

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS FITOQUIMICO Y TOXICOLOGICO DE LA SEMILLA DEL CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

JESSICA GALVEZ RUIZ



MEXICO, D. F.

278030

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Eugenio Athanas Bratoeff Titeff

Vocal: Alfonso Sebastián Lira Rocha

Secretario: Francisco Hernández Luis

1^{er} Suplente: María de Lourdes Mayet Cruz

2^{do} Suplente: Irma Susana Rojas Tome

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 121, "Conjunto E", Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química, bajo la dirección del M. en C. Alfonso Sebastián Lira Rocha y con la colaboración de la QFB. María del Pilar Rodríguez Loaiza

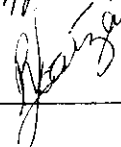
ASESOR:

M. en C. Alfonso Sebastián Lira Rocha



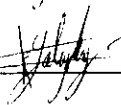
ASESOR TECNICO:

Q.F.B. María del Pilar Rodríguez Loaiza



SUSTENTANTE:

Gálvez Ruiz Jessica



DEDICATORIAS

A mis padres

Trini y Frosi, por el apoyo que me brindaron durante la carrera. En mi vida han representado lo más importante y la razón para superarme profesional y personalmente, **GRACIAS**.

A mis hermanos

Maritza y José Ismael, que lograron que siempre tuviera él propósito de mejorar día con día y a mis sobrinos Miguel y Miriam, dos semillas que comienzan a crecer y espero algún día este trabajo les sirva o por lo menos sepan lo que hacia su tía.

A José Luis

Que estuviste en los buenos y malos momentos de mi carrera y siempre me diste una palabra de aliento para seguir adelante cuando más lo necesite, gracias por escuchar, por tus consejos y sobretodo por tu **amor**.

Al M. en c. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Por su confianza, apoyo y por los conocimientos que me transmitió cada día sin reservas.

A Pily

Por la enseñanza, los consejos y sobretodo por brindarme su amistad.

A Monica

Por ser la amiga de toda la vida, por caminar conmigo y hacer más fácil todos los cambios a los que nos enfrentamos en la vida.

A Carmen y Gina

Por el tiempo que me dieron durante la carrera, por ayudarme en los estudios, por su sinceridad y sus consejos.

A mis compañeros y amigos que formaron parte de mi desarrollo como estudiante, a todos ellos nunca los olvidare.

"Todo hombre que pretenda colaborar con sus luces al saber general de la humanidad tiene que convertirse en escritor.

Este es el único camino por el que saldrá de sí mismo y proyectará sus conocimientos sobre las generaciones venideras traspasando el umbral y límites de lugar y tiempo"

CARLOS BOSCH GARCÍA

☞ No hay premio sin victoria;
ni victoria sin lucha.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Bernardo Lucas, por proporcionar la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*), para la realización de este proyecto.

A la USAI (Unidad de Servicio Auxiliar para la Investigación) por proporcionar el equipo necesario para la realización de las espectroscopias.

A la Q.F.B Graciela Chavéz y a la Q. Maricela Gutiérrez por la realización de los espectros de infrarrojo y rotación óptica.

A la Q.F.B Rosa Isela del Villar y al Q.F.B Oscar Salvador Yañez Muñoz, por la realización de los espectros de RMN.

Al I.Q Luis Velasco Ibarra por la determinación del espectro de masas.

A Maribel Ramírez, Irais Gómez y Oliva Zuñiga del Programa Jóvenes a la Investigación, por el apoyo técnico proporcionado para la elaboración de esta tesis.

INDICE

| | |
|-------------------|---|
| ABREVIATURAS..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1.1 Leguminosas..... | 6 |
| 1.2 Cacahuanano..... | 8 |
| 1.2.1 Características Botánicas..... | 9 |
| 1.2.2 Hábitat | 11 |
| 1.2.3 Distribución Geográfica..... | 12 |
| 1.2.4 Usos | 12 |
| 1.3 Composición química | 13 |
| 1.3.1 Análisis Bromatológico..... | 20 |

CAPITULO 2

| | |
|----------------------------------|----|
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 24 |
| OBJETIVOS | |
| a.- General | 25 |
| b.- Particulares..... | 25 |

CAPITULO 3**METODOLOGIA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

| | |
|--|----|
| 3.1 Material, equipo y reactivos..... | 27 |
| 3.2 Extracción y evaluación en <i>Artemia salina</i> | 31 |
| 3.3 Fraccionamiento y evaluación en <i>Artemia salina</i> | 37 |
| 3.4 Aislamiento y evaluación en <i>Artemia salina</i> | 39 |

CAPITULO 4

| | |
|-------------------------------------|----|
| ANALISIS DE RESULTADOS | 42 |
|-------------------------------------|----|

CAPITULO 5

| | |
|---------------------------|----|
| CONCLUSIONES | 49 |
|---------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| BIBLIOGRAFÍA | 51 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| APENDICE | 54 |
|-----------------------|----|

ESPECTROS

| | |
|-----------------|----|
| Infrarrojo..... | 58 |
|-----------------|----|

| | |
|-------------------------|----|
| RMN ¹ H..... | 59 |
|-------------------------|----|

| | |
|-----------|----|
| COSY..... | 62 |
|-----------|----|

| | |
|----------------------|----|
| ¹³ C..... | 64 |
|----------------------|----|

| | |
|-----------|----|
| DEPT..... | 67 |
|-----------|----|

| | |
|-------------|----|
| HETCOR..... | 68 |
|-------------|----|

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| cc | Cromatografía en columna |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| ccfa | Cromatografía en capa fina analítica |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| EtOH | Etanol |
| MeOH | Metanol |
| <i>n</i> -BuOH | <i>n</i> -Butanol |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |
| CD ₃ OD | Metanol deuterado |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| Na ₂ SO ₄ | Sulfato de sodio |
| g | Gramos |
| mg | Miligramos |
| L | Litros |
| mL | Mililitros |
| μL | Microlitros |
| P.F. | Punto de fusión |
| ppm | Partes por millón |

| | |
|----------------------|---|
| °C | Grados centígrados |
| CL ₅₀ | Concentración letal media |
| UV | Ultravioleta |
| IR | Infrarrojo |
| RMN ¹ H | Resonancia magnética nuclear protónica |
| RMN ¹³ C | Resonancia magnética nuclear carbono 13 |
| COSY | Correlación espectroscópica bidimensional |
| DEPT | Distorsión reducida por una transferencia de polarización |
| HETCOR | Correlación heteronuclear |
| FAB ⁺ -MS | Bombardeo atómico rápido - espectrometría de masas |
| J | Constante de acoplamiento |
| MHz | Mega Hertz |
| s | Singulete |
| d | Doblete |
| dd | Doble de dobles |
| dq | Doble cuadruplete |
| q | Cuadruplete |
| δ | Desplazamiento químico |

INTRODUCCIÓN

Los problemas económicos han dado lugar a la desnutrición en México y en otros países en vías de desarrollo, lo que ha fomentado el interés por obtener nuevas fuentes de alimentación que además de ser de gran valor nutricional, sean económicas y puedan servir como "complemento alimenticio".

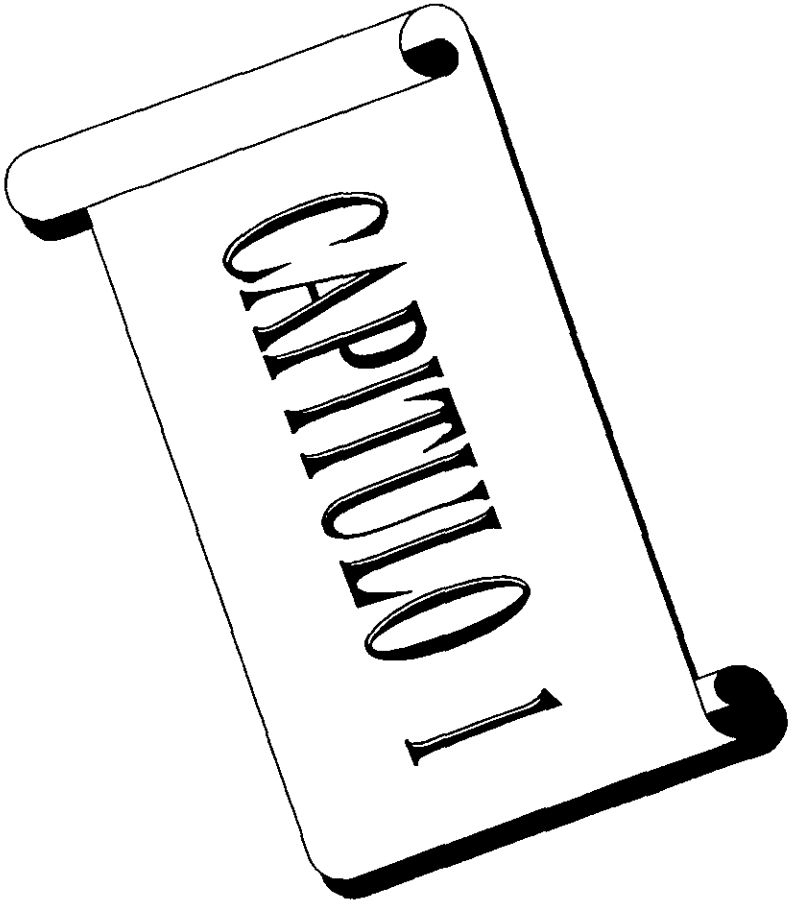
La producción de las semillas no ha sido aprovechada en su totalidad ya que soló en algunas ocasiones se utiliza para el ganado, otra porción menor es utilizada para consumo humano y la mayor parte se deja pudrir en el terreno. Tomando en cuenta que gran parte de la población mundial se encuentra al borde de la desnutrición, esta pérdida de energía almacenada no debería tomarse a la ligera (incluso reconociendo que no debe subestimarse el valor que la materia orgánica representa para la conservación de la fertilidad del suelo).

El cacahuanano es una leguminosa silvestre muy abundante en México. En los estudios previos de la semilla se ha encontrado que tiene un gran valor proteico, por lo que podría ser utilizado tanto para la alimentación animal como humana. Sin embargo, la familia de las leguminosas contienen generalmente factores tóxicos y antinutricionales como: glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, saponinas, alcaloides, factores antivitaminicos, factores que producen flatulencia, taninos, compuestos polifenólicos, aminoácidos no proteicos,

además de otros metabolitos primarios y secundarios que varían dependiendo del género, especie y la zona geográfica en la que se encuentren. ^{1,2}

La química de los productos naturales (Fitoquímica), como es definida actualmente, está relacionada con la formación, estructura y propiedades de los metabolitos secundarios. Estos se relacionan dependiendo del grupo biológico particular, tal como familia, género y especie, debido a que se elaboran a través de rutas especializadas, a partir de metabolitos primarios, los cuales a diferencia de los primeros son esenciales para el desarrollo y formación de la planta.

Este trabajo representa el primer estudio fitoquímico realizado a la semilla de cacahuanano (*Glinicidia sepium*).



ANTECEDENTES

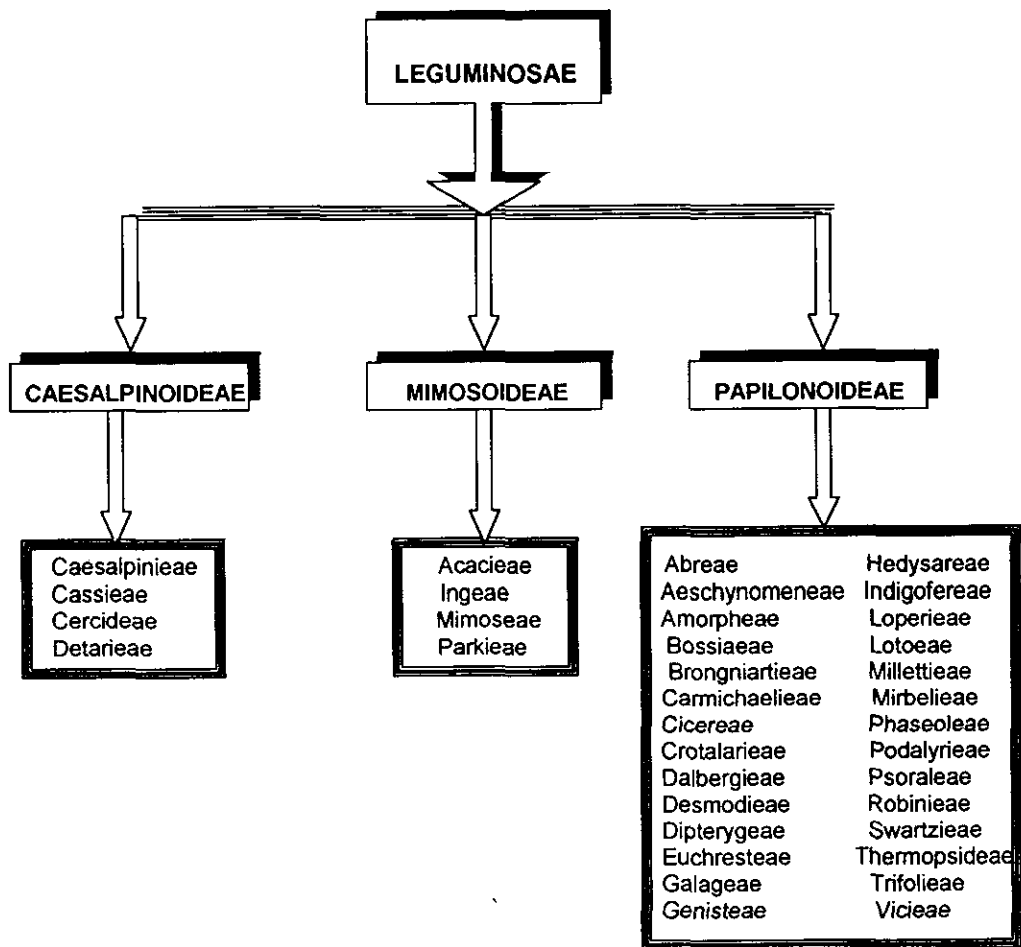
1.1 LEGUMINOSAS.

La familia Leguminosae es, económicamente, la más importante de las dicotiledóneas con muchas especies cultivadas con fines alimenticios o para la producción de forraje. De hecho, las leguminosas, cuya característica principal es que dan fruto o semilla dentro de una vaina, son aprovechadas, sobre todo las Gramíneas (cereales), como productos alimenticios de mayor importancia en el mundo de la agricultura, y por su calidad en proteínas, son considerados alimentos básicos balanceados.

Además en esta familia las plantas son ampliamente utilizadas, como fuente para obtener madera, fibra, goma, resinas, taninos y material para colorantes e insecticidas.

La familia Leguminosae, esta considerada dentro de las tres familias más grandes, con aproximadamente 17,000 o más especies, abarcando una gran diversidad de diminutas hierbas y gigantescos árboles forestales. Sólo dentro de las angiospermas, es superada en número por las familias Compositae y Orchidaceae las cuales comprenden entre 500 y 690 géneros y 12,000 a 17,000 especies.³ En México ocupa el 2º lugar, después de las Compositae, con 37

tribus, 385 géneros y 2678 especies. En el esquema No. 1 se muestra la clasificación de la familia Leguminosae y tribus encontradas dentro de cada subfamilia.



Esquema No. 1 Familia Leguminosae y la relación entre subfamilias y tribus.²

1.2 CACAHUANANO



Figura No. 1 Cacahuanano (*Gliricidia sepium*)

El nombre más común es cacahuanano, que proviene del nahuatl *cacahuanantl*, que se traduce como "madre de cacao". Es llamado así en Sinaloa, Nayarit, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, también se le conoce en esta región como cacahuananche; cocoite (Pichucalco Chiapas); cocuitle (región del Tajín, Veracruz), cocomuite cuchunuc (lengua zoque, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas); chanté (Chiapas),

frijolillo (Temascaltepec, México); guieniiza (lengua zapoteca, Oaxaca); lipa-ca-si-la (lengua chontal, Oaxaca); hipa-ca-ujcum (tzeltal, Chiapas); madre de cacao (Quintana Roo, Jalisco y Chiapas); mata ratón (Chiapas, Panamá y Colombia); muites; multi (región del Tajín Veracruz), sayab (Yucatán); tunduit (lengua mixteca, Oaxaca); yaité (Soconusco, Chiapas); mata rata (Gerrero); jelelelte (lengua huasteca, sureste de San Luis Potosí); flor de San José (sureste de San Luis Potosí); lengua de perico (Veracruz); palo de corral (sureste de San Luis Potosí); primavera (Hidalgo y San Luis Potosí); sangre de dragón (Costa Rica); madera negra (Costa Rica, Panamá y Nicaragua) bien vestida (Peñón Florido, Cuba), palo de hierro, cocoite (América Central), kakawati (Filipinas), gamal (Indonesia), quick stick (Jamaica).⁴⁻⁶

1.2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Clasificación taxonómica:

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu : Robinieae

Genero: *Gliricidia*

Especie: *Gliricidia sepium*

Árbol de hasta 15 m de hojas pinadas, con 7-15 hojuelas ovadas o elípticas de 3-6.5 cm, agudas y pálidas; flores amariposadas de 2.5 cm, blanco-rosadas en

racimos; el fruto esta en vainas aplanadas de 10-15 cm. El follaje sirve de forraje pero la corteza o las hojas son venenosas principalmente para los ratones.⁴

La madera es dura para trabajar y resistente a la humedad, pero la madera del corazón da un buen acabado en artículos de artesanía.⁵

La corteza externa es escamosa, ligeramente fisurada, de pardo amarillenta a pardo grisácea, con protuberancias blancas. La corteza interna es de color crema amarillento, fibrosa.⁵

Las hojas tienen yemas alargadas de 3-5 mm, desnudas, con abundantes pelos sedosos simples especialmente a lo largo de las nervaduras. Las hojas se disponen en espiral, de 12-24 cm de largo incluyendo el peciolo, de forma ovalada o elíptica, verde oscura en el haz, verde grisáceo en el envés. Las hojas se pierden en la época de floración, que es de diciembre a abril.^{4,6}

Las flores se presentan en racimos de 10-15 cm de largo, dispersos, situados en las axilas de las hojas caídas, flores papilionadas, de 2-2.5 cm de largo, estandarte de color lila con una mancha amarillenta en el centro de la cara externa, de 1.8-2 cm de largo, redondeado, alas de color lila en ambas superficies de 2-2.5 cm de largo, anchamente lineares, compuestas de 2 pétalos parcialmente fusionados cerca del ápice, filamentos fuertemente blancos y antenas amarillas, el

color de las flores varía desde tonos muy oscuros, hasta muy pálidos. Florece de diciembre a abril.⁴

Los frutos están en vainas dehiscentes, aguda, con una fina nervadura, aplanadas de 15-20 cm de largo y de 2-3 cm de ancho, verde amarillentas, conteniendo de 4-10 semillas casi redondas, aplanadas de 1-1.4 cm de diámetro, café y brillantes. Los frutos maduran de febrero-marzo y de junio-julio.⁴

1.2.2 HABITAT

La floración corresponde al comienzo de la estación seca cuando los árboles han perdido sus hojas. En su medio natural la floración ocurre de noviembre a marzo. En áreas sin una estación seca pronunciada, la floración puede ocurrir todo el año pero se forman pocas vainas.

Tolera los suelos ácidos, pero no la acidez severa (pH menor a 4.5) ni la saturación alta de aluminio (mayor que 60%). *Gliricidia* coloniza los suelos infértiles y retoña rápidamente después de quemarse y puede así beneficiarse de las quemas. Bajo condiciones óptimas de almacenaje, 6 a 10% del contenido de humedad a 4 °C, la semilla permanece buena durante más de 10 años. A un contenido de 50% de humedad y 17 °C la semilla puede ser almacenada durante un año.⁷

1.2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El verdadero alcance natural de *G. sepium* está restringido a las tierras secas y subhúmedas de las costas del Pacífico de México y Centro América, y adyacente a los valles en tierra seca del interior. Los indígenas de América domesticaron las especies en otras partes de Centro América. Los españoles las introdujeron en el Caribe y en las Filipinas. En el último siglo la *Gliricidia* se ha vuelto común en los trópicos.⁷

Principalmente se encuentra distribuida la *Gliricidia* en:³

- **Africa:** Camerún, Ghana, Nigeria, Sierra Leona, Tanzania, Uganda, Zimbabwe
- **Asia:** Bután, India, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka
- **Australia:** Papua Nueva Guinea, Caribbean
- **América Central:** Costa Rica, El Salvador, México (sureste), Panamá.

1.2.4 USOS

Gliricidia sepium es un árbol versátil de crecimiento rápido, preferido por los agricultores para defensas, viviendas, combustible, forraje, abono verde, sombra, apoyo a cosechas y control de la erosión. Los árboles se han utilizado ampliamente como cercas vivas de terrenos agrícolas ganaderos de zonas tropicales, en gran parte por su facilidad de regenerarse a partir de estacas. Mucho se le ha

utilizado como sombra de plantas de cacao. Los nativos utilizan la madera para construir chozas por su resistencia a pudrirse por la humedad. El ganado puede comer los retoños sin peligro, pero hay partes de la planta que son venenosas para las ratas, ratones y otros roedores.⁴

Los retoños molidos y mezclados con masa de maíz, queso, etc., se usan para matar ratones, perros y otros animales. Los brotes tiernos y las flores son comestibles. Los indígenas utilizaban las hojas para curar el espanto, pasándolas repetidas veces por el cuerpo de la persona "espantada". En Acaponeta, Nayarit, se dan baños con el cocimiento de las hojas contra el paludismo.⁷

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Puesto que tiene muchos usos prácticos, la familia **Leguminosae** ha sido ampliamente investigada con relación a sus metabolitos secundarios, los cuales presentan en su composición una gran variedad de estructuras químicas complejas, (tabla No.1).

Por ejemplo, la familia es especialmente rica en flavonoides, que comprenden alrededor del 28% de todos los flavonoides conocidos y 95% de todos los aglicones de isoflavonoides.^{8-10, 2}

Tabla No.1. Metabolitos secundarios reportados para la familia Leguminosae.²

| COMPUESTO | LOCALIZACIÓN |
|--|---------------------------|
| Alifáticos | Hojas |
| Antraquinonas | Raíces |
| Policetidos | Hojas |
| Carotenoides | Flores |
| Carbohidratos | - |
| Oxígenos heterocíclicos | Flores y hojas |
| Aromáticos simples | Hojas |
| Benzofuranoides | corazón del árbol |
| Benzopiranooides | corazón del árbol |
| Flavonoides | Hojas y corazón del árbol |
| Taninos | - |
| Lignanós | - |
| Policíclicos aromáticos | Hojas y flores |
| Terpenoides (diterpenos, saponinas triterpenoides) | Semillas |
| Esteroides | - |
| Aminoácidos y peptidos | Hojas |
| Alcaloides | Flores y hojas |
| Xantonas | Hojas |
| Furanocumaronas | Hojas |

Los compuestos que comúnmente presenta esta familia son cuatro ácidos hidroxicinámicos tales como: El ácido cafeico, ácido felurico, ácido *p*- coumárico y ácido sináptico. El ácido *o*- cumárico, uno de los raros ácidos fenilpropanoides, ha sido reportado junto con el ácido melotico y cumarinas, en tres miembros de la familia Leguminosae, *Gliricidia sepium* (Galegeae), *Dipteryx odorata* (Dalbergieae) y *Melilotus alba* (Trifolieae).³ *Gliricidia sepium* forma parte de la tribu Robinieae perteneciente a la subfamilia Papilionoideae, esta tribu comprende 11 géneros y 49 especies, (tabla No. 2).

Tabla No.2. Géneros y compuestos presentes en la tribu Robinieae.²

| GENERO | No. ESPECIES | COMPUESTO |
|--------------------------|--------------|---|
| Coursetia | 20 | A, Pe |
| Genistidium | 1 | A, Pe |
| Gliricidia | 3 | A, Pe, As, Bpir, Flav. |
| Hybosema | 1 | A, Pe |
| Lennea | 5 | A, Pe |
| Olneya | 1 | A, Pe |
| Peteria | 4 | A, Pe |
| Poitea | 12 | A, Pe |
| Robinia | 4 | A, Pe, Carb, As, Bpir Flav, Terp, Est, Alcs. |
| Sesbania (Glottidium) | 51 | A, Pe, Flav, Lign, Terp, Est, Alcs. |
| Sphictospermum | 2 | A, Pe, Alcs. |

As= aromáticos simples, Bpir= Benzopiranoideos, Carb= carbohidratos,
Flav= Flavonoides, Est= Esteroides, Alcs= Alcaloides, Terp= Terpenoides,
Lign= Lignanos, A= Aminoácidos y Pe= Peptidos.

La importancia de los constituyentes fenólicos en esta familia ha sido enfatizada por Bate-Smith,¹¹ quien hace notar que "la familia Leguminosae, únicamente entre las dicotiledoneas, contienen compuestos fenil-propanoides representativos". Esto es debido a la dimensión de la familia.

Dentro del Genero *Gliricidia* podemos encontrar tres especies con riqueza fitoquímica: *Gliricidia meistophyllia*, *Gliricida sepium* y *Gliricidia maculata*. Las especies que más se han estudiado son *Gliricidia sepium* y *Gliricidia maculata*, las cuales por su composición similar se reportan en la literatura como una sola especie (Tabla No. 3). Es importante señalar que la actividad biológica que se muestra en la tabla No. 3, no es de los compuestos aislados debido a que se han

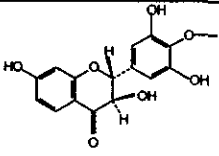
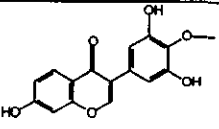
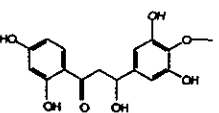
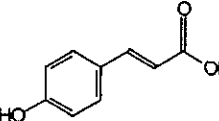
empleado para la evaluación, los extractos MeOH (metanolicos) o fracciones parcialmente puras.^{3,8}

Tabla No.3 Distribución de los constituyentes químicos de las especies del genero *Gliricidia*.

| ESPECIE | COMPUESTO | LOCALIZACIÓN | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|--|---|-------------------|---|
| <i>Gliricidia meistophylla</i> , <i>Gliricidia sepium</i> y <i>Gliricidia maculata</i> | Aminoácidos y Peptidos: canavanina | Semillas | No reportada |
| <i>Gliricidia sepium</i> y <i>Gliricidia maculata</i> | Productos naturales aromáticos simples: Ácido 3-(2-Hidroxifenil) propanoico, ácido 3-(2-Hidroxifenil)-2-propanoico (E); Benzopiranoïdes: 2H-1-Benzopirano-2-ona Flavonoïdes: Kaempferol, 3-o-(Ramnosil galactosido) | Hojas | Las hojas son utilizadas para el tratamiento de infecciones causadas por protozoarios como: <i>Trypanosoma cruzi</i> . ¹² |
| <i>Gliricidia sepium</i> y <i>Gliricidia maculata</i> | Flavonoïdes: Astragalina, Robinin, Trifolin Delphinidin, Quercetin | Flores | Antifungicos contra <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> . ¹³ |
| <i>Gliricidia sepium</i> y <i>Gliricidia maculata</i> | Flavonoïdes: Butin (S), Gliricidol, Gliricidin, IsomucronulatoI, Robinetin, Sepiol, Sepinol, y 2'-o-Metil- sepiol | Corazón del árbol | — |
| <i>Gliricidia sepium</i> | ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido gentísico, ácido β-resorcíclico, ácido vaníllico, ácido siringico, ácido p-coumarico, ácido m-coumarico, ácido o-coumarico, ácido ferulico, ácido sinapínico (cis y trans), coumarinas y Myricetin. | Hojas | Tóxicos, inhiben la germinación de la semilla y la elongación de las raíces de: <i>Sorghum vulgare</i> . ⁶ |

La especie *Gliricidia sepium*, contiene una variedad de metabolitos secundarios. La mayoría contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico (C₆-C₃-C₆), que son dos anillos aromáticos comúnmente unidos por una unidad formada por tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo. Los flavonoides, chalconas y cumarinas son algunos de los constituyentes característicos de este género, (tabla 3 y 4).

Tabla No. 4. Metabolitos secundarios encontrados en *Gliricidia sepium*, en hojas, flores y corazón de la corteza del árbol

| ESTRUCTURA QUÍMICA | NOMBRE | LOCALIZACIÓN | pf (°C) | SOLUBILIDAD |
|---|---|-------------------|---------|-------------|
|  | Sepinol C ₁₆ H ₁₄ O ₇ (2R)-(3R)-(-)-4'-metoxi 1-3',5',7-trihidroxidihidroflavonol | Corazón del árbol | 253-254 | EtOH |
|  | Gliricidin (C ₁₆ H ₁₂ O ₆) 4'-metoxi-3'-5',7-trihidroxiisoflavona | Corazón del árbol | 298 | MeOH |
|  | Gliricidol (C ₁₆ H ₁₆ O ₇) (4'-metoxi-β-2',3',4',5'-pentahidroxidihidrochalcona | Corazón del árbol | 165-166 | EtOH |
|  | Ác. p-cumarico (C ₉ H ₈ O ₃) ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico | Hojas | 210-213 | EtOH y eter |

| | | | | |
|--|--|-------|---------|------------------------|
| | Ac. Vainillico ($C_8H_8O_4$) ác. 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico | Hojas | 210 | EtOH y eter |
| | Ac. Gentsico ($C_7H_6O_4$) ác. 2-5-Dihidrobenzoico. | Hojas | 199-200 | EtOH |
| | Ac. Galico ($C_7H_6O_5$) ác. 3,4,5-Trihidrobenzoico | Hojas | - | EtOH, Acetona |
| | Coumarina ($C_9H_6O_2$) 2H-1-Benzopirano-2-ona | Hojas | 68-70 | Cloroformo, eter, EtOH |
| | Myrcetin ($C_{15}H_{10}O_8$) 3,5,7-Trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona | Hojas | 357 | EtOH |

Normalmente los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y se encuentran generalmente en todas las partes de la planta, incluyendo hojas, raíces, néctar, polen, flores, bayas y semillas (Figura No.1).¹⁴

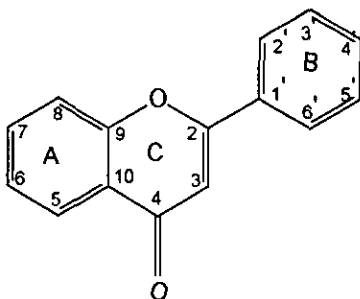


Figura No 2. Estructura de un flavonoide simple.

Dentro del grupo de los flavonoides se agrupan los compuestos denominados chalconas, los cuales son flavonoides de cadena abierta, en donde los dos anillos aromáticos están enlazados por 3 átomos de carbono, mediante sistema carbonilo α,β - insaturado. En estos compuestos los anillos aromáticos se encuentran hidroxilados en mayor o menor grado, estas chalconas se distribuyen en la naturaleza en el corazón y corteza de los troncos de los árboles, hojas, frutas y raíces (Figura No. 2).¹⁴

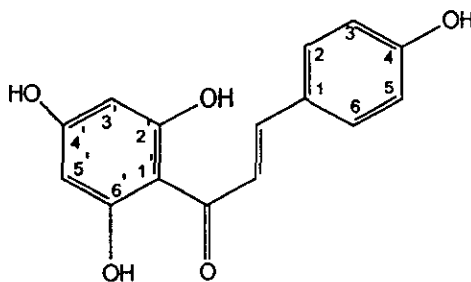


Figura No 3. Estructura de una chalcona simple, 4-hidrochalcona

Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos naturales; a los cuales se les considera derivados de la lactona de ácido *o*- hidroxicinámico, usualmente llamada cumarina, (Figura No. 3). La mayoría de las cumarinas encontradas en *Gliricidia sepium* se encuentran en su forma libre, aún cuando, en algunas especies de la familia Leguminosae se han aislado como glicósidos. Las cumarinas se encuentran generalmente en cualquiera de los órganos vegetales, desde las raíces hasta flores y frutos.¹⁴

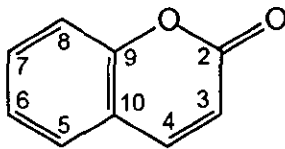


Figura 4. Estructura de una cumarina simple

1.3.1 ANALISIS BROMATOLOGICO

En las semillas la composición mayoritaria se divide en carbohidratos y lípidos, siendo éste el más común y económicamente importante. No se conoce que las proteínas sean el material predominante, sin embargo, pueden haber excepciones como en el caso de la semilla de soya o *Macherium acutifolium*, que se ha reportado por contener 42.57% de proteínas. Precisamente esta información sobre la composición de las semillas, se considera como uno de los usos importantes dentro de la industria alimenticia.^{15, 16}

Los constituyentes de la semilla se determinan genéticamente, sin embargo la relativa acumulación de estos constituyentes en muchas ocasiones depende de factores ambientales como son la nutrición mineral y clima. De tal manera que la deficiencia en sulfuros, fosfatos o potasio, induce cambios en la acumulación relativa de diferentes proteínas en las semillas.¹⁵

En las tablas No. 5 y 6 se ilustra la variación en la composición de las semillas y cereales, en estas tablas se puede apreciar que generalmente la semilla de

soya, contiene un 42.57% de proteínas y 17% de aceite, lo cual indica que la proteína es el principal componente de la semilla a diferencia de la semilla de cacahuate con 31 % de proteínas y 48% de aceite.^{17, 18} El análisis bromotológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*), (g/100 g. de muestra), se muestra en la tabla 7.^{19, 20}

Tabla No. 5. Composición química de semillas.¹⁵

| NOMBRE COMÚN | NOMBRE CIENTÍFICO | CHO'S (%) | PROTEINAS (%) | ACEITES (%) |
|-----------------------|-------------------------------|-----------|---------------|-------------|
| Maíz de palomitas | <i>Zea mays</i> | 1-4 | 10 | 5 |
| Chicharo | <i>Psum sativum</i> | 4-6 | 20 | 2 |
| Cacahuate | <i>Arachis hypogea</i> | 12 | 31 | 48 |
| Girasol | <i>Helianthus annuus</i> | 2 | 25 | 45-50 |
| Ricino | <i>Ricinus communis</i> | 0 | 18 | 64 |
| Maple | <i>Acer saccharinum</i> | 20 | 27.5 | 4 |
| Arroz del Perú | <i>Chenopodium quinoa</i> | 48 | 19 | 5 |
| Castaña para caballos | <i>Aesculus hippocastanum</i> | 68 | 7 | 5 |
| Linasa | <i>Linum usitatissimum</i> | 23 | 23 | 34 |
| Brocoli | <i>Brassica rapa</i> | 25 | 20 | 34 |
| Semilla de soya | <i>Macherium acutifolium</i> | 23.10 | 42.57 | 17 |
| Haba | <i>Vicia faba</i> | 58.05 | 27.60 | 1 |
| Frijol | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 60.09 | 24.0 | - |
| Lenteja | <i>Eruum Lens</i> | 59.09 | 19.40 | - |
| Alverjon | <i>Pisum sativum</i> | - | 20.40 | - |
| Alubia grande | <i>Phaseolus vulgaris</i> | - | 20.20 | - |
| Amaranto | <i>Amaranthus caruentus</i> | 76.50 | 7.20 | - |
| Almendra | <i>Terminalia catappa</i> | 3.85 | 27.50 | 45-50 |
| Ajonjoli | <i>Sesamun indicum</i> | 13.29 | 20.60 | 39 |

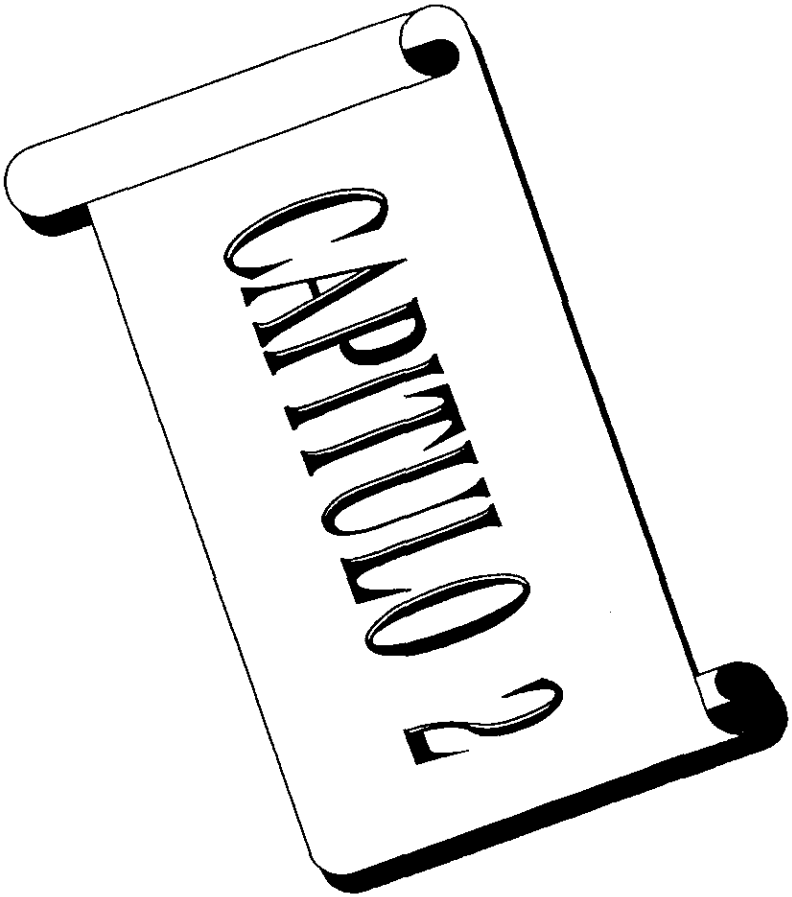
Tabla No. 6. Composición química de los granos de cereales ⁽¹⁷⁾.

| NOMBRE COMÚN | NOMBRE CIENTÍFICO | CHO'S (%) | PROTEÍNAS (%) | ACEITES (%) |
|----------------|------------------------|-----------|---------------|-------------|
| Trigo | <i>Triticum</i> | 9 | 13.2 | 2 |
| Sorgo | <i>Sorghum vulgare</i> | 70.9 | 11 | 3.2 |
| Centeno | <i>Secale cereale</i> | 71.7 | 12.4 | 1.3 |
| Cebada | <i>Hordeum vulgare</i> | 66.4 | 10 | 1.5 |
| Arroz (pulido) | <i>Oryza sativa</i> | 78.2 | 8.6 | 0.4 |
| Avena | <i>Avena sativa</i> | 66.4 | 13.3 | 6.2 |

Tabla No. 7. Análisis bromatológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*),

| COMPOSICIÓN | MUESTRA CRUDA | MUESTRA COCIDA |
|---------------|---------------|----------------|
| Humedad | 7.04 | 4.39 |
| Cenizas | 4.18 | 4.53 |
| Proteínas | 42.78 | 41.83 |
| Grasa cruda | 24.52 | 29.46 |
| Fibra cruda | 6.73 | 10.72 |
| Carbohidratos | 21.79 | 13.46 |

De acuerdo a los datos ilustrados en las tablas No. 5, 6, y 7, la semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*), contiene una mayor cantidad de proteínas que los enunciados anteriormente lo cual hace notar su importancia como complemento alimenticio.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*) es una leguminosa silvestre muy abundante en México. En los estudios previos de la semilla se ha encontrado que tiene un gran valor proteico, por lo que podría ser utilizado tanto para la alimentación animal como humana.

Dentro de las exigencias de la calidad en un producto esta el interés por satisfacer las necesidades del consumidor y evitar daños posteriores por el consumo prolongado como en el caso de la alimentación. En este contexto el trabajo se enfoca al estudio de fuentes nutricionales alternas. Uno de sus objetivos es determinar la toxicidad e identificación de los elementos responsables de la misma. En el presente proyecto se seleccionó la semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*), colectada entre Puerto Marqués y Pinotepa Nacional (Guerrero-Oaxaca) en el mes de marzo, como objeto de estudio.

Mediante un fraccionamiento biodirigido se procedió a analizar esta semilla, empleando el ensayo con *Artemia salina*, se determinó cuales son los extractos, fracciones y compuestos biológicamente activos.

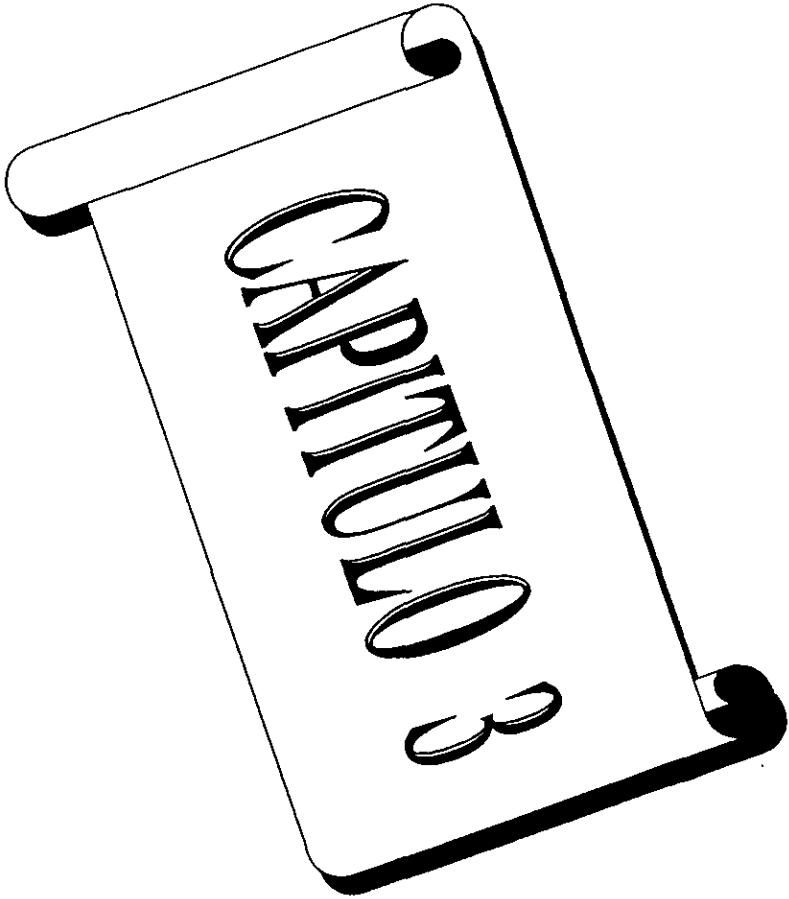
OBJETIVOS

a.- General

- Aislamiento, purificación e identificación de los compuestos bioactivos, presentes en la semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

b.- Particulares

- Obtención de los extractos orgánicos de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*), empleando disolventes orgánicos.
 - Determinar, por medio de un bioensayo simple (*in vitro*), la toxicidad de los extractos obtenidos de la semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*).
 - Aislamiento y purificación de los compuestos bioactivos, por medio de técnicas cromatográficas.
 - Elucidación estructural de los compuestos bioactivos mediante técnicas espectroscópicas tales como: RMN ^1H y ^{13}C , Espectrometría de masa, IR, U.V y Rotación óptica.
-
-



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1 Material, equipo y reactivos

La semilla de cacahuanano se colectó en la localidad de Puerto Marqués y Pinotepa Nacional (Guerrero-Oaxaca) en el mes de marzo de 1997, época en la cual la semilla se encuentra en su estado de maduración, por el M. en C. Bernardo Lucas. La semilla desvainada y desecada a temperatura ambiente, se fragmentó en un molino de aspas, Modelo Thomas-Wiley (Laboratory Mill), utilizando la malla de 2 mm de diámetro de partícula.

Para la cromatografía en columna se empleó gel de sílice Merck 60, con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (malla 70-230).

El análisis del desarrollo de la cromatografía en columna, aislamiento y purificación de los compuestos se realizó en CCF analítica bajo métodos convencionales, empleando cromatoplasmas de vidrio recubiertas con gel de sílice de Merck 60 F₂₅₄ espesor de 0.2 mm y sílica gel de fase reversa RP-8 F₂₅₄S Merck, de 0.25 mm de grosor. Los sistemas de elución y reveladores empleados se listan en los cuadros 2 y 3, respectivamente.

La purificación de los compuestos, se realizó en cromatoplasmas de fase reversa, RP-8 F₂₅₄S (Merck), de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de grosor.

Todos los disolventes orgánicos se destilaron a presión reducida y en el caso del alcohol *n*-butílico (*n*- BuOH) se eliminó *in vacuo*.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Nicolet FT-55x en pastilla. Las unidades se indican en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (300 MHz) y Varian VxR-300S (75 MHz), respectivamente, utilizando como disolvente CD_3OD .

Los espectros de masas se determinaron por el método de FAB⁺ con matriz de glicerol y fueron obtenidos en un espectrofotómetro de masas JOEL Sx102 en un voltaje acelerado de 10 Kv.

Los huevecillos de *Artemia salina* se eclosionaron en un termo-baño Mod. Felisa a una temperatura de 30-35°C, los medios de incubación y eclosión se mencionan en el cuadro 1.

La CL_{50} , se determinó mediante un programa basado en el análisis de probits de Finney, para datos cuantales, diseñado en la Universidad de Purdue (West Lafayette IN).

MEDIOS
(Evaluación en *Arteria salina*)

- Solución Salina
- Buffer de fosfatos (PBS) pH=7.2

Cuadro 1

| | | |
|---|------------|---------------------------------------|
| A | 9:1 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH |
| C | 85:15 | CH ₂ Cl ₂ :MeOH |
| D | 60:40 +0.5 | H ₂ O: Acetona +THF |
| E | 9:1 | Hexano:AcOEt |
| F | 4:6 | Hexano:AcOEt |

Cuadro 2

REVELADORES

- Sulfato cérico
- Anisaldehido
- Dragendorff
- Luz UV (254nm)

Cuadro 3

En la figura No 5, se muestra el diagrama de flujo que señala los diferentes procesos que se llevaron a cabo para la obtención de los compuestos biológicamente activos, presentes en la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

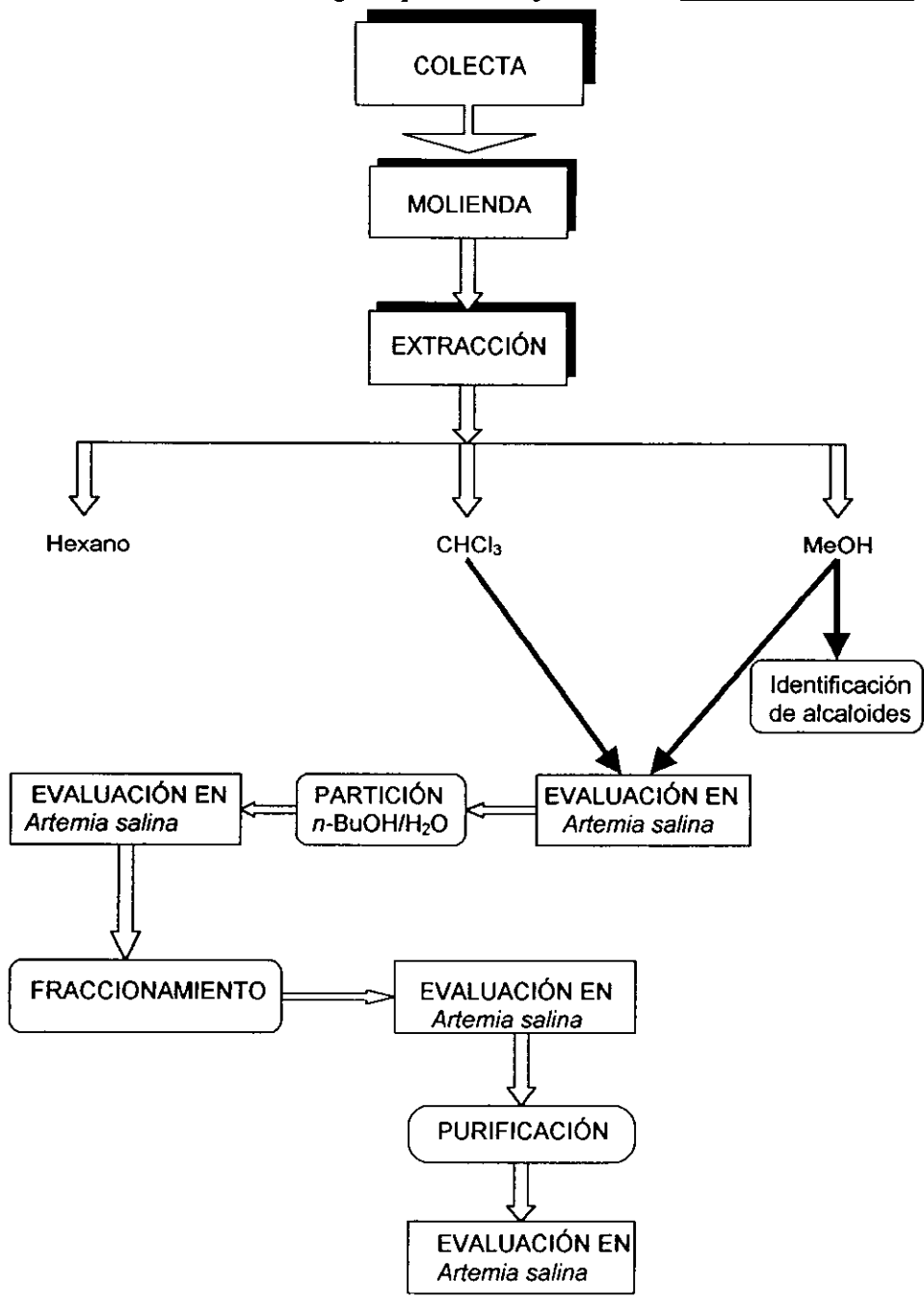


Figura No. 5. Esquema general de trabajo

3.2 Extracción y evaluación en *Artemia salina*

700g de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*) previamente desecadas a temperatura ambiente, se fragmentó con un molino de aspas y malla de 2 mm de diámetro. Al material fragmentado se le realizaron las siguientes extracciones:

Tabla No. 8 Extractos obtenidos de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

| DISOLVENTE | TIEMPO DE EXTRACCIÓN (días) | CANTIDAD OBTENIDA (g) | RENDIMIENTO (%) en peso |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Hexano | 10 | 178.46 | 25.49 |
| CHCl ₃ | 4 | 7.01 | 1.00 |
| MeOH | 14 | 129.85 | 18.55 |

Se colocó el material vegetal fragmentado en un sistema de extracción continua (Soxhlet) con 1800 mL de cada uno de los disolvente, los cuales en todos los casos, eran renovados cada 3^{er} día de extracción.

La extracción con hexano y subsiguiente eliminación del disolvente produjo un aceite de color amarillo.

El material vegetal desengrasado y seco se extrajo con CHCl₃ durante dos días en maceración y dos días en soxhlet. El color del extracto obtenido fue verde oscuro.

Por último, se extrajo la semilla seca con MeOH en el mismo sistema, se realizaron cinco extracciones: tres de ellas se obtuvieron de un proceso de dos días c/u y el cuarto extracto MeOH se obtuvo dejando una semana en el soxhlet y el quinto extracto se obtuvo de tres días de extracción en el soxhlet.

Cada uno de los extractos metanólicos se analizaron mediante CCF, con el sistema de elución C (eluyendo primero una tercera parte de la placa y después una corrida completa), y se observó que no existía diferencia en composición por lo tanto se mezclaron para ser analizados posteriormente. Dicho extracto era de color café y presentó apariencia de jarabe.

El análisis cromatografico en (CCF), (sistema de elución E y Cx2) de los extractos obtenidos, permitió observar diferentes compuestos mayoritarios que revelaban tanto al U.V como con el CeSO₄ (sulfato cerico) y sus valores de R_f se muestran en la tabla No. 9.

Tabla No.9. Análisis por CCF de los extractos obtenidos

| Sistema de elución: 9:1 Hexano:AcOEt. Revelador: Sulfato Cérico | |
|--|--------------------------------------|
| Extracto | R_f |
| Hexano | 0.907, 0.804, 0.430, 0.217 |
| Cloroformo | 0.907, 0.740 |
| Metanol | no eluye |
| Sistema de elución: 85:15 Cl₂H₂:MeOH*2. Revelador: Sulfato Cérico | |
| Extracto | R_f |
| Hexano | 1 |
| Cloroformo | 1, 0.927, 0.903, 0.843, 0.698, 0.578 |
| Metanol | 0.927, 0.710, 0.313 |

EVALUACION TOXICOLOGICA EN EL CRUSTACEO (*Artemia salina*)^(23,24)

Proceso de eclosión de los huevecillos de *Artemia salina*.

NOTA: Todo el material que se emplea para la prueba con *Artemias*, se debe lavar con jabón en polvo nuevo, sin mezclar con otros materiales que lo

puedan contaminar, enjuagar con agua destilada, después con alcohol al 70 % y finalmente dejar secar.

Después se prepara una solución salina (SS) con 38 g de sal (Ocean Instant, mantenida en desecador) por cada litro de agua destilada.

La cantidad de huevecillos que se adicionan variará dependiendo del número de concentraciones y repeticiones a realizar (1 mg de huevecillos/ vial). La solución salina se debe oxigenar durante 2 horas, antes de adicionar los huevecillos. En caso de que haya una gran producción de artemias, se puede oxigenar nuevamente el medio de incubación durante 30 minutos.

Evaluación toxicológica con *Artemia salina*.

Para la realización de la prueba se requieren artemias obtenidas de un proceso de eclosión de **48 horas**.

Preparar cada una de las concentraciones del extracto o sustancia a evaluar utilizando un disolvente que no sea tóxico y genere falsos positivos. Para obtener las concentraciones se debe considerar el volumen que se adicionará en los viales del medio de prueba, ya sea solución salina comercial, PBS (solución de fosfatos) o solución salina con solución amortiguadora (pH=9).

La prueba se realiza por triplicado y un blanco para cada una de las concentraciones. El blanco contiene el disolvente en el que es soluble la muestra original, la cantidad depende la concentración que represente, y 9 mL del medio seleccionado.

54 mg de c/u de los extractos, se disolvieron en 600 μ L de DMSO 3% los extractos hexánico y cloroformico, el extracto Metanolico se disolvió en 600 μ L de MeOH; de estas soluciones (90000 μ g/mL), se tomaron alicuotas de: 100 μ L, 50 μ L y 5 μ L, las cuales se llevaron a 9 mL de PBS pH=7.2, que contienen previamente 10 artemias, con esto se tiene una concentración de 1000ppm, 500 ppm, 50ppm, respectivamente.

El extracto *n*- BuOH se evaluó en *Artemia salina* (crustáceo), para lo cual se tomaron 27.0 mg y 54.0 mg de extracto se aforaron a 1200 μ L y 600 μ L respectivamente, dando así una concentración de 22500 μ g/mL de donde se tomaron alicuotas de 100 μ L, 40 μ L y 4 μ L y de 90000 μ g/mL, 100 μ L, 50 μ L y 5 μ L, en ambos casos se llevaron a un volumen final de 9 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) pH=7.2, en donde se tenían previamente 10 artemias para así obtener concentraciones de 250 ppm, 100 ppm, 10 ppm de la primera concentración y , 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm de la segunda concentración.

Antes de adicionar las artemias a los viales se deberán lavar previamente con el medio que se elija para hacer la prueba de toxicidad. Lo anterior se realiza tomando el mínimo del volumen del medio de incubación junto con las *Artemias* y transfiriendo a un volumen aproximado de 20 mL de PBS pH= 7.2.

El tiempo de incubación en medio PBS pH= 7.2 es de 16 horas. Tapar los viales con un vidrio a una altura de 1 cm aproximadamente, por encima del vial, colocar una lampara a 30 cm por encima del nivel del vidrio colocado en los viales.

Después de completar el tiempo de incubación realizar la lectura de artemias vivas y muertas de cada concentración.

Cada uno de los extractos obtenidos, (ver Tabla No.8), se evaluaron en *Artemia salina* (crustáceo). Los resultados de esta evaluación se indican en la Tabla No.10.

Tabla No.10. Análisis de evaluación toxicológica sobre *Artemias salinas*. La CL_{50} , se calculó por probits.

| EXTRACTO | 50 ppm | 500 ppm | 1000 ppm | CL_{50} (ppm) |
|----------|--------|---------|----------|--------------------|
| Hexano | - | - | - | - |
| $CHCl_3$ | 8 | 3 | - | 619.49 |
| MeOH | 8 | 4 | - | 546.44 |

Al extracto MeOH que resultó más activo, se le realizaron placas cromatograficas (ccf), con el sistema de elución C (primero se eluyó la tercera parte de la placa y después una elución completa), y se revelaron con Dragendorff para identificación de alcaloides. Los compuestos que revelaban al U.V dieron resultados (-) con el revelador.

En ensayos posteriores con *Artemia salina* (crustáceo), realizados al extracto metanolico, se observó que conforme pasaba el tiempo, la actividad del extracto disminuía.

Debido a que se realizaron placas cromatograficas (ccf), empleando el sistema de elución (C), para determinar la presencia de alcaloides, empleando como revelador Dragendorff, las cuales dieron como resultado prueba (-), para

asegurar la ausencia de alcaloides se realizó una partición ácido/base del extracto metanólico. La supuesta fracción de alcaloides, se analizó con (ccf), el sistema de elución (C) y como revelador el reactivo Dragendorff, resultando negativo el ensayo.

Por la apariencia del extracto metanólico y su disminución en actividad toxicológica, debida posiblemente a la presencia de azúcares que favorecen la oxidación de los compuestos presentes en el extracto, se procedió a la detección de carbohidratos en el extracto, para lo cual se realizaron placas cromatograficas (ccf), empleando el sistema de elución C (primero se eluyó una tercera parte de la placa y después una elución completa), y como revelador p-anisaldehido para detectar la presencia de carbohidratos, siendo el resultado positivo. Por lo anterior, se procedió a realizar un proceso de partición *n*-BuOH/H₂O (alcohol *n*-butílico/agua), con el fin de eliminar los carbohidratos del extracto MeOH.

Inicialmente, 100g de extracto MeOH, se suspendieron en 800 mL de H₂O y se extrajeron con 400 mL de *n*- BuOH, se repitió la extracción con tres porciones de 260 mL de *n*-BuOH c/u y finalmente con cinco porciones de 130 mL c/u.

Por análisis cromatografico en ccf, empleando el sistema de elución (Cx2) y empleando como revelador CeSO₄, se observo que las fases orgánicas eran similares en composición, por lo que se mezclaron y se eliminó el disolvente a presión reducida (*in vacuo*).

El extracto obtenido fue un sólido de color amarillo-café, 18.13 g (18.13% de rendimiento).

Se realizaron placas cromatograficas de este extracto *n*- BuOH, empleando el sistema de elución (Cx2) y utilizando como revelador anisaldehído y sulfato cérico, se observaron compuestos que se observaban a luz U.V y con sulfato cérico dio resultado (+) y con anisaldehído (-).

El extracto *n*- BuOH se evaluó en *Artemia salina* (crustáceo). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 11.

Tabla No.11. Análisis de evaluación toxicológica sobre *Artemias salinas*. La CL₅₀, se calculó por probits.

| EXTRACTO | 10 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 1000 ppm | CL ₅₀ (ppm) |
|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|---------------------------|
| <i>n</i> - BuOH | - | - | 1 | 4 | 7 | 10 | 292.47 |

3.3 Fraccionamiento y evaluación en *Artemia salina* (crustáceo):

El extracto butanólico (15g), se sometió a un proceso de fraccionamiento de cromatografía, en columna abierta (cc), la porción de gel de sílice (SiO₂) empleada fue de 8 g de SiO₂ por cada gramo de extracto (120 g) y una octava parte del SiO₂ (15 g) para adsorber el extracto, empleando como eluyente CH₂Cl₂, con incrementos graduales de MeOH. Las fracciones obtenidas se listan en la Tabla No.12.

Tabla No. 12. Fraccionamiento del extracto butanólico

| FRACCIONES | SISTEMA DE ELUCIÓN |
|------------|---|
| 1 | CH ₂ Cl ₂ |
| 2 | CH ₂ Cl ₂ + 2.0%MeOH |
| 3 | CH ₂ Cl ₂ + 3.0%MeOH |
| 4 | CH ₂ Cl ₂ + 5.0%MeOH |
| 5 | CH ₂ Cl ₂ + 7.0%MeOH |
| 6 | CH ₂ Cl ₂ + 8.0%MeOH |
| 7 | CH ₂ Cl ₂ + 9.0%MeOH |
| 8 | CH ₂ Cl ₂ + 11.0%MeOH |
| 9 | CH ₂ Cl ₂ + 13.0%MeOH |
| 10 | CH ₂ Cl ₂ + 15.0%MeOH |
| 11 | CH ₂ Cl ₂ + 19.0%MeOH |

Las fracciones 1,3,5,7,9,11, se evaluaron en *Artemia salina* (crustáceo). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 13.

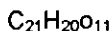
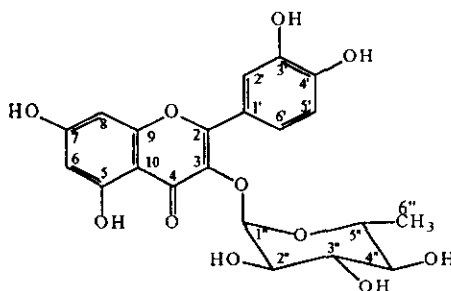
Tabla No.13. Análisis de evaluación toxicológica sobre *Artemias salinas*.
La CL₅₀, se calculo por probits.

| FRACCION | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm | CL ₅₀ (ppm) |
|----------|-----------|-----------|------------|------------|---------------------------|
| 1 | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - |
| 5 | 0 | 3 | 7 | 9 | 79.43 |
| 7 | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | 2 | 5 | 241.27 |
| 11 | - | - | 6 | 9 | - |

3.4 Aislamiento y evaluación en *Artemia salina*

La fracción 5 obtenida de la cromatografía en columna, se analizó con placas cromatográficas (ccfa) de fase reversa analíticas, empleado el sistema de elución D (ver cuadro No.3), con el cual se observó un compuesto mayoritario, el cual fue aislado y purificado mediante las condiciones señaladas anteriormente. De aquí se obtiene el compuesto 1. Sus características físicas y espectroscópicas se muestran a continuación.

Compuesto No. 1:



Cristales amarillos solubles en MeOH, con $pf = 168-170\text{ }^{\circ}C$ y $R_f = 0.357$ (sistema de elución D), UV λ_{max} , nm, MeOH) 255.01, 348.35. IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} 3406.04 (C-OH), 1654.87 (C=O), 1526.67 y 1607.40 (C=C aromático), 1087.89 y 1059.84 (C-O), $[\alpha]_D^{25} = -923$, (FAB⁺) con matriz de glicerol, muestra un pico a 449 (M+1).

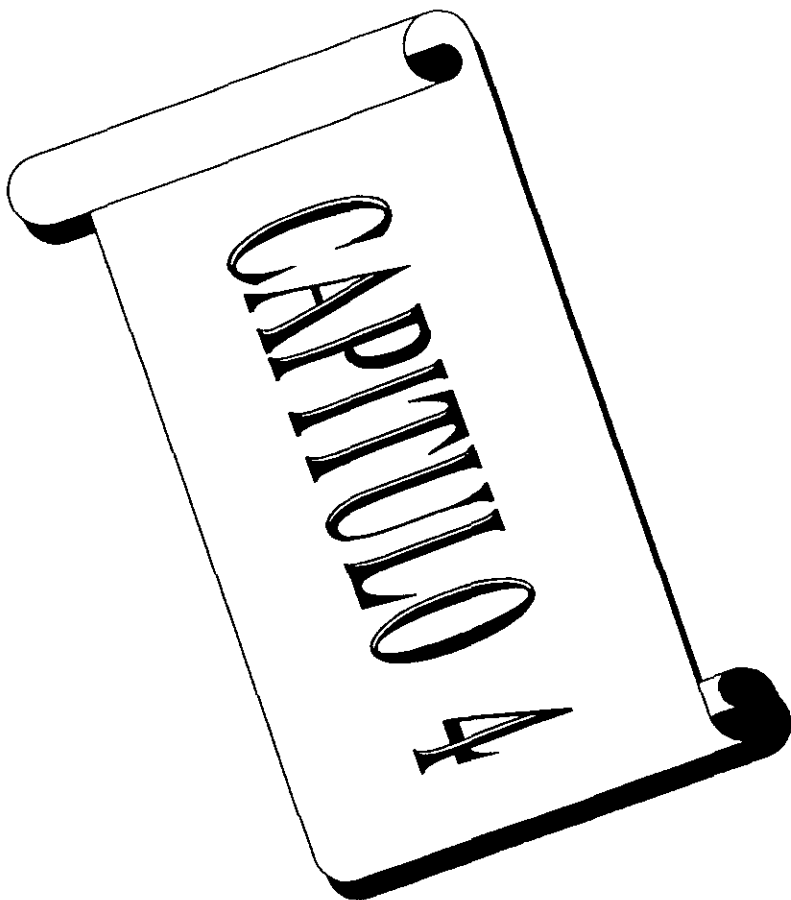
Tabla 14. RMN¹H (CD₃OD, 300.2 MHz) y ¹³C (CD₃OD, 75.5 MHz), del compuesto 1.

| Posición | RMN ¹ H | ¹³ C (ppm) |
|----------|-----------------------------------|--------------------------|
| 2 | | 158.54, s |
| 3 | | 136.23, s |
| 4 | | 179.66, s |
| 5 | | 163.22, s |
| 6 | 6.20 ppm, (1H,d), J= 2.1 MHz | 99.80, d |
| 7 | | 165.88, s |
| 8 | 6.37 ppm, (1H,d), J= 2.1MHz | 94.70, d |
| 9 | | 159.32, s |
| 10 | | 105.80, s |
| 1' | | 122.90, s |
| 2' | 7.34 ppm, (1H,d), J= 2.1 MHz | 116.90, d |
| 3' | | 146.42, s |
| 4' | | 149.81, s |
| 5' | 6.91 ppm, (1H,d), J= 8.4 MHz | 116.30, d |
| 6' | 7.29 ppm, (1H,dd), J= 2.1,8.1 MHz | 122.85, d |
| 1" | 5.34 ppm, (1H,d), J= 1.5 MHz | 103.50, d |
| 2" | 3.74 ppm, (2H,dd), J= 9.45 MHz | 72.10, d |
| 3" | 3.74 ppm, (2H,dd), J= 9.45 MHz | 72.00, d |
| 4" | 3.41 ppm, (1H,dq), J= 9.75 MHz | 73.25, d |
| 5" | 4.21 ppm, (1H,dd), J= 3.3 MHz | 71.90, d |
| 6" | 3.32 ppm, (3H,d), J= 6.0 MHz | 17.65, q |

El compuesto 1, se evaluó en *Artemia salina* (crustáceo). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 15.

Tabla No.15. Análisis de evaluación toxicológica sobre *Artemias salinas*. La CL₅₀, se calculó por probits.

| COMPUESTO | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 250 ppm | CL ₅₀ |
|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------------|
| 1 | 0 | 1 | 4 | 6 | 167.84 |



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los extractos evaluados variaron en composición dependiendo de la polaridad del disolvente empleado durante la extracción; esto se logra apreciar, al comparar el R_f de los compuestos presentes en los diferentes extractos (ver tabla 9). Al emplearse un sistema de elución poco polar (9:1 Hexano: AcOEt), se observaron diferencias en la composición de cada uno de los extractos, de igual manera cuando se utilizó un sistema de mayor polaridad (85:15 CH_2Cl_2 :MeOH).

Durante la realización de este estudio se observó que el extracto MeOH recién obtenido presentaba toxicidad, sin embargo, esta disminuía con el paso del tiempo. Lo anterior se atribuyó a la presencia de carbohidratos en el extracto MeOH, los cuales promueven la oxidación de los otros compuestos. Por esta razón se realizó la partición con *n*-BuOH/ H_2O (ver el Diagrama 1), con el fin de eliminar los carbohidratos. La evaluación biológica del extracto *n*-BuOH mostró una toxicidad mayor que el extracto MeOH (ver la tabla 3 y 4), además de que esta actividad se mantuvo sin variación con el paso del tiempo.

Del extracto butanólico de la semilla de *Gliricidia sepium* (Leguminosae), se aisló e identificó el siguiente compuesto:

Compuesto 1:

Este compuesto es un sólido de color amarillo de $pf= 168-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $Rf= 0.357$ (sistema de elución D).

El espectro de U.V. muestra bandas características para flavonoides ⁽²⁵⁾, consistiendo de dos bandas, una en el rango de 240-285 nm (banda II) y 300-400 nm (banda I), mostrando este compuesto absorciones máx de 255.01(banda II), causada por el sistema benzoilo y 348.35 nm (banda I) causada por el sistema cinamoilo, ver fig. 1.

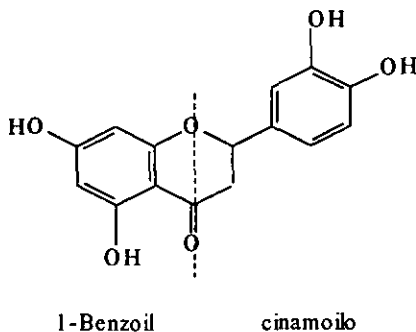


Figura 1.

En su espectro de IR (espectro 1) se observa una banda a 3406 cm^{-1} que indica la vibración causada por el grupo hidroxilo (-OH), la banda de 1654.87 corresponde a un grupo carbonilo (C=O), las bandas de 1526.67 y 1607.40 indican la vibración del sistema insaturado (C=C) aromático, las bandas de 1087.89 y 1059.84 corresponden a la vibración (C-O).

Por otra parte, en el espectro de RMN^1H (espectro 2), se observa una señal a 6.91 ppm , (1H,d), $J=8.4\text{ Hz}$, que corresponde a un protón de un anillo aromático

vecino a un carbono que soporta un grupo electrodonador, como es el caso de un grupo hidroxilo, lo cual esta en concordancia con la banda que se observa en el espectro de IR, además su patrón y constante de acoplamiento indica la vecindad con un protón, en relación orto, dicho patrón se presenta a 7.29 ppm como una señal doble de doble con constantes de acoplamiento de 2.1 y 8.1 Hz. La primera constante de acoplamiento corresponde a un acoplamiento con otro protón en relación meta y que se encuentra a 6.91 ppm.

El análisis del experimento COSY (espectro 3), corrobora las asignaciones de acoplamiento señaladas anteriormente.

La señal de la región aromática en 7.34 ppm, está acoplada con la señal de 6.91ppm, correspondientes a los protones H-2' y H-5' respectivamente. Se propone el siguiente fragmento parcial para este patrón de sustitución:

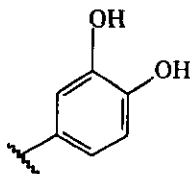


Figura 2.

Además, se observa una señal doble (d) ($J = 2.1\text{Hz}$), a 6.37 ppm, que esta acoplada a la señal doble de 6.20 ppm, ($J = 2.1\text{ Hz}$). Esto indica una relación meta entre estos dos protones y debe estar en el anillo aromático A. Debido a que no se observan señales correspondientes a grupos metóxilos, se asume que existen

únicamente grupos hidroxilo en la molécula. En la figura 3, se muestra este patrón de sustitución.

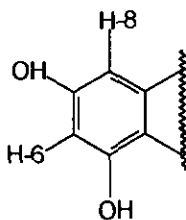


Figura 3.

Tomando en consideración los datos del espectro de IR y los datos mencionados anteriormente, podemos proponer la siguiente estructura parcial, ver figura 4.

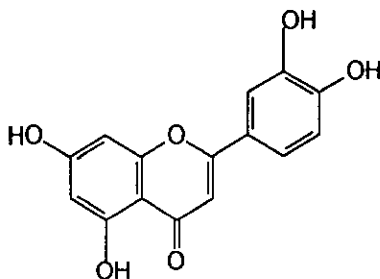


Figura 4.

En el espectro de ^{13}C (espectro 4), del compuesto 1, se observan 21 átomos de carbono. Considerando la estructura parcial de la figura 4, la cual consta de 15 átomos de carbono, restan 6 átomos de carbono, los cuales forman parte de una hexosa. La señal a 103.50 ppm corresponde al carbón anómero del azúcar, las señales a 73.25 ppm (d), 72.1 ppm (d), 72.0 ppm(d) y 71.9 ppm(d), corresponden a

átomos de carbono unidos a oxígeno y la señal a 17.65 ppm(q), que corresponde a un grupo metilo de acuerdo al espectro DEPT (espectro 5), permite proponer la presencia de un residuo glicosídico de tipo ramnosa ^(26,27). Por otra parte, la señal a 179 ppm se asigna al carbono del grupo carbonilo de la posición 4, característico de un flavonoide. Posteriormente se observan 6 átomos de carbono totalmente sustituidos (ipso), a los cuales se les asignaron los siguientes carbonos: la señal a 165.88 ppm el C-7, 163.228 el C-5, 159.32 el C-9, 159.54 el C-2, 149.81 el C-4' y 146.42 el C-3', estas señales mostraron desplazamientos de carbonos de tipo aromático. Estas señales se muestran en forma de singulete (s), esto se puede ver en el espectro DEPT.

Las señales a 122.96 ppm, 122.85 ppm, corresponden a carbonos de un sistema aromático y se les asignó la posición C-6' (d) y C-1' (s) respectivamente, las señales a 116.30 ppm y 116.90 ppm, corresponden a carbonos de un sistema aromático pero que tienen vecino a un grupo electrodonador y se les asigno el C-5' y C-2' respectivamente, de acuerdo al análisis realizado con el espectro DEPT, se ve que estos carbonos están protonados dando señales dobles (d) y en el espectro de HETCOR (espectro 6), se ve la correlación de los carbonos: C-6' con la señal de RMN¹H a 7.29 ppm, el C-5' con la señal a 6.91 ppm y la señal para C-2' se correlaciona con la señal de 7.34 ppm.

La señal a 105.89 ppm(s), se le asignó el C-10, la señal a 99.80 ppm y 94.70 ppm, se les asignó el C-6 y C-8 respectivamente; estas señales en el espectro DEPT muestran que son (d) y con el HETCOR se ve que están correlacionadas con las señales observadas a 6.20 ppm y 6.37 ppm respectivamente.

Por otra parte, por el desplazamiento de la señal a 136.22 ppm a la cual se asignó el C-3 por el tipo de desplazamiento, se puede afirmar que este carbono soporta un átomo electronegativo y que además, de acuerdo a reportes previos para este tipo de flavonoides ^(26,28), este carbono se desplaza a campo bajo cuando tiene unido un átomo de oxígeno, razón por la cual proponemos que en esta posición se encuentra el residuo glicosídico de ramnosa.

Incorporando cada uno de los resultados anteriormente mencionados, la estructura asignada se ilustra en la figura 5.

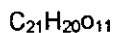
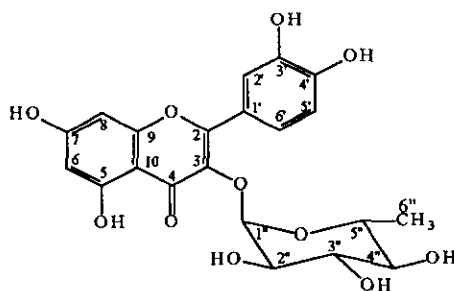


Figura 5.

El análisis del espectro de masa (FAB^+) muestra un pico a 449 ($M+1$), el cual corresponde a la fórmula condensada $C_{21}H_{20}O_{11}$ que equivale a un $PM= 448$, lo que está en concordancia con la estructura propuesta.



CONCLUSIONES

A partir del extracto butanólico de *Gliricidia sepium* se aisló por métodos cromatográficos, un compuesto: un flavonol glicosídico, (quercitrina). Su elucidación estructural se realizó por medio de métodos espectroscópicos.

Se estima que alrededor del 2% de todo el carbón fotosintetizado por las plantas es convertido a flavonoides o en compuestos estrechamente relacionados. Los flavonoides constituyen uno de los grupos más grandes de la naturaleza de los compuestos fenólicos.²⁸

Los flavonoides presentan efectos bioquímicos y fisiológicos importantes debido a que actúan como antioxidantes, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias tóxicas y pigmentos; además se les atribuyen actividades como antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales, antiproliferativos y anticarcinogénicos.⁸

El Programa Nacional de Toxicología (NTP), ha reportado que la quercetina causa tumores en ratas, vía urinaria en dosis de 40 000 ppm de quercetina, además inhibe la actividad mutagénica del benzo pireno (BP) un representante de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) carcinogénicos.

Debido a que se trata de un estudio fitoquímico realizado por primera vez a la semilla de *Gliricidia sepium* (cacahuanano), sería de gran importancia de que se

aislaran más compuestos del extracto butanólico, el cual presentó mayor actividad biológica con el ensayo realizado en el crustáceo (*Artemia salina*), por otra parte, los resultados obtenidos con este ensayo, pone en evidencia que los compuestos de mayor polaridad son los responsables de la actividad biológica del extracto butanólico.

Con el compuesto encontrado, no se puede afirmar que es el único responsable de la actividad toxicológica, asimismo tampoco se puede decir que la toxicidad que presenta la semilla del cacahuanano (*Gliricidia sepium*), fue eliminada, por lo tanto, queda abierta la posibilidad de realizar estudios farmacológicos a la semilla fragmentada y que fue sometida a los diversos procesos de extracción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez X., Métodos de Investigación Fitoquímica, Ed. Limusa, México, 1973, pág.81-87, 111-116,
 2. Harborne J., Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, 1986, Vol.1, Ed. Chapman & Hall, pág. xx-xxi, xxxiii, 333-334.
 3. Harborne J., Boulter, D. and Turner, B., Chemiotaxonomy of Leguminosae, Ed. Academic Press, London NewYork , 1971, pág. 258-259.
 4. Ingeborg B. y Ana Cecilia B., *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 62, 107-115.
 5. Cáceres A, López B., et. al, *Journal of Ethnopharmacology*, 1993, 40, 207-213
 6. Murugesan R. y Kailash P., *Journal of chemical Ecology*, 1993, 19 (8), 1691-1701.
 7. e-mail: forestry@msmail.winrock.org. www.winrock.org/forestry/factnet.htm. Tel: 501-727-5435, fax:501-727-5417.
 8. Maximino M., Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, Fondo de cultura Económica, México, 1979.
 9. Maximino M., Plantas útiles de la flora mexicana, Ed. Botas, México, 1959.
 10. Maximino M., Las plantas medicinales de México. Ed. Botas, México 1939.
 11. Hegnauer, R. y Grayer. R.J., *Phytochemistry*, 1993, 34, 39
-

12. Gary D., Leonard J., *Phytochemistry*, 1979, 18, 1037- 1042.
 13. Bate-Smith, J. *Linn. Soc.*, 1962, 58, 95.
 14. Hakim A., Al-Ani y Paul M., *Phytochemistry*, 1985, 24 (1), 55-61.
 15. Mayerand A. y Polajakoff A., The germinación of seeds, 4^a edición, Ed. Pergamon Press. 1989, pág. 23-35, 71-96, 237-238.
 16. Hector B., et. al., Tablas de composición de Alimentos (Subdirección de nutrición experimental y ciencias de los alimentos, instituto nacional de la nutrición salvador zubiran (INNSZ), Edición 50 aniversario, 1996.
 17. J. DereK B. y Michael B., Seeds, (physiology of developmente and germinación), 2^a edición, Ed. Plenum Press, 1994. Pág. 10-30.
 18. Manuel C. y Mariano G., Tecnología de los cereales, Ed. Acriba, 1971, pág 36-57.
 19. Blanc Ochoa José Fernando, Estudio de los componentes químicos, nutricionales y toxicológicos de la semilla de Cacahuanano (*Gliricidia sepium*), **Tesis**, Facultad de Química UNAM, 1979.
 20. Ramírez Schuetz María Gilda, Aislamiento de Canavanina Presente En Cacahuanano (*Gliricidia Sepium*). **Tesis**, Facultad de Química UNAM, 1985.
 21. Arnold, Gordon J. y Richard A., The Chemist's companion A Handbook of Practical Data, Techniques, and References, pág., 379, 378.
 22. Egon Stahl, Thin-Layer Chomatoraphy a Laboratory Handbook, 2^a. Edición, 1990.
-

23. Detección isolation and estructural determination, (Toxicity Testing usin Bine Shim Artemia Salina, Biactive natural products), Ed. Press INC, 1993, Capitulo 18.
 24. Lewan L., Andersson M. y Morales P., *ATLA*, 1992, 20, 297-301
 25. Harborne J., Phytochemical Methods, Ed. Academic Press, London NewYork, 1980, pág. 47-81, 306-323.
 26. RMN¹H , Sadtler Research Laboratories, The Matherson Company INC., East Rutherford, New Jersey, 1969, pág. 6682 M.
 27. RMN ¹³C, Sadtler Research Laboratories, Aldrich Chemical Company, INC., Milwaukee Wisconsin, 1978, pág. 4206 C.
 28. Harborne J., The flavonoids, Advances en research since, Editado por Harborne J., Ed. Chapman & Hall, 1986, pág. 345-384, 619-621.
 29. Gupta D., *Phytochemistry*, 1990, 30 (8), 2761-2763.
 30. Paraveda B y Marco J., *Phytochemistry*, 1986, 25 (10), 2361-2365.
 31. Marco, J, Barbera O., et. al., *J. Nat. Prod.*, 1986, 49, 151-156.
 32. Adell J, Marco J. y Barbera O., *Phytochemistry*, 1989, 27 (9), 2967-2970.
 33. Iwagawa T., Jun-Ichi K., et. al. , *Phytochemistry*, 1990, 29 (3), 1013-1014.
 34. Tomás F., García G., et. al., *Phytochemistry*, 1989, 28 (7), 1993-1995.
 35. Soicke, Górtér H., et. al., *Planta Med*, 1990, 56, 410- 413.
 36. Iinuma M., Ohyama M., et. al., *J. Nat. Prod*, 1991, 59, 144-1147.
-
-

APÉNDICE

REVELADORES

Sulfato cérico: (Revelador para identificación de terpenos)

- Sulfato cérico $[(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$
- 22.2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- 350 g de hielo
- Adicionar el H_2SO_4 , al hielo y por ultimo el $(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, agitar hasta la disolución. Se aplica por aspersión y se calienta.

Anisaldehído: (Revelador para identificar carbohidratos)

- 0.5 mL Anisaldehído ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$)
- 0.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4)_c
- 9 mL Etanol al 95%
- Gotas de ácido acético

Mezclar el anisaldehído con el etanol, por otra parte adicionar las gotas de ácido acético al ácido sulfúrico. Por ultimo mezclar ambas soluciones. Se aplica por aspersión y se calienta entre 20-30 minutos a 100-110 °C. Los carbohidratos revelan de color azul.

Dragendorff: (revelador para identificar alcaloides)

Solución A:

- 850 mg Subnitrato de bismuto; disolver en una mezcla de
- 10 mL ácido acético glacial
- 40 mL H₂O destilada

Solución B:

- 8 g KI disolver en
- 20 mL H₂O destilada y mezclar

Solución C:

- 5 mL de sol A y
- 5 mL de sol. B en un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar
- 20 mL de ácido acético glacial y aforar con H₂O

Aplicar con aspersor. Los alcaloides revelan color anaranjado

MEDIOS PARA EVALUAR LA TOXICIDAD**Buffer de Fosfatos (PBS) pH= 7.2 :**

- 8 g NaCl.
 - 0.02 g KCl.
 - 2.9 g Na₂HPO₄ • 12 H₂O.
 - 0.2 g KH₂PO₄.
-

- 0.7 g KCl.
- 1000 mL H₂O destilada.

Aforar a 1000 mL. y ajustar la solución final a un pH= 7.2.

Solución Salina pH= 9.0:

- 23 g NaCl.
- 11 g MgCl₂ • 12 H₂O.
- 4 g Na₂SO₄.
- 1.3 g CaCl₂ • 2H₂O ó 2.0 g CaCl₂ • 6H₂O.
- 0.7 g KCl.
- 1000 mL H₂O destilada.

Aforar a 1000 mL. y ajustar la solución final a un pH= 9.0

Nota: Ajustar el pH con Na₂CO₃ para evitar el riesgo de muerte de la artemia a causa de una disminución del pH durante la incubación.

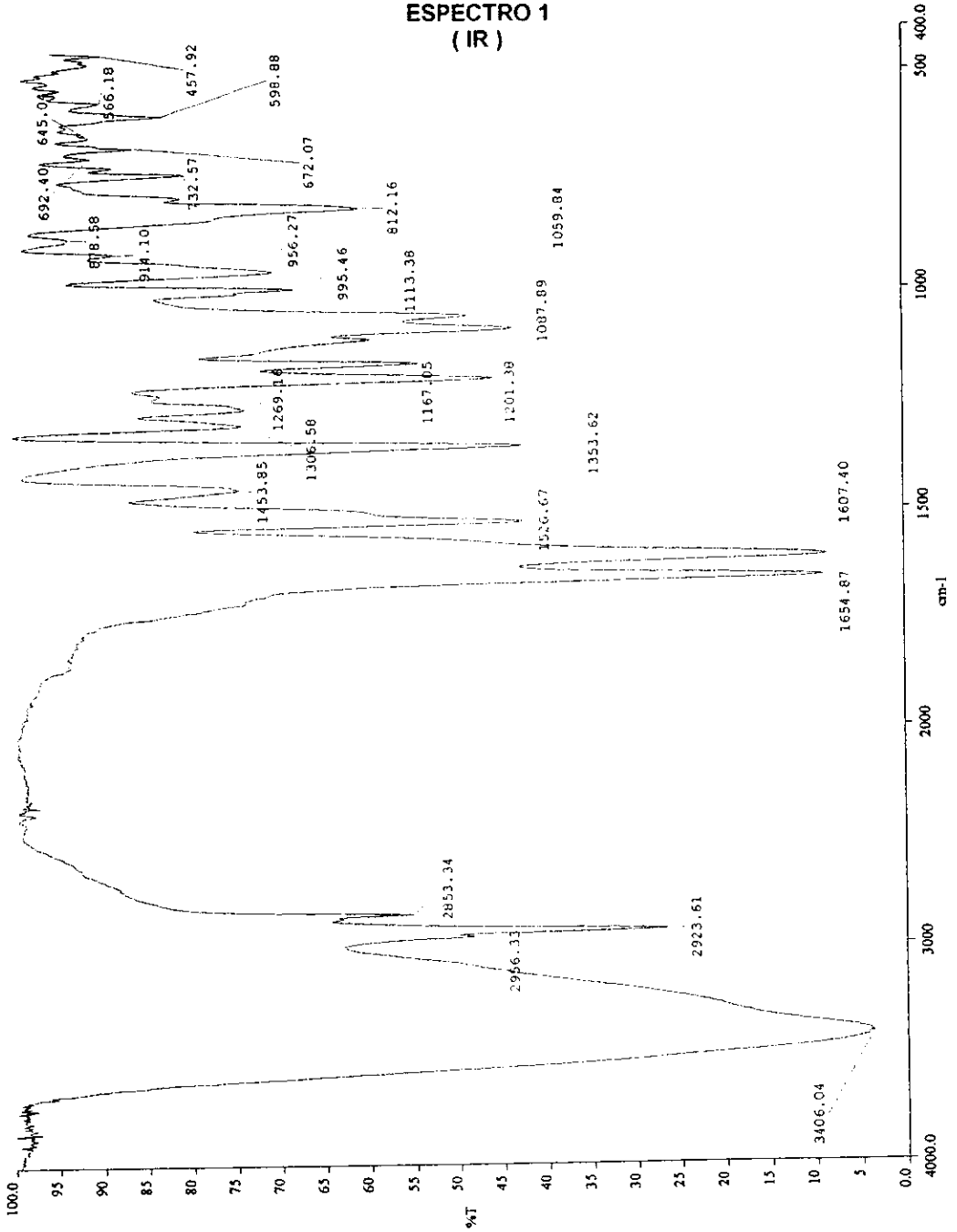
MEDIO DE INCUBACIÓN

Solución Salina para eclosionar *Artemia Salina*:

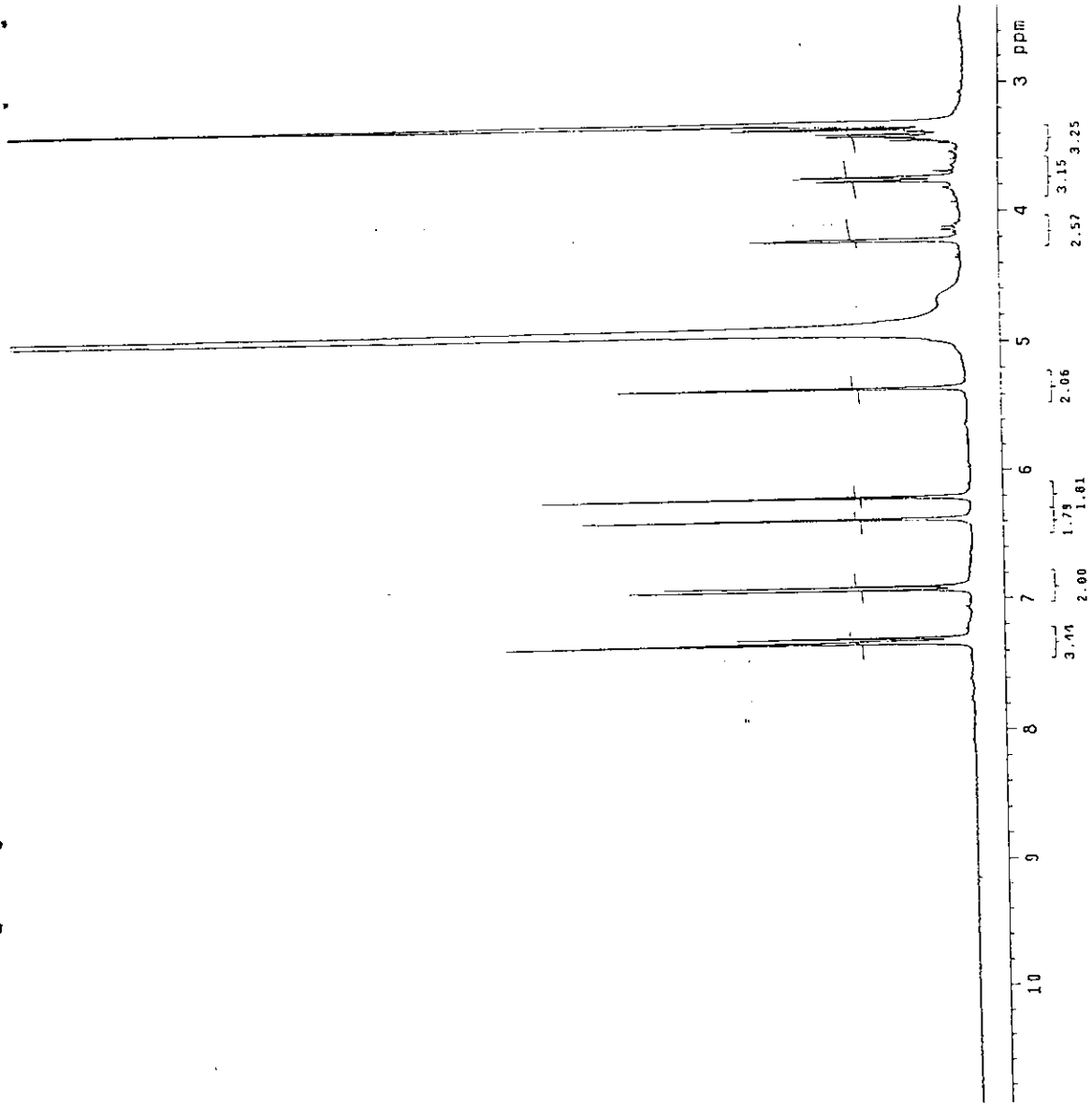
- 38 g de sal (Instant Ocean).
- 1000 mL de H₂O destilada.

Disolver la sal y aforar a 1000 mL.

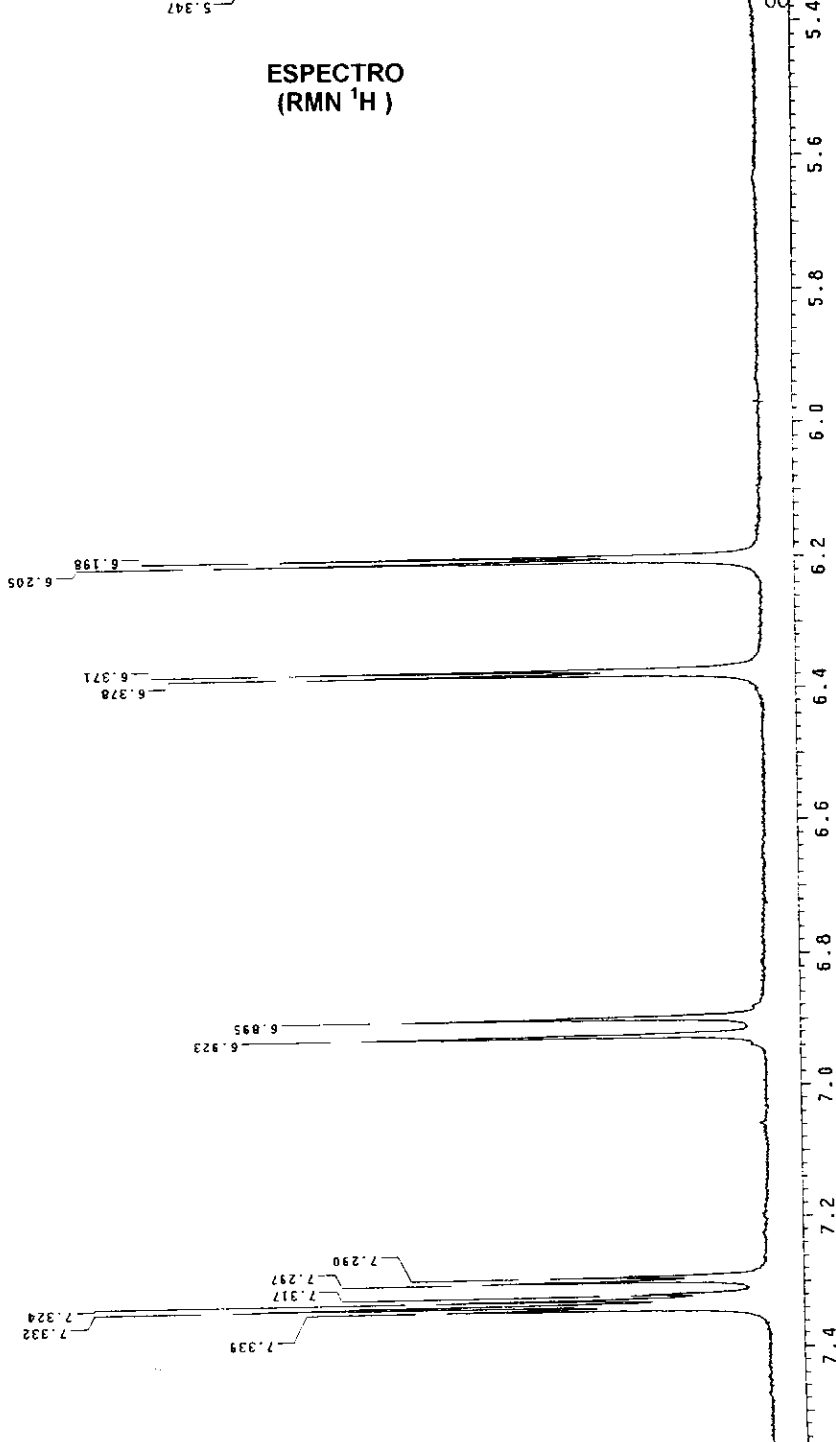
ESPECTRO 1 (IR)



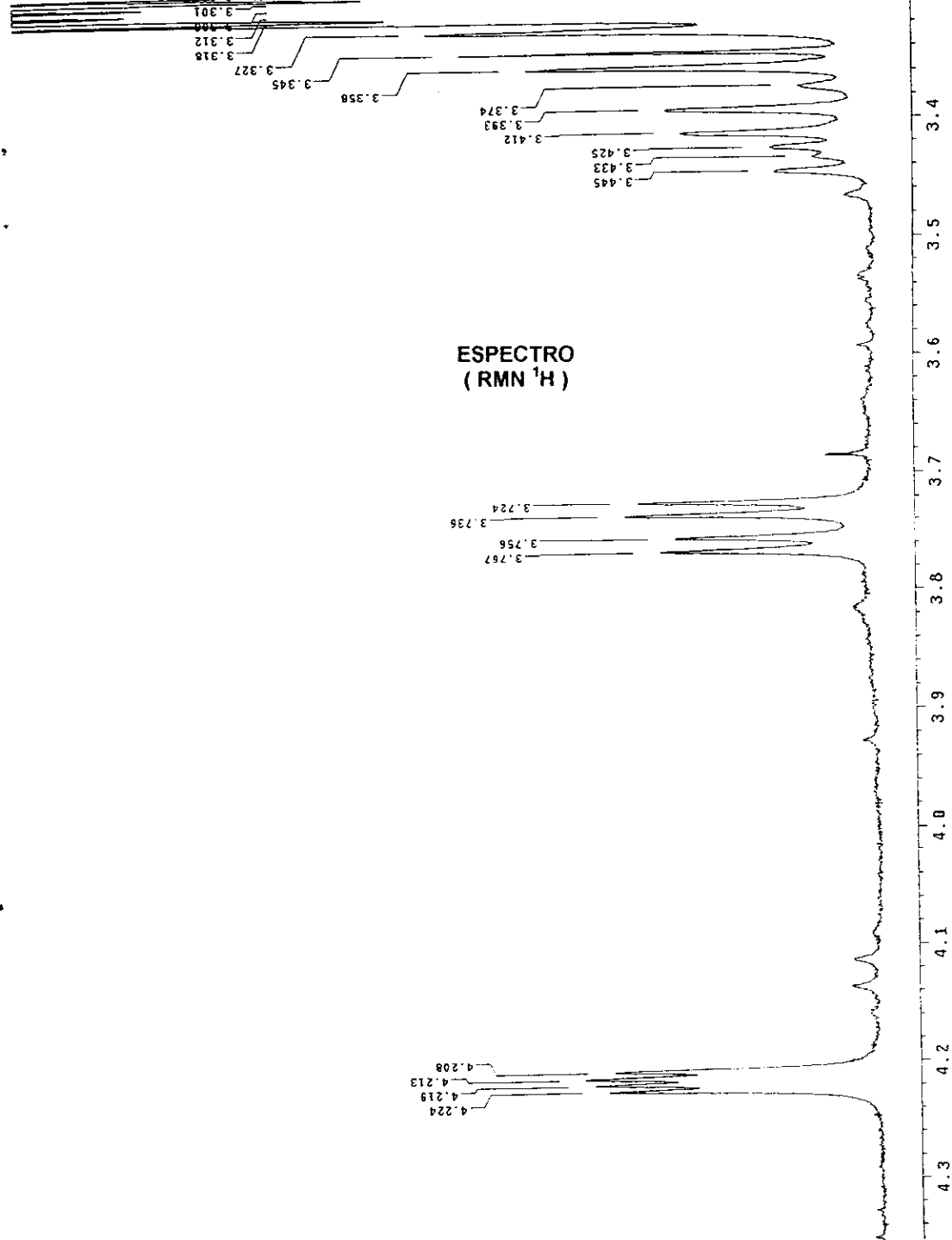
ESPECTRO 2
(RMN ^1H)



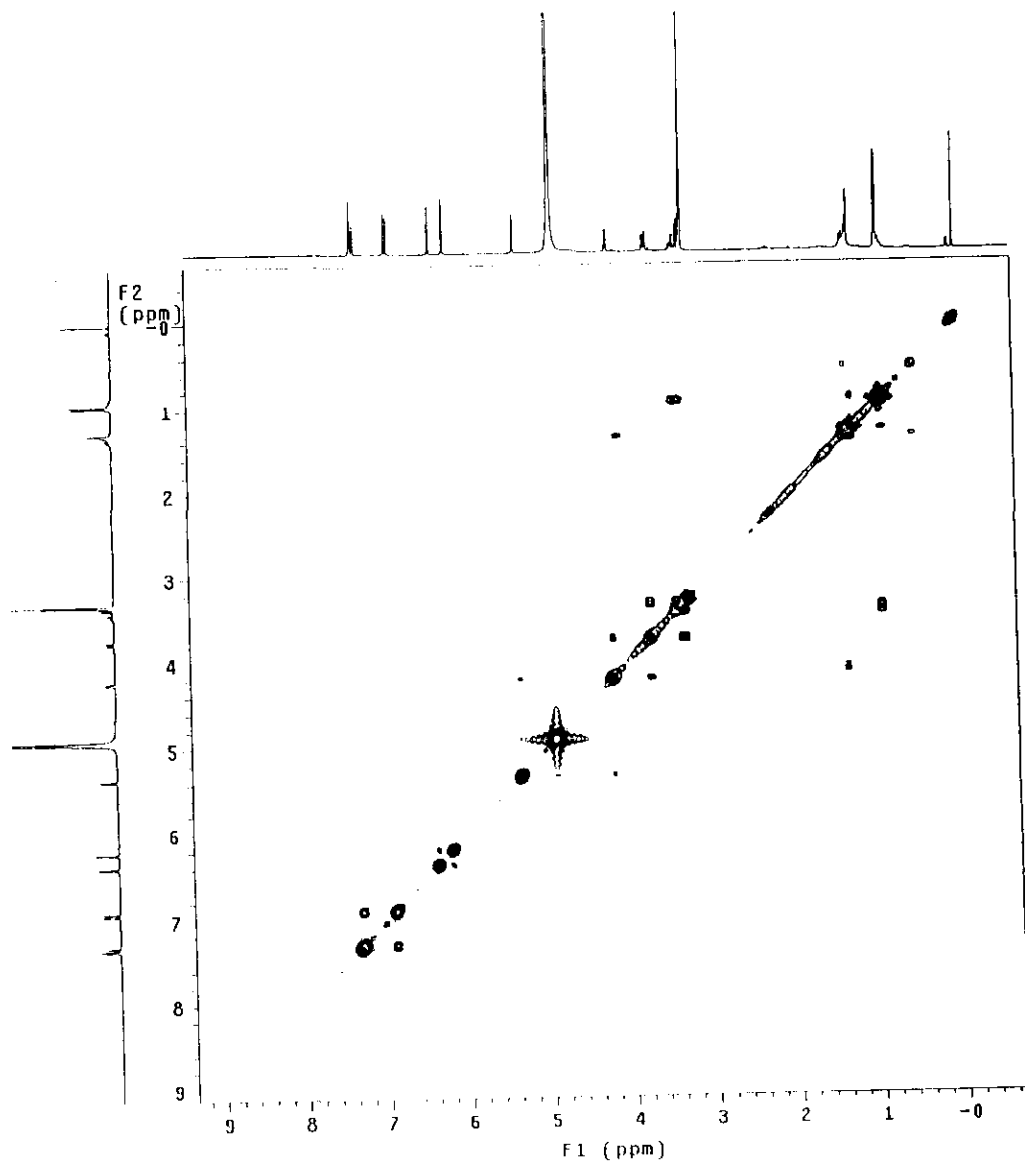
ESPECTRO
(RMN ^1H)

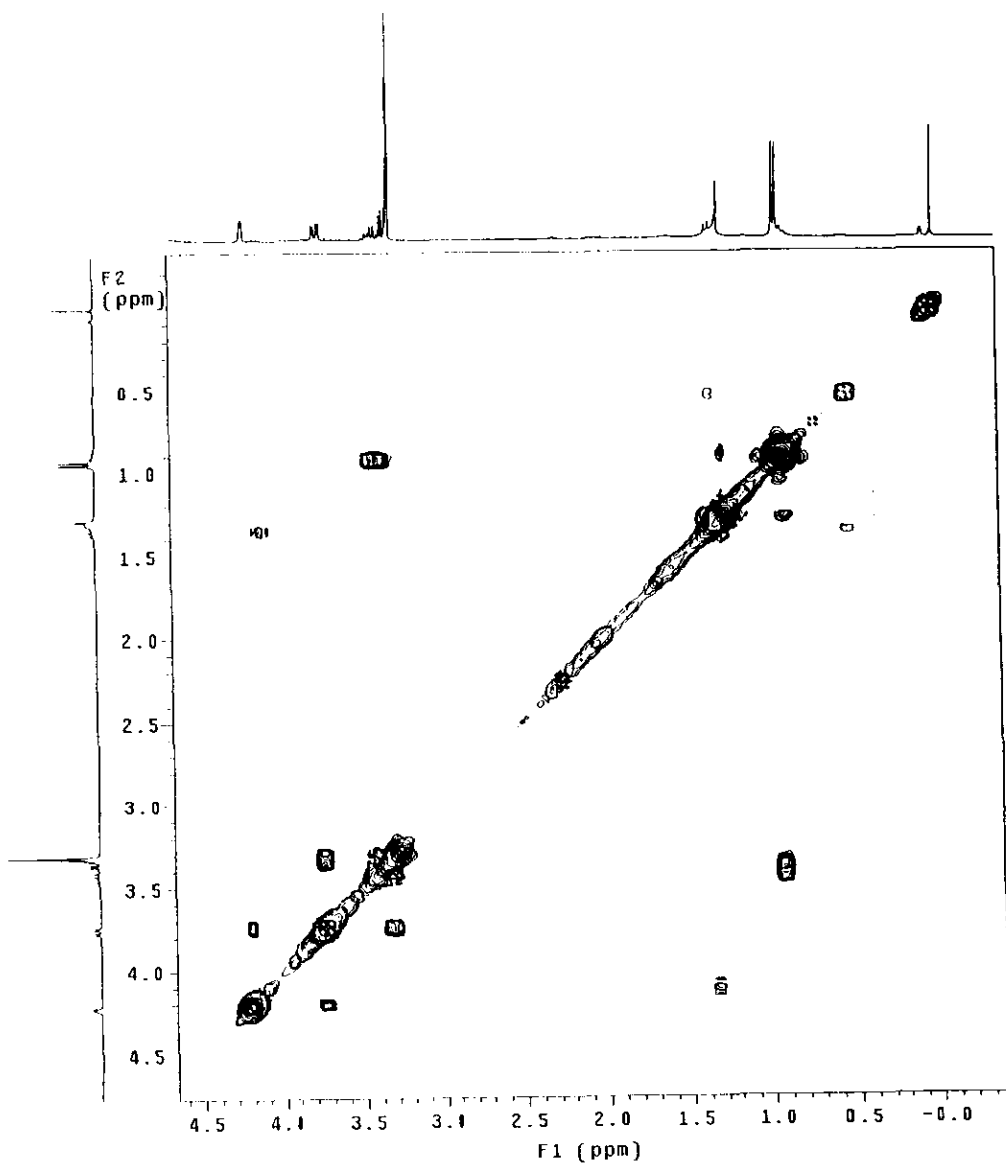


ESPECTRO
(RMN ^1H)

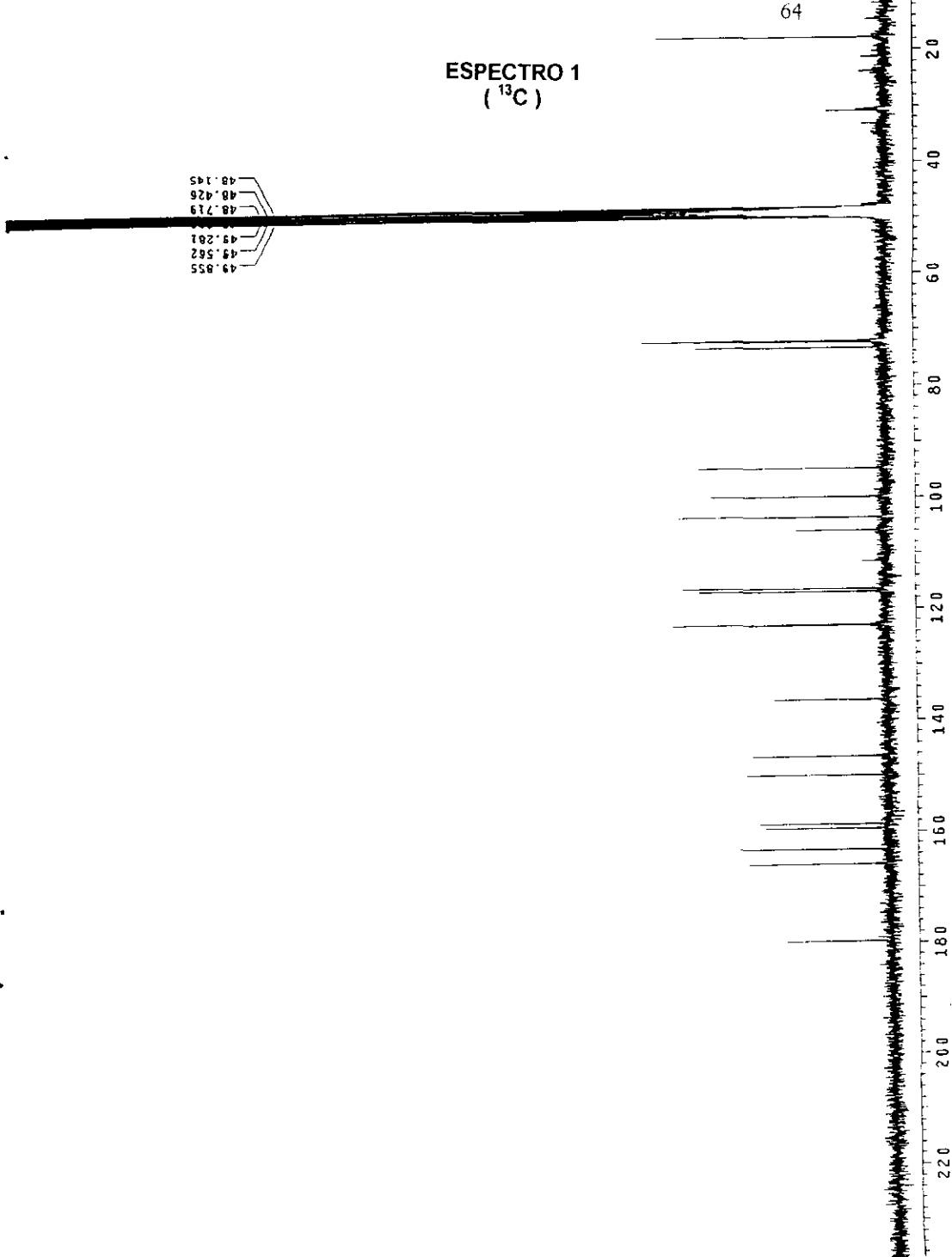


ESPECTRO 3
(COSY)



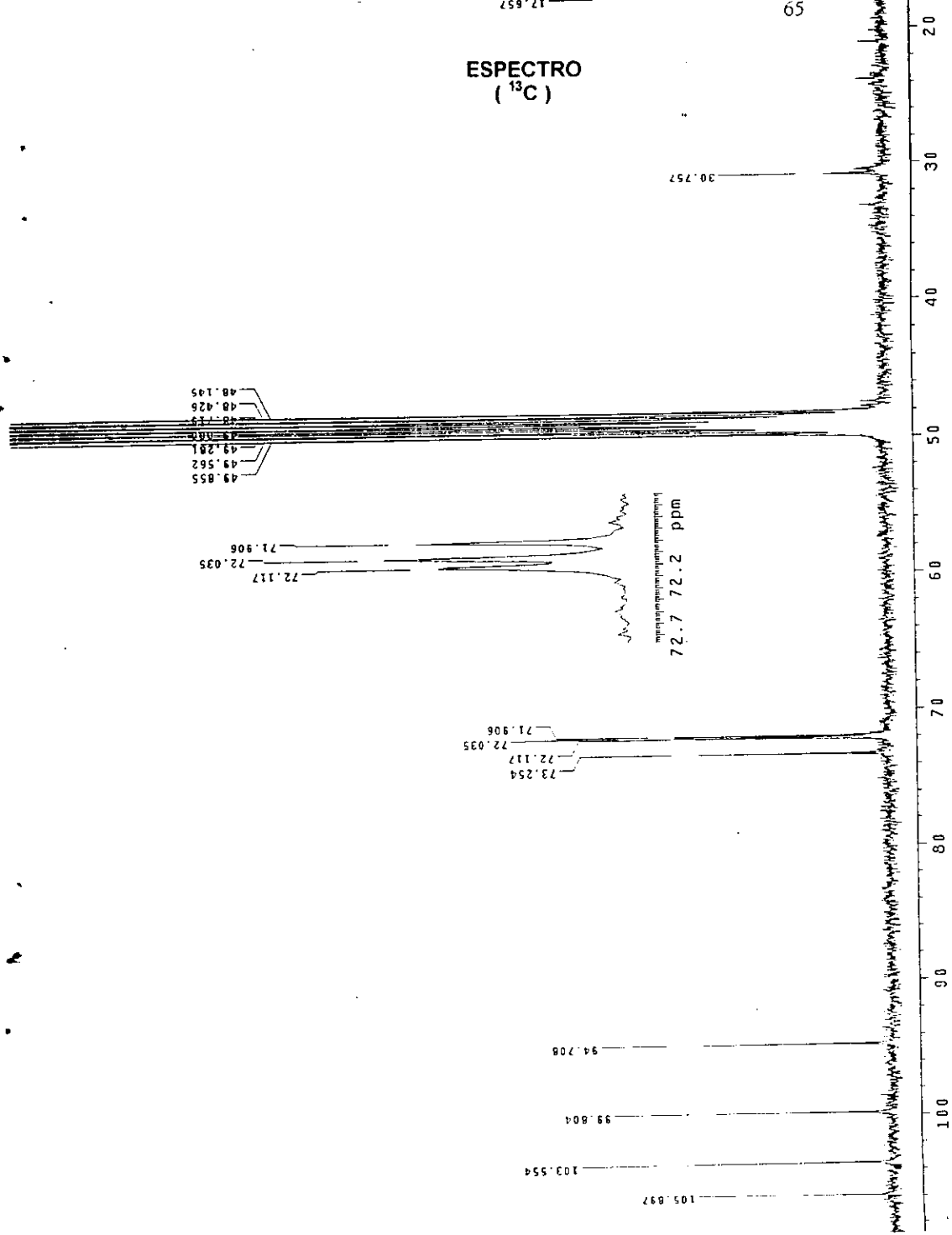
ESPECTRO
(COSY)

ESPECTRO 1
(¹³C)

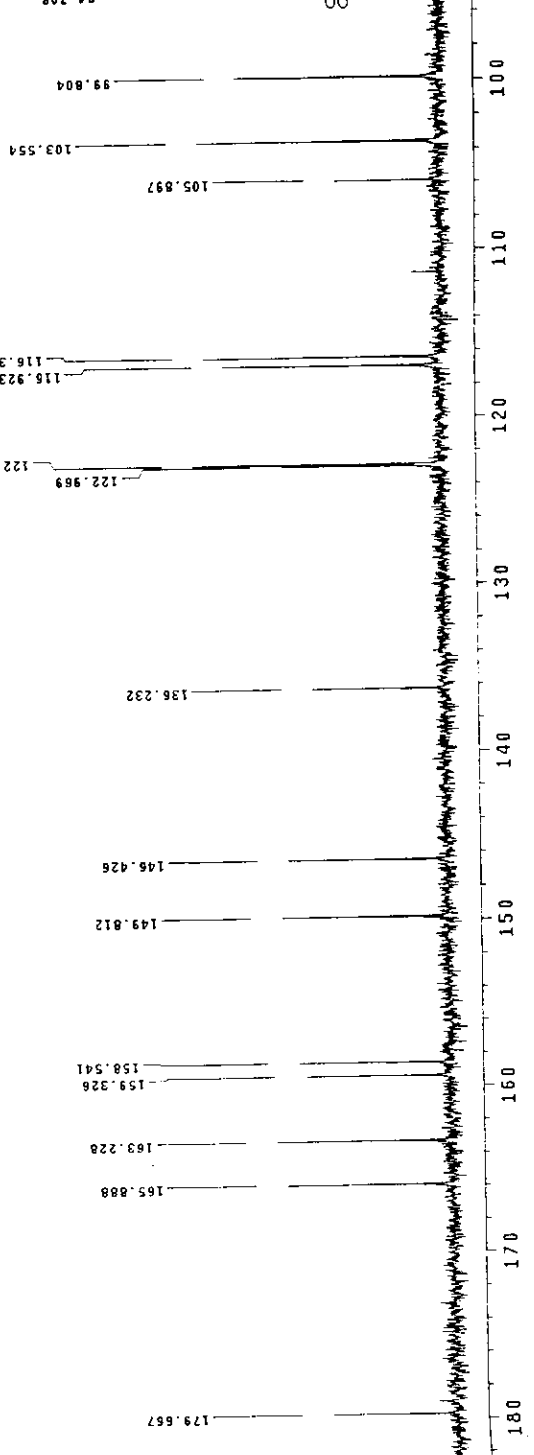


ESPECTRO
(¹³C)

65

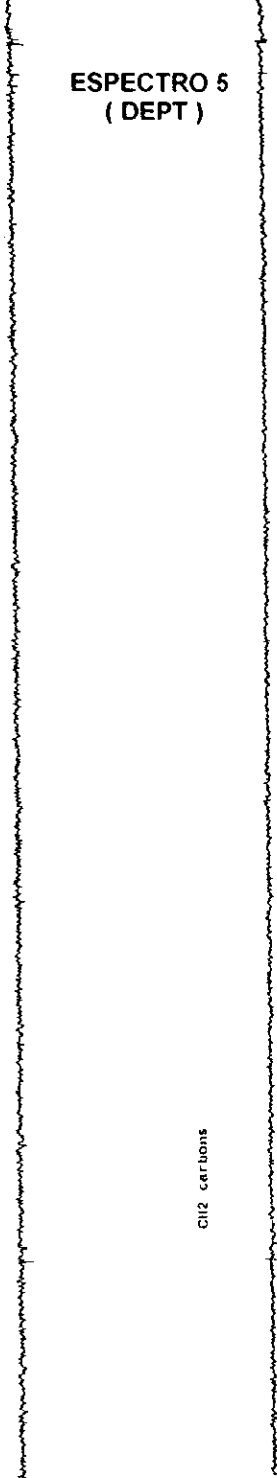


ESPECTRO
(¹³C)

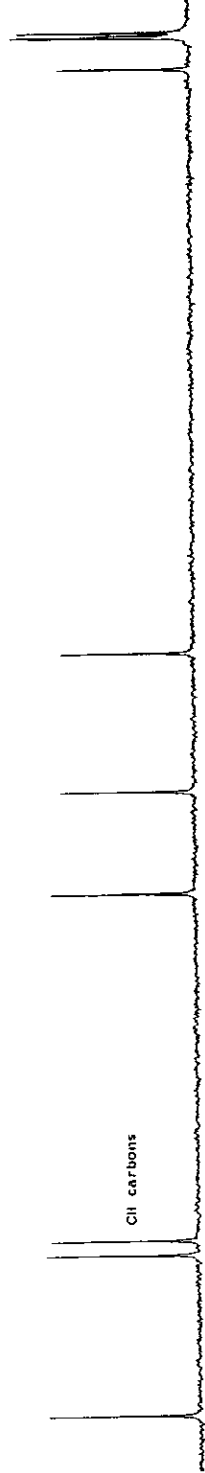


ESPECTRO 5
(DEPT)

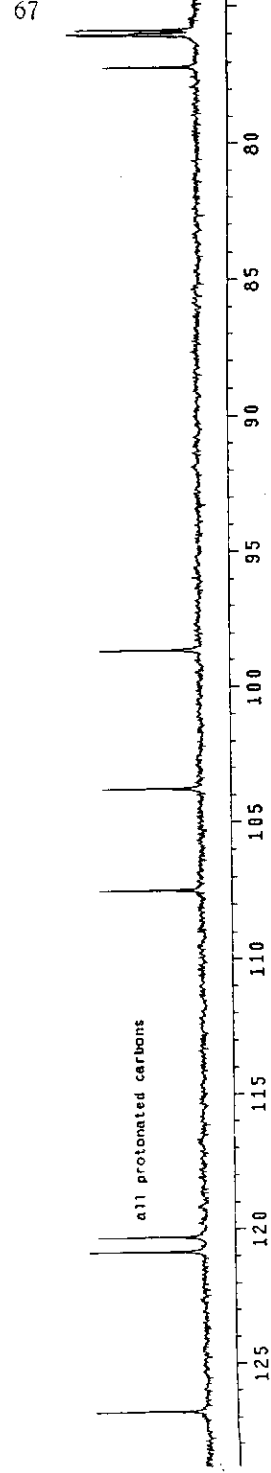
CH3 carbons



CH2 carbons

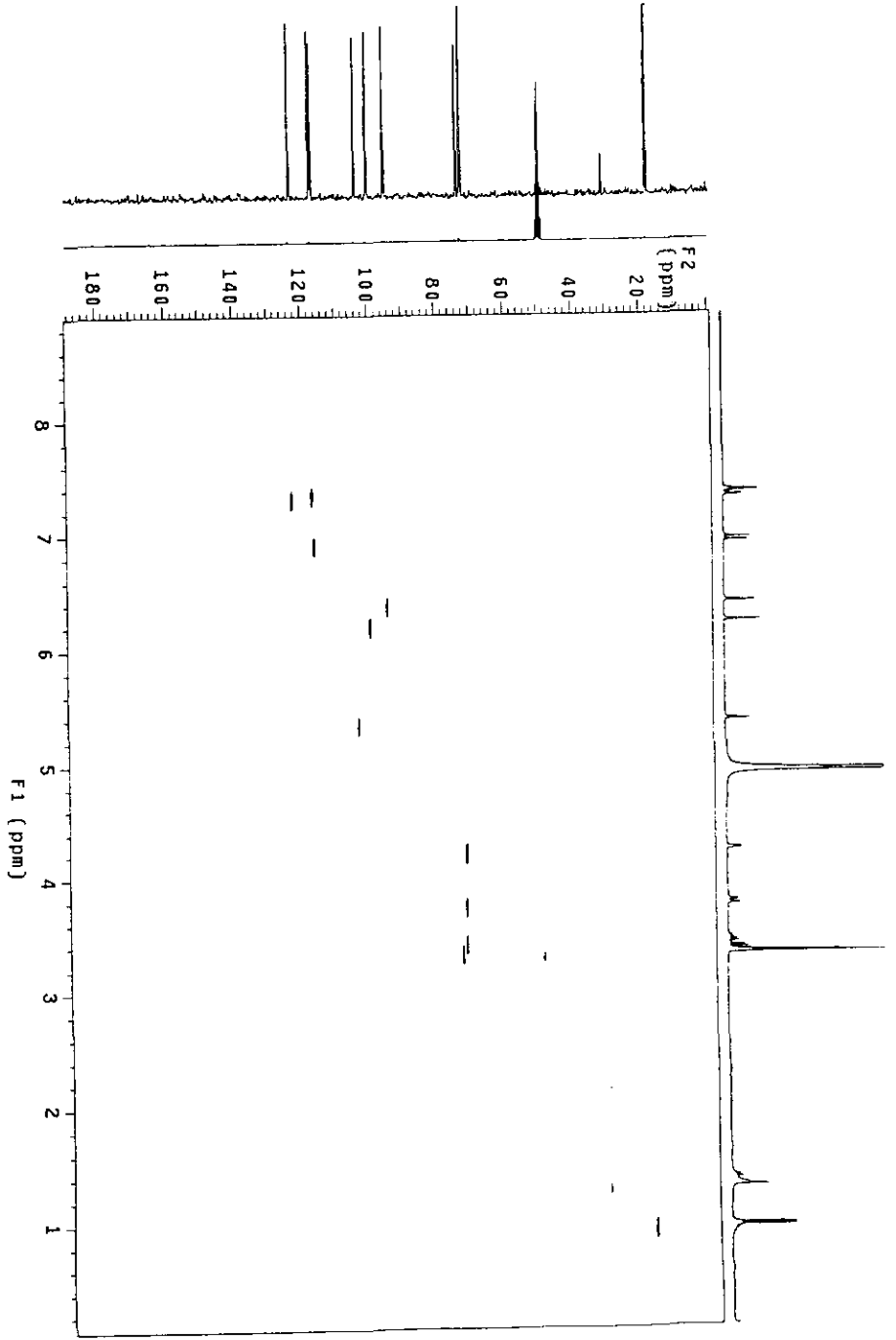


CH carbons

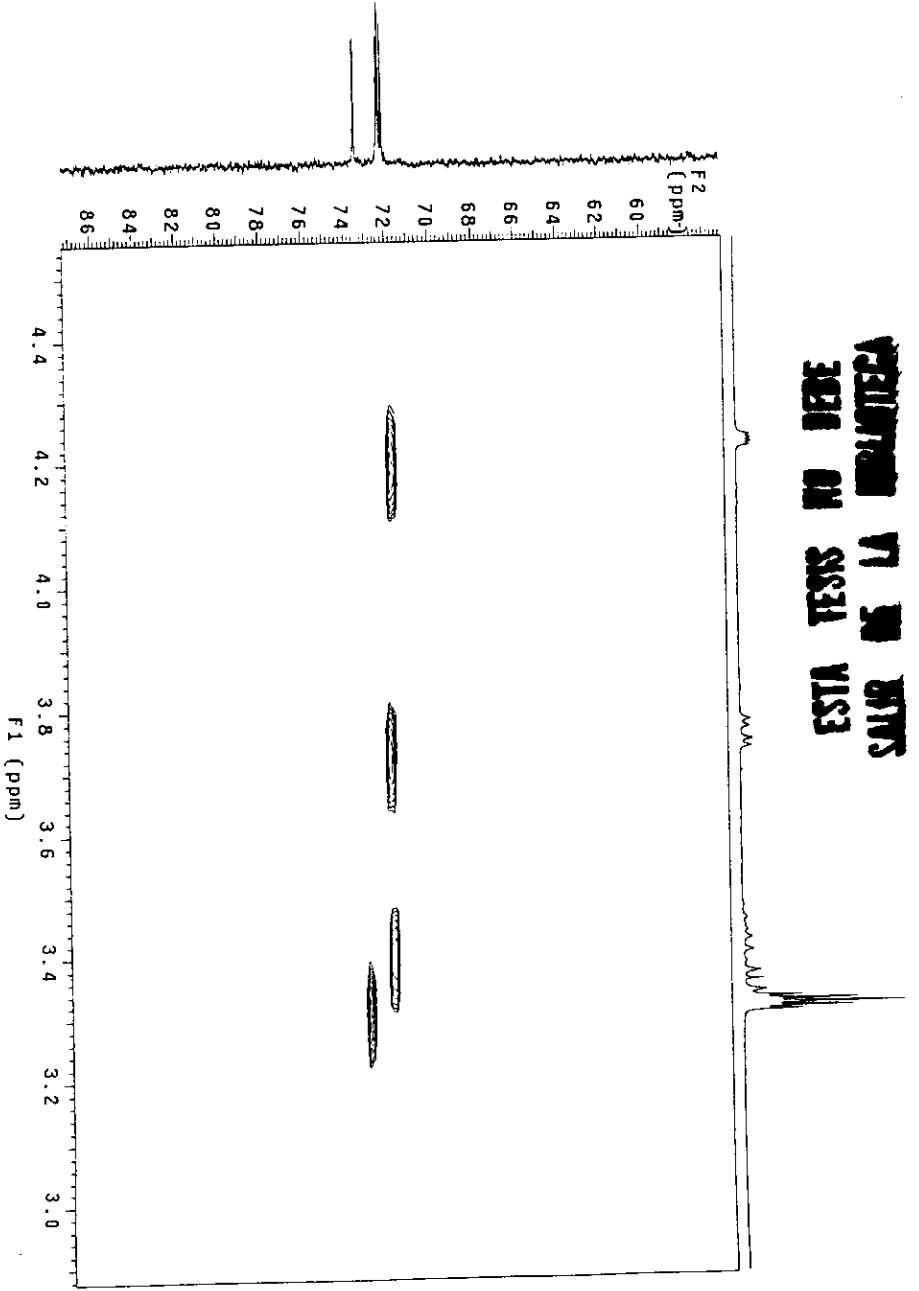


all protonated carbons

ESPECTRO 6 (HETCOR)



ESPECTRO (HETCOR)



ESPECTRO
(HETCOR)