



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

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ANÁLISIS QUÍMICO DE EXTRACTOS
ORGÁNICOS DE *Chrysophyllum caimito* L
(Modalidad: Investigación)

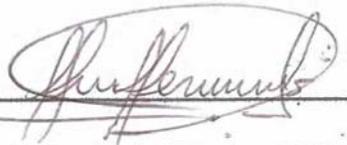
JOSÉ ANTONIO SALAZAR MARÍN

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

CUMANÁ, 2011

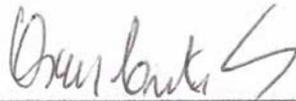
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ANÁLISIS QUÍMICO DE EXTRACTOS
ORGÁNICOS DE *Chrysophyllum caimito* L

APROBADO POR:

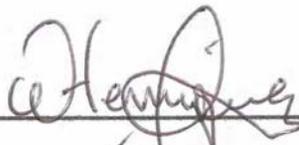


Prof. Hernando Herrera, M.Sc.

Asesor



Jurado



Jurado

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	15
Obtención del material vegetal.....	15
Obtención de los extractos del material vegetal.....	16
Análisis químico	17
Alcaloides.....	18
Saponinas	18
Esteroles y triterpenos	18
Taninos y polifenoles	19
Flavonoides	19
Antraquinonas	19
Glicósidos cianogénicos.....	20
Actividad biológica	20
Actividad antibacteriana.....	21
Toxicidad	22
Actividad antifúngica	22
Obtención de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L	23
Fraccionamiento de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	24
Fraccionamiento de la fracción once (f11) proveniente de la fracción de flavonoides <i>Chrysophyllum caimito</i> L	25
Fraccionamiento por cromatografía descendente.....	26

Caracterización de estructura de los compuestos químicos	28
Resonancia magnética nuclear	28
Resonancia magnética nuclear (RMN)	28
Espectrometría de masas	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Rendimiento de los extractos en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de semillas y hojas de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	30
ANÁLISIS QUÍMICO	31
Saponinas	31
Esteroles	31
Flavonoides	31
Taninos.....	32
Polifenoles.....	33
Glicósidos cianogénicos.....	33
Actividad biológica	33
Actividad antibacteriana.....	34
Toxicidad	35
Actividad antifúngica	37
Actividad antibacteriana de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	39
Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L	41
Actividad antibacteriana de las fracciones derivadas de la fracción F ₁₁ proveniente de la fracción de flavonoides <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	42
Fracciones significativas obtenidas en el fraccionamiento de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	43
Análisis espectral	45
Espectrometría de masas	45
Fracción F _{11.31}	45

Fracción F11.4.1.1	48
Análisis del espectro de RMN-1H de la fracción F11.4.1.1.1	48
Análisis por espectrometría de masas de la fracción F11.4.1.1.1	49
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
APENDICES.....	60
HOJA DE METADATOS	66

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de mi vida.

A mis padres, mil gracias por su amor, apoyo y motivación para culminar esta carrera; siendo ésta una recompensa a su esfuerzo y confianza.

A mi abuela Vicenta, gracias por su amor y cuidados en mi infancia.

A mis hermanas, Marcelys, Rosa, Ysolena e Ysolanda.

† A la memoria de José María y Pablo Antonio, vivos en mi corazón y por la protección que me brindan desde el cielo. Q.E.P.D.

A mi compañera, Oralís por el amor, comprensión y ayuda que me ha brindado en todo momento.

A mi hijo, José Esteban, quien con su inocencia y ternura me llena de felicidad.

A mi suegra, por ser una en un millón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná.

Al Departamento de Química.

Al Profesor Hernando Herrera, por asesorarme.

Al Dr. William Henríquez, por su invaluable ayuda.

Al Dr. Oscar Crescente por su enseñanza.

A la Dra. Maj Britt Mostue, por siempre darme ánimo.

A la Dra. Leonor Brito, por su amistad y aporte brindado en la realización del presente trabajo.

A la profesora Shailili Moreno, por el aporte dado en la realización de los espectros. A mis grandes amigos, Enfred, Daniel, Bucarito, Sucre, Manuel, Alexander y Wladimir.

Al grupo de profesores y técnicos del Departamento de Química, por enseñarme que aprender es una aventura interminable y maravillosa que permite que el hombre triunfe sobre las amenazas de su existencia.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas para medir el efecto antibacteriano	21
Tabla 2. Cepas de hongos utilizadas para evaluar la actividad antifúngica,	23
Tabla 3. Fraccionamiento de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	25
Tabla 4.- Fraccionamiento de la fracción activa (Fu) proveniente de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	26
Tabla 5. Rendimientos de los extractos en n-hexano cloroformo, acetato de etilo.....	30
metanol de semilla y hojas de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	30
Tabla 6 Análisis fitoquímico de los extractos de semillas y hojas cloroformo, acetato de etilo y metanol en n-hexano, de <i>Chrysophyllum Caimito</i> L.....	32
Tabla 7. Actividad antibacteriana de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	35
Tabla 8. Número de individuos muertos y CL50 de los extractos de semillas y hojas en nhexano, cloroformo, acetato de etilo y metano! de <i>Chrysophyllum caimito</i> L. ...	37
Tabla 9. Actividad antifúngica de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	39
Tabla 10. Efecto antibacteriano de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	40
Tabla 11. Efecto antibacteriano de las fracciones derivadas de la fracción de flavonoides de <i>Chrisophyllum caimito</i> L.	41
Tabla 12. Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes de la fracción activa (Fu) derivadas de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	43
Tabla 13. Fracciones significativas obtenidas en el fraccionamiento de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	44
Tabla 14 señales del espectro de RMN- ¹ H de la fracción F114111	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura base de un flavonoide.....	9
Figura 2. 5,7,4'-tribidroxi-flavona.	9
Figura 3. 5,7,4'-trihidroxi-fiavanona.	10
Figura 4. 5,7,4-trihidroxi-antocianidina.	10
Figura 5. 5,7,4'-trihidroxi-isoflavonas.	11
Figura 6. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos.....	12
Figura 7 Características estructurales de flavonoides con actividad atrapadora de radicales libres.....	14
Figura 8. <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	15
Figura 9. Lugar de recolección de la especie <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	16
Figura 10. Esquema de obtención de los extractos crudos de semillas y hojas en nhexano, cloroformo, acetato de etilo y metano 1 de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	17
Figura 11. Esquema de obtención de la fracción de flavonoides a partir del extracto 24 metanólico de las hojas de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.	24
Figura 12. Esquema del fraccionamiento de la fracción de flavonoides de <i>Chrysophyllum caimito</i> L.....	27
Figura 13. Espectro de masas [M-1] de la fracción F11.31	46
Figura 14. 5,7,3',4' -tetrahidroxi-3-O-a-L-ramnopiranosil-flaVOfla (quercitrina). 46	
Figura 15. Espectro de MS/MS del ion molecular con m/z 446,96.	47
Figura 16. Patrón de fragmentación sugerido para el ion molecular de 446,96 mlz... observado en el espectro MS/MS de la fracción F1 1.3.1.....	48
Figura 17. Patrón de fragmentación sugerido para el ion molecular de 462,88 mlz... observado en el espectro MS/MS de la fracción F1 1.4.1.1.1.....	51
Figura 18. 5,7,3',4',5' -pentahidroxi-3-O-cL-L-ramnopiranosil-flavona (mericitrina)	51

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica y letalidad de los extractos en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de los órganos (semillas y hojas) de *Chrysophyllum Caimito* L, donde el extracto en metanol de las hojas (D) fue el más eficiente inhibiendo el crecimiento de: *E. coli*, *E. cloacae*, *A. calcoaceticus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *M luteus*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, con halos que variaron desde 12 cm hasta 16 cm. Además, mostró actividad antifúngica frente a *Mucor* sp (16 cm de diámetro de inhibición) y *Curvularia lunata* (16 cm de diámetro de inhibición), y presentó toxicidad frente el crustáceo *Artemia salina*, con un CL50 de 6,78 mg/ml. Se realizó un estudio químico a los distintos extractos, donde el extracto metanólico de las hojas presentó un mayor contenido de metabolitos secundarios, entre los cuales están la familia de: saponinas, flavonoides, taninos, polifenoles y glicosidos cianogénicos. La fracción de flavonoides (I) mostró actividad antibacteriana frente todas las bacterias antes mencionadas. Se logró obtener las fracciones F_{11.3.1} y F_{11.4.1.1.1} siendo estas caracterizadas parcialmente por espectrometría de masas y espectroscopía de RMN-¹H sugiriendo los compuestos mayoritarios de las fracciones F_{11.3.1} y F_{11.4.1.1.1}: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavona (quercitrina) y 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavona (mericitrina) respectivamente.

Palabras o Frases Claves:

INTRODUCCIÓN

Entre las más antiguas actividades del ser humano está el estudio de plantas y animales, en particular como fuentes de alimento. Desde tiempos atrás el hombre se vio en la necesidad de hacer la distinción entre aquellas plantas que eran venenosas y las que no lo eran, adquiriendo así un amplio conocimiento sobre aquellas que poseían propiedades medicinales, que fue transmitiendo a través del tiempo al principio en forma verbal y luego por medio de la escritura. Sin duda alguna, en el reino vegetal existen muchas especies de plantas que contienen sustancias de gran importancia para la medicina y que aún están por descubrir [1].

Los productos de origen natural pueden ser renovables o no renovables, siendo los primeros todos aquellos que se obtienen del metabolismo de las plantas, los microorganismos y los organismos marinos. El estudio químico de los productos naturales renovables, provenientes de un metabolismo, en general, es conocido como metabolismo primario que produce compuestos como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, glicéridos, ácidos nucleídos, los cuales, son objeto de estudio en bioquímica.

El estudio de las sustancias provenientes de un metabolismo especializado que transforma los metabolismos primarios, es el que corresponde a lo que se ha llamado química de los metabolitos secundarios y es a la que se hace referencia cuando se habla de productos naturales. La fitoquímica, que estudia los productos de los metabolismos especializados de las plantas, ha sido una de las áreas de la química de mayor desarrollo en los últimos años, dada su importancia en la solución de problemas de salud de la humanidad [1].

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas para realizar determinadas funciones, dispersión de semillas, defensa frente a determinadas agresiones o la captación de los insectos polinizadores, son un elemento importante y necesario ya que en el reino vegetal representan una ventaja competitiva. Cada familia de plantas utiliza precursores químicos comunes originando diferentes resultados. También son importantes para los humanos, pues presentan incontables aplicaciones en los campos de la farmacología, la industria agrícola o la industria cosmética. Sin duda las plantas son una fuente para multitud de aplicaciones que utiliza un 80% de la población mundial. Los metabolitos secundarios, sin embargo, se extraen de una forma muy limitada y la demanda es tal que, además de contribuir a que se encarezcan, también se contribuye a la posible extinción de los metabolitos secundarios [2].

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas, tanto crudas, como en sus distintas formas de preparación, tales como infusión, decocción, tinturas, jarabes, zumos, cataplasmas,... En el siglo XVIII, se dieron los primeros pasos en la purificación de productos naturales, sin embargo, la mayoría de ellos permanecieron como mezcla. Sólo hasta fines del siglo XIX los químicos aislaron, en forma relativamente pura, los principios activos presentes en esos extractos brutos. La determinación de la estructura de estos compuestos llevó muchos años de investigación, dada la complejidad de la metodología utilizada (degradación e identificación de los productos). Esto hizo que el tiempo transcurrido entre el aislamiento de un compuesto nuevo y su determinación estructural fuese bastante grande. Por ejemplo, la quinina se aisló por primera vez en 1820 y su estructura sólo fue determinada hasta 1907. Con la introducción de nuevos métodos de análisis, estas diferencias de tiempos se redujeron y así, por ejemplo, la penicilina se aisló en 1942, para el año de 1946 se conocía su estructura y en 1957 se podía sintetizar [1].

Durante el desarrollo de la química de los productos naturales, se aislaron, identificaron y sintetizaron muchos compuestos y esto contribuyó al enriquecimiento de la química orgánica con nuevos conceptos (isomería óptica) y métodos de trabajos (análisis espectroscópicos, síntesis orgánica,...). El desarrollo alcanzado después de la segunda guerra mundial, en los llamados métodos de análisis, tales como espectroscopias, ultravioleta e infrarrojo, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y diferentes técnicas de cromatografía, facilitaron el enorme trabajo de aislamiento y elucidación de estructuras y aumentando así la velocidad de análisis de los productos naturales [1,2].

Es así como se estudian los productos naturales vegetales como posibles fuentes de compuestos biológicamente activos con potencial uso como agentes antimicrobianos y herbicidas, mediante el fraccionamiento por métodos físicos de los extractos de las plantas y posterior aislamiento e identificación de los componentes responsables de las actividades biológicas buscadas a través de un seguimiento de la actividad biológica durante el estudio. Por otra parte, se estudian métodos para lograr el control de calidad de drogas de origen vegetal [2].

Actualmente, el estudio de los productos naturales está dado, principalmente, por tres factores que no se contraponen ni se jerarquizan, sino que, marcan las diferentes estrategias que puedan emplear para aproximarse al conocimiento de esta área. Así, desde el punto vista estructural, los productos naturales suponen retos importantes para la aplicación de estrategias analíticas que permitan dilucidar su estructura química. Por otro lado, la actividad biológica presentada por muchos metabolitos secundarios y sus derivados los hacen sumamente atractivos en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos [2,3]. Del mismo modo, la actividad biológica en las investigaciones fitoquímicas se evalúan con ensayos para detectar los efectos antibacterianos, tóxicos, antifúngicos, entre otros [4-6].

Concretamente, los métodos de difusión se basan en la distribución homogénea del antibiótico, extracto, fracción y/o compuesto sobre los medios sólidos de cultivo. En términos generales los antibióticos, extractos, fracciones y/o compuestos se impregnan en discos de papel que se colocan sobre placas de medio de cultivo en las que previamente se ha extendido la cepa bacteriana que se considera. Tanto la cantidad de antibiótico como el número de bacterias (inóculo) deben controlarse cuidadosamente. El antibiótico, extracto, fracción y/o compuesto difunde por el agar, creando un gradiente de concentración decreciente según se aleja del disco. La bacteria, si resulta susceptible, no crece en las inmediaciones del disco y forma un halo de inhibición. Dicho halo es más grande cuanto mayor es el grado de sensibilidad de la cepa al antimicrobiano. Esta técnica, denominada de disco-difusión es fácil de realizar, barata, aceptada por los organismos de estandarización y abierta, en el sentido que permite analizar cualquier microorganismo y cualquier antibiótico. Incluso, puede aplicarse directamente sobre muestras clínicas en infecciones graves como la meningitis. Los discos con antibiótico, extracto, fracción y/o compuesto deben conservarse en frío [7].

El inóculo para sembrar las placas suele ajustarse por turbidez y debe corresponder con el nivel 0,5 en la escala de McFarland. Tras la incubación, se miden los diámetros de los halos de inhibición y se interpretan los resultados con ayuda de los puntos de corte establecidos internacionalmente para cada microorganismo y para cada antibiótico, extracto, fracción y/o compuesto [7].

Para la correcta realización e interpretación de las técnicas de antibiograma deben considerarse los siguientes factores:

El número de microorganismos aplicados en el ensayo debe reproducir lo más posible las condiciones en el extracto, fracción y/o compuesto. El inóculo

estandarizado es de 108 células/mi, aproximadamente. Inóculos mayores o menores pueden derivar en falsos niveles de resistencia o sensibilidad [7].

El medio de cultivo Mueller-Hinton es el estandarizado para los métodos de antibiograma. Se dispone en forma líquida y sólida, en función de los requerimientos del microorganismo [7].

Antibiótico, extracto, fracción y/o compuesto. Ha de tener la concentración previamente establecida. Debe conservarse en buenas condiciones. Si pierde actividad cepas sensibles pueden informarse como resistentes [7].

Incubación. Las cepas bacterianas son estandarizadas a 37°C y 20-24 h en atmósfera aerobia o rica en CO₂ según el microorganismo. Además, el crecimiento bacteriano sigue tres fases. Cuando una población bacteriana se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que le permite crecer necesita un período de adaptación a dicho ambiente. Esta primera fase se denomina fase de adaptación o fase *lag* y conlleva un lento crecimiento, donde las células se preparan para comenzar un rápido crecimiento, y una elevada tasa de biosíntesis de las proteínas necesarias para ello, como ribosomas, proteínas de membrana,... [7, 8]. La segunda fase de crecimiento se denomina fase exponencial, ya que se caracteriza por el crecimiento exponencial de las células. La velocidad de crecimiento durante esta fase se conoce como la *tasa de crecimiento k* y el tiempo que tarda cada célula en dividirse como el *tiempo de generación g*. Durante esta fase, los nutrientes son metabolizados a la máxima velocidad posible, hasta que dichos nutrientes se agoten, dando paso a la siguiente fase. La última fase de crecimiento se denomina fase estacionaria y se produce como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. En esta fase, las células reducen drásticamente su actividad metabólica y comienzan a utilizar como fuente energética aquellas proteínas celulares no esenciales. La fase estacionaria es un período de transición desde el rápido

crecimiento a un estado de respuesta a estrés, en el cual se activa la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en el metabolismo antioxidante y en el transporte de nutrientes [9].

La identificación de bacterias en el laboratorio es particularmente relevante en medicina, donde la determinación de la especie causante de una infección es crucial a la hora de aplicar un correcto tratamiento. Por ello, la necesidad de identificar a los patógenos humanos ha dado lugar a un potente desarrollo de técnicas para la identificación de bacterias. La técnica de tinción de membranas de bacterias de Gram, desarrollada por Hans Christian Gram en 1884 [10]. Ha supuesto un antes y un después en el campo de la medicina, y consiste en teñir con tintes específicos diversas muestras de bacterias en un portaobjetos para saber si se han teñido o no con dicho tinte [11].

Una vez que se han adicionado los tintes específicos en las muestras, y se han lavado la muestras pasados unos minutos para evitar confusiones, hay que limpiarlas con unas gotas de alcohol etílico. La función del alcohol es la de eliminar el tinte de las bacterias, y es aquí donde se reconocen las bacterias que se han tomado: si la bacteria conserva el tinte, es una Gram positiva, las cuales poseen una pared más gruesa constituida por varias decenas de capas de diversos componentes proteicos; en el caso de que el tinte no se mantenga, la bacteria es una Gram negativa, la cual posee una pared de una composición diferente. La función biológica que posee ésta técnica es la de fabricar antibióticos específicos para esas bacterias. Esta tinción es empleada en microbiología para la visualización de bacterias en muestras clínicas. También se emplea como primer paso en la distinción de diferentes especies de bacterias [11]. Considerándose bacterias Gram positivas a aquellas que se tornan de color violeta y Gram negativas a las que se toman de color rojo o rosado [12- 15].

La evaluación de sustancias bioactivas o de condiciones ecotóxicas requiere de la medición de una multiplicidad de parámetros que se deben tomar de manera y en cantidad suficiente que permitan extraer conclusiones a través de un análisis estadístico correcto. En términos generales, un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos; a su vez se puede señalar como cualquier método por medio del cual alguna probabilidad de una sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce [16]. Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo, sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $n - r$ no lo hacen. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización, denotado como DL50 por dosis letal media (o DE50 por dosis efectiva media, CL50 por concentración letal media, CE50 por concentración efectiva media y Ltm por límite de tolerancia media). El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL50, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo [17].

En la actualidad, no se pueden ignorar los avances de la ciencia y la tecnología en materia de salud, ya que muchas son las enfermedades que se pudieron controlar e incluso erradicar a través de métodos diagnósticos cada vez más precisos y sofisticados, junto con el desarrollo de vacunas y novedosas drogas de síntesis. Sin embargo, un gran número de padecimientos continúan aquejando al hombre, en especial aquellos de curso crónico (cáncer, artrosis, asma bronquial, depresión, psoriasis,...) o las que comprometen al sistema inmunológico (enfermedades virales, resistencia a los antibióticos, sida,...). Tampoco se pueden dejar de lado las reacciones adversas, tóxicas y los efectos secundarios generados por las drogas de síntesis, lo

cual, lejos de desdeñarlas, advierte que su empleo no está exento de riesgos, debiendo con ellas actuar en el momento oportuno y con el paciente adecuado. En el preciso caso de las enfermedades crónicas es donde muchas de estas drogas de síntesis no cumplen con los objetivos preestablecidos, y por contraposición, los fitomedicamentos se erigen una alternativa altamente positiva y con menores “secundarismos” o efectos adversos [18].

Desde tiempos remotos el hombre hizo uso de las plantas con fines alimenticios y medicinales, aprendiendo primero del comportamiento de los animales y luego a través de su propio instinto, generado en base al método del acierto y el error (conocimiento empírico). De esta manera supo distinguir entre especies beneficiosas y dañinas, constituyendo el primer escalón en la extensa historia de la fitoterapia [18]. Para toda persona, indistintamente de su profesión u oficio, no hay duda de que las plantas son importantes para la vida, debido a que son capaces de producir sustancias denominadas metabolitos secundarios que son beneficiosas para la salud; dentro de estas sustancias se encuentran los flavonoides, compuestos químicos de origen botánico con variada actividad biológica y que fueron bautizados así porque los primeros aislados fueron de coloración amarilla. Los flavonoides comprenden un grupo de sustancias naturales que tienen estructuras fenólicas variables. Para los químicos, los flavonoides tienen una estructura muy definida, como se muestra en la figura 1. Puede observarse que, de manera general, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (aromáticos) unidos a través de una cadena de átomos de carbonos, puesto que cada anillo bencénico tiene seis (6) átomos de carbonos, los autores los denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$. Dentro de este grupo se encuentran: flavanonas, flavonas, antocianidinas e isoflavonas, entre otros [18-20].

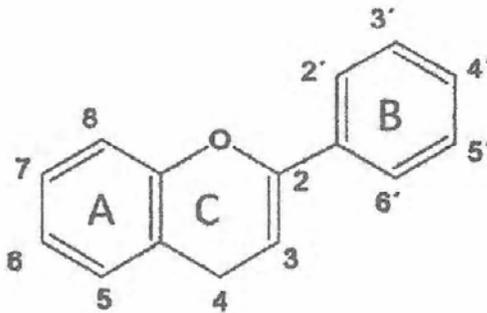


Figura 1. Estructura base de un flavonoide

Los flavonoides se encuentran principalmente en frutas, vegetales, granos y algunas bebidas como el vino y el té. Los niveles de flavonoides en los alimentos procesados son alrededor de 50% menos de lo que se encuentran en los mismos alimentos frescos [18,20].

Las flavonas (figura 2) se caracterizan por tener una estructura plana debido a un doble enlace en el anillo central. Dentro de esta clase están: campferol., miricetina, crisma, rutina y quercetina, siendo esta última una de las más importantes, encontrándose en importantes cantidades en la cebolla, manzanas, brócoll, tomates y papas [18,21].

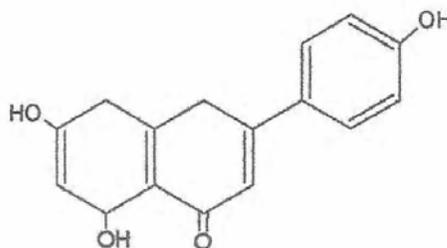


Figura 2. 5,7,4'-tribidroxi-flavona.

Entre las flavanonas (figura 3) están; narangina (responsables del sabor amargo de las toronjas), narigenina, flsetina, hesperetina, entre otras. Esta clase de

flavonoides se encuentra principalmente en las frutas cítricas, incluyendo su corteza [18,22].

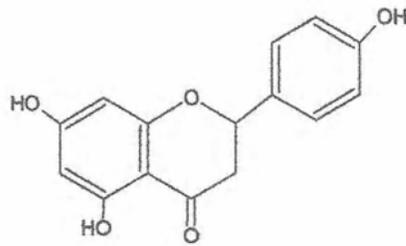


Figura 3. 5,7,4'-trihidroxi-flavanona.

Los flavonoides también son responsables del color que toman algunas frutas y vegetales, ya que comprenden una serie de pigmentos (antocianinas y antoxiantinas), los cuales son solubles en agua [18, 22-24].

Las antocianidinas (figura 4) se forman a partir de las antocianinas, debido al residuo de azúcar de dicha antocianina. Se encuentran principalmente en el vino rojo, uvas rojas y negras [22-24].

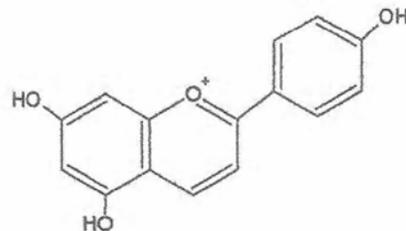


Figura 4. 5,7,4'-trihidroxi-antocianidina.

Las antocianinas pueden ser rojas, púrpuras o azules; el color dependerá de los grupos que se unan a su estructura básica y a la posición del carbono al que estos se unan. Al aumentar el número de hidroxilos, el color cambiará de rojo a azul, dando lugar a varios pigmentos entre los que están: pelargonidina, cianidina, delfmidina,

malvidina. Se encuentran principalmente en cerezas, uvas, fresa, té y cáscaras de frutas oscuras [18, 22, 23].

Dentro de los flavonoides también se encuentran las isoflavonas (figura 5), las cuales están dentro de un grupo llamado fitoestrógenos (estrógeno vegetal), el cual es el nombre genérico usado para definir compuestos que no son esteroideos. Los fitoestrógenos más comunes son: lignanos, coumestanos e isoflavonas, siendo estos últimos los más potentes y los que han despertado mayor interés de investigación [25]. Las características comunes entre los fitoestrógenos es la presencia de un anillo fenólico, el cual les permite ligarse a los receptores de estrógeno, produciendo una actividad estrogénica débil en comparación con la del estrógeno estradiol [26].

Además, es importante mencionar que los estrógenos tienen dos efectos opuestos para el cáncer, dependiendo de la dosis; grandes dosis inhiben el desarrollo de tumores que producen tumores de seno, mientras que pequeñas dosis promueven el crecimiento de tumores. Estos efectos también se aplican para los fitoestrógenos o isoflavonas, es decir, las isoflavonas pueden estimular o inhibir el crecimiento de tumores [27].

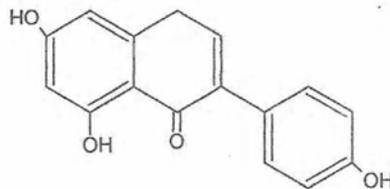


Figura 5. 5,7,4'-trihidroxi-isoflavonas.

Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en el frijol de soya y las más importantes y estudiadas son la genisteína y la daidzeína [22, 25, 28-31].

A lo largo de los años un gran número de estudios han sugerido que el consumo de frutas, verduras, granos, hierbas y otros alimentos pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el cáncer, potencialmente atribuidos a compuestos fenólicos [32]. Algunos compuestos fenólicos presentan capacidad antioxidante, los antioxidantes presentes en las hierbas son principalmente compuestos ácidos, flavonoides y catequinas [33].

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con la capacidad de quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación in vitro. El mecanismo más estudiado ha sido la captación de radicales libres. Esta probabilidad depende de la estructura de la molécula; ya que, el principal determinante es el número y la localización de grupos hidroxilos donadores de electrones. Al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los dobles enlaces en el anillo (figura 6) [34].

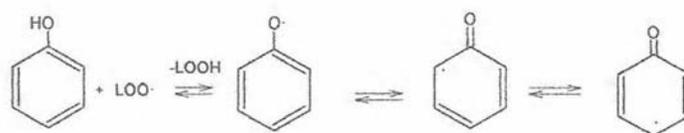


Figura 6. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos.

Los flavonoides son pigmentos vegetales que protegen a organismo del daño producido por agentes oxidantes, tales como los rayos ultravioleta, y la contaminación ambiental, entre otras. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante alimentación o en forma de suplementos [35].

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradora de radicales libres [35-37]. La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro mecanismo a través de los cuales los flavonoides ejercen su actividad antioxidante. Los flavonoides secuestran aniones superóxidos (O_2^-) y radicales hidroxilos (OH); también inhiben los efectos degradativos provocados por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [38,39].

En el caso particular de los flavonoides, el estudio de la relación estructura-actividad es complicado, debido a la relativa complejidad de las moléculas. Algunas de las características estructurales que determinan la capacidad antioxidante se presenta en la figura 7:

- La posición del grupo OH en el anillo B; en particular, una estructura ortodihidroxi (grupo catecol) produce una elevada actividad, ya que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; actuando además como sitio de fijación preferida para trazas de metales [35, 40].
- La presencia de grupos hidroxilos en la posición 3', 4', 5' del anillo B ha sido reportada por incrementar la capacidad antioxidante, en comparación con los flavonoides que tienen un simple grupo hidroxilo, sin embargo bajo las mismas condiciones, tales compuestos pueden actuar como prooxidantes, neutralizando el efecto antioxidante [41].
- Un doble enlace entre los carbonos C_2 y C_3 , conjugado con el grupo 4-oxo, en el anillo C [40,42]. La presencia adicional de grupos hidroxilos en posición C-3 y C-5 incrementa la capacidad captadora de radicales libres de los flavonoides [43].

- Un doble enlace entre el C-2 y C-3 combinado con 3-OH, en el anillo C, incrementa también la capacidad captadora de radicales libres, como en el caso del camferol [41]. Una sustitución del grupo 3-OH produce un incremento del ángulo de torsión y una pérdida de coplanaridad y, subsecuentemente, una reducción de la actividad antioxidante [44].

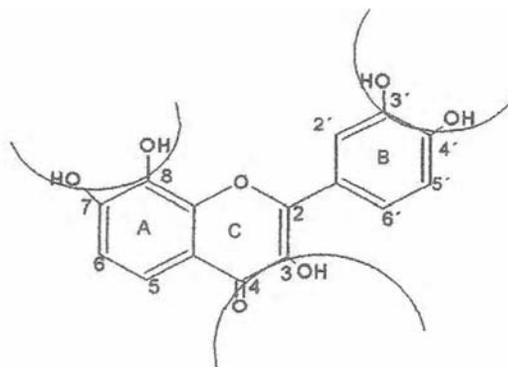


Figura 7 Características estructurales de flavonoides con actividad atrapadora de radicales libres.

Numerosas investigaciones han descrito la importancia de las moléculas de origen natural, que permiten demostrar los efectos terapéuticos de las plantas, entre ellas la especie *Chrysophyllum caimito* L (figura 8); usada fitoterapéuticamente como expectorante, antidiarréico, astringente, diurético y hemostático; además, presenta propiedades curativas en la papilomatosis canina [45-48]. En tal sentido, se propuso evaluar la actividad biológica de extractos de semillas y hojas de *Chrysophyllum caimito* L y determinar la presencia de compuestos responsables de tal actividad.

METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal

La especie estudiada (*Chrysophyllum caimito* L) fue recolectada en la localidad de El Tigrito, estado Anzoátegui. Posteriormente, se identificó en el Herbario I.R.B.R. del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente. El material usado para la investigación (semillas y hojas), fue llevado al Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, de la misma Universidad, donde se secó a temperatura ambiente y a la sombra para su posterior trituración y obtención de los diferentes extractos.



Figura 8. *Chrysophyllum caimito* L.



Figura 9. Lugar de recolección de la especie *Crysohillum caimito* L

Obtención de los extractos del material vegetal

Una vez deshidratados los órganos (semillas y hojas), éstos fueron molidos o triturados en un molino eléctrico, para su posterior extracción sucesiva con n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, por varios días, hasta su agotamiento. Posteriormente, el solvente fue evaporado a presión reducida en un rotaevaporador marca Büchi, modelo 461, a 35°C, obteniéndose los extractos crudos de cada órgano.

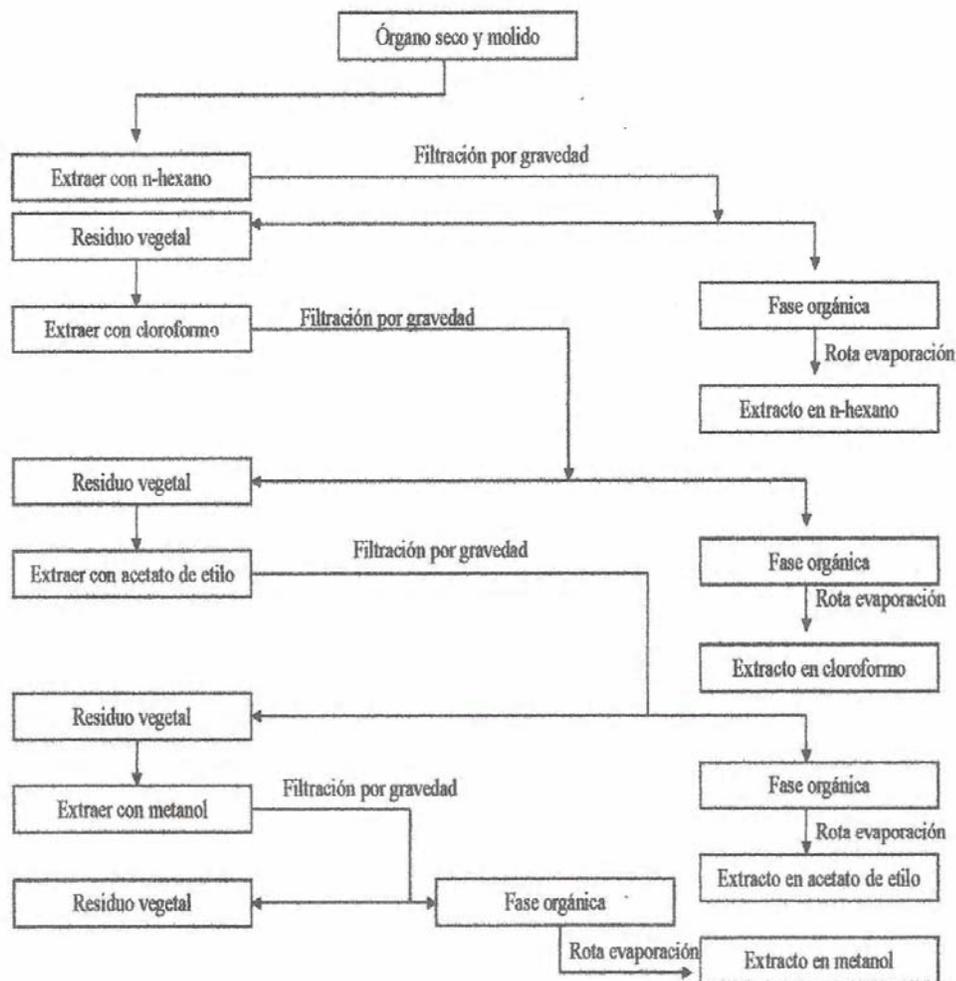


Figura 10. Esquema de obtención de los extractos crudos de semillas y hojas en nhexano, cloroformo, acetato de etilo y metano 1 de *Chrysophyllum caimito* L.

Análisis químico

El estudio químico se efectuó sobre los extractos en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de los órganos antes mencionados. La existencia o no de alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, antraquinonas, taninos,

polifenoles y glicósidos cianogénicos se determinó mediante la aplicación de las técnicas colorimétricas respectivas [49].

Alcaloides

El extracto crudo, casi seco, se retomó con HCl al 10% y se agitó con un solvente inmiscible (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo) y éste fue posteriormente separado. La fase acuosa fue alcalinizada (con NaOH) y extraída con un solvente inmiscible. Las tres fases fueron analizadas para alcaloides, por separado, a través de la utilización de los reactivos de Meyer, Dragendorff y Wagner, lo que permitió detectar la existencia de alcaloides básicos, débilmente básicos o sales cuaternarias de amonio, respectivamente [50-53].

Saponinas

Esta familia de compuestos se detectó agitando el extracto con agua destilada. Una formación de espuma consistente que dure por lo menos 15 minutos indicó su posible existencia [50-53].

Esteroles y triterpenos

El extracto crudo se hidrolizó con HCl al 10%, el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se mezcló con el reactivo de Liebermann-Burchard (1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo a 0°C), más unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Si hay formación de una coloración azul, verde, rojo..., que cambia con el tiempo, confirma la presencia de esteroles o triterpenos [50-53].

Taninos y polifenoles

Los compuestos fenólicos se detectaron al producir una coloración parda en presencia de cloruro de hierro (III) al 1% en etanol. Para ello, el extracto total se evaporó hasta sequedad, fue retomado en agua y filtrado antes de la reacción con cloruro de hierro (III). Si los taninos están presentes, se produce un precipitado al tratar la solución con gelatina al 1% en NaCl al 1% [50-53].

Flavonoides

- a. Una vez que el crudo fue desgrasado con ii-hexano, se llevó hasta sequedad y se trató con HCl concentrado, más unas virutas de magnesio. La reacción fue positiva al producir una coloración roja al dejar la muestra en reposo por unos 10-20 minutos.

Una gota del extracto desgrasado es absorbida en un papel de filtro:

- b. Se colocó en contacto con vapores de amoníaco, si se produce algún cambio de color es evidente la presencia de flavonoides.
- c. Se rocía con una solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol; la aparición de una mancha fluorescente bajo la luz UV fue indicativo en la presencia de flavonoides [50-53].

Antraquinonas

El crudo fue extraído con KOH (0,5 mol/l). Posteriormente, filtrado y acidificado con ácido acético y después agitado con benceno. Si la capa orgánica

toma una coloración roja al alcalizar con hidróxido de amonio, hay presencia de antraquinonas [50-53].

Glicósidos cianogénicos

Al material fresco se le añadieron unas gotas de cloroformo y se calentó entre 50 y 70°C en un tubo cerrado, los vapores fueron puestos en contacto con un papel de filtro impregnado con una solución de ácido pícrico al 1% en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se manifiestan con una coloración roja sobre el papel de filtro.

El tiempo de la reacción es variable y pudiera tomar hasta dos horas [50-53].

Actividad biológica

Según la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población mundial depende de forma directa o indirecta de las plantas medicinales para su atención primaria en salud [54]. La idea generalizada de una menor incidencia de efectos secundarios, el costo accesible y una aparente efectividad en los tratamientos son, entre otros, los factores que han influido en la creciente demanda de productos naturales con fines medicinales. Por encima de estas consideraciones, el hecho de constituir una fuente química tan vasta y diversa explica en buena parte el aporte permanente de nuevos fármacos al arsenal terapéutico [55,56].

El efecto que ejercen los diferentes extractos crudos, fracciones y/o compuestos aislados sobre los microorganismos (hongos y bacterias) y el crustáceo *Artemia salina*, fue momtoreado por los siguientes bioensayos.

Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuentes de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica [57].

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se reconoce ampliamente como una amenaza para el ejercicio médico en todo el mundo [58]. A pesar de estos esfuerzos, muchas de estas entidades de salud pública han realizado para tratar de disminuir dicha resistencia, ésta continúa emergiendo y proliferando, como lo demuestra la existente a múltiples medicamentos de cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas [58-60]. El efecto antibacteriano se comprobó mediante el uso de las siguientes cepas bacterianas (tabla 1), existentes en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas para medir el efecto antibacteriano

Bacteria	Origen	Coloración de Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC(25922)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	DAI(26951)	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC(23055)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC(27853)	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA(07)	+
<i>Micrococcus luteus</i>	Bioanálisis (33-8-10)	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBE(DDC-19)	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO(14)	+

El efecto antibacteriano en los extractos o fracciones se determinó mediante la técnica de difusión de agar o antibiograma, la cual consiste en imprégna r discos de papel de filtro Whatman # 3 de 5 y 10 mm de diámetro con 10 y 25 .il de la solución

o extracto (1 y 30 mg/ml) a probar. Luego, estos discos fueron colocados en placas de Petri previamente servidas con agar Müller-Hinton e inoculadas con suspensión de las cepas bacterianas a utilizar. Posteriormente, las placas fueron preincubadas a 5°C por 12 horas (para permitir la difusión del extracto en el agar) y luego incubadas a 37°C (para permitir el crecimiento bacteriano), en una estufa eléctrica por 24 horas. Por último, el efecto antibacteriano se midió con una regla tomando el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

Toxicidad

El efecto tóxico de los extractos o fracciones se comprobó con el crustáceo *Artemia salina*, para lo cual se preparó una solución disolviendo 50 mg de extracto o sustancia a ensayar en 0,5ml de agua o dimetilsulfóxido, según sea la solubilidad, completando hasta un volumen de 5ml con agua de mar bifiltrada, para sí obtener una solución de 10 000 mg/ml. A partir de esta solución madre se prepararon, por medio de diluciones sucesivas, con agua de mar bifiltrada., soluciones de 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 mg/ml. Posteriormente, se añadieron 10 organismos provenientes de quistes eclosionados con 24 horas de anticipación; para cada concentración se realizaron cuatro réplicas, además de un control con la mayor concentración de solvente. Una vez transcurridas las 24 horas, se determinó la mortalidad de los organismos con la ayuda de una lupa electrónica marca BAUSCH & LOMB. Por último, con estos datos de mortalidad se calculó la dosis letal efectiva (DL50) por medio de un programa de análisis estadístico [6,61, 62].

Actividad antifúngica

El efecto antifúngico de los extractos o fracciones se determinó mediante la técnica de difusión de agar o antibiograma, por medio de la cual cepas de hongos se incubaron por una semana a temperatura ambiente, en agar PDA inclinado.

Posteriormente, se le añadieron 10 ml de agua destilada, se agitó y se filtró sobre gasa estéril. La suspensión esporangial se sembró sobre cápsulas de Petri, previamente servidas con agar PDA. Finalmente, se colocaron los discos de papel de filtro Whatman # 3 de 10mm de diámetro con 25 μ l de la solución o extracto (30 mg/ml) a ensayar; se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 48 horas, y se midió con una regla el diámetro del halo de inhibición alrededor del disco [7, 63-67].

La capacidad de inhibir fue comprobada mediante el uso de cepas de hongos certificadas (tabla 2), pertenecientes a la colección americana de cultivos tipo (ATCC) y cinco aislados de procesos patógenos y fitopatógenos, proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Tabla 2. Cepas de hongos utilizadas para evaluar la actividad antifúngica,

Organismo	Origen	Clasificación
<i>Mucor</i> sp	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Curvularia lunata</i>	Laboratorio de Micología	Patógeno
<i>Penicillium expansum</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Candida albicans</i>	ATCC(10231)	Oportunista
<i>Aspergillus oryzae</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Aspergillus niger</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno

Obtención de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L

El extracto metanólico (80 g) fue disuelto con etanol caliente y tratado con acetato de plomo al 4% en etanol, en proporción de (1:1); luego se dejó en reposo por 24 h y después se filtró la solución, que fue concentrada por rotaevaporación. El concentrado fue extraído con acetato de etilo y concentrado a presión reducida.

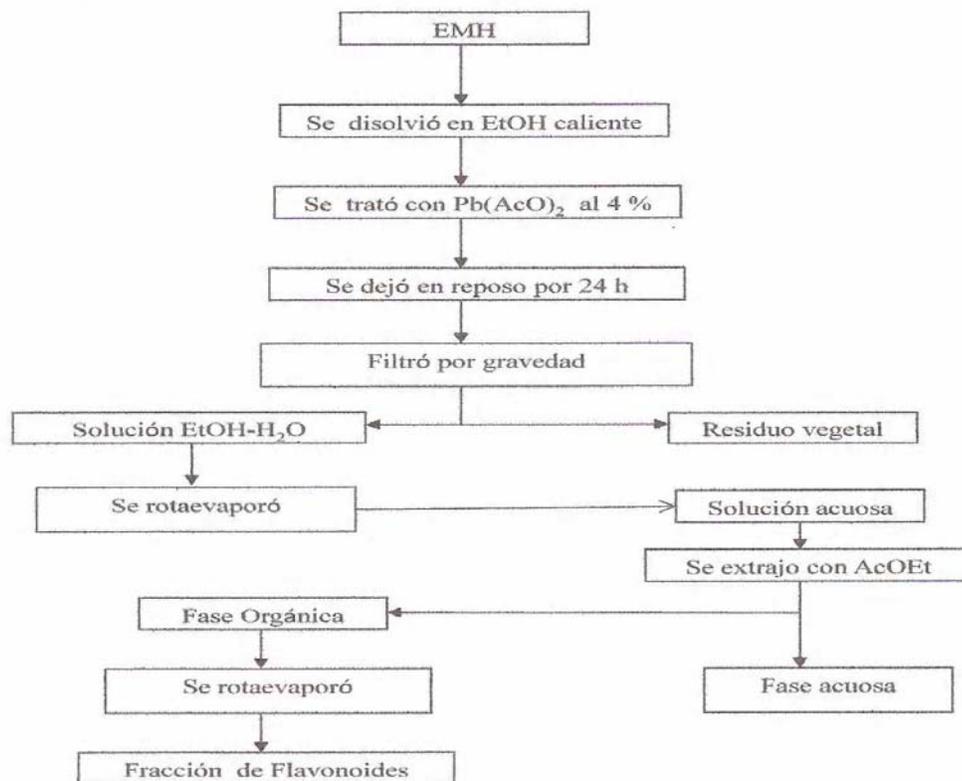


Figura 11. Esquema de obtención de la fracción de flavonoides a partir del extracto metanólico de las hojas de *Chrysophyllum caimito* L.

Fracionamiento de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L

La cromatografía de filtración en gel es una técnica que permite separar compuestos en función de su tamaño molecular. La capacidad separadora reside fundamentalmente en el gel, cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. El fraccionamiento de la fracción de flavonoides se realizó empleando la técnica de cromatografía de columna: en ésta se usó una columna de 20 cm de longitud y 2 cm de diámetro, usando 5 g de Shephadex LH-20 como fase estacionaria. Para la fase móvil fueron usadas mezclas de n-hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, metanol. En el desarrollo de la cromatografía se lograron

obtener 161 eluatos de 5 ml cada uno, que fueron agrupados por cromatografía de capa fina analítica según fuera su similitud frente a las diferentes proporciones de solventes, dando como resultado catorce fracciones que, posteriormente, fueron concentradas rotaevaporando a presión reducida a 37°C y que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Fracción	eluatos	Masa (mg)	Solventes	proporción
F ₁	1	4,9	Hexano-cloroformo	(4:1)
F ₂	2	22,9	Hexano-cloroformo	(4:1)
F ₃	3-24	17,6	Hexano-cloroformo	(4:1)
F ₄	25-31	13,0	Hexano-cloroformo	(3:2)
F ₅	32-40	13,9	Hexano-cloroformo	(3:2)
F ₆	41-51	31,1	Hexano-cloroformo	(3:2)
F ₇	52-82	104,1	Cloroformo-AcOEt	(4:1)
F ₈	83-96	19,5	Cloroformo-AcOEt	(1:1)
F ₉	97-98	30,2	Cloroformo-AcOEt	(1:1)
F ₁₀	99	49,2	AcOEt-MeOH	(4:1)
F ₁₁	100-117	204,2	AcOEt-MeOH	(4:1)
F ₁₂	118-122	242,0	AcOEt-MeOH	(1:1)
F ₁₃	123-132	99,8	AcOEt-MeOH	(1:1)
F ₁₄	133-161	148,5	AcOEt-MeOH	(1:1)

Fraccionamiento de la fracción once (f11) proveniente de la fracción de flavonoides *Chrysophyllum caimito* L

Por cromatografía de filtración en gel se lograron obtener 80 eluatos de 2 ml cada uno, los cuales fueron agrupados por cromatografía de capa fina en placas de vidrio servidas con sílica gel de 60 mesh y con diferentes mezclas de solventes (cloroformo, acetato de etilo y metanol), dependiendo de la polaridad de los eluatos, logrando así obtener siete fracciones o subfracciones que derivan de la fracción once. En la tabla 4 se puede detallar con claridad la masa, eluatos, solventes y proporción de solventes, para cada una de las fracciones obtenidas.

Tabla 4.- Fraccionamiento de la fracción activa (Fu) proveniente de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum cainito* L.

Fracciones	Eluatos (2ml)	Masa (mg)	solventes	Proporción
F _{11.1}	1-4	14,2	CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	(3-4-3)
F _{11.2}	5	2	AcOEt-MeOH	(4-1)
F _{11.3}	6-17	18,2	AcOEt-MeOH	(4-1)
F _{11.4}	18-29	51,5	AcOEt-MeOH	(4-1)
F _{11.5}	30-38	25,7	AcOEt-MeOH	(3-2)
F _{11.6}	39-53	12,02	AcOEt-MeOH	(3-2)
F _{11.7}	54-80	22,05	AcOEt-MeOH	(3-2)

Fraccionamiento por cromatografía descendente.

Una vez aplicadas las muestras (a 9 cm del borde superior del papel Whatman # 3, 60x40), la orilla del papel fue doblado y luego se introdujo en una cámara de vidrio (Tanque cromatografico). El papel se fijó en la cámara mediante una varilla de vidrio y se pasó sobre una segunda varilla de vidrio más elevada que impidió que el disolvente se sifonara. El disolvente se añadió cuidadosamente a la cámara a través de un orificio situado en la parte superior. La cámara se cerró herméticamente para que mantuviera la saturación de los vapores de los componentes del disolvente. Al concluir el desarrollo cromatográfico se marcó el frente del solvente y se secó el

papel por 12 h a temperatura ambiente para ser revelado con vapores de amonio y así se midió la distancia recorrida por las fracciones, con el fin de determinar sus Rf.

El cromatograma de las fracciones F111, F11,3, F114 y F115, se realizó usando inicialmente 2-butanol-ácido acético-agua (TBA en 3: 1: 1) como solvente o fase móvil, teniendo un tiempo de duración de 12 ho cuando el frente del solvente alcanzara aproximadamente 3 cm del borde inferior del papel de cromatografía; luego se desarrolló la cromatografía descendente con ácido acético (HAOc) al 15%, en un tiempo de 4 horas. El esquema seguido en el desarrollo del proceso de purificación por cromatografía se muestra en la figura 12.

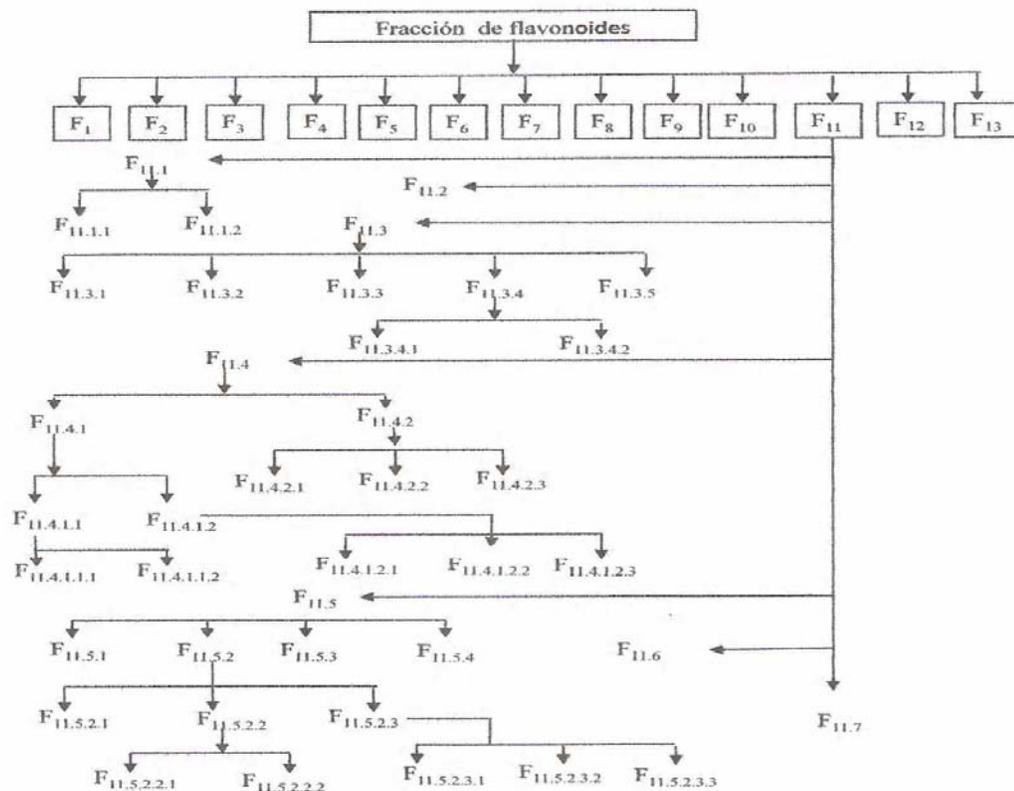


Figura 12. Esquema del fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Caracterización de estructura de los compuestos químicos

Resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de RMN es una técnica que proporciona información estructural y estereoquímica de gran interés en un espacio de tiempo muy reducido. Se trata de una técnica no destructiva que estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen espín nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético produce un desdoblamiento de los niveles de energía del espín nuclear (^1H y ^{13}C), de modo que puedan inducir transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. En este momento, los espines, comportándose como pequeños imanes polarizados, comienzan a precesar con su frecuencia característica en torno al campo magnético externo, incluyendo una pequeña corriente oscilante de radio frecuencia (RF) en una bobina receptora situada en las inmediaciones de la muestra. A medida que los núcleos van regresando poco a poco a la situación inicial del equilibrio alineado con el campo magnético principal, la señal detectada va disminuyendo de intensidad hasta hacerse cero. Esta caída de señal se conoce como caída libre de la inducción (FID, del inglés “Free Induction Decay”) y dan lugar al espectro de RMN [68,69].

Resonancia magnética nuclear (RMN)

El espectro revela el valor del desplazamiento químico, dependiendo del ambiente químico de cada protón (en ppm), la multiplicidad de cada señal y la constante de acoplamiento (J) para cada hidrógeno, lo cual permite relacionar estrechamente cada protón con los átomos de carbono adyacentes [68,69].

Los espectros de RMN-¹H para la identificación de los metabolitos secundarios se realizaron en un equipo de RMN marca Bruker de 500 MHz, perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), las muestras, se disolvieron en metanol deuterado y se colocaron en un tubo de resonancia, para luego ser introducidos en el equipo de RMN, los desplazamientos químicos (δ) fueron reportados en ppm.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) es un método analítico en el cual se producen iones moleculares, producidos por un proceso de ionización química de las moléculas a ser analizadas, los cuales se someten a campos magnéticos y eléctricos a alto vacío para el análisis de la relación masa/carga (m/z). Aunque inicialmente fue desarrollada para investigaciones físicas, la espectrometría de masas ha encontrado una amplia aplicación en moléculas orgánicas. El análisis de un espectro de masas consiste, en primer lugar, en relacionar los picos principales e interpretarlos simultáneamente. La comparación con una muestra conocida y el análisis del patrón de fragmentación es, por lo general, la manera como finalmente se obtiene la elucidación estructural del compuesto [69]. Los análisis de EM-ESI se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones científicas (IVIC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de semillas y hojas de *Chrysophyllum caimito* L

Las extracciones sucesivas con u-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de las semillas y hojas de *Chrysophyllum caimito* L, dio como resultado los mostrados en la Tabla 3. Se puede observar que el rendimiento más alto fue obtenido en la extracción con hexano en las semillas (E), en la cual se obtuvieron 300,6 197 g, equivalentes al 24,60% (mlm), a partir de 1221 g de semillas. En segundo orden de extracción está el extracto en cloroformo de la semilla con 100 g (8,25% (mlm)), después se encuentra el extracto obtenido por extracción con metanol en las hojas con 84,0838 g de extracto (5,90% (m/m)), partiendo de 1403,50 g de bojas. Cabe destacar que si se hace un balance entre los extractos de baja y los de mayor polaridad en los distintos órganos, se demuestra que la especie *Chrysophyllum caimito* L es más rica en compuestos polares para los extractos provenientes de las hojas, mientras que los extractos derivados de las semillas son más abundantes en componentes de baja polaridad.

Tabla 5. Rendimientos de los extractos en n-hexano cloroformo, acetato de etilo metanol de semilla y hojas de *Chrysophyllum caimito* L.

Extracto	Masa (g)	% (m/m)
A	34,8436	2,50
B	32,5648	2,30
C	10,2206	0,70
D	84,0838	5,90
E	300,6197	24,60
F	100,7560	8,25
G	30,1832	2,50
H	68,2463	5,60

A: Extracto en hexano de las hojas.
 B: Extracto en cloroformo de las hojas
 C: Extracto en acetato de etilo de las hojas.
 D: Extracto en metanol de las hojas.
 E: Extracto en hexano de las semillas.
 F: Extracto en cloroformo de las semillas.
 G: Extracto en acetato de etilo de las semillas.
 H: Extracto en metanol de las semillas.

ANÁLISIS QUÍMICO

El tamizaje fitoquímico realizado sobre los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* E., sirvió para la evaluación cualitativa de la posible presencia o ausencia de metabolitos secundarios, entre los cuales se tiene:

Saponinas

Se comprobó la existencia de esta familia realizando la prueba de espuma, la cual perduró por espacio de 25 mm, en el extracto en metanol de las hojas y en los extractos en cloroformo, acetato de etilo y metanol de las semillas.

Esteroles

Esta familia de compuestos se detectó al producirse una coloración azul-verdosa que cambiaba con el paso del tiempo cuando se trató los extractos en cloroformo y acetato de etilo de las hojas y los extractos en cloroformo, acetato de etilo y metanol de las semillas con el reactivo de Liebermann-Burchard.

Flavonoides

Su existencia se pudo intuir, al observar una coloración roja formada en 15 mm cuando se trató la muestra (el extracto en metanol de las hojas) con un (1) ml de ácido clorhídrico (HCl) y virutas de magnesio; también se apreció la aparición de una mancha fluorescente bajo la luz ultra violeta (UV) al tratar una gota del extracto impregnado en papel de filtro con cloruro de aluminio al 1% en etanol. Además, se produjo un cambio de coloración al tratar una gota de la muestra impregnada en un papel de filtro con vapores de amoníaco.

Taninos

La formación de un precipitado al tratar el extracto en metanol de las hojas con unas gotas de gelatina al 1% en cloruro de sodio (NaCl) al 1%, se pudo constatar la existencia de los taninos.

Tabla 6 Análisis fitoquímico de los extractos de semillas y hojas cloroformo, acetato de etilo y metanol en n-hexano, de *Chrysophyllum Caimito* L.

Familiade compuestos		Extracto							
		A	B	C	D	E	F	G	D
Alcaloides	I	-	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas		-	-	-	+	-	+	+	+
Esteroles		-	+	+	-	-	+	+	+
Triterpenos		-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides		-	-	-	+	-	-	-	-
Taninos		-	-	-	+	-	-	-	-
Polifenoles		-	-	-	+	-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosidos cianogénicos		-	-	-	+	-	-	-	-

A: Extracto en hexano de las hojas.
 B: Extracto en cloroformo de las hojas
 C: Extracto en acetato de etilo de las hojas.
 D: Extracto en metanol de las hojas.
 E: Extracto en hexano de las semillas.
 F: Extracto en cloroformo de las semillas.
 G: Extracto en acetato de etilo de las semillas.

H: Extracto en metanol de las semillas.
 +: Posible existencia
 -: Ausencia o baja concentración
 I: Alcaloides débilmente básicos
 II: Alcaloides básicos
 III: Sales cuaternarias

Polifenoles

Estos fueron identificados, por la formación de una coloración parda, cuando se trató el extracto en metano! de las hojas, con unas gotas de cloruro férrico al 1%.

Glicósidos cianogénicos

Un anillo rojo sobre el papel de filtro impregnado con una solución de ácido pícrico al 1% en carbonato de sodio al 10% y puesto en contacto con los vapores del extracto en metanol de las hojas, que fue calentada entre 5 0-70°C en un tubo cerrado, permitió detectar la presencia esta familia de compuestos.

Actividad biológica

Una amplia variedad de vegetales son ampliamente apreciados por su potencial terapéutico, atribuido al contenido de componentes químicos bioactivos [70]. En la industria farmacéutica, las plantas son la materia prima más importante para la obtención de drogas quimiotrapéuticas, ya que exhiben efectos farmacológicos aplicables para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades crónico degenerativas, como diabetes y cáncer. A fin de obtener principios bioactivos medicinales inocuos al ser humano y eficaces, se ha intensificado la búsqueda de fitoquímicos de origen vegetal y derivados de vegetales, considerados como alimentos funcionales, y que puedan ser evaluados biológicamente por medio de bioensayos [71].

Para evaluar los principios bioactivos se han diseñado bioensayos que sirven para hacer seguimiento a los componentes responsables de los efectos biológicos, entre estos se pueden mencionar:

Actividad antibacteriana

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes tradicionales como las plantas superiores, es tan importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad antibacteriana frente a bacterias resistentes a antibióticos y otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos [58-60].

En el estudio antibacteriano de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* L se evidenció que los extractos crudos de las hojas resultaron ser más eficientes que los de las semillas, como se muestra en la tabla 5, donde se observa que los resultados obtenidos por medición de los halos de inhibición variaban desde 11 mm hasta 16 mm. A diferencia de los extractos crudos de las semillas, los extractos en cloroformo y acetato de etilo de las hojas presentaron actividad antibacteriana, cuyos halos tomaron valores entre 11 mm y 16 mm de diámetro. Con respecto a los extractos que no ejercieron actividad antibacteriana, además de los extractos en hexano de hoja y semillas de *Chrysophyllum caimito* L, fueron los extractos en cloroformo y acetato de etilo de las semillas. Existen dos posibles razones por la cual no pudieran haber inhibido el crecimiento bacteriano, una de ellas la poca capacidad de difundir de los extractos y otra que en realidad no se trata de metabolitos que presenten principios activos. Otro aspecto importante que hay que destacar es la mejor capacidad de difusión en el agar del extracto metanólico de las semillas de *Chrysophyllum caimito* L, que el de las hojas; esto se puede observar en el tamaño de los halos de inhibición. Sin embargo, no fue capaz de impedir el crecimiento bacteriano en su totalidad, por lo que se puede decir que es menos efectivo que el extracto metanólico de las hojas, a) no presentar actividad frente a *Acinetobacter calcoaceticus*.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* L.

Organismo	Extracto (mm de inhibición)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	12	0	0	0	20
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	11	16	0	0	0	19
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0	11	11	14	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	11	11	15	0	0	0	15
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	11	16	0	0	0	20
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	11	15	0	0	0	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	11	0	15	0	0	0	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	13	16	0	0	0	25

A: Extracto en hexano de las hojas.
 B: Extracto en cloroformo de las hojas
 C: Extracto en acetato de etilo de las hojas.
 D: Extracto en metanol de las hoias.
 E: Extracto en hexano de las semillas.
 F: Extracto en cloroformo de las semillas.
 G: Extracto en acetato de etilo de las semillas.
 H: Extracto en metanol de las semillas.

Toxicidad

En el campo de la química de los productos naturales, siempre se van conociendo nuevas sustancias o compuestos con propiedades terapéuticas, que en algunos casos, ayudan al hombre a subsanar parte de sus males físicos o fisiológicos. Es por ello que en esta investigación se realizaron ensayos de letalidad con extractos de *Chrysophyllum caimito* L frente al crustáceo *Artemia salina* [61].

Para comprobar la sensibilidad de los extractos se usó la técnica de concentración letal 50 (CL50), definida como la concentración a la cual muere el 50 % de los individuos expuestos a una sustancia (extracto), en un tiempo de exposición determinado y la menor concentración a la que se observa efecto significativo con respecto al grupo [61].

En la siguiente Tabla (8) se observa el número de individuos muertos al ser expuestos a los diferentes extractos de *Chrysophyllum caimito* L a partir de los cuales se calcularon sus respectivos CL50 por un programa estadístico, por el método probit [61].

Es necesario explicar que esta prueba se utiliza en forma generalizada, ya que existe una correlación positiva con las células cancerígenas 9KB es decir, que si se observa una actividad contra Anemia salina se espera encontrar un posible compuesto que se caracterice como tóxico o citotóxico, con un posible potencial anticancerígeno y/o antitumoral [62].

Se pudo observar que el D y II presentaron una CL50 de 6,78 y 9,09 mg/mi, respectivamente, lo que indicó gran actividad tóxica de estos extractos frente a *Artemia salina*, indicando la presencia de un posible potencial anticancerígeno y/o antitumoral, basándose en los estudios... Además, C, E y O, poseen un valor de concentración letal media muy superior al valor propuesto por algunos autores, para catalogar un compuesto como tóxico o citotóxico, mientras que los demás extractos no presentaron ningún indicio de toxicidad. En otras palabras, se puede decir que los extractos que provocaron la mayor cantidad de individuos muertos fueron los extractos metanólicos de ambos órganos (semillas y hojas) de *Chrysophyllum caimito* L.

instituciones del mundo occidental refieren un aumento de la incidencia de las micosis sistémicas que, en ocasiones, son hasta 10 veces más frecuentes en la actualidad de lo que, lo eran hace sólo diez años. Junto a estos cambios cuantitativos, hay cambios cualitativos espectaculares. Cambian las enfermedades de base sobre las que asientan las micosis invasoras y cambian los hongos que las causan. Entre los cambios de las enfermedades de base, resalta la irrupción del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), como una de las enfermedades subyacentes más frecuentes. Junto a ello, los trasplantados de médula ósea y de órganos sólidos constituyen, en la actualidad, un grupo con especial susceptibilidad a estos agentes [63, 64].

Los pacientes inmunodeprimidos, por leucemias u otros tumores, son hoy, porcentualmente, solo una parte discreta de los enfermos que sufren micosis. A ese cambio de huésped se asocia a veces la modificación del comportamiento de algunas entidades clínicas o la aparición de otras prácticamente nuevas. Buen ejemplo de ello es la traqueobronquitis necrotizante, causada por *Aspergillus* sp en pacientes con trasplante pulmonar, o la endocarditis sobre corazón trasplantado que tiene también a *Aspergillus* sp como uno de los agentes etiológicos más frecuentes [65-67].

Todo lo anterior ha motivado también cambios importantes en los agentes responsables. El estudio antifúngico de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* L tuvo como finalidad encontrar, entre otras, moléculas posiblemente eficaces en la destrucción de células fungicas.

En la Tabla 9 se precisa la poca actividad fungicida de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* L, por lo que, esta especie resultó de poco interés antifúngico. La incapacidad de inhibir a las cepas de hongos: *Penidihium expansum*, *Candida albicans*,

Aspergillus oryzae y *Aspergillus niger*, se debe, probablemente a la rigidez de la pared celular y a la complejidad estructural de los hongos. No obstante, los extractos en acetato de etilo y metanol de las hojas de *Chrysophyllum caimito* L fueron capaces de inhibir las cepas de hongos: *Mucor* sp, *Curvularia lunata*, y este resultado da indicios de que pudiera hacerse un seguimiento de los extractos, con miras de encontrar algún metabolito secundario que pudiese ser usado en el desarrollo de un nuevo fármaco antifúngico.

Tabla 9. Actividad antifúngica de los extractos de semillas y hojas en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de *Chrysophyllum caimito* L.

Organismo	Extracto (mm de inhibición)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Mucor</i> sp	0	0	11	16	0	0	0	0
<i>Curvularia lunata</i>	0	0	12	16	0	0	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

A: Extracto en hexano de las hojas. E: Extracto en hexano de las semillas.
 B: Extracto en cloroformo de las hojas F: Extracto en cloroformo de las semillas.
 C: Extracto en acetato de etilo de las hojas. G: Extracto en acetato de etilo de las semillas.
 D: Extracto en metanol de las hojas. H: Extracto en metanol de las semillas.

Actividad antibacteriana de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

En estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides, demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención en diversas enfermedades, como: cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas [72].

La prueba antibacteriana fue un pilar fundamental a la hora de decidir la orientación en el desarrollo y desempeño del fraccionamiento, por tal motivo se aplicó la técnica propuesta por Harborne para flavonoides al extracto metanólico de las hojas de *Chrysophyllum caimito* L, y sobre la base de los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas.

A la fracción obtenida de las hojas de *Chrysophyllum caimito* L (fracción en acetato de etilo de flavonoides (1)), se le realizó un análisis bacteriano, dando como resultado un extracto capaz de inhibir todas las cepas bacterianas usadas en este bioensayo y además los halos de inhibición variaron desde 16 mm hasta 31 mm de diámetro, siendo la cepa bacteriana *Acinetobacter calcoaceticus* la de mayor resistencia a la fracción de flavonoides y la de menor resistencia *Micrococcus luteus*, lo cual se aprecia en la Tabla 10.

Tabla 10. Efecto antibacteriano de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Organismo	I (mm de inhibición)
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Enterobacter cloacae</i>	30
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	27
<i>Bacillus subtilis</i>	28
<i>Micrococcus luteus</i>	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17

I: Fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L

El aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos es el principal problema al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas [73,74]. Esta problemática tiene mayor incidencia en alteraciones orgánicas como tuberculosis, malaria, cólera, neumonías... que en conjunto constituyen la causa de muerte de más de 10 millones de individuos anualmente en el mundo [75,76].

La actividad de las fracciones o subfracciones frente a las bacterias se realizó usando la técnica de difusión en agar antes descrita. En la Tabla 11 se puede apreciar que i presentó actividad antibacteriana in vitro frente a: *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando halos de inhibición de 10, 6, 8, 6, 10 y 10 mm, respectivamente. Además es de notar la actividad mostrada por F7 y F8 frente a *Enterococcus faecalis*.

Tabla 11. Efecto antibacteriano de las fracciones derivadas de la fracción de flavonoides de *Chrisophyllum caimito* L.

Organismo	Fracción													
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃	F ₁₄
<i>Eschericia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	8	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
<i>Speudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0

Actividad antibacteriana de las fracciones derivadas de la fracción F₁₁ proveniente de la fracción de flavonoides *Chrysophyllum caimito* L.

Una de las actividades farmacológicas más significativas es la actividad antibacteriana de variados compuestos, ya que muchos de estos microorganismos son los primeros causantes de enfermedades en los seres humanos, cuyo cuadro clínico puede incluir diarrea, náusea, vómito, fiebre y deshidratación, especialmente en lactantes y ancianos; las defunciones por esta causa son raras, excepto en las personas en edades extremas o inmunosuprimidas; además, estos microorganismos también pueden ser los causantes de otras enfermedades, como por ejemplo la gastroenteritis [77.].

Al realizarse la prueba de actividad antibacteriana de las diferentes fracciones derivadas de la fracción once (F₁₁), en la Tabla 12 se puede observar que inhiben el crecimiento de las bacterias *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *St ap hylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; es decir, inhiben el crecimiento de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, reflejando esto un amplio espectro de acción. Ahora bien, las fracciones que inhibieron el crecimiento de todas las cepas bacterianas fueron las fracciones F₁ 1.4, F₁ 1.5, las cuales mostraron halos de inhibición entre 6 y 12 mm de diámetro; es de notar, que la fracción F₁₁1 no pudo inhibir el crecimiento bacteriano de la cepa *Enterococcus faecalis*, indicando que no presenta actividad antibacteriana frente a este organismo, pero si contra el resto de las bacterias. Otra fracción .) no fue efectiva frente a la cepa de *St ap hylococcus aureus*. La fracción F₁₁,6 mostró actividad antibacteriana frente a *Enterobacter cloacae*, con un halo de inhibición de 9 mm y *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 7 mm, mientras que, la fracción F₁₁7 pudo impedir el crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus luteus* con 7 y 8 mm de diámetro en el halo de

inhibición, respectivamente. Es de observar la nula actividad antibacteriana de la fracción F1 1.2 contra alguna de las cepas bacterianas.

Tabla 12. Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes de la fracción activa (Fu) derivadas de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Organismo \ Fracción	F _{11.1}	F _{11.2}	F _{11.3}	F _{11.4}	F _{11.5}	F _{11.6}	F _{11.7}
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	0	10	13	10	9	0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	6	0	7	8	6	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	8	6	7	0	7
<i>Micrococcus luteus</i>	7	0	10	11	7	0	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	0	0	9	8	7	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	0	7	12	9	0	0

El desempeño de las fracciones frente a los diferentes microorganismos (ver Tabla 12) permitió realizar una nueva partición en las fracciones más activas (F11i, F11.3, F114, Fj15). En el esquema (figura 12) se muestra el desarrollo del fraccionamiento de dichas fracciones, realizado siguiendo la técnica de cromatografía descendente en papel; la cromatografía se inició empleando TBA (2-butanol-ácido acético glacial-agua) en una proporción de 3:1:1 como fase móvil, en una primera dimensión, y luego se usó ácido acético glacial al 15% en la segunda dimensión. Esta técnica se aplicó de manera sucesiva a las fracciones que se fueron obteniendo hasta lograr unas fracciones considerablemente puras.

Fracciones significativas obtenidas en el fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Una vez culminado el fraccionamiento, en la tabla 13, se muestra la masa (mg), el porcentaje y los respectivos Rf de las fracciones significativas o fracciones que resultaron positivas a la prueba de flavonoides, en ella se puede apreciar que la fracción F114.1.1.1 presentó un rendimiento de 8,3% , equivalente a 12,6 mg.

Tabla 13. Fracciones significativas obtenidas en el fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Chrysophyllum caimito* L.

Fracción	Masa (mg)	%	R _f
F _{11.1.2}	8,50	5,6	0,85
F _{11.3.1}	2,10	1,4	0,40
F _{11.3.4.1}	5,00	3,2	0,35
F _{11.3.4.2}	5,60	3,7	0,50
F _{11.4.1.1.1}	12,60	8,3	0,46
F _{11.4.1.2.1}	6,02	3,9	0,20
F _{11.4.1.2.2}	2,00	1,3	0,70
F _{11.5.2.2.1}	4,00	2,6	0,40
F _{11.5.2.3.1}	4,20	2,8	0,71
F _{11.5.2.3.2}	7,00	4,6	0,85
F _{11.5.4}	5,80	3,8	0,90

Análisis espectral

Espectrometría de masas

Para el análisis de masa se usó la técnica de ionización suave, debido a la naturaleza de las fracciones (polaridad alta); esta técnica de ionización no induce mucha fragmentación en la molécula aunque en algunas ocasiones si puede existir abundancia de iones fragmentos; se puede detectar iones positivos e iones negativos, e incluso para un pico en específico (masas de masas).

Fracción F_{11,31}

Se obtuvo 1,3 mg de un sólido verde amorfo, positivo a la prueba de vapores de amonio para flavonoides. Éste fue analizado por espectrometría de masas.

El análisis por espectrometría de masas por la técnica ESI en modo ion negativo, permitió determinar en la fracción F_{n,31} la masa relativa del compuesto mayoritario por la abundancia relativa del ion. El espectro (figura 13) presenta una señal 446,96 m/z con una intensidad de 100%, asignable a la fórmula C₂₁H₂₀O₁₁, la cual coincide con la masa molar de la 5,7,3'4'- tetrahidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavofl (figura 14).

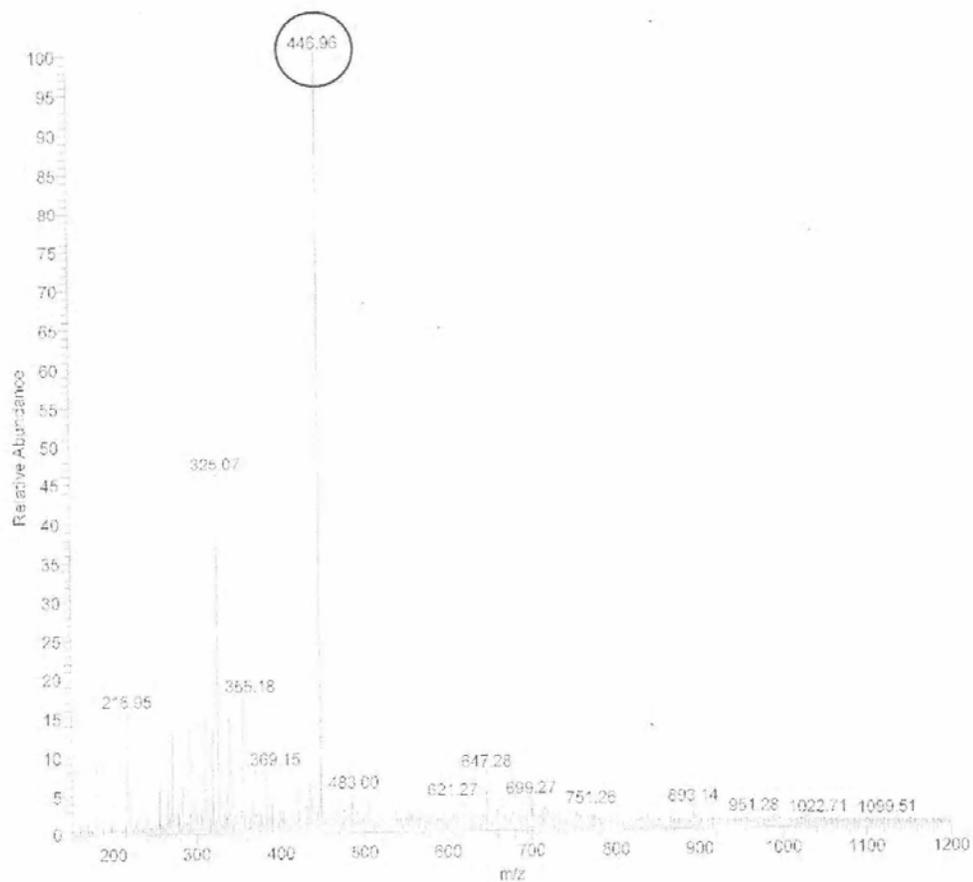


Figura 13. Espectro de masas [M-1] de la fracción F11.31

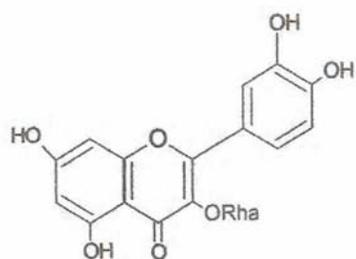


Figura 14. 5,7,3,'4' -tetrahidroxi-3-O-a-L-ramnopiranosil-flaVOfla (quercitrina).

Esto fue confirmado con el análisis de espectrometría de masas/espectrometría de masas (figura 15), donde se muestra un pico base para el ion molecular [M-1] a

446,88 mlz, con una intensidad de 100%, correspondiente a la fórmula molecular C₂₁H₂₀O₁₁, asociada a 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O- α -L-ramnopiramilosil-flavoflavanol (quercitrina) y el ion fragmento [M-C₆H₁₀O₄] a 299,90 mlz, con una abundancia relativa de 65%, producido por la pérdida del residuo ramnosídico, representado por el patrón de fragmentación (figura 16).

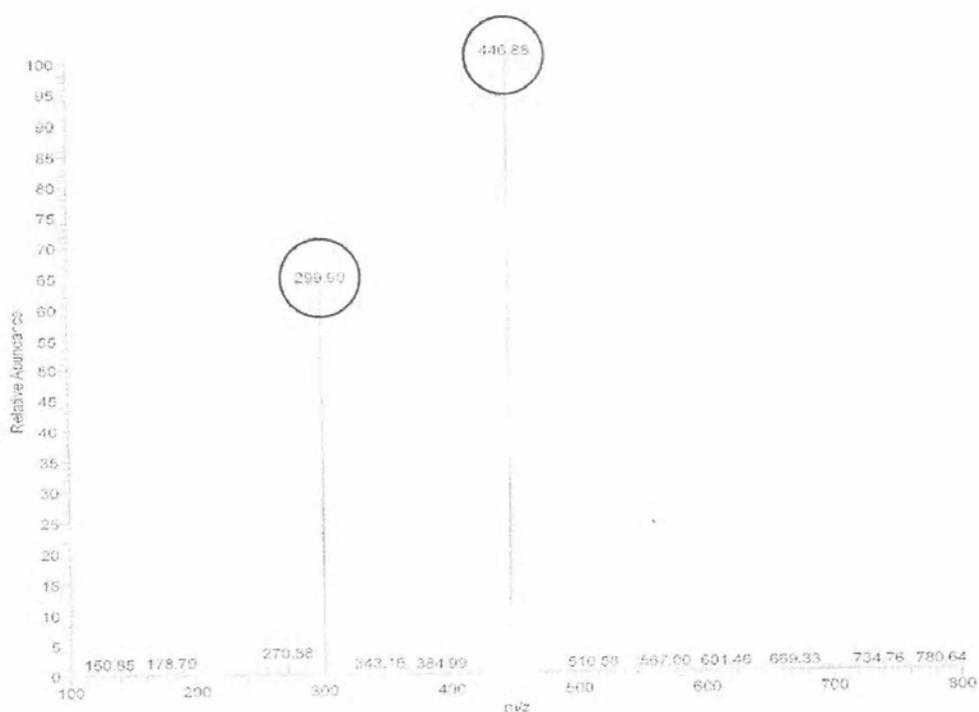


Figura 15. Espectro de MS/MS del ion molecular con m/z 446,96.

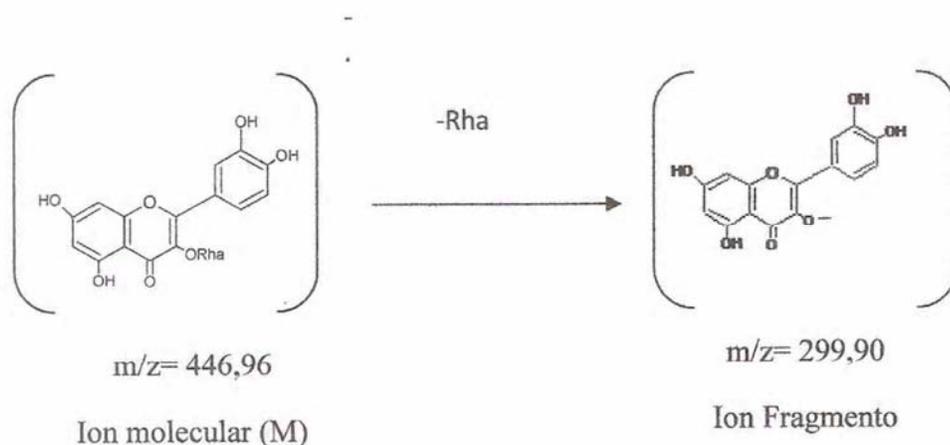


Figura 16. Patrón de fragmentación sugerido para el ion molecular de 446,96 mlz observado en el espectro MS/MS de la fracción F1 1.3.1

Dada la similitud y concordancia obtenida por espectrometría de masas, con los resultados obtenidos anteriormente para la especie *Chrysophyllum caimito* L [78], donde se identificó el compuesto 5,7,3 '4' -tetrahidroxi-3-O-a-L-ramnopiramnosil-flavona (quercitrina), se puede inferir que se está en presencia del mismo componente.

Fracción F11.4.1.1

Análisis del espectro de RMN-1H de la fracción F11.4.1.1.1

En el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (en MeOD, a 500 MHz), Apéndice (A, B, C, D), en la región aromática, se observa una señal con un desplazamiento químico 6,95ppm que integra para dos protones, asignados a los protones H'-2 y H'-6 del anillo B de una estructura de flavonoides. A un 6 (6,35ppm) observa un doblete con una constante de acoplamiento (J) de 2,05 Hz que indica un meta acoplamiento con el proton H-6, asignable al protón H-8. Además, se observa una señal que se desdobra a 6 (6,20 ppm), con un J (2,05 Hz) asignada al protón H-6

acoplado con otro hidrógeno (H-8) en posición meta para el anillo A de los flavonoides. También presenta una señal con δ 6 (5,32 ppm) que integra para un hidrógeno, atribuido al protón anomérico (H'-1) de un azúcar. Muestra un singulete a δ 6 (4,20 ppm), el cual se asumió para el grupo hidroxilo sobre el carbono dos (OH'-2); el desplazamiento químico mostrado a δ 6 (4,0 ppm) se asignó al OH''-3; aunado a esto, el doblete de dobletes que apareció a δ 8 (3,77-3,80) ppm que a su vez indicó un meta-orto acoplamiento con un J(3,3; 9,5) Hz respectivamente. Una señal múltiple que se mostró a δ 6 (3,55; 3,54; 3,52; 3,50) ppm asignables a protones del azúcar (H''-2, H''-3, H''-4 y H''-5), respectivamente. También es de notar un multiplete a δ 6 (0,96) ppm, atribuido a los hidrógenos del C-6 del azúcar (3-H'-6). Estos datos espectroscópicos están resumidos en la Tabla 14. Dado que no es suficiente la información proporcionada por el espectro de RMN-'H, para establecer la estructura de un compuesto, se procedió a analizar la muestra por espectrometría de masa por un método de ionización blanda.

Análisis por espectrometría de masas de la fracción F11.4.1.1.1

El análisis por espectrometría de masas por la técnica EM- ESI en modo ion negativo, esta técnica de ionización suave que produce poca fragmentación, permitió determinar en la fracción F114,11.1 la masa molecular de uno de sus constituyentes mayoritarios por abundancia relativa del ión [M-lf. En este espectro (Apéndice E) se observa una de las señales mayoritarias, con una intensidad a $m/z = 462,94$ urna (65%), correspondiente a una masa molar de 464 urna y fórmula $C_{21}H_{20}O_{12}$.

Con la finalidad de determinar la estructura de uno de los componentes de la mezcla, por medio de espectrometría de ionización blanda, se realizó un espectro de masas/masas en modo ión negativo (Apéndice F). Este tipo de análisis se utiliza para determinar la masa de un compuesto, por medio de una específica intensidad relativa. Con ella se obtuvo un pico para el ión molecular [M-1] a $m/z = 462,88$, representando

el (95%), indicando la existencia de una masa de 464 urna, al que se le asocia la fórmula C₂₁H₂₀₀,2. También se observa una señal de menor intensidad a 316,90 m/z (22%), correspondiente al ión fragmento [M-lf, asociado a la pérdida de 146 urna, atribuido a una unidad de ramnosa (C₆H₁₀₀4); este suceso es observado en el patrón de fragmentación (figura 17).

Unido a esto, existe un estudio realizado a la especie *Chrysophyllum caimito* L donde fueron identificados una serie de compuestos flavonólicos, entre los cuales se encuentra el 5, 7, 3', 4', 5'- pentahidroxi-3-O-cL-L-ramnopiramnosil-flavona (mericitrina) [78]. Dada, pues, la similitud y la evidencia proporcionada por los espectros de RMN-'H y ESI-MS con lo reportado, se puede inferir que uno de los constituyentes mayoritarios de la fracción F11411.1 es el 5 7 3' 4', 5'- pentahidroxi-3-(L)-imopirarnnosil- flavona (figura 18).

Tabla 14 señales del espectro de RMN-'H de la fracción F114111

Hidrogeno	Carbono	δ(ppm)	Multiplicidad	J(Hz)
H'-2	C ₂ '	6,95	s	-
H'-6	C ₆ '	6,95	s	-
H-8	C ₈	6,35	d	2,05
H-6	C ₆	6,20	d	2,05
H''-1	C ₁ ''	5,32	s	-
OH''-2	C ₂ ''	4,20	s	-
OH''-3	C ₃ ''	4,00	s	-
OH''-4	C ₄ ''	3,77-3,80	d-d	3,3; 9,5
H''-2	C ₂ ''	3,55	m	-
H''-3	C ₃ ''	3,54	m	-
H''-4	C ₄ ''	3,52	m	-
H''-5	C ₅ ''	3,50	m	-
3-H''-6	C ₆ ''	0,96	m	-

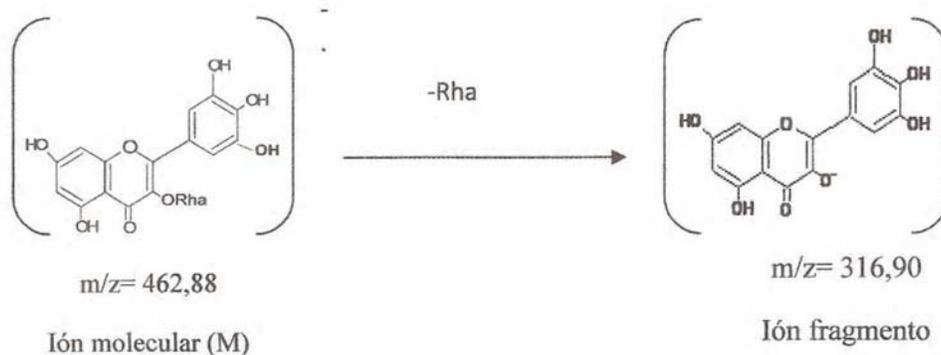


Figura 17. Patrón de fragmentación sugerido para el ion molecular de 462,88 mlz observado en el espectro MS/MS de la fracción F1 1.4.1.1.1.

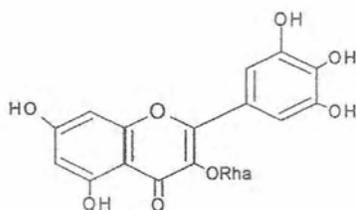


Figura 18. 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-3-O-c-L-L-ramnopiramnosil-flavona (mericitrina)

De todo lo anterior expuesto, queda demostrada la presencia de, al menos, dos flavonoides biológicamente activos en la especie *Chrysophyllum cainito* E, lo que denota la importancia de este tipo de compuestos en una posible y futura profundización de sus propiedades terapéuticas, con otros estudios en este sentido.

CONCLUSIONES

Los extractos de de *Chrysophyllum caimito* L que presentaron mayor actividad antibacteriana fueron el extracto metanólico de las hojas y el extracto metanólico de las semillas.

Los extractos metanólicos de las hojas y las semillas de *Chrysophyllum caimito* E presentaron la mayor letalidad, mostrando concentraciones letales medias (CE50) 6,78 y 9,09 mg/mi, respectivamente, frente al crustáceo *Anemia salina*.

El extracto flavonólico de *Chrysophyllum caimito* E presentó actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando halos de inhibición de 17, 30 16, 27, 28, 31, 27 y 17 mm de diámetro, respectivamente.

El estudio químico de las fracciones polares permitió identificar a: 5,7,3'4' - tetrahidroxi-3-O-ii-L-ramnopiranosil-fiavona. (quercitrina), 5,7,3 '4' ,5 '- pentahidroxi-3-O-u-L- ranmopiranosil-flavona (mericitrina), como responsables de la actividad biológica observada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez, J. 23-05-2007. 2007. *Scientia et technica*. [hUp://scien.iau.uj.educo](http://scien.iau.uj.educo): 15- 02-2008, 9:00 AM.
2. Chawla, H. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*, 2m1 ed. Science Publishers. inc.
3. Croteau, R.; Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. “Natural Products (Secondary Metabolites)”. En: Buchanan, Gruissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
4. Rowland, M. y Toser, N. 1995. *Concepts and applications*. Pharmacokinetics. 3ed. Williams y Wilkins. Baltimore.
5. Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testig by standardized single disk method. *Am. J Clin.. Pathol.* 45 (4): 493-496.
6. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y Mclaughlin, J. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45 (1): 3 1-34.
7. Goren, N.; Jakaupovic, J. y Topal, S. 1990. Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum var argyrophyllum*. *Phytochemistiy*, 45 (1): 1467.
8. Prats, C.; López, D.; Giró, A.; Ferrer, J. y Valls J. 2006. Individual-based modelling of bacterial cultures to study the microscopic causes of the lag phase. *J Theor Biol.* 241 (4): 939—53.
9. Hecker, M.y Vlker, U. 2000. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 44: 35—91.
10. Gram, H.C.1884.Über die isolierte Fibrung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpriiparaten. *Fortschr. Med.* 2: 1 85--1 89.
11. Ryan, K.J. y Ray, C.G. (editors) 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill.

12. Madigan, M.T. ; Martinko, J. y Parker, J. 2004. *Brock Biology of Microorganisms*, 10th Edition, Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore.
13. Beveridge, T.J. y Davies, J. A. “Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain”. 1 *Bacteriol.* 156 (2): 846-858.
14. Davies, J.A.; Anderson, G.K.; Beveridge, T.J. y Clark, H.C. “Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain”. *J Bacteriol.* 156 (2): 837- 845.
15. Silva, A.; Casals, G. y Casals, P. 2002. BIOENSAYO. URL: <http://www.multired.com/ciencia/gosilagu/analisis%20estadistico.htm>. 05/O 1/2010.
16. Hubert, J. *Bioassay* Kendall/Hunt Publishing Company; Dubuque, Iowa, U.S.A., 1980.
17. Nijveldt, R. 2001. Flavonoids; a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*; 74: 418-425.
18. Gershwin, M.E.; German, J.B. y Keen, C.L.2000. Nutrition and immunology; principles and practice. USA *Humana Press Inc.* 10 p.
19. Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2ed. España: Acribia, S. A. 824- 825,872.
20. “American Institute for Cancer Research”. 1999. Stopping cancer before it starts. USA: *Golden Bookpublishing Co.* 194-202.
21. Caney, H.1995. Tecnología de alimentos. Trad. A. González, M Solís. México: Limusa.
22. Beyond Vitamins: Flavonoids. 2001 .<<http://www.amni.com/resprints/Flavonoids.html>>.
23. Flavonoids. 2001. <<http://www.amni.com/resprints/Supp/Flavonoids.html>>.
24. “Isoflavona de Soya”; su rol en la prevención de enfermedades crónicas. Sojar, Doc. Tec.

25. "Institute of Food Technologists". 2000; expert panel on food safety and nutrition. Functional Food; Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*. 52:63-68.
26. Pszczola, D.; Katz, F. Giese, J. 2000. Research Trends in Healthful Foods. *Food Technology*. 54:52
27. La proteína de soya y salud". 1998; Descubrimiento del papel de la proteína de soya en la lucha de la cardiopatía coronaria. USA: *Marimac Communication / Protein Technologies International*. 6-8
28. "Métodos de Investigación en fitoestrógenos".1999. Química, análisis y propiedades biológicas. USA: *Asociación Americana de la Soya*. 7p.
29. Katz, F. 1997. That's using the oid bean. *Food Technology*. 52:43.
30. Messias, M.J. y Loprinzi, C.L. 2001. Soy for breast cancer survivors: A Critical Review of the Literature. *J NuLr*. 131: 3095-3 108.
31. Proteggente, A. R.; Rice-Evans, C.; Seman, S. y Van de Put, F. 2003. The relationship between the phenolic composition and antioxidante activity of fruits and vegetable. Cap 3 en flavonoids in heath and disease. Marcel Dekeker, New York, EUA 71-96.
32. Shahidi, F. 2004. *Funtional foods*: Their role in health promotion and disease prevention. *Journal FoodScience*. 69(5): 146-149.
33. Siquet, C.; Paiva-Martins, F.; Lima, J.L.F.C.; Reis, S. y Borges, S. 2006 Antioxidant profile of dihydroxy and trihydroxyphenolics acids. A structure- activity relationship study. *Free radical research*. 40: 433-442.
34. Martínez- Flores, S. ; Gonzalez-Gallego, .1.; Culebras, J.M. y Tuñon, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acción antioxidante. *Nutrición Ho.spitalaria*. 17(6): 271- 278.

35. Bohm, H.; Boeing, H.; Hempel, T.; Dard, H. y Krok. A. 1998. Flavonoids, flavones and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss.* 2:147-163.
36. Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56: 317-333.
37. Groot, H. y Rau, U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology.* 3: 294-255.
38. Sichel, G. Corsaro, C.; Scalia, M.D.; Bifulco, A.J. y Bonomo, R.P. 1991. *In vitro*. Scavenger activity of some flavonoids and mechanism against **OH**: *Free Radical Biology and medicine.* 11: 1-18.
39. Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products.* 63: 1035- 1042.
40. Van, A.; Van, B.D.J.; Tromp, M.N.; Griffioen, D.F.I.; Van, B.W.P. y Van, V. W. J. 1997. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20: 341-42.
41. Dragan, A.; Dusanka, D. A.; Drago, B. y Nenac T. 2003. Structure-radical Scavenging Activity Relationship of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta.* 76(1): 55- 61.
42. Chen, J.W.; Zhu, Z.Q.; Hu, T.X. y Zhu, D.Y. 2004. Antifungal diterpenoids and flavonoid from *Ballota inaequidens*. *Pharmaceutical Biology.* 42 (8): 659- 663.
43. Seeram, N. P. y Nair, M.G. 2002 . Inhibition of lipid per oxidation and structureactivity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal agricultural food chemistry.* 50: 5308-5382.
44. "Biodiversity International". 2008. *New World Fruits Database* en línea. Roma: Biodiversity International

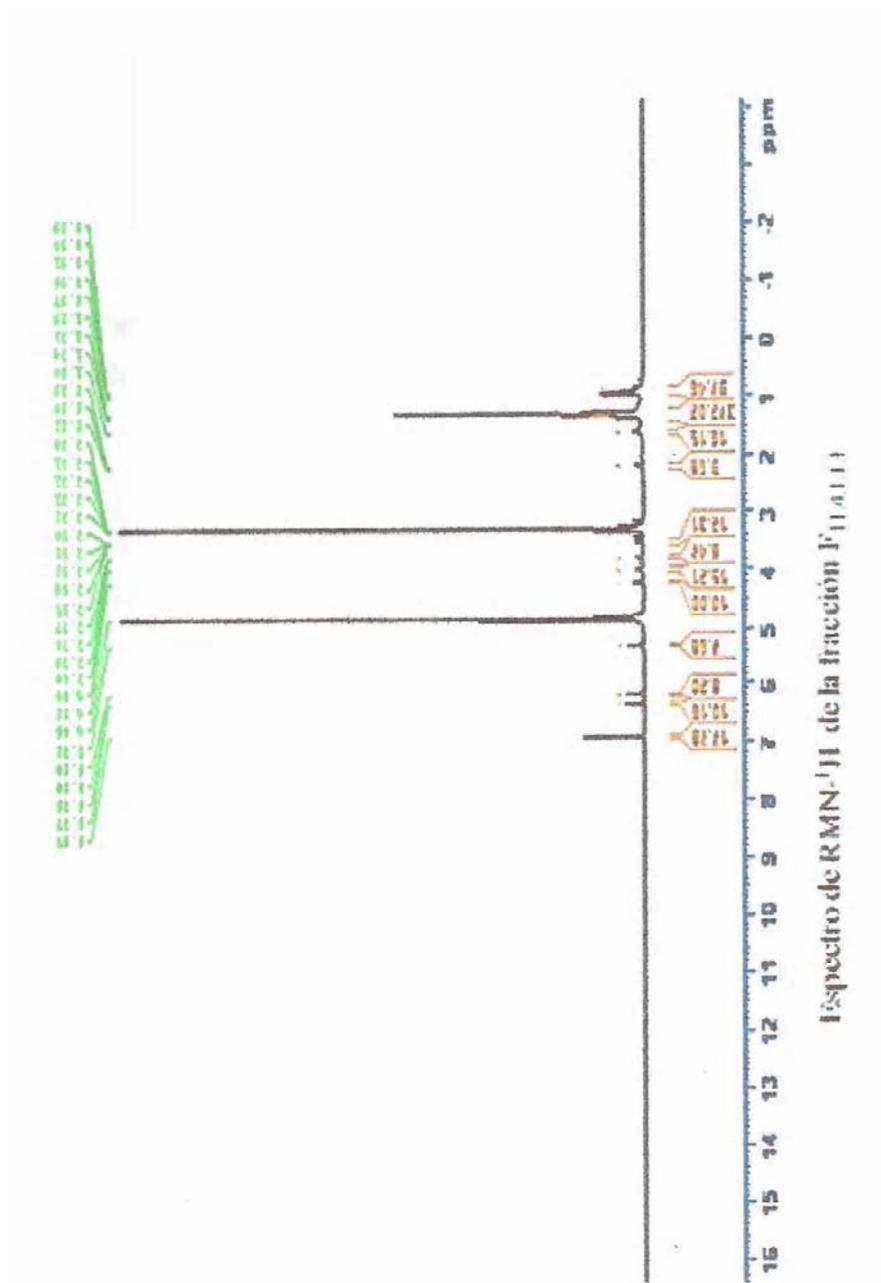
45. Cuéllar, M. 2008. F. *Frutas de Colombia* [en línea]. Bogotá: Colombia Curiosa. Disponible en: <http://colombiacuriosa.blogspot.com/>. 4/12/2008.
46. Orduz, R. J. O. y Rangel M. 2002. *Frutas tropicales potenciales para el piedemonte llanero*. Villavicencio (Meta, Colombia): Corpoica.
47. Baudi, J., 1991. Plantas medicinales existentes en Venezuela y Latino América De. America, C.A. 95, 96 p.
48. "Secondary Metabolites and Plant Defense". 2006. En: Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Cap. 13.
49. "Secondary Plant Compounds. En: Judd, W. S. Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J". 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition*. Sinauer, USA. Cap. 4; "Structural and Biochemical Characters".
50. Chakaraboty, A.; Clowdhury, B. y Bhattacharyya, P. 1995. Clausenol and clausenine, two carbamate alkaloids from *Clausena anisata*. *Phytochemistry*, 21 (11): 2753-2755.
51. Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación Jito química*. Editorial Limusa. México. 281 pp.
52. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Filo química orgánica*. Consejo de Desarrollo científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela. 54 pp.
53. Faini, F. y Labbe, C. 1994. Evaluación tóxica frente *Artemia salina* de extractos y metabolitos secundarios de *Psoralea glandulosa*. II Simposio Internacional de Química de los productos naturales y sus aplicaciones. Concepción, Chile. 483 pp.
54. WHO (World Health Organization), 1998. Quality Control methods for medicinal plant materials. Geneva india, *Journal of Medical Research*, july, (2010).
55. Butier, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery, *Journal of Natural Products*. 67,2141.

56. Vuorrelaa, P. Leinonenb, M.; Saikkuc, P.; Tammela, P.; Rauhada, .1.; Wennberge, T. y Vuorrela, H. 2004. Natural products jo the process of finding new drug candidates, *Currení Medical Chemisfry*, 11, 1375.
57. López, R. 1997. Actividad antifúngica *in vitro* de *Pinus caribaea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2:25-29.
58. Livermore, D.M. 2004. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect.* 10 (S4): 1-9.
59. Guzmán, M.; Casellas, J.M. y Sander, H.S. 2000. Bacterial Resistance to antimicrobial agents in Latin America. The gaint is awakening. *Infect. Dis. Clin. North. America.* 14:67-81.
60. Livermore, D.M. 2005. Minimising antibiotic resistance. *Lance! Infect Dis.* 5: 450- 459.
61. Fullas, F.; Hussain, R.; Chal, II. y Pezzuto, J. 1994. Cytotoxie and constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. 57(6): 801-807.
62. Chinou. Y. Demetzos, C.; Harvala, y Vervist, J., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from aerial plarts of *Citrus incanus*. *Planta Medica*, 60: 34-3 5.
63. Martínez, A. y Torres, J.M. 1990. *Micosis que afectan piel y mucosas*. Ediciones Doyma, Barcelona. 34-71.
64. Rubio M.C.; Rezusta, A.; Gil, J. y Ruesca, R.B. 1999. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Rey. Iberoam. Micol.* 16:16-22.
65. Buitrago G.E. 1994. Dermatomicosis en población de Manizales. *Biomédica.* 14: 77- 84.
66. Ascioглу S.; Rex, J.H.; De Pauw; B. y Bennett, LE. 2002. Deflninig opportunistic invasive flingical infection in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem ceil transplants. *Interna consensus.* 37: 7-14.
67. Ostrosky, Z.; Rex, J.H. y Bennett, LE. 2002. Deeply invasive candidiasis. *I?!fect Dis Clin. Noth. Am.* 16:821-5.

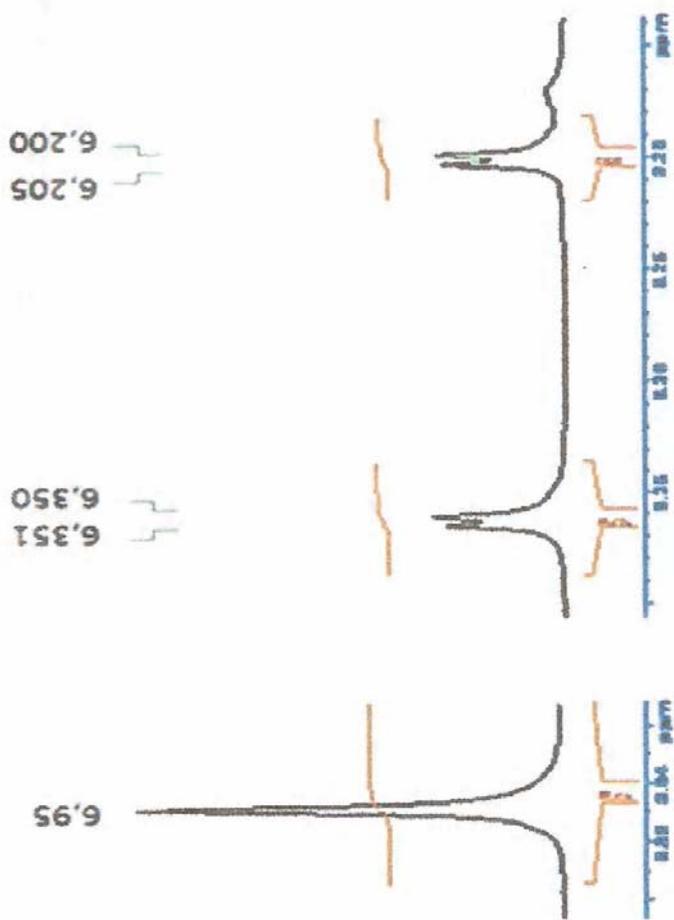
68. Gauglitz, G. y Vo-Dinh., 1. 2003. *Handbook of spectroscopy*. WILEY-VCH verlog Grnbhy Weinheim.
69. Bloor, S. y Porter, L., 1993. Mass spectrometry. *Bioactive natural products*. 1 05-123.
70. Foster, B.C.; Arnason, J.T. y Briggs, C.J. 2005. Natural health products and drugs disposition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:203-226.
71. Jones P.J. 2002. Clinical nutrition: 7. Functional foods more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, 166(12): 1555-1563
72. Sánchez-Moreno, C. 2002. Compuestos polifenólicos: efecto fisiológico. Actividad antioxidante. *Alimentaria*. 29-40.
73. Ktimmerer, K. 2004 Resistance in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54(2): 311.
74. Russell, G. 2000. Antibiotic-resistant organism infection. *The American Surgeon*. 66 (2): 112.
75. Illmer, J.; Ritchie, J. y Rabbino 11. 2000. Toward a dynamic theory of antibiotic resistance. *System Dynamics Review*. 16(4): 287.
76. Heath, P. y Breathnach, S. 2002 Treatment of infections due to resistant organisms. *British Medical Bulletin*. 61(1): 231.
77. Aguilar, I. y Galbes, T. 1976. *Tratado práctico de medicina moderna*. Ediciones interamericanas. Bogotá
78. Xiao-Dong, L. 2002. "Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum caimito* L (star Apple)". "Published on web". <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf11178n>. 30/07/2009.

APENDICES

APENDICE A

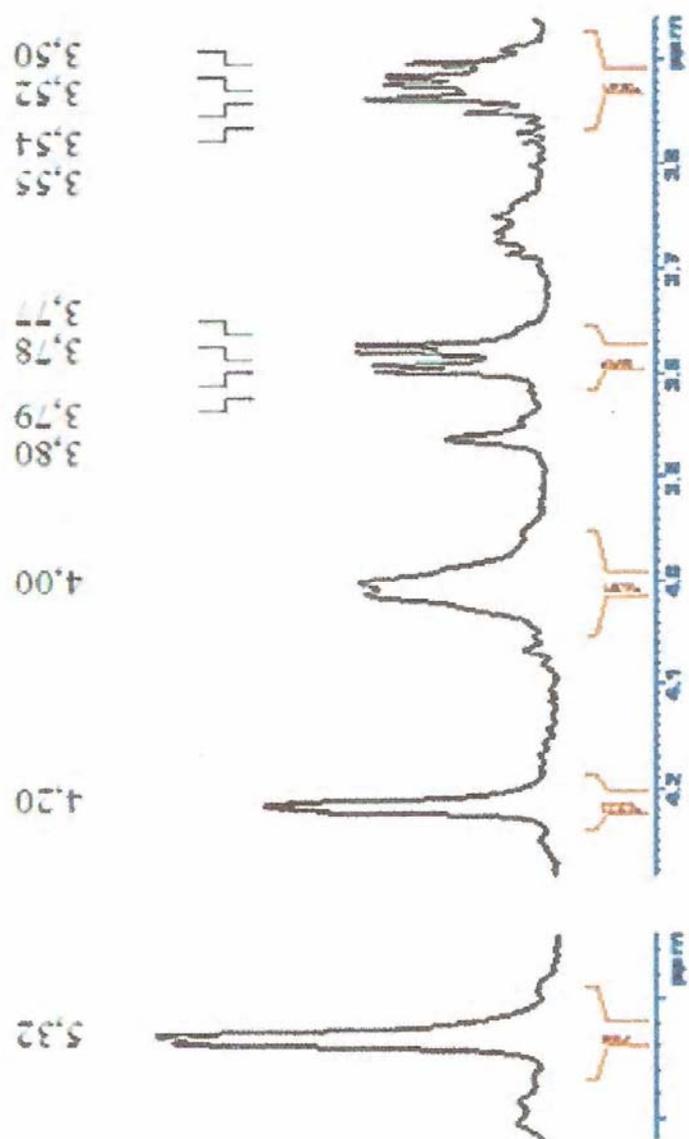


APENDICE B



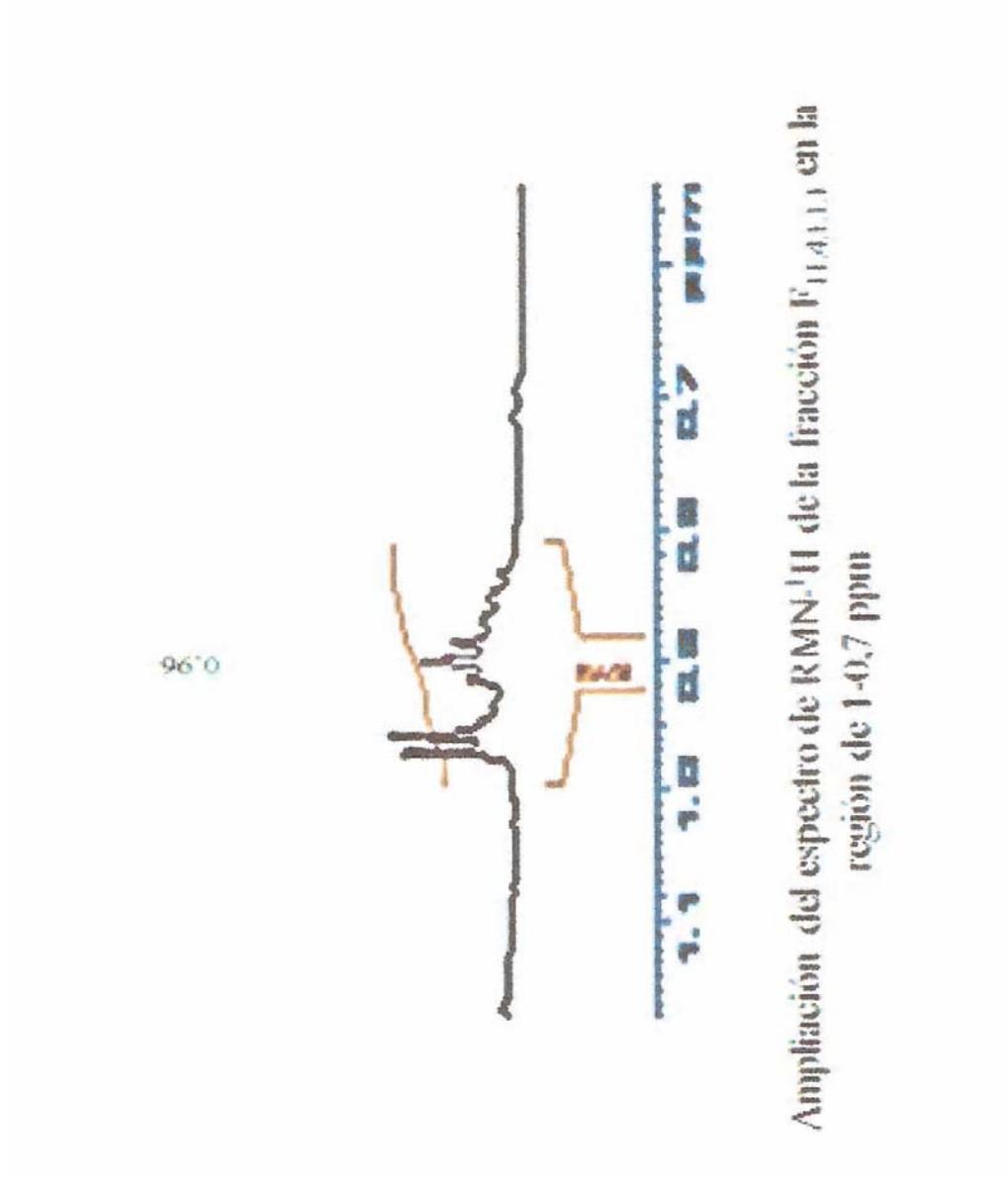
Amplificación del espectro de RMN- ^1H de la fracción F_{11.41.1} en la región de 6-7 ppm

APENDICE C

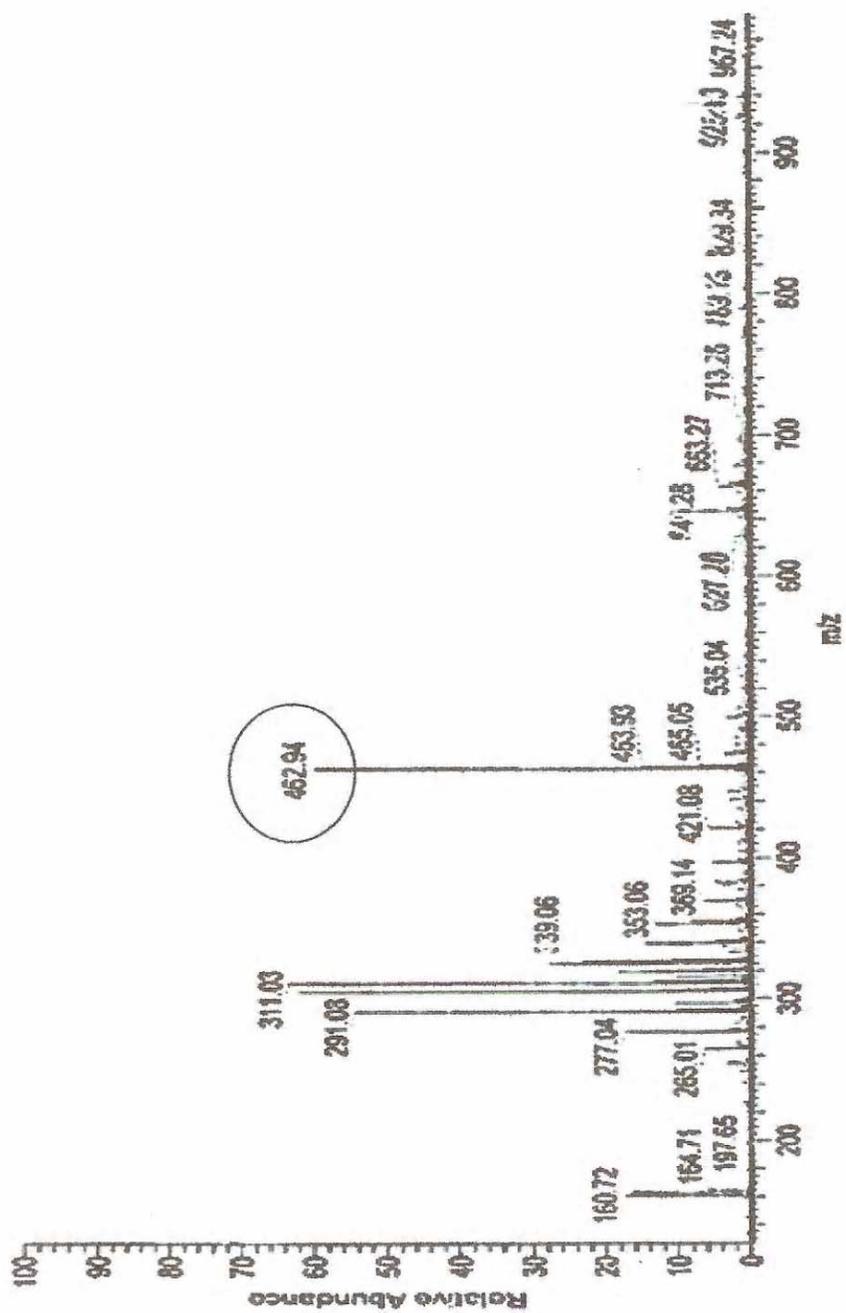


Ampliación del espectro de RMN- ^1H de la fracción F11A11 en la región de 3.5 ppm

APENDICE D

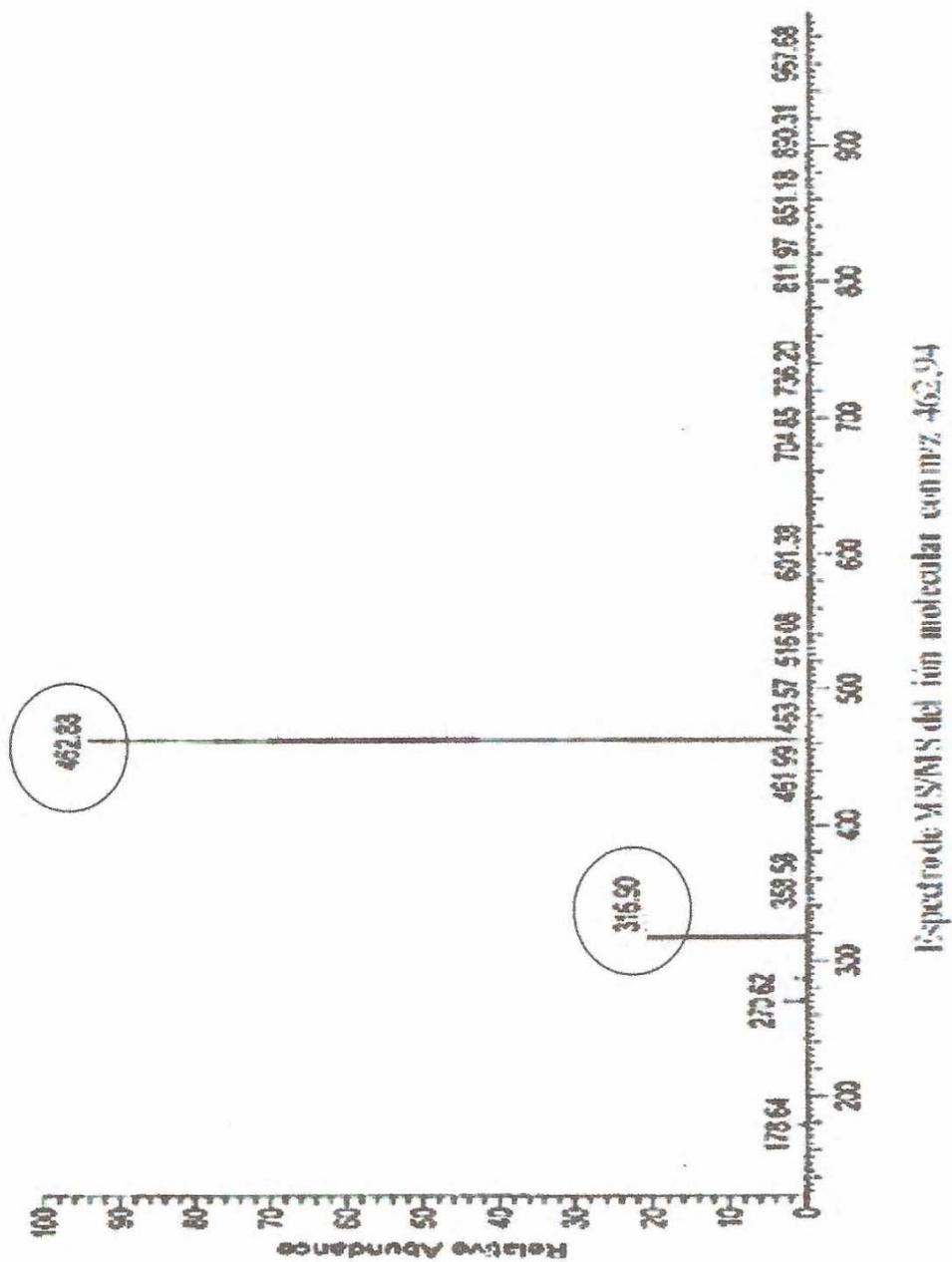


APENDICE E



Espectro de masas [M-1] de la fracción F_{11.4.1.1}

APENDICE F



HOJA DE METADATOS

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

Título	ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ANÁLISIS QUÍMICO DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>Chrysophyllum caimito</i> L
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
JOSÉ ANTONIO SALAZAR MARÍN	CVLAC	14.524.524
	e-mail	salazarja80@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Extracto en metano! de las hojas y semillas
Extracto en acetato de etilo de las hojas y semillas
Extracto en cloroformo de las hojas y semillas
Extracto en hexano de las hojas y semillas

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química de los Productos Naturales

Resumen (abstract):

Se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica y letalidad de los extractos en n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol de los órganos (semillas y hojas) de *Chrysophyllum Caimito* L, donde el extracto en metanol de las hojas (D) fue el más eficiente inhibiendo el crecimiento de: *E. coli*, *E. cloacae*, *A. calcoaceticus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *M luteus*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, con halos que variaron desde 12 cm hasta 16 cm. Además, mostró actividad antifúngica frente a *Mucor* sp (16 cm de diámetro de inhibición) y *Curvularia lunata* (16 cm de diámetro de inhibición), y presentó toxicidad frente el crustáceo *Artemia salina*, con un CL50 de 6,78 mg/ml. Se realizó un estudio químico a los distintos extractos, donde el extracto metanólico de las hojas presentó un mayor contenido de metabolitos secundarios, entre los cuales están la familia de: saponinas, flavonoides, taninos, polifenoles y glicosidos cianogénicos. La fracción de flavonoides (I) mostró actividad antibacteriana frente todas las bacterias antes mencionadas. Se logró obtener las fracciones F_{11.3.1} y F_{11.4.1.1.1} siendo estas caracterizadas parcialmente por espectrometría de masas y espectroscopía de RMN-¹H sugiriendo los compuestos mayoritarios de las fracciones F_{11.3.1} y F_{11.4.1.1.1}: 5,7,3,4'-tetrahidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavona (quercitrina) y 5,7,3,4',5'-pentahidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavona (mericitrina) respectivamente.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Hernando Herrera Mata	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.872.532
	e-mail	herreram40@hotmail.com
	e-mail	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2010	12	14
------	----	----

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis – salazarj.doc	Aplication/MSWord

Alcance:

Espacial : Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio:

Química

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

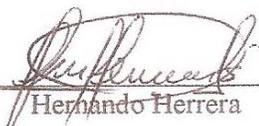
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de aclarar y difundir, por cualquier medio, el contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.



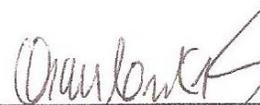
José Salazar



Hernando Herrera



Wilmar Henríquez



Oscar Crescente

POR LA COMISION DE TESIS



Maj Britt Mostue
