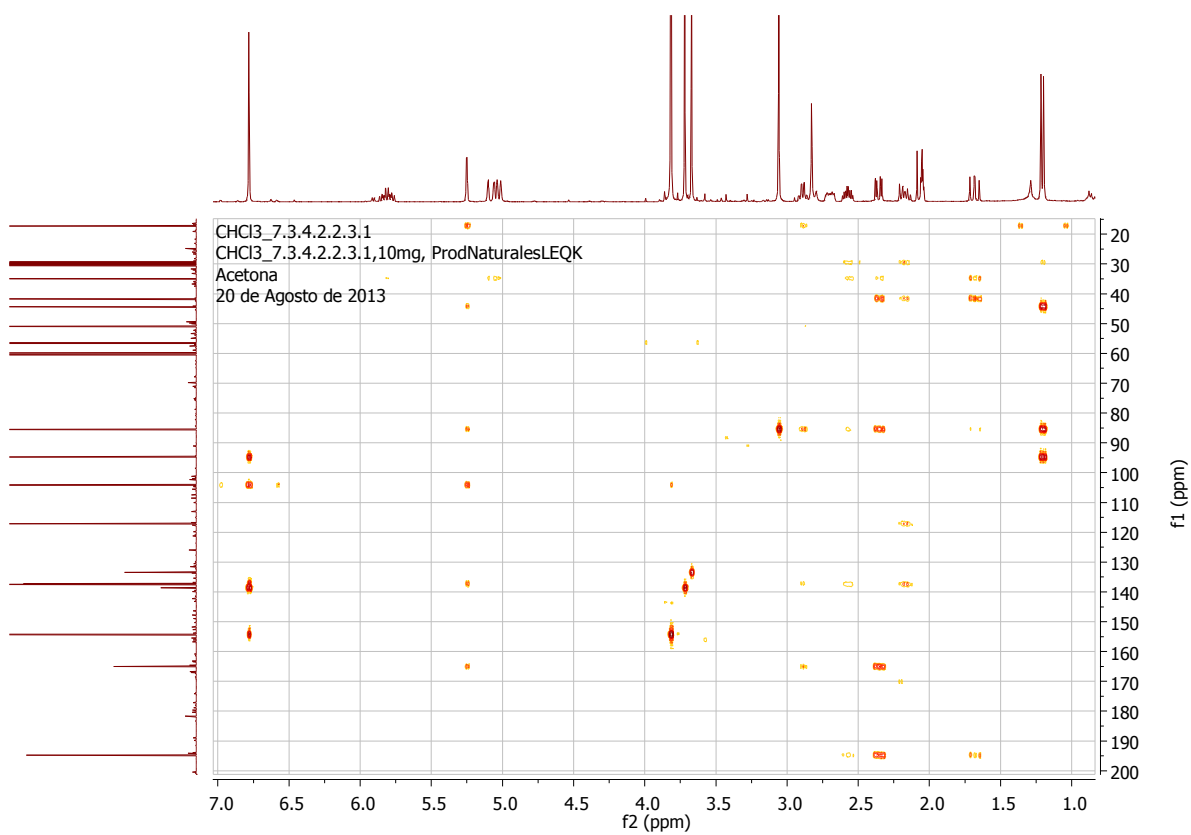
B.5 Experimento COSY Compuesto Ohc H2 heterocromina A



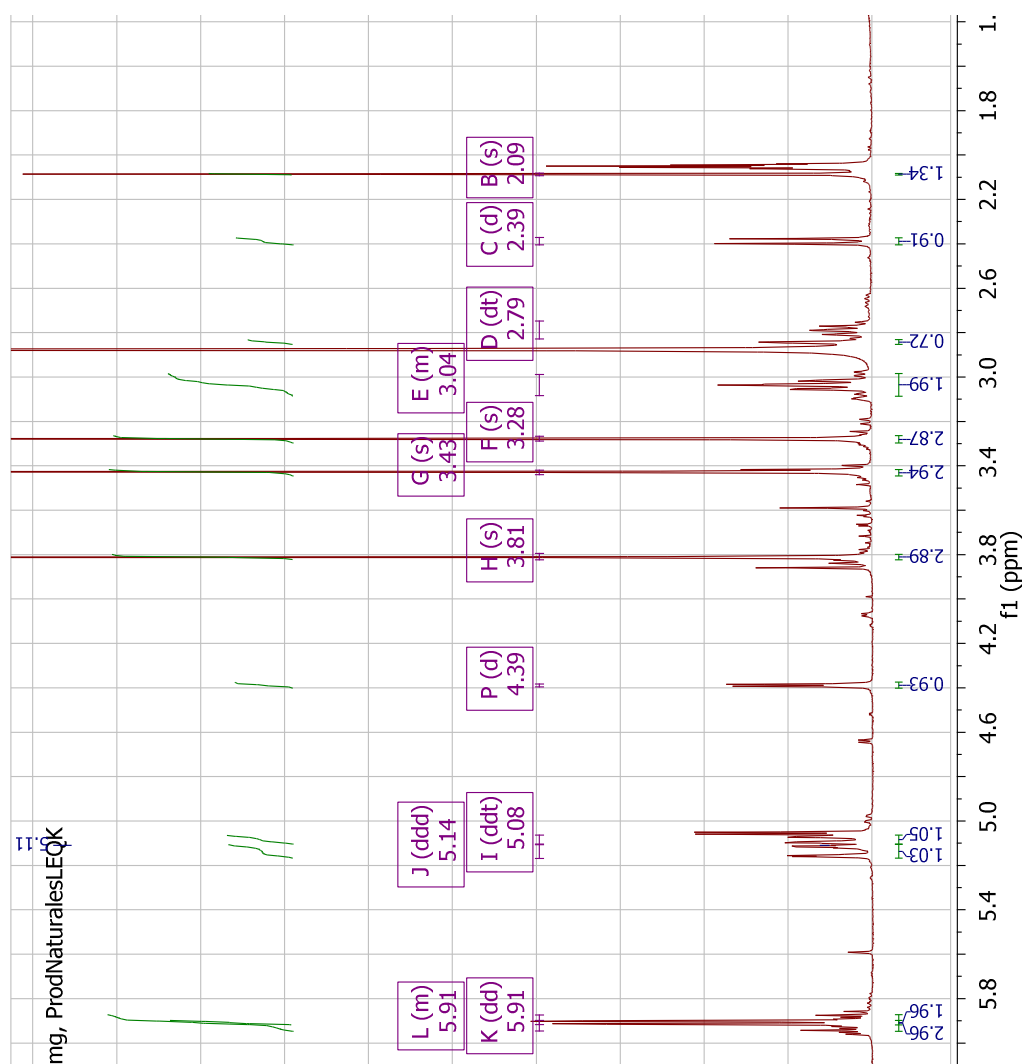
B.6 Experimento HMBC Compuesto Ohc H2 heterocromina A



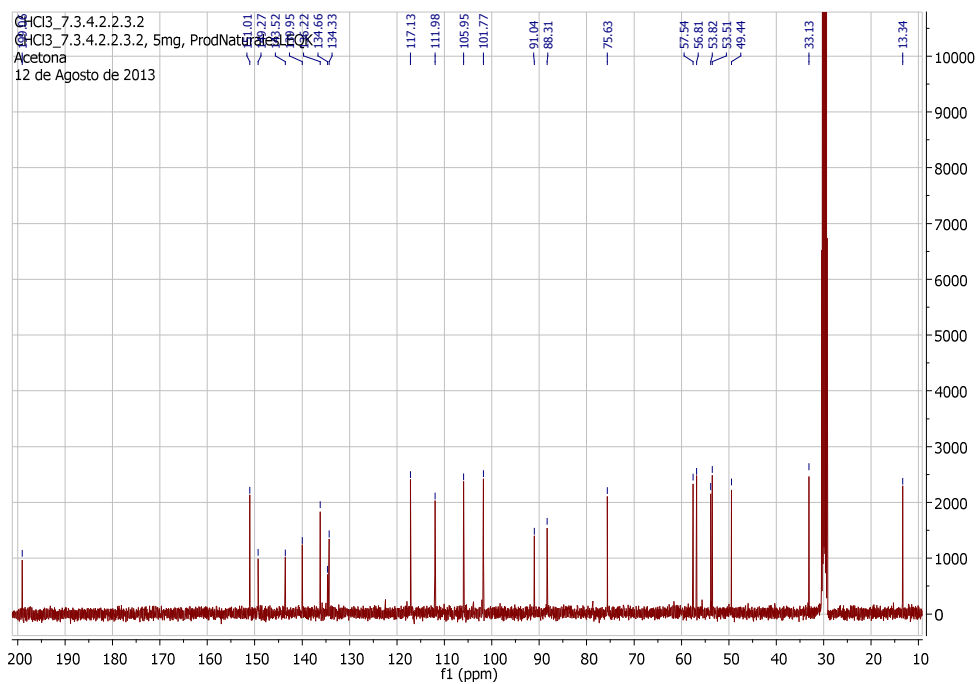
B.7 Experimento HMQC Compuesto Ohc H2

**heterocromina A (Ohc H2)**

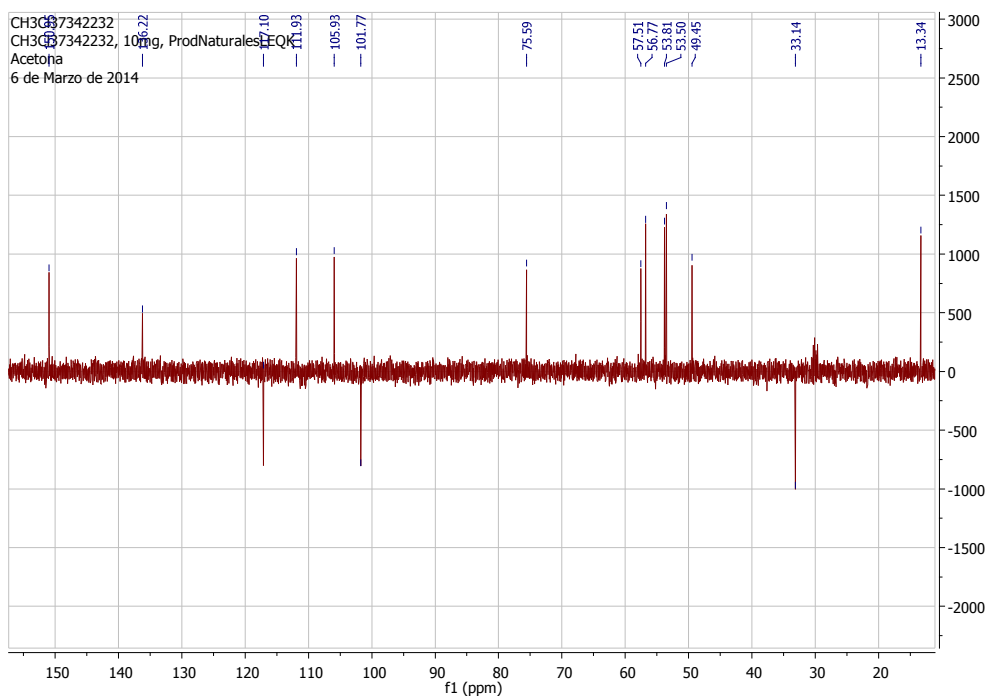
B.8 Espectro de RMN ¹H del compuesto Ohc H3 cinerina C



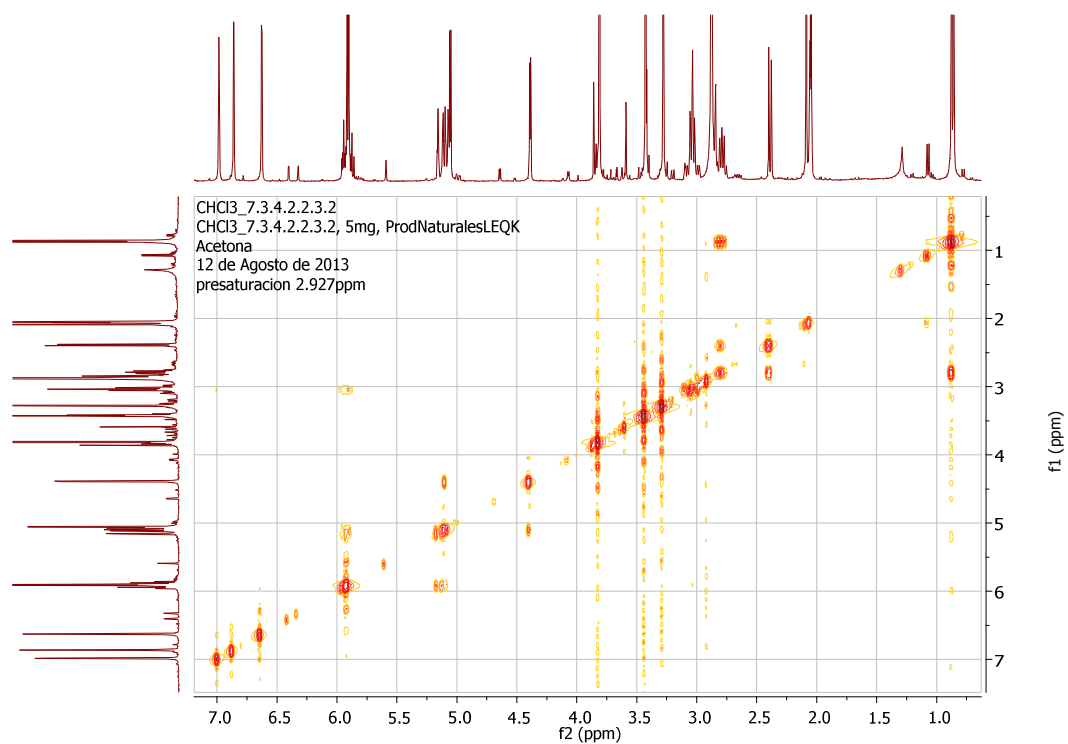
B.9 Espectro de RMN ¹³C del compuesto Ohc H3 cinerina C



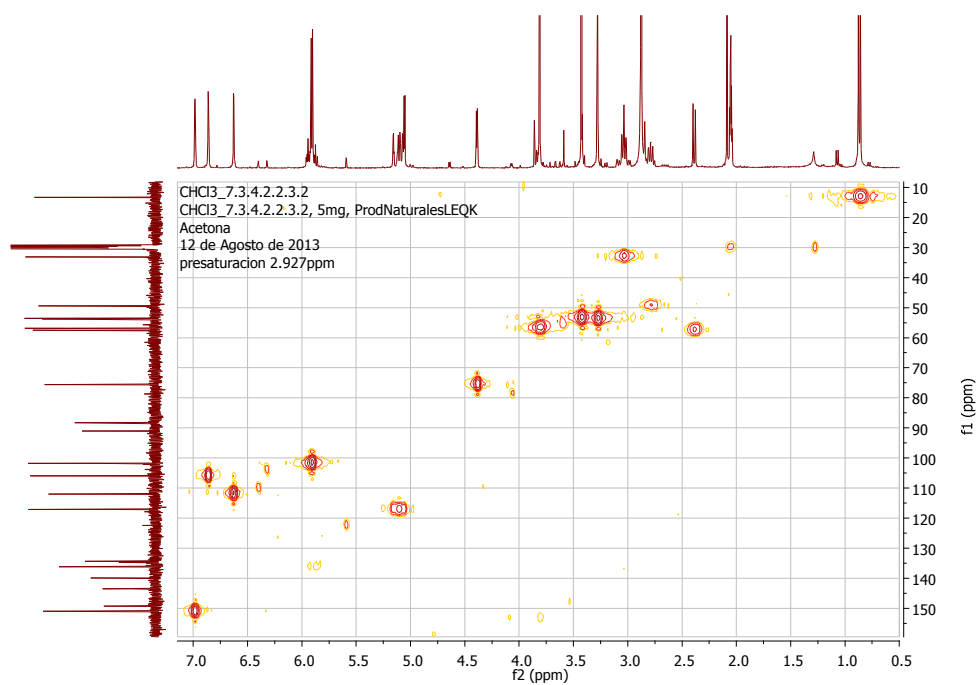
B.10 Experimento DEPT 135 Compuesto Ohc H3 cinerina C



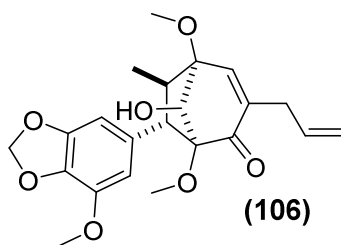
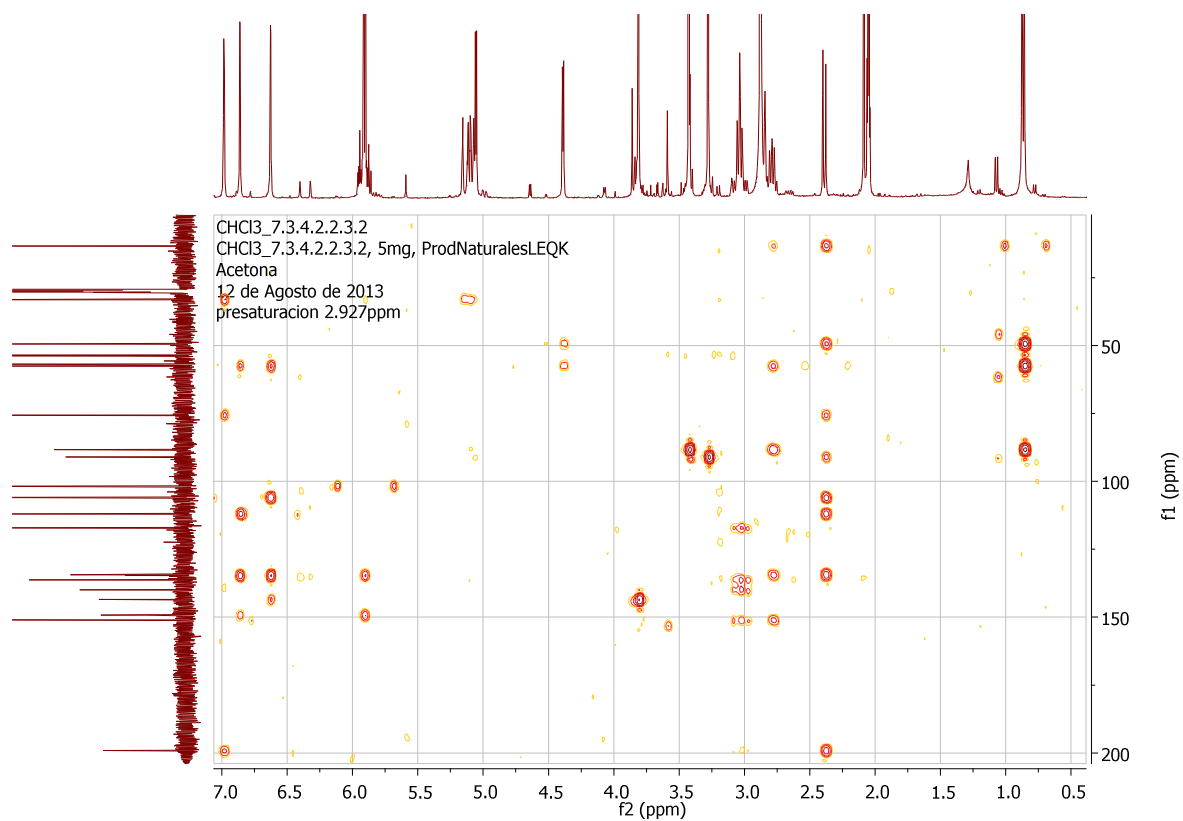
B.11 Experimento COSY Compuesto Ohc H3 cinerina C



B.12 Experimento HMBC Compuesto Ohc H3 cinerina C

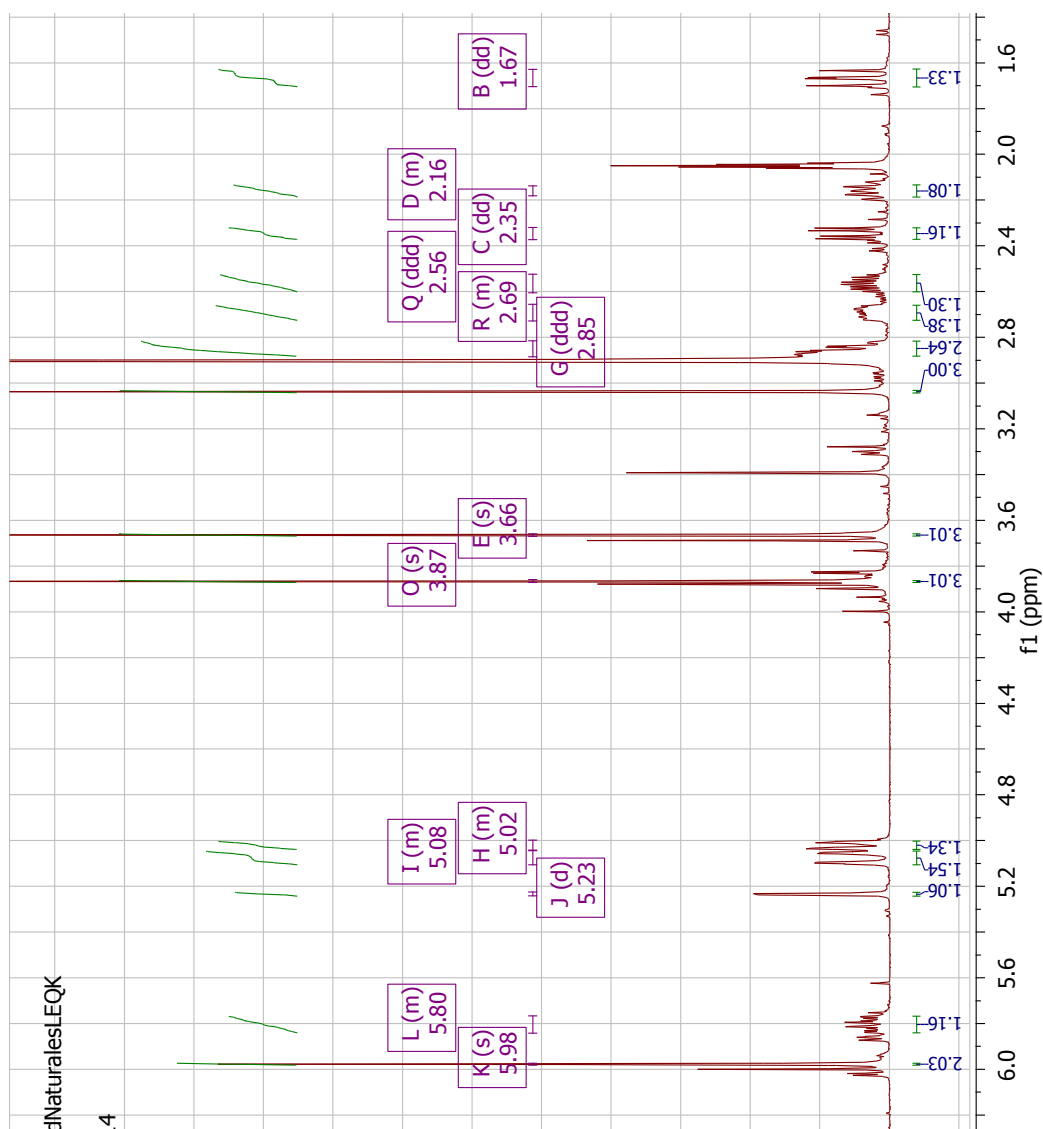


B.13 Experimento HMQC Compuesto Ohc H3 cinerina C

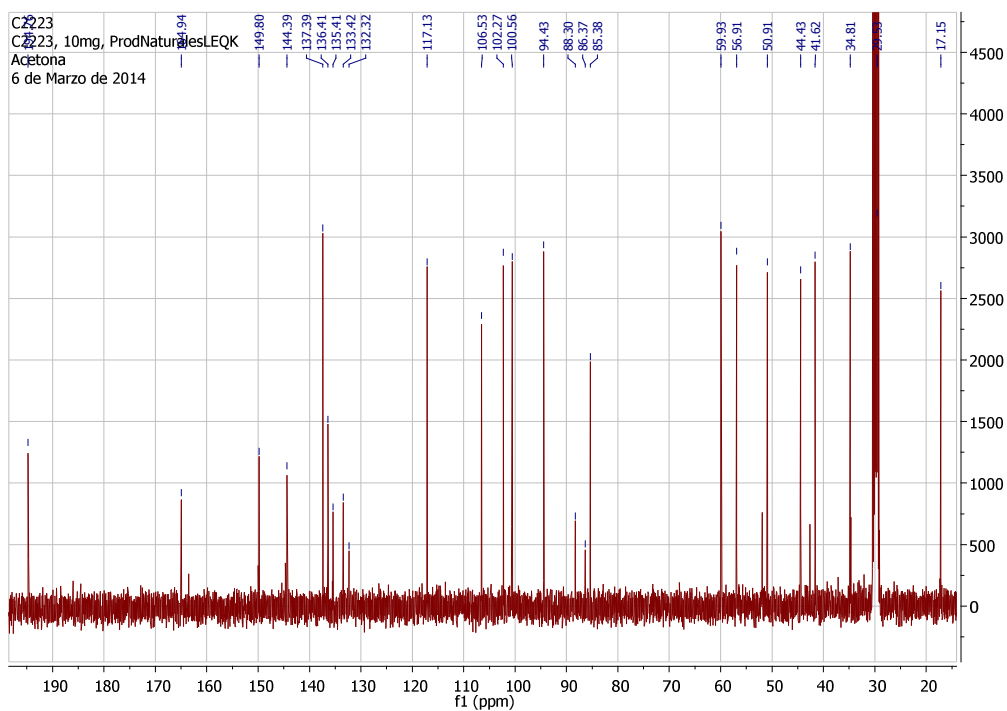


cinerina C (Ohc H3)

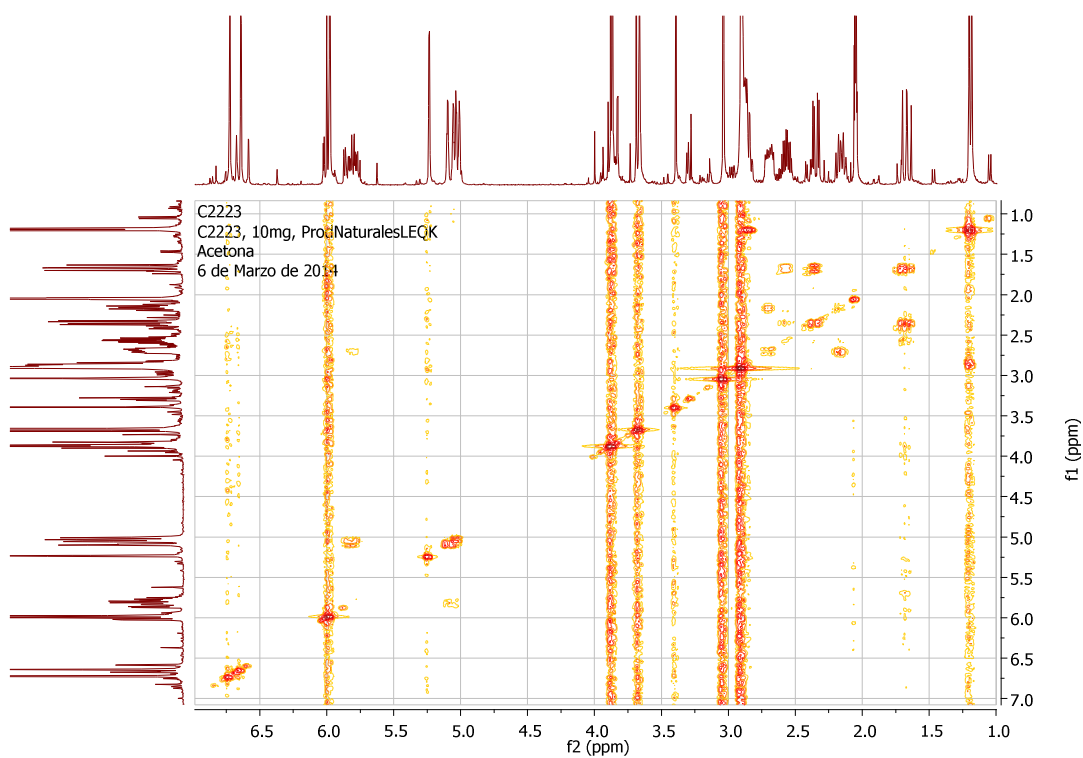
B.14 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto Ohc H4 heterocromina B



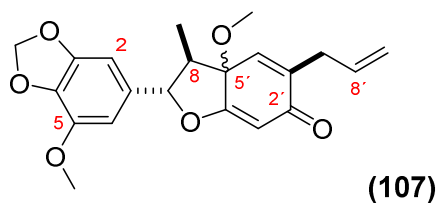
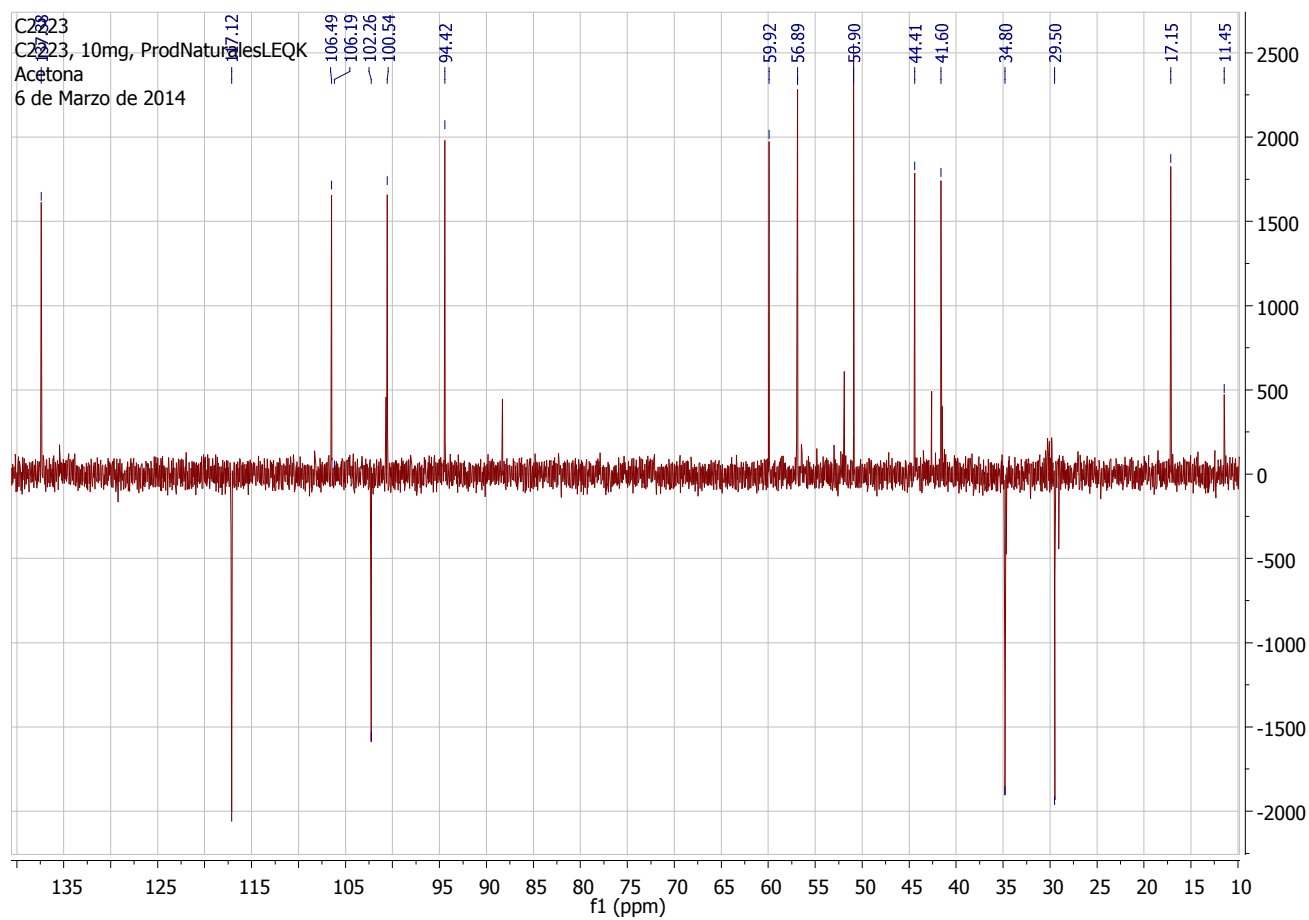
B. 15 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto Ohc H4 heterocromina B



B.16 Experimento COSY Compuesto Ohc H4 heterocromina B

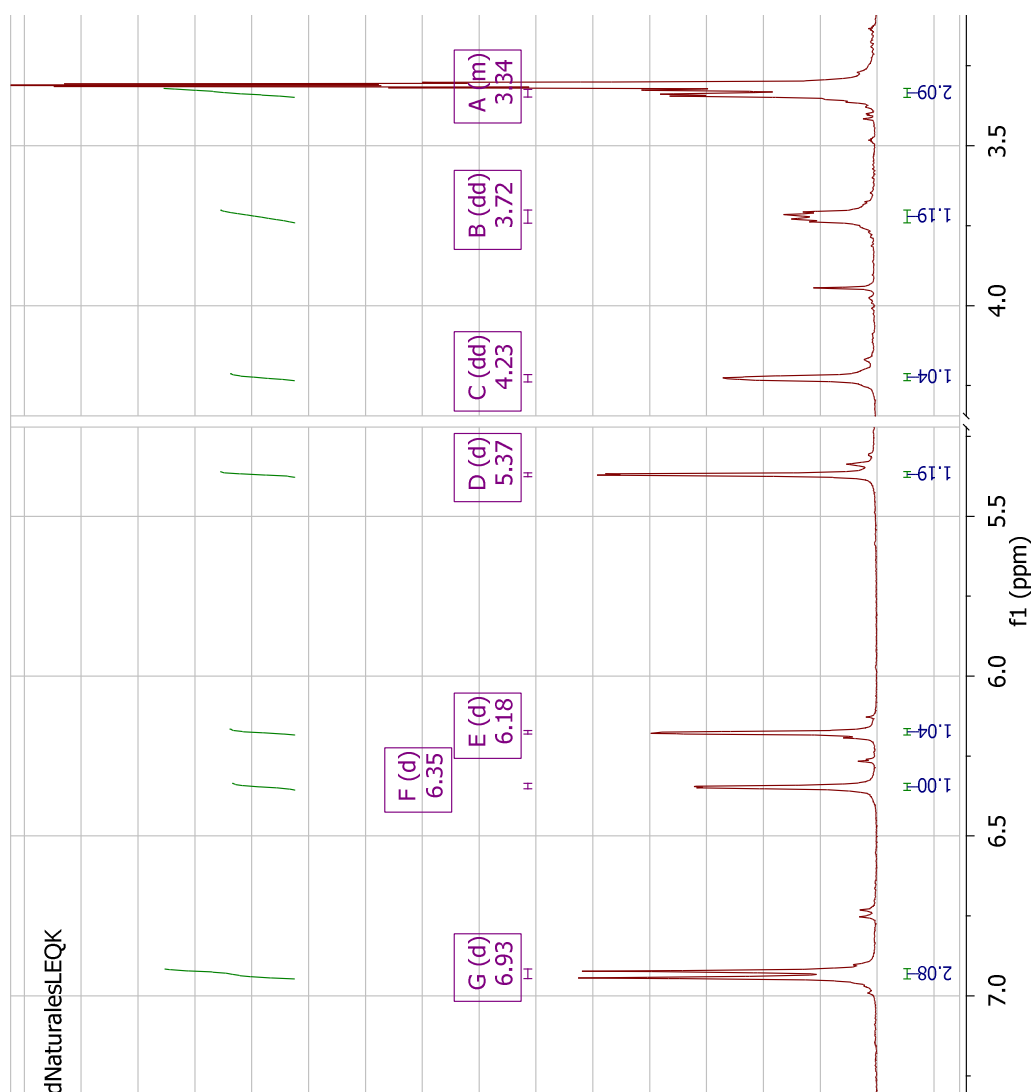


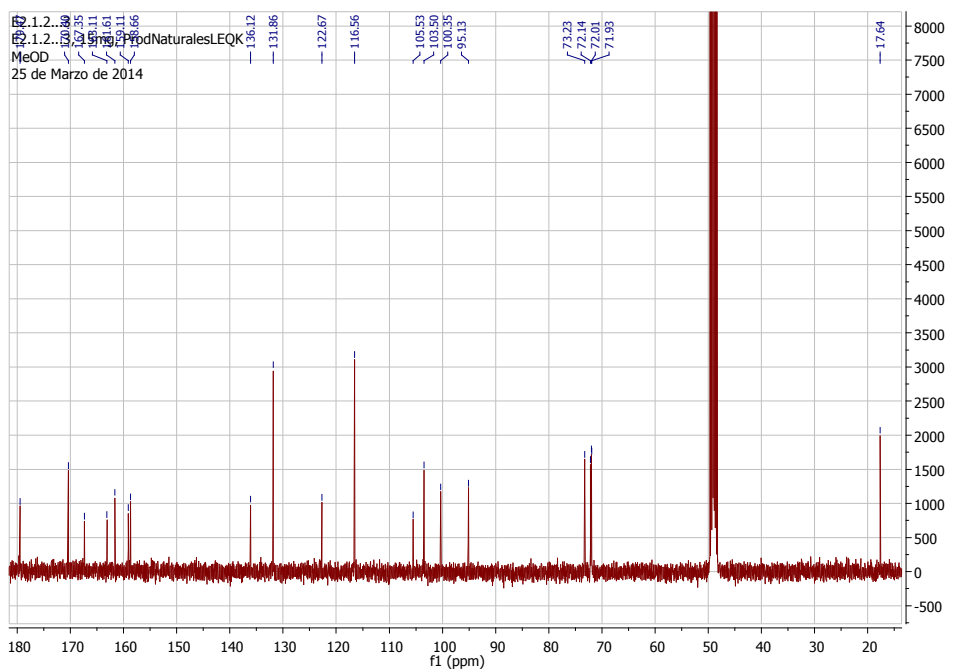
B.17 Experimento DEPT 135 Compuesto Ohc H4 heterocromina B



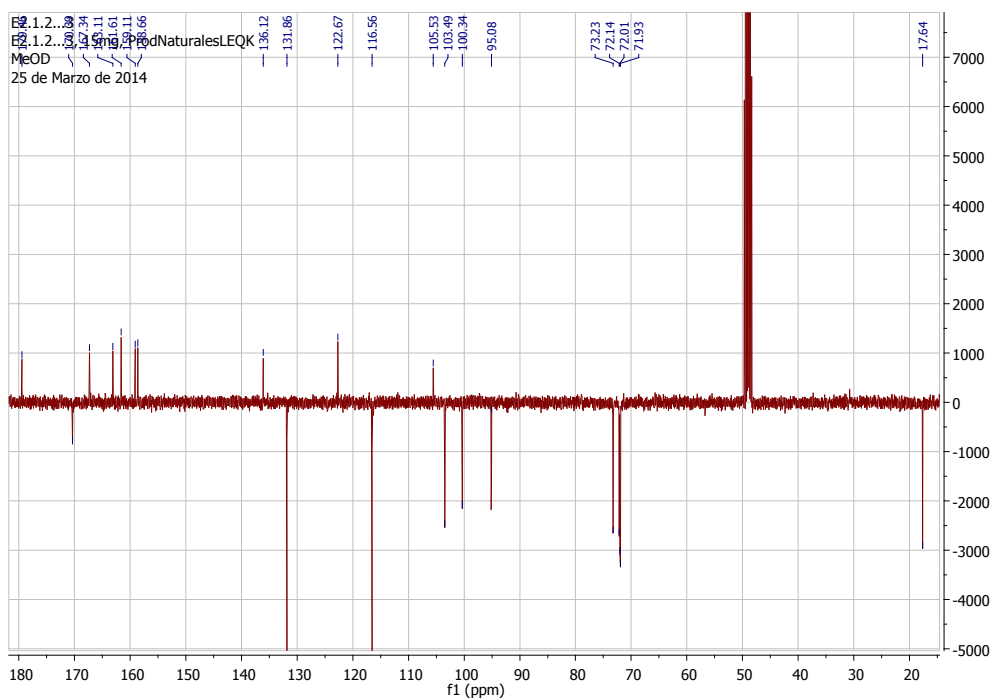
heterocromina B (Ohc H4)

B. 18 Espectro de RMN ¹³C del compuesto Ohc H5 afzelina

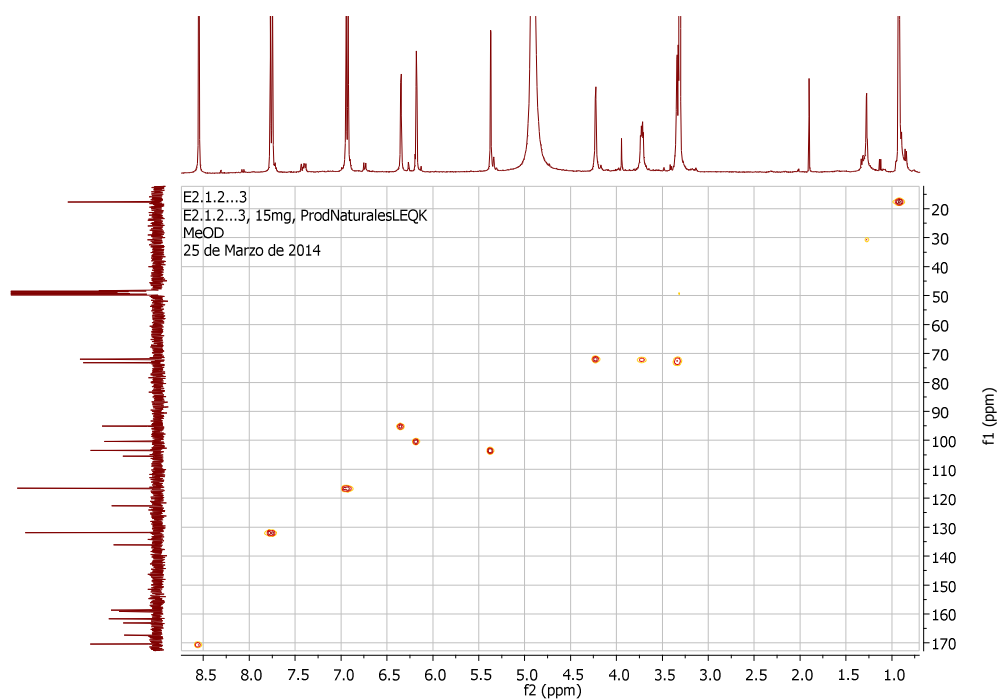
B.19 Espectro de RMN ¹³C del compuesto Ohc H5 afzelina



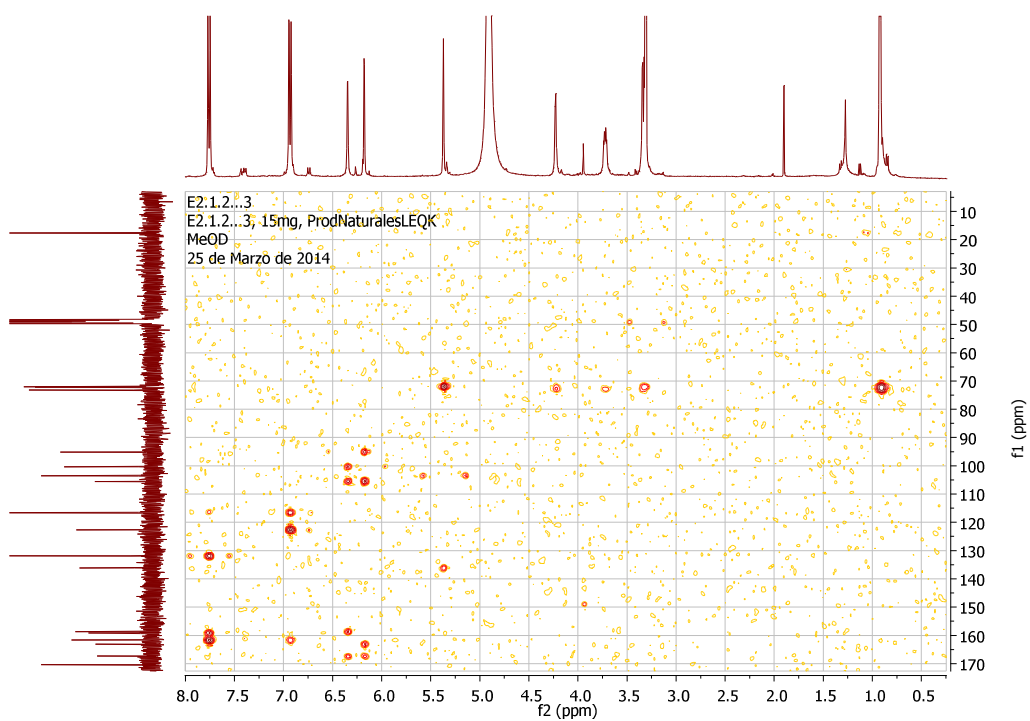
B.20 Experimento RMN ¹³C (APT) Compuesto Ohc H5

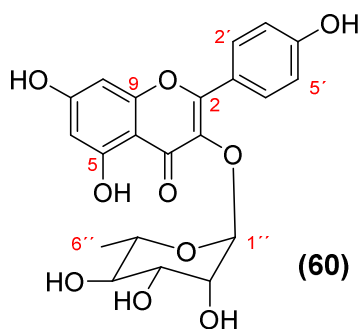


B.21 Experimento HMBC Compuesto Ohc H5

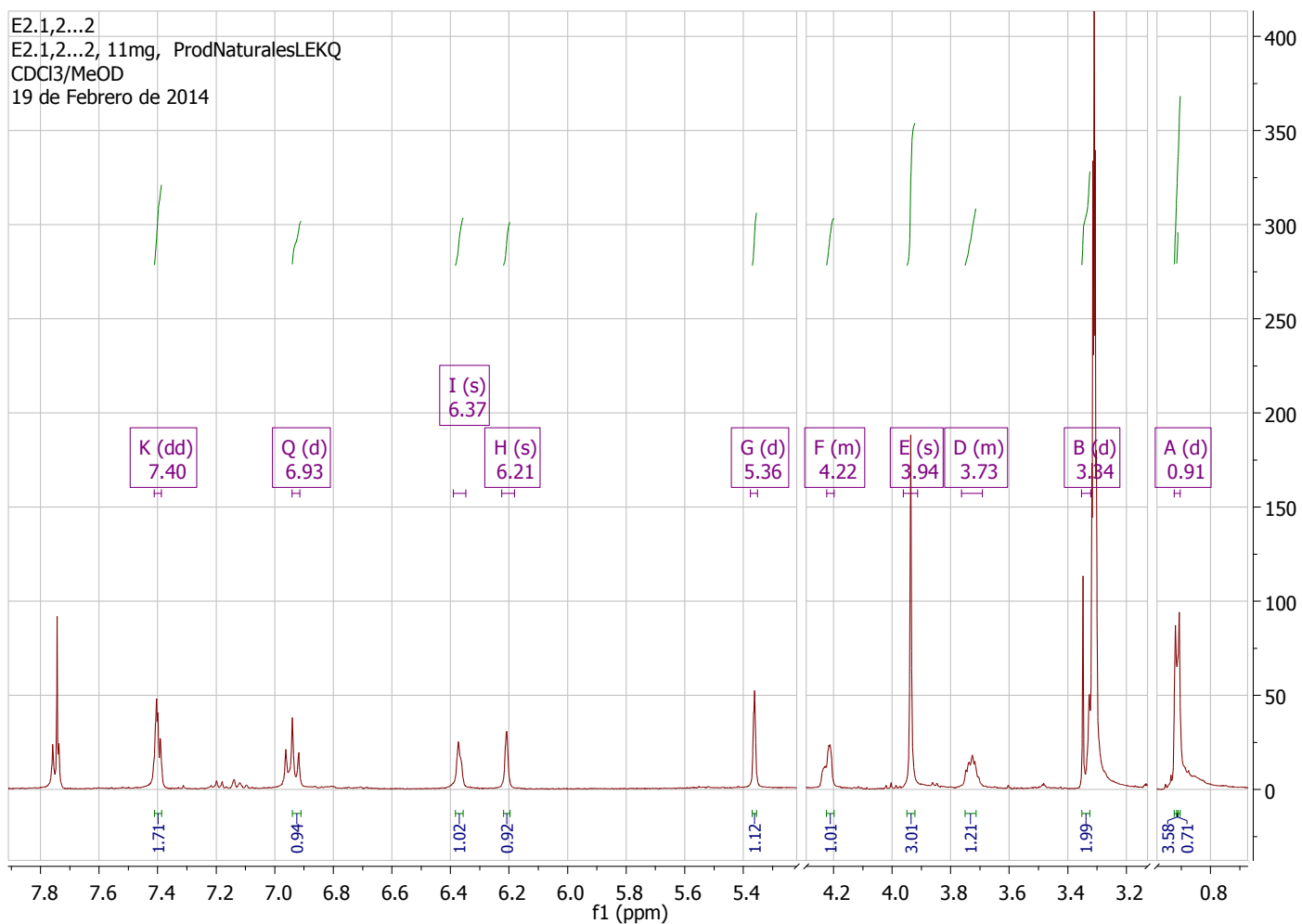


B.22 Experimento HMQC Compuesto Ohc H5

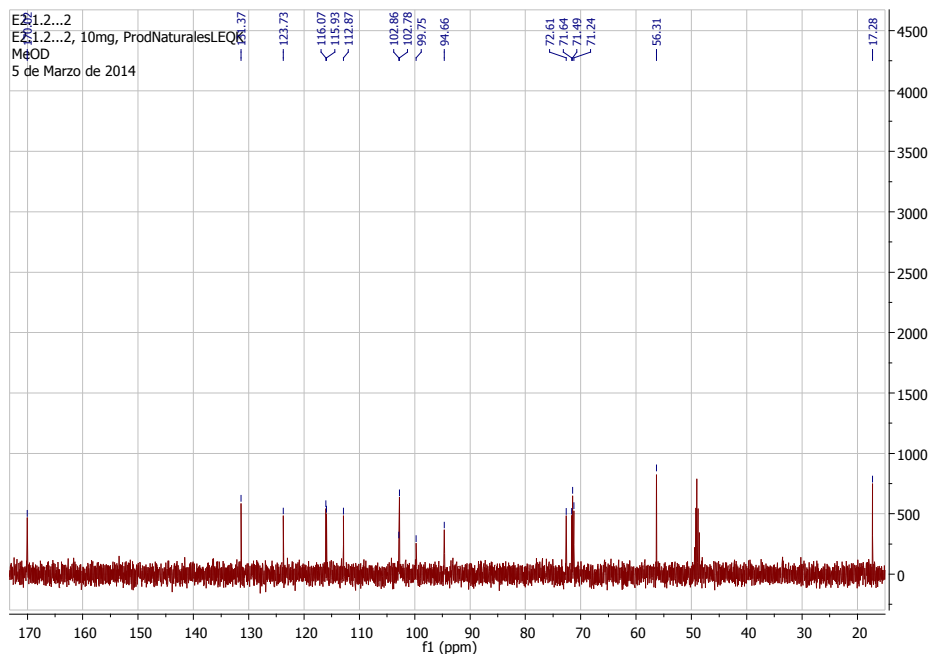




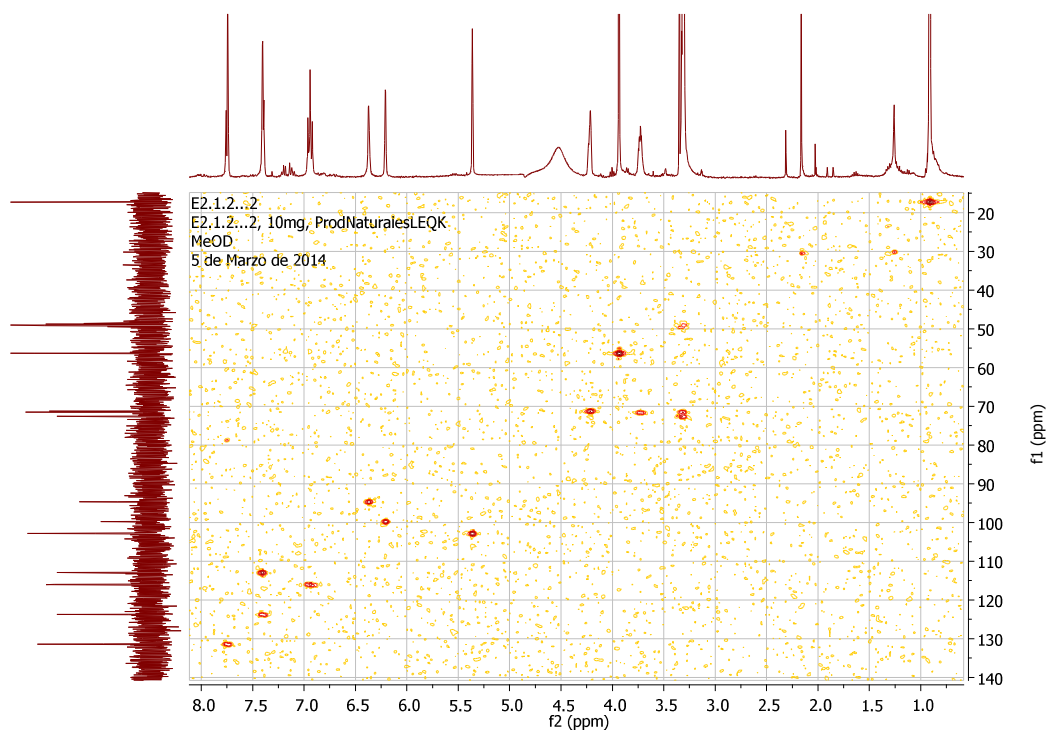
afzelina (Ohc H5)

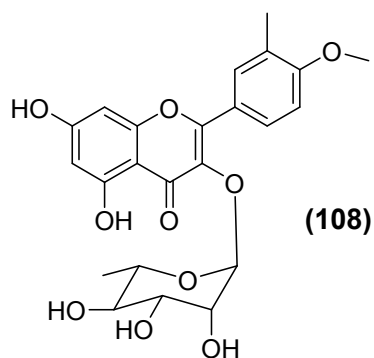
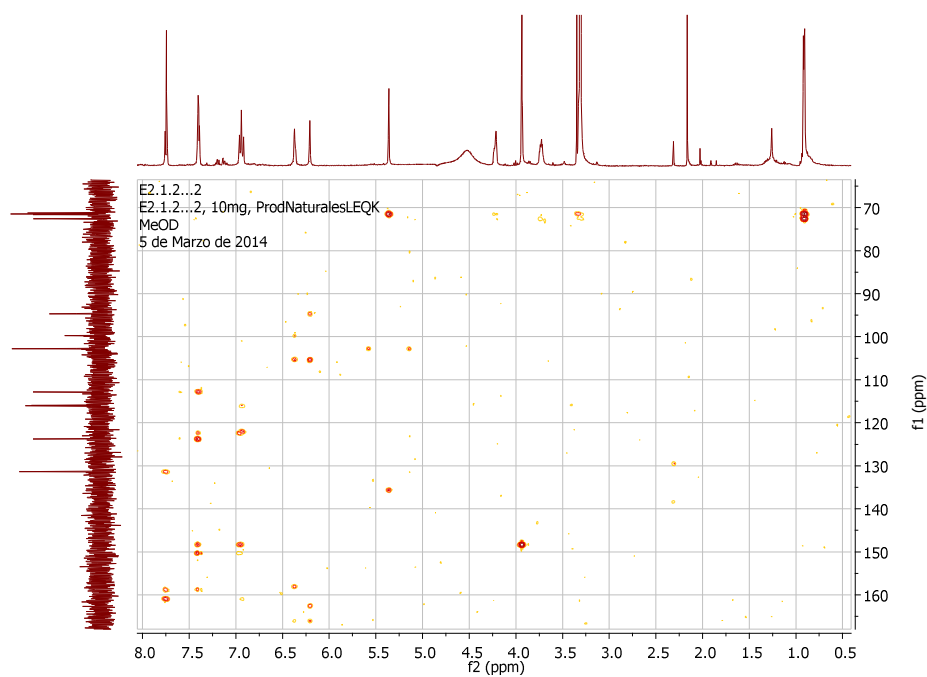
B.23 Espectro de RMN ^1H del compuesto Ohc H6 tamarixetina-3-O-ramosido

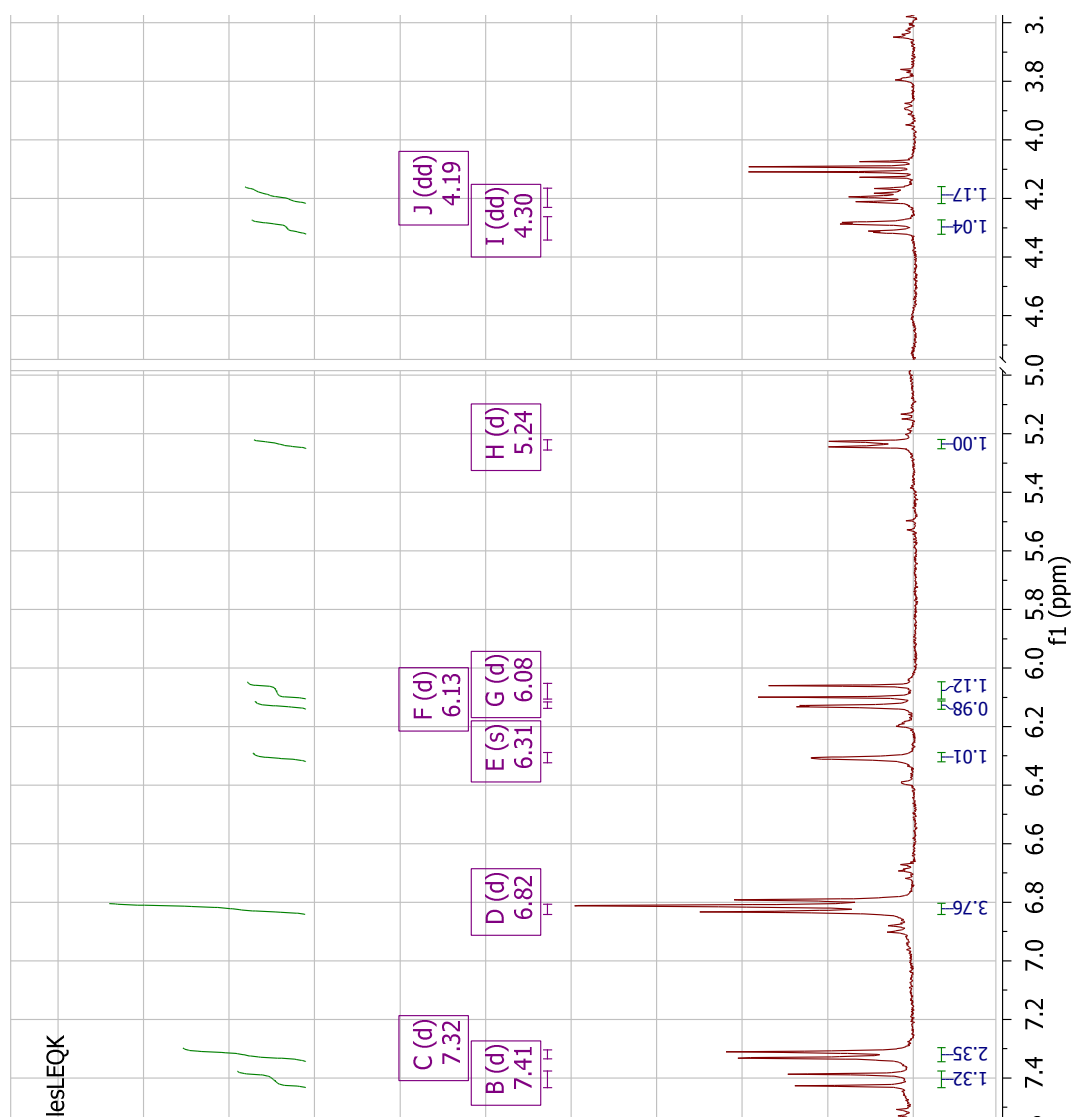
B.24 Espectro de RMN ¹³C del compuesto Ohc H6 tamarixetina-3-O-ramnosido

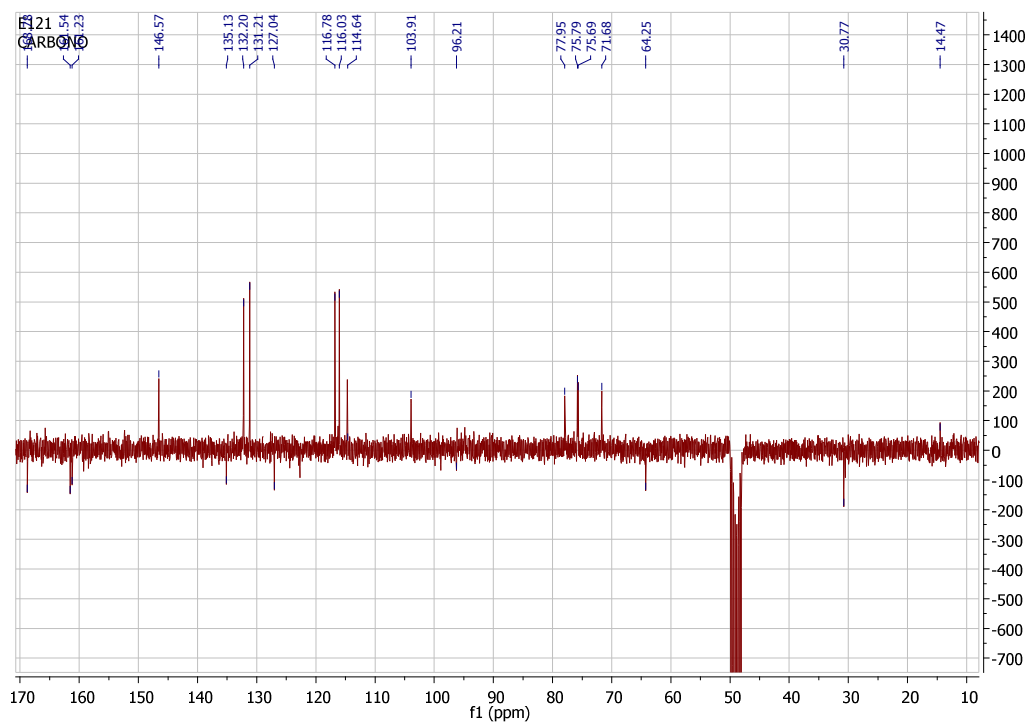


B.25 Experimento HMBC Compuesto Ohc H6 tamarixetina-3-O-ramnosido

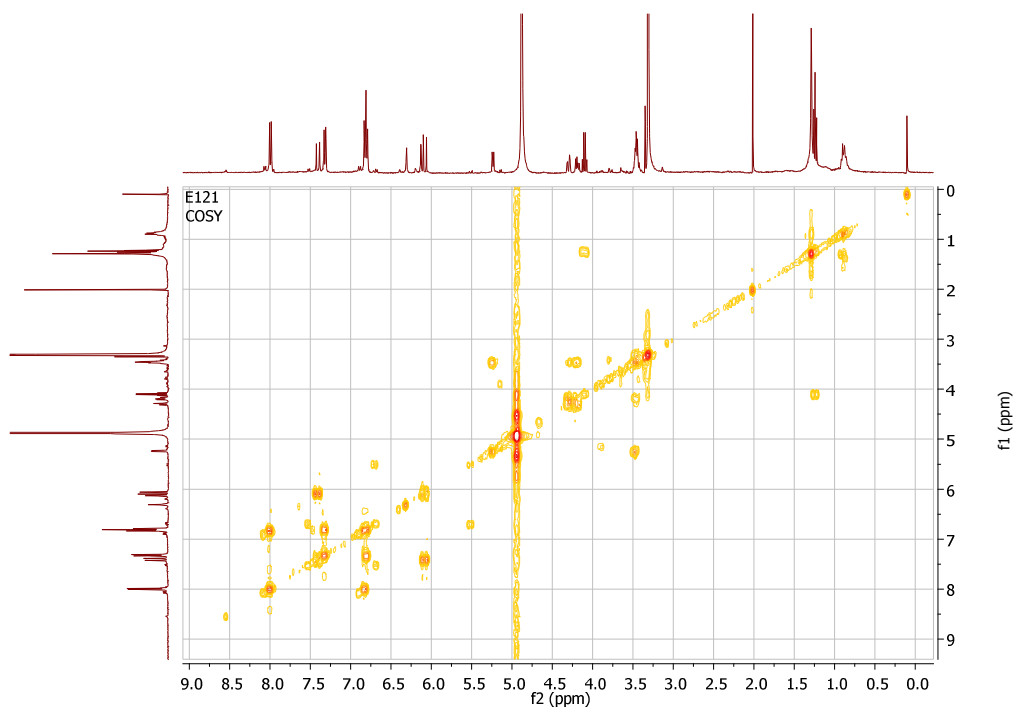


B.26 Experimento HMQC Compuesto Ohc H6 tamarixetina-3-O-ramnosido**tamarixetina-3-O-ramnosido (Ohc H6)**

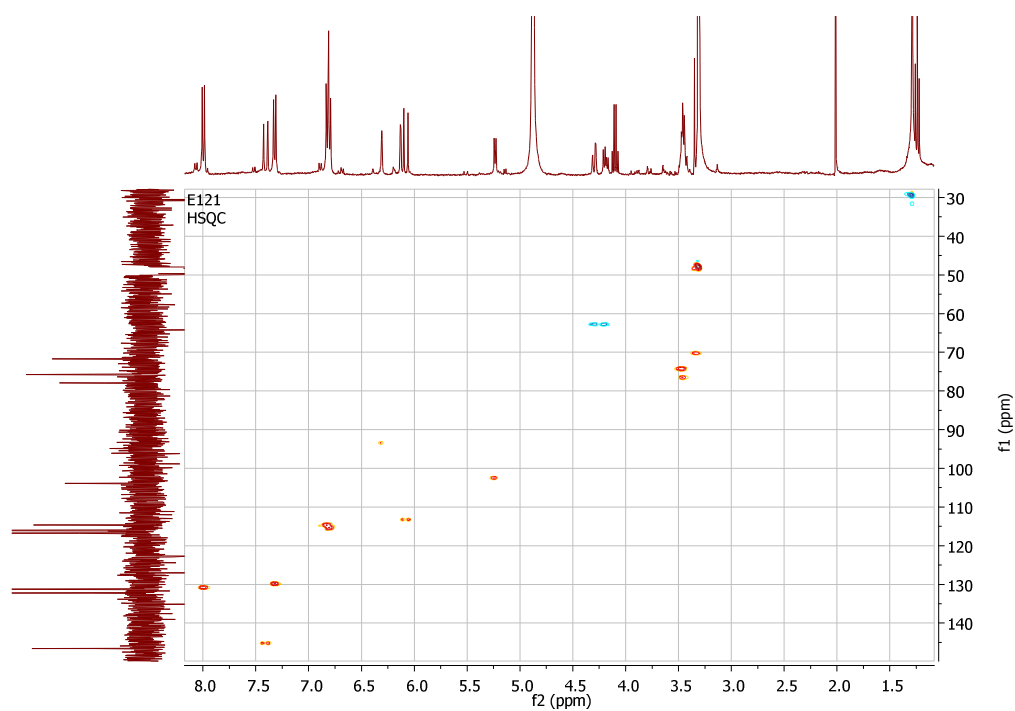
B.27 Espectro RMN ^1H compuesto Ohc H72'-(z-p-coumaroil)astragalinaExperimento RMN ^{13}C (APT) compuesto Ohc H72'-(z-p-coumaroil)astragalina



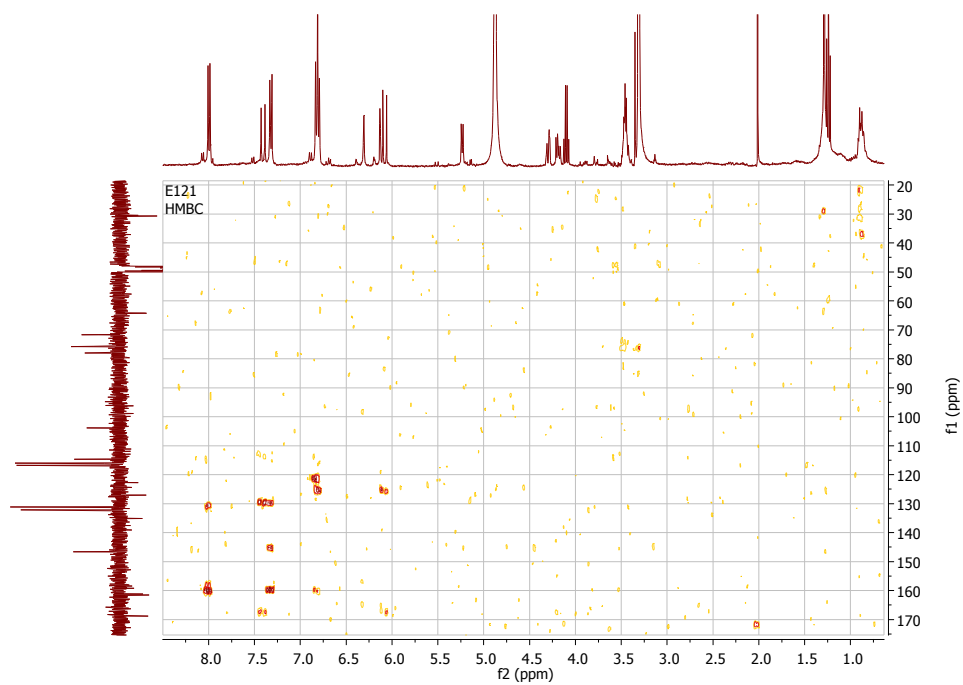
B.21 Experimento COSY Compuesto Ohc H7

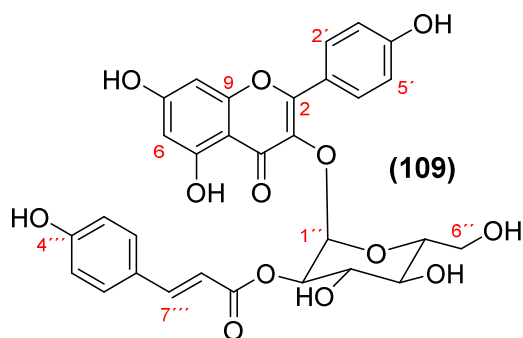


B.22 Experimento HMBC Compuesto Ohc H7



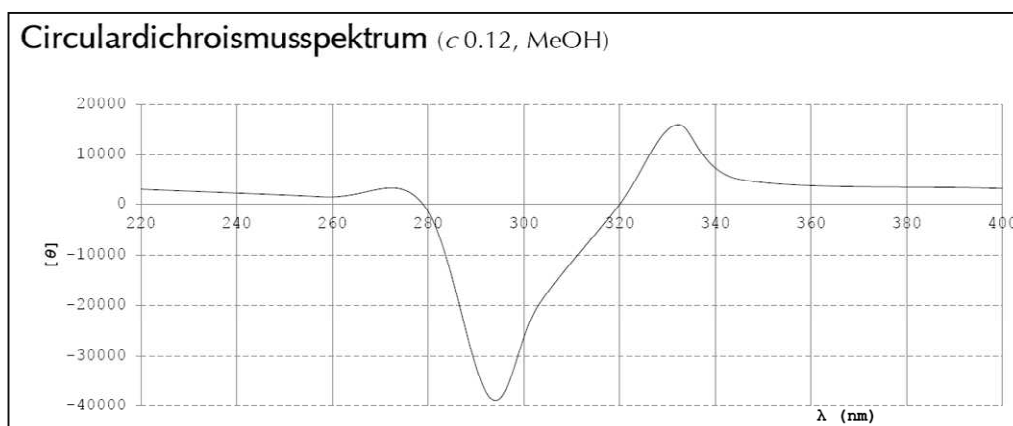
B.23 Experimento HMQC Compuesto Ohc H7



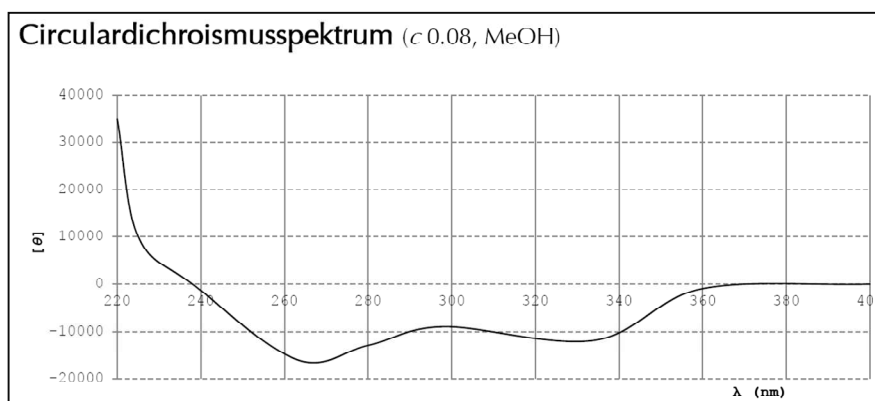


2'-(z-p-coumaroil)astragalina(Ohc H7)

B.24 Espectro de DC para Ohc H2



B.25 Espectro de DC para Ohc H3



C. Tablas de comparación de desplazamientos de RMN ^{13}C para los compuestos aislados con datos de literatura

C.1 Compuesto Ohc H1.

# C	^{13}C (Ohc H1) ^b	^{13}C (cinamato de etilo) ^a	^1H (Ohc H1) ^b	^1H (cinamato de etilo)
1	169.3	167.8		
2	115.9	115.3	6.30 (d, J= 16 Hz, 1H)	6.28 (d, J= 15.6 Hz, 1H)
3	144.4	146.3	7.62 (d, J= 16 Hz, 1H)	7.43(d, J= 15.6 Hz, 1H)
4	127.5	127.2		
5-9	130.1	131.1	7.42 (dd, J=8.6, 1.8 Hz, 2H)	7.43 (d, J=8.6, 2H)
6-8	116	116.8	6.79 (dd, J= J=8.6, 1.8 Hz, 2H)	6.84 (d, J=8.6, 2H)
7	161.2	157.7		
1'	64.9	61.4	4.19 (t, J=6.7 Hz, 2H)	4.19 (q, 2H)
2'	14.3	14.6	1.69 (m, 3H)	1.29 (t, 3H)

^a datos tomados a 150 MHz para RMN ^{13}C y 600 MHz para RMN ^1H . (Solvente CD_3OD) (Peng et al., 2011)

^b datos tomados a 100 MHz para RMN ^{13}C y 400 MHz para RMN ^1H . (Solvente CDCl_3)

Anexo C: Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^{13}C para Ohc H1 a Ohc H7116

C.2 Compuesto Ohc H2.

# C	^{13}C (Ohc H2) ^a	^{13}C (mirandina A) ^b	HMBC ^a
1	137.2	135.5	
2-6	104.2	102.6	6.78 (s 2H)
3-5	154.3	152.8	
4	138.6	137.2	
7	94.8	94.3	5.25 (d J=2 Hz, 1H)
8	44.3	46.9	2.89 (dq J= 7.4, 2 Hz, 1H)
9	17.2	17.3	1.21 (d J = 7.4 Hz 3H)
1'	41.7	142.5	2.57 (ddt J = 12.4, 8.3, 4.1 Hz 1H)
2'	194.2	186.8	
3'	133.5	104.6	
4'	165	177.6	
5'	85.5	80.9	
6'	29.6	131.6	1,68 (dd J= 14, 12.2 Hz 1H)
			2.36 (dd J= 14, 4.3 Hz 1H)
7'	34.9	33.2	2.17 (m 1H)
			2.70 (m 1H)
8'	137.4	134.8	5.81 (m 1H)
9'	117.1	116.9	5.03
			5.08
OCH ₃ 3-5	56.5	56.1	3.82 (s 3H)
OCH ₃ 4	60.5	60.7	3.72 (s 3H)
OCH ₃ 3'	51		3.67 (s 3H)
OCH ₃ 5'	59.9	50.3	3.05 (s 3H)

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ^{13}C y 400 MHz para RMN ^1H . (Solvente $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

^b datos tomados a 25.2 MHz en (Solvente CDCl_3) (Wenkert et al., 1976)

C.3 Compuesto Ohc H3.

# C	¹³ C (Ohc H3) ^a	¹³ C (cinerina C) ^b	HMBC ^a
1	134.33	131.7	
2	105.95	104.8	6.63 (d, J=1.3Hz, 1H)
3	149.27	148.8	
4	134.66	134.4	
5	143.5	143.1	
6	111.98	110.5	6.86 (d, 1.4 Hz, 1H)
7	57.54	56.4	2.39 (d, J= 8.6 Hz, 1H)
8	49.4	47.8	2.79 (dt, J=14.5, 7.1 Hz, 1H)
9	13.34	13.4	0.87 (d, J=6.9 Hz, 3H)
1'	137.95	139.6	
2'	199.06	198.3	
3'	91.04	87.2	
4'	75.63	75.3	4.39 (s, 1H)
5'	88.31	89.9	
6'	151.01	149.3	
7'	33.13	32.6	3.04 (m, 2H)
8'	136.22	134.4	5.95-5.87 (m, 1H)
9'	117.13	117.9	5.08-5.14 (m, 2H)
OCH ₂ O	101.77	101.5	5.91(d, J = 4.1 Hz, 2H)
OCH ₃ 5	56.81	56.7	3.81 (s, 3H)
OCH ₃ 5'	53.51	54.6	3.43 (s, 3H)
OCH ₃ 3'	53.82	53.8	3.28 (s, 3H)

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ¹³C y 400 MHz para RMN ¹H. (Solvente (CD₃)₂CO)

^b datos tomados a 100 MHz para RMN ¹³C y 400 MHz para RMN ¹H. (Solvente CDCl₃) (Coy-Barrera, Cuca-Suárez, & Sefkow, 2009a)

Anexo C: Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^{13}C para Ohc H1 a Ohc H7118

C.4 Compuesto Ohc H4.

Para este compuesto se comparo con la mirandina A, relacionada estructuralmente con tanto con el compuesto Ohc H4 como con el compuesto Ohc H2 y se asigno por comparación.

# C	^{13}C (Ohc H4) ^a	^{13}C (mirandina A) ^b	^1H ^a
1	136.4	135.5	
2	102.3	102.6	6.64 (d, J=1.0 Hz, 1H)
3	149.8	152.8	
4	135.4	137.2	
5	144.4	152.8	
6	106.4	102.6	6.72 (d, J=0.8 Hz, 1H)
7	94.4	94.3	5.23 (d J=2,1 Hz, 1H)
8	44.4	46.9	2.85 (ddd J= 14.9, 7.4, 2.2 Hz, 1H)
9	17.2	17.3	1.19 (d J = 7.4 Hz, 3H)
1'	41.6	142.5	2.56 (ddd, J = 16.3, 8.4, 4.1 Hz 1H)
2'	194.8	186.8	
3'	133.4	104.6	
4'	164.9	177.6	
5'	85.4	80.9	
6'	29.5	131.6	1,67 (dd J= 14, 12.2 Hz, 1H)
			2.35 (dd J= 14, 4.3 Hz, 1H)
7'	34.8	33.2	2.16 (m 1H)
			2.69 (m 1H)
8'	137.4	134.8	5.80 (m 1H)
9'	117.1	116.9	5.02 (m 1H)
			5.08 (m 1H)
OCH ₃ 3	56.9	56.1	3.82 (s 3H)
OCH ₂ O 4,5	100.5		5.98 (s 2H)
OCH ₃ 3'	50.9	50.3	3.05 (s 3H)
OCH ₃ 5'	59.9	-	3.67 (s 3H)

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ^{13}C y 400 MHz para RMN ^1H . (Solvente (CD₃)₂CO)

^b datos tomados a 25.2 MHz en (Solvente CDCl₃) (Wenkert et al., 1976)

C.5 Compuesto Ohc H5.

# C	¹³ C (Ohc H5) ^a	¹³ C (afzelina) ^b	HMBC ^a
2	158.7	157.3	
3	136.1	134.2	
4	179.4	177.7	
5	163.1	161.3	
6	100.3	98.7	6.18 (d, J=1.7 Hz 1H)
7	167.3	164.2	
8	95.1	93.8	6.35 (d, J= 1.5 Hz)
9	161.6	156.5	
10	105.5	104.1	
1'	122.7	120.5	
2'-6'	131.9	130.6	7.76 (d, J= 8.7 Hz, 2H)
3'-5'	116.6	115.4	6.93 (d, J=8.7 Hz, 2H)
4'	159.1	160.0	
1''	100.3	101.8	5.37 (d, J=1.4 Hz, 1H)
2''	71.9	70.1	4.23 (dd, J= 3.0, 1.5 Hz, 1H)
3''	72.1	70.6	3.72 (dd, J= 8.9, 3.3 Hz, 1H)
4''	73.2	71.1	3.33 (m 2H)
5''	72	70.3	
6''	17.6	17.5	0.92 (d, J= 5.6 Hz, 1H)

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ¹³C y 400 MHz para RMN ¹H. (Solvente CD₃OD)

^b datos tomados a 125 MHz en (Solvente CD₃OD) (Kim, Kim, Choi, & Ryu, 2004)

Anexo C: Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^{13}C para Ohc H1 a Ohc H7120

C.6 Compuesto Ohc H6.

# C	^{13}C (Ohc H5) ^a	^{13}C (tamarixetina) ^b aglicona	HMBC ^a
2	158.9	159.5	
3	131.3	133.6	
4	170	178.7	
5	162	162.8	
6	99.7	100.5	6.21 (s 1H)
7	166.3	166.5	
8	94.6	94.9	6.37 (s 1H)
9	158	158.6	
10	105.3	105.6	
1'	122.8	122.4	
2'	113.4	114.3	7.40 (m 2H)
3'	150.1	151.5	
4'	148.4	148.7	
5'	116.1	116.2	6.93 (d, J=8.8 Hz, 1H)
6'	127.1	123.9	7.40 (m 2H)
1''	102.7	101.8	5.36 (d, J=1.3 Hz, 1H)
2''	71.2	70.1	4.22 (m 1H)
3''	71.6	70.6	3.73 (m 1H)
4''	72.6	71.1	3.34 (m 2H)
5''	71.5	70.3	3.34 (m 2H)
6''	17.3	17.5	0.91 (d, J= 5.3 Hz, 3H)
OCH3 4'	56.3	56.8	3.94 (s 3H)

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ^{13}C y 400 MHz para RMN ^1H . (Solvente CD_3OD)

^b datos tomados a 100 MHz en (Solvente CD_3OD)(Parveen et al., 2012)

C.7 Compuesto Ohc H7.

# C	¹³ C (Ohc H7) ^a	¹³ C (2'-O-(Z-p-coumaroil)astragalina) ^b	HMBC ^a
2	161.5	159.9	
3	135.1	135.7	
4	179.3	179.5	
5	167.	163.5	
6	96.2	100.5	6.13 (d J=1.4 Hz 1H)
7	166	166.4	
8	94.8	95.3	6.31 (s 1H)
9	158.4	158.9	
10	106.8	106.1	
1'	123.5	123.2	
2'-6'	132.2	132.7	8.0 (d J=8.9 Hz, 2H)
3'-5'	116	117.3	6.82 (d J=8.5 Hz, 2H)
4'	165.6	162	
1''	103.9	104.4	5.24 (d, J=7.4 Hz, 1H)
2''	77.8	78.5	3.45 (m 3H)
3''	75.8	76.4	3.45 (m 3H)
4''	71.7	72.2	3.32 (m 1H)
5''	75.7	76.2	3.45 (m 3H)
6''	64.3	64.7	4.19 (dd J= 11.8, 6.5 Hz, 1H)
			4.30 (dd J= 11.7, 2.0 Hz 1H)
1'''	168.8	169.2	
2'''	114.6	117	6.08 (d, J=15.9 Hz, 1H)
3'''	146.6	147	7.41 (d, J=15.9 Hz, 1H)
4'''	127	127.6	
5'''-9'''	131.2	131.6	7.32 (d, J= 8.6 Hz, 1H)
6'''-8'''	116.8	116.7	6.80 (d, J= 8.0 Hz, 1H)
7'''	161.2	161.5	

^a datos tomados a 100 MHz para RMN ¹³C y 400 MHz para RMN ¹H. (Solvente CD₃OD)

^b datos tomados a 125 MHz en (Solvente CD₃OD) (Nguelefack et al., 2011)

D. Datos del sistema FR-CLAE-DAD-EM para los compuestos aislados (Ohc H1-Ohc H9) y comparación con extracto de corteza y madera.

Compuesto	t_{ret} (min)	[M+H] m/z		Corteza	Madera
Ohc H1	17.04	193		+	-
Ohc H2	18.2	419		+	+
Ohc H3	17.99	387		+	-
Ohc H4	18.97	402		+	+
Ohc H5	18.44	433	287	+	-
Ohc H6	12.55	463	317	-	-
Ohc H7	19.34	595	287	+	+
Ohc H8	10.05	463	317	-	-
Ohc H9	10.85	449	287	-	-

+/- presencia o no del compuesto por comparación del EM en el tiempo de retención establecido.

5. Bibliografía

- Adeyemi, O. O., Okpo, S. O., & Ogunti, O. O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia*, 73, 375–380. doi:10.1016/S0367-326X(02)00118-1
- Aiba, C., Gottlieb, O., Pagliosa, F., Yoshida, M., & Magalhaes, M. (1977). Neolignans from *Nectandra miranda*. *Phytochemistry*, 16, 745–748.
- Aiba, C. J., Filho, R. B., & Gottlieb, O. R. (1973). Porosin: A neolignan from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry*, 12, 413–416. doi:10.1016/0031-9422(73)80030-5
- Avalos, J., Fernández-Martín, R., Prado, M. M., Giordano, W., Domenech, C. E., & Cerdá-Olmedo, E. (1999). Biosíntesis de giberelinas, bikaverina y carotenoides en *Gibberella fujikuroi*. *Bioteconología Y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados*, 169–188. Retrieved from http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/10781/1/CC_48_art_9.pdf
- Balick, M. J., Atha, D. E., Canham, S., & Romero, L. (2002). Capoche-Rediscovery of a Forgotten Febrifuge (*Ocotea veraguensis* [Meisn.] Mez) from Belize, Central America, Including a New Floristic Record. *Economic Botany*, 56(1), 89–94. doi:10.1007/BF02862283
- Barbosa-Filho, J. M., Yoshida, M., & Gottlieb, O. (1989). Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens.*, 28(7), 1991.
- Becke, A. D. (1993). Density Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.*, 98(7), 5648–5652. doi:10.1063/1.464913
- Benarroz, M. O., Fonseca, A. S., Rocha, G. S., Frydman, J. N. G., Rocha, V. C., Pereira, M. O., & Bernardo-Filho, M. (2008). *Cinnamomum zeylanicum* extract on the radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells: In vitro assay. *Applied Radiation and Isotopes*, 66, 139–146. doi:10.1016/j.apradiso.2007.08.004
- Bilbao Rodriguez, M. R. (1997). *Análisis Fitoquímico Preliminar. Química de Productos Naturales* (Universida.). Armenia.
- Brittain, H. G. (2000). Techniques of Chiroptical Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 35(3), 175–201. doi:10.1081/ASR-100101224
- Cabral, M. M. O., Barbosa-Filho, J. M., Maia, G. L. A., Chaves, M. C. O., Braga, M. V., De Souza, W., & Soares, R. O. A. (2010). Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 124, 319–324. doi:10.1016/j.exppara.2009.11.007
- Cardenas, D., & Salinas, N. (2006). Libro rojo de plantas de Colombia: Especies maderables amenazadas parte I. Retrieved September 16, 2014, from

<http://www.corpoamazonia.gov.co/index.php/noticias/120-en-el-jardin-botanico-corpoamazonia-preserva-especies-categorizadas-en-peligro>

- Chanderbali, A. S., van der Werff, H., & Renner, S. S. (2001). Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(1), 104–134. doi:10.2307/2666133
- Chang, F., Chao, Y., Teng, C., & Wu, Y. (1998). Chemical Constituents from *Cassytha filiformis* II. *Journal of Natural Products*, 61(7), 863–866.
- Chen, C. Y., Chen, C. H., Wong, C. H., Liu, Y. W., Lin, Y. S., Wang, Y. Der, & Hsui, Y. R. (2007). Cytotoxic constituents of the stems of *Cinnamomum subavenium*. *Journal of Natural Products*, 70, 103–106. doi:10.1021/np060425k
- Chouna, J. R., Nkeng-Efouet, P. A., Lenta, B. N., Wansi, J. D., Kimbu, S. F., & Sewald, N. (2010). Endiandric acid derivatives from the stem bark of *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry Letters*, 3, 13–16. doi:10.1016/j.phytol.2009.10.005
- Christie, W. W. (2014). The AOCS Lipid Library. Retrieved November 05, 2014, from <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tocol/index.htm>
- Coy-Barrera, E. D., & Cuca-Suarez, L. E. (2009). Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 522–524. doi:10.1016/j.bse.2009.05.002
- Coy-Barrera, E. D., Cuca-Suárez, L. E., & Sefkow, M. (2009a). COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6922–6925. doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.069
- Coy-Barrera, E. D., Cuca-Suárez, L. E., & Sefkow, M. (2009b). Macrophyllin-type bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from the leaves of *Pleurothyrium cinereum*. *Journal of Natural Products*, 72, 1245–1248. doi:10.1021/np9000569
- Coy-Barrera, E. D., Cuca-Suárez, L. E., & Sefkow, M. (2009c). PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). *Phytochemistry*, 70, 1309–1314. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.010
- Cuca-Suarez, L. E., Leon, P., & Coy-Barrera, E. D. (2009). A bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), 179–181. doi:10.1007/s10600-009-9304-3
- Cuca-Suarez, L. E., Ramos, C. A., & Coy-Barrera, E. D. (2013). Novel cadinane-related sesquiterpenes from *Nectandra amazonum*. *Phytochemistry Letters*, 6, 435–438. doi:10.1016/j.phytol.2013.05.010
- Da Silva, I. G., Barbosa-Filho, J. M., Da Silva, M. S., De Lacerda, C. D. G., & Da-Cunha, E. V. . L. (2002). Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 881–883. doi:10.1016/S0305-1978(02)00024-8

- De Alvarenga, M. A., Castro C., O., Giesbrecht, A. M., & Gottlieb, O. R. (1977). Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from *Aniba simulans*. *Phytochemistry*, 16, 1801–1804.
- De Lima Silva, L., da Silva, D. T., Garlet, Q. I., Cunha, M. A., Mallmann, C. A., Baldisserotto, B., ... Heinzmann, B. M. (2013). Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, 11(2), 443–451. doi:10.1590/S1679-62252013000200014
- De Marino, S., Borbone, N., Zollo, F., Ianaro, A., Di Meglio, P., & Iorizzi, M. (2004). Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7525–7531. doi:10.1021/jf048782t
- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., & Stewart, J. J. P. (1985). AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, 107(13), 3902–3909. doi:10.1021/ja00299a024
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. (Wiley., p. 150).
- Diaz D, P. P., Massayoshi, Y., & Gottlieb, O. (1980). Neolignans from *Aniba lancifolia*. *Phytochemistry*, 19, 285–288.
- Drewes, S., Horn, M. M., Sehlapelo, B. M., Ramesar, N., Field, J. S., Shaw, R. S., & Sandor, P. (1995). Iso-ocobullenone and a neolignan ketone from *Ocotea bullata* bark. *Phytochemistry*, 38(6), 1505–1508.
- Dumontet, V., Gaspard, C., Hung, N. Van, Fahy, J., Tchertanov, L., Sévenet, T., & Guéritte, F. (2001). New cytotoxic flavonoids from *Cryptocarya infectoria*. *Tetrahedron*, 57, 6189–6196.
- Eliel, E., & Wilen, S. (2005). *Stereochemistry of Organic Compounds*. (John Wiley., pp. 726–727). New York.
- Fang, S. H., Rao, Y. K., & Tzeng, Y. M. (2005). Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-g-activated murine macrophages. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 2381–2388. doi:10.1016/j.bmc.2005.01.050
- Feng, R., Guo, Z. K., Yan, C. M., Li, E. G., Tan, R. X., & Ge, H. M. (2012). Anti-inflammatory flavonoids from *Cryptocarya chingii*. *Phytochemistry*. doi:10.1016/j.phytochem.2012.01.007
- Fiorini, C., David, B., Fourasté, I., & Vercauteren, J. (1998). Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. *Phytochemistry*, 47(5), 821–824. doi:10.1016/S0031-9422(97)00563-3

- Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Guy, I., Guinaudeau, H., & Heinzen, H. (2007). Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, *78*, 382–384. doi:10.1016/j.fitote.2007.03.003
- Fraga, B. M., Terrero, D., Gutiérrez, C., & González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: Their antifeedant activity. *Phytochemistry*, *56*, 315–320. doi:10.1016/S0031-9422(00)00376-9
- Funasaki, M., Lordello, A. L. L., Viana, A. M., Santa-Catarina, C., Floh, E. I. S., Yoshida, M., & Kato, M. J. (2009). Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *20*(5), 853–859. doi:10.1590/S0103-50532009000500008
- Garcez, W. S., Yoshida, M., & Gottlieb, O. (1995). Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, *39*(4), 815–816. doi:10.1016/0031-9422(94)00961-R
- García Barriga, H. (1992). *Flora medicinal colombiana, Tomo I* (Tercer Mun., p. 364). Santa fe de Bogotá.
- Garrett, R., Romanos, M. T. V., Borges, R. M., Santos, M. G., Rocha, L., & da Silva, A. J. R. (2012). Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *22*(2), 306–313. doi:10.1590/S0102-695X2012005000003
- Gottlieb, O. (1972). Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, *11*, 1537–1570. doi:10.1016/0031-9422(72)85001-5
- Gui, C., Zhu, W., Chen, G., Luo, X., Liew, O. W., Pua, C. M., ... Jiang, H. (2007). Understanding the Regulation Mechanisms of PAF Receptor by Agonists and Antagonists: Molecular Modeling and Molecular Dynamics Simulation Studies. *Proteins*, *67*, 41–52. doi:10.1002/prot
- Guilhon, G. M. S. P., Conserva, L. M., Maia, J. G. S., Yoshida, M., & Gottlieb, O. R. (1992). Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from *Licaria brasiliensis*. *Phytochemistry*, *31*(8), 2847–2850.
- Henry, G. E., Adams, L. S., Rosales, J. C., Jacobs, H., Heber, D., & Seeram, N. P. (2006). Kaurene diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, *244*, 190–194. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.022
- Herbario Nacional Colombiano. (2014). Herbario Nacional Colombiano. Retrieved October 13, 2014, from <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>
- Herrera Valencia, W., Barbosa Sampaio, P. D. T., & Gomes De Souza, L. A. (2010). Crecimiento inicial de Palo de Rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*) en distintos ambientes de fertilidad. *Acta Amazonica*, *40*(4), 693–698. doi:10.1590/S0044-59672010000400008

- Holloway, D., & Scheinmann, F. (1974). Two lignans from *Litsea grandis* and *L. gracilipes*. *Phytochemistry*, 13, 1233–1236. doi:10.1016/0031-9422(74)80107-X
- Hu, J. N., Zhang, B., Zhu, X. M., Li, J., Fan, Y. W., Liu, R., ... Deng, Z. Y. (2011). Characterization of medium-chain triacylglycerol (MCT)-enriched seed oil from *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) and its oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4771–4778. doi:10.1021/jf200188r
- Huh, G.-W., Park, J.-H., Kang, J.-H., Jeong, T.-S., Kang, H. C., & Baek, N.-I. (2014). Flavonoids from *Lindera glauca* Blume as low-density lipoprotein oxidation inhibitors. *Natural Product Research*, 28(11), 831–834. doi:10.1080/14786419.2013.879583
- Ishige, M., Motidome, M., Yoshida, M., & Gottlieb, O. R. (1991). Neolignans from *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*, 30(12), 4121–4128. doi:10.1016/S0031-9422(00)84995-X
- Jiang, Z., Akhtar, Y., Bradbury, R., Zhang, X., & Isman, M. B. (2009). Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the Cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4833–4837. doi:10.1021/jf900274r
- Jiménez-Pérez, N. del C., Lorea-Hernández, F. G., Jankowski, C. K., & Reyes-Chilpa, R. (2011). Essential Oils in Mexican Bays (*Litsea* spp., Lauraceae): Taxonomic Assortment and Ethnobotanical Implications. *Economic Botany*, 65(2), 178–189. doi:10.1007/s12231-011-9160-5
- Kim, M. R., Jung, H. J., Min, B. S., Oh, S. R., Kim, C. S., Ahn, K. S., ... Lee, H. K. (2002). Constituents from the stems of *Actinodaphne lancifolia*. *Phytochemistry*, 59, 861–865. doi:10.1016/S0031-9422(02)00018-3
- Kim, Y.-K., Kim, Y. S., Choi, S. U., & Ryu, S. Y. (2004). Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1), 44–47.
- Konkimalla, V. B., & Efferth, T. (2010). Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aphorphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1092–1099. doi:10.1016/j.bcp.2009.11.025
- Lacava Lordello, A. L., & Yoshida, M. (1997). Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*, 46(4), 741–744.
- Lee, S.-S., & Chen, C.-H. (1993). Additional alkaloids from *Cryptocarya chinensis*. *Journal of Natural Products*, 56(2), 227–232.
- Liu, Q., Ahn, J. H., Kim, S. B., Lee, C., Hwang, B. Y., & Lee, M. K. (2013). Sesquiterpene lactones from the roots of *Lindera strychnifolia*. *Phytochemistry*, 87, 112–118. doi:10.1016/j.phytochem.2012.11.004

- Liu, R., Zhang, H. C., Zhou, F., Wang, R. M., Tu, Q., & Wang, J. Y. (2013). Flavonoids and alkaloids from the leaves of *Litsea fruticosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *50*, 293–295. doi:10.1016/j.bse.2013.04.008
- Lopez, H., & Valera, A. (1995). Lignans from *Ocotea foetens*. *Journal of Natural Products*, *58*(5), 782–785.
- Marques, C. (2001). Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta E Ambiente*, *8*(1), 195–206. Retrieved from <http://www.floram.org/files/v8n?nico/v8nunicoa25.pdf>
- Medeiros, M. A. A., Nunes, X. P., Barbosa-Filho, J. M., Lemos, V. S., Pinho, J. F., Roman-Campos, D., ... Cruz, J. S. (2009). (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca²⁺ channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *379*, 115–125. doi:10.1007/s00210-008-0352-1
- Min, B. S., Lee, S. Y., Kim, J. H., Kwon, O. K., Park, B. Y., An, R. B., ... Lee, H. K. (2003). Lactones from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *Journal of Natural Products*, *66*, 1388–1390. doi:10.1002/ptr.1453
- Monte Neto, R. L., Sousa, L. M. A., Dias, C. S., Barbosa Filho, J. M., Oliveira, M. R., & Figueiredo, R. C. B. Q. (2011). Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology*, *127*, 215–221. doi:10.1016/j.exppara.2010.07.020
- Morais, L. C. S. L., Barbosa-Filho, J. M., & Almeida, R. N. (1998). Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *62*, 57–61. doi:10.1016/S0378-8741(98)00044-0
- Nafiah, M. A., Mukhtar, M. R., Omar, H., Ahmad, K., Morita, H., Litaudon, M., ... Hadi, A. H. A. (2011). N-cyanomethylnorboldine: A new aporphine isolated from *Alseodaphne perakensis* (Lauraceae). *Molecules*, *16*, 3402–3409. doi:10.3390/molecules16043402
- Nguelefack, T. B., Mbakam, F. H. K., Taponjoui, L. A., Watcho, P., Nguelefack-Mbuyo, E. P., Ponou, B. K., ... Park, H. J. (2011). A dimeric triterpenoid glycoside and flavonoid glycosides with free radical-scavenging activity isolated from *Rubus rigidus* var. *camerunensis*. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(4), 543–550. doi:10.1007/s12272-011-0404-9
- Palomino, E., Maldonado, C., Kempff, M. B., & Ksebati, M. B. (1996). Caparratriene, an active sesquiterpene hydrocarbon from *Ocotea caparrapi*. *Journal of Natural Products*, *59*, 77–79. doi:10.1021/np960012r
- Parveen, S., Riaz, N., Saleem, M., Khan, J., Ahmad, S., Ashraf, M., ... Jabbar, A. (2012). Bioactive Phenolics from *Launaea intybacea*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, *34*(6), 1513–1519.
- Peng, W., Han, T., Wang, Y., Xin, W. B., Zheng, C. J., & Qin, L. P. (2011). Chemical constituents of the aerial part of *Atractylodes macrocephala*. *Chemistry of Natural Compounds*, *46*(6), 959–960. doi:10.1007/s10600-011-9795-6

- Pereira Marques, R. C., Batistuzzo De Medeiros, S. R., Da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J. M., & Agnez-Lima, L. F. (2003). Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, 536, 117–120. doi:10.1016/S1383-5718(03)00040-8
- Pradeepa, K., Krishna, V., Venkatesh, Kumar, G., Thirumalesh, B. V., & Naveen Kumar, K. J. (2011). Antibacterial screening of the stem bark and leaf extracts of *Litsea glutinosa* (Lour.) C.B. Rob – an ethnomedicinally important tree of the Western Ghats. *Pharmacognosy Journal*, 3(21), 72–76. doi:10.5530/pj.2011.21.13
- Reiter, E., Jiang, Q., & Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 668–691. doi:10.1016/j.mam.2007.01.003
- Romoff, P., Yoshida, M., & Gottlieb, O. R. (1984). Neolignans from *Ocotea aciphylla*. *Phytochemistry*, 23(9), 2101–2104.
- Royal Botanic Gardens, & Kew and Missouri Botanical Garden. (2013). The plant list. Retrieved October 15, 2014, from <http://www.theplantlist.org/browse/A/Lauraceae/Ocotea/>
- Salleh, W. M. N. H. W., Ahmad, F., & Yen, K. H. (2014). Chemical compositions and biological activities of the essential oils of *Beilschmiedia madang* Blume (Lauraceae). *Archives of Pharmacal Research*. doi:10.1007/s12272-014-0460-z
- Sehlapelo, B. M., Drewes, S. E., & Sandor, P. (1993). Ocobullenone: A bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry*, 32(5), 1352–1353. doi:10.1016/S0031-9422(00)95121-5
- Shityakov, S., & Förster, C. (2014). In silico structure-based screening of versatile P-glycoprotein inhibitors using polynomial empirical scoring functions. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 7, 1–9. doi:10.2147/AABC.S56046
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29–47.
- Takaku, S., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2007). Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 525–532. doi:10.1016/j.bse.2007.02.003
- Tao, R., Wang, C. Z., & Kong, Z. W. (2013). Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyprenols and other lipids isolated from *Ginkgo Biloba* L. leaves. *Molecules*, 18, 2166–2182. doi:10.3390/molecules18022166
- Telascrea, M., de Araújo, C. C., Marques, M. O. M., Facanali, R., de Moraes, P. L. R., & Cavalheiro, A. J. (2007). Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 222–232. doi:10.1016/j.bse.2006.09.015

- Tewari, S., Bhakuni, D. S., & Dhar, M. M. (1972). The aporphine alkaloids of *Litsea glutenosa*. *Phytochemistry*, *11*, 1149–1152. doi:10.1016/S0031-9422(00)88469-1
- Trevisan, L. M. V., Yoshida, M., & Gottlieb, O. (1984). Hexahydrobenzofuranoid neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, *23*(3), 661–665.
- Uprety, H., Bhakuni, D. S., & Dhar, M. M. (1972). Aporphine Alkaloids of *Litsea sebifera*, *L. wightiana* and *Actinodaphne obovata*. *Phytochemistry*, *11*, 3057–3059.
- Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F. A., ... Bourdy, G. (2009). Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *123*, 413–422. doi:10.1016/j.jep.2009.03.041
- Van der Werff, H., & Lorea-Hernández, F. G. (1997). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Lauraceae. *Trabajo*, *56*, 1–58. Retrieved from [http://www1.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora 78.pdf](http://www1.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2078.pdf)
- Wang, C. C., Kuoh, C. S., & Wu, T. S. (1996). Constituents of *Persea japonica*. *Journal of Natural Products*, *59*, 409–411. doi:10.1021/np9601824
- Wenkert, E., Gottlieb, H., Gottlieb, O., Pereira, M. O. da S., & Formiga, M. (1976). ¹³C NMR spectroscopy of neolignans. *Phytochemistry*, *15*, 1547–1551.
- worldagroforestry. (2009). *Ocotea usambarensis* L. *Agroforestry Database*, 1–5.
- Wu, Y., Chao, Y., Chang, F., & Chen, Y. (1997). Alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Phytochemistry*, *46*(1), 181–184.
- Yamaguchi, M. U., Garcia, F. P., Garcia Cortez, D. A., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2011). Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *99*, 507–514. doi:10.1007/s10482-010-9516-3
- Yang, L. J., Chen, W., Luo, Y. P., Li, G. P., Yang, X. D., & Li, L. (2009). Lignans and ketonic compounds from *Litsea chinpingensis* (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *37*, 696–698. doi:10.1016/j.bse.2009.11.003
- Zhao, Q., Zhao, Y., & Wang, K. (2006). Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. *Journal of Ethnopharmacology*, *106*, 408–413. doi:10.1016/j.jep.2006.01.019
- Zschocke, S., Van Staden, J., Paulus, K., Bauer, R., Horn, M. M., Munro, O. Q., Drewes, S. E. (2000). Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry*, *54*, 591–595. doi:10.1016/S0031-9422(00)00163-1