

## Estudio Fitoquímico del extracto de acetato de etilo de *Haplopappus venetus* (Kunth) S. F. Blake

### Phytochemical Study of *Haplopappus venetus* (Kunth) S. F. Blake Ethyl Acetate Extract

Aracely Hernández-Pérez<sup>a</sup>, Alma Delia Hernández-Fuentes<sup>a</sup> René Velázquez-Jiménez<sup>b\*</sup>

#### Abstract:

*Haplopappus venetus*, is a shrub used in Mexico to treat diabetes due to its hypoglycaemic effect. However, no scientific information justifies this effect; therefore, we must carry out phytochemical studies since they allow us to guide future research to determine Biological activity. Thus, the objective was to perform a phytochemical analysis of the Ethyl acetate extract of *H. Venetus*. The RMN spectroscopy results of <sup>1</sup>H presented characteristic signs of the terpenic compounds (oxide of *b*-cariofilylene) and other typical signs of aromatic hydrogens corresponding to phenolic compounds. The present study suggests the possibility of using *H. Venetus* as a source of pharmacological application.

#### Keywords:

*Haplopappus venetus*, extraction, ethyl acetate, terpenes, phenolic compounds, oxide of  $\beta$ -cariofilylene and <sup>1</sup>H NMR

#### Resumen:

*Haplopappus venetus*, es un arbusto que se usa en México para tratar la diabetes debido a su efecto hipoglucemiante, sin embargo, no existen información científica que justifique este efecto, por lo tanto, es necesario realizar estudios fitoquímicos ya que permiten orientar futuras investigaciones para determinar la actividad biológica. Por lo anterior, el objetivo fue realizar un análisis fitoquímico del extracto de acetato de etilo de *H. venetus*. Los resultados de espectroscopía de RMN de <sup>1</sup>H presentó señales características de compuestos terpénicos (óxido de *b*-cariofileno) además de, señales típicas de hidrógenos aromáticos correspondientes posiblemente a compuestos fenólicos. El presente estudio sugiere la posibilidad de utilizar *H. venetus* como fuente de aplicación farmacológica en un futuro.

#### Palabras Clave:

*Haplopappus venetus*, extracción, acetato de etilo, terpenos, compuestos fenólicos, óxido de  $\beta$ -cariofileno y RMN de <sup>1</sup>H

## 1. Introducción

México es un país megadiverso, se estima que cuenta con 25,077 especies de plantas [1], de las cuales 4000 son con un fin medicinal. Las plantas medicinales son definidas como materiales o productos derivados de plantas con beneficios

terapéuticos u otros beneficios humanos, que contienen materias primas o ingredientes procesados de una o más plantas [2]. Desde la antigüedad las plantas medicinales se emplean para aliviar y controlar enfermedades, sin embargo, aún no existe evidencia científica suficiente para consolidar la medicina herbolaria dentro de los sistemas de salud [3].

<sup>a</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Rancho Universitario, Av. Universidad Km.1 s/n Exhacienda Aquetzalpa, C.P. 43600 Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. <http://orcid.org/0000-0003-2592-6689>, Email: [almah@uaeh.edu.mx](mailto:almah@uaeh.edu.mx); <https://orcid.org/0000-0001-8357-0735>, Email: [he409779@uaeh.edu.mx](mailto:he409779@uaeh.edu.mx), <sup>b</sup>Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo; Área Académica de Química, Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, C.P. 42090. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. <http://orcid.org/0000-0002-3100-2944>, Email: [rene\\_velazquez10269@ach.edu.mx](mailto:rene_velazquez10269@ach.edu.mx)\*

En los últimos años se ha dado gran importancia al uso de las plantas medicinales para tratar distintos padecimientos, en donde se han utilizado hojas, tallos, raíces, flores, semillas, cortezas y frutos, ya sea directamente o través de sus extractos en diversas formas de preparación (destilación por arrastre, decocción, maceración, infusión, percolación, ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos y extracción acelerada por solventes) [4]. Los extractos vegetales aportan una amplia variedad de compuestos bioactivos [5], entre los que destacan fenoles, flavonoides y terpenos que son compuestos que le confieren diversas actividades biológicas entre ellas la actividad hipoglucemiante [6].

*Haplopappus* es un género endémico de América del Sur, se estima que existen alrededor de 70 especies, de las cuales 28 se ha estudiado en el ámbito fitoquímico, como resultado se han identificado diferentes grupos de compuestos químicos, entre los que destacan los terpenoides, fenoles y flavonoides [7]. El género *Haplopappus* es utilizados en la prevención y/o tratamiento de diversas patologías humanas y animales, principalmente es considerado antidiarreico, antiséptico, antirreumático, antiviral, antiespasmódico, astringente entre otros [7,8].

*Haplopappus venetus* es una planta semiarbustiva, con tricomas glandulares en hojas, flores amarillas y numerosas cerdas de vilano (Figura 1). Comúnmente se le conoce como “damiana”, “falsa damiana” o “xapulli”. En México esta planta se emplea para bajar los niveles de azúcar en la sangre [9], sin embargo, no existen datos científicos que justifiquen este efecto, aunado a esto, existe poca información sobre su composición fitoquímica, por lo tanto, es esencial realizar estudios fitoquímicos ya que permiten orientar futuras investigaciones para determinar la actividad biológica y los compuestos activos involucrados. Por esta razón, este trabajo tiene como objetivo dar a conocer de forma preliminar la composición fitoquímica de *Haplopappus venetus* de extracto de acetato de etilo de las hojas y flores



Figura 1. *Haplopappus venetus*

## 2. Materiales y métodos

*Haplopappus venetus* fue colectada en abril de 2019 en la comunidad de Nopalillo en el municipio de Epazoyucan, Hgo (Latitud 20° 03' 52" N y Longitud 98° 35' 04" O). Fue identificado por el M. en C. Manuel González Ledezma. Se separaron hojas y flores, las cuales se secaron a temperatura ambiente durante 7 días. Se molió la materia vegetal seca en un molino de cuchillas marca RETCH GM-200. La materia vegetal se maceró con acetato de etilo (AcOEt) en una proporción 1:3 (P/V) durante 7 días en ausencia de luz. El AcOEt se eliminó por destilación a presión reducida con un rotavapor (BUCHI R-215), conectado a una bomba de vacío (BUCHI Vacuum Pump V-700), los extractos vegetales se almacenaron en refrigeración a 4°C, posteriormente se determinó el rendimiento del extracto mediante la siguiente formula: [10].

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE= Peso obtenido después de la extracción

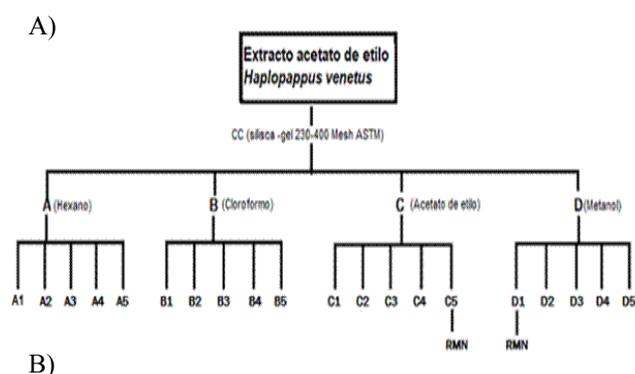
PI=Peso inicial del material vegetal a extraer

Para el fraccionamiento del extracto se empleó las técnicas cromatográficas en columna (CC) y en capa fina (TLC), se emplearon columnas de vidrio de 2.5 y 5 cm de diámetro interno, cromatofolios de sílica gel (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) y sílica gel 60 Merck (230-400 mesh ASTM). La fase móvil que se utilizó fue: hexano (A), cloroformo (B), acetato de etilo (C) y metanol (D). Se obtuvieron 20 fracciones (100 mL cada una) y se etiquetaron como: A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4, B5, C1, C2, C3, C4, C5, D1, D2, D3, D4, D5, para su posterior análisis por resonancia magnética nuclear (RMN de <sup>1</sup>H) y TLC. Las TLC se revelaron con sulfato de cerio amoniacal (agente cromógeno) y su posterior calentamiento. Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H se determinaron en CDCl<sub>3</sub> utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia a 400 MHz en un espectrofotómetro Bruker Ascend 400. El desplazamiento químico (δ) se expresó en ppm con respecto a la señal TMS [11].

### 3. Resultados y discusión

El rendimiento del extracto de AcOEt fue de un 26%. Estos resultados se pueden atribuir a la naturaleza de los compuestos presentes en la planta y a la afinidad con el disolvente utilizado, así como a la técnica de extracción empleada [12].

En la separación cromatográfica del extracto de AcOEt se obtuvieron 20 fracciones (Figura 2A). El análisis mediante RMN de <sup>1</sup>H y CCF permitió la agrupación en las subfracciones A3-4, A5-B2, B3-4, D2-D4 debido a los valores similares de la R<sub>f</sub> (Relación de frente) de cada mancha observada en las placas cromatográficas. La R<sub>f</sub> obtenidos van de 0.27-0.77 que correspondieron a posibles terpenos y flavonoides (Figura 2B) [13].



**Figura 2.** A) Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt de *H. venetus* mediante CC rápida. B) Cromatograma de capa fina de subfracciones obtenidas.

En el espectro RMN de <sup>1</sup>H (Figura 3) de subfracción C5 [de AcOEt] del extracto de AcOEt, se presenta la ampliación en la zona de 6.5 a 8.4 ppm, en la cual, se observan señales típicas de hidrógenos aromáticos correspondientes a señales características de compuestos fenólicos y flavonoides, principalmente. Especies como *Haplopappus multifolius* y *H. taeda* han reportado la presencia de fenoles y flavonoides, los cuales evidencia la presencia de compuestos de tipo fenólico en el género *Haplopappus* [14].

En la subfracción D1 [de MeOH] su espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 4) presentó a frecuencias bajas entre 0.8 y 2.3 ppm señales de hidrógenos alifáticos principalmente correspondientes a grupos metilo y posiblemente pertenecientes a compuestos de la familia de los terpenos, principalmente. Los compuestos terpenoides de tipo carvacrol  $\alpha$ -pineno, trans-pinocarveol y óxido de cariofileno se han encontrado mayoritariamente en *Haplopappus greenei* [15], así como limoneno, canfeno,  $\alpha$ -tuyeno, p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno en la especie *Haplopappus foliosus* [16].

En el espectro de RNM de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 5), se apreciaron tres señales típicas de metilos terciarios en 0.98 ppm, 1.00 y 1.20 ppm, entre 0.98 ppm y 2.65 ppm aparecieron señales múltiples pertenecientes a protones alifáticos, en 2.88 ppm apareció una señal doble de dobles ( $J=11.0, 4.0$  Hz) típica de protón de base de epóxido, se apreciaron dos señales dobles en 4.85 ppm ( $J=1.5$  Hz) y en 4.97 ppm ( $J=1.1$  Hz) correspondientes a protones vinílicos.

Dentro de los grupos de compuestos mayormente encontrados en el género *Haplopappus* se encuentran los terpenoides, seguido de flavonoides y fenoles [7].

Cabe mencionar que los metabolitos secundarios de tipo fenólico, flavonoides y terpenos son de interés farmacológico debido a que presentan actividades biológicas como antioxidante, anticancerígenos, antibacterianos, agentes cardioprotectores, antiinflamatorios, promotores del sistema inmunológico [19].

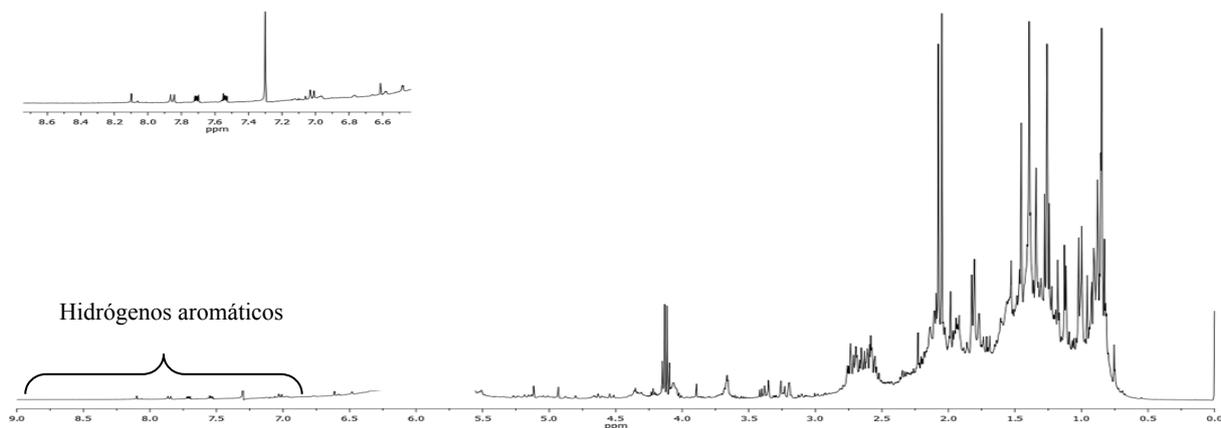


Figura 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción C5 del extracto de AcOEt (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

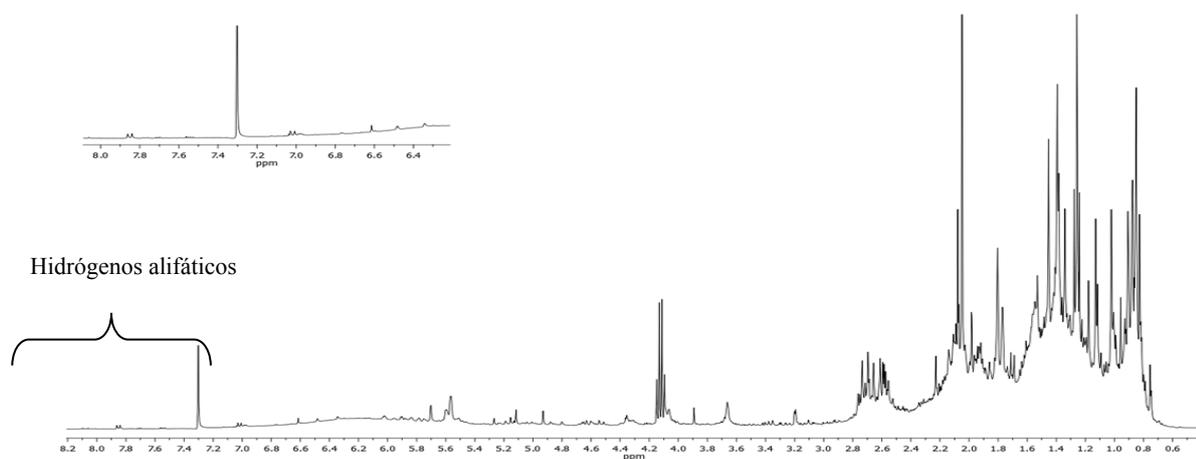


Figura 4. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la subfracción D1 [de MeOH] del extracto de AcOEt (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

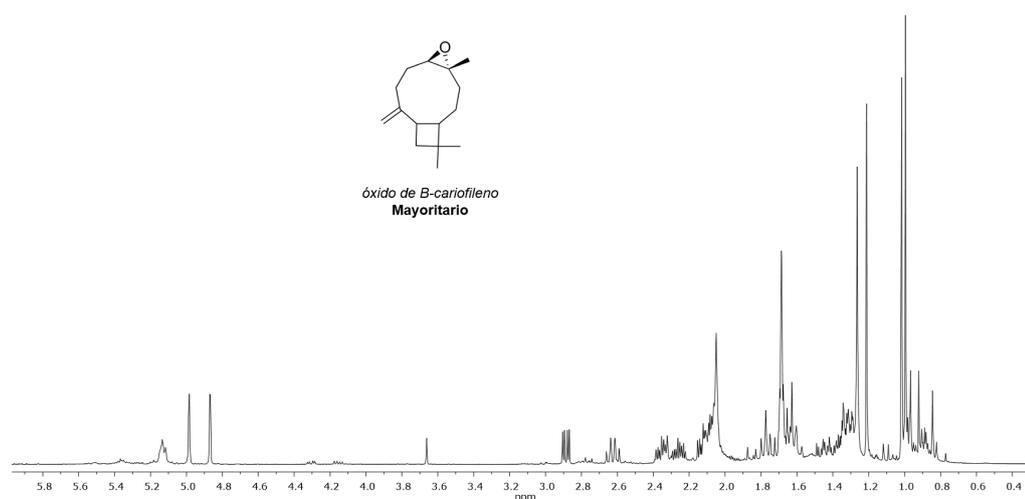


Figura 5. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la fracción 2 del extracto de AcOEt (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4. Conclusiones

El extracto de acetato de etilo mostró la presencia del sesquiterpeno óxido de  $\beta$ -cariofileno y mezclas de otros compuestos terpénicos y compuestos de tipo fenólicos. Los resultados del presente estudio sugieren la posibilidad de emplear los extractos de *Haplopappus venetus* para el desarrollo de productos en el área farmacológica.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses

#### Referencias

- [1] Villaseñor JL, Meave JA. *Floristics in México today: insights into a better understanding of biodiversity in a megadiverse country*. Botanical Sciences, 2022; **100**:14-33.
- [2] Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. Interciencia, 2005; **30**: 453-459.
- [3] Gallegos-Zurita M. *Las plantas medicinales: Principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador*. Anales de la Facultad de Medicina, 2016; **77**: 327-332.
- [4] Bitwell C, Indra SS, Luke C, Kakoma MK. *A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants*. Scientific African. 2023; **19**:1585.
- [5] Conde-Hernández LA, Ibarra-Cantú D, Luna-Vital D, Luna-Guevara JJ, Luna Guevara ML. *Functional properties of bioactive compounds contained in vegetables commonly consumed in México*. Natural Products Chemistry Elsevier, 2023; **79**: 241-288.
- [6] Andrade-Cetto A, Espinoza-Hernández F, Mata-Torres G, Escandón-Rivera S. *Hypoglycemic Effect of Two Mexican Medicinal Plants*. Plants, 2021; **10**:2060-2075.
- [7] Mitsi C, Echeverría J. *The genus Haplopappus: Botany, phytochemistry, traditional uses, and pharmacological properties*. Frontiers in Pharmacology, 2024; **15**:1490243.
- [8] González-López BB, Vogel H. *Estudios morfológicos, histológicos y químicos de especies medicinales del género Haplopappus* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile) Facultad de Ciencias Agrarias. 2007
- [9] Andrade-Cetto A, Heinrich M. *Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes*. Journal of Ethnopharmacology, 2005; **99**: 325-348.
- [10] García L, Verde J, Castro R, Chávez A, Oranday A, Núñez A, Rivas C. *Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana*. Revista Mexicana de Ciencias. Farmacéuticas, 2010; **41**: 28-36.
- [11] Velázquez-Jiménez R, Hernández-Sosa A, Martínez-Otero D, González-Montiel S, Sánchez-Ortega I, González-Ramírez CA. *First 6, 7-Seco-Clerodane Furan Diterpenoid from Croton morifolius*. Records of Natural Products, 2022; **1**:106-112.
- [12] Abubakar A, Haque M. *Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2020; **12**: 1-10.
- [13] Asante IK, Owusu E, Essilfie MK, Kwarteng M, Amuzuah O. *Phytochemical investigation and thin layer chromatography of methanolic extracts of some selected grain legumes*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2016; **5**: 240-244.
- [14] Padilla C, Lobos O, Poblete-Tapia P, Carrasco-Sánchez V. *Antimicrobial activity of bioactive compounds of Haplopappus multifolius and Haplopappus taeda against human pathogenic microorganisms*. Iranian Journal of Microbiology, 2021; **13**: 98-103.
- [15] Demirci B, Baser KHC, Tabanca N, Wedge DE. *Characterization of Volatile Constituents of Haplopappus greenei and Studies on the Antifungal Activity against Phytopathogens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006; **54**: 3146-3150.
- [16] Villagra C, Vera W, Lenitz S, Bergmann J. *Differences in volatile emissions between healthy and gall-induced branches of Haplopappus foliosus (Asteraceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2021; **98**:104309.
- [17] Nogueira-Sobrinho AC, Morais SMD, Souza EBD, Albuquerque MRJR, Santos HSD, Cavalcante CSDP, Sousa HAD, Fontenelle RO DS. *Antifungal and Antioxidant Activities of Vernonia Chalybaea Mart. Ex DC. Essential Oil and their Major Constituent  $\beta$ -caryophyllene*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2020; **63**: 20190177.
- [18] Di-Sotto A, Mancinelli R, Gulli M, Eufemi M, Mammola L, Mazzanti G, Di-Giacomo S. *Chemopreventive Potential of Caryophyllane Sesquiterpenes: An Overview of Preliminary Evidence*. Cancers, 2020; **12**: 3034.
- [19] Tungmunthum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. *Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview*. Medicines, 2018; **5**: 93.