

Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México

Preliminary phytochemical analysis from hexanic extract of *Hemiphylacus novogalicianus* leaves, an endemic specie of Mexico

Virginia Flores-Morales^{1*}, Oswaldo Castañeda Hernández²,
Tomás Montiel Santillán³, Gloria Patricia Hernández Delgado⁴

Flores-Morales, V., Castañeda Hernández, O., Montiel Santillán, T., Hernández Delgado, G. P. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 63: 18-23, septiembre-diciembre 2014.

RESUMEN

En este trabajo se aborda el análisis fitoquímico preliminar (AFP) del extracto hexánico de las hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. El estudio permitió establecer la posible composición química de la planta. En este análisis se detectó la presencia de lo que pudiesen ser compuestos de tipo indol y sus derivados compuestos con grupos carbonilos, esteroides y ácidos grasos insaturados.

ABSTRACT

This work addresses the phytochemical preliminary analysis (PPA) from hexanic extract of *Hemiphylacus novogalicianus* leaves, an endemic specie of

Palabras clave: análisis fitoquímico, composición química, *Hemiphylacus novogalicianus*, especie endémica, muerte de ganado vacuno.

Keywords: phytochemical analysis, chemical composition, *Hemiphylacus novogalicianus*, endemic species, cattle's death.

Recibido: 18 de septiembre de 2013, aceptado: 25 de julio de 2014

¹ Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética, Universidad Autónoma de Zacatecas.

² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

³ Laboratorio de Físicoquímica, Universidad Autónoma de Zacatecas.

⁴ Laboratorio de Farmacología, Universidad Autónoma de Zacatecas.

* Autor para correspondencia: virginia.flores@uaz.edu.mx.

Mexico. The Phytochemical Preliminary Analysis was used to establish the possible chemical composition of the plant. In the PPA there has been detected the presence of compounds that could be indol compounds and its derivatives, compounds with carbonyl groups, steroids and unsaturated fatty acids.

INTRODUCCIÓN

México es un país que presenta un universo propio en cuanto a vegetación, lo que permite incluso la presencia de especies endémicas. No obstante, muestra rezago en cuanto al conocimiento de la composición química de sus plantas; lo cual resulta paradójico ya que nuestra sociedad, como muchas otras, se caracteriza por una gran recurrencia al uso de plantas para el tratamiento de múltiples afecciones (Rzedowski, 1991; García-Alvarado et al., 2001; Villaseñor, 2004; Villaseñor y Espinosa-García, 2004).

Zacatecas, ubicado en una zona árida y semiárida del norte del país, es uno de los estados con menor conocimiento de su flora. Un claro ejemplo lo constituye la planta *Hemiphylacus novogalicianus*, de nombre común cebolleta. Según algunos reportes verbales, el ganado vacuno de la localidad de San Pedro Piedra Gorda, Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas, muere tras la ingesta de dicha planta. Sin embargo, no se ha determinado qué es lo que ocasiona el envenenamiento, debido a que no se conoce la composición química de la misma, por lo

que la investigación en lo referente a la fitoquímica de este tipo de plantas tiene que intensificarse.

En ese contexto, el grupo de trabajo del Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética (LSAyB) de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ) se interesó en realizar un estudio fitoquímico de esta especie; debido a que actualmente no se cuenta con un estudio de esta naturaleza. La realización del proyecto permitirá que la UAZ contribuya a la solución del problema referido y, con ello, evitar pérdidas económicas a los ganaderos locales, asociadas a dicha problemática. Así, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio, que consiste en el estudio fitoquímico preliminar del extracto hexánico de las hojas de la planta.

Por definición, la fitoquímica es el estudio de los componentes químicos de las plantas. La técnica más común para obtener los principios activos (PA) a partir de plantas es conocida como extracción y su finalidad es la separación de la materia soluble (componentes fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) por acción de un disolvente (Shing, 2011). Dentro de los métodos empleados para ello se encuentran las técnicas de extracción sólido-líquido, que implican el contacto íntimo entre la materia prima y el disolvente, siendo éstas la percolación, la inmersión y la maceración (Bart y Pilz, 2011). La separación de los componentes es una etapa importante en un análisis fitoquímico. Los métodos más empleados son los físicos y dentro de ellos, los de mayor aplicación son los métodos cromatográficos: cromatografía en capa fina -CCF- y cromatografía en columna -CC- (Rios et al., 2013).

En la búsqueda de plantas con principios activos, las pruebas químicas resultan de gran utilidad, pues se caracterizan por ser específicas, rápidas y requerir un equipo mínimo (fácil de transportar cuando es necesario), además de ser económicas. Entre todos los métodos destaca el tratamiento de los extractos con los agentes cromógenos, el AFP, el cual contempla la detección de los principales tipos de metabolitos que se encuentran relacionados con alguna actividad biológica, a saber: alcoholes, alcaloides, flavonoides, compuestos carbonílicos, esteroides, indoles, ácidos grasos y azúcares; así como los correspondientes derivados de los tres últimos tipos de compuestos (Domínguez, 1973; Reyes et al., 2010; Shing, 2011).

Tras la extracción de los componentes químicos, la detección de éstos es la etapa siguiente en un análisis fitoquímico (Cseke et al., 2006). Algunas sustancias pueden ser observadas a simple vista (como las clorofilas y algunos otros pigmentos), mientras que la detección de sustancias incoloras se realiza mediante el análisis de placas cromatográficas (Fried y Sherma, 1996). Varios componentes bajo radiación UV (254 y 365 nm) mostrarán absorción de la radiación o fluorescencia. Además, la visualización puede realizarse empleando agentes cromógenos, algunos de ellos universales (yodo: sublimado y en solución alcohólica) y otros más específicos para determinados grupos funcionales, constituyen en conjunto al AFP.

***Hemiphyllacus novogalicianus* L. Hern.**

Hemiphyllacus novogalicianus es una planta endémica de México (particularmente de los estados de Zacatecas y Aguascalientes), de la cual no se dispone de muchos reportes sobre su taxonomía ni composición química. Hasta el momento existe cierto grado de controversia en cuanto a su clasificación, pues los especialistas la agrupan en dos posibles subfamilias de la familia Liliaceae *sensu lato*: Hyacinthaceae y Asphodelaceae. De acuerdo a la primera, la planta se clasifica así: reino Plantae; división Angiospermae; clase Liliopsida; subclase Liliidae; orden Liliales; familia Liliaceae; subfamilia Hyacinthaceae; género *Hemiphyllacus*, y especie *novogalicianus* (Chase, 1998, 2003; Mahidol et al., 1998; Chase et al., 2000; Mwafongo et al., 2010; Pohl et al., 2010; Hernández, 2011).

La subfamilia Hyacinthaceae cuenta con aproximadamente 70 géneros y 1,000 especies. La mayor diversidad se encuentra en Sudáfrica, aunque también hay en el Mediterráneo, sureste de Asia, noreste de Europa y América. En México se encuentran 3 géneros y 7 especies (Perry, 1985; Hamouche et al., 2010). Las plantas pertenecientes a la subfamilia Hyacinthaceae son plantas de hoja perenne con raíz bulbosa y crecimiento elevado a partir de un tallo cilíndrico muy estrecho. Químicamente se caracterizan por contener flavonoides de tipo homoisoflavona que poseen propiedades antibacteriales y antiinflamatorias. Contienen saponinas esteroidales y alcaloides de alta toxicidad, relacionada con el envenenamiento de mamíferos (Pohl et al., 2000; George et al., 2001; Waller et al., 2013; Masondo et al., 2014).

Hemiphylacus novogalicianus es una planta perenne, presenta hojas lanceoladas y en posición vertical, vasculares, de textura suave, con savia y no viscosa. La inflorescencia carece de hojas y generalmente es larga, de 70 cm a 90 cm (Figura 1). Las flores se encuentran dispuestas en racimos radialmente simétricos, con seis pétalos dispuestos en verticilos de dos hojas cada uno. El fruto es una cápsula negra que al madurar se abre y libera las semillas, que son de forma irregular (Figura 2).

Hasta el momento se desconoce la razón por la cual esta planta es tóxica para el ganado vacuno y no existe registro alguno de la composición química de esta especie, por lo que no es posible hacer referencia a un tipo específico de compuesto que se relacione con esta actividad. Sin embargo, la evidencia encontrada en otros géneros pertenecientes a la subfamilia Hyacinthaceae nos hace plantear como primera hipótesis del trabajo que a través de una prueba cualitativa como el AFP será posible tener un panorama inicial de las familias de metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de hojas secas de *Hemiphylacus novogalicianus*. En un segundo momento se realizará un análisis fitoquímico completo que permita encontrar a los compuestos responsables de la toxicidad de la planta.

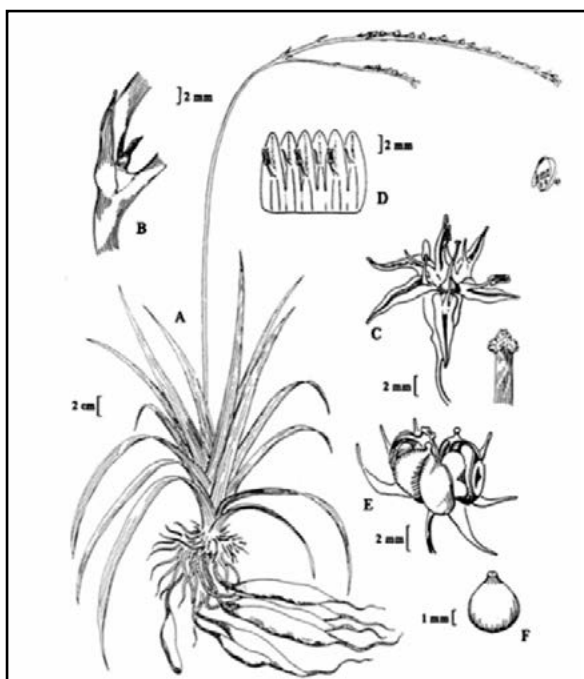


Figura 1. Morfología del género *Hemiphylacus novogalicianus*. Imagen tomada de Hernández (1997).



Figura 2. *Hemiphylacus novogalicianus*. a) Planta en su hábitat, b) Hojas, c) Inflorescencia y d) Flor y fruto. Fotografías tomadas en la zona de recolección y durante el procesamiento del material vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo precisó del uso de material común de laboratorio. El material de vidrio fue lavado con Extran® y secado en una estufa a 80 °C durante 24 h previas a su uso. La recolección del material vegetal se realizó en la localidad de San Pedro Piedra Gorda (Latitud: 22°26'16.48" N; Longitud: 102°22'19.34" O, elevación 2109 msnm) del municipio de Ciudad Cuauhtémoc, Zacatecas. Después de la recolección las muestras recibieron un tratamiento que consistió en el deshojado de las plantas, lavado con agua corriente y después con agua destilada, así como un secado bajo la sombra durante 30 días.

Para la extracción de los componentes se empleó hexano, mientras que la elución de las placas cromatográficas se realizó con mezclas de hexano-acetato de etilo (Química Meyer, grado ACS, pureza 99.9% y 99.7%, respectivamente). En la identificación de los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico se utilizaron diversos agentes cromógenos, los cuales fueron preparados según lo descrito por Domínguez (1982) y Fried y Sherma (1996). En la Tabla 1 se muestran los agentes cromógenos empleados.

Se consideró la maceración como el método más adecuado para la extracción de los componentes. Se realizaron tres maceraciones sucesivas, a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente, tiempo durante el cual se mantuvo una atmósfera inerte con nitrógeno. Se maceraron 1,300 g de hojas secas de *H. novogalicianus* con 11.5 L de hexano. El disolvente fue retirado en un rotavapor (Büchi R-200) a presión reducida, para evitar el sobrecalentamiento de los componentes presentes en el extracto, con lo que se obtuvieron 19.3 g de extracto crudo, lo que corresponde al 1.5% de la masa inicial.

Tabla 1. Agentes cromógenos empleados durante el AFP

Agente cromógeno	Coloración esperada
	Componentes que identifica
Sulfato cérico amoniacal al 1%	Manchas rojizas sobre un fondo amarillo, o manchas amarillo intenso
	Alcoholes y polialcoholes
Reactivo Dragendorff	Manchas rojas o naranjas sobre un fondo amarillo
	Alcaloides
Reactivo de Ehrlich	Manchas azules, verdes, violetas y rojas
	Indoles y sus derivados
Reactivo de Hager	Manchas rojas o naranjas
	Alcaloides
Permanganato de potasio	Manchas rojas o naranjas sobre un fondo amarillo
	Alcaloides
Reactivo de Wagner	Manchas rojas o naranjas
	Alcaloides
Reactivo Ninhidrina	Manchas azules o violáceas
	Aminoácidos
Reactivo de Van-Urk	Manchas azules
	Indoles simples
Reactivo de Benedict	Manchas rojas o marrón
	Glucósidos
2,4-Dinitro fenilhidracina	Manchas amarillas, naranjas o rojas
	Compuestos con carbonilos
Reactivo Libermann-Burchard	Manchas azules, verdes, rosas, violáceas o grises
	Esteroides
Ácido fosfomolibdico	Manchas azules (intenso)
	Ácidos grasos insaturados y compuestos con carbonilos
Nitroprusiato de sodio	Manchas rojo-marrón
	Ésteres

Con el objeto de identificar los principales grupos de metabolitos presentes en el extracto hexánico de *H. novogalicianus*, se realizó el AFP empleando la técnica de CCF, con el uso de la lámpara de luz UV, yodo sublimado y los agentes cromógenos. Para ello, se preparó una muestra a partir de 100 mg de extracto crudo disueltos en 0.3 mL de hexano. Se

usaron 13 cromatoplasmas de gel de sílice de 1.0 cm de ancho por 5.0 cm de alto, y con ayuda del capilar, se aplicó la muestra del extracto crudo, las placas fueron eluidas empleando un sistema 9:1 (v/v) hexano:AcOEt y se probaron los reveladores químicos citados en la Tabla 1.

RESULTADOS

Los resultados del análisis por CCF con los agentes cromógenos específicos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de los tipos de metabolitos presentes en el extracto hexánico

Agente cromógeno	Resultado
Sulfato cérico amoniacal al 1%	Negativo
Reactivo de Dragendorff	Negativo
Reactivo de Ehrlich	Positivo
Reactivo de Hager	Negativo
Permanganato de potasio	Negativo
Reactivo de Wagner	Negativo
Reactivo Ninhidrina	Negativo
Reactivo de Van-Urk	Positivo
Reactivo de Benedict	Negativo
2,4-Dinitrofenilhidrazina	Positivo
Reactivo Libermann-Burchard	Positivo
Ácido fosfomolibdico	Positivo
Nitroprusiato de sodio	Negativo

De los resultados positivos de las placas cromatográficas mostrados en la Tabla 2 se detectó la presencia de lo que pudiesen ser indoles y sus derivados; así como compuestos con grupos carbonilos, esteroides y ácidos grasos insaturados (Figura 3).

DISCUSIÓN

En el AFP se obtuvieron resultados positivos asociados a la presencia de metabolitos de tipo indol y sus derivados, esteroides, ácidos grasos insaturados y compuestos con carbonilos. Estos resultados muestran que *H. novogalicianus* tiene en su composición compuestos de naturaleza no polar, extraíbles en hexano. Este disolvente es capaz de extraer compuestos lipofílicos tales como alcanos, ácidos grasos, ceras, esteroides, terpenoides, cumarinas e incluso algunos alcaloides

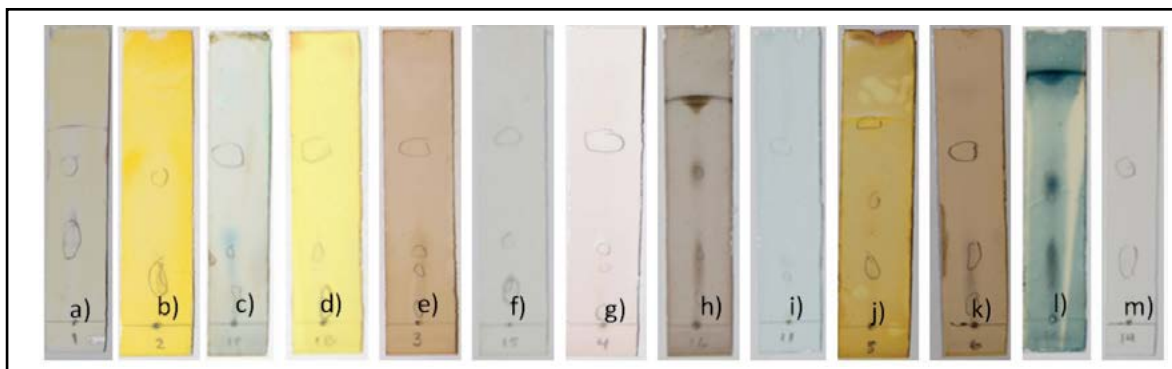


Figura 3. Cromatoplasmas reveladas con los agentes cromógenos empleados: a) Sulfato cérico amoniacal al 1%, b) Reactivo Dragendorff, c) Reactivo de Ehrlich, d) Reactivo de Hager, e) Permanganato de potasio, f) Reactivo de Wagner, g) Reactivo Ninhidrina, h) Reactivo de Van-Urk, i) Reactivo de Benedict, j) 2,4-Dinitrofenilhidrazina, k) Reactivo Libermann-Burchard, l) Ácido fosfomolibdico y m) Nitroprusiato de sodio.

(Sarker et al., 2006). Esto explica el resultado positivo encontrado con varios de los agentes cromógenos, incluida la presencia de alcaloides; los cuales deben estar en su forma neutra para ser aislados en este tipo de disolvente. El resultado positivo para ácidos grasos y esteroides (fitoesteroides) puede estar relacionado con compuestos que forman parte de la estructura de la planta, principalmente membranas celulares.

En el caso de las pruebas que arrojaron resultados negativos, éstas no comprueban definitivamente la inexistencia de los metabolitos que identifican; ya que este tipo de resultados pueden verse afectados ya sea: por la sensibilidad de la CCF o por las interferencias de otros compuestos en las reacciones de reconocimiento; es decir, que algunos compuestos se superpongan con otros, lo cual impide la reacción de los componentes con el agente cromógeno. Por ello es necesario complementar estos resultados iniciando el fraccionamiento del extracto crudo para aislar los componentes y su identificación por otro tipo de metodologías con mayor sensibilidad, como la cromatografía de gases acoplado a masas (GC-EM) y, en el caso de compuestos puros, el empleo de resonancia magnética nuclear (RMN).

De igual manera, si la actividad biológica de *H. novogalicianus* está conferida a compuestos tipo alcaloide o alguno de los metabolitos secundarios descritos para otros miembros de la subfamilia *Hyacinthaceae*, resulta necesario el análisis de extractos de mayor polaridad como el acetónico; ya que éste, debido a la capacidad de extracción del disolvente, puede contener compuestos de tipo flavonoide, terpenos y alcaloides. También se debe examinar el extracto metanólico donde pueden



Figura 4. Hojas y bulbos de *Hemiphylacus novogalicianus* recolectada en San Pedro Piedra Gorda, Cd. Cuauhtémoc, Zacatecas. Fotografía tomada por los autores en junio de 2013.

aparecer compuestos tipo saponinas, esteroides y alcaloides; todos ellos relacionados con la toxicidad de la subfamilia en mamíferos (George et al., 2001).

Por tanto, en lo que respecta a la identificación preliminar de metabolitos a los que se pudiera atribuir la toxicidad de la planta, los resultados que se obtuvieron en el AFP parecen indicar que el extracto hexánico no presenta este tipo de componentes. Sin embargo, será necesario establecer la naturaleza de los compuestos presentes, tales como esteroides y alcaloides, ya que algunos de ellos (o su combinación) pueden estar relacionados con la actividad biológica en el ganado vacuno.

CONCLUSIONES

Hemiphylacus novogalicianus es una planta endémica de México, de la cual se tiene muy poca información, y en particular, se carece de reportes acerca de su composición química. La identificación preliminar de fitoquímicos se realizó por medio de CCF y agentes cromógenos (AFP), que obtuvieron resultados positivos para la presencia de compuestos

de tipo indol, con grupos carbonílicos, esteroides y ácidos grasos. Con los resultados obtenidos hasta el momento, a reserva de obtener la composición unívoca del extracto hexánico mediante otras metodologías como CG-EM y/o RMN y hasta que se realice una prueba de toxicidad en un modelo *in vivo*, se puede afirmar que no es posible atribuir la toxicidad de la planta al grupo de compuestos determinados cualitativamente en este extracto.

LITERATURA CITADA

- BART, H. J. y PILZ S. *Industrial scale natural products extraction*. Alemania: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011.
- CHASE, M. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85(4): 531-553, 1998.
- CHASE, M. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(4): 399-436, 2003.
- CHASE, M. et al. Phylogenetics of *Asphodelaceae* (Asparagales): An Analysis of Plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA Sequences. *Annals of Botany*, 86, 935-951, 2000.
- CSEKE, L. J. et al. *Natural Products from Plants*. 2^{ed.}, USA: CRC Press Taylor & Francis, 2006.
- DOMÍNGUEZ, X. A. *Cromatografía en papel y capa delgada*. [Serie Química. Monografía 16] Washington, DC: OEA, 1982.
- DOMÍNGUEZ, X. A. *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa, 1973.
- FRIED, B. y SHERMA, J. *Practical Thin-layer Chromatography. A Multidisciplinary Approach*. USA: CRC Press, 1996.
- GARCÍA-ALVARADO, J. S. et al. Traditional Uses and Scientific Knowledge of Medicinal Plants from Mexico and Central America. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 8(2-3): 37-89, 2001.
- GEORGE, J. et al. Phytochemical Research in South Africa. *South African Journal of Science*, 97(3-4): 93-105, 2001.
- HAMOUCHE, Y. et al. Cytotaxonomy of Autumnal Flowering Species of *Hyacinthaceae* from Algeria. *Plant Systematics and Evolution*, 285(3-4): 177-187, 2010.
- HERNÁNDEZ, L. *Hemiphylacus novogalicianus* L. Hern. México: Instituto de Biología de la UNAM-Colecciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- HERNÁNDEZ, S. L. Fascículo 15. *Hyacinthaceae* Batsch. [Serie Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán] México, D. F.: Instituto de Biología UNAM, 1997.
- MAHIDOL, C. et al. Biodiversity and Natural Products Drug Discovery. *Pure & Applied Chemistry*, 70(11): 2065-2072, 1998.
- MASONDO, N. A. et al. Pharmacological Potential and Conservation of the Genus *Eucomis* (Hyacinthaceae) Endemic to Southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 44-53, 2014.
- MWAFONGO, E. et al. Ethnobotanical Study of *Hyacinthaceae* and non-*Hyacinthaceae* Geophytes in Selected Districts of Malawi. *Ethnobotany Research & Applications*, 8, 75-93, 2010.
- PERRY, P. The Restructuring of the Family *Liliaceae*. *Veld & Flora*, 71(3): 66-68, 1985.
- POHL, T. S. et al. Southern African *Hyacinthaceae*: Chemistry, Bioactivity and Ethnobotany. *Current Organic Chemistry*, 4(12): 1287-1324, 2000.
- REYES, R. S. G. et al. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UVC-Scientia*, 2(2): 11-22, 2010.
- RÍOS, M. Y. et al. Chemical Constituents from *Flourensia resinosa* S.F. Blake (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 240-242, 2013.
- RZEDOWSKI, J. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, 14, 3-21, 1991.
- SARKER, S. D. et al. *Natural Products Isolation*. 2 ed., USA: Humana Press, 2006.
- SHING, S. A. *Herbalism, Phytochemistry and Ethnopharmacology*. USA: CRC Press Taylor & Francis, 2011.
- VILLASEÑOR, J. L. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 105-135, 2004.
- VILLASEÑOR, J. L. y ESPINOSA-GARCÍA, F. J. The Alien Flowering Plants of Mexico. *Diversity and Distributions*, 2004(10): 113-123, 2004.
- WALLER, C. P. et al. COX-2 Inhibitory Activity of Homoiso flavanones and Xanthones from the Bulbs of the Southern African *Ledebouria socialis* and *Ledebouria ovatifolia* (Hyacinthaceae: Hyacinthoideae). *Phytochemistry*, 95, 284-290, 2013.