



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

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
FLAVONOIDES Y OTROS CONSTITUYENTES DE LA PLANTA *Conocliniopsis*  
*prasiifolia* (ASTERACEAE)  
(Modalidad: Tesis de Grado)

MÓNICA MARÍA ROSALES CÓRDOVA

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

Cumaná, enero de 2013

## INDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTO .....	II
LISTA DE TABLAS .....	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN .....	VIII
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>I</b>
RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	12
Flavonoides.....	12
Glicósidos cianogénicos .....	13
Glicósidos cardiotónicos.....	14
Saponinas.....	14
Alcaloides .....	15
Taninos y Polifenoles.....	15
Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	16
Antraquinonas.....	17
Metilcetonas.....	17
EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD .....	18
Actividad antibacteriana .....	18
Actividad antifúngica.....	19
Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	20
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOIDEOS <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . 21	
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE	
FLAVONOIDEOS .....	22
Cromatografía de columna (CC).....	22
Cromatografía de capa fina (CCF) y capa fina preparativa (CCFP).....	23

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	23
Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	23
Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS EN METANOL, HEXANO Y CLOROFORMO DE LOS ÓRGANOS DE LA PLANTA <i>Conocliniopsis     prasiifolia</i> .....	26
PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES.....	27
PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	29
Actividad antibacteriana .....	29
Actividad antifúngica.....	30
Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	31
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOIDEOS <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . 32	
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO .....	32
Cromatografía de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> .....	33
Separación e identificación de de la subfracciones F <sub>4.2.3.1.5</sub> .....	41
Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F <sub>4.2.7.6</sub> .....	49
Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F <sub>4.2.5.2.2</sub> .....	64
Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F <sub>4.2.5.2.4</sub> .....	69
Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F <sub>4.2.5.2.5</sub> .....	77
CONCLUSIÓN.....	I
BIBLIOGRAFÍA .....	I
HOJA DE METADATOS .....	92

## DEDICATORIA

A:

**Mi Dios** todo poderoso, por ser mi roca fuerte, la luz que me guía y el sostén que me mantiene de pie ante la vida.

**Mi madre, Luisa de Rosales**, la mejor maestra, la inspiración del cómo luchar por mis sueños, mi fortaleza al levantar en mí la esperanza y mi ayuda que no desmaya hasta ver culminada mis metas.

**Mi incomparable padre, Mario Rosales**, por ser el mayor ejemplo de amor y esperanza, mi apoyo incondicional al creer siempre en mí y por dar gran parte de su vida por solo ver realizado mis sueños.

**Mis grandes hermanos, Mario Rosales**, por tener siempre un consejo, un abrazo fuerte y respuestas a mis preguntas que son la fuente de mi aprendizaje, **Fanny Rosales**, por estar siempre a mi lado, brindándome su ayuda inigualable, amor, amistad, protección, humildad y confianza, **Marlyn Rosales** por ser mi guía, la mano extendida, amistad incondicional y mi compañera en todo momento.

**Mi hijo, Mauro Vásquez**, por ser el ángel de mi vida, mi mayor inspiración, el motivo a luchar y mi gran felicidad.

**Mi bello esposo, Mauro Vásquez**, por ser uno en un millón, brindándome su amor, ayuda y comprensión, siendo esta una recompensa a su esfuerzo y confianza.

**Mis hermosos sobrinos**, quienes son la fuente de alegría y motivación para crecer y ser su ejemplo a seguir: **Marivys Rosales, Cesar Salazar, Stefanny Salazar y Elías García**.

## AGRADECIMIENTO

Con respuesta grata a toda ayuda recibida en este largo recorrido con amor doy gracias.

A:

Dios por ser mi padre mi dulce compañía, quien ha cuidado de mí para ver cumplida en mi sus promesas con fidelidad y amor, a mi señor y salvador, Jesús mi amor eterno, quien va siempre delante mi ayudándome a vencer toda adversidad, fortaleciendo mi corazón y obediencia y al mejor regalo que me ha podido dejar, mi consolador, el espíritu santo quien me ha llevado a sentir su dulce presencia, adorando y alabando al todo poderoso Dios.

La Universidad De Oriente y al Departamento de Química por brindarme la educación y formación profesional, que me permitió realizar este trabajo de investigación.

Mi asesor el Dr. Oscar Crescente, mil gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo sus conocimientos y enseñanza, brindándome su amistad y esfuerzos dejando huellas.

Quien considere en todo momento mi coasesor el Dr. William Henríquez, por su invaluable extraordinaria ayuda, compartiendo su conocimiento profesional, amistad y enseñanza que me motivaron a seguir aun mas allá de esta meta.

Mis buenos amigos, Marlyn, Raúl, Rosanny, Berenice, Yolimar, Irmina, María José, Ana Karina, Asyuri, Aidyn, Yulinet y miguel. Los cuales aprecio y estoy muy agradecida, por brindarme su apoyo en todo momento, amistad y confianza. Dios les bendiga.

Mis compañeros del laboratorio, Oralís, José, María, Hellen, Jean Carlos, Manuel y Marines.

Los profesores, Maj Britt Mostue, Gustavo Liendo, Ernesto Bastardo, Hernando Herrera, Francisco López, Euclides Velazco, Haydelba D' Armas y Daniel Loroño, entre otros, sus conocimientos fueron la base de mi formación profesional.

Los técnicos Simón Sanoja, Roseline Zabala, Lirismar Rivero, Moraima Carrillo, Hernán Subero, Luis Cortez, Yoselin Guevara, por todas sus orientaciones en los laboratorios.

Al Dr. Daniel Loroño, Dr. William Henríquez, Dra. Shailily Moreno y IUTC, por el aporte dado, con la donación de reactivos y solventes para la realización de este trabajo.

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepas bacterianas .....	18
Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes al laboratorio de Micología.....	19
Tabla 3. Porcentajes de rendimientos de los extractos en metanol, hexano y cloroformo de los órganos de la planta <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	26
Tabla 4. Análisis químico preliminar de extractos de hoja, tallo, raíz y flor en hexano y metanol de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	27
Tabla 5. Actividad antibacteriana de las fracciones solubles en preliminar de extractos de hoja, tallo, raíz y flor en hexano y metanol de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	30
Tabla 6. Actividad letal (ig/ml) contra <i>Artemia salina</i> , de las fracciones solubles metanol de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	32
Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de flavonoides y otros constituyentes de hojas soluble en cloroformo de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	33
Tabla 8. Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes del extracto de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	34
Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción F <sub>4</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	35
Tabla 10. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas del fraccionamiento de F <sub>4</sub> . ....	35
Tabla 11. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	36
Tabla 12. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2.3</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	37
Tabla 13. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2.3.1</sub> proveniente de la proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	37
Tabla 14. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2.5</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	38
Tabla 15. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2.5.2</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	38
Tabla 16. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F <sub>4.2.7</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	39
Tabla 17. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.3.1.6</sub> . ....	41
Tabla 18. Compuestos identificados en la subfracción F <sub>4.2.3.1.6</sub> por (CG-EM). ....	43
Tabla 19. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.7.6</sub> . ....	50
Tabla 20. Compuestos identificados en la subfracción F <sub>4.2.7.6</sub> por (CG-EM). ....	51
Tabla 21. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.2</sub> . ....	64
Tabla 22. Compuestos identificados en la subfracción F <sub>4.2.5.2.2</sub> por (CG-EM). ....	67

Tabla 23. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN $^1H$ de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> .....	70
Tabla 24. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_C$ ) de algunas señales de RMN $C^{13}$ la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> .....	72
Tabla 25. Desplazamientos químicos de $H^1$ de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> y del 9â-hidroxi-atrupliciolide-8- <i>O</i> -tiglate (lactona sequiterpenica).....	75
Tabla 26. Desplazamientos químicos de $C^{13}$ de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> y del 9â-hidroxi-atrupliciolide-8- <i>O</i> -tiglate (lactona sequiterpenica).....	76
Tabla 27. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN $^1H$ de la subfracción F <sub>4.2.5.2.5</sub> .....	77
Tabla 28. Compuestos identificados en la subfracción F <sub>4.2.5.2.5</sub> por (CG-EM). .....	79

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del 2-fenil-1-benzopirona.....	1
Figura 2. Estructura de la quercetina. ....	1
Figura3. Estructura del kaempferol. ....	1
Figura 4. Estructura de la quercitrina-3- <i>O</i> -glucósido. ....	1
Figura 5. Estructura del kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido. ....	1
Figura 6. Estructura del faradiol. ....	1
Figura 7. Estructura de la 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil-3-buten-2-ona).....	1
Figura 8. Estructura de saponinas. ....	1
Figura 9. Estructura del tanino.....	1
Figura10. Estructura de la cumarina. ....	1
Figura 11. <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> .....	1
Figura 12. Representación esquemática de la obtención de los extractos crudos.....	12
Figura 13. Representación esquemática de las pruebas de la determinación de flavonoides.....	13
Figura 14. Representación esquemática de la detección de glicósidos cianogénicos.....	1
Figura 15. Representación esquemática de la detección de glicósidos cardiotónicos. ....	14
Figura 16. Representación esquemática de la detección de saponinas. ....	14
Figura 17. Representación esquemática de la detección de alcaloides.....	15
Figura 18. Representación esquemática de la detección de taninos y compuestos fenólicos.....	16
Figura 19. Representación esquemática de la detección de esteroides y triterpenos.....	16
Figura 20. Representación esquemática de la detección de antraquinonas. ....	17
Figura 21. Representación esquemática de la detección de metilcetonas.....	17
Figura 22. Representación esquemática del ensayo antibacteriano.....	19
Figura 23. Representación esquemática del ensayo antifúngico .....	20
Figura. 24. Toxicidad contra <i>Artemia salina</i> . ....	21
Figura 25. Esquema de obtención del extracto de flavonoides y otros constituyentes a partir del extracto metanólico de las hojas de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> . ....	22
Figura 26. Esquema de fraccionamiento de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> .....	41
Figura 27. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.3.1.5</sub> .....	42
Figura 28. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.3.1.5</sub> .....	43
Figura 29. Cromatograma de la subfracción F <sub>4.2.3.1.5</sub> .....	1
Figura 30. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico.....	1
Figura 31. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.....	46
Figura 32. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico.....	1
Figura 33. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido hexadecanoico.....	47
Figura 34. Espectro de masas del friedelan 3-ona. ....	47
Figura 35. Patrón de fragmentación del friedelan 3-ona. ....	1
Figura 36. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.7.6</sub> .....	50
Figura 37. Ampliación del espectro de RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.7.6</sub> .....	51
Figura 38. Cromatograma de la fracción subfracción F <sub>4.2.7.6</sub> .....	1

Figura 39. Espectro de masas del éster metílico del ácido dodecanoico. ....	1
Figura 41. Espectro de masas del 6, 10,14-trimetil-2-Pentadecanona. ....	1
Figura 43. Espectro de masas del éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico. ....	54
Figura 45. Espectro de masas del nonadecano. ....	54
Figura 47. Espectro del éster metílico del ácido tridecanoico. ....	55
Figura 49. Espectro de masas del docosano. ....	55
Figura 51. Espectro de masas del hexacosano. ....	56
Figura 40. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido dodecanoico. ....	1
Figura 42. Patrón de fragmentación del 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. ....	1
Figura 44. Patrón de fragmentación del éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico. ....	1
Figura 46. Patrón de fragmentación del nonadecano. ....	60
Figura 48. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido tridecanoico. ....	61
Figura 50. Patrón de fragmentación del docosano. ....	1
Figura 52. Patrón de fragmentación del hexacosano. ....	1
Figura 53. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.2</sub> . ....	1
Figura 54. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.2</sub> . ....	1
Figura 55. Cromatograma de gases de la subfracción F <sub>4.2.5.2.2</sub> . ....	1
Figura 56. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico. ....	1
Figura 57. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico. ....	1
Figura 58. Espectro de masas del Friedelan-3-ona. ....	1
Figura 59. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción. ....	71
Figura 60. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> . ....	72
Figura 61. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> . ....	73
Figura 62. Espectro DEPT 135 de la subfracción F <sub>4.2.5.2.4</sub> . ....	1
Figura 63. Estructura del 9-hidroxy-atrípliciolide-8-O-triglate. ....	1
Figura 64. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.5</sub> . ....	1
Figura 65. Ampliación del espectro RMN <sup>1</sup> H de la subfracción F <sub>4.2.5.2.5</sub> . ....	1
Figura 66. Cromatograma de gases de la subfracción F <sub>4.2.5.2.5</sub> . ....	1
Figura 67. Espectro de masas del pentadecano. ....	1
Figura 68. Patrón de fraccionamiento del pentadecano. ....	1
Figura 69. Espectro de masas del heptadecano. ....	1
Figura 71. Espectro de masas del eicosano. ....	1
Figura 70. Patrón de fragmentación del heptadecano. ....	1
Figura 72. Patrón de fragmentación del eicosano. ....	1
Figura 73. Espectro de masas del éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico. ....	1
Figura 74. Patrón de fragmentación del éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1, 2-benzenodicarboxílico. ....	1

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. EMH= Extracto metanólico de hojas.
2. EMT= Extracto metanólico del tallo.
3. EMR= Extracto metanólico de la raíz.
4. EMF= Extracto metanólico de flores.
5. EHH= Extracto hexánico de hojas.
6. EHT= Extracto hexánico del tallo.
7. EHR= Extracto hexánico de la raíz.
8. EHF= Extracto hexánico de flores.
9. ECH= Extracto clorofórmico de hojas.
10. ECT= Extracto clorofórmico del tallo.
11. ECR= Extracto clorofórmico de la raíz.
12. ECF= Extracto clorofórmico de flores.
13. UV= Espectroscopia ultravioleta.
14. TMS= Tetrametilsilano.
15. AcOEt = Acetato de etilo.
16. CC= Cromatografía de columna.
17. CCF= Cromatografía de capa fina.
18. CCFP=Cromatografía de capa fina preparativa.
19. CG-EM= Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas.
20. CL<sub>50</sub> = Concentración letal media.
21. DMSO= Dimetilsulfóxido.
22. PDA= Agar Papa Dextrosa.
23. DETP = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
24. R<sub>f</sub>= Relacion entre los desplazamiento del solute y el sovente.
25. RMN <sup>13</sup>C = Resonancia Magnética Nuclear de Carbono.
26. RMN<sup>1</sup>H= Resonancia Magnética Nuclear de Protón.
27. TR= Tiempo de retención.

## RESUMEN

La evaluación química preliminar y el estudio de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y letales de los extractos solubles en metanol y hexano de los órganos de la planta *Conocliniopsis prasiifolia*, recolectada en la localidad de San Juan, estado Sucre, evidenciaron la posible presencia de alcaloides, esteroides, triterpenos pentacíclicos, antraquinonas, polifenoles, metilencetonas, taninos y flavonoides con potencial actividad biológica. Entre estos extractos, los metanólicos mostraron mayor actividad antibacteriana contra de *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, siendo el extracto metanólico de hojas el que presentó los mayores halos de inhibición. Los extractos usados en la actividad antifúngica no presentaron actividad antimicótica. La actividad letal en *Artemia salina*, con mayor importancia la mostraron los extractos metanólicos de raíz y de hojas, con valores de CL<sub>50</sub> de 0,04 y 3,16 µg/ml, respectivamente, lo cual evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estos extractos. Las subfracciones obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de hojas, provenientes de F<sub>4</sub> mostraron actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *E.coli*, lo que evidenció la presencia de metabolitos con potencial actividad bactericida; lográndose caracterizar e identificar por RMN-H<sup>1</sup> y CG/EM, algunos constituyentes como, los ésteres metílicos y etílicos del ácido hexadecanoico, heptadecano, pentadecano, eicosano, nonadecano, éster metílico del ácido dodecanoico; 6, 10,14-trimetil-2-pentadecanona, éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico, éster metílico del ácido tridecanoico, docosano y hexacosano de las subfracciones F<sub>4.2.3.1.6</sub> y F<sub>4.2.5.2.2</sub> se identificó un triterpeno pentacíclico friedelan-3-ona y de la subfracción F<sub>4.2.5.2.4</sub> se identificó la posible presencia de una lactona sequiterpenica 9β-hidroxi-atrípliciolide-8-O-tiglate. Siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de estos constituyentes en *Conocliniopsis prasiifolia*. Considerando los resultados obtenidos, se puede inferir que los metabolitos identificados en *Conocliniopsis prasiifolia* posiblemente son los causantes de la bioactividad observada.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido, desde la antigüedad, un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades, por lo que se les llamaron plantas medicinales, siendo veneradas por las virtudes que se les habían reconocido, transmitiéndose estas de generación en generación; nadie buscaba el saber por qué o cómo actuaban, pero ofrecían resultados incontestables y que llegó a parecer mágico (1).

La química de los productos naturales se basa en el estudio de los metabolitos secundarios, que son compuestos químicos sintetizados por las plantas para realizar determinadas funciones, son un elemento importante y necesario, ya que en el reino vegetal representan una ventaja competitiva, con una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene, es decir, su distribución es relativamente restringida en la naturaleza que, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas (2,3).

Es posible que algunos de estos metabolitos no sean esenciales para el organismo que los produce, pero en general deben tener algún significado biológico ya que son biosintetizados y biodegradados, por lo que se presume que deben poseer alguna función, probablemente, específica. Se ha propuesto que estos compuestos están relacionados con la interacción con otros organismos (función ecológica, no fisiológica), como defensa frente al ataque de depredadores, o que son la respuesta a condiciones ambientales de estrés (2,4).

Es por esto que muchos autores han considerado a la naturaleza como una fuente inagotable de compuestos activos que, desde un punto de vista farmacológico, se vienen utilizando con gran efectividad para combatir numerosas enfermedades. La búsqueda de nuevos medicamentos con estructuras novedosas, para fines terapéuticos, se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La existencia de enfermedades para las cuales no existen medicamentos efectivos, la resistencia de los agentes patógenos y los avances instrumentales, han propiciado la identificación de un número

cada vez mayor de compuestos bioactivos (5). Entre los cuales se incluyen sustancias con valor terapéutico, como antibióticos, antitumorales, antivirales, entre otros; así mismo incluyen sustancias citotóxicas, insecticidas, sustancias repelentes y atrayentes (6).

Gran parte de estas sustancias se encuentran en una diversidad de familias de plantas, las cuales representan la fuente de donde se pueden aislar e identificar dichos compuestos (7).

Se han reportado el aislamiento de compuestos bioactivos en especies pertenecientes a la familia Asteraceae, también conocidas como Compositae, la cual se caracterizan por poseer plantas bien definidas por sus inflorescencias en capítulos o cabezuelas, sus flores mayormente gamopétalas y pentámeras, el cáliz modificado en un vilano, los estambres generalmente sinantereos y el ovario ínfero bicapelar (8).

En el 2008 han sido aislados flavonoides, saponinas y aceites esenciales, los cuales promueven la actividad antiinflamatoria, diurética, espasmolítica, antiflogística, antimicóticas, antihipertensivas e inmunoestimulante, a partir de la especie *Virgaueria solidago*, con gran actividad antioxidante y antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*, demostrado mediante el uso de el modelo *in vitro*, atribuido a la presencia de timol, carvacol y otros terpenos presentes en el aceite esencial (9,10).

Entre estos compuestos, los flavonoides son de origen biosintético mixto, sus anillos (A, B y C), el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C provienen de la ruta del ácido shikímico, los autores lo definen como C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>, representado por su estructura base como, 2-fenil-1-benzopirona (figura 1), de los cuales se han aislado, la quercetrina (figura 2), kaempferol (figura 3), siendo considerado los mayores proveedores de estas actividades, antiinflamatorias, diuréticas y antimicóticas así como a los efectos antioxidantes y a su capacidad de actuar contra las histaminas y

otros mediadores de los procesos inflamatorios, como son las prostaglandinas y los leucotrienos (11-12).

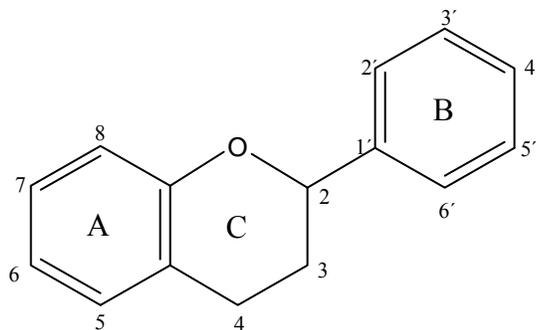


Figura 1. Estructura del 2-fenil-1-benzopirona.

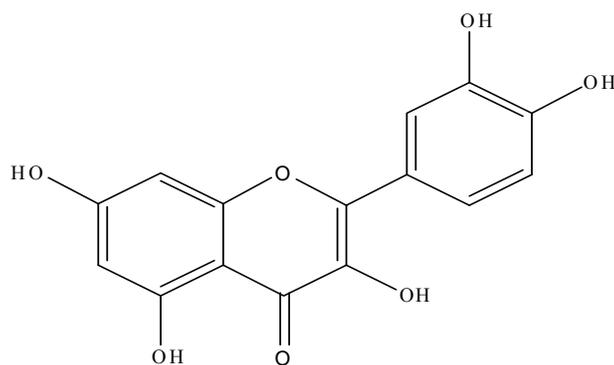


Figura 2. Estructura de la quercetina.

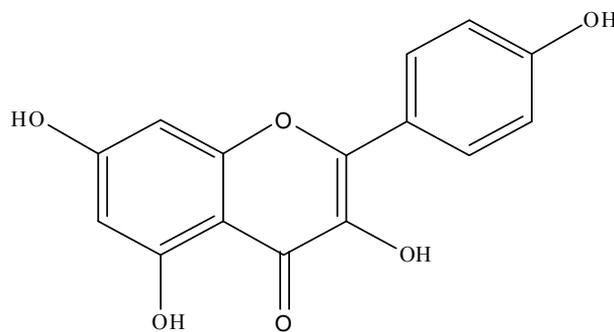


Figura3. Estructura del kaempferol.

Entre los flavonoides conjugados con azúcares, los *O*-glicósidos son los más abundantes, en este género de plantas lo que le confiere excelentes propiedades antioxidantes a cada una de estas especies, además de los efectos terapéuticos que se generan contra cierto número de patologías, incluyendo cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (13,14).

En Colombia, varias plantas medicinales han sido aprobadas por el Ministerio de Salud como antiinflamatorias, entre ellas, se encuentra *Arnica montana*, la cual es utilizada tradicionalmente como antiinflamatorio muscular externo. Estudios realizados comprobaron esta actividad mediante el aislamiento de quercitrina-3-*O*-glucósido (figura 4) y kaempferol-3-*O*-glucósido (figura 5). Así mismo, los ácidos caféico, clorogénico y los ácidos lácticos le proporcionan numerosas propiedades antibacterianas, por ende, se utiliza para tratar eccemas y acné. Es aconsejable en casos de afecciones del tipo faringitis o anginas (15,16).

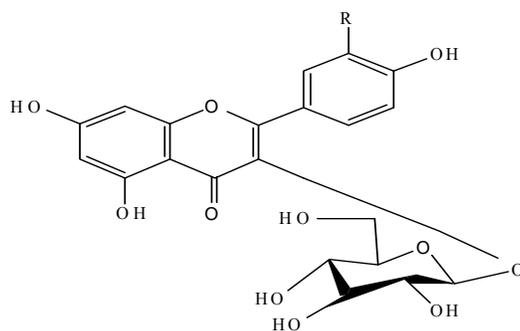


Figura 4. Estructura de la quercitrina-3-*O*-glucósido.

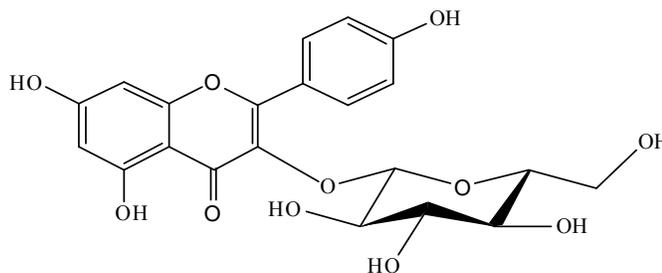


Figura 5. Estructura del kaempferol-3-*O*-glucósido.

De la planta *Calendula officinalis*, se ha reportado el aislamiento de triterpenos como el faradiol (figura 6) con una considerable actividad antiinflamatoria, usando el modelo *in vivo* con los extractos de la flor, mediante el estudio de estimulación por epitelización de heridas hechas quirúrgicamente en roedores y en edemas producidos por carragenina y prostaglandina, un efecto antihiperlipidémico por calendusidos aislados, la actividad bactericida usando el modelo *in vitro* respecto a *Staphylococcus aureus*, la actividad antifúngica y virucida, contra los virus de la influenza y el virus del herpes simple por la presencia de polisacáridos y terpenos oxigenados, 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-3-buten-2-ona (figura 7) presentes en la flor de la planta (17,18).

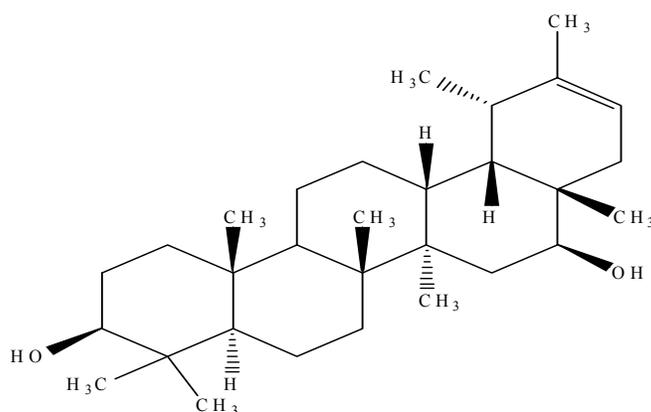


Figura 6. Estructura del faradiol.

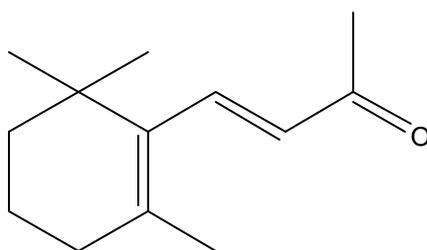


Figura 7. Estructura de la 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-3-buten-2-ona).

En los últimos años, la búsqueda de metabolitos antioxidantes, antimicrobianos y con propiedades anti inflamatorias han ido en aumento debido a su potencial uso en los tratamientos de enfermedades crónicas e infecciosas. Los estudios han demostrado el daño oxidativo celular derivado de un desequilibrio entre la generación de radicales libres como la causa primaria de enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras (19,20).

Debido al riesgo de los efectos adversos producidos con el uso de antibióticos sintéticos, se ha podido determinar que las plantas medicinales pueden ofrecer una fuente alternativa de agentes antimicrobianos con una significativa actividad frente a estos microorganismos infecciosos. Además, un número de antibióticos han perdido su eficacia debido al desarrollo de cepas resistentes, principalmente a través de la formación de genes de resistencia (21).

La actividad biológica de una planta medicinal reside en un conjunto de compuestos químicos que se encuentran en los tejidos de las plantas. Actualmente, se utilizan diversos métodos en los laboratorios para evaluar la actividad biológica producida por extractos de plantas y animales, entre los cuales se puede mencionar, el de la sensibilidad antibacteriana, antifúngica, tóxica y citotóxica. El objetivo esencial de estas pruebas de susceptibilidad es facilitar la predicción del probable impacto de la administración del compuesto ensayado y resultado de la enfermedad que es causada por un organismo o unos organismos similares. Los productos crudos aislados de estos organismos han servido como fuente de drogas y sustancias precursoras en las síntesis de las mismas (22,23).

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 (24,25).

Recientemente en el 2011, se evaluó la actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria de los extractos etanolicos de hojas, tallo y flor de la planta *Wedelia trilobata*, mediante el uso del reactivo Folin-Ciocalteu se determinó el contenido de fenoles totales en todos los extractos, evaluando su actividad antioxidante, midiendo la captación de radicales libres con el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) el (DPPH) y por FRAP (ferric reducing activity/antioxidant power), en los cuales la hoja y el tallo mostraron una inhibición de los radicales libres de (86, 82 y 630, 72, 508, 81), respectivamente. Su actividad antimicrobiana generó una fuerte inhibición frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas. *In vitro* se comprobó la actividad antiinflamatoria mediante la inhibición por la desnaturalización inducida por calor y albumina por medio de la estabilización de la membrana de glóbulos rojos y por el ensayo inhibidor de la proteinasa, utilizando la aspirina como medicamento estándar, el análisis fitoquímico reveló la presencia de saponinas (figura 8), taninos (figura 9), flavonoides, terpenos, fenoles, haciendo estos los responsables de las actividades evaluadas en esta planta (26,27).

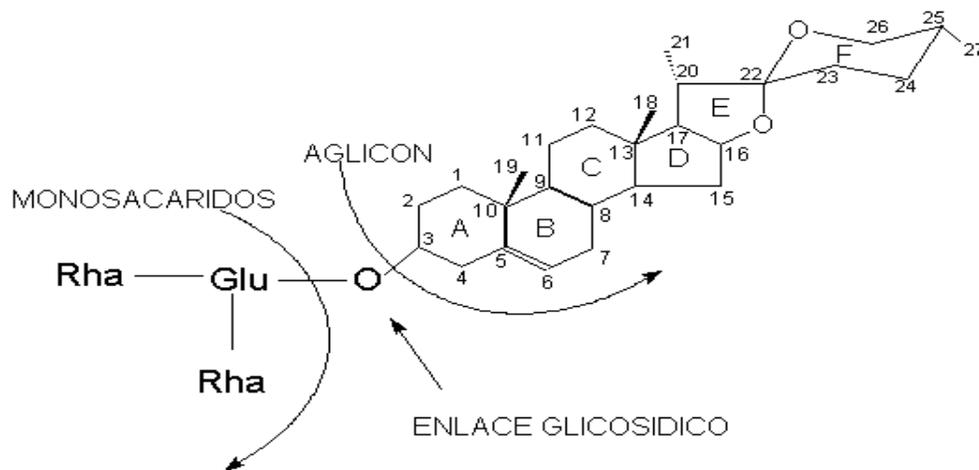


Figura 8. Estructura de saponinas.

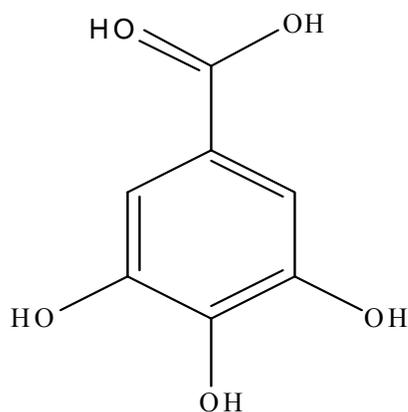


Figura 9. Estructura del tanino

Las plantas adquirieron una importancia fundamental una medicina popular. Con el desarrollo de ciencias naturales y el método en la medicina científica, los medicamentos de origen vegetal se convirtieron en objeto de análisis para científicos. Se han hecho esfuerzos para mejorar las sustancias naturales aumentando las propiedades deseadas y minimizar sus efectos secundarios adversos. Hay un sin número de registros que muestra la búsqueda incesante, de plantas medicinales para la cura o incluso el alivio de las enfermedades que han azotado sin piedad la humanidad (28,29).

La búsqueda de nuevos agentes farmacológicos activos, obtenidos a partir de las plantas ha llevado al descubrimiento de muchos fármacos clínicamente activos. Varias plantas de la flora brasilera se utilizan en la medicina popular, pero muchos de ellos todavía requieren estudios científicos que avalen su uso terapéutico (30).

La especie *Conocliniopsis prasiifolia*, popularmente conocida como "mentrasto", "aleluya" y "cabeza de lagarto", es una planta de distribución en América del Sur utilizada en la medicina tradicional como anti-inflamatorio, analgésico y antipirético, caracterizada por ser rica en triterpenos (31,32).

En 1984, estudios químicos realizados con las raíces *Conocliniopsis prasiifolia*, tuvo como resultado, el aislamiento de nueve lactonas sesquiterpénicas y una cumarina y los

análisis químicos con las partes aéreas dio también como resultado también, la presencia de lactonas sesquiterpénicas, que son comunes en la familia Asteraceae, conocidas por poseer compuestos antitumorales, antileucémicas, citotóxicas, antimicrobianos, antiinflamatorios y analgésicos(33,34).

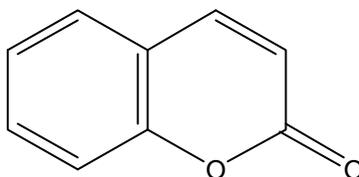


Figura10. Estructura de la cumarina.

Un estudio en el 2005 evaluó el posible efecto analgésico anti-inflamatorio, del extracto etanolico de hojas en *Conocliniopsis prasiifolia* (EECp) en animales de experimentación (roedores), en la prueba de la placa caliente, cada animal, individualmente, se colocó sobre la placa caliente ( $50 \pm 1$ ) ° C. por 35 segundos, para evitar la lesión de los tejidos. El (EECp) se suministró (50, 100, 200 mg / kg, por vía intraperitoneal (i.p.) causó una disminución en el volumen en la pata de la rata, entre 3 y 5 horas después de la aplicación de (EECp) y 250, 500 por vía oral (p.o.) mg / kg, tiene un efecto sobre la indometacina, coutilizado, como nivel de drogas, induce un efecto significativo progresivo en 1,5, 3,0 y 5,0 horas después de la administración, de la carragenina así como también, por el método de punción auricular (PMA) inducidas en roedores, en edema de la oreja utilizando (1mg/oreja, aplicación tópica) (EECp) mostraron efectos inhibitorios sobre el edema. Concluyendo, EECp mostró efecto analgésico central y anti-inflamatorios en roedores a dosis y rutas de prueba (35).

En *Lourteigia ballotaefolia* (Asteraceae) se aislaron tres lactonas sesquiterpénicas como el 9beta-hidroxi-atripliciolide-8-O-tiglate, se aisló por primera vez a partir de esta planta y se había informado anteriormente en *Conocliniopsis prasiifolia*, la 9β-hidroxi-atripliciolide-8-O-(5-acetoxitiglate) ya se había descrito en esta especie y el componente menor el 9beta-(tigloiloxi)-atripliciolide, el cual es un nuevo compuesto. La actividad

anti-inflamatoria de estos compuestos se evaluó usando el aceite de crotón en orejas de ratones (36).

Todas las plantas antes mencionadas pertenecientes a la familia Asteráceae, han sido estudiadas con el propósito de obtener nuevas sustancias de origen natural que puedan ser recursos renovables de múltiples usos, en vista que los constituyentes en las plantas participan en los ciclos biosintéticos y su estudio contribuye a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen con fines científicos. Es por ello que, cada día, aumentan los intereses por explorar los productos naturales de plantas, con el propósito de encontrar nuevas sustancias que sirvan para dar respuestas a preguntas que han venido surgiendo tiempos atrás, así como también promover el avance de la biomedicina que pueda compensar la necesidad de tener la solución a enfermedades que han sido imposibles hasta ahora de encontrarle cura. Dado que las investigaciones en productos naturales en nuestro país no abundan, es sumamente importante promover estas investigaciones que permitan conocer la biodiversidad química del país, tomando en cuenta, que existe una gran gama de plantas que habitan en los bosques, selvas y montañas.

Por lo antes expuesto, se consideró de interés desarrollar el presente estudio, a través del cual se evaluó la posible bioactividad y presencia de flavonoides y otros constituyentes presentes en los extractos orgánicos de *Conocliniopsis prasiifolia* recolectadas en la localidad de San Juan, estado Sucre, para así tener un conocimiento más profundo de la química de esta planta y del potencial que puedan tener sus constituyentes en el campo de la biomedicina.

## METODOLOGÍA

### RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La especie estudiada, *Conocliniopsis prasiifolia*, fue recolectada en la localidad de San Juan, sector la Zona, estado Sucre. Posteriormente se identificó en el herbario IRBR del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. El material usado para la investigación, 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 11. *Conocliniopsis prasiifolia*.

### OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL MATERIAL VEGETAL

Una vez deshidratados los distintos órganos (hojas, tallo, raíz y flores), estos fueron pulverizados por separado en un molino eléctrico, para posteriormente ser sometidos exhaustivamente a extracciones sucesivas, con metanol y hexano, los cuales fueron evaporados y concentrados a presión reducida en un rotaevaporador marca Büchi, modelo 461, a 35°C, obteniéndose los extractos crudos de cada órgano.

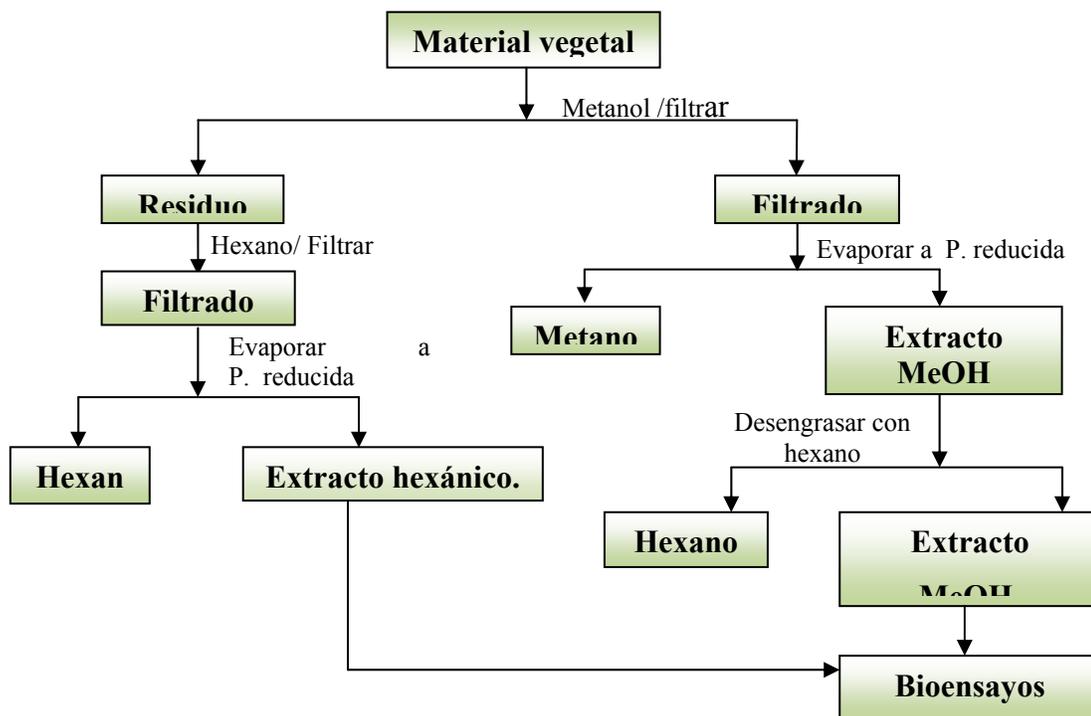


Figura 12. Representación esquemática de la obtención de los extractos crudos.

## ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Se realizaron una serie de pruebas químicas para detectar la posible presencia de algunos metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas, esteroides insaturados, Triterpenos pentacíclicos, flavonoides, antraquinonas, glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiotónicos, taninos, polifenoles y metilencetonas. Las pruebas fueron realizadas tanto a los extractos metanólicos desengrasados como hexánicos de cada uno de los órganos de la especie vegetal (37).

### Flavonoides

Se tomaron 2 g aproximadamente del extracto crudo y se trató con HCl concentrado y virutas de magnesio, la reacción fue positiva al formarse de una coloración roja (al cabo de 10-20 minutos). También, se realizaron dos pruebas alternas, la primera consistió en colocar una gota del extracto sobre el papel de filtro rociado con una solución de

cloruro de aluminio al 1% en etanol, la aparición de una mancha amarilla fluorescente bajo la luz UV, indicó la presencia de flavonoides, la segunda consistió en colocar una gota del extracto, luego se observó, bajo luz UV, seguidamente, se expuso el papel en vapores de  $\text{NH}_4^+$  concentrado; de mostrarse un cambio o intensificación de color, la prueba se considera positiva para flavonoides.

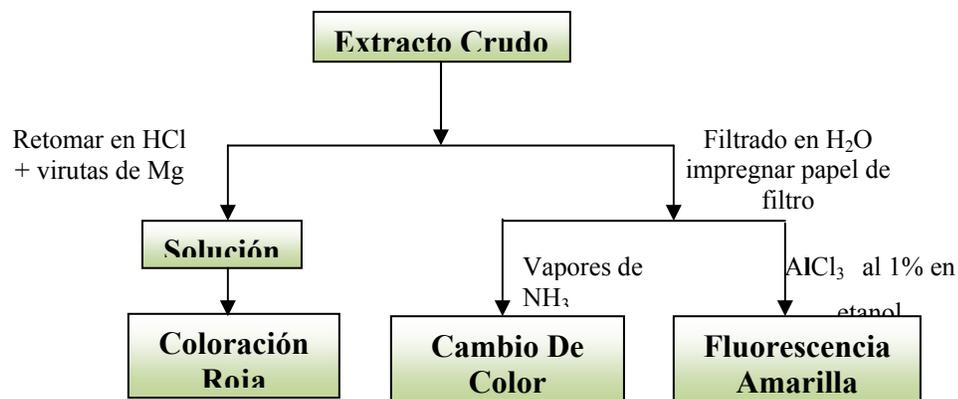
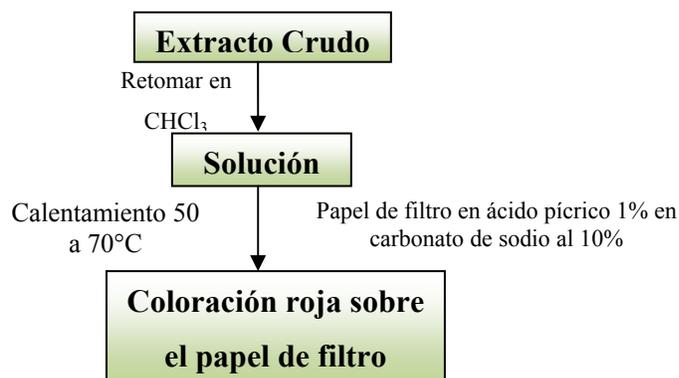


Figura 13. Representación esquemática de las pruebas de la determinación de flavonoides.

### Glicósidos cianogénicos

Se colocó una porción de la muestra en un tubo de ensayo, se le añadieron unas gotas de cloroformo, se tapó el tubo con papel de filtro impregnado de una solución al 1% (m/v) de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10% (m/v) y se calentó en un rango de 50 a 70°C. La presencia de una coloración roja sobre el papel de filtro confirmó la presencia de estos compuestos químicos.



**Glic** Figura 14. Representación esquemática de la detección de glicósidos cianogénicos. A una porción del extracto crudo se le agregó una gotas de una mezcla recién preparada de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) en KOH (0,5 mol/l), la aparición de coloraciones azules o violetas es indicativo de la presencia de estos compuestos.

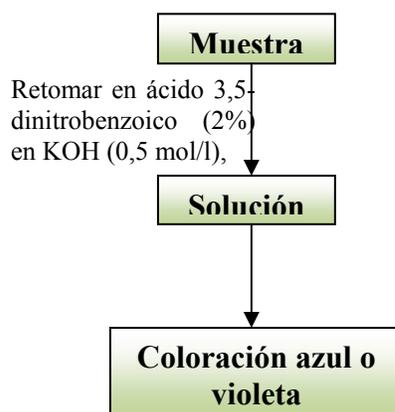


Figura 15. Representación esquemática de la detección de glicósidos cardiotónicos.

### Saponinas

Una parte de la muestra se disolvió en agua destilada, luego, se agitó vigorosamente durante unos minutos. La formación de una espuma estable por 30 minutos, indicó la posible presencia de saponinas.

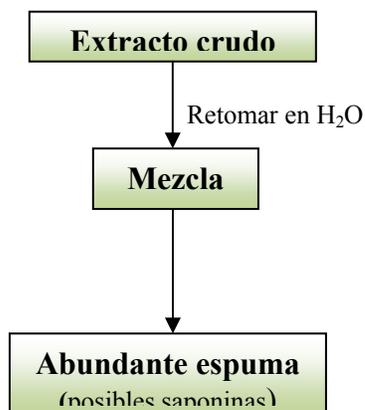


Figura 16. Representación esquemática de la detección de saponinas.

## Alcaloides

La muestra se trató con HCl al 10% (v/v) y fue extraída con cloroformo. La fase acuosa se alcalinizó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10% (v/v) y fue particionada nuevamente con cloroformo, las tres fases se analizaron con el reactivo de Dragendorff lo que permitió detectar la presencia de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio en las fases obtenidas, considerándose positiva si la solución se tornó rojo intenso.

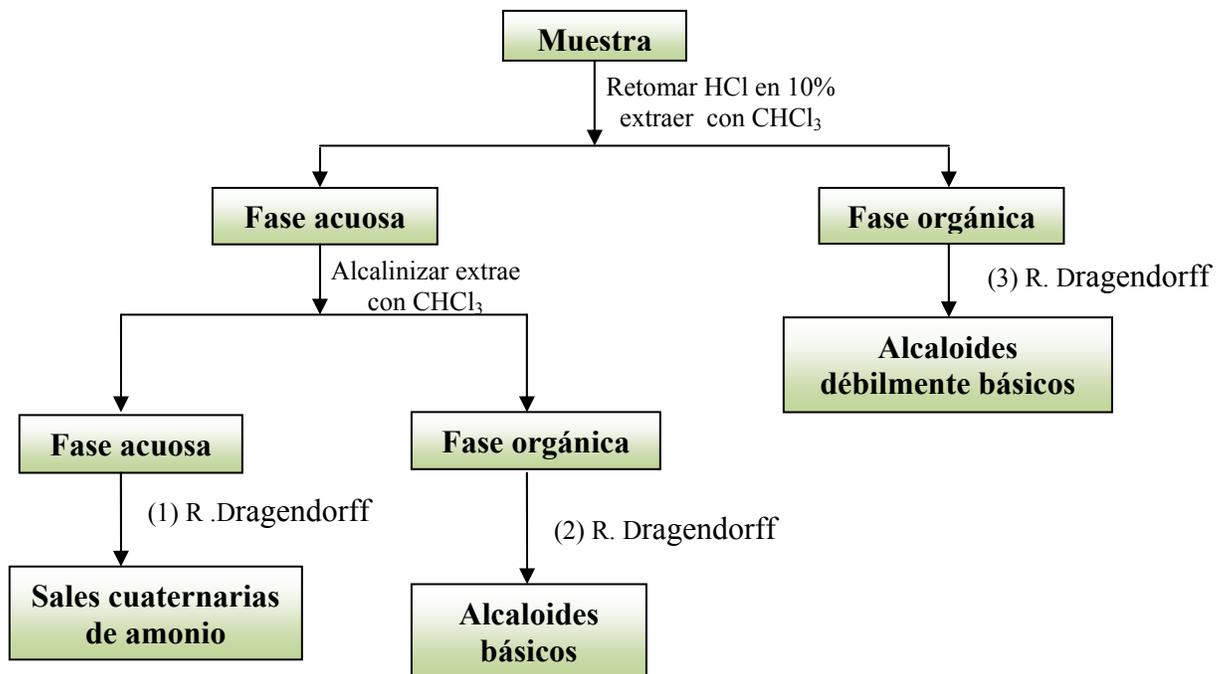


Figura 17. Representación esquemática de la detección de alcaloides.

## Taninos y Polifenoles

Los compuestos fenólicos se detectaron por la coloración parda en presencia de una solución de cloruro de hierro (III) al 1% (m/v). Para ello, parte del extracto total fue evaporado a sequedad, retomado en agua y filtrado antes de la reacción con cloruro de

hierro (III). Si los taninos están presentes, al tratar el crudo con solución al 1% (m/v) de gelatina en NaCl al 1% (m/v), se produce un precipitado.

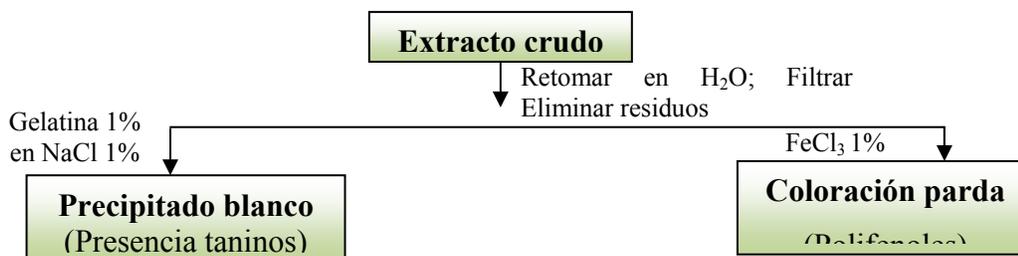


Figura 18. Representación esquemática de la detección de taninos y compuestos fenólicos.

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

Una porción de la muestra se hidrolizó con HCl al 10% (v/v) el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. A la fase orgánica se le agregaron gotas del reactivo de Liebermann-Bürchard. La aparición de una coloración verde a los tres minutos de la reacción indicó la presencia de esteroides insaturados. Por lo contrario, la formación de una coloración roja o anaranjada confirmó la existencia de triterpenos pentacíclicos.

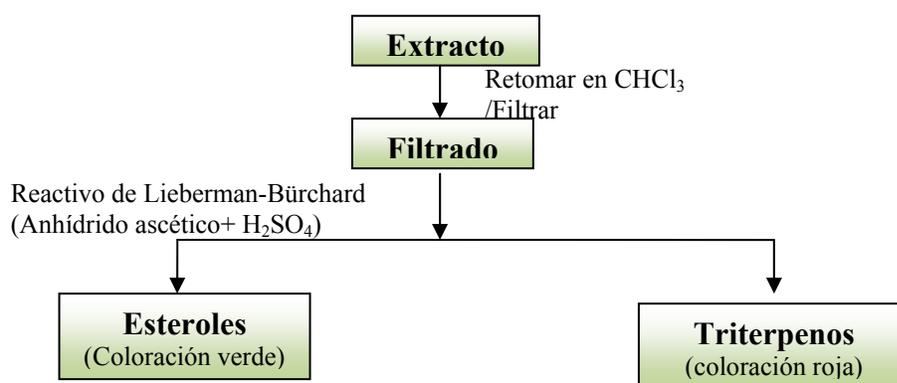


Figura 19. Representación esquemática de la detección de esteroides y triterpenos.

### Antraquinonas

Una parte del extracto fue llevado a sequedad, se extrajo con KOH (0,5 mol/l), se filtró, se acidificó con ácido acético y se agitó con benceno. Si la capa orgánica tomó una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hubo antraquinonas presentes.

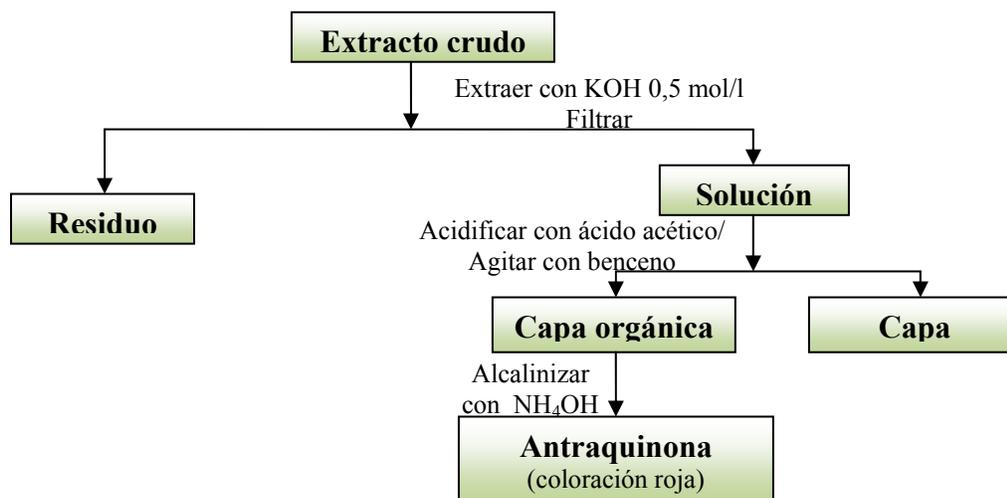


Figura 20. Representación esquemática de la detección de antraquinonas.

### Metilencetonas

Una parte del extracto crudo se disolvió en agua destilada, para, luego, ser filtrado y tratado con el reactivo de Baljet, la producción de una coloración roja será indicativa de la presencia de metilencetonas.

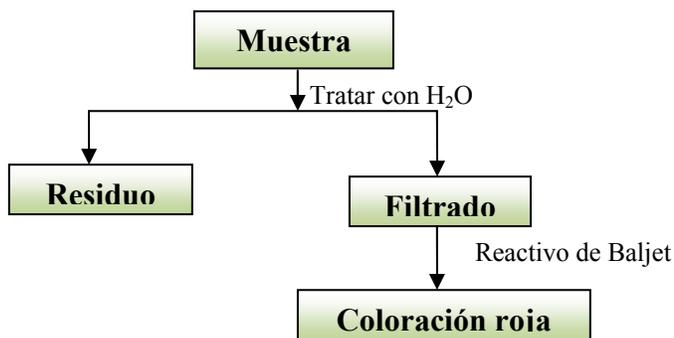


Figura 21. Representación esquemática de la detección de metilencetonas.

## EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD

Se realizaron pruebas de actividad biológica, como, actividad antibacteriana, antifúngica y de letalidad en *Artemia salina*, a los extractos y/o compuestos aislados, con el propósito de determinar la posible actividad farmacológica que pudiese presentar la planta en estudio. Se describe brevemente las metodologías a usar.

### Actividad antibacteriana

Para este bioensayo, se realizó la técnica de difusión en agar, llamada antibiograma, la cual consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µl de una solución de 40 mg/ml del extracto o fracción a probar y colocarlos en una placa contentiva de agar Müller-Hinton, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^8$  células/ml). Posteriormente, se preincubaron a 5°C por 12 h, y seguidamente se incubaron a 37°C por 24 h. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro (mm) del crecimiento bacteriano alrededor del disco (38).

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas.

Bacterias	Origen	Coloración de Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC(25922)	-
<i>Entereobacter cloacae</i>	DAI(26951)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	IBE(DDC-19)	+
<i>Entereococcus faecalis</i>	WHO(14)	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC(27853)	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA(07)	+
<i>Acineobacter calcoaceticus</i>	ATCC(230555)	-
<i>Micrococcus luteus</i>	Bioanálisis (33-8-10)	+

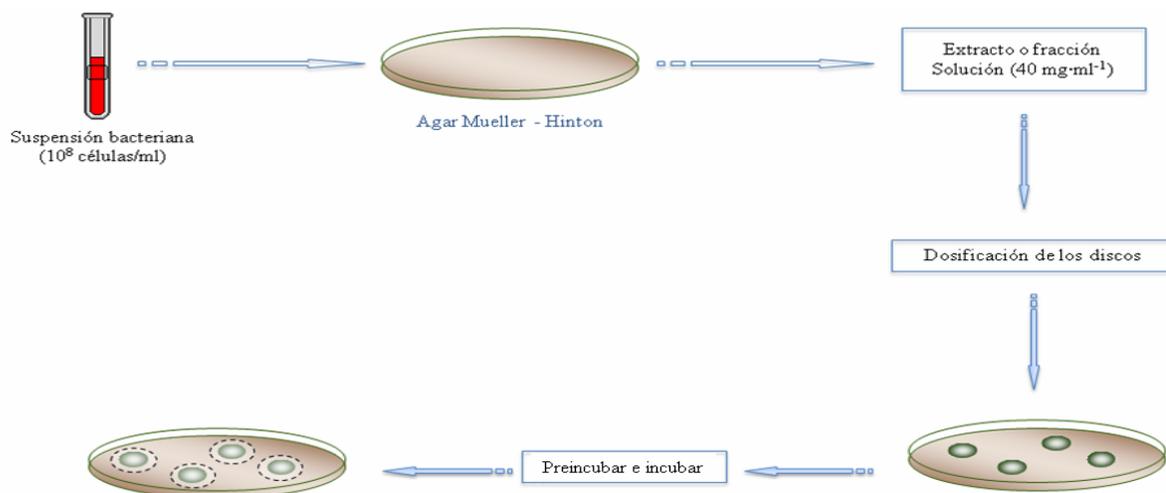


Figura 22. Representación esquemática del ensayo antibacteriano.

### Actividad antifúngica

Este método consistió en incubar cepas de hongos en tubos, a temperatura ambiente por una semana. Transcurrido este tiempo, se le agregaron aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo para remover las esporas y se filtraron sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial. Utilizando hisopos estériles, se colocó la solución obtenida sobre las cápsulas de Petri, previamente preparadas con el agar papa dextrosa (PDA). Seguidamente, se realizó la técnica del antibiograma, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados previamente con aproximadamente 10  $\mu$ l de la muestra de concentración 40mg/ml y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente. La actividad antimicótica se detectó al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición que se observaron alrededor del disco (39).

Tabla 2. Cepas de hongos pertenecientes al laboratorio de Micología.

Hongos	Origen	Clasificación
<i>Penicillium hirsutum</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Trichoderma viridis</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Penicillium expansum</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Cladosporium macrocarpus</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Rhizopus orizoe</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Mucor racemosus</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno

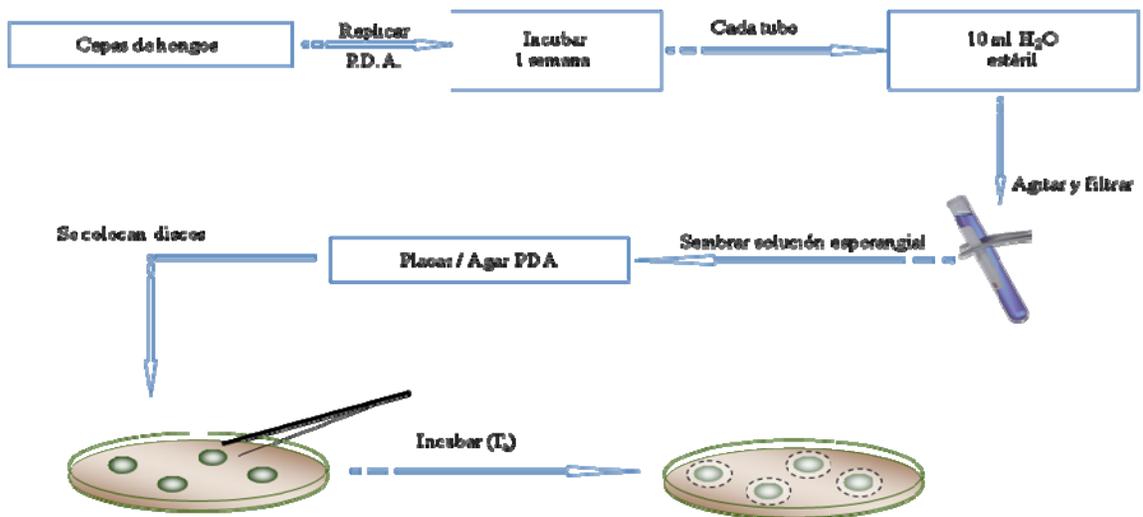
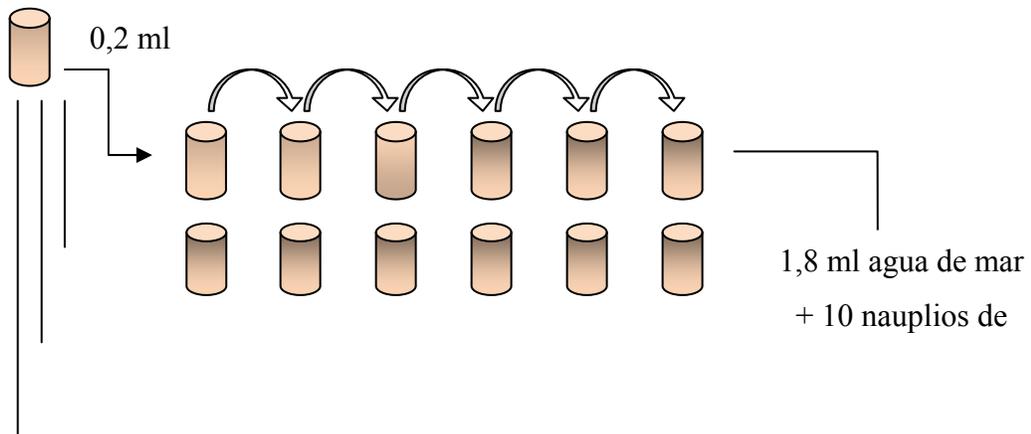


Figura 23. Representación esquemática del ensayo antifúngico **Actividad letal en *Artemia salina***

La actividad letal contra larvas del crustáceo *A. salina*, del extracto crudo, fracciones y/o metabolitos separados de las esponjas fue evaluada mediante la realización de un bioensayo, en el cual se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto o fracción a probar, en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO según la solubilidad de éstos y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/ml, mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada en viales que contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina* eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron cuatro réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas analizadas, usando diversos métodos estadísticos diseñados para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (40,41).

Solución patrón 10000(µg/ ml)

0,2 ml (20 mg extracto +0,2 ml DMSO + 1,8 ml H<sub>2</sub>O de mar)



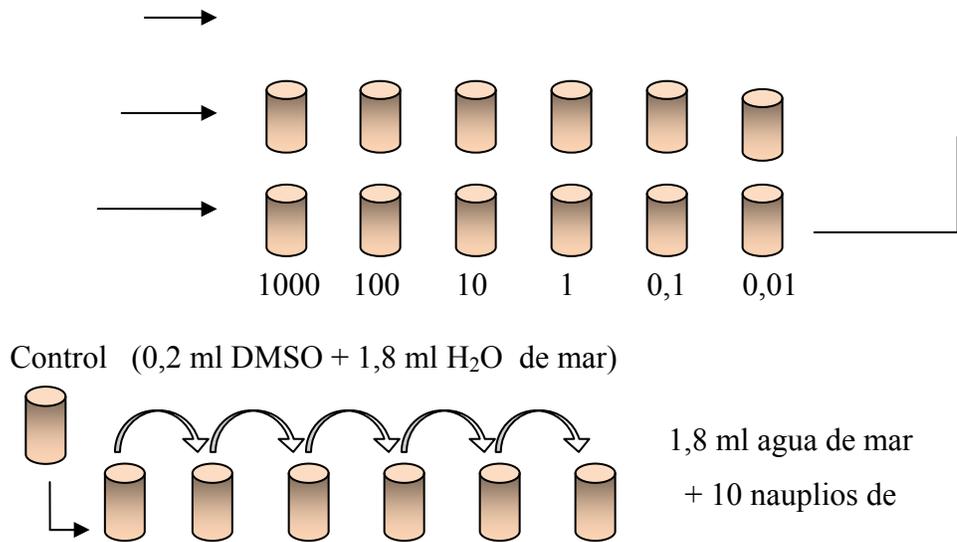
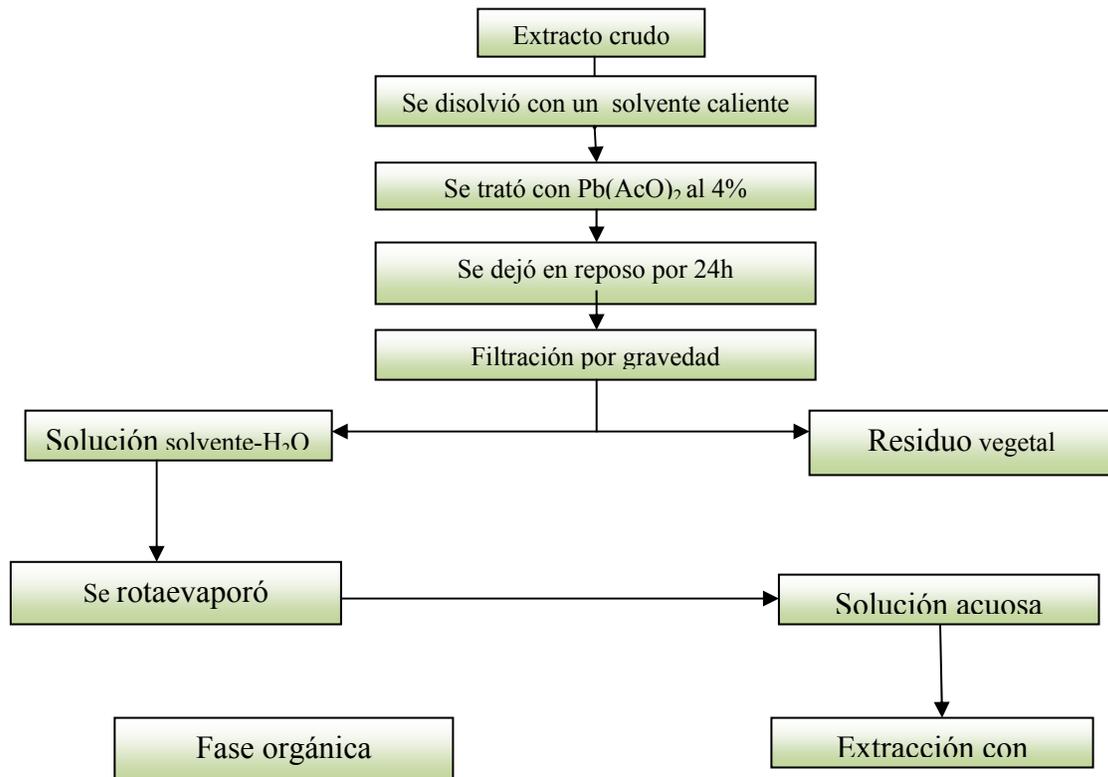


Figura. 24. Toxicidad contra *Artemia salina*.

**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOIDES *Conocliniopsis prasiifolia*.**

El extracto crudo fue disuelto con un solvente miscible caliente y tratado con acetato de plomo al 4%, en proporción (1:1); luego se dejó en reposo por 24 h y después se filtró la solución, la cual se concentró por medio de rotaevaporación. Este concentrado fue extraído con cloroformo y concentrado a presión reducida, como se muestra en la figura 25.



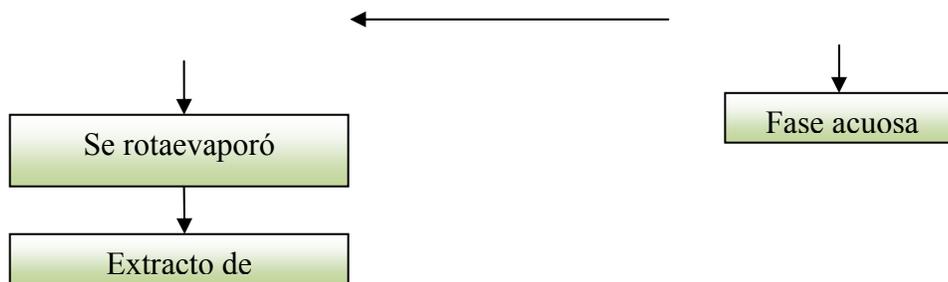


Figura 25. Esquema de obtención del extracto de flavonoides y otros constituyentes a partir del extracto metanólico de las hojas de *Conocliniopsis prasiifolia*.

## **FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE FLAVONOIDES**

La separación y aislamiento de flavonoides y otros metabolitos secundarios, solubles en cloroformo, provenientes del órgano más bioactivo se realizó mediante el fraccionamiento de las fracciones y subfracciones obtenidas, usando las siguientes técnicas cromatográficas:

### **Cromatografía de columna (CC)**

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 del extracto de flavonoides, la separación de estos componentes u otros metabolitos se realizó en una columna cromatográfica de dimensiones 20 cm de longitud y 2 cm diámetro, usando 5 g de Shephadex LH-20, como fase estacionaria y diversos solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente, como fase móvil.

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

La técnica de CCF fue empleada con fines cualitativos, para la combinación de las fracciones provenientes de la cromatografía en columna (CC). Para ello, se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm<sup>2</sup>) recubiertas con sílica gel 10-40 μm con un espesor de 0,5 mm como fase estacionaria, y como fase móvil, el solvente o mezcla de solventes con el cual se luyeron las subfracciones al momento de fluir el extracto de la columna cromatográfica. Luego se tomaron los R<sub>f</sub> de las subfracciones bajo luz ultravioleta de onda corta como agente revelador, y aquellas que mostraron un comportamiento similar, según sus R<sub>f</sub>, se combinaron en una sola subfracción.

La CCFP se utilizó para aislar y purificar los compuestos provenientes de las subfracciones obtenidas. Esta técnica es semejante a la CCF, con la diferencia de que el espesor de la sílica gel en la placa, fue de 1 mm. Para ello la fracción o subfracción, se disolvió en 2 ml de un solvente adecuado y se colocó de manera uniforme, con una pipeta Pasteur, en el origen; se procedió al desarrollo de la cromatografía, empleando como fase móvil el solvente o mezcla de solventes que proporcionó mayor separación en la CCF. Posteriormente, se observaron en un cámara con luz UV y se procedió a tomar lo R<sub>f</sub> de los componentes, para luego desprender la sílica de las placas y de esta forma aislar la zona correspondiente al compuesto en cuestión. Seguidamente, la sílica se colocó en un *beaker* y se extrajo con solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente, para asegurar la extracción total del componente de la sílica gel, procediendo a filtrar la solución y evaporando el solvente para obtener así el componente.

### **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL**

Para la elucidación de las estructuras moleculares de los componentes aislados, se utilizaron técnicas espectroscópicas y espectrométricas, tales como:

#### **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

La RMN es uno de los métodos más utilizados en el área de los productos naturales, cuyos espectros ofrecen evidencias bastante explícitas sobre las posiciones, entornos químicos y características de los núcleos que conforman una molécula dada,

de manera que, permite obtener información más acertada de la estructura del compuesto en estudio. Este hecho la convierte en una de las técnicas más poderosas para la determinación de estructuras moleculares, teniendo como fundamento del estudio de las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos específicos de las moléculas.

Los análisis de las subfracciones y compuestos obtenidos se realizaron en un equipo de RMN, modelo Bruker de 400 MHz, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las muestras fueron disueltas en solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), según la solubilidad de las muestras, y se colocaron en un tubo de resonancia, para luego ser introducidas en el equipo de RMN, obteniéndose los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) obtenidos en los espectros, se reportaron en ppm en relación a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS).

Se empleó el experimento de RMN: Distortionless Enhancement Through Polarization Transfer (DEPT), ya que los espectros DEPT-135 son muy útiles para asignar señales de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ . En el caso del DEPT-135, los picos del  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$  son observados hacia arriba y los del  $\text{CH}_2$  invertidos.

### **Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)**

Generalmente, la cromatografía de gases es ampliamente usada en combinación con la espectrometría de masas, siendo este el método más simple para la separación e identificación de compuestos orgánicos que se encuentran en mezclas complejas. La fragmentación de la molécula, da la ventaja para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos químicos específicos de la misma. Siendo, la destrucción de la muestra, la única desventaja apreciable para esta técnica. La masa total de cada fragmento, es observado en el espectro de masas como un pico, por ende, el análisis consiste en primer lugar, en relacionar los picos principales y en interpretarlos simultáneamente; teniendo en cuenta que el espectro exhibirá un pico menos abundante correspondiente al ión molecular del compuesto, el cual da información sobre la masa molar del mismo. La manera de obtener finalmente la elucidación estructural del

compuesto, es la comparación con el espectro de un compuesto conocido a través de bases de datos que ayudan a la confirmación y el patrón de fragmentación.

Para el análisis de algunas de las muestras se usó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo Saturn 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las muestras se inyectaron en una columna CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I. y helio como gas de arrastre, a una rapidez de 1ml por minuto. La temperatura del inyector fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rapidez de calentamiento de 5°C por minuto, hasta llegar a la temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los compuestos se realizó por la comparación computarizada con la librería NIST.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La planta *Conocliniopsis prasiifolia* de la localidad de San Juan sector la Zona, estado Sucre, fue analizada, realizándose un estudio de la bioactividad, de la fracción soluble en metanol, mediante la actividad antibacteriana, antifúngica y letalidad en *Artemia salina*; procediéndose a la identificación y caracterización de los metabolitos de los órganos que resultaron más bioactivos, cuyos resultados se presentan a continuación.

### RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS EN METANOL, HEXANO Y CLOROFORMO DE LOS ÓRGANOS DE LA PLANTA *Conocliniopsis prasiifolia*.

Los resultados obtenidos de las extracciones sucesivas con metanol, hexano y cloroformo de los distintos órganos de la planta *Conocliniopsis prasiifolia* se muestran en la tabla 3. Se puede observar que el rendimiento más alto se obtuvo de la extracción de flor con metanol (EMF), en el cual se obtuvieron 9,0555 g, equivalentes al 18 % (m/m) a partir de 50,5 g de flor; seguidamente de la extracción de hojas en metanol (EMH), con un 14,00 % (m/m), al obtenerse 33,3269 g a partir de 238 g de hojas, es decir los extractos en metanol, presentaron los rendimientos más altos con respecto a los demás extractos en hexano y cloroformo mostrando estos los rendimientos más bajos.

Tabla 3. Porcentajes de rendimientos de los extractos en metanol, hexano y cloroformo de los órganos de la planta *Conocliniopsis prasiifolia*.

Extracto	Masa (g)	%(m/m)
EMH	33,3269	14,00
EMT	37,6826	7,7
EMR	11,7227	10
EMF	9,0555	18
EHH	7,2695	3,04
EHT	4,4867	0,91
EHR	1,5350	1,34
EHF	1,0038	2,00
ECH	2,9203	1,22
ECT	2,5371	0,51
ECR	1,3462	1,2
ECF	1,0025	1,98

## PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Los metabolitos detectados en las fracciones dieron positivos para una serie de pruebas basadas en reacciones químicas de clasificación de grupos funcionales, tales como: flavonoides ( al agregar virutas de Mg y 10 ml de HCl, dando como resultado una coloración roja), Las pruebas químicas preliminares revelaron la posible presencia y ausencia de familias de metabolitos secundarios, en las fracciones solubles de la planta, lo que proporcionó una información importante, que ayudó a seleccionar los tratamientos cromatográficos y estrategias de separación más eficientes, que permitieron aislar algunos de los constituyentes químicos de la hoja de la planta estudiada, alcaloides (al ser tratado una porción de la fracción con el reactivo de Dragendorff se observó un coloración naranja rojiza), taninos (al agregar unas gotas de una solución de gelatina al 1% en cloruro de sodio al 1% se formó un precipitado blanco), metilencetonas (al agregar unas gotas de una mezcla 1:1 de una solución de ácido pícrico al 1% y NaOH al 10% se formó una coloración roja), esteroles y triterpenos (al agregar unas gotas del reactivo de Liebermann-Burchard, se observó una coloración azul-verdosa y/o violeta, respectivamente).

Tabla 4. Análisis químico preliminar de extractos de hoja, tallo, raíz y flor en hexano y metanol de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Familia de Compuestos	EMH	EMT	EMR	EMF	EHH	EHT	EHR	EHR
Alcaloides	+	-	+	+	-	+	-	-
Flavonoides	+	-	+	-	-	-	-	-
Metilencetonas	+	-	-	-	-	-	-	-
Esteroles Insaturados	+	+	-	+	-	-	-	-
Triterpenos Pentacíclicos	+	+	+	+	-	-	+	-
Antraquinonas	-	-	+	-	-	-	-	-
Polifenoles	+	-	+	-	-	-	-	-
Glicósidos Cianogénicos	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicósidos Cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	-	+	+	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+	-	-	-	-

+: Detectado  
 -: No detectado

EMH: Extracto metabólico de hojas.  
 EMT: Extracto metanólico de tallo.  
 EMR: Extracto metanólico de raíz.  
 EMF: Extracto metanólico de flor.

EHH: Extracto hexánico de hojas  
 EHT: Extracto hexánico de tallo.  
 EHR: Extracto hexánico de raíz.  
 EHF: Extracto hexánico de flor

Las familias de metabolitos detectados pueden observarse en la tabla 4, donde se puede apreciar, que la mayor presencia de compuestos, se detectaron en los extractos metanólicos como alcaloides en (EMH, EMR, EMF), flavonoides en (EMH, EMR, EMF), esteroides insaturados en (EMH, EMT, EMF), los triterpenos se detectaron en todos los extractos metanólicos (EMH, EMT, EMF, EMR) a diferencia de las antraquinonas solo se detectaron en EMR, los polifenoles en (EMH, EMR), saponinas en (EMH, EMR, EMF) y en todos los extractos se encontraron taninos, a diferencia de los extractos hexánicos que solo se detectó presencia de alcaloides en EHT y triterpenos pentacíclicos en el EHR.

Los resultados obtenidos son consistentes con los trabajos realizados a esta familia de plantas reportados en la literatura, donde se han aislado estos compuestos como flavonoides, alcaloides, triterpenos, saponinas y taninos, en vista que son compuestos generalmente muy polares se detectan en gran manera en los extractos de metanol (11,12).

Los triterpenos mostraron una abundancia importante en la planta estudiada, lo cual está en concordancia con muchos estudios donde han sido reportados e identificados, como en las raíces de *Conocliniopsis prasiifolia* y *Lourteigia ballotaefolia* donde se aisló por primera vez, una lactona sesquiterpenica como 9-hidroxi-atrípliciolide-8-O-tiglate, atribuyéndose que esta familia de plantas son ricas en este tipo de metabolitos, las cuales poseen actividad antiinflamatoria y antipirética y son comunes en las Asteráceas (35).

Con las diferentes pruebas de detección de metabolitos secundarios, se pudo confirmar la presencia de cierta familia de compuestos, pero no se puede afirmar la ausencia de las mismas. Muchas pruebas ameritan una concentración mínima para poder ser eficiente, otras necesitan que se sigan una serie de pasos para poder extraer el compuesto a detectar, en algunos casos, factores como el pH, la temperatura, algunas de las sustancias presentes, entre otros, pueden inferir en el resultado e inducir a una conclusión errónea.

En general es recomendable efectuar más de una prueba y confirmar la presencia mediante el uso de técnicas espectroscópicas.

## **PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Los bioensayos realizados fueron determinantes para la selección del extracto a los cuales se les realizaron los fraccionamientos cromatográficos por las técnicas cromatográficas convencionales, permitiendo llevar a cabo un estudio biodirigido de los constituyentes químicos de las fracciones bioactivas seleccionadas para tal fin.

Entre las pruebas realizadas se encuentran las siguientes:

### **Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana es uno de los bioensayos más significativos en el estudio farmacológico, debido al continuo crecimiento de la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos comunes, lo cual ha resultado en un problema para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Es por esto, que los científicos han dirigido sus investigaciones hacia la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

En la tabla 5, se muestra que el estudio antibacteriano de los extractos de los órganos de *Conocliniopsis prasiifolia* en metanol y hexano, evidenció que los extractos crudos en metanol mostraron gran actividad antibacteriana frente a los microorganismos ensayados, presentando la hoja (EMH) mayor actividad, seguidamente de la flor (EMF), raíz (EMR) y tallo (EMT) con halos de inhibición desde (17 a 25) mm, (14 a 25) mm, (14 a 27) mm y (6 a 15) mm respectivamente; a diferencia de los extractos hexánicos que mostraron menor actividad, resaltando el extracto de raíz (EHR) el cual tuvo mayores halos de inhibición entre estos, seguido por la hoja (EMH), flor (EHF), y tallo (EHT) con (10 a 15) mm, (6 a 17), (8 a 11) mm y (0 a 15) mm respectivamente.

También es de interés mencionar que el EMH presentó una fuerte actividad contra *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus luteus* y moderada contra *Acineobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, es decir, mostró

actividad tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-); este hecho puede ser atribuido a la presencia de más de un constituyente activo en este extracto, Además, se puede inferir que la presencia de los flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos y metilencetonas detectados, pudiesen estar asociados a la actividad antibacteriana observada. Resaltando que esta familia de plantas proporcionan estas actividades frente a estos microorganismos tal como la especie *Virguera solidago*, la cual posee gran actividad antioxidante y antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*, demostrado mediante el uso de el modelo *in vitro* (42,43).

Tabla 5. Actividad antibacteriana de las fracciones solubles en preliminar de extractos de hoja, tallo, raíz y flor en hexano y metanol de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Microorganismos	Extracto (mm de Inhibición)							
	EMH	EMT	EMR	EMF	EHH	EHT	EHR	EHF
<i>Escherichia coli</i>	18	13	17	20	6	0	10	10
<i>Entereobacter cloacae</i>	17	15	22	25	13	10	15	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	13	20	21	17	10	13	10
<i>Entereococcus faecalis</i>	25	15	14	22	12	15	13	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	14	15	20	7	7	10	8
<i>Bacillus subtilis</i>	16	6	17	14	9	6	14	11
<i>Acineobacter calcoaceticus</i>	20	6	20	20	6	10	14	11
<i>Micrococcus luteus</i>	25	10	27	25	14	9	10	9

#### Actividad antifúngica

El estudio antimicótico tiene gran importancia, tanto en la farmacología como en la industria alimenticia, debido a la proliferación de hongos, por el tiempo de almacenamiento de los alimentos, y la resistencia que ofrecen éstos a los antimicóticos, complicándose así el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por las esporas de los hongos (44).

Destacándose que ningún extracto en estudio presentó actividad antifúngica frente a las cepas de hongos ensayadas.

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

Dentro de los bioensayos de gran utilidad en el campo de los productos naturales y la ecotoxicología, se encuentra el de toxicidad aguda o concentración letal media ( $CL_{50}$ ) en *Artemia salina*, debido a que se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *A. salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 3PS (leucemia) por lo cual este ensayo puede ser utilizado para detectar compuestos antitumorales y pesticidas (45).

Para comprobar la sensibilidad de los extractos se usó la técnica de 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 (46).

En la siguiente tabla 6, se muestran las  $CL_{50}$  de los extractos metanólicos de los órganos de *Conocliniopsis prasiifolia*, siendo el extracto de flor (EMF) el que presentó los mayores valores de  $CL_{50}$ , por lo que se puede decir que este extracto fue el menos letal; sin embargo, esto no quiere decir que este extracto no poseen metabolitos con posible actividad letal, sino que las larvas de *A. salina* no respondieron al efecto de los metabolitos secundarios detectados.

Sin embargo, la letalidad del extracto de hojas fue relevante, el cual presentó una  $CL_{50}$  de 3,16 y el extracto de la raíz con 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo cual evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estos extractos. Posiblemente, este efecto letal se deba a los alcaloides, flavonoides, triterpenos y taninos detectados en las pruebas químicas preliminares; evidenciando la posible habilidad de estas especies para producir la muerte de células cancerígenas en cultivos de tejidos y otros usos farmacológicos, en cambio el extracto del tallo no presentó indicio de toxicidad en el tiempo empleado (47).

La toxicidad observada en estos extractos puede obedecer a mecanismos de defensa que podría utilizar esta planta en contra de depredadores, asegurando así la preservación de su especie.

A diferencia de los extractos hexánicos al no presentar toxicidad alguna frente a los crustáceos, lo cual se puede inducir a la posibilidad que la mayoría de los compuestos que causan tal actividad son muy polares, los cuales pudieron ser extraídos solo con el metanol, así como también que se encuentren en baja proporción impidiéndole reaccionar de manera satisfactoria frente a estos crustáceos.

Tabla 6. Actividad letal (ig/ml) contra *Artemia salina*, de las fracciones solubles metanol de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Método empleado	(CL50) (ppm) tallo	(CL50) (ppm) flor	(CL50) (ppm) raíz	(CL50) (ppm) hojas
Binomial	****	100,00	****	3,16
M. average.	****	181,88	****	3,16
Probit	****	963,86	0,04	3,16
Logit	****	513,13	0,04	3,11

#### **OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE FLAVONOIDES *Conocliniopsis prasiifolia*.**

Debido a que el extracto metanólico de hojas presentó la mejor actividad antibacteriana y CL<sub>50</sub>, se decidió tomar este extracto y tratarlo con acetato de plomo al 4%, para luego obtener la fracción de flavonoides y otros constituyentes en cloroformo, responsables de la bioactividad.

#### **FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO**

Al obtener la fracción de flavonoides y otros constituyentes en cloroformo, se procedió a realizar un fraccionamiento cromatográfico biodirigido a esta fracción, con el objetivo de aislar en lo posible algunos flavonoides o los constituyentes químicos responsables de la bioactividad de éste extracto.

**Cromatografía de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de *Conocliniopsis prasiifolia*.**

La fracción soluble en cloroformo de hojas fue fraccionada por cromatografía de columna (CC) usando 5 g de Shephadex LH-20, en una columna cromatográfica de dimensiones, 20 cm de longitud y 2 cm diámetro, para lo cual se empleó 2,91 g de muestra. Se utilizó una mezcla de solventes de polaridad creciente, AcOEt - MeOH con proporción 1:1; MeOH como eluyentes, finalizándose con H<sub>2</sub>O al 100%. Se obtuvieron 64 eluatos, los cuales fueron recogidos en erlenmeyers de 25 ml contentivos de 10 ml cada uno (Tabla 7), los cuales fueron agrupados en 9 fracciones tomando en cuenta su comportamiento en la cromatografía de capa fina (CCF) por comparación de sus R<sub>f</sub> y empleándose luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y vapores de Iodo como agentes reveladores.

Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de flavonoides y otros constituyentes de hojas soluble en cloroformo de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Fracción	Eluatos	Masa(g)	Solventes	Proporción
F <sub>1</sub>	1-14	0,0000	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>2</sub>	15-21	0,0723	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>3</sub>	22-26	0,4744	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>4</sub>	27-31	1,6501	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>5</sub>	32-39	0,3642	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>6</sub>	42-46	1,0010	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>7</sub>	47-56	0,1451	MeOH/AcOEt	1:1
F <sub>8</sub>	47-56	0,1335	MeOH	0
F <sub>9</sub>	63-64	0,0180	H <sub>2</sub> O	0

A las 9 fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del extracto de flavonoides y otros compuestos polares, se les evaluó la actividad antibacteriana contra 5 microorganismos como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad antibacteriana de las fracciones provenientes del extracto de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Fracción	Diámetro del halo de inhibición (mm)				
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>A.calcoaceticus</i>
1	0	0	0	0	0
2	11	21	10	0	0
3	35	12	10	0	0
4	43	15	10	0	15
5	32	1	5	0	0
6	1	0	0	0	10
7	0	14	0	0	0
8	0	14	0	0	0
9	0	10	0	1	0

Se puede observar que la fracción 4 (F<sub>4</sub>) generó mayor resistencia contra los microorganismos ensayados con halos de inhibición de (43 a 0) mm mostrando fuerte resistencia contra *Pseudomonas* y moderada contra *E.coli* y *Acineobacter*, es decir con gran actividad tanto frente a bacterias Gram (+) como Gram (-); por ende se escogió esta fracción para ser recromatografiada y aislar en lo posible el compuesto responsable de la actividad biológica.

La F<sub>4</sub> (1,6501) fue fraccionada por cromatografía de columna (CC) usando 5g de Sephadex LH-20, en una columna cromatográfica de dimensiones 20 cm de longitud y 2 cm diámetro, utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente de partida, posteriormente mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - AcOEt, AcOEt - MeOH y finalizando con MeOH, recolectándose 36 eluatos de 10 ml cada uno, tomando en cuenta su comportamiento en la cromatografía de capa fina (CCF) por comparación de sus R<sub>f</sub>. Empleándose luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y vapores de Iodo como agentes reveladores, agrupándose en 5 subfracciones.

Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción F<sub>4</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de las hojas soluble en cloroformo de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Subfracciones	Eluatos	Masa (g)	Solventes	Proporción
4.1	1-15	0,0158	CHCl <sub>3</sub>	1
4.2	16-25	1,4277	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	1:1
4.3	26-34	0,9291	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt	1:1
4.4	35-36	0,3841	AcOEt	1
4.5	37-38	0,0426	MeOH	1

A cada una de las subfracciones obtenidas se les evaluó la actividad antibacteriana contra cepas Gram (+) como Gram (-) ,mostrando solo las subfracciones F<sub>4.2</sub> y F<sub>4.3</sub>, las que generaron actividad con halos de inhibición de 25 mm y 15 mm frente *Pseudomonas*, 12 mm y 10 mm frente a *E. coli* respectivamente.

Tabla 10. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas del fraccionamiento de F<sub>4</sub>.

Subfracción	Diámetro del Halo de Inhibición (mm)				
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>A.calcoaceticus</i>
4.1	0	0	0	0	0
4.2	25	12	0	0	0
4.3	15	10	0	0	0
4.4	0	0	0	0	0
4.5	30	0	0	0	0

La subfracción 4.2 fue seleccionada en vista que mostró mayor actividad antibacteriana y que su proporción era mayor, para ser fraccionada por CCFP, debido a que presentó manchas definidas y con R<sub>f</sub> no muy cercanos, utilizando placas de vidrio (20x20 cm<sup>2</sup>) recubiertas con silica gel 10-40 µm con un espesor de 1 mm. Por consiguiente, esta

subfracción se disolvió en 2 ml de CHCl<sub>3</sub> y se colocó de manera uniforme, con un capilar, en el origen; eluyendo la muestra con CHCl<sub>3</sub> - AcOEt con una proporción de 1:1, lo que proporcionó mayor separación en la CCFP. Empleándose luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm), se procedió a tomar los R<sub>f</sub> de las subfracciones, para luego desprender la silica de las placas y de esta forma aislar la zona correspondiente al compuesto en cuestión. Seguidamente, la silica se colocó en un erlenmeyers y se extrajo con solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente, como hexano, cloroformo acetato de etilo y metanol para asegurar la extracción total del componente de la silica gel, procediendo a filtrar la solución y evaporando el solvente para obtener así el o los constituyentes, cromatografiados, obteniéndose 7 subfracciones mas, entre las cuales se tomaron tres para ser sometidas nuevamente a CCFP, ya que al ser expuestas la luz UV, se observó bandas con buenas separación es decir, con R<sub>f</sub> lejanos.

Tabla 11. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.1	75	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.2	9,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3	19	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.4	8,1	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5	225	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.6	11	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7	13,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

Las subfracciones 4.2.3, 4.2.5 y 4.2.7 fueron seleccionadas para continuar con el proceso de separación por medio CCFP, utilizando la misma fase estacionaria y el mismo sistema de solventes CHCl<sub>3</sub> - AcOEt (1:1), en vista que eran muy soluble y generaba buena separación con R<sub>f</sub> lejanos, hasta obtener en lo posible el componente puro.

Tabla 12. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2.3</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.3.1	9,6	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.2	2,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.3	4,1	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

Al ser reveladas por luz UV, se observó que la subfracción 4.2.3.1 poseía menos impureza y buena separación, para lo que finalmente se sometió a CCFP, mediante el mismo sistema de solventes aplicado anteriormente, obteniéndose seis subfracciones de las cuales se seleccionó la subfracción 4.2.3.1.6, en vista que las demás quedaron con una proporción muy pequeña, lo que resulta imposible someterla a estudios espectroscópico y espectrométrico.

Tabla 13. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2.3.1</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.3.1.1	1,1	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.1.2	1,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.1.3	2,6	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.1.4	0,8	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.3.1.5	4,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

La subfracción 4.2.3.1.5, fue sometida a análisis espectroscópico y espectrométrico para la elucidación estructural, de los constituyentes presentes en esta subfracción, tales como RMN H<sup>1</sup> y CG-EM.

Tabla 14. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2.5</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.5.1	36,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.2	45,7	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.3	9,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.4	16,8	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.5	12,5	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

Al ser reveladas por luz UV de longitud de onda corta (100-280 nm), se observó que la subfracción 4.2.5.2 tenía buena separación con Rf lejanos en comparación con la demás subfracciones, por ende esta se continuó fraccionando usando la misma técnica de separación (CCFP), aplicando el mismo sistema de solvente ya que al ser sometidas a pruebas con otros sistemas no presentaban buena separación por lo que se continuo con este sistema, CHCl<sub>3</sub> - AcOEt (1:1), obteniéndose finalmente 5 subfracciones.

Tabla 15. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2.5.2</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.5.2.1	4,1	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.2.2	5,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.2.3	4,5	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.2.4	5,9	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.5.2.5	5,6	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

La subfracción 4.2.5.2.2 y 4.2.5.2.5, fueron sometidas a análisis espectroscópicos y espectrométricos para su elucidación estructural, tal como RMN H<sup>1</sup>, CG-EM, y 4.2.5.2.4 se sometió a RMN H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>; DEPT -135.

Tabla 16. Subfracciones obtenidas del refraccionamiento de F<sub>4.2.7</sub> proveniente de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*.

Subfracciones	Masa (mg)	Solventes
4.2.7.1	0,6	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7.2	1,3	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7.3	1,5	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7.4	0,7	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7.5	2,1	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt
4.2.7.6	5,2	CHCl <sub>3</sub> - AcOEt

Esta separación fue mediante CCFP, continuando con CHCl<sub>3</sub> - AcOEt (1:1), como eluyentes, obteniéndose 6 subfracciones de las cuales se escogió la 4.2.7.6 en vista que se observó buena separación, también se sometió a los análisis espectroscópico y espectrometrico para su elucidación estructural, tal como RMN H<sup>1</sup>; y CG-EM.

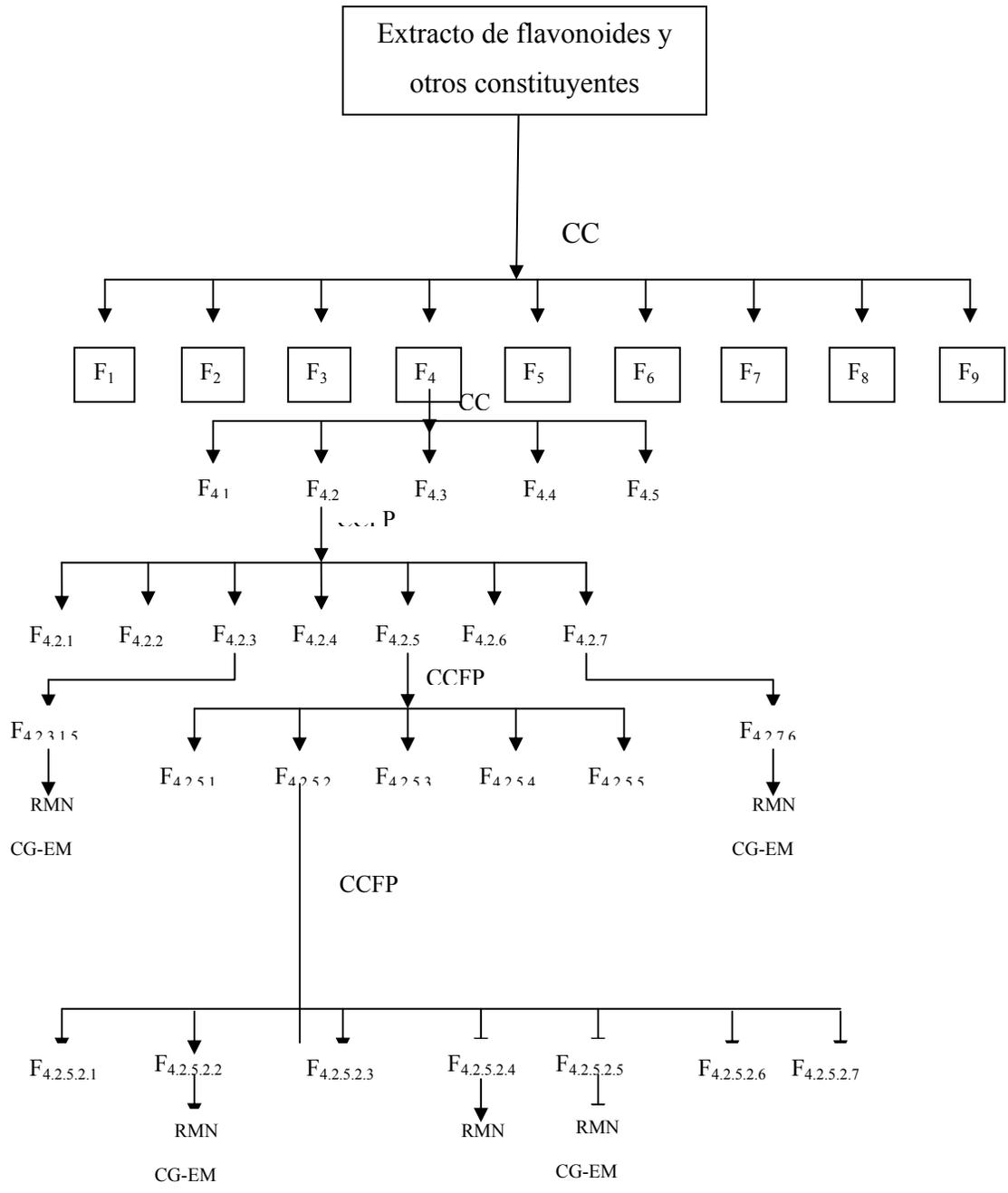


Figura 26. Esquema de fraccionamiento de la fracción de flavonoides y otros constituyentes de *Conocliniopsis prasiifolia*

### Separación e identificación de de la subfracciones F<sub>4.2.3.1.5</sub>

Esta subfracción fue analizada por RMN <sup>1</sup>H y por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), para la identificación estructural de los compuestos presentes, (figura 27). La tabla 17 muestra las asignaciones correspondientes a las señales más importantes seleccionadas.

Tabla 17. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup>H de la subfracción F<sub>4.2.3.1.6</sub>

Señal	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
A	multiplete ( <i>m</i> )	0,90	-CH <sub>3</sub>
B	multiplete ( <i>m</i> )	1,23	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C	singlete ( <i>s</i> )	2,31	OC-CH <sub>2</sub>
D	multiplete ( <i>m</i> )	2,50	OC-CH <sub>2</sub>
E	triplete ( <i>t</i> )	3,05	-O-CH
F	triplete ( <i>t</i> )	3,12	-O-CH
G	triplete ( <i>t</i> )	3,25	-O-CH
H	singlete ( <i>s</i> )	3,65	-O-CH <sub>3</sub>
I	Doblete ( <i>d</i> )	3,95	-O-CH <sub>3</sub>
J	multiplete ( <i>m</i> )	4,20	-CH <sub>2</sub> -
K	multiplete ( <i>m</i> )	4,29	-CH <sub>2</sub> -

En el espectro RMN <sup>1</sup>H figura (27) de la subfracción F<sub>4.2.3.1.5</sub> se observaron 11 señales, a campo alto se muestra una señal ubicada en la zona alifática del espectro asignable a protones metílicos a  $\delta_H$  0,90 ppm formando un multiplete (A), seguida de la señal (B) con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  1,23 ppm se muestra una señal la cual integra para protones metilénicos destacándose como un multiplete, a  $\delta_H$  (2,31 (C) y 2,50 (D)) ppm se muestran formando un singlete y multiplete respectivamente dichas señales integrando para portones metilénicos cercanos a un átomo de oxígeno, con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  (3,05(E) ; 3,12 (F) y 3,25 (G)) ppm correspondientes a protones metinicos cercanos a un átomo de oxígeno formando un tripletes, así como también se desplegaron dos señales con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  (3,65(H) Y 3,95(I)) ppm correspondientes a protones metílicos cercanos a un átomo de oxígeno

formando singlete y doblete respectivamente, a campo bajo se exhibieron con desplazamientos químicos dos señales a  $\delta_H$  (4,20 (J) y 4,29 (K)) las cuales integran para protones metilénicos formando multipletes cada una.

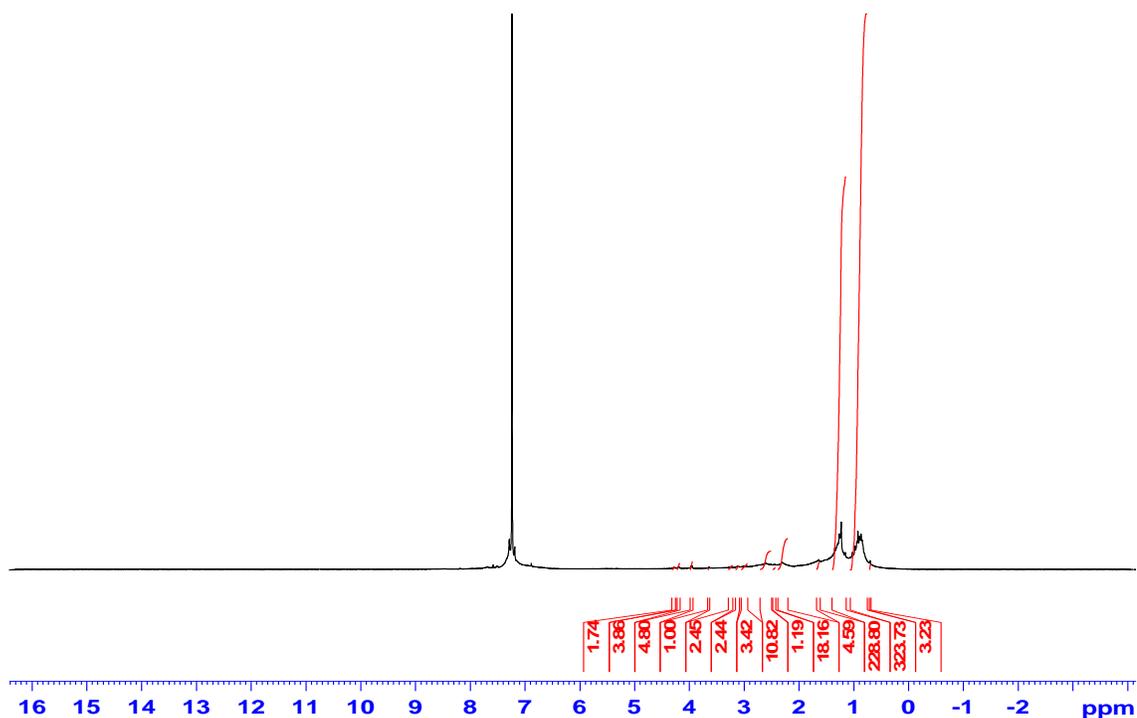


Figura 27. Espectro RMN  $H^1$  de la subfracción  $F_{4.2.3.1.5}$

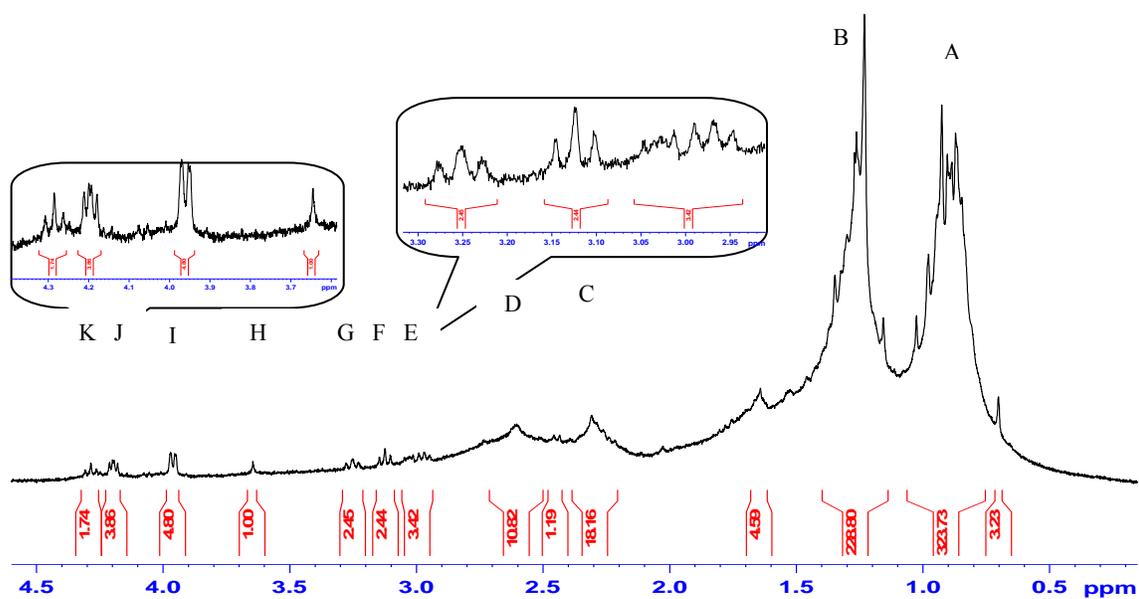


Figura 28. Ampliación del espectro RMNH<sup>1</sup> de la subfracción F<sub>4.2.3.1.5</sub>

Con estas señales reportadas por el análisis de RMN <sup>1</sup>H, y con las reportadas por la cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), se identificaron los componentes presentes en esta subfracción, con el fin de obtener información de manera más completa de los constituyentes presentes en esta, como se muestra en el cromatograma (figura 29).

Se evidenció la presencia de 3 constituyentes químicos que se encontraban con mayor probabilidad, en los que se destacan el éster metílico del ácido hexadecanoico, el éster etílico del ácido hexadecanoico y friedelan 3-ona.

Tabla 18. Compuestos identificados en la subfracción F<sub>4.2.3.1.5</sub> por (CG-EM).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Formula
éster metílico del ácido hexadecanoico	17,699	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
éster etílico del ácido hexadecanoico	19,654	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
friedelan 3-ona	27,999	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O

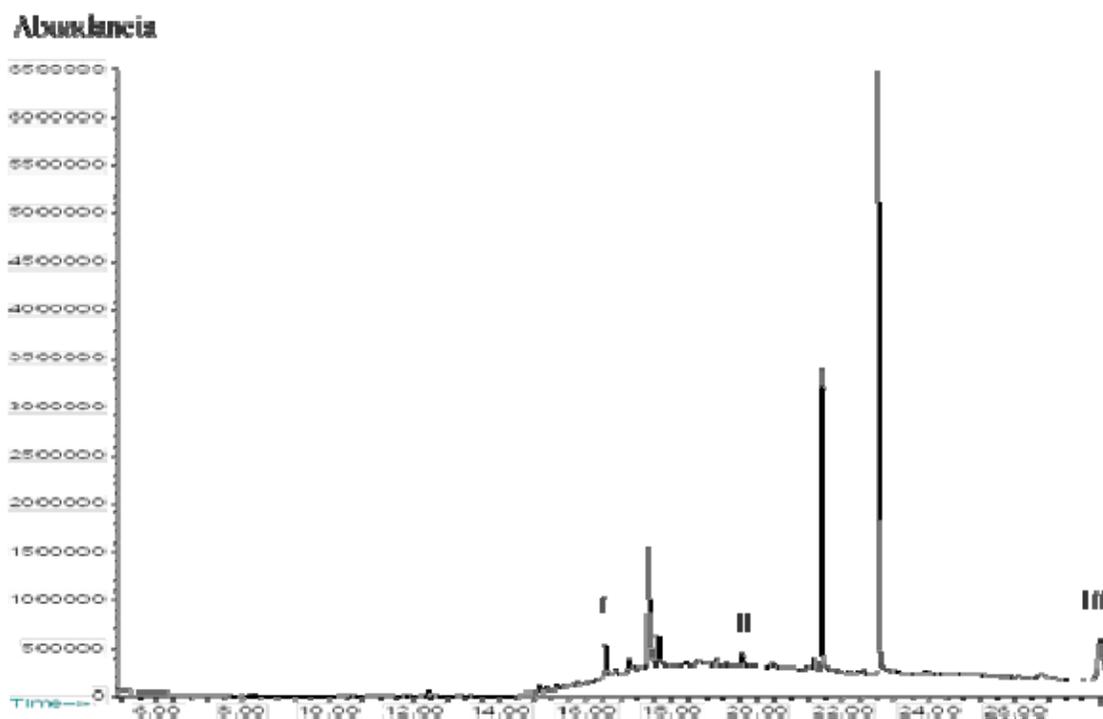


Figura 29. Cromatograma de la subfracción F<sub>4.2.3.1.5</sub>

El espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (I) (TR =17,699 min) (figura 30), desplegó un ión molecular a  $m/z$  270 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  227, 165,143, 129, 87, 74 (pico base), 57. En la figura 31, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

El éster etílico del ácido hexadecanoico (II) (TR =19,654 min) (figura 32), generó un ión molecular a  $m/z$  284 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos más abundantes a  $m/z$  241, 157, 115 y 88 (pico base), 55. En la figura 33, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

El Friedelan-3-one (III) (TR =27,999 min) constituyó el metabolito más abundante de esta subfracción. Su espectro de masas (figura 34), desplegó un ión molecular a  $m/z$  426 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos más abundantes a  $m/z$  411, 341, 302,

273, 205, 179, 177,55 (pico base). En la figura 35, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

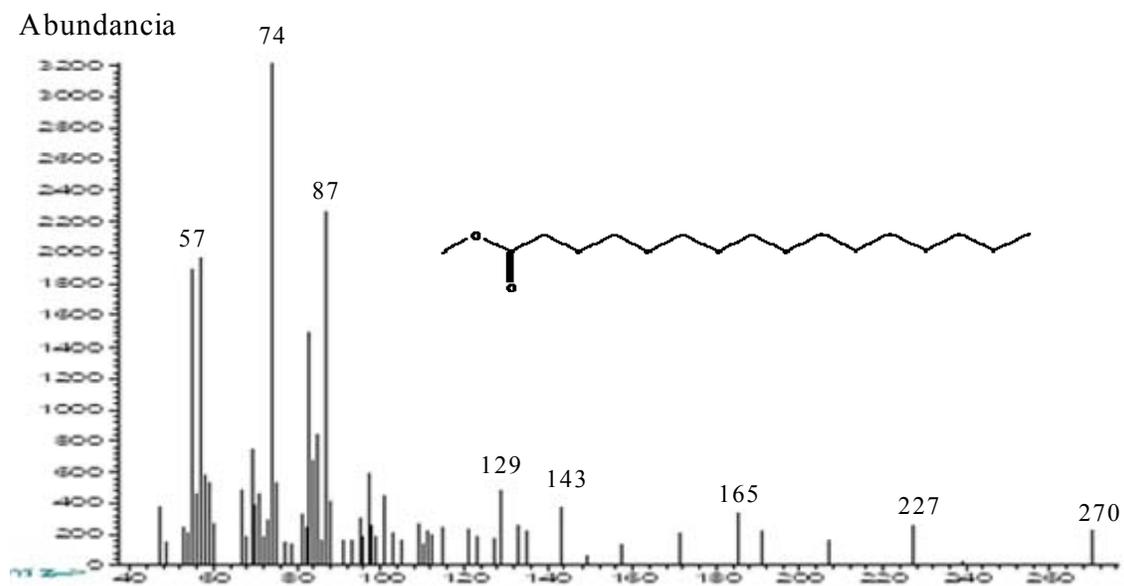


Figura 30. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico.

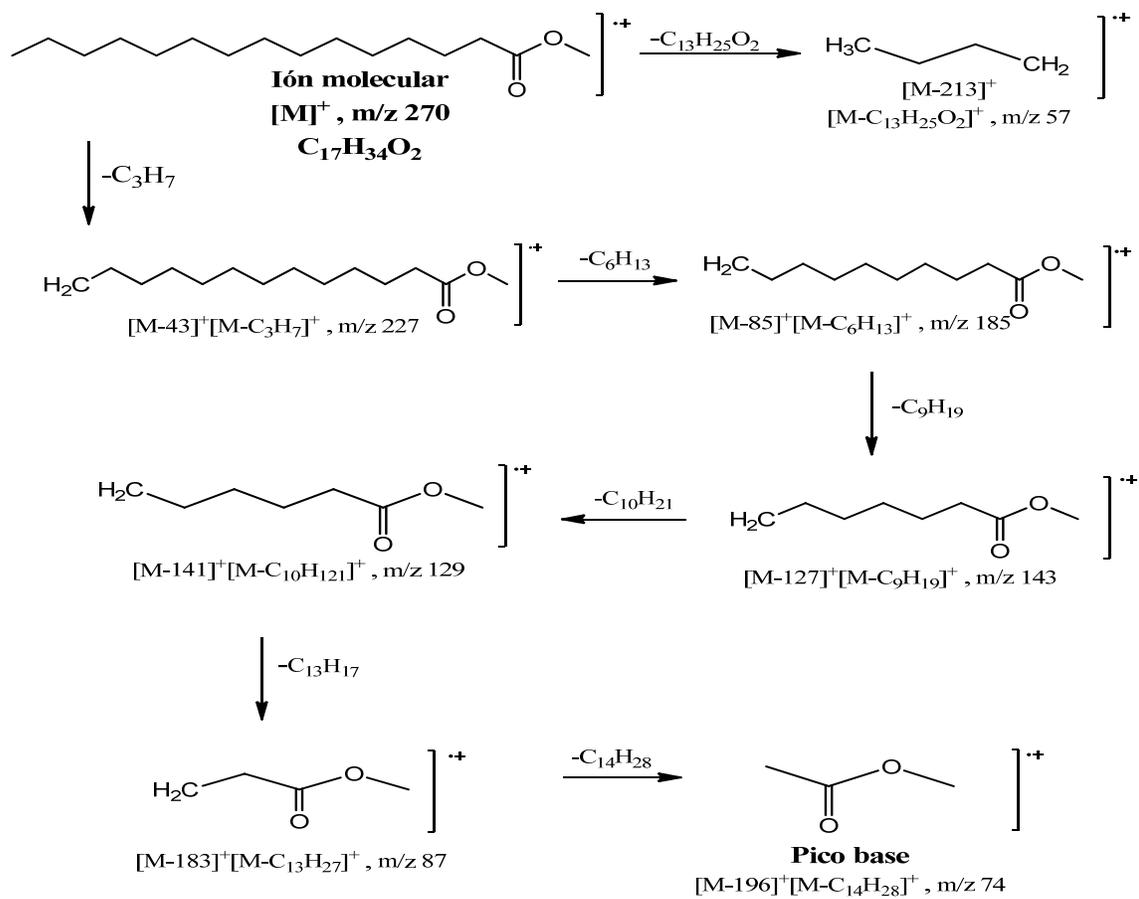


Figura 31. Patrón de fragmentación del éster metílico del ácido hexadecanoico.

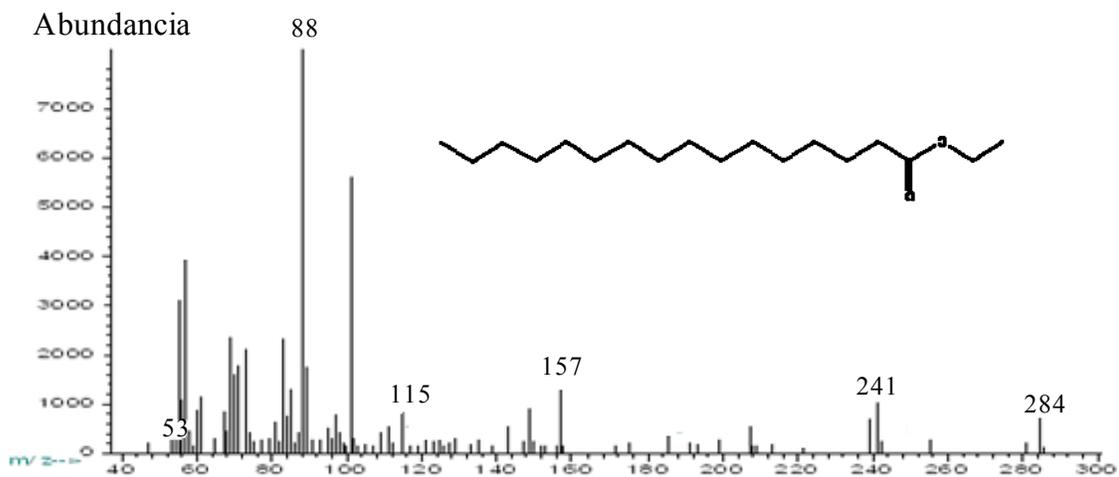


Figura 32. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico.

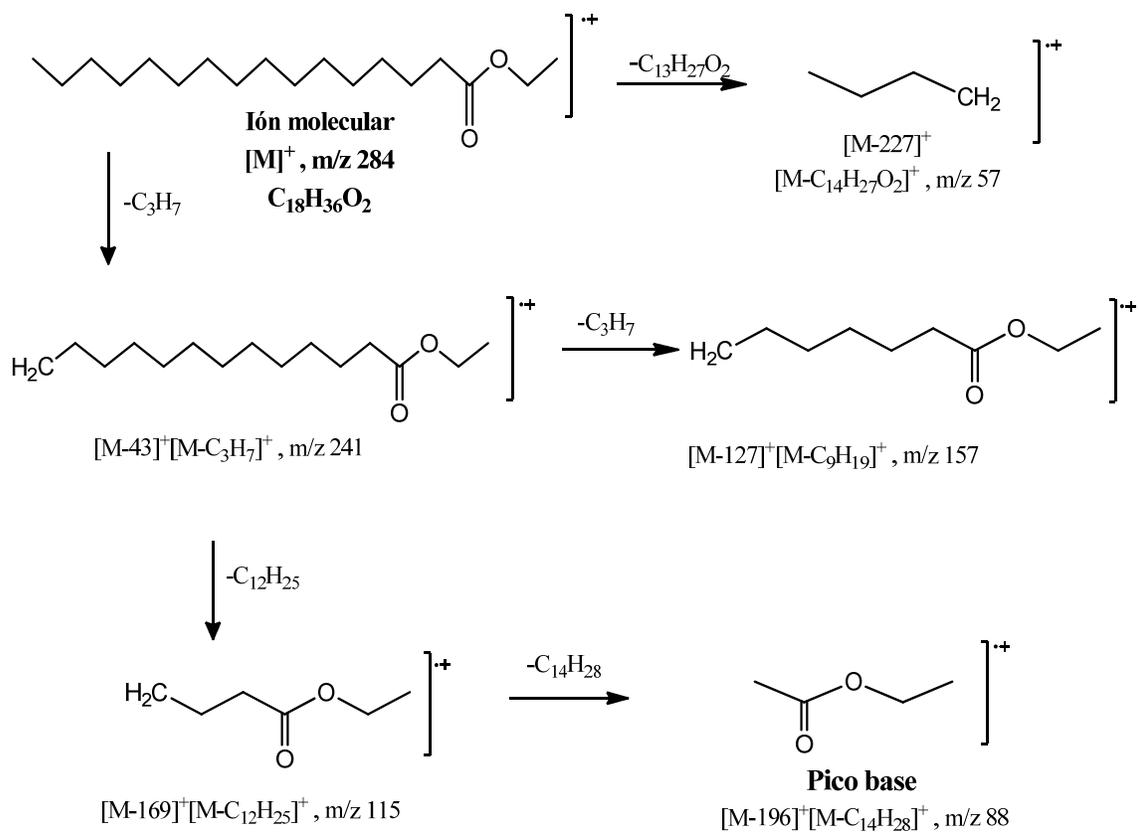


Figura 33. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido hexadecanoico

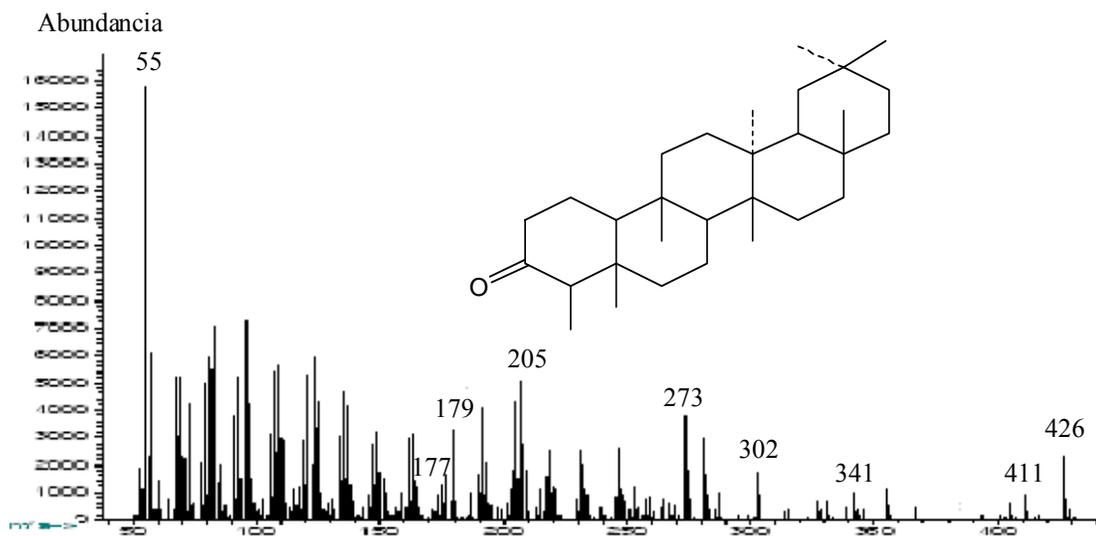


Figura 34. Espectro de masas del friedelan 3-ona.

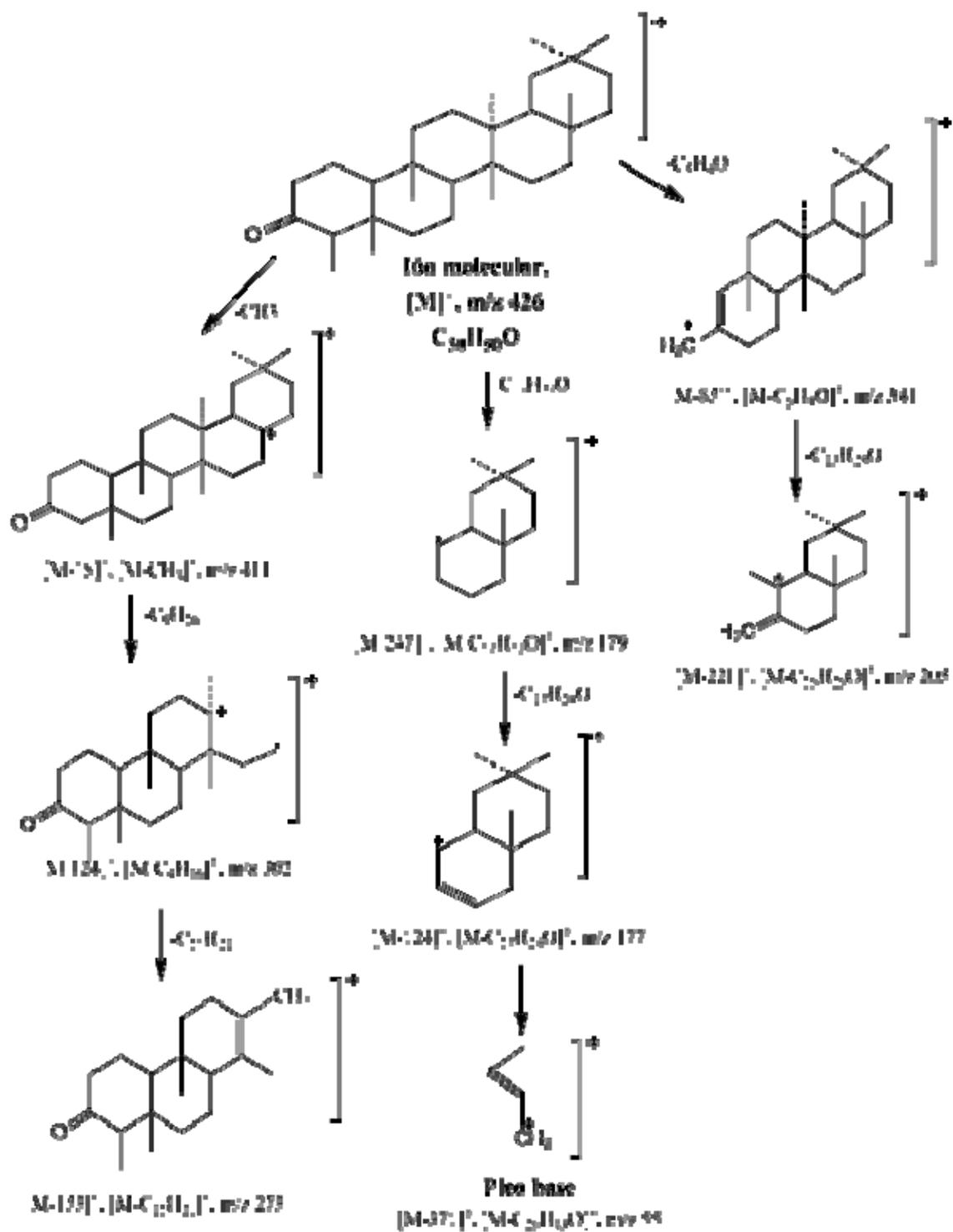


Figura 35. Patrón de fragmentación del friedelan 3-ona.

La identificación de ésteres en *Conocliniopsis prasiifolia* representa un aporte más a su quimiotaxonomía, ya que no existen en la literatura reportes acerca de la presencia de estos compuestos en esta especie como lo son, el éster metílico del ácido hexadecanoico y el éster etílico del ácido hexadecanoico.

En una investigación se ha reportado que los ésteres de ácidos grasos a altas concentraciones, provocan la muerte celular por apoptosis, y cuando las concentraciones se incrementan, la muerte celular ocurre por necrosis, debido a inhibición de la síntesis de ADN, a pesar que poseen una gama de fuentes de principios químicos para su potencial uso como agentes antineoplásicos (48,49).

Así como también el triterpeno, friedelan -3-ona, que es un triterpeno pentacíclico ha sido reportado en diferentes plantas estudiadas, tal como fue identificado en la especie *Maytenus ilicifolia* *Maytenus* perteneciente a la familia Celastráceas destacándose, a este con propiedades antiespasmódico, anticoncepción, gastroprotectora, diurético, analgésico y cicatrizante. Mediante la determinación de la composición química en 15 poblaciones de *Maytenus ilicifolia* nativa distribuida en el sur y al oeste de las regiones de Brasil (50).

Confirmando los análisis realizados en *Conocliniopsis prasiifolia*, en los que se han reportado una variedad de terpenos, a los que les han atribuido su actividad microbiana, siendo este un aporte más a su quimiotaxonomía (36).

#### **Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F<sub>4.2.7.6</sub>**

La identificación estructural de los constituyentes presentes en esta subfracción, se realizó por RMN H<sup>1</sup> (figura 36), complementándolo mediante el uso de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), La tabla 19 muestra las asignaciones correspondientes a las señales más importantes seleccionadas.

Tabla 19. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN  $^1H$  de la subfracción F<sub>4.2.7.6</sub>

Señal	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
A	multiplete ( <i>m</i> )	0,90	-CH <sub>3</sub>
B	singlete ( <i>s</i> )	1,23	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C	singlete ( <i>s</i> )	1,97	-CH <sub>2</sub>
D	cuarteto ( <i>c</i> )	3,47	O-CH
E	singlete ( <i>s</i> )	3,54	-O-CH
F	doblete ( <i>d</i> )	4,08	-O-CH <sub>2</sub>
G	cuarteto ( <i>c</i> )	4,20	-COO-CH <sub>2</sub>
H	triplete ( <i>t</i> )	4,28	-CH <sub>2</sub> -
I	multiplete ( <i>m</i> )	7,51	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
J	multiplete ( <i>m</i> )	7,70	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

El espectro de RMN  $H^1$ , de esta subfracción exhibió campo alto una señal en la región alifática, con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  0,90 ppm (A) formando un multiplete, el cual es asignado a protones metílicos, seguida de dos singletes a  $\delta_H$  (1,23(B) y 1,97(C)) ppm integrable para protones metilénicos, una serie de señales en forma de cuarteto y singlete entre  $\delta_H$  3,47 ppm (D) y  $\delta_H$  3,54 ppm (E) asignables a protones metinicos cercanos a un átomo de oxígeno, con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  4,08 (F) se desplego un doblete atribuible a protones metilénicos cercanos a un átomo de oxígeno, a  $\delta_H$  4,20 ppm (G) y  $\delta_H$  4,28ppm (H) se muestran un cuarteto y un triplete integrables para protones metilénicos, finalmente se observa a campo bajo en la región aromática dos señales desde  $\delta_H$  7,51 ppm (I) a  $\delta_H$  7,70 ppm (J) como multipletes asignables a protones aromáticos.

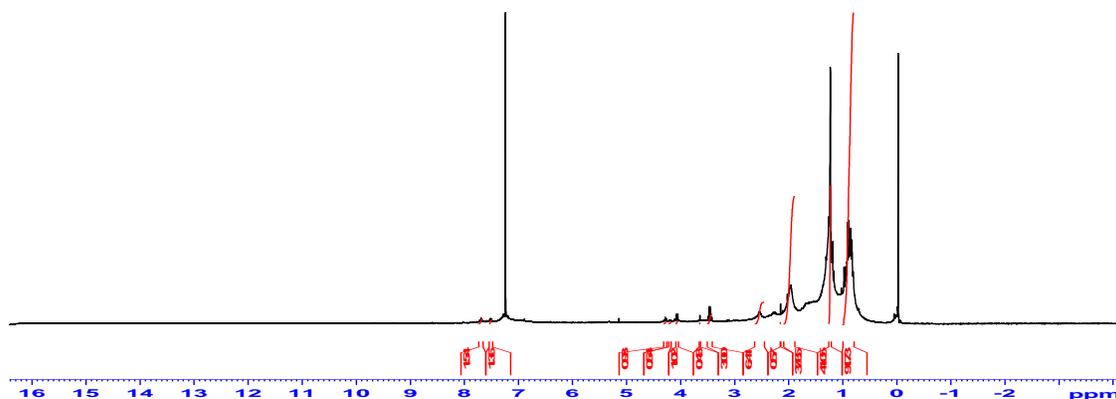


Figura 36. Espectro RMN  $^1H$  de la subfracción F<sub>4.2.7.6</sub>

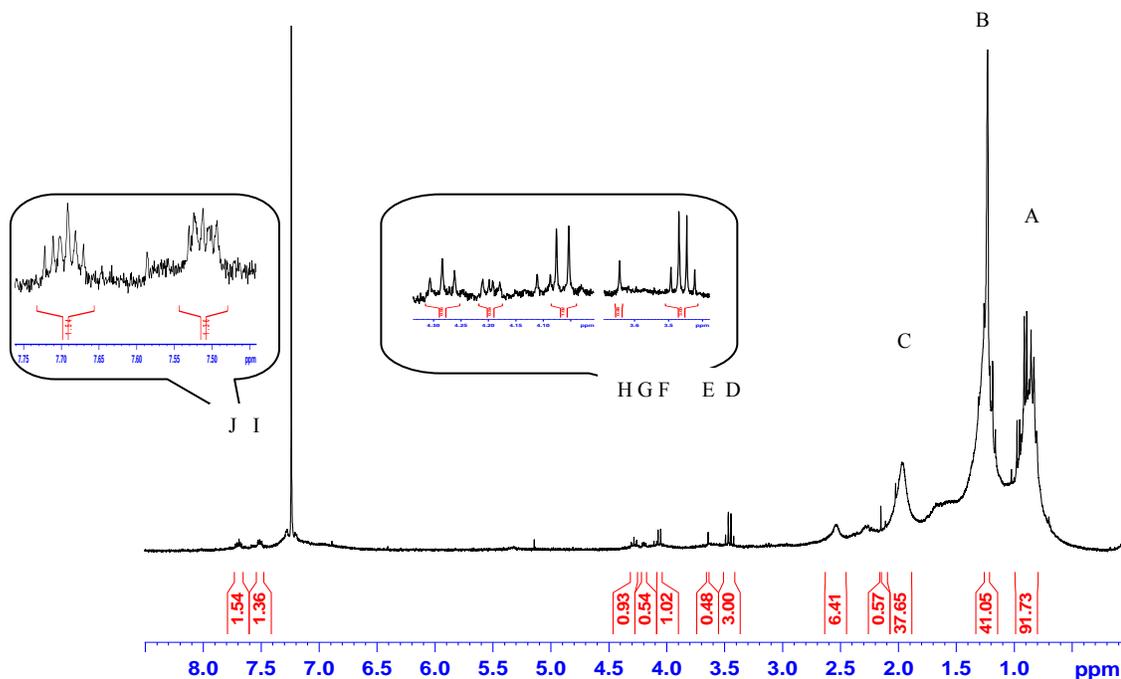


Figura 37. Ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $F_{4.2.7.6}$

De acuerdo con los desplazamientos químicos reportados por el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se evidenció que se trataban de compuestos con grupos carboxílicos y aromáticos, para lo cual fue necesario realizar un análisis mediante el uso de la espectrometría de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), para comprobar los posibles constituyentes presentes en esta subfracción, reportándose la presencia de 8 compuestos tal como se muestra en el cromatograma (figura 38).

Tabla 20. Compuestos identificados en la subfracción  $F_{4.2.7.6}$  por (CG-EM).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Formula
éster metílico del ácido dodecanoico	13,196	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	16,147	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$
éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico	16,493	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$
nonadecano	16.703	$\text{C}_{19}\text{H}_{40}$
éster metílico del ácido tridecanoico	16,991	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$
docosano	19,696	$\text{C}_{22}\text{H}_{46}$
hexacosano	23,124	$\text{C}_{26}\text{H}_{54}$



Para el 6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona el espectro de masas (II) (TR =16,147 min) (figura 41), mostró un ión molecular a  $m/z$  268 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  250, 165, 141, 97, 71,57(pico base). En la figura 42, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

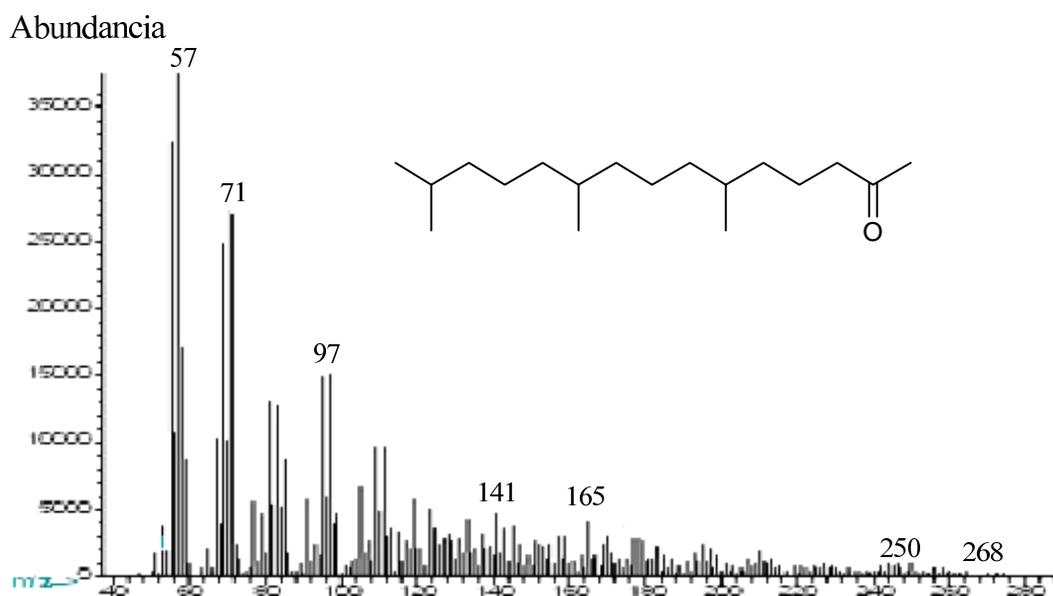


Figura 41. Espectro de masas del 6, 10,14-trimetil-2-Pentadecanona.

De acuerdo con diversas investigaciones, la hexahidrofarnesil acetona forma parte del aceite esencial de especies como: *Aster lanceolatus*, *Ilex dumosa* e *Ilex paraguarienses* y de *Elaphoglossun spathulatum* encontradas en América Central y del Sur, las cuales se caracterizan por poseer propiedades antibacteriales y se utilizan para curar enfermedades reumáticas e intestinales. Además, estas especies son consideradas como antioxidantes, diuréticas y laxantes naturales.

Así como también para el éster bis (2-metilpropil) ácido 1,2-benzenodicarboxílico, su espectro de masas (III) (TR =16,493 min) (figura 43), generó un ión molecular a  $m/z$  278 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  167,149(pico base), 104, 76,57. En la figura 44, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

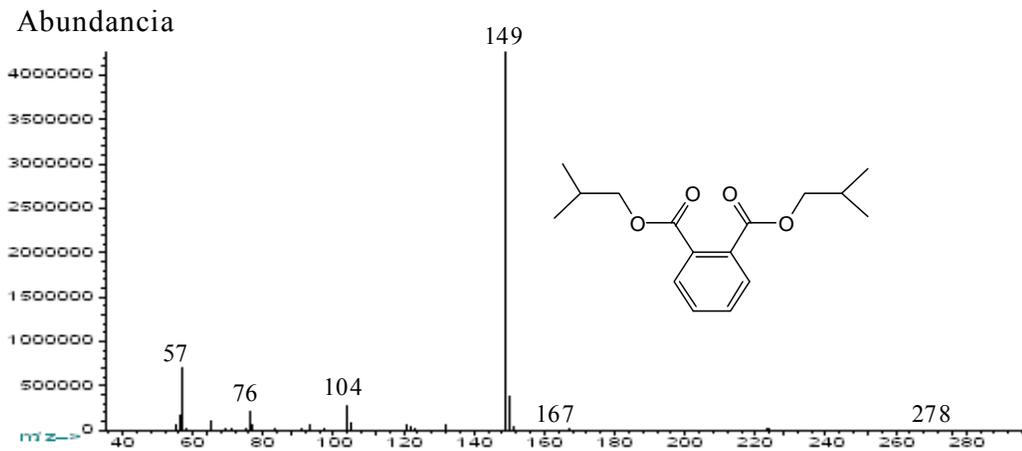


Figura 43. Espectro de masas del éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico

Para el nonadecano, mostró en su espectro de masas (IV) (TR =16,703 min) (figura 45), un ión molecular a  $m/z$  268 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  225, 210, 141,111, 85, 71,57, (pico base). En la figura 46, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

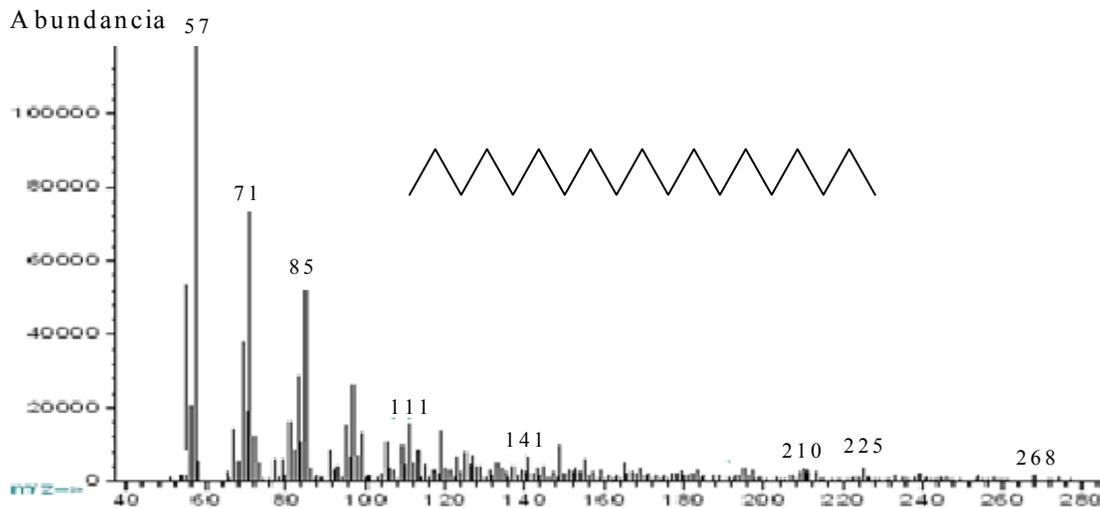


Figura 45. Espectro de masas del nonadecano.

El espectro del éster metílico del ácido tridecanoico (V) (TR =16,991 min) (figura 47), desplegó un ión molecular a  $m/z$  228 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  185, 171, 87,74 (pico base), 45. En la figura 48, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

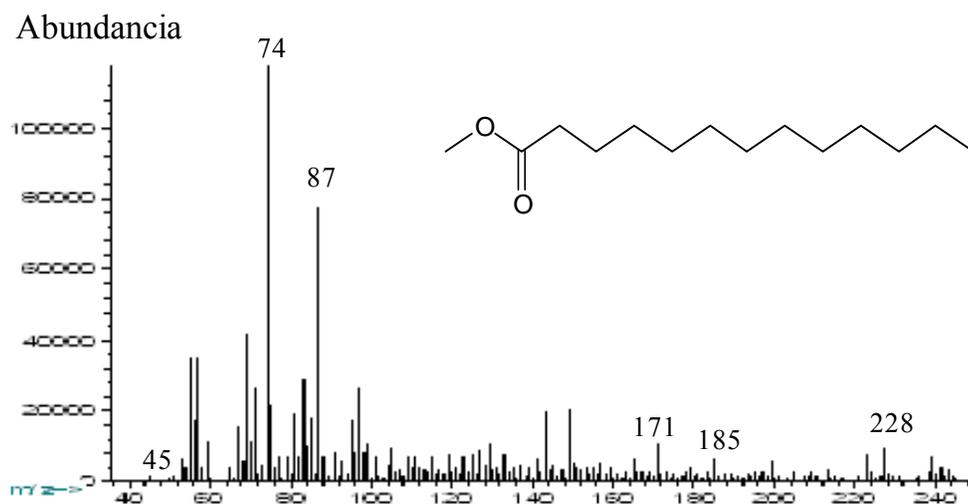


Figura 47. Espectro del éster metílico del ácido tridecanoico.

Así como también para el docosano, su espectro de masas (VI) (TR =16,969 min) (figura 49), generó un ión molecular a  $m/z$  310  $[M^+]$  y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  267, 253,141, 125, 111, 97, 71, 57, (pico base). En la figura 50, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto

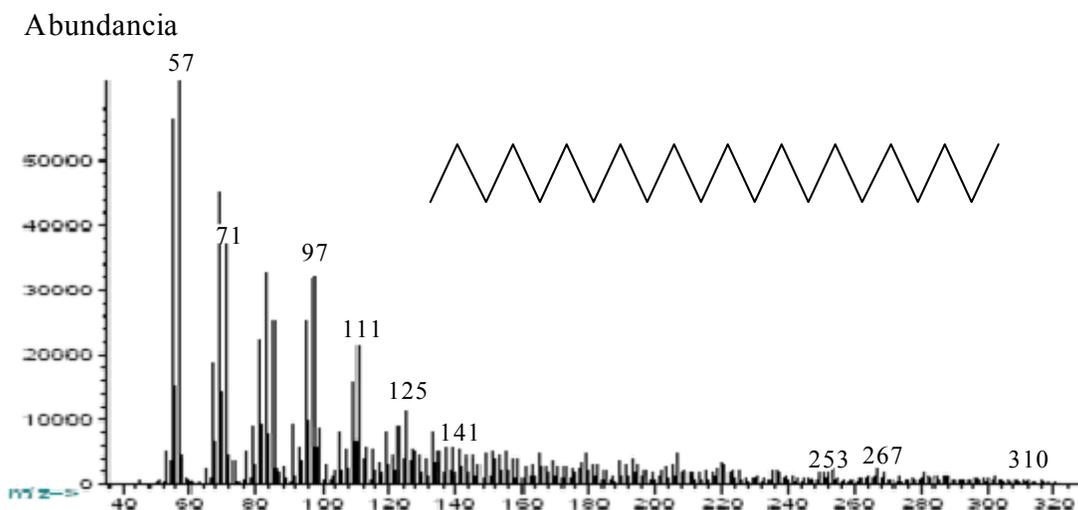


Figura 49. Espectro de masas del docosano.

El espectro de masas hexacosano (VIII) (TR =23,124 min) (figura 51), desplegó un ión molecular a  $m/z$  366 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  337, 295, 239, 125, 111, 85, 57 (pico base), 55. En la figura 52, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

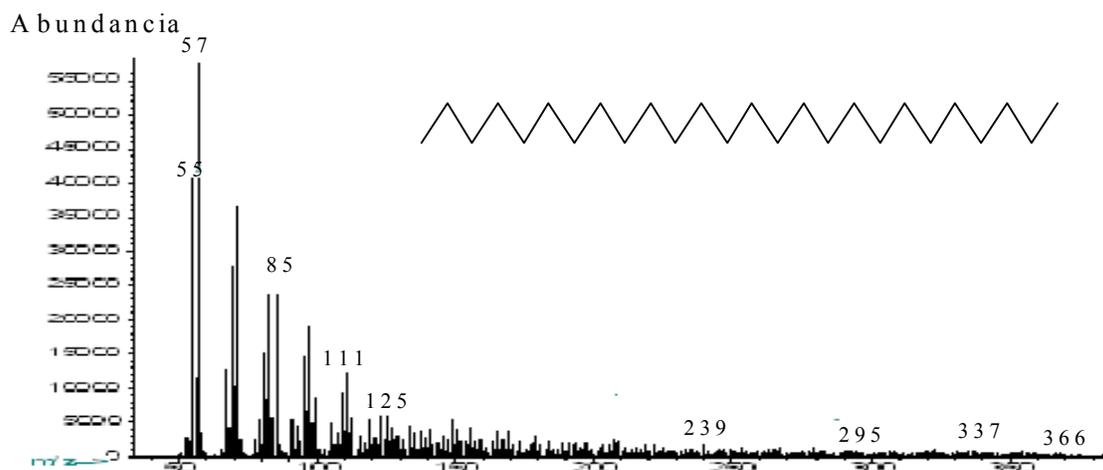


Figura 51. Espectro de masas del hexacosano.

Es común encontrar en los productos naturales, ácidos grasos ligados a distintas clases de lípidos, como por ejemplo fosfolípidos, glicolípidos, glicéridos, esteroides o en forma libre, con longitudes de cadena superiores a  $C_{24}$  y generalmente con un patrón de insaturación *cis*  $C_5$  y *cis*  $C_9$ ; ácidos grasos con cadena impar y ácidos con un patrón de insaturación  $C_6$  y  $C_{11}$ , muy poco difundido en la naturaleza, además de la presencia de ácidos poliinsaturados y ramificados (51). Es posible pensar que los ésteres encontrados en esta planta sea derivado de ácidos con estas características, como es el caso del éster etílico del ácido dodecanoico y el éster metílico del ácido tridecanoico. Pudiéndose atribuir, además, la letalidad de esta subfracción en *Artemia salina*, a la mezcla de los ésteres metílicos y etílicos de ácidos saturados.

En las plantas vivas, los hidrocarburos saturados están universalmente distribuidos como los recubrimientos cerosos (ceras cuticulares) en las hojas y como ceras de cutícula en las superficies de las frutas. Varias plantas son ricas en hidrocarburos alifáticos,

utilizados en los aceites vegetales; por ejemplo, el aceite de olivo, derivado de los frutos del olivo (*Olea europea*) contiene hidrocarburos en el rango C<sub>13</sub> a C<sub>28</sub>. Los alcanos simples ramificados (excluyendo terpenos) ocurren raramente en cantidades significativas en las plantas (52).

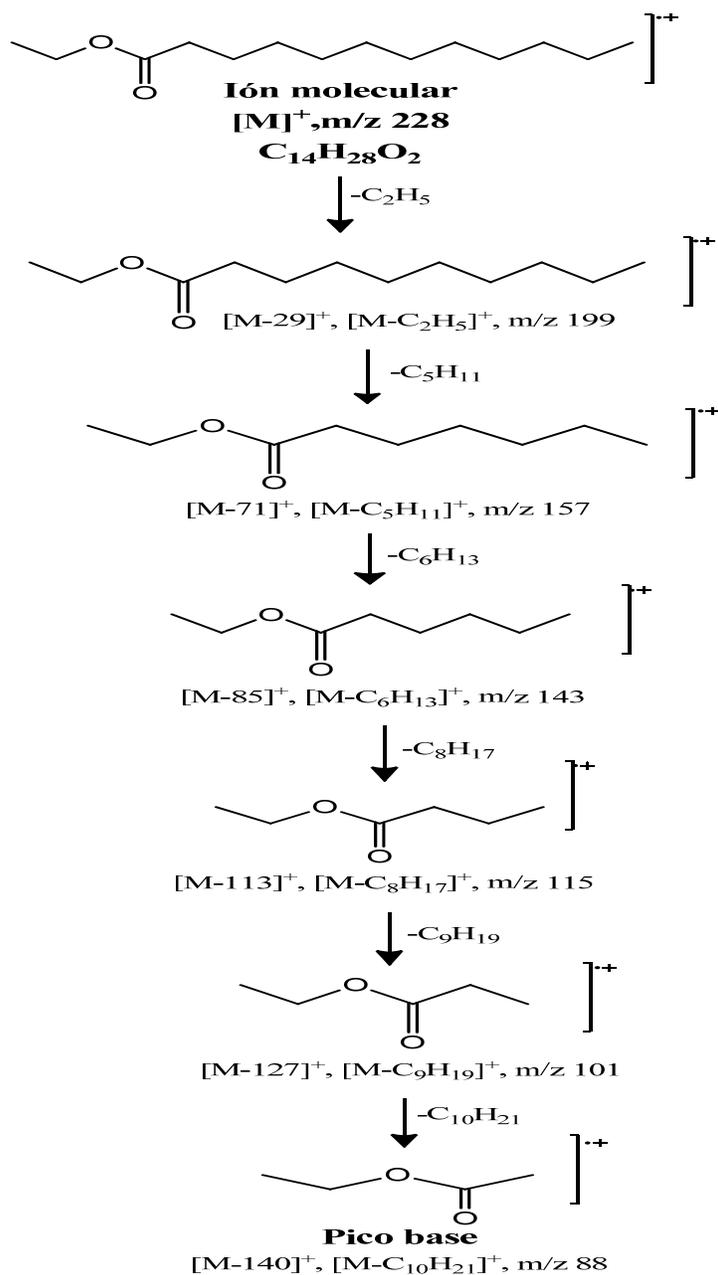
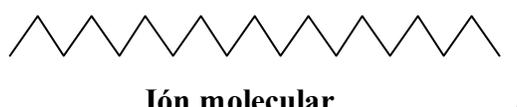


Figura 40. Patrón de fragmentación del éster etílico del ácido dodecanoico.



Figura 44. Patrón de fragmentación del éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.



**Ión molecular**

**[M]<sup>+</sup>, m/z 268**

**C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>**

—C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>

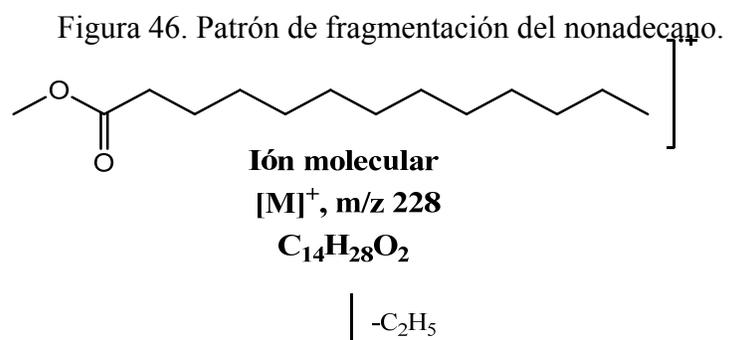


Figura 48. Patrón de fragmentación del ester metílico del ácido tridecanoico.

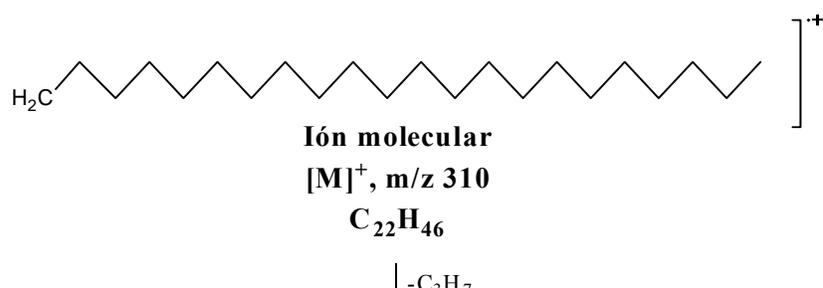


Figura 50. Patrón de fragmentación del docosano.

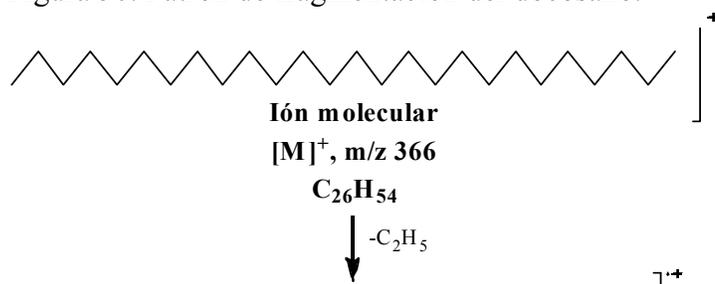


Figura 52. Patrón de fragmentación del hexacosano.

### Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F<sub>4.2.5.2.2</sub>

La identificación de los compuestos presentes en esta subfracción se realizó por RMN <sup>1</sup>H (figura 53) y mediante el uso de la cromatografía de gases acoplado a un detector de masas. La tabla 21 muestra las asignaciones correspondientes a las señales más importantes seleccionadas, para esta subfracción.

Tabla 21. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup>H de la subfracción F<sub>4.2.5.2.2</sub>

Señal	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
A	triplete ( <i>t</i> )	0,90	-CH <sub>3</sub>
B	triplete ( <i>t</i> )	1,22	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C	multiplete ( <i>m</i> )	1,62	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
D	singlete ( <i>s</i> )	2,03	-CH <sub>3</sub> -COO-
E	singlete ( <i>s</i> )	2,15	CH <sub>3</sub> -CO-
F	doblete ( <i>d</i> )	2,53	-CH-CO-
G	multiplete ( <i>m</i> )	3,00	-CH <sub>2</sub> -CO-
H	triplete ( <i>t</i> )	3,12	-CH <sub>2</sub> -CO-
I	multiplete ( <i>m</i> )	3,25	-CH <sub>2</sub> -CO-
J	multiplete ( <i>m</i> )	3,45	-O-CH <sub>2</sub>
K	singlete ( <i>s</i> )	3,52	-O-CH
L	doblete ( <i>d</i> )	4,11	-OCO-CH <sub>2</sub> -
M	multiplete ( <i>m</i> )	5,47	-C=C-H
N	multiplete ( <i>m</i> )	6,17	-C=C-H

En el espectro RMN <sup>1</sup>H figura (53) de la subfracción F<sub>4.2.5.2.2</sub> se observaron 14 señales a campo alto ubicadas en la zona alifática del espectro. Una señal asignable a protones metílicos a  $\delta_H$  0,90 ppm (A), formando un triplete. La segunda con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  1,22 ppm (B) que integra para protones metilénicos formando un triplete, seguida de una señal (C) que corresponde a dos protones asignables a un metileno unido a un átomo de carbono formando un multiplete a  $\delta_H$  1,62 ppm, la señal (D) se encuentra a  $\delta_H$  2,03 ppm como, un singlete correspondiente para protones metílicos unidos a un grupo carboxílico, en la región de  $\delta_H$  2,15 y 2,53 (E y F) ppm se revelan como singlete y

doblete asignables a protones metínicos y metilénicos respectivamente unidos a un átomo de carbono que a su vez se encuentra unido a un átomo de oxígeno, las señales que se encuentran con desplazamientos químicos de  $\delta_H$  ( 3,00 (G); 3,12 (H) y 3,25 (I)) corresponden a protones metilénicos unidos a un carbono unido a un átomo de oxígeno formando (multiplete, triplete y multiplete) respectivamente. Con desplazamiento químico de  $\delta_H$  3,45 (J) y  $\delta_H$  3,52 (K) ppm se observan señales formando un multiplete y singlete respectivamente que integran para protones metínicos unidos y metilénicos unidos a un átomo de oxígeno, otra a  $\delta_H$  4,11(L) como un doblete correspondiente a protones metilénicos cercanos a un átomo de oxígeno, finalizando con dos señales a campo bajo, no bien definidas, formando multipletes que integran para un hidrógeno a  $\delta_H$  6,17 (N) y  $\delta_H$  5,47 (M) asignados a un protón olefínico debido a la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula.

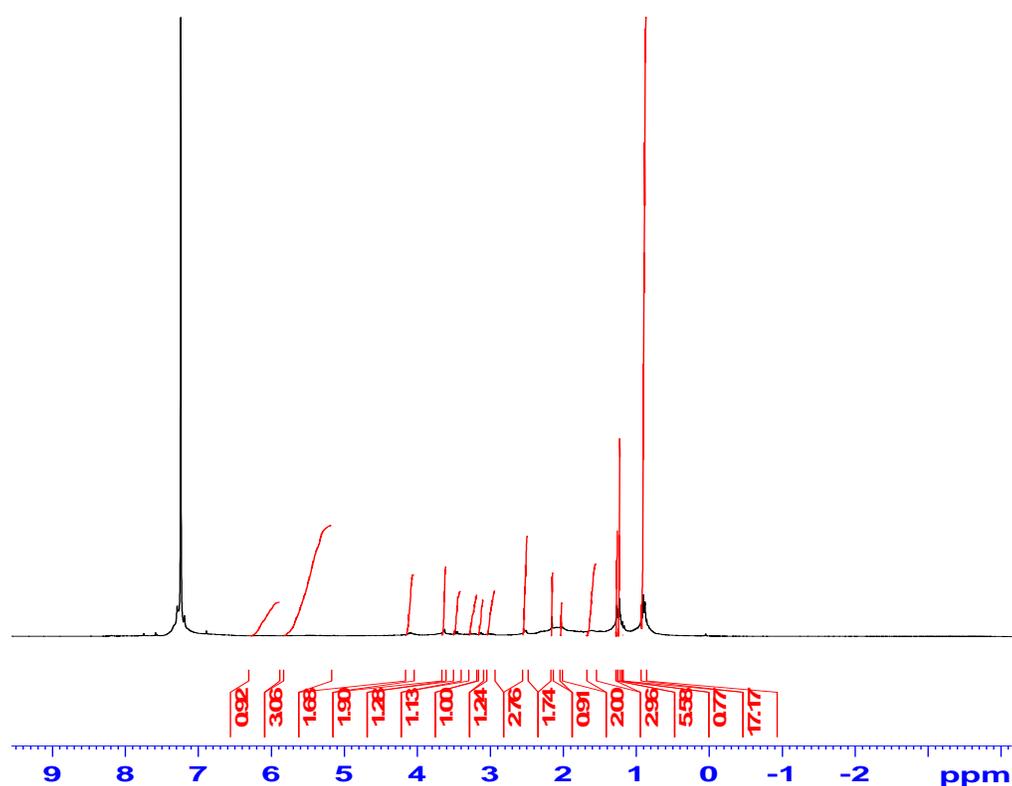


Figura 53. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción F<sub>4.2.5.2.2</sub>.

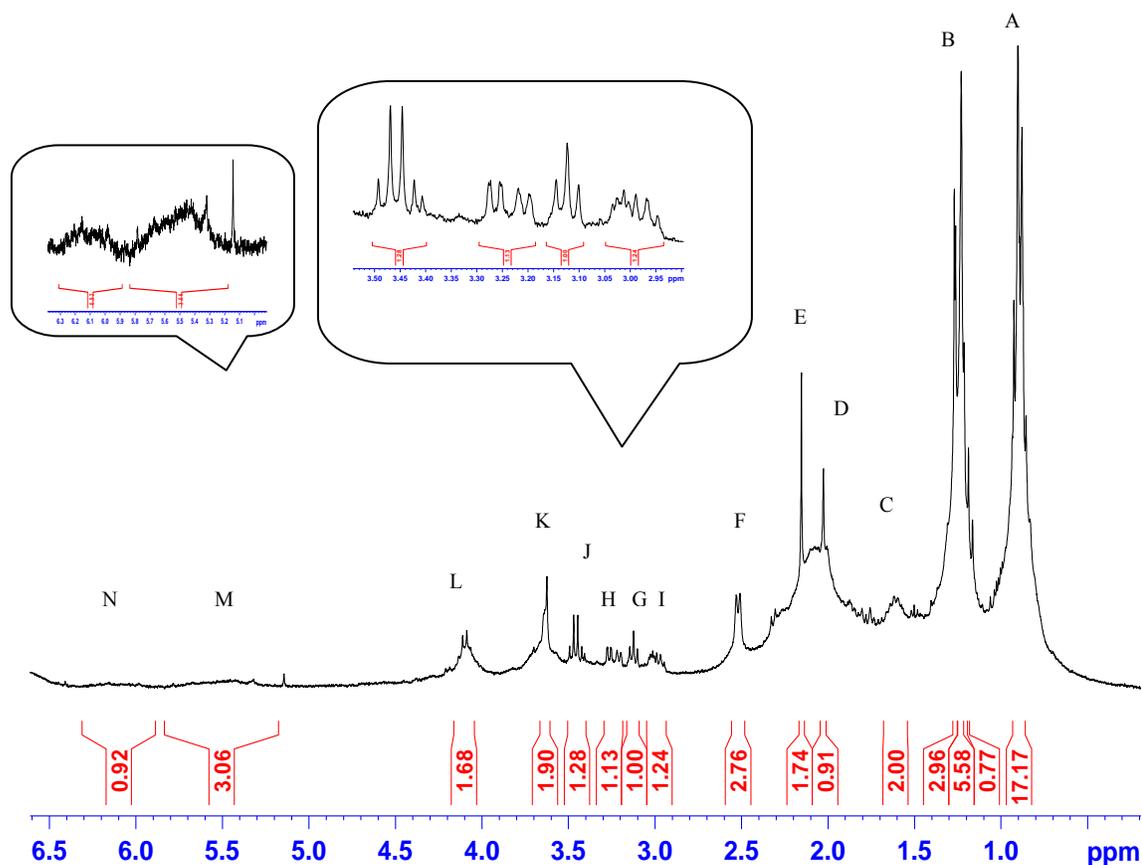


Figura 54. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $F_{4.2.5.2.2}$ .

De acuerdo con estas señales reportadas en el análisis de RMN  $^1\text{H}$  se procedió a complementar dicho análisis para, la separación e identificación de los componentes presentes en esta subfracción, tomando en cuenta que presento solubilidad en cloroformo y acetato de etilo, se le realizó un estudio por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), como se muestra en el cromatograma (figura 55).

Se evidenció la presencia de tres constituyentes químicos que se encontraban en mayor proporción y probabilidad, en los que se destacan el éster metílico del ácido hexadecanoico, éster etílico del ácido hexadecanoico y el triterpeno Friedelan-3-one, siendo este el más abundante. Los cuales fueron detectados en la subfracción  $F_{4.2.3.1.6}$  con la diferencia que los tiempos de retención variaron, lo que incrementa aun más la

probabilidad que dichos compuestos estén presentes en *Conocliniopsis prasiifolia*, tal como se muestra en la siguiente tabla y el cromatograma de gases (figura 55).

Tabla 22. Compuestos identificados en la subfracción F<sub>4.2.5.2.2</sub> por (CG-EM).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Formula
<b>Ester metílico del ácido hexadecanoico</b>	17,248	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
<b>Ester etílico del ácido hexadecanoico</b>	17,903	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
<b>Friedelan-3-ona</b>	28,026	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O

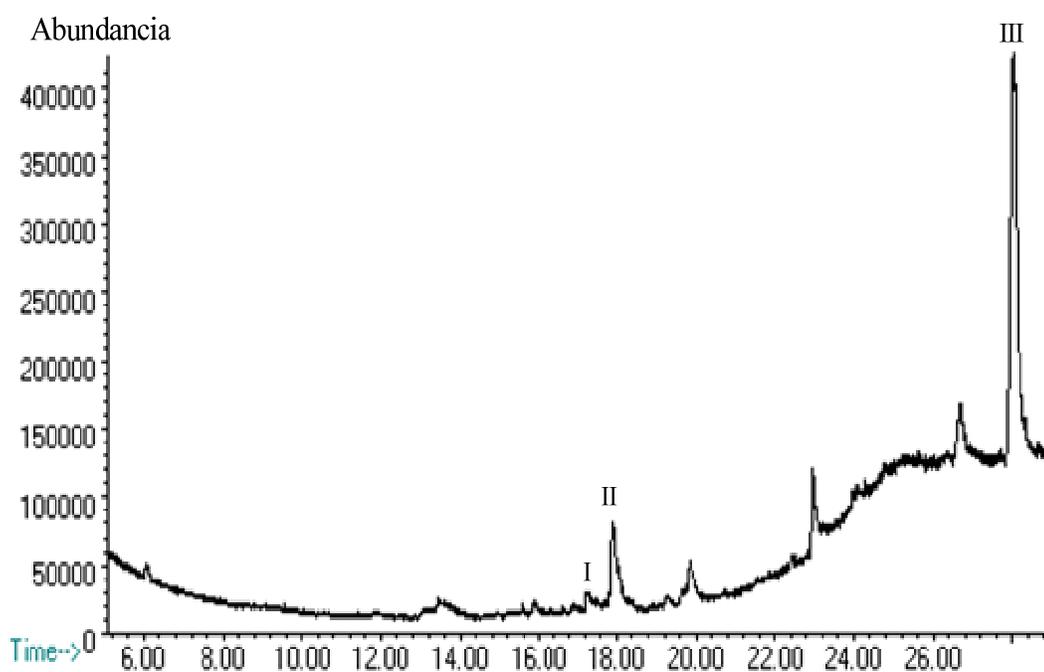
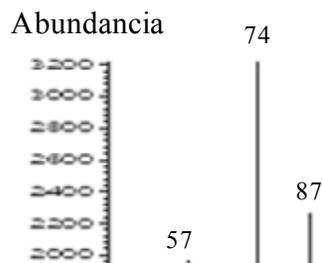


Figura 55. Cromatograma de gases de la subfracción F<sub>4.2.5.2.2</sub>.

El espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (I) (TR =17,248 min) (figura 56), desplegó un ión molecular a m/z 270 [M<sup>+</sup>] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 227, 207, 185,143, 129, 87, 74 (pico base), 57 y 47.



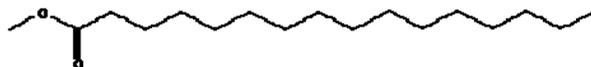


Figura 56. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico.

El éster etílico del ácido hexadecanoico (II) (TR =17,903 min) (figura 57), generó un ión molecular a  $m/z$  284 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos más abundantes a  $m/z$  241, 157, 88 (pico base), 83y 55.

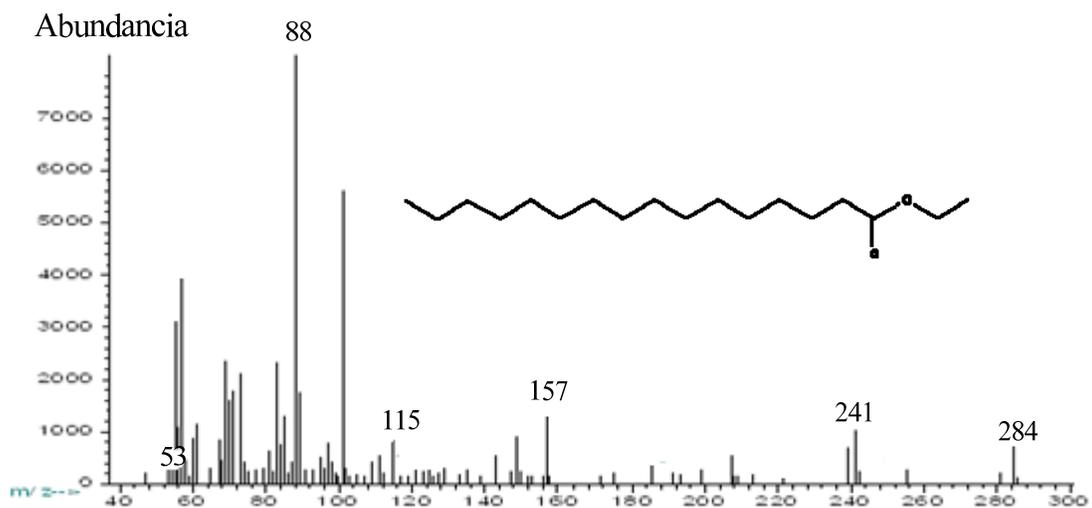


Figura 57. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico.

El Friedelan-3-ona (III) (TR =28,026 min) constituyó el metabolito más abundante de esta subfracción. Su espectro de masas (figura 58), desplegó nuevamente un ión molecular a  $m/z$  426 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos más abundantes a  $m/z$  411, 341, 302, 273, 205, 179, 177, 55 (pico base)

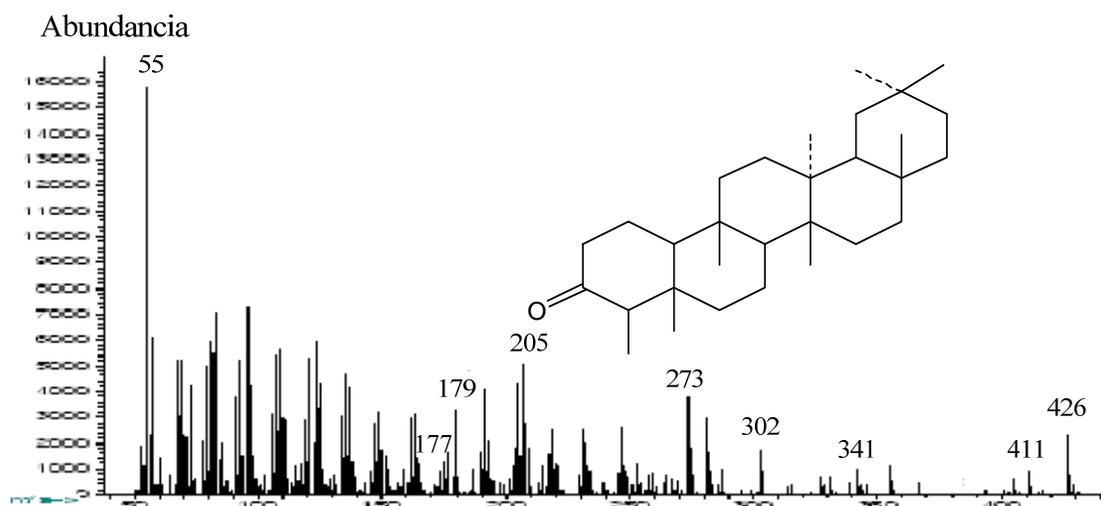


Figura 58. Espectro de masas del Friedelan-3-ona.

Con las señales reportadas por el cromatograma se puede destacar que el compuesto del friedelan-3-ona, es el compuesto que se encuentra en mayor proporción en esta subfracción y su probabilidad de estar presente grande, por ende se puede pensar que este constituyente también tiene mayor actividad frente a las bacterias ensayadas ya que los triterpenos tienen gran resistencia frente a estos microorganismos, así como también a la actividad contra *Artemia salina*, logrando destacar que este compuesto entra en la posibilidad de ser uno de los más responsables de estas actividades.

#### **Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F<sub>4.2.5.2.4</sub>**

Al realizar el revelado de la CCF se observó que no presentaba separación con ninguna mezcla de solventes, lo que evidenciaba que estaba formada por una mezcla compleja de compuestos. Esta subfracción se presentó como un líquido amarillo, soluble en

cloroformo y acetato de etilo. Analizando las características del líquido en cuestión, se le realizó un estudio de los componentes por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135.

Tabla 23. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_{\text{H}}$ ) de algunas señales de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción F<sub>4.2.5.2.4</sub>.

Señal	Multiplicidad	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Asignación
A	doblete ( <i>d</i> )	0,91	- <u>CH</u> <sub>3</sub>
B	triplete ( <i>t</i> )	1,20	-CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C	doblete ( <i>d</i> )	1,46	-CH- <u>CH</u> <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -
D	multiplete ( <i>m</i> )	1,83	-CH <sub>2</sub> - <u>CH</u> <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
E	doblete ( <i>d</i> )	2,26	<u>CH</u> -C=
F	triplete ( <i>t</i> )	2,52	- <u>OH</u>
G	triplete ( <i>t</i> )	3,06	- <u>CH</u> -CO-
H	singlete ( <i>s</i> )	3,46	- <u>CH</u> -CO
I	multiplete ( <i>m</i> )	3,75	- <u>CH</u> -CO
J	multiplete ( <i>m</i> )	4,04	- <u>CH</u> -O
K	singlete ( <i>s</i> )	4,35	<u>CH</u> -OH
L	doblete ( <i>d</i> )	4,52	<u>CH</u> -OH
M	doblete ( <i>d</i> )	4,67	-OCO- <u>CH</u> <sub>2</sub> -
N	singlete ( <i>s</i> )	5,30	<u>CH</u> -OH
Ñ	multiplete ( <i>m</i> )	5,43	-CH=C- <u>H</u>
O	singlete ( <i>s</i> )	5,52	-CH=C- <u>H</u>
P	singlete ( <i>s</i> )	5,79	- <u>CH</u> <sub>2</sub>
Q	singlete ( <i>s</i> )	5,98	-CH=C- <u>H</u>
R	doblete ( <i>d</i> )	6,24	-CH=C- <u>H</u>
S	doblete ( <i>d</i> )	6,74	-CH=C- <u>H</u>

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  figura (59) de la subfracción F<sub>4.2.5.2.4</sub> se observaron 20 señales a campo alto ubicadas en la zona alifática del espectro. Una señal asignable a protones metílicos a  $\delta_{\text{H}}$  0,91 ppm (A) formando un doblete, en las regiones  $\delta_{\text{H}}$  (1,20 (B); 1,46 (C) y 1,83 (D)) ppm se desglosaron señales que integran para protones metilénicos, formando (triplete, doblete y multiplete) respectivamente, seguida de un doblete (E) con desplazamiento químico de  $\delta_{\text{H}}$  2,26 ppm que integra para dos portones correspondientes a un metileno, también se puede observar dos tripletes a  $\delta_{\text{H}}$  (2,52 (F) y 3,06 (G) ) integrando para un protón hidroxílico y el otro para un protón metínico unido a un átomo de carbono que a su vez se encuentra unido a un átomo de oxígeno, a un campo más bajo con desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{H}}$  (3,46 (H) Y 3,75 (I)) ppm dos señales integran

para protones metínicos cercanos a un átomo de oxígeno formando singletes, disminuyendo mas el campo se encuentran tres señales con desplazamientos químicos de  $\delta_H$  (4,04 (J); 4,35(K); 4,52 (L))ppm correspondientes a protones metinicos muy cercanos a un átomo de oxígeno formando singletes y dobletes, a  $\delta_H$  4,67 (M) se generó una señal que integra para protones metilénicos cercano a dos átomos de oxígeno como un doblete, a campo bajo se exhibieron 7 señales con desplazamientos químicos de  $\delta_H$  (5,30 (N); 5,43 (Ñ); 5,52 (O); 5,79 (P); 5,98 (Q); 6,24 (R)y 6,74 (S)) ppm correspondientes para un protones olefínicos debido a la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula formando singletes multipletes y dobletes.

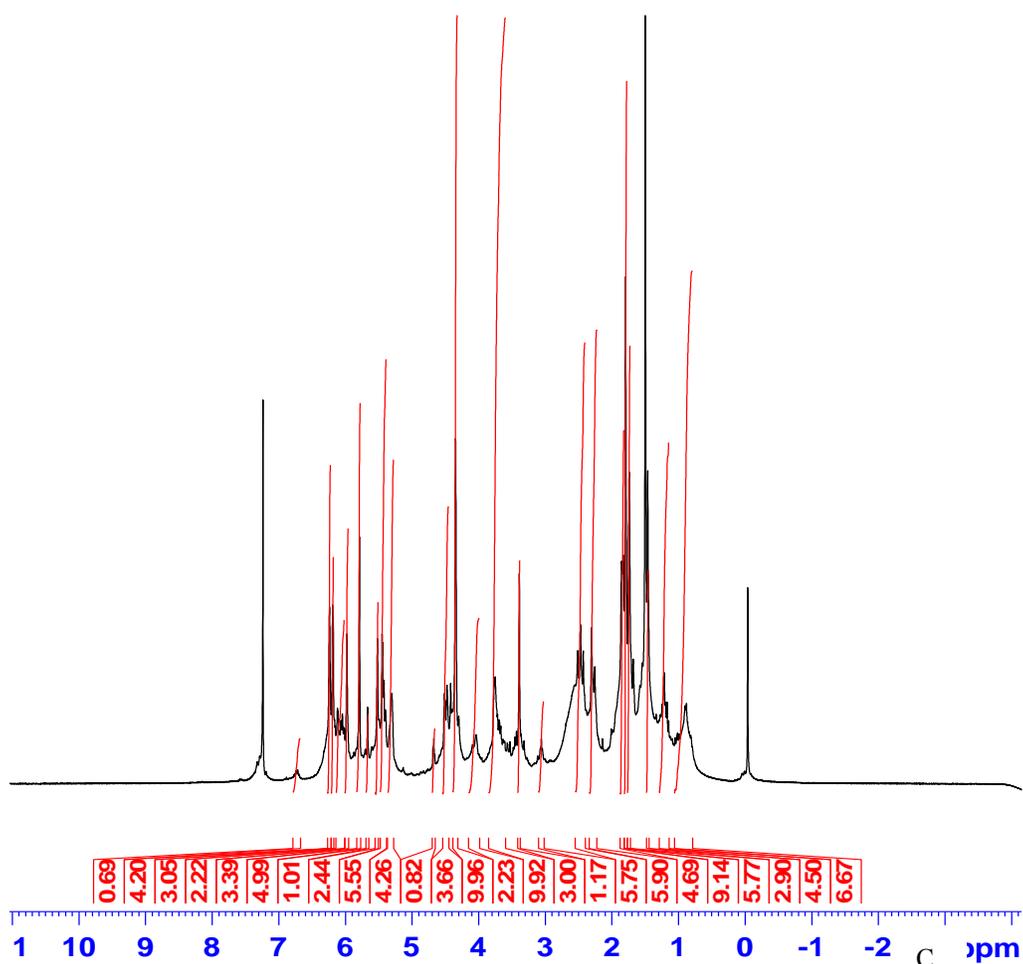


Figura59. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción

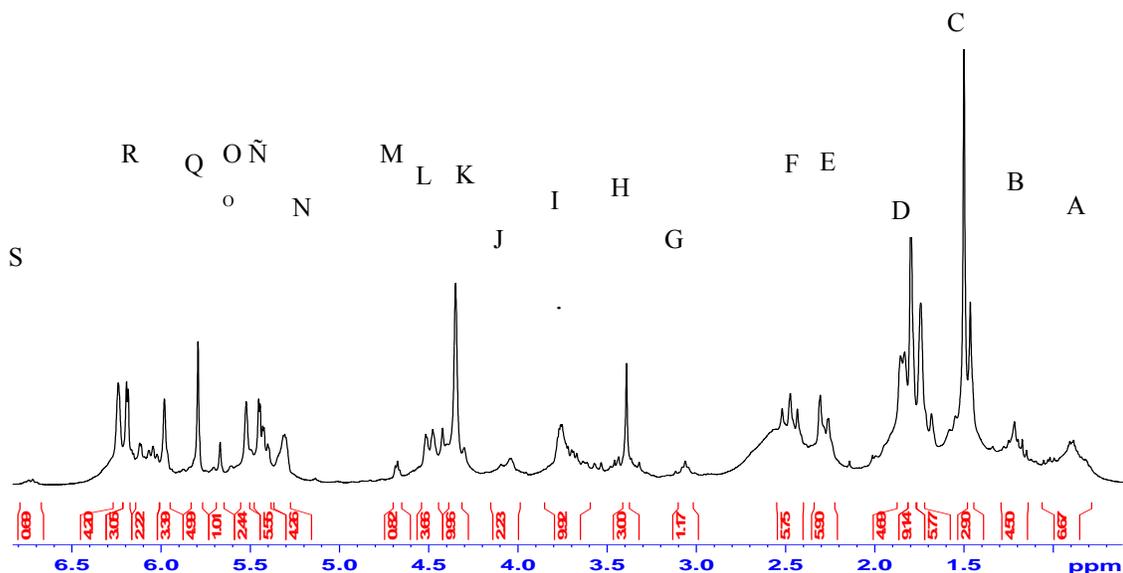


Figura 60. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\text{F}_{4.2.5.2.4}$ .

Tabla 24. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_{\text{C}}$ ) de algunas señales de RMN  $\text{C}^{13}$  la subfracción  $\text{F}_{4.2.5.2.4}$ .

Señal	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Asignación
$\text{C}_1\text{-C}_5$	11,7 - 21,02	$\underline{\text{C}}\text{H}$ ; $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$
$\text{C}_6\text{-C}_8$	43,95 - 44,49	$\text{C}\text{H}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C}$
$\text{C}_9\text{-C}_{11}$	46,82 - 59,32	$\text{O}\underline{\text{C}}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$
$\text{C}_{12}\text{-C}_{13}$	63,06 - 70,57	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$
$\text{C}_{14}\text{-C}_{17}$	72,15 - 85,70	$\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\text{-O}$
$\text{C}_{18}\text{-C}_{19}$	89,11 - 89,89	$\underline{\text{C}}$
$\text{C}_{20}\text{-C}_{21}$	105,9 - 106,67	$\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}$
$\text{C}_{22}\text{-C}_{26}$	124,04 - 126,62	$\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$
$\text{C}_{27}\text{-C}_{31}$	133,13 - 134,66; 138,87	$\underline{\text{C}}\text{H}=\text{-}$
$\text{C}_{32}\text{-C}_{33}$	140,50 - 140,89	$\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{-}$
$\text{C}_{33}\text{-C}_{43}$	166,87 - 284,22	$\underline{\text{C}}$

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  exhibió 43 desplazamientos químicos de carbonos bien definidos, lo que indica que esta subfracción posee 43 átomos de carbonos magnéticamente diferentes presentes, con mayor desplazamiento químico se encuentran 10 señales a campo bajo correspondientes a carbonos cuaternarios asignables a carbonos de un anillo aromático sustituido, esto confirma lo observado en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , acerca de las señales en la región de los aromáticos además, exhibió señales características de grupos olefinicos a  $\delta_{\text{C}}$  105,9 a  $\delta_{\text{C}}$  140,89 ppm, confirmando la

presencia de un doble enlace en el o los compuestos. También, mostró desplazamientos químicos a  $\delta_C$  (89,11 – 89,89) ppm, característico de un carbono cuaternario, así como en la región  $\delta_C$  (72,15 – 85,70) ppm correspondientes a carbonos oxigenados y varios desplazamientos a campo alto que son asignables a grupos metilénicos, metínicos y metílicos (tabla 24)

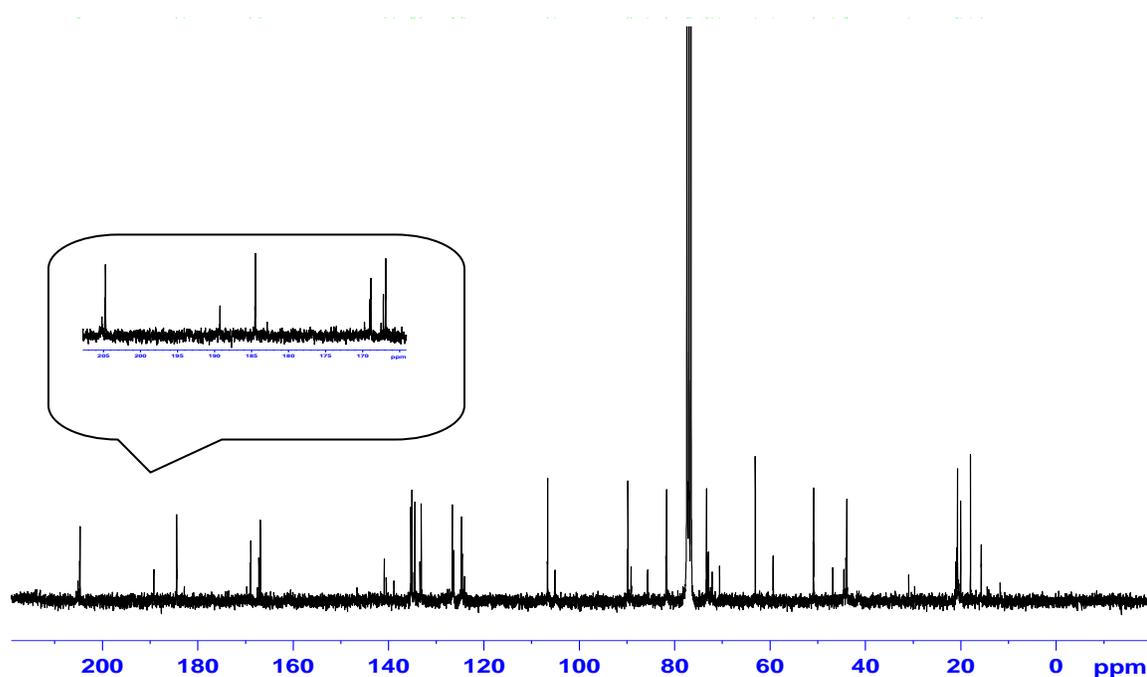


Figura 61. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción  $F_{4.2.5.2.4}$ .

Mediante las señales mostradas por el espectro DEPT-135 (figuras 61), ayudaron a identificar los tipos de carbonos presentes en la estructura como por ejemplo se pudo constatar la presencia carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en la estructura y se observó la presencia de 8 carbonos cuaternarios (tabla 24). Mediante este espectro se confirmaron las asignaciones realizadas.

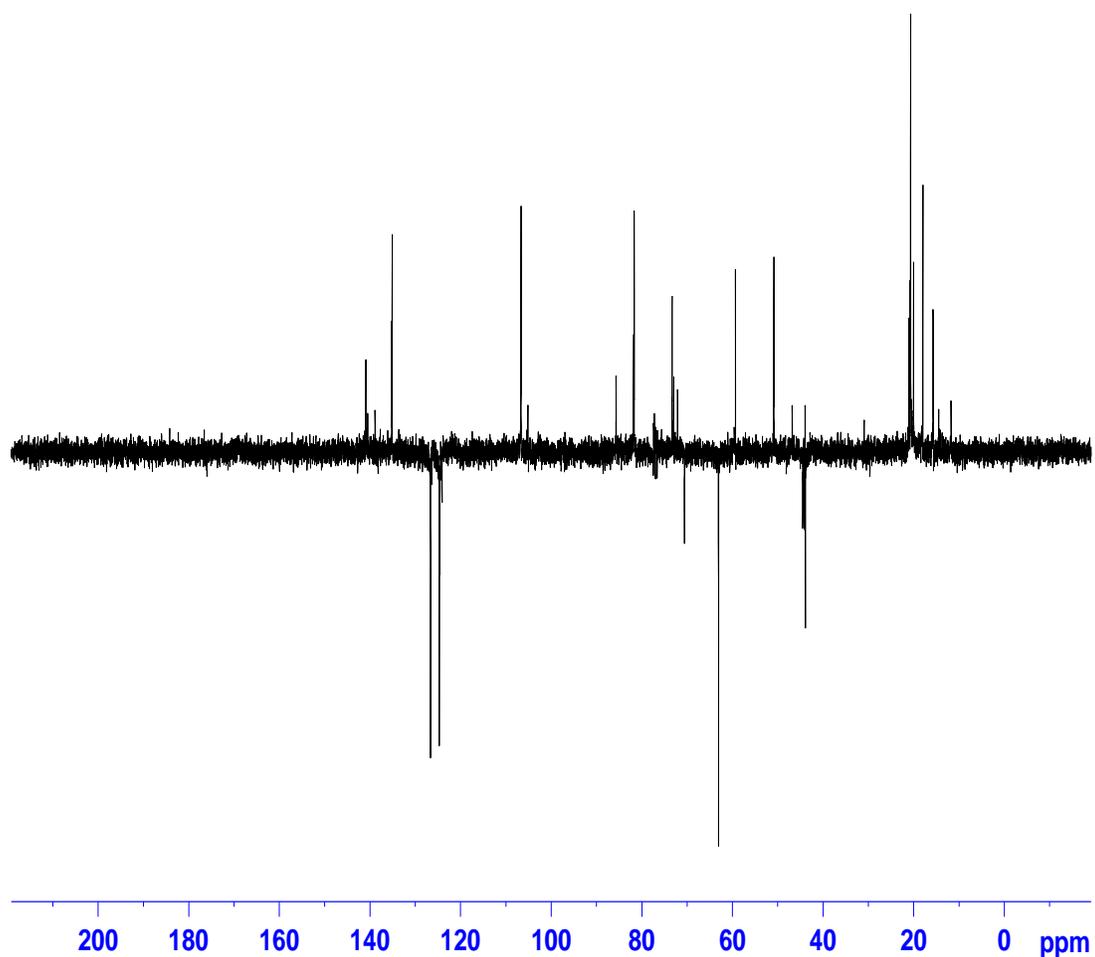


Figura 62. Espectro DEPT 135 de la subfracción F<sub>4.2.5.2.4</sub>

Sin embargo, este análisis no proporciona información acerca del protón que se encuentra enlazado al átomo de carbono (heteroátomo), por lo cual se realizaron indagaciones en las literaturas en las que se han reportado desplazamientos químicos similares, junto con el análisis combinado de los datos espectrales obtenidos de los RMN y DEPT-135, obteniéndose que el compuesto en cuestión presentó desplazamientos muy similares de C<sup>13</sup> y H<sup>1</sup> a los reportados en las literaturas como el 9- $\beta$ -hidroxi-atrípliciólido-8-O-tiglate (figura 63) que es una lactona sesquiterpénica, la cual se propuso como el principal constituyente de esta subfracción destacando que existe la posibilidad que se trata de la misma estructura u otra similar pero que tiene las mismas

características a esta ya que los desplazamientos químicos de las señales de  $C^{13}$  y  $H^1$  se reflejaron en regiones muy cercanas a las reportadas en la literatura, así como también es posible que estén presentes otros constituyentes ya que se observaron otras señales con diferentes desplazamientos químicos de  $C^{13}$  y  $H^1$ . Con la excepción de los carbonos metilénicos en vista que esta lactona no posee este tipo de carbonos, lo que nos afirma que la muestra analizada contenía otros componentes. Esta lactona sequiterpenica fue identificada anteriormente en esta planta, (confirmando aun mas que se trate de el mismo compuesto) y en *Lourteigia ballotaeifolia*, fue comprobada su actividad anti-inflamatoria mediante el uso de aceite de crotón en la oreja de ratones (36).

Tabla 25. Desplazamientos químicos de  $H^1$  de la subfracción  $F_{4.2.5.2.4}$  y del 9-hidroxi-atrípliciolide-8-O-tiglate (lactona sequiterpenica).

Posición	Fracción $F_{4.2.5.2.4}$ , $\delta_H$ (ppm)	9-hidroxi-atrípliciolide-8-O-tiglate $\delta_H$ (ppm)
1	----	----
2	5,52	5,99
3	----	----
4	----	----
5	5,98	5,99
6	5,79	5,70
7	3,46	3,45
8	4,04	4,13
9	5,30	5,27
9'	2,57	2,26
10	----	----
11	----	----
12	----	----
13	----	----
14	1,46	1,46
15	2,26	2,04
1'	----	----
2'	----	----
3'	6,74	7,20
4'	1,83	1,86
5'	6,24 ; 5,67	6,35 ; 5,69

Tabla 26. Desplazamientos químicos de  $C^{13}$  de la subfracción  $F_{4.2.5.2.4}$  y del 9â-hidroxi-atrupliciolide-8-O-tiglate (lactona sequiterpenica).

Posición	Fracción $F_{4.2.5.2.4}$ , $\delta_c$ (ppm)	9â-hidroxi-atrupliciolide-8-O-tiglate $\delta_c$ (ppm)
1	204,82	203,9
2	105,9	104,9
3	184,5	184,4
4	133,13	130,9
5	134,6	134,6
6	73,3	73,8
7	46,8	47,7
8	77,0	77,0
9	81,66	80,0
10	85,66	85,7
11	140,5	140,2
12	168,8	168,9
13	124,04	124,1
14	20,01	19,6
15	20,66	19,8
1'	166,8	166,6
2'	126,6	127,6
3'	140,8	140,8
4'	15,66	14,8
5'	11,78	12,0

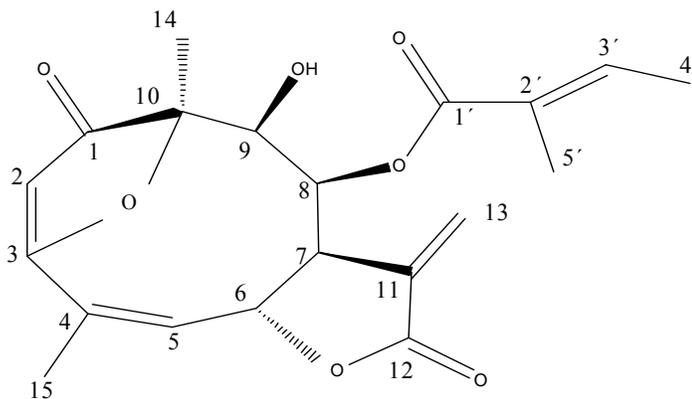


Figura 63. Estructura del 9â-hidroxy-atrupliciolide-8-O-triglate.

### Separación e identificación de los compuestos de la subfracciones F<sub>4.2.5.2.5</sub>

La identificación estructural de los compuestos presentes en esta subfracciones se realizó por RMN <sup>1</sup>H, (figura 64) observándose en el espectro, que la misma poseía desplazamientos químicos similares a compuestos. La tabla 27 muestra las asignaciones correspondientes a las señales más importantes seleccionadas.

Tabla 27. Asignaciones de desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) de algunas señales de RMN <sup>1</sup>H de la subfracción F<sub>4.2.5.2.5</sub>

señal	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
A	multiplete ( <i>m</i> )	0,90	-CH <sub>3</sub>
B	multiplete ( <i>m</i> )	1.21	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C	singlete ( <i>s</i> )	1,51	-CH-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -
D	multiplete ( <i>m</i> )	1,82	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
E	multiplete ( <i>m</i> )	2,28	CH <sub>2</sub> -C
F	multiplete ( <i>m</i> )	3,05	-O-CH
G	singlete ( <i>s</i> )	3,40	-O-CH <sub>3</sub>
H	doblete ( <i>d</i> )	3,44	-O-CH <sub>3</sub>
I	multiplete ( <i>m</i> )	3,62	-O-CH <sub>3</sub>
J	multiplete ( <i>m</i> )	4,05	CH-OH
K	singlete ( <i>s</i> )	4,37	-CH <sub>2</sub> -
L	Triplete ( <i>t</i> )	4,50	-CH=C-H
M	multiplete ( <i>m</i> )	5,32	-CH=C-H
N	singlete ( <i>s</i> )	5,43	-CH=C-H
Ñ	doblete ( <i>d</i> )	5,53	-CH=C-H
O	singlete ( <i>s</i> )	5,67	-CH=C-H
P	singlete ( <i>s</i> )	5,79	-CH=C-H
Q	multiplete ( <i>m</i> )	5,99	-CH=C-H
R	Triplete ( <i>t</i> )	6,25	-CH=C-H

En el espectro RMN <sup>1</sup>H figura (64) de la subfracción F<sub>4.2.5.2.5</sub> se observaron 19 señales, entre las cuales a campo alto se destacaron señales ubicadas en la zona alifática del espectro. Una señal asignable a protones metílicos a  $\delta_H$  0,90 ppm (A), seguida por las

señales que aparecen en regiones a  $\delta_H$  (1,21 (B); 1,51 (C); 1,82 (D); y 2,28 (E)) ppm que integran para protones metilénicos, formando (multiplete, singulete, multiplete y multiplete) respectivamente. Con desplazamientos químicos de  $\delta_H$  (3,05 (F); 3,40 (H); 3,44 (I); 3,62(J)) ppm que integran para un protón metínico y tres para protones metílicos cercanos a un átomo de oxígeno. A campo bajo se exhibieron 8 señales con desplazamientos químicos de  $\delta_H$  (4,50 (L); 5,32 (M); 5,43 (N); 5,53 (Ñ); 5,67 (O); 5,79 (P); 5,99 (Q) y 6,25 (R)) ppm correspondientes para protones olefínicos debido a la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula.

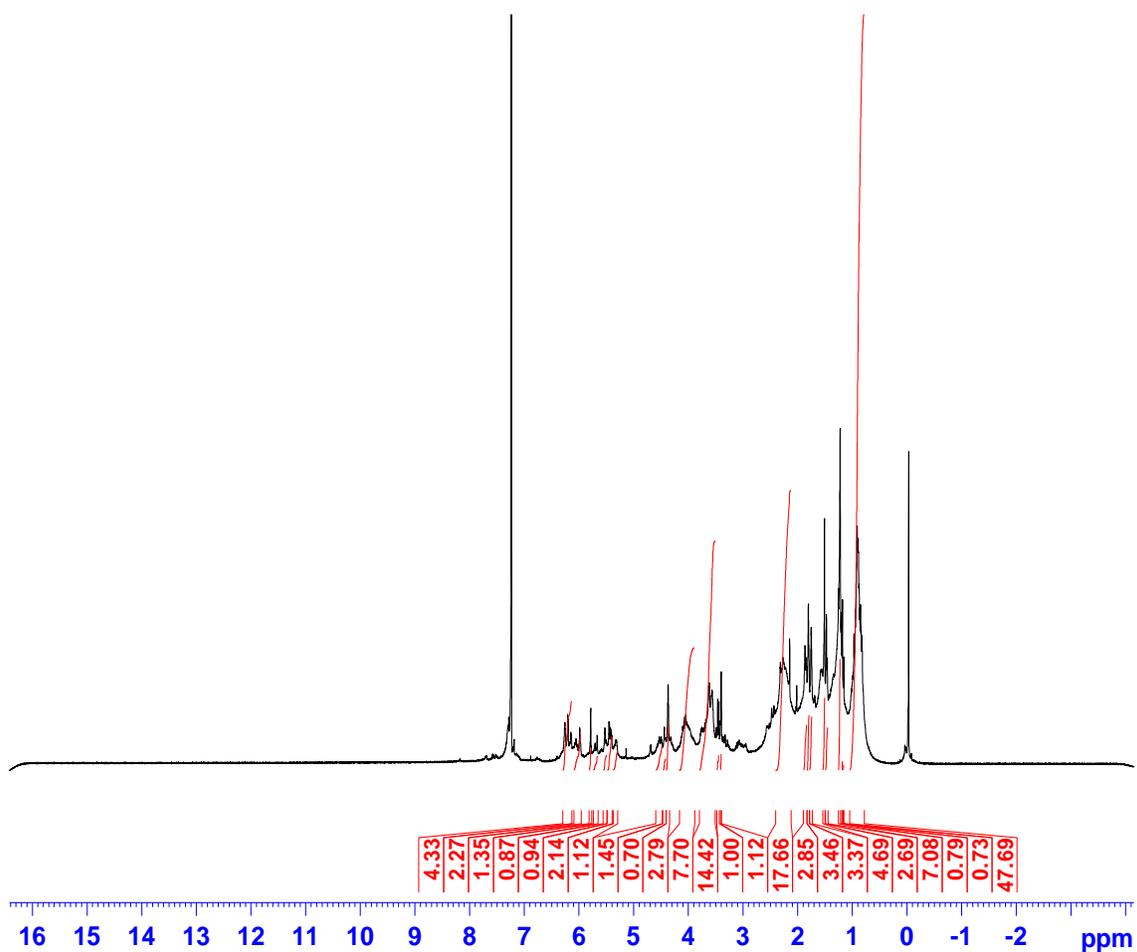


Figura 64. Espectro RMN  $^1H$  de la subfracción F<sub>4.2.5.2.5</sub>.

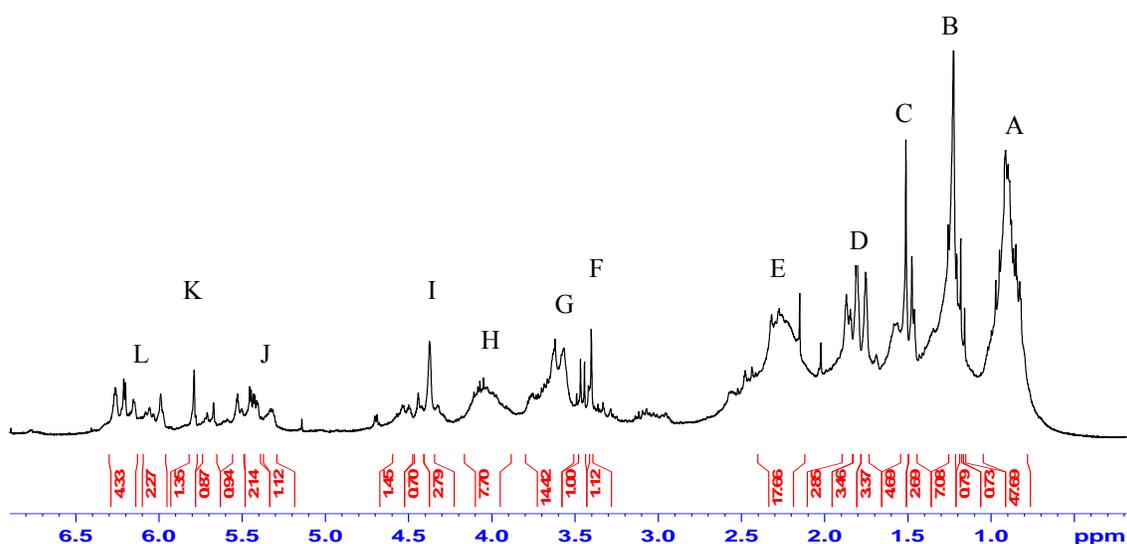


Figura 65. Ampliación del espectro RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $F_{4.2.5.2.5}$ .

Con estas señales reportadas por el análisis de RMN  $^1\text{H}$ , se procedió a complementar dicho análisis para la separación e identificación de los componentes presentes en esta subfracción, en vista que la relación de sus integrales no son similares y sus señales dan indicios que no se trata de un solo constituyente por lo que se decidió realizar un análisis de estos, mediante el uso de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), como se muestra en el cromatograma (figura 66).

Se evidenció la presencia de 4 constituyentes químicos, en los que se destacan el pentadecano, heptadecano, eicosano, éster mono (2-ethylhexil del ácido 1,2-Benzenodicarboxílico

Tabla 28. Compuestos identificados en la subfracción  $F_{4.2.5.2.5}$  por (CG-EM).

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Formula
Pentadecano	17,708	$\text{C}_{15}\text{H}_{32}$
Heptadecano	17,751	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}$
Eicosano	18,747	$\text{C}_{20}\text{H}_{42}$
éster mono(2-ethylhexil del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	22,841	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}$

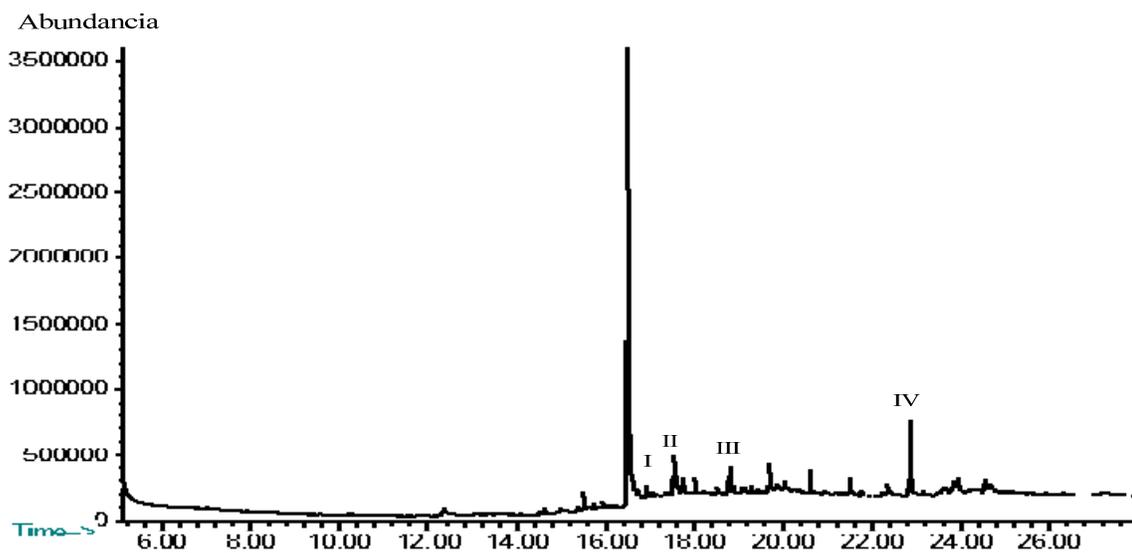


Figura 66. Cromatograma de gases de la subfracción F<sub>4.2.5.2.5</sub>.

El espectro de masas del pentadecano (I) (TR =17,708 min) (figura 67), desplegó un ión molecular a m/z 212 [M<sup>+</sup>] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 155, 127, 99, 85, 71,57, (pico base), 51. En la figura 68, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

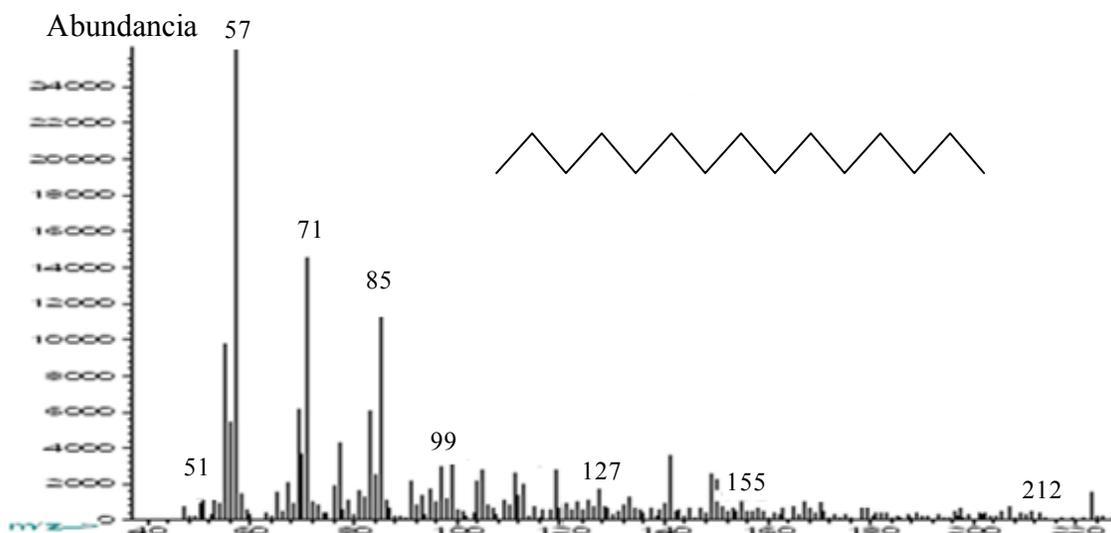


Figura 67 Espectro de masas del pentadecano.

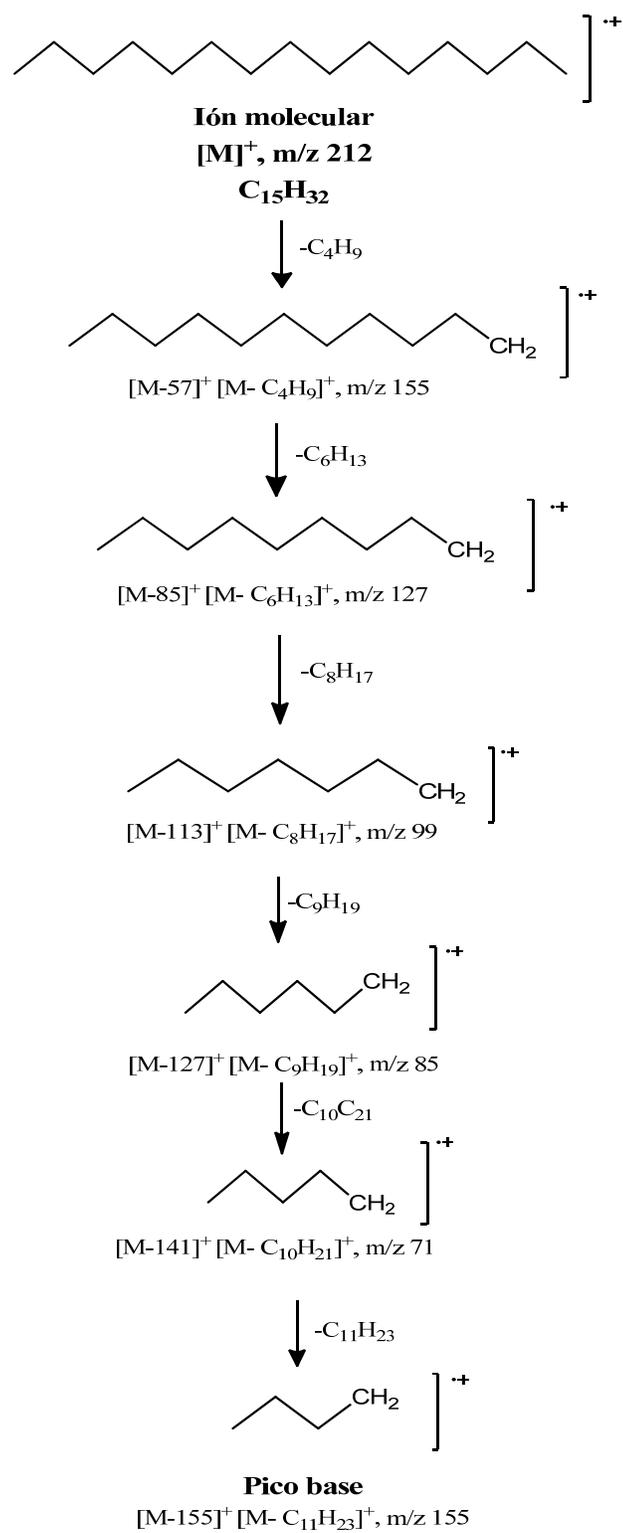


Figura 68. Patrón de fraccionamiento del pentadecano.

Para el heptadecano, el espectro de masas (II) (TR =17,751 min) (figura 69), mostró un ión molecular a  $m/z$  240 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  197, 141, 99, 85, 71,57, (pico base), 45. En la figura 70, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

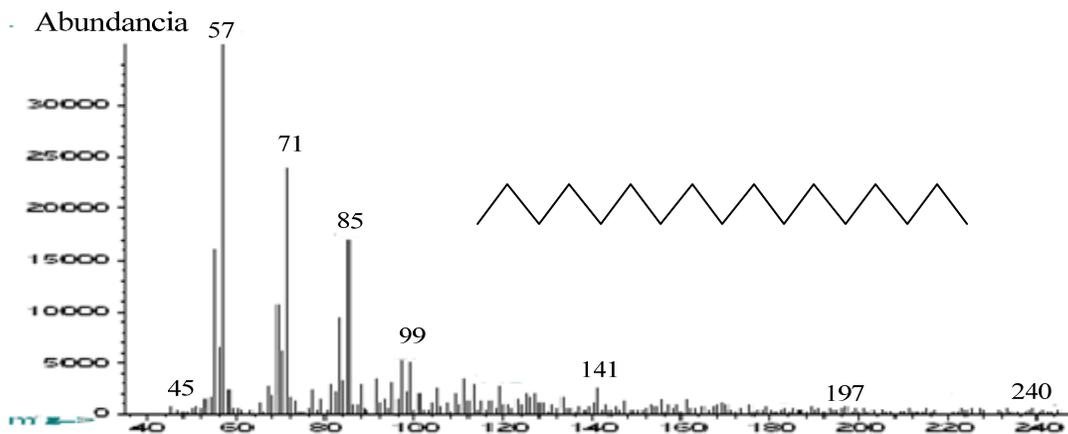


Figura 69. Espectro de masas del heptadecano.

Así como también para el eicosano, su espectro de masas (III) (TR =17,747 min) (figura 71), generó un ión molecular a  $m/z$  282 [ $M^+$ ] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  253, 239,183, 141, 127,71,57, (pico base), 45. En la figura 72, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

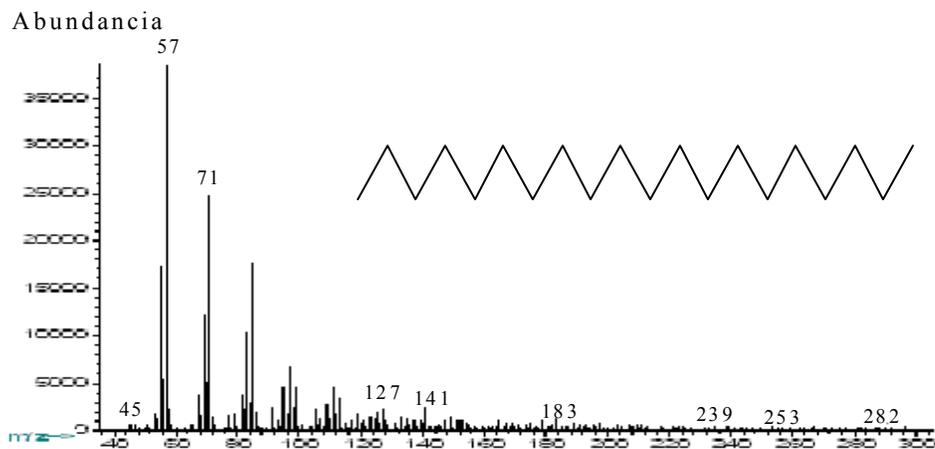


Figura 71. Espectro de masas del eicosano.

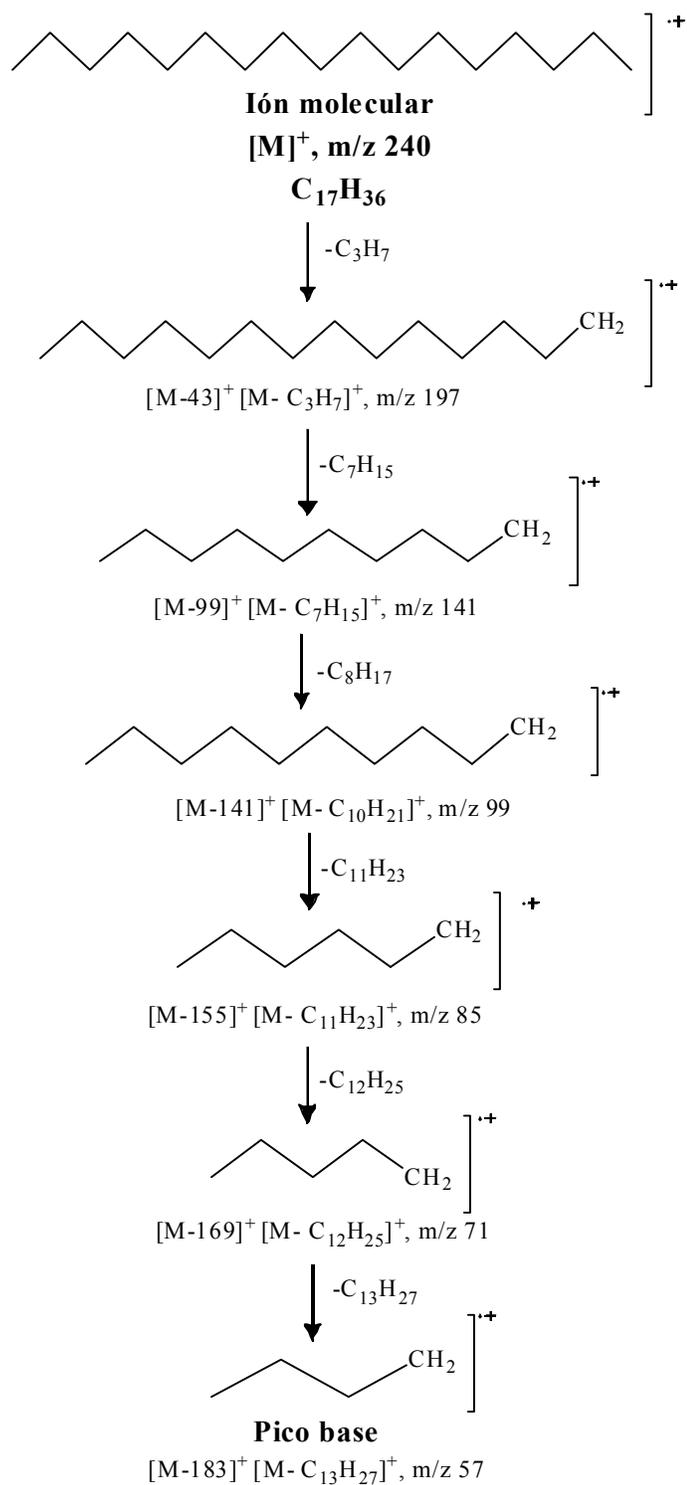


Figura 70. Patrón de fragmentación del heptadecano

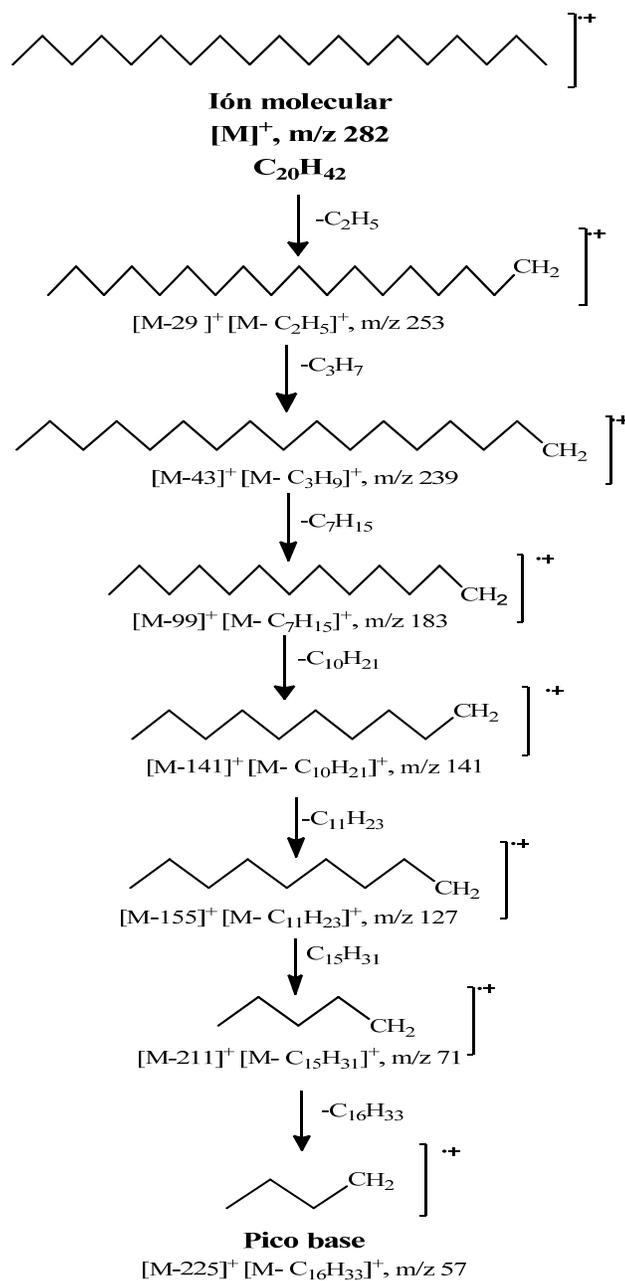


Figura 72. Patrón de fragmentación del eicosano.

El espectro de masas del éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1, 2-Benzenodicarboxílico (IV) (TR =22,841 min) (figura 73), desplegó un ión molecular a m/z 278 [M<sup>+</sup>] y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 207, 167,

149,57 (pico base), 53. En la figura 74, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto.

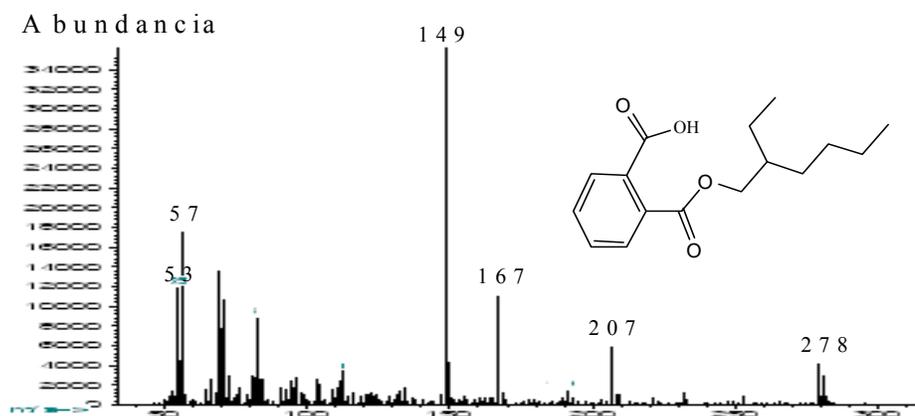


Figura 73. espectro de masas del éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1, 2-benzenodicarboxilico

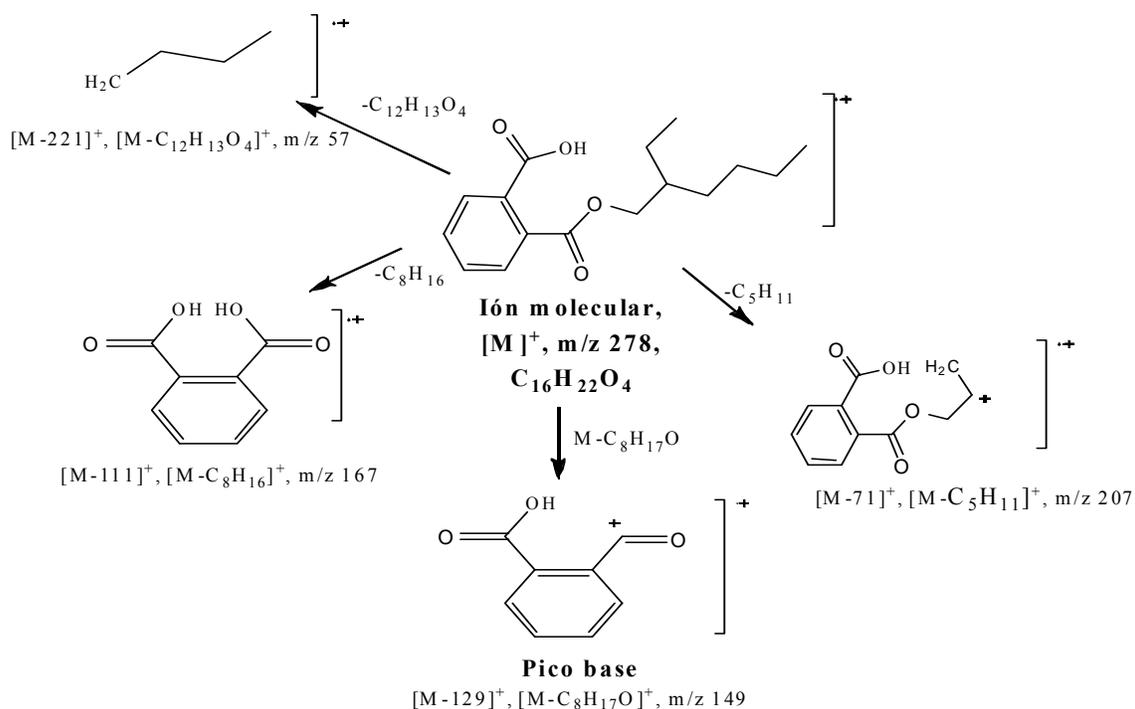


Figura 74. Patrón de fragmentación del éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1, 2-benzenodicarboxilico

## CONCLUSIÓN

El análisis químico preliminar realizado a las fracciones solubles en metanol y hexano de los órganos de la planta *Conocliniopsis prasiifolia*, evidenció la presencia de varias familias de metabolitos secundarios, como alcaloides flavonoides, esteroides, insaturados, antraquinonas saponinas y taninos.

Las fracciones solubles en metanol mostraron gran actividad antibacteriana frente a los microorganismos ensayados, presentando la hoja mayor actividad, en comparación con los demás extractos metanólicos de los demás órganos de la planta, tanto para bacterias Gram (+) como Gram (-).

Las fracciones de solubles en metanol y hexano no presentaron actividad antifúngica frente a las cepas de hongos ensayadas.

Las fracciones solubles en metanol de hojas fueron relevantes, el cual presentó una  $CL_{50}$  de 3,16 y el extracto de la raíz con 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo cual evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estas fracciones.

Mediante el análisis por RMN  $^1\text{H}$  y CG-EM de la subfracciones  $F_{4.2.3.1.5}$  y  $F_{4.2.5.2.2}$ , se lograron identificar algunos constituyentes como los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico y un triterpeno como friedelan 3-ona, siendo este el más abundante en estas subfracciones, a los cuales se les atribuye la actividad antibacteriana y a la letalidad.

El análisis de los datos obtenidos por RMN  $^1\text{H}$  y CG-EM de la subfracción  $F_{4.2.7.6}$ , evidenció la presencia de una mezcla de ésteres e hidrocarburos y una cetona, de los cuales se lograron identificar éster metílico del ácido dodecanoico, 6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona, éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico, nonadecano, éster metílico del ácido tridecanoico, docosano, hexacosano.

A través del análisis de los datos obtenidos por RMN  $H^1$  y  $^{13}C$  y DEPT-135 de la subfracción F<sub>4.2.5.2.4</sub>, así como la comparación de los mismos con los reportados en la literatura, se propone, una lactona sequitерpenica como el 9-hidroxi-atrípliciolide-8-*O*-tiglate o derivado de ésta, como posible estructura.

Mediante el estudio por RMN  $H^1$  y CG-EM de la subfracción F<sub>4.2.5.2.5</sub>, se lograron identificar algunos constituyentes: Pentadecano, heptadecano, eicosano, éster mono (2-ethylhexil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lock, O. 1994. *Investigación fitoquímica*. Segunda edición. Pontificia Universidad Católica del Perú.
2. Gros, E.; Pomilio, A.; Seldes, A. y Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografía N° 30. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y tecnológico. Washington, D.C-USA.
3. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Litopar. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
4. Luckner, M. 1984. *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals*. Springer-Verlag. Nueva York-USA.
5. Garateix, A.; García, T.; Salceda, E. y Soto, E. 2003. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. *Revista de Ecología, Oceanología, y Biodiversidad Tropical*, 1: 23-26.
6. De Lara, G. 1992. Toxic properties of some marine algae. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 43: 81-85.
7. Ikan, R. 1969. *Natural Products*. Academic Press. . Hebrew University, Jerusalem.
8. Villarreal, J.; Valdés, J y Villaseñor, J. 1996. Corología de las asteráceas de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*, 36: 29-42.
9. Kołodziej, B.2008. Effect of agrotechnical factors on the yield of golden rod (*Solidago virgaurea* L .ssp. *virgaurea*). *University of Life Sciences in Lublin*. 4: 920-950.
10. Devendra, M.; Shivani, J.; Ganga, B. y Sangeeta, P. 2010. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Solidago virgaurea* Linn. Root Essential Oil. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 1:187-189.
11. Martínez, A. 2005. *Flavonoides*. Universidad de Antioquia. Medellín.
12. Mabry, T.; Markhan, K. y Thomas, M. 1970. *Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-verlag. New York.
13. Martínez, S.; Gonzales, J.; Culebras, J. y Tuñon, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 18:529-532.

14. Averett, J.; Zardini, E. y Hoch, P. 1990. Flavonoid Systematics of ten Sections of *Ludwigia* (*Onagraceae*). *Biochemistry System Ecology*, 18: 529-532.
15. Judžentienė, A. y Būdienė, J. 2009. Analysis of the chemical composition of flower essential oils from *Arnica Montana* of Lithuanian origin. *Chemija*. 190–194.
16. Fernández, B. 2006. La homeopatía: Ciencia y Naturaleza. *Introducción a la mesoterapia*. Oviedo-España..
17. Muñoz, L. 2004. Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L. (Asteráceas). *Medicina Naturista*, 5:257-261.
18. Cañingeral, S.; Vila, R.; & Wichtl. 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. *Manual para farmacéuticos y médicos*. OEMF, Internacional Millán-Italia.
19. Ryan, K.J. y Ray, C.G. (editors) 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill.
20. Gershwin, M.E.; German, J.B. y Keen, C.L. 2000. Nutrition and immunology: Principles and practice. *Humana Press Inc.* USA. 110 p.
21. Silva, A.; Casals, G. y Casals, P. 2002. BIOENSAYO. URL: <http://www.multired.com/gosilagu/analisis%20estadistico.htm>.05/01/2010.
22. Carmona, O.; Gómez, M.; Montes, T.; Marcano, C. y Marino, F. 1997. *Microbiología Médica*. 5<sup>ta</sup> edición. McGraw Hill Interamericana. Caracas-Venezuela.1452 p.
23. Agudelo, D. y Arenas, F. 2003. *Identificación y estudio fitoquímico de las plantas medicinales en el área de influencia del Prodigio, San Luis, Antioquia*. Universidad Nacional de Medellín, Colombia.
24. Chawla, H. 2002. Introduction to Plant Biotechnology, 2<sup>nd</sup> ed. Science Publishers. Inc.
25. Mahady, G. 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 2405-291.
26. Brito, S.; Crescente, O.; Fernández, A.; Coronado, A. y Rodríguez, N. 2006. Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta Venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Biomédica*. 26: 180-187.
27. Henríquez, W.; Crescente, O.; Arrieché, D. y Marchan, E. 2002. Biological activities of a kaurenic acid isolated from *Wedelia trilobata*. 2:38.

28. De La Rúa, A. 1983. *El poder curativo de las hierbas*. Intermedio Editores S.A. Bogotá-Colombia.
29. Pomilio, A. 2002. Medicamentos y Etnomedicina: del uso popular a la industria farmacéutica. *Ciencia hoy*, 12 (68): 192-197.
30. Souza, A.R.M. y Souza A.A. 1993 *J. Ethnopharmacol.* 39: 53-67.
31. Matos, F.J.A. 1997. "Parte II: *Conjunto de vertebres descritos das plantas medicinais do formulario terapêutico*. ed. EUFC Fortaleza. 49-226 pp.
32. Cañingeral, S.; Vila, R.; & Wichtl. 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. *Manual para farmacéuticos y médicos*. OEMF, internacional Millán.
33. Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. y Robinson, H. 1980. *Phytochemistry* 19: 1547-9
34. Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. y Robinson, H. 1984. *Phytochemistry* 23: 1509-11.
35. Silva, M.; Oliveira, F.; Quintans, L.; Oliveira, T. y Diniz, M. 2005. Investigación do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 533-7.
36. Romero, A.; Martinez, C.; Crescente, O.; Acosta, M.; Curini, M.; Epifano, F.; Marcotullio, M.; Rosati, O.; Tubaro, A. y Sosa, S. 2002. *Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from Lourteigia ballotaefolia*. *Planta Med* 68: 843-845.
37. Domínguez, X. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México.
38. Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk. M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493-496.
39. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33 (3): 232-237.
40. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pennsylvania-USA.

41. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nicols, D. y McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45 (1): 31-34.
42. Ko<sup>3</sup>odziej, B. 2008. Effect of agrotechnical factors on the yield of goldenrod (*Solidago virgaurea* L .ssp. *virgaurea*). University of Life Sciences in Lublin. 4: 920-950.
43. Devendra, M.; Shivani, J.; Ganga, B. y Sangeeta, P. 2010. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Solidago virgaurea* Linn. Root Essential Oil. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 187-189.
44. Stainer, R.; Ingrahan, J. y Adelberg, E. 1984. *Microbiología*. Reverte. Barcelona, España.
45. Mora, J.; Newmark, F.; Santos, M. y Sánchez, J. 2008. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21 (3):174-179.
46. Fullas, F.; Hussain, R.; Chai, H. y Pezzuto, J. 1994. Cytotoxic and constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. 57(6): 801-807.
47. Pérez, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.*, 22 (1):34-43.
48. Pandalai, K.; Pilat, M.; Yamazaki, K. y Pienta, K. 1996. The effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on in vitro prostate cancer growth. *Anticancer Res.*, 16:815-820.
49. Yoo, Y.; Shin, B.; Hong, J.; Lee, J.; Chee, H.; Song, K. y Lee, K. 2007. Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitaris* larva. *Arch. Pharm. Res.*, 30: 361-365.
50. Mossi, A.; Mazutti, M.; Paroul, N.; Corazza, M.; Dariva, C.; Cansian, R. y Oliveira, V. 2009. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. *Braz. J. Biol.*, 69(2): 339-345.
51. Edid, M. 2010. "Fitoquímicos, los componentes químicos de las plantas" <<http://www.nutricionpersonalizada.wordpress.com/fitoquimicos/>> (13/10/2012).
52. Castellanos, L. y Duque, C. 2008. Composición química y actividad *antifouling* de la fracción lipídica de la esponja marina *Cliona tenuis* (Clionidae). *Rev. Colomb. Quím.*, 37 (3): 259-274.

## HOJA DE METADATOS

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

<b>Título</b>	AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FLAVONOIDES Y OTROS CONSTITUYENTES DE LA PLANTA <i>Conocliniopsis prasiifolia</i> (ASTERACEAE)
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
<b>Mónica Rosales</b>	<b>CVLAC</b>	<b>17.911.600</b>
	<b>e-mail</b>	<b>monicaros85@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

Flavonoides, *Conocliniopsis prasiifolia*, asteraceae.

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química

### Resumen (abstract):

La evaluación química preliminar y el estudio de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y letales de los extractos solubles en metanol y hexano de los órganos de la planta *Conocliniopsis prasiifolia*, recolectada en la localidad de San Juan, estado Sucre, evidenciaron la posible presencia de alcaloides, esteroides, triterpenos pentacíclicos, antraquinonas, polifenoles, metilcetonas, taninos y flavonoides con potencial actividad biológica. Entre estos extractos, los metanólicos mostraron mayor actividad antibacteriana contra de *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, siendo el extracto metanólico de hojas el que presentó los mayores halos de inhibición. Los extractos usados en la actividad antifúngica no presentaron actividad antimicótica. La actividad letal en *Artemia salina*, con mayor importancia la mostraron los extractos metanólicos de hojas y de raíz, con valores de  $CL_{50}$  de 3,16 y 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo cual evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estos extractos. Las subfracciones obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de hojas, provenientes de  $F_4$  mostraron actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *E.coli*, lo que evidenció la presencia de metabolitos con potencial actividad bactericida; lográndose caracterizar e identificar por RMN- $^1\text{H}$  y CG/EM, algunos constituyentes como, los ésteres metílicos y etílicos del ácido hexadecanoico, heptadecano, pentadecano, eicosano, nonadecano, éster metílico del ácido dodecanoico; 6, 10,14-trimetil-2-pentadecanona, éster bis (2-metilpropil) del ácido 1,2-benzenedicarboxílico, éster metílico del ácido tridecanoico, docosano y hexacosano de las subfracciones  $F_{4.2.3.1.6}$  y  $F_{4.2.5.2.2}$  se identificó un triterpeno pentacíclico friedelan-3-ona y de la subfracción  $F_{4.2.5.2.4}$  se identificó la posible presencia de una lactona sequiterpenica  $9\beta$ -hidroxi-atropliciolide-8-O-tiglate. Siendo este el primer reporte acerca del aislamiento de estos constituyentes en *Conocliniopsis prasiifolia*. Considerando los resultados obtenidos, se puede inferir que los metabolitos identificados en *Conocliniopsis prasiifolia* posiblemente son los causantes de la bioactividad observada.

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

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Dr. Oscar Crescente	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	8.439.342
	<b>e-mail</b>	goyomartinez@gmail.com
	<b>e-mail</b>	
Dra. Haydelba D'Armas	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	4.297.804
	<b>e-mail</b>	htrinidad86@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	
Dr. Ysabel Campos-Santaella	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	8.309.182
	<b>e-mail</b>	ysabelita63@yahoo.com
	<b>e-mail</b>	

Fecha de discusión y aprobación:

Año      Mes      Día

2013	01	23
------	----	----

Lenguaje: **SPA**

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

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_MMRC	Application/Word

### Alcance:

Espacial:      Nacional                      (Opcional)

Temporal:      Temporal                                  (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Química

### Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

### Área de Estudio:

Química

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

Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre

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

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_MMRC	Application/Word

### Alcance:

Espacial:      Nacional                      (Opcional)

Temporal:      Temporal                      (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Química

### Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

### Área de Estudio:

Química

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

Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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

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

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Firma]*  
**JUAN A. BOLAÑOS CUNDELO**  
Secretario



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

JABC/YGC/maruja

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

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Rosales', is written over a horizontal line.

MÓNICA ROSALES

AUTOR