

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ALGUNOS COMPONENTES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Melochia villosa* (STERCULIACEAE) PROVENIENTE DEL AMAZONAS VENEZOLANO

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF SOME COMPONENTS OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF LEAVES OF *Melochia villosa* (STERCULIACEAE) FROM VENEZUELAN AMAZONIA

FÁTIMA RODRÍGUEZ¹, HAYDELBA D'ARMAS², JOSÉ SALAZAR²

Universidad de Oriente, ¹Núcleo de Monagas, Unidad de Estudios Básicos, Departamento de Ciencias, Sección de Química, Maturín, Venezuela, ²Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, Cumaná, Venezuela
E-mail: htrinidad86@hotmail.com

RESUMEN

En el fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa* se obtuvieron 9 fracciones (desde la A hasta la F), de las cuales solo pudieron ser ensayadas las fracciones C, D, E y F. La fracción C mostró actividad antibacteriana moderada contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*; actividad leve contra *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, y actividad antifúngica leve contra el hongo *Mucor racemus*. Por su parte, la fracción D mostró actividad letal elevada, con una LC_{50} de 19,51 μ g/mL. En la subfracción B1 se identificó, mediante CG/EM, la presencia de varios ácidos grasos y algunos ésteres, siendo el ácido hexadecanoico el componente mayoritario. De la subfracción B2, se logró aislar el ácido hexadecanoico según la evidencia de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C. El análisis de CG/EM de la subfracción C2 reveló la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y el éster dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, como compuestos mayoritarios, mientras que las subfracciones A6, C4 y D4 fueron analizadas mediante CG/EM, encontrándose la presencia repetitiva de muchos de los compuestos reportados en los cromatogramas de CG/EM de las subfracciones B1 y C2.

PALABRAS CLAVE: Ácido hexadecanoico, CG/EM, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

From the chromatographic fractionation of the alcoholic extract of *Melochia villosa* leaves, 9 fractions were obtained, from which only fractions C, D, E and F were assayed. Fraction C showed moderate antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, a slight activity against *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, and slight antifungal activity against *Mucor racemus*. In the other hand, fraction D showed a high lethal activity, with an LC_{50} of 19.51 mg/mL. The presence of various fatty acids and certain esters, were identified by GC / MS from B1 subfraction, being hexadecanoic acid the major component. Meanwhile, the hexadecanoic acid was isolate from B2 subfraction, according to the evidence of ¹H and ¹³C NMR spectra. The analysis of GC/MS of C2 subfraction revealed the presence of 6,10,14 - trimethyl-2- pentadecanone and the dibutyl ester of 1,2 - benzenedicarboxylic acid as majority compounds, while A6, C4 and D4 subfractions were analyzed GC / MS, showing the repetitive presence of many secondary metabolites found in the chromatograms of B1 and C2 subfractions.

KEY WORDS: Hexadecanoic acid, GC/MS, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, han sido muy explotados los productos químicos de origen natural provenientes del reino vegetal, animal y de microorganismos. Sin embargo, los productos naturales originados de las plantas pueden ser considerados como una fuente incalculable de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina (Compagnone *et al.* 1999). Se ha reportado que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Sterculiaceae son usados en la medicina tradicional. Algunas de sus especies son reconocidas por ser ricas en alcaloides, particularmente, los alcaloides ciclopéptidos, quinolinona e isatin y han sido usadas para aliviar procesos

inflamatorios faríngeos, para la distensión abdominal, disentería y mordeduras de serpientes y como agentes antitumorales (Dias *et al.* 2007).

Esta familia contiene el género *Melochia*, con unas 65 especies extendidas en todo el trópico. Las especies *Melochia tomentosa* (Kapadia *et al.* 1977) y *Melochia corchorifolia*, han sido las más investigadas. Algunos flavonoides y alcaloides ciclopeptídicos, como frangulofin, franganin y adouetin-y' fueron reportados para *M. corchorifolia* por Tschesche y Reutel (1968).

Según la revisión bibliográfica, *M. villosa* es una planta que no ha sido sometida anteriormente a estudios

de tipo fitoquímico ni biológico. Por tal motivo, se decidió realizar el fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico de las hojas de dicha planta, para identificar algunos metabolitos secundarios presentes y evaluar su posible actividad biológica, aportándose así una información valiosa al campo de los productos naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un trabajo publicado previamente, se reportó el proceso de extracción de todas las partes botánicas de la planta *M. villosa* con éter dietílico y metanol, obteniéndose seis extractos distintos, siendo el extracto alcohólico de las hojas (EALH) uno de los extraídos en mayor cantidad, con una masa de 3,6 g y un rendimiento de 2,69% (D'Armas *et al.* 2013). Posteriormente, dicho extracto fue procesado mediante las técnicas cromatográficas convencionales para lograr la separación y purificación de algunos metabolitos presentes y de esta forma facilitar su identificación estructural.

Fraccionamiento cromatográfico del extracto

Se utilizó la cromatografía en columna para fraccionar el EALH y sus distintas fracciones, utilizando columnas de vidrio de distinta longitud y diámetro de acuerdo a la masa del extracto o fracción a separar. Se empleó como fase estacionaria sílica gel de 35-70 mesh (0,2-0,5 mm) y como fase móvil solventes de distintas polaridades como hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, así como también las mezclas de los mismos en diversas proporciones variando la polaridad en forma creciente. Seguidamente, se empleó la cromatografía en capa fina sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm², recubiertas con sílica gel tipo GF con un espesor de 0,5 mm y placas de aluminio recubiertas con sílica gel e indicador de fluoresceína, utilizando la luz ultravioleta de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio al 10% en H₂SO₄ al 5% como agentes reveladores.

Identificación estructural

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM)

Los análisis de las fracciones y/o subfracciones provenientes del EALH de *M. villosa*, se realizaron en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard (HP) modelo 5890, serie II, acoplado a un espectrómetro de masas de la misma marca modelo 5971 A. La adquisición de los espectros se realizó bajo

el modo de barridos de masas. La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación con los espectros de masa existentes en la base de datos de la librería @NIST 2008.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los metabolitos secundarios aislados fueron analizados en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), y para obtener los espectros de RMN se usó un espectrómetro marca Bruker AM 300, el cual opera a 300 MHz para ¹H y a 75 MHz para ¹³C. Al disolver la muestra en 800 µL de CDCl₃ se colocaron en tubos de vidrio de resonancia de 5 mm para espectroscopia y sometidos a un campo magnético en el interior del equipo de RMN. Los desplazamientos obtenidos (δ_H y δ_C) se reportaron en partes por millón (ppm), con relación a un estándar interno de tetrametil silano (TMS).

Pruebas biológicas

La actividad letal contra *Artemia salina* de las fracciones del EALH de *M. villosa* se realizó con nauplios de *Artemia* quienes fueron expuestos a una serie de diluciones de distintas concentraciones de la fracción correspondiente, siguiendo la metodología expuesta por Meyer *et al.* (1982). Por su parte, las pruebas de actividad antimicrobiana de las mismas fracciones se realizaron por medio de la técnica de difusión en agar, la cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µL de una solución del extracto (40 mg·mL⁻¹) y colocarlos sobre cápsulas servidas con agar Muller-Hilton (actividad antibacteriana) o agar papa-dextrosa (actividad antifúngica) sobre las cuales se sembró el correspondiente microorganismo, siguiendo la metodología de Madubunyi (1995) y Bauer *et al.* (1966). Las fracciones reportadas en este artículo fueron ensayadas en iguales condiciones y mediante el mismo procedimiento aplicado al extracto crudo del cual proviene, utilizándose las cepas de microorganismos reportadas previamente (D'Armas *et al.* 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios anteriores realizados al extracto alcohólico de las hojas de *M. villosa* se detectó la presencia de fenilpropanoides y flavonoides mediante las pruebas fitoquímicas. Por su parte, al evaluar su actividad antibacteriana se detectó una actividad leve contra las cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y

Pseudomonas aeruginosa. De igual manera, dicho extracto también mostró marcada actividad letal contra larvas de *Artemia salina* (estadio I) con una CL_{50} de 74,68 g/mL a las 48 horas (D'Armas *et al.* 2013), lo cual hace a dicho extracto atractivo para ser estudiado.

Fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa*

El fraccionamiento de 1,7 g del extracto alcohólico se realizó (Fig. 1), empleándose una columna de 2,4 cm

de diámetro y 50 cm de altura, utilizando una relación g extracto: g sílica de 1:50, y un sistema de solventes desde el hexano, pasando por acetato de etilo hasta el metanol y las respectivas mezclas de los mismos, variando las proporciones en orden creciente de polaridad, lográndose recoger 37 eluatos consecutivos de 75 mL cada uno. Posteriormente, dichos eluatos fueron juntados según sus R_f , obteniéndose así las fracciones desde la A hasta la I, recuperándose un total de materia orgánica de 1,6 g con un rendimiento de la columna de un 92,24%.

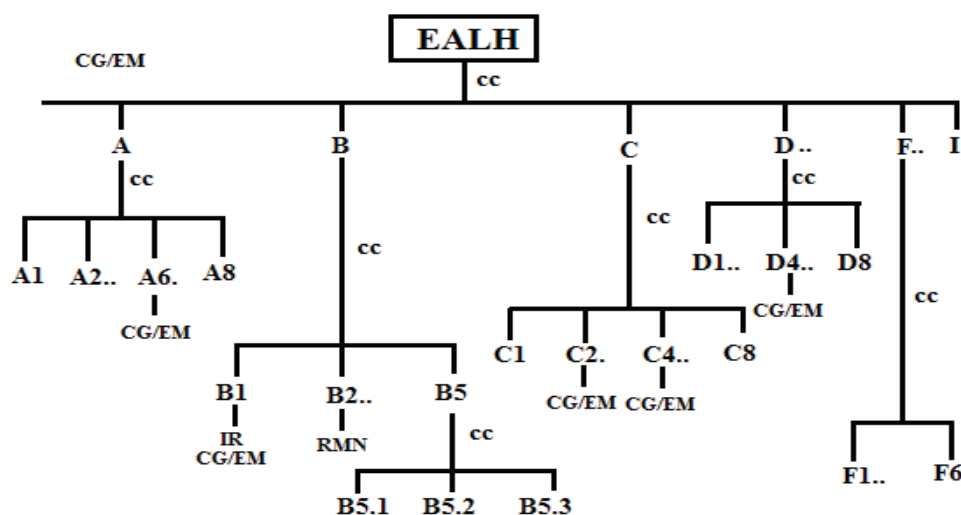


Figura 1. Fraccionamiento cromatográfico del EALH de *Melochia villosa* mediante CC por gravedad.

Actividad antimicrobiana y letal de algunas fracciones

Al ensayar parte de las fracciones provenientes del extracto alcohólico de las hojas, se observó actividad antibacteriana moderada en la fracción C, con un porcentaje de microorganismos sensibles a una misma fracción (%msf) de 75,00% para las cepas ensayadas, mientras que el resto de las fracciones no presentó actividad (Tabla 1); en consecuencia, posiblemente los compuestos presentes en la fracción C, sean en gran parte responsables del efecto bacteriostático ejercido por el EALH. Es probable que el aumento en la actividad de la fracción con respecto al correspondiente extracto del cual proviene, pueda deberse a un efecto antagónico o a un efecto de concentración.

Por su parte, en la actividad antifúngica, se observó que solo la fracción C mostró actividad leve contra el hongo *Mucor racemus*, mientras que el resto de las fracciones que lograron ser ensayadas no presentaron actividad. Este hecho indicaría que las hojas de *M. villosa* poseen poca capacidad para inhibir el crecimiento de algunas cepas de hongos.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de algunas fracciones ensayadas del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa*.

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

Según Monks *et al.* (2002): (+) Actividad leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro. %msf: porcentaje de microorganismos sensibles a una misma fracción. Las fracciones fueron ensayadas a una concentración de 40 µg/mL.

En el ensayo de letalidad con *A. salina*, se encontró que la fracción D presentó una actividad letal bastante elevada con una CL_{50} de 19,51 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el resto de las fracciones, provenientes del mismo extracto, que fueron ensayadas, no ejercieron inhibición (Tabla 2), lo que quiere decir que tal vez en la fracción D se encuentran compuestos con propiedades promisorias para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas.

Tabla 2. Letalidad de las fracciones del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa* frente al crustáceo *Artemia salina* (estadio I).

Fracción	Método	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$; 48 h)
C	-	-
D	Logit	19,51
F	Binomial	261,70

(-) concentración muy elevada

Cabe destacar que en este estudio solo se reporta la actividad biológica de las fracciones que se lograron ensayar, debido a la limitación de la poca cantidad de masa obtenida en el resto de las fracciones; sin embargo, es posible que las fracciones que no se ensayaron puedan presentar algún tipo de actividad, lo cual por las razones expuestas no pudo probarse.

Subfraccionamiento cromatográfico de la fracción B

Se separaron 262 mg de la fracción B, en una columna de 25,6 cm de altura con un diámetro de 0,9 mm, aplicando una relación g extracto-g sílica de 1:30, y como fase móvil

solventes y mezclas de distintas polaridades con hexano, acetato de etilo y metanol, recogiendo 37 eluatos, que posteriormente fueron combinados mediante la evidencia de CCF en 5 subfracciones (B1- B5). La subfracción B1 resultó un sólido blanco, observándose una pequeña estela al ser ensayada mediante CCF, utilizando una mezcla 4:1 V/V de hexano-AcEot, por lo que fue seleccionada para análisis de CG/EM. La subfracción B2 presentó las mismas propiedades que la subfracción B1 en cuanto a coloración y textura, y tomando en cuenta además que dichas subfracciones fueron separadas consecutivamente, utilizando mezclas de solventes con poca diferencia de polaridad, se pudo considerar que probablemente se trataba de los mismos compuestos, entre los cuales tal vez se encontraba alguno de ellos en mayor proporción. No obstante, al realizar la CCF de la subfracción B2 con una mezcla 7:3 V/V de hexano-AcOEt, se observó la separación de un compuesto puro, por lo que se decidió realizar un análisis de resonancia magnética nuclear RMN a la misma.

Análisis de CG/EM de la subfracción B1

Se realizó CG/EM a los 29,7 mg obtenidos de dicha subfracción (Fig. 2), lográndose separar e identificar varios compuestos, entre los cuales se encuentran cetonas como la 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona y la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, diversos ésteres como los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico, el éster metílico del ácido octadecanoico, entre otros.

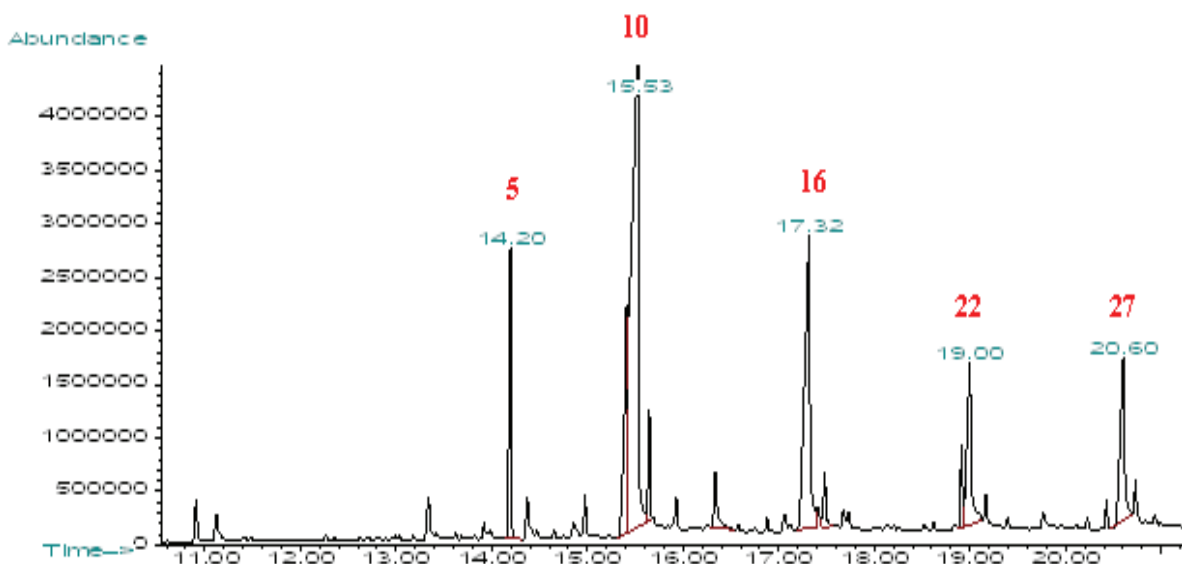


Figura 2. Cromatograma de la subfracción B1 obtenido mediante CG/EM.

De todos los compuestos reconocidos en la subfracción B1, se logró identificar con mayor abundancia la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y los ácidos hexadecanoico (palmítico), octadecanoico (esteárico), eicosanoico y docosanoico, siendo el ácido hexadecanoico el más abundante con un área de 32,16% y 97% de probabilidad (Tabla 3). Fueron también identificados en menor abundancia otros ácidos grasos como el

tetradecanoico, heptadecanoico, dodecanoico, y los ésteres de algunos de ellos como por ejemplo los ésteres metílico del ácido hexadecanoico, octadecanoico y docosanoico entre otros, mientras que los compuestos como el éster dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster etílico del ácido nonadecanoico, isopropil palmitato e isopropil estereato, presentaron una baja probabilidad de encontrarse en la fracción (inferiores al 90%).

Tabla 3. Composición química de la subfracción B1.

Pico	Identificación	RT	% Área	%P
1	5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona	10,912	0,97	95
2	Ácido dodecanoico	11,123	0,95	99
3	Ácido tetradecanoico	13,344	1,10	99
4	-	13,921	0,22	NI
5	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	14,196	5,83	99
6	Ácido pentadecanoico	14,373	1,13	98
7	-	14,860	0,65	NI
8	Éster metílico del ácido hexadecanoico	14,980	0,89	97
9	Éster dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	15,415	7,72	74
10	Ácido hexadecanoico	15,529	32,16	97
11	Ester etílico del ácido hexadecanoico	15,649	2,16	99
12	Isopropil palmitato	15,930	0,82	83
13	Ácido heptadecanoico	16,342	2,26	95
14	Éster metílico del ácido octadecanoico	16,880	0,37	98
15	-	17,063	0,63	NI
16	Ácido octadecanoico	17,315	15,31	95
17	Éster metílico del ácido kauro-16-en-18-oico	17,412	0,83	91
18	Ester metílico del ácido octadecanoico	17,481	1,79	97
19	-	17,675	0,65	NI
20	Isopropil estereato	17,732	0,64	72
21	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18,911	1,78	98
22	Ácido eicosanoico	18,997	7,40	96
23	Éster etílico del ácido heptadecanoico	19,169	0,82	97
24	-	19,769	0,73	NI
25	Éster metílico del ácido docosanoico	20,227	0,25	98
26	Éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	20,427	0,57	91
27	Ácido docosanoico	20,605	7,74	96
28	Éster etílico del ácido nonadecanoico	20,731	1,14	87
29	Ácido docosanoico	21,309	0,60	64
30	5-(3-metoxifenil)-3-metil-5-fenil-1-trimetilsilil-2,4-imidazolidinediona	22,035	0,56	90
31	Éster etílico del ácido octadecanoico	22,178	0,26	64
32	-	22,871	0,46	NI
33	-	26,607	0,67	NI

En negritas: los compuestos más abundantes, TR: tiempo de retención, %P: porcentaje de probabilidad, NI: compuesto no identificado.

El espectro de masas del ácido hexadecanoico, fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$ (Fig. 3), obtenido de la separación cromatográfica de gases de dicha muestra con un tiempo de retención de 15,52; muestra el correspondiente ion molecular a una relación m/z 256, un pico base a una relación m/z 73 y los picos de los fragmentos más abundantes a una relación de m/z 213, 129 y 60. Los espectros de masas de los ácidos octadecanoico, eicosanoico y docosanoico presentaron la

aparición de varios picos característicos, así como también se observó el mismo pico base del ácido hexadecanoico (m/e 73), debido a que la molécula se rompe por los mismos sitios, originando así en muchos casos los mismos fragmentos. La diferencia fundamental entre las estructuras de cada uno de los ácidos grasos, está básicamente en el alargamiento de la cadena, por lo que sus patrones de fragmentación fueron muy similares.

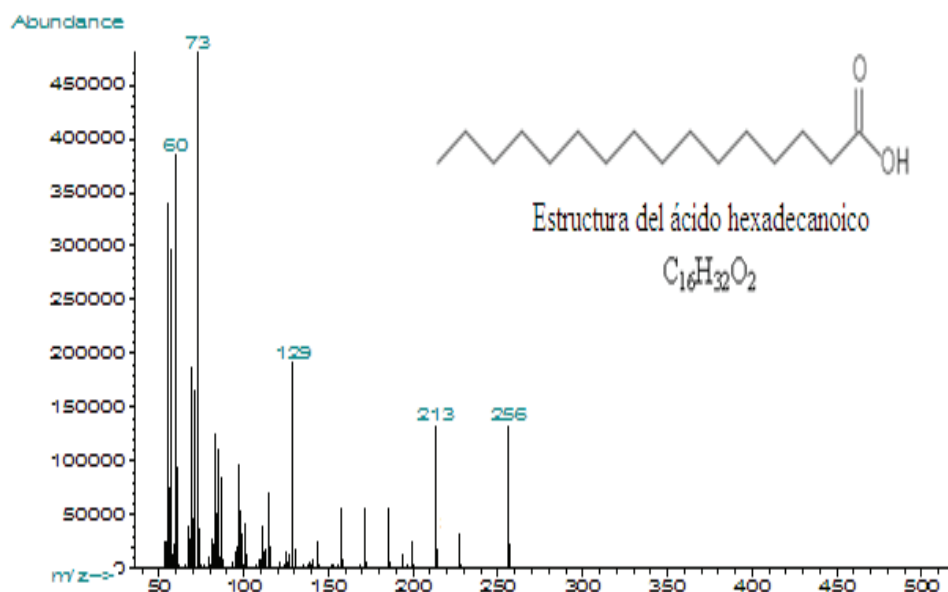


Figura 3. Espectro de masas del pico con TR 15,53 y área 32,16 asignado al ácido hexadecanoico.

Identificación del componente presente en la subfracción B2

La ampliación del espectro de RMN 1H de la subfracción B2 (Fig. 4), mostró la presencia de un triplete con un δ_H 0,8 ppm correspondiente a los protones metilo (H_{16}) del CH_3 terminal

de la molécula, un multiplete muy intenso correspondiente a los protones de los grupos metilenos de la cadena carbonada desde el carbono 3 hasta el carbono 15 (H_3-H_{15}), con un desplazamiento químico de δ_H 1,2 ppm y un triplete a un desplazamiento de δ_H 2,3 ppm del protón del grupo metileno de la molécula (H_2) adyacente al grupo carbonilo (Tabla 4).

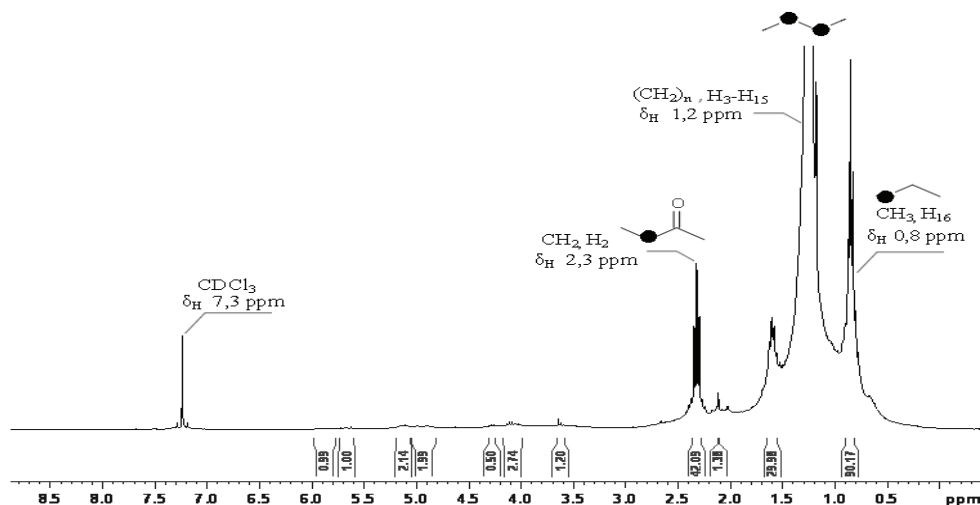


Figura 4. Ampliación del espectro RMN 1H de la subfracción B2.

Tabla 4. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H de la subfracción B2.

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

El espectro de RMN del isótopo de carbono 13 (^{13}C) de la misma subfracción, en concordancia con el RMN ^1H , muestra una señal indicativa de un carbono metílico (C₁₆) a un desplazamiento químico δ_{C} de 14,2 ppm y una señal intensa en el rango de 29-30 ppm asignada al desplazamiento químico producido por los carbonos metilénicos superpuestos (C₄-C₁₃), así como también muestra la señal correspondiente al solvente a un desplazamiento de 76-80 ppm aproximadamente. A diferencia del espectro de RMN ^1H , se evidencia la presencia de una señal a campo

bajo con un desplazamiento químico δ_{C} entre 179-180 ppm, la cual corresponde al carbono carbonílico de los ácidos orgánicos (Fig. 5).

En la ampliación del espectro de RMN ^{13}C (Fig. 6), se puede apreciar con mayor claridad las señales antes mencionadas, además de observarse con mayor precisión una señal correspondiente al carbono del metileno adyacente al metilo (C₁₅) a un δ_{C} de 22,7 ppm, una señal a los 24,7 ppm correspondiente al carbono metilénico C₃, a un desplazamiento de δ_{C} de 32,9 ppm la señal asignada al carbono metilénico C₁₄ y otra señal a los 34 ppm correspondiente al carbono metilénico C₂ adyacente al grupo carbonilo (Tabla 5). Con la ayuda del programa RMN predictor del ChemBioDraw Ultra 11.0, se logró corroborar que el espectro RMN de la subfracción B2 corresponde al ácido hexadecanoico, compuesto de mayor abundancia en la subfracción B1, de acuerdo a lo identificado por CG/EM.

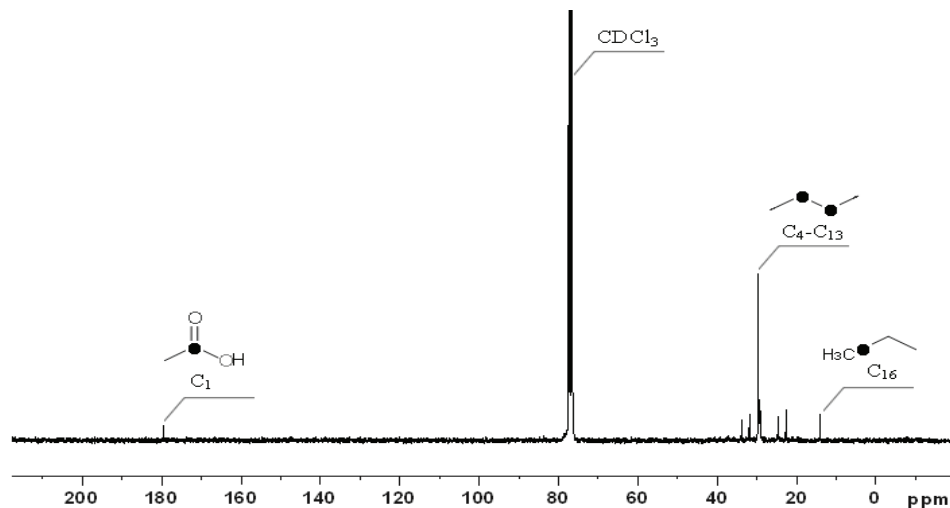


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción B2.

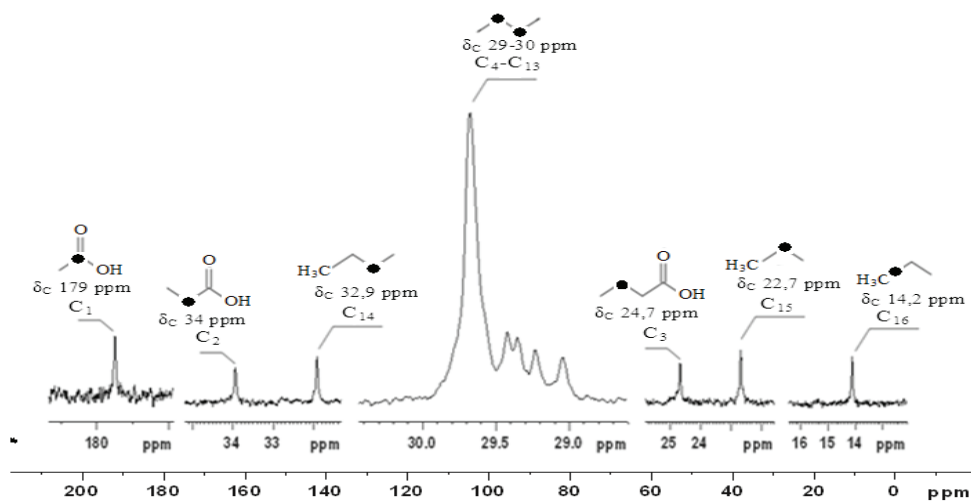


Figura 6. Ampliación del RMN de ^{13}C de la subfracción B2.

Tabla 5. Desplazamientos químicos (δ_c) del espectro RMN ^{13}C de la subfracción B2.

Posición	δ_c (ppm)	Tipo de carbono
C ₁	179	- <u>C</u> OOH
C ₂	34	- <u>CH</u> ₂ -COOH
C ₃	24,7	- <u>CH</u> ₂ -CH ₂ -COOH
C ₄ -C ₁₃	29-30	(- <u>CH</u> ₂ -) ₁₀
C ₁₄	32,9	CH ₃ -CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -
C ₁₅	22,7	CH ₃ - <u>CH</u> ₂ -
C ₁₆	14,2	<u>CH</u> ₃ -
-	76-80	<u>CD</u> Cl ₃

Ciertos ácidos grasos esenciales matan a las células cancerosas en condiciones de laboratorio y casi todos los experimentos similares dan por sentado que los ácidos grasos esenciales poseen una enorme actividad anti-cancerígena, ya que pueden ayudar a bloquear las señales que ordenan replicarse a las células cancerosas y ayudan a mantener la fluidez de las membranas celulares (Solórzano 2007). En otro estudio se señala que los ácidos grasos inhiben de manera efectiva las bacterias Gram positivas, además de que exhiben actividad antimicótica, reportándose el ácido hexadecanoico como inhibidor efectivo de bacterias y hongos (Pandalai *et al.* 1996). Es posible que parte de la actividad antibacteriana mostrada por el EALH, del cual provienen las subfracciones B1 y B2, se deba a la presencia de estos ácidos grasos, y de acuerdo a lo reportado en la literatura, este tipo de compuesto se encuentra presente en otras especies de este género, como lo es *M. tomentosa* (Espinoza 2010), así como también en la especie *H. baruensis* Jacq de la misma familia Sterculiaceae (Tarache 2007).

Subfraccionamiento cromatográfico de la fracción C

Se llevó a cabo la separación de 350 mg de la fracción C, en una columna de 33,5 cm de altura con un diámetro de 1

cm, rellena con silica gel, en una proporción fracción-silica de 1:50 m/m, y haciendo uso de solventes como hexano, acetato de etilo y metanol, y sus mezclas en distintas proporciones. Esta fracción mostró actividad antibacteriana moderada contra varias de las cepas de bacterias ensayadas, y una actividad antifúngica leve contra el hongo *Mucor racemus*, según lo expuesto en la sección de actividad antibacteriana y antifúngica, además, fue una de las fracciones de la cual se obtuvo suficiente masa, motivo por el cual fue seleccionada para ser cromatografiada. De tal subfraccionamiento, se obtuvo un total de 49 eluatos de 50 mL c/u, los cuales fueron juntados mediante CCF, obteniéndose ocho subfracciones (C1-C8).

La subfracción C2 (33,6 mg) fue un sólido amarillento, y su CCF utilizando una mezcla 4:1 V/V hexano-AcOEt, reveló una pequeña estela que llegó cerca del frente del solvente, por lo que se dedujo que se trataba de una mezcla de compuestos no muy compleja, motivo por el cual se decidió realizar un análisis de CG/EM a dicha subfracción.

Identificación de los componentes de la subfracción C2

En el análisis de CG/EM realizada a la fracción C2 se lograron identificar siete compuestos (Tabla 6), siendo el ácido 4-metoxiontranílico y el 9-octildocosano reportados con poca probabilidad, según la base de datos. De la lista de compuestos identificados, los más abundantes fueron la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, y los ésteres mono (2-etilhexílico) y dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, como se muestra en el respectivo cromatograma (Fig. 7). La 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y los ácidos hexadecanoico y octadecanoico fueron también identificados en la subfracción B1 del mismo extracto, siendo el primero uno de los compuestos identificados en mayor proporción en la subfracción C2.

Tabla 6. Composición química de la subfracción C2.

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

NI: no identificado; TR: tiempo de retención; %P: porcentaje de probabilidad; **En negritas**: los compuestos más abundantes.

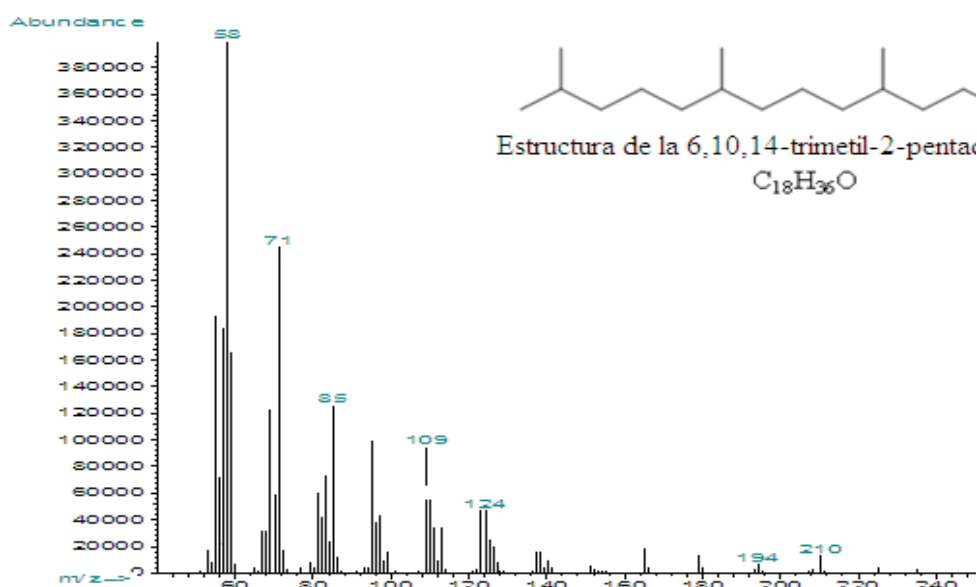


Figura 7. Cromatograma de la subfracción C2 obtenido mediante CG/EM.

El espectro de masas de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (Fig. 8), exhibió un ión molecular $[M^+]$ con una relación m/z 268, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O$, sin embargo, se encontró poca abundancia del mismo en el momento de la realización de la EM, debido a que su estabilidad es muy baja en comparación a la de los otros iones

resultantes de la fragmentación del mismo. Por su parte, se observaron los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes con una relación de m/z 85 $[M-C_{13}H_{27}]$, 71 $[M-C_{14}H_{29}]$ y 58 $[M-C_{15}H_{30}]$ (pico base), e identificándose en menor abundancia el fragmento correspondiente a un con una relación m/z de 210 $[M-C_3H_6O]$.

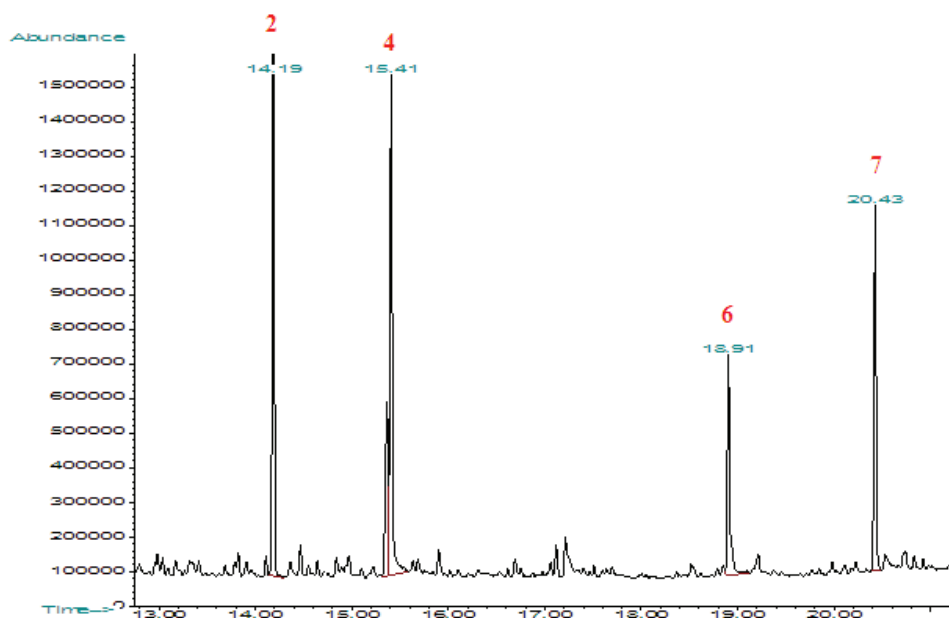


Figura 8. Espectro de masas del pico con TR 14,20 y área 23,46, asignado a la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

Como en el caso de los aldehídos, la fragmentación es también principalmente provocada por la ionización del

grupo carbonilo y se ha demostrado que m/z 57 (C_3H_5O), 71 (C_4H_7O) y 85 (C_5H_9O) poseen más del 40% de la intensidad

del pico base en los tipos de etilo, propilo respectivamente (Budzikiewicz *et al.* 1965).

El compuesto reportado con mayor abundancia en esta subfracción, fue el éster dibutílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico o dibutil ftalato (DBP). Se ha reportado en la literatura el aislamiento de algunos ftalatos como metabolitos secundarios, como por ejemplo el dibutil ftalato aislado de *Mimusops elengi* (Ruikar *et al.* 2011); además, el análisis del contenido de la abundancia natural de ^{14}C en el dibutil ftalato (DBP) de dos algas pardas comestibles, *Undaria pinnatifida* y *Laminaria japonica*, y un alga verde, *Ulva* sp., reveló que el DBP se produce de forma natural. La proporción natural del contenido de ^{14}C de di-(2-etilhexil) ftalato obtenidos de las algas estaba entre 60-80% (Namikoshi *et al.* 2006). Aunque este compuesto es un conocido plastificante, se ha reportado su presencia en distintas plantas como *Aloe vera*, *Euphorbia cyparissias* y *Seguieriana euphorbia*, por lo que debe tener alguna importancia taxonómica (Rowshanul y Rezaul 2009).

De igual manera que las subfracciones B1 y C2, las subfracciones A6, C4 y D4, también fueron analizadas mediante CG/EM, encontrándose la presencia repetitiva de muchos de los metabolitos secundarios detectados en las subfracciones expuestas anteriormente.

CONCLUSIONES

La fracción C del EALH mostró una mayor actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y una actividad leve contra *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, y la fracción D una actividad letal elevada contra *A. salina*, con una CL_{50} de 19,51 $\mu\text{g/mL}$, lo cual evidencia la presencia de sustancias bioactivas con potencial antibacteriano y letal en las mismas.

El análisis de RMN de ^1H y ^{13}C de la subfracción B2, indicó que la posible estructura es el ácido hexadecanoico, y el de CG/EM de la subfracción C2 reveló la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y el éster dibutílico del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, como compuestos mayoritarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER A, KIRBY A, SHERRIS J, TURK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4):493-496.
- BUDZIKIEWICZ H, DJERASSI C, WILLIAMS D. 1965. Interpretation of mass spectra of organic compounds. Segunda edición (en idioma inglés). Holden-Day, Inc, San Francisco, USA, pp. 43.
- COMPAGNONE R, SUÁREZ A, CASTILLO A, DELLE-MORACHE F, FERRARI F. 1999. Estudio fitoquímico de algunas plantas de posible uso en la medicina tradicional venezolana. *Mem. Inst. Biol. Exp.* 2:187-190.
- D'ARMAS H, RODRÍGUEZ F, SALAZAR J. 2013. Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta *Melochia villosa* proveniente del estado Amazonas, Venezuela. *Saber.* 25(4):382-389.
- DIAS G, GRESSLER V, HOENZEL S, SILVA U, DALCOL I, MOREL A. 2007. Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys*. *Phytoch.* 68(5):668-672.
- ESPINOZA B. 2010. Análisis fitoquímico y bioactividad de la planta *Melochia tomentosa* (Sterculiaceae). Cumaná: Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Química [Disertación Grado Licenciado en Química], pp. 122.
- KAPADIA G, SHUKLA Y, MORTON J, LLOYD H. 1977. New cyclopeptide alkaloids from *Melochia tomentosa*. *Phytoch.* 16(9):1431-1433.
- MADUBUNYI I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.* 33(3):232-237.
- MEYER B, FERRIGNI N, PUTMAN J, JACOBSEN L, NICHOLS D, MCLAUGHLIN J. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *P. Med.* 45(1):31-34.
- MONKS N, LERNER C, HENRIQUES A, FARIAS F, SCHAPOVAL E, SUYENAGA E, DA ROCHA A, SCHWARTSMANN G, MOTHES B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281(1-2):1-12.
- NAMIKOSHI M, FUJIWARA T, NISHIKAWA T, UKAI K. 2006. Natural Abundance ^{14}C Content of Dibutyl Phthalate (DBP) from Three Marine Algae. *Mar. Drugs.* 4(4): 290-297.
- PANDALAI K, PILAT M, YAMAZAKI K, PIENTA K. 1996.

The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Res.* 16(2):815-820.

ROWSHANUL M, REZAUL M. 2009. Antimicrobial and Citotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Pthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn) Flower. *M. Biol.* 37(1):31-36.

RUIKAR A, GADKARI T, PHALGUNE U, PURANIK V, DESHPANDE N. 2011. Dibutyl phtalate, a secondary metabolite from *Mimusops elengi*. *Chem. Nat. Comp.* 46(6):955.

SOLÓRZANO H. 2007. El cáncer y los ácidos grasos. *Terapia*

Bioquímica Nutricional. México. Disponible en línea en: <http://hector.solorzano.com.mx/articulos/acidos.html> (Acceso 14.08.2011).

TARACHE A. 2007. Separación e identificación de algunos compuestos constituyentes de la planta *Helicteres baruensis* Jacq. (Sterculiaceae) y su actividad biológica. Cumaná: Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Química [Disertación Grado Licenciado en Química], pp. 177.

TSCHESCHE R, REUTEL I. 1968. Alkaloide aus Sterculiaceae, über peptidalkaloide aus *Melochia corchorifolia*. *Tetrah. Lett.* 9(35):3817-3818.