



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**  
**NÚCLEO DE SUCRE**  
**ESCUELA DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *VISMIA CAYENNENSIS* Y SU POSIBLE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
(Modalidad: Investigación)

KARINA DEL CARMEN MARÍN JIMÉNEZ

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA**

CUMANÁ, 2009



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *VISMIA CAYENNENSIS* Y SU POSIBLE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
(Modalidad: Investigación)**

**AUTOR:  
Br. Karina Del Carmen Marín Jiménez  
C.I. 17.762.822**

**ACTA DE APROBACIÓN DEL JURADO**

**Trabajo Especial de Grado aprobado en nombre de la Universidad de Oriente,  
por el siguiente jurado calificador, en la ciudad de Cumaná, a los días del mes  
de de 2009.**

---

Dra. Haydelba D'Armas  
Asesora Académica

---

Dra. María Maillo  
Asesora Externa

---

Dr. Oscar Crescente  
Jurado Principal

---

M.Sc. Yvanovis Dasilva  
Jurado Principal

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
LISTA DE ABREVIATURA .....	iv
LISTA DE FIGURA .....	v
LISTA DE TABLAS .....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN .....	8
METODOLOGÍA .....	22
Recolección de la especie de interés .....	22
Obtención del extracto y fracciones solubles .....	22
Caracterización fitoquímica .....	24
• Alcaloides .....	24
• Flavonoides .....	24
• Saponinas.....	25
• Taninos y polifenoles .....	25
• Antraquinonas .....	26
• Triterpenos y/o esterol.....	26
Pruebas biológicas.....	27
• Actividad antibacteriana.....	27

• Ensayos de citotoxicidad e inflamación .....	28
Cromatografía.....	34
Técnicas de identificación .....	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
Obtención de las fracciones solubles.....	34
Análisis fitoquímico .....	35
Pruebas biológicas.....	37
• Actividad antibacteriana.....	37
• Ensayo antiinflamatorio y citotóxico.....	39
Fraccionamiento biodirigido .....	42
Cromatografía de la fracción soluble en cloroformo (FSC).....	42
• Purificación de la subfracción B <sub>17</sub> .....	44
• Análisis estructural del compuesto B <sub>17.1</sub> .....	49
• Análisis espectrométrico de la subfracción B <sub>17.2</sub> .....	72
• Análisis espectrométrico de la subfracción C <sub>12.1</sub> .....	82
CONCLUSIONES .....	95
BIBLIOGRAFÍA .....	97
HOJA DE METADATOS .....	104

## DEDICATORIA

Con todo amor y cariño a:

Dios todopoderoso, por ser mi guía.

Mis padres y mi hermano, por ser mi orgullo y fuente de inspiración.

Mis abuelos, por apoyarme.

Mi tía Petra<sup>†</sup>, porque aun sus consejos me inspiran a ser cada día mejor persona.

Antonio Alcalá, por ser mi complemento.

Mis grandes y valiosos amigos, simplemente por estar allí.

## **AGRADECIMIENTO**

En estas líneas me gustaría agradecer a muchas personas que me apoyaron durante el proceso de culminación de esta gran meta.

A Dios, por iluminarme el camino y siempre acompañarme.

Mis padres, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por darme mi formación y les agradezco de todo corazón el que estén conmigo de forma incondicional y les estoy restituyendo solamente una parte de lo que ustedes me brindaron en un principio, los amo.

Mi hermano Fernando, gracias por todo el cariño y apoyo brindado.

A la familia Jiménez Pinto, por formar parte de mi vida.

Antonio Alcalá, gracias por ser mi mejor amigo, haberme apoyado, animado y hacerme sonreír muchísimas veces, gracias. Te agradezco esos miles de consejos y sobretodo tu amor incondicional, Te amo...

A la familia Alcalá Fuentes por su gran cariño y la confianza brindado en todo momento.

A mis amigas de toda la vida (KIERCHPAM), uno de mis tesoros... muchas gracias por estar conmigo todo este tiempo y ser mis hermanas... Las quiero muchísimo.

A la familia Jiménez Bello, por haberme recibido en su hogar y por todos los momentos gratos, se le quiere.

A mis tutoras y amigas Dra. Haydelba D'Armas, gracias por toda la disposición, paciencia y cariño brindado, en todo momento y la Dra. María Maillo, principalmente por haber confiado en mí y haberme orientado en todo momento. Esto permitió éste gran logro.

Al Dr. José Villamizar, Dr. Alberto Quintero y Dr. Ajoy Banerjee, por su confianza, apoyo y consejos oportunos.

A la Lic. Mirian García, por ser mi amiga y haberme ayudado cuando más lo necesite.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por haberme permitido la oportunidad de realizar mi trabajo experimental y sobretodo de conocer personas que marcaron mi vida, la Lic. Nora, Lic. Franklin, Lic. Karla, Lic. Ana, Lic. Carlos, Elizabeth y Favio, gracias por todos los lindos momentos compartidos.

Como dejar pasar a mis AMIGOS Lic. Edgar, Lic. Maryuris, Lic. Yurimar, Lic. José y Lic. Jesús, no tengo palabras para agradecerles TODO... los quiero mucho.

A la M.Sc. Sara Pekerar, Lic. Alberto Albornoz y M.Sc. Matilde, por su valiosa colaboración en la realización de los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

A la Universidad de Oriente, al Departamento de Química, a los profesores y a todos mis amigos y compañeros de la carrera, especialmente Surima Dakdouk, Pablo Guzmán y Luís Malavé.

## LISTA DE ABREVIATURA

SRB= Sulforodamina B

MTS/PMS= (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)/metosulfato de fenazina

ATCC= American type culture collection

IBE= Instituto de biología experimental

DMEM= Medio basal modificado de Eagle

LPS= Lipopolisacárido

SFB= Suero fetal bovino.

NED= Diclorhidrato de naftilendiamina

CC= Cromatografía de columna

CCF= Cromatografía de capa fina

CCFP= Cromatografía de capa fina preparativa

RMN  $^{13}\text{C}$ = Resonancia magnética nuclear de carbono

RMN  $^1\text{H}$ = Resonancia magnética nuclear de protones

DEPT= Distortionless enhancement by polarization transfer

COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ = Correlated spectroscopy

HMQC= Heteronuclear multiple quantum coherence

HMBC= Heteronuclear multiple bond correlation

EM= Espectrometría de masas

CG/EM= Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas

FSH= Fracción soluble en hexano



FSC= Fracción soluble en cloroformo

FSA= Fracción soluble en acetona

FSM= Fracción soluble en metanol

FSAG= Fracción soluble en agua

EHP= Extracto hidroalcohólico de la planta

X= Terramicina

Y= Vibramicina

IC<sub>50</sub>=Inhibición del 50% del crecimiento de la célula.

ITC= Inhibición total del crecimiento.

CL<sub>50</sub>: Efecto citotóxico del 50% de las células.

hex= Hexano

Act= Acetona

## LISTA DE FIGURA

Figura 1. Esquema general de biosíntesis de metabolitos secundarios.....	10
Figura 2. Reacciones enzimáticas.....	11
Figura 3. Compuestos aislados de la especie. <i>Garcinia mangostana</i> ;	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 4. Algunos compuestos aislados del genero <i>Hypericum</i> ;	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5. Compuestos aislados de las especies <i>Allanblichia floribunda</i> y <i>Psoralea febrifuga</i> .....	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 6. Compuestos aislados de la especie <i>Vismia ceniensis</i> ;	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 7. Compuestos aislados de la especie <i>Vismia orientalis</i> ;	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 8. Compuestos aislados de la corteza y frutos de la especie <i>Vismia cayennensis</i> .....	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 9. Compuestos aislados de las hojas de la especie <i>Vismia cayennensis</i> ;	<b>Error! Marcador no definido.</b>
Figura 10. Representación esquemática de la obtención del extracto hidroalcohólico y fracciones solubles de la corteza (tallos) de <i>V. cayennensis</i> .....	23
Figura 11. Representación esquemática del ensayo antibacteriano.....	28
Figura 12. Representación esquemática de ensayo citotóxico, mediante el método de MTS/PMS.....	32
Figura 13. Representación esquemática del ensayo citotóxico, mediante el método de SRB.....	33
Figura 14. Representación esquemática del ensayo antiinflamatorio.....	34

Figura 15. Interacciones que se observan en un espectro COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .....	37
Figura 16. Interacciones que se observan en un espectro HMQC. ....	37
Figura 17. Interacciones que se observan en el espectro de HMBC a dos enlaces (17.a) y tres enlaces (17.b).....	38
Figura 18. Resultados del ensayo antiinflamatorio, utilizando óxido nítrico como mediador, correspondiente a las fracciones solubles de <i>V.</i> <i>cayennensis</i> . (amino/: aminoguanidina, LPS: lipopolisacárido). ....	40
Figura 19. Resultados del ensayo citotóxico de las fracciones de <i>V.</i> <i>cayennensis</i> , solubles en solventes de distintas polaridades, mediante el método de (MTS/PMS).....	41
Figura 20. Esquema de tratamiento de la fracción soluble en cloroformo (FSC). ....	43
Figura 21. Esquema de recristalización de la subfracción B <sub>17</sub> .....	44
Figura 22. Estructura propuesta para el compuesto B <sub>17.1</sub> y su numeración. ....	50
Figura 23. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> y ampliación de la zona 5,0-4,50 ppm.....	52
Figura 24. Ampliación de la zona 3,14-2,10 ppm del espectro de RMN $^1\text{H}$ del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	53
Figura 25. Ampliación de la zona 2,0-0,7 ppm del espectro de RMN $^1\text{H}$ del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	53
Figura 26. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	56
Figura 27. Ampliación de la zona 60-10 ppm del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	57
Figura 28. Espectro DEPT 135° del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> . ....	57

Figura 29. Ampliación zona 80-10 ppm del espectro DEPT 135° del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	58
Figura 30. Espectro de HMQC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	60
Figura 31. Ampliación A del espectro de HMQC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	60
Figura 32. Ampliación B del espectro de HMQC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	61
Figura 33. Ampliación A del espectro HMBC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	61
Figura 34. Ampliación B del espectro HMBC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	62
Figura 35. Ampliación C del espectro HMBC del producto sólido aislado B <sub>17.1</sub> .....	62
Figura 36. Estructura parcial A del compuesto B <sub>17.1</sub> .....	63
Figura 37. Estructura parcial A del compuesto B <sub>17.1</sub> y algunas de sus correlaciones por HMQC y HMBC.....	63
Figura 38. Espectro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H del compuesto B <sub>17.1</sub> . ....	65
Figura 39. Ampliación espectro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H del compuesto B <sub>17.1</sub> . ....	66
Figura 40. Estructura parcial B del compuesto B <sub>17.1</sub> .....	67
Figura 41. Estructura parcial B del compuesto B <sub>17.1</sub> y algunas de sus correlaciones por HMQC, HMBC y COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H propuestas. ....	68
Figura 42. Estructura y numeración del esqueleto de los triterpenos pentacíclicos tipo tetrahimanos. ....	69
Figura 43. Estructura del triterpeno pentacíclico tetrahimanol.....	69

Figura 44. Estructura probable del compuesto B <sub>17.1</sub> y algunas asignaciones propuestas.....	71
Figura 45. Estructura propuesta del compuesto B <sub>17.1</sub> y algunas correlaciones por HMQC, HMBC y COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H propuestas.....	71
Figura 46. Resultados del ensayo citotóxico del compuesto B <sub>17.1</sub> , aislado de la FSC de la especie <i>V. cayennensis</i> , mediante el método de (MTS/PMS).....	72
Figura 47. Cromatograma de gases de la subfracción B <sub>17.2</sub> .....	73
Figura 48. Espectro de masas del 2,4- bis(1,1-dimetiletil) fenol.....	74
Figura 49. Patrón de fragmentación de masas del 2,4- bis(1,1-dimetiletil) fenol.....	75
Figura 50. Espectro de masas del éster dietílico del ácido 1, 2-bencenodicarboxílico.....	76
Figura 51. Patrón de fragmentación del éster dietílico del ácido 1, 2-bencenodicarboxílico.....	77
Figura 52. Esquema de partición de la fracción soluble en acetona (FSA).....	78
Figura 53. Cromatograma de gases de la subfracción C <sub>12.1</sub> .....	83
Figura 54. Espectro de masas del 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno.....	84
Figura 55. Patrón de fragmentación del 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno.....	85
Figura 56. Espectro de masas del 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona.....	86
Figura 57. Patrón de fragmentación del 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona.....	87

Figura 58. Espectro de masas del 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehido. ....	88
Figura 59. Patrón de fragmentación del 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehido. ....	89
Figura 60. Espectro de masas del 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona. ....	90
Figura 61. Patrón de fragmentación del 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona.....	91
Figura 62. Espectro de masas del 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico. ....	92
Figura 63. Patrón de fragmentación del 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.....	93

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sub-familias, géneros y especies de la familia Clusiaceae. ....	14
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para el bioensayo.....	27
Tabla 3. Resultados de la extracción sólido-líquido. ....	34
Tabla 4. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles en solventes de distintas polaridades, de la corteza (tallo) de <i>V. cayennensis</i> . ....	36
Tabla 5. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles en solventes de distintas polaridades, de la corteza (tallo) de <i>V. cayennensis</i> . ....	38
Tabla 6. Resultados del ensayo citotóxico del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles de <i>V. cayennensis</i> , mediante el método de sulforodamina B.....	42
Tabla 7. Solventes utilizados en la CC de la FSC de <i>V.cayennensis</i> . ....	45
Tabla 8. Subfracciones obtenidas de la fracción soluble en cloroformo.....	47
Tabla 9. Subfracciones obtenidas en la recristalización de la subfracción B <sub>17</sub> . ....	49
Tabla 10. Desplazamientos químicos de algunas de las señales seleccionadas del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto B <sub>17.1</sub> . ....	51
Tabla 11. Desplazamientos químicos de algunas de las señales seleccionadas del espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto B <sub>17.1</sub> . ....	54
Tabla 12. Datos seleccionados de los espectros HMQC y HMBC para la estructura parcial A del compuesto B <sub>17.1</sub> . ....	59

Tabla 13. Datos seleccionados de los espectros HMQC y HMBC para la estructura parcial B del compuesto B <sub>17.1</sub> . .....	66
Tabla 14. Solventes utilizados en la CC de la FSA de <i>V. cayennensis</i> . .....	79
Tabla 15. Subfracciones obtenidas de la fracción soluble en acetona. ....	81
Tabla 16. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C <sub>12.1</sub> .....	82





**UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *VISMIA CAYENNENSIS* Y SU POSIBLE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA (Modalidad: Investigación)**

**AUTOR:** Karina Del Carmen Marín Jiménez

**RESUMEN**

Un estudio preliminar de las propiedades biológicas y químicas de la corteza (tallo) de la planta *Vismia cayennensis*, reveló que esta especie representar una fuente de compuestos bioactivos. Los ensayos antibacterianos realizados al extracto y fracciones de *V. cayennensis* en solventes de distintas polaridad, revelaron una inhibición de los microorganismos *Escherichia coli* y *Shiguella* sp. La inhibición del crecimiento de la cepa *Shiguella* sp. obtenidas para las fracciones de acetona, metanol y agua, es el 50% de lo observado para el extracto hidroalcohólico de la planta. La fracción de cloroformo mostró un efecto antiinflamatorio. Asimismo se realizaron los ensayos de citotoxicidad al extracto y a las fracciones solubles, observándose que sólo la fracción en agua presenta un efecto citotóxico significativo. Además, se realizó un análisis fitoquímico, el cual reveló la presencia de algunas familias de metabolitos secundarios tales como flavonoides, saponinas, taninos, antraquinonas, triterpenos y/o esteroides. En base a los resultados obtenidos en los bioensayos, se fraccionó consecutivamente las fracciones en cloroformo y acetona del extracto hidroalcohólico de la planta *V. cayennensis*. La fracción en cloroformo se fraccionó mediante cromatografía de columna y capa fina preparativa, lográndose aislar un derivado hidroxílico de un triterpeno pentacíclico con esqueleto tipo tetrahimanos (B<sub>17.1</sub>), el cual es un compuesto novedoso, cuya estructura se determinó mediante el análisis combinado de los métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear. Asimismo, se identificaron otros constituyentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Una de las subfracciones del extracto en cloroformo (B<sub>17.2</sub>), presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 2, 4-bis (1,1-dimetiletil) fenol y el éster dietílico del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico. La subfracción (C<sub>12.1</sub>) de la fracción soluble en acetona, presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 1, 4-diona-2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno; 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona; el 3,5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehído; 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona y ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.

**Palabras claves:** actividad biológica, productos naturales, *Vismia*.

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son compuestos orgánicos derivados de fuentes naturales, como las plantas, animales y microorganismos terrestres y marinos [1].

Históricamente, el hombre ha usado las plantas para cubrir sus necesidades básicas; tales como: vestidos, refugios, comida y medicinas. Los productos naturales por su parte, han jugado un papel importante en la medicina tradicional, debido a su uso para tratamientos y prevención de diferentes enfermedades alrededor del mundo. Durante el siglo XIII, en muchos países se practicó de forma exhaustiva la botánica y la medicina tradicional, obteniéndose así notables personajes como Hipócrates, Dioscórides, Plinio, y Teofrasto.

En el continente americano, los nativos manejaban los productos naturales y los utilizaban como agentes terapéuticos. Ellos tenían conocimientos de muchas plantas de su ambiente natural que producían sustancias, empleadas como digestivos, febrífugos, antiinflamatorios, sedantes, analgésicos, estimulantes, condimentos, colorantes, perfumes, entre otros. A éstas, se les atribuían propiedades curativas de acuerdo a su forma, olor o hábitat. Un ejemplo de ello es la raíz de *Rauwolfia serpentina*, la cual usaban para combatir los efectos de las mordeduras de serpientes y los embriones de quenopodio, por parecerse a una lombriz, lo empleaban como antihelmínticos. Independientemente de su aspecto, estas plantas son efectivas en los tratamientos indicados debido a ciertos compuestos presentes en ellas [2,3].

En Venezuela, existen varios personajes que aportaron información importante al área de los productos naturales, tal es el caso de Henry Pittier, el cual describió las plantas de acuerdo a su clasificación botánica y a su uso. Asimismo, Vicente Marcano famoso investigador de las ciencias naturales y de la química orgánica, el cual se le

ha considerado como el pionero de la investigación fitoquímica en el campo de la farmacia y agronomía venezolana [2].

Aunque existen escritos basados en la etnobotánica, término que se aplica para referirse al estudio de plantas utilizadas por etnias, por infortunio la mayoría no están suficientemente documentadas ni alertan contra los posibles efectos colaterales derivados del uso indiscriminado de material vegetal. Es por ello, que los científicos han dedicado sus investigaciones al estudio de los componentes químicos y los efectos de las plantas [2-4].

Los compuestos de ocurrencia natural, se pueden dividir en dos amplias categorías; en primer lugar se encuentran los metabolitos primarios, los cuales son constituyentes celulares que juegan un papel central en el funcionamiento de las células; estos metabolitos incluyen los lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y proteínas. Los metabolitos primarios, ejercen su efecto biológico dentro de la célula u organismo que es el responsable de su reproducción. En segundo lugar se encuentran los metabolitos secundarios, éstos no son esenciales al funcionamiento de la célula vegetal o animal y, por consiguiente, no toman parte en las transformaciones bioquímicas comunes de las plantas o animales; éstos son propios de una familia, de un género o aun de una especie particular [5,6].

Todos los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, a menudo contienen oxígeno y nitrógeno y menos frecuente, azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en las plantas superiores, algas y algunas bacterias. En el siguiente esquema, se ilustra la secuencia de aparición de los metabolitos secundarios formados por distintas rutas biosintéticas (Figura 1) [6].

La fotosíntesis de las plantas es un proceso endotérmico que requiere de luz solar, este proceso convierte el dióxido de carbono y el agua en carbohidratos simples (monosacáridos), los cuales pueden combinarse para formar moléculas más

complejas como los polisacáridos y ácidos nucleicos. Adicionalmente, por rupturas de los carbohidratos simples (glicólisis) se forma el ácido pirúvico. Este ácido presenta dos maneras de síntesis; la primera vía esta representada por la condensación con eritrosa para formar así el ácido shikímico, con lo cual se obtienen los compuestos aromáticos y aminoácidos presentes en la naturaleza y una segunda vía la constituye la descarboxilación del ácido pirúvico para obtener ácido acético, el cual es el precursor biogénico de los compuestos alifáticos y aromáticos; es decir, la mayoría de los productos naturales. Mediante las reacciones de condensación del ácido acético se logran los policétidos, el ácido mevalónico, que es un intermediario de los terpenos, también se obtienen ácido grasos, flavonoides, saponinas, esteroides, ligninas, entre otros [6,7].

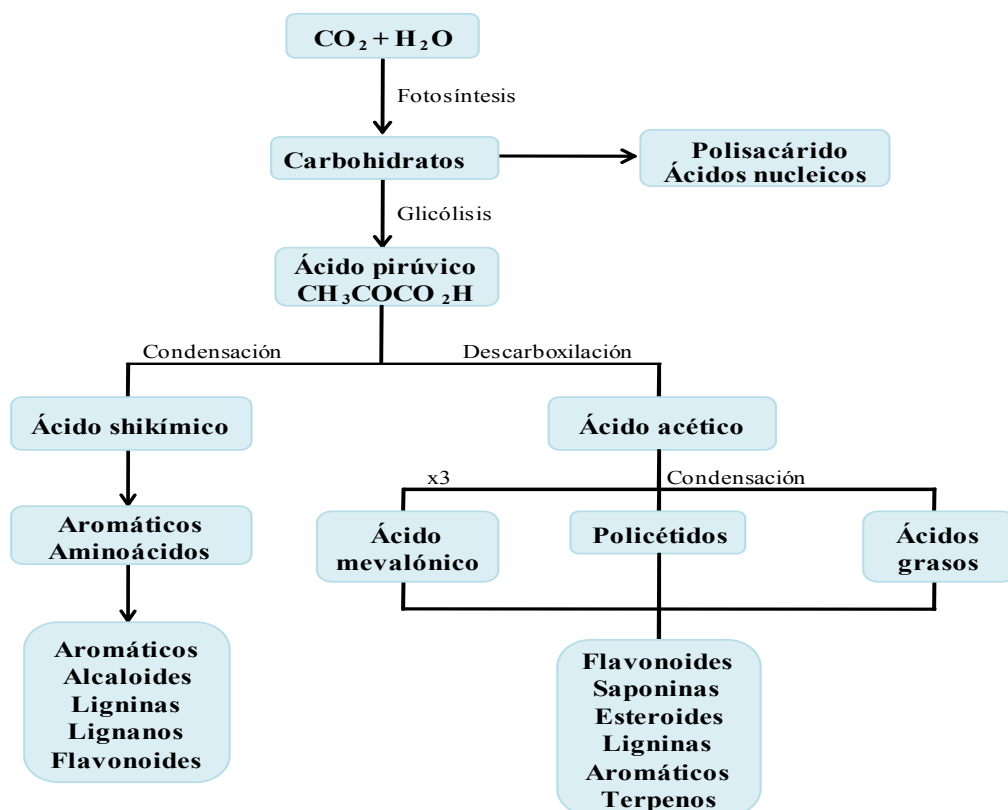


Figura 1. Esquema general de biosíntesis de metabolitos secundarios.

Las reacciones de condensación, descarboxilación y carboxilación, que se dan en la biosíntesis de estos productos se llevan a cabo a través de la Coenzima A (Figura 2).

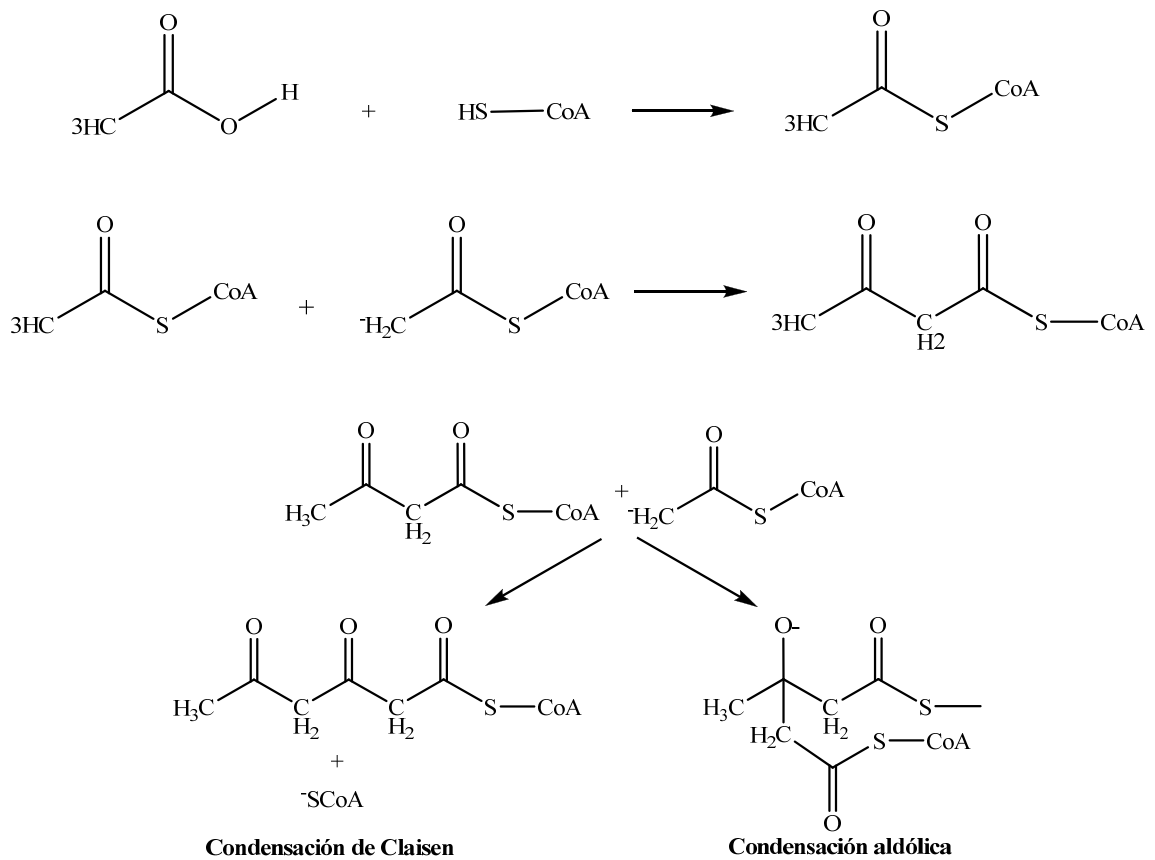


Figura 2. Reacciones enzimáticas.

Esta coenzima por tener un grupo SH activa la reacción y se obtiene una unidad de 4 carbonos, conocida como aceto acetyl-Coenzima A. Ésta puede sufrir dos tipos de condensaciones, aldólica (ramificada) y Claisen (no ramificada), originando el trímero de ácido acético respectivo. El primero dará origen a la unidad fundamental de los terpenos: el isopreno (por deshidratación y descarboxilación del ácido

mevalónico) y el segundo, al sufrir otras condensaciones iguales, originará cadenas largas no ramificadas típicas de compuestos alifáticos como ácidos grasos, acetogeninas, policetilenos, o ciclará para dar compuestos aromáticos como ácido orselínico o evoluciona hasta estructuras más complejas: quinonas, xantonas y un segmento de las moléculas de flavonoides (Figura 1) [6].

Muchas plantas ricas en metabolitos secundarios que presentan potente actividad biológica se encuentran distribuidas en toda la zona tropical, debido a que esta área presenta una extraordinaria biodiversidad. Venezuela, es uno de los países pertenecientes a la zona tropical, y por ende, posee una considerable diversidad biológica relativamente poco conocida, tiene una amplia tradición etnobotánica donde más de 1500 especies de plantas son utilizadas por comunidades indígenas y locales para el tratamiento de enfermedades [4, 8, 9].

De acuerdo con la información derivada de la Organización Mundial de la Salud, una de las causas significativas de morbilidad y mortalidad en los países tropicales, lo representan en aproximadamente un 50%, las enfermedades infecciosas y los parásitos, debido a la resistencia que han ido adquiriendo estos microorganismos frente a los diferentes fármacos utilizados comúnmente. Esto ha incrementado la búsqueda de compuestos bioactivos presentes en los extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional, para el tratamiento de tales enfermedades [4].

Las bacterias, son los microorganismos más abundantes en el planeta y aunque muchas de ellas forman parte del organismo humano, algunas son organismos patógenos que provocan ciertos malestares. Entre estos microorganismos se pueden mencionar la *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Helicobacter pylori*, las cuales son causantes de enfermedades gastrointestinales. Actualmente, se han realizado importantes estudios *in Vitro* de diferentes extractos de plantas que presentan actividad frente a estas

bacterias, algunas de estas especies son la *Vismia laurentii de Wild*, *Garcinia mangostana*, *Mesua ferrea*, *Ochrocarpos siamensis* y *Garcinia atroviridis*, todas pertenecientes a la familia Clusiaceae, aunque también existen muchas especies pertenecientes a las familias Fabacea y Asteracea que presentan actividad antimicrobial [4, 10-12].

Otra de las alteraciones que ha sido tradicionalmente tratada mediante el uso de extractos naturales son las reacciones inflamatorias, que generalmente se debe a alguna modificación estructural de algún tejido atacado en el organismo, donde el macrófago actúa como una célula de alarma indicando la presencia de material extraño o de daños, mediante la liberación de sustancias vasoactivas que incluyen citoquinas, histaminas, quininas, radicales libres derivados de oxígeno, entre otros; los cuales son mejor conocidos como mediadores clásicos de inflamación. Durante esta reacción de inflamación, uno de los mediadores clásicos liberados es el óxido nítrico, el cual se libera como defensa y como regulador fisiológico. Sin embargo, la producción en exceso de óxido nítrico, que es un radical reactivo, daña las funciones normales del tejido produciendo generalmente la vasodilatación periférica o necrosis tisular. Entre algunos extractos de plantas que poseen actividad antiinflamatoria, se encuentran las especies *Bryophyllum pinnatum*, *Baccharis cordifolia*, *Hypericum empetrifolium* y en ciertos frutos como la mora (*Rubus fruticosus B*), fresa (*Fragaria vesca L.*) y el grapefruit (*Citrus paradisi M.*), también se ha observado esta propiedad [13-16].

Las plantas han sido y serán de gran importancia para la humanidad debido a sus aplicabilidades; es por esto, que en las últimas décadas, se ha intensificado la investigación científica para tratar de extraer, aislar, purificar y elucidar la estructura de los compuestos responsables de la actividad biológica observada en los organismos vegetales. Los constituyentes biológicamente activos de las plantas han sido estudiados durante el desarrollo de la química orgánica y ha sido estimado que

aproximadamente el 40% de los fármacos tiene su origen en los productos naturales [2, 3, 5].

Se ha reportado que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae (Guttifera), son usados en la medicina tradicional. Esta familia comprende alrededor de 25 géneros y 1 000 especies, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en las regiones tropicales, con excepción del género *Hypericum* que se halla en regiones de clima templado (Tabla 1) [17].

Dentro de la familia Clusiaceae, uno de los géneros más estudiados es la *Garcinia*, la cual se encuentra distribuida mayormente en los bosques lluviosos de las áreas tropicales bajas del sureste de Asia y oeste de África.

Tabla 1. Sub-familias, géneros y especies de la familia Clusiaceae.

SUB-FAMILIAS	GÉNEROS	NÚMERO DE ESPECIES
Kielmeyeroideae	<i>Kielmeyera</i>	20
	<i>Mahurea</i>	8
	<i>Caraipa</i>	20
	<i>Haploclathra</i>	4
	<i>Bonnetia</i>	18
	<i>Archytaea</i>	2
Calophylloideae	<i>Calophyllum</i>	110
	<i>Mesua (inc. Kayea)</i>	40



	<i>Mammea (inc. Ochrocarpus)</i>	50
Clusioideae	<i>Clusia</i>	145
	<i>Tovomita</i>	60
	<i>Allanblackia</i>	8
	<i>Garcinia</i>	400
	<i>Pentaphalangium</i>	7
	<i>Rheedia</i>	45
Moronoboideae	<i>Moronobea</i>	7
	<i>Pentadesma</i>	4
	<i>Platonia</i>	2
	<i>Symphonia</i>	20
Lorostemoneae	<i>Lorostemon</i>	3
Hypericoideae	<i>Cratoxylum</i>	6
	<i>Hypericum</i>	400
	<i>Harungana</i>	1
	<i>Psorospermum</i>	40
	<i>Vismia</i>	35

Investigaciones realizadas han revelado que el género *Garcinia* representa una gran fuente de xantonas preniladas, benzofenonas y biflavonoides. Entre las especies del género *Garcinia*, se encuentra la *G. pyrifera*, *G. nervosa* y *G. polyanta*, de las cuales se aislaron compuestos tales como rubraxantona, isocowanina, isocowanol, nervoxantona, rudixantona-B e isoreedixantona-B [18]. Un estudio de estructura-reactividad reveló que ciertas xantonas, entre ellas rubraxantona e isocowanol, inhiben la fijación del factor de activación plaquetario (FAP) sobre sus receptores plaquetarios, lo que evita perturbaciones a nivel mecánico, reológico y bioquímico en el sistema circulatorio [19].

Del extracto soluble en diclorometano de la fruta de la *G. mangostana*, se aislaron dos nuevos compuestos la 1,2-dihidro-1,8,10-trihidroxi-2-(2-hidroxiopropano-2-il)-9-(3-metilbut-2-enil)furo[3,2-a]xanten-4-ona (I) y 6-deoxi-7-dimetilmangostatina (II); estos dos compuestos exhibieron una inducción a la quinona reductasa (Figura 3). [20].

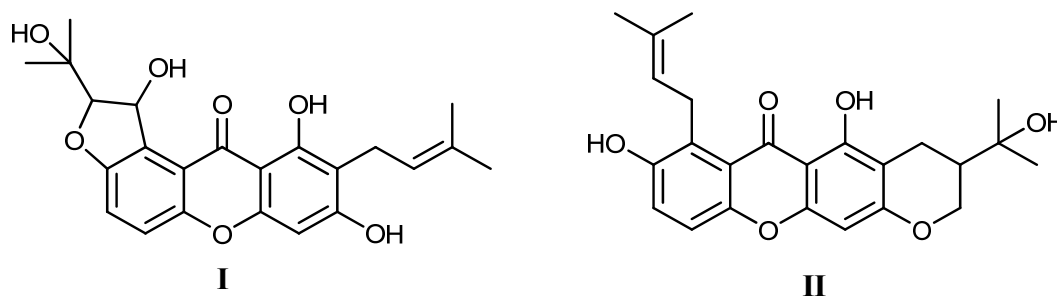


Figura 3. Compuestos aislados de la especie *Garcinia mangostana*.

Adicional a los estudios hechos con especies del género *Garcinia*, también, se han realizado numerosas investigaciones del género *Hypericum*, el cual presenta una distribución casi mundial, faltando solamente las tierras bajas tropicales, los desiertos y las regiones árticas. *Hypericum* es un género de aproximadamente 400 especies, de las cuales se puede hacer referencia a la *H. entities* y *H. empetrifolium*, en las cuales

se han podido hallar compuestos como la hipericina (III), hiperforina (IV), y derivados acilploroglusinol respectivamente. Estos compuestos poseen usos terapéuticos, debido a su actividad citotóxica, antibacteriana, antioxidante, cicatrizante, anti-inflamatoria y antidepresiva [21-22]. Otras especies *Hypericum* estudiadas son, *H. carinatum* de la cual se aislaron dos nuevas benzofenonas carifenona A (V) y carifenona B (VI) (Figura 4) [23].

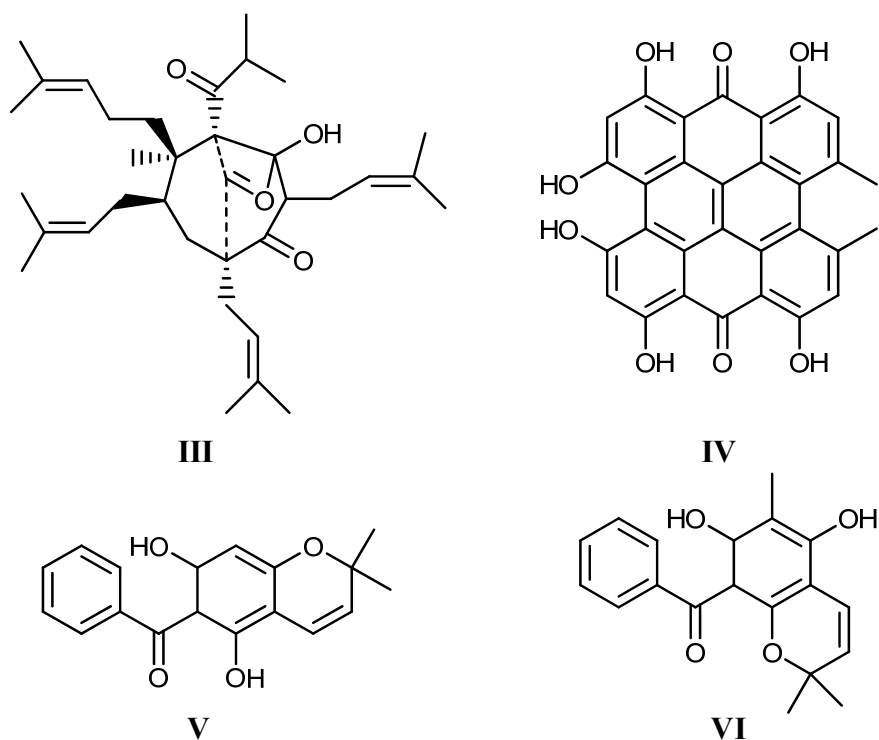


Figura 4. Algunos compuestos aislados del género *Hypericum*.

Asimismo, se han obtenido nuevos constituyentes tales como: allanxantona A (VII) aislada de la especie *Allanblackia floribunda*, y se aislaron nueve compuestos entre estos la coccinona A-H y 7-epi-carcinol de la especie *Moronobea coccínea*, los cuales exhibieron una elevada actividad antibacteriana. Por otra parte, el compuesto 3-geraniloxi-6-metil-1,8-dihidroxiantrona (VIII) exhibió actividad antibacteriana, el

Vismion D (IX) y acetilvismion D (X) revelaron actividad citotóxica, todos estos aislados de la *Psorospermum febrifugum* (Figura 5) [24-26].

El género *Vismia* comprende alrededor de 35 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de Sur y Centro América. Este género es utilizado en la medicina popular para el tratamiento de muchas enfermedades, tales como: dermatitis, sífilis, lepra y herpes, además posee actividad citotóxica, antiprotozoarios, anticancerígena, anti-VIH o anti-HIV y antimicrobial [27].

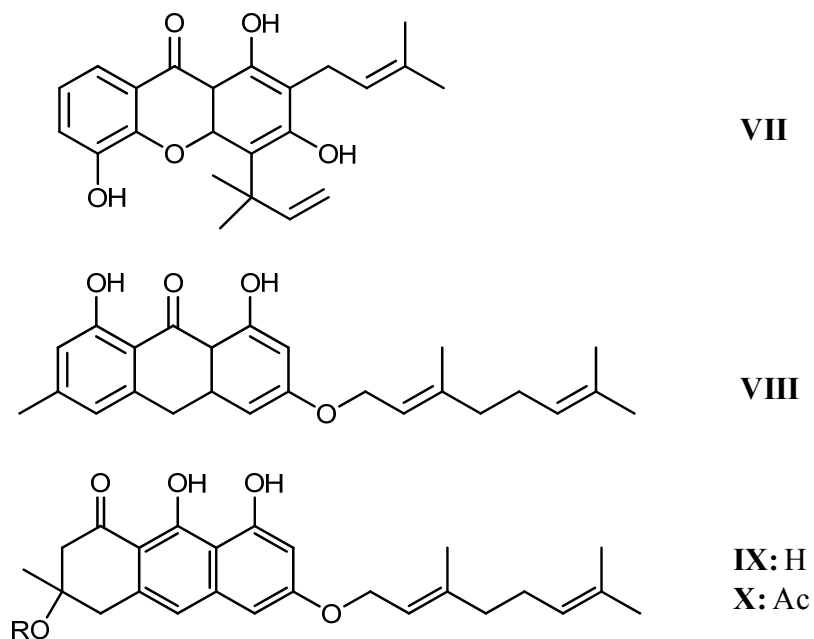


Figura 5. Compuestos aislados de las especies *Allanblickia floribunda* y *Psorospermum febrifugum*.

Una de las especies *Vismia*, que ha sido estudiada, es la *Vismia laurentii*, de la cual se han aislado compuestos que presentan actividad antibacteriana, antifúngica y antimicrobial; entre los cuales, se encuentran laurentiquinona A-C, emodina, isoxantorina, kaenferol, vismiaquinona, friedelin, *O*-demetil-3'4'-deoxisorospermin-

3'4'-diol-1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metilantraqinona, laurentixantona-A y B [28-31].

Otra especie del género *Vismia* que ha sido muy estudiada es la *Vismia guineensis*. De la misma se han aislado muchos metabolitos, siendo uno de los más importantes la 1,8-dihidro-3-(2-metoxi-3-metilbut-2-eniloxi)-6-metilxantona, la cual presenta una actividad antimicótica significativa [32,33].

Estudios realizados a las especies *V. orientalis* y *V. cenieensis* permitieron el aislamiento de la 3-O-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-emodina (XI), 3-O-(2-metoxi-3-metilbut-3-enil)-emodina (XII), 3-O-(3-hidroximetil-4-hidroxi-2-enil)-emodina (XIII) (Figura 6) y biantrona A (XIV), éste último posee actividad antiprotozoaria (Figura 7) [26].

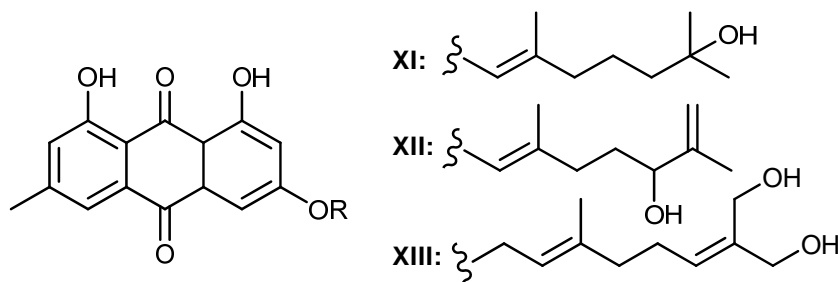


Figura 6. Compuestos aislados de la especie *Vismia cenieensis*.

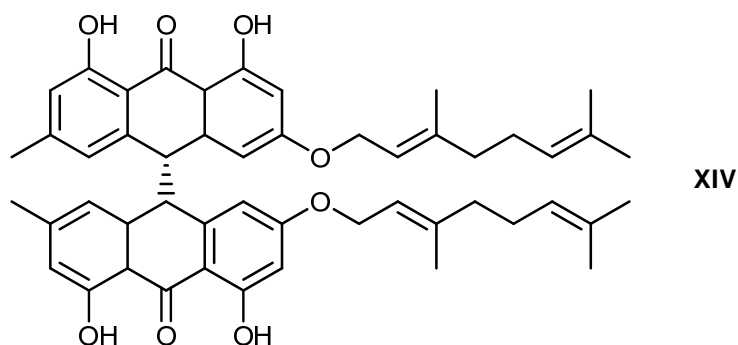


Figura 7. Compuestos aislados de la especie *Vismia orientalis*.

La planta *Vismia cayennensis*, perteneciente al género *Vismia* de la familia Clusiaceae, se encuentra distribuida por toda Suramérica. En Venezuela, se encuentra específicamente en los estados Delta Amacuro, Bolívar, Amazonas y el sureste del estado Apure. Esta especie es popularmente conocida como “lacra”, “lacre blanco”, “palo de gallina”, “arvoreda-febre”, “goma-lacre”, “pau-de-lacre” y “pichirina”. *Vismia cayennensis* es un arbusto pequeño de 2 a 15 m de altura, ramas lisas, tallo de 4 a 10 mm de largo, hojas de forma elíptica de 5 a 11,5 cm de largo y sus frutos son de aproximadamente 10 a 15 mm de largo. Las hojas, el látex de la corteza y el fruto de esta planta se usan tradicionalmente para combatir enfermedades de la piel [27, 34, 35].

Esta especie no ha sido muy estudiada, sólo se han realizado investigaciones de muestras recolectadas en Ecuador y Brasil: de su corteza, se aislaron el physcion (XV),  $\beta$ -amyrin (XVI) y sitosterol (XVII) [36]. De los frutos se aislaron compuestos como el ácido crisofánico (XVIII), physcion, isocariofileno,  $\beta$ -selineno (XIX) y *trans*- $\alpha$ -farneseno (XX) (Figura 8) [37].

Además de sus hojas, se obtuvieron cuatro nuevos compuestos, la vismiafenona D (XXI), vismiafenona E (XXII), vismiafenona F (XXIII) y vismiafenona G (XXIV), de las cuales la vismiafenona D exhibió actividad inhibidora HIV en ensayos preliminares realizados en el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) (Figura 9) [38,39].

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas constituyen una fuente de sustancias bioactivas. Hoy en día, el interés científico de estos metabolitos se ha intensificado, debido a que se busca conseguir nuevas drogas provenientes de las fuentes naturales. Las plantas de la familia Clusiaceae, son conocidas como muy buena fuente de metabolitos secundarios; sin embargo, la biosíntesis de éstos se ve drásticamente influenciada por el hábitat al cual está sometida una especie. En tal sentido, se propone realizar un estudio fitoquímico de la corteza (tallo) de *Vismia cayennensis*, con el fin de obtener información acerca de los constituyentes químicos

presentes en esta especie, asimismo se ensayará su actividad antiinflamatoria (utilizando como mediador el óxido nítrico) y antibacteriana contra las cepas de *Escherichia coli* y *Shigella* sp. (causantes de algunas enfermedades gastrointestinales) y citotóxica (utilizando los métodos de Sulforodamina B y MTS/PMS). De ser probada alguna de estas actividades, su explotación representaría el punto de partida para la producción de futuros fármacos en este campo biomédico.

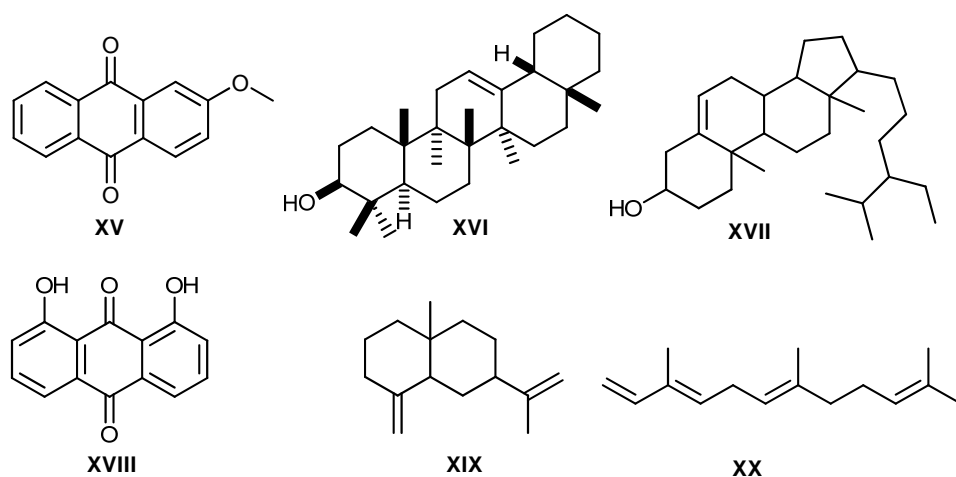


Figura 8. Compuestos aislados de la corteza y frutos de la especie *Vismia cayennensis*.

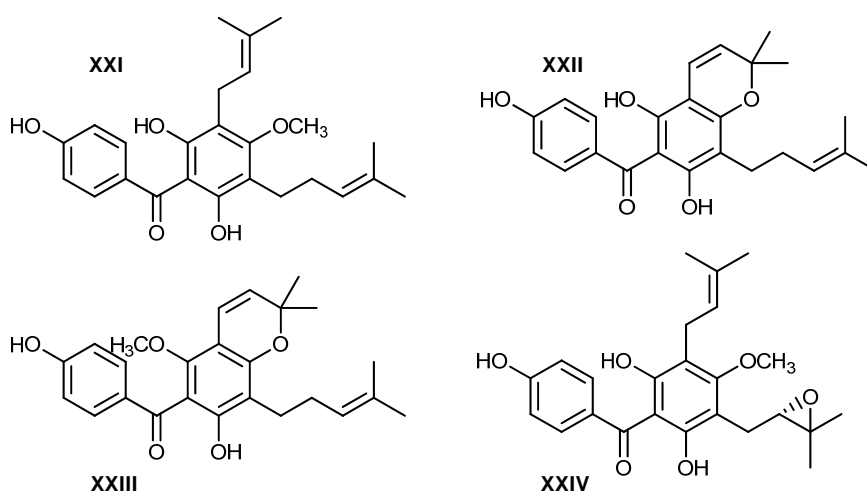


Figura 9. Compuestos aislados de las hojas de la especie *Vismia cayennensis*.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de la especie de interés**

Las muestras de la corteza (tallo) de la planta *Vismia cayennensis* fueron recolectadas en la localidad de Yutajé, municipio Manapiare, estado Amazonas (Coordenadas: 05°36'51''N, 66°06'85''W/ Altitud m SNM: 110), e identificados en la sección botánica del laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

### **Obtención del extracto y fracciones solubles**

La maceración del ejemplar se realizó en campo y consistió en la colecta discriminada del mismo y la separación de sus partes: la hoja, el tallo, la raíz, la flor, el fruto, la corteza; cada uno de éstos cuando fuese conveniente. Se trasladaron las muestras al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas para ser sometidas a extracción y bioensayos posteriores. Seguidamente, se tomó una cantidad del material vegetal fresco y se homogeneizó con etanol, en proporciones de 1 kg de material vegetal fresco por 3 litros de etanol. Este material se dejó macerar durante 72 horas y culminado este periodo, se procedió a realizar el filtrado con ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente, se retomó en etanol el material vegetal del filtrado, este procedimiento se repitió varias veces. Seguidamente, se procedió a evaporar el solvente, bajo presión reducida en un rotaevaporador Büchi R-3000, para obtener así el extracto acuoso que se liofilizó para dar lugar al extracto hidroalcohólico.



El extracto hidroalcohólico, se sometió a una extracción sólido-líquido utilizando cinco solventes de polaridad ascendente (hexano<cloroformo<acetona<metanol<agua). Este procedimiento se basó, en una extracción sucesiva con el solvente correspondiente a una temperatura no mayor a los 40°C, para obtener las fracciones solubles. Tanto a las fracciones como a el extracto hidroalcohólico, se les realizaron pruebas fitoquímicas y de actividad biológica respectivas (Figura 10).

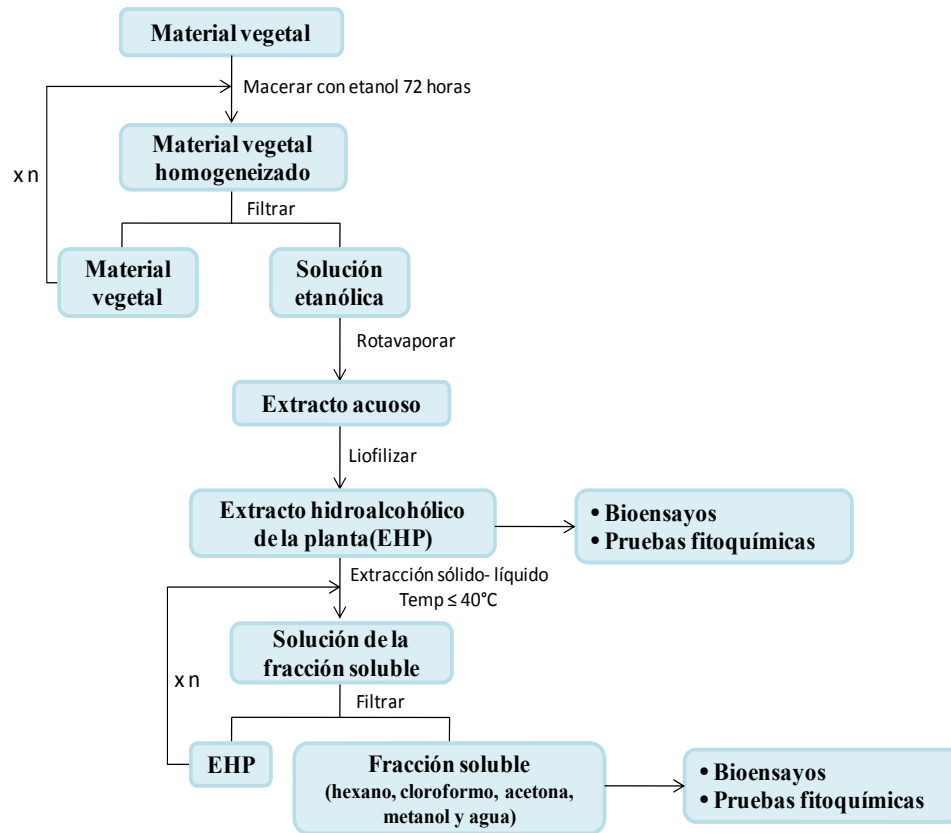


Figura 10. Representación esquemática de la obtención del extracto hidroalcohólico y fracciones solubles de la corteza (tallo) de *V. cayennensis*.

## **Caracterización fitoquímica**

Para detectar los diferentes tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en los extractos y fracciones solubles obtenidas, se realizaron procedimientos que involucraron reacciones químicas, los cuales proporcionaron la información necesaria para conocer sobre la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, polifenoles, antraquinonas, triterpenos y/o esteroides. Para ello, se siguieron las metodologías planteadas [4,40], como se resume a continuación:

- **Alcaloides**

El extracto hidroalcohólico se disolvió en etanol, se llevó a sequedad y se disolvió nuevamente en HCl al 10%. Esta solución se calentó por 10 minutos adicionales, se dejó enfriar, se procedió a filtrar y por último se dividió el filtrado en tres tubos de ensayo, a los cuales se les agregaron una pequeña cantidad de los reactivos de reconocimiento: Meyer, Dragendorff y Wagner. Una leve turbidez o precipitado evidenció la presencia de los mismos.

- **Flavonoides**

La presencia de esta familia de metabolitos secundarios se evaluó mediante dos procedimientos diferentes, descritos a continuación:

- Utilizando la prueba de Shinoda, se tomó una solución del extracto hidroalcohólico disuelto en etanol, y se colocó en un tubo de ensayo. Se agregó una cantidad de HCl concentrado y algunas virutas de magnesio. La solución se dejó reposar por 10 minutos aproximadamente, la prueba se consideró positiva si se observó cambios en la coloración.

- Como una prueba química adicional, se tomó una tira de papel de filtro impregnada con la solución del extracto hidroalcohólico en etanol, ésta se observó a la luz UV; posteriormente, se expuso a vapores de amoníaco concentrado, de mostrarse un cambio o intensificación de la coloración, la prueba se consideró positiva.

- Saponinas

Se preparó una solución del extracto hidroalcohólico en agua y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Si se formaba una espuma persistente durante 15 minutos, en una zona de 5-15 mm por encima de la superficie del líquido, se asume presencia de saponinas.

- Taninos y polifenoles

La presencia de esta familia de metabolitos secundarios se evaluó mediante dos procedimientos diferentes, descritos a continuación:

- Mediante la prueba del cloruro de hierro (III), se tomó una cantidad del extracto disuelto en agua, se filtró y este filtrado se dividió en dos tubos de ensayo. Un tubo de ensayo se hizo reaccionar con una cantidad de la solución de cloruro de hierro (III) al 1% recién preparada. Si se observa una coloración parda se concluye que hay presencia de polifenoles.

- Mediante la prueba de la gelatina-sal, se tomó el otro tubo que contenía la

- Antraquinonas

Se tomó una pequeña cantidad del extracto y se extrajo con KOH al 5%, se filtró, se acidificó con ácido acético 5% y se agitó con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja, al alcalinizarse con hidróxido de amonio, hay presencia de antraquinonas.

- Triterpenos y/o esteroides

- Se llevó a cabo mediante la prueba de Liebermann-Burchard: se colocó el extracto y/o fracción en un crisol y se llevó a sequedad, se dejó enfriar y se adicionaron gotas de cloroformo. Se repartió la mezcla en dos tubos de ensayo, a uno de los tubos se le añadió anhídrido acético seguido de unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, el otro se dejó como testigo. Los cambios de colores se interpretaron de la siguiente manera: tonos de azul a verde (esteroides insaturados), tonos de rojo a violeta (triterpenos pentacíclicos) y amarillo pálido (esteroides y triterpenos saturados).

- Otra prueba con la cual se verificó la presencia de esta familia de metabolitos es el ensayo de Salkowski, en el cual se tomó una mínima cantidad del extracto, se mezcló con cloroformo, se dejó deslizar por las paredes del tubo, con sumo cuidado, unas gotas de ácido sulfúrico al 85%, si la solución se torna amarilla o

roja se considera positiva.

### Pruebas biológicas

La actividad biológica del extracto hidroalcohólico y fracciones solubles de la corteza (tallo) de *V. cayennensis*, se evaluó mediante la utilización de los siguientes bioensayos:

- Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó utilizando bacterias certificadas, pertenecientes al laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para el bioensayo.

Bacterias	Origen	Coloración de Gram
<i>Escherichia coli</i>	[ATCC] 11126	-
<i>Shigella</i> sp.	[IBE (DOC-9)]	-

Este bioensayo se realizó mediante la técnica de difusión en agar o método de antibiograma [41], el cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 7 mm de diámetro con 25 µl de una solución preparada con el extracto y con 10 µl para las fracciones y sub-fracciones a analizar. Estos discos se colocaron en una placa de agar Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $1 \times 10^8$  células/ml), preparada por comparación con un patrón comercial McFarlan 0,5. Seguidamente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en una estufa, para permitir el crecimiento bacteriano y la actividad se determinó mediante la medida directa de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco (Figura 11).

Las medidas de estos halos de inhibición, se compararon con los halos correspondientes a los antibióticos utilizados como blancos positivos, terramicina (*Escherichia coli*) y vibramicina (*Shigella* sp).

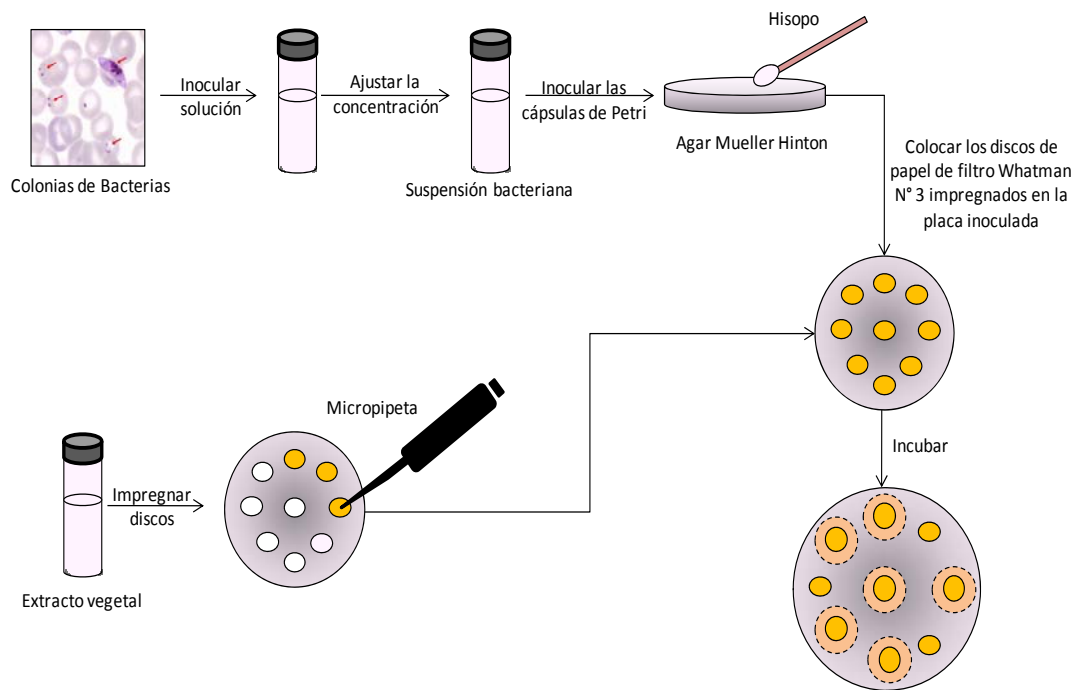


Figura 11. Representación esquemática del ensayo antibacteriano.

- Ensayos de citotoxicidad e inflamación

Estos bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

- Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotóxicidad se evaluó mediante dos métodos diferentes: sulforodamina B (SRB) y (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)/metosulfato de fenazina (MTS/PMS) [42,43].

Los macrófagos RAW 264,7 fueron sembrados a razón de 50 000 células / pozo en 100 µl del medio basal de Eagle modificado (DMEM). Las placas fueron incubadas sin tratamiento durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub>. Una vez formada la monocapa de célula, se agregó el crudo o fracción a distintas concentraciones y asimismo los controles respectivos (células sin tratamiento). Transcurrida 1 hora de incubación, se agregó el Lipopolisacárido (LPS) (2 µg/ml/pozo) y nuevamente se llevó a la estufa. Pasadas 48 horas, el sobrenadante fue recolectado para realizar ensayos de inflamación y las células que quedaron adheridas a la placa fueron ensayadas por el método de MTS/PMS, a fin de verificar la no citotoxicidad de la droga.

- MTS/PMS.

Una vez recolectado el sobrenadante se agregaron 100 µl/pozo de medio de cultivo nuevo y se añadieron 25 µl de solución MTS/PMS en una relación 20:1 de acuerdo a las instrucciones de manufactura de Promega Corporation [42]: seguidamente, se dejó incubar por 1 hora en la estufa. Posteriormente, se determinó la producción de formazan a 492 nm en un lector de microplacas de ELISA, la absorbancia de cada pozo fue directamente proporcional al número de células viables en el cultivo (Figura 12).

- Sulforodamina B (SRB).

Este ensayo consistió en sembrar macrófagos RAW 264,7 en dos placas, una placa a tiempo cero ( $t=0$  h) y otra placa a 48 horas ( $t=48$ h), a razón de 50 000 células/pozo en 100  $\mu$ l del medio basal de Eagle modificado (DMEM). Las placas fueron incubadas, sin tratamiento, durante un tiempo de 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, la placa tiempo cero se fijó con 25  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 1% (TCA), luego de lo cual se incubó por una hora en la nevera a 4°C. Transcurrido este tiempo, se descartó el medio, se realizaron 5 lavados con agua desionizada, se secó y se guardó la placa protegida de la luz. Seguidamente, a la placa 48 horas se le aplicó el tratamiento. Para ello se descartó el medio de cultivo y se le agregaron 100  $\mu$ l del extracto crudo o las fracciones, a distintas concentraciones diluidas en medio basal de Eagle modificado (DMEM) y se llevó a la estufa por 24 horas adicionales. Posteriormente, se procedió a realizar el mismo tratamiento de fijación que se le aplicó a la placa  $t=0$ .

Una vez fijadas ambas placas, simultáneamente se les agregaron 50  $\mu$ l de Sulforodamina B (SRB) y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (protegida de la luz). Transcurrido este tiempo, se descartó el colorante, se realizaron 4 lavados con ácido acético al 1%, se dejaron secar sobre un papel absorbente, rápidamente se les agregaron 100  $\mu$ l de Trizma base 1,0 mmol·l<sup>-1</sup> y se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de placas de Elisa (Figura 13) [43].



– Actividad antiinflamatoria

Las células RAW 264,7 (donadas por el Dr. Juan De Santis del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela), fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 96 pozos, utilizando medio basal de Eagle modificado (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubaron por una hora a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda de  $\text{CO}_2$ . Seguidamente, las células fueron tratadas con el extracto crudo o fracciones a distintas concentraciones; asimismo, los pozos correspondientes al control fueron tratados con aminoguanidina ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), se realizó nuevamente la incubación durante 1 hora, al cabo de este tiempo las células fueron estimuladas con lipopolisacárido (LPS)  $2 \mu\text{g/ml}$  durante un lapso de 48 horas. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes fueron recolectados y ensayados para la determinación de nitritos, como mediador estable de la síntesis del óxido nítrico, a través de la reacción de Griess [44]. Para llevar a cabo tal reacción, se tomaron  $80 \mu\text{l}$  del sobrenadante del cultivo celular y se colocaron en placas de 96 pozos; adicionalmente, se le agregó  $40 \mu\text{l}$  de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 2,5 % y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  por un periodo de 10 minutos; seguidamente, se añadieron  $40 \mu\text{l}$  de diclorhidrato de naftilendiamina (NED) al 0,1 %, incubándose nuevamente a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos, para completar la reacción de diazotación. Inmediatamente, se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 562 nm. La cantidad de nitritos en el sobrenadante se comparó con una curva estándar de nitritos de concentraciones conocidas (Figura 14).

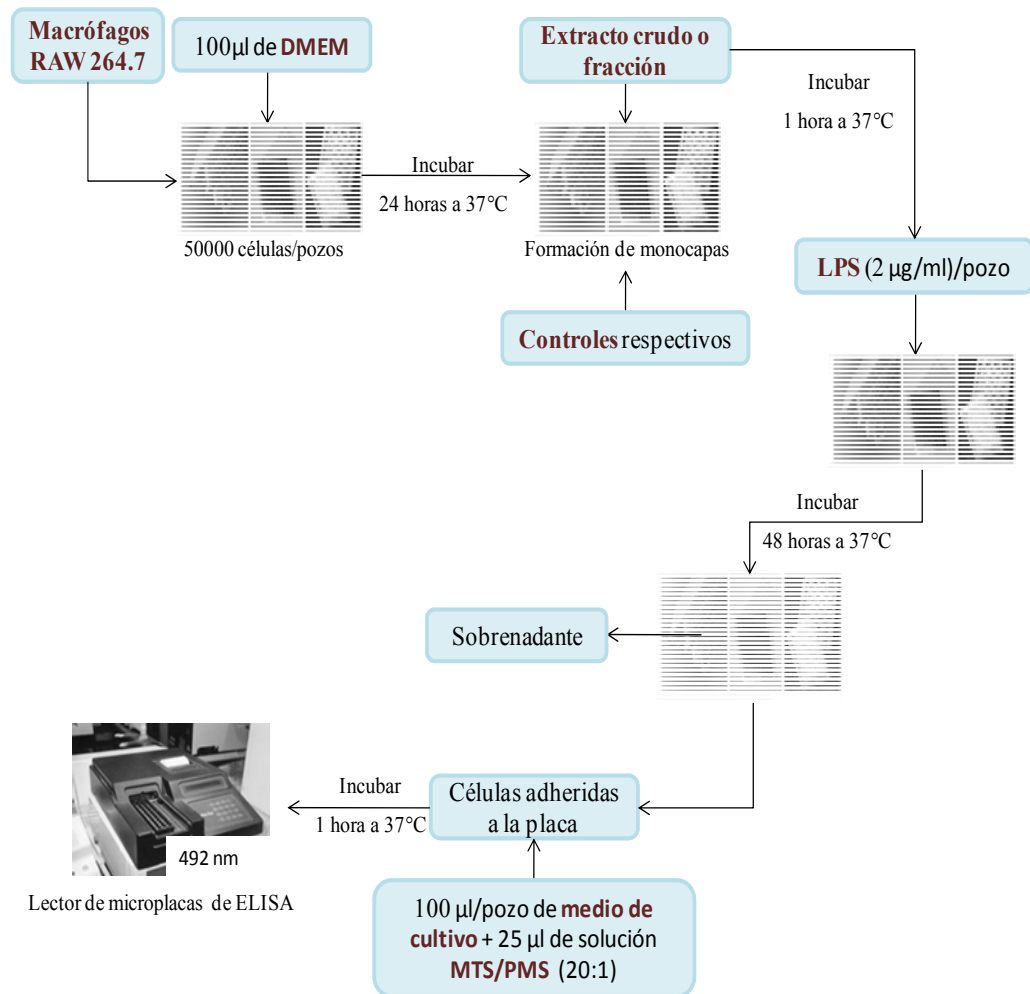


Figura 12. Representación esquemática de ensayo citotóxico, mediante el método de MTS/PMS.

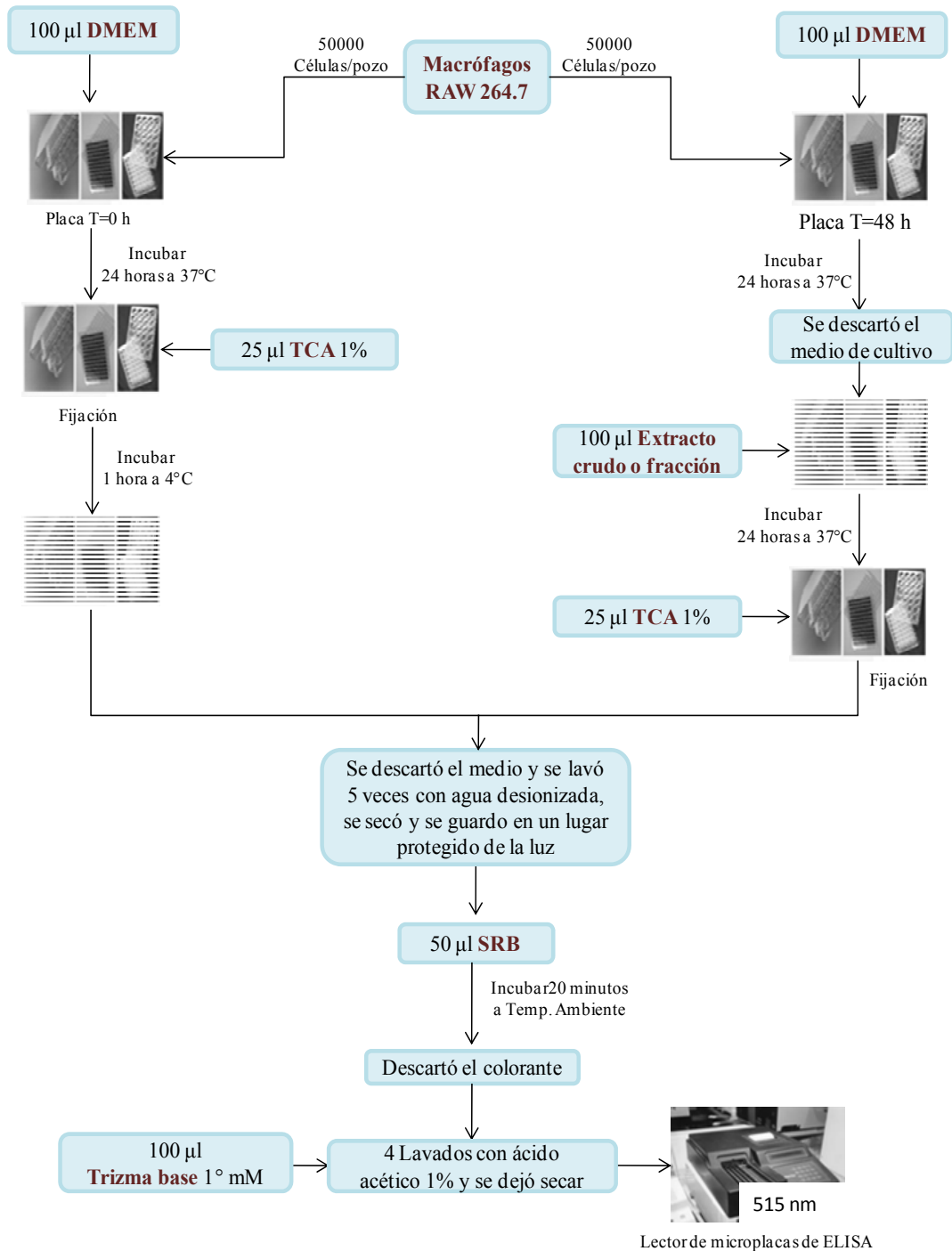


Figura 13. Representación esquemática del ensayo citotóxico, mediante el método de SRB.

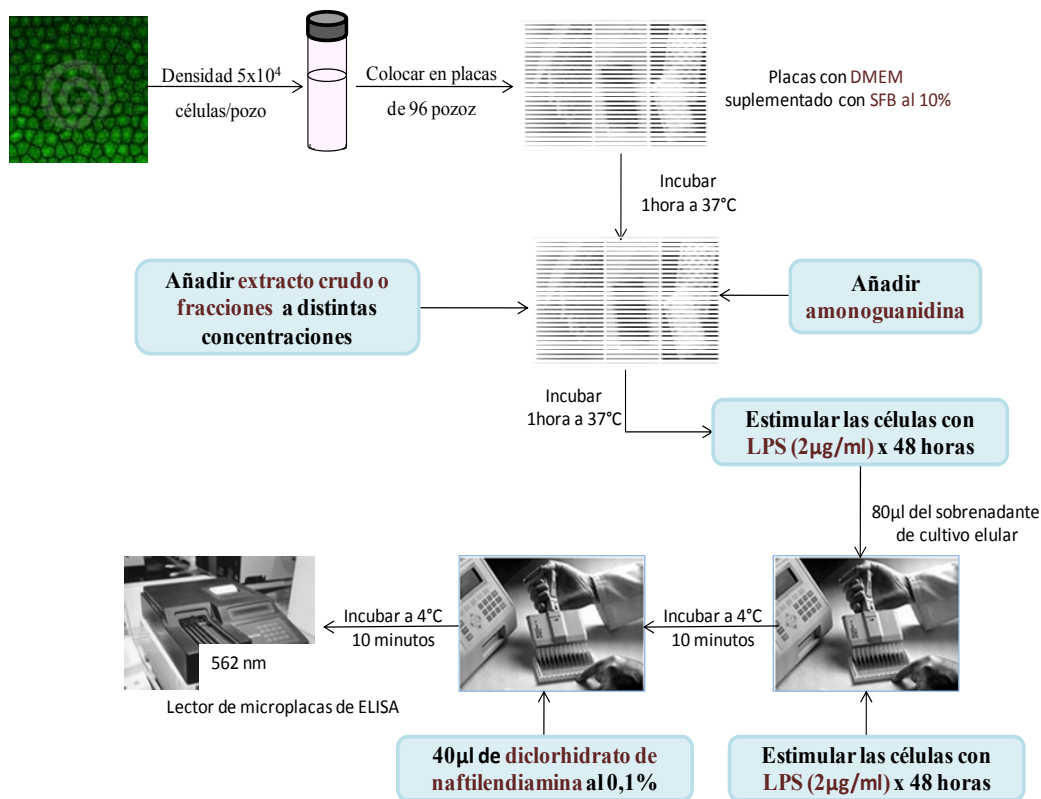


Figura 14. Representación esquemática del ensayo antiinflamatorio.

## Cromatografía

Una vez obtenido el extracto hidroalcohólico y las fracciones solubles en solventes de distintas polaridades, se procedió con el fraccionamiento. Se cromatografiaron aquellas fracciones solubles que mostraron alguna actividad biológica significativa, utilizando las técnicas cromatográficas convencionales (columna y capa fina preparativa), para aislar y purificar los compuestos.

– Cromatografía de columna (CC)

Se realizó cromatografía en columna por gravedad utilizando como fase estacionaria sílica gel de 70-230 mesh en una proporción 1:50 (masa de muestra por masa de sílica). Como eluyentes se emplearon los solventes hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, agua y mezclas de ellos en diferentes proporciones.

– Cromatografía de capa fina (CCF)

Se emplearon placas cromatográficas de 20x20 cm<sup>2</sup> soportadas sobre aluminio, cubiertas con una capa de 0,25 mm de espesor de sílica gel de 60 mesh, marca Merck. Además de las placas de sílica gel se usaron placas de óxido de aluminio de 0,2 mm, marca Merck. Con este método, se agruparon las fracciones y subfracciones obtenidas después de haber realizado las cromatografías de columna. El revelado se realizó mediante luz ultravioleta (365 nm) o exponiendo las placas a vapores de yodo.

– Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)

Se emplearon placas cromatográficas de 20x20 cm<sup>2</sup> soportadas sobre vidrio, cubiertas con una capa de 1,5 mm de espesor de óxido de aluminio f-254, marca Merck. Mediante esta técnica, se purificaron las fracciones y/o subfracciones obtenidas. El revelado se realizó con luz ultravioleta a 365 nm.

### **Técnicas de identificación**

Las técnicas de identificación utilizadas permitieron caracterizar y determinar algunas de las estructuras de las moléculas orgánicas presentes en el extracto estudiado.

– Resonancia magnética nuclear (RMN)

La técnica de resonancia magnética nuclear es la herramienta más poderosa que se dispone para la determinación de una estructura química, al examinar las propiedades magnéticas de átomos específicos de las moléculas. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto Venezolano de Investigaciones científicas

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  fueron tomados en un espectrómetro BRUKER AM 500 (frecuencia de resonancia  $^1\text{H} = 500$  MHz) y los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  (frecuencia de resonancia  $^{13}\text{C} = 125,76$  MHz), utilizando acetona deuterada como solvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) para los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se reportan en ppm relativo a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS) y la constante de acoplamiento ( $J$ ) se reportan en Hertz (Hz). Además de los RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se realizó el DEPT-135 (Distortionless Enhancement through Polarization Transfer) el cual proporcionó información de la cantidad y el tipo de carbonos presente en la estructura.

Los espectros bidimensionales se realizaron en el mismo equipo (frecuencia de resonancia  $^1\text{H} = 500$  MHz y frecuencia de resonancia  $^{13}\text{C} = 125,76$  MHz) utilizando los siguientes experimentos:

COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Correlated spectroscopy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  o Correlación espectroscópica homonuclear): Correlaciona todos los desplazamientos químicos de protones sobre carbonos contiguos ( $\text{H}_a\text{-C-C-H}_b$ ), con lo cual es posible ubicar los protones vecinos que están acoplados (Figura 15).

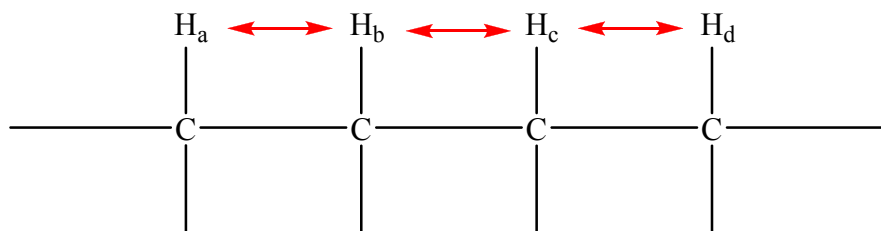


Figura 15. Interacciones que se observan en un espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation o Correlación directa heteronuclear): Correlaciona los desplazamientos químicos de un protón (o protones) que está(n) unido(s) a un carbono particular, lo cual facilita la asignación espectroscópica de ambos núcleos. La ventaja de este experimento es que se utiliza menos cantidad de muestra, debido a que la correlación C-H se establece a través del hidrógeno. En un espectro de este tipo se observarían interacciones entre  $\text{C}_a\text{-H}_a$ ,  $\text{C}_b\text{-H}_b$ ,  $\text{C}_c\text{-H}_c$  y  $\text{C}_d\text{-H}_d$  (Figura 16).

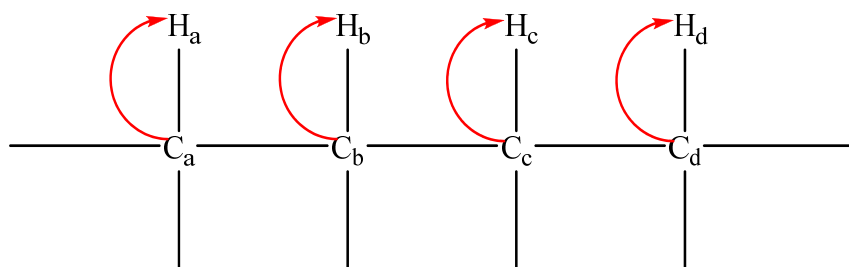


Figura 16. Interacciones que se observan en un espectro HMQC.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation o Correlación heteronuclear entre varios enlaces): Permite obtener información sobre la correlación (a través del carbono) entre carbonos unidos a hidrógenos separados por dos o tres enlaces. Una ventaja de este experimento es que permite

identificar los carbonos cuaternarios acoplados a protones. De este tipo de espectros (Figura 17.a) se obtendrían señales de conectividades a dos enlaces, entre  $C_a-H_b$ ,  $C_b-H_a$ ,  $C_c-H_b$ ,  $C_c-H_d$  y  $C_d-H_c$ . Del espectro de la Figura 17.b, se obtendrían señales para las conectividades a tres enlaces entre  $C_a-H_c$  y  $C_b-H_d$ .

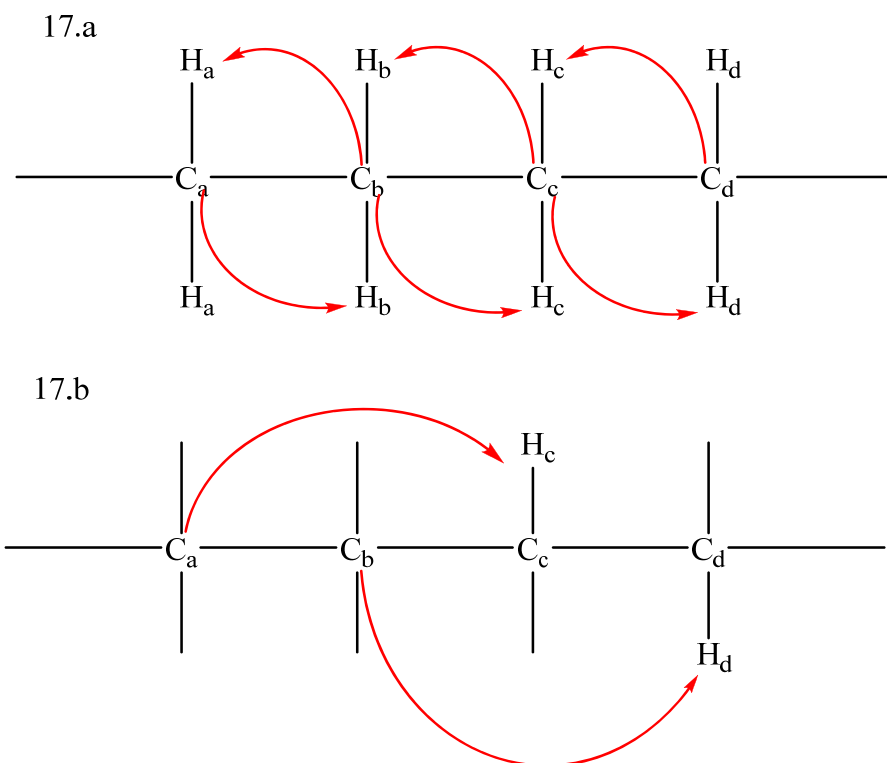


Figura 17. Interacciones que se observan en el espectro de HMBC a dos enlaces (17.a) y tres enlaces (17.b).

– Espectrometría de masas (EM)

La espectrometría de masas es el método más simple para determinar la masa molar de un compuesto e, incluso, la fórmula molecular correspondiente. También, da información sobre la estructura, subestructuras o fragmentos y los grupos funcionales presentes en la molécula. La fragmentación, característica



de cada clase de compuestos, es aprovechada para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos particulares de las moléculas. La desventaja de este análisis es que destruye la muestra, aunque se usan pocos miligramos de la misma.

La cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (CG/EM), permitió identificar compuestos de mezclas orgánicas, mediante un patrón de fragmentación. La ventaja de este método, radica en usar microcantidades para su realización.

El equipo utilizado para el análisis fue un cromatógrafo de gases marca Varian modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones. Las muestras fueron inyectadas en una columna CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I. y helio como gas de arrastre, a una rapidez de 1 ml por minuto. La temperatura del inyector fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rapidez de calentamiento de 5°C por minuto, hasta llegar a la temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías de Wiley y NIST.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante esta investigación y el análisis de los mismos:

### Obtención de las fracciones solubles

Para la obtención de las fracciones solubles, se realizó una extracción sólido-líquido utilizando 10,01 g del extracto hidroalcohólico de la corteza (tallo) de *Vismia cayennensis* para la cual se utilizaron solventes de polaridad creciente (hexano<cloroformo<acetona<metanol<agua). Las cantidades y porcentajes de cada fracción soluble obtenida se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la extracción sólido-líquido.

Fracciones	Masa (mg)	Porcentaje (% m/m)
FSH	570,00	5,70
FSC	490,00	4,88
FSA	4920,00	49,16
FSM	2190,00	21,89
FSAG	30,00	0,28

Masa total: 8200,00 mg; % de recuperación: 82 %.

FSH: hexano, FSC: cloroformo, FSA: acetona, FSM: metanol y FSAG: agua.

El método utilizado para la obtención de las fracciones solubles resultó ser efectivo, esto se puede evidenciar con el valor obtenido en el porcentaje de recuperación el cual fue de 82%.

### **Análisis fitoquímico**

Los análisis fitoquímicos realizados a los extractos y fracciones solubles de la corteza (tallo) de *Vismia cayennensis*, arrojó la presencia de ciertas familias de compuestos, tales como:

Flavonoides: se observó una coloración naranja al practicarle a la muestra la prueba de Shinoda.

Saponinas: se observó espuma persistente, por un tiempo aproximado de 10 minutos.

Taninos y polifenoles: se observó un precipitado blanco en la prueba de gelatina-sal y una coloración parda en la reacción con cloruro de hierro (III), correspondientes a taninos y polifenoles respectivamente.

Antraquinonas: se observó una coloración roja al alcalinizar con hidróxido de amonio.

Triterpenos y/o esteroides: se observó una coloración amarilla pálida, mediante la prueba de Liebermann-Burchard correspondiente a triterpenos y/o esteroides saturados. Asimismo, se observó una coloración verde con la prueba de Salkowski correspondientes a esteroides insaturados.

La Tabla 4 muestra un resumen de los grupos de metabolitos secundarios detectados en la especie *Vismia cayennensis*.

Tabla 4. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles en solventes de distintas polaridades, de la corteza (tallo) de *V. cayennensis*.

Familia de metabolitos secundarios	Fracciones solubles					
	EHP	FSH	FSC	FSA	FSM	FSAG
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	-	+	-
Saponinas	-	-	-	+	+	-
Taninos	+	-	-	-	+	-
Polifenoles	+	-	-	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-	+	-	-
Triterpenos	+	-	-	+	+	-
Esteroles	+	+	+	-	-	-

EHP: Extracto hidroalcohólico de la planta.

(+): Presencia.

(-): No detectados.

Las familias de metabolitos secundarios determinadas, han estado presentes en muchas especies *Vismia*. Ejemplo de estos compuestos aislados son la *O*-demetil-3'4'-deoxisorospermin-3'4'-diol-1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antraquinona (*V. laurentii*),

ácido crisofánico (*V. cayennensis*),  $\beta$ -selineno (*V. cayennensis*), physcion (*V. cayennensis*),  $\beta$ -amyrin (*V. cayennensis*) y sitosterol (*V. cayennensis*) [28-31; 36-37].

A pesar de que algunas familias de metabolitos secundarios no fueron detectadas, es importante destacar que no se puede afirmar la ausencia de las mismas; debido a que, muchas veces ocurre, que éstas no se encuentren en concentraciones apreciables, para poder ser detectados mediante las pruebas comúnmente realizadas.

### **Pruebas biológicas**

La realización de estos bioensayos fue vital en el proceso de investigación, debido a que por medio de ellos se observó la bioactividad del extracto y de las fracciones solubles en los distintos solventes, permitiendo así llevar a cabo un fraccionamiento biodirigido. Estos estudios de actividad biológica son los primeros realizados con esta especie, lo cual es de gran importancia, dado que proporciona información significativa al campo de la química orgánica y productos naturales.

- **Actividad antibacteriana**

Los resultados obtenidos en esta prueba, revelaron que el extracto hidroalcohólico de la planta (EHP) exhibió una actividad inhibitoria frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Shigella* sp. Esta actividad, se ve reflejada en los halos de inhibición observados, para el extracto fue de 15,50 (61%) para *Escherichia coli* y 16,63 (71%) para *Shigella* sp (Tabla 5). El porcentaje reportado se refiere a los antibióticos utilizados como blancos, terramicina (*Escherichia coli*) y vibramicina (*Shigella* sp.). Sin embargo, las fracciones solubles no mostraron una actividad antibacteriana relevante, sólo las fracciones de acetona, metanol y agua exhibieron

una moderada actividad antibacteriana frente a la bacteria *Shigella* sp. con halos de inhibición de 9,00 mm (38%); 8,25 mm (35%) y 11,00 mm (47%) respectivamente.

Además, se observó que el extracto y algunas fracciones presentaron una fuerte actividad bacteriostática frente a la cepa *Shigella* sp., este hecho puede ser atribuido a la presencia de más de un componente activo, la diferencia de masas molares de cada sustancia, así como también el tipo de microorganismo sobre el cual esté actuando la sustancia.

Tabla 5. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles en solventes de distintas polaridades, de la corteza (tallo) de *V. cayennensis*.

Cepas bacterianas	Halos de inhibición (mm)							
	EHP	Fracciones solubles					Antibióticos	
		FSH	FSC	FSA	FSM	FSAG	X	Y
<i>Escherichia coli</i> <sup>c</sup>	15,50	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	25,63	---
<i>Shigella</i> sp. <sup>c</sup>	16,63 (15,60*)	7,00	7,00	9,00 (11,42* )	8,25 (11,58* )	11,00 (10,88*)	---	23,50

<sup>a</sup> El diámetro del papel de filtro utilizado es de 7mm.

<sup>b</sup> FSH: hexano, FSC: cloroformo, FSA: acetona, FSM: metanol y FSAG: agua.

<sup>c</sup> El suministro de cepas: *Escherichia coli* [IBE (DOC-9)] y *Shigella* sp. [ATCC 11126].

<sup>x</sup> Terramicina, antibiótico utilizado como blanco positivo para la cepa *Escherichia coli*.

<sup>y</sup> Vibramicina, antibiótico utilizado como blanco positivo para la cepa *Shigella* sp.

(\*) Halo bacteriostático.

- Ensayo antiinflamatorio y citotóxico

Estos bioensayos fueron muy significativos en el trabajo de investigación, debido a que por medio de los mismos se observó la bioactividad de la fracción soluble en cloroformo (FSC), permitiendo así llevar a cabo un fraccionamiento biodirigido; del cual se logró aislar un compuesto puro.

Los resultados obtenidos en los ensayos antiinflamatorios, permiten inferir que la FSC presenta una inhibición moderada de la producción de óxido nítrico con respecto al control (Figura 18). El valor obtenido para esta fracción se considera significativo, debido a que ésta no exhibió citotoxicidad relevante a concentraciones menores o iguales a 30  $\mu\text{g/ml}$ , según los resultados reflejados por el ensayo citotóxico mediante el método de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)/metosulfato de fenazina o (MTS/PMS) (Figura 19). Este hecho se verificó, mediante los resultados obtenidos por el método de sulforodamina B, donde se observó que la inhibición del 50% del crecimiento de las células ( $\text{IC}_{50}$ ) para esta fracción fue a 67  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 6). Las demás fracciones solubles no inhibieron de manera apreciable la producción de óxido nítrico. La fracción soluble en hexano (FSH) exhibió una actividad citotóxica a concentraciones mayores o iguales a 30  $\mu\text{g/ml}$ , este valor lo reflejó el resultado del método MTS/PMS. Mediante el ensayo de sulforodamina B para esta fracción, se observó que inhibición del 50% del crecimiento de las células ( $\text{IC}_{50}$ ) es de 34  $\mu\text{g/ml}$ , la inhibición total del crecimiento (ITC) fue de 43  $\mu\text{g/ml}$  y el efecto citotóxico del 50% de las células ( $\text{CL}_{50}$ ) fue de 98  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 6). El resto de estas fracciones mantuvieron valores relativamente bajos de citotoxicidad.

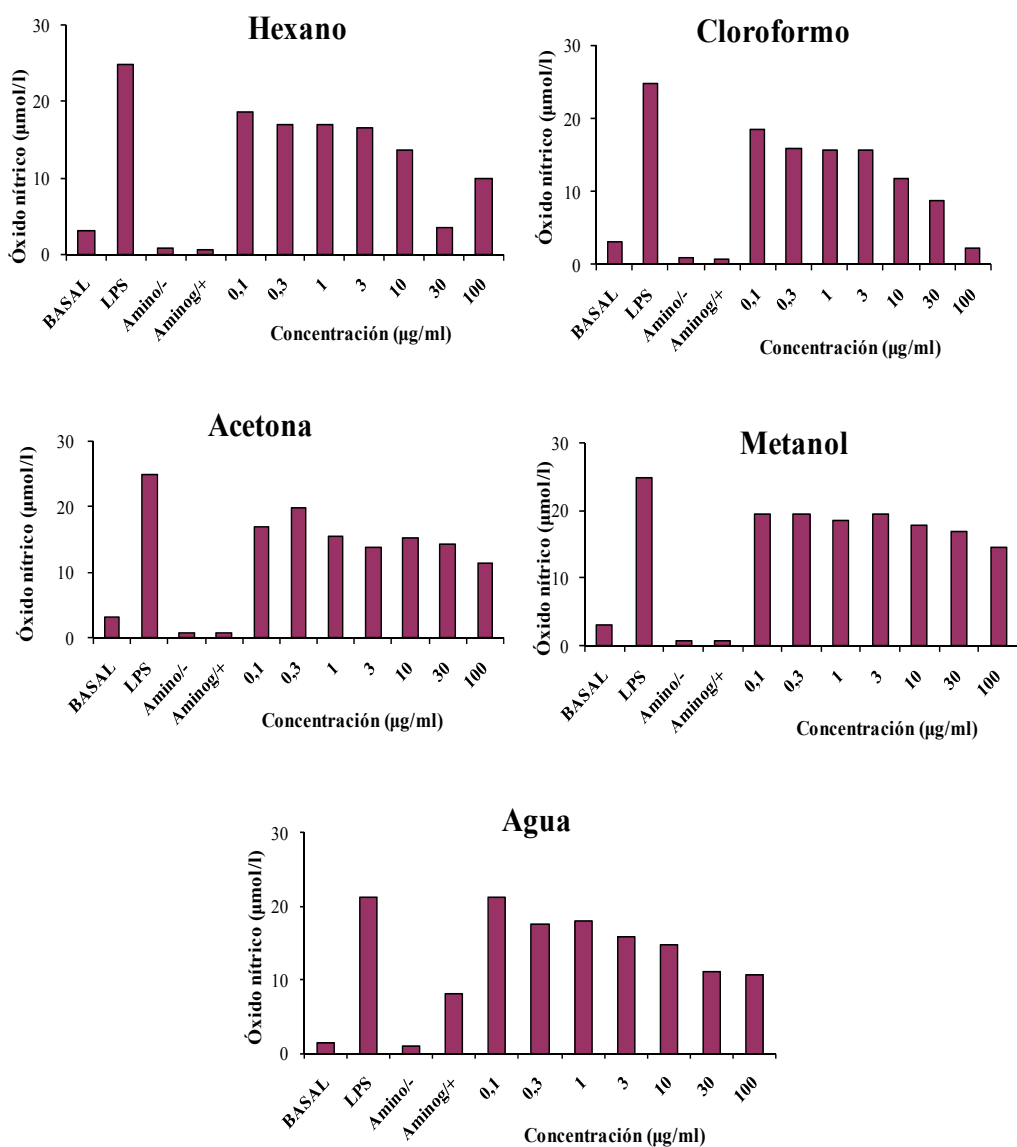


Figura 18. Resultados del ensayo antiinflamatorio, utilizando óxido nítrico como mediador, correspondiente a las fracciones solubles de *V. cayennensis*. (amino/: aminoguanidina, LPS: lipopolisacárido).



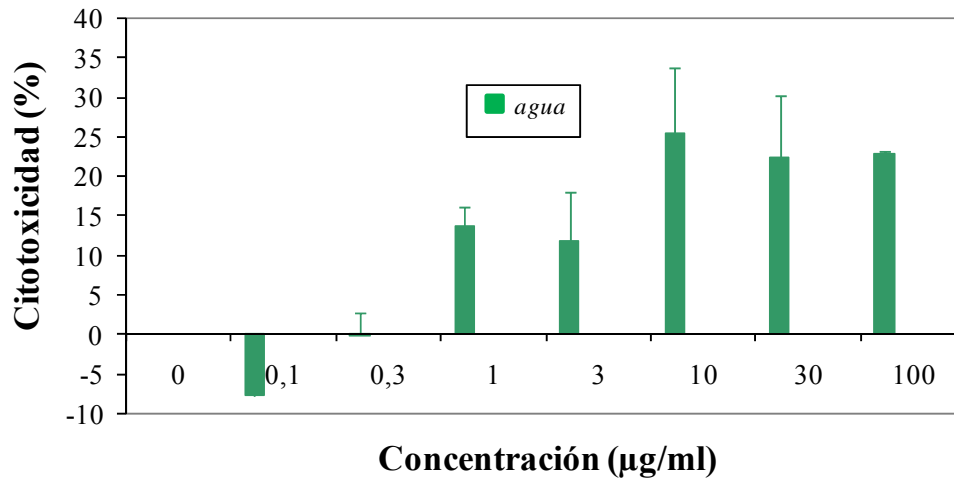
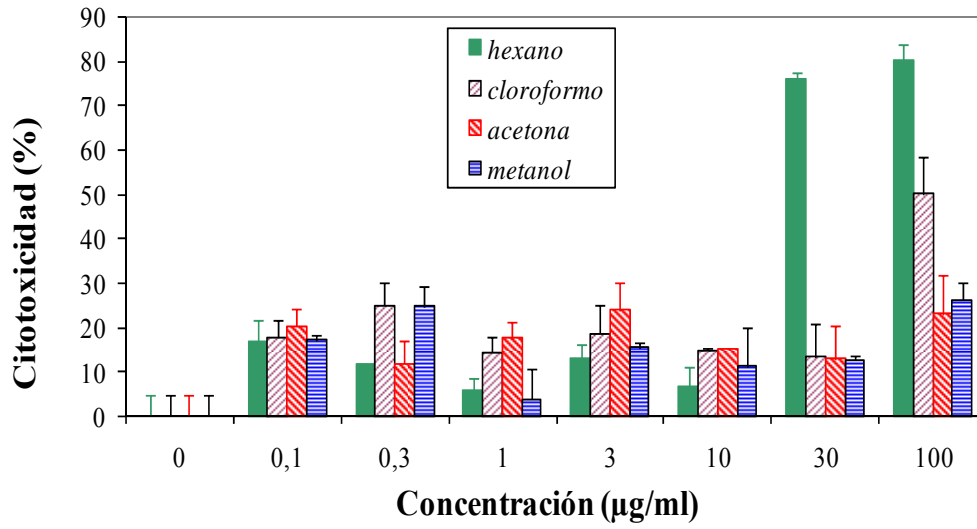


Figura 19. Resultados del ensayo citotóxico de las fracciones de *V. cayennensis*, solubles en solventes de distintas polaridades, mediante el método de (MTS/PMS).

Tabla 6. Resultados del ensayo citotóxico del extracto hidroalcohólico (EHP) y fracciones solubles de *V. cayennensis*, mediante el método de sulforodamina B.

Fracciones	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	ITC (µg/ml)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)
EHP	67	-	-
FSH	34	43	98
FSC	67	-	-
FSA	8	-	-
FSM	71	-	-
FSAG	-	-	-

IC<sub>50</sub>: Inhibición del 50% del crecimiento de la célula.

ITC (µg/ml): inhibición total del crecimiento.

CL<sub>50</sub>: Efecto citotóxico del 50% de las células.

FSH: hexano, FSC: cloroformo, FSA: acetona, FSM: metanol y FSAG: agua.

### Fraccionamiento biodirigido

Este fraccionamiento cromatográfico se realizó con respecto a los resultados observados en los bioensayos efectuados previamente.

### Cromatografía de la fracción soluble en cloroformo (FSC)

La fracción soluble en cloroformo se cromatografió debido a los resultados observados en los ensayos antiinflamatorios y citotóxicos. Los efectos evidenciados revelaron inhibición moderada del mediador de inflamación ensayado, manteniendo valores bajos de citotoxicidad.

Se fraccionaron 0,21 g de la muestra en una columna cromatográfica de 40 ml empaquetada con 12,5 g de sílica gel 70-230 mesh, en proporciones 1:50 (gramos de compuesto: gramos de sílica). Los solventes utilizados para la elución fueron hexano (hex), mezclas de polaridad ascendente de hex-eter dietílico, hex-cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), CHCl<sub>3</sub>-acetato de etilo (ActOEt), ActOEt-acetona (Act) y Act-metanol (MeOH). De esta cromatografía, se obtuvieron 438 eluatos de 30 ml cada uno como se muestra en la Tabla 7. En la Figura 20 se observa el esquema de tratamiento de esta fracción soluble. Los eluatos obtenidos de la partición de la fracción soluble en cloroformo se les aplicó cromatografía en capa fina (CCF), agrupándose 45 subfracciones (Tabla 8) por comparación de sus factores de retención (R<sub>f</sub>), utilizando como revelador la luz UV.

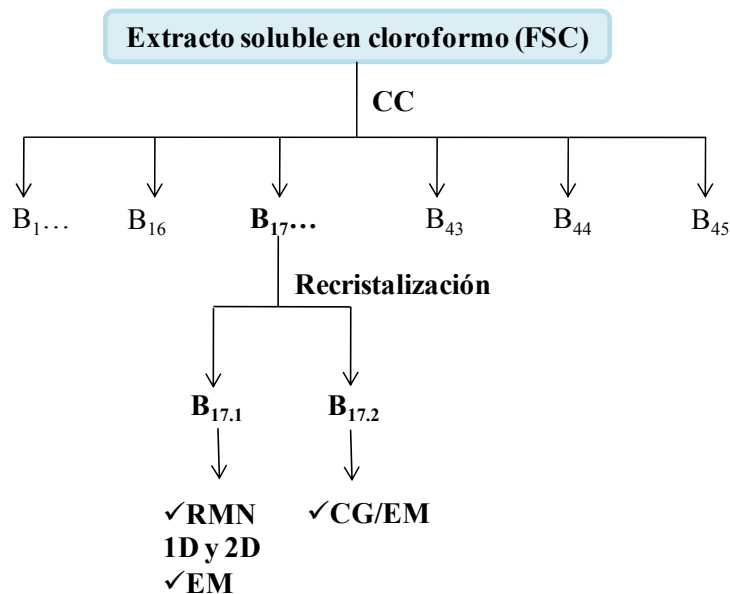


Figura 20. Esquema de tratamiento de la fracción soluble en cloroformo (FSC).

A las subfracciones obtenidas de la partición de la FSC se les practicó CCF, observándose que la gran mayoría de estas presentaban mezclas complejas de

compuestos, a excepción de la subfracción B<sub>17</sub>. Dicha subfracción B<sub>17</sub> fue posteriormente purificada.

- Purificación de la subfracción B<sub>17</sub>

La subfracción (B<sub>17</sub>) se obtuvo en forma de un sólido amarillo (10,00 mg), la cual reveló en CCF, dos manchas de R<sub>f</sub> muy distintos utilizando varios sistemas de solventes. El sólido se purificó mediante el siguiente esquema de recrystalización (Figura 21), y los resultados de la purificación se detallan en la Tabla 9.

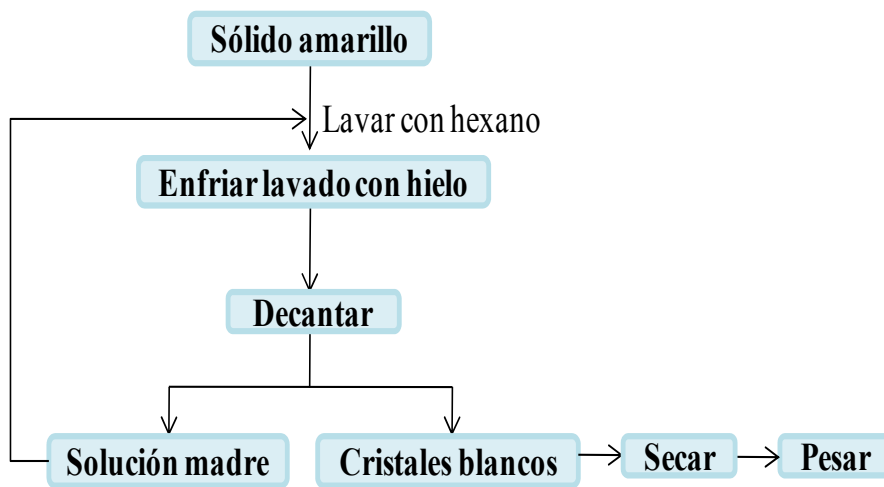


Figura 21. Esquema de recrystalización de la subfracción B<sub>17</sub>.

Tabla 7. Solventes utilizados en la CC de la FSC de *V.cayennensis*.

<b>Eluatos</b>	<b>Solventes</b>	<b>Porcentaje (% V/V)</b>
1-50	hexano	100%
51-82	hex:eter dietilico	95:5
83-93	hex:eter dietilico	90:10
94-110	hex:eter dietilico	85:15
111-120	hex:eter dietilico	80:20
121-130	hex:eter dietilico	75:25
131-140	hex:eter dietilico	70:30
141-163	hex:eter dietilico	65:35
164-173	hex:eter dietilico	60:40
174-186	hex:eter dietilico	55:45
187-197	hex:eter dietilico	50:50
198-209	hex:eter dietilico	45:55
210-220	hex:eter dietilico	40:60
221-226	hex:eter dietilico	35:65
227-229	hex: CHCl <sub>3</sub>	50:50
230-323	hex: CHCl <sub>3</sub>	40:60
233-245	hex: CHCl <sub>3</sub>	30:70

246-253	hex: CHCl <sub>3</sub>	20:80
254-272	hex: CHCl <sub>3</sub>	10:90
266-265	CHCl <sub>3</sub>	100
273-280	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	90:10
281-286	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	80:20
287-294	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	70:30
295-302	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	60:40
303-310	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50
311-319	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	40:60
320-327	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	30:70
328-336	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	20:80
337-344	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	10:90
345-351	AcOEt	100
352-358	AcOEt:Acet	90:10
359-366	AcOEt:Acet	80:20
367-374	AcOEt:Acet	70:30
375-383	AcOEt:Acet	60:40
384-390	AcOEt:Acet	50:50
391-398	AcOEt:Acet	40:60
399-406	AcOEt:Acet	30:70

407-414	AcOEt:Acet	20:80
415-422	AcOEt:Acet	10:90
423-430	Acet	100
431-435	Acet:MeOH	50:50

Continuación Tabla 7.

<b>Eluatos</b>	<b>Solventes</b>	<b>Porcentaje (% V/V)</b>
435-438	MeOH	100

Tabla 8. Subfracciones obtenidas de la fracción soluble en cloroformo.

<b>Eluatos</b>	<b>Subfracción</b>	<b>Eluatos</b>	<b>Subfracción</b>
1	B <sub>1</sub>	140	B <sub>24</sub>
2-6	B <sub>2</sub>	141-148	B <sub>25</sub>
7	B <sub>3</sub>	149-168	B <sub>26</sub>
8-9	B <sub>4</sub>	169-177	B <sub>25</sub>
10	B <sub>5</sub>	178-209	B <sub>28</sub>
11-12	B <sub>6</sub>	210-228	B <sub>29</sub>
13	B <sub>7</sub>	229-244	B <sub>30</sub>

14-23	B <sub>8</sub>	245-252	B <sub>31</sub>
24-31	B <sub>9</sub>	253-258	B <sub>32</sub>
32-35	B <sub>10</sub>	259-263	B <sub>33</sub>
36	B <sub>11</sub>	264-272	B <sub>34</sub>
37-50	B <sub>12</sub>	273-290	B <sub>35</sub>
51	B <sub>13</sub>	291-337	B <sub>36</sub>
52	B <sub>14</sub>	338-362	B <sub>37</sub>
53-54	B <sub>15</sub>	363-369	B <sub>38</sub>
55-69	B <sub>16</sub>	370-383	B <sub>39</sub>
70-93	B <sub>17</sub>	384-387	B <sub>40</sub>
94-95	B <sub>18</sub>	388	B <sub>41</sub>
96-98	B <sub>19</sub>	389-415	B <sub>42</sub>
99-100	B <sub>20</sub>	416-427	B <sub>43</sub>
101-103	B <sub>21</sub>	428-433	B <sub>44</sub>
104-109	B <sub>22</sub>	434-436	B <sub>45</sub>
110-139	B <sub>23</sub>		

---



Tabla 9. Subfracciones obtenidas en la recrystalización de la subfracción B<sub>17</sub>.

Subfracción	Masa (mg)
Sólido blanco (B <sub>17.1</sub> )	4,80
Solución madre (B <sub>17.2</sub> )	5,10

Masa total: 9,90 mg ; % de recuperación: 99%

- Análisis estructural del compuesto B<sub>17.1</sub>

El compuesto (B<sub>17.1</sub>) fue aislado mediante la recrystalización de la subfracción B<sub>17</sub>, en forma de un sólido blanco (4,80 mg). Posteriormente, este compuesto (B<sub>17.1</sub>) fue disuelto en acetona deuterada, a esta solución se le realizaron los análisis espectroscópicos de RMN convencionales de una y dos dimensiones; específicamente, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, DEPT, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HMQC y HMBC, para su posterior identificación.

Según las evidencias arrojadas por el análisis combinado de los datos espectrales de RMN uni y bidimensional, se propone una estructura para el compuesto B<sub>17.1</sub> como un derivado hidroxílico de un triterpeno pentacíclico (Figura 22), dicho compuesto es novedoso, dado que no ha sido reportado en la literatura.

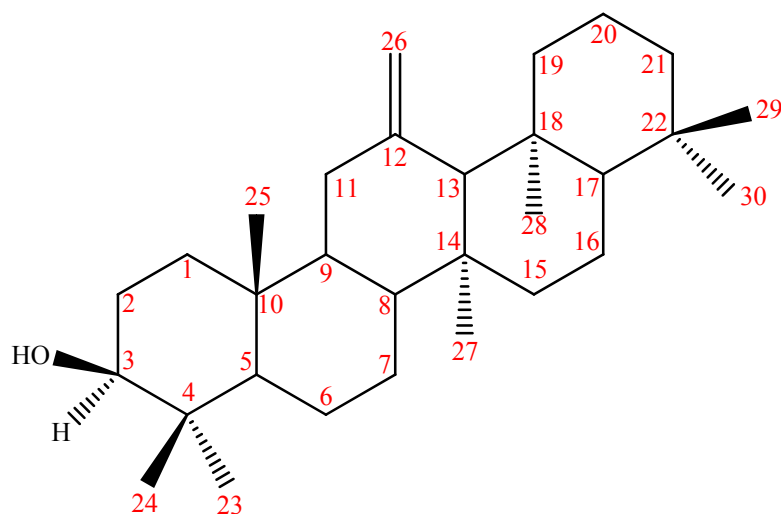


Figura 22. Estructura propuesta para el compuesto B<sub>17.1</sub> y su numeración.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de este compuesto (Figura 23), exhibió un doblete con una constante de acoplamiento *J*: 2,22, que integra para un protón vinílico a  $\delta_H$  4,72; asimismo, se observa un doblete de dobletes a  $\delta_H$  4,58 con unas constantes de acoplamiento de *J*: 1,50; 2,49; que integra para un protón vinílico. Estas dos señales corresponden a protones enlazados a un carbono olefínico; el cual fue consistente con la presencia de esta porción en la estructura probable del compuesto. A campo más alto,  $\delta_H$  3,12; se observó un doblete de dobletes (Figura 24), con unas constantes de acoplamiento *J*: 5,82; 10,36; asignable al protón en posición  $\alpha$  en el carbono 3, el cual se acopla con los protones diastereotópicos del carbono metilénico 2. A  $\delta_H$  2,37; exhibió un multiplete, asignable al protón en posición  $\beta$  del carbono 2. Por otra parte, a  $\delta_H$  2,26 se observó un multiplete, asignable al protón en  $\alpha$  del carbono 2. A campo más alto, se observaron siete señales como singletes correspondientes a los grupos metílicos (Figura 25) a  $\delta_H$  1,72; 1,44; 1,04; 0,98; 0,78; 0,91 y 0,88 (Tabla 10).

Tabla 10. Desplazamientos químicos de algunas de las señales seleccionadas del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto B<sub>17.1</sub>.

N° de señales	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	(N° de protones, multiplicidad, $J_{\text{H-H}}$ Hz)
1	4,72	(1H, d, $J= 2,22$ )
2	4,58	(1H, dd, $J= 1,50; 2,49$ )
3	3,12	(1H, dd, $J= 5,82; 10,36$ )
4	2,37	(1H,m)
5	2,26	(1H, m)
6	1,72	(4H, s)
7	1,44	(3H, s)
8	1,04	(3H, s)
9	0,98	(4H, s)
10	0,91	(3H, s)
11	0,88	(3H, s)
12	0,78	(4H, s)

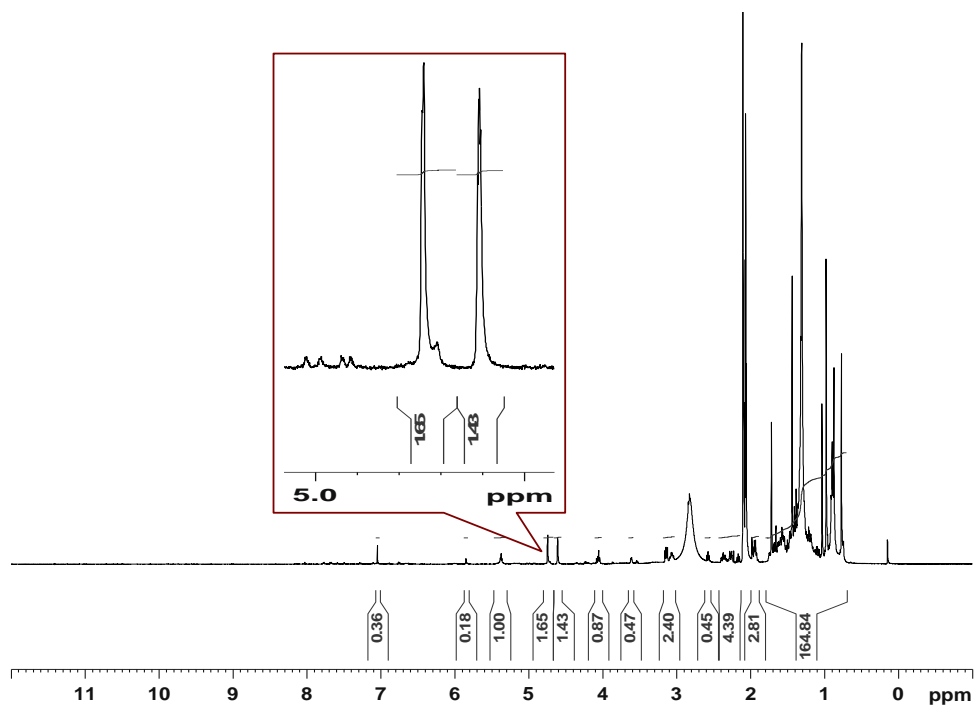


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub> y ampliación de la zona 5,0-4,50 ppm.

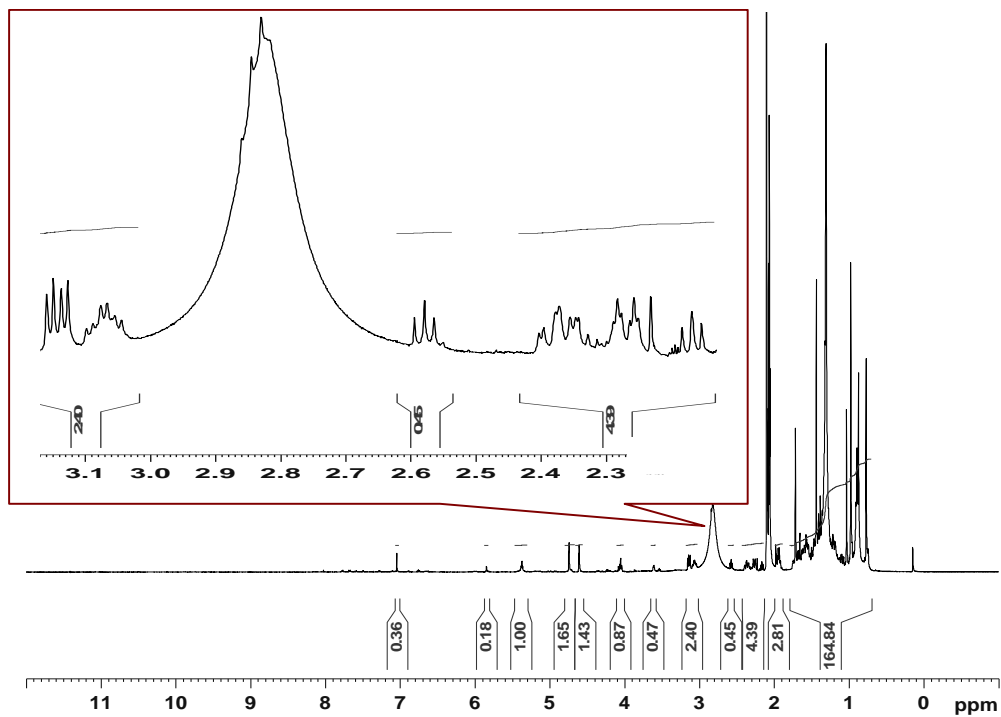


Figura 24. Ampliación de la zona 3,14-2,10 ppm del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto sólido aislado  $\text{B}_{17.1}$ .

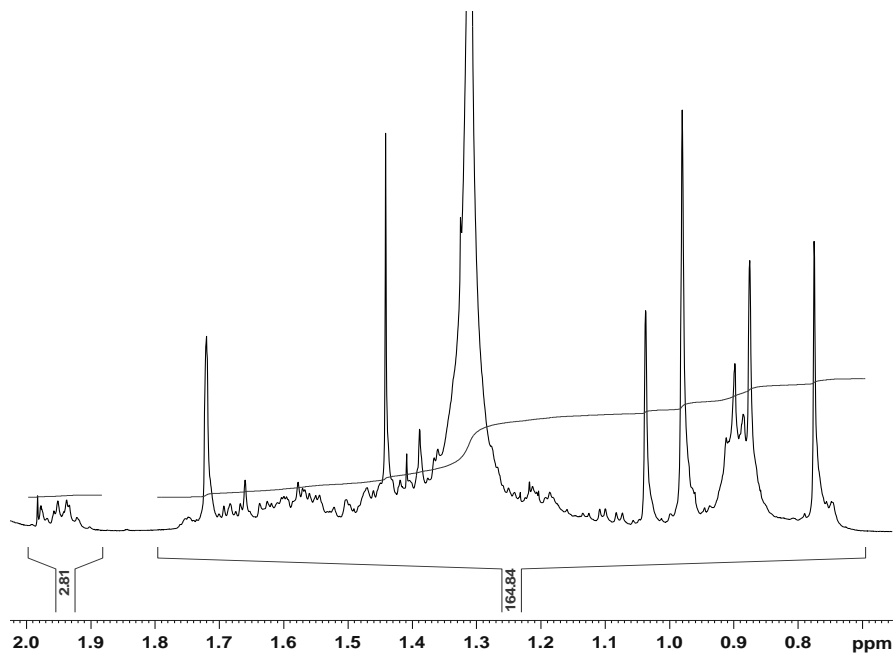


Figura 25. Ampliación de la zona 2,0-0,7 ppm del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto sólido aislado  $\text{B}_{17.1}$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de este compuesto (Figura 26), mostró desplazamientos químicos indicativos de que es un compuesto que posee treinta átomos de carbono ( $\text{C}_{30}$ ). Entre el conjunto de señales obtenidas destacan tres señales a campo bajo, cuyos desplazamientos son  $\delta_{\text{C}}$  150,72 y 109,05 correspondientes a los carbonos olefínicos y la señal a  $\delta_{\text{C}}$  77,65, asignable al carbono enlazado a un oxígeno. El resto de los desplazamientos corresponden a los carbonos alifáticos (Figura 27). A campo más alto, se observan siete señales a  $\delta_{\text{C}}$  18,56; 18,18; 15,71; 15,63; 15,15; 14,10 y 13,40; asignables a los carbonos metílicos (Tabla 11).

El espectro DEPT  $135^\circ$  (Figuras 28 y 29), proporcionó información con respecto a los carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en la estructura, permitiendo confirmar algunas de las asignaciones realizadas. Los carbonos cuaternarios que no poseen protones enlazados, se asignaron mediante la información suministrada por el HMBC y las conectividades directas del HMQC.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de algunas de las señales seleccionadas del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $\text{B}_{17.1}$ .

N° de señales	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	150,72
2	109,05
3	77,65
4	55,88
5	55,43

6	50,55
7	49,06
8	47,30
9	42,30
10	40,63
11	38,63
12	38,13
13	37,07
14	36,63
15	34,31
16	31,95
17	31,70
18	30,44

Continuación Tabla 11.

N° de señales	$\delta_C$ (ppm)
19	27,64
20	27,38
21	25,50
22	22,38

23	20,79
24	18,56
25	18,18
26	15,71
27	15,63
28	15,15
29	14,10
30	13,40

---

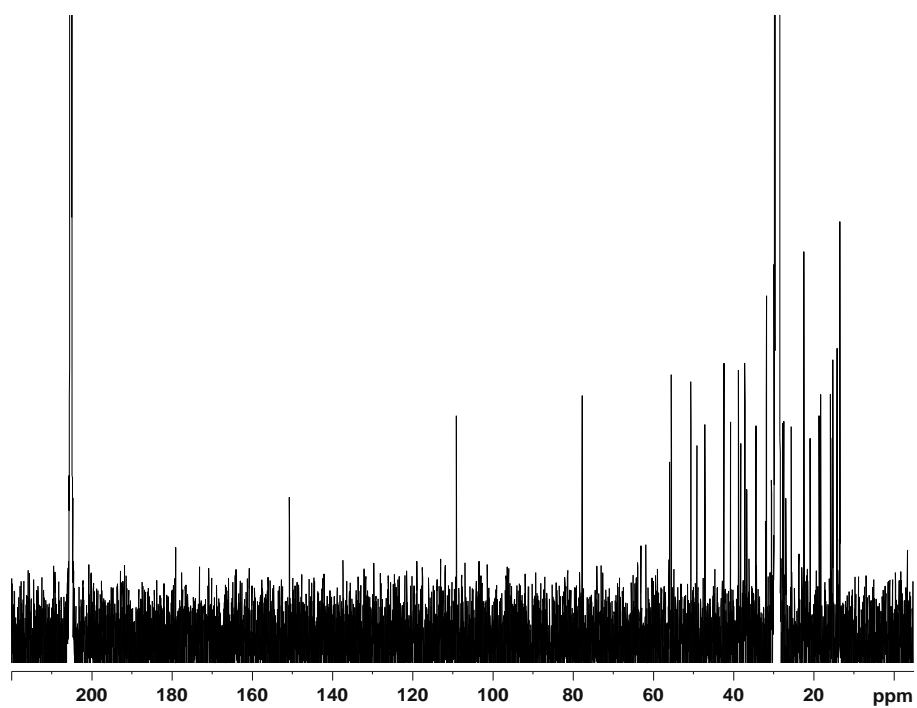


Figura 26. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.



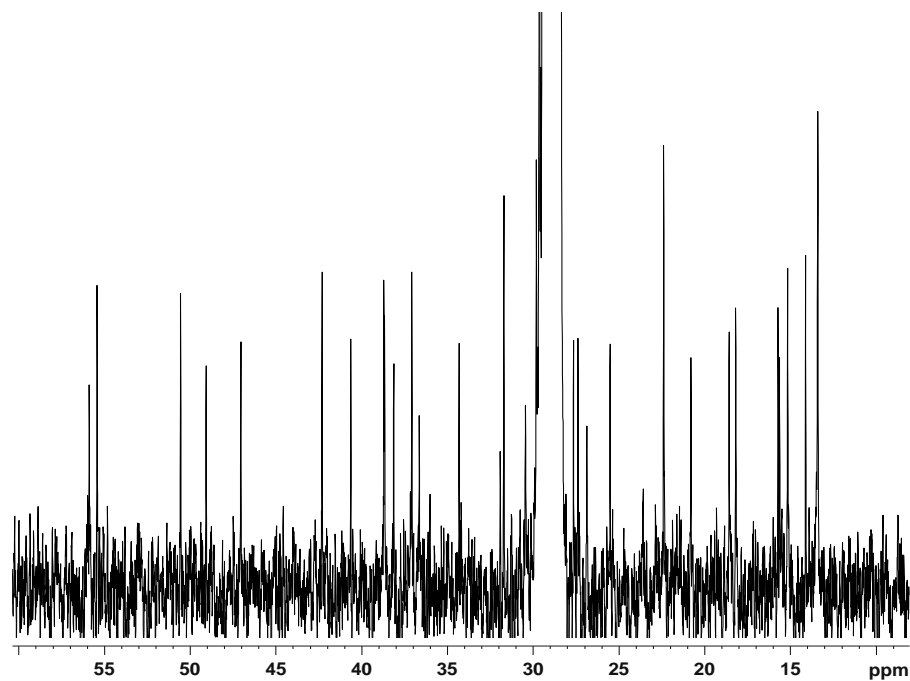


Figura 27. Ampliación de la zona 60-10 ppm del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

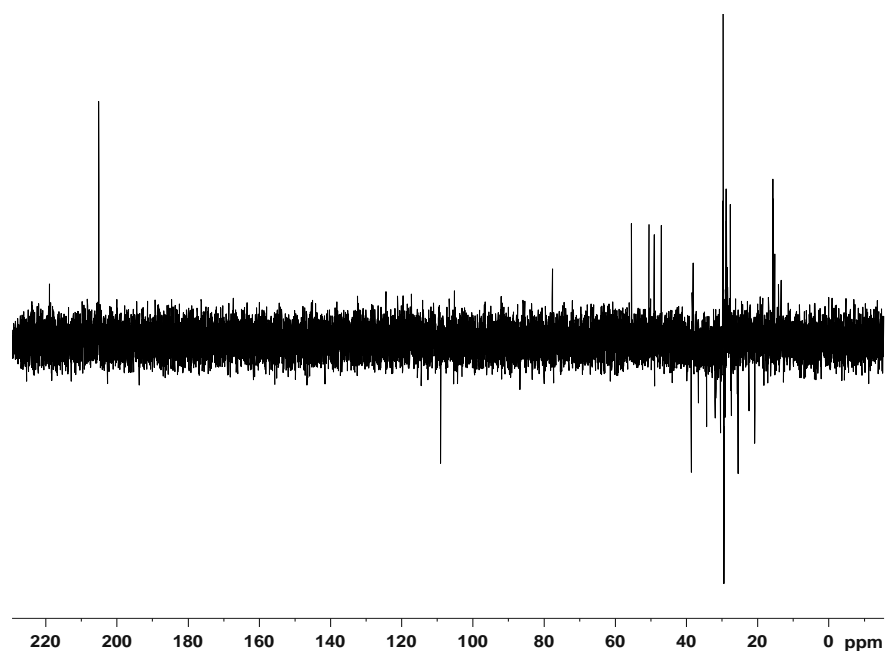


Figura 28. Espectro DEPT 135° del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

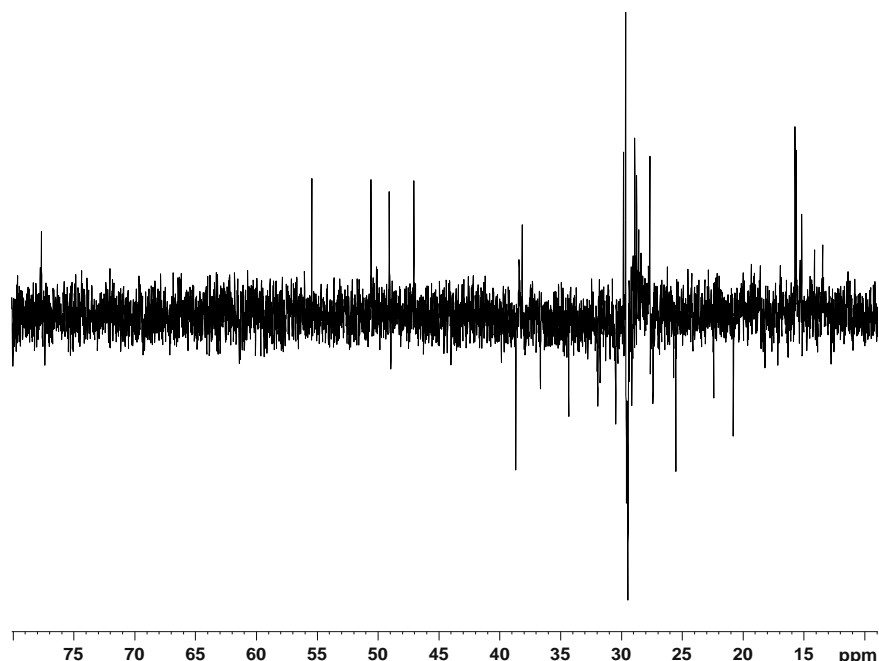


Figura 29. Ampliación zona 80-10 ppm del espectro DEPT 135° del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

El protón R-CH-OR ( $\delta_H$ : 3,12) asumido como el protón 3, apareció como doblete de doblete en el RMN  $^1H$  (Figura 24), esto debido a la interacción del mismo con los dos protones del carbono 2. Esta señal anterior, se confirma con los desplazamientos observados en forma de multiplete a  $\delta_H$  2,26 y  $\delta_H$  2,37; las cuales corresponden a los acoplamientos de los dos protones  $\alpha$  y  $\beta$  (diasterotópicos) con el protón del sistema R-CH-OR. Mediante los espectros de HMQC (Figura 30), se observó la interacción directa del carbono oxigenado a  $\delta_C$  77,65 con el protón 3 a  $\delta_H$  3,12 (Figura 31). Asimismo, mediante los espectros de HMBC se observó el punto de intercepción del carbono oxigenado con los protones metílicos geminales a  $\delta_H$  0,98 y 0,78 (Figura 33), los cuales se encuentran enlazados con los carbonos metílicos a  $\delta_C$  15,63 y 15,15 respectivamente (Figura 32). De igual manera, el carbono a  $\delta_C$  55,88 exhibió interacción a más de dos enlaces, con los protones metílicos  $\delta_H$  0,98; 0,88 y 0,78 (Figura 34). Los protones a desplazamientos  $\delta_H$  0,88 se encuentran directamente enlazados al carbono metílico a  $\delta_C$  15,71 (Figura 33).

Mediante los espectros de HMQC, se visualizó que el carbono metilénico a  $\delta_C$  27,64, muestra un enlace directo con un protón a  $\delta_H$  0,98 (Figura 32); además, este mismo carbono exhibió puntos de intercepción, mediante HMBC, con el protón metílico a  $\delta_H$  0,88 y un protón a 0,78 (Figura 34); éste último enlazado al carbono metínico a  $\delta_C$  55,43 (Figura 30). El carbono a  $\delta_C$  50,55 está enlazado directamente al protón  $\delta_H$  1,36 (Figura 32) y mostró conectividades cruzadas con los protones metílicos a  $\delta_H$  0,98 y 0,88 (Figura 34) (Tabla 12).

Tabla 12. Datos seleccionados de los espectros HMQC y HMBC para la estructura parcial A del compuesto B<sub>17.1</sub>.

HMQC		HMBC
$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
77,65	3,12	0,78 y 0,98
55,88	----	0,78; 0,88 y 0,98
50,55	1,36	0,98 y 0,88
27,64	0,98	0,78 y 0,88
15,71	0,88	0,98
15,63	0,98	3,12
15,15	0,78	3,12

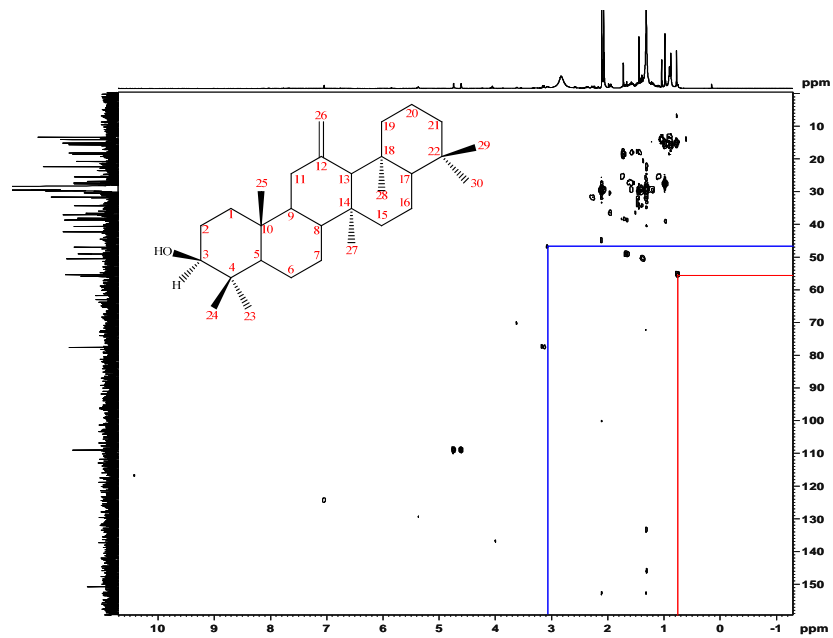


Figura 30. Espectro de HMQC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>

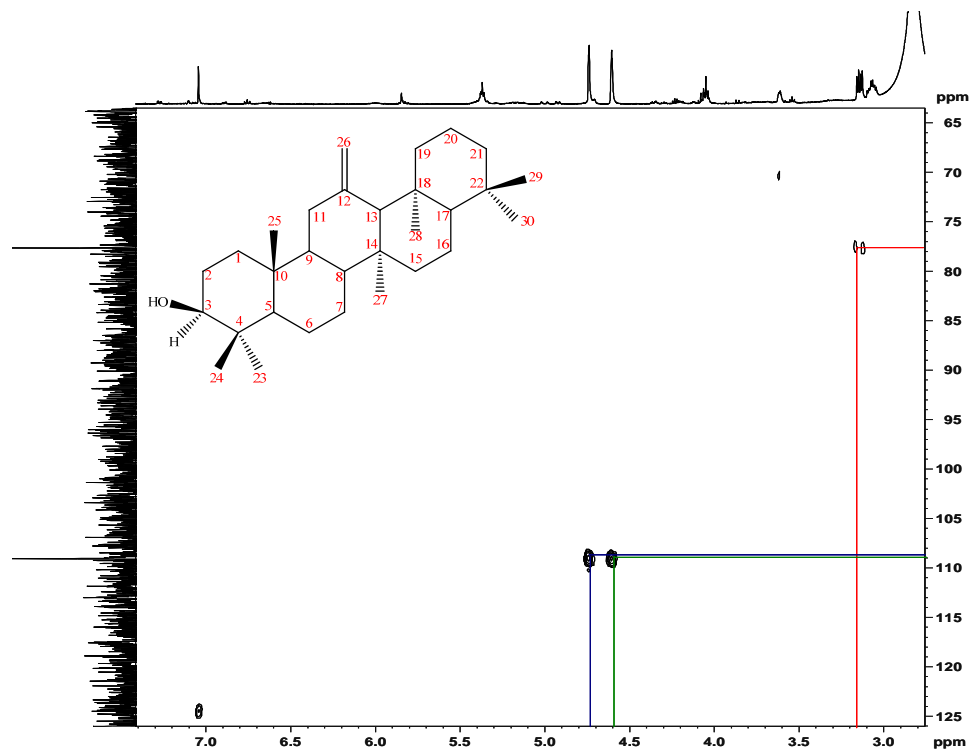


Figura 31. Ampliación A del espectro de HMQC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

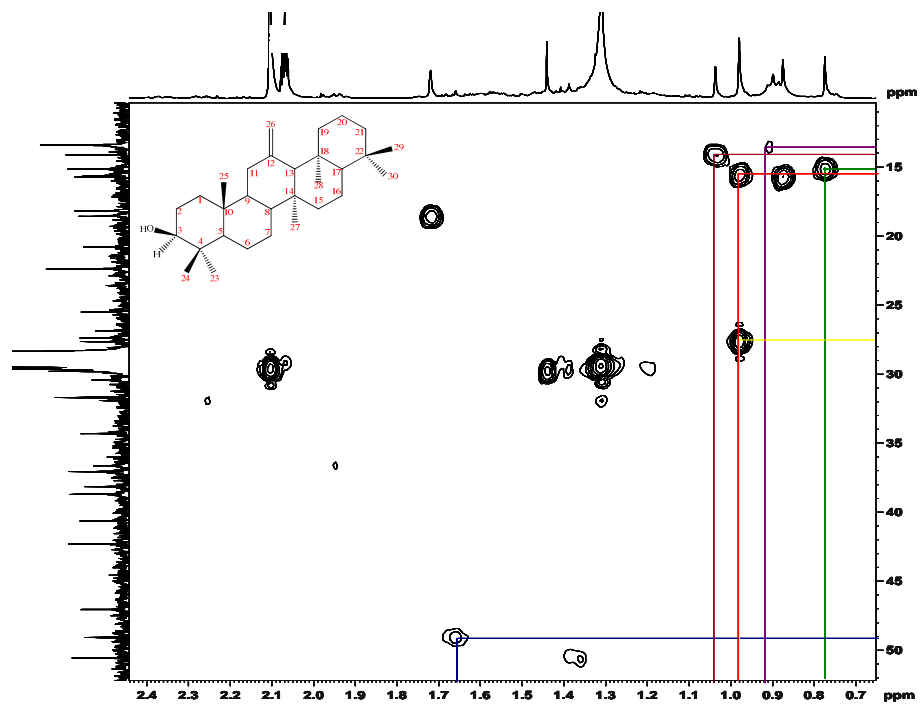


Figura 32. Ampliación B del espectro de HMQC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

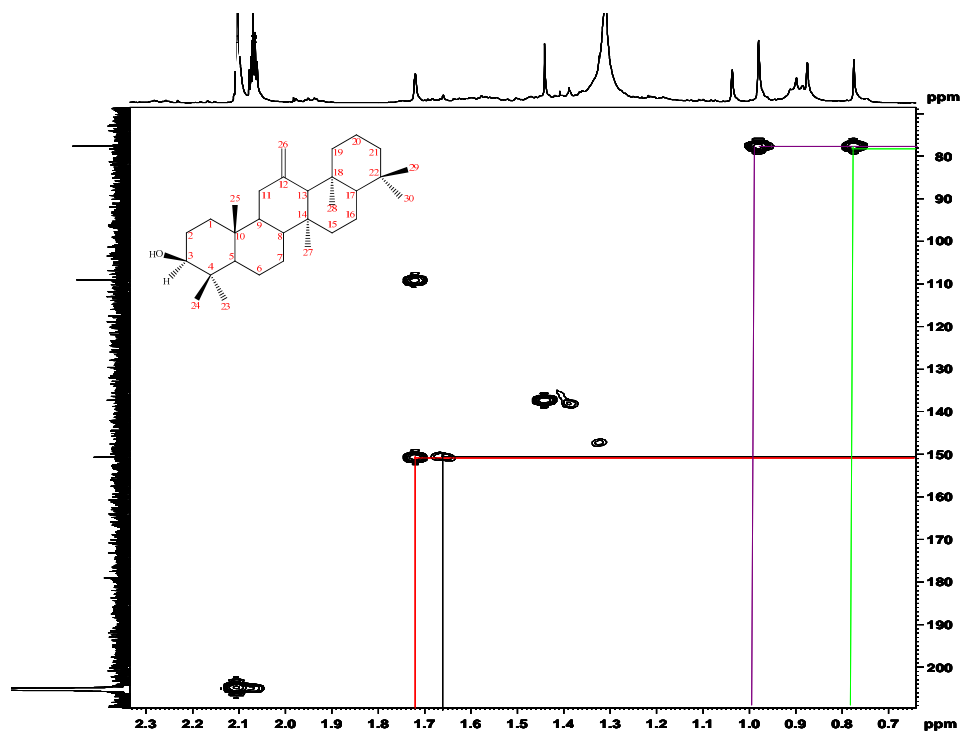


Figura 33. Ampliación A del espectro HMBC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

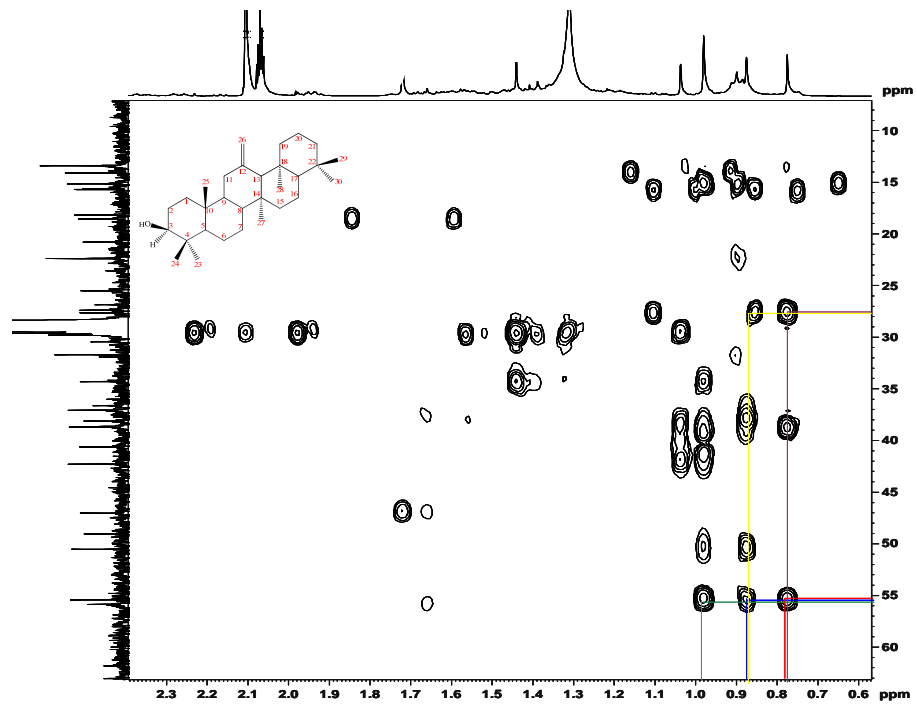


Figura 34. Ampliación B del espectro HMBC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

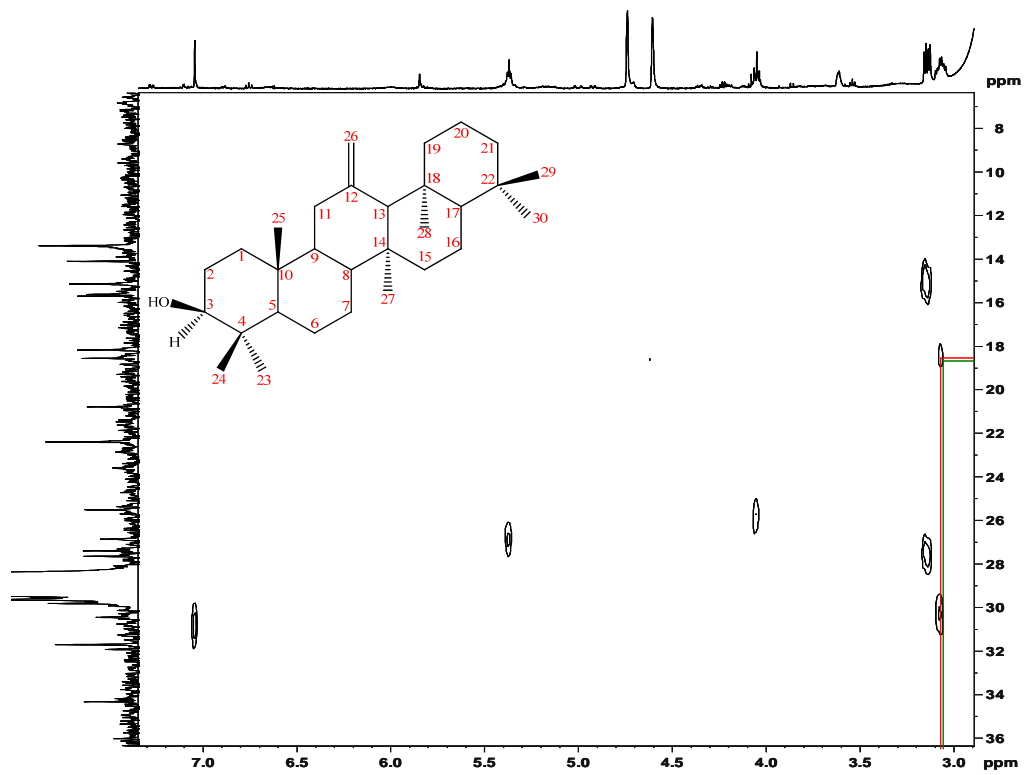


Figura 35. Ampliación C del espectro HMBC del producto sólido aislado B<sub>17.1</sub>.

Los enlaces e interacciones descritos anteriormente, permiten plantear una estructura parcial A para el compuesto B<sub>17.1</sub> (Figura 36). La estructura parcial A con algunas interacciones se observan en la Figura 37.

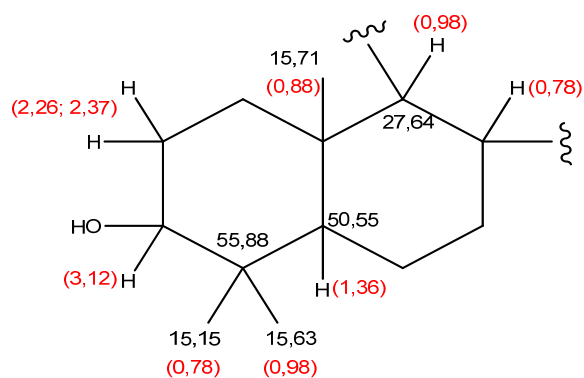


Figura 36. Estructura parcial A del compuesto B<sub>17.1</sub>.

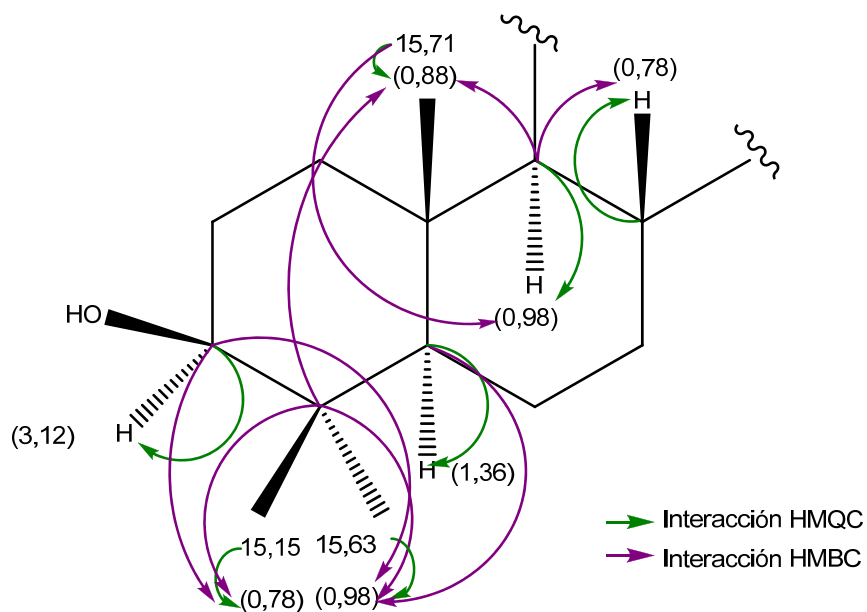


Figura 37. Estructura parcial A del compuesto B<sub>17.1</sub> y algunas de sus correlaciones por HMQC y HMBC.

A partir de los espectros de HMQC y HMBC, se observa que el carbono olefínico a  $\delta_C$  109,05 se enlaza directamente con los protones  $\delta_H$  4,58 ( $J$ : 1,50; 2,49) y 4,72 ( $J$ : 2,22) (Figura 31); los cuales interactúan espacialmente, según lo observado en los espectros COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 38), con el protón  $\delta_H$  1,72. Este protón  $\delta_H$  1,72 y el 1,11 están directamente enlazado al carbono metilénico a  $\delta_C$  25,50 (Figura 34). El otro carbono olefínico a  $\delta_C$  150,72 interactúa a más de dos enlaces con los protones  $\delta_H$  1,72 y 1,66 (Figura 33); este último protón esta enlazado al carbono a  $\delta_C$  49,07 (Figura 32).

El carbono metílico a  $\delta_C$  13,40 está enlazado con los protones metílicos a  $\delta_H$  0,91 (Figura 32); este carbono presenta interacción con protones cercanos a  $\delta_H$  0,78 y 1,04 (Figura 34). El protón metínico  $\delta_H$  0,78, según se aprecia en el espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 39), mostró correlación con los protones vecinos  $\delta_H$  0,98 y 0,91. Los protones metílicos a  $\delta_H$  1,04 se encuentran enlazados al carbono metílico  $\delta_C$  14,10 (Figura 32); el cual interactúa con los protones a  $\delta_H$  0,91, según lo observado por HMBC (Figura 34). El protón a campo bajo 3,08 se encuentra enlazado, según lo observado en el HMQC, al carbono  $\delta_C$  47,03 (Figura 30); este carbono exhibió picos cruzados, según HMBC, con los protones metílicos  $\delta_H$  1,72 y el protón metínico a  $\delta_H$  1,66 (Figura 34).

Finalmente, se observan correlaciones significativas en el HMBC entre el carbono a  $\delta_C$  27,64 y el protón metilénico a  $\delta_H$  1,11; el carbono a  $\delta_C$  55,43 y el protón metínico a  $\delta_H$  1,66; el carbono cuaternario a  $\delta_C$  42,30 y los protones metílicos a  $\delta_H$  1,04; el carbono cuaternario a  $\delta_C$  40,63 y los protones metílicos a  $\delta_H$  1,04; igualmente, los carbonos metílicos  $\delta_C$  18,56 y 18,18 interactúan con los protones metilénicos a  $\delta_H$  1,84 y 1,56 (Figuras 34 y 35); el carbono a  $\delta_C$  18,56 también se correlaciona con el protón a  $\delta_H$  3,08. Las interacciones indicadas por HMQC y HMBC, se detallan en la Tabla 13.



El espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  obtenido para este compuesto fue muy complejo, lo que dificultó la observación de este tipo de interacciones ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), se tomó información sólo en ciertas asignaciones realizadas a la estructura probable del compuesto B<sub>17.1</sub>.

Las conectividades e interacciones descritas anteriormente, permiten plantear una estructura parcial B para el compuesto B<sub>17.1</sub> (Figura 40). La estructura parcial B con algunas interacciones se observan en la Figura 41.

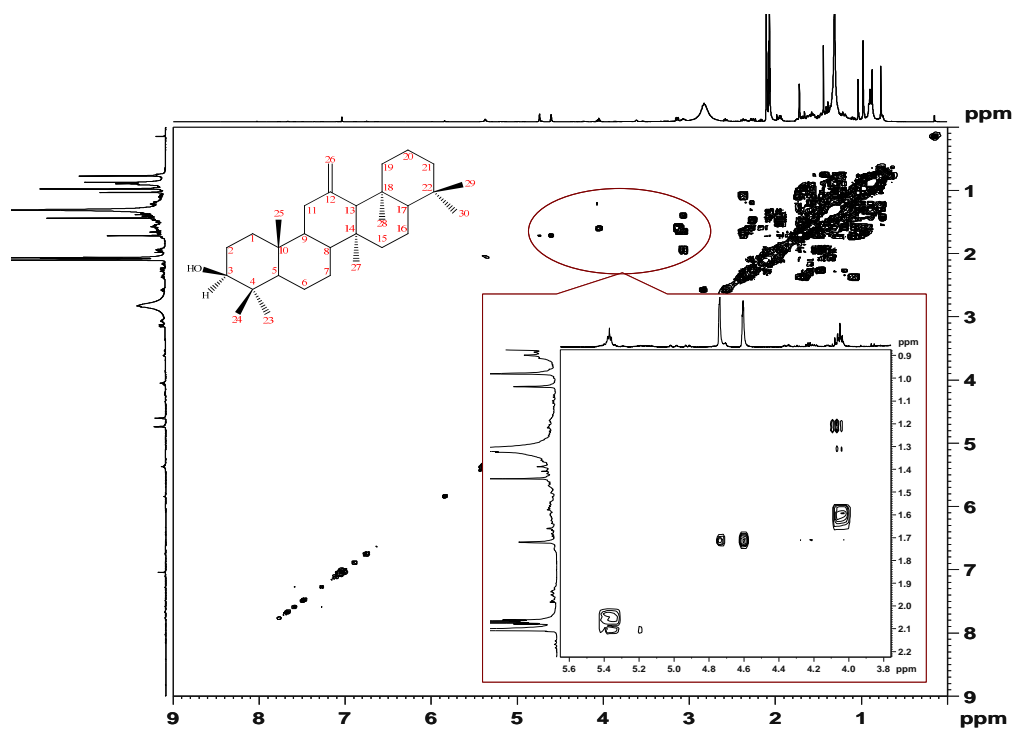


Figura 38. Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del compuesto B<sub>17.1</sub>.

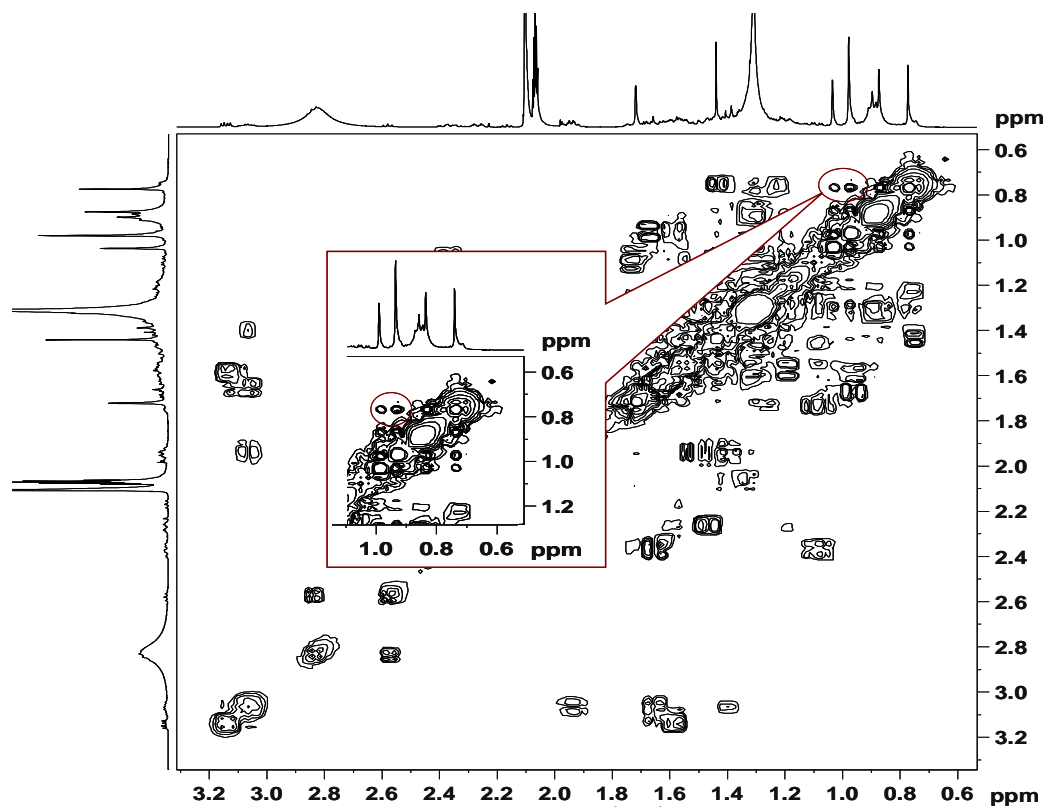


Figura 39. Ampliación espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del compuesto B<sub>17.1</sub>.

Tabla 13. Datos seleccionados de los espectros HMQC y HMBC para la estructura parcial B del compuesto B<sub>17.1</sub>.

HMQC		HMBC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
150,72	----	1,66 y 1,72	----
109,05	4,58 y 4,72	1,72	1,72
55,43	0,78	1,66	0,91y 0,98
49,07	1,66	----	----
47,03	3,08	1,66 y 1,72	----

42,30	----	0,98 y 1,04	----
40,63	----	1,04	----
27,64	0,98	0,78 y 1,11	----
25,50	1,72 y 1,11	----	----
18,56	1,72	1,58; 1,64 y 3,08	----
18,18	1,44	1,58 y 1,84	----
14,10	1,04	0,91	----
13,40	0,91	0,78	----

---

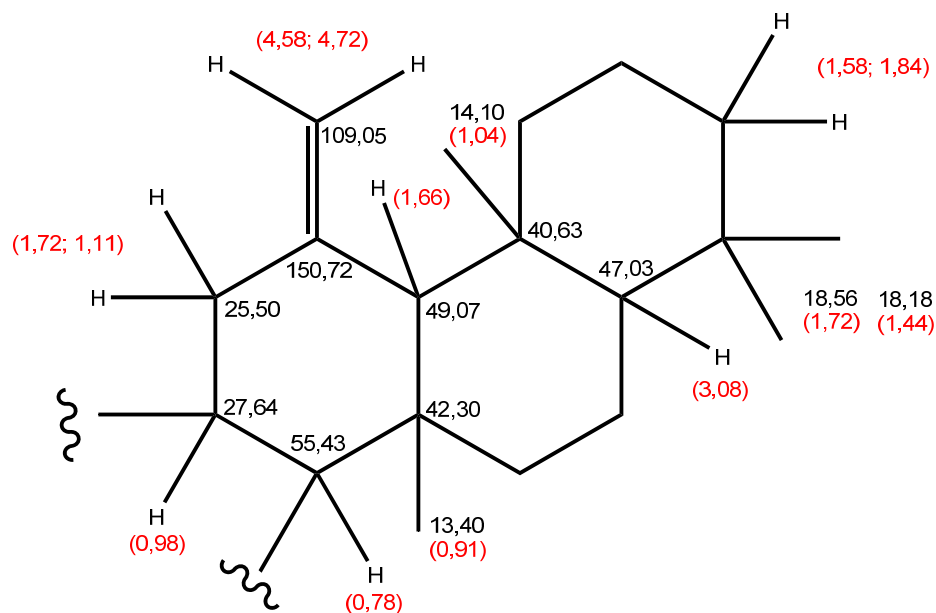


Figura 40. Estructura parcial B del compuesto B<sub>17.1</sub>.

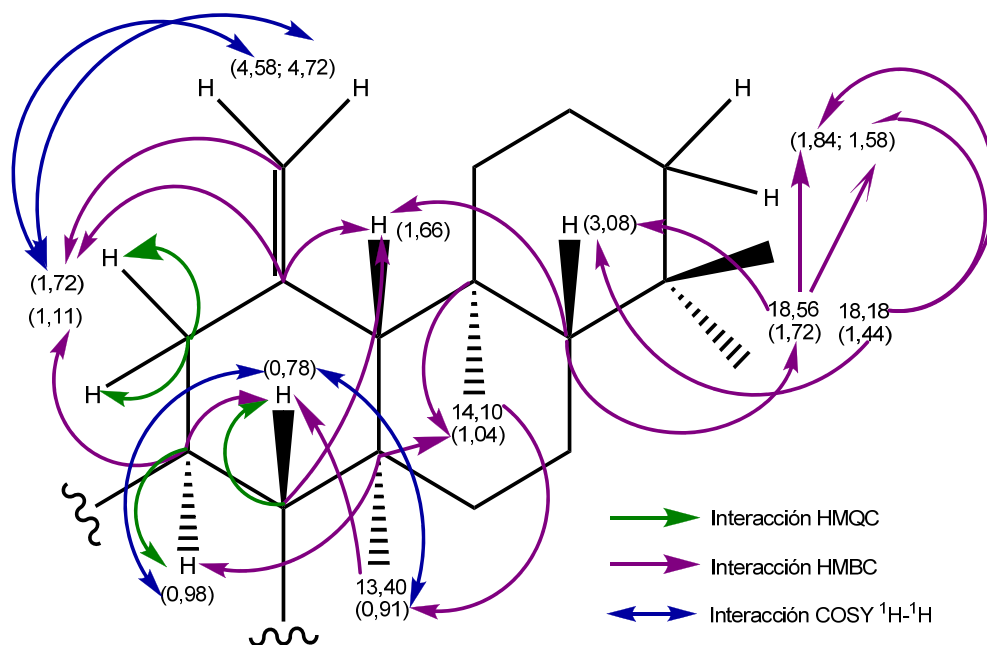


Figura 41. Estructura parcial B del compuesto B<sub>17.1</sub> y algunas de sus correlaciones por HMQC, HMBC y COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  propuestas.

La estructura propuesta para el compuesto B<sub>17.1</sub> es un derivado hidroxílico de un triterpeno pentacíclico con esqueleto tipo tetrahimanos. Los triterpenos pentacíclicos más abundantes presentan regularmente los carbonos oxigenados en las posiciones 2, 3, 6 y 23; la numeración en los anillos sigue el sistema esteroidal (Figura 42).

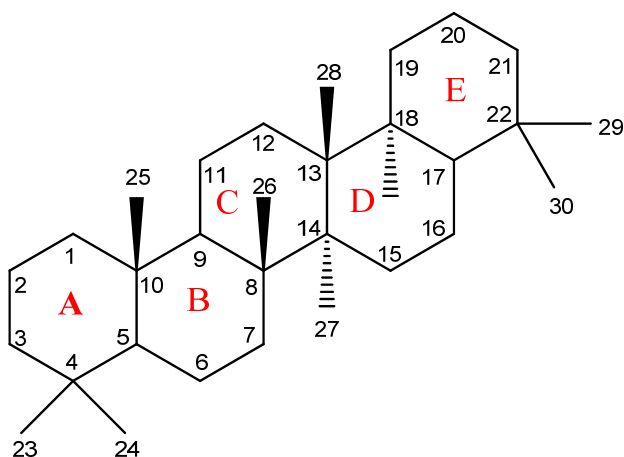


Figura 42. Estructura y numeración del esqueleto de los triterpenos pentacíclicos tipo tetrahimanos.

La estereoquímica de la estructura probable se sugirió a partir de la información biogenética de este tipo de compuestos y la comparación con estructuras triterpenoides con esqueletos tipo tetrahimanos, como es el caso del tetrahimanol (Figura 43) [3].

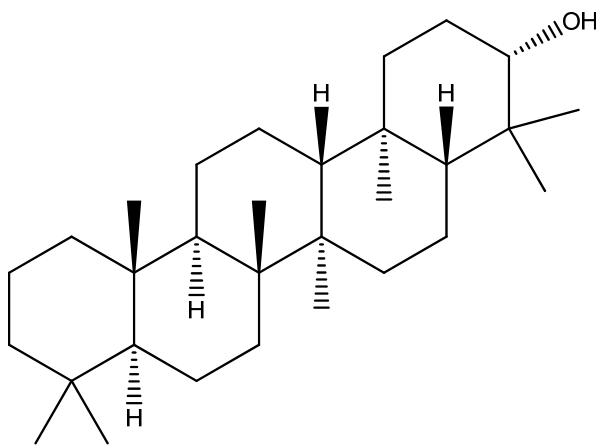


Figura 43. Estructura del triterpeno pentacíclico tetrahimanol.

La estructura propuesta para el compuesto B<sub>17.1</sub>, es un triterpeno pentacíclico que posee un grupo hidroxilo en el carbono 3, un doble enlace exocíclico en el anillo C y siete grupos metilos distribuidos según la información bibliográfica (Figura 44) [3]; además, se muestran algunas de las interacciones observadas en los espectros (Figura 45). Es importante resaltar que este es el primer reporte de este metabolito en la literatura.

A este compuesto novedoso se le realizaron los ensayos de citotoxicidad, los cuales revelaron que éste no es citotóxico. Los resultados obtenidos por el método de MTS/PMS (Figura 46), reflejó que este compuesto exhibe una citotoxicidad relativamente baja (12%) a concentraciones cercanas a los 100 µg/ml, este efecto se verificó mediante el método de SRB, donde se visualiza una inhibición del 50% de las células (IC<sub>50</sub>) a concentraciones mayores a los 80 µg/ml y además, no hubo inhibición total del crecimiento (ITC), ni se observó algún efecto citotóxico de 50% de las células (CL<sub>50</sub>). Estos resultados satisfactorios de citotoxicidad obtenidos para el compuesto B<sub>17.1</sub>, permiten experimentar en un amplio rango de concentraciones con respecto a los ensayos antiinflamatorios, para detectar si éste es el responsable de la antibiosis observada en la fracción soluble de cloroformo.



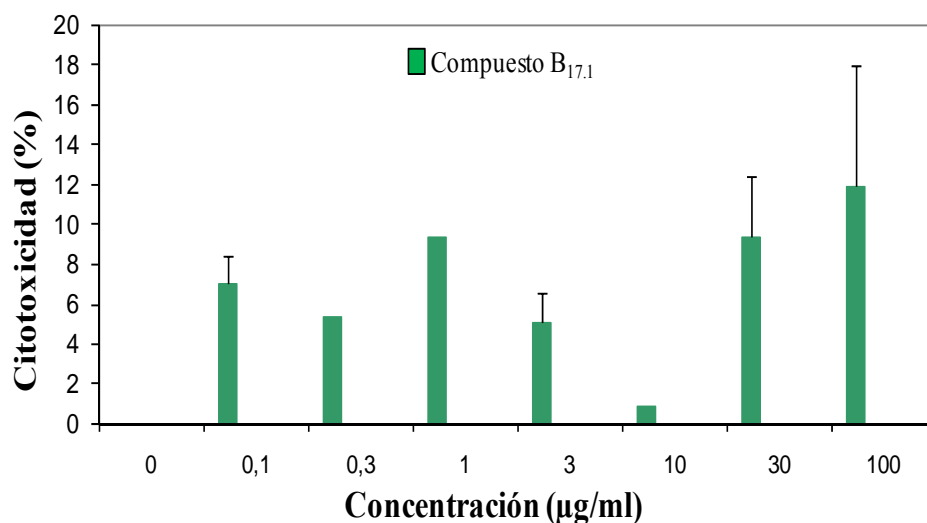


Figura 46. Resultados del ensayo citotóxico del compuesto B<sub>17.1</sub>, aislado de la FSC de la especie *V. cayennensis*, mediante el método de (MTS/PMS)

- Análisis espectrométrico de la subfracción B17.2

Con respecto a la solución madre (B<sub>17.2</sub>), se le realizaron CCF, con sistemas diferentes de solventes, observándose sólo 2 manchas de distintos R<sub>f</sub>, por lo que se le realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG/EM). El cromatograma de gases obtenido reflejó la presencia de dos componentes en mayor proporción (Figura 47), los cuales se identificaron y verificaron mediante sus patrones de fragmentación.

Los compuestos identificados fueron el 2, 4-bis (1,1-dimetiletil) fenol (A) y el éster dietílico del ácido 1, 2-bencenodicarboxílico (B).



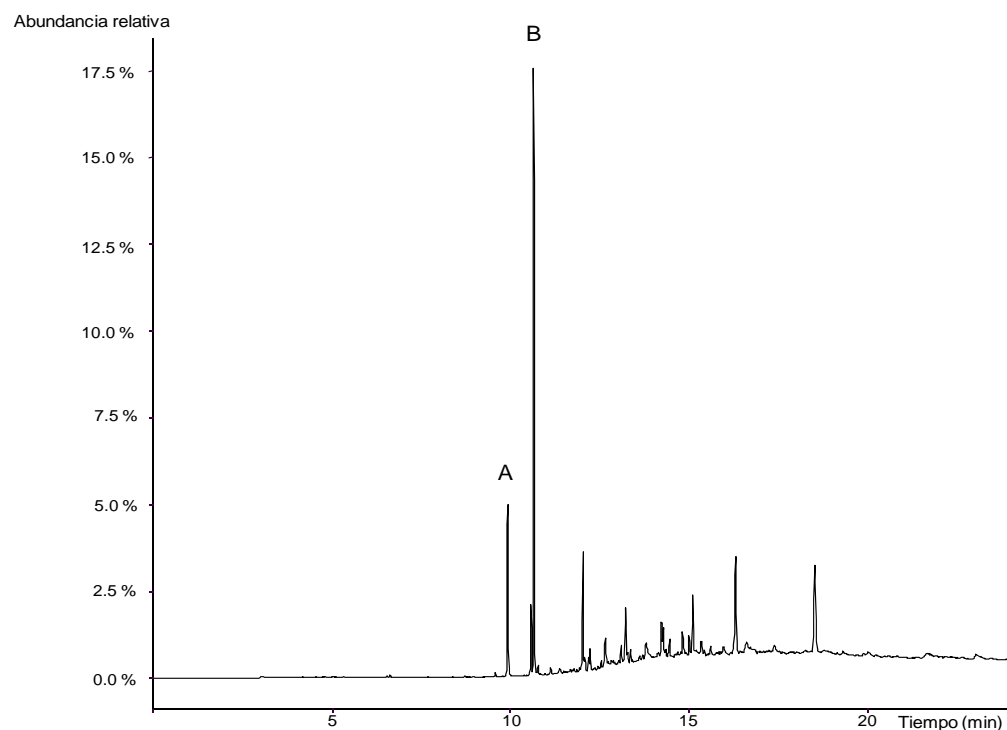


Figura 47. Cromatograma de gases de la subfracción B<sub>17.2</sub>.

#### Obtención de 2,4- bis (1,1-dimetiletil) fenol (A)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 9,9170 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 48), evidenció el ión molecular a  $m/z$  206 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{14}H_{22}O$  (calculado 206,1476 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  206 [ $M^+$ ], 191 (pico base) [ $M^+ - CH_3$ ], 163 [ $M^+ - C_3H_{11}$ ], 91 [ $M^+ - C_4H_{11}O$ ] y 57 [ $M^+ - C_7H_{16}$ ]. Su esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 49).

El 2,4- bis(1,1-dimetiletil) fenol, es un compuesto que ha sido aislado de la especie animal *Scolopendra subspinipes*, al cual se le ha determinado efecto antioxidante [45]

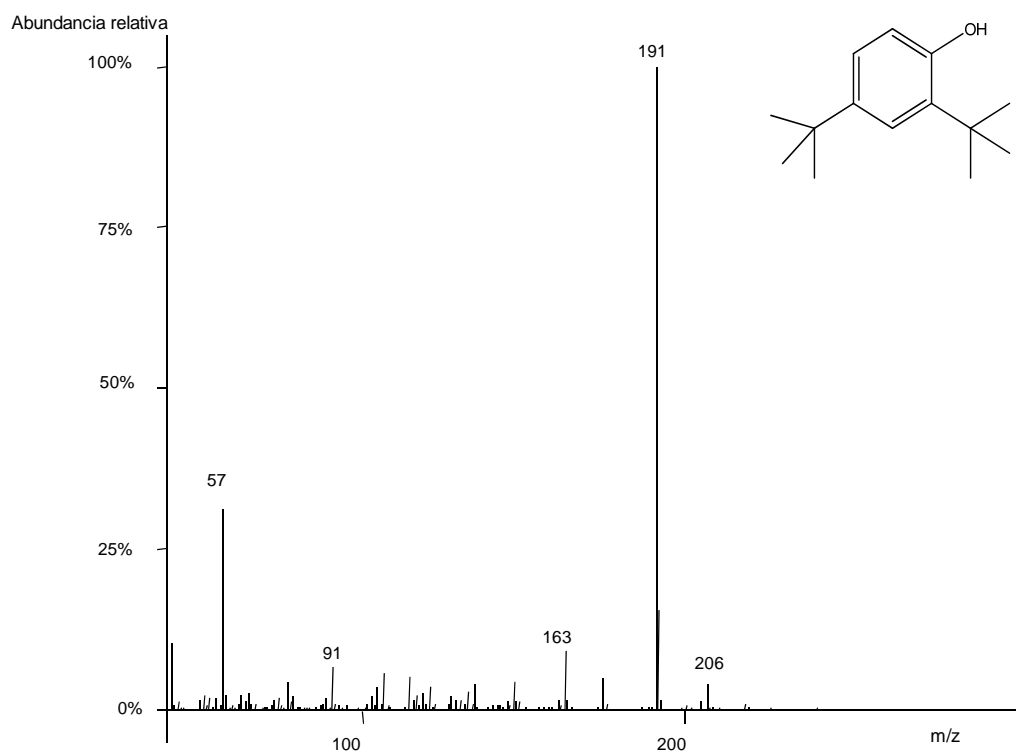


Figura 48. Espectro de masas del 2,4- bis(1,1-dimetiletil) fenol.

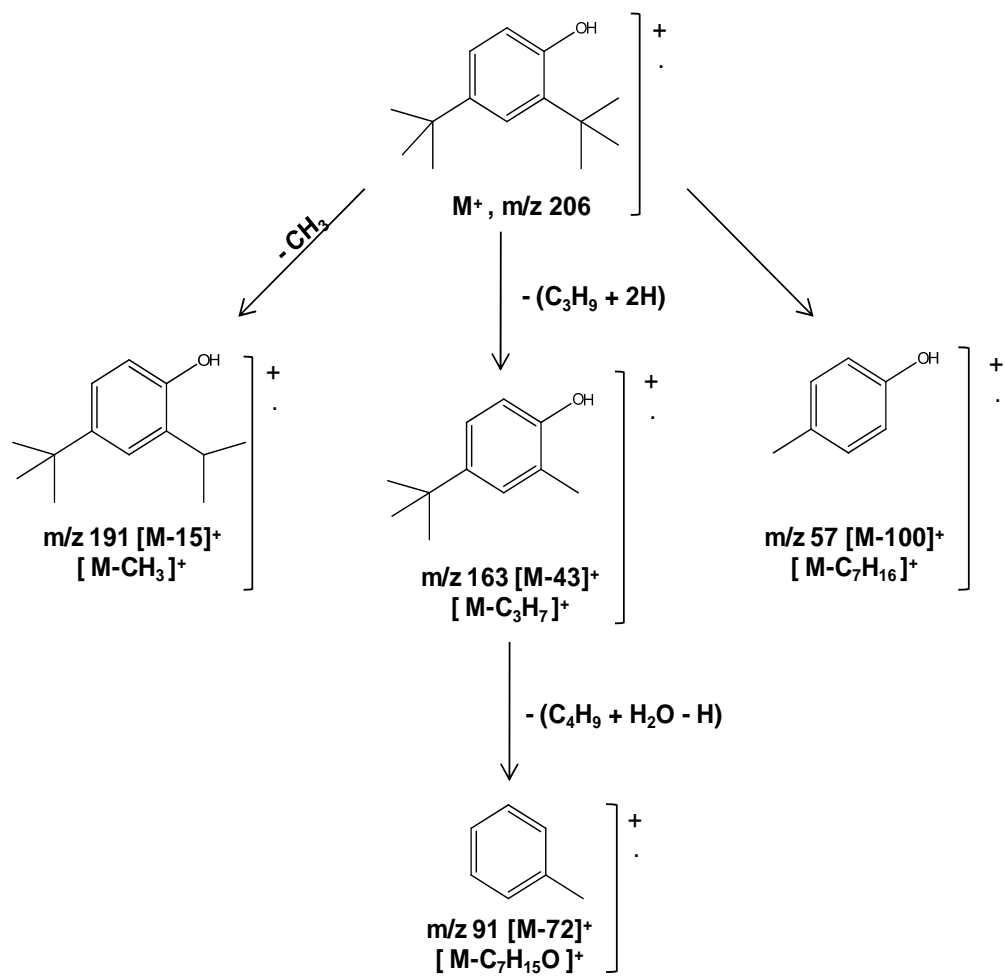


Figura 49. Patrón de fragmentación de masas del 2,4- bis(1,1-dimetiletil) fenol.

## Obtención del éster dietílico del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico (B)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 10,7000 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 50), mostró el ión molecular a  $m/z$  222 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{12}H_{14}O_4$  (calculado 222,0912 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  222 [ $M^+$ ], 177 [ $M^+ - CO_2H$ ], 149 (pico base) [ $M^+ - C_3H_5O_2$ ] y 76 [ $M^+ - C_3H_6O_2$ ]. Su esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 51).

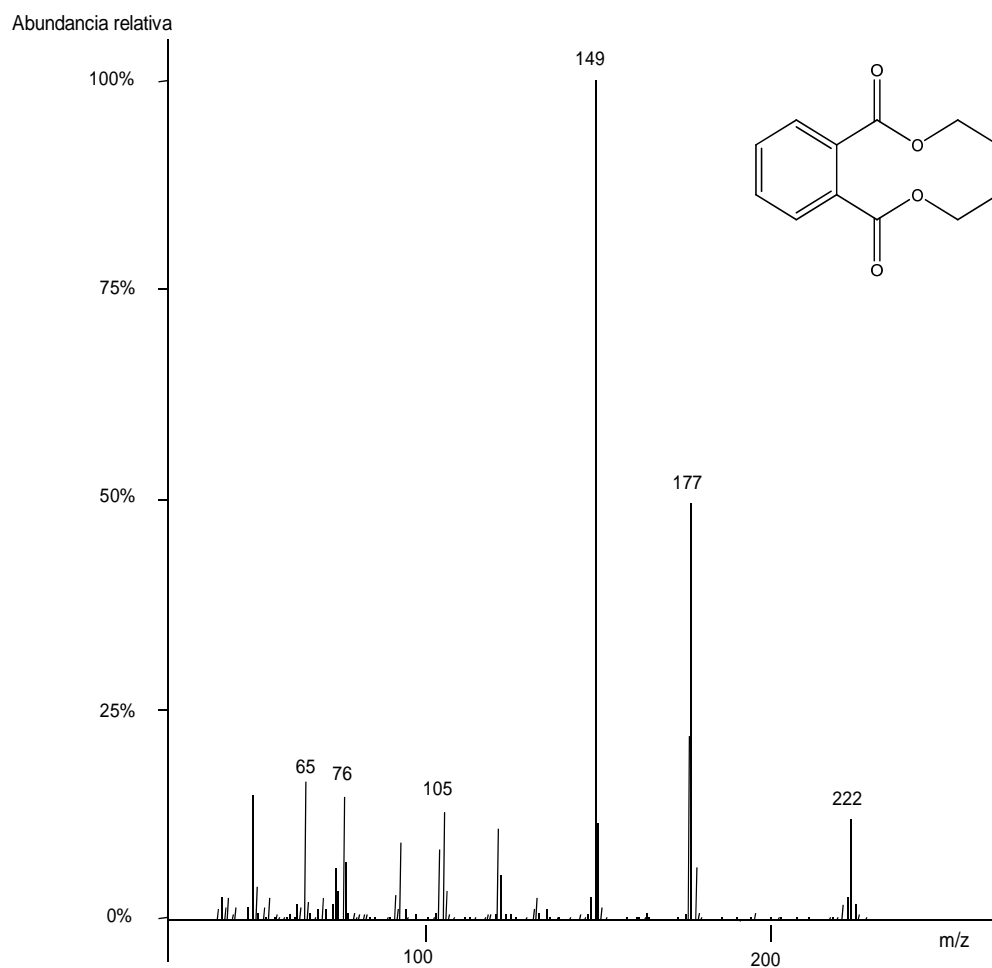


Figura 50. Espectro de masas del éster dietílico del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico.

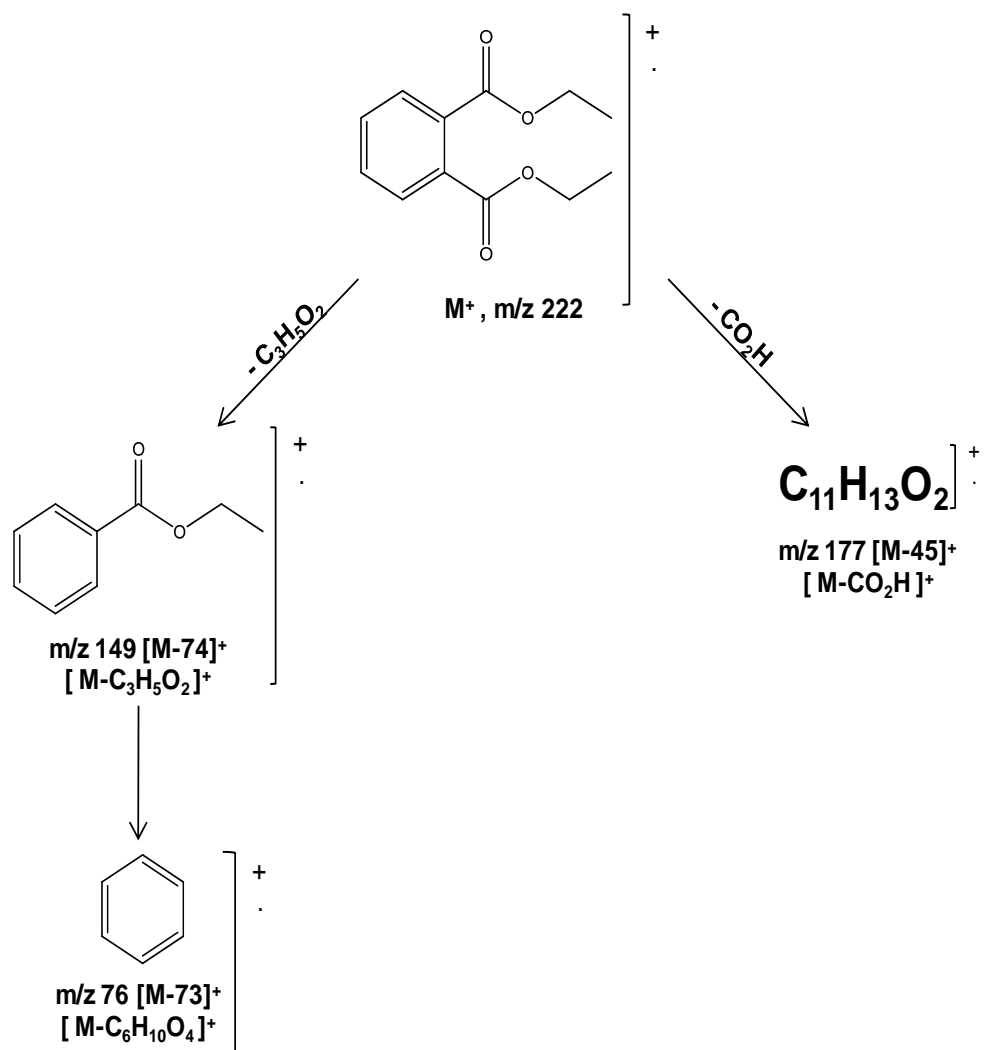


Figura 51. Patrón de fragmentación del éster dietílico del ácido 1, 2-bencenodicarboxílico.

- Partición de la fracción soluble en acetona (FSA)

Esta fracción se cromatografió debido a los resultados observados en los ensayos antibacterianos. Esta fracción mostró un efecto bactericida moderado y un efecto bacteriostático significativo frente a la cepa *Shigella* sp.

Se partitionaron 4,88 g de la muestra en una columna cromatográfica de 400 ml empaquetada con 146,50 g de sílica gel 70-230 mesh, en proporción 1:30 (gramos de compuesto: gramos de sílica). Los solventes utilizados para la elución fueron hexano (hex), mezclas de polaridad ascendente de hex-cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ),  $\text{CHCl}_3$ -acetato de etilo (ActOEt), ActOEt-acetona (Act), Act-metanol (MeOH) y MeOH-agua (Figura 52). De esta cromatografía se obtuvieron 353 eluatos de 125 y 50 ml cada uno como se muestra en la Tabla 15.

A los eluatos obtenidos de la partición de la fracción soluble en acetona se les aplicó cromatografía en capa fina (CCF), agrupándose 21 subfracciones (Tabla 16) por comparación de sus factores de retención ( $R_f$ ), utilizándose como revelador la luz UV.

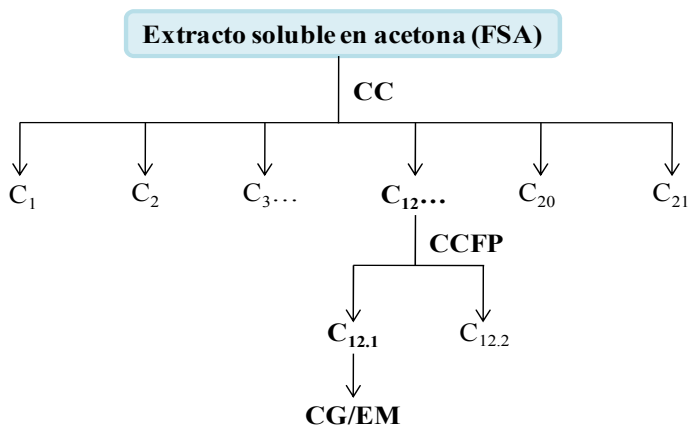


Figura 52. Esquema de partición de la fracción soluble en acetona (FSA).

Tabla 14. Solventes utilizados en la CC de la FSA de *V. cayennensis*.

<b>Eluatos</b>	<b>Solventes</b>	<b>Porcentaje (% V/V)</b>
1-6	hexano	100
7-10	hex: CHCl <sub>3</sub>	75:25
11-24	hex: CHCl <sub>3</sub>	50:50
25-31	hex: CHCl <sub>3</sub>	30:70
32-34	hex: CHCl <sub>3</sub>	10:90
35-43	CHCl <sub>3</sub>	100
44-55	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	90:10
56-63	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	80:20
64-73	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	70:30
74-87	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	60:40
88-110	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50
111-121	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	40:60
122-130	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	30:70
131-139	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	20:80
140-146	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	10:90
147-156	AcOEt	100

157-165	AcOEt:Acet	90:10
166-172	AcOEt:Acet	80:20
173-187	AcOEt:Acet	70:30
188-200	AcOEt:Acet	60:40
201-214	AcOEt:Acet	50:50
215-223	AcOEt:Acet	40:60
224-232	AcOEt:Acet	30:70
233-245	AcOEt:Acet	20:80
246-255	AcOEt:Acet	10:90
256-265	acetona	100
266-282	Acet:MeOH	90:10
283-295	Acet:MeOH	70:30
296-305	Acet:MeOH	50:50
306-316	Acet:MeOH	30:70
317-327	Acet:MeOH	10:90
328-337	MeOH:H <sub>2</sub> O	90:10
338-348	MeOH:H <sub>2</sub> O	70:30
349-353	MeOH:H <sub>2</sub> O	50:50

---



Tabla 15. Subfracciones obtenidas de la fracción soluble en acetona.

<b>Eluatos</b>	<b>Subfracción</b>	<b>Masa (mg)</b>
1-7	C <sub>1</sub>	4,67
8-15	C <sub>2</sub>	2,10
16-22	C <sub>3</sub>	9,60
23-42	C <sub>4</sub>	2,64
43-54	C <sub>5</sub>	1,68
55-61	C <sub>6</sub>	1,30
62-65	C <sub>7</sub>	0,63
66-72	C <sub>8</sub>	1,11
73-81	C <sub>9</sub>	1,96
82	C <sub>10</sub>	0,41
83-89	C <sub>11</sub>	1,35
90-256	C <sub>12</sub>	244,83
257	C <sub>13</sub>	2,53
258	C <sub>14</sub>	2,05
259-321	C <sub>15</sub>	130,57
322-327	C <sub>16</sub>	50,25
328-353	C <sub>17</sub>	25,00

---

Masa total: 482,68; % de recuperación: 98,90%.

– Partición de la subfracción C<sub>12</sub>, mediante CCFP

A la subfracción (C<sub>12</sub>), se le realizó CCF, con sistemas diferentes de solventes, observándose pocos componentes de distintos R<sub>f</sub>, por lo que se le realizó una CCFP. Se cromatografió 64,9 g de muestra en placas cromatográficas de 20x20 cm<sup>2</sup>, cubiertas con una capa de 1,5 mm de espesor de óxido de aluminio y como sistema de solventes una mezcla de hex-CHCl<sub>3</sub> (1:1), luego, se reveló con luz UV evidenciándose la presencia de cuatro bandas con R<sub>f</sub> no muy bien definidos. Éstas fueron separadas y extraídas con cloroformo. Seguidamente, se les realizó CCF a cada banda y se observó que de las cuatro bandas, tres mostraban un mismo desplazamiento, por lo que se unieron. Como resultado final de la CCFP se obtuvieron 2 subfracciones (Tabla 16).

Tabla 16. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C<sub>12.1</sub>.

Subfracción	Masa (mg)
C <sub>12.1</sub>	58,60
C <sub>12.2</sub>	0,63

Masa total: 59,23 ; % de recuperación: 91,26%

• Análisis espectrométrico de la subfracción C<sub>12.1</sub>

A la subfracción (C<sub>12.1</sub>), se le realizaron CCF, con sistemas diferentes de solventes, observándose cuatro manchas de R<sub>f</sub> muy cercanos, por lo que se le realizó una cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG/EM). El

cromatógrama de gases obtenido reflejó la presencia de cinco componentes (Figura 53), los cuales se identificaron y verificaron mediante sus patrones de fragmentación.

Los compuestos identificados fueron el 1, 4-diona-2, 6-bis(1,1-dimetil)etil-2, 5-ciclohexadieno (A); 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona (B); el 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehido (C); 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona (D) y ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico (E), observandose que el componente C se encuentra en mayor proporción.

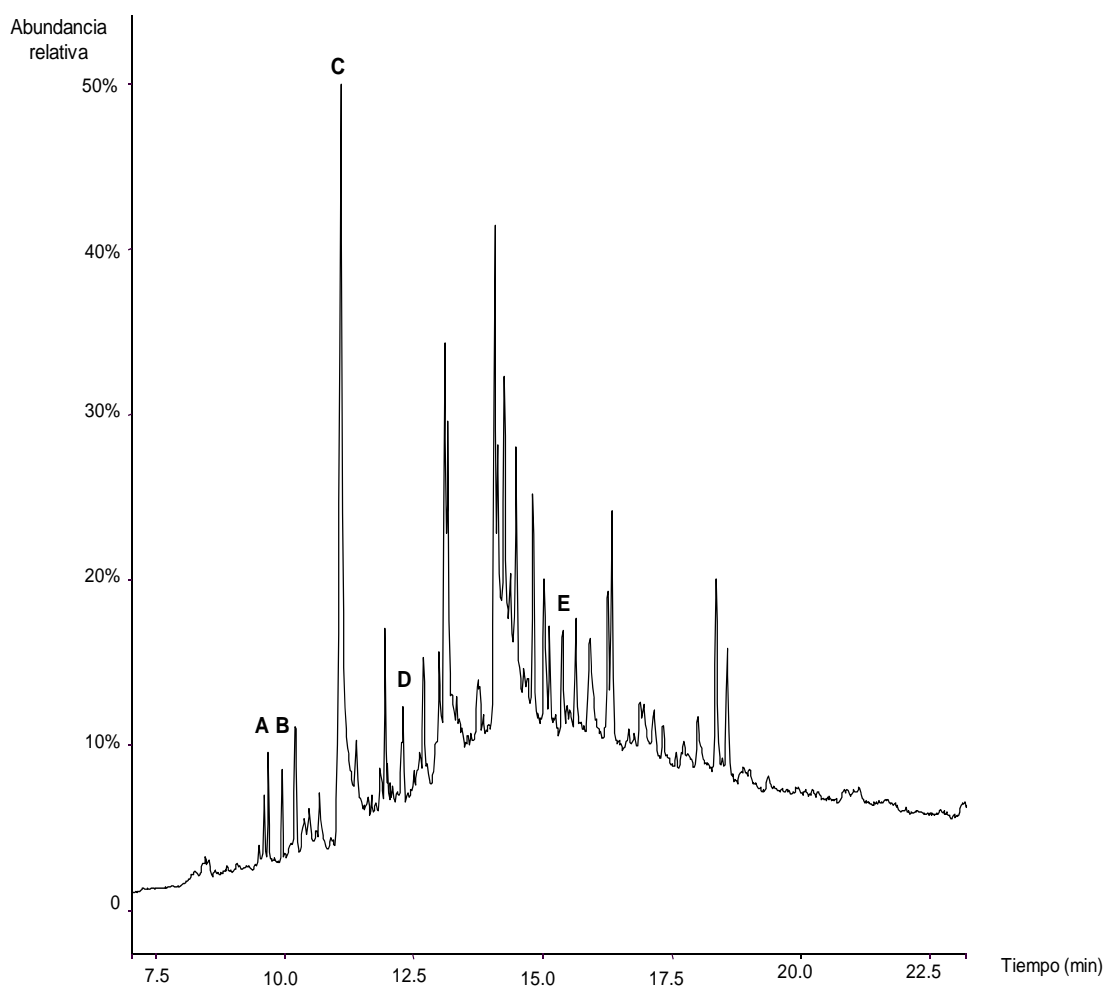


Figura 53. Cromatógrama de gases de la subfracción C<sub>12.1</sub>.

## Obtención del 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno (A)

Este metabolito, se observó a un tiempo de retención de 9,6160 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 54), evidenció el ión molecular a  $m/z$  220 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{14}H_{20}O_2$  (calculado 220,1360 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  220 [ $M^+$ ], 177 (pico base) [ $M^+ - C_2H_3O$ ], 135 [ $M^+ - C_5H_9O$ ] y 67 [ $M^+ - C_5H_8$ ]. Cuyo esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 55).

El 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno, es un compuesto al cual se le ha determinado efecto oxidante [46].

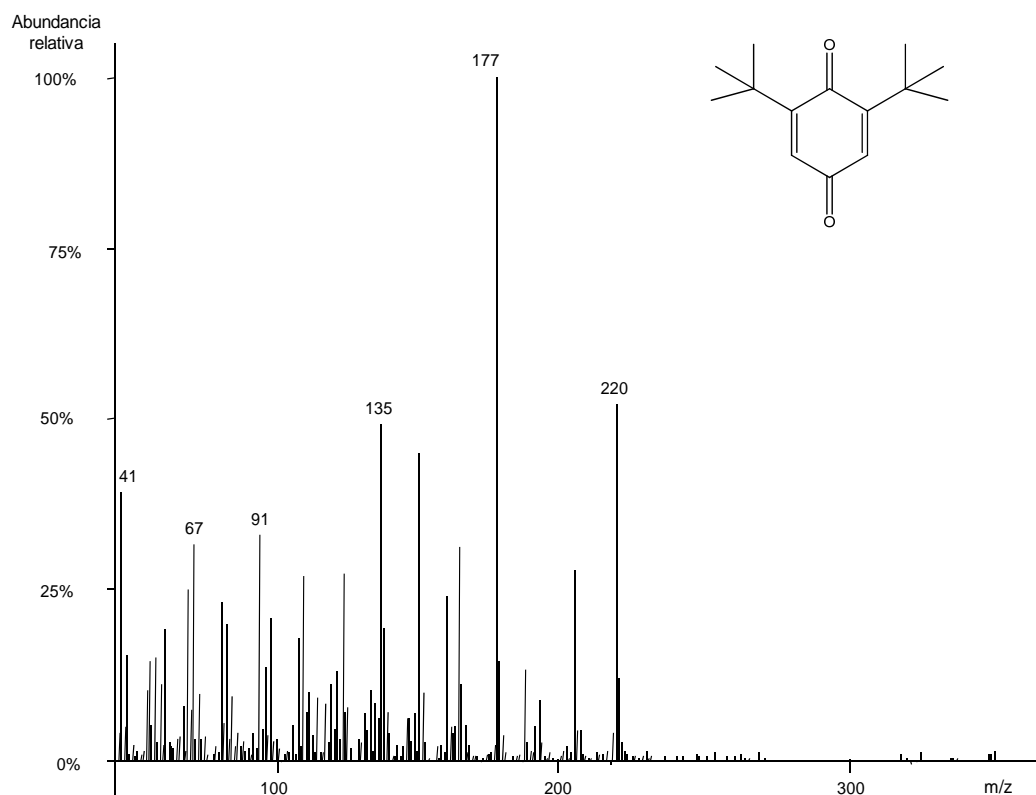


Figura 54. Espectro de masas del 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno.

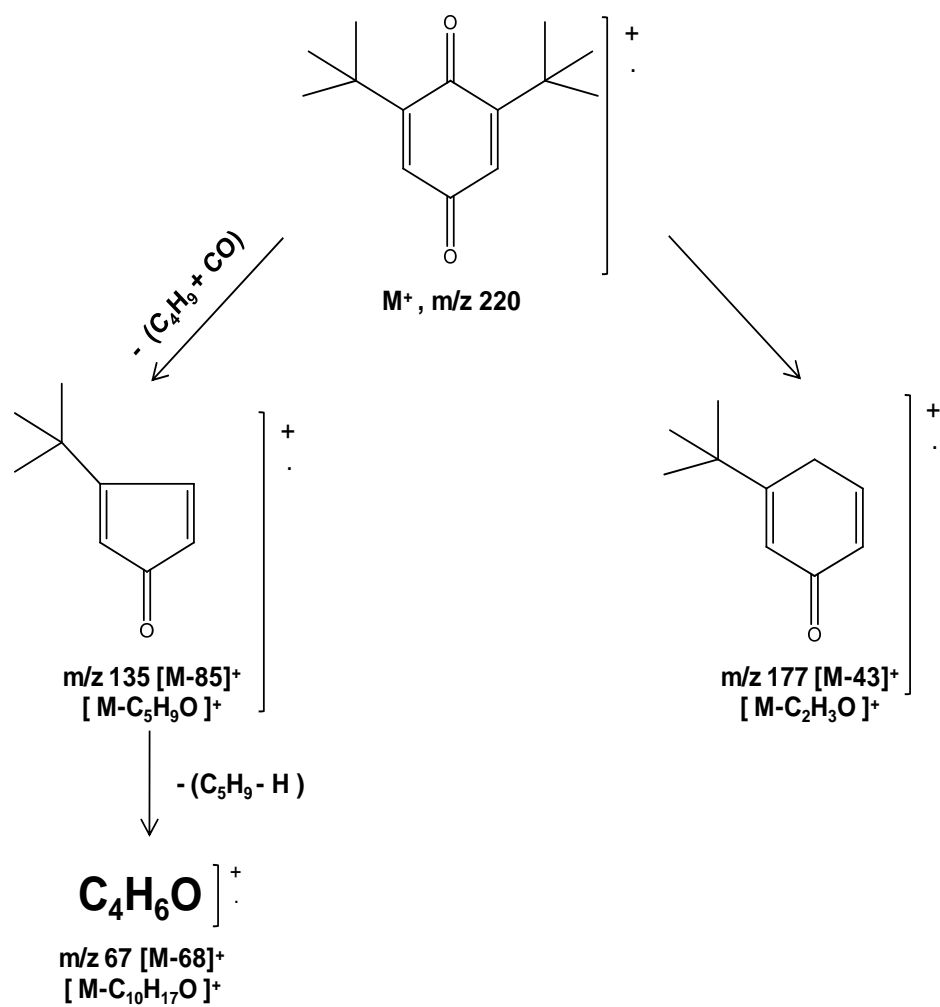


Figura 55. Patrón de fragmentación del 1, 4-diona-2, 6-bis (1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno.

## Obtención del 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona (B)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 9,6830 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 56), evidenció el ión molecular a  $m/z$  218 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O$  (calculado 218,1576 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  218 [ $M^+$ ], 203 [ $M^+ - CH_3$ ], 189 [ $M^+ - C_2H_6$ ], 175 [ $M^+ - C_3H_6$ ], 161 (pico base) [ $M^+ - C_3H_5O$ ], 147 [ $M^+ - C_5H_{14}$ ] y 105 [ $M^+ - C_8H_{20}$ ]. Cuyo esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 57).

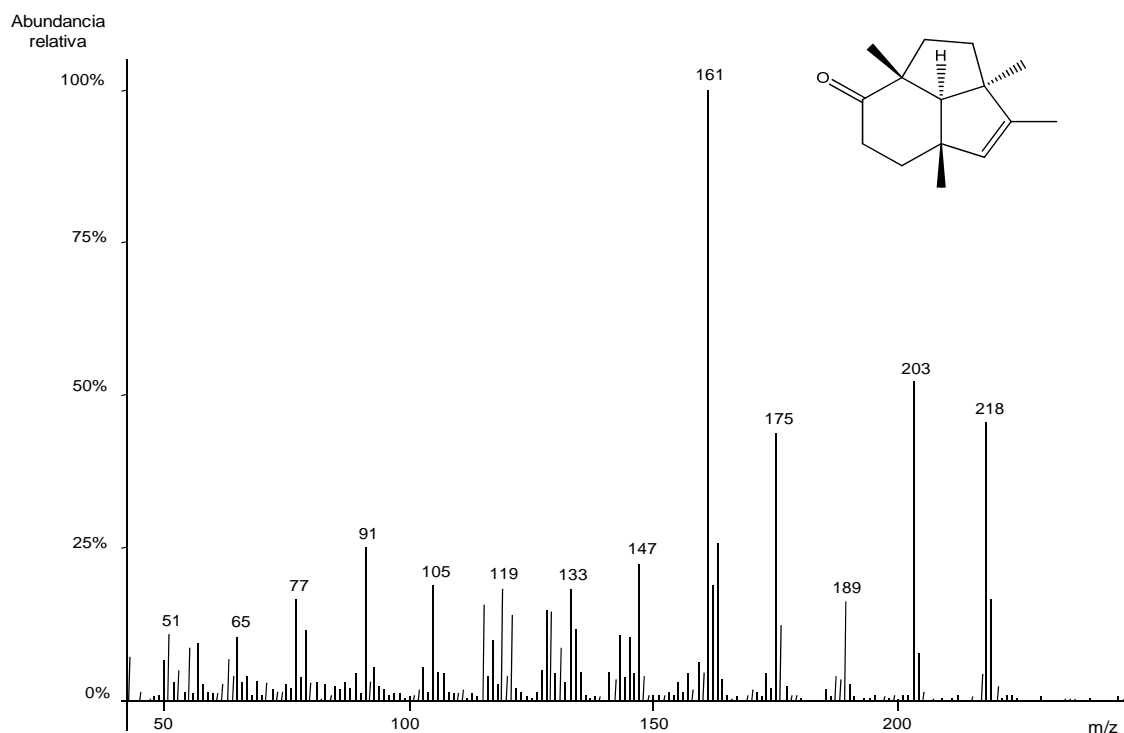


Figura 56. Espectro de masas del 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona.

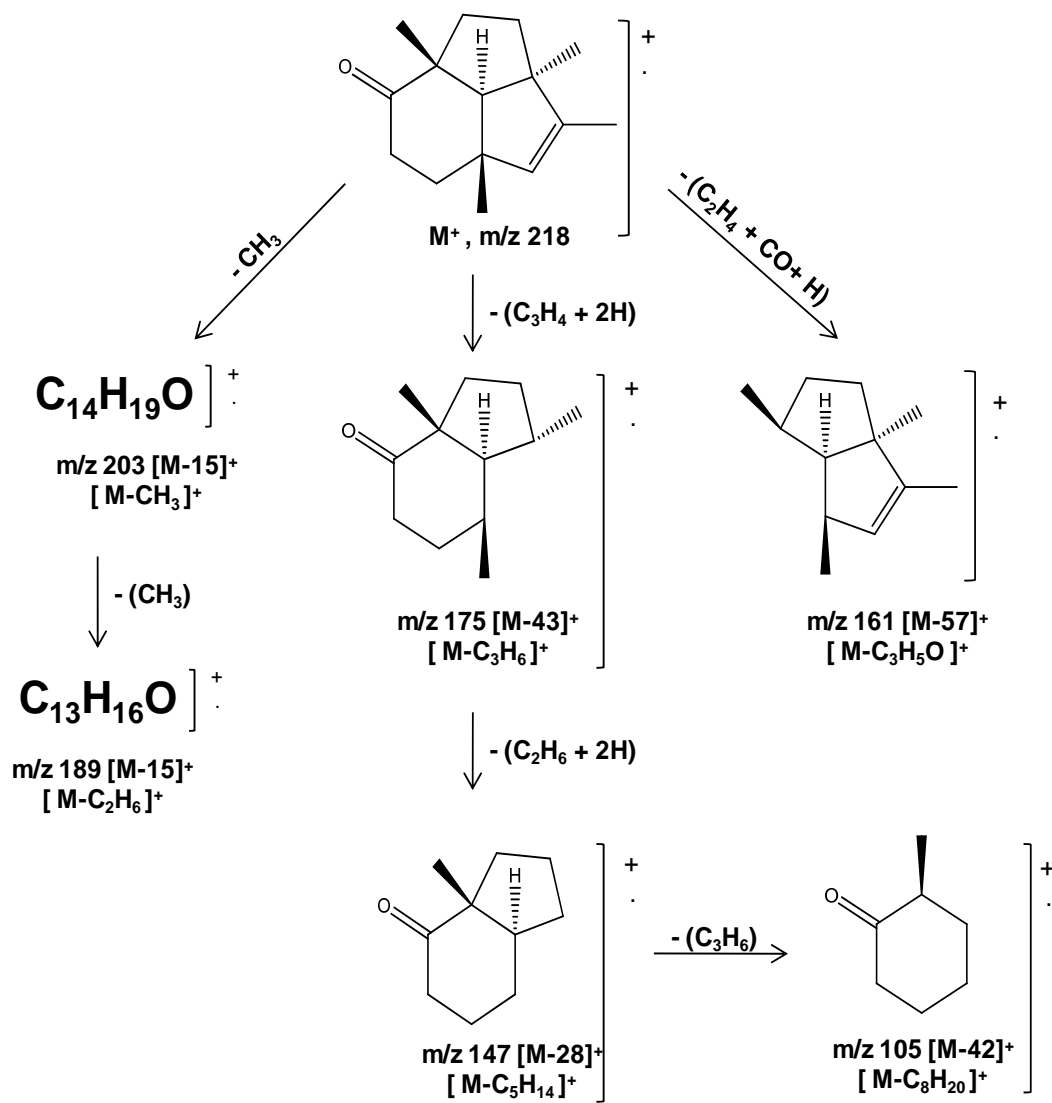


Figura 57. Patrón de fragmentación del 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltricyclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona.

## Obtención del 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehído (C)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 12,0000 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 58), exhibió el ión molecular a  $m/z$  234 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_2$  (calculado 234,15 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  234 [ $M^+$ ], 219 (pico base) [ $M^+ - CH_3$ ], 147 [ $M^+ - C_5H_{11}O$ ], 129 [ $M^+ - C_5H_{13}O_2$ ] y 73 [ $M^+ - C_9H_{22}O_2$ ]. El esquema de fragmentación del componente en mayor proporción, muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 59).

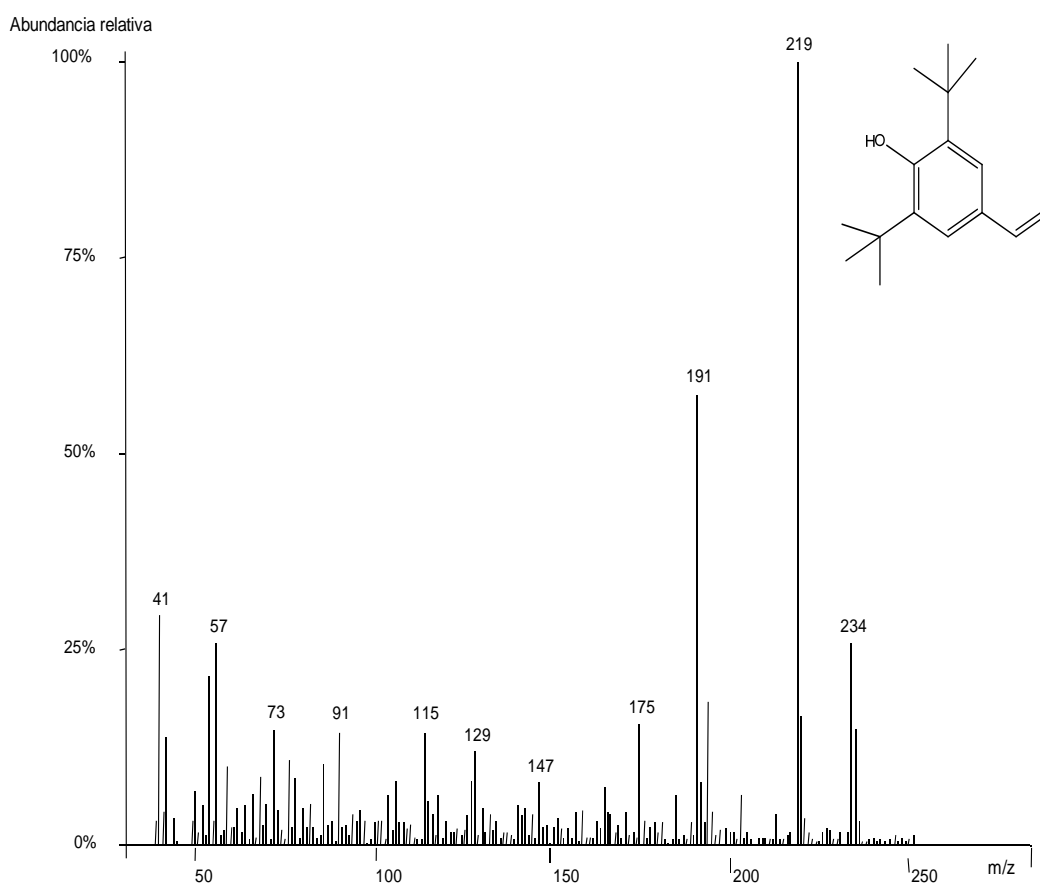


Figura 58. Espectro de masas del 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehído.



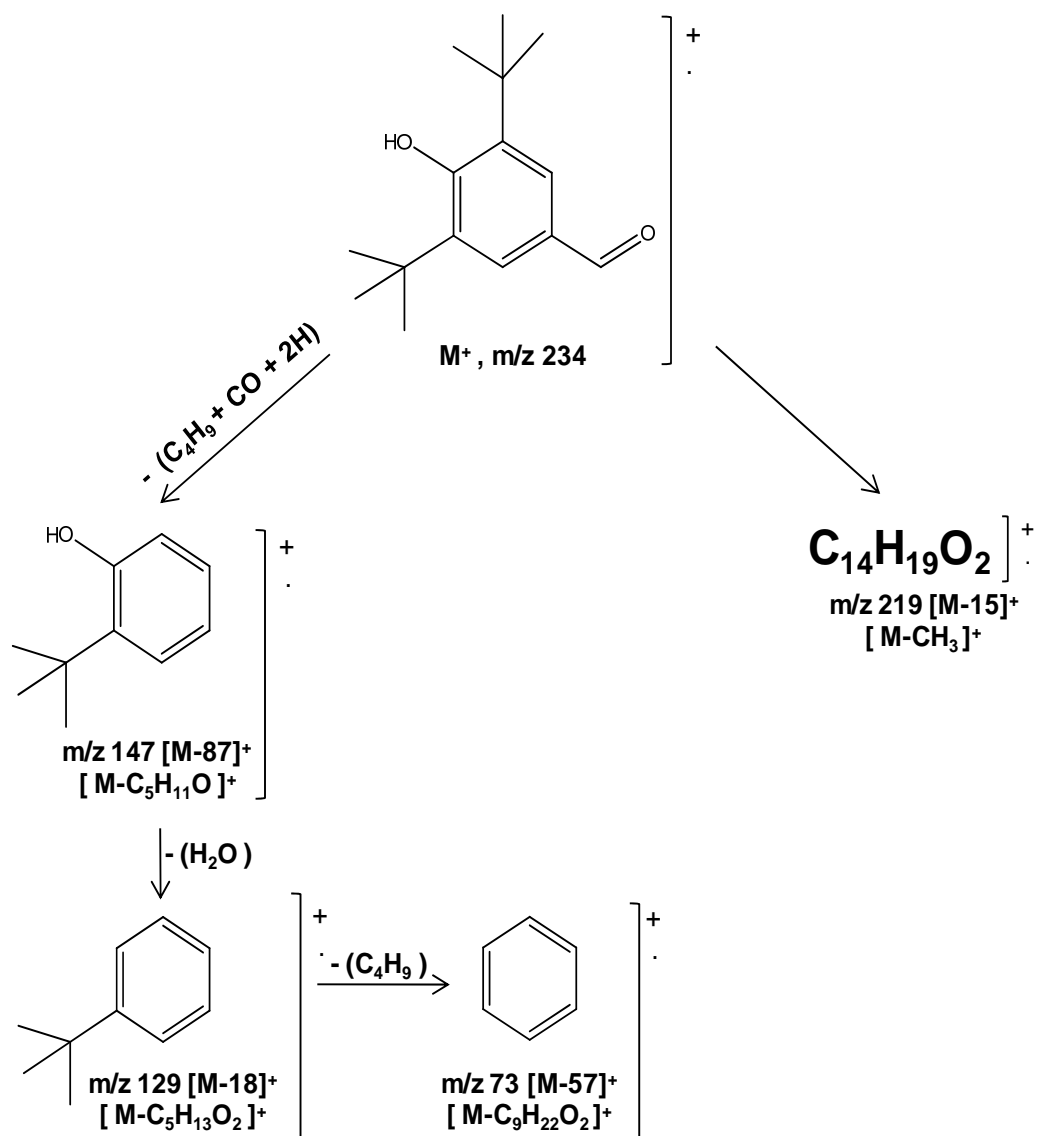


Figura 59. Patrón de fragmentación del 3, 5-diterbutil-4-hidroxi-benzaldehído.

## Obtención del 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona (D)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 12,3170 minutos. El espectro de masas de este compuesto (Figura 60), mostró el ión molecular a  $m/z$  248 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{16}H_{24}O_2$  (calculado 248,1592 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  248 [ $M^+$ ], 233 (pico base) [ $M^+ - CH_3$ ], 205 [ $M^+ - COCH_3$ ], 115 [ $M^+ - C_8H_{21}O$ ] y 91 [ $M^+ - C_{10}H_{21}O$ ]. Su esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 61).

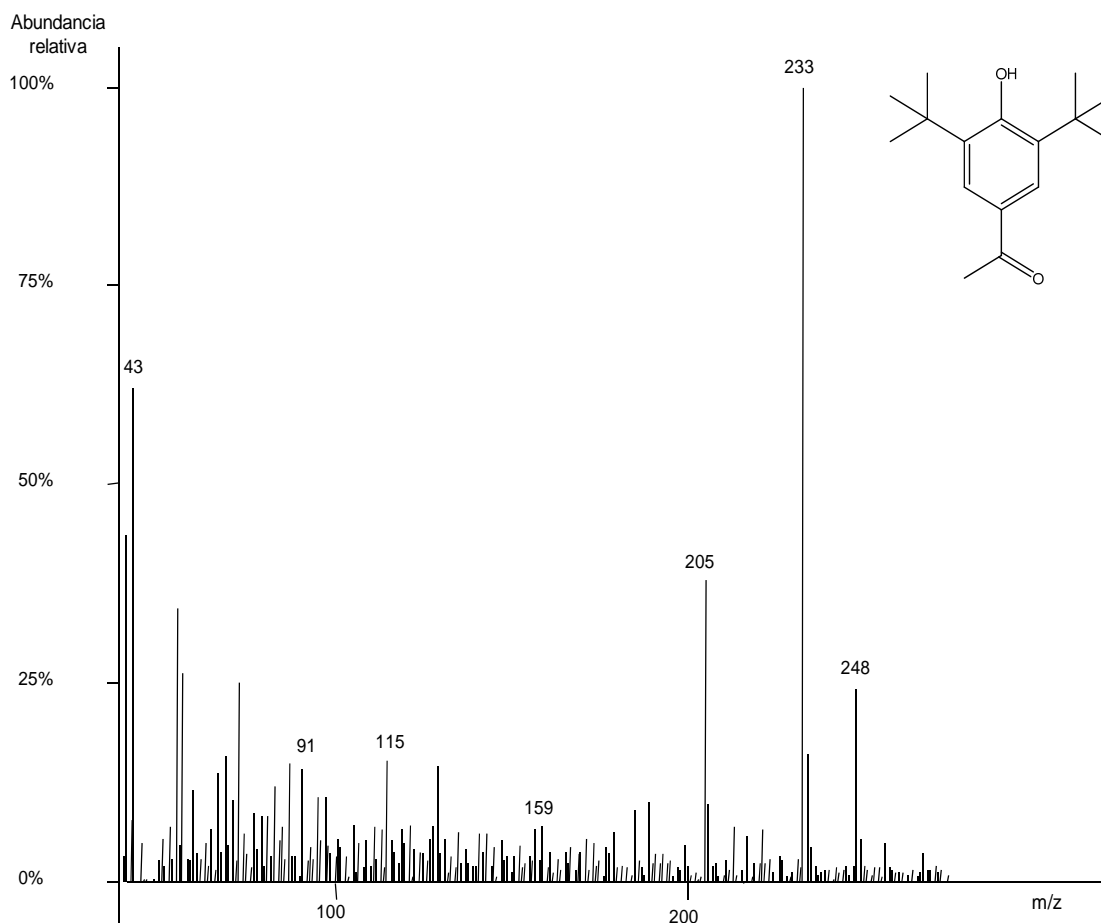


Figura 60. Espectro de masas del 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona.

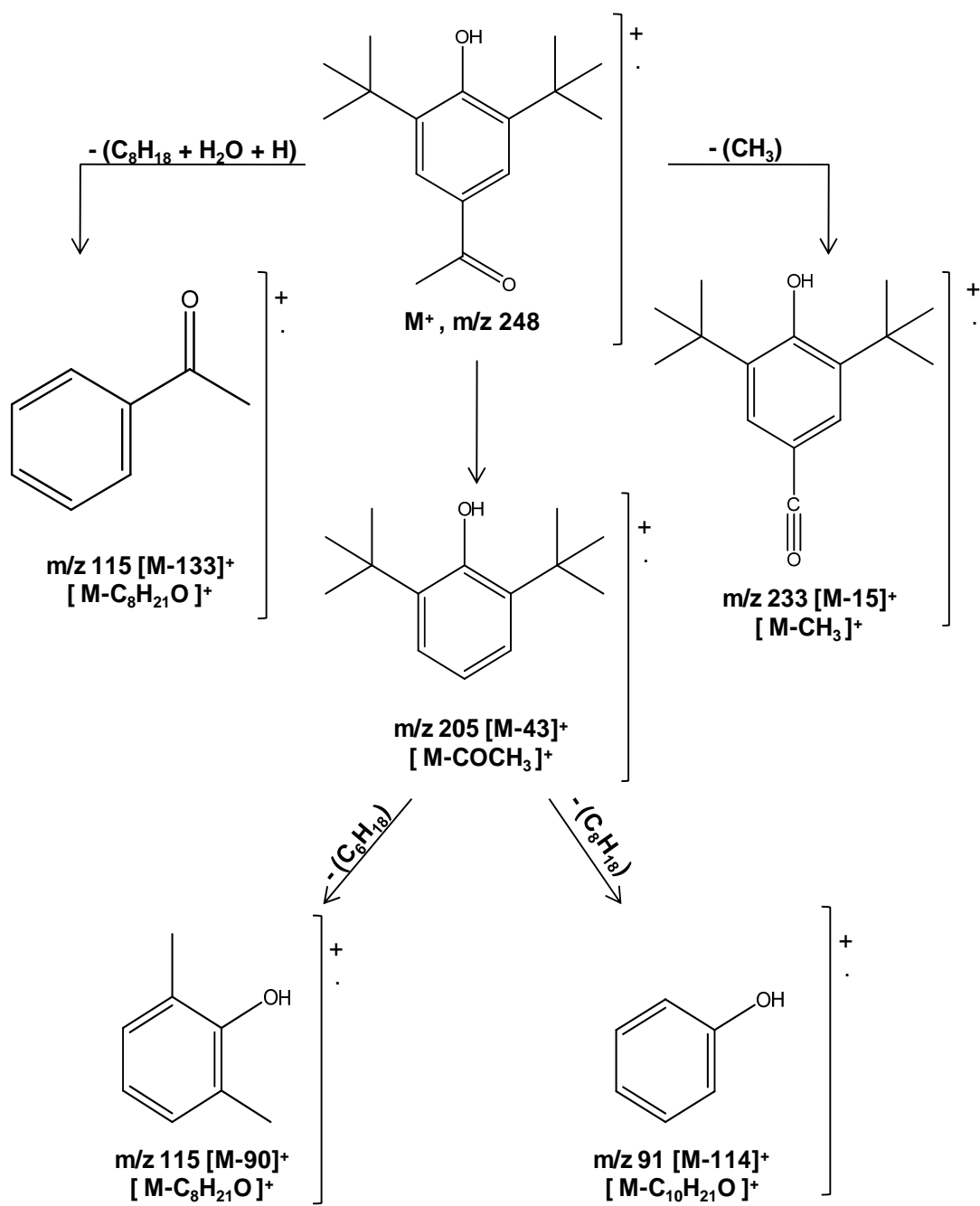


Figura 61. Patrón de fragmentación del 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona.

## Obtención del ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico (E)

Este constituyente, se observó a un tiempo de retención de 15,1330 minutos y es uno de los minoritarios de la subfracción. El espectro de masas de este compuesto (Figura 62), evidenció el ión molecular a  $m/z$  178 correspondiente a la fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_3$  (calculado 178,0780 g/mol). Los picos significativos se observan a  $m/z$  178 (pico base)  $[M^+]$ , 161  $[M^+ - OH]$ , 133  $[M^+ - CO_2H]$ , 73  $[M^+ - C_6H_5O]$  y 91  $[M^+ - C_6H_7O_2]$ . Su esquema de fragmentación muestra la estructura de la mayoría de dichos fragmentos (Figura 63).

El ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico, es un compuesto al cual se le ha comprobado actividad antimicrobial frente a las cepas *Escherichia coli* y *Candida albicans* [47].

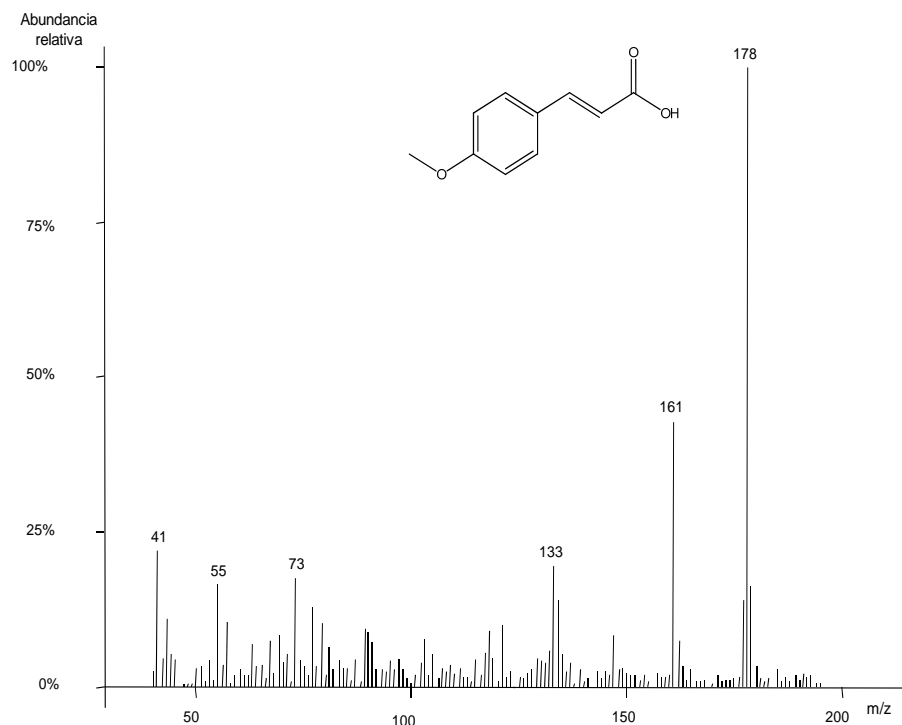


Figura 62. Espectro de masas del 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.

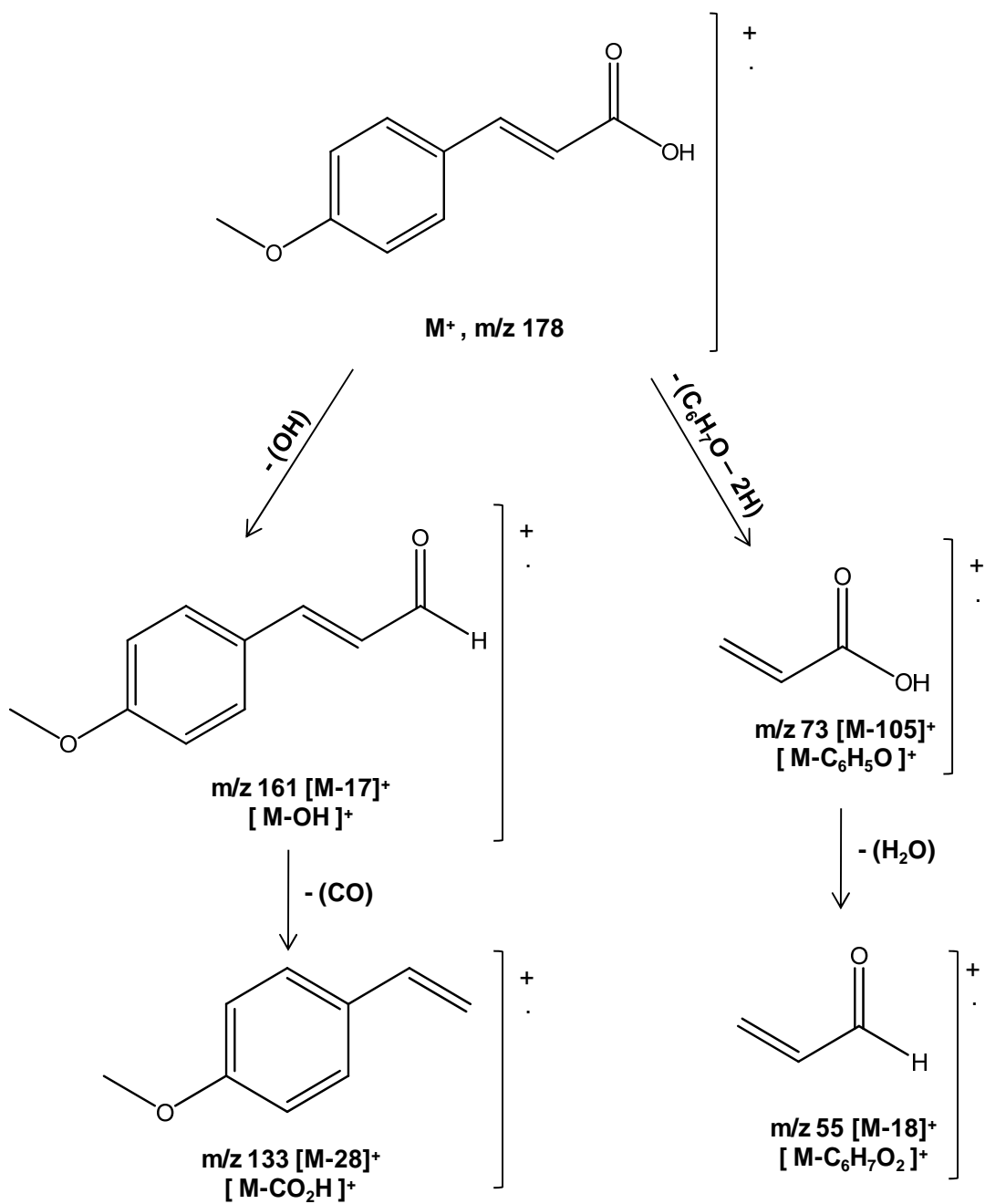


Figura 63. Patrón de fragmentación del 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.

## CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de la corteza (tallo) de la planta *Vismia cayennensis* exhibió una actividad antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Shigella* sp.

Las fracciones de acetona, metanol y agua revelaron una inhibición moderada del microorganismo *Shigella* sp.

Mediante las pruebas fitoquímicas, se evidenció la presencia de flavonoides en EHP y en las fracciones de hexano, cloroformo y metanol; saponinas en las fracciones de acetona y metanol; triterpenos y/o esteroides en las fracciones de acetona y cloroformo; y antraquinonas tan solo en la fracción acetónica.

Los ensayos de citotoxicidad, revelaron que las fracciones solubles poseen una baja citotoxicidad (25%) hasta concentraciones menores o iguales a 10 µg/ml. La fracción de cloroformo presentó 50% de citotoxicidad a concentraciones iguales o mayores a 100 µg/ml. La fracción de hexano por su parte, exhibió una actividad citotóxica de aproximadamente 80%, a concentraciones iguales o mayores a 30 µg/ml.

Los ensayos antiinflamatorios realizados a las fracciones solubles, revelaron que la fracción de cloroformo exhibió una inhibición moderada de la producción de óxido nítrico en comparación con el control.

A partir del fraccionamiento cromatográfico sucesivo de la FSC del EHP, se logró aislar un nuevo metabolito, el cual es un derivado hidroxílico de un triterpeno pentacíclico con esqueleto tipo tetrahimano.

Al compuesto nuevo aislado se le ensayó citotoxicidad y resultó no ser citotóxico. Este resultado es satisfactorio, debido a que permite poder experimentar este compuesto con ensayos antiinflamatorios.

La subfracción B<sub>17.2</sub> de la fracción soluble en cloroformo, presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 2, 4-bis (1,1-dimetiletil) fenol y el éster dietílico del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico.

La subfracción C<sub>12.1</sub> de la fracción soluble en acetona, presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 1, 4-diona-2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno; 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona; el 3, 5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehido; 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona y ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.

## BIBLIOGRAFÍA

“*Escherichia*”. *Enciclopedia Salvat De la Ciencia y de la Tecnología*. 1964, Tomo 5, Pág. 242-243

“*Shiguella*”. *Enciclopedia Salvat De la Ciencia y de la Tecnología*. 1964, Tomo 12, Pág. 577.

Albornoz, A. 1980. *Sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Ampofo, S. y Waterman, P. 1986. Xanthones from three *Garcinia* species. *Phytochemistry*, 25: 2351- 2355.

Araujo, L.; Buitrago, D.; Marquina, M.; Morales, N.; Mendéz, G.; Pernía, T. y Sosa, M. 2002. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los polifenoles presentes en las frutas; Mora (*Rubus fruticosus B.*), Fresa (*Fragaria vesca L.*) y Grapefruit (*Citrus paradisi M.*). *Revista De la Facultad de Farmacia De la Universidad de Los Andes*, vol. 44:64-69.

Baker, D.; Chu, M. y Rajgarhia, V. 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, 24: 1225-1244.

Balasubramanian, N.; Deepak, B.; Devayani, P.; Vishnukant, M. y Avinash, D. 2004. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis,



antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(10):827-834.

Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk. M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4): 493-496.

Benardi, P.; Ferraz, A.; Albring, D.; Borignon, S.; Schripsema, J.; Bridi, R.; ultra-Filho, C.; Henríquez, A. y Poser, G. 2005. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *Journal Natural Products* 68: 784-786.

Bennett, G. y Lee, H. 1988. Xanthonas from *Guttiferae*. *Phytochemistry*, 28: 967-998.

Bilia, A.; Warsame, A.; Braca, A.; Keita, A. y Morelli, I. 1999. New prenylated anthraquinones and xanthonas from *Vismia guineensis*. *Journal of Natural Products*, 63: 16-21.

Bohr, G.; Gerhauser, C.; Knauff, J.; Zapp, J. y Becker, H. 2005. Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Natural Products*, 68: 1545-1548.

Botta, G.; Delle, F.; Delle, G.; Marini, B. y Menichini, F. 1985. Vismione H and prenylated xanthonas from *Vismia guineensis*. *Phytochemistry*, 25: 1217-1219.

Castillo, A. 1995. El uso medicinal de los árboles del bosque húmedo del Río Cataniapo, estado Amazonas. *Acta Botánica Venezolana*. Venezuela.

Cecchini, C.; Cresci, A.; Coman, M.; Ricciutelli, M.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Lucarini, D. y Maggi, F. 2007. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Tetrahedron Letter*, 73: 564-566.

CellTiter 96<sup>TM</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin, # TB112, Promega Corporation.

Chín, Y.; Jung, H.; Chaí, H.; Keller, W. y Kinghorn, A. 2008. Xanthonés with quinone reductase-Inducing activity from the fruits of *Garcinía mangostana* (Mangosteen). *Phytochemistry* 69: 754-758.

Choi, E. y Hwang, J. 2004. Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of Raw 264.7 cells and antioxidant activity. *Fitoterapia*, 76:194:203.

Crockett, S.; Wenzig, E.; Kunert, O. y Bauer, R. 2007. Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochemistry Letter*, 1: 37-43.

Delascio, F. 1994. El género Bromelia en el Hato Piñero, estado Cojedes. *Acta Terramaris* vol. 7. Venezuela.

Desmarchelier, C. y Ciccía, G. Antioxidantes de origen vegetal. 1998. *Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencias Hoy*. 8 (44).

Domínguez, A. y Bacallao, M. Actividad antiinflamatoria de extracto fluido de hojas de Siempreviva (*Bryophyllum pinnatum*). 2002. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* 21(2):86-90.

Epifano, F.; Genovese, S.; Menghini, L. y Curini, M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68: 939-953.

Fuller, R.; Westergaard, C.; Collins, J.; Cardellina, J. y Boyd, M. 1998. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *Journal of Natural Products*, 62: 67-69.

Hanson, J. 2003. *Natural products*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.

Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawa, I.; Steventon, G.; Hylands, P. y Lee, C. 2007. The Sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42:377-387.

Jantan, I.; Pizar, M.; Idris, M.; Taher, M. y Ali, R. 2002. *In vitro* inhibitory effect of rubraxanthone isolated from *Garcinia parvifolia* on platelet-activating factor receptor binding. *Tetrahedron Letter*, 68: 1133-1134.

Koskinen, A. 1993. *Asymmetric synthesis of natural products*. Editorial John Wiley & Sons. Chichester.

Kuete, V.; Nguemeving, J.; Beng, V.; Azebaze, A.; Etoa, F.; Meyer, M.; Bodo, B. y Nkengfack, E. 2006. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia Laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethno-Pharmacology*, 109: 372-379.

Mahady, G. 2005. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design* 11:2405-2427.

Marcano, D. y Cortés, L. 1998. *Fundamentos de química orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Segunda edición. Litopar. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Marti, G.; Eparvier, V.; Moretti, C.; Susplugas, S.; Paro, S.; Grelliler, P.; Retailleau, P.; Guirritte, F. y Litaudon, M. 2009. Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 70: 75-85.

Miraglia, M.; Mesquita, A.; Varejao, M.; Gottlieb, O. y Gottlieb, H. 1981. Anthraquinones from *Vismia species*. *Phytochemistry*, 20: 2041-2042.

Montaño, T. IVIC investiga el uso medicinal de los recursos botánicos venezolanos. Bitácora, boletín informativo IVIC, 27 de mayo de 2009. Pág. 1.

Moura, D.; Silva, J.; Ohama, D.; Mendonça, M.; Ferreira, J. y Amaral, C. 2008. Histological study of the leaf, bark and fruit of *Vismia cayennensis*. *International Journal of Botanic*. 4(3): 321-325.

Nguemeving, J.; Azebaze, A.; Kuete, V.; Carly, N.; Beng, V.; Meyer, M.; Blond, A.; Bodo, B. y Nkengfack, A. 2006. Laurentixanthonones A and B, antimicrobial xanthonones from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*, 67: 1341-1346.

Nkengfack, A.; Azebaze, G.; Vardamidez, J.; Fomum, Z. y Van Heerden, F. 2002. A prenylated xanthone from *Allanblackia floribundum*. *Phytochemistry* 60: 381-384.

Noungoue, D.; Antheaume, C.; Chaabi, M.; Ndjakou, B.; Ngouela, S.; Lobstein, A. y Tsamo, E. 2007. Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*, 69: 1024-1028.

Noungove, D.; Antheaume, C.; Chaabi, M.; Ndjaka, B.; Ngouela, S.; Lobstein, A. y Tsamo, E. 2008. Antraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry* 69: 1024-1028.

Oikawa, S.; Nishino, K.; Oikawa, S.; Inoue, S.; Mizutani, T. y Kawanishi, S. 1998. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochemical Pharmacology* 56(3):361-370.

Parratt, J. 1998. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41:31-39.

Perea, E. y Arteaga, J. 2007. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios*. Universidad de Tolima, Facultad de Ciencias. Ibagué.

Pinheiro, R.; Mac-Quhae, M.; Bettolo, G. y Monache, F. 1983. Prenylated anthraquinoids from *Vismia species*. *Phytochemistry*, 23: 1737-1740.

Rojas, N.; Chaves, E. y García, F. 2006. *Bacteriología diagnóstica*. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. Costa Rica.

Singh, I.; Bharate, S. y Bhutani, K. 2005. Anti-HIV natural products. *Current Science*, 89: 269-290.

Yoon, M.; Jeong, T.; Park, D.; Xu, M.; Oh, H.; Song, K.; Lee, W. y Park, H.  
2006. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated  
from *Scolopendra subspinipes*. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 29(4):735-739.

# **HOJA DE METADATOS**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	<b>ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>VISMIA CAYENNENSIS</i> Y SU POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Karina Del Carmen Marín Jiménez</b>	<b>CVLAC</b>	<b>17.762.822</b>
	<b>e-mail</b>	<b>Kmj1985@yahoo.es</b>

### Palabras o frases claves:

<b>Actividad biológica, Productos naturales, <i>Vismia</i>.</b>
-----------------------------------------------------------------



# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

## Líneas y sub líneas:

Área	Sub área
Ciencias	Química

## RESUMEN:

Un estudio de las propiedades biológicas y químicas de la corteza (tallo) de la planta *Vismia cayennensis*, reveló que esta especie representar una fuente de compuestos bioactivos. Los ensayos antibacterianos realizados al extracto y fracciones de *V. cayennensis* en solventes de distintas polaridad, revelaron una inhibición de los microorganismos *Escherichia coli* y *Shiguella* sp. La inhibición del crecimiento de *Shiguella* sp. obtenidas para las fracciones de acetona, metanol y agua, es el 50% de lo observado para el extracto hidroalcohólico de la planta. La fracción de cloroformo mostró un efecto antiinflamatorio. Asimismo se realizaron los ensayos de citotoxicidad al extracto y las fracciones solubles, observándose que sólo la fracción en agua presenta un efecto citotóxico significativo. Además, se realizó un análisis fitoquímico, el cual reveló la presencia de algunas familias de metabolitos secundarios tales como flavonoides, saponinas, taninos, antraquinonas, triterpenos y/o esteroides. En base a los resultados obtenidos en los bioensayos, se fraccionó las fracciones en cloroformo y acetona del extracto hidroalcohólico de la planta *V. cayennensis*. La fracción en cloroformo se fraccionó mediante cromatografía de columna y capa fina preparativa, lográndose aislar un derivado hidroxílico de un triterpeno pentacíclico con esqueleto tipo tetrahimanos (B<sub>17.1</sub>), el cual es un compuesto novedoso, cuya estructura se determinó mediante el análisis combinado de los métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear. Asimismo, se identificaron otros constituyentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Una de las subfracciones del extracto en cloroformo (B<sub>17.2</sub>), presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 2, 4-bis (1,1-dimetiletil) fenol y el éster dietílico del ácido 1, 2-bencenodicarboxílico. La subfracción (C<sub>12.1</sub>) de la fracción soluble en acetona, presentó en mayor proporción los compuestos identificados como: 1, 4-diona-2, 6-bis(1,1-dimetiletil)-2, 5-ciclohexadieno; 1S, 4R, 7R, 11R-1, 3, 4, 7-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,4)]undec-2-en-8-ona; el 3,5-diterbutil-4-hidroxibenzaldehído; 3, 5-diterbutil-4-hidroxiacetofenona y ácido 3-(4-metoxifenil)-2-propenoico.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail					
Dra. Haydelba D'Armas	ROL	AS	X	CA	TU	JU
	CVLAC	C.I. 4.297.804				
	e-mail	htrinidad@hotmail.com				
Dr.Oscar Crescente	ROL	AS		CA	TU	JU X
	CVLAC	C.I. 2.740.590				
	e-mail	ocrescente@yahoo.com				
M.Sc. Yvanovis Dasilva	ROL	AS		CA	TU	JU X
	CVLAC	C.I. 12.660.605				
	e-mail	yndasilva@yahoo.es				

## Fecha de discusión y aprobación:

Año      Mes      Día

2009	11	03
------	----	----

Lenguaje: spa

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Química

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

### Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, el contenido de este trabajo especial de grado. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.

Karina del Carmen Marín Jiménez

Dra. Haydelba D'Armas  
Asesora Académica

Dr. Oscar Crescente  
Jurado Principal

M.Sc. Yvanovis Dasilva  
Jurado Principal

Dra. Maj Britt Mostue  
Por la Subcomisión de Trabajo de Grado

