

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

---



TESIS DE GRADO

Aislamiento, purificación y caracterización de un isómero de la afinina  
presente en extractos de la raíz de *Heliopsis longipes* (Gray)Blake  
(Asteraceae).

PRESENTA:

Yamhilette Licón Muñoz

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Biología

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jorge Molina-Torres

ASESORA:

Dra. Galina Petrovna Zaitseva.



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura*  
*en Biología*  
959/ C. C. BIOLOGÍA

**C. YAMHILETTE LICON MUÑOZ**  
**PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **"Aislamiento, Purificación y caracterización de isómeros de la afinina presente en extractos de la raíz de *Heliopsis longipes*"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DR. JORGE MOLINA TORRES** y el asesor/es es el/la: **DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 3 de Mayo del 2006.  
"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.  
Don Benito Juárez García"

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**BIBLIOTECA CUCBA**

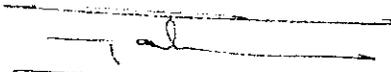
Dr. Carlos Álvarez Moya.  
Presidente del Comité de Titulación.  
Carrera de Licenciado en Biología.  
CUCBA.  
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, con el título: "Aislamiento, purificación y caracterización de isómeros de la afinina presente en extractos de la raíz de *Heliopsis longipes*" que realizó la pasante Yamhilette Licón Muñoz con número de código B01007378 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
Zapopan, Jal. Diciembre/2006

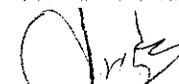
Firma Vo.Bo.



Dr. Jorge Molina Torres  
Director del trabajo.



Dra. Galina Zaitseva Petrovna.  
Asesora.

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Margarita Bonilla M		12-12-06
Wynneck Ramirez Delgadillo		15/12/2006
Supl. Delia Guzmán Bonagret		15/12/2006
Supl. Luciana Claudio		15/12/2006

~~Vo.Bo.  
CUCBA.  
15/12/06~~

## I. RESUMEN

En este estudio se aisló, purificó y caracterizó un isómero de la afinina proveniente del extracto de la raíz de *Heliopsis longipes* tratado con temperatura alta en presencia de alto contenido de humedad. La muestra isomerizada fue analizada por Cromatografía de Gases acoplada a un detector de Selectivo de Masas (GC/MSD) analizando el espectro obtenido. En el cromatograma se observó la presencia de la afinina y dos estéreos isómeros que se resolvieron en columna capilar analítica de 30 m. de longitud. Los isómeros del extracto isomerizado fueron fraccionados utilizando una fase estacionaria activada con plata en Cromatografía en Columna y en forma similar por Cromatografía en Capa Fina (TLC). Uno de los isómeros se separó y caracterizó por espectrometría de masas, IR y RMN. Con este isómero se realizó un bioensayo de toxicidad con *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas syringae helianthi* para comparar su actividad biocida en relación a de la afinina. Se utilizaron para evaluación dosis de 50, 75, 150, 200 y 250 µg/ml. En los tres microorganismos el isómero de afinina todo *trans* aislado mostró tener mayor eficacia como inhibidor de crecimiento. Para *S. cerevisiae* a 75 µg/ml, afinina inhibió un 12% de en comparación a un 94% con el isómero; para *B. subtilis*, 75 µg/ml un 55% de inhibición con afinina en comparación a un 98% de inhibición con el isómero; y para *P. syringae helianthi* 50 µg/ml mostró una inhibición del 15% con la afinina en comparación a un 73% de inhibición con el isómero. Para su debida caracterización, el isómero aislado se envió a un estudio de Resonancia Magnética de <sup>13</sup>Carbono en un equipo <sup>1</sup>HNMR y <sup>13</sup>CNMR Modelo Varian Gemini 200 en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y

fue lo que nos confirmó que realmente el isómero aislado se trata de afinina todo-*trans* .  
Por lo que concluimos que la configuración *trans-cis-trans* de la afinina tiene relación con su actividad inhibidora de crecimiento, y proponemos que se realicen más estudios para comprobar si otras propiedades que se le atribuyen a esta molécula tienen relación con su configuración.

## II. ANTECEDENTES

### *Heliopsis longipes* (Gray) Blake

#### Descripción taxonómica

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Asteraceae. Incluye 14 especies, la mayoría endémicas a México y aún no todas totalmente definidas (García-Chávez *et al.*, 2004). La mayor diferencia que separa las especies de *Heliopsis* de las de otros géneros es la siguiente combinación de caracteres en su inflorescencia: La presencia de flores fértiles en el disco, flores liguladas persistentes y fértiles, corolas sésiles y persistentes, aquenios gruesos (3 a 4 angulares) y vilano ausente. (Figura 1). *H. longipes* es una planta perenne, ya que completa su ciclo de vida en tres o más años. Tiende a crecer de dos formas: erecta y subdecumbente. Es escasamente ramificada desde su base. Las raíces son gruesas, toscas y fibrosas. Los tallos, con internodos de 2.5 a 5 cm. de largo, tienen un grosor de 1 a 1.5 mm., son glabros en la base y de escasa a densamente escabrosos en su parte superior. Las hojas miden de 2-3 cm. de largo y de 1 a 2.3 cm. de ancho. Tienen una forma que varía de oblongo-lanceolada a elíptica. Los pecíolos son de 1 a 2.5 mm. de longitud y estrigosos, con láminas de irregularmente dentadas a enteras arriba y casi igualmente de agudas a obtusas en el ápice. Los pedúnculos son de 9-20 cm. de largo, escasamente pubescente en la parte de abajo y densamente pubescentes arriba. Los capítulos, cuando inmaduros, miden de 0.6 a 0.9 cm. de ancho y de 0.9 a 1.2 cm. de altura. El involucre posee dos series de filarios, de las cuales los más externos son densamente pubescentes en la parte de atrás, glabros en su parte interna y de forma



**Figura 1**

- A) Inflorescencia de *Heliopsis longipes*, se observan las flores liguladas insertas en el disco.  
B) Partes de la inflorescencia, se observan los aquenios del disco y las flores con lígulas color amarillo, oblongo-lineales.

Fotos: cortesía del Dr. Jorge Molina-Torres

obtusa; los filarios internos son más cortos glabros y acuminados en el ápice. Se presentan de 6-8 lígulas (rayos) de color amarillo, oblongo-lineales, con 2 a 3 hendiduras, de casi 0.3 cm. de ancho y 1 a 1.2 cm. de largo, escasamente pubescentes en su parte posterior. La corola del disco mide 3 mm. de largo, es glabra y amarillo-café en su parte superior. Las paleas son lineo-lanceoladas de color café-amarillento, de casi 1 mm. de ancho y 1 cm. de largo, con 4 nervaduras, acuminadas y glabras. Los aquenios de las lígulas, cuando inmaduros, son triangulares y glabros. Los aquenios del disco, cuando inmaduros, son cuadrangulares, glabros, o pueden presentar 2 a 3 aristas diminutas y membranosas (Fisher, 1957).

Las raíces son por lo general en fascículos o a veces solitarias, ligeramente suculentas, grises o morenas, de 15 a 30 cm. De largo por tres a cuatro mm. de diámetro. Estas raíces suculentas no tienen ramificaciones, sino unas cuantas fibras laterales que se extienden en la tierra. Las hojas varían de de ovadas a ovales y de enteras a claramente dentadas, y las pequeñas tienen una pelusa muy densa y blanquizca. Aunque generalmente hay solamente uno a dos capítulos, las plantas grandes tienen hasta 10 o más. El epíteto botánico *longipes* alude a los pedúnculos alargados. Es difícil reconocer al chilcuague en la estación seca en invierno porque las plantas tienen poca altura y son inconspicuas, con tallos casi secos. En la primavera aparecen las hojas pequeñas de un cm. de largo en las ramas. El desarrollo de los tallos y hojas es más rápido en los meses de junio a septiembre, favorecido por las lluvias del verano. Florece de julio a septiembre (Little, 1948).

## Distribución en México

La distribución de esta especie se restringe a la Sierra Gorda, en el centro de México; en la región de colindancia de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro (García-Chávez *et al.*, 2004). La zona del chilcuague en la parte Noroeste de Guanajuato tiene de 1825 a 2250 m. sobre el nivel del mar. Esta región montañosa está en la falda oriental de la cresta divisoria del continente y en la cabecera de la vertiente atlántica. Expuestas a los vientos del Este, las montañas (2020 m. de altura sobre el nivel del mar) reciben mayor precipitación que la meseta alrededor de San Luis de la Paz la cual está en la zona casi desértica y tiene una precipitación de 370 mm. anualmente. La zona forestal de los encinos, donde se encuentra el chilcuague, desciende por la falda oriental a la altura de 1825 m., cerca de Xichú (1400 m.). Esta especie se ha observado solamente donde hay tierra vegetal fértil y bastante húmeda, usualmente con una capa de hojas viejas de encino y humus. Abajo está la tierra mineral arenosa o arcillosa y a veces pedregosa (Little, 1948).

## Usos etnobotánicos

En México es común el uso de las plantas medicinales en la terapéutica, tanto en humanos como en animales. Dado el endemismo regional de algunas plantas, estas son utilizadas en forma similar por la población humana que habita estas regiones. Como chilcuague se conoce a las raíces de la planta *Heliopsis longipes* (Figura 2), el cual es un recurso de uso medicinal y culinario en Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí. Ésta especie tiene una larga tradición en la herbolaria indígena que se puede apreciar por su nombre de origen náhuatl: chimecatl de *chili*, chile y *mecatl*, mecate,

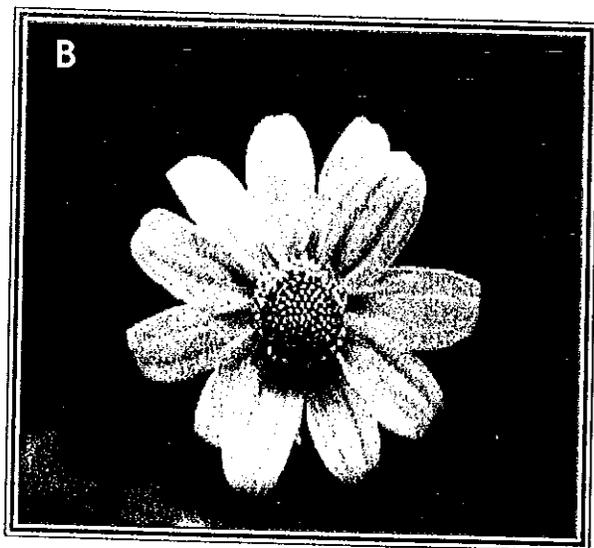
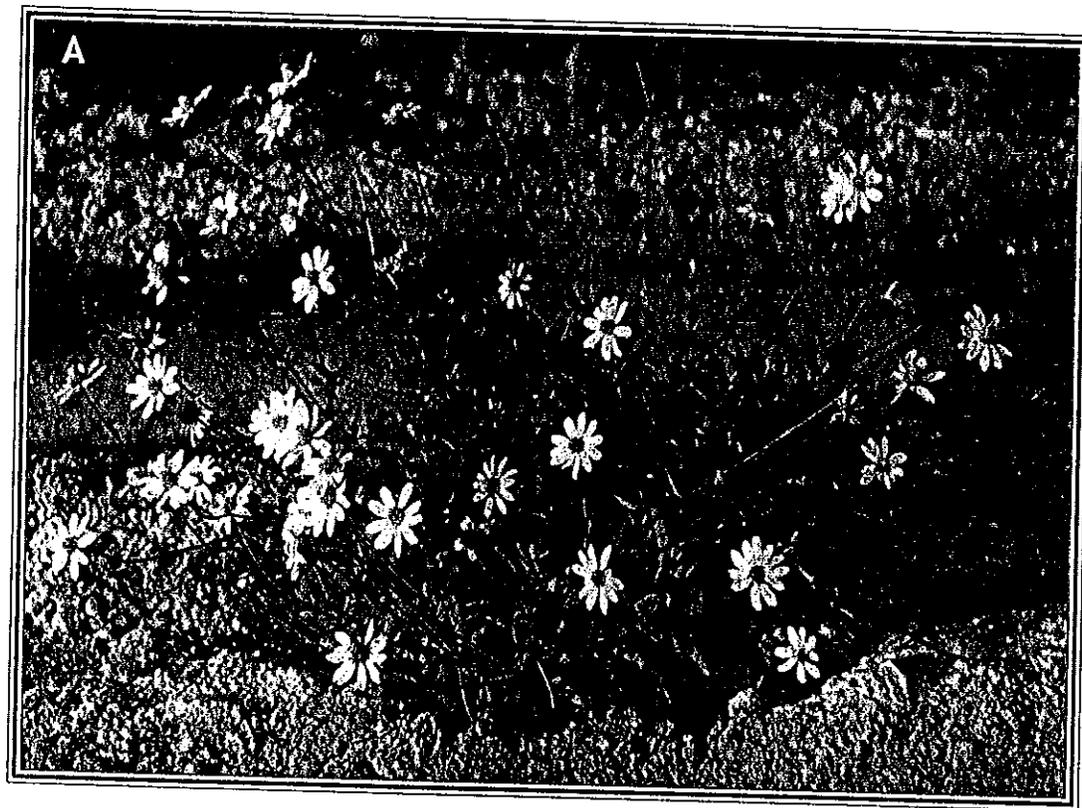


Figura 2

A) Fotografía de la planta del género *Heliopsis*

B) Inflorescencia de *Heliopsis longipes*

Fotos: Cortesía del Dr. Jorge Molina-Torres

aludiendo a las raíces filiformes y al sabor picante de éstas; y chilcuague o chilcuán, chile de víbora (Martínez, 1933).

La raíz de *Heliopsis longipes*, es utilizada como anestésico local a nivel bucal, para eliminar el pie de atleta, como antibiótico en las infecciones de los aparatos respiratorio y digestivo, así como contra las gusaneras del ganado. También se utiliza para condimentar salsa, frijoles, nopales y otros platillos de la región (Romero *et al.*, 1989; Molina-Torres y García-Chávez 2001).

Aunque la planta no se ha localizado en registros precolombinos, se presume que su uso terapéutico es anterior a la conquista. Los datos referentes a su uso pueden encontrarse en la literatura de la época colonial temprana, por ejemplo en la obra editada por el fraile Francisco Ximénez en 1615 "Qvatro libros de la Naturaleza" basada en a obra original de el protomédico Francisco Hernández (Ximénez, 1615).

### **Alcamidas**

El grupo funcional amida es ubicuo, se encuentra en todos los organismos vivos constituyendo los enlaces peptídicos, esto es, la unión entre los aminoácidos para la formación de la estructura primaria de las proteínas, moléculas que son la base de la vida como la conocemos hasta ahora. Las aminas como metabolitos secundarios, por otra parte, no son tan frecuentes (Molina-Torres y García-Chávez, 2001).

Las alcamidas representan una clase singular de productos naturales que, desde el punto de vista biogénico, se forman al combinarse dos rutas metabólicas: la de los ácidos grasos y la de los aminoácidos. La parte acídica se origina de un ácido graso de longitud de cadena de mediana a larga, que puede ser de ocho a dieciocho carbonos,

generalmente alifática o lineal; éste, al condensarse con un aminoácido y en descarboxilación concomitante, resulta en la producción de una alcanida. Las amidas cuya cadena acídica es alifática, dependiendo del tipo de enlaces insaturados que presenten, se pueden separar en dos grupos: las alcanidas olefinicas, con al menos una doble ligadura; y las alcanidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura (Greger, 1984). En el género *Heliopsis* sólo se han encontrado alcanidas alifáticas y acetilénicas (Molina-Torres y García-Chávez, 2001).

Además de la familia de Asteraceae a la que pertenece *Heliopsis longipes* se han encontrado reportes de la presencia estructuras de alcanidas acumuladas en varios tejidos de diferentes especies en un total de diez familias de plantas. A continuación se citan éstas con algunos comentarios:

- Aristolochiaceae (*Asiasarum heterotropoides*): Es una familia tropical y solo hay reportes de presencia de alcanidas en el género *Asiasarum* (Yasuda *et al.*, 1981).
- Brassicaceae (*Lepidium meyenii*): Una familia importante en la economía y en la investigación, sin embargo solo se han reportado alcanidas en Maca (*Lepidium meyenii*) una planta utilizada como afrodisíaco un Perú (Muhammad *et al.*, 2002).
- Convolvulaceae (*Ipomoea aquatica* y *Merremia quinquefolia*): En esta familia se han reportado dos géneros (Tofern *et al.*, 1999) pero ha sido poco explorada desde el punto de vista fitoquímico.
- Euphorbiaceae (*Phyllanthus fraternus*): Sólo existe un reporte en esta familia, pero probablemente este género presentará especies con alcanidas cuando se exploren más detalladamente (Sittie *et al.*, 1998).

- Menispermaceae (*Cissampelos glaberrima* St.-Hil): Sólo existe un reporte para esta Familia. Esta especie es ampliamente utilizada en medicina tradicional en Brasil (Laurerio-Rosario *et al.*, 1996).
- Piperaceae (*Piper* spp): Una familia predominantemente monogénica de plantas tropicales y con una gran cantidad de especies con alcaloides de uso tradicional alimentario y medicinal en todo el mundo (Parmar *et al.*, 1997).
- Poaceae (*Ctenium aromaticum* Panz.): Aún en la familia Poaceae se ha observado la presencia de alcaloides en las raíces de este pasto de las praderas de Norte América restringida a las áreas húmedas de las costas del suroeste de ese país, donde se ha utilizado desde el siglo XVIII para aliviar el dolor de muelas, aunque su uso ha sido eclipsado por el uso de la corteza de *Zanthoxylum americanum* Miller, Rutaceae (Gamboa-Leon y Chilton, 2000).
- Rutaceae (*Zanthoxylum* spp): En esta familia varias especies del género *Zanthoxylum* presentan alcaloides tanto en corteza, raíces como en los frutos. Una de las primeras alcaloides reportadas se encontró en especies de este género en América. Es un género ampliamente utilizado en Asia y especialmente en China y Japón, tanto como saborizante como en uso medicinal (Xiong *et al.*, 1997).
- Solanaceae (*Capsicum* spp, *Solanum khasianum*): Además de las muy conocidas alcaloides de *Capsicum* o capsaicinoides, limitadas a este género que se sintetizan exclusivamente en el fruto, en la estructura denominada placenta, a la que se encuentran unidas las semillas conocida popularmente como venas. La principal alcaloide en este caso es la capsaicina, cuya estructura es la de una bencilamina sustituida, unida a una cadena ácida 6*E*-monoeno-isodecanoico. Existe algunos

reportes de alcalmidas no capsaicinoides derivadas de la tiramina en la familia Solanaceae (Sarmiento-Silva *et al.*, 2002).

### **Alcamidas en la familia Asteraceae**

Las alcalmidas olefínicas se presentan en dos tribus importantes en la familia Asteraceae, en Heliantheae y Anthemideae. Las acil alcalmidas se encuentran ampliamente distribuidas en esta familia, lo que les da importancia taxonómica. Desde el punto de vista bioquímico, presentan un patrón biosintético interesante de estudiar. Este grupo de alcalmidas se asocia a tejidos específicos de la planta, principalmente a las raíces, a las cabezuelas florales y a las semillas, pero en algunas especies se distribuye en la planta completa. Se pueden subdividir en dos grupos importantes. El primer y el más amplio subgrupo está constituido por alcalmidas de cadena acilo lineal que van de C9 a C18 pero principalmente con cadenas C10 y C14, tanto con número par como impar de carbonos en esta cadena, con una o más uniones acetilénicas. La mayor parte de las especies que contienen este tipo de compuesto pertenecen a la tribu Anthemideae y al amplio género *Achillea* (Christensen, 1992).

El segundo subgrupo está formado por alcalmidas de cadena acilo lineal que van de C8 a C14, donde la mayoría son C10 o C12 ambos subgrupos presentan instauraciones en posición similares: 2E,6Z,8E o 2E,4Z,8E,10E y el sustituyente amida puede ser isobutilo, 2-metilbutilo o etilfenilo. Estas alcalmidas forman en si una clase de metabolitos secundarios (Molina Torres *et al.*, 1999).

La familia Asteraceae es en la que más especies con alcalmidas se han reportado y algunas de estas presentan las más alta concentración encontrada

especialmente en raíces. Quizás donde mas géneros conteniendo alcanidas se reporten es en la tribu Anthemideae (Christensen, 1992). México es la región más importante de diversificación de esta familia la cual es una de las más grandes familias de plantas también denominada Compositae (Rzedowski, 1991).

### **Afinina**

*H. longipes* fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica (Acree *et al.*, 1945). Sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en laboratorio resultó erróneamente identificada como *Erigeron affinis* y así, la amida aislada fue denominada afinina. Más tarde se aclaró esta confusión pero el nombre de la amida ya se había aceptado (Little, 1948).

La afinina también denominada espilantol (*N*-isobutil 2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida), es la alcanida mayoritaria y principal responsable de los efectos biológicos observados en esta planta (Jacobson *et al.*, 1947; Molina-Torres y García-Chávez, 2001). Esta alcanida es un aceite amarillo pálido con una fórmula empírica C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO (Figura 3A), y tiene las siguientes propiedades químicas: punto de ebullición entre 160-162°C, punto de fusión 23°C, densidad 1.5128 y es soluble en todos los solventes orgánicos usuales e insoluble en agua (The Merck Index, 1996). Ésta molécula ha probado tener actividad insecticida (Romero *et al.*, 1989), antiinflamatoria (Garrido *et al.*, 2002), antimicrobiana (Molina-Torres *et al.*, 1999) y antifúngica (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000), entre otras.

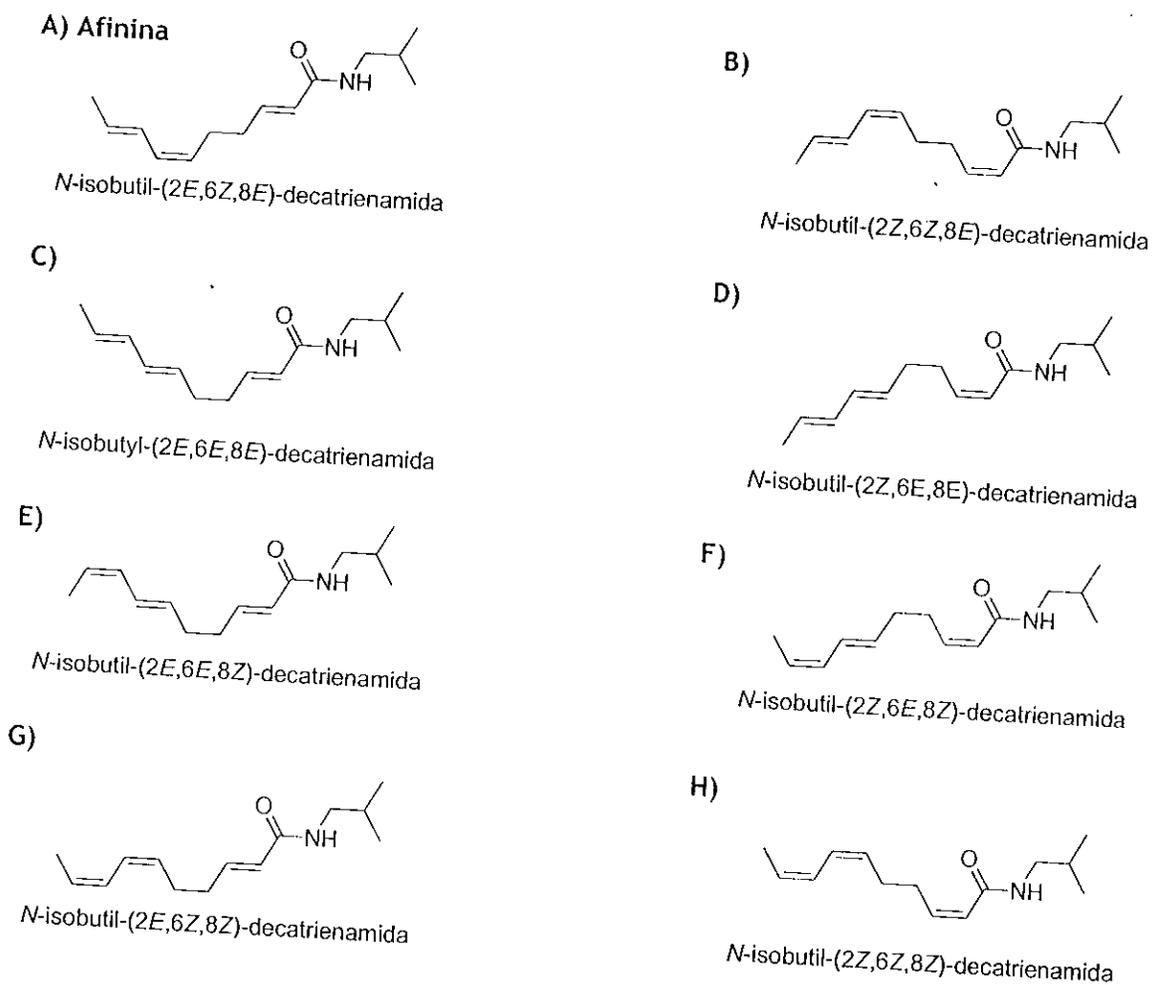


Figura 3 .- Afinina y sus isómeros

A): Estructura molecular de la afinina: *N*-isobutil- (2*E*, 6*Z*, 8*E*) decatrienamida

B) – H): Estructuras moleculares de las posibles formas isoméricas de la afinina.

## Isomería

Se definen como isómeros aquellas moléculas que teniendo fórmula molecular idéntica (mismo número y tipo de átomos) difieren en su arreglo. Se pueden considerar tres clases de isómeros: estructurales, conformacionales y estereo isómeros. Estos últimos se refieren a moléculas que teniendo los mismos átomos, secuencia y ligaduras difieren en su arreglo tridimensional. Se pueden dividir en enantiómeros, los que son moléculas que son imágenes especulares que no se pueden superponer, y diastereo isómeros. En este caso nos referiremos a la isomería que resulta de la presencia de dobles ligaduras; donde la isomería se refiere a los sustituyentes prioritarios en cada uno de los carbonos formando estas. El caso del acomodo en el que las dos grupos de mayor prioridad o los dos de menor prioridad se eclipsen se denomina isómero *Z* (*Zusammen* en alemán juntos). El caso contrario se denomina *E* (*Entgegen*, opuesto). Esto es similar a la nomenclatura *cis* y *trans*, pero dada la ambigüedad de esta terminología en olefinas acíclicas está siendo abandonada (Orchin *et al.*, 1980).

La actividad insecticida que presenta la afinina ha sido encontrada en otras isobutilamidas que tienen un doble enlace conjugado al grupo carbonilo (Greger, 1984). Existen evidencias que sugieren que la posición del doble enlace conjugado, así como el isomerismo *E* juegan un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida de las alcanamidas (Crombie y Krasinski, 1962).

Trabajos con isobutilamidas insaturadas ha probado que el isomerismo ***E-Z*** juega un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida. Por ejemplo: *N*-isobutil-2*E*-4*E*-decadienamida causa parálisis de las membranas mucosas y resultó ser

la mitad de tóxico que las piretrinas para la mosca común, mientras el mismo compuesto con por lo menos una doble ligadura (o dos) poseyendo la configuración Z resultó comparativamente inactiva (Jacobson, 1954, Elliot *et al.*, 1986).

La determinación de la estructura 2E,6Z,8E de la afinina se realizó varios años después de su aislamiento inicial por Acree (Crombie *et al.*, 1960; Correa *et al.*, 1971). De acuerdo a su configuración molecular, existen 8 probabilidades distintas de la molécula -7 posibles isómeros- como puede observarse en la Figura 3.

### **Microorganismos en este estudio**

Para evaluar la capacidad inhibitoria de crecimiento se utilizaron tres modelos de microorganismos: un hongo ascomicete microscópico (*Saccharomyces cerevisiae*), una bacteria Gram-positiva (*Bacillus subtilis*) y una bacteria Gram-negativa (*Pseudomonas syringae*). *S. cerevisiae* y *B. subtilis* se eligieron debido a que las dosis efectivas inhibitorias de crecimiento de la afinina sobre estos microorganismos ya se conocen (Molina-Torres *et al.*, 1999). *P. syringae* se utilizó como modelo Gram-negativo y por tener importancia económica, ya que es la bacteria patógena de plantas.

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

Dentro del género *Sacharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye la levadura, el microorganismo eucarionte más estudiado. Desde fines del siglo XIX se reconocieron algunas de las ventajas que ofrece el uso de *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico en la investigación. Por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes

cantidades de este hongo ascomicete, y por otro, el hecho de que *S. cerevisiae* posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal. Posee un genoma pequeño, solamente unas cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de las células de mamífero, esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo (González y Valenzuela, 2000).

### ***Bacillus subtilis***

Las características generales del género *Bacillus* son: Producen endosporas, las que son termoresistentes y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares ácidos orgánicos y alcoholes como las únicas fuentes de carbono y el amoníaco como única fuente de nitrógeno. Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C. El límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3. La bacteria *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva, cuyo hábitat natural es el suelo. Está emparentado filogenéticamente con patógenos de importancia, tal es el caso de *B. anthracis* y *Clostridium sp.*, por lo cual es interesante utilizar esta bacteria como modelo de investigación (Bernabé, 2004).

## ***Pseudomonas syringae***

Las bacterias del género *Pseudomonas* se caracterizan por ser Gram-negativas, tienen una forma de bacilo recto o ligeramente curvado, poseer una movilidad mediante flagelos polares, un metabolismo respiratorio (nunca fermentativo) y utilizar como medio de catabolismo de glucosa la Vía Entner-Doudoroff. Las especies de *Pseudomonas* están distribuidas en el suelo y ecosistemas acuáticos y pueden estar libres o asociados con animales y plantas. En el caso de *Pseudomonas syringae*, se trata de una especie de bacterias patógenas de plantas. En girasol (*Heliantus annuus* L.), la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* produce la enfermedad conocida como mancha angular o tizón bacteriano (Atlas, 1998).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

***Heliopsis longipes* Gray (Blake):** Las raíces de *Heliopsis longipes* que se utilizaron fueron cultivadas en El Roblar, remoto sitio dentro de la Sierra Gorda, Municipio de Xichú en el estado de Guanajuato.

**Extracto etanólico:** Los extractos de *Heliopsis longipes* fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitobioquímica, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de Plantas de CINVESTAV Unidad Irapuato; sin embargo, a continuación se describe el procedimiento que se realizó para obtenerlos.

**Extracto 1.-** El extracto que en lo sucesivo se denominará Extracto 1 se obtuvo de la siguiente manera: Se pulverizaron 1.5 kg de raíces secas de *Heliopsis longipes* y se extrajeron con 10 l de etanol absoluto durante una semana a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se concentró en un rotavapor Büchi 461 a temperatura de 50°C, hasta reducir el volumen a aproximadamente 500 ml. El extracto así obtenido se sometió a su análisis por GC-MSD para determinar la presencia de afinina y se guardó a 4°C para su posterior uso.

**Extracto 2.-** Se obtuvo en la industria Altenox Química (Toluca, Estado de México) mediante métodos poco convencionales, los cuales nos fueron descritos como: Se pulverizó la misma cantidad de raíces secas de *Heliopsis longipes* y se extrajo con 10 l de etanol/agua (9/1 v/v). Se trataron a 80°C por aproximadamente 5 horas. El filtrado y concentrado se realizó bajo las mismas condiciones que el Extracto 1.

**Cepas de microorganismos:** Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*, *Bacillus subtilis* fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitobioquímica. CINVESTAV IPN Unidad Irapuato.

## **Equipo**

**Cromatografía en Columna:** Para el análisis de cromatografía en columna, se utilizó una columna de vidrio de 50 cm de largo, y 2.5 cm de diámetro en un soporte universal.

**Cromatografía en capa fina:** Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de 0.5 mm de sílica.

**Cromatógrafo de gases/ Espectrómetro de Masas:** Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard GC Mod. 5890 acoplado a un espectrómetro de masas de baja resolución Hewlett Packard Mod. 5972 MSD, con una columna HP-5MS (Crosslinked 5% Phenylmethyl Silonane) 30m de longitud, x 0.25mm diámetro interno y 0.25um espesor de película.

**Espectrofotometría UV-Visible:** Para el análisis de turbidez se utilizó un espectrofotómetro de luz UV-Visible Cary Varian modelo 3E de doble rayo con rango de medición de 180nm a 800nm.

**Espectroscopia Infrarrojo:** El espectroscopio de infrarrojo medio de marca Perkin Elmer 1600 Series FTIR con un rango de 400 a 4000 nm.

**Resonancia Magnética Nuclear:** Se realizó un estudio de Resonancia Protónica (Carbono 13) en un equipo  $^1\text{H}$ NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR Modelo Varian Gemini 200.

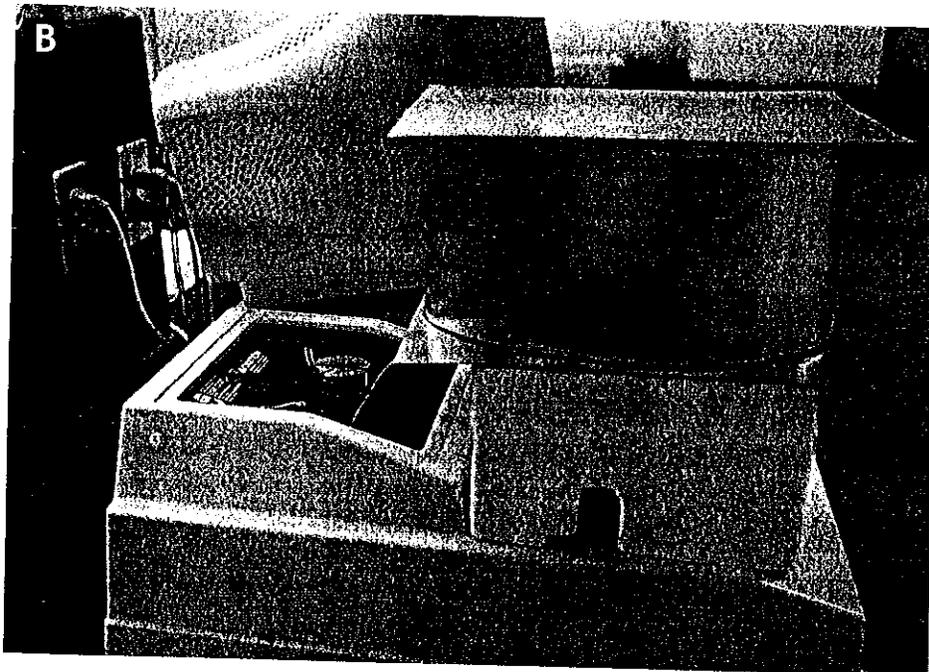
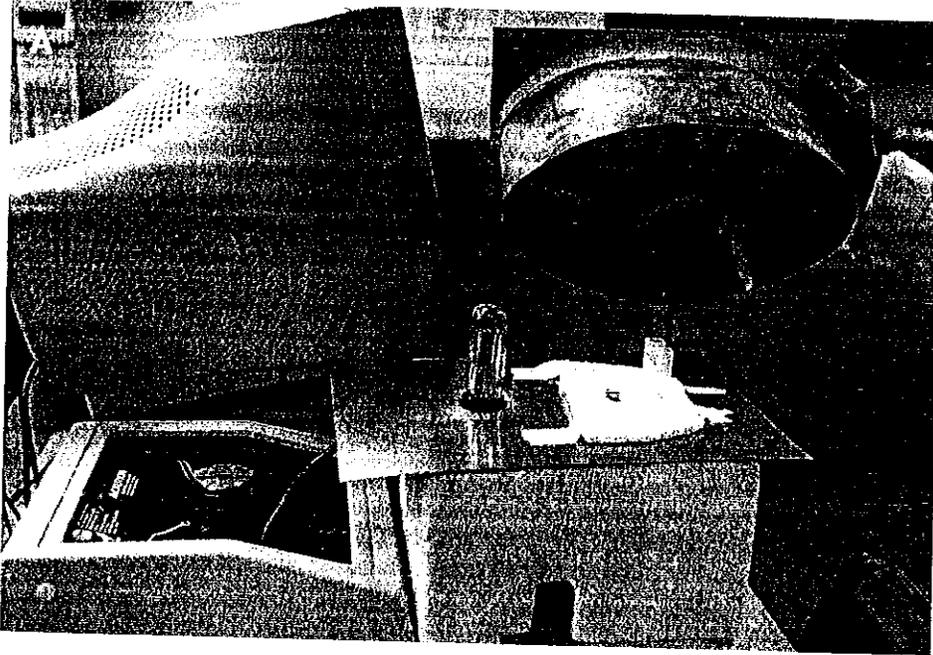
**Cámara para Isomerización por luz Ultravioleta:** Para la isomerización de la afinina, se elaboró una cámara que permitiera la exposición de los extractos a radiación intensa con luz ultra violeta (UV). La fuente de luz ultravioleta utilizada fue la lámpara de deuterio del espectrofotómetro de UV-Visible Cary Varian 3E. La cámara consistía en un óvalo de 30 x 15 cm de aluminio con su respectiva tapa, dentro de ella en uno de los focos del óvalo se colocó la lámpara para radiación total sin monocromador ni filtros, y en el otro foco una base de unicel para sostener dos celdas de cuarzo`conteniendo los extractos (Figura 4).

## **Métodos**

### **Aislamiento de la afinina**

#### **Cromatografía en Columna de Sílice**

Se pesaron 28 g de sílice y se solvató con 100 ml. de hexano, se homogenizó agitando suavemente de 10 a 15 min. A continuación se le aplicó vacío para quitarle las burbujas, se montó la columna y se colocó un sello de algodón en el interior de la columna antes de la llave. Se adicionaron 5 cm. de hexano y se procedió a empacarla con el sílice solvatado, se montó la columna 15 min. dejando 1 cm. de hexano en la parte superior de la columna sobre el sílice para vaciar con una pipeta Pasteur 1 g del extracto concentrado sin tocar las paredes. Se abrió la llave y se agregaron suavemente 100 ml. de hexano para que el extracto empezara a penetrar el empaque de la columna.



**Figura 4**

A) En esta imagen se puede apreciar el foco de luz ultravioleta proveniente del espectrofotómetro de luz UV-Visible, las dos celdas de cuarzo que fue donde se pusieron los extractos y la cámara de aluminio diseñada para exponer los extractos a la luz ultravioleta

B) El dispositivo cerrado permite la exposición a la luz ultravioleta de los extractos.

Se agregaron 250 ml. de hexano con la finalidad de que el extracto se incorpore totalmente a la fase de la columna. En este momento se agregan diferentes volúmenes de la mezcla solventes de elución para separar los compuestos de interés. Se inició con 100 ml. de una mezcla hexano:acetato de etilo (9:1), posteriormente se eluyó con 100 ml. de hexano: acetato de etilo (8:2) y así sucesivamente hasta llegar a la fracción 5:5. Por último se pasan 200 ml. de acetato de etilo solo, para limpiar la columna y arrastrar lo que se quedó en la sílice. Se colectaron fracciones de 50 ml. Las cuales se concentraron en el rotavapor a 50<sup>0</sup>C a sequedad con la finalidad de evaporar el hexano y el acetato de etilo. Cada muestra se resuspendió en 1 ml. de etanol absoluto y con una pipeta Pasteur, se trasladó a un vial, éste se etiquetó con el número de la columna, de recolección y de fracción para después ser analizado en cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MSD). Éste procedimiento se realizó varias veces con la finalidad de recolectar la mayor cantidad de extracto purificado posible.

### **Cromatografía en Columna de Sílice impregnada de AgNO<sub>3</sub>**

Las fracciones que probaron mediante GC-MSD tener presencia de afinina y/o isómeros se reunieron y se concentraron para volverse a pasar por Cromatografía en Columna, pero esta ocasión con sílice activado con AgNO<sub>3</sub>. Para preparar el sílice se pesaron 100 g de sílice para cromatografía en columna y se mezclaron con 200 ml. de agua destilada con AgNO<sub>3</sub> al 5%. Se mezcló bien, se puso en un cristizador y se dejó secar en un horno a 60<sup>0</sup>C por 26 horas. Se montó la columna siguiendo el mismo procedimiento y el mismo sistema de solventes detallado en el apartado anterior.

## **Cromatografía en Placa o Capa Fina (TLC)**

**Elaboración de placas:** Se pesaron 40 g de sílice para cromatografía en placa fina, se colocaron en un matraz de 250 ml, y se mezclaron con 90 ml de agua destilada. En el caso de preparar placas activadas con  $\text{AgNO}_3$ , en este paso se le agrega al agua destilada 5% de  $\text{AgNO}_3$  correspondiente a 4.5 g. Una vez lista la mezcla se agitó hasta quedar homogénea, luego se vació en un deslizador de sílice manual para hacer placas de TLC con un espesor de 0.5 mm. y se dejó gelificar y secar, para posteriormente activarlas en una estufa a  $100^\circ\text{C}$  por una hora.

La muestra se aplicó en las placas ya frías, utilizando una jeringa Hamilton, y se puso en una cámara que contiene un sistema de solventes hexano:acetato de etilo 2:1. Después de que el sistema de solventes desarrolló la placa, llegando el solvente a 3 cm. de la parte superior, se retiró de la cámara y se dejó en la campana para permitir la evaporación del solvente. Posteriormente se asperjó la placa con una solución etanólica de fluoresceína al 0.02%, y se observó bajo luz ultravioleta. Se marcaron las bandas oscuras sobre fondo fluorescente que aparecían y se rasparon para extraer sus compuestos.

**Elusión de los compuestos del sílice:** Los compuestos se eluyeron del sílice con 3 ml. de acetato de etilo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min., el solvente se pasó a un tubo limpio, y después de repetir la operación el solvente recolectado se concentró con una corriente de nitrógeno para evaporar el acetato de etilo, una vez concentrado el compuesto se resuspendió en 1 ml de etanol, para analizar su pureza por GC-MSD.

## Purificación

### **Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas (GC-MSD)**

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de baja resolución. Se tomó una alícuota de la muestra en un vial y se inyectó 1ul de esta con un inyector automático modelo HP7683. Las condiciones de operación utilizadas fueron: a) la temperatura del inyector se mantuvo a 200°C, b) el programa de temperatura del horno fue una temperatura inicial de 150°C por 3 min, y entonces incrementando a una tasa de 4°C por minuto hasta una temperatura final de 250°C mantenida por 4 minutos; c) se utilizó helio grado cromatográfico como gas acarreador a un flujo constante de 1ml/min. Esta serie de análisis se realizaron con la finalidad de verificar la pureza y así poder juntar la mayor cantidad de extracto concentrado obtenido de la cromatografía en sílice para volver a realizar cromatografías para purificar y concentrar las moléculas de interés e ir monitoreando el proceso.

## Caracterización

Cuando se obtuvo la pureza deseada monitoreada como un solo pico en GC/MSD, la caracterización del isómero aislado se llevó a cabo mediante un estudio comparativo de infrarrojo de 400-4000 nm. con un equipo marca Perkin Elmer modelo 1600 Series FTIR y un estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con <sup>13</sup>Carbono en un equipo <sup>1</sup>HNMR y <sup>13</sup>CNMR Modelo Varian Gemini 2000. Este último estudio fue llevado a cabo en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### Isomerización de afinina

Tomando en cuenta el procedimiento reportado por Jacobson (1954) se procedió a realizar la isomerización de la afinina (*N*-isobutil 2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida) a su isómero "afinina todo-*trans*" (*N*-isobutil 2*E*,6*E*,8*E*-decatrienamida).

Se utilizó la muestra concentrada y purificada de afinina como molécula mayoritaria proveniente del extracto 1, se tomó 1ml., y se concentró con una corriente de nitrógeno para evaporar el etanol, se agregó 3 ml. de tolueno en una celda de cuarzo, y un pequeño cristal de yodo como catalizador; se expuso a la radiación de la fuente de luz ultravioleta y se tomaron muestras a las 1, 2, 3, 4 horas para leerse por GC-MS y observar la transformación.

### Ensayos de Actividad Biológica

Se preparó medio PDB (caldo papa dextrosa DIFCO 24 g en 1 l de agua destilada) y en matraces de 250 ml. con 10 ml. de medio cada uno se inocularon cepas de *Pseudomonas syringae helianthi* (bacteria Gram-negativa), *Bacillus subtilis* (bacteria Gram-positiva), *Saccharomyces cerevisiae* (ascomicete microscópico); las cuales se mantuvieron en agitación a 250 rpm con una temperatura de 28<sup>0</sup>C antes de ser utilizados.

Para *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* se utilizaron las dosis que se ha probado tienen efecto inhibitorio en la afinina (Molina-Torres *et al.*, 1999) y para *Pseudomonas syringae helianthi* se realizó una prueba preliminar para determinar las dosis. Se realizaron tres repeticiones para cada dosis y el grupo control consistió en la

dosis máxima de cada grupo en etanol, solvente en el que se suspendieron las moléculas utilizadas como tratamiento.

Las dosis utilizadas fueron:

Para *Saccharomyces cerevisiae*: Control (0), 75, 150, 200 y 250 µg/ml

Para *Bacillus subtilis*: Control (0), 75, 150, 200 y 250 µg/ml

Para *Pseudomonas syringae helianthi*: Control (0), 50, 75, y 150 µg/ml

Las alcámidas se agregaron al medio PDB antes de ser inoculados.

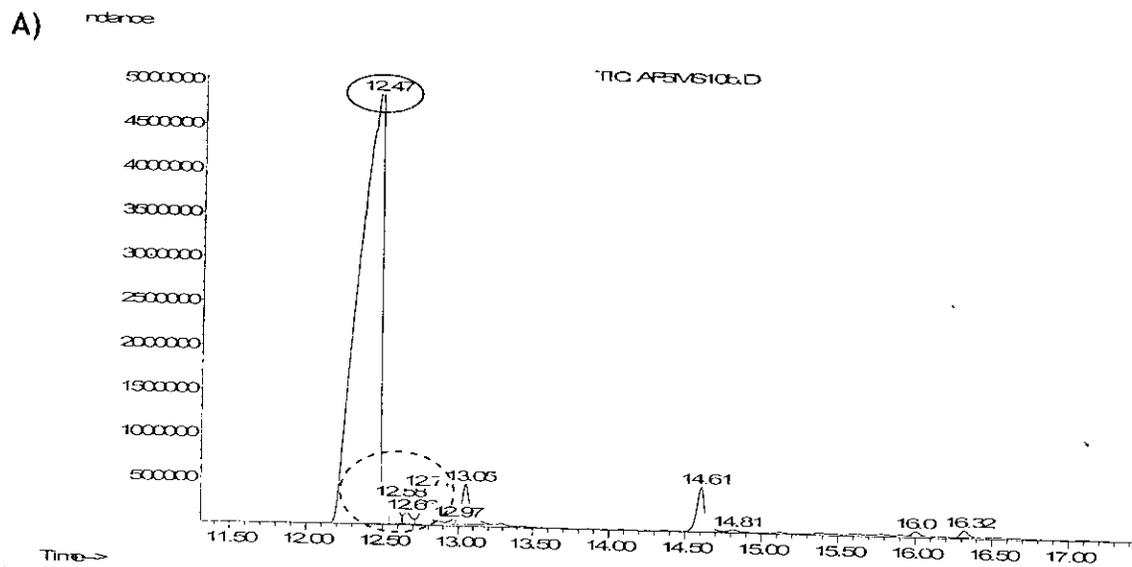
Para evaluar el crecimiento de los microorganismos en el medio se determinó la turbidez midiendo densidad óptica en un espectrofotómetro Cary Varian 3E de luz ultravioleta visible a una absorbancia de 630 nm. Se tomaron dos lecturas: la primera al inocular los microorganismos y la segunda después de permanecer 24 horas a 28 °C y 250 rpm en agitación.

## VII. RESULTADOS

### Obtención de Extractos

**Extracto 1.-** Realizando el procedimiento descrito con anterioridad, se obtuvo un extracto que contiene como molécula mayoritaria la afinina, como muestra su cromatograma (Figura 5) y en forma minoritaria se observan pequeños picos. Los tiempos de retención absolutos se referirán al tiempo de retención de la afinina produciendo tiempos de retención relativos a este compuesto ( $RR_{t_{af}}$ ). La presenta un  $R_t$  de 12.47 min ( $RR_{t_{af}}$  1.000) mientras que los tres más abundantes de estos pequeños picos presentan  $R_t$  12.58 min ( $RR_{t_{af}}$  1.008), 12.66 min ( $RR_{t_{af}}$  1.015) y 12.77 min ( $RR_{t_{af}}$  1.024). El espectro de masas de estas tres moléculas presenta en la Figura 6. Los espectros de estas tres moléculas presentan el mismo ión molecular (221 m/z) y los mismos iones componentes, sin embargo la principal diferencia se encuentra en la proporción de los iones mayoritarios 81 y 141 m/z. El espectro del pico con  $R_t$  12.58 min, Figura 6A, presenta m/z = 81 como ión padre (100%) seguido con menor abundancia por m/z = 141 (60%). El espectro del pico con  $R_t$  12.66 min, Figura 6B, presenta m/z = 81 como ión padre (100%) seguido con menor abundancia m/z = 141 (82%). Por último el espectro correspondiente al pico de  $R_t$  12.77 min, Figura 6C, presenta nuevamente m/z = 81 como ión padre (100%) seguido casi en idéntica abundancia por el ión m/z = 141 (91%).

Por estas pequeñas diferencias en el tiempo de retención y similitud en masas, se espera que sean formas isoméricas, cabe mencionar que en el cromatograma pueden observarse más picos, pero al estar en poca abundancia el equipo no detecta sus tiempos de retención.



B)

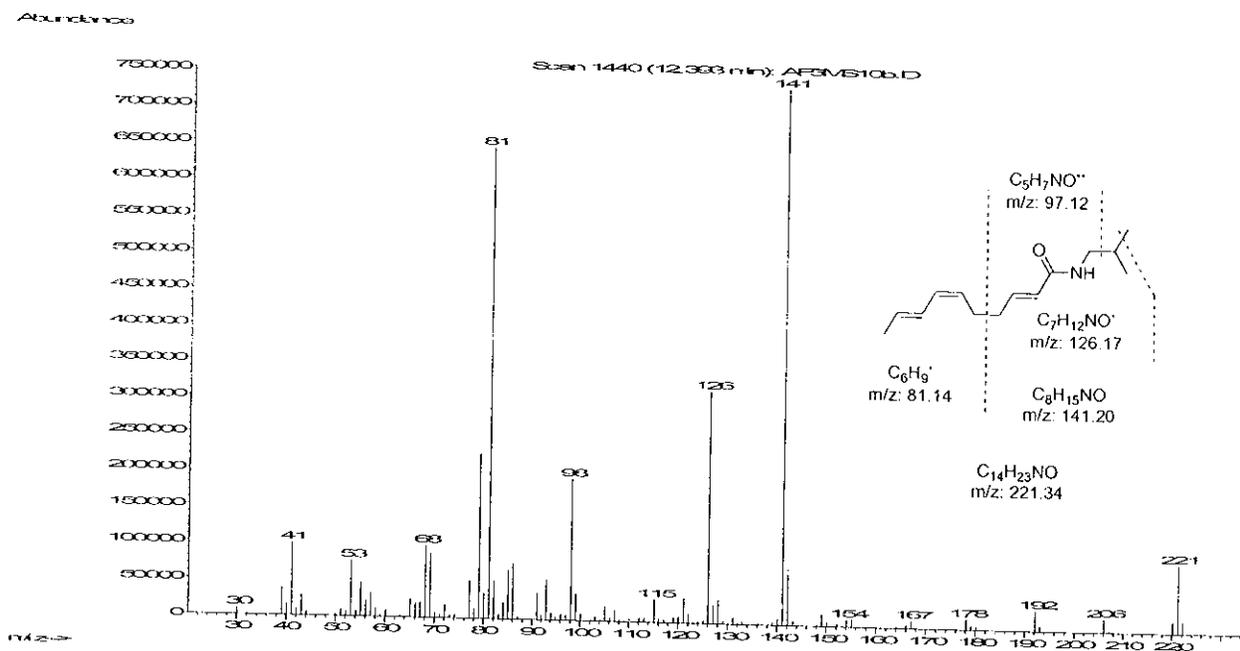
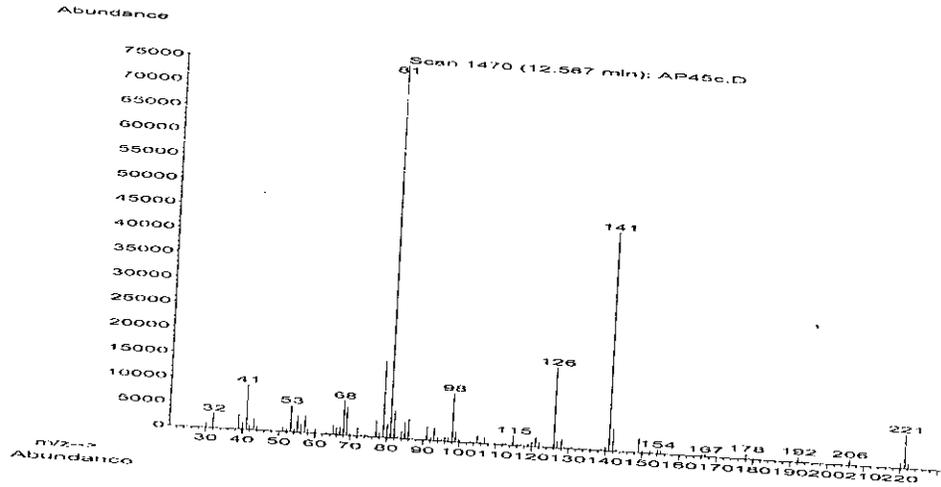
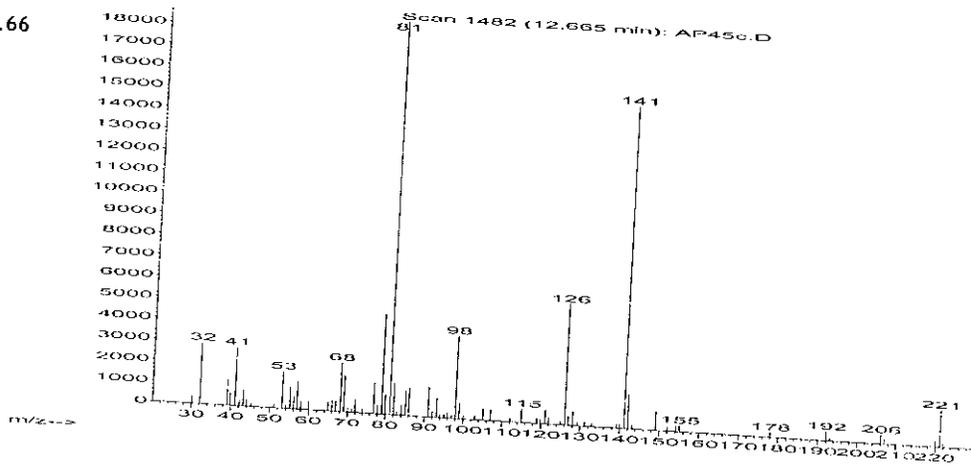


Figura 5.- A) Cromatograma de gases correspondiente a la muestra del extracto 1. Encerrados con una línea punteada se pueden apreciar pequeños picos correspondientes a los isómeros minoritarios de Afinina, la cual en este extracto se encuentra en mayor concentración (óvalo) con un  $R_t$  de 12.47. B) Espectro de masas de la afinina ( $R_t$  12.47) donde se muestra el ión molecular (221 m/z) y los iones componentes principales (81, 98 y 126 m/z) así como a que parte de la molécula corresponden.

A)  $R_t$  12.58



B)  $R_t$  12.66



C)  $R_t$  12.77

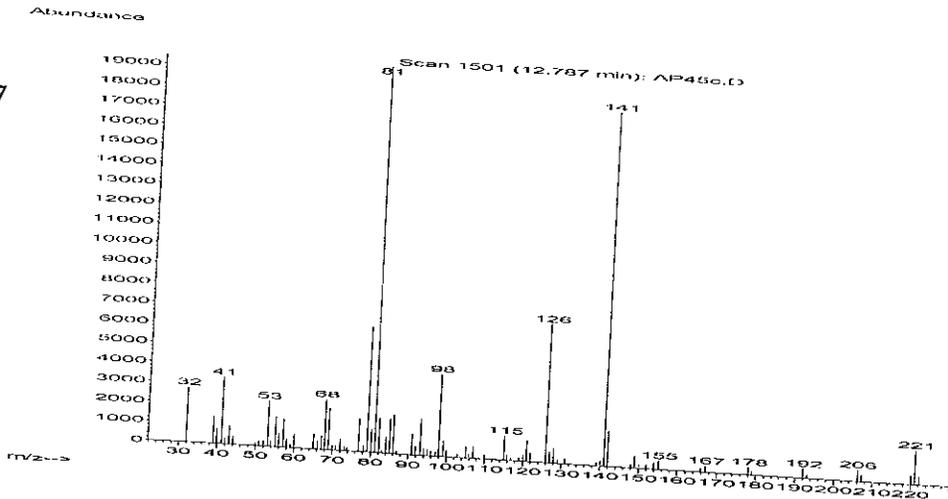


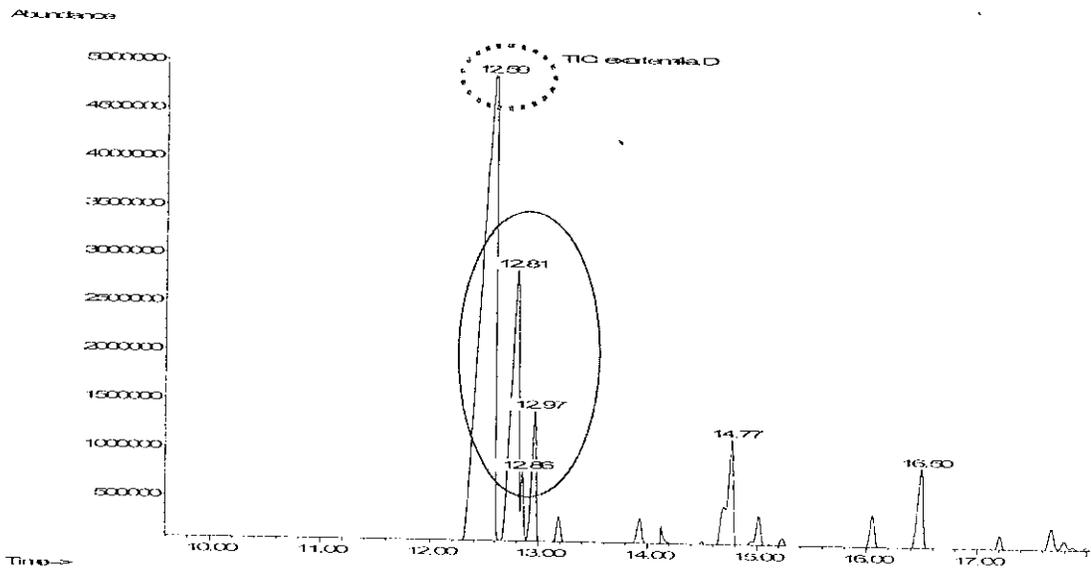
Figura 6.- A) El espectro del pico con  $R_t$  12.58 min presenta  $m/z = 81$  como ión padre (100%) seguido con menor abundancia por  $m/z = 141$  (60%). B) El espectro del pico con  $R_t$  12.66 min presenta  $m/z = 81$  como ión padre (100%) seguido con menor abundancia  $m/z = 141$  (82%). C) El espectro correspondiente al pico de  $R_t$  12.77 min presenta nuevamente  $m/z = 81$  como ión padre (100%) seguido casi en idéntica abundancia por el ión  $m/z = 141$  (91%).

**Extracto 2.-** La segunda muestra presenta un cromatograma con varias diferencias en comparación con el extracto 1. En este caso, los pequeños picos que se observaban en el extracto 1 están en mayor abundancia (Figura 7). El tiempo de retención de la afinina es 12.59 min ( $RR_{tar}$  1.000). Como puede observarse en ésta muestra los isómeros se encuentran en cantidades más abundantes en comparación al Extracto 1 (casi a la par con la afinina) y con un  $R_t$  de 12.81 min ( $RR_{tar}$  1.017), 12.86 min ( $RR_{tar}$  1.021) y 12.97 min ( $RR_{tar}$  1.030). Los espectros de masas se presentan en la Figura 8, en los cuales puede observarse que el pico correspondiente a  $R_t$  de 12.81 min ( $RR_{tar}$  1.010) tiene  $m/z = 81$  como ión padre (100%) y seguido en abundancia por  $m/z = 141$  (52.56%) (Figura 8A). El espectro correspondiente al pico de  $R_t$  12.55 ( $RR_{tar}$  1.014) nuevamente con ión padre  $m/z = 81$  (100%) y seguido en abundancia por  $m/z = 141$  (73.3%) (Figura 8B). Y por último al espectro de  $R_t$  12.65 ( $RR_{tar}$  1.022) como ión padre  $m/z = 81$  (100%) y es seguido en abundancia por  $m/z = 141$  (87.59%).

### Aislamiento

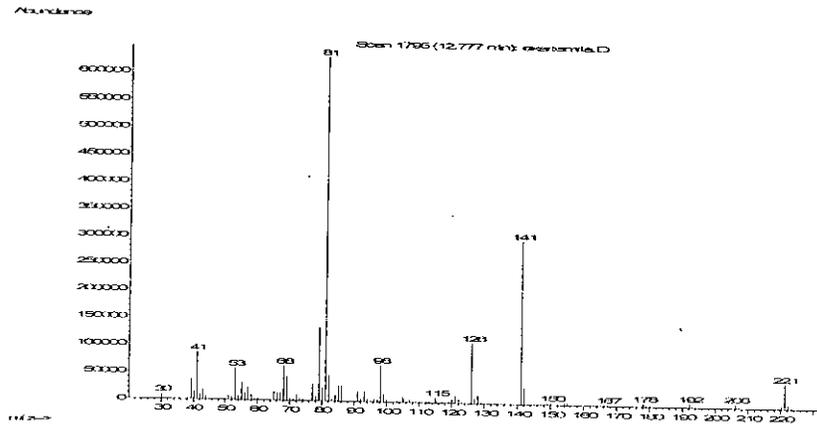
Se realizaron varias cromatografías tanto en columna como en placa fina (con sílice común y con sílice activado con  $AgNO_3$ ) monitoreándose con el GC-MSD con la finalidad de ir adquiriendo cantidades considerables de las moléculas de interés, cada vez más concentradas.

**Cromatografía en Columna:** Dentro de la Cromatografía en Columna, se obtuvieron aproximadamente 17 fracciones en cada corrida; las fracciones que por análisis de GC/MS demostraron tener una cantidad considerable de afinina y/o sus isómeros fueron de la fracción 7 a la 13 en la mayor parte de las eluciones. Estas fracciones se juntaron para volverse a purificar.

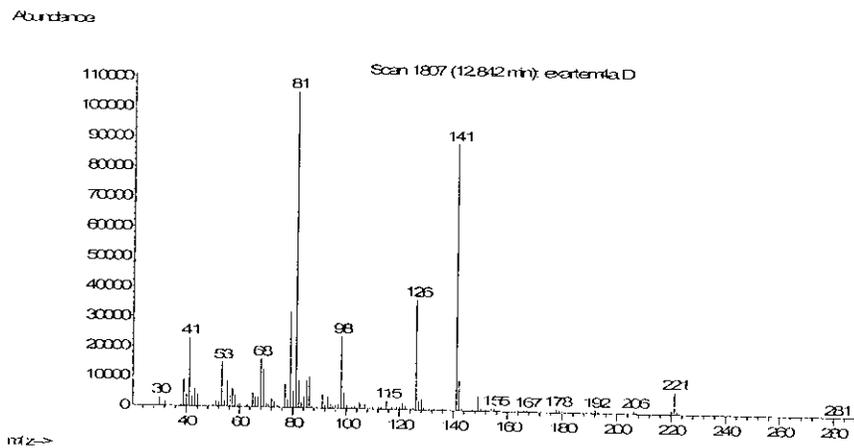


**Figura 7.-** Cromatografía de gases correspondiente al extracto 2. El tiempo de retención de la afinina es 12.59 ( $RR_{tar}$  1.000). Como puede observarse en ésta muestra los isómeros se encuentran en cantidades más abundantes en comparación al Extracto 1 y con un  $Rt$  de 12.81, 12.86 y 12.95 min.

A)  
R<sub>t</sub> 12.81



B)  
R<sub>t</sub> 12.86



C)  
R<sub>t</sub> 12.97

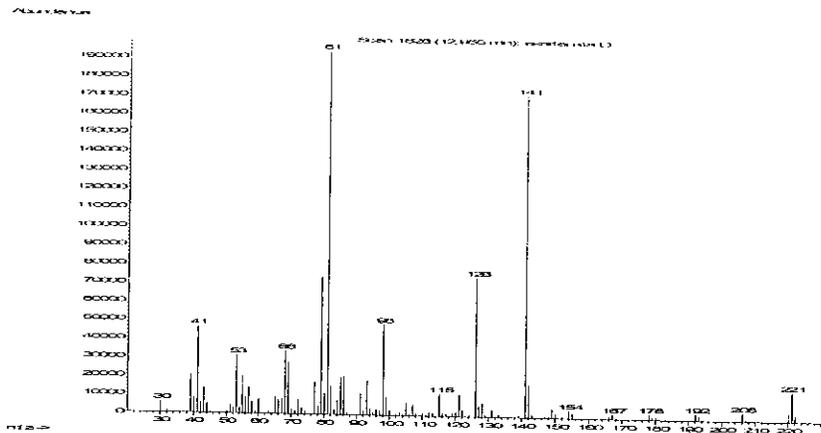


Figura 8.- Espectros de masas de los isómeros presentes en el Extracto 2. **A)** Espectro correspondiente al pico de R<sub>t</sub> 12.81 el cual presenta m/z = 81 como ión padre (100%) y seguido en abundancia por m/z = 141 (52.56%) **B)** Espectro correspondiente al pico de R<sub>t</sub> 12.86 con ión padre m/z = 81(100%) y seguido en abundancia por m/z = 141 (73.3%). **C)** Espectro de R<sub>t</sub> 12.97 el cual presenta nuevamente como ión padre m/z = 81 (100%) y seguido con similar abundancia m/z = 141 (87.59%).

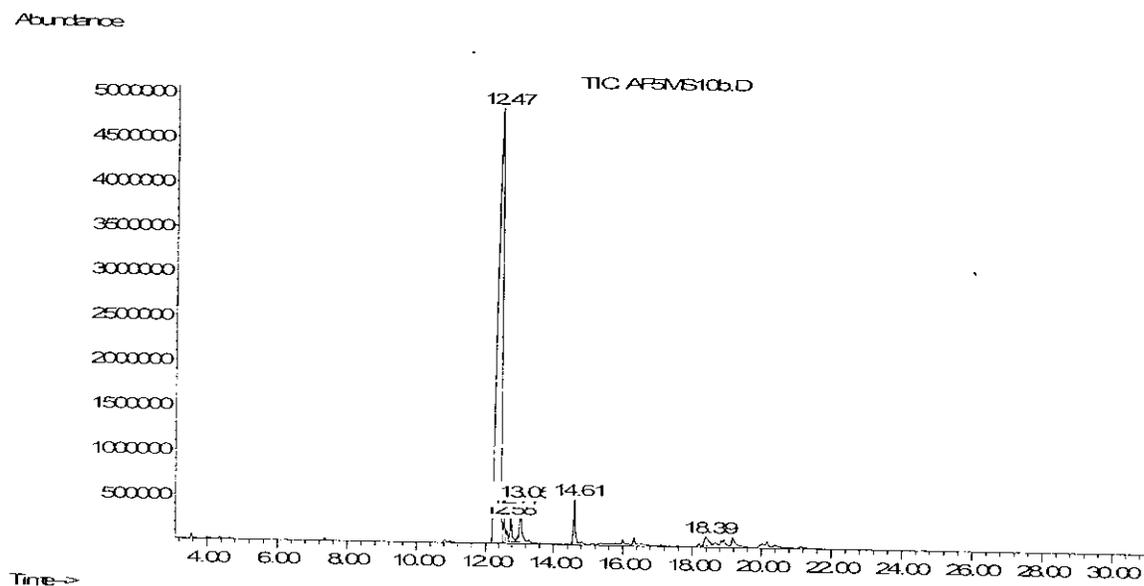
**Cromatografía en placa fina:** Con respecto a la cromatografía en placa fina, la afinina apareció con un  $R_f$  de 0.5. Inicialmente se planearon las técnicas de cromatografía en columna y placa fina para separar muestras de afinina natural con cualquiera de sus isómeros, sin embargo, al seguir la metodología, la muestra mientras se más se separaba, más se diluía, por lo que se procedió a utilizar las técnicas señaladas para purificar afinina e isomerizarla. La cromatografía en placa fina activada con  $AgNO_3$  la utilizamos para limpiar los extractos después de isomerizarlos.

### Isomerización

Utilizando lámpara de deuterio del espectrofotómetro de luz UV-Visible y la cámara diseñada para exponer a los extractos a la radiación UV, se procedió a la radiación de las muestras mencionadas disueltas en tolueno, y se tomaron alicuotas cada hora para verificar, por GC-MSD, la evolución de la reacción. Observándose que después de 3 hora, la reacción se estabiliza, es decir en los cromatogramas subsecuentes a las 3 horas ya no se observaron cambios en la muestra, por lo que se asume que después de ese tiempo la reacción llega a un equilibrio. En ambos extractos se observó un cambio en el tiempo de retención del pico del componente mayoritario.

El Extracto 1 en el cromatograma de la Figura 9A presenta se observa a la afinina ( $R_t$  12.47) como molécula mayoritaria y a sus isómeros correspondientes en baja abundancia, antes de comenzar el proceso de isomerización. Después de tres horas de exposición a la luz ultravioleta se observó un cambio en cuanto a la

A)



B)

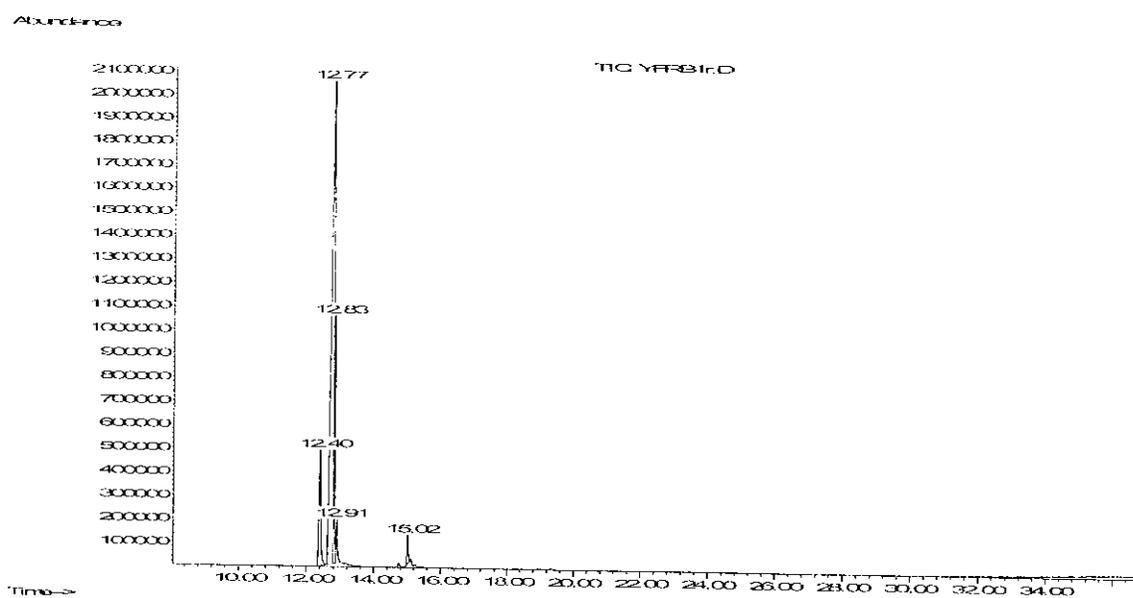


Figura 9.- A) En este cromatograma se observa a la Afinina pura (y una pequeña cantidad de picos correspondientes a los isómeros presentes en el Extracto 1 antes de comenzar el proceso de isomerización. La Afinina presenta un  $R_t$  de 12.47 y es la molécula mayoritaria. B) Después de tres horas de exposición al foco de luz ultravioleta se observa que la molécula mayoritaria es una de las formas isoméricas, con  $R_t$  de 12.77.

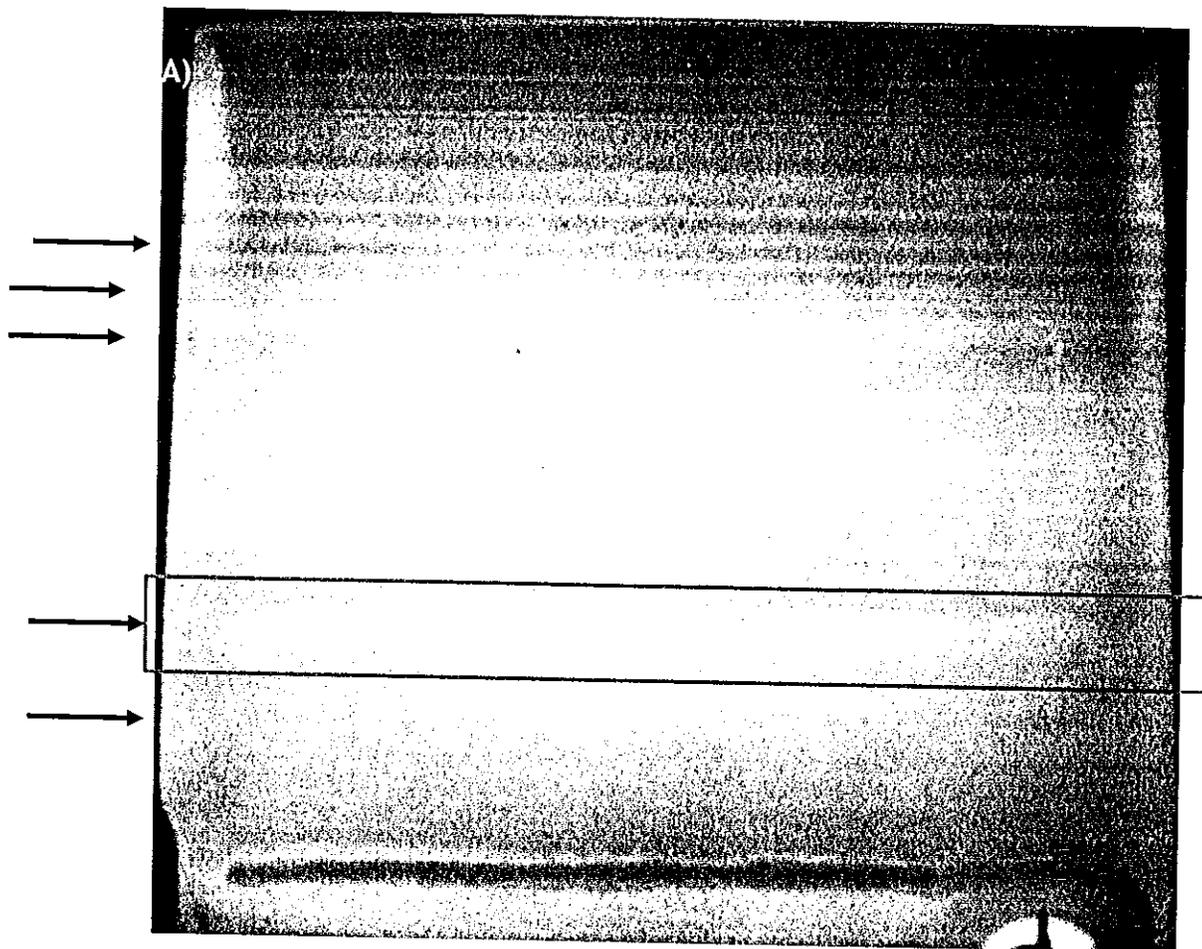
distribución de abundancia: la molécula mayoritaria resultante presentó un  $R_t$  de 12.77 min ( $RR_{t_{af}}$  1.024) como se muestra en Figura 9B.

La molécula mayoritaria resultante del experimento, es probablemente el isómero afinina todo-*trans*, ya descrito previamente por Jacobson (1954). Como en ambas muestras se observaron acompañadas de otras moléculas se realizó una purificación por TLC activado con  $AgNO_3$  para separar el isómero de interés. En este caso el procedimiento se realizó en un cuarto a 4°C para tratar de mejorar la resolución de la metodología. Se eligió el extracto 1 para realizar la TLC por ser el que tenía menor cantidad de impurezas.

Los resultados de éste procedimiento se ilustran en la Figura 10 donde se observa una placa con 5 bandas separadas que se visualizaron mediante luz ultravioleta. Las bandas se separaron, y se extrajeron de la sílice para monitorear su pureza por GC-MS. La banda correspondiente a el  $R_f$  de 0.28 se separo del sílice y se sometio a GC-MS. El cromatograma presentó un  $R_t$  de 12.80 min ( $RR_{t_{af}}$  1.030) y libre de otras moléculas (Figura 10B).

### Caracterización

**Espectroscopia en Infrarrojo:** La molécula aislada se comparó mediante un estudio de infrarrojo con la molécula afinina (Figura 11) donde se puede observar las pequeñas diferencias en la transmitancia de ambas moléculas, coincidiendo con lo esperado en una forma isomérica de la misma molécula. Sin embargo, nuestros resultados difieren a los obtenidos por Jacobson (1954) muy probablemente por las diferencias en el equipo y la baja resolución del equipo utilizado en ese estudio.



B)

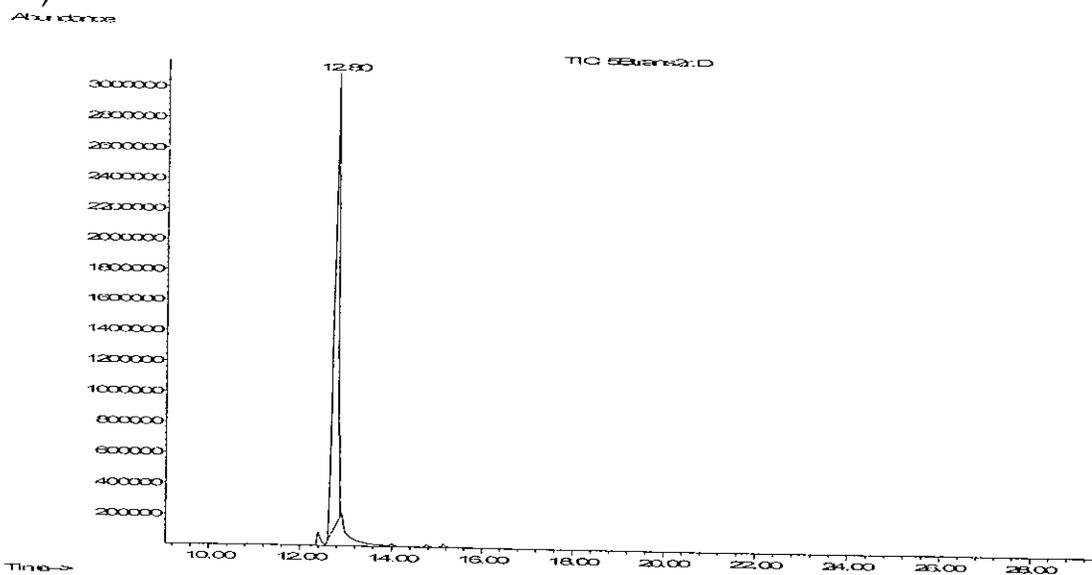
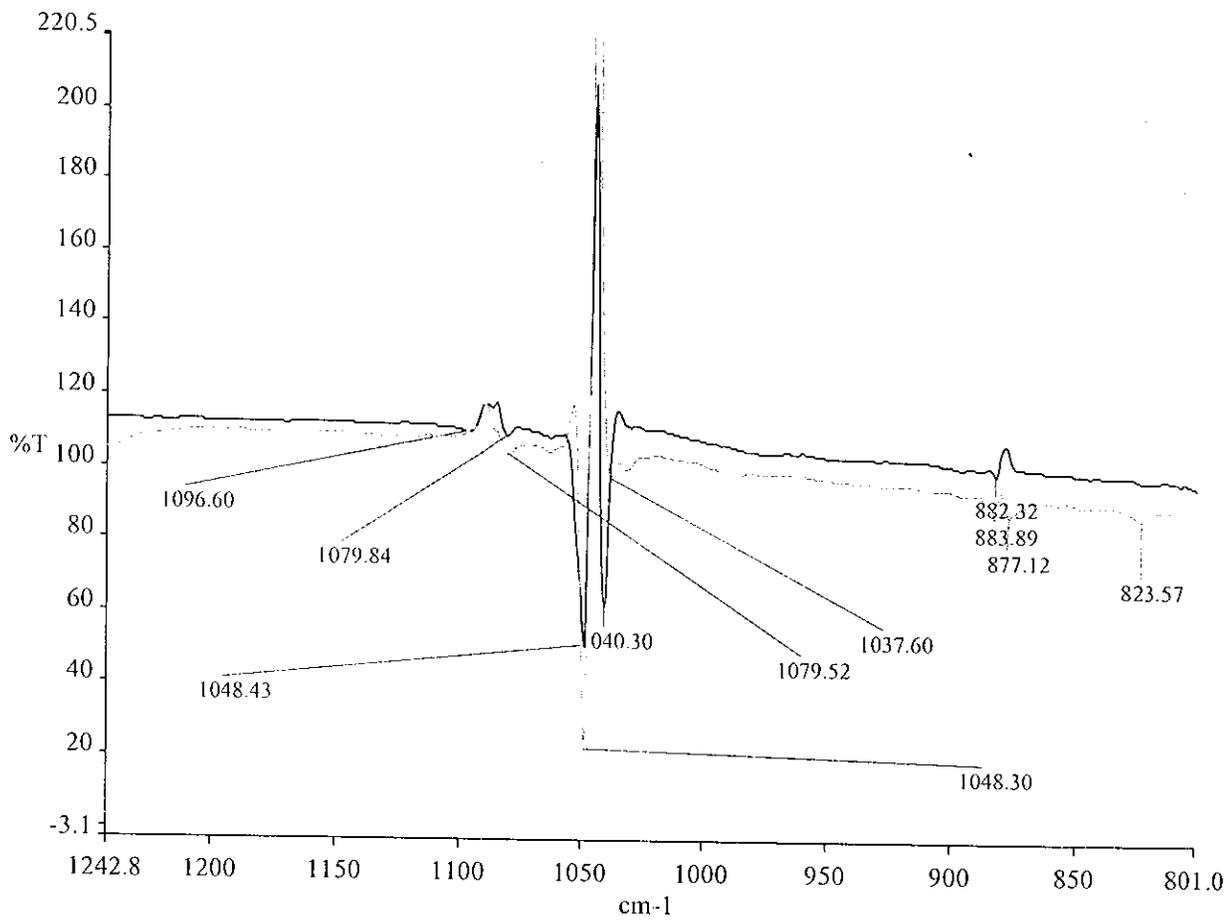


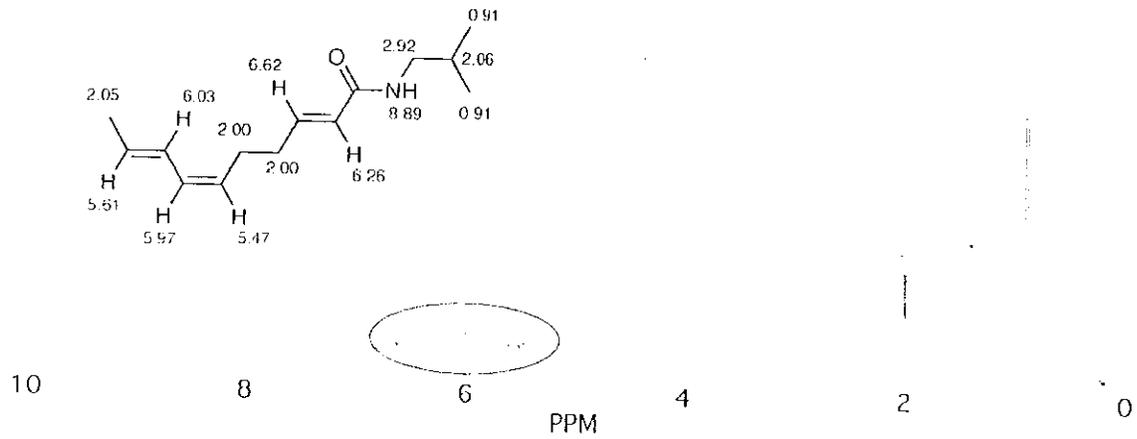
Figura 10.- A) TLC del Extracto 1 después de isomerizarse. La banda aislada (marcada en recuadro) es la que corresponde a la *trans*-afinina y presentó un  $R_f$  de 0.28. B) Cromatograma de la banda señalada. Con un  $R_t$  de 12.80 y libre de otras moléculas.



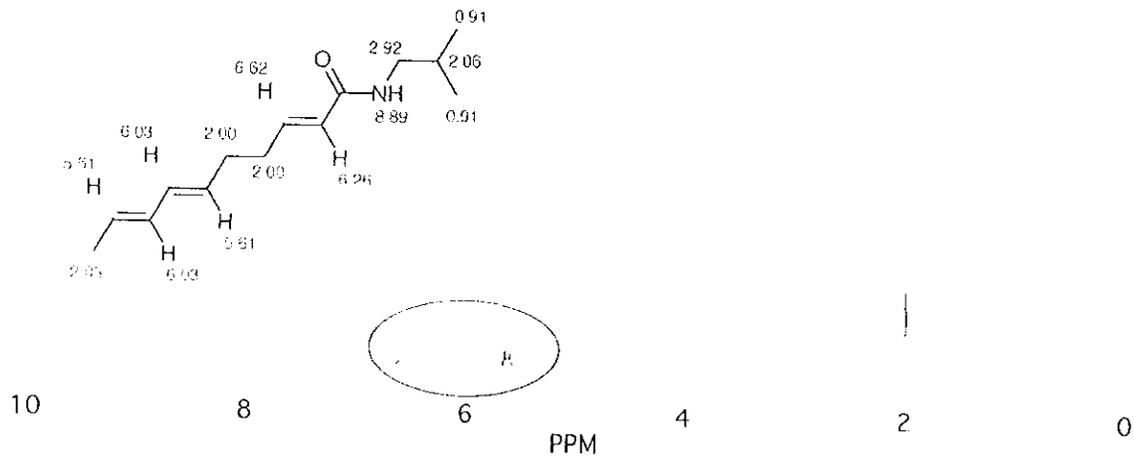
**Figura 11.-** Comparación de la afinina (línea negra) y afinina *todo-trans* (línea rosa) mediante un estudio de infrarrojo. Se observan pequeñas diferencias en sus picos de transmitancia lo que nos sugiere que se trata de una forma isomérica de la misma molécula.

**Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear:** Este resultado nos mostró la configuración definitiva del isómero aislado, en un principio se realizó una comparación de los espectros de resonancia mediante el programa ChemDraw (Figura 12) así como sus tablas de valores, para verificar la zona donde se observaría la diferencia de la frecuencia de resonancia. La muestra enviada para su caracterización por espectroscopia de resonancia magnética se presenta en la Figura 13 nos confirmó que el isómero aislado se trataba de afinina todo-*trans* ya que además que el espectro resultó muy parecido al propuesto por el programa ChemDraw, los valores de tablas correspondientes a la configuración *trans* coincide.

A)



B)



**Figura 12.-** Aquí se presentan la diferencia en el estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que se espera encontrar. La diferencia en frecuencia de resonancia se encuentra en los 6 ppm encerrado en un óvalo. Y nos ubica en el área de isomería de la molécula. **A)** RMN esperado para Afinina **B)** RMN esperado para afinina *todo-trans*.

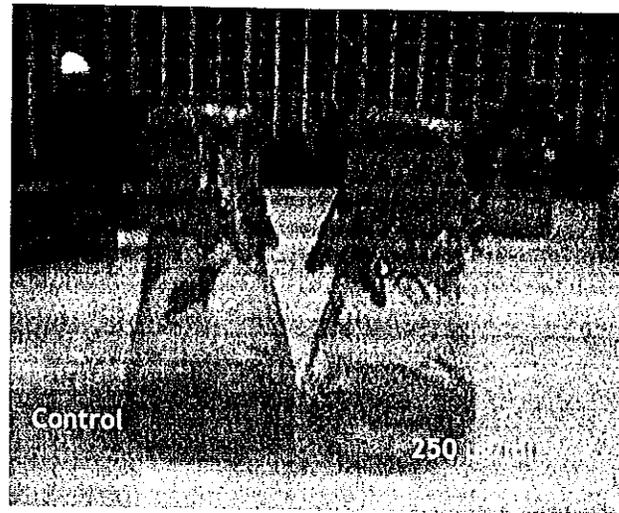


## Ensayos de actividad Biológica

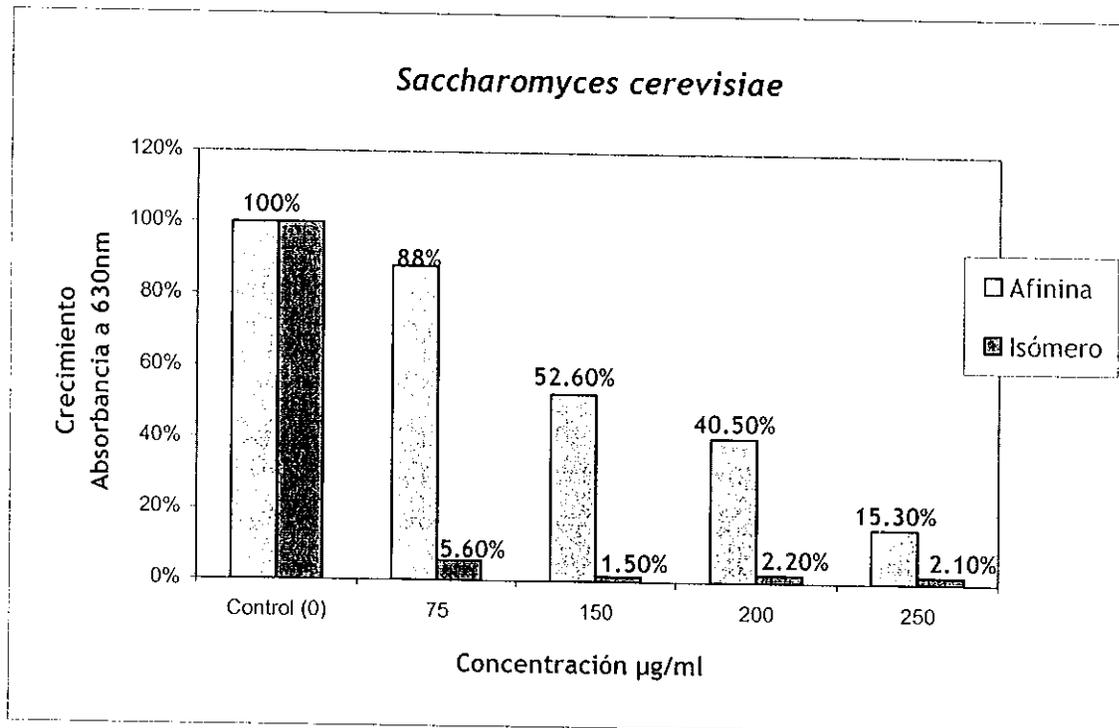
En los resultados de los bioensayos se utilizó el medio PDB solo como blanco y los controles como 100% de crecimiento. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 14) se aprecia que la afinina a partir de una dosis de 150 µg/ml tiene una actividad inhibidora de crecimiento máxima de 50% en comparación con la afinina *todo-trans* que a partir de 75 µg/ml tiene una inhibición aproximada del 94%. En el caso de *Bacillus subtilis* se repite esta tendencia: el isómero a partir de la dosis de 75 µg/ml presenta un 98% de inhibición en comparación con la afinina que en concentraciones de 250 µg/ml consigue un máximo de 59% de inhibición (Figura 15) en el caso de *Pseudomonas syringae* también ocurre lo mismo: en las dosis más altas (150 µg/ml) la afinina consiguió inhibir en un 19% aproximadamente, mientras que la afinina *todo-trans* en un 91% (Figura 16).

Además se observó en los ensayos de *Saccharomyces cerevisiae* con la afinina isomerizada que a partir de la dosis de 200 µg/ml al reinocular el medio con el tratamiento y dejarlo bajo las mismas condiciones por más de 72 horas, este no creció. Lo mismo ocurrió con *Bacillus subtilis* (también tratado con afinina *todo-trans*) con las dosis 150 µg/ml en adelante; por lo que en ambos casos se presentó algo que con la afinina no está reportado que sucede: además de inhibir el crecimiento el isómero afinina *todo-trans* impide que se reestablezca, lo cual marca una diferencia importante en la actividad microbiológica.

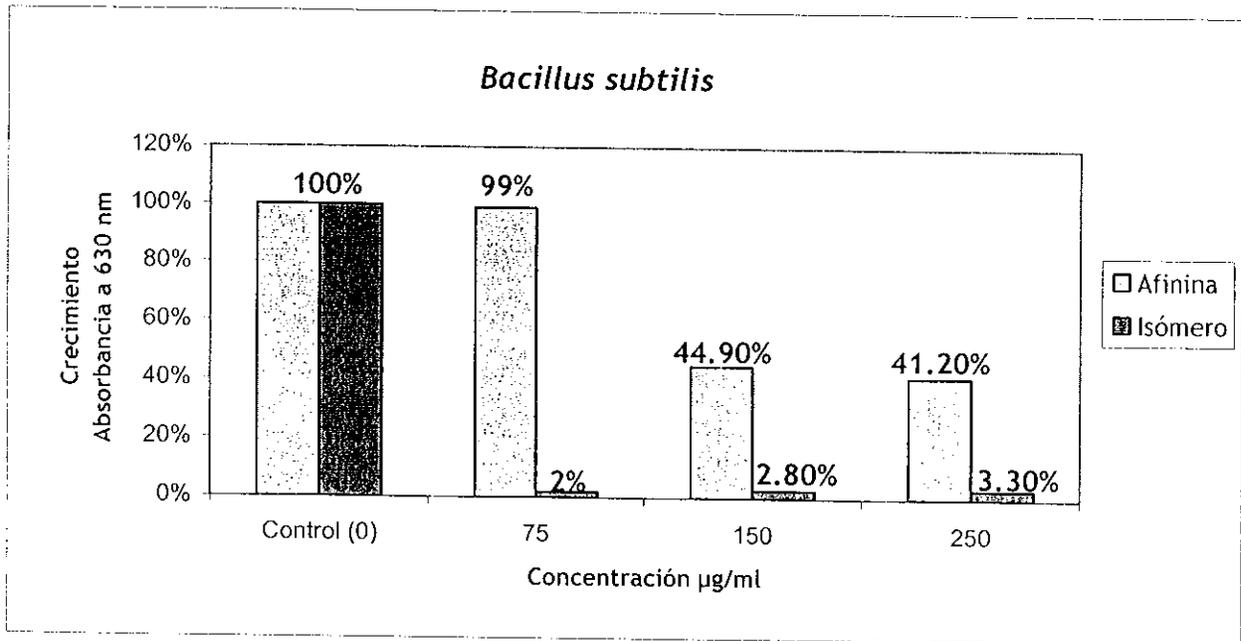
A)



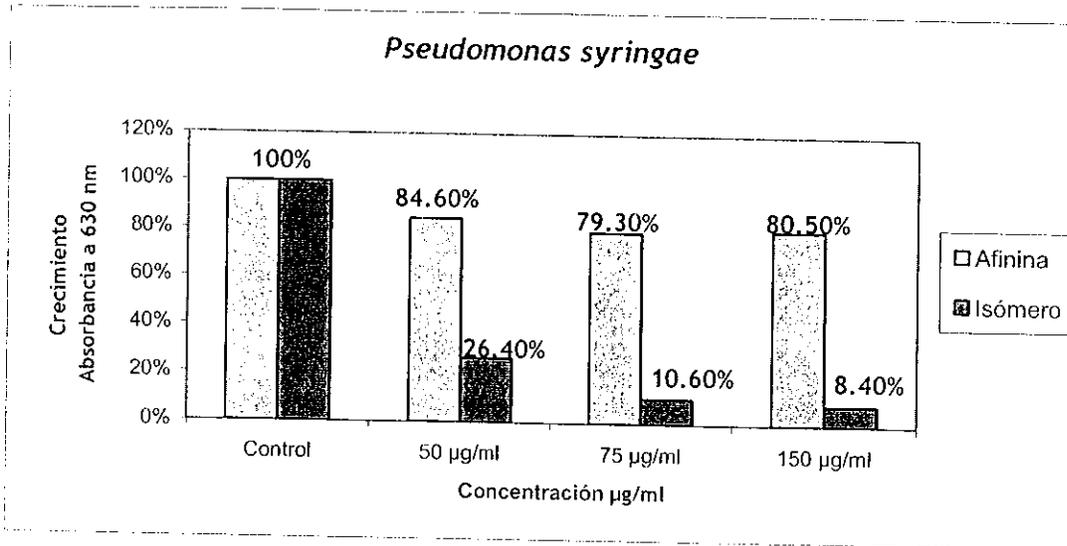
B)



**Figura 14.-** A) Fotografía de los matraces conteniendo el control y la concentración 250 µg/ml de afinina todo-*trans*. A simple vista se detecta la diferencia en densidad óptica. B) En esta gráfica pueden apreciarse los resultados obtenidos en el bioensayo con *Saccharomyces cerevisiae* utilizando distintas concentraciones de afinina y *trans*-afinina para evaluar su actividad como inhibidor de crecimiento. Se observa una diferencia importante entre el porcentaje de crecimiento de las cepas que tuvieron como tratamiento afinina y las que tuvieron su isómero.



**Figura 15.-**En esta gráfica se aprecian los resultados obtenidos con las cepas de *Bacillus subtilis*. En este bioensayo también se observó una marcada diferencia entre las dos moléculas. Comparativamente el isómero resultó tener una mayor capacidad en la inhibición de crecimiento.



**Figura 16.-** En este gráfico se muestran comparativamente los resultados obtenidos en el porcentaje de crecimiento de *Pseudomonas syringae*. De nuevo el isómero *trans*-afinina mostró tener una mayor capacidad de inhibición de crecimiento.

## VIII. DISCUSIÓN

La afinina es una molécula con múltiples propiedades y la relación de esas propiedades con su configuración química además de importante es muy útil y tiene muchas posibles aplicaciones biotecnológicas. Al evaluar la mayoría de la actividad biológica en diferentes modelos reportadas para afinina no se ha tomado en cuenta la influencia que puedan tener las formas isoméricas de la misma, debido a que no se ha puesto atención a su presencia y frecuentemente los equipos no las detectan por su alta similitud estructural.

Molina-Torres (1999) propone que las alcamidas insaturadas naturales pueden tener más de un mecanismo de interacción con respecto a distintos tipos de microorganismos y organismos superiores. En este caso, el experimento previo demostró que la configuración *cis-trans* de la afinina juega un papel fundamental en la propiedad inhibitoria de crecimiento en microorganismos. También nos sugiere que la configuración de la afinina *todo-trans* no solo inhibe el crecimiento, sino a diferencia de la afinina, esta inhibición es permanente aún a tiempos prolongados después del ensayo, lo que podría significar que su actividad antimicrobiana es más alta.

Hasta ahora, el mecanismo de acción a nivel celular de la afinina es desconocido; sin embargo, al observar diferencias entre la funcionalidad de la molécula y su estructura podemos tener pistas de cómo funciona ésta. Habiendo comprobado por medio de éste trabajo que si existe diferencia estructura-función en una propiedad tan importante de la afinina como es la inhibición de crecimiento se justifica que es necesario comparar la actividad de otros isómeros con distinta configuración en este mismo experimento para

poder hacer más inferencias sobre cuál es la función de el juego *cis-trans* en la actividad inhibitoria de crecimiento y biocida de la afinina comparar la actividad de este isómero con la afinina en otros modelos biológicos en los que la afinina ha demostrado poseer propiedades útiles al ser humano.

Con respecto al procedimiento de isomerización se puede mencionar que en forma natural -Extracto 1- la afinina constituye un 97% de los isómeros totales posibles, mientras en la muestra isomerizada por temperatura y 10% de agua constituye un 72%. Lo cual nos indica que la configuración **E,Z,E** de la afinina de forma natural es la más estable, proporción que se modifica al exponer al extracto reacciones de alta energía ya sea alta temperatura o radiación ultravioleta.

Jacobson en 1954 reportó que la irradiación producía, por este método 50% de afinina todo-*trans*, cuando nosotros observamos en la isomerización por temperatura un 20% de este isómero. En la muestra isomerizada por radiación obtuvimos un equilibrio con 69% de afinina todo-*trans*. En forma natural, en el Extracto 1 este isómero constituye solamente el 1%. No se puede realizar una relación cuantitativa del posible acomodo de los isómeros en los cromatogramas de gases ya que la separación en los extractos difiere de muestra a muestra; sin embargo, las observaciones cualitativas son muy valiosas y el isómero afinina todo-*trans* sigue inmediatamente en elusión a la molécula de afinina.

## IX. CONCLUSIONES

- En forma natural el isómero todo-*trans* afinina constituye una parte minoritaria de las alcanidas en raíces de *Heliopsis longipes* (Gray) Blake.
- Es posible isomerizar la afinina a afinina todo-*trans* mediante la exposición a la luz ultravioleta por 3 horas.
- La reacción de isomerización se estabiliza, por lo tanto, el resultado final contiene otras moléculas presentes además del isómero.
- Para obtener el isómero afinina todo-*trans* puro después del procedimiento es necesario separarla de otras moléculas.
- La forma con la que se obtienen mejores resultados para separar la afinina todo-*trans* de otras moléculas es utilizando placas para TLC activadas con AgNO<sub>3</sub>, al realizar este procedimiento en el cuarto de 4°C la calidad del recorrido de la placa mejora considerablemente.
- La configuración todo-*trans* de la afinina es más efectiva que la afinina para evitar el crecimiento de microorganismos, lo que nos indica que la configuración *cis-trans* juega un papel fundamental en su actividad inhibitoria.
- Existe diferencia en las proporciones de afinina y afinina todo-*trans* dentro del extracto natural, el extracto isomerizado a alta temperatura y el extracto isomerizado con luz ultravioleta.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Acree F, Jacobson M, Haller HL (1945) The structure of affinin, the insecticidal amide from *Erigeron affinis* D.C. Journal of Organic Chemistry 10: 449-451.

Atlas, RM (1998) Microbiology: Fundamentals and Applications. Macmillan Publishing Company. EUA. pp 72, 413-415.

Bernabé (2004) Novel roles of the master transcription factor SPO0A and SIGMA B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. Journal of Bacteriology, 186: (4) 989 -1000.

Correa J, Roquet S y E Díaz. (1971) Multiple NMR analysis of the affinin. Organic Magnetic Resonance.Vol.3 pp. 1 to 5.

Crombie, L Krasinski AHA y Manzoor-i-Khuda. (1960) Amides of Vegetable origin. Part X. The Stereochemistry and Synthesis of Affinin. Austral. J. Chem. 1960,13,347.

Crombie L y Krasinski AHA (1962). Synthesis of *N*-isobutyldeca-*trans*-2,*cis*-6,*trans*-8- and *trans*-2,*cis*-6,*cis*-8-trienamide. Chemistry and Industry. June 2: 983-984.

Christensen LP (1992) Acetylenes and related compounds in Anthemideae. Phytochemistry 31: 7-49.

Elliot M, Farnham AW, Janes NF, Johnson DM, Pulman DA, Sawicki RM (1986) Insecticidal amides with selective potency against a resistant (Super-krd)

# BIBLIOTECA CUCBA

strain of houseflies (*Musca domestica* L.). Agricultural and Biological Chemistry 50: 1347-1349.

Fisher TR (1957). Taxonomy of the genus *Heliopsis* (Compositae). Ohio Journal of Science 57: 171-191.

Gamboa-Leon R y Chilton W (2000). Isobutylamide numbing agents of toothache grass, *Ctenium aromaticum*. Biochemical Systematics and Ecology 28: 1019-1021.

García-Chávez A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J (2004) El Género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. Acta Botánica Mexicana. 69:115– 131.

Garrido G, Márquez L, Martínez I, Hernández I, Delporte C, Diéguez R, Prieto-González S, Molina J, y Delgado, R. (2002). Evaluación in vitro e in vivo del efecto anti-inflamatorio del extracto etanólico de la raíz de *Heliopsis longipes*. Revista Cubana de Farmacia 36, 137-139.

González A y Valenzuela L, (2000). *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios en Línea. Cap 16. Ed Martínez Romero E y Martínez Romero JC. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno UNAM. Publicación digital disponible en: <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>

Gregèr H (1984). Alkamides: Structural Relationships, Distribution and Biological Activity. Planta Medica 50: 366-375.

Jacobson M, Acree F y Haller HL (1947). Correction of the source of "Affinin" (*N*-isobutyl-2,6,8-decatrienoamide). United States Department of

Agriculture, Agricultural Research Administration: Bureau of Entomology and Plant Quarantine. pp. 731-732.

Jacobson M (1954). Constituents of *Heliopsis* species. III. *cis-trans* isomerism in affinin. *Journal of the American Chemical Society* 76: 4606-4608.

Laurerio-Rosario S, da Silva AJR, Paz-Parente J (1996) Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Medica* 62: 376-377.

Little EL (1948). *Heliopsis longipes*, a Mexican insecticidal plant species. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 38: 269-274.

Martínez M (1933) *Las Plantas Medicinales de México*, Ed Sexta edición (reimpresión) 1994. Editorial Botas, México, D. F.

The Merck Index(1996): An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Ed Twelfth Edition. Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc.

Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E (1999) Antimicrobial properties of natural alkamides traditionally used in Mesoamerica: Affinin and Capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 241-248.

Molina-Torres J, García-Chávez A (2001) Alcamidas en plantas: Distribución e importancia. *Avance y Perspectiva* 20: 377-387.

Muhammad I, Zhao J, Dunbar DC y Khana IA (2002). Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochemistry* 59, 105–110.

Orchin M, Kaplan F, Macomber R, Wilson RM y Zimmer H (1980). *The Vocabulary of Organic Chemistry*. Willey Interscience.

Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, y Bool PM (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.

Ramírez-Chávez E, Lucas-Valdez L, Virgen-Calleros G, Molina-Torres J (2000) Actividad fungicida de afinina y extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*. *AgroCiencia* 34: 207-217.

Romero CM, Del-Castillo AR, Martínez AC y Calderon CJ (1989). Preliminary studies on the antibacterial, insecticidal and toxicological effects of the Chilcuan root *Heliopsis longipes*. *Veterinaria* 20, 151-156.

Rzedowski J, (1991) Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21.

Sarmiento-Silva TM, Braz-Filho R, de-Carvalho MG, y Agra MF (2002). Flavonoids and an alkamide from *Solanum paludosum* Moric. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 479-481.

Sittie AA, Lemmich E, Olsen CE, Hviid L y Broegger CS (1998). Alkamides from *Phyllanthus fraternus*. *Planta Medica* 64: 192-193.

Tofern B, Mann P, Kaloga M, Jenett-Siems K, Witte L, y Eich E (1999). Aliphatic pyrrolidine amides from two tropical convolvulaceous species. *Phytochemistry* 52: 1437-1441.

Yasuda I, Takeda K, y Itokawa H. (1981). Structures of amides from *Asiasarum heterotropoides* Maek. var *mandshuricum* Maek. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokio)* 29: 564-566.