



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Sphaeralcea*
angustifolia (CAV.) G. DON, UNA PLANTA CON INTERÉS MEDICINAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO SOTO CORREA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018



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: PROFESOR: MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

VOCAL: PROFESOR: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: PROFESOR: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR

2° SUPLENTE: PROFESOR: MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

ALFREDO SOTO CORREA

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Familia Malvaceae	9
2.2 Género <i>Sphaeralcea</i>	9
2.2.1 Características del género	10
2.2.2. Distribución	10
2.2.3. Composición química	11
2.2.4. Actividades farmacológicas del género <i>Sphaeralcea</i>	12
2.2.4.1 Actividad antiinflamatoria y desinfectante	12
2.3. <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	13
2.3.1 Nombres comunes	13
2.3.2. Clasificación taxonómica	13
2.3.3. Sinonimia	14
2.3.4. Distribución geográfica	14
2.3.4.1. Área de origen	14
2.3.4.2. Distribución en México	14
2.3.4.3. Estatus migratorio en México	14
2.3.4.4 Floración	15
2.3.5. Descripción	15
2.3.6. Usos	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo principal:	18
4.2 Objetivos particulares:	18
5. PARTE EXPERIMENTAL	19
5.1 Material y equipo utilizado	19
5.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)	19



5.1.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)	19
5.2 Recolección e identificación del material vegetal.	19
5.3 Determinación del efecto sobre el crecimiento microbiano de los extractos de <i>S. angustifolia</i>	20
5.3.1 Microorganismos utilizados (Tabla 2).....	20
5.3.2 Preparación de las muestras.....	20
5.3.3 Preparación del inóculo.....	20
5.3.4 Bioensayo	21
5.4 Extracción.....	21
5.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano.....	22
5.5.1. Aislamiento del glucósido de β -sitosterol	23
5.5.2. Método general de acetilación	23
5.5.3 Acetilación del glucósido de β -sitosterol.....	23
5.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano	24
5.6.1 Obtención de estigmasterol.	25
5.7 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol.	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1 Aislamiento de hidrocarburos del extracto de diclorometano	26
6.2 Aislamiento y purificación de β -sitosterol	26
6.3 Obtención del 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-D-glucósido de β -sitosterilo	27
6.4 Aislamiento e identificación del estigmasterol	28
6.5 Actividad antimicrobiana	29
7. CONCLUSIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31
9. ANEXOS.....	33



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados Celsius
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.
δ	Desplazamiento químico
EM	Espectroscopía de masas
FD	Fracción del extracto de diclorometano
FH	Fracción del extracto de hexano
FM	Fracción del extracto de metanol
g	Gramos
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IR	Infrarrojo
M ⁺	Ión molecular
mg	miligramos
µg	microgramos
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros



N	Concentración Normal
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN -¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN -¹H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V_{max}	Frecuencia máxima



ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Estructuras de metabolitos secundarios aislados de <i>S. angustifolia</i> .	11-12
Figura 2.	<i>Sphaeralcea angustifolia</i> .	15
Figura 3.	Espectro en el IR de la fracción FD2.	33
Figura 4.	Espectro de RMN- ¹ H de la fracción FD2	34
Figura 5.	Cromatograma de gases de la fracción FD2.	35
Figura 6.	Espectro de masas con tiempo de retención de 10.47 min.	35
Figura 7.	Espectro de masas con tiempo de retención de 11.25 min.	36
Figura 8.	Espectro de masas con tiempo de retención de 12.30 min.	36
Figura 9.	Espectro en el IR de β-D-glucósido de sitosterol.	37
Figura 10.	Espectro de RMN- ¹ H de β-D-glucósido de sitosterol.	38
Figura 11.	Espectro de RMN- ¹ H del 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucósido de β-sitosterilo.	39
Figura 12.	Espectro en el IR del estigmasterol.	40
Figura 13.	Espectro de RMN- ¹ H del estigmasterol.	41

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Página
Tabla 1. Familias de Angiospermas mayormente presentes en México (modificado de Villaseñor 2003).	9
Tabla 2. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana.	20
Tabla3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano.	22
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano.	24
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol.	25
Tabla 6. Evaluación de la CMI de los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico.	29



1. INTRODUCCIÓN

En diversos países del mundo, el uso de plantas medicinales para el alivio de diversos malestares de salud es una práctica común.

Las razones más comunes para el empleo de la medicina tradicional son las siguientes: es más asequible y alivia las preocupaciones acerca de los efectos adversos de los medicamentos sintéticos. Sin embargo, el uso de remedios tradicionales aumenta cuando la medicina convencional no es eficaz en el tratamiento de una enfermedad en particular, como es el caso del cáncer o de enfermedades crónicas. Por otra parte, la medicina tradicional es percibida como natural y segura, es decir, inocua y por lo tanto, carente de toxicidad. Esto no es necesariamente cierto, especialmente cuando no existen antecedentes de estudios científicos que avalen su seguridad y que se conozca la interacción que éstas puedan tener con medicamentos alopáticos, cuando son consumidos en forma conjunta. Las hierbas pueden ser procesadas y comercializadas de diferentes maneras y formas, que incluyen a la droga cruda, infusiones, jarabes, aceites esenciales, pomadas, ungüentos, frotaciones con los preparados, cápsulas y tabletas (Engebretson 2002).

Según la OMS la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales que incluyen hierbas, material de herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos ingredientes (OMS, 2013).

En México según datos de la Secretaría de Salud, aproximadamente el 90% de la población utiliza plantas medicinales y el 45% específicamente utiliza “hierbas”. De ese 90% una parte de la población cuenta únicamente con los beneficios que



les aporta la medicina tradicional y la otra la utiliza como un complemento al tratamiento alopático. México cuenta con el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas registradas con más de 4500, sólo detrás de China (Muñetón Pérez, 2009).

De acuerdo con lo anterior se resalta que es de suma importancia una mayor investigación dentro de la medicina tradicional mexicana, para que a través de estudios científicos se dé un respaldo a la población para el uso seguro de los productos naturales medicinales.



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Malvaceae

La familia *Malvaceae* es una familia de plantas perteneciente al orden de las malvales. Reúne plantas herbáceas, leñosas o arbustos (más frecuentes en países cálidos). Se estima que posee 244 géneros y 4225 especies (Christenhusz & Byng, 2016).

50 de los géneros de esta familia están registrados en México con 356 especies, de las cuales 180 (50.6%) son endémicas; esto la coloca en la posición número 11 de las familias con mayor porcentaje de endemismos en México y la posición 14 en cuanto a número de especies (Tabla 1) (Villaseñor, 2003).

Tabla 1. Familias de Angiospermas mayormente presentes en México (modificado de Villaseñor, 2003).

Familia	Géneros	Especies	Porcentaje de endemismo
<i>Compositae</i>	361	3021	65.9
<i>Fabaceae</i>	93	1274	59.5
<i>Orchidaceae</i>	155	1145	63.1
<i>Cactaceae</i>	74	946	82.6
<i>Rubiaceae</i>	93	593	48.7
<i>Labiatae</i>	30	530	67.5
<i>Solanaceae</i>	33	430	46.7
<i>Acanthaceae</i>	47	384	58.8
<i>Malvaceae</i>	50	356	50.6
<i>Bromeliaceae</i>	20	333	67.6

2.2 Género *Sphaeralcea*

El género *Sphaeralcea* incluye alrededor de cuarenta especies y tiene distribución disyunta.



2.2.1 Características del género

Hierbas o arbustos, generalmente perennes, estrellado pubescentes, frecuentemente con numerosos tallos. Hojas pecioladas, las láminas lanceoladas, ovadas, u orbiculares a veces hastadas o palmadamente partidas. Inflorescencia racemosa, paniculada o tirsoide, los pedicelos generalmente más cortos que el cáliz; cálculo de tres bracteolas lineares; cáliz 5-lobulado, generalmente pubescente; corola amarilla, anaranjada, rosa o púrpura, cerca de dos veces lo largo del cáliz; androceo incluido, amarillo pálido o púrpura, frecuentemente pubescente; estigmas capitados. Frutos esquizocárpicos, oblados o truncado-cónicos, los carpidios generalmente 10-16, apiculados o redondeados apicalmente, generalmente diferenciados en dos partes, la parte inferior reticulada e indehisciente, la parte superior lisa y dehiscente; semillas 1-3 por carpelo, más o menos pubescentes, los pelos muy cortos (Fryxell, 1992).

2.2.2. Distribución

La mayoría de especies del género *Sphaeralcea* se distribuye en el norte de México y en los estados occidentales de los Estados Unidos hasta latitudes de 50 grados. Cerca de veinte especies ocurren en el norte de México y dos están registradas en el sur de Veracruz (Fryxell, 1992). De manera disyunta también se presenta en regiones templadas de Sudamérica como en Argentina y países adyacentes. Es un género principalmente localizado en zonas templadas (Peterson, 2008).

A continuación se enlistan las especies más representativas del género *Sphaeralcea*:

<i>S. ambigua</i>	<i>S. coccinea</i>	<i>S. grossulariifolia</i>
<i>S. bonariensis</i>	<i>S. munroana</i>	
<i>S. angustifolia</i>	<i>S. hastulata</i>	<i>S. spp</i>



2.2.3. Composición química

A la fecha existen reportes sobre metabolitos aislados de *S. angustifolia* como son escopoletina (1), β -sitosterol (2), estigmasterol (3), α y β amirinas (4), ácido trans-cinámico (5), (García-Rodríguez et al. 2012), el monoterpene loliólida (6), sacarosa (7) (Osti-Castillo et al. 2010), ácido esferálico (8) y tomentina (9) (Fig.1) (Pérez-Hernández et al., 2014).

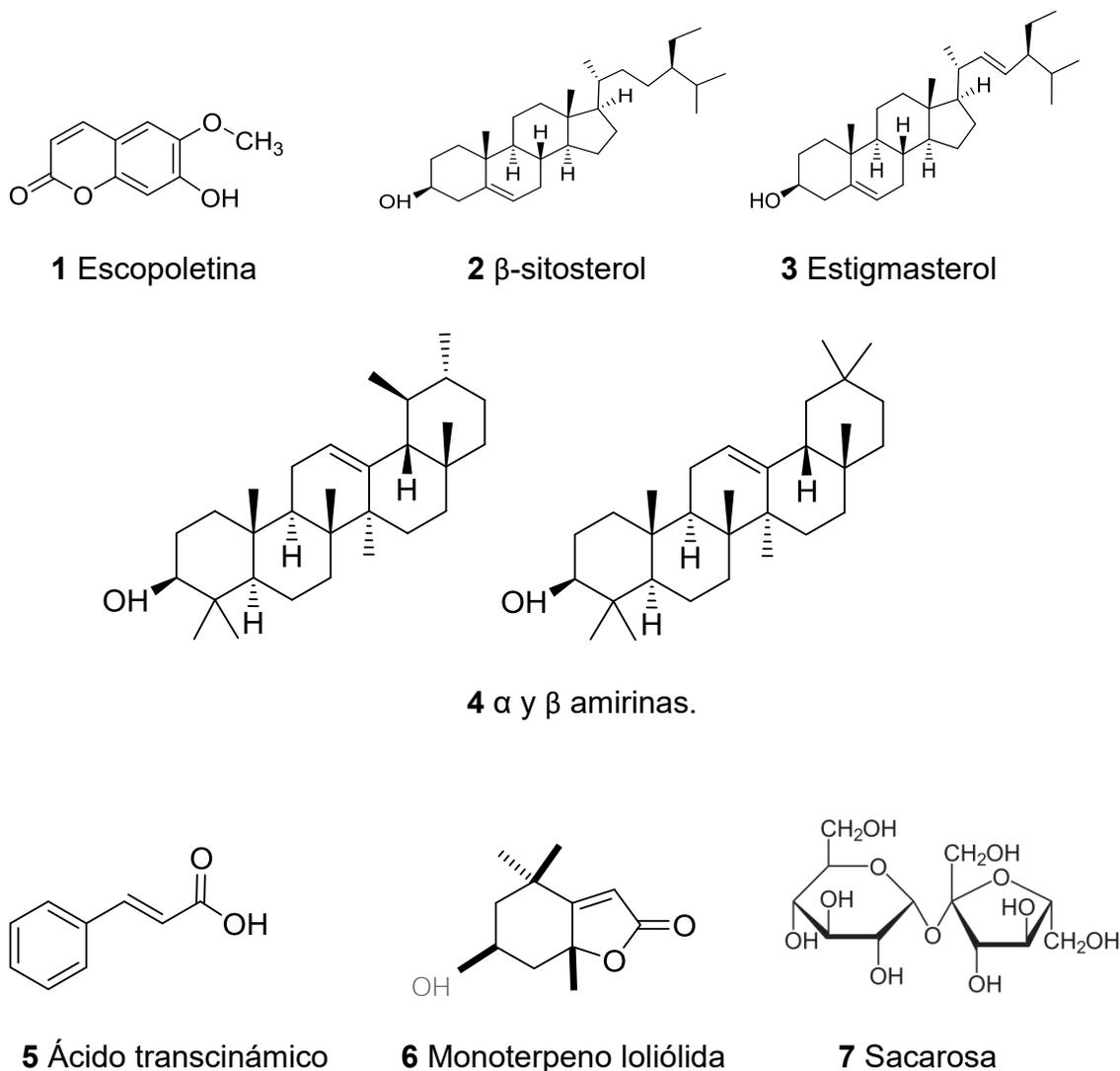


Figura 1. Estructuras de metabolitos secundarios aislados de *S. angustifolia*.

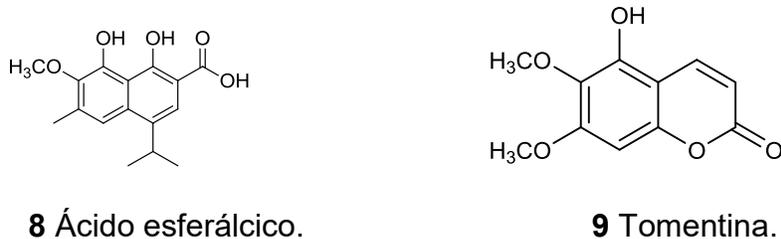


Figura 1. Estructuras de metabolitos secundarios aislados de *S. angustifolia* (continuación).

2.2.4. Actividades farmacológicas del género *Sphaeralcea*

2.2.4.1 Actividad antiinflamatoria y desinfectante

El extracto de diclorometano de las partes aéreas de la planta inhibe las moléculas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1, el factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-6 con una expresión máxima en la fase tardía (García-Rodríguez et al., 2012), también se ha demostrado que en ratas con inflamación crónica inducida por medio de adyuvante completo de Freund (CFA), el extracto (100 mg/kg por día durante 8 días) produce una inhibición sostenida y significativa del edema (62.6%). La aplicación tópica del extracto de diclorometano produjo la reducción del edema de la oreja (50.6%) y un efecto protector contra la irritación de la oreja del ratón inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoil forbol (TPA) (García-Rodríguez et al. 2012). Por otra parte, propiedades antiinflamatorias han sido demostradas en diferentes modelos farmacológicos (Romero-Cerecero, 2013). *S. angustifolia* ha sido empleada para la desinfección de heridas (Macías et al., 2009).



2.3. *Sphaeralcea angustifolia*.

2.3.1 Nombres comunes

- Hierba del negro (Martínez, 1979) (Calderón & Rzedowski, 2001).
- Vara de San José (Fryxell, 1992).
- Hierba del golpe (CONABIO, 2017).
- Cardón (CONABIO, 2017).
- Malvón (CONABIO, 2017).
- En náhuatl se le conoce como "lixihuitl" (Martínez, 1979).

Nombres comunes en inglés:

- Copper globemallow. (CONABIO, 2017)
- Narrowleaf Desertmallow. (CONABIO, 2017)

2.3.2. Clasificación taxonómica. (CONABIO, 2017)

Reino: *Plantae*.

Subreino: *Traqueobionta* (plantas vasculares).

Superdivisión: *Spermatophyta* (plantas con semillas).

División: *Magnoliophyta* (plantas con flor).

Clase: *Magnoliopsida* (dicotiledóneas).

Subclase: *Dillenidae*.

Orden: *Malvales*.

Familia: *Malvaceae*.

Género: *Sphaeralcea*.



Especie: *Sphaeralcea angustifolia*.

2.3.3. Sinonimia

De acuerdo a Fryxell (1992) las siguientes son especies sinónimas de *S. angustifolia*:

- *Malva angustifolia* Cav.
- *Malva longifolia* Sessé & Mociño.

2.3.4. Distribución geográfica

2.3.4.1. Área de origen

Estados Unidos (centro-sur) y México (Calderón & Rzedowski, 2001).

2.3.4.2. Distribución en México

La especie se propaga de manera silvestre en zonas de clima templado, semiseco y seco, entre los 1800 y 3900 m; asociada a matorral xerófilo, pastizal, bosques de pino encino, terrenos agrícolas (UNAM, 2017).

Se ha registrado en Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas (Luis & Espinoza, 1998).

2.3.4.3. Estatus migratorio en México

- Nativa (CONABIO, 2017).



2.3.4.4 Floración.

- Todo el año (Fryxell, 1992).

2.3.5. Descripción

Sphaeralcea angustifolia (Fig. 2). Son Hierbas erectas o subarbustos de 0.5-1.5 m de altura, los tallos diminutamente pubescentes. Hojas cortamente pecioladas, las láminas 4-11 cm de longitud, 4-6 veces lo largo de lo ancho, estrechamente lanceoladas, crenadas, más o menos agudas, ligeramente discoloras. Inflorescencias estrechas panículas racemiformes, las flores en glomérulos axilares, las hojas reducidas hacia arriba, los pedicelos más cortos que el cáliz; cálculo de 3 brácteas, filiformes, más cortas que el cáliz; cáliz 7-8 mm de longitud, estrellado-pubescente; pétalos 8-16 mm de longitud, azul-rosados o púrpura; androceo incluido, generalmente púrpura, la columna pubescente; estilos 10-16. Frutos generalmente cubiertos por el cáliz, estrellado-pubescentes, 4.5-6 mm de diámetro, subglobosos o truncado-cónicos, los carpidios 10-16, generalmente connados en la madurez, parcialmente dehiscentes, apicalmente redondeados; semillas 1-3 por carpidio, generalmente glabras de 2 mm de longitud (Fryxell, 1992).



Figura 2. *Sphaeralcea angustifolia* (Gshinton, 2017).



2.3.6. Usos

En la medicina tradicional mexicana *Sphaeralcea angustifolia* es una planta de gran uso debido a que se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas. En Durango esta especie se utiliza en golpes, para lo cual se aplica machacada y con unas gotitas de aceite se frota la parte afectada. En Aguascalientes, se fríen las ramas con cebo o aceite para aplicarlas sobre el golpe y luego cubrirlas con un lienzo. De igual forma se aprovecha esta preparación en quebraduras y torceduras (UNAM, 2017).

Asimismo, se recomienda el cocimiento de las ramas para dar baños cuando hay dolor de estómago, para lavar heridas, contra la caída del cabello (en Guanajuato) o sólo para lavarlo. Además, se aconseja beberlo para la hipertensión, como antitusígeno, cuando hay pujo en los niños y para la vejiga. En caso de diarrea crónica, el cocimiento de la planta se prepara junto con manzanilla (*Matricaria recutita*), salvia (*Buddleja scordioides*) y yerbabuena. También se sugiere el uso de la raíz contra la disentería (UNAM, 2017).



3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas producen una gran cantidad de sustancias, producto de su metabolismo secundario, algunas de ellas son responsables del color y aromas de flores y frutos y gran cantidad de ellas han sido empleadas como materias primas para la preparación de medicamentos en la industria farmacéutica.

La Fitoquímica estudia los metabolitos secundarios extraídos de las plantas. Esta rama de la química aporta los conocimientos necesarios para el aislamiento e identificación de los compuestos químicos presentes en las mismas, entre los cuales se destacan aquellos con importante actividad biológica. Muchos de estos principios activos constituyen nuevas fuentes de materia prima para el desarrollo de medicamentos o para terapias alternativas en la medicina actual con mayor eficacia y/o potencia terapéutica.

Un punto importante en el conocimiento de las moléculas provenientes de plantas con actividad biológica, es la determinación de su estructura y de su comportamiento químico, para establecer parámetros utilizables, entre otros, para un control de calidad de la planta.

Por lo descrito anteriormente, se presenta en esta tesis el estudio fitoquímico de la planta *Sphaeralcea angustifolia*, como parte de un proyecto que permita contribuir a su conocimiento metabólico y a su potencial farmacéutico para eventualmente integrar estos resultados dentro de una monografía de la planta.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal:

Aislar e identificar a los componentes químicos mayoritarios contenidos en los extractos de las partes aéreas de *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don (*Malvaceae*) y ponderar su potencial antimicrobiano.

4.2 Objetivos particulares:

- Obtención de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las partes aéreas de *S. angustifolia*.
- Pruebas de actividad antimicrobiana a los extractos obtenidos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas representantes.
- Aislamiento y purificación de los compuestos químicos mayoritarios contenidos en los extractos, por medio de un fraccionamiento cromatográfico de los mismos.
- Identificación por métodos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos aislados.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y equipo utilizado

5.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se emplearon cromatofolios de gel de sílice MACHEREY-NAGEL Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, una cámara con lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF240c, a dos longitudes de onda, 254 y 365 nm. Se utilizaron sistemas de elución cromatográfica variables y como revelador químico una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4 \text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en H_2SO_4 2N seguido de calentamiento en parrilla eléctrica.

5.1.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)

La cromatografía en columna abierta se efectuó utilizando columnas de vidrio, como adsorbente gel de sílice 60 marca Merck (malla 0.063-0.200mm) y diversas fases móviles.

5.2 Recolección e identificación del material vegetal.

El material vegetal utilizado fue recolectado en la Reserva Ecológica de Ciudad Universitaria en octubre del 2012 por la M. en C. Beatriz King Díaz quien amablemente nos lo donó para este estudio. La identificación botánica fue determinada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU), por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo y un ejemplar de muestra se encuentra depositado en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química.



5.3 Determinación del efecto sobre el crecimiento microbiano de los extractos de *S. angustifolia*.

5.3.1 Microorganismos utilizados (Tabla 2)

Tabla 2. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana.

Microorganismo	Descripción
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina resistente	Bacteria Gram (+)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteria Gram (-)

5.3.2 Preparación de las muestras

Los extractos (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de DMSO. A partir de esta disolución, se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 1.0 a 4.0 mg/mL.

5.3.3 Preparación del inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo y se incubaron durante 48 horas a 37°C.



El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Las concentraciones de los inóculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland).

5.3.4 Bioensayo

Las muestras preparadas a diferentes diluciones se mezclaron con el medio de cultivo apropiado, en el cual se inoculó previamente el microorganismo de prueba; después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento del microorganismo en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de la muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible será considerada como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias Gram (+) y Gram (-). Adicionalmente, se preparó un control de crecimiento negativo.

5.4 Extracción

500 gramos de partes aéreas de *S. angustifolia* previamente sometidas al proceso de desecación (a temperatura ambiente y a la sombra) y molienda (molino de cuchillas), se extrajeron por maceración de manera sucesiva y exhaustivamente con hexano, CH_2Cl_2 y MeOH, por periodos de 24 h, a temperatura ambiente. El producto de extracción en cada caso se llevó a sequedad a presión reducida mediante el uso de un rota evaporador obteniéndose 19.3, 13.5 y 38.0 g respectivamente de cada extracto.



5.5 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano

13.5 gramos del extracto de diclorometano fueron adsorbidos en 50 gramos de gel de sílice y aplicados en una columna cromatográfica abierta de vidrio, la cual fue empacada con 150 gramos de gel de sílice suspendidos en diclorometano. Se aplicó el extracto adsorbido y se eluyó con mezclas de hexano-acetato de etilo y cloroformo-metanol de polaridad creciente en proporciones de menor a mayor polaridad (recolectando fracciones de 100 mL cada una).

Las fracciones obtenidas (291 fracciones) se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas con contenido químico con R_f similar como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano.

Fracciones	Sistemas de elución	Proporción %	Clave
1-5	Hexano	100	FD-1
6-11	Hexano	100	FD-2*
12	Hexano	100	FD-3
13-14	Hexano	100	FD-4
20-24	Hexano:AcOEt	90:10	FD-5
25-39	Hexano:AcOEt	90:10	FD-6
40-49	Hexano:AcOEt	80:20	FD-7
50-59	Hexano:AcOEt	80:20	FD-8
60-69	Hexano:AcOEt	80:20	FD-9
70-79	Hexano:AcOEt	80:20	FD-10
80-89	Hexano:AcOEt	70:30	FD-11
90-99	Hexano:AcOEt	60:40	FD-12
100-119	Hexano:AcOEt	50:50	FD-13
120-139	Hexano:AcOEt	40:60 30:70	FD-14
140-161	AcOEt	100	FD-15
162-170	AcOEt	100	FD-16*
171-190	CHCl ₃	100	FD-17
191-210	CHCl ₃	100	FD-18*
211-240	CHCl ₃ :MeOH	90:10	FD-19
241-270	CHCl ₃ :MeOH	80:20	FD-20
		70:30	
		60:40	
271-291	Metanol	100	FD-21

*FD-2, FD-16 y FD-18 presentaron un precipitado.



5.5.1. Aislamiento del glucósido de β -sitosterol

De la fracción FD-16 del extracto de diclorometano cristalizó espontáneamente un compuesto blanco con uniformidad cromatográfica en cromatografía en capa fina. Su identificación estructural se llevó a cabo por análisis espectroscópico de RMN-¹H (Fig. 10) y por comparación con los datos de la literatura (Collantes Díaz et al., 2011).

5.5.2. Método general de acetilación

100 mg del compuesto o fracción se acetilaron con 1 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina, con agitación magnética y a temperatura ambiente durante 24 h. Al cabo de este tiempo se añadieron 5.0 g de agua/hielo y se aciduló con HCl al 10%. Se extrajo con 3 porciones de 15 mL cada una de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con 3 porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO₃ y finalmente el extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los compuestos acetilados (Shriner, 2012).

5.5.3 Acetilación del D-glucósido de β -sitosterol

20 mg de β -sitosterol se sometieron al proceso de acetilación según el método del inciso 5.5.2, resultando en 25 mg de producto crudo de color blanco. Su confirmación estructural se llevó a cabo por RMN-¹H (Fig. 11).



5.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano

19.3 gramos del extracto de hexano fueron adsorbidos en 50 gramos de gel de sílice y aplicados en una columna cromatográfica abierta de vidrio, la cual fue empacada con 150 gramos de gel de sílice suspendidos en hexano. Se aplicó el extracto adsorbido y se eluyó con mezclas de hexano-acetato de etilo y cloroformo-metanol de polaridad creciente en proporciones de menor a mayor polaridad (recolectando fracciones de 100 mL cada una).

Las fracciones obtenidas (109 fracciones) se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina y se juntaron aquellas con contenido químico con R_f similar como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano.

Fracciones	Sistemas de elución	Proporción %	Clave
1-5	Hexano	100	FH-1
6-11	Hexano	100	FH-2
12-16	Hexano:AcOEt	90:10	FH-3
17-21	Hexano:AcOEt	80:20	FH-4
22-24	Hexano:AcOEt	70:30	FH-5
25-27	Hexano:AcOEt	60:40	FH-6*
28-36	Hexano:AcOEt	50:50	FH-7
37-45	Hexano:AcOEt	40:60	FH-8
46-53	Hexano:AcOEt	30:70	FH-9
54-81	Hexano:AcOEt	20:80	FH-10
82-89	CHCl ₃	100	FH-11
90-92	CHCl ₃ :MeOH	90:10	FH-12
93-101	CHCl ₃ :MeOH	80:20 70:30	FH-13

*FH-6 presentó un precipitado.



5.6.1 Obtención de estigmasterol.

De la fracción FH-6 se obtuvo un sólido blanco que presentó uniformidad cromatográfica en cromatografía en capa fina. Su identificación estructural se llevó a cabo por análisis espectroscópico de RMN-¹H (Fig. 13) y correspondió al estigmasterol.

5.7 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol.

38.0 gramos del extracto de diclorometano fueron adsorbidos en 50 gramos de gel de sílice y aplicados en una columna cromatográfica abierta de vidrio, la cual fue empacada con 200 gramos de gel de sílice suspendidos en metanol. Se aplicó el extracto adsorbido y se eluyó con mezclas de diclorometano-metanol de polaridad creciente en proporciones de menor a mayor polaridad (recolectando fracciones de 100 mL cada una).

Las fracciones obtenidas (113 fracciones) se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas con contenido químico con R_f similar como se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de metanol.

Fracciones	Sistemas de elución	Proporción %	Clave
1-2	CH ₂ Cl ₂	100	FM-1
3-4	CH ₂ Cl ₂	100	FM-2
5-8	CH ₂ Cl ₂	100	FM-3
9-19	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	FM-4
20-24	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	80:20	FM-5
25-40	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	70:30	FM-6
41-50	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	60:40	FM-7
51-69	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	FM-8
70-77	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	40:60	FM-9
78-87	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	30:70	FM-10
88-96	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	20:80	FM-11
97-101	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	10:90	FM-12
102-113	MeOH	100	FM-13



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de hidrocarburos del extracto de diclorometano

De la fracción FD-2 se obtuvo un precipitado de color blanco que fue identificado como una mezcla de hidrocarburos de acuerdo a las siguientes consideraciones: en el espectro en el IR (Fig. 3) se observaron señales en 2955 a 2847, 1462, 1472 cm^{-1} , típicas para grupos metilo y metilenos alifáticos; las señales en 729 y 719 cm^{-1} corroboraron una cadena hidrocarbonada lineal de más de cuatro átomos de carbono. En el espectro de RMN- ^1H (Fig. 4), solamente se observaron señales para metilos, metilenos y metinos. El análisis por CG/EM mostró tres componentes mayoritarios (Fig. 5). El pico de t. r. 10.47 min con un resultado m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Fig. 6) y subsecuentes pérdidas de 14 unidades de masa en su mayoría y un patrón de fragmentación parecido al de una semicurva de Gauss, sugiere la presencia de un hidrocarburo mayormente lineal de 32 átomos de carbono con tres dobles ligaduras (derivado del dotriacontano). Otro pico observado tuvo un tiempo de retención de 11.25 min con el mismo resultado de masa molecular (m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$) (Fig. 7), aunque diferente fragmentación, lo que sugiere la presencia de un isómero del compuesto antes mencionado. El último pico detectado tuvo un tiempo de retención de 12.30 con una masa de 503 (Fig.8). El patrón de fragmentación en este caso fue también muy similar al de los dos anteriores por lo que se debe tratar de un homólogo superior de esos hidrocarburos observados.

6.2 Aislamiento y purificación de β -sitosterol

De la fracción FD-16 del extracto de diclorometano se aisló un sólido cristalino de color blanco que de acuerdo a sus características espectroscópicas de IR y ^1H -RMN resultó ser el glucósido de β -sitosterol. Sus características



espectroscópicas más relevantes son las siguientes: en el espectro en el IR (Fig.9) se observaron señales en 3382 cm^{-1} (característica de grupos hidroxilo), de 2958 a 2932 cm^{-1} se observan numerosas señales para grupos alifáticos: metilos, metilenos y metinos; en 1643 cm^{-1} una pequeña banda para la ligadura C-C de carbonos sp^2 y en 1052 y 1039 , bandas intensas para grupos C-O. Por otra parte, en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Fig.10) se observó el patrón del espectro de un esteroil con señales para metilos angulares entre 0.7 y 1.9 ppm, señales múltiples descendientes en intensidad entre 1.0 y 2.4 ppm asignadas a numerosos metilenos y metinos. Las señales de un hidrógeno en carbono base de oxígeno en 3.53 ppm se asignaron al hidrógeno H-3 del β -sitosterol; la señal en 5.32 ppm se asignó al hidrógeno vinílico en C-6 del esteroil. Este compuesto se encuentra en forma glicosilada, ya que también aparecen en este espectro señales entre 2.8 y 3.4 de los hidrógenos en carbonos base de oxígeno del azúcar y un doblete característico del hidrógeno anomérico en 4.2 .

6.3 Obtención del 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucósido de β -sitosterilo

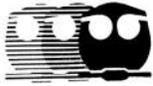
El producto de reacción de acetilación del compuesto que precipitó de la fracción FD-16, se presentó como un sólido blanco cuyo espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (Fig. 11) fue similar al del β -sitosterol: en la zona de 0.6 a 0.9 ppm se observaron las señales de los metilos angulares y del resto de metilos de la cadena isoprenílica lateral; en 3.4 ppm se observó un multiplete que integró para un hidrógeno correspondiente a H-3 (base de un oxígeno); en 5.32 se observó un doblete ancho que integró para un hidrógeno el cual es característico del hidrógeno vinílico H-6, también se observaron las señales propias de los grupos metilenos y metinos del esqueleto del esteroil entre 0.9 y 2.2 ppm. Se observaron señales adicionales correspondientes a un residuo de glucosa como fueron los dobles de doble que integraron para un hidrógeno cada una en 3.6 , 4.88 , 4.99 y 5.15 ppm correspondientes a los 4 metinos de la glucosa; en 4.04 y 4.19 se observan dos señales doble de dobles, cada una integrando para un hidrógeno que se asignaron



a los hidrógenos del metileno en 6, y en 3.4 ppm se observa una señal múltiple que integró para un hidrógeno que se asignó a H-5'. Todas estas últimas señales (desde 3.6 ppm) se encuentran en la zona de hidrógenos base de carbonos unidos a oxígenos, de grupos hidroxilo, las cuales están desplazadas a campo bajo por estar acetilados. Por último, se observan en esta Figura 11 cuatro señales singulete en 1.93, 1.95, 1.98 y 2.01 ppm correspondientes a los metilos de los grupos acetilo del residuo de glucosa, confirmándose la estructura del 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucósido de β -sitosterilo

6.4 Aislamiento e identificación del estigmasterol

Del extracto de hexano se aisló un polvo blanco que de acuerdo a sus características espectroscópicas de IR y ^1H -RMN resultó ser el estigmasterol. Sus características espectroscópicas más importantes son las siguientes: en el espectro en el IR (Fig. 12) se observaron señales en 3424, 1462, 1376, 1053 cm^{-1} , asignadas a grupos hidroxilo (3424 cm^{-1}), metilos, metilenos y metinos (1462 y 1376 cm^{-1}) y carbono-oxígeno (1053 cm^{-1}); el espectro de RMN de hidrógeno (Fig12) mostró las señales características de esteroides, en la zona de 0.5 a 2 ppm para metilos metilenos y metinos y dentro de éstas, los metilos angulares entre 0.7 y 1.9 ppm. Por otra parte, en 3.5 ppm se observó un multiplete que integró para un hidrógeno y que fue asignado a H-3. También se observaron las señales en 5.03 y en 5.11 ppm que integraron para dos hidrógenos, como dos pares de doble de dobles típicas de los hidrógenos en las posiciones 22 y 23 del esqueleto esteroideal y por último, en 5.34 ppm un doblete ancho que se asignó al hidrógeno vinílico H-6. La comparación de estas características con las reportadas en la literatura confirmó la propuesta estructural para el estigmasterol (Collantes Díaz et al. 2011) (Holland et al. 1978).



6.5 Actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos de diclorometano, de hexano y de metanol utilizando cepas de microorganismos Gram positivo y Gram negativo. Los resultados de la CMI obtenidos para cada uno de los extractos se muestran en la Tabla 6 en la cual se observa que el extracto de hexano fue activo hacia *S. aureus* y *S. aureus* meticilina-resistente y *Enterococcus faecalis*, con MIC's de 0.75 y 0.125 y 1.0 mg/mL).

Tabla 6. Evaluación de la CMI de los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico.

Extracto	Valores de CMI (mg/mL)				
	SA	SA-R1	SF	KN	EC
Hexánico	0.75	0.125	1.0	>2.0	>2.0
Diclorometánico	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
Metanólico	2.0	2.0	>2.0	>2.0	>2.0



7. CONCLUSIONES

El extracto de diclorometano de la planta medicinal estudiada mostró contenido de esteroides, uno de los cuales ha sido reportado como hipocolesterolemiante y eficaz para la disminución de cierto tipo de adenomas, lo que está de acuerdo con algunos de los usos de la planta de estudio en la medicina tradicional. Por otra parte, el extracto de hexano mostró eficacia como antibacteriano, lo que correlaciona indirectamente con una actividad antiinflamatoria.

Los resultados de actividad antimicrobiana obtenidos confirman en cierta medida la utilidad de *S. angustifolia* en la medicina tradicional mexicana.



8. BIBLIOGRAFÍA

Calderón, G. & Rzedowski, J., 2001. "Flora fanerogámica del Valle de México". *Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. 2ª Edición. Michoacán, México.

Collantes Díaz et al. 2011. "Constituyentes químicos del túbero de *Dracontium Spruceanum* (Schott) G. Zhu Ex *Dracontium Loretense* Krause (Araceae)". *Revista Soc, Quim. Perú*, 77(2), pp.117–26.

Christenhusz, M.J.M. & Byng, J.W., 2016. "The number of known plants species in the world and its annual increase". *Phytotaxa*, 261(3), pp.209.

CONABIO, 2017. "*Sphaeralcea angustifolia*". Disponible en línea en : <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/sphaeralcea-angustifolia/fichas/ficha.htm>.

Engebretson, J., 2002. "Culture and complementary therapies". *Complementary therapies in nursing & midwifery*, pp.177–184.

Fryxell, P.A., 1992. "Malvaceae (V)". *Flora de Veracruz*, 68, p.231.

García-Rodríguez, R.V. et al., 2012. "Extracto de *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don, Un potencial fitofármaco para tratar la inflamación crónica". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(5), pp.454–463.

Gshinton, 2017. *naturalista.mx*. Disponible en línea en: <http://www.naturalista.mx/observations/7361849>.

Holland, H.L., Diakow, P.R.P., Taylor, G.J., 1978 "¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some C-19-hydroxy, C-5,6-epoxy, C-24-ethyl and C-19-norsteroids". *Canadian Journal of Chemistry*, 56, 3121-3127.

Luis, V. R. J. & Espinoza, F. J., 1998. "Catálogo de malezas de México". *Fondo de Cultura Económica*. México D.F.

Macías, K. L. et al. 2009. "Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40 pp.5-9



Martínez, M., 1979. "Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas". *Fondo de Cultura Económica. México, D.F.*

Muñetón Pérez, P., 2009. "Plantas Medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos, entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo". *Revista digital universitaria*. UNAM. Mexico D.F.

OMS, 2013. "Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023", Hong Kong SAR, China: OMS.

Osti-Castillo, M.D.R., Martín, J.J. & Roberto, J., 2010. "Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (5); pp.359-367.

Pérez-Hernández, J. et al., 2014. "Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*". *Planta medica*, 80(2-3), pp.209–14.

Peterson, P.M., 2008. "Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes"., p. 159.

Romero-Cerecero, O. Jiménez-Ferrer, J. E. Nicasio-Torres, P. Pérez-García, D, Tortoriello, J., 2013. "Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis". *Journal of Ethnopharmacology*, 147, 467-473 (2013).

Shriner, R., 2012. "Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos". 1 ed. México: LIMUSA.

UNAM, 2017. "Medicina Tradicional Mexicana UNAM, Monografía *Sphaeralcea angustifolia*". Disponible en línea en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Sphaeralcea%20angustifolia&id=7576>.

Villaseñor, J.L., 2003. "Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de Mexico". *Interciencia*, 28(3), p. 162.



9. ANEXOS

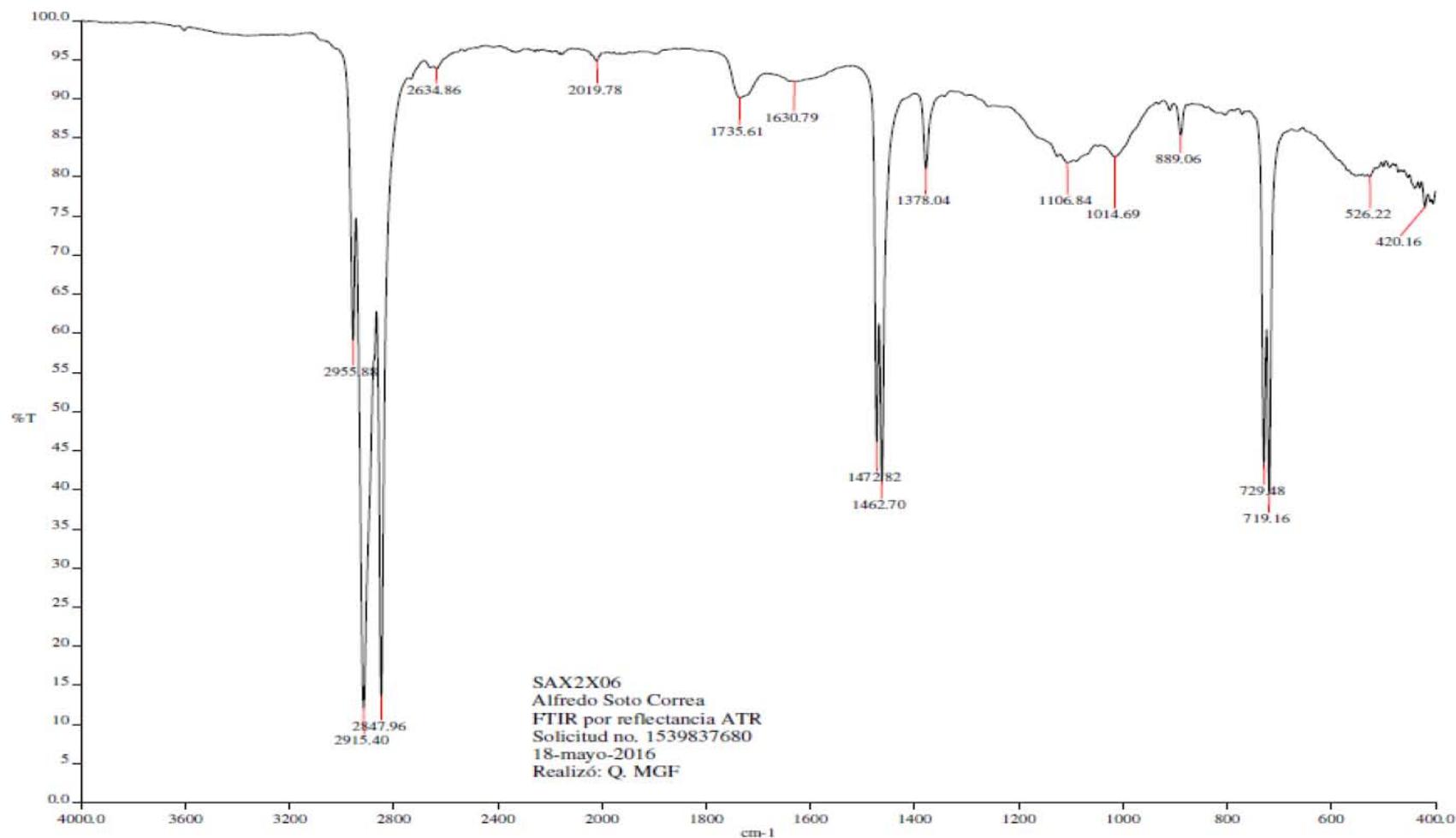


Figura 3. Espectro en el IR de la fracción FD2.

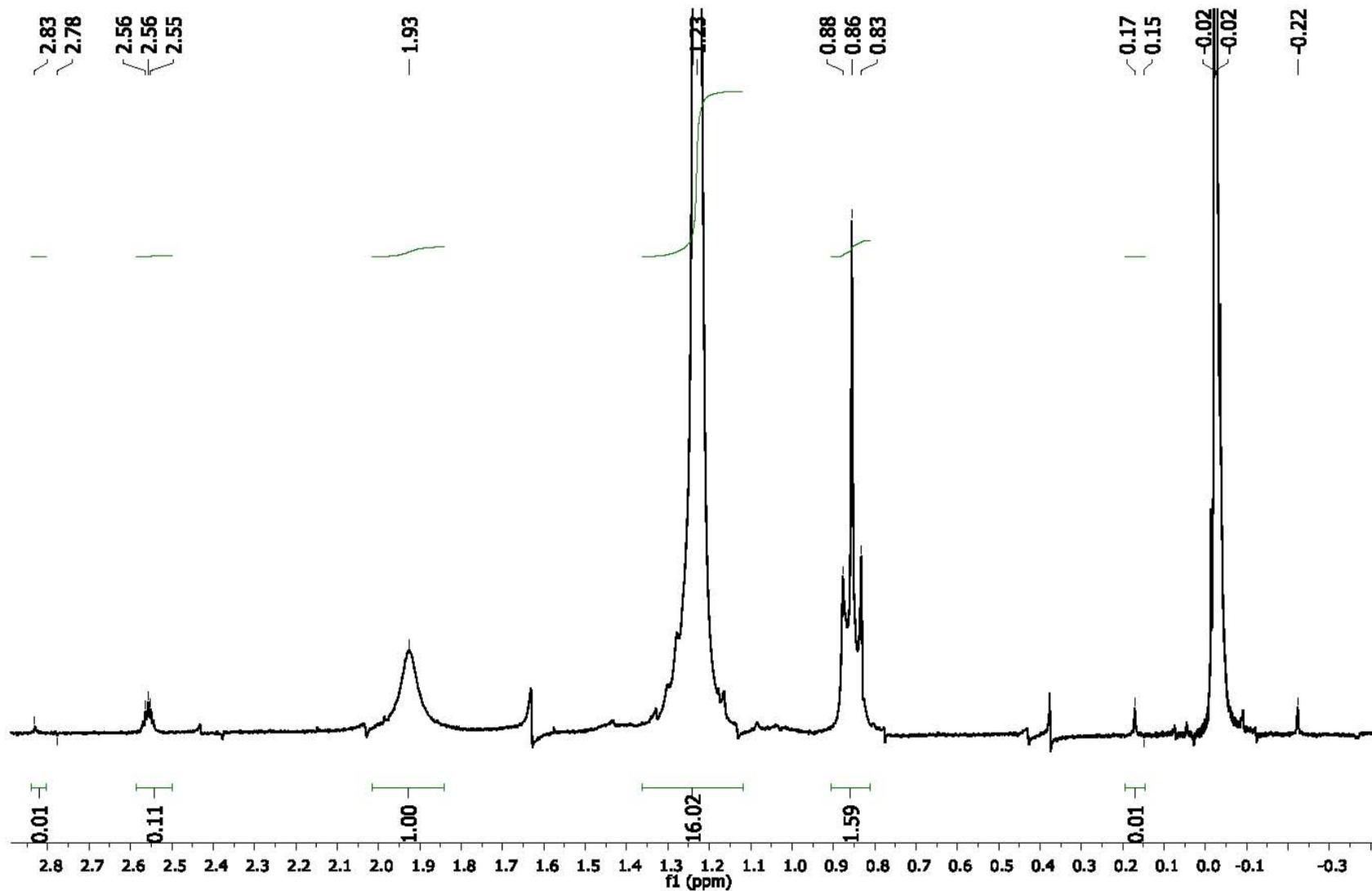


Figura 4. Espectro de RMN- ^1H de la fracción FD2

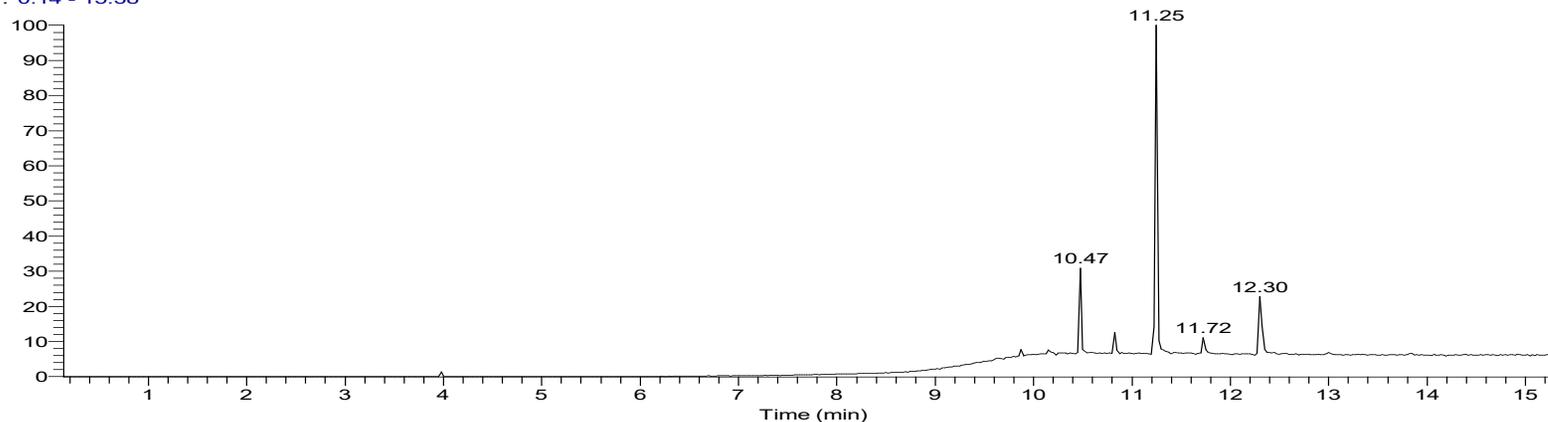


D:\Xcalibur\data\USA\CG\SAX2X06-2

5/24/2016 3:09:36 PM

SAX2X06

RT: 0.14 - 15.38

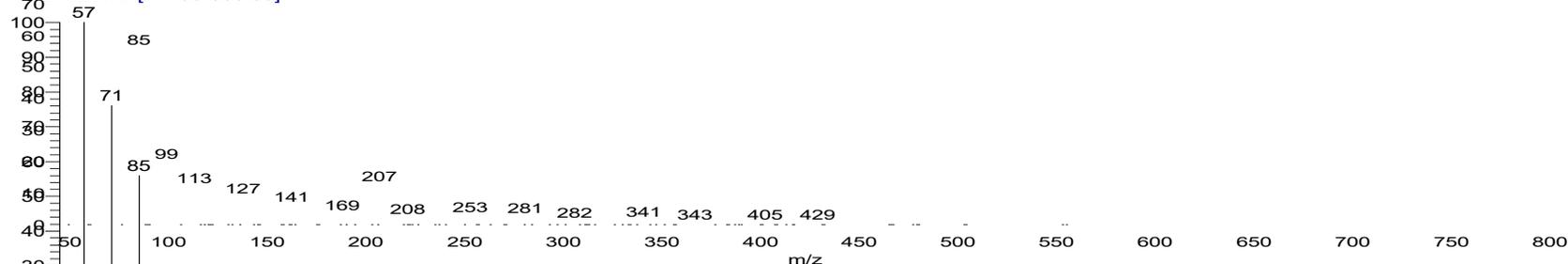


NL:
8.42E7
TIC MS
SAX2X06-2

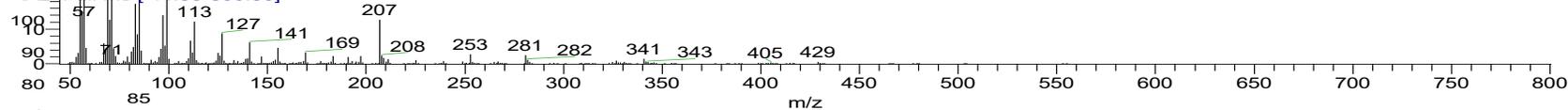
SAX2X06-2 #419 RT: 10.47 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 3.77E6
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]

Figura 5. Cromatograma de gases de la fracción FD2.

SAX2X06-2 #419 RT: 10.47 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 3.77E6
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]

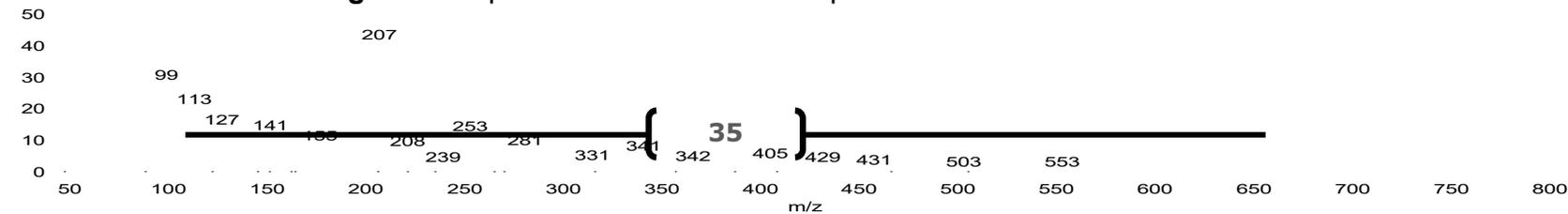


SAX2X06-2 #433 RT: 10.82 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 6.65E5
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]



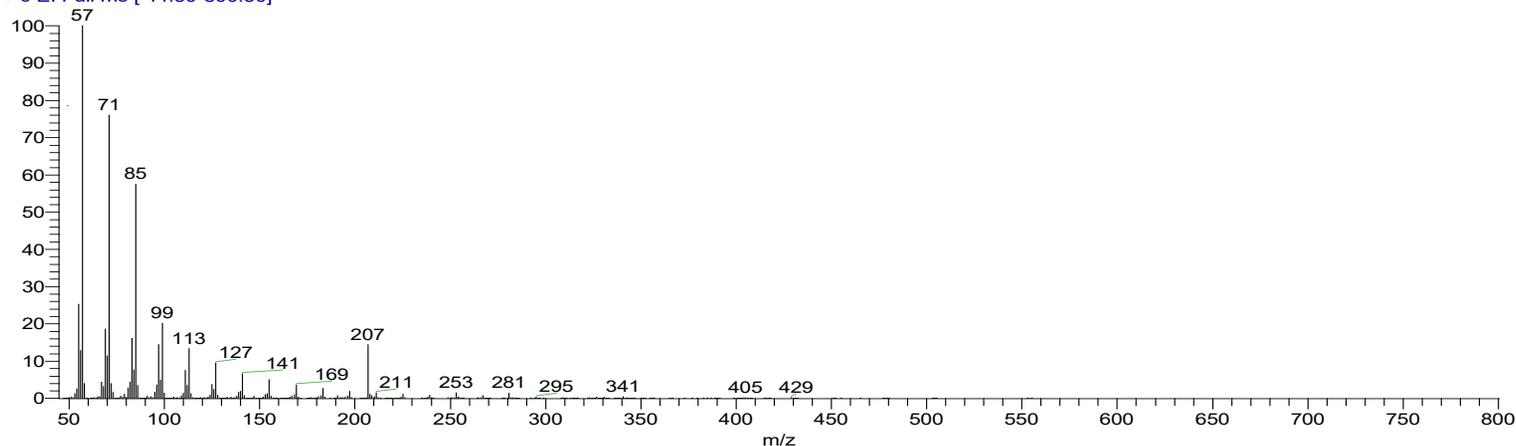
SAX2X06-2 #433 RT: 10.82 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 6.65E5

Figura 6. Espectro de masas con tiempo de retención de 10.47 min.





SAX2X06-2 #450 RT: 11.25 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 1.53E7
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]



SAX2X06-2 #492 RT: 12.30 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 1.78E6

Figura 7. Espectro de masas con tiempo de retención de 11.25 min.

SAX2X06-2 #492 RT: 12.30 AV: 1 SB: 57 9.50-10.17 , 12.70-13.40 NL: 1.78E6
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]

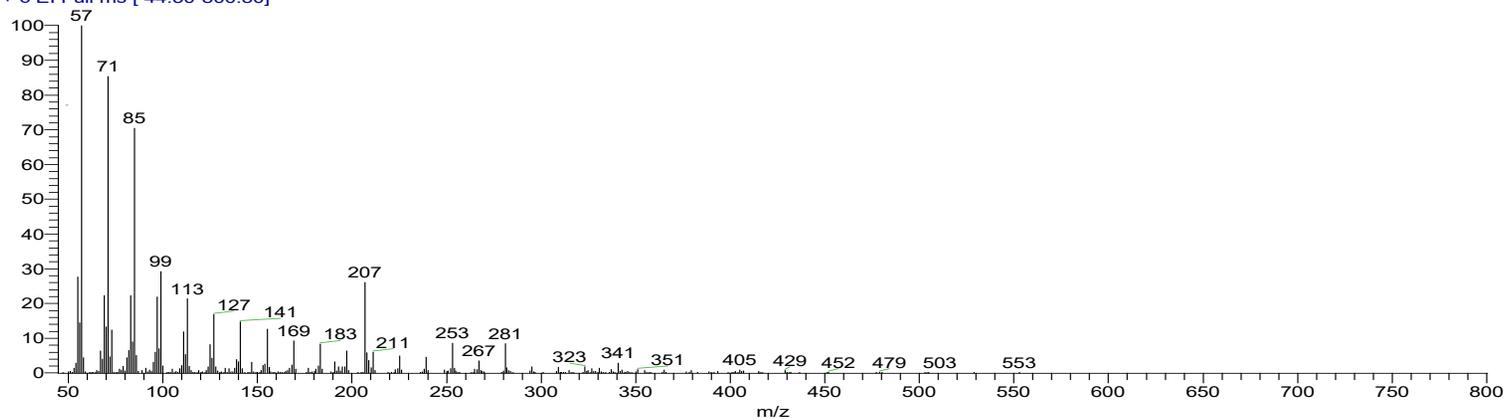


Figura 8. Espectro de masas con tiempo de retención de 12.30 min.

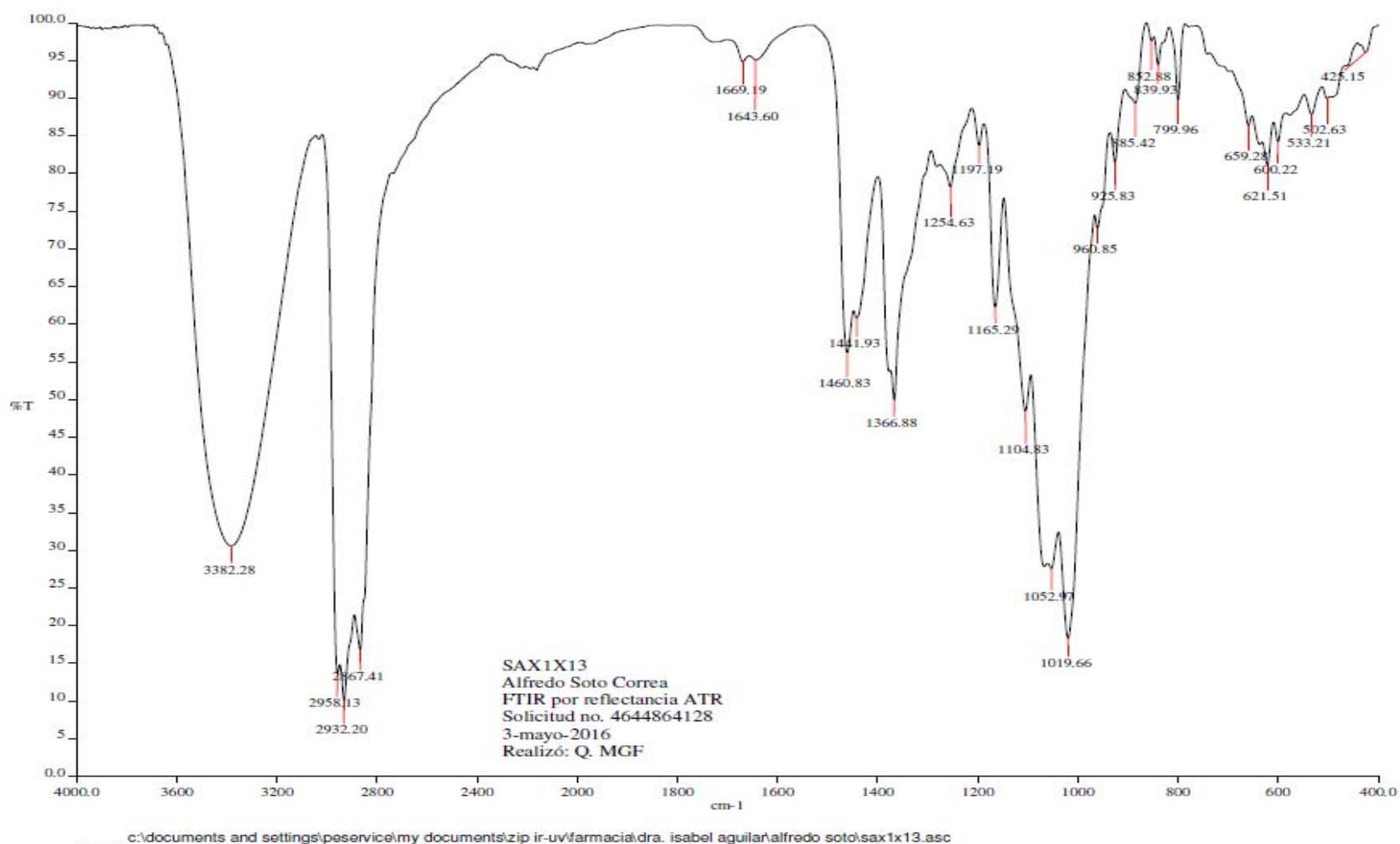


Figura 9. Espectro en el IR de β -D-glucósido de sitosterol.



339sa116h
Sa-1-16
Dra. I. Aguilar L.
1H
DMSO
Varian UInity Inova 300 MHz
No. 339
17-V-16
AAH

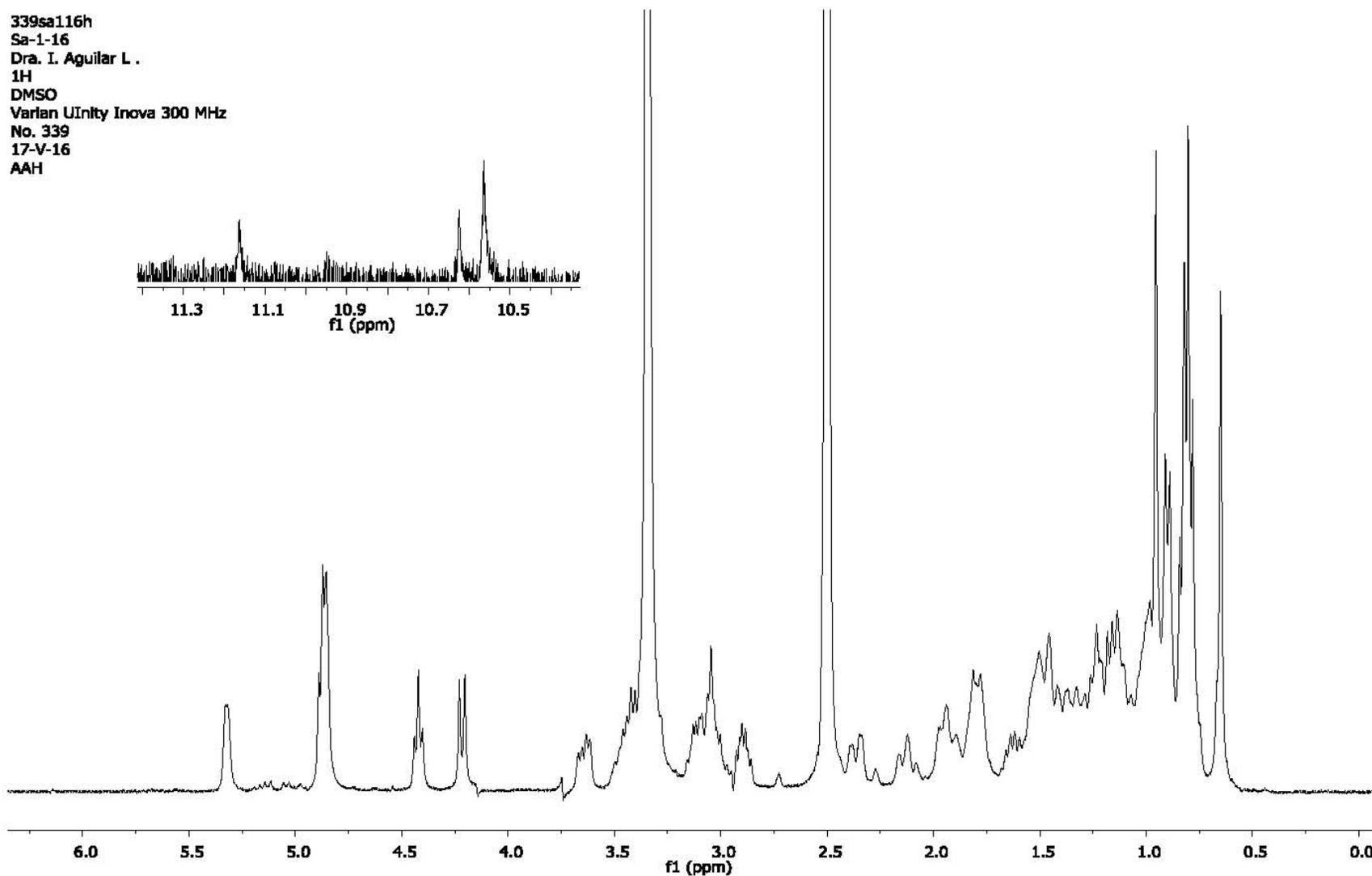


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H de β -D-glucósido de sitosterol.

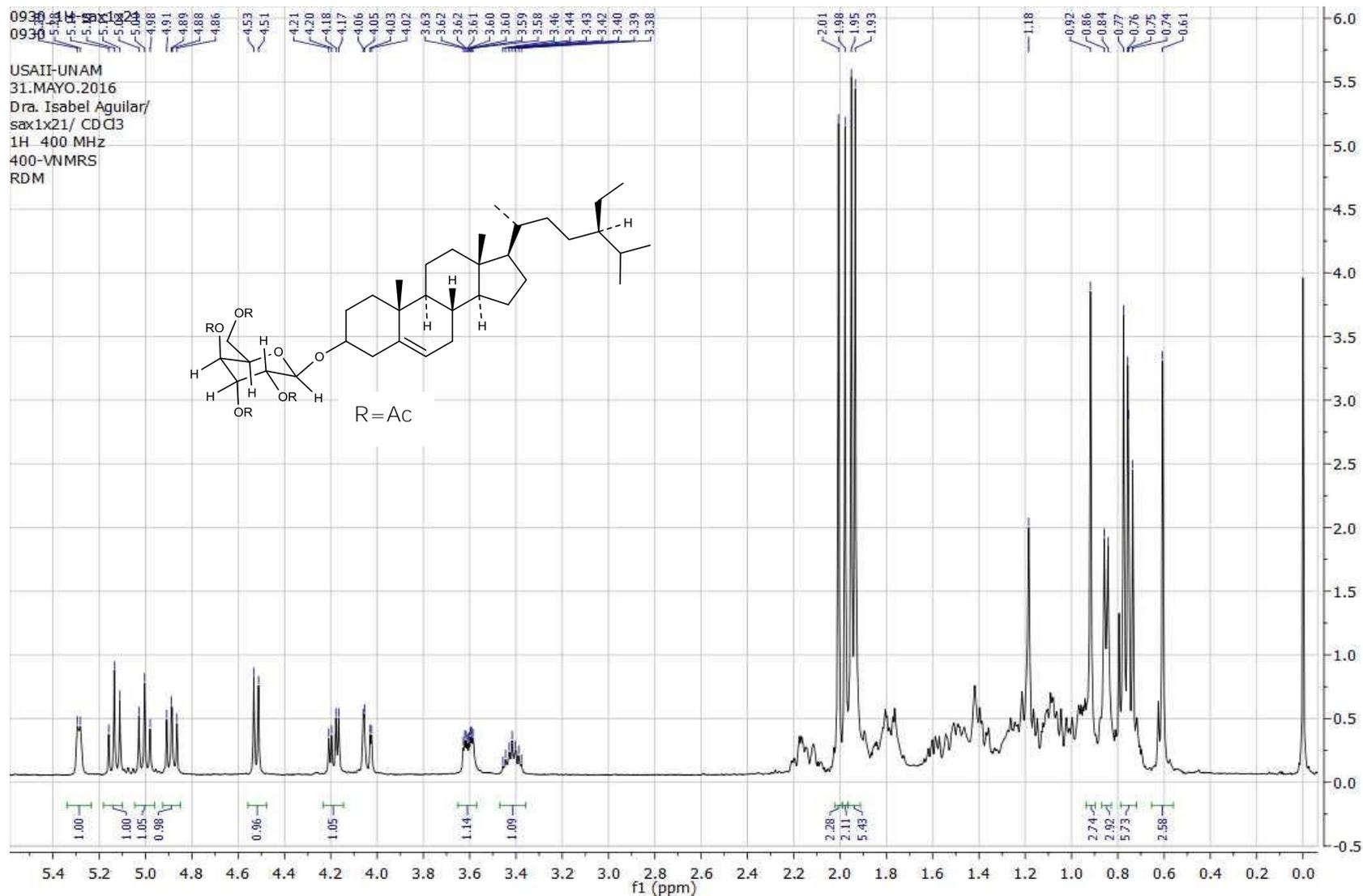


Figura 11. Espectro de RMN-¹H del 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucósido de β-sitosterilo.

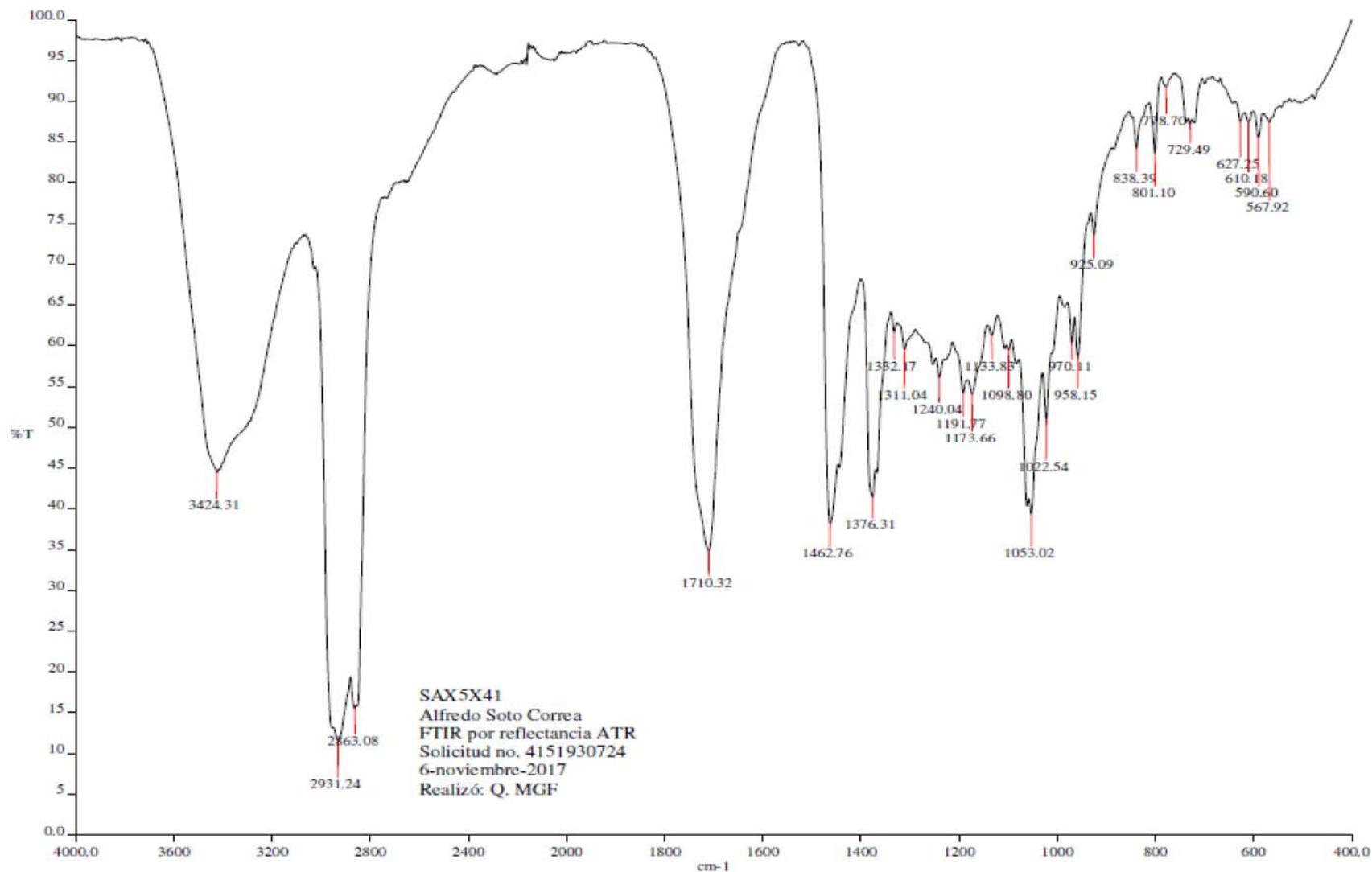


Figura 12. Espectro en el IR del estigmasterol.

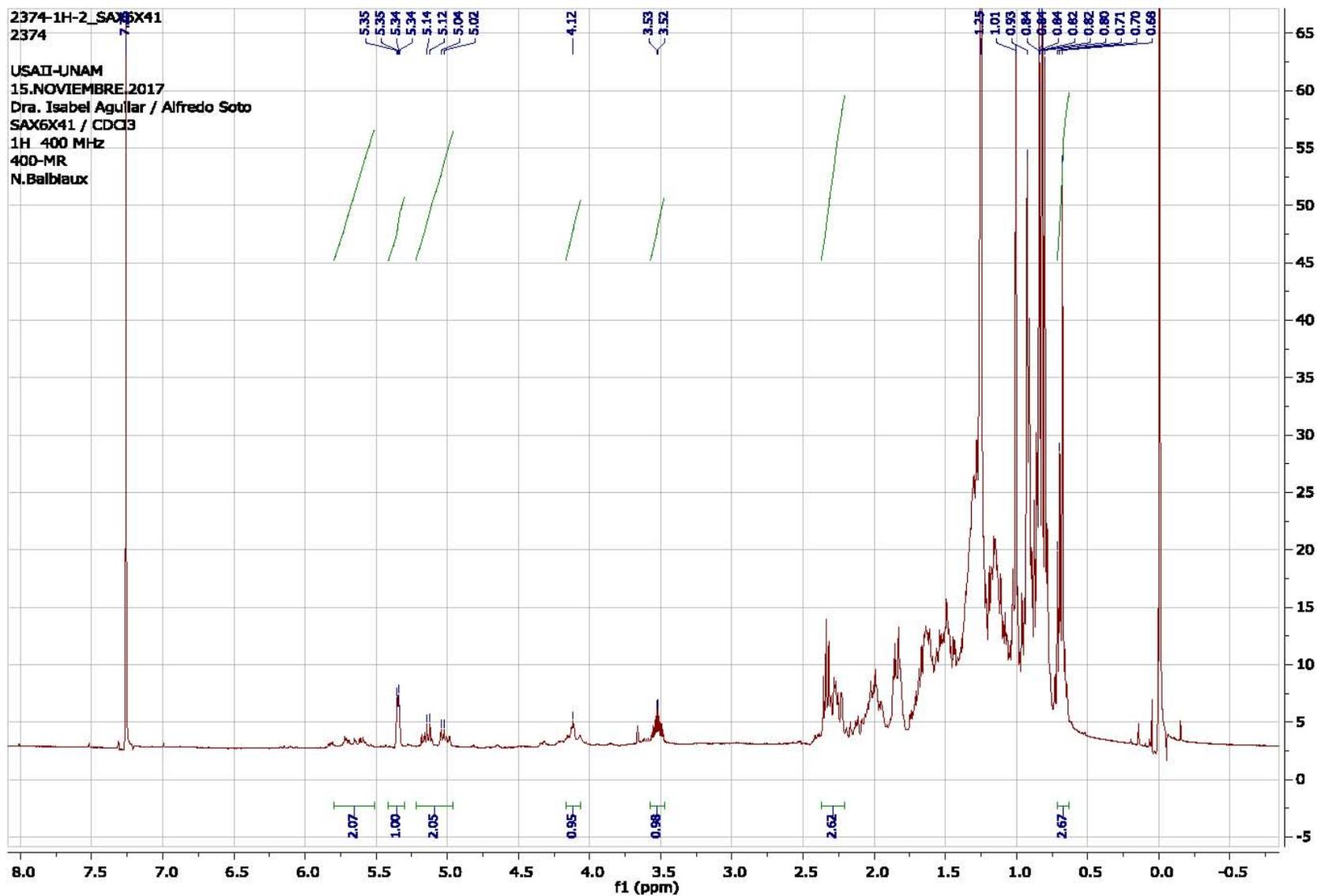


Figura 13. Espectro de RMN¹H del estigmasterol.