



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Acacia farnesiana* UTILIZADA TRADICIONALMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA

Ada Zurima Daza Bareño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de farmacia
Bogotá, Colombia
2014

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Acacia farnesiana* UTILIZADA TRADICIONALMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA

Ada Zurima Daza Bareño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Javier Rincón Velandia, Q.F., Ph.D. Química Orgánica,

Línea de Investigación:

Fitoquímica y farmacognosia

Grupo de Investigación:

Principios Bioactivos en Plantas Medicinales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2014

A mi madre

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia por la formación profesional y por abrirme sus puertas durante estos años.

A los profesores del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por la formación, colaboración y respaldo.

A los profesores Pilar E. Luengas y Giovanni Garavito por su colaboración con el material vegetal y el diseño experimental.

Al Grupo de Investigación Principios Bioactivos de Plantas Medicinales del Departamento de Farmacia por el apoyo con sus recursos humanos, físicos y financieros para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Departamento de química por facilitarme acceder a sus equipos

A mis compañeros de laboratorio 303 del Departamento de Farmacia. A Martha por su colaboración en el trabajo experimental. A Lina Nerio por su colaboración, esfuerzo y compañía. A Jonathan Tapias por su compañía y su amistad.

A mis compañeros Daniel Delgado y Carlos Calderón por su apoyo, colaboración y amistad.

A la profesora Maritza Rojas agradezco su acompañamiento, su apoyo en el todo momento, valiosa orientación y amistad.

Al profesor Javier Rincón Velandia por su colaboración incondicional, valiosa orientación, dedicación a este trabajo, por confiar en mí, apoyarme siempre y su amistad desinteresada.

A mi Madre y Fabián Rincón por su motivación y apoyo incondicional en cada momento de la realización de este trabajo

Agradezco a Dios Todo Poderoso, que con su infinita sabiduría dispuso de maravillosas personas que me acompañasen, me fortalecieran e hicieran conmigo tangible este proyecto.

Resumen

En Colombia se ha reportado el uso de decocciones de las hojas y la corteza de *Acacia farnesiana* para el tratamiento de fiebres y malaria. El presente trabajo es una contribución al estudio fitoquímico de la corteza de esta especie colectada en dos épocas del año, época seca (junio) y de lluvia (octubre). Para tal fin se recolectó el material vegetal en Armero-Guayabal, Departamento Tolima (Colombia) y se realizó una caracterización fitoquímica del extracto etanólico obtenido por percolación y de las fracciones obtenidas a partir de éste, utilizando solventes de diferente polaridad, por pruebas químicas para detectar la presencia de taninos y de compuestos azufrados, además, de diferentes técnicas como cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). También se realizó la caracterización por técnicas espectroscópicas como IR, RMN-¹H y RMN-¹³C. Para la determinación estructural de los metabolitos aislados y purificados de las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo se utilizaron métodos como CG-EM y RMN (mono y bidimensional).

De la caracterización fitoquímica del extracto etanólico de la corteza de esta especie vegetal y de las fracciones obtenidas en éter de petróleo, acetato de etilo y butanol se evidenciaron metabolitos como: esteroides y/o terpenos, flavonoides, taninos y compuestos azufrados, observándose diferencias en las dos épocas del año. Al purificar la fracción en éter de petróleo obtenida en la época de lluvia se detectó la presencia por CG-EM de la mezcla de estigmasterol y sitosterol. En la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia se identificó la presencia de 3 β -O-D-glucopiranosil- β -sitosterol, lentionina, mezcla de germanicol y lupeol. En la fracción en acetato de etilo obtenida en la época seca se identificaron tonalido y 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo.

Palabras clave: *Acacia farnesiana*, esteroides, compuestos azufrados, composición química, época de colecta.

Abstract

In Colombia have been reported the use of decoctions of leaves and bark of *Acacia farnesiana* to treat fevers and malaria. This work contributes to the phytochemical study of the bark of this species collected in two seasons, dry season (June) and rainy (October); for this purpose the plant material was collected in Armero-Guayabal, Tolima Department (Colombia). Phytochemical characterization of ethanol extract obtained by percolation and their fractions was performed, using different polarity solvents, by chemical tests to detect the presence of sulfur compounds and tannins, in addition to various technical such as thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Also the characterization by spectroscopic techniques was performed IR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. For structure determination of the metabolites in the fractions of the isolation and purification of fraction in petroleum ether and ethyl acetate methods as GC-MS and NMR (mono and bidimensional) were used.

From the phytochemical characterization of the ethanol extract of the bark of this plant species and the fractions obtained in petroleum ether, butanol and ethyl acetate as metabolites were demonstrated: steroids and / or terpenes, flavonoids, tannins and sulfur compounds observed differences in the two times of the year. By purifying the fraction in petroleum ether the presence rainy by GC-MS of mixture of stigmasterol and sitosterol was detected. In the fraction in ethyl acetate from the rainy presence identified $3\beta\text{-O-D-glucopiranosil-}\beta\text{-sitosterol}$, lenthionine, mixture germanicol and lupeol. In the fraction in ethyl acetate obtained in the dry season tonalide and 2,3-bis (acetyloxy) propyl-eicosanoate waere identified.

Keywords: *Acacia farnesiana*, steroids, sulfur compounds, chemical composition, collecting time.

Contenido

Agradecimientos.....	VII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Contenido.....	XI
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIX
Objetivos.....	XXI
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	3
1.1 Descripción de la especie vegetal <i>Acacia farnesiana</i>	3
1.2 Estudio fitoquímico.....	7
2. Metodología.....	11
2.1 Equipos.....	11
2.2 Recolección del material vegetal en época seca y de lluvia, elaboración de extractos y fraccionamiento.....	12
2.3 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia. 13	
2.3.1 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por pruebas químicas para taninos y compuestos azufrados.....	15
2.3.2 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas cromatográficas.....	16
2.3.3 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas espectroscópicas.....	17
2.4 Aislamiento, purificación e identificación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo provenientes de las dos épocas del año estudiadas.....	18
2.4.1 Fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	19

2.4.2	Fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	22
3.	Resultados y discusión	31
3.1	Recolección del material vegetal en época seca y de lluvia, elaboración de extractos y fraccionamiento.....	31
3.2	Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia	33
3.2.1	Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por pruebas químicas para taninos y compuestos azufrados	33
3.2.2	Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas cromatográficas	38
3.2.3	Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas espectroscópicas.....	50
3.3	Aislamiento, purificación e Identificación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo en las dos épocas del año.....	59
3.3.1	Análisis de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	59
3.3.2	Análisis de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	66
4.	Conclusiones y recomendaciones	95
4.1	Conclusiones.....	95
4.2	Recomendaciones.....	96
5.	Bibliografía.....	97

Lista de figuras

Figura 1-1: <i>Acacia farnesiana</i> (Mobile, 2008)	4
Figura 2-1: Diagrama general de la extracción y fraccionamiento de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	13
Figura 2-2: Diagrama general para la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	14
Figura 2-3: Diagrama general de aislamiento, purificación e identificación de metabolitos de las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	21
Figura 2-4: Análisis de las fracciones en éter de petróleo obtenidas de los extractos etanólicos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época seca y de lluvia.	23
Figura 2-5: Análisis de la fracción en acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época seca y de lluvia.	24
Figura 2-6: Análisis de las fracciones en Hexano/ CHCl_3 (1:1) provenientes de las fracciones en acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época seca y de lluvia.	25
Figura 2-7: Análisis de las fracciones en CHCl_3 provenientes de las fracciones de acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época seca y de lluvia.	26
Figura 2-8: Análisis de la fracción en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) proveniente de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época seca.	27

Figura 2-9: Análisis de la fracción en AcOEt proveniente de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> recolectada en la época de lluvia.....	29
Figura 3-1: <i>Acacia farnesia</i> (L) Willd.	31
Figura 3-2: Caracterización del contenido de taninos presentes en los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	34
Figura 3-3: Caracterización de compuestos azufrados presentes en los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	36
Figura 3-4. Análisis por CCD de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en época seca y de lluvia.	39
Figura 3-5: Caracterización por medio de CCD revelando con el reactivo Godin de los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	40
Figura 3-6: Caracterización por medio de CCD revelando con el reactivo NP-PEG de los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	43
Figura 3-7: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	45
Figura 3-8: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	47
Figura 3-9: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción butanólica obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	48
Figura 3-10: Caracterización por IR de los extractos etanólicos de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	50

Figura 3-11: Caracterización por RMN ^1H de los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol provenientes de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia (400 MHz, CDCl_3 o MeOD).	53
Figura 3-12: Caracterización por RMN ^{13}C de los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol provenientes de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia (100 MHz, CDCl_3 o MeOD).	56
Figura 3-13: Perfiles cromatográficos por CG-EM de la fracción en éter de petróleo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	60
Figura 3-14: Cromatograma CG-EM de EL-2 obtenida de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia.	63
Figura 3-15: Espectros de masas de estigmasterol y sitosterol presentes en EL-2 de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia.	63
Figura 3-16: Estructura de A1.....	67
Figura 3-17: Perfil cromatográfico de CG-EM del compuesto A2 presente en las fracciones de Hexano- CHCl_3 (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo provenientes de época seca y de lluvia.	69
Figura 3-18: Espectros de masas de A2 (lentionina) presente en las fracciones de Hexano/ CHCl_3 obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia.....	70
Figura 3-19: Cromatograma de A3 proveniente de la fracción en CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.	72
Figura 3-20: Espectros de masas de germanicol y lupeol presentes en el sólido A3 proveniente de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.	72
Figura 3-21: Cromatograma de A4 de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca.	75
Figura 3-22: Espectros de masas del tonalido (1) presente en A4 proveniente de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.	75
Figura 3-23: Espectro RMN ^1H de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)	76

Figura 3-24: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135 $^{\circ}\text{C}$ de la muestra A4 (100 MHz, CDCl_3)	77
Figura 3-25: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)	78
Figura 3-26: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)	79
Figura 3-27: Cromatograma de la muestra A5 provenientes de la fracción en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.	81
Figura 3-28: Espectros de masas del 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo presente en A5 proveniente de la fracción en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.	82
Figura 3-29: Espectro RMN ^1H de A5 (400 MHz, CDCl_3)	83
Figura 3-30: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135 $^{\circ}$ de A5 (100 MHz, CDCl_3)	84
Figura 3-31: Espectro RMN COSY de A5 (400 MHz, CDCl_3)	85
Figura 3-32: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de A5 (400 MHz, CDCl_3)	86
Figura 3-33: Espectro RMN ^1H de A6 (400 MHz, MeOD)	88
Figura 3-34: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135 $^{\circ}$ de A6 (100 MHz, MeOD)	89
Figura 3-35: Espectro COSY de A6 (400 MHz, MeOD)	90
Figura 3-36: Espectro HMQC de A6 (400 MHz, MeOD)	91
Figura 3-37: Espectro HMBC de A6 (400 MHz, MeOD)	92
Figura 3-38: Espectro de masas de la muestra A6.	93
Figura 3-39: Estructuras propuestas para la muestra A6.	93

Lista de tablas

Tabla 1-1: Algunas especies del género <i>Acacia</i> utilizadas en África para el tratamiento de la malaria.....	6
Tabla 1-2: Metabolitos secundarios reportados en la literatura para la especie <i>Acacia farnesiana</i>	7
Tabla 2-1: Condiciones para el análisis por CLAE de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en época seca y de lluvia.	17
Tabla 3-1: Rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto etanólico la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	32
Tabla 3-2. Datos de concentración de taninos de los extractos, fracciones butanólica y acuosa obtenidas en las dos épocas del año.	35
Tabla 3-3: Tiempos de retención por CLAE de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.	45
Tabla 3-4: Desplazamiento químico (RMN ¹ H) de las señales observadas en los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol en las dos épocas del año (400 MHz).....	52
Tabla 3-5: Compuestos detectados por CG-EM en la fracción de éter de petróleo obtenida en el extracto etanólico de la corteza de <i>A. farnesiana</i> colectada en la época seca y de lluvia.....	61
Tabla 3-6: Comparación de datos de RMN ¹³ C de EL-2 con la literatura.	64
Tabla 3-7: Comparación de datos de RMN ¹³ C de A1a con la literatura.	67
Tabla 3-8: Comparación de datos de RMN ¹³ C de A3 con la literatura.	73

Tabla 3-9: Datos de RMN ^1H - ^{13}C - DEP 135 $^\circ$ - HMQC y HMBC de A4 (400 MHz, CDCl_3) 79

Tabla 3-10: Datos de RMN ^1H - ^{13}C - DEP 135 $^\circ$ - HMQC y HMBC del sólido A5 (400 MHz, CDCl_3)..... 86

Tabla 3-11: Datos de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135 $^\circ$, HMQC y HMBC de A6 (400 MHz, MeOD)..... 92

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AcOEt	Acetato de etilo
AcL	Fracción acuosa en la época de lluvia
AcS	Fracción acuosa en la época seca
AL	Fracción en acetato de etilo en la época de lluvia
AS	Fracción en acetato de etilo en la época seca
BL	Fracción butanólica en la época de lluvia
BS	Fracción butanólica en la época seca
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCI₃	Cloroformo deuterado
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CG – EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CHCl₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
cm	Centímetros
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
d	Doblete
dd	Doble doblete
DAD	Diode Array Detector
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
EL	Extracto etanólico en la época de lluvia

ES	Extracto etanólico en la época seca
EPL	Fracción en éter de petróleo en la época de lluvia
EPS	Fracción en éter de petróleo en la época seca
g	gramos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia)
Hz	Hertz
IE	Ionización por Impacto Electrónico
IR	Espectroscopía infraroja
J	Constante de acoplamiento
M	Molaridad
m	Molalidad
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramos
min	Minutos
NP-PEG	Reactivo Natural Products (difenilboriloxietilendiamina)/polietilenglicol 4000
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
s	Singlete
t	Triplete
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico en ppm

Objetivos

- **General**

Contribuir al estudio fitoquímico de la corteza de *Acacia farnesiana* utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria.

- **Específicos**

Caracterizar los principales metabolitos secundarios presentes en las fracciones de diferente polaridad obtenidas a partir de la especie vegetal *Acacia farnesiana*.

Obtener metabolitos secundarios de las fracciones provenientes del extracto etanólico con solventes de diferente polaridad.

Contribuir en la identificación estructural de metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas, utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Introducción

Ancestralmente se han utilizado alrededor del mundo productos naturales para los tratamientos básicos de la salud y en la actualidad son fuente importante de metabolitos secundarios obtenidos de varias especies vegetales (Evans, 1989). Aunque las funciones de los metabolitos secundarios no son completamente conocidas desempeñan una variedad de funciones ecológicas en la planta, como defensa contra depredadores y patógenos, atracción de polinizadores, protección a la planta de las radiaciones UV e interacciones con otras plantas, entre otras (Valares, 2011).

En Colombia y en otros países de regiones tropicales del mundo se emplean especies vegetales como fuente de principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades entre ellas la malaria. La elevada prevalencia de esta enfermedad, la resistencia de los mosquitos a los insecticidas y además la resistencia de los parásitos a los tratamientos existentes ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la malaria, dentro de las que se incluyen las plantas utilizadas en la medicina tradicional (Klayman, 1985). Los estudios científicos han permitido la obtención de principios activos como la quinina, la artemisinina, el lapachol, entre otros (Wells T. 2011).

En diferentes regiones del mundo, entre estos el continente Africano, se utilizan plantas medicinales para el tratamiento de la malaria, siendo el género *Acacia* muy utilizado en preparaciones tradicionales como decocciones e infusiones de hojas, raíces y cortezas (Muthaura *et al.*, 2007). En Colombia se utilizan varias especies vegetales entre las cuales se encuentra *Acacia farnesiana*, de la cual se utilizan principalmente las hojas y la corteza en decocciones (García-Barriga, 1992).

La especie *Acacia farnesiana* (Fabaceae) es un arbusto espinoso, de 1 a 2 m de altura (*Acacia farnesiana* (L.) Willd, 1806, 1806), ampliamente distribuida en la regiones tropicales y en el mediterráneo (Little *et al.*, 2001).

En estudios previos realizados para esta especie, el extracto etanólico se evaluó en diferentes modelos antimaláricos y los resultados permitieron concluir que la corteza de *A. farnesiana* presentó efectos antimaláricos promisorios (Garavito *et al.*, 2006). Sus propiedades biológicas y los usos reportados en la literatura hacen que *A. farnesiana* sea una especie interesante para adelantar estudios fitoquímicos adicionales. El presente trabajo muestra el estudio fitoquímico de la corteza de esta especie colectada en dos épocas del año (seca y de lluvia) para observar las diferencias existentes en el contenido de metabolitos y la actividad biológica que serán posteriormente investigados. La caracterización de las dos épocas de colecta se realizó por medio de pruebas químicas, técnicas cromatográficas y técnicas espectroscópicas. Para la detección e identificación de metabolitos se utilizaron diferentes métodos cromatográficos como CCD, CC en sílica gel y sephadex LH-20; CCDP y técnicas instrumentales como CG – EM, RMN mono y bidimensional.

1. Marco teórico

1.1 Descripción de la especie vegetal *Acacia farnesiana*

El género *Acacia* está conformado por más de 1.350 especies que pertenecen a la familia Fabaceae, se extiende por las regiones cálidas y áridas del mundo, sus especies poseen metabolitos secundarios como flavonoides, taninos condensados, polisacáridos como gomas, etc (Seigler, 2003).

La *Acacia farnesiana* corresponde a sinónimos como: *Mimosa farnesiana* L. y *Vachellia farnesiana* Wight et Arn. (García-Barriga, 1992; Mobile, 2008) entre otras. Presenta como nombres comunes: casha, cassia (Islas Vírgenes); aroma, aramo (España); cambrón (República Dominicana); aroma amarilla (Cuba); huisache, quisache, binorama, subinche (México); espino blanco, espinal, subín (Guatemala); pelá, cují cimarrón, uña de cabra (Colombia); huaranga (Perú); espino blanco (Bolivia); sweet acacia, cassie, huisache (Estados Unidos); esponjeira (Brasil) (Little *et al.*, 2001), entre otros.

Acacia farnesiana es un arbusto espinoso, la forma arbustiva es de 1 a 2 m y la forma arbórea de 3 a 10 m de altura, presenta hojas bipinnadas, alternas, frecuentemente aglomeradas en las axilas de cada par de espinas, las espinas de 4,5 cm de largo muy apuntadas. Los tallos son rígidos y fuertes, la corteza es lisa de color castaño oscuro con un marcado olor azufrado. Las flores se presentan en cabezuelas de color amarillo, originadas en las axilas de las espinas, solitarias o en grupos de 2 a 3; con un aroma agradable (*Acacia farnesiana* (L.) Willd, 1806) (Figura 1-1).

Figura 1-1: *Acacia farnesiana* (Mobile, 2008)



Esta especie está ampliamente distribuida en América, naturalizada en todo el mundo en especial en el trópico y en el mediterráneo. En las Américas se extiende del sur de Estados Unidos, pasando por México y Centroamérica hasta Argentina y Chile. También a lo largo de las Antillas, desde Bahamas y Cuba hasta Trinidad y Tobago, Curazao y Aruba (Little *et al.*, 2001).

De la especie vegetal *A. farnesiana* se usa el aceite esencial presente en las flores como aromatizante en la industria de perfumería (Seigler, 2003). En el proceso de curtiembre se usa la corteza y el fruto por su contenido de taninos (Evans, 1989). Las hojas y frutos, se emplean como forraje para ganado vacuno y caprino, especialmente durante el invierno (Parrotta, 1992).

Esta especie vegetal es ampliamente utilizada en medicina popular en varios países para tratar diferentes enfermedades: en México es utilizada para trastornos gastrointestinales por medio de una decocción de la corteza o las espinas (Moreno *et al.*, 2008). En la India se usa la corteza para trastornos gastrointestinales (Kshirsagar *et al.*, 2001; Dey *et al.*, 2012), la goma se aplica en la piel para el tratamiento de quemaduras (Saikia *et al.*,

2006), la corteza y la raíz para tratar la bronquitis (Ram *et al.*, 2011). En Palestina se usa para el reumatismo, quemaduras de piel y el tratamiento de enfermedades del sistema digestivo (Ali-Shtayeh *et al.*, 2000). En Bolivia se realiza una infusión de las flores para los trastornos gastrointestinales (Bourdy *et al.*, 2000). En el Líbano se prepara una decocción de la corteza para el reumatismo (El Beyrouthy *et al.*, 2008). En Colombia los frutos triturados se usan para el tratamiento de diarreas, la decocción de la raíz para disminuir la fiebre y para procedimiento de enemas, las hojas y corteza se usan para el tratamiento de la malaria, entre otras (García-Barriga, 1992).

A partir de los usos tradicionales empleados para esta especie se han realizado varios estudios donde se reporta actividad antiamebiana de las hojas (Cruz *et al.*, 2000), actividad antimicrobiana de la raíz (Hernández *et al.*, 2009), actividad antiinflamatoria y reducción del edema de la pata en roedores con el uso de extractos de la parte aérea de la planta (Meckes *et al.*, 2004). Se aisló de las semillas la proteína lectina la cual mostró un efecto fitopatógeno en bacterias gram negativas y gram positivas (Santi-Gadelha *et al.*, 2012). El extracto metanólico de la corteza de *A. farnesiana* inhibe cepas de la bacteria *Campylobacter* (Castillo *et al.*, 2011). El compuesto galato de metilo obtenido de la corteza de esta especie, el extracto etanólico y metanólico pueden alterar las membranas celulares de la bacteria gram negativa *Vibrio cholerae*, inhibiendo su crecimiento (Sánchez *et al.*, 2013, García *et al.*, 2006, Sánchez *et al.*, 2010). Se purificó la enzima liasa S-alquil-L-cisteína a partir de extractos en acetona de plántulas, semillas y flores (Mazelis *et al.*, 1975, Mazelis 1975). Las hojas contienen compuestos cianogénicos (Secor *et al.*, 1976), como la linamarina y lotaustralina (Seigler *et al.*, 1979).

En África y Sur América esta especie se emplea frecuentemente para el tratamiento de la malaria, una enfermedad parasitaria producida por varias especies de *Plasmodium* transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles* principalmente en regiones tropicales. Es común en países con sistemas de salud y estrategias de control menos desarrollados. Las altas tasas de morbilidad y mortalidad pueden atribuirse principalmente a problemas de salubridad, falta de acceso a un tratamiento y a la creciente resistencia del parásito a los medicamentos antimaláricos. Esto ha significado un problema de salud pública en las regiones endémicas (Mita *et al.*, 2009, López *et al.*, 2010) por lo tanto los productos naturales y sus derivados son una alternativa importante

en la investigación para el tratamiento de la malaria y son considerados como una fuente potencial de nuevos fármacos (Wells T. 2011).

En el continente africano, el género *Acacia* es muy utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la malaria en decocciones e infusiones de hojas, raíz y particularmente la corteza (Tabla 1-1). Estudios realizados al extracto en metanol y la betulina aislada del extracto en diclorometano de la corteza del tallo de *Acacia mellifera* reportaron actividad antimalárica frente a *Plasmodium berghei* (Mutai *et al.*, 2008).

Tabla 1-1: Algunas especies del género *Acacia* utilizadas en África para el tratamiento de la malaria

Especie	Órgano de la planta	Referencia
<i>Acacia mellifera</i>	corteza	Muthaura <i>et al.</i> , 2011; Mutai <i>et al.</i> , 2008; Koch <i>et al.</i> , 2005; Wambugu <i>et al.</i> , 2011.
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd.	corteza	Muthaura <i>et al.</i> , 2007; Wambugu <i>et al.</i> , 2011
<i>Acacia seyal</i>	corteza	Nguta <i>et al.</i> , 2010; Wambugu <i>et al.</i> , 2011
<i>Acacia xanthophloeae</i> Benth	corteza	Pillay <i>et al.</i> , 2008; Prozesky <i>et al.</i> , 2001

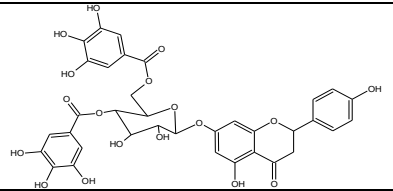
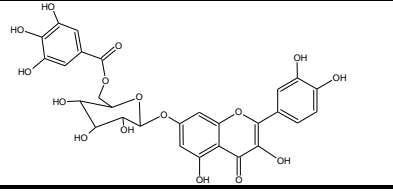
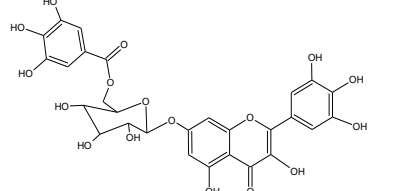
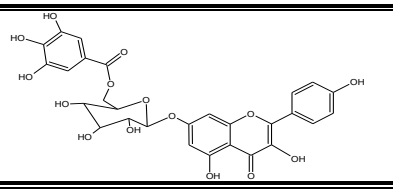
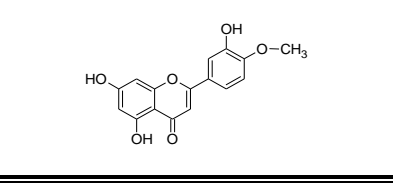
En Colombia se utiliza la especie vegetal *Acacia farnesiana* junto con varias plantas medicinales para tratar la malaria mediante infusiones o decocciones de las hojas y cortezas. En estudios previos realizados con esta especie se obtuvo un extracto etanólico que se evaluó en diferentes modelos antimaláricos, los resultados permitieron concluir que la corteza presenta actividad promisoriosa (< 2 µg/mL) contra *Plasmodium falciparum*, mientras que no fue activo a la dosis estudiada en *Plasmodium berghei in vivo* (< 50%) y en el modelo FBIT (test de inhibición de la biopolimerización de la ferriprotoporfirina) presentó un valor > 10 mg/mL (Garavito *et al.*, 2006).

1.2 Estudio fitoquímico

La literatura científica ha reportado varios grupos de metabolitos obtenidos del género *Acacia* como aminas, alcaloides, aceites esenciales, aminoácidos no protéicos, diterpenos, ácidos grasos, triterpenos, fitoesteroles, saponinas, flavonoides, gomas, taninos hidrolizables y condensados (Seigler, 2003).

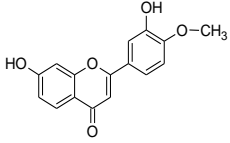
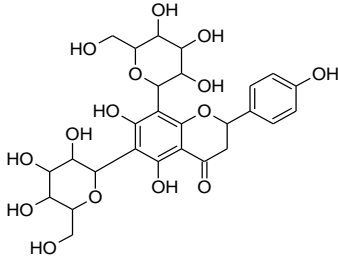
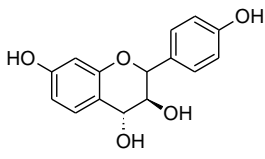
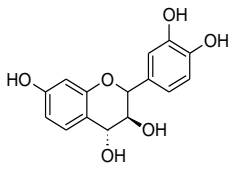
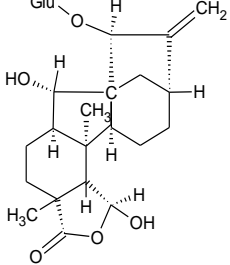
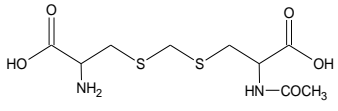
En la especie vegetal *Acacia farnesiana* se identificaron varios metabolitos entre los que se han encontrado cuatro nuevos diterpenos presentes en raíces, llamados acasiana A, acasiana B, farnesirana A y farnesirana B (Lin As *et al.*, 2009). La Tabla 1-2 muestra algunas estructuras presentes en esta especie.

Tabla 1-2: Metabolitos secundarios reportados en la literatura para la especie *Acacia farnesiana*.

Nombre del metabolito	Estructura	Órgano de la planta	Referencia
7-O-β-(4'',6'' digaloilglucopiranosido) Naringenina		Vainas	(Barakat <i>et al.</i> , 1999)
7-O-β-(6'' -galoilglucopiranosido)- Quercetina		Vainas	(Barakat <i>et al.</i> , 1999)
7-O-β-(6'' -galoilglucopiranosido)- Miricetina		Vainas	(Barakat <i>et al.</i> , 1999)
7-(6'' -galoilglucósido) Kaempferol		Vainas	(Barakat <i>et al.</i> , 1999)
Diosmetina		Semillas	(Sahu <i>et al.</i> , 1998)

(Continúa)

(Continuación)

Nombre del metabolito	Estructura	Órgano de la planta	Referencia
(7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona) Farnisina		Semillas	(Sahu <i>et al.</i> , 1998)
6,8-bis-C-β-D - glucopiranosido-Apigenina (vicenina)		*	(Seigler, 2003).
Guibourticacina		*	(Seigler, 2003).
Mollisacacina		*	(Seigler, 2003).
Farnesiasida		Semillas	(Sahu <i>et al.</i> , 1997)
Ácido N-acetil djenkolico		Semillas	(Gmelin <i>et al.</i> , 1962)

* no se reporta órgano de la planta

Estudios realizados en las vainas reportan el aislamiento e identificación en el extracto etanólico de fenoles como: ácido gálico, ácido elágico, ácido *m*-digálico, galato de metilo, kaempferol, aromadendrina y naringenina. Además, en el extracto de acetato de etilo se encontró: 7-diglucósido-kaempferol y 7-glucósido-naringenina (El Sissi *et al.*, 1973).

Investigaciones del aceite esencial de las flores de *Acacia farnesiana*, presenta contenido de: salicilato de metilo (47,5%), anisaldehído (17,3%), geraniol (9,8%), benzaldehído (6%), acetato de geranilo (3,3%), geranial (2,8%), (0,7%), mirceno (0,5%), alcohol bencílico (0,5%), linalol (0,4%), y otros componentes utilizados en perfumería (Seigler, 2003). Se destaca la presencia de taninos y fenoles en la corteza de esta planta (Devi *et al.*, 1991).

Los usos en la medicina tradicional, resultados de los ensayos biológicos reportados y trabajos científicos de la especie vegetal *Acacia farnesiana*, hacen que sea una especie interesante para adelantar estudios fitoquímicos adicionales y de actividad biológica de esta planta, por lo que en el presente trabajo se propuso una caracterización fitoquímica de la corteza de *A. farnesiana* colectada en dos épocas del año (seca y de lluvia), con el fin de determinar variaciones en el contenido de metabolitos, estos datos posteriormente serán contrastados con ensayos de actividad biológica que serán realizados en el grupo y permitirá acercarnos al tipo de metabolitos involucrados en la actividad biológica o en funciones ecológicas.

2. Metodología

2.1 Equipos

Los análisis por HPLC fueron registrados en un equipo Agilent serie 1200 equipado con desgasificador de vacío serie 1200 G1322A para cuatro canales, una bomba cuaternaria serie 1200, un automuestreador serie 1260 G1329B, un compartimento termostatado de columna serie 1200 G1316A con temperatura máxima de 80 °C, y un detector DAD serie 1200 G1315B con lámpara de deuterio y tungsteno para longitudes de onda entre 190 – 900 nm. La separación se realizó en una columna RP-18, 5 µm (4 mm x 250 mm) Merck®.

Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FT-IR™, en celdas de NaCl y pastillas de KBr. Los espectros de Resonancia magnética nuclear ¹H - ¹³C, DEPT 135 y bidimensionales HMQC y HMBC fueron registrados en un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker de 400 MHz en el laboratorio de resonancia magnética nuclear de la Universidad Nacional de Colombia.

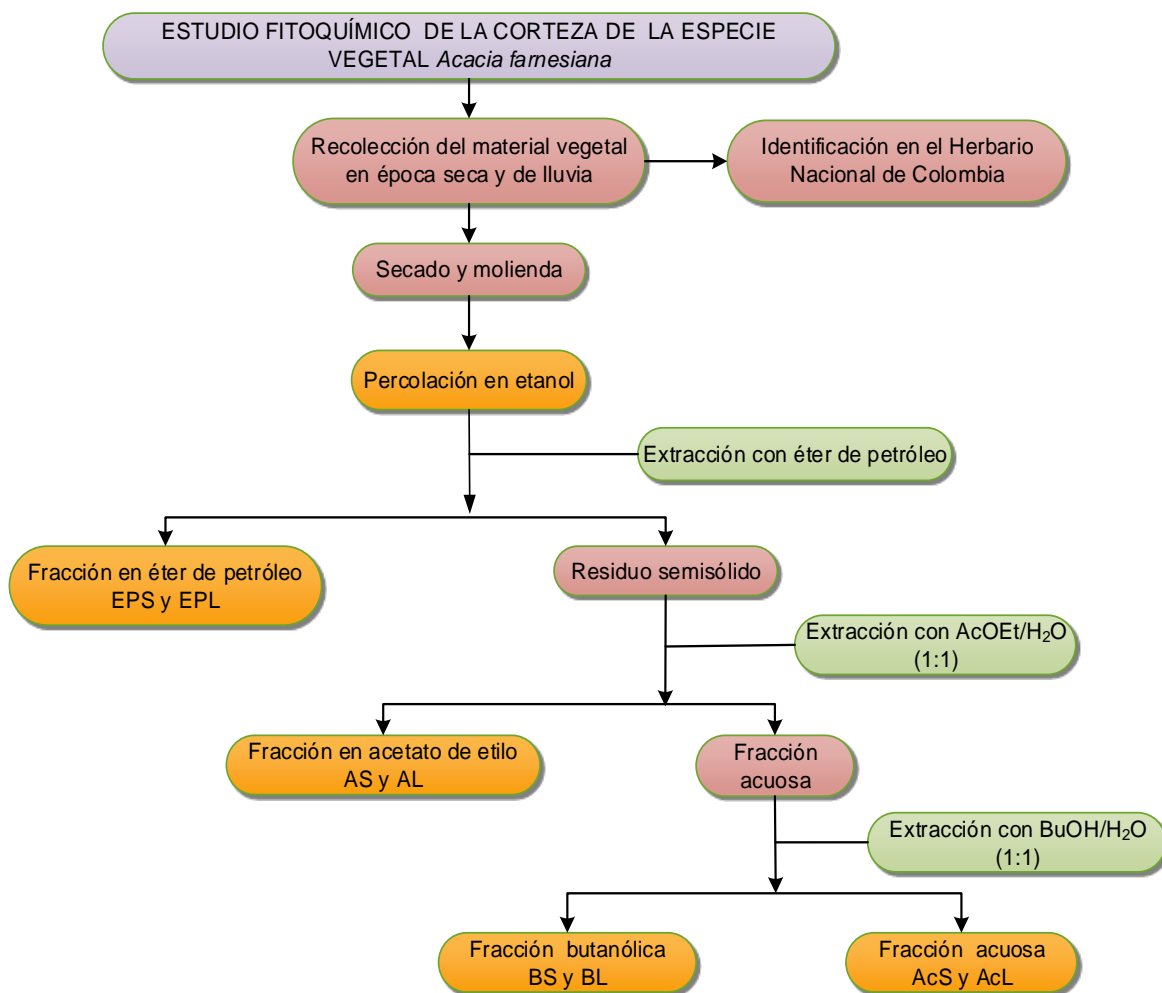
Los análisis de CG-EM fueron realizados en un cromatógrafo de gases shimadzu QP2010 plus con analizador tipo cuadrupolo, la separación se realizó en una columna capilar HP-5 de 30 m, del laboratorio de química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y un cromatógrafo de gases agilent technologies 5975C VL MSD, la separación se realizó en una columna HP-5, 30 m, del laboratorio del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

2.2 Recolección del material vegetal en época seca y de lluvia, elaboración de extractos y fraccionamiento.

El material vegetal fue colectado en dos épocas del año, una seca (junio) y otra de lluvia (octubre), en Armero-Guayabal, Departamento del Tolima (Colombia). La clasificación taxonómica de la muestra vegetal se realizó en el Herbario Nacional Colombiano, registrada como *Acacia farnesiana* (L.) Willd con el código COL 526762. Los procedimientos realizados a la corteza de *A. farnesiana* se efectuaron paralelamente pero por separado para las dos épocas del año.

La corteza de *A. farnesiana* se sometió a un proceso de secado y molienda, por medio de percolación con etanol al 96%, se obtuvo el extracto etanólico de época seca (ES) y de lluvia (EL). Los extractos secos de las dos épocas del año obtenidos, luego de evaporar el solvente a vacío, se sometieron a tratamiento con éter de petróleo (Figura 2-1) dando lugar a la fracción en éter de petróleo época seca (EPS) - éter de petróleo época de lluvia (EPL) y residuos semisólidos que se sometieron a partición con una mezcla de AcOEt:H₂O (1:1) obteniendo las fracciones en acetato de etilo época seca (AS) – acetato de etilo época de lluvia (AL) y acuosas, estas últimas se extrajeron con una mezcla de *n*-Butanol:H₂O (1:1) para dar lugar a las fracciones butanólica época seca (BS) – butanólica época de lluvia (BL) y las fracciones acuosas época seca (AcS) – acuosa época de lluvia (AcL).

Figura 2-1: Diagrama general de la extracción y fraccionamiento de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



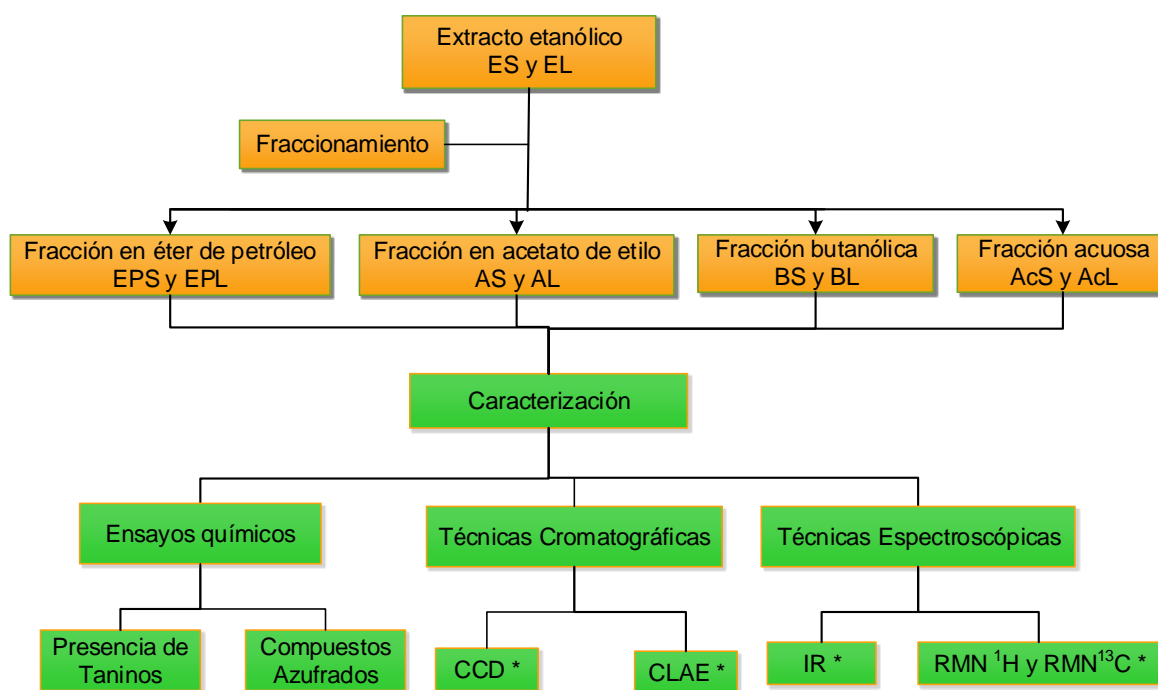
- **ES:** extracto etanólico época seca, **EL:** extracto etanólico época de lluvia, **EPS:** fracción en éter de petróleo época seca, **EPL:** fracción en éter de petróleo época de lluvia, **AS:** fracción en acetato de etilo época seca, **AL:** fracción en acetato de etilo época de lluvia, **BS:** fracción butanólica época seca, **BL:** fracción butanólica época de lluvia, **AcS:** fracción acuosa época seca, **AcL:** fracción acuosa época de lluvia.
- Los solventes de los extractos y fracciones fueron eliminados en rotaevaporador a vacío y por liofilización para la fase acuosa.

2.3 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia.

Luego de eliminar los solventes por evaporación al vacío y liofilización en el caso de la fracción acuosa, se realizó un análisis fitoquímico al extracto y a las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanólica y acuosa obtenidas en la época seca y de lluvia para

determinar las similitudes o diferencias entre ellas (Figura 2-2). La caracterización de los diferentes grupos de metabolitos se realizó mediante pruebas químicas para detectar la presencia de taninos y de compuestos con azufre, además de técnicas cromatográficas como cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE- HPLC) y por técnicas espectroscópicas como infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) y carbono (RMN-¹³C), los cuales se muestran a continuación en la Figura 2-2.

Figura 2-2: Diagrama general para la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



* CCD: cromatografía en capa delgada. RMN ¹H y RMN ¹³C: resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono. IR: infrarrojo. CLAE: cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

2.3.1 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por pruebas químicas para taninos y compuestos azufrados.

- **Análisis del contenido de taninos en los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

La presencia de taninos se detectó al realizar pruebas cualitativas utilizando tres ensayos en diferentes condiciones para determinar la más óptima y proceder a realizar una prueba cualitativa (Price M. & Butler L., 1977):

- **Ensayo cualitativo:** En un tubo de ensayo se tomó aproximadamente 10 mg de muestra, se adicionaron 0,5 mL de FeCl_3 0,008 M en HCl 0,008 N, seguido de 0,5 mL de ferricianuro de potasio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,0015 M. El color azul de prusia indica la presencia de taninos, según Price M. & Butler L., 1978, la presencia de color verde claro contiene baja o nula concentración de taninos, verde oscuro contenido medio y azul alto contenido de taninos.
- **Ensayo cuantitativo:** Para la preparación de la curva de calibración se utilizó una solución estándar de ácido tánico (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se pesaron aproximadamente 1,5 mg de los extractos etanólicos, fracciones butanólicas y fracciones acuosas obtenidas en las dos épocas del año. Las cantidades pesadas se llevaron cuantitativamente a un volumen final de 10 mL utilizando como solvente metanol/agua (1:1) a excepción de los extractos acuosos que fueron en agua. En una placa de 96 pozos se adicionaron 50 μL de cada uno de los estándares y muestras previamente preparados seguido de 50 μL de cloruro férrico (FeCl_3) 0,008 M en 0,1 N HCl y por último 50 μL de ferricianuro de potasio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,003 M. Se midieron las absorbancias a 720 nm de longitud de onda después de 60 segundos, en un equipo espectrofotómetro de microplacas xMark Bio-Rad.

▪ **Análisis de compuestos azufrados en los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

Por medio de dos ensayos se detectó la presencia de compuestos azufrados en los extractos y en las fracciones obtenidas en las dos épocas del año seca y de lluvia:

- **Ensayo 1. Nitroferricianuro de sodio:** En un tubo de ensayo se tomaron aproximadamente 10 mg de la muestra, se agregó 0,5 mL de hidróxido de sodio 1 N y 0,5 mL de agua, se calentó el tubo de ensayo en un recipiente con agua a ebullición durante 10 min, se enfrió y se filtró. Al filtrado se le adicionaron 2 gotas de nitroferricianuro de sodio 0,18 M. La aparición de color rojo o rojo naranja indica la presencia de compuestos que contienen azufre (USP, 2013).
- **Ensayo 2. Acetato de plomo:** En un tubo de ensayo se tomaron aproximadamente 10 mg de muestra, en la boca del tubo se colocó papel filtro impregnado con una solución de acetato de plomo saturada y se calentó el tubo. La aparición de color café indica la presencia de compuestos que contienen azufre (USP, 2013).

2.3.2 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas cromatográficas

▪ **Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

A los extractos etanólicos y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y agua provenientes de las dos épocas del año seca y de lluvia, se les realizaron perfiles cromatográficos con diferentes fases móviles preparadas en diferentes proporciones de los siguientes solventes: CHCl_3 , AcOEt, MeOH y H_2O , ocasionalmente se utilizó ac. fórmico y como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ en soporte de aluminio con espesor de 0,25 mm (Merck®). Una vez eluidas las placas se revelaron con luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 y 365 nm, reveladores químicos como Godin (vainillina 1%/ H_2SO_4 10% y calentamiento) y NP/PEG para flavonoides (Wagner H. & Blatt S., 2001).

▪ **Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de las fracciones obtenidas de la corteza de *A. farnesiana*.**

Las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo y butanol se analizaron en un equipo HPLC Agilent equipado con un detector DAD y columna RP-18, las condiciones utilizadas para cada fracción se muestran en la Tabla 2-1. Las condiciones reportadas son producto de varios intentos realizando diversas alternativas para los extractos y fracciones analizadas.

Tabla 2-1: Condiciones para el análisis por CLAE de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en época seca y de lluvia.

Fracción	Éter de petróleo (EPS-EPL)	Acetato de etilo (AS-AL)	Butanólica (BS-BL)
Concentración (mg/mL)	10	30	30
Volumen de inyección (µL)	50	20	20
Flujo (mL / min)	1	1	1,2
Temperatura (°C)	25	25	25
Fase móvil	agua-ácido fórmico 0,1% (A) y acetonitrilo (B)	agua-ácido fórmico 0,2 % (C) y metanol (D)	agua-ácido fórmico 0,4 % (E) y metanol (F)
Gradiente	40% de B a 0 min, 90% B en 50 min, 90% B en 60 min	30% de D a 0 min, 45% D en 20 min, 100% D 50 min, 100% en D en 60 min	10% de F a 0 min, 35% F en 60 min, 50% F 75 min, 100% en F en 80 min, 100% en F en 85 min
Detección λ (nm)	210, 254 y 280	210, 254, 280 y 350	254, 280 y 350

Columna RP-18. EPL: fracción en éter de petróleo época de lluvia, EPS: fracción en éter de petróleo época seca, AL: fracción en acetato de etilo época de lluvia, AS: fracción en acetato de etilo época seca, BL: fracción en butanol época de lluvia, BS: fracción en butanol época seca.

2.3.3 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas espectroscópicas

El extracto etanólico y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo y butanólica provenientes de las dos épocas del año se analizaron por infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN ^1H y ^{13}C).

▪ **Análisis por infrarrojo (IR) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

Los extractos y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo y butanol obtenidos en la época seca y de lluvia se analizaron en un equipo ATI Mattson Genesis Series FT-IR™ en celdas de NaCl y pastillas de KBr.

▪ **Análisis por RMN ¹H y ¹³C de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

Los extractos y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y agua obtenidas en la época seca y de lluvia se analizaron en un equipo Bruker de 400 MHz usando solventes deuterados como cloroformo (CDCl₃) o metanol (CD₃OD).

2.4 Aislamiento, purificación e identificación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo provenientes de las dos épocas del año estudiadas.

Las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* en la época seca y de lluvia se seleccionaron para someterlas a procedimientos de separación y purificación (Figura 2-3) empleando cromatografía en columna (CC) utilizando como absorbente sílica gel 60 y eluyendo con mezclas de solventes de diferente polaridad (hexano, hexano/CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH, MeOH).

De estas columnas se obtuvieron subfracciones de 10 mL, las cuales fueron monitoreadas por CCD en diferentes sistemas de elución con el fin de detectar los principales grupos de metabolitos presentes en las mismas por medio de luz ultravioleta a 254 y 365 nm y utilizando diferentes reveladores químicos como Godin (vainillina 1%/H₂SO₄ 10%) y NP/PEG.

Con algunas de las fracciones obtenidas por CC fue necesario realizar nuevas separaciones por cromatografía utilizando sílica gel 60 con un tamaño de partícula de

0,063 a 0,2 mm (MERCK®) y cromatografía en Sephadex LH-20 (SIGMA®) como fase estacionaria y eluyendo con solventes de diferente polaridad. Posteriormente se realizaron recristalizaciones y cromatografías en capa delgada preparativa (CCDP) empleando placas de vidrio de 20x20 cm con una capa de sílica gel 60 GF₂₅₄ de 0,3 mm de espesor para purificar las muestras.

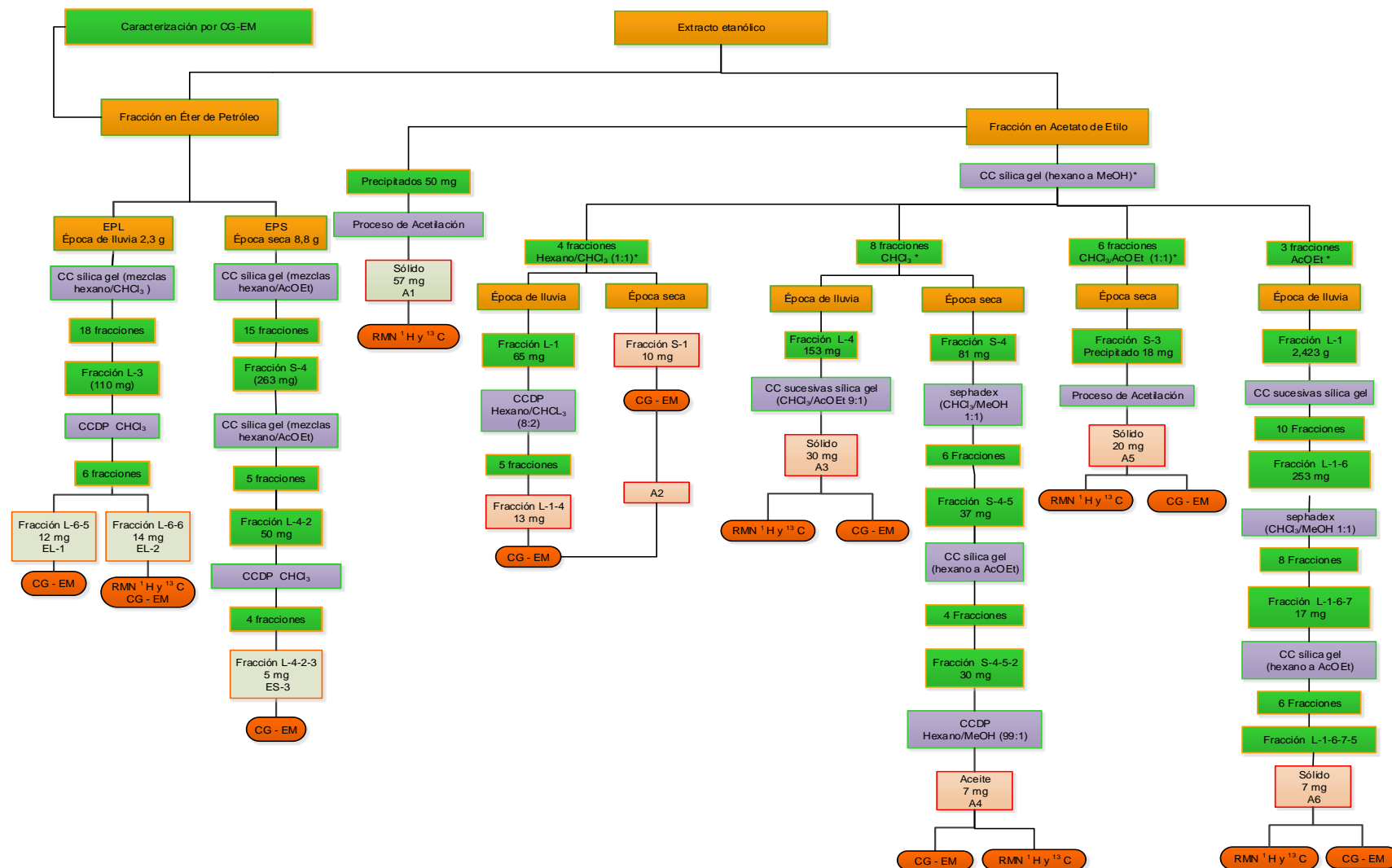
El análisis de metabolitos obtenidos en algunas subfracciones provenientes de las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo en las dos épocas del año, se realizó empleando técnicas instrumentales como RMN monodimensional (¹H, ¹³C, DEPT 135) y bidimensional (homocopy, HMQC, HMBC) y (CG-EM) Figura 2-3.

2.4.1 Fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

- **Fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia (EPL)**

La fracción en éter de petróleo obtenida en la época de lluvia (2,3 g) fue fraccionada por CC empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y mezclas de hexano/CHCl₃ en polaridad creciente, de esta columna se obtuvieron un total de 18 fracciones, tras la evaporación del solvente se agruparon según su comportamiento por CCD revelando con el reactivo de Godin. Algunas de estas fracciones se seleccionaron para continuar en proceso de purificación teniendo en cuenta su peso y su perfil cromatográfico (CCD). La fracción L-3 (110 mg) fue purificada por CCDP en sílica gel 60 G F₂₅₄, empleando como fase móvil CHCl₃ para obtener un total de 6 fracciones. La fracción L-6-5 presentó un sólido denominado **EL-1** y la fracción L-6-6 presentó un sólido denominado **EL-2** (Figura 2-4).

Figura 2-3: Diagrama general de aislamiento, purificación e identificación de metabolitos de las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



▪ **Fracción en éter de petróleo proveniente de la época seca (EPS)**

La fracción en éter de petróleo obtenida en la época seca (8.8 g) fue fraccionada por CC empleando como fase estacionaria sílica gel 60, iniciando la elución con hexano como fase móvil aumentando la polaridad con adición de 10% de CHCl_3 hasta 100% de CHCl_3 y posteriormente con mezclas de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1 a 1:9), luego de la evaporación del solvente se analizaron las fracciones por CCD revelando con el reactivo de Godin y se reunieron en 15 fracciones.

La fracción S-4 (263 mg) se sometió a purificación por CC empleando sílica gel 60, se eluyó inicialmente con hexano aumentando la polaridad por adición de CHCl_3 hasta llegar a la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (90:10), se obtuvo un total de 5 fracciones después de agruparlas según su comportamiento en CCD. La subfracción S-4-2 (50 mg) obtenida de la columna anterior fue sometida a purificación por CCDP en sílica gel 60 G F₂₅₄, se empleó como fase móvil CHCl_3 para obtener un total de 4 fracciones. La fracción S-4-2-3 presentó un sólido denominado **ES-3** (Figura 2-4).

2.4.2 Fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

Al obtener la fracción en acetato de etilo en la época de lluvia se observó un precipitado soluble en la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ o en piridina la cual se analiza posteriormente.

Para adelantar el proceso de purificación de las fracciones en acetato de etilo obtenidas en las dos épocas del año (Figura 2-5) se realizó CC en sílica gel 60 eluyendo con mezclas de hexano, CHCl_3 , acetato de etilo en diferentes proporciones hasta metanol. Las fracciones colectadas, luego de evaporar el solvente, fueron monitoreadas por CCD con diferentes mezclas de solventes como hexano, CHCl_3 , acetato de etilo y metanol en diferentes proporciones para detectar similitudes que pudieran ser utilizadas como criterio para la unión de las mismas revelando con el reactivo de Godin.

De la CC en sílica gel 60 se obtuvieron 29 fracciones de cada época del año distribuidas como se muestra en la Figura 2-5. Con el fin de purificar los metabolitos de las fracciones obtenidas en la mezcla de Hexano/ CHCl_3 (1:1), CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1), y AcOEt provenientes de las dos épocas del año se realizaron procedimientos cromatográficos

(CC en sílica gel 60, sephadex LH 20 y CCDP) de acuerdo a los resultados de estas fracciones por CCD revelando con el reactivo de Godin.

Figura 2-4: Análisis de las fracciones en éter de petróleo obtenidas de los extractos etanólicos de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época seca y de lluvia.

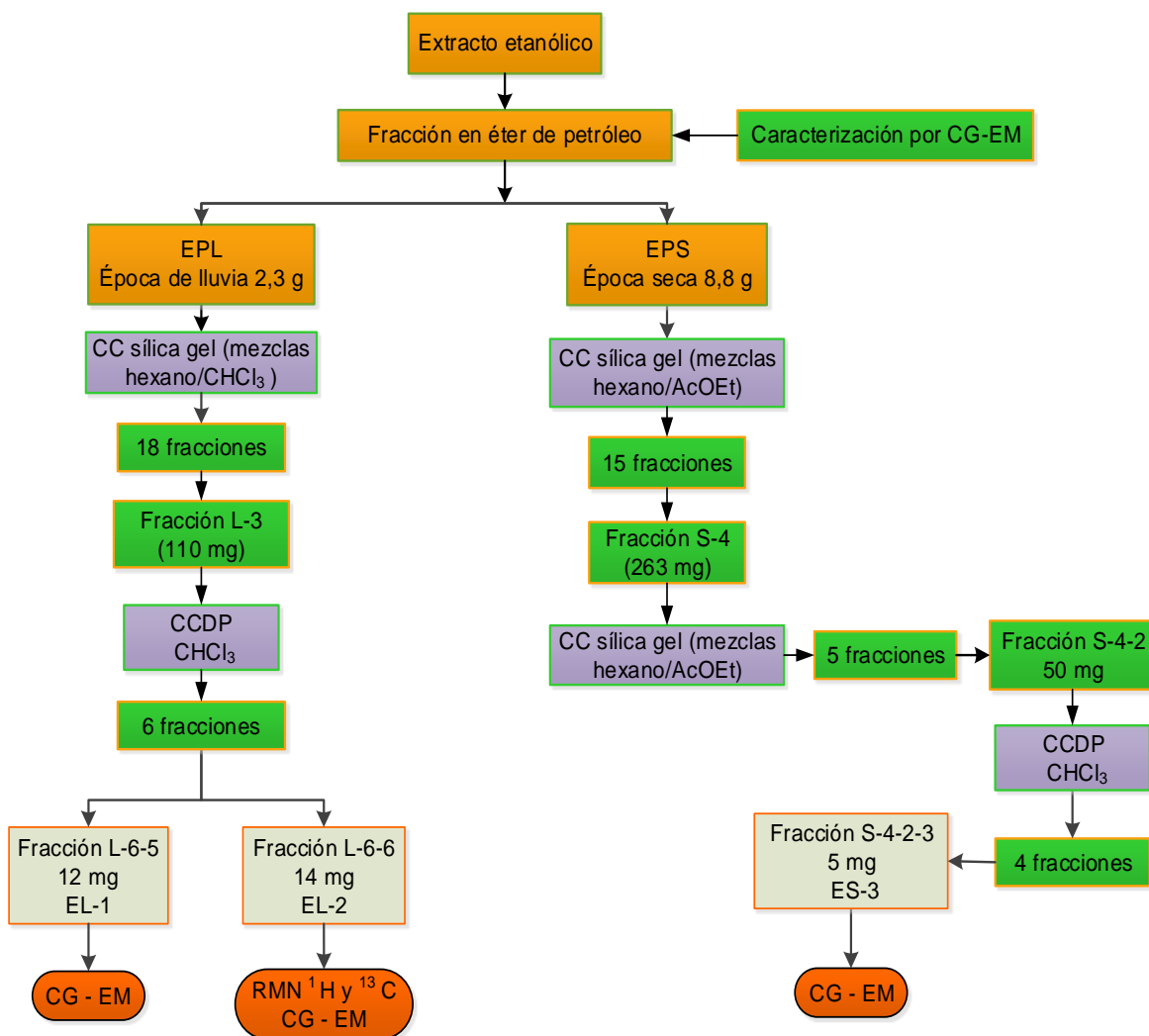
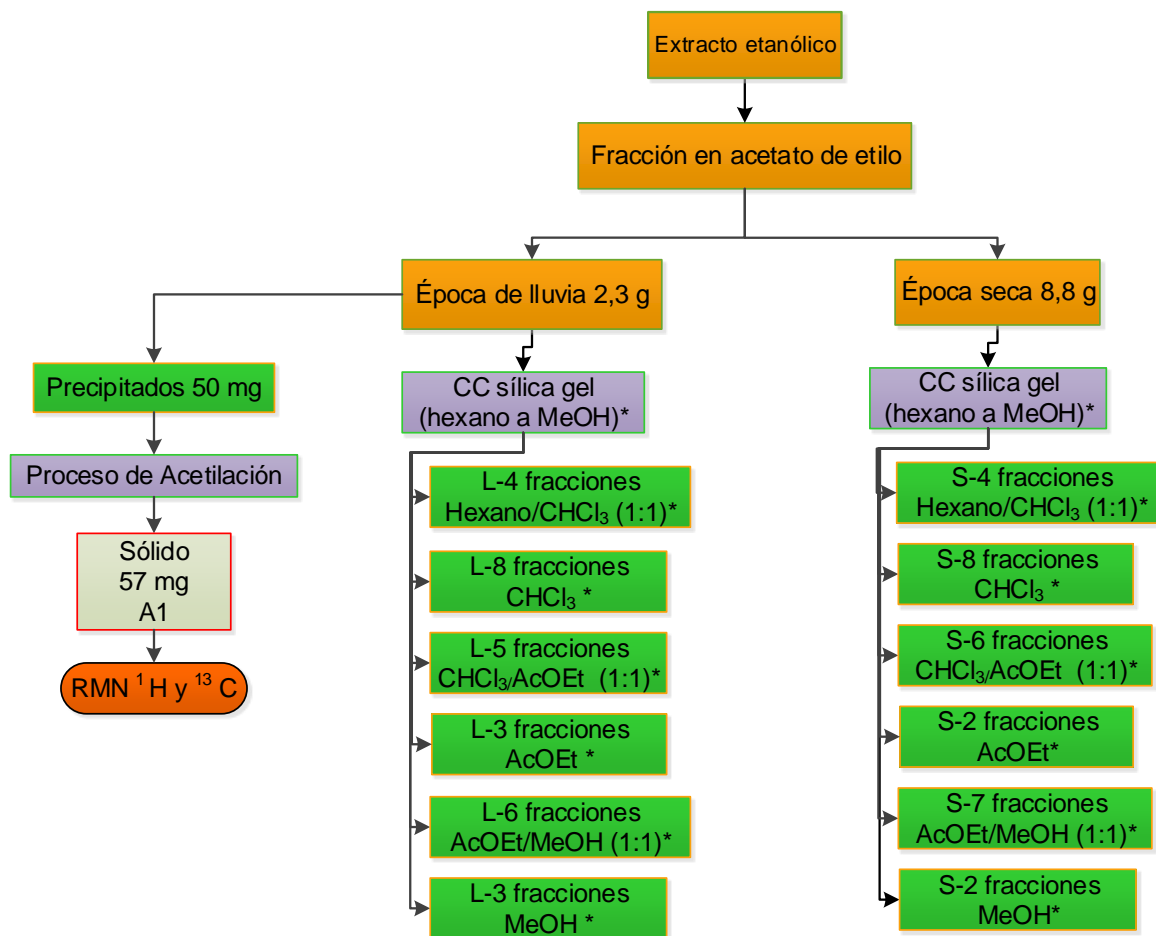


Figura 2-5: Análisis de la fracción en acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época seca y de lluvia.



*solventes de elución.

▪ **Análisis del precipitado obtenido en la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.**

Al concentrar la fracción en acetato de etilo época de lluvia se observó un precipitado (Figura 2-5) denominado **A1** soluble en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) o en piridina.

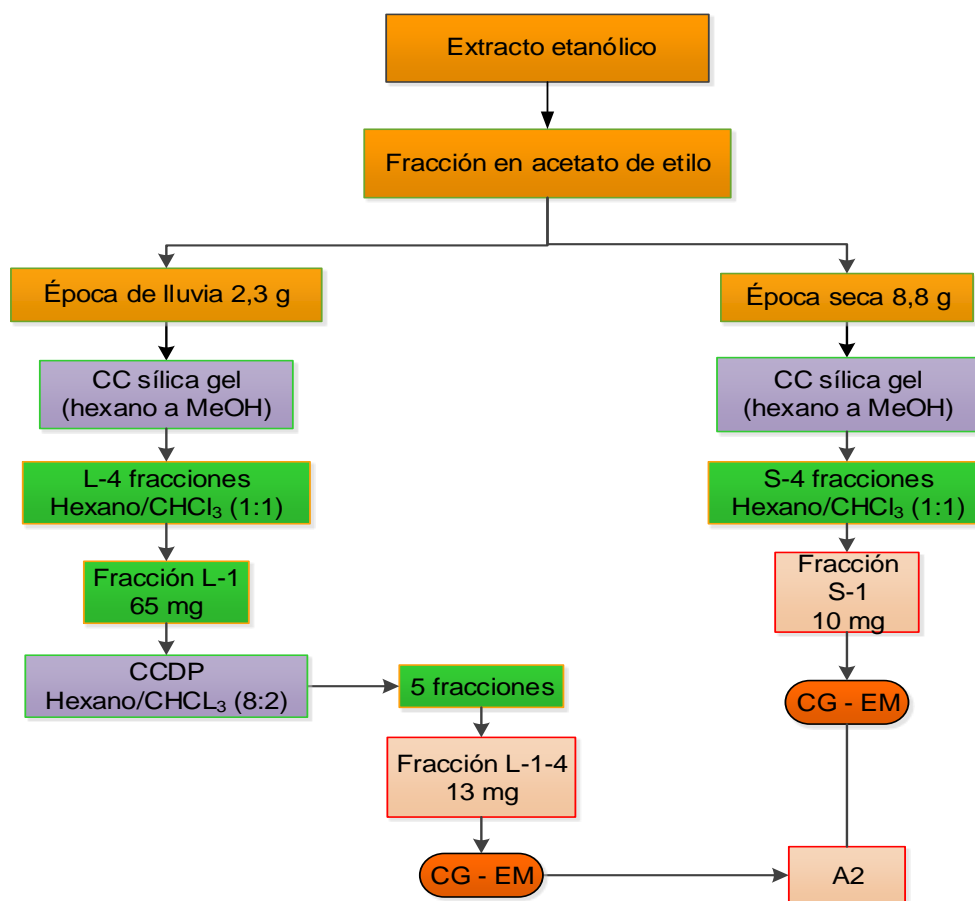
Para analizar la muestra por RMN y facilitar su análisis se realizó un proceso de acetilación. En un reactor químico se adicionaron 50 mg de A1, 1 mL de piridina, 1 mL de anhídrido acético, posteriormente se agitó por 24 h. Al terminar, se hizo una extracción adicionando 10 mL de diclorometano (por triplicado), luego se adicionaron 10 mL de HCl 10% (por triplicado) y 10 mL de agua (por triplicado). Por último se trató la muestra en un

embudo con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el solvente y se pesó. Se obtuvieron 57 mg de un sólido blanco (Figura 2-5).

▪ **Fracciones en Hexano/ CHCl_3 (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo provenientes de la época seca y de lluvia.**

La fracción L-1 (65 mg) proveniente de la época de lluvia se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) con sílica gel 60 G F_{254} , eluyendo con Hexano/ CHCl_3 (8:2) obteniéndose 5 fracciones, la fracción L-1-4 se analizó por CG-EM (Figura 2-6).

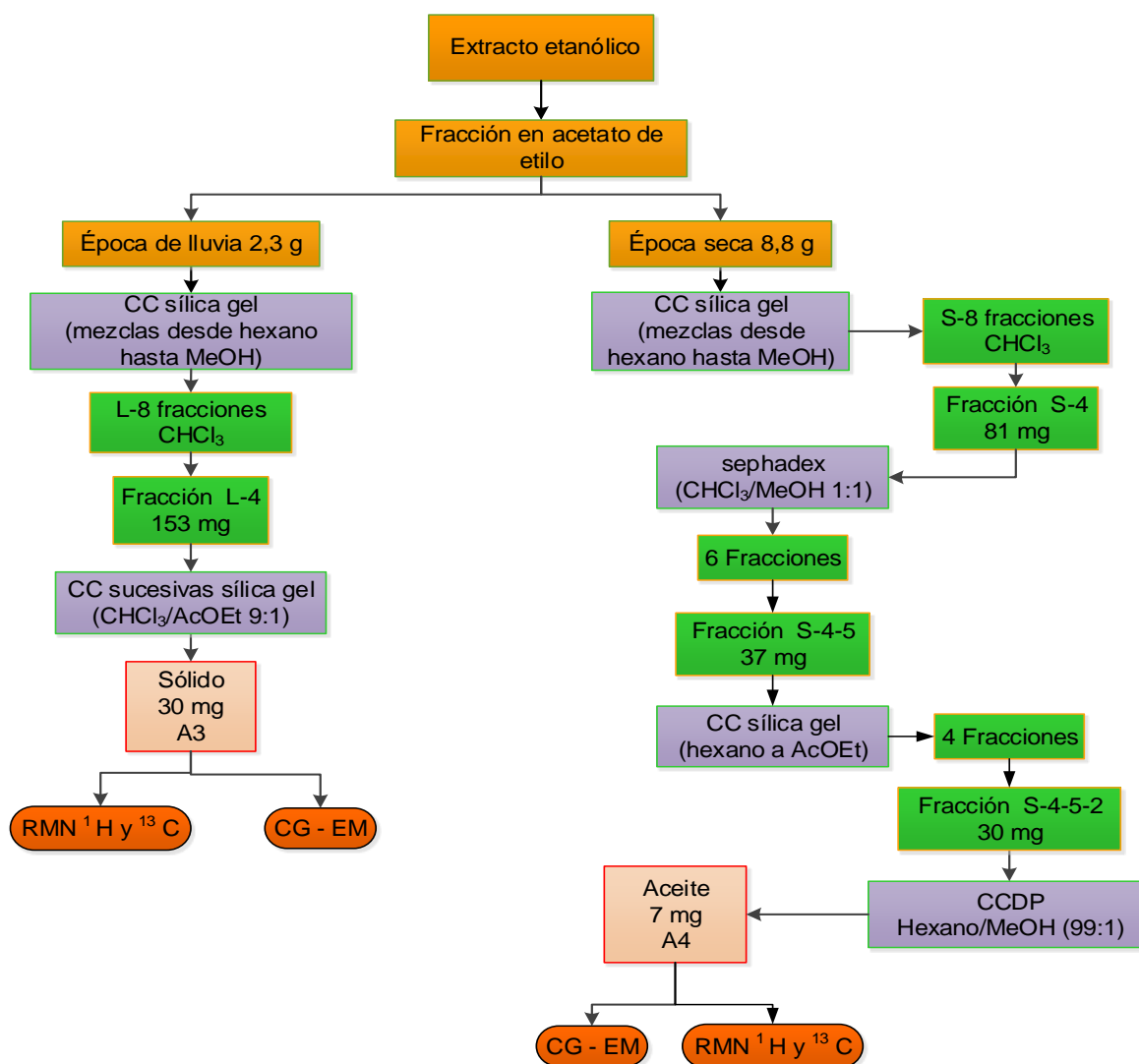
Figura 2-6: Análisis de las fracciones en Hexano/ CHCl_3 (1:1) provenientes de las fracciones en acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época seca y de lluvia.



▪ **Fracciones en CHCl₃ obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia.**

De las fracciones obtenidas en CHCl₃ de la fracción acetato de etilo proveniente de la época de lluvia, la fracción L-4 (153 mg) se sometió a purificación por CC sucesivas empleando sílica gel 60 eluyendo con solventes de diferente polaridad comenzando con hexano hasta una mezcla de CHCl₃/AcOEt 9:1 obteniendo un sólido denominado A3 (Figura 2-7).

Figura 2-7: Análisis de las fracciones en CHCl₃ provenientes de las fracciones de acetato de etilo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época seca y de lluvia.

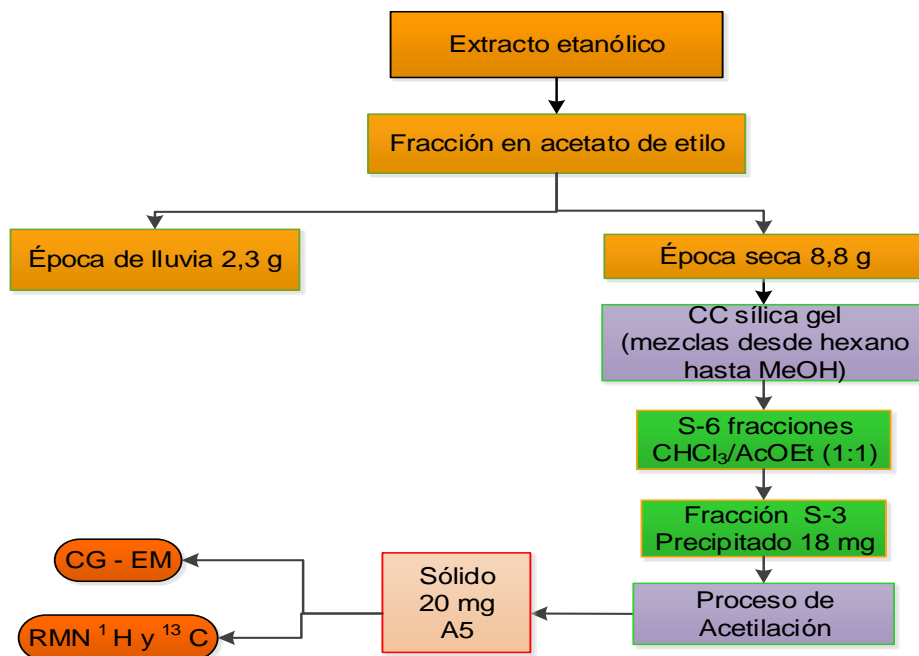


De las fracciones en CHCl_3 obtenidas de la fracción en acetato de etilo obtenida de la época seca, la fracción S-4 (81 mg) se purificó por sephadex LH-20 cuya elución se realizó con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) obteniéndose 6 subfracciones que fueron caracterizadas por CCD. La fracción S-4-5 (37 mg) se purificó por CC empleando sílica gel 60, iniciando la elución con hexano y aumentando la polaridad de la fase móvil por la adición creciente de 10% de CHCl_3 hasta 100%, se continuó con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) hasta AcOEt obteniéndose 4 fracciones. La fracción S-4-5-2 (30 mg) se purificó por CCDP empleando sílica gel 60 G F₂₅₄ y fue eluida con Hexano/MeOH (99:1), obteniéndose un aceite denominado A4 (Figura 2-7).

▪ **Fracciones en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca.**

De las 6 fracciones de la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo época seca, la fracción S-3 presentó un precipitado (Figura 2-8) denominado A5.

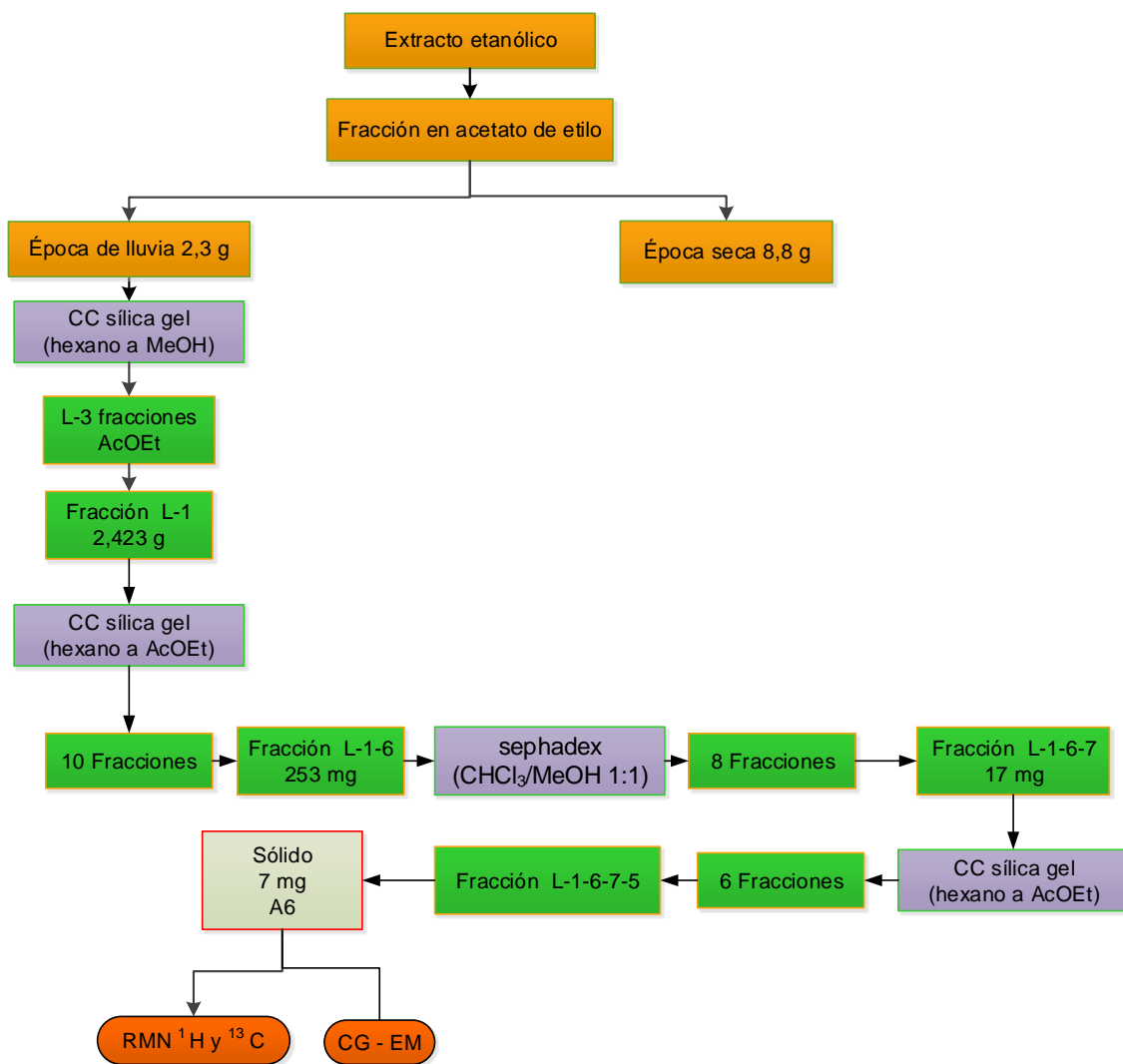
Figura 2-8: Análisis de la fracción en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) proveniente de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época seca.



▪ **Fracciones en AcOEt obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.**

De las 3 fracciones obtenidas en AcOEt provenientes de la fracción en acetato en la época de lluvia, la fracción L-1 (2,423 g) fue fraccionada por CC empleando como fase estacionaria sílica gel 60, la elución se inició con hexano aumentando la polaridad de 10% CHCl₃ hasta 100%, se continuo con una mezcla de CHCl₃/AcOEt (1:1) hasta AcOEt y por último con mezclas de AcOEt/MeOH (1:1) hasta MeOH con esta columna se obtuvieron 10 fracciones. La fracción L-1-6 (253 mg) fue purificada por sephadex LH-20 la elución se realizó con una mezcla de CHCl₃/MeOH (1:1) como resultado de esta columna se obtuvieron 8 fracciones que fueron caracterizadas por CCD. La fracción L-1-6-7 (17 mg) se purificó por CC empleando sílica gel 60 iniciando la elución con hexano y aumentando la polaridad de la fase móvil por la adición creciente de 10% de CHCl₃ hasta 100%, se continuó con una mezcla de CHCl₃/AcOEt (1:1) hasta AcOEt obteniendo 6 fracciones. La fracción L1-6-7-5 presenta un sólido denominado **A6** (Figura 2-9)

Figura 2-9: Análisis de la fracción en AcOEt proveniente de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* recolectada en la época de lluvia.



3. Resultados y discusión

3.1 Recolección del material vegetal en época seca y de lluvia, elaboración de extractos y fraccionamiento

Los cambios en la concentración de los metabolitos de las plantas tienen relación con los cambios ecológicos entre esta y su ambiente (Valares, 2011). Por lo que se consideró interesante hacer el estudio en dos épocas del año (seca y de lluvia) con el fin de determinar variaciones en el contenido de metabolitos y así aportar datos para posteriores estudios relacionados con la ecología y su posible uso en terapéutica.

El material vegetal colectado en dos épocas del año, una seca (junio) y otra de lluvia (octubre) en Armero-Guayabal, Departamento del Tolima (Colombia), fue clasificado taxonómicamente como *Acacia farnesiana* (L) Willd con el número COL 526762, identificado por el biólogo Jhon Infante-Betancur (Figura 3-1).

Figura 3-1: *Acacia farnesiana* (L) Willd.



Se tomaron 520 g de corteza seca y molida de *A. farnesiana* colectada en época seca y época de lluvia, los cuales se sometieron a percolación, el extracto se filtró y luego de eliminar el solvente utilizando un rotaevaporador, se obtuvieron extractos etanólicos que pesaron 160 g con un rendimiento del 30,8 % obtenido de la época seca y 152 g con un rendimiento del 29,2 % obtenido de la época de lluvia, debido a que el material vegetal corresponde a cortezas los rendimientos son altos con respecto a otros tejidos vegetales como las hojas. De estos extractos se tomó 30 g para ensayos biológicos que se realizarán en posteriores estudios y 40 g para ensayos fitoquímicos de caracterización, estas cantidades se tomaron de cada época del año. Los extractos presentaron un residuo sólido de 6,5 g obtenidos en la época seca y 5,3 g obtenidos en la época de lluvia. Al realizar el proceso de fraccionamiento a los extractos, se generaron fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanólica y acuosa de cada época del año. El peso seco y el rendimiento con respecto al extracto etanólico de las fracciones obtenidas se encuentran en la Tabla 3-1. Al obtener las fracciones se presentaron precipitados en algunas de ellas, estas cantidades no están incluidas en el porcentaje de cada fracción.

Tabla 3-1: Rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto etanólico la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

fracciones	Extracto etanólico época seca 83,5 g		Extracto etanólico época de lluvia 76,7 g	
	Peso seco (g)	Rendimiento (%)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
Fracción en éter de petróleo	2,3	2,8	8,8	11,5
Fracción en acetato de etilo	12,8	15,3	18,2	23,7
Fracción butanólica	12,8	15,3	3,03	4,0
Fracción acuosa	8,7	10,4	9,9	12,9

Los resultados mostrados en la Tabla 3-1 presentan diferencias entre los rendimientos de las dos épocas, la fracción en éter de petróleo con 11,5 % obtenida en época de lluvia y 2,8 % obtenida en época seca respecto al extracto etanólico, diferencia que se debe posiblemente a la mayor presencia de compuestos de baja polaridad como ácidos grasos, terpenos u otros presentes en la fracción obtenida en la época de lluvia. Por otro lado la fracción butanólica obtenida en la época de lluvia tiene 4,0 % de rendimiento y la fracción obtenida en la época seca 15,3 % de rendimiento frente al extracto etanólico, con respecto a la época seca su alto porcentaje se podría deber a que en esta época la

planta posee un estrés hídrico y déficit de nutrientes, produciendo un aumento en la concentración de metabolitos secundarios; como taninos condensados, ligninas, fenoles totales y/o glucósidos (Valares, 2011). Las demás fracciones como acetato de etilo y acuosa no presentaron variaciones significativas. Se realizó una caracterización del extracto etanólico y las fracciones obtenidas.

3.2 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia

El análisis fitoquímico del extracto y las fracciones (éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y acuosa) provenientes de la corteza de *A. farnesiana* colectada en las dos épocas del año (seca y de lluvia) permitió determinar las similitudes o diferencias por medio de pruebas químicas para el análisis del contenido de taninos, un grupo de metabolitos presentes en gran proporción en la corteza de *A. farnesiana* lo que la hace útil en el proceso de curtiembre (Parrotta, J. A. 1992), por lo tanto analizar la presencia de estos metabolitos es un indicativo para detectar las diferencias en las épocas colectadas, además, este dato es útil para ensayos posteriores en pruebas químicas, biológicas, tecnológicas, como referencia o marcador. Asimismo, esta especie se caracteriza por tener un fuerte olor que condujo a estudiar la presencia de compuestos azufrados. Las similitudes o diferencias también se analizaron por técnicas cromatográficas como CCD y CLAE, y técnicas instrumentales como IR y RMN.

3.2.1 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por pruebas químicas para taninos y compuestos azufrados

- **Análisis del contenido de taninos en los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**















Los taninos comprenden un gran grupo de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y cuando estos se encuentran en gran proporción se localizan en las hojas, frutos o corteza (Tyler V *et al.*, 1988). La corteza de *A. farnesiana*

es utilizada en el proceso de curtiembre por su contenido de taninos (Parrotta, J. A. 1992).

Por medio de un ensayo químico cualitativo con ferricianuro de potasio y cloruro férrico en medio ácido (por triplicado) se observó la presencia de taninos en mayor cantidad tanto en el extracto etanólico como en las fracciones butanólica y acuosa provenientes de la época seca, por la aparición de un color azul de prusia característico para estos compuestos. Con los resultados registrados en la Figura 3-2 se observa claramente que se presenta menor concentración de taninos en el extracto y fracciones provenientes del material colectado en la época de lluvia (color verde claro) que en el material colectado en la época seca (Color azul oscuro). Se usó como patrón una muestra de vino tinto.

Se realizaron tres ensayos en condiciones diferentes (Price M. & Butler L., 1977) observándose resultados equivalentes por lo que en la Figura 3-2 solo se muestran los resultados más representativos. En los ensayos realizados se evidenció la ausencia de taninos en las fracciones de éter de petróleo y acetato de etilo frente al blanco.

Figura 3-2: Caracterización del contenido de taninos presentes en los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

	Extracto etanólico	Éter de petróleo	Acetato de etilo	Butanol	Acuosa	Patrón vino tinto	Blanco
Época lluvia							
Época seca							

La mayor cantidad de taninos se observó en la fracción butanólica de la época seca (color azul Prusia, Figura 3.2) y en la Tabla 3-1 el rendimiento de esta fracción en la época seca fue alto; estos resultados pueden corresponder a la mayor proporción de taninos, teniendo en cuenta que en el análisis por CCD se observó menor presencia de flavonoides.

Para corroborar los resultados obtenidos con las pruebas cualitativas, se realizó una prueba cuantitativa donde se usó ácido tánico como estándar, extracto etanólico, fracciones butanólica y acuosa obtenidas en las dos épocas. Estos resultados confirmaron la mayor presencia de taninos en los extractos y fracciones obtenidos en la época seca (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Datos de concentración de taninos de los extractos, fracciones butanólica y acuosa obtenidas en las dos épocas del año.

Muestras	época seca		época de lluvia	
	%	µg/mL	%	µg/mL
Extracto etanólico	35,6	50,3	14	19,6
Fracción butanólica	89,1	147,0	40,1	61,2
Fracción acuosa	17,2	24,3	4,3	6,9

La literatura reporta que en algunas especies del género *Acacia* los taninos hidrolizables se encuentran entre 1 y el 8 % en las hojas y en menor proporción en la corteza. Los taninos condensados se encuentran en especies de *Acacias* Americanas entre el 1 y 8 % en hojas y corteza, en ocasiones hasta un 20%; en Sudáfrica y Brasil, la corteza presenta entre el 20-40% de taninos condensados y los extractos cerca del 70% de proantocianidinas (Seigler, 2003). Bajo las premisas anteriores es probable que en el extracto etanólico, las fracciones butanólica y acuosa en época seca se encuentren los taninos condensados-proantocianidinas con unidades terminales como catequina y epicatequina entre otras, debido a los porcentajes obtenidos en la prueba cualitativa (Tabla 3-2).

▪ **Análisis de compuestos azufrados en los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**



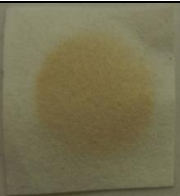


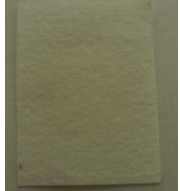


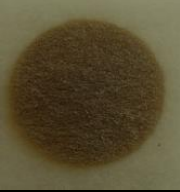


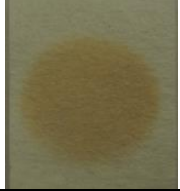








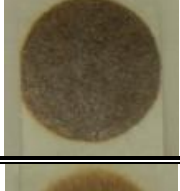


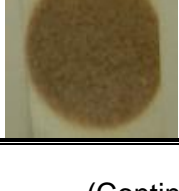
Debido a que se percibió un olor característico de la corteza en el momento de recolecta y durante el proceso de secado, se realizaron análisis de compuestos azufrados, además, se ha reportado la presencia de compuestos que contienen azufre en la especie *A. farnesiana* como el ácido N-acetildjenkólico aislado de las semillas (Gmelin *et al.*, 1962) y la enzima liasa S-alquil-L-cisteína aislada a partir de extractos en acetona de plántulas, semillas y flores (Mazelis *et al.*, 1975, Mazelis 1975).

Se realizaron dos pruebas cualitativas para detectar compuestos azufrados (numeral 2.3.1.). Dichos ensayos mostraron la presencia en mayor proporción de compuestos que contienen azufre en el extracto etanólico, las fracciones en acetato de etilo, butanólica y acuosa obtenidas en la época de lluvia (Figura 3-3). En las fracciones provenientes de la época seca se evidencia menor cantidad de compuestos que contienen azufre (Figura 3-3). Los ensayos fueron comparados con aproximadamente 10 mg de muestra patrón empleada (ajo) usando el mismo procedimiento.

Figura 3-3: Caracterización de compuestos azufrados presentes en los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.







MUESTRA		PRUEBA		
		NITROFERRICIANURO DE SODIO*		ACETATO DE PLOMO*
		Antes	Después	
Extracto etanólico	Época lluvia			
	Época seca			

(Continúa)

MUESTRA		PRUEBA		
		NITROFERRICIANURO DE SODIO*		ACETATO DE PLOMO*
		Antes	Después	
Éter de petróleo	Época lluvia			
	Época seca			
Acetato de etilo	Época lluvia			
	Época seca			
Butanol	Época lluvia			
	Época seca			
Acuosa	Época lluvia			
	Época seca			

(Continúa)

(Continuación)

MUESTRA	PRUEBA		
	NITROFERRICIANURO DE SODIO*		ACETATO DE PLOMO*
	Antes	Después	
Patrón Ajo			
Blanco			

* USP, 2013

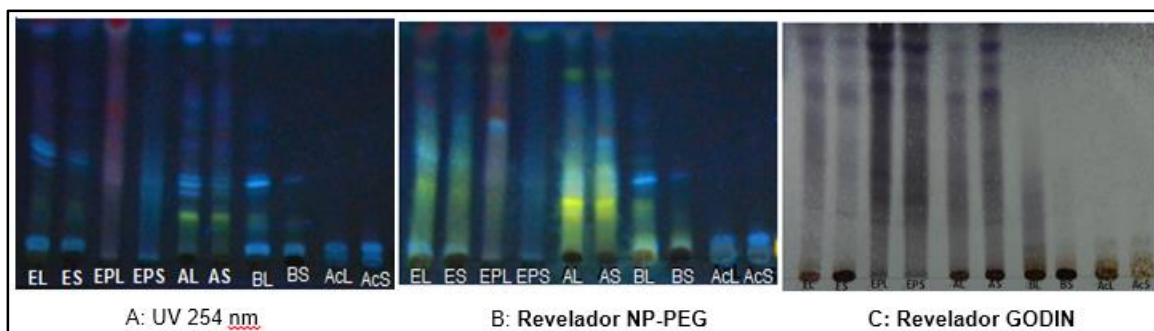
En la prueba de nitroferricianuro de sodio (USP, 2013), se evidenció la mayor presencia de compuestos que contienen azufre en el extracto etanólico y en las fracciones de acetato de etilo, butanólica y acuosa provenientes de la época de lluvia. Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se realizó una prueba con acetato de plomo (Figura 3-3) (USP, 2013) en la cual se observó la presencia de compuestos azufrados en el mismo extracto y fracciones. Además se puede destacar que en las fracciones provenientes de la época de lluvia se detectó la mayor presencia de estos compuestos, justificado por la intensidad en la coloración y comparados con 10 mg de ajo sometido al mismo proceso.

3.2.2 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas cromatográficas

- **Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

Se realizó un estudio por CCD de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia (10 mg/mL de c/u) para observar las diferencias o similitudes entre ellas (Figura 3-4).

Figura 3-4. Análisis por CCD de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en época seca y de lluvia.



Fase móvil: CHCl_3 – MeOH (9:1), 10 mg/mL.

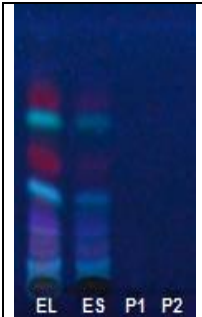

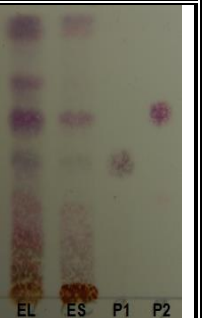
Al observar la Figura 3-4 se puede corroborar el fraccionamiento realizado a los extractos debido a que se encuentran los diferentes metabolitos distribuidos en las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanólica y acuosa, observando diferencias en las dos épocas del año, con reveladores como UV, el reactivo de NP-PEG y Godin, obteniendo como resultado la presencia de flavonoides, esteroides y/o terpenoides. De la Figura 3-4 se puede deducir que en las dos épocas del año, los flavonoides o los compuestos relacionados se presentan en los extractos etanólicos y en las fracciones en acetato de etilo en mayor proporción que en las fracciones butanólicas. Además, los compuestos apolares pueden corresponder principalmente a compuestos terpénicos o esteroidales. Para observar mejor las diferencias se procedió a realizar CCD con 10 mg /mL para cada fracción modificando la fase móvil.

Se realizaron perfiles cromatográficos por CCD con el extracto etanólico y las fracciones antes mencionadas, con fases móviles en diferentes proporciones de los siguientes solventes: CHCl_3 , AcOEt, MeOH y H_2O , ocasionalmente ac. fórmico, según el perfil de elución más adecuado. Después de la elución se reveló con luz ultravioleta a 254 y 365 nm, como se ve en la Figura 3-5 y Figura 3-6 y con diferentes reveladores químicos como el reactivo de Godin (Figura 3-5) y NP-PEG (Figura 3-6) para detectar la presencia de los principales metabolitos secundarios. En general se observa mayor proporción de metabolitos tanto en el extracto como en las fracciones provenientes de la época de lluvia.

Los principales metabolitos secundarios que se pueden revelar utilizando reactivos como Godin son esteroides y/o triterpenos de color morado y flavonoides de color amarillo o café al visible. Al revelar con luz ultravioleta en las dos longitudes de onda (254 y 365 nm) se observó la posible presencia de compuestos con grupos cromóforos con enlaces conjugados y/o grupos carbonilo. El extracto y principalmente las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo presentan algunos compuestos del tipo esteroide y/o terpenoide, las cuales fueron comparadas con una mezcla de sitosterol y estigmasterol (P1) y lupeol (P2) identificando Rf similares (Figura 3-5). Esto es razonable teniendo en cuenta que los compuestos revelados presentan características de menor polaridad como la mezcla utilizada de patrón. Asimismo, la fracción butanólica presenta menor proporción de estos compuestos y mayor proporción de compuestos con mayor polaridad como flavonoides o compuestos similares.

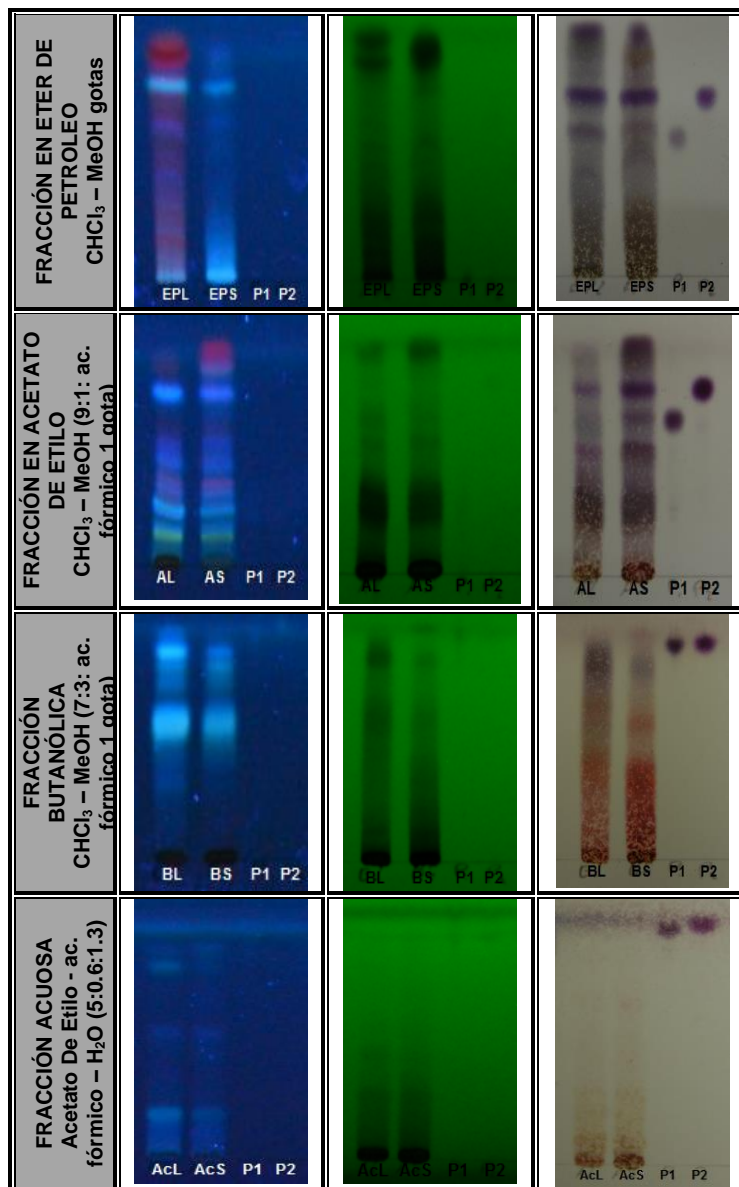
Asimismo, se observaron algunas manchas que se pueden apreciar en solo una época, tal es el caso del extracto etanólico obtenido en la época de lluvia que posee una mancha con un Rf de 0,73 no apreciable en época seca. Las manchas que se presentan en las fracciones provenientes de la época seca son las presentes en las fracciones en éter de petróleo con un Rf de 0,82, en la fracción en acetato de etilo con Rf en 0,90 y en la fracción butanólica un Rf de 0,55 ausentes en las fracciones provenientes de la época de lluvia (Figura 3-5).

Figura 3-5: Caracterización por medio de CCD revelando con el reactivo Godin de los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

Fase móvil	Revelador		
	UV 254 nm antes de revelar	UV 365 nm antes de revelar	Visible después de Revelar con el reactivo de Godin
EXTRACTO ETANOLICO CHCl ₃ – MeOH (9:1: Ac. fórmico 0,2-0,5)			
	EL ES P1 P2	EL ES P1 P2	EL ES P1 P2

(Continúa)

(Continuación)



EL: extracto etanólico época de lluvia, **ES:** extracto etanólico época seca, **EPL:** fracción en éter de petróleo época de lluvia, **EPS:** fracción en éter de petróleo época seca, **AL:** fracción en acetato de etilo época de lluvia, **AS:** fracción en acetato de etilo época seca, **BL:** fracción en butanol época de lluvia, **BS:** fracción en butanol época seca, **AcL:** fracción acuosa época de lluvia, **AcS:** fracción acuosa época seca, **P1:** mezcla sitosterol y stigmasterol, **P2:** lupeol

En la figura 3-6 se observa que los perfiles del extracto etanólico y las fracciones (10 mg/mL c/u) obtenidas en las dos épocas del año son diferentes, observándose una mayor proporción de compuestos en el extracto etanólico y fracciones provenientes de la época de lluvia.

Uno de los grupos de metabolitos secundarios que se pueden caracterizar utilizando el revelador NP-PEG son flavonoides, que generan color amarillo al visible y aumento de fluorescencia (azul-naranja-amarillo) en la luz ultravioleta (Wagner H. & Bladt S., 2001), como se observa en la Figura 3-6. Al revelar con luz ultravioleta en las dos longitudes de onda (254 y 365 nm), se observó principalmente en los extractos etanólicos y las fracciones en acetato de etilo la posible presencia de compuestos con grupos funcionales cromóforos como enlaces conjugados y/o grupos carbonilo, que pueden corresponder a compuestos tipo flavonoide. El extracto etanólico y su fracción en acetato de etilo en las dos épocas del año, presentaron varias manchas con un mismo Rf que aumentaron su fluorescencia después de revelar, evidenciándose la presencia de compuestos menos polares que la mezcla de isoquercetina y rutina (P), probablemente flavonoides no glicosidados. En la fracción de éter de petróleo y butanólica obtenidas en la época de lluvia se observó la aparición de una mancha posterior al revelado con un Rf de 0,24 y 0,42 respectivamente, no apreciables en estas fracciones obtenidas en la época seca.

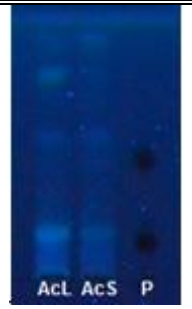
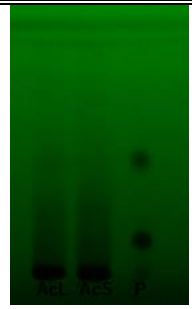

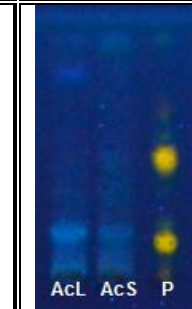
Se resalta que el género *Acacia* biosintetiza flavonoides del tipo flavonoles y flavonas flavan-3-oles, flavan-3,4-dioles, las cuales se pueden presentar como glicósiladas o agliconas, presentes en las hojas y la corteza de especies de *Acacia*, en especial las cortezas contienen mezclas de flavonoides muy complejos que no se observaron en la Figura 3-6 (Seigler, 2003). No se detectó la presencia de alcaloides ni tampoco cumarinas, se utilizó como patrón atropina y umbelliferona, respectivamente.

Figura 3-6: Caracterización por medio de CCD revelando con el reactivo NP-PEG de los extractos etanólicos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

Fase móvil	Revelador			
	UV 254 nm antes de revelar	UV 365 nm antes de revelar	visible después de revelar con NP-PEG	UV 254 nm después de revelar con NP-PEG
EXTRACTO ETANOLICO CHCl ₃ – MeOH (9:1: Ac. fórmico 0,2-0,5)				
FRACCIÓN EN ETER DE PETROLEO CHCl ₃ – MeOH gotas				
FRACCIÓN EN ACETATO DE ETILO C HCl ₃ – MeOH (9:1: ac. fórmico 1 gota)				
FRACCIÓN BUTANOLICA CHCl ₃ – MeOH (7:3: ac. fórmico 1 gota)				

(Continúa)

(Continuación)

Fase móvil	Revelador			
	UV 254 nm antes de revelar	UV 365 nm antes de revelar	visible después de revelar con NP-PEG	UV 254 nm después de revelar con NP-PEG
FRACCIÓN ACUOSA Acetato De Etilo - ac. fórmico – H ₂ O (5:0.6:1.3)				

EL: extracto etanólico época lluvia, ES: extracto etanólico época seca, EPL: fracción éter de petróleo época lluvia, EPS: fracción éter de petróleo época seca, AL: fracción acetato de etilo época lluvia, AS: fracción acetato de etilo época seca, BL: fracción butanol época lluvia, BS: fracción butanol época seca, AcL: fracción acuosa época lluvia, AcS: fracción acuosa época seca, P: mezcla isoquercetina y rutina.

▪ **Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de las fracciones obtenidas de la corteza de *A. farnesiana*.**

Las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo y butanol se analizaron por CLAE en fase reversa por triplicado para identificar las diferencias existentes en las dos épocas de colecta. No se analizó la fracción acuosa debido a la falta de resultados significativos por CCD. Se realizaron varios ensayos usando diferentes condiciones y solo se muestran los resultados más significativos.

Las fracciones en éter de petróleo se analizaron a una concentración de 10 mg/mL, se eluyeron ácido fórmico 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B) con un gradiente de 40% de B a 0 min, 90% de B en 50 min, 90% de B en 60 min. Los cromatogramas fueron tomados a diferentes longitudes de onda de 210, 254 y 280 nm. En la Tabla 3-3 se muestran algunas señales de absorbancia que aparecen en la fracción éter de petróleo en una de las épocas del año. Una particularidad a resaltar son las señales de esta fracción, que aparecen en las dos épocas del año, donde la absorbancia aumentó en la fracción obtenida de la época seca, lo que indica que se encuentran posibles metabolitos de baja o media polaridad con enlaces conjugados, las diferencias o similitudes se pueden apreciar con flechas de colores en la Figura 3-7 lo que concuerda con lo encontrado en CCD.

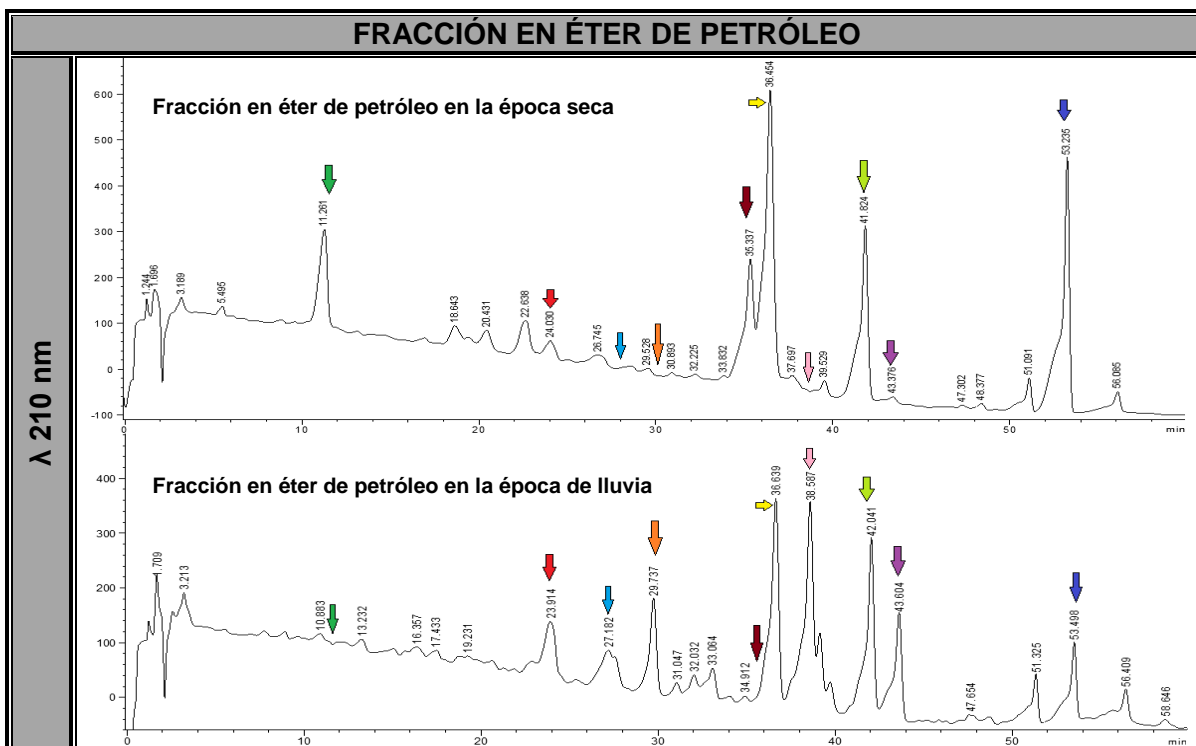
Tabla 3-3: Tiempos de retención por CLAE de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

λ (nm)	Tiempos de retención (min)													
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
210	época seca	11.2	24.0	*	26.7	*	*	35.3	36.4	*	*	41.9	43.3	53.2
	época lluvia	*	23.9	*	27.1	29.7	*	*	36.6	*	38.5	41.9	43.6	53.5
254	época seca	11.1	23.9	*	26.7	*	*	35.2	36.6	*	*	*	*	53.2
	época lluvia	*	23.8	*	26.9	29.7	*	*	36.7	*	38.5	*	43.6	53.5
280	época seca	11.1	*	25.4	26.7	*	32.1	35.2	36.5	*	*	*	*	53.2
	época lluvia	*	24.0	25.7	26.9	*	32.2	*	36.7	37.4	*	*	*	53.5

* no se detecta

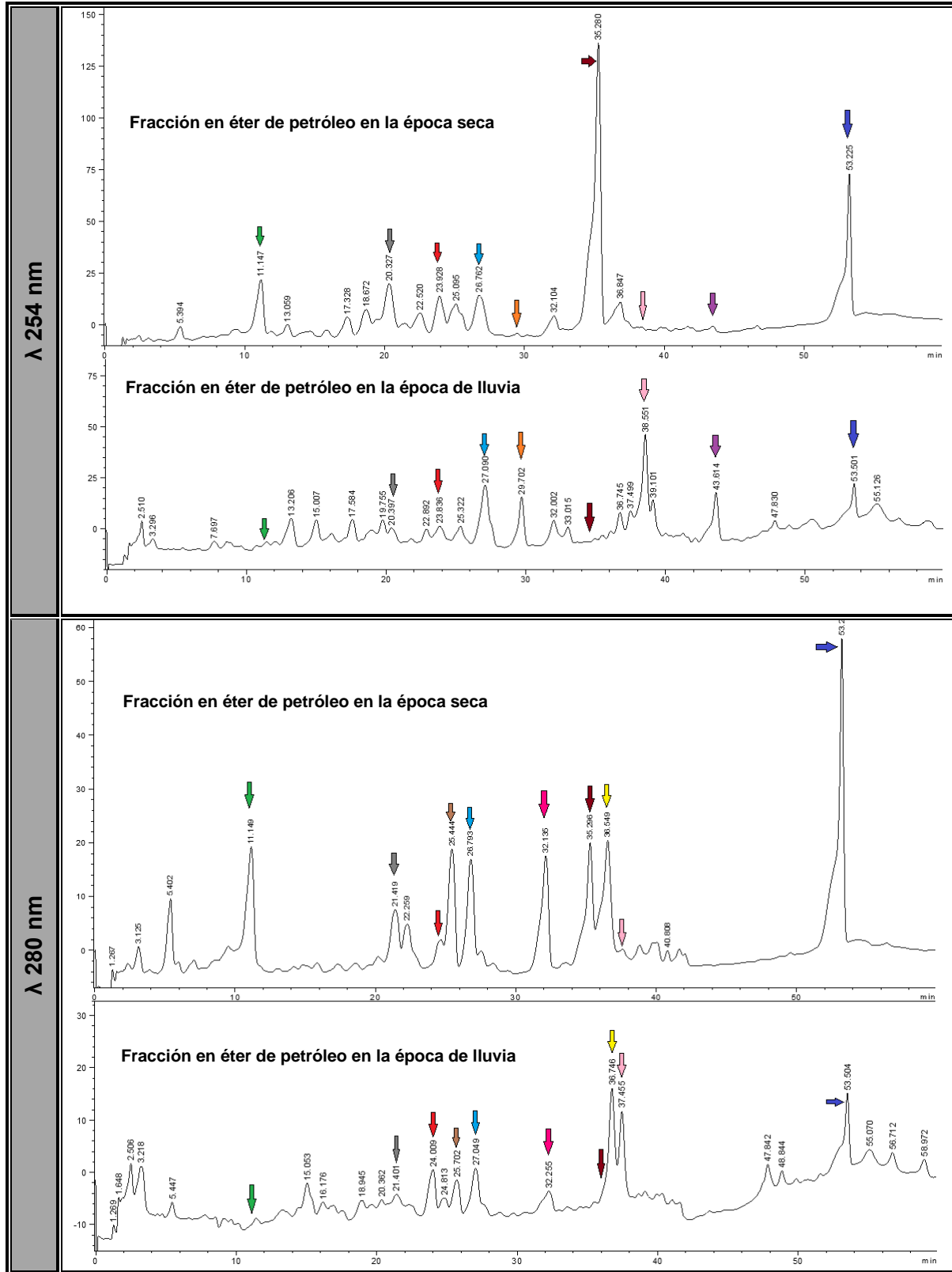
En la Tabla 3-3 se sugieren 13 picos para evaluar la similitud o diferencia de la fracción en éter de petróleo proveniente de las dos épocas de colecta, evaluadas a tres longitudes de onda (210, 254, 280 nm). Los resultados muestran que los picos 1 y 7 que se presenta en la fracción proveniente de la época seca están ausentes en la fracción proveniente de la época de lluvia. Los picos 5, 10 y 12 se presentan en la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia están ausentes en la fracción proveniente de la época seca. Los picos 2, 4, 8 y 13 se presentan en la fracción proveniente de las épocas de colecta seca y de lluvia (Tabla 3-3 y Figura 3-7).

Figura 3-7: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



(Continúa)

(Continuación)

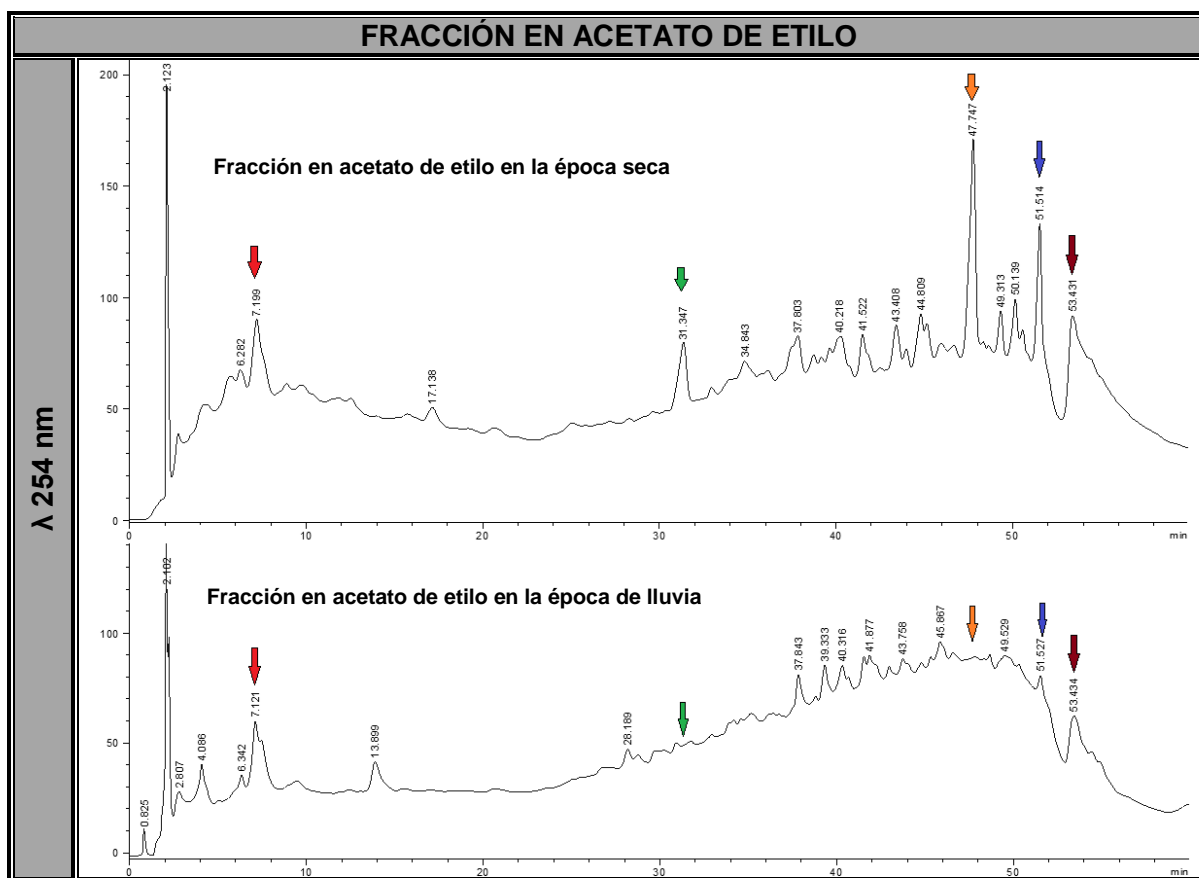


FM: (A) agua y ácido fórmico 0,1% y (B) acetonitrilo con un gradiente de 40% de B a 0 min, 90% de B en 50 min, 90% de B en 60 min. Columna RP-18, flujo de 1 mL/min, volumen de inyección 50 μ L, concentración de 10 mg/mL.

La fracción en acetato de etilo se analizó a una concentración de 30 mg/mL, se eluyó con ácido fórmico 0,2% (C) y metanol (D) con un gradiente de 30% de D a 0 min, 45% de D en 20 min, 100% de D 50 min, 100% de D en 60 min. La Figura 3-8 muestra en el cromatograma las diferencias de las fracciones en acetato de etilo obtenidas en las dos épocas del año para la longitud de onda de 254 nm, en las demás longitudes de onda analizadas (210, 280 y 350 nm) las diferencias fueron similares.

Se observaron diferencias en los picos a tiempos de retención de 7.1, 51.5 y 53.4 min que se presentan en la fracción en acetato de etilo obtenida en las dos épocas del año y tiempos de retención de 31.3 y 47.7 min exclusivos de la fracción obtenida en época seca. Posiblemente estos picos corresponden a compuestos con grupos cromóforos. Pueden observarse las diferencias con mayor detalle en la Figura 3-8 siguiendo las flechas de colores.

Figura 3-8: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

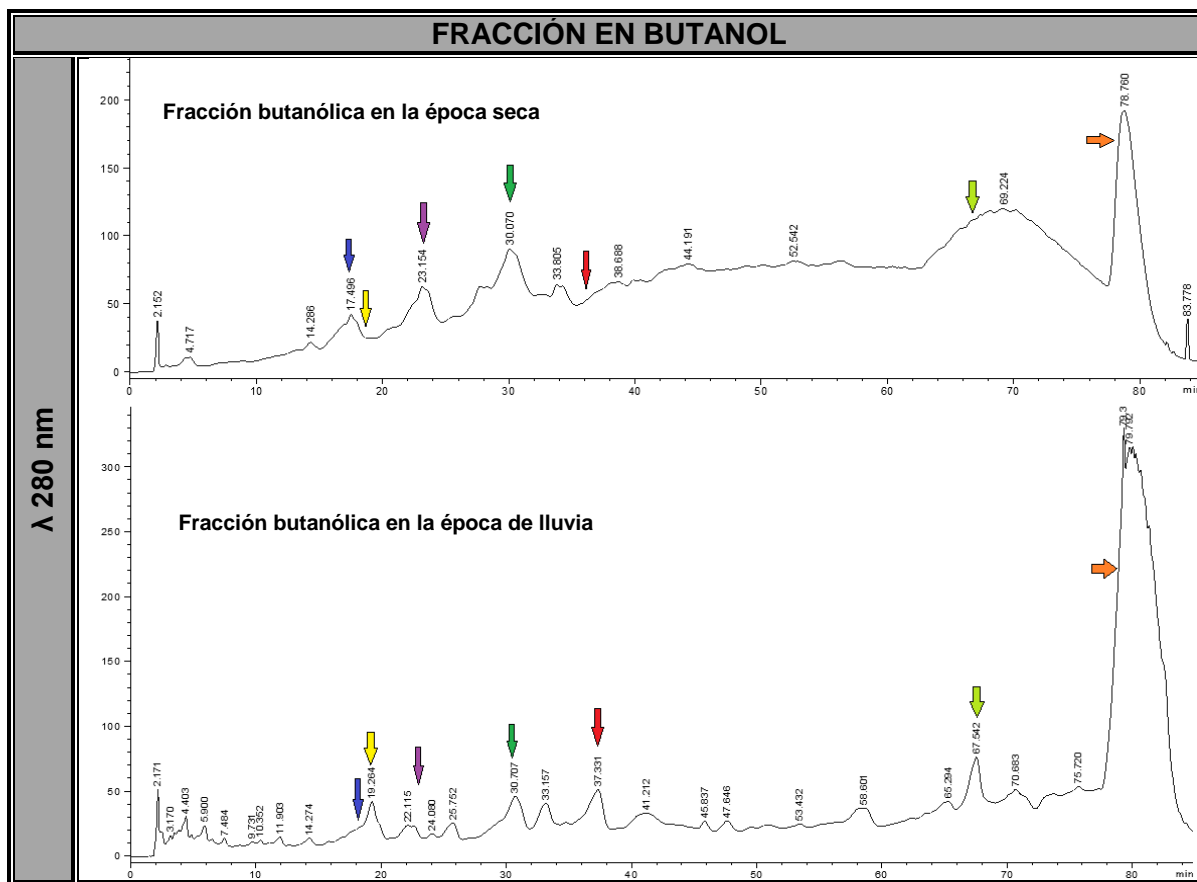


FM: (C) ácido fórmico 0,2% y (D) metanol con un gradiente de 30% de D a 0 min, 45% de D en 20 min, 100% de D 50 min, 100% de D en 60 min. Columna RP-18, flujo de 1 mL/min, volumen de inyección 20 μ L, concentración de 30 mg/mL.

La fracción butanólica se analizó a una concentración de 30 mg/mL, fue eluida con ácido fórmico 0,4% (E) y metanol (F) con un gradiente de 10% de F a 0 min, 35% de F en 60 min, 50% de F 75 min, 100% en F en 80 min, 100% en F en 85 min. La Figura 3-9 muestra las diferencias en las dos épocas del año a las longitudes de onda de 280 y 350 nm, en las demás longitudes de onda analizadas (210 y 254 nm) también se evidenciaron diferencias.

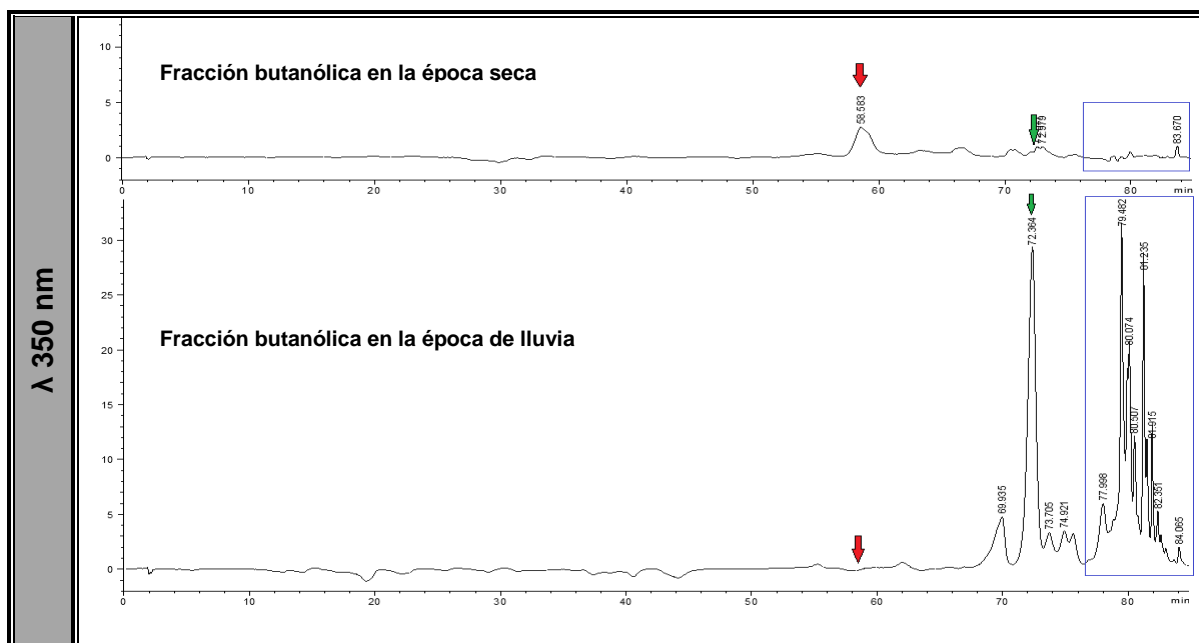
Se observaron señales en la longitud de onda de 280 nm a tiempos de retención de 30.1 y 78.8 min que se presentan en la fracción butanólica proveniente de las dos épocas del año, las diferencias se pueden observar con flechas de colores en la Figura 3-9.

Figura 3-9: Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción butanólica obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



(Continúa)

(Continuación)



FM: (E) ácido fórmico 0,4% y (F) metanol con un gradiente de 10% de F a 0 min, 35% de F en 60 min, 50% de F 75 min, 100% en F en 80 min, 100% en F en 85 min. Columna RP-18, flujo de 1,2 mL/min, volumen de inyección 20 μ L, concentración de 30 mg/mL.

Los resultados en los rendimientos de las fracciones (Tabla 3-1) en los que se observó una mayor proporción de compuestos polares se vería ratificado con los resultados en CLAE de la fracción butanólica, además, se confirman las diferencias en las dos épocas de colecta con lo obtenido en CCD.

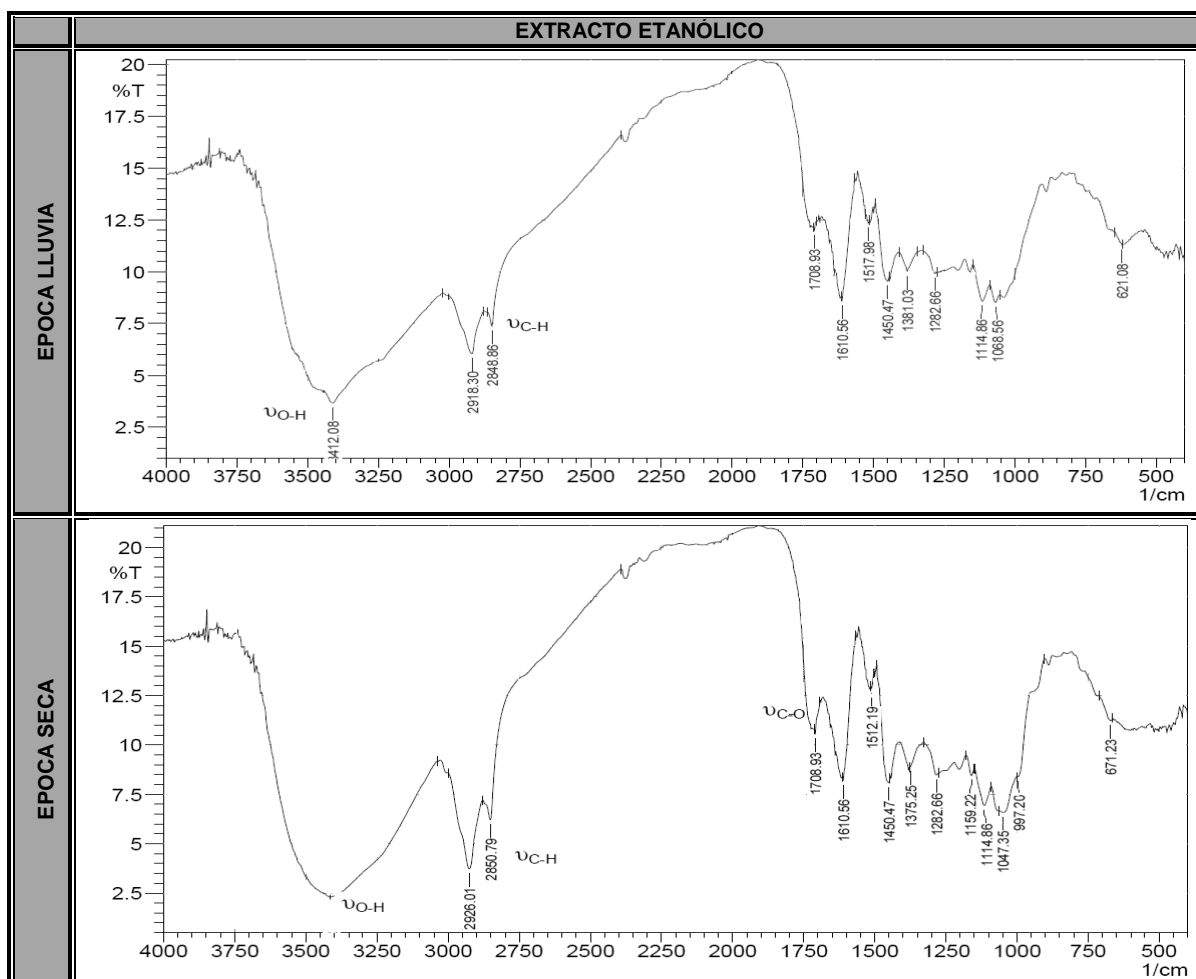
En la fracción de éter de petróleo obtenida en la época seca se detectó menor cantidad de señales con intensidad de absorbancia mayor respecto a la época de lluvia, por otro lado en la fracción de acetato de etilo se detectaron mayor número de picos que cuentan con intensidad significativa respecto a la misma fracción obtenida en la época de lluvia, estos resultados muestran concordancia con los datos observados por CCD que indican mayor proporción y variedad de metabolitos de baja y media polaridad en la corteza colectada en época seca. Por otro lado la fracción butanólica obtenida en la época seca muestra menor número de picos y baja intensidad respecto a la misma fracción en época de lluvia.

3.2.3 Caracterización de los extractos y fracciones obtenidas en la época seca y de lluvia por técnicas espectroscópicas

▪ **Análisis por infrarrojo (IR) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

En la Figura 3-10 se muestran los espectros de Infrarojo (IR) de los extractos etanólicos obtenidos en la época seca y de lluvia. Los espectros de las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo y butanol no se observaron bandas que pudieran determinar las diferencias en las dos épocas.

Figura 3-10: Caracterización por IR de los extractos etanólicos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



Los espectros se tomaron a extractos y fracciones los cuales poseen varios grupos de metabolitos secundarios por lo que no se puede comentar con seguridad que tipos de metabolitos están presentes ya que se pueden encontrar vibraciones de alquenos, alcanos, compuestos que presenten OH, entre otros (Silverstein et al., 2005; Calderon 1985). En la Figura 3-10 se observan pequeñas diferencias en las señales e intensidades pero los datos que aporta esta técnica no son adecuados para detectar diferencias entre las dos épocas del año.

▪ **Análisis por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y carbono (RMN ^{13}C) de los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *A. farnesiana*.**

El extracto etanólico y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y agua fueron analizadas por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) Figura 3-11 y de carbono (RMN ^{13}C) Figura 3-12, para detectar diferencias en los desplazamientos químicos de las señales presentes en las dos épocas de año, haciendo énfasis en el desplazamiento.

En la Figura 3-11 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) realizados al extracto y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanólica y acuosa. Estas muestras corresponden a mezclas de compuestos y por lo tanto no se hacen asignaciones puntuales solo se realiza la comparación de los espectros. Todas las muestras fueron tomadas con 20 mg c/u.

Los espectros muestran desplazamientos químicos entre 0,5 a 2,0 ppm que corresponderían a señales de hidrógenos de grupo metilo o metileno propios de grupos alifáticos saturados e insaturados que pueden corresponder a compuestos principalmente ácidos grasos entre otros. En los desplazamientos químicos entre 3,2 a 5,5 ppm se pueden encontrar señales de hidrógenos de azúcares lo que indica la presencia de compuestos glicosidados; entre 2,0 a 3,0 ppm hidrógenos alfa o vecinos a carbonos con grupo carbonilo o carboxilo de compuestos con grupo ceto o éster, entre otros desplazamientos (Silverstein *et al.*, 2005). En los espectros de los extractos y fracciones obtenidos en la época seca y de lluvia se observaron diferencias en la

intensidad de algunas señales que se indican con flechas y círculos de colores en la Figura 3-11.

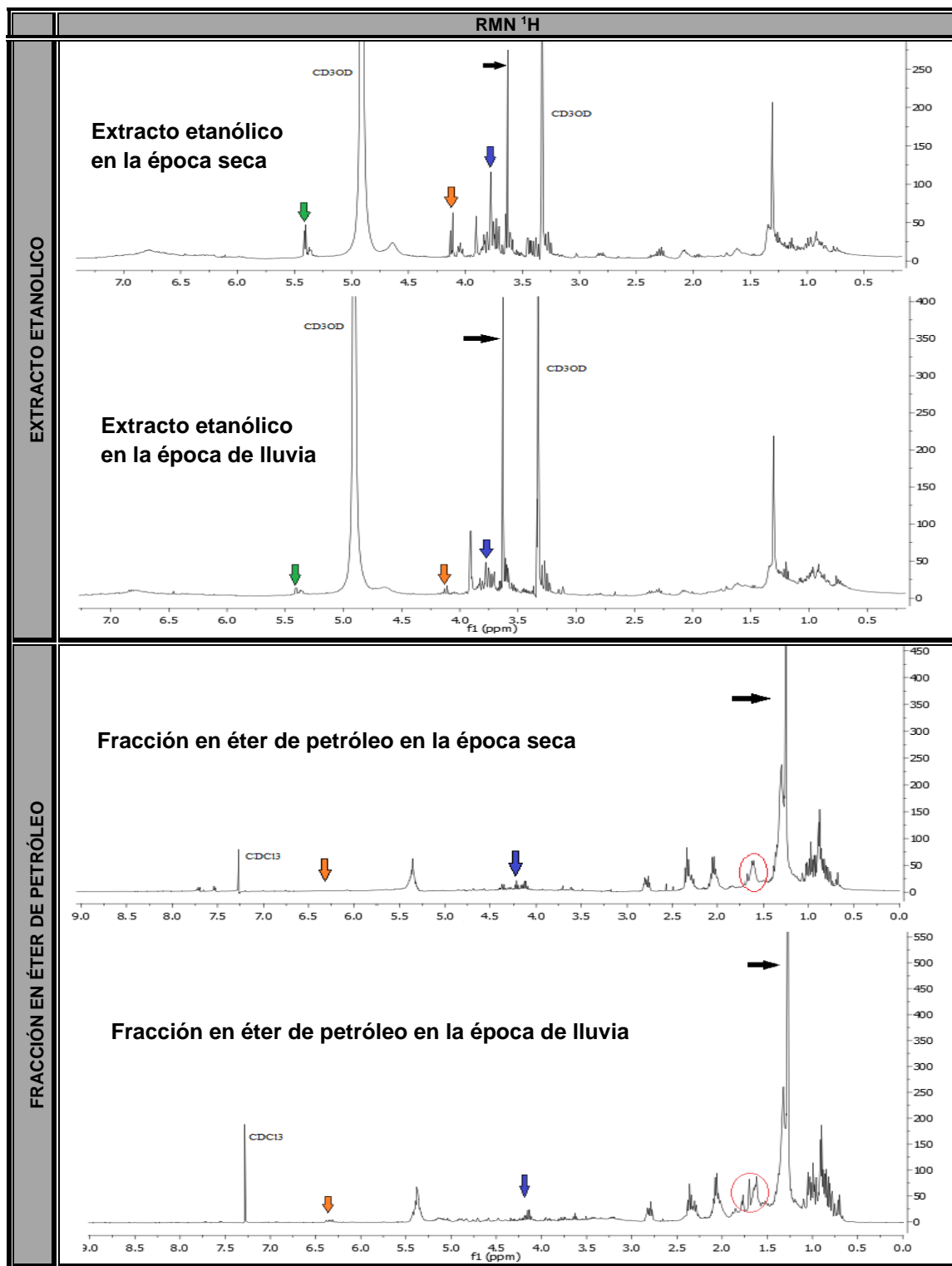
En la Tabla 3-4 se muestran algunas señales que aparecen en las dos o una sola época del año, algunas señales muy pequeñas pueden deberse a la baja concentración de algunos componentes presentes en los extractos o fracciones. Adicionalmente, en la Figura 3-11 se aprecian con flechas o círculos de colores diferencias en las intensidades de las señales, en especial la mayor cantidad de señales se observa en los extractos o fracciones provenientes de la época seca.

Tabla 3-4: Desplazamiento químico (RMN ¹H) de las señales observadas en los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol en las dos épocas del año (400 MHz).

Extracto etanólico (δ_H ppm) MeOD				
Época seca	5,37 -5,41	4,11 -4,13	3,78	3,63
Época de lluvia	5,35 -5,41	4,11 -4,13	3,78	3,63
Fracción en éter de petróleo (δ_H ppm) CDCl ₃				
Época seca	*	4,09 – 4,38	1,25	*
Época de lluvia	6,33 – 6,38	4,12 – 4,19	1,27	*
Fracción en acetato de etilo (δ_H ppm) MeOD				
Época seca	5,35 -5,37	4,10 – 4,37	2,78 – 2,85	1,31
Época de lluvia	*	*	*	1,31
Fracción butanólica (δ_H ppm) MeOD				
Época seca	3,81 – 3,90	3,60	3,34	2,15
Época de lluvia	3,79 – 3,90	3,60	*	*
Fracción acuosa (δ_H ppm) MeOD				
Época seca	5,37	4,07 -4,09	3,87	3,66 – 3,79
Época lluvia	5,37	4,07 -4,09	3,87	3,66 – 3,79

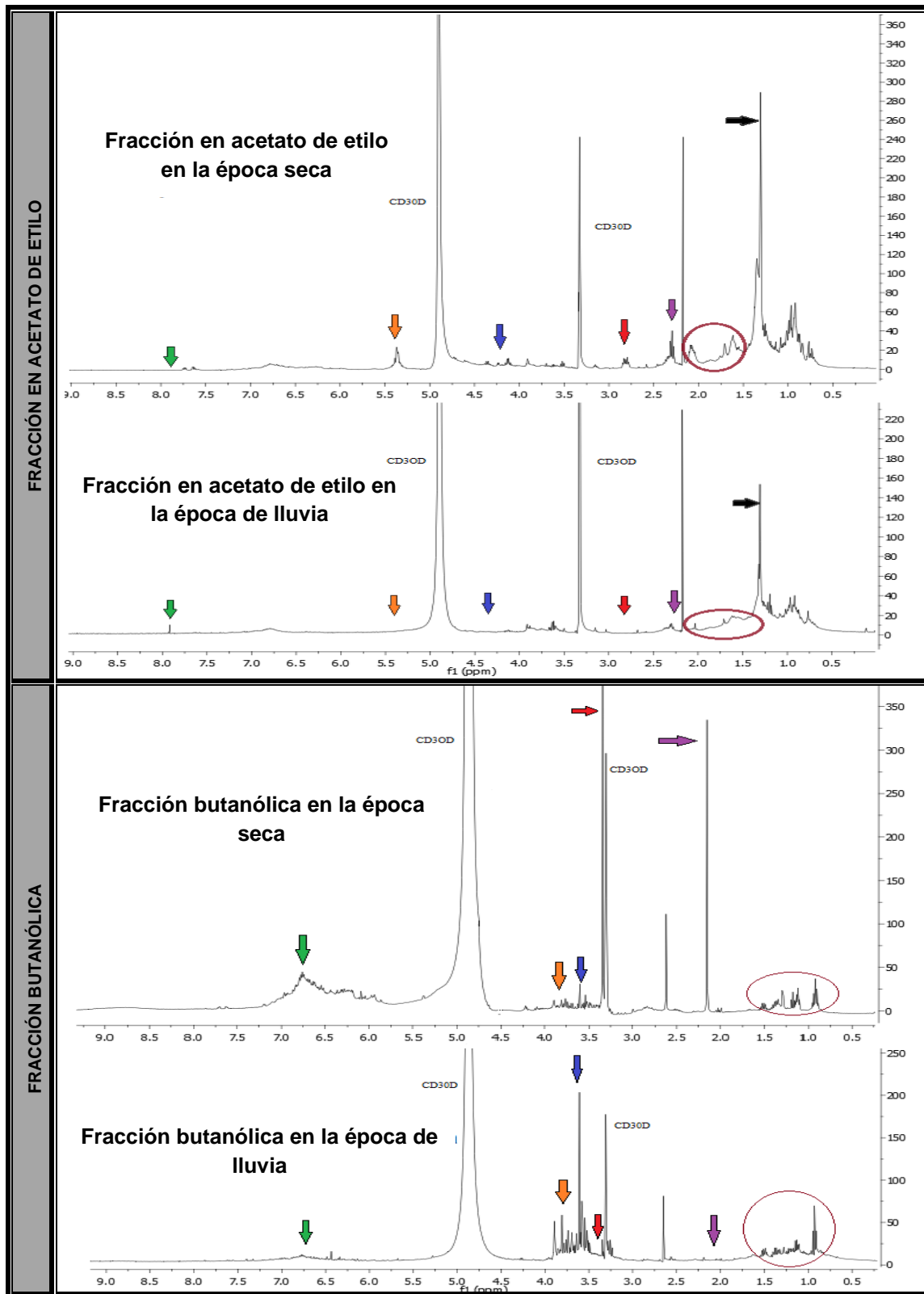
*no se presenta

Figura 3-11: Caracterización por RMN ^1H de los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol provenientes de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia (400 MHz, CDCl_3 o MeOD).



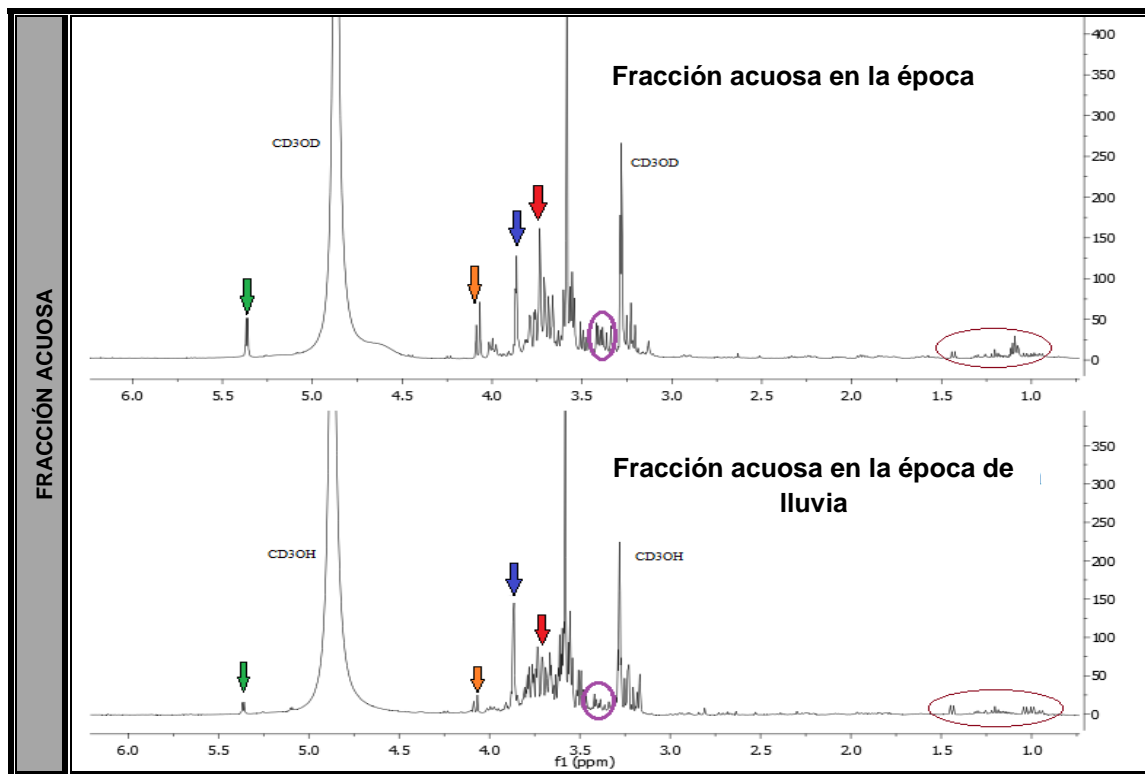
(Continúa)

(Continuación)



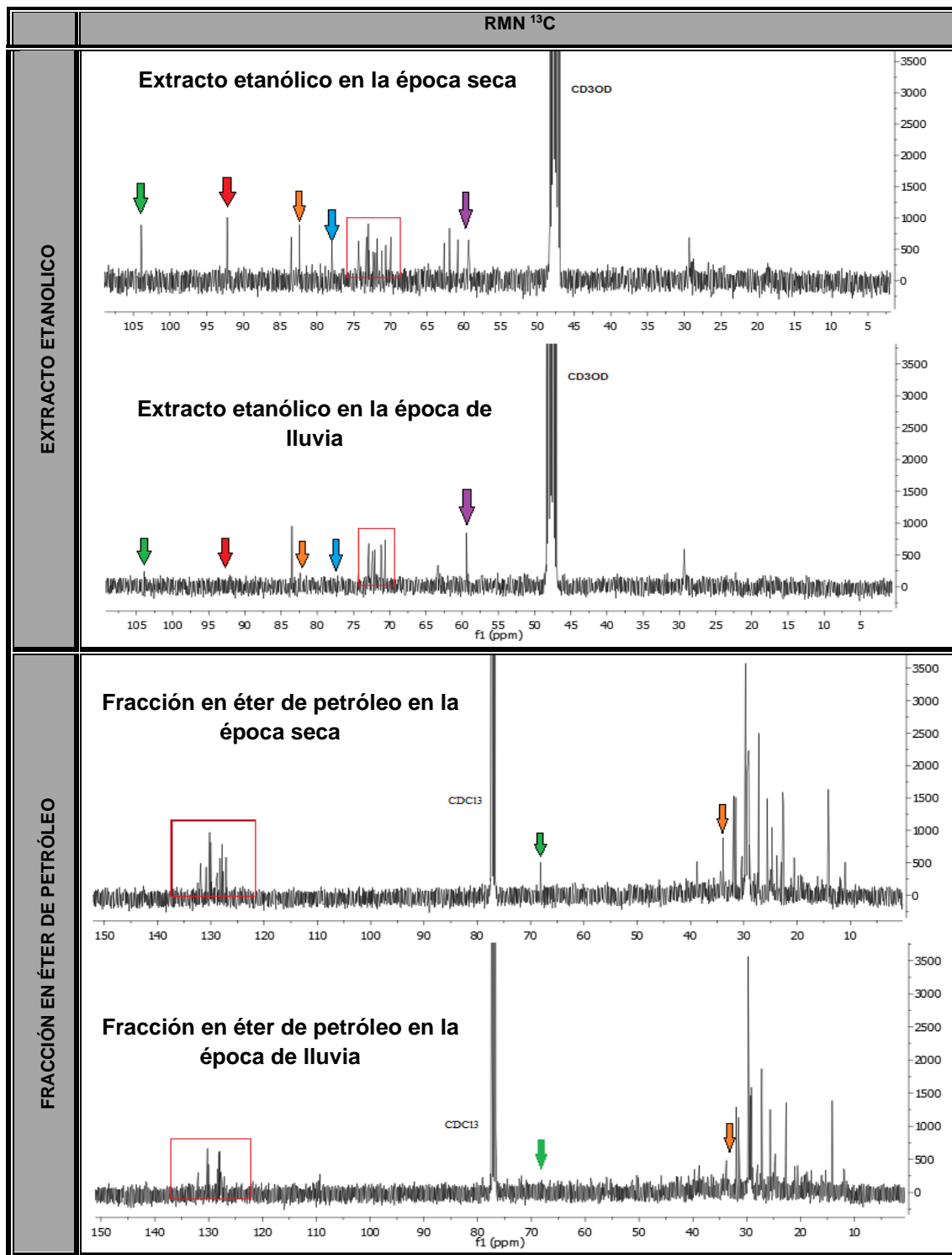
(Continúa)

(Continuación)



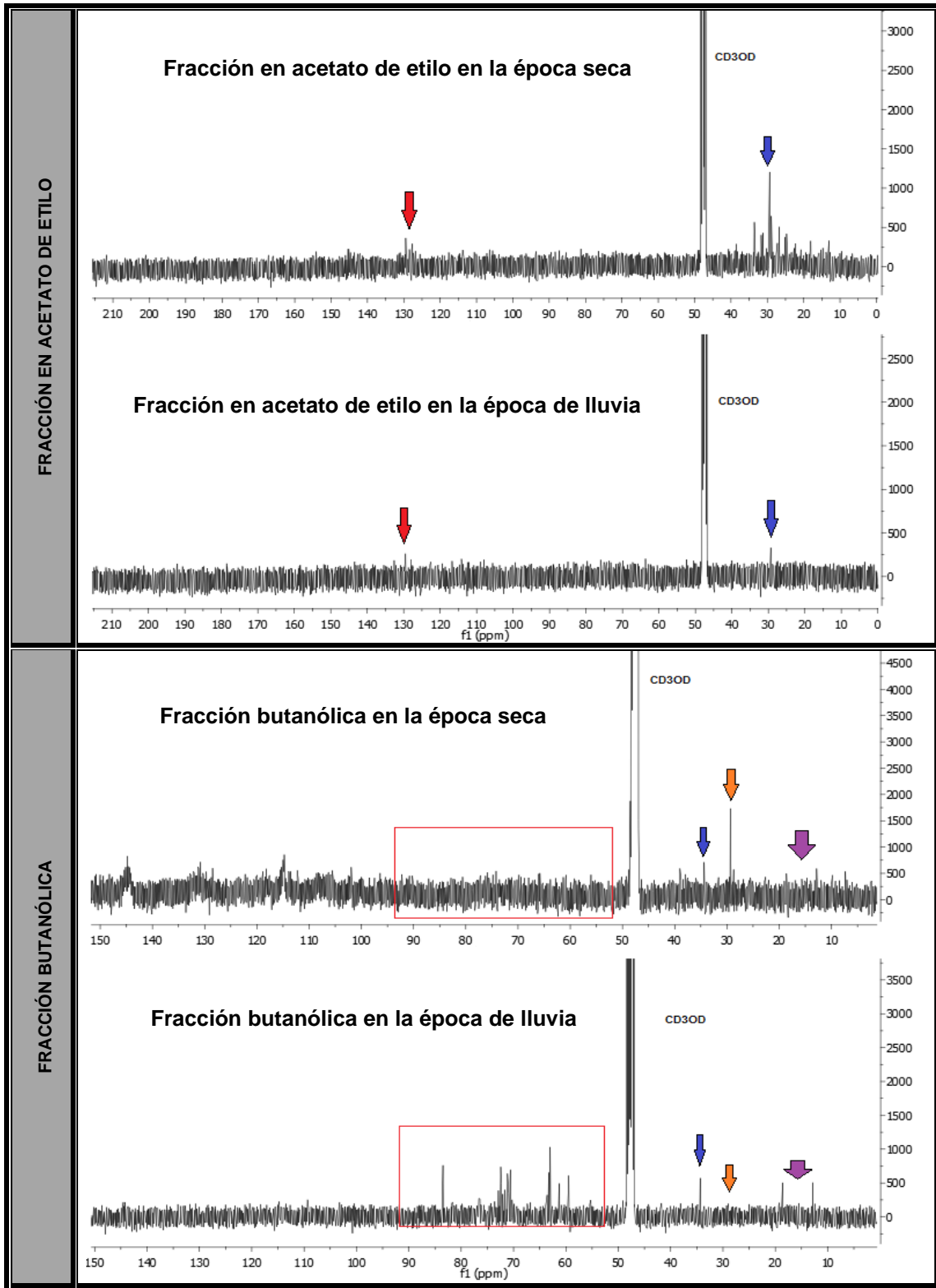
En la Figura 3-12 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ($\text{RMN } ^{13}\text{C}$) realizados al extracto y las fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanólica y acuosa con aproximadamente 20 mg c/u. Los espectros muestran desplazamientos químicos entre 1,0 a 60 ppm aproximadamente, que corresponden a carbonos de grupo metilo propios de ácidos grasos (fracción en éter de petróleo), entre otros. Carbonos de azúcares con desplazamientos químicos entre 62 a 105 ppm (en el extracto etanólico y la fracción acuosa provenientes de época de lluvia se presenta un monómero, en el extracto y fracciones provenientes de la época seca varios monómeros o disacáridos). Carbonos de compuestos con grupos éteres, entre 80 a 150 ppm carbonos de grupo metileno propios de compuestos con insaturaciones, carbonos de compuestos aromáticos, entre otros. En los espectros de los extractos y fracciones obtenidos en la época seca y de lluvia se observaron diferencias con algunas señales que aparecen en las dos o una sola época de colecta, las señales donde se aprecia el aumento de intensidad se presenta en la época seca, diferencias que se pueden apreciar con flechas y cuadrados de colores en la Figura 3-12.

Figura 3-12: Caracterización por RMN ^{13}C de los extractos etanólicos, fracciones éter de petróleo, acetato de etilo, butanol provenientes de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia (100 MHz, CDCl_3 o MeOD).



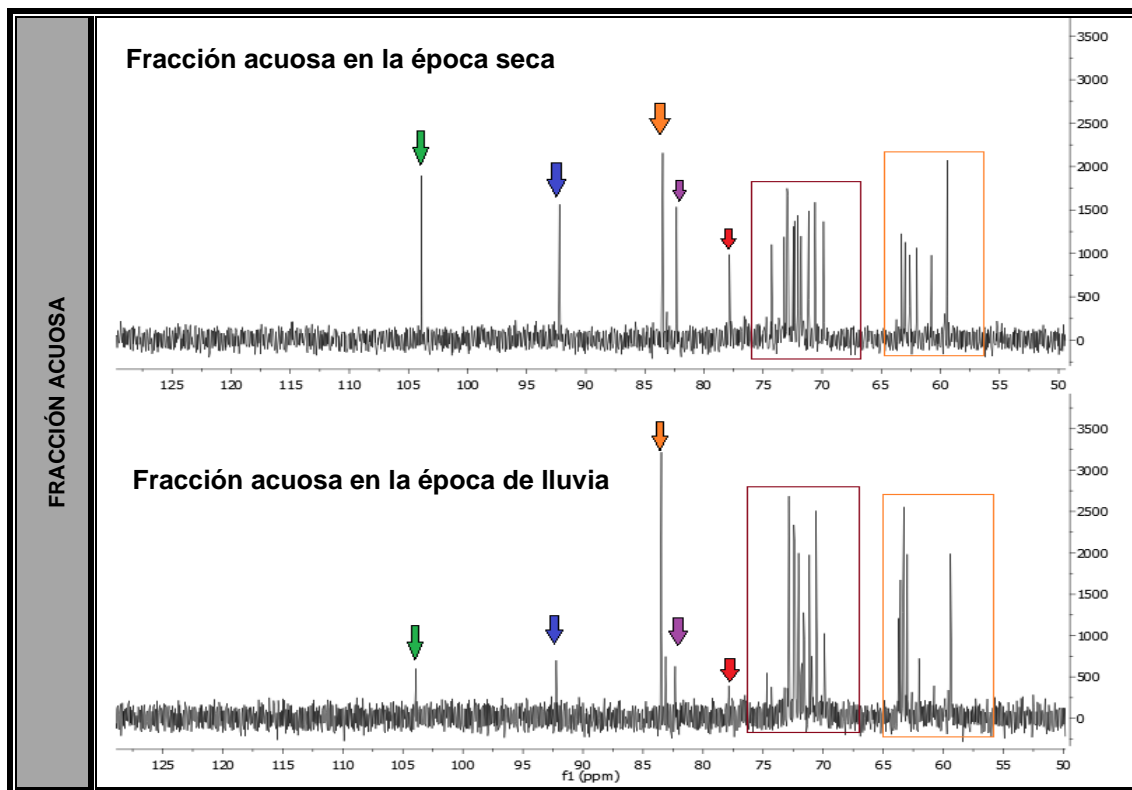
(Continúa)

(Continuación)



(Continúa)

(Continuación)



En el extracto y fracciones provenientes de la época seca se presenta mayor intensidad y número de señales tanto en los espectros de RMN ^1H como de RMN ^{13}C . Los extractos y fracción acuosa presentan compuestos glicosidados. En La fracción en éter de petróleo se observan desplazamientos característicos de ácidos grasos. Además, Los extractos y fracciones por CCD mostraron la presencia de metabolitos secundarios del tipo flavonoide y en RMN no son evidentes señales características de estos compuestos, posiblemente por su baja concentración, además, puede ser que los compuestos tipo esteroide y/o triterpenos, ácidos grasos o algún tipo de compuestos con características similares están en mayor proporción que los flavonoides.

3.3 Aislamiento, purificación e Identificación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo en las dos épocas del año.

Se realizaron procesos de aislamiento y purificación de las fracciones en éter de petróleo y acetato de etilo de los extractos etanólicos obtenidos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en época seca y de lluvia además, se estudió un precipitado generado en la fracción en acetato de etilo dirigido a identificar los metabolitos secundarios presentes. Las fracciones butanólica y acuosa serán consideradas para estudios posteriores.

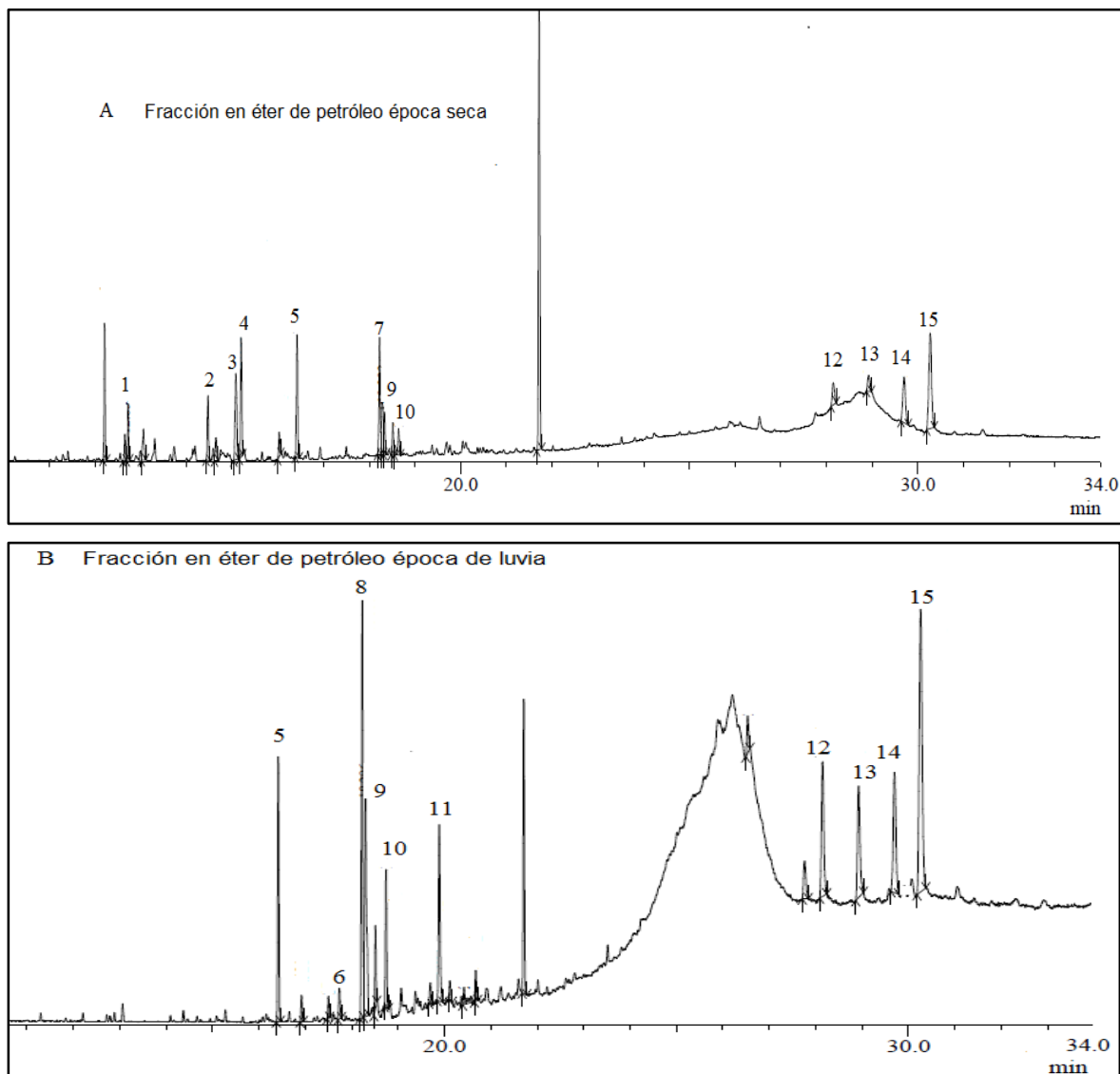
3.3.1 Análisis de la fracción en éter de petróleo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

El estudio de las fracciones en éter de petróleo obtenidas de los extractos etanólicos de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia mostraron diferencias entre ellas de acuerdo a los resultados por CCD (Figuras 3-5 y 3-6), CLAE (Figuras 3-7) y RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 3-11 y 3-12). Para complementar la caracterización y observar similitudes o diferencias en la fracción en éter de petróleo obtenida en época seca y de lluvia, se analizaron las fracciones por CG-EM en un equipo shimadzu QP2010 con 2 mg/mL c/u en CHCl_3 . Los perfiles cromatográficos de las fracciones provenientes de las dos épocas se observan en la Figura 3-13. Este análisis contribuyó al aislamiento y purificación de metabolitos presentes en estas fracciones.

Del estudio de los perfiles cromatográficos de las fracciones en éter de petróleo obtenidas en época seca y de lluvia se detectaron compuestos presentes en las fracciones obtenidas en las dos épocas del año como hexadecanoato de etilo (tiempo de retención de 16,4 min), 9,12,15-octadecatrienoato de butilo (18,3 min), estigmasterol (28,1 min), sitosterol (28,9 min), germanicol (29,7 min) y lupeol (30,3 min), en todos los casos el porcentaje de área es mayor para todos los compuestos presentes en la fracción éter de petróleo proveniente de la época de lluvia, excepto para el 15-metilheptadecanoato de etilo (18,5 min) donde su porcentaje de área es mayor para la fracción éter de petróleo proveniente de la época seca, ver Tabla 3-5. Los compuestos

presentan % de coincidencia mayor al 80% comparado con la base de datos NIST 08. LIB®. Los demás compuestos se presentan en una sola de las épocas, diferencias apreciables en la Figura 3-13 y Tabla 3-5.

Figura 3-13: Perfiles cromatográficos por CG-EM de la fracción en éter de petróleo obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.



A: Perfil cromatográfico de la fracción en éter de petróleo obtenida en la época seca. B: Perfil cromatográfico de la fracción en éter de petróleo obtenida en la época de lluvia. Equipo shimadzu GC-EM QP2010, columna capilar HP-5 de 30 m, flujo constante de 1,2 mL/min. Temperatura de 50 °C (2 min) de 15 °C/min hasta 200 °C (2 min) de 10 °C/min hasta 300 °C (10min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos. Con 2 mg/mL de muestra.

Tabla 3-5: Compuestos detectados por CG-EM en la fracción de éter de petróleo obtenida en el extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

Nº	Nombre	Época seca			Época de lluvia		
		Tiempo de retención (min)	% de coincidencia	Área %	Tiempo de retención (min)	% de coincidencia	Área %
1	(3-oxo-2-pentil Ciclopentil) acetato de metilo	12,7	88	2,6	*	*	*
2	12-metil -tridecanoato de propilo	14,4	83	3,4	*	*	*
3	Galoxolido	15,0	85	6,3	*	*	*
4	Tonalido	15,2	90	6,8	*	*	*
5	Hexadecanoato de etilo	16,4	90	6,5	16,4	90	7,6
6	Fitol	*	*	*	17,7	88	1,0
7	9,12 octadecadienoato de propilo	18,2	92	6,5	*	*	*
8	9,12 octadecadienoato de butilo	*	*	*	18,2	92	12,3
9	9,12,15 octadecatrienoato de etilo	18,3	89	4,1	18,3	91	10,3
10	15 metil heptadecanoato de etilo	18,5	88	1,9	18,5	88	1,7
11	Verticiol	*	*	*	19,9	83	6,3
12	Estigmasterol	28,1	80	2,0	28,1	80	7,3
13	Sitosterol	28,9	80	1,5	28,9	80	6,5
14	Germanicol	29,7	83	5,2	29,6	82	7,3
15	Lupeol	30,3	83	11,0	30,3	82	18,9

* no se presenta

Los resultados encontrados son importantes para determinar que el tipo y la concentración de los metabolitos es diferente para las dos épocas lo que puede determinar su comportamiento en posteriores ensayos biológicos.

Para obtener mayor información de la composición química de las fracciones en éter de petróleo en ambas épocas se realizaron procesos de purificación por CC en sílica gel 60 y CCDP en sílica gel 60 G F₂₅₄ eluyendo con solventes de polaridad creciente y mezclas en diferentes proporciones desde hexano hasta acetato de etilo, los procesos seguidos para cada fracción se muestran en la Figura 2-4 (numeral 2.4.1).

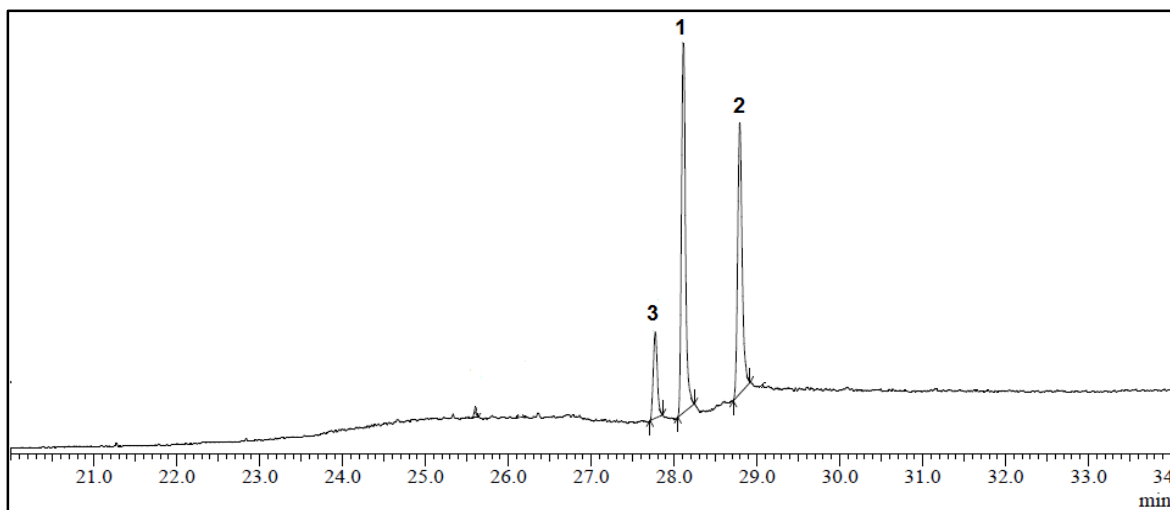
▪ **Análisis de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia (EPL)**

La fracción en éter de petróleo obtenida en la época de lluvia (2,3 g) fue fraccionada por CC empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y mezclas de hexano/CHCl₃ en polaridad creciente, ver numeral 2.4.1 y Figura 2-4. La fracción 6-5 (12 mg) presenta un sólido blanco denominado **EL-1** con un porcentaje de rendimiento del 0,14 % frente a la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia y la fracción 6-6 (14 mg) presentó un sólido blanco denominado **EL-2** con un porcentaje de rendimiento del 0,16 % frente a la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia (Figura 2-4). EL-1 y EL-2 mostraron por CCD la presencia de metabolitos tipo esteroide y/o terpeno al revelar con el reactivo de Godin.

El análisis de **EL-1** por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de dos picos principales, con un tiempo de retención de 29,7 min (83 % de coincidencia) correspondiente a germanicol y 30,3 min (83 % de coincidencia) del lupeol comparados con la base de datos NIST 08. LIB®.

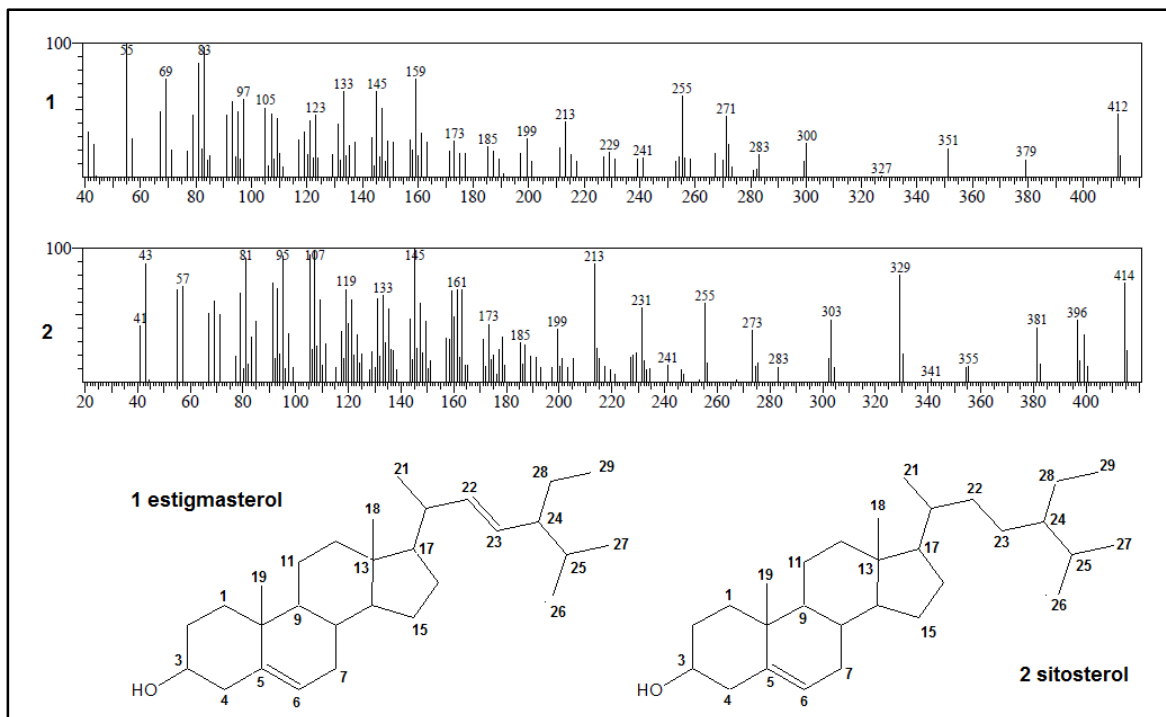
El análisis de **EL-2** por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de tres picos principales: con un tiempo de retención de 28,1 min (84 % de coincidencia), correspondiente al estigmasterol, de 28,9 min (77 % de coincidencia) del sitosterol y 27,9 min (84 % de coincidencia) del ergosterol, comparados con la base de datos NIST 08. LIB®. La Figura 3-14 muestra el perfil cromatográfico de EL-2, la Figura 3-15 muestra los espectros de masas de los picos principales.

Figura 3-14: Cromatograma CG-EM de EL-2 obtenida de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia.



1: estigmasterol. 2: sitosterol 3: ergosterol. Equipo shimadzu CG-EM QP2010, columna capilar HP-5 de 30 m, flujo constante de 1,2 mL/min. Temperatura de 50 °C (2 min) de 15 °C/min hasta 200 °C (2 min) de 10 °C/min hasta 300 °C (10 min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos. Con 2 mg/mL de muestra.

Figura 3-15: Espectros de masas de estigmasterol y sitosterol presentes en EL-2 de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia.



Se realizó una CCD (FM: CHCl₃) con una mezcla de estos compuestos (estigmasterol y sitosterol) generando un Rf (0,21) similar con una única mancha de color morado con el reactivo de Godin, esta única mancha se debe a la semejanza estructural de tipo esteroidal.

En el espectro de masas de estigmasterol y sitosterol que se muestra en la Figura 3-15 se observan una serie de señales cuyos valores más representativos son: 1) estigmasterol *m/z* 412 [M⁺], 379, 351, 300, 271, 255, 213, 83 y 55 (100%). 2) sitosterol *m/z* 414 [M⁺] 396, 381, 329, 303, 255, 213 y 43 (100%). Además de fragmentos con pérdida de M-85 y M-111 característicos de esteroides. En el espectro de RMN ¹H se muestran señales características de esteroides: un hidrógeno olefínico en δ_H 5,36 (1H, m, H-6) y un hidrógeno carbinólico en δ_H 3,55 ppm (1H, m, H-3) las cuales integran para 2 hidrógenos lo que sugiere la presencia de una mezcla de compuestos similares. También se presentan hidrógenos olefínicos en δ_H 5,04 y 5,16 ppm (2H, dd, *J*= 16.0, 8.0 Hz, H-22 y H-23) y señales de grupos metilos en δ_H 1,03 (3H, s, H-19), y δ_H 0,70 (3H, s, H-18). Los resultados de RMN de ¹H y ¹³C fueron comparados con la literatura (Kojima *et al.*, 1990), los datos de RMN de ¹³C se muestran en la Tabla 3-6, confirmando la presencia de estigmasterol y sitosterol, compuestos comúnmente encontrados en especies vegetales (Figura 3-15).

Tabla 3-6: Comparación de datos de RMN ¹³C de EL-2 con la literatura.

Carbono	Sitosterol		Estigmasterol	
	EL-2 δ _C ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Kojima <i>et al.</i> , 1990) δ _C ppm CDCl ₃ – 100 MHz	EL-2 δ _C ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Kojima <i>et al.</i> , 1990) δ _C ppm, CDCl ₃ – 100 MHz
1	CH ₂	37,2	37,2	37,2
2	CH ₂	31,6	31,6	31,6
3	CH	71,8	71,8	71,8
4	CH ₂	42,3	42,3	42,3
5	C	140,7	140,7	140,7
6	CH	121,7	121,7	121,7
7	CH ₂	31,9	31,9	31,9
8	CH	31,9	31,9	31,9
9	CH	50,0	50,1	50,1
10	C	36,5	36,5	36,5
11	CH ₂	21,1	21,1	21,1

(Continúa)

(Continuación)

		Sitosterol		Estigmasterol	
12	CH ₂	39,8	39,8	39,7	39,7
13	C	42,3	42,3	42,2	42,2
14	CH	56,8	56,8	56,8	56,8
15	CH ₂	24,3	24,3	24,4	24,4
16	CH ₂	28,2	28,2	28,9	28,9
17	CH	55,9	56,0	55,9	55,9
18	CH ₃	11,9	11,9	12,0	12,0
19	CH ₃	19,4	19,4	19,4	19,4
20	CH	36,1	36,1	40,5	40,5
21	CH ₃	18,7	18,8	21,2	21,2
22	CH ₂ /CH	33,9	33,9	138,3	138,3
23	CH ₂ /CH	26,1	26,0	129,2	129,2
24	CH	45,8	45,8	51,2	51,2
25	CH	29,1	29,1	31,9	31,9
26	CH ₃	19,8	19,8	21,1	21,1
27	CH ₃	19,0	19,0	19,0	19,0
28	CH ₂	23,0	23,0	25,4	25,4
29	CH ₃	12,0	12,0	12,3	12,3

Se detectó la presencia de EL-1 (germanicol y lupeol) y EL-2 (estigmasterol y sitosterol) en varias fracciones que no fueron purificadas. Igualmente estos compuestos se detectaron en la caracterización de la fracción en éter de petróleo por CCD (Figura 3-5) y CG-EM (Figura 3-13 y Tabla 3-5) presentes en esta fracción obtenida en la época de lluvia.

▪ **Análisis de la fracción en éter de petróleo proveniente de la época seca**

La fracción en éter de petróleo obtenida en la época seca (8.8 g) fue fraccionada por CC, iniciando la elución con hexano aumentando la polaridad, luego de la evaporación del solvente se analizaron las fracciones por CCD revelando con el reactivo de Godin y se reunieron en 15 fracciones (Figura 2.4, numeral 2.4.1). La fracción 4-2-3 (ver Figura 2.4) mostró una mancha por CCD revelando con el reactivo de Godin a la que se le denominó **ES-3** (5 mg) un sólido de color blanco con un porcentaje de rendimiento del 0,2 % frente a la fracción en éter de petróleo obtenida en la época seca.

El análisis de **ES-3** por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de dos compuestos principales, germanicol y lupeol con cantidad (mg) menor frente al

compuesto EL-1 presente en la fracción en éter de petróleo proveniente de la época de lluvia, este resultado confirma lo observado en la caracterización de la fracción en éter de petróleo por CCD (Figura 3-5) y CG-EM (Figura 3-13 y Tabla 3-5).

3.3.2 Análisis de la fracción en acetato de etilo obtenida del extracto etanólico de la corteza de *A. farnesiana* colectada en la época seca y de lluvia.

Al obtener la fracción en acetato de etilo en la época de lluvia se observó un precipitado blanco soluble en la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ o en piridina, analizada posteriormente.

Para adelantar el proceso de purificación de las fracciones en acetato de etilo obtenidas en las dos épocas del año se realizó CC en sílica gel 60 (ver Figura 2-5, numeral 2.4.2).

▪ Análisis del precipitado obtenido en la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.

Al concentrar la fracción en acetato de etilo época de lluvia se observó un precipitado (Figura 2-5) denominado **A1** soluble en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) o en piridina.

Para analizar la muestra por RMN y facilitar su análisis se realizó un proceso de acetilación donde se obtuvo 57 mg de un sólido blanco el cual se analizó por CCD en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) observando una mancha de coloración violeta luego de revelar con el reactivo de Godin, que se analizó por RMN de ^1H y ^{13}C .

En el espectro de RMN ^1H de A1 se muestran señales características de un núcleo esteroide: una señal de hidrógeno olefínico en δ_{H} 5,36 ppm (1H, m, H-6), otra señal de hidrógeno carbinólico en δ_{H} 3,48 ppm (1H, m, H-3) y señales de hidrógenos de grupos metilos en δ_{H} 0,98 (3H, s, H-19) y en δ_{H} 0,67 (3H, s, H-18) que pueden ser asignadas a un esteroide. Se detectaron señales de los hidrógenos en δ_{H} 5,20 ppm (1H, t $J=8$ Hz, H-3'), δ_{H} 5,07 (2H, m, H-4' y H-5'), δ_{H} 4,56 (1H, d $J=8$ Hz, H-1'), δ_{H} 4,09 (2H, d $J=12$ Hz, H-6'), además, de cuatro señales en el rango de δ_{H} 2,00 – 2,07 ppm provenientes de hidrógenos metílicos obtenidos de la acetilación; y la presencia de un carbono anomérico en δ_{C} 99,6 ppm (C-1') sugieren la presencia de un azúcar, unida a un esteroide. Los resultados de RMN de ^1H y ^{13}C fueron comparados con la literatura (Alia *et al.*, 2002), los datos de RMN de ^{13}C se muestran en la Tabla 3-7, confirmando la presencia de 3 β -O-D-

glucopiranosil- β -sitosterol (A1) y el derivado acetilado tetra-*O*-acetil- β -*D*-glucopiranosil- β -sitosterol (A1a) en el sólido A1, (Figura 3-16).

Figura 3-16: Estructura de A1

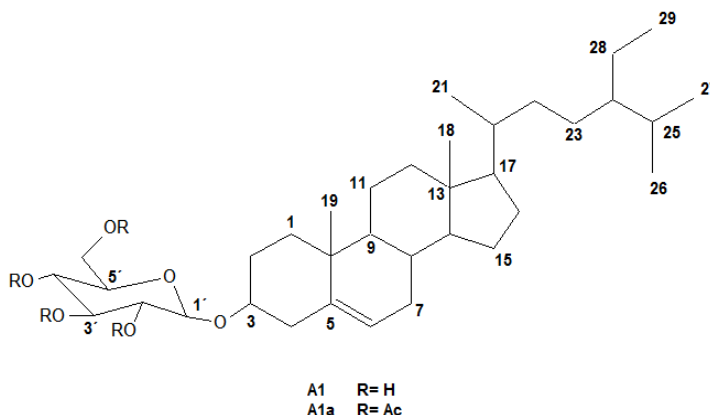


Tabla 3-7: Comparación de datos de RMN ^{13}C de A1a con la literatura.

Carbono		A1 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Rincón, 1997) δ_c ppm CDCl ₃ – 50,3 MHz	(Ali M. <i>et al.</i> , 2002) δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz
1	CH ₂	37,2	37,1	37,2
2	CH ₂	29,5	29,4	29,4
3	CH	80,1	80,0	80,1
4	CH ₂	38,9	38,9	38,9
5	C	140,3	140,3	140,3
6	CH	122,1	122,1	122,1
7	CH ₂	31,9	31,9	31,9
8	CH	31,8	31,8	31,8
9	CH	50,1	50,1	50,1
10	C	36,7	36,7	36,5
11	CH ₂	21,1	21,0	21,1
12	CH ₂	39,8	39,7	39,7
13	C	42,3	42,3	42,2
14	CH	56,7	56,7	56,7
15	CH ₂	24,3	24,2	24,2
16	CH ₂	28,2	28,2	28,2
17	CH	56,0	55,9	56,0
18	CH ₃	11,8	11,8	11,9
19	CH ₃	19,4	19,3	19,5
20	CH	36,1	36,1	36,1
21	CH ₃	18,8	18,7	18,8
22	CH ₂	33,9	33,9	33,9

(Continúa)

(Continuación)

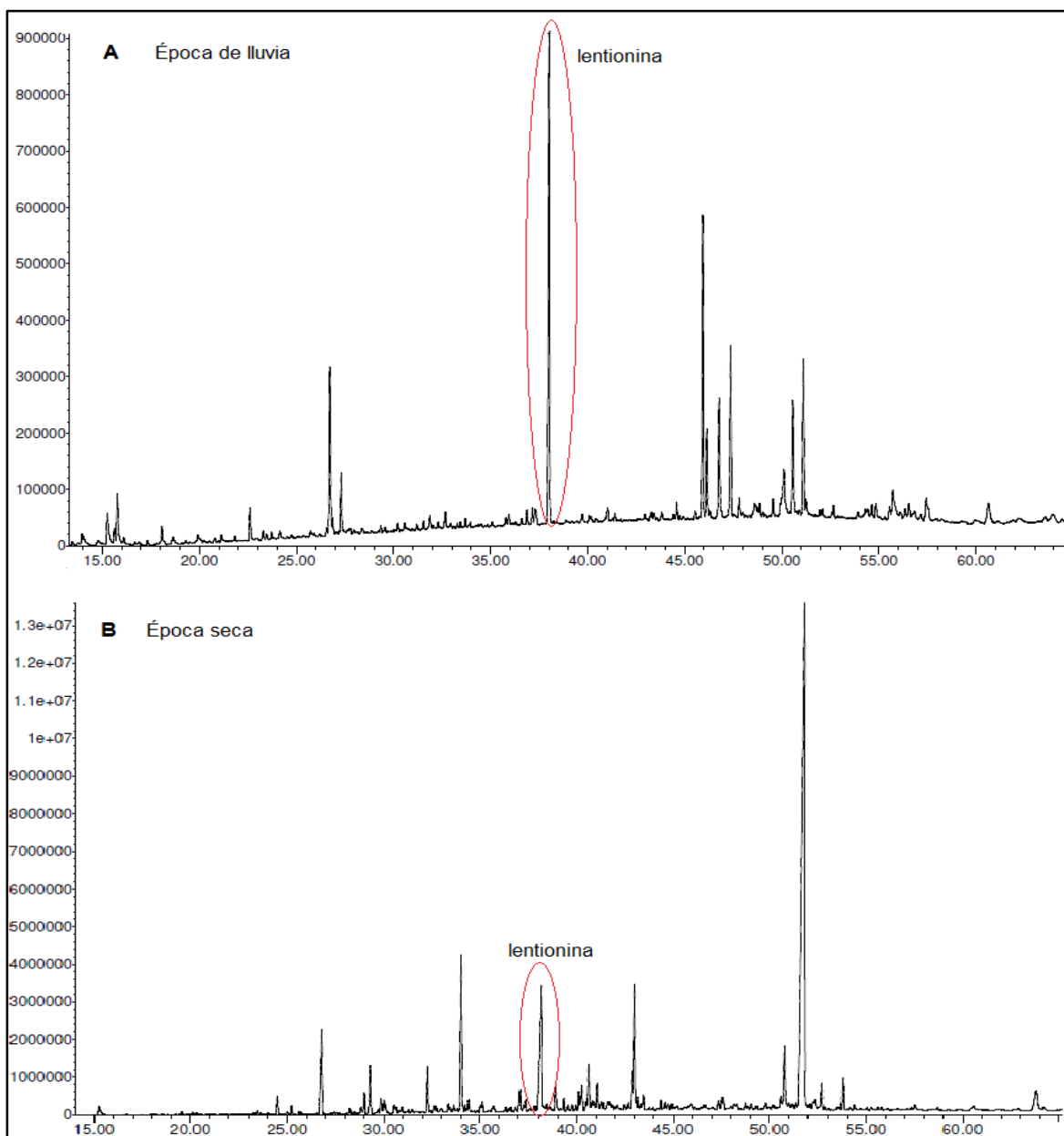
Carbono		A1 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Rincón, 1997) δ_c ppm CDCl ₃ – 50,3 MHz	(Ali M. <i>et al.</i> , 2002) δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz
23	CH ₂	26,0	25,9	26,0
24	CH	45,8	45,8	45,8
25	CH	29,1	29,1	29,1
26	CH ₃	19,8	19,8	19,8
27	CH ₃	19,0	18,9	19,0
28	CH ₂	23,1	23,0	23,0
29	CH ₃	12,0	11,9	12,0
1'	CH	99,6	99,6	99,6
2'	CH	71,5	71,4	71,5
3'	CH	72,9	72,9	71,7
4'	CH	68,5	68,5	68,5
5'	CH	71,7	71,6	72,9
6'	CH ₂	62,1	62,0	61,9
	AcO	169,3 – 170,3 - 20,6 – 20,7	169,3 – 170,7 - 20,6 – 20,7	169,8 – 170,3– 20,7 – 21,0

▪ **Análisis de las fracciones en Hexano/CHCl₃ (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia.**

Las fracciones obtenidas en Hexano/CHCl₃ obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia (ver Figura 2-6, numeral 2.4.2) presentaron un olor característico asociado a compuestos azufrados. La fracción L-1-4 ver Figura 2-6 se obtuvo como un aceite con olor característico analizada por CG-EM. El análisis de la fracción L-1-4 proveniente de la época de lluvia por CG-EM permitió detectar la presencia de varios compuestos, el compuesto con mayor porcentaje de coincidencia y área, posee un tiempo de retención de 38,0 min, 99 % de coincidencia y un porcentaje de área de 28,4 % comparados con la base de datos NIST 08. LIB[®]. El compuesto corresponde a lentionina (1,2,3,5,6-pentatiopano) posible responsable del olor característico asociado a compuestos azufrados. En la época seca también fue detectado este compuesto con un tiempo de retención de 38,1 min, 97 % de coincidencia y un porcentaje de área de 7,5 %. La Figura 3-17 muestra el perfil cromatográfico de las fracciones en Hexano/CHCl₃ (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia. El compuesto lentionina denominado A2 se señala en el perfil cromatográfico Figura 3-17 y

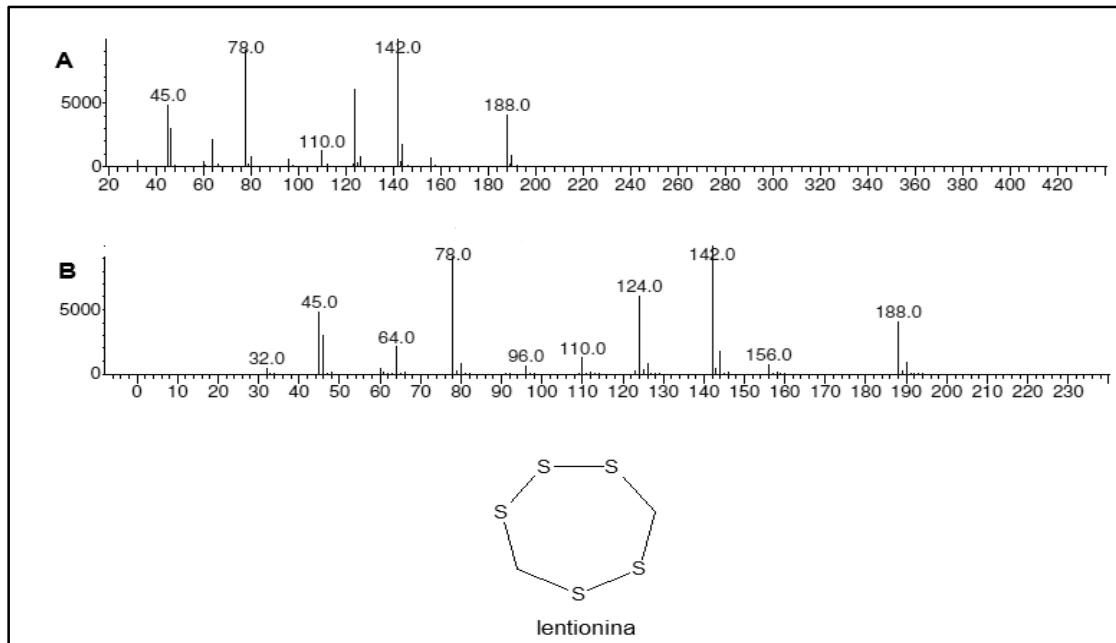
en la Figura 3-18 se muestra el espectro de masas del compuesto lentionina denominado A2.

Figura 3-17: Perfil cromatográfico de CG-EM del compuesto A2 presente en las fracciones de Hexano-CHCl₃ (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo provenientes de época seca y de lluvia.



A: Cromatograma fracción Hexano-CHCl₃ proveniente de la época de lluvia. B: Cromatograma fracción Hexano-CHCl₃ proveniente de época seca. La señal que presenta un círculo de color es el compuesto A2. Equipo Agilent Technologies 5975C VL MSD, columna HP-5, 30 m, flujo de 1 mL/min, temperatura inicial de columna de 50 °C, rampa de 3 °C/min hasta 250 °C, tiempo de corrida de 80 min. Con 2 mg/mL de muestra c/u.

Figura 3-18: Espectros de masas de A2 (lentionina) presente en las fracciones de Hexano/ CHCl_3 obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia.



A: Espectro de masas del compuesto A2 de la fracción Hexano- CHCl_3 proveniente de la época de lluvia. B: Espectro de masas del compuesto A2 de la fracción Hexano- CHCl_3 proveniente de la época seca.

En el espectro de masas de lentionina que se muestra en la Figura 3-18 presentó una serie de señales cuyos valores más representativos son: m/z 188 [M^+], 124, 78, 45 y 142 (100%) de fragmentos azufre-azufre o azufre-grupo metilénico.

La lentionina es un compuesto organosulfurado cíclico volátil que ha sido encontrado en el hongo comestible shiitake (*Lenthinus edodes*), este compuesto es responsable del olor de esta seta, reportado como potencial antibiótico y antifúngico (Yavari I. *et al.*, 2003, Hatvani 2001). Se ha determinado la actividad inhibidora contra la agregación plaquetaria de lentionina (Shimada S. *et al.*, 2004).

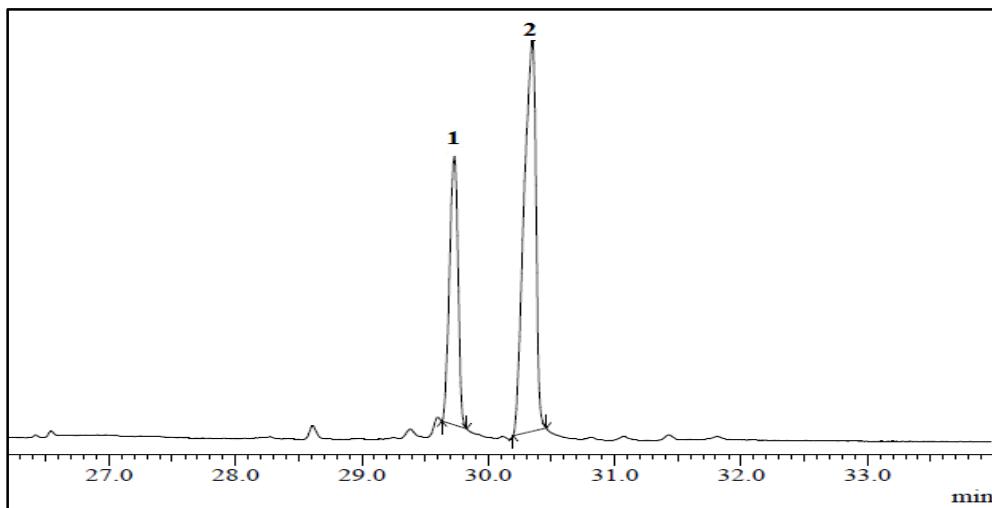
La presencia de este compuesto en la especie *A. farnesiana* puede ser atribuido a un hongo presente en la corteza al momento de la colecta o a la enzima liasa S-alquil-L-cisteína que fue purificada en esta especie (Mazelis *et al.*, 1975, Mazelis 1975), enzima que contribuye a la síntesis de lentionina (Block & Deorazio 1994).

- **Análisis de las fracciones en CHCl_3 obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca y de lluvia.**

De las fracciones obtenidas en CHCl_3 de la fracción acetato de etilo proveniente de la época de lluvia, la fracción L-4 (153 mg) reveló por CCD con el reactivo Godin la presencia de una sustancia mayoritaria del tipo esteroidal y/o triterpénico, dicha fracción se sometió a purificación por CC sucesivas empleando sílica gel 60 eluyendo con solventes de diferente polaridad (ver numeral 2.4.2 Figura 2-7) obteniendo un sólido blanco denominado **A3** que pesó 30 mg con un porcentaje de rendimiento del 0,16% con relación a la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia. (Figura 2-7). El sólido A3 se evaluó por medio de CCD eluyendo con CHCl_3 y al ser revelada con el reactivo de Godin se detectó la presencia de una mancha (R_f 0,30). El sólido A3 fue analizado por CG-EM y RMN ^1H - ^{13}C .

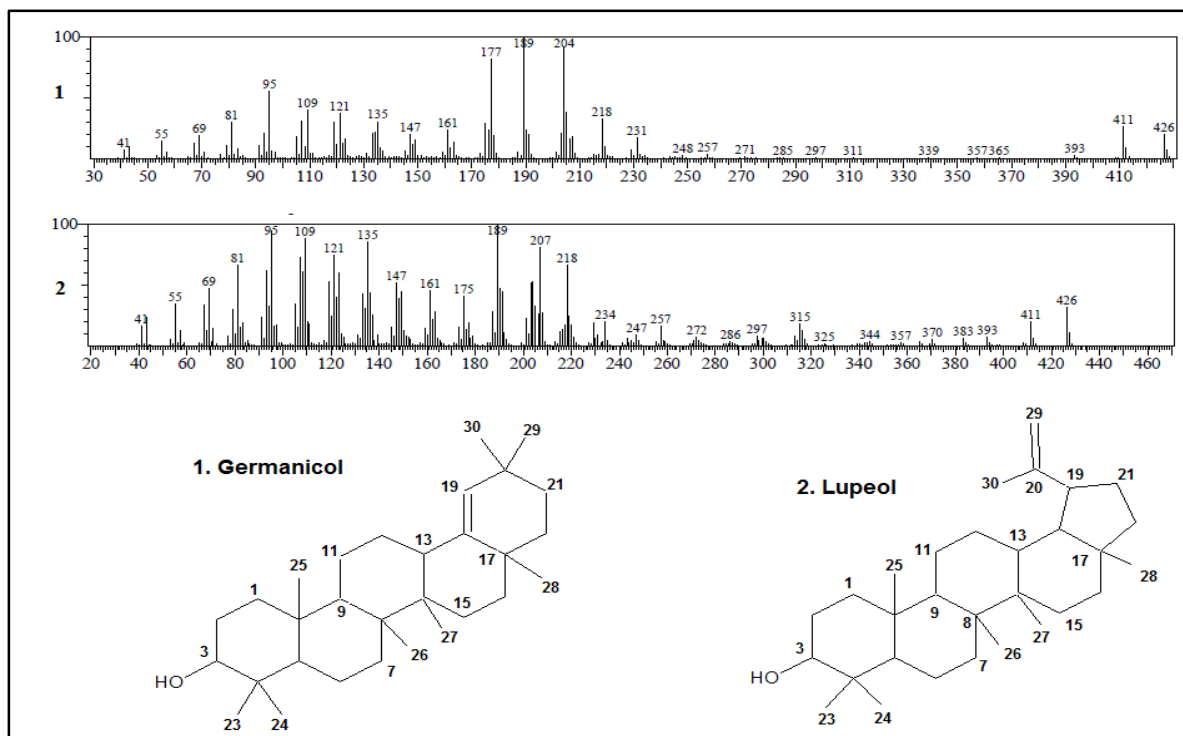
El análisis del compuesto A3 por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de dos picos con un tiempo de retención de 29,6 min, 83 % de coincidencia, porcentaje de área de 28,9 % correspondiente a germanicol y de 30,4 min, 83 % de coincidencia, porcentaje de área de 69,3 % del lupeol, comparados con la base de datos NIST 08. LIB[®]. La Figura 3-19 muestra el cromatograma del sólido A3 y la Figura 3-20 muestra el espectro de masas de los compuestos presentes en el sólido A3. Estos compuestos poseen estructuras similares mostrando una mancha por CCD; además, son compuestos de tipo triterpenos que revelan con el reactivo de Godin observándose una mancha de color morado característica de estos compuestos.

Figura 3-19: Cromatograma de A3 proveniente de la fracción en CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.



1: compuesto germanicol. 2: compuesto lupeol. Equipo shimadzu GC-EM QP2010, columna capilar HP-5 de 30 m, flujo constante de 1,2 mL/min. Temperatura de 50 °C (2 min) de 15 °C/min hasta 200 °C (2 min) de 10 °C/min hasta 300 °C (10 min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos. Con 2 mg/mL de muestra.

Figura 3-20: Espectros de masas de germanicol y lupeol presentes en el sólido A3 proveniente de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época de lluvia.



En la Figura 3-20 se muestran dos espectros de masas: el espectro 1 presenta una serie de señales cuyos valores más representativos son: m/z 426 [M^+], 411, 231, 204, 218, 177, 95 y 189 (100%) que puede atribuirse al compuesto germanicol y el espectro 2 presenta valores como: m/z 426 [M^+], 207, 161, 135 y 189 (100%) que corresponden al compuesto lupeol.

El espectro de RMN 1H de A3 presenta señales características como: las señales en δ_H 4.68 y 4.56 (2H, s, H-29) de hidrógeno metilénico y δ_H 4,85 ppm (1H, s, H-19) de hidrógeno metínico, una señal de hidrógeno carbinólico en δ_H 3,20 ppm (1H, dd $J=12.0$, 4.0 Hz, H-3) y señales de hidrógenos de grupos metilos entre δ_H 1,25 a 0,76 ppm, estas señales son características de triterpenos. Los resultados de RMN de 1H y ^{13}C fueron comparados con la literatura (Jamal *et al.*, 2008; Lagharia A. H *et al.*, 2011; Koul S. *et al.*, 2000; Wang Z. *et al.*, 2011), los datos de RMN de ^{13}C se muestran en la Tabla 3-8, confirmando la presencia de germanicol y lupeol (Figura 3-20).

Tabla 3-8: Comparación de datos de RMN ^{13}C de A3 con la literatura.

Carbono		Lupeol		Germanicol	
		A3 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Jamal <i>et al.</i> , 2008) δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	A3 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Wang Z. <i>et al.</i> , 2011) δ_c ppm CDCl ₃ – 150 MHz
1	CH ₂	38,1	38.2	38,4	38.4
2	CH ₂	25,2	25.3	27,4	27.4
3	CH	79,0	79.1	79,0	79.0
4	C	38,9	38.9	38,9	38.9
5	CH	55,3	55.5	55,3	55.5
6	CH ₂	18,3	18.5	18,3	18.3
7	CH ₂	34,4	34.5	34,6	34.6
8	C	40,9	41.0	40,0	40.8
9	CH	50,5	50.6	51,2	51.2
10	C	37,2	37.3	37,2	37.2
11	CH ₂	20,9	21.1	20,9	21.1
12	CH ₂	27,4	27.5	26,2	26.2
13	CH	39,7	39.0	38,9	38.9
14	C	43,0	43.0	43,3	43.3
15	CH ₂	27,5	27.6	27,5	27.5
16	CH ₂	35,6	35.8	37,7	37.7
17	C	43,4	43.2	34,4	34.4
18	CH/C	48,3	48.5	142,9	142.8

(Continúa)

(Continuación)

Carbono		Lupeol		Germanicol	
		A3 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Jamal <i>et al.</i> , 2008) δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	A3 δ_c ppm CDCl ₃ – 100 MHz	(Wang Z. <i>et al.</i> , 2011) δ_c ppm CDCl ₃ – 150 MHz
19	CH	48,0	48.1	129,7	129.7
20	C	150,9	151.1	32,4	32.3
21	CH ₂	29,9	30.0	33,3	33.3
22	CH ₂	40,0	40.2	37,3	37.3
23	CH ₃	28,0	28.2	28,0	28.0
24	CH ₃	15,4	15.6	15,4	15.4
25	CH ₃	16,1	16.3	16,1	16.1
26	CH ₃	16,0	16.2	16,7	16.7
27	CH ₃	14,6	14.7	14,6	14.6
28	CH ₃	18,0	18.2	25,3	25.3
29	CH ₂ /CH ₃	109,3	109.5	31,4	31.3
30	CH ₃	19,4	19.5	29,2	29.2

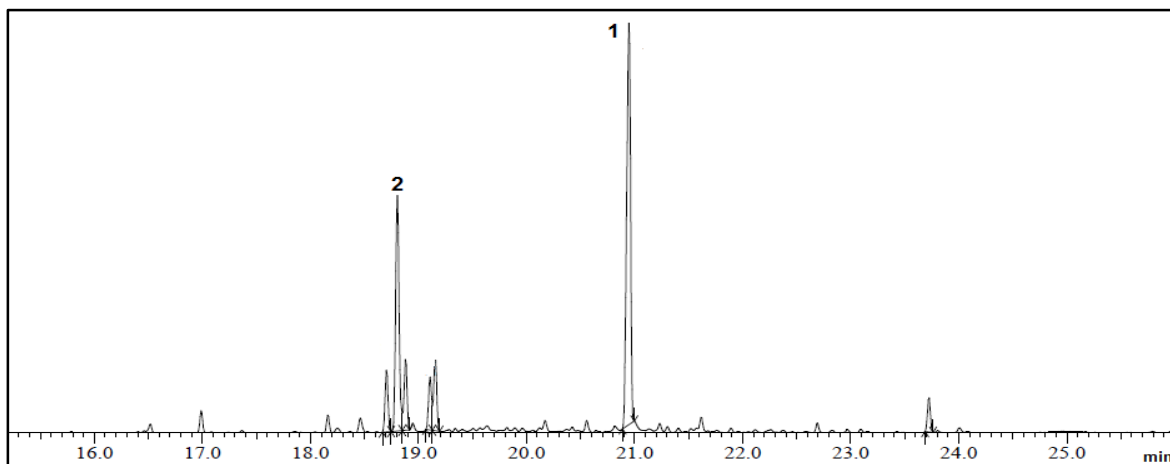
El lupeol es un terpeno pentacíclico comúnmente encontrado en especies vegetales y con varios estudios como el de Mohammad (2009) que reporta actividades antiinflamatoria y anticancerígena, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, se ha reportado el mejoramiento de las anomalías lipídicas-oxidativas en la etapa temprana de la aterosclerosis, antihipercolesterolemia (Varatharajan *et al.*, 2006) y estudios adicionales indican que el lupeol es un hepatoprotector tan activo como la silimarina (Preetha *et al.*, 2006).

De las fracciones en CHCl₃ obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca, la fracción S-4-5-2 (30 mg) (ver Figura 2-7, numeral 2.4.2) se purificó por CCDP empleando sílica gel 60 G F₂₅₄ y fue eluida con Hexano/MeOH (99:1), obteniéndose un aceite denominado A4 que pesó 7 mg con un porcentaje de rendimiento del 0,05 % frente a la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca, (Figura 2-7) con un olor característico y analizada por CG-EM y RMN ¹H -¹³C. La muestra A4 se detectó por CCD en varias fracciones que no fueron purificadas.

El análisis de la muestra A4 por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de un pico principal con un tiempo de retención de 20,9 min, 90 % de coincidencia que al compararlo con la base de datos NIST 08. LIB[®], correspondió al

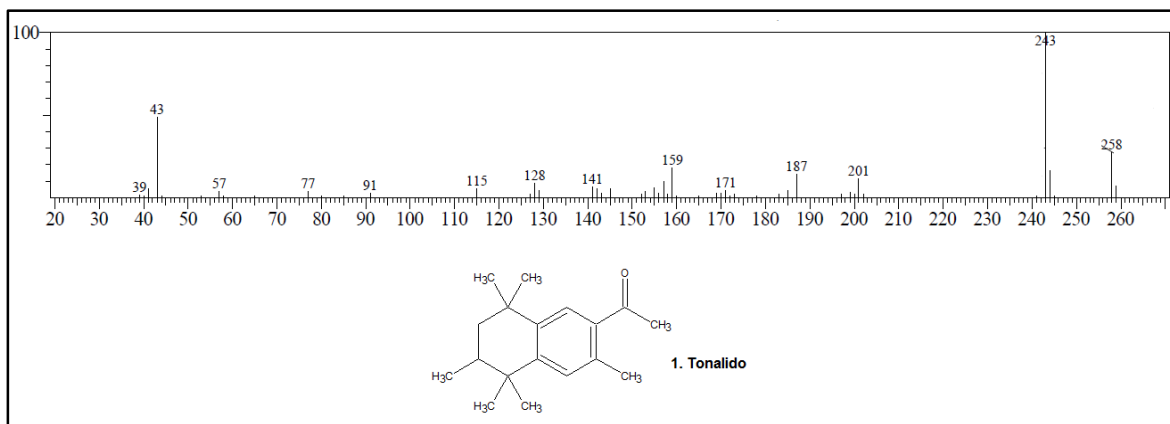
compuesto de nombre común tonalido numerado como 1. La Figura 3-21 muestra el cromatograma de la muestra A4 y la Figura 3-22 muestra el espectro de masas del compuesto presente en el aceite A4.

Figura 3-21: Cromatograma de A4 de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca.



1: tonalido. 2: Ciclohexeno 1,3,3, trimetil 2-(1-metil but 1-en, 3-ona, 1-il). Equipo shimadzu QP2010 plus, columna capilar HP-5 de 30 m. Temperatura de 45 °C (5 min) de 5 °C/min, hasta 60 °C (1 min) de 30 °C/min, hasta 130 °C de 4 °C/min, hasta 190 °C (2 min) de 40 °C/min, hasta 285 °C para un tiempo total de análisis de 30 minutos. Con 1 mg/mL de muestra.

Figura 3-22: Espectros de masas del tonalido (1) presente en A4 proveniente de la fracción CHCl_3 obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.

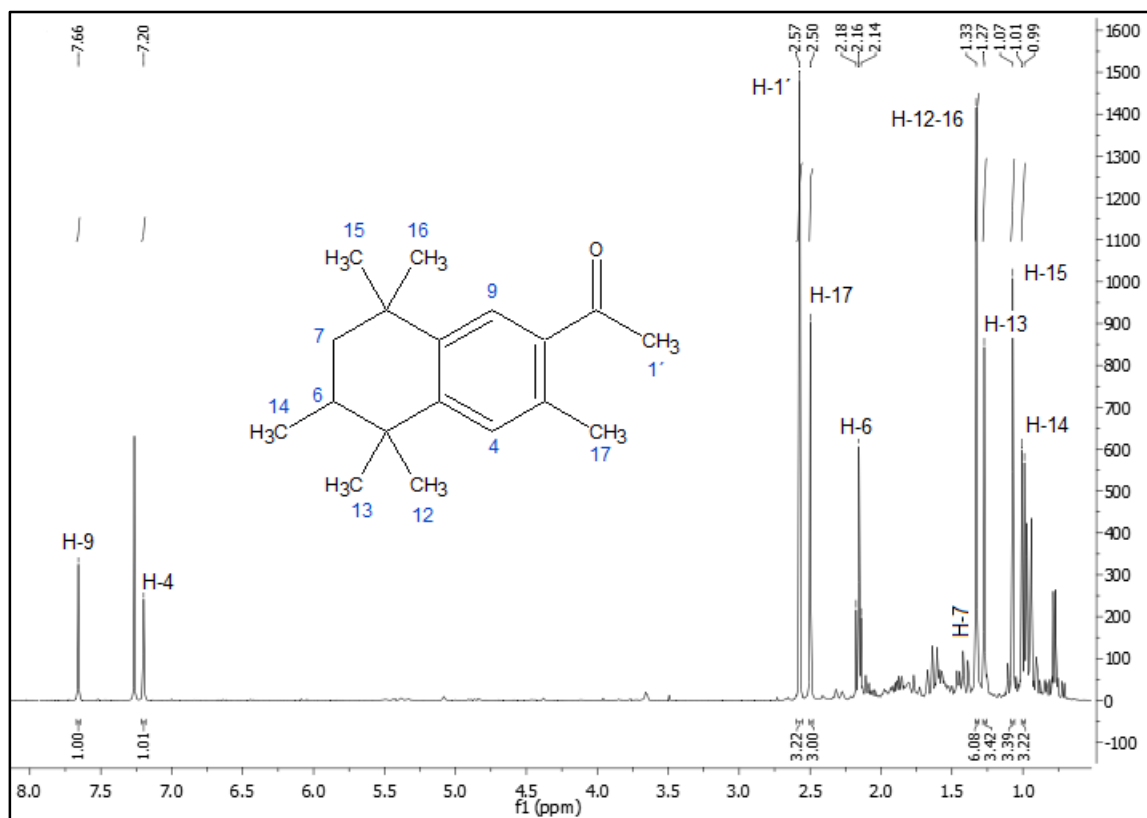


En la Figura 3-22 se muestra el espectro de masas que presenta una serie de señales cuyos valores más representativos son: m/z 258 [M^+], 243 (100%) pérdida de $\text{M}-\text{Me}$, 187 y 43. Para confirmar la estructura del compuesto mayoritario presente en A4 se realizó un espectro de RMN ^1H y ^{13}C además, se realizaron experimentos como DEPT 135°, HMBC

y HMQC que confirman la estructura del tonalido como compuesto mayoritario. El cromatograma CG-EM del aceite A4 mostró una mezcla de compuestos sin embargo al analizar el espectro de RMN de ^1H de A4 (Figura 3-23) se observaron señales que comprueban la estructura de tonalido como principal componente.

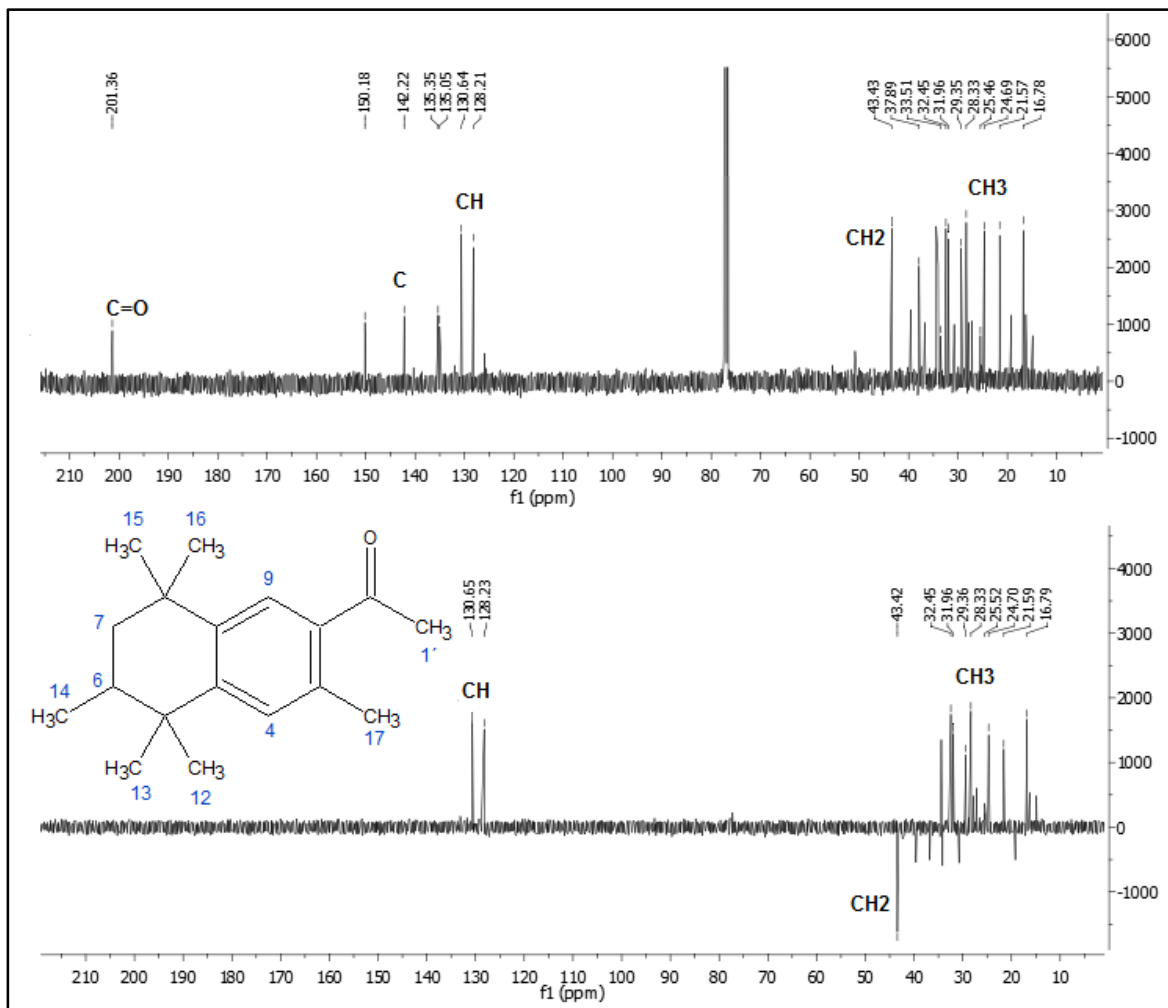
El espectro de RMN ^1H de A4 (Figura 3-23), mostró señales principales como: las señales en δ_{H} 7,66 y 7,20 ppm (1H, s, H-9 y H-4) que corresponden a hidrógenos metínicos de anillo aromático. Dos señales de hidrógenos metílicos en δ_{H} 2,57 y 2,50 (3H, s, H-1' y H-17) uno vecino a un grupo carbonilo y el otro perteneciente a un anillo aromático, señales de hidrógenos de grupos metilo en δ_{H} 1,33, 1,27 y 1,07 (3H, s, H-12, H-13, H-15, H-16) y en δ_{H} 1,01 (3H d, $J=8,0$ Hz, H-14). Estos datos de RMN ^1H se compararon con la literatura (Wood *et al.*, 1963).

Figura 3-23: Espectro RMN ^1H de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)



El espectro de RMN ^{13}C (Figura 3-24) presentó un total de 18 señales, la señal de un grupo carbonilo en δ_{C} 201,36 ppm, 7 señales de carbonos de grupos metilo, dos señales correspondientes al grupo metino de un anillo aromático δ_{C} 130,64 y 128,21 ppm (C-4 y C-9), una señal de carbono metilénico en δ_{C} 43,43 ppm (C-7) y 6 señales de carbonos cuaternarios de acuerdo al análisis del espectro DEPT 135 $^{\circ}$ (Figura 3-24).

Figura 3-24: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135 $^{\circ}\text{C}$ de la muestra A4 (100 MHz, CDCl_3)



Para confirmar la estructura del tonalido se realizó un experimento de correlación HMQC (Figura 3-25) permitiendo la asignación de las señales de hidrógeno a sus respectivos carbonos como se muestra en la Tabla 3-9. El espectro de HMBC (Figura 3-26) permitió la ubicación del grupo carbonilo en el anillo aromático con la correlación a 3 enlaces entre las señales en δ_{C} 201,36 y δ_{H} 7,66 ppm (H-9) y un grupo metilo con la correlación a

2 enlaces entre las señales en δ_C 135,05 y δ_H 2,50 ppm (H-17) además, de la ubicación de un cicloalcano sustituido por grupos metilos en el C-5, C-6 y C-8 que está unido al anillo aromático. Se deduce que el compuesto que se encuentra presente en mayor proporción en la muestra A4 corresponde a 1-(3,5,5,6,8,8-hexametil-6,7-dihidronaftalen-2-il)-etanona o tonalido. Este compuestos se detectó por CCD en varias fracciones que no fueron purificadas.

Figura 3-25: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)

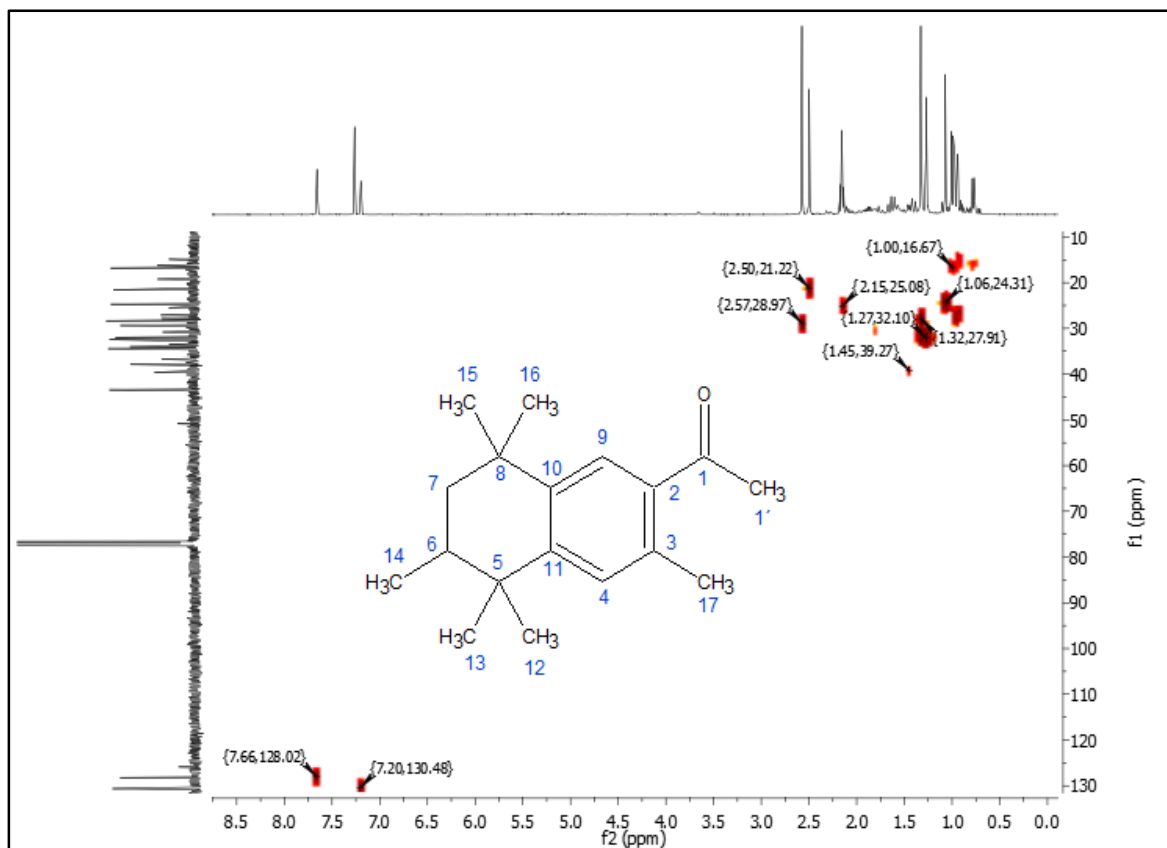
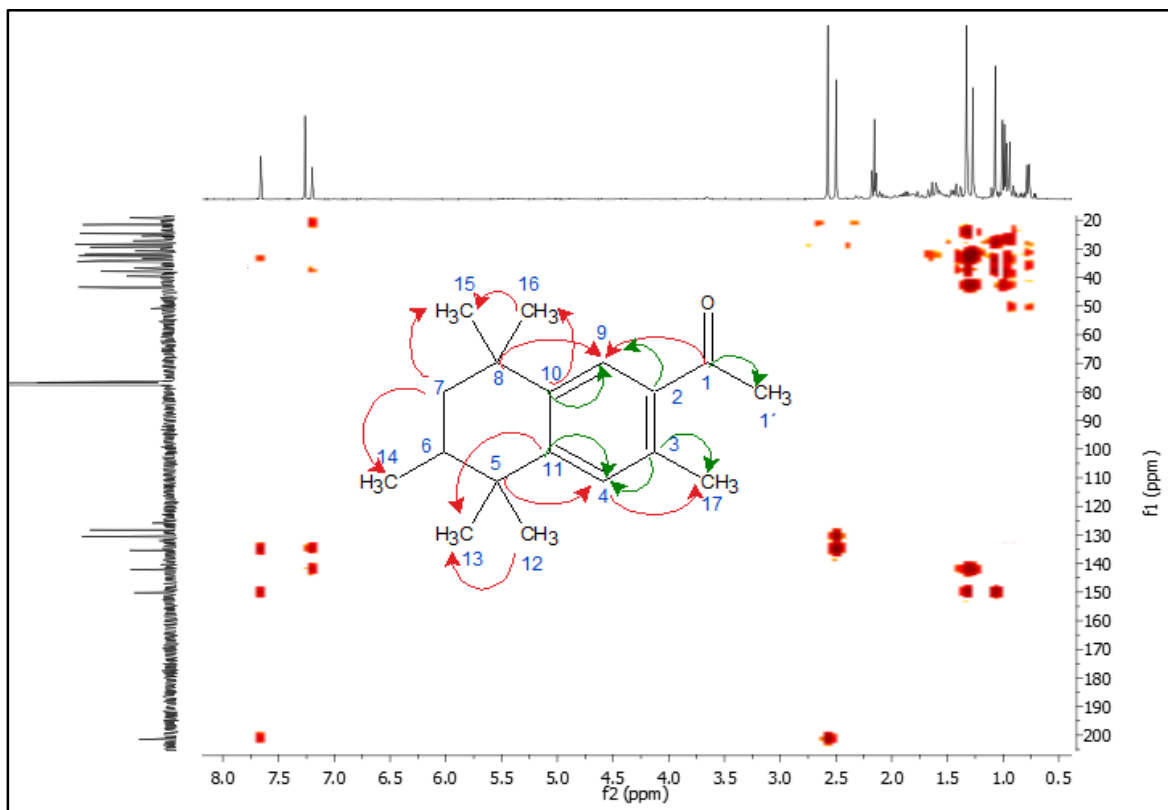


Figura 3-26: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la muestra A4 (400 MHz, CDCl_3)

Las flechas de color verde corresponden a interacciones entre carbonos e hidrógenos a dos enlaces y las flechas de color rojo a tres enlaces.

Tabla 3-9: Datos de RMN ^1H - ^{13}C - DEPT 135 $^\circ$ - HMQC y HMBC de A4 (400 MHz, CDCl_3)

Posición Carbono	DEPT 135 $^\circ$	HMQC		HMBC
		δ_c ppm	δ_H ppm, (J) Hz	
1	C	201,36	*	H-9, H-1'
1'	CH ₃	29,35	2,57 (3H, s)	*
2	C	135,35	*	H-9
3	C	135,05	*	H-4, H-17
4	CH	130,64	7,20 (1H, s)	H-17
5	C	37,89	*	H-15, H-4, H-16, H-15
6	CH	25,46	2,16 (1H, t $J= 8,0$ Hz)	*
7	CH ₂	43,43	1,42 (2H, d $J= 8,0$ Hz)	H-15, H-14,
8	C	33,51	*	H-9
9	CH	128,21	7,66 (1H, s)	*
10	C	150,18	*	H-9, H-16, H-15
11	C	142,22	*	H-4, H-13

(Continúa)

(Continuación)

12	CH ₃	32,45	*	H-13
13	CH ₃	31,96	1,27 (3H, s)	*
14	CH ₃	16,78	1,01 (3H, d J= 8,0 Hz)	*
15	CH ₃	24,69	1,07 (3H, s)	H-16
16	CH ₃	27,88	1,33 (3H, s)	H-15
17	CH ₃	21,57	2,50 (3H, s)	H-4

S: singlete, d: doblete. * no se presenta

El tonalido es un contaminante de agua y suelo que afecta a la agricultura esto se debe principalmente a su amplio uso doméstico como fragancia en una variedad de productos tales como cosméticos, detergentes, suavizantes de tejidos, productos de limpieza y otros productos para el hogar (Gómez M. *et al.*, 2012). De acuerdo a estudios realizados en los últimos años se detectó la presencia de este compuesto en leche materna humana (Zhang *et al.*, 2011), en tejido adiposo humano (Rimkus & Wolf, 1996) y sangre (Hutter *et al.*, 2005) por uso de productos de aseo personal con aromas. Se encontró este compuesto en lombrices de tierra en suelo contaminado por bioacumulación (Kinney *et al.*, 2007). Dosis altas de tonalido en ratas produce daño hepático agudo (Steinberg *et al.*, 1999; Api *et al.*, 2004). Además la *A. farnesiana* bioacumula metales pesados como el plomo y se utiliza para reforestar sitios contaminados con residuos mineros (Maldonado *et al.*, 2011).

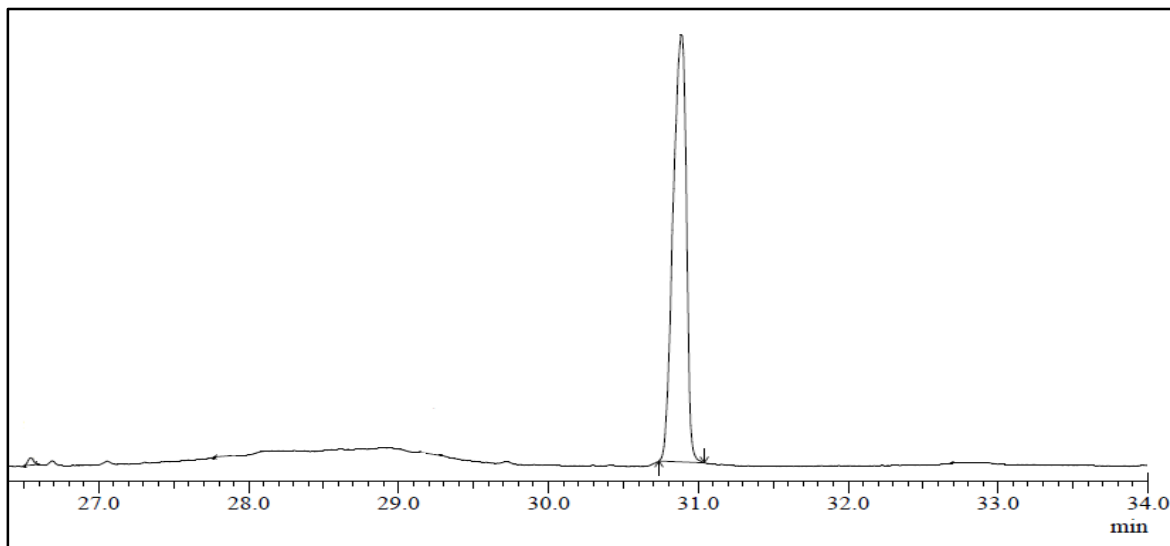
La presencia del tonalido en la planta puede deberse a que el suelo donde se recolectó el material vegetal pudo estar contaminado por este compuesto, la planta lo debió absorber y acumular en su corteza concentrándose en la época seca donde se evidenció su presencia siendo que es un gran contaminante para el suelo, el agua y el ser humano. Este aspecto es importante que sea aclarado con estudios posteriores y se pueda determinar de forma contundente si este compuesto es de origen natural o proviene de contaminación ambiental.

▪ **Análisis de las fracciones en CHCl₃/AcOEt (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca.**

De las fracciones en CHCl₃/AcOEt (1:1) obtenidas de la fracción en acetato de etilo en la época seca, la fracción 3 presentó un precipitado (Figura 2-8) de color blanco denominado **A5**, el cual peso 18 mg, con una baja solubilidad en solventes orgánicos por lo que fue necesario para su análisis la acetilación con un procedimiento igual al descrito para el sólido A1. El sólido A5 por CCD mostró un compuesto principal al ser revelado con el reactivo Godin; se analizó por CG-EM, RMN ¹H y ¹³C.

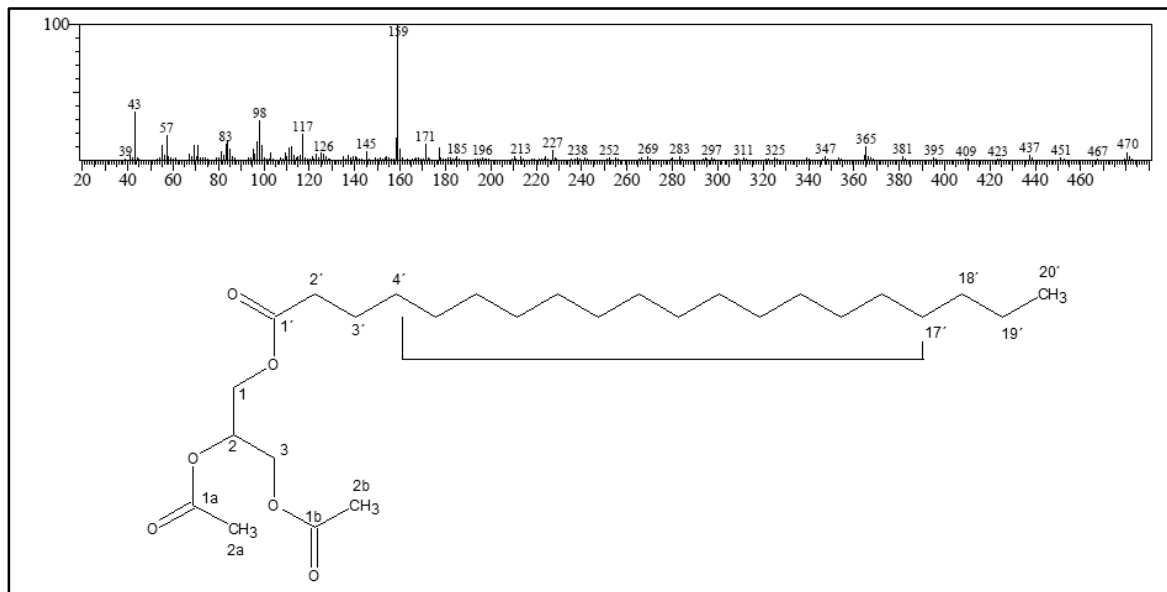
El análisis de la muestra A5 por CG-EM (shimadzu QP2010) permitió detectar la presencia de un pico en mayor proporción con un tiempo de retención de 30,9 min, 78 % de coincidencia comparado con la base de datos NIST 08. LIB[®] y que corresponde a 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo. La Figura 3-27 muestra el cromatograma del sólido A5 y la Figura 3-28 muestra el espectro de masas del compuesto presente en el sólido A5.

Figura 3-27: Cromatograma de la muestra A5 provenientes de la fracción en CHCl₃/AcOEt (1:1) obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.



Compuesto: 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo. Equipo shimadzu GC-EM QP2010, columna capilar HP-5 de 30 m, flujo constante de 1,2 mL/min. Temperatura de 50 °C (2 min) de 15 °C/min hasta 200 °C (2 min) de 10 °C/min hasta 300 °C (10min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos. Con 1 mg/mL de muestra).

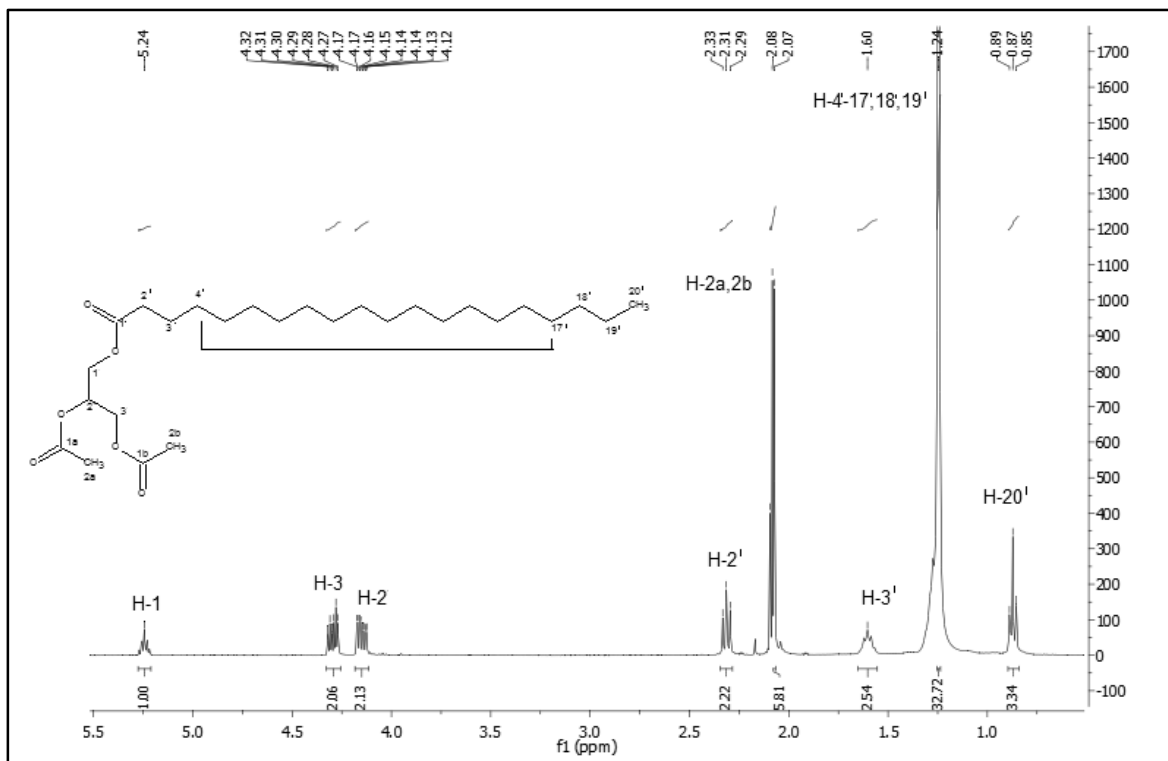
Figura 3-28: Espectros de masas del 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo presente en A5 proveniente de la fracción en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1) obtenida de la fracción en acetato de etilo de la época seca.



En la Figura 3-28 se muestra el espectro de masas que presenta una serie de señales cuyos valores más representativos son: m/z 470 [M^+], 159 (100%).

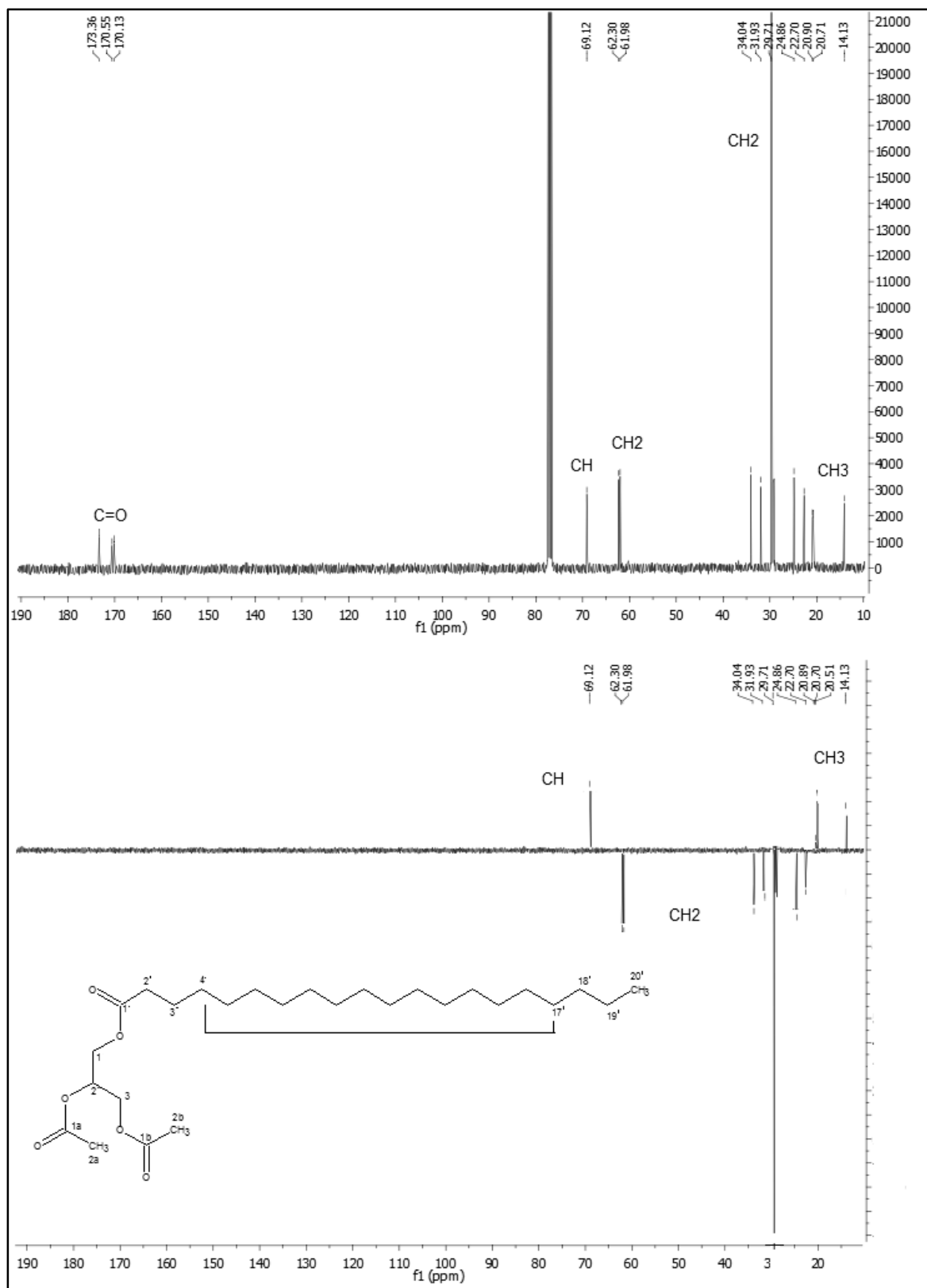
Para confirmar la estructura del principal componente de A5 se realizó un espectro de RMN ^1H y ^{13}C , además de experimentos como DEPT 135, HMBC y HMQC que confirman la estructura del 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo.

El espectro de RMN ^1H (Figura 3-29), mostró señales como: Señales de hidrogeno del grupo metilo en δ_{H} 2,08 y 207 ppm (3H, s, H-2a-2b) producto de la acetilación, una señal de hidrógeno metilénico en δ_{H} 1,24 (32H, s, H-4'-17', 18', 19'), la señal de hidrogeno del grupo metilo en δ_{H} 0,87 ppm (3H, t $J=8$ Hz, H-20').

Figura 3-29: Espectro RMN ^1H de A5 (400 MHz, CDCl_3)

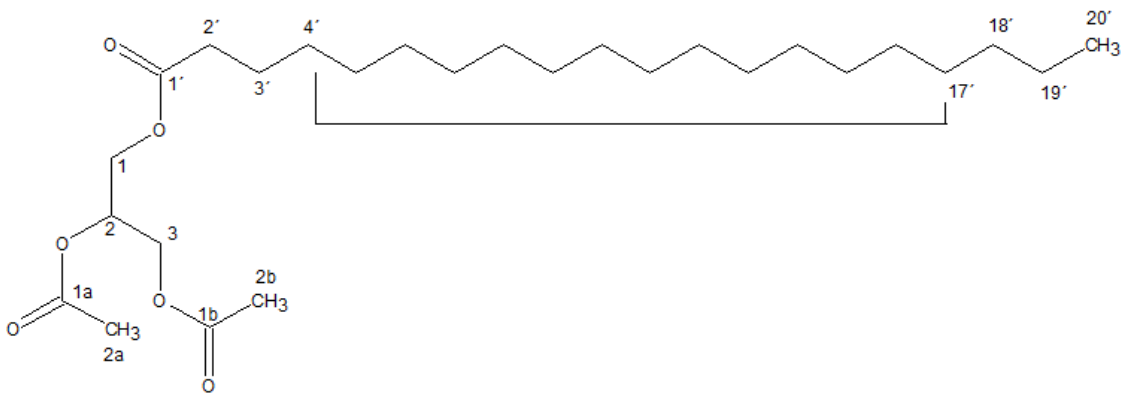
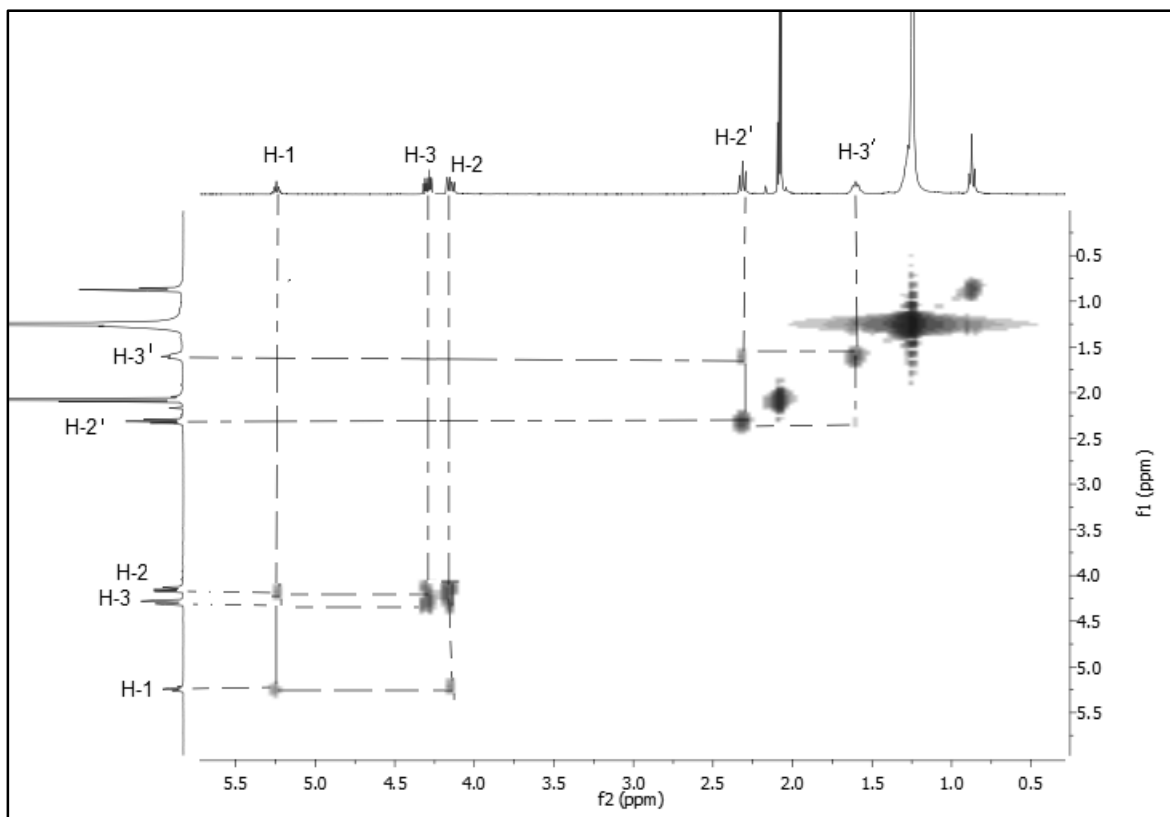
El espectro de RMN ^{13}C (Figura 3-30) presentó un total de 14 señales, tres señales de carbono carbonilo de grupos ceto en δ_c 173,36, 170,55 y 170,13. Tres señales de carbonos de grupos metilo, una señal de carbono metínico en δ_c 69,12, 7 señales correspondientes a carbonos metilénicos de acuerdo al espectro DEPT 135 $^\circ$ (Figura 3-35).

Figura 3-30: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135 $^\circ$ de A5 (100 MHz, CDCl_3)



Para confirmar la estructura 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo se realizó un experimento de correlación COSY (Figura 3-31), permite determinar los acoplamientos escalares entre los protones que están correlacionando entre sí, el protón de δ_H 5,25 ppm (1H, m) se encuentra correlacionando con las señales en δ_H 4,28 (2H, dd $J= 8$ Hz) y δ_H 4,33 (2H, t $J= 4$ Hz).

Figura 3-31: Espectro RMN COSY de A5 (400 MHz, $CDCl_3$)



Además, el espectro de HMQC (Figura 3-32) posibilitó la asignación de las señales de hidrógeno a sus respectivos carbonos, como se muestra en la Tabla 3-10. De esta manera se concluyó que el compuesto que se encuentra presente en el sólido A5 corresponde al 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo.

Figura 3-32: Espectro RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de A5 (400 MHz, CDCl_3)

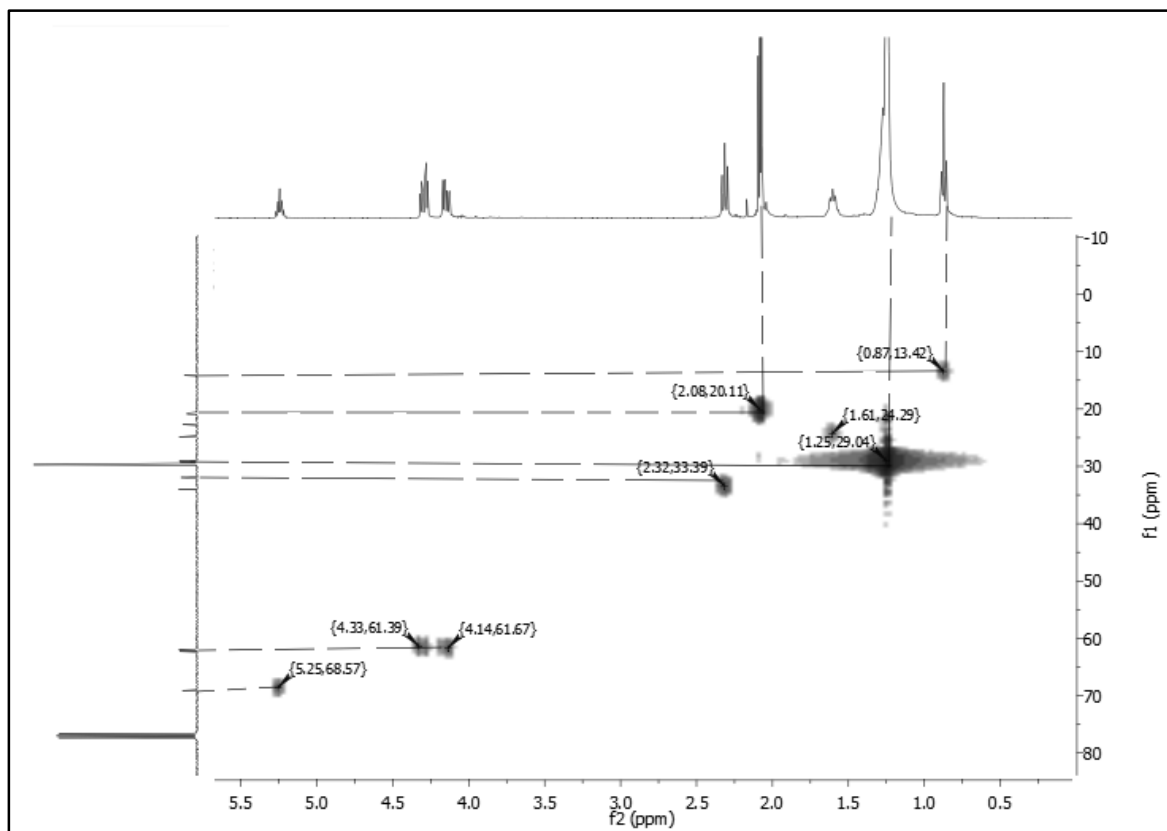


Tabla 3-10: Datos de RMN ^1H - ^{13}C - DEP 135 $^\circ$ - HMQC y HMBC del sólido A5 (400 MHz, CDCl_3)

Posición Carbono	DEPT 135 $^\circ$	HMQC		COSY
		δ_c ppm	δ_H ppm, (J) Hz	
1	CH ₂	69,12	5,25 (1H, m)	H-2
2	CH	61,98	4,28 (2H, dd $J= 8$ Hz)	H-1, H-3
3	CH ₂	62,30	4,33 (2H, t $J= 4$ Hz)	H-2
1'	C	173,36	*	*

(Continúa)

(Continuación)

2'	CH ₂	34,04	2,31 (2H, t $J=8$ Hz)	H-3'
3'	CH ₂	24,86	1,60 (2H, m)	H-2'
4'	CH ₂	29,71	1,24 (2H, s)	H-4'
5'-18'	CH ₂	31,93	1,24 (2H, s)	H-5'-18'
19'	CH ₂	22,70	1,24 (2H, s)	H-19'
20'	CH ₃	14,13	0,87 (3H, t $J=8$ Hz)	H-20'
1a	C	170,55	*	*
1b	C	170,13	*	*
2a	CH ₃	20,90	2,08 (3H, s)	H-2a
2b	CH ₃	20,71	2,08 (3H, s)	H-2b

S: singlete, d: doblete, t: triplete, dd: doble de dobles, m: multiplete

* no se presenta

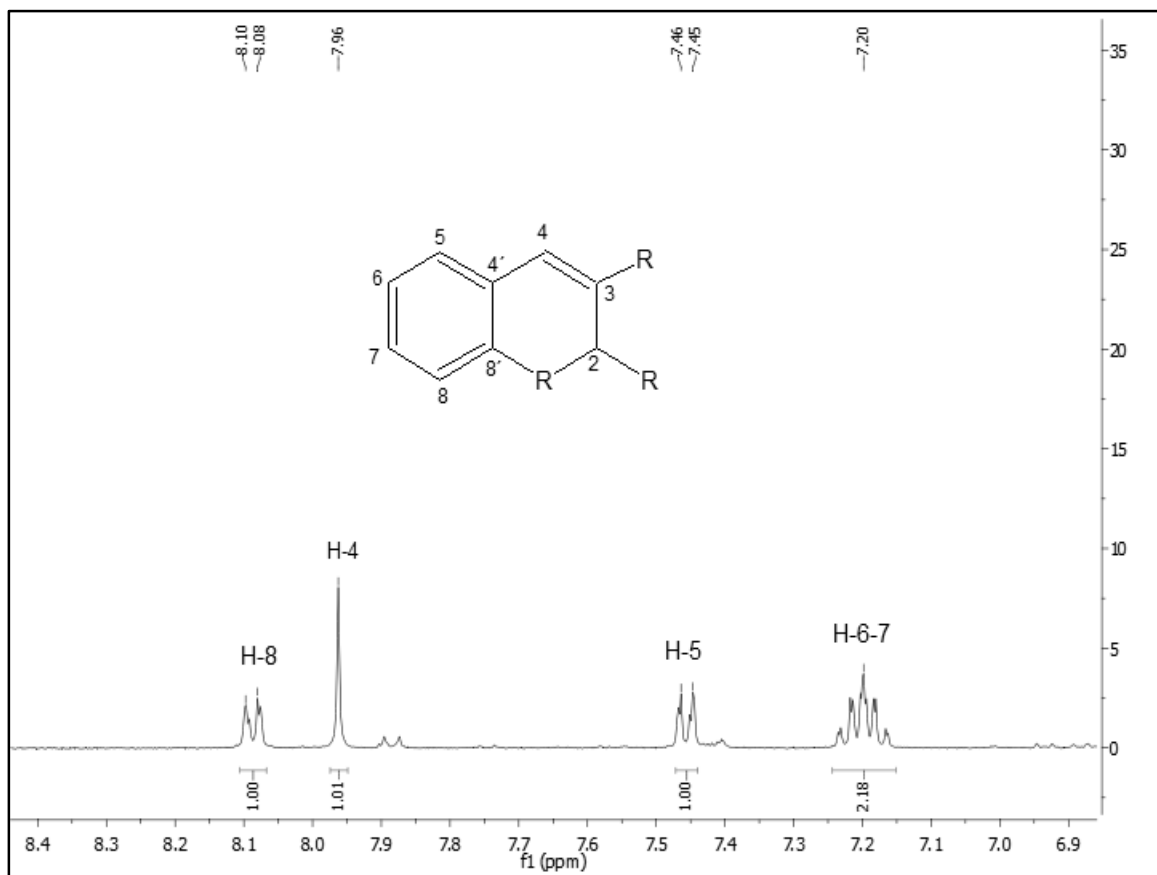
▪ **Análisis de las fracciones en AcOEt obtenidas de la fracción en acetato de etilo proveniente de época de lluvia.**

De las fracciones obtenidas en acetato época de lluvia, la fracción L-1-6-7-5 (ver numeral 2.4.2, Figura 2-9) presenta un sólido denominado **A6** soluble en metanol, que pesó 7 mg y su porcentaje de rendimiento es del 0,04 % frente a la fracción en acetato de etilo de la época de lluvia, (Figura 2-9), se evaluó por medio de CCD eluyendo con una mezcla de CHCl₃-MeOH (9:1) que revelada con el reactivo de Godin y NP-PEG se observa una sustancia mayoritaria de color naranja, esta muestra fue analizada por RMN ¹H y ¹³C.

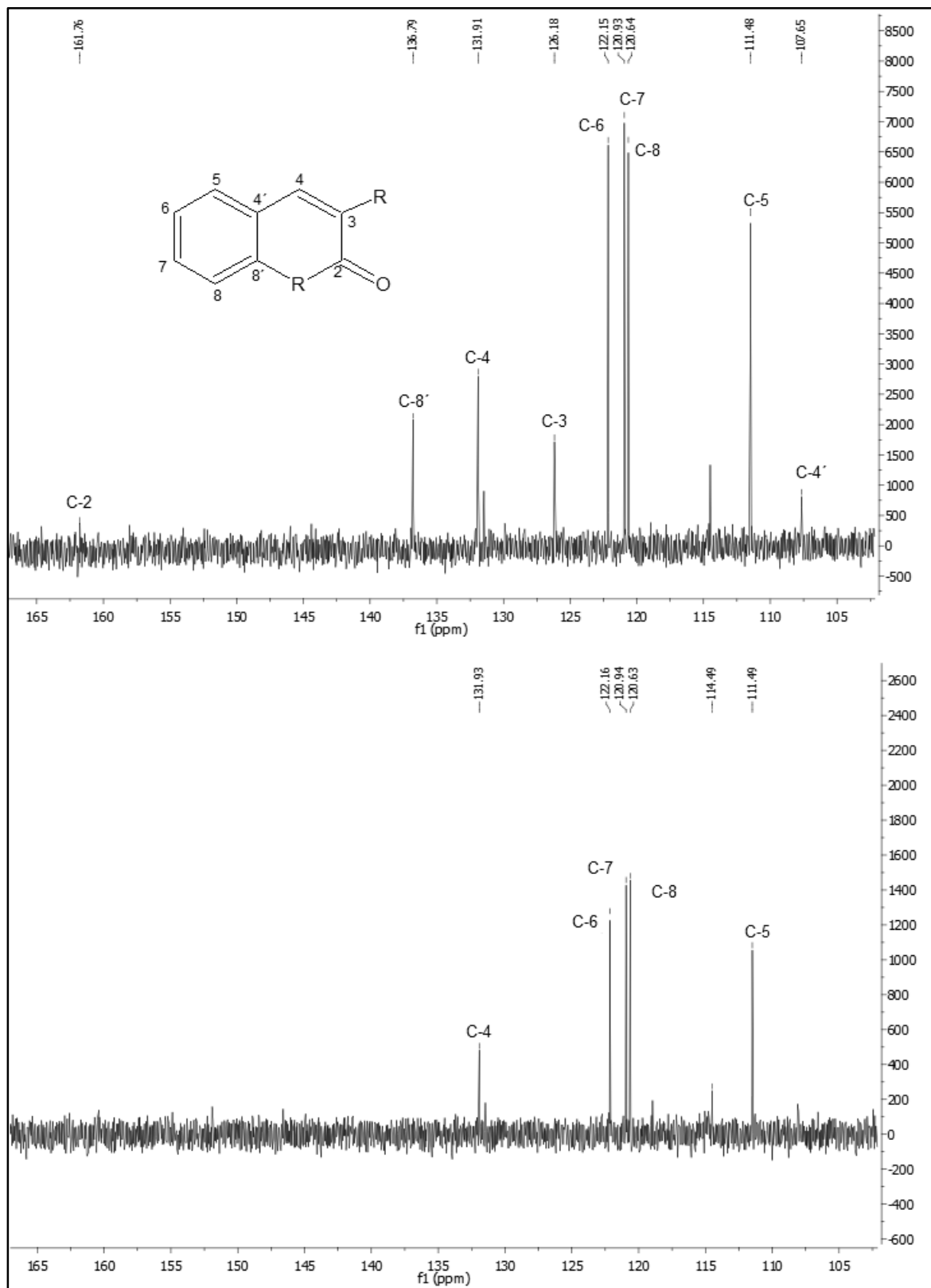
Al analizar los espectros de RMN ¹H (Figura 3-33), RMN ¹³C y DEPT 135° (Figura 3-34), HMQC (Figura 3-36) y HMBC (Figura 3-37) de la muestra A6 se propuso la estructura que se relaciona con los datos obtenidos en estos experimentos espectroscópicos que se muestran en la Tabla 3-11.

El espectro de RMN ¹H de A6 (Figura 3-33), se observan cuatro señales en la región aromática. Se presentan dos dobletes que integra para un protón en δ_H 8,10 ppm (1H, d $J=8$ Hz, H-8), δ_H 7,46 ppm (1H, d $J=4$ Hz, H-5), los cuales acoplan con δ_H 7,20 ppm (1H, m H-6, H-7) que integra para dos protones. Un singlete en δ_H 7,96 ppm (1H, s, H-4). Estos protones corresponden a hidrógenos metínicos.

Figura 3-33: Espectro RMN ^1H de A6 (400 MHz, MeOD)

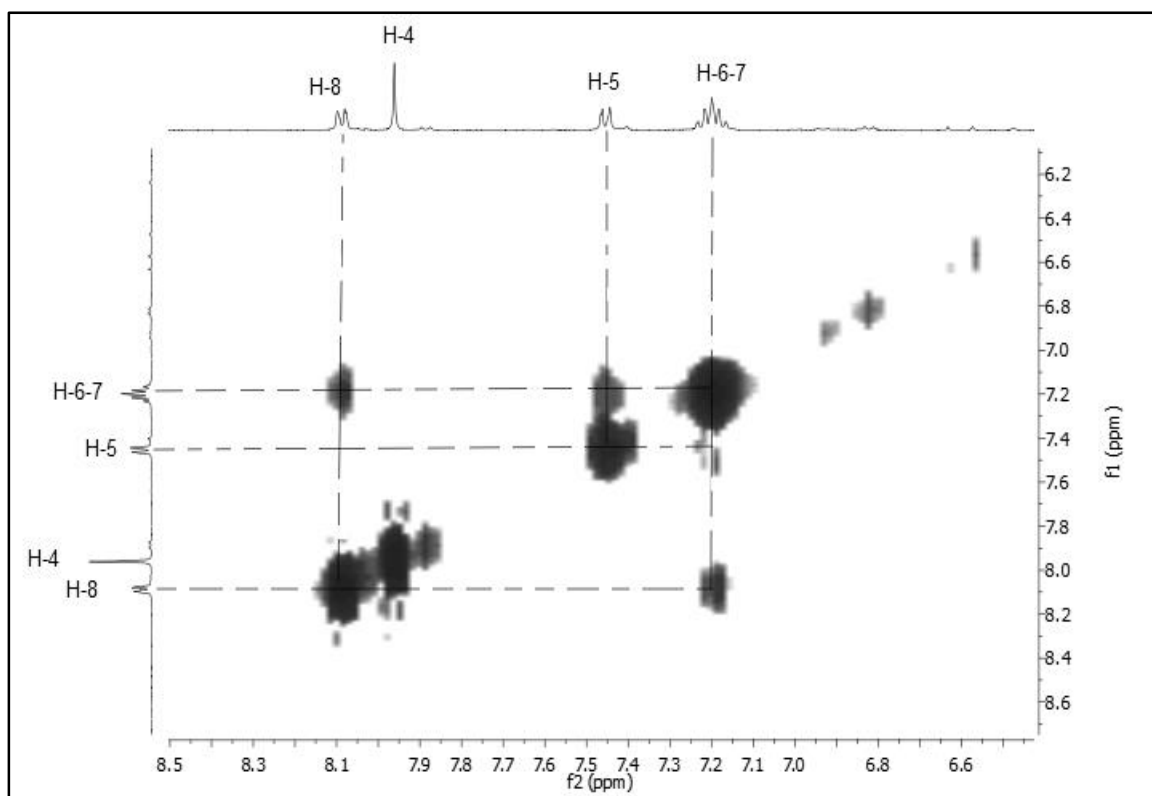


El espectro de RMN ^{13}C (Figura 3-34) presentó un total de 9 señales. En el espectro DEPT 135 (Figura 3-34) permitió comparar las señales y determinar la presencia de tres carbonos cuaternarios y un carbono carboxilo de grupo amida en δ_c 161,76 ppm, 5 carbonos de grupos metino δ_c 131,91, 111,48, 122,15, 120,93 y 120,63 ppm correspondientes a los carbonos C-4, C-5, C-6, C-7 y C8, respectivamente.

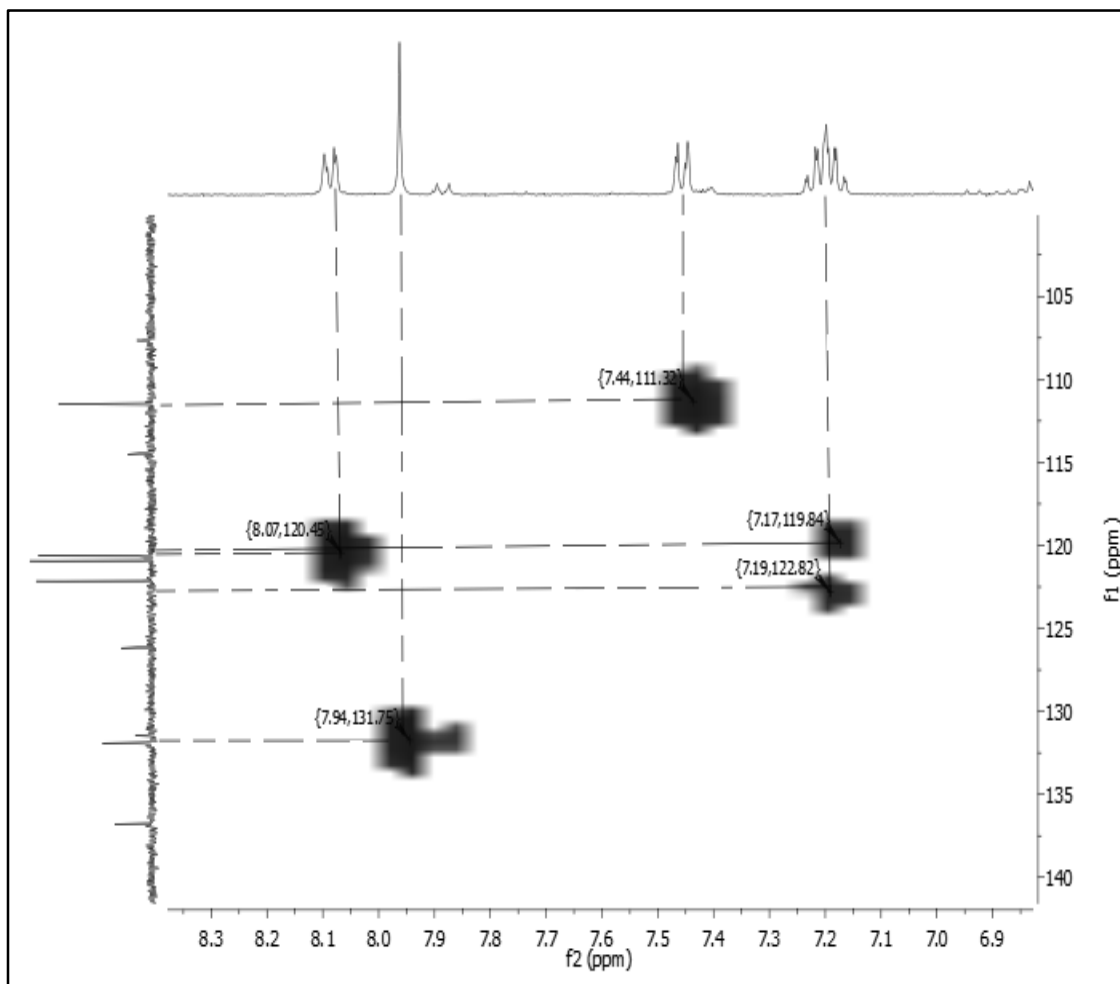
Figura 3-34: Espectro RMN ^{13}C y DEPT 135° de A6 (100 MHz, MeOD)

El espectro COSY (Figura 3-35), permite determinar los acoplamientos escalares entre los protones que están correlacionando entre sí, el multiplete de δ_H 7,20 ppm (1H, m H-6, H-7) se encuentra correlacionando con las señales en δ_H 8,10 ppm (1H, d $J=8$ Hz, H-8) y δ_H 7,46 ppm (1H, d $J=4$ Hz, H-5).

Figura 3-35: Espectro COSY de A6 (400 MHz, MeOD)

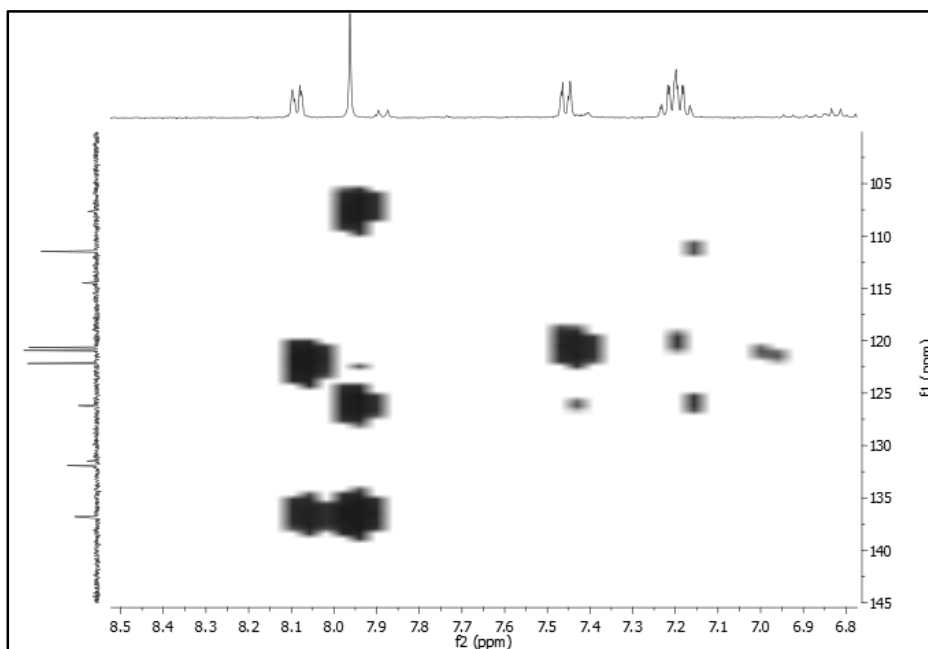


La conectividad de cada hidrogeno con el carbono al cual está unido, se realizó mediante el análisis del espectro HMQC (Figura 3-36, Tabla 3-11).

Figura 3-36: Espectro HMQC de A6 (400 MHz, MeOD)

El experimento HMBC permitió asignar la ubicación del sustituyente R en el carbono C-3. Se encuentran la correlación a tres enlaces del protón en δ_H 7.96 ubicado en la posición C-4, con el carbono cuaternario δ_C 107.65 el cual se ubicó en la posición C-4', este protón también mostró correlación con los carbonos cuaternarios δ_C 126,18 y 136,79 que corresponden a C-3 y C-8', respectivamente. Las demás señales de correlación a dos y tres enlaces se observan en la Tabla 3-11.

Figura 3-37: Espectro HMBC de A6 (400 MHz, MeOD)



Con los espectros COSY (Figura 3-35), HMQC (Figura 3-36) y HMBC (Figura 3-37) permitiendo la asignación de las señales a nuestra molécula propuesta, datos que se pueden evidenciar en la Tabla 3-11.

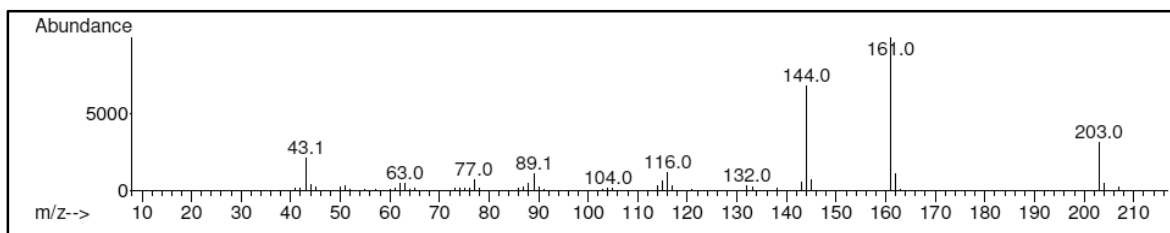
Tabla 3-11: Datos de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135° , HMQC y HMBC de A6 (400 MHz, MeOD).

Carbono	DEPT 135°	HMQC		HMBC	COSY
		δ_c ppm	δ_H ppm, (J) Hz		
2	C=O	161,71	*	*	*
3	C	126,18	*	H-4	*
4	CH	131,91	7,96 (1H, s)	H-3, H-4', H-8'	*
4'	C	107,65	*	H-4	*
5	CH	111,48	7,46 (1H, d $J=4$ Hz)	H-7	H-6, H-7
6	CH	122,15	7,20 (1H, m)	H-8	H-5, H-8
7	CH	120,93	7,20 (1H, m)	H-8	H-5, H-8
8	CH	120,63	8,10 (1H, d $J=8$ Hz)	H-6, H-8'	H-6, H-7
8'	C	136,79	*	H-4, H-8	*

S: singlete, d: doblete, m: multiplete. * no se presenta.

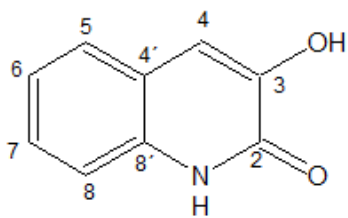
Se realizó una acetilación a la muestra y posterior análisis por RMN ^1H y RMN ^{13}C , donde se evidenció una acetilación correspondiente a un posible grupo hidroxilo en el carbono C-3. Además se realizó a esta muestra acetilada un espectro de CG-EM (Figura 3-38) mostrando una masa impar sugiriendo que el compuesto contiene nitrógeno. En la Figura 3-39 se proponen dos estructuras para la muestra A6. Aunque faltan evidencias para determinar la estructura por medio de varias técnicas como NOESY, masas de alta resolución

Figura 3-38: Espectro de masas de la muestra A6.

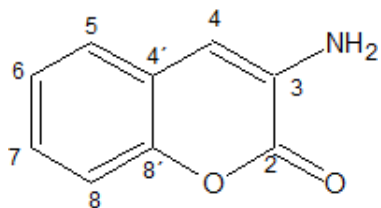


Equipo Agilent Technologies 5975C VL MSD, columna HP-5, 30 m, flujo de 1 mL/min, temperatura de inyector de 250 °C, rampa de temperatura de 75 °C/2 min y 5 °C/min hasta 275 °C, tiempo de corrida de 28 min. Con 2 mg/mL de muestra.

Figura 3-39: Estructuras propuestas para la muestra A6.



3-hidroxiquinolin-2(1H)-ona



3-amino-2H-cromen-2-one

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se contribuyó al conocimiento del estudio fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de la especie vegetal *Acacia farnesiana* colectada en Armero-Guayabal, Departamento del Tolima (Colombia), detectando algunos metabolitos aislados, purificados e identificados por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Se detectaron diferencias significativas en la composición química de los extractos y las fracciones obtenidos de la corteza de *Acacia farnesiana* colectada en dos épocas del año, datos que se pueden utilizar para posteriores estudios de actividad biológica y de control de calidad.

Se realizaron perfiles cromatográficos por CLAE y CG-EM que son importantes para la caracterización de los extractos y/o fracciones obtenidas.

Con los métodos realizados para la caracterización de los metabolitos estudiados, se observaron diferencias en la proporción y grupos de metabolitos en las dos épocas del año, los compuestos de tipo esteoridal, terpénicos y compuestos azufrados se presentan en mayor proporción en material colectado en la época de lluvia, en tanto los taninos son más evidentes en el material colectado en la época seca.

Se detectó estigmasterol, sitosterol, germanicol, lupeol y 3 β -O-D-glicopinosil- β -sitosterol, además de lentionina un compuesto azufrado mayoritario presente en la fracción de acetato de etilo proveniente de la época de lluvia estudiada por CG-EM.

El aislamiento de compuestos a partir de la fracción en acetato de etilo proveniente de la época seca, condujo a la identificación de 2,3-bis-(acetiloxi)-eicosanoato de propilo y tonalido.

4.2 Recomendaciones

Evaluar la actividad antimalárica de las fracciones y compuestos obtenidos.

Realizar un aislamiento bioguiado relacionado con la actividad antimalárica de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Acacia farnesiana*.

Estudiar las fracciones que contienen compuestos azufrados, realizar su aislamiento e identificación y evaluar su actividad biológica.

Desarrollar ensayos para determinar si los compuestos azufrados provienen de la planta o de hongos presentes en la corteza de la especie vegetal *Acacia farnesiana*.

Estudiar los posibles orígenes de la presencia de tonalido en esta especie vegetal y su posible uso como indicador de contaminación química en el medio ambiente.

De acuerdo a los resultados se podría plantear el desarrollo de cultivos tecnificados que permitan obtener extractos concentrados de los metabolitos con actividad antimalárica

Complementar los estudios de aislamiento y purificación de las fracciones polares (butanólicas y acuosas), datos que serán importantes para entender el comportamiento biológico de esta especie vegetal.

5. Bibliografía

Ali M., Saleem M., Ahmad W., Parvez M., & Yamdagni R. (2002) A chlorinated monoterpene ketone, acylated b-sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 59, 889-895

Ali-Shtayeh M. S., Yaniv Z. & Mahajna J. (2000). Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 221–232.

Acacia farnesiana (L.) Willd. (1806). *Species Plantarum*, 4, 1083-1084.

Barakat, H., Souleman, A., Hussein, S., Ibrahiem, O., & Nawwar, M. (1999). Flavonoid galloyl glucosides from the pods of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 51, 139 – 142.

Block E. & Deorazio R. (1994). Chemistry in a salad bowl: Comparative organosulfur chemistry of garlic, onion and shiitake mushrooms. *Pure & Appl. Chem.* 66, 2205-2206.

Bourdy G., DeWalt S.J., Chávez de Michel L.R., Roca A., Deharo E., Muñoz V., Balderrama L., Quenevo C. & Gimenez A. (2000). Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 87–109

Castillo L. S., Heredia N., Contreras F. J., & García S. (2011). Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*, 76, M421-M426.

Cruz-Vega D.E., Aguilar A., Castro-Garza J. & González-Garza M.T. (2000). Antiamebic Activity of Aqueous Extracts from Five Medicinal Plants from Northeastern Mexico. *Archives of Medical Research*, 31, S17–S18

Devi, R., & Prasad, M.N.V. (1991). Tannins and related polyphenols from ten common *Acacia* species of India. *Bioresource Technology*, 31, 189-192.

Dey A. & Nath De J. (2012). Ethnobotanical survey of Purulia district, West Bengal, India for medicinal plants used against gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 68–80.

El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A. & Dupont F. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 315–334.

El Sissi, H.I., El Ansari M. A. El Negoumy S. I. (1973). Phenolics of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 12, 2303.

El Sissi, H.I., Saleh, N.A.M., El Nnegoumy, S.I., Wagner, H., Iyengar, A., & Seligmann, O. (1974). Prunin-0-6"-gallat aus *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 13, 2843-2844.

Evans W.C. (1991). *Farmacognosia*. Madrid: Mc.GrawHill / Interamerica.

Garavito, G., Rincón, J., Arteaga, L., Hata, Y., Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzón, R., & Deharo, E. (2006). Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 460–462.

García – Barriga H. (1992). *Flora Medicinal Colombiana.*, vol. 3. Tercer Mundo Editores, Bogotá.

García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C., & Heredia, N. (2006). Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholera*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22, 660-674.

Gmelin, R., Kjaer, A., & Larsen, O. (1962). N-acetyl -djenkolic acid, a novel amino acid isolated from *Acacia farnesiana* willd. *Phytochemistry*, 1, 233-236.

Gómez M. J., Herrera S., Solé D., García E., & Fernández A. (2012) Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. *Science of the Total Environment*. 420, 134-145.

Hatvani N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17, 71–74.

Hernández R. M., Saucedo S. A., Cuéllar C. A, Álvarez R. B. & Moya L. D. (2009). 129 Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*. *CENIC Ciencias Biológicas*, 40 (2), 129 – 134.

Hutter H. P, Wallner P., Moshammer H., Hartl W., Sattelberger R., Lorbeer G. & Kundi M. (2005). Blood concentrations of polycyclic musks in healthy young adults. *Chemosphere*. 59, 487–492.

Jamal A., Yaacob W. & Din B. (2008). A Chemical Study on *Phyllanthus reticulatus*. *Journal of Physical Science*, 19(2), 45–50

Kinney C., Furlong E., Kolpin D., Burkhardt M., Zaugg S., Werner S., Bossio J. & Bennotti M. (2008). Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. *Environmental Science & Technology*. 42 (6), 1863-1870.

Klayman, D.L., (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228, 1049–1055.

Koch, A., Tamez, P., Pezzuto, J., & Soejarto, D. (2005). Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 95–99.

Kojima H., Sato N., Hatano A., Ogura H. (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29 (7), 2351-2355.

Koul S., Razdana T.K, Andotra C.S., Kalla A.K., Koul S., Taneja S.C., & DharK.L. (2000). Koelpinin-A, B and C ð three triterpenoids from *Koelipinia linearis*. *Phytochemistry*. 53, 305-309.

Kshirsagar R.D. & Singh N.P. (2001). Some less known ethnomedicinal uses from Mysore and Coorg districts, Karnataka state, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 231–238.

Lagharía A. H., Memona S., Nelofar A., Khan K. M. (2011). Alhagi maurorum: A convenient source of lupeol. *Industrial Crops and Products* 34, 1141– 1145

Lin, AS., Lin, CR., Du, YC., Lübken, T., Chiang, MY., Chen, IH., Wu, CC., Hwang, TL., Chen, SL., Yen, MH., Chang, FR., & Wu, YC. (2009). Acasiane A and B and farnesirane A and B, diterpene derivatives from the roots of *Acacia farnesiana*. *Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. Planta Med*, 75, 256-261.

Little, E., Wadsworth, F., & Marrero, J. (2001). *Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes*. San Juan: Editorial de la universidad de Puerto Rico. (pp 145 – 147).

López, C., Saravia, C., Gomez, A., Hoebeke, J., & Patarroyo, M. (2010). Mechanisms of genetically based resistance to malaria. *Gene*, 467, 1-12.

Maldonado, A., Favela, E., Rivera, F. & Volke T. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil*, 339, 377-389.

Mazelis, M., (1975). The cleavage of the ether linkage of o-methyl serine by the alkyl cysteine lyase of *Acacia farnesiana*. *Febs letters*, 54 (2), 193-195

Mazelis, M., & Creveling, R. (1975). Purification and Properties of S-Alkyl-L-cysteine Lyase from Seedlings of *Acacia farnesiana* Willd. *Journal of Biochemistry*, 147, 485-491.

Meckes M., David-Rivera A.D., Nava-Aguilar V. & Jimenez A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 11, 446-451.

Mita, T., Tanabe, K., & Kita, K. (2009). Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitology International*, 58, 201-209.

Mobile Reference. (2008). The illustrated encyclopedia of trees and shrubs of the world. Extraído el 25 octubre, 2013, de books.google.com.co.

Mohammad S. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters* 285, 109-115.

Moreno-Salazar S.F., Robles-Zepeda R.E., Johnson D.E. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, 79, 132-141

Mutai, C., Rukunga, G., Vagias, C., & Roussis, V. (2008). In vivo screening of antimalarial activity of *Acacia mellifera* (Benth) (Leguminosae) on *Plasmodium Berghei* in mice. Afr. J. Traditional. *Complementary and Alternative Medicines*, 5, 46 - 50.

Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., & Njagi, E.N.M. (2007). Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast, *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 377–386.

Muthaura, C.N., Keriko, J.M., Derese, S., Yenesew, A., & Rukunga, G.M. (2011). Investigation of some medicinal plants traditionally used for treatment of malaria in Kenya as potential sources of antimalarial drugs. *Experimental Parasitology*, 127, 609–626.

Nguta, J.M., Mbaria, J.M., Gakuya, D.W., Gathumbi, P.K., & Kiama, S.G. (2010). Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the South Coast community, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 256–267.

Parrotta, J. A. (1992). *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Aroma, huisache. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 6 p. Extraído el 25 octubre, 2011, de www.fs.fed.us/global/iitf/Acaciafarnesiana.pdf.

Price M. & Butler L. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal Agricultural Experiment Station Technical*, 25, 1268 – 1273.

Price M., Vanscoyoc S., Butler L. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1214-1218.

Pillay P., Maharaj V.J., & Smith, P.J. (2008). Investigating South African plants as a source of new antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 438–454.

Preetha S.P., Kanniappan M., Selvakumar E., Nagaraj M., Varalakshmi P. (2006). Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143, 333–339

Prozesky, E.A., Meyer, J.J.M., & Louw, A.I. (2001). In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 239–245.

Ram A., Balachandar S., Vijayananth P. & Singh V. P. (2011). Medicinal plants useful for treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current status and future perspectives. *Fitoterapia*, 82, 141–151.

Rao J. R., Millar B. C. & Moore J. E. (2009). Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). Letter to the Editor. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 591–592.

Rimkus G. & Wolf M. (1996). Polycyclic musk fragrances in human adipose tissue and human milk. *Chemosphere*. 33, 10, 2033—2043.

Rincon J. (1997). *Constituintes químicos de ouratea semiserrata e transformacoes químicas da neolignana aureina*. Tesis de doctorado. Universidad federal rural de rio de janeiro.

Sahu, N., Achari, B., & Banerjee, S. (1998). 7,3`dihydroxy 4` methoxy flavones from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 49, 1425 – 1426.

Sahu, N., Koike, K., Banerjee, S., Achari, B., Jia, Z., & Nikaido, T. (1997). A Novel Diterpene Glycoside from the Seeds of *Acacia farnesiana*. *Tetrahedron Letters*, 38, 8405 – 8408.

Salama A. & Calle J. (2005). Manual de laboratorio farmacognosia y fitoquímica. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia.

Sánchez, E., Heredia, N., Camacho, R. & García, S. (2013). Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1307-1316.

Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León, 76, 6888-6894.

Saikia A. P., Ryakala V. K., Sharma P., Goswami P. & Bora U. (2006). Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 149–157

Santi-Gadelha T., Rocha B.A.M., Gadelha C.A.A., Silva H.C., Castellon R.E.R., Gonçalves F.J.T., Toyama D.O., Toyama M.H., Souza A.J.F., Beriam L.O.S., Martins J.L., Joazeiro P.P. & Cavada B.S. (2012). Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 15–22.

Secor, J.B., Conn, E.E., Dunn, J.E., & Seigler, D.S. (1976). Detection and identification of cyanogenic glucosides in six species of *Acacia*. *Phytochemistry*, 15, 1703-1706.

Seigler, D.S. (2003). Phytochemistry of *Acacia*—sensu lat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 845–873.

Seigler, D.S., Conn, E.E., Dunn, J.E., & Janzen, D.H. (1979). Cyanogenesis in *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 18, 1389-1390.

Shimada, S., Komamura, K., Kumagai, H., & Sakurai, H. (2004). Inhibitory activity of shiitake flavor against platelet aggregation. *BioFactors*. 22(1–4), 177–179.

Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. 7a ed. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Steinberg P., Fischer T., Arand M., Park E., Elmadfa I., Rimkus G., Brunn H. & Dienes H. (1999). Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN). *Toxicology Letters*. 111, 151–160.

Tyler V., Brady L. & Robbers J. (1988). *Pharmacognosy*. Philadelphia: Editorial Lea & Febiger. 516 p.

USP, 36. (2013). Farmacopea de los Estados Unidos de América, formulario nacional. Volumen 1.

Valares C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Tesis de doctorado, Badajoz, Universidad de Extremadura.

Varatharajan S., Sekar A. K., Palaninathan V. (2006). Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic–oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences*. 78, 1329 – 1335.

Wagner H. & Blatt S. (2001). *Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas*. New York: Editorial springer.

Wambugu, S. N., Mathiu, P. M., Gakuya, D. W., Kanui, T I., Kabasa, J.D., & Kiama, S.G. (2011). Medicinal plants used in the management of chronic joint pains in Machakos and Makueni counties, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 945– 955.

Wang Z., LI J., Tang X., & Li G. (2011). Triterpenes and Steroids from Semi-mangrove Plant *Hibiscus tiliaceus*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(3), 0190–0192.

Wells. T. (2011). Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1):S3.

Wood T. F., Easter W. M., Arpenter M. S. & Angiolini J. (1963). Polycyclic Musks. I. Acyl- and Dinitropolyalkyltetralin Derivatives. *Journal of Organic Chemistry*. 28, 2248-2255.

Yavari I., Jabbari A., Moradi S. (2003). An ab initio study of conformational properties of lenthionine. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. 63, 225–229.

Zhang X., Liang G., Zeng X., Zhou J., Sheng G. & Fu J. (2011). Levels of synthetic musk fragrances in human milk from three cities in the Yangtze River Delta in Eastern China. *Journal of Environmental Sciences*, 23 (6), 983–990.