

## Estudio Fitoquímico y evaluación insecticida del extracto orgánico de las hojas de *A. ochroleuca* S.

Xochitl Netzai Alba Mares,<sup>1</sup> Luis Francisco Flores León,<sup>1</sup> Alan Francisco Mugica Jiménez,<sup>1</sup> David Cruz Cruz,<sup>1\*</sup> Clarisa Villegas Gómez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N Guanajuato Gto. 36050, México  
david.cruz@ugto.mx<sup>1</sup>; clarisa.villegas@ugto.mx<sup>1</sup>

### Resumen

Siglos atrás y por muchos años, dentro de la Medicina Tradicional Mexicana se han empleado a diferentes generos de plantas medicinales para la cura o el tratamiento de diversas enfermedades, como ejemplo a estas especies, encontramos a *Argemone ochroleuca* (Papaveraceae), comúnmente conocida como “chicalote” la cual se utiliza para el tratamiento en enfermedades respiratorias como la tos, bronquitis y asma, también en problemas oculares, como es la remoción de cataratas o alergias (conjuntivitis), finalmente por sus efectos sedantes se utiliza como anticonvulsivo y tranquilizante.

En particular, reportes en la literatura sobre otras especies de este genero, en específico de *Argemone* mexicana, han revelado la presencia de alcaloides del tipo bencilisoquinolínicos tales como, sanguinarina, queleritrina, protopina, berberina, dihidrosanguinarina, alocriptopina, entre otros, así como actividades biológicas de interés, motivo por el cual, en el presente proyecto se realiza el estudio fitoquímico de extractos orgánicos de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* Sweet.

**Palabras clave:** *Argemone ochroleuca* Sweet, chicalote, alcaloides bencilisoquinolínicos, Medicina Tradicional Mexicana, Plantas Medicinales.

### Introducción

La familia Papaveraceae se compone de géneros con características muy particulares, entre ellos la síntesis de alcaloides de importancia biológica. Varias plantas que conforman a esta familia se han ganado un lugar en la Medicina Tradicional Mexicana, tal es el caso del género *Argemone*, el cual contiene aproximadamente 35 especies con una amplia difusión en el continente americano. Este género comprende plantas herbáceas, anuales o bienales perennes, poco vivaces, erectas, ramosas y de hojas basales en forma de roseta, dentadas y sumamente espinosas, poseen un látex lechoso de color blanquecino a amarillento claro.<sup>1</sup>

Poco más de 20 especies de este género se encuentran en regiones templadas, algunas de ellas son exclusivamente del continente americano, pero algunas especies se han distribuido en otras regiones debido a su interés medicinal, tal es el caso de *Argemone mexicana* (chicalote, amapolilla, amapola montés e incluso cardo santo) la cual ha sido introducida a otras partes del mundo como Asia, África y Oceanía.<sup>1</sup>

Las plantas *Argemone spp.*, son plantas de ambientes abiertos y cálidos, se presentan como malezas, pues su habitat preferencial son en parcelas, terrenos perturbados comunmente conocidos como terrenos baldíos, y pueden ser fácilmente identificacos en los bordes de los caminos u orillas de carretera. Dentro de la Medicina Tradicional Mexicana, se le atribuyen propiedades curativas a cada una de las partes aéreas de la especie, por ejemplo; a) Hojas: la decocción de hojas se utiliza en el tratamiento de la fiebre palúdica y en dolores musculares y de estómago, del mismo modo hojas y semillas se utilizan para regular los niveles de colesterol en sangre. Cataplasmas de hojas es útil para la cura de heridas, úlceras, verrugas y otras afecciones cutáneas como sarna y dermatosis. b) Raíz: se utiliza para el tratamiento de enfermedades cutáneas crónicas, tiene propiedades antihelmínticas y también se usa como agente antibacetrrial, cicatrizante, antioxidante y antifúngico. Las raíces en forma de infusión se utilizan para el tratamiento de la tos, la maceración de las mismas se emplea para tratar infecciones vaginales y también problemas hepatobiliares. c) Semillas: el aceite de las semillas es purgante y laxante. d) Latex: se utiliza para tratar probelmas asamáticos, tos y bronquitis. Es importante mencionar el uso que se le dá a esta sustancia lechosa en el tratamiento de problemas oculares, pues habitantes de ciertas comunidades aplican el látex directamente

en el ojo, dando un pequeño masaje para aliviar infecciones en el ojo, alergias, y remoción de cataratas. e) Flores: son expectorantes y como auxiliar para disminuir la tos.<sup>2,3</sup>

Reportes realizados por diversos grupos de investigación, han demostrado que especies de *Argemone* han sido estudiadas previamente, tal es el caso del estudio fitoquímico de las hojas y tallos de *Argemone mexicana* Linn (Figura 1) comúnmente conocida como “cardo santo” donde se señala la presencia de diversos metabolitos secundarios entre los que se encuentran, alcaloides bencilisoquinolínicos del tipo de la pavinina tales como, protopina, criptocavina, berberina y sanguinarina, del mismo modo de las flores y semillas se detectaron algunos flavonoides como quercetina, luteolina e isoramnetina (Figura 2).<sup>4</sup> Estudios de actividad biológica con respecto a los extractos etanólicos de esta especie demostraron que poseen una interesante actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. diptheriae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *S. paratyphi*.<sup>5</sup>



Figura 1. *Argemone mexicana* L. (Foto de Naturalista.mx)

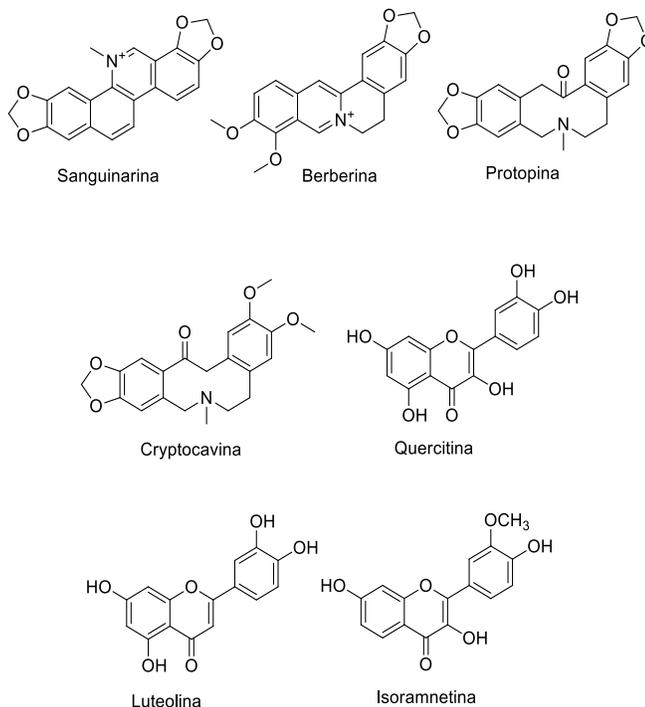


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Argemone mexicana* L.

Con respecto a otras especies de *Argemone*, una planta de interés debido a su química y farmacología es *Argemone platyceras*, conocida comúnmente como “chicalote de montaña” donde infusiones de esta especie de utiliza para el tratamiento de afecciones respiratorias, estudios fitoquímicos demuestran la presencia de alcaloides como, norargemonina, argemonina, entre otros (figura 3).<sup>6</sup> Del mismo modo, otra especie conocida

como “cardo santo amarillo” (*Argemone subfusiformis*) en la Medicina Tradicional sus hojas se utilizan como emplastos para tratar heridas cutáneas, siendo esto demostrado por estudios realizados por Afolayan y colaboradores, donde los extractos de las partes aéreas de esta especie son activas contra *S. aureus*, *S. epidermis*, *M. kristinae* y *E. coli*.<sup>7</sup>

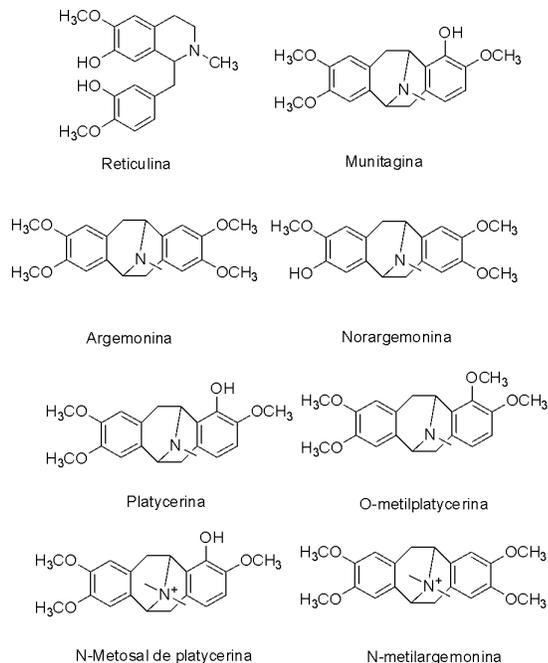


Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de *Argemone platyceras*.

### *Argemone ochroleuca* Sweet

*Argemone ochroleuca* Sweet, popularmente conocida como “chicalote, cardo o espinocilla” es una planta perenne que mide hasta 1.2 m de altura, con tallos azulado-blanquecino y espinosos, los cuales al momento de cortarlos desprenden un látex lechoso, es originaria de México y Australia, su hábitat es de clima cálido a semicaldo, semiseco y templado, principalmente crece en cultivos abandonados y/o terrenos perturbados (Figura 4).<sup>8</sup>

Esta especie cuenta con una gran trayectoria dentro de la Medicina Tradicional Mexicana, pues en el Códice Florentino se menciona que es útil para aliviar el dolor de ojos al aplicar unas gotas del látex directamente. Por otro lado, el Instituto Médico Nacional señaló su importancia como antiescabiático, cicatrizante y contra la dermatosis. Posteriormente se reportaron sus usos como anticonvulsivo, antidiarréico, antiespasmódico, antitúsgeno, hipnótico y narcótico.<sup>9</sup> Los Otomíes lo utilizan para curar el “mal de ojo” al cual denominan “yiato” la cual es una afección que se manifiesta por tener los ojos irritados.



Figura 4. *Argemone ochroleuca* Sweet. (Foto de Naturalista.mx)

Es importante señalar que los estudios tanto fitoquímicos como biológicos de esta especie han sido muy limitados, las únicas investigaciones que se han realizado han sido reportados por Alamri y colaboradores en 2010 donde investigaron la actividad antibacteriana in vitro del látex contra diversas bacterias patógenas humanas *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *M. luteus*, *E. coli* y *S. Aureus*.<sup>2, 10</sup>

Por otro lado, en 2011, se evaluó la actividad antibacteriana frente a trece cepas bacterianas y nueve cepas fúngicas de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las partes aéreas de *A. ochroleuca*, solo el extracto metanólico presentó actividad antibacteriana, la bacteria *Staphylococcus aureus* (MIC= 125 µg/mL) y el hongo *Cryptococcus neoformans* (MIC= 500 µg/mL) fueron las cepas que presentaron mayor sensibilidad, estos resultados los llevó a purificar este extracto identificando al alcaloide isoquinolinico berberina (Figura 2).<sup>2, 11</sup>

En 2013, Alrumman y su grupo de investigación estudiaron las actividades antifúngicas in vitro del látex crudo de *A. ochroleuca* contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* y de otros hongos patógenos de plantas (*Alternaria alternate*, *Drechslera halodes*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophonia phaseolina*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*). Los hallazgos en estos estudios indicaron que esta especie es una buena fuente de antifúngicos principalmente contra *Drechslera halodes* y *Candida spp.*<sup>2, 12</sup>

En México, es importante destacar que solo existe el estudio realizado por Andrés Navarrete y colaboradores, donde, reportan el aislamiento de la berberina (Figura 2) a partir del extracto diclorometánico de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* Sweet (hojas, tallos y flores juntas a excepción de las semillas). El compuesto aislado fue evaluado en su actividad biológica encontrando un excelente efecto como relajante muscular con una  $EC_{50} = 118.50 \pm 3.91 \mu M$ .<sup>13</sup>

Finalmente, debido a los pocos estudios realizados en esta especie, a la gran importancia y a los usos dentro de la Medicina Tradicional Mexicana, el presente grupo de investigación se enfoca en la búsqueda de alcaloides bencilisoquinolinicos a partir de los extractos de las partes aéreas de *Argemone ochroleuca* S, así como la elucidación y su actividad biológica. Del mismo modo, se enfoca en la transformación semisintética de los compuestos sintetizados por dicha especie. Siendo este proyecto un referente para la comunidad científica.

## Metodología

*Argemone ochroleuca* S. fue recolectado en el municipio del "Establo" Puentecillas en Guanajuato, Gto, el 1 de marzo de 2019. La planta fue identificada por la Bióloga y curadora del museo Alfredo Dugés. El procedimiento de extracción se llevó a cabo acorde a las técnicas utilizadas y ya reportadas por nuestro grupo de investigación. Derivado de este trabajo, se trabajaron las hojas, tallos y semillas por separado, dando como resultado la obtención de 7 extractos orgánicos a diferentes polaridades, de los cuales en el presente proyecto de Verano de la Ciencia se trabajó solamente uno, siendo el extracto diclorometánico de tallos.

En el presente proyecto, se desarrollaron y aprendieron técnicas muy específicas para el óptimo desarrollo de la Química de Productos Naturales, debido a esto, el presente artículo describirá las técnicas a seguir para un estudio fitoquímico correcto.

## Metodología a seguir para la separación de Metabolitos Secundarios.

Se efectuaron técnicas muy útiles para trabajar en el laboratorio: preparación del punto de aplicación, empaquetamiento de una columna para cromatografía, elección del adsorbente y de la fase móvil adecuada, y por último una metodología muy indispensable como la cromatografía en placa fina, la cual nos ayuda a conocer la cantidad de compuestos que presenta nuestra muestra y elegir el tamaño adecuado de nuestra columna.

### a) Preparación del punto de aplicación:

1. El extracto diclorometánico se tenía en refrigeración para tener un mejor estado de conservación. Se descongeló, se pesó y se guardaron aproximadamente 2 g de dicho extracto para referencia y estudios biológicos posteriores.
2. En un mortero se colocó el extracto disuelto en un solvente orgánico y se adicionó  $\text{SiO}_2$ . Comenzamos a homogenizar la mezcla, todo este procedimiento se realizó en la campana de extracción para una mejor y rapidez y eficiencia en la evaporación del solvente.
3. Se agitó lentamente y envolviendo toda la mezcla, se observó que pasa primero de un estado "chiclosa" a un polvo fino. Es un proceso tardado y se debe ser paciente. (Figura 5)

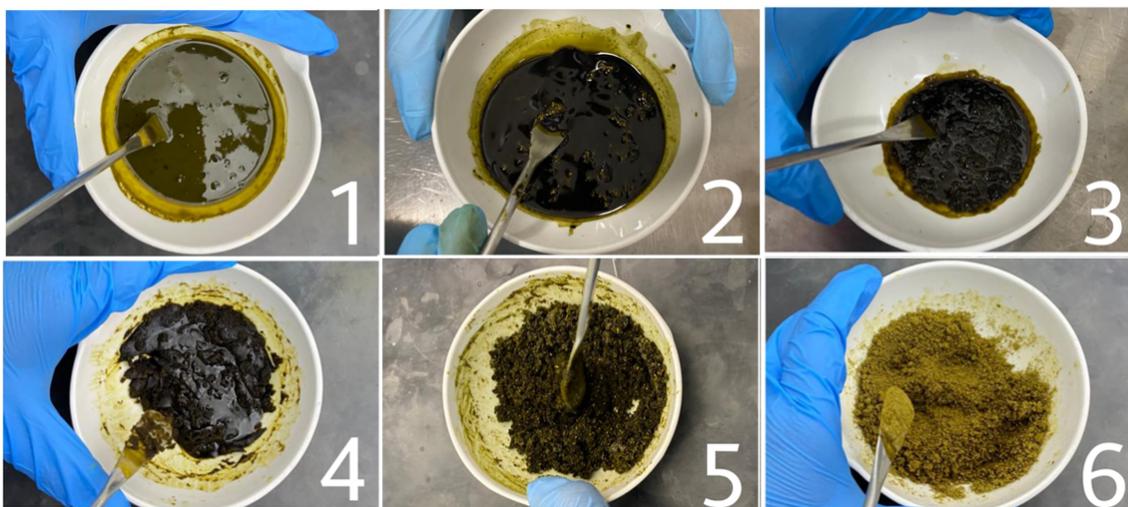


Figura 5. Proceso de elaboración de una pastilla, se observa un líquido (fotografía 1) y posteriormente como cambia hasta obtener un polvo fino (fotografía 6).

### b) Preparación de columna cromatográfica:

1. Antes de iniciar el proceso, es importante verificar que la columna cromatográfica de elección sea la adecuada para separar correctamente los componentes de interés. El tamaño de la columna debe ser directamente proporcional a la cantidad de punto de aplicación.
2. Se montó la columna de vidrio con ayuda de unas pinzas metálicas ajustadas a un soporte universal, se adaptó la columna en posición vertical todo el tiempo y la altura a la que se encuentra debe ser adecuada para colocar un matraz Erlenmeyer o un tubo de ensayo debajo de ella.
3. Se cerró la llave de paso en la parte inferior de la columna y con ayuda de un embudo se vertió con cuidado la fase estacionaria, para este caso, se empleó gel de sílice como fase estacionaria.
4. Suavemente se añadió una solución de hexano:acetato de etilo como fase móvil, se abrió la llave para que el eluyente transcurriera por la columna y de ese modo se completó un empaquetamiento uniforme.

5. Es importante que la fase estacionaria que se va empaquetando no se seque ya que podrían formarse canales o burbujas de aire, provocando una deficiente separación de los compuestos.
6. Lentamente se depositó el punto de aplicación en la parte superior de la fase estacionaria, distribuyéndolo de manera uniforme para que quedara adherido a las paredes de la columna, se colocó encima una porción de 1 cm de algodón y con ayuda de una pipeta se agregó parte de la solución con la que se va a eluir la columna (Figura 6).
7. Se dejó eluir la columna de manera continua, recolectando fracciones de 50 mL aproximadamente monitoreando cada fracción mediante cromatografía en capa fina. Cabe señalar que en cada fracción se encuentran los metabolitos secundarios de interés (Figura 7).



Figura 6. Empaquetamiento de columna cromatográfica



Figura 7. Elución de la columna cromatográfica

c) Preparación y metodología de la cromatografía en placa fina:

1. Se utilizaron placas comerciales de gel de sílice con revelador UV y base de aluminio.
2. Se confirmó que las placas estuvieran limpias, de no ser así se limpiaron cuidadosamente con algún solvente para eliminar residuos.
3. La muestra a analizar se aplicó a la lámina a no menos de 1 cm del borde inferior de una tira rectangular, y a no menos de 1 cm de los bordes laterales. Se tocó la lámina con la punta de la pipeta cargada con muestra, evaporando el solvente entre cada toque, a fin de concentrar el punto de siembra y tratando de que la mancha producida no supere un diámetro de 3 mm.
4. Se procedió a su desarrollo o corrida de las placas, utilizando una cámara cromatográfica de vidrio (consisten en recipientes rectangulares de vidrio con tapa hermética, con lo cual se evita la evaporación de la fase móvil) con un solvente. Se colocó dicho solvente en el fondo de la cámara tratando que el volumen no toque los puntos de aplicación. La placa se colocó de forma vertical, esperando a que el solvente subiera por capilaridad hasta llegar 3 mm antes del borde superior de la placa.
5. Posterior a esto, se retiró la placa de la cámara y esperando a que el solvente se evaporara.
6. Finalmente, se llevaron las placas bajo una lámpara UV de onda corta (240-260 nm) y de onda larga (360 nm) para su análisis e interpretación (Figura 7).

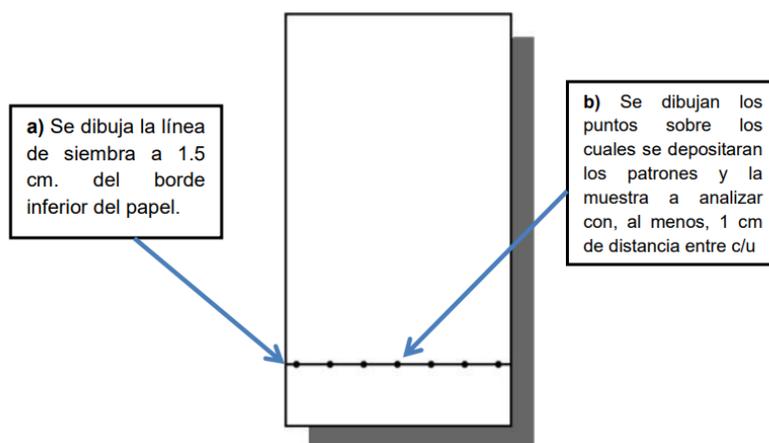
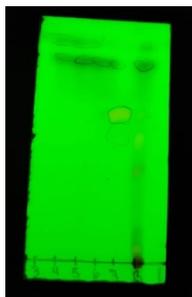


Figura 7. Metodología general para la cromatografía en placa fina.

**d) Agrupación, elección y evaporación de fracciones:**

1. Una vez que se llevó a cabo la elución de la columna de manera eficiente, las fracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía en placa fina, esto nos ayudó a determinar que fracciones eran similares con respecto a los MS.



2. Con base en lo anterior, se decidió el número de fracciones a juntar y se procedió a evaporar, donde las fracciones se colocaron en un matraz de fondo redondo, llenándolo como máximo hasta la mitad de su capacidad.
3. Se evapora el solvente a presión reducida por medio de un rotavapor (Figura 8).
4. Una vez que el solvente se evaporó a su totalidad, se retira la muestra, se pesa y se guarda protegido de la luz y el calor.



Figura 8. Evaporación de las fracciones mediante el uso de un rotavapor.

## Resultados

### Primera columna

Se recolectaron 187 fracciones, una gran parte de estas, fueron eluidas de la columna con una mezcla de disolventes 8:2 hexano/acetato de etilo, por lo cual los componentes aislados en las primeras fracciones tenían características de menor polaridad. Posteriormente, se cambió la naturaleza de la fase móvil a una solución 7:3 hexano/acetato de etilo y se continuó recuperando otra gran cantidad de muestras, la composición de la fase móvil se modificó para arrastrar los compuestos más polares de la columna hasta llegar a una polaridad de eluyente 1:1 hexano/acetato de etilo y recuperar la mayor cantidad de compuestos de la muestra.

Posteriormente se, realizó una TLC y con los resultados de las placas se determinó debido a la similitud de los compuestos presentes, se debían dividir finalmente en once fracciones (Figura 9).

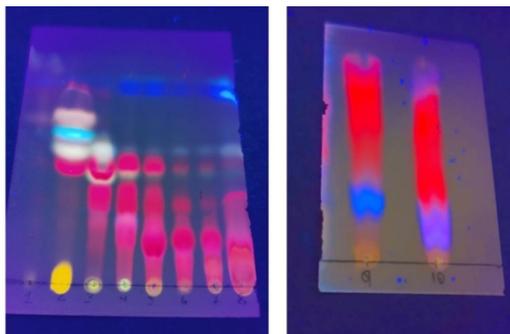


Figura 9. Revelado de la placa con luz UV (onda corta) de las once fracciones finales de la primera columna.

Al observar la placa y analizar la fracción 1, concluimos que la presencia de ciertos compuestos es mínima, una vez pasado el tiempo de reposo la muestra comenzó a cristalizar, se realizó una recrystalización dando un aceite y un sólido blanco, finalmente del aceite se obtuvo su espectro de resonancia magnética nuclear. Las fracciones 5, 6 y 7 mostraron similitudes y se decidió juntar para posteriormente realizar otra columna. Las fracciones 9, 10 y 11 revelaron semejanzas, por ello se agruparon. De la segunda columna (Sistema 7:3 hexano/acetato de etilo) se recolectaron 6 fracciones, las cuales de igual manera se llevaron al rotavapor y se dejaron reposar un día para eliminar el solvente. Después, se le realizó cromatografía en placa fina. A la fracción 2 se sometió a resonancia magnética nuclear de hidrógeno y con la fracción 3 se realizó una tercera columna. De la tercera columna (Sistema 7:3 hexano/acetato), se recolectaron 2 fracciones, donde la segunda se llevó a resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

### Segunda columna

Se agruparon las fracciones 5, 6 y 7 de la primera columna, se obtuvieron 61 muestras las cuales se aplicó TLC y al ver las placas con los compuestos similares se redujeron a 6 fracciones (Figura 10).



Figura 10. Placa de las seis fracciones finales que se obtuvieron en la segunda columna.

Al prestar atención a la placa y observar la fracción 4 (D), determinamos que posiblemente solo se tiene la presencia de un compuesto. En conclusión, se decidió mandar la muestra a realizarle un espectro de resonancia magnética nuclear.

### Tercera columna

Se analizó la fracción 3 de la segunda columna, decidimos que era factible hacer una tercera columna, ya que se observan dos compuestos los cuales se podrían separar satisfactoriamente mediante cromatografía. De esta, se recolectaron 12 muestras las cuales se redujeron 2 fracciones finalmente (Figura 11).



Figura 11. Revelado de la placa con luz UV (onda corta) de las dos fracciones finales que se obtuvieron en la tercera columna.

En la figura 12 se logra apreciar el procedimiento que se llevó a cabo en las columnas cromatográficas para la separación de los metabolitos secundarios de interés.



Figura 12. Fotografías de las columnas 1, 2 y 3

Actualmente se está trabajando en la elucidación de los espectros de RMN que se realizaron, en la tabla 1 se muestra el registro de las fracciones y pesos obtenidos, resultado de la primera columna.

**Tabla 1.** Peso de las fracciones recolectadas

Fracción	Peso Columna 1
1	2.18 g
2	0.64 g
3	0.75 g
4	0.02 g
5	1.22 g
6	0.12 g
7	0.13 g
8	0.26 g
9	0.91 g
10	0.72 g
11	0.22 g

En el la figura 13 se observa de manera general el procedimiento y resultados obtenidos en la separación de los metabolitos secundarios del extracto diclorometanico de *A. Ochroleuca* S.

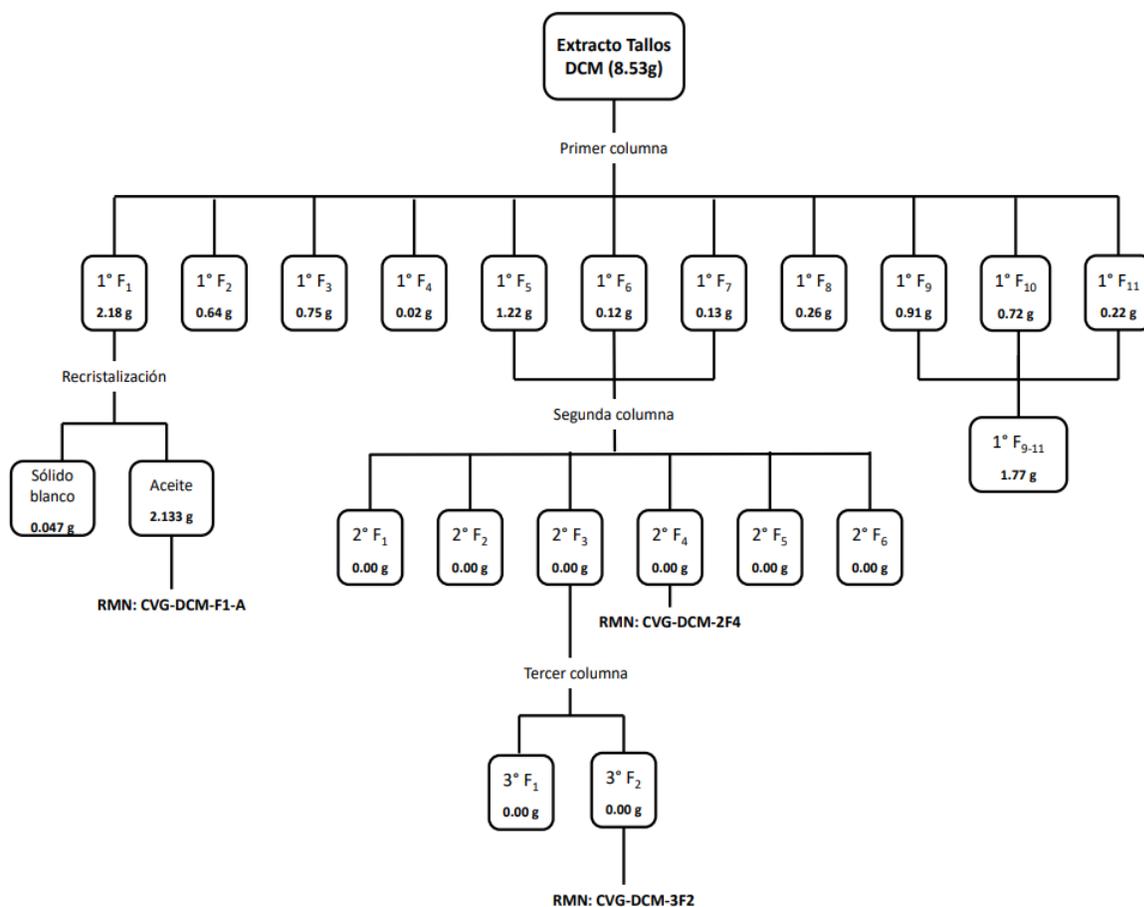


Figura 13. Esquema general del tratamiento realizado al extracto diclorometanico de *Argemone ochroleuca* Sweet.

## Pruebas de actividad insecticida

Todos los extractos orgánicos de *Argemone ochroleuca* fueron evaluados para medir su actividad insecticida. Se realizaron con plagas de importancia en nuestro país, debido a la fuerte pérdida de cultivos.

Todos los extractos evaluados mostraron importantes resultados, en el presente artículo los autores decidimos omitir esta información debido a que está en vías de publicación y se necesita proteger los datos y resultados experimentales.

En conclusión, en el presente trabajo se lograron completar de manera exitosa los objetivos propuestos, del mismo modo, se conocieron experimentalmente las bases, conceptos y técnicas principales en el laboratorio para la extracción de metabolitos secundarios.

Sin duda, todavía hay mucho trabajo por realizar, al cual se le seguirá dando seguimiento mediante proyectos de tesis, servicio social etc.

## Referencias

- Rzedowski, G. C. **1991**. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. Fascículo 1. Papaveraceae.
- Hernández Martínez, A. L.; Cervantes Jauregi, J. A.; Cruz Cruz, D.; Villegas Gómez, C. **2020**. "Chicalote" *Argemone ochroleuca* Sweet: La gran fábrica de alcaloides". *Naturaleza y Tecnología*, enero-junio 2020, 16-23.
- Argueta Villamar, A.; Cano-Asselein, L.; Rodante, M.E. **1994**. "Atlas de plantas de la Medicina Tradicional Mexicana". *Instituto Nacional Indigenista*. Vol. 3.
- Cahliková, L.; Kučera, R.; Hošťalková, A.; Klimeš, J.; Opletal, L. **2012**. Identificación of pavinane alkaloids in the genera *Argemone* and *eschscholzia* by GC-MS. *Natural Products Communications*, 7 10, 1781-1789.
- More, N. V.; Kharat, K. R.; Kharat, A.S. **2017**. "Berberine from *Argemone Mexicana* L. exhibits a broadspectrum antibacterial activity. *Acta Biochimica Polonica*, 64, 4, 653-660.
- Atta-ur-Rahman. **1994**. "Isoquinoline Alkaloids". Handbook of Natural Products Data, Vol. 3. Elsevier.
- Jimoh, F.; Addedapo, A.; Aliero, A.; Afolayan, A. **2010**. Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) and *Urtica urens* (Urticaceae). *Revista biológica tropical*, 58, 4, 1517-1531.
- CONABIO  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone-ochroleuca/fichas/ficha.htm>
- Sánchez Mendoza, . E. **2007**. Mecanismo de acción relajante de la berberina aislada de *Argemone ochroleuca* en traquea de cobayo. *Tesis Doctoral*. UNAM.
- Alamri, S. A.; Mahmoud, M. F. **2010**. Antibacterial activity of the latex of *Argemone ochroleuca* S. *Saudi Medical Journal*, 31, 11, 1207-1210.
- Reyes, F. D.; Canales, C. J.; Jiménez, M.; Meráz, M.; Hernández, T. **2011**. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* S. (chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 2, 139-146.
- Moustafa, M. F.; Alamri, S. A.; Taha, T. H.; Alrumman, S. A. **2013**, In vitro antifungal activity of *Argemone ochroleuca* S. latex against some pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 12, 10, 1132-1137.
- Sánchez Mendoza, M. E.; Castillo Henkel, C.; Navarrete, A. **2008**. Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of *Argemone ochroleuca* S. in guinea-pig-tracheal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 60, 2, 229-236.