



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

METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA *Waltheria berteroi*  
(Sterculiaceae) COLECTADA EN EL ESTADO AMAZONAS (VENEZUELA) Y SU  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETAL  
(Modalidad: Tesis de Grado)

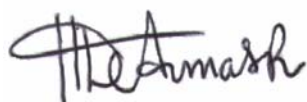
CARMEN DEL VALLE SALAZAR SÁNCHEZ

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

CUMANÁ, 2012

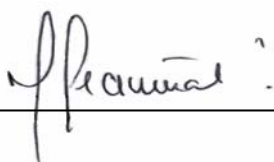
METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA PLANTA *Waltheria berteroi*  
(Sterculiaceae) COLECTADA EN EL ESTADO AMAZONAS (VENEZUELA) Y SU  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LETAL

APROBADO POR:



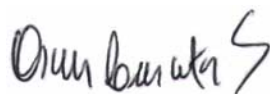
---

Haydelba D'Armas, PhD.  
Asesora Académica



---

Jurado principal



---

Jurado principal

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO .....	i
DEDICATORIA .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	13
MUESTREO .....	13
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	13
PRUEBAS BIOLÓGICAS .....	13
Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	14
Actividad antifúngica.....	14
Actividad antibacteriana .....	15
PRUEBAS QUÍMICAS.....	16
Saponinas .....	17
Alcaloides .....	17
Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	17
Flavonoides.....	18
Fenilpropanoides.....	18
Taninos y Polifenoles.....	18
Glicósidos cardiotónicos.....	19
Glicósidos cianogénicos .....	19
Metilencetonas .....	19
Antraquinonas .....	19
Cumarinas .....	20
FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS .....	20
Cromatografía de columna (CC).....	20
Cromatografía de capa fina (CCF) y capa fina preparativa (CCFP).....	20
CARACTERIZACIÓN.....	21
Espectroscopia infrarroja .....	21
Espectroscopia de RMN .....	22
Espectrometría de masas.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS DE LA HOJA, TALLO Y FLOR DE <i>W. berteroi</i> .....	25
ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR .....	26
ANÁLISIS BIOLÓGICO .....	30
Actividad Letal .....	30
Actividad Antibacterial.....	32
Actividad Antifúngica.....	35
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO .....	36
Fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo (EAT) de <i>W. berteroi</i> .....	37

Fraccionamiento cromatografico de la fracción A .....	40
Fraccionamiento cromatografico de la fracción B.....	50
Fraccionamiento cromatografico de la fracción C.....	68
Fraccionamiento cromatografico de la fracción D .....	71
Fraccionamiento cromatografico de la fracción F .....	73
Fraccionamiento del extracto crudo alcohólico de la hoja de <i>W. berteroi</i> .....	81
Fraccionamiento cromatografico de la fracción 1 .....	84
Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 3 .....	87
Fraccionamiento cromatografico de la fracción 4 .....	92
Fraccionamiento cromatografico de la fracción 5 .....	94
Fraccionamiento cromatografico de la fracción 6 .....	100
CONCLUSIONES .....	103
BIBLIOGRAFÍA .....	106
APÉNDICE.....	117
HOJA DE METADATOS .....	120

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios padre todopoderoso por darme salud, fuerza, coraje y valor para enfrentar todos los obstáculos que se presentaron a lo largo de la carrera y le doy las gracias porque siempre me asiste en mis necesidades; además le pido que me siga dando fortaleza y me guíe e ilumine el camino que me toca recorrer en esta vida.

A la Virgen del Valle por cubrirme con su manto, aliviar mis dolores, calmar mis angustias y acompañarme en todo momento, que como buena madre siempre me atiende y acude a mí cuando la necesito.

A mis padres Juan y Josefa por darme la vida, un hogar humilde pero con cariño, amor y respeto. Gracias por brindarme la educación, confiar en mí, apoyarme en todas mis decisiones, por sus consejos y acompañarme en mis momentos tristes y alegres. Los amo y han sido mi caballo de batalla en esta lucha y con todo mi corazón les dedico este título, que a ustedes les pertenece tanto como a mí.

A mis hermanos José (el negro), Luis y Carmen María, tres seres muy especiales para mí, que con sus apoyos y cariños incondicionales me han ayudado a superar muchos obstáculos en esta vida. Los quiero mucho.

A mis tíos Luis y Santa por abrirme las puertas de su casa y aceptarme con cariño brindándome su protección y tenerme mucha paciencia sobre todo en esos momentos difíciles. Gracias por todo lo que me ofrecieron y por ayudarme a conseguir este título.

A mis primos hermanos Jean, Carmen y Marbenys por pasar lindos momentos conmigo y brindarme sus cariños y apoyo. Ocupan un lugar muy bonito en mi corazón.

A todos mis tíos, primos y demás familiares por sus consejos, confianza y cariño. Gracias por estar siempre pendiente de mí.

A la Dra. Haydelba D'Armas por su apoyo, consejos, regaños, confianza, paciencia atención y amistad que siempre me brindó. Gracias profe por estar pendiente de mí y de todos sus hijos del laboratorio. Le tengo mucho cariño y respeto.

Al Lcdo. José Baudilio Rondon<sup>+</sup>, que a pesar de ya no estar entre nosotros, desde aquí le doy las gracias por su colaboración en la recolección e identificación de la planta.

A la Universidad de Oriente por darme la oportunidad de entrar en la casa más alta y permitirme alcanzar mi título universitario, igualmente agradezco al Departamento de Química por brindarme toda la ayuda y la colaboración necesaria en cuanto al suministro de equipos, materiales y reactivos necesarios para culminar la carrera y en la ejecución de este trabajo de investigación.

A mi amiga Laurenis, mi hermana de corazón, la margariteña que Dios un día cruzó en mi camino para recorrer juntas toda la carrera universitaria y enfrentar todos los obstáculos que se nos presentaron. Gracias mi amiga por estar siempre dispuesta a brindarme la mano y ayudarme desinteresadamente. Te quiero mucho y le pido a Dios que te cuide mucho.

A mi amiga Fátima por su ayuda, amistad y apoyo en todo momento y a su mamá la señora Milagros, una bella persona que me dejó entrar en su casa y me brindó su confianza, amistad y muchos consejos. Gracias a las dos por todo lo que me ofrecieron.

A mis compañeros de estudio y profesores por ofrecerme sus amistades y ayudarme cuando lo necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio Alexis, Julineth, Miguel, Lino y Daniela por siempre brindarme una mano amiga.

A todas las personas que de una u otra manera se cruzaron en mi vida y me ayudaron, alentaron y colaboraron con todos sus consejos a seguir adelante y triunfar sin hacer daño a nadie. Gracias a todas esas personas por creer en mí.

## **DEDICATORIA**

A:

Dios todopoderoso y la Virgen del Valle, mis padres celestiales.

Mis padres terrenales, Juan y Josefa.

Mis hermanos José (el negro), Luis y Carmen María.

Mis tíos, primos, amigos, compañeros y todas las personas que me apoyaron para alcanzar esta meta.

La amiga, profesora, asesora, Dra. Haydelba D'Armas.



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de hongos empleadas en el bioensayo de actividad antifúngica. ....	15
Tabla 2. Cepas de bacterias empleadas en el bioensayo de actividad antibacteriana. ....	16
Tabla 3. Masas de los extractos de los diferentes órganos de la planta <i>W. berteroi</i> . ....	25
Tabla 4. Familia de metabolitos presentes en la planta <i>W. berteroi</i> . ....	26
Tabla 5. Actividad letal de los extractos de <i>W. berteroi</i> contra el crustáceo <i>A. salina</i> . ....	31
Tabla 6. Actividad antibacterial de los extractos crudos de la planta <i>W. berteroi</i> . ....	33
Tabla 7. Fraccionamiento del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	37
Tabla 8. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EAT de <i>W. berteroi</i> . .....	38
Tabla 9. Fraccionamiento de la fracción A del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	40
Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción A del EAT. ....	41
Tabla 11. Subfracciones obtenidas de la CCFP realizada a la subfracción A.2. ....	42
Tabla 12. Valores de los desplazamientos químicos de protones ( $\delta H$ ) de algunas señales de RMN $^1H$ de la subfracción A.2.3. ....	45
Tabla 13. Valores de los desplazamientos químicos de carbono ( $\delta C$ ) de las señales de RMN $^{13}C$ de la subfracción A.2.3. ....	46
Tabla 14. Fraccionamiento de la fracción B del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	50
Tabla 15. Subfracciones de la separación cromatográfica de la fracción B del EAT. ....	51
Tabla 16. Comparación de los valores de los desplazamientos químicos de protones $\delta H$ de ciertas señales de los RMN $^1H$ de las subfracciones A.2.3 y B.2. ....	53
Tabla 17. Comparación de los valores de los desplazamientos químicos de carbono $\delta C$ de las señales de los RMN $^{13}C$ de las subfracciones A.2.3 y B.2. ....	54
Tabla 18. Compuestos identificados en la subfracción B.3 mediante CG/EM. ....	55
Tabla 19. Compuestos identificados en la subfracción B.5 mediante CG/EM. ....	60
Tabla 20. Fraccionamiento de la fracción C del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	68
Tabla 21. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción C del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	69
Tabla 22. Compuestos identificados en la subfracción C.2 mediante CG/EM. ....	70
Tabla 23. Fraccionamiento de la fracción D del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	71
Tabla 24. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción D del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	71
Tabla 25. Compuestos identificados en la subfracción D.1 mediante CG/EM. ....	73
Tabla 26. Fraccionamiento de la fracción F del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	74
Tabla 27. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción D del EAT. ....	75
Tabla 28. Fraccionamiento de la subfracción F.6 del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	75
Tabla 29. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción F.6 del EAT de <i>W. berteroi</i> . ....	76
Tabla 30. Compuestos identificados en la subfracción F.6.2 mediante CG/EM. ....	79
Tabla 31. Fraccionamiento del EAH de <i>W. berteroi</i> . ....	82
Tabla 32. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EAH de <i>W. berteroi</i> . .....	83

Tabla 33. Fraccionamiento de la fracción 1 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	85
Tabla 34. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 1 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	85
Tabla 35. Fraccionamiento de la fracción 3 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	88
Tabla 36. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 3 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	88
Tabla 37. Fraccionamiento de la subfracción 3.2 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	89
Tabla 38. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción 3.2 del EA2 de <i>W. berteroi</i> .....	90
Tabla 39. Fraccionamiento de la fracción 4 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	93
Tabla 40. Fracciones de la separación cromatográfica de la fracción 4 del EAH.....	93
Tabla 41. Fraccionamiento de la fracción 5 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	95
Tabla 42. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 5 del EA2 de <i>W. berteroi</i> .....	95
Tabla 43. Compuestos identificados en la subfracción 5.3 mediante CG/EM.....	97
Tabla 44. Fraccionamiento de la fracción 6 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	100
Tabla 45. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 6 del EAH de <i>W. berteroi</i> .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de chamaedrina. ....	4
Figura 2. Estructura de waltherina A. ....	5
Figura 3. Estructura de waltherina B. ....	5
Figura 4. Estructura de waltherina C. ....	6
Figura 5. Estructura de waltheriona A. ....	6
Figura 6. Estructura de waltheriona B. ....	6
Figura 7. Estructura de vanessina. ....	7
Figura 8. Estructura de <i>o</i> -metiltembamida. ....	7
Figura 9. Estructura de antidesmona. ....	7
Figura 10. Estructura de 2', 3', 5- trihidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona. ....	8
Figura 11. Estructura de 5,2'-dihidroxi-3, 7, 4',5'-tetrametoxiflavona. ....	8
Figura 12. Estructura de quercetina. ....	9
Figura 13. Estructura de (-)-epicatechina. ....	9
Figura 14. Estructura de tilirosida. ....	9
Figura 15. <i>Waltheria berteroi</i> . ....	11
Figura 16. Esquema de fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo de <i>W. berteroi</i> . .....	39
Figura 17. Espectro IR de la subfracción A.2.3. ....	43
Figura 18. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción A.2.3. ....	44
Figura 19. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la subfracción A.2.3. ....	45
Figura 20. Espectro DEPT - 135 de la subfracción A.2.3. ....	47
Figura 21. Comparación de los espectros de RMN <sup>13</sup> C y DEPT - 135 de la subfracción A.2.3. ....	47
Figura 22. Estructura del éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico. ....	48
Figura 23. Espectro IR de la subfracción B.2. ....	51
Figura 24. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción B.2. ....	52
Figura 25. Espectro RMN <sup>13</sup> C de la subfracción B.2. ....	52
Figura 26. Espectro DEPT - 135 de la subfracción B.2. ....	53
Figura 28. Espectro de masas del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2- benedenicarboxílico. ....	56
Figura 29. Patrón de fragmentación del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2- benedenicarboxílico. ....	57
Figura 30. Espectro de masas del éster diisooctílico del ácido 1,2-benedenicarboxílico. .....	58
Figura 31. Patrón de fragmentación del éster diisooctílico del ácido 1,2- benedenicarboxílico. ....	59
Figura 32. Cromatograma de gases de la subfracción B.5. ....	60
Figura 33. Espectro de masas del ácido tetradecanoico. ....	61
Figura 34. Espectro de masas de ácido hexadecanoico. ....	62
Figura 35. Patrón de fragmentación del ácido tetradecanoico. ....	62
Figura 36. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico. ....	63
Figura 37. Espectro de masas del ácido heptadecanoico. ....	64
Figura 38. Espectro de masas del ácido octadecanoico. ....	64

Figura 39. Patrón de fragmentación del ácido heptadecanoico. ....	65
Figura 40. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico. ....	66
Figura 41. Cromatograma de gases de la subfracción C.2.....	69
Figura 42. Cromatograma de gases de la subfracción D.1. ....	72
Figura 43. Cromatograma de gases de la subfracción F.6.1. ....	77
Figura 44. Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico .....	77
Figura 45. Cromatograma de gases de la subfracción F.6.2. ....	78
Figura 46. Espectro de masas del 3-eicoseno. ....	80
Figura 47. Patrón de fragmentación del 3-eicoseno. ....	81
Figura 48. Esquema de fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo de <i>W. berteroi</i> .....	84
Figura 49. Espectro IR de la subfracción 1.2.....	87
Figura 50. Espectro IR de la subfracción 3.2.2.....	91
Figura 51. Cromatograma de gases de la subfracción 3.2.2. ....	91
Figura 52. Éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.....	92
Figura 53. Cromatograma de gases de la subfracción 5.3 .....	96
Figura 54. Espectro de masas del ácido dodecanoico.....	98
Figura 55. Patrón de fragmentación del ácido dodecanoico.....	99
Figura 56. Espectro IR de la subfracción 6.2.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

EEDH: Extracto en éter dietílico de las hojas  
EAH: Extracto alcohólico de las hojas  
EEDF: Extracto en éter dietílico de las flores  
EAF: Extracto alcohólico de las flores  
EEDT: Extracto en éter dietílico del tallo  
EAT: Extracto alcohólico del tallo  
%MPP: Porcentaje de metabolitos presente en la planta  
%MPE: Porcentaje de metabolito presente en cada extracto  
CL<sub>50</sub>: Concentración letal media  
% IAT: Porcentaje de incremento de la actividad respecto al tiempo  
%EAB: Porcentaje de extractos activos contra una misma bacteria  
%BSE: Porcentaje de bacterias sensibles a cada extracto  
CG/EM: Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas  
RMN <sup>1</sup>H: Resonancia Magnética Nuclear de Protón  
RMN <sup>13</sup>C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono  
DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

## RESUMEN

La planta *Waltheria berteroi* (Sterculiaceae), fue recolectada en el Amazonas venezolano y para su estudio, se realizaron extracciones sucesivas de las hojas, tallo y flores con éter dietílico, etanol y metanol, uniéndose las dos últimas extracciones para obtener los extractos alcohólicos y etéreos. A cada uno de ellos, se le realizaron pruebas químicas y biológicas: antibacteriana, antifúngica y letalidad con *Artemia salina*. El análisis químico reveló esteroides insaturados en todos los extractos y saponinas, fenilpropanoides, taninos, metilencetonas, flavonoides y polifenoles en algunos extractos. Los bioensayos demostraron que los extractos poseen actividad letal contra el crustáceo *A. salina*, con valores de  $CL_{50}$  inferiores a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ; siendo el más significativo el extracto alcohólico de las flores con un valor de 48,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de exposición y el extracto alcohólico del tallo exhibió actividad antibacteriana contra las bacterias: *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus leutens*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, ninguno de los extractos presentaron actividad antifúngica. Del fraccionamiento cromatográfico de los extractos alcohólico del tallo y la hoja se obtuvieron diferentes fracciones y algunas de ellas presentaron buena actividad en los bioensayos realizados. Ciertas subfracciones fueron analizadas mediante CG-EM, lográndose identificar los compuestos: éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, 3-eicoseno, los ácidos: dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico, heptadecanoico y octadecanoico, como constituyentes principales de la planta. Con las técnicas espectroscópicas de IR y RMN en una dimensión, se logró identificar el compuesto: éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

Palabras o Frases Claves:

*Waltheria berteroi*, análisis químico, bioensayos, fraccionamiento

## INTRODUCCIÓN

Un particular interés sobre el uso de las plantas medicinales se incrementó considerablemente en la segunda mitad del siglo XX; así como también los estudios químicos y farmacológicos de los productos naturales aislados de éstas (1). De esta manera, los productos naturales o metabolitos secundarios originados de las plantas pueden ser considerados como una fuente incalculable de información para el descubrimiento de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina (2). El conocimiento que la humanidad tiene sobre los poderes curativos de las plantas fue transmitido principalmente de manera verbal de padres a hijos, de brujos a médicos y de sacerdotes a aprendices (3).

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades (4). La acción medicinal de las plantas depende de unas sustancias químicas, denominadas metabolitos secundarios, los cuales resultan ser propios de cada especie y en la mayoría de los casos no tienen utilidad aparente para el ser que los sintetiza; estos metabolitos, en algunas ocasiones poseen estructuras complejas, cuyas propiedades dependen del proceso metabólico que se lleve a cabo en la planta (3,5). A veces, estas sustancias, en concentraciones muy bajas, ejercen sobre los seres vivos diferentes acciones con la finalidad de mejorar e incluso prevenir ciertas anomalías (6).

Diversas especies de plantas ricas en metabolitos secundarios, han sido durante años el principal objeto de estudio por parte del hombre, para la búsqueda de compuestos con alto potencial químico y biológico que beneficien a todos los seres vivos. Por esta razón, en la actualidad, muchos medicamentos que se venden en las farmacias contienen ingredientes activos extraídos o derivados de plantas (7).

Las plantas, en general, poseen una gama muy variada de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, esteroides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, polifenoles, antraquinonas, etc.), que poseen una enorme diversidad de estructuras, obtenidas como producto final de largas rutas metabólicas, donde inicialmente se lleva a cabo el proceso de fotosíntesis (8).

Los metabolitos secundarios gozan del interés de muchos científicos, debido a que estos tipos de compuestos han demostrado tener una enorme efectividad en tratamientos antibacterianos, antiinflamatorios, antitumorales, anticancerígenos, entre otros (7). Es por esto que la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, para agrupar las plantas según sus efectos similares, para conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separar estos compuestos de las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad, y finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, entre otros (9).

El conocimiento sobre los usos de las plantas en la medicina popular se remonta desde la antigüedad y aun en nuestros días, no ha dejado de tener vigencia; ya que en años recientes, se ha reportado una gran variedad de especies del reino vegetal con potentes actividades biológicas, que son empleadas con fines terapéuticos específicos (8,10). Por ejemplo, la infusión de las raíces de *Stevia salicifolia* (Compositae) es utilizada para aliviar los trastornos gastrointestinales, los rizomas de *Cephalis ipecacuanha* (Rubiaceae) han sido usados en el tratamiento de la amibiasis (11). Las hojas, flores y frutos de *Cordia dentada* (Boraginaceae) son usados para el tratamiento del sarampión, laxante y antipirético (2). La cocción de las hojas de *Chromolaena odorata* (Asteraceae) se utiliza en el tratamiento de las heridas por quemaduras y las infecciones superficiales (12).

De igual forma, existen numerosas publicaciones donde se reportan que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Sterculiaceae son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento o cura de ciertas enfermedades; como el caso de las hojas de *Melochia pyramidata*, empleada para aliviar la tos y la bronquitis; así mismo las hojas de *Waltheria americana* son usadas en el tratamiento de la bronquitis, tos y sífilis; por otra parte, la infusión de las flores de *Byttneria* sp., es utilizada para la diabetes, asma e hipertensión (1,13). El sumo del tallo de *Sterculia setigera* es empleado



para calmar el dolor de muela y la gingivitis; además, la cocción del tallo de esta planta es bueno para el asma y enfermedades de la piel (14).

La familia Sterculiaceae, en la actualidad, comprende aproximadamente 70 géneros y 1 500 especies, distribuidas entre árboles y arbustos que presentan flores hermafroditas o unisexuales apétalas y asépalas (15,16). Esta familia de plantas se pueden encontrar en los países tropicales y subtropicales (16). Numerosas investigaciones fitoquímicas y farmacológicas se han realizado en algunas especies pertenecientes a esta familia, entre las cuales destaca *Helicteres angustifolia*, conocida como una especie inhibidora de tumores y sus hojas son utilizadas en Taiwán para el tratamiento de la gripe; además, esta planta posee efectos analgésicos, antiinflamatorios y antibacteriano (17–19). Los estudios fitoquímicos realizados a la corteza de la raíz describen el aislamiento de triterpenoides, cumarinas y derivados del lupano (19).

*Helicteres isora* ha tenido un uso muy amplio en la medicina tradicional en países como China y diversas partes de la India, empleada para tratar la nefritis crónica, úlceras gástricas y la diabetes. Los frutos son astringentes útiles en quemaduras de la piel y tienen buena actividad antiespasmódica. De esta parte botánica de la planta se aislaron cinco flavonoides glucurónidos (20,21). El extracto etanólico de las raíces de *H. isora* presentó actividad antidiabética e hipolipidémica *in vivo* en animales modelos (ratones suizos albinos y *hamsters* con sobrepeso); el aislamiento de los compuestos activos presentes en la planta para definir el mecanismo de su bioactividad se encuentra aún en progreso (22).

Dentro del género *Helicteres*, también, se encuentra *H. baruensis* Jacq, usada folklóricamente en Colombia como anticonceptivo por algunos grupos indígenas y campesinos. El extracto acuoso presentó actividad estrogénica *in vitro*, medida por competencia entre el citosol del útero de coneja contra estradiol radiactivo; los efectos observados en este estudio permitió deducir la existencia de sustancias con efectos antifertilizantes prolongados y relativamente libres de efectos colaterales indeseables. Los extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos de esta planta exhibieron la presencia de esteroides, polifenoles y la ausencia de alcaloides sólo en el extracto de los frutos. Todos estos extractos demostraron tener poca actividad tóxica frente al crustáceo



alcaloides tipo quinolinonas llamadas: waltheriona A, waltheriona B, vanessina, antidesmona y *o*-metiltembamida (Figura 5–9). En la evaluación de la actividad antimicrobiana de dichos alcaloides quinolinonas, sólo la vanessina presentó una débil actividad (28).

Esta clase de alcaloides no es muy frecuente en la familia Sterculiaceae. Por ejemplo, en la literatura sólo se encuentran reportes sobre alcaloides melochinonas y melovinonas, ambos aislados de la *Melochia tomentosa* L, y las esterculininas I y II aisladas de la *Sterculia lychonophora* Hance (28).

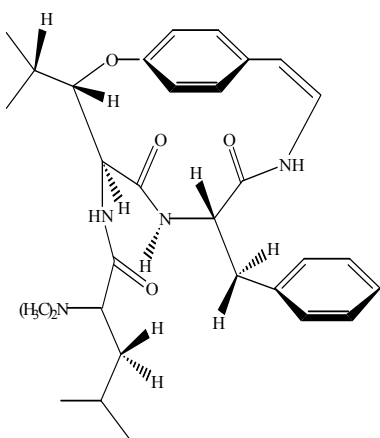


Figura 2. Estructura de waltheriona A.

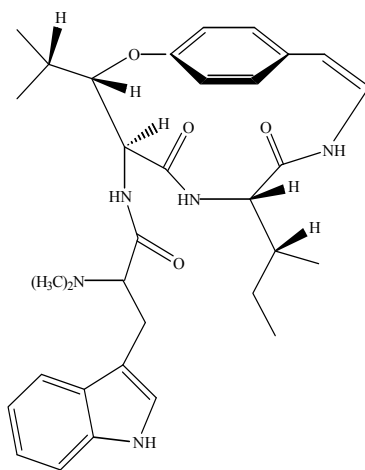


Figura 3. Estructura de waltheriona B.

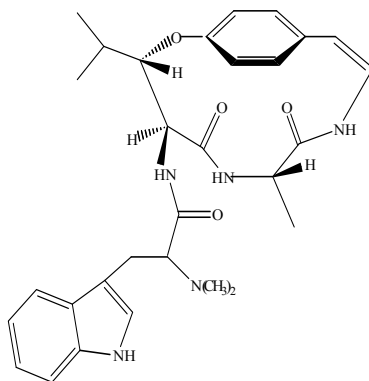


Figura 4. Estructura de waltherina C.

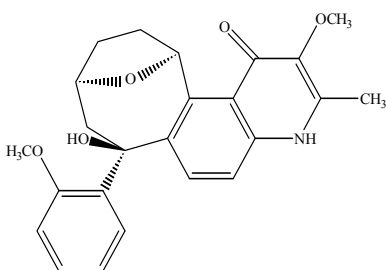


Figura 5. Estructura de waltheriona A.

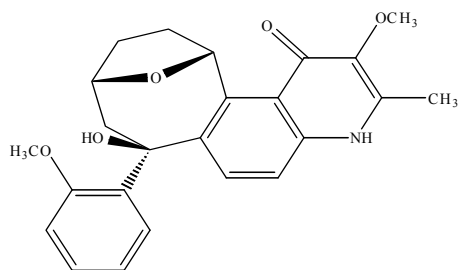


Figura 6. Estructura de waltheriona B.

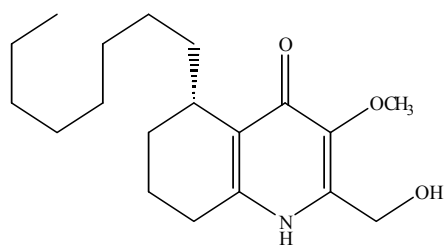


Figura 7. Estructura de vanessina.

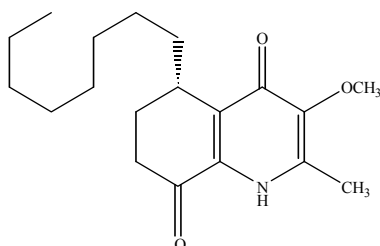


Figura 8. Estructura de *o*-metiltembamida.

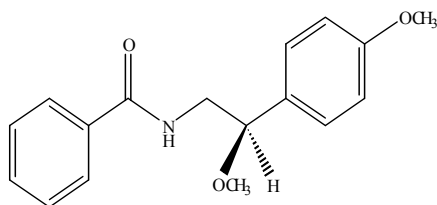


Figura 9. Estructura de antidesmona.

Dentro del género *Waltheria*, se encuentra una especie ampliamente estudiada, llamada *Waltheria indica*, empleada por miles de años en Taiwán y otras ciudades Asiáticas, como tónico para el tratamiento de inflamaciones, protección del hígado, prevención del cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (29). Esta planta también es empleada en algunas regiones de Sur África, en donde es usada en el tratamiento de la malaria, fiebre, enfermedades gastrointestinales y respiratorias (30). Investigaciones químicas mostraron que esta planta contiene alcaloides ciclopeptídicos, flavonoides, flavonoides glicosilados y ácido cafeico; lográndose aislar y caracterizar dos flavonoides conocidos como: 2', 3', 5- trihidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona (Figura

10) y 5,2'-dihidroxi-3, 7, 4',5'-tetrametoxiflavona (Figura 11) (31).

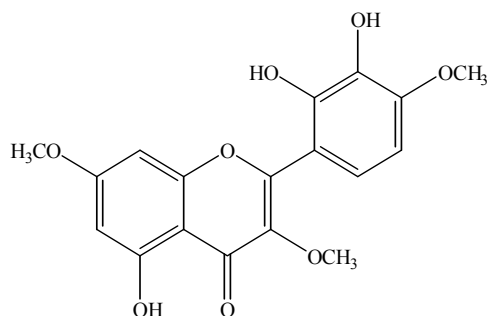


Figura 10. Estructura de 2', 3', 5- trihidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona.

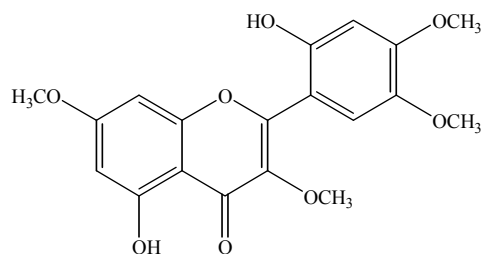


Figura 11. Estructura de 5,2'-dihidroxi-3, 7, 4',5'-tetrametoxiflavona.

Otro estudio proporcionó información sobre los efectos anticancerígenos y antioxidantes de algunos flavonoides y compuestos relacionados, aislados de *W. indica*. En esta investigación se determinó la acción proliferativa de la quercetina (Figura 12), (-)-epicatequina (Figura 13) y tilirosida (Figura 14) contra ciertas líneas celulares de tumores humanos. La evaluación de la actividad antioxidante reveló que estos compuestos presentan un fuerte efecto frente al radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y mostraron un efecto moderado contra el radical superóxido (O<sub>2</sub>) (29).

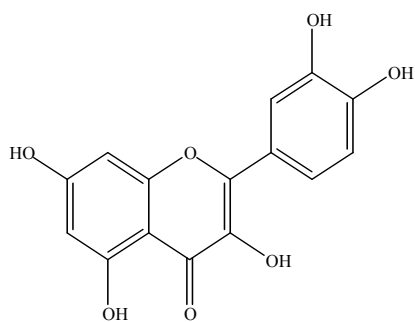


Figura 12. Estructura de quercetina.

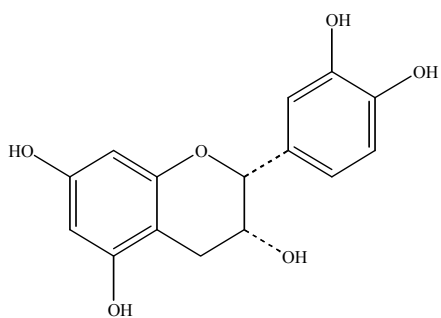


Figura 13. Estructura de (-)-epicatequina.

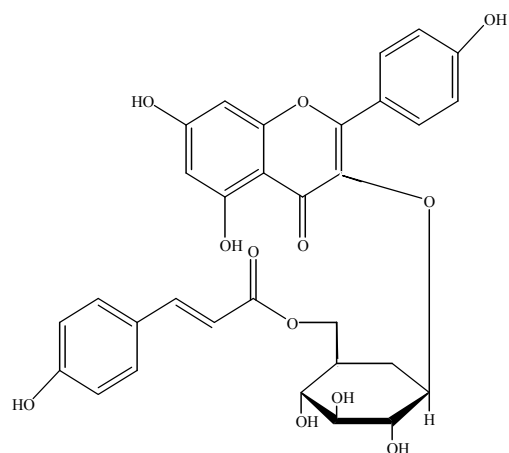


Figura 14. Estructura de tilirosida.

*Waltheria ovata* es otra especie del género con propiedades curativas, la cual es empleada en la medicina popular de Perú, donde es conocida como lucraco, palo negro o negrillo. En este país la infusión de las hojas y tallo de *W. Ovata*, son usadas para tratar afecciones bronquiales y problemas de tos. En las últimas décadas, las raíces de la planta se han utilizado como anti-inflamatorio prostático. En un estudio fitoquímico realizado a la planta entera se detectó la presencia de taninos y/o grupos fenólicos libres, triterpenoides y/o esteroides, alcaloides, catequinas, flavonoides y saponinas (32).

En la actualidad, se hace necesaria la integración de la medicina tradicional-moderna y afrontar integralmente la formulación de los fármacos de origen natural, que recoja el conocimiento popular y lo integre al conocimiento científico. Por esta razón, en Perú se pretende promover investigaciones más profundas, tanto en el campo, como en los laboratorios para lograr la industrialización de la raíz de la *W. ovata*, cuyas cualidades antiinflamatorias prostáticas, bajo su principio activo, que son las flavoninas, están otorgando resultados sumamente alentadores, en cuanto a su consumo y la apertura a nuevos mercados cuya tendencia es hacia la fitoterapia o medicina natural (32).

El género *Waltheria* está representado a nivel mundial por unas 60 especies, ampliamente distribuidas en los países tropicales (33). En Venezuela, se encuentran aproximadamente 10 especies de *Waltheria* distribuidas en las regiones cálidas del país, donde se destaca *W. albicans*, *W. carmensarae*, *W. collina*, *W. glomerata*, *W. indica*, *W. operculata*, *W. viscosissima*, *W. involucrata*, *W. berteroi* e intermedio entre *W. involucrata* y *W. berteroi*; siendo la *W. indica* la de más amplia distribución, comúnmente en vegetación seca y a lo largo de caminos, generalmente, terrenos abiertos y deforestados (34).

Para este género, son pocos los estudios que se han realizado en el país (34). Los primeros reportes sobre *Waltheria* hacen referencia ecológica y medicinal de *Waltheria americana* (35). En otros reportes, sólo señalan el sitio de recolección de las especies *Waltheria americana* y *Waltheria viscosissima*; en cambio, para las especies *Waltheria indica*, *Waltheria viscosissima* y *Waltheria involucrata*, se aportaron importantes datos ecológicos y etnobotánicos (16).

*Waltheria berteroi* (Figura 15) es la especie de interés en esta investigación, sobre



la cual no se han reportado estudios etnobotánicos ni fitoquímicos; sólo se ha informado sobre un estudio taxonómico describiendo el aspecto físico de la planta; el mismo detalla que *W. berteroi* presenta un arbusto de 1,5-3 m de alto con tallo cubierto de una capa de pelos cortos, suaves y entrecruzados, hojas discoloras de 3,5-15,7 cm de largo y 2,7-8,4 cm de ancho, flores de 8,5-9 mm de largo con 5 divisiones de su cáliz de 7-8 mm de largo, 5 pétalos de color amarillo de 5,5-6 mm de largo separados entre sí y 5 estambres de 4-5 mm de largo opuestos a los pétalos; además, *W. berteroi* presenta frutos en forma de cápsula de 3-4 mm de largo con presencia de espinas cortas y según el estudio taxonómico no se observaron semillas. Esta planta se encuentra distribuida al Norte y Oeste de Colombia y Noreste y Sur de Venezuela (34).

De acuerdo a los conocimientos de las propiedades curativas de la familia Sterculiaceae y los interesantes antecedentes del género *Waltheria*, en cuanto a estudios químicos y biológicos, así como el aislamiento de importantes metabolitos secundarios bioactivos, se estimó beneficioso evaluar la especie *W. berteroi* recolectada en el Amazonas venezolano al sur de Puerto Ayacucho; con el propósito de aislar e identificar, en lo posible, algunos metabolitos secundarios presentes en las partes botánicas seleccionadas (tallos, hojas y flores); además de determinar la actividad biológica de los diferentes extractos crudos y algunas fracciones obtenidas de la misma.



*Figura 15. Waltheria berteroi.*

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en esta investigación constituirán un valioso aporte acerca del conocimiento de esta especie, ya que hasta la actualidad no se le conoce ningún uso en la medicina tradicional, ni se tiene información de estudios fitoquímicos previos; así mismo, estos resultados contribuirán de manera significativa en el área de los productos naturales y en la medicina actual, como posibles agentes terapéuticos y como base para la síntesis de nuevos fármacos.

## **METODOLOGÍA**

### **MUESTREO**

Los ejemplares de la planta *W. berteroi*, fueron recolectados en el Estado Amazonas, específicamente en la vía Samariapo, cerca de la Comunidad Indígena Santo Rosario de Aguas Linda, Municipio Ature, Sector el Tobogán de la Selva a 37 km al sur de Puerto Ayacucho, a una latitud +5° 23' 14,18'' y longitud -67° 37' 6,61''. Los ejemplares fueron identificados en el herbario IRBR del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

### **OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS**

El material vegetal se deshidrató a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez separadas las partes botánicas de la planta (hoja, tallo, flores y fruto), se pulverizaron por separado en un molino eléctrico. Posteriormente, se realizó la primera extracción con éter dietílico, dejándose en digestión por 72 horas. Luego de decantado y filtrado el solvente de extracción, el mismo se dejó evaporar a temperatura ambiente, con lo cual se obtuvo el extracto crudo en éter. Seguidamente, el residuo de la planta se colocó en suficiente etanol, el mismo fue filtrado y concentrado a presión reducida en un rotaevaporador. Posteriormente, el residuo se reextrajo con suficiente metanol y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida en un rotaevaporador. Luego, los filtrados concentrados, tanto el metanólico como el etanólico, se unieron para obtener un extracto crudo alcohólico.

### **PRUEBAS BIOLÓGICAS**

La actividad biológica de los extractos crudos y algunas fracciones de las hojas y el tallo obtenidas de *W. berteroi*, se evaluó mediante el uso de los siguientes bioensayos:

### **Actividad letal en *Artemia salina***

Para conocer el grado de toxicidad de los extractos crudos o fracciones se utilizó el crustáceo *Artemia salina*. Los quistes de este organismo se colocaron con agua de mar bifiltrada en un envase plástico provisto de una abertura, que les facilitó la aireación continua durante 24 horas, para obtener los nauplios de *Artemia*.

Este método consistió en la preparación de una solución madre de 10 000 µg/ml del extracto o fracción con agua de mar bifiltrada y dimetilsulfóxido (DMSO), según la solubilidad en éstos. A partir de la solución madre, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1 y 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada. Luego, a cada solución se le agregaron 10 nauplios de *A. salina* y por cada concentración se realizarán 3 réplicas y controles con igual número de réplicas. La mortalidad de los nauplios se determinó una vez transcurridas 48 horas de iniciado el bioensayo y se anotaron el número de organismos muertos en cada una de las concentraciones estudiadas (36).

Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación de un programa de computación diseñado para tal fin; el cual, presenta cuatro métodos: Moving Average, Probit, Logit y Binomial con límites de confianza de 95%. Según este programa de computación, la CL<sub>50</sub> más confiable está determinada por el método que presente el rango más estrecho de límites de confiabilidad (37).

### **Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica se evaluó mediante la utilización de cepas de hongos (Tabla 1) proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología y Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 1. Cepas de hongos empleadas en el bioensayo de actividad antifúngica.

Hongos	Características
<i>Mucor racemus</i>	
<i>Fusarium maniliforme</i>	Patógeno
<i>Trichoderma viridis</i>	
<i>Fusarium poae</i>	

Este método se llevó a cabo incubando cepas de hongos en tubos de ensayo, a temperatura ambiente por una semana. Trascurrido este tiempo, se les agregó, aproximadamente, 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo para remover las esporas y se filtró sobre gasas estériles, con el objetivo de obtener la solución esporangial. La solución obtenida fue inoculada, utilizando hisopos estériles, sobre las capsulas de Petri, previamente preparadas con agar papa dextrosa (PDA). Seguidamente, se utilizó la técnica del antibiograma, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados con aproximadamente 10 µl de una solución preparada con el extracto o fracción a analizar (40 mg del extracto o fracción en 1 ml de un solvente adecuado) y luego se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente. La actividad antimicótica de los extractos y las fracciones, fue detectada al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición que se observó alrededor del disco (38).

### **Actividad antibacteriana**

Para la realización de este bioensayo se utilizaron bacterias certificadas (Tabla 2), existentes en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 2. Cepas de bacterias empleadas en el bioensayo de actividad antibacteriana.

Bacterias	Origen	Características
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	DAI (269JI)	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC (23055)	Gram-negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (25416)	
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA (07)	
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC (27853)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBE (DOC-19)	Gram-positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO (14)	

Esta prueba se realizó por medio de la técnica de difusión en agar, llamada antibiograma, la cual consiste en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µl de una solución preparada con el extracto o fracción a analizar (40 mg del extracto o fracción en 1 ml de un solvente adecuado). Estos discos fueron colocados en una placa de agar Müller-Hinton, previamente inoculados con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^8$  células/ml). Posteriormente, las placas se preincubaron a 5°C por 12 horas, para permitir la difusión del extracto o fracción, y, luego, se incubaron a 37°C durante 48 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. La actividad antibacteriana se verificó midiendo el diámetro (mm) de los halos de inhibición alrededor del disco. Para esta evaluación, se tomó como referencia los criterios expuestos por algunos investigadores del área de productos naturales (39).

## PRUEBAS QUÍMICAS

A cada extracto se les realizaron algunas pruebas con reactivos específicos de identificación de grupos funcionales, que permitieron detectar la posible presencia de algunas familias de metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, saponinas, esteroides,

triterpenos, flavonoides, cumarinas, fenilpropanoides, compuestos fenólicos, metilencetonas, antraquinonas, glucósidos cianogénicos y cardiotónicos. Para la realización de estas pruebas se siguió los métodos descritos en la literatura (3,40).

### **Saponinas**

Para el análisis de saponinas se colocó 0,5 g del extracto crudo en un tubo de ensayo, junto con 2 ml de agua destilada, seguidamente, se agitó el tubo de ensayo vigorosamente durante 30 segundos. La formación de espuma persistente durante 30 min, es indicativo de la presencia de saponinas.

### **Alcaloides**

Del extracto crudo se tomó 0,5 g y se disolvió con HCl al 10%, luego, esta solución se agitó en un embudo de separación con cloroformo. La capa acuosa se alcalinizó con NaOH al 10% y posteriormente, fue tratada con cloroformo. Las tres fases se analizaron con el reactivo de Dragendorff (8 g nitrito de bismuto pentahidratado con 20 ml de ácido nítrico y 27,2 g de yoduro de potasio con 50 ml de agua), la aparición de un precipitado blanco y solución roja o naranja, evidencia la posible presencia de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio.

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

Una porción de 0,5 g del extracto crudo se disolvió con cloroformo y se le agregaron unas gotas del reactivo de Liebermann-Burchard (solución de anhídrido acético y cloroformo 1:1 a 0°C más dos gotas de ácido sulfúrico) recién preparado. Una coloración de azul a verde en la solución indica la presencia de esteroles, mientras que una coloración roja o violeta se considera positiva para triterpenos.

## **Flavonoides**

Del extracto crudo se tomó 0,5 g, se desgrasó con éter de petróleo y se filtró. El residuo se trató con virutas de magnesio y unas gotas de HCl concentrado, hasta no observar desprendimiento de hidrógeno. El ensayo se considera positivo para flavonoides, si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10-20 minutos.

Una pequeña porción del extracto crudo se disolvió en cloroformo y unas gotas de la solución se colocaron sobre el papel de filtro y se observó bajo luz UV. Posteriormente, el papel de filtro fue expuesto a vapores de amonio concentrado por algunos minutos y luego observado bajo luz UV. Un cambio o intensidad del color se considera positiva para flavonoides.

## **Fenilpropanoides**

Para la determinación de fenilpropanoides se emplearon tres tubos de ensayos. En el primer tubo se realizó el testigo, el cual contenía una pequeña parte del extracto disuelto en etanol; en el segundo tubo de ensayo se colocó aproximadamente la misma porción de extracto, se disolvió el etanol y luego se agregó HCl 0,5 mol/l, solución acuosa de nitrito de sodio al 10% y finalmente se añadió solución acuosa de NaOH 2 mol/l. El tercer tubo de ensayo también se preparó como testigo, con todos los reactivos sin el extracto crudo. Una solución rosado púrpura es indicativo de la presencia de fenilpropanoides.

## **Taninos y Polifenoles**

Para la detección de taninos y polifenoles, se pesó 0,5 g del extracto crudo y se disolvió en etanol. Seguidamente, la solución se dividió en dos partes. La primera parte se hizo reaccionar con cloruro de hierro (III) al 1%; el cambio a una coloración parda en



la solución indica la presencia de fenoles. La segunda parte de la solución se trató con una solución al 1% de gelatina en NaCl al 1%, la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos.

### **Glicósidos cardiotónicos**

El extracto crudo (0,5 g) se disolvió en cloroformo y luego se hizo reaccionar con una mezcla (1:1) recién preparada de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) e KOH (0,5 mol/l). Una coloración azul o violeta en la solución se considera positiva para este metabolito.

### **Glicósidos cianogénicos**

Una porción de 0,5 g del extracto crudo se trató con cloroformo y se calentó entre 50-70°C, en un tubo de ensayo cerrado con papel de filtro, impregnado con solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Luego de transcurrido 2 horas, el papel de filtro se observó, en donde los compuestos cianogénicos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel de filtro.

### **Metilencetonas**

Una cantidad de 0,5 g del extracto crudo se disolvió en etanol y posteriormente se trató con el reactivo de Baljet (mezcla de 1 g de ácido pícrico con 100 ml de etanol y 10 g de hidróxido de sodio con 100 ml de agua). Una coloración roja en la solución indica la presencia de metilencetonas.

### **Antraquinonas**

El extracto crudo (0,5 g) se extrajo con una solución de KOH 0,5 mol.l; después, se acidificó con ácido acético y se agitó con benceno. Las capas formadas se separaron y se alcalinizó la capa orgánica con hidróxido de amonio. Una coloración roja en la solución indica antraquinonas presentes.

## **Cumarinas**

Una pequeña parte del extracto crudo (0,5 g) se colocó en un tubo de ensayo y se disolvió en etanol. El tubo de ensayo se cerró con papel de filtro impregnado en solución diluida de NaOH; luego, se calentó la solución en un baño de agua a 100°C por varios minutos. El papel fue removido y examinado bajo luz UV. Una fluorescencia amarilla es indicativa de cumarinas.

## **FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS**

Los extractos alcohólicos de las hojas y el tallo obtenidos a partir de la especie en estudio y las fracciones de distintas polaridades provenientes de estas partes botánicas, se fraccionaron por distintas técnicas cromatográficas, para separar y purificar los compuestos presentes. Entre las técnicas cromatográficas empleadas, se encuentran:

### **Cromatografía de columna (CC)**

Se utilizó la cromatografía en columna (CC) por gravedad, usando columnas de vidrio de diámetros y longitudes, según la masa del extracto o fracción a separar; como fase estacionaria se empleó sílica gel 35-70 mesh y como fase móvil, se utilizaron distintos solventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo y metanol) y mezclas de solventes, variando en forma creciente su polaridad.

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

Otro tipo de cromatografía que se empleó en esta investigación fue la cromatografía de capa fina (CCF), la cual se realizó en placas cromatográficas de vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup>, cubiertas con una capa de 0,5 mm de espesor de sílica gel 60 mesh. Este

tipo de cromatografía se utilizó para agrupar las fracciones y subfracciones obtenidas en la CC, tomando en cuenta los valores de  $R_f$  de cada uno de los eluatos.

Para separar y obtener los compuestos puros de las fracciones combinadas se utilizó la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP); en esta cromatografía la muestra se colocó en placas cromatográficas de vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup>, cubiertas con una capa de 1,0 mm de espesor de sílica gel 60 mesh.

Las CCF se revelaron con una solución de molibdato de amonio al 10% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%, y para las CCFP se utilizó luz ultravioleta (UV) de onda corta (100-280 nm). Para ambas cromatografía se usaron mezclas de solventes de diferentes polaridades como fase móvil.

## **CARACTERIZACIÓN**

Para la elucidación de las estructuras moleculares de los compuestos aislados, se emplearon, técnicas espectroscópicas, tales como resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR), y espectrometría de masas.

### **Espectroscopia infrarroja**

La radiación infrarroja corresponde a energías relacionadas con las vibraciones moleculares. Los espectrofotómetros de infrarrojo (IR) cubren las regiones de tensión (estiramiento) y deformación (flexión) molecular, permitiendo observar absorción por parte de las moléculas en estas regiones. El análisis del espectro IR ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en las estructuras de los compuestos aislados. El empleo de esta técnica consiste en mezclar la muestra con KBr y prensarlas para obtener pastillas delgadas o en disolver la muestra en CHCl<sub>3</sub> y colocarlas en celdas de NaCl o KCl. Luego, serán analizadas en un espectrómetro de IR con transformada de Fourier (FT-IR).

Los espectros de IR de los compuestos obtenidos de la planta *W. berteroi*, se llevaron a cabo en el Intituto Universitario Tecnológico (IUT) de Cumaná, para ésto las

muestras fueron disueltas en  $\text{CHCl}_3$  y colocadas en placas de KCl, luego se analizaron en un espectrofotómetro de FT-IR 16 PC marca Perkin Elmer.

### **Espectroscopia de RMN**

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares; basada en la medida de absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias, por los cambios de orientación del spin nuclear de ciertas moléculas orgánicas, en presencia de un campo magnético fuerte.

La espectrometría de RMN se utiliza para estudiar una amplia variedad de núcleos, sin embargo, prefieren los núcleos de número cuántico de espín nuclear igual a  $\frac{1}{2}$ . Uno de los isótopos más abundante y útil en la elucidación de estructuras es el  $^1\text{H}$ , dando lugar a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón. También es importante en química orgánica el  $^{13}\text{C}$ , aunque se trata de un núcleo poco abundante y poco sensible. En el campo de los productos naturales, la RMN más útil es la de protón ( $^1\text{H}$ ) y la del carbono ( $^{13}\text{C}$ ), ya que estos elementos son los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas (8,41).

La espectroscopia de RMN es la herramienta más poderosa de la que se dispone actualmente para la determinación de una estructura orgánica, ya que el espectro de RMN  $^1\text{H}$  proporciona información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen cada hidrógeno; por otra parte la RMN  $^{13}\text{C}$ , también da información de los grupos funcionales presentes en las moléculas, así como del número y tipos de carbonos que provocan cada señal observada en el espectro. Esta técnica espectroscópica, además, posee la ventaja de utilizar pequeñas cantidades de muestra para el análisis, sin ser destruida.

Las estructuras de los compuestos aislados, obtenidos en la separación cromatográfica de *W. berteroi*, se elucidaron mediante RMN unidimensional (RMN  $^1\text{H}$ ,

$^{13}\text{C}$  y DEPT). Para tal fin, las muestras fueron analizadas en el Instituto Venezolano de Investigación Científicas (IVIC) en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Para la obtención de los espectros, las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y colocadas en un tubo de resonancia, el cual fue introducida en el equipo de RMN. Los desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$  o  $\delta_{\text{C}}$ ) obtenidos en los espectros se reportaron en ppm y en relación con un estándar interno de tetrametilsilano (TMS).

### **Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es el método más simple que permite la medición de iones derivados de moléculas (fragmentos) para determinar la masa molar de un compuesto, además de su fórmula molecular correspondiente. Esta técnica puede ser llevada a cabo utilizando pequeñas cantidades de muestras vaporizadas; sobre la cual se hace incidir un rayo de electrones (u otras partículas) de alta energía, lo que hace que se rompan las moléculas en varios fragmentos y separándolos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) (42).

Para el análisis de mezclas complejas, se separan e identifican los compuestos presentes en las mismas, mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM). El cromatógrafo de gases se utiliza como separador de la muestra desconocida en sus distintos componentes y el espectrómetro de masas ioniza los componentes separados y realiza un barrido electrónico de todos los iones, para ubicarlos por comparación de los tiempos de detección y masas obtenidas, con una librería o base de datos.

Diferentes subfracciones obtenidas de *W. berteroi* se analizaron mediante la utilización de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa. Estos análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV) en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar; utilizándose un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard (HP) modelo 5890 serie II, acoplado a un detector de masa marca Hewlett Packard (HP) modelo 5971 A, con una fuente de ionización por impacto electrónico.

Las muestras fueron inyectadas en una columna de metilsilicona de 25 m x 0,18 D.I x 0,18 mm de espesor y helio (He) como gas de arrastre. La temperatura de inyección fue de 280 °C y la temperatura de inicial de horno fue de 70 °C, con una rapidez de calentamiento de 6 °C por minuto. La identificación de los compuestos se realizó por comparación computarizada utilizando la librería Wiley.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*W. berteroi* es una especie de planta que sólo cuenta con un estudio taxonómico, fue evaluada mediante análisis fitoquímico y biológico, para conocer en lo posible la familia de metabolitos secundarios y las propiedades antimicrobianas y tóxicas que esta planta pueda presentar en las partes botánicas seleccionadas (hoja, tallo y flor).

### RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS DE LA HOJA, TALLO Y FLOR DE *W. berteroi*

Una vez obtenidas las distintas partes botánicas completamente secas de *W. berteroi*, se procedió a pesar el material vegetal a ser extraído. Luego de las extracciones realizadas, se obtuvieron masas de 3,1959 g, 1,3017 g y 0,3345 g para los extractos crudos etéricos de la hoja, tallo y flor, respectivamente. Para los extractos crudos alcohólicos se obtuvieron masas de 24,1982 g, 7,8929 g y 1,0165 g correspondiente a la hoja, tallo y flor respectivamente. En los extractos etéricos se obtuvieron los compuestos menos polares y en los extractos alcohólicos los compuestos más polares. La Tabla 3 muestra los rendimientos de los extractos de cada parte botánica en estudio.

Tabla 3. Masas de los extractos de los diferentes órganos de la planta *W. berteroi*.

Órgano	Cantidad (g)	Extracto etérico (g)	Extracto alcohólico (g)	Rend. (%)
Hoja	149,1	3,1959	22,9363	17,53
Tallo	125,4	1,3017	7,3486	6,90
Flor	5,6	0,3345	1,0165	24,13

Según los resultados expuestos en la tabla, tanto el extracto etérico como el alcohólico de la hoja, presentaron mayor cantidad de extracto, luego le siguen el tallo y finalmente los extractos de la flor. Las cantidades de extracto obtenidas, están estrechamente relacionadas con la cantidad de material vegetal seco utilizado en las extracciones. Además, los resultados indican que las cantidades de los extractos alcohólicos son superiores a los extractos etéricos, por lo que se puede pensar, que la

planta *W. berteroi* tiene la particularidad de producir mayormente compuestos polares, o también puede ser que se logre una mayor extracción con solventes polares, ya que se extrae cualquier residuo lipídico.

## ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Los resultados del análisis fitoquímico revelaron que *W. berteroi* es capaz de biosintetizar ciertas familias de metabolitos secundarios tales como: saponinas, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides insaturados, polifenoles, taninos y metilencetonas. Estas clases de metabolitos secundarios se encontraron distribuidos, algunos de ellos, en la hoja, tallo y otros en la flor de *W. berteroi*, como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Familia de metabolitos presentes en la planta *W. berteroi*.

Familia de Metabolitos	Hoja		Tallo		Flor		%MPP
	EED	EA	EED	EA	EED	EA	
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	0
Saponinas	-	+	-	+	-	-	33,33
Esteroides insaturados	+	+	+	+	+	+	100
Triterpenos pentacíclicos	-	-	-	-	-	-	0
Taninos	-	-	-	-	+	-	16,66
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	0
Polifenoles	-	+	-	-	-	-	16,66
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	-	-	-	0
Metilencetonas	-	-	-	-	+	-	16,66
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	0
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	0
Flavonoides	-	+	-	+	-	+	50
Fenilpropanoides	-	+	-	+	-	+	50
<b>%MPE</b>	<b>7,69</b>	<b>38,46</b>	<b>7,69</b>	<b>30,77</b>	<b>23,08</b>	<b>23,08</b>	

EED: Extracto en éter dietílico; EA: Extracto alcohólico; (+): Detectados; (-): No detectados; %MPP: Porcentaje de metabolitos presentes en la planta; %MPE: Porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto.



En la Tabla 4 se puede apreciar, que los extractos etéricos y alcohólicos de todas las partes botánicas en estudio mostraron la presencia de esteroides insaturados, con un porcentaje de metabolito presente en la planta (%MPP) del 100%, es decir, los esteroides insaturados se encuentran distribuidos en toda la planta; luego se encuentran los flavonoides y fenilpropanoides que poseen un %MPP de 50%; ya que estos metabolitos solo se detectaron en los extractos alcohólicos de cada parte botánica de la planta. Después con un porcentaje de metabolito presente de 33,33%, correspondiente a las saponinas, que sólo se encontraron en los extractos alcohólicos del tallo y las hojas. Por último, con un %MPP de 16,66% se tiene a los taninos, polifenoles detectados en el extracto alcohólico de las hojas y las metilcetonas detectadas en el extracto etérico de la flor.

En cuanto al porcentaje de metabolito presente en cada extracto (%MPE) se observa, que el extracto alcohólico de las hojas mostró el mayor porcentaje de metabolitos detectados con un 38,46% y el extracto alcohólico del tallo presentó un 30,77%. Los extractos etéricos y alcohólicos de la flor evidenciaron el mismo porcentaje (23,08%), pero diferentes metabolitos detectados y los extractos con el menor porcentaje de 7,69%, equivalente a un sólo metabolito manifestado, lo presentaron los extractos etéricos de las hojas y el tallo.

Los esteroides insaturados son una clase de metabolitos que se encuentra incluido en la diversidad de compuestos naturales que comprende los esteroides. Los esteroides son 3  $\beta$ -hidroxiesteroides cristalinos que contienen una cadena lateral alifática. Estos compuestos están muy difundidos y se encuentran tanto libres como ésteres o como glicósidos. Distintas cadenas laterales dan lugar a una serie de esteroides muy abundantes y característicos de plantas; tales como: estigmasterol, sitosterol, brasicasterol, campesterol, etc (43).

La principal función de los esteroides en las plantas, es formar parte de la membrana celular para proporcionarle estabilidad, además de proteger a las plantas de ciertos insectos (44). Científicos describen que el rol de los fitoesteroides para el bienestar de la humanidad es poco entendido; sin embargo, hay evidencia de que algunos fitoesteroides son efectivos contra enfermedades cardiovasculares (8).

La Tabla 4 también muestra, que todos los extractos alcohólicos de *W. berteroi* exhibieron la presencia de fenilpropanoides y flavonoides. Los fenilpropanoides son importantes compuestos de muchos aceites esenciales, caracterizados por presentar un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos. Estos compuestos son derivados biosintéticamente del ácido shiquímico y como ejemplos de fenilpropanoides se incluyen la hidroxycumarinas, fenilpropanos y los lignanos. Los fenilpropanoides parecen ser los determinantes del efecto antiagregante plaquetario y antirretracción de coágulo sanguíneos, detectado en diversas plantas; además estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (45, 46).

Por otro lado, los flavonoides son los metabolitos secundarios más difundidos, ya que se encuentran en angiospermas y gimnospermas, raramente en pteridofitas y briofitas (43). Estos metabolitos poseen dos anillos bencénicos separados por una cadena propanoica y son derivados de flavonas (8).

Los flavonoides cumplen múltiples funciones en las plantas, entre las cuales se destaca, la de atraer ciertos insectos favoreciendo así, la polinización, protegen a las plantas contra el ataque de otros insectos, las infecciones a virus o a hongos, controlan el proceso de crecimiento en colaboración con las hormonas correspondientes, inhiben la acción enzimática y participan en los sistemas redox de las células vegetales (43). La acción farmacológica de los flavonoides es extensa y variada; bien conocidos son sus actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, etc (8, 43).

Las saponinas también fueron detectadas en los extractos alcohólicos del tallo y la hoja. Esta familia de metabolito esta formada por glucósidos triterpénicos de alta masa molecular que contienen un grupo azúcar unido a un esteroide u otro triterpeno. Biosintéticamente, las saponinas están compuestas de seis unidades de isopreno y también pueden ser derivados de escualenos (8). Estos compuestos tienen propiedades expectorantes, diuréticas, depurativas, disminuyen el colesterol y poseen acción hemolítica sobre los glóbulos rojos; además, se incluyen sus actividades antimicrobianas, antitumoral, citotóxicas, insecticidas, antiinflamatorias, antiúlceras, analgésicas, antipiréticas, sedantes, antimicóticas, entre otras (40, 47).

El estudio fitoquímico realizado a *W. berteroi*, reveló la presencia de polifenoles sólo en el extracto alcohólico de las hojas. Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas, que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Estos compuestos son importantes para la fisiología de las plantas, pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad, por su continua exposición a estresantes cambios ambientales; incluyendo radiaciones ultravioletas y altas temperaturas. Los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las lipoproteínas de baja densidad del daño oxidativo (40).

En el estudio fitoquímico, también, se detectaron taninos y metilencetonas; pero sólo en el extracto etérico de la flor. Los taninos son compuestos polifenólicos de alta masa molecular que se caracterizan por ser astringentes, debido a su capacidad de unión a proteínas, formando complejos estables y poseen gustos muy amargos (40). Esta clase de metabolito comúnmente en las plantas, se pueden encontrar en el tejido leñoso, así como también, en las flores o semillas de las plantas (8). En las plantas, los taninos cumplen la función de protegerlas contra las heridas que sufren, a causa de los ataques exteriores; bien porque estos metabolitos resultan ser tóxicos para los microorganismos o herbívoros; ya que no son digeribles para estos últimos (40).

Varios autores reportan un estudio sobre los taninos como agentes anticancerígenos, antivirales, fotoprotectores, antioxidantes, cicatrizantes, antimicrobianos e inhibidores de proteasas. Muchas plantas ricas en taninos han sido y continúan siendo empleadas en la práctica farmacéutica etnobotánica por muchos pueblos para tratar los problemas de salud a los que se enfrentan (48-51). Por su parte, las metilencetonas son metabolitos que poseen propiedades antioxidantes, antitumoral, antimicrobiana, etc (52).

Dentro del género *Waltheria*, ya han sido reportados algunas de las familias de metabolitos secundarios detectados en *W. berteroi*; por ejemplo, *W. viscosissima* y *W. ovata*; donde según estudios químicos realizados en estas plantas, las mismas exhibieron la presencia de esteroides insaturados. Otras especies como: *W. indica*, *W. ovata* y *W. americana* presentaron flavonoides dentro de su composición química; las saponinas

fueron detectadas en *W. viscosissima* y *W. ovata*; otros metabolitos como los taninos, mostraron su presencia en *W. ovata* (31, 32, 53, 54).

El hecho de que algunos metabolitos secundarios no fueron detectados, durante la realización de las pruebas químicas, no significa la completa ausencia de estos compuestos en los extractos crudos. Una de las causas por las cuales los metabolitos no fueron detectados puede ser, por la baja concentración en que estos compuestos se encuentran en los extractos. Otra probabilidad puede ser debida, a que la mezcla de compuestos presente en los extractos, impida por efecto sinérgico, que se pueda evidenciar la presencia de ciertos metabolitos.

## **ANÁLISIS BIOLÓGICO**

En los últimos años, se han incorporado algunos ensayos biológicos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de la actividad letal, antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales, conduciendo de esta forma hacia los principios activos (55-57).

Con el objetivo de conocer las actividades letal y antimicrobiana de los extractos crudos y algunas fracciones provenientes de *W. berteroi*, se realizaron tres bioensayos con procedimientos económicos y fáciles de ejecutar; en el cual los resultados se describen a continuación

### **Actividad Letal**

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados, lo ocupa el ensayo de *A. salina*. Este es un ensayo de amplio uso que determina el efecto letal de los extractos vegetales en larvas de *A. salina*, prediciendo su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivos de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (55-57).

En tal sentido, a los extractos crudos de *W. berteroi* se les evaluó su letalidad frente al crustáceo *A. salina*, arrojando resultados de concentración letal media (dosis letal que mata el 50% de los organismos),  $CL_{50}$ , por debajo de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , en cada

extracto estudiado (Tabla 5).

Los valores que se muestran en la Tabla 5, indican que los extractos poseen principios biológicamente activos, con posibles propiedades antitumorales y/o pesticidas, que le confieren un carácter letal o citotóxico sobre *A. salina* (58). Además, en la tabla se observa que el extracto alcohólico de la flor (EAF) posee el valor de  $CL_{50}$  más bajo 48,45  $\mu\text{g/ml}$ , a las 24 horas de montado el bioensayo, lo que está relacionado con una mayor actividad letal contra *A. salina*. Por lo tanto, se piensa que el EAF es el que contiene los metabolitos más bioactivos para la actividad letal, luego le sigue el extracto en éter dietílico de la hoja (EEDH) y el extracto alcohólico del tallo (EAT) con valores de  $CL_{50}$  igual a 206,42  $\mu\text{g/ml}$  en ambos extractos.

Tabla 5. Actividad letal de los extractos de *W. berteroi* contra el crustáceo *A. salina*.

Extractos	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		% IAT	
	24 horas	48horas		
Hoja	EED	206,42	20,64	90,00
	EA	316,23	248,05	21,56
Tallo	EED	484,45	24,81	94,88
	EA	206,42	20,64	90,00
Flor	EA	48,45	20,64	57,40

EED: Extracto en éter dietílico; EA: Extracto alcohólico,  $CL_{50}$ : Concentración letal media en  $\mu\text{g/ml}$ , % IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

Según investigaciones se reporta, que valores de  $CL_{50}$  menores a 1000  $\mu\text{g/ml}$ , son considerados buenos resultados, en cuanto a la actividad antitumoral; ya que este bioensayo se utiliza para la preevaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos con propiedades antitumorales. Además, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de larvas de *A. salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388) (leucemia *in vivo*) (3, 38, 55, 58).

En la Tabla 5, también se puede apreciar el incremento de la actividad letal con respecto al tiempo (%IAT), donde los resultados más destacados fueron los extractos

tanto etéreo como alcohólico del tallo con 94,88% y 90,00% respectivamente. Así mismo, se observó un 90,00% del incremento de actividad letal en el EEDH.

El aumento de la actividad letal en relación al tiempo puede deberse a una alteración del proceso de desarrollo de los nauplios de *A. salina*, por efecto de los principios activos presentes en los diferentes extractos orgánicos, ya que a las 48 horas del bioensayo, la membrana celular que protege a estos organismos se ha debilitado por la exposición a los extractos; permitiendo de esta manera que los compuestos activos actúen con mayor efectividad (59).

La actividad letal de algunas fracciones y subfracciones procedentes de la separación cromatográfica de los extractos del tallo y la hoja, se irán identificando en las secciones siguientes y los resultados de letalidad se muestran en las tablas A1-A4 del apéndice A, donde se observan valores interesantes y significativos de  $CL_{50}$ , ya que se encuentran muy por debajo de 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Actividad Antibacterial**

Con el pasar de los años, las drogas utilizadas para combatir las bacterias han llegado a ser menos efectivas contra estas. La emergencia que origina la resistencia de las bacterias a los antibióticos suministrados, incentiva a los científicos para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos; por lo que la protección que presentan los extractos de plantas contra algunos microorganismos, representa un punto de partida para la búsqueda de nuevas drogas antimicrobianas (8).

El bioensayo de actividad antibacterial reveló que el EEDH presentó actividad leve frente a la bacteria Gram-negativa *Bacillus subtilis*; mientras que el extracto en éter dietílico del tallo (EEDT) no mostró actividad frente a ninguna de las bacterias ensayadas, en cambio, el extracto alcohólico de las hojas (EAH) y EAF exhibieron actividad leve contra la bacteria Gram-positiva *Escherichia coli*, y el EAH también mostró actividad leve contra la bacteria Gram-negativa *Acinetobacter calcoaceticus*. Por su parte, el EAT presentó una actividad antibacteriana leve frente la mayoría de las bacterias ensayadas, con un efecto bacteriostático (capacidad de bloquear el crecimiento

e inhibir la multiplicación de bacterias) (Tabla 6).

Según los resultados mostrados en la Tabla 6, se observa que el extracto alcohólico del tallo resultó activo frente a la mayoría de las cepas bacterianas ensayadas: *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus leutens*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este extracto mostró poseer el mayor porcentaje de bacterias sensibles a sus compuestos con un %BSE de 75%. Por el contrario, se observó un comportamiento inhibitorio totalmente distinto en el extracto etéreo del tallo, ya que no mostró actividad contra ninguna de las bacterias empleadas.

Tabla 6. Actividad antibacterial de los extractos crudos de la planta *W. berteroi*.

Microorganismos	Hoja		Tallo		Flor	%EAB
	EDD	EA	EDD	EA	EA	
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	+	40
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	-	20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	+	-	+	-	40
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	-	20
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	20
<i>Micrococcus leutens</i>	-	-	-	+	-	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	-	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	20
<b>%BSE</b>	12,50	25	0	75	12,50	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hay actividad, %EAB: Porcentaje de extractos activos contra una misma bacteria, %BSE: Porcentaje de bacterias sensibles a cada extracto.

Para el resto de los extractos ensayados, la actividad antibacteriana sólo se observó para ciertas bacterias; por ejemplo el extracto alcohólico de las hojas mostró un %BSE de 25% contra las bacterias *Escherichia coli* y *Acinetobacter calcoaceticus*; en cambio, el extracto etéreo de las hojas exhibió 12,50% de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*, así como también, el extracto alcohólico de las flores presentó un 12,50% de inhibición contra la bacteria *Escherichia coli*.

Los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano puede estar relacionado con la naturaleza del microorganismo, la presencia de más de un compuesto activo y la concentración en la que estos se encuentren en los extractos, así como también, al efecto sinérgico que ejercen los compuestos (60). Debido a esto, se muestra en la Tabla 6 que los extractos alcohólicos de las hojas y la flor resultaron ser activos contra la bacteria *Escherichia coli* y los extractos alcohólico de las hojas y el tallo mostraron actividad frente la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*, en ambos casos el porcentaje de extractos activos contra una bacteria (%EAB) fue de 40%, el porcentaje más alto que se observa en la tabla.

Se pudo notar que los extractos activos fueron los más polares (alcohólicos), lo que se tiende a pensar que en ellos se encuentran la mayoría de los compuestos con posible actividad antibacteriana. En todas las demás bacterias se observa un %EAB de 20%, lo que indica resistencia de estos microorganismos frente a los extractos ensayados.

La actividad presentada por los extractos, pudiera estar vinculada con la familia de metabolitos que se detectó en los extractos crudo de *W. berteroi*, ya que se ha reportado que algunos metabolitos secundarios (polifenoles, saponinas, flavonoides, etc) poseen actividad antibacteriana (61-63).

Como ejemplo de lo anteriormente dicho, se ha publicado que los polifenoles, una clase de metabolito que encierra varios compuestos, poseen acción bacteriostática contra *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* y *Pseudomonas aeruginosa* y tiene acción bactericida sobre *Pseudomonas pseudomalliea*; además, inhiben *in vitro* el crecimiento de *Vibrio cholerae*, varios *Streptococcus* y otras bacterias. Se considera que la acción de los polifenoles contra las bacterias se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisterna, así como también, actuando sobre los polipéptidos de la pared celular o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas (61).

La acción antibacteriana que poseen algunos metabolitos secundarios en gran parte es gracias a la novedad de sus estructuras, es decir, el gran tamaño y las complejas estructuras de estos compuestos facilitan que ellos puedan interactuar en procesos biológicos complejos, como son las interacciones proteína-proteína. En relación con lo



antes mencionado, ciertas publicaciones reportan que los mecanismos de acción antibacteriana puede ser a través de varios procesos: inhibición de la síntesis de la pared celular, interrupción del metabolismo del ADN, inhibición de la síntesis de proteína, alteración de la permeabilidad de la membrana celular e inhibición del metabolismo celular (64).

Los resultados de la actividad antibacterial de *W. berteroi*, se ajustan satisfactoriamente con los resultados obtenidos en algunas investigaciones realizadas a otras *Waltherias*; ya que algunas publicaciones reportan que varias especies pertenecientes a este género poseen actividad antibacteriana contra ciertas bacterias, por ejemplo, *W. indica* posee actividad antibacterial contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (30,31,65). *W. douradinha* presenta actividad contra *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis* (28-66). *W. lanceolata* utilizada para tratar la diarrea, vómito y tos, mostró actividad contra *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (67,68).

Este bioensayo, fue aplicado a ciertas fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de los extractos alcohólicos del tallo y la hoja; observándose que dos fracciones del extracto alcohólico de las hojas y una fracción del extracto alcohólico del tallo mostraron actividad inhibitoria frente a las mayoría de la bacterias ensayadas. Estos resultados se resumen en la Tabla B1 del apéndice B y serán discutidos posteriormente durante el fraccionamiento cromatográfico.

### **Actividad Antifúngica**

La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular contra diversos hongos, los cuales causan infecciones frecuentes en humanos, ha sido ampliamente estudiada, debido a los efectos adversos de algunas de las drogas antifúngicas utilizadas actualmente, que son poco efectivas e inducen frecuentemente la resistencia de muchos hongos. Debido a los elevados costos de los tratamientos antimicóticos, numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos procedentes de plantas para

el tratamiento de estas infecciones.

Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica ensayada a cada uno de los extractos de *W. berteroi*, revelaron que ninguno de los extractos presentó actividad contra los hongos ensayados. La ausencia de actividad antifúngica, es posible que se deba a la mezcla de compuestos presentes en los extractos crudos, es decir, unión o sinergia de todos los compuestos impide, que el o los principios activos muestren su actividad; también puede ser que la ausencia de actividad antifúngica esté relacionada con la constitución de la pared celular fúngica, la cual, está formada por polisacáridos entrecruzados, proteínas y glucoproteínas, que le proporcionan al hongo estabilidad osmótica y rigidez. La estructura de los hongos hace difícil crear antibióticos con toxicidad selectiva para los mismos (69).

El bioensayo de actividad antifúngica, fue aplicado a ciertas fracciones obtenidas de los extractos alcohólicos del tallo y la hoja. Como resultado del mismo, se obtuvo una actividad moderada para una fracción de extracto del tallo, donde se puede inferir que el efecto antagónico producido por los compuestos presentes en el extracto crudo no permitió la inhibición del crecimiento fúngico, mientras que luego de una separación cromatográfica se pudo apreciar que una de las fracciones (específicamente C) mostró actividad contra el hongo *Fusarium poae*, lo cual indica un efecto antagónico presente en el extracto alcohólico del tallo, dado que éste no exhibió actividad antifúngica contra ninguno de los hongos ensayados. En el apéndice C (Tabla C1), se observan los resultados del bioensayo practicado a las fracciones.

## **FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO**

Debido a que no se encontraron reportes bibliográficos sobre la composición química de la especie en estudio, se consideró interesante aplicar varias técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, capa fina y capa fina preparativa), con el principal objetivo de separar y purificar, en lo posible, algunos compuestos químicos presentes en los extractos alcohólicos crudos del tallo y las hojas de *W. berteroi*. Estos

extractos fueron seleccionados para ser fraccionados, debido a los buenos resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana y letal.

### **Fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo (EAT) de *W. berteroi***

El extracto alcohólico del tallo (EAT) fue fraccionado por cromatografía de columna (CC) sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 mm) como fase estacionaria, en una columna de 2 cm de diámetro y 60 cm de alto aproximadamente. La relación sílica – extracto fue de 1:50 (g de extracto: g de sílica); se utilizó 2,0133 g de extracto y 100,6650 g de sílica gel. Como fase móvil se emplearon mezclas de solventes de polaridad variada, iniciándose la cromatografía con un solvente menos polar (hexano) y finalizando con uno más polar (metanol). Se recolectaron 50 eluatos de 75 ml cada uno (Tabla 7).

Tabla 7. Fraccionamiento del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1-2	100
Hexano- Acetato de etilo	3-10	80-20
Hexano- Acetato de etilo	11-22	60-40
Hexano- Acetato de etilo	23-29	40-60
Hexano- Acetato de etilo	30-33	20-80
Acetato de etilo	34-39	100
Acetato de etilo- Metanol	40-44	50-50
Metanol	45-50	100

Los 50 eluatos recolectados fueron agrupados en 8 fracciones (Tabla 8), según el comportamiento de cada eluato observado en la cromatografía de capa fina (CCF) y por comparación de los  $R_f$  más resaltantes observada en la misma. Para la CCF se emplearon mezclas de solventes de diferentes polaridades y proporciones como 4:1; 3:2 hexano – acetato de etilo y 1:1; 1:4 acetato de etilo – metanol. Como agentes reveladores

se emplearon luz ultravioleta de longitud de onda corta (100 – 280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio al 3%.

Luego de la cromatografía de columna se recuperó una masa total de 1,5858 g, lo que representa el 78,76% del material orgánico cromatografiado. La pérdida del material después del fraccionamiento, puede deberse a la adsorción del extracto sobre la sílica gel y al hecho que el extracto es alcohólico, por lo que contiene en su mayoría compuestos muy polares, que no pudieron separarse con metanol durante la cromatografía.

A cada una de las fracciones obtenidas se les realizaron CCF, empleándose solventes como hexano y metanol al 100% y diversas mezclas de solventes en diferentes proporciones (3:2; 1:1; 2:3; 1:4 hexano – acetato de etilo y 3:2; 1:1 acetato de etilo – metanol) y los agentes reveladores mencionados anteriormente; así como también a ciertas fracciones (C, D, E, F y G), se le realizaron pruebas de actividad antimicrobiana y letalidad con *A. salina*.

Tabla 8. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EAT de *W. berteroi*.

Fracciones	Eluatos	Masas (mg)
A	1-5	117,40
B	6-11	152,80
C	12-17	206,80
D	18-24	98,60
E	25-36	143,80
F	37-41	598,10
G	42-45	175,60
H	46-50	92,70

Luego de realizadas las CCF, se decidió analizar las fracciones A y B por presentar después de la revelación de las placas cromatográficas, manchas definidas y  $R_f$  diferentes. Sin embargo, aunque el resto de las fracciones mostraron ser mezclas de compuestos con  $R_f$  muy próximos, los resultados de las pruebas biológicas evidenciaron que la fracción C posee actividad leve contra las bacterias *Escherichia coli*,

*Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, con un porcentaje de bacterias sensibles a un extracto (%BSE) de 75%, uno de los valores más altos obtenidos en el bioensayo realizado a estas fracciones (apéndice, Tabla B1).

La fracción C presentó actividad moderada frente al hongo *Fusarium poae*; con un porcentaje de hongos sensibles a un extracto (%HSE) de 25%, único valor que se obtuvo, ya que esta fracción fue la única que presentó actividad antifúngica (apéndice, Tabla C1) y en la evaluación de letalidad con *A. salina* se obtuvo un valor de CL<sub>50</sub> de 0,32 µg/ml a las 48 horas de exposición; un valor considerado muy bueno, ya que está muy por debajo de 1000 µg/ml.

Por su parte, la fracción D sólo presentó actividad leve contra la bacteria *Bacillus subtilis* y la fracción F mostró una buena actividad letal con un valor de CL<sub>50</sub> de 24,81 µg/ml a las 48 horas de montado el bioensayo (apéndice, Tabla A.1). De acuerdo a estos resultados se decidió estudiar las fracciones C, D y F. El resto de las fracciones mostraron ser mezclas complejas de compuestos y no evidenciaron tener actividad antimicrobiana ni letalidad contra *A. salina*; por lo tanto, fueron descartadas para ser estudiadas.

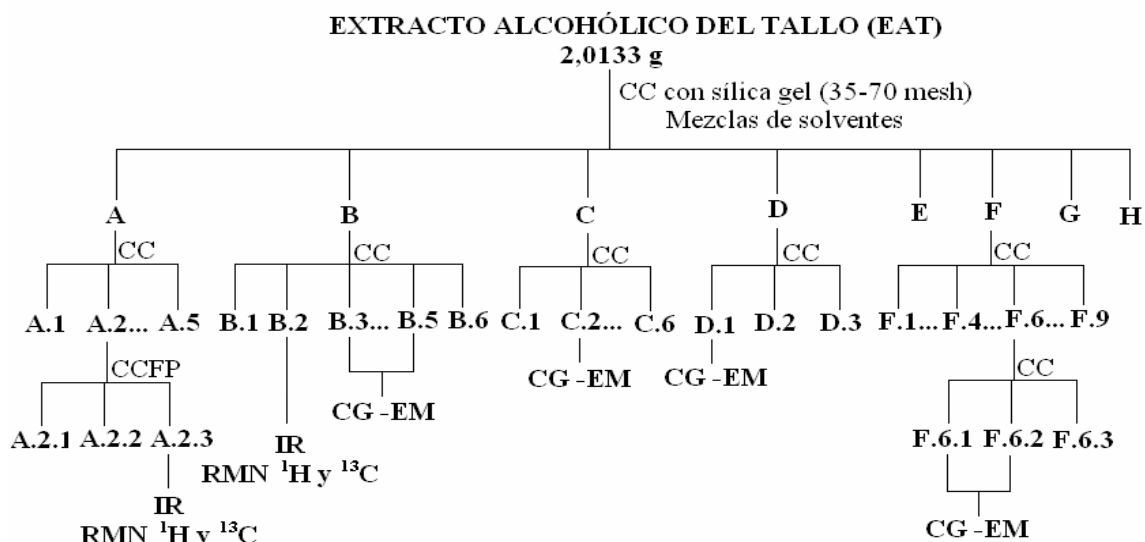


Figura 16. Esquema de fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo de *W. berteri*.

## Fraccionamiento cromatografico de la fracción A

La fracción A (aceite de color verde claro) fue fraccionada mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm). Se utilizó como columna una bureta de 25 ml y una relación muestra – sílica de 1:40 (0,1074 g: 4,2960 g). La separación cromatografica se inició con hexano al 100%, posteriormente se agregaron mezclas de solventes de polaridad creciente y se finalizó con acetato de etilo al 100%. Se obtuvieron 21 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 9).

Se realizó CCF para observar el comportamiento de cada eluato. En las cromatografías se emplearon mezclas de solventes de diferentes polaridades como 3:2 y 1:1 hexano- diclorometano y 1:1 diclorometano – acetato de etilo. Las placas fueron reveladas utilizando luz ultravioleta de longitud de onda corta (100 - 280 nm) y solución ácida de molibdato de amonio. Los eluatos se unieron en 5 subfracciones de acuerdo al comportamiento observado en las placas (Tabla 10).

Tabla 9. Fraccionamiento de la fracción A del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1-3	100
Hexano – Diclorometano	4-6	90-10
Hexano – Diclorometano	7-10	70-30
Hexano – Diclorometano	11-14	50-50
Diclorometano	15-16	100
Diclorometano - Acetato de etilo	17-19	50-50
Acetato de etilo	20-21	100

Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción A del EAT.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
A.1	1-6	8,60
A.2	7	52,30
A.3	8	9,50
A.4	9-10	9,30
A.5	11-21	27,00

La masa total recuperada fue 0,1067 g, lo que corresponde a un 99,34% del material orgánico cromatografiado. Este buen rendimiento se debe a la baja polaridad de la fracción; por lo que se pudieron obtener sus compuestos con los solventes añadidos, sin mucha pérdida de material.

Las subfracciones A.2 y A.5 fueron las que presentaron mayor masa; sin embargo, luego de las CCF realizadas con mezclas de hexano – diclorometano en proporciones de 3:2, 1:1 y 2:3; también se utilizó diclorometano al 100%; se observó que A.2 presentaba una mejor separación de sus compuestos y el resto de las subfracciones mostraron mezclas de compuestos con  $R_f$  muy cercanos, lo que dificultaba su separación.

Debido a la separación definida de los compuestos presentes en la subfracción A.2, observada en la CCF, se decidió realizar una cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), utilizándose como fase estacionaria sílica gel 60 mesh de 1 mm de espesor sobre una placa de vidrio 20x20 cm<sup>2</sup> y como fase móvil se utilizó una mezcla de 1:1 hexano – diclorometano. De esta cromatografía se obtuvieron 3 bandas con  $R_f$  diferentes (Tabla 11).

Tabla 11. Subfracciones obtenidas de la CCFP realizada a la subfracción A.2

Subfracciones	R <sub>f</sub>	Masas (mg)
A.2.1	0,48	2,10
A.2.2	0,50	2,80
A.2.3	0,78	36,50

Luego de la CCFP se recuperó una masa total de 0,0414 g, lo que representa el 79,16% de la subfracción A.2. La pérdida de masa del material orgánico se debe a su adsorción en la sílica gel 60 mesh. A las tres subfracciones se les realizaron CCF en mezclas de proporciones de 1:1, 3:2 y 1:1 de hexano – diclorometano. Estas placas mostraron que la subfracción A.2.1 y A.2.2 eran mezclas de compuestos y se encontraban en muy poca masa. En cambio, la subfracción A.2.3 (aceite incoloro) mostró ser una sola mancha, lo que indicó la presencia de un compuesto posiblemente puro. Tomando en cuenta estas características y la masa obtenida, se consideró analizarla por espectroscopia infrarrojo (IR) con la finalidad de identificar los grupos funcionales presentes en la muestra y resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C), para identificar en lo posible el compuesto presente en la subfracción A.2.3.

El espectro IR (Figura 17) indicó varias bandas de absorción; una señal a 3020,52 cm<sup>-1</sup> debido al estiramiento del = C – H del anillo aromático, otra a 2968,37 – 2936,82 cm<sup>-1</sup> de la tensión del enlace C – H, correspondiente de una cadena alifática; también se observó las absorciones características del sistema aromático o sobretodo a 1780 - 2010 cm<sup>-1</sup> aproximadamente. Otras señales se mostraron a 1723,33 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al estiramiento del enlace C = O, una a 1599,87- 1581,79 cm<sup>-1</sup> debido a la tensión C = C, de igual forma a 1290,57 cm<sup>-1</sup> se observó una señal de tensión correspondiente al enlace C – O y otra a 758,98 cm<sup>-1</sup> de la deformación del enlace C- H del anillo aromático. El análisis del espectro IR sugiere que la subfracción A.2.3 podría estar constituida, posiblemente, por un anillo aromático unido a un grupo éster.



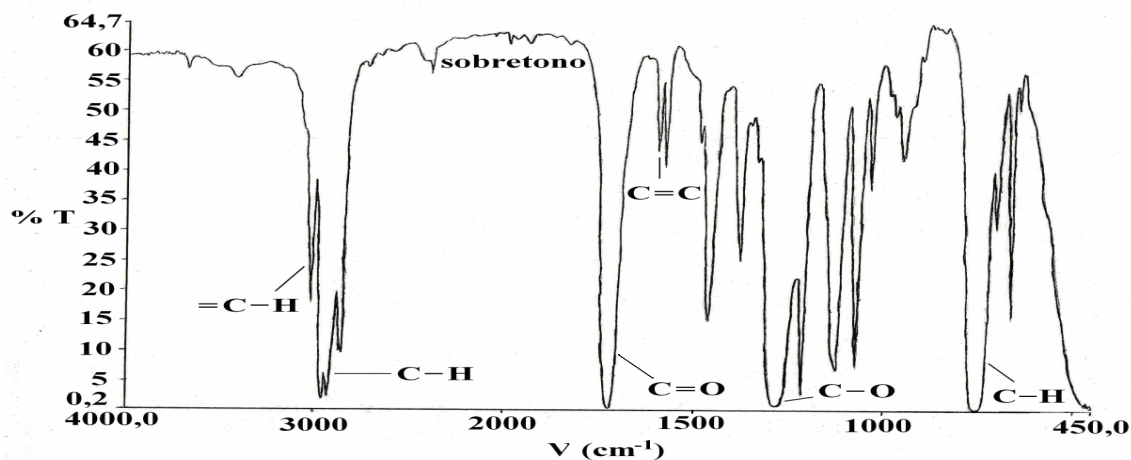


Figura 17. Espectro IR de la subfracción A.2.3.

Por su parte el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18) evidenció a campo bajo dos multipletes con  $\delta_{\text{H}}$  7,49 – 7,53 ppm y 7,67 – 7,70 ppm correspondiente a los protones desapantallados del anillo aromático; el cual se supone está disustituido posiblemente en posición orto o para; ya que se muestran dos grupos de señales bastante simétricas que integran dos átomos de hidrógeno cada uno. A un  $\delta_{\text{H}}$  4,18 – 4,21 ppm se observó un multiplete, debido a los protones desapantallados por un átomo de oxígeno. Dos multipletes a  $\delta_{\text{H}}$  1,30 – 1,45 ppm y 1,62 – 1,68 ppm, asignados a protones metilenos y metinos de una cadena de carbono. A campo alto, se evidenció un triplete a  $\delta_{\text{H}}$  0,87 – 0,92 ppm, correspondiente a protones metilos terminales.

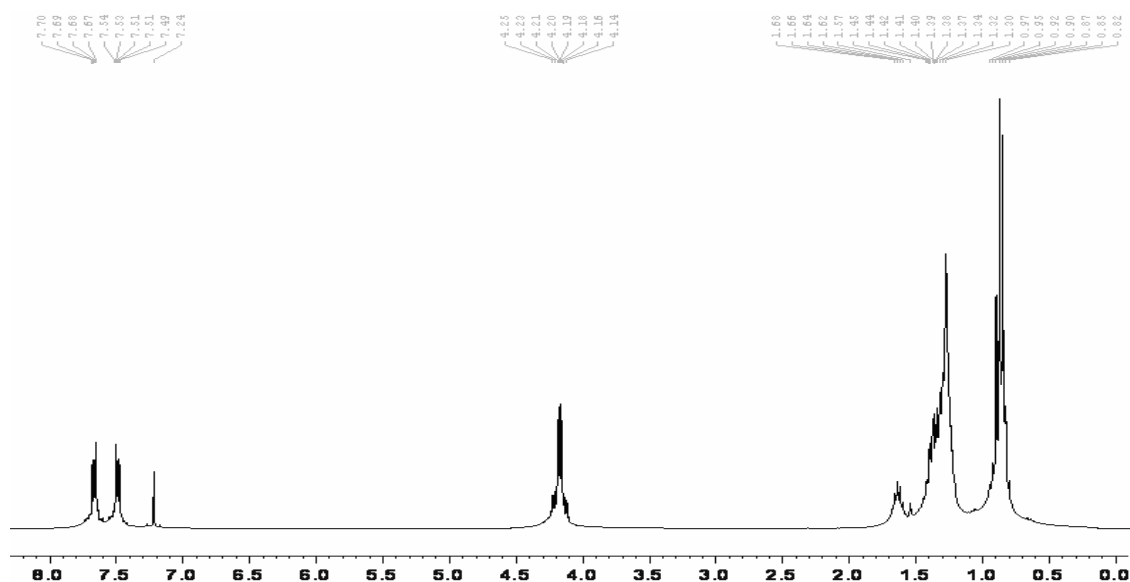


Figura 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción A.2.3.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) se observó a campo bajo una señal con  $\delta_{\text{C}}$  167,75 ppm; debida al carbono carbonilo, otras señales a  $\delta_{\text{C}}$  128,78 ppm; 130,87 ppm y 132,42 ppm, correspondiente a los carbonos del anillo aromático, y según los desplazamientos se supone que está disustituido en posición orto con una estructura simétrica; es decir, dos sustituyentes iguales. Una señal a  $\delta_{\text{C}}$  68,13 ppm perteneciente a un carbono metileno unido a un átomo de oxígeno y otras señales con  $\delta_{\text{C}}$  22,97 ppm; 23,71 ppm; 28,90 ppm; 30,33 ppm y 38,6 ppm, atribuidas a los carbonos metileno y metinos de una cadena ramificada. A campo alto, se observaron las señales a  $\delta_{\text{C}}$  10,94 ppm y 14,05 ppm, debidas a carbonos de metilos terminales.

Luego de analizar detenidamente los espectros IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; se propuso para la muestra A.2.3 una posible estructura; la cual fue estudiada y comparada con los desplazamientos químicos obtenidos mediante el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008. En este estudio, los datos suministrados por el programa fueron similares a los  $\delta_{\text{H}}$  obtenidos por el espectrómetro Bruker a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ; siendo así de gran ayuda este programa para asignar los desplazamientos químicos a ciertos protones presentes en la molécula (Tabla 12).

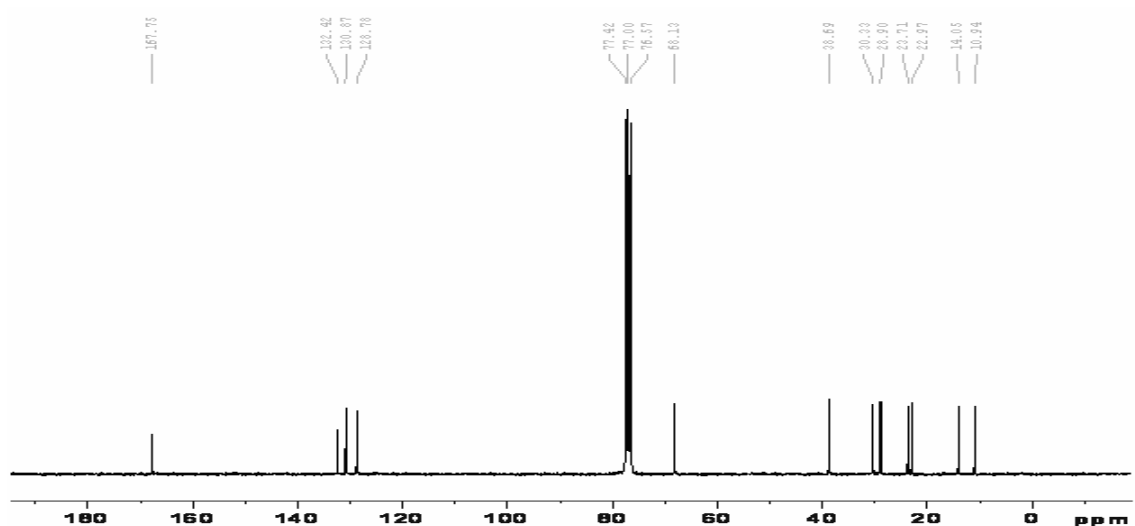

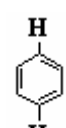


Figura 19. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción A.2.3.

Tabla 12. Valores de los desplazamientos químicos de protones ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción A.2.3.

$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{(b)}$ (ppm)	Multiplicidad	Asignación
0,87 – 0,92	0,89	triplete	– $\text{CH}_2$ – $\underline{\text{CH}_3}$
1,30 – 1,45	1,23 – 1,41	multiplete	– $\underline{\text{CH}_2}$ – $\underline{\text{CH}_2}$ – $\text{CH}_3$
1,62 – 1,68	1,54 – 1,70	multiplete	– $\underline{\text{CH}}$ – $\underline{\text{CH}_2}$ – $\text{CH}_2$
4,18 – 4,21	4,01	multiplete	– $\text{O}$ – $\underline{\text{CH}_2}$ –
7,49 – 7,53	7,31	multiplete	
7,67 – 7,70	7,80	multiplete	





<sup>(a)</sup>: Datos obtenidos a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>(b)</sup>: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

Por su parte, los  $\delta_{\text{C}}$  arrojados por el programa se ajustaron bastante bien a los  $\delta_{\text{C}}$  obtenidos por el espectrómetro Bruker a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ , lo que conduce a decir que la estructura propuesta podría ser satisfactoriamente la misma del compuesto presente en la muestra A.2.3 (Tabla 13). Para estar más seguro de la estructura planteada

para el compuesto aislado, se realizó el análisis de los carbonos metilos, metilenos y metinos a través del espectro DEPT – 135 de dicha subfracción.

Tabla 13. Valores de los desplazamientos químicos de carbono ( $\delta_C$ ) de las señales de RMN  $^{13}C$  de la subfracción A.2.3.

$\delta_C^{(a)}$ (ppm)	$\delta_C^{(b)}$ (ppm)	Asignación
10,94	10,47	– CH – CH <sub>2</sub> – <u>CH</u> <sub>3</sub>
14,05	13,58	– CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> – <u>CH</u> <sub>3</sub>
22,97	22,17	– CH <sub>2</sub> – <u>CH</u> <sub>2</sub> – CH <sub>3</sub>
23,71	23,22	– CH – <u>CH</u> <sub>2</sub> – CH <sub>3</sub>
28,90	28,13	– CH <sub>2</sub> – <u>CH</u> <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> –
30,33	29,83	– CH – <u>CH</u> <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> –
38,69	38,53	– O – CH <sub>2</sub> – <u>CH</u> –
68,13	67,22	– O – <u>CH</u> <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub> –
128,78	128,68	
130,87	130,15	
132,42	131,60	
167,75	166,47	

<sup>(a)</sup>: Datos obtenidos a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

<sup>(b)</sup>: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

El espectro DEPT -135 (Figura 20) muestra a los grupos CH<sub>3</sub> y CH como señales positivas y a los CH<sub>2</sub> como señales negativas. Se observó en el espectro que la muestra posee 5 carbonos metilenos señalados en la parte inferior o negativa del espectro y en la parte superior o positiva se observó a parte de la señal del solvente, 5 señales correspondientes a los carbonos metínicos y metílicos.

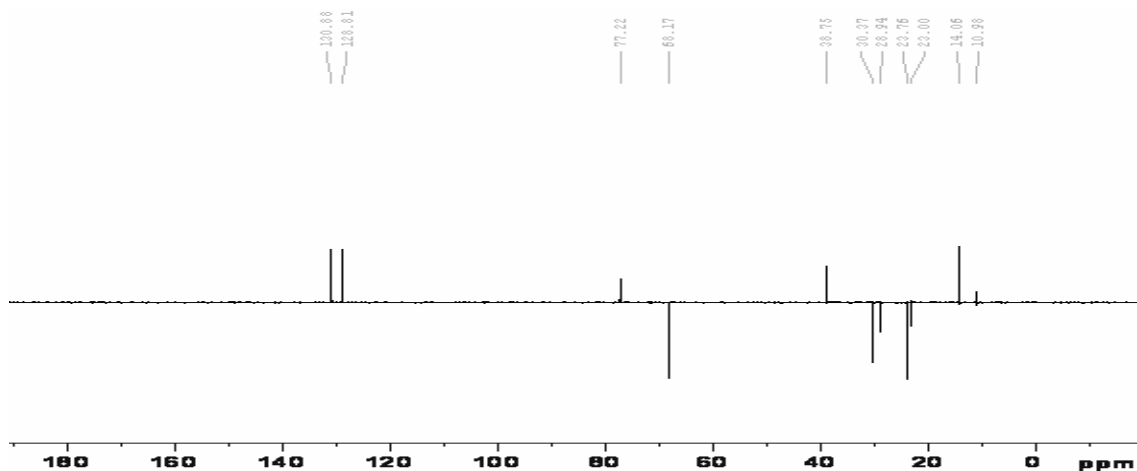


Figura 20. Espectro DEPT - 135 de la subfracción A.2.3.

Para obtener una visión más clara de los distintos tipos de carbonos presentes en la muestra se realizó una comparación del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT - 135 (Figura 21), observándose en el espectro de carbono la presencia de una señal correspondiente a un carbono cuaternario perteneciente al carbono carbonílico y otra señal perteneciente a los carbonos cuaternarios sustituidos del anillo aromático, todas las demás señales corresponden con lo dicho anteriormente.

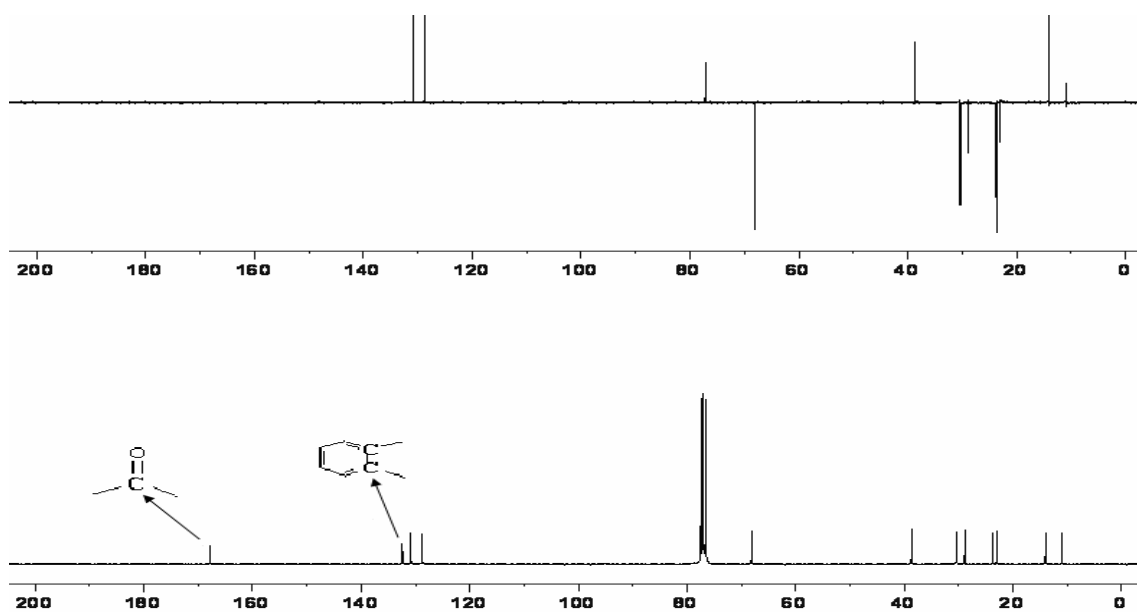


Figura 21. Comparación de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT - 135 de la subfracción A.2.3.

Tomando en cuenta los análisis realizados a cada uno de los espectros antes mencionados y con la ayuda del Programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008, se propone para la subfracción A.2.3, la estructura de un posible compuesto perteneciente a los ésteres del ácido bencenodicarboxílico, el cual, fue identificado como éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (Figura 22).

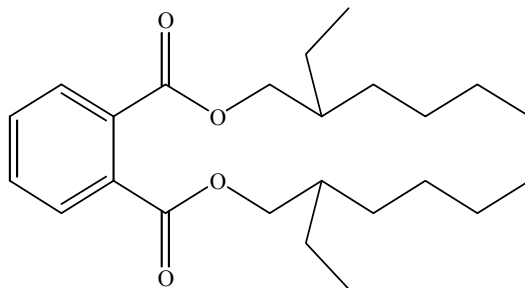


Figura 22. Estructura del éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

El éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico o di(2-etilhexilo) ftalato (DEHF) es un éster del ácido bencenodicarboxílico, que a temperatura ambiente es un líquido oleoso entre incoloro y amarillo. Es miscible con la mayor parte de los solventes orgánicos. Debido a su carácter hidrófobo, el DEHF se absorbe muy fácilmente al suelo, los sedimentos y la materia particulada (70). El grado de bioacumulación depende de la capacidad de los organismos para metabolizarlo (71).

El DEHF está muy ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentra en la mayor parte de las muestras, por ejemplo de aire, precipitaciones, sedimentos, suelos y biota (72-75). Según estudios científicos, se ha reportado la presencia de este compuesto en varias plantas tales como: *Alchornea cordifolia* (76), *Aloe vera* (77), *Euphorbia hylonoma* Hand-Mazz (78), *Daucus carota*, *Festuca arundinaca* y *Capiscum annum* (79). Además de otras plantas, como: *Helicteres guazumifolia* Kunth. (80), *Cassia auriculata* (81), *Helicteres baruensis* Jacq. (23), *Ricinus communis* (82), *Mallotus tetracoccus* Kurz. (83), *Euphorbia cyparissias* y *Euphorbia seguieriana* (84).

Además, existen publicaciones que reportan la actividad biológica del DEHF aislado de algunas plantas; por ejemplo, de un estudio fitoquímico realizado a las flores de *Calotropis gigantea* (Linn), se logró aislar el di(2-etilhexilo) ftalato. Al compuesto

aislado se le evaluó la actividad antibacteriana y los resultados mostraron que el DEHF exhibió la mayor actividad contra las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Sarcina lutea* y las Gram-negativas *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* y *Shigella dysenteriae*. En la actividad antifúngica sólo presentó actividad contra el hongo *Aspergillus flavus*. Este compuesto, además manifestó toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina*, y mostró el mejor valor de toxicidad observado en el bioensayo, con un CL<sub>50</sub> de 9,19 µg/ml (85).

Otra planta donde se aisló el di(2-etilhexilo) ftalato fue *Alchornea cordifolia* y el mismo mostró una baja actividad antiinflamatoria (76). En cambio, el di(2-etilhexilo) ftalato aislado del *Aloe vera* exhibió propiedades antileucémica y un efecto antimutagénico (77).

Algunos estudios sobre el DEHF se han realizado en ratas y ratones, entre los cuales, uno sugiere que las dosis de DEHF entre 6,3 – 12,5 g/kg de alimento al día causan reducción de masa corporal (86). En otras investigaciones con estos mismos animales se ha detectado atrofia testicular, evidente al cabo de pocos días, relacionada con la administración de este compuesto en concentraciones de 10 – 20 g de DEHF/kg de alimento. Las ratas más jóvenes parecen ser más susceptibles que las viejas, pero se observó que la atrofia es reversible; además cuando se administraron dosis de concentraciones 0,5 – 2 g/kg de alimento, se observaron malformaciones sólo en ratones. Sin embargo, las pruebas de mutagenidad han dado resultados negativos en la mayor parte de los estudios (87).

El DEHF puede inducir transformación celular en ratas y efectos carcinógenos en ratones, según publicado en un estudio, donde además, reporta que en ambas especies se produjo un aumento de tumores hepatocelulares debidos a la inducción de la proliferación de peroxisomas hepáticos; estos trastornos celulares son dependientes de la dosis administrada de DEHF en el alimento (88).

A diferencia de lo que ocurre con los hepatocitos de ratas, el DEHF no induce la proliferación de peroxisomas en cultivos de hepatocitos humanos, así como tampoco hay pruebas suficientes que indiquen que este compuesto sea un posible carcinógeno para el ser humano (89).

## Fraccionamiento cromatografico de la fracción B

La fracción B (solidó pastoso de color verde) se fraccionó mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); utilizando como columna una bureta de 25 ml de capacidad y una relación muestra – sílica de 1: 40 (0,1428 g: 5,7120 g). Se emplearon como eluyentes hexano al 100%, mezclas de solventes de polaridad creciente de hexano – cloroformo y cloroformo – acetato de etilo; se finalizó con acetato de etilo al 100%. Se obtuvieron 27 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 14); a los cuales se les realizó CCF con mezcla de 3:2 hexano – cloroformo y 4:1; 1:1 cloroformo – acetato de etilo.

Tabla 14. Fraccionamiento de la fracción B del EAT de *W. berteri*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1	100
Hexano - Cloroformo	2-9	80-20
Hexano - Cloroformo	10-14	60-40
Hexano - Cloroformo	15-18	50-50
Cloroformo	19-22	100
Cloroformo - Acetato de etilo	23-24	50-50
Acetato de etilo	25-27	100

Se obtuvieron 6 subfracciones (Tabla 15) y se recuperó una masa total de 0,1406 g, lo que representa el 98,46% del material cromatografiado. De las subfracciones obtenidas, se mostró interés en tres de ellas; ya que en las CCF realizadas con mezclas de solventes en proporciones como: 3:2 hexano – cloroformo y 4:1; 1:1 cloroformo – acetato de etilo; solo las subfracciones B.2, B.3 y B.5 presentaron un comportamiento diferente al de las demás subfracciones; por ejemplo, para el caso de la muestra B.2 se observó una mancha definida, y para las otras dos muestras, se revelaron mezclas de compuestos con  $R_f$  próximos uno de otro.

Debido a que la subfraccion B.2. (aceite incoloro), mostró una sola mancha en la CCF, se sospechó la presencia de un compuesto posiblemente puro y se consideró conveniente analizarla por espectroscopia IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para identificar los grupos



funcionales y los tipos de protones y carbonos que esta subfracción pudiera contener.

Tabla 15. Subfracciones de la separación cromatográfica de la fracción B del EAT.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
B.1	1-2	19,70
B.2	3	43,80
B.3	4-5	29,90
B.4	6-7	17,50
B.5	8-10	10,40
B.6	11-27	19,30

El espectro IR de la subfracción B.2 (Figura 23), evidenció gran similitud con el IR de la subfracción A.2.3, al ser comparadas las bandas de absorción observadas en ambos espectros. Se observaron las señales de tensión = C – H, C – H, C = C, C = O y C – O; y la absorción de deformación del enlace C- H del anillo aromático. Las absorciones características del anillo aromático o sobretonos no se observaron claramente y puede ser debido a que la muestra B.2 no se encontraba tan concentrada como la muestra A.2.3 ó también puede ser que se trate de un compuesto que no posea en su estructura un anillo aromático.

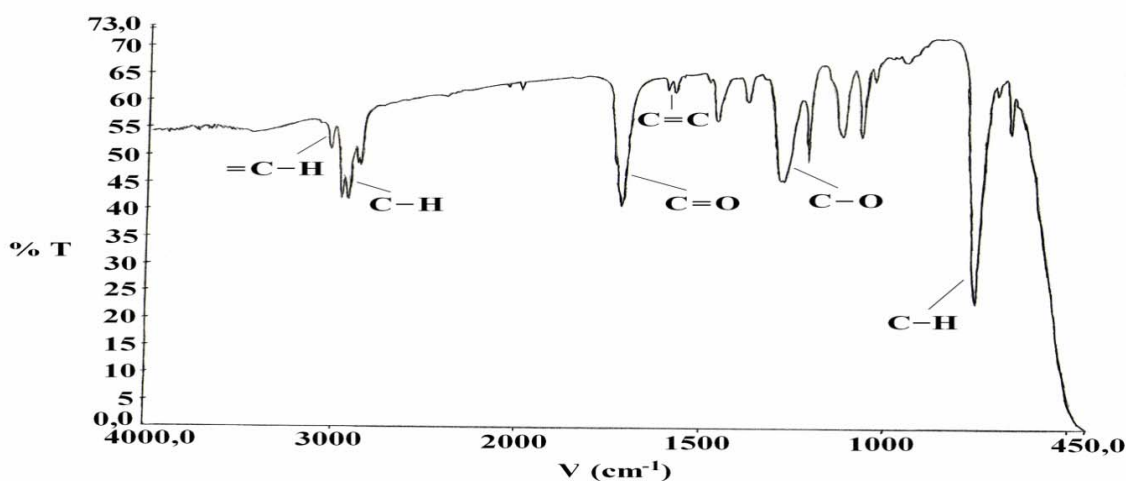


Figura 23. Espectro IR de la subfracción B.2.

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 24 - 25) se observaron todos los desplazamientos químicos similares a lo de la muestra A.2.3, tanto de protones como de carbono (ver Tablas 16 y 17), por lo que se considera que el posible compuesto presente en la subfracción B.2 es el éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

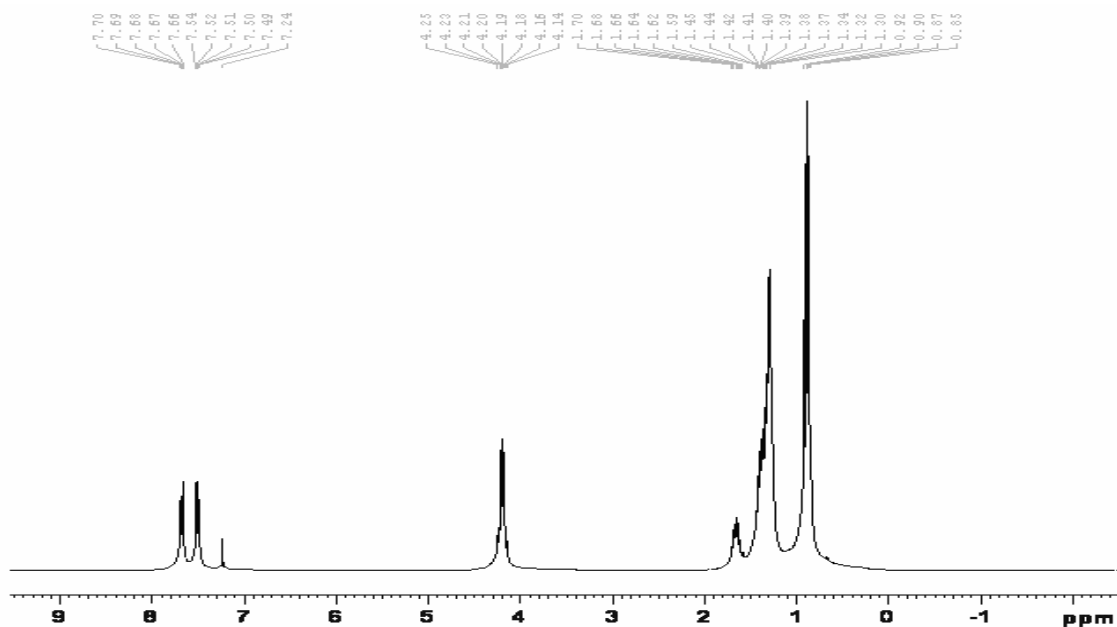


Figura 24. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción B.2.

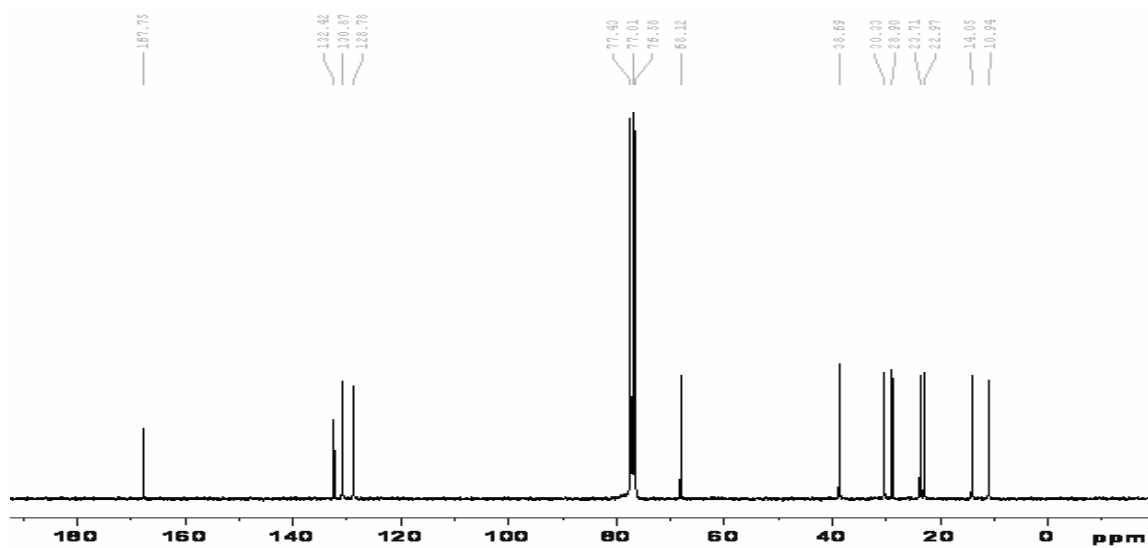




Figura 25. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción B.2.

Tabla 16. Comparación de los valores de los desplazamientos químicos de protones  $\delta_H$  de ciertas señales de los RMN  $^1H$  de las subfracciones A.2.3 y B.2

$\delta_H^{(a)}$ (ppm)	$\delta_H^{(b)}$ (ppm)	$\delta_H^{(c)}$ (ppm)	Asignación
0,89	0,87 – 0,92	0,87 – 0,92	– CH <sub>2</sub> – <b>CH</b> <sub>3</sub>
1,23 – 1,41	1,30 – 1,45	1,30 – 1,45	– <b>CH</b> <sub>2</sub> – <b>CH</b> <sub>2</sub> – CH <sub>3</sub>
1,54 – 1,70	1,62 – 1,68	1,62 – 1,70	– <b>CH</b> – <b>CH</b> <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub>
4,01	4,18 – 4,21	4,14 – 4,25	– O – <b>CH</b> <sub>2</sub> –
7,31	7,49 – 7,53	7,49 – 7,54	
7,80	7,67 – 7,70	7,66 – 7,70	

(a): Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

(b): Datos de la subfracción A.2.3 obtenidos a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

(c): Datos de la subfracción B.2 obtenidos a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

Para una mayor afirmación de la presencia del éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en la muestra, se analizó el espectro DEPT - 135 (Figura 26), el mismo, mostró 5 desplazamientos de los grupos CH<sub>3</sub> y CH como señales positivas y 5 desplazamientos de los CH<sub>2</sub> como señales negativas, coincidiendo con las observadas para la subfracción A.2.3; lo cual confirma que se trata del mismo constituyente.

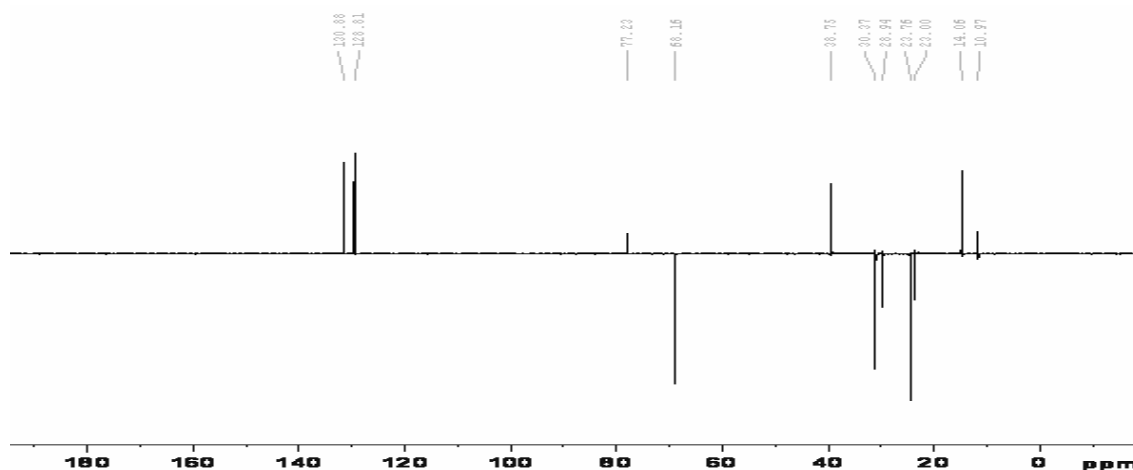






Figura 26. Espectro DEPT - 135 de la subfracción B.2.

Tabla 17. Comparación de los valores de los desplazamientos químicos de carbono  $\delta_C$  de las señales de los RMN  $^{13}C$  de las subfracciones A.2.3 y B.2

$\delta_C^{(a)}$ (ppm)	$\delta_C^{(b)}$ (ppm)	$\delta_C^{(c)}$ (ppm)	Asignación
10,47	10,94	10,94	- CH - CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>3</sub>
14,58	14,05	14,05	- CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>3</sub>
22,17	22,97	22,97	- CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
23,22	23,71	23,71	- CH - <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
28,13	28,90	28,90	- CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -
29,83	30,33	30,33	- CH - <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -
38,53	38,69	38,69	- O - CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> -
67,22	68,13	68,12	- O - <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -
128,68	128,78	128,78	
130,15	130,87	130,87	
131,60	132,42	132,42	
166,47	167,75	167,75	

<sup>(a)</sup>: Datos obtenidos mediante el modelado con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008.

<sup>(b)</sup>: Datos de la subfracción A.2.3 obtenidos a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

<sup>(c)</sup>: Datos de la subfracción B.2 obtenidos a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>.

Las subfracciones B.3, de aspecto pastoso, de color amarillo claro, y B.5, un sólido blanco, fueron analizadas por CG/EM; ya que presentaron mezclas de compuestos con  $R_f$  cercanos, y no se contaba con los reactivos necesarios para lograr aislar los compuestos de dichas muestras.

El cromatograma de gases de la subfracción B.3 (Figura 27) evidenció la existencia de cuatro compuestos todos con un porcentaje de probabilidad de 91%. Los demás compuestos identificados presentaron valores de porcentaje de probabilidad inferiores a 80%, por lo que no se tomaron en cuenta por ser su probabilidad inferior al 90%; valor aceptable para la confiabilidad de existencia de un compuesto.

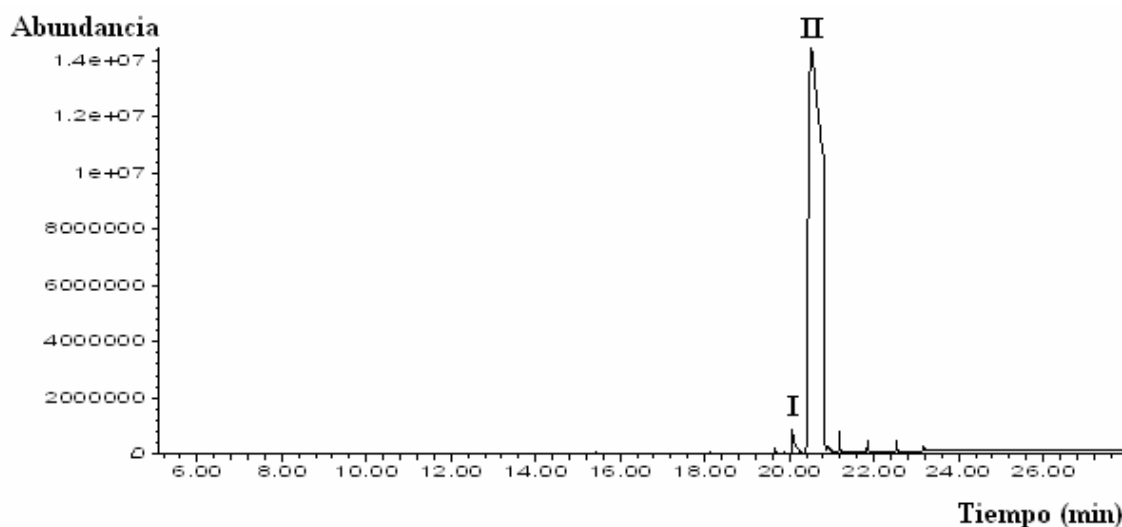


Figura 27. Cromatograma de gases de la subfracción B.3.

Los compuestos identificados con menor porcentaje de área fueron el éster (2-etilhexil) hexílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico y el éster (2-etilhexil) decílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, con áreas de 0,13% y 0,22% a tiempos de retención de 19,655 min y 22,539 min. Otro compuesto reconocido fue el éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con área de 1,35% a un tiempo de retención de 20,073 min; y con un área de 97,17% se identificó, el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico a un tiempo de retención de 20,519 min (Tabla 18).

Tabla 18 .Compuestos identificados en la subfracción B.3 mediante CG/EM.

Compuestos	Formula molecular	TR (min)	% P	% A
Éster (2-etilhexil) hexílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> )	19,655	91	0,13
Éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I)	(C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> )	20,073	91	1,35
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II)	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	20,519	91	97,17
Éster (2-etilhexil) decílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> )	22,539	91	0,22

TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de área.

El éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II) y éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I), por ser los compuestos con mayor porcentaje de área fueron seleccionados para analizar sus espectros de masas y realizar su patrón de fragmentación con los fragmentos que posean los picos más abundantes.

Se ha demostrado que estos tipos de compuestos de ésteres del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, pueden estar presentes de forma natural en algunas plantas terrestres o marinas y no por contaminación, tal como lo refiere investigación realizada sobre la abundancia natural del contenido de  $^{14}\text{C}$  de DBP en tres especies de algas marinas (90).

El espectro de masa del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (Figura 28) mostró un ión molecular  $[\text{M}^+ + \text{H}]$  a  $m/z$  279, el cual se corresponde con la fórmula  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4 + \text{H}$ . Los picos asignados a los fragmentos más abundantes se apreciaron a  $m/z$  167, 149 (pico base), 113, 71 y 57. El patrón de fragmentación de este compuesto (Figura 29), muestra el posible esquema más ajustado de las diferentes rupturas de enlaces de la molécula y señala las estructuras de los fragmentos ya mencionados.

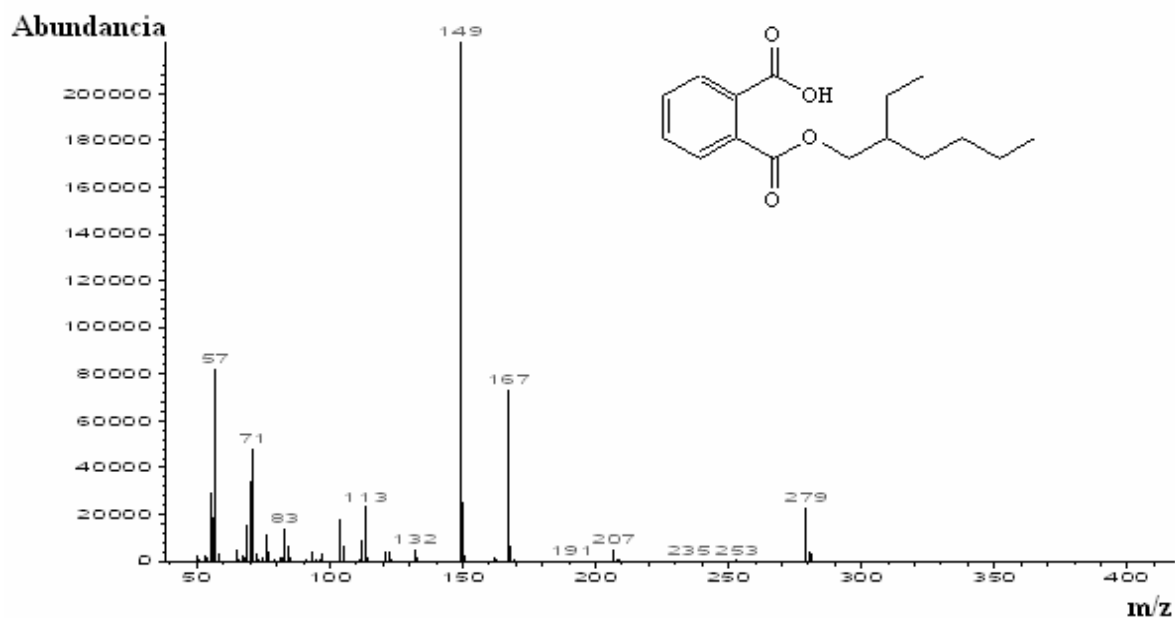


Figura 28. Espectro de masas del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

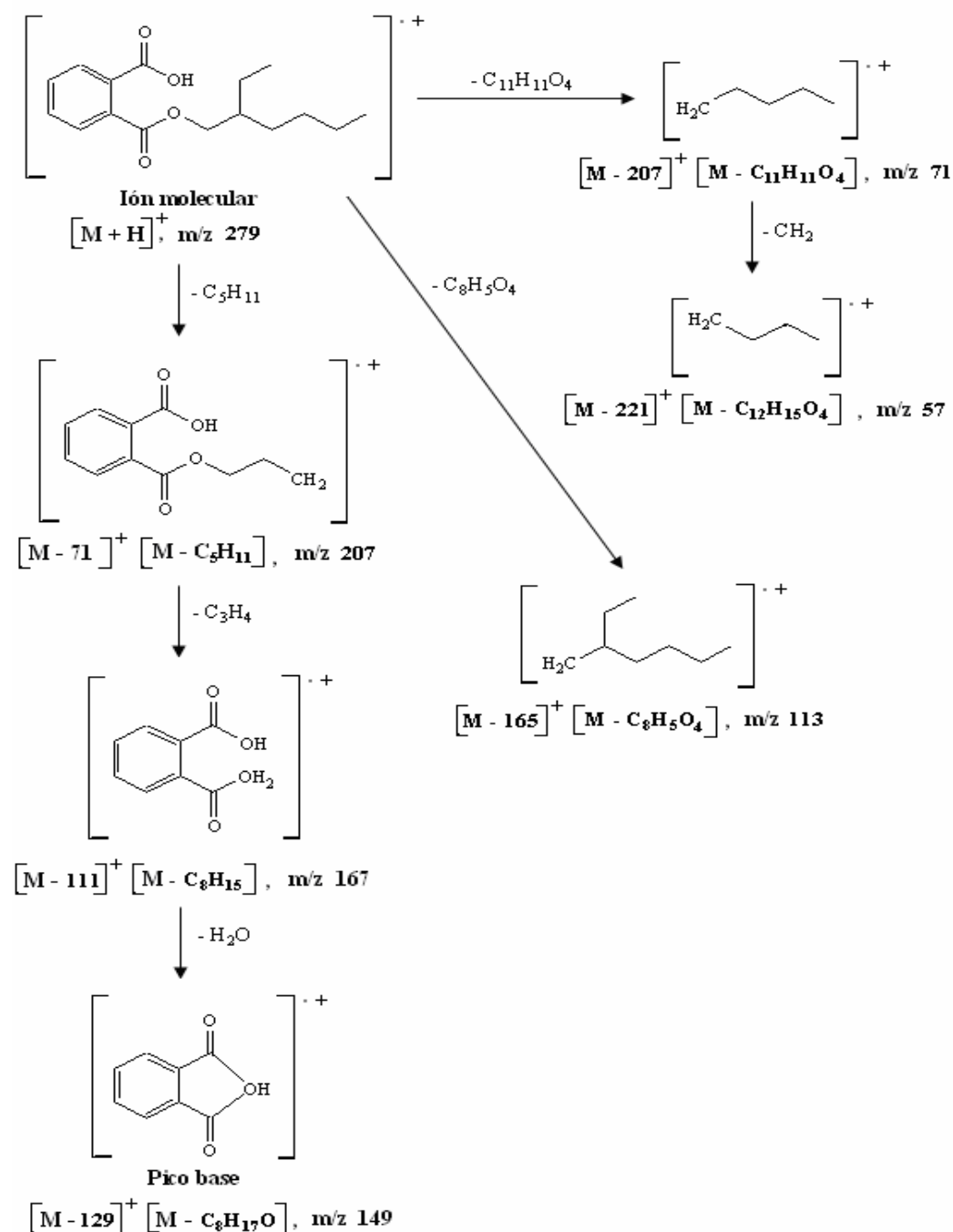


Figura 29. Patrón de fragmentación del éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

El espectro de masas del éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (Figura 30) evidenció un ión molecular  $[M^+ + H]$  a  $m/z$  391, que se ajusta con la fórmula

$C_{24}H_{38}O_4 + H$ , en donde los picos de los fragmentos más abundantes se apreciaron a  $m/z$  279, 167, 149 (pico base), 71 y 57. Estos fragmentos se observan en el patrón de fragmentación del compuesto ya mencionado (Figura 31).

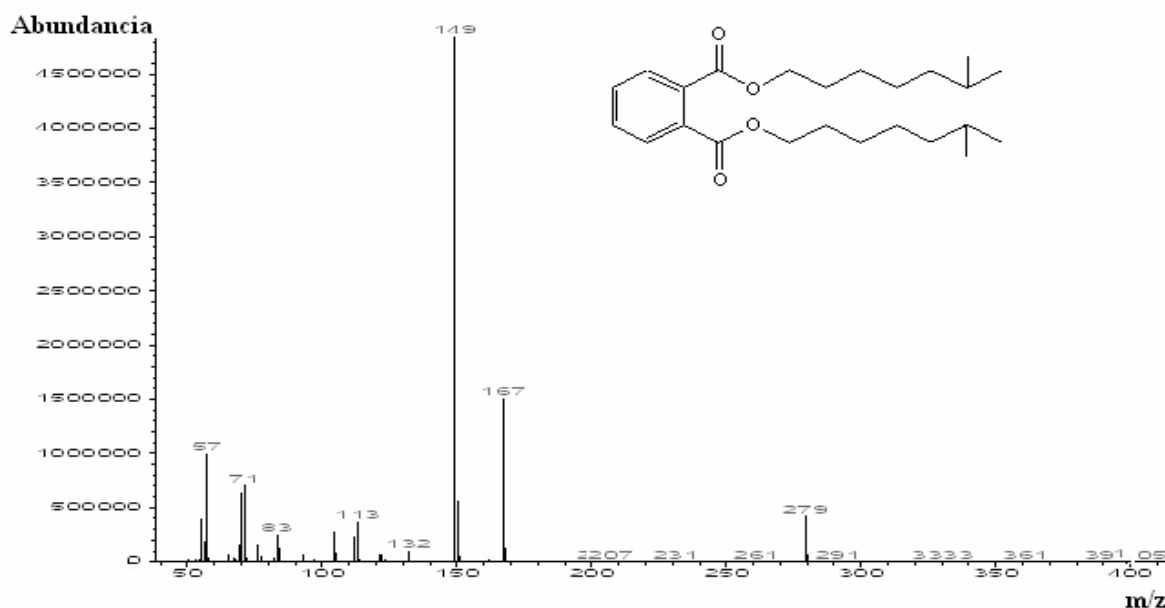


Figura 30. Espectro de masas del éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

En la literatura, también se encuentran publicaciones sobre la presencia de muchos ftalatos en una amplia variedad de plantas; así, como en ciertos alimentos tales como leche, mantequilla y carne, donde estos compuestos pueden tener un origen natural (91-93)

Según en una publicación, se sostiene que la posibilidad de encontrar alguno de estos compuestos en muestras biológicas y geoquímicas no puede ser ignorada, ya que su origen puede ser biosintético (94). Otras investigaciones reportan que los ésteres del ácido 1,2-benzenodicarboxílico que se encuentran en ciertas muestras (aceites sólidos, plantas y animales), pueden tener origen antropogénico o un origen natural; además, se ha demostrado que los ftalatos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, pero sus niveles son relativamente bajos, debido a que ellos están expuestos a la rápida degradación biológica y fotoquímica (95,96).



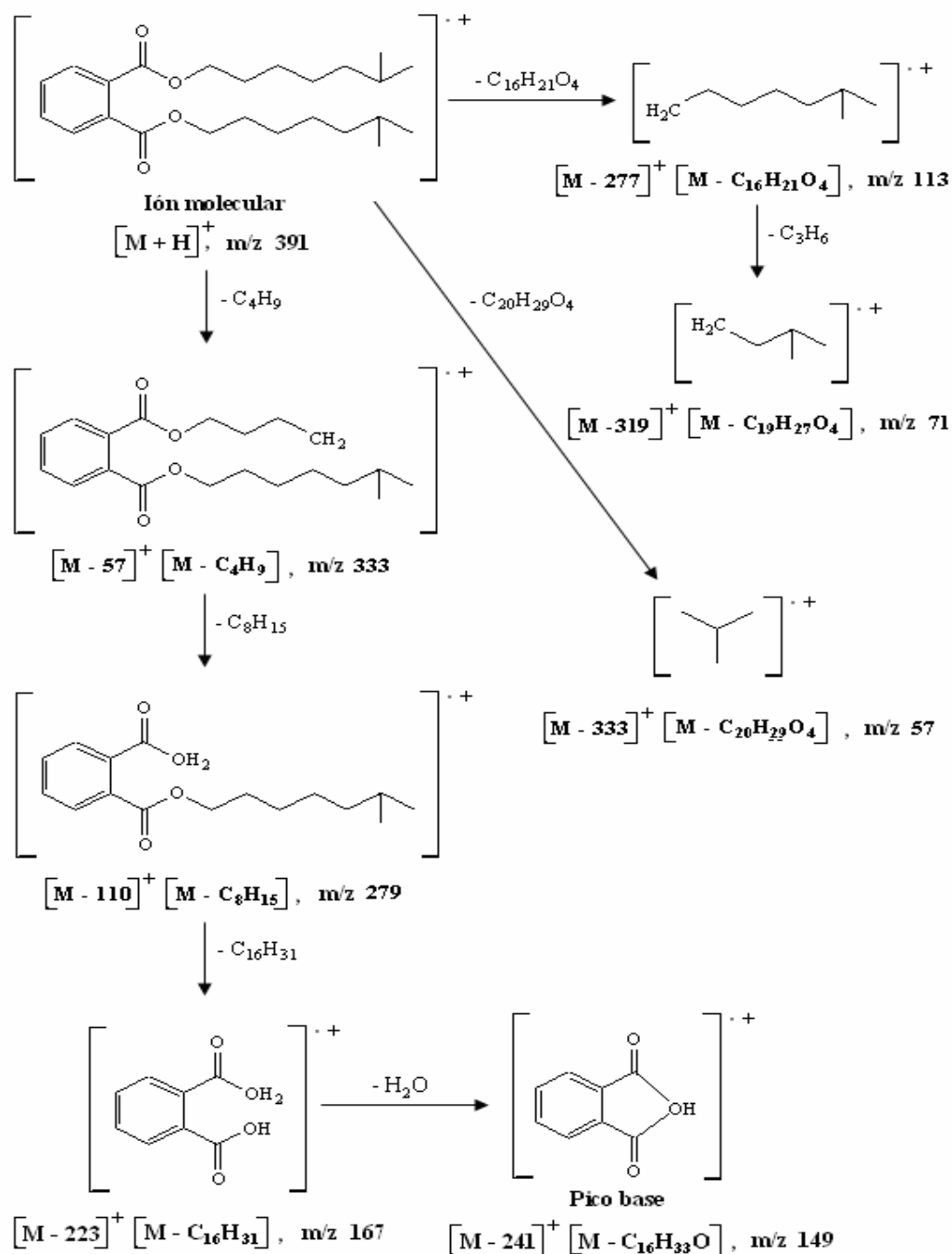


Figura 31. Patrón de fragmentación del éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

El cromatograma de gases de la subfracción B.5 (Figura 32) manifestó la presencia de varios compuestos; todos identificados como ácidos grasos, a excepción del éster del

ácido 1,2-bencenodicarboxílico con un porcentaje de probabilidad de 91%, área de 0,72% y un tiempo de retención de 20,433 min. Los ácidos grasos mostraron porcentaje de probabilidad entre 94% y 99%; áreas entre 0,61% y 65,64%; con diversos tiempos de retención. Otros compuestos identificados presentaron porcentaje de probabilidad inferiores a 64%; los cuales no fueron tomados en cuenta a la hora de nombrar los compuestos presentes en la muestra B.5 (Tabla 19).

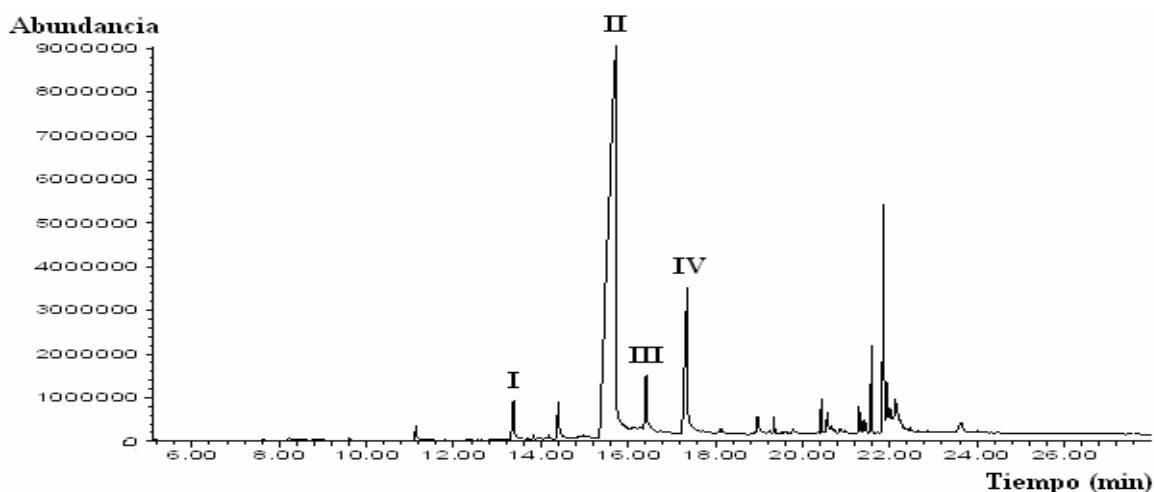


Figura 32. Cromatograma de gases de la subfracción B.5.

Tabla 19 .Compuestos identificados en la subfracción B.5 mediante CG/EM.

Compuestos	Formula molecular	TR (min)	% P	% A
Ácido dodecanoico	(C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	11, 135	98	0,61
Ácido tetradecanoico (I)	(C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	13,372	99	1,74
Ácido pentadecanoico	(C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	14,402	98	1,65
Ácido hexadecanoico (II)	(C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	15,718	96	65,64
Ácido heptadecanoico (III)	(C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	16,411	95	2,35
Ácido octadecanoico (IV)	(C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	17,355	95	9,33
Ácido eicosanoico	(C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	18,968	94	0,76
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	20,433	91	0,72
Ácido docosanoico	(C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> )	20,570	97	0,77

TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de área.

De los compuestos señalados en la Tabla 19, sólo se eligieron cuatro de ellos, con el mayor porcentaje de área; entre los cuales se encuentran el ácido tetradecanoico (I), ácido hexadecanoico (II), ácido heptadecanoico (III) y ácido octadecanoico (IV); a quienes se les analizaron sus espectros de masas y se les realizó el patrón de fragmentación más conveniente de acuerdo con los fragmentos que posean los picos resaltantes.

En estudios realizados a diferentes plantas se han reportado una diversidad de ácidos grasos; que han demostrado tener propiedades antibacterianas y se ha comprobado que son tóxicos en varias líneas celulares tumorales humanas como cáncer de próstata, vejiga, pulmón y leucemia (97).

El espectro de masas del ácido tetradecanoico (Figura 33) mostró un ión molecular  $[M^+]$  a  $m/z$  228, correspondiente a la fórmula  $C_{14}H_{28}O_2$ . Los picos asignados a los fragmentos más abundantes se muestran a  $m/z$  185, 129, 83, 73 (pico base) y 60. Para el ácido hexadecanoico, el ión molecular se observó en el espectro de masas a  $m/z$  256 (Figura 34), con fórmula molecular de  $C_{16}H_{32}O_2$  y los picos de mayor abundancia se muestran a  $m/z$  213, 129, 83, 73 (pico base) y 55. En la figuras 35 y 36 se muestran los patrones de fragmentación de estos compuestos, señalando las estructuras de dichos fragmentos.

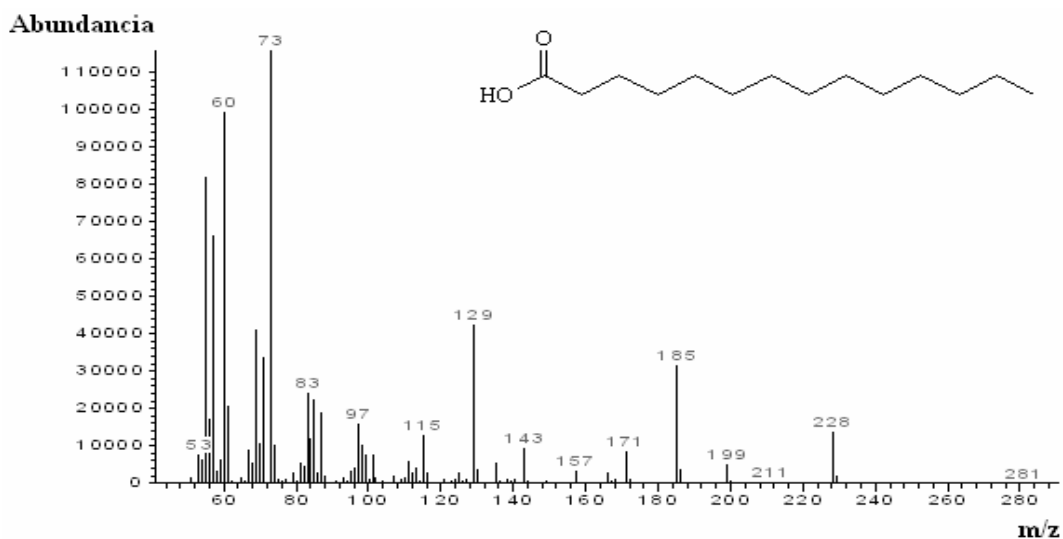


Figura 33. Espectro de masas del ácido tetradecanoico.

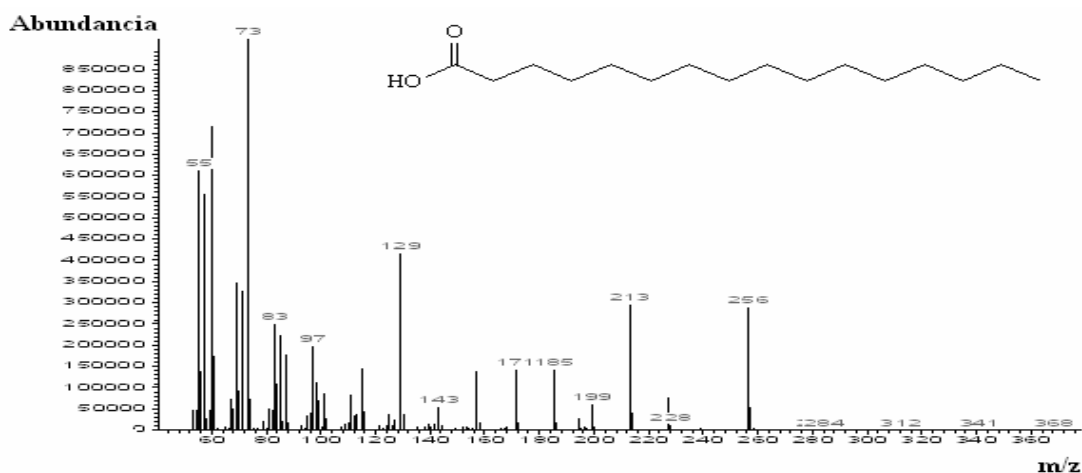


Figura 34. Espectro de masas de ácido hexadecanoico

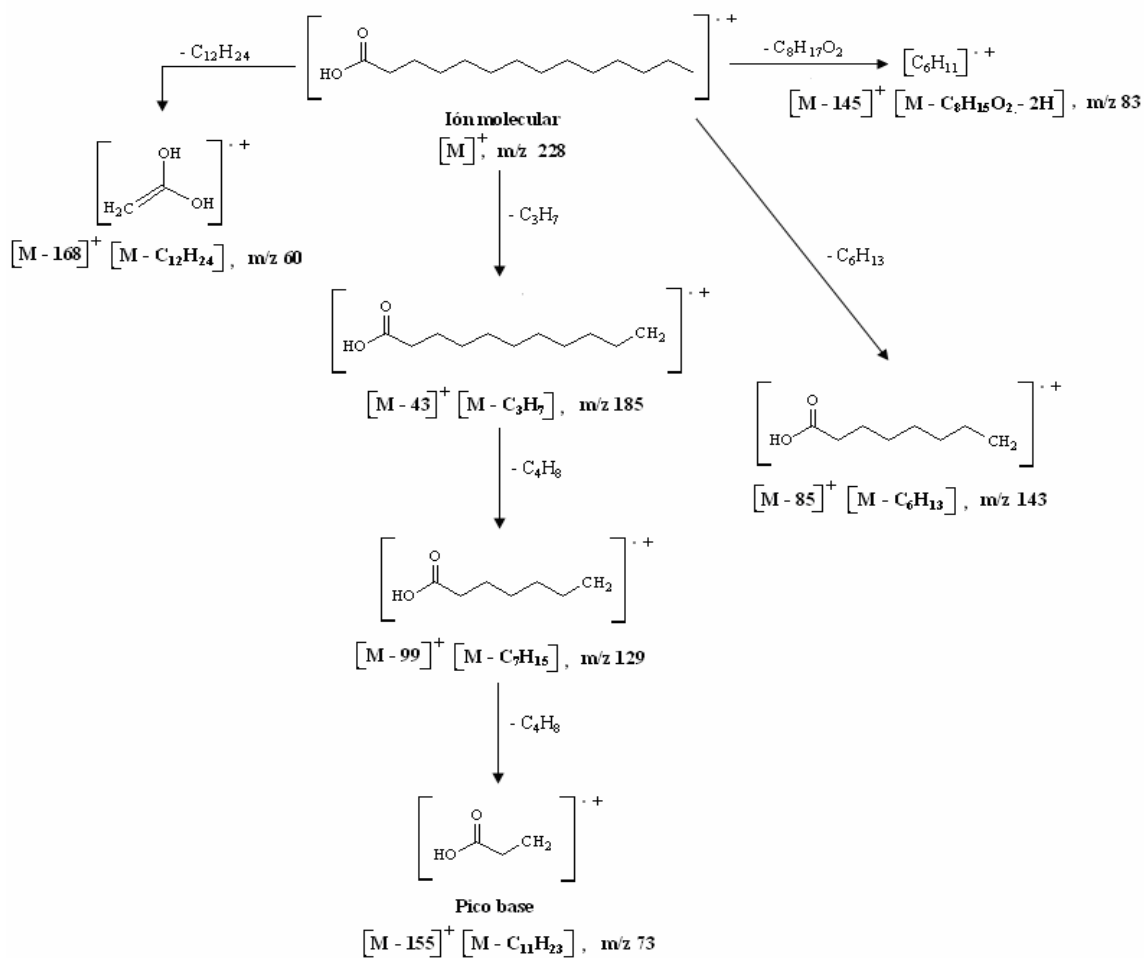


Figura 35. Patrón de fragmentación del ácido tetradecanoico.

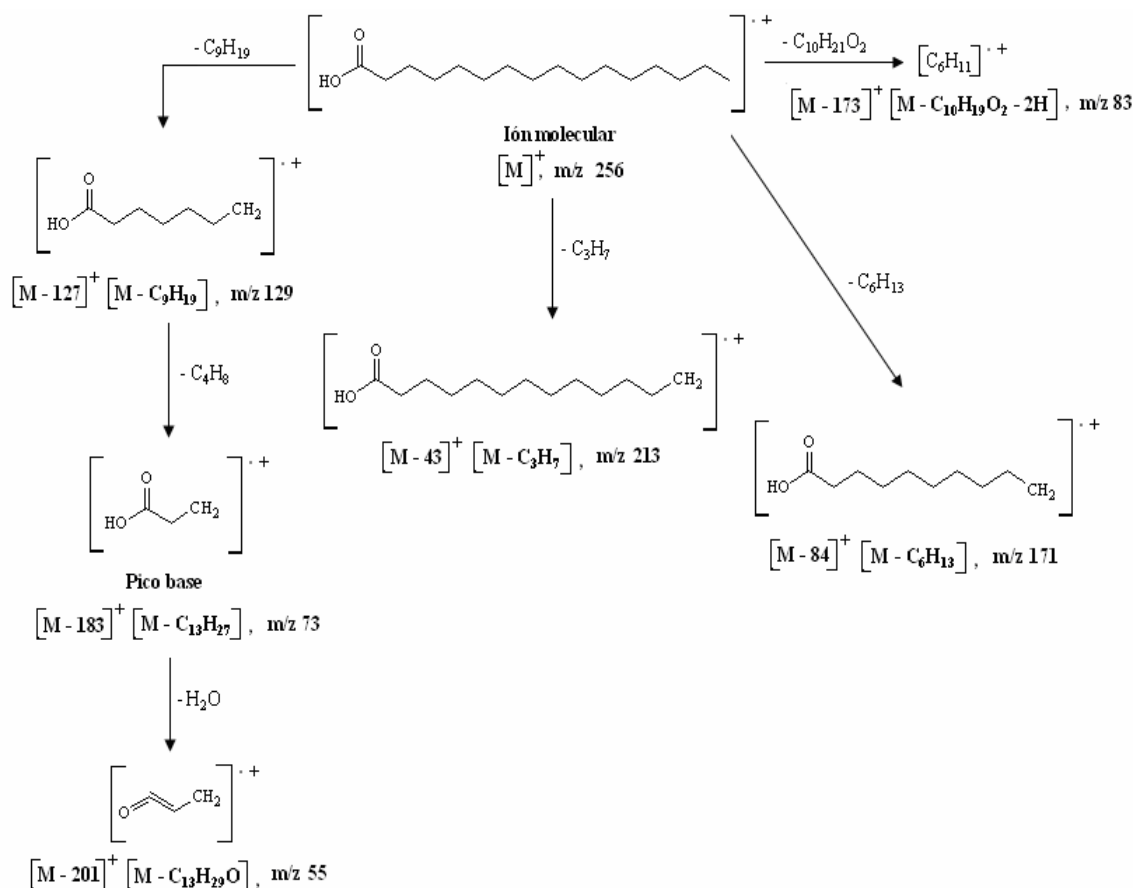


Figura 36. Patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico.

El mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la inhibición del transporte de membrana, lo que resulta en una carencia nutricional de las células. Algunos autores sugieren que los ácidos grasos son los inhibidores más efectivos de bacterias Gram-positivas, reportando entre ellos los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico como inhibidores efectivos de estas bacterias (98).

El espectro de masas del ácido heptadecanoico (Figura 37) evidenció un ión molecular  $[M]^+$  a  $m/z$  270, que se la atribuye la fórmula  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ . A  $m/z$  227, 129, 83, 73 (pico base) y 55 se muestran los picos de los fragmentos más abundantes; y el espectro del ácido octadecanoico mostró un ión molecular a  $m/z$  284 (Figura 38), con fórmula molecular de  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$  y los picos de mayor abundancia se muestran a  $m/z$  241, 185, 129, 83, 73 (pico base) y 60. Los patrones de fragmentación de estos ácidos grasos, se observan en las figuras 39 y 40.

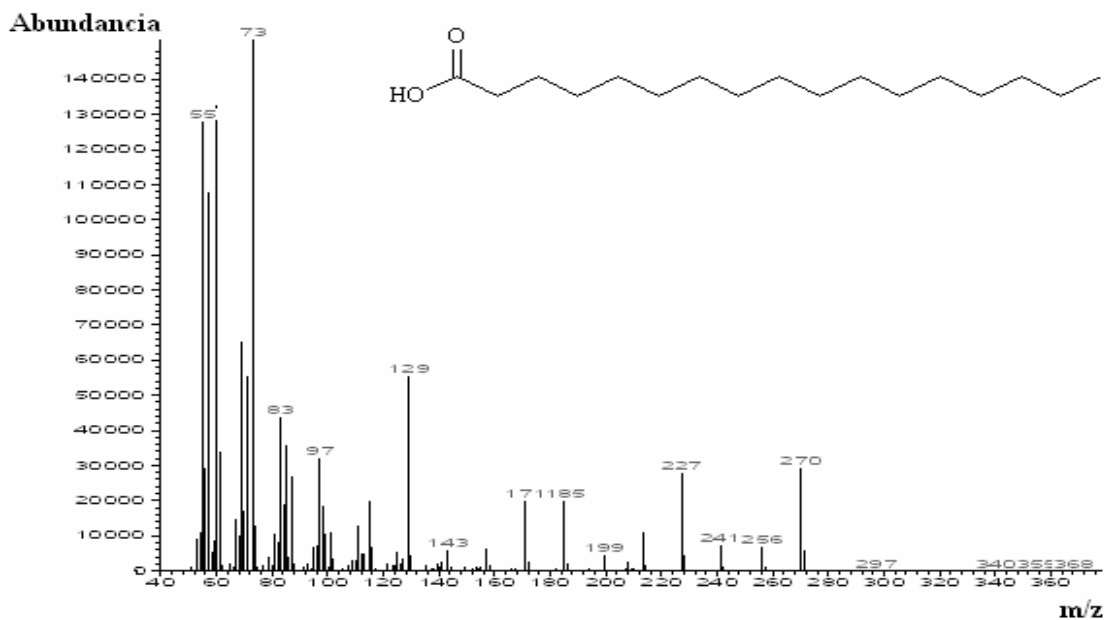


Figura 37. Espectro de masas del ácido heptadecanoico.

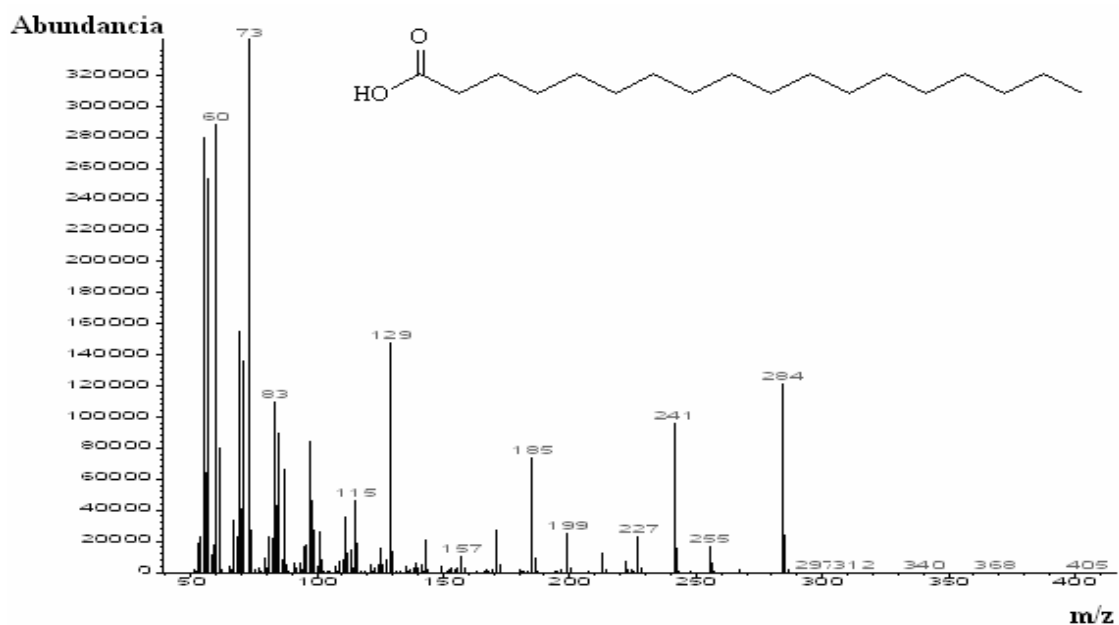


Figura 38. Espectro de masas del ácido octadecanoico.

Muchos ácidos grasos se han identificado en algunas plantas; por ejemplo, se encuentra reportado el ácido tetradecanoico o mirístico, ácido hexadecanoico o palmítico y el ácido dodecanoico o láurico presente en las plantas *Dombeya rotunfigolia*

y *Hermannia depressa* (99). El ácido octadecanoico o esteárico se ha identificado en *Larrea tridentada* (100), *Ailanthus altissima* (101), *Ludwigia octovalvis* (102), entre otras y el ácido heptadecanoico se ha encontrado en *Solanum subinerme* (103).

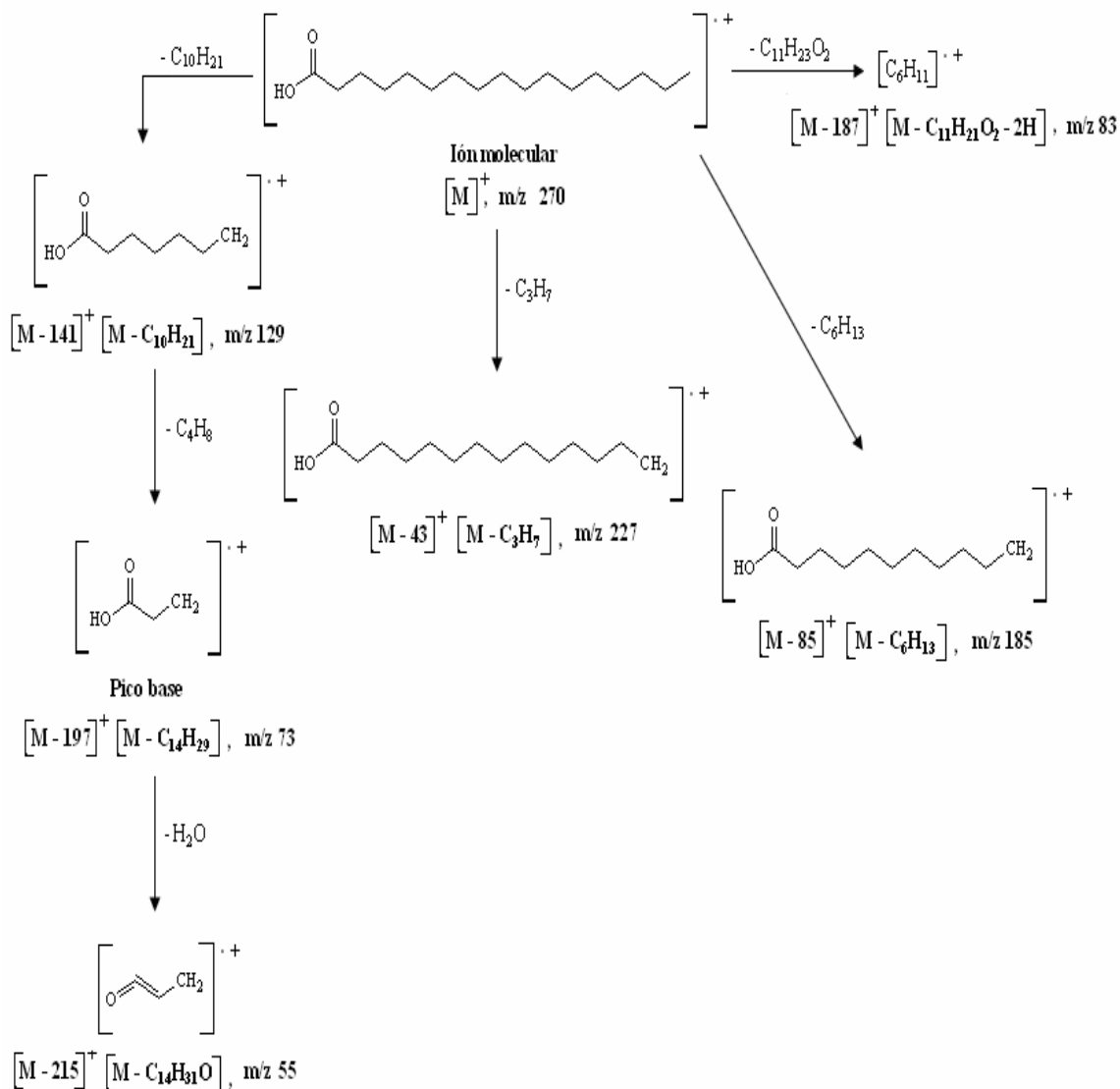


Figura 39. Patrón de fragmentación del ácido heptadecanoico.

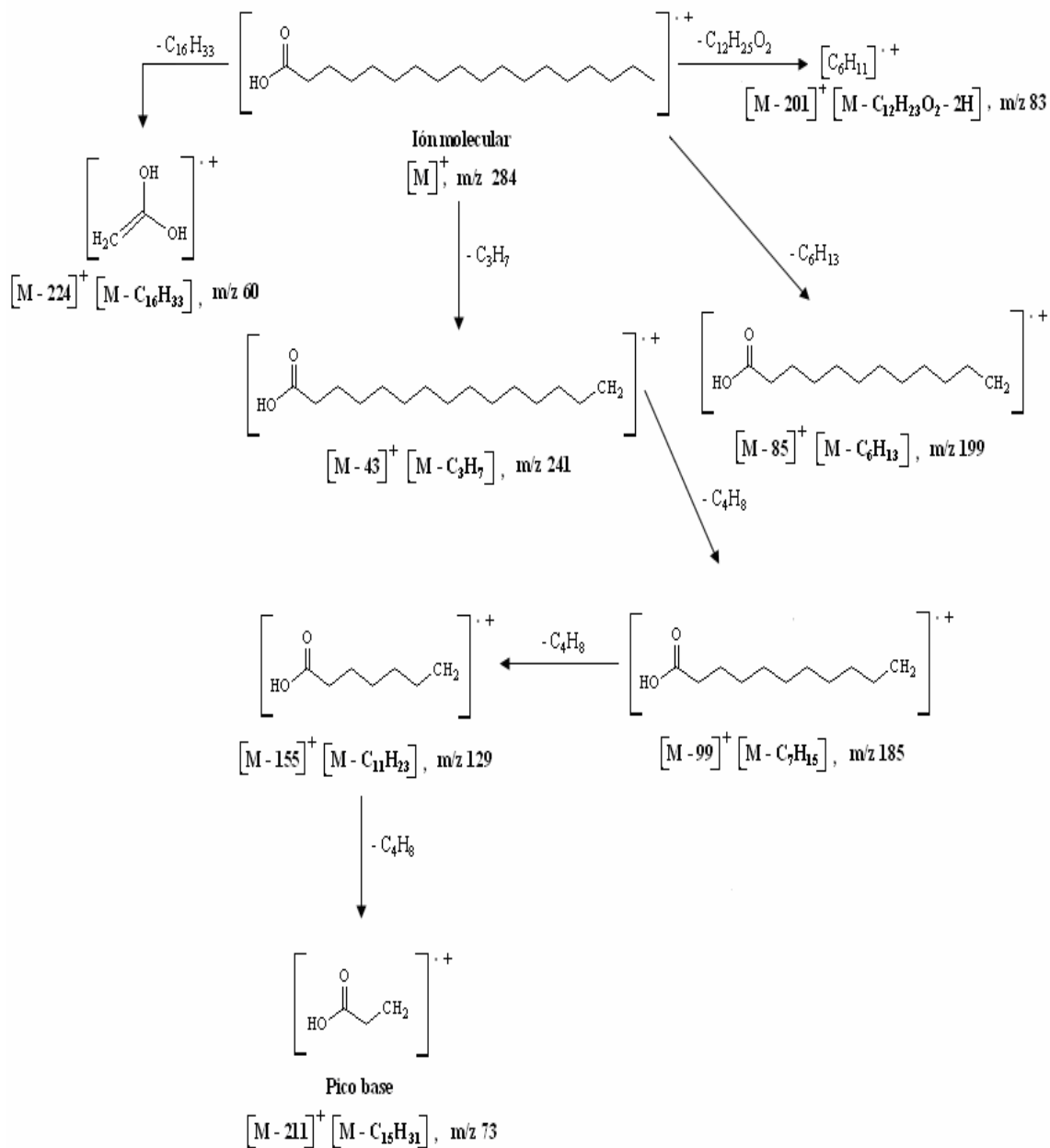


Figura 40. Patrón de fragmentación del ácido octadecanoico.

Según registros señalan que los ácidos hexadecanoico y octadecanoico, poseen propiedades apópticas (104); así como también contribuyen a reducir el colesterol LDL y protegen contra las enfermedades cardíacas (105).

Es importante señalar que los ácidos grasos son ácidos orgánicos de cadena larga que están presentes en muchas plantas y otros organismos vivos. Los ácidos orgánicos



ejercen sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados los cuales son el efecto antimicrobiano debido a la acidez y el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada (106).

En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, esto es, a la disminución del pH extracelular; debido a que todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo de pH fuera del cual les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular, ya que el pH intracelular tiene que estar necesariamente cerca de la neutralidad, incluso el de los organismos que crecen mejor a pH ácidos (acidófilos). El mantenimiento de estas condiciones adecuadas de pH se consigue mediante diversos mecanismos de homeostasis. La mayoría de las bacterias a pH inferiores a 5 no exhiben un crecimiento óptimo, pero este nivel de acidez no garantiza, naturalmente, la esterilidad microbiológica y muchas bacterias pueden sobrevivir en estas condiciones durante periodos prolongados de tiempo (106, 107).

El efecto de la acidificación del medio depende de la concentración y fuerza del ácido. Por tanto, este tipo de efecto antimicrobiano ocurrirá igual con ácidos orgánicos que inorgánicos, con la salvedad de que hará falta utilizar una cantidad mayor de un ácido orgánico (débil) que de un ácido inorgánico (fuerte) para alcanzar el mismo pH (107).

El segundo tipo, más importante en la práctica, es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada. El efecto antimicrobiano de muchos ácidos orgánicos se ejerce a través de la forma no disociada y este factor tiene mayor importancia que la disminución del pH por sí misma. La forma disociada de los ácidos, al ser un anión, es altamente polar y por tanto no atraviesa fácilmente la membrana plasmática de los microorganismos. La forma no disociada del ácido, por el contrario, sí atraviesa la membrana. Una vez en el interior de la bacteria, el ácido puede disociarse y entonces afecta directamente al pH intracelular microbiano. Esto puede afectar gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pH ácidos (107).

### Fraccionamiento cromatografico de la fracción C

La fracción C (líquido aceitoso de color verde) se fraccionó a través CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); en una columna de 1 cm de diámetro y 25 cm de longitud con una relación muestra – sílica de 1: 40 (0,1968 g: 7,8720 g). En la CC se utilizaron eluyentes como hexano al 100%, mezclas de solventes de diferentes polaridades en forma creciente de hexano – cloroformo, cloroformo al 100%, cloroformo – acetato de etilo y acetato de etilo al 100%. Del fraccionamiento cromatográfico se obtuvieron 16 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 20). A estos eluatos se les realizó CCF con mezcla de solventes de hexano – cloroformo (1:1), cloroformo 100% y cloroformo – acetato de etilo (1:1).

Tabla 20. Fraccionamiento de la fracción C del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1	100
Hexano - Cloroformo	2-4	50-50
Cloroformo	5-7	100
Cloroformo – Acetato de etilo	8-9	60-40
Cloroformo - Acetato de etilo	10-13	50-50
Acetato de etilo	14-16	100

Después de observar la CCF se unieron los eluatos que mostraron comportamientos similares y se obtuvieron 6 subfracciones (Tabla 21). Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 0,0952 g, equivalente al 48,37% de la subfracción C.

Las CCF aplicadas a cada una de las subfracciones se realizaron con mezclas de solventes en proporciones como: hexano – cloroformo 3:2, cloroformo al 100% y cloroformo – acetato de etilo 4:1 y 1:1. La subfracción C.2 (aceite de color amarillo) en la CCF exhibió un comportamiento diferente al de las demás subfracciones, ya que mostró una estela con algunas manchas resaltantes pertenecientes posiblemente a ciertos compuestos, por tal motivo se decidió analizarla por CG/EM.

Tabla 21. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción C del EAT de *W. berteri*.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
C.1	1	10,60
C.2	2	38,20
C.3	3	11,90
C.4	4-5	10,90
C.5	6-10	12,30
C.6	11-16	11,30

El cromatograma de gases de la subfracción C.2 (Figura 41) mostró la presencia de varios compuestos; todos ésteres del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con porcentaje de probabilidad de 95% y 91%. El éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico fueron los compuestos que presentaron porcentaje de área significativo 1,45% y 96,83% respectivamente, siendo el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, el compuesto en presentar mayor porcentaje de área (Tabla 22). Los compuestos identificados con valores de porcentaje de probabilidad inferiores a 90%, no fueron tomados en cuenta para integrar el grupo de compuestos que posiblemente presente la subfracción.

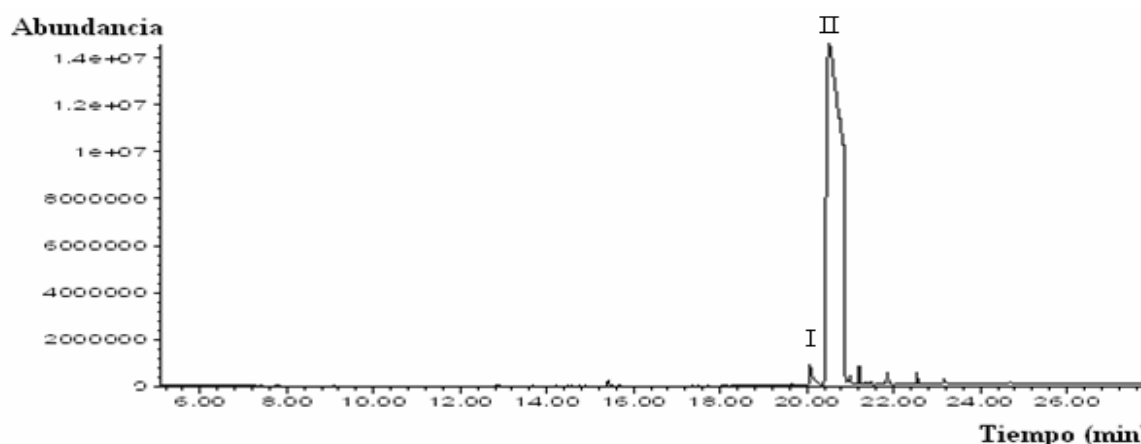


Figura 41. Cromatograma de gases de la subfracción C.2.

El éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I) y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II) arrojaron porcentaje de probabilidad de 91%, con áreas de 1,45% y 96,83% en tiempos de retención de 20,073 min y 20,519 min. Estos compuestos por presentar mayor porcentaje de área fueron los seleccionados para analizar sus espectros de masas; sin embargo, los mismos ya fueron citados en la subfracción B.3, donde se puede observar sus espectros de masas y sus respectivos patrones de fragmentación.

Tabla 22 .Compuestos identificados en la subfracción C.2 mediante CG/EM.

Compuestos	Formula molecular	TR (min)	% P	% A
Benzoato de dibutilo	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	15,415	95	0,17
Éster (2-etilhexil) hexílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> )	19,655	91	0,09
Éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I)	(C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> )	20,073	91	1,45
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II)	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	20,519	91	96,83
Éster (2-etilhexil) decílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> )	22,545	91	0,24

TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de area

A pesar de que existen publicaciones acerca de que los ftalatos son compuestos sintetizados por el hombre, se encuentran muchos artículos científicos que reportan el aislamiento de ftalatos proveniente de bacterias, hongos, algas marinas y plantas (71,76-85,90).

Se piensa que la actividad antimicrobiana y letal que demostró tener la fracción C es debida a la subfracción C.2, ya que ésta presentó mayor masa y la actividad biológica mostrada es posiblemente debida a la mezcla de ésteres de ácidos 1,2-benzenodicarboxílicos. Sin embargo, la actividad biológica que posee la fracción C también pudiera ser originada por la unión de todas sus subfracciones o sinergia entre todos los metabolitos que la conforman.

### Fraccionamiento cromatografico de la fracción D

La fracción D (solidó pastoso de color amarillo) fue fraccionada mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); se utilizó como columna una bureta de 25 ml de capacidad y una relación muestra – sílica de 1: 40 (0,0886 g: 3,5440 g). Se empleó como primer eluyente una mezcla de hexano – cloroformo en una proporción 3:2, luego se agregó hexano – cloroformo 1:1, seguidamente cloroformo al 100% y mezclas de solventes de polaridad creciente de cloroformo – acetato de etilo en proporciones 3:2 y 1:1; se finalizó con acetato de etilo al 100%. Se obtuvieron 25 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 23), a quienes se les realizó CCF con mezcla de hexano – cloroformo 3:2 y cloroformo – acetato de etilo 4:1 y 1:1. Se obtuvieron 4 subfracciones (Tabla 24) y se recuperó una masa total de 0,0514 g, lo que representa el 58,01% con relación a la masa inicial de la fracción.

Tabla 23. Fraccionamiento de la fracción D del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano - Cloroformo	1-2	70-30
Hexano - Cloroformo	3-6	50-50
Cloroformo	7-11	100
Cloroformo- Acetato de etilo	12-16	70-30
Cloroformo - Acetato de etilo	17-21	50-50
Acetato de etilo	22-25	100

Tabla 24. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción D del EAT de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
D.1	1-2	35,90
D.2	3-11	5,80
D.3	12-16	5,50
D.4	17-25	4,20

Sólo una de las subfracciones mostró mayor masa y mejor separación para ser estudiada; ya que en las CCF realizadas a cada una de las otras subfracciones, con mezclas de solventes en proporciones como: hexano – cloroformo 1:1, cloroformo 100% y cloroformo – acetato de etilo 1:1, se observaron mezclas muy complejas. La subfracción D.1 presentó una mezcla de compuestos muy marcados pero con  $R_f$  cercanos.

El cromatograma de gases de la subfracción D.1 (Figura 42) presentó la existencia de muchos compuestos; entre ellos se encuentran hidrocarburos alifáticos y bencénicos con porcentaje de probabilidad de 91%, 94%, 95% y 97%; así como también, se identificaron varios ésteres del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con porcentaje de probabilidad de 91% a excepción del benzoato de dibutilo que presentó una probabilidad de 95%. Para esta subfracción los compuestos que presentaron mayor porcentaje de área fueron el éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con un área de 1,53% con tiempo de retención de 20,084 min, y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con un área de 92,49% a un tiempo de retención de 20,525 min (Tabla 25). Para los demás compuestos identificados, se obtuvieron valores de porcentaje de probabilidad inferiores a 80%, y por tal motivo no fueron señalados como compuestos presentes en la subfracción D.1.

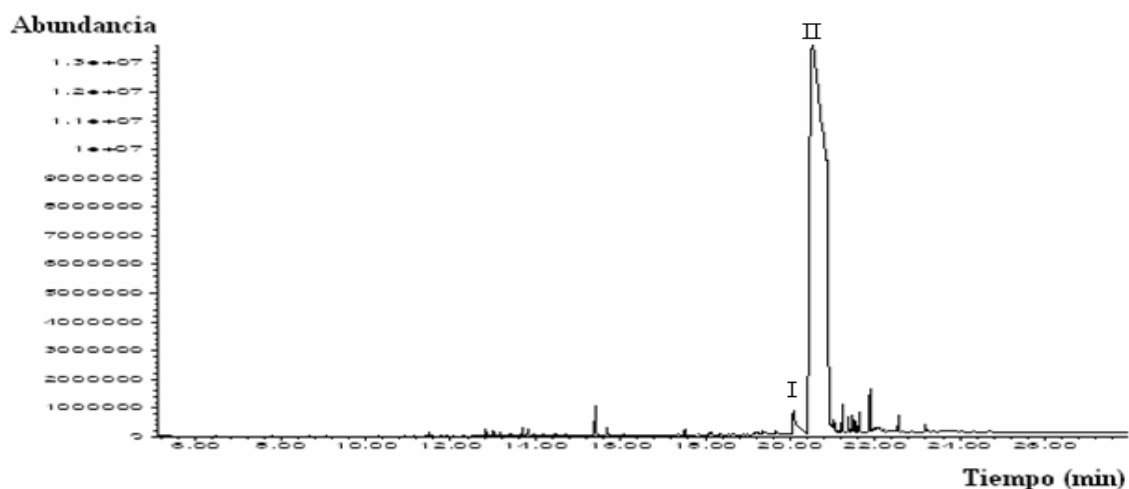


Figura 42. Cromatograma de gases de la subfracción D.1.

Los compuestos seleccionados para el análisis de sus espectros de masa fueron el éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I) y el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II); pero estos compuestos ya han sido discutidos anteriormente, ya que se encontraron presentes en las subfracciones B.3 y C.2.

Tabla 25 .Compuestos identificados en la subfracción D.1 mediante CG/EM.

Compuestos	Formula molecular	TR (min)	% P	% A
Hexadecano	(C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> )	11,490	97	0,06
Pentilheptilbenceno	(C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> )	12,989	97	0,08
Butilheptilbenceno	(C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> )	13,040	97	0,08
Propilnonilbenceno	(C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> )	13,178	97	0,05
Etildecilbenceno	(C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> )	13,418	94	0,06
Nonadecano	(C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	13,693	91	0,12
Benzoato de dibutilo	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O)	15,409	95	0,55
Eicosano	(C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	15,690	95	0,14
Docosano	(C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> )	17,515	95	0,09
Éster (2-etil-1-butil) hexílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O)	18,127	91	0,06
Tetracosano	(C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> )	19,197	95	0,09
Éster (2-etilhexil) hexílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> )	19,661	91	0,13
Éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (I)	(C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> )	20,084	91	1,53
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico (II)	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	20,525	91	92,49
Éster (2-etilhexil) decílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	(C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> )	22,556	91	0,26

TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de área.

### Fraccionamiento cromatografico de la fracción F

La fracción F presentó un aspecto sólido de color marrón y su fraccionamiento se realizó mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm), en una columna de 2

cm de diámetro y 37 cm de longitud, en una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,5881 g: 29,4050 g). Los eluyentes empleados fueron hexano – acetato de etilo en proporciones 1:1 y 3:7, acetato de etilo 100%, acetato de etilo – metanol en diversas proporciones (7:3, 1:1 y 3:7) y se finalizó la cromatografía con metanol 100%. Se recolectaron 47 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 26).

Tabla 26. Fraccionamiento de la fracción F del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano – Acetato de etilo	1-6	50-50
Hexano – Acetato de etilo	7-14	30-70
Acetato de etilo	15-22	100
Acetato de etilo - Metanol	23-30	70-30
Acetato de etilo - Metanol	31-35	50-50
Acetato de etilo - Metanol	36-39	30-70
Metanol	40-47	100

Luego de realizar CCF con los eluatos obtenidos y en mezclas de solventes hexano – acetato de etilo (1:1) y acetato de etilo – metanol (3:2), se obtuvieron 9 subfracciones (Tabla 27) y se recuperó una masa total de 0,3215 g, lo que representa el 54,66% con relación a la masa inicial de la fracción. La pérdida del material cromatografiado puede ser a causa de la polaridad de la fracción, que debido a esto se quedó adsorbida sobre la sílica y no fue posible obtener todos sus compuestos con los solventes empleados.

Se realizaron CCF a cada una de las subfracciones obtenidas con diversas mezclas de solventes de hexano – acetato de etilo (4:1, 1:1, 2:3 y 1:4), acetato de etilo 100% y acetato de etilo – metanol en diferentes proporciones (4:1, 3:2, 1:1 y 1:4). Todas las CCF mostraron mezclas muy complejas; sin embargo, la subfracción F.6 fue seleccionada para ser analizada, por presentar mayor masa y un excelente resultado en la evaluación de la actividad letal con *A. salina*, con un  $CL_{50}$  de 0,54  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de montado el bioensayo y 0,04  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas, obteniéndose un porcentaje de incremento de actividad con respecto al tiempo de 92,6% (ver apéndice, Tabla A.2).



Tabla 27. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción D del EAT.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
F.1	1-2	11,90
F.2	3-4	12,30
F.3	5-8	13,20
F.4	9-12	13,90
F.5	13-22	16,40
F.6	23-31	139,20
F.7	32-41	16,80
F.8	42-44	42,60
F.9	45-47	55,20

El estudio de la subfracción F.6, se inició con una separación cromatográfica en columna, utilizando una bureta de 25 ml de capacidad, como columna y una relación muestra – sílica de 1: 40 (0,1206 g: 4,8240 g). Se empleó como primer eluyente una mezcla de hexano – acetato de etilo (1:1), luego se continuó con acetato de etilo 100%, también se agregó una mezcla de polaridad creciente de acetato de etilo – metanol (7:3, 1:1 y 3:7); la cromatografía se finalizó con metanol 100%. Se obtuvieron 28 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 28).

Tabla 28. Fraccionamiento de la subfracción F.6 del EAT de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano – Acetato de etilo	1-6	50-50
Acetato de etilo	7-9	100
Acetato de etilo - Metanol	10-14	70-30
Acetato de etilo - Metanol	15-21	50-50
Acetato de etilo - Metanol	22-25	30-70
Metanol	26-28	100

Con los eluatos recolectados se realizó CCF en mezclas de solventes: acetato de etilo – metanol (4:1) y acetato de etilo – metanol (1:4); según lo observado en las CCF se unieron los eluatos y se obtuvieron 3 subfracciones (Tabla 29). Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 0,1175 g, lo que corresponde el 97,42% con relación a la masa inicial de la subfracción.

Tabla 29. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción F.6 del EAT de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
F.6.1	1-11	49,20
F.6.2	12-23	36,80
F.6.3	24-28	31,50

A las subfracciones obtenidas se les evaluó la actividad letal con el crustáceo *A. salina* y se les realizaron CCF con acetato de etilo 100%, acetato de etilo – metanol (1:1) y acetato de etilo – metanol (1:4).

Las subfracciones F.6.2 y F.6.3 fueron las que presentaron los mejores resultados, ya que los valores de  $CL_{50}$  de estas subfracciones se encuentran muy por debajo de 1000  $\mu\text{g/ml}$ ; es decir 0,09  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas y 0,06  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas, para la subfracción F.6.2; en el caso de la subfracción F.6.3, su  $CL_{50}$  a las 24 horas fue 0,54  $\mu\text{g/ml}$  y 0,04  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas (apéndice – Tabla A.2); en cambio, la subfracción F.6.1 arrojó un  $CL_{50}$  por encima 1000  $\mu\text{g/ml}$ , tanto a las 24 horas como a las 48 horas de exposición de los nauplios de *A. salina* con el extracto.

La CCF de la subfracción F.6.1 mostró una sola mancha alargada, en cambio la CCF de la subfracción F.6.2 exhibió varias manchas muy cercanas unas de otras y la subfracción F.6.3 mostró una mezcla de compuestos muy compleja. Por lo observado en las CCF se consideró analizar las subfracciones F.6.1 y F.6.2 por CG/EM, para identificar en lo posible los compuestos que estas muestras puedan contener y causantes de la antibiosis observada para F.6.2.

El cromatograma de gases de la subfracción F.6.1 (Figura 43) evidenció la

existencia de un sólo compuesto; el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (Figura 44) con un porcentaje de probabilidad de 91%, área de 100% y con tiempo de retención de 19,537 min.

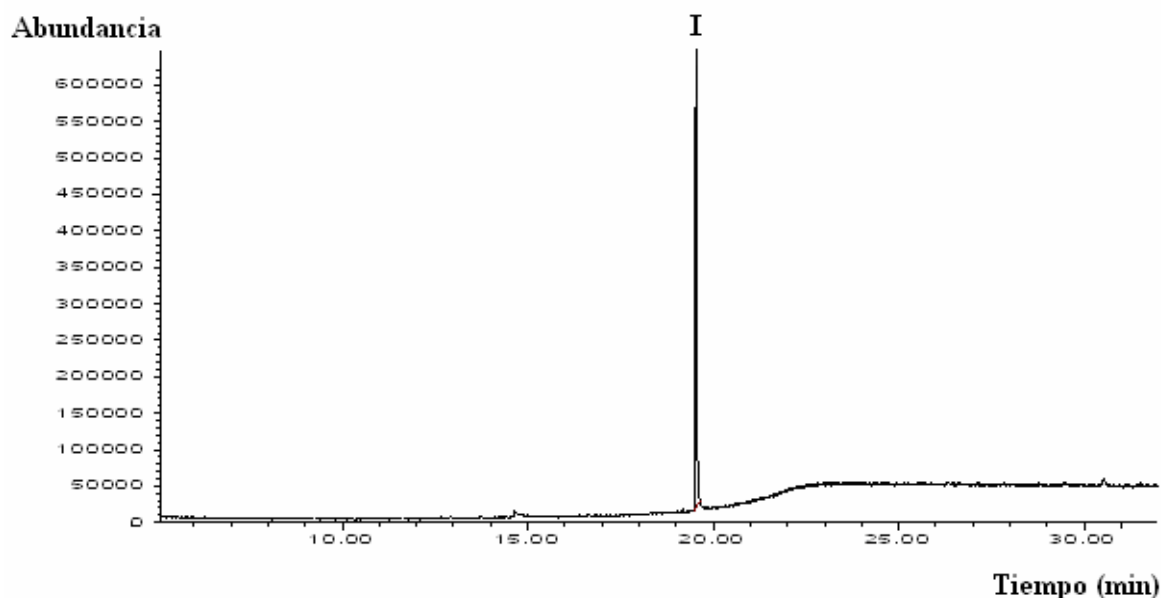


Figura 43. Cromatograma de gases de la subfracción F.6.1.

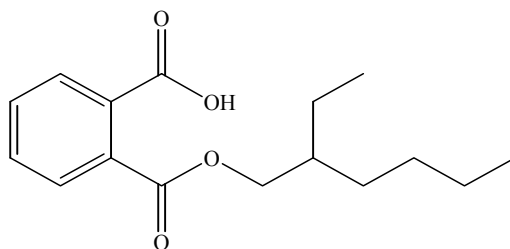


Figura 44. Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico

En las referencias bibliográficas consultadas no se encontró reporte sobre la identificación o aislamiento del mono éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico en algún organismo terrestre o marino; sin embargo, este compuesto es el metabolito primario del éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

Para la subfracción F.6.2 el cromatograma de gases (Figura 45) reveló la presencia de varios compuestos; entre los cuales se encuentran ésteres de ácidos con porcentaje de

probabilidad de 93% y 91%. También se identificaron una acetona, un alqueno, un éter y un compuesto con estaño, todos con diversos porcentajes de probabilidad igual o superior a 90%. Los compuestos que presentaron mayor porcentaje de área fueron el 3-eicoseno, éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico y dibutilciclohexilmetil-estano con valores de 1,93%, 4,88% y 19,975% en tiempos de retención de 15,723min, 19,521min y 20,007 min, respectivamente (Tabla 30). Los compuestos identificados con valores de porcentaje de probabilidad inferiores a 90%, no fueron nombrados ni tomados en cuenta para integrar el grupo de compuestos que posiblemente presente la subfracción.

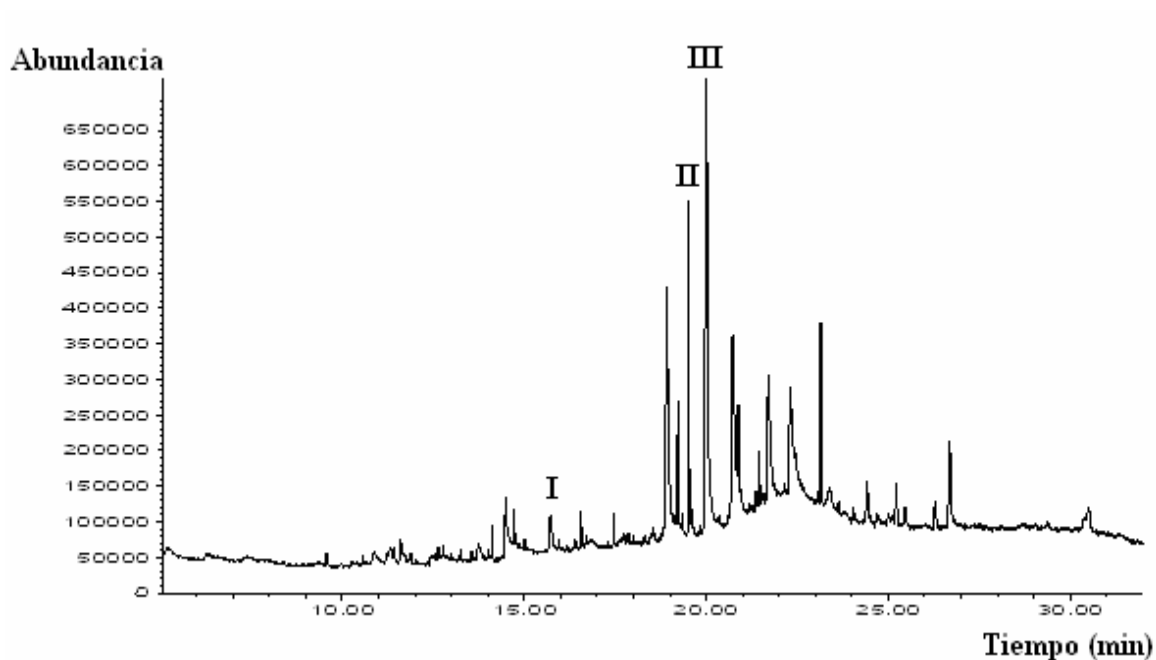


Figura 45. Cromatograma de gases de la subfracción F.6.2.

Estos tres compuestos por presentar mayor porcentaje de área fueron los escogidos para analizar sus espectros de masas; sin embargo, el éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico ya fue nombrado en la subfracción B.3, donde se muestra el espectro de masas y patrón de fragmentación de este compuesto. Por otra parte, el dibutilciclohexilmetil-estano es un compuesto organometálico o compuesto orgánico de estaño y para el estudio de *W. berteroi* sólo se analizarán compuestos

orgánicos, ya que el estudio de esta planta es en el área de orgánica, pero es importante mencionar que los compuestos orgánicos de estaño se encuentran en el aire, el agua y el suelo; además, pueden acumularse en peces, en otros animales y en plantas (108).

Tabla 30. Compuestos identificados en la subfracción F.6.2 mediante CG/EM.

Compuestos	Fórmula molecular	TR (min)	%P	% A
7,9-diterbutil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	(C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> )	14,119	99	0,49
3-icoseno (I)	(C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	15,723	90	1,93
Éster etílico del ácido octadecanoico	(C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	16,566	93	0,62
2-heptadecil-oxirano	(C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O)	19,348	95	0,64
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (II)	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	19,521	91	4,88
Dibutildiclohexilmetil-estanano (III)	(C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> S <sub>n</sub> )	20,007	90	19,97

TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de área.

Estudios han demostrado que respirar o ingerir ciertos compuestos orgánicos de estaño (por ejemplo, trimetilestaño y trietilestaño) puede interferir con el funcionamiento del sistema nervioso y el cerebro. En casos graves, puede causar la muerte. Otros compuestos orgánicos de estaño (por ejemplo, dibutilestaño y tributilestaño) afectan el sistema inmunitario en animales, pero esto no se ha evaluado en seres humanos. Algunos estudios en animales también han demostrado que estos compuestos afectan la reproducción. Esto tampoco se ha evaluado en seres humanos (109, 110).

Un estudio realizado en mamíferos marinos residentes en las Islas Canarias publicó la detección de compuestos orgánicos de estaños, fundamentalmente en delfines, siendo dibutilestaño el principal metabolito detectado (111, 112).

De acuerdo a lo anteriormente dicho, de los tres compuestos seleccionados para el análisis de sus espectros de masas, sólo al 3-icoseno se le realizó este análisis, mostrando su espectro de masas y el patrón de fraccionamiento con los fragmentos que posean los picos resaltantes.

El espectro de masas del 3-icoseno (Figura 46) manifestó un ión molecular  $[M^+ + H]$  a  $m/z$  281, que se relaciona con la fórmula  $C_{20}H_{40} + H$ . Los picos asignados a los fragmentos más abundantes se apreciaron a  $m/z$  111, 97, 83, 55 y 43 (pico base). El patrón de fragmentación del 3-icoseno (Figura 47) revela el posible esquema de las diferentes rupturas de enlaces de la molécula y señala las estructuras de los fragmentos ya mencionados.

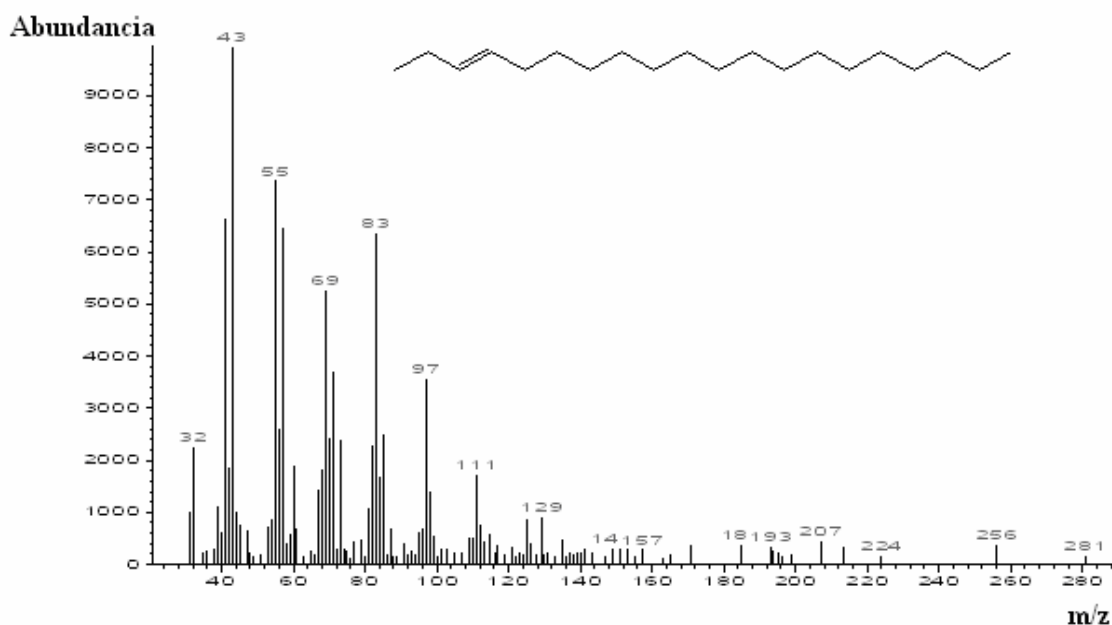


Figura 46. Espectro de masas del 3-icoseno.

La grasa natural, a pesar de estar constituida por una mezcla de triglicéridos de ácidos grasos, también tiene presente otros compuestos como cera e hidrocarburos (113); estos últimos representan los productos naturales orgánicos menos polares, lo cual se forman por descarboxilación de los ácidos grasos. En pétalos de rosa y caña de azúcar, han sido identificados varios alquenos (114). Estos compuestos se presentan tanto en animales como en vegetales y sus estructuras son más sencillas que la mayoría de los metabolitos secundarios (113).

Una evaluación química del extracto del hongo marino *Aspergillus ochraceus*, aislado de *Rhizophora mangle* fue identificado el 3-icoseno mediante CG-EM (115).

Este compuesto también fue identificado en el aceite esencial de *Rosa alba* (116).

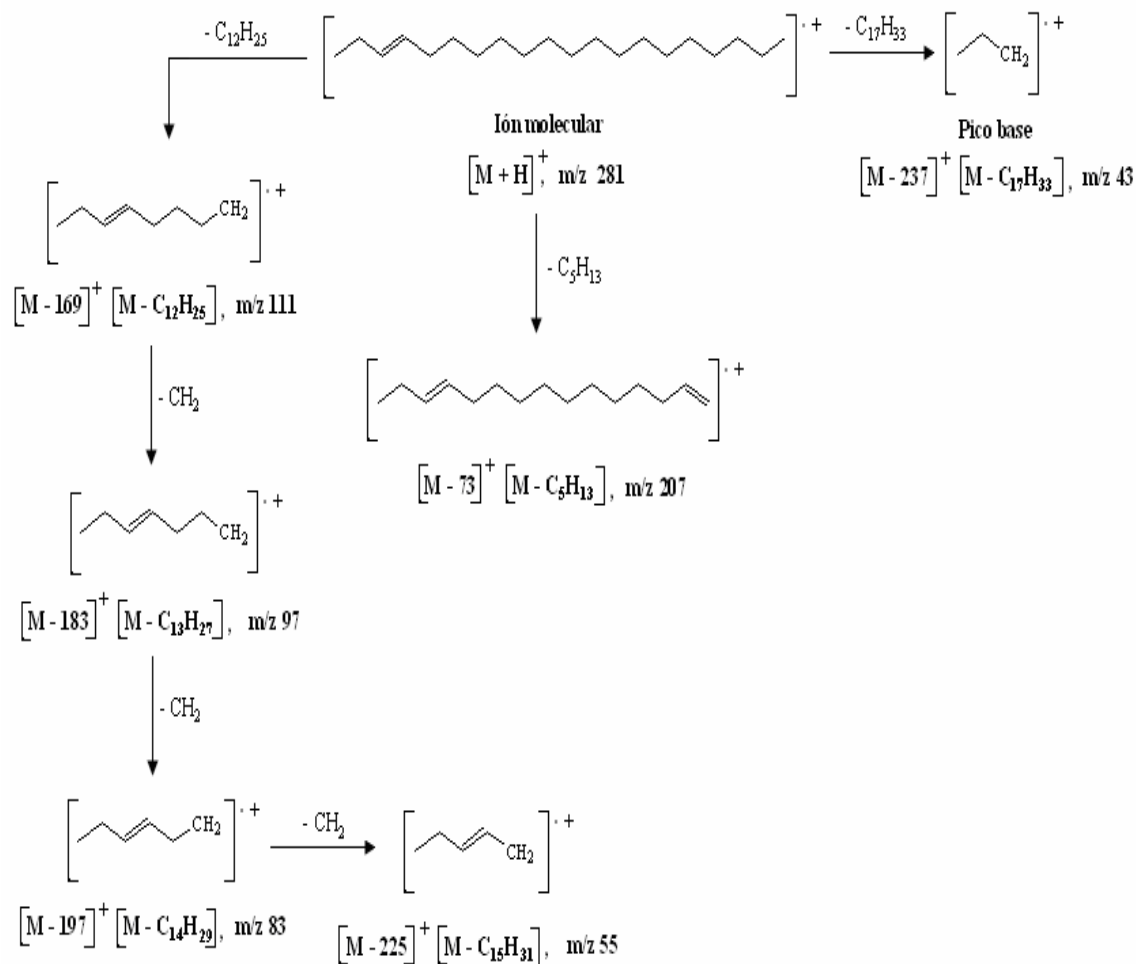


Figura 47. Patrón de fragmentación del 3-eicoseno.

### **Fraccionamiento del extracto crudo alcohólico de la hoja de *W. berteroi***

El extracto alcohólico de la hoja (EAH) se fraccionó por cromatografía de columna (CC) sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 mm), en una columna de 1,5 cm de diámetro y 50 cm de alto aproximadamente. La relación sílica – extracto utilizada en la cromatografía fue de 1: 50 (g de extracto: g de sílica); 1,5051 g de extracto y 75,2550 g de sílica gel. Se emplearon varias mezclas de solventes de variada polaridad. Se inició la

cromatografía con hexano – diclorometano, luego se continuo con diversas mezclas de solventes y se finalizó con metanol. Se recolectaron 53 eluatos de 50 ml (Tabla 31).

Tabla 31. Fraccionamiento del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano- Diclorometano	1-10	80-20
Hexano- Diclorometano	11-14	60-40
Hexano- Diclorometano	15-17	20-80
Diclorometano	18-24	100
Diclorometano - Acetato de etilo	25-30	50-50
Acetato de etilo	31-34	100
Acetato de etilo- Metanol	35-44	50-50
Metanol	45-53	100

De acuerdo al comportamiento que mostraron los eluatos en la cromatografía de capa fina (CCF) y por comparación de los  $R_f$ , se agruparon los eluatos y se obtuvieron 8 fracciones (Tabla 32). En las CCF realizadas se emplearon mezclas de solventes de diversas polaridades y proporciones (hexano – diclorometano 2:3; diclorometano – acetato de etilo 4:1 y acetato de etilo – metanol 4:1). Como agentes reveladores se emplearon luz ultravioleta de longitud de onda corta (100 – 280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio al 3%.

Después de la cromatografía, se recuperó una masa total de 1,3616 g, lo que representa el 90,47 % del material orgánico cromatografiado. La pérdida del material después de la cromatografía puede deberse posiblemente a la adsorción del extracto sobre la sílica gel y debido a que es un extracto alcohólico, lo cual, en su mayoría está constituido por compuestos muy polares, que no pudieron separarse con metanol durante la cromatografía.

Para observar el comportamiento de cada una de las fracciones se les realizaron CCF, en las mismas se emplearon solventes como diclorometano y acetato de etilo al 100% y diversas mezclas de solventes en diferentes proporciones como: hexano –



diclorometano 3:2 y 1:1; diclorometano – acetato de etilo 2:3 y 1:4; acetato de etilo - metanol 1:1y 1:4 y los agentes reveladores mencionados anteriormente.

Tabla 32. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del EAH de *W. berteroi*.

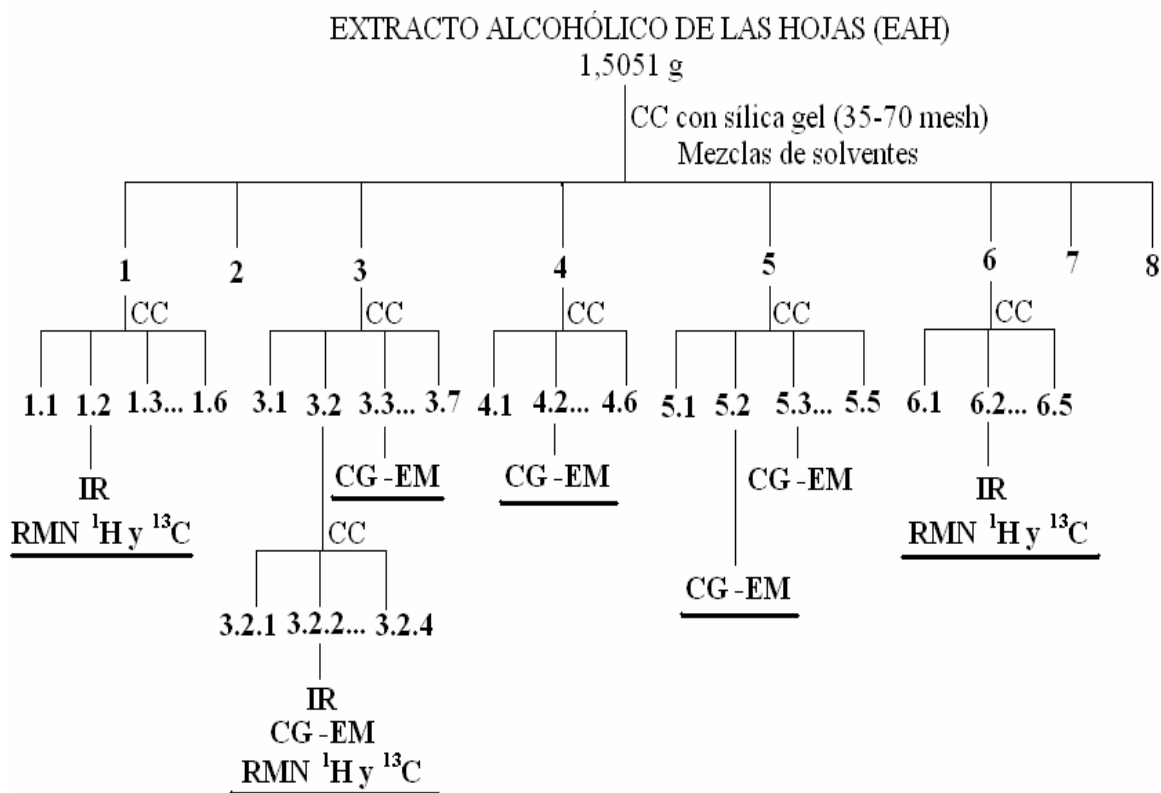
Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
1	1-14	239,10
2	15-17	10,30
3	18-25	240,20
4	26-28	123,20
5	29-34	147,50
6	35-41	556,20
7	42-44	21,40
8	45-52	23,70

Algunas fracciones (1, 3, 4, 5 y 6) presentaron manchas definidas en las CCF y se consideró conveniente evaluar la actividad biológica de estas fracciones, a través de los bioensayos de actividad letal y actividad antimicrobiana. Sólo a las fracciones 1, 3 y 5 se les realizó el bioensayo de actividad letal con *A. salina* y la actividad antimicrobiana fue estudiada en las fracciones 1, 3, 4, 5 y 6.

Los resultados de estos bioensayos se pueden observar en el apéndice (Tabla A.3), los mismos mostraron que las fracciones 3 y 5 evidenciaron los mejores valores de  $CL_{50}$  (8,83  $\mu\text{g/ml}$  y 6,92  $\mu\text{g/ml}$ ) a las 24 horas de exposición; sin embargo, las fracciones 1 y 3 fueron las que presentaron mayor porcentaje de incremento de actividad letal con respecto al tiempo (%IAT) con un porcentaje de 99,99 %.

Por su parte, los resultados de las pruebas biológicas revelaron que las fracciones 4 y 5 tienen actividad leve contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; con porcentaje de bacterias sensibles al extracto (%BSE) de 75% y ninguna de la fracciones estudiadas mostraron actividad antifúngica. A pesar que la fracción 6, no mostró actividad antimicrobiana, su CCF evidenció unas manchas

separadas y muy marcadas. Por lo tanto, conforme a los resultados obtenidos en la CCF y a los ensayos biológicos se concluyó estudiar las fracciones antes mencionadas.



RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y CG-EM ; En espera por los resultados

Figura 48. Esquema de fraccionamiento del extracto alcohólico del tallo de *W. berteroi*

### Fraccionamiento cromatografico de la fracción 1

La fracción 1 exhibió un aspecto aceitoso y de color verde, la misma fue fraccionada a través de CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm), en una columna de 1 cm de diámetro y 25 cm de longitud con una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,2071 g: 10,3550 g). Se inició la separación cromatográfica con hexano al 100%, luego se agregaron mezclas de solventes de polaridad creciente de hexano –

diclorometano, diclorometano 100%, y se finalizó con una mezcla de diclorometano - acetato de etilo. Se obtuvieron 36 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 33).

Tabla 33. Fraccionamiento de la fracción 1 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1-5	100
Hexano - Diclorometano	6-17	80-20
Hexano - Diclorometano	18-21	50-50
Hexano - Diclorometano	22-27	30-70
Diclorometano	28-31	100
Diclorometano - Acetato de etilo	32-35	70-30
Diclorometano - Acetato de etilo	36	50-50

Para observar el comportamiento de cada eluato se realizó CCF con mezclas de solventes de diferentes polaridades como hexano- diclorometano 7:3 y diclorometano – acetato de etilo 6:4. De acuerdo al comportamiento observado en las placas, los eluatos se unieron y se obtuvieron 6 subfracciones (Tabla 34). La masa total recuperada fue 0,1927 g lo que corresponde con un 93,05% del material orgánico cromatografiado.

Tabla 34. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 1 del EAH de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
1.1	1-7	8,61
1.2	8-17	165,42
1.3	18-21	3,90
1.4	22-31	2,84
1.5	32-35	8,80
1.6	36	3,21

Luego de las CCF realizadas a todas las subfracciones con mezclas de hexano –

diclorometano en proporciones de 3:2 y 1:1; también se utilizó diclorometano al 100% y diclorometano – acetato de etilo en proporciones de 4:1 y 3:2. La subfracción 1.2 (aceite incoloro) presentó mayor masa y mostró una sola mancha en la CCF; por lo que se sospechó que se trataba de un compuesto posiblemente puro; en vista de esto se consideró conveniente analizarlo por espectroscopia IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para identificar los grupos funcionales y los tipos de protones y carbonos que esta subfracción pudiera contener.

Se debe mencionar que la subfracción 1.2, exhibió un excelente resultado en la evaluación de la actividad letal con *A. salina*; ya que se obtuvo un  $\text{CL}_{50}$  de 0,32  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de montado el bioensayo y un  $\text{CL}_{50}$  de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas de exposición de los nauplios con el extracto, lo que corresponde a un porcentaje de incremento de actividad con respecto al tiempo de 96,9%. Estos resultados se pueden observar en el apéndice (Tabla A.4).

El espectro IR de la subfracción 1.2 (Figura 49), presentó similitud con el IR de la subfracción A.2.3 y B.2, ya que se observaron las señales de tensión = C – H del anillo aromático a  $3020,28\text{ cm}^{-1}$ , a  $2961,55 - 2930,77\text{ cm}^{-1}$  se observó una absorción debida al enlace C – H de una cadena alifática. Otras señales se mostraron a  $1720,56\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace C = O, una a  $1597,85 - 1580,84\text{ cm}^{-1}$  debido a la tensión C = C; así como también se observó a  $1279,64\text{ cm}^{-1}$  una señal de tensión correspondiente al enlace C – O y a  $757,16\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la absorción de deformación del enlace C- H del anillo aromático.

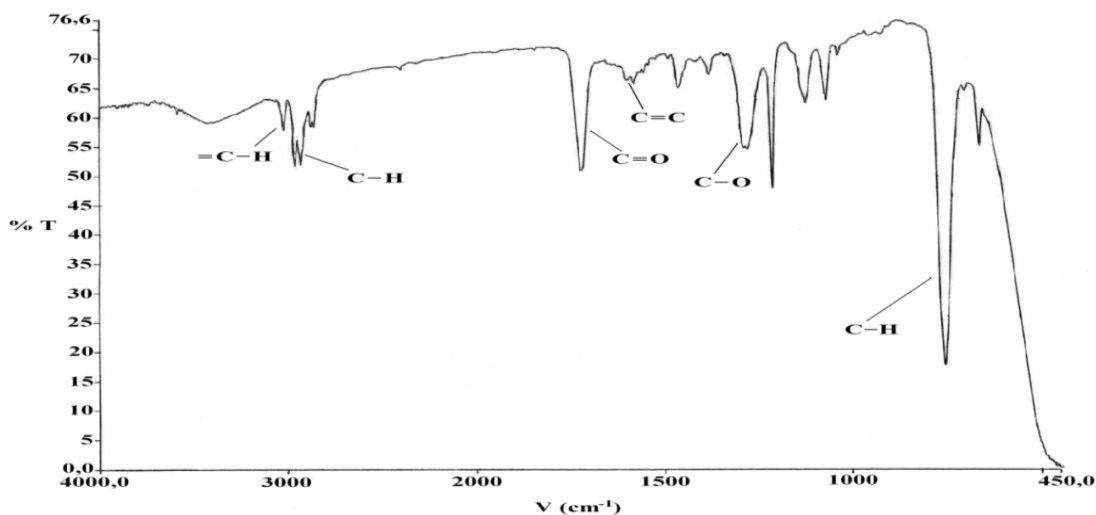


Figura 49. Espectro IR de la subfracción 1.2.

Según el análisis del IR se sugiere que la subfracción 1.2 podría contener en su estructura un anillo aromático unido a un grupo éster, como en el caso de las subfracciones A.2.3 y B.2.; es decir, que para conocer mejor la estructura del compuesto de la subfracción 1.2, es necesario analizar los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT – 135; cuyos resultados del análisis espectroscópicos aún se están esperando.

### Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 3

La fracción 3 exhibió un aspecto aceitoso y de color verde, la misma fue fraccionada a través de CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 mm); para esto se empleó una columna de 1 cm de diámetro y 25 cm de longitud con una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,2379 g: 11,8950 g). La cromatografía se inició con hexano al 100%, luego se agregaron mezclas de solventes de polaridad creciente de hexano – diclorometano, diclorometano 100%, mezclas de diclorometano – acetato de etilo en diversas proporciones, acetato de etilo 100% y se finalizó con una mezcla de acetato de etilo – metanol (7:3). Se obtuvieron 45 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 35).

Tabla 35. Fraccionamiento de la fracción 3 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1-4	100
Hexano - Diclorometano	5-8	80-20
Hexano - Diclorometano	9-14	60-40
Hexano - Diclorometano	15-20	40-60
Hexano - Diclorometano	21-24	20-80
Diclorometano	25-28	100
Diclorometano - Acetato de etilo	29-34	70-30
Diclorometano - Acetato de etilo	35-40	50-50
Acetato de etilo	41-44	100
Acetato de etilo - Metanol	45	70-30

Para obtener las subfracciones, fue necesario realizar una CCF en mezcla de solvente 1:1 hexano- diclorometano, y en diclorometano 100%. Según lo observado en las CCF se unieron los eluatos y se obtuvieron 7 subfracciones (Tabla 36).

Luego de obtener las subfracciones completamente secas, se recuperó una masa de 0,1475 g, lo que corresponde a un 62,00% del material orgánico cromatografiado. El bajo rendimiento se debe posiblemente a la adsorción de la fracción sobre la sílica gel.

Tabla 36. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 3 del EAH de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
3.1	1-8	3,80
3.2	9-11	116,80
3.3	12-14	4,80
3.4	15-17	3,70
3.5	18-28	4,60
3.6	29-44	5,90
3.7	45	7,90

Se realizaron CCF con los eluatos obtenidos en mezclas de solventes hexano – diclorometano 4:1 y 3:2, diclorometano 100%, mezclas en diferentes proporciones de diclorometano – acetato de etilo (3:2, 1:4 y 2:3) y acetato de etilo – metanol 4:1. La CCF de la subfracción 3.2 mostró una mancha definida pero con pequeñas manchitas muy cercanas debajo de ella y la subfraccion 3.3 presentó varias manchas bien marcadas y con  $R_f$  diferentes.

De acuerdo a lo visto en las CCF y a las masas de las subfracciones, se consideró conveniente aplicarle una cromatografía de columna a la subfracción 3.2 para limpiarla de las impurezas que contenía y obtener en lo posible un compuesto puro. En el caso de subfraccion 3.3, por presentar poca masa se decidió analizarla por CG/EM.

La subfracción 3.2 de aspecto pastoso y aceitoso presentó un resultado muy bueno e interesante en la evaluación de la actividad letal con *A. salina*; donde mostró un  $CL_{50}$  de 0,32  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de montado el bioensayo y un  $CL_{50}$  de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 horas, con un porcentaje de incremento de actividad con respecto al tiempo de 96,9%. Estos resultados se pueden observar en el apéndice (Tabla A.4).

Esta subfracción fue fraccionada mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); se utilizó como columna una bureta de 25 ml de capacidad y una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,0750 g: 3,7500 g). Se emplearon como eluyente: hexano al 100%, hexano – diclorometano, diclorometano 100% y diclorometano – acetato de etilo. Se recolectaron 22 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 37).

Tabla 37. Fraccionamiento de la subfracción 3.2 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano	1-5	100
Hexano - Diclorometano	6-10	70-30
Hexano - Diclorometano	11-15	50-50
Diclorometano	16-20	100
Diclorometano - Acetato de etilo	21-22	50-50

Con los eluatos obtenidos se realizó CCF con mezcla de 3:2 hexano – diclorometano y 4:1 diclorometano – acetato de etilo. De acuerdo a lo observado en las placas, se unieron los eluatos y se obtuvieron 4 subfracciones (Tabla 38). Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 0,0663 g, lo que corresponde al 88,40% en relación a la masa inicial de la subfracción 3.2.

Tabla 38. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción 3.2 del EA2 de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)
3.2.1	1-5	1,40
3.2.2	6	62,30
3.2.3	7-20	3,40
3.2.4	21-22	1,70

Se le realizaron CCF a cada una de las subfracciones antes obtenidas y se emplearon como fase móvil hexano – diclorometano (3:2) y diclorometano - acetato de etilo (4:1). La subfracción 3.2.2 fue la única que exhibió una sola mancha, lo que puede ser un compuesto posiblemente puro y por tal motivo, se consideró analizar esta subfracción por IR, CG/EM, RMN <sup>1</sup>H RMN <sup>13</sup>C y DEPT para conocer en lo posible la estructura del compuesto que esta muestra contiene.

El espectro IR de la subfracción 3.2.2 (Figura 50), es muy semejante al IR de la subfracción 1.2, debido a que se observaron a 2968,37 – 2936,82 cm<sup>-1</sup> una señal de absorción debida al enlace C – H de una cadena alifática. El enlace C = O mostró una señal a 1723,33 cm<sup>-1</sup>, otras se observaron a 1599,87- 1581,79 cm<sup>-1</sup> debido a la tensión C = C, a 1290,57 cm<sup>-1</sup> una señal de tensión correspondiente al enlace C – O y 758,98 cm<sup>-1</sup> se encuentra la absorción de deformación del enlace C- H del anillo aromático, sin embargo, las señales de tensión = C – H del anillo aromático no se observan claramente en el espectro IR.

El análisis del espectro IR sugiere que la subfracción 3.2.2 podría contener en su estructura un grupo éster, así como también podría contener un anillo aromático como



en los casos de las otras subfracciones (A.2.3, B.2 y 1.2), para saber esto es necesario estudiar los espectros de CG/EM y RMN.

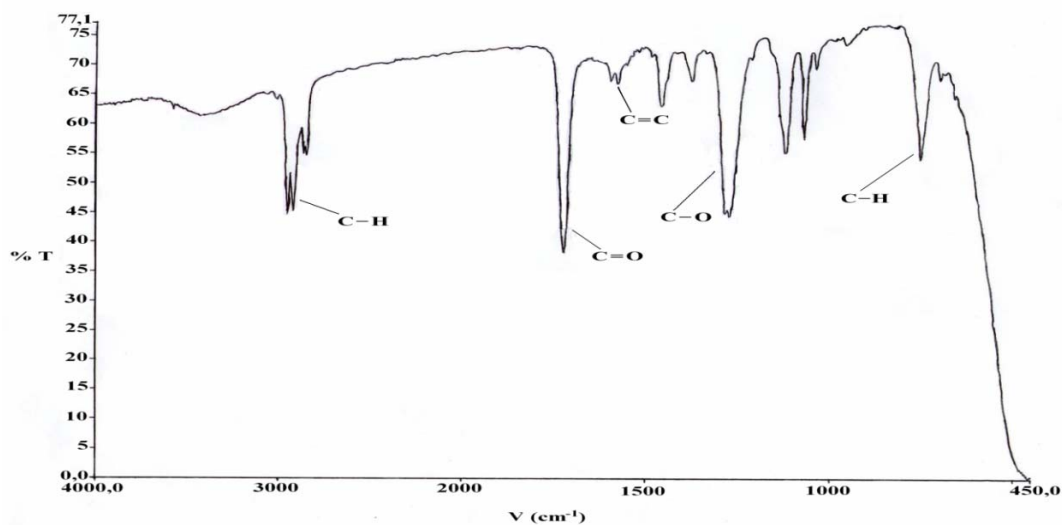


Figura 50. Espectro IR de la subfracción 3.2.2.

El cromatograma de gases de la subfracción 3.2.2 (Figura 51) justificó lo observado en la CCF, ya que exhibió la existencia de un sólo compuesto; el éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (Figura 52) con un porcentaje de probabilidad de 91%, área de 100% y con tiempo de retención de 19,575 min.

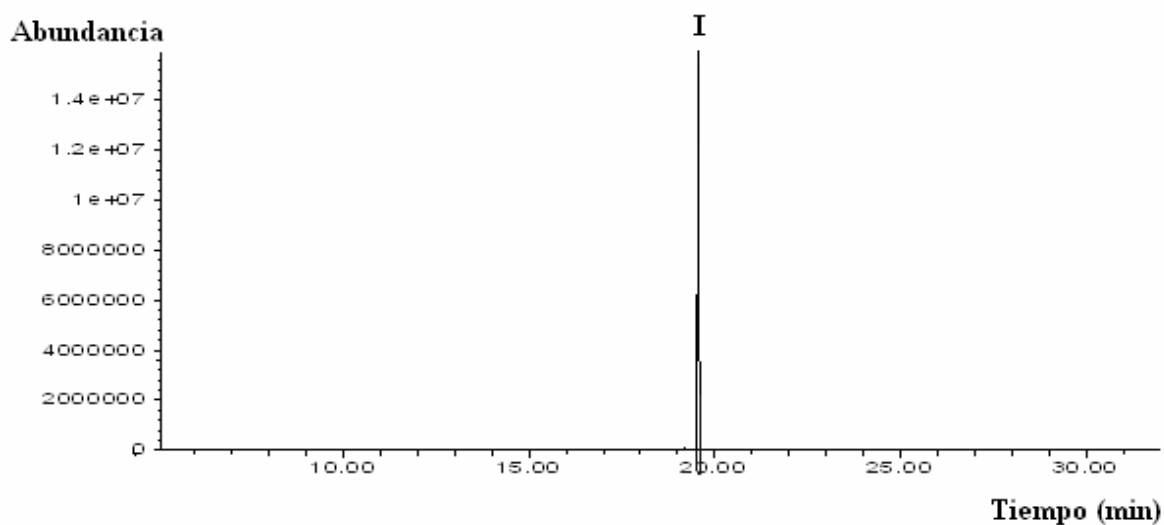


Figura 51. Cromatograma de gases de la subfracción 3.2.2.

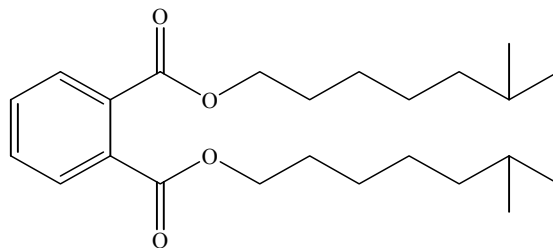


Figura 52. Éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico

El éster diisooctilo del ácido 1,2-benzenodicarboxílico ha sido identificado *en Limonium bicolor* Kuntze (117) y *Dracaena cochinchinensis* Lour (118) y aislado de *Nigella glandulifera* Freyn, donde en un estudio mostró ser un compuesto inhibitorio de la melanogénesis (119).

A pesar de que los resultados de la espectroscopia de RMN todavía no se tienen, por lo que no se ha podido realizar el análisis de los mismos; con los resultados mostrados anteriormente, se puede decir que el compuesto aislado es el éster diisooctilo del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

De igual forma los resultados de la CG/EM de la subfracción 3.3, están aun en espera por su llegada, para realizarle el análisis respectivo.

#### **Fraccionamiento cromatografico de la fracción 4**

La fracción 4, sólido pastoso de color verde oscuro, se fraccionó utilizando CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm), en una bureta de 25 ml de capacidad y una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,0630 g: 3,1500 g). La separación cromatográfica se inició con una mezcla hexano – diclorometano 9:1, luego se agregó la misma mezcla pero en otras proporciones; seguido se adicionó diclorometano 100%, mezcla de diclorometano – acetato de etilo, acetato de etilo 100% y se finalizó la cromatografía con una mezcla acetato de etilo – metanol 8:2. Del fraccionamiento cromatográfico se obtuvieron 20 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 39).

Con los eluatos recolectados se realizaron CCF con mezcla de solventes de hexano – diclorometano 2:3, diclorometano – acetato de etilo 4:1 y acetato de etilo 100%. Después de observar la CCF, se unieron los eluatos que mostraron comportamientos similares y se obtuvieron 6 subfracciones (Tabla 40). Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 0,0618 g, con un porcentaje de 98,10%.

Tabla 39. Fraccionamiento de la fracción 4 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano - Diclorometano	1-2	90-10
Hexano - Diclorometano	3-6	70-30
Hexano - Diclorometano	7	40-60
Diclorometano	8-10	100
Diclorometano – Acetato de etilo	11-12	80-20
Diclorometano – Acetato de etilo	13-16	50-50
Acetato de etilo	17-18	100
Acetato de etilo - Metanol	19-20	80-20

Tabla 40. Fracciones de la separación cromatográfica de la fracción 4 del EAH.

Fracciones	Eluatos	Masa (mg)
4.1	1-2	2,40
4.2	3-4	28,50
4.3	5	2,00
4.4	6-13	12,10
4.5	14-17	5,50
4.6	18-20	11,30

Las CCF de las subfracciones se realizaron con mezclas de solventes en proporciones como: hexano – diclorometano 2:3 y 1:4, diclorometano – acetato de etilo 4:1, acetato de etilo 100% y acetato de etilo – metanol 4:1.

La subfracción 4.2, además de presentar mayor masa también exhibió en la CCF exhibió un comportamiento diferente, ya que mostró algunas manchas resaltantes y con  $R_f$  diferente pertenecientes posiblemente a varios compuestos, por tal motivo, se mandó analizarla por CG/EM, para identificar los constituyentes de esta subfracción. No obstante los resultados de este análisis hasta ahora no han llegado, para su posterior interpretación.

### **Fraccionamiento cromatografico de la fracción 5**

La fracción 5 (líquido aceitoso de color verde) se fraccionó mediante CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); en una columna de 1cm de diámetro y 25cm de longitud con una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,1319 g: 6,5950 g). Se utilizaron eluyentes diferentes tipos de mezcla (hexano – diclorometano, diclorometano – acetato de etilo y acetato de etilo – metanol) en diversas proporciones, también se agregaron solventes al 100% como: diclorometano y acetato de etilo. Se recolectaron 41 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 41).

Se realizaron CCF para observar el comportamiento de los eluatos con mezcla de solventes de 2:3 hexano – diclorometano, 2:3 diclorometano – acetato de etilo y 4:1 acetato de etilo – metanol. Luego de las CCF se procedió a unir los eluatos y se obtuvieron 5 subfracciones (Tabla 42). Se recuperó una masa total de 0,0796 g, correspondiente al 60,35% del material cromatografiado.

Tabla 41. Fraccionamiento de la fracción 5 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano – Diclorometano	1-4	90-10
Hexano – Diclorometano	5-12	70-30
Hexano – Diclorometano	13-16	40-60
Diclorometano	17-22	100
Diclorometano – Acetato de etilo	23-26	70-30
Diclorometano – Acetato de etilo	27-30	50-50
Diclorometano – Acetato de etilo	31-36	30-70
Acetato de etilo	37-40	100
Acetato de etilo - Metanol	41	70-30

Tabla 42. Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 5 del EA2 de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
5.1	1-5	5,70
5.2	6-12	45,40
5.3	13-28	11,80
5.4	29-40	6,80
5.5	41	9,90

A cada subfracción se la realizó una CCF y se emplearon varias mezclas de solventes como: hexano – diclorometano 1:1, diclorometano – acetato de etilo 1:1 y acetato de etilo – metanol 4:1, además de solventes al 100% como diclorometano y acetato de etilo.

Las subfracciones que mostraron resultados interesantes fueron la 5.2 (sólido amarillo claro) y 5.3 (sólido blanco), ya que en las CCF se observó una serie de manchas separadas pero con  $R_f$  próximos uno de otro. Por motivo, al no disponerse de suficiente masa, se decidió analizar ambas subfracciones por CG/EM.

Los resultados de CG/EM de la subfracción 5.2 están aún en espera, para luego iniciar el estudio de los espectros de masas de los compuestos que sean identificados por la base de datos con una probabilidad igual o mayor de 90%.

En el cromatograma de gases de la subfracción 5.3 (Figura 53) se observa la presencia de varios compuestos y se identificaron diferentes ácidos grasos, ésteres de ácido carboxílico, una cetona, un compuesto de fosfato y un terpeno, todos con diferentes porcentajes de probabilidad entre 91% y 99%. Los ácidos tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico, además del 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, fueron los compuestos que presentaron mayor porcentaje de probabilidad con un valor de 99% y el ácido hexadecanoico fue el que exhibió mayor porcentaje de área con un 51,42% (Tabla 43). Los compuestos con un porcentaje de probabilidades inferiores a 90%, no fueron nombrados para integrar el grupo de compuestos que posiblemente presente la subfracción.

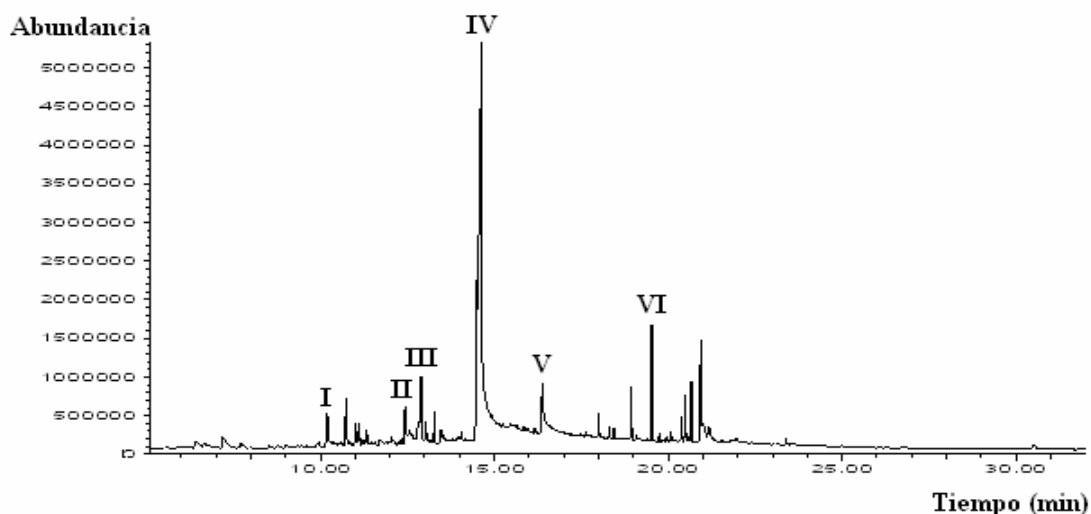


Figura 53. Cromatograma de gases de la subfracción 5.3

Los compuestos que mostraron valores de porcentaje de área significativo fueron: ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, fosfato (3:1)-1-cloro-2-propanol, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico y éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. Estos compuestos fueron los seleccionados para analizar sus espectros de masas; sin embargo los ácidos tetradecanoico, hexadecanoico y

octadecanoico, así como también éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico ya fueron identificados en las subfracciones B.3 y B.5, donde se muestran los espectros de masas y patrones de fragmentación de dichos compuestos.

Tabla 43 .Compuestos identificados en la subfracción 5.3 mediante CG/EM.

Compuestos	FM	TR (min)	% P	% A
Anhídrido ftálico	(C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> )	7,183	96	1,70
Ácido dodecanoico (I)	(C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	10,192	98	1,95
Ácido tetradecanoico (II)	(C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	12,433	99	2,02
Fosfato (3:1)-1-cloro-2-propanol (III)	(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ClHPO <sub>4</sub> )	12,898	95	5,29
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	(C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O)	13,271	99	0,94
Ácido pentadecanoico	(C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O)	13,471	97	0,70
Ácido hexadecanoico (IV)	(C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	14,621	99	51,42
Ácido octadecanoico (V)	(C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	16,382	99	5,36
4,8,12,16- tetrametilheptadecano-4-olido	(C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	18,003	91	0,78
Éster di(2-etilhexílico) del ácido hexanodioico	(C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> )	18,311	91	0,38
Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (VI)	(C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> )	19,526	91	3,30

FM: Fórmula molecular; TR (min): tiempo de retención en minuto; %P: porcentaje de probabilidad; % A: porcentaje de área.

El fosfato (3:1)-1-cloro-2-propanol es otro compuesto que presentó un porcentaje de área significativo, pero a diferencia de los otros compuestos seleccionados, este es un compuesto inorgánico. Se encontró en la literatura que los compuestos de fosfato son la materia biológica común de intercambio de energía, y el trifosfato de adenosina (ATP) es el portador de energía más importante de la célula y que las raíces de las plantas al estar en contacto con el suelo, se puede ver afectada la solubilidad de los nutrientes del suelo hacia la raíz, ya que las raíces de algunas especies de plantas, tienen la capacidad de producir exudados de muy variada naturaleza química y biológica que contribuyen al proceso de solubilización del fósforo, para luego absorberlo, y aumentar la

disponibilidad del P que puede ser aprovechado por las plantas para su crecimiento (120).

Continuando con los compuestos seleccionados para analizar su espectro de masas, el ácido dodecanoico, no ha sido explicado hasta ahora en este trabajo y por lo tanto se mostrará su espectro de masas y el patrón de fragmentación con los fragmentos que posean los picos resaltantes.

El espectro de masas del ácido dodecanoico (Figura 54) reveló un ión molecular  $[M]^+$  a  $m/z$  200, que corresponde con la fórmula  $C_{12}H_{24}O_2$ . Los picos establecidos a los fragmentos más abundantes se apreciaron a  $m/z$  157, 129, 73 (pico base), 60 y 43. El patrón de fragmentación del ácido dodecanoico (Figura 55) muestra el posible esquema de las diferentes rupturas de enlaces de la molécula y señala las estructuras de los fragmentos antes mencionados.

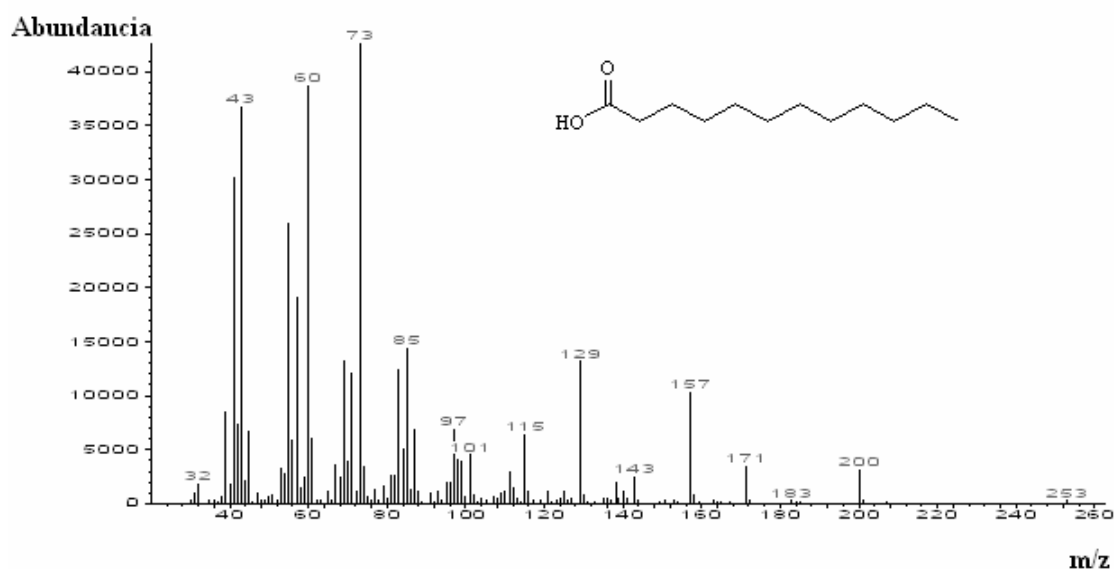


Figura 54. Espectro de masas del ácido dodecanoico.

En los años 80, investigaciones detalladas de algunas plantas, condujeron al aislamiento de un número elevado de ácidos grasos de cadena larga, con actividad insecticida. Estas sustancias tienen acción lenta y particularmente son efectivos frente a insectos tales como Lepidópteros y *Leptinotarsa decemlineata* Say (121, 122).

El ácido dodecanoico es un ácido graso saturado que se distribuye en plantas y



otros organismos vivos, este compuesto se ha identificado en *Helicteres guazumifolia* (103), *Dombeya rotunfigolia* y *Hermannia depressa* (99).

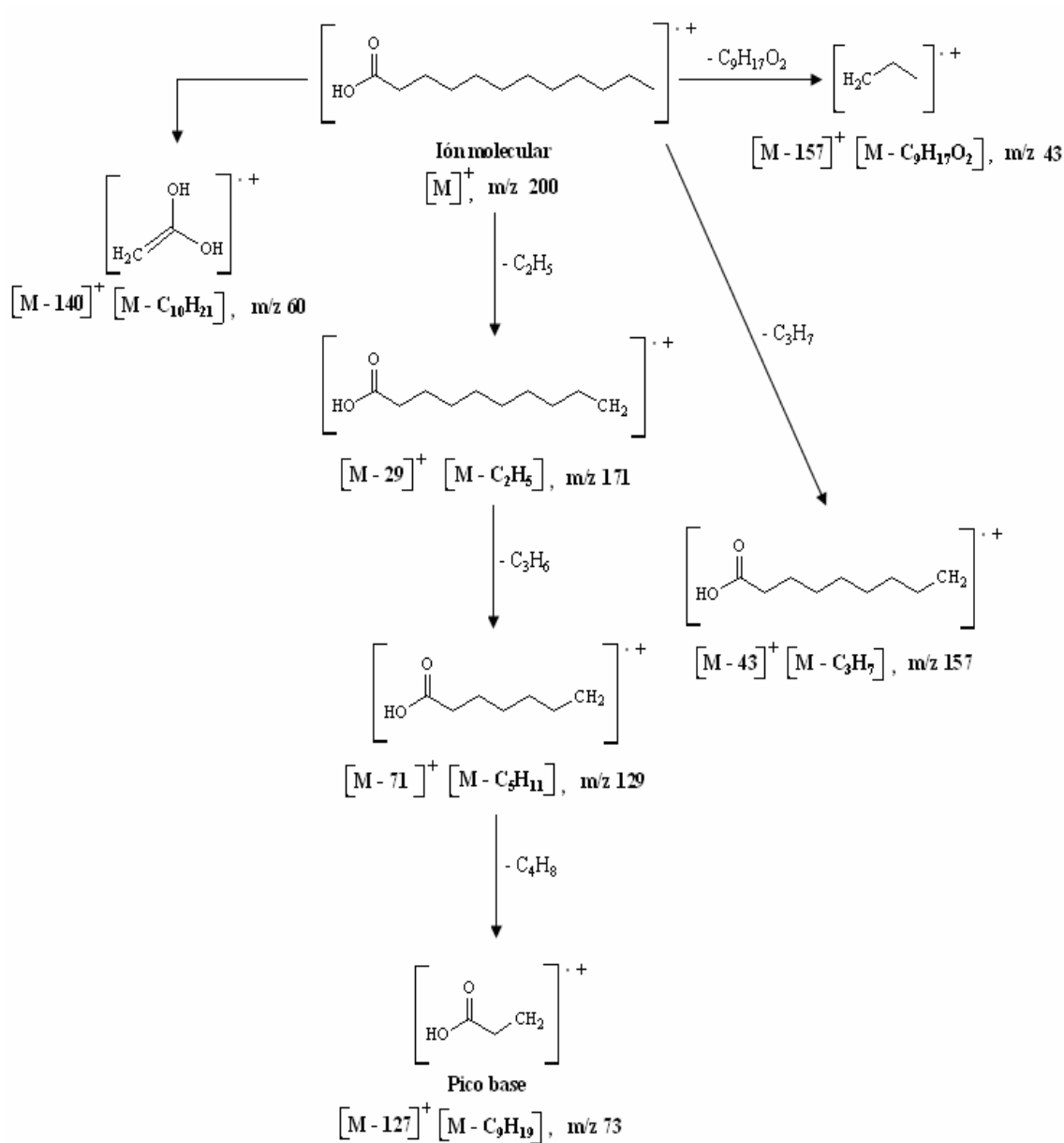


Figura 55. Patrón de fragmentación del ácido dodecanoico.

## Fraccionamiento cromatografico de la fracción 6

Para la fracción 6 (sólido marrón) se realizó una CC sobre sílica gel 35 – 70 mesh (0,2 – 0,5 nm); en una columna de 2 cm de diámetro y 37 cm de longitud, en una relación muestra – sílica de 1: 50 (0,4625 g: 18,5000 g). La cromatografía se inició con una mezcla de hexano – diclorometano (8:2), luego se emplearon solventes al 100% y mezclas de solventes en diferentes proporciones. Se finalizó la cromatografía con metanol 100%. De la separación cromatográfica se obtuvieron 50 eluatos de 25 ml cada uno (Tabla 44).

A los eluatos se les realizó CCF con mezcla de solventes de 3:2 hexano – diclorometano, 3:2 diclorometano – acetato de etilo y 3:2 acetato de etilo - metanol. Después de observar la CCF se unieron los eluatos y se obtuvieron 5 subfracciones (Tabla 45). Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 0,2337 g, correspondiente al 50,53% de la subfracción.

Tabla 44. Fraccionamiento de la fracción 6 del EAH de *W. berteroi*.

Eluyentes	Eluatos	Porcentaje % V/V
Hexano - Diclorometano	1-4	80-20
Hexano - Diclorometano	5-14	50-50
Diclorometano	15-18	100
Diclorometano – Acetato de etilo	19-22	70-30
Diclorometano – Acetato de etilo	23-30	50-50
Acetato de etilo	31-38	100
Acetato de etilo - Metanol	39-46	50-50
Metanol	47-50	100

A cada subfracción se le realizó CCF con mezclas de solventes en proporciones como: 3:2 hexano – diclorometano, 1:1 hexano – diclorometano, acetato de etilo 100% y 1:1 acetato de etilo - metanol. Las subfracciones que presentaron mayor masa fueron 6.2 y 6.5, pero la subfracción 6.2 (aceite incoloro) exhibió en la CCF una sola mancha bien marcada y la subfracción 6.5 (sólido marrón) mostró una estela, lo que significa una

mezcla de compuesto con  $R_f$  muy cercanos, lo que complica un poco la separación de los mismos. En tal caso se estimó conveniente analizar la subfracción 6.2 por espectroscopia IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , ya que esta subfracción puede contener un compuesto posiblemente puro.

Tabla 45. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción 6 del EAH de *W. berteroi*.

Subfracciones	Eluatos	Masas (mg)
6.1	1-4	8,90
6.2	5-14	38,80
6.3	15-26	9,50
6.4	27-47	9,20
6.5	48-50	167,30

El espectro IR de la subfracción 6.2 (Figura 56), mostró gran semejanza con los IR de las subfracciones (A.2.3, B.2, 1.2 y 3.2.2) antes presentado. En el IR de la subfracción 6.2, se observan las señales de tensión = C – H del anillo aromático a  $3020,28\text{ cm}^{-1}$ , a  $2961,36 - 2930,85\text{ cm}^{-1}$ , la señal de absorción del enlace C – H de una cadena alifática. También a  $1719,30\text{ cm}^{-1}$  se muestra una absorción correspondiente al estiramiento del enlace C = O, a  $1599,67- 1580,70\text{ cm}^{-1}$  se aprecia una señal debido a la tensión C = C; así como también se observa a  $1290,27\text{ cm}^{-1}$  una señal de tensión correspondiente al enlace C – O y a  $757,88\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la absorción de deformación del enlace C- H del anillo aromático. Las señales características de sobretono del anillo aromático no se observan, pero esto no es indicativo de que la muestra no contenga un anillo aromático.

El análisis del IR indica que la subfracción 6.2 podría contener en su estructura un anillo aromático unido a un grupo éster, como en el caso de las subfracciones, ya analizadas por IR. Se estima que la subfracción 6.2 sea un compuesto aromático y que presente un grupo éster, aunque se deben analizar los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT - 135 para poder caracterizar este constituyente, sin embargo los resultados de

dichos análisis espectroscópicos aún no se han obtenido.

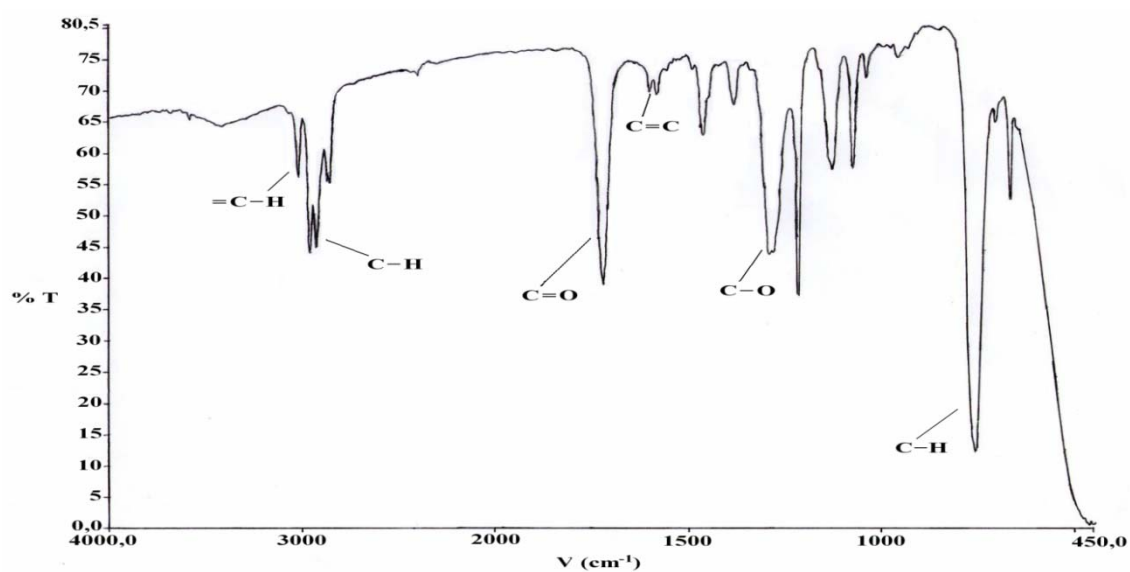


Figura 56. Espectro IR de la subfracción 6.2.

## CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar evidenció esteroides insaturados en todos los extractos en estudio, para los extractos alcohólicos se detectó flavonoides y fenilpropanoides; adicionalmente, el extracto alcohólico del tallo y las hojas mostraron la presencia de saponinas; además, en este último se evidenciaron polifenoles y el extracto etéreo de las flores exhibió taninos y metilencetonas.

Todos los extractos en estudios mostraron actividad letal contra el crustáceo *A. salina*, con valores de letalidad media (CL<sub>50</sub>) inferiores a 1000 µg/ml, siendo el extracto alcohólico de las flores el que presentó el CL<sub>50</sub> más significativo de 48,45 µg/ml a las 24 horas de exposición.

Las subfracciones F.6, F.6.2 y F.6.3 provenientes del extracto alcohólico del tallo, presentaron fuerte actividad letal contra *A. salina* con CL<sub>50</sub> de 0,54 µg/ml; 0,09 µg/ml y 0,54 µg/ml, respectivamente; por su parte las subfracciones 1.2 y 3.2 del extracto alcohólico de las hojas, exhibieron excelentes resultados de CL<sub>50</sub> con valores de 0,32 µg/ml en ambas subfracciones.

De los extractos estudiados, sólo el extracto alcohólico del tallo mostró actividad antibacteriana frente a: *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; en cambio, ninguno de los extractos presentó actividad antifúngica.

Las subfracciones 4 y 5 del extracto alcohólico de las hojas mostraron actividad contra las bacterias: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; de igual manera la subfracción C del extracto alcohólico del tallo presentó actividad frente estas bacterias; así mismo, exhibió actividad moderada contra el hongo: *Fusarium poae*.

Mediante el análisis de IR y RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT- 135) realizado a los compuestos aislados de la subfracción A.2.3 y B.2, y comparando estos datos con los datos arrojados por el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2008 para los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; se logró elucidar en ambas subfracciones el éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, como el posible compuesto presente en las subfracciones.

En la subfracción B.3 se identificaron mediante CG/EM; varios ésteres del ácido 1,2-bencenodicarboxílico; entre los cuales destaca el éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico y el éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico; de la misma manera, en las subfracciones C.2 y D.1 también se identificaron estos compuestos.

A través de CG/EM se identificaron en la subfracción B.5 los ácidos: tetradecanoico, hexadecanoico, heptadecanoico y octadecanoico como constituyentes principales; además, de otros ácidos grasos (ácido dodecanoico, pentadecanoico, eicosanoico y docosanoico) y el éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

El análisis CG/EM realizado a la subfracción F.6.1 arrojó la detección de un solo compuesto identificado como el éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

De la subfracción F.6.2 fue posible identificar mediante CG/EM, los compuestos: 3-eicoseno, éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico y el dibutilciclohexilmetil-estano, como compuestos principales, también se identificaron al 7,9-diterbutil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona, el éster etílico del ácido octadecanoico y el 2-heptadecil-oxirano.

Con el análisis de IR y mediante la CG/EM aplicada al compuesto aislado de la subfracción 3.2.2, fue posible identificar el éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

En la subfracción 5.3 se identificaron varios compuestos mediante CG/EM; entre los constituyentes más destacados se encuentran: fosfato (3:1)-1-cloro-2-propanol, éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico y los ácidos dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Albuquerque, U.; Medeiros, P.; Almeida, A.; Monteiro, J.; Machado, E.; Melo, J y Dos Santos, M. 1998. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 325-354.
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. Gullece, M.; Aslan, A.; Sokmen, M.; Sahin, F.; Adiguzel, A.; Agar, G. y Sokmen, A. 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderian*. *Phytomedicine*, 13: 515-521.
5. Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215:923-927.
6. Pomilio, A. 2002. Medicamentos y Etnomedicina: del uso popular a la industria farmacéutica. *Ciencias Hoy*, 12: 192-197.
7. Potes, B.; Faulkner, D. y Jacobs, R. 1992. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from marine organisms. *Journal of Natural Products*, 55: 1701-1717.
8. Ceseke, L.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.; Warber, S.; Duke, J. y Brielmann, H. 2006. *Natural Products from Plants*. Segunda edición. Taylor y Francis. Estados Unidos. Nueva York.
9. Farnsworth, N. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55: 225-275.
10. Blanco, J. 1999. La Fitoquímica en el marco de la etnobotánica. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 2: 7-10.
11. Da Silva, I. 2001. Aislamiento y caracterización de compuestos del arbusto *Krameria ixina* L. y su actividad biológica. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
12. Phan, T.; Hughes, M.; Cherry, G.; Le, T. y Phan, H. 1996. An aqueous extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (Formerly *Eupatorium odoratum*) (Eupolin) inhibits



hydrated collagen lattice contraction by normal human dermal fibroblasts. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 3: 335-343.

13. Nadembega, P.; Boussim, J.; Nikiema, J.; Poli, F. y Antognoni, F. 2011. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 378-395.
14. Tapsoba, H. y Deschamps, J. 2006. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 68-78.
15. Gressler, V.; Stüker, C.; Dias, G.; Dalcol, I.; Burrow, R.; Schmidt, J.; Wessjohann, L. y Morel, A. 2008. Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*, 69: 994-999.
16. Rondón, J. 1983. Estudio preliminar de Sterculiaceae en la región nor-oriental del país. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
17. Chen, C.; Chen, Z. y Hong, Y. 1990. A mansonone from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry*, 29: 980-982.
18. Chen, Z.; Lee, S. y Chen, C. 2006. Cucurbitacin B 2-sulfate and cucurbitacin glucosides from the root bark of *Helicteres angustifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54: 1605-1607.
19. Chang, Y.; Lin, J.; Lu, K. y Ho, L. 2001. Analysis of three lupane type triterpenoids in *Helicteres angustifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26: 849-855.
20. Bianchi, A. 1999. La farmacia más grande del mundo. *Newton*, 15: 64-68.
21. Kumar, G.; Sharmila, G.; Murugesan, A. y Rajasekara, M. 2006. Hypoglycaemic effect of *Helicteres isora* bark extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 304-307.
22. Chakrabarti, R.; Vikramadithyan, R.; Mullangi, R.; Sharma, V.; Lagadheshas, H.; Rao, Y.; Sairam, P. y Rajagupalan, R.; 2002. Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Helicteres isora* in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 343-349.
23. 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.
24. 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.
25. Dias, G.; Gressler, V.; Hoenzel, S.; Silva, U.; Dalcon, I.; y Morel, A.; 2007. Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys*. *Phytochemistry*, 68: 668-672.
  26. Morel, A.; Gehrke, I.; Mostardeiro, M.; Ethur, E.; Zanatta, N.; y Machado, E.; 1999. Cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*, 51: 473-477.
  27. Morel, A.; Flach, A.; Zanatta, N.; Ethur, E.; Mostardeiro, M.; y Gehrke, I. 1999. A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. *Tetrahedron Letters*, 40: 9205-9209.
  28. Hoelzel, S.; Vieira, E.; Giacomelli, S.; Dalcol, I.; Zanatta, N. y Morel, A. 2005. An unusual quinolinona alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*, 66: 1163-1167.
  29. Rao, Y.; Geethangili, M.; Fang, S. y Tzeng, Y. 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1770-1776.
  30. Jansen, O.; Angenot, L.; Nicolas, J.; De Mol, P.; Nikiéma, J. y Frédéricich, M. 2010. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 143-150.
  31. Petrus, A. 1990. Polyphenolic components of *W. indica*. *Phytochemical Communications Fitoterapia*, 61: 371-372.
  32. Chang, A. y Klinar, S. 2006. Perspectiva Natural en Prostatitis: lucraco, *Waltheria ovata* L. Sterculiaceae. *Revista Científica del Laboratorio de Productos Naturales*, 1(3): 6-7.
  33. Critóbal, C.; Sauder, J. y Berry, P. 2005. Sterculiaceae. En: *Flora of the Venezuelan Guayana*. P.E. Berry, K. Yatskievych y B.K. Holst (eds), St. Louis, U.S.A. Pág. 587.
  34. Rondón, J. 2008. Revisión taxonómica del género *Waltheria* L. (Sterculiaceae) en Venezuela, 18: 3-5.
  35. Pittier, H. 1926. *Manual de las plantas usuales de Venezuela*. Litografía del Comercio, Caracas.
  36. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putman, J.; Jacobsen, L.; Nichol, D. y McLaughling, J. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.

37. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in  $CL_{50}$ . En: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia.
38. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activity of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *International Journal of Pharmaceutics*, 33(3): 232-237.
39. 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.
40. Murillo, E. y Méndez, J. 2007. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios*. Universidad de Tolima. Colombia.
41. Wade, L. 2004. *Química orgánica*. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Mexico. D.F.
42. Skoog, D.; Holler, F. y Nieman, T. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición. Mc.Graw-Hill. Interamericana.
43. Gros, E.; Pomilio, A.; Seldes, A. y Purton, G. 1985. Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Monografía n° 30. Secretaria General de Estados Americanos. Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. D.C.
44. Ávalos, A. y Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
45. Tognolini, M.; Barocelli, E.; Ballabeni, V.; Bruni, R.; Bianchi, A.; Chiavarini, M. y Impicciatore, M. 2006 Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life of Science*, 78(13): 1419-32.
46. Funes, L.; Laporta, O.; Calero, M. y Micol V. 2010. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chemical of Phytochemistry Lipids*, 163(2): 190-199.
47. Mahato, S.; Ganguly, A. y Sahu, N. 1982. Steroid saponins. *Phytochemistry*, 21: 959-978.
48. Fukushi, K. Sakagami, H. Okuda, T. Hatano, T. Tanuma, S. y Kitajita, K. 1989. Tannins as anticancer agents. *Anticancer Research*, 9:313-318.
49. Santana, J.; Peña, M.; González, S.; Melo, P.; García, M. y Martínez, F. 1999 Evaluación de la actividad antimicrobiana, fotoprotectora y antielastasa de taninos

- vegetales extraídos a partir de residuales de la explotación forestal en Cuba. *Contribución a la Educación y a la Protección Ambiental*, 0:100-105.
50. Santana, J.; Martínez, F.; Simón, R.; González, A. y Codorniz, E. 2000. Aprovechamiento de residuales forestales con actividad biológica antioxidante. *Contribución a la Educación y a la Protección Ambiental*, 1: 313-317.
51. Santana, J.; Sánchez, L.; Isaac, K.; Melo, P.; Vargas, L. y Martínez, F. 1999. Evaluación de las propiedades antioxidantes de taninos vegetales extraídos a partir de residuales de la producción forestal en Cuba. Actividad SOD e inhibición de la peroxidación lipídica. *Contribución a la Educación y a la Protección Ambiental*, 0: 95-105.
52. De Lara, G. 1992. Toxic properties of some marine algae. *Journal of the Mexican Society of Natural History*, 43: 81-85.
53. Vasques, C.; Cortes, S.; Silva, M. y Medeiro, I. 1999. Muscarinic agonist properties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* St. Hil. (*Sterculiaceae*) in Rats. *Phytotherapy Research*, 13: 312–317.
54. Ragasa, C.; Cruz, C.; Chiong, I.; Tada, M. y Rideout, J. 1997. Antifungal flavonoids from *Waltheria americana*. Philippine. *Journal of Sciences*, 126: 243-250.
55. McLaughlin, J.; Lingling, L. y Anderson, J. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
56. Fatope, M. 1995. Phytocompounds: Their bioassay and diversity. *Discovery and Innovation*, 7(3): 229-235.
57. Fatope, M.; Ibrahim, H. y Takeda, Y. 1993. Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 4: 250-254.
58. Schmitz, F.; Bowden, A. y Toth, S. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 1: 138-197.
59. Carballo, J.; Hernández, Z.; Pérez, P. y García, M. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *Biotechnology*, 2: 17-21.
60. Flores, M.; D'Armas, H. y Herrera, H. 2007. Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. *Ciencia*, 15: 1-12.

61. Cowan, M. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*, 12(4): 564–582.
62. Bazalar, D.; Choquesillo, F.; Milla, H.; Herrera, O. y Felix, M. 1998. Acción inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxilum novogranatense* var. *Truxyllense* y *Plantago major* frente a bacterias y hongos. *Ciencia e Investigación*, 1(2): 24–30.
63. De Paula, J. y Martínez, A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1): 26-9.
64. Beer, M. y Berkom, R. 1999. *El manual MERCK de diagnóstico y tratamiento*. Harcourt, Madrid, España.
65. Elegami, A.; Almagboul, A. y Omer, A. 2001. Sudanese plants used in folkloric medicine: screening for antibacterial activity. *Part X. Fitoterapia*, 72: 810–817.
66. Schmidt, C.; Fronza, M.; Goettert, M.; Geller, F.; Luik, S.; Flores, E.; Bittencourt, C.; Zanetti, G.; Heinzmann, B.; Laufer, S. y Merfort, I. 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 523–532.
67. Koné, W.; Kamanzi, K.; Terreaux, C.; Hostettmann, K.; Traeré, D. y Dosso, M. 2004. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1): 43-49.
68. Mamidou, W.; Kamanzi, K.; Kacou, A. y Dosso, M. 2007. Evaluation of 17 medicinal plants from Northern Côte D'Ivoire for their *In Vitro* activity against *Streptococcus Pneumoniae*. *Afr. Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(1): 17–22.
69. Walter, S. 2000. *Microbiología*. McGraw-Hill. México. D.F.
70. Clayton, G. y Clayton, F. 1981. *Patty's industrial hygiene and Toxicology*. Tercera edición. Wiley-Interscience. New York.
71. Melancon, M. 1979. Metabolism of phthalate esters in aquatic species. En: Pesticides and xenobiotic metabolism in aquatic organisms. *American Chemical Society*, 99: 77-94.
72. Thuren, A. y Larsson, P. 1990. Phthalate esters in the Swedish atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 24: 554-559.

73. Atlas, E. y Giam, C. 1981. Global transport of organic pollutants: Ambient concentrations in the remote marine atmosphere. *Sciences*, 211: 163-165.
74. Eisenreich, S.; Looney, B. y Thornton, J. 1981. Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. *Environmental Science & Technology*, 15: 30-38.
75. Peterson, J. y Freeman, D. 1984. Variations of phthalate ester concentrations in sediments from the Chester river, Maryland. *International Environmental Analytical Chemistry*, 18: 237-252.
76. Mavar, H.; Haddad, M.; Pieters, L.; Baccelli, C.; Penge, A. y Quetin, J. 2008. Anti-inflammatory compounds from leaves and root of *Alchornea cordifolia* Müll. *Journal of Ethnopharmacol*, 115: 25-29.
77. Lee, K.; Kim, J.; Lim, D. y Kim, C. 2000. Antileukaemic and anti-mutagenic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52: 593-598.
78. Ruan, H.; Zhang, Y. y Wu J. 2006. Studies on constituents from roots of *Euphorbia hylonom*. *Journal of Ethnopharmacology*, 31: 742-744.
79. Aranda, J.; O'connor, G. y Eiceman, G. 1989. Effects of sewage sludge on di-(2-ethylhexyl) phthalate uptake by plants. *Journal of Environmental Quality*, 18: 45-50.
80. Vasquez, 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.
81. Nageshwara, G.; Mahesh, P.; Dhandapani, V.; Ramakrishna, T. y Hayashi, T. 2000. Constituents of *Cassia auriculata*. *Fitoterapia*, 71: 82-83.
82. Sani, U. y Pateh, U. 2009. Isolation of 1, 2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester from methanol extract of the variety minor seeds of *Ricinus communis* Linn. (*Euphorbiaceae*). *Nig. Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2): 107 – 114.
83. Ramalakshmi, S. y Muthuchelian, K. 2001. Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetraococcus* (roxb.) kurz, by gas chromatography - mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(6): 1449-1454.
84. Toth, L.; Gulyas, S. y Szegetes, Z. 1993. Functional connection between and extracellular secretion in species of *Euphorbia* genus. *Acta Biologica Hungarica*, 44: 433-443.

85. 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.
86. Oishi, S. 1990. Effects of phthalic acid esters on testicular mitochondrial functions in the rat. *Applied Toxicology*, 64: 143-147.
87. Gray, T.; Rowland, I.; Foster, P. y Gangolli, S. 1982. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicology Letters*, 11: 141-147.
88. Takagi, A.; Sai, K.; Umemura, T.; Hasegawa, R. y Kurokawa, Y. 1990. Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate Jpn. *Journal of Cancer Research*, 81: 213-215.
89. Bichet, N.; Cahard, D.; Fabre, G.; Remandet, B.; Gouy, D. y Cano, J. 1990. Toxicological studies on a benzofuran derivative. III. Comparison of peroxisome proliferation in rat and human hepatocytes in primary culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 106: 509-517.
90. 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. *Mar. Drugs*, 4: 290-297.
91. Perkins, E. 1967. Characterization of the non-volatile compounds formed during the thermal oxidation of corn oil. II. Phthalate esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44(3): 197-199.
92. Duc, N.; Dung, N.; Lyun, H.; Hyang, L.; Dongman, K.; Junghyun, S. y Eunki, K. 2007. Isolation of dioctyl phthalate with high depigmenting effect from Chinese herb *Nigella glandulifera* Freyn. *Journal of Biotechnology*, 131(2): 43.
93. Kohn, M.; Parham, F. y Masten, S. 2000. Human exposure estimates for phthalates. *Environmental Health Perspectives*, 108(10): 440-442.
94. Mathur, S. 1974. Phthalate esters in the environment: Pollutants or natural products. *Journal of Environmental Quality*, 3: 189.
95. Pare, J.; Belanger, J. y Jankowski, K. 1981. Asymmetric phthalate from *Sansevieria trifasciata*. *Journal of Natural Products*, 44: 490-492.
96. Hurford, N.; Law, R.; Payne, A. y Fileman, T. 1989. Concentrations of chemical in the north sea arising from dischargings from chemical tankers. *Oil and Chemical Pollution*, 5: 391- 410.

97. 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 Research*, 16: 815-820.
98. Ordóñez, A.; Gómez, J.; Cudmani, N.; Vattunone, M. y Isla, M. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq) Swartz. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15: 33-39.
99. Reid, K.; Jäger, A.; Light, M.; Mulholland, D. y Van Staden, J. 2005. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 285-291.
100. García, C.; Martínez, A.; Ortega, J. y Castro, F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, 2: 86-96.
101. Sundran, K. 1991. Volatile constituents of *Ailanthus altissima*. *Journal of Natural Products*, 53: 974-976.
102. Noguera, T. 2007. aislamiento, elucidación estructural y posible bioactividad de algunos de los metabolitos secundarios de la planta *Ludwigia octovalvis* (Onagraceae). Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
103. Ordaz, G.; D'Armas, H.; Yáñez, D. y Moreno, Sh. 2011. Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(2): 585-595.
104. Yoo, Y.; Shin, B.; Hong, J.; Lee, J.; Chee, H.; Song, K. y Lee, K. 2007. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva. *Archives of Pharmacal Research*, 30: 361-365.
105. Tholstrup, T. 1998. Efecto natural del ácido palmítico en el perfil lipídico de jóvenes normolipémicos. *Lipids*, 33: 11-21.
106. Slonczewski, J. y Foster, J. 1987. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology*. J.L. Ingraham. et al. *American Society for Microbiology*, 96: 1539-1549.
107. Madigan, M. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International Inc. New York.
108. Newman, M. 2003. *Fundamentals of ecotoxicology*. Segunda edición. Lewis publishers. Estados Unidos. New York.



109. Krajnc, E.; Webster, P. y Loeber, J. 1984. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. I: Short-term effects of general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75: 363-386.
110. Vos, J.; Deklerk, A.; Krajnc, E; Van Loveren, E. y Rozing, J. 1990. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat: effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 105:144-155.
111. Kannan, K.; Corsolini, S.; Focardi, S.; Tanabe, S.; Tatsukawa, R. 1996. Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna and shark collected from italian coastal waters. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 31:19-23.
112. Tanabe, S.; Prudente, M.; Mizuno, T.; Hasegawa, J.; Iwata, H. y Miyazaki, N. 1998. Butyltin contamination in marine mammals from north Pacific and Asian coastal waters. *Environment Science Technology*, 32: 193-198.
113. Garcia, L. 2003. Evaluación química y actividad biológica de la especie *Brownea leucantha*. Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
114. Kaufman, P.; Cseke, L.; Warber, S.; Duke, J. y Briemann, H. 1999. *Natural Products from Plants*. CRC Press LLC, Florida.
115. D'armas, H.; Castillo, I.; Noguera, T. y Quintero, M. 2009. Evaluación química del hongo *Aspergillus ochraceus*, aislado de raíces de *Rhizophora mangle*. *Centro de Investigaciones Biológicas*, 43(2): 122-131.
116. Hosni, K. 2011. *Rosa alba*: source of essential minerals and volatiles oils. *Natural Products and Bioprospecting*, 1(1): 57-61.
117. Wei, Y. y Wang, J. 2006. Studies on the chemical constituents of hypogean part from *Limonium bicolor*. *Zhong Yao Cai*, 29: 1182-1184.
118. Wei, H.; Wen, D.; Liu, X. y Tang, R. 1998. Constituents in petroleum ether and ethyl acetate extract fractions of *Dracaena cochinchinensis* (Lour). S.C.Chen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 21: 616-640.
119. Nguyen, D.; Lyun, H.; Lee, H.; Shin, J. y Kim, E. 2007. Inhibition of melanogenesis by dioctyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 1585-1590.

120. Uhde-Stone, C.; Vance, C. y Allan, D. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3): 423-447.
121. Álvarez, Olga.; Borrachina, I.; Ayala, M.; González, C.; Moya, P.; Neske, A. y Bardon, A. 2008. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Pest Science*, 81: 85-89.
122. Álvarez, O.; Neske, A.; Popich, S. y Bardón, A. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: *Annonaceae*) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 80: 63-67.

## APÉNDICE

Tabla A1. Actividad letal de algunas fracciones del extracto alcohólico del tallo de *W. berteroi* contra el crustáceo *Artemia salina*.

Fracciones	CL <sub>50</sub> (µg/ml)		% IAT
	24 horas	48 horas	
C	316,23	0,32	99,90
F	48,73	24,81	49,09

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media en µg/ml, % IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

Tabla A2. Actividad letal de algunas sub-fracciones del extracto alcohólico del tallo de *W. berteroi* contra el crustáceo *Artemia salina*.

Sub-fracciones	CL <sub>50</sub> (µg/ml)		% IAT
	24 horas	48horas	
A.3	30,46	0,01	99,97
B.1	31,62	0,01	99,97
F.6	0,54	0,04	92,59
F.6.2	0,09	0,06	33,33
F.6.3	0,54	0,04	92,59

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media en µg/ml, % IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

Tabla A3. Actividad letal de las fracciones del extracto alcohólico de las hojas de *W. berteroi* contra el crustáceo *Artemia salina*.

Fracciones	CL <sub>50</sub> (µg/ml)		% IAT
	24 horas	48horas	
1	417,09	0,03	99,99
3	8,83	0,01	99,89
5	6,92	0,09	98,70

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media en µg/ml, % IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

Tabla A4. Actividad letal de algunas sub-fracciones del extracto alcohólico de las hojas de *W. berteroi* contra el crustáceo *Artemia salina*.

Sub-fracciones	CL <sub>50</sub> (µg/ml)		% IAT
	24 horas	48horas	
1.2	0,32	0,01	96,88
3.2	0,32	0,01	96,88

CL<sub>50</sub>: Concentración letal media en µg/ml, % IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

Tabla B1. Actividad antibacterial de algunas fracciones de los extractos alcohólicos de las hojas y el tallo obtenidos de *W. berteroi*.

Bacterias	Hoja						Tallo					%EAB
	1	3	4	5	6	C	D	E	F	G		
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	40	
<i>Micrococcus leutens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	
<b>%BSE</b>	0	0	75	75	0	75	12,50	0	0	0		

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hay actividad, %EAB: Porcentaje de extractos activos contra una misma bacteria, %BSE: Porcentaje de bacterias sensibles a cada extracto.

Tabla C1. Actividad antifungica de algunas fracciones de los extractos alcohólicos de las hojas y el tallo obtenidos de *W. berteroi*.

Hongos	Hoja					Tallo					%EAH	
	1	3	4	5	6	C	D	E	F	G		
<i>Mucor racemus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Fusarium maniforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Trichoderma viridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Fusarium poae</i>	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	10
<b>%HSE</b>	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hay actividad, %EAH: Porcentaje de extractos activos contra una mismo hongo, %HSE: Porcentaje de hongos sensibles a cada extracto.

**HOJA DE METADATOS**  
**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6**

<b>Título</b>	Metabolitos Secundarios Presentes En La Planta <i>Waltheria Berteroi</i> (Sterculiaceae) Colectada En El Estado Amazonas (Venezuela) Y Su Actividad Antimicrobiana Y Letal
---------------	--

**Autor(es)**

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Salazar S., Carmen del V.	CVLAC	17. 909. 264
	e-mail	Salazar_0904@hotmail.com
	e-mail	

**Palabras o frases claves:**

*Waltheria berteroi*, análisis químico, bioensayos, fraccionamiento

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	Química

### Resumen (abstract):

La planta *Waltheria berteroi* (Sterculiaceae), fue recolectada en el Amazonas venezolano y para su estudio, se realizaron extracciones sucesivas de las hojas, tallo y flores con éter dietílico, etanol y metanol, uniéndose las dos últimas extracciones para obtener los extractos alcohólicos y etéreos. A cada uno de ellos, se le realizaron pruebas químicas y biológicas: antibacteriana, antifúngica y letalidad con *Artemia salina*. El análisis químico reveló esteroides insaturados en todos los extractos y saponinas, fenilpropanoides, taninos, metilencetonas, flavonoides y polifenoles en algunos extractos. Los bioensayos demostraron que los extractos poseen actividad letal contra el crustáceo *A. salina*, con valores de  $CL_{50}$  inferiores a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ; siendo el más significativo el extracto alcohólico de las flores con un valor de 48,45  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de exposición y el extracto alcohólico del tallo exhibió actividad antibacteriana contra las bacterias: *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus leutens*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, ninguno de los extractos presentaron actividad antifúngica. Del fraccionamiento cromatográfico de los extractos alcohólico del tallo y la hoja se obtuvieron diferentes fracciones y algunas de ellas presentaron buena actividad en los bioensayos realizados. Ciertas subfracciones fueron analizadas mediante CG-EM, lográndose identificar los compuestos: éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, 3-eicoseno, los ácidos: dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico, heptadecanoico y octadecanoico, como constituyentes principales de la planta. Con las técnicas espectroscópicas de IR y RMN en una dimensión, se logró identificar el compuesto: éster di(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6**  
**Contribuidores:**

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>ROL / Código CVLAC / e-mail</b>	
D'ARMAS, HAYDELBA	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4 297 804
	e-mail	haydelba@yahoo.com
	e-mail	
FARIÑAS, MILAGROS	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 440 052
	e-mail	Milyfari2006@gmail.com
	e-mail	
CRESCENTE, OSCAR	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	2 740 590
	e-mail	ocrescente@gmail.com
	e-mail	ocrescente@ yahoo.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	03	09

Lenguaje: **SPA**



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

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-SalazarC.DOC	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.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUMPELO**  
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/maruja

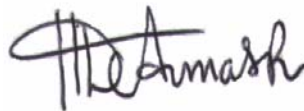
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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”.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Salazar', written in a cursive style.

**AUTOR**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Amash', written in a cursive style.

**TUTOR**