



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

ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *Wedelia calycina* L.C. RICH.
COLECTADA EN LA LOCALIDAD DE SAN JUAN DE MACARAPANA, ESTADO
SUCRE

HELLEN YANDRI BRUZUAL VILLARROEL

TESIS DE GRADO PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2013

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Ciencias, para evaluar la Tesis de Grado presentada por la Bachiller Hellen Yandri Bruzual Villarroel, titulada:

ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *Wedelia calycina* L.C. RICH.
COLECTADA EN LA LOCALIDAD DE SAN JUAN DE MACARAPANA, ESTADO
SUCRE

Consideran que la misma cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Licenciado en Química, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO CON MENCIÓN HONORÍFICA.

Willian Henríquez
Asesor Académico

Gustavo Liendo
Jurado principal

Hernando Herrera
Jurado principal

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de ver y vivir, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a todas aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo transcurrido desde el inicio de este largo camino hasta hoy.

A mi padre, que ya partió a la presencia del Altísimo, porque siempre estuvo allí para mí y estará siempre presente en mi corazón y mis pensamientos.

A mi madre y hermanos que me acompañaron a lo largo del camino, brindándome la fuerza necesaria para continuar y momentos de ánimo, así mismo ayudándome en lo que fuera posible, dándome consejos y orientación, estoy muy agradecida especialmente a mi mamá ¡gracias!

A mi persona, por haber superado todos los obstáculos que se presentaron en el camino durante todo este trayecto y poder cumplir con la meta propuesta.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios, por haberme dado la existencia y permitido llegar al final de la carrera y poder ver los logros obtenidos.

A mi familia y amigos, por todo el apoyo brindado en esta travesía que implicó unos cuantos años de mi vida, por haber estado allí al pie del cañón, siempre.

Al Dr. Willian Henríquez, por depositar su confianza en mí para llevar a cabo este proyecto de investigación, por los conocimientos brindados que fueron muchos, por haber sido mi asesor y guía durante todo mi paso por el laboratorio 412, pero sobre todo por ofrecerme su amistad y su apoyo, más que un asesor y un amigo, ha sido como un padre ¡Un millón de gracias por todo!

A María Gabriela Cova Pineda, muchísimas gracias por tu infinita paciencia, por tu compañía y tu inagotable apoyo, por compartir alegrías, tristezas, retos, victorias y derrotas. No me canso de agradecerle a Dios el haberte puesto en mi camino, por ser una gran amiga y compañera incondicional.

A Manuel, Oralis, Juan Carlos, Viviannys, Sabrina y Hebert, por ser muy buenos compañeros de laboratorio, por haberme soportado y brindado su apoyo durante mi estadía en el 412.

A Moraima Carrillo, por toda su colaboración durante el desarrollo de esta carrera y por brindarme su confianza y su amistad.

A todos los profesores que me han acompañado durante este largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación.

A José Gregorio Lanza, por la colaboración prestada a la hora de realizar los análisis de CG/EM de las muestras, a los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas del IVIC, por el apoyo brindado en la realización de los análisis de RMN mono y bidimensionales y los análisis ESI-MS.

A todos aquellos compañeros que siempre estuvieron cerca para ayudarme y que también me permitieron ayudarles: Rosángelos, Claudiarys, Víctor, John, Susana, Mauri, Félix, Jesús.

A todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto, gracias por su apoyo.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
METODOLOGÍA	16
OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	16
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	16
OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	17
ANÁLISIS QUÍMICO	18
Alcaloides	18
Saponinas	18
Flavonoides	18
Taninos y polifenoles	19
Esteroles insaturados	19
BIOENSAYOS	19
Actividad antibacteriana	19
Actividad antifúngica	20
FRACCIONAMIENTO	21
Fraccionamiento de la FCT del tallo	24
Fraccionamiento de la FCT-4	24
Fraccionamiento de la FTBT del tallo	25
Agentes reveladores	27
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS	
AISLADOS	27
Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- ¹³ C) y Protones (RMN- ¹ H)	27
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	27
Espectrometría de masas con electronebulización (ESI-MS)	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Rendimiento de los extractos y fracciones primarias de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	30
Análisis de los metabolitos secundarios presentes en los extractos	

metanólicos de hojas y tallos de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	31
Actividad biológica de los extractos y fracciones primarias obtenidas	32
Fraccionamiento cromatográfico de la fracción en cloroformo obtenida del EMT.	34
Actividad biológica de las fracciones secundarias FCT-3 y FCT-4, obtenidas del fraccionamiento del FCT.	35
Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-3.	36
Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-3.4.	37
Análisis de RMN ¹ H de la fracción FCT-3.4.4.	38
Análisis de CG/EM de la fracción FCT-3.4.4.	39
Análisis de RMN ¹ H para la fracción FCT-3.4.6.	43
Análisis de CG/EM de la fracción FCT-3.4.6.	44
Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-4.	48
Análisis de RMN ¹ H para la fracción FCT-4.1.	49
Análisis de CG/EM para la fracción FCT-4.1.	50
Fraccionamiento de la fracción en ter-butanol del EMT.	55
Características físicas de la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	55
Análisis de RMN ¹ H para la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	56
Análisis de RMN ¹³ C para la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	58
Análisis de RMN ¹ H de correlación homonuclear COSY H-H de la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	59
Análisis RMN de correlación heteronuclear HMQC C-H a un enlace de la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	61
Análisis de espectrometría de masas con electronebulización (ESI-MS) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1.	63
Estructura propuesta para el compuesto de la FTBT-2.1.2.2.1.	63
Aceite esencial obtenido de las hojas frescas de <i>Wedelia calycina</i> L. C. Rich.	65
Análisis por CG/EM del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de <i>Wedelia calycina</i> L. C. Rich.	66
Análisis del espectro de masas del pico con TR de 23,670 minutos, identificado como germacreno D.	70
Análisis del espectro de masas del pico con TR de 22,299 minutos, identificado como 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano.	73
Análisis del espectro de masas del pico con TR de 24,549 minutos identificado como β-Sesquifelandreno.	74
Análisis del espectro de masas del pico con TR de 27,938 minutos, identificado como óxido de cariofileno.	76
Actividad biológica del aceite esencial obtenido de las hojas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	78
Actividad antifúngica de los extractos, fracciones primarias y aceite esencial obtenidos de las hojas y tallos de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	80
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	84

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana	20
Tabla 2: Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antifúngica	21
Tabla 3: Rendimiento de los extractos y fracciones primarias obtenidos de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	30
Tabla 4: Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	31
Tabla 5: Actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones primarias de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich. a concentraciones de 40 mg/ml.	32
Tabla 6: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico por columna de la FCT de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	35
Tabla 7: Actividad antimicrobiana por las fracciones FCT, FCT-3 y FCT-4 de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich. a concentraciones de 40 mg/ml.	36
Tabla 8: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico (CC) de la FCT-3 de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	37
Tabla 9: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico por columna de la FCT-3.4 de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	37
Tabla 10: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico (CCFP) de la FCT-4 de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	48
Tabla 11: Rendimiento de los sólidos obtenidos a partir de la FTBT de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	55
Tabla 11: Rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de <i>Wedelia calycina</i> L. C. Rich.	65
Tabla 13: Componentes identificados en el aceite esencial de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich., agrupados por familias de compuestos.	68
Tabla 14: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estructuras química de la podofilotoxina y sus derivados.....	7
Figura 2: Estructura química del Paclitaxel (Taxol).....	8
Figura 3: Estructura química de la camptotecina.....	8
Figura 4: Estructura química del acidoent-kaur-16-en-19-oico.....	9
Figura 5: Estructura química del atractilósido.....	10
Figura 6: Estructura química de la wedelolactona.....	10
Figura7: <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich. En Pers. (Silva & Santos, 2010).....	13
Figura 8: Localización del área de muestreo, San Juan de Macarapana – Sector la Última, estado Sucre, Venezuela.....	16
Figura 9: Imagen del montaje del equipo empleado para la destilación por arrastre con vapor.....	17
Figura 10: Diagrama de fraccionamiento primario del extracto metanólico de las hojas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	22
Figura 11: Diagrama de fraccionamiento primario del extracto metanólico del tallo de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	23
Figura 12: Diagrama de fraccionamiento de la fracción clorofórmica del tallo (FTC) de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	25
Figura 13: Diagrama del fraccionamiento de la fracción terbutanólica del tallo (FTBT) de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.....	26
Figura 14: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la sub-fracción FCT-3.4.4, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.....	39
Figura 15: Cromatograma de gases de la sub-fracción FCT-3.4.4.....	40
Figura 16: Espectros de masas de: a) compuesto denotado como I en el cromatograma de gases de la fracción FCT-3.4.4, b) éster etílico del ácido hexadecanoico obtenido de la librería del equipo (NIST MS Search 2.0) y c) comparación de ambos espectros para corroborar la identificación del éster etílico del ácido hexadecanoico como compuesto I.....	41
Figura 17: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido hexadecanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.....	42
Figura 18: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la sub-fracción FCT-3.4.6, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.....	43
Figura 19: Cromatograma de gases obtenido del análisis por CG/EM de la sub-fracción FCT-3.4.6.....	44
Figura 20: Espectros de masas de: a) compuesto denotado como II en el cromatograma de la fracción FCT-3.4.6, b) éster etílico del ácido eicosanoico obtenido de la librería del equipo (NIST MS Search 2.0) y c)	

comparación de ambos espectros para corroborar la identificación del éster como compuesto II.....	45
Figura 21: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido eicosanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.....	46
Figura 22: Espectro de masa del pico con TR de 33,194 min (denotado como III), identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0 como el éster etílico del ácido undecanoico.....	47
Figura 23: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido undecanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.....	48
Figura 24: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la sub-fracción FCT-4.1, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.....	49
Figura 25: Análisis por CG/EM de la sub-fracción FCT-4.1	51
Figura 26: Espectro de masa del pico con TR de 49,62 min (denotado como IV), identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0 como gamma-caprolactona.....	51
Figura 27: Patrón de fragmentación propuesto para la gamma-caprolactona identificada por comparación espectral con la base de datos NIST MS Search 2.0.....	52
Figura 28: Escisiones posibles en la gamma-butirolactona (Martin, 2004).....	53
Figura 29: Patrón de fragmentación propuesto para la gamma-butirolactona (Martin, 2004).....	54
Figura 30: Formas geométricas de los cristales denotados como FTBT-2.1.2.2.1	55
Figura 31: Espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	56
Figura 32: Ampliación de la región a campo bajo entre 7,1 y 8 ppm del espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	57
Figura 33: Estructura del hidroxibenzotriazol de acuerdo a su espectro de RMN ^1H tomado de la base de datos SDBS-1H (http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).....	57
Figura 34: Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	58
Figura 35: Estructura del benzotriazol de acuerdo a su espectro de RMN ^{13}C tomado de la base de datos SDBS- ^{13}C (http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).....	58
Figura 36: Espectro RMN ^1H de correlación homonuclear COSY H-H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	59
Figura 37: Ampliación de la región de $\delta = 7,30\text{-}7,95$ ppm del espectro RMN COSY H-H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	60
Figura 38: Espectro RMN de correlación heteronuclear C-H a un enlace HMQC (125 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1.....	61
Figura 39: Ampliación de la región de $\delta = 7,30\text{-}7,95$ ppm del espectro RMN	

de correlación heteronuclear C-H HMQC (125 MHz, D ₂ O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	62
Figura 40: Espectro de masas ESI-MS de la fracción FTBT-2.1.2.2.1	63
Figura 41: Posibles estructuras propuestas para el compuesto presente en la muestra FTBT-2.1.2.2.1 (a: benzotriazol, b: 1-hidroxibenzotriazol, c: sales de amonio y N-alquilamonio derivadas de 1-hidroxibenzotriazol)	64
Figura 42: Cromatograma de gases del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	66
Figura 43: Ampliación de la región entre los 20 y 29 minutos del cromatograma de gases del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	70
Figura 44: Espectro de masa del pico con TR de 23,670 minutos, identificado con una probabilidad de 96% como germacreno D.....	71
Figura 45: Patrón de fragmentación propuesto para el germacreno D (Schmidt <i>et al</i> , 1999).	72
Figura 46: Espectro de masa del compuesto identificado como 3,3,7,7-tetrametil -5- (2-metil-1-propeniltricyclo[4.1.0.0 (2,4)] heptano, en el pico con TR de 22,299 min.....	73
Figura 47: Patrón de fragmentación propuesto para el 3,3,7,7-tetrametil -5- (2-metil-1-propeniltricyclo[4.1.0.0 (2,4)] heptano identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0.	74
Figura 48: Espectro de masa del compuesto identificado como β -Sesquifelandreno, en el pico con TR de 24,549 min.	75
Figura 49: Patrón de fragmentación propuesto para el β -Sesquifelandreno de acuerdo con las señales del espectro de masas	76
Figura 50: Espectro de masa del compuesto con TR de 27,938 min identificado como óxido de cariofileno.	77
Figura 51: Patrón de fragmentación para el óxido de cariofileno propuesto de acuerdo con las señales del espectro de masas	78
Figura 52: Representación gráfica de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de <i>Wedelia calycina</i> L.C. Rich.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

RTI: Research Triangle Institute, por sus siglas en inglés
I.R.B.R: Herbario “Isidro Ramón Bermúdez Romero”
MeOH: Metanol
ATCC: American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés
PDA: agar papa dextrosa
EMH: Extracto metanólico de las hojas
FAEH: Fracción de las hojas en acetato de etilo
FCH: Fracción de las hojas en cloroformo
EMT: Extracto metanólico del tallo
FAET: Partición del EMT en acetato de etilo
FCT: Partición del EMT en cloroformo
FTBT: Partición del EMT en *ter*-butanol
CC: Cromatografía de columna
CCFP: Cromatografía de capa fina preparativa
RMN: Resonancia magnética nuclear
RMN – ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN – ¹H: Resonancia magnética nuclear de protones
J: Constante de acoplamiento espín-espín
 δ : Desplazamiento químico en ppm
uma: Unidad de masa atómica
COSY: Análisis RMN - ¹H de correlación homonuclear
HMQC: Análisis RMN de correlación heteronuclear C-H a un enlace
CG/EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
FID: Detector de ionización de llama
TR: Tiempo de retención
IR: Índice de retención lineal

RESUMEN

En el extracto EMT, de *Wedelia calycina* L.C. Rich., colectada en la localidad de San Juan de Macarapana, estado Sucre se determinó la presencia de familias de compuestos polifenólicos y flavonoides y se probó la inhibición del crecimiento de cinco de las seis cepas bacterianas ensayadas: *B. subtilis* y *S. aureus* en forma moderada, y contra *K. pneumoniae*, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera leve. Mientras que el extracto EMH resultó positivo a la evaluación fitoquímica de alcaloides, flavonoides y polifenoles; de manera similar ejerció efecto sobre el crecimiento poblacional de cuatro cepas bacterianas: *S. aureus* y *B. subtilis* en forma leve, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera moderada. De las particiones líquido-líquido FAEH y FCH, sólo la FAEH fue activa contra *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* en forma moderada. Contrariamente, la fracción FCH, no exhibió ningún tipo de actividad. Para el tallo, sólo las fracciones FAET y FCT mostraron actividad sobre los microorganismos empleados, opuesto a este efecto, la fracción terbutanólica no mostró actividad. La bioactividad ejercida por la fracción primaria FCT fue el punto de partida para someterla a varios procesos de fraccionamiento cromatográfico, sobre Sephadex LH-20, obteniéndose 7 fracciones. Del fraccionamiento de la FCT-3 se identificaron mediante CG/EM ésteres etílicos de los ácidos hexadecanoico, eicosanoico y undecanoico. De la FCT-4 se identificó la gamma-caprolactona que es una feromona de insectos. De la FTBT se obtuvieron unos cristales translúcidos de carácter aromático similar al benzotriazol de acuerdo con los análisis de RMN realizados, los cristales no funden a temperaturas entre 40 - 600 °C. Por otra parte, el aceite esencial obtenido a partir de las hojas dio con un rendimiento en masa del 0,025% luego de la destilación por arrastre con vapor. Éste está constituido mayormente por sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados, tales como germacreno D (8,83%); 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano, (8,66%); β -Sesquifelandreno, (7,87%) y óxido de cariofileno (5,10%). En total se identificaron 44 componentes, por la base de datos NIST05a.L del equipo, 23 de estos fueron reconocidos por sus índices de retención experimentales, los cuales representan el 17,79% m/m. Este aceite fue activo para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, y el de la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae*; observándose una marcada relación entre la concentración del aceite y la inhibición del crecimiento de la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Al realizarse las pruebas de actividad antifúngica para los extractos y las fracciones obtenidas, no se observó actividad biológica alguna por parte de las muestras ensayadas sobre las cepas de microorganismos empleados para el ensayo.

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso natural renovable que proporciona numerosos beneficios a la humanidad. Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como medicinas en sus distintas preparaciones, como infusiones, decocciones, tinturas, jarabes, zumos, cataplasmas, vahos, etc. Además, se ha basado en la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas como la producción de alimentos, refugios, ropa, medios de transporte, fertilizantes, sabores y fragancias; proporcionándoles a éstos un importante rol en el desarrollo de la sociedad. En ese sentido, las plantas han formado la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional que han estado en existencia por miles de años (Akerlele, 1999).

El conocimiento de las plantas medicinales se extiende a cualquier parte del mundo donde el hombre, tradicionalmente, las ha necesitado, para curar sus enfermedades. Así, mezcla de magia y religión, de necesidad y casualidad, de ensayo y error. El paso de las diferentes culturas ha creado todo un conocimiento de remedios vegetales que ha servido como base de la medicina moderna. Estos conocimientos no pueden atribuirse a ninguna cultura en particular sino al hombre en su globalidad y nos corresponde a todos conocer y salvaguardarlos (Newman *et al.*, 2000).

Durante mucho tiempo, los remedios naturales, sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e, incluso, el único recurso terapéutico disponible. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que se extraen a partir de ellas. De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte del arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales en algunos casos para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica (Harvey, 2008; Ganesan, 2008).

Si bien es cierto que, durante el progreso de la industria sintética, se dejó de utilizar una parte considerable de las sustancias vegetales. En la actualidad, debido a los efectos adversos de una elevada cantidad de fármacos sintéticos, así como por la gran demanda

de fármacos menos nocivos y más naturales, existe un crecimiento notable de remedios farmacológicos obtenidos, en su mayor parte, con materia prima de origen vegetal (Newman *et al.*, 2003). De los 1010 nuevos fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) desde enero de 1981 hasta junio de 2006, 43 eran productos naturales inalterados y 232 eran derivados de productos naturales encuadrados en la denominada segunda generación (Newman & Cragg, 2007).

Los extractos naturales provenientes de plantas son valorados por el hombre como fuente de principios activos para uso medicinal debido a sus metabolitos secundarios, que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros. La complejidad estructural de estos metabolitos puede determinar su actividad biológica; por lo que representan un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos. La búsqueda de medicamentos naturales surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos como el cáncer; que se ha extendido en el panorama epidemiológico mundial desde finales del siglo XX, con un registro superior a los 10 millones de casos nuevos, desde 1990 a 2000 (Bye *et al.*, 1992; Farnsworth *et al.*, 1992; Hostettmann *et al.*, 1995; Perkin *et al.*, 2004).

La importancia de los productos naturales está en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, servir de modelo para la preparación de sustancias bioactivas, ser materia prima en la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o industrial como estructuras privilegiadas usando el concepto de farmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutiérrez & Estévez, 2009).

Dentro de los metabolitos secundarios, muchos componentes vegetales se caracterizan por tener una alta volatilidad, los cuales son denominados aceites esenciales. Los aceites esenciales extraídos de muchas plantas también han ganado popularidad debido al interés científico que representan. Muchos de estos se han empleado tanto en la industria de alimentos como en la industria farmacéutica y la perfumería (Heath, 1981). Los

investigadores han mostrado su interés en los compuestos biológicamente activos presentes en los aceites esenciales aislados de las diferentes especies de plantas, para combatir microorganismos patogénicos debido a la resistencia de dichos microorganismos a los antibióticos (Essawi & Srour, 2000) y por su alto potencial como preservantes de alimentos de los efectos tóxicos oxidativos (Deans & Ritchie, 1987; Barlow, 1990; Baratta *et al.* 1998a; 1998b).

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. (Stashenko, 1996; González, 1996). Consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de las plantas. Pueden estar localizados en hojas, sistema vascular, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal. Son de naturaleza volátil y entre los principales métodos de extracción se encuentran la hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor, hidrofusión, extracción con dióxido de carbono y microondas (Tripathi *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista taxonómico, los estudios sobre aceites esenciales han sido de ayuda para definir especies y subespecies, detectar hibridaciones en poblaciones naturales, así como para establecer algunos patrones de variación geográfica, frecuentemente asociados a la diversidad climática (Harborne & Turner, 1984). Esto se debe a que la composición química de un determinado aceite esencial puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e incluso en los diferentes órganos de la misma planta como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo (Shaaya & Rafaeli, 2007).

El modo de acción de los aceites esenciales está íntimamente relacionado con las estructuras de las moléculas que lo componen. Así, la actividad biológica depende del tipo de grupo funcional y de su posición en la molécula más que de su volatilidad y su masa molecular (Tripathi *et al.*, 2009).

Según Lock (1994), los aceites esenciales de anís, menta y canela son carminativos, el de clavo especie es analgésico dental y se utiliza además en la producción comercial de

vainillina; el de pino es desinfectante y desodorante; el de eucalipto es expectorante; los de valeriana y de lavanda tienen efectos sedantes. Por su parte, cada uno de los constituyentes aislados puede también tener una aplicación, como el citronelal que es repelente de mosquitos, el mentol calmante de dolores de muela y de garganta, anestésico y antiespasmódico; el citral tiene acción antihistamínica y analgésico en oftalmología, el cineol-1,8, es expectorante y antiséptico, etc. Se conocen aproximadamente unos 3.000 componentes de aceites esenciales de los cuales 300 son de importancia comercial para la industria farmacéutica, cosmética y perfumería (Tripathi *et al.*, 2009).

En este sentido, Arslan & Celik (2008), evaluaron la actividad biológica ejercida por el aceite esencial de *Salvia chrysophylla* contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Cowan liyofili*, encontrándose una actividad antiestafilocócica significativa. En este mismo orden de ideas, Rivera (2008) encontró que los aceites esenciales de tres especies del género *Piper*: *Piper donnellsmithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum*, poseen actividad tóxica contra *Artemia salina*, siendo letal a los nauplios con una concentración de 1mg/ml.

Similarmente, Molina *et al.* (2008) analizaron la composición, caracterización del quimiotipo e influencia de las variaciones estacionales, del aceite esencial de una variedad española de *Artemisia absinthium* L (Asteraceae), el cual tiene presencia mayoritaria de cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo, su composición incluye además productos característicos de reacciones que son consecuencia de las condiciones del proceso de extracción (degradaciones térmicas, hidrólisis, actividad enzimática, etc.) tales como el chamazuleno y el metiljasmonato, además de que la composición del aceite esencial es condicionada por las condiciones individuales de su crecimiento y su estadio vegetativo particular.

En este orden de ideas, Stefanazzi (2010) analizó la actividad insecticida, repelente, además de posibles alteraciones sobre la fisiología nutricional y el efecto fagodisuasivo del aceite esencial de *Tagetes terniflora* (Asteraceae) en larvas y adultos del gorgojo de

la harina *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae) y en adultos del gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera:Curculionidae). Dicho estudio demostró que el aceite esencial de *T. terniflora*, a concentraciones entre 0,04 – 2 % m/v, generó toxicidad fumigante y por contacto, además de actividad repelente en larvas y adultos de ambas plagas.

Por su parte, Yáñez *et al.*, en 2011, evaluaron la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. (Asteraceae) recolectada en los llanos venezolanos, encontrando como compuestos mayoritarios al gamma-curcumeno (23,99%), seguido de ar-curcumeno (14,08%), acetato de bornilo (10,35%), camfor (5,03%) y epóxido de oximene (4,79%), los cuales podrían ser responsables de la actividad antibacteriana del aceite esencial, frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhi*.

Así mismo, los extractos en solventes orgánicos obtenidos de plantas superiores ejercen actividad biológica sobre ciertos microorganismos. Osborn, (1943) evaluó tal actividad de 63 especies de plantas pertenecientes a varias familias, las cuales mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Rao y Álvarez, en 1981, comprobaron que el extracto metanólico de *Eupatorium capillifolium* posee actividad contra *Bacillus subtilis*. Miski *et al.* (1983) demostraron que algunos flavonoides aislados de las hojas de *Salvia palestina* presentan actividad contra las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Klebsiella pneumoniae*. Mori *et al.* (1987) aislaron una sustancia de *Eleagnus glabra* que mostró actividad contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*.

En este mismo sentido, Pino-Rodríguez *et al.*, en 2004, estudiaron 19 especies de *Erythrina*, de la familia Fabaceae, de las cuales *Erythrina abyssinica*, *E. variegata* y *E. suberosa* Roxb exhibieron actividad contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Micrococcus luteus*.

El uso de extractos de plantas para el tratamiento de las convulsiones ha sido reportado por Ashok *et al.* (1987) y en los trabajos originales de Adesina (1982), se describe la acción farmacológica anticonvulsionante de más de 50 especies de plantas. Chaturvedi *et al.* (1976) evaluaron algunos triterpenoides extraídos de plantas en la búsqueda de sustancias anticonvulsivantes y concluyeron que estas sustancias protegían entre 10 – 40% contra las convulsiones inducidas por pentilenotetrasol. En este mismo sentido, Pérez de Alejo *et al.* (1998) demostraron la actividad anticonvulsivante de fracciones butanólicas y acetato de etilo de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón).

Por su parte, Monroy-Vázquez *et al.* (2009), confirmaron que la especie vegetal *Sechium edule* (Cucurbitaceae), comúnmente llamada “chayote”, es empleada en la medicina tradicional como diurético, cardiovascular, antiinflamatorio, contra calcificaciones renales y arteriosclerosis (Jensen & Lai, 1986). El chayote contiene alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos y flavonoides glicosilados, los cuales, de acuerdo con estudios validados científicamente, le confieren estas propiedades farmacológicas (Salama *et al.*, 1986; Salama *et al.*, 1987; Gordon *et al.*, 2000; Ordoñez *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2004; Ordoñez *et al.*, 2006).

En otro orden de ideas, para contrarrestar padecimientos ocasionados por tumores cancerígenos, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos; por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica cobran relevancia como nuevos recursos para tratamientos alternativos y la química farmacéutica (Mans *et al.*, 2000; Setzer & Setzer, 2003).

Las drogas antitumorales de interés clínico derivadas de plantas se encuentran clasificadas en 4 grupos importantes: vinca alcaloides, epipodofilotoxinas, taxanos y camptotescinas. La vinblastina y vincristina fueron aisladas de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) y han tenido uso clínico por más de 40 años. A partir de estos alcaloides se han desarrollado derivados (alrededor de unos 75) de uso comercial que actúan como inhibidores mitóticos, uniéndose a los microtúbulos (Mukherjee *et al.*, 2001; Newman &

Cragg, 2005). Las podofilotoxinas fueron aisladas como agentes antitumorales de las hojas del *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae) (Kelly & Hartwell, 1954; Jardin, 1980) y consecuentemente se hicieron enormes esfuerzos en la modificación de su estructura con el objeto de obtener agentes con menor toxicidad e igual o mayor actividad.

De esas modificaciones resultaron los isómeros de podofilotoxina, el etopósido y el tenipósido, (Mukherjee *et al.*, 2001; Newman & Cragg, 2005; Srivastava *et al.*, 2005). Mientras que la podofilotoxina actúa inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos durante la mitosis quedando ésta detenida en metafase; el etopósido y el tenipósido son más selectivos a la hora de actuar sobre las células, pues tienen la capacidad de formar complejos terciarios estables con la topoisomerasa II y con el ADN, lo que conduce a fracturas en la doble hélice, quedando el ciclo celular detenido en la fase G2, produciéndose en último término la muerte de la célula (Boluda *et al.*, 2005).

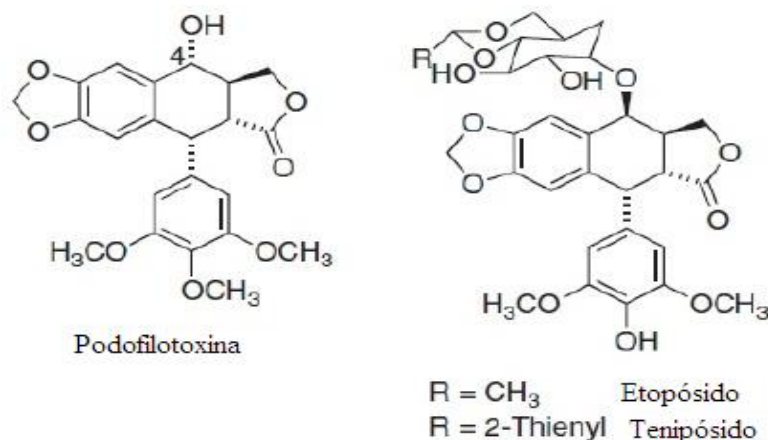


Figura 1: Estructuras química de la podofilotoxina y sus derivados.

Dentro de éstos, otro grupo de fármacos bien conocido son los taxanos, que incluyen el paclitaxel, aislado de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae); el paclitaxel es un agente estabilizador de los microtúbulos mientras que otras drogas hacen lo contrario sobre el citoesqueleto, el cual es una estructura tridimensional dinámica que se extiende a través del citoplasma. Igual a lo que ocurre con muchos fármacos utilizados en la terapia del cáncer, durante su proceso de desarrollo, el paclitaxel sólo mostraba una pequeña actividad en algunos modelos de leucemia y no fue considerado de especial interés

hasta mediados de 1970. El paclitaxel después de atravesar un largo camino fue aprobado para su comercialización por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos en 1992 para el tratamiento del cáncer de ovario metastático (Kim *et al.*, 1998; Mavroudis, 2002; Newman & Cragg, 2005).

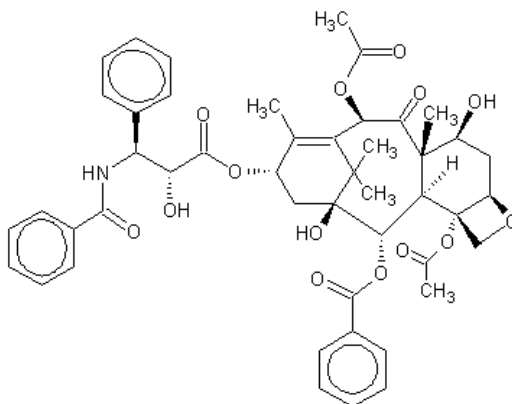


Figura 2: Estructura química del Paclitaxel (Taxol)

Finalmente, otras de las drogas antitumorales de gran interés son las camptotecinas (CPT), que fueron aisladas de *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae). Las CPT son agentes con alta citotoxicidad principalmente sobre los tumores sólidos, inhibiendo la topoisomerasa I, enzima que fragmenta al ADN en varios sitios en una sola cadena. Aún cuando el compuesto presentó gran actividad antitumoral quedó en fase II de los ensayos clínicos debido a los severos efectos secundarios que causa. Dentro de sus derivados clínicamente activos se encuentran el topotecan1 {3,5,11-hycamptamina}, el irinotecan (CPT-11) y la 9-aminocamptotecina (Redinbo, 1998; Staker,2002; Srivastava, 2005).

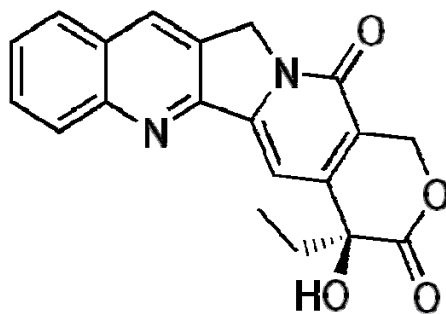


Figura 3: Estructura química de la camptotecina

El género de plantas fanerógamas *Wedelia*, perteneciente a la familia de las asteráceas, tiene 284 especies, de las cuales, recientemente, en Venezuela, se ha aislado productos naturales de la especie *Wedelia trilobata*. Ésta biosintetiza metabolitos secundarios llamados kaurenos, diterpenos que contienen un rígido esqueleto tetracíclico (Coronado, 1998; Henríquez *et al.*, 2002).

El ácido ent-kaur-16-en-19-oico aislado de *Wedelia trilobata* ha mostrado ejercer actividad biológica diversa, entre las cuales se encuentra, actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, bioactividad que también fue ejercida por el mismo ácido obtenido de *Copifera paupera* (Tincual *et al.*, 2002) y plantas del género *Espeletia* (Campos *et al.*, 1997) y, además, una potente actividad sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* con una DL₅₀ de 0,25 µg/ml sobre amastigotes axénicos, lo cual indica una mayor sensibilidad de este tipo celular tal como ha sido reportado para el Glucantime® (Ephros *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2006).

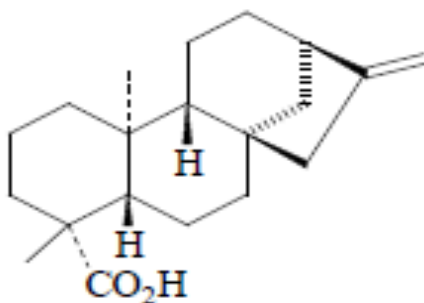


Figura 4: Estructura química del ácido ent-kaur-16-en-19-oico.

No obstante, de la especie *Wedelia glauca*, conocida popularmente como sunchillo, se ha identificado un principio activo tóxico para el ganado bovino, ovino y cerdos, el cual es el sulfato de un glucósido diterpénico, denominado atractilósido (también llamado Wedeliósido), el cual conserva su toxicidad en el material vegetal henificado y posee una estructura muy similar al carboxiatractilósido. El atractilósido produce una grave patología hepática descrita como "Hígado en nuez moscada", capaz de producir la muerte del animal (Fernández, 2010).

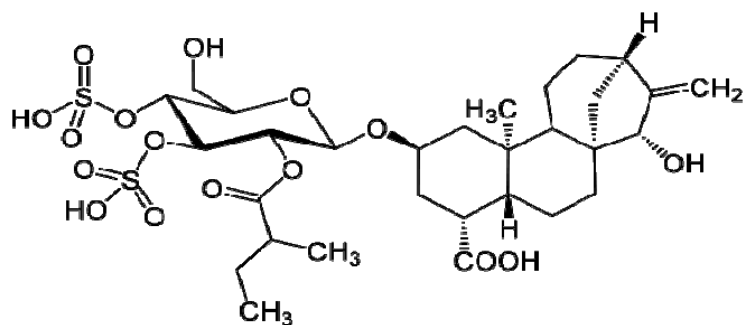


Figura 5: Estructura química del atractilósido.

El aceite esencial de las partes aéreas de la especie *Wedelia chinensis* ha sido analizado por cromatografía de gases/espectrometría de masas, del cual se han identificado principalmente hidrocarburos monoterpenos (50,6%), hidrocarburos sesquiterpenos (22,5%), sesquiterpenos oxigenados (20,3%), con sólo pequeñas cantidades de monoterpenos oxigenados (0,7%); como constituyentes principales alfa-pineno (21,7%), espatulenol (20,3%) y limoneno (14,3%) (Garg *et al.*, 2005). La luteolina, apigenina, wedelolactona y el indol-3-carboxaldehído también han sido reportados (Lin *et al.*, 2007). Debido a la variedad de compuestos bioactivos aislados de esta planta, han sido numerosas las investigaciones realizadas, por lo que Koul *et al.* (2012) recopilaron la información existente en el continente asiático sobre esta especie de *Wedelia* y destacaron su importancia farmacológica como hepatoprotectiva, anticancerígena, inmunoestimulante, antioxidante, sedante, analgésica y antiinflamatoria, antibacterial e insecticida, entre otras.

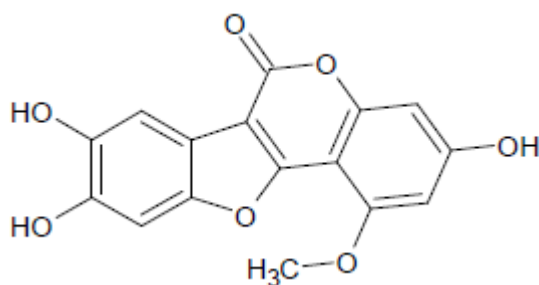


Figura 6: Estructura química de la wedelolactona.

Los componentes volátiles de las flores, hojas y tallos de *Wedelia urticifolia* son, en su mayoría, monoterpenos y sesquiterpenos tanto hidrocarbonados como oxigenados, y algunos compuestos no-terpenoides. Destacan como compuestos más abundantes en las

flores el α -pineno (19,80%) y D-limoneno (17,31%), mientras que el α -pineno (15,57%), D-limoneno (11,19%), α -felandreno (9,69%), γ -terpineno (9,01%), y germacreno D (9,68%) son los principales componentes del aceite de las hojas. En los aceites esenciales de los tallos, los principales compuestos fueron D-limoneno (18,11%), γ -terpineno (13,89%), germacreno D (12,80%), y α -pineno (9,21%). Estos aceites de las flores, hojas y tallos mostraron actividad antimicrobiana frente a una variedad de bacterias, levaduras y hongos (Zhu *et al.*, 2012).

La separación y aislamiento de todos estos metabolitos secundarios, provenientes de las plantas superiores se realiza, generalmente, mediante el fraccionamiento de las fracciones y subfracciones obtenidas, usando las técnicas cromatográficas de columna y de capa fina. La técnica de cromatografía de capa fina (CCF) se emplea con fines cualitativos, para la combinación de las fracciones provenientes de la cromatografía en columna (CC) y la cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) se utiliza para aislar y purificar los compuestos provenientes de las subfracciones obtenidas.

La complejidad de la determinación de la estructura de moléculas orgánicas, es tal que se requiere la utilización de distintas técnicas complementarias para asignar inequívocamente una estructura a un compuesto desconocido. De hecho, para aceptar la estructura química de un compuesto obtenido, bien sea de fuente natural o por medio de síntesis, y demostrar así su existencia y estructura, las revistas de investigaciones especializadas en química orgánica requieren de datos proporcionados por los análisis de resonancia magnética nuclear de protones y carbono 13 (RMN-¹H y RMN-¹³C), IR con transformada Fourier (FTIR), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), difracción de rayos X, entre otras.

Generalmente, la cromatografía de gases es ampliamente usada en combinación con la espectrometría de masas, siendo este el método más simple para la separación e identificación de compuestos orgánicos que se encuentran en mezclas complejas. En este sentido, la cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) para la separación y la identificación de la composición química de aceites

esenciales, ha tenido un avance considerable, el estudio de la influencia del ciclo vegetativo en la producción de los aceites esenciales es un ejemplo de su aplicación ya que permite determinar la composición química del aceite en función del metabolismo vegetativo de la planta, además de evidenciar un eventual polimorfismo y, como consecuencia de estos resultados, el productor local de estos aceites esenciales, puede determinar el período correcto para la obtención de un producto de composición y calidad constante, con rendimientos óptimos (Sharapin, 2000; Skoog *et al.*, 2001).

En el área de los productos naturales, la resonancia magnética nuclear es uno de los métodos más utilizados, cuyos espectros proporcionan información certera sobre las posiciones, entornos químicos y características de los núcleos que conforman una molécula dada, de manera que, permite obtener información más acertada de la estructura del compuesto en estudio. Lo cual la convierte en una de las técnicas más empleadas para la determinación de estructuras moleculares, teniendo como fundamento el estudio de las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos específicos de las moléculas (Skoog *et al.*, 2001).

Numerosas han sido las investigaciones en estudios biodirigidos de plantas con propiedades medicinales, debido a la resistencia de las enfermedades a los distintos antimicóticos y antibacterianos comerciales utilizados en la actualidad, lo que ha estimulado, en los últimos años, a la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas y antibacterianas entre los productos naturales variados. Por ello, se seleccionó a *Wedelia calycina* L.C. Rich, conocida comúnmente como clavelito o girasolito, con el fin de evaluarla fitoquímicamente, demostrar la efectividad de sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, aislar y caracterizar los compuestos responsables de tal actividad.

Wedelia calycina L.C. Rich, girasolito o clavelito, es un arbusto perenne, erecto, bastante ramificado de una altura entre 0,7 – 1,5m, el cual puede variar según el lugar y la época del año. Es una planta cuyo follaje le sirve de alimento al ganado vacuno y caprino y por esta razón es apreciado por los ganaderos, también es el alimento principal en la dieta del cardenalito. Florece durante los períodos lluviosos, bien sea en la época de lluvia

propiamente dicha (Abril a Diciembre) o fuera de ella, siempre y cuando se den 1 ó 2 meses con suficientes precipitaciones.

Esta especie vegetal, ha sido localizada a diferentes alturas, las que generalmente oscilan entre los 40 y 1500 m.s.n.m. Habita en las sabanas de tierras bajas, bosques secundarios y áreas degradadas. Se encuentra florecida casi todo el año, frutos duros de agosto a octubre. Existen otras especies semejantes como: *Wedelia fruticosa*, *W. parviflora* y *Calea berteriana*, las cuales son muy parecidas al clavelito, pero con pequeñas diferencias en cuanto al tamaño y la morfología de las hojas, flores y frutos (Silva & Santos, 2010).

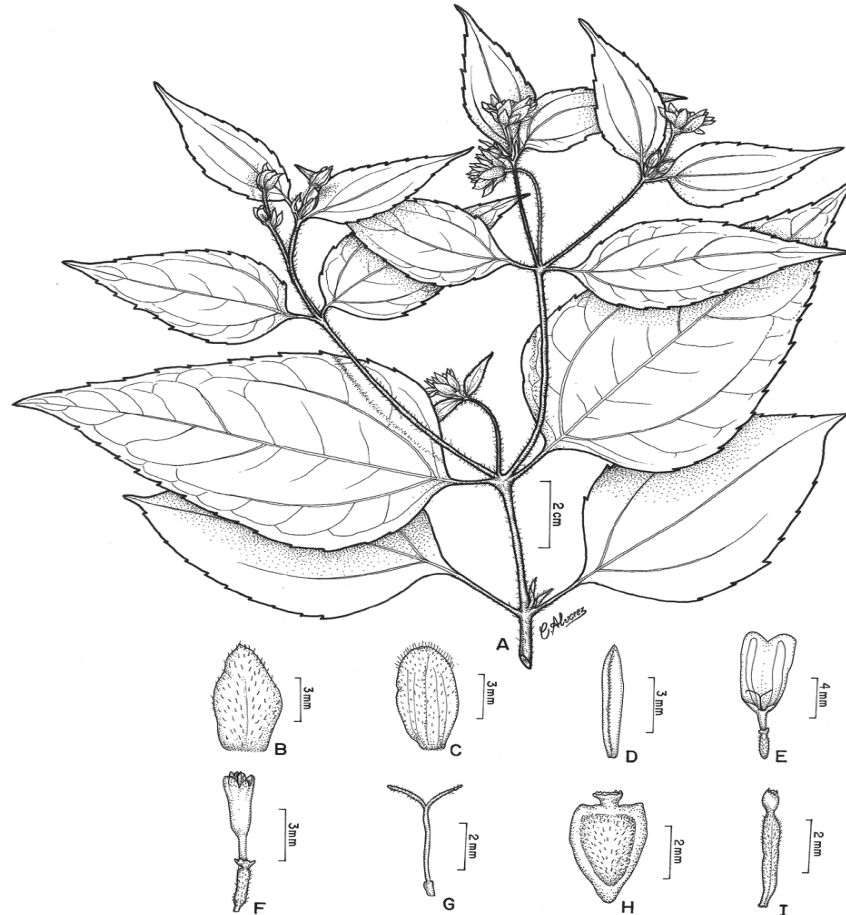


Figura7: *Wedelia calycina* L.C. Rich. En Pers. (Silva & Santos, 2010)

El propósito del presente trabajo de investigación, se fundamenta sobre la base de que

las plantas constituyen un recurso ideal para la obtención de nuevos fármacos útiles para el hombre; por tanto, es necesario experimentar con diversas especies para detectar posibles fuentes de compuestos bioactivos. Actualmente, la medicina moderna se enriquece con el aporte de nuevos agentes terapéuticos extraídos de ellas y dada la efectividad de la misma se ha utilizado en varios campos, especialmente en la salud. La identificación de varios compuestos, con actividad biológica diversa, presentes en las especies *Wedelia trilobata*, *W. glauca*, *W. urticifolia* y *W. chinensis*, sugiere, en este género de plantas, variedad de metabolitos secundarios con potencial farmacológico. Razón por la cual, se analizaron los tallos y hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich, para determinar su composición fitoquímica, actividad biológica y comprobar la presencia de algunas sustancias con posible bioactividad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar fitoquímica y biológicamente extractos de tallos y hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich., mediante la caracterización de los compuestos aislados responsables de efectos biológicos.

Objetivos Específicos

Obtener los aceites esenciales de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich e identificarlos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

Obtener los extractos metanólicos de los tallos y hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Analizar fitoquímicamente los extractos metanólicos de tallos y hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Determinar la actividad antifúngica y antibacteriana de los extractos metanólicos y aceites esenciales de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracccionar los extractos para la purificación de algunos compuestos presentes en las fracciones con mayor actividad biológica de los extractos metanólicos de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Caracterizar químicamente los componentes aislados, mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H y RMN-¹³C), además de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las muestras de *Wedelia calycina* L.C. Rich se recolectaron en las zonas verdes de la localidad de San Juan de Macarapana, (en el sector conocido como “la Última”), estado Sucre. Luego, se trasladaron al Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química, Núcleo de Sucre, de la Universidad de Oriente para su procesamiento. La identificación de la misma se realizó por comparación con especímenes depositados en el Herbario I.R.B.R. del Departamento de Biología, Núcleo de Sucre de la UDO.



Figura 8: Localización del área de muestreo, San Juan de Macarapana – Sector la Última, estado Sucre, Venezuela.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

El extracto metanólico de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich se obtuvo mediante el tratamiento de 406,7 g del material vegetal, seco y molido, macerado a temperatura ambiente con 2 litros de metanol (MeOH), realizándose la extracción hasta agotamiento. Para el extracto metanólico del tallo, se utilizaron 477,8 g de material y 2 litros de MeOH. Los extractos fueron filtrados y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador

marca Büchi 461. El procedimiento de extracción se realizó hasta agotamiento.

OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para la extracción por arrastre con vapor, se siguió el procedimiento descrito por Pavia *et al.* (1988). Las hojas frescas se trituraron para reducir su tamaño a la mitad y se colocaron en un balón de destilación. Luego, se conectó éste a un balón con agua y, por calentamiento de este último, se hizo circular vapor de agua por el material vegetal. Se obtuvo por evaporación-condensación una solución de agua/aceite esencial, luego se biparticionó con *n*-hexano y se separó la fase orgánica, que fue secada con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el solvente, a 35°C y presión reducida, en un rotaevaporador marca Büchi 461.

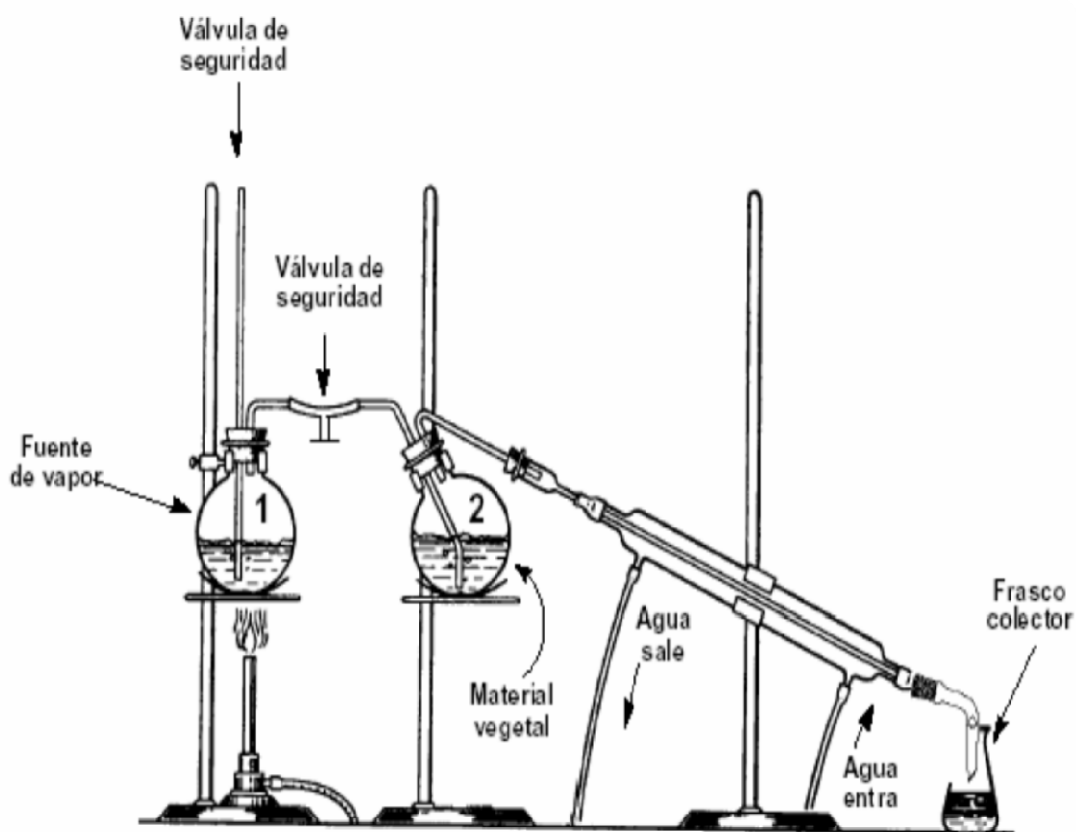


Figura 9: Imagen del montaje del equipo empleado para la destilación por arrastre con vapor.

ANÁLISIS QUÍMICO

Se realizaron pruebas químicas para detectar familias de compuestos presentes en los extractos más activos en los ensayos biológicos, siguiendo los procedimientos descritos por Marcano y Hasegawa (2002), para evaluar la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, saponinas, polifenoles, taninos y esteroides insaturados.

Alcaloides

La muestra a evaluar se resuspendió en ácido clorhídrico al 10% y se particionó con cloroformo. La fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo nuevamente con cloroformo. Las tres fases se ensayaron con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Meyer, para detectar alcaloides básicos, débilmente básicos y sales cuaternarias de amonio, por la formación de productos de adición insolubles entre el nitrógeno del alcaloide y el reactivo a emplear, de coloración rojo-naranja (reactivo Dragendorff), sólido blanco (reactivo Mayer) y precipitado marrón (reactivo de Wagner).

Saponinas

La presencia de saponinas se evidenció por la formación de espuma que permanece al menos 15 min, cuando se agite el extracto alcohólico con agua destilada.

Otra prueba consistió en añadir una solución acuosa de la muestra a una suspensión de glóbulos rojos en solución salina. Si los glóbulos rojos se rompen (lisan o hemolizan), se asume que la prueba es positiva.

Flavonoides

Una solución del extracto crudo se trató con: ácido clorhídrico concentrado y virutas de magnesio; se considera positivo al producirse una coloración roja al dejar la mezcla en reposo durante 20 min, debido a que los flavonoides con el núcleo benzopirona producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado.

Adicionalmente, una gota del extracto, se absorbió sobre papel de filtro y se roció con una solución de cloruro de aluminio al 1%. La aparición de una mancha fluorescente

amarilla bajo luz ultravioleta indica la presencia de flavonoides, por la formación de quelatos.

Taninos y polifenoles

Los compuestos fenólicos en el extracto crudo o muestra a probar se detectan al producir una coloración parda, en presencia de una solución de cloruro de hierro (III) al 1%. Para ello, el extracto seco se resuspende en agua y se filtra antes de que ocurra la reacción con cloruro de hierro (III). La presencia de taninos será indicada por la formación de un precipitado al tratar el crudo con solución de gelatina al 1% en cloruro de sodio al 1%.

Esteroles insaturados

La muestra a probar se hidrolizó con ácido clorhídrico 10% v/v y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se mezcló con el reactivo de Liebermann-Burchard (1 mililitro de anhídrido acético frío mezclado con dos o tres gotas de ácido sulfúrico concentrado), desde una coloración púrpura rojizo a azul verdoso, indica la presencia de esteroides, por la formación de un cromóforo ácido colestano-sulfónico.

BIOENSAYOS

Actividad antibacteriana

Se comprobó el efecto antibacteriano de los extractos, fracciones y/o compuestos aislados de la especie vegetal en estudio, utilizando cepas bacterianas de origen comercial ATCC. La actividad antibacteriana se determinó mediante la técnica de difusión en agar llamada antibiograma, la cual consiste en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro con una solución, de concentración conocida (entre 5-40 mg/ml) de los extractos o fracciones a ensayar y un disco control impregnado con el solvente en el cual se diluyeron las muestras a ensayar.

Estos discos son colocados sobre la superficie de placas de Petri, previamente servidas con agar Müller – Hinton e inoculadas con una suspensión bacteriana estandarizada por comparación con un patrón MacFarland 0,5 (Cona, 2003). Luego, las placas se preincubaban a 5°C por 12 horas en un refrigerador convencional y, seguidamente, se colocan a 37°C durante 24 horas, en una estufa eléctrica marca “P-Selecta”. Finalmente,

se evidencia el efecto producido por los extractos sobre las cepas de los diferentes microorganismos, midiendo los diámetros de los halos de inhibición alrededor del disco, con una regla milimetrada.

Tabla 1: Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana

Microorganismos	Origen	Tinción de Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBE Doc-19	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO14	+
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA-07	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	-
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698	+

Actividad antifúngica

El efecto antifúngico de los extractos, fracciones y compuestos aislados se evaluó sobre cepas de hongos patógenos y fitopatógenos. La actividad se valoró utilizando un método de difusión en agar, llamado antibiograma, en el cual las cepas de hongos se incuban durante una semana a temperatura ambiente en tubos de vidrio inclinados que contienen cuñas de agar papa dextrosa (PDA). Seguidamente, se le añadió a cada tubo 10 ml de agua destilada estéril, se agita fuertemente y se filtró sobre gasa estéril.

Las suspensiones obtenidas contienen esporas de las cepas de hongos, las cuales son inoculadas posteriormente. Cada suspensión se siembra sobre cápsulas de Petri, previamente servidas con agar PDA.

Finalmente, se colocan sobre las placas los discos de papel de filtro, Whatman N° 3, de 6 mm de diámetro impregnados con una solución, de concentración conocida (entre 0-40 mg/ml), de los extractos o fracciones a ensayar y un disco control impregnado con el solvente en el cual se diluyeron las muestras a ensayar, y se dejan incubar durante 48 horas a temperatura ambiente, para, luego, medir la actividad antifúngica como el diámetro de halo de inhibición (Cona 2003).

Tabla 2: Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antifúngica

Microorganismos	Origen
<i>Aspergillus niger</i>	Lab. Micología
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lab. Micología
<i>Curvularia lunata</i>	Lab. Micología
<i>Candida albicans</i>	Lab. Micología
<i>Penicillium hirsutum</i>	Lab. Micología
<i>Penicillium expansus</i>	Lab. Micología
<i>Mucor racemosus</i>	Lab. Micología
<i>Trichoderma viridis</i>	Lab. Micología
<i>Fusarium sp</i>	Lab. Micología
<i>Fusarium poae</i>	Lab. Micología
<i>Fusarium moniliforme</i>	Lab. Micología

FRACCIONAMIENTO

Los extractos crudos del tallo (37,291 g) y las hojas (39,373 g) de *Wedelia calycina* L.C. Rich, fueron disueltos en 200 ml de metanol y posteriormente fueron tratados con una solución de acetato de plomo al 2%. Luego del filtrado, la solución resultante después de eliminado el metanol se sometió a partición líquido-líquido con cloroformo, acetato de etilo y *ter*-butanol en el caso del tallo, cloroformo y acetato de etilo para las hojas. Los solventes se evaporaron a presión reducida y así se obtuvieron las fracciones primarias. Debido a la mayor actividad antibacteriana de las fracciones primarias del tallo, en relación a la bioactividad mostrada por las fracciones primarias de las hojas, se procedió al fraccionamiento químico de las fracciones del tallo, con el fin de aislar algunos de los compuestos responsables de tal bioactividad.

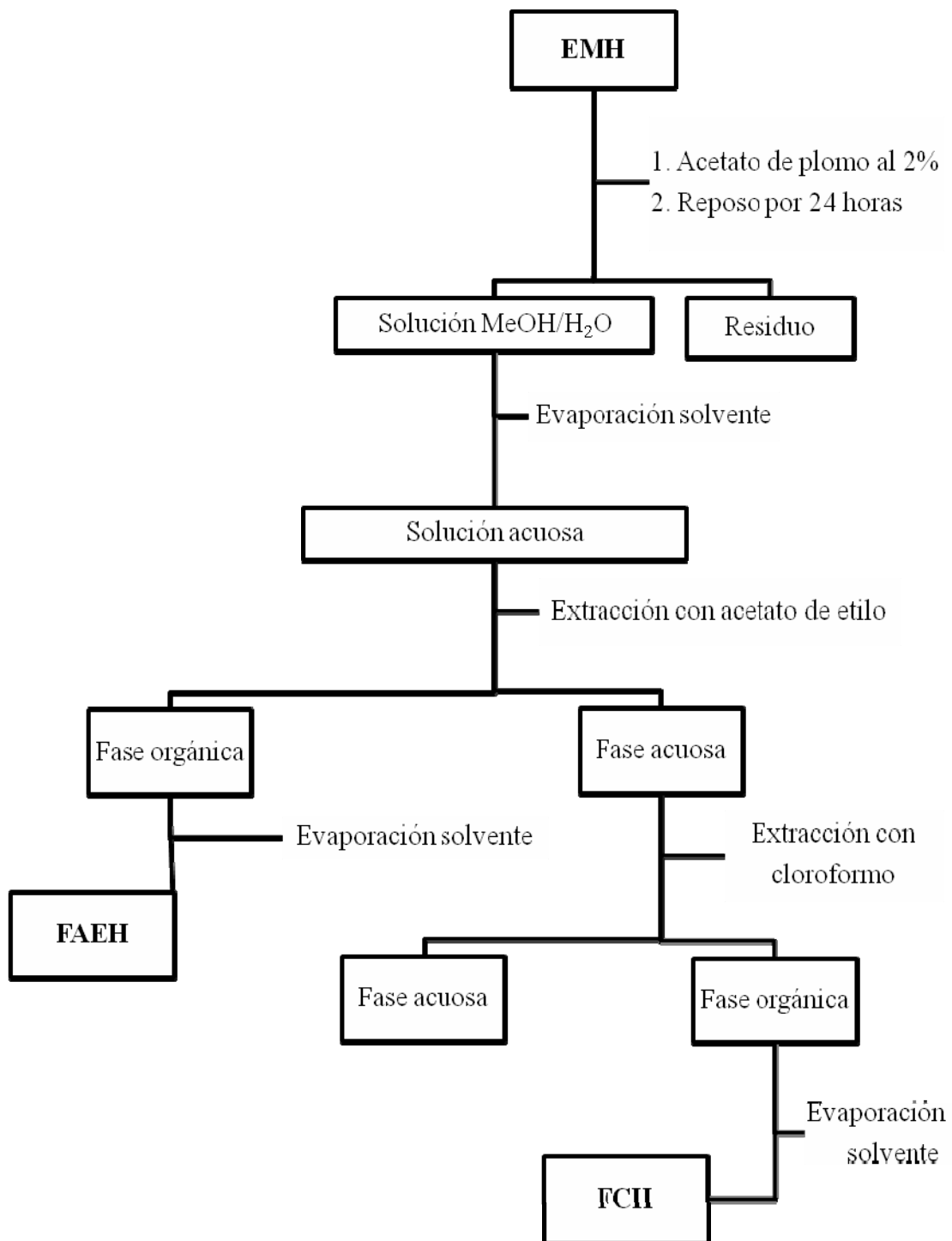


Figura 10: Diagrama de fraccionamiento primario del extracto metanólico de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich. (EMH: Extracto Metanólico de las Hojas. FAEH: Fracción del extracto metanólico de las Hojas en Acetato de Etilo. FCH: Fracción del extracto metanólico de las Hojas en Cloroformo)

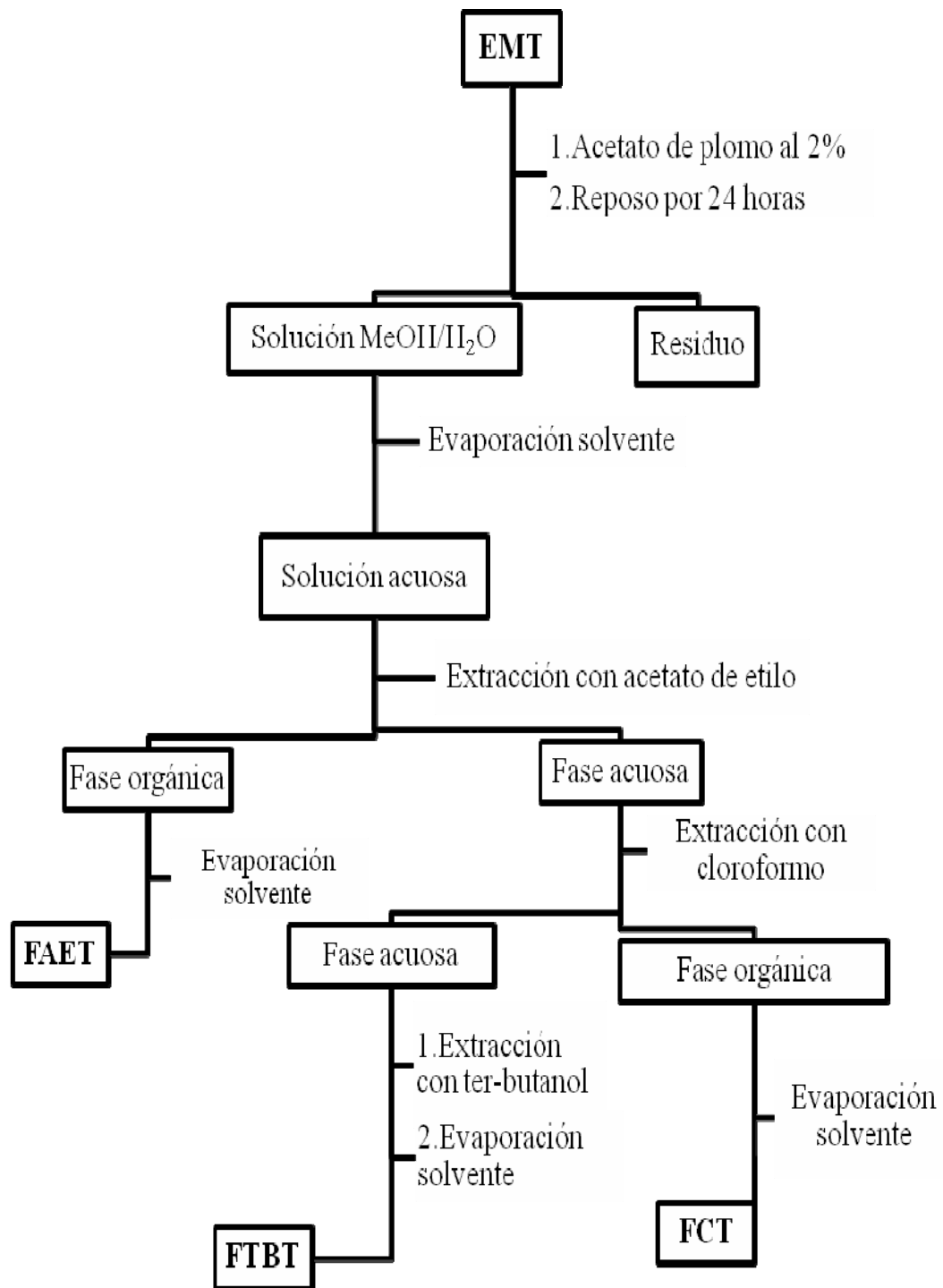


Figura 11: Diagrama de fraccionamiento primario del extracto metanólico del tallo de *Wedelia calycina* L.C. Rich. (EMT: Extracto Metanólico del Tallo. FAET: Fracción del extracto metanólico del Tallo en Acetato de Etilo. FCT: Fracción del extracto metanólico del Tallo en Cloroformo. FTBT: Fracción del extracto metanólico del Tallo en *ter*-butanol)

Fraccionamiento de la FCT del tallo

De acuerdo a la actividad antibacteriana ejercida por las fracciones primarias del tallo, se realizó un proceso de fraccionamiento mediante cromatografía de columna de la fracción en cloroformo (0,3442 g). Para ello, se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20; se eluyó con una mezcla cloroformo-metanol aumentando gradualmente la polaridad en diferentes proporciones; CHCl_3 (100%), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1 y 1:1), MeOH (100%); obteniéndose 60 eluatos de 10 ml cada uno, agrupados en 7 fracciones de acuerdo a la similitud de sus componentes en corridas por cromatografía de capa fina analítica, denotadas como FCT-1 a 7.

La fracción 3 (132,7 mg) fue sometida a un nuevo proceso de fraccionamiento por cromatografía de columna, usando como fase estacionaria sílica gel 60, tamaño de partícula: 0,04-0,06 mm, Merck; se eluyó variando gradualmente la polaridad en mezclas de pentano-cloroformo (2:1 y 1:2) y pentano-cloroformo-metanol (1:2:1 y 1:2:2). Se obtuvieron 48 eluatos de 10 ml, los cuales fueron agrupados en fracciones de acuerdo a la similitud de sus componentes en corridas por cromatografía de capa fina y se obtuvieron 5 fracciones a las que se denotaron como FCT-3.1 a 3.5.

La fracción 3.4 (71,4mg), fue sometida a otro proceso de cromatografía de columna, usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y una mezcla de diclorometano-acetato 1:1 como fase móvil, obteniéndose 60 eluatos de 3 ml, los cuales fueron agrupados en 7 sub-fracciones de acuerdo a la similitud de los R_f de los componentes, denotadas desde FTC-3.4.1 hasta FTC-3.4.7.

Fraccionamiento de la FCT-4

Para separar los compuestos de la fracción FCT-4, se realizó una cromatografía en placa fina preparativa. Para ello se aplicaron 104,5 mg de la fracción en cromatofolios de sílica gel de 2 mm de espesor de 20 x 20 cm (Merck), utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (2:1). Se obtuvieron 4 sub-fracciones secundarias, denotadas como FCT-4.1 a 4.4.

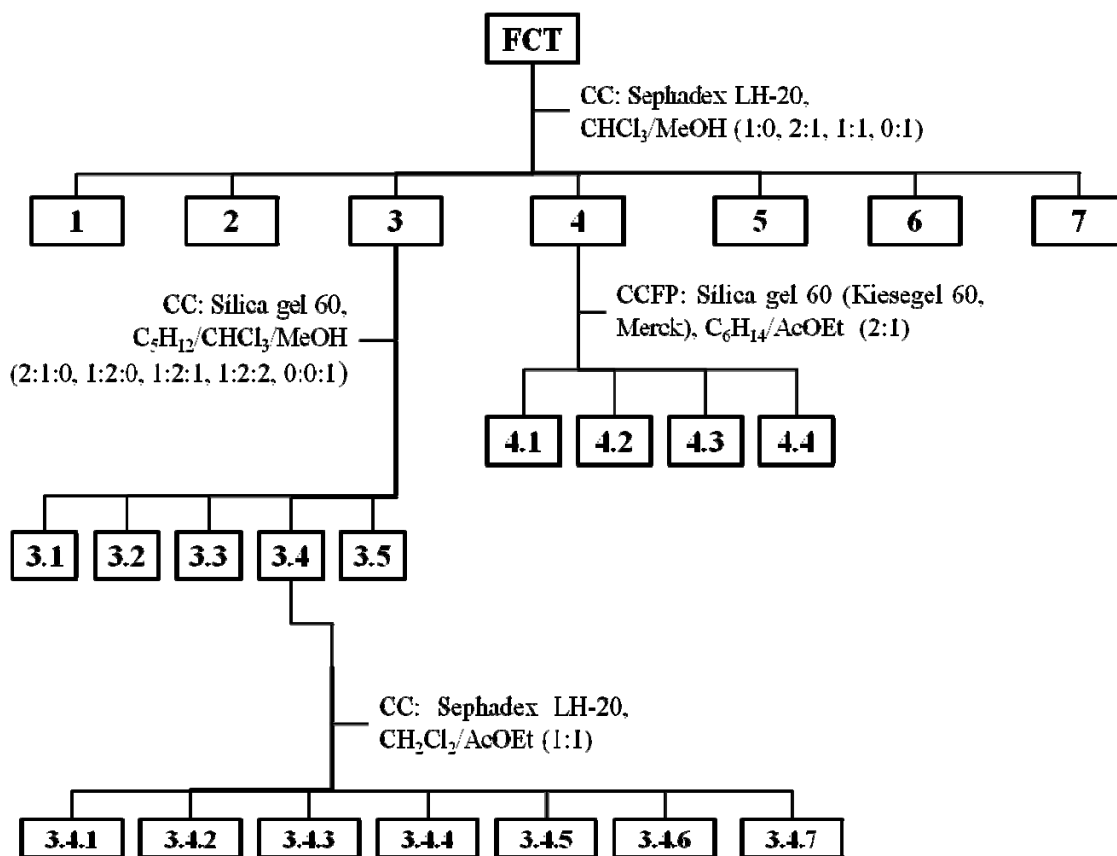


Figura 12: Diagrama de fraccionamiento de la fracción clorofórmica del tallo (FCT) de *Wedelia calycina* L.C. Rich. (CC: cromatografía de columna. CCFP: cromatografía de capa fina preparativa).

Fraccionamiento de la FTBT del tallo

En el caso de la fracción del extracto metanólico del tallo en *ter*-butanol, FTBT, ésta fue disuelta en metanol, luego de estar completamente en solución, se observó la formación de un sólido marrón oscuro (FTBT-1); éste fue separado de la solución por centrifugación y la solución alcohólica resultante (FTBT-2) fue sometida a rotaevaporación para eliminar el solvente. La fracción obtenida luego de evaporar el solvente (FTBT-2.1) fue disuelta en una mezcla cloroformo-metanol (2:1). Luego de dejar la mezcla en reposo para eliminar el solvente de manera espontánea a temperatura ambiente se observó la formación de un precipitado con aspecto cremoso de color marrón claro, se procedió a centrifugar la solución y separar dicho sólido (FTBT-2.1.2). Éste fue disuelto en metanol y precipitaron ciertos cristales amarillos (FTBT-2.1.2.1), los cuales fueron separados de la solución que los contenía.

Estos cristales amarillos fueron lavados varias veces con metanol para eliminar restos de sólido aceitoso; los cristales obtenidos (FTBT-2.1.2.1) fueron almacenados hasta su uso. Posterior a la evaporación del solvente, en las aguas de lavado (FTBT-2.1.2.2) de los cristales anteriormente obtenidos, se observó la aparición de cristales translúcidos (FTBT-2.1.2.2.1), que al ser separados de la solución, se recrystalizaron con una mezcla cloroformo-metanol 1:1 mediante evaporación espontánea del solvente a temperatura ambiente en placas de Petri.

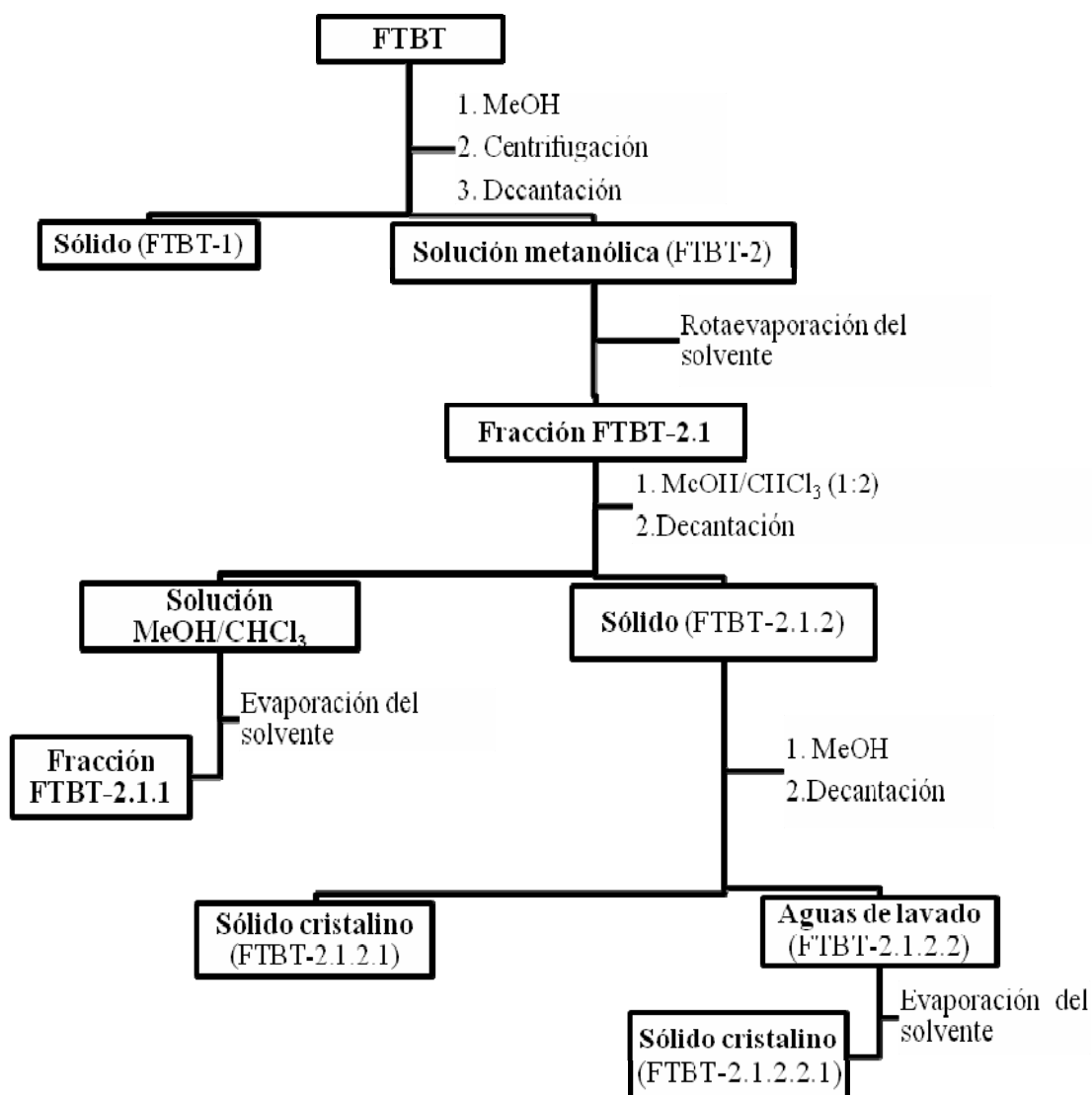


Figura 13: Diagrama del fraccionamiento de la fracción terbutanólica del tallo (FTBT) de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Agentes reveladores

Se utilizaron como agentes reveladores (agentes cromógenos), vapores de yodo y de amoníaco, adecuados para verificar el comportamiento de los compuestos, fracciones o eluatos. El cromatograma fue impregnado dentro de la campana de extracción a una distancia de 20 cm, permitiendo localizar la mancha, utilizándose una lámpara UV.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- ^{13}C) y Protones (RMN- ^1H)

Se empleó un equipo de RMN marca BRUKER, de 500 MHz para los análisis de protones y 125 MHz en el caso de los espectros de carbono. La RMN es una de las técnicas más usadas en el campo de los productos naturales, por su naturaleza no destructiva, y proporcionar información muy precisa, sobre los acoplamientos C-H, al momento de elucidar la estructura de un compuesto. Las muestras fueron disueltas en solventes deuterados (CDCl_3 o D_2O), según la solubilidad de las mismas, y se colocaron en un tubo de resonancia, para luego ser introducidas en el equipo de RMN, para los análisis de RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensionales, respectivamente.

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

Esta técnica es la más sencilla para determinar la masa molar de un compuesto e, incluso, la fórmula molecular correspondiente. Para ello, Los análisis por cromatografía de gases fueron realizados en un cromatógrafo marca Perkin Elmer, modelo Autosystem con un detector FID, empleando una columna HP-5 de 30 metros de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de film. Se usó helio como gas portador con un flujo de 0,8 ml/min. La temperatura inicial fue de 60°C (1 min) y luego se calentó a razón de 4°C/min hasta 280°C (20 min); el inyector se mantuvo a 200°C y el detector a 230°C. Se determinaron los índices de Kováts, analizando la muestra por comparación con una mezcla de *n*-alcanos (C8 a C22) (Davies, 1990; Adams, 2001).

Espectrometría de masas con electronebulización (ESI-MS)

La ionización por electronebulización o electroespray (ESI) es una técnica de espectrometría de masas de ionización blanda (ESI-MS) que genera solo iones

moleculares sin fragmentación. Es especialmente útil en la producción de iones a partir de macromoléculas, pues supera la propensión de estas a fragmentarse cuando se ionizan. Para llevarse a cabo, en un principio, se introdujo el analito (a ionizarse) disuelto en un solvente más volátil por un capilar de metal muy pequeño y cargado; debido a la repulsión de las cargas eléctricas, el líquido sale del capilar y se forma un aerosol, una nube de pequeñas gotas (10 μm) altamente cargadas.

Conforme el solvente se evapora, las moléculas del analito se aproximan, se repelen y finalmente, cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas (Explosión de Coulomb). El proceso se repite hasta que el analito esté libre de solvente, de modo que no quede más que iones moviéndose hacia el analizador de masa (Fenn *et al.*, 1990). Estos análisis de espectrometría de masas mediante ionización por electronebulización o electrospray (ESI-MS) se realizaron con un espectrómetro de Masas cuadripolar (QMS) Finnigan TSQ Quantum ThermoScientific-Scientificinstruments, en el laboratorio de espectrometría de masas del centro de química en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las diversas extracciones de órganos de la especie vegetal *Wedelia calycina* L.C. Rich. y posterior fraccionamiento de los extractos crudos y evaluación de efectos biológicos de los mismos, su caracterización química, así como un análisis y discusión son presentados a continuación.

Rendimiento de los extractos y fracciones primarias de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Luego de llevarse a cabo las extracciones metanólicas sucesivas de las hojas y tallos de *Wedelia calycina* L.C. Rich., se obtuvieron dos extractos crudos, uno por cada órgano. Éstos fueron tratados posteriormente con una solución de acetato de plomo al 2% para eliminar ciertas sustancias de bajo interés, desde el punto de vista de los productos naturales, tales como la clorofila. Luego de filtrada, la solución fue concentrada a presión reducida y la solución acuosa resultante fue biparticionada con solventes orgánicos, tales como acetato de etilo, cloroformo y *ter*-butanol, obteniéndose varias fracciones de cada extracto de los órganos de la planta. El rendimiento obtenido para cada uno de los extractos y fracciones obtenidas, es mostrado en la tabla 3.

Tabla 3: Rendimiento de los extractos y fracciones primarias obtenidos de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

CANTIDAD OBTENIDA	EXTRACTOS*						
	EMH	EMT	FAEH	FCH	FAET	FCT	FTBT
Material vegetal procesado(g)	406,7	477,8	5,65	5,65	37,29	37,29	37,29
Extracto obtenido (g)	39,37	37,29	0,45	1,98	0,45	0,34	11,30
Rendimiento (% m/m)	9,17	8,24	7,96	35,04	1,21	0,91	30,30

*EMT: Extracto metanólico del tallo; EMH: Extracto metanólico de las hojas; FAEH: Partición del EMH en acetato de etilo; FCH: Partición del EMH en cloroformo; FAET: Partición del EMT en Acetato de Etilo; FCT: Partición del EMT en Cloroformo; FTBT: Partición del EMT en Ter-butanol.

Los extractos metanólicos se obtuvieron con un rendimiento en masa, de aproximadamente el 9% para las hojas y el 8% para el tallo. Luego del tratamiento con acetato de plomo al 2% m/v, de las particiones de acetato de etilo y cloroformo de las hojas, se obtuvo 7,96 y 35,04% m/m, respectivamente; estas fueron de mayor rendimiento en masa que las particiones obtenidas del tallo. Las particiones del extracto

metanólico del tallo generaron muy bajos rendimientos, siendo éstos: cloroformo 0,91% m/m y acetato de etilo 1,21% m/m. No obstante, en *ter*-butanol hubo un mayor rendimiento con respecto a todas las particiones obtenidas del tallo, con un 30,30% en masa.

Análisis de los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Luego de aplicarse las pruebas de análisis fitoquímico, según Marcano y Hasegawa (2002), el extracto metanólico de las hojas resultó positivo a la evaluación fitoquímica de alcaloides, flavonoides y polifenoles. En el caso del tallo, para su extracto alcohólico, se determinó la presencia de familias de compuestos polifenólicos y flavonoides (Tabla 4).

Tabla 4: Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Metabolitos secundarios	EMT*	EMH*
Alcaloides	-	+
Saponinas	-	-
Flavonoides	+	+
Taninos	-	-
Polifenoles	+	+
Esteroles y triterpenos	-	-

*EMT: Extracto metanólico del tallo; EMH: Extracto metanólico de las hojas

La presencia de compuestos alcaloidales se detectó por la formación de un precipitado naranja al tratar el extracto metanólico de las hojas con el reactivo de Dragendorff. La familia de compuestos flavonoides, fue identificada por la fluorescencia de las muestras luego de ser tratadas con $AlCl_3$ al 1% en etanol. Igualmente, se confirmó la presencia de flavonoides por el cambio de coloración observado al exponer ambos extractos crudos a los vapores de amoníaco. Los polifenoles fueron identificados por la formación de una coloración parda, cuando se trató el extracto metanólico de las hojas y el extracto metanólico del tallo, con unas gotas de cloruro férrico al 1%.

De las pruebas químicas cualitativas realizadas, no se detectó la presencia de compuestos como taninos, saponinas, esteroides y triterpenos. Esto puede deberse a que dichos compuestos no estén presentes en la planta o están en tan baja concentración que no pudieron ser detectados por la metodología empleada.

Actividad biológica de los extractos y fracciones primarias obtenidas

Los resultados del análisis del estudio antibacteriano de los extractos y fracciones obtenidos de *Wedelia calycina* L.C. Rich., a una concentración de 40 mg/ml, se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5: Actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones primarias de *Wedelia calycina* L.C. Rich. a concentraciones de 40 mg/ml.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición*						
	EMH	EMT	FAEH	FCH	FAET	FCT	FTBT
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> IBE (Doc-19)	9	13	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (WHO14)	17	8	-	-	-	11	-
<i>B. subtilis</i> (ICTA-07)	9	15	12	-	14	15	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (10031)	-	11	18	-	19	10	-
<i>M. luteus</i> ATCC (4698)	17	11	18	-	19	11	-

*Diámetro del halo de inhibición (mm), diámetro del disco 6 mm, valores obtenidos con una desviación promedio de ± 2 mm. FAEH: Partición del EMH en acetato de etilo; FCH: Partición del EMH en cloroformo; FAET: Partición del EMT en acetato de etilo; FCT: Partición del EMT en cloroformo; FTBT: Partición del EMT en *ter*-butanol. Escala de actividad: No activo: (-); actividad débil: halo = 7-11 mm; actividad moderada: halo = 11-16 mm; muy activo: halo > 16 mm (Monks *et al.*, 2002).

Al analizar estos datos, se observó que el extracto del tallo fue activo para inhibir cinco de las seis cepas de bacterias ensayadas, similarmente el de las hojas, inhibió el crecimiento poblacional de cuatro cepas bacterianas: *S. aureus* y *B. subtilis* en forma leve, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera moderada. El extracto metanólico del tallo, exhibió inhibición del crecimiento de las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus* en forma moderada, y contra *K. pneumoniae*, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera leve (11, 11 y 8 mm, respectivamente).

Luego del tratamiento con la solución de acetato de plomo al 2%, las particiones líquido-líquido obtenidas, también fueron ensayadas por medio del método del antibiograma,

obteniéndose como resultados, en el caso de las hojas, la partición obtenida en acetato de etilo fue activa contra el crecimiento de *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* en forma moderada. La fracción obtenida del extracto de las hojas en cloroformo, no exhibió ningún tipo de actividad antimicrobiana.

La actividad inhibitoria ejercida, por la fracción en acetato de etilo de las hojas, es ligeramente mayor en comparación con los valores del extracto crudo sobre *B. subtilis* y, contra *M. luteus* ambos extractos muestran valores similares. Mientras que el extracto crudo de las hojas inhibe el crecimiento de *S. aureus* y la fracción en acetato de etilo inhibe moderadamente el crecimiento de *K. pneumoniae*. Dichos resultados indican que al realizarse la partición del extracto crudo de las hojas con acetato de etilo, se potencia la actividad contra *B. subtilis*, mientras que contra *S. aureus* disminuye y ejerce efecto moderado sobre *K. pneumoniae*.

De las particiones obtenidas, luego del tratamiento, del extracto crudo del tallo, sólo las fracciones en acetato de etilo y en cloroformo mostraron actividad sobre los microorganismos empleados, contrariamente la fracción *ter*-butanólica no mostró actividad. La fracción en acetato de etilo del tallo mostró una inhibición moderada sobre el crecimiento de *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus*. En cambio, la partición en cloroformo, inhibió el crecimiento de los microorganismos *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* levemente; así como de forma moderada a la bacteria *B. subtilis*.

Al comparar la actividad biológica ejercida por el extracto crudo del tallo, se observó que ninguna fracción obtenida de las particiones inhibió el crecimiento de la bacteria *S. aureus*, pero sí lograron potenciar la actividad sobre *K. pneumoniae* y *M. luteus* de 11 mm en EMT a 19 mm en el caso del FAET y contra *E. faecalis* de 8 mm en EMT a 11 mm en el caso del FCT. Los halos mostrados sobre la bacteria *B. subtilis* fueron constantes para el extracto crudo y las particiones FAET y FCT.

Tomando en cuenta el análisis de los metabolitos presentes en cada extracto crudo, el EMH contiene alcaloides, flavonoides y polifenoles, además es activo únicamente contra las bacterias Gram positivas ensayadas. Mientras que el EMT que resultó positivo a las pruebas químicas de flavonoides y polifenoles, inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas y también actúa sobre la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae*. Razón

por la cual puede inferirse que los posibles alcaloides presentes en el EMH disminuyen la acción de este extracto alcohólico contra las bacterias Gram negativas empleadas pero potencian su acción inhibitoria sobre *S. aureus* y *E. faecalis*. Mientras que los posibles flavonoides y polifenoles presentes en el EMT le proporcionan bioactividad contra las bacterias ensayadas exceptuando contra *E. coli*, sobre la cual ningún extracto ni fracción primaria ejerció actividad.

La acción del extracto EMT y las fracciones FAEH, FAET y FCT sobre la bacteria *K. pneumoniae* respaldan el uso medicinal que se le da a esta especie vegetal en el estado Bolívar como medicina para la tos, de acuerdo con Díaz & Delascio (2007). Similarmente, esta actividad biológica ejercida por la planta sobre dicha bacteria Gram negativa, la coloca como un posible candidato para la elaboración de fármacos que permitan contrarrestar las potentes infecciones respiratorias que ocasiona esta bacteria al estar en contacto con el cuerpo humano, las cuales muchas veces conllevan a la muerte (Bartram *et al.*, 2003; Ainsworth, 2004).

Fraccionamiento cromatográfico de la fracción en cloroformo obtenida del EMT.

Debido a la actividad biológica de la FCT (0,3442 g), se seleccionó para ser fraccionada mediante cromatografía de columna; utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20; eluída con una mezcla cloroformo-metanol aumentando gradualmente la polaridad en diferentes proporciones; generó 60 eluatos, agrupados en siete fracciones que representaron el 92,38% del total de la muestra inicial.

De estas fracciones, sólo las fracciones FCT-3 (0,133 g) y FCT-4 (0,115 g) fueron sometidas a fraccionamientos posteriores por ser ambas las de mayor rendimiento en masa y su actividad antimicrobiana. Los rendimientos obtenidos luego del proceso de fraccionamiento realizado, se muestran a continuación, en la tabla 6.

Tabla 6: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico por columna de la FCT de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracción	Nº de eluatos	Solvente (v/v)	Masa (g)
FCT-1	1-20	CHCl ₃ (100%)	0,008
FCT-2	21-26	CHCl ₃ /MeOH (2:1)	0,015
FCT-3	27-32	CHCl ₃ /MeOH (2:1)	0,133
FCT-4	33-37	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	0,115
FCT-5	38-45	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	0,020
FCT-6	46-50	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	0,018
FCT-7	51-60	MeOH (100%)	0,009

Actividad biológica de las fracciones secundarias FCT-3 y FCT-4, obtenidas del fraccionamiento del FCT.

Al evaluar la actividad biológica ejercida por las fracciones FCT, FCT-3 y FCT-4 sobre los microorganismos empleados, se observó que las fracciones secundarias obtenidas de la FCT inhiben de forma leve el crecimiento de la bacteria *S. aureus*, acción que no ejerce la fracción primaria de la cual provienen. Sin embargo, la FCT inhibe débilmente el crecimiento de *E. faecalis* mientras que las fracciones FCT-3 y FCT-4 no ejercieron actividad sobre este microorganismo (ver tabla 7).

La fracción FCT-3 fue activa en forma leve contra cuatro de las seis cepas bacterianas empleadas, desarrollando halos de inhibición mayores contra *S. aureus* (11 mm) y *B. subtilis* (10 mm). En el caso de su acción contra *K. pneumoniae* y *M. luteus* se observaron valores similares de 7 mm de diámetro en cada uno. Esta fracción (FCT-3) fue inactiva para inhibir a las bacterias *E. coli* y *E. faecalis*.

Similarmente, la fracción FCT-4 inhibió débilmente el crecimiento de las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*. Ambas fracciones secundarias, FCT-3 y FCT-4, inhibieron a la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae* con halos de inhibición de igual diámetro (7 mm), también exhibieron valores similares en su acción contra *S. aureus*. La FCT-4 no logró inhibir el crecimiento de *E. coli*, *E. faecalis* y *M. luteus*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, luego de realizarse el proceso de fraccionamiento de la fracción primaria FCT se observó una disminución de su potencial activo contra los microorganismos *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* y *M. luteus*; desapareciendo la actividad contra *E. faecalis* y mostrando actividad contra el crecimiento de *S. aureus*

en ambas fracciones secundarias.

En este mismo orden de ideas, la FCT-3 mostró mayor potencial antimicrobiano al ser activo contra un mayor número de bacterias ensayadas que la FCT-4, también pudo observarse que luego del fraccionamiento de la FCT la inhibición ejercida por las fracciones secundarias obtenidas es menor, pero FCT-3 y FCT-4 siguen siendo activas aunque de manera leve contra las bacterias *B. subtilis* y *K. pneumoniae* al igual que la fracción originaria de la que provienen. A pesar de que la FCT de la cual provienen ambas subfracciones no inhibe el crecimiento de *S. aureus*, las FCT-3 y FCT-4 si logran inhibirlo de forma leve en comparación con la acción moderada que ejerce el EMT sobre dicha bacteria.

Tabla 7: Actividad antimicrobiana por las fracciones FCT, FCT-3 y FCT-4 de *Wedelia calycina* L.C. Rich. a concentraciones de 40 mg/ml.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición*		
	FCT	FCT-3	FCT-4
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	-	-
<i>S. aureus</i> IBE (Doc-19)	-	11	10
<i>E. faecalis</i> (WHO14)	11	-	-
<i>B. subtilis</i> (ICTA-07)	15	10	7
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (10031)	10	7	7
<i>M. luteus</i> ATCC (4698)	11	7	-

*Diámetro del halo de inhibición (mm), diámetro del disco 6 mm, valores obtenidos con una desviación promedio de ± 2 mm. FCT: Partición del EMT en Cloroformo. FCT-3 y FCT-4: Sub-fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de la FCT. Escala de actividad: No activo: (-); actividad débil: halo = 7-11 mm; actividad moderada: halo = 11-16 mm; muy activo: halo > 16 mm (Monks *et al.*, 2002).

Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-3.

La FCT-3 (0,133 g), por tener mayor rendimiento en masa y por su actividad biológica ejercida sobre los microorganismos evaluados, fue sometida a fraccionamiento cromatográfico (CC) usando como fase estacionaria sílica gel 60 (tamaño de partícula: 0.04-0.06 mm, Merck) y como fase móvil varias mezclas de pentano-cloroformo-metanol; obteniéndose 48 eluatos, agrupados en cinco sub-fracciones FCT-3.1 a 3.5; los rendimientos en masa de las mismas se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico (CC) de la FCT-3 de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracción	Nº de eluatos	Solvente (v/v)	Masa (g)
FCT-3.1	1-6	C ₅ H ₁₂ /CHCl ₃ (2:1)	0,007
FCT-3.2	7-12	C ₅ H ₁₂ /CHCl ₃ (1:2)	0,012
FCT-3.3	13-21	C ₅ H ₁₂ /CHCl ₃ (1:2)	0,010
FCT-3.4	22-31	C ₅ H ₁₂ /CHCl ₃ /MeOH (1:2:1)	0,038
	32-39	C ₅ H ₁₂ /CHCl ₃ /MeOH (1:2:2)	0,033
FCT-3.5	40-48	MeOH (100%)	0,006

La masa de las cinco sub-fracciones FCT-3.1 a 3.5, obtenidas de este fraccionamiento representan el 79,87% de la masa total de la FCT-3. La FCT-3.4 se obtuvo por la combinación de los eluatos 22 al 39, luego de compararse por cromatografía de capa fina analítica se observó valores de Rf iguales.

Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-3.4

La FCT-3.4 (0,0714 g) fue sometida a un nuevo proceso de fraccionamiento por CC, por ser la más pura de las fracciones obtenidas de la FCT-3, empleándose como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil una mezcla de proporción 1:1 en volumen de los solventes diclorometano y acetato, obteniéndose siete sub-fracciones denotadas desde FCT-3.4.1 hasta FCT-3.4.7. Los valores resultantes luego de este nuevo proceso de fraccionamiento, se muestran a continuación, en la tabla 9.

Tabla 9: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico por columna de la FCT-3.4 de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracción	Nº de eluatos	Masa (g)
FCT-3.4.1	1-18	0,002
FCT-3.4.2	19-25	0,003
FCT-3.4.3	26-33	0,006
FCT-3.4.4	34-41	0,016
FCT-3.4.5	42-45	0,006
FCT-3.4.6	46-54	0,015
FCT-3.4.7	55-60	0,006

Las siete sub-fracciones obtenidas del fraccionamiento de la FCT-3.4, representan el

75,63% de la muestra de partida. De éstas, sólo la FCT-3.4.4 y la FCT-3.4.6 fueron sometidas a análisis de RMN (^1H y ^{13}C) y CG/EM por ser las de mayor rendimiento en masa y las más puras de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina analítica.

Análisis de RMN ^1H de la fracción FCT-3.4.4

Por el comportamiento observado en cromatografía de capa fina, esta fracción parecía estar fundamentalmente pura, pero al realizar el análisis de RMN se determinó que es una mezcla de varios compuestos, por la presencia de señales de distintos tipos de protones de compuestos hidrocarbonados y oxigenados, solapándose unas con otras, resultando muy compleja la identificación de un compuesto en específico. Dicha muestra fue sometida a pruebas químicas cualitativas y se detectó la posible presencia de grupos fenólicos, pues al ser tratada con una solución de cloruro de hierro (III) al 3% en etanol dicha solución se tornó de coloración parda, indicando así la presencia de estos compuestos. Al analizar los desplazamientos químicos de las señales de los diferentes grupos de protones en el espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtenido para la fracción FCT-3.4.4 (figura 14), se puede notar la existencia de protones aromáticos y olefínicos con desplazamientos químicos (δ) entre 4,9-6,9 ppm. Similarmente, las señales entre $\delta = 6,5-6,9$ ppm sugiere la presencia de posibles compuestos fenólicos y posibles impurezas generadas por ésteres bencenodicarboxílicos.

A campo alto se encuentran señales asignables a grupos metilo terminales ($\delta = 0,8-0,9$ y $1,9-2,0$ ppm) y grupos metilenos ($\delta = 1,9-2,4$ ppm). También existe un gran número de protones en la zona entre $\delta = 3,6-3,9$ ppm, los cuales pueden corresponder con la presencia de grupos metoxilos o de grupos CH- enlazados con átomos muy electronegativos como el oxígeno así como en compuestos glicosídicos. En la zona de campo alto, δ entre $1,2-1,3$ ppm, se encuentra una señal que puede corresponderse con protones metilo terminales unidos a un átomo de carbono cercano a un grupo epóxido, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía (Jaime, 2008; Castro & Bedoya, 2011).

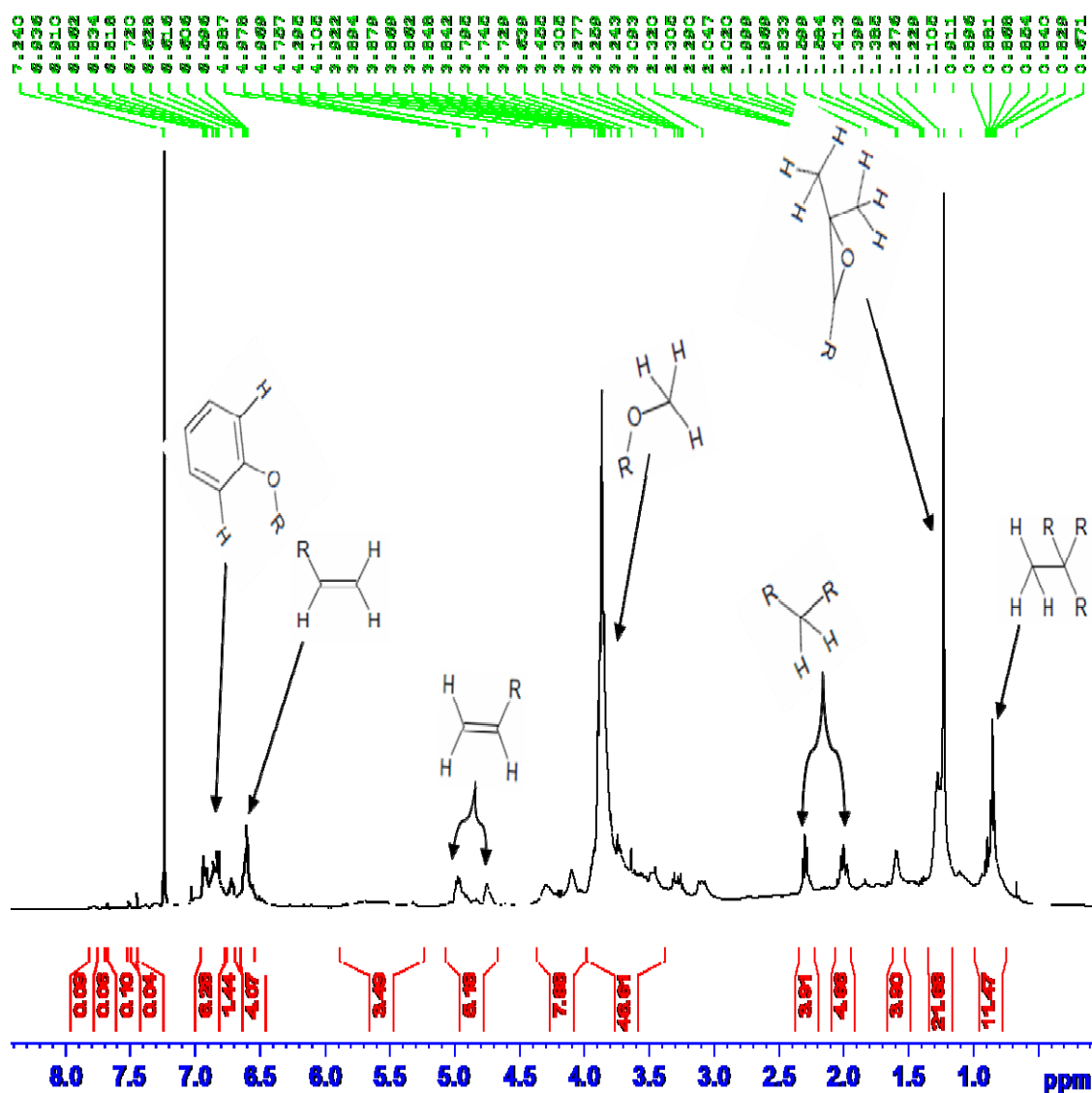


Figura 14: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la sub-fracción FCT-3.4.4, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.

Análisis de CG/EM de la fracción FCT-3.4.4

Para dilucidar de una manera más precisa sobre la composición estructural de la mezcla de compuestos presentes en la FCT-3.4.4, se realizó un análisis de CG/EM. Este análisis muestra la existencia de dos compuestos mayoritarios, de éstos sólo se tomó en consideración el pico con tiempo de retención (TR) de 33,15 minutos; el cual fue identificado como el éster etílico del ácido hexadecanoico mediante comparación con la base de datos NIST MS Search 2.0 del equipo.

El pico con TR de 45,14 minutos se corresponde con el éster diisooctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico, considerado una impureza proveniente del equipo de vacío con el que se eliminó el solvente de la muestra, el cual está presente en todos los cromatogramas de las tres muestras analizadas con un TR constante, razón por la que se descarta tomarlo como un metabolito producido por la planta. El cromatograma de la fracción FCT-3.4.4 se presenta en la figura 15.

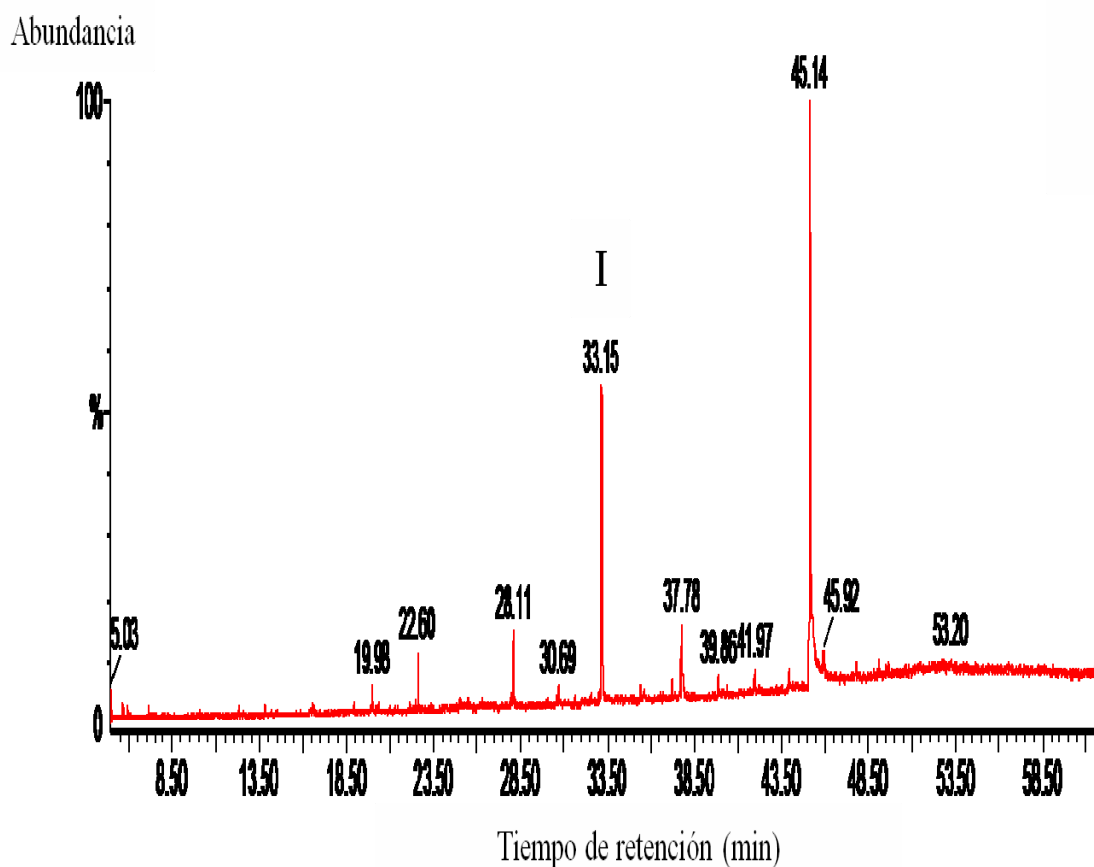


Figura 15: Cromatograma de gases de la sub-fracción FCT-3.4.4

Al comparar el espectro de masas obtenido para el compuesto denotado como I (TR = 33,15 minutos) en el cromatograma de la sub-fracción FCT-3.4.4 con el espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico y se pudo corroborar que dicho compuesto está presente en la muestra, con una probabilidad del 99% (ver figura 16).

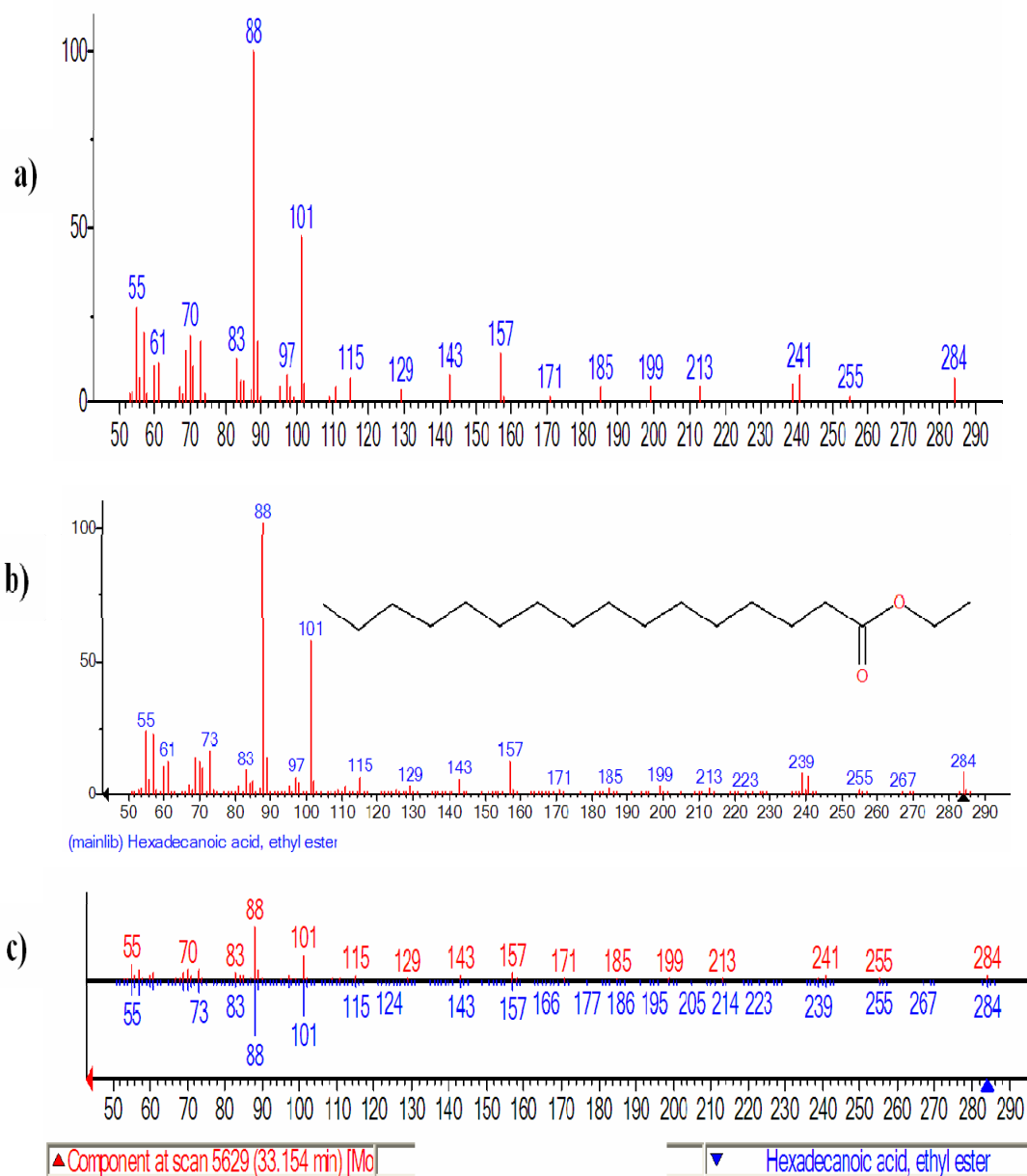


Figura 16: Espectros de masas de: a) compuesto denotado como I en el cromatograma de gases de la fracción FCT-3.4.4, b) éster etílico del ácido hexadecanoico obtenido de la librería del equipo (NIST MS Search 2.0) y c) comparación de ambos espectros para corroborar la identificación del éster etílico del ácido hexadecanoico como compuesto I.

En este mismo orden de ideas, el espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico identificado en la FCT-3.4.4 exhibe ocho señales características correspondientes a iones fragmentos originados a partir de este. La señal con relación masa/carga (m/z) de 284 corresponde al ion molecular del compuesto I, a una relación

m/z de 241 se observa una señal que se corresponde con la pérdida de 43 unidades de masa del ion molecular, la pérdida de agrupaciones atómicas de la cadena hidrocarbonada del ácido ($-C_9H_{19}$, $-C_{12}H_{25}$ y $-C_{13}H_{27}$) generan las señales con m/z de 157, 115 y 101, respectivamente. El pico base se observa con una m/z de 88, es una señal muy intensa característica de los ésteres de ácidos grasos de cadena larga, proveniente de una fragmentación de la molécula por un rearrreglo MacLafferty. Similarmente, las señales con m/z de 73 y 55 son muy comunes en la fragmentación de este tipo de compuestos.

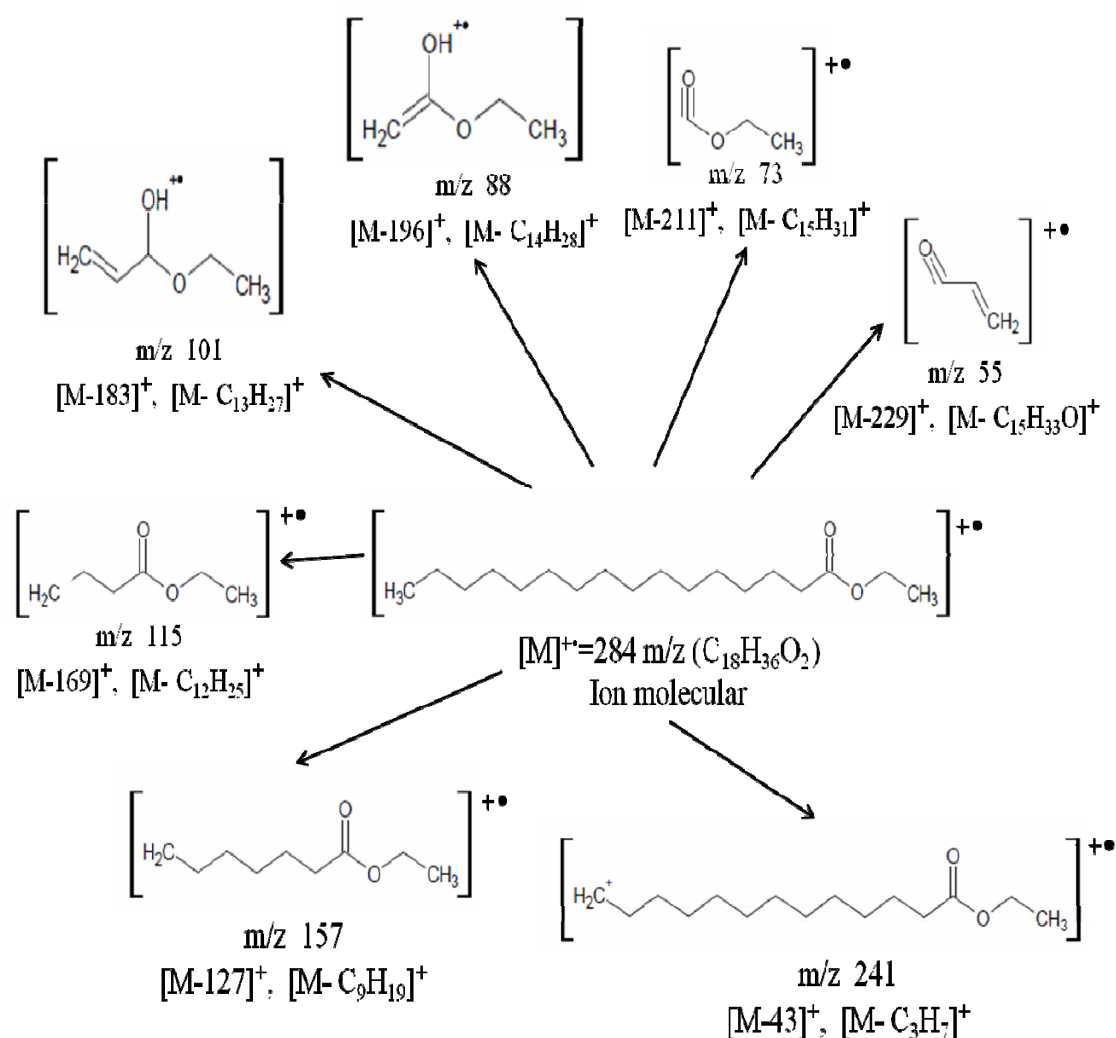


Figura 17: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido hexadecanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.

Análisis de RMN ^1H para la fracción FCT-3.4.6

En relación a la fracción FCT-3.4.6, el espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtenido, es muy parecido al de la fracción FCT-3.4.4, con pequeñas diferencias en cuanto al número de señales de protones presentes y al desplazamiento químico, tal como puede detallarse en la figura 18.

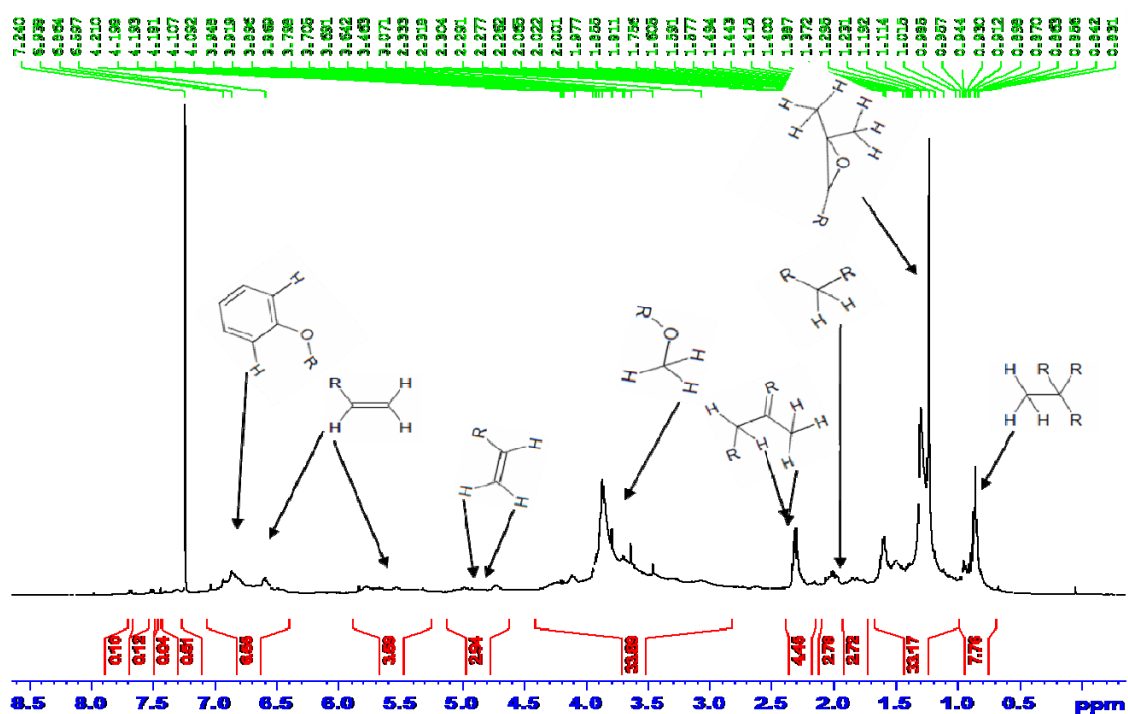


Figura 18: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la sub-fracción FCT-3.4.6, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.

En el espectro RMN ^1H de la fracción FCT-3.4.6, se observa la existencia de señales asignables a protones aromáticos y olefínicos entre $\delta = 4,7-6,9$ ppm; además a campo alto se encuentran señales correspondientes a grupos metilo y metileno ($\delta = 0,8-0,9$ y $1,7-2,4$ ppm respectivamente). Las señales entre $\delta = 6,5-6,9$ ppm sugiere la presencia de posibles compuestos fenólicos y posibles impurezas generadas por ésteres bencenodicarboxílicos. También se observan señales de protones en la zona entre $\delta = 3,1-4,2$ ppm que pueden ser asignables a grupos de protones metoxilo o protones unidos a carbonos enlazados a átomos muy electronegativos como oxígenos; y en la zona de campo alto entre $\delta = 1,2-1,3$ ppm una señal que puede corresponderse con protones

metilo terminales unidos a un átomo de carbono cercano a un grupo epóxido (Jaime, 2008; Castro & Bedoya, 2011).

Análisis de CG/EM de la fracción FCT-3.4.6

El análisis de CG/EM de la FCT-3.4.6, evidenció la abundancia de una mezcla de dos compuestos con TR de 33,190 y 33,194 minutos correspondientes con el éster etílico del ácido eicosanoico y el éster etílico del ácido undecanoico. También se observa un pico mayoritario con TR de 45,14 minutos el cual fue identificado como el éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico considerado como una impureza proveniente tal vez de la bomba de vacío. El cromatograma obtenido de la FCT-3.4.6 se presenta en la figura 19.

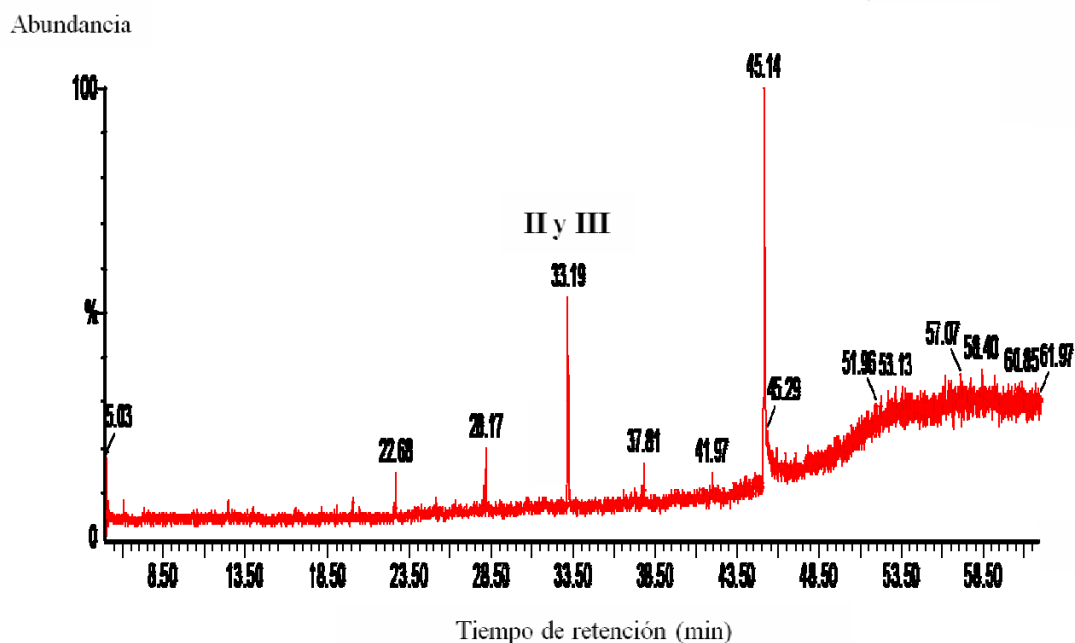


Figura 19: Cromatograma de gases obtenido del análisis por CG/EM de la sub-fracción FCT-3.4.6

Al analizar mediante espectrometría de masas la señal del cromatograma con TR de 33,19 minutos, se obtuvieron los espectros de masas para los compuestos II (33,190 min) y III (33,194 min), los cuales se pueden detallar en las figuras 20 y 22.

El análisis del segundo compuesto pico con TR de 33,190 min, presente en el

cromatograma de gases de la FCT-3.4.6, por espectrometría de masas, indica la presencia del éster etílico del ácido eicosanoico (ver figura 20). El éster etílico del ácido eicosanoico identificado no muestra la señal del ion molecular pero si exhibe una señal con relación m/z de 297 correspondiente con la pérdida de 43 unidades de masa, algo muy común en los ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, al comparar el espectro de masas almacenado en la base de datos del equipo NIST MS Search 2.0 (figura 20.b) con el espectro obtenido para la FCT-3.4.6 (figura 20.a), existe un 96 % de probabilidad de que éste sea el compuesto presente a este TR de 33,190 min.

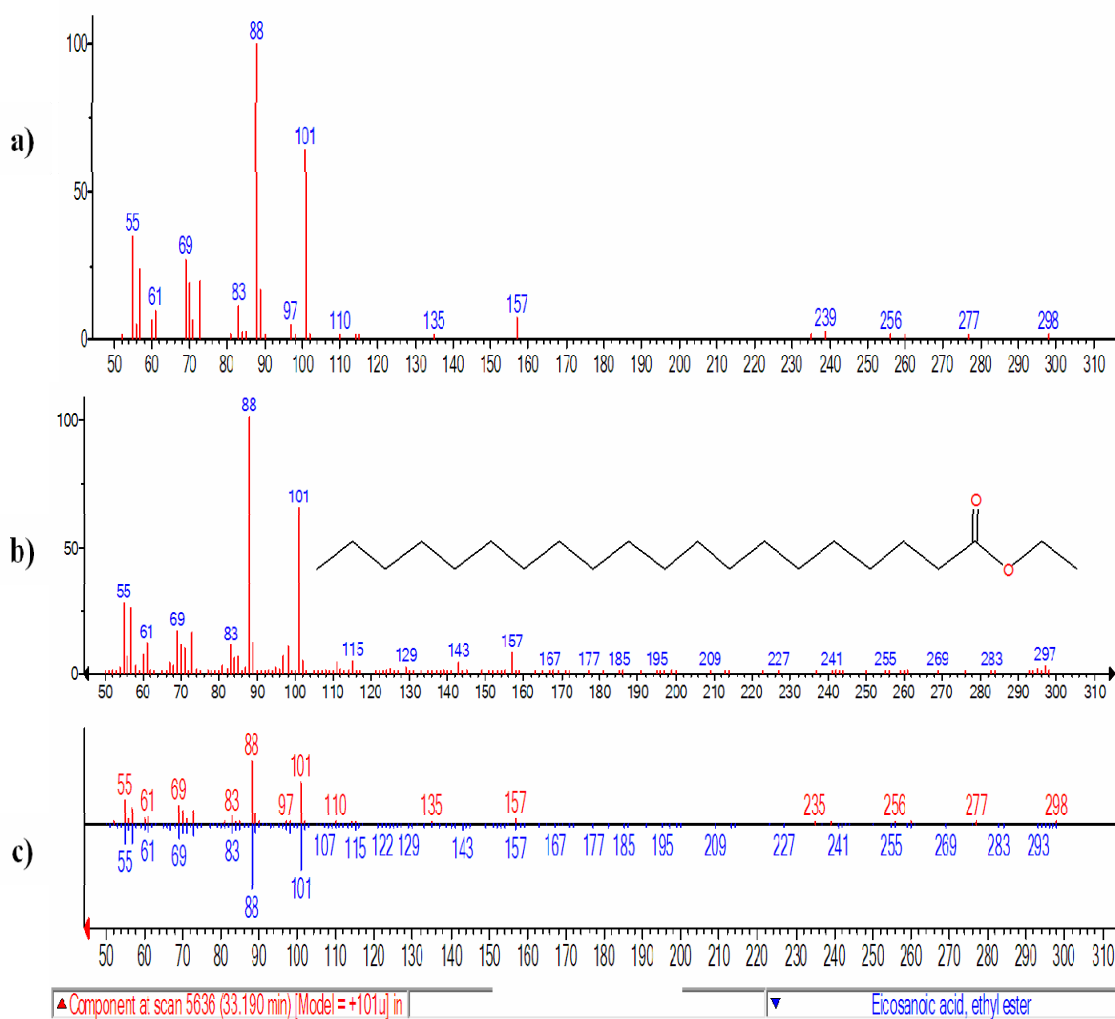


Figura 20: Espectros de masas de: a) compuesto denotado como II en el cromatograma de la fracción FCT-3.4.6, b) éster etílico del ácido eicosanoico obtenido de la librería del equipo (NIST MS Search 2.0) y c) comparación de ambos espectros para corroborar la identificación del éster como compuesto II.

De acuerdo con el espectro de masas obtenido, la pérdida de los fragmentos $-C_9H_{19}$, $-C_{16}H_{33}$ y $-C_{19}H_{35}$ generan las señales con relación m/z igual a 213, 115 y 101 unidades de masa, respectivamente. Similarmente, exhibe el pico base con una relación masa/carga de 88 uma, por la pérdida de un fragmento $-C_{18}H_{36}$ mediante un rearrreglo de MacLafferty, y los iones fragmentos de m/z 73 $[M - C_{19}H_{39}]^+$ y m/z 55 $[M - C_{19}H_{41}O]^+$ como señales características de los ésteres (ver figura 21).

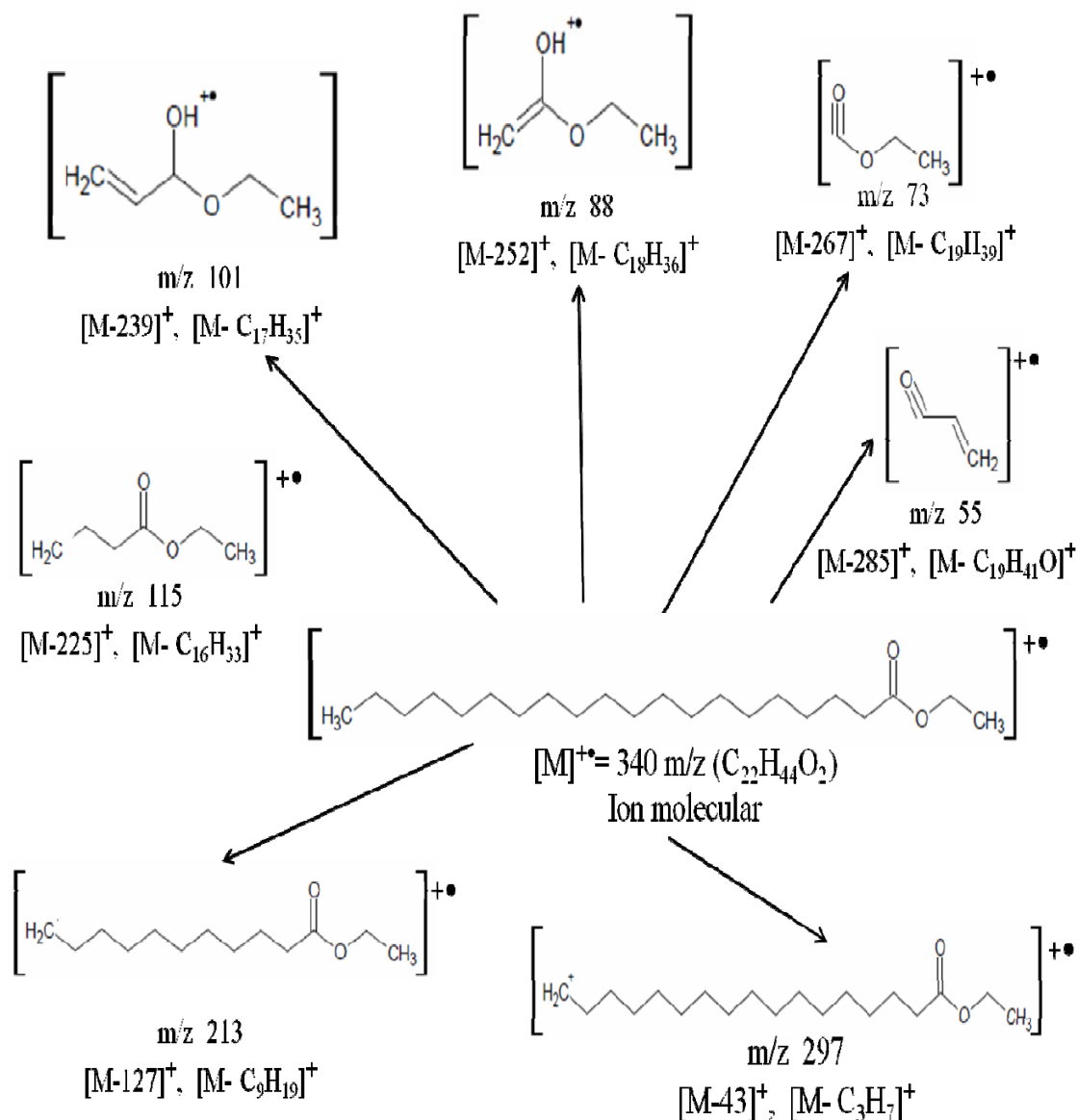


Figura 21: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido eicosanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.

Similarmente, para el compuesto denotado como III con TR de 33,194 min, se obtuvo el espectro de masas característico del éster etílico del ácido undecanoico (ver figura 22).

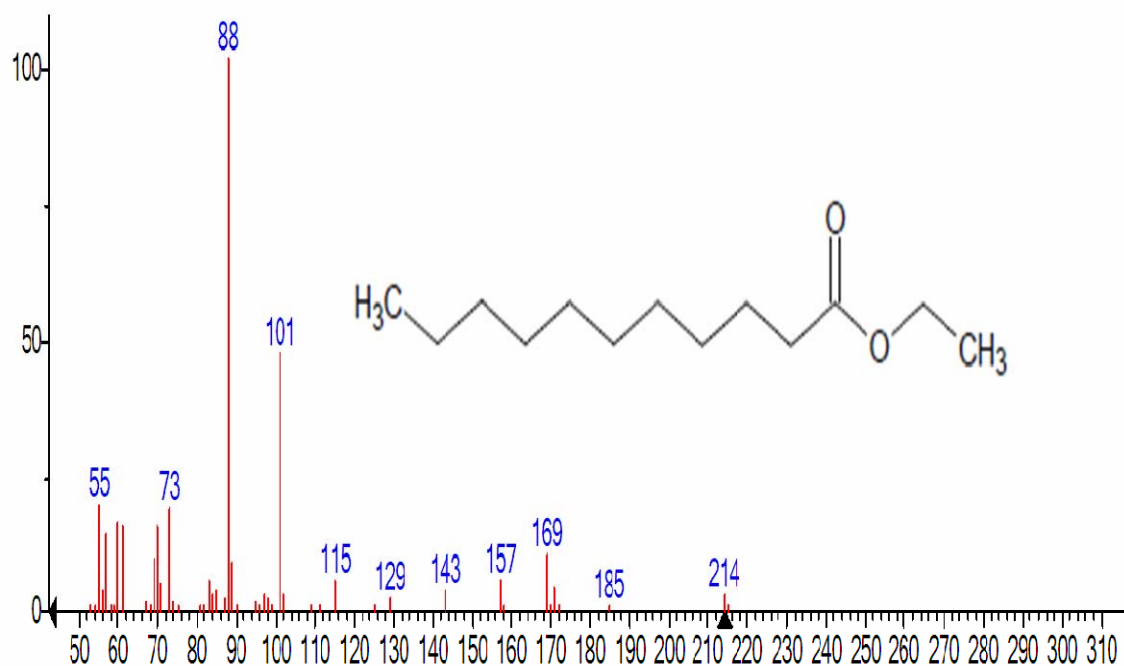


Figura 22: Espectro de masa del pico con TR de 33,194 min (denotado como III), identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0 como el éster etílico del ácido undecanoico.

El éster etílico del ácido undecanoico identificado en la FCT-3.4.6 exhibe siete señales de iones fragmentos características de este tipo de compuestos. Del ion molecular con relación m/z de 241 uma, se generan iones fragmentos producto de la pérdida de 43 unidades de masa y la pérdida de los fragmentos $-C_8H_{17}$ y $-C_7H_{15}$ que generan las señales de relaciones m/z igual a 171, 101 y 115 uma, respectivamente. El pico base se observa con una relación m/z de 88 uma, por la pérdida de un fragmento $-C_9H_{19}$ mediante un rearrreglo de Mac Lafferty, como una señal característica de los ésteres de ácidos grasos de cadena larga, al igual que los fragmentos con relación m/z de 73 y 55 uma.

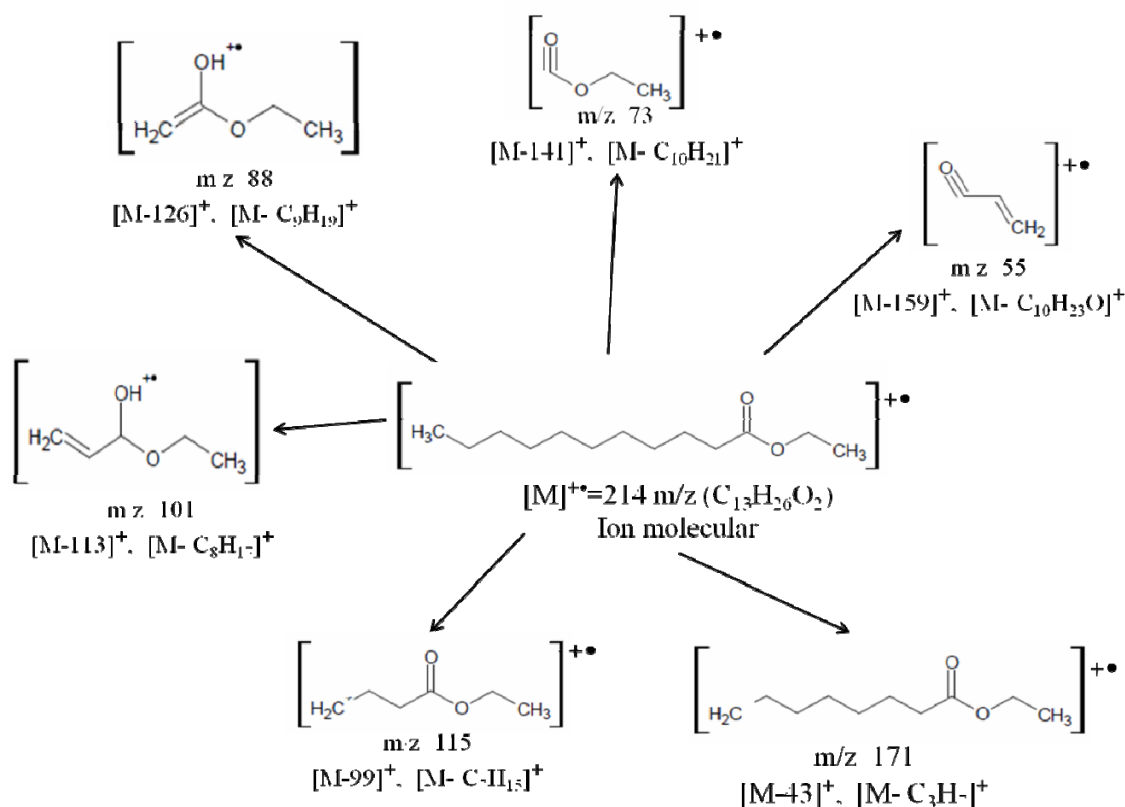


Figura 23: Patrón de fragmentación propuesto para el éster etílico del ácido undecanoico, de acuerdo a los picos de relación masa/carga observados en el espectro de masas.

Fraccionamiento cromatográfico de la FCT-4

A la fracción FCT-4 (0,1045 g), por su actividad antibacteriana y su rendimiento en masa, se le realizó una cromatografía de capa fina preparativa en cromatofolios de sílica gel (Merck) de 2 mm de espesor de 20 x 20 cm, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (2:1); obteniéndose 4 sub-fracciones FCT-4.1 a 4.4, con rendimientos mostrados a continuación.

Tabla 10: Rendimiento de las fracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico (CCFP) de la FCT-4 de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracción	Masa (g)
FCT-4.1	0,017
FCT-4.2	0,004
FCT-4.3	0,004
FCT-4.4	0,004

La cantidad de muestra recogida al final del proceso cromatográfico fue muy poca, representando un 27,75% de la muestra de partida. La sub-fracción FCT-4.1 fue sometida a análisis de RMN (^1H y ^{13}C) y CG/EM por ser la de mayor cantidad y al someterse a cromatografía de capa fina analítica su comportamiento indicaba cierto grado de pureza.

Análisis de RMN ^1H para la fracción FCT-4.1

El espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la fracción FCT-4.1, es muy similar a los espectros de las fracciones FCT-3.4.4 y FCT-3.4.6 mostrados anteriormente, con pequeñas diferencias en cuanto a la cantidad de protones presentes por señal, los valores de las integrales son menores en comparación con los valores de los espectros anteriores. Esto puede deberse a que las fracciones FCT-3.4.4 y FCT-3.4.6 provienen de un mismo fraccionamiento de la fracción FCT-3.4 y la fracción FCT-4.1 proviene de la separación por cromatografía de capa fina de la fracción FCT-4. En la figura 24, se muestra el espectro RMN ^1H de la fracción FCT-4.1.

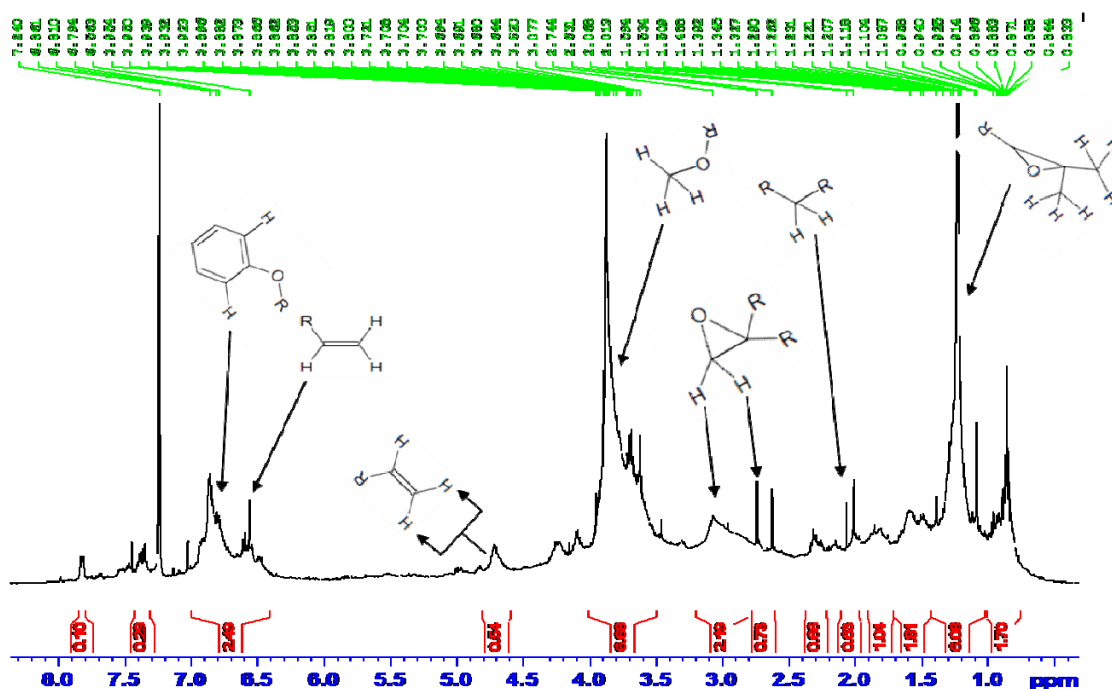


Figura 24: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la sub-fracción FCT-4.1, con indicación por estructuras químicas de los posibles grupos de protones presentes.

Después de analizar este espectro, se observa la presencia de protones olefínicos y aromáticos entre $\delta = 4,7-7,0$ ppm; las señales entre $\delta = 6,5-6,9$ ppm sugieren la presencia de posibles compuestos fenólicos e impurezas generadas por ésteres bencenodioxídicos, a campo alto se encuentran señales correspondientes con grupos metilo y metilenos ($\delta = 0,8-0,9$ y $1,7-2,3$ ppm).

Además una cantidad relativa de protones en la zona entre $\delta = 3,6-3,9$ ppm correspondientes con la presencia de grupos metoxilo. En la zona de campo alto entre $\delta = 1,2-1,3$ ppm una señal que puede corresponderse con protones metilo terminales unidos a un átomo de carbono cercano a un grupo epóxido; los cuales están en proporción similar a los protones de grupos metoxilo. También existen señales entre $2,6-3,1$ ppm correspondientes a grupos metileno unidos a carbonos de grupos epoxi (Jaime, 2008; Castro & Bedoya, 2011). Estas señales no permiten identificar un compuesto como tal, sin embargo los análisis por CG/EM, evidenciaron una mezcla compleja de compuestos presentes en la muestra.

Análisis de CG/EM para la fracción FCT-4.1

El análisis por CG/EM de la FCT-4.1 evidenció la abundancia de varios compuestos, algunos de los cuales fueron identificados como la 2,2,5-trimetil-3,4-hexanodiona (TR de 33,09; 37,72; 39,88, 41,98 y 43,98 min) y la 5-etildihidro-2(3H)-Furanona (TR de 49,62 min) conocida comercialmente como gamma-caprolactona. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 25.

La presencia de varias señales referidas a la 2,2,5-trimetil-3,4-hexanodiona, se debe a que este tipo de compuestos son el punto de partida para la formación de heterociclos pentagonales (Beyer & Walter, 1987; Weininger & Stermitz, 1988; McMurry, 2008), lo cual justifica en cierta medida la existencia de la gamma-caprolactona en esta muestra (Camean, 1995).

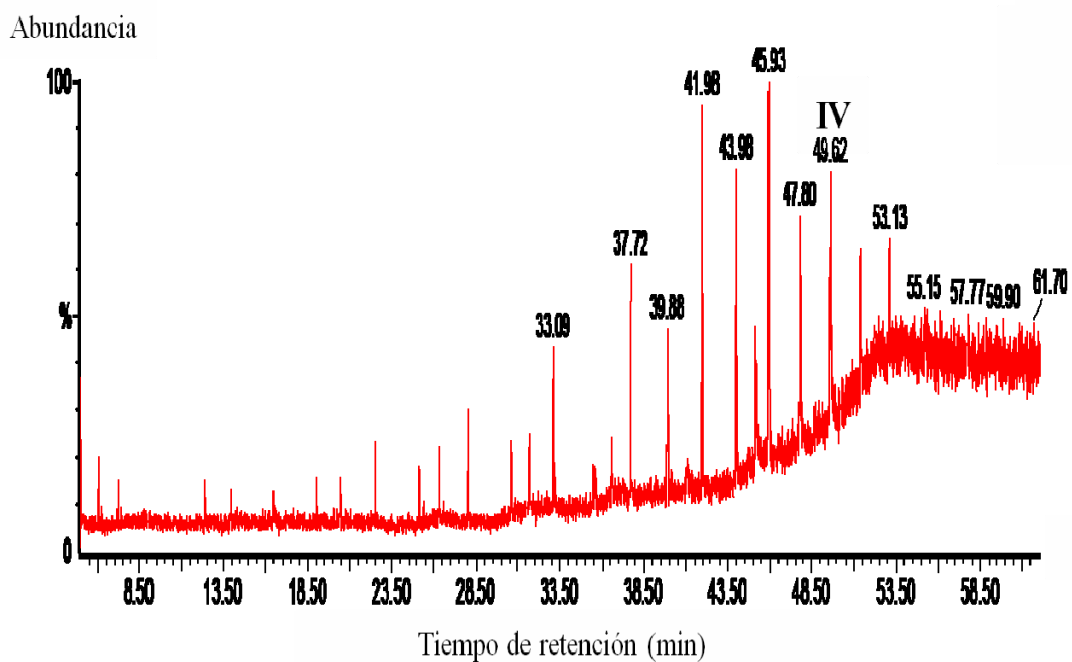


Figura 25: Análisis por CG/EM de la sub-fracción FCT-4.1

El análisis por EM del pico con TR de 49,62 minutos sugiere la existencia de la gamma-caprolactona, la cual es un componente del aroma de algunas flores y una feromona de insectos (Nuñez & Martín, 1990). Este compuesto fue identificado por comparación con la base de datos NIST MS Search 2.0 con una probabilidad de 82%, en la figura 26 se presenta el espectro de masas de dicho compuesto.

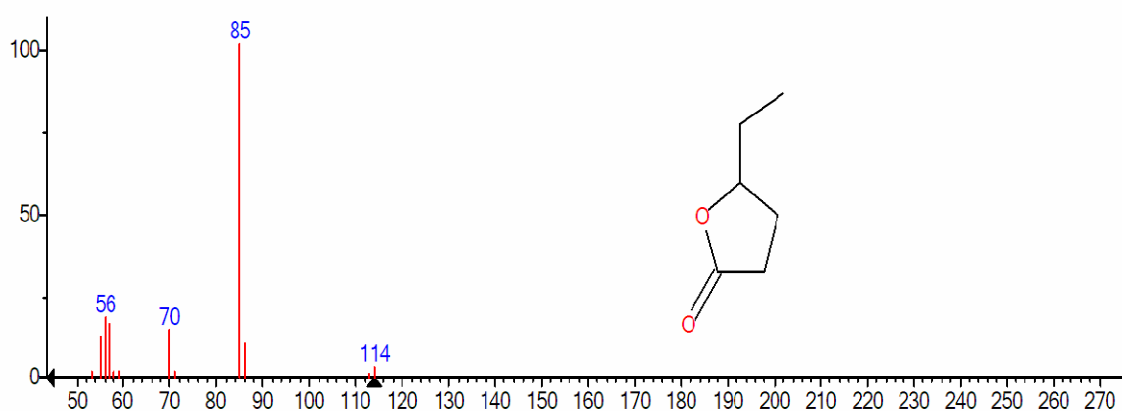


Figura 26: Espectro de masa del pico con TR de 49,62 min (denotado como IV), identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0 como gamma-caprolactona.

El espectro de masas de la gamma-caprolactona, muestra señal del ion molecular con relación m/z de 114. La pérdida de los fragmentos $-C_2H_5O$ y $-C_3H_6O$ generan señales con relación m/z de 70 y 56, respectivamente. El pico base tiene una relación m/z de 85, generado por la pérdida de un grupo etil $-C_2H_5$ de la gamma-caprolactona. Esta relación m/z de 85 es una señal característica de un rearrreglo propio de la butirolactona (m/z 86) por la pérdida de un protón. En la figura 27 se presentan los posibles iones fragmentos presentes en el espectro de masas de la gamma-caprolactona identificada.

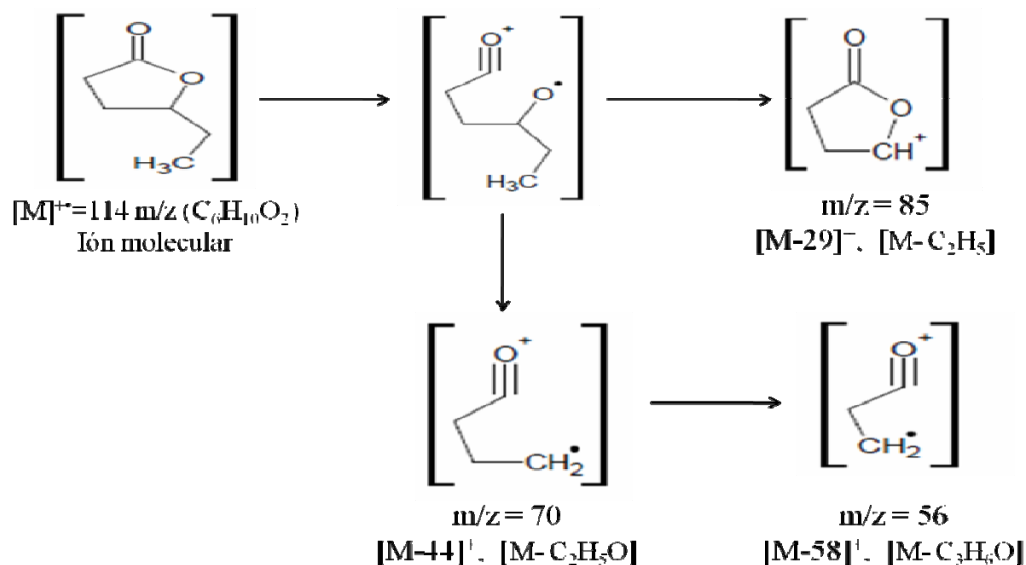


Figura 27: Patrón de fragmentación propuesto para la gamma-caprolactona identificada por comparación espectral con la base de datos NIST MS Search 2.0.

Cabe destacar que el espectro de masas de la gamma-caprolactona obtenida exhibe señales de m/z 56 y 85 que se corresponden en cierta medida con la fragmentación de butirolactonas, razón por la cual se muestra también el esquema de fragmentación de la gamma-butirolactona para observar en detalle la formación de dichos iones (ver figura 29).

Un espectro de masas característico para la gamma-butirolactona muestra los principales picos de iones fragmento con m/z 85, 56, 42, y 28, correspondiente a las pérdidas neutrales de 1, 30, 44, y 56 unidades de masa, respectivamente. De acuerdo a la estructura de este compuesto, según Martin (2004), las tres primeras pérdidas pueden ser por falta de un protón radical $\cdot H$, la pérdida de formaldehído ($H_2C=O$) y la salida de

CO₂. El ion con relación m/z 28 podría ser H₂•C – C⁺H₂ o CO⁺ o ambos, debido a que las escisiones posibles que presenta la gamma-butirolactona sin reordenamiento de cualquier átomo (ver figura 28), su formación puede ser bastante sencilla.

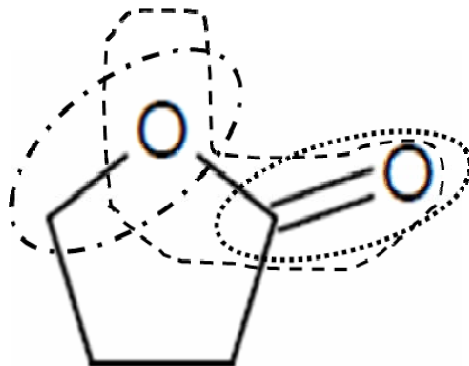


Figura 28: Escisiones posibles en la gamma-butirolactona (Martin, 2004).

Debido a que la gamma-butirolactona contiene un grupo carbonilo, la ionización inicial debe ocurrir por la pérdida de uno de los electrones n en el oxígeno del carbonilo. La escisión α a cada lado del grupo carbonilo (Figura 29) produce dos iones distónicos isoméricos que tienen la carga en el átomo de O-carbonilo (que tiene el sitio radical en el átomo de C- α , ruta a) y el otro con el sitio radical en el átomo de oxígeno del anillo (ruta b). Estos iones contienen cada uno grupos cuya pérdida superficial explica las fragmentaciones importantes.

El ion distónico formado por la ruta a, tiene el sitio radical en el átomo de C- α . Para justificar la pérdida de CO₂ de este ion, la carga debe ser movida desde el átomo de oxígeno a los átomos de carbono del anillo. Para llevar a cabo esta escisión heterolítica entre el átomo de C- γ y el átomo de oxígeno del anillo debe ser como se muestra en el lado izquierdo de la figura 29. Esto produce el ion con m/z 42, que a su vez puede perder •H para generar el ion alilo estabilizado por resonancia con m/z 41. Este comportamiento es típico de los iones que contienen sólo C y H.

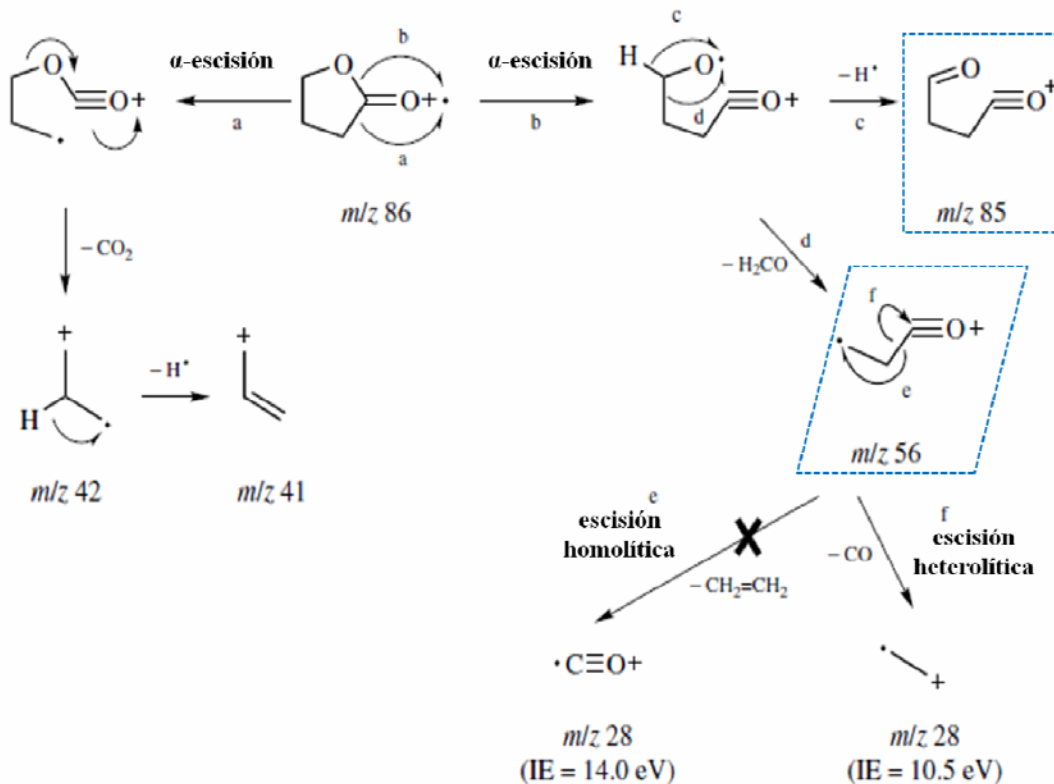


Figura 29: Patrón de fragmentación propuesto para la γ -butirolactona (Martin, 2004).

El ion distónico formado por la ruta b, figura 29, tiene dos opciones que son razonables. En primer lugar, la pérdida de $\cdot\text{H}$ del átomo de C- γ forma un nuevo enlace π C-O y produce el ion que tiene m/z 85 (ruta c). En la segunda opción, se pierde $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ a través de la escisión homolítica de la unión entre átomos de carbono beta y gamma, formando el ion con m/z 56 y un nuevo enlace π en la molécula por la expulsión de $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ (Figura 29, ruta d). Este ion resultante de m/z 56, a su vez, puede escindir el enlace entre el carbonilo y átomos de C- α ya sea homolíticamente o heterolíticamente para formar un fragmento con m/z 28. En el primer caso se forman etileno y $\text{CO}^{+\cdot}$ (Figura 29, ruta e), mientras que en el segundo caso se producen CO y $\text{H}_2\cdot\text{C} - \text{C}^+\text{H}_2$ (Figura 29, ruta f). Debido a que la energía de ionización (IE) del etileno es sustancialmente menor que la IE del CO, la regla de Stevenson predice que el CO y $\text{H}_2\cdot\text{C} - \text{C}^+\text{H}_2$ deben ser los que se forman, por lo que se descarta la escisión homolítica de la ruta e (Martin, 2004).

Fraccionamiento de la fracción en *ter*-butanol del EMT.

En el caso de la FTBT, para lograr la separación de sus componentes fue disuelta en mezclas de solventes (ver figura 13), pues de la FTBT precipitaron varios sólidos inactivos frente a las bacterias ensayadas por medio de la técnica del antibiograma, cuyos rendimientos en masa se muestran en la tabla 11. De estos sólidos sólo la fracción FTBT-2.1.2.2.1 obtenida después de varios procesos de purificación, fue sometida a análisis de RMN unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (COSY y HMQC), además de análisis de espectrometría de masas por electronebulización (ESI-MS) para determinar su masa molecular.

Tabla 11: Rendimiento de los sólidos obtenidos a partir de la FTBT de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Fracción	Solvente (v/v)	Masa (g)
FTBT-1	MeOH (100%)	2,009
FTBT-2.1.1	CHCl ₃ /MeOH (2:1)	4,029
FTBT-2.1.2	CHCl ₃ /MeOH (2:1)	4,067
FTBT-2.1.2.1	MeOH (100%)	0,336
FTBT-2.1.2.2.1	MeOH (100%)	0,134

Características físicas de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Los cristales translúcidos, denotados como FTBT-2.1.2.2.1, solubles únicamente en agua, no funden a temperaturas entre 40 – 600 °C, al ser observados al microscopio se nota que poseen una forma octaédrica irregular con tendencia a formar agregados de mayor tamaño a medida que transcurre el tiempo de cristalización.



Figura 30: Formas geométricas de los cristales denotados como FTBT-2.1.2.2.1

Análisis de RMN ^1H para la fracción FTBT-2.1.2.2.1

A la fracción FTBT-2.1.2.2.1 se le realizaron análisis de RMN, los resultados espectroscópicos son mostrados a continuación.

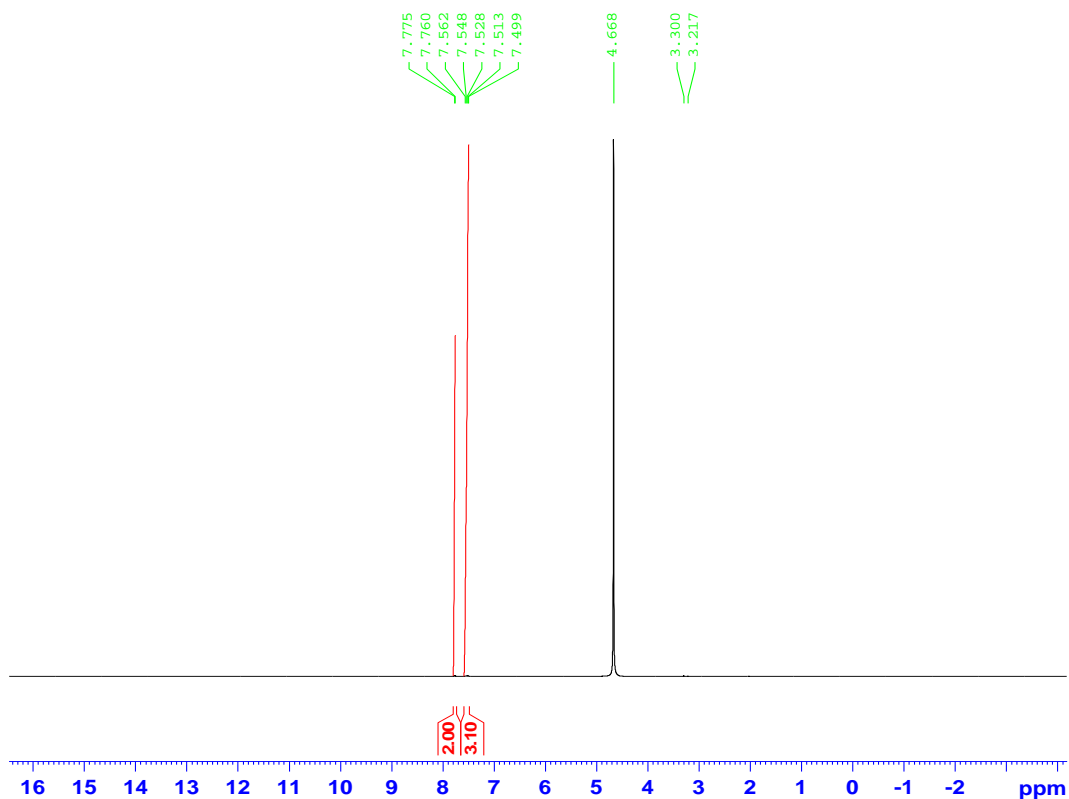


Figura 31: Espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

En el espectro de protones de la muestra FTBT-2.1.2.2.1 se puede observar la presencia de dos señales a campo bajo entre $\delta = 7-8$ ppm que integran para una relación de protones 2:3 y una señal muy intensa a $\delta = 4,6$ ppm que tal vez corresponda a la señal de restos de agua en el solvente. También se observan dos desplazamientos químicos entre $\delta = 3,2-3,3$ ppm, cuyas señales son muy pequeñas y las integrales no se observan. La ampliación de la región a campo bajo muestra tres señales a campo bajo (ver figura 32).

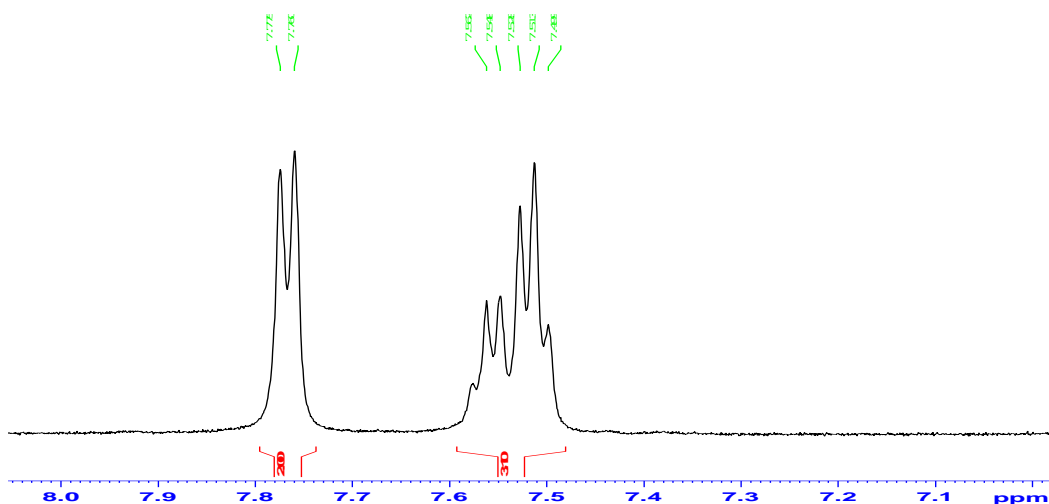


Figura 32: Ampliación de la región a campo bajo entre 7,1 y 8 ppm del espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

La ampliación del espectro de protones muestra las tres señales iniciales, un doblete a $\delta = 7,77$ ppm, un cuarteto a $\delta = 7,56$ ppm y un triplete a $\delta = 7,51$ ppm. Al calcularse las constantes de acoplamiento (J) de estas señales se determinó que el doblete a $\delta = 7,77$ ppm se acopla con el triplete a $\delta = 7,51$ ppm al tener valores de $J = 7,4$ Hz y $J = 7,5$ Hz respectivamente. El triplete y el cuarteto también están acoplados con una $J = 7,1$ Hz para ambas señales. Estos valores de estas constantes de acoplamiento confirman que el compuesto es de naturaleza aromática. De acuerdo con los desplazamientos observados en el espectro de RMN ^1H , se puede proponer una estructura similar a la del hidroxibenzotriazol, en el que los protones aromáticos aparecen a desplazamientos químicos de 7,43-8,10 ppm.

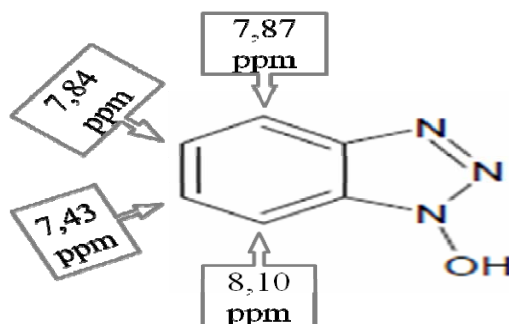


Figura 33: Estructura del hidroxibenzotriazol de acuerdo a su espectro de RMN ^1H tomado de la base de datos SDBS-1H (http://sdb.s.riodb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

Análisis de RMN ^{13}C para la fracción FTBT-2.1.2.2.1

En el espectro RMN ^{13}C , mostrado a continuación, se resaltan tres señales de carbono entre 125-131 ppm, correspondientes con átomos de carbono aromáticos. Esto concuerda con lo observado en el espectro de RMN ^1H , en el cual se observan señales asignables a protones aromáticos.

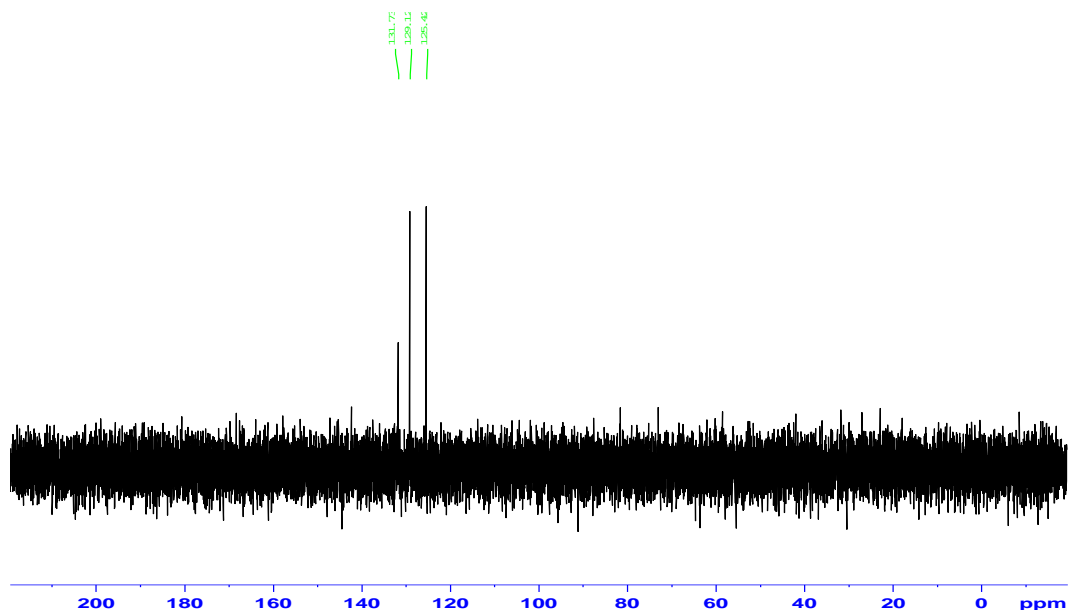


Figura 34: Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

De acuerdo con los desplazamientos observados en el espectro de RMN ^{13}C , se puede proponer una estructura similar a la del benzotriazol, en el que los átomos de carbono aromáticos aparecen a desplazamientos químicos de 114-139 ppm.

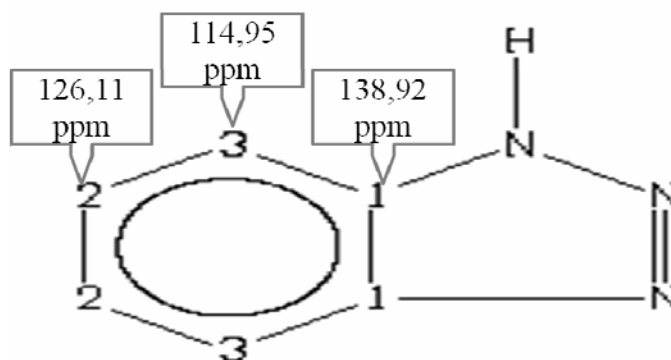


Figura 35: Estructura del benzotriazol de acuerdo a su espectro de RMN ^{13}C tomado de la base de datos SDBS- ^{13}C (http://sdfs.riodb.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

Análisis de RMN ^1H de correlación homonuclear COSY H-H de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Al analizar el resultado del experimento bidimensional de correlación de núcleos de protones para la muestra FTBT-2.1.2.2.1, pudo determinarse la correlación existente entre los protones de ambos grupos de señales de la región a campo bajo entre 7,1 y 8 ppm del espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) de dicha muestra. Similarmente, se observa que la intensa señal a $\delta = 4,67$ ppm se correlaciona entre sí misma y no tiene ningún tipo de relación con las señales de los posibles protones aromáticos presentes a campo bajo, lo que confirma que corresponde a restos de agua en el solvente (ver figura 36).

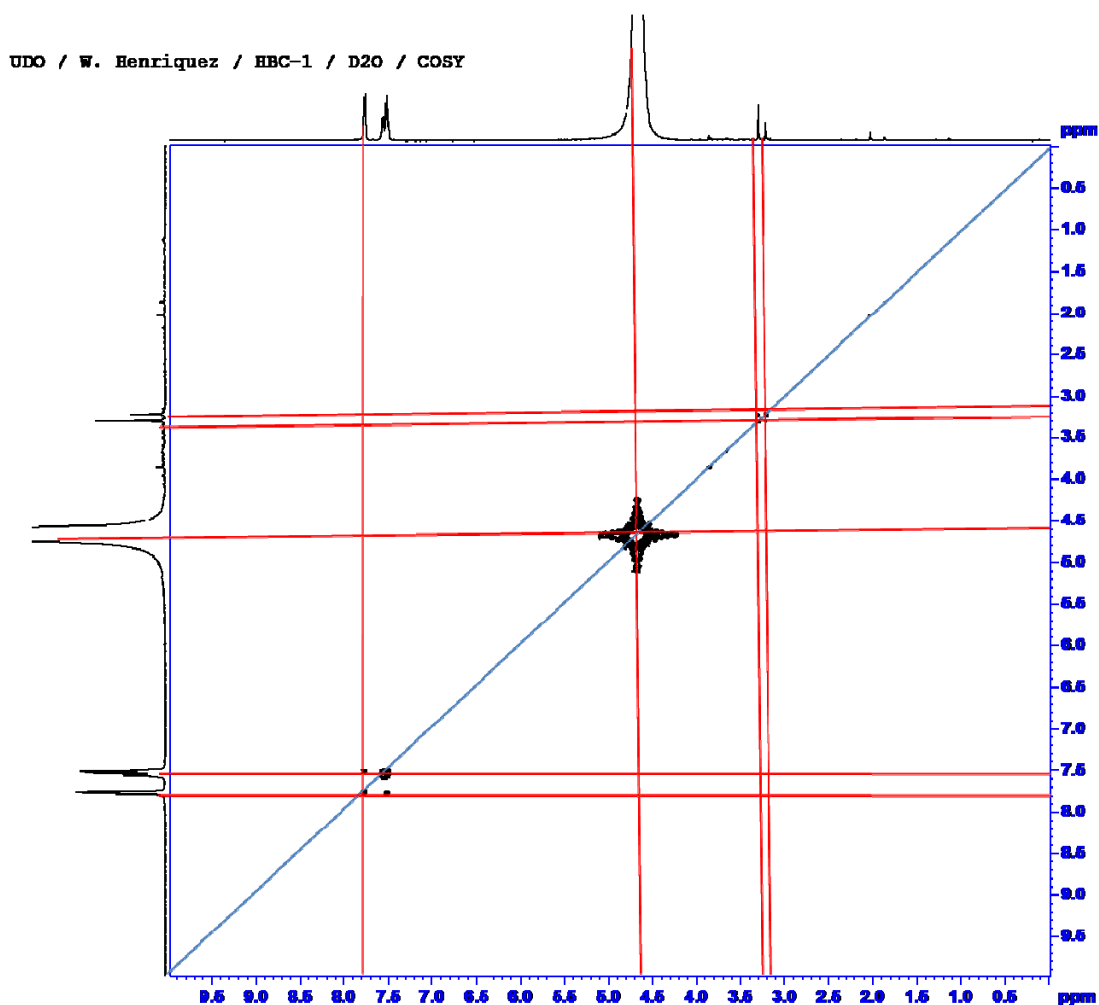


Figura 36: Espectro RMN ^1H de correlación homonuclear COSY H-H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Para observar de forma más detallada la correlación existente entre las señales de protones a campo bajo, se realizó la ampliación de la zona entre $\delta = 7,30$ - $7,95$ ppm del espectro RMN ^1H – COSY obtenido para la FTBT-2.1.2.2.1 (ver figura 37). El triplete con $\delta = 7,51$ ppm está correlacionado entre sí y, además, con el doblete a $7,77$ ppm. De igual manera, el doblete a $7,77$ ppm está relacionado entre sí y con las señales del triplete. Las señales del cuarteto con $\delta = 7,56$ ppm sólo se relacionan entre sí mismas y con las señales del triplete a $7,51$ ppm.

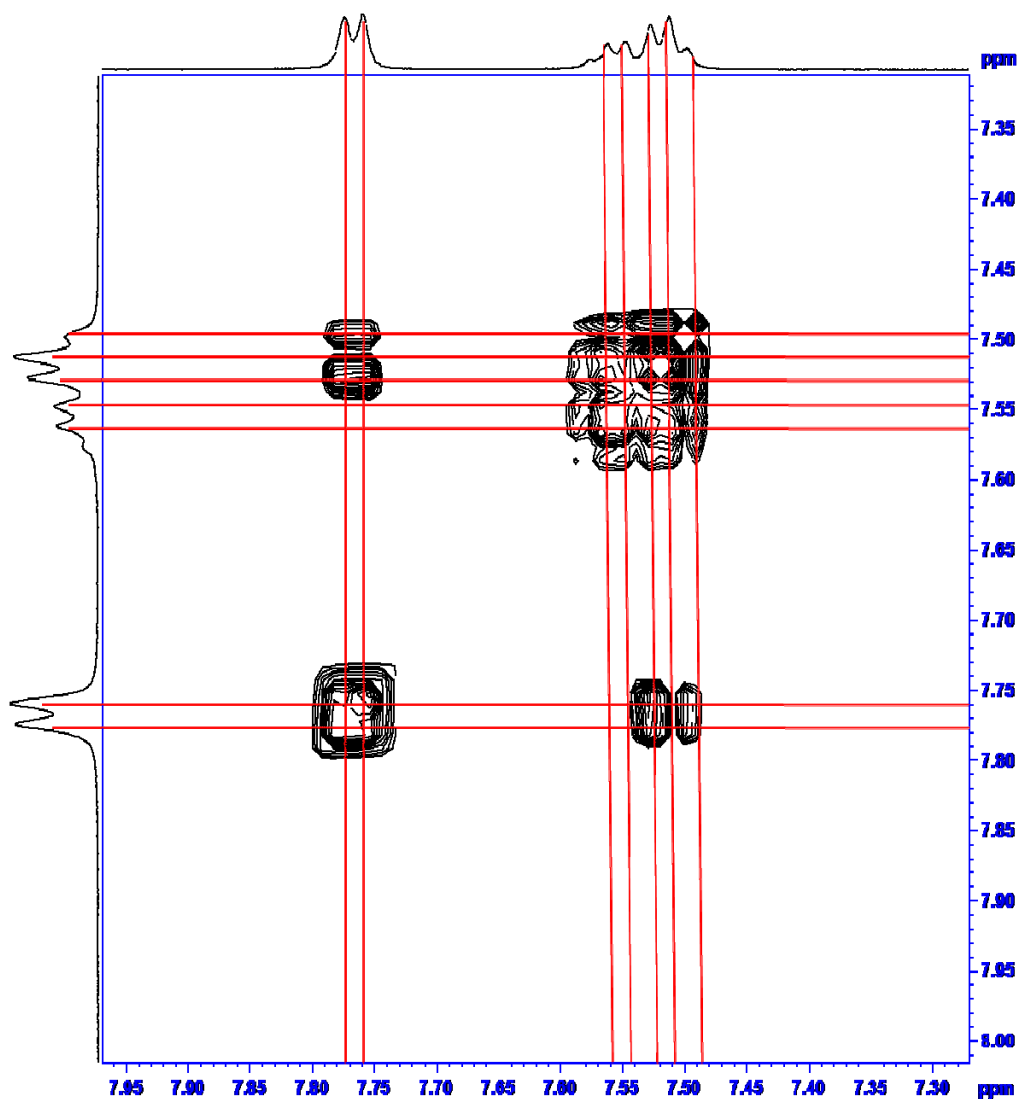


Figura 37: Ampliación de la región de $\delta = 7,30$ - $7,95$ ppm del espectro RMN COSY H-H (500 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Análisis RMN de correlación heteronuclear HMQC C-H a un enlace de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

El resultado de este experimento bidimensional de correlación heteronuclear C-H para la muestra FTBT-2.1.2.2.1, permitió determinar la correlación existente entre los protones de ambos grupos de señales de la región a campo bajo entre 7,1 y 8 ppm del espectro RMN ^1H (500 MHz, D_2O) y las señales de los átomos de carbono entre 123-140 ppm del espectro RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) de dicha muestra (ver figura 38).

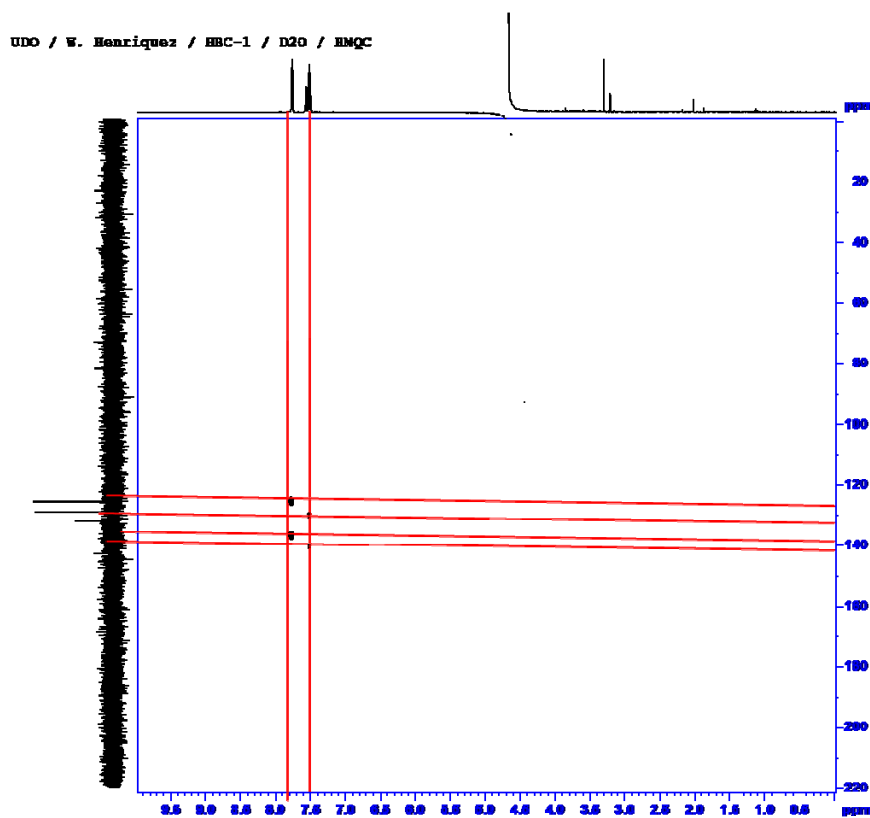


Figura 38: Espectro RMN de correlación heteronuclear C-H a un enlace HMQC (125 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Al ampliarse la zona de la correlación observada entre las señales de protones y carbonos, se observó con mayor detalle la relación heteronuclear (ver figura 39). Las señales de carbono con $\delta = 129,12$ y $131,73$ ppm no se relacionan con ninguna de las señales de protones presentes, razón por la cual puede suponerse que se trate de átomos de carbono aromáticos cuaternarios. La señal de los protones del doblete a $7,77$ ppm

están relacionadas con la señal de carbono con $\delta = 125,42$ ppm y con una señal con $\delta \approx 136,5$ ppm, la cual es muy pequeña en el espectro de RMN ^{13}C . Similarmente, los protones con $\delta = 7,51$ ppm están correlacionados con una señal de carbono a $\delta \approx 129,8$ ppm muy poco apreciable en el espectro de RMN ^{13}C . Las señales de protones del cuarteto con δ de 7,56 ppm no se correlacionan con ningún átomo de carbono presente en el espectro, razón por la cual puede suponerse que están enlazados a otro átomo, posiblemente nitrógeno.

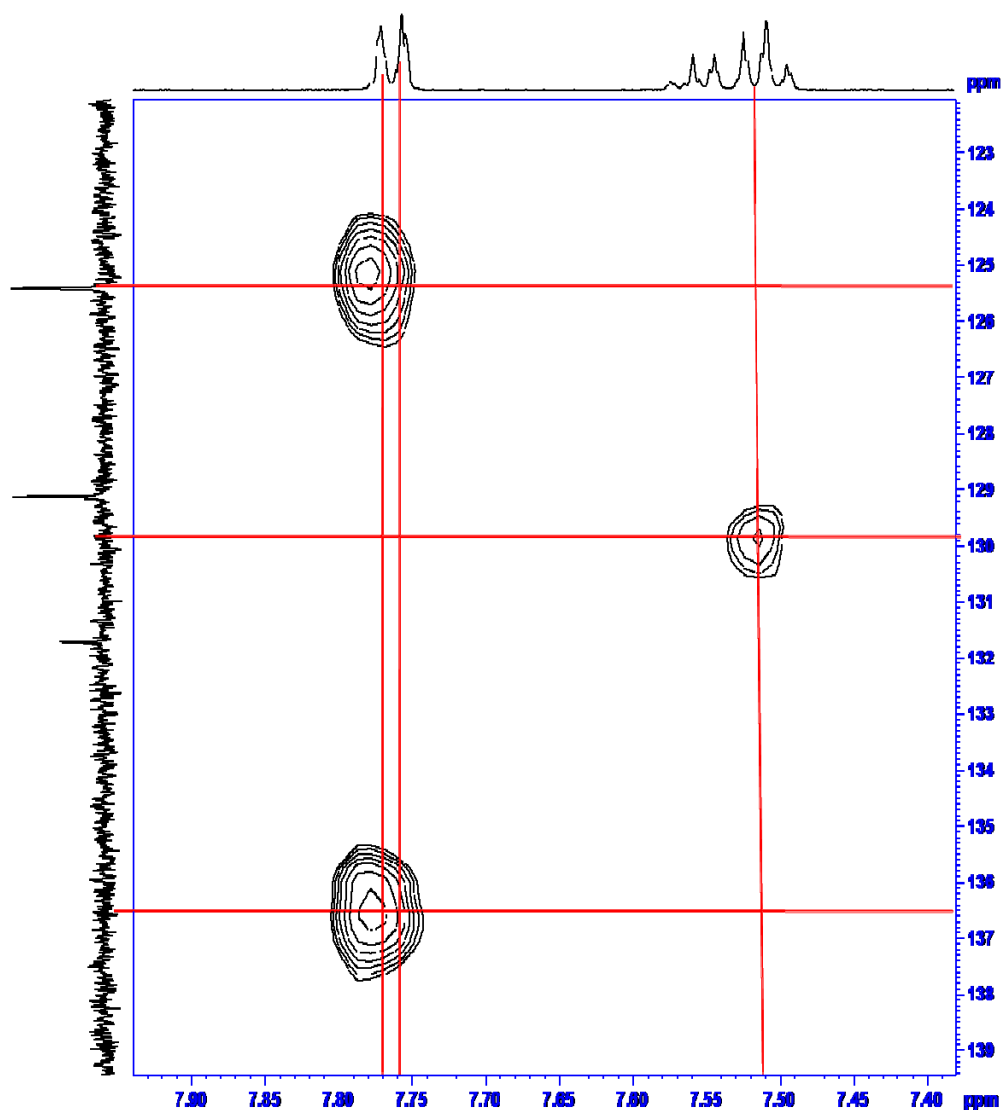


Figura 39: Ampliación de la región de $\delta = 7,30$ -7,95 ppm del espectro RMN de correlación heteronuclear C-H HMQC (125 MHz, D_2O) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Análisis de espectrometría de masas con electronebulización (ESI-MS) de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Este espectro presentó una serie de iones dentro de un rango de masas con relación m/z que van desde 100 hasta 1500 uma. Se observa la existencia de iones muy intensos con relación masa/carga de 567, 611, 655, 699, 743 y 787 separados entre sí por 44 uma. También se observa un ion de mediana intensidad con una relación m/z de 155,9 (ver figura 40).

Gustavo2 #488 RT: 7.60 AV: 1 NL: 8.32E5
T: + c ESI Q1MS [110.000-1500.000]

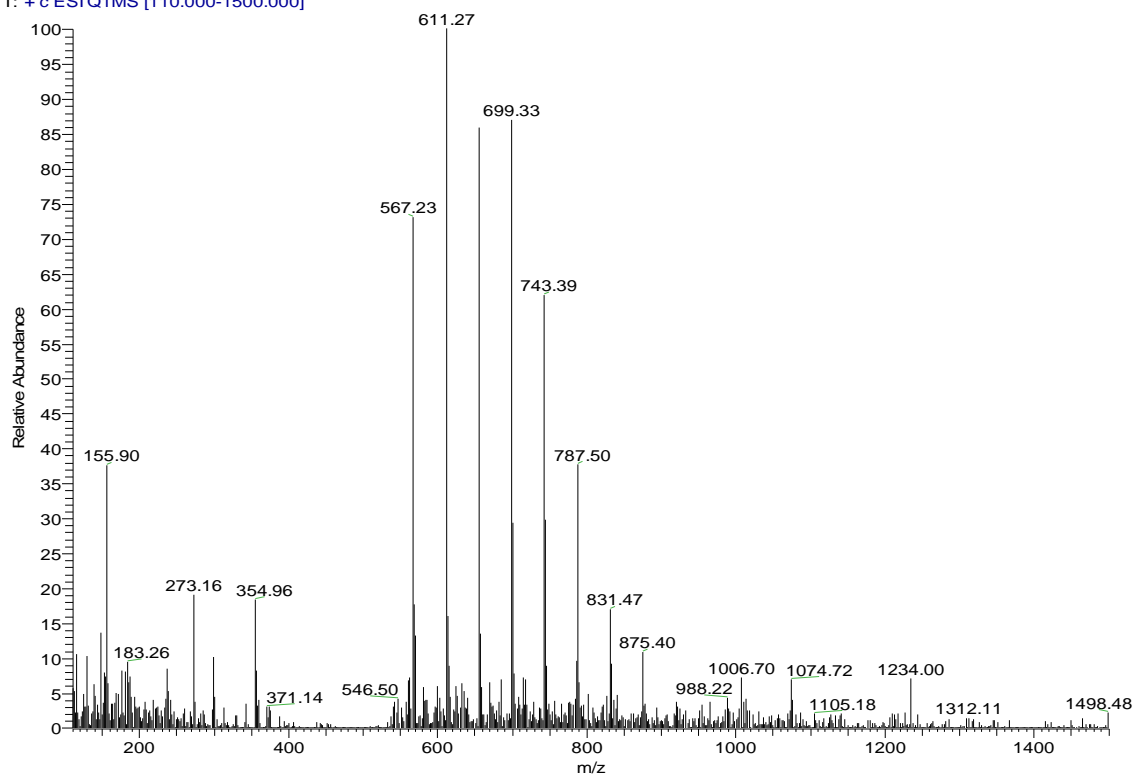


Figura 40: Espectro de masas ESI-MS de la fracción FTBT-2.1.2.2.1

Estructura propuesta para el compuesto de la FTBT-2.1.2.2.1

En concordancia con los resultados obtenidos por los métodos espectroscópicos y espectrométricos realizados a la muestra FTBT-2.1.2.2.1, se propone que la estructura del compuesto contiene un anillo aromático del tipo de los benzotriazoles y debido a que no fundió a las temperaturas ensayadas también puede sugerirse que sea una sal de algún benzotriazol (ver figura 41).

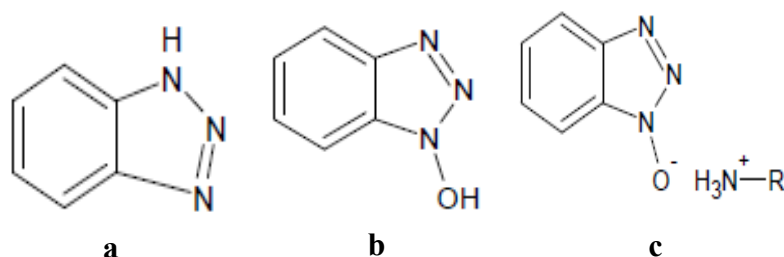


Figura 41: Posibles estructuras propuestas para el compuesto presente en la muestra FTBT-2.1.2.2.1 (a: benzotriazol, b: 1-hidroxibenzotriazol, c: sales de amonio y N-alquilamonio derivadas de 1-hidroxibenzotriazol)

Los benzotriazoles son compuestos heterocíclicos que contienen tres átomos de nitrógeno, con la fórmula química $C_6H_5N_3$, son compuestos polares y tienen carácter aromático, pueden ser utilizados en diversos campos. El benzotriazol ha sido conocido por su gran versatilidad; se ha utilizado como un mecanismo de contención en emulsiones fotográficas y como un reactivo para la determinación analítica de plata, ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor de corrosión en el ambiente y bajo el agua. Además de toda la aplicación mencionada anteriormente, los benzotriazoles se pueden utilizar como anticongelantes, calefacción y refrigeración, fluidos hidráulicos y así como también inhibidores de la fase de vapor (Sease, 1978).

De acuerdo con el trabajo de Matjaž (2010), el benzotriazol es un inhibidor eficaz de la corrosión del cobre y sus aleaciones mediante la prevención de reacciones superficiales indeseables. Se sabe que se forma una capa pasiva, que consiste de un complejo entre el cobre y el benzotriazol, cuando el cobre se sumerge en una solución que contiene benzotriazol. La capa pasiva es insoluble en muchas soluciones acuosas y orgánicas. Existe una correlación positiva entre el espesor de la capa pasiva y la eficacia de la prevención de la corrosión.

Por otra parte, según Raju *et al.* (2010), los derivados del benzotriazol tienen propiedades químicas y biológicas que son versátiles en la industria farmacéutica. Ciertos derivados de benzotriazol pueden actuar como agonistas para muchas proteínas. Por ejemplo, vorozol y alizaprida tienen propiedades inhibitoras contra las diferentes proteínas y ésteres de benzotriazol, ha sido reportado que funcionan

como un mecanismo basado en la inactivación de la proteínasa 3CL^{pro} o M^{pro} del síndrome respiratorio agudo severo (SARS, por sus siglas en inglés). La presencia de este tipo de compuestos en esta especie vegetal, la coloca como una fuente farmacológica potencial, además de realzar su uso medicinal para la tos e infecciones respiratorias y otros usos que puedan darse como anticongelantes, calefacción, refrigeración, etc.

Aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Wedelia calycina* L. C. Rich.

De acuerdo con los resultados, ver tabla 11, puede notarse que el aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich. se obtuvo en un bajo porcentaje de rendimiento en masa (0,025%), luego de la destilación por arrastre con vapor. Sin embargo, a pesar del bajo rendimiento, esta técnica permitió obtener el aceite esencial de las partes aéreas de la planta sin ser necesario el empleo de tecnología sofisticada.

Tabla 11: Rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Wedelia calycina* L. C. Rich.

PARÁMETRO	CANTIDAD OBTENIDA
Material vegetal procesado(g)	457,900
Componentes volátiles (g)	0,113
Rendimiento (% m/m)	0,025

Este porcentaje de rendimiento de 0,025% m/m obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de las partes aéreas de *Wedelia calycina* L.C. Rich., fue menor en comparación con el valor reportado por Buitrago (2012) de 0,045% m/m para el aceite esencial extraído de la misma especie vegetal a partir de hidrodestilación con trampa de Clevenger; lo cual debe estar relacionado con las diferencias en cuanto a los métodos de extracción empleados y al ambiente alrededor de cada planta, ya que en el trabajo de Buitrago (2012) la muestra vegetal fue colectada en el estado Barinas y la muestra analizada en este trabajo de investigación se colectó en el estado Sucre.

Análisis por CG/EM del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Wedelia calycina* L. C. Rich.

Luego de la destilación por arrastre con vapor, el aceite obtenido fue analizado por cromatografía de gases/espectrometría de masas para su caracterización, el cromatograma muestra la existencia de una mezcla compleja de constituyentes químicos, como se puede evidenciar en la figura 42.

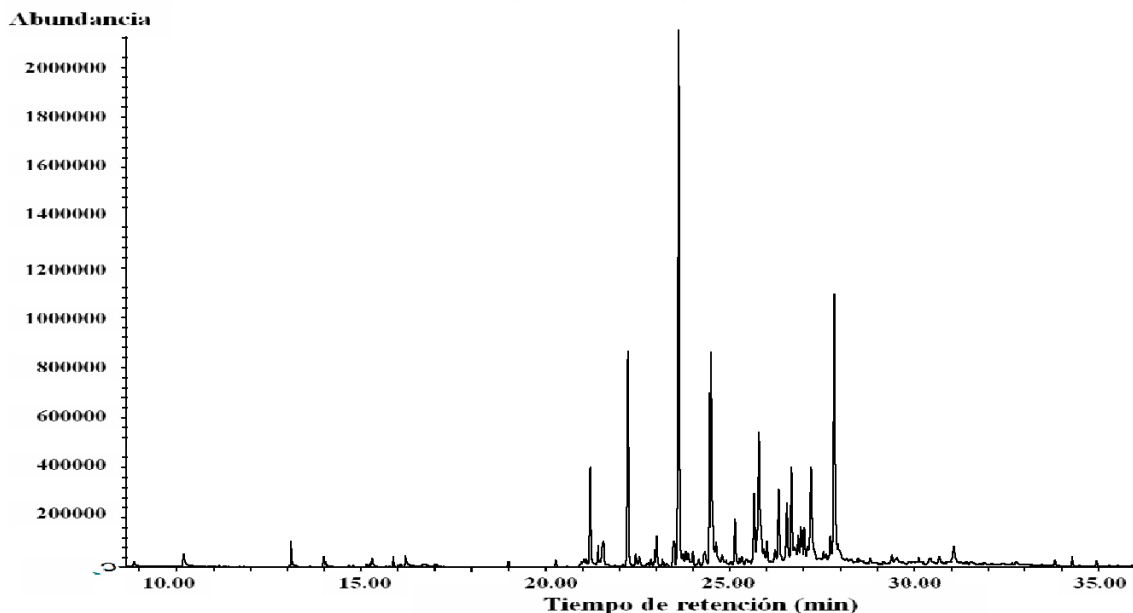


Figura 42: Cromatograma de gases del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

En el cromatograma (Figura 42), los componentes mayoritarios presentes eluyeron con tiempos de retención entre 20 y 30 minutos, observándose cinco picos mayoritarios. En la tabla 12, se muestran los resultados para los componentes mayoritarios en la muestra del aceite esencial analizada e identificados por la base de datos NIST05a.L y los índices de Kováts obtenidos luego de analizar la muestra por comparación con una mezcla de patrones estándar de *n*-alcanos (C8 a C22). Los índices de Kováts se definen de modo tal de asignar un valor de 100 veces el número de carbonos de cada uno de los hidrocarburos lineales. De esta forma, cuando se cromatografía una serie homóloga de *n*-hidrocarburos, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación está controlada fundamentalmente por las diferencias en la presión de vapor relacionada con los puntos de ebullición.

Tabla 12: Componentes del aceite esencial de *Wedelia calycina* L.C. Rich. identificado mediante análisis de CG/EM y por comparación con los patrones estándar de *n*-alcanos (C8 a C22).

Nº	%	TR	IR	Prob	Componente
1	0,08	8,939	928	90	Trans-Tujeno*
2	0,04	9,871	955	96	Benzaldehido*
3	0,05	10,352	973	91	Sabineno*
4	0,05	11,657	1015	97	α -terpineno*
5	0,05	11,877	1023	95	p-cimeno*
6	0,07	12,013	1042	91	β -felandreno*
7	0,83	13,153	1158	96	Cis- β -terpineol*
8	0,03	15,901	1160	91	Isoborneol*
9	0,95	16,222	1175	96	Terpinen-4-ol*
10	0,23	16,714	1195	94	Mirtenol*
11	0,15	17,011	1200	98	Verbenona*
12	0,08	17,308	1218	94	Carveol*
13	0,07	18,720	1273	98	felandral*
14	0,14	18,993	1280	98	Acetato de isobornilo*
15	0,24	20,287	1335	98	δ -elemene*♦
16	1,78	20,726	1355	98	Eugenol*
17	0,19	21,041	1365	98	Ciclosativeno*♦
18	2,51	21,249	1371	99	α -ylangeno*♦
19	1,24	21,587		95	(-)- β -elemene♦
20	8,66	22,299		64	3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propenil)- Triciclo[4.1.0.0(2,4)]heptano♦
21	2,09	23,035		89	alfa.-Cariofileno♦
22	0,89	23,522		99	γ -Muuroleno♦
23	8,83	23,670	1477	96	Germacreno D*♦
24	1,15	24,015		94	Biciclo[4.4.0]dec-1-eno, 2-isopropil-5-metil-9-metileno-
25	7,87	24,549		93	β -Sesquifelandreno♦
26	0,75	24,946	1545	95	α -calacoreno*♦
27	1,40	25,178		35	2-(2-Etil-1,3-dimetil-ciclopent-2-enil)-propan-2-ol
28	0,25	25,291	1560	91	α -nerolidol*
29	2,12	25,748		91	Espatuleno♦
30	4,65	25,860		42	1,4-Metanoazulen-7(1H)-ona, octahidro-4,8,8,9-tetrametil-, (+)-♦
31	2,44	26,407		64	4,4-Dimetil-3-(3-metilbut-3-enilideno)-2- metilenebiciclo[4.1.0]heptano♦
32	1,97	26,585		30	4-Pentiloxianilina
33	3,22	26,763		56	(-)-Espatuleno♦
34	1,04	26,917		58	(+)-3R-trans-Isolimoneno
35	1,12	27,077		52	Aromadendreno oxido-(2)
36	3,11	27,279		60	6-Isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol♦
37	1,02	27,321		14	2-metiltio-4-hidroxi-6-amino-Pirimidina

Tabla 12: Continuación.

Nº	%	TR	IR	Prob	Componente
38	1,11	27,784		64	8-hidroxi-endo-Cicloisolongifoleno♦
39	5,10	27,938		97	Oxido de cariofileno♦
40	2,78	27,962		35	2-Hidrazinopiridina
41	1,17	31,101		41	8,14-Cedranoxido
42	0,24	34,306	2030	99	Kaur-16-ene*
43	0,18	35,167	2144	90	Fitol*
44	0,03	38,158		86	Acido Kaur-16-en-18-oico, metiléster, (4.beta.)-

%: porcentaje del compuesto en el aceite; TR: tiempo de elución en minutos; IR: índice de retención; *Componentes registrados según el orden de elusión con sus respectivos índices de retención lineal experimentales, calculados en columna SE 52; ♦: compuestos sesquiterpenoides.

El aceite esencial obtenido de *Wedelia calycina* L.C. Rich, de acuerdo a su consistencia y composición química, es una esencia fluida, abundante en componentes sesquiterpenoides; 71,73% de su composición total; entre estos abundan, los sesquiterpenos hidrocarbonados (44,83% m/m) en comparación con los sesquiterpenoides oxigenados (26,90% m/m). Los monoterpenoides constituyen el 15,79% en masa del total, distribuidos entre compuestos hidrocarbonados (3,70% m/m), oxigenados (8,62% m/m) y aromáticos (3,47% m/m). El 12,41% en masa restante, lo componen compuestos alifáticos de baja masa molecular, algunos alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y ciertas aminas (ver tabla 13).

Tabla 13: Componentes identificados en el aceite esencial de *Wedelia calycina* L.C. Rich., agrupados por familias de compuestos.

Grupo	% en el aceite (% m/m)	
	Hidrocarbonados	3,70
Monoterpenos	Oxigenados	8,62
	Aromáticos	3,47
Sesquiterpenos	Hidrocarbonados	44,83
	Oxigenados	26,90
Otros compuestos		12,41
Total		99,93

El análisis por CG/EM reveló la presencia de 44 componentes, identificados por la base de datos del equipo NIST05a.L, 23 de estos fueron reconocidos por sus índices de

retención experimentales luego de analizar y comparar los resultados obtenidos para la muestra del aceite con los resultados de una mezcla de *n*-alcanos (C8 a C22) bajo las mismas condiciones experimentales, los cuales representan el 17,79% m/m. El aceite esencial está constituido mayormente por sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados, tales como germacreno D (8,83%), 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano (8,66%), β -Sesquifelandreno (7,87%) y óxido de cariofileno (5,10%), los cuales pueden ser observados por la intensidad de sus señales en el cromatograma de gases (Ver figura 43).

En concordancia con esto, el trabajo de Buitrago (2012) para esta especie vegetal, colectada en la población de Calderas-estado Barinas, muestra que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas, empleando la trampa de Clevenger, está conformado mayoritariamente (95,88%) de compuestos sesquiterpénicos; siendo germacreno-D (49,48%), β -cariofileno (23,94%), cadina-1,4-dieno (4,56%) y fonenol (3,94%) los principales compuestos identificados.

Al comparar dichos resultados de la especie colectada en los llanos venezolanos con la colectada en el oriente del país (objeto de estudio de esta investigación), puede decirse que ambas muestras están compuestas mayoritariamente por compuestos sesquiterpénicos tanto hidrocarbonados como oxigenados y de éstos el germacreno D es el componente más abundante. No obstante, el método de obtención de cada aceite esencial fue diferente, generando una diferencia notable en su composición, el aceite obtenido por hidrodestilación Clevenger sólo contiene sesquiterpenos mientras que el aceite obtenido por destilación de arrastre con vapor contiene monoterpenos hidrocarbonados, oxigenados y aromáticos además de compuestos sesquiterpénicos y compuestos alifáticos de baja masa molecular, como algunos alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y ciertas aminas.

Estas diferencias en la composición de ambos aceites obtenidos a partir de la misma especie vegetal pueden deberse a las condiciones ambientales de los sitios de recolección, ya que una fue colectada en la zona de los llanos venezolanos y la otra (objeto de nuestro estudio) provino de la zona oriental del país. Los métodos de extracción fueron diferentes, lo cual pudo también ejercer cierta influencia sobre la falta

de compuestos monoterpénicos y de baja masa molecular en el aceite de la muestra de los llanos.

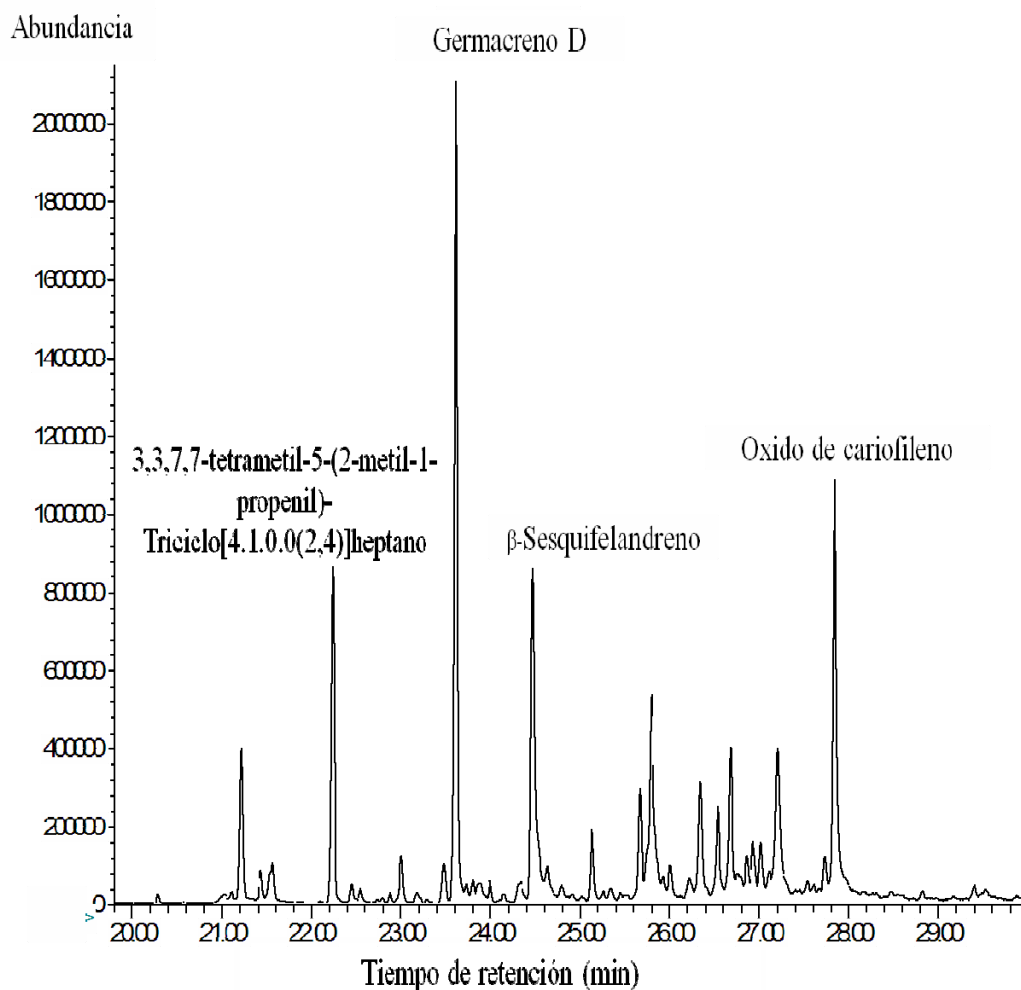


Figura 43: Ampliación de la región entre los 20 y 29 minutos del cromatograma de gases del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Análisis del espectro de masas del pico con TR de 23,670 minutos, identificado como germacreno D.

La señal más abundante del espectro de masas del germacreno D (pico base) aparece a una relación m/z de 161, en este sentido Schmidt *et al* (1999) demostraron que el fragmento de relación m/z 161 es generado por la pérdida de un radical isopropilo (m/z 43) del ion molecular (m/z 204).

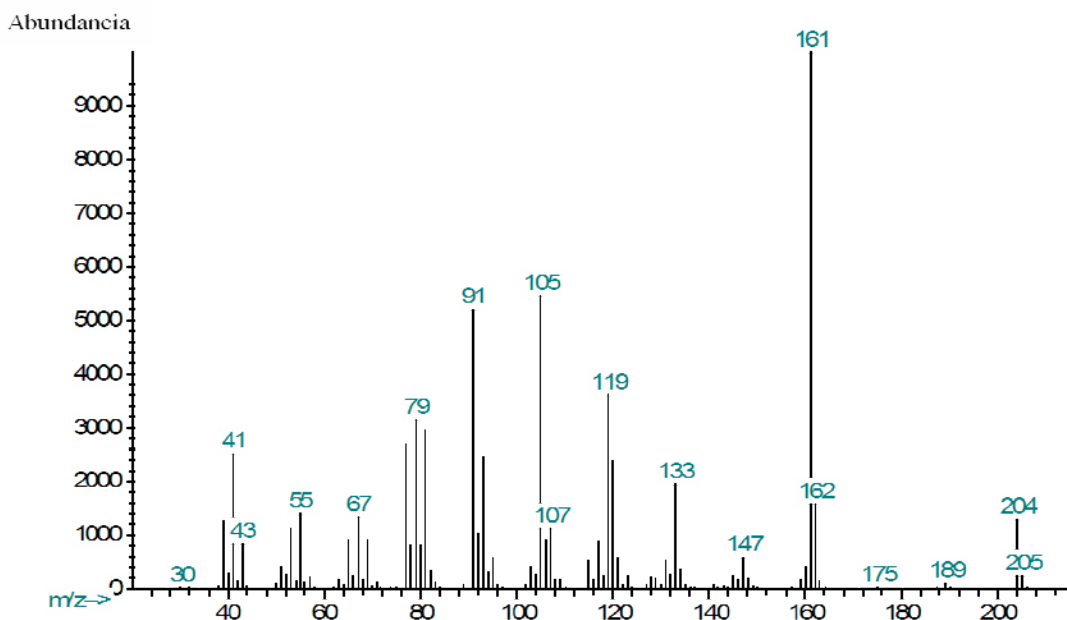


Figura 44: Espectro de masa del pico con TR de 23,670 minutos, identificado con una probabilidad de 96% como germacreno D.

De acuerdo con esto, es razonable suponer que la pérdida del residuo isopropilo probablemente se produce por una escisión alfa, como se sugiere en la figura 45, ruta a. El fragmento con relación m/z 189 surge por la pérdida de 15 unidades de masa del ion molecular atribuible a la eliminación de un grupo metilo radical (Figura 45, ruta b). Una fragmentación del ion de m/z 161 conduce a un ion con m/z 133, consistente con el mecanismo propuesto en la figura 45, ruta d, que implica pérdida neutral de C_2H_4 . La descomposición del ion con m/z 133 da iones abundantes con m/z 105 (pérdida de C_2H_4) y 91 (pérdida de C_3H_6 , atribuible probablemente a un catión tropilio). La figura 45, ruta e, proporciona una posible degradación que explica la formación de un ion con m/z 119 a partir del ion con relación m/z 161, por pérdida de C_3H_6 ; una fragmentación sucesiva del ion con relación m/z 119 produce mayor rendimiento de un ion con m/z 91 (probable ion tropilio) por pérdida de C_2H_4 . La disociación del ion con m/z 189 da un ion con m/z 147 (pérdida de 42 unidades de masa), figura 45, ruta f, proporciona un posible mecanismo que es consistente con estas observaciones. Una fragmentación del ion con m/z 147 da lugar a iones de m/z 119 (Figura 45, ruta g), 105 (pérdida de C_3H_6) y 91.

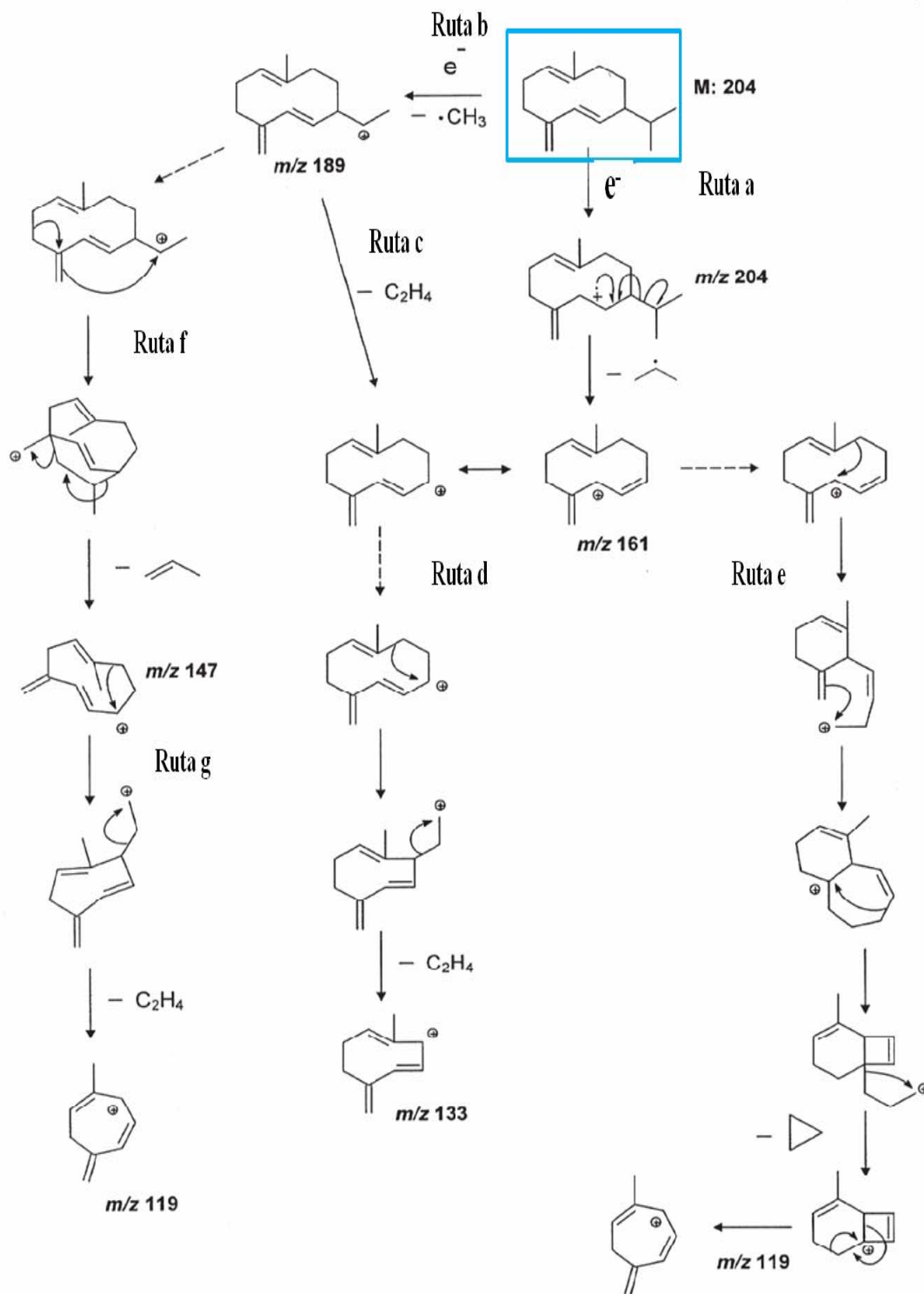


Figura 45: Patrón de fragmentación propuesto para el germacreno D (Schmidt *et al*, 1999).

Análisis del espectro de masas del pico con TR de 22,299 minutos, identificado como 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano.

Similarmente, en el espectro de masas del 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano (Figura 45) la señal más intensa tiene una relación m/z de 161 generado por la pérdida de un radical isopropilo del ion molecular. También se encuentran señales con relación m/z de 189, 147, 133,119, 105 y 91 presentes en el espectro de masas del germacreno D, lo cual se corresponde con los compuestos sesquiterpenoides.

Abundancia

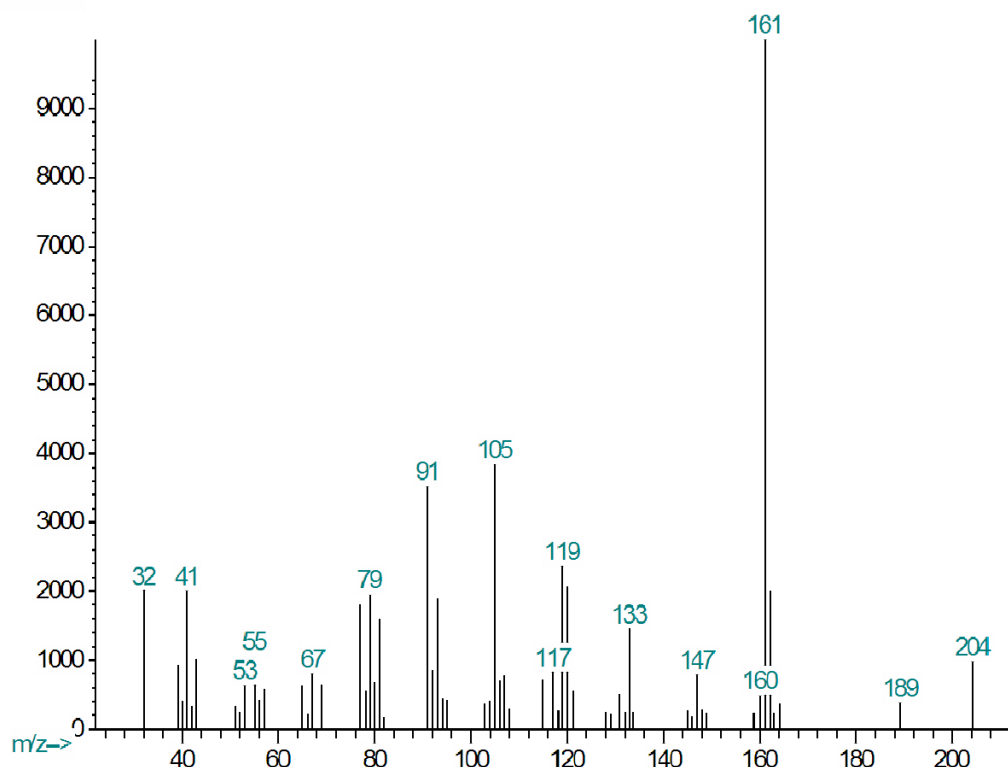


Figura 46: Espectro de masa del compuesto identificado como 3,3,7,7-tetrametil -5- (2-metil-1-propeniltricyclo[4.1.0.0 (2,4)] heptano, en el pico con TR de 22,299 min.

Este sesquiterpeno, identificado por la base de datos del equipo, no tiene una estructura sesquiterpenoide común pero exhibe iones fragmentos característicos de este tipo de compuestos, razón por la cual se propone un patrón de fragmentación de acuerdo con el espectro de masas obtenido, donde los iones fragmentos de $[C_{14}H_{21}]^+$ (m/z 189),

$[C_{12}H_{17}]^+$ (m/z 161), $[C_9H_{11}]^+$ (m/z 119), $[C_8H_9]^+$ (m/z 105) y $[C_7H_7]^{+•}$ (m/z 91) son originados por la pérdida de cadenas hidrocarbonadas con relación m/z de 15, 43, 85, 99 y 113 respectivamente.

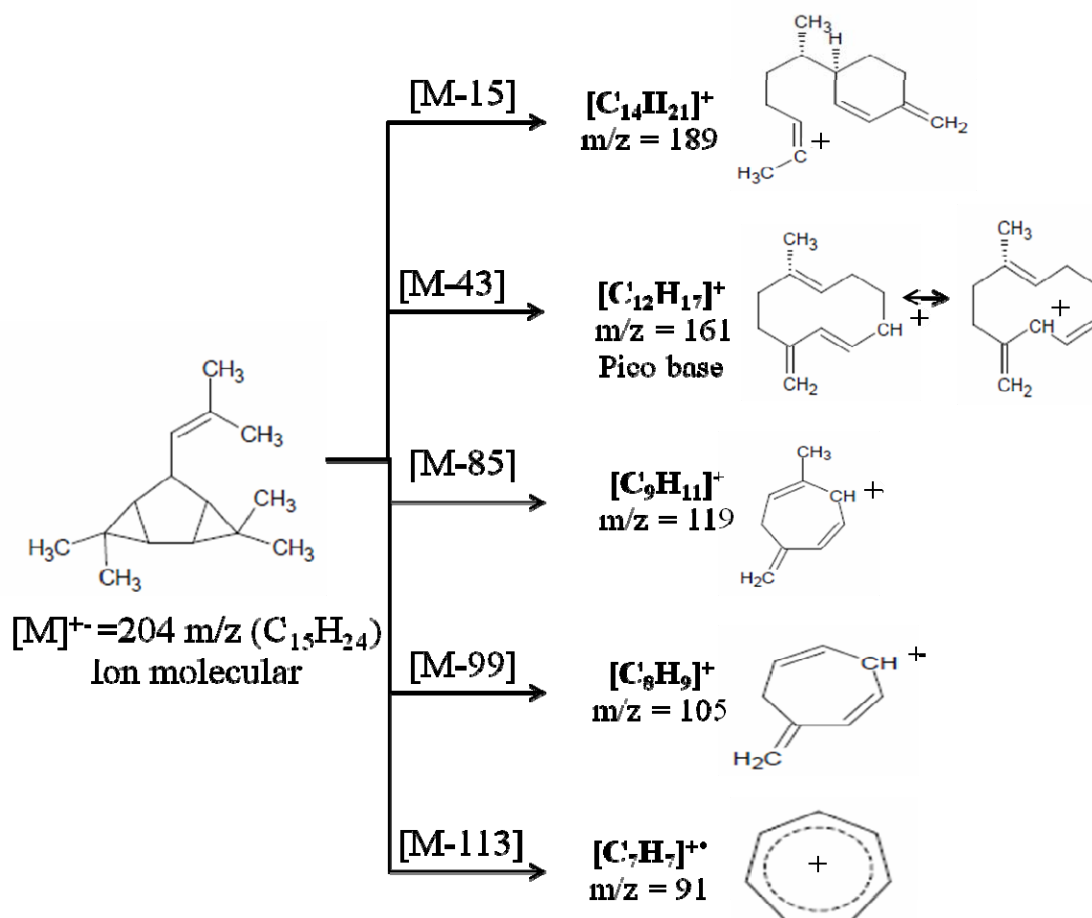


Figura 47: Patrón de fragmentación propuesto para el 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propenil)tricyclo[4.1.0.0(2,4)]heptano identificado por la base de datos NIST MS Search 2.0.

Análisis del espectro de masas del pico con TR de 24,549 minutos identificado como β -Sesquifelandreno.

El espectro de masas del β -Sesquifelandreno, muestra señales intensas de relación m/z 41, 69, 77, 91, 105, 119, 133, 161 y 204, siendo esta última señal la correspondiente al ion molecular del compuesto.

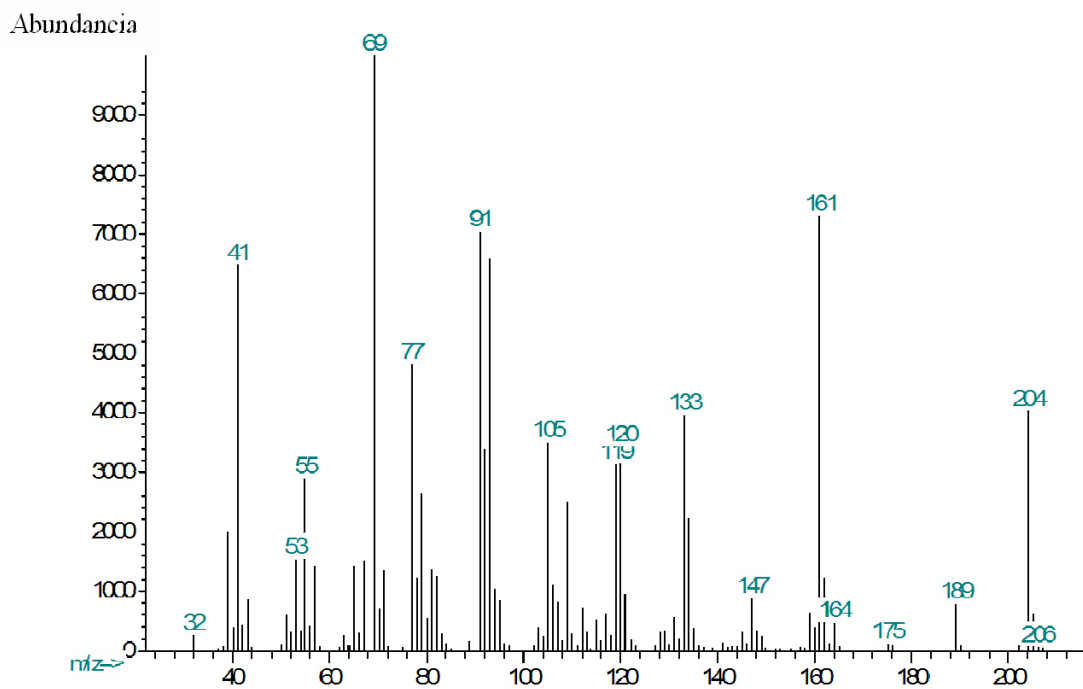


Figura 48: Espectro de masa del compuesto identificado como β -Sesquifelandreno, en el pico con TR de 24,549 min.

En concordancia con esto, el patrón de fragmentación que se propone para el β – Sesquifelandreno comprende en un principio la pérdida de un metilo para originar el fragmento $[C_{14}H_{21}]^+$ con relación m/z 189. El pico base con relación m/z de 161 se origina por el rearrreglo de la molécula al perder un radical isopropilo el cual es doblemente estabilizado por resonancia. Los iones fragmentos $[C_{10}H_{13}]^+$, $[C_9H_{11}]^+$ y $[C_8H_9]^+$ se originan por la pérdida de 71, 85 y 99 unidades de masa, respectivamente. La degradación sucesiva del ion $[C_9H_{11}]^+$ genera los cationes tropilio (m/z 91) y fenilo (m/z 77). La pérdida de 135 unidades de masa del ion molecular origina dos posibles formas catiónicas del isopreno (m/z 69) y la fragmentación sucesiva de ellas genera un catión propenilo $[C_3H_5]^+$, las estructuras de estos iones fragmentos se pueden detallar en la figura 49.

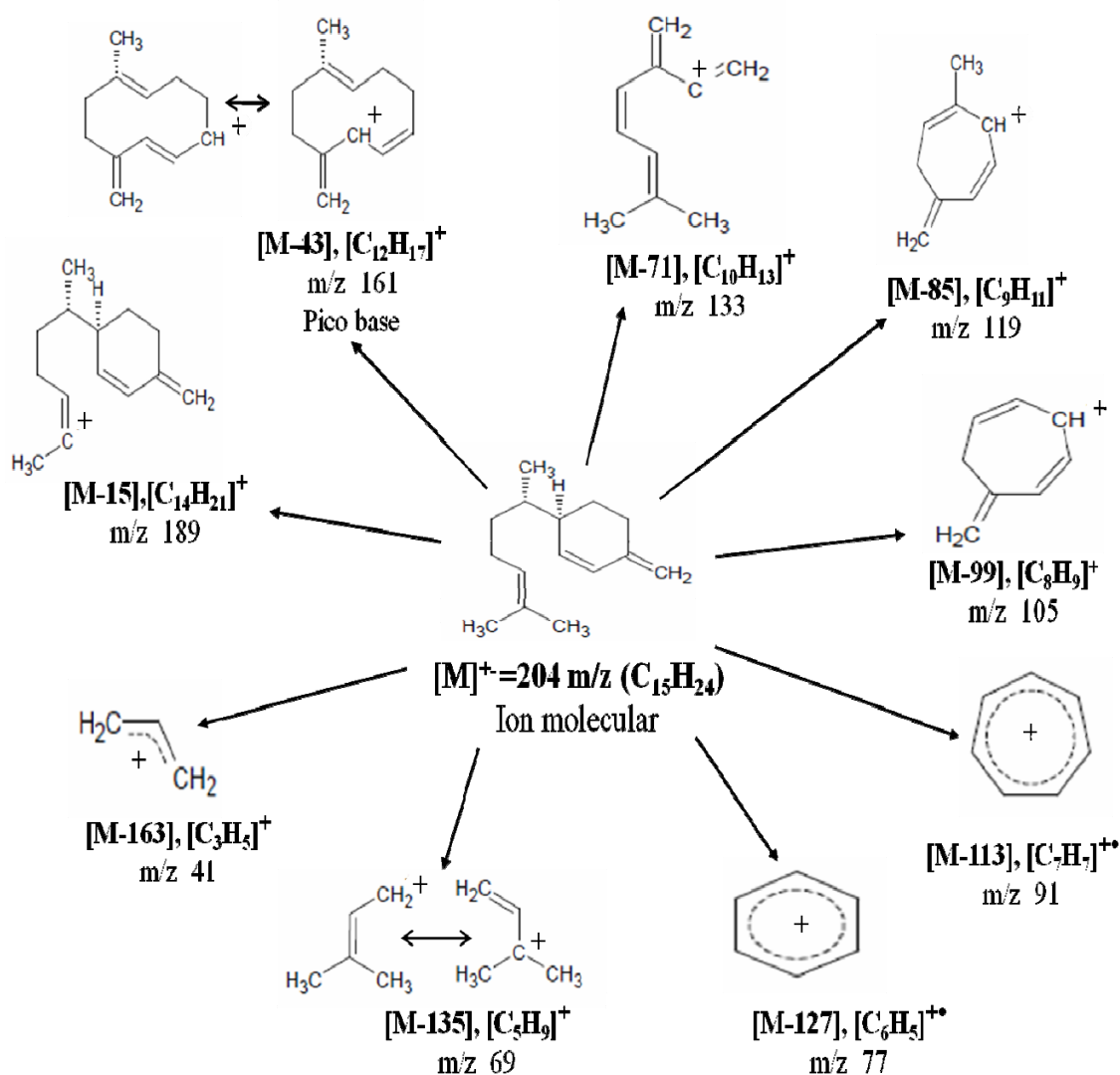


Figura 49: Patrón de fragmentación propuesto para el β -Sesquifelandreno de acuerdo con las señales del espectro de masas

Análisis del espectro de masas del pico con TR de 27,938 minutos, identificado como óxido de cariofileno.

Otro compuesto identificado en el aceite esencial es el óxido de cariofileno, el cual comparte algunas de las señales presentes en el espectro de masas de los sesquiterpenos anteriormente descritos, debido a que posee ciertas similitudes en su esqueleto molecular. Sin embargo, exhibe también una única señal muy intensa a una relación m/z 32 que lo distingue de los compuestos anteriores (ver figura 50).

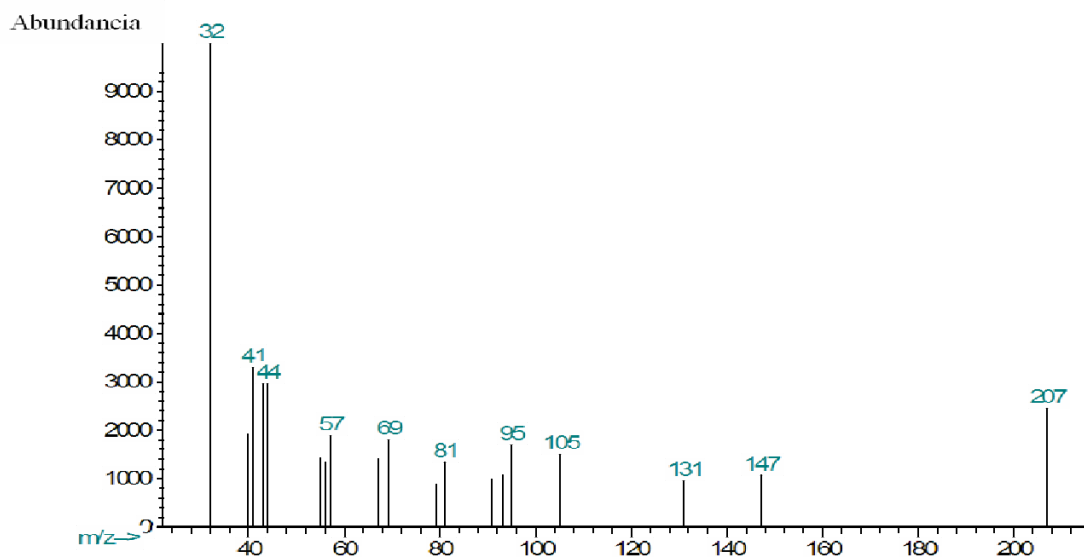


Figura 50: Espectro de masa del compuesto con TR de 27,938 min identificado como óxido de cariofileno.

La señal con m/z 220 correspondiente al ion molecular no fue detectada por el equipo, sin embargo, al comparar el espectro de masas del compuesto obtenido del aceite esencial a un TR de 27,938 minutos con la base de datos NIST05a.L se obtuvo un 97% de probabilidades de que el compuesto obtenido fuese identificado como óxido de cariofileno, además todas las demás señales características de este compuesto pudieron ser analizadas.

La pérdida de 13 unidades de masa genera un ion fragmento $[C_{14}H_{23}O]^+$ de m/z 207 por la apertura del anillo epóxido. Al igual que en el caso del β -Sesquifelandreno, se originan dos posibles formas catiónicas del isopreno y la fragmentación sucesiva de ellas genera un catión propenilo $[C_3H_5]^+$ por la pérdida de 151 y 163 unidades de masa del ion molecular, respectivamente. La pérdida del átomo de oxígeno de la molécula provoca tres rearrreglos a nivel intramolecular que generan los cationes $[C_{11}H_{15}]^+$, $[C_{10}H_{11}]^+$ y $[C_8H_9]^+$ con relaciones m/z 147, 131 y 105, respectivamente. Se confirma la presencia del grupo hidroxilo en la molécula por la existencia de los fragmentos derivados de alcoholes primarios $[C_3H_5O]^+$ y $[CH_4O]^+$, siendo este último el de mayor abundancia en el espectro de masas.

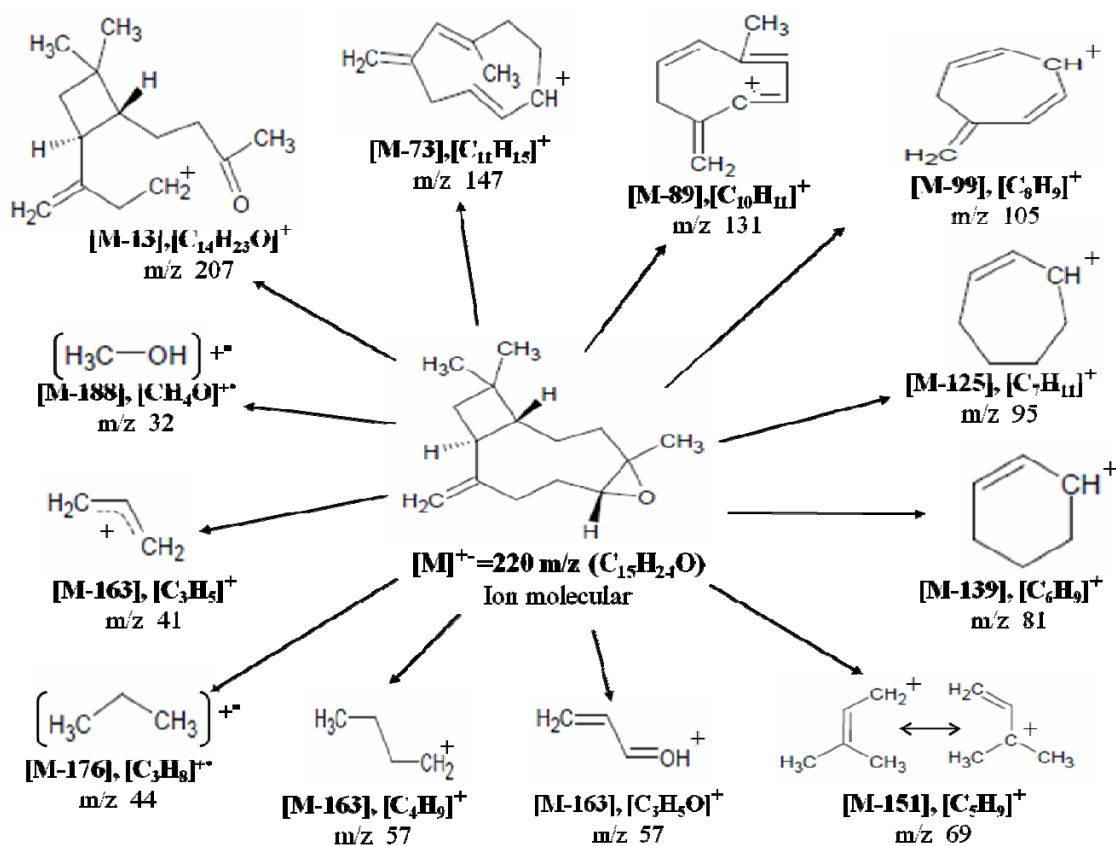


Figura 51: Patrón de fragmentación para el óxido de cariofileno propuesto de acuerdo con las señales del espectro de masas

En el aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich., se identificaron otros compuestos pero por su bajo porcentaje en dicho aceite no se proponen sus patrones de fragmentación.

Actividad biológica del aceite esencial obtenido de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

En el bioensayo antibacterial, el aceite esencial fue activo a concentraciones entre 7 y 28 mg/ml, para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, y la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae*. Contra la bacteria Gram positiva *B. subtilis* se observó una marcada relación entre la concentración del aceite y la inhibición del crecimiento de ésta: a una concentración de 7 mg/ml tiene un halo de inhibición de 10 mm, a 11 mg/ml el diámetro aumenta a 14 mm, a 18 mg/ml se observa

un diámetro de inhibición de 25 mm y a 28 g/ml el diámetro es de 35 mm. En relación a la inhibición de las bacterias *S. aureus* y *K. pneumoniae*, el diámetro del halo generado se mantiene prácticamente dentro de un rango de valores constante, no es posible apreciar una relación concentración/actividad significativa. La inhibición del crecimiento de la bacteria *M. luteus* por acción del aceite esencial a diferentes concentraciones, exhibió una relación también dependiente de la concentración relativamente significativa, con diámetros de 7, 10, 14 y 15 mm a medida que la concentración aumenta de 7 a 11, 18 y 25 mg/ml respectivamente. Contra *E. coli* y *E. faecalis* el aceite esencial fue inactivo.

Tabla 14: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición*			
	7 mg/ml	11 mg/ml	18 mg/ml	28 mg/ml
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> IBE (Doc-19)	8	11	10	11
<i>E. faecalis</i> (WHO14)	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> (ICTA-07)	10	14	25	35
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (10031)	8	12	10	12
<i>M. luteus</i> ATCC (4698)	7	10	14	15

*Diámetro del halo de inhibición (mm), diámetro del disco 6 mm, valores obtenidos con una desviación promedio de ± 2 mm. Escala de actividad: No activo: (-); actividad débil: halo = 7-11 mm; actividad moderada: halo = 11-16 mm; muy activo: halo > 16 mm (Monks *et al.*, 2002).

B. subtilis está considerada como un saprófito y no patógeno para el humano, sin embargo es capaz de contaminar algunos alimentos, raramente causa intoxicación alimenticia, pero sus esporas tienen la capacidad de sobrevivir a altas temperaturas lo que hace complicada su eliminación (Madigan, 2005). Tiene facultad para formar endosporas de gran resistencia, que le proporcionan una gran ventaja para subsistir en condiciones extremas. Esta cualidad le otorga a estas células una clasificación entre las más resistentes del planeta (Fajardo *et al.*, 2006). Normalmente estas bacterias crecen a un pH alrededor de 7-7.4, y entre 12-45 °C; pero tiene la capacidad de adaptarse a las condiciones que estén a su alrededor, reflejando la configuración correspondiente, ya sea en su forma vegetativa o latente (Madigan, 2005).

La marcada relación entre la concentración del aceite obtenido y la inhibición del

crecimiento de *B. subtilis*, permite señalar que la cualidad de esta bacteria para adaptarse a las condiciones de este ambiente no fue lo suficientemente fuerte para resistir la acción ejercida por el aceite esencial obtenido de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich, pues a mayor concentración de éste menor crecimiento de *B. subtilis* al observarse mayor halo de inhibición (diámetros con valores de 10 a 35 mm), como puede verse en la figura 52.

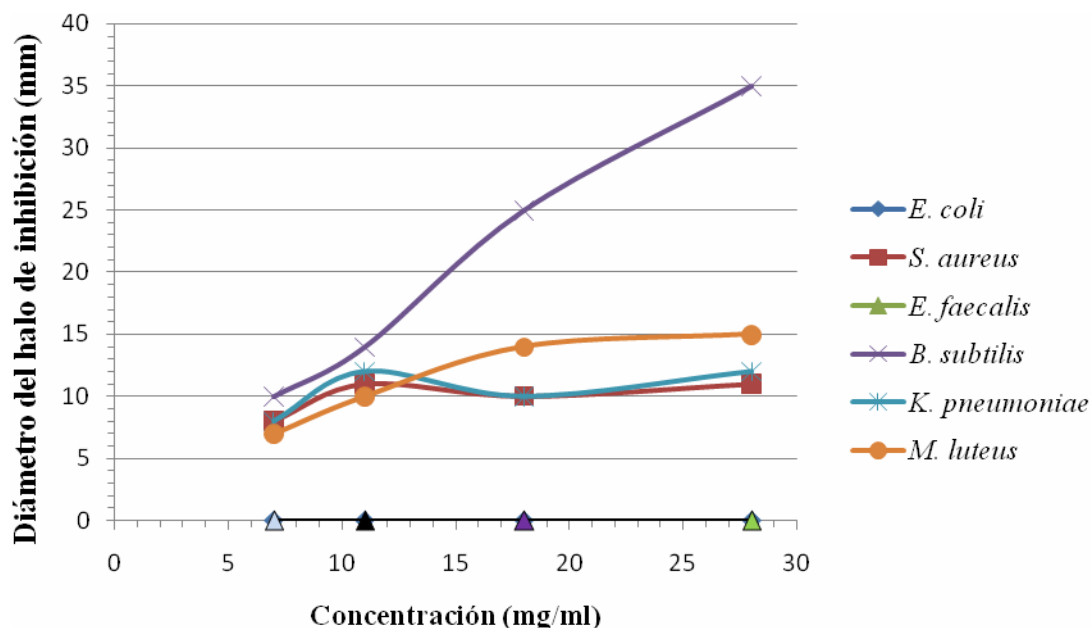


Figura 52: Representación gráfica de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich. (Δ : 7 mg/ml, \blacktriangle : 11 mg/ml, \blacktriangle : 18 mg/ml, \blacktriangle : 28 mg/ml)

Actividad antifúngica de los extractos, fracciones primarias y aceite esencial obtenidos de las hojas y tallos de *Wedelia calycina* L.C. Rich.

La actividad antifúngica tanto de los extractos alcohólicos y subfracciones obtenidas como del aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich., fue negativa. Pues, ninguna muestra de las hojas y tallos inhibió el crecimiento de los hongos fitopatógenos y patógeno empleados en el bioensayo.

CONCLUSIONES

Se determinó familias de compuestos polifenólicos y flavonoides en el extracto metanólico del tallo (EMT), el cual inhibe el crecimiento de *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *M. luteus* y *E. faecalis*, mientras que frente a *E. coli* fue inactivo.

El EMH resultó positivo a la evaluación fitoquímica de alcaloides, flavonoides y polifenoles; inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* y *E. faecalis*. Frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* no ejerció efecto.

Se identificaron mediante análisis de CG/EM los ésteres etílicos de los ácidos hexadecanoico, eicosanoico y undecanoico, producto del fraccionamiento de la FCT-3. De la FCT-4 se obtuvo la gamma-caprolactona, ésta es un componente del aroma de algunas flores, además es una feromona de insectos. De acuerdo con los análisis de RMN realizados a los cristales obtenidos (denotados como FTBT-2.1.2.2.1) puede suponerse que se trata de un compuesto de características aromáticas similares al benzotriazol.

De acuerdo con los análisis de RMN realizados a los cristales obtenidos (denotados como FTBT-2.1.2.2.1) puede suponerse que se trata de un compuesto de características aromáticas similares al benzotriazol.

El aceite esencial de las hojas de *Wedelia calycina* L.C. Rich. se obtuvo con un 0,025% m/m, abundante en componentes sesquiterpenoides hidrocarbonados y oxigenados (71,73% del total). En total se identificaron 44 componentes, por la base de datos NIST05a.L del equipo, 23 de estos fueron reconocidos por sus índices de retención experimentales.

El aceite esencial fue activo para inhibir el crecimiento de las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, y *K. pneumoniae*, ejerciendo un marcado efecto concentración dependiente contra *B. subtilis*, mientras que contra las demás especies bacterianas dicho efecto es menor.

La acción del extracto EMT, las fracciones FAEH, FAET, FCT y el aceite esencial sobre la bacteria *K. pneumoniae* respaldan el uso medicinal que se le da a esta especie vegetal como medicina para la tos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P. 2001. Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.
- Adesina SK. 1982. Studies on some plants used as anticonvulsants in Amerindian and African traditional medicine. *Fitoterapia*, 53 (5-6):146-62.
- Ainsworth, R. 2004. Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems. IWA Publishing, Londres (Reino Unido), para la Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza).
- Akerele, O. 1999. WHO's Traditional Medicine Programme: progress and perspectives. *WHO Chronicle*, 38: 76-81.
- Arslan I. and Celik A. 2008. Chemical composition and antistaphylococcal activity of an endemic *Salvia chrysophylla* stapf. naturally distributed Denizli province (turkey) and its vicinity. *Pak. J. Bot.*, 40(4): 1799-1804.
- Ashok K., Mahaveer P., Bruwan C.J. 1988. A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity. *J. Ethopharmacol*, 22:11-23.
- Baratta, M.T., H.J.D. Dorman, S.G. Deans, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso and G. Ruberto. 1998a. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial oils. *Flav. Frag. J.*, 13: 235-244.
- Baratta, M.T., H.J.D. Dorman, S.G. Deans, D.M. Biondi and G. Ruberto. 1998b. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Ess. Oil Res.*, 10: 618-627.
- Barlow, S. M. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In B. J. F.Hudson (Ed.), *Food Antioxidants* (pp. 253-307). London, UK: Elsevier.
- Bartram, J. *et al.* 2003. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, I. y Turk, M. 1966. Antibiotic suceptibility testing by standarized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496.
- Beyer, H. & Walter, W. 1987. Manual de Química Orgánica. España. Editorial Reverté, S.A.
- Boluda, C.J., Aragón, Z., Duque Ma. A., Díez, F., Duque, B., Gulyas, G. 2005. Lignanos (2). *Fitoterapia*, Vol. 5, Nº 2, pp. 135-148. ISSN 1576-0952.
- Brito M., Crescente O., Fernández A., Coronado A., Rodríguez N. 2006. Eficacia de un

ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica*, 26 (Supl 1):180-7.

Buitrago, D., *et al.* 2012. Estudio de los componentes volátiles de *Wedelia calycina* Rich. (Asteraceae). *ULA Rev. Fac. Farm*; 54 (1): 3-6

Bye, R., E. Estrada L., and E. Linares. 1992. Recursos genéticos en plantas medicinales de México. En: *Plantas medicinales de México, introducción a su estudio*. 4ª edición.

Camean, A. 1995. Toxicología Avanzada. España. Ediciones Díaz de Santos, S.A.

Campos-Bedolla P., Campos M., Valencia-Sánchez A., Ponce Montero H., Uribe C., Osuna L. *et al.* 1997. Inhibitory action of kaurenoic acid derivatives from *Montana tormentosa* (Asteraceae) on acetylcholine, oxytocin and serotonin induced rat uterine contractions. *Phytother Res*, 11:11.

Castro B., J. y Bedoya G., I. 2011. Aislamiento y epoxidación con dimetildioxirano de los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales de *Tagetes lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* y *Eucalyptus citriodora*. Universidad Tecnológica de Pereira, Clombia. Escuela de Tecnología Química - Grupo Polifenoles.

Chaturvedi AK; Parmar SS; Nigam SK y Bhatnagar SC. 1976. Antiinflammatory and anticonvulsant properties of some natural plants triterpenoids. *Pharmacol Res. Commun*: 8 (2):199-210.

Cona T., Erna. 2003. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. Chil. Infect.*, 19 (Supl. 2): S 77-81.

Coronado A. 1998. Propiedades biológicas y análisis fotoquímico de *Wedelia trilobata* y *Tridax procumbens* (Asteraceae). Departamento de Biología, Universidad de Oriente: Cumaná, Venezuela.

Cragg, G. M. and Newman, D. J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100: 72-79.

Davies, N. W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A Vol. 503*: 1-24.

Deans, S.G., and G. Ritchie. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International J. Food Microbiol.*, 5: 165-180.

Díaz P., W. A. y Delascio-Chitty, F. 2007. Catálogo de plantas vasculares de ciudad Bolívar y sus alrededores, estado Bolívar, Venezuela. *Acta Bot. Venez. v.30 n.1*.

Ephros, M.; Bitnun, A.; Shaked, P.; Waldman, E. and Zilberstein, D. 1999. Stage-

Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania donovani* Axenic Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 43, p. 278–282

Essawi, T. and M. Srour. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 70: 343-349.

Estrada L., E. (ed). Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 362-370.

Fajardo C., P. and Nicolson, W. 2006. *Bacillus* endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed *Bacillus spp.* from endolithic and extreme environments. *Microbiology and Cell Science*. 72: 2856-2863.

Farnsworth, N. R.; Akerele O.; Bingel A. S.; Soejarto D. D. y Guo Z. 1992. Las plantas medicinales en la terapéutica. En: *Plantas Medicinales de México, introducción a su estudio*. 4ª edición. Estrada L., E. (ed.). Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 295-312.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. 1990. Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrometry Reviews* 9 (1): pp. 37-70.

Fernández P., C. 2010. Alerta, sunchillo (*Wedelia glauca*). *Rev. Brangus, Bs. As.*, 32 (60): 66-72.

Ganesan, A. 2008. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 306-317.

Garg, S. N.; Gupta, D. and Jain, S. P. 2005. Volatile constituents of the aerial parts of *Wedelia chinensis* Merrill. from the north Indian plants. *J. Essent. Oil Res.*; 17(4): 364-365.

González P., D. J. 1996. Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales. *J. Nat. Prod.* 59 (1) 77-79.

Gordon E. A., Guppy L. J., and Nelson M. 2000. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Ind. Med. J.* 49(1): 27-31.

Gutiérrez, A. and Estévez, A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* Vol. 103, N°. 2, pp 409-419.

Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall. London.

Harborne, J.B. y Turner, B.L. 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London.

Harvey, A. L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13: 894-

901.

Heath, H.B. 1981. *Source Book of Flavours*. Westport: Avi, pp.890.

Heldman A.; Cheng L.; Jenkins G.; Heller P.; Kim D.; Ware M.; Nater C.; Hruban R.; Rezai B.; Abella B.; Bunge K.; Kinsella J.; Sollott S.; Lakatta E.; Brinker J.; Hunter W. y Froehlich J. 2001. «Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis». *Circulation* 103 (18): pp. 2289-95.

Henriquez W.; Crescente O.; Arrieche D. y Marchan E. 2002. Biological activities of a kaurenic acid isolated from *Wedelia trilobata*. *Nat. Prod. Res. Mill.*, (2):38.

Hostettmann, K.; Marston, A. and Wolfender, J. L.. 1995. Strategy in the Search for New Biologically Active Plant Constituents. In: *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Hostettmann, K.A., A. Marston, and M. Millard (eds) *Oxford Science Publications* 37: 17-45.

Jaime A., C. 2008. Elucidación estructural por GC-MS de metabolitos del extracto en diclorometano de la melastomatácea *Clidemia rubra*. Universidad Tecnológica de Pereira, Clombia. Escuela de Química - Grupo Polifenoles.

Jardin, I. 1980. In *Phodophyllotoxin sin Anticancer agents based on natural products agents*. New York Academic Press.

Jenkins, R. y Zinder, R. 1996. *Introduction to X-ray pòwer diffractometry*. John Wiley. New Cork.

Jensen, L.P., and A.R. Lai. 1986. Chayote (*Sechium edule*) causing hypokalemia in pregnancy. *Am. J. Obst. and Gynecol.* 155: 1048-1049.

Kelly, M. and Hartwell, J. L. 1954. The biological effects and the chemical composition of podophyllin: a review. *J. Natl. Cancer Inst.* 14: 967-1010.

Kim, S. A.; Kwon, Y.; Kim, J. H.; Muller, M. T. and Chung, I. K. 1998. Induction of topoisomerase II mediated DNA cleavage by a protoberberine alkaloid, berberrubine. *Biochemistry*, 37:16 316-324.

Koul, S.; Pandurangan, A. and Khosa, R. L. 2012. *Wedelia chinensis* (Asteraceae) - An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5: 1169-1175.

Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Editorial Omega. Barcelona. Pp. 32-45.

- Lin FM, Chen LR, Lin EH, Ke FC, Chen HY, Tsai MJ, *et al.* 2007. Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*; 28(12): 2521-2529.
- Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da Edición. Perú. 24-33, pp 300.
- Madigan M., M. J. 2005. Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
- Mans, D.R.A.; Da Rocha A.B., & G. Schwartzmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*, 5: 185-198.
- Marcano, D.; Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 588 pp.
- Martin S., R. 2004. Understanding mass spectra: a basic approach. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- Matjaz F., I. M. 2010. Inhibition of copper corrosion by 1,2,3-benzotriazole: A review, *Corrosion Science* 52, Issue 9, pp. 2737-2749.
- Mavroudis, D.; Kouroussis, C.; Kakolyris, S.; *et al.* 2002. Phase I study of paclitaxel (taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (caelyx) administered every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Oncology*, 62: 216-222.
- McMurry, J. 2008. Química orgánica. 7ª Edición. México. Cengage Learning Editores.
- Miski M, Uhubelon A, Johanson C, Mabry TT, 1983. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palestina*. *J. Nut. Prod.*, 46 (6):874 –875.
- Molina, J. A., Castell Z., V. y Ramírez, R. P. 2008. Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium L* procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales. *XILOCA* 36; págs. 61-84; ISSN: 0214-1175.
- Monks, N.; Lerner, C.; Henriques, A.; Farias, F.; Schapoval, E.; Suyenaga, E.; Da Rocha, A.; Schwartzmann, 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: 1–12.
- Monroy-Vázquez, M. Elena; Soto-Hernández, Marcos; Cadena-Iñiguez, Jorge; Santiago-Osorio, Edelmiro; Ruiz-Posadas, Lucero del Mar, Rosas-Acevedo, Hortensia. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (jacq.) Swartz. *Agrociencia*, 43: 777-790.

- Mori, A.; Chikao, N.; Nubuyase, E. y Shinkichi, T. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26 (8): 2231-2234.
- Mukherjee, A.K.; Basu, S.; Sarkar N.; Ghosh, A.C. 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* 8: 14 67-86.
- Neuman D, Cragg G, Snader K. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17 (3):215–234.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.
- Núñez, M. T. & Martín, V. S. 1990. Efficient oxidation of phenyl groups to carboxylic acids with ruthenium tetroxide. A simple synthesis of (R)-.gamma.-caprolactone, the pheromone of *Trogoderma granarium*. *J. Org. Chem.* 55 (6), pp 1928–1932.
- Ordoñez A. A. L., J. D. Gómez, N. M. Cudmani, M. A. Vattuone, and M. I. Isla. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbial Ecol. in Health and Dis.* 15: 33-39.
- Ordoñez, A. A. L., J. D. Gomez, M. A. Vattuone, and M. I. Isla. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* 97: 452-458.
- Osborn, M. 1943. On the occurrence of antibacterial substances in the green plants. *Br. J. Exp. Pathol*, 24: 227-233.
- Pavia, D.L.; Lampman, G. M. and Kriz, G. S, 1988. Introduction to Organic Laboratory Techniques. Saunders College Publishing, Fort worth.
- Pérez de Alejo, José L., Rodríguez Rodríguez, Gilda y Miranda Flores, Roberto. 1998. Actividad anticonvulsivante de las fracciones butanólica y acetato de etilo de la *Indigofera suffruticosa mill* (añil cimarrón). *Rev. Cubana Plant. Med.* (3):7-11.
- Perkin M.; Bray F.; Ferlay J. y Pisani P. 2004. IARC Cancer Base N° 5 Version 2. Lyon, France: *IARC, Press*.
- Pino-Rodríguez Suley; Prieto-González Sylvia; Pérez-Rodríguez Marta Elena y Molina-Torres Jorge. 2004. Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farm. Bonaerense*, 23 (2): 252-8.
- Raju R. K.; Virendra P.; Prabhu P., M., and Vinod K., T. 2010. Recent developments in benzotriazole methodology for construction of pharmacologically important heterocyclic

skeletons. *Monatsh Chemistry* 141: 1159–1182.

Rao, K. y Alvarez, F. 1981. Antibiotic principles of *Eupatorium capillifolium*. *J. Nat. Prod.*, 44 (3): 252-256.

Redinbo, M. R.; Stewart, L.; Kuhn, P.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and non covalent complexes with DNA. *Science*; 279: 1504-1513.

Rivera S., Dafne. 2008. Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género *piper* y evaluación de la actividad citotóxica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Salama, A. M., A. E. Polo, C.R. Contretras, y L. Maldonado. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. *Rev. Colombiana Cien. Quím.-Farm.* 15: 79- 82.

Salama, A. M., H. Achenbach, M. Sánchez, y M. Gutiérrez. 1987. Aislamiento e identificación de glicósidos antiinflamatorios de los frutos de *Sechium edule*. *Rev. Colombiana Cien. Quím.-Farm.* 16: 15-16.

Saville M, Lietzau J, Pluda J, Feuerstein I, Odom J, Wilson W, Humphrey R, Feigal E, Steinberg S, Broder S. 1995. «Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel.». *Lancet* 346 (8966): pp. 26-28.

Schmidt, C. O.; Bouwmeester, H. J.; Franke, S. and König, W. A. 1999. Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. *Chirality: Vol. 11*, Issue 5-6, pp 353–362.

Sease, C. 1978. Benzotriazole: A Review for Conservators. *Studies in Conservation*. Vol. 23, No. 2, pp. 76-85.

Setzer, W. N. & M. C. Setzer. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Rev. Med. Chem.*, 3: 540-556.

Shaaya, E. & Rafaeli, A. 2007. Essential Oils as Biorational Insecticides-Potency and Mode of Action. En: Ishaaya, I.; Nauen, R. y Horowitz, R. (Eds.). *Insecticides Desing Using Advanced Technologies*. Springer. Pp 249-261.

Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1era. Edición. Colombia. 179-189, 198-204, 247 pp.

Siciliano, T., N. de Tommasi, I. Morelli, and A. Braca. 2004. Study of Flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6510-

6515.

Silva, G.; Dos Santos, J. 2010. Novos registros de espécies da Subtribo Ecliptinae (Heliantheae - Asteraceae) para a Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, Vol. 40 (3): 499 – 508.

Skoog et al. 2001. Química Analítica. 7ª Edición. México. Editorial McGraw-Hill.

Spectral Database of Organic Compounds, SDBS ¹H y ¹³C. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (15/01/2013).

Srivastava, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M. y Khanuja, S. P. 2005. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads.

Bioorg. Med. Chem. 13:5 892-908.

Staker, B. L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin, A. B. Jr.; Stewart, L. 2002. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:15 387-392.

Stashenko, E. 1996. Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga. pp. 29-53.

Stefanazzi N. 2010. Aceites esenciales, una herramienta alternativa en el manejo integrado de plagas de grano almacenado. Universidad Nacional del Sur, Departamento de Biología; Bioquímica y Farmacia. Bahía Blanca, Argentina.

Tincual B.M.; Jimenez I.A.; Bazzochi I.L.; Moujir L.M.; Mamani Z.A.; Barroso J.P.; *et al.* 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Plant. Med.*, 68: 808-12.

Tripathi, A.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M. & Bhattacharya, P. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1 (15): 52- 63.

Villarreal Ortega, María Luisa. 2008. Las plantas en el combate contra el cáncer. Academia de Ciencias de Morelos. *La Unión de Morelos*. Pp. 33.

Weininger, S. J. & Stermitz, F. R. 1988. Química orgánica. España. Editorial Reverté, S.A.

Yáñez C., C.A.; Ríos, N., Mora F., Rojas L., Díaz T., Velasco J., Ríos N. y Meléndez, P.

2011. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Rev. Peru. Biol.* 18(2): 149 - 151 Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. ISSN 1561-0837.

Zhu, L.; Tian, Y. J.; Yin, Y. C. And Zhu, S. M. 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from flowers, leaves, and stems of *Wedelia urticifolia*. *Ital. J. Food Sci.*, vol. 24.

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

Título	Estudio químico biodirigido de <i>Wedeliacalycina</i> L.C. RICH Colectada en la localidad de San Juan de Macarapana, estado Sucre
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
BRUZUAL VILLARROEL, HELLEN YANDRI	CVLAC	18581108
	e-mail	tuamorhelenahotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Wedeliacalycina</i>, metabolitos secundarios, bioactividad, actividad antimicrobiana.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química
	Productos naturales

Resumen (abstract):

En el extracto EMT, de *Wedeliacalycina* L.C. Rich., colectada en la localidad de San Juan de Macarapana, estado Sucre se determinó la presencia de familias de compuestos polifenólicos y flavonoides y se probó la inhibición del crecimiento de cinco de las seis cepas bacterianas ensayadas: *B. subtilis* y *S. aureus* en forma moderada, y contra *K. pneumoniae*, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera leve. Mientras que el extracto EMH resultó positivo a la evaluación fitoquímica de alcaloides, flavonoides y polifenoles; de manera similar ejerció efecto sobre el crecimiento poblacional de cuatro cepas bacterianas: *S. aureus* y *B. subtilis* en forma leve, *M. luteus* y *E. faecalis* de manera moderada. De las particiones líquido-líquido FAEH y FCH, sólo la FAEH fue activa contra *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* en forma moderada. Contrariamente, la fracción FCH, no exhibió ningún tipo de actividad. Para el tallo, sólo las fracciones FAET y FCT mostraron actividad sobre los microorganismos empleados, opuesto a este efecto, la fracción terbutanólica no mostró actividad. La bioactividad ejercida por la fracción primaria FCT fue el punto de partida para someterla a varios procesos de fraccionamiento cromatográfico, sobre Sephadex LH-20, obteniéndose 7 fracciones. Del fraccionamiento de la FCT-3 se identificaron mediante CG/EM ésteres etílicos de los ácidos hexadecanoico, eicosanoico y undecanoico. De la FCT-4 se identificó la gamma-caprolactona que es una feromona de insectos. De la FTBT se obtuvieron unos cristales translúcidos de carácter aromático similar al benzotriazol de acuerdo con los análisis de RMN realizados, los cristales no funden a temperaturas entre 40 - 600 °C. Por otra parte, el aceite esencial obtenido a partir de las hojas dio con un rendimiento en masa del 0,025% luego de la destilación por arrastre con vapor. Éste está constituido mayormente por sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados, tales como germacreno D (8,83%); 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propeniltricyclo [4.1.0.0(2,4)] heptano, (8,66%); β -Sesquifelandreno, (7,87%) y óxido de cariofileno (5,10%). En total se identificaron 44 componentes, por la base de datos NIST05a.L del equipo, 23 de estos fueron reconocidos por sus índices de retención experimentales, los cuales representan el 17,79% m/m. Este aceite fue activo para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, y el de la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae*; observándose una marcada relación entre la concentración del aceite y la inhibición del crecimiento de la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Al realizarse las pruebas de actividad antifúngica para los extractos y las fracciones obtenidas, no se observó actividad biológica alguna por parte de las muestras ensayadas sobre las cepas de microorganismos empleados para el ensayo.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Willian Henríquez	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8 249 952
	e-mail	whenriquez66@gmail.com
	e-mail	
Gustavo Liendo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8 255 407
	e-mail	gustavoliendo@gmail.com
	e-mail	
Hernando Herrera	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5872352
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	06	14

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_HYBV.DOC	Aplication/word

Alcance:

Espacial: NACIONAL

Temporal: TEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado(a) en Química

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

Área de Estudio:

Química

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

Universidad de Oriente



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"**.

Letido 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.



Cordialmente,

[Signature]
JUAN A. BOLANOS CUMBELE
Secretario



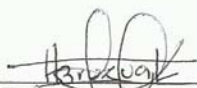
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

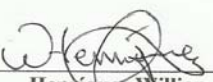
JABC/YGC/maruja

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

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 Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.


Bruzual V. Mefflen Y.
Autor


Henriquez Willian
Asesor