

## Caracterización química y bioactividad de metabolitos secundarios del tallo de *Melochia villosa* (Sterculiaceae)

Fátima Rodríguez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3878-2269>

Haydelba D'Armas<sup>2,3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9301-3801>

José Lanza<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7155-4671>

Mario Alcarraz<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5262-2969>

Vidalina Heredia<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6556-5948>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias, Unidad de Estudios Básicos, Núcleo de Monagas, Universidad de Oriente. Maturín. Estado Monagas. Venezuela. CP 6201.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Cumaná, Universidad Oriente. Cumaná. Estado Sucre. Venezuela. CP 6101.

<sup>3</sup>Universidad Estatal de Milagro. Milagro. Provincia de Guayas. Ecuador. CP 091050.

<sup>4</sup>Viamed Technical Laboratory SPA. Santiago RM. Chile. CP 8320000.

<sup>5</sup>Laboratorio de Bioprocesos Industriales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. CP 51.

<sup>6</sup>Laboratorio de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. CP 51.

\*Autora para correspondencia e-mail: [rodriguezffatima3@gmail.com](mailto:rodriguezffatima3@gmail.com)

### RESUMEN

*Melochia villosa* (Mill.) Fawc. & Rendle es una de las especies pertenecientes a la familia *Sterculiaceae* que fitoquímicamente ha sido muy poco estudiada. El objetivo de la investigación fue identificar metabolitos secundarios presentes en el tallo de *M. villosa* con propiedades de aplicación como posibles fármacos y contribuir con la quimiotaxonomía de la especie. Para la elucidación estructural se utilizaron técnicas como la espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En el fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico se obtuvieron nueve fracciones, de las cuales se realizaron ensayos con las fracciones 3, 5, 8 y 9. Las fracciones 3 y 9 mostraron actividad antifúngica contra *Fusarium verticillioides* y *F. poae*. Las fracciones 5 y 8 produjeron letalidad en nauplios de *Artemia salina*. Del fraccionamiento del extracto etéreo se obtuvieron ocho fracciones, en su mayoría con presencia de esteroides insaturados, donde las fracciones II, VII y VIII con actividad letal. Se evidenció la presencia del grupo carbonilo y el enlace éster, así como el éster diisocilico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico. También se observó la presencia del ácido hexadecanoico, éster mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster undecílico del ácido undecanoico, así como colestano-3-ona y la spinasterona, ambos compuestos derivados de esteroides insaturados.

Palabras clave: ácido hexadecanoico, colestano-3-ona, Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, elucidación estructural, Espectroscopía Infrarroja, éster undecílico del ácido undecanoico, Resonancia Magnética nuclear, spinasterona

### Chemical characterization and bioactivity of secondary metabolites of the stem of *Melochia villosa* (Sterculiaceae)

#### ABSTRACT

*Melochia villosa* (Mill.) Fawc. & Rendle is one of the species belonging to the *Sterculiaceae* family that has been little studied phytochemically. The objective of the research was to perform phytochemical analysis and characterization of the alcoholic and ethereal extracts of

the stem of this species, in order to identify secondary metabolites present in this botanical part with properties of application as possible drugs, as well as contributing to the chemotaxonomy of the species. For structural elucidation, techniques such as infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, and gas chromatography coupled to mass spectrometry were used. In the chromatographic fractionation of the alcoholic extract, nine fractions were obtained, of which only fractions 3, 5, 8 and 9 could be tested, with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*, and *F. poae* for fractions 3 and 9 respectively. Fractions 5 and 8 produced lethality on nauplii of *Artemia salina*. Eight fractions were obtained from the fractionation of the ethereal extract, mostly with the presence of unsaturated sterols, where fractions II, VII and VIII lethal activity. The presence of the carbonyl group and the ester bond was evidenced, as well as the diisocyclic ester of 1,2-benzenedicarboxylic acid. The presence of hexadecanoic acid, mono-(2-ethylhexyl) ester of 1,2-benzenedicarboxylic acid, undecyl ester of undecanoic acid, as well as cholestan-3-one and spinasterone, both compounds derived from unsaturated sterols, were also observed.

**Keywords:** cholestan-3-one, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, hexadecanoic acid, Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance, spinasterone, structural elucidation, undecyl ester of undecanoic acid

## INTRODUCCIÓN

En la literatura científica se han informado varias investigaciones fitoquímicas que indican que las plantas de la familia *Sterculiaceae* son una fuente de posibles metabolitos secundarios bioactivos. Por ejemplo, en una investigación realizada en *Waltheria ovata* Cav. se ha demostrado que el extracto etanólico de la raíz de esta especie presenta efecto antioxidante que supera a trolox y vitamina C (Herrera, 2016).

En relación con el género *Helicteres*, se informó la presencia de esteroides en los extractos de las hojas, tallos y frutos de la especie *Helicteres baruensis* Jacq; y polifenoles en todos los extractos. Además, se identificó un esteroide a través de Espectroscopía Infrarroja (IR) y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cuya posible estructura es la del campesterol (Tarache, 2007). Recientemente, D'Armas *et al.* (2018) refirieron la presencia de alcaloides, saponinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y terpenoides y una fuerte actividad letal contra larvas de *Artemia salina* Linnaeus 1978, en los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Helicteres guazumifolia* Kunth.

Del género *Melochia*, las especies más investigadas han sido *Melochia corchorifolia* L. y *Melochia tomentosa* L. Algunos flavonoides y alcaloides ciclopeptídicos, como frangulofin, franganin y adouetin-y´ fueron encontrados en *M. corchorifolia* (Tschesche y Reutel, 1968). Sin embargo, para *M. tomentosa* se

detectó la posible presencia de flavonoides y esteroides insaturados. Del fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las hojas de la misma especie se lograron identificar los ácidos hexadecanoico y octadecanoico con sus respectivos ésteres metílicos, y se aisló un derivado acetilado de un esteroide a partir del extracto metanólico del tallo (Espinoza, 2010).

En la literatura científica consultada aparecen pocos estudios de naturaleza fitoquímica y biológica referentes a la especie *Melochia villosa*. En el análisis fitoquímico preliminar realizado a los extractos crudos de las hojas, tallo y flores de *M. villosa* se evidenció la presencia de esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos en todos los extractos, exceptuando el extracto alcohólico de las hojas, flavonoides solo en los extractos alcohólicos y fenilpropanoides en los extractos alcohólicos de las hojas y tallo. El extracto alcohólico del tallo mostró actividad antifúngica leve contra *Fusarium poae*, y actividad letal contra *Artemia salina*, con una  $CL_{50}$  de  $10.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mientras que el extracto etéreo del tallo fue letal con una  $CL_{50}$   $2.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Por su parte, el extracto alcohólico de las hojas mostró actividad antibacteriana contra cinco cepas bacterianas y actividad letalidad con  $CL_{50}$  de  $74.68 \mu\text{g ml}^{-1}$  (D'Armas *et al.*, 2013). Posteriormente, se informó la caracterización estructural del extracto alcohólico de las hojas de esta especie, donde se identificó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) la presencia de varios ácidos grasos y algunos

de sus esteroides, con la presencia dominante del ácido hexadecanoico que fue además aislado e identificado en la subfracción B2 de dicho extracto mediante RMN  $H^1$  y  $C^{13}$  (Rodríguez *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la evidencia previa de la actividad biológica mostrada especialmente por los extractos crudos del tallo de la especie (D'Armas *et al.*, 2013), el objetivo de este trabajo fue identificar metabolitos secundarios presentes en el tallo de *M. villosa* con propiedades de aplicación como posibles fármacos y contribuir con la quimiotaxonomía de la especie. Para ello se decidió realizar el fraccionamiento cromatográfico de los extractos alcohólico y etéreo del tallo de *M. villosa* y profundizar en la caracterización estructural y bioactividad de algunas fracciones como posible fuente de metabolitos secundarios bioactivos en esta importante parte botánica de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Ejemplares adultos de *M. villosa* recolectados en Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela.

### Obtención de extractos

El material vegetal del tallo de *M. villosa* fue separado de los otros órganos de la planta y posteriormente molido en un molino eléctrico. Seguidamente, los extractos fueron obtenidos mediante extracción simple. El material vegetal se dejó en remojo durante 48 horas primeramente en éter dietílico y luego en una mezcla 1:1 metanol:etanol. Finalmente, el líquido fue filtrado y el solvente evaporado a presión reducida, según la metodología aplicada por D'Armas *et al.* (2013).

### Fraccionamiento cromatográfico

#### Extracto alcohólico del tallo (EALT)

El EALT fue fraccionado mediante Cromatografía de columna (CC). Se utilizó una columna cromatográfica de 35 cm de altura, con un diámetro de 2.4 cm, rellena con sílica gel de diámetro 5-70 mesh (0.2-0.5 mm) como fase estacionaria, en una relación extracto-sílica de 1:60, y como fase móvil solventes

como hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y las respectivas mezclas de estos variando la polaridad en orden creciente. Seguidamente, se empleó la cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup>, recubiertas con sílica gel tipo GF con un espesor de 0.5 mm, y placas de aluminio recubiertas con sílica gel e indicador de fluoresceína. Se utilizó la luz ultravioleta de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio al 10% en  $H_2SO_4$  al 5% como agentes reveladores. Ocasionalmente, se utilizó la cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup>, recubiertas con sílica gel tipo GF con un espesor de 0.1 mm, para subfraccionar y lograr el aislamiento de algún compuesto.

#### Extracto etéreo del tallo (EET)

El extracto en éter dietílico de *M. villosa* fue separado mediante CC, en una columna de 25 cm de altura con un diámetro de 0.8 cm, y se fraccionaron 250 mg del extracto en una relación 1:30 extracto-sílica (35-70 mesh), utilizando eluyentes como éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol, y la subfracción III (50 mg) se separó por CCFP, en una placa de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup>, recubierta con sílica gel tipo GF con un espesor de 1 mm, y como fase móvil una mezcla 1:1 éter de petróleo-cloroformo. Se utilizó la luz ultravioleta de onda corta (100-280 nm) y solución ácida al 10% en  $H_2SO_4$  al 5% en molibdato de amonio como agentes reveladores.

### Pruebas químicas y biológicas

#### Detección de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos

Ante la evidencia existente de presencia de esteroides insaturados y flavonoides en los extractos crudos del tallo de *M. villosa* (D'Armas *et al.*, 2013), se aplicó prueba de detección de estas familias de metabolitos a la mayoría de las fracciones provenientes del EET según la metodología de Marcano y Hasegawa (2002).

#### Actividad antifúngica

En función de la evidencia previa de actividad antifúngica del EALT de *M. villosa* contra

*Fusarium poae* (D'Armas *et al.*, 2013), se ensayó la actividad antifúngica contra cuatro cepas distintas de hongos (*Mucor racemosus* Fres., *Trichoderma viride* Pers ex S. F Gray., *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., y *Fusarium verticillioides* Sacc), proporcionados por el laboratorio de Fitopatología y Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela. Para ello se utilizó la metodología de Madubunyi, (1995).

#### Actividad letal contra *Artemia salina*

Tomando como evidencia previa la actividad letal mostrada por los extractos crudos del tallo de *M. villosa* que fueron observadas por D'Armas *et al.* (2013) se evaluó el nivel de toxicidad de algunas fracciones provenientes de los extractos alcohólico y etéreo del tallo de la especie fraccionados en este trabajo. Se utilizó el crustáceo *A. salina* y se aplicó la metodología propuesta por Meyer *et al.* (1982). La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) se determinó mediante un programa estadístico (métodos Binomial, Probit y Logit) propuesto por Stephan (1977).

#### Caracterización estructural

Para el análisis por IR, los compuestos separados se disolvieron en cloroformo ( $CHCl_3$ ) u otro solvente según su polaridad, se colocaron en celdas de cloruro de sodio (NaCl) y se analizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo FTIR16PC (Perkin Elmer). Los resultados fueron comparados con las frecuencias de vibración y estiramiento características de cada grupo funcional.

La CG/EM se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett- Packard HP, modelo 5890, serie II), acoplado a un espectrómetro de masas de la misma marca (modelo 5971 A), y la identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación con los espectros de masa existentes en la base de datos y biblioteca NIST 2008 del Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

En el análisis RMN, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado según su solubilidad y se colocaron en un tubo de resonancia, posteriormente sometido a un campo magnético dentro del equipo de RMN.

Para tal fin, se utilizó un equipo de RMN (Bruker AM 300) (frecuencia de resonancia  $^1H = 300$  MHz) perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Los desplazamientos obtenidos ( $\delta_H$  y  $\delta_C$ ) se informaron en partes por millón (ppm), en relación con un estándar interno de tetrametil silano (TMS), y el cálculo teórico del espectro RMN de la molécula se realizó utilizando el programa RMN Predictor para  $^1H$  y  $^{13}C$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fraccionamiento cromatográfico

#### Extracto alcohólico del tallo (EALT)

Del fraccionamiento cromatográfico de 1.2 g del EALT se obtuvieron nueve fracciones, de las cuales se analizó la fracción 3 mediante IR y CG/EM. Por su parte, la fracción 5 por haber sido obtenida en mayor cantidad (73.3 mg), fue subfraccionada en una columna cromatográfica de 22 cm de altura, con un diámetro de 0.5 cm, en una relación fracción-sílica 1:30, y se obtuvieron cinco subfracciones que posteriormente se ensayaron con una CCF. En la subfracción 5.1 se constató la presencia de una mezcla poco compleja de compuestos que no lograron separarse, y otra mancha de un presunto compuesto aislado con un  $R_f$  de 0.80; por lo que se aplicó una CCFP en la que se utilizó sílica gel tipo GF en placas de 1.0 mm de espesor, y una mezcla diclorometano-AcOEt 4:1 como fase móvil, y se logró aislar el compuesto (Tabla 1). Finalmente se realizó una CG/EM a la subfracción 5.1.1 (banda que se fue con el solvente), y un análisis de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  al compuesto aislado (subfracción 5.1.2).

#### Extracto etéreo del tallo (EET)

Del fraccionamiento cromatográfico de 250 mg EET se obtuvieron ocho fracciones, en su mayoría con muy poco rendimiento. En tal sentido, solo fue posible realizar el subfraccionamiento de la fracción III (50.3 mg) mediante una CCFP, en la que se observó la separación de dos franjas diferentes con  $R_f$  de 0.14 y 0.58 respectivamente (subfracciones III.1 y III.2), las cuales no pudieron recuperarse en cantidad suficiente para ser analizadas,

Tabla 1. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de la subfracción 5.1 del EALT de *Melochia villosa* mediante Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP).

Subfracción	R <sub>f</sub>	Masa (mg)
5.1.1	0.99	4.0
5.1.2	0.83	4.3

Tabla 2. Actividad antifúngica de fracciones provenientes del extracto alcohólico (EALT) del tallo de *Melochia villosa* (Mill.) Fawc. & Rendle.

Hongo	Fracciones del EALT		
	3	8	9
<i>Mucor racemosus</i>	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	++	-	-
<i>Trichoderma viride</i>	-	-	-
<i>Fusarium poae</i>	-	-	++

(+) Actividad antifúngica leve con halos de 11-14 mm de diámetro; (++) actividad antifúngica moderada con halos de 15-18 mm de diámetro; (+++) actividad antifúngica fuerte con diámetro de halo superior a 18 mm; (-) ausencia de actividad. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro. EALT: extracto alcohólico del tallo

mientras de la subfracción III.3 se obtuvieron 7 mg que posteriormente se analizaron mediante IR y CG/EM para su elucidación estructural. El resto de las fracciones provenientes de este extracto, fueron ensayadas en su mayor parte mediante las pruebas fitoquímicas para la detección de metabolitos secundarios, así como también se logró ensayar la letalidad de las fracciones II, VII y VIII con *A. salina*.

#### Pruebas químicas y biológicas

##### Detección de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos

Según las pruebas fitoquímicas aplicadas, se detectó la presencia de esteroides insaturados en todas las fracciones EET (IV, V, VI, VII, VIII) que se lograron ensayar. Esto indicó que dicha familia de metabolitos probablemente está presente en buena proporción en todas las fracciones del extracto. Sin embargo, los flavonoides estuvieron ausentes.

##### Actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones 3 y 9 del EALT evidenciaron

actividad antimicrobiana moderada contra las cepas de *F. verticillioides* y *F. poae*, respectivamente (Tabla 2). Esto indicó, que probablemente los compuestos presentes en las mencionadas fracciones poseen algún efecto antifúngico contra estas especies de *Fusarium*. El aumento en la actividad de estas fracciones con respecto al extracto crudo del cual provienen (D'Armas *et al.*, 2013) pudiera deberse a un efecto antagónico sufrido por interacción del compuesto activo con otros metabolitos presentes en el mismo extracto, o en su defecto, un efecto de concentración, es decir, la concentración del metabolito activo aumenta en la totalidad de la muestra (fracción) al ser separado de otros.

Estudios previos han demostrado el efecto antifúngico de extractos polares y apolares de otras especies pertenecientes a la familia *Sterculiaceae*, como por ejemplo *H. guazumifolia* (D'Armas *et al.*, 2018) y *Helicteres isora* L. (Pandey *et al.*, 2015), al inhibir el crecimiento de cepas de hongos (*Aspergillus oryzae* (Ahlburg), *Curvularia lunata* (Wakker), *Mucor* sp., *Candida albicans*, entre otros).

### Actividad letal contra *A. salina*

Respecto a la letalidad de fracciones de los extractos alcohólico y etéreo del tallo de *M. villosa*, la 5, 8 y 9 del EALT, así como las fracciones II, VII y VIII del EET, evidenciaron actividad letal o tóxica contra *A. salina* ( $CL_{50} < 1000.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a las 48 h de exposición (Tabla 3). Posiblemente estas fracciones provenientes de ambos extractos del tallo de dicha especie, sean una fuente de metabolitos con propiedades promisorias para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas. Se conoce que este bioensayo tiene correlación con actividades citotóxicas (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin *et al.*, 1988). Por ello, este resultado sugiere la presencia de algún agente citotóxico potencial en *M. villosa*, como en

otros extractos de la familia *Sterculiaceae* (Li *et al.*, 2016; Dayal *et al.*, 2017).

### Caracterización estructural

#### Metabolitos secundarios presentes en el EALT

#### Análisis de IR de la fracción 3

El análisis de IR de la fracción 3 mostró las bandas asignadas al *stretching* característico de los enlaces C-H alifáticos en la región comprendida entre 3019 y 2854  $\text{cm}^{-1}$ , la banda del enlace carbonilo C=O a los 1719  $\text{cm}^{-1}$ , a los 1215  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente del enlace C-O del grupo éster, y una banda intensa asignada a los estiramientos de los enlaces  $\text{CH}_2$  de una cadena alifática a los 758  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 1).

Tabla 3. Letalidad de las fracciones de extractos del tallo de *Melochia villosa* (Mill.) Fawc. & Rendle sobre *Artemia salina* Linnaeus.

Fracción	Método	$CL_{50}$ a las 48 horas
5	Binomial	2.48
8	Binomial	12.00
9	Logit	316.00
II	Logit	3.50
VII	Probit	1.40
VIII	Binomial	1.34

5,8 y 9: fracciones provenientes del extracto alcohólico del tallo;  
I, II y III: fracciones provenientes del extracto etéreo del tallo

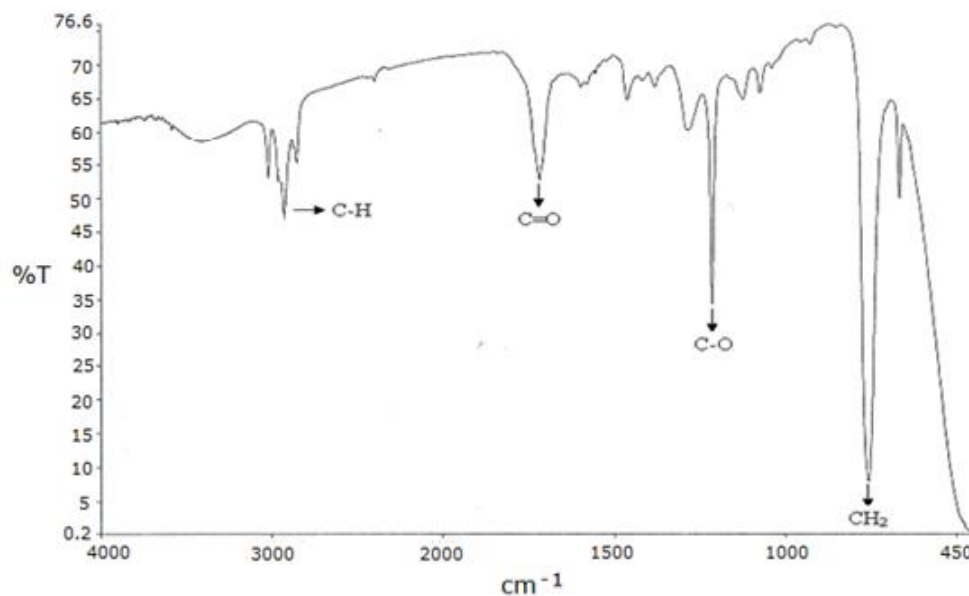


Figura 1. Espectro IR de la fracción 3 proveniente del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

La fracción 3 se observó como un sólido color naranja muy opaco, siendo esta una de las fracciones más limpias y poco contaminadas. En el análisis posterior de CG/EM (Figura 2) se encontró la separación de cuatro compuestos, de los cuales el éster diisocílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico fue el componente mayoritario y los ésteres 2-metilpropil-butílico y metílico butílico del mismo

ácido fueron los componentes en menor cantidad (Tabla 4). El espectro de masas del éster diisocílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico produjo un ion molecular a una relación  $m/z$  de 390, poco observable por lo que se asume que se trata de un ion poco estable. Además, se lograron detectar las señales correspondientes a  $m/z$  279, 167, 149 y 57 (Figura 3).

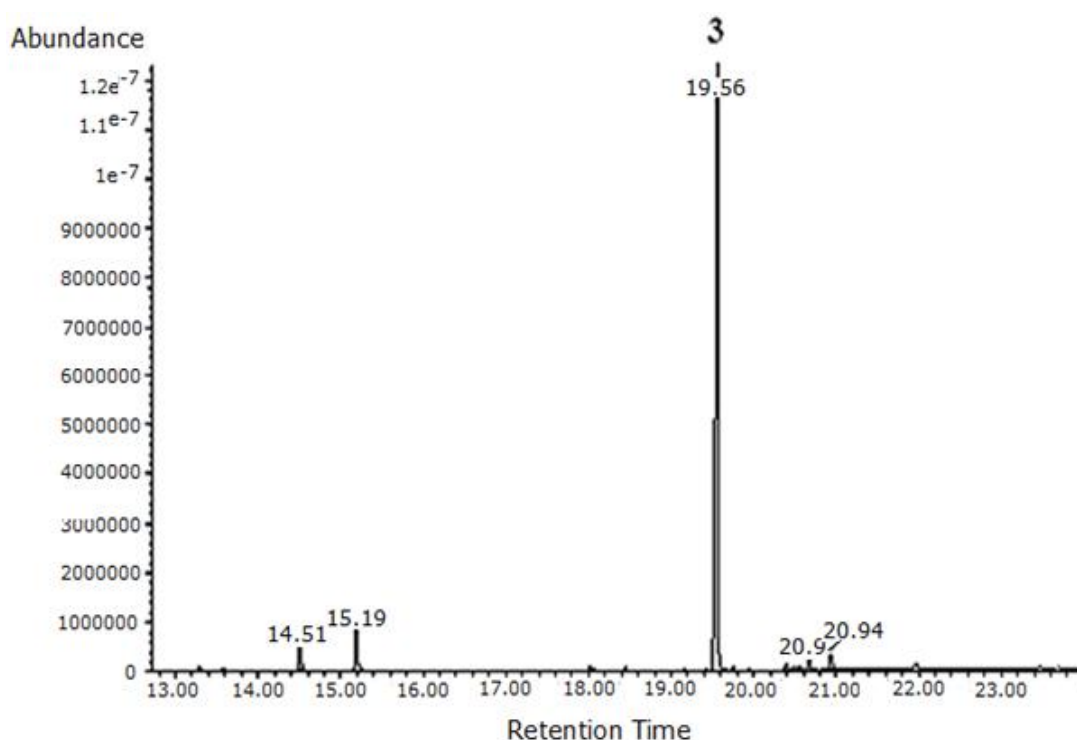


Figura 2. Cromatograma de la separación de los componentes que integran la fracción 3 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*, obtenido mediante CG/EM.

Tabla 4. Composición química de la fracción 3 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Pico	Identificación	RT	%Área	%P
1	Éster-2-metilpropil-butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico.	14.508	3.78	95
2	Éster metílico butílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	15.194	8.87	87
3	Éster diisocílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	19.559	87.33	91

TR: tiempo de retención, %P: porcentaje de probabilidad

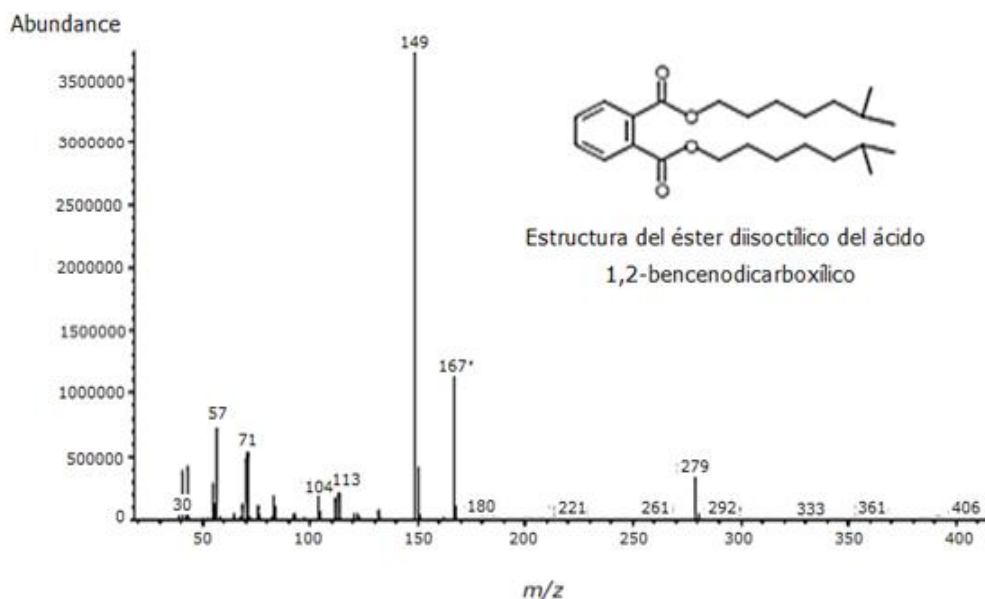


Figura 3. Espectro de masas del éster diisooctílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico identificado como compuesto mayoritario de la fracción 3 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa* a un tiempo de retención 19.559.

Del fraccionamiento cromatográfico del extracto alcohólico de las hojas de *M. villosa*, en el análisis de CG/EM de la subfracción C2 se identificaron varios ftalatos, entre los que se encontraba el DBP como compuesto mayoritario (Rodríguez *et al.*, 2015), por lo que se podría decir en forma general, que este tipo de compuestos se encuentra presente en las distintas partes botánicas de dicha especie. A pesar de que los ftalatos son petroquímicos utilizados como plastificantes o disolventes en una variedad de productos industriales (Namikoshi *et al.*, 2006), han sido informados en la literatura científica como metabolitos secundarios aislados en forma natural, y se ha encontrado su presencia en distintas plantas como *Aloe vera* L., *Euphorbia cyparissias* L. y *Euphorbia seguieriana* Neck. (Rowshanul y Rezaul, 2009). Además, el contenido de la abundancia natural de  $^{14}\text{C}$  en el dibutil ftalato (DBP) de *Laminaria japonica* Aresh. y *Undaria pinnatifida* (Harv), dos algas pardas, y *Ulva* sp., un alga verde, reveló que este compuesto se produce en forma natural, además de encontrarse que el contenido de  $^{14}\text{C}$  del di-(2-etilhexil) ftalato obtenidos de las algas estaba entre 60-80% (Namikoshi *et al.*, 2006). Otro estudio refirió la presencia del DBP como metabolito secundario aislado de *Mimusops elengi* Linn (Ruikar *et al.*, 2011). Por otra parte, en la caracterización estructural de *Whalteria berteroi* (Spreng.) J.G. Saunders

(Sterculiaceae) fueron encontrados el ácido 1,2-benzenodicarboxílico y algunos de sus ésteres como el éster di-(2-etilhexílico) y el éster diisooctílico del mismo ácido en su extracto alcohólico (Salazar, 2012).

#### Análisis de CG/EM de la subfracción 5.1.1

De la subfracción 5.1.1, se lograron identificar mediante CG/EM cinco compuestos presentes en distinta cantidad, de los cuales tres de ellos se encontraron en mayor abundancia. Los compuestos en menor proporción identificados en la subfracción 5.1.1 fueron los ésteres metílico y etílico del ácido hexadecanoico (Tabla 5, Figura 4).

Cabe destacar que los compuestos de mayor abundancia identificados en este análisis, fueron también encontrados en la fracción B1 del extracto alcohólico de las hojas (EALH) de *M. villosa* (Rodríguez *et al.*, 2015), lo cual sugiere que están presentes en ambas partes de la planta.

El espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico (Figura 5), mostró un pico a  $m/z$  270 correspondiente al ion molecular de dicho éster, de fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ , un pico base a  $m/z$  74 y los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes a  $m/z$  227, 143, 87 y 55 respectivamente.



Tabla 5. Composición química de la subfracción 5.1.1 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Pico	Identificación	TR	%Área	%P
1	6.10.14-trimetil-2-pentadecanona	14.190	9.07	99
2	Ester metílico del ácido hexadecanoico	14.980	3.63	97
3	Ácido hexadecanoico	15.398	50.72	78
4	Ester etílico del ácido hexadecanoico	15.638	4.47	96
5	Ester mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	20.427	32.11	91

TR: tiempo de retención. %P: porcentaje de probabilidad

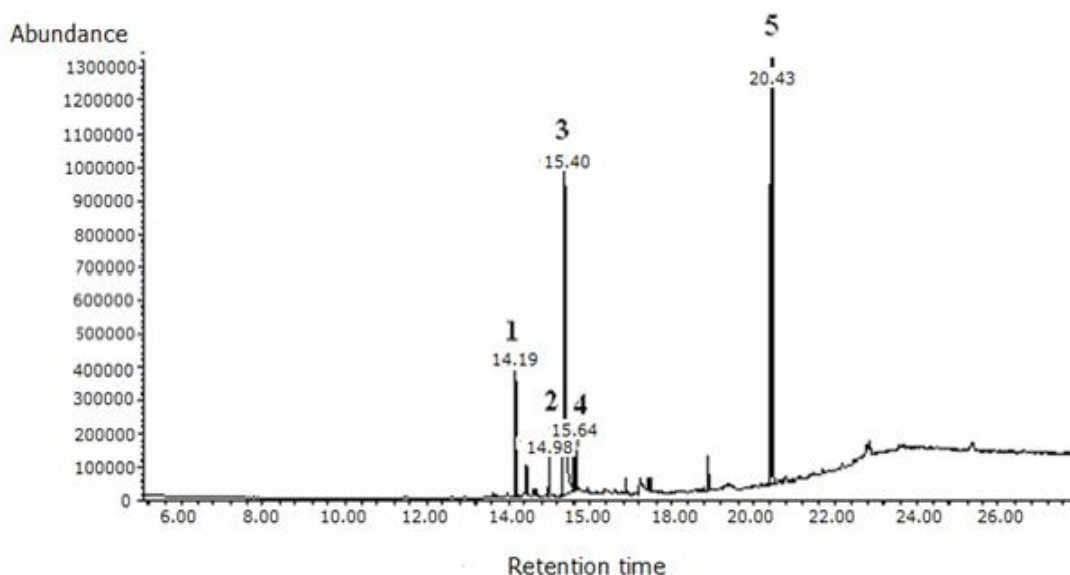


Figura 4. Cromatograma del fraccionamiento de la subfracción 5.1.1 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa* obtenido mediante CG/EM.

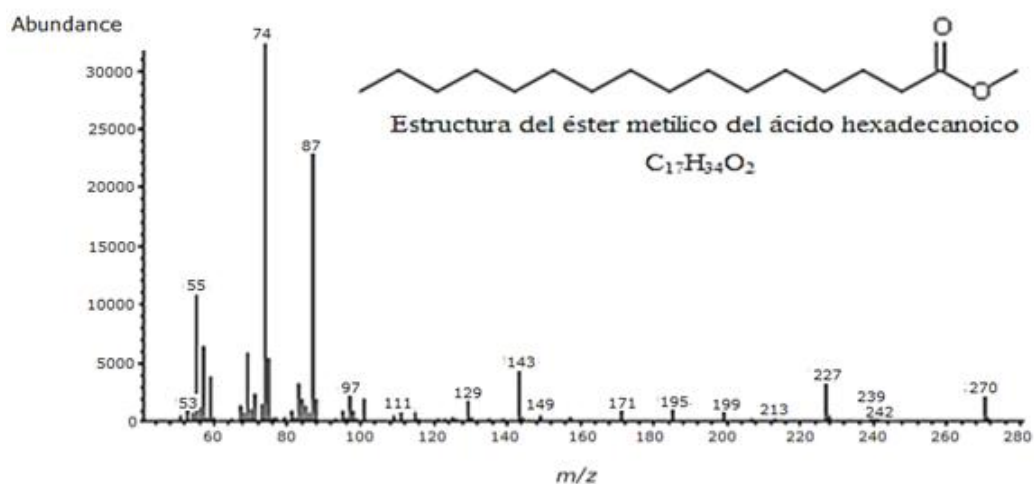


Figura 5. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico identificado en el extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa* y separado en el tiempo de retención de 14.980

Por su parte, el espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico (Figura 6), exhibió el pico propio del ion molecular correspondiente a la fórmula de dicho compuesto ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) a  $m/z$  284; un pico base a  $m/z$  88, y se observaron también los picos correspondientes a los fragmentos más abundantes a  $m/z$  241, 157, 101, 73 y 55.

#### Análisis de RMN de la subfracción 5.1.2

El análisis de RMN  $^1H$  de la subfracción 5.1.2, evidenció cinco señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en el compuesto estudiado, así como también se observó la señal correspondiente al solvente. En la ampliación del RMN  $^1H$ , a un desplazamiento  $\delta_H$  0.83 ppm se observó un triplete correspondiente al acoplamiento de los protones del grupo metilo  $-CH_3$  terminal ( $H_{11}$  y  $H_{22}$ ), un multiplete muy intenso a un  $\delta_H$  de 1.27 ppm, asignado a los metilenos  $(-CH_2-)_n$  de la zona alifática ( $H_4-H_{20}$  y  $H_{13}-H_{21}$ ), a los 1.59 ppm un multiplete correspondiente al protón metilénico  $-CH_2-CH_2-COO-$  correspondiente al carbono 3 de la molécula ( $H_3$ ), un triplete al  $\delta_H$  2.27 ppm, asignado al protón metilénico  $-CH_2-COO-$  adyacente al grupo carbonilo ( $H_2$ ) y finalmente un triplete correspondiente a un protón metilénico adyacente a un oxígeno  $-COO-CH_2-(H_{12})$  a

un desplazamiento químico de 4.03 ppm (Figura 7, Tabla 6).

El espectro de RMN de  $^{13}C$  de este compuesto (Figura 8), mostró una señal a un  $\delta_C$  de 15 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos metílicos terminales de la molécula ( $-CH_3$ ) ( $C_{11}$  y  $C_{22}$ ), una señal a los 23 ppm asignada a los carbonos metilénicos adyacentes a los metilos terminales ( $CH_3-CH_2-$ ) ( $C_{10}$  y  $C_{21}$ ). Además, un pico muy intenso correspondiente a los carbonos metilénicos de la zona alifática de la molécula a un desplazamiento químico  $\delta_C$  de 30 ppm, una señal a un  $\delta_C$  de 32 ppm asignada a los carbonos metilénicos  $(-CH_2-)$   $C_9$  y  $C_{20}$  del compuesto; otra señal a los 35 ppm, correspondiente al carbono metilénico  $-CH_2-COO-$  adyacente al grupo carbonilo ( $C_2$ ); un desplazamiento químico a  $\delta_C$  de 65 ppm asignado al carbono metilénico  $COO-CH_2-$  adyacente al oxígeno del grupo éster ( $C_{12}$ ); así como también, se evidenció a campo bajo la señal correspondiente al carbono carbonílico de la molécula  $-COO-(C_1)$  con desplazamiento químico  $\delta_C$  de 174 ppm. Dicha información se confirmó con el experimento DEPT-135 de RMN en dos dimensiones, el cual además dio indicios de tratarse de una molécula simétrica con los metilos terminales superpuestos y el grupo éster en el centro (Figura 9, Tabla 7).

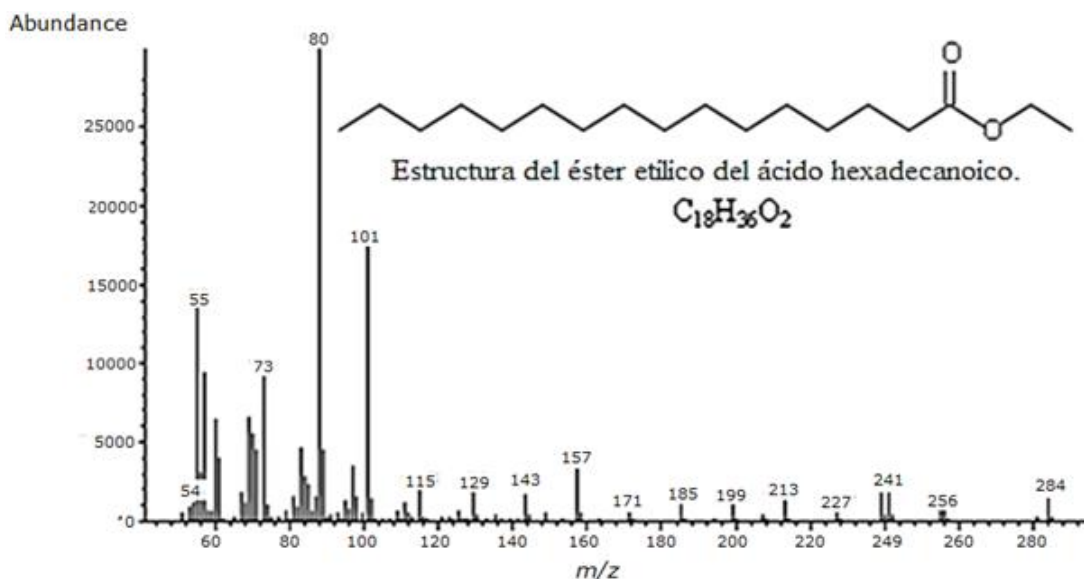


Figura 6. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico identificado en el extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa* y separado al tiempo de retención de 15.398.

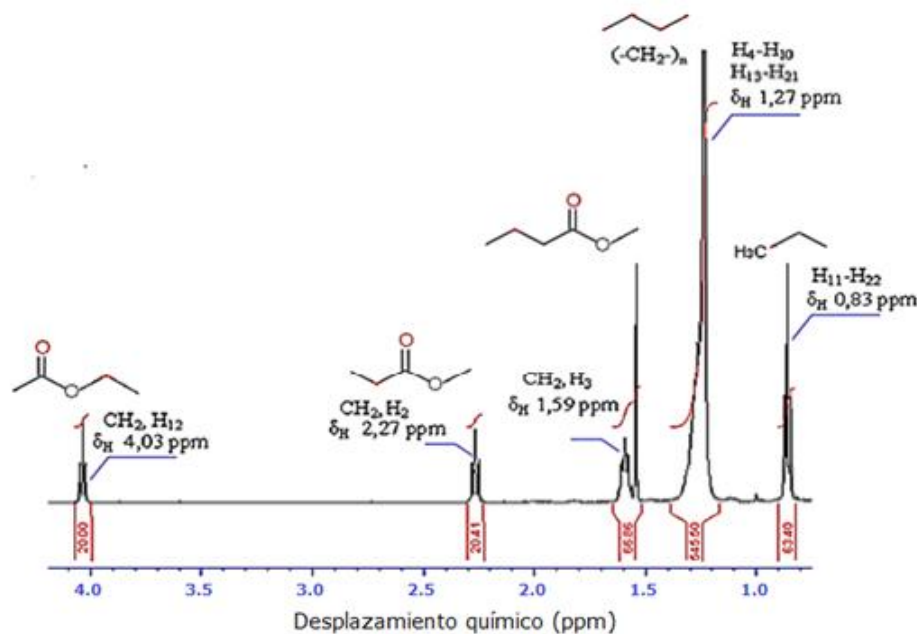


Figura 7. Espectro RMN <sup>1</sup>H de la subfracción 5.1.2. del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Tabla 6. Desplazamientos químicos  $\delta_H$  del espectro RMN de <sup>1</sup>H de la subfracción 5.1.2. del del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Posición	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
H <sub>11</sub> , H <sub>22</sub>	Triplete ( <i>t</i> )	0.83	-CH <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> -H <sub>10</sub> y H <sub>13</sub> -H <sub>21</sub>	Multiplete ( <i>m</i> )	1.27	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>n</sub>
H <sub>3</sub>	Multiplete ( <i>m</i> )	1.59	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>2</sub>	Triplete ( <i>t</i> )	2.27	-CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>12</sub>	Triplete ( <i>t</i> )	4.03	-COO-CH <sub>2</sub> -
-	Singlete ( <i>s</i> )	7.30	CHCl <sub>3</sub>

En el análisis de RMN para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de la subfracción 5.1.2 del EALT de *M. villosa* se confirmó que dicho espectro corresponde a un éster alifático de 22 átomos de carbono con estas características, identificado como éster undecilico del ácido undecanoico (Figura 9).

En estudios realizados anteriormente a otras plantas de la familia *Sterculiaceae*, se encontró la presencia de algunos ésteres de ácidos grasos, tales como el éster metílico del ácido pentadecanoico, en el extracto metanólico de *Helicteres guazumifolia* (Vásquez, 2010); los ésteres metílicos de los ácidos octadecanoico e icosanoico en *M. tomentosa* (Espinoza, 2010), así como también se identificó la presencia del éster metílico del ácido hexadecanoico en ambas especies, y los ácidos dodecanoico, tetradecanoico,

hexadecanoico, heptadecanoico y octadecanoico como compuestos principales de la especie *Whalteria berteroi* (Salazar, 2012). Por su parte, en el extracto alcohólico de las hojas de *M. villosa* fueron identificados varios ácidos grasos de los cuales el ácido hexadecanoico fue el más abundante (Rodríguez *et al.*, 2015). Los ésteres etílicos de ácidos grasos se utilizan junto con cambios en el estilo de vida (dieta, adelgazamiento y ejercicio) para reducir la cantidad de triglicéridos (sustancias grasas) en la sangre. Los ésteres etílicos de ácidos omega 3 pertenecen a una clase de medicamentos denominados agentes antilipémicos o reguladores de los lípidos, puesto que es posible que dichas sustancias actúen al reducir la cantidad de triglicéridos y otras grasas que se producen en el hígado (Medline Plus, 2019).

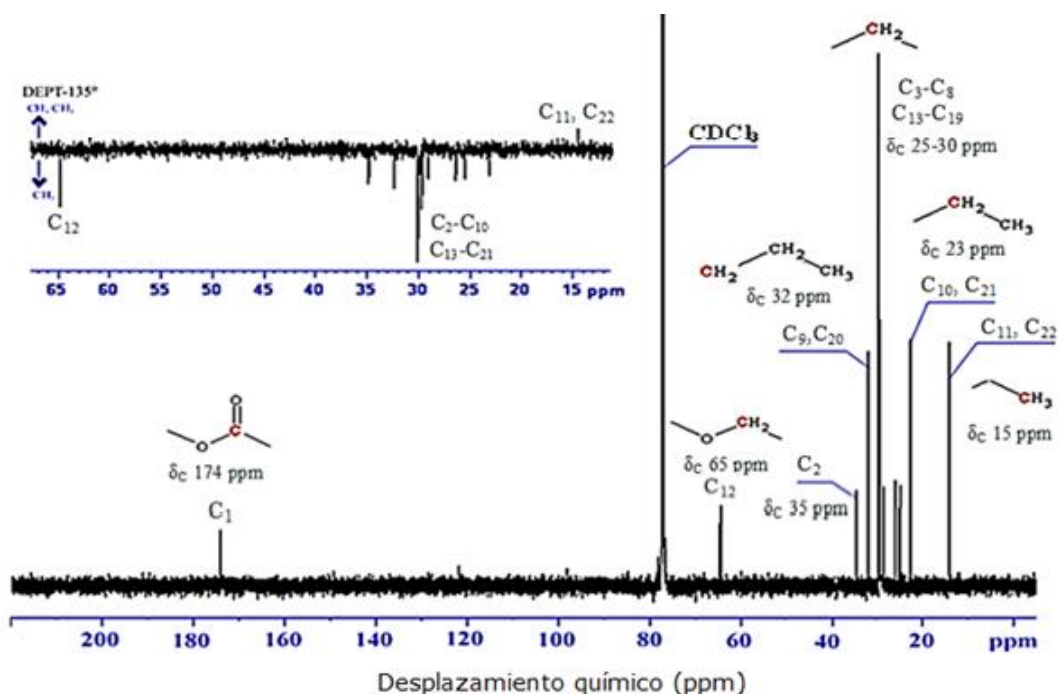


Figura 8. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  incluyendo espectro bidimensional DEPT-135 de la subfracción 5.1.2 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Tabla 7. Desplazamientos químicos  $\delta_c$  del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la subfracción 5.1.2 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa*.

Posición	$\delta_c$ (ppm)	Tipo de carbono
C <sub>11</sub> , C <sub>22</sub>	15	-CH <sub>3</sub>
C <sub>10</sub> , C <sub>21</sub>	23	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -
C <sub>3</sub> -C <sub>8</sub> y C <sub>13</sub> -C <sub>19</sub>	30	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>10</sub>
C <sub>9</sub> , C <sub>20</sub>	32	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
C <sub>2</sub>	35	-CH <sub>2</sub> -COO-
C <sub>12</sub>	65	-COO-CH <sub>2</sub> -
C <sub>1</sub>	174	-CH <sub>2</sub> -COO-CH <sub>2</sub> -
-	76-80	CDCl <sub>3</sub>

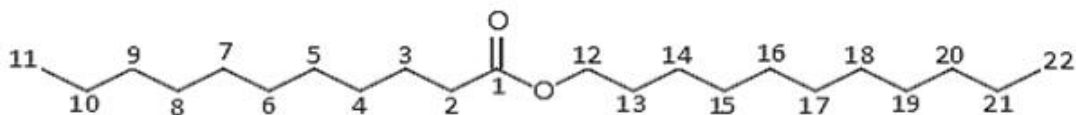


Figura 9. Estructura del éster undecílico del ácido undecanoico identificado de la subfracción 5.1.2 del extracto alcohólico del tallo de *Melochia villosa* mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

En estudios previos realizados al extracto alcohólico (EALT) del tallo de *M. villosa* se detectó la presencia de esteroides insaturados y/o triterpenos pentacíclicos, además de flavonoides y fenilpropanoides, con actividad letal contra *A. salina* y una  $\text{CL}_{50}$  de  $10.00 \mu\text{g ml}^{-1}$  a las 48 horas, y una leve actividad antifúngica

contra *Fusarium poae* (D'Armas *et al.*, 2013). Atendiendo a ello se presume que este tipo de metabolitos pudo haber quedado en las fracciones que no lograron ser analizadas mediante las técnicas espectroscópicas utilizadas, y en menor proporción el extracto alcohólico, tal vez debido a su naturaleza poco polar.

Metabolitos secundarios presentes en el extracto etéreo del tallo (EET) de *M. villosa*

corresponde a los CH<sub>2</sub> de una cadena alifática (Figura 10).

Análisis IR de la subfracción III.3

Análisis de CG/EM de la subfracción III.3

El espectro de IR de la subfracción III.3 mostró las bandas asignadas a los estiramientos propios de los enlaces CH alifáticos a los 3018 y 2851 cm<sup>-1</sup>; a los 1714 cm<sup>-1</sup>, se observó una banda correspondiente a las vibraciones del grupo carbonilo C=O, los estiramientos característicos del enlace C-O del grupo éster a los 1215.49 cm<sup>-1</sup>, y finalmente una banda bastante intensa a los 758 cm<sup>-1</sup> que

El análisis de CG/EM de la subfracción III.3, reveló la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y los ésteres di-butílico y mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico. De igual forma, fueron también separados e identificados, el éster 2-hidroxi-1metilpropílico del ácido octadecanoico, colestan-3-ona y spinasterona (Figura 11, Tabla 8).

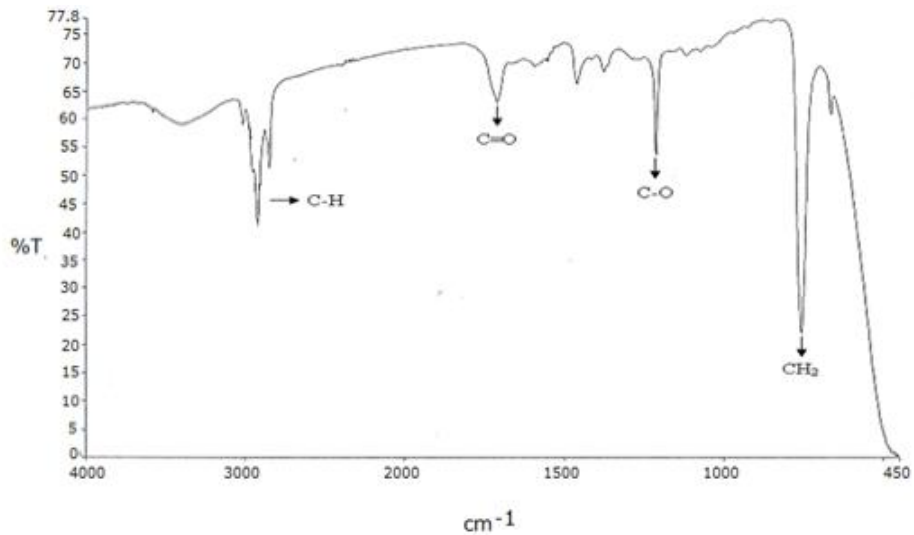


Figura 10. Espectro de IR de la subfracción III.3 proveniente del extracto etéreo del tallo de *Melochia villosa*.

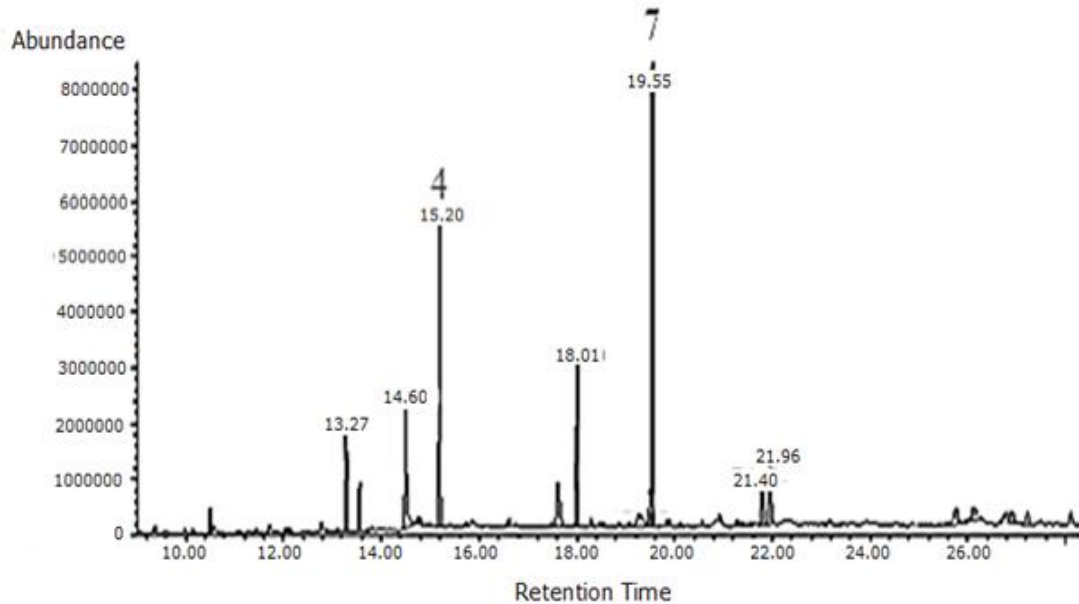


Figura 11. Cromatográfica de gases de los componentes de la subfracción III.3 del extracto etéreo del tallo de *Melochia villosa*.

Tabla 8. Composición química de la subfracción III.3 del extracto etéreo del tallo de *Melochia villosa*.

Pico	Identificación	TR	%Area	%P
1	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	13.271	3.84	99
2	Ester isobutil undecílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	13.557	2.17	99
3	Ester dibutílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	14.497	8.58	95
4	Ester metílico butílico del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	15.199	13.87	91
5	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	18.014	7.36	98
6	Ester 2-hidroxi-1-metilpropílico del ácido octadecanoico	19.278	3.05	91
7	Ester mono (2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	19.548	2.54	98
8	Colestan-3-ona	25.760	2.54	98
9	Spinasterona	27.230	1.44	96

TR: tiempo de retención, %P: porcentaje de probabilidad, Gris: compuestos más abundantes

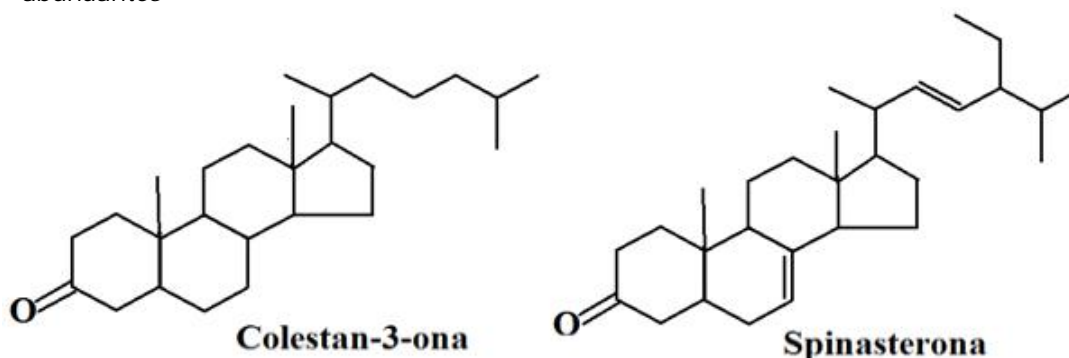


Figura 12. Estructuras de: colestan-3-ona y spinasterona, identificados en la subfracción III.3 del extracto etéreo del tallo de *Melochia villosa*.

Los compuestos colestan-3-ona y spinasterona, poseen como estructura núcleo el sistema policíclico del ciclopentanoperhidrofenantreno, típico de compuestos pertenecientes al grupo de esteroides insaturados (Figura 12), por lo que ambas moléculas probablemente deriven de su correspondiente esteroide, lo cual confirma la presencia de este tipo de metabolitos secundarios en el tallo *M. villosa*, tal y como se evidenció en las pruebas químicas realizadas. De acuerdo con lo observado en los estudios fitoquímicos en otras plantas pertenecientes a la familia *Sterculiaceae*, se presume que esta familia de metabolitos secundarios es característica en las plantas de esta familia.

## CONCLUSIONES

El tallo es uno de los principales órganos de *Melochia villosa* que podría ser considerado como una fuente prometedora de metabolitos secundarios bioactivos para el desarrollo de productos farmacológicos. Fracciones de extracto alcohólico del tallo poseen propiedades antifúngicas contra *Fusarium verticillioides* y *F. poae*, además provocan letalidad en *Artemia salina*. Los ácidos carboxílicos y ésteres de ácidos que son los compuestos con mayor abundancia en este extracto podrían ser los responsables de dicha actividad biológica. Entre ellos se encuentra el éster undecílico del ácido undecanoico.

Igualmente, fracciones del extracto etéreo del tallo contienen esteroides insaturados como colestano-3-ona y spinasterona.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Oriente UDO-VE, Cumaná, Venezuela, por colaborar con sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación, al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y a la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, por su colaboración para la realización de los análisis de RMN y CG/EM.

#### Conflicto de interés

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento y quienes están de acuerdo con su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

#### Contribución de los autores

Conceptualización: FR, HD, Investigación: FR, JL, MA, VH, Escritura – primera redacción: FR, HD, MA, VH, Escritura - revisión y edición: FR, HD, MA, VH.

#### REFERENCIAS

D'Armas H, Rodríguez F, Salazar J (2013) Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta *Melochia villosa* proveniente del estado Amazonas, Venezuela. *Saber* 25(4): 382-389

D'Armas H, Vásquez V, Ordaz G (2018) Phytochemical screening and bioactivity analysis of extracts from *Helicteres guazumifolia* Kunth (Sterculiaceae). *International Journal of Herbal Medicine* 6(1): 47-50

Dayal R, Singh A, Mishra KP (2017) Potential of enhancing tumor toxicity by crude ethanolic extracts of fruits of *Helicteres isora* (L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(1): 417-423

Espinoza B (2010) Análisis fitoquímico y bioactividad de la planta *Melochia tomentosa* (Sterculiaceae). Trabajo de pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

Herrera O (2016) Efecto antioxidante y antitumoral *in vitro* del extracto etanólico de

la raíz de *Waltheria ovata* Cav. lucraco en línea celular de cáncer de próstata DU-145. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/303960971>. Consultado 14/05/2019

Li K, Yu Y, Sun S, Liu Y, Garg S, Kaul S, Lei Z, Gao R, Wadhwa R (2016) Functional Characterisation of Anticancer Activity in the Aqueous Extract of *Helicteres angustifolia* L. Roots. *PlosOne* 11(3): e0152017; doi: 10.1371/journal.pone.0152017

Madubunyi, I (1995) Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern J Pharm* 33: 232-237

Marcano DY, Hasegawa M (2002) Fitoquímica orgánica. UCV. Litopar

McLaughlin J, Rogers L, Anderson J (1998) The use of biological assay to evaluate botanicals. *Drug information journal* 32(2):513-524

Medline Plus (2019) Esteres etílicos del ácido graso omega 3. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a607065-es.html>. Consultado 28/06/2019

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ, McLaughlin JL (1982) Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45(1): 31-34

Namikoshi M, Fujiwara T, Nishikawa T, Ukai K (2006) Natural Abundance <sup>14</sup>C Content of Dibutyl Phthalate (DBP) from Three Marine Algae. *Marine Drugs* 4(4): 290-297

Pandey A, Upadhyaya A, Pande KK (2015) Screening of antimicrobial activity of *Helicteres isora*, *Cichcory intybus* and *Litsea chinensis*. *International Journal of Bioassays* 4(7): 4127-4130

Rodríguez F, D'Armas H, Salazar J (2015) Caracterización estructural de algunos componentes del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa* (Sterculiaceae) proveniente del Amazonas venezolano. *Saber* 27(1): 67-77

Rowshanul M, Rezaul M (2009) Antimicrobial and Citotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl)

Pthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn) Flower. *Journal of Molecular Biology* 37(1): 31-36

Ruikar A, Gadkari T, Phalgune U, Puranik V, Deshpade N (2011) Dibutil Phtalate, a secondary metabolite from *Mimusops elengi*. *Chemistry of Natural Compounds* 46(6): 955

Salazar C (2012) Metabolitos secundarios presentes en la planta *Whalteria berteroi* (Sterculiaceae) colectada en el estado Amazonas (Venezuela) y su actividad antimicrobiana y letal. Tesis de pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela

Stephan C (1977) Methods for calculating in  $LC_{50}$ . En: Mayer FL, Hamelink J (eds). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, pp. 65-84. ASTM International, Philadelphia; doi: 10.1520/STP32389S

Tarache A (2007) Separación e identificación de algunos compuestos constituyentes de la planta *Helicteres baruensis* Jacq. (Sterculiaceae) y su actividad biológica. Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

Tschesche R, Reutel I (1968) Alkaloide aus Sterculiaceae, über peptidalkaloide aus *Melochia corchorifolia*. *Tetrahedron Letters* 35: 3817-3818

Vásquez V (2010) Aislamiento e identificación de algunos constituyentes de la hoja de la planta *Helicteres guazumifolia* Kunth (Sterculiaceae) y su posible actividad biológica. Trabajo de pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

Recibido: 03-02-2020

Aceptado: 06-04-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.