

56  
201



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO PRELIMINAR DE Helianthella quinquenervis



# T E S I S

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
LEDA CRISEIDA GOMEZ LEON

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAG
LISTA DE ESQUEMAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE ESPECTROS	IV
LISTA DE GRAFICAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1.INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes del género <i>Helianthella</i> .	1
1.2 Antecedentes de la <i>Helianthella quinquenervis</i> .	2
1.3 Generalidades del ácido angélico.	2
1.3.1 Estructura y distribución en la naturaleza.	2
1.3.2 Biosíntesis.	4
1.3.3 Propiedades físicas.	4
1.3.4 Determinación estructural.	6
1.3.5 Actividad biológica.	6
2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.	7
3. PARTE EXPERIMENTAL.	9
3.1 Materiales y métodos.	9
3.1.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.	9
3.1.1.1 Preparación de las muestras	9
3.1.1.2 Bioensayo	9
3.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana	10
3.1.2.1 Microorganismos de prueba	10
3.1.2.2 Preparación de las muestras a evaluar y de los controles positivos	10

3.1.2.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba	11
3.1.2.4 Preparación de los medios para siembra del microorganismo	11
3.1.2.5 Siembra de los microorganismos	11
3.1.2.6 Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los microorganismos de prueba.	12
3.1.2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana	12
3.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica	12
3.1.4 Determinación de la actividad alelopática del ácido angélico	13
3.1.5 Material Vegetal	13
3.1.6 Métodos de extracción y fraccionamiento	13
3.1.7. Aislamiento y purificación del compuesto	17
3.1.7.1 Obtención del ácido angélico	17
3.1.7.2 Obtención del metil derivado del ácido angélico	17
3.1.8 Caracterización del compuesto aislado	17
3.1.8.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>19</b>
4.1 Identificación del compuesto aislado	19
4.2 Ensayos biológicos preliminares	31
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>36</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

	PAG.
Esquema 1 Preparación del extracto metanólico de la corteza de <i>Helianthella quinquenervis</i> .	14

**LISTA DE FIGURAS**

		<b>PAG</b>
<b>Figura 1</b>	<b>Estructura del ácido angélico</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Biosíntesis del ácido angélico en <i>Cynoglossum officinale</i></b>	<b>5</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Estructuras propuestas para el compuesto aislado derivadas del análisis espectroscópico</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Fragmentos característicos del ácido angélico</b>	<b>30</b>

## LISTA DE CUADROS.

	PAG
Cuadro 1. Microorganismos de prueba empleados para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.	10
Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto metanólico de <i>Helianthella quinquenervis</i>	15
Cuadro 3. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	16
Cuadro 4. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido angélico.	20
Cuadro 5. Comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del producto natural con los ácidos tíglico y angélico (Nathan, 1984)	29
Cuadro 6. Actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>Helianthella quinquenervis</i> .	32
Cuadro 7. Resultados de la evaluación de las fracciones primarias contra <i>Artemia salina</i> .	33

**LISTA DE ESPECTROS**

	PAG
Espectro 1 Espectro de IR del ácido angélico	21
Espectro 2 Espectro UV del ácido angélico	22
Espectro 3 Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido angélico	23
Espectro 4 Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido angélico	24
Espectro 5 Espectro de RMN <sup>1</sup> H bidimensional COSY del ácido angélico	25
Espectro 6 Espectro EMIE del ácido angélico	26

## LISTA DE GRAFICAS

	PAG
Gráfica 1 Efecto del ácido angélico sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	34

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>IR :</b>	<b>infrarrojo.</b>
<b>RMN<sup>1</sup>H :</b>	<b>resonancia magnética nuclear protónica.</b>
<b>CDCl<sub>3</sub> :</b>	<b>cloroformo deuterado.</b>
<b>RMN<sup>13</sup>C :</b>	<b>resonancia magnética nuclear de Carbono 13.</b>
<b>Hex :</b>	<b>hexano.</b>
<b>CHCl<sub>3</sub> :</b>	<b>cloroformo.</b>
<b>MeOH :</b>	<b>metanol.</b>
<b>LC<sub>50</sub> :</b>	<b>concentración letal media.</b>
<b>mm :</b>	<b>milímetros.</b>
<b>μl :</b>	<b>microlitros.</b>
<b>p.f. :</b>	<b>punto de fusión.</b>
<b>TMS :</b>	<b>tetrametil silano.</b>
<b>ppm :</b>	<b>partes por millón.</b>
<b>ml :</b>	<b>mililitros.</b>
<b>mg :</b>	<b>miligramos.</b>
<b>μg :</b>	<b>microgramos.</b>
<b>g :</b>	<b>gramos.</b>
<b>MHz :</b>	<b>megahertz.</b>
<b>KBr :</b>	<b>bromuro de potasio.</b>
<b>μm :</b>	<b>micrómetros.</b>
<b>nm :</b>	<b>nanómetros.</b>
<b>DE<sub>50</sub> :</b>	<b>dosis efectiva media.</b>
<b>UV :</b>	<b>ultravioleta.</b>
<b>cc :</b>	<b>cuarteto cuarteteado.</b>
<b>dc :</b>	<b>doblete cuarteteado.</b>
<b>MIC :</b>	<b>concentración mínima inhibitoria.</b>

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Antecedentes del género *Helianthella*.

El género *Helianthella* pertenece a la familia Asteraceae, subfamilia Asteroideae, subtribu Heliantheae (Stuessy, 1977) o Ecliptinae como se ha descrito recientemente por Robinson (1981), y comprende 3 especies: *Helianthella uniflora*, *Helianthella madreensis* y *Helianthella quinquenervis*.

De manera general, las plantas pertenecientes a esta subtribu tienen las siguientes características: hojas opuestas palmadas, con venación pinada; con rayas y formas en disco. Los pigmentos florales son en su mayor parte amarillos; los discos en las corolas usualmente tienen lóbulos cortos y el polen es de 23  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Desde el punto de vista fitoquímico, estudios de algunos géneros correspondientes a esta subtribu han permitido la obtención de varios metabolitos secundarios (Robinson, 1981), tales como lactonas sesquiterpénicas (de tipo germacranólidas, eudesmanólidas, eremofilanólidas, guayanólidas, etc.), poliacetilenos (derivados de ácidos grasos de 18 carbonos), flavonoides (chalconas, auronas, antocianinas y flavonoles) y aminoácidos. En el caso específico del género *Helianthella*, éste ha sido objeto de muy pocas investigaciones. Para el caso de las especies *Helianthella uniflora* y *Helianthella quinquenervis* se han obtenido metabolitos de tipo isopentenilacetofenonas (Bohman, 1970) y cromanos (Herz, 1984) respectivamente; adicionalmente, de la primera especie se han aislado diversos aminoácidos (Inouye, 1980). Por lo que respecta a la especie *Helianthella madreensis*, ésta no ha sido objeto de estudio.

## 1.2 Antecedentes de la *Helianthella quinquenervis*.

La *Helianthella quinquenervis* se encuentra distribuida al Oeste de Estados Unidos, Canadá y México (Herz, 1984). Se le conoce popularmente con el nombre de álamo temblon y flor de sol (Inouye, 1980).

En el caso particular de México se encuentra distribuida en el estado de Chihuahua donde es empleada como agente antiparasitario y en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales; en ambos casos se utiliza una infusión de las raíces. Como ya se mencionó anteriormente, estudios realizados sobre esta especie, describen el aislamiento y caracterización de cromanos (Herz, 1984) y aminoácidos (Inouye, 1980), siendo los primeros los principales metabolitos secundarios presentes en esta planta.

## 1.3 Generalidades del ácido angélico.

### 1.3.1 Estructura y distribución en la naturaleza.

El ácido angélico (ácido 2-metil-trans-but-2-enoico) tiene la estructura indicada en la Figura 1.



Figura 1. Estructura del ácido angélico.

Este compuesto en la naturaleza coexiste en la mayoría de los casos con su isómero *cis*, el ácido tíglico (ácido 2-metil-*cis*-but-2-enoico). Ambos ácidos se encuentran distribuidos principalmente como ésteres de diversos productos naturales de origen vegetal (Herz,1980; Ohno,1980; Rustalyan,1980; Roman,1981; Nathan,1972; *inter alia*), aunque también se les encuentra en forma libre en insectos (Kanehisa,1982; Attygalle,1991; Davidson,1989; Oshima,1975, *inter alia*).

Los ésteres de este ácido han sido aislados de diversas fuentes naturales, principalmente de plantas, tales como: *Senecio coronopifolius* (Sanz,1990), *Petasites georgicus* (Toropkina,1973), *Xanthogalum tatianae* (Sokolova,1970), *Heracleum sosnowskyi* (Sipinskaya,1968), *Anthemis nobilis* L. (Hasebe,1989), etc. Algunos ejemplos de ésteres que han sido identificados recientemente en plantas son: neoadenostilona aislada de *P. candidissima* (Bah,1992), angelato de atripliolido aislado de *Calea pilosa* (Ober,1985), 6-O-Angeloilantirrinósido (Boros,1990), angelato de un hidroxiforbol (Sosath,1988), lapiferol aislado de *Ferula latipinna* (González,1988), e ingenol aislado de *E. hermentiana* (Kingham,1987). Cabe mencionar, que se ha identificado la presencia de este ácido en el vino aunque se desconoce su mecanismo de formación (Moehler,1969).

El ácido en forma libre presenta una distribución restringida en la naturaleza, específicamente en artrópodos (escarabajos) de la familia Carabidae. Estos insectos, poseen un par de glándulas localizadas cerca del abdomen, donde son producidos, además del ácido angélico otros ácidos grasos como el ácido metacrílico, crotónico, benzoico, fórmico, tíglico, etc., los cuales son almacenados en reservorios hasta que son secretados por una estimulación externa, como por ejemplo los causados por el ataque de predadores (Kanehisa,1982; Davidson,1989; Attygalle,1991).

Resulta interesante destacar, que estos insectos segregan estos ácidos en forma de rocío, acompañado por un olor pungente; se ha observado también, que esta secreción irrita los ojos y al ponerse en contacto con la piel provoca dolor (Davidson,1989).

Por último, cabe mencionar que la química y morfología de las glándulas de los escarabajos han sido ampliamente estudiados. Dichos estudios han permitido la caracterización de diversos compuestos, incluyendo como ya se mencionó anteriormente, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos (Hefetz,1984; Kanehisa,1985; Blum,1981).

Algunos ejemplos de escarabajos que han sido objeto de estudio son: *Oodes americanus*, *Oodes modestus* (Attygalle,1991), *Pasimachus subsulcatus* (Davidson,1989), *Carabus procerulus Chaudoir* y *Damaster blaptoides oxuroides* (Oshima,1975).

### 1.3.2 Biosíntesis.

En estudios realizados en las especies *Cynoglossum officinale* (Mc Gaw,1979) y en *Physalis peruviana* (Beresford,1974), se comprobó que el ácido angélico se biosintetiza a partir del aminoácido L(+)-isoleucina, via el ácido 2-metilbutanoico, según se indica en la Figura 2.

### 1.3.3 Propiedades físicas.

El ácido angélico es un sólido cristalino con p.f 45° C, sublimable y de olor picante, con un valor de UVmax (H<sub>2</sub>O) 217 nm; escasamente soluble en agua fría, soluble en agua caliente, alcohol y éter. El calentamiento prolongado de la solución acuosa causa isomerización al ácido tíglico. (Merck Index, 1983).

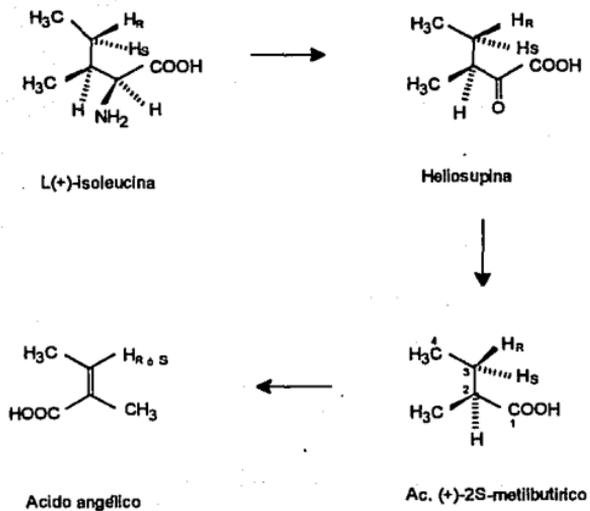


Figura 2. Biosíntesis del ácido angélico en *Cynoglossum officinale*.

#### 1.3.4 Determinación estructural.

Para la elucidación estructural de este compuesto, se han empleado fundamentalmente métodos físicos (espectroscópicos, espectrométricos y difracción de rayos X) (Fraser,1960; Kanehisa,1982; Nathan,1984; Porte,1959; *inter alia*).

Cabe hacer notar que se ha descrito la difracción de Rayos X de ambos compuestos (Porte,1959), aunque las configuraciones asignadas no son correctas.

#### 1.3.5 Actividad biológica.

Los estudios biológicos realizados sobre este compuesto son prácticamente nulos; el único reporte previo describe, como ya se mencionó anteriormente, que tanto el ácido angélico como otros ácidos grasos, son segregados por artrópodos como un mecanismo de defensa (Attygalle,1991; Davidson,1989; Kanehisa,1982).

## 2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Uno de los criterios para descubrir nuevos productos naturales con posible actividad terapéutica, ha sido el estudio de plantas usadas en medicina tradicional. Entre las plantas mexicanas que son utilizadas en la medicina popular, se encuentra la *Helianthella quinquenervis*, la cual como ya se mencionó previamente es empleada como agente antiparasitario y para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Con base en lo antes expuesto y considerando que no existe ningún reporte previo de dicha planta en México, se decidió realizar el estudio químico y biológico preliminar de *Helianthella quinquenervis* como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas empleadas en la medicina tradicional, con la finalidad de aislar compuestos bioactivos y por otra parte, contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la misma.

Los objetivos específicos planteados para el presente trabajo son los siguientes:

- a) Recopilar la información bibliográfica acerca de los aspectos biológicos, fitoquímicos, etnobotánicos y taxonómicos de la planta objeto de estudio.
- b) Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales y fraccionarlo mediante los métodos adecuados.
- c) Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos el (los) compuesto(s) aislado(s).
- d) Determinar la toxicidad del extracto, fracciones y compuesto(s) aislado(s) para la *Artemia salina* Leach., considerando que este bioensayo permite detectar de forma preliminar actividades biológicas más complejas.

**e) Determinar la actividad antimicrobiana del extracto y compuestos aislados considerando que este bioensayo ha revelado el potencial de plantas superiores como fuente de nuevos agentes anti-infectivos.**

**f) Realizar la evaluación del extracto como agente potencial antitumoral.**

**g) Determinar la actividad alelopática del (los) compuesto(s) aislado(s).**

### 3. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Materiales y métodos.

##### 3.1.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

###### 3.1.1.1 Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos) se prepararon disolviendo 20 mg de material en 2.0 ml de disolvente apropiado. Posteriormente se transfirieron a tres viales, colocando 500, 50 y 5  $\mu$ l de la solución original, teniendo concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm respectivamente, cada una de las cuales se realizaron por triplicado. Por último se dejó evaporar el disolvente de cada una de las soluciones al vacío.

###### 3.1.1.2 Bioensayo.

Se incubaron los huevecillos de *Artemia salina* durante 48 horas en un medio salino artificial; al cabo de este tiempo, se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los viales, más 5 ml. de medio salino.

Transcurridas 24 horas se registró el número de crustáceos sobrevivientes o muertos. Los resultados finales se expresan en porcentaje de muerte de los crustáceos ó calculando la concentración letal media ( $LC_{50}$ ).

En caso de que las concentraciones anteriores no fueran suficientes para calcular la  $LC_{50}$  se preparan otras concentraciones adicionales para poder calcular dicho parámetro.

### 3.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

#### 3.1.2.1 Microorganismos de prueba.

Los microorganismos empleados para la evaluación incluyeron bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. En el Cuadro 1 se resumen los microorganismos de prueba, indicándose además las cepas correspondientes.

**Cuadro 1** Microorganismos de prueba empleados para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 15006)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
Gram -	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	(ATCC 14207)
	<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
Levadura	<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)

#### 3.1.2.2 Preparación de las muestras a evaluar y de los controles positivos.

El extracto, fracciones y/o compuestos puros objeto de estudio se evaluaron como una suspensión en Agua-Tween 80 a concentraciones de 20 mg/ml y 100 mg/ml.

Como controles positivos se prepararon soluciones de estreptomycinina (1 g en 100 ml) para las bacterias y de nistatina (1 g en 10 ml) para la levadura.

### 3.1.2.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba.

Las bacterias se sembraron en caldo nutritivo (Merck) y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 37° C. La levadura se sembró en caldo-glucosa 2% Sabouraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C.

Una vez desarrollados los microorganismos fué necesario estandarizar su número a una concentración aproximada de  $3 \times 10^6$  células/ml empleando los patrones de turbidez de Mc.Farland (Barley, 1984) mediante la disolución del caldo nutritivo (1 ml) en una solución salina isotónica estéril (10 ml).

### 3.1.2.4 Preparación de los medios para siembra del microorganismo.

Las cajas petri previamente estériles, se llenaron con agar disuelto estéril (aproximadamente 20 ml) el cual se dejó solidificar para su posterior prueba de esterilidad; para el caso de las bacterias 24 horas a 37° C y para el de la levadura 48 horas a 28 °C.

El agar empleado para las bacterias fué el agar No.1 para antibióticos de Merck y en el caso de la levadura se utilizó agar de dextrosa Sabouraud (Merck).

### 3.1.2.5 Siembra de los microorganismos.

Para lograr una mejor distribución de los microorganismos se utilizó el método de vertido en placa, en el cual 1 ml de las soluciones estandarizadas de microorganismos (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml) se colocó en las placas con agar, que previamente pasaron la prueba de esterilidad; posteriormente se homogenizaron con una varilla de vidrio en toda la caja.

### 3.1.2.6 Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los microorganismos de prueba.

En cada placa con agar, se hicieron 3 horadaciones convenientemente distribuidas utilizando un horador cilíndrico de 10 mm. de diámetro, eliminando el agar y la solución de microorganismos que haya penetrado. Posteriormente se adicionó a cada pozo 100 y 50  $\mu$ l de la muestra a evaluar y 100  $\mu$ l del control positivo. Las placas se dejaron difundir por 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron por 24 horas a 37°C en el caso de las bacterias y durante 48 horas a 28° C para el caso de la levadura.

### 3.1.2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Al finalizar el tiempo de incubación se evaluó la actividad antimicrobiana de las muestras midiendo el diámetro de la zona clara de inhibición.

Las pruebas se realizaron por duplicado y todo el proceso se efectuó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

### 3.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica.

La actividad citotóxica del extracto metanólico de la corteza de *Helianthella quinquenervis*, se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional de los Estados Unidos, y fueron realizadas por el Dr. McLaughlin de la Universidad de Purdue. Las líneas celulares empleadas fueron adeno-carcinoma de colon (HT-29), carcinoma de pecho (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549). Los resultados se expresan en términos de DE<sub>50</sub>.

### 3.1.4 Determinación de la actividad alelopática del ácido angélico.

El potencial alelopático del ácido angélico fué probado sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Esta evaluación fué realizada en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La evaluación se realizó de acuerdo a la metodología descrita para este tipo de bioensayos. (Anaya, 1990; Castañeda, 1992).

### 3.1.5 Material Vegetal.

La corteza de *Helianthella quinquenervis* fué recolectada en el municipio Bocoyana del estado de Chihuahua, México, en Noviembre de 1991 y fué identificada por el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Una muestra de referencia se depositó en la colección de etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher R. Bye 18058).

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y se molió en un molino de cuchillas modelo Willey 4.

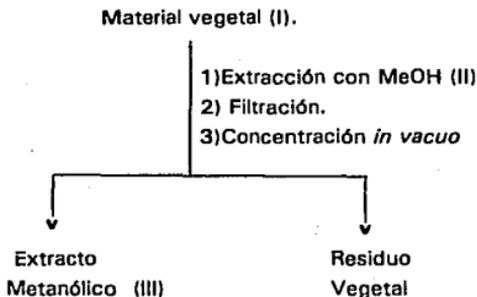
### 3.1.6 Métodos de extracción y fraccionamiento.

El material vegetal molido se trató según el procedimiento mostrado en el Esquema 1.

El extracto metanólico resultante (137.98 g) se fraccionó via cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (1.379 Kg de sílica gel G 60 Merck). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol en diferentes proporciones.

Se recogieron un total de 115 fracciones de un litro cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares.

En el Cuadro 2 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.



- I. Cantidad de material vegetal 500.0 g.
- II. Extracción via maceración (5 veces por periodos de 48 horas cada uno con un volúmen de 1.6 litros).
- III. Peso extracto metanólico 137.98 g.

Esquema 1. Preparación del extracto metanólico de la corteza de *Helianthella quinquenervis*.

**Cuadro 2** Resumen del fraccionamiento preliminar via cromatografía en columna del extracto metanólico de *Helianthella quinquenervis*.

Eluyente	Proporción	No.fracciones	Fracciones combinadas
Hexano	100	1-21	1
			2
			3-14
			15-34
Hex-CHCl <sub>3</sub>	90:10	22-35	
Hex-CHCl <sub>3</sub>	70:30	36-51	35-39
			40-45
			46-54
Hex-CHCl <sub>3</sub>	60:40	52-55	55-56
Hex-CHCl <sub>3</sub>	50:50	56-73	57-81
CHCl <sub>3</sub>	100	74-78	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	95:5	79-82	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	90:10	83-88	82-89
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	80:20	89-95	90
			91-94
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	50:50	96-106	95-102
			103
			104-111
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	30:70	107-112	
MeOH	100	113-115	112-114
			115

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 GF 254 Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos.

Los sistemas de eluyentes y reactivos reveladores empleados se encuentran resumidos en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.**

Sistema de eluyente	Composición	Proporción
I	Hex- $\text{CHCl}_3$	Diversas
II	$\text{CHCl}_3$	100
III	$\text{CHCl}_3$ -MeOH	Diversas

Reactivo	Agentes cromogénicos composición	Referencia
Sulfato cérico*	12 g de sulfato cérico 22.2 ml de $\text{H}_2\text{SO}_4$ conc. 350 g de hielo picado	Stahl, 1969
Iodo	Iodo metálico	-----

\* Para el desarrollo de color fué necesario calentar por dos minutos aproximadamente.

### 3.1.7 Aislamiento y purificación del compuesto.

#### 3.1.7.1 Obtención del ácido angélico.

Del extracto metanólico, precipitaron de manera espontánea unos cristales blanco-amarillentos de olor desagradable (picante). Dichos cristales se purificaron por sublimación utilizando hexano como disolvente. Se obtuvieron 169.7 mg del compuesto, el cual presentó un punto de fusión de 41-44°C.

#### 3.1.7.2 Obtención del metil derivado del ácido angélico.

Para obtener el derivado metilado del producto aislado se utilizó una solución etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de metanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald Aldrich), en 45 ml de éter etílico (por cada 100 mg de producto por metilar se utilizó 20 ml de una solución etérea de diazometano). El producto por metilar se disolvió en 10 ml de metanol y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas.

### 3.1.8 Caracterización del compuesto aislado.

#### 3.1.8.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

- a) El punto de fusión fué medido en un aparato Fisher-Johnes.y se reporta sin corregir
- b) Los espectros IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin Elmer modelo 549 B en pastilla KBr.
- c) Los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se determinaron en un instrumento Varian VXR-300S utilizando como disolvente CDCl<sub>3</sub> y como referencia interna TMS.

d) El espectro UV del ácido fué registrado en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer 202.

e) El espectro de masas fué obtenido en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5988A.

#### 4.RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 4.1 Identificación del compuesto aislado.

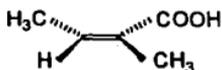
El extracto metanólico preparado a partir de la corteza de *Helianthella quinquenervis*, se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, según se indicó en la sección 3.1.6. Del extracto original, precipitó de manera espontánea un sólido, el cual se purificó mediante sucesivas recristalizaciones, obteniéndose 169.7 mg de un sólido cristalino, (0.034 % de rendimiento con base a la planta seca), de olor picante. La elucidación estructural del compuesto aislado será el objetivo de la presente sección. En el Cuadro 4 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas empleadas en el proceso de caracterización.

El compuesto presentó un punto de fusión de 41-44°C; su fórmula molecular fué establecida por espectrometría de masas como  $C_8H_8O_2$ . El espectro IR (Espectro 1) mostró bandas características para grupo hidroxilo de ácido ( $2958\text{ cm}^{-1}$ ), C-H saturado ( $2592\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo ( $1672\text{ cm}^{-1}$ ) y doble enlace ( $1636\text{ cm}^{-1}$ ). Por otro lado, el espectro de UV (Espectro 2) mostró un máximo de absorción a 218 nm, característico de un ácido  $\alpha,\beta$  insaturado (Silverstein,1981; Creswell,1980).

El espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 3) mostró cinco señales en concordancia con la fórmula molecular establecida. El análisis del espectro de RMN<sup>13</sup>C modalidad APT permitió discriminar las señales de la siguiente manera:

- a) La señal positiva desplazada a campo bajo ( $\delta$  173.7) se asignó a un grupo carbonilo de ácido, previamente evidenciado por el espectro de IR.
- b) Las señales a  $\delta$  141.1 (negativa) y 127.1 (positiva), de acuerdo al desplazamiento químico observado eran asignables a dos carbonos vinílicos correspondientes a una doble ligadura trisustituida, y
- c) Finalmente, dos señales negativas a  $\delta$  16.07 y 20.3, asignadas a dos grupos metilo.

Cuadro 4. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido angélico.

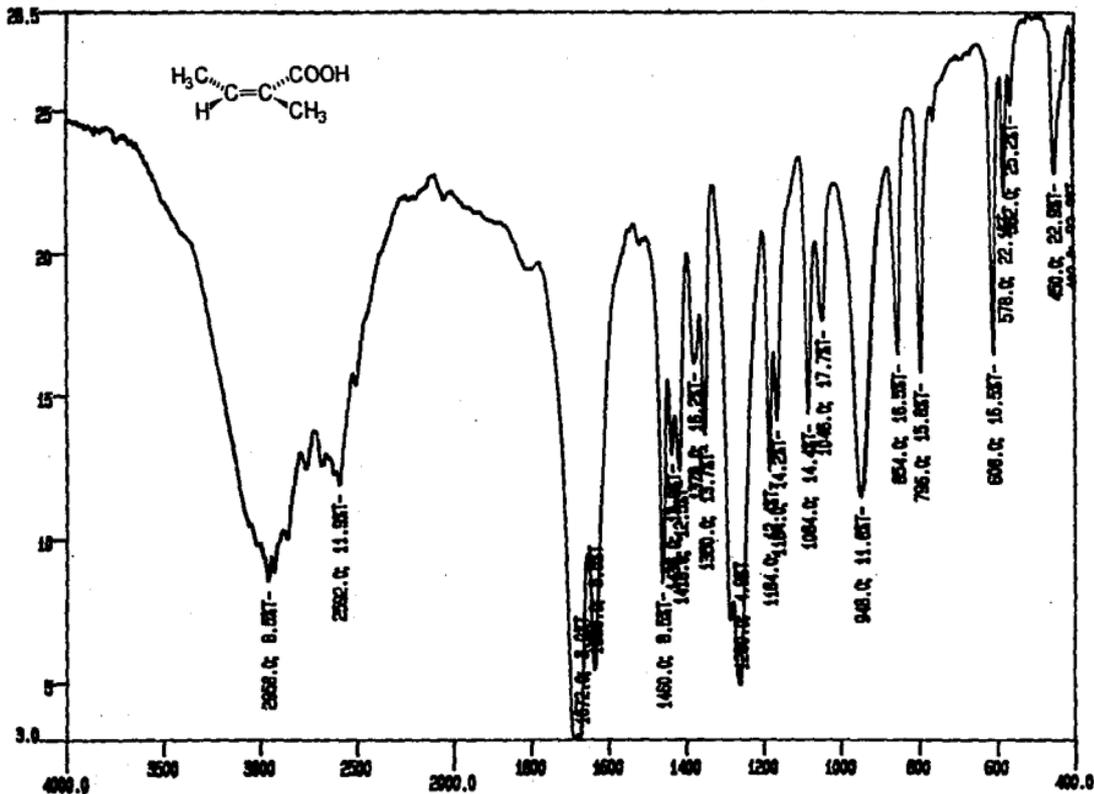


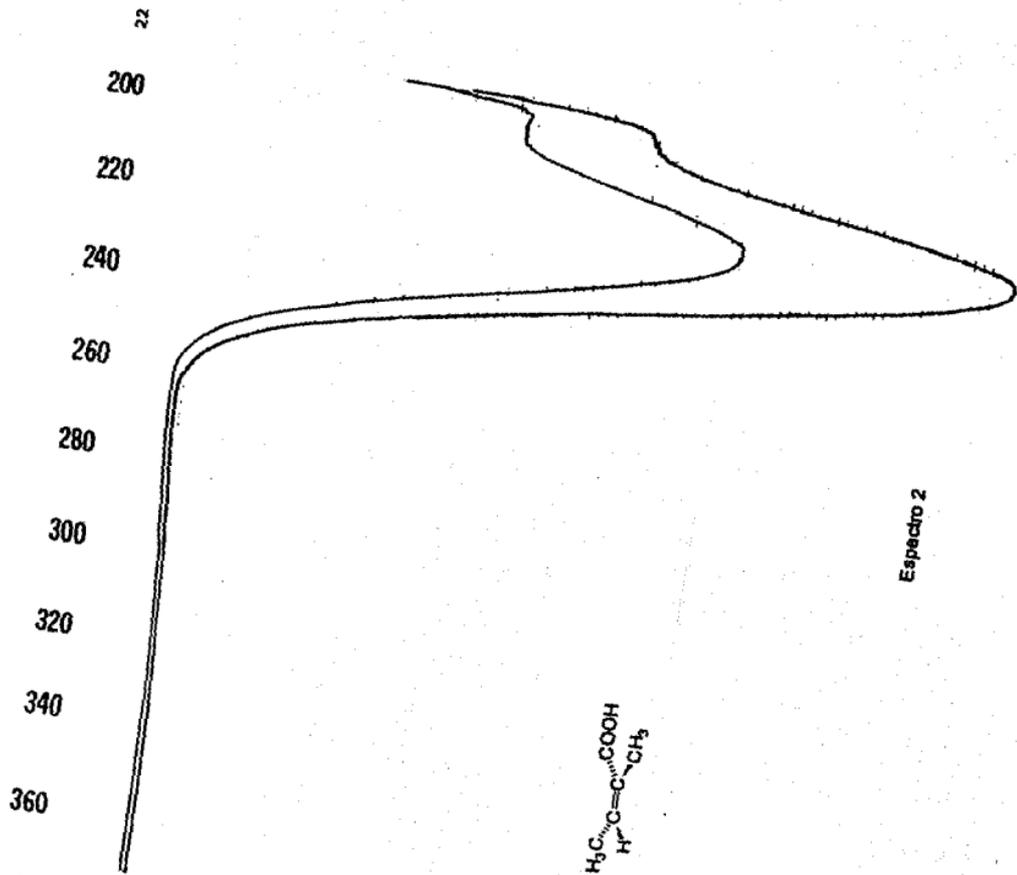
Acido angélico.

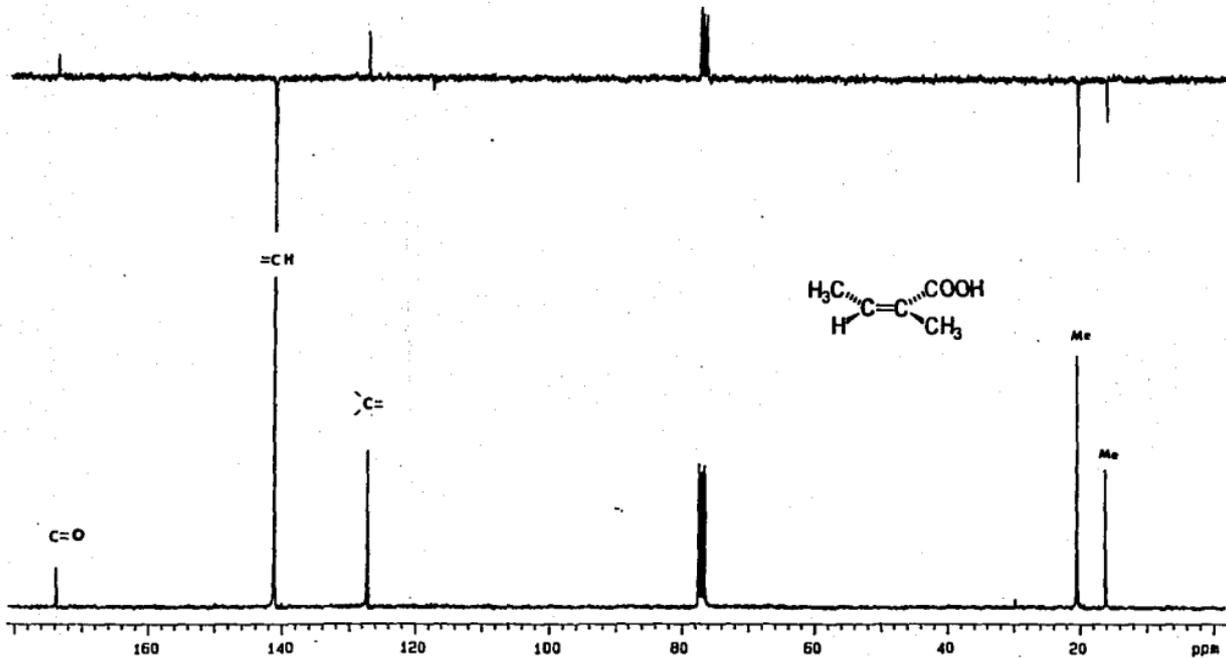
Fórmula molecular	$C_5H_8O_2$
Punto de fusión	41-44°C
UV <sub>max</sub> (H <sub>2</sub> O) (Espectro 2)	218 nm
IR (KBr) $cm^{-1}$ (Espectro 1)	2958, 2592, 1672, 1636, 1460, 1436, 1416, 1378, 1350, 1260, 1184, 1164, 1084, 1046, 948, 854, 796, 608, 578, 562, 450.
RMN <sup>13</sup> C ppm (CDCl <sub>3</sub> -75 MHz) (Espectro 3)	173.7 (C-1, +), 141.1 (C-3,-), 127.1 (C-2, +), 20.3 (C-5,-), 16.07 (C-4,-).
RMN <sup>1</sup> H ppm (CDCl <sub>3</sub> -300 MHz) (Espectro 4)	1.91 (3 H, m, J=1.5 Hz), 2.04 (3 H, dc, J= 7.2, 1.5 Hz), 6.24 (1 H, cc, J=7.35, 1.5 Hz), 12.4 (1 H, s).
EMIE m/z (%) (Espectro 6)	100 M <sup>+</sup> (4) , 99 M-1 (55) , 84 (23), 81.9 (23), 55 (100), 54 (46), 53 (36), 44.9 (30), 41 (31), 39 (86).

IR

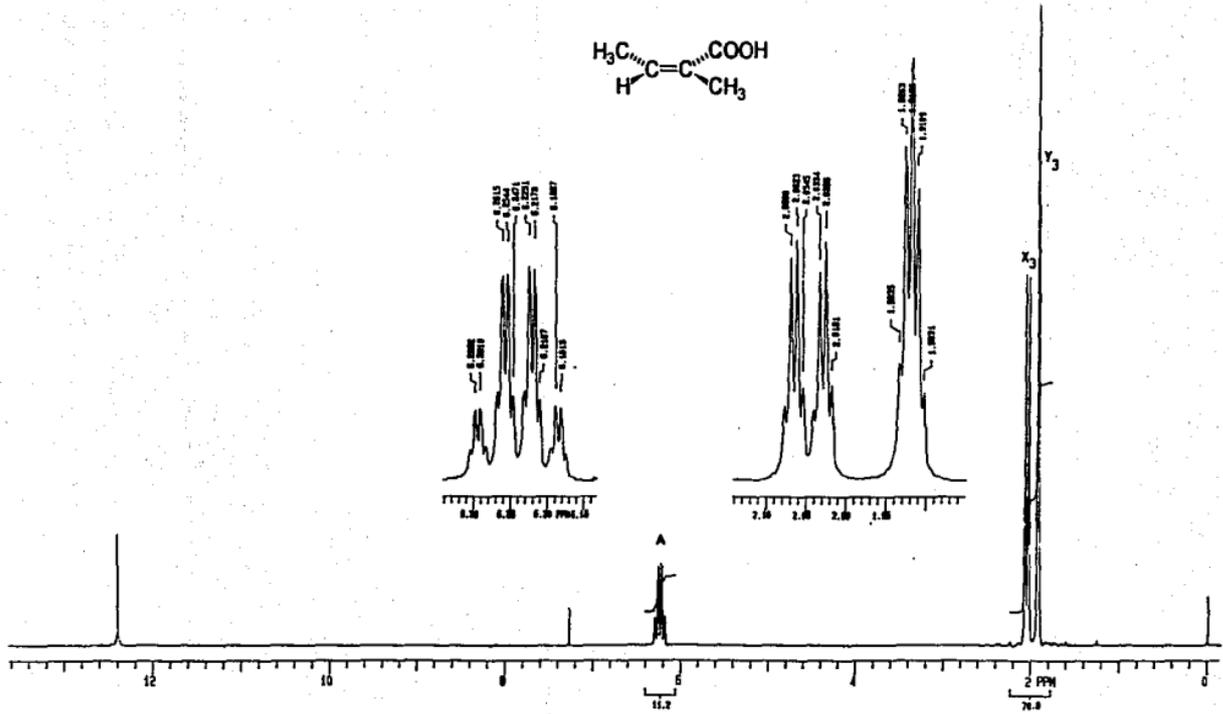
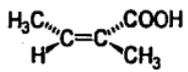
Espectro 1





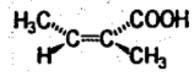
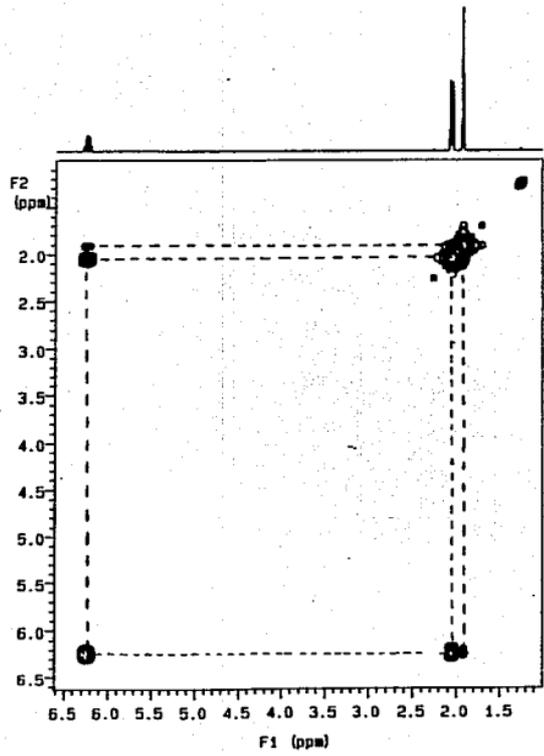


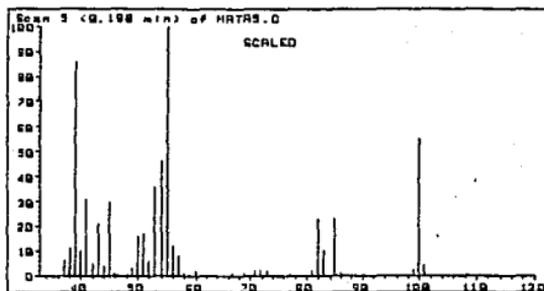
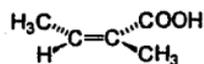
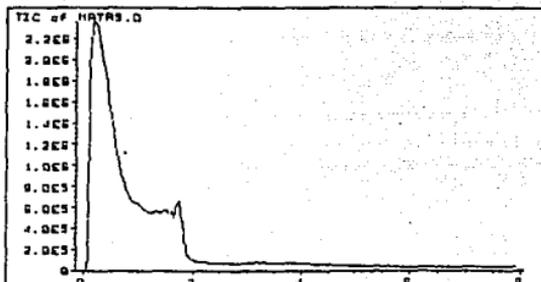
Espetro 3



Espectro 4

Espectro 5





Scan 5 (0.198 min) of MATAS.D  
RM-23-11 INT.DIRECTA

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
37.00	6	45.90	1	57.00	8	81.00	2
38.00	11	49.00	3	58.00	1	81.90	23
39.00	86	50.00	16	60.00	2	83.00	10
40.00	10	51.00	17	66.90	1	84.90	23
41.00	31	52.00	6	69.00	1	85.90	1
42.00	5	53.00	36	71.00	2	99.00	2
43.00	21	54.00	46	71.90	2	99.90	55
44.00	4	55.00	100	73.00	2	100.90	4
44.90	30	56.00	12				

Espectro 6

Por otro lado, el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 4) presentó las siguientes señales:

a) en la zona de protones vinílicos ( $\delta$  6.24), se observó una señal que integraba para un hidrógeno; la multiplicidad observada (cc,  $J=7.35$ , 1.5 Hz) sugería la vecindad de este hidrógeno con dos grupos metilo.

b) en la zona donde resuenan los grupos metilo se observaron dos señales a  $\delta$  2.04, dc,  $J=7.2$ , 1.5 Hz y a  $\delta$  1.91, m,  $J=1.5$  Hz. Una vez más, la multiplicidad observada para ambos metilos, permitía proponer la interacción que existía entre ambos, así como con el hidrógeno vinílico previamente descrito. Esto se logró confirmar mediante la conectividad observada en el espectro bidimensional COSY (Espectro 5).

Los datos analizados hasta el momento, permitieron proponer las estructuras A y B mostradas en la Figura 3.



Figura 3. Estructuras propuestas para el compuesto aislado derivadas del análisis espectroscópico,

La comparación de los desplazamientos químicos obtenidos para ambos metilos del producto natural con los previamente descritos en la literatura, así como los valores de las constantes de acoplamiento (Nathan,1984), permitieron corroborar de manera inequívoca la asignación del isómero trans (A) para este compuesto. En el Cuadro 5 se resumen de manera comparativa los datos de RMN<sup>1</sup>H y de RMN<sup>13</sup>C para el producto natural, así como los descritos previamente para el ácido tíglico y angélico.

El espectro de masas del producto natural (Espectro 6), mostró el ión molecular a m/z 100 y presentó entre otros fragmentos los correspondientes a M-15 y M-18; en la Figura 4 se ilustra la fragmentación característica del ácido angélico.

Cabe mencionar que los métodos espectrométricos no han sido de gran utilidad para la diferenciación de ambos isómeros ya que muestran patrones de fragmentación muy similares (Kanehisa,1982).

El tratamiento del producto natural con diazometano permitió la obtención del derivado metilado, confirmando químicamente la presencia de un grupo funcional ácido, previamente evidenciado por los espectros de IR y RMN.

Con base en lo antes descrito, el compuesto fué identificado como el ácido angélico, el cual, como se indicó en la sección de antecedentes, se ha obtenido previamente en forma libre de artrópodos de la familia Carabidae (Attygalle,1991; Davidson,1989; Sanz,1990; Toropkina,1973).

Cuadro 5. Comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del producto natural con los ácidos tíglico y angélico (Nathan, 1984).

C	Producto natural		Acido angélico		Acido tíglico	
	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$
1	12.4	173.7	12.4	173.96	12.3	174.48
2	-----	127.1	-----	127.33	-----	127.98
3	6.24	141.1	6.23	140.87	6.95	139.86
4	2.04	16.07	2.04	15.93	1.76	13.83
5	1.91	20.3	1.92	20.22	1.78	10.95
	$J_{3,5} = 1.5 \text{ Hz}$		$J_{3,5} = 1.5 \text{ Hz}$		$J_{3,5} = 1.4 \text{ Hz}$	
	$J_{3,4} = 7.3 \text{ Hz}$		$J_{3,4} = 7.3 \text{ Hz}$		$J_{3,4} = 7.0 \text{ Hz}$	
	$J_{4,5} = 1.5 \text{ Hz}$		$J_{4,5} = 1.6 \text{ Hz}$		$J_{4,5} = 1.2 \text{ Hz}$	

\* Los espectros fueron registrados en  $\text{CDCl}_3$ ; los desplazamientos químicos estan dados en ppm.

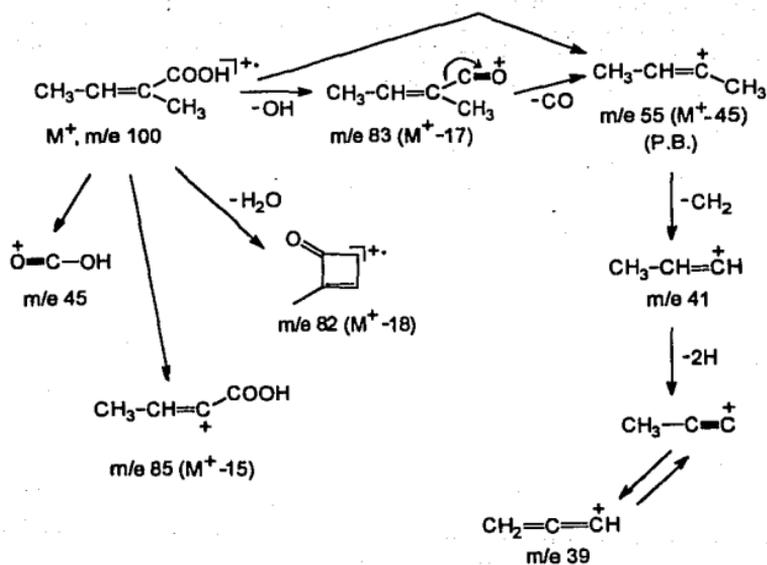


Figura 4. Fragmentos característicos del ácido angélico.

#### 4.2 Ensayos biológicos prelliminares.

Se determinó la toxicidad del extracto metanólico de *Helianthella quinquenervis* en contra de *Artemia salina* Leach. El resultado obtenido de esta evaluación fué satisfactorio (Meyer, 1982), y se encuentra expresado en términos de concentración letal media ( $LC_{50} = 6.9 \mu\text{g/ml}$ ).

Considerando que este bioensayo ha sido empleado en diversas ocasiones en estudios biodirigidos para la obtención de compuestos bioactivos, la correlación observada con actividades más complejas, por ejemplo citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas (Anderson, 1991), actividad antihelmíntica (Camacho, 1990) etc., y la toxicidad mostrada por el extracto para el crustáceo, se decidió evaluar de manera adicional la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial del extracto metanólico

En el primer caso, se determinó el potencial antimicrobiano en contra de bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura, de acuerdo a los criterios convencionales (Mitscher, 1987) empleando el método de difusión en agar. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones no fueron satisfactorios (Mitscher, 1987).

Por lo que respecta a la evaluación de la actividad citotóxica, ésta se llevó a cabo *in vitro* empleando tres líneas celulares, A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de pecho) y HT-29 (adeno-carcinoma de colon). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 6 y se encuentran expresados en términos de  $DE_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), como se puede apreciar, el extracto metanólico mostró una significativa actividad citotóxica para la línea celular MCF-7 (valores de  $LC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$  se consideran inactivos).

Cabe mencionar, que los resultados obtenidos para el extracto metanólico en la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, mostró una buena correlación con la citotoxicidad observada en la línea celular de carcinoma de pecho.

**Cuadro 6. Actividad citotóxica del extracto metanólico de *Helianthella quinquenervis*.**

Líneas celulares			
	A-549 (DE <sub>50</sub> )	MCF-7 (DE <sub>50</sub> )	HT-29 (DE <sub>50</sub> )
Extracto metanólico de <i>Helianthella quinquenervis</i>	35.46	13.10	> 100
Adriamicina	3.53 x 10 <sup>-3</sup>	2.31 x 10 <sup>-2</sup>	4.47 x 10 <sup>-3</sup>
A-549	Carcinoma de pulmón		
MCF-7	Carcinoma de pecho		
HT-29	Adeno-carcinoma de colon		

El extracto metanólico activo, se sometió a un fraccionamiento vía cromatografía en columna según se indicó en la sección 3.1.6. Las fracciones primarias (Cuadro 2) combinadas de acuerdo al análisis cromatográfico en capa fina, fueron evaluadas biológicamente empleando el bioensayo de *Artemia salina*.

Los resultados de estas evaluaciones se indican en el Cuadro 7, en donde claramente se puede apreciar que diez grupos de fracciones mostraron resultados halagadores (LC<sub>50</sub> < 1000 ppm).

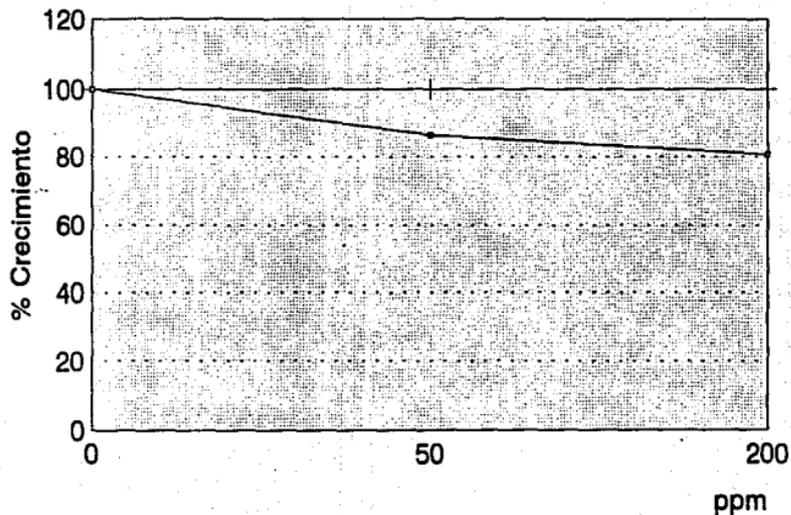
**Cuadro 7. Resultados de la evaluación de las fracciones primarias contra *Artemia salina*.**

Muestra objeto de evaluación.		LC <sub>50</sub> (µg/ml)
Fraciones primarias	2	50.0
	3-14	20.1
	15-34	20.1
	35-39	32.4
	40-45	50.9
	46-54	33.3
	55-56	22.0
	57-81	66.0
	82-89	422.3
	90	554.4

Por otra parte, se determinó la toxicidad y la actividad antimicrobiana potencial del ácido angélico. En la prueba de toxicidad para *Artemia salina*, presentó una LC<sub>50</sub> = 435.7 ppm y mostró una significativa actividad antimicrobiana en contra de *Candida albicans* (Mitscher, 1987), obteniéndose halos de inhibición de 6 y 15 mm. de diámetro a las concentraciones de 100 y 50 µl respectivamente.

Por último, se evaluó el potencial alelopático del ácido angélico; el cual no mostró resultados satisfactorios sobre las dos especies objeto de estudio (ver Gráfica 1).

## Efecto del ácido angélico sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*



→ *A. hypocondriacus* + *E. crusgalli*

Gráfica 1

## 5. CONCLUSIONES.

5.1 El estudio químico y biológico preliminar de la corteza de *Helianthella quinquenervis* permitió el aislamiento e identificación de un metabolito secundario, caracterizado como el ácido angélico. Este estudio constituye el primer reporte de la presencia del ácido angélico en forma libre en plantas, ya que en todos los casos éste se encuentra formando ésteres con diversos metabolitos secundarios.

5.2 El extracto metanólico y las fracciones menos polares mostraron actividad significativa frente a *Artemia salina* ( $LC_{50} < 1000$  ppm).

5.3 El extracto metanólico y el ácido angélico se evaluaron como posibles agentes antimicrobianos empleando bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. El ácido angélico mostró actividad significativa frente a *Candida albicans*.

5.4 Se evaluó el potencial antitumoral del extracto metanólico en varias líneas celulares, presentando actividad para la línea MCF-7 (carcinoma de pecho,  $DE_{50} = 13.10$ ).

5.5 Se evaluó el potencial alelopático del ácido angélico sobre las especies *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios.

5.6 El presente trabajo describe las primeras evaluaciones biológicas realizadas al ácido angélico.

## **6. Recomendaciones.**

**6.1** Continuar la investigación fitoquímica de la corteza de *Helianthella quinquenervis*, con la finalidad de establecer el perfil metabólico de esta parte de la planta y aislar compuestos bioactivos, haciendo particular énfasis en el aislamiento de los principios activos responsables de la actividad citotóxica demostrado en este estudio.

**6.2** Ampliar la evaluación de la potencialidad farmacológica y/o biológica de esta especie.

**6.3** Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) para *Candida albicans* del ácido angélico.

## BIBLIOGRAFIA

Anaya, A.; Calera, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; J. Chem. Ecology, **16**, 2145 (1990).

Anderson, J.; Goetz, C.; Mc Laughlin, J.; Suffness, M.; Phytochem. Anal., **2**, 107-11 (1991).

Attygalle, A.; Meinwald, J.; Lieberr, J.; Eisner, T.; Experientia, **47**, 296-9 (1991).

Bah, M.; Determinación del contenido alcaloideo de la *Packera candidissima* (Greene) Weber & Love mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Tesis de Maestría, UNAM (1992).

Barley; Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company 175-200 (1974).

Beresford, P.; Woolley, J.; Phytochemistry, **13**, 2143-44 (1974).

Bohmann, F.; Grenz, M.; Chem. Ber., **103**, 90-6 (1970).

Blum, M.S.; Chemical defenses in arthropods. Academic Press. New York, (1981).

Camacho, M. R.; Sánchez, B.; Quiroz, H.; Contreras, J. L.; Mata, R.; Journal of Ethnopharmacology, **31**, 383-9 (1991).

Castañeda, P.; García, M.R.; Hernández, B.E.; Torres, B.A.; Anaya, A.L.; Mata, R.; Journal of Chemical Ecology, **18**, 1025 (1992).

Creswell, C.; Runquist, O.; Campbell, M.; Análisis espectral de compuestos orgánicos, Editorial Diana, México (1980).

Davidson, B.; Eisner, T.; Witz, B.; Meinwald, J.; Journal of Chemical Ecology, **15**, 1689-97 (1989).

- Fraser, R.; *Can. J. Chem.* **38**, 549-53, (1960). Chem. Abstr. **54**, 16184 d, (1960).
- Hasebe, A.; Oomura, T., *Koryo* **161**, 93-101, (1989). Chem. Abstr. **111**, 45024 n, (1989).
- Hefetz, A.; Lloyd, H.A.; Valdenverg, A.; Experientia, **40**, 539 (1984).
- Herz, W.; Kulanthaivel, P.; Phytochemistry, **23**, 435-7 (1984).
- Herz, W.; Kumar, N.; Phytochemistry, **19**, 593 (1980).
- Inouye, D.; Inouye, R.; American Journal of Botany, **67**, 1394-6 (1980).
- Kanehisa, K.; Kawazu, K.; Appl. Ent. Zool., **17**, 460-6 (1982).
- Kanehisa, K.; Kawazu, K.; Appl. Ent. Zool., **20**, 299 (1985).
- Mc Gaw, B.; Woolley, J.; Phytochemistry, **18**, 1647-49 (1979).
- Mc Laughlin, J.; Suffness, M.; In *Methods in Plant Biochemistry*, 1-32, Vol.6 Academic Press, USA (1991).
- Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Tenth Edition, 677-8, (1983).
- Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobson, L.; Nichols, D.; Mc Laughlin, J.; Planta Med., **45**, 31-4 (1982).
- Mitscher, L.; Drake, S.; Sitaraghav, R.; Okwute, G.; Journal of Natural Products, **50**, 1025-40 (1987).
- Moehler, K.; Pires, R.; *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **140-2**, 88-93, (1969). Chem. Abstr. **71**, 89993 n, (1969).

- Nathan, P.; Wesener, J.; Gunther, H.; Organic Magnetic Resonance, **22**, 190-1 (1984).
- Nathan, P.; González, P.; Rodríguez, V.; Phytochemistry, **11**, 1803 (1972).
- Ohno, N.; Mabry, T., Phytochemistry, **19**, 609 (1980).
- Oshima, K.; Honda, H.; Yamamoto, I.; Tokyo Nogyo Daigaku Nogaku Shuho **20(2)**, 109-11 (1975). Chem. Abstr. **84**, 118707 y, (1975).
- Porte, A.; Monteath, J.; J. Chem. Soc., 817-24 (1959).
- Robinson, H.; Smithsonian Contributions to Botany **51**, (1981).
- Roman, L.; Del Rio, R.; Hernández, J.; Nathan, P.; Zabel, V.; Watson, W.; Tetrahedron, **37**, 2769 (1981).
- Rustalyan, A.; Nazarians, L.; Bohlmann, F.; Phytochemistry, **19**, 1230 (1980).
- Sanz, J.; Marco, J.; Pharmazie **45(5)**, 381, (1990). Chem. Abstr. **113**, 12532 h, (1990).
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, Editorial Diana, México (1981).
- Sipinskaya, O.; Rozentsveig, P.; Tr. Leningrad Khim-Farm. Inst. **26**, 185-8 (1968). Chem. Abstr. **73**, 73851 v, (1970).
- Sokolova, A.; Ninokov, G.; Rast. Resur. **6(4)**, 573-5, (1970). Chem. Abstr. **74**, 121329 a, (1971).
- Sudalai, A.; Krishna, R.; Indian Journal of Chemistry, **28 B**, 760-1 (1989).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

Toropkina, R.; Orlovskii V.; Rast. Resur. 9(1), 53-6, (1973). Chem. Abstr.  
78, 121300 s, (1973).