

IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA RAÍZ DE WEREQUE, EXTRAÍBLES EN MEDIO ACUOSO, POR GC-MS

IDENTIFICATION OF THE MAIN WEREQUE'S ROOT COMPONENTS, EXTRACTIBLE IN AQUEOUS MEDIUM, BY GC-MS

Dulce M. Morales¹, Samuel Siles¹

(1) Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Edificio no. 7, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07738 México, D.F. (e-mail: dules_bast@hotmail.com)

Recibido: 02/10/2012 - Evaluado: 04/12/2012 - Aceptado: 07/02/2013

RESUMEN

En este trabajo se realizó la identificación de los principales componentes de la raíz de Wereque por GC-MS. A partir de extracciones acuosas de las raíces frescas de Wereque mediante infusión, decocción neutra y básica, y maceración, se obtuvieron seis muestras a analizar. Los extractos crudos fueron filtrados, purificados y derivatizados antes de ser analizados. Los análisis por GC-MS fueron realizados en un equipo Perkin Elmer Clarus 600T, con una columna capilar Elite-5 MS 30 m, ϕ_{int} : 0.32 mm, film: 0.25 μm ; He: 0.8 mL/min, T_{inj} : 200 °C; T_{fuente} y $T_{línea\ de\ transferencia}$: 230 °C; $T_{columna}$: 60 °C, 5min; 60 a 180°C, 20°C/min; 180°C, 10min; 70 eV, m/z 30 a 450. Se identificaron 33 compuestos diferentes, entre los cuales se encuentra el ácido palmítico. Este compuesto forma parte de un grupo de ácidos grasos y monoglicéridos a los que se les atribuye la actividad hipoglucemiante del Wereque.

ABSTRACT

This work comprises the identification of the Wereque's root main components. For that purpose, aqueous extractions of Wereque's fresh roots were made by infusion, decoction (both neutral and basic), and maceration, from which six samples were obtained for analysis. The raw extracts were filtered, purified and derivatized before they were analyzed. The GC-MS analyses were conducted on a Perkin Elmer Clarus 600T instrument, an Elite-5 MS, 30 m capillar column, ϕ_{int} : 0.32 mm, film: 0.25 μm ; He: 0.8 mL/min; T_{inj} : 200 °C; T_{source} and $T_{transfer\ line}$: 230 °C; T_{column} : 60 °C, 5min; 60 a 180°C, 20°C/min; 180°C, 10min; 70 eV, m/z 30 a 450. Through this work, 33 different compounds were identified, including palmitic acid. Based on existing literature, this component belongs to a group of fatty acids and monoglycerides responsible of the Wereque's hypoglycemic activity.

Palabras clave: Wereque; *Ibervillea sonorae*; cromatografía de gases; espectrometría de masas
Keywords: Wereque; *Ibervillea sonorae*; gas chromatography; mass spectrometry

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades crónico-degenerativas, cuyas tasas de prevalencia y mortalidad se han incrementando significativamente en los últimos años, es la Diabetes Mellitus (DM), la cual es reconocida por la OMS como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 180 millones de personas con DM y es probable que esta cifra se duplique antes del año 2030 (Secretaría de Salud, 2008).

En menos de cuatro décadas la DM se ha convertido en el problema de salud pública más importante de México, ya que desde el año 2000 esta enfermedad representa la primera causa de mortalidad general en el país (Aguilar *et al.*, 2003; Secretaría de Salud, 2010).

Alrededor del 54% de la población mexicana no cuenta con acceso a servicios médicos (SINAIS, 2008), por lo que generalmente recurre a tratamientos alternativos, entre los que se encuentra el uso de plantas medicinales. Se estima que a nivel mundial se emplean más de 1,200 plantas para el control de la DM (Hernández *et al.*, 2007).

Una planta ampliamente utilizada en México para tal fin se conoce como Wereque (Martínez *et al.*, 2011) [*Ibervillea sonorae* Greene (Greene, 1895)]. Se trata de una planta dioica perenne que pertenece a la familia Cucurbitaceae (Alarcón *et al.*, 2005). Se desarrolla en la región semiárida al norte de México (Hernández *et al.*, 2007) y ha sido empleada desde hace varios siglos por diferentes grupos étnicos para tratar padecimientos de la piel, artritis, reumatismo y algunas enfermedades cardíacas (Hernández, 2011).

El consumo de esta planta se ha vuelto una alternativa terapéutica eficiente para personas con DM que no cuentan con los recursos económicos para adquirir medicamentos alópatas y, por lo tanto, su uso es cada vez más recurrente. La forma más común de extracción de los principios activos de esta planta para su consumo es la decocción acuosa de la raíz (Alarcón *et al.*, 2005). El efecto hipoglucémico del extracto acuoso se ha demostrado y validado en diversos estudios (Rivera *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2005; Blancas, 2005).

De acuerdo con lo mostrado por Hernández *et al.* (2007), la actividad hipoglucemiante del Wereque se atribuye a un grupo de monoglicéridos y ácidos grasos, presentes en la raíz de la planta, que fueron extraídos con diclorometano. Sin embargo es necesario ampliar el reconocimiento de componentes contenidos en las fracciones acuosas, ya que éste es el modo habitual de consumo. El propósito del presente trabajo es identificar los principales componentes del Wereque, obtenidos mediante extracciones acuosas, empleando la técnica acoplada de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

METODOLOGÍA

Las raíces frescas de Wereque fueron peladas, ralladas y secadas a la sombra, extendidas en capas delgadas sobre hojas de papel.

Para el proceso de extracción se emplea el siguiente procedimiento:

- Infusión: Se pesaron 5 g de material seco y pulverizado, se agregaron a 100 mL de agua hirviendo. Se enfrió con agitación manual constante, hasta temperatura ambiente; se separaron los sólidos por filtración. El filtrado se hizo pasar por tierras diatomeas para disminuir la turbidez, añadiendo 20 mL de etanol para favorecer la filtración. Una pequeña porción del filtrado fue secado con aire; el residuo sólido fue recuperado con 3 mL de metanol y saponificado con 2 mL de una solución metanólica de KOH (0.5 N) a reflujo y con agitación durante 20 minutos. El producto saponificado se hizo reaccionar con 1 mL de BF_3 y 3 mL de metanol a reflujo 30 minutos. Al producto metilado se le añadió agua destilada y 6 mL de hexano. La fase orgánica fue secada con 0.5 g de MgSO_4 , filtrada y guardada (*Muestra 1*).

- Decocción neutra: 5 g de material seco y pulverizado fue mezclado con 200 mL de agua destilada. La mezcla se mantuvo en reflujo con agitación por 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aplicó baño ultrasónico durante 1 hora. La mezcla fue filtrada y el filtrado fue separado en dos porciones; la primera fue filtrada a través de tierras diatomeas y la segunda fue centrifugada. Muestras de los sobrenadantes fueron procesadas mediante cromatografía independientemente sobre silicagel en pipeta Pasteur. Las fracciones obtenidas fueron saponificadas y metiladas (*Muestra 2 y Muestra 3*).
- Decocción básica: 5 g de material seco y pulverizado fue mezclado con 200 mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 al 2%. La mezcla se mantuvo en reflujo con agitación por 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le aplicó baño ultrasónico durante 1 hora; los sólidos fueron separados por filtración en papel y el sobrenadante fue pasado por tierras diatomeas para disminuir la turbidez. El nuevo filtrado fue saponificado y metilado (*Muestra 4*).
- Maceración: Se pusieron 500 g de raíz de Wereque fresca y pelada en 1 L de agua de la llave y se dejó en reposo durante 6 horas. El material sólido fue separado por decantación. La fase acuosa fue basicada con NH_4OH hasta $\text{pH} > 11$. Se formó un precipitado blanco que fue separado por filtración. El filtrado fue separado en dos porciones; la primera fue extraída con CHCl_3 (3x 60 mL) y la segunda con CCl_4 (3x 60 mL). Las fases orgánicas fueron secadas y filtradas independientemente y luego guardadas para sus respectivos análisis (*Muestra 5 y Muestra 6*).

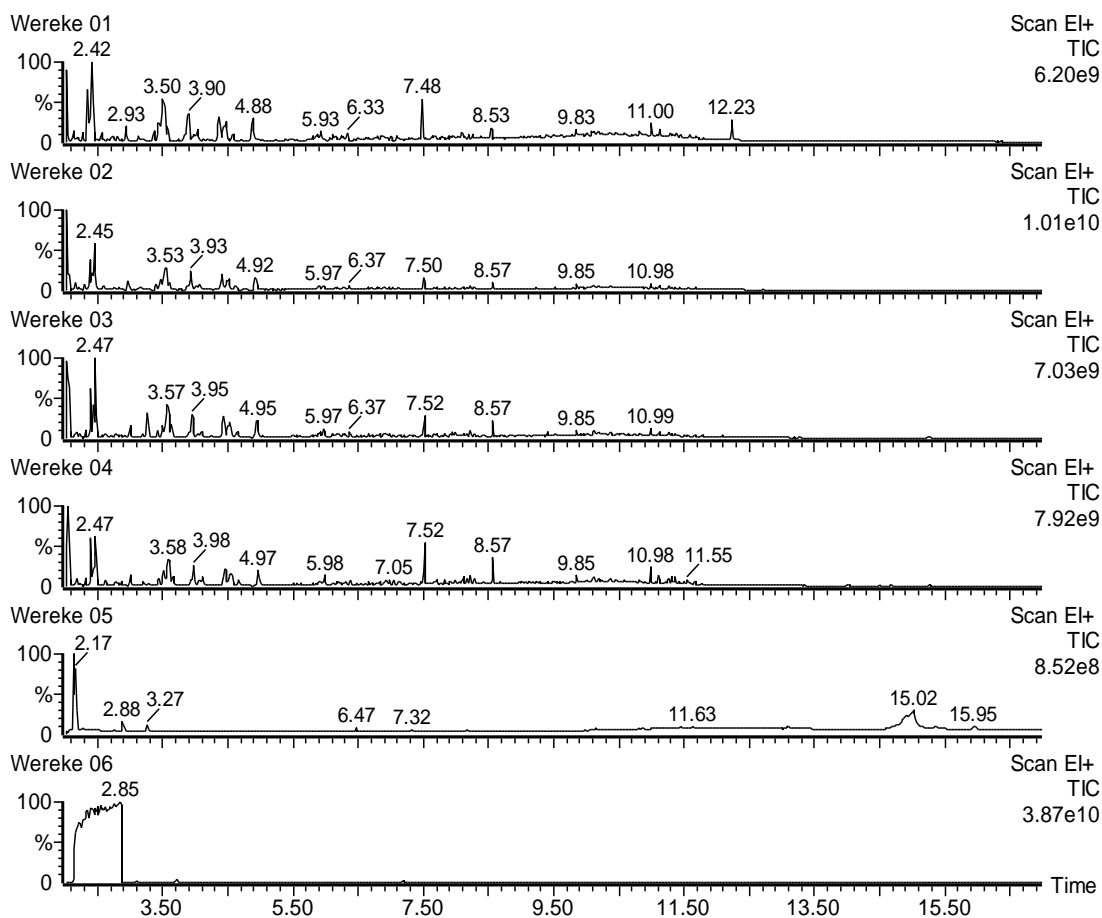


Fig. 1: Fragmentogramas

Los análisis por GC-MS fueron realizados en un equipo Perkin Elmer Clarus 600T, con una columna capilar Elite-5 MS de 30 m de longitud, diámetro interior de 0.32 mm, 0.25 μm de espesor de film y helio como gas portador (0.8 mL/min). T_{inyector} : 200 $^{\circ}\text{C}$; T_{fuente} y $T_{\text{línea de transferencia}}$: 230 $^{\circ}\text{C}$; T_{columna} : 60 $^{\circ}\text{C}$, 5min; 60 a 180 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 180 $^{\circ}\text{C}$, 10min; Energía de 70 eV y barrido de 30 a 450 m/z.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los fragmentogramas obtenidos de cada una de las seis muestras (Figura 1) se observa que los primeros cuatro extractos tienen similitudes considerables. Las diferencias de concentración pueden ser atribuidas a las variaciones operativas durante la separación. Los extractos obtenidos por maceración presentan una composición significativamente diferente. El número de compuestos observados para las diferentes extracciones fue mayor en la infusión y en la decocción neutra (*Muestras 1, 2 y 3*) y considerablemente menor en la maceración (*Muestras 5 y Muestra 6*).

El examen general de los espectros de masas permite proponer estructuras que son verificadas explicando los iones más representativos mediante los mecanismos de fragmentación correspondientes. La consistencia de los mecanismos de fragmentación confirma la validez de las estructuras propuestas. Se confirmaron 33 compuestos diferentes (Tabla 1); sus respectivos tiempos de retención (Rt) e intensidades relativas de los iones (I%) se muestran en la Tabla 2.

Es importante hacer notar que la mayor parte de los compuestos encontrados fueron alcoholes, cetonas y alcanos. La presencia de compuestos lipofílicos en los extractos acuosos se explica porque su solubilidad en agua no es nula (Bailey, 2001; Maczynski *et al.*, 2004). La sensibilidad de la técnica analítica empleada permitió detectarlos incluso en muy bajas concentraciones.

Tabla 1: Número (No.), nombre, ion molecular (M^{+}) y fórmula bruta (FB) de los compuestos identificados.

No.	Nombre	M^{+}	FB	No.	Nombre	M^{+}	FB
1	Pentanamida	101	$C_5H_{11}NO$	18	Dodecano	170	$C_{12}H_{26}$
2	4-Metil-3-penten-2-ol	100	$C_6H_{12}O$	19	2-Butenoato de isopropilo	128	$C_7H_{12}O_2$
3	4-Hexen-3-ona	98	$C_6H_{10}O$	20	5-Metil-2-carboximetil ciclopentanona	156	$C_8H_{12}O_3$
4	3-Hexen-2-ona	98	$C_6H_{10}O$	21	1-Ciclopentil-5-metilhex-2-en-1-ona	180	$C_{12}H_{20}O$
5	3-Metil-2-ciclopentenona	96	C_6H_8O	22	4,5-Dimetilnonano	156	$C_{11}H_{24}$
6	3-Metilhexano	100	C_7H_{16}	23	Vinilbenceno	104	C_8H_8
7	2-Metilpentan-2,3-diol	118	$C_6H_{14}O_2$	24	N,N-Dibutilformamida	157	$C_9H_{19}NO$
8	4-Metilpentan-1,4-diol	118	$C_6H_{14}O_2$	25	Hexadecanoato de metilo	270	$C_{17}H_{34}O_2$
9	2-Metil-2-pentenol	100	$C_6H_{12}O$	26	Etanoato de n-butilo	116	$C_6H_{12}O_2$
10	3,5-Dimetil-4-hidroxi-2-hexanona	144	$C_8H_{16}O_2$	27	1,3-Dimetilbenceno	106	C_8H_{10}
11	2-Metil-4-hidroxi-3-heptanona	144	$C_8H_{16}O_2$	28	1,2-Dimetilbenceno	106	C_8H_{10}
12	1-Etoxi-3-metil-2-penteno	128	$C_8H_{16}O$	29	1-Metil-4-isopropenilciclohexeno	136	$C_{10}H_{16}$
13	2-Metilhepten-3-ol	128	$C_8H_{16}O$	30	Ácido hexadecanoico	256	$C_{16}H_{32}O_2$
14	3,4-Dimetilhexa-2-ona	128	$C_8H_{16}O$	31	2-Butenoato de n-butilo	142	$C_8H_{14}O_2$
15	Decano	142	$C_{10}H_{22}$	32	1,3,5-Trimetilbenceno	120	C_9H_{12}
16	3-Metilenciclopenteno	80	C_6H_8	33	2-Metil-6-etildecano	184	$C_{13}H_{28}$
17	Undecano	156	$C_{11}H_{24}$				

Entre los diferentes componentes identificados se encuentra el ácido palmítico (hexadecanoico, *Muestra 5*) o su éster metílico (hexadecanoato de metilo, *Muestra 3*), que forma parte de los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante de la raíz de Werekue (Hernández *et al.*, 2007).

Tabla 2: Tiempos de retención (Rt) e intensidades relativas (I%) de los iones principales (m/z).

No.	Rt [minutos] Muestras:						m/z (I%)
	1	2	3	4	5	6	
1	2.03	2.07	2.07	2.07	-	-	101(M ⁺ ,5), 72(10), 59(100), 58(35), 45(36), 44(6), 31(14)
2	2.13	2.17	2.17	2.18	-	-	100(M ⁺ ,35), 85(88), 82(34), 67(100), 57(24), 55(19), 43(76), 41(73), 39(43)
3	2.35	2.38	2.40	2.40	-	-	98(M ⁺ ,21), 83(6), 70(7), 69(100), 57(6), 41(64), 39(32)
4	2.42	2.45	2.47	2.47	-	-	98(M ⁺ ,39), 83(100), 55(79), 53(12), 43(59), 39(22)
5	2.93 y 4.88	2.97 y 4.92	3.00 y 4.95	3.00 y 4.97	-	-	96(M ⁺ ,89), 81(100), 68(19), 67(68), 53(75), 40(19), 39(43)
6	3.37	3.40	3.43	3.45	-	-	100(M ⁺ ,0.5), 85(21), 71(61), 55(57), 43(100), 41(36)
7	3.45	3.48	3.50	3.52	-	-	118(M ⁺ ,0), 103(2), 89(2), 85(4), 72(2), 71(10), 59(100), 45(4), 43(46), 31(12)
8	3.50	3.53	3.57	3.58	-	-	118(M ⁺ ,0), 103(1), 100(1), 85(25), 69(15), 67(6), 59(60), 57(8), 56(6), 43(100)
9	3.57	3.60	3.63	3.65	-	-	100(M ⁺ ,4), 85(15), 83(23), 71(53), 69(24), 67(20), 55(36), 43(57), 41(100), 39(54)
10	3.90	3.93	3.95	3.98	-	-	144(M ⁺ ,0), 85(15), 73(37), 72(18), 57(16), 55(22), 43(100), 41(19), 31(3)
11	4.03	4.07	4.10	4.12	-	-	144(M ⁺ ,0), 89(12), 73(100), 71(20), 57(15), 55(38), 43(89)
12	4.37	4.42	4.43	4.45	-	-	128(M ⁺ ,0), 100(5), 83(66), 82(36), 67(90), 55(61), 53(25), 43(95), 41(100), 39(83)
13	4.47	4.52	4.53	4.55	-	-	128(M ⁺ ,0), 100(5), 83(46), 82(16), 71(90), 69(41), 67(36), 55(64), 53(20), 41(100)
14	4.58	4.62	4.65	4.67	-	-	128(M ⁺ ,0), 100(12), 85(34), 83(43), 82(23), 67(64), 57(17), 55(66), 43(100)
15	5.93	5.97	5.97	5.98	-	-	142(M ⁺ ,6), 113(6), 99(5), 85(20), 71(41), 57(100), 43(83)
16	6.33	6.37	6.37	6.38	-	-	80(M ⁺ ,49), 79(100), 65(7), 53(15), 39(22)
17	7.48	7.50	7.52	7.52	-	-	156(M ⁺ ,9), 113(6), 99(7), 85(32), 71(56), 57(93), 43(100)
18	8.53	8.56	8.57	8.57	-	-	170(M ⁺ ,10), 141(3), 127(4), 113(6), 99(11), 85(39), 71(65), 57(90), 43(100)
19	9.83	9.85	9.85	9.85	-	-	128(M ⁺ ,3), 113(14), 87(8), 69(100), 59(31), 43(58), 41(35)
20	11.02	10.99	10.99	10.99	-	-	156(M ⁺ ,9), 114(15), 98(7), 97(100), 83(8), 69(10), 59(12), 58(18), 43(39)
21	12.24	12.20	12.20	12.20			180(M ⁺ ,7), 165(3), 137(9), 123(14), 111(9), 97(100), 83(16), 69(16), 57(47), 43(24)
22	-	8.22	8.22	8.22	-	-	156(M ⁺ ,0.2), 141(1), 127(9), 113(4), 99(11), 85(40), 71(57), 57(71), 43(100)
23	-	-	3.27	-	-	-	104(M ⁺ ,100), 78(43), 77(22), 51(24)
24	-	-	9.40	-	-	-	157(M ⁺ ,3), 142(17), 128(5), 114(56), 97(9), 83(14), 72(100), 57(29), 41(23)
25	-	-	15.27	-	-	-	270(M ⁺ ,7), 239(4), 227(7), 185(4), 171(4), 143(14), 129(6), 101(5), 97(6), 87(60), 83(9), 74(100), 71(5), 69(13), 59(7), 57(15), 55(22), 43(36), 41(23)
26	-	-	-	-	2.17	-	116(M ⁺ ,0), 73(15), 61(13), 57(4), 56(44), 43(100)
27	-	-	-	-	2.88	-	106(M ⁺ ,47), 91(100), 77(12), 65(6), 51(10)
28	-	-	-	-	3.27	-	106(M ⁺ ,43), 91(100), 77(13), 65(6), 51(11)
29	-	-	-	-	6.47	-	136(M ⁺ ,32), 121(24), 107(25), 93(82), 79(57), 68(100), 53(25), 41(26)
30	-	-	-	-	15.02	-	256(M ⁺ ,15), 213(15), 185(11), 171(11), 157(12), 129(35), 115(13), 97(19), 87(19), 85(29), 83(28), 73(85), 71(38), 69(32), 60(73), 57(73), 55(65), 43(100), 41(69)
31	-	-	-	-	-	5.63	142(M ⁺ ,0), 87(66), 69(100), 57(5), 56(44), 41(69), 39(22)
32	-	-	-	-	-	5.90	120(M ⁺ ,44), 105(100), 91(12), 77(16), 65(5), 51(6)
33	-	-	-	-	-	10.17	184(M ⁺ ,0), 141(3), 127(1), 113(3), 99(8), 85(35), 71(73), 57(100), 43(90)

CONCLUSIONES

Al comparar las técnicas de extracción se observa que la eficiencia es mayor en la infusión y en la decocción neutra al arrojar un mayor número de compuestos, mientras que en la maceración se observa lo contrario debido a que la extracción se realiza únicamente por difusión. Esto muestra que el incremento de temperatura favorece la extracción.

De acuerdo a la literatura (Hernández *et al.*, 2007) la actividad hipoglucemiante de la planta se atribuye a un grupo de ácidos grasos y monoglicéridos extraídos con diclorometano. Sin embargo, en dicho estudio se sostiene que los extractos acuosos también tienen efecto hipoglucemiante, por lo que se infiere que en estas fracciones también están presentes los principios activos.

En este trabajo se identificó el ácido palmítico, que forma parte de los componentes reportados como hipoglucemiantes por Hernández *et al.* (2007). Es posible que algunos otros principios activos fueran extraídos en medio acuoso, pero hayan sido discriminados durante los tratamientos previos al análisis. Para realizar una identificación más precisa de tales componentes, se recomienda realizar separaciones y purificaciones más eficientes.

Se identificó un total de 33 componentes: 5 alcoholes, de los cuales 2 son dioles saturados y 3 monoalcoholes insaturados; 6 alcanos, de 7 a 13 carbonos, 3 ramificados y 4 lineales; 7 cetonas, 2 son hidroxí-cetonas y 4 son cetonas insaturadas; 4 ésteres de 6 a 17 carbonos, de los cuales 3 son insaturados; 4 aromáticos; 2 alquenos cíclicos; 2 amidas; 1 éter insaturado y el ácido palmítico.

REFERENCIAS

1. Aguilar, C.A., Velázquez, O., Gómez, F.J., González, A., Esqueda, A., Molina, *et al.* (2003). *Diabetes Care*, 7 (26), 2021-2026.
2. Alarcón, F.J., Calzada, F., Hernández, G., Ruiz, C. & Román, R. (2005). Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 447-452.
3. Bailey, A. (2001). Naturaleza de los aceites y grasas. En su: Aceites y grasas industriales. Edición en español. España, Reverté, pp. 3-92.
4. Blancas, G. (2005). Obtención del extracto y la fracción hipoglucemiante de la raíz de *Ibervillea sonora*. Trabajo de servicio social, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México. Bajado diciembre 10, 2012, desde, <http://148.206.53.231/UAMI12246.PDF>.
5. Greene, E.I. (1895). Corrections in nomenclature – VII. *Erythea*, 5 (3), 75-76.
6. Hernández, A.F. (2011). Producción de extractos de *Ibervillea sonora* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*. Tesis de maestría, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México. Bajado diciembre 10, 2012, desde, http://www.biotecnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/Tesis/mc_afhernandez.pdf
7. Hernández, E., Calzada, F., Román, R. & Alarcón, F.J. (2007). Monoglycerides and Fatty acids from *Ibervillea sonora* Root: Isolation and Hypoglycemic Activity. *Planta Med.*, 73, 236-240.
8. Martínez, A.T., Ramírez, M.G. & Piña, A.B. (2011, agosto). Wereke: Un tratamiento natural para la diabetes. *InFÁRMate*, 27, año 7, artículo e007-e0015. Bajado noviembre 13, 2011, desde, <http://www.infarmate.org.mx/index.php/component/content/article/26-principal/168-numero-27-infarmate>
9. Maczynski, A., Wisniewska, B. & Goral, M. (2004); Recommended Liquid-Liquid Equilibrium Data. Part 1. Binary Alkane-Water Systems. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2 (33), 550-577.
10. Rivera, F.; Escalona, G.N., Garduño, L., Galaviz, C. & Paniagua, N. (2011); Antiobesity and Hypoglycaemic Effects of Aqueous Extract of *Ibervillea sonora* in Mice Fed a High-Fat Diet with Fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1, 1-6.
11. Secretaría de Salud (2008). Programa de acción específico 2007-2012: Diabetes Mellitus. Recuperado, Noviembre 13, 2011, de Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Secretaría de Salud, México. Sitio web: <http://www.spps.gob.mx/diabetes-mellitus>

12. Secretaría de Salud (2010). Principales causas de mortalidad general. Recuperado, Noviembre 13, 2011, de Sistema Nacional de Información en Salud, Secretaría de Salud, México. Sitio web: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>

13. SIN AIS (2008). Encuesta nacional de gasto en salud, 2008, Informe final de campo. Recuperado, Noviembre 13, 2011, de Sistema Nacional de Información en Salud, Secretaría de Salud, México. Sitio web: http://sinais.salud.gob.mx/descargas/pdf/enagas_reporte.pdf