

Sej 19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO QUIMICO-BIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS HEXANICOS DE TAGETES TENUIFOLIA (COMPOSITAE)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A :

YARA DEL CARMEN BAUTE ROMERO



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.

INDICE

	Pags.
I INTRODUCCION	2
II ANTECEDENTES	4
a. Cumarinas	4
b. Tiofenos	4
c. Poliacetilenos	6
d. Probable mecanismo de acción	6
III UBICACION TAXONOMICA DE LA PLANTA	9
IV DESCRIPCION MORFOLOGICA	9
V MATERIAL Y METODOS	10
a. Obtención de los extractos	10
b. Pruebas biológicas	11
1. Actividad hemolítica	11
2. Actividad bacteriostática	12
c. Pruebas químicas	14
1. Separación de los componentes de los extractos	14
2. Caracterización del alfa-tertienilo y otros compuestos	15
VI RESULTADOS Y DISCUSION	17-27
VII CONCLUSIONES	28
VIII REFERENCIAS	29

I INTRODUCCION

La fotoquímica tiene su origen en las propiedades que poseen ciertas moléculas de absorber la luz UV (ultravioleta). Durante esta absorción las moléculas se excitan y sufren cambios en su estructura electrónica que ocasionan finalmente un cambio en su estructura estérica y funcional (9).

La fotorreducción de cetonas es un de los procesos más antiguamente conocidos y se puede realizar, entre otras formas, por exposición de una solución de la cetona a la luz solar.

Reacciones de este tipo no son, sin embargo, exclusivas del trabajo de laboratorio; en las plantas, que pueden considerarse como pequeños laboratorios químicos vivientes, ocurren procesos fotoquímicos en los que intervienen diversos metabolitos secundarios.

La presencia de estos procesos en los vegetales se ha puesto en evidencia por las propiedades que manifiestan algunas plantas como la de causar dermatitis por contacto con la piel y en presencia de la luz solar, pero no en la obscuridad (13); o bien, por su poder hemolítico (17) o bacteriostático (10).

Este fenómeno fotoquímico, al que se dio el nombre de fototoxicidad (8), indujo a los investigadores a buscar los metabolitos secundarios que en los vegetales pudieran sufrir una reacción de tal naturaleza.

Se ha encontrado que los productos responsables de la fototoxicidad en las plantas pertenecen a varios grupos como son las furocumarinas, los tiofenos y los acetilenos.

Las furocumarinas fueron los primeros productos que se caracterizaron por sus propiedades fototóxicas. Se encuentran en diversas familias : Rutaceae, Leguminosae, Apiaceae, Papilion-

ceae, Moraceae y Umbelliferae (4, 14). En la familia Compositae no se ha encontrado furocumarinas, pero sí poliacetilenos y tiofenos. De Bidens pilosa se aisló el tridecapentaineno ($\text{CH}_3\text{-(C=C)}_5\text{-CH=CH}_2$) (14), que tiene acción bacteriostática y fungistática contra algunos microorganismos incluyendo Candida albicans. Los nativos de las islas Hawaii usaban la especie Bidens camphylothea en forma de té como tónico o purificador sanguíneo y en el tratamiento de las aftas que aparecían en la boca de los lactantes, causadas por Candida (14).

En el género Tagetes, son los tiofenos y los poliacetilenos los responsables de las propiedades fototóxicas de las plantas (17). Se han hecho estudios químicos en varias especies de este género (patula, minuta, glandulifera y erecta) pero en ninguna referencia se estudia detalladamente Tagetes tenuifolia planta que se eligió en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM para realizar este trabajo.

Dentro del análisis fitoquímico de las especies, uno de los intereses al estudiar los productos secundarios que en ellas se encuentran, es localizar aquellos que sean característicos de una familia o género y que puedan ser usados como marcadores químicos en taxonomía. En el caso de Tagetes, los tiofenos aislados por Inwers (14) y Atkinson (1) en algunas especies podrían ser característicos del género.

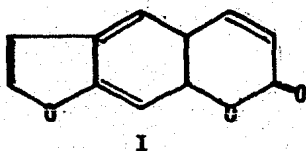
Con el fin de aumentar el número de especies analizadas del género Tagetes para dar apoyo a esta hipótesis, se inicia este estudio con Tagetes tenuifolia, motivo de la presente investigación, -siendo sus objetivos: Comprobar la actividad fototóxica de los extractos hexánicos de la planta y, si son activos, aislar y caracterizar los compuestos responsables de dicha actividad.

II ANTECEDENTES

Se analizará aquí brevemente la naturaleza química de los compuestos responsables de la fototoxicidad de ciertos vegetales y la forma como se ha puesto en evidencia esta toxicidad.

a. Cumarinas

Dentro del grupo de las cumarinas, son las furocumarinas como el psoraleno (furo(3-2g)cumarina) (I) y sus derivados, los que causan daño a la piel humana en presencia de luz UV de onda larga (320-370 nm), pero no en la obscuridad (13).



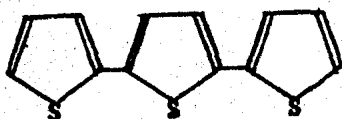
Fowlks demostró, en 1958 (10) que los psoralenos son fototóxicos también para las bacterias. Posteriormente Daniels (8) empleó un método relativamente sencillo con Candida albicans para mostrar plantas que tuvieran fototoxicidad. La prueba consiste en colocar una parte de la planta problema en una caja de Petri sobre una placa de agar sembrada con la levadura e incubar con luz UV y en la obscuridad. Si la planta es activa, la placa presenta un halo por inhibición de crecimiento cuando se incubaba expuesta a la luz UV, pero no cuando se hace la incubación en la obscuridad.

b. Tiofenos

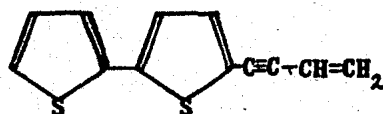
Entre las plantas que examinó Daniels (1965)(8) y que tuvieron fototoxicidad sobre Candida está el fruto del camposúchitl (caléndula, maravilla o clavelín), Tagetes patula. Esta planta pertenece a la familia Compositae (Asteraceae) y hasta entonces no se ha

bía reportado la presencia de furocumarinas en esta familia, que podrían ser las causantes probables del fenómeno fototóxico por lo que Towers (1977)(14) emprendió el estudio de algunos de sus miembros, entre ellos Tagetes patula, para investigar la naturaleza química de las sustancias que provocan este efecto y encontró que pertenecen al grupo de los tintenens.

En 1958 Uhlenbroek y Bijloo aislaron de T. erecta dos compuestos fuertemente antihelmínticos: el alfa-tertienilo (2,2':5'2"-tertienilo)(II), que ya Zechmeister y Sease habían aislado con anterioridad de pétalos de la misma especie (18), y un compuesto nuevo, el (5-(but-3-en-1-inil)2,2'bitienilo)(III), y comprobaron plenamente sus estructuras por síntesis (15).



II



III

De esta misma especie Bohlman y Herbst (3) aislaron un tercer compuesto, el cis-5-(4 acetoxy but-1-enil)-2,2'-bitienilo (IV):



IV

Estas tres sustancias se encontraron también en T. patula (3).

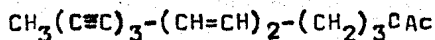
En 1965, Atkinson y colaboradores estudiaron los componentes de la raíz de T. minuta y encontraron varios bitienilos (1). La planta tiene marcada actividad antihelmíntica contra Meloidogyne javanica, gusano que ataca la raíz del tabaco. Igualmente se analizaron los extractos de la raíz de las especies de Tagetes estudiadas por su grupo por cromatografía en placa fina (7), encontrando poca variación cualitativa en los patrones de las manchas

... los derivados del tiofeno, siendo los compuestos principales en todas las especies estudiadas, los compuestos II y III.

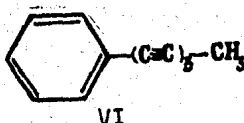
Towers et al. (14) investigaron la naturaleza química de los compuestos responsables de la fototoxicidad en T. patula y aislaron y comprobaron que son los mismos (II y III) que obtuvo Uhlenbroek.

c. Poliacetenos

El grupo de Towers examinó igualmente otros miembros de la familia Compositae y en los extractos de flósculos de Chrysanthemum leucanthemum encontró que el compuesto fototóxico más activo era un poliacetileno cuyo espectro en el UV fue similar al de V (4):



En Bidens pilosa L. (16), que también tiene acción sobre Candida y otros microorganismos como Escherichia coli y Bacillus subtilis, encontraron que los agentes causantes del fenómeno son varios poliacetenos, entre ellos el fenilheptatrieno (VI):



d. Probable mecanismo de acción

E. Yamamoto et al. (17) sometieron eritrocitos humanos a la acción de algunos compuestos poliacetilénicos en presencia de luz UV y detectaron pérdida de potasio y hemólisis. Previamente a ésta ocurría una inactivación de acetilcolinesterasa y de otras enzimas en el exterior de la membrana celular, debido tal vez a un

daño en su estructura o a una modificación en el ambiente de la membrana que parece ser el primer blanco del fenilheptariino y del alfa-tertienilo, en particular. Ambos actúan dañando las proteínas celulares.

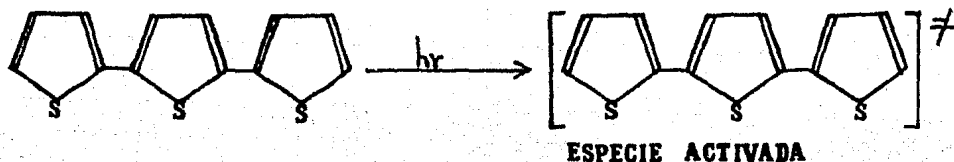
A nivel molecular la acción tóxica se explica de la siguiente forma:

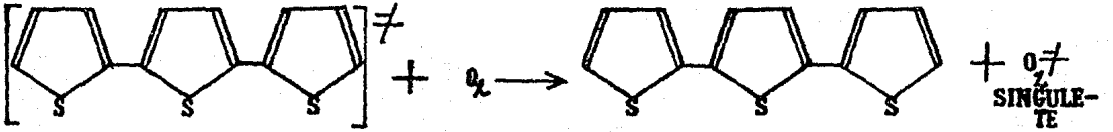
Las furocumarinas lineales se combinan con las bases pirimídicas del ADN (con la timina en el ADN de timo de becerro) a través de sus dobles enlaces en las posiciones 3,4 o 4',5'. Se cree que el daño celular ocurre cuando se establece un enlace covalente cruzado entre las dos hélices del ADN y los dos dobles enlaces de una molécula de psoraleno. Estos enlaces cruzados mantienen las dos hélices unidas, aun en condiciones de desnaturalización (16).

En las furocumarinas angulares el mecanismo de acción es diferente, reaccionan formando también enlaces cruzados, pero con una sola de las hélices del ADN, permitiendo su separación por desnaturalización (16).

Un mecanismo similar al de las furocumarinas angulares se postula para el fenilheptatriino (16).

En el caso del alfa-tertienilo y sus derivados, la acción fototóxica parece deberse a la producción de oxígeno singulete (activado), por efecto de la irradiación (2):





O_2

+ PROTEINA →

Inactivación por daño a uno de cinco aminoácidos: p-hidroxihistidina, metionina, fenilalanina, cisteína o triptófano.

III UBICACION TAXONOMICA DE LA PLANTA (6)

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Tribu: Heleniae

Género: Tagetes

Especie: Tagetes tenuifolia Cav.

IV DESCRIPCION MORFOLÓGICA (12)

Hierba de 20-40 cm de altura, con las hojas opuestas pinatisectas, con las divisiones pequeñas, elípticas, finamente aserradas. Cabezuelas con el involucre de 11-14 mm de alto; lígulas anchas de 7-8 mm de longitud. Aquenios lineares, negros, con 4-5 es camitas diferentes de unos 4-5 mm de largo.

Florece en septiembre y octubre y crece en altitudes de 1 800 a 2 900 msnm, en el Pedregal de San Angel en el D.F.; en el cerro de San Bartolo, en la Sierra de Guadalupe, Cerro de Hidalgo, Cañada de Cuajimalpa, en la bajada a Chimalpa, Jilotepec, Ixtapan de la Sal y Teutli, en el Estado de México.

V MATERIAL Y METODOS

La colecta del material se hizo en el Pedregal de San Angel, D. F. durante el mes de octubre en que la planta presenta flores. Se procuró sacar a los ejemplares completos incluyendo la raíz. El ejemplar seleccionado para determinación y Herbario se encuentra depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, (FCME).

El material se secó a temperatura ambiente y una vez secas las plantas se separó raíz, parte aérea y flor, moliéndose en un molino manual por separado. Los molidos tuvieron los pesos que se indican en la tabla 1.

a) Obtención de los extractos

Los molidos de flor (437.5 g) y de raíz (777.0 g) se colocaron en su totalidad en matraces de bola de 12 l de capacidad, mientras que del tallo se ocuparon únicamente 928.0 g, ya que el total (1 239.5 g) excedía la capacidad del recipiente. En cada matraz se vertieron 10 l de hexano para realizar una extracción en frío y al abrigo de la luz (los compuestos buscados son termo y fotolábiles) durante cuatro semanas.

La separación de los extractos hexánicos del resto del material sólido se hizo por filtración en papel y posteriormente se evaporó el filtrado a presión reducida, trabajando siempre al abrigo de la luz. Una vez obtenidos los extractos secos se pesaron para conocer el rendimiento de la extracción. Los resultados se encuentran anotados en la tabla 2.

Sobre los extractos se realizaron dos clases de pruebas: Biológicas (actividad hemolítica y bacteriostática) y Químicas (separación de los componentes de los extractos y caracterización del alfa-tertienilo y otros compuestos.

b. Pruebas biológicas

1. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los extractos se determinó por el método usual para detectar hemólisis, con las modificaciones propias del caso.

Antes de efectuar las determinaciones sobre los extractos se hizo una curva de calibración para calcular posteriormente el porcentaje de hemólisis causado por la fotoactivación de éstos.

Se tomaron 5 ml de sangre humana por venipuntura y se colocó 1 ml en cada uno de 5 tubos de ensayo, ajustando el volumen a 5 ml con soluciones de NaCl al 0.9, 0.7, 0.3 y 0.1%, respectivamente, y el último tubo se ajustó con agua destilada. Al término de media hora se centrifugaron a 5 000 rpm durante 5 minutos y con el sobrenadante se hicieron las lecturas de la hemoglobina liberada en un espectrofotómetro Perkin- Elmer Coleman 295, a 525 nm. Las lecturas promedio de tres repeticiones, dadas en absorbancia, se encuentran en la tabla 4.

Con estas lecturas se trazó la curva de calibración, anotando las concentraciones de las soluciones de NaCl en las abscisas y en las ordenadas, las absorbancias. En esta curva se interpolaron las diferencias de absorbancia entre las lecturas obtenidas de los tubos problema y testigo para obtener el % de hemólisis provocada por fotoactivación de los extractos. Se consideró como 100% de hemólisis la provocada por el agua destilada (fig. 1).

Para el experimento con los extractos de las diferentes partes de la planta se tomaron 10 ml de sangre humana y se llevaron a 100 ml con solución isotónica de NaCl, habiéndose establecido previamente esta dilución como la adecuada para las condiciones de la de terminación, la cual se hizo con dos series de tubos de ensayo, u-

na mantenida al abrigo de la radiación UV, forrando los tubos con papel aluminio (serie testigo), y la otra con los tubos sin forrar para someterla a la acción de la luz UV (serie problema). Cada serie constó de 5 tubos, 3 para cada uno de los extractos y 2 - controles.

En las dos series se colocaron en cada uno de los tubos 4.5 ml de la suspensión de glóbulos rojos; a 3 de ellos se agregaron 0.5 ml de una solución hexánica (1 mg/1 ml) de los extractos de raíz, tallo y flor respectivamente, al cuarto se agregaron 0.5 ml de hexano y al quinto 0.5 ml de solución isotónica de NaCl.

Los 10 tubos de las dos series se colocaron en un baño de temperatura constante a 34-35°C y se irradiaron con una lámpara de luz UV de onda larga Philips 57413p40-TUV30W, durante 1 hora, agitando suavemente cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de exposición se decantó la solución hexánica del extracto, que se había separado de la fase acuosa, los tubos se centrifugaron 5 000 rpm durante 5 minutos y con el sobrenadante se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro, a 525 nm. Esta determinación se repitió tres veces y los resultados promedio, dados en absorbancia, se encuentran en la tabla 5.

2. Actividad bacteriostática

Los organismos utilizados en estas pruebas fueron Escherichia coli y Bacillus subtilis. Se empleó el método usual en microbiología para el crecimiento de microorganismos, aplicando para la determinación de la fotosensibilidad el método sugerido por Daniels (8).

El trabajo se inició con E. coli (bacterias pertenecientes a la cepa pBR 327 RR1 procedente del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM). Se preparó A-

gar de Mueller-Hinton de Bioxon, para cultivo de microorganismos, 38 g por l de agua destilada, y se le adicionaron 0.25 g de colorante vegetal rojo para lograr contraste óptico con las colonias en crecimiento. El medio de cultivo y el material de cristalería se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15 lbs de presión, durante 15 minutos. La manipulación posterior se efectuó dentro de una campana estéril. Cuando el material estuvo lo suficientemente frío como para manipularlo se procedió a verter el medio en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se efectuó la siembra con aplicadores de plástico con puntas de algodón, que se introdujeron en el cultivo de reserva y se aplicaron al gel procurando formar líneas gruesas muy cercanas entre sí sin romper la superficie, con objeto de obtener un crecimiento compacto.

La determinación de la fotoactivación de los extractos se hizo con dos series de cajas, una protegida de la radiación UV con papel aluminio y la otra libre de protección. Cada serie constó de 9 cajas, distribuidas como se indica en el cuadro adjunto, más dos controles.

En cada caja se introdujo un círculo de papel filtro Whatman No. 2, de 2 cm de diámetro, previamente impregnado de las soluciones de los extractos hexánicos de raíz, tallo y flor a las concentraciones que se indican en el cuadro. Antes de introducir el papel filtro a las cajas se dejó secar al aire para eliminar la mayor parte del disolvente. En una de las dos cajas control se colocó un disco impregnado sólo con hexano y la otra se dejó sin disco.

Distribución de las cajas de Petri para la determinación de la fototoxicidad de los extractos

Concentración	Flr		Rafz		Tallo	
	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV
1 mg/ 2 ml	1	1	1	1	1	1
1 mg/ 5 ml	1	1	1	1	1	1
1 mg/10 ml	1	1	1	1	1	1

Todas las cajas se colocaron en una campana bajo radiación UV de onda larga (con la misma lámpara empleada para la determinación de la actividad hemolítica) durante 24 horas. Al concluir este tiempo se suspendió la radiación y se hizo la observación del crecimiento bacteriano. Se dejaron las cajas 24 horas más sin radiación y se volvió a hacer la observación.

Toda esta experimentación se repitió 6 veces y el promedio de las observaciones se encuentra anotado en la tabla 6.

Para Bacillus subtilis se procedió de idéntica manera. En este caso la cepa provino del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y los resultados promedio aparecen anotados en la tabla 7.

c Pruebas químicas

1. Separación de los componentes de los extractos.

Para separar los componentes se hizo una cromatografía líquido-líquido de alta presión de cada uno de los tres extractos purificados. Para purificarlos, a cada uno se le sometió a una cromatografía en columna de gel de sílice, en la que la relación gel-extracto fue de 100:1 (150 g de sílice y 1.5 g de extracto disuelto en la mínima cantidad de hexano).

El eluyente fue hexano y se recogieron fracciones de 40 ml cada una; se empleó como indicador de la presencia de los compuestos

buscados, luz UV de onda larga, aplicada directamente sobre las fracciones con una lámpara Blak Ray UVL 56. Las tres columnas se forraron con papel aluminio para evitar el paso de la luz, así como los matraces en que se recogieron las fracciones.

En el caso del extracto de raíz, se colectaron 37 fracciones de las que las primeras 17 no tuvieron fluorescencia a la luz UV, de la 18ª en adelante, hasta la 32ª, hubo intensa fluorescencia, el resto de las fracciones que no presentó respuesta se desechó.

Del extracto de tallo se recogieron 30 fracciones de las cuales las fracciones 8ª y 12ª y desde la 14ª hasta la 26ª presentaron intensa fluorescencia, las demás se desecharon.

La cromatografía del extracto de flor fue de 50 fracciones, de las que sólo presentaron fluorescencia de la 18ª a la 47ª inclusive.

Al igual que en los casos anteriores, las restantes se descartaron. Las fracciones fluorescentes se reunieron en un matrás balón, 1 para cada extracto, y se evaporaron a presión reducida para eliminar el hexano. Los rendimientos de estas cromatografías se asientan en la tabla 3.

Los extractos secos, que quedaron en las paredes del matraz como pequeñas manchas blanco-amarillentas, de textura lisa se sometieron a una cromatografía de alta presión líquido-líquido. Esta cromatografía se llevó a cabo en un aparato Varian 8 500 con detector de índice de refracción. Los cromatogramas obtenidos se encuentran en las figuras 2, 3 y 4.

2. Caracterización del alfa-tertienilo y de otros compuestos

Para caracterizar las fracciones de la cromatografía del extracto de raíz, que se tomó como tipo, se empleó espectroscopía en el

ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), de resonancia magnética protónica (RMP) y de masas (EM). Los espectros obtenidos se encuentran en las figuras correspondientes.

VI
RESULTADOS

TABLA 1

Peso de los melidos de Tacetes

	Peso (g)
Raíz	777.00
Tallo	1 239.50
Flor	437.50

TABLA 2

Rendimiento de las extracciones

Extracto hexánico	Peso (g)
Raíz	12.90
Tallo	16.40
Flor	11.45

TABLA 3

Rendimiento de la cromatografía en columna

Extracto	Peso (mg)
Raíz	86.60
Tallo	815.20
Flor	75.00

TABLA 4

Curva de calibración

Concentración NaCl %	Absorbancia
0.9	0
0.7	0.050
0.3	0.055
0.1	0.154
0.0	0.207

TABLA 5

Actividad hemolítica

Absorbancia

Extractos	Problema	Testigo	△	Hemólisis
Raíz	0.9022	0.8715	0.0307	15.0%
Tallo	0.9075	0.8256	0.0819	39.0
Flor	0.9647	0.8055	0.1592	75.4

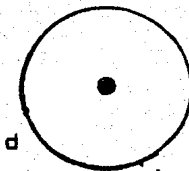
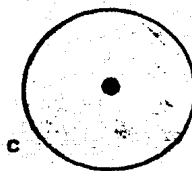
Controles

	Absorbancia		Hemólisis %	
	con hexano	con sol. isotónica	con hexano	con sol. isotónica
Irradiado	0.1614	0.0086	5	0
Sin Irradiar	0.0755	0		

Tablas cualitativas de crecimiento bacteriano

Claves de crecimiento:

- **** crecimiento muy abundante (a)
 *** crecimiento abundante (b)
 ** crecimiento poco abundante (c)
 * ningún crecimiento (d)

Crecimiento de E. coli

Concentración	Flor		Raíz		Tallo	
	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV
1 mg/ 2 ml	***	**	***	**	***	**
1 mg/ 5 ml	***	**	***	***	***	**
1 mg/10 ml	***	**	****	****	***	***

Controles

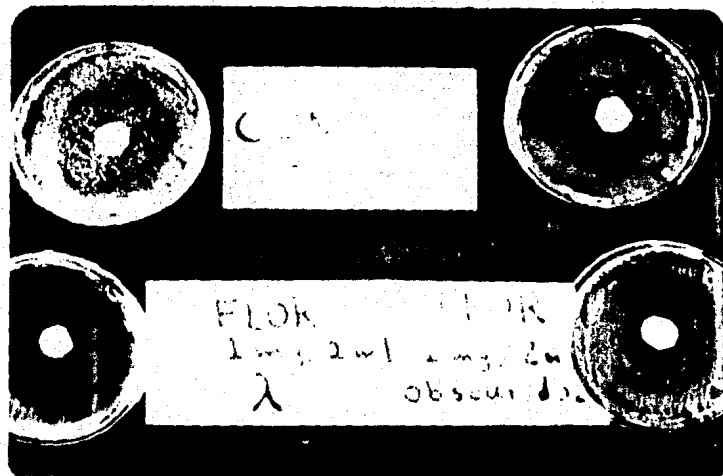
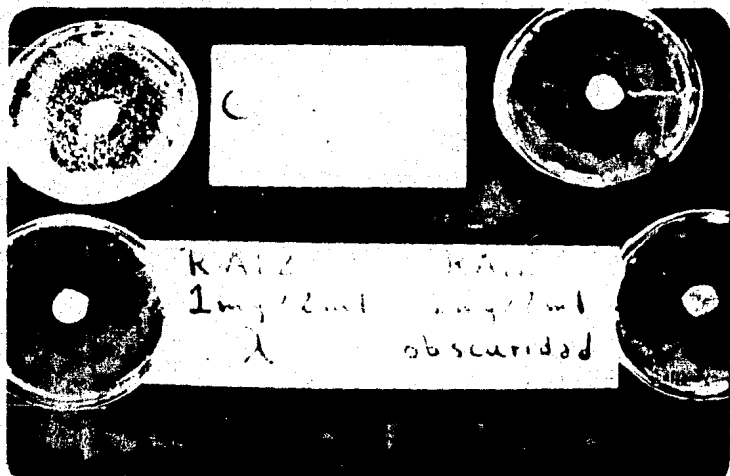
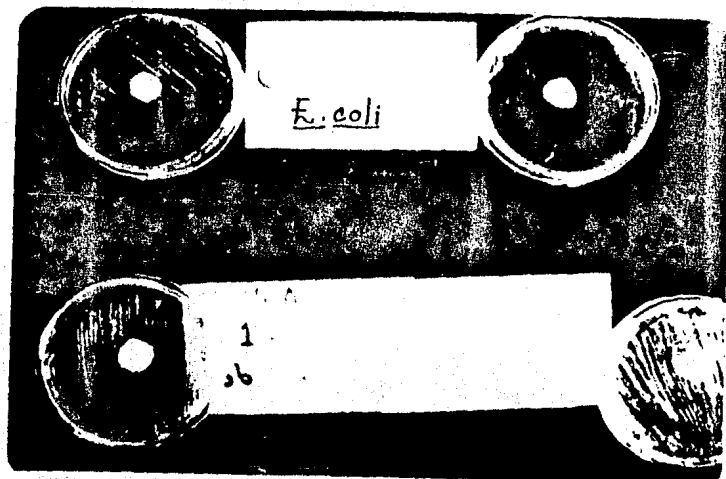
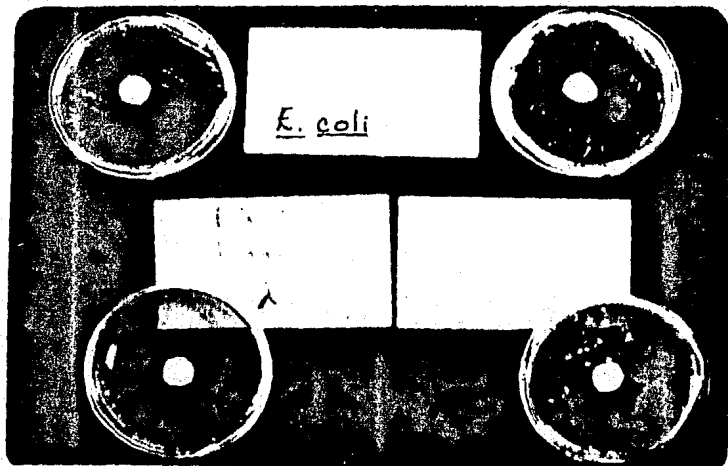
Condiciones	sin UV		con UV	
Sin papel filtro	***		**	
Con papel filtro y hexano	***		**	

TABLA 7

Crecimiento de B. subtilis

Concentración	Flor		Raíz		Tallo	
	sin UV	con UV	sin UV	con UV	sin UV	con UV
1 mg/ 2 ml	***	*	****	*	***	*
1 mg/ 5 ml	***	*	****	**	****	*
1 mg/10 ml	****	*	****	**	****	**

Condiciones	Controles	
	sin UV	con UV
Sin papel filtro	****	***
Con papel filtro y hexano	****	***



VI DISCUSION

Actividad hemolítica

Analizando la tabla de resultados número 5, los controles señalan que la irradiación por sí sola prácticamente no provocó hemólisis durante el tiempo que duró la experimentación y que el hexa no ocasiona un muy pequeño porcentaje ($\approx 5\%$) de hemólisis, por lo que la liberación de hemoglobina en los tubos testigo y problema se debe exclusivamente a la acción de los extractos sobre los eritrocitos.

En la serie de tubos testigo la absorbancia es menor que en la de los tubos problema, lo cual indica que los extractos son activos por sí mismos, pero que al irradiarlos, esta actividad aumenta. La diferencia entre la absorbancia de los tubos problema y la de los testigos da, interpolada en la curva de calibración (Fig.1) el porcentaje de hemólisis producido por la fotoactivación de los extractos.

El extracto de flor es el más sensible a la activación por radiación UV (75.4% de hemólisis), el de tallo tiene un valor intermedio (39.0%) y el de raíz es el menos sensible (15%).

Esta sensibilidad a la fotoactivación está de acuerdo con la composición química de los extractos. Se sabe que los poliacetilenos son fotosensibles y tienen acción sobre los eritrocitos (17). El extracto de flor es el que tiene mayor proporción de poliacetilenos y fue el más activo. En orden decreciente de proporción de poliacetilenos y de actividad se encuentran los extractos de tallo y raíz.

Actividad bacteriostática

Las plantas que al someterlas a la prueba de Daniels (8) presentan un halo de inhibición de crecimiento bien definido, tanto a la luz UV como en la obscuridad, se denominan antibióticas (14).

Tagetes tenuifolia pertenece a este grupo. Se pudo observar en las cajas de crecimiento un halo de inhibición alrededor del papel filtro, ligeramente marcado en las cajas que no se irradiaron (lote testigo) y perfectamente definido y de diferente ancho en las irradiadas (lote problema). En estas últimas, además, el crecimiento de los organismos a partir del halo y hacia el borde de la caja es menor que en las no irradiadas, yendo en disminución, según la actividad del extracto y la concentración, hasta llegar a ser nulo. Esto se debe a que hay difusión del extracto en todo el medio de cultivo, quedando más concentrado en la parte inmediata al papel filtro.

Los controles indican que tanto la acción de la luz UV por sí sola, como la del hexano irradiado, es mínima sobre los microorganismos, por lo que la inhibición del crecimiento se debió, prácticamente en su totalidad, a la acción fototóxica de los extractos.

La diferencia de crecimiento en Escherichia coli (colonias circulares, planas, lisas, de color blanco lechoso) entre el lote testigo y el problema fue pequeña. Por lo que respecta a Bacillus subtilis, el crecimiento en el lote problema (colonias circulares, blancas, planas y lisas) se vio inhibido fuertemente, por lo que la diferencia con el testigo fue muy marcada.

Se ve pues, que E. coli (Gram -) tiene una menor sensibilidad a la acción fototóxica de los extractos que B. subtilis (Gram +). Esto se debe a que los microorganismos Gram -, no se afectan prácticamente por la acción de los poliacetilenos fotoactivados, pero sí los Gram+ (14), y los extractos de Tagetes tenuifolia tienen poliacetilenos. La pequeña sensibilidad que muestra E. coli se debe a los tintenos.

Respecto a dichos extractos, el de flor, en el que predominan los poliacetilenos, resultó el más activo y tiene fuerte acción bacteriostática aun a la menor dilución probada. Vienen en seguida el de tallo y flor, con una muy pequeña diferencia entre ambos, y ya sin acción

a la dilución menor.

Se puede deducir de estos resultados y considerando la composición química de los extractos, que los poliacetilenos tienen una mayor actividad fototóxica que los tiofenos frente a los microorganismos, igual que como se vio para los eritrocitos.

Composición de los extractos

Una vez comprobada la actividad fototóxica de los extractos de las diversas partes de la planta (raíz, tallo y flor) con las pruebas hemolítica y bacteriostática, se procedió a separar sus componentes con objetos de cerciorarnos de que esta actividad se debe a la presencia de tiofenos y poliacetilenos.

La separación se hizo por cromatografía líquida-líquida de alta presión y en los cromatogramas obtenidos se puede apreciar la presencia de 6 diferentes sustancias que guardan entre sí distintas proporciones en los tres extractos (de raíz, tallo y flor) - (Figs. 2, 3 y 4 respectivamente).

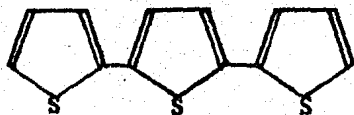
El último pico de los cromatogramas, o sea, las últimas fracciones de la cromatografía, es el que tiene el alfa-tertienilo y puede verse que la cantidad de este compuesto, existente en los extractos, es diferente para cada uno de ellos. La mayor proporción corresponde al extracto de raíz y en orden decreciente vienen los extractos de tallo, con una proporción intermedia y los de flor con una proporción ligeramente menor que la del tallo.

Antes de proceder a la cromatografía del extracto crudo de raíz, que se tomó como tipo, se le determinó un espectro en el UV para referencia y se vio que prácticamente corresponde al del alfa-tertienilo, sólo que con sus máximos desplazados ligeramente hacia longitudes de onda menores (343.5 y 249 nm).

Una vez fraccionado el extracto en la cromatografía, se determi-

nó el espectro en el UV de la fracción 7, una de las correspondientes al pico de mayor proporción (pico 6) en el cromatograma. Este espectro tuvo el mismo perfil (Fig. 4) que el del extracto crudo, sólo que con los máximos desplazados a una mayor longitud de onda (347 y 248 nm) y las curvas con un coeficiente de extinción mayor. No obstante que ya es una sustancia purificada, todavía no alcanzó los máximos reportados para el alfa-tertienilo (350 y 252 nm) - (11); la diferencia se debe probablemente a pequeñas impurezas y a que los espectros no se corrieron con el mismo aparato.

Además del espectro en el UV, a esta fracción se le corrió un espectro de masas (Fig. 5), en donde el ión molecular tiene una señal a 248 m/e que concuerda con el peso molecular del alfa-tertienilo (248). Queda así comprobado que el componente principal del extracto de raíz es esta sustancia.

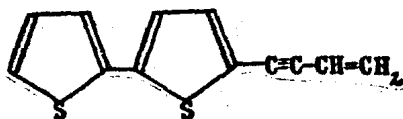


alfa-tertienilo (II)



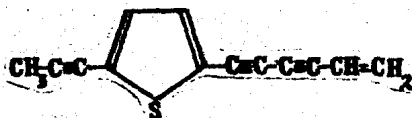
De la fracción 5 del cromatograma del mismo extracto, que corresponde a la confluencia del pico 5 con el principio del pico 6, se determinaron los espectros en el UV, en el IR y de RMP. El espectro en el UV muestra el mismo perfil que el del alfa-tertienilo (Fig. 6) y en el IR, además de las bandas características de este compuesto, entre 1 000 y 650 cm^{-1} , se puede apreciar una a 2 200 cm^{-1} de triples enlaces (Fig. 7). En el espectro de RMP (Fig. 8) se pueden ver señales correspondientes a dos protones vinílicos terminales y a uno vecino a un enlace acetilénico (centrados a 7.22 τ - 5.4 δ , respectivamente), por lo que el compuesto correspondiente al

pico 5 se identifica como el 2(butin-1-en-3-il)ditenilo (III).



III

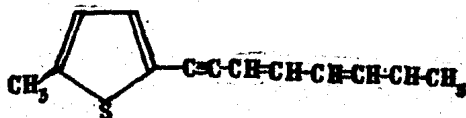
A la fracción 4 del cromatograma se le hicieron iguales determinaciones espectroscópicas, identificándose el compuesto correspondiente como el 2(hexadien-1,3-en-5-il)5(propin-1-il-1)tiofeno, (VII).



VII

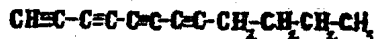
De las tres primeras fracciones del cromatograma, que corresponden a los picos 1, 2 y 3, se determinaron también los espectros en el UV y se proponen para los compuestos correspondientes a estos tres picos las siguientes fórmulas tentativas:

Pico 3



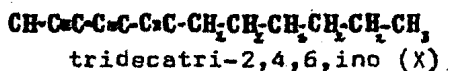
2(octadien-1,3,5-trien-5-il)5-metiltiofeno (VIII)

Pico 2



dodecatetra-1,3,5,7-ino (IX)

Ficc 1



Mediante este análisis se puede ver que los extractos hexánicos tanto de raíz, como de tallo y flor están constituidos por compuestos poliacetilénicos y tiofénicos, que son los que les confieren la actividad fototóxica. La diferencia de actividad de los extractos está dada por las distintas proporciones en que se encuentran estos dos tipos de compuestos en ellos. Se puede apreciar que los poliacetilénicos tienen mayor actividad fototóxica que los tiofénicos, ya que el extracto de flor, en el que hay mayor proporción de poliacetilenos, resultó el más activo, y el de raíz en el cual predominan los tiofenos, fue el menos activo.

FIG. 1

CURVA DE CALIBRACION PARA DETERMINAR
% DE HEMOLISIS

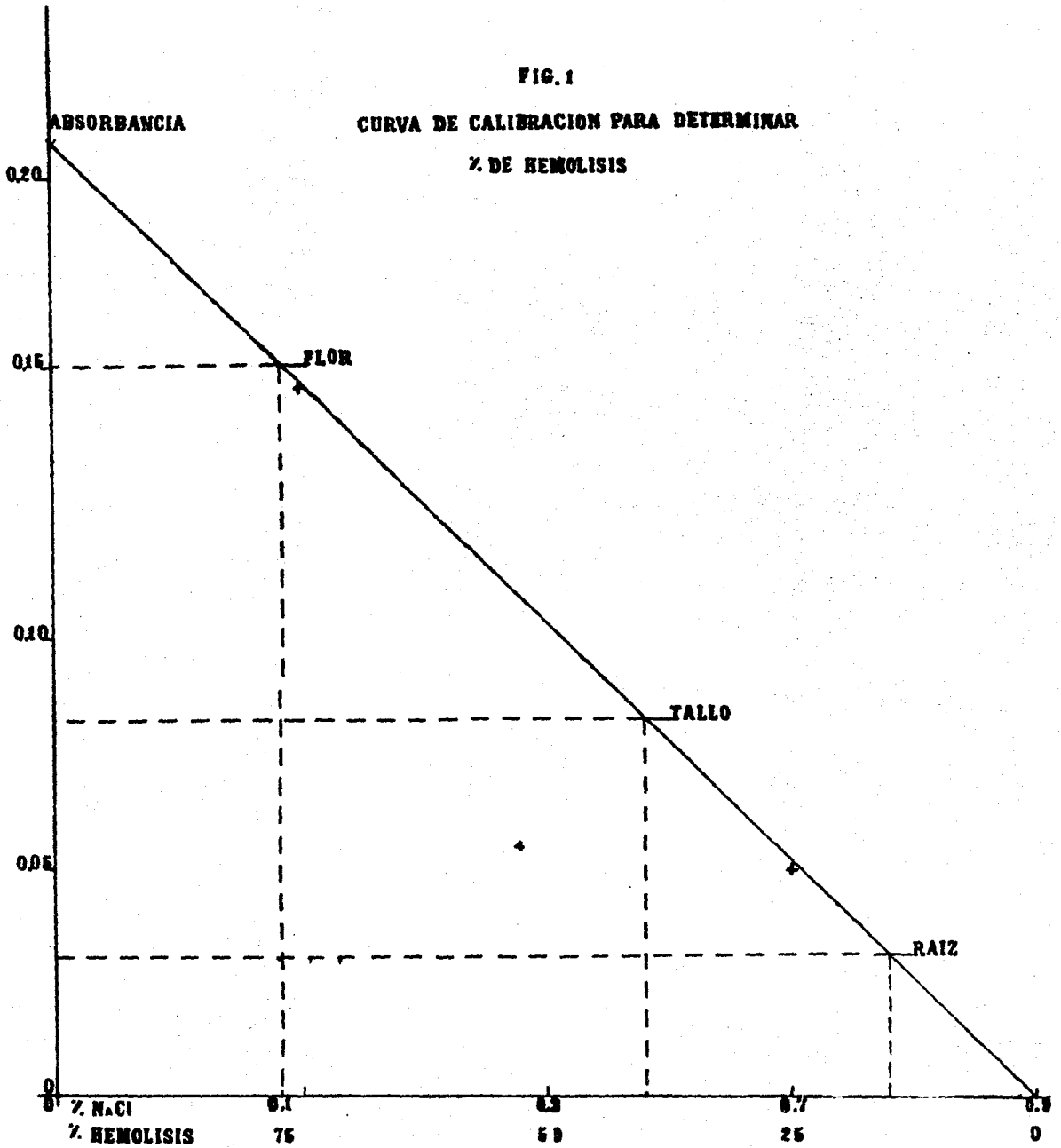


FIG. 2

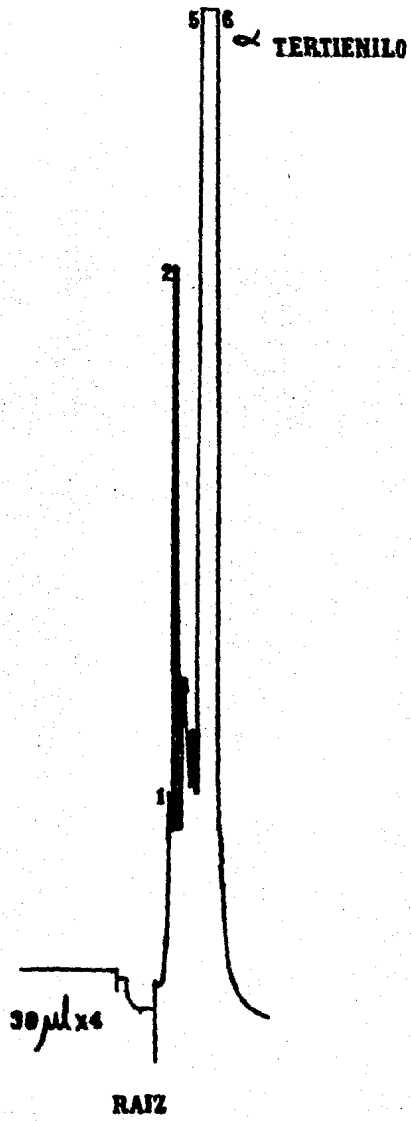
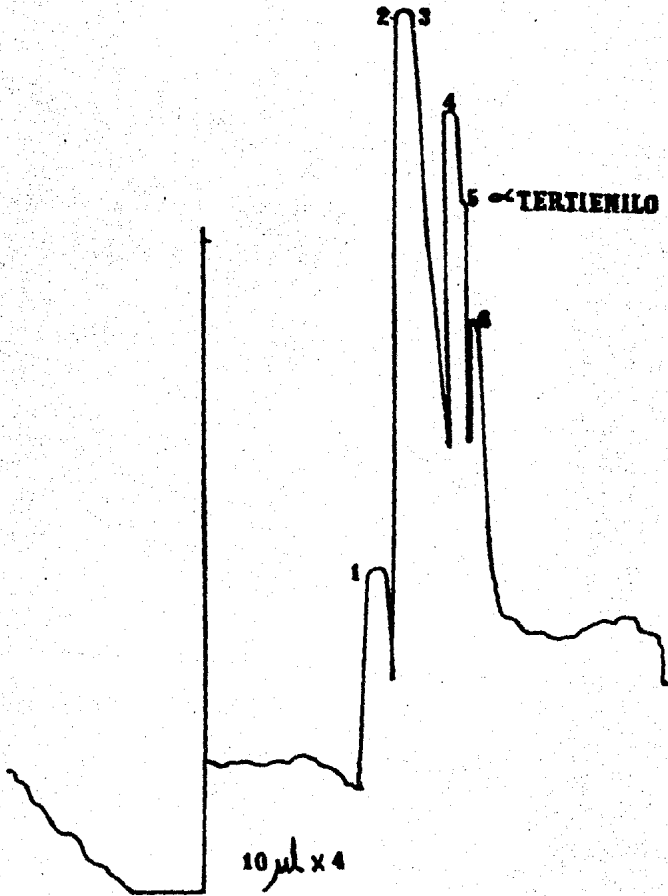
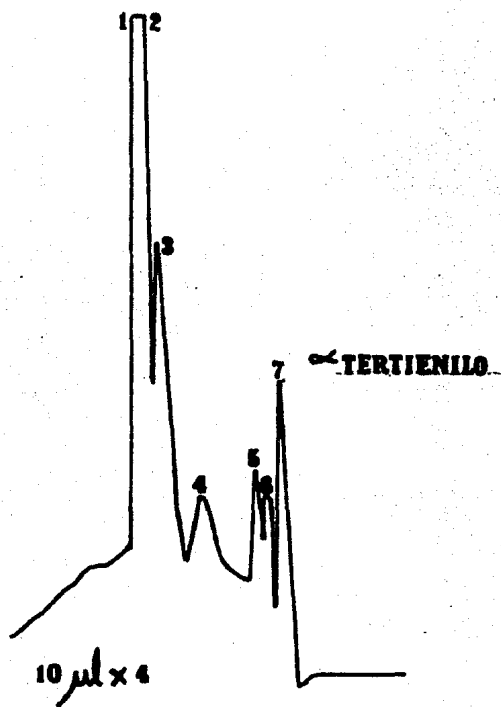


FIG. 3



TALLO

FIG. 4



FLOR

FIG. 5 (←TERTIENILO)

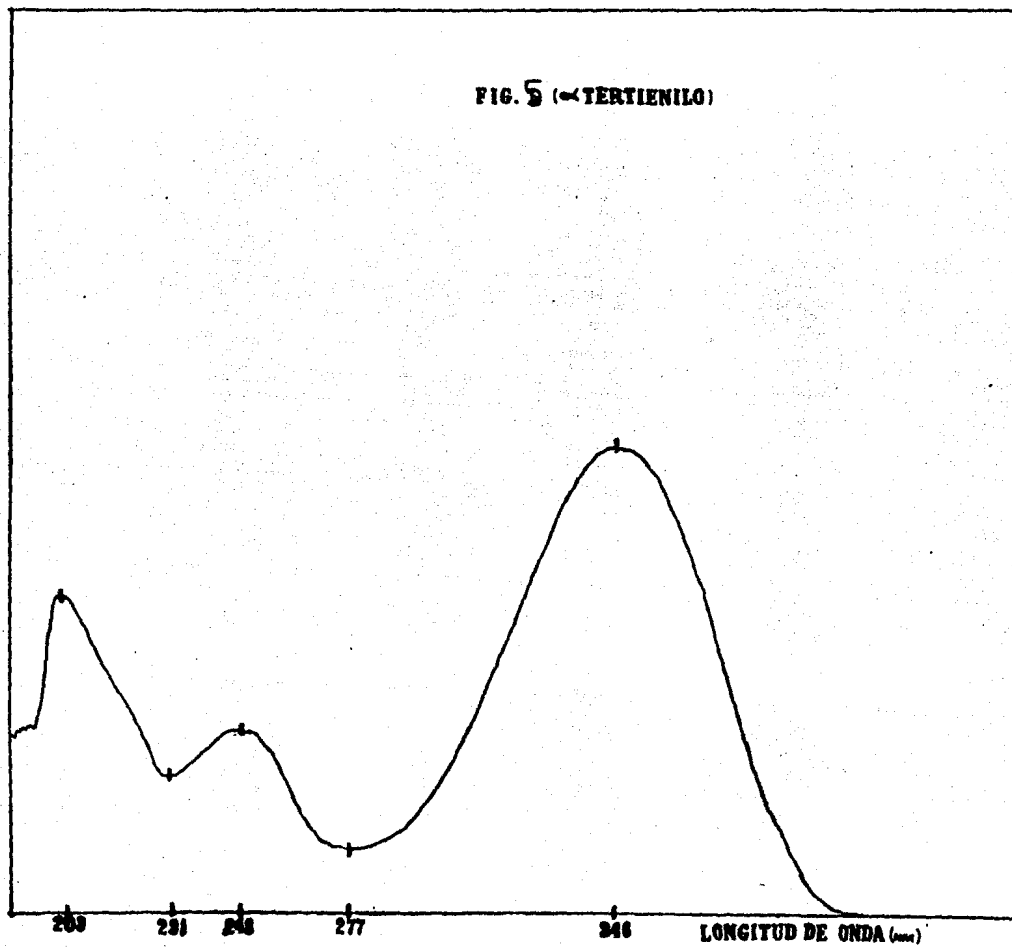


FIG. 6

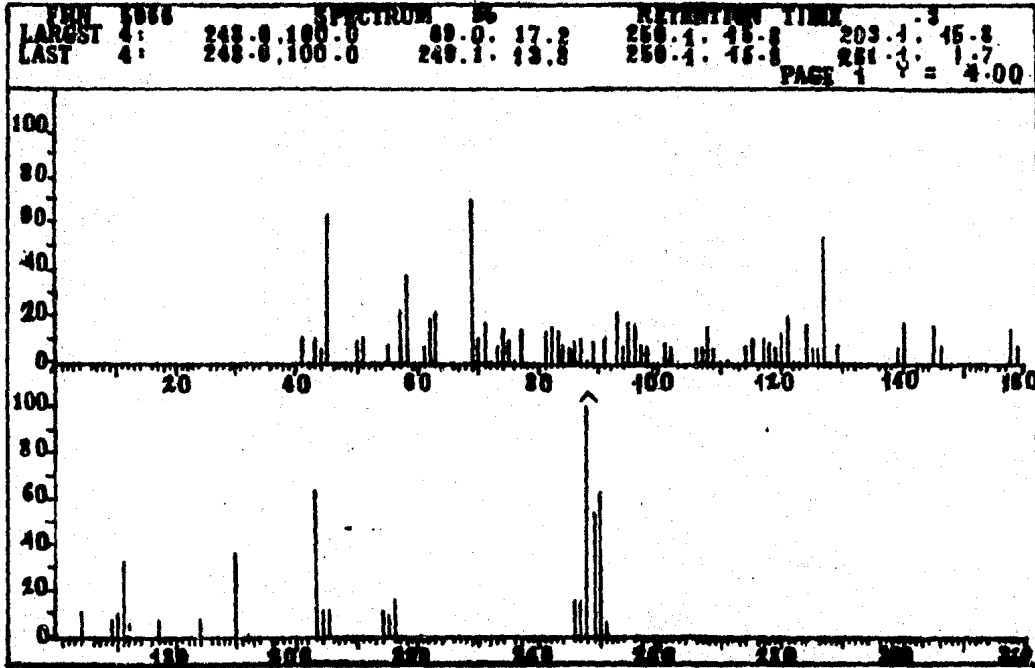


FIG. 7 (COMP. III)

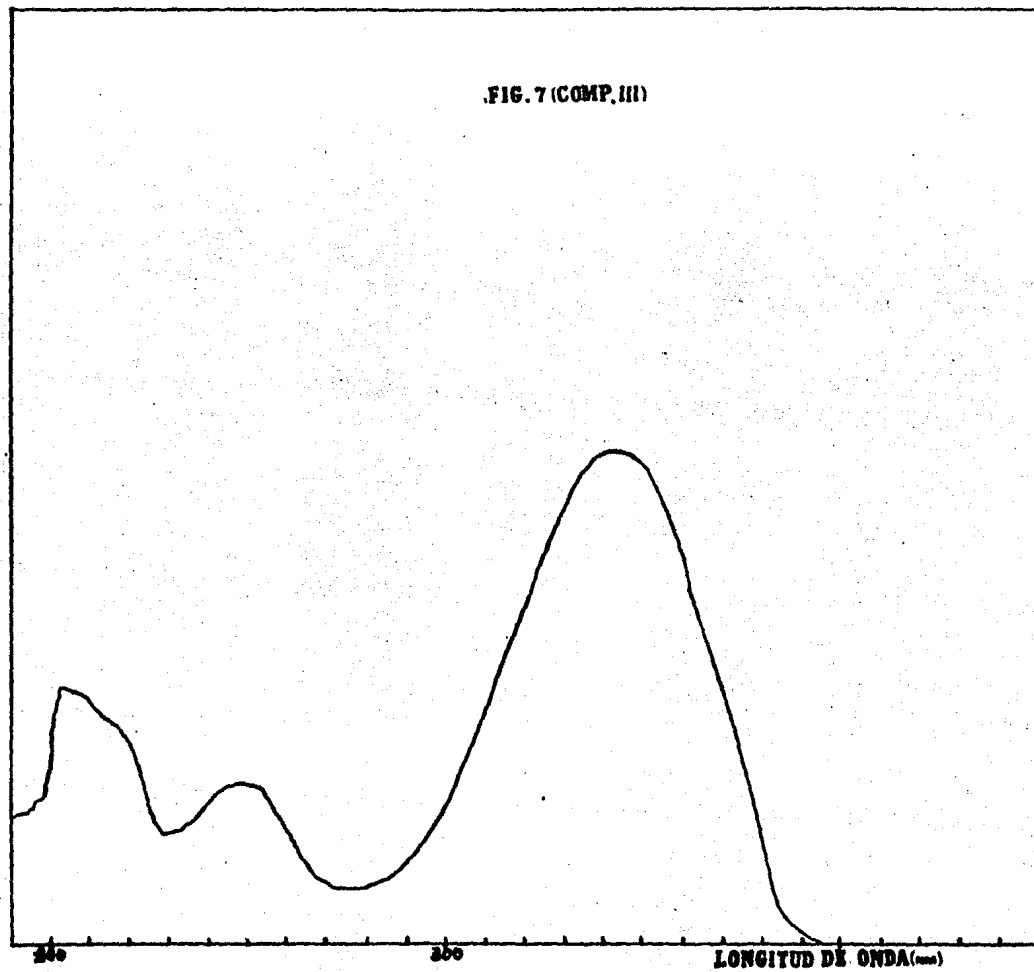


FIG. 8
MICRAS

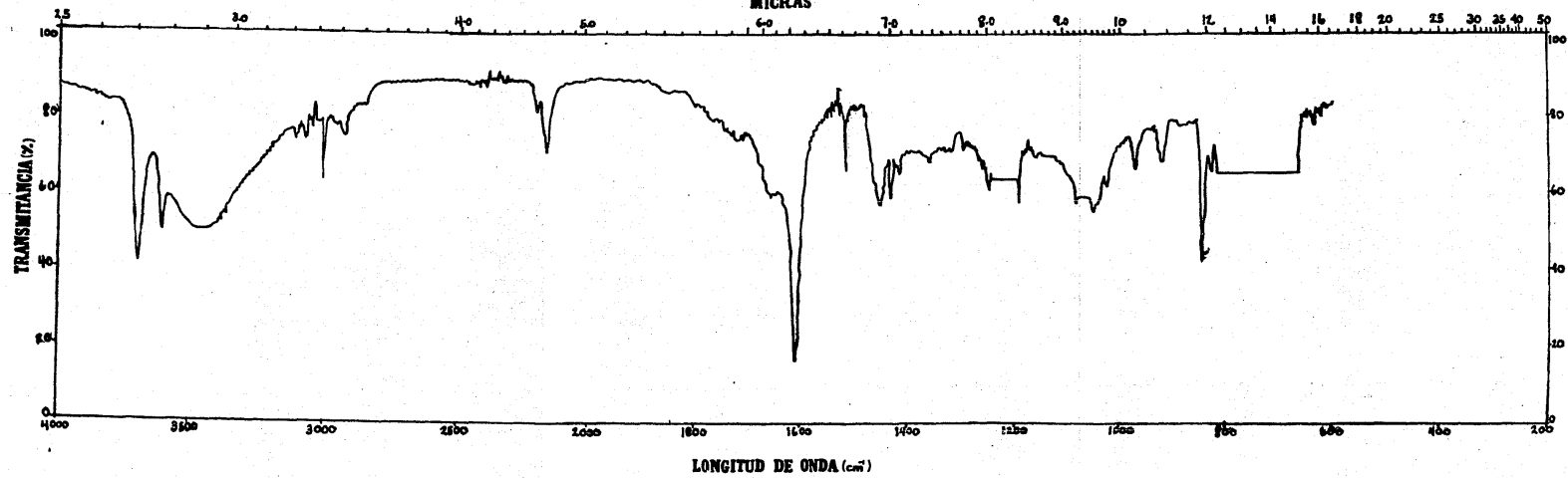
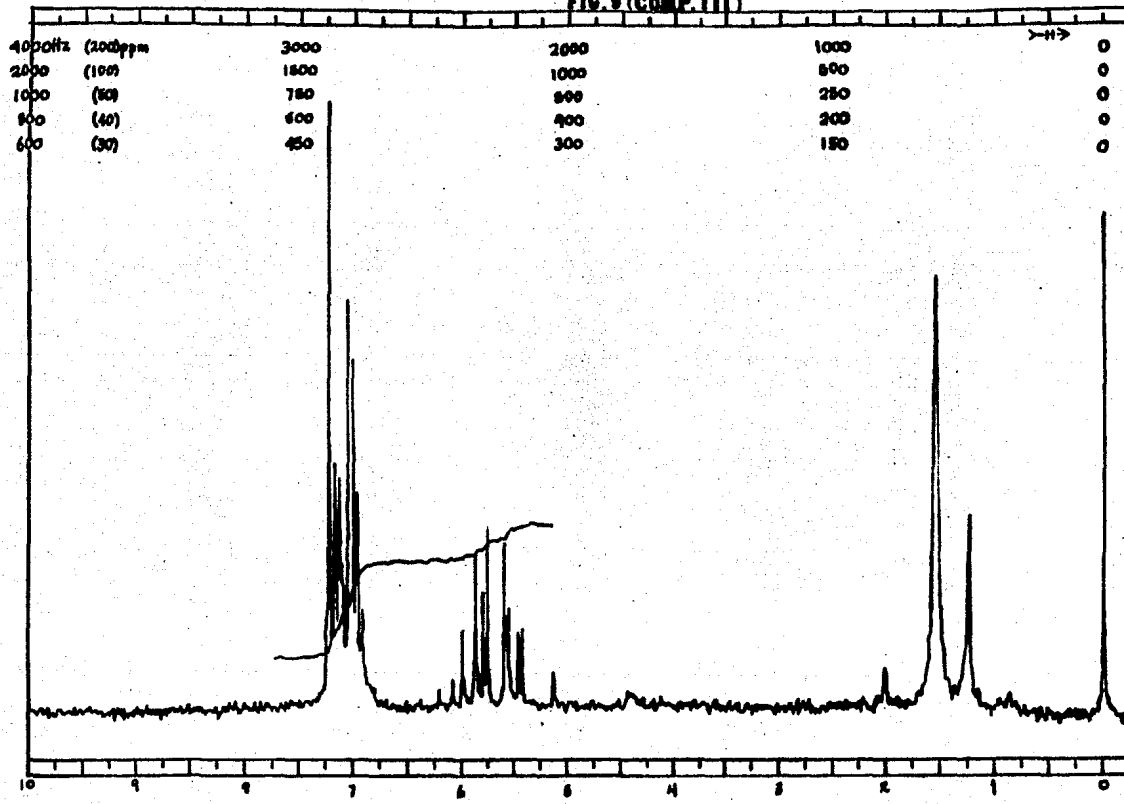


FIG. 9 (COMP. III)



VII CONCLUSIONES

- 1) Los extractos hexánicos de raíz, tallo y flor de Taraxacum tenuifolia tienen actividad fototóxica (hemolítica y bacteriostática.
- 2) La actividad de los extractos va, en orden decreciente, de flor a tallo y a raíz.
- 3) Bacillus subtilis es más sensible a la acción de los extractos que Escherichia coli.
- 4) La cromatografía líquido-líquido de alta presión indica la presencia de seis componentes en los extractos, en diferentes proporciones en cada uno.
- 5) El análisis espectrométrico de las fracciones de la cromatografía permitió la identificación del alfa-tertienilo y de los compuestos poliacetilénicos.
- 6) Se comprobó así que la actividad fototóxica de los extractos se debe a la presencia de tiofenos y poliacetilenos.

VIII REFERENCIAS

1. Atkinson, R. E., R. F. Curtis y G. T. Phillips. *J. Chem. Soc.* 7109 (1965).
2. Bakke, J., F. J. Gommers, I. Nieuwenhevis y H. Wynberg. *J. Biol. Chem.*, 254, 1841 (1979).
3. Bohlmann, F. y P. Herbst. *Chem. Ber.*, 95, 2945 (1962).
4. Camm, E. L., G. H. N. Towers y J. C. Mitchell. *Phytochemistry*, 14, 2007 (1975).
5. Chan, G. F. Q., G. H. N. Towers y J. C. Mitchell. *Phytochemistry*, 14, 2295 (1975).
6. Cronquist, A. "An Integrated System of Classification of Flowering Plants". Columbia University Press, New York (1981).
7. Curtis, R. F. y G. T. Phillips. *J. Chromatog.*, 9, 366 (1962).
8. Daniels, F. *J. Invest. Dermat.*, 44, 259 (1965).
9. Depuy, C. H. y C. L. Chapman. "Reacciones moleculares y fotoquímicas". Alhambra, Madrid (1975).
10. Fowlks, W. L., D. G. Griffith y E. L. Oginsky. *Nature* 181, 571 (1958)
11. Kooreman, H. J. y H. Wynberg. *Recueil*, 86, 37 (1967)
12. Martinez, M. y E. Matuda. "Flora del Estado de México", II. Biblioteca Enciclopédica del Valle de México. México (1979).
13. Pathak, M. A. y D. M. Kramer. *Biochim. Biophys. Acta*, 195 (1969).
14. Towers, G. H. N., C. K. Wat, E. A. Graham y R. J. Bandani. *Lloydia*, 40, 487 (1977).
15. Uhlenbroek, J. H. y J. D. Bijloo. *Recueil Trav. Chim. Pays-Bas*, 77, 1004 (1958).
16. Wat, C., R. K. Biswas, E. A. Graham, L. Bohm y G. H. N. Towers. *J. Nat. Prod.* 42, 103 (1978)
17. Yamamoto, E., C. Wat, W. D. Macrae y G. H. N. Towers. *Febs Letters*, 107, 134 (1979).
18. Zechmeister, L., y J. Sease. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 270 (1947).