

Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. Parte II

Máryury Flores¹, Haydelba D'Armas^{1*} y Hernando Herrera²

¹ Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre-Venezuela. ²Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Recibido: 30-01-06 Aceptado: 21-04-07

Resumen

Se realizó un análisis de bioactividad, a los extractos en metanol, diclorometano y hexano, de las hojas de la planta *Chromolaena laevigata*, basándose en ensayos de actividad antibacteriana. Todos los extractos inhibieron el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Bacillus cereus* (ATCC 9634), por el contrario, no presentaron actividad frente a las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9920) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 10031). El extracto en diclorometano fue separado por cromatografía en columna obteniéndose diez fracciones. Después de sucesivas columnas cromatográficas, dos subfracciones fueron caracterizadas por CG/EM, evaluándose su actividad antibacteriana. Se identificaron los compuestos 1-metoxi-2,4,8-nonatrieno, 3-(3-propenil-5-propil) ciclohexilpropanoato de metilo. El extracto de hexano fue fraccionado por cromatografía de columna, obteniéndose ocho fracciones. Dos subfracciones fueron caracterizadas mediante el uso de CG/EM, identificándose la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanoico, y los ésteres metílicos de los ácidos hexadecanoico, octadecanoico, eicosanoico, docosanoico y heptadecanoico.

Palabras clave: Actividad biológica; *chromolaena laevigata*; CG/EM.

Identification of some chemical constituents from the *Chromolaena laevigata* leaves by gas chromatography-mass spectrometric. Part II

Abstract

The methanol, dichloromethane and hexane extracts of *Chromolaena laevigata* leaves were evaluated for their antibacterial properties. The bioassays revealed that all the extracts inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634), otherwise, they did not showed activity against *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9920) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 10031) bacteria. The dichloromethane extract was separated by column chromatography affording ten fractions. After successive column chromatography, two sub fractions were evaluated for its antibacterial property, which were analyzed by GC/MS. The compounds 1-methoxy-2.4.8-nonatriene, 3-(3-propenil-5-propil) methyl cyclohexyl-

* Autor para la correspondencia. E-mail: haydelba@sucre.udo.edu.ve

propanoate were identified. The hexane extract was fractionated by column chromatography, being obtained eight fractions. Two sub fractions were analyzed by GC/MS and identified the following components: 6.10.14-trimethyl-2-pentadecanone, methyl hexadecanoate, methyl octadecanoate, methyl eicosanoate, methyl docosanoate and methyl heptadecanoate.

Key words: Biological activity; *Chromolaena laevigata*; GC/MS.

Introducción

El reino vegetal constituye una de las principales fuentes potenciales de compuestos útiles, que son de importante utilidad debido a que algunas de ellas pueden emplearse como medicamento (1, 2). Con el interés que ha despertado la medicina "naturista", a diario crece el número de escritos que ilustran el uso de diversas plantas para el tratamiento de ciertas afecciones. Paralelamente, con el desarrollo de la química orgánica, se ha evolucionado hacia el estudio científico de los componentes y los efectos de algunas plantas que, tradicionalmente, muestran actividades biológicas interesantes (3, 4). El empleo de ciertas plantas, con fines terapéuticos específicos, indica que éstas poseen compuestos con propiedades curativas de gran importancia, entre éstas se puede citar las plantas pertenecientes a la gran familia botánica Asteraceae (anteriormente denominada *Compositae*), siendo ésta una de las más distribuidas en el mundo aunque su mayor diversidad se encuentra en el continente americano (5), caracterizada por su diversidad de tipos de plantas con flor, con cerca de 20 000 especies, como los crisantemos, las dalias y las margaritas, algunas plantas de esta familia tienen gran importancia económica, ya que son utilizadas con fines ornamentales y medicinales, gracias a sus propiedades curativas, algunas de ellas son la camomila (*Santolina chamaecyparissus*), te de roca (*Jasonia glutinosa*), aliento de toro y espina de pez (*Achillea ageratum* y *Achillea millefolium*), hierba de renegado (*Othanthus maritimus*), donceles (especies de *Artemisia*), caléndula (*Calendula officinalis*) (6), así como también en el caso del género *Chromolaena* siendo esta muy conocida en el mundo fitoquímico por producir lactonas sesquiterpé-

nicas, flavonoides, compuestos glicosidados, entre otros. Además, han sido reportados compuestos con actividad biológica, lo que aumenta el gran interés de su estudio (7). Una de las especies de la cual se tiene poca información, es *Chromolaena laevigata*, conocida como mora dulce, azotacaballo, camará o camará, sanalotodo, salvia y doctorcito. La misma es utilizada en la medicina naturista para aliviar ciertos males y dolencias, desinflamar hinchazones, tumores, dolor de muelas, enfermedades intestinales, antigripal, rasquiña y para combatir la lepra. La parte de la planta utilizada en la medicina popular son las hojas, que bien pueden prepararse en alcohol o cociéndolas en agua (8, 9). Los estudios químicos a esta planta han arrojado como resultado la identificación de algunas clases de metabolitos, tales como la 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, un ácido diterpénico de la serie clerodanos, parcialmente identificado (8), laevigatin, el cual es un furano sesquiterpenoide ópticamente activo que se obtuvo del aceite esencial de la misma (10). Posteriormente estudios realizados permitieron aislar cuatro nuevos compuestos derivados de chromolaenin (laevigatin); dehidrochromolaenin ácido 7,7-dihidroxicalamendodecanoico lactona, ácido 7-hidroxi-7-metoxicalamendodecanoico lactona y tetrahydrochromolaenin; cuatro derivados tipo clerodano: ácido 6a-isobutirilo-xi-7 β -acetoxi-13-Z-kolavénico, ácido 6a-angeliloxi-7 β -acetoxi-13-Z-kolavénico, ácido 6a-7 β -diacetoxi-13-Z-kolavénico, ácido 6a-isobutiriloxi-7 β -angeliloxi-13,14-dihidro-kolavénico, un nuevo tipo de norsesquiterpeno; chromolaevanadiona, como también dos sesquiterpenos con un nuevo esqueleto carbonado; 10-oxo-isodaue-3-en-15-al y 10a-hidroxiisodaue-3-en-15-al (9).

Los análisis biológicos han demostrado que el extracto en diclorometano de *C. laevigata*, presenta actividad citotóxica y antifúngica, frente al hongo *Mucor miehei* y actividad antibacteriana frente a *Bacillus brevis*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (8). Esto evidencia que dicha planta posee actividad biológica de interés farmacológico, lo cual hace interesante la realización de un estudio químico para poder aislar, en lo posible, el o los metabolitos responsables de la actividad atribuida a sus usos en la medicina popular.

Materiales y Métodos

Recolección de la especie de interés

Los ejemplares de *Chromolaena laevigata* fueron recolectados al azar y en forma discriminada en la localidad de Caripe, estado Monagas, sector La Brisa, e identificados en el herbario del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente. Una vez deshidratada la muestra, mediante el secado al aire libre, se procedió a estudiar las hojas.

Obtención de los extractos

Las hojas de la planta fueron molidas en un molino eléctrico para, posteriormente, ser extraídas con metanol. Una vez evaporado el solvente, bajo presión reducida, se obtuvo el extracto crudo en metanol, al cual, se le añadió una mezcla metanol:agua al 90-10%, se calentó ligeramente, y luego fue extraído, sucesivamente, con hexano y diclorometano. Tanto al extracto crudo como a las fracciones solubles en los dos distintos solventes, se les realizaron las pruebas de actividad biológica.

Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana

La presencia de principios antibacterianos se detectó utilizando bacterias certificadas, pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) existentes en

el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Esta prueba se realizó siguiendo la técnica de difusión en agar o método de antibiograma (11). Ésta consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N 3 de 10 mm de diámetro con 25 μ L de la muestra para los extractos crudos y 5 mm de diámetro con 25 μ L para las fracciones. Luego, estos discos fueron colocados dentro de cápsulas de Petri que contenían agar Muller Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana estandarizada, de concentración conocida 1×10^8 bacterias/mL, por comparación con un patrón McFarlan 0,5. Seguidamente, las cápsulas se preincubaron a unos 5°C durante 12 horas, para permitir una mayor difusión del extracto, luego se incubaron por 24 horas a 37°C en una estufa, para así permitir el crecimiento de la bacteria. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco es el indicativo de la actividad del extracto o fracción, la cual se midió tomando en cuenta el diámetro (mm).

Fraccionamiento de los extractos

Extracto en diclorometano

Fueron fraccionados 3900 mg del extracto en diclorometano de las hojas de *C. laevigata* sobre sílica gel 0,063-0,200 mm en una columna (1,50 cm x 70 cm). La cromatografía se inició con diclorometano como eluyente aumentando la polaridad utilizando mezclas de diclorometano-acetona finalizando con metanol al 100%. Se obtuvieron ciento treinta y siete eluatos contentivos de 50 mL cada uno, agrupados en once fracciones tomando en cuenta los valores de R_f observados en la cromatografía en capa fina. Como agente revelador, se utilizó una solución de molibdato de amonio al 5% en H_2SO_4 al 10%.

Se obtuvo una masa total de 2163,80 mg, que representó el 55,48% del material cromatográfico. A cada una de las fracciones obtenidas, se le realizó cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio o alu-

minio (20x20 cm²) recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm; éstas fueron eluidas con diferentes mezclas de solventes. Como agente revelador se utilizó una solución de molibdato de amonio al 5% en H₂SO₄ al 10%, y se estudiaron aquellas fracciones que presentaron separación definida de sus componentes.

Extracto en hexano

Una fracción (3500 mg) del extracto en hexano de las hojas de *C. laevigata*, fue cromatografiada sobre una columna (1,5 cm x 70 cm) con sílica gel 0,2-0,5 mm. La cromatografía se inició con hexano como eluyente y, luego, se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo de distintas polaridades, CHCl₃ al 100%, CHCl₃-acetato de etilo al 50-50%, acetato de etilo al 100%, acetato de etilo-EtOH al 80-20%, EtOH al 100%, finalizando con metanol al 100%. Se obtuvieron cincuenta y nueve eluatos contentivos de 50 mL cada uno, los cuales fueron agrupados en ocho fracciones tomando en cuenta los valores de R_f observados en la cromatografía en capa fina, revelados con molibdato de amonio al 5% en H₂SO₄ al 10%. Se obtuvo una masa total de 753,6 mg, que representó el 21,53% del material cromatográfico. El criterio de selección, aplicado a las fracciones obtenidas, fue realizado tomando en cuenta el resultado de la cromatografía en capa fina, con distintas mezclas de solventes, así como de la masa obtenida.

Técnica de identificación

La identificación de las estructuras de los metabolitos secundarios se realizó utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplado con un espectrómetro de masas (CG/EM). Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard (HP), modelo 5970; serie 2, equipado con una columna de 25 m x 0,2 mm x 0,1 µm de espesor utilizando helio (He) como gas de arrastre con una presión de 68,918 Pa a una velocidad de 1 mL por minuto. La temperatura inicial (T_i) del horno fue de 70°C con una rampa de 6°C por minuto hasta llegar a

300°C (T_f). El cromatógrafo de gases está acoplado con un espectrómetro de masas marca Hewlett-Packard (HP) modelo 5971A. La muestra fue fragmentada por impacto electrónico con una potencia de 70 ev. La identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con una librería Wiley 138 L.

Resultados y Discusión

Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos demostraron que los extractos en estudio inhiben el crecimiento de las cepas *B. cereus* y *S. aureus*, siendo el extracto en metanol quien exhibió la mejor actividad frente a *S. aureus*. Estos extractos, además de mostrar actividad bactericida (muerte de la bacteria), presentaron actividad bacteriostática (disminución de la tasa de crecimiento de la bacteria), lo que puede atribuirse a diversos factores, tales como la presencia de más de un compuesto activo, la concentración a la cual se encuentra presente la sustancia, las diferencias entre las masas molares de cada sustancia, así como también del tipo de microorganismo sobre el cual esté actuando la sustancia (Tabla 1).

Extracto en diclorometano

Obtención del 2-(metoxicarbonilmetileno) benzoato de etilo y el 1-metoxi-2,4,8-nonatrieno

La subfracción D₁ (94,50 mg) fue separada mediante la técnica de cromatografía en columna por gravedad sobre 5,0 g de sílica gel 0,063-0,200 mm, utilizando para esto una bureta de 10 mL de capacidad como columna. Se comenzó eluyendo con éter de petróleo (35-60°C), seguidamente, con mezclas de éter de petróleo (35-60°C)-CHCl₃, con aumentos sucesivos de concentración de CHCl₃, luego una mezcla de CHCl₃-MeOH al 50-50% y, finalmente, MeOH al 100%. Treinta eluatos contentivos de 20 mL cada uno, fueron recolectados y agrupados en

Tabla 1
Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Chromolaena laevigata*.

D.H.I	Origen (ATCC)	Coloración de Gram	ExM	ExD	ExH
Bacterias					
<i>Escherichia coli</i>	10536	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9920	-	-	-	-
<i>Salmonella tiphymurium</i>	10031	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	20*	12/21*	12/18*
<i>Bacillus cereus</i>	9634	+	16	18	12

D.H.I: Diámetro del halo de inhibición (mm). (*): Halo bacteriostático.
Disco: 10 mm. (-): Inactivo. Concentración: 40 mg/mL.

nueve fracciones según los resultados de la cromatografía en capa fina realizada. Se obtuvo una masa total de 90,60 mg, que representó el 95,87% del material cromatográfico. La subfracción D_{1.8} fue seleccionada por presentar mejor separación de sus componentes, según la cromatografía en capa fina, así como por poseer mayor masa. El resto de las fracciones resultó ser mezclas de compuestos con R_f muy cercanos, por lo cual fue difícil su separación y no fueron cabalmente estudiadas. La fracción seleccionada, fue separada mediante la técnica de cromatografía en columna, sobre 2040 mg de sílica gel 0,063-0,200 mm, utilizando una bureta de 10 mL de capacidad como columna. La cromatografía fue iniciada con una mezcla de hexano-diclorometano al 30-70%, con aumento en polaridad hasta metanol (MeOH) al 100%. Se recolectaron dieciséis eluatos contentivos de 10 mL cada uno que, posteriormente, fueron agrupados según sus valores de R_f.

Se obtuvo una masa total de 37,20 mg, que representó el 91,18% de material cromatográfico. Según lo evidenciado en la cromatografía en capa fina, todas las fracciones resultaron ser mezclas complejas; sin embargo, a pesar de lo expuesto, la fracción D_{1.83} fue seleccionada, para analizarse, por encontrarse en mayor proporción. A ésta se le evaluó la actividad antibacteriana contra

las cepas utilizadas. Sin embargo, este análisis resultó negativo para cada una de las bacterias. Posteriormente, se analizó cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas (CG/EM) con el propósito de detectar los posibles compuestos presentes. En la Figura 1, se muestra el cromatograma obtenido.

El espectro de masas del compuesto mayoritario de esta mezcla (TR= 15,36 min), desplegó un ión molecular a m/z 222, el cual corresponde a la fórmula molecular C₁₂H₁₄O₄ (calculado 222,2416 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 222 [M⁺], 149 [M⁺ - C₃H₅O₂], 121 [M⁺ - (C₃H₅O₂ + C₂H₅)], 104 [M⁺ - (C₃H₅O₂ + C₂H₅O)], 76 [M⁺ - (2C₃H₅O₂)], 41 [M⁺ - (CH₃OH + C₆H₄ + C₃H₅O₂)], 32 [M⁺ - (C₆H₄ + C₃H₅O₂ + C₂HO)]. Estos fragmentos indicaron la presencia de un sistema aromático sustituido por los grupos: etoxicarbonil y metoxicarbonil metileno. Según estos resultados y el estudio del patrón de fragmentación de masas se propuso al 2-(metoxicarbonilmetileno) benzoato de etilo como posible compuesto (Figura 2).

En TR= 14,53 min aparece un compuesto con área de 13,98 que representa el segundo compuesto en abundancia. El espectro de masas de este compuesto, evidenció el ión molecular a m/z 152, correspondiente a la fórmula molecular C₁₀H₁₆O (calcu-

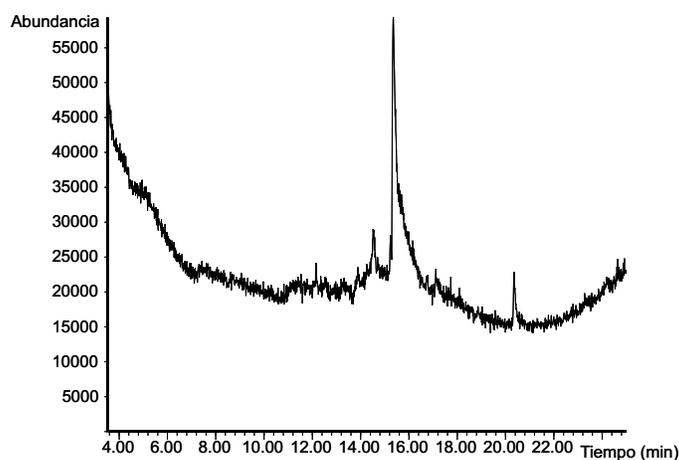


Figura 1. Cromatograma obtenido a partir de la subfracción $D_{1.8.3}$ de las hojas de *C. laevigata*.

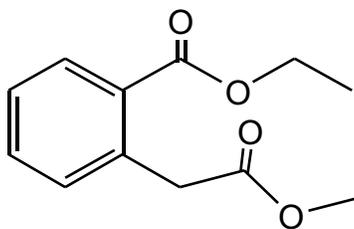


Figura 2. Estructura del 2-(metoxicarbonilmetileno) benzoato de etilo, identificado en la subfracción $D_{1.8.3}$ del extracto en CH_2Cl_2 de las hojas de *C. laevigata*.

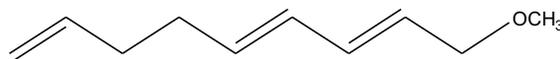


Figura 3. Estructura del 1-metoxi-2,4,8-nonatrieno, identificado en la subfracción $D_{1.8.3}$ del extracto en CH_2Cl_2 de las hojas de *C. laevigata*.

lado 152,2358 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 152 [M^+], 121 [$\text{M}^+ - \text{OCH}_3$], 97 [$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_7$], 83 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8$], 69 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}$], 55 [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_9\text{O}$], 32 [$\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{13}$]. Estos fragmentos indicaron la presencia de un compuesto lineal insaturado con un grupo metoxi y dobles enlaces en las posiciones 2, 4 y 8. Según estos resultados, se propuso el 1-metoxi-2,4,8-nonatrieno como posible compuesto (Figura 3).

Es importante acotar que en la revisión bibliográfica realizada no se encontró información acerca del aislamiento y/o caracterización de los compuestos identificados en la fracción $D_{1.8.3}$. Por lo tanto, el reporte de estos componentes, es un importante aporte para el conocimiento de la composición química de ésta especie.

Obtención del 3-(3-propenil-5-propil) ciclohexil propanoato de metilo

La subfracción D_2 (81,40 mg) fue separada utilizando cromatografía en columna sobre 4000 mg de sílica gel 0,063-0,200 mm. Se comenzó eluyendo con éter de petróleo (35-60°C) seguidamente con mezclas de éter de petróleo- CHCl_3 , con aumentos sucesivos de concentración de CHCl_3 , luego una mezcla de CHCl_3 -MeOH al 50-50% y, finalmente, MeOH al 100%. Veintitrés eluatos, contentivos de 20 mL cada uno, fueron recolectados. A cada uno de los eluatos obtenidos, se le realizó cromatografía en capa fina, para así agrupar aquellas fracciones que presentaban similitud en sus R_f , con diferentes mezclas de solventes, utilizando como agente revelador una solución de molibdato de amonio al 5% en H_2SO_4 al 10%. Tomando en

cuenta lo observado en la cromatografía en capa fina, se obtuvieron siete subfracciones.

Se obtuvo una masa total de 75,60 mg, que representó el 92,87% del material cromatográfico. Se le realizó cromatografía en capa fina a todas las subfracciones, sin embargo la subfracción $D_{2,6}$, evidenció una mejor separación de sus componentes y por tal motivo, así como por poseer mayor masa, la misma fue seleccionada para su posterior análisis cromatográfico.

La separación de la subfracción $D_{2,6}$ fue mediante cromatografía en columna por gravedad sobre 1600 mg de sílica gel 0,2-0,5 mm, utilizando para esto una bureta de 10 mL de capacidad como columna. La cromatografía fue iniciada utilizando éter de petróleo (35-60°C), seguidamente mezclas de éter de petróleo- CH_2Cl_2 con diferentes polaridades. Luego se utilizó una mezcla de CH_2Cl_2 -EtOH al 70-30% y finalmente EtOH al 100%. Se recolectaron veintiséis eluatos de 10 mL cada uno.

A cada uno de los eluatos obtenidos se le realizó cromatografía en capa fina, con diferentes mezclas de solventes, con la finalidad de agrupar aquellas fracciones que presentaran un comportamiento cromatográfico similar. El agente revelador fue una solu-

ción de molibdato de amonio al 5% en H_2SO_4 al 10%. Tomando en cuenta los R_f , se obtuvieron ocho subfracciones.

Se obtuvo una masa total de 29,9 mg, que representó 92,28% del material cromatográfico. Todas las subfracciones resultaron ser mezclas complejas; sin embargo la subfracción $D_{2,6.4}$ fue seleccionada por encontrarse en mayor proporción. La evaluación de la actividad antibacteriana, utilizando discos de 5 mm de diámetro, mostró que la fracción en estudio inhibe el crecimiento de las cepas *B. cereus* y *E. coli*, observándose halos de inhibición de 7 y 11 mm de diámetro, respectivamente. Sin embargo este análisis resultó negativo contra el resto de las cepas utilizadas (Tabla 1). Posteriormente, se analizó por cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas (CG/EM) para de esta manera, determinar los compuestos presentes. En la Figura 4, se muestra el cromatograma obtenido.

El espectro de masas del compuesto mayoritario de esta mezcla (TR= 15,74 min), mostró un ión molecular a m/z 252, el cual corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2$ (calculado 252,40 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 252 [M^+], 223 [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$], 209 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7$], 109 [$\text{M}^+ - (\text{C}_3\text{H}_7 + \text{C}_3\text{H}_5 + \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$], 191 [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$], 81 [$\text{M}^+ -$

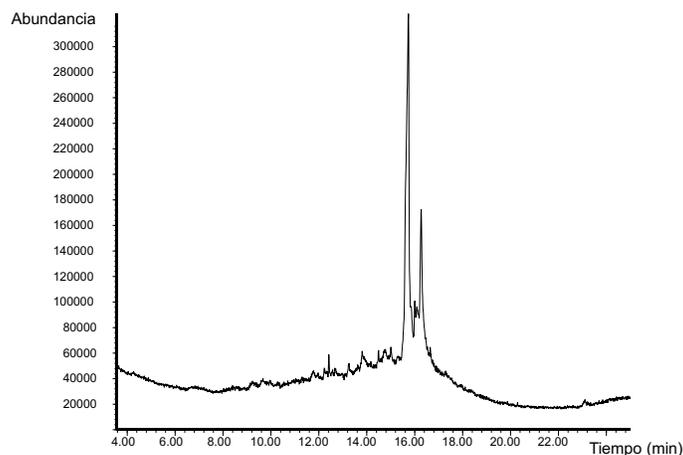


Figura 4. Cromatograma obtenido a partir de la subfracción $D_{2,6.4}$ del extracto en CH_2Cl_2 de las hojas de *C. laevigata*.

($C_3H_7 + C_3H_5 + C_4H_7O_2$), 41 [$M^+ - (C_3H_7 + C_6H_9 + C_4H_7O_2)$], 32 [$M^+ - (C_3H_7 + C_3H_5 + C_6H_9 + C_3H_4O)$]. Estos fragmentos indicaron la presencia de un ciclohexano trisustituido por los grupos propilo, propenilo y un éster. Según estos resultados se propuso al 3-(3-propenil-5-propil) ciclohexilpropanoato de metilo como posible compuesto (Figura 5). Es importante señalar que, según la revisión bibliográfica realizada, no se encontró información alguna referente al compuesto identificado en la subfracción $D_{2.6.4}$.

Extracto en hexano

La cromatografía en capa fina, con distintas mezclas de solventes, realizada a la subfracción H_1 , reveló separación definida de sus componentes. Además de esto, esta fracción presentó la mayor masa y, por esta razón, se le realizaron los análisis cromatográficos y químicos correspondientes con el fin de obtener los posibles compuestos presentes en ella.

La separación cromatográfica, de la subfracción H_1 (503,20 mg) se realizó utilizando cromatografía en capa fina preparativa sobre sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de éter de petróleo (35-60°C)-diclorometano 40-60%, obteniéndose dos bandas cromatográficas. La masa recuperada, de la cromatografía realizada a esta subfracción, fue de 404,70 mg, que representó el 80,42% del material cromatográfico.

La cromatografía en capa fina de la subfracción $H_{1.2}$, mostró separación definida de sus componentes, por tal motivo, se le realizó cromatografía en capa fina preparativa, utilizando una mezcla de éter de petróleo (35-60°C)-acetato de etilo al 19-1%, obteniéndose cuatro bandas cromatográficas.

Se obtuvo una masa total de 165,1 mg, que representó el 53,97% del material cromatográfico. Se estudió la subfracción $H_{1.2.4}$ por encontrarse en mayor proporción además de presentar mejor resolución en la cromatografía realizada. Esta subfracción fue

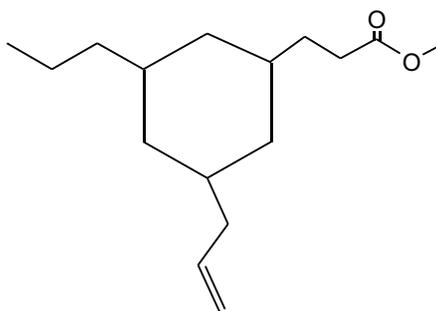


Figura 5. Estructura del 3-(3-propenil-5-propil) ciclohexilpropanoato de metilo, identificado en la subfracción $D_{2.6.4}$ del extracto en CH_2Cl_2 de las hojas de *C. laevigata*.

separada mediante cromatografía de capa fina preparativa utilizando una mezcla de éter de petróleo (35-60°C)-cloroformo al 24-1% como eluyente, obteniéndose cuatro bandas cromatográficas. Se obtuvo una masa total de 69,50 mg, que representó el 65,44% del material cromatográfico. El uso de cromatografía en capa fina, con distintas mezclas de solventes, sugirió la presencia de un posible compuesto puro, tanto en $H_{1.2.4.2}$ como en $H_{1.2.4.3}$, por tal motivo, las mismas, fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas (CG/EM), en cada caso, con el propósito de verificar la pureza de dichas fracciones y detectar el o los compuestos presentes.

A pesar que la cromatografía en capa fina, con distintas mezclas de solventes, realizada a la subfracción $H_{1.2.4.2}$ sugirió la presencia de un posible compuesto puro, la cromatografía de gases evidencia lo contrario (Figura 6). Probablemente, esta fracción era una mezcla de compuestos con R_f iguales, donde se puede apreciar un componente en mayor proporción con tiempo de retención de 14,90 min y área 51,75%.

El espectro de masas del compuesto mayoritario de esta mezcla ($TR = 13,86$ min), exhibió un ión molecular a m/z 268, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O$ (calculado 268,48 g/mol). Los picos signifi-

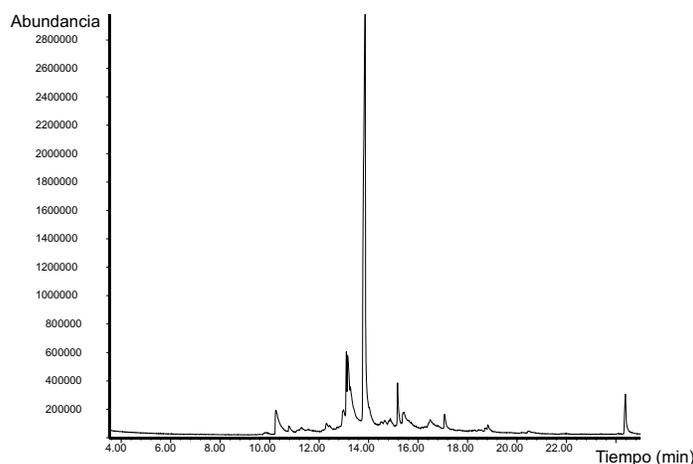


Figura 6. Cromatograma obtenido a partir de la subfracción $H_{1.2.4.2'}$ del extracto en hexano de las hojas de *C. laevigata*.

cativos se observaron a m/z 268 [M^+], 225 [$M^+ - C_3H_7$], 210 [$M^+ - C_3H_6O$], 194 [$M^+ - (C_2H_2O + 2CH_3)$], 85 [$M^+ - C_{13}H_{27}$], 71 [$M^+ - C_{14}H_{29}$], 58 [$M^+ - C_{15}H_{31}$], 43 [$M^+ - C_{15}H_{29}O$]. Estos fragmentos indicaron la presencia de una cetona en un sistema saturado sustituido por tres grupos metilos. Según estos resultados, se propuso al 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona como posible compuesto (Figura 7), el cual también es conocido como hexahidrofarnesil acetona. Este metabolito ha sido reportado en la especie *Euglossa hemicholra* (12), así como también en plantas de la familia Lamiaceae, tales como *Elsholtzia polystachya* (13), *Nepeta racemosa* (14) y *Thymus longicaulis* (15), entre otras. El cromatograma obtenido para la fracción $H_{1.2.4.3}$ es mostrado en la Figura 8.

A pesar que la cromatografía en capa fina realizada, con distintas mezclas de solventes, a la subfracción $H_{1.2.4.3}$ (Figura 8) indicaba la presencia de un posible compuesto puro, la cromatografía de gases muestra la existencia de, por lo menos, veinte compuestos, lo cual era indicativo de que la misma se trataba de una mezcla de compuestos con el mismo R_f .

Con el fin de facilitar el análisis, se estudiaron aquellos picos que presentaron mayor índice de certeza, suministrado por la base

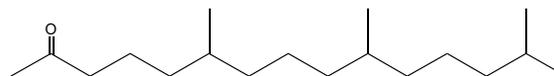


Figura 7. Estructura de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, identificado en la subfracción $H_{1.2.4.2}$ del extracto en hexano de las hojas de *C. laevigata*.

de datos, así como mayor área. De acuerdo a esto, se lograron identificar cinco picos. En cada uno de los casos se estudió detalladamente el espectro de masas y se realizó un patrón de fragmentación para, así, confirmar la estructura de cada componente.

El espectro de masas del compuesto mayoritario de esta mezcla (TR= 14,90 min), mostró un ión molecular a m/z 270, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$ (calculado 270,45 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 270 [M^+], 255 [$M - CH_3$] $^+$, 239 [$M - OCH_3$] $^+$, 227 [$M - C_3H_7$] $^+$, 213 [$M - C_4H_9$] $^+$, 199 [$M - C_5H_{11}$] $^+$, 185 [$M - C_6H_{13}$] $^+$, 171 [$M - C_7H_{15}$] $^+$, 157 [$M - C_8H_9$] $^+$, 143 [$M - C_9H_{19}$] $^+$, 129 [$M - C_{10}H_{21}$] $^+$, 115 [$M - C_{11}H_{23}$] $^+$, 87 [$M - C_{13}H_{27}$] $^+$, 74 [$M+1 - C_{14}H_{29}$] $^+$, 43 [$M - C_{14}H_{27}O_2$] $^+$, 32 [$M+1 - C_{16}H_{31}O$] $^+$. Estos fragmentos indicaron la presencia de un éster

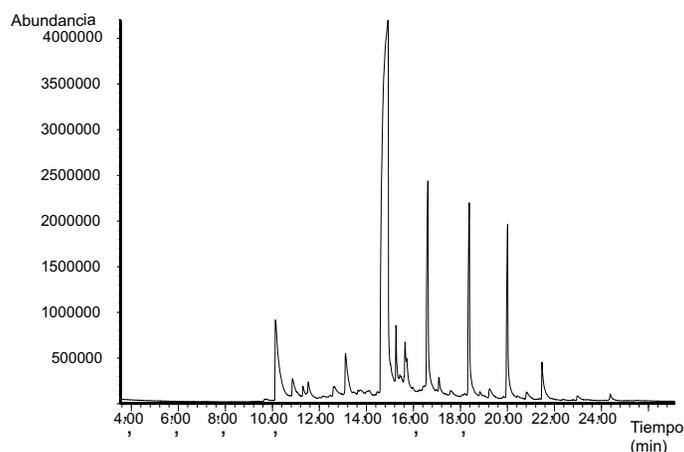


Figura8. Cromatograma obtenido a partir de la subfracción $H_{1.2.4.3}$ del extracto en hexano de las hojas de *C. laevigata*.

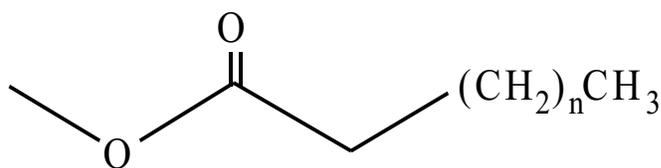
metílico con una cadena lineal saturada. Según estos resultados, se propuso al hexadecanoato de metilo como posible compuesto (Figura 9), el cual ha sido reportado en las especies *Krameria axina* (16), *Eugenia caryophyllus* (17), *Calanthe sieboldii* (18) y *Serenoa serrulata* (19). En ninguno de los casos se tiene información sobre su actividad biológica.

El segundo compuesto más abundante en esta mezcla (TR = 16,60 min), mostró ión molecular a 298 m/z, que concuerda con la fórmula molecular $C_{19}H_{38}O_2$ (calculado 298,50 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 298 $[M]^+$, 270 $[M - C_2H_5]^+$, 255 $[M - C_3H_7]^+$, 241 $[M - C_4H_9]^+$, 227 $[M - C_5H_{11}]^+$, 199 $[M - C_7H_{15}]^+$, 185 $[M - C_8H_{17}]^+$, 157 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 143 $[M - C_{11}H_{23}]^+$, 129 $[M - C_{12}H_{25}]^+$, 87 $[M - C_{15}H_{31}]^+$, 74 $[M+1 - C_{16}H_{33}]^+$, 43 $[M - C_{16}H_{31}O_2]^+$, 32 $[M+1 - C_{18}H_{35}O]^+$. Estos fragmentos indicaron la presencia de un éster metílico con cadena lineal saturada. Según los resultados, se propuso al octadecanoato de metilo como posible compuesto (Figura 9), el cual ha sido aislado de las especies: *Eugenia caryophyllus* (17), *Stellaria media* (20) y *Ophiocoma scolopendrina* (21).

El espectro de masas del tercer compuesto más abundante en masa de esta mezcla (TR = 18,37 min), exhibió un ión mo-

lecular a m/z 326, correspondiente a la fórmula molecular $C_{21}H_{42}O_2$ (calculado 326,56 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 326 $[M]^+$, 295 $[M - OCH_3]^+$, 283 $[M - C_3H_7]^+$, 255 $[M - C_5H_{11}]^+$, 241 $[M - C_6H_{13}]^+$, 227 $[M - C_7H_{15}]^+$, 199 $[M - C_9H_{19}]^+$, 185 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 171 $[M - C_{11}H_{23}]^+$, 143 $[M - C_{13}H_{27}]^+$, 87 $[M - C_{17}H_{35}]^+$, 74 $[M+1 - C_{18}H_{37}]^+$, 43 $[M - C_{18}H_{35}O_2]^+$, 32 $[M + 1 - C_{20}H_{39}O]^+$. Estos fragmentos indicaron la presencia de un éster metílico con cadena lineal saturada. De acuerdo a esto, se propuso al eicosanoato de metilo como posible compuesto (Figura 9), el cual también ha sido reportado en las especies *Ophiocoma scolopendrina* (21), *Valeriana wallichii* (22) y *Aralia elata Seemann* (23).

El cuarto compuesto más abundante de esta mezcla (TR= 20,00 min). El ión molecular a 354 m/z, corresponde a la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$ (calculado 354,61 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 354 $[M]^+$, 340 $[M+1 - CH_3]^+$, 311 $[M - C_3H_7]^+$, 297 $[M - C_4H_9]^+$, 283 $[M - C_5H_{11}]^+$, 255 $[M - C_7H_{15}]^+$, 241 $[M - C_8H_{17}]^+$, 213 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 199 $[M - C_{11}H_{23}]^+$, 185 $[M - C_{12}H_{25}]^+$, 157 $[M - C_{14}H_{29}]^+$, 143 $[M - C_{15}H_{31}]^+$, 129 $[M - C_{16}H_{33}]^+$, 101 $[M - C_{18}H_{37}]^+$, 87 $[M - C_{19}H_{39}]^+$, 74 $[M+1 - C_{20}H_{41}]^+$, 43 $[M - C_{20}H_{39}O_2]^+$, 32 $[M+1 - C_{22}H_{43}O]^+$. Estos fragmentos indicaron la presencia de un éster metílico con cadena lineal saturada. Según estos resultados, se



n = 13 éster metílico del ácido hexadecanoico

n = 14 éster metílico del ácido heptadecanoico

n = 15 éster metílico del ácido octadecanoico

n = 17 éster metílico del ácido eicosanoico

n = 19 éster metílico del ácido docosanoico

Figura 9. Estructura de los ésteres metílicos aislados a partir de la subfracción $H_{1,2,4,3}$ del extracto en hexano de las hojas de *C. laevigata*.

propuso al docosanoato de metilo como posible compuesto (Figura 9), el cual también ha sido reportado en las especies; *Ophiocoma scolopendrina* (21), y *Comanthus japonica* (24).

El quinto compuesto más abundante de esta mezcla (TR = 15,65 min), mostró un ión molecular a 284 m/z, este valor es consistente con la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$ (calculado 284,48 g/mol). Los picos significativos se observaron a m/z 284 $[M^+]$, 270 $[M+1 - CH_3]^+$, 241 $[M - C_3H_7]^+$, 227 $[M - C_4H_9]^+$, 213 $[M - C_5H_{11}]^+$, 199 $[M - C_6H_{13}]^+$, 185 $[M - C_7H_{15}]^+$, 171 $[M - C_8H_{17}]^+$, 143 $[M - C_{10}H_{21}]^+$, 115 $[M - C_{12}H_{25}]^+$, 101 $[M - C_{13}H_{27}]^+$, 87 $[M - C_{14}H_{29}]^+$, 74 $[M+1 - C_{15}H_{31}]^+$, 57 $[M - C_{14}H_{27}O_2]^+$, 43 $[M - C_{15}H_{29}O_2]^+$, 32 $[M+1 - C_{17}H_{33}O]^+$. Estos fragmentos indicaron la presencia de un éster metílico con cadena lineal saturada. Según estos resultados, se propuso al heptadecanoato de metilo como posible compuesto (Figura 9). Éste fue reportado anteriormente en las flores de *Calanthe sieboldii* (18) y en las hojas de la planta *Flacourtia indica* (25).

Las fracciones restantes pertenecientes al extracto en hexano, resultaron ser mezclas complejas, es decir, no se observó separación definida de sus componentes, al realizar la cromatografía en capa fina con distintas mezclas de solventes, por lo cual no se hizo ningún tipo de análisis químico con las mismas.

Conclusiones

Todos los extractos de las hojas de la planta mostraron actividad antibacteriana contra las especies de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

La fracción $D_{1,83}$, del extracto en CH_2Cl_2 , no mostró actividad antibacteriana frente a las bacterias utilizadas y los compuestos presentes en mayor proporción se identificaron como: 2-(metoxicarbonilmetileno) benzoato de etilo y 1-metoxi-2,4,8-nonatrieno.

La fracción $D_{2,6}$, del extracto en CH_2Cl_2 , mostró actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* y el componente en mayor proporción se identificó como: 3-(3-propenil-5-propil) ciclohexilpropanoato de metilo.

El componente en mayor proporción en la fracción $H_{1,2,4,2}$, del extracto en hexano, se identificó como: 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

Los compuestos presentes en mayor proporción en la fracción $H_{1,2,4,3}$, del extracto en hexano, se identificaron como: hexadecanoato de metilo, octadecanoato de metilo, eicosanoato de metilo, docosanoato de metilo y heptadecanoato de metilo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Investigación y al Departamento de Química del Núcleo de Sucre

de la Universidad de Oriente, por haber financiado parcialmente esta investigación. Al Laboratorio de Fitoquímica Biodirigida de la Universidad Simón Bolívar, por facilitar la realización de los análisis de CG/MS.

Referencias Bibliográficas

1. BLANCO J. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* 2: 7-10, 1999.
2. DESMARCHELIER C. *Ciencia Hoy* 44: 33-38, 1998.
3. ZARAGOZÁ F. Viejos Fármacos, Nuevos Fármacos: las plantas medicinales. Disponible en línea en la página web: <http://www.larebotica.es/larebotica/secciones/expertos/zaragozaplantasy/index.htm>. Consulta realizada el: 14/05/2005.
4. MARCANO D., HASEGAWA M. *Fitoquímica Orgánica* U.C.V. Litopar. pp. 588, 2002.
5. SERRATO M. *Ciencia y Desarrollo en Internet* Julio-Agosto, 2004.
6. EYDEN D. *Revista Arqueológica Mexicana* 57 10: 17-23, 2002.
7. HERIQUEZ W., CRESCENTE O., HIDALGO D., ROSAS A., HERRERA J., COMPAGNONE R. *Saber* 10(2): 57-60, 1998.
8. HIDALGO D., NIEVES B. *Memorias del III Congreso Venezolano de Química*. Caracas (Venezuela), pp. 159-161, 1996.
9. MISRA L., JAKUPOVIC J., BOHLMANN F. *Tetrahedron* 41(22): 5353-5356, 1985.
10. BRAGA A., DE OLIVEIRA G. *Tetrahedron letters* 30: 2653-2654, 1978.
11. BAUER A., KIRBY A., SHERRIS J., TURK M. *American Journal of Clinical Pathol* 45: 493-496, 1996.
12. ELTZ T., ROUBIK D., WHITTEN M. *Physiological Entomology* 28(4): 251-260, 2003.
13. MATHELA C., MELKANI A., BISHT J., PANTA., BESTMANN H., ERLER J., KOBOLD U., RAUSCHER J., VOSTROWSKY O. *Planta Medica* 58: 376-379, 1992.
14. BASER K., OZEK T., AKGUL A., TUMEN G. *J Ess Oil Res* 5: 215-217, 1993.
15. BASER K., OZEK T., KIRIMER N., TUMEN G. *J Ess Oil Res* 5: 291-295, 1993.
16. DASILVA I. Aislamiento y caracterización de compuestos del arbusto *Krameria ixina* L. y su actividad biológica (Tesis de Pregrado). Universidad de Oriente, Cumaná (Venezuela), pp 71, 2001.
17. MUCHALAL M., CROUZET J. *Agric Biol Chem* 49(6): 1583-1590, 1984.
18. AWANO K., ICHIKAWA Y., TOKUDA K., KURAOKA M. *Flavour and Fragrance Journal* 12(5): 327-330, 1996.
19. CAMPAULT G. *Br J Clin Pharm* 18: 461, 1984.
20. PANDE A., SHUKLA Y., TRIPATHI A. *Phytochemistry* 39(3): 709-712, 1995.
21. INAGAKI M., SHIBAI M., ISOBE R., HIGUCHI R. *Chem Pharm Bull* 49(12): 1521-1525, 2001.
22. PANDE A., UNIYAL G., SHUKLA Y. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 56(2): 56-58, 1994.
23. CHUNG C., JUNG M. *Biol Pharm Bull* 26(10): 1502-1504, 2003.
24. ARAO K., INAGAKI M., HIGUCHI R. *Chem Pharm Bull* 47(5): 687-689, 1999.
25. DEHMLow E., GUNTENHÖNER M., VAN REE T. *Z Naturforsch* 55: 333-335, 2000.