



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

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE LA CULEBRA CIEGA (*Anguis fragilis*) Y SU POSIBLE  
BIOACTIVIDAD  
(Modalidad: Tesis de Grado)

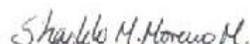
JUSMERLIN DEL VALLE NÚÑEZ MARCHAN

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

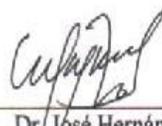
CUMANÁ, 2017

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS  
 SECUNDARIOS DE LA CULEBRA CIEGA (*Anguis fragilis*) Y SU POSIBLE  
 BIOACTIVIDAD

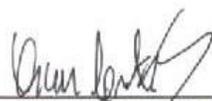
APROBADO POR:



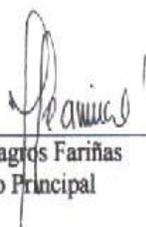
Dra. Shailili Moreno  
 Asesora



Dr. José Hernández  
 Co-asesor



Oscar Crescente Ph.D  
 Jurado Principal



Dra. Milagros Fariñas  
 Jurado Principal

## DEDICATORIA

*Este trabajo representa un ciclo importante en mi vida, el más importante hasta ahora, y no hubiese sido posible sin la ayuda de Dios. Él ha estado siempre conmigo, dándome la fortaleza, la confianza y la sabiduría para seguir adelante, a pesar de las adversidades.*

A:

*Mis padres Jesús Enrique Núñez y Minerva Marchan, por su constante apoyo, y por darme siempre esas palabras de aliento cuando veía que no era posible, ellos son la fuente de motivación para terminar este trabajo.*

*Mis hermanos Ronmel Núñez, Miller Núñez, Lady Núñez, Minerlin Núñez y Jesús Núñez, quienes son mis segundos padres y pilares importantes, en mi vida y formación.*

*Mi amor, amigo y compañero Eduardo Flores, por estar siempre a mi lado durante todo este tiempo brindándome su apoyo y dándome siempre esas palabras de aliento cuando más las necesitaba. A ti que le devolviste la luz a mi vida y fuiste testigo de mis triunfos y mis derrotas, gracias por confiar en mí.*

*Mis amigas por ser un pilar importante y levantar mis ánimos cuando estaba decaída, Alejandra Álvarez, María Mata, Jenireth Flores y Cleomarys Ortiz.*

*Mis sobrinos, Ronmel Núñez, Johann Rosales, Milyer Núñez y Romina Núñez, esperando ser una luz en su camino y servirles de inspiración como mi madre lo es para mí.*

*Todos mis compañeros con los cuales compartí dentro y fuera de la universidad Mariangeles Senior, Adargelis Andrade, Rosibel Bermúdez, Greiciskellys Rincones, Adriana Otero, Marlis Henríquez, María Veliz, Daniela Antón, Verónica Coronado, Rosmaira Martínez, Domingo Figueroa, Simón Rengel, Oswaldo Rodríguez, y Danika Sisco, por brindarme su mano solidaria, y siempre estar conmigo en pie de lucha.*

*Especialmente a mi persona, Jusmerlin Núñez, por ser ejemplo de perseverancia y constancia. Y a todas esas personas que de manera directa e indirecta contribuyeron a que alcanzara esta gran meta.*

## AGRADECIMIENTOS

Muchas personas han colaborado en la realización de esta investigación y para mí ha sido un verdadero placer que lo hicieran. Expreso mi eterno y sincero agradecimiento a:

La Dra. Shailili Moreno por su asesoría y valioso tiempo dedicado durante la realización de este trabajo, así como su confianza depositada en mí. Sin usted esto no hubiese sido posible.

El Dr. José Vicente Hernández mi coasesor, encargado del Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento perteneciente a la Universidad Simón Bolívar (USB), por su valiosa ayuda en la realización de los CG-EM necesarios para la culminación de esta investigación.

La Dra. Milagros Fariñas por el espacio y materiales facilitados para la realización de las pruebas de actividad antibacteriana y antifúngica, efectuadas en el Laboratorio de Bioactivos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV).

Todos los profesores que contribuyeron a mi formación profesional y a los técnicos que gustosamente me brindaron su amistad y colaboración, en especial a Moraima Carrillo, a los Prof. Roger Vásquez y Gabriel Ordaz.

Ligia Llovera, *M. Sc.* por la realización de los espectros de RMN en el Lab. de RMN perteneciente al IVIC.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS, DIOS LES PREMIE DE BENDICIONES.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN .....	IX
INTRODUCCIÓN .....	X
METODOLOGÍA .....	19
1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	19
2. LIMPIEZA Y SECADO DE LA MUESTRA.....	19
3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS .....	20
4. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES .....	20
4.1. Alcaloides.....	20
4.2. Cumarinas .....	21
4.3. Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos .....	21
4.4. Fenilpropanoides .....	21
4.5. Flavonoides .....	21
4.6. Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos.....	22
4.7. Metilencetonas .....	22
4.8. Polifenoles.....	22
4.9. Saponinas .....	22
4.10. Taninos.....	23
4.11. Antraquinonas .....	23
5. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS .....	23
5.1 Cromatografía de columna (CC) con elución de gradiente .....	23
5.2. Cromatografía de capa fina (CCF) .....	23
5.3. Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP).....	24
6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	24
6.1. Espectroscopia infrarroja (IR).....	25
6.2. Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C.....	25
6.3. Cromatografía de gases- Espectrometría de masas (CG-EM) .....	25
7. EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD .....	26
7.1. Actividad letal frente a <i>Artemia salina</i> .....	26
7.2 Actividad antifúngica.....	27
7.4 Actividad antibacteriana .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30

1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS .....	30
2. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES .....	32
3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	34
3.1. Actividad letal frente a <i>Artemia salina</i> .....	35
3.2. Actividad antifúngica.....	35
3.3. Actividad antibacteriana .....	36
4. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO.....	38
4.1. Cromatografía de columna del extracto etanólico de <i>A. fragilis</i> .....	38
4. 2. Análisis del extracto etanólico (EE) .....	41
4.3. Análisis de la fracción C proveniente del EE.....	51
4. 4. Cromatografía de la fracción C del EE .....	53
4. 5. Cromatografía de la subfracción C <sub>1</sub> .....	54
4. 6. Cromatografía de la subfracción C <sub>2</sub> .....	60
5. ANÁLISIS DEL EXTRACTO EN ÉTER DE PETRÓLEO .....	65
5.1. Espectro de infrarrojo (IR).....	66
CONCLUSIONES .....	68
RECOMENDACIONES .....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
HOJAS DE METADATOS .....	33

## LISTA DE TABLAS

1. Masa y rendimiento en la obtención de los extractos de <i>A. fragilis</i>	23
2. Familias de metabolitos secundarios identificados en los extractos EE y EEP de <i>A. fragilis</i>	24
3. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm) de la fracción C del EE de <i>A. fragilis</i>	29
4. Fracciones obtenidas en el fraccionamiento cromatográfico del EE de <i>A. fragilis</i>	30
5. Compuestos identificados mediante CG-EM en el EE	35
6. Fracciones obtenidas en el subfraccionamiento cromatográfico de la fracción C proveniente del EE	45
7. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C <sub>1</sub> del EE	46
8. Principales desplazamientos químicos (ppm) de los diferentes protones de la subfracción C <sub>1-3</sub> y los reportados para el ciclopentanoperhidrofenantreno	49
9. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C <sub>2</sub> del EE	52
10. Principales desplazamientos químicos (ppm) de los diferentes protones de la subfracción C <sub>2-3</sub> y los reportados para el ciclopentanoperhidrofenantreno	55

## LISTA DE FIGURAS

1. Estructura de algunos metabolitos secundarios	3
2. Precursores esteroidales	4
3. Estructura de la exenatida	5
4. Estructura del captopril	6
5. Cromatina e interacción con el ADN	7
6. Estructura general de las mambalginas	8
7. Culebra ciega o morrona ( <i>Anguis fragilis</i> )	8
8. Estructuras de $\beta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina y astaxantina	9
9. Ubicación geográfica del sitio de recolección	11
10. Esquema del bioensayo de actividad letal frente a <i>A. salina</i>	19
11. Esquema del bioensayo de actividad antifúngica	20
12. Esquema del bioensayo de actividad antibacteriana	21
13. Esquema de separación y análisis de los constituyentes del EE	32
14. Espectro de infrarrojo del EE	34
15. Cromatograma de iones totales del EE	35
16. Espectro de masas teórico del hexadecanoato de etilo	36
17. Espectro de masas obtenido del EE ( $T_r = 21,288$ min)	36
18. Patrón de fragmentación del hexadecanoato de etilo	37
19. Espectro de masas teórico del ácido linoleico	38
20. Espectro de masas obtenido del EE ( $T_r = 23,443$ min)	39
21. Patrón de fragmentación del ácido linoleico	39
22. Espectro de masas teórico del colesterol	41
23. Espectro de masas obtenido del EE ( $T_r = 33,461$ min)	41
24. Patrón de fragmentación del colesterol	42
25. Espectro de infrarrojo de la fracción C del EE	44
26. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\text{C}_{1-3}$	47
27. Ampliación de RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\text{C}_{1-3}$ desde 4,0 a 1,0 ppm	48
28. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT-135 ° de la subfracción $\text{C}_{1-3}$	50
29. Posible base esteroideal de la subfracción $\text{C}_{1-3}$	51
30. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\text{C}_{2-3}$	53
31. Ampliación de RMN $^1\text{H}$ de la subfracción $\text{C}_{2-3}$ desde 4,0 a 1,0 ppm	54
32. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT-135 ° de la subfracción $\text{C}_{2-3}$	56
33. Espectro de infrarrojo del EEP	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Cromatografía de Columna
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CCFA	Cromatografía de Capa Fina Analítica
CCFP	Cromatografía de Capa Fina Preparativa
IR-TF	Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
DEPT	Siglas en inglés de <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
UV	Ultravioleta
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etilo
AB	Actividad antibacteriana
AF	Actividad antifúngica
R <sub>f</sub>	Relación entre desplazamiento de soluto y solvente
T <sub>r</sub>	Tiempo de retención
EE	Extracto etanólico
EEP	Extracto en éter de petróleo
NIST	Siglas en inglés de <i>National Institute of Standards and Technology</i>
IOV	Instituto Oceanográfico de Venezuela
USB	Universidad Simón Bolívar
APD	Agar Papa Dextrosa

## RESUMEN

Un ejemplar de *A. fragilis* de 98,2 g fue recolectado en El Tigrito, sector Barrio Sur, municipio San José de Guanipa, estado Anzoátegui. Este ejemplar se extrajo, durante 3 semanas hasta agotamiento con etanol y luego con éter de petróleo. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida obteniendo 3,65 g de extracto etanólico (EE) y 0,03 g de extracto en éter de petróleo (EEP), con un rendimiento en masa de 3,72% y 0,03%, respectivamente. A cada extracto se le realizó un análisis por IR-TF, ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica, y letalidad contra crustáceos de *Artemia salina*; además, se realizaron pruebas químicas preliminares, donde se detectó la posible presencia de cumarinas, alcaloides, taninos, y glicósidos cardiotónicos para el EE; adicionalmente, en el EEP fue detectado la posible presencia de taninos, cumarinas, flavonoides, y alcaloides. En ambos extractos, se confirmaron por IR-TF los grupos funcionales, asignables a las familias de compuestos identificados previamente. El EE (el de mayor masa) fue fraccionado mediante columna cromatográfica, obteniendo 10 fracciones (A-J). Ninguno de los extractos, ni las fracciones del EE, mostraron actividad letal frente a *A. salina*. Para las pruebas antibacterianas se emplearon las cepas *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* y *Bacillus subtilis*, ninguna de ellas mostró sensibilidad ante los dos extractos. Con respecto a las fracciones, sólo la fracción C mostró actividad contra la mayoría de las bacterias ensayadas, con halos de inhibición entre 12 mm y 14 mm. En la evaluación de actividad antifúngica (*Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*) tampoco se evidenció sensibilidad de los organismos, frente a los extractos ni a las fracciones. A la fracción C se le realizó el análisis de IR-TF, observando que conserva los mismos grupos funcionales presentes en el extracto de origen. El EE se analizó mediante CG-EM y se identificaron el hexadecanoato de etilo, el ácido linoleico, el octadecanoato de etilo, y el colestano-5-en-3-ol. Además, se logró realizar la caracterización parcial de dos compuestos esteroideos, los cuales presentan una base estructural de ciclopentanoperhidrofenantreno.

## INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos de estructura relativamente compleja, que se caracterizan por no intervenir en el crecimiento del organismo que los produce. En estado natural sus funciones se hallan ordenadas a la supervivencia de la especie, pero cuando los organismos que los producen se desarrollan en cultivo puro no desempeñan esa misión. Generalmente, se producen como una mezcla de sustancias muy relacionadas químicamente entre sí (10).

Estos metabolitos, considerando únicamente los compuestos de mayor importancia, se pueden dividir, de acuerdo a sus atributos, en cuatro grandes grupos: compuestos terpénicos, compuestos fenólicos, glicósidos y compuestos con nitrógeno (11). Ejemplos de ellos se muestran en la figura 1.

En el primer grupo (terpénicos) se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales; que constituyen el grupo de metabolitos secundarios más numeroso, con 40 000 moléculas diferentes, suelen ser insolubles en agua y derivan de la unidad de isopreno, agrupando también a los esteroides y terpenos que tienen masa molar, considerablemente, elevada, como los sesquiterpenos y diterpenos.

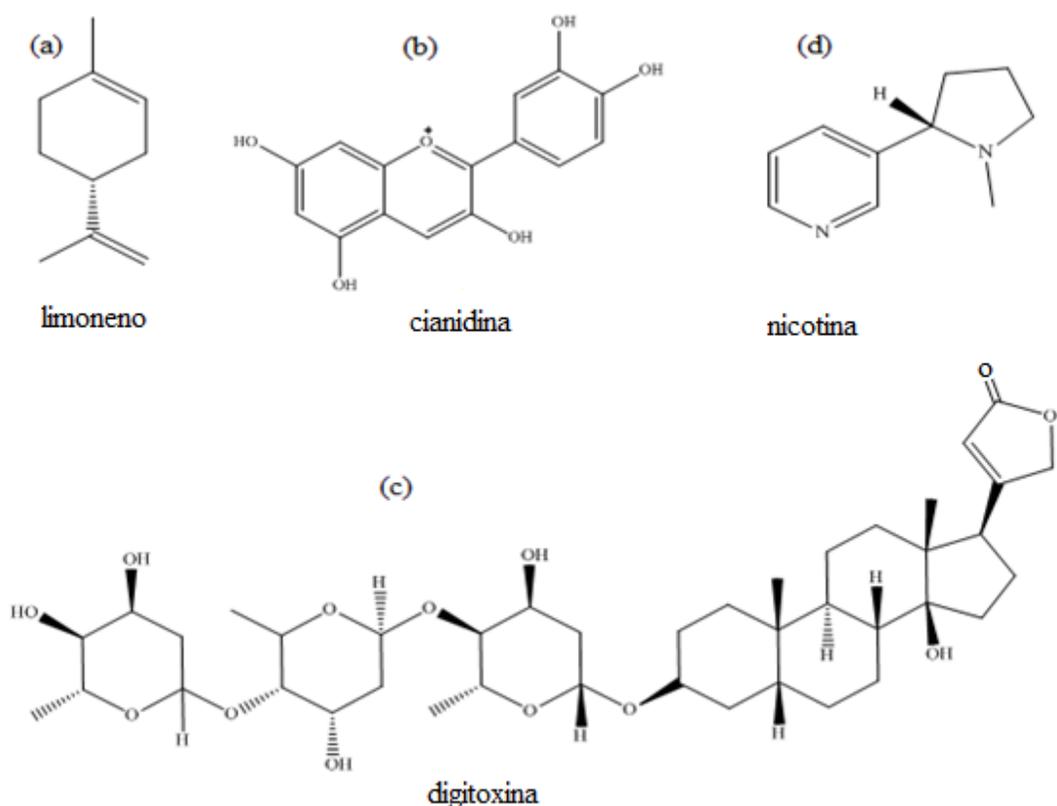


Figura 1. Estructura de algunos metabolitos secundarios (a: terpeno, b: compuesto fenólico, c: glicósido y d: compuesto nitrogenado).

Los esteroides se derivan biogénicamente de la acetilCoA, ruta del acetato, vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol (figura 2a), mientras que los animales tienen al lanosterol (figura 2b). Todos ellos, se caracterizan por presentar un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 2c), y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (11, 12).

La mayoría de los esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el carbono 5. De una forma análoga se originan los triterpenoides. En la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones C-C, metilaciones (vía s-adenosilmetionina), hidroxilaciones, entre otras (12).

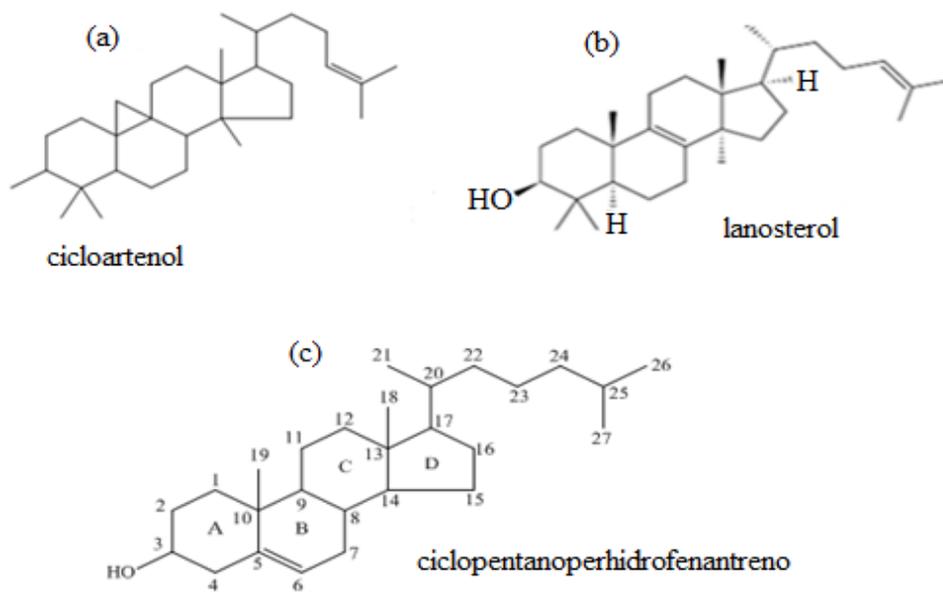


Figura 2. Precursores esteroidales (a: cicloartenol y b: lanosterol) y núcleo básico de esteroides (c: ciclopentanoperhidrofenantreno).

En otro orden de ideas, la necesidad de las comunidades rurales de acudir a cuanto medio tengan a su alcance, para enfrentarse con éxito a la enfermedad y al dolor, le ha hecho recurrir al uso de los reptiles (13). Estos son animales vertebrados de piel seca, queratinizada y gruesa. Por lo general, cubierta de escamas protectoras, como estrategia evolutiva para evitar su desecación, y la piel es mudada periódicamente. Algunos son netamente terrestres y otros pueden ser acuáticos. Presentan cuatro patas, aunque las serpientes y algunos lagartos carecen de ellas. Su respiración es únicamente vía pulmonar. Existen alrededor de 9 547 especies de reptiles en el mundo que se clasifican en cuatro órdenes: cocodrilos (*Crocodylia*), lagartijas y serpientes (*Squamata*), tortugas (*Testudines*) y tuátaras (*Sphenodontia*) (14).

En este sentido, muchas sustancias farmacológicas han sido aisladas de reptiles. En Estados Unidos, por ejemplo, el lagarto o monstruo de Gila (*Heloderma suspentum*) es un reptil que se alimenta con muy poca frecuencia (entre 5 y 10 veces al año, en su habilidad natural) y entre dos comidas sucesivas tiene la capacidad de ralentizar su

metabolismo y desactivar su páncreas. Cuando llega el momento de alimentarse de nuevo, segrega en su saliva la hormona exendina 4, que reactiva el páncreas y estimula la secreción de insulina. En el 2005 se aprobó el uso de la exenatida (figura 3) (nombre que recibió la exendina 4 de origen sintético) para el tratamiento de la diabetes tipo II, esta hormona se administra dos veces al día por vía subcutánea, generalmente, por inyección abdominal (15, 16).

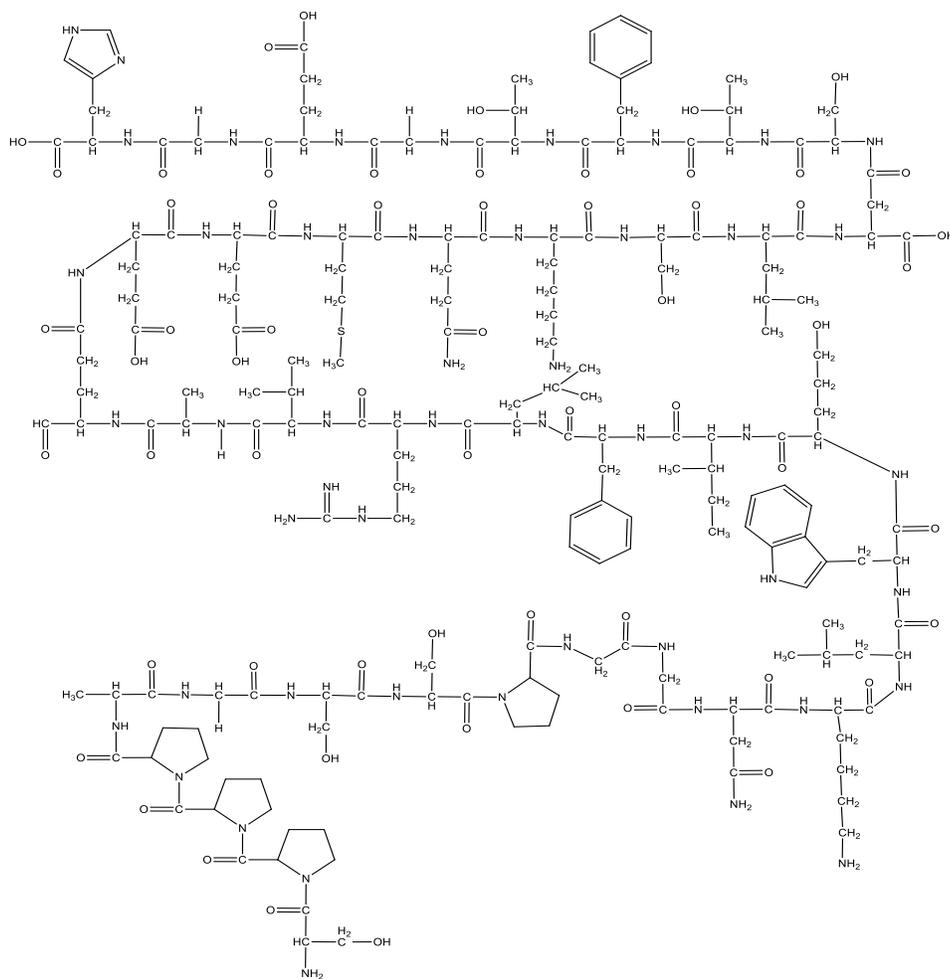


Figura 3. Estructura de la exenatida.

Además de los efectos de la exenatida en los niveles de glucosa en la sangre, esta tiene la ventaja de producir una significativa pérdida de peso, lo cual es muy beneficioso en la mayoría de los pacientes que padecen de diabetes tipo II, y se debe a que retrasa el

vaciamiento gástrico e induce una sensación de saciedad (16).

Análogamente, en Argentina las serpientes se utilizaban para aliviar la otitis, además que su veneno se emplea en la medicina tradicional para fabricar antídotos, brebajes y pociones que, aplicados en las cantidades adecuadas, neutralizan la acción mortal de los venenos y fortalecen el sistema inmunológico humano (13). Una prueba de ello es el captopril, nombre comercial del fármaco, cuya estructura se aprecia en la figura 4. Se trata de un componente aislado de veneno de serpiente, que inhibe la enzima que convierte la molécula Angiotensina I en II, la cual incrementa la acción vasoconstrictora. Por eso, se usa para tratar la hipertensión arterial. Su hallazgo se produjo tras la observación de que la mordedura de la serpiente jararaca (*Bothrops*) producía un súbito descenso de la tensión sanguínea. Esto condujo al aislamiento de péptidos hipotensivos, un tipo de moléculas cuya estructura llevó en 1950 al desarrollo del medicamento (17).

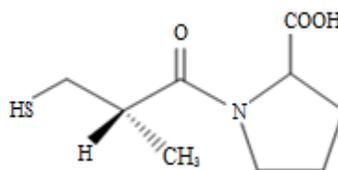
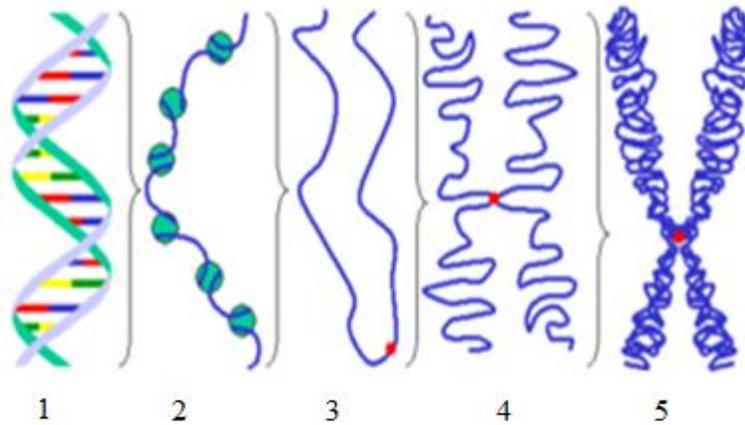


Figura 4. Estructura del captopril.

De igual forma, una sustancia extraída del veneno de cascabel (*Crotalus durissus*), según experimentos realizados por investigadores brasileños, por ahora en ratones de laboratorio, puede aumentar la expectativa de vida de pacientes con cáncer en la piel. Se trata de la cromatina (figura 5), la cual es una proteína aislada del veneno de esta serpiente sudamericana, y aumentó en hasta un 70% la supervivencia de ratones con cáncer en la piel (melanoma); información suministrada por el Instituto Butantan, del Centro Público Brasileño de Estudios Médicos responsable del descubrimiento. De acuerdo con los investigadores de este Instituto, vinculado a la Secretaría de Salud del estado brasileño de Sao Paulo, la proteína también ayudó a retardar, significativamente, el desarrollo del tumor e incluso a inhibir su formación por completo. Los responsables del estudio inédito descubrieron que la proteína es capaz de inducir la muerte de las

células, pero que su acción tóxica es exclusiva sobre las células del melanoma, es decir, no afecta a otras células del organismo (18).



- (1) Hebra simple de ADN.
- (2) Hebra de cromatina (ADN con histonas, “cuenta de collar”).
- (3) Cromatina durante la interfase con centromero.
- (4) Cromatina condensada durante la profase (dos copias de ADN están presentes).
- (5) Cromosoma durante la metafase.

Figura 5. Cromatina e interacción con el ADN.

Del mismo modo, componentes del veneno de una de las serpientes más venenosas del mundo, la “mamba negra africana” (*Dendroaspis polylepis*), han sido aislados y bautizados como “mambalginas” (figura 6) con efectos similares al de los más fuertes opiáceos, pero sin los efectos secundarios más preocupantes en los analgésicos de mayor potencia, como las dificultades respiratorias. Su estructura ha sido obtenida de forma aproximada, usando analogías con estructuras conocidas (19).

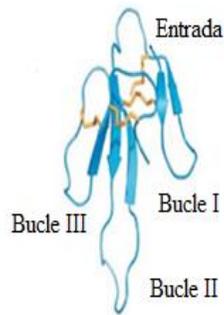


Figura 6. Estructura general de las mambalginas, pertenecientes a la familia de las toxinas de tres bucles, como muestra la reconstrucción tridimensional.

A nivel local, una especie común en el oriente venezolano es la culebra ciega (*Anguis fragilis*) (figura 7), la cual es un reptil del orden de los escamosos (*Squamata*). En el género *Anguis* se reconocen dos especies, *Anguis fragilis* y *Anguis cephalonicus*; esta última tiene una distribución muy restringida y sus diferencias morfológicas con la primera son mínimas (20).



Figura 7. Culebra ciega o morrona (*Anguis fragilis*) (21).

De manera más específica, la especie *A. fragilis* es un saurio sin patas, su cabeza imita la cola, el cuello es apenas definido, de hocico romo y abertura timpánica pequeña. Tiene escamas lisas y brillantes en todo el cuerpo, su piel es rígida ya que bajo las escamas tiene osteodermos. El color es variable, desde gris u ocráceo a pardo con las partes inferiores más oscuras. En cuanto al macho, tiene la coloración más uniforme que las hembras; son pardo homogéneos y en los adultos aparecen a veces a los lados del cuerpo manchas azules. Sin embargo, las hembras tienen una gran banda dorsal ocrácea, en

ocasiones con una franja vertebral negra, los costados y el vientre de marrón oscuro o negro; y los juveniles son del mismo color que la hembra. Es ovípara y da a luz a crías bien formadas tras un periodo de gravidez de 75-90 días, unos 5-26 individuos que nacen envueltos en una membrana embrionaria. En Venezuela es conocida como culebra ciega o morrona, y se usa para aliviar los dolores de huesos en seres humanos. De hecho, existe una crema mentolada a base de ron de culebra ciega la cual sirve para tratar diferentes tipos de dolencias, como reúmas, fracturas de huesos, artritis, entre otras afecciones de la salud (21).

Una investigación previa demuestra que el contenido de carotenoides de la piel, los músculos, el hígado y el intestino de *Anguis fragilis*, determinados por cromatografía de columna y capa fina, incluyen metabolitos como  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y astaxantina (figura 8). Además, presenta un alto contenido de calcio, encontrándose evidencia de que esta especie, tanto adultos como embriones, pueden almacenar calcio en los sacos endolinfáticos del oído interno (22).

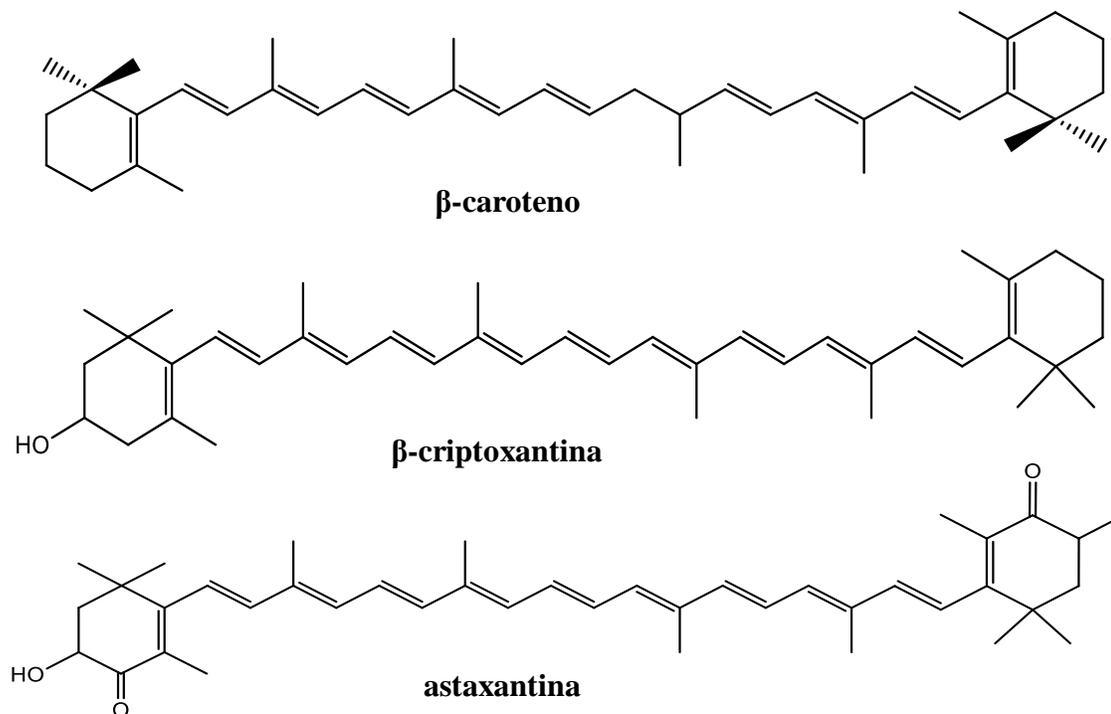


Figura 8. Estructuras de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y astaxantina.

En la actualidad, cabe destacar el gran esfuerzo que es realizado en el campo de los productos naturales de origen terrestre, ya que los ecosistemas terrestres comprenden una gran diversidad y riqueza biológica. Motivo por el cual, no resulta extraño que los metabolitos secundarios provenientes de éstos, representen una fuente de hallazgos de nuevos fármacos, de hecho algunos ya están en el mercado y otros en fases avanzadas de ensayo clínico.

Con base a lo antes expuesto, cobra importancia el estudio químico y la bioactividad de los compuestos de la especie *Anguis fragilis*, la cual ha sido poco investigada en Venezuela. Aunado a la disponibilidad de esta culebra en el oriente de nuestro país y al amplio uso que le da la población para combatir problemas óseos; se planteó como objetivo: Caracterizar metabolitos presentes en los extractos orgánicos del cuerpo completo de la culebra ciega *Anguis fragilis*, recolectada en El Tigrito, Barrio Sur, municipio San José de Guanipa, estado Anzoátegui, y evaluar la posible actividad biológica de los extractos orgánicos de esta especie.

## METODOLOGÍA

### 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Fueron recolectados 2 ejemplares de *A. fragilis* mediante técnicas manuales, debido a que se encuentra muy superficial. El muestreo fue realizado por trabajadores de campo en El Tigrito, sector Barrio Sur, Municipio San José de Guanipa, Estado Anzoátegui, con ubicación geográfica de 8° 53' 00" Latitud Norte y 64° 09' 00" Longitud Sur, (figura 9).



Figura 9. Ubicación geográfica del sitio de recolección.

Uno de los dos ejemplares muestreados fue llevado al Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, para su identificación. El espécimen fue identificado taxonómicamente por el prof. Óscar Chinchilla *M.Sc.* y, posteriormente, liberado en campo.

### 2. LIMPIEZA Y SECADO DE LA MUESTRA

De acuerdo con el conocimiento folclórico, de quienes popularmente preparan y expenden el “ron de culebra”, esta se sumerge limpia en alcohol. De allí que, el otro ejemplar de *A. fragilis* fue lavado con agua destilada dentro del envase en el que se

encontraba; el lavado se realizó 4 veces con agua destilada asegurándose que no quedaran restos de arena y organismos epífitos del mismo, que pudieran interferir a la hora de realizar el estudio. A medida que se limpió, éste fue secado con pinzas y algodón, hasta que el material quedara libre de humedad.

### **3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS**

Una vez secada toda la culebra se procedió a introducirla en un contenedor de vidrio previamente esterilizado y pesado, la culebra se pesó con el envase de vidrio, seguidamente se maceró con 1 litro de etanol durante 3 semanas, luego se filtró el solvente, inmediatamente se reextrajo el residuo de la culebra con otro litro de etanol durante 3 semanas más, para la completa extracción de los compuestos afines a este solvente, posteriormente se volvió a filtrar para unir los extractos. El extracto fue concentrado en un rotaevaporador marca Hildolph a 40°C, obteniendo 20 ml del extracto etanólico (EE). De la misma forma, se obtuvo el extracto en éter de petróleo (EEP), a partir del residuo de la culebra en etanol. Una vez concentrado el material se trasvasó a viales previamente rotulados y pesados. Finalmente, se determinó la masa de los extractos secos y fueron almacenados en un desecador para ser usados posteriormente.

### **4. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES**

La posible presencia de familias de metabolitos secundarios se evidenció empleando ensayos analíticos húmedos, para ello, se utilizaron reactivos certificados según la metodología descrita a continuación (23, 24).

#### **4.1. Alcaloides**

Una muestra de 5 mg del extracto seco se retomó con 1 ml de HCl (10%), luego fue reextraída con 1 ml de cloroformo, se separaron ambas fases. La fase acuosa se alcalinizó con 1 ml de NH<sub>4</sub>OH (10%) y se particionó con 1 ml de cloroformo nuevamente. Las tres fases fueron analizadas para alcaloides con el reactivo de Dragendorff (tetrayodobismutato de potasio). La aparición de un precipitado marrón-rojizo indica la presencia de alcaloides.

## **4.2. Cumarinas**

Se disolvieron 5 mg del extracto en 1 ml de etanol, se tapó con un papel de filtro impregnado con una solución diluida de NaOH (0,1 mol/l), seguidamente se llevó a un baño de agua a 100°C por algunos minutos. Posteriormente, se retiró el papel de filtro y se observó bajo la luz UV. La fluorescencia amarilla revela la presencia de cumarinas.

## **4.3. Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos**

Se hidrolizaron 5 mg del extracto con 1 ml de HCl al 10%, luego el hidrolizado se concentró y se extrajo con 1 ml de cloroformo. Seguidamente, la solución proveniente de la hidrólisis, se analizó para esteroles y triterpenos (reacción de Libermann-Burchard), una coloración azul o verdosa es indicativa de la presencia de esteroles. Mientras que una coloración roja o violeta, es considerada positiva para triterpenos.

## **4.4. Fenilpropanoides**

Se disolvieron 10 mg del extracto en 2 ml de etanol y se añadió 1 ml de la solución del extracto etanólico en tres tubos de ensayo. El primero sirvió como patrón de comparación, al segundo se le añadieron 2 ml de HCl (0,5 mol/l), 2 ml de la solución acuosa de nitrito de sodio al 10% (reactivo de Arnow) y 2 ml de NaOH (2 mol/l), en el tercer tubo, se agregaron todos los reactivos sin la muestra, sirvió como control. El reactivo de Arnow, en presencia de fenilpropanoides, presenta una coloración naranja y luego de la adición del NaOH cambia a un rosado púrpura, manifestando la presencia de fenilpropanoides.

## **4.5. Flavonoides**

A una muestra de 10 mg del extracto seco se le agregaron 0,5 g de virutas de Mg y HCl concentrado gota a gota, hasta que terminó el desprendimiento de hidrógeno y durante 10 min se observaron los cambios de color en la solución. La aparición de un color amarillo a rojo es indicativo de flavonas y flavonoles; rojo a magenta de flavanonoles; violeta y azul de flavanonas.

#### **4.6. Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos**

A 10 mg del extracto seco se le añadieron 3 gotas de cloroformo y se calentó entre 50°C a 70°C en un tubo de ensayo, los vapores fueron puestos en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se pueden identificar por la aparición de una mancha roja sobre el papel.

Los glicósidos cardiotónicos son detectados por una reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,5 mol/l). La presencia de los glicósidos cardiotónicos se detectó por la aparición de un color azul o violeta.

#### **4.7. Metilencetonas**

Se disolvieron 5 mg del extracto en 1 ml agua destilada, se filtró la solución y luego se trató con el reactivo de Baljet (mezcla 1:1 de 1 g de ácido pícrico en 25 ml de etanol y 2 g de NaOH en 25 ml de agua). Una coloración roja es indicativo de metilencetonas.

#### **4.8. Polifenoles**

Para la detección de polifenoles, el extracto se evaporó hasta sequedad, se retomó en 1 ml de agua destilada y se filtró. Seguidamente, el extracto filtrado se hizo reaccionar con 1 ml de una solución de  $\text{FeCl}_3$  al 1%, el cambio hacia una coloración parda indica la presencia de polifenoles.

#### **4.9. Saponinas**

Una muestra de 10 mg del extracto se trasvasó a un tubo de ensayo con 2 ml de agua destilada. Posteriormente, se agitó vigorosamente la muestra durante 30 s. La presencia de saponinas es positiva al formarse una espuma persistente durante 10 min, en una zona de 3 cm por encima de la superficie del líquido.

#### **4.10. Taninos**

En un tubo de ensayo, se colocaron 5 mg del extracto y 1 ml de solución de gelatina-sal (solución de gelatina al 1% en NaCl al 10%). La formación de un precipitado, es indicativo de la presencia de taninos.

#### **4.11. Antraquinonas**

Se llevó a sequedad una muestra de 5 mg del extracto y se extrajo con 1 ml de KOH (0,5 mol/l); posteriormente, se filtró, se acidificó con 1 ml de ácido acético, y después, la solución obtenida se agitó con 1 ml de benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizar con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.

### **5. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS**

El uso de diferentes técnicas de cromatografía permitió separar algunos de los compuestos químicos presentes en EE y EEP.

#### **5.1 Cromatografía de columna (CC) con elución de gradiente**

La separación de los principales constituyentes químicos de los extractos y fracciones se realizó mediante columnas cromatográficas empaquetadas, adecuadas a la cantidad obtenida de los extractos y fracciones en una proporción 1:30 o 1:50 (m/m) de acuerdo a los requerimientos de la muestra a separar. La técnica usada fue la de adsorción en fase normal a presión atmosférica, en donde se utilizó sílicagel de 35-70 mesh (extracto etanólico) o Sephadex LH-20 (fracción C) para rellenar la columna (fase estacionaria), la fase móvil se constituyó de las siguientes proporciones de solventes en polaridad creciente: diclorometano (100%), diclorometano-acetona (1:1), acetona (100%), acetona-acetato de etilo (1:1), acetato de etilo (100%), acetato de etilo-metanol (1:1), y metanol (100%).

#### **5.2. Cromatografía de capa fina (CCF)**

Este tipo de técnica se basa en el mismo principio de las cromatografías en columna, adsorción a presión atmosférica, la principal diferencia es que la fase estacionaria se

encuentra soportada en una superficie lisa, por lo cual se utilizaron placas de aluminio recubiertas de sílica; como fase móvil se utilizaron 20 ml del solvente o mezcla de solventes con el cual eluyeron las fracciones al momento de correr la columna cromatográfica de los extractos. Se tomaron en cuenta los  $R_f$  de los eluatos, los cuales se midieron, de acuerdo con su visibilidad bajo la luz ultravioleta y soluciones ácidas de molibdato de amonio (0,01 mol/l), y las fracciones que presentaron iguales  $R_f$  se combinaron.

### **5.3. Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)**

La CCFP es similar a la CCFA, con la diferencia de que el espesor de la sílica fue de 1 mm. Esta técnica fue empleada para aislar y purificar los diferentes constituyentes químicos de las fracciones y subfracciones separados en la CCFA. Para la separación de los componentes de las fracciones y subfracciones, se colocaron 100 mg de la muestra sobre la placa preparativa en forma de franja (en línea recta) a 1,0 cm de distancia del borde de la placa de vidrio. Luego de desarrollada la cromatografía, se observaron las bandas a través de la lámpara UV, dichas franjas observadas se marcaron con una espátula. Una vez localizadas, se raspó con cuidado la porción de sílica marcada con la ayuda de una espátula. Posteriormente, cada uno de los componentes separados se colocó en un erlenmeyer y se extrajo con 20 ml de diclorometano. La(s) sustancia(s) extraída(s) se filtraron varias veces, y el solvente fue evaporado hasta sequedad a temperatura ambiente dentro una campana de extracción, para obtener, finalmente, la muestra a caracterizar.

## **6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL**

Las estructuras de algunos de los metabolitos biosintetizados por la culebra ciega *A. fragilis*, se elucidaron mediante las técnicas convencionales de resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR-TF) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) (25-30).

### **6.1. Espectroscopia infrarroja (IR)**

Se utilizaron dos espectrofotómetros. Un espectrofotómetro de IR con transformada de Fourier (IR-TF) 16 PC, Perkin Elmer (IIBCA) y un espectrofotómetro de IR modelo Tensor 27, Bruker (USB). Los análisis se realizaron como muestra-KBr-aire con 24 barridos de solución de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon mezclando 5 mg del sólido con KBr anhídrido, triturando luego en un mortero de ágata de forma que se homogenizó la mezcla. Las pastillas se compactaron en una prensa a  $1,05 \times 10^9\text{ kg/m}^2$  de presión.

### **6.2. Espectroscopia de RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$**

Algunas de las subfracciones obtenidas se analizaron en un equipo de RMN BRUKER, modelo AVANCE 300 MHz para los análisis de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en el laboratorio de RMN perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). También, se realizaron análisis bidimensionales DEPT (por sus siglas en inglés "*Distortionless Enhancement Through Polarization Transfer*") específicamente DEPT-135 °. Las muestras se disolvieron en 0,5 ml de un solvente deuterado adecuado ( $\text{D}_2\text{O}$ ), luego fueron colocadas en un tubo de resonancia e introducido al equipo de RMN.

### **6.3. Cromatografía de gases- Espectrometría de masas (CG-EM)**

Una parte del extracto etanólico (1  $\mu\text{l}$ ) fue analizado a través de CG-EM. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento de la Universidad Simón Bolívar (USB). La muestra se analizó en un Cromatógrafo de Gases (CG, Agilent, modelo 7890A) acoplado a un Espectrómetro de Masas (EM, Agilent, modelo 5975C) de impacto electrónico (70 eV); operando en modo SCAN (rango de  $m/z$  30 a 500), y fuente de ionización a  $250^\circ\text{C}$ . La muestra se analizó en modo *splitless* con tiempo de apertura de válvula de 0,60 min y helio como gas de arrastre. Se utilizó una columna cromatográfica capilar con la siguiente fase estacionaria: 5% fenilmetilsilicona (Equity<sup>TM</sup> 5, supelco; 30 m x 0,18 mm d. i, 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase). El programa de temperatura para la fase estacionaria se estableció a partir del trabajo de Naka *et al.* (2006) y la presión del inyector se fijó para reproducir el tiempo. La identificación de los compuestos se realizó mediante la utilización de la base de datos NIST-2005.

## **7. EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD**

Se realizaron pruebas a los extractos y metabolitos aislados, la actividad letal frente al crustáceo *A. salina*, antibacteriana y antifúngica, con la finalidad de determinar la posible actividad farmacológica que pudieran presentar los metabolitos de la culebra ciega *A. fragilis* frente a diferentes organismos en estudio.

### **7.1. Actividad letal frente a *Artemia salina***

La letalidad de los extractos y fracciones fue evaluada empleando nauplios de *A. salina*. Este bioensayo posee la ventaja de ser un método, rápido, barato y sencillo en el cual se pueden utilizar pequeñas cantidades de la muestra; cabe destacar que, los defensores de los derechos animales no han cuestionado el uso de estos crustáceos en experimentos. Para la obtención de los nauplios del crustáceo, se colocaron los quistes en agua de mar bifiltrada en un envase de plástico con aireación continua y luz artificial durante 24 horas.

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto o fracción en una mezcla de 1 500 µl de agua de mar bifiltrada al 40% y 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de ésta solución, se realizaron soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/ml, mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada en tubos de ensayo que contenían 10 nauplios de *A. salina* (figura 10), eclosionados con 24 horas de anticipación. Para las diferentes soluciones preparadas y su respectivo control se realizaron tres réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo trascurridas 24 horas. En cada una de las soluciones preparadas, se contabilizó la cantidad de larvas muertas, con una lupa estereoscópica.

El análisis de la actividad letal de los extractos y fracciones, se realizó mediante el empleo de diversos métodos estadísticos (Binomial, Moving Average, Probit y Logit) diseñados para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (31).

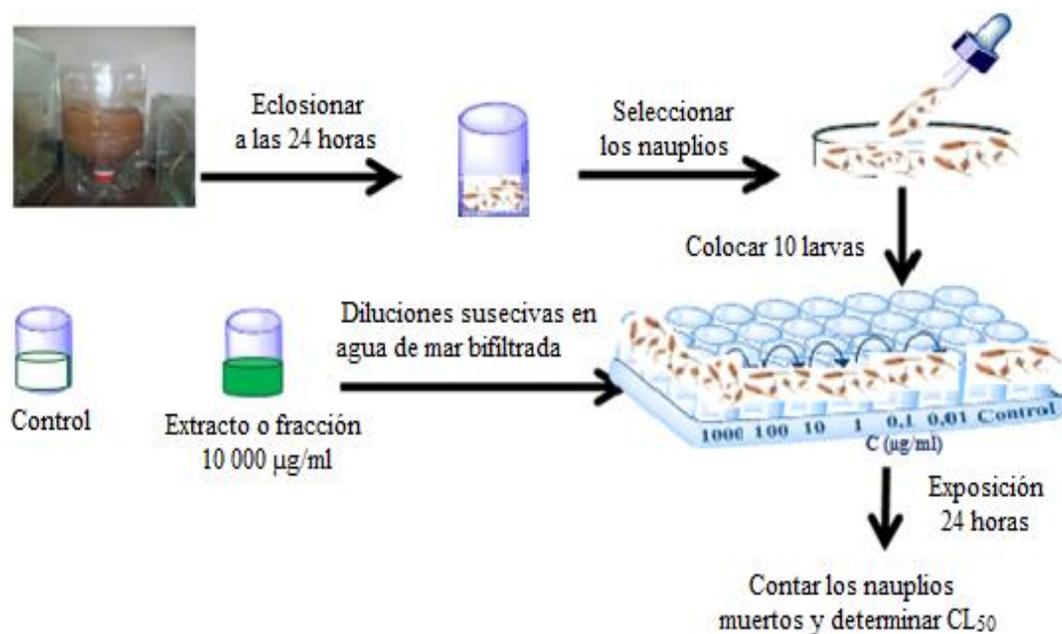


Figura 10. Esquema del bioensayo de actividad letal frente a *A. salina*.

## 7.2. Actividad antifúngica

Para la realización de esta prueba se incubaron las cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* mediante protocolos microbiológicos en tubos de ensayo, a temperatura ambiente por una semana. Transcurrido este tiempo se agregaron 10 ml de agua destilada estéril a los tubos para remover las esporas y se filtraron sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial. Utilizando aplicadores estériles, se colocó una alícuota de la solución obtenida (0,1 ml) sobre las cápsulas de Petri, previamente preparadas con agar papa dextrosa (APD). Seguidamente, se realizó la técnica de difusión en agar, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnado previamente con 25 µl del extracto o fracción de concentración 40 mg/ml y se incubaron por 48 horas bajo condiciones ambientales (temperatura, luz y humedad no controladas). La actividad antimicótica se detectó al medir el diámetro del halo de inhibición que se observó alrededor del disco (figura 11) (32).

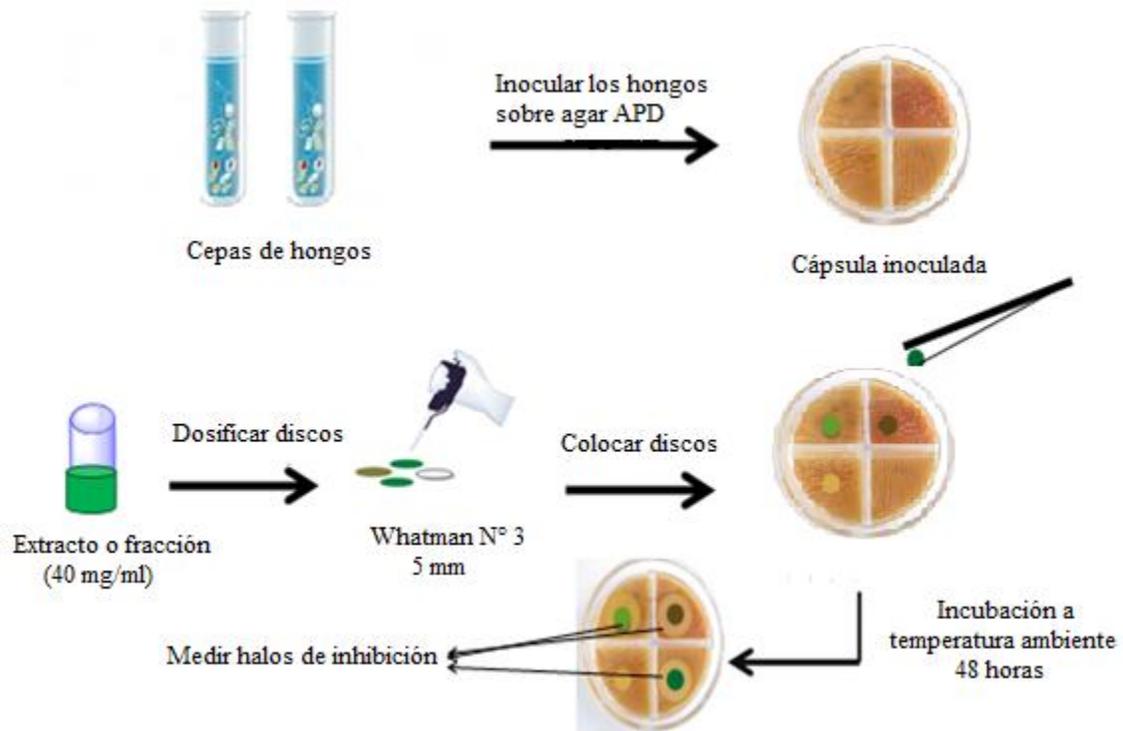


Figura 11. Esquema del bioensayo de actividad antifúngica.

### 7.3. Actividad antibacteriana

Para detectar la actividad antibacteriana se emplearon las siguientes cepas certificadas, perteneciente al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) existente en el laboratorio de Bioactivos Marinos del IOV, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* y *Bacillus subtilis*. En la realización de este bioensayo se utilizó la técnica de difusión en agar (figura 12), la cual consiste en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro con 25  $\mu$ l de una solución (preparada con 40 mg del extracto o fracción a probar en 1 ml de un solvente adecuado) y colocarlos en una placa previamente servida con agar Müller-Hinton e inoculado con una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^8$  células/ml). Posteriormente, las placas se preincubaron a 5°C por 12 horas y, luego, se incubaron a 37°C por 24 horas. La acción antibacteriana se midió tomando

el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnado(33).

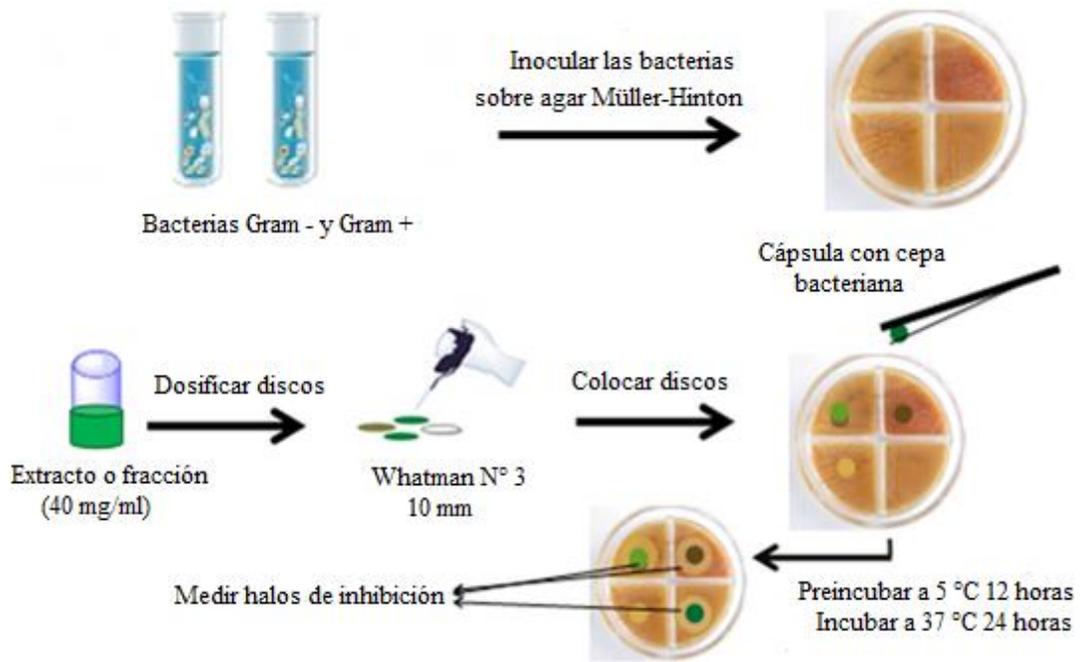


Figura 12. Esquema del bioensayo de actividad antibacteriana.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación química y la actividad biológica de los extractos y fracciones de la culebra ciega *A. fragilis* (Anguillidae), se realizó mediante aislamiento, identificación de metabolitos y bioensayos de actividad a través de pruebas antibacterianas, antifúngicas y letalidad frente a *A. salina*. Los resultados se muestran a continuación.

### 1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos en los solventes usados presentaron una textura aceitosa, pero mostraron colores diferentes, destacándose el extracto etanólico (EE) que presentó una coloración amarilla intensa, y el extracto en éter de petróleo (EEP) de color amarillo pálido. De acuerdo a la coloración de los extractos, estos presentan grupos funcionales con capacidad cromatófora, capaces de absorber energía en la región de UV-visible, estos grupos funcionales pueden ser dobles enlaces aislados, dobles enlaces conjugados, átomos con pares de electrones libres, entre otros, que hacen posible visualizar estos colores en los extractos (34). Cabe resaltar que, el EE presentó una coloración más intensa la cual puede ser atribuida a la presencia de carotenoides en la piel de la culebra, ya que este grupo de compuestos son de la familia de los terpenos, constituidos por múltiples unidades de isoprenoides con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Este esqueleto polieno (o cromóforo) puede ser modificado por ciclación de uno o ambos extremos, por cambios en el nivel de hidrogenación o por adición de grupos funcionales que contienen oxígeno. De esta forma los carotenoides se dividen en carotenos (compuestos hidrocarbonados) y xantofilas (compuestos derivados de los carotenos que contienen uno o más oxígenos). El rasgo más destacado y característico de la estructura carotenoide es el largo sistema de enlaces dobles alternantes y simples que conforman la parte central de la molécula. Estos enlaces constituyen un sistema conjugado en el que los electrones  $\pi$  están deslocalizados a lo largo de toda la cadena poliénica. Es esta la característica que le da a los carotenoides su forma molecular distintiva, así como su reactividad química y la propiedad de

absorber luz; esta última se deriva de la presencia de 7 o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible, con colores que van del amarillo al rojo (35).

Los rendimientos y las masas de los extractos obtenidos, se muestran en la tabla 1. Es notable que el EE presenta un mayor porcentaje de rendimiento y, por ende, una masa mayor; esto debe ser producto de la gran cantidad de sustancias y pigmentos que posee la culebra, como los carotenoides de la piel, que tienen una elevada masa molar y, en grandes cantidades, su masa puede ser significativa. También puede deberse a que la cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, los carotenoides como grupo son, extremadamente, hidrofóbicos con poca o ninguna solubilidad en agua. Obviamente, los grupos funcionales polares alteran la polaridad y afectan a las interacciones con otras moléculas, las cuales fueron arrastradas por el etanol (36).

Tabla 1. Masa y rendimiento en la obtención de los extractos de *A. fragilis*.

<b>Extracto</b>	<b>Masa (g)</b>	<b>Rendimiento (% en masa)</b>
EE	3,65	3,73
EEP	0,03	0,03

EE: Extracto etanólico; EEP: Extracto en éter de petróleo

En general, los productos naturales terrestres presentan rendimientos muy bajos, ya que, aproximadamente, más del 70% de su composición es agua. Esto permite explicar los bajos rendimientos observados en la obtención de los extractos. Sin embargo, en el EEP se obtuvo un rendimiento menor que en el EE, lo cual indica que en esta culebra, se encuentran presentes pequeñas cantidades de compuestos de baja polaridad solubles en éter de petróleo.

Es conocido que la humedad es responsable del crecimiento de bacterias y hongos, además puede producir hidrólisis de los constituyentes, por lo cual los extractos de *A. fragilis*, se mantuvieron bajo condiciones adecuadas, para conservar los principios

activos, almacenando las muestras en lugares limpios, secos y protegidos de la luz evitando así la descomposición y contaminación de los mismos.

## 2. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Con las pruebas químicas preliminares realizadas a los extractos se pudo detectar los metabolitos posiblemente presentes en los extractos EE y EEP de la culebra, lo cual permitió idear tratamientos cromatográficos y estrategias de separación más eficientes, que ayudaron a extraer algunos de los constituyentes químicos. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Familias de metabolitos secundarios identificados en los extractos EE y EEP de *A. fragilis*.

Familia de metabolitos	Extracto	
	EE	EEP
Alcaloides	+	+
Cumarinas	+	+
Esteroles insaturados	-	-
Flavonoides	-	+
Fenilpropanoides	-	-
Glicósidos cardiotónicos	+	-
Glicósidos cianogénicos	-	-
Metilencetonas	-	-
Polifenoles	-	-
Saponinas	-	-
Taninos	+	+
Antraquinonas	-	-

Metabolitos como los alcaloides, posiblemente presentes en ambos extractos, son identificados a través de reacciones de precipitación; donde ocurre un intercambio del anión voluminoso del reactivo en acción (tetrayodobismutato de potasio), que reemplaza

a los aniones pequeños de las sales de los alcaloides. Estos principios activos, poseen un grupo amino, que les confiere propiedades alcalinas y, al ser llevados a un medio ácido, se protonan e interaccionan electrostáticamente con los aniones voluminosos mencionados (37, 38). La reacción de Dragendorff produce sales de los alcaloides que son precipitados coloreados; el bismuto del reactivo de Dragendorff presenta una geometría octaédrica y una carga formal de -2, en su esfera de coordinación (anión voluminoso) para interactuar electrostáticamente con dos moléculas de alcaloide protonadas (39).

Por su parte, las cumarinas pueden ser visualizadas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm, observando en el papel de filtro una fluorescencia amarilla, lo que indicó, efectivamente, la presencia de estos metabolitos en ambos extractos. Las cumarinas son compuestos derivados de benzo- $\alpha$ -pirona, estas tienen propiedades antiinflamatoria, antitrombóticas y vasodilatadoras. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariote, lo que explica también su actividad antiviral (40).

La posible presencia de taninos en ambos extractos, se determinó al producirse una precipitación cuando la muestra fue tratada con una solución al 1% de gelatina en cloruro de sodio al 10%. Los taninos tienen composiciones diferentes, algunos son llamados taninos condensados, son fenoles de glucosa, o de algún otro azúcar y ácidos trihidroxibenzoicos. Las propiedades de precipitación de los taninos se utilizan para clarear o limpiar vinos o cervezas, y resultan muy útiles en medicina, porque pueden usarse como astringentes, estípticos y antisépticos, en este último caso privando de alimento a las bacterias (41).

Por otro lado, los flavonoides fueron detectados en el EEP. Este tipo de compuestos son comunes al metabolismo de las plantas; no obstante, se han reportado en otro tipo de organismos (34). Antiguamente, se consideraba que la síntesis de flavonoides era una actividad exclusiva de las plantas, actualmente, se conoce que microorganismos como *Streptomyces griseus* codifican una proteína que tiene gran similitud con la de las

plantas. Los modelos microbianos son una herramienta excelente para la producción de metabolitos secundarios de plantas, pues se sabe que los microorganismos mimetizan el metabolismo de los mamíferos, plantas e insectos. Además de poseer sistemas enzimáticos similares a éstos, catalizan reacciones similares de importancia en metabolismo primario y secundario (42). De allí que, los flavonoides posiblemente presentes en el EEP de *A. fragilis* pueden ser propios de su metabolismo o adquiridos de las fuentes vegetales o bacterianas, con las que estaban en contacto durante su proceso de reproducción y crecimiento.

Por su parte, la presencia de los glicósidos cardiotónicos en el EE se detectó por la aparición de un color violeta en la solución. Los glicósidos cardiotónicos poseen una estructura esteroideal que se caracterizan por llevar en el carbono 17 un anillo de lactona no saturado, los cardenólidos tienen específicamente un anillo pentagonal con un doble enlace conjugado con el grupo carbonilo. Además, y como parte de la denominada glicona, incluyen en la posición 3 moléculas de azúcar como sustituyentes, siendo las más comunes, la glucosa, ramnosa, digitalosa, entre otras; que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca (43).

El análisis preliminar evidenció la posible presencia de algunas de las familias de compuestos y la ausencia de otras; aun así un resultado negativo, no es significativo de la ausencia de una familia de metabolitos en específico, tal vez estén presentes en bajas concentraciones que son imposibles de detectar a través de las técnicas utilizadas. Así, como todo resultado positivo no asegura la presencia de alguna familia de compuestos, pues podría ocurrir un falso positivo, debido a la interferencia de otro compuesto.

### **3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Los bioensayos permitieron seleccionar las fracciones a las cuales se les realizaron separaciones cromatográficas, mediante técnicas convencionales, para llevar a cabo un estudio biodirigido de los constituyentes químicos de *A. fragilis*; donde se realizaron las siguientes pruebas:

### **3.1. Actividad letal frente a *Artemia salina***

Para evaluar la actividad letal se pueden emplear diferentes organismos; sin embargo, el bioensayo de toxicidad aguda o concentración letal media (CL<sub>50</sub>) frente *A. salina*, es de gran utilidad en el campo de los productos naturales y ecotoxicología (34), debido a que se comprobó, científicamente, 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 bioensayo puede ser utilizado para detectar posibles compuestos antitumorales y pesticidas de origen natural, debido a que estos crustáceos son muy sensibles a un amplio rango de compuestos químicos biológicamente diversos (44).

Esta prueba fue practicada para los extractos y las fracciones A, C y H. Después de 24 horas de exposición, ningún nauplio resultó muerto. De allí que, los extractos y las fracciones mencionadas no presentan efecto contra *A. salina* a las concentraciones ensayadas.

A pesar de que *A. salina* es un organismo muy sensible a las sustancias tóxicas para mamíferos adultos (45); este ensayo no detecta principios citotóxicos que requieren activación metabólica en mamíferos. En los extractos (EE y EEP) y las fracciones (A, C y H) ensayadas pueden estar presentes compuestos citotóxicos que no mostraron actividad contra los nauplios utilizados, debido a que su acción en el metabolismo de *A. salina* puede ser muy diferente a la acción que tienen sobre células de mamíferos y, es posible que la activación intracelular que ocurre en ellos no tenga lugar en el crustáceo (46).

### **3.2. Actividad antifúngica**

Tanto en las industrias farmacológicas, como en las alimenticias, los estudios antimicóticos son de gran importancia, debido a la proliferación de hongos, por el tiempo que los alimentos permanecen almacenados y la resistencia que ofrecen estos a los antibióticos, dificultando el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por las esporas de los hongos (47).

Para la prueba antifúngica se usaron dos tipos de hongos, capaces de afectar el sistema respiratorio, dérmico, digestivo, entre otros. Ninguno de los extractos, ni de las fracciones utilizadas, mostraron propiedades antifúngicas, bajo las condiciones y concentraciones empleadas; sin embargo, puede ser que a concentraciones mayores, utilizando distintos hongos o condiciones experimentales diferentes, los extractos EE y EEP de *A. fragilis* presenten actividad antifúngica.

### **3.3. Actividad antibacteriana**

Dentro de las actividades farmacológicas, la antibacteriana es de gran importancia, ya que cada día existe una marcada tendencia a la resistencia de las cepas bacterianas frente a los antibióticos, lo que constituye un serio problema al aplicar tratamientos sobre enfermedades infecciosas, por tal motivo, muchos investigadores han enfocado su atención en la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos (48).

Es resaltante que los extractos no presentaron actividad antibacteriana; esto puede ser debido a que éstos tienen una gran cantidad de compuestos, de los cuales no se conocen todos sus constituyentes y menos la masa de cada uno de éstos en el mismo; causando que, aquellas sustancias responsables de la sensibilidad bacteriana, disminuyan el espectro de acción, probablemente, por la poca concentración. Es decir, hay a un efecto antagónico de los constituyentes químicos presentes en el mismo, en otras palabras, la sustancia original no podrá actuar ya que se combinan con sustancias químicas para bloquear esa acción, sin producir efecto (49).

Las condiciones bajo las cuales se realizó la prueba también permiten inferir acerca de la sensibilidad bacteriana frente a los extractos, el hecho de que no se apreciara actividad, no es indicativo de que a concentraciones mayores o condiciones diferentes, los extractos pudiesen llegar a presentar cierta actividad frente a estas cepas, u otras no empleadas en este trabajo.

La tabla 3 muestra las cepas utilizadas para la realización del bioensayo, las Gram negativas (*S. typhimurium* y *E. coli*), y las Gram positivas (*E. faecalis*, *B. cereus* y *B.*

*subtilis*), todas estas son patógenas y provocan infecciones respiratorias, urinarias o estomacales; siendo un problema grave de salud pública, debido a la resistencia que han desarrollado frente a antibióticos de uso común, por lo tanto, se ensayan nuevas alternativas que presenten mayor efectividad a los antibióticos comerciales utilizados.

Tabla 3. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm) de la fracción C del EE de *A. fragilis*.

<b>Bacterias</b>	<b>Diámetro del halo de inhibición (mm)</b>
	<b>Fracción C</b>
<i>Samonella tiphymurium</i>	14
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	12
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	12

Control: Cloroformo

Además, los organismos no presentaron sensibilidad ante el solvente utilizado (blanco negativo) para realizar la disolución, es decir que la actividad antibacteriana mostrada en la tabla es netamente de la muestra, la cual es una de las fracciones provenientes del extracto etanólico. Se evidenció que la fracción C tiene efecto antibacteriano frente a *S. tiphymurium*, *E. faecalis* y *B. cereus*, indicando que de las cinco bacterias ensayadas, esta fracción inhibió el crecimiento total o parcial de tres de ellas.

Los resultados demuestran que *A. fragilis* presenta actividad antibacteriana, sobre especies Gram positivas y Gram negativas, a pesar de la diferencia que reside en las paredes celulares. Las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa que está casi toda compuesta de peptidoglicanos, esta capa de peptidoglicanos en las bacterias Gram negativas es muy delgada y su capa más exterior está protegida por una membrana de moléculas de lipoproteínas, resistiendo los efectos de muchos tipos de antibióticos, porque es impermeable a éstos. Tal situación implica que las infecciones causadas por bacterias Gram negativas son muy difíciles de tratar (50).

#### 4. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO

La separación de los principales constituyentes presentes en el EE, fue llevada a cabo tomando en consideración la cantidad de muestra obtenida y la actividad biológica ejercida por el extracto sobre los diferentes organismos ensayados. A pesar de que este extracto no manifestó ningún resultado positivo ante las pruebas de actividad biológica, se evidenció un buen porcentaje de rendimiento en su obtención, permitiendo seleccionar al extracto para realizarle un fraccionamiento cromatográfico.

##### 4.1. Cromatografía de columna del extracto etanólico de *A. fragilis*

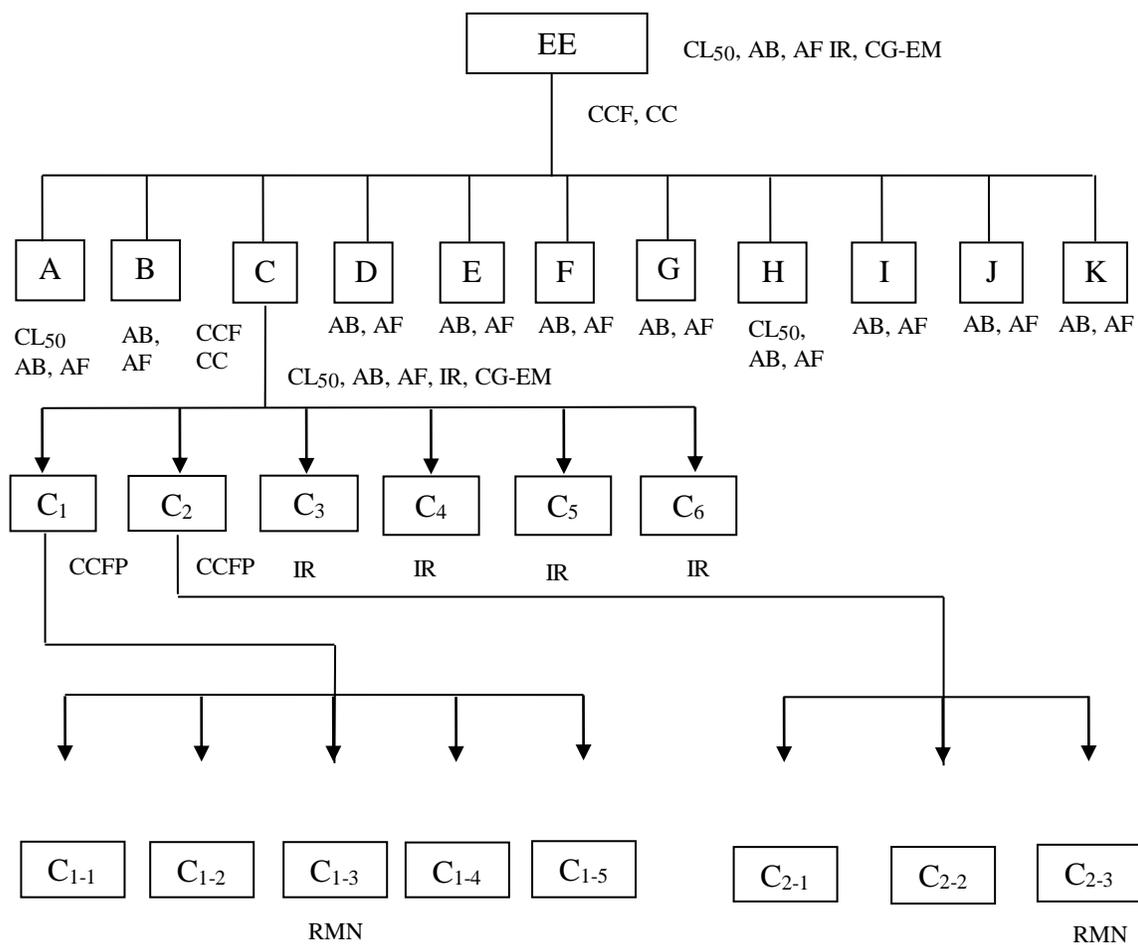
El EE fue fraccionado mediante columna cromatográfica (CC) con una altura de 34,0 cm y 2,9 cm de diámetro, utilizándose una relación m/m, extracto-sílica de 1:30 (3,65 g de extracto y 110,0 g de sílicagel). De esta separación se obtuvieron 25 eluatos de 100 ml cada uno, agrupados en 10 fracciones, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Fracciones obtenidas en el fraccionamiento cromatográfico del EE de *A. fragilis*.

Fracción	Eluatos	Masa ( $\pm 0,0001$ g)
A	1 – 5	2,6016
B	6	0,0767
C	7	0,3719
D	8	0,0134
E	9 – 10	0,0165
F	11 – 15	0,0024
G	16	0,0008
H	17 – 19	0,2851
I	20– 22	0,0156
J	23 – 25	0,1407

Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) realizados a los eluatos, visualizando los  $R_f$ , bajo luz ultravioleta y una solución ácida de molibdato de amonio, como agente revelador, permitieron ver manchas definidas que presentaron  $R_f$  cercanos o iguales, y fueron tomadas en cuenta a la hora de unir los eluatos. El rendimiento de esta separación fue de 96,56% indicando una pérdida de masa de 0,1253 g durante el proceso; la pérdida del material después del fraccionamiento puede deberse a la adsorción del extracto sobre la sílicagel y al hecho de que el extracto es alcohólico, por lo que contiene en su mayoría compuestos polares, que no pudieron separarse a pesar de usar metanol durante la cromatografía.

Las fracciones resultantes en esta separación, también fueron analizadas por CCF para observar el comportamiento de los componentes presentes en cada fracción, para continuar, posteriormente, con la separación y elucidación de los principales metabolitos. De acuerdo al esquema mostrado en la figura 13, fue seleccionada la fracción C, por el efecto antibacteriano que tuvo sobre la mayoría de las bacterias ensayadas, además de tener una masa de 0,3719 g para realizar una nueva separación, y en la CCF se observaron manchas con  $R_f$  bien definidos y distantes entre sí. Las demás fracciones no fueron seleccionadas para realizarles una separación cromatográfica debido a que presentaban mezclas de compuestos difíciles de separar, la realización de columnas sucesivas para lograr su separación sería una pérdida de solvente y masa, tampoco presentaron ningún tipo actividad biológica, motivos por los cuales las demás fracciones no fueron seleccionadas para su separación y purificación.



CC	Columna cromatográfica.	AB	Actividad antibacteriana.
CCF	Cromatografía de capa fina.	AF	Actividad antifúngica.
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media frente a <i>A. salina</i> .	IR	Infrarrojo.
CG-EM	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.	RMN	Resonancia magnética nuclear.

AF	Actividad antifúngica.
RMN	Resonancia magnética nuclear.

Figura 13. Esquema de separación y análisis de los constituyentes del EE.

#### 4. 2. Análisis del extracto etanólico (EE)

A pesar de que este extracto no mostró ningún tipo de actividad biológica, presentó una buena cantidad de muestra; además, en la CCF resultó ser una mezcla de compuestos; siendo un líquido de aspecto aceitoso y con un color amarillo intenso, lo cual indica la presencia de grupos cromóforos, que son capaces de absorber energía en el rango de UV-visible. Por tales motivos, se seleccionó para analizar mediante IR-TF y CG-EM los compuestos presentes en este extracto.

En el espectro de IR (figura 14) se muestran las vibraciones de los principales grupos funcionales de los compuestos en mayor proporción, donde se observan dos señales intensas a  $2924,97\text{ cm}^{-1}$  y  $2853,93\text{ cm}^{-1}$ , asignables al estiramiento de enlaces C-H  $sp^3$  (alcano) y  $sp^2$  (alqueno) no conjugados, y sus correspondientes sobretonos a  $1466,33\text{ cm}^{-1}$  y  $1377,55\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de grupos metílicos terminales, puesto que son bandas correspondientes a las deformaciones simétricas y asimétricas del grupo  $-\text{CH}_3$ , respectivamente. La señal de absorción a  $722,36\text{ cm}^{-1}$  se debe a la deformación de los enlaces C-H de grupos metilenos continuos,  $(\text{CH}_2)_n$  ( $n>4$ ). La absorción a  $1745,37\text{ cm}^{-1}$  observada como una tensión intensa, es originada por el doble enlace C=O característico de los compuestos carbonílicos (cetonas, ésteres, aldehídos y ácidos carboxílicos).

Estas señales son características de alcanos, alquenos y ácidos grasos, posiblemente correspondientes a compuestos esteroidales, cuyas estructuras generales contienen enlaces C-H  $sp^3$  (alcanos) y  $sp^2$  (alquenos) no conjugados; e incluso pueden contener el grupo carbonilo (C=O) en sus cadenas sustituyentes.

Por otra parte, la señal ancha alrededor de  $3401,44\text{ cm}^{-1}$ , podría indicar la presencia de un grupo N-H, lo cual es lógico si tomamos en cuenta que se obtuvo resultado positivo para alcaloides, quienes tienen el grupo N-H en su estructura, pero se descarta con la ausencia de señales intensas C-N  $sp^3$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , C-N  $sp^2$  a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y  $sp^3$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, esta misma señal ( $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde al grupo O-H alcohólico o fenólico, confirmando el resultado positivo obtenido para glicósidos cardiotónicos, los

cuales poseen en su estructura una parte esteroidal. En este espectro también se visualizan dos bandas a  $1118,47\text{ cm}^{-1}$  y  $1164,43\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al alargamiento C-O. De acuerdo con el análisis del espectro de infrarrojo, este extracto puede estar constituido, principalmente, por compuestos esteroidales.

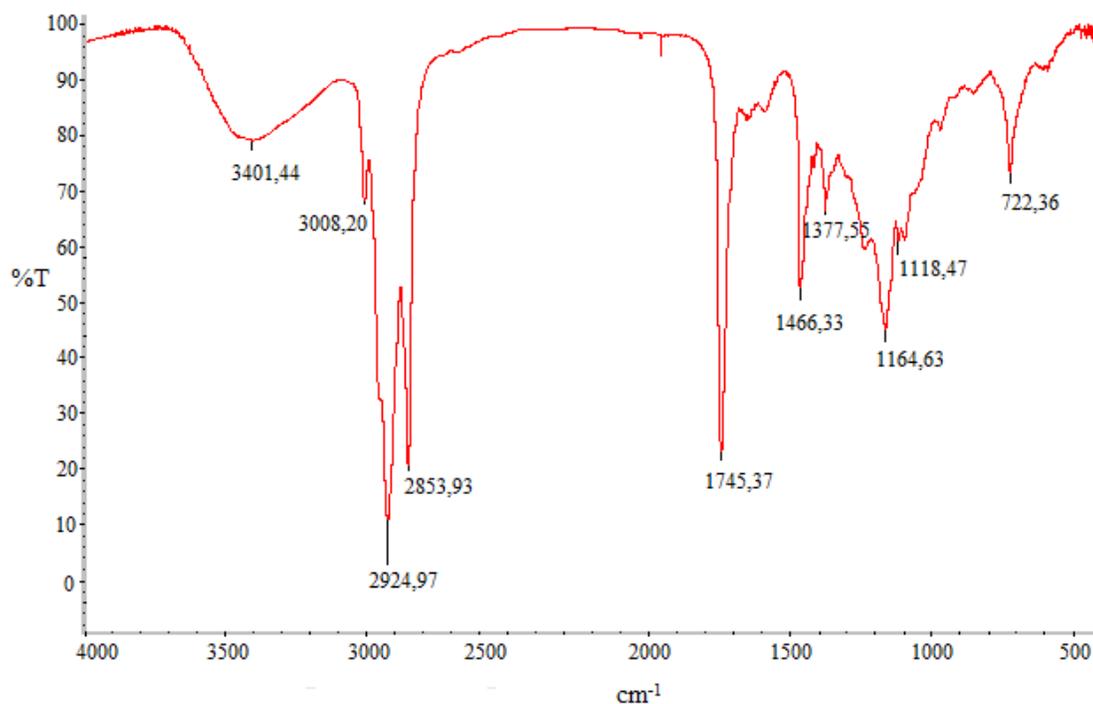


Figura 14. Espectro de infrarrojo del EE.

Para su análisis mediante CG-EM se utilizaron 4 mg, disueltos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En el cromatograma de iones totales (figura 15) se visualizan 7 señales bien definidas, las cuales corresponden a una variedad de compuestos presentes en la muestra, los picos más significativos fueron identificados mediante espectrometría de masas con un porcentaje de confianza  $\geq 90\%$ , haciendo uso de la Librería de Espectros NIST-2005, los compuestos son enlistados en la tabla 5.

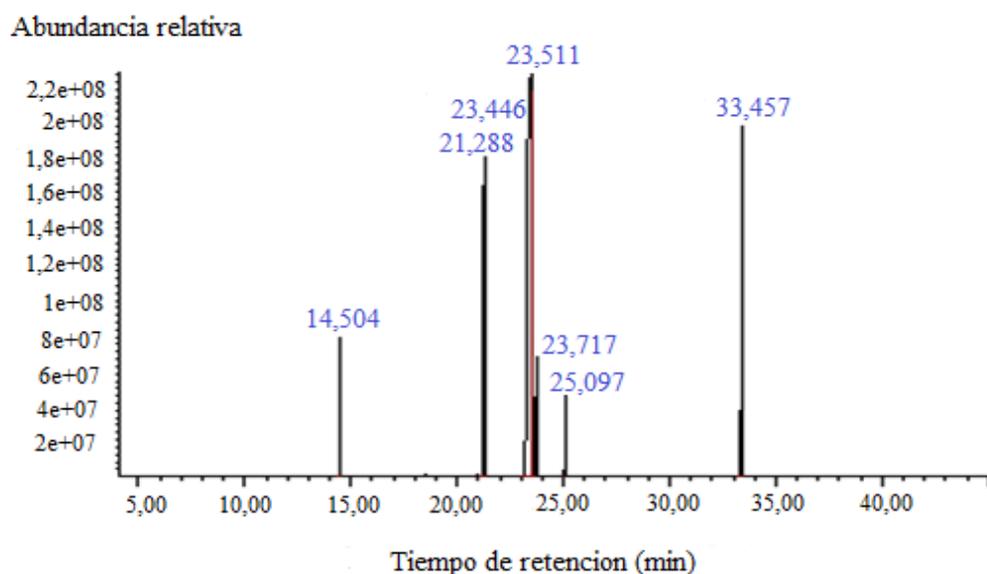


Figura 15. Cromatograma de iones totales del EE.

Tabla 5. Compuestos identificados mediante CG-EM en el EE.

<b>T<sub>r</sub>(min)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>Probabilidad (%)</b>	<b>Compuesto</b>
21,288	14,00	90	Hexadecanoato de etilo
23,443	44,46	95	Ácido linoleico
23,719	1,97	97	Octadecanoato de etilo
33,453	15,36	99	Colestan-5-en-3-ol

La mayoría de los compuestos identificados son ésteres de ácidos, todos estos compuestos presentan un porcentaje de área mayor a la unidad.

El hexadecanoato de etilo es identificado con un 90% de confianza, comparando el espectro teórico de la base de datos de la NIST (figura 16) y práctico (figura 17) se encontró un ión molecular a una relación  $m/z$  de 284, que concuerda con la fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O_2$ , y cuya ruptura originó los picos de los fragmentos más abundantes a  $m/z$  241, 199, 157, 101, 88 (pico base) y 43.

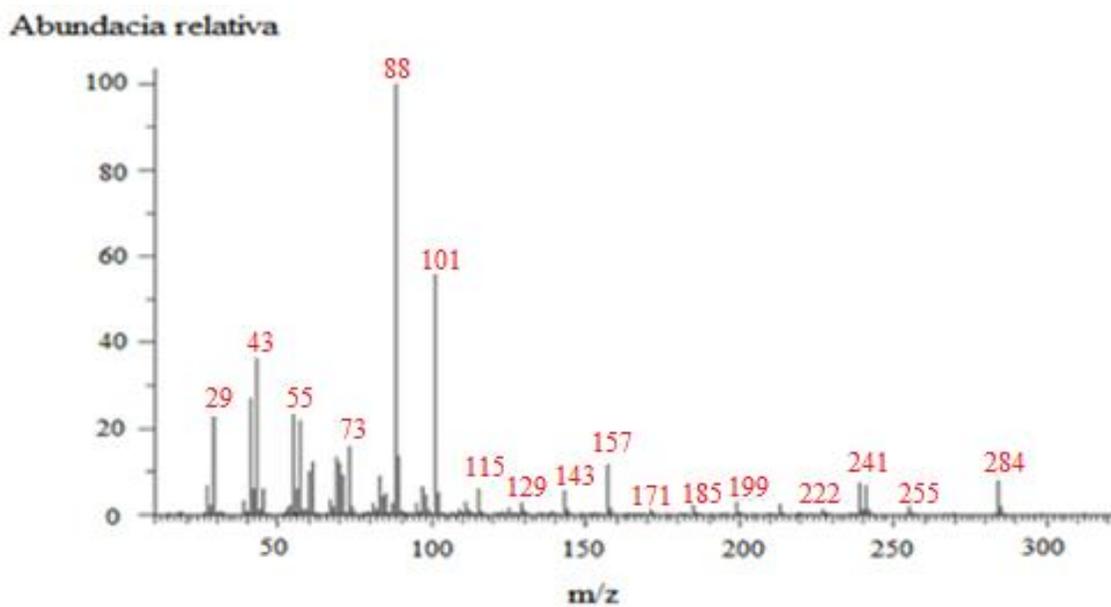


Figura 16. Espectro de masas teórico del hexadecanoato de etilo.

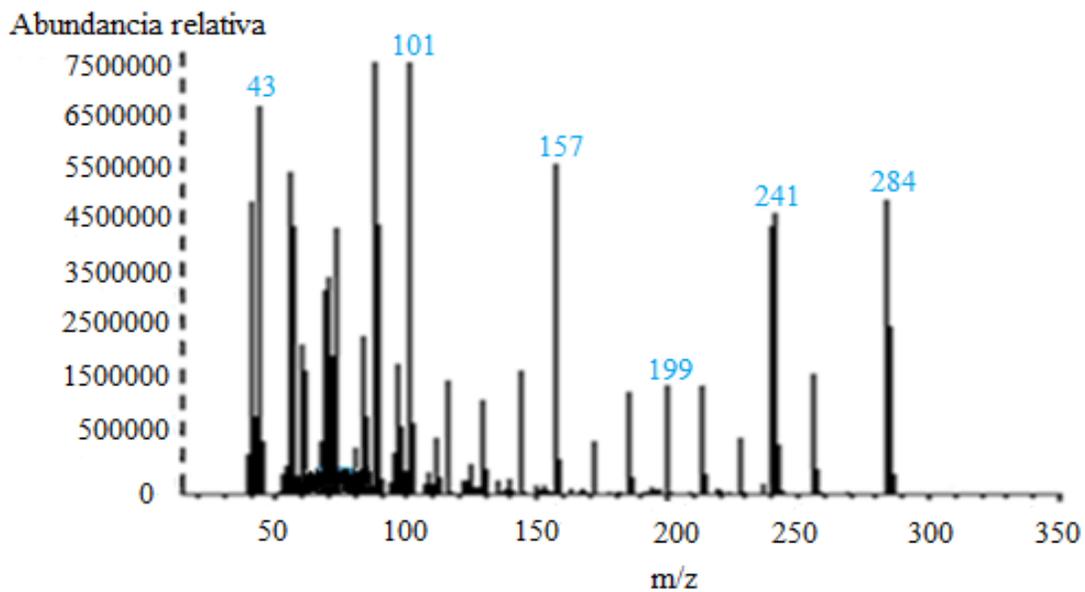


Figura 17. Espectro de masas obtenido del EE ( $T_r = 21,288$  min).

En la figura 18 se muestra el patrón de fragmentación de algunos de los iones más abundantes característico del compuesto hexadecanoato de etilo.

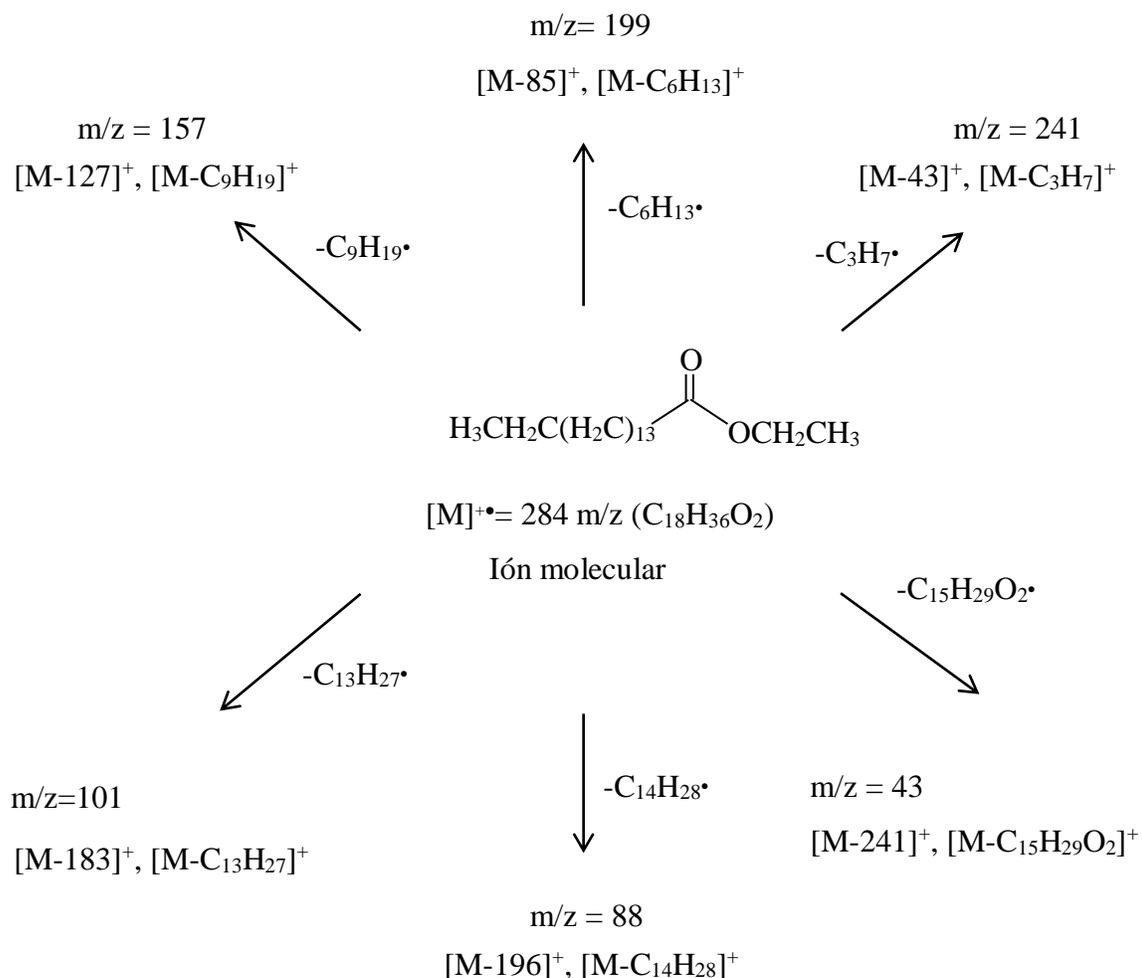


Figura 18. Patrón de fragmentación del hexadecanoato de etilo.

Comparando los espectros es notable que se trata del mismo compuesto, a pesar de que se observan ligeras diferencias, por ejemplo, en la abundancia relativa. El pico base se identifica a 88 m/z. Además, se nota que algunas señales aparecen acompañadas de otras más pequeñas que representan la fracción de moléculas que contienen un isótopo de mayor masa ( $^{13}C$  o  $^2H$ ). La relación de intensidades de los iones está definida por la abundancia natural de  $^{13}C$ ,  $^2H$ , entre otros, y en consecuencia por la probabilidad de que uno de los isótopos de mayor masa esté incorporado en la molécula ionizada (51).

La presencia de ésteres de ácidos grasos en la culebra, puede estar asociado a posibles funciones defensivas de *A. fragilis*, cuyo comportamiento ocurre entre las plantas y los insectos (52). Los ácidos grasos al igual que sus ésteres metílicos, pudieran ser los responsables de la actividad antibacteriana observada en la fracción C. Sin embargo, se ha demostrado que, la esterificación de los ácidos grasos insaturados causan la pérdida de la actividad inhibitoria. La baja actividad antibacteriana de los ésteres de ácidos grasos se debe, a que el grupo carbonilo libre es necesario para dicha actividad; además que está relacionada con el tipo de bacteria (53).

Por otra parte, el ácido linoleico fue identificado con un 95% de confianza, comparando el espectro teórico (figura 19) y práctico (figura 20) es apreciable el ión molecular a 280 m/z, correspondiente a la fórmula molecular  $C_{18}H_{32}O_2$ , también, se pueden distinguir los diferentes fragmentos característicos para este tipo de compuestos a m/z 264, 222, 150, 110, 81, 67 (pico base) y 41.

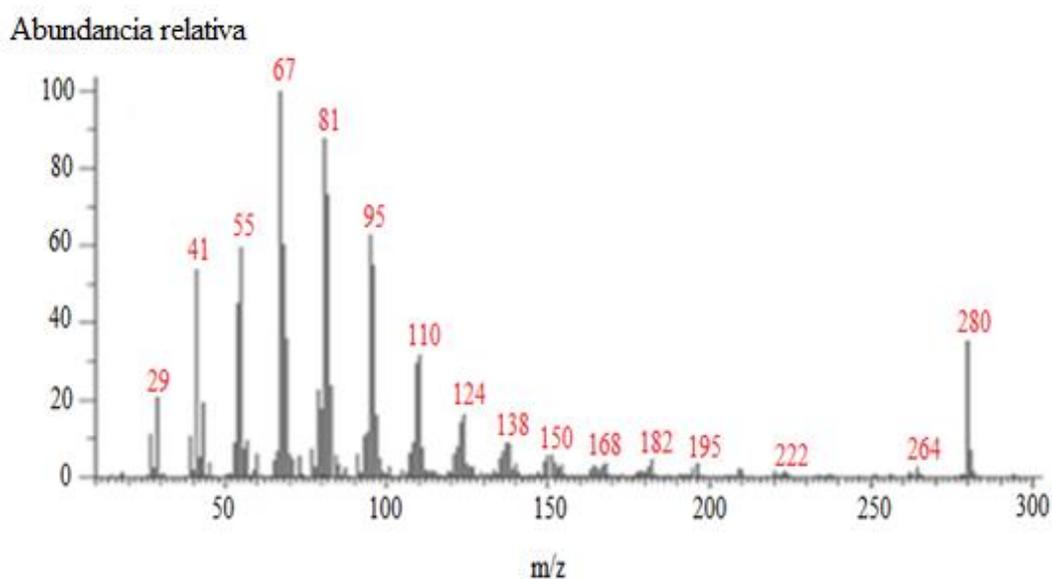


Figura 19. Espectro de masas teórico del ácido linoleico.



Comparando los espectros es notable que se trata del mismo compuesto, a pesar de que en el espectro práctico no se observan los picos correspondientes a pérdidas de masas de alrededor de 29 m/z.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la inhibición del transporte de membrana, lo que resulta en una carencia nutricional de las células. Algunos autores sugieren que los ácidos grasos son los inhibidores más efectivos frente a las bacterias Gram positivas, entre ellos los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico son los más efectivos (54). Así mismo, se han reportado algunas investigaciones sobre la actividad biológica de ácidos grasos, donde se resalta la actividad antibacteriana y antifúngica de los ácidos oleico, laurico, palmítico y linoleico (55, 56, 57). Por otra parte, estudios realizados han demostrado que la buena actividad antiinflamatoria manifestada por la grasa de iguana, puede ser debido a la presencia de ácido linoleico en dicha grasa, ya que está demostrado que las deficiencias de ácidos grasos esenciales induce procesos inflamatorios tanto en ratas como en humanos. Los cuales pueden ser revertidos mediante la aplicación cutánea de estos ácidos en diversas formas (58).

De todos los compuestos identificados por CG-EM, no se realizará el análisis del espectro de masas del octadecanoato de etilo, puesto que, anteriormente ya se habló acerca de estos tipos de compuestos.

El colestano-5-en-3-ol es identificado con un 99% de confianza, comparando el espectro teórico (figura 22) y el experimental (figura 23) se observa claramente el ión molecular en 368 m/z de fórmula molecular ( $C_{27}H_{46}O$ ), así como fragmentos característicos de esta molécula a m/z 326, 276, 213, 145, 105, 81 (pico base) y 43.

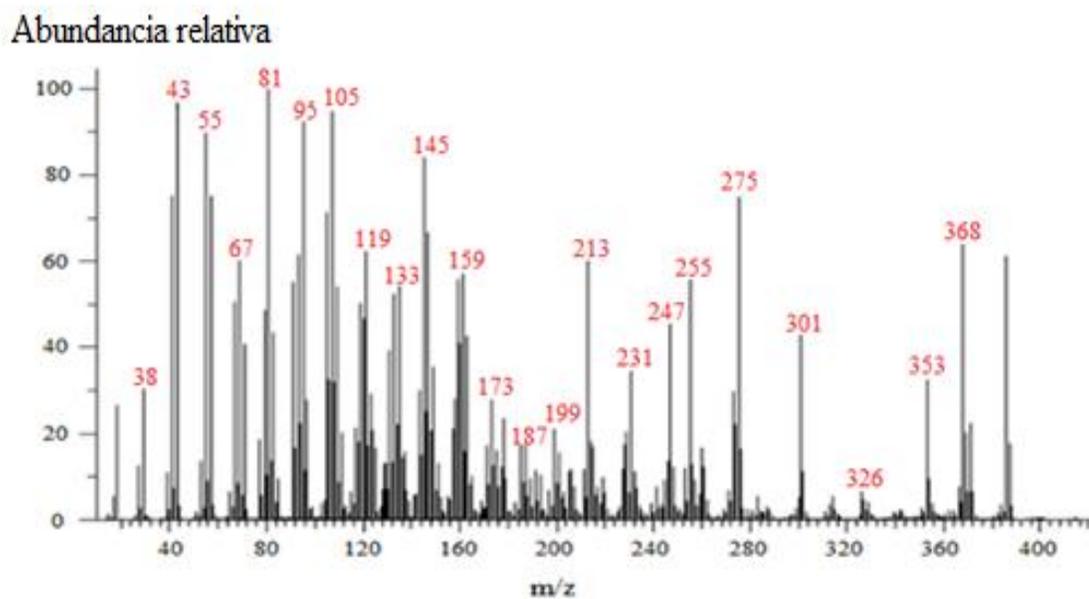


Figura 22. Espectro de masas teórico del colesterol.

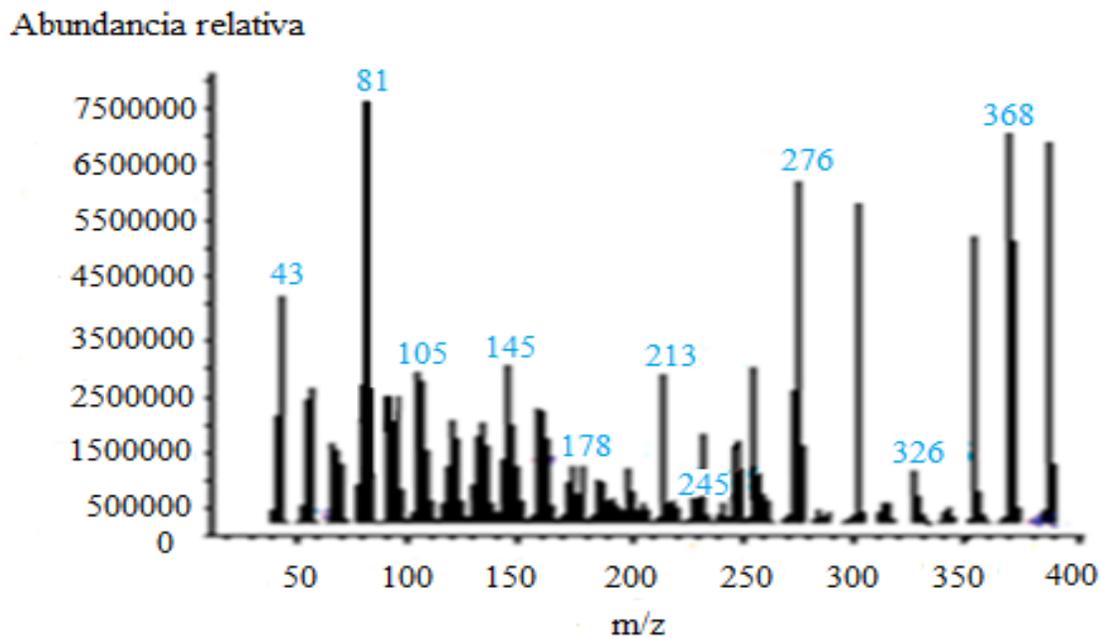


Figura 23. Espectro de masas obtenido del EE ( $T_r = 33,461$  min).

En la figura 24 se observa el patrón de fragmentación de algunos de los iones más abundantes correspondientes a este compuesto.

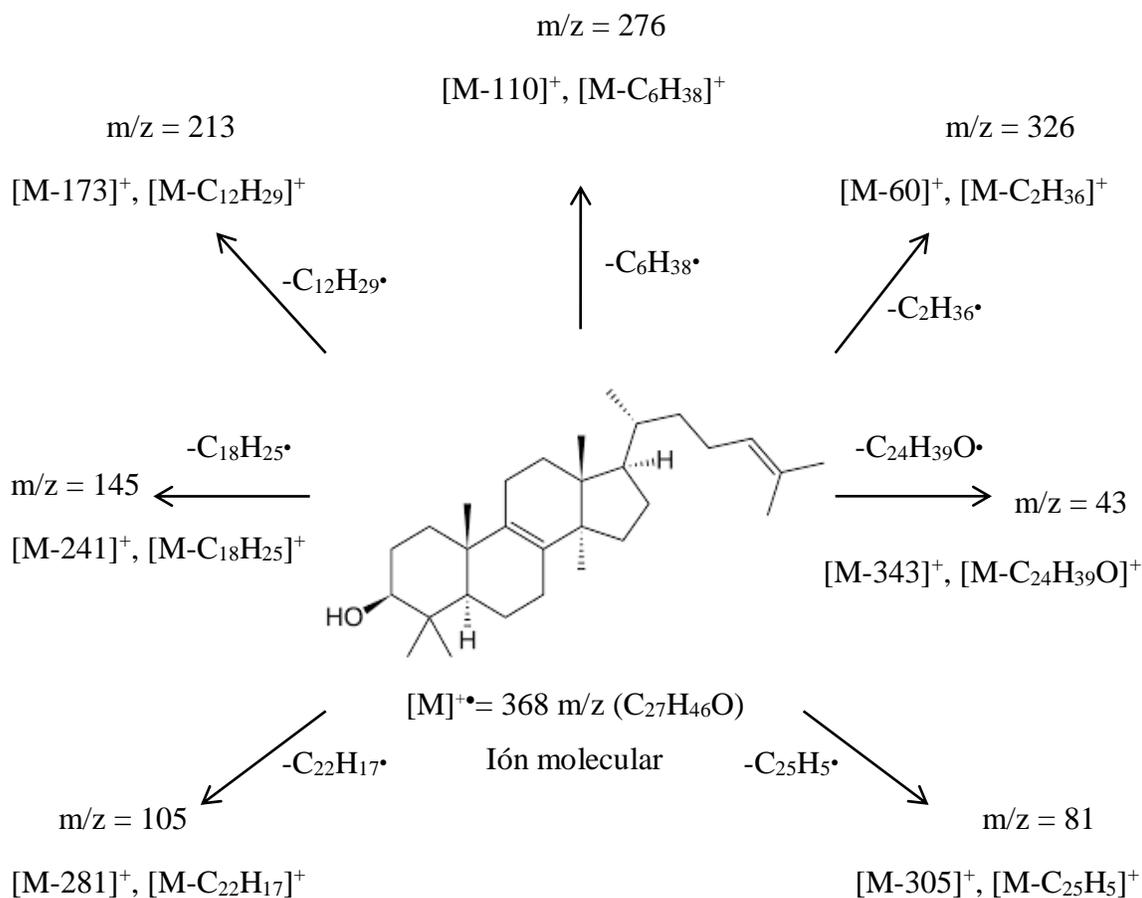


Figura 24. Patrón de fragmentación del colesterol.

Comparando los espectros es notable que se trata del mismo compuesto, a pesar de que en el espectro práctico no se observan los picos correspondientes a pérdidas de masas de alrededor de 38 m/z.

El colesterol (colestano-5-en-3-ol) es un esteroide de origen animal que cumple numerosas funciones metabólicas: constituye la estructura básica para la formación de las hormonas esteroidales, sustancias que regulan un gran número de funciones fisiológicas entre las que se encuentran el desarrollo sexual y el metabolismo glucídico, a partir de él también se forman las sales biliares que cumplen un rol importante en la digestión y absorción de las grasas en el tracto digestivo, posee importantes funciones

regulatorias en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos, y es, junto con los fosfolípidos, uno de los componentes más importantes de las membranas celulares. Otra de sus funciones más importantes es que es el precursor de la vitamina D esencial en el metabolismo del calcio (59).

El calcio interviene en funciones orgánicas diversas, tanto a nivel intracelular como extracelular. Entre las primeras podríamos mencionar su papel en la contracción muscular, en la actividad de la célula nerviosa durante la sinapsis, en los procesos secretorios mediante exocitosis, incluyendo la secreción de hormonas, o en la activación de enzimas. Entre las funciones del calcio a nivel extracelular destaca, por ejemplo, su papel en la coagulación sanguínea, en el mantenimiento y estabilidad de las membranas celulares o en el de la integridad estructural de huesos y dientes. La vitamina D es la encargada de regular el paso del calcio a los huesos. Por ello, si la vitamina D falta, este paso no se produce y los huesos empiezan a debilitarse y a curvarse produciéndose malformaciones irreversibles: el raquitismo. La vitamina D tiene un papel importante en el mantenimiento de órganos y sistemas a través de múltiples funciones, tales como: la regulación de los niveles de calcio y fósforo en la sangre, promoviendo la absorción intestinal de los mismos a partir de los alimentos y la reabsorción de calcio a nivel renal. Con esto contribuye a la formación ósea, siendo esencial para el desarrollo del esqueleto (60).

Con base en esto, es lógico que algunas poblaciones utilicen el “ron de culebra” elaborado con *A. fragilis* en etanol, ya que su contenido de colesterol, sumado al calcio ubicado en los sacos endolinfáticos del oído interno; podrían estar ayudando a aliviar los síntomas de artritis, reumas, fracturas de huesos, entre otros tipos de dolencias.

#### **4.3. Análisis de la fracción C proveniente del EE**

Esta fracción es un líquido de aspecto aceitoso y con un color amarillo intenso, lo cual indica la presencia de grupos cromóforos, que son capaces de absorber energía en el rango de UV-visible. Por tal motivo, se seleccionó para analizar mediante IR-TF.

El espectro de IR (figura 25) presenta señales de gran intensidad entre  $2925,36\text{ cm}^{-1}$  y  $2854,36\text{ cm}^{-1}$ , asignables al estiramiento de enlaces C-H  $sp^3$  (alcano) y  $sp^2$  (alqueno), y sus correspondientes sobretonos a  $1465,07\text{ cm}^{-1}$  y  $1378,11\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Adicionalmente, se aprecia una banda de absorción a  $1739,89\text{ cm}^{-1}$ , de intensidad fuerte, correspondiente a un grupo carbonilo (C=O).

Por otra parte, la señal ancha a  $3446,99\text{ cm}^{-1}$ , podría indicar la presencia del grupo N-H, pero también se descarta por la ausencia de señales fuertes de C-N  $sp^3$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , C-N  $sp^2$  a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y  $sp^3$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ . Esta misma zona corresponde al grupo O-H alcohólico o fenólico, confirmando el resultado positivo obtenido para taninos u otro tipo de sustancia con O-H en su estructura. En este espectro también se visualizan dos señales a  $1114,53\text{ cm}^{-1}$  y  $1169,39\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al alargamiento C-O. De acuerdo con el análisis del espectro de infrarrojo, esta fracción puede estar constituida por compuestos hidroxilados.

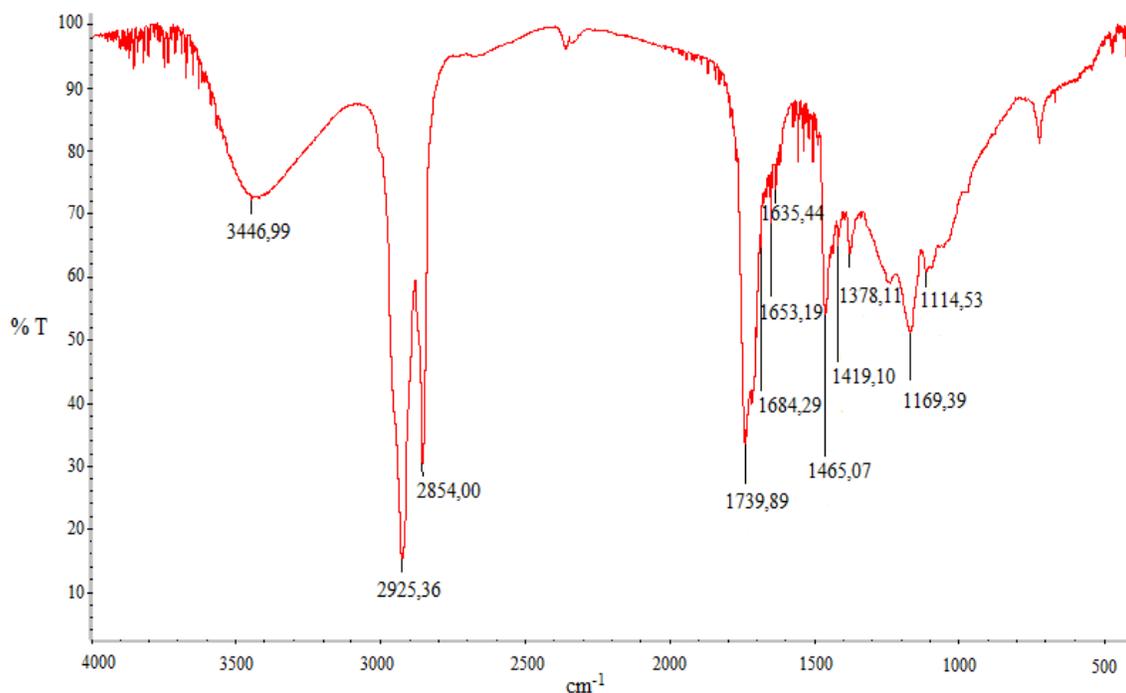


Figura 25. Espectro de infrarrojo de la fracción C del EE.

#### 4. 4. Cromatografía de la fracción C del EE

Esta fracción mostró actividad biológica y fue la única que tuvo efecto antibacteriano frente a la mayoría de las bacterias ensayadas, además de tener una masa de 0,3719 g; en la CCF manifestó ser una mezcla de compuestos de fácil separación. Por tales motivos se seleccionó para realizar una nueva separación en columna. A esta fracción se le realizaron pruebas químicas preliminares, donde se detectó la posible presencia de taninos u otro tipo de sustancia con O-H en su estructura; y en el análisis de IR-TF, se observó que conserva los mismos grupos funcionales presentes en el extracto de origen.

El subfraccionamiento mediante columna cromatográfica (CC), tenía una altura de 19,8 cm y 1,5 cm de diámetro y una relación m/m, sephadex-extracto 50:1 (12,455 g de sephadex y 0,2491 g de extracto). Obteniéndose 24 eluatos de 15 ml cada uno, los cuales fueron unidos, después de realizarles cromatografías de capa fina (CCF), donde se visualizaron los  $R_f$ , bajo luz ultravioleta y una solución ácida de molibdato de amonio, como agente revelador, las manchas definidas que presentaron  $R_f$  cercanos fueron tomadas en cuenta, formando seis fracciones, como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Fracciones obtenidas en el subfraccionamiento cromatográfico de la fracción C proveniente del EE.

<b>Fracción</b>	<b>Eluatos</b>	<b>Masa (<math>\pm 0,0001</math> g)</b>
C <sub>1</sub>	1-4	0,1824
C <sub>2</sub>	5-8	0,0383
C <sub>3</sub>	9-12	0,0050
C <sub>4</sub>	13-16	0,0042
C <sub>5</sub>	17-20	0,0051
C <sub>6</sub>	21-24	0,0033

De la cromatografía realizada se obtuvo un rendimiento del 95,66%, en la cual las subfracciones C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> fueron las que presentaron una mejor separación de sus constituyentes ya que mostraron manchas bien definidas en la CCF, con valores de  $R_f$  no

muy cercanos al ser revelados. Por otra parte, el resto de las subfracciones resultaron ser mezclas complejas de muchos compuestos de difícil separación, que se manifestaron como manchas continuas que se extendían a lo largo de toda la placa cromatográfica, razón por la cual fueron descartadas.

#### 4. 5. Cromatografía de la subfracción C<sub>1</sub>

La subfracción C<sub>1</sub> mostró en el análisis de CCF, la presencia de una mancha en forma de estela acompañada por 5 manchas con valores de R<sub>f</sub> iguales a 0,34, 0,38, 0,42, 0,46 y 0,50 respectivamente. En esta observación se evidenció que las franjas podían separarse realizando una cromatografía de capa fina preparativa. Una vez realizada la CCFP se observaron 5 bandas al revelarse con la lámpara UV de onda corta, las cuales fueron separadas y extraídas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Obteniéndose finalmente 5 subfracciones en esta cromatografía (tabla 7).

Tabla 7. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C<sub>1</sub> del EE.

Subfracciones	Masa(± 0,0001 g)
C <sub>1-1</sub>	0,0516
C <sub>1-2</sub>	0,0393
C <sub>1-3</sub>	0,0234
C <sub>1-4</sub>	0,0248
C <sub>1-5</sub>	0,0225

En este fraccionamiento se recuperaron 0,1616 g de la muestra lo que corresponde al 88,59% del rendimiento de la subfracción C<sub>1</sub>. A todas las subfracciones obtenidas se les realizó CCF utilizando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EP en una proporción 1:3, en donde se observó que las muestras no presentaron manchas definidas, sino que estaban formadas por una zona tipo estela seguida de 2 manchas con valores de R<sub>f</sub> muy próximos.

Por otra parte, la subfracción C<sub>1-3</sub> mostró una sola mancha, lográndose purificar la mancha observada en el análisis de CCF de la subfracción C<sub>1</sub>. A la cual, posteriormente,

se le realizó un análisis de RMN- $^1\text{H}$  y DEPT-135 °. Para esto se solubilizó la muestra en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), obteniéndose los siguientes espectros.

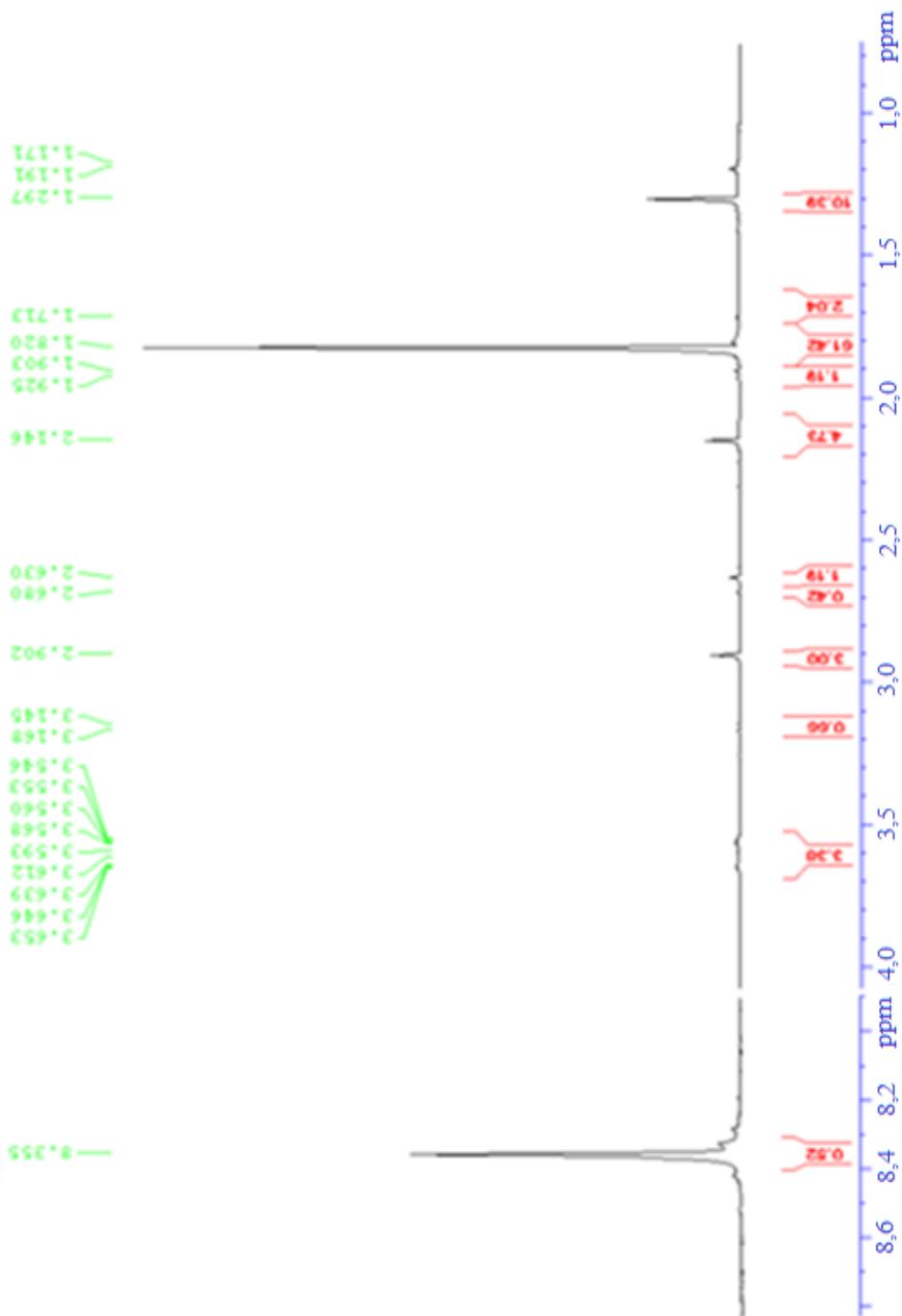


Figura 26. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\text{C}_{1.3}$ .

De acuerdo al espectro RMN-<sup>1</sup>H (figura 26), se puede deducir el tipo de entorno de los protones, atendiendo su desplazamiento químico así como su multiplicidad; a campo bajo 8,35 ppm aproximadamente se observa una señal que corresponde a protones olefínicos, la poca resolución del espectro no permite apreciar la multiplicidad de los picos.

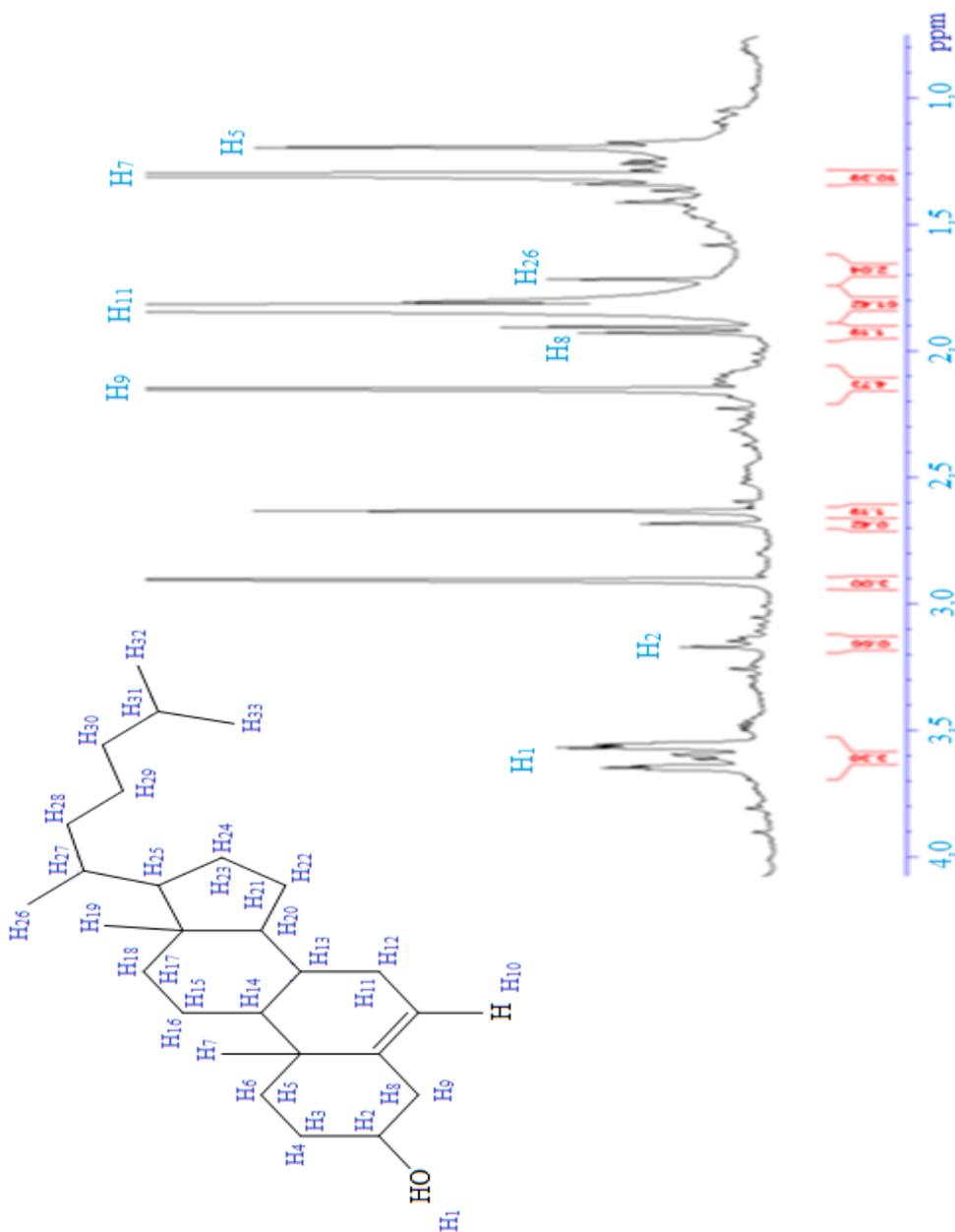


Figura 27. Ampliación de RMN <sup>1</sup>H de la subfracción C<sub>1-3</sub> desde 4,0 a 1,0 ppm.

La ampliación del espectro, en la zona de 1,0 a 4,0 ppm (figura 27) muestra que, desplazándonos hacia campos más altos se aprecia una señal en 1,17 ppm (H<sub>5</sub>) que corresponde a protones metilénicos adyacentes a un carbono enlazado a un grupo metilo. A 1,29 ppm (H<sub>7</sub>) aproximadamente se tiene una señal que es asociada a protones metílicos terminales, los cuales son equivalentes y no tienen protones vecinos. A 1,93 ppm (H<sub>8</sub>) y 2,15 ppm (H<sub>9</sub>) respectivamente, se visualizan unas señales que corresponden a protones metilénicos vecinos a un carbono enlazado a un oxígeno. A 1,82 ppm (H<sub>11</sub>) aparece una señal, que es asignable a protones metilénicos enlazados a un carbono olefínico. En 1,71 ppm (H<sub>26</sub>), se aprecia una señal que es asignable a protones metílicos terminales enlazados a un carbono del tipo metínico. A 3,17 ppm (H<sub>2</sub>) se refleja una señal que es atribuida a protones sobre carbonos enlazados directamente a elementos electronegativos, como el oxígeno. Finalmente, a 3,59 ppm (H<sub>1</sub>) se aprecia una señal, que es asociada a un protón sobre un átomo electronegativo, posiblemente oxígeno, el cual a su vez puede estar formando un enlace con el hidrógeno para formar un alcohol o un grupo hidroxilo, presumiblemente correspondiente al carbono 3 del anillo A. Estos datos se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Principales desplazamientos químicos (ppm) de los diferentes protones de la subfracción C<sub>1-3</sub> y los reportados para el ciclopentanoperhidrofenantreno.

<b>Asignación</b>	<b>δ<sub>H</sub>Teórico</b>	<b>δ<sub>H</sub>Experimental</b>
H <sub>1</sub>	3,58	3,59
H <sub>2</sub>	3,25	3,17
H <sub>5</sub>	1,13	1,17
H <sub>7</sub>	1,30	1,29
H <sub>8</sub>	1,98	1,93
H <sub>9</sub>	2,23	2,15
H <sub>11</sub>	1,79	1,82
H <sub>26</sub>	1,64	1,71

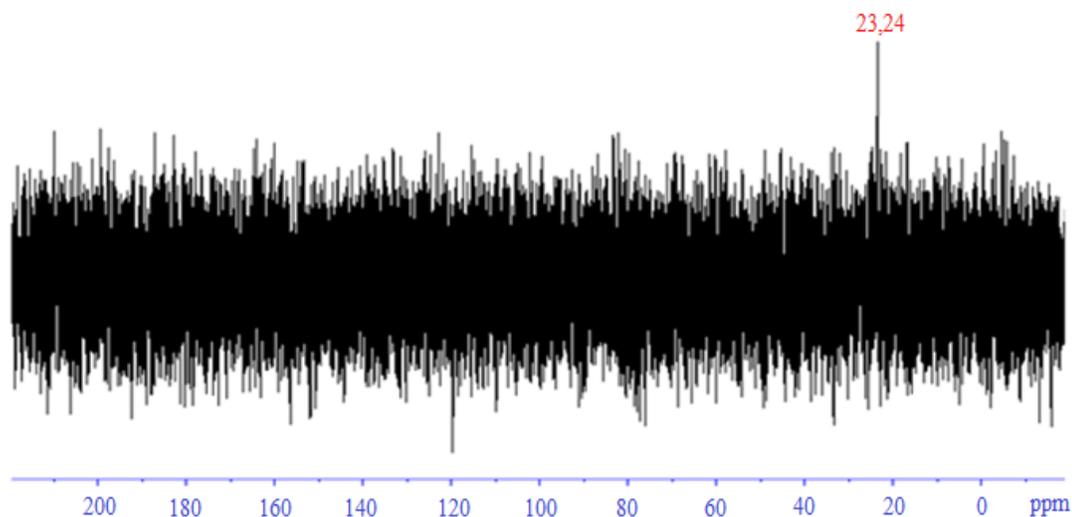


Figura 28. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 ° de la subfracción C<sub>1-3</sub>.

En el espectro de RMN DEPT 135 ° (figura 28), solamente se logró identificar con claridad, un carbono metílico a 23,24 ppm ésta misma señal es asignable al carbono 26, correspondiente a los metilos terminales de la cadena lateral de la estructura. El resto de los carbonos tanto metínicos como metilénicos no lograron apreciarse debido al intenso ruido del equipo.

Basándonos en los desplazamientos químicos, de las señales de protones y la señal de carbono mostrada, se propone una posible estructura para este compuesto, que presenta una base ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 29). Es decir, una base tipo esteroidal, que presenta una estructura rígida, permitiendo asignar las diferentes señales de los desplazamientos químicos; para la confirmación de ésta, se realizó una simulación de RMN  $^1\text{H}$  en el programa Chem Office, donde se logró asociar los diferentes desplazamientos de los protones a una base muy parecida a la mencionada anteriormente, además los desplazamientos fueron comparados, a su vez, con desplazamientos experimentales de diferentes bases esteroidales, ya identificadas y tabuladas mediante RMN  $^1\text{H}$  (NMR analysis Wilson); lo cual nos permite decir que, la

molécula separada en esta fracción, es un esteroide que presenta la misma base esteroidal del ciclopentanoperhidrofenantreno.

De igual manera, la señal asignada al carbono 26, se observa en la zona positiva en el RMN DEPT 135 °, permitiéndonos sugerir, que se encuentra sustituida, por un grupo metilo.

Cabe destacar que los desplazamientos teóricos para esta estructura, concuerdan con los encontrados experimentalmente; lo que nos permite proponer la siguiente estructura:

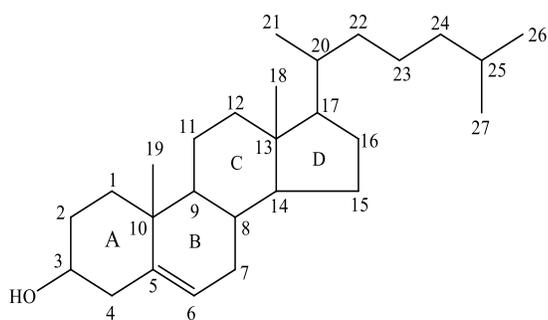


Figura 29. Posible base esteroidal de la subfracción C<sub>1-3</sub>.

A pesar de que en los análisis de RMN se identificaron los desplazamientos químicos de los H presentes en la estructura, no se pudo establecer con exactitud la estructura del compuesto aislado en la subfracción C<sub>1-3</sub>, ya que para su elucidación se requiere CG-EM para obtener mayor información de esta molécula y así, establecer la estructura de este compuesto. Sin embargo, se puede resaltar que esta sustancia posee como esqueleto principal un esteroide.

El esteroide más antiguo es el colesterol. Los esteroides son esteroides con 27 a 29 átomos de carbono, su estructura química deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, una molécula de 17 carbonos formada por 3 anillos hexagonales y uno pentagonal. En los esteroides, se añade una cadena lateral de 8 o más átomos de carbonos en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo (OH) en el carbono 3. Estas sustancias se encuentran

en abundancia en los organismos vivos, sobre todo en animales y en algunas algas rojas. Son solubles en los disolventes orgánicos y poseen un elevado punto de fusión (12).

#### 4. 6. Cromatografía de la subfracción C<sub>2</sub>

La subfracción C<sub>2</sub> presentó en su análisis por CCF, una mancha en forma de estela acompañada por 3 zonas con valores de R<sub>f</sub> iguales a 0,33, 0,36 y 0,39 respectivamente. Esta observación mostró que las manchas podían separarse realizando una cromatografía de capa fina preparativa. Una vez desarrollada la CCFP se visualizó la placa en la lámpara UV de onda corta, y se observaron 3 bandas bien definidas, las cuales fueron separadas y extraídas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En esta cromatografía se obtuvieron 3 nuevas subfracciones (tabla 9).

Tabla 9. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción C<sub>2</sub> del EE.

Subfracciones	Masa ( $\pm 0,0001$ g)
C <sub>2-1</sub>	0,0071
C <sub>2-2</sub>	0,0103
C <sub>2-3</sub>	0,0193

La masa recuperada en esta cromatografía fue de 0,0367 g, lo que representa el 95,82% del rendimiento. El análisis por CCF de la subfracción C<sub>2-1</sub> presentó 2 manchas separadas con R<sub>f</sub> muy cercanos, por su parte, la subfracción C<sub>2-2</sub> mostró 1 mancha continua, es decir una mezcla compleja; mientras que el análisis por CCF de la subfracción C<sub>2-3</sub>, mostró la presencia de una sola mancha bien definida, lográndose purificar la mancha observada en el análisis de CCF de la fracción C<sub>2</sub>. A esta última subfracción se le realizó análisis de RMN-<sup>1</sup>H y DEPT-135 °. Para esto se solubilizó la muestra en agua deuterada (D<sub>2</sub>O), obteniéndose los siguientes espectros.

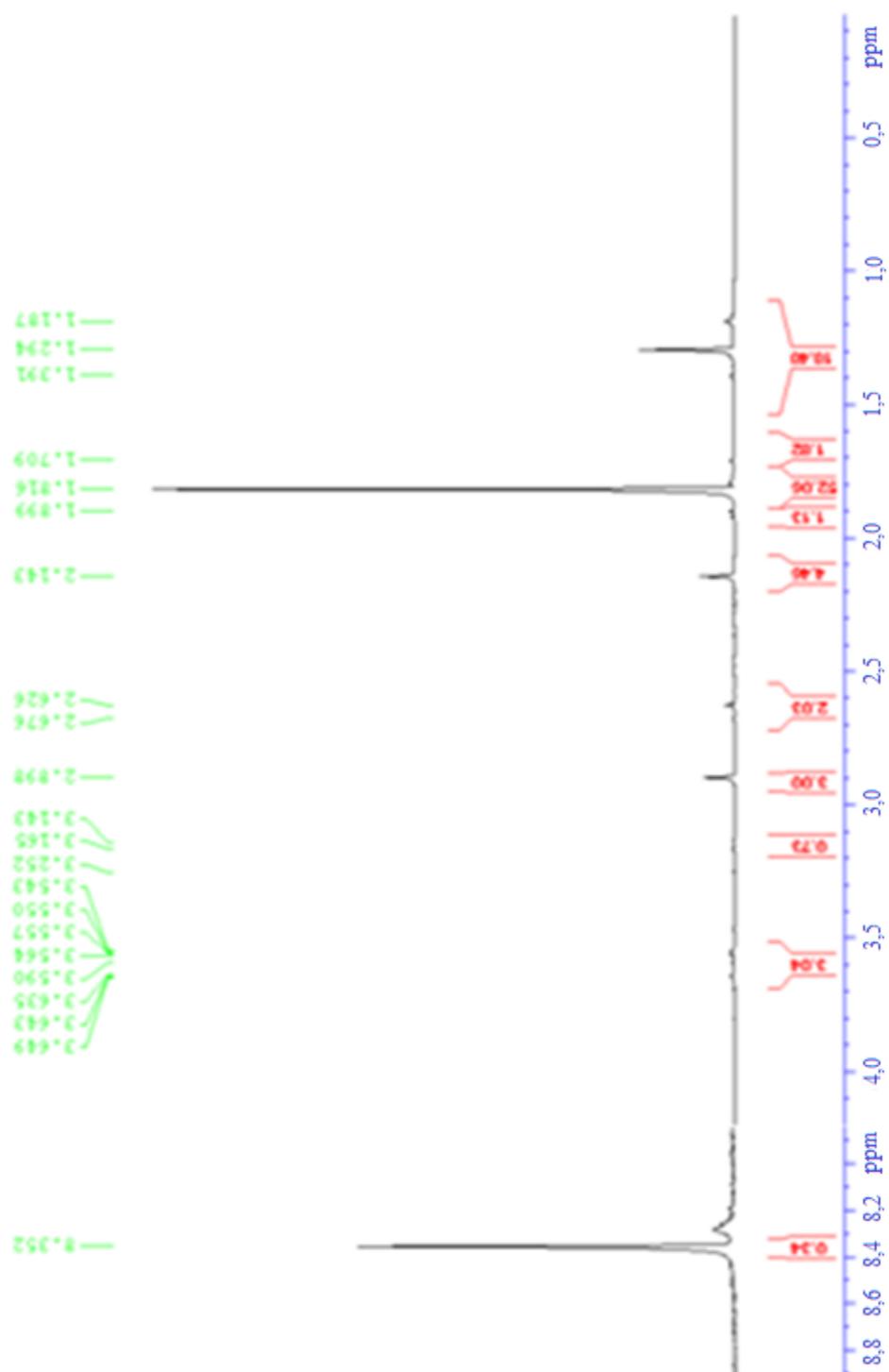


Figura 30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción C<sub>2-3</sub>.

Visualizando el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\text{C}_{2-3}$  (figura 30), encontramos a campo bajo 8,35 ppm aproximadamente una señal que es asociada a protones olefínicos, la multiplicidad de los picos no se aprecian bien por la poca resolución del espectro.

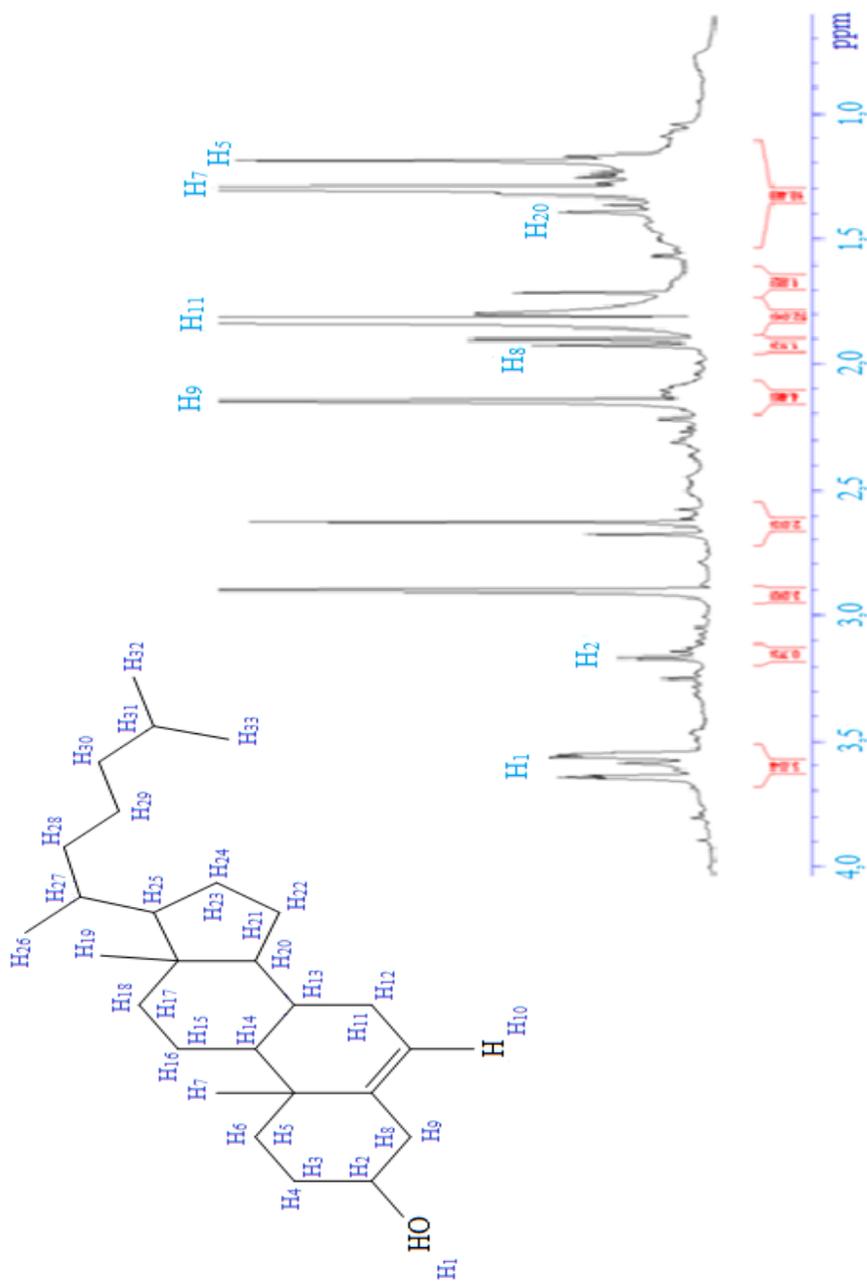


Figura 31. Ampliación de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción  $\text{C}_{2-3}$  desde 4,0 a 1,0 ppm.

Desplazándonos a campos más altos (figura 31), se observó que a 1,18 ppm (H<sub>5</sub>) aproximadamente se tiene una señal que corresponde a protones metilénicos adyacentes a un carbono enlazado a un grupo metilo. A 1,29 ppm (H<sub>7</sub>) se aprecia una señal que es asociada a protones metílicos terminales, los cuales son equivalentes y no tienen protones vecinos. En 1,90 ppm (H<sub>8</sub>) y 2,14 ppm (H<sub>9</sub>) respectivamente, se visualizan unas señales que son asignables a protones metilénicos vecinos a un carbono enlazado a un oxígeno. A 1,81 ppm (H<sub>11</sub>) se refleja una señal, correspondiente a protones metilénicos enlazados a un carbono olefínico. A 1,39 ppm (H<sub>20</sub>) se tiene una señal, asociada a protones metínicos. A 3,25 ppm (H<sub>2</sub>) aproximadamente se observa una señal, que corresponde a protones sobre un carbono enlazado a elementos electronegativos, en este caso un átomo de oxígeno. Finalmente, a 3,59 ppm (H<sub>1</sub>) se aprecia una señal, que es asociada a un protón sobre un átomo electronegativo, posiblemente oxígeno, el cual a su vez puede estar formando un enlace con el hidrógeno para formar un alcohol o un grupo hidroxilo, presumiblemente correspondiente al carbono 3 del anillo A. Estos datos son mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Principales desplazamientos químicos (ppm) de los diferentes protones de la subfracción C<sub>2-3</sub> y los reportados para el ciclopentanoperhidrofenantreno.

<b>Asignación</b>	<b>δ<sub>H</sub> Teórico</b>	<b>δ<sub>H</sub> Experimental</b>
H <sub>1</sub>	3,58	3,59
H <sub>2</sub>	3,25	3,25
H <sub>5</sub>	1,13	1,18
H <sub>7</sub>	1,30	1,29
H <sub>8</sub>	1,98	1,90
H <sub>9</sub>	2,23	2,14
H <sub>11</sub>	1,79	1,81
H <sub>20</sub>	1,40	1,39

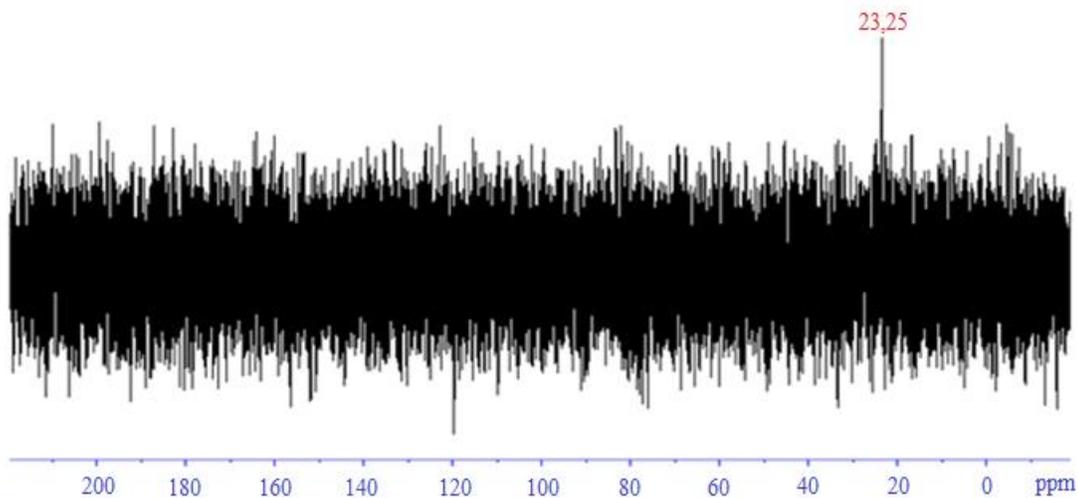


Figura 32. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 ° de la subfracción C<sub>2-3</sub>.

En el espectro de RMN DEPT 135 ° (figura 32), solamente se identificó con claridad, un carbono metílico a 23,25 ppm, esta señal corresponde al carbono 26, que es asociado a metilos terminales de la cadena lateral de la estructura. El resto de los carbonos tanto metínicos como metilénicos no lograron apreciarse debido al intenso ruido del equipo.

Al igual que la subfracción C<sub>1-3</sub>, los desplazamientos coinciden con un esteroide. Para identificar la base se empleó el programa Chem Office, realizando simulaciones de RMN  $^1\text{H}$  de las distintas bases esteroidales, de las cuales se encontró similitud con el esqueleto base del ciclopentanoperhidrofenantreno, además los desplazamientos fueron comparados a su vez con desplazamientos experimentales, de diferentes bases esteroidales, ya identificadas y tabuladas mediante RMN  $^1\text{H}$ , lo cual nos permite decir que, la molécula separada en esta subfracción, es un esteroide tipo esteroide, que presenta la misma base del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 29).

De igual manera, la señal asignada al carbono 26, se observa en la zona positiva en el RMN DEPT 135 °, permitiéndonos sugerir, que se encuentra sustituida, por un grupo metilo.

Los análisis de RMN realizados no permitieron determinar con exactitud la estructura del esteroide presente en la subfracción C<sub>2-3</sub>, ya que es necesario realizarle análisis de CG-EM para obtener más información acerca de la disposición de los diversos átomos presentes en esta sustancia; sin embargo, se pudo establecer que este metabolito posee un esqueleto esteroide.

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas esteroideas) como ésteres o como glicósidos. En los animales superiores (incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (hormonas, ácidos biliares, vitamina D, entre otros) (12).

El parecido de los fitosteroides con el colesterol permite a los esteroides engañar al organismo, permitiendo así limitar el paso del colesterol del intestino hacia la sangre. En el intestino delgado, el colesterol y los esteroides compiten por la absorción del colesterol por el organismo. Además de las funciones biológicas que cumplen los esteroides, se ha encontrado que estos pueden ser empleados en las síntesis de esteroides (12).

## **5. ANÁLISIS DEL EXTRACTO EN ÉTER DE PETRÓLEO**

A pesar de que este extracto no manifestó ningún resultado positivo ante las pruebas de actividad biológica, ni presentó una suficiente cantidad de muestra para realizar fraccionamientos cromatográficos, era una mezcla muy compleja, evidenciándose en los resultados obtenidos de CCF, lo cual se aprecia por manchas con R<sub>f</sub> muy cercanos a lo largo de su desplazamiento. El extracto era de aspecto aceitoso y con un color amarillo pálido, indicando la presencia de grupos cromóforos, que son capaces de absorber energía en el rango de UV-Visible. Por tales motivos se tomó como un candidato para analizar mediante IR-TF, con el objetivo de identificar los grupos funcionales principales, presentes en este extracto, y establecer correspondencia entre estos grupos y las familias de metabolitos evidenciadas previamente.

## 5.1. Espectro de infrarrojo (IR)

El espectro de IR del EEP (figura 33) presenta señales intensas entre  $2923,76\text{ cm}^{-1}$  y  $2851,24\text{ cm}^{-1}$ , asignables al estiramiento de enlaces C-H  $sp^3$  (alcano) y  $sp^2$  (alqueno), y sus correspondientes sobretonos a  $1465,96\text{ cm}^{-1}$  y  $1377,77\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. También se aprecia una señal intensa a  $1737,85\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo carbonilo (C=O).

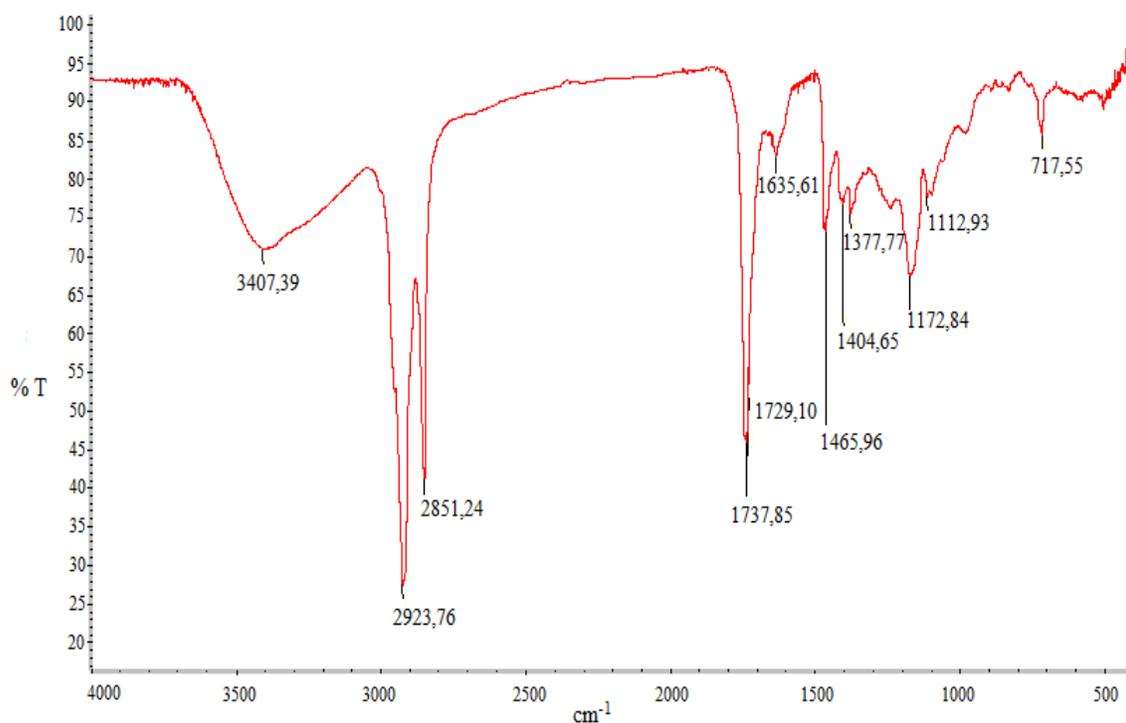


Figura 33. Espectro de infrarrojo del EEP.

Por otro lado, la señal ancha alrededor de  $3407,39\text{ cm}^{-1}$  podría indicar la presencia de un grupo N-H, lo cual es lógico si tomamos en cuenta que se obtuvo resultado positivo para alcaloides, quienes tienen el grupo N-H en su estructura, pero se descarta con la ausencia de señales intensas C-N  $sp^3$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , C-N  $sp^2$  a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y  $sp^3$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, esta misma zona ( $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde al grupo O-H alcohólico o fenólico, confirmando el resultado positivo obtenido para taninos u otra sustancia que

contenga O-H en su estructura. De igual forma, se visualizan dos señales a  $1172,84\text{ cm}^{-1}$  y  $1112,93\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al alargamiento C-O. La señal de absorción a  $717,55\text{ cm}^{-1}$  se debe a la deformación de los enlaces C-H de grupos metilenos continuos,  $(\text{CH}_2)_n$  ( $n > 4$ ). De acuerdo con el análisis del espectro de infrarrojo, este extracto también puede estar constituido por compuestos hidroxilados.

La mayor parte de la información obtenida en este análisis espectroscópico confirma los resultados obtenidos en el análisis químico preliminar. Sin embargo, debido al bajo rendimiento, no se pudo obtener los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y CG-EM que permitiera proponer una estructura para este compuesto.

## CONCLUSIONES

Los análisis químicos preliminares realizados a cada extracto proveniente de la culebra ciega *Anguis fragilis* evidenciaron la posible presencia de metabolitos secundarios, como alcaloides, cumarinas, taninos, glicósidos cardiotónicos y flavonoides.

Las pruebas de letalidad realizadas frente a *Artemia salina*, mostraron que ni los extractos ni las fracciones son letales. Los hongos empleados para la investigación no presentaron sensibilidad frente a los extractos ni a las fracciones.

Las bacterias Gram negativas *S. typhimurium* y *E. coli*, así como las Gram positivas: *E. faecalis*, *B. subtilis*, y *B. cereus* mostraron sensibilidad ante la fracción C del EE.

Se identificaron mediante CG-EM, en el EE, compuestos mayoritarios como hexadecanoato de etilo, octadecanoato de etilo, ácido linoleico y el colestano-5-en-3-ol.

Los análisis de los datos obtenidos por RMN  $^1\text{H}$  y DEPT-135°, de las subfracciones C<sub>1-3</sub> y C<sub>2-3</sub> provenientes del EE, permitieron identificar estructuras esteroidales.

El fraccionamiento cromatográfico permitió aislar esteroides, estableciéndose estructuras base mediante análisis de resonancia magnética nuclear.

La culebra ciega *A. fragilis* es capaz de sintetizar compuestos bioactivos, los cuales le confieren propiedades antibacterianas.

Esta investigación es el primer aporte al conocimiento de la bioactividad y composición química de la especie *A. fragilis* proveniente del oriente venezolano.

## **RECOMENDACIONES**

Utilizando esta investigación como base, y para futuras investigaciones, se recomienda profundizar más en la caracterización de los esteroides que mostraron actividad biológica; así como, realizar un estudio más extenso de los esteroides presentes en *A. fragilis*. Adicionalmente, se recomienda realizar otras pruebas de actividad biológica para ampliar el rango de acción de estos metabolitos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez, J. 2003. Productos naturales de origen marino, una perspectiva en la búsqueda de nuevos fármacos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2: 5-13.
2. Jaspars, M. y Houssen, W. 2006. Isolation of marine natural products. In: *Natural Products Isolation*. Sarker, S.; Latif, Z. y Gray, A. (eds) 2006. Segunda edición. Editorial Humana Press Inc. New Jersey.
3. Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 74(1): 151-170.
4. Avedaño, M. 2010. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión en conjunto.  
<<http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1150/1196>>  
(23/07/2011).
5. De la Calle, F. 2007. Fármacos de origen marino. *Treballas de la SCB*, 58: 141-155.
6. González, A.; Presa, M.; y Latorre, M. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad toxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 59-61.
7. Karp, G. 1998. *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana Editores. Pág. 805.
8. Lee, K. 2010. Discovery and development of natural derived Chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *Journal Natural Products*, 73: 500-516.
9. Csere, L.; Kirakosyan, A.; Kaufman, S.; Duke, J. y Brielman, H. 2006. *Natural Products from Plants*. Segunda edición. Tailor y Francis Group. Boca Ratón.
10. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. UCV. Litopar. Caracas.
11. Ávalos, A. y Pérez, E. 2009. Metabolitos secundarios de plantas. *Reduca*, 2(3): 119-145.
12. Martínez, A. 2002. *Esteroles*. Universidad de Antioquia. Medellín.
13. Rabal, G. 2006. Creencias medicinales relacionadas con el mundo animal en el campo de Cartagena. *Revista Murciana de Antropología*, 13: 113-129.

14. Flores, O. y García, U. 2013. Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 1-73.
15. Hernández, V. 2002. *El monstruo de Gila*. Red Escolar. México.
16. Campoamor, F. 2009. Informe de evaluación: Exenatida en diabetes tipo II. Consultado el 15-04-15.
17. Instituto de Salud para Usted (ISPU). 2012. *El Captopril*. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU.
18. Warrell, D. 2004. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. Vol. I. p. 709-761. In: Campbell J, Lamar W, editors. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca, USA: Cornell University Press.
19. Gopalakrishnakone, P.; Gutierrez, J.; Harrison, R.; Warrell, D.; White, J.; Williams, D. y Winkel, K. 2010. Global Snake Bite Initiative Working Group; International Society on Toxinology. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*, 375(9708): 89-91.
20. González, H. 2004. *Anguis fragilis*. Miembro del seminario de Estudio Iconográficos. Universidad Complutense de Madrid.
21. Salvador, A. 1998. *Anguis fragilis* (Linneo, 1788). In: Salvador, A. (coord). *Fauna Ibérica*, Vol. 10. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, Madrid.
22. Czczuga, B. 2014. Carotenoids in some parts of certain species of lizards. American Chemical Society (ACS). *Biochemistry & Molecular Biology*, 65B (4): 755-7.
23. Murillo, E. y Méndez, J. 2007. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios*. Departamento de Química Facultad de Ciencias. Universidad de Tolima. Colombia.
24. Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa, México.
25. Wade, L. 2004. *Química orgánica*. Pearson Educación, S. A. Madrid.
26. Skoog, D.; Holler, J. y Nieman, T. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición. McGraw-Hill. Madrid.
27. Gauglitz, G. y Vo-Dinh, T. 1988. *Handbook of spectroscopy*. WILEY-VCH, Weinheim.

28. Byrne, L. 1993. Nuclear magnetic resonance spectroscopy strategies for structural determination. *Bioactive Natural Product*. 75-104.
29. Pine, S.; Hendrickson, J; Cram, D. y Hammond, G. 1998. *Química Orgánica*. Segunda edición. McGraw-Hill. México.
30. Bloor, S. y Lawrence, J. 1993. Mass spectrometry. *Bioactive Natural Product*. 105-123.
31. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putman, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y McLaughling, J. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Medica*, 45 (1): 31-34.
32. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*, 33 (3): 232-247.
33. Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk, M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol.*, 45 (4): 493-496.
34. Moreno, S. 2016. Composición y actividad biológica de los extractos de *Ulomoides dermestoides* (Tenebrionidae) procesados bajo diferentes condiciones. Trabajo para ascender a la categoría de asociado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
35. Meléndez, A. y Heredia, F. 2007. Pigmentos carotenoides: Consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57 (2): 175-191.
36. Carranco, M.; Calvo, M. y Pérez, F. 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 61 (3): 231-235.
37. Ganoza, M. 2000. Fundamentación química de las reacciones de coloración y precipitación en la identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
38. Villar Del Fresno, A. 1999. *Farmacognosia general*. Síntesis. España. Págs.136-267.
39. Enríquez, A.; Prieto, E.; De los Ríos, E. y Ruiz, S. 2008. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo-Región Junín. Perú. *Revista Medica Vallejana*, 5(1): 50-64.
40. Casamayor, E. 2007. Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección *Plinthine* del género *Arenaria* (*Caryophyllaceae*). Tesis doctoral. Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

41. Barboza, V.; Frollini, E.; Ramirez, E. y Tanaka, I. (2010). Biobased composites form tannin-phenolic polymers reinforced with fibers. *Industrial Crops and Products*, 32: 305-312.
42. Clark, J.; Blanco, E. y Sánchez, M. 2007. Análisis del potencial del género *Aspergillus* en la síntesis y transformación de flavonoides. Congreso Regional de la Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Págs. 1-4.
43. Takechi, M.; Uno, C. y Tanaka, Y. 1995. Structure-activity relationships of synthetic cardiac glycosides. *Phytochemistry*, 41 (1): 125-127.
44. Pérez, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22 (1): 34-43.
45. Juárez, M. 1996. *Evaluación Citotóxica de Diez Extractos de Plantas en Larvas de Artemia salina*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC, Guatemala. Pág. 47.
46. Harbone, J. 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman y Hall Ltd. London.
47. Strainer, R.; Ingraham, J. y Adelberg, E. 1984. *Microbiología*. Reverte. Barcelona, España.
48. Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 2003. Brock Biología de los microorganismos. Editorial Pearson Prentice-Hall. Madrid, España. Pág. 986.
49. Bailey, P. y Bailey C. 1998. *Química Orgánica: conceptos y aplicaciones*. Quinta edición. Prentice Hall. México.
50. Waksman, S.; Schatz, A. y Bugle, E. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 55: 66-69.
51. Moreno, S. 2003. *Aislamiento Biodirigido y Caracterización de Metabolitos Secundarios de Cocoloba uvifera Jacq.* Trabajo de Grado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
52. De Rosa, S.; Kamenarska, Z.; Stefanov, K.; Dimitrova, S.; Najdenski, C.; Tzvetkova, I.; Ninova, V. y Popov, S. 2003. Chemical composition of *Corallina mediterranea* Areschoug and *Corallina granifera* Ell Et Soland. *Z. Naturforsch*, 58 (c): 325-332.
53. Zheng, C.; Jung-Sung, Y.; Tae-Gyu, L.; Hee-Young, C.; Young-Ho, K. y Won-Gon, K. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *Federation of European Biochemical Societies*, 579: 5157-5162.

54. Castillo, D.; Lanza, J y Crescente, O. 2010. Identificación preliminar de algunos constituyentes del tallo de *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae) y actividad biológica. *Avances en Química*, 5 (1): 57-61.
55. Goecke, F.; Hernández, V.; Bittner, M.; González, M.; Becerra, J. y Silva, M. 2010. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (2): 325-330.
56. Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V. y Hsu, M. 2007. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal Microbiology*, 38: 739-742.
57. Manilal, A.; Sujith, S.; SeghalKiran, G.; Selvin, J. y Shakir, C. 2009. Biopotentials of mangroves collected from the southwest coast of India. *Global Journal of Biotechnology y Biochemistry*, 4 (1): 59-65.
58. Lezcano, I.; Molerio, J.; Gómez, M.; Contreras, R.; Roura, G. y Díaz, W. 1995. Actividad *invitro* del OLEOZON frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 29: 209.
59. Rilling, C. y Chayet, T. 1985. Biosynthesis of cholesterol. En: *Sterols and Bile Acids*. Danielsson, H y Sjoval, J. (eds). Elsevier. Págs. 1-40.
60. Marwaha, K.; Tandon, N. y Reddy D. 2005. *Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India*, 82: 477-82.

## HOJAS DE METADATOS

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

<b>Título</b>	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA CULEBRA CIEGA ( <i>Anguis fragilis</i> ) Y SU POSIBLE BIOACTIVIDAD
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
NÚÑEZ MARCHAN JUSMERLIN DEL VALLE	CVLAC	20 065 937
	e-mail	<a href="mailto:Jusmenm@hotmail.com">Jusmenm@hotmail.com</a>
	e-mail	<a href="mailto:Jusmerlin201510@hotmail.com">Jusmerlin201510@hotmail.com</a>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

### Palabras o frases claves:

<b>Metabolitos secundarios</b>
<b>Bioactividad</b>
<i>Anguis fragilis</i>

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química de productos naturales

### Resumen (abstract):

Un ejemplar de *A. fragilis* de 98,2 g fue recolectado en El Tigrito, sector Barrio Sur, municipio San José de Guanipa, estado Anzoátegui. Este ejemplar se extrajo, durante 3 semanas hasta agotamiento con etanol y luego con éter de petróleo. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida obteniendo 3,65 g de extracto etanólico (EE) y 0,03 g de extracto en éter de petróleo (EEP), con un rendimiento en masa de 3,72% y 0,03%, respectivamente. A cada extracto se le realizó un análisis por IR-TF, ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica, y letalidad contra crustáceos de *Artemia salina*; además, se realizaron pruebas químicas preliminares, donde se detectó la posible presencia de cumarinas, alcaloides, taninos, y glicósidos cardiotónicos para el EE; adicionalmente, en el EEP fue detectado la posible presencia de taninos, cumarinas, flavonoides, y alcaloides. En ambos extractos, se confirmaron por IR-TF los grupos funcionales, asignables a las familias de compuestos identificados previamente. El EE (el de mayor masa) fue fraccionado mediante columna cromatográfica, obteniendo 10 fracciones (A-J). Ninguno de los extractos, ni las fracciones del EE, mostraron actividad letal frente a *A. salina*. Para las pruebas antibacterianas se emplearon las cepas *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* y *Bacillus subtilis*, ninguna de ellas mostrósensibilidad ante los dos extractos. Con respecto a las fracciones, sólo la fracción C mostró actividad contra la mayoría de las bacterias ensayadas, con halos de inhibición entre 12 mm y 14 mm. En la evaluación de actividad antifúngica (*Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*) tampoco se evidenció sensibilidad de los organismos, frente a los extractos ni a las fracciones. A la fracción C se le realizó el análisis de IR-TF, observando que conserva los mismos grupos funcionales presentes en el extracto de origen. El EE se analizó mediante CG-EM y se identificaron el hexadecanoato de etilo, el ácido linoleico, el octadecanoato de etilo, y el colestano-5-en-3-ol. Además, se logró realizar la caracterización parcial de dos compuestos esteroideos, los cuales presentan una base estructural de ciclopentanoperhidrofenantreno.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Moreno Shailili	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLC	14 285 141
	e-mail	<u>shaililico@yahoo.com</u>
	e-mail	
Crescente Oscar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLC	2 740 590
	e-mail	<u>ocrescente@yahoo.com</u>
	e-mail	
Fariñas Milagros	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLC	8 440 052
	e-mail	milyfari2006@ <u>gmail.com</u>
	e-mail	
Hernández José Vicente		CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLC	4 815 811
	e-mail	jnandezusb@ <u>gmail.com</u>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

**Año Mes Día**

2017	11	10
------	----	----

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
Tesis JNuñez.doc	Application/Word

**Alcance:**

**Espacial:** \_\_\_\_\_ Internacional **(Opcional)**

**Temporal:** \_\_\_\_\_ Temporal **(Opcional)**

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciado en Química

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciatura

**Área de Estudio:** Química

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:** Universidad de Oriente

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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



hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*Juan A. Bolaños Cunele*  
JUAN A. BOLAÑOS CUNELE  
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 Telemática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

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

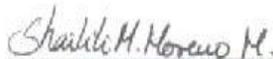
**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo Previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



---

**Br. Jusmerlin Núñez**

**Autor**



---

**Dra. Shailili Moreno**

**Asesor**