



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

EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOACTIVIDAD DE LA PLANTA *Melochia villosa*  
(Sterculiaceae) PROVENIENTE DEL AMAZONAS VENEZOLANO.  
(Modalidad: Tesis de Grado)

FÁTIMA DEL VALLE RODRÍGUEZ FIGUERA

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

CUMANÁ, 2012

EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOACTIVIDAD DE LA PLANTA *Melochia villosa*  
(Sterculiaceae) PROVENIENTE DEL AMAZONAS VENEZOLANO.

APROBADO POR:

---

Haydelba D'Armas, Ph.D  
Asesor académico

---

Dr. Willian Henriquez  
Jurado principal

---

MSc. Yvanovis Dasilva  
Jurado principal

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTO .....	iii
DEDICATORIA .....	v
LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN .....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	11
Recolección de la muestra .....	11
Obtención de los extractos.....	11
Pruebas químicas preliminares .....	11
Alcaloides .....	12
Saponinas.....	12
Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	12
Glicósidos cardiotónicos.....	12
Taninos y polifenoles.....	12
Metilcetonas (sesquiterpenlactonas) .....	13
Glicósidos cianogénicos .....	13
Antraquinonas.....	13
Cumarinas .....	13
Fenilpropanoides.....	13
Flavonoides.....	14
Pruebas biológicas .....	14
Actividad letal con <i>Artemia salina</i> .....	14
Actividad antibacteriana .....	15
Actividad antifúngica.....	16
Fracionamiento cromatográfico.....	17
Cromatografía en columna (CC).....	17
Cromatografía en capa fina (CCF).....	17

Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) .....	18
Agentes reveladores .....	18
Caracterización estructural .....	18
Espectroscopia infrarrojo .....	18
Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG EM) .....	19
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) .....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
Rendimiento porcentual de los extractos crudos de <i>M. villosa</i> .....	21
<i>Análisis fitoquímico preliminar</i> .....	22
Actividad biológica .....	26
Actividad antibacteriana .....	26
Actividad antifúngica .....	28
Actividad letal contra el crustáceo <i>Artemia salina</i> .....	29
Fraccionamiento cromatográfico .....	31
Fraccionamiento del extracto alcohólico de las hojas (EALH) de <i>M. villosa</i> .....	31
Fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico del tallo (EALT) de <i>M. villosa</i> .....	61
Fraccionamiento del extracto etéreo del tallo (EET) de <i>M. villosa</i> .....	80
CONCLUSIONES .....	91
BIBLIOGRAFÍA .....	94
APENDICE .....	98
HOJA DE METADATOS .....	100

## AGRADECIMIENTO

Gracias A:

Mi Dios, porque hoy veo los resultados de mi esfuerzo, y a pesar de los malos momentos y de todos los obstáculos que se pudieron presentar en el transcurso de mi carrera, siempre estuvo allí acompañándome en mi lucha y ayudándome a alcanzar mi meta.

Mi profe, la Dra. Haydelba D'Armas por ser más que una asesora, la amiga que con su cariño, paciencia y dedicación supo guiar mis pasos e impulsarme a culminar con éxito. Muchas gracias profe, por ser con sus tesis como la mamá con sus pollitos.

La Universidad de Oriente y a mis profesores, por haberme formado profesionalmente.

El profesor José Baudilio Rondón (QEPD), por haber hecho posible la obtención de los ejemplares de la planta utilizados en dicha investigación.

El Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), a la Universidad Simón Bolívar (USB) y al Instituto Universitario de Tecnología Cumaná (IUT), muy especialmente a la licenciada Noris Rodríguez por su disposición para la realización de los análisis espectroscópicos de IR necesarios para la culminación de esta investigación.

El licenciado José Salazar por su disposición y colaboración en la realización de las pruebas biológicas necesarias para la presente investigación.

Mis compañeros de laboratorio, Marylin, Alexis, Jean Paul, Brimar, Julineth, Yetzy, Aidín, Lino, Marifer, Miguel, Adriana, Nirosky, Victoria y muy particularmente a mi compañero el licenciado Raul Cedeño, por aportarme sus conocimientos y adiestrarme en mis primeros pasos en el trabajo experimental.

Mis amigos Gaby (la morocha), Cesar, Yolimer, Yessica, Julia, Madeleine, Polo, Natiana, Enrique, quienes me acompañaron durante mi formación académica en esta institución, y muy especialmente a Carmen y Laurenis quienes fueron mi compañía en el laboratorio durante la diaria labor de la ejecución de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A:

El padre creador por permitirme llegar hasta donde estoy.

Mi madre Milagro Figuera por luchar, educarme y hacerme una persona de bien.

Mis abuelos Marcos Figuera y Graciosa de Figuera por acompañarme durante una parte importante de mi vida.

Mi prima, Luisana por los consejos y el apoyo que siempre me ha brindado.

Mi asesora Haydelba D'Armas por su paciencia y dedicación.

Mis amigos, mi familia y todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido al alcance de esta meta.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo de actividad antibacteriana.....	16
Tabla 2. Cepas de hongos utilizadas para realizar el bioensayo de actividad antifúngica. .....	16
Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de los extractos etéreos y alcohólicos de las partes botánicas de la planta <i>M. villosa</i> .....	21
Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos etéreos y alcohólicos de cada una de las partes botánicas de la planta <i>M. villosa</i> .....	23
Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de <i>M. villosa</i> .....	26
Tabla 6. Actividad antifúngica de los extractos crudos de <i>M. villosa</i> .....	29
Tabla 7. Promedio de nauplios muertos a las 48 horas de haber sido expuestos a los distintos extractos. ....	30
Tabla 8. Letalidad de los extractos de <i>M. villosa</i> frente al crustáceo <i>Artemia salina</i> .....	30
Tabla 9. Sistema de solventes utilizado en el fraccionamiento cromatográfico del EALH de <i>M.villosa</i> .....	33
Tabla 10. Fracciones provenientes del fraccionamiento cromatográfico del EALH.....	33
Tabla 11. Sistema de solventes utilizado en el subfraccionamiento de la fracción B.....	35
Tabla 12. Fracciones provenientes del subfraccionamiento de la fracción B.....	36
Tabla 13. Composición química de la subfracción B1.....	38
Tabla 14. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción B2.....	47
Tabla 15. Desplazamientos químicos $\delta_C$ del espectro RMN <sup>13</sup> C de la subfracción B2...	49
Tabla 16. Sistema de solventes utilizados en el subfraccionamiento de la fracción C....	51
Tabla 17. Fracciones provenientes del subfraccionamiento de la fracción C.....	52
Tabla 18. Composición química de la subfracción C2.....	53
Tabla 19. Composición química de la subfracción D4.....	59
Tabla 20. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico del tallo (EALT).....	62



Tabla 21. Fracciones obtenidas de la CC del extracto alcohólico del tallo de <i>M. villosa</i> . .....	63
Tabla 22. Composición química de la fracción 3. ....	66
Tabla 23. Sistema de solventes empleado en el subfraccionamiento de la fracción 5. ...	69
Tabla 24. Subfracciones obtenidas de la CC de la fracción 5.....	70
Tabla 25. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción 5.1.....	71
Tabla 26. Composición química de la subfracción 5.1.1.....	71
Tabla 27. Desplazamientos químicos $\delta_H$ del espectro RMN de $^1H$ de la subfracción 5.1.2. .....	77
Tabla 28. Desplazamientos químicos $\delta_C$ del espectro RMN $^{13}C$ de la subfracción 5.1.2. .....	78
Tabla 29. Sistema de solventes utilizado en el fraccionamiento cromatográfico del extracto en éter dietílico del tallo de <i>M.villosa</i> . ....	81
Tabla 30. Fracciones obtenidas en la CC del EET. ....	81
Tabla 31. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción III. ....	83
Tabla 32. Composición química de la subfracción III.3.....	85
Tabla 33. Pruebas químicas realizadas a algunas fracciones del extracto etéreo del tallo EET. ....	88
Tabla 34. Composición química de la subfracción VIII.....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural de waltherion-A (1), en su forma fenólica ..... 2 y su correspondiente derivado <i>o</i> -metilato (2). ..... 2	2
Figura 2. Flavonoides aislados de <i>Waltheria indica</i> . ..... 3	3
Figura 3. Estructura de los metabolitos aislados de las raíces y partes aéreas de <i>H. angustifolia</i> . ..... 4	4
Figura 4. Estructura del campesterol. .... 5	5
Figura 5. Estructura del 3-acetilcolest-1,5-dieno. .... 7	7
Figura 6. Fórmula estructural del alcaloide ciclopeptídico chamaedrina. .... 8	8
Figura 7. Partes botánicas de <i>M. villosa</i> : (a) Rama con flor y fruto, (b) Alabastro, ..... 9 (c) Flor, (d) Pétalo, cara adaxial, (e) Gineceo. (f,g) Estambres, cara abaxial y adaxial. ... 9 (h) Fruto. (i) Detalle flor brevistila. .... 9	9
Figura 8. Fotografía de <i>M. villosa</i> . .... 10	10
Figura 9. Fraccionamiento cromatográfico del EALH de <i>M.villosa</i> mediante CC por gravedad ..... 32	32
Figura 10. Espectro IR de la subfracción B1 ..... 37	37
Figura 11. Cromatograma de la subfracción B1 obtenida mediante CG/EM. .... 38	38
Figura 12. Espectro de masas del picocon TR 14,20 y área 5,83 asignado a la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. .... 40	40
Figura 13. Patrón de fragmentación de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. .... 40	40
Figura 14. Espectro de masas del pico con TR 15,53 y área 32,16 asignado al ácido hexadecanoico. .... 41	41
Figura 15. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico. .... 41	41
Figura 16. Espectro de masas del pico con TR 17,32 y área 15,31 asignado al ácido octadecanoico. .... 42	42
Figura 17. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico. .... 42	42
Figura 18. Espectro de masas del pico con TR 19,00 y área 7,40 asignado al ácido eicosanoico. .... 43	43
Figura 19. Patrón de fragmentación del ácido eicosanoico. .... 43	43

Figura 20. Espectro de masas del pico con TR 20,60 y área 7,74 asignado al ácido docosanoico. ....	44
Figura 21. Patrón de fragmentación del ácido docosanoico. ....	44
Figura 22. Transposición de McLafferty. ....	45
Figura 23. Mecanismo de la transposición de McLafferty en una metilcetona. ....	45
Figura 24. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción B2. ....	47
Figura 25. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de la subfracción B2. ....	48
Figura 26. Ampliación del RMN de <sup>13</sup> C de la subfracción B2. ....	49
Figura 27. Estructura del ácido hexadecanoico. ....	49
Figura 28. Cromatograma de la subfracción C2 obtenid mediante CC. ....	54
Figura 29. Espectro de masas del pico con TR 15,41 y área 24,37 asignado al éster dibutílico del ácido 1,2- bencenodicarboxílico. ....	54
Figura 30. Patrón de fragmentación del éster dibutílico del ácido 1,2- bencenodicarboxílico. ....	55
Figura 31. Espectro de masas del pico con TR 18,91 y área 11,75 asignado la 4,8,12,16- tetrametil-4-olido. ....	56
Figura 32. Patrón de fragmentación de la 4,8,12,16-tetrametil-4-olido. ....	56
Figura 33. Espectro de masas del pico con TR 19,56 con área 87,33 asignado al éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. ....	57
Figura 34. Patrón de fragmentación del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2- bencenodicarboxílico. ....	57
Figura 35. Cromatograma de la separación de la subfracción D4 obtenido mediante CG/EM. ....	59
Figura 36. Estructura de la N-[2-hidroxietil] succinimida. ....	59
Figura 37. Cromatograma de la subfracción C4 obtenido mediante CG/EM. ....	60
Figura 38. Cromatograma de la separación de la subfracción A6 obtenido mediante CG/EM. ....	61
Figura 39. Fraccionamiento del EALT de la planta <i>M.villosa</i> . Se utilizó CC por gravedad. ....	62
Figura 40. Espectro IR de la fracción 3. ....	65

Figura 41. Cromatograma de la separación de los componentes de la fracción 3 obtenido mediante CG/EM. ....	65
Figura 42. Estructura de algunos compuestos identificados en la fracción 3 del EALT. ....	66
Figura 43. Espectro de masas del pico con TR 19,56 y area 87,33 asignado al éster diisocilico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (ver pico 3, fig.39). ....	67
Figura 44. Patrón de fragmentación del éster diisocilico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. ....	67
Figura 45. Espectro IR de la fracción 4. ....	69
Figura 46. Cromatograma del fraccionamiento de la subfracción 5.1.1 obtenido mediante CG/EM. ....	72
Figura 47. Espectro de masas del pico con TR 14,98 y área 3,63 asignado éster metílico del ácido hexadecanoico. ....	73
Figura 48. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico. ....	74
Figura 49. Espectro de masas del pico con TR 15,64 y área 4,47 asignado al éster etílico del ácido hexadecanoico. ....	74
Figura 50. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido hexadecanoico. ....	75
Figura 51. Mecanismo de transposición de McLafferty para un ester metílico. ....	75
Figura 52. RMN de <sup>1</sup> H de la subfracción 5.1.2. ....	76
Figura 53. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción 5.1.2. ....	77
Figura 54. RMN de <sup>13</sup> C incluyendo DEPT-135 de la subfracción 5.1.2. ....	78
Figura 55. Estructura del éster undecilico del ácido undecanoico. ....	79
Figura 56. Esquema del fraccionamiento cromatográfico del extracto etéreo del tallo de <i>M. villosa</i> . ....	80
Figura 57. Espectro de IR de la subfracción III.3. ....	84
Figura 58. Separación cromatográfica de los componentes de la subfracción III.3. ....	85
Figura 59. Espectro de masas del pico con TR 15,20 y área 13,87 asignado al éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. ....	86
Figura 60. Patrón de fragmentación del éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. ....	86
Figura 61. Estructura de algunos compuestos identificados en la subfracción III.3. ....	87

Figura 62. Cromatograma de la separación de la fracción VIII.....	89
Figura 63. Estructura de algunos esteroides. ....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

1.	EEH	Extracto en éter dietílico de las hojas
2.	EET	Extracto en éter dietílico del tallo
3.	EEF	Extracto en éter dietílico de las flores
4.	EALH	Extracto alcohólico de las hojas
5.	EALT	Extracto alcohólico del tallo
6.	EALF	Extracto alcohólico de las flores
7.	CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
8.	DMSO	Dimetilsulfóxido
9.	CC	Cromatografía en columna
10.	CCF	Cromatografía de capa fina
11.	CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
12.	IR	Espectroscopia infrarrojo
13.	CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
14.	TR	Tiempo de retención
15.	NI	No identificado
16.	DBP	Dibutil ftalato
17.	DEHP	Di (2-etilhexil) ftalato
18.	DIDP	Diisodecilo ftalato
19.	DINP	Diisononilo
20.	DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**Nota:** Los extractos alcohólicos fueron obtenidos con una mezcla etanol-metanol.

## RESUMEN

Los extractos crudos de *M. villosa* fueron sometidos a un análisis fitoquímico preliminar y se evaluó su actividad antifúngica, antibacteriana y letal contra el crustáceo *Artemia salina*. El análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos, flavonoides y fenilpropanoides. El extracto etéreo del tallo mostró actividad antibacteriana leve contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto etéreo de las flores fue activo contra la misma, además de mostrar actividad leve contra *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*. El extracto alcohólico de las hojas fue activo contra *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto alcohólico del tallo mostró una actividad antifúngica leve contra *Fusarium poae*. El extracto etéreo del tallo exhibió una excelente actividad letal con una CL<sub>50</sub> de 2,06 ppm, seguido del extracto etéreo de las flores y el extracto alcohólico del tallo con una CL<sub>50</sub> de 10,00 ppm; el extracto alcohólico de las hojas con una CL<sub>50</sub> de 74,68 ppm y finalmente el extracto alcohólico de las hojas con una CL<sub>50</sub> de 169,10 ppm. Para el fraccionamiento cromatográfico de los distintos extractos, se emplearon las técnicas cromatográficas convencionales, obteniéndose varias fracciones y subfracciones, de las cuales algunas fueron analizadas mediante espectroscopía IR, y CG/EM, identificándose principalmente: 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y cuatro ácidos grasos en una de ellas; en otra se identificaron el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres dibutilico y mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico; los compuestos 2-hidroxietil-succinimida y ácido hexadecanoico fueron identificados en otra subfracción; También se identificó el éster diisocílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en una de ellas; y en otra de las subfracciones fue identificado el éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico además de dos esteroides. Mediante el análisis de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, se lograron identificar el ácido hexadecanoico y el éster undecílico del ácido undecanoico.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los productos naturales o metabolitos secundarios fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, la investigación de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopia para elucidar sus estructuras, y metodologías de síntesis que hoy constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea (1).

En los últimos años, han sido muy explotados los productos químicos de origen natural provenientes del reino vegetal, animal y de microorganismos. Sin embargo, los productos naturales originados de las plantas pueden ser considerados como una fuente incalculable de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina (2). Desde la prehistoria, se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones, y aún las plantas sin tratamiento se han empleado para los mismos fines (3).

La familia Sterculiaceae es bastante conocida, porque a ella pertenecen los géneros *Guazuma* y *Theobroma*. En el primero se incluye al *Guazuma ulmifolia* “guácimo”, como una planta de alto valor forrajero, puesto que sus frutos y partes vegetativas tienen un mucílago que es apetecible al ganado; en el segundo, al *Theobroma cacao* L. “cacao” especie explotada comercialmente (4).

Se ha reportado que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Sterculiaceae son usadas en la medicina tradicional. La familia comprende aproximadamente 68 géneros y 1000 especies (5). Entre dichos géneros se encuentran: *Waltheria*, *Melochia*, *Sterculia*, *Helicteres* y *Theobroma* entre otros (4). Las plantas de esta familia son reconocidas por ser ricas en alcaloides, particularmente, los alcaloides ciclopéptidos, quinolinona e isatin y han sido usadas en la medicina tradicional para aliviar la inflamación de la garganta, como agentes antitumorales, y para curar la



hinchazón abdominal, disentería y mordedura de culebra (6).

*Waltheria douradinha* es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades como la bronquitis, laringitis y para limpiar y sanar heridas. El estudio de la constitución química de *Waltheria douradinha* se basó en el aislamiento y elucidación estructural de alcaloides ciclopeptídicos (7); sin embargo, en un estudio más reciente del extracto metanólico de la corteza de la raíz de *W. douradinha*, se encontró un nuevo alcaloide quinolinolico llamado waltherion-A (figura 1), cuya estructura fue determinada mediante espectroscopia de RMN. La actividad antibacteriana de waltherion-A y de su derivado correspondiente *o*-metilato, fue probada utilizando bacterias Gram- y Gram+, siendo el derivado *o*-metilato el que presentó una actividad moderada contra ambas clases de bacterias (8).

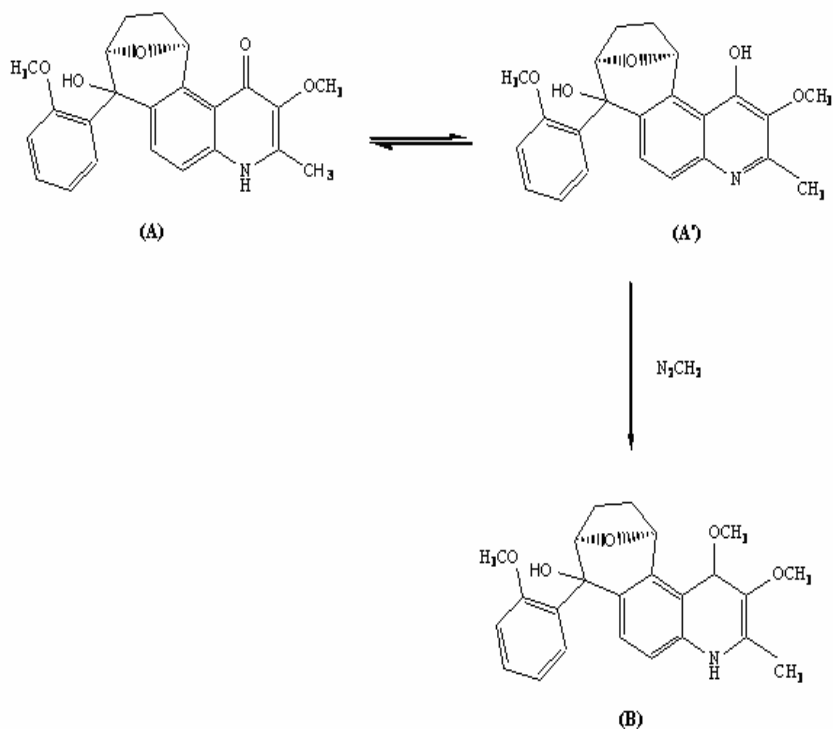
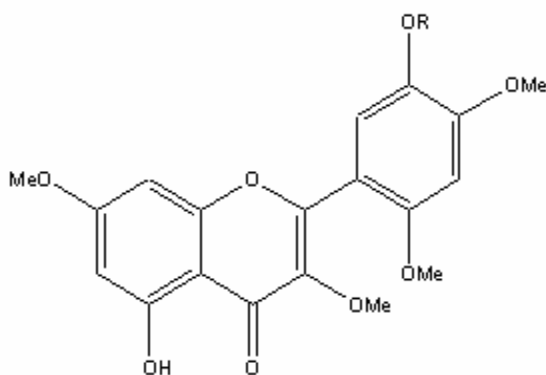


Figura 1. Fórmula estructural de waltherion-A (1), en su forma fenólica y su correspondiente derivado *o*-metilato (2).

Otra de las especies de este género que ha sido estudiada es la *Waltheria indica*, la cual se utiliza como febrífugo, emoliente, antirrábica, antisifilítica y purgante. El estudio fitoquímico de la especie reveló la presencia de alcaloides ciclopeptídicos, flavonoides, flavonoides glicosilados y ácido cafeico, además de encontrarse una marcada actividad antifúngica en contra del hongo *Trichophyton mentagrophytes*, atribuida a la presencia de flavonoides. En el aislamiento y caracterización de los metabolitos de dicha planta, se lograron identificar dos flavonoides (figura 2) conocidos como: 2,3',5-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (C) y 5,2'-dihidroxi-3,7,4',5'-tetrametoxiflavona (D) (8-10).



(C) R = H  
(D) R = CH<sub>3</sub>

Figura 2. Flavonoides aislados de *Waltheria indica*.

El género *Helicteres* ha sido, tal vez, el más estudiado de la familia Sterculiaceae. *Helicteres isora* ha tenido un uso amplio en medicina tradicional: en China, las raíces se utilizan en el tratamiento de la nefritis crónica y úlceras gástricas. Las frutas son emolientes, suavemente astringentes, útiles en quemaduras y flatulencia. El extracto etanólico de las raíces de *H. isora* presentó actividad antidiabética e hipolipidémica *in vivo* en animales modelos (ratones suizos albinos y hámsters con sobrepeso) (11), y una actividad antitumoral *in vitro* del carcinoma nasofaríngeo humano, lográndose aislar dos compuestos citotóxicos potentes, identificados como cucurbitacin B e isocucurbitacin B

(12). Por otra parte, el análisis químico realizado al extracto etanólico de las hojas frescas de *H. isora* condujo al aislamiento de una nueva flavona 7,4'-dimetiliscutellarein (5,8-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) junto con kaempferol-3-*O*-galactósido (trifolin) y herbacetin-8-*O*-glucurónido (hibifolin) (13).

En otra investigación, llevada a cabo con *Helicteres angustifolia*, fueron aislados de las raíces y partes aéreas de la misma, cuatro productos naturales que poseían los esqueletos del pregnano (figura 3): (2 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,20 $\alpha$ -trihidroxi-3 $\beta$ ,21-dimetoxi-5-pregnano) (F), cumarina (6,7,9 $\alpha$ -trihidroxi-3,8,11 $\alpha$ -trimetilciclohexo-[d,e]-cumarina) (G), y diterpenicos tipo pregnano [(ácido 3 $\beta$ -hidroxi-27-benzoiloxilup-20(29)-en-28-oico) (H) y (éster metílico del ácido 3 $\beta$ -hidroxi-27-benzoiloxilup-20(29)-en-28-oico) (I)], junto con otros 24 compuestos conocidos (14).

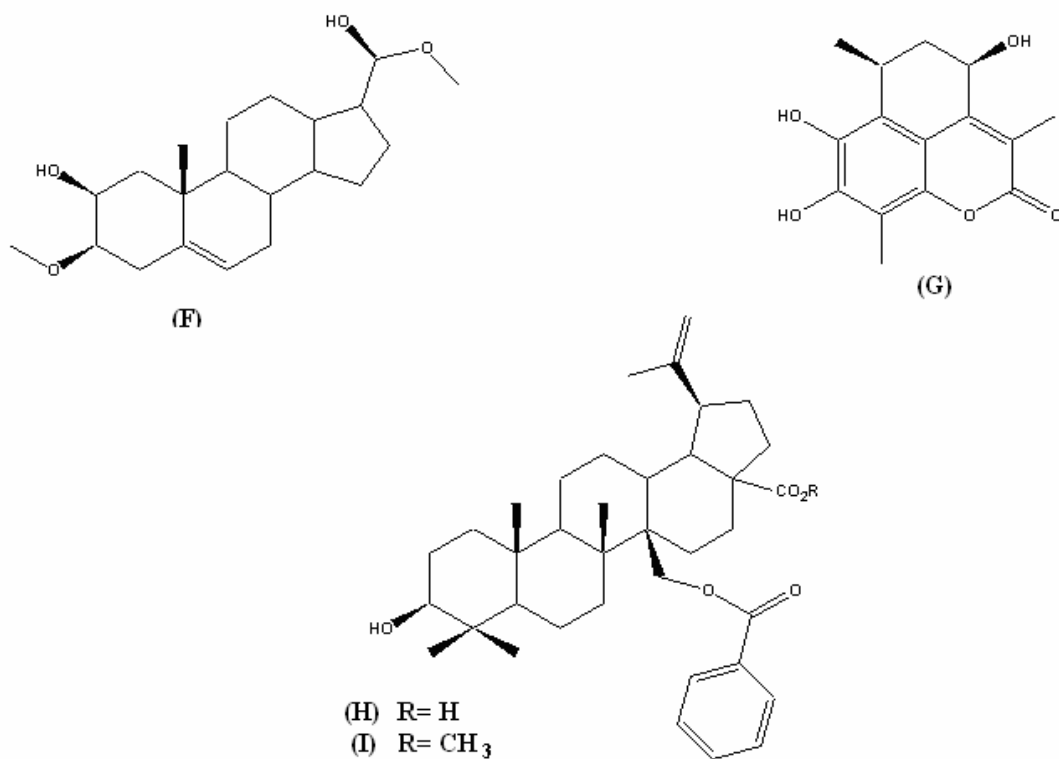


Figura 3. Estructura de los metabolitos aislados de las raíces y partes aéreas de *H. angustifolia*.

De igual manera, fue investigada la especie *Helicteres baruensis* Jacq, y entre los posibles metabolitos secundarios, se detectaron esteroides en los extractos de las hojas, tallos y frutos; y polifenoles en todos los extractos. Del fraccionamiento realizado a la fracción no polar, se identificaron por CG/EM: dotriacontano, éster metílico del ácido linoleico, 6,10,14-trimetil-2-etoxi-purina, benzoato de dibutilo, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, dihidroactinidiolido, ácido hexadecanoico, isopropilpalmitato, ácido dodecanoico, ácido mirístico y la 2-metilacetofenona. En la fracción clorofórmica se identificó un esteroide a través de IR y RMN, cuya posible estructura es la del campesterol (figura 4). El extracto metanólico del fruto se fraccionó por cromatografía de columna (CC) y por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM) se identificaron diversos constituyentes, como: 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, octadecanoato de metilo, docosanoato de metilo, ácido hexadecanoico, octadecanoato de etilo y ácido octadecanoico (15).

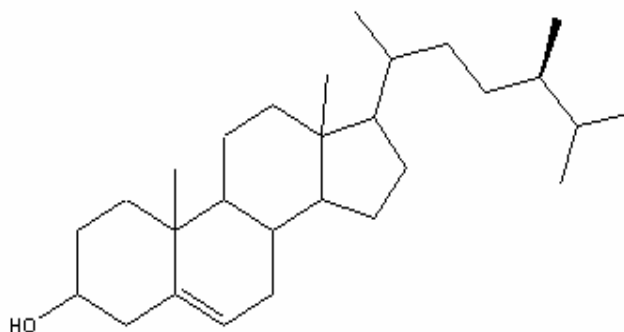


Figura 4. Estructura del campesterol.

Igualmente, en un estudio reciente realizado a la planta *Helicteres guazumifolia* Kunth, se encontró que el estudio fitoquímico preliminar de los extractos crudos etéreos y metanólicos de la misma arrojó la posible presencia de alcaloides, metilencetonas, saponinas, esteroides y triterpenos pentacíclicos; además de presentar actividad letal, actividad antibacteriana contra las bacterias *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis* y actividad antifúngica contra las cepas de hongos *Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata* y *Mucor* sp. En el fraccionamiento

cromatográfico realizado a los extractos etéreos y metanólicos de las hojas de esta especie, se realizó un análisis de CG-EM lográndose identificar los siguientes compuestos: di(2-hexil) ftalato, etil cetilato, dibutil ftalato, metil palmitato, (24R)-4-estigmasten-3-ona, 4-sitosterol-3-ona, 4,8,12,16-tetrametilheptadecano-4-olido, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y la benzofenona. De la misma manera, por técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones se identificó el 1-octanol, el éster metílico del ácido palmítico, el cérido nonato de octilo y un posible esteroles insaturado y/o triterpeno pentacíclico (16).

Otro de los géneros pertenecientes a esta familia, es *Melochia*, el cual comprende alrededor de 65 especies, las cuales están extendidas en todo el trópico. Entre éstas, *Melochia corchorifolia* y *Melochia tomentosa*, han sido las más investigadas. Algunos flavonoides y alcaloides ciclopeptídicos, como frangufolin, franganin y adouetin-y' fueron reportados para *M. corchorifolia* (17). En otra investigación realizada a la misma planta, se logró aislar un nuevo alcaloide ciclopeptídico llamado melofonine. Este último se caracterizó, principalmente por su espectro de masas (EM) y productos de hidrólisis (18).

Por su parte, en investigaciones realizadas en la especie *M. tomentosa*, fueron reportados melochinona y un alcaloide quinolinolico, y el extracto de la raíz de esta planta resultó ser cancerígeno. Para aislar los principios activos del extracto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de las raíces, se utilizaron la cromatografía en silica gel lográndose obtener varios compuestos cristalinos, entre ellos una cumarina. Este constituye el primer reporte de una cumarina en la familia Sterculiaceae (19). En análisis posteriores, fueron aislados 3 alcaloides ciclopeptídicos de la raíz de esta planta, uno de los alcaloides fue identificado como scutianine B; los otros dos, melonovines A y B, cuyas estructuras se determinaron por espectrometría de masas (EM) (20). Además, de la misma especie fueron aislados y caracterizados alcaloides tipo isatin: melosatin A, B y C, los cuales son de color amarillo y reaccionan típicamente con ácido sulfúrico cambiando a verde azulado (21).

En otro estudio reciente realizado a las hojas de *M. tomentosa*, proveniente de la localidad de Tocuchare, estado Sucre, Venezuela, se detectó la posible presencia de flavonoides y esteroides insaturados en los extractos metanólicos de las hojas y el tallo, así como también se detectaron saponinas, polifenoles y taninos en el extracto del tallo. El extracto de las hojas presentó actividad letal moderada y resultó inactivo frente a hongos y bacterias, mientras que el extracto del tallo presentó actividad contra varias cepas de bacterias y hongos, y una buena actividad letal. Del tallo se caracterizó por RMN a *N,N'*(6-hidroxi-10-fenil-6-metildecano-1,7diil)diacetamina y a un derivado acetilado de un esteroide, el cual fue nombrado como 3-acetilcolest-1,5-dieno (figura 5), siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de este metabolito en *M. tomentosa*.

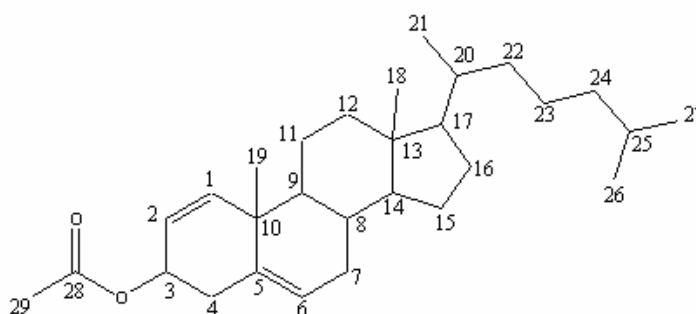


Figura 5. Estructura del 3-acetilcolest-1,5-dieno.

Las subfracciones obtenidas por fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las hojas de dicha planta fueron caracterizadas por CG/EM, lográndose identificar los ácidos haxadecanoico y octadecanoico y sus respectivos ésteres metílicos. En otra de las subfracciones, se logró identificar el 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-trimetilcona-8,14-dien-3-il dodecanoato. Por RMN caracterizaron el éster metílico del ácido eicosanoico y 3,7-dimetil-9-fenil-7-en-3-nonanol (22).

Otra de las especies que ha sido estudiada fitoquímicamente, es la *Melochia chamaedrys*, la cual es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de varias

enfermedades como el cáncer y como agente anti-hipertensivo, sin embargo, no se conocía ningún reporte acerca de su constitución química. Según el estudio realizado, se reportó el aislamiento y la elucidación estructural de la chamaedrina (figura 6), un alcaloide ciclopeptídico de la raíz de esta especie, el cual fue obtenido en forma de un polvo blanco. La fórmula molecular de dicho compuesto fue determinada como  $C_{36}H_{41}N_5O_4$ , mediante el uso de la espectrometría de masas en conjunto con el análisis de los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (6).

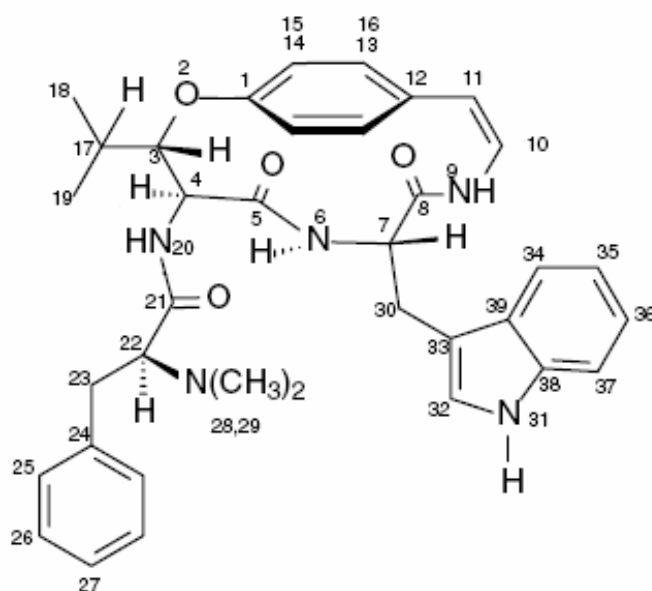


Figura 6. Fórmula estructural del alcaloide ciclopeptídico chamaedrina.

*Melochia villosa* es una hierba de 0,5-1 m de altura, posee un tallo viloso, tomentoso, ferrugíneo. Hojas membranosas; estípulas 2-4 mm de largo, lanceoladas, pubescentes; lámina 1,7-5,6 cm de largo x 0,7-3,8 cm de ancho, ovalado-oblonga, tomentosa en ambas caras con tricomas simples, estrellados y glandulares, y flores de 12-14 mm de largo (figura 7). Se encuentra en habitat de suelos secos arenoso-arcillosos, generalmente, húmedos hasta pantanosos, y sus individuos crecen, generalmente, en forma aislada, a veces en pequeños grupos. Esta planta se conoce comúnmente como

“malva” o “hierba de San Juan”, y la decocción de su raíz se usa como desinfectante, para lavar la boca y recuperar el apetito luego de fiebres y resfriados (23).

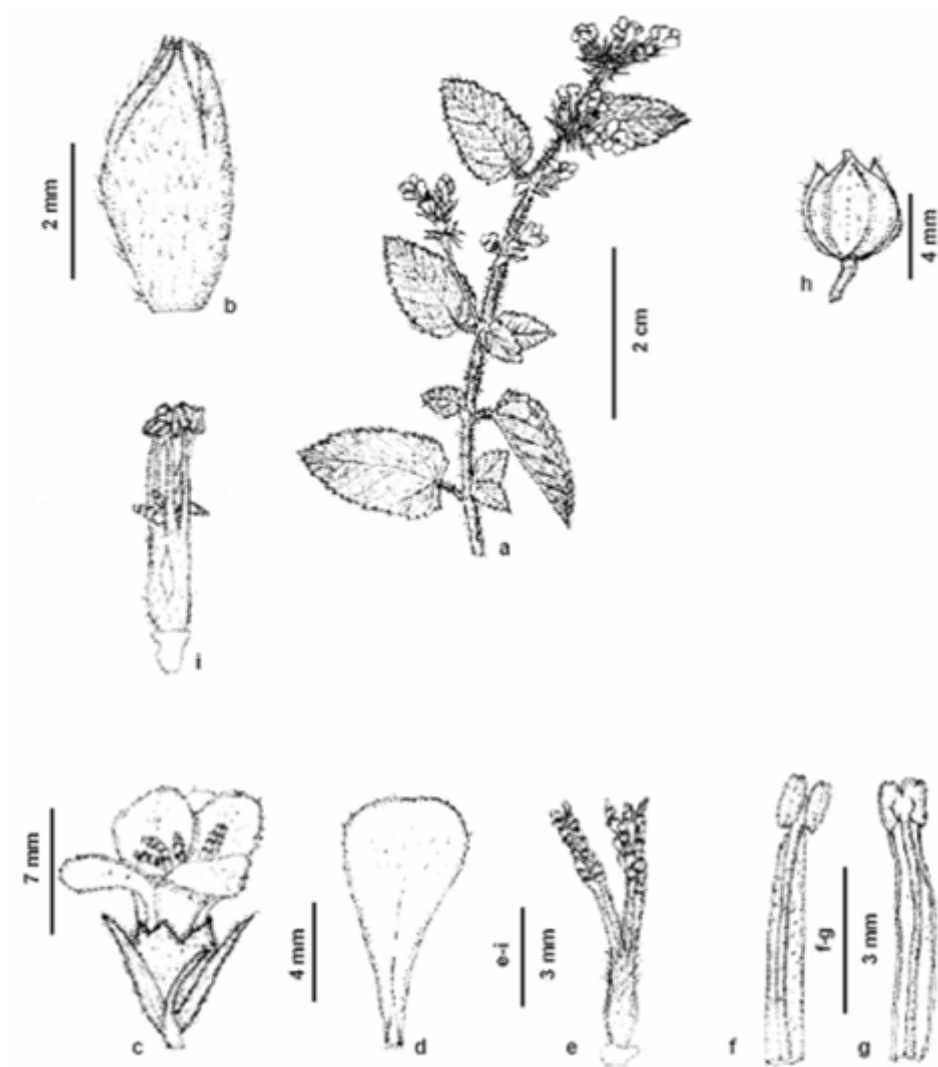


Figura 7. Partes botánicas de *M. villosa*: (a) Rama con flor y fruto, (b) Alabastro, (c) Flor, (d) Pétalo, cara adaxial, (e) Gineceo. (f,g) Estambres, cara abaxial y adaxial. (h) Fruto. (i) Detalle flor brevistila.

La planta *M. villosa* (figura 8) no ha sido estudiada químicamente, por tal motivo, se decidió realizar el estudio fitoquímico de la misma, para identificar algunos metabolitos



secundarios presentes y evaluar su posible actividad biológica, aportándose así una información valiosa al campo de los productos naturales.



Figura 8. Fotografía de *M. villosa*.

## METODOLOGÍA

### **Recolección de la muestra**

Los ejemplares de la planta *Melochia villosa* se recolectaron en los alrededores de Puerto Ayacucho estado Amazonas, a lo largo de la carretera, a una latitud de 5° 40' 0,01'' N, longitud 67° 30' 28,71'' O. Luego, dichos ejemplares fueron trasladados en bolsas desde el sitio de muestreo hasta la ciudad de Cumaná y se llevaron al herbario IRBR del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, estado Sucre, donde fueron identificados.

### **Obtención de los extractos**

Para la obtención del extracto crudo, se dejó secar la planta a temperatura ambiente en el Laboratorio de Lípidos y Productos Naturales (EC-310) de la Universidad de Oriente, luego se separaron cada una de las partes de la planta (hojas, tallo, flores y frutos), las cuales fueron molidas por separado en un molino eléctrico y posteriormente extraídas en éter dietílico para obtener los compuestos menos polares. De igual manera se realizaron extracciones sucesivas con una mezcla de etanol y metanol para extraer los componentes más polares. Luego de decantado y filtrado el solvente de extracción, la solución de metabolitos fue evaporada bajo presión reducida en un rotoevaporador, obteniéndose así el concentrado de los extractos crudos éterereos y alcohólicos, los cuales fueron colocados bajo campana en frascos de compota para lograr la total evaporación de los solventes, obteniéndose de esta manera los extractos crudos. Seguidamente, se procedió a la realización de los análisis fitoquímicos preliminares, así como también las pruebas de actividad biológica, antes de realizar el fraccionamiento cromatográfico.

### **Pruebas químicas preliminares**

La presencia de las diferentes familias de metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, saponinas, triterpenos, polifenoles, etc) que se encontraron en los extractos obtenidos, se determinó utilizando las metodologías de análisis fitoquímico reportadas (3 y 24).

### **Alcaloides**

El extracto crudo, casi seco, se retomó con una solución de HCl al 10% y se agitó con cloroformo para posteriormente separar las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica se reservó, mientras que la fase acuosa fue alcalinizada con una solución de NaOH al 10% y luego fue extraída con cloroformo. Las tres fases se analizaron para alcaloides por separado, utilizando el reactivo de Dragendorff.

### **Saponinas**

Se tomó una pequeña porción del extracto crudo y se colocó en un tubo de ensayo con 2 ml de agua destilada; luego, se agitó vigorosamente la muestra durante 30 segundos. Se asume la presencia de saponinas, si se observa la formación de una espuma persistente durante 30 minutos, en una zona de 3 cm por encima de la superficie del líquido.

### **Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos**

Una pequeña porción del extracto crudo se disolvió en cloroformo, luego, se hidrolizó con HCl al 10 %. Tanto la fase orgánica como la acuosa proveniente de la hidrólisis, se analizaron agregándole el reactivo de Libermann-Burchard (unas gotas de ácido sulfúrico concentrado con unas gotas de anhídrido acético); una coloración azul o verdosa indicó la presencia de esteroles. Si se produce una coloración roja, rosada o violeta, la prueba se considera positiva para triterpenos.

### **Glicósidos cardiotónicos**

Para determinar glicósidos cardiotónicos, el extracto crudo se disolvió en cloroformo, y luego se hizo reaccionar con una mezcla (1:1) recién preparada de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,7 mol/l). La prueba se considera positiva si se observa una coloración azul o violeta.

### **Taninos y polifenoles**

El extracto crudo fué retomado en agua destilada y filtrado, para luego hacerlo reaccionar con una solución de cloruro de hierro (III) al 1 %; el cambio hacia una

coloración parda indica la presencia de fenoles. La presencia de taninos se evidencia observando la formación de un precipitado blanco, al tratar el crudo previamente disuelto con una solución al 1 % de gelatina en NaCl al 1 %.

### **Metilencetonas (sesquiterpenlactonas)**

El extracto crudo se disolvió en agua, se filtró y luego se trató con el reactivo de Baljet (mezcla 1:1 de 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol y 10 g de NaOH en 100 ml de agua). La aparición de una coloración roja indica la presencia de metilencetonas.

### **Glicósidos cianogénicos**

Se disolvió una pequeña porción del extracto en cloroformo y se calentó (entre 50-60 °C) en un tubo de ensayo cerrado, luego se colocaron los vapores en contacto con un papel de filtro previamente impregnado de una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. La prueba resulta positiva al observarse la aparición de una mancha roja sobre el papel. El tiempo de reacción varía y puede tomar hasta 2 horas.

### **Antraquinonas**

Los extractos crudos se extrajeron con KOH (0,5 mol/l); posteriormente, se acidificaron con ácido acético y después se agitaron con benceno. Si la capa orgánica presenta una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.

### **Cumarinas**

Una pequeña porción del extracto se disolvió en etanol, luego se tapó con papel de filtro impregnado en una solución diluida de NaOH y se llevó a baño de María a 100 °C por algunos minutos. Seguidamente, se dejó secar el papel de filtro y el mismo se examinó bajo luz UV, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas.

### **Fenilpropanoides**

Se manejaron tres tubos de ensayos de la siguiente manera: en el primero se colocó 1 ml del extracto etanólico a ensayar (testigo), en el segundo tubo se colocó 1 ml de extracto

etanólico y a éste se le adicionaron 2 ml de HCl 0,5 mol/l, 2 ml de solución acuosa de nitrito de sodio al 10% (reactivo de Arnow) y finalmente, se adicionaron 2 ml de solución acuosa de NaOH 2 mol/l. En el tercer tubo, se agregó toda la mezcla de reactivos sin la muestra (testigo). La prueba resulta positiva con la aparición de una coloración naranja ante la presencia del reactivo de Arnow.

### **Flavonoides**

Para la detección de flavonoides se emplearon los siguientes métodos:

Se disolvió una porción del extracto en cloroformo, se le agregó una viruta de magnesio, se le añadieron unas gotas de HCl hasta reacción total y se observaron los cambios. La aparición de una coloración rosada, roja, violeta o anaranjada indica la presencia de un núcleo de la  $\gamma$ -benzopirona, tales como: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, xantonas. Las isoflavonas, charconas y auronas no dan coloración.

Una gota del extracto, se colocó sobre un papel de filtro y se expuso a los vapores de hidróxido de amonio. La aparición de una mancha fluorescente amarilla bajo luz UV, indicó la presencia de flavonoides.

### **Pruebas biológicas**

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

#### **Actividad letal con *Artemia salina***

Se utilizó el bioensayo con este crustáceo para evaluar el nivel de toxicidad de los extractos crudos de la planta y de algunas de sus fracciones. Para ello, se colocaron los quistes del crustáceo con agua de mar bifiltrada en un envase plástico provisto de una apertura que facilitó la aireación continua durante 24 horas, para obtener así los nauplios de *Artemia*. Conjuntamente, se preparó 1 ml de una solución madre de 10 000  $\mu\text{g/ml}$  del extracto o fracción, preparada disolviendo la fracción o extracto en la mínima cantidad posible de dimetilsulfóxido (DMSO) y completando hasta 1 ml con agua de

mar bifiltra. A partir de la solución madre, se prepararon soluciones diluidas de 1 000; 100; 10; 1; 0,1 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$  mediante diluciones sucesivas. Posteriormente, a cada disolución se le agregaron 10 nauplios de *A. salina* eclosionados con anterioridad, y por cada concentración se realizaron 3 réplicas del bioensayo. De igual manera, se realizó un blanco con la misma mezcla de DMSO y agua de mar utilizada en la preparación de las soluciones madre. Se determinó la mortalidad de los nauplios transcurridas las 48 horas de la realización del bioensayo, y se anotó el número de organismos muertos en cada una de las concentraciones (25). Seguidamente, se determinó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) mediante un programa estadístico de computación (Probit, Logit o Binomial) (26).

### **Actividad antibacteriana**

Este bioensayo se realizó por medio de la técnica de difusión en agar o método de antibiograma, el cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro con 10 ó 25  $\mu\text{l}$  de una solución (preparada con 40 mg del extracto o fracción a probar en 1 ml de un solvente adecuado). Dichos discos fueron colocados en una placa servida con agar Müller-Hilton, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $1 \times 10^8$  bacterias/ml). Posteriormente, las placas fueron preincubadas a  $5^\circ\text{C}$  por 12 horas, para luego ser incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas, permitiendo así el crecimiento bacteriano. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro (mm) del halo de inhibición alrededor del disco (27).

La presencia de actividad antibacteriana se detectó utilizando bacterias certificadas, pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) existentes en el Laboratorio de Productos Naturales (412) del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre (tabla 1). Estos microorganismos se clasifican como Gram positivos o Gram negativos de acuerdo a la coloración que presenten ante la tinción de un colorante formado por violeta de genciana y una solución yodada. Las cepas Gram positivas se visualizan de color violeta, mientras que las Gram negativas

muestran una coloración roja o rosa ante la presencia del reactivo.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo de actividad antibacteriana.

<b>Bacteria</b>	<b>Origen</b>	<b>Coloración Gram</b>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	DAI – 269JI	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA - 07	+
<i>Micrococcus luteus</i>	Bioanálisis 33810	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBE (DOC-19)	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO (14)	+

#### **Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica se evaluó utilizando cepas de hongos patógenos y fitopatógenos proporcionados por los Laboratorios de Fitopatología y Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre (tabla 2).

Tabla 2. Cepas de hongos utilizadas para realizar el bioensayo de actividad antifúngica.

<b>Hongo</b>	<b>Clasificación</b>
<i>Mucor racemus</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium maniliforme</i>	fitopatógeno
<i>Trichoderma viridis</i>	fitopatógeno
<i>Fusarium poae</i>	patógeno

El método consistió en incubar cepas de hongos en tubos de ensayo por una semana a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se agregó aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo para remover las esporas, y luego, se filtró sobre gasa estéril para obtener la solución esporangial de cada cepa incubada. La solución obtenida se

sembró sobre cápsulas de Petri, previamente preparadas con agar papa dextrosa (PDA), usando hisopos estériles. Seguidamente, se impregnaron los discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro con aproximadamente 10 ó 25 µl de la muestra y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente, para permitir el crecimiento fúngico. La actividad antifúngica se determinó mediante la aparición de halos de inhibición alrededor del disco impregnado con el extracto o fracción ensayada. Dichos halos se midieron tomando en cuenta su diámetro (mm) y relacionando el tamaño de los mismos con el grado de actividad mostrada, según el criterio establecido por algunos investigadores del área de productos naturales (28).

### **Fracionamiento cromatográfico**

Los extractos alcohólicos crudos de la hoja y el tallo así como también el extracto etéreo de las flores de *M. villosa* y sus distintas fracciones, fueron procesados mediante las técnicas cromatográficas convencionales para lograr la separación y purificación de los metabolitos presentes. Entre dichas técnicas se encuentran:

#### **Cromatografía en columna (CC)**

De acuerdo a la masa del extracto o fracción a separar, se emplearon columnas de vidrio de distinta longitud y diámetro para la realización de la cromatografía en columna por gravedad, utilizando como fase estacionaria sílica gel de 35-70 mesh y como fase móvil diversos solventes de distintas polaridades como hexano, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol, y mezclas de los mismos en diversas proporciones variando la polaridad en forma creciente.

#### **Cromatografía en capa fina (CCF)**

La cromatografía en capa fina (CCF) se utilizó para combinar las fracciones provenientes de la CC. Para ello se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup>, recubiertas con sílica gel tipo GF con un espesor de 0,5 mm y placas de aluminio recubiertas con sílica gel con indicador de fluoresceína, según la disponibilidad.



### **Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)**

Ocasionalmente, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), para aislar y purificar los compuestos provenientes de las fracciones y sub-fracciones obtenidas del fraccionamiento previo. La diferencia fundamental entre las placas utilizadas para CCF y CCFP radica en el espesor de la sílica gel la cual fue de 1 mm, y en dicha placa se colocó toda la fracción o subfracción a separar. Finalmente, los metabolitos separados fueron recuperados del adsorbente, mediante desprendimiento de la banda respectiva y disolución de los mismos en un solvente adecuado.

### **Agentes reveladores**

Para el revelado de las fracciones y sub fracciones se utilizó luz ultravioleta (UV) de onda corta (100-280 nm) y/o una solución de molibdato de amonio al 10% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%.

### **Caracterización estructural**

Para la elucidación estructural, se utilizaron técnicas como la espectroscopia infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) 1D, y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

### **Espectroscopia infrarrojo**

La región infrarroja del espectro electromagnético corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del visible, y por encima de las microondas más altas y de frecuencias de radar: longitudes de onda entre  $8 \times 10^{-5}$  cm y  $1 \times 10^{-2}$  cm. Los fotones de luz infrarroja no tienen suficiente energía para producir transiciones electrónicas, pero pueden hacer que grupos de átomos vibren respecto a los enlaces que lo contengan (29). Esta información es utilizada para identificar los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura de la molécula analizada.

Los compuestos separados se disolvieron en cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) u otro solvente según la polaridad de los mismos, se colocaron en celdas de cloruro de sodio (NaCl) y se

analizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo FTIR16PC marca Perkin Elmer, perteneciente al Instituto Universitario Tecnológico (IUT) de Cumaná. Los resultados obtenidos fueron comparados con las frecuencias de vibración y estiramiento características de cada grupo funcional.

### **Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG EM)**

La espectrometría de masas (EM) es una técnica para medir la masa molar de una molécula. Además, con frecuencia, es posible adquirir información sobre la estructura de una molécula midiendo las masas de los fragmentos que se producen cuando las mismas se desintegran (30). Esta técnica de análisis permite obtener un espectro de EM con pequeñas cantidades de la muestra. Cada pico observado en el mismo, muestra la masa total del fragmento ( $M^+$ ), el cual puede contener diversos tipos de átomos y distintas sub-estructuras. Por tal motivo, el análisis de un espectro de masas consistirá en primer lugar en relacionar los picos principales observados y en interpretarlos simultáneamente. La comparación con el espectro de una muestra conocida es, por lo general, la manera cómo finalmente se obtiene la estructura.

En cuanto al análisis de las mezclas complejas, los constituyentes se separaron e identificaron mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM). El cromatógrafo utiliza una columna capilar incluida en un horno termostatzado, revestida en su interior por un gel o sílice, cuya diferente interacción con las sustancias de la mezcla permite separar los componentes de la misma. Los componentes separados abandonan la columna a tiempos diferentes, pasando mediante un conducto de transferencia a la fuente de iones del espectrómetro de masas, donde las moléculas se ionizan y se fragmentan.

Los análisis de las fracciones y/o subfracciones provenientes de los extractos de *M.villosa*, se realizaron en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett- Packard (HP) modelo 5890, serie II, acoplado a un espectrómetro de masas de la misma marca modelo

5971 A. La identificación de los compuestos se realizó mediante la utilización de la base de datos y librería NIST 2008.

### **Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Con esta técnica, se estudian las propiedades magnéticas de átomos específicos (por ejemplo C, H, N y O) en la molécula, y a diferencia de otros métodos espectroscópicos, cada señal puede ser asignada a un núcleo (o grupo de núcleos) en la molécula, proporcionando de esta manera, una información más acertada de la disposición de los átomos en la estructura del compuesto en estudio. Su principal ventaja, es su naturaleza no destructiva, la cual la hace una de las técnicas más utilizadas en el área de los productos naturales.

Los metabolitos secundarios aislados fueron analizados en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), en un equipo de RMN marca Bruker AM 300 (frecuencia de resonancia  $^1\text{H} = 300 \text{ MHz}$ ). Para tal fin, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado según la solubilidad de la misma y fueron colocadas en un tubo de resonancia, el cual fue sometido a un campo magnético en el interior del equipo de RMN. Los desplazamientos obtenidos ( $\delta_{\text{H}}$  y  $\delta_{\text{C}}$ ) se reportaron en partes por millón (ppm), en relación a un estándar interno de tetrametil silano (TMS). Se realizó el experimento de RMN DEPT-135 (Distortionless Enhancement Through Polarization Transfer), ya que el mismo es muy útil para asignar las señales de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según la revisión bibliográfica, *M. villosa* es una planta que no ha sido sometida anteriormente a estudios de tipo fitoquímico ni biológico, por lo que a continuación se presentan los resultados obtenidos en el análisis del extracto alcohólico de las hojas, así como también en los extractos alcohólico y etéreo del tallo de la misma.

### Rendimiento porcentual de los extractos crudos de *M. villosa*

Se determinó la masa de cada uno de los órganos de de la planta *M. villosa*, y se realizó el proceso de extracción con éter dietílico y metanol. Una vez obtenidos los extractos secos, se procedió a determinar las masas de los mismos y su respectivo rendimiento, obteniéndose así 1,0486 g del EEH, 0,3816g del EET y 0,4638g de EEF, con un rendimiento de 0,79%, 0,24% y 1,07% respectivamente. De igual manera, se logró obtener 3,5551 g del EALH, 1,8703g del EALT y 1,5831g del EALF, con un rendimiento de 2,69%, 1,16% y 3,65% (tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de rendimiento de los extractos etéreos y alcohólicos de las partes botánicas de la planta *M. villosa*.

Extracto	Masa órgano (g)	Masa extracto (g)	Rendimiento (%)
EEH	132,3	1,0486	0,79
EET	160,7	0,3816	0,24
EEF	43,4	0,4638	1,07
EALH	132,3	3,5551	2,69
EALT	160,7	1,8703	1,16
EALF	43,4	1,5831	3,65

(EEH ) extracto etéreo de hojas, (EET) extracto etéreo de tallos; (EEF) extracto etéreo de flores; (EALH) extracto alcohólico de hojas; (EALT) extracto alcohólico de tallos; (EALF) extracto alcohólico de flores.

Estos resultados muestran claramente, que la mayor parte de los compuestos presentes

en la planta son de naturaleza polar, puesto que se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción alcohólica; sin embargo, también hay presencia de compuestos poco polares en una menor abundancia en dicha especie. Según la literatura, se observó el mismo comportamiento en los extractos obtenidos de *H. baruensis* Jacq, *H. guazumofolia* Kunth, *M. tomentosa* y *M. chamaedrys*; sin embargo, cabe destacar que para *M. tomentosa* solo se realizaron extracciones metanólicas (15,16, 22 y 31).

#### ***Análisis fitoquímico preliminar***

Al realizar las pruebas químicas de identificación de algunos núcleos secundarios, se logró mostrar la presencia de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos en los extractos, a excepción del extracto alcohólico de la hoja. También, se manifestó la presencia de fenilpropanoides en los extractos alcohólicos de las hojas y el tallo, al igual que fue detectado la presencia de flavonoides en todos los extractos alcohólicos obtenidos, resultando negativa dicha prueba para los extractos en éter dietílico (tabla 4).

Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos etéreos y alcohólicos de cada una de las partes botánicas de la planta *M. villosa*.

Familia de metabolitos	Hojas		Tallo		Flores		%emf
	EEH	EALH	EET	EALT	EEF	EALF	
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	0,00
Saponinas	-	-	-	-	-	-	0,00
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	0,00
Polifenoles	-	-	-	-	-	-	0,00
Taninos	-	-	-	-	-	-	0,00
Metilencetonas	-	-	-	-	-	-	0,00
Esteroles insaturados	+	-	+	+	+	+	83,33
Triterpenos pentacíclicos	+	-	+	+	+	+	83,33
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	-	-	-	0,00
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	0,00
Flavonoides	-	+	-	+	-	+	50,00
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	0,00
Fenilpropanoides	-	+	-	+	-	-	33,33
<b>%mpe</b>	15,38	15,38	15,38	30,77	15,38	23,08	

( - ) Ausencia del metabolito; ( + ) presencia del metabolito, EEH: extracto etereo de las hojas, EALH: extracto alcohólico de las hojas, EET: extracto etereo del tallo, EALT: extracto alcohólico del tallo, EEF: extracto etéreo de las flores, EALF: extracto alcohólico de las flores.

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

%mpe: porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto.

Los esteroles naturales son esteroides cristalinos que contienen una cadena lateral alifática, están muy difundidos y se encuentran tanto libres como esterificados. Por tratamiento con ácidos fuertes en condiciones de deshidratación, dan reacciones coloreadas que son útiles para su identificación preliminar (reacción de Lieberman-Burchard), por lo cual al agregar las gotas de dicho reactivo, se observó la aparición de una coloración verde intensa indicadora de la presencia de esteroles en los extractos analizados (32).

Los fenilpropanoides son sustancias aromáticas que tienen funciones oxigenadas (hidroxilos, metoxilos, metilendioxilos) en posiciones *orto* y/o *para*; están muy difundidos en el reino vegetal. En este grupo de compuestos aromáticos se encuentran sustancias que poseen esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> inalterado o bien repetido, fenilpropanoides con cadena lateral acortada (con esqueletos de la forma C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> y C<sub>6</sub>) y algunos que presentan esqueletos de la forma C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> de una o varias unidades isoprenicas (30). Su presencia fue evidenciada mediante la aparición de la coloración naranja, característica del reactivo de Arnow frente a los fenilpropanoides.

Por su parte, los flavonoides son pigmentos vegetales no nitrogenados, que comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, el chocolate, la cerveza y el vino rojo. Este tipo de compuesto posee una estructura de 15 carbonos, con un esqueleto de la forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, que provienen biogénicamente de tres unidades de acetato y una unidad de fenilpropanoide. Su acción farmacológica es extensa y variada, bien conocida por su actividad contra la fragilidad capilar, su acción antiesclerótica y antiinflamatoria, dilatadora de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. Se destaca su actividad antimicrobiana; además de que limitan la acción de los radicales libres (oxidantes), reduciendo el riesgo de cáncer y enfermedades cardíacas, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, refuerzan los vasos sanguíneos, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, así como también, evitan los sofocones en la menopausia (24 y 30).

Al exponer los extractos ante los vapores de hidróxido de amonio y colocarlos bajo luz ultravioleta, se observó una fluorescencia que indicó la presencia de flavonoides. Cabe destacar, que es posible que los flavonoides detectados en los extractos de *M. villosa*, puedan provenir de la biosíntesis de los fenilpropanoides propios de dicha especie.

De acuerdo al porcentaje de extractos con metabolitos pertenecientes a la misma familia (% emf), se pudo observar que la familia de los esteroides insaturados y triterpenos

pentacíclicos fueron los más abundantes dentro del grupo de extractos analizados (83.33%), seguido por los flavonoides (50%) y en último lugar los fenilpropanoides (33,33%), lo que quiere decir, que son los esteroides y triterpenos un grupo de metabolitos bastante abundante en la planta *M.villosa*. De igual forma, según el porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto (% mpe), se observó que el extracto alcohólico del tallo (EALT) fue el que presentó la presencia de la mayor cantidad de núcleos secundarios, seguido del extracto alcohólico de las flores (EALF), presentando el resto de los extractos una menor cantidad de los mismos (ver tabla 4). Esto hace al EALT un extracto bastante promisorio para ser estudiado. Cabe destacar que el extracto alcohólico de las flores (EALF) no pudo ser estudiado, ya que posteriormente a la aplicación de las pruebas químicas preliminares, se produjo una contaminación fúngica del mismo.

El hecho de no haber detectado la presencia de algunas familias de metabolitos, no implica necesariamente la ausencia de los mismos, ya que es posible que éstos se hayan encontrado en concentraciones muy bajas para ser detectados, mediante las pruebas húmedas de determinación de núcleos secundarios.

Este estudio fitoquímico constituye un aporte importante a la quimiotaxonomía de *M. villosa*, ya que no existe en la literatura reportes de este tipo para dicha especie; además, se evidenció la presencia de esteroides insaturados, los cuales constituyen un grupo de metabolitos muy característicos de las plantas de la familia Sterculiaceae, puesto que según los reportes de la literatura, este tipo de metabolitos se encuentra presente en otras especies tales como *H. baruensis* Jacq (15), *H. guazumifolia* Kunth (16) y *M. tomentosa* (22). El hecho de detectar la presencia de los mismos grupos de metabolitos en varias plantas de la misma familia, es evidencia de la relación quimiotaxonómica de las mismas, con lo cual se confirma aun más que efectivamente *M. villosa* pertenece a esta familia. Por otra parte, la presencia de flavonoides también fue detectada en *M. tomentosa* y *Waltheria americana* (33), evidenciándose la presencia este segundo grupo de metabolitos en algunas plantas de esta familia.



## Actividad biológica

### Actividad antibacteriana

Al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos crudos de *M. villosa*, se detectó una actividad leve en el extracto alcohólico de las hojas contra cinco de las cepas bacterianas, el extracto etéreo del tallo lo hizo contra una de las cepas, mientras que el extracto etéreo de las flores inhibió el crecimiento contra cuatro de las cepas ensayadas (tabla 5).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de *M. villosa*.

Bacteria	Hojas		Tallo		Flores	% eam
	EEH	EALH	EET	EALT	EEF	
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	-	20,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	+	20,00
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	+	-	-	-	20,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	0,00
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	40,00
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	+	20,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	-	+	60,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	20,00
<b>% mse</b>	0,00	62,50	12,50	0,00	50,00	

(+) Actividad leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro.

%eam: porcentaje de los extractos evaluados que resultaron activos contra el mismo organismo.

%mse: porcentaje de microorganismos sensibles a un mismo extracto.

El efecto antibacteriano de una sustancia puede describirse como bactericida o bacteriostático. La diferencia entre ambos efectos es sencilla, un agente bactericida es aquél capaz de matar a las bacterias, sin embargo, un agente bacteriostático no llega a

matarlas, pero si les impide reproducirse, frenando rápidamente el crecimiento de sus poblaciones (34). Según el análisis realizado, para la mayoría de los casos el efecto antibacteriano fue bacteriostático, es decir, no hubo proliferación alguna de la bacteria en la región inhibida, sin embargo, en el extracto etéreo de las flores (EEF) se observó una acción bacteriostática contra las cepas ensayadas, es decir, que hubo cierto crecimiento bacteriano dentro del halo de inhibición para las cepas de *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. De igual manera, se observó este comportamiento al ensayar el extracto etéreo del tallo (EET) contra la segunda cepa antes mencionada, y al ensayar el extracto alcohólico de las hojas contra *Escherichia coli*, por lo que el efecto antibacteriano del extracto se considera menos potente para estos casos.

De acuerdo al porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo (%eam), *Staphylococcus aureus* (IBE (DOC-19) fue el microorganismo sensible a la mayor cantidad de extractos con un 60,00% de los mismos, a pesar de que en alguno de ellos la acción antibacteriana fue bacteriostática, es decir, no se erradicó la bacteria, pero si se inhibió su crecimiento. Esto quiere decir que la mayor parte de los extractos provenientes de *M. villosa* están compuestos por metabolitos activos contra esta cepa de bacterias. Por su parte, la cepa de *Bacillus subtilis* (ICTA - 07) fue inhibida por un 40,00% de los extractos ensayados, seguido de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 23055) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), con un 20,00%, lo cual significa que estas cepas son mas resistentes ante la acción de los metabolitos presentes en *M. villosa*, con respecto a *Staphylococcus aureus*.

Según el porcentaje de microorganismos sensibles a un mismo extracto (%mse), se observó que el extracto alcohólico de las hojas (EALH) fue el que presentó mayor actividad con un 62,50%, seguido del extracto etéreo de las flores con un 50,00% y finalizando con el extracto etéreo del tallo con un 12,5%, siendo inactivo el resto de los extractos. Esto significa que el extracto alcohólico de las hojas posee ciertos metabolitos que le confieren una mayor propiedad antibacteriana en comparación con los demás.

Esto lo convierte en un extracto bastante promisorio para ser estudiado. Cabe destacar, que para el EALH, la mayor parte de las cepas inhibidas fueron Gram- mientras que para el EEF las cepas inhibidas fueron en su mayoría Gram+, a excepción de *Enterobacter cloacae*; por su parte, para el EET la única cepa inhibida fue Gram+, con lo cual se puede inferir que *M. villosa* ejerce un mayor efecto antibacteriano ante las cepas de bacterias Gram+.

Según los reportes de la literatura, los extractos metanólicos crudos de las hojas de *Helicteres guazumifolia* Kunth (16), presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Bacillus subtilis*. Por su parte, la fracción etérea de las hojas de *Helicteres baruensis* Jacq (15), presentó actividad bacteriostática leve a la bacteria *Salmonella enteritidis*, y la fracción clorofórmica mostró un efecto bactericida contra la misma, así como también mostró actividad leve contra *Bacillus cereus*. De igual manera, las hojas de *W. americana* (33) mostraron actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que el extracto metanólico de la planta en general, fue también activo contra *Escherichia coli*. Para *M. tomentosa* (22), el extracto metanólico del tallo exhibió una actividad antimicrobiana considerable contra *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En concordancia con este hecho, se dice que *M. villosa*, al igual que otras plantas de la familia Sterculiaceae, presenta propiedades antibacterianas.

### **Actividad antifúngica**

Al ensayar los distintos extractos de *M. villosa* contra cuatro cepas distintas de hongos, solo se observó una actividad muy leve ejercida por el EALT frente a la cepa de *Fusarium poae* (tabla 6). Según la literatura, el extracto metanólico del tallo de *Melochia tomentosa* (22), ejerció un efecto inhibitorio contra el crecimiento fungico de las cepas de *Curvularia lunata*, *Mucor* sp y *Penicillium* sp, Igualmente, los extractos en éter de petróleo y metanol de las hojas de *Helicteres guazumifolia* Kunth (16), ejercieron actividad antifúngica contra las dos primeras cepas mencionadas, así como también

inhibió el crecimiento de *Aspegillus oryzae*. Por su parte, los extractos acuoso y metanólico de las hojas, tallo y flores de *W. americana* ejercieron actividad antifúngica contra *Candida albicans* (33), por lo que hay evidencia de que las plantas de la familia Sterculiaceae poseen cierta actividad antifúngica; sin embargo, la actividad mostrada por *M. villosa* fue menos marcada que en los casos anteriores.

Tabla 6. Actividad antifúngica de los extractos crudos de *M. villosa*.

Hongo	Hojas		Tallo		Flores
	EEH	EALH	EET	EALT	EEF
<i>Mucor racemus</i>	-	-	-	-	-
<i>Fusarium maniliforme</i>	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma viridis</i>	-	-	-	-	-
<i>Fusarium poae</i>	-	-	-	+	-

(+) Actividad leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro.

### Actividad letal contra el crustáceo *Artemia salina*

Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia salina*, y de esta manera se predice su potencia para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos, puesto que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388) (leucemia *in vivo*), medida en términos de concentración letal media (35).

Al determinar el promedio de nauplios muertos a las 48 horas de haber sido expuestos a los diferentes extractos obtenidos (tabla 7), se utilizaron estos datos para calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) mediante el uso de un programa estadístico de computación, encontrándose que el EET presentó una potente actividad letal con una CL<sub>50</sub> de 2,06 µg/ml, siguiendo en letalidad el EALT y el EEF con una CL<sub>50</sub> de 10,00

µg/ml, el EALH con 74,68 µg/ml; siendo el EEH el menos letal, con una CL<sub>50</sub> de 169,10 µg/ml (tabla 8). Estos resultados muestran que *M. villosa* es una fuente potente de compuestos letales, encontrándose una letalidad moderada en las hojas y fuerte en las flores y tallo, siendo éste último el órgano más letal de la especie, especialmente en sus compuestos menos polares.

Tabla 7. Promedio de nauplios muertos a las 48 horas de haber sido expuestos a los distintos extractos.

Concentración (µg/ml)	Número de nauplios muertos				
	EEH	EET	EEF	EALH	EALT
1000	10	10	10	10	10
100	3	10	10	6	10
10	0	10	5	0	5
1	0	3	1	0	1
0,1	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0

(EEH ) extracto etéreo de la hoja, (EET) extracto etéreo del tallo; (EEF) extracto etéreo flores; (EALH) extracto alcohólico hoja; (EALT) extracto alcohólico tallo.

Tabla 8. Letalidad de los extractos de *M. villosa* frente al crustáceo *Artemia salina*.

Extracto	Método	CL <sub>50</sub> a las 48 horas
EEH	Binomial	169,10
EET	Binomial	2,06
EEF	Binomial	10,00
EALH	Binomial	74,68
EALT	Binomial	10,00

(EEH) extracto etéreo de la hoja, (EET) extracto etéreo del tallo; (EEF) extracto etéreo flores; (EALH) extracto alcohólico hoja; (EALT) extracto alcohólico tallo.

La mayoría de los extractos ensayados con el crustáceo *A. salina* mostraron una muy buena actividad letal, por lo que es posiblemente que *M. villosa* sea una planta con propiedades promisorias para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas. Este hecho concuerda con lo reportado en la literatura, la cual expone una muy buena actividad letal en otras especies pertenecientes a la familia Sterculiaceae, como por ejemplo, el tallo de *Melochia tomentosa* (22), la raíz de *Melochia chamaedrys* (31), las flores y los frutos de *Helicteres guazumifolia* Kunth (16) y las flores de *Helicteres baruensis* Jacq (15).

### **Fraccionamiento cromatográfico**

Para la presente investigación, los extractos de las distintas partes botánicas de *M. villosa* se sometieron a diferentes técnicas de separación cromatográfica para aislar y purificar en lo posible los compuestos presentes y facilitar su elucidación estructural.

### **Fraccionamiento del extracto alcohólico de las hojas (EALH) de *M. villosa***

Se utilizó la CC para fraccionar 1,7 g del extracto alcohólico de las hojas de *M. villosa* EALH (figura 9), utilizándose sílica gel 35-70 mesh (0,2-0,5 mm) como fase estacionaria y como fase móvil, solventes de distintas polaridades como hexano, acetato de etilo y metanol, y las mezclas respectivas de los mismos, variando la polaridad en orden creciente desde el hexano (menos polar), pasando por el acetato de etilo (medianamente polar) y finalizando con metanol (más polar) (tabla 9).

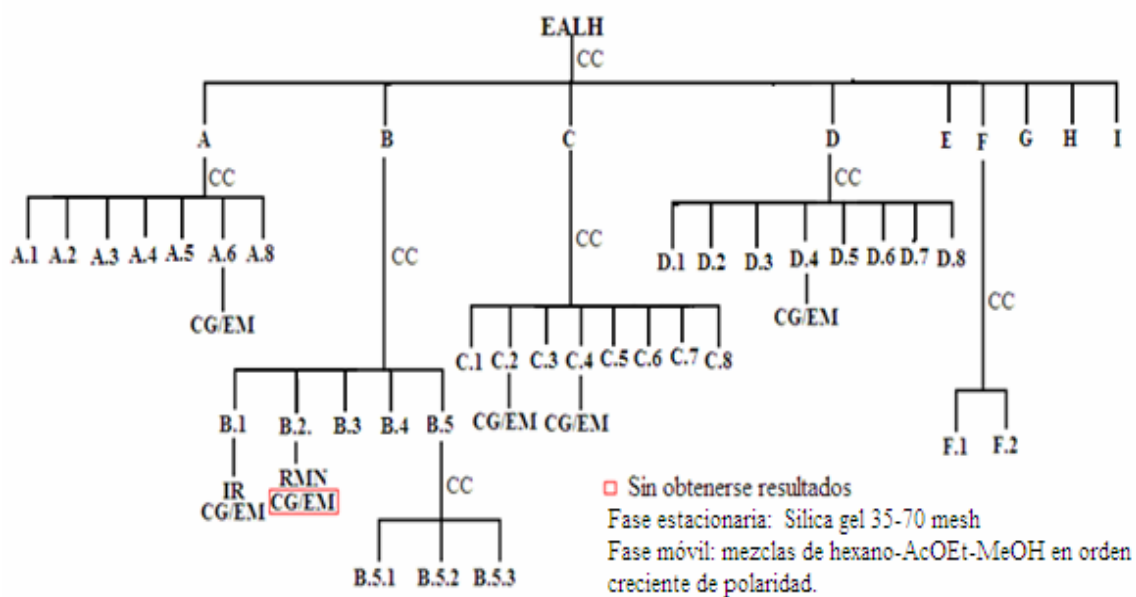


Figura 9. Fraccionamiento cromatográfico del EALH de *M. villosa* mediante CC por gravedad.

En el fraccionamiento del extracto crudo se empleó una columna de 2,4 cm de diámetro, la cual alcanzó una altura de 41 cm utilizando una relación extracto: sílica de 1:50 (g de extracto: g de sílica), recogiéndose consecutivamente 37 eluatos de 75 ml cada uno, los cuales posteriormente fueron juntados, lográndose así obtener 9 fracciones (tabla 10). Para tal fin, se empleó la cromatografía de capa fina (CCF), haciendo uso de la luz ultravioleta de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio como agentes reveladores, para observar los respectivos  $R_f$  que sirvieron de referencia para la combinación de los eluatos.

Tabla 9. Sistema de solventes utilizado en el fraccionamiento cromatográfico del EALH de *M.villosa*.

Eluyentes	% V/V	Eluatos
Hexano-AcOEt	80:20	1-5
Hexano-AcOEt	60:40	6-9
Hexano-AcOEt	40:30	10-17
Hexano-AcOEt	20:80	18-22
AcOEt	100	23-27
AcOEt-MeOH	50:50	28-30
MeOH	100	31-37

Tabla 10. Fracciones provenientes del fraccionamiento cromatográfico del EALH.

Eluatos	Fracciones	Masa (mg)
1-5	A	154,7
6-9	B	262,6
10-16	C	414,9
17-20	D	535,4
21-22	E	72,8
23-25	F	55,2
26-30	G	28,6
31	H	7,0
32-37	I	34,7

De la respectiva separación se recuperó un total de materia orgánica de 1,5660 g, distribuido en las nueve fracciones obtenidas, lográndose así un rendimiento de 92,24%. Las fracciones C y D fueron ensayadas en las pruebas biológicas, mostrando la fracción C una actividad antimicótica leve contra el hongo *Mucor racemus*, y una actividad antibacteriana moderada, mientras que la fracción D mostró muy buena letalidad con un CL<sub>50</sub> de 19,51 ppm, motivo por el cual se decidió realizar el subfraccionamiento de las mismas mediante CC para separar aun más los compuestos responsables de



dicha actividad.

### **Actividad antibacteriana de algunas fracciones provenientes del EALH**

Al ensayar parte de las fracciones provenientes del extracto alcohólico de las hojas, solo se observó actividad antibacteriana moderada en la fracción C, con un %fam de 16,67% y un %msf de 75,00% para las cepas ensayadas, mientras que el resto de las fracciones ensayadas no presentaron actividad (apéndice, tabla A1); en consecuencia, posiblemente los compuestos presentes en la fracción C, sean los responsables en gran parte del efecto bacteriostático mostrado por el EALH. Es probable que el aumento en la actividad de la fracción puede deberse a un efecto antagónico, es decir, que los compuestos presentes en un mismo extracto al estar juntos presentan un efecto menor que el que pueden presentar cuando se encuentran separados, o también puede darse el caso de un efecto de concentración en el cual los metabolitos activos se encuentran menos concentrados en el extracto crudo y una vez separados se concentran en una fracción mostrando así toda su actividad.

### **Actividad antifúngica de algunas fracciones provenientes del EALH**

Al ensayar algunas de las fracciones obtenidas del extracto alcohólico de las hojas, se observó que solo la fracción C mostró actividad antifúngica leve contra el hongo *Mucor racemus*, mientras que el resto de las fracciones provenientes del mismo extracto que lograron ser ensayadas no ejercieron actividad antifúngica contra ninguna de las sepas (apéndice, tabla A2). Este hecho da indicio de que las hojas de *M. villosa* poseen poca capacidad para inhibir el crecimiento de hongos.

### **Letalidad de algunas fracciones provenientes del EALH**

Al realizar el ensayo de letalidad con *A. salina* para algunas fracciones provenientes del EALH, se encontró que la fracción D presentó una actividad letal bastante elevada con una  $CL_{50}$  de 19,51  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que el resto de las fracciones provenientes del mismo extracto que fueron ensayadas no ejercieron inhibición (apéndice, tabla A3), lo que quiere decir que tal vez en la fracción D se encuentran compuestos con propiedades

promisorias para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas.

Cabe destacar que en este estudio solo se reporta la actividad biológica de las fracciones que se lograron ensayar, debido a la limitación de la poca cantidad de masa obtenida en el resto de las fracciones, sin embargo, es posible que las fracciones que no se logró ensayar puedan presentar algún tipo de actividad la cual no pudo ser probada en la presente investigación.

### **Fraccionamiento cromatográfico de la fracción B**

Para el subfraccionamiento cromatográfico de la fracción B, se separaron 262 mg de la misma, en una columna de 25,6 cm de altura con un diámetro de 0,9 mm, utilizando como fase estacionaria sílica gel 35-70 mesh (0,2-0,5 mm) en una relación extracto-sílica de 1:30, y como fase móvil solventes de distintas polaridades tales como hexano, acetato de etilo y metanol, así como también se hicieron las respectivas mezclas de hexano-acetato y acetato-metanol para variar la polaridad en orden creciente (tabla 11).

Tabla 11. Sistema de solventes utilizado en el subfraccionamiento de la fracción B

Eluyente	% V/V	Eluatos
Hexano	100	1-4
Hexano-AcOEt	90:10	5-8
Hexano-AcOEt	80:20	9-13
Hexano-AcOEt	70:30	14-20
Hexano-AcOEt	50:50	21-27
Hexano-AcOEt	30:70	28-31
AcOEt	100	32-35
AcOEt-MeOH	50:50	36-37

De tal fraccionamiento se recogieron 37 eluatos, los cuales fueron juntados mediante la evidencia de CCF, con ayuda de la luz ultravioleta y una solución de molibdato de amonio ácido como agente revelador, obteniéndose de esta manera 5 subfracciones

(tabla 12), recuperandose 169,2 mg de material orgánico con un rendimiento de 64,58% en el respectivo fraccionamiento.

Entre las fracciones obtenidas, la fracción B1 fue un sólido blanco, observándose una pequeña estela al ser ensayada mediante CCF, utilizando una mezcla de 80:20 hexano-AcEOt, por lo que dicha fracción fue seleccionada para análisis de IR y CG/EM para de esta manera identificar los compuestos en mayor proporción, así como también las posibles trazas de los otros compuestos que pudieran encontrarse mezclados junto con los compuestos mayoritarios.

Tabla 12. Fracciones provenientes del subfraccionamiento de la fracción B.

Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
B1	1-8	29,7
B2	9-14	15,5
B3	15-27	59,1
B4	28-35	30,9
B5	36-37	34,0

### **Análisis de infrarrojo de la subfracción B1**

Al realizar el IR de la subfracción B1, se observó una banda ancha a los  $3400\text{ cm}^{-1}$  del bending del grupo OH; la banda del stretching característico del grupo carbonilo a los  $1600\text{ cm}^{-1}$ , presente en compuestos como cetonas, ésteres y ácidos orgánicos; la banda característica del stretching del enlace CO del grupo éster a los  $1150\text{ cm}^{-1}$ ; así como también se observaron bandas correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-H en la región de los  $2900\text{ cm}^{-1}$  y la banda del  $\text{CH}_2$  disustituido de los alcanos en la región de los  $700\text{ cm}^{-1}$  (figura 10).

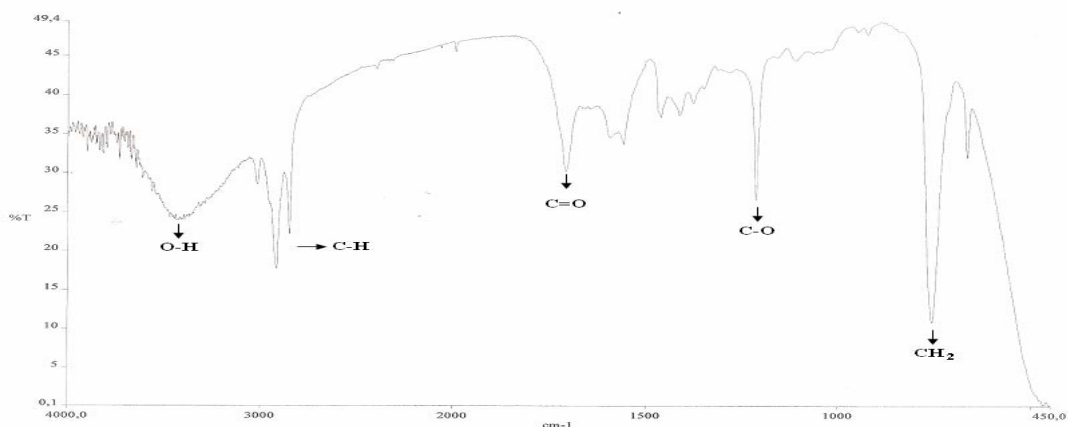


Figura 10. Espectro IR de la subfracción B1.

### Análisis de CG/EM de la subfracción B1

De igual manera, se realizó CG/EM a la misma fracción (figura 11), lográndose separar e identificar varios compuestos, entre los cuales se encuentran cetonas como la 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona y la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, diversos ésteres como los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico, el éster metílico del ácido octadecanoico, entre otros, lo cual confirma con la presencia del grupo éster (-OC-O-) observado en el IR; observándose también la existencia del grupo OH evidenciado en el espectro IR de esta fracción. De los compuestos como el ester dibutilico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, ester etílico del ácido nonadecanoico, isopropil palmitato e isopropil estereato, solo se puede hablar de una baja probabilidad de encontrarse en la fracción, puesto que sus probabilidades fueron inferiores al 90%.

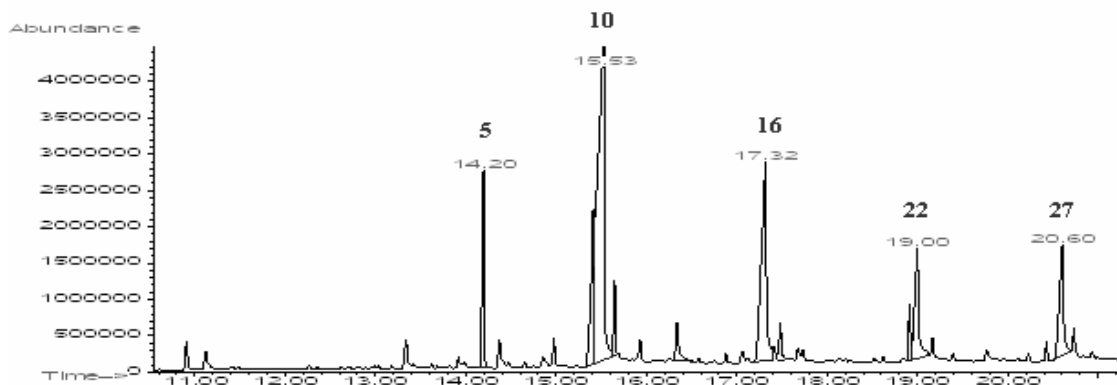


Figura 11. Cromatograma de la subfracción B1 obtenida mediante CG/EM.

De todos los compuestos reconocidos en la fracción B1, se logró identificar con una mayor abundancia la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y los ácidos hexadecanoico (palmítico), octadecanoico (esteárico), eicosanoico y docosanoico, siendo el ácido hexadecanoico el más abundante con un área de 32,16% y un 97% de probabilidad (tabla 13). Fueron también identificados en menor abundancia otros ácidos grasos como el tetradecanoico, heptadecanoico, dodecanoico y los ésteres de algunos de ellos como por ejemplo los ésteres metílico del ácido hexadecanoico, octadecanoico y docosanoico entre otros.

Tabla 13. Composición química de la subfracción B1.

Pico	Identificación	RT	% Área	%P
1	5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona	10,912	0,97	95
2	Ácido dodecanoico	11,123	0,95	99
3	Ácido tetradecanoico	13,344	1,10	99
4	-	13,921	0,22	NI
5	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	14,196	5,83	99
6	Ácido pentadecanoico	14,373	1,13	98
7	-	14,860	0,65	NI
8	Éster metílico del ácido hexadecanoico	14,980	0,89	97
9	Éster dibutílico del ácido 1,2-bencenodioxílico	15,415	7,72	74
10	Ácido hexadecanoico	15,529	32,16	97
11	Ester etílico del ácido hexadecanoico	15,649	2,16	99
12	Isopropil palmitato	15,930	0,82	83
13	Ácido heptadecanoico	16,342	2,26	95
14	Éster metílico del ácido octadecanoico	16,880	0,37	98
15	-	17,063	0,63	NI
16	Ácido octadecanoico	17,315	15,31	95
17	Éster metílico del ácido kauro-16-en-18-oico	17,412	0,83	91
18	Ester metílico del ácido octadecanoico	17,481	1,79	97
19	-	17,675	0,65	NI

20	Isopropil estereato	17,732	0,64	72
21	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18,911	1,78	98
22	Ácido eicosanoico	18,997	7,40	96
23	Éster etílico del ácido heptadecanoico	19,169	0,82	97
24	-	19,769	0,73	NI
25	Éster metílico del ácido docosanoico	20,227	0,25	98
26	Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	20,427	0,57	91
27	Ácido docosanoico	20,605	7,74	96
28	Éster etílico del ácido nonadecanoico	20,731	1,14	87
29	Ácido docosanoico	21,309	0,60	64
30	5-(3-metoxifenil)-3-metil-5-fenil-1-trimetilsilil-2,4-imidazolidinediona	22,035	0,56	90
31	Éster etílico del ácido octadecanoico	22,178	0,26	64
32	-	22,871	0,46	NI
33	-	26,607	0,67	NI

Gris: compuestos más abundantes, TR: tiempo de retención, %P: porcentaje de probabilidad,

NI: compuesto no identificado.

El espectro de masas de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (figura 12), exhibió un ión molecular  $[M^+]$  con una relación  $m/z$  268, el cual corresponde a la fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O$ ; sin embargo, se encontró poca abundancia del mismo en el momento de la realización de la EM, debido a que su estabilidad es muy baja en comparación a la de los otros iones que resultan de su fragmentación. Por su parte, se observaron los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes con una relación de  $m/z$  85, 71 y 58 (pico base), e identificándose también los fragmentos correspondientes a los picos con una relación  $m/z$  de 210 y 194, cuyo patrón de fragmentación se muestra en la figura 13.

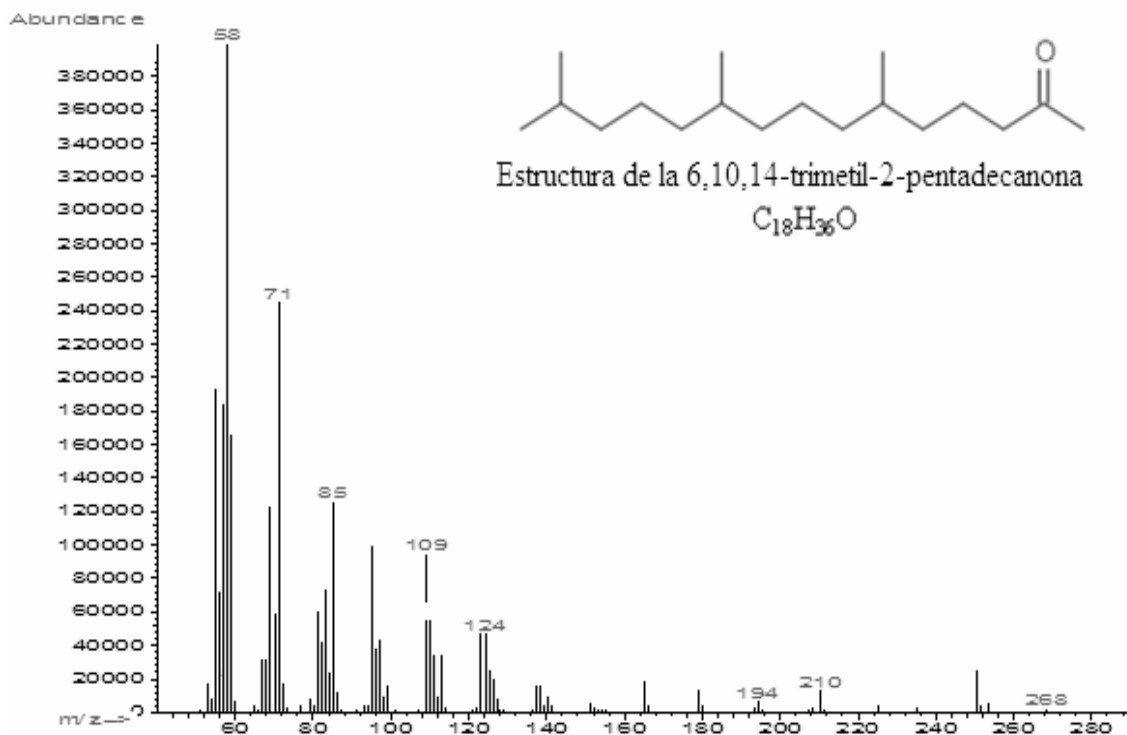


Figura 12. Espectro de masas del picocon TR 14,20 y área 5,83 asignado a la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

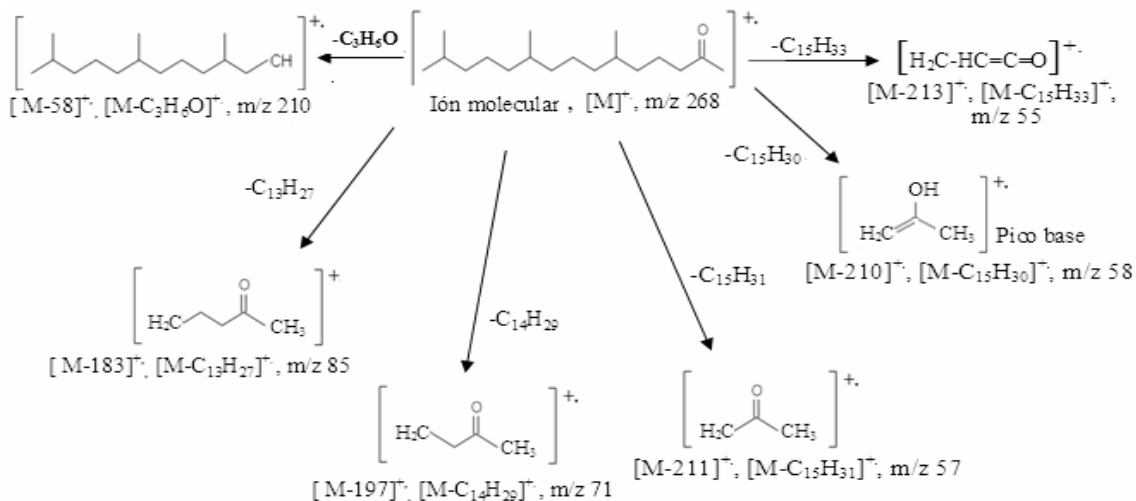


Figura 13. Patrón de fragmentación de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

Como en el caso de los aldehídos, la fragmentación es también principalmente provocada por la ionización del grupo carbonilo y se ha demostrado que  $m/z$  57

(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O), 71 (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O) y 85 (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O) poseen más del 40% de la intensidad del pico base en los tipos de etilo, propilo respectivamente (36).

Por su parte, el espectro de masas del ácido hexadecanoico de fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> con un tiempo de retención de 15,52 (figura 14), muestra el correspondiente ion molecular a una relación m/z 256, un pico base a una relación m/z 73 y los picos de los fragmentos más abundantes a una relación de m/z 213, 129 y 60. En la figura 15 se muestra su patrón de fragmentación.

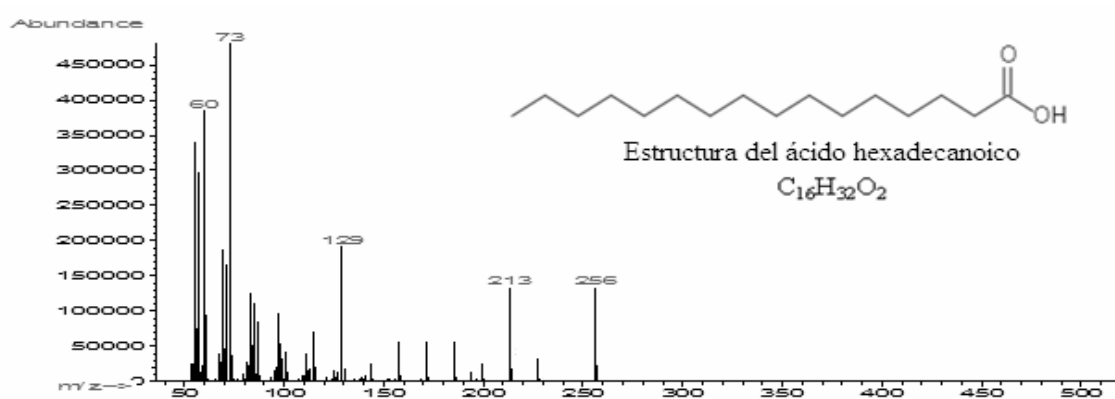


Figura 14. Espectro de masas del pico con TR 15,53 y área 32,16 asignado al ácido hexadecanoico.

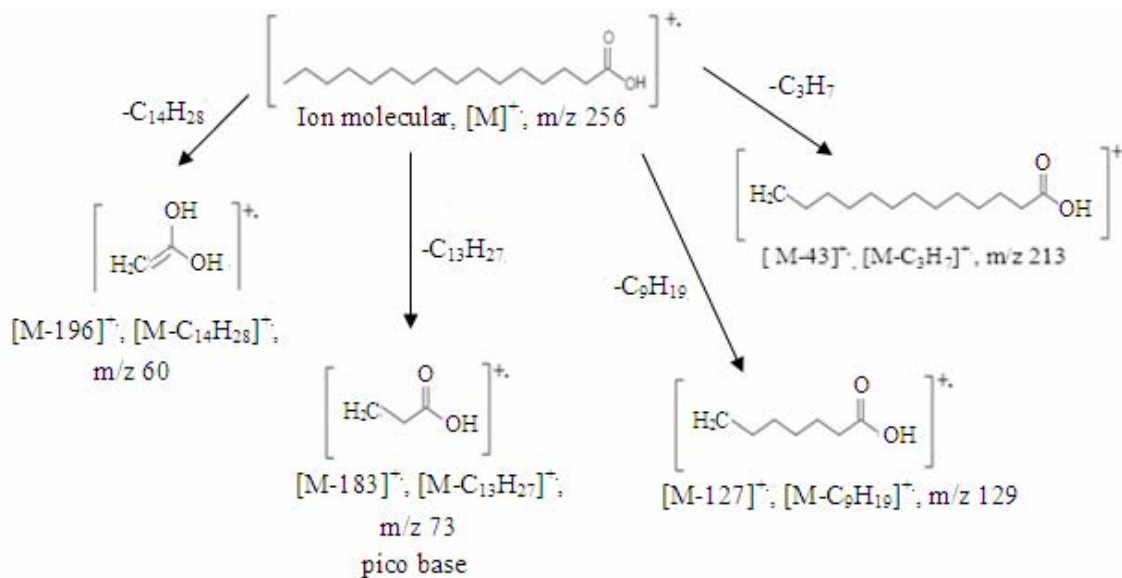


Figura 15. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico.



El espectro de masas del ácido octadecanoico (figura 16), muestra un ion molecular a una relación m/z 281, el cual concuerda perfectamente con la masa de este compuesto de fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O_2$ , y unos picos a una relación m/z 241, 185, 129, 73 (pico base) y 55, cuyo patrón de fragmentación puede observarse en la figura 17.

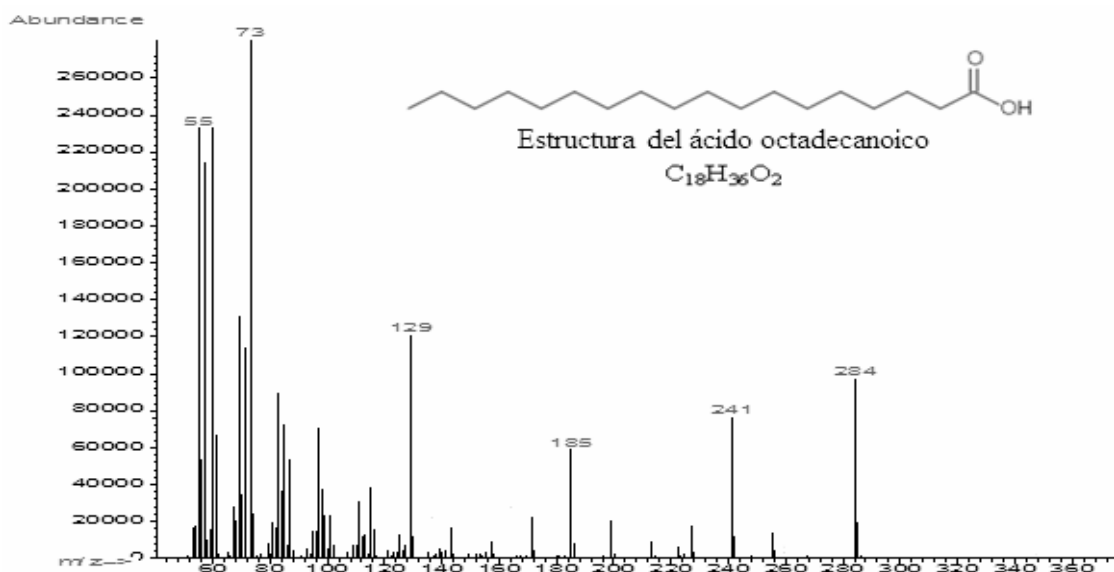


Figura 16. Espectro de masas del pico con TR 17,32 y área 15,31 asignado al ácido octadecanoico.

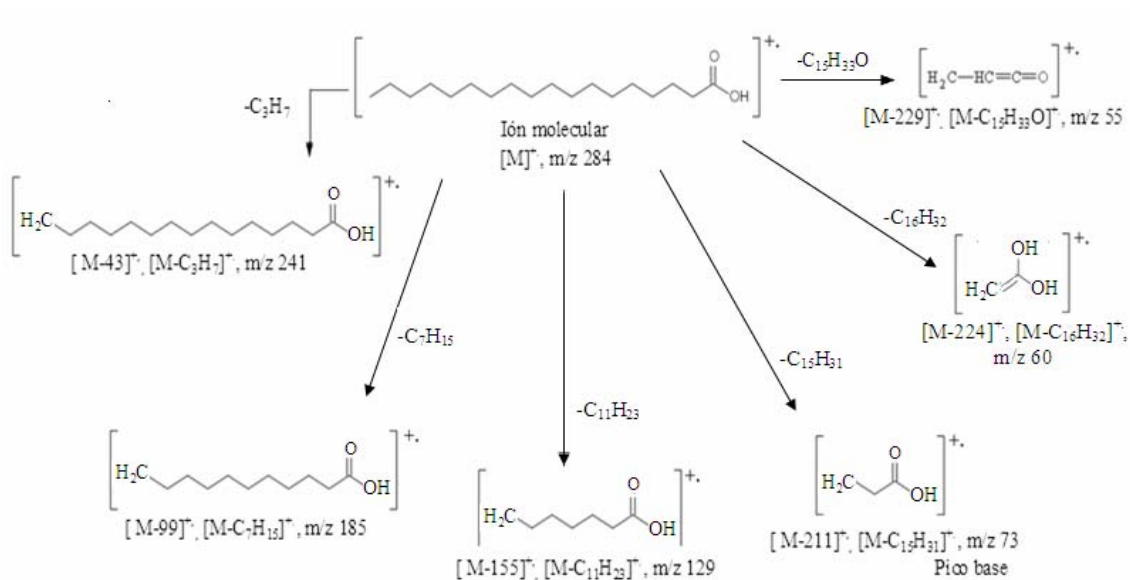


Figura 17. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico.

De igual forma, en el espectro de masas del ácido eicosanoico (figura 18), se observó un pico a una relación  $m/z$  312 correspondiente al ion molecular de dicho compuesto, de masa molecular 312 y fórmula  $C_{20}H_{40}O_2$ , un pico base a una relación  $m/z$  73 y las señales correspondientes a otros fragmentos con una relación  $m/z$  269,185,129 y 55. En la figura 19 se muestran las estructuras de dichos fragmentos.

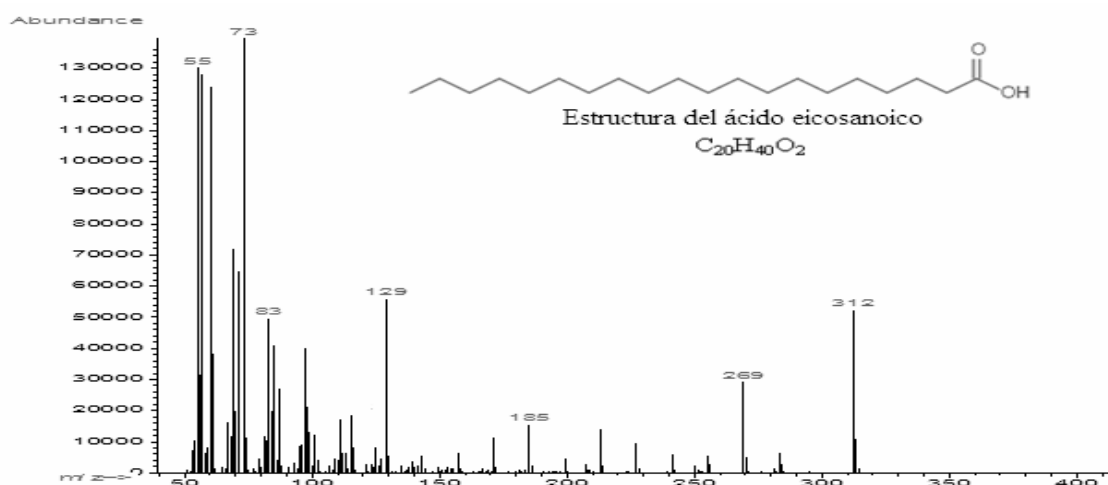


Figura 18. Espectro de masas del pico con TR 19,00 y área 7,40 asignado al ácido eicosanoico.

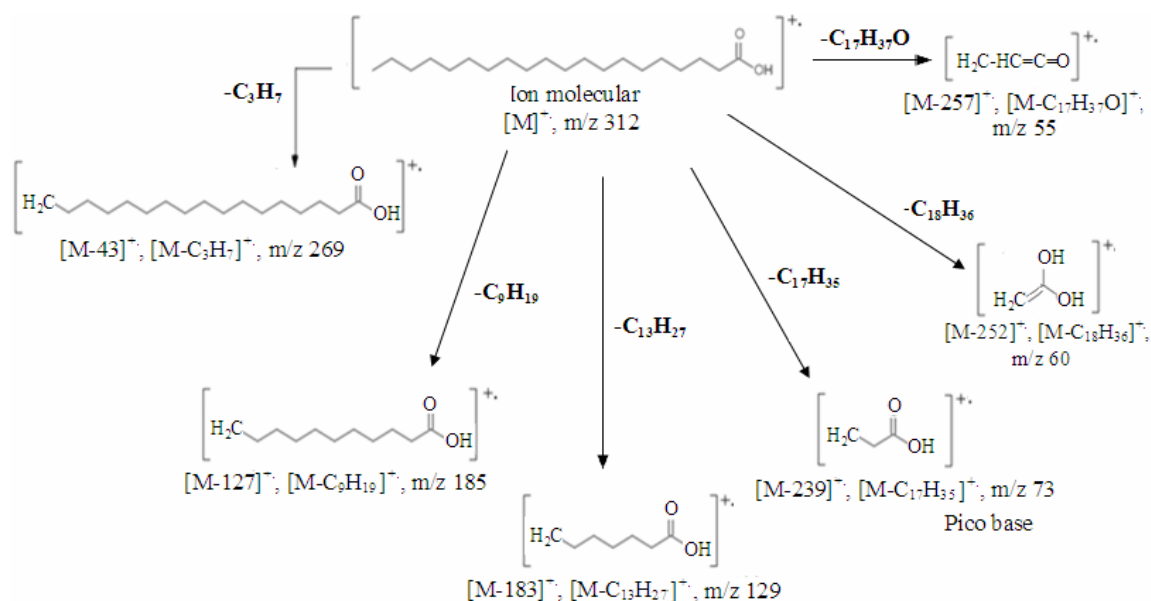


Figura 19. Patrón de fragmentación del ácido eicosanoico.

Por su parte, el espectro de masas del ácido docosanoico (figura 20), muestra un pico bastante pronunciado a una relación  $m/z$  340, el cual corresponde al ion molecular de dicho compuesto de fórmula molecular  $C_{22}H_{44}O_2$ , un pico base a una relación  $m/z$  73 y los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes, con una relación  $m/z$  297, 241, 185, 129, 60, 57 y 55. El patrón de fragmentación de dicho compuesto se muestra en la figura 21.

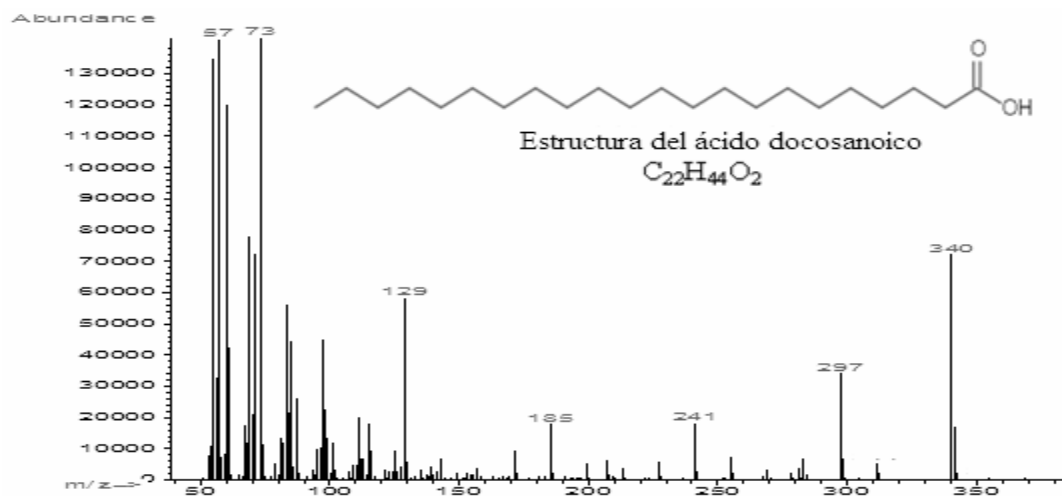


Figura 20. Espectro de masas del pico con TR 20,60 y área 7,74 asignado al ácido docosanoico.

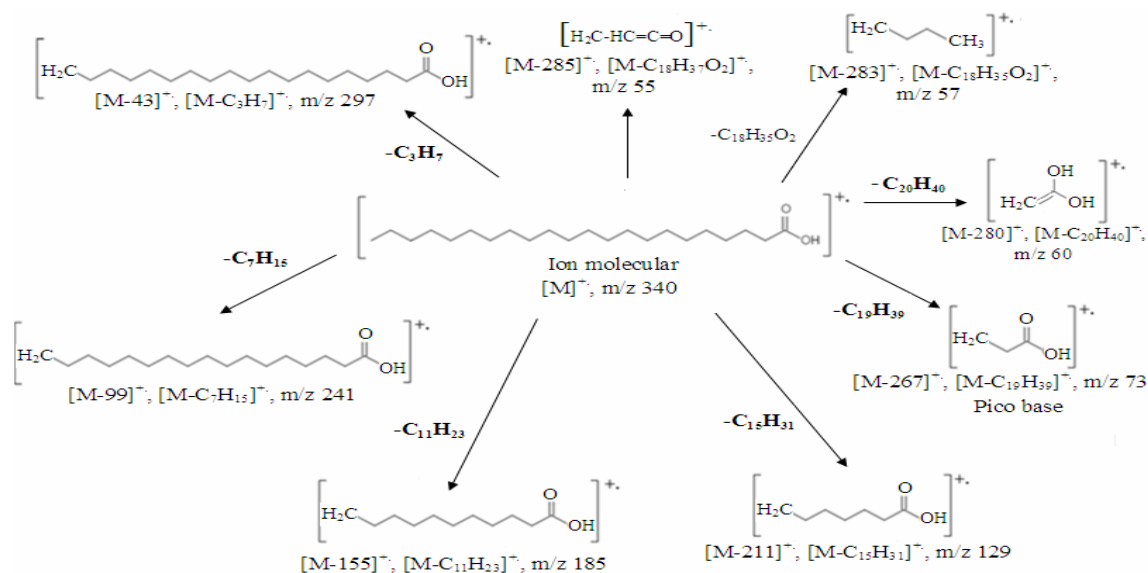


Figura 21. Patrón de fragmentación del ácido docosanoico.

En la espectrometría de masas la rotura simultánea de dos enlaces simples: produce normalmente la eliminación de moléculas neutras. En este tipo se engloban también las transposiciones o reagrupamientos a través de estados cíclicos como la transposición de McLafferty. o transposición específica de Hidrógeno (figura 22), en la cual los dobles enlaces y los heteroátomos favorecen, como aceptores de Hidrógeno, la transposición de un hidrógeno a través de un estado cíclico de transición de seis miembros.

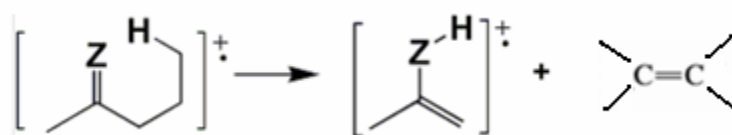


Figura 22. Transposición de McLafferty.

Para que se produzca debe existir un átomo de Hidrógeno en posición  $\gamma$  (gama) respecto al doble enlace aceptor de Hidrógeno. Este tipo de rearrreglo es común en los compuestos carbonílicos tales como cetonas, ácidos y ésteres, dando como resultado iones con gran estabilidad, los cuales generan picos base característicos en el espectro de masas del compuesto. En el caso de las metilcetonas, esta transposición da origen a un fragmento que produce un pico característico a una relación  $m/z$  58 (figura 23).

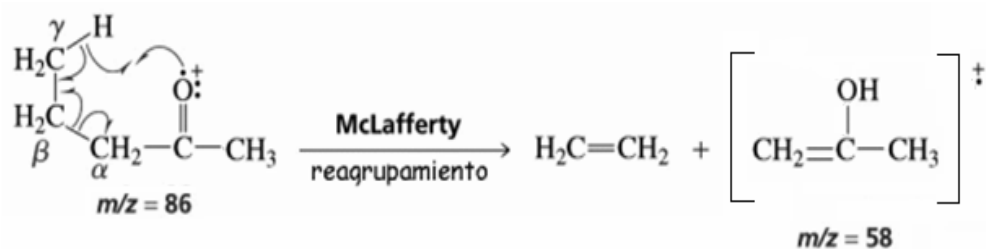


Figura 23. Mecanismo de la transposición de McLafferty en una metilcetona.

En el caso de los ácidos carboxílicos, el resultado del rearrreglo es un enol característico que muestra su señal con un pico base a una relación  $m/z$  de 60 correspondiente al fragmento  $\text{CH}_2=\text{COH-OH}$ , siendo este el pico característico observado en los espectros de masa de los ácidos grasos analizados.

### **Identificación del componente presente en la subfracción B2**

La subfracción B2 presentó las mismas propiedades que la subfracción B1 en cuanto a coloración y textura, y tomando en cuenta además que dichas subfracciones fueron separadas consecutivamente, utilizando mezclas de solventes con poca diferencia de polaridad (tablas 13 y 14), se pudo considerar que probablemente se trate de los mismos compuestos, entre los cuales tal vez se encuentre alguno de ellos en mayor proporción, sin embargo, al realizar la CCF de la subfracción B2 con una mezcla 7:3 hexano-AcOEt se observó una sola mancha indicando la separación de un compuesto puro, por lo que se decidió realizar un RMN a la subfracción B2.

La ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción B2 (Figura 24), mostró la presencia de un triplete a  $\delta_{\text{H}}$  0,8 ppm correspondiente a los protones metilo ( $\text{H}_{16}$ ) del  $\text{CH}_3$  terminal de la molécula, un multiplete muy intenso correspondiente a los metilenos ( $\text{H}_3\text{-H}_{15}$ ), con un desplazamiento químico de  $\delta_{\text{H}}$  1,2 ppm, un triplete a un desplazamiento de  $\delta_{\text{H}}$  2,3 ppm de un metileno ( $\text{H}_2$ ) adyacente al grupo carbonilo y una señal a un  $\delta_{\text{H}}$  de 7,3 ppm en forma de singlete, correspondiente a la parte de solvente sin deuterar (tabla 14).

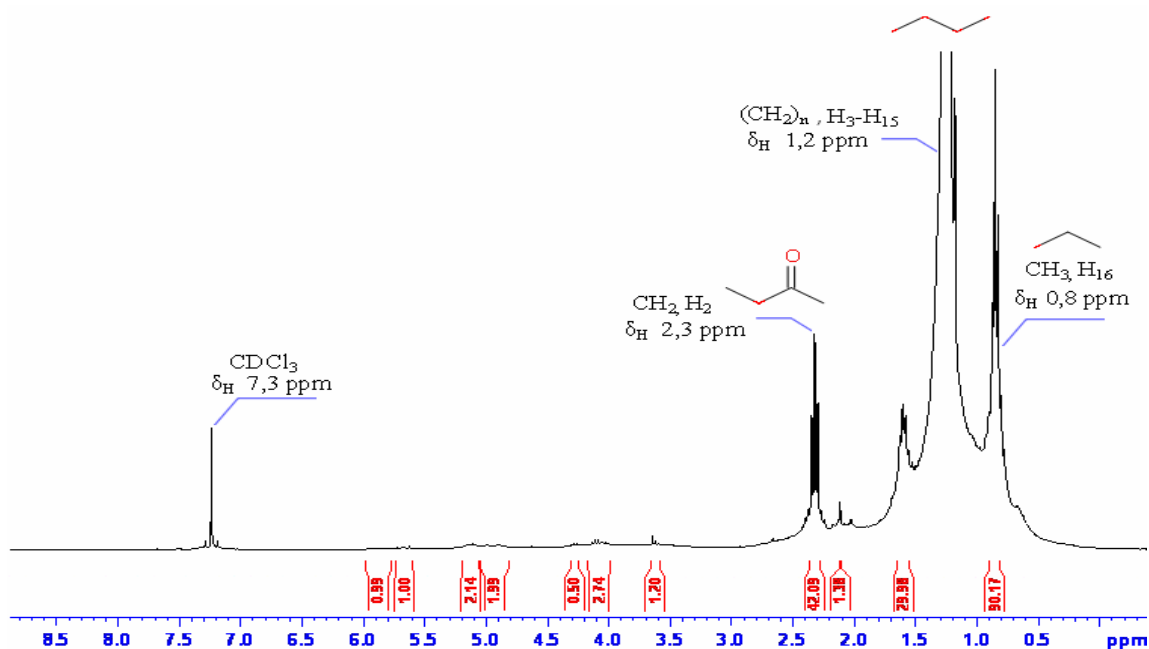


Figura 24. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción B2.

Tabla 14. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción B2.

Posición	Multiplicidad	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Asignación
H <sub>2</sub>	Triplete ( <i>t</i> )	0,8	-CH <sub>3</sub>
H <sub>3</sub> -H <sub>15</sub>	Multiplete ( <i>m</i> )	1,2	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>10</sub>
H <sub>16</sub>	Triplete ( <i>t</i> )	2,3	-CH <sub>2</sub> -COO-
-	Singlete ( <i>s</i> )	7,3	CHCl <sub>3</sub>

El espectro de  $^{13}\text{C}$  de la misma subfracción, en concordancia con el RMN de  $^1\text{H}$ , muestra una señal indicativa de un carbono metílico (C<sub>16</sub>) a un desplazamiento a un  $\delta_{\text{C}}$  de 14,2 ppm y una señal intensa entre los 29-30 ppm asignada al desplazamiento químico producido por los carbonos metilénicos superpuestos (C<sub>4</sub>-C<sub>13</sub>), así como también muestra la señal correspondiente al solvente a un desplazamiento de 76-80 ppm aproximadamente. A diferencia del espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se evidencia la presencia una señal a campo bajo con un desplazamiento químico  $\delta_{\text{C}}$  entre 179-180 ppm, la cual

corresponde al carbono carbonílico de los ácidos orgánicos (Figura 25).

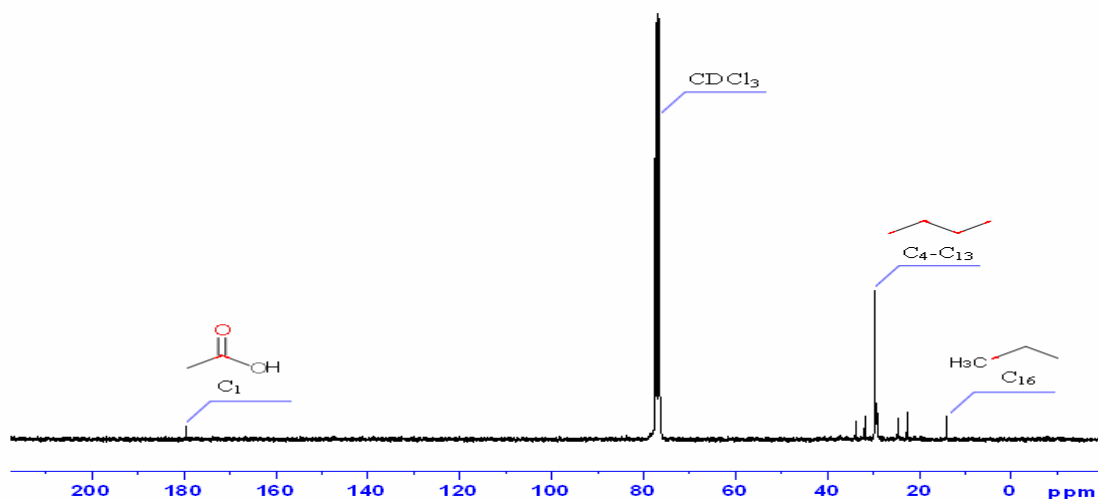


Figura 25. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la subfracción B2.

En la ampliación del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 26), se puede apreciar con mayor claridad las señales antes mencionadas, además de observarse con mayor precisión una señal correspondiente al carbono del metileno adyacente al metilo ( $\text{C}_{15}$ ) a un  $\delta_{\text{C}}$  de 22,7 ppm, una señal a los 24,7 ppm correspondiente al carbono metilénico  $\text{C}_3$ , a un desplazamiento de  $\delta_{\text{C}}$  de 32,9 ppm la señal asignada al carbono metilénico  $\text{C}_{14}$  y otra señal a los 34 ppm correspondiente al carbono metilénico  $\text{C}_2$  adyacente al grupo carbonilo (tabla 15).

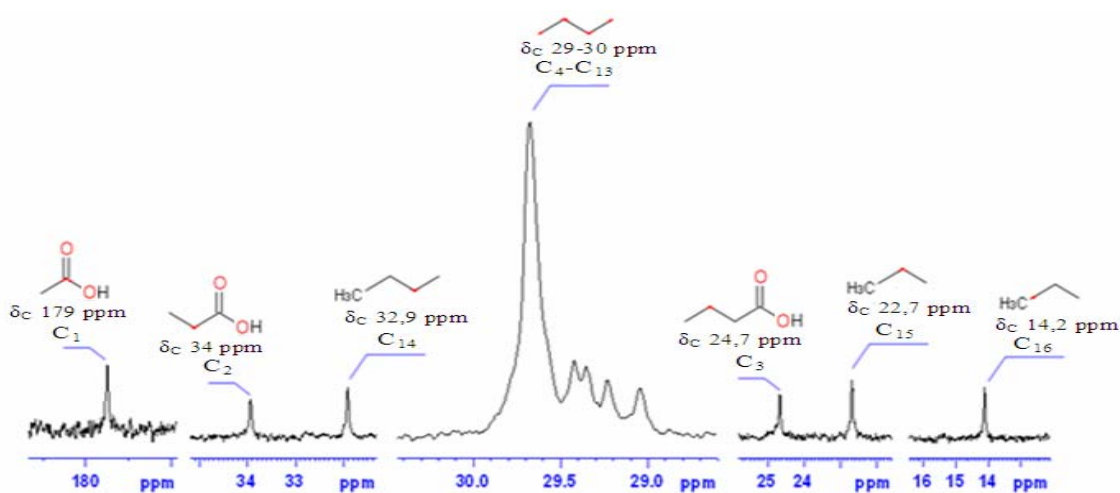


Figura 26. Ampliación del RMN de  $^{13}\text{C}$  de la subfracción B2.

Tabla 15. Desplazamientos químicos  $\delta_c$  del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción B2.

Posición	$\delta_c$ (ppm)	Tipo de carbono
C <sub>1</sub>	179	-COOH
C <sub>2</sub>	34	-CH <sub>2</sub> -COOH
C <sub>3</sub>	24,7	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
C <sub>4</sub> -C <sub>13</sub>	29-30	(-CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>
C <sub>14</sub>	32,9	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C <sub>15</sub>	22,7	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
C <sub>16</sub>	14,2	CH <sub>3</sub> -
-	76-80	CDCl <sub>3</sub>

Con la ayuda del programa RMN predictor, se logró corroborar que el espectro RMN de la subfracción B2 corresponde al ácido hexadecanoico (figura 27), compuesto de mayor abundancia en la subfracción B1 de acuerdo a lo identificado por CG/EM.

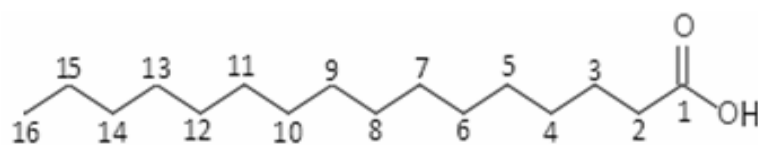


Figura 27. Estructura del ácido hexadecanoico.



Los ácidos grasos son unas sustancias necesarias para nuestra salud. Son, junto con los azúcares, la principal fuente de energía para nuestro organismo. Al mismo tiempo, los ácidos grasos forman parte fundamental de las membranas de nuestras células, y según su composición derivará su funcionalidad. Desde un punto de vista del metabolismo, son punto de partida para la síntesis de sustancias con una acción similar a las hormonas, (icosanoides) que se manifiestan potenciando o inhibiendo procesos inflamatorios, además, por su contenido en hidrógenos pueden oxidarse en mayor medida que los glúcidos u otros compuestos orgánicos que no están reducidos (37).

La investigación actual revela que, tal como se podía esperar, ciertos ácidos grasos esenciales matan a las células cancerosas en condiciones de laboratorio y casi todos los experimentos similares dan por sentado que los ácidos grasos esenciales poseen una enorme actividad anticancerosa, ya que pueden ayudar a bloquear las señales que ordenan replicarse a las células cancerosas y ayudan a mantener la fluidez de las membranas celulares (38). En otros estudios se señala que los ácidos grasos inhiben de manera efectiva las bacterias Gram positivas, además de que exhiben actividad antimicótica, reportándose el ácido hexadecanoico como inhibidor efectivo de bacterias y hongos. Éste es uno de los ácidos grasos más comunes, y algunos registros señalan que al igual que el ácido octadecanoico, posee propiedades apópticas (39,40). Es posible que parte de la actividad antibacteriana mostrada por el EALH del cual provienen las subfracciones B1 y B2, se deba a la presencia de estos ácidos grasos.

Según la literatura, existen varios reportes de la importancia de los ácidos grasos y sus ésteres como precursores de actividades o efectos antimicrobianos. Los ácidos grasos poliinsaturados con 20 átomos de carbono tienen actividades biológicas únicas y son los precursores en la biosíntesis de prostaglandinas, leucotrienos y otros eicosanoides, los cuales son importantes para el mantenimiento de la fisiología normal de los mamíferos (41), son metabolitos activos muy conocidos y sirven como un importante sustrato energético para las células (42) y generalmente, los ácidos grasos inhiben principalmente a las bacterias Grampositivas y levaduras y los ácidos mirístico y palmítico (ácido

hexadecanoico) son los más efectivos (43,44). De acuerdo a lo reportado en la literatura, este tipo de compuestos se encuentran presentes en otras especies de este género, como lo es *M. tomentosa* (22), así como también en especies del género *Helicteres* tal como *H. baruensis* Jacq (15).

### Subfraccionamiento cromatográfico de la fracción C

Para la separación de 350 mg de la fracción C del extracto alcohólico de las hojas (EALH) de *M. villosa*, se utilizó una columna de 33,5 cm de altura con un diámetro de 1 cm, rellena con silica gel (fase estacionaria), en una proporción fracción-silica de 1:50, y haciendo uso de solventes como hexano, acetato de etilo y metanol, y sus respectivas mezclas (tabla 16).

Tabla 16. Sistema de solventes utilizados en el subfraccionamiento de la fracción C.

Eluyente	% V/V	Eluatos
Hexano	100	1-4
Hexano-AcOEt	80:20	5-10
Hexano-AcOEt	60:40	11-17
Hexano-AcOEt	50:50	18-27
Hexano-AcOEt	40:60	28-34
Hexano-AcOEt	20:80	35-40
AcOEt	100	41-48
MeOH-AcOEt	50:50	49

Esta fracción mostró actividad antibacteriana moderada contra varias de las cepas de bacterias ensayadas, y una actividad antifúngica leve contra el hongo *Mucor racemus*, según lo expuesto en la sección de actividad antibacteriana y antifúngica, además, fue una de las fracciones de la cual se obtuvo suficiente masa, motivo por el cual fue seleccionada para ser separada. De tal subfraccionamiento se obtuvo un total de 49 eluatos de 50 ml c/u, los cuales fueron juntados mediante CCF haciendo uso de luz UV y una solución ácida de molibdato de amonio, obteniéndose de esta manera ocho

subfracciones (tabla 17), recuperándose un total de 224,6 mg de materia orgánica, con un rendimiento de 64,17%.

Tabla 17. Fracciones provenientes del subfraccionamiento de la fracción C.

Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
C1	1-4	3,0
C2	5-9	33,6
C3	10-12	27,0
C4	13-14	16,9
C5	15-27	47,6
C6	28-34	13,4
C7	35-48	32,4
C8	49	50,7

La subfracción C2 fue un sólido amarillento, y la CCF de la subfracción utilizando una mezcla 4:1 hexano-AcOEt, reveló una pequeña estela que llegó cerca del frente del solvente, por lo que se dedujo que se trataba de una mezcla de compuestos no muy compleja, motivo por el cual se decidió realizar una CG/EM a dicha subfracción.

### Separación e identificación de los componentes de la subfracción C2

En la CG/EM realizada a la fracción C2 del extracto alcohólico de las hojas de *M. villosa*, se lograron identificar siete compuestos (tabla 18), siendo los compuestos 8 y 10 reportados con poca probabilidad, por lo que en estos casos no se puede afirmar la identificación de los mismos con seguridad. De la lista de compuestos identificados mediante este análisis, los compuestos más abundantes en la subfracción C<sub>2</sub> resultaron ser la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres mono (2-etilhexílico) y dibutílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, como se muestra en el respectivo cromatograma (figura 28).

Tabla 18. Composición química de la subfracción C2.

Pico	Identificación	RT	% Area	%P
1	-	9,80	2,52	NI
2	6.10.14-trimetil-2-pentadecanona	14,191	23,46	99
3	Ácido hexadecanoico	15,364	9,88	95
4	Éster dibutílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	15,409	24,37	92
5	Ácido octadecanoico	17,218	3,29	95
6	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18,906	11,75	97
7	Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	20,428	17,00	91
8	Ácido 4-metoxiontranílico	22,505	2,67	59
9	Eicosano	22,871	2,97	94
10	9-octil-docosano	23,563	2,09	60

TR: tiempo de retención; %P: porcentaje de probabilidad; Gris: compuestos más abundantes.

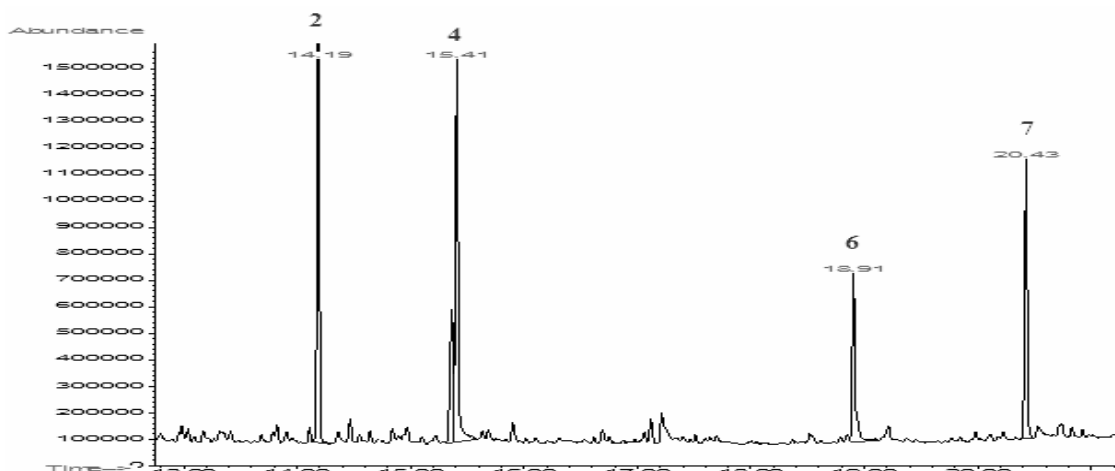


Figura 28. Cromatograma de la subfracción C2 obtenid mediante CC.

La 6.10.14-trimetil-2-pentadecanona, fue identificada anteriormente en la subfracción B1 del mismo extracto, por lo que su espectro de masas fue analizado en dicha sección. Por su parte, el espectro de masas del éster dibutílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (figura 29), mostró, entre otros, los picos correspondientes a una relación  $m/z$  de 223, 149 (pico base), 121, 73 y 57, además de producir un ion molecular  $[M^+]$  a  $m/z$  278, el cual no pudo apreciarse debido a su poca estabilidad. En la figura 30 se muestra el respectivo patrón de fragmentación.

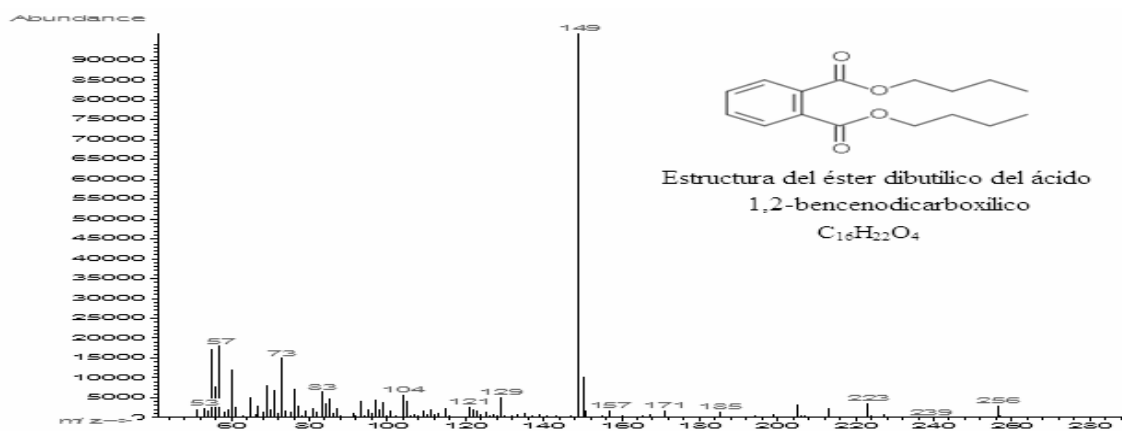


Figura 29. Espectro de masas del pico con TR 15,41 y área 24,37 asignado al éster dibutílico del ácido 1,2- bencenodicarboxílico.

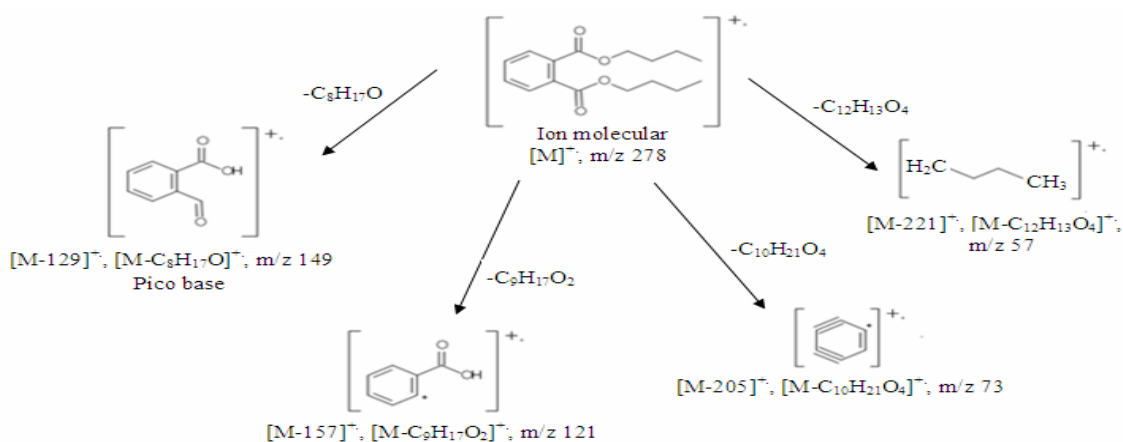


Figura 30. Patrón de fragmentación del éster dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

Según la literatura, uno de los picos importantes en el espectro de masas de las antraquinonas está asociado a la pérdida de monóxido de carbono, originándose la formación del ión bencilo de fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_4$  a  $m/z$  76 (34), por lo que es posible también la formación de un ión parecido al bencilo ( $\text{C}_6\text{H}_2$ ) a un  $m/z$  73 a partir de la estructura del ácido benzoico.

El espectro de masas del 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido (figura 31), produjo un ión molecular  $[M^+]$  a una relación  $m/z$  324 correspondiente a la masa de dicho compuesto de fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$ ; sin embargo, la apreciación del mismo fue baja debido a su poca estabilidad. De igual forma, se observaron pequeños picos a una relación de  $m/z$  254 y 184, y los picos de los fragmentos más abundantes fueron observados a una relación de  $m/z$  114, 99 (pico base), 83, 69 y 55. En la figura 32 se puede observar el patrón de fragmentación.

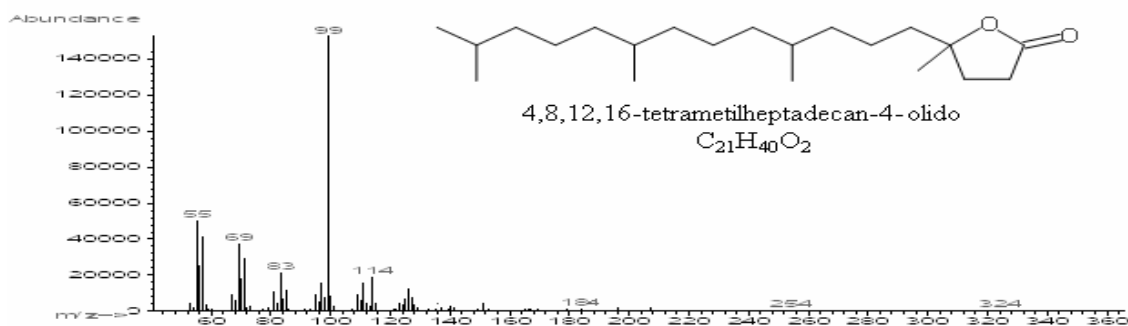


Figura 31. Espectro de masas del pico con TR 18,91 y área 11,75 asignado la 4,8,12,16-tetrametil-4-olido.

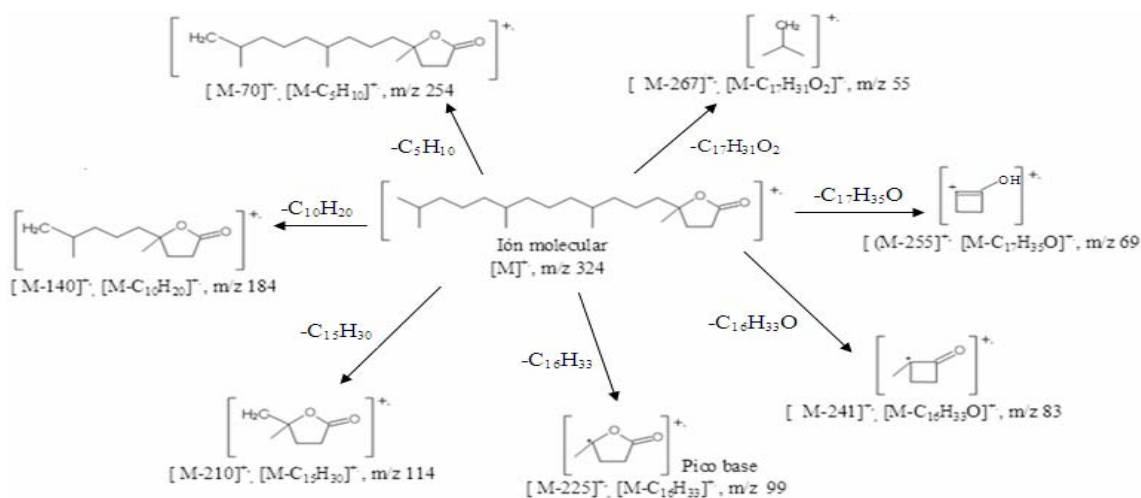


Figura 32. Patrón de fragmentación de la 4,8,12,16-tetrametil-4-olido.

Por su parte, en el espectro de masas del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (figura 33), se produjo un ion molecular [M<sup>+</sup>] a m/z 278, observándose en su lugar el ión [M + H]<sup>+</sup> a m/z 279, siendo este el indicio de la presencia de un isótopo de <sup>2</sup>H en la molécula de dicho compuesto. De igual manera, se logró observar las señales correspondientes a los fragmentos más abundantes a una relación m/z 167, 149 (pico base), 113, 71 y 57 respectivamente. Estos fragmentos son los que pueden observarse en la figura 34.

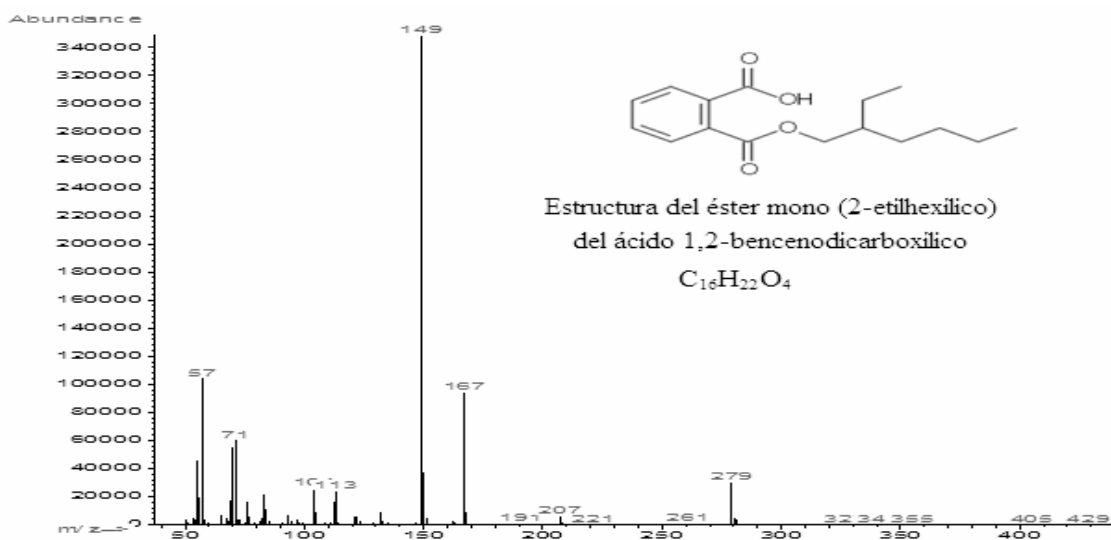


Figura 33. Espectro de masas del pico con TR 19,56 con área 87,33 asignado al éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico.

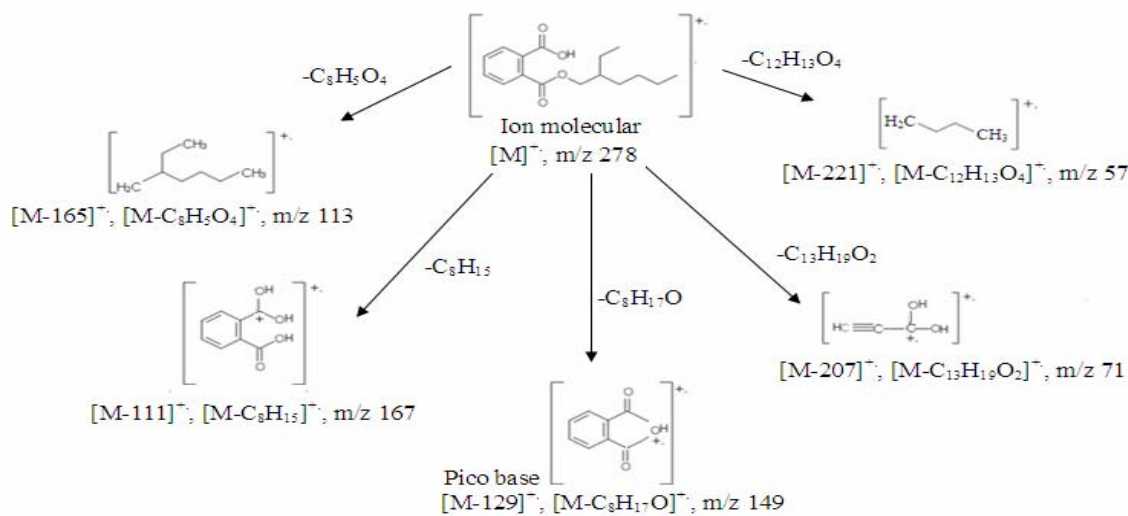


Figura 34. Patrón de fragmentación del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico.

Se ha reportado en la literatura el aislamiento de algunos ftalatos como metabolitos secundarios, como por ejemplo el dibutil ftalato o éster dibutilico del ácido 1,2-benzenedicarboxílico aislado de *Mimusops elengi* (45), por su parte, el análisis del contenido de la abundancia natural de  $^{14}\text{C}$  en el dibutil ftalato (DBP) de dos algas



pardas comestibles, *Undaria pinnatifida* y *Laminaria japonica*, y un alga verde, *Ulva* sp, reveló que el PAD se produce de forma natural. La proporción natural del contenido de 14C de di-(2-etilhexil) ftalato obtenidos de las algas estaba entre un 50-80% (46).

El di-(2-ethylhexil) ftalato o éster di-2-etilhexílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico fue aislado de *Calotropis gigantea* (Linn) de la familia Asclepiadaceae, mostrando actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Sarcina lutea*, y cepas Gram negativas como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* y *Shigella dysenteriae*. Aunque este compuesto es un conocido plastificante, se ha reportado su presencia en distintas plantas como *Aloe vera*, *Euphorbia cyparissias* y *Seguieriana euphorbia*, por lo que debe tener alguna importancia taxonómica (47).

También se ha reportado en la literatura que el aceite esencial de *Leea indica* (Burm.f.) mostró actividad antibacterial contra tres cepas Gram positivas, dos Gram negativas y tres cepas de hongos patógenos, siendo aproximadamente el 95% de los compuestos de este aceite, ésteres del ácido ftálico tales como el di-isobutil ftalato, di-n- butil ftalato, n-butylisobutil ftalato y butylisohexil ftalato, por lo que es probable que parte de la actividad biológica mostrada por algunas plantas que contienen ftalatos pueda deberse a la presencia de los mismos(48).

#### **Separación e identificación de los componentes de la subfracción D4**

Al realizar la CG/EM de la subfracción D4 (figura 35), se separaron 77 compuestos a distintos tiempos de retención, de los cuales solo se lograron identificar dos de ellos, el (2-hidroxietil-succinimida) (figura 36) a un tiempo de retención de 7,93 y el ácido hexadecanoico a un tiempo de retención de 14,45; encontrándose dichos compuestos en baja abundancia (tabla 19). El resto de los compuestos, inclusive el compuesto de mayor abundancia, no pudieron ser identificados por lo que se supone que se trata de compuestos que no han sido aun incluidos en la base de datos del equipo de CG/EM.

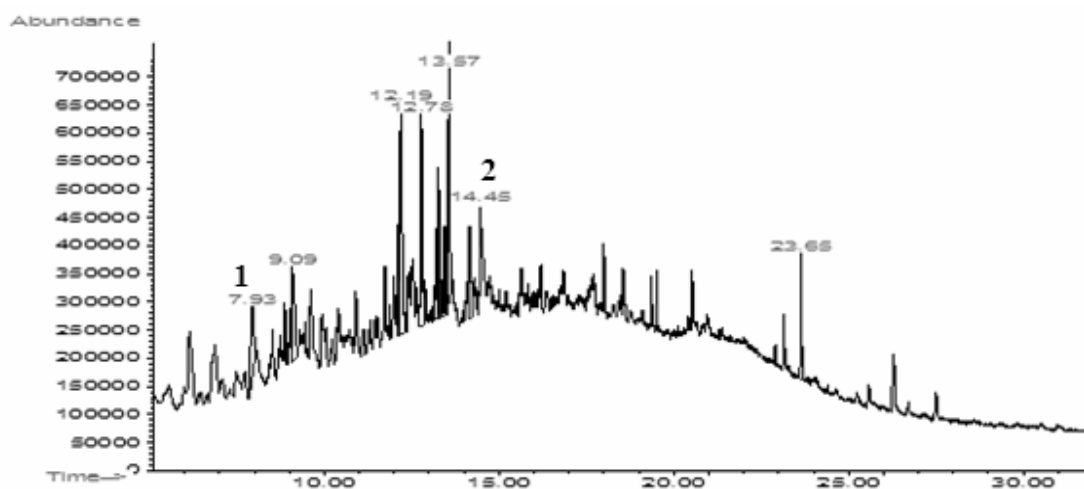


Figura 35. Cromatograma de la separación de la subfracción D4 obtenido mediante CG/EM.

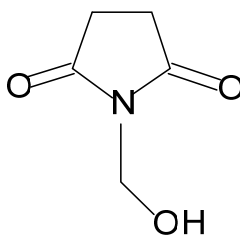


Figura 36. Estructura de la N-[2-hidroxietyl] succinimida.

Tabla 19. Composición química de la subfracción D4.

Pico	Identificación	RT	% Area	%P
1	2-hidroxietyl-succinimida	7,93	2,73	90
2	Ácido hexadecanoico	14,45	1,76	99

TR: tiempo de retención, %: porcentaje de probabilidad.

De igual manera que las subfracciones B1, C2 y D4, la subfracción C4 proveniente del EALH fue sometida a un análisis de CG/EM (figura 37), separándose 24 compuestos, de los cuales se logró identificar la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona a un tiempo de retención de 14,19 con un 91%, el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido a un tiempo de

retención de 18,91 con una probabilidad de 97%, los ésteres dibutílico (90%) y mono (2-ethylhexílico) del ácido 1,2- bencenodicarboxílico (91%) a tiempos de retención de 15,40 y 20,43 respectivamente, el ácido tetradecanoico a un tiempo de retención de 15,36 con una probabilidad de 93%, y los alcanos como el octacosano (93%), nonacosano (95%) y octadecano (97%) a tiempos de 22,19; 22,87 y 23,56 respectivamente; así como también se identificó el 1-clorofosfato-2-propanol con 90% de probabilidad a un tiempo de 13,84 y el 2,6,6-trimetil-(1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-bicicloheptano a un tiempo de retención de 14,12 con una probabilidad de 91%. Los otros 14 compuestos separados, entre los cuales se cuenta el de mayor abundancia en la fracción, no fueron reportados puesto que no lograron ser identificados. Esto pudo deberse a que posiblemente se trate de compuestos desconocidos para la base de datos utilizada.

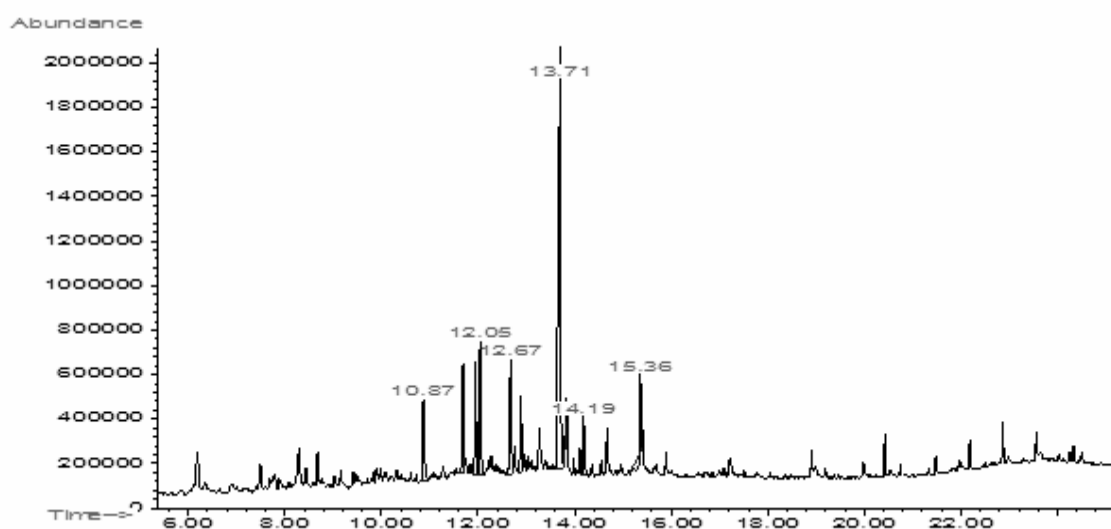


Figura 37. Cromatograma de la subfracción C4 obtenido mediante CG/EM.

Por su parte, en el análisis de CG/EM realizado a la subfracción A6 del EALH de *M. villosa* (figura 38), pudo también identificarse la presencia de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona a un tiempo de retención de 14,19 y con un porcentaje de abundancia de 99%, los ácidos hexadecanoico (95% de probabilidad) y octadecanoico (96% de probabilidad) a un tiempo de retención de 15,37 y 17,21 respectivamente, los ésteres dibutílico y mono (2-ethylhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico con un 91% de probabilidad para ambos ésteres con tiempos de retención de 15,40 y 20,42

respectivamente, y finalmente el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido con una probabilidad de 98% a un tiempo de retención de 18,91. Los compuestos separados a tiempo de retención de 7,23, 7,59 y 12,96 no lograron ser identificados, puesto que la probabilidad fue inferior al 50%.

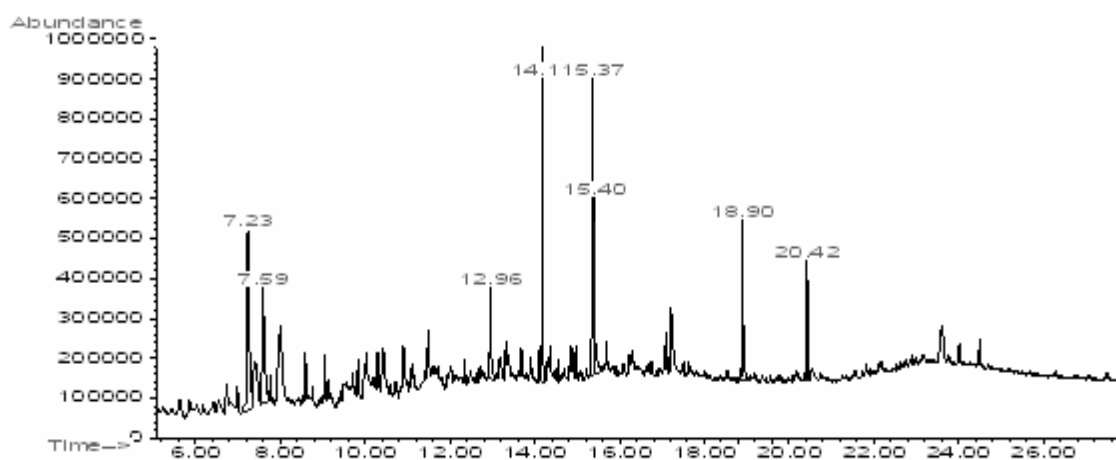


Figura 38. Cromatograma de la separación de la subfracción A6 obtenido mediante CG/EM.

### **Fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico del tallo (EALT) de *M. villosa*.**

El EALT de esta especie, presentó una muy buena actividad letal ( $CL_{50}$  de 10,00 ppm), además de detectarse la presencia de varios núcleos secundarios como esteroides, triterpenos, flavonoides y fenilpropanoides, siendo este uno de los extractos de los cuales se obtuvo una mayor masa de materia orgánica, por lo que se decidió realizar su fraccionamiento.

Se fraccionaron 1,2 g de EALT (figura 39) utilizando una columna cromatográfica de 35 cm de altura, con un diámetro de 2,4 cm, rellena con sílica gel de diámetro 5-70 mesh (0,2-0,5 mm) como fase estacionaria, en una relación extracto-sílica de 1:60, y como fase móvil solventes como hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y las

respectivas mezclas de los mismos variando la polaridad en orden creciente (tabla 20).

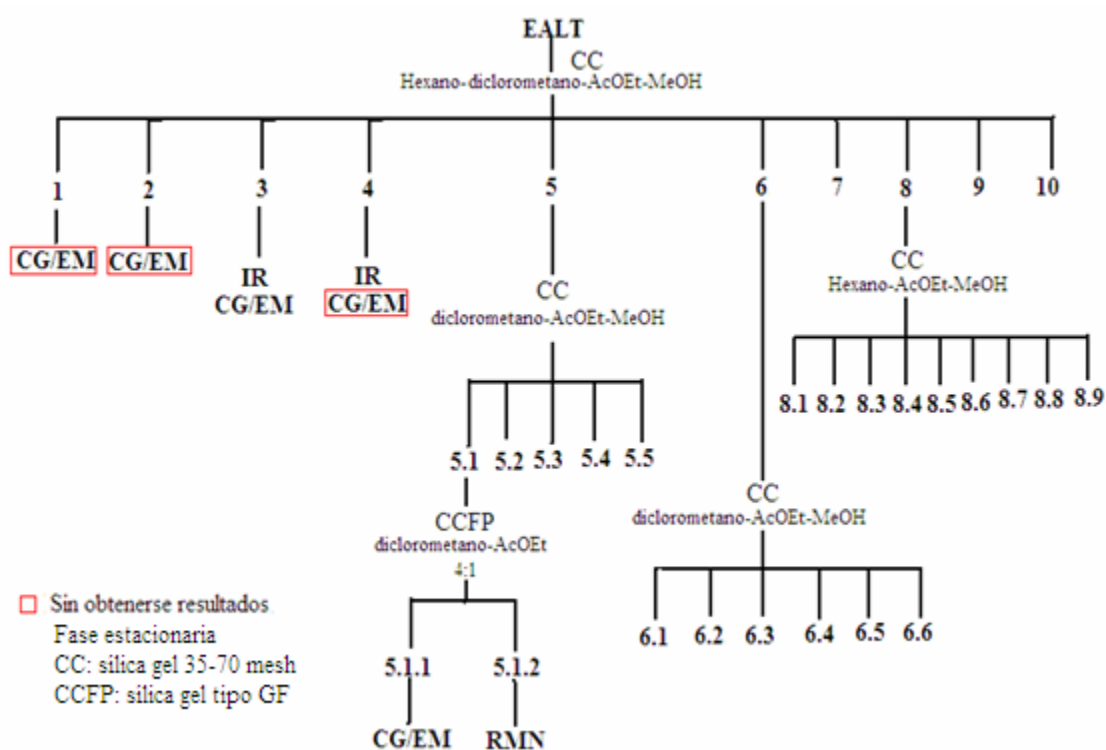


Figura 39. Fraccionamiento del EALT de la planta *M. villosa*. Se utilizó CC por gravedad.

Tabla 20. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico del tallo (EALT).

Eluyente	Eluatos	% V/V
Hexano-diclorometano	1-8	20:80
Hexano-diclorometano	9-12	40:60
diclorometano	13-19	100
Diclorometano-AcOEt	20-28	50:50
AcOEt	29-33	100
AcOEt-MeOH	34-42	50:50
MeOH	43-48	100

Se recogió un total de 49 eluatos de 50 ml cada uno, los cuales fueron juntados de acuerdo a los  $R_f$  observados, haciendo uso de la CCF, y agentes reveladores como la luz UV y molibdato de amonio, obteniéndose un total de 10 fracciones (tabla 21). El total de materia orgánica recuperada fue de 923,3 mg, obteniéndose de esta manera un 76,94% de rendimiento en la columna, por lo que se puede decir que se obtuvo un buen rendimiento para tal fraccionamiento.

Tabla 21. Fracciones obtenidas de la CC del extracto alcohólico del tallo de *M. villosa*.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)
1	1-8	14,7
2	9-12	11,7
3	13-19	37,4
4	20-22	11,6
5	23-24	112,0
6	25-33	26,3
7	34-37	15,4
8	38-41	545,0
9	42-44	120,0
10	45-47	29,1

### **Actividad antifúngica de algunas fracciones provenientes del EALT**

La fracción 9 proveniente del extracto alcohólico del tallo, ejerció una mayor actividad contra la cepa de *Fusarium poae* en comparación con dicho extracto (apéndice, tabla A2). Este hecho puede atribuirse a un posible efecto antagónico o al efecto de concentración. En el efecto antagónico los compuestos presentes en las fracciones mencionadas al estar mezclados con los otros componentes del mismo extracto, se encuentran enmascarados y de esta manera muestran una actividad muy baja, la cual si se exhibe al separar dichos compuestos. Por su parte, también puede darse el caso de que los compuestos activos al encontrarse menos concentrados en el extracto crudo

disminuyen su actividad, y al concentrarse en una fracción se observa la potenciación de su efecto, siendo en este caso un efecto de concentración.

### **Letalidad de algunas fracciones provenientes del EALT**

Al ensayar algunas fracciones obtenidas del extracto alcohólico del tallo, se encontró que la fracción 8 del mismo ejerció una actividad letal muy elevada; con una  $CL_{50}$  de 2,48 (apéndice, tabla A3), lo que quiere decir que en esta fracción se encuentra concentrada una cantidad de compuestos que posiblemente poseen propiedades promisorias para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas. En vista de esto y de la cantidad de masa obtenida de la misma, se decidió realizar su fraccionamiento, sin embargo lamentablemente dicha fracción no pudo estudiarse a mayor profundidad puesto que el proceso de fraccionamiento no fue satisfactorio.

### **Análisis de IR de la fracción 3**

El espectro de IR de la fracción 3 del extracto alcohólico del tallo (EALT) de *M. villosa* mostró las bandas asignadas al stretching característico de los enlaces C-H alifáticos en la región comprendida entre los 3019 y 2854  $cm^{-1}$ , a los 1719  $cm^{-1}$  se observó una banda asignada al estiramiento sufrido por el enlace carbonílico C=O, a los 1215  $cm^{-1}$  mostró también la banda correspondiente a las vibraciones del enlace C-O del grupo éster, y una banda bastante intensa asignada a los estiramientos de los enlaces  $CH_2$  de una cadena alifática a los 758  $cm^{-1}$  (figura 40).

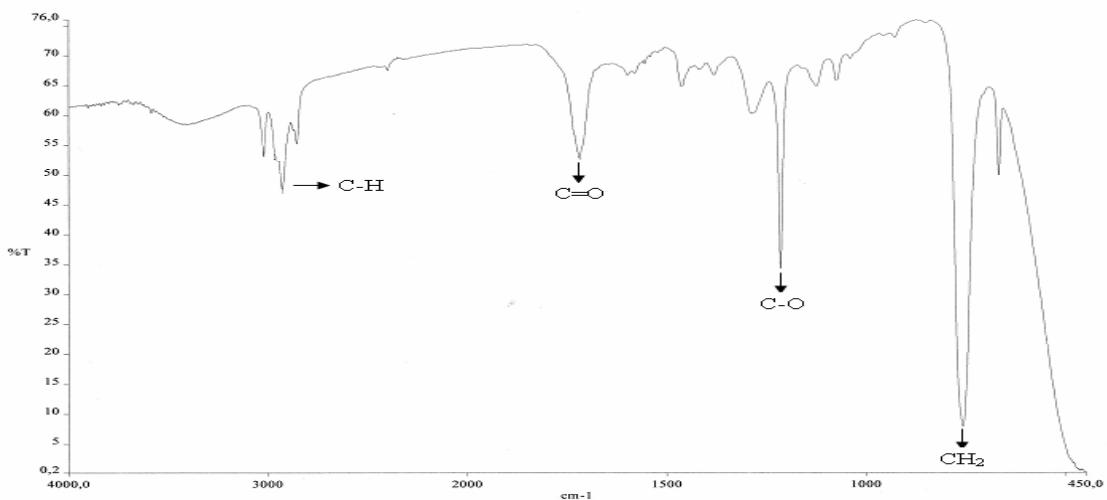


Figura 40. Espectro IR de la fracción 3.

### Análisis de CG/EM de la fracción 3

La fracción 3 fue un sólido, de color naranja muy opaco, siendo esta una de las fracciones más limpias, lo cual sugirió una posible mezcla de compuestos poco contaminada, por lo cual se decidió realizar un análisis de CG/EM cuyo cromatograma se muestra en la figura 41.

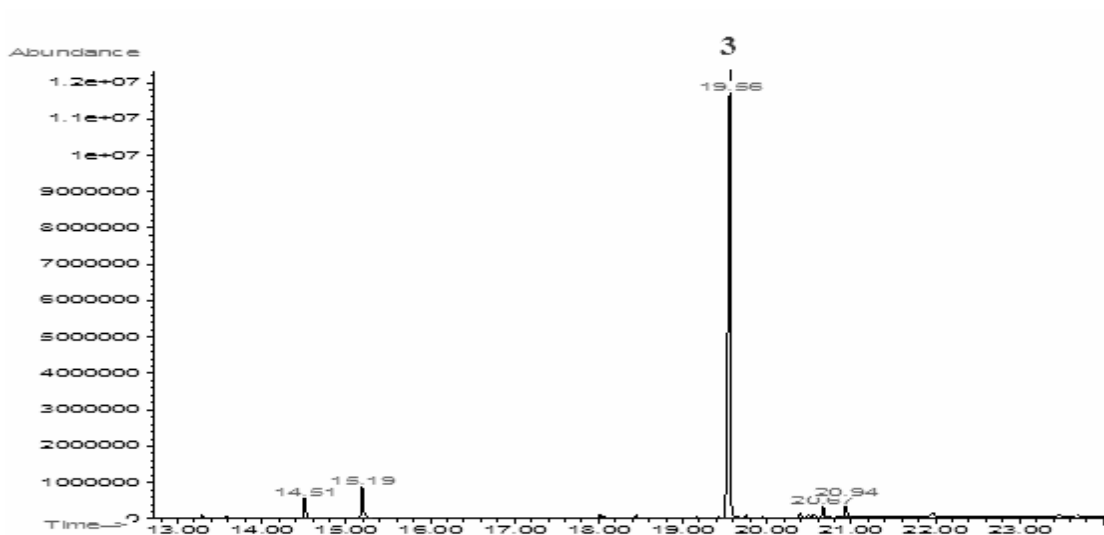


Figura 41. Cromatograma de la separación de los componentes de la fracción 3 obtenido mediante CG/EM.

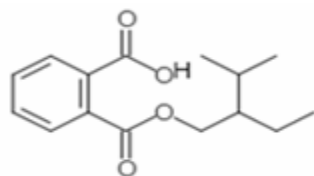


Se pudo observar, que de los 4 compuestos separados, el éster diisocilico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico fue el componente mayoritario en dicha fracción, encontrándose los ésteres 2-metilpropil-butílico y metílico butílico del mismo ácido en poca cantidad (tabla 22). En la figura 42 se muestran las estructuras de los dos últimos.

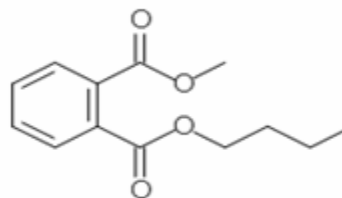
Tabla 22. Composición química de la fracción 3.

Pico	Identificación	RT	%Area	%P
1	Éster-2-metilpropil-butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.	14,508	3,78	95
2	Éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	15,194	8,87	87
3	Éster diisocilico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	19,559	87,33	91
4	-	20,936	3,02	NI

TR: tiempo de retención, NI: no identificado, %P: porcentaje de probabilidad, Gris: compuesto más abundante.



Estructura del éster metilpropílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.



Estructura del éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico

Figura 42. Estructura de algunos compuestos identificados en la fracción 3 del EALT.

El espectro de masas del éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (figura 43) produjo un ion molecular a una relación m/z de 390 el cual fue poco observable, por lo que se asume que se trata de un ion poco estable. También, se lograron observar las señales correspondientes a m/z 279, 167, 149 y 57, cuyos fragmentos pueden apreciarse en la figura 44.

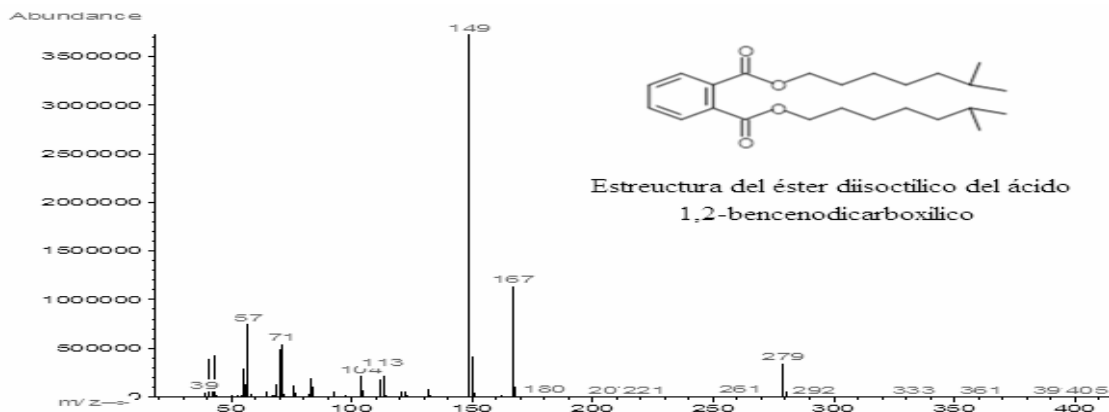


Figura 43. Espectro de masas del pico con TR 19,56 y area 87,33 asignado al éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (ver pico 3, fig.39).

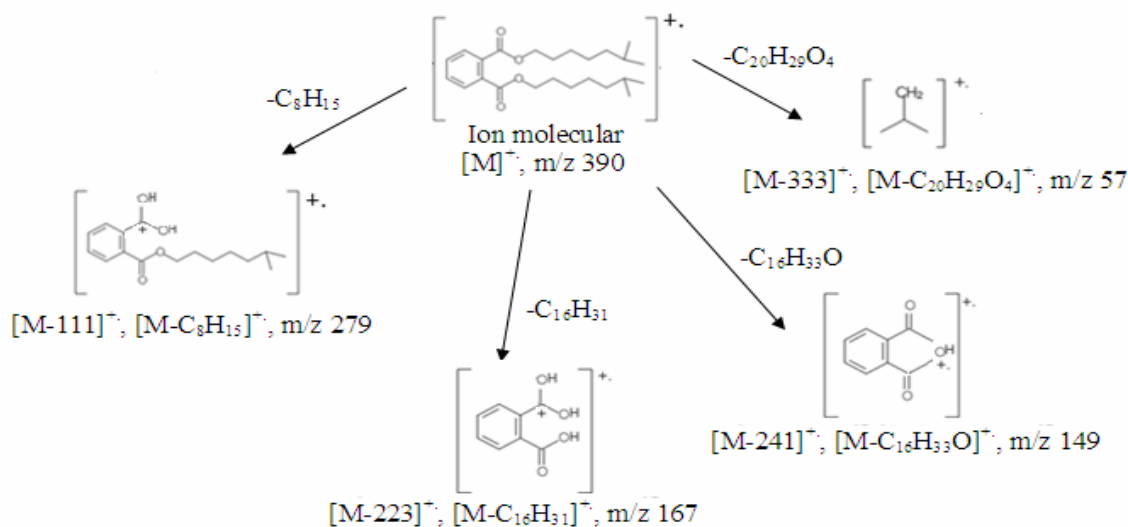


Figura 44. Patrón de fragmentación del éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

El di-n-octil ftalato fue reportado como metabolito secundario en los extractos etanólicos de la planta *Mallotus tetraococcus*, así como también se aisló el ácido 1,2-bencenodicarboxílico y el éster di-(2-etilhexílico) del mismo ácido en dicha planta (49).

Los dialquil ftalatos, como di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), diisononilo (DINP), diisodécilo ftalato (DIDP) y ftalato de dibutilo (DBP), son los petroquímicos utilizados como plastificantes o disolventes en una variedad de productos industriales. Estos productos químicos han sido considerados como contaminantes del medio ambiente y se detecta en suelos, sedimentos, aguas terrestres y marinas, y también los organismos vivos. El DEHP se ha aislado de los organismos terrestres y marinos, incluyendo las plantas, las algas marinas, caldos de cultivo, y de hongos y bacterias, sin embargo, es difícil determinar si el DEHP fue producido por estos organismos, o de la contaminación de la muestra durante el proceso de separación, o bien puede ser que el DEHP se encuentra acumulado en el organismo (46).

#### **Análisis de la fracción 4**

Al realizar el análisis de IR de la fracción 4, se evidenció en dicho espectro la señal correspondiente al bending del enlace O-H a los  $3350\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, entre los  $2900$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  la señal correspondiente a las vibraciones de los enlaces C-H; la banda característica de las vibraciones del grupo carbonilo C=O a  $1650\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente y una banda asignada a los estiramientos propios de los grupos  $\text{CH}_2$  alifáticos aproximadamente a  $700\text{ cm}^{-1}$  (figura 45). Esto es indicio de que dicha fracción puede tener compuestos carbonílicos e hidroxílicos.

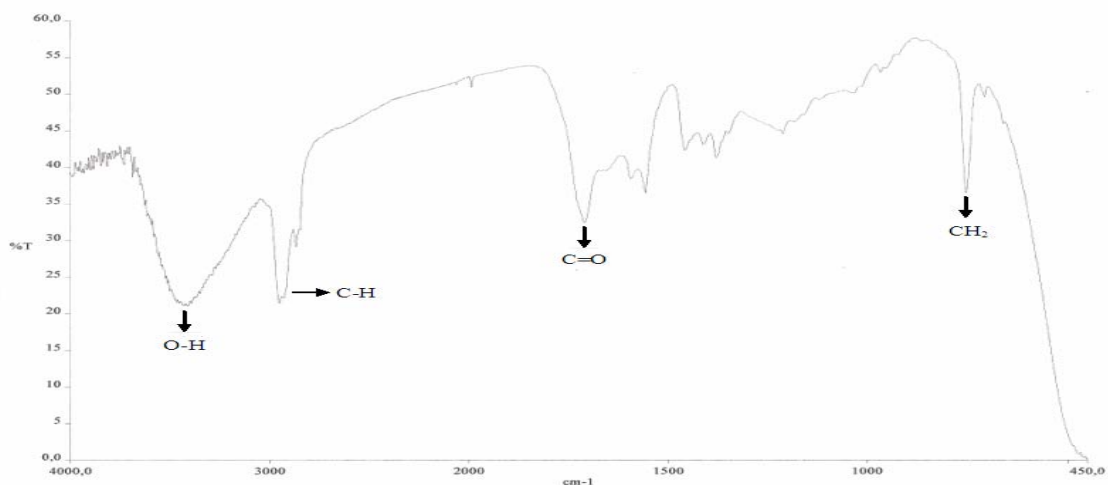


Figura 45. Espectro IR de la fracción 4.

### Subfraccionamiento de la fracción 5

Por ser una de las fracciones con mayor masa, se tomó la fracción 5 para ser subfraccionada, haciendo uso de una columna cromatográfica de 22 cm de altura, con un diámetro de 0,5 cm, separándose así 73,3 mg de la misma en una relación 1:30 fracción-silica. Se recogieron 15 eluatos de 25 ml cada uno (tabla 23).

Tabla 23. Sistema de solventes empleado en el subfraccionamiento de la fracción 5.

Eluyente	Eluatos	% V/V
Diclorometano	1-4	100
Diclorometano-AcOEt	5-7	75:25
Diclorometano-AcOEt	8-10	50:50
Diclorometano-AcOEt	11-12	20:80
AcOEt	13-14	100
AcOEt-MeOH	15	50:50

Se colectaron eluatos de 25 ml c/u.

Los provenientes de la CC de la fracción 5 del EALT fueron agrupados en 5 subfracciones según la metodología antes descrita (tabla 24), recuperandos un total de 68,7 mg de materia orgánica, con un rendimiento de 93,72 %.

Tabla 24. Subfracciones obtenidas de la CC de la fracción 5.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)
5.1	1-2	25,8
5.2	3-4	4,4
5.3	5-8	24,2
5.4	9-14	9,2
5.5	15	5,1

Cabe destacar que al realizar la CCF con una mezcla 4:1 diclorometano-AcOEt, en los eluatos 1 y 2 se observaron dos manchas, una que corrió hasta el frente del solvente, la cual pudo tratarse de una mezcla poco compleja de compuestos que no lograron separarse, y otra mancha de un presunto compuesto aislado con un  $R_f$  de 0,83, por lo que dichos eluatos fueron juntados en una subfracción (subfracción 5.1). Luego del combinado, se le realizó una CCF a la fracción 5.1 utilizándose la misma mezcla de solventes para la elución de sus respectivos eluatos constituyentes, observándose así el mismo comportamiento, por lo que se decidió tratar dicha subfracción con una CCFP, para tratar de aislar el compuesto puro.

#### **Fraccionamiento de la subfracción 5.1 mediante CCFP**

Se disolvieron los 25,8 mg de la subfracción 5.1 en una mínima cantidad de diclorometano, y luego esta solución fue extraída del vial donde se encontraba, utilizando una pipeta Pasteur con un algodón en la punta, provista de un bulbo para succionar el líquido. Esta solución fue colocada haciendo una franja sobre el borde inferior de una placa de 1,0 mm de espesor, la cual posteriormente fue eluida con la mezcla diclorometano-AcOEt 4:1. Seguidamente, se desprendió la banda arrastrada hasta el frente del solvente, así como también se desprendió la banda correspondiente al compuesto de  $R_f$  0,83, y ambas bandas fueron colocadas en remojo en un beaker con diclorometano durante 3 horas aproximadamente, para luego ser filtrada y recogida en

un vial pesado en donde se dejó evaporar el solvente hasta sequedad.

Luego de evaporado todo el solvente, se tomó la masa de cada subfracción (tabla 25), y se decidió realizar una CG/EM a la subfracción 5.1.1 (banda que se fue con el solvente), y un análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  al compuesto aislado (subfracción 5.1.2).

Tabla 25. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la subfracción 5.1.

Subfraccion	R <sub>f</sub>	Masa (mg)
5.1.1	1	4,0 mg
5.1.2	0,83	4,3 mg

Se utilizó sílica gel tipo GF en placas de 1,0 mm de espesor, y una mezcla diclorometano-AcOEt 4:1 como fase móvil.

### Análisis de CG/EM de la subfracción 5.1.1

Al realizar el análisis de CG/EM a la subfracción 5.1.1, se lograron identificar 5 compuestos presentes en distinta cantidad (tabla 26), de los cuales 3 de ellos se encontraron en mayor abundancia mientras que los otros dos fueron menos abundantes.

Tabla 26. Composición química de la subfracción 5.1.1.

Pico	Identificación	TR	Area	%
1	6.10.14-trimetil-2-pentadecanona	14,190	9,07	99
2	Ester metílico del ácido hexadecanoico	14,980	3,63	97
3	Ácido hexadecanoico	15,398	50,72	78
4	Ester etílico del ácido hexadecanoico	15,638	4,47	96
5	Ester mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	20,427	32,11	91

TR: tiempo de retención, Gris: compuestos más abundantes

En la figura 46 se muestra el cromatograma de la separación de la subfracción 5.1.1. Los compuestos más abundantes fueron la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, resultando el ácido tetradecanoico con una probabilidad del 78%; sin embargo, el espectro de masas de este último corresponde al ácido hexadecanoico, con un ion molecular de 256 que corresponde con la masa molecular del mismo (figura 14), por lo que es evidente que el compuesto separado al tiempo de retención de 15,398 con un área de 50,72 es el ácido hexadecanoico (abundancia de 50,72%).

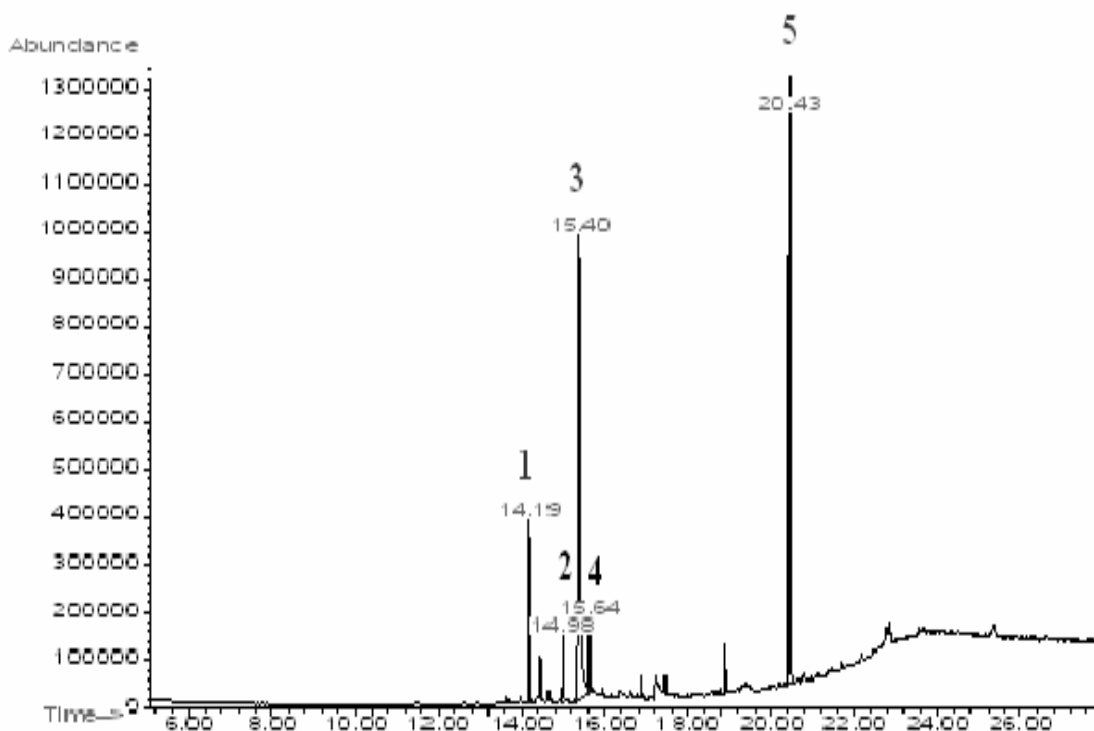


Figura 46. Cromatograma del fraccionamiento de la subfracción 5.1.1 obtenido mediante CG/EM.

Cabe destacar, que los tres compuestos antes mencionados, fueron también identificados y analizados previamente en la subfracción B1 del extracto alcohólico de las hojas

(EALH) de *M. villosa*. Por su parte, los compuestos de menor abundancia identificados en la subfracción 5.1.1 fueron los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico.

El espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (figura 47), muestra un pico a  $m/z$  270 correspondiente al ión molecular de dicho éster, de fórmula molecular  $C_{17}H_{34}O_2$ , un pico base a  $m/z$  74 y los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes a  $m/z$  227, 143, 87 y 55 respectivamente. En la figura 48 se muestra el patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.

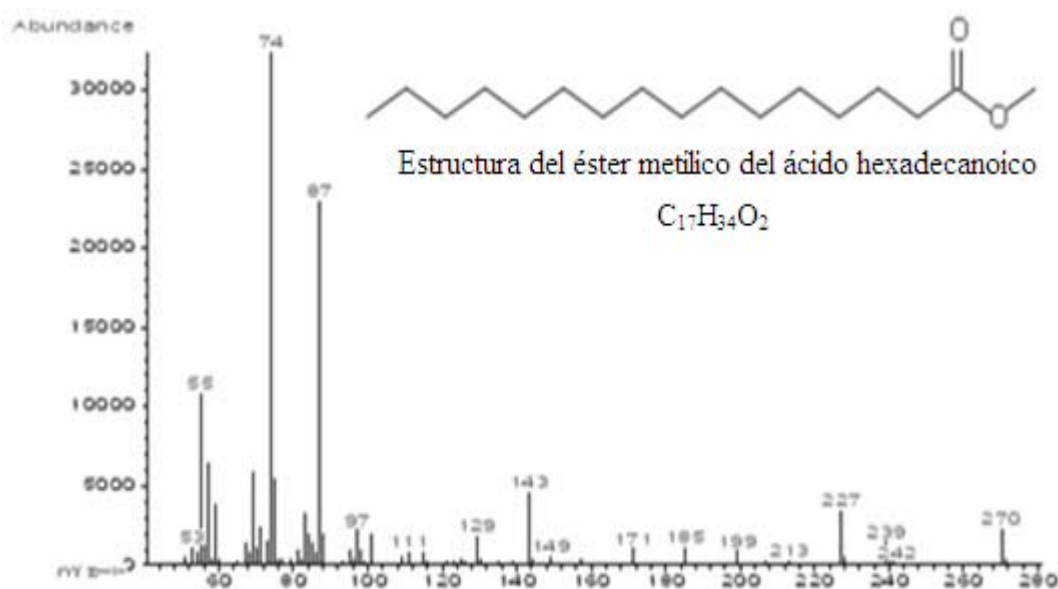


Figura 47. Espectro de masas del pico con TR 14,98 y área 3,63 asignado éster metílico del ácido hexadecanoico.



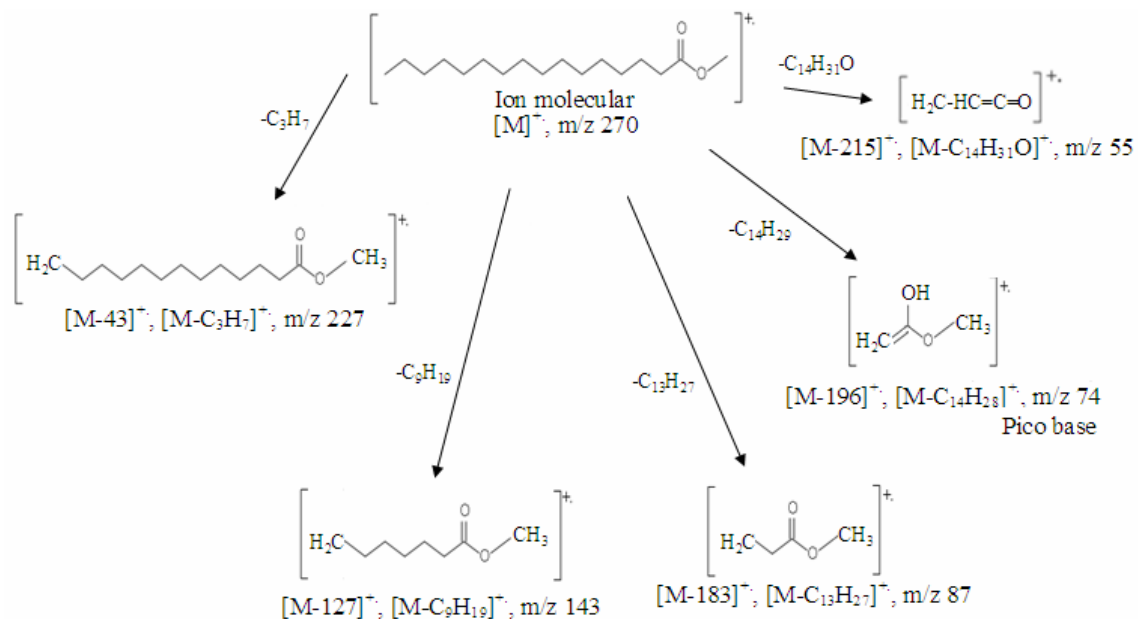


Figura 48. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.

Por su parte, el espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico (figura 49), muestra el pico propio del ión molecular correspondiente a la fórmula de dicho compuesto ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) a  $m/z$  284; un pico base a  $m/z$  88, observándose también los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes a  $m/z$  241, 157, 101, 73 y 55; cuyo patrón de fragmentación se muestra en la figura 50.



Figura 49. Espectro de masas del pico con TR 15,64 y área 4,47 asignado al éster etílico del ácido hexadecanoico.

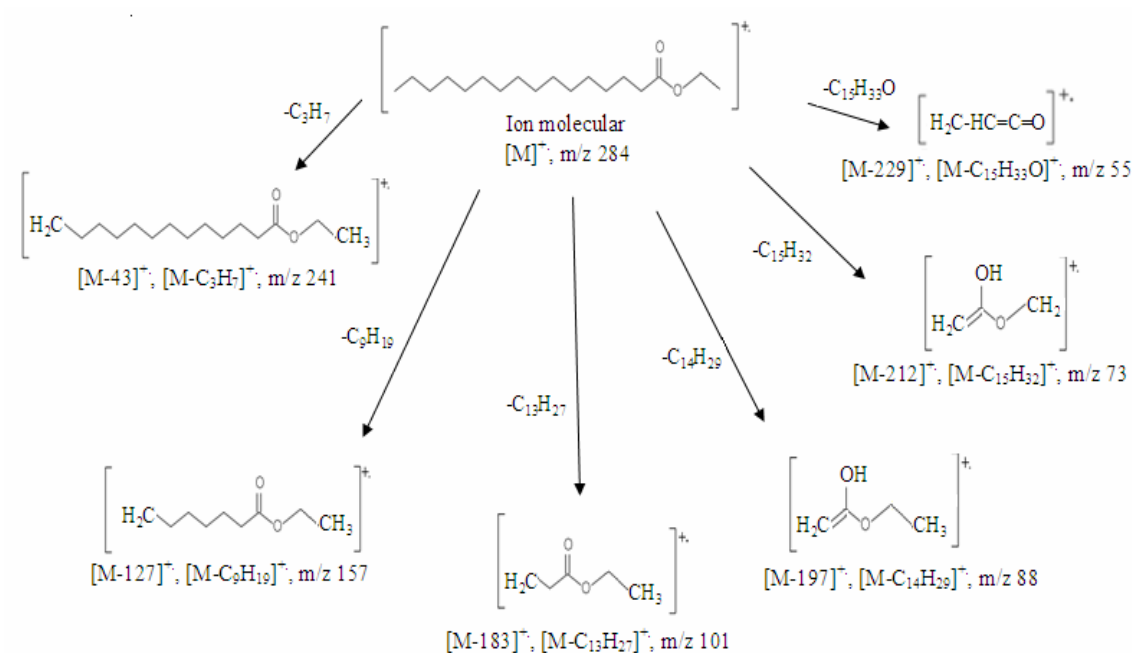


Figura 50. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido hexadecanoico.

Todos los ésteres metílicos de ácidos carboxílicos saturados, poseen un espectro de masas muy similar y su pico base se muestra siempre a un  $m/z$  74, el cual corresponde a la formación del ión  $CH_2=OH-OCH_3$ , siendo éste el fragmento de mayor estabilidad en este tipo de compuestos. En caso de un rearrreglo de un hidrógeno en la molécula del éster metílico, es posible observar este pico a  $m/z$  75 ó 73 (37). Cabe destacar que los ésteres de ácidos carboxílicos también sufren transposición de McLafferty (figura 51), cuyo rearrreglo es el responsable del pico base observado a una relación  $m/z$  74 en el éster metílico y a  $m/z$  87 en el éster etílico del ácido hexadecanoico.

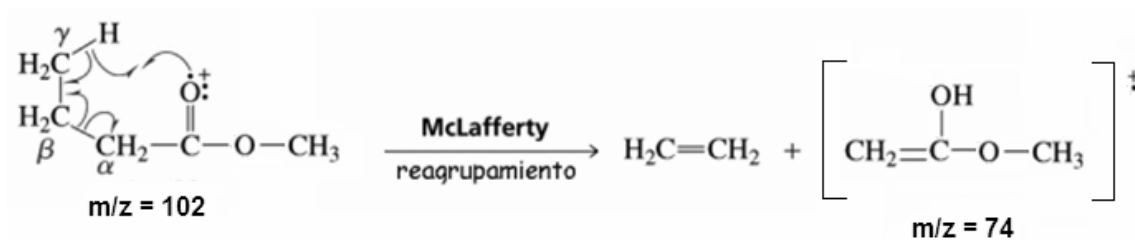


Figura 51. Mecanismo de transposición de McLafferty para un éster metílico.

### Analisis de RMN de la subfracción 5.1.2

En la figura 52 se observa el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción 5.1.2.

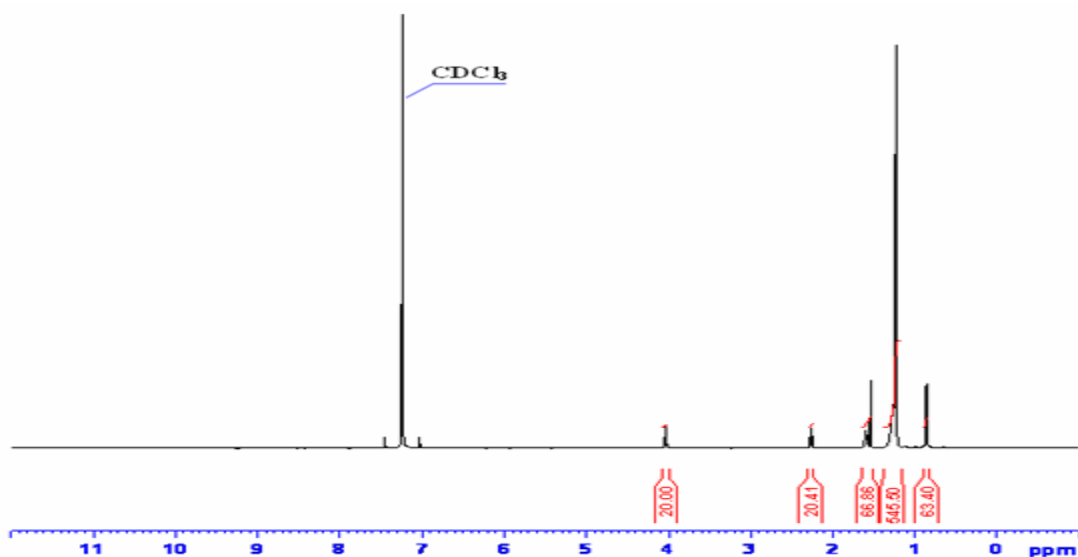


Figura 52. RMN de  $^1\text{H}$  de la subfracción 5.1.2.

Al realizar el análisis de RMN  $^1\text{H}$  de esta subfracción, se observaron cinco señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en el compuesto estudiado, así como también se observó la señal correspondiente al solvente. Por su parte, en la ampliación del RMN  $^1\text{H}$  de esta subfracción, se puede apreciar con una mayor claridad el tipo de señal mostrada por el espectro, facilitando de esta manera la asignación correspondiente a cada tipo de protón (figura 53). A un desplazamiento  $\delta_{\text{H}}$  de 0,83 ppm se observó un triplete correspondiente al acoplamiento de los protones del grupo metilo  $\text{CH}_3$  terminal ( $\text{H}_{11}$  y  $\text{H}_{22}$ ), un multiplete muy intenso a un  $\delta_{\text{H}}$  de 1,27 ppm, asignado a los metilenos de la zona alifática ( $\text{H}_4\text{-H}_{20}$  y  $\text{H}_{13}\text{-H}_{21}$ ), a los 1,57 ppm un multiplete correspondiente al protón metilénico  $\text{H}_3$  de la molécula, un triplete al  $\delta_{\text{H}}$  2,27 ppm, asignado al protón metilénico adyacente al grupo carbonilo ( $\text{H}_2$ ) y finalmente un triplete correspondiente a un protón metilénico adyacente a un oxígeno ( $\text{H}_{12}$ ) a un desplazamiento químico de 4,03 ppm (tabla 27).

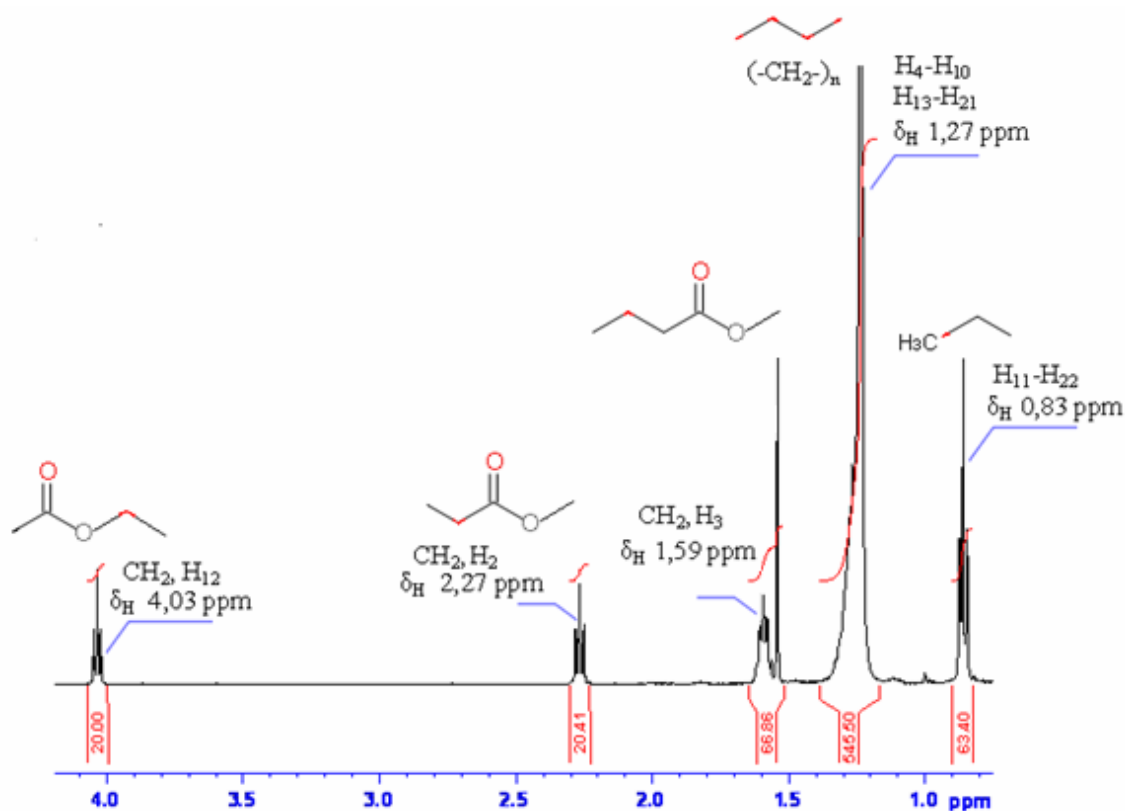


Figura 53. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción 5.1.2.

Tabla 27. Desplazamientos químicos  $\delta_{\text{H}}$  del espectro RMN de  $^1\text{H}$  de la subfracción 5.1.2.

Posición	Multiplicidad	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Asignación
$\text{H}_{11}, \text{H}_{22}$	Triplete ( <i>t</i> )	0,83	$-\text{CH}_3$
$\text{H}_4\text{-H}_{10}$ y $\text{H}_{13}\text{-H}_{21}$	Multiplete ( <i>m</i> )	1,27	$(-\text{CH}_2\text{-})_n$
$\text{H}_3$	Multiplete ( <i>m</i> )	1,59	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-}$
$\text{H}_2$	Triplete ( <i>t</i> )	2,27	$-\text{CH}_2\text{-COO-}$
$\text{H}_{12}$	Triplete ( <i>t</i> )	4,03	$-\text{COO-CH}_2\text{-}$
-	Singlete ( <i>s</i> )	7,3	$\text{CHCl}_3$

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de este compuesto (figura 54), muestra una señal a un  $\delta_{\text{C}}$  de 17 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos metílicos terminales de la molécula ( $\text{C}_{11}$  y  $\text{C}_{22}$ ), una señal a los 23 ppm asignada a los carbonos metilénicos adyacentes a los

metilos terminales ( $C_{10}$  y  $C_{21}$ ); un pico muy intenso correspondiente a los carbonos metilénicos de la zona alifática de la molécula a un desplazamiento químico  $\delta_C$  de 30 ppm, una señal a un  $\delta_C$  de 32 ppm asignada a los carbonos metilénicos  $C_9$  y  $C_{20}$  del compuesto; otra señal a los 35 ppm, correspondiente al carbono metilénico adyacente al grupo carbonilo ( $C_2$ ); un desplazamiento químico a  $\delta_C$  de 65 ppm asignado al carbono metilénico adyacente al oxígeno del grupo éster ( $C_{12}$ ); así como también, se evidenció a campo bajo la señal correspondiente al carbono carbonílico de la molécula ( $C_1$ ) (tabla 28).

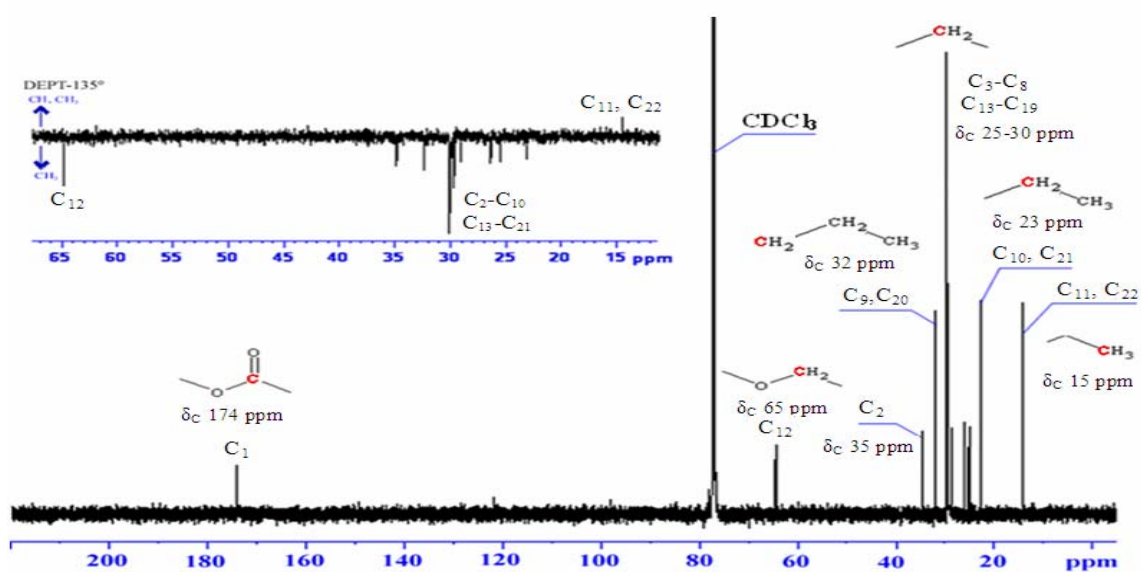


Figura 54. RMN de  $^{13}\text{C}$  incluyendo DEPT-135 de la subfracción 5.1.2.

Tabla 28. Desplazamientos químicos  $\delta_C$  del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción 5.1.2.

Posición	$\delta_C$ (ppm)	Tipo de carbono
$C_{11}, C_{22}$	15	$-\underline{\text{C}}\text{H}_3$
$C_{10}, C_{21}$	23	$\text{CH}_3-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$
$C_3-C_8$ y $C_{13}-C_{19}$	30	$(-\underline{\text{C}}\text{H}_2-)^{10}$
$C_9, C_{20}$	32	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$
$C_2$	35	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}-$
$C_{12}$	65	$-\text{COO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$
$C_1$	174	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$
-	76-80	$\underline{\text{C}}\text{DCl}_3$

La información antes descrita, pudo ser confirmada al observar el DEPT-135 del compuesto, cuya región revela que efectivamente la primera señal observada ( $\delta_C$  15 ppm) en el espectro RMN de  $^{13}C$  corresponde a un metilo puesto que se encuentra en el cuadrante positivo del espectro, otra señal en el cuadrante negativo correspondiente al carbono oxigenado ( $C_{12}$ ) a campo bajo ( $\delta_C$  65ppm), mientras que el resto de la señales corresponden a carbonos con numero par de protones, es decir, carbonos metilénicos, puesto que dichas señales se observaron en el cuadrante negativo. El hecho de no observar ninguna otra señal correspondiente a carbonos metílicos, dio indicios de tratarse de una molécula simétrica con los metilos terminales superpuestos y el grupo éster en el centro.

Utilizando esta información, se realizó el cálculo teórico del espectro RMN de la molécula utilizando el programa RMN Predictor para  $^1H$  y  $^{13}C$ , confirmándose que dicho espectro corresponde a un éster alifático de 22 átomos de carbono con estas características, identificado como éster undecílico del ácido undecanoico (figura 55).

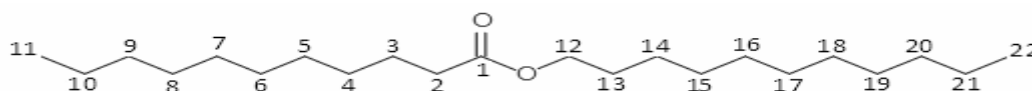


Figura 55. Estructura del éster undecílico del ácido undecanoico.

Los ésteres etílicos de ácidos grasos se utilizan junto con cambios en el estilo de vida (dieta, adelgazamiento y ejercicio) para reducir la cantidad de triglicéridos (sustancias grasas) en la sangre. Los ésteres etílicos de ácidos omega 3 pertenecen a una clase de medicamentos denominados agentes antilipémicos o reguladores de los lípidos, puesto que es posible que dichas sustancias actúen al reducir la cantidad de triglicéridos y otras grasas que se producen en el hígado (50).

En estudios realizados anteriormente a otras plantas de la familia Sterculiaceae, se encontró la presencia de algunos ésteres de ácidos grasos, tales como el éster metílico del ácido pentadecanoico, en el extracto metanólico de las especies *H. guazumifolia*

Kunth; los ésteres metílicos de los ácidos octadecanoico e icosanoico en *M. tomentosa*, así como también se reportó la presencia del éster metílico del ácido hexadecanoico en ambas especies. En espera por los resultados

### Fraccionamiento del extracto etéreo del tallo (EET) de *M. villosa*

El extracto en éter dietílico de *M. villosa* fue separado mediante CC (figura 56), utilizándose una columna de 25 cm de altura con un diámetro de 0,8 cm, fraccionándose 250 mg del extracto en una relación 1:30 extracto-silica (35-70 mesh), siendo esta la fase estacionaria, mientras que la fase móvil estuvo constituida por solventes como éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol.

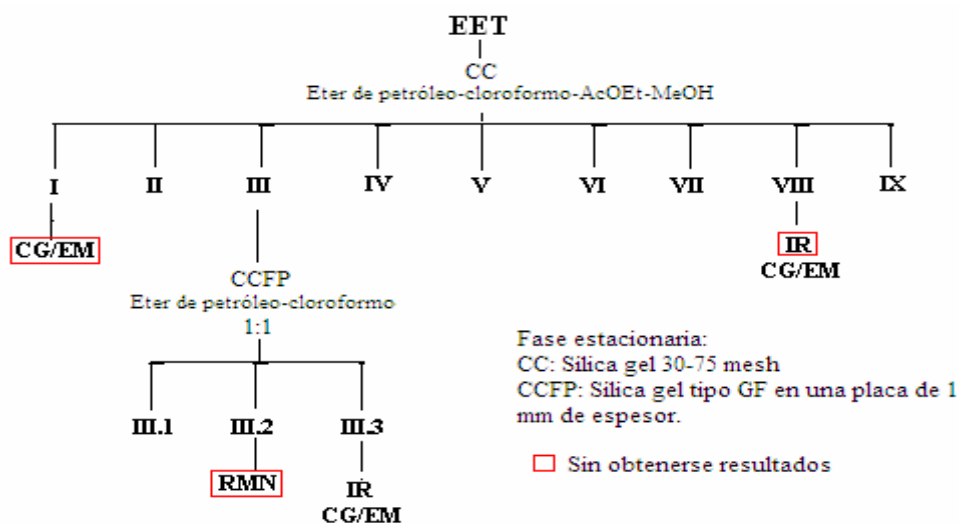


Figura 56. Esquema del fraccionamiento cromatográfico del extracto etéreo del tallo de *M. villosa*.

La cromatografía se inició con éter de petróleo 100%, y luego se eluyó con mezclas de polaridad creciente de éter de petróleo-cloroformo, cloroformo 100%, cloroformo-acetato de etilo, acetato de etilo 100% y finalizando con una mezcla 1:1 acetato de etilo-metanol, lográndose de esta manera recoger un total de 34 eluatos de 25 ml c/u (tabla 29).

Tabla 29. Sistema de solventes utilizado en el fraccionamiento cromatográfico del extracto en éter dietílico del tallo de *M.villosa*.

Eluyente	% V/V	Eluatos
Éter de petróleo	100	1-2
Éter-cloroformo	70:30	3-6
Éter-cloroformo	50:50	7-13
Éter-cloroformo	30:70	14-16
Cloroformo	100	14-16
Cloroformo-AcOEt	70:30	21-26
Cloroformo-AcOEt	50:50	27-32
AcOEt	100	33
AcOEt-MeOH	50:50	34

Haciendo uso de la CCF y por comparación de los  $R_f$ , se agruparon los 34 eluatos obtenidos en nueve fracciones, utilizando como agentes reveladores la luz ultravioleta de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio (tabla 30). Se logró recuperar un total de 202,8 mg de material orgánico, obteniéndose un rendimiento de 81,12%.

Tabla 30. Fracciones obtenidas en la CC del EET.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)
I	1-5	14,4
II	6-7	15,0
III	8-10	50,3
IV	11-14	48,6
V	15-19	24,0
VI	20-24	16,6
VII	25-29	6,2
VIII	30-33	12,5
IX	32	15,2



### **Letalidad de algunas fracciones provenientes del EET**

Las fracciones II, VII y VIII del extracto etéreo del tallo fueron ensayadas con el crustáceo *A.salina*, encontrándose que las mismas ejercieron una potente actividad letal con una  $CL_{50}$  de 3,50  $\mu\text{g/ml}$ , 1,40  $\mu\text{g/ml}$  y 1,34  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (apéndice, tabla A3). La disminución en la letalidad de la fracción II con respecto a la del EET podría deberse a un posible efecto sinérgico, es decir, que el efecto inhibitorio se ejerce por el conjunto completo de metabolitos integrantes del extracto, los cuales una vez separados pierden su efecto. Por el contrario, en el caso de las fracciones en donde se observó un aumento de letalidad, esto podría atribuirse a un posible efecto antagónico o de concentración, lo cual indica que posiblemente los compuestos más letales pudieron ser separados en las fracciones más activas logrando que ejercieran una mayor actividad que cuando se encontraban mezclados con otros compuestos, o bien que al ser separados en una fracción, aumentó la concentración de los mismos, potenciándose de esta manera su efecto inhibitorio.

La fracción I, fue un sólido de aspecto bastante limpio, y al realizar la CCF de la fracción en una plaquita de aluminio recubierta con sílica, y utilizando como eluyente una mezcla 1:1 eter de petróleo:cloroformo, se observó una estela que subió hasta cierta altura de la plaquita, deduciéndose de esta manera que se trataba de una mezcla no muy compleja, por lo que se decidió realizar un análisis de CG/EM.

En la CCF realizada previamente en la placa de vidrio a la hora del juntado, se observó entre los eluatos 8 y 10, la aparición de una mancha oscura y aislada a cierta altura de la placa, eluida con una mezcla 1:1 eter de petróleo-cloroformo, así como también pudieron observarse la aparición de otras tres manchas muy tenues y poco separadas. Cabe destacar que estas últimas no fueron observadas mediante el uso de la luz UV por lo que fue necesario utilizar una solución ácida de molibdato de amonio para revelarlas, lo que indicó que los compuestos constituyentes de estas manchas no poseen grupos cromóforos en su estructura. Este comportamiento fue observado en los tres eluatos

mencionados, por lo que los mismos fueron juntados formando una sola fracción denominada fracción III. Este mismo comportamiento fue observado al utilizar la misma mezcla de solventes en la CCF realizada a la fracción completa, por lo que se decidió realizar una cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) para aislar algún compuesto puro y separarlo de los demás.

### **Subfraccionamiento de la fracción III**

Se disolvieron 50 mg de la fracción III en una mínima cantidad de cloroformo, para luego dispersarla en forma de franja por la orilla inferior de una placa de 1 mm de espesor, utilizándose como eluyente una mezcla 1:1 eter de petróleo-cloroformo, observándose varias manchitas cerca del origen de la placa a un  $R_f$  de 0,14 y la aparición de la mancha correspondiente al compuesto aislado a un  $R_f$  de 0,58. Por su parte, se supuso la presencia de los compuestos carentes de grupos cromóforos en la región superior de la placa, siendo desprendidas las bandas de cada una de estas subfracciones, las cuales fueron extraídas de la sílica utilizando cloroformo como solvente, y evaporadas hasta sequedad en un vial pesado para obtener su masa de las mismas (tabla 31).

Tabla 31. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción III.

<b>Subfracción</b>	<b><math>R_f</math></b>	<b>Masa (mg)</b>
III.1	0,14	5,7
III.2	0,58	4,4
III.3	-	7,0

Se utilizó sílica gel tipo GF como fase estacionaria, en una placa de 1,0 mm de espesor, y como fase móvil una mezcla eter de petróleo-cloroformo 1:1.

Debido a las características mostradas por cada una de las subfracciones obtenidas, se decidió realizar un análisis de CG/EM a las subfracciones III.1 y III.3, y un análisis de RMN al compuesto puro que logró aislarse en la subfracción III.2 (en espera por el resultado).

### Separación e identificación de los componentes de la subfracción III.3

El espectro de IR de la subfracción III.3 mostró las bandas asignadas a los estiramientos propios de los enlaces CH alifáticos en la región comprendida entre los 3018 y 2851  $\text{cm}^{-1}$ ; a los 1714  $\text{cm}^{-1}$  se observó una banda correspondiente a las vibraciones del grupo carbonilo C=O, mostrando también una banda asignada los estiramientos característicos del enlace C-O del grupo éster a los 1215,49  $\text{cm}^{-1}$ , y finalmente una banda bastante intensa a los 758  $\text{cm}^{-1}$  la cual corresponde a los  $\text{CH}_2$  de una cadena alifática (figura 57).

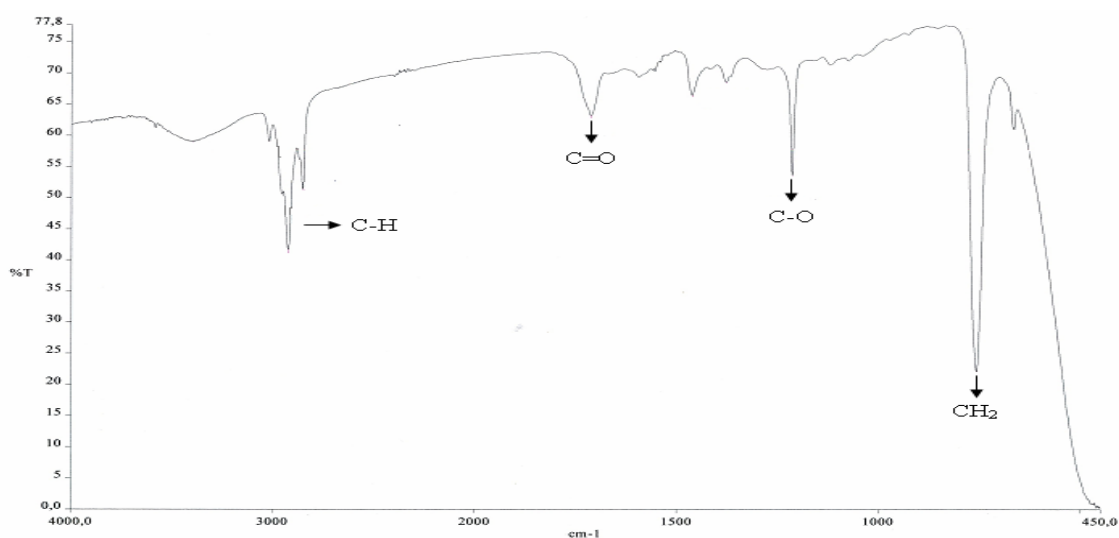


Figura 57. Espectro de IR de la subfracción III.3

### Análisis de CG/EM de la subfracción III.3

Al realizar la CG/EM de la subfracción III.3 (figura 58), se encontró la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres dibutilico y mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, los cuales fueron identificados anteriormente en la subfracción C2 del extracto alcohólico de las hojas, así como también fueron identificados dichos ésteres en la subfracción 5.1.1 del extracto alcohólico del tallo. De igual forma, fueron también separados e identificados el éster 2-hidroxi-1metilpropílico del ácido octadecanoico, la colestán-3-ona y la spinasterona (tabla 32).

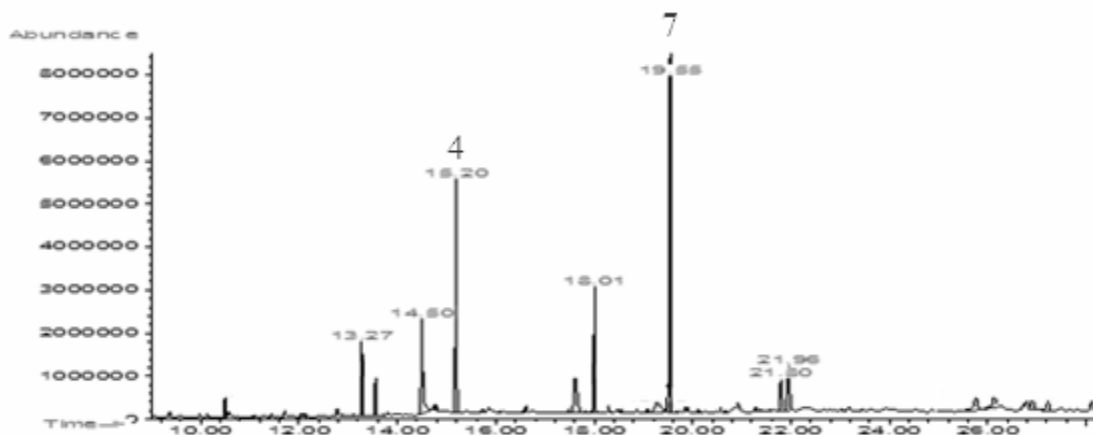


Figura 58. Separación cromatográfica de los componentes de la subfracción III.3.

Tabla 32. Composición química de la subfracción III.3.

Pico	Identificación	TR	%Area	%P
1	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	13,271	3,84	99
2	Ester isobutil undecilico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	13,557	2,17	99
3	Ester dibutilico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	14,497	8,58	95
4	Ester metílico butilico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	15,199	13,87	91
5	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18,014	7,36	98
6	Ester 2-hidroxi-1-metilpropilico del ácido octadecanoico	19,278	3,05	91
7	Ester mono (2-etilhexilico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	19,548	23,65	91
8	Colestan-3-ona	25,760	2,54	98
9	Spinasterona	27,230	1,44	96

TR: tiempo de retención, %P: porcentaje de probabilidad, Gris: compuestos más abundantes

Cabe destacar que de todos los compuestos identificados, los ésteres metilbutilico y mono (2-etilhexilico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, fueron los más abundantes en la subfracción III.3.

El espectro de masas del éster metílico butílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, produjo un ion molecular a una relación m/z 236 el cual fue poco observable, así como también produjo las señales correspondientes a una relación m/z de 163, 149 y 120 (figura 59). Las estructuras de dichos fragmentos se muestran en la figura 60.

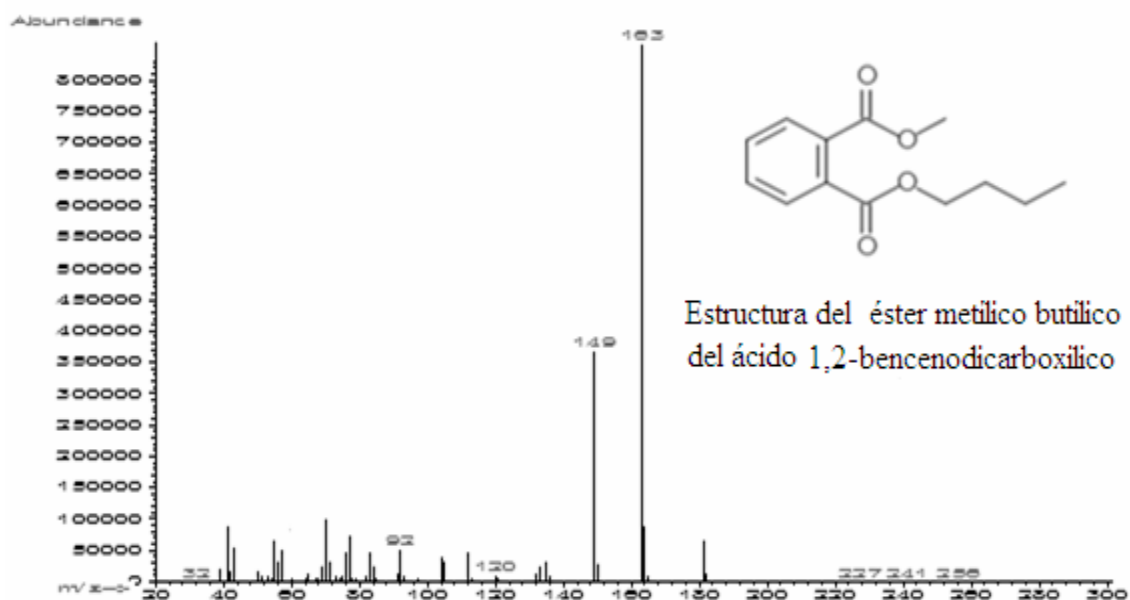


Figura 59. Espectro de masas del pico con TR 15,20 y área 13,87 asignado al éster metílico butílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

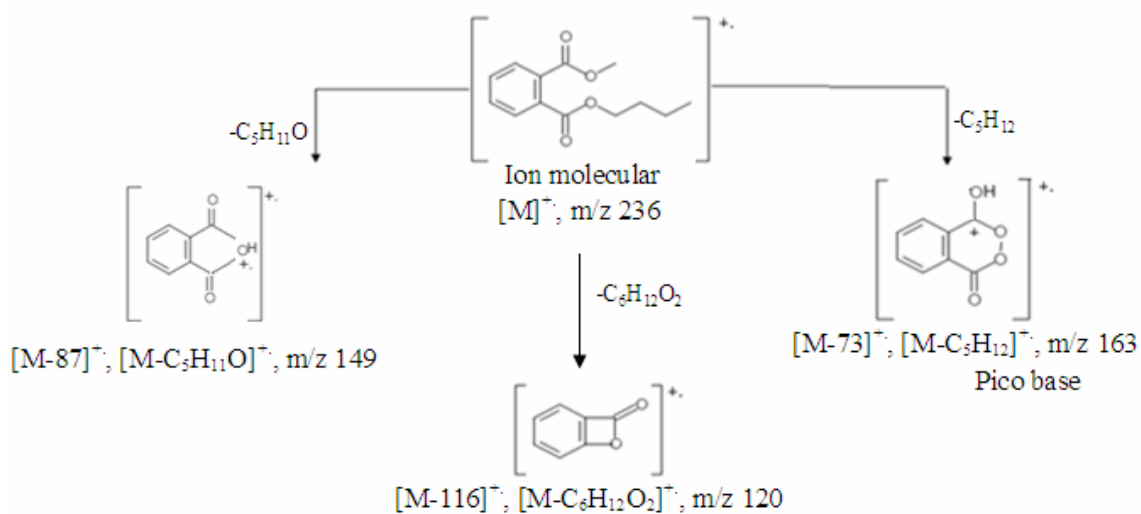


Figura 60. Patrón de fragmentación del éster metílico butílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

También se logró identificar el éster isobutilundecílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en una menor abundancia, así como también fueron encontrados en pequeña cantidad esteroides como la colestan-3-ona y la spinasterona (figura 61).

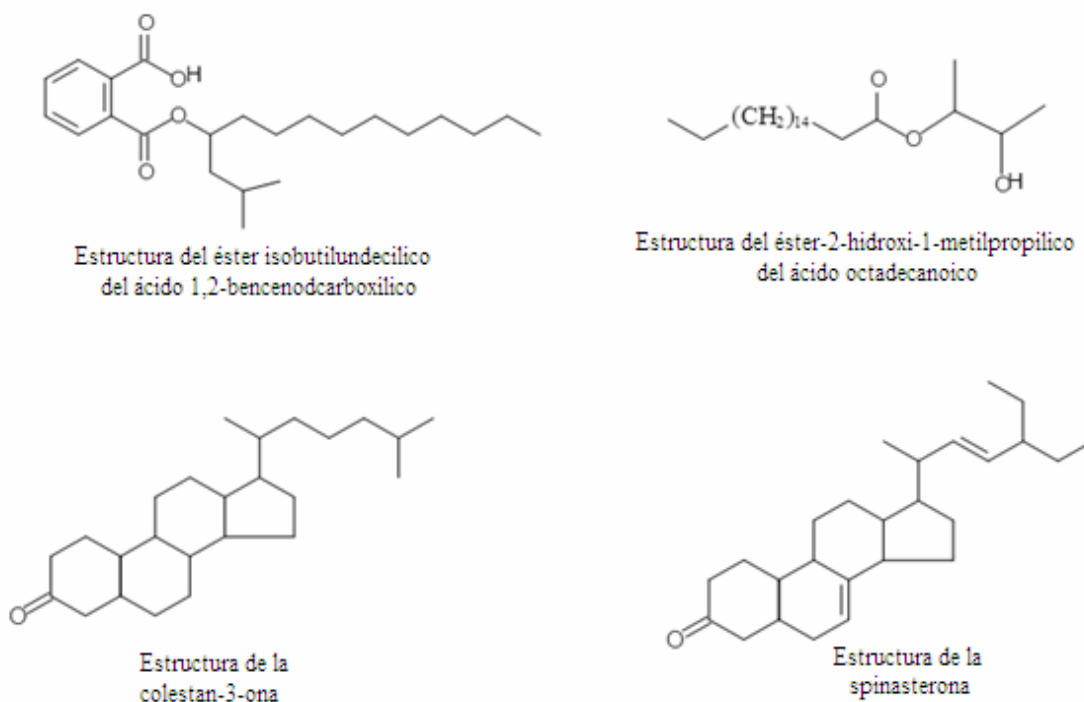


Figura 61. Estructura de algunos compuestos identificados en la subfracción III.3.

Por su parte, los ésteres mono (2-etilhexílico) y dibutílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico fueron reportados anteriormente, al igual que el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido.

Cabe destacar que los ésteres del ácido 1,2-bencenodicarboxílico son reconocidos plastificantes de amplio uso en la industria petroquímica, y en ocasiones dichos compuestos producen la contaminación de las muestras a través del uso de los sistemas de vacío, por lo cual no se garantiza que la presencia de este tipo de compuestos sea de *M. villosa*, sin embargo, también hay evidencias de que estos compuestos han sido producidos en forma natural por diversas especies terrestres y acuáticas.

A pesar de encontrarse en poca abundancia, según este análisis se logró identificar dos esteroides en la fracción III.3 proveniente del EET de *M. villosa*, con lo cual se confirma la presencia de este grupo de metabolitos, siendo este un grupo muy importante de núcleos secundarios muy característicos de las plantas de la familia Sterculiaceae.

### **Estudio de otras fracciones pertenecientes al EET**

Las fracciones IV, V, VI, VII y VIII provenientes del EET, a pesar de obtenerse en poca cantidad, fueron sometidas a las pruebas de identificación de flavonoides y esteroides (tabla 33), resultando positiva la presencia del segundo grupo en todas ellas; además, todas las fracciones de este extracto que lograron ser ensayadas con *A. salina*, mostraron excelente actividad letal (apéndice, tabla A3), al igual que el extracto crudo (tabla 8), por lo que se decidió tomar una muestra de estas para ser analizadas mediante CG/EM.

Tabla 33. Pruebas químicas realizadas a algunas fracciones del extracto etéreo del tallo EET.

Familia de metabolitos	Fracciones				
	IV	V	VI	VII	VIII
Esteroides insaturados	+	+	+	+	+
Flavonoides	-	-	-	-	-

### **Separación e identificación de los compuestos de la fracción VIII**

En el análisis de CG/EM de la fracción VIII del extracto etéreo del tallo de *M. villosa* (EET) (figura 62), se lograron identificar varios compuestos como el 1-metilciclododeceno, hexadecil oxirano, octadecanal y hexadecanal, así como también se logró identificar la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (tabla 34).

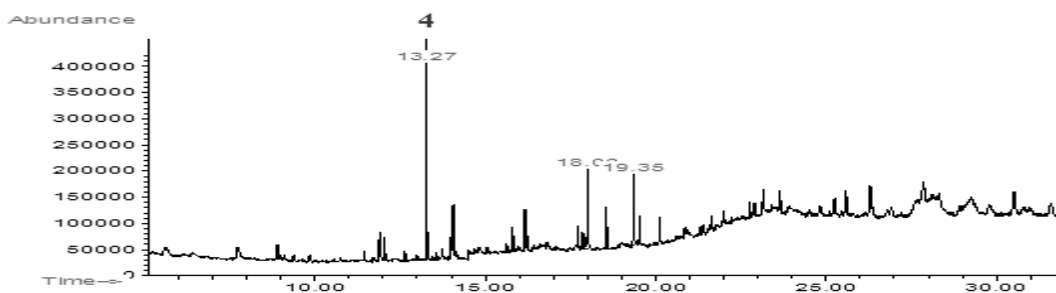


Figura 62. Cromatograma de la separación de la fracción VIII.

Tabla 34. Composición química de la subfracción VIII.

Pico	Identificación	TR	Area	%
2	1-metil-ciclododeceno	11,899	2,65	91
4	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	13,271	13,78	99
11	Hexadecil oxirano	17,728	1,84	80
13	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18,003	6,63	95
18	octadecanal	18,554	3,43	91
16	Ester mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	19,526	2,28	91
17	hexadecanal	20,121	1,96	91

TR: tiempo de retención, Gris: compuestos más abundantes.

Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. Entre los triterpenos se encuentran los esteroides y esteroles derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal C<sub>30</sub> de la que se derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol se denominan esteroides, este es el caso de casi todos los esteroides vegetales. La estructura de este tipo de metabolitos está conformada por el anillo cicloperhidrofenantreno, y los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que solo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre el carbono número 20 y el carbono número 21 (figura 63).



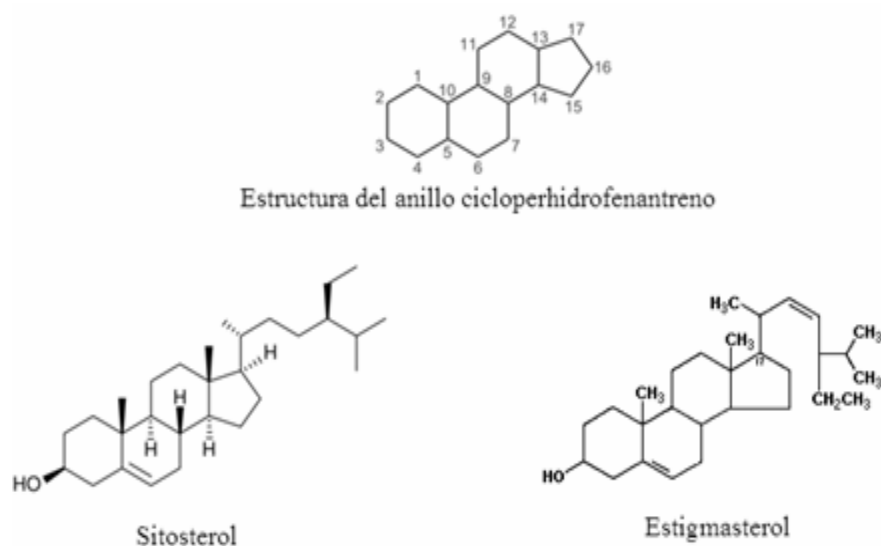


Figura 63. Estructura de algunos esteroides.

La principal función de los esteroides en las plantas, es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos esteroides tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisoma aislada del helecho común (51).

Según los reportes de la literatura, se logró separar e identificar esteroides como la (24R)-4-estigmasten-3-ona, el 4-sitosterol-3-ona y un posible esteroide insaturado y/o triterpeno pentacíclico en los extractos etéreo y metanólico de *H. guazumifolia* Kunth, en la fracción cloroformica de las hojas de *H. baruensis* Jacq se identificó el campesterol (figura 4) y en el extracto metanólico de las hojas de *M. tomentosa* se logró aislar un derivado acetilado de un esteroide, el cual fue nombrado como 3-acetilcolest-1,5-dieno (figura 5).

## CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar reveló en la mayoría de los extractos la presencia de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos, flavonoides en los extractos alcohólicos de flores, hojas y tallos de *M. villosa*, además de fenilpropanoides en los dos últimos.

El EALH ejerció actividad antibacteriana leve contra las sepas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; el EEF inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Enterobacter cloacae*, mientras que el EET solo redujo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

La fracción C del EALH mostró una mayor actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y una actividad leve contra *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

El EALT mostró actividad antifúngica leve contra *Fusarium poae*, la fracción 9 proveniente del mismo, mostró una actividad moderada contra la misma cepa, y la fracción C del EALH fue levemente activa contra *Mucor racemosus*.

El EET presentó una potente actividad letal contra el crustáceo *A. salina* con una  $CL_{50}$  de 2,06  $\mu\text{g/ml}$ , seguido por el EALT y el EEF con una  $CL_{50}$  de 10,00  $\mu\text{g/ml}$ , el EALH con 74,68  $\mu\text{g/ml}$ , siendo el EEH el menos letal con una  $CL_{50}$  de 169,10  $\mu\text{g/ml}$ .

La mayoría de las fracciones ensayadas mostraron una actividad letal elevada, con una  $CL_{50}$  de 19,51  $\mu\text{g/ml}$  para la fracción D proveniente del EALH, una  $CL_{50}$  de 2,48 para la fracción 8 proveniente del EALT y algunas fracciones del EET como las II, VII y VIII con una  $CL_{50}$  de 3,50; 1,40 y 1,34  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

En el análisis de IR de la subfracción B1, se mostró la presencia de estiramientos O-H, C-O, C=O, C-H y CH<sub>2</sub>, mientras el análisis de CG/EM evidenció la presencia del ácido hexadecanoico como compuesto mayoritario.

El análisis de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de la subfracción B2, en comparación con los datos teóricos arrojados por el RMN predictor, ayudó a elucidar la posible estructura del ácido hexadecanoico.

El análisis de CG/EM de la subfracción C2 reveló la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres dibutílico y mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, como compuestos mayoritarios.

En la subfracción D4 proveniente del EALH, se identificaron mediante CG/EM los compuestos 2-hidroxietil-succinimida y ácido hexadecanoico.

El espectro de IR de la fracción 3 del EALT de *M. villosa* mostró la presencia de las vibraciones características de los enlaces CH alifáticos, grupo carbonilo C=O, enlace C-O y CH<sub>2</sub> alifáticos.

El análisis de CG/EM de la fracción 3, evidenció la presencia de ésteres del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, siendo el éster diisocilico el más abundante.

El análisis de CG/EM de la subfracción 5.1.1, reveló la presencia de los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico, el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y el ácido hexadecanoico en mayor abundancia.

El análisis de RMN de la fracción 5.1.2 en comparación con los datos teóricos arrojados por el RMN predictor, ayudó a caracterizar la posible estructura del éster undecílico del ácido undecanoico.

El análisis de CG/EM de la subfracción III.3 evidenció la presencia de los ésteres mono (2-etilhexílico) y metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico como compuestos mayoritarios, además de mostrar la presencia de esteroides como el colestano-3-ona y spinasterona.

Las pruebas químicas realizadas a algunas fracciones provenientes de EET, evidenciaron la presencia de esteroides.

El análisis de CG/EM de la fracción VIII mostró la presencia de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona como compuesto mayoritario entre otros.

No se puede asegurar el origen de la presencia de los ésteres derivados del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en los extractos y/o fracciones analizadas, puesto hay evidencia de que dichos compuestos pueden ser contaminantes provenientes de los sistemas de separación y purificación empleados tales como los rotaevaporadores y bombas de vacío, o bien pueden ser de origen natural de la planta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Swain, T (ed). 1973. *Chemistry in evolution and systematics*. Butterworth, Londres.
2. Compagnone, R.; Suárez, A.; Castillo, A.; Delle-Morache, F. y Ferrari, F. 1999. Estudio fitoquímico de algunas plantas de posible uso en la medicina tradicional venezolana. *Memorias del instituto de Biología Experimental*, 2: 187-190.
3. Marcano, D. Y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. UCV. Litopar.
4. Rondón, J.B. y Cumana, L. 2006. Clave preliminar para identificar especies de la familia Sterculiaceae en Venezuela. *Saber*, 18: 142-152.
5. Reid, K.A.; Jáger, A.K.; Light, M.E, Muiholland, D.A. y Van Staden, J. 2005. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 97:285-291.
6. Dias G. C. D. ; Gressler V.; Hoenzel S.C.S.M.; Silva U.F., Dalcol I.I. y Morel A.F. 2007. Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys*. *Phytochemistry*, 68: 668–672
7. Morel, A.F.; Flach, A.; Zanatta, N.; Ethur, E.M.; Mostardeiro, M.A. y Gehrke, T.S.1999b. A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. *Tetrahedron Letters*, 40: 9205–9209.
8. Solange, C.S.M.; Hoelzel, E.R.; Vieira, S.R.; Giacomelli, I.I.; Dalcol, N.Z. y Morel, A.F. 2005. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*, 66: 1163–1167
9. Ragasa, C.; Cruz, C.; Tada, M. y Rideout, J. 1997. Flavonoids from *Waltheria americana*. *Philippine Journal of Science*, 126:250.
10. Petrus, A. 1990. Pholiphenolics components of *Waltheria indica*. *Phitochemical communications fitoterapia*, 61: 371.
11. Chacrabarti, R.; Vikramadithyan, R.K.; Millangi, R.; Sharma, V.M.; Lagadheshan, H.; Rao, Y.N.; Sairam, P. y Rajagupalan, R. 2002. Antidiabetic and hipolipidemic activity of *Helicteres isora* in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 343-349.
12. Bean, K.; Antoun, M.; Abramson, O.; Chang, C.; McLaughlin, J. y Cassady, J. 1985. Cucurbitacin B and isocucurbitacin B. Cytotoxic components of *Helicteres isora*. *Journal of Natural Products*, 48: 500.
13. Ramesh, P. y Yuvarajan C.R. 1995. A new flavone methyl ether from *Helicteres isora*. *Journal of Natural Products*, 58: 1242-1243.

14. 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.
15. Tarache, A. 2007. 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. 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.
17. Tschesche, R. y I. Reutel. 1968. Alkaloide aus Sterculiaceae, über peptidalkaloide aus *Melochia corchorifolia*. *Tetrahedron Letters*, 35: 3817-3818
18. Bhakuni, R.S; Shukla, Y.N y Thakur, R.S. 1986. Ciclopeptide alkaloids from *Melochia corchorifolia*. *Phytochemistry*, 26:324-325
19. Shukla, Y.N.; Sokoloski, A. y Fales, H.M. 1976. 6-methoxy-7,8-methylenedioxy coumarin from *Melochia tomentosa*. *Phytochemistry*, 15: 1788
20. Kapadia, G; Shukla, Y.N; Morton, J.F y Lloyd H.A. 1977. New ciclopeptide alkaloids from *Melochia tomentosa*. *Phytochemistry*, 16:1431-1433
21. Kapadia, G; Shukla, Y.N. y Basak S.P. 1979. The melosatins- a novel class of alkaloids from *Melochia tomentosa*. *Tetrahedron*, 36:2441-2447
22. Espinoza, B. 2010. Análisis fitoquímico y bioactividad de la planta *Melochia tomentosa* (Sterculiaceae). Trabajo de pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná.
23. Rondón, J.B. 2009. Revisión taxonómica del género de *Melochia* L. (Sterculiaceae) en Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*, 32: 1-61
24. Murrillo, E. y Mendez, J. 2007. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios*. Universidad de Tolima. Colombia.
25. Meyer, B; Ferrigni, N; Putman, j.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y McLaughling, J. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
26. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pennsylvania.
27. 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.
28. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern .J .Pharm.*, 33: 232-237.
  29. Wade, L. 2004. *Química orgánica*. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Mexico D.F.
  30. McMurry, J.2004. *Química orgánica*. Sexta edición. Thomson. Mexico D.F.
  31. Costa, G. 2005. Estudio fitoquímico da raiz da espécie *Melochia chamaedrys* St. Hil. Tesis de doctorado en química. Área de Química Orgánica. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
  32. Programa Regional de Desarrollo Científico Tecnológico OEA. Introducción al estudio de los productos naturales. 1-133
  33. Osuna, L.; Tapia, M. y Aguilar, A. 2005. Plantas tradicionales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. *Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Primera edición. Universitat de Barcelona. España.
  34. Diccionario General y Médico Multilingüe. 2006. “Bacteriostático”. <<http://www.super55.com/word.php?id=587&lang=span&word=%20%20Bacteriost%C3%A1tico>> (16/06/2011).
  35. Pino, O. y Jorge, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista Protección Vegetal*, 22: 34-43.
  36. Budzikiewicz, H.; Djerassi, Carl. y Williams, D. 1965. *Interpretation of mass spectra of organic compounds*. Segunda edición. Editorial Holden-Day, INC. San Francisco.
  37. Sabater, J y Sabater, G. 2006. “Ácidos grasos: importancia metabólica”. <<http://www.sabater-tobella.com/index.php?id=331>> (14/08/2011).
  38. Solorzano, H. 2007. “El cáncer y los ácidos grasos. Terapia Bioquímica nutricional”.<<http://hector.solorzano.com.mx/articulos/acidos.html>> (14/08/2011).
  39. 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.
  40. Yoo, Y.; Shin, B.; Hong, J.; Lee, J.; Chee, H.; Song, K. y Lee, K. 2007. Isolation of fatty acids whit anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva. *Arch. Parm.*

Res., 30: 361-365.

41. Brito, L. 2009. Actividad biológica, identificación y caracterización de compuestos obtenidos de las algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Gracilariaceae), *Gelidium serrulatum* (Gelidiales, Gelidiaceae) y *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Solieriaceae) del Oriente de Venezuela. Trabajo de grado. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente, Cumaná.
42. Mitova, M.; Taskova, R.; Popov, S.; Gunter, R.; Krings, U. y Handjieva, N. 2003. GC/MS análisis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch* 58: 697-703.
43. Kabara, J.; Swieczkowski, D.; Conley, A. y Truant, J. 1972. Fatty acid and derivatives of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2: 23.
44. Linday, R. 1985. Food additives. In: Food chemistry. O.R. Femenina (ed), Marcel Dekker, Inc. New York. 115.
45. Ruikar, A.; Gadkari, T.; Phalgune, U.; Puranik, V. y Deshpande, N. 2011. Dibutyl phthalate, a secondary metabolite from *Mimusops elengi*. *Chemistry of Natural Compounds.* 46(6):955.
46. Namikoshi, M.; Fujiwara, T.; Nishikawa, T. y Ukai, K. 2006. Natural Abundance <sup>14</sup>C Content of Dibutyl Phthalate (DBP) from Three Marine Algae. *Marine drugs.* 4: 290-297.
47. Rowshanul, M. y Rezaul, M. 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn) Flower. *Mycobiology.* 37(1):31-36.
48. Srinivasan, G.; Sharanappa, P.; Leela, N.; Sadashiva, C. y Vijayan, K. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Leea indica* (Burm.f.) Merr. Flowers. *Natural Product Radiance.* 8(5): 488-493.
49. Ramalakshmi, S. y Muthuchelian, K. 2011. Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetracoccus* (Roxb.) Kurz, by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 15: 1451.
50. Medline plus. 2011. "Esteres etílicos del ácido graso omega 3". < <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a607065-es.html> > 29/08/2011
51. García, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolito secundario de plantas. *Reduca (Biología), Serie Fisiología vegetal.* 2 (3): 119-145.



## APENDICE

Tabla A1. Actividad antibacteriana de algunas fracciones ensayadas de *M. villosa*.

Bacteria	EALH				EALT		%fam
	C	D	E	F	8	9	
<i>Escherichia coli</i>	++	-	-	-	-	-	16,67
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	0,00
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	-	-	-	-	-	16,67
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	16,67
<i>Bacillus subtilis</i>	++	-	-	-	-	-	16,67
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-	16,67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	-	-	-	-	16,67
<b>%msf</b>	75,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

(+) Actividad leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro. C,D, etc: fracciones provenientes del extracto alcohólico de las hojas; 8,9: fracciones provenientes del extracto alcohólico del tallo;

%fam: porcentaje de las fracciones evaluadas que resultaron activas contra el mismo organismo.

%msf: porcentaje de microorganismos sensibles a una misma fracción.

Tabla A2. Actividad antifúngica de algunas fracciones ensayadas de *M. villosa*.

Hongo	EALH				EALT	
	C	D	E	F	8	9
<i>Mucor racemus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Fusarium maniliforme</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma viridis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium poae</i>	-	-	-	-	-	++

(+) Actividad leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro.

Tabla A3. Letalidad de las fracciones de *M. villosa* frente al crustáceo *Artemia salina*.

Fracción	Método	CL <sub>50</sub> a las 48 horas
C	-	-
D	Logit	19,51
F	Binomial	261,70
5	-	-
8	Binomial	2,48
9	Logit	316,00
II	Logit	3,50
VII	Probit	1,40
VIII	Binomial	1,34

(-) concentración elevada; C,D y F: fracciones provenientes del extracto alcohólico de las hojas; 5,8 y 9: fracciones provenientes del extracto alcohólico del tallo; II, VII y VIII: fracciones provenientes del extracto etéreo del tallo.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	Evaluación Química Y Bioactividad De La Planta <i>Melochia Villosa</i> (Sterculiaceae) Proveniente Del Amazonas Venezolano.
---------------	---

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rodríguez F., Fátima del V.	CVLAC	18.580.464
	e-mail	Tafimita_18@gmial.com
	e-mail	fatimafiguera@gmail.com

#### Palabras o frases claves:

Sterculiaceae, *Melochia villosa*, Metabolitos secundarios.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	Química

### Resumen (abstract):

Los extractos crudos de *M. villosa* fueron sometidos a un análisis fitoquímico preliminar y se evaluó su actividad antifúngica, antibacteriana y letal contra el crustáceo *Artemia salina*. El análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos, flavonoides y fenilpropanoides. El extracto etéreo del tallo mostró actividad antibacteriana leve contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto etéreo de las flores fue activo contra la misma, además de mostrar actividad leve contra *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*. El extracto alcohólico de las hojas fue activo contra *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto alcohólico del tallo mostró una actividad antifúngica leve contra *Fusarium poae*. El extracto etéreo del tallo exhibió una excelente actividad letal con una  $CL_{50}$  de 2,06 ppm, seguido del extracto etéreo de las flores y el extracto alcohólico del tallo con una  $CL_{50}$  de 10,00 ppm; el extracto alcohólico de las hojas con una  $CL_{50}$  de 74,68 ppm y finalmente el extracto alcohólico de las hojas con una  $CL_{50}$  de 169,10 ppm. Para el fraccionamiento cromatográfico de los distintos extractos, se emplearon las técnicas cromatográficas convencionales, obteniéndose varias fracciones y subfracciones, de las cuales algunas fueron analizadas mediante espectroscopía IR, y CG/EM, identificándose principalmente: 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y cuatro ácidos grasos en una de ellas; en otra se identificaron el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres dibutilico y mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico; los compuestos 2-hidroxietil-succinimida y ácido hexadecanoico fueron identificados en otra subfracción; También se identificó el éster diisocílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en una de ellas; y en otra de las subfracciones fue identificado el éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico además de dos esteroides. Mediante el análisis de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ , se lograron identificar el ácido hexadecanoico y el éster undecílico del ácido undecanoico.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>D'ARMAS, HAYDELBA, PhD</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>4.297.804</b>
	e-mail	<b>htrinidad@hotmail.com</b>
	e-mail	<b>haydelba@yahoo.com</b>
<b>Dr. HENRIQUEZ, WILLIAN</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>8.249.952</b>
	e-mail	<b>whenriquez66@ gmail.com</b>
	e-mail	
<b>MSc. DASILVA, YVANOVIS</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>12.660.605</b>
	e-mail	<b>hernan_dawis@hotmail.com</b>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
<b>2012</b>	<b>03</b>	<b>09</b>

Lenguaje: **SPA**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-RodríguezF	Aplication/Word

### Alcance:

Espacial :      Nacional                      (Opcional)

Temporal:      Temporal                              (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Química

### Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

### 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 – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *Mazzeley*  
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*JUAN A. BOLANOS CUNTELO*  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.

*Fátima del V. Rodríguez F.*  
**Rodríguez F., Fátima del V.**  
**AUTOR**

*Haydelba D'Armas*  
**D'Armas, Haydelba**  
**TUTOR**