



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

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LA PLANTA *Melochia tomentosa* (STERCULIACEAE)
(Modalidad: Investigación)

BRIMAR OTILIA ESPINOZA NAVARRO

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

CUMANÁ, 2010

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LA PLANTA *Melochia tomentosa* (STERCULIACEAE)

APROBADO POR:

Haydelba D' Armas Ph.D.
Asesora

Yvanovis Da Silva M.Sc.
Jurado

Hernando Herrera M.Sc.
Jurado

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
1. Triacilgliceroles.....	¡Error! Marcador no definido.
2. Fosfolípidos.....	¡Error! Marcador no definido.
3. Colesterol y ésteres de colesterol	¡Error! Marcador no definido.
4. Ácidos grasos y sus propiedades.....	¡Error! Marcador no definido.
Proteínas.....	¡Error! Marcador no definido.
Carbohidratos	¡Error! Marcador no definido.
METODOLOGÍA	15
1. Recolección de las muestras.....	¡Error! Marcador no definido.
2. Obtención de los extractos lipídicos (30).....	¡Error! Marcador no definido.
3. Aislamiento y cuantificación de los diferentes lípidos.....	¡Error! Marcador no definido.
4. Esterificación de los ácidos grasos (33).....	¡Error! Marcador no definido.
5. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos.....	¡Error! Marcador no definido.
6. Caracterización de los lípidos por resonancia magnética nuclear.....	¡Error! Marcador no definido.
7. Evaluación comparativa del contenido lipídico	¡Error! Marcador no definido.
8. Determinación cuantitativa de proteínas totales	¡Error! Marcador no definido.
9. Determinación cuantitativa de glucógeno.....	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

1. Determinación cuantitativa de lípidos totales	¡Error! Marcador no definido.
2. Análisis del contenido lipídico.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Caracterización y cuantificación de los lípidos mediante CCFP	¡Error!
Marcador no definido.	
2.2 Identificación de los lípidos por la técnica de RMN de ¹³ C.....	¡Error!
Marcador no definido.	
3. Análisis de los ácidos grasos.....	¡Error! Marcador no definido.
4. Determinación de proteínas totales.	¡Error! Marcador no definido.
5. Determinación de glucógeno.....	¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIONES	104
LISTA DE ABREVIATURAS	106
BIBLIOGRAFÍA	107
LISTA DE APÉNDICES	¡Error! Marcador no definido.
APÉNDICES.....	113
HOJA DE METADATOS	118

DEDICATORIA

A:

Dios todo poderoso por guiarme cuando desespero.

La virgen del Valle por ser mi guía espiritual.

Mis padres Margarita y Jesús por la educación y los valores que me inculcaron y estar a mi lado en los momentos difíciles.

Mis hermanos Margaret y Williams por el cariño y la confianza que me han dado.

Mi tía Eugenia por ser como una madre para mí, y siempre brindarme su ayuda y apoyo. Además de ser un ejemplo de constancia y dedicación.

Todas las personas que de manera directa e indirecta contribuyeron a que alcanzaré esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida que escogió para mí, porque a pesar de las dificultades y los obstáculos, puso en mi vida personas maravillosas que me han ayudado a seguir adelante y que me han motivado a luchar por mis sueños y mis metas. Mis padres Margarita y Jesús, por confiar en mí, la paciencia que me han tenido y por su ayuda incondicional. Octavio Sanguinetti, por haberme acompañado durante gran parte de mi carrera, por ser mi amigo incondicional y estar a mi lado en los momentos más difíciles por los que pase en esta ciudad y por todos y cada uno de los detalles. Además muy agradecida con la señora Doris Gamboa de Sanguinetti, por el cariño y la confianza que me ha brindado. Mi pupila Margaret (mi hermana) por ser la persona que me ha motivado a seguir adelante, gracias por ser mi amiga, por apoyarme y por aguantar todas mis cosas. Te adoro hermana. A mis amigos y compañeros Adelser, Adriana, Mafe, Raúl, Mary, Melisa, David, Gabriela, Yetzi, Jesús Fernando y en especial a Leidis y Luis Fernandopor estar a mi lado durante los momentos realmente duros y difíciles para mí, por todos los consejos y las palabras de ánimo. Todos ustedes son un ejemplo de constancia, esfuerzo y dedicación, gracias por todos los momentos inolvidables, por el cariño que siempre me transmitieron, por estar pendientes de mí y de mis cosas, con ustedes aprendí que antes de pensar en rendirse hay que luchar, gracias porque nunca me dejaron caer, siempre estuvieron allí para evitarlo. Los quiero muchísimo. A Elisa Campos, por ser como una hermana para mí, por escucharme, apoyarme y ayudarme en todo momento. A mis amigos Yesli, Rafael, Jesusmarit, Jose Gregorio, Kysbel, Gregory y Juan Luis, con los que tuve la oportunidad de compartir muchísimas cosas tanto académicas como personales. Muchos éxitos para ustedes. A mis tíos Jesús, Zoraida, Eugenia y Ligia por creer en mí, sin su ayuda no hubiese sido posible alcanzar esta meta. Muchas bendiciones para ustedes. Mi asesora, Dra. Haydelba D' Armas, por su paciencia y dedicación, usted fue mas que una asesora, gracias profesora, siempre le estaré agradecida por todo lo

que hizo por mí. Que Dios todo poderoso la llene de mucha salud para que siga contribuyendo a la formación académica de más personas. A José (Bamban), por su ayuda y colaboración en el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros de laboratorio Vicki, Niroski, Adriana Sanchez, Jean Paul, Marilyn, Alexis, Carmen, Fátima, Laurenis y Julineth. Los profesores Rita Tenia, Ernesto Bastardo, Maj Britt Mostue y Carlos Hurtado por formar parte de mi formación profesional. El rectorado y en especial al licenciado José Gregorio Valencia por su valioso aporte en el financiamiento parcial para la ejecución de este trabajo de investigación. A la Universidad de Oriente, y en especial al Departamento de Química, quienes me dieron la oportunidad de crecer en la parte académica gracias al alto nivel que poseen cada uno de los profesores que integran dicho Departamento. Las metas nunca las alcanzamos solos, siempre hay muchas personas que contribuyen a que eso sea posible, con sus consejos y ayuda. Gracias a cada una de las personas que formaron parte de esta meta, y a las que deje de nombrar, igualmente gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).	16
Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología y Laboratorio de Microbiología, de la Universidad de Oriente.	17
Tabla 3. Porcentaje de extracción de las partes botánicas (hojas y tallo) de <i>M. tomentosa</i>	33
Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de <i>M. tomentosa</i>	33
Tabla 5. Actividad letal de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de <i>M. tomentosa</i>	37
Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de <i>M. tomentosa</i>	39
Tabla 7. Actividad antifúngica de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de <i>M. tomentosa</i>	41
Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la EMH de <i>M. tomentosa</i>	42
Tabla 9. Fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del EMH de <i>M. tomentosa</i>	43
Tabla 10. Subfracciones obtenidas en la separación de la fracción C.	43
Tabla 11. Compuestos identificados en la subfracción C1.	45
Tabla 12. Subfracciones obtenidas de la subfracción de C2.	52
Tabla 13. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN 1H del compuesto C2.1.	53
Tabla 14. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C2.1.	55
Tabla 15. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN 1H del compuesto C2.1.	57

Tabla 16. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C2.2.	57
Tabla 17. Compuestos aislados e identificado en la fracción H obtenido en la separación cromatográfica de las hojas de <i>M. tomentosa</i>	61
Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico del EMT de <i>M. tomentosa</i>	71
Tabla 19. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EMT de <i>M. tomentosa</i>	73
Tabla 20. Subfracciones obtenidas en la extracción de la fracción C.	74
Tabla 21. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción C1.	76
Tabla 22. Subfracciones obtenidas en la separación cromatográfica de la subfracción C1.	76
Tabla 23. Subfracciones obtenidas a partir de la 1-butanol a la subfracción C1.8. ...	77
Tabla 24. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C1.8a.	78
Tabla 25. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN ^1H del compuesto C1.8a1.	80
Tabla 26. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C1.8a1.	82
Tabla 27. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F.	85
Tabla 28. Subfracciones obtenidas en la separación cromatográficas de la fracción F.	86
Tabla 29. Asignaciones de desplazamientos químicos (δ_H) de algunas señales de RMN ^1H del compuesto F1.	87
Tabla 30. Asignaciones de desplazamientos químicos (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C y el tipo de carbono según el espectro de RMN DEPT-135.	90
Tabla 31. Datos seleccionados de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC, HMBC y COSY del compuesto F.	93
Tabla 32. Subfracciones obtenidas en la acetilación de la fracción G.	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la morfina.....	1
Figura 2. Estructura del ácido acetilsalicílico.	2
Figura 3. Estructura del paclitaxel.	2
Figura 4. Estructura de los flavonoides glucurónidos.	5
Figura 5. Estructuras de los metabolitos aislados de las raíces y partes aéreas de <i>H. angustifolia</i>	6
Figura 6. Estructural del campesterol.....	7
Figura 7. Representación general del alcaloide ciclopeptídico.....	8
Figura 8. Representación general de la quinolinona.	9
Figura 9. Estructura de la walteriona-A.	9
Figura 10. Estructuras de los flavonoides aislado de la <i>W. indica</i>	10
Figura 11. Estructuras de los alcaloides ciclopeptídicos aislados de la <i>M. corchorifolia</i>	10
Figura 12. Estructura de la melochicorina.	11
Figura 13. Estructura de la chamaedrina.	11
Figura 14. Estructuras de los metabolitos aislados de las raíces de <i>M. tomentosa</i>	12
Figura 15. Estructuras de los alcaloides aislados de las raíces de <i>M. tomentosa</i>	12
Figura 16. Estructuras de los alcaloides ciclopeptídicos aislados de la raíces de <i>M. tomentosa</i>	13
Figura 17. <i>Melochia tomentosa</i>	14
Figura 18. Zona de muestreo de la planta <i>M. tomentosa</i>	15
Figura 19. Representación esquemática del análisis de la actividad antibacteriana. ..	17
Figura 20. Metodología para evaluar la actividad antifúngica de los extractos y fracciones de <i>M. tomentosa</i>	18

Figura 21. Metodología para evaluar la actividad letal de los extractos y fracciones de <i>M. tomentosa</i>	19
Figura 22. Esquema de la prueba de detección de saponinas.	21
Figura 23. Esquema de la prueba de detección de flavonoides.....	22
Figura 24. Esquema de la prueba de detección de glicósidos cardiotónicos.	22
Figura 25. Esquema de la prueba de detección de glicósidos cianogénicos.	23
Figura 26. Esquema de las pruebas de detección de compuestos fenólicos.....	24
Figura 27. Esquema de las pruebas de detección de antraquinonas.....	24
Figura 28. Esquema de las pruebas de detección de compuestos alcaloides.	25
Figura 29. Esquema de las pruebas de detección de esteroides insaturados y triterpenos insaturados.	26
Figura 30. Fraccionamiento cromatográfico del EMH de <i>M. tomentosa</i>	44
Figura 31. Cromatograma de gases de la subfracción C1	46
Figura 32. Espectro de masa del éster metílico del ácido hexadecanoico.	47
Figura 33. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.	47
Figura 34. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.	48
Figura 35. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico.....	48
Figura 36. Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico.....	49
Figura 37. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido octadecanoico.	49
Figura 38. Espectro de masas del ácido octadecanoico.	50
Figura 39. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico.....	50
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H la subfracción C2.1.	54
Figura 41. Ampliación de la región a campo alto del espectro de RMN ¹ H de la subfracción C2.1.	54
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C la de subfracción C2.1.	55
Figura 43. Estructura del éster metílico del ácido eicosanoico.	56
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H de la subfracción C2.2.	58
Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la subfracción C2.2.	58
Figura 46. Espectro de RMN ¹³ C la subfracción C2.2.....	59

Figura 47. Posible compuesto de la subfracción C2.2.	59
Figura 48. Cromatograma de gases de la fracción H.	60
Figura 49. Espectro de masas de la 7,9- di- tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-diona.	61
Figura 50. Patrón de fragmentación de 7,9- di- tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona.	62
Figura 51. Espectro de masas del docosanol.....	63
Figura 52. Patrón de fragmentación del docosanol.....	64
Figura 53. Espectro de masas del acetato 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo.....	65
Figura 54. Patrón de fragmentación del 4, 4, 13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo.....	66
Figura 55. Espectro de masas del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol.....	67
Figura 56. Patrón de fragmentación del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol.....	68
Figura 57. Espectro de masas del 4, 4,17- trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato.	69
Figura 58. Estructura del 4, 4,17- trimetilcolest-8,14 – dien-3-il dodecanoato.	69
Figura 59. Patrón de fragmentación 4, 4,17- trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato	70
Figura 60. Fraccionamiento cromatográfico del EMT de <i>M.tomentosa</i>	72
Figura 61. Espectro IR de la subfracción C2.	75
Figura 62. Espectro IR de la subfracción C1.8a1.....	79
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H de la subfracción C1.8a1.	80
Figura 64. Ampliación del espectro de RMN ¹ H de la subfracción C1.8a1.	81
Figura 65. Espectro de RMN ¹³ C de la subfracción C1.8a1.	82
Figura 66. Ampliación I del espectro de RMN ¹³ C de la subfracción C1.8a1.....	83
Figura 67. Posible estructura del compuesto C1.8a1.....	83
Figura 68. Espectro IR de la fracción E.	84
Figura 69. Espectro de RMN ¹ H del compuesto F1.....	88

Figura 70. Ampliación del espectro RMN ^1H del compuesto F1.	88
Figura 71. Espectro RMN ^{13}C del compuesto F1.	89
Figura 72. Espectro DEPT 135 del compuesto F1.	91
Figura 73. Espectro HMQC del compuesto F1.	92
Figura 74. Ampliación I del espectro HMQC del compuesto F1.	92
Figura 75. Espectro de HSQC del compuesto F1.	94
Figura 76. Ampliación II del espectro HMQC del compuesto F1.	95
Figura 77. Espectro HMBC del compuesto F1.	95
Figura 78. Ampliación I del espectro HMBC del compuesto F1.	96
Figura 79. Ampliación II del espectro HMBC del compuesto F1.	97
Figura 80. Ampliación III del espectro HMBC del compuesto F1.	98
Figura 81. Estructura parcial I del compuesto F1 mostrando las correlaciones HMBC.	98
Figura 82. Estructura parcial II del compuesto F1 mostrando las correlaciones HMBC.	98
Figura 83. Espectro de COSY del compuesto F1.	99
Figura 84. Ampliación I del espectro de COSY del compuesto F1.	100
Figura 85. Estructura del 3-acetilcolest-1,5-dieno.	100
Figura 86. Espectro IR de la fracción G.	101

RESUMEN

A los extractos metanólicos de las hojas y el tallo de la planta *Melochia tomentosa*, se les realizó un estudio fitoquímico para evaluar las propiedades antimicrobianas y letal con crustáceos de *Artemia salina* en ambos extractos, así como las fracciones provenientes de ellos. El análisis químico preliminar mostró la posible presencia de flavonoides y esteroides insaturados en ambos extractos, además en el extracto del tallo se detectaron saponinas, polifenoles y taninos. El extracto de las hojas resultó inactivo frente a todas las bacterias y hongos ensayados, y exhibió un CL_{50} de 182,51 $\mu\text{g/ml}$; dos fracciones provenientes de este extracto mostraron poseer actividad antimicótica contra *Mucor* sp. El extracto metanólico del tallo mostró una actividad antimicrobiana considerable, resultando activo frente a las bacterias *Escherichiacoli*; *Micrococcus luteus*; *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes cepas de hongos, tales como *Curvularia lunata*, *Mucor* sp y *Penicillium* sp; además, presentó una actividad letal de 21,24 $\mu\text{g/ml}$. Las subfracciones obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las hojas fueron caracterizada por CG/EM, lográndose identificar los ácidos hexadecanoico y octadecanoico y sus respectivos ésteres metílicos, mientras que en otra subfracción se logró identificar al 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-diene-2,8-diona; docosanol; 4, 4, 13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo; 4,4,17-trimetilcolest-8,14-dien-3-il y 4,4,17-trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato. Por RMN de una dimensión se logró caracterizar al éster metílico del ácido eicosanoico y 3,7-dimetil-9-fenil-7-en-3-nonanol. En el extracto metanólico del tallo se caracterizó por RMN al *N,N*-(6-hidroxi-10-fenil-6-metildecano-1,7-diil)diacetamida y se logró aislar un derivado acetilado de un esteroide, el cual fue nombrado como el 3-acetilcolest-1,5-dieno, siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de este metabolito secundario en *M. tomentosa* y en la literatura en general.

Palabras o Frases Claves: productos naturales, *Sterculiaceae*, *Melochia tomentosa*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han formado la base de sofisticados sistemas de la medicina tradicional que han estado en existencia por miles de años, por esta razón, la ciencia quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades que poseen y así poder agruparlas según su efecto, conocer el principio activo responsable de aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar su estructura química, procurar su síntesis y de esta manera proponer modificaciones estructurales que le confieran una mayor actividad (1).

De las plantas, se han aislado compuestos con importante actividad farmacológica como lo es la morfina (figura 1), la cual es un alcaloide que posee propiedad narcótica, sedante, hipnótica y analgésica (2).

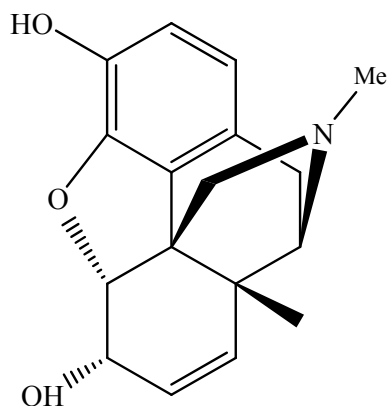


Figura 1. Estructura de la morfina.

Otro compuesto aislado también de las plantas y de mucha utilidad medicinal es el ácido acetilsalicílico (figura 2) el cual se usa como analgésico, antiinflamatorio, antipirético y antitrombótico (3).

El aislamiento de compuestos con actividad biológica, derivados de plantas y animales, es de gran importancia en la biomedicina, ya que los productos crudos extraídos de estos organismos han servido como fuente de nuevas drogas y sustancias precursoras en la síntesis de las mismas (4). Esto se hace evidente, ya que en la actualidad el 60% de los medicamentos para el tratamiento del cáncer es elaborado en base de compuestos aislados de las plantas, y un 75% es utilizado para el tratamiento de enfermedades infecciosas (5). Un ejemplo es el Taxol, cuyo principio activo es el paclitaxel (figura 3), el cual fue aislado de una fracción de la *Taxusbrevifolia* e identificado como un compuesto con actividad citotóxica y, en 1992, fue aprobada su comercialización como un agente para la quimioterapia (6).

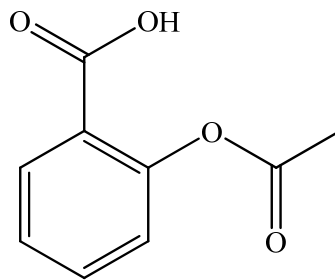


Figura 2. Estructura del ácido acetilsalicílico.

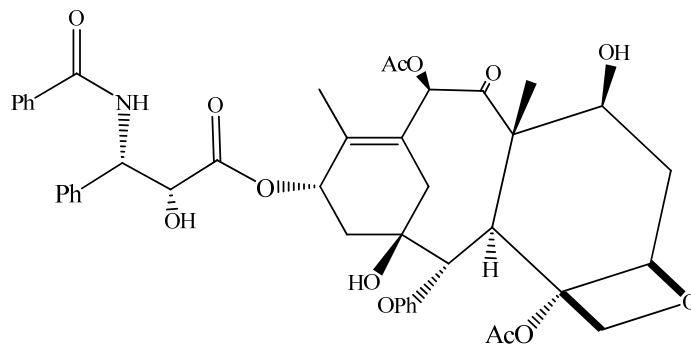


Figura 3. Estructura del paclitaxel.

Los productos naturales han sido, durante la historia, la principal fuente de agentes farmacológicos, de hecho, el 90% de las prácticas terapéuticas actuales utiliza compuestos derivados de plantas y hoy en día un tercio de la población mundial utiliza plantas medicinales para su atención farmacéutica primaria . En los países en proceso de desarrollo, las enfermedades a causa de infecciones bacterianas son muy frecuentes y comunes, además, enfermedades como el SIDA, la malaria y la tuberculosis son las principales causas de mortalidad (5).

En muchos de estos países en desarrollo y en especial en África, la medicina tradicional se utiliza ampliamente para tratar algunas de estas dolencias, estos tratamientos, en la mayoría de los casos son administrados por los curanderos de la región y generalmente consiste en material crudo y los extractos, sin tomar las prevenciones de las reacciones secundarias que las plantas puedan producir en las personas, es por ello que muchos investigadores se han dedicado al estudio de las mismas (7).

Se ha podido constatar, que muchas familias de plantas distribuidas en zonas tropicales son ricas en metabolitos secundarios confiriéndole una importante actividad biológica, ésto ha incrementado en las últimas décadas, las investigaciones acerca de las plantas con propiedades farmacológicas, de manera que se pueda extraer, aislar, purificar y elucidar las estructuras de los compuestos responsables de la actividad biológica (8, 9).

Con el fin de validar la medicina tradicional en África, se realizó un estudio de diferentes familias de plantas, entre las que destaca la familia Sterculiaceae, la cual es muy utilizada por las personas que allí habitan debido a sus propiedades curativas. Para ello se seleccionaron 5 especies que varían en su crecimiento y su uso en la medicina tradicional. Las especies seleccionadas fueron: *Cola greenwayi*, *Dombeyaburgessiae*, *Dombeyacymosa*, *Hermannia depressa* y *Cola natalensis*. Los

extractos de cada una de las especies fueron analizados para alcaloides, glucósidos cardiotónicos, glucósidos cianogénicos, saponinas y taninos (7).

Se pudo probar la ausencia de alcaloides, glucósidos cianogénicos y saponinas en todas las especies analizadas, así como la presencia de terpenos en *D. burgessiae* y *D. cymosa*, también, se demostró la presencia de taninos en las hojas de *C. greenwayi*, y en el tallo, hojas y raíces de la *H. depressa*. Se evaluó la actividad biológica de cada una de las especies mediante la actividad antiinflamatoria y antibacteriana observándose que los extractos de etanol y diclorometano de *C. greenwayi*, *D. burgessiae* y *D. cymosa*. Estos junto el extracto de diclorometano de *H. depressa*, presentaron los mayores niveles de inhibición en cada uno de los ensayos realizados (7).

Los análisis espectroscópicos revelaron la presencia de ácido palmítico y ácido mirístico en los extractos de *C. greenwayi*, *D. burgessiae*, *D. cymosa* y *H. depressa*; el alcohol esteárico fue detectado en los extractos de *C. greenwayi* y *H. depressa*; el ácido láurico en los extractos de *D. cymosa* y *H. depressa*, y el eicosano solo fue detectado en *C. greenwayi* (7).

En el continente americano, también, se ha realizado un estudio exhaustivo de la familia Sterculiaceae, debido a sus propiedades y a los antecedentes que presentan, acerca de la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos, compuestos polifenólicos, saponinas, taninos y alcaloides (7,10,11). Esta familia es bastante conocida en los campos americanos, porque a ella pertenecen los géneros *Guazuma* y *Theobroma*, en el primero se incluye al guacimo, como una planta de alto valor, puesto que sus frutos y partes vegetativas tienen un mucílago que es apetecible al ganado; en el segundo, se incluye al “cacao”, especie explotada comercialmente, pues se ha establecido como cultivo económico por las propiedades de sus semillas, de

las cuales se extrae la materia prima para preparar chocolate y la manteca de cacao (12,13).

Hasta ahora, de la familia Sterculiaceae se han identificado 70 géneros y unas 1500 especies, en su mayoría originarias de las regiones tropicales en ambos hemisferios (14). Entre los géneros más estudiado y de los que se han reportado importantes compuestos con aplicabilidad medicinal, se encuentran los *Helicteres*(15), *Walteria* (16) y *Melochia*(17).

Helicteres es uno de los géneros que más se ha estudiado en la familia Sterculiaceae y de donde se han aislado cinco importante flavonoides glucurónidos, los cuales fueron nombrados como: isoscutellarein4'-metiléter 8-*O*-β-D-glucurónido (I); isoscutellarein4'-metiléter 8-*O*-β-D-glucurónido 6''-*n*-butiléster (II); isoscutellarein4'-metiléter 8-*O*-β-D-glucurónido 2''-sulfato (III); isoscutellarein4'-metiléter 8-*O*-β-D-glucurónido2'',4''-disulfato (IV) y isoscutellarein 8-*O*-β-D-glucurónido2'',4''-disulfato (V) (figura 4) (18).

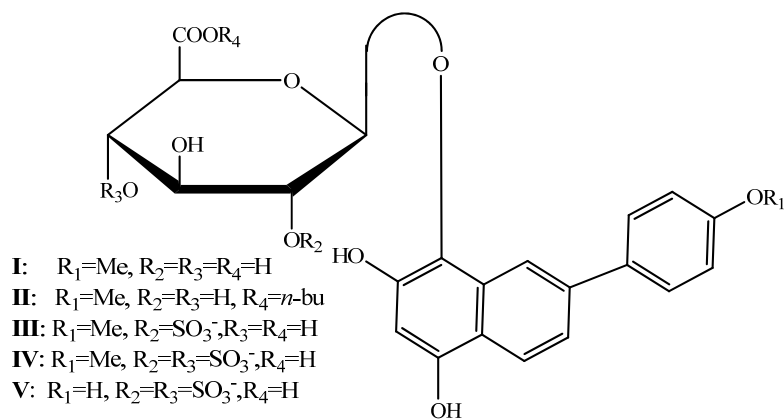


Figura 4. Estructura de los flavonoides glucurónidos.

En el ensayo biológico realizado a las raíces de *H. isora*, se encontró que presentaba actividad antidiabética e hipolipidémica *in vivo* en animales modelos

(ratones suizos albinos y hámsters con sobrepeso); el aislamiento de los compuestos activos presentes en esta planta para definir el mecanismo de su bioactividad, se encuentra aún en progreso (15).

Otra especie que ha sido objeto de estudio es la *H. angustifolia*, de donde se logró aislar cuatro compuestos que poseían los esqueletos del pregnano, (2 α , 7 β , 20 α -trihidroxi-3 β , 21-dimetoxi-5-pregnano) (VI), cumarina (6,7,9 α -trihidroxi-3,8,11 α -trimetilciclohexo-[d,e]-coumarina) (VII), del lupano(ácido 3 β -hidroxi-27-benzoilxilup-20(29)-en-28-oico) (VIII), (ésteres metílicos delos ácidos 3 β -hidroxi-27-benzoilxilup-20(29)-en-28-oico y éster metílico del ácido 3 β -hidroxi-27-benzoilxilup-20(29)-en-28-oico) (IX) (figura 5), adicionalmente se identificaron veinticuatro compuestos que ya han sido reportados, entre los que se encuentran dos derivados del cucurbitacin, los cuales exhibieron actividad inhibitoria significativa contra el crecimiento de las células hepatocelulares delcarcinoma BEL-7402 y de las células malignas del melanoma SK-MEL-28 (19).

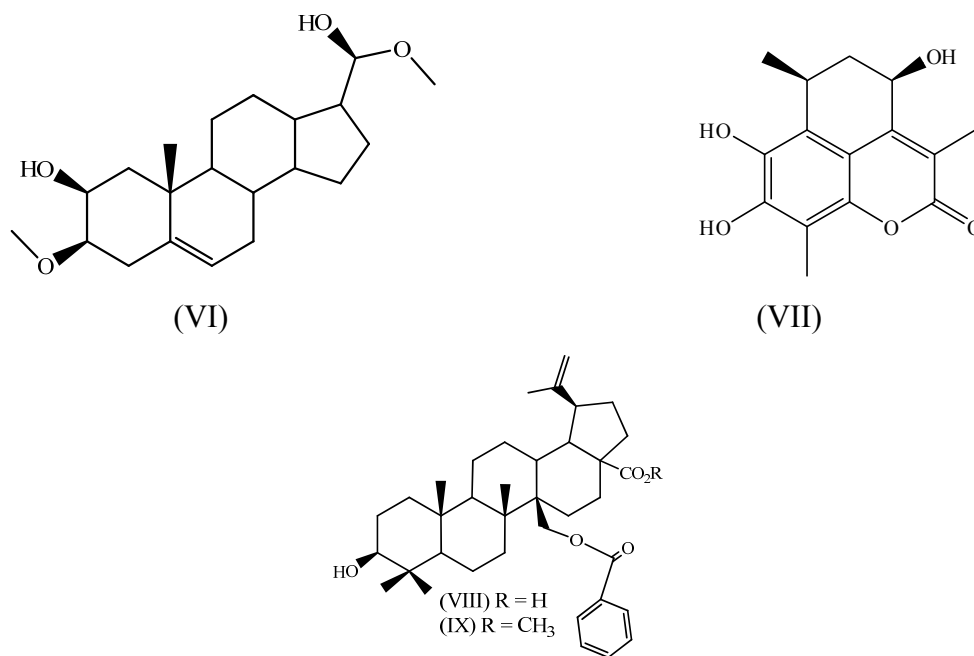


Figura 5. Estructuras de los metabolitos aislados de las raíces y partes aéreas de *H. angustifolia*.

En el oriente venezolano se realizó un estudio acerca de dos especies de *Helicteres* que son ampliamente usados por los habitantes de esa región. Con el fin de constatar su acción farmacológica, se realizaron ensayos biológicos a la *H. baruensis* Jacq y se encontró que posee una importante actividad antibacteriana frente a las bacterias *Salmonella enteritidis* y *Bacillus cereus* una letalidad significativa. Algunos de los compuestos responsables de esta actividad fueron identificados por cromatografía de gases acoplado a un espectro de masas (CG/EM) y se encontró que eran el ácido hexadecanoico, éster metílico del ácido linoleico, ácido mirístico, ácido octadecanoico y por RMN identificaron un esteroide que posiblemente corresponda al campesterol (figura 6) (15).

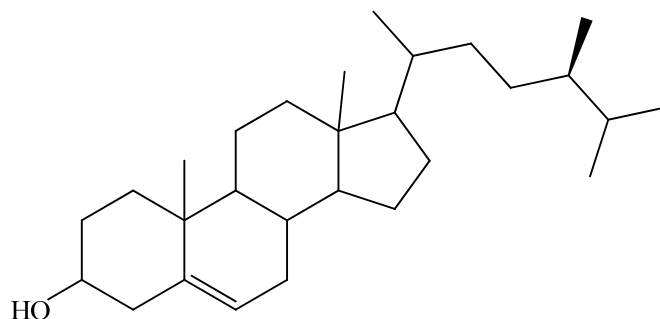


Figura 6. Estructural del campesterol.

En otra investigación se analizó la actividad biológica de *H. guazumifolia* y los posibles compuestos responsables de esta actividad. Se encontró que esta planta posee propiedad antibacteriana, antimicótica y letal y los compuestos responsables de esta actividad fueron identificados en su mayoría como ácidos grasos y sus ésteres (20).

Otros géneros de la familia Sterculiaceae que han despertado un gran interés en investigadores de varias partes del mundo son *Walteria* y *Melochia*, por sus propiedades y uso en la medicina tradicional, y porque existen reportes que las

especies que pertenecen a estos géneros presentan alcaloides ciclopeptídicos(figura 7) como constituyentes principales (16,17).

Este tipo de alcaloide ha demostrado tener diferentes acciones farmacológicas, como: actividades hipotensivas, antidiarreicas, antifúngicas y antibióticas principalmente contra bacterias Grampositivas (21).

Otro alcaloide de gran importancia medicinal que se encuentra presente en estos géneros, es la quinolinona (figura 8). Este metabolito secundario es un agente antibacteriano de gran interés en la industria farmacéutica, ya que es utilizado como tratamiento para las vías urinarias, enfermedades de transmisión sexual, infecciones respiratorias e infecciones gastrointestinales (22,23). La primera quinolinona o ácido nalixídico, fue descubierto en 1962 como una impureza de un producto antimalárico el cual fue comercializado posteriormente (24).

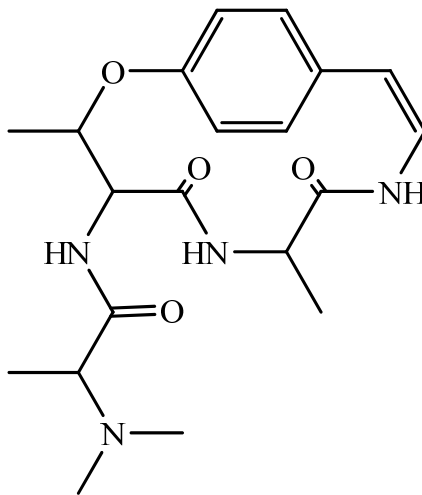


Figura 7. Representación general del alcaloide ciclopeptídico.

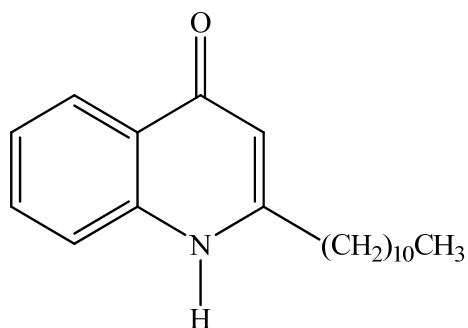


Figura 8. Representación general de la quinolinona.

La *W.douradinha*, es una planta nativa de América del Sur y es utilizada como tratamiento de diversas enfermedades tales como bronquitis, laringitis, además de ser usada como astringente (25). De esta planta se aisló un alcaloide quinolinólico con estructura poco usual al cual llamaron walteriona-A (figura 9), esta clase de alcaloide solo se había reportado anteriormente de la *Melochia tomentosa* de donde se aislaron la melochinona (26) y la melovinona (27).

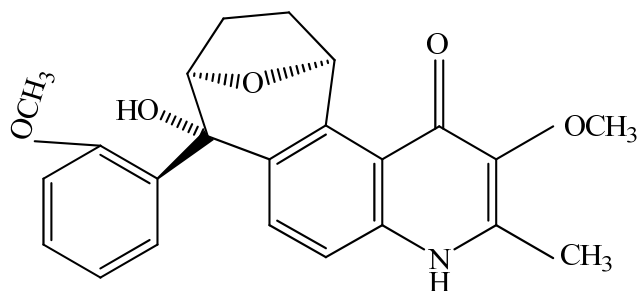


Figura 9. Estructura de la walteriona-A.

Otra especie que pertenece al género *Walteriaes* la *W. indica*, que se encuentra principalmente en Filipinas y es utilizada como febrífugo, emoliente, antirábica, antisifilítica y purgante. Las investigaciones químicas mostraron que esta planta está constituida por alcaloides ciclopeptídicos, flavonoides, flavonoides glicosilados y ácido cafeico; además de poseer una actividad antifúngica importante frente al hongo *Trichophytonmentagrophytes*, debido a la presencia de flavonoides.

De la *W. indica* se aislaron y caracterizaron dos flavonoides conocidos como: 2,3',5'-trihidroxi-3,7,4'- trimetoxiflavona (X) y 5, 2'-dihidroxi-3,7,4',5'- tetrametoxiflavona (XI) (figura 10) (25,28,29).

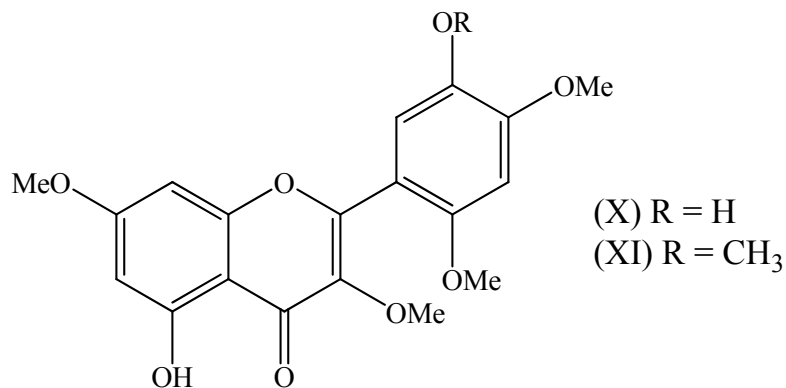


Figura 10. Estructuras de los flavonoides aislado de la *W. indica*.

Del género *Melochia*, específicamente *M.corchorifolia*, se logró aislar y elucidar tres alcaloides del tipo ciclopeptídico, los cuales fueron nombrados como franganina (XII), fragufoia(XIII), y melofolina(XIV) (figura 11) (30).

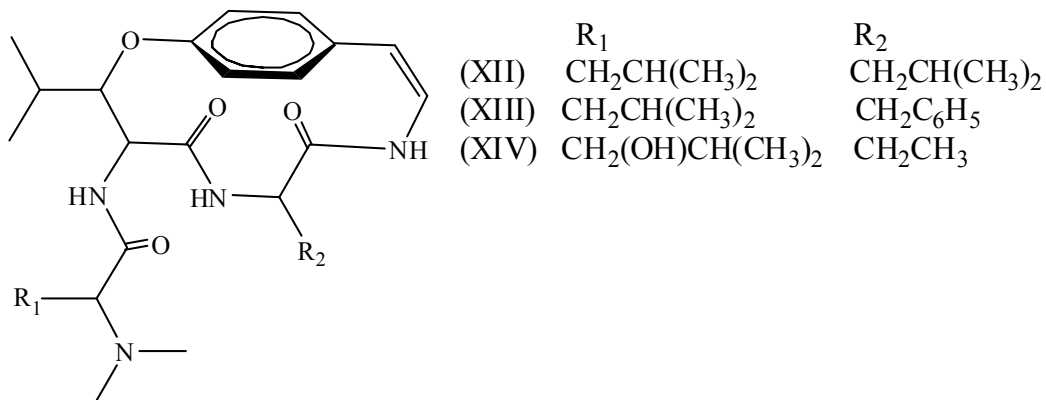


Figura 11. Estructuras de los alcaloides ciclopeptídicos aislados de la *M.corchorifolia*.

Posteriormente, de esta misma especie se aisló un alcaloide pseudoindólico, el cual fue nombrado como melochicorina (figura12), y por medio de un tratamiento

con anhídrido acético y piridina, se confirmó, la presencia natural del grupo hidroxilo terciario en la molécula (30).

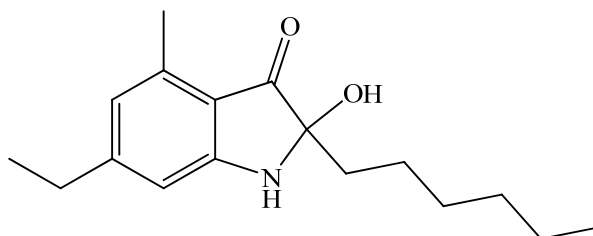


Figura 12. Estructura de la melochicorina.

De la raíz de *M. chamaedryse* aislaron cinco compuestos, de los cuales cuatro eran conocidos y uno era desconocido, este último fue identificado como un péptido cíclico mediante análisis espectroscópico, y se nombró como chamaedrina (figura 13), esta parte de la planta es utilizada por la población local para tratar el cáncer, y como antihipertensivo (31).

De la raíz de *M. tomentosa* recolectadas en Brasil, se aisló la primera cumarina identificada en la familia Sterculiaceae, la cual fue **nombrada como 6-metoxi-7,8-metilenodioxicumarina (XV) (figura 14) (32)**. Además, se aisló un alcaloide quinolinólico conocido como melochinona (XVI) (26) y un compuesto análogo al mismo, de cadena abierta conocido como melovinona (XVII) (figura 14) (27).

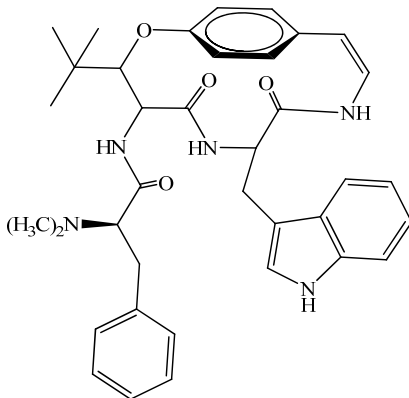


Figura 13. Estructura de la chamaedrina.

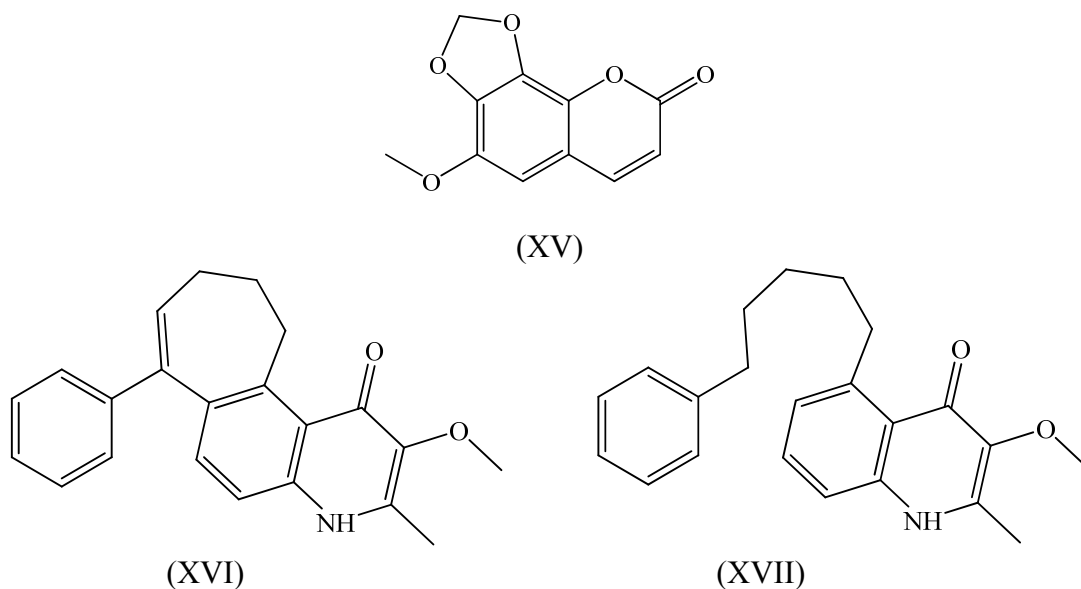


Figura 14. Estructuras de los metabolitos aislados de las raíces de *M. tomentosa*.

Otra clase de alcaloide que se aisló de las raíces de esta misma especie, son los alcaloides del tipo isantín, identificados como melosatinas A (XVII), B (XVIII) y C (XIX) (figura 15) (33).

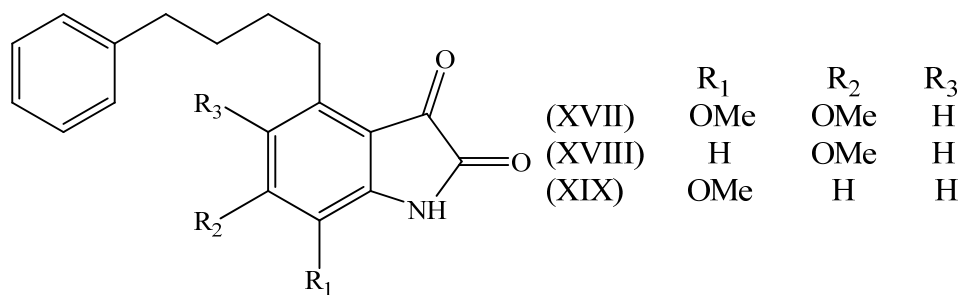


Figura 15. Estructuras de los alcaloides aislados de las raíces de *M. tomentosa*.

Además, se aisló tres alcaloides ciclopeptídicos conocidos como scutianina B (XX), melonovinas A (XXI) y B (XXII) (figura 16) (34).

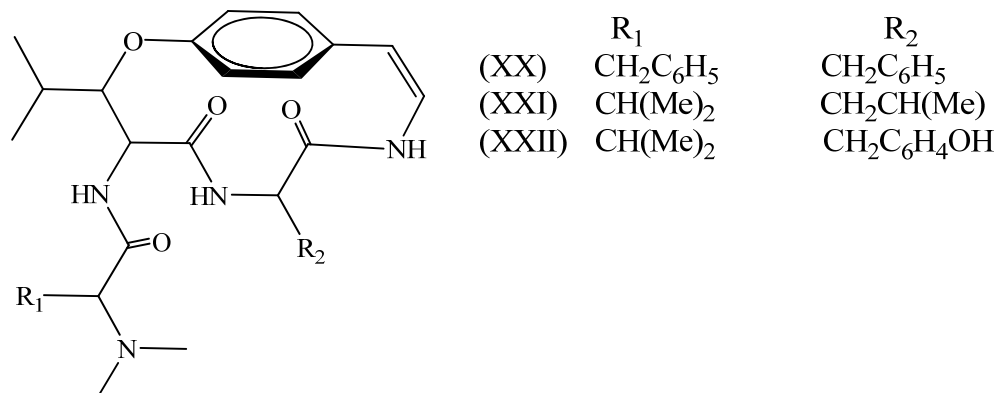


Figura 16. Estructuras de los alcaloides ciclopeptídicos aislados de la raíces de *M. tomentosa*.

Melochiaes el género de interés a ser estudiado y está representado por aproximadamente unas 68 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, con escasas especies en zonas templadas. En Venezuela, se han reportado 17 especies del género *Melochia* que se desarrollan en diferentes regiones y formaciones vegetales (14). Plantas de este género son utilizadas por algunas localidades, para el alivio de la inflamación de garganta, agentes antitumorales, como una cura para la hinchazón abdominal y para la conjuntivitis (17,35).

En particular, *M. tomentosa* (figura 17) es la especie de interés en esta investigación, la misma crece en América, es conocida como malva de rosa y en Venezuela su nombre común es “bretónica morada”. Es una hierba arbustiva de 1 a 3 m de alto, de color cenizo; sus hojas y tallo están cubiertos por vellosidades; las flores son de color violeta; el fruto es de color verde, mide alrededor de 1 cm de largo y se encuentra cubierto de pelos (14).



Figura 17. *Melochia tomentosa*.

La parte botánica de *M. tomentosa* que ha sido, hasta ahora, ampliamente estudiada en otros países de América, ha sido la raíz, de la cual se ha reportado el aislamiento de varios de sus constituyentes químicos y sus estructuras.

La búsqueda de nuevos compuestos con potencial aplicabilidad en la industria farmacéutica ha conllevado a muchos investigadores al estudio de las plantas, ya que estas representan la fuente más importante de sustancias químicas con actividades biológicas y una vía para aislar compuestos que puedan ser aplicados como tratamiento para el cáncer. Por lo antes expuesto y basados en los antecedentes que existen de esta especie acerca de sus constituyentes principales, el presente trabajo de investigación está enfocado en el estudio de *M. tomentosa*, recolectada en el oriente venezolano, con el fin de aislar e identificar los constituyentes químicos presentes en las partes botánicas seleccionadas (tallos y hojas). Es importante señalar que los resultados que se obtengan de esta investigación constituirán un aporte para la validación del uso medicinal de esta familia de plantas realizada en África, y un aporte científico para la población venezolana que hace uso de esta especie. Además existe poca información en la literatura acerca del estudio realizado en Venezuela de esta planta.

METODOLOGÍA

MUESTREO

Los ejemplares de *M. tomentosa* fueron recolectados en la localidad de Tocuchare, estado Sucre (figura 18), Venezuela e identificados en el herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (IRBR) del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente (UDO).



Figura 18. Zona de muestreo de la planta *M. tomentosa*.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La planta se secó a la sombra, a temperatura ambiente en el Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos (EC-310). La obtención de los extractos crudos, se realizó moliendo, por separado, cada una de las partes orgánicas (hojas y tallo) en un molino eléctrico. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con metanol y el solvente fue eliminado, evaporándolo bajo presión reducida para la obtención de los extractos crudos; luego, se le realizaron las pruebas de actividad biológica y un estudio fitoquímico preliminar antes del fraccionamiento cromatográfico.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

La actividad biológica de los extractos crudos y las fracciones de *M. tomentosa* (hojas y tallo), se evaluó mediante la utilización de los siguientes bioensayos:

Actividad antibacteriana

La presencia de principios activos antibacterianos se detectó utilizando bacterias certificadas (tabla 1), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) existentes en el Laboratorio de Productos Naturales (Lab 410) del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 1. Cepas bacterianas pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Características	Microorganismos	Origen
Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC) 6538
	<i>Micrococcus luteus</i>	(ATCC) 9341
Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	(ATCC) 10536
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC) 25416

Este ensayo se realizó siguiendo la técnica de difusión en agar o método de Antibiograma (36), el cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro con 10 o 25 µl de una solución preparada (40 mg/ml) del extracto o fracción a analizar. Estos discos se colocaron dentro de cápsulas de Petri que contenían agar Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1×10^8 bacterias/ml), preparada por comparación con un patrón comercial estándar N° 0,5 de McFarland. Posteriormente, las cápsulas se preincubaron a 5°C durante 12 horas, para permitir la difusión del

extracto o fracción, y, luego, se incubaron a 37°C durante 48 horas, para permitir el crecimiento bacteriano.

La actividad antibacteriana se verificó midiendo el diámetro (mm) de los halos de inhibición alrededor de los discos. Se evaluaron los diámetros de los halos de inhibición tomando como referencia los criterios expuestos, por algunos investigadores del área de productos naturales, para extractos crudos (37).

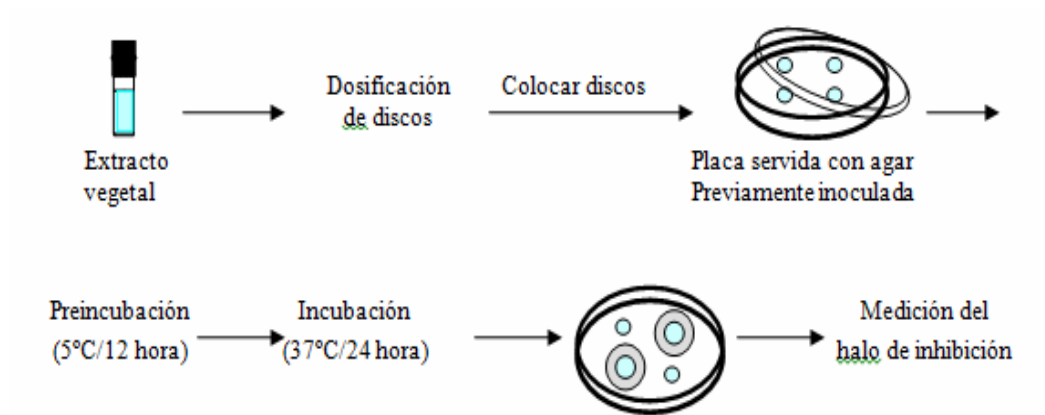


Figura 19. Representación esquemática del análisis de la actividad antibacteriana.

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica fue evaluada mediante la utilización de cepas de hongos (tabla 2), los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Biología y Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología y Laboratorio de Microbiología, de la Universidad de Oriente.

Característica	Hongos	Origen
Patógeno	<i>Curvularia lunata</i>	----
Patógeno	<i>Mucor</i> sp	----
Patógeno	<i>Penicillium</i> sp	----
Patógeno	<i>Candida albicans</i>	(ATCC) 10231
Patógeno	<i>Aspergillus oryzae</i>	----
Patógeno	<i>Aspergillus niger</i>	----

Esta técnica consistió en incubar cepas de hongos por una semana, en tubos de vidrio a temperatura ambiente; al cabo de este tiempo se añadieron 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo, se agitó y filtró para obtener una suspensión de esporas de cada cepa incubada. La solución obtenida se sembró sobre cápsulas de Petri, previamente servidas con agar Papa Dextrosa (PDA), usando hisopos estériles. Seguidamente, se colocaron discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro impregnados con la muestra (10 ó 25 µl). Se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente para permitir el crecimiento fúngico. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco, fue el indicativo de la actividad fúngica del extracto o fracción, los cuales se midieron tomando en cuenta el diámetro, en mm (38).

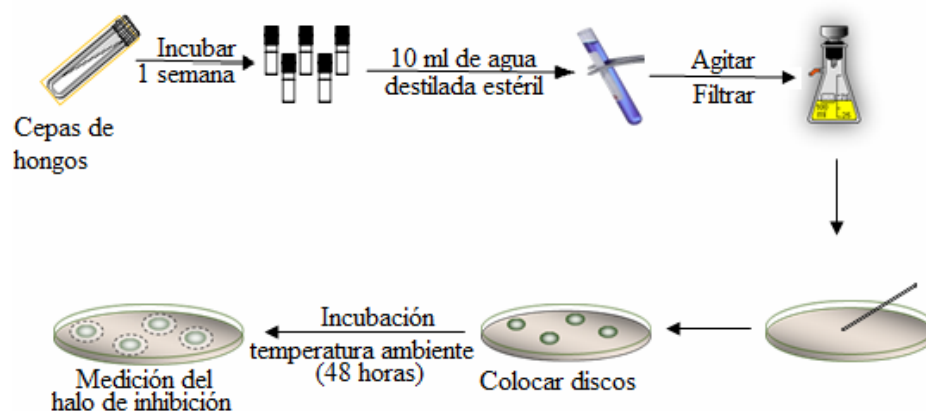


Figura 20. Metodología para evaluar la actividad antifúngica de los extractos y fracciones de *M. tomentosa*.

Ensayo de Artemia salina

El grado de toxicidad de los extractos crudos y de algunas fracciones, se evaluó con crustáceos de *A. salina*. Los quistes se colocaron en un envase de plástico provisto de una apertura con agua de mar bifiltrada, y de esta manera facilitar la aireación continua durante 24 horas para obtener los nauplios de *A. salina*.

Solución patrón: 10 000 µg/ml

(10 mg de extracto + 0,5 ml de agua de mar bifiltrada + 0,5 ml de solvente)

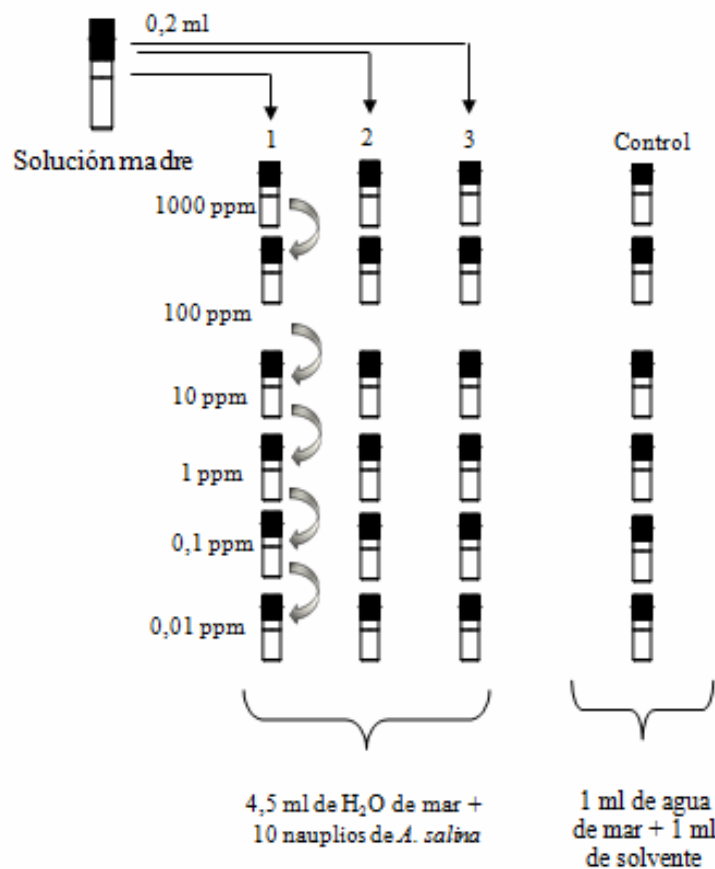


Figura 21. Metodología para evaluar la actividad letal de los extractos y fracciones de *M. tomentosa*.

Este método consistió en la preparación de una solución madre de 10 000 µg/ml del extracto o fracción con agua de mar bifiltrada o en dimetilsulfóxido (DMSO), según la solubilidad en éstos. A partir de la solución madre, se prepararon

soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ mediante diluciones sucesivas. Posteriormente, a cada solución se le agregaron 10 nauplios de *Artemia salina* y, por cada concentración se realizaron 3 réplicas y controles con igual número de réplicas. El grado de mortalidad de los nauplios se determinó después de transcurridas 24 horas desde el inicio del bioensayo y, luego se anotó el número de organismos muertos para cada una de las concentraciones. Con los datos obtenidos se calculó la concentración letal media (CL_{50}) utilizando un programa estadístico de computación (Probit, Logit o Binomial), diseñado con un límite de confianza de 95% (39).

PRUEBAS QUÍMICAS

A cada extracto se le realizó un análisis fitoquímico, con el fin de detectar la posible presencia de familias de compuestos, tales como: alcaloides, triterpenos, esteroides, flavonoides, saponinas, polifenoles, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos, metilencetonas y antraquinonas (40). Para ello, se siguieron las siguientes metodologías.

Saponinas

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 g del el extracto crudo y se adicionaron 2 ml de agua destilada; posteriormente, se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se asume la presencia de saponinas, si se forma una espuma persistente durante 30 minutos, en una zona de 3-15 cm por encima de la superficie del líquido.

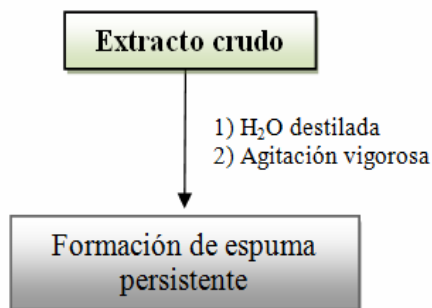


Figura 22. Esquema de la prueba de detección de saponinas.

Flavonoides

Se pesó 1 g del extracto crudo y luego se desgrasó con éter de petróleo, se filtró y el residuo se analizó para flavonoides, empleando los siguientes métodos: La parte del residuo, se colocó en un tubo de ensayo y se le agregaron 2 ml de HCl concentrado y virutas de magnesio. Se consideró positivo para flavonoides al producirse una coloración roja cuando se dejó reposar la reacción por unos 10-20 minutos.

Una gota del extracto se colocó sobre un papel de filtro y se roció con una solución de cloruro de amonio al 1% en etanol. La aparición de una mancha fluorescente amarilla bajo luz UV indicó la presencia de flavonoides.

Se colocó sobre un papel de filtro, aproximadamente 0,5 g del extracto crudo disuelto en cloroformo y se observó, bajo luz UV. Seguidamente, se expuso el papel en vapores de amoníaco concentrado; de mostrarse un cambio o intensificación de color, la prueba se considera positiva para flavonoides.

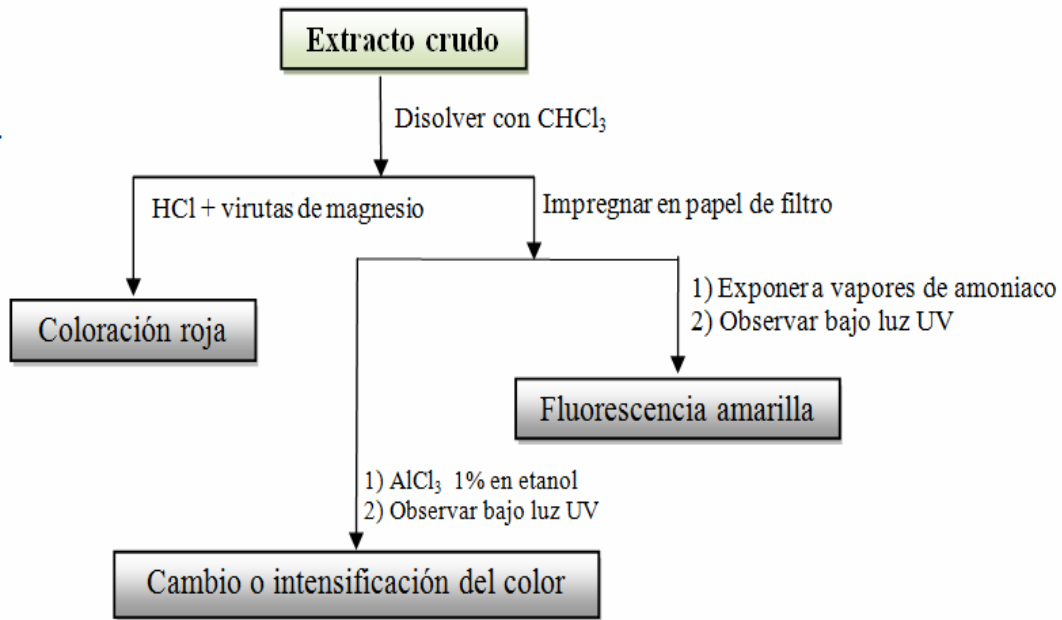


Figura 23. Esquema de la prueba de detección de flavonoides.

Glicósidos cardiotónicos

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 g del extracto crudo, se disolvió en cloroformo y, luego se hizo reaccionar con una mezcla al 50-50% recién preparada de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,5 mol/l). Se consideró positiva esta prueba con la aparición de una coloración azul o violeta.

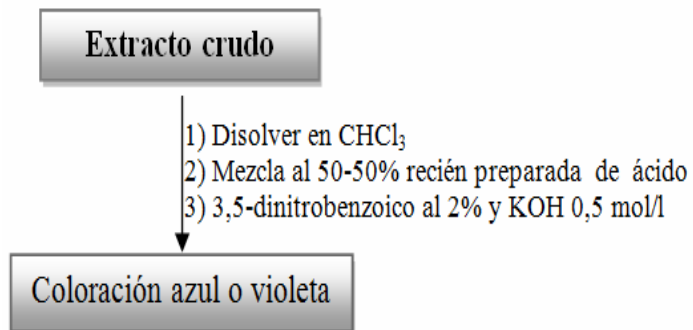


Figura 24. Esquema de la prueba de detección de glicósidos cardiotónicos.

Glicósidos cianogénicos

Al extracto crudo se le añadieron unas gotas de cloroformo y se calentó a 50-70°C en un tubo cerrado, los vapores entraron en contacto con un papel de filtro impregnado con una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se manifestaron como una mancha roja sobre el papel. El tiempo de reacción varía, y puede tomar hasta 2 horas.

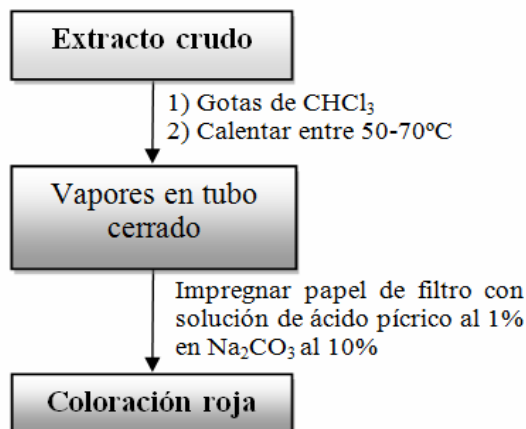


Figura 25. Esquema de la prueba de detección de glicósidos cianogénicos.

Compuestos fenólicos

Polifenoles: Se colocó aproximadamente 1 g del extracto crudo en suspensión con agua, se filtró y el filtrado se dividió en dos; la mitad de la solución se colocó en un tubo de ensayo y, se le agregaron unas gotas de una solución de cloruro de hierro (III) al 1% recién preparada. Si se produce una coloración parda, se asume la presencia de polifenoles.

Taninos: La otra mitad del filtrado (suspensión acuosa del extracto crudo), se trató con una solución al 1% de gelatina en cloruro de sodio al 1%, un precipitado blanco indicó la presencia de taninos.

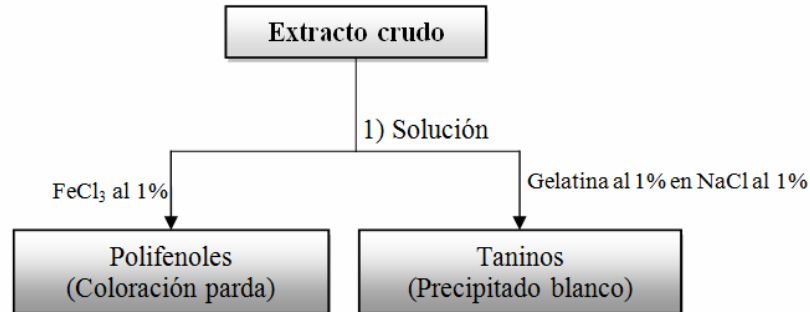


Figura 26. Esquema de las pruebas de detección de compuestos fenólicos.

Antraquinonas

Se pesó 0,5 g del extracto crudo y se extrajo con KOH (0,5mol/l), se filtró y luego se acidificó con ácido acético y se agitó con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.

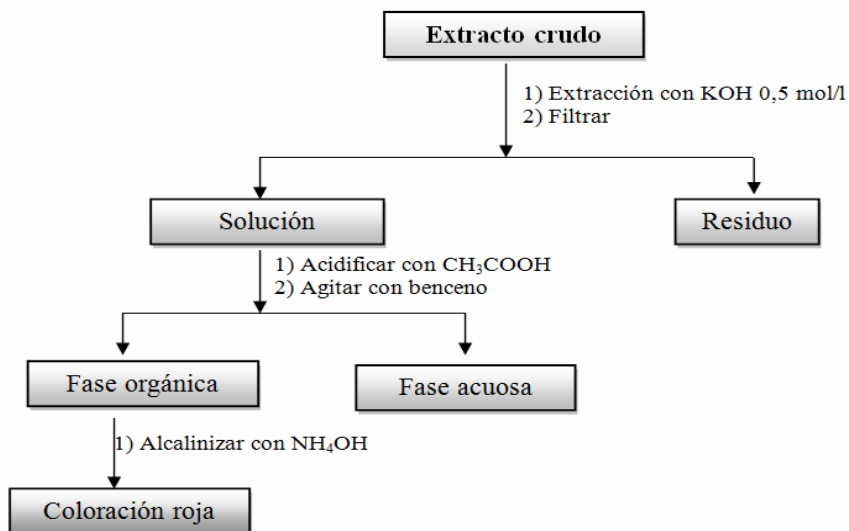


Figura 27. Esquema de las pruebas de detección de antraquinonas.

Alcaloides

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 g del extracto crudo y luego, se disolvió en HCl (10%) y se agitó en un embudo de separación con cloroformo, la fase orgánica se conservó, mientras que la fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio al 10% y se extrajo con cloroformo. Las tres fases se analizaron para alcaloides, por separado, utilizando el reactivo de Dragendorff; un precipitado naranja rojizo dio indicio de la presencia de alcaloides.

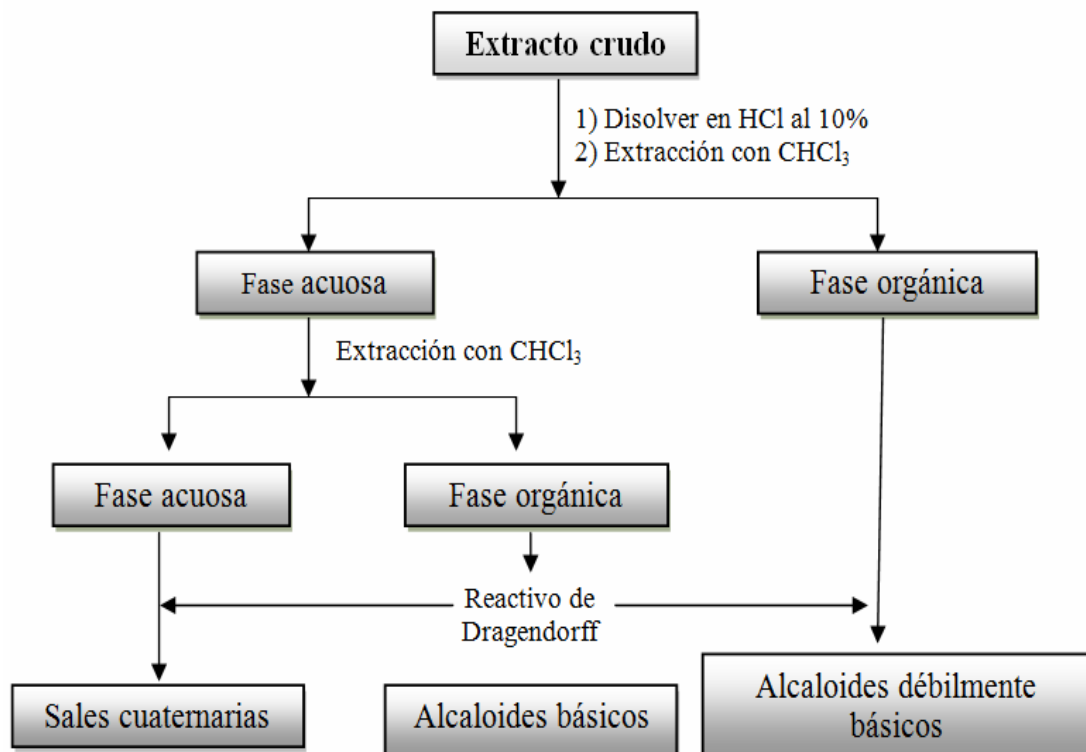


Figura 28. Esquema de las pruebas de detección de compuestos alcaloides.

Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos

Se pesó 0,5 g del extracto crudo y se disolvió en cloroformo, luego se hizo reaccionar con unas pocas gotas del reactivo Liebermann-Burchard (solución de

anhídrido acético y cloroformo 1:1 a 0°C, más dos gotas de ácido sulfúrico), recién preparado. Un cambio en la coloración de azul a verde, indicó la presencia de esteroides insaturados; sin embargo, si se produce una coloración violeta se considera positivo para triterpenos pentacíclicos.

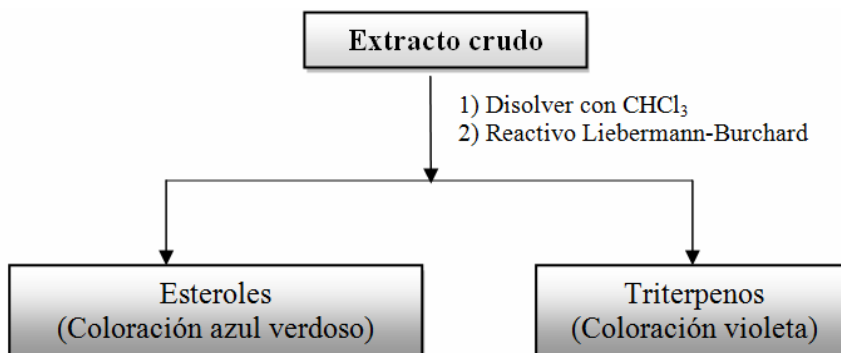


Figura 29. Esquema de las pruebas de detección de esteroides insaturados y triterpenos insaturados.

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes, en los extractos crudos y las fracciones de *M. tomentosa*, se usaron las técnicas cromatográficas convencionales, entre las cuales se encuentran:

Cromatografía de columna (CC)

Se realizó cromatografía de columna por gravedad, utilizando columnas de vidrio de diferentes diámetros y longitud según la masa del extracto o fracción a separar; como fase estacionaria o adsorbente se utilizó sílica gel de 35 – 79 mesh y como fase móvil (eluyentes) se empleó hexano, éter de petróleo, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol y mezclas de estos en distintas proporciones.

Cromatografía de capa fina (CCF) y capa fina preparativa (CCFP)

La cromatografía de capa fina (CCF) se empleó para agrupar las fracciones y subfracciones obtenidas en la CC, tomando en cuenta el R_f de cada uno de los eluatos obtenidos; para ello, se utilizaron placas de vidrio 20 x 20 cm² cubiertas de sílica gel de 60 mesh con un espesor de 0,5 cm. En la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) el espesor de la sílica gel varió de 0,25 a 1,0 mm, este método se utilizó para separar algunas fracciones y purificar los compuestos aislados; para ambas cromatografías se usaron mezclas de solventes de diferentes polaridades. El revelado se realizó mediante luz ultravioleta (UV) de onda corta (100-280 nm) y/o solución de molibdato de amonio al 5% en H₂SO₄ al 10%.

ACETILACIÓN Y/ O ESTERIFICACIÓN DE FISCHER

Este método se empleó para sintetizar los ésteres de los alcoholes o ácidos grasos que presentaron problemas de solubilidad con los solventes orgánicos; para ello se acetilaron 400 mg de la muestra con 1 ml de anhídrido acético y 0,5 ml de piridina, luego se dejó a temperatura ambiente por toda la noche. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en H₂O/hielo y se extrajo con cloroformo. La solución en cloroformo (fase orgánica) se lavó con HCl al 10 %, luego se agregó NaOH al 10%, seguidamente se separó la solución de cloroformo (fase orgánica), la solución de NaOH y una parte de la mezcla que no se acetiló. La solución clorofórmica se lavó con agua, se secó con Na₂SO₄ anhídrido y se dejó en un desecador para que se concentrara (41).

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Para la identificación de los compuestos aislados, se hizo uso de las siguientes técnicas espectroscópicas y espectrométricas:

Espectroscopia infrarrojo (IR)

Esta técnica espectroscópica es una herramienta útil, donde la absorción de radiación en la región del IR puede proporcionar valiosa información acerca de la naturaleza de los compuestos, y de la existencia de grupo funcionales. Esto se debe a que la absorción de la luz infrarroja produce aumentos en las frecuencias de alargamiento y flexión de los enlaces entre los átomos. Estas frecuencias de un enlace está determinada principalmente por la masa de los átomos que participan en él y por la fuerza del enlace. Los enlaces que caracterizan los grupos funcionales poseen frecuencias específicas a las cuales absorben, y bandas de absorción características en la región infrarrojo del espectro, por lo que esta técnica representa una herramienta valiosísima para la caracterización de los grupos funcionales presentes en las muestras a ser analizadas.

Estos espectros se realizaron en el Instituto Universitario Tecnológico (IUT) de Cumaná, para lo cual las muestras se disolvieron en CHCl_3 , y se colocaron en placas de KCl o en algunos casos se prepararon pastillas con KBr, luego, se analizaron en un espectrofotómetro de FTIR 16 PC marca Perkin Elmer.

Cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG/EM)

La cromatografía de gases (CG) es una técnica muy versátil que se emplea para separar mezclas muy complejas en componentes individuales, donde los compuestos vaporizados son fraccionados como consecuencia de la partición entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria mantenida en una columna. La muestra es introducida como un gas en la cabeza de la columna; los componentes que tienen una solubilidad finita en la fase estacionaria se distribuyen entre esta fase y el gas. La espectrometría de masas (EM) es una técnica que consiste en bombardear las moléculas en fase gaseosa con electrones de alta energía, lo que ocasiona que un

electrón sea expulsado de la molécula y se forme un catión radical (ión padre), esto facilita la determinación de la masa molecular exacta de los componentes presentes en la muestra.

Los análisis de los compuestos aislados de la *M. tomentosa* se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), empleando un cromatógrafo de gases marca Varian, modelo Saturn 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones. Las muestras se inyectaron en una columna CP-SIL-8CB-MS de 30m x 0,25 D.I. y helio como gas de arrastre, a una rapidez de 1ml 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. Posteriormente, la identificación de los compuestos se realizó por la comparación computarizada con las librerías WILEY 275 L.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Esta técnica espectroscópica es la herramienta más utilizada para la identificación de productos naturales o compuestos orgánicos en general, ya que permite estudiar las propiedades de las moléculas que contienen núcleos magnéticos, observándose los campos magnéticos en los que entran en resonancia con un campo externo aplicado de frecuencia definida.

Las estructuras de los metabolitos puros obtenidos en la separación cromatográfica de *M. tomentosa*, se elucidaron mediante RMN uni (RMN ^1H , ^{13}C y DEPT – 135) y bidimensional (HMQC, HMBC, COSY ^1H - ^1H , HSQC).

Los análisis de RMN se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en un espectrómetro de BRUKER AM 500 (frecuencia de resonancia ^1H = 500 HMz). Los espectros de RMN ^1H proporcionan

información importante del número de señales distintas de ^1H , el desplazamiento químico, el patrón de acoplamiento y la integración de la intensidad de las señales. Los espectros de RMN ^{13}C proporcionan información acerca del número de tipos diferentes de carbono y el desplazamiento químico de cada señal, que está determinado por el contorno molecular de cada carbono.

Para tal fin, las muestras se disolvieron según la solubilidad de las mismas en solventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) obtenidos en los espectros se reportaron en ppm, respecto a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS). Además de los experimentos de RMN ya mencionados, se realizó DEPT-135 (Distortionless Enhancement Through Polarization Transfer), el cual proporcionó información acerca de la cantidad y el tipo de carbonos (CH , CH_2 , CH_3) presentes en la estructura de los compuestos elucidados.

Los espectros bidimensionales se registraron a frecuencias de resonancia de $^1\text{H} = 500\text{ MHz}$ y de $^{13}\text{C} = 125,72\text{ MHz}$, utilizando los siguientes experimentos:

HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence): Este experimento de correlación heteronuclear permite correlacionar protones y carbonos unidos directamente con un enlace de alta sensibilidad.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation): Este experimento tiene una secuencia con elementos comunes del HMQC y suministra espectros similares, la diferencia fundamental entre ambos experimentos radica en que HMQC están ausentes los acoplamientos homonucleares, por lo que los anchos de línea en esta dimensión están apreciablemente reducidas en el HSQC.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity): Este experimento establece la correlación entre protones y carbonos separados por 2 ó 3 enlaces. A

semejanza del HMQC y el HSQC, es un experimento muy sensible por resultar de excitación y detección protónica. El HMBC es esencialmente un experimento HMQC adecuado a la detección de correlaciones a través de acoplamientos débiles. Una de las ventajas de este experimento es que permite detectar los carbonos cuaternarios acoplados a protones.

Esta técnica de correlación heteronuclear a 2 ó 3 enlaces permite obtener información valiosísima en la determinación estructural, la información que suministra el HMBC lo convierte en un experimento muy utilizado para ensamblar una estructura desconocida a partir de fragmentos conocidos. Mientras que con los espectros HMQC o HSQC sólo determina conectividades locales a través de un enlace; el HMBC permite conectar átomos más distantes, inclusive aquellos que carecen de protones y para los cuales las técnicas de correlación homonuclear no funcionan.

COSY¹H-¹H (Correlated Spectroscopy Homonuclear): Correlaciona todos los desplazamientos químicos de protones sobre carbonos contiguos (H-C-C-H), con lo cual es posible ubicar los protones vecinos que están acoplados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

M. tomentosa es una planta que ha sido sometida a estudios en Brasil, debido a la presencia de una importante familia de compuestos químicos, como los alcaloides y especialmente alcaloides del tipo ciclopeptídicos y quinolinólicos; sin embargo, hasta el momento solo han sido reportados en las raíces de esta planta. Por tal motivo, se procedió a la recolección de las muestras de *M. tomentosa* en suelo venezolano para ser estudiadas mediante análisis fitoquímico y biológico para constatar la presencia de esta clase de metabolitos secundarios y la presencia de otra clase de compuestos químicos en otras partes de esta planta (hojas y tallo), que pudieran ser aprovechadas con fines curativos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los análisis fitoquímicos y biológicos de los extractos metanólicos y fracciones de las hojas y del tallo de *M. tomentosa*.

RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS Y EL TALLO DE *M. tomentosa*

Para la obtención de los extractos metanólicos, se separaron cada una de las partes botánicas de interés y se dejaron secar al aire libre por varios días en el laboratorio de Productos Naturales y Lípidos (Lab 310), obteniéndose 45,4798 g de hojas secas y 70,7865 g del tallo igualmente seco. Posteriormente, se realizaron extracciones exhaustivas con metanol, y el solvente en ambos casos, fue eliminado a presión reducida en un rotaevaporador Heidolf, obteniéndose un líquido muy viscoso y pegajoso, de olor agradable y de color ámbar en el caso del tallo, y una pasta color ámbar y de poco olor, para las hojas. El porcentaje de extracción con relación al

material seco, fue de 62,98% y 74,12% para las hojas y el tallo, respectivamente. En la tabla 3 se reportan los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción.

Tabla 3. Porcentaje de extracción de las partes botánicas (hojas y tallo) de *M. tomentosa*.

Parte botánica (g)	Material seco (g)	Extracto crudo (g)	%Extracción
Hojas	22,1514	13,9510	62,98
Tallo	27,2861	20,2245	74,12

ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

En el análisis fitoquímico realizado al extracto metanólico de las hojas (EMH) y del tallo (EMT), se detectó la presencia de esteroides insaturados y flavonoides en ambos extractos. Además, en el EMT se detectaron otras familias de metabolitos secundarios, tales como: saponinas, taninos y polifenoles (tabla 4).

En el caso del EMH, donde solo se detectaron dos familias de metabolitos secundarios, se puede decir, que es probable que se deba a las bajas concentraciones en que se encuentren los mismos en el extracto, como para ser detectados por los reactivos químicos empleados; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que este extracto se halle constituido por otros tipos de metabolitos secundarios.

Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de *M. tomentosa*.

Familia de compuestos	EMH	EMT	% EMF
Alcaloides	-	-	0
Saponinas	-	+	50
Esteroides insaturados	+	+	100
Triterpenos pentacíclicos	-	-	0
Glucósidos cardiotónicos	-	-	0
Glucósidos cianogénicos	-	-	0
Polifenoles	-	+	50
Metilencetonas	-	-	0
Taninos	-	+	50
Antraquinonas	-	-	0
Flavonoides	+	+	100

%MPE	18,18	45,45
------	-------	-------

(+) : detectado (-) : no detectado.

%EMF: porcentaje de extractos con metabolitos pertenecientes a la misma familia química.

%MPE: porcentajes de metabolitos presentes para cada extracto.

Los resultados obtenidos representan un importante aporte a la quimiotaxonomía de *M. tomentosa*, ya que no existe en la literatura reportes acerca de la identificación de estas familias de metabolitos secundarios en el género *Melochia*; sin embargo, estudios realizados a otros géneros de la familia Sterculiaceae, demuestran que los esteroides son compuestos característicos de los géneros que integran esta familia de plantas.

Los esteroides insaturados fueron detectados en el EMT y EMH, mediante el reactivo de Liebermann-Burchard; esta familia de compuestos ha sido reportada en otras especie pertenecientes a la familia Sterculiaceae, como en *Helicteres guazumifolia* Kunth, donde se identificaron los esteroides (24R)-4-estigmasten-3-ona y 4-sitosterol-3-ona mediante cromatografía de gas acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM), y también se caracterizó por RMN de una y dos dimensiones, un esteroide insaturado (20). En *Helicteres baruensis* Jacq se reportó un esteroide, cuya estructura fue identificada como el campesterol (15), y mediante un análisis químico realizado a la *Walteria viscosissima*, se detectó la presencia de esteroides (11).

Los flavonoides también fueron detectados en ambos extractos crudos de *M. tomentosa*; a esta clase de metabolitos secundarios se le atribuye diversas propiedades en las plantas, entre ellas, se puede citar: (a) protección a los vegetales contra la incidencia de rayos ultravioleta y visible, así como protección contra insectos, hongos, virus y bacterias, (b) control de la acción de las hormonas vegetales, (c) agente alelopático y (d) inhibidora de las enzimas. Por otro lado, estos compuestos poseen también importancia farmacológica, ya que algunos investigadores han demostrado que poseen propiedades antiinflamatoria, antiespasmódica, antialérgica,

antiulcerogénica, antiviral, anticarcinogénica y antioxidante; así mismo, son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, diabetes y afecciones cardíacas, entre otras (42).

En un estudio realizado a otra especie de esta familia (*Helicteres isora*) se caracterizaron cuatro flavonoides glucuronidos, los cuales fueron identificados como: isoscutellarein 4-metiléter-8-O-β-D-glucurónido, isoscutellarein 4'-metiléter-8-O-β-D-glucurónido-6''-n-butiléster, isoscutellarein-4-metiléter-8-O-β-D-glucurónido-2''-sulfato e isoscutellarein 4-metiléter-8-O-β-D-glucurónido-2'',4''-disulfato (7).

Otra especie que pertenece a la familia Sterculiaceae es la *Walteria indica*; esta planta es nativa de Filipinas y es usada como febrífugo, emoliente, antirabia y como purgante; las investigaciones químicas revelaron la presencia de flavonoides (10).

El ensayo para verificar la presencia de taninos resultó positivo para el EMT; esta familia de metabolitos secundarios fue evidenciada mediante el tratamiento con una solución al 1% de gelatina en cloruro de sodio al 1%, al formarse un precipitado blanco. Estos productos naturales han sido reportados en otros géneros de la familia Sterculiaceae, donde se puede mencionar los extractos de las hojas de *Cola greenwayi* y de las hojas y tallo de *Hermannia depressa*. Además, se encontró que cada uno de los extractos presentaron actividad antiinflamatoria y antibacteriana, lo cual confirma los antecedentes de los taninos reportados en la literatura, donde se señala que estos metabolitos poseen actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante (7).

El ensayo realizado para determinar la presencia de saponinas resultó positivo para el EMT; este grupo de metabolitos secundarios tiene la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos (acción hemolítica), también ha mostrado poseer una diversidad de actividades biológicas; como antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, molusquicida,

insecticida, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, antiúlceras, analgésica, antipirética, sedante y antimicótica, entre otras. Su aplicabilidad más importante, se debe a que son utilizadas como los únicos precursores de muchos medicamentos esteroideos, tales como hormonas sexuales, contraceptivos orales y diuréticos (43).

Esta familia de compuestos químicos ha sido reportada en los extractos metanólicos de las hojas, tallo, fruto y flor de *H. guazumifolia* Kunth (20) y en el extracto etanólico de *W. viscosissima* (11). La ausencia de las demás familias de metabolitos, y en particular los alcaloides, no indica que no estén presentes en los extractos de *M. tomentosa*, es posible que haya ocurrido un efecto sinérgico con los demás compuestos, por lo que se dificultó detectarlo mediante los reactivos químicos empleados para la caracterización de los grupos funcionales.

ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS EXTRACTOS Y LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS HOJAS Y TALLO DE *M. tomentosa*

Con la finalidad de evaluar la actividad farmacológica de esta planta, se realizaron ensayos de letalidad, antimicrobianos y antifúngicos a los EMH, EMT y las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de los extractos de *M. tomentosa*. Los resultados obtenidos proporcionaron información acerca de las fracciones bioactivas, donde posiblemente se encontraban los metabolitos secundarios causantes de la actividad biológica observada, permitiendo seleccionar algunas de las fracciones para ser analizadas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de letalidad, antimicrobiano y antifúngico.

Actividad letal

La actividad letal se realizó para cada uno de los extractos y algunas fracciones, empleando larvas de *A. salina*; este ensayo fue propuesto inicialmente por varios investigadores como un método rápido, eficiente y sencillo para evaluar la actividad farmacológica y presencia de toxinas en plantas (44).

Los resultados obtenidos mostraron una actividad letal significativa para el EMT (tabla 5), según lo establecido por los investigadores, quienes han señalado que al obtenerse valores de CL_{50} menores o igual a 30 $\mu\text{g/ml}$ se tiene una buena correlación con líneas celulares anticancerígenas del tipo 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 9SP (leucemia), por lo que el extracto o compuestos bioactivos que constituyen una especie en particular pueden exhibir un potencial citotóxico importante. Sin embargo, el EMH se considera letal al exhibir un $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ (39, 44).

Tabla 5. Actividad letal de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de *M. tomentosa*.

Extracto y/o fracción	Método estadístico	Concentración letal media (CL_{50} , $\mu\text{g/ml}$) (24 horas)
EMH	Binomial	182,51
EMT	Binomial	21,24
FHB	-	-
FHG	-	-
FTE	Logit	131,08
FTG	Binomial	821,88

(-): concentración alta ($> 1000 \mu\text{g/ml}$); FHB y FHG: fracción B y G respectivamente obtenidas a partir del extracto de las hojas; FTE y FTG: fracción E y G respectivamente obtenidas a partir del extracto del tallo.

En la tabla 5, se muestran los valores obtenidos en la evaluación de la actividad letal en los EMT y EMH, además también se evaluó para algunas de las fracciones provenientes de las hojas y el tallo de *M. tomentosa*. El EMH mostró un CL_{50}

moderado y las fracciones analizadas a partir de este extracto resultaron inocuas contra *A. salina*, por otra parte el EMT presentó una actividad letal muy buena y las fracciones obtenidas a partir de este extracto, mostraron una letalidad moderada para el caso del FTE y muy leve para FTG.

Esta diferencia en la letalidad entre el EMT y las fracciones obtenidas a partir del mismo, con el EMH y sus fracciones, podría guardar relación con el análisis químico preliminar (tabla 4), donde se observó que el EMT posee un 45,45% de metabolitos secundarios y el EMH solo posee un 18,18%, con respecto a los grupos químicos ensayados; la presencia de más productos naturales en el EMT le confiere una actividad letal significativa en comparación al EMH. Este resultado concuerda con investigaciones realizadas a otras especies de la familia Sterculiaceae, como la *H. guazumifolia* Kunth donde el EMT y EMH presentó un CL₅₀ de 18, 82 µg/ml y 64,82 µg/ml, respectivamente (20).

Actividad antibacteriana

El ensayo de actividad antibacteriana es uno de los ensayos más importantes en el campo de los productos naturales, ya que la búsqueda de nuevos compuestos que puedan inhibir el crecimiento de bacterias es cada vez mayor, debido la resistencia que estos presentan ante los antibióticos disponibles actualmente (45).

En este bioensayo se observó que el EMT presentó una actividad antibacteriana moderada con un efecto bacteriostático (capacidad de bloquear el crecimiento e inhibir la multiplicación de bacterias) frente a todas bacterias ensayadas (tabla 6); mientras que, el EMH no presentó actividad bactericida o bacteriostática ante las cepas ensayadas.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de *M. tomentosa*.

Extracto o Fracción	Microorganismos				%MSE
	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
EMH	-	-	-	-	0
EMT	++	+	++	++	100
FTI	-	++	+	++	75
%EAM	33,33	66,67	66,67	66,67	

(+++): Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), (++): actividad moderada (diámetro entre 15-18mm), (+): actividad leve (diámetro entre 11-14 mm); FTI: fracción I del extracto metanólico del tallo; %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo; %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto.

En la tabla 6, se observa que el EMT resultó activo en un 100% frente a las cepas bacterianas empleadas; sin embargo, el EMH resultó inactivo contra las mismas. Además, a cada una de las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de ambos extractos, se le realizó el estudio para evaluar su posible actividad antibacteriana, y se observó que ninguna de las fracciones fueron activas frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas ensayadas, a excepción de la FTI que inhibió el crecimiento del 75% de los microorganismos empleados; no obstante, la bacteria *E. coli* resultó completamente inactiva frente a esta fracción.

La ausencia de actividad antibacteriana en el EMH está en concordancia con lo reportado en la literatura, acerca de otras investigaciones biológicas realizadas en de las varias especies de la familia Sterculiaceae, donde se menciona que *H. bauruensis* Jacq (15) y *H. guazumifolia* Kunth (20), no presentaron actividad antibacteriana en los extractos metanólicos de las hojas.

Actividad antifúngica

La determinación de la actividad antimicótica se ha convertido en una herramienta valiosa en la química de los productos naturales, ya que proporciona información acerca del potencial que puedan presentar los extractos o fracciones para

inhibir el crecimiento de hongos u organismos filamentosos. Las infecciones a causa de los hongos se han incrementado considerablemente en los últimos años y principalmente en personas inmunodeprimidas, esto le confiere mayor importancia farmacológica a este análisis, pues los resultados obtenidos pueden ser aprovechados con el fin de aislar el o los compuestos causantes de esta actividad (46).

La actividad antifúngica para los extractos y las fracciones de la *M. tomentosa* fue determinada mediante la técnica de difusión en agar. A continuación se presentan los resultados obtenidos en este bioensayo (tabla 7).

El EMH no mostró actividad antifúngica frente a los microorganismos ensayados; sin embargo, la fracción C y H exhibieron una acción bactericida moderada y leve, respectivamente, frente al hongo *Mucor* sp; las demás fracciones no mostraron actividad antimicótica. El hecho de que estas dos fracciones mostraran actividad antimicótica y el EMH resultara inocuo, indicia que existe un efecto antagónico entre los compuestos químicos que constituyen el EMH, y es posible que la ausencia de actividad se deba a este efecto.

El EMT presentó una actividad antimicótica moderada frente *C. lunata*, *Mucor* sp y *Penicillium* sp, la cual significa que el 75% de los microorganismos resultaron sensibles a este extracto; en cambio, las fracciones obtenidas resultaron ser inactivas frente a todas las cepas de hongos ensayadas (tabla 7), a excepción de la FTI que presentó una actividad antifúngica bastante considerable (fuerte) frente al hongo *Penicillium* sp, lo cual podría indicar que la mayoría de los compuestos con este tipo de bioactividad presentes en este extracto, se aislaron en esta fracción.

Tabla 7. Actividad antifúngica de los extractos crudos y las fracciones de las hojas y el tallo de *M.tomentosa*

Microorganismo	Extracto o fracción					%EAM
	EMT	EMH	FHC	FHH	FTI	
<i>Curvularia lunata</i>	++	-	-	-	-	20
<i>Mucor</i> sp	++	-	++	+	-	60
<i>Penicillium</i> sp	++	-	-	-	> +++	40
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	NE	-	-	-	NE	0
<i>Aspergillus niger</i>	NE	-	-	-	NE	0
%MSE	75	0	16,67	16,67	16,67	

(+++): actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), (++): actividad moderada (diámetro entre 15-18mm), (+): actividad leve (diámetro entre 11-14 mm); (NE): no ensayado; FHC y FHH: fracción C y H del extracto metanólico de las hojas; FTI: fracción I del extracto metanólico del tallo;%EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo; %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto.

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Con el fin de aislar y purificar en lo posible los compuestos responsables de la actividad antimicótica, antibacteriana y letal observada en los extractos y algunas fracciones de *M. tomentosa*, se emplearon diferentes técnicas cromatográficas.

Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *M. tomentosa*

El fraccionamiento del EMH se realizó por cromatografía de columna (CC), utilizando sílica gel 35-70 mesh (0,2 – 0,5 mm) como fase estacionaria; como fase móvil se utilizó mezclas de solventes que varió desde el menos polar (hexano) hasta el más polar (metanol). La columna empleada midió aproximadamente 70 cm de alto con un diámetro de 2,5 cm. La relación entre la sílica y el extracto fue de 1:50 (g de extracto: g de sílica gel). Se recolectaron 117 eluatos contentivos de 50 ml cada uno (tabla 8), los cuales fueron agrupados en 12 fracciones (tabla 9) tomando como referencia los R_f observados en la cromatografía de capa fina analítica (CCF). Como

agentes reveladores se emplearon luz ultravioleta de longitud corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio.

El material orgánico recuperado en la CC del EMH fue de 4,2580 g, esto representa un rendimiento de 87,05%.

A cada una de las fracciones obtenidas, se le realizó un ensayo antimicrobiano y se observó que ninguna de las fracciones mostró actividad ante las bacterias ensayadas; sin embargo, la fracción C y H mostraron actividad antimicótica moderada y leve, respectivamente frente al hongo *Mucor* sp. Las demás fracciones resultaron inocuas frente a las cepas de hongos.

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico de la EMH de *M. tomentosa*.

Eluyentes	Porcentaje (%)V/V	Eluatos
Hexano	100	1-3
Hexano-AcOEt	80-20	4-43
Hexano-AcOEt	60-40	44-90
Hexano-AcOEt	50-50	91
Hexano-AcOEt	20-80	92
AcOEt	100	93-98
AcOEt-Acetona	50-50	99
Acetona	100	100-107
MeOH	100	108-117

Tomando como referencia los resultados obtenidos en el análisis antifúngico, las fracciones C y H fueron seleccionadas para ser analizadas y aislar, en lo posible, los compuestos responsables de esta actividad.

La fracción K, a pesar de no haber mostrado ningún actividad de interés farmacológico, fue seleccionada para ser separada y analizada, debido a la buena separación entre sus constituyentes, observada en la CCF; además, es posible que exista un efecto antagónico entre los compuestos que constituyen esta fracción. Las

demás fracciones mostraron ser mezclas complejas de difícil separación según evidencias arrojadas por CCF, por lo que se descartaron para ser analizadas.

Tabla 9. Fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del EMH de *M. tomentosa*.

Eluatos	Fracciones	Masa (mg)
1-7	A	2,7
8-28	B	195,5
9-47	C	85,8
48-60	D	100,1
61-75	E	79,7
76-85	F	156,8
86-106	G	157,3
104-106	H	8,9
107-109	I	9,89
110-111	J	1983,5
112	K	250,6
113-117	L	1089,4

Fraccionamiento cromatográfico de la fracción C

La fracción C no fue necesario separarla mediante técnicas cromatográficas convencionales, ya que en las pruebas de solubilidad, se observó que al agregarle metanol se formaba un precipitado blanco, el cual se separó del líquido; a ambos se le realizó CCF para comparar los R_f de los posibles compuestos presentes en estas sub-fracciones. En el caso del sólido, se observó que se trataba de una mezcla de compuestos con R_f muy cercanos, lo que dificultaría su separación cromatográfica; basado en esto se decidió identificar los compuestos mediante CG/EM.

Tabla 10. Subfracciones obtenidas en la separación de la fracción C.

Subfracción	Característica	Masa (mg)
C1	Sólido blanco	7,9
C2	Líquido amarillento	45,8

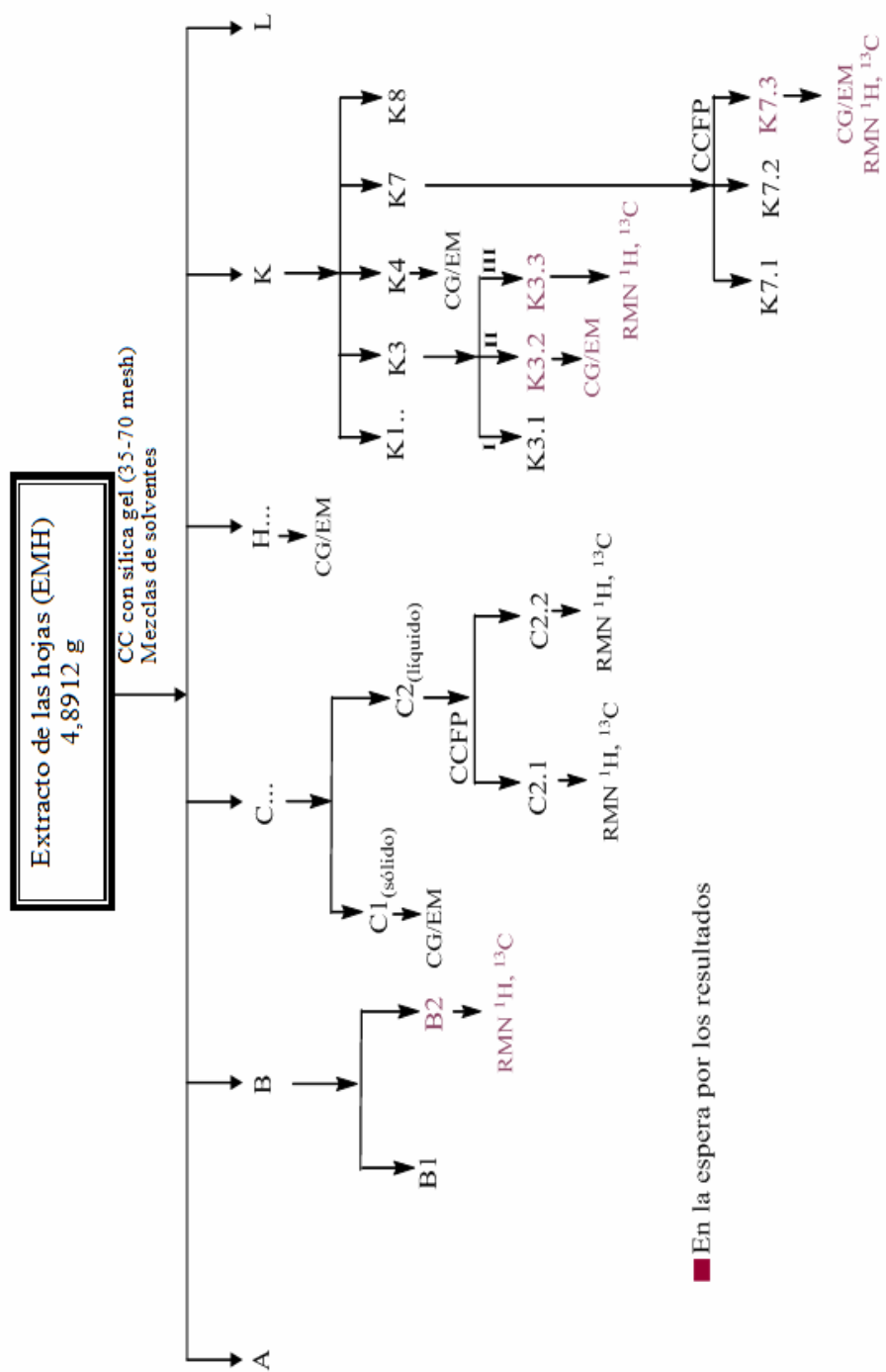


Figura 30. Fraccionamiento cromatográfico del EMH de *M. tomentosa*.

La CCF del líquido reveló que se trataba de una mezcla de dos compuestos con R_f definidos, por lo que se decidió separarlos y purificarlos por CCFP, para posteriormente ser analizados sus constituyentes por RMN.

Separación e identificación de los compuestos de la subfracción C1

La identificación estructural de los compuestos presentes en esta subfracción se realizó por CG/EM, como se muestra en el cromatograma (figura 31). Se evidenció la presencia de 4 constituyentes químicos en los que destacan los ácidos alifáticos: hexadecanoico y octadecanoico; además, fueron identificados sus respectivos ésteres metílicos (tabla 11).

Tabla 11. Compuestos identificados en la subfracción C1.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Fórmula
Éster metílico del ácido hexadecanoico	12,44	$C_{17}H_{34}O_2$
Ácido hexadecanoico	12,75	$C_{16}H_{32}O_2$
Éster metílico del ácido octadecanoico	14,03	$C_{19}H_{38}O_2$
Ácido octadecanoico	14,32	$C_{18}H_{36}O_2$

El espectro de masa del éster metílico del ácido hexadecanoico (I) (TR = 12, 44 min) (figura 32), desplegó un ión molecular a m/z 270 [M^+], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 227, 185, 143, 74 (pico base) y 43. En la figura 33, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

El ácido hexadecanoico (II) (TR = 12, 75 min) constituyó el metabolito más abundante de esta subfracción. Su espectro de masas (figura 34), desplegó un ión molecular a m/z 256 [M^+], y los fragmentos correspondiente a los picos de los iones

más abundantes a m/z 213, 129, 73 y 43 (pico base). En la figura 35 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

El espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico (III) (TR= 14,03 min) (figura 36), exhibió un ión molecular a m/z 298 [M^+], y los fragmentos correspondientes a los picos más abundantes a m/z 255, 199, 143, 74 (pico base) y 43. En la figura 37 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

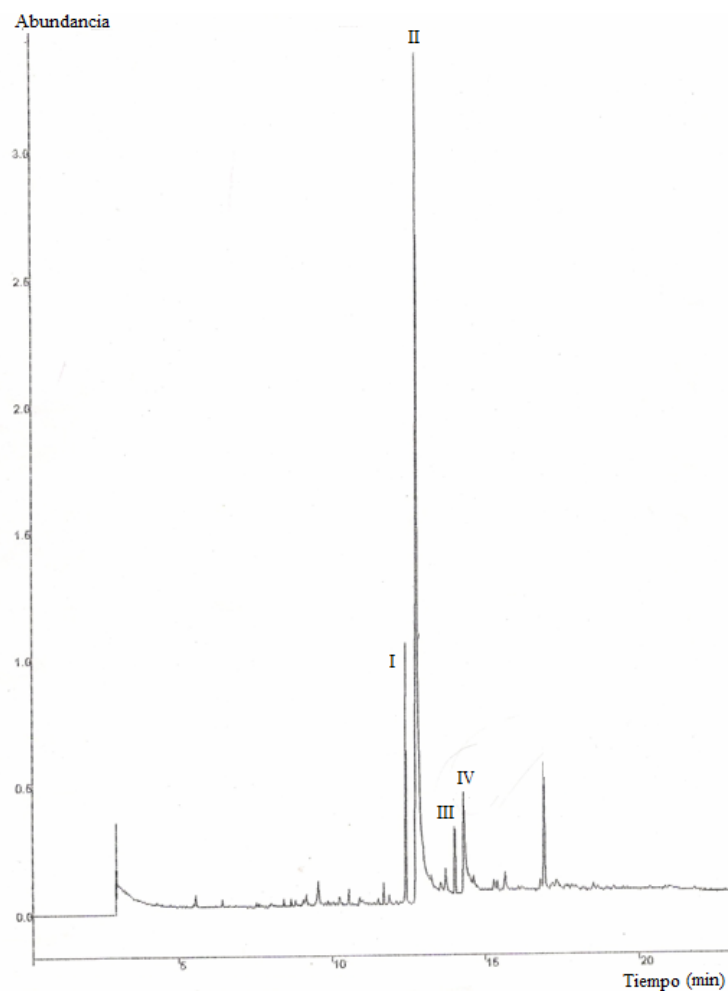


Figura 31. Cromatograma de gases de la subfracción C1

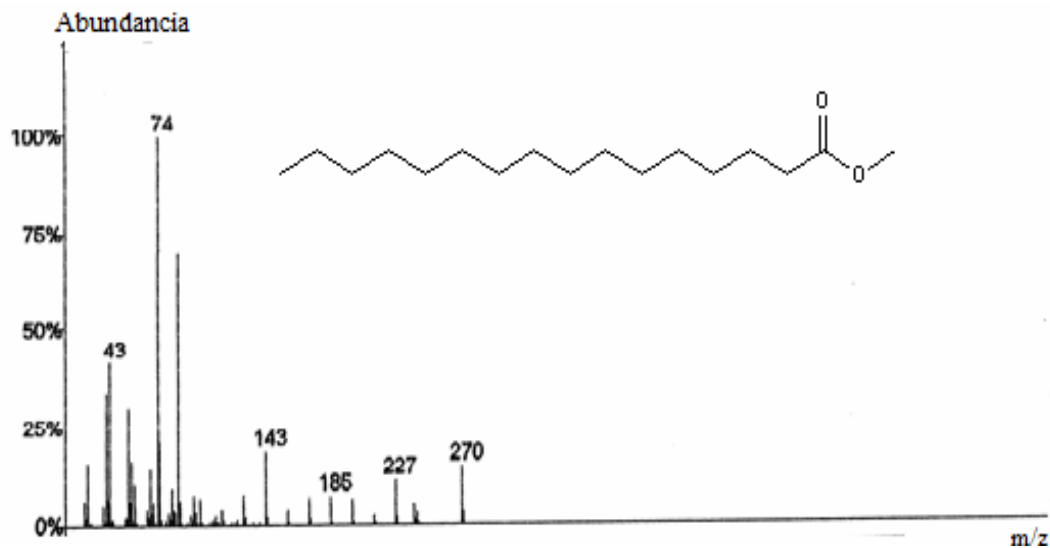


Figura 32. Espectro de masa del éster metílico del ácido hexadecanoico.

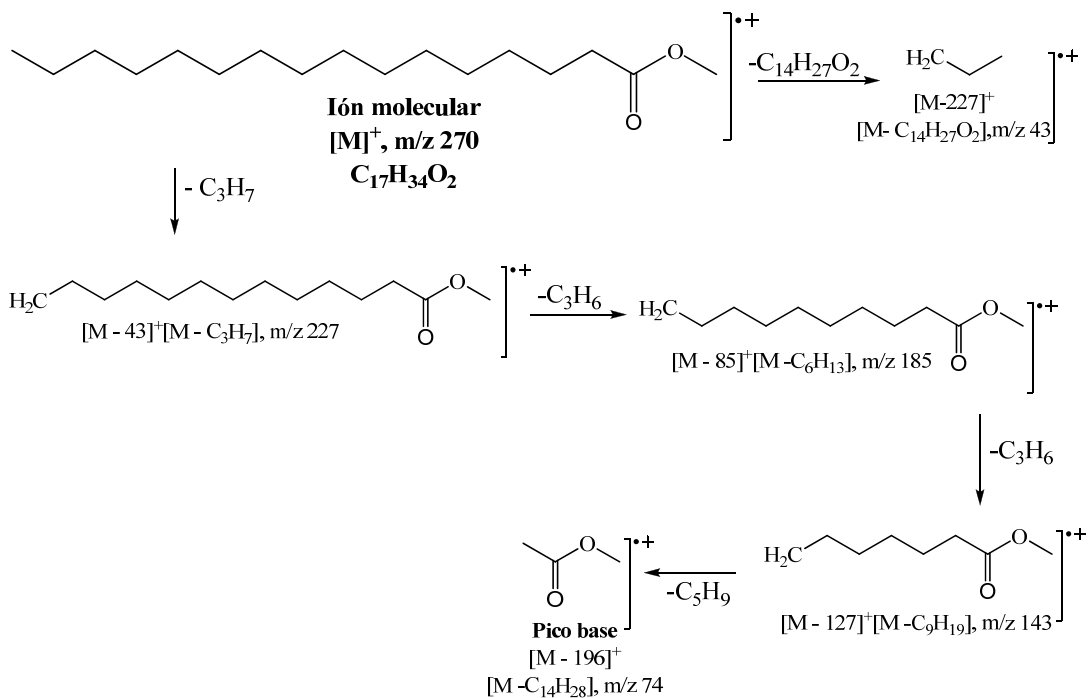


Figura 33. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.

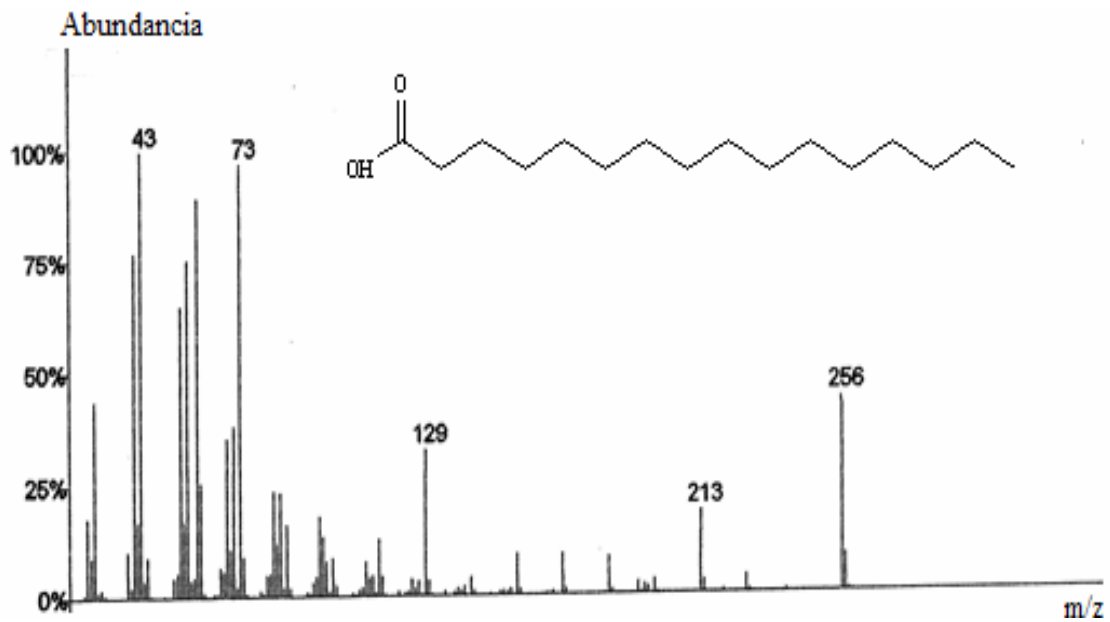


Figura 34. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.

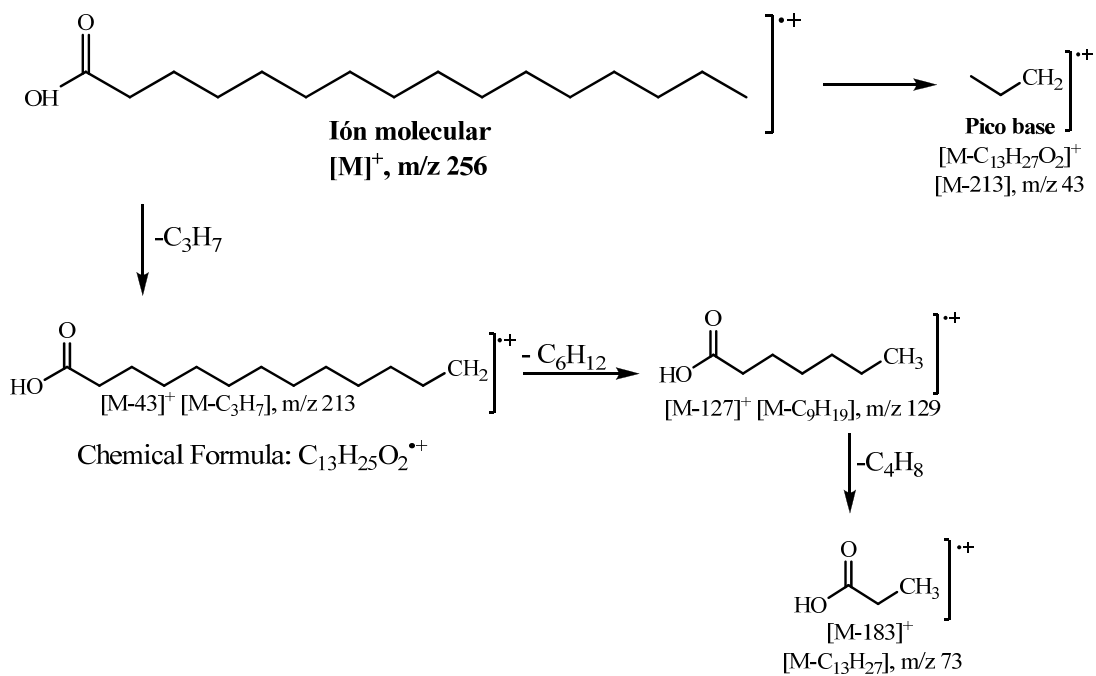


Figura 35. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico.

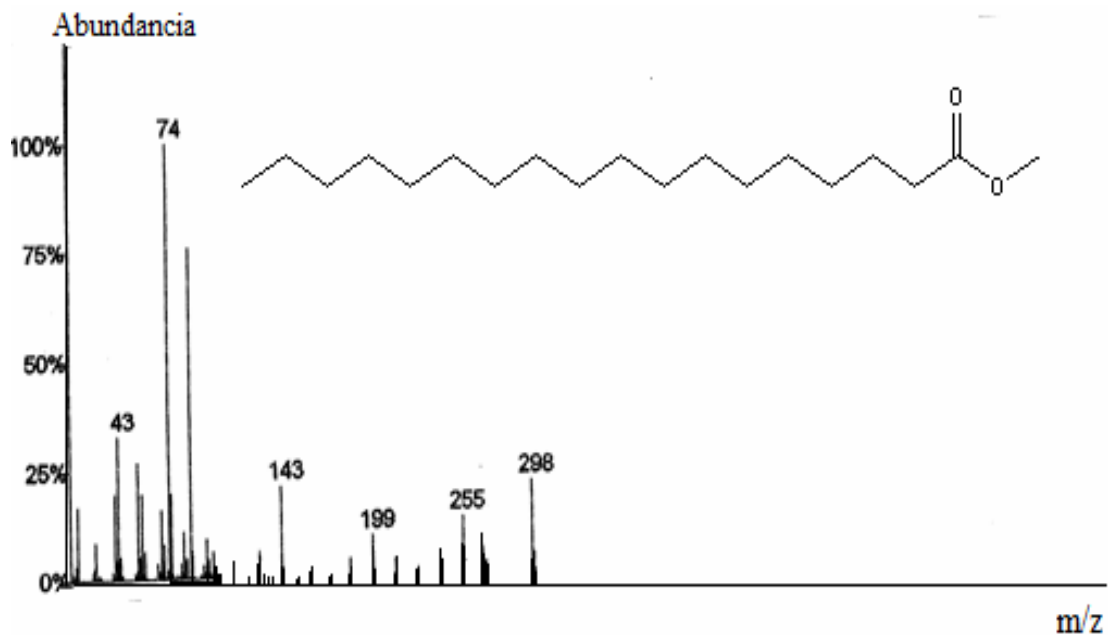


Figura 36. Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico.

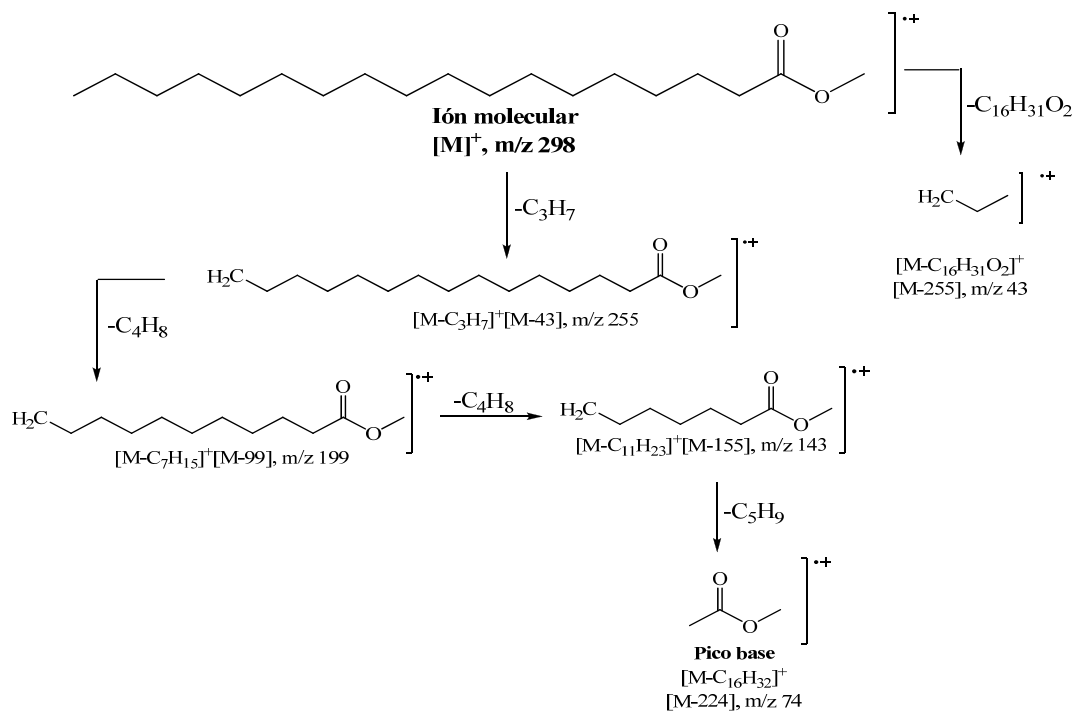


Figura 37. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido octadecanoico.

El compuesto IV se identificó como el ácido octadecanoico (TR =14, 75), su espectro de masas (figura 38), desplegó un ión molecular a m/z 284 $[M]^+$, y los fragmentos correspondiente a los picos más abundante a m/z 284, 241, 185, 129 y 43 (picos base). En la figura 39 se muestra el patrón de fragmentación de este constituyente.

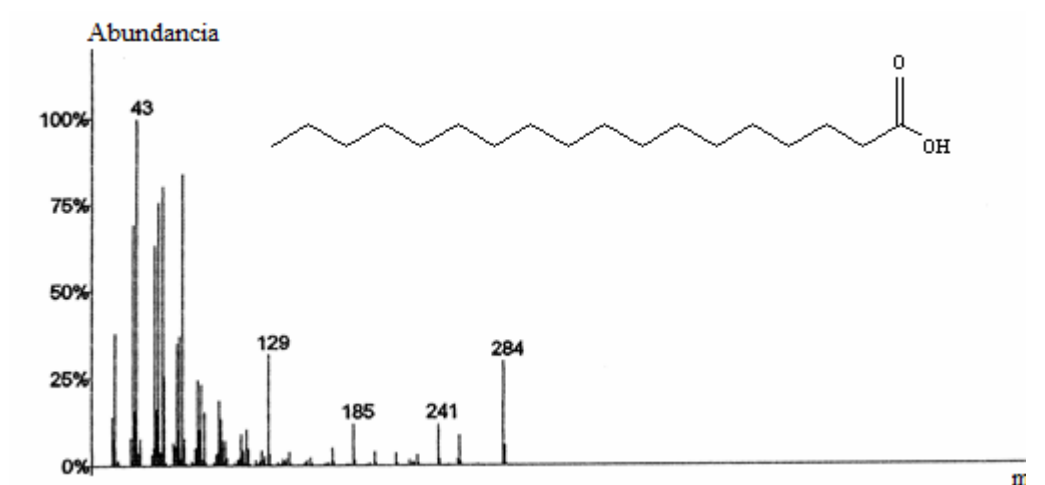


Figura 38. Espectro de masas del ácido octadecanoico.

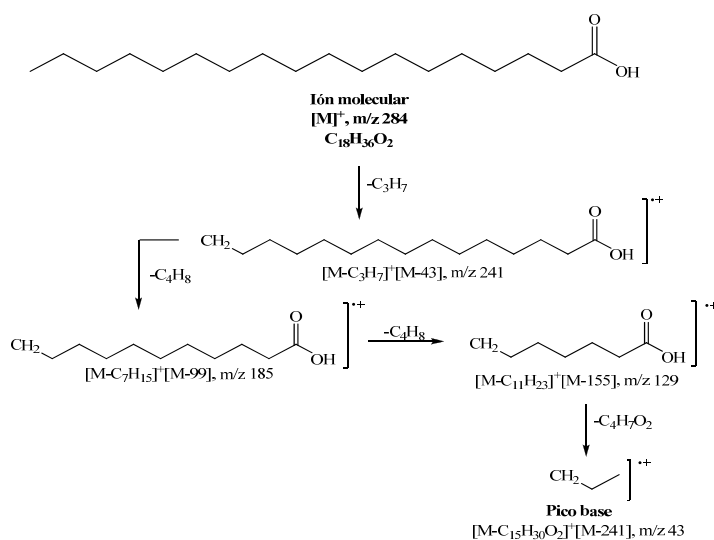


Figura 39. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico.

La identificación de estos metabolitos en *M. tomentosa* representa un aporte a su quimiotaxonomía, ya que no existen en la literatura reportes acerca de la presencia de estos compuestos en esta especie; no obstante, han sido reportados en otro género de la familia Sterculiaceae como en los *Helicteres*, específicamente en las especies *H. guazumifolia* (20) y *H. baruensis* (15).

En una investigación realizada acerca de los ácidos grasos se comprobó que son tóxicos para varias líneas celulares tumorales humanas, como cáncer de próstata, pecho, vejiga, pulmón y leucemia (47). En otros estudios se señala que los ácidos grasos inhiben de manera efectiva las bacterias Gram positivas, además de que exhiben actividad antimicótica, reportándose al ácido hexadecanoico como un inhibidor efectivo de bacterias y hongos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis antifúngico de esta subfracción. El ácido hexadecanoico es uno de los ácidos grasos más comunes en los lípidos y ha sido reportado en una amplia variedad de especies terrestres y marinas. Además, algunos registros señalan que el ácido hexadecanoico, al igual que ácido octadecanoico, posee propiedad apópticas (48,49).

En un estudio biodirigido realizado al extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq), se encontró que de cuatro de las fracciones aisladas, tres exhibieron actividad antiproliferativa y citotóxica de tipo dosis dependiente. La caracterización estructural de estas fracciones, reveló que las fracciones más activas, estaban constituidas mayoritariamente por ésteres metílicos de los ácidos hexadecanoico y octadecanoico (50).

También se ha reportado que los ésteres de ácidos grasos a altas concentraciones, provocan la muerte celular por apoptosis, y cuando las concentraciones se incrementan, la muerte celular ocurre por necrosis, debido a inhibición de la síntesis de ADN (51).

Separación de la subfracción C2

En la CCF realizada a esta subfracción se observó la presencia de dos compuestos, por lo que se procedió a separarlos por CCFP utilizando una placa vidrio de 20x20 cm² recubierta de sílica gel 10-40 μm de 1mm de espesor. Para ello se colocaron 45 mg del extracto en la placa y se utilizó una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1); el revelado de la misma se realizó con una lámpara de UV. Las franjas de sílica que contenían cada uno de los compuestos, se arrancaron de manera cuidadosa y posteriormente se extrajeron con cloroformo.

Se recuperó una masa total de 12,3 mg, lo que representó el 25,36% del material cromatografiado.

Tabla 12. Subfracciones obtenidas de la subfracción de C2.

Subfracción	Masa (mg)	R _f
C2.1	6,4	0,73
C2.2	5,9	0,31

A cada una de las subfracciones, se le realizó nuevamente CCF para verificar la pureza de los compuestos aislados, y se observó en cada caso una sola mancha muy bien definida, indicando la presencia de un posible compuesto puro, por lo que se decidió analizarse por RMN.

Análisis estructural de la subfracción C2.1

En el análisis del espectro de RMN ¹H (figuras 40 y 41) de la subfracción C2.1 se observó un desplazamiento a δ_H 3,64 ppm que corresponde a un singulete de un átomo de hidrógeno enlazado a un carbono que se encuentra unido a un átomo oxígeno (O-C-H). Además, éste exhibió dos multipletes a δ_H 1,70 y δ_H 1,28 ppm, y

desplazamientos químicos a δ_H 2,27 y δ_H 0,89 ppm que corresponden a tripletes atribuibles a un grupo metileno y metilo, respectivamente (tabla 13).

En el espectro de RMN- ^{13}C (figura 42), de esta subfracción se evidenció un desplazamiento químico a δ_C 176,05 ppm, que corresponde a un grupo carbonilo (-COOR-); lo cual sugiere la presencia de un éster. A campo alto, se observó una señal a δ_C 57,28 ppm, característica de un carbono enlazado a un oxígeno (C-O); también, se observa una señal intensa entre δ_C 48,09 - 47,07 ppm, que corresponde a señales de carbonos metilénicos (-CH₂), y finalmente, se observa una señal a δ_C 29,01 ppm, asignable a un carbono metílico terminal (R-CH₃) (tabla 14).

Tabla 13. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN 1H del compuesto C2.1.

δ_H (ppm) ^a	δ_H (ppm) ^b	Multiplicidad	Asignación
3,64	3,65	Singulete (<i>s</i>)	O-CH ₃
2,27	2,32	Triplete (<i>t</i>)	OC-CH ₂
1,70	1,64	Multiplete (<i>m</i>)	OC-CH ₂ -CH ₂
1,28	1,26	Multiplete (<i>m</i> , ancho)	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
0,89	0,85	Triplete (<i>t</i>)	CH ₂ -CH ₃

^a: Datos obtenidos a 400 MHz en DOCD₃.

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

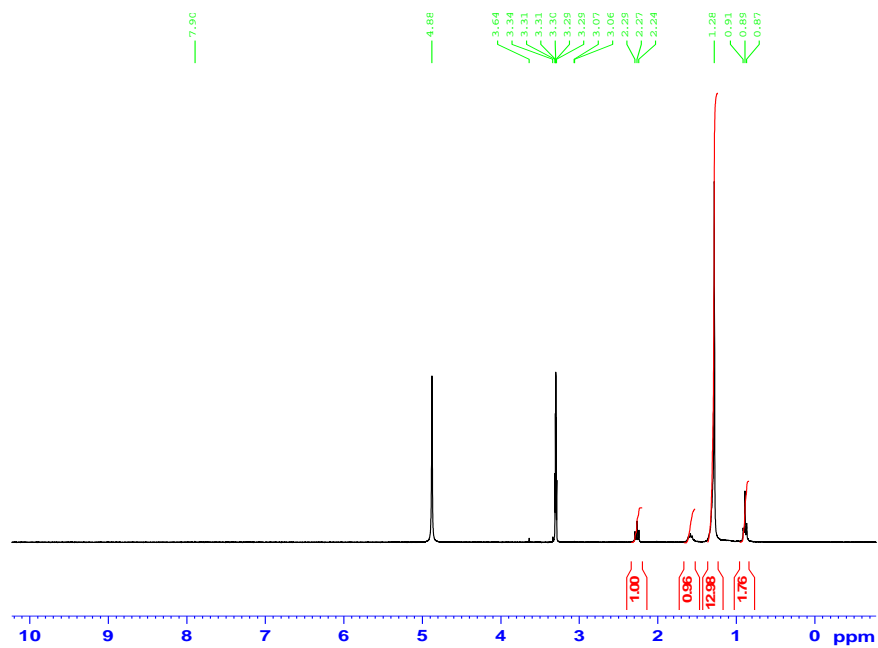


Figura 40. Espectro de RMN ¹H la subfracción C2.1.

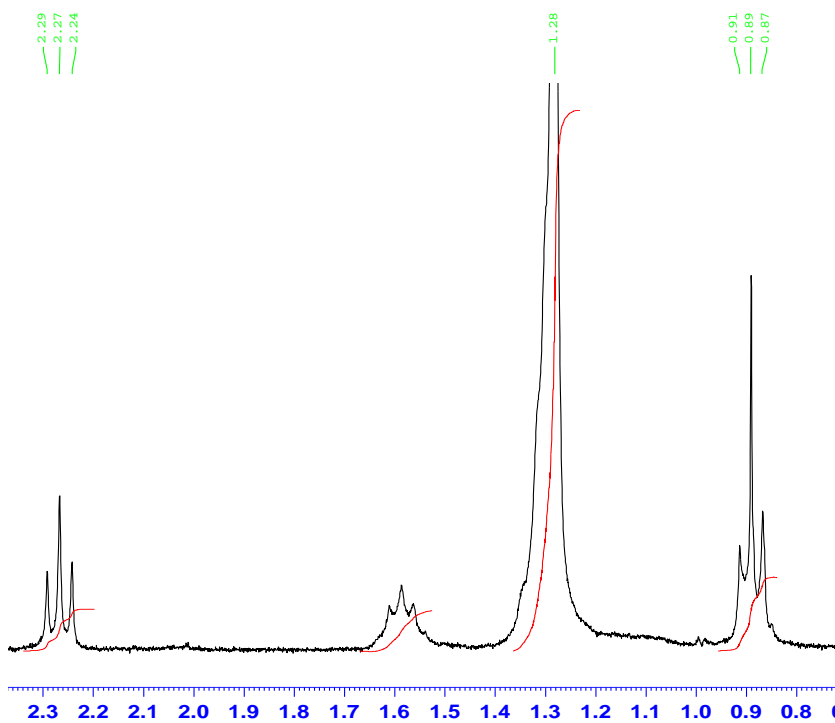


Figura 41. Ampliación de la región a campo alto del espectro de RMN ¹H de la subfracción C2.1.

Tabla 14. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C2.1.

δ_C (ppm) ^a	δ_C (ppm) ^b	Tipo de carbono
176,05	173,10	C=O
57,28	52,00	O-CH ₃
47,58	45,98	CH ₂
29,01	28,23	CH ₃

^a: Datos obtenidos a 100 MHz en DOCD_3 .

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

Debido a que no se realizaron otros experimentos de RMN y según el análisis realizado a los RMN 1D, se propuso la estructura del posible compuesto como la del éster metílico del ácido eicosanoico, lo cual fue confirmado utilizando el programa de modelado de estructura Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008, al compararse los δ experimentales con los teóricos (figura 43).

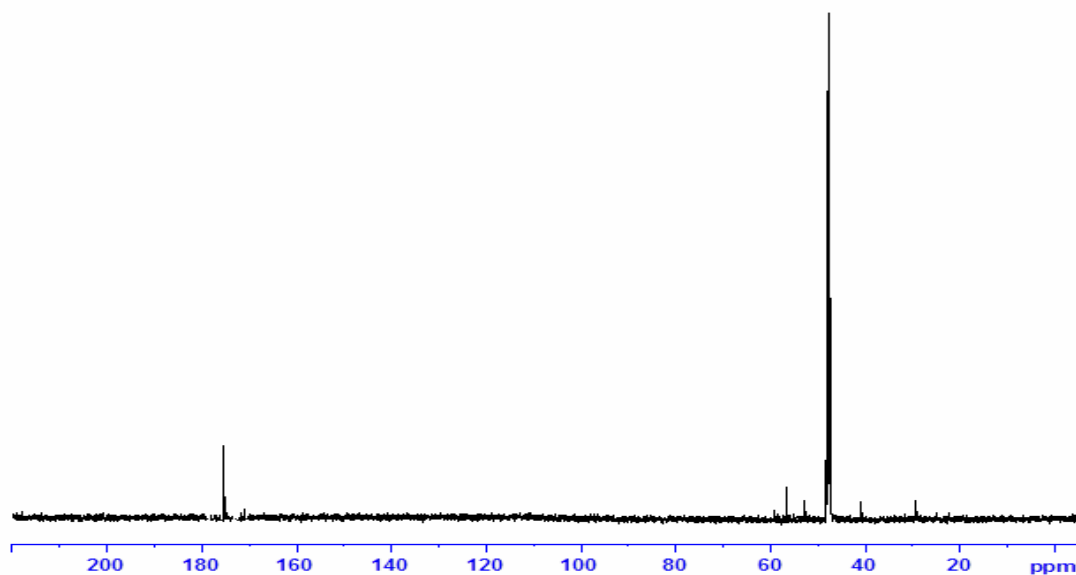


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C la de subfracción C2.1.

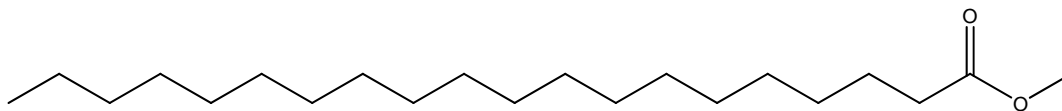


Figura 43. Estructura del éster metílico del ácido eicosanoico.

Análisis estructural de la subfracción C2.2

El espectro de RMN ^1H (figuras 44 y 45) de esta subfracción, exhibió una señal en la región de los aromáticos a δ_{H} 7,66 ppm, en la región olefínica mostró una señal a δ_{H} 4,93 ppm, un desplazamiento químico a δ_{H} 3,60 ppm atribuible al hidroxilo (HO); una serie de señales en forma de multipletes entre δ_{H} 1,40 y δ_{H} 2,51 ppm asignables a grupos metilenos, una señal intensa a δ_{H} 1,27 ppm asignada a un protón unido a un carbono que se encuentra enlazado a un carbono cuaternario y, finalmente, se observa un triplete a δ_{H} 0,89 ppm atribuido a un grupo metílico ($-\text{CH}_3$) que se encuentra enlazado a un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) (tabla 15).

En el espectro de RMN- ^{13}C (figura 46) de esta subfracción, se observaron a campo alto tres señales asignables a carbonos de un anillo aromático sustituido, esto confirma lo observado en el espectro de RMN ^1H , acerca de las señales en la región de los aromáticos; además, exhibió señales características de grupos olefínicos a δ_{C} 142,11 y δ_{C} 122,62 ppm, confirmando la presencia de un doble enlace en la estructura del compuesto. También, mostró un desplazamiento químico a δ_{C} 73,51 ppm, característico de un carbono cuaternario y varios desplazamientos a campo alto que son asignables a grupos metilenos (tabla 16).

Tabla 15. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN 1H del compuesto C2.1.

$^a\delta_H$ (ppm)	$^b\delta_H$ (ppm)	Multiplicidad	Asignación
7,66	7,33	multiplete (<i>m</i>)	C ₆ <u>H</u> ₅
4,93	5,50	triplete (<i>t</i>)	<u>H</u> C=C
3,60	4,65	singulete (<i>s</i>)	O <u>H</u>
2,51	2,55	multiplete (<i>m</i>)	CH <u>2</u>
1,99	1,96	multiplete (<i>m</i>)	CH <u>2</u>
1,40	1,37	multiplete (<i>m</i>)	CH <u>2</u>
1,27	1,28	singulete (<i>s</i>)	CH <u>2</u>
0,89	0,90	triplete (<i>s</i>)	CH <u>3</u>

^a: Datos obtenidos a 400 MHz en DOCD₃.

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

Tabla 16. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C2.2.

$^a\delta_C$ (ppm)	$^b\delta_C$ (ppm)	Tipo de carbono
147, 81	146,80	C= <u>C</u> CH ₃
139, 25	138,50	
122,62	121,60	CH ₂ <u>C</u> H=C
73,51	74,40	C
47,52	42,90	CH ₂ <u>C</u> H ₂ C
29,32	27,30	HO <u>C</u> CH ₃
17,19	16,78	CH ₃

^a: Datos obtenidos a 100 MHz en CDCl₃.

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

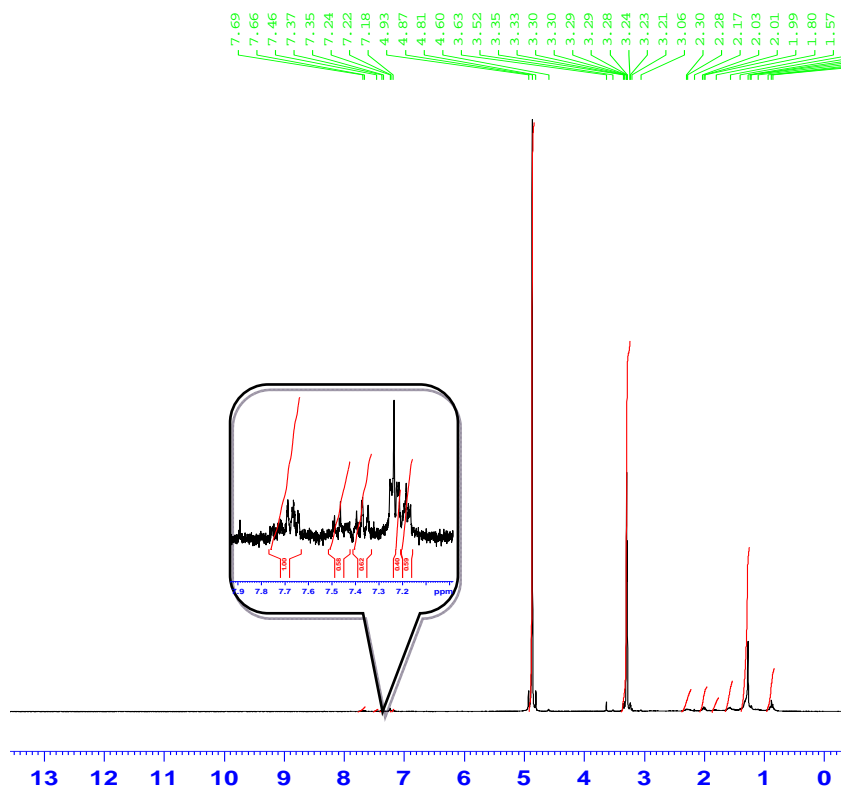


Figura 44. Espectro de RMN ^1H de la subfracción C2.2.

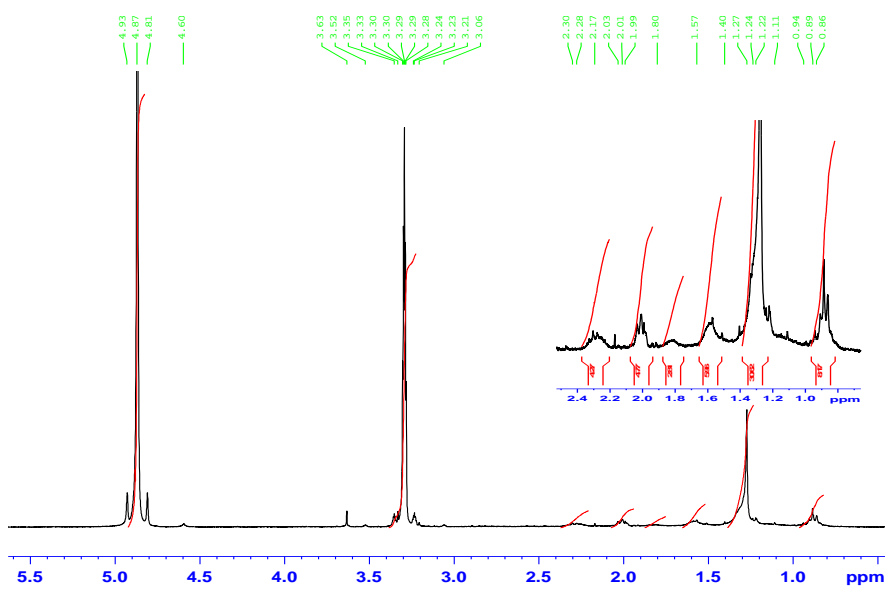


Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la subfracción C2.2.

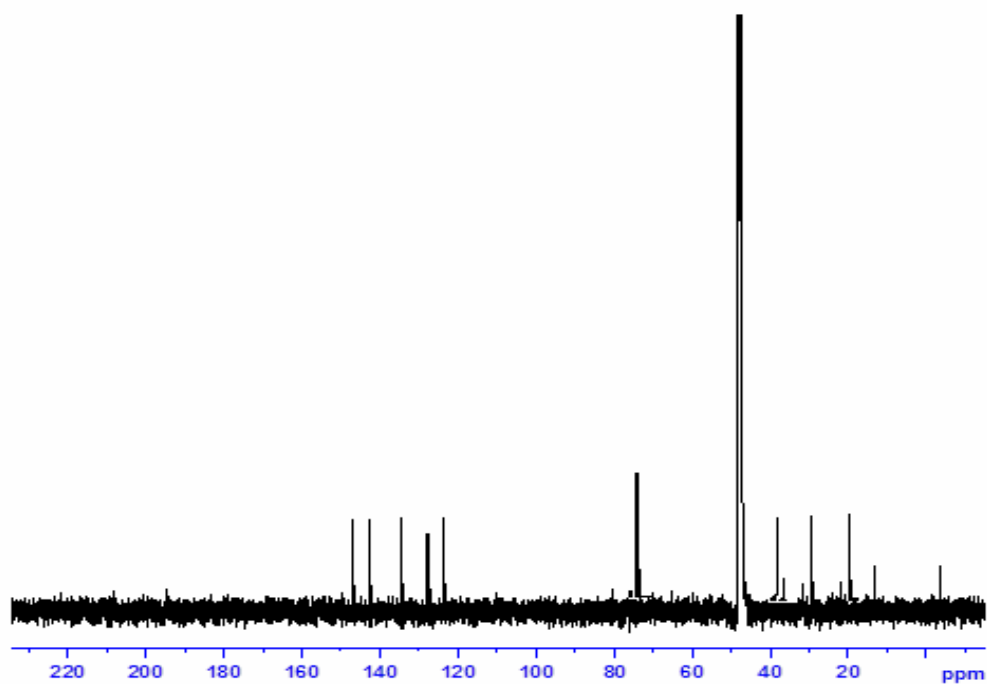


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C la subfracción C2.2.

Según el análisis de los espectros de RMN de una dimensión y por comparación de los desplazamientos arrojados por el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008, se propuso como posible núcleo estructural de esta subfracción al 3,7-dimetil-9-fenil-7-en-3-nonanol (figura 47).

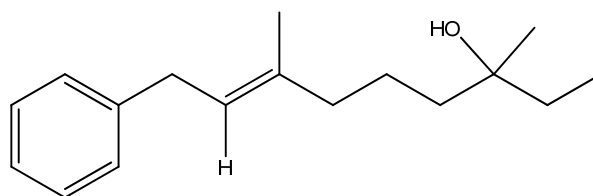


Figura 47. Posible compuesto de la subfracción C2.2.

Separación cromatográfica de la fracción H

La fracción H presentó una característica bastante interesante, ya que se obtuvo como un sólido marrón, de partículas muy finas y brillantes, soluble en cloroformo, acetona y metanol; sin embargo, se obtuvo muy poca cantidad. Debido a que esta fracción presentó actividad antimicótica ante el hongo *Mucor* sp y no mostró una buena separación de sus constituyentes en la CCF, se decidió analizarla por CG/EM (figura 48).

La cromatografía de gases de la fracción H, evidenció la presencia de varios compuestos, entre los cuales se pudieron identificar: el docosanol (II) como compuesto mayoritario, seguido del 7,9- di-tert-butil- 1- oxaspiro [4,5] deca-6,9- dieno-2,8-diona (I) y, en menor proporción, una mezcla de esteroides y ésteres de esteroides (tabla 17).

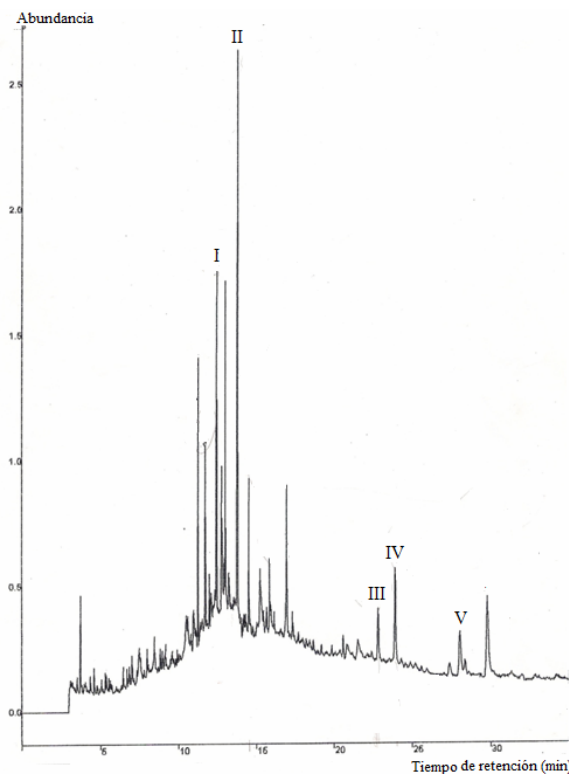


Figura 48. Cromatograma de gases de la fracción H.

Tabla 17. Compuestos aislados e identificado en la fracción H obtenido en la separación cromatográfica de las hojas de *M. tomentosa*.

Compuestos	TR (min)	Fórmula
7,9 -di-tert-butil-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-dieno-2,8-diona (I)	12,43	C ₁₇ H ₂₄ O ₃
Docosanol (II)	13,75	C ₂₂ H ₄₆ O
Acetato de 4,4,10,13,17-pentametil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol (III)	22,81	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
4, 4,17- trimetilcolest-8,14 – dien-3-il dodecanoato (IV)	28,03	C ₄₂ H ₇₂ O ₂
4, 4, 24- trimetilcolesta-8,14-24-trien-3-ol (V)	29,77	C ₂₉ H ₄₆ O

El espectro de masas del 7,9 - di-tert-butil- 1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona (TR=12,43 min) (figura 49) desplegó un ión molecular a m/z 276 [M⁺], correspondiente a la fórmula molecular C₁₇H₂₄O₃, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 261, 206, 175, 135, 109, 91 y 57 (picos base). En la figura 50 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto, el cual permitió confirmar la estructura.

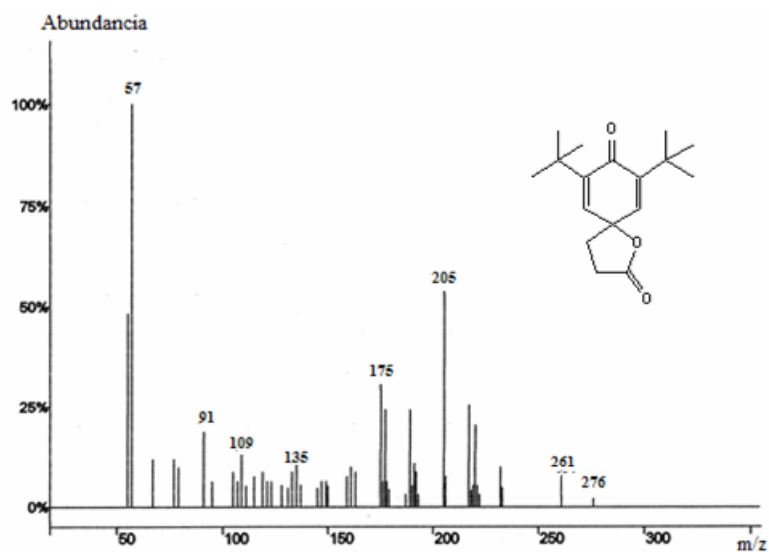


Figura 49. Espectro de masas de la 7,9- di- tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-diona.

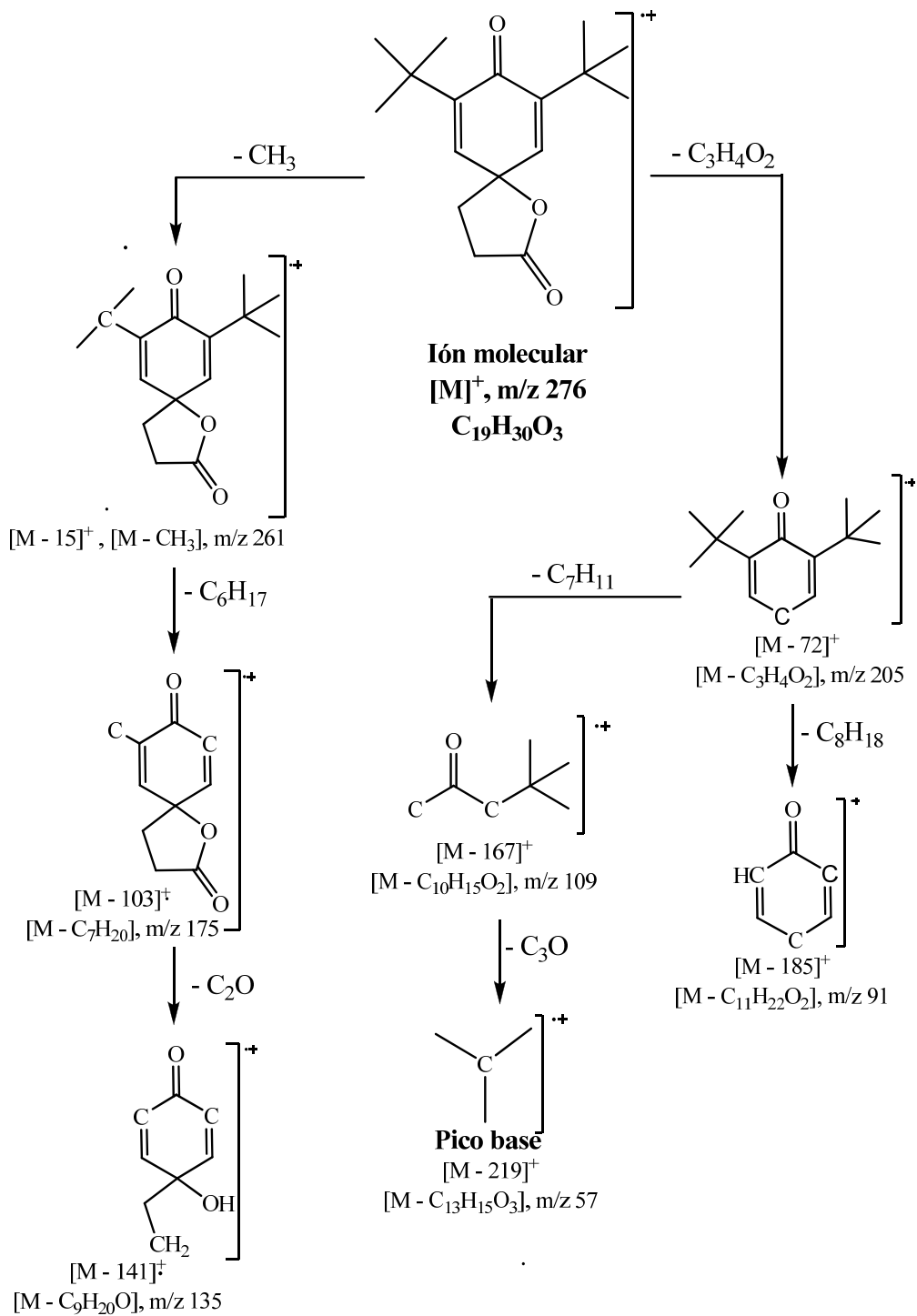


Figura 50. Patrón de fragmentación de 7,9- di- tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9- dieno-2,8-diona.

La 7,9- di- tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-diona no ha sido reportado en especies de la familia Sterculiaceae; por lo que se podría afirmar que este es el primer reporte de este compuesto en una planta perteneciente a esta familia. No existe información en la literatura de algún tipo de actividad farmacológica relacionada con este compuesto; sin embargo, el mismo fue identificado mediante CG/EM en el extracto etéreo del arroz, en una investigación sobre la actividad alelopática que posee este cereal (52).

El espectro de masas del docosanol (TR= 13,75 min) (figura 51) desplegó un ión molecular a m/z 308 [M^+], que corresponde a la fórmula molecular $C_{22}H_{46}O$ y los fragmentos de los picos mas abundantes a m/z 97 y 43 (pico base). En la figura 52 se muestra las subestructuras de los principales fragmentos correspondientes a este compuesto.

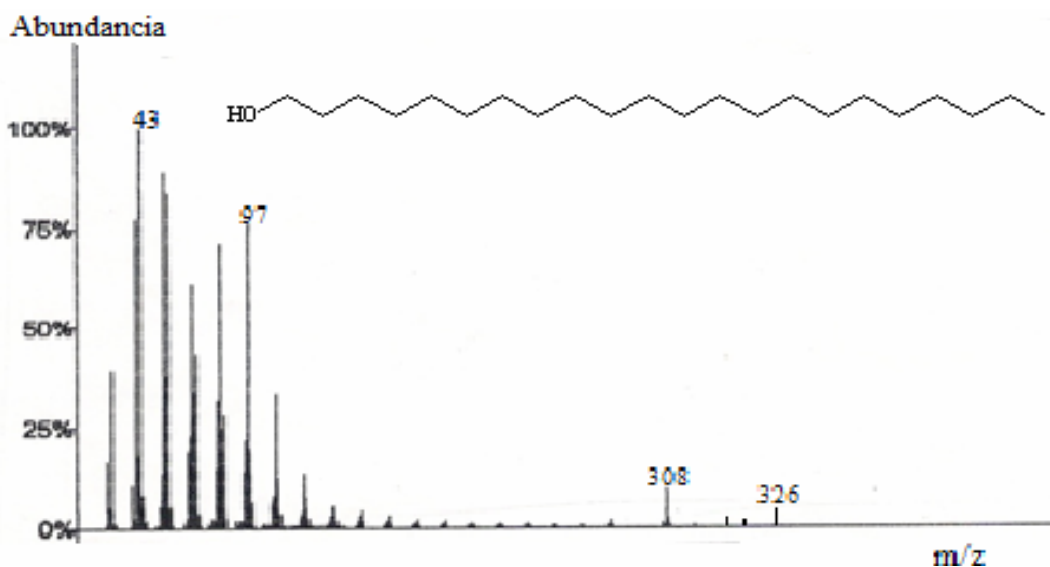


Figura 51. Espectro de masas del docosanol.

El docosanol es un alcohol graso saturado, utilizado principalmente como agente antiviral; este compuesto es el ingrediente activo de una crema de uso tópico

que es utilizada específicamente para el tratamiento de enfermedades causadas por el virus del herpes simple. El mismo funciona inhibiendo la fusión de la célula huésped humana con la envoltura viral del virus del herpes, previniendo las réplicas; su mecanismo no ha sido observado directamente ni probado (53).

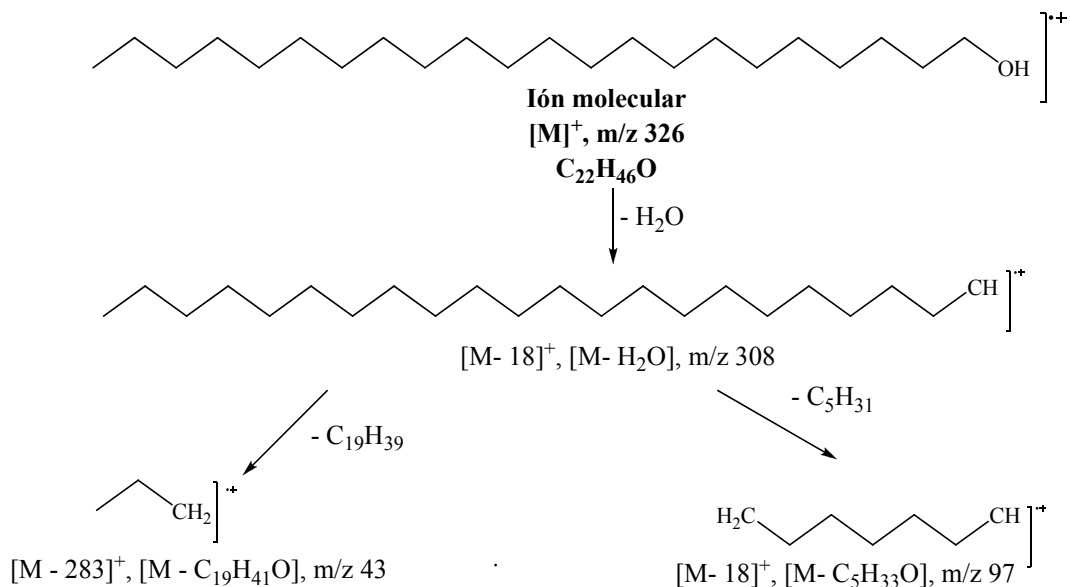


Figura 52. Patrón de fragmentación del docosanol.

El descubrimiento de este compuesto fue un gran aporte a la medicina, ya que la infección provocada por el virus del herpes simple es un problema común que afecta a un porcentaje importante de la población. Su comercialización se realizó por primera vez en julio de 2000 por la FDA, después de numerosos ensayos clínicos, con el nombre de Abreva (docosanol 10%), y en Europa es comercializada hoy en día con el nombre de Erazaban (54).

El docosanol fue reportado como uno de los productos químicos de la *Nicotiana tabacum* L; además, en otros trabajos se reportó la actividad alelopática de esta planta, lo cual es un tema de mucho interés químico, ya que algunas líneas de investigación están referidas a las plantas con metabolitos secundarios que posean

este efecto alelopático, que puedan sustituir el uso de los herbicidas para evitar la contaminación ambiental (55).

En el espectro de masas del esteroide 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo (TR = 22,81 min) (figura 53), se observó un ión molecular a m/z 468 [M^+], correspondiente a la fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$, y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a m/z 393, 355, 295, 239, 159, 119 y 43 (pico base). En la figura 54, se muestra el patrón de fragmentación que corresponde a este compuesto, el cual permitió confirmar su estructura.

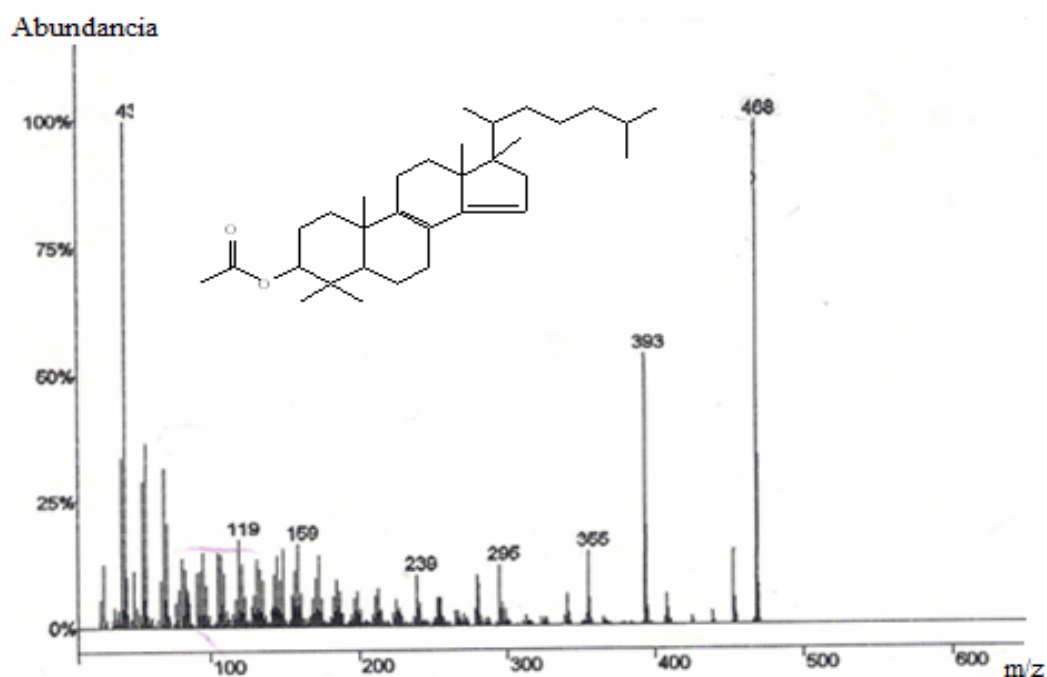


Figura 53. Espectro de masas del acetato 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo.

El espectro de masas del compuesto V, identificado como el 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol (figura 55) (TR = 29,77 min), desplegó un ión molecular a m/z 410 [M^+], correspondiente a la fórmula molecular $C_{29}H_{46}O$, y los picos de los

fragmentos más abundantes se observaron a m/z 396, 382 (pico base), 355, 330, 304, 270, 228, 145 y 41. En la figura 56 se muestran las subestructuras de los iones principales del patrón de fragmentación que corresponde a este compuesto.

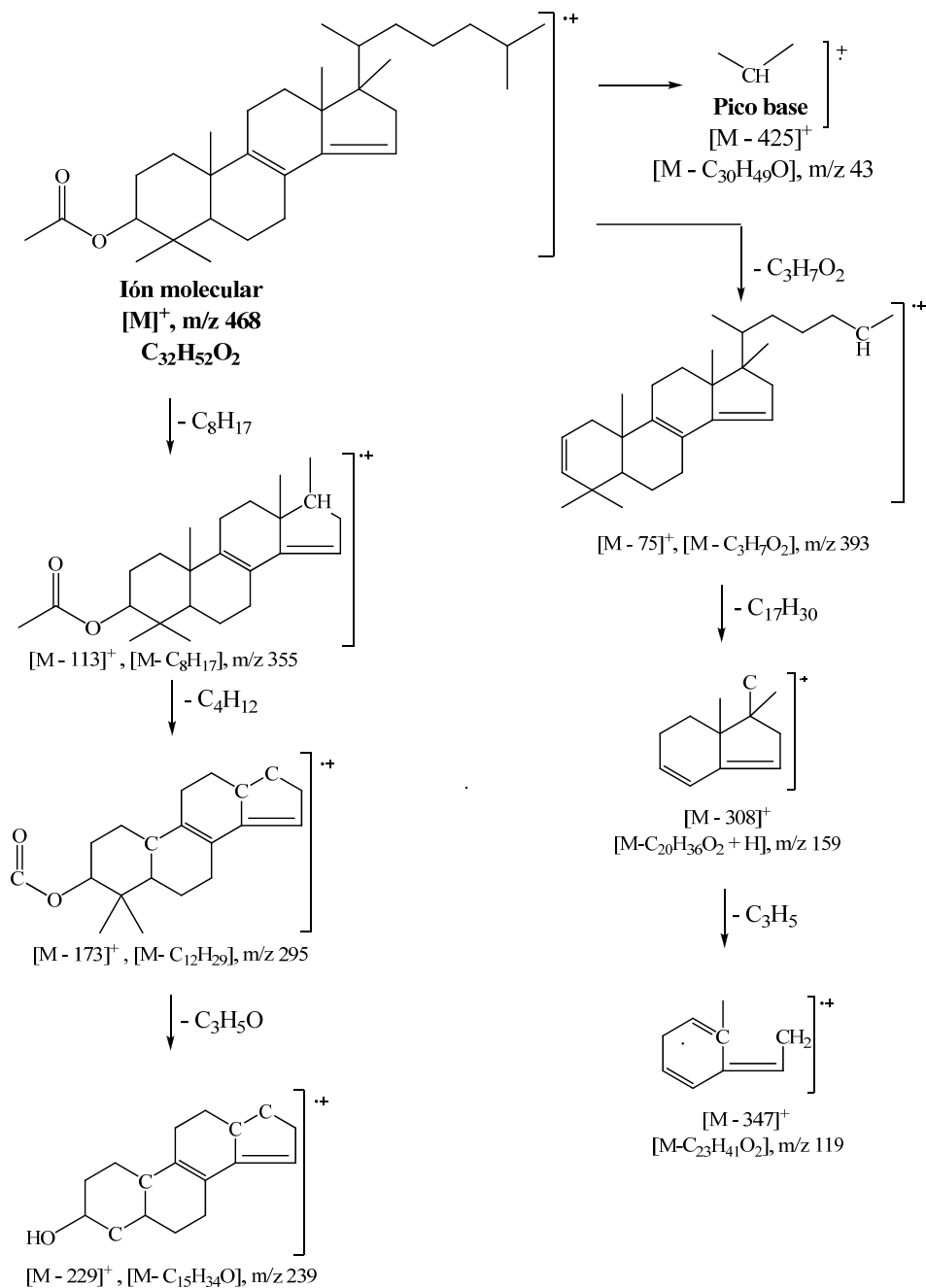


Figura 54. Patrón de fragmentación del 4,4,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo.

El espectro de masas del compuesto IV, identificado como 4, 4,17-trimetilcolest-8,14- dien-3-il dodecanoato (figura 57) (TR = 28,03), exhibió un ión molecular a m/z 608 [M^+], correspondiente a la fórmula molecular $C_{42}H_{72}O_2$, y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a m/z 564, 489, 409, 393, 375 (pico base), 355, 269, 230, 207,145 y 55. En la figura 58 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

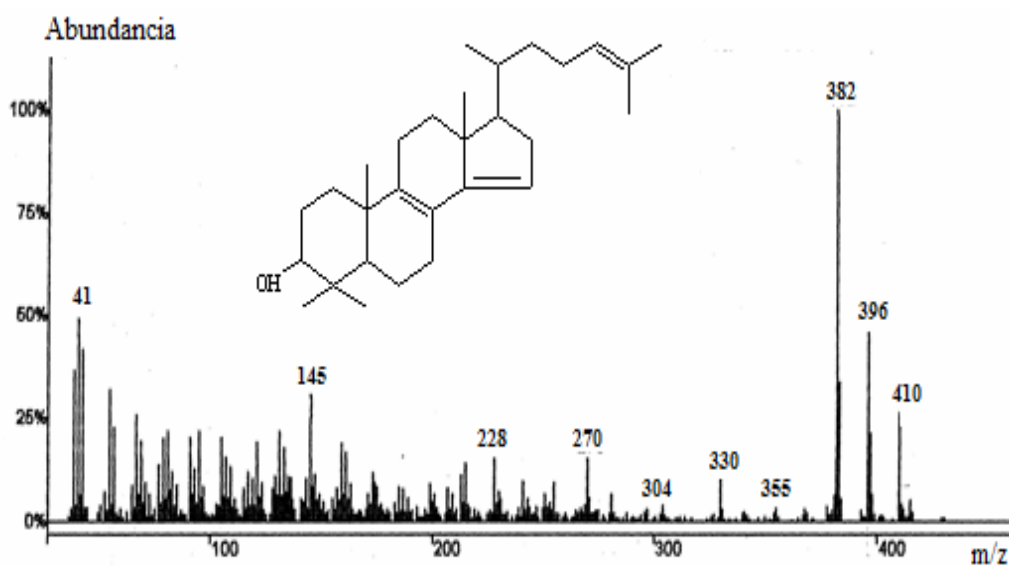


Figura 55. Espectro de masas del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol.

Los esteroides provenientes de las plantas o fitosteroides, son esteroides con estructuras químicas similares a la del colesterol, excepto por un grupo extra metilo o etilo. Cuando los esteroides de las plantas están saturados en la posición 5 del anillo A, se forman los estanoles de las plantas. Ellos desempeñan un papel parecido al del colesterol en los humanos, es decir, el de mantener la estructura y función de la membrana celular. En un estudio realizado se reportó la eficacia de los esteroides vegetales como agentes de reducción media en lipoproteínas de baja densidad (LDL); además, se informó que según un estudio clínico realizado, el consumo de esteroides vegetales disminuye el LDL a una razón del 5 al 15% (56).

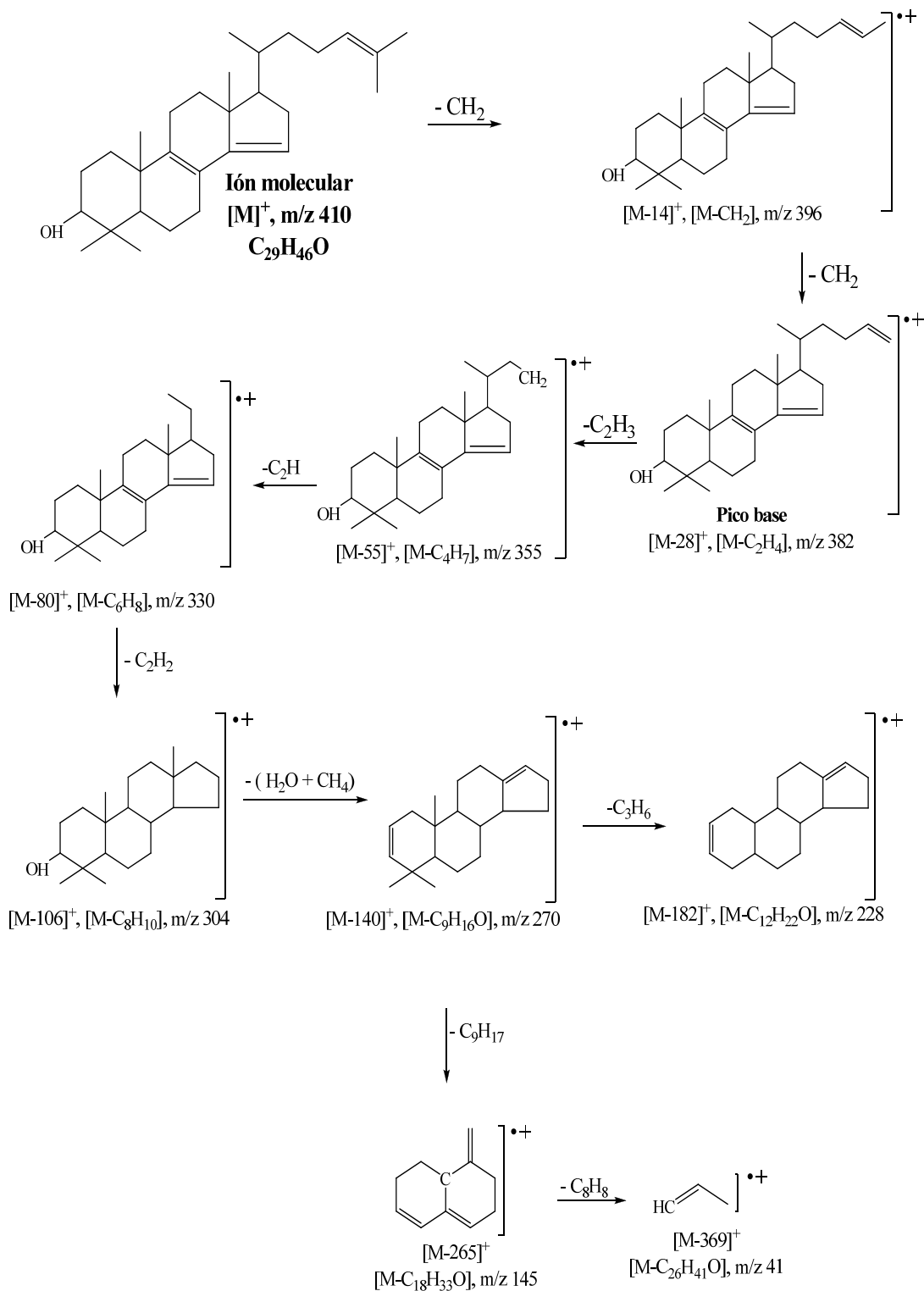


Figura 56. Patrón de fragmentación del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol.

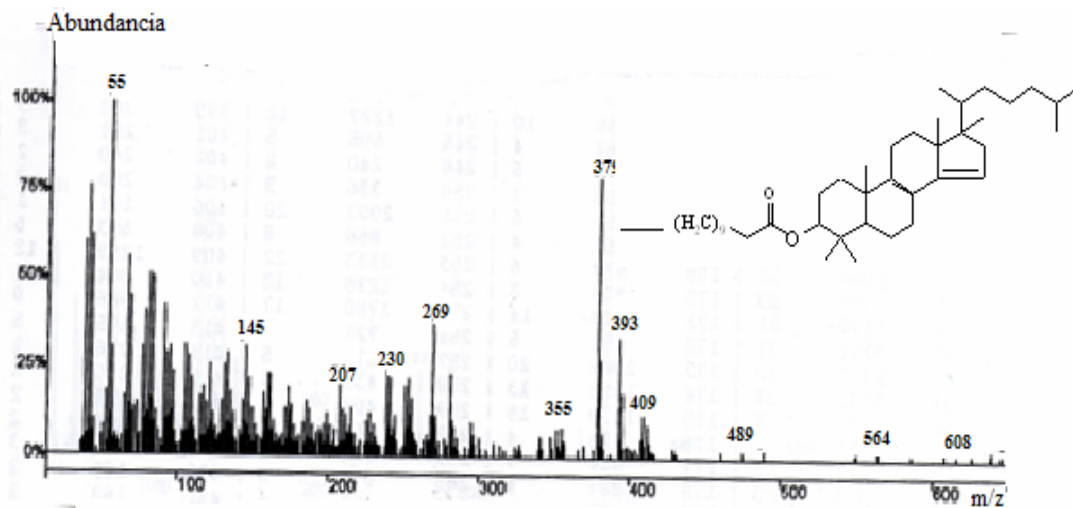


Figura 57. Espectro de masas del 4, 4,17- trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato.

La identificación del 4, 4,17- trimetilcolest-8,14 – dien-3-il dodecanoato (figura 59), en las hojas de *M. tomentosa*, le confiere una gran importancia, tanto medicinal como comercial, ya que este éster de ácido graso de un esteroide de planta ha sido obtenido de manera natural, lo que indica que esta planta tiene la capacidad de biosintetizar esta clase de compuesto químico; esto posiblemente se deba al alto contenido de ácidos grasos en esta parte de *M. tomentosa*.

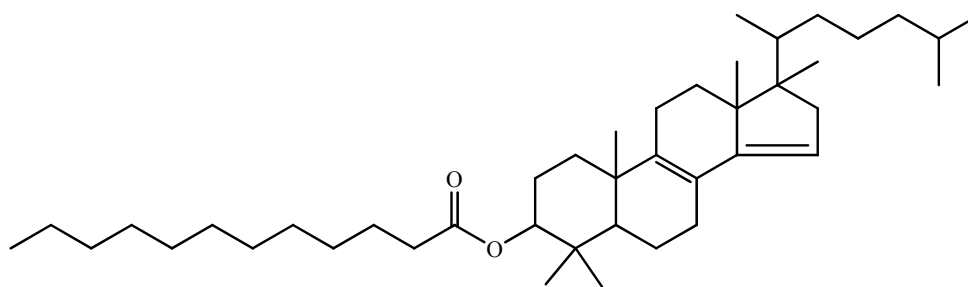


Figura 58. Estructura del 4, 4,17- trimetilcolest-8,14 – dien-3-il dodecanoato.

En un estudio realizado en humanos, se mostró que los ésteres de ácidos grasos de esteroides vegetales no solo disminuyen los niveles de colesterol en la sangre (colesterol-LDL), sino los niveles de triacilglicerol (57).

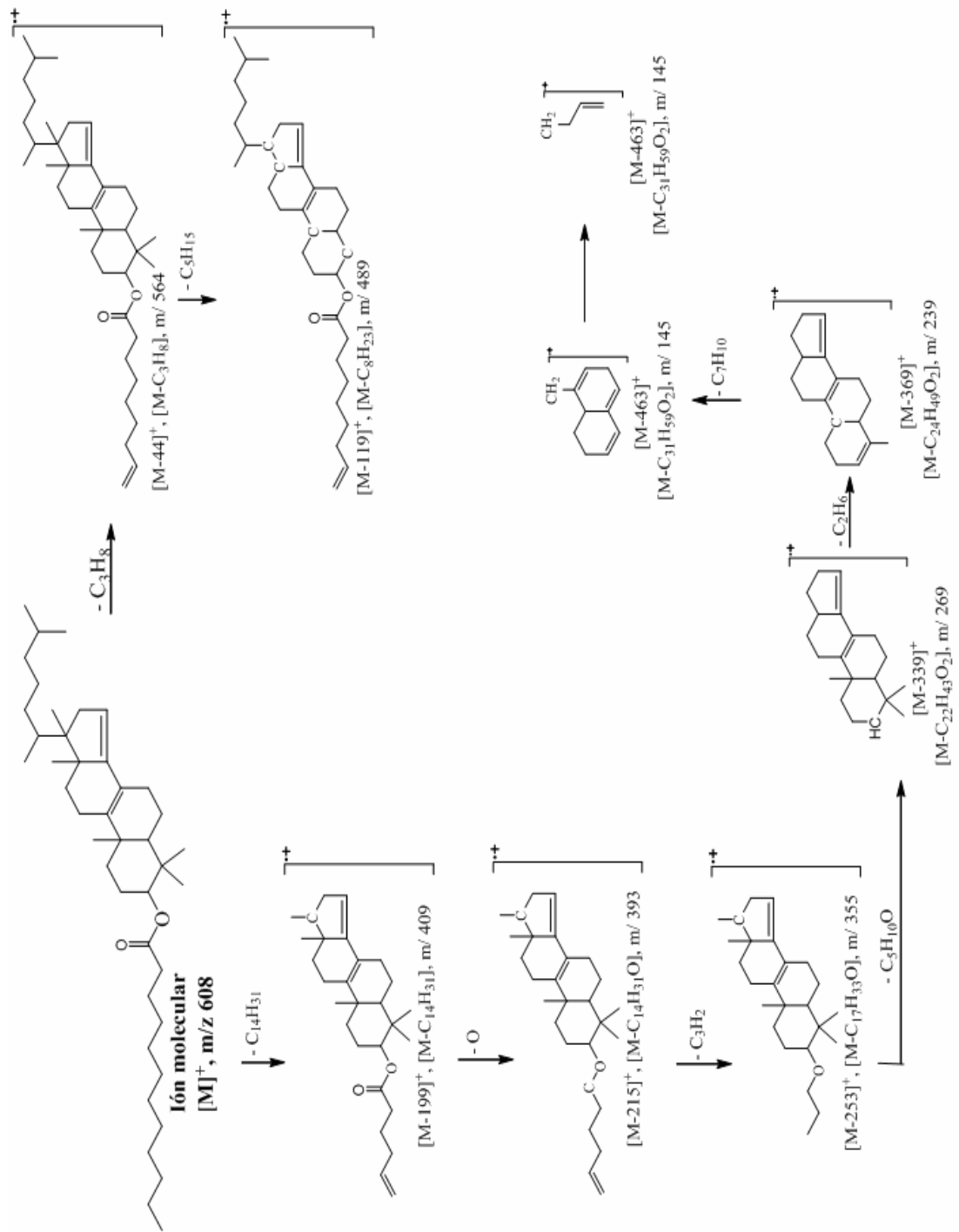


Figura 59. Patrón de fragmentación 4, 4,17- trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato

Fraccionamiento del extracto metanólico del tallo (EMT) de *M. tomentosa*

El fraccionamiento del EMT se realizó por cromatografía de columna (CC), utilizando sílica gel 35-70 mesh (0,2 – 0,5 mm) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó una mezcla de solventes, que varió desde el poco polar (éter de petróleo), hasta el más polar (metanol). La columna empleada midió aproximadamente 70 cm de alto, con un diámetro de 2,5 cm. La relación entre la sílica y el extracto fue de 1:30, respectivamente. Se recolectaron 60 eluatos contentivos de 50 ml cada uno (tabla 18), los cuales fueron agrupados en 8 fracciones (tabla 19) tomando como referencia los R_f observado en la cromatografía de capa fina (CCF). Como agentes reveladores se empleó luz ultravioleta de longitud corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio.

El material orgánico recuperado en la CC del EMT fue de 2,6373 g, lo cual representa un rendimiento de 87,91% del material cromatografiado.

Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico del EMT de *M. tomentosa*.

Eluyentes	Porcentaje (%)V/V	Eluatos
Éter de petróleo-Acoet	80-20	1-3
Éter de petróleo-Acoet	60-40	4-9
Éter de petróleo-AcOEt	40-60	9-14
Éter de petróleo-AcOEt	20-80	15-20
AcOEt	100	21-29
AcOEt-Acetona	20-60	30-35
Acetona	100	36-39
Acetona-MeOH	50-50	40-41
Acetona-MeOH	40-60	42-48
MeOH	100	49-60

Una vez obtenidas las fracciones, se les realizó un ensayo antimicrobiano y se evidenció que solo la fracción I resultó activa frente a los microorganismos ensayados y las demás resultaron inactivas. Adicionalmente, se analizaron mediante CCF y en base a los resultados obtenidos, cantidad en masa y solubilidad, se decidió el método para separarlas.

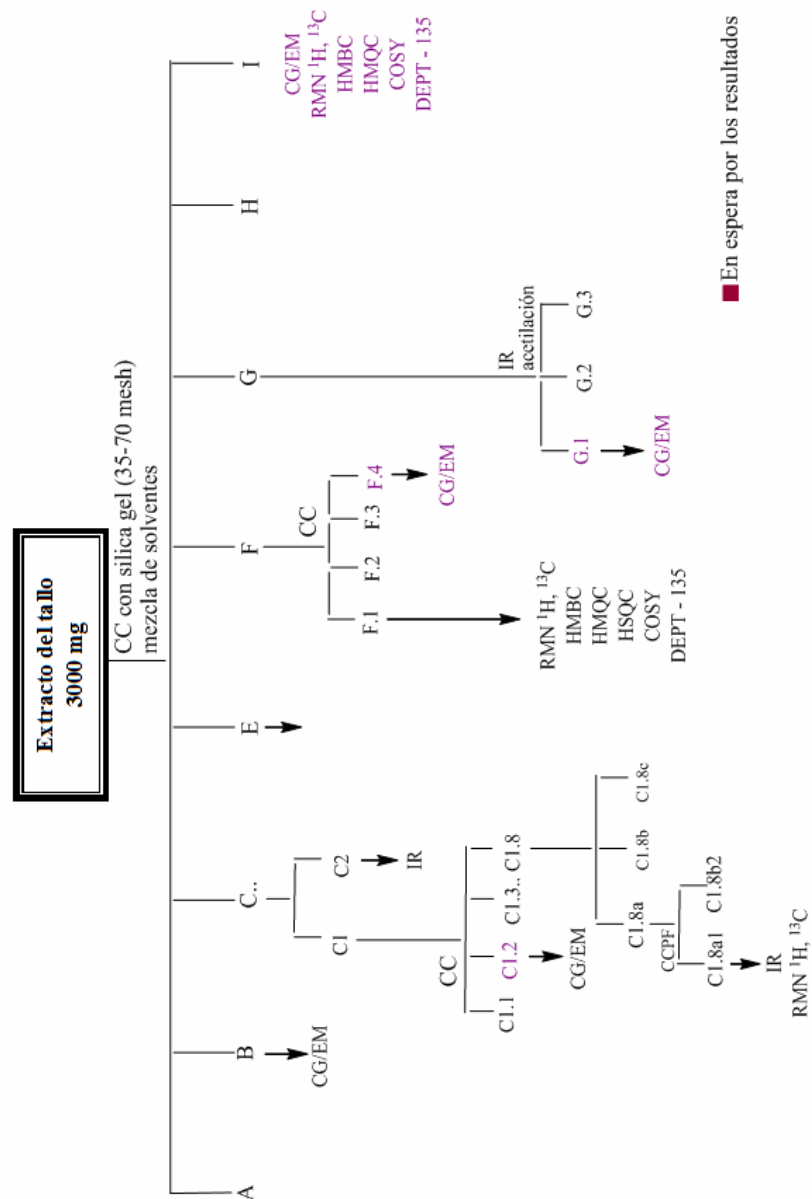


Figura 60. Fraccionamiento cromatográfico del EMT de *M.tomentosa*

Tabla 19. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EMT de *M. tomentosa*

Eluatos	Fracciones	Masa (mg)
1-17	A	97,9
18-20	B	12,9
21-26	C	174,7
27-36	D	470,0
37-40	E	709,5
41	F	249,7
42	G	816,8
43	H	50,3
44-46	I	20,4
47-60	J	35,1

La CCF de la fracción B mostró la presencia de tres manchas muy definidas y separadas, lo que indicó la presencia de tres posibles compuestos; no obstante, debido que la cantidad en masa era muy pequeña se decidió separarlos e identificarlos por CG/EM.

Separación cromatográfica de la fracción B

Esta fracción no pudo ser separada por el CG disponible en el IVIC, debido a que la muestra no pudo ser eluida en la columna disponible para este equipo, lo cual significa que es posible que esta fracción este constituida por una mezcla de compuestos de distintas polaridades lo que dificultó su separación. Esto fue tomado como referencia para tratar las demás fracciones.

Separación cromatográfica de la fracción C

La fracción C era un sólido blanco constituido por compuestos muy polares y otros poco polares; esto se evidenció en la cromatografía de CCF, ya que se observó una mancha muy definida cercana al origen y otra mancha cercana al frente del

solvente, por lo que se decidió extraer los compuestos menos polares con acetato de etilo; el resto de los compuestos solo fueron solubles en metanol.

Tabla 20. Subfracciones obtenidas en la extracción de la fracción C.

Subfracción	Masa (mg)
C1	97,90
C2	76,80

C1: compuestos extraído con acetato de etilo.

C2: compuestos solubles en metanol.

Nuevamente, cada una de las subfracciones fueron analizadas por CCF; para el caso de C2 no hubo ninguna separación con los solventes utilizados, por lo que se decidió analizarla por IR, para obtener información de los grupos funcionales. Para el caso de C1 si hubo separación de los constituyentes, así que se decidió separar y purificar por CC.

Análisis espectroscópico de C2

El espectro IR de esta subfracción (figura 63), mostró una señal a 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace O-H, una absorción a 2900 cm^{-1} que corresponde al *stretching* del C-H, también se observó una banda a 1600 cm^{-1} que corresponde a la deformación del enlace C=O y otra a 1100 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O.

Tomando como referencia las bandas de absorción exhibidas por el espectro de infrarrojo, la característica de la muestra, la polaridad que presentó y los metabolitos secundarios que fueron detectados en este trabajo, se sugiere que la subfracción C2 podría estar constituida por una mezcla de saponinas y compuestos glucosídicos.

Separación cromatográfica de la subfracción C1

La fracción C1 fue separada por CC, empleando una bureta de 25 ml de capacidad, utilizándose sílica gel 35-70 mesh (0,2 – 0,5 mm) como fase estacionaria a una de relación 1:30 (extracto-sílica) y como fase móvil se empleó una mezcla de solventes que varió según su polaridad. En esta separación se obtuvieron 53 eluatos (tabla 20) las cuales se agruparon en 8 subfracciones de acuerdo a los R_f observados (tabla 21).

Se recuperaron 91,21 mg del material orgánico, lo que representa el 94,03% del material cromatografiado.

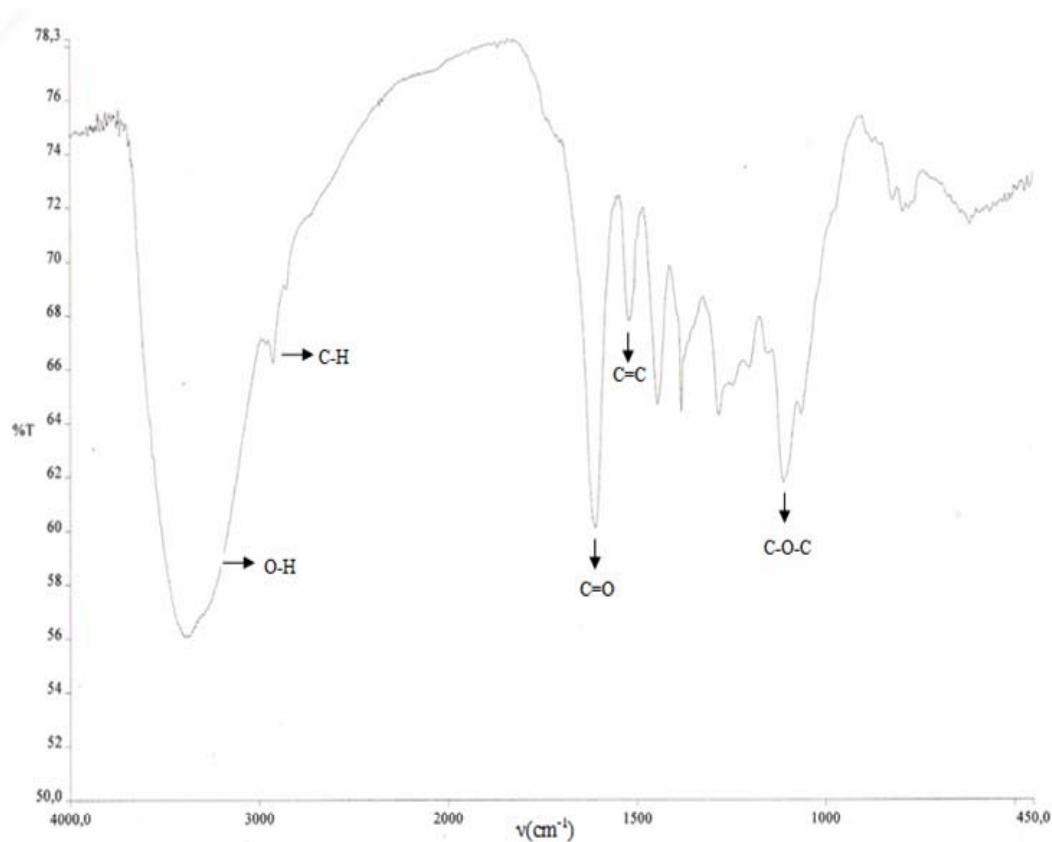


Figura 61. Espectro IR de la subfracción C2.

Posteriormente, cada subfracción se analizó por CCF y se observó que solo C1.2 presentó una separación moderada de sus constituyentes, por lo que se decidió analizarla por CG/EM sin embargo, los resultados de los análisis aún se están esperando. Por otra parte, la subfracción C1.8 fue tratada con 1-butanol para extraer todos los compuestos orgánicos y en el proceso de extracción se obtuvieron tres subfracciones (tabla 22), con características físicas (color y textura) diferentes, por lo que se procedió a separarlas y a tratarlas de manera independiente.

Tabla 21. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción C1.

Eluyentes	Porcentaje (% v/v)	Eluatos
Éter de petróleo	100	1-6
Éter de petróleo – AcOEt	60-40	7-16
Éter de petróleo – AcOEt	50-50	17-25
AcOEt	100	26-31
AcOEt - Acetona	50-50	32-42
MeOH	80-20	43-48
Agua	100	49-53

Tabla 22. Subfracciones obtenidas en la separación cromatográfica de la subfracción C1.

Eluatos	Subfracción	Masa (mg)
1-6	C1.1	7,3
7-16	C1.2	33,60
17-20	C1.3	5,93
21-25	C1.4	10,86
26-31	C1.5	11,2
32-38	C1.6	6,70
39-48	C1.7	4,5
49-53	C1.8	11,42

Tabla 23. Subfracciones obtenidas a partir de la 1-butanol a la subfracción C1.8.

Subfracción	Característica	Masa (mg)
C1.8a	Sólido /aceitoso	6,83
C1.8b	Aceite amarillo/ viscoso	2,91
C1.8c	Aceite casi incoloro	1,68

Nuevamente, se le realizó CCF a cada subfracción para evaluar la separación de sus constituyentes, y se observó en las subfracciones C1.8b y C1.8c una estela color muy intenso desde el origen hasta el frente del solvente, ambas fueron tratadas con carbón activado para tratar de eliminar los pigmentos que pudieran estar presentes. En la CCF realizada a la subfracción C1.8a se observó que se trataba de dos compuestos con R_f definidos y muy diferentes, por lo que se decidió a separarlos y purificarlos por CCFP.

Separación cromatografica de la subfracción C1.8a

Debido a la buena separación que presentó esta subfracción en la CCF, se procedió a separarla por CCFP, utilizándose una placa de vidrio de 20x20 cm² recubierta de sílica gel 10-40 μ m de 0,25 mm de espesor. Como eluyente se utilizó una mezcla de cloroformo-metanol (0,5:9,5) y como agente revelador se empleó una lámpara de luz ultravioleta de longitud corta (100-280 nm). Se evidenció la presencia de dos bandas, que posteriormente fueron arrancadas de la sílica y extraídas con metanol (tabla 23).

Se recuperaron 4,57 mg del material orgánico, lo que representa el 66,91% de la muestra cromatografiada.

Tabla 24. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C1.8a.

Subfracciones	Características	Masa (mg)
C1.8a1	Sólido blanco	2,62
C1.8a2	Aceite color ámbar y viscoso	1,95

A cada subfracción se le realizó CCF para evaluar la pureza de sus constituyentes, y se observó una estela de color marrón claro en el caso de la subfracción C1.8a2, lo cual mostró que se trataba de una mezcla de compuestos difíciles de separar por los métodos cromatográficos convencionales; por otra parte la CCF de la subfracción C1.8a1 mostró una sola mancha, lo que evidenció que se trataba de un compuesto puro, por lo que se decidió analizar por IR y RMN.

Análisis estructural de la subfracción C1.8a1

La subfracción C1.8a1, fue obtenida como un sólido blanco, con un punto de fusión mayor a 250 °C, soluble en dimetilsulfóxido e insoluble en todos los solventes orgánicos ensayados. El análisis estructural de este compuesto se realizó por IR y RMN ^1H y ^{13}C .

El espectro IR (figura 64) del compuesto mostró una señal alrededor de 3400 cm^{-1} característica de un grupo OH, una absorción intensa y definida debido al estiramiento del enlace C=O; además, a 1510 cm^{-1} se observa una señal intensa que puede ser causada por la tensión de un enlace C=C o por un enlace C-N, y una señal a 1000 cm^{-1} debido al enlace C-O.

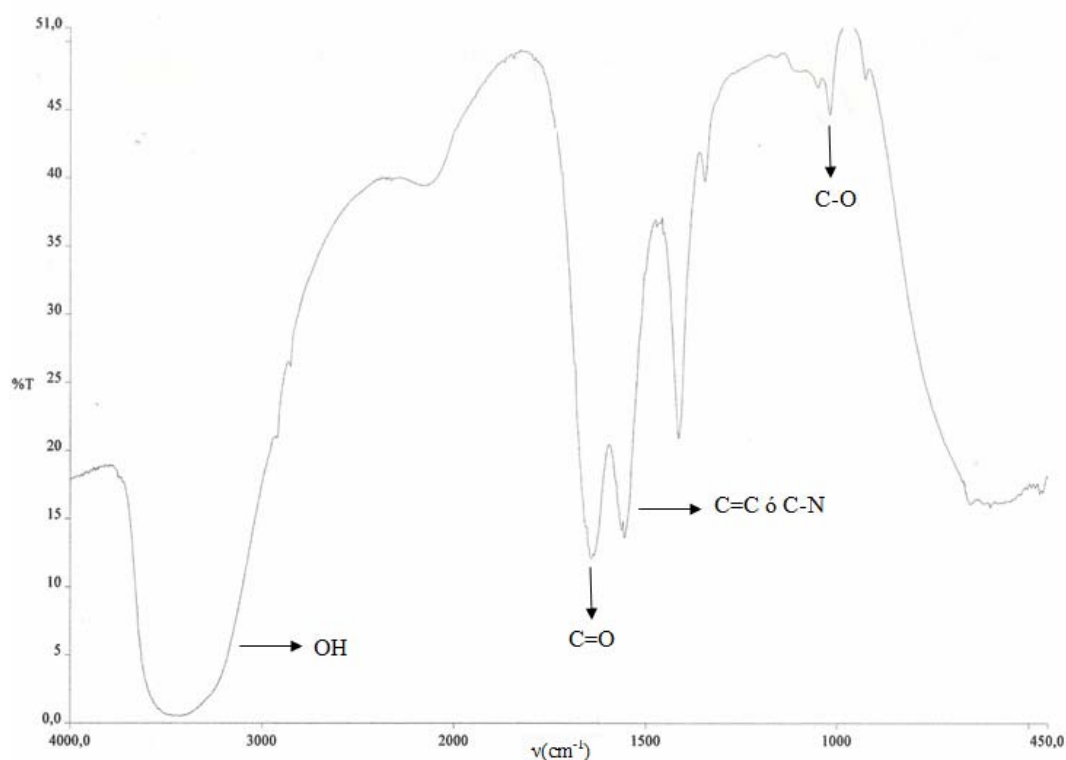


Figura 62. Espectro IR de la subfracción C1.8a1.

El espectro de RMN ^1H (figuras 65 y 66) de la subfracción C1.8a1, mostró dos señales a campo bajo: una a δ_{H} 8,21 ppm y la otra a δ_{H} 8,41 ppm, ambas características de protones enlazados a nitrógeno (N-H), estas señales confirman la presencia de un enlace C-N observado en el espectro IR y debido a que no se observan señales en la región olefínica del espectro de RMN ^1H , se descarta la presencia de enlaces C=C en la estructura del compuesto de la subfracción C1.8a1. A campo bajo también desplegó dos desplazamientos químicos a δ_{H} 7,10 y 7,41 ppm atribuidos a protones de un anillo aromático; además exhibió un singulete a δ_{H} 4,73 ppm asignado al hidrógeno unido a un oxígeno (OH). A campo alto, el espectro de RMN ^1H desplegó tres singuletes, a δ_{H} 2,49; 1,71 y 1,09 ppm, asignados a grupos metilos (tabla 24).

Tabla 25. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones (δ_H) de algunas señales de RMN 1H del compuesto C1.8a1.

δ_H (ppm) ^a	δ_H (ppm) ^b	Multiplicidad	Asignación
8,41	8,35	singulete (<i>s</i>)	N- <u>H</u>
8,21	8,13	singulete (<i>s</i>)	N- <u>H</u>
7,41	7,40	triplete (<i>t</i>)	C(13) <u>H</u> ; C(15) <u>H</u>
7,10	7,27	triplete (<i>t</i>)	C(12) <u>H</u> ; C(14) <u>H</u> ; C(16) <u>H</u>
4,73	3,98	singulete (<i>s</i>)	O- <u>H</u>
1,60	1,62	singulete (<i>s</i>)	CO- <u>CH</u> ₃
1,92	1,91	multiplete (<i>s</i>)	CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -CH ₂

^a: Datos obtenidos a 400 MHz en DOCD₃.

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

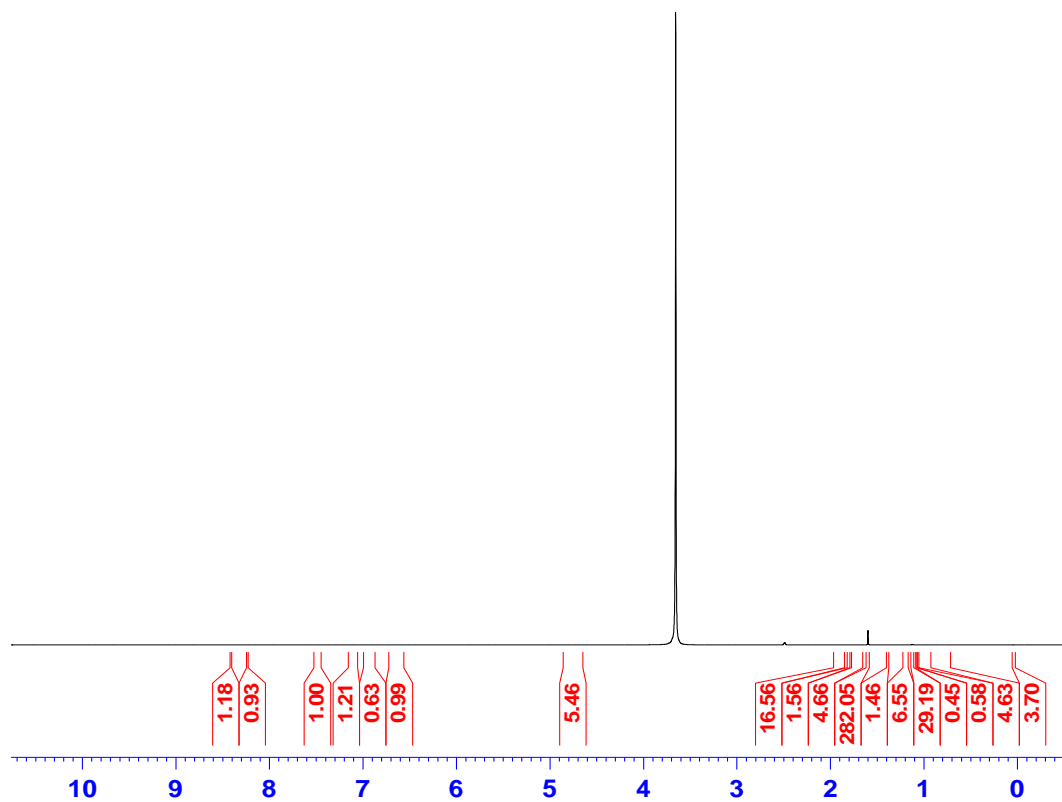


Figura 63. Espectro de RMN 1H de la subfracción C1.8a1.

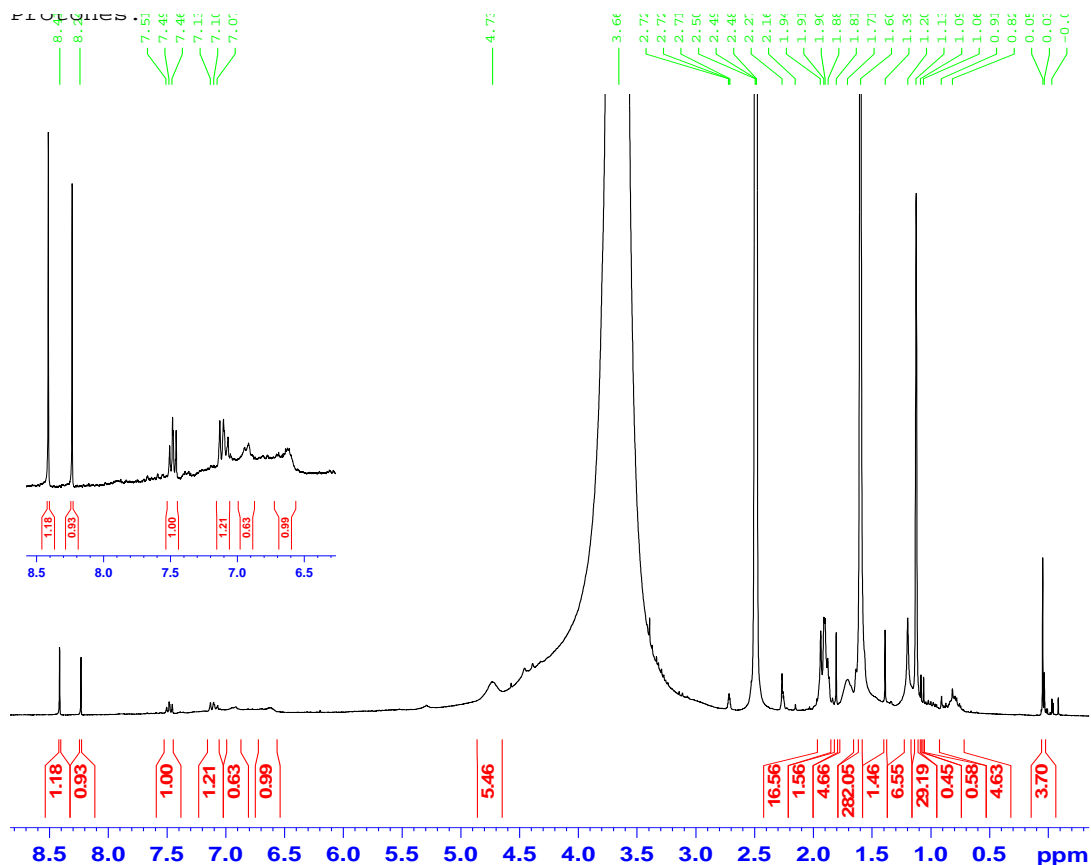

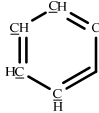


Figura 64. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la subfracción C1.8a1.

El espectro RMN ^{13}C de este compuesto (figuras 67 y 68) mostró una serie de señales a campo bajo, cuyos desplazamientos químicos son: a δ_{C} 175, 35 ppm atribuible al carbonilo (C=O) de una amida, además de dos señales a δ_{C} 140, 54 y 125,87 ppm atribuibles a los carbonos del anillo aromático, y una señal a δ_{C} 74,12 ppm asignable a un carbono enlazado a un oxígeno. A campo alto, se observa una señal intensa a 39,49 ppm característica de grupos metílicos y otra a δ_{C} 25,41 asignable a un grupo metílico terminal (tabla 25).

Tabla 26. Asignaciones de desplazamientos químicos de carbono (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C del compuesto C1.8a1.

$^a\delta_C(\text{ppm})$	$^b\delta_C(\text{ppm})$	Tipo de carbono
175,35	173,9	O=C-NH
140,54	142,6	
125,87	128,3	
74,12	76,6	HO-CH
25,41	25,3	HN-CO- <u>CH</u> ₃

^a: Datos obtenidos a 100 MHz en CDCl_3

^b: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008

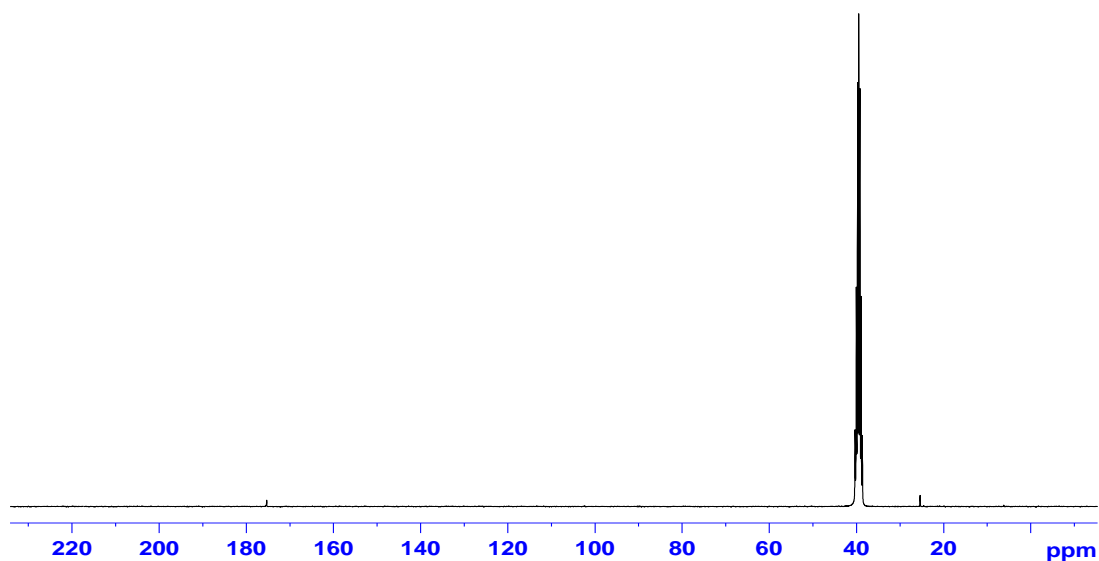


Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C de la subfracción C1.8a1.

Debido a que no se pudieron realizar otros experimentos de RMN, se propuso una posible estructura, al comparar los datos teóricos obtenidos con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008 y con el análisis combinado de RMN de una

dimensión del compuesto. Ésta se corresponde con el *N,N'*(6-hidroxi-10-fenil-6-metildecano-1,7diil)diacetamida (figura 69).

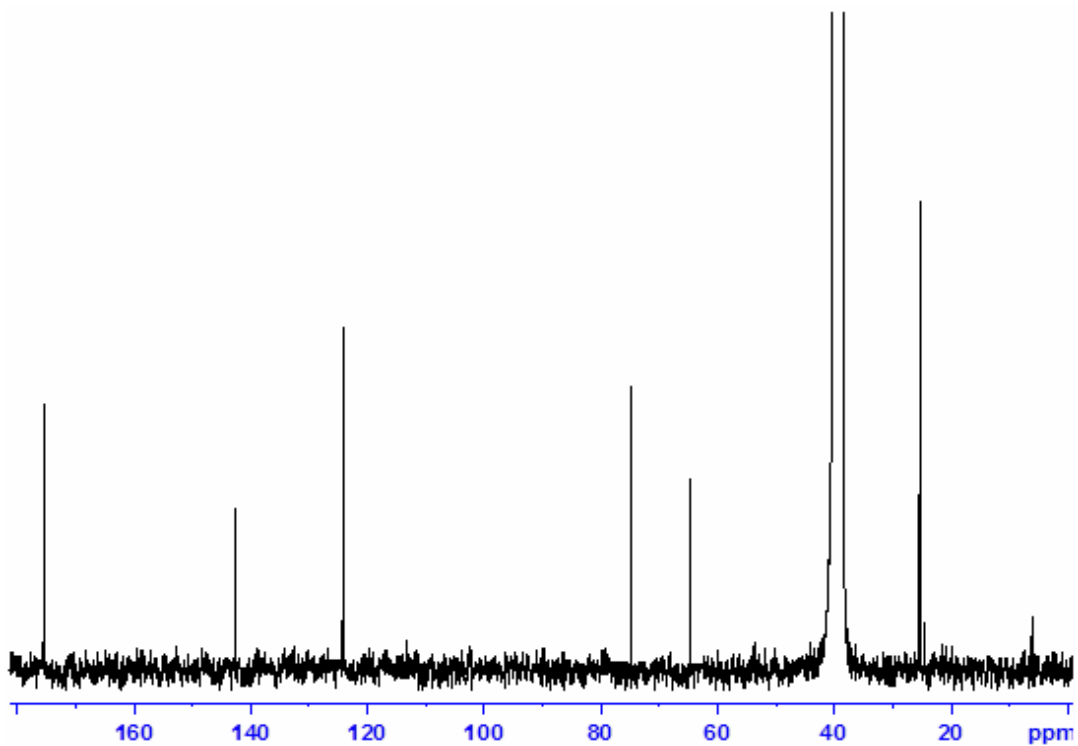


Figura 66. Ampliación I del espectro de RMN ^{13}C de la subfracción C1.8a1.

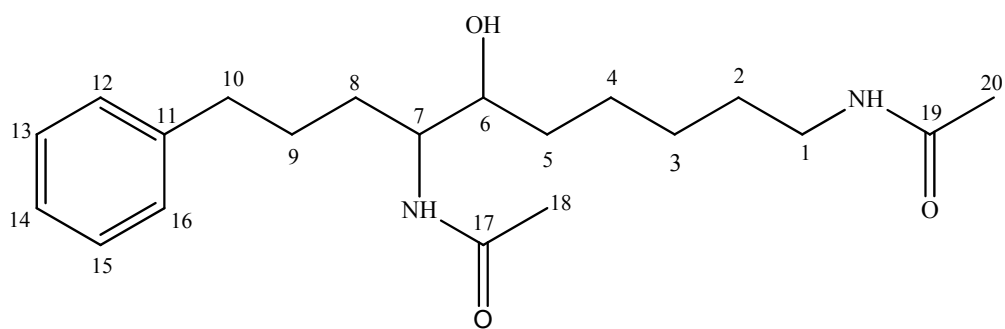


Figura 67. Posible estructura del compuesto C1.8a1.

Separación cromatográfica de la fracción E

La fracción E no pudo ser separada por los métodos cromatográficos convencionales, ya que esta muestra no fue soluble en ninguno de los solventes orgánicos disponibles; es importante destacar que esta fracción, al igual que la fracción D y G, inicialmente era soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, pero transcurrido un periodo aproximadamente de dos semanas, las muestras aparentemente sufrieron una modificación estructural de sus constituyentes o una descomposición de los mismos, provocando un cambio en su solubilidad, lo cual conlleva a inferir que son constituyentes de masas elevadas con más de un grupo hidroxilo, por lo tanto de una alta polaridad.

Con el fin de identificar los grupos funcionales de los metabolitos presentes en esta fracción, se le realizó espectroscopia de IR (figura 70), observándose una banda ancha intensa, a $3\ 400\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del enlace O-H, una absorción a $2\ 900\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento del enlace C-H, otras bandas de absorción a 1620 y 1500 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C=O y tensión causada por el enlace C=C, respectivamente.

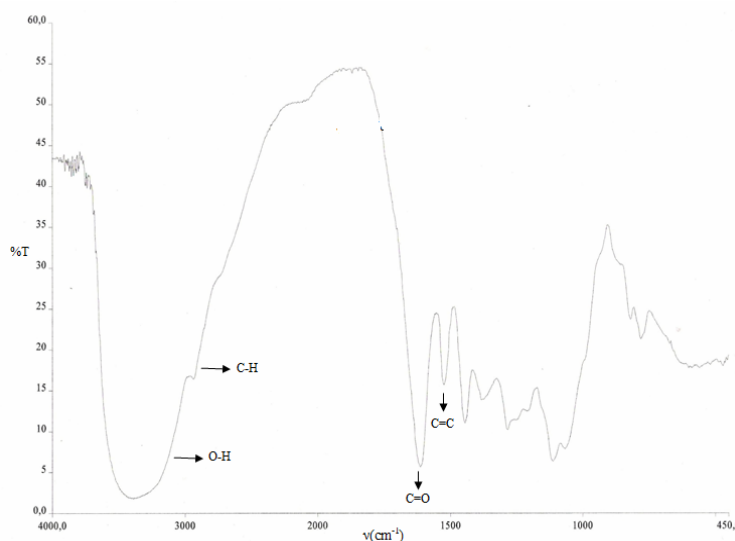


Figura 68. Espectro IR de la fracción E.

Separación cromatográfica de la fracción F

La fracción F fue separada por CC sobre sílica gel 35-70 mesh (0,2 - 0,5 mm), en una columna de 42 cm de alto y un diámetro de 1,5 cm; utilizándose 549,70 mg del extracto y 16,49 g de sílica (relación 1:30 m/m). La cromatografía fue iniciada con éter de petróleo y luego se eluyó con una mezcla de solventes de polaridad creciente, finalizándose con metanol. Se obtuvieron 34 eluatos de 25 ml cada uno (tabla 26), los cuales fueron agrupados en 4 fracciones (tabla 27), tomando en cuenta su comportamiento en la CCF, por comparación de sus R_f . Como agentes reveladores se utilizó luz UV de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio.

Se recuperaron 168,12 mg del material orgánico, lo que representa el 67,32% del material cromatografiado.

Tabla 27. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción F.

Eluyentes	Porcentaje (% v/v)	Eluatos
Éter de petróleo	100	1-5
Éter de petróleo - AcOEt	80-20	6-11
Éter de petróleo - AcOEt	50-50	12-14
AcOEt	100	15-18
AcOEt - Acetona	50-50	19-23
Acetona	100	24-26
Cetona - MeOH	80-20	27-29
Cetona - MeOH	50-50	30-32
MeOH	100	33-34

Se realizaron CCF a cada una de las subfracciones obtenidas, empleándose mezclas de solventes de distintas polaridades y revelándose como se mencionó

anteriormente. En base a las características físicas, a lo observado en la CCF y la solubilidad, se decidió analizar las subfracciones F1 y F4. Las demás subfracciones no fueron estudiadas, ya que mostraron ser mezclas complejas con R_f muy cercanos, lo que dificultaría su separación.

La fracción F4 evidenció en la CCF que se trataba de dos compuestos, por lo que aún está siendo analizada por CG/EM en el IVIC. La fracción F1 se presentó como sólido amarillento, con un punto de fusión entre 176-177 °C, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos; este sólido fue recristalizado en metanol, obteniéndose un sólido cristalino amarillento. En la CCF realizada a este sólido se observó que se trataba de un solo compuesto, al cual se le realizaron los siguientes experimentos RMN: ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HMBC, HMQC Y HSQC.

Tabla 28. Subfracciones obtenidas en la separación cromatográficas de la fracción F.

Eluatos	Subfracción	Masa (mg)
1-11	F1	32,8
12-23	F2	65,9
24-29	F3	12,5
30-34	F4	56,8

Análisis estructural de la subfracción F1

El espectro de RMN ^1H (figuras 71 y 72) del compuesto F1 realizado en cloroformo deuterado desplegó un espectro muy amplio, exhibiendo señales desde la región olefínica hasta campo alto.

En la región olefínica se observaron dos señales una como un doblete ancho y otra como un multiplete con desplazamientos químicos a $\delta_{\text{H}} 5,36$ ppm y $\delta_{\text{H}} 5,15$ ppm, respectivamente; exhibió una señal a $\delta_{\text{H}} 4,58$ ppm en forma de multiplete asignable a

un hidrógeno unido a un carbono que se encuentra enlazado a un grupo acetato ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}$). Esta inferencia resulta lógica ya que este grupo, debido a la alta densidad electrónica que posee, tiene la capacidad de desplazar el protón hacia la región cercana a la olefínica. A campo alto, en δ_{H} 2,31 ppm, se observó un doblete asignable a un grupo metileno ($\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}$), un singulete como una señal intensa a δ_{H} 2,01 ppm, correspondiente a protones metílicos unidos a un carbono enlazado a un grupo carboxílico ($\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{COO}$). También se puede apreciar la presencia de cinco singuletes a δ_{H} 0,99; 0,94; 0,89; 0,85 y 0,65 ppm, asignados a grupos metílicos ($-\text{CH}_3$) (tabla 28).

Tabla 29. Asignaciones de desplazamientos químicos (δ_{H}) de algunas señales de RMN ^1H del compuesto F1.

Posición	δ_{H} (ppm) ^a	Multiplicidad	Asignación
1 ^b	5,15	triplete (<i>t</i>)	$\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}$
2 ^b	5,15	doblete (<i>d</i>)	$\text{HC}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$
3	4,60	multipléte (<i>m</i>)	$\text{CO}_2-\underline{\text{C}}\text{H}$
4	2,31	doblete (<i>d</i>)	$\text{OCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}$
5	5,36	doblete (<i>d</i> .ancho)	$\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}$
11	1,53	multipléte (<i>m</i>)	$\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$
15	1,57	multipléte (<i>m</i>)	$\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$
18	0,65	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
19	0,99	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
21	0,94	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
26	0,89	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
27	0,85	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
29	2,01	singulete (<i>s</i>)	$\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{CO}_2$

^a: Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl_3 .

^b: Ambos protones muestran señales prácticamente a la misma intensidad, la diferencia es mínima y se debe a la disposición espacial que posee.

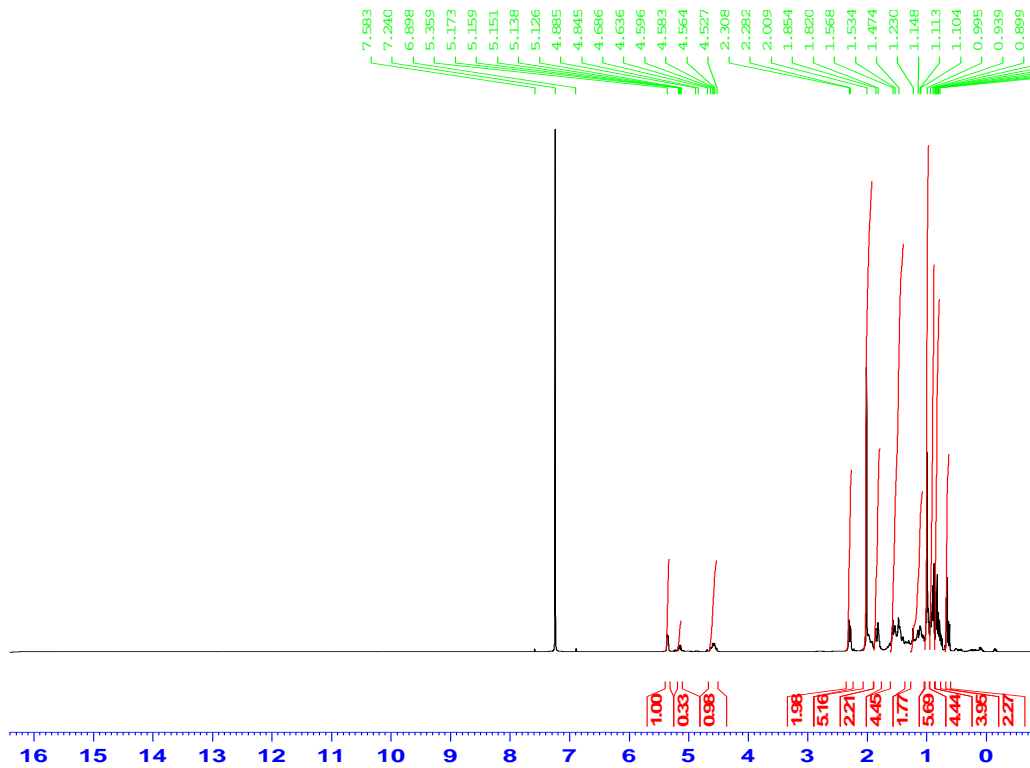


Figura 69. Espectro de RMN ^1H del compuesto F1.

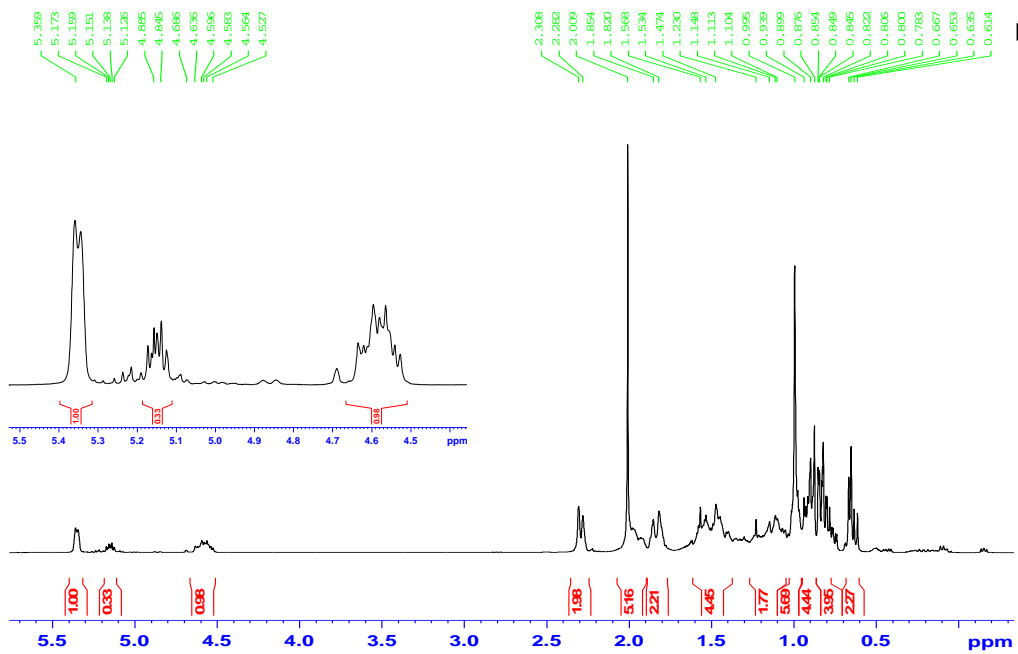


Figura 70. Ampliación del espectro RMN ^1H del compuesto F1.

El espectro de RMN ^{13}C (figuras 73), exhibió 29 desplazamientos químicos de carbonos magnéticamente diferentes presentes en la molécula. Con mayor desplazamiento químico se encuentra el grupo carboxílico a δ_{C} 170,51 ppm, confirmando la presencia de un grupo acetato en la estructura del compuesto F1. También se observó el despliegue de 4 señales en la región olefínica, sugiriendo la presencia de dobles enlaces en la estructura del compuesto en estudio. La primera señal se observó a δ_{C} 139,66 ppm, que corresponde a un grupo etileno ($\text{C}=\text{C}$) trisustituido, seguida de 2 señales de menor intensidad a δ_{C} 135,81 y a δ_{C} 131,70 ppm, asignables a carbonos olefínicos disustituídos. La última señal observada en la región olefínica, mostró un desplazamiento químico a δ_{C} 122,71 ppm, lo cual concuerda con el doblete ancho a δ_{H} 5,36 ppm mostrado en el espectro de RMN ^1H . A campo medio, se observó el despliegue de una señal a δ_{C} 73,96 ppm, que corresponde a un carbono enlazado a oxígeno ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}$). A campo alto, se observaron señales atribuidas a los grupos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en la estructura del compuesto F1 (tabla 29). En el apéndice A se observan las ampliaciones realizadas al espectro de RMN ^{13}C .

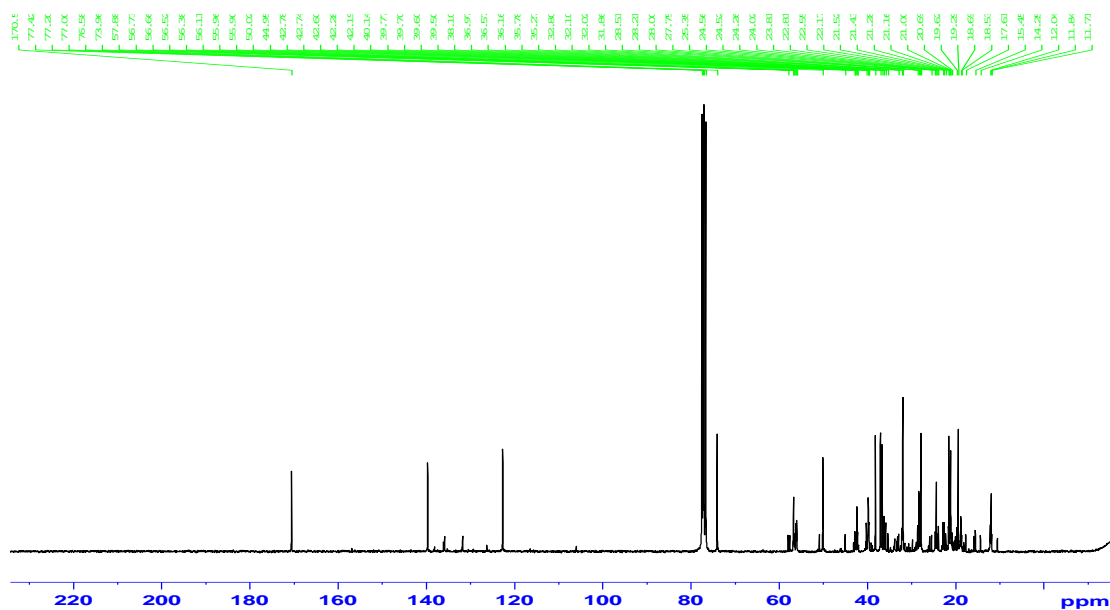


Figura 71. Espectro RMN ^{13}C del compuesto F1.

Tabla 30. Asignaciones de desplazamientos químicos (δ_C) de algunas señales de RMN ^{13}C y el tipo de carbono según el espectro de RMN DEPT-135.

Posición	δ_C (ppm)	Asignación (DEPT-135)
1	131,70	HC= <u>CH</u>
2	135,81	H <u>C</u> =CH
3	73,96	HC-O
4	38,10	CH ₂
5	139,66	CH ₂ - <u>C</u> =CH
6	122,71	C= <u>CH</u>
7	31,86	CH- <u>CH</u> ₂ CH
8	31,89	CH
10	36,57	R ₄ C
11	21,00	CH ₃
13	42,28	R ₄ C
14	50,04	CH
15	24,29	CH ₂
17	56,12	CH
18	12,04	CH ₃
19	19,32	CH ₃
25	28,02	<u>CH</u> (CH ₃) ₂
^(c) 26	22,57	CH ₃
^(c) 27	22,83	CH ₃
28	170,51	CH ₃ <u>C</u> O ₂
29	21,46	CH ₃

^(c) las asignaciones para los metilos 26 y 27 pueden ser intercambiables.

Mediante el espectro DEPT-135 (figuras 74), se asignaron los tipos de carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en la estructura y se observó la presencia de 3 carbonos cuaternarios (tabla 29). Mediante este espectro se confirmaron las

asignaciones realizadas; sin embargo, este experimento no proporciona información acerca del protón que se encuentra enlazado al átomo de carbono (heteroátomo), por lo cual se realizaron experimentos de HMQC, HMBC, HSQC y COSY. Algunas de las ampliaciones realizadas al espectro DEPT-135, se muestran en el apéndice B.

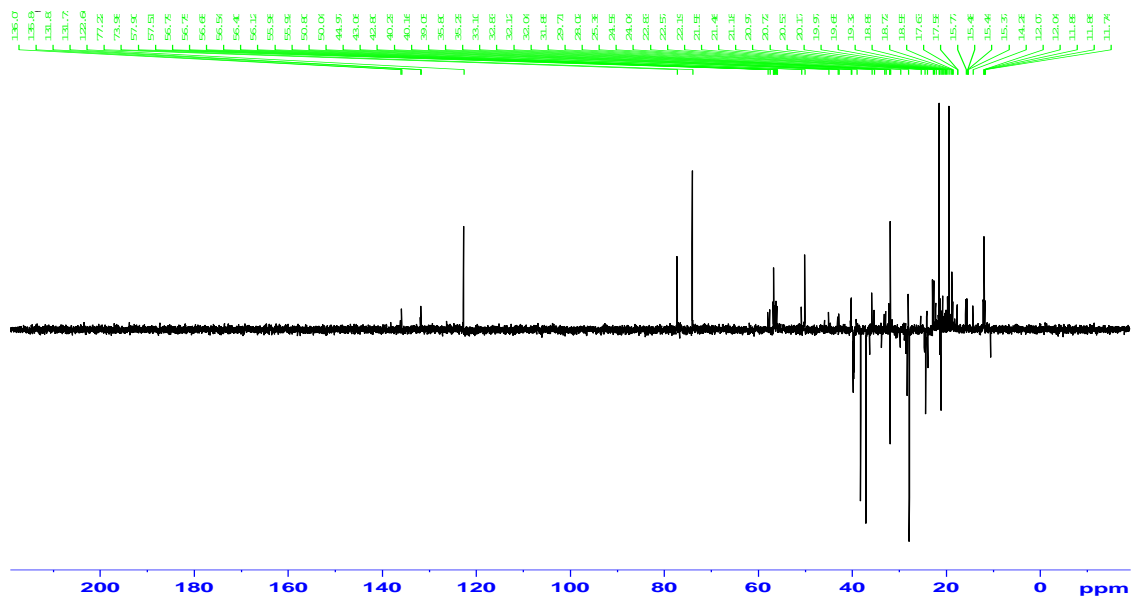


Figura 72. Espectro DEPT 135 del compuesto F1.

Por medio del experimento HMQC, se logró asignar algunos de los protones y los carbonos enlazados directamente a ellos, a través de un enlace de alta sensibilidad; además, fue necesario realizar experimento de HSQC. Aunque ambos proporcionan la misma información, el HMQC es más sensible a desajustarse en los parámetros de registros, mientras que el HSQC posee una mejor resolución cuando los espectros muestran muchas señales, como es el caso del compuesto en estudio.

Con el experimento del HMQC (figura 75), se confirmó la conectividad directa del carbono olefínico (C6) a δ_C 122,71 ppm con el doblete ancho correspondiente al hidrógeno a δ_H 5,36 ppm; además, se observó la conectividad directa de los carbonos a δ_C 131, 70 ppm y 135,81 ppm con el multiplete ancho observado a δ_H 5,15 ppm y

la interacción de un carbono oxigenado a δ_C 73, 96 ppm con el protón en la posición 3 a 4,60 ppm (figura 76); ambas interacciones también fueron observadas en el espectro HSQC (figura 77).

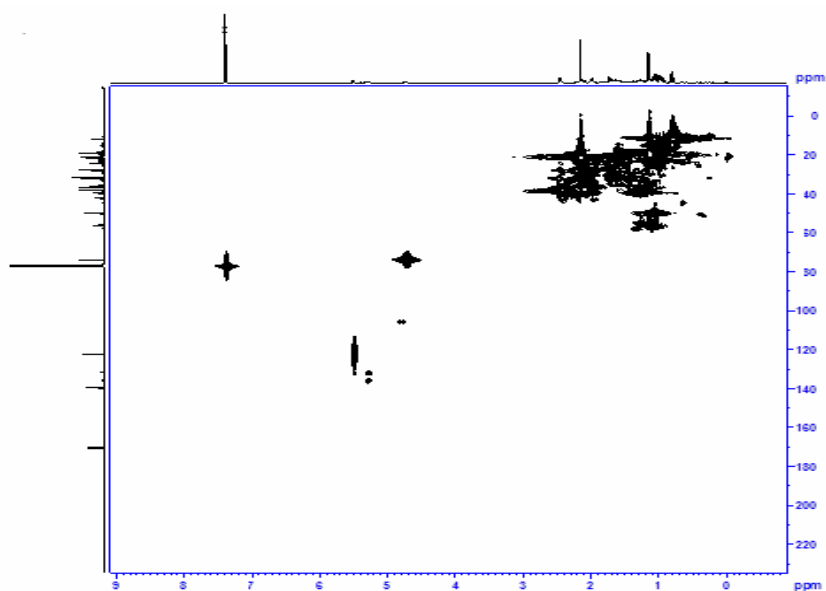


Figura 73. Espectro HMQC del compuesto F1.

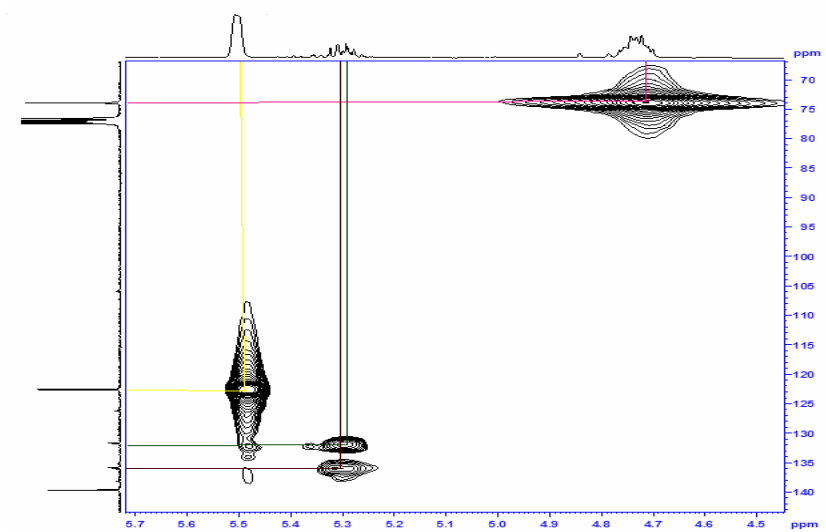


Figura 74. Ampliación I del espectro HMQC del compuesto F1.

Tabla 31. Datos seleccionados de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC, HMBC y COSY del compuesto F.

Nº de señales	δ_{H} (ppm)	HMQC (ppm) ^a	δ_{C}	HMBC (ppm) ^a	δ_{H}	COSY ^1H - ^1H (ppm) ^a
1	5,15	131,70		----		----
2	5,15	135,81		2,009		----
3	4,58	73,96		2,308		----
4	2,31	38,10		----		----
5	----	139,66		2,308; 1,474	0,995;	----
6	5,36	122,71		2,308		1,474
7	1,47	31,86		5,359		5,359
8	----	31,89		----		----
10	----	36,57		----		----
11	1,53	21,00		----		----
13	----	42,28		----		----
14	0,94	50,04		----		----
17	1,82	56,12		0,653		----
18	0,65	12,04		----		----
19	0,99	19,32		----		----
21	0,93	----		----		----
25	1,10	28,02		0,899;0,845		----
26	0,89	22,57		----		----
27	0,85	22,83		5,151		----
28	----	170,51		4,583; 2,009		----
29	2,01	21,46		----		----

^a: Datos obtenidos a 100 MHz en CDCl_3

En la ampliación II del espectro HMQC (figura 78), se observa la conectividad directa de los carbonos 4, 11, 18, 19 y 29 con los hidrógenos a δ_H 2,31; 1,53; 0,65; 0,99 y 2,01 ppm, respectivamente. Adicionalmente, se muestran las ampliaciones en el apéndice C, donde se observa algunas de las conectividades antes mencionadas.

El espectro HMBC fue realizado con $CDCl_3$, obteniéndose un espectro bastante poblado a campo alto, lo que dificultó las asignaciones de las correlaciones indirectas como se observa en la figura 79, esto indica la presencia de muchas interacciones en esa región. En las ampliaciones realizadas a esta región tampoco fue posible realizar con certeza las correlaciones. Sin embargo, a campo bajo las interacciones son suficientemente claras, lo cual permitió proponer la estructura parcial I (figura 83).

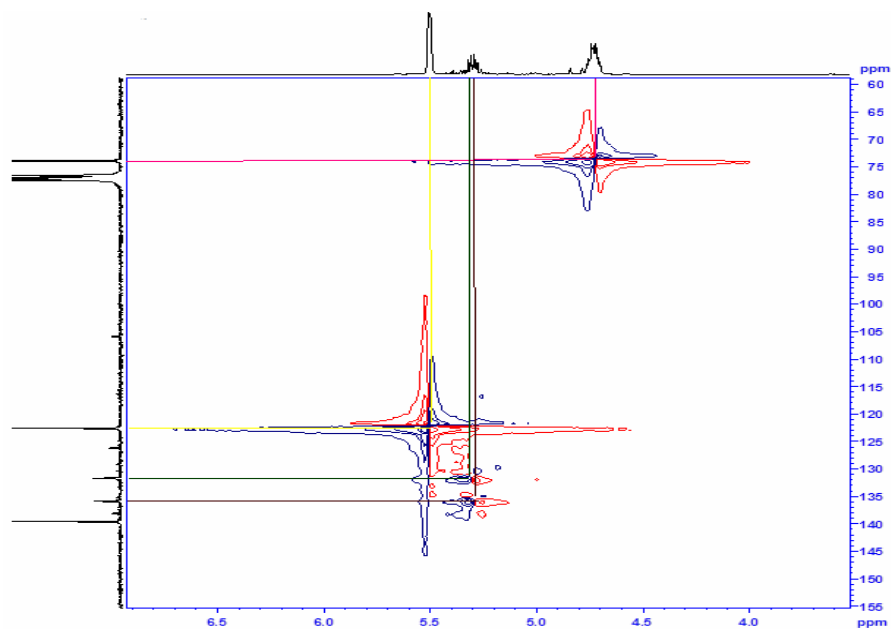


Figura 75. Espectro de HSQC del compuesto F1.

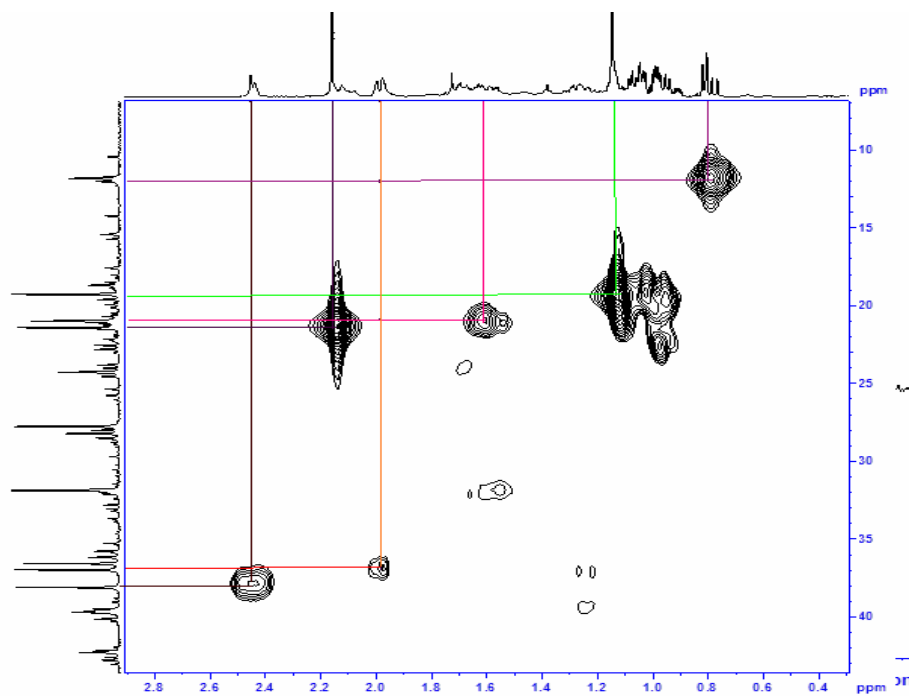


Figura 76. Ampliación II del espectro HMQC del compuesto F1.

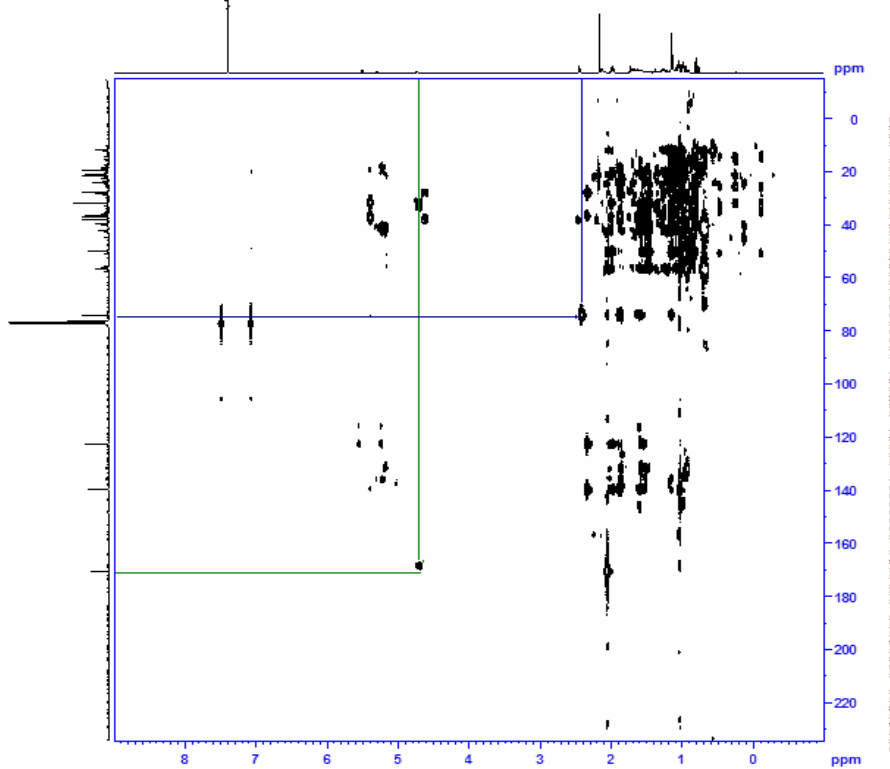


Figura 77. Espectro HMBC del compuesto F1.

A partir de la ampliación I del espectro de HMBC (figura 80), se observa que el carbono olefínico a δ_C 122,71 ppm enlazado directamente al protón que se encuentra a δ_H 5,36 ppm, mostró una correlación con el protón a δ_H 2,31 ppm, lo cual, según lo observado en el espectro de HMQC (figura 76), se encuentra enlazado al carbono a δ_C 38,10 ppm; la misma interacción también se observa con el carbono oxigenado que se encuentra a δ_C 73,96 ppm. El carbono olefínico que se encuentra a δ_H 139,66 ppm también mostró una correlación con el protón que exhibió un desplazamiento a δ_H 0,99 ppm (el mismo se encuentra enlazado al carbono a δ_C 19,32 ppm).

El carbono cuaternario que se encuentra a δ_C 139,66 ppm mostró una correlación con los protones con desplazamiento a δ_H 2,31; 0,99 y 1,47 ppm; además, se observa la interacción del carbono a δ_C 170,51 ppm con el protón a δ_H 2,01 ppm que corresponde al carbono metílico δ_C 21,46 ppm (figura 80) y otra conectividad con el protón que se encuentra a δ_H 4,58 ppm.

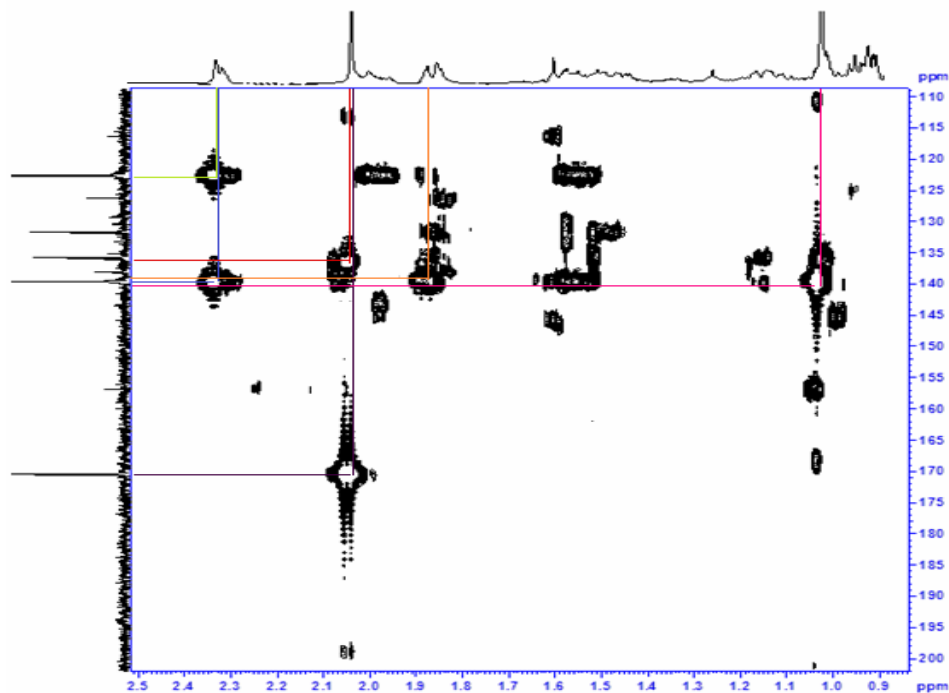


Figura 78. Ampliación I del espectro HMBC del compuesto F1.

En la ampliación II y III del espectro de HMBC (figuras 81 y 82), se observan tres correlaciones importantes que permitieron proponer una posible estructura para el compuesto F1: una es la correlación mostrada por el carbono olefínico a δ_C 122, 71 ppm con el multiplete que se encontraba a δ_H 5,15 ppm, y las otras son picos cruzados que exhibieron los carbonos olefínicos a δ_C 131,70 y 135,81 ppm con los respectivos protones.

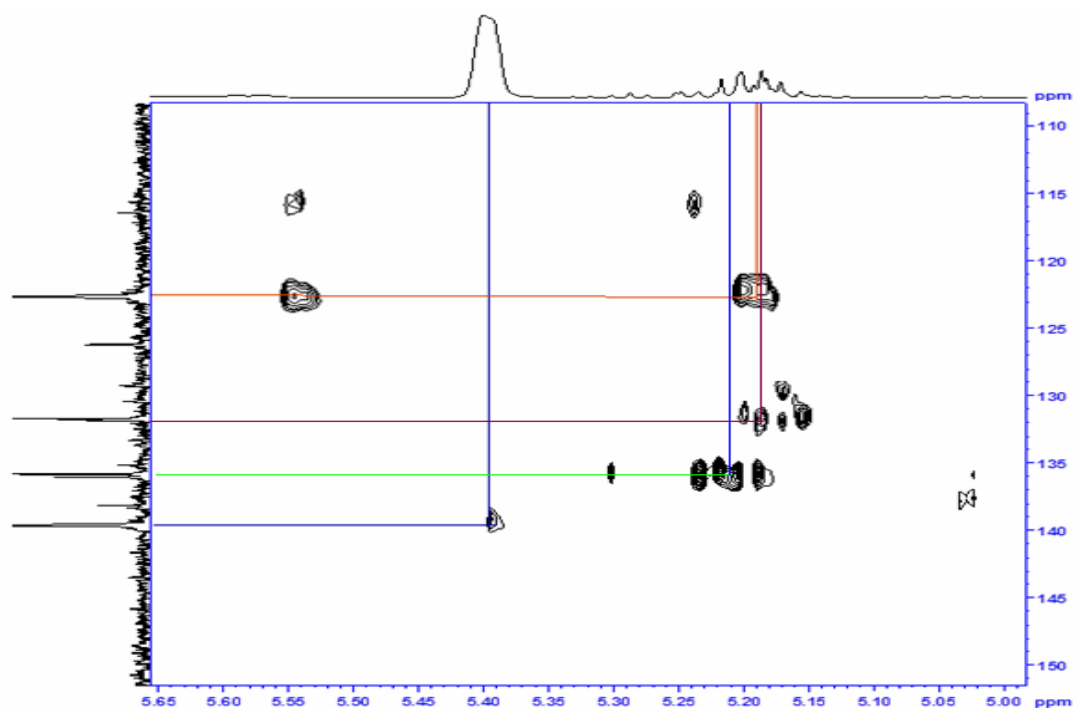


Figura 79. Ampliación II del espectro HMBC del compuesto F1.

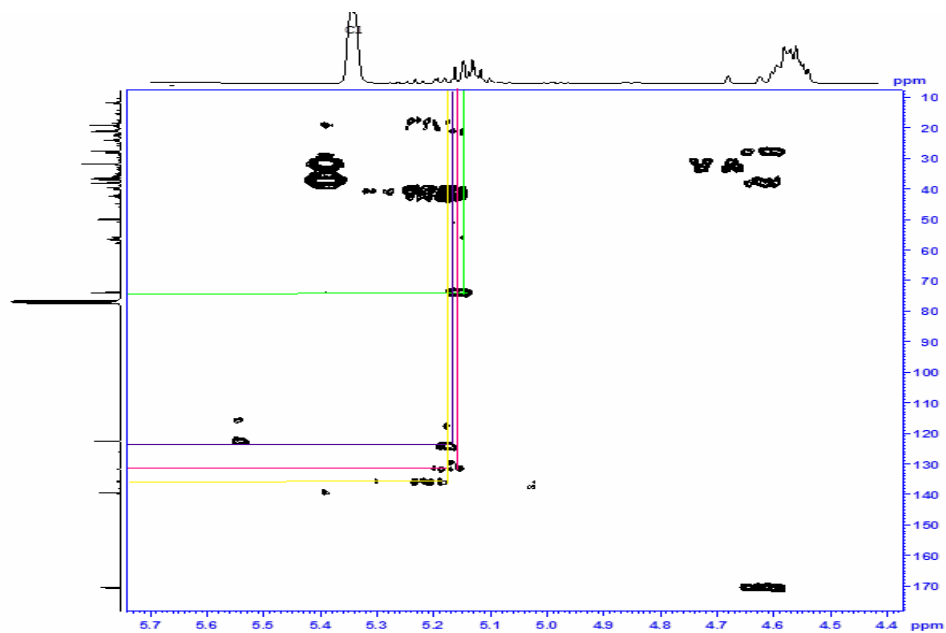


Figura 80. Ampliación III del espectro HMBC del compuesto F1.

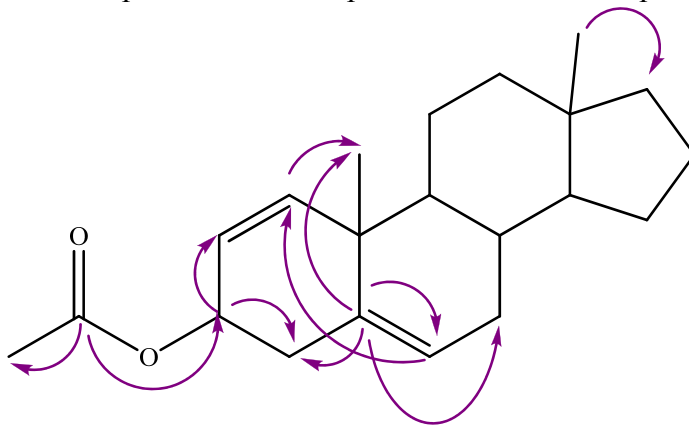


Figura 81. Estructura parcial I del compuesto F1 mostrando las correlaciones HMBC.

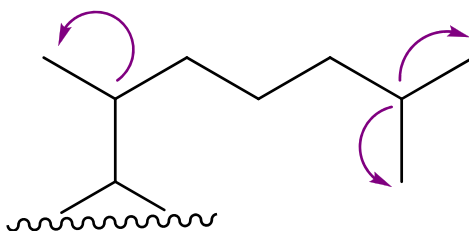


Figura 82. Estructura parcial II del compuesto F1 mostrando las correlaciones HMBC.

El espectro COSY ^1H - ^1H (figura 85 y 86) obtenido para este compuesto resultó muy complejo, además se observó un corrimiento en los desplazamientos químicos bastante considerable en algunas de las ampliaciones, lo cual dificultó obtener más información de este espectro.

Basados en el análisis estructural realizado al compuesto F1, se propone este compuesto como un posible derivado acetilado del colestano, con dos dobles enlaces en las posiciones 1 y 5, el cual fue nombrado como 3-acetilcolest-1,5-dieno (figura 87), siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de este metabolito secundario en *M. tomentosa* y en la literatura en general.

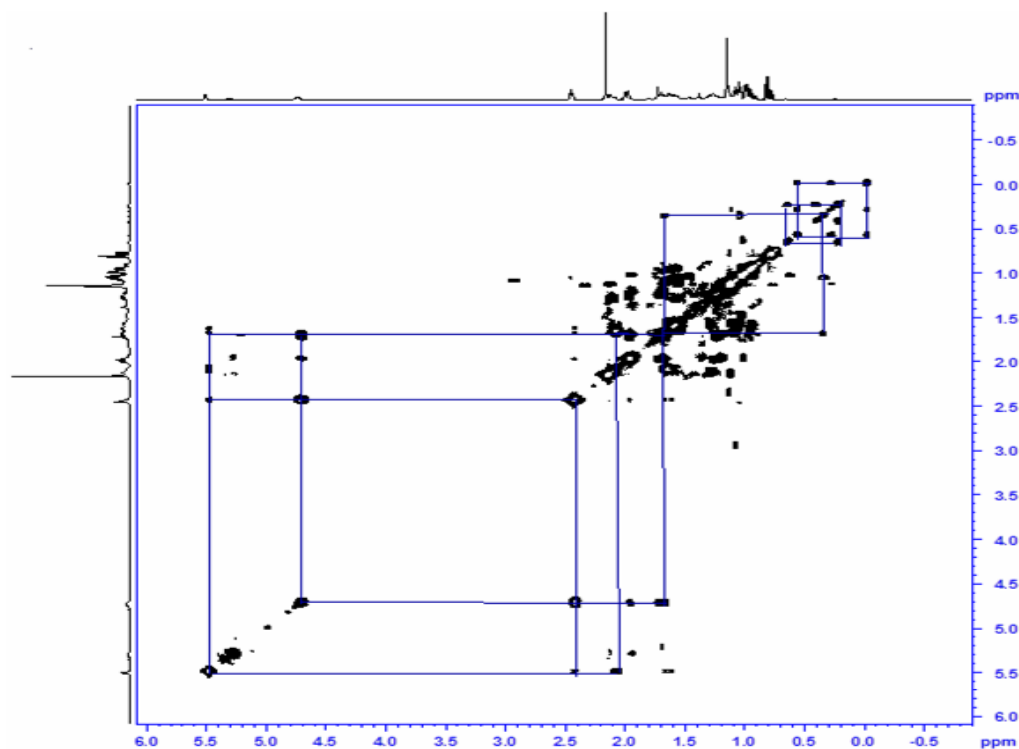


Figura 83. Espectro de COSY del compuesto F1.

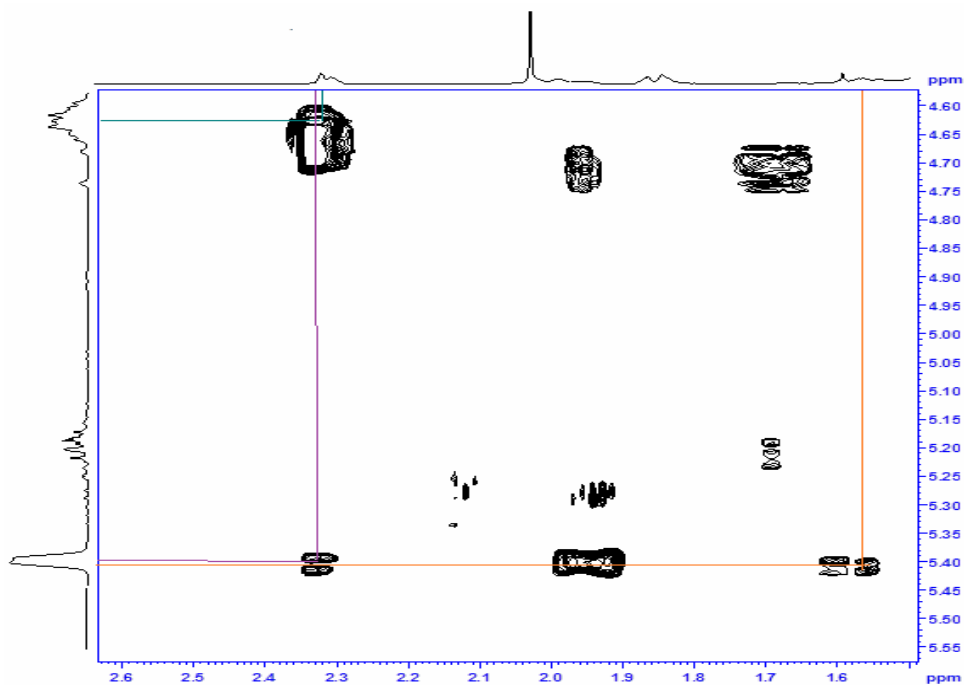


Figura 84. Ampliación I del espectro de COSY del compuesto F1.

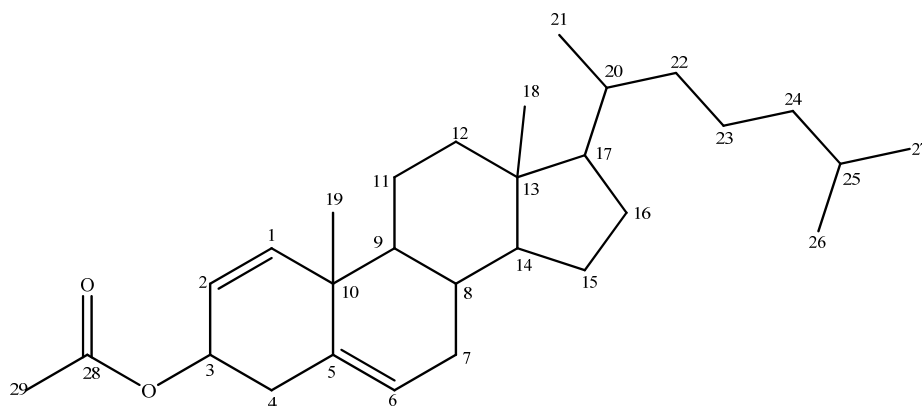


Figura 85. Estructura del 3-acetilcolest-1,5-dieno.

Separación cromatográfica de la fracción G

La fracción G presentó una característica muy particular, al ser obtenido del fraccionamiento del EMT, ya que al agitarse vigorosamente se formaba una espuma muy persistente que duraba hasta tres días, lo que evidenció que esta fracción estaba

constituida por saponinas. En la CCF realizada antes de evaporar el solvente con el cual fue eluido (acetona-metanol 2:3), se observó que se trata de una mezcla muy compleja de compuestos constituidos posiblemente por saponinas, ya que al ser revelado se observaba una estela muy oscura, sin ninguna separación. Una vez evaporado el solvente se obtuvo un sólido amorfo de color marrón oscuro, con punto de fusión mayor a 250 °C e insoluble en todos los solventes orgánicos, además insoluble en agua y DMSO.

Para tratar de identificar el grupo funcional se le realizó espectroscopia de IR (figura 88) y se observó una banda ancha y muy intensa a 3400 cm^{-1} que corresponde a la tensión del enlace O-H, una absorción a 1600 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C=O olefínico, una absorción a 1550 cm^{-1} causada por la distorsión del enlace C=C, una banda de flexión de enlaces saturados C-H alrededor de 1445 cm^{-1} y una banda a 1000 cm^{-1} debido a la tensión del enlace C-O.

Basado en las características físicas de la muestra y las señales observadas en el espectro de IR, es posible que esta fracción esté constituida por saponinas esteroidales. Esta aseveración, es posible, ya que el EMT resultó positivo en los ensayos para saponinas; además, ésta fue la única fracción donde se observó una espuma persistente, evidenciando la presencia de este tipo de metabolito.

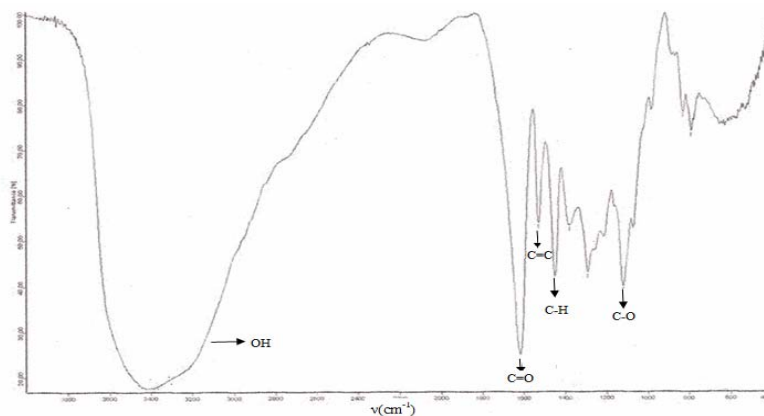


Figura 86. Espectro IR de la fracción G.

Las saponinas esteroidales, por su carácter glucosídico, son insolubles en la mayoría de los solventes y para extraerlas es necesario realizar un tratamiento especial. Este metabolito secundario, solo ha sido reportado en pocas familias de plantas entre las que se puede mencionar a Liliaceae, Dioscoreaceae y Solanaceae. En el reino animal solo ha sido encontrado en las estrellas de mar (43).

Debido a la importancia de esta familia de metabolitos secundarios en la industria farmacéutica para la elaboración de antibióticos, a los pocos reportes que existen de los mismos y que nunca han sido reportados en la familia Sterculiaceae, se decidió acetilar la fracción G, teniendo en cuenta la presencia del grupo hidroxilo para obtener el éster de este compuesto, que en teoría debería presentar una polaridad menor y así poder ser analizado.

La acetilación de la fracción G se realizó en presencia de anhídrido acético y piridina, el resultado de la acetilación fue poco favorable, ya que solo una poca cantidad de la fracción pudo ser acetilada, obteniéndose tres subfracciones (tabla 31).

Tabla 32. Subfracciones obtenidas en la acetilación de la fracción G.

Subfracción	Características	Masa (mg)
G1	Aceite amarillo pálido	12,3
G2	Sólido amorfo, color marrón oscuro	434,98
G3	Líquido marrón	340,87

La subfracción G1, fue la parte de la fracción que pudo ser acetilada, obteniendo como un aceite muy viscoso de color amarillo pálido, soluble en cloroformo y metanol, se le realizó CCF para analizar los constituyentes de esta subfracción y se observaron dos manchas bien definidas, una muy cercana al origen y otras muy cercana al frente del solvente. Debido a que los compuestos mostraron una

notable separación y a la poca cantidad que se obtuvo, se decidió analizarla por CG/EM; aún se está a la espera de los resultados.

La subfracción G2, fue la parte de fracción G que no se acetiló, mantuvo las mismas características físicas que el sólido antes de ser acetilado, igualmente resultó insoluble ante todos los solventes, con un punto de fusión mayor a 250 °C.

La subfracción G3, es posible que se trate de las sales de estos compuestos, debido que al momento de lavar el acetilado con la solución de NaOH al 10%, una parte del sólido que no se acetiló fue disuelta por esta solución. A esta subfracción se le realizó un tratamiento especial con el fin de inducir al precipitado de los constituyentes presentes. Inicialmente, la muestra fue sometida a bajas temperaturas, obteniéndose cristales en forma de agujas, que fueron separados de la solución madre en frío, luego se secaron a baja presión y posteriormente fue analizado por CG/EM; sin embargo, aún se está a la espera de los resultados para ser interpretados. La solución madre fue tratada con diferentes solventes de polaridad creciente, obteniéndose precipitados con características físicas y solubilidades distintas.

CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos metanólicos de las hojas y el tallo evidenció la presencia de flavonoides y esteroides insaturados en ambos extractos, y adicionalmente en el tallo se detectaron saponinas, polifenoles y taninos.

El extracto metanólico del tallo mostró actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y negativas; además, la fracción I proveniente de este extracto exhibió una actividad moderada contra *M. luteus* y *P. aeruginosa* y leve frente a *S. aureus*; sin embargo, tanto el extracto de las hojas como sus fracciones no afectaron a las cepas bacterianas ensayadas.

El extracto metanólico de las hojas resultó ser inocuo frente a todas las cepas de hongos utilizadas, mientras que las fracciones C y H provenientes de este extracto, presentaron una actividad antifúngica moderada y leve frente al hongo *Mucor* sp respectivamente.

El extracto metanólico del tallo mostró una actividad antifúngica moderada contra *C. lunata*, *Mucor* sp y *Penicillium* sp e inactivo frente al hongo *C. albicans*. La fracción I proveniente de este extracto exhibió una actividad fuerte frente al hongo *Penicillium* sp.

En el ensayo de letalidad media (CL_{50}), el extracto del tallo y la fracción E proveniente del mismo mostraron una actividad letal fuerte y moderada (CL_{50} = 21,24 y 182,51 μ g/ml respectivamente). Las fracciones provenientes del extracto metanólico de las hojas no presentaron actividad letal.

En el análisis de CG/EM a la subfracción C1, se identificó al ácido hexadecanoico como constituyente principal, además de su respectivo éster metílico, el ácido octadecanoico y su éster metílico.

El análisis por RMN 1D realizado a la subfracción C2.1 y comparando con los datos arrojados por el programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008 para los espectros de ^1H y ^{13}C , se propuso al éster metílico del ácido eicosanoico como posible compuesto.

Mediante análisis de RMN de ^1H y ^{13}C de la subfracción C2.2 y por comparación de los datos obtenidos con los teóricos del Predictor ChemBioDraw Ultra 2008, se sugirió al 3,7-dimetil-9-fenil-7-en-3-ol como posible estructura.

En la fracción H, se identificaron al docosanol; 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-dien-2,8-diona; 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo; 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo; 4,4,17, trimetilcolesta-8,14-dien-3-il y 4,4,17-metilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato, mediante CG/EM.

En la subfracción C1.8a1, por análisis de IR y RMN de ^1H , ^{13}C y por comparación de los datos con el programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2008, el posible compuesto fue identificado *N,N*-(6-hidroxi-10-fenil-6-metildecano-1,7-diil)diacetamida.

El análisis estructural realizado al compuesto aislado de la subfracción F1, mediante los diferentes experimentos de RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT-135) y 2D (HMQC, HSQC, HMBC y COSY), condujo a proponer a un esteroide C_{29} , derivado acetilado del colestano, con dobles enlaces en las posiciones 1 y 5, y una cadena lateral saturada, como posible estructura.

LISTA DE ABREVIATURAS

1. EMH Extracto metanólico de la hojas
2. EMT Extracto metanólico del tallo
3. CL₅₀ Concentración letal media
4. CC Cromatografía de columna
5. CCF Cromatografía de capa fina
6. CCFP Cromatografía de capa fina preparativa
7. IR Espectroscopia Infrarroja
8. CG-EM Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas
9. TR Tiempo de retención
10. RMN ¹H Resonancia Magnética Nuclear de Protones
11. RMN ¹³C Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
12. HMQC Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
13. HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation
14. HSQC Heteronuclear Single Quantum Correlation
15. DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
16. COSY Correlated Spectroscopy Homonuclear

BIBLIOGRAFÍA

1. Lock, O. 2002. "Análisis fitoquímicos y metabolitos secundarios". <[http:// www.maca -peruana.com/analisis.htm](http://www.maca-peruana.com/analisis.htm)> (06/0 4/2009).
2. Rodriguez, L. 2006. "Morfina". <[http://www.uam.es/departamentos/ medicina/ anesnet/agenda/farmacologia/morfina](http://www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/agenda/farmacologia/morfina)>(11/01/2010).
3. Marcano, D. 2008. "Ácidoacetilsalicílico".[http://www.cun.es/areadesalud /medicamentos/sistema-nervioso/analgesicos/analgesicos-no- iaceos/acetilsalicilico-acido- analgésico](http://www.cun.es/areadesalud/medicamentos/sistema-nervioso/analgesicos/analgesicos-no-iaceos/acetilsalicilico-acido-analgésico)>(11/01/2010).
4. Bianchi, A. 1999. La farmacia más grande del mundo. *Newton*, 15: 64-68.
5. McChesney, J.; Venkataraman, S. y Henri, J. 2007. Plant natural products: Back to the future or into extinction. *Phytochemistry*, 68: 2015-2022.
6. Wani, M.; Taylor, H.; Wall, M.; Coggon, P. y McPhail, A. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, anovel antileukemic and antitumor agent from *Taxusbrevifolia*. *J. Chem. Soc.*, 93: 2325–2327.
7. Reid, A.; Jager, K.; Light, E.; Mulholland, A. y Van Staden, J. 2005. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceaespecies and isolation of antibacterial compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 285-291.
8. Mahady, G. 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 2405-2427.
9. Newman, D.; Cragg, G. y Snader, K. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 215-234.
10. Ragasa, C.; Cruz, C.; Chiong, I.; Tada, M. y Rideout, J. 1997. Antifungal flavonoids from *Waltheriaamerica*. *Philippine Journal of Science*, 126: 243-250.
11. Vásques, C.; Cortes, S.; Silva, M. y Medeiros, I. 1999. Muscarinic agoins properties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheriaviscosissima*St. Hil(*Sterculiaceae*) in rats. *Phytoterapy Research*, 13: 312- 317.

12. Janzen, D. 1975. Intra and interhabitat variations in *Guazuma ulmifolia* (sterculiaceae) seed predation by *Amblycerus cystelinus* (bruchidae) in Costa Rica. *Ecolog.*, 56: 1009-1013.
13. Sotelo, A y Alvarez, R. 1991. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39:1940-1943.
14. Rondón, B. 2007. Estudio taxonómico del género *Melochia* L. (Sterculiaceae) en el estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7: 122-137.
15. Tarache, A. 2004. Separación e identificación de algunos compuestos constituyentes de la planta *Helicteres baruensis* Jacq. (Sterculiaceae) y su actividad biológica. Trabajo de pregrado. Departamento de Química. Universidad de oriente, Cumaná.
16. Gressler, V. 2006. Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Waltheriadouradinha* St. Hil. Trabajo doctoral. Departamento de Química. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
17. Oliveira, G. 2005. Estudio fitoquímico de la raíz de la especie *Melochiachamaedrys* St. Hil. Trabajo doctoral. Departamento de Química. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
18. Kamiya, K.; Saiki, Y.; Hama, T.; Fujimoto, Y.; Endang, H.; Umar, M. y Satake, T. 2001. Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. *Phytochemistry*, 57: 297-301.
19. Chen, W.; Tang, W.; Lou, L. y Zhao, W. 2006. Pregnane, coumarin and lupane derivatives and cytotoxic constituents from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry*, 67: 1041-1047.
20. Vásquez, V. 2010. Aislamiento e identificación de algunos constituyentes de la hoja de la planta *Helicteres guazumifolia* Kunth (Sterculiaceae) y su posible actividad biológica. Trabajo de pregrado. Departamento de química. Universidad de oriente, Cumaná.
21. Gourneliff, D.; Laskarisb, G. y Verpoorte, R. 1995. Cyclopeptide alkaloids. *Natural Product Reports*, 26: 299-306.
22. Mitscher, L. 2005. Bacterial toisomerase inhibitors: Quinolone and pyridine antibacterial agents. *Chem. Rev.*, 105: 559-592.

23. Gutiérrez, Z. 2004. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Quimioterap.*, 17: 232-243.
24. Leshner, G.; Froelich, D. y Guert, M. 1962. 1,8-naphthydine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *Chem.*, 5:1063-1068.
25. Hoelzel, S.; Vierira, E.; Giacomelli, S.; Dalcol, L.; Zanatta, N. y Morel, A. 2005. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheriadouradinha*. *Phytochemistry*, 66: 1163-1167.
26. Kapadia, J.; Silvertson, B.; Fales, H. y Sokoloski. 1975. Melochinone, a novel quinolinone from *Melochiatomentosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 97: 6814-6819.
27. Govind, J.; Kapadia, J. y Shukla, Y. 1978. Melovinone an open chain analogue of melochinone from *Melochiatomentosa*. *Phytochemistry*, 17:1444-1445.
28. Ragasa, C.; Cruz, C.; Tada, M. y Rideout, J. 1997. Flavonoids from *Waltheriaamericana*. *Philippine Journal of Science*, 126:250.
29. Petrus, A. 1990. Polyphenolic components of *W.indica*. *Phytochemical communications fitoterapia*, 61:371.
30. Bhakuni, R.; Shukla, Y. y Thakur, R. 1987. Cyclopeptide alkaloids from *Melochiacorchorifolia*. *Phytochemistry*, 26: 324-325.
31. Bhakuni, R.; Shukla, Y. y Thakur, R. 1991. Alkaloids from *Melochiachamaedrys*. *Phytochemistry*, 9:3159-3160.
32. Shukla, Y.; Sokoloskii, H.; Fales, M. y Kapadia, G. 1976. 6-Methoxy-7,8-methylenedioxy coumarin from *Melochiatomentosa*. *Phytochemistry*, 15: 1788.
33. Kapadia, J.; Shukla, Y. y Sokoloski, H. 1979. The melosatins-a novel class of alkaloids from *Melochiatomentosa*. *Phytochemistry*, 16: 2441-2447.
34. Govind, J.; Kapadia, J. y Shukla, Y. 1977. New Cyclopeptide alkaloids from *Melochiatomentosa*. *Phytochemistry*, 16:1431-1433.
35. Rondón, B. y Cumaná, L. 2006. Clave preliminar para identificar especies de la familia Sterculiaceae en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7: 142-152.
36. Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility

- testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol.*, 45: 493-496.
37. Monks, N.; C, Lerner.; A, Henriques.; F, Farias.; E, Schapoval.; E, Suyenaga.; A, Da Rocha.; G. Schwartzmann. y B, Mothes. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 281: 1-12.
 38. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Phar.*, 33: 232-237.
 39. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC₅₀. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pensilvania. Pág. 65.
 40. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
 41. D' Armas, H. 2001. Constituyentes químicos de octocorales seleccionados del Caribe meridional. Trabajo para ascender a la categoría de profesor titular. Departamento de química. Universidad de Oriente. Cumaná.
 42. Martínez, S.; González, J.; Culebras, J. y Tuñón M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 6: 271-278.
 43. Mahato, S.; Ganguly, A. y Sahu, N. 1982. Steroidsaponins. *Phytochemistry*, 21: 959-978.
 44. Pérez, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.*, 22:34-43.
 45. Valgas, C.; Machado, S.; Smania, E. y Smania, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 23: 369-380.
 46. Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Fusco, A.; Siqueira, H.; Silva, V. y Soares M. 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 391-397.
 47. Benzaria, A.; Meskini, N.; Dubois, M.; Némoy, G.; Lagarde, M. y Prigent, F. 2007. Phospholipase D as a potential target for the antiproliferative effects of

- polyunsaturated fatty acids in rat thymocytes. *Journal Nutr. Biochem.*, 18: 228-235.
48. Pandalai, K.; Pilat, M.; Yamazaki, K. y Pienta, K. 1996. The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Res.*, 16: 815-820.
49. Yoo, Y.; Shin, B.; Hong, J.; Lee, J.; Chee, H.; Song, K. y Lee, K. 2007. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetiabrevitarsis* larva. *Arch. Pharm. Res.*, 30: 361-365.
50. Ordoñez, A.; Gómez, J.; Cudmani, N.; Vattunone, M. e Isla, M. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechiumedule*(Jacq.) Swartz. *Microbial Ecology in Hearlth and Disease*, 15: 33-39.
51. Kharroubi, L.; Ladrie, L.; Cardozo, A.; Dogusan, Z.; Cnop, M. y Eizirik, A. 2004. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic b-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*, 145: 5087-5096.
52. Murillo, E. 2006. “actividad alelopática de las arvenses asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en el Tolima-Colombia” <http://w.w.w.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000200004&lng=en&nmr=iso&ignore=html. (25/08/2010).
53. Sachs, S.; Thisted, R.; Jones, T.; Barbarash, R. y Mikolich, D. 2001. Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: a multicenter, randomized, placebocontrolled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45: 222-230.
54. Katz, D.; Marcelletti, J.; Khalil, M.; Pope, L. y Kats, L. 1991. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *PNAS*, 88: 10825- 10829.
55. Habbema, L.; De Boule, K. y Katz, D. 1996. N-Docosanol 10% cream in the treatment of recurrent herpes labialis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *ActaDermVenereol*, 76: 479-481.
56. Eldin, A. y Moazzami, A. 2009. Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agricultura*, 1: 1-14.

57. Arnqvist, L. 2007. Plant sterol metabolism with emphasis on glycoalkaloid biosynthesis in potato. PhD. Department of Plant Biology and Forest Genetics, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Uppsala.

APÉNDICES

APÉNDICE A

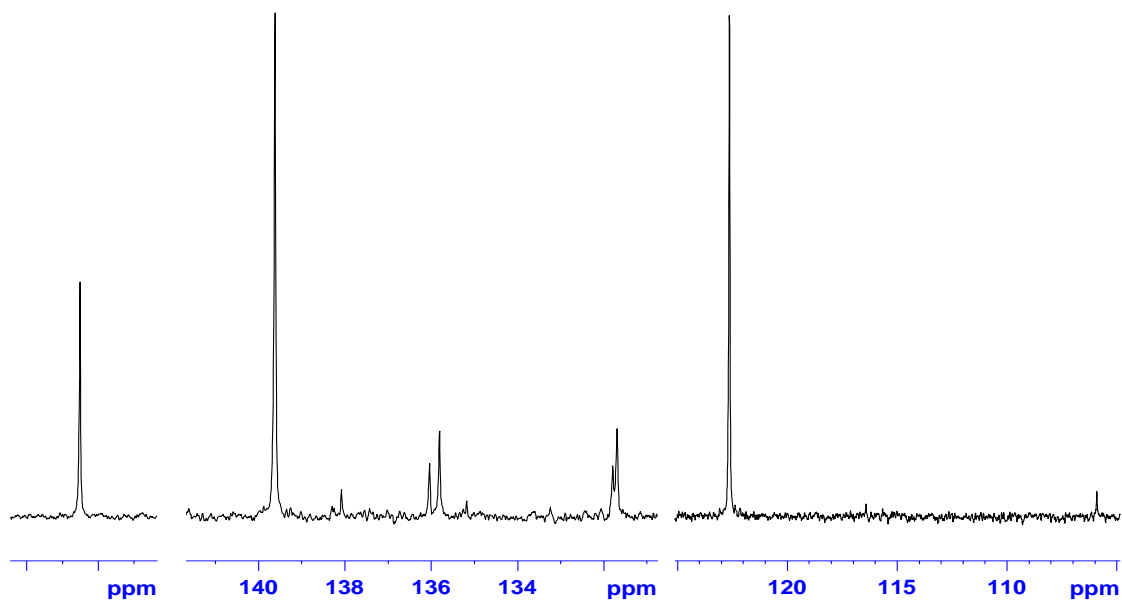


Figura A1. Ampliación I del espectro RMN ^{13}C del compuesto F1.

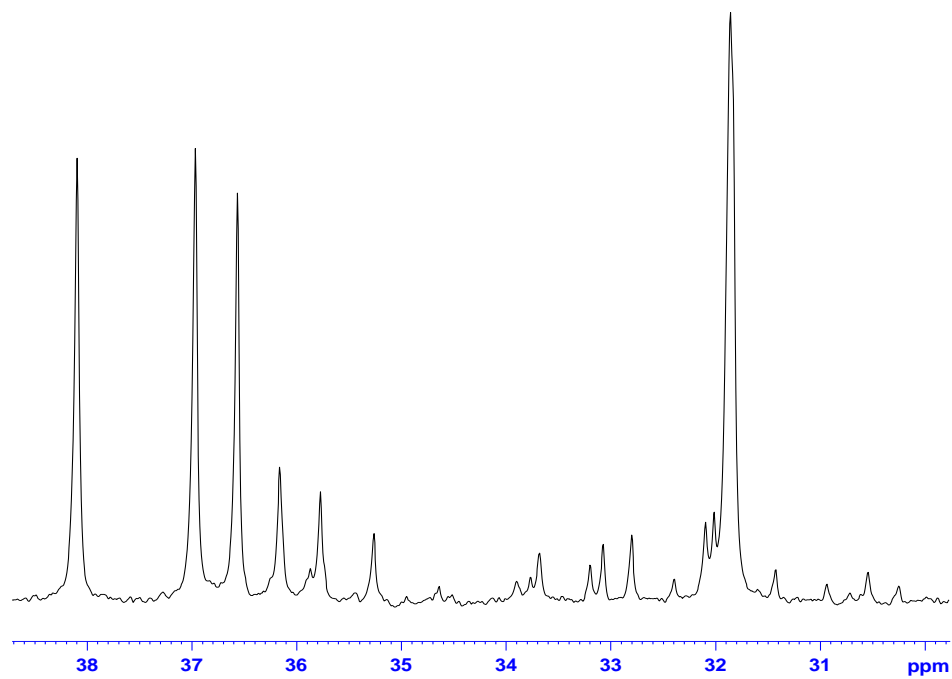


Figura A2. Ampliación II del espectro RMN ^{13}C del compuesto F1.

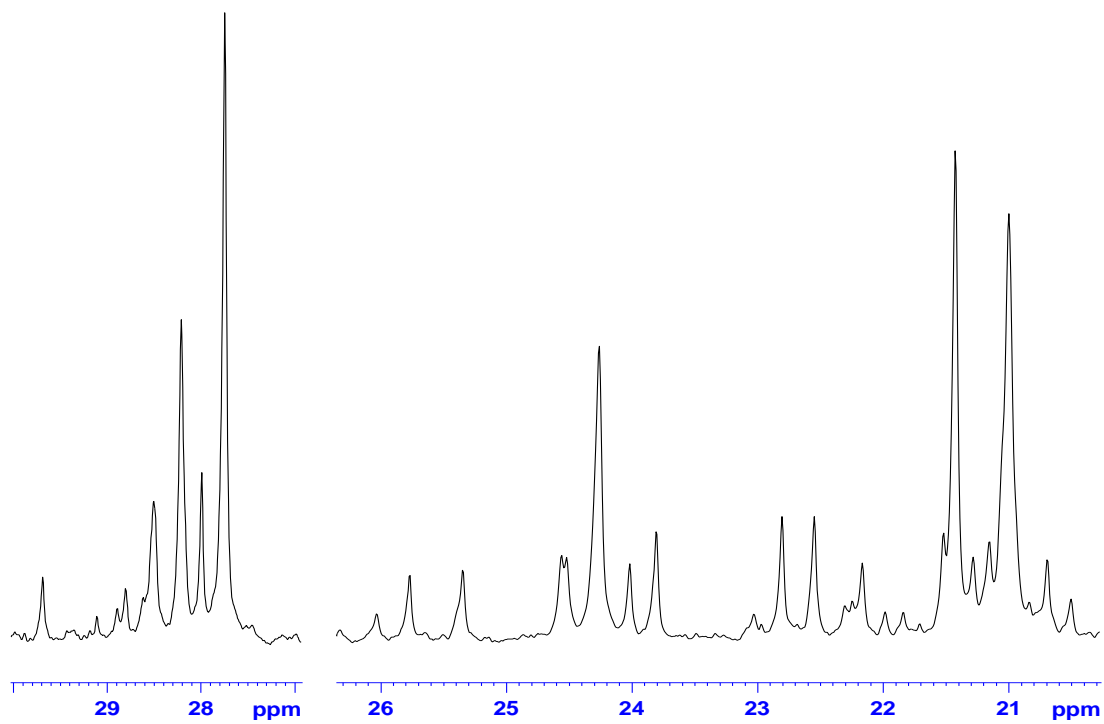


Figura A3. Ampliación III del espectro RMN ^{13}C del compuesto F1.

APÉNDICE B

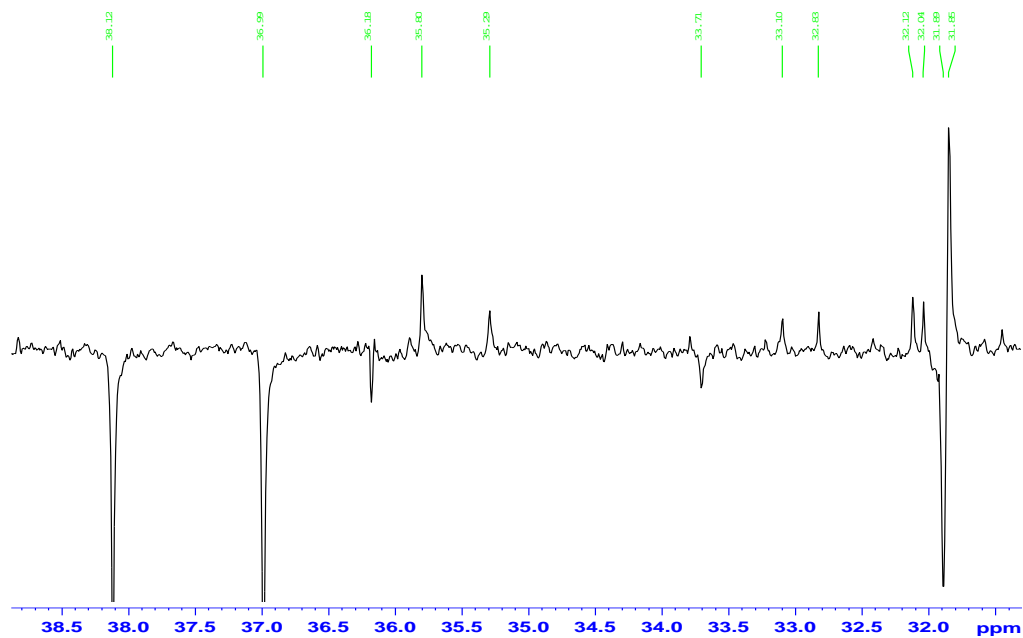


Figura B1. Ampliación II del espectro DEPT 135 del compuesto F1.

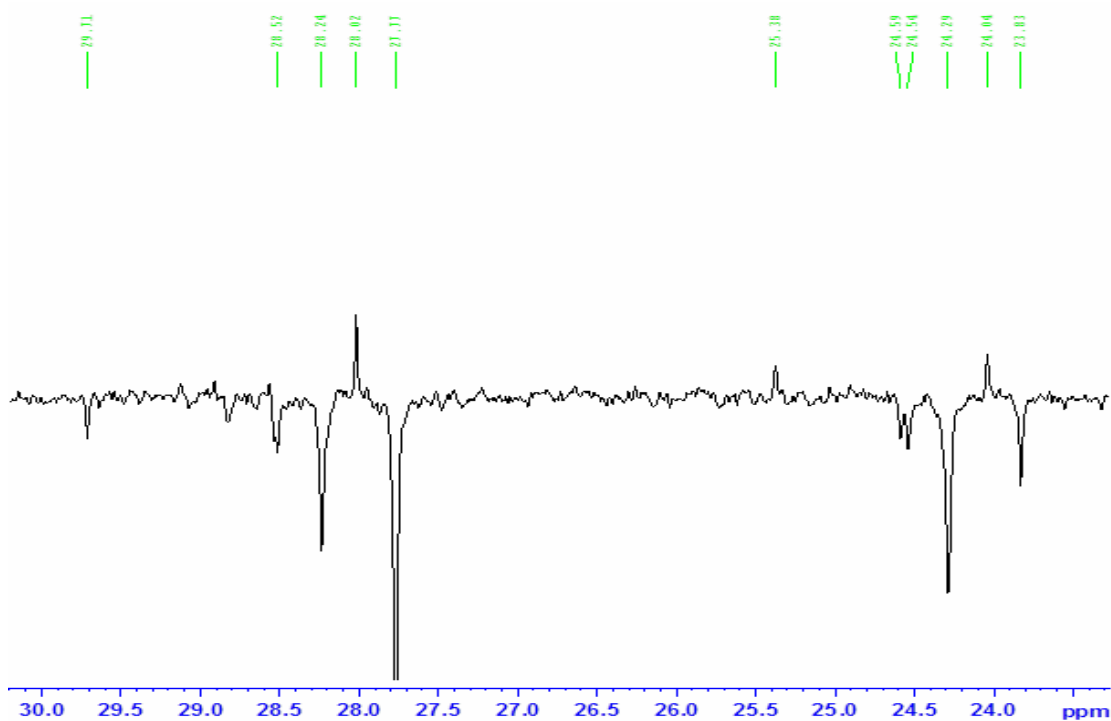


Figura B2. Ampliación III del espectro DEPT 135 del compuesto F1.

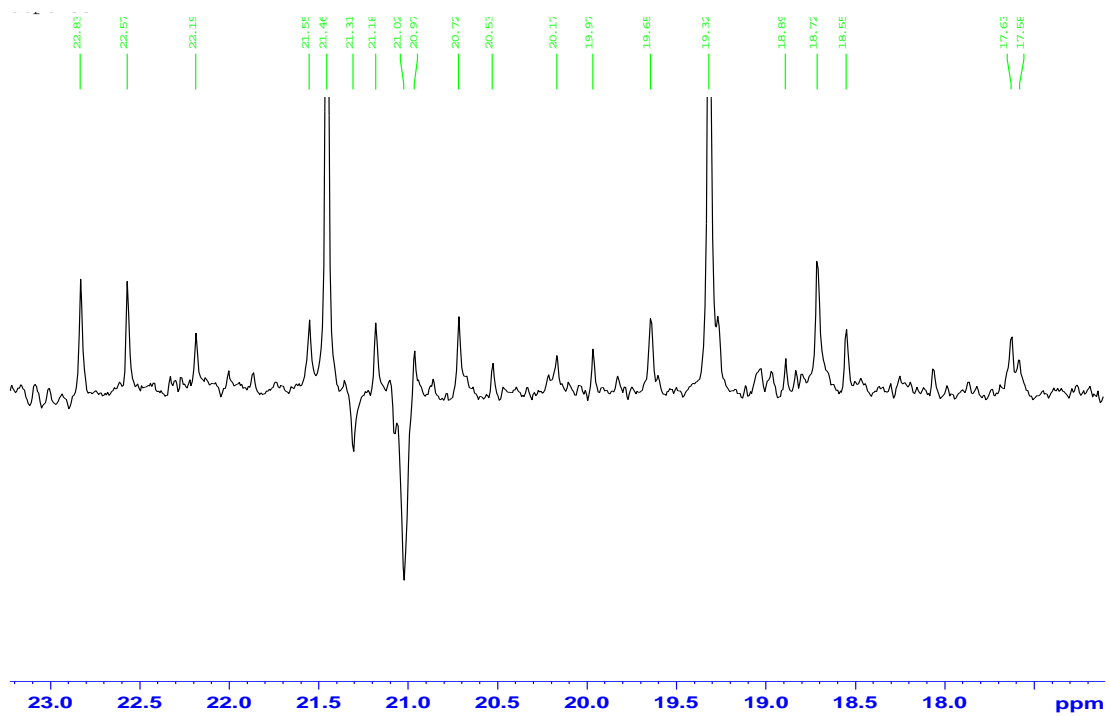


Figura B3. Ampliación IV del espectro DEPT 135 del compuesto F1.

APÉNDICE C

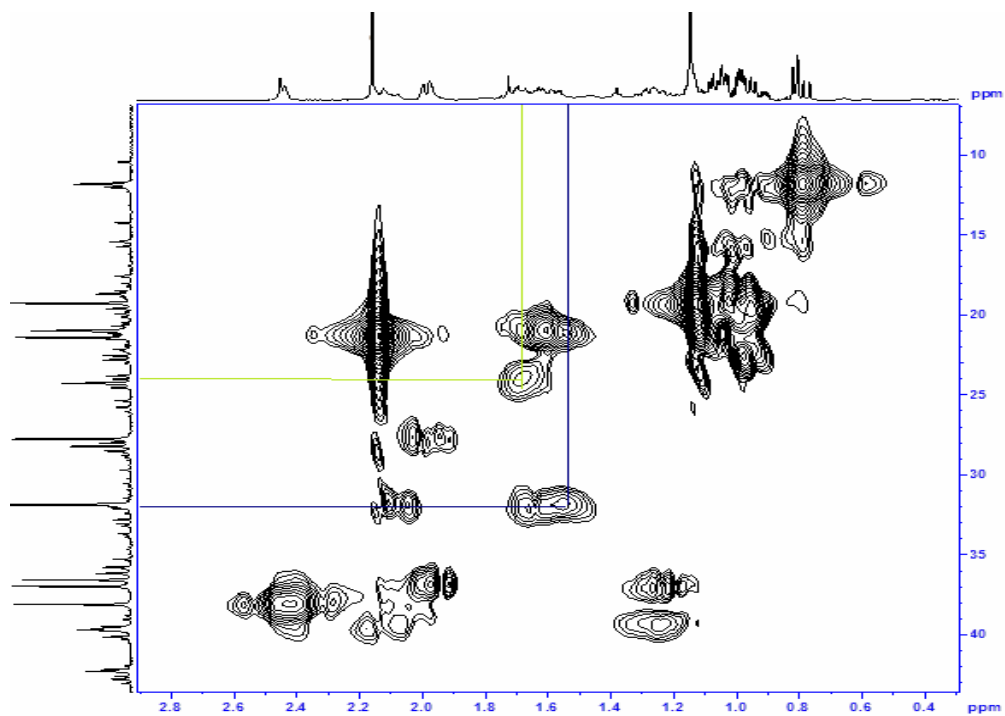


Figura C1. Ampliación III del espectro HMQC del compuesto F1.

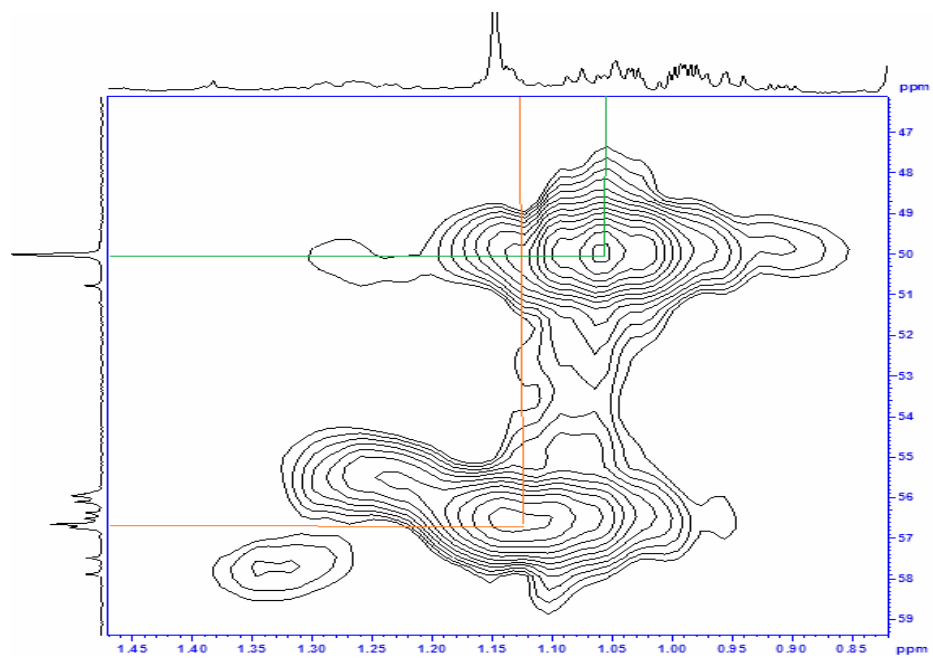


Figura C2. Ampliación IV del espectro HMQC del compuesto F1.

HOJA DE METADATOS

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

Título	ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y BIOACTIVIDAD DE LA PLANTA <i>Melochia tomentosa</i> (STERCULIACEAE)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Espinoza Navarro, Brimar Otilia	CVLAC	18.413.352
	e-mail	brimar_es@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

productos naturales
Sterculiaceae
<i>Melochia tomentosa</i>

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química de Productos Naturales

Resumen (abstract):

A los extractos metanólicos de las hojas y el tallo de la planta *Melochia tomentosa*, se les realizó un estudio fitoquímico para evaluar las propiedades antimicrobianas y letal con crustáceos de *Artemia salina* en ambos extractos, así como las fracciones provenientes de ellos. El análisis químico preliminar mostró la posible presencia de flavonoides y esteroides insaturados en ambos extractos, además en el extracto del tallo se detectó saponinas, polifenoles y taninos. El extracto de las hojas resultó inactivo frente a todas las bacterias y hongos ensayados, y exhibió un CL₅₀ de 182,51 µg/ml; dos fracciones provenientes de este extracto mostraron poseer actividad antimicótica contra *Mucor* sp. El extracto metanólico del tallo mostró una actividad antimicrobiana considerable, resultando activo frente a las bacterias *Escherichiacoli*; *Micrococcusluteus*; *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonasaeruginosa* y diferentes cepas de hongos, tales como *Curvularialunata*, *Mucor* sp y *Penicillum* sp; además, presentó una actividad letal de 21,24 µg/ml. Las subfracciones obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las hojas fueron caracterizada por CG/EM, lográndose identificar los ácidos hexadecanoico y octadecanoico y sus respectivos ésteres metílicos, mientras que en otra subfracción se logró identificar al 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-diene-2,8-diona; docosanol; acetato de 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trien-3-ol; 4,4,17-trimetilcolesta-8,14-dien-3-il y 4,4,17-trimetilcolest-8,14- dien-3-il dodecanoato. Por RMN de una dimensión se logró caracterizar al éster metílico del ácido icosanoico y 3,7-dimetil-9-fenil-7-en-3-nonanol. En el extracto metanólico del tallo se caracterizó por RMN al *N,N*(6-hidroxi-10-fenil-6-metildecano-1,7diil)diacetamida y se logró aislar un derivado acetilado de un esteroide el cual fue nombrado como el 3-acetilcolest-1,5-dieno, siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de este metabolito secundario en *M. tomentosa* y en la literatura en general.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Haydelba D'Armas	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4297804
	e-mail	htrinidad86@hotmail.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2010	12	15
------	----	----

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis – espinozab.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : Internacional (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio:

Química

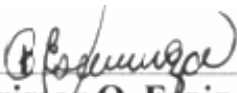
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

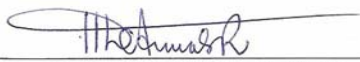
UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 5/5

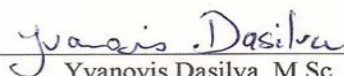
Derechos:

Yo, Brimar Otilia, Espinoza Navarro., portadora de la C.I. N° 18 413 352 autorizo a la biblioteca central de la UDO-Sucre la utilización de mi trabajo de grado, para ser


Brimar O, Espinoza N


Haydelba D' Armas, Ph.D.


Hernando Herrera, M.Sc.


Yvanovis Dasilva, M.Sc.

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS: