

Posgrado en Ciencias y Biotecnología en Plantas

Apiaceas mexicanas relacionadas filogenéticamente con Apiaceas sudamericanas como posibles fuentes de metabolitos secundarios biológicamente activos

Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestría en Ciencias

Biol. Cecilia Guízar González

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2007

A dios

*Por enseñarme el arte de la vida y estar a mi lado en todo momento mientras
aún trato de comprender todo lo que este arte representa*

A mis padres

*Por demostrarme con su ejemplo que la grandeza de los seres humanos
reside en el corazón, por confiar en lo que puedo lograr antes de haberlo
alcanzado y por ser la brea que me impulsa a seguir adelante en cada
instante de mi vida*

A mis hermanos

*Por otorgarme toda la fortaleza que le faltó a mi corazón convirtiendo todos
mis miedos en grandes logros y por coincidir conmigo en tiempo y espacio*

A mis sobrinas

*Por ser esos ángeles celestiales que despertaron en mi interior sentimientos
insospechados aún para el propio corazón*

A tu memoria

*Por enseñarme que el verdadero amor es un milagro porque nace desde el
fondo de nuestro corazón penetrando las fortalezas de la razón*

CONTENIDO

Agradecimientos	i
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xii
Introducción	1
Bibliografía	3
CAPITULO I. ANTECEDENTES	
1.1 Familia <i>Apiaceae</i>	5
1.2 Botánica, Ecología y Etnobotánica de las Apiaceas mexicanas en estudio	6
1.3 Estudios químicos y farmacológicos en Apiaceas mexicanas	11
1.4 Estudios químicos y farmacológicos en Apiaceas sudamericanas	16
1.5 La filogenia como una herramienta para orientar la búsqueda de metabolitos secundarios de interés farmacológico	23
1.6 Factores que influyen la producción de metabolitos secundarios	27
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29
1.7 Hipótesis	29
1.8 Objetivos	29
1.8.1 Objetivo general	29
1.8.2 Objetivos específicos	29
1.9 Bibliografía	30
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Evaluación de la información filogenética de la Familia <i>Apiaceae</i>	39
2.2 Ubicación de las Apiaceas Mexicanas en estudio	39
2.3 Sitios de colecta del material vegetal	39
2.4 Preparación y extracción del material vegetal	42
2.5 Comparación de los perfiles cromatográficos entre Apiaceas mexicanas y sudamericanas	42
2.6 Evaluación de la actividad biológica en extractos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas	43
2.6.1 Actividad Antiprotozoaria	43
2.6.1.1 Actividad Leishmanicida	43
2.6.2 Actividad antibacteriana	44

2.6.2.1 Bioautografía	45
2.6.3 Actividad antifúngica	45
2.6.4 Actividad antioxidante	46
2.7 Bibliografía	47

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Diversidad y distribución de Apiaceas en México	49
3.2 Delimitación de grupos taxonómicos	49
3.3 Rendimientos de los extractos orgánicos crudos	52
3.4 Análisis de los perfiles cromatográficos de Apiaceas Mexicanas	56
3.5 Comparación de perfiles cromatográficos de extractos obtenidos de Apiaceas mexicanas y Apiaceas sudamericanas	60
3.6 Comparación de los perfiles cromatográficos entre apiaceas mexicanas y metabolitos secundarios de Apiaceas sudamericanas	62
3.7 Extractos con actividad antiprotozoaria	65
3.7.1 Extractos con actividad Leishmanicida	65
3.7.2 Extractos con actividad antibacterina	71
3.7.2.1 Bioautografía	73
3.7.3 Otras evaluaciones de actividad biológica	77
3.8 Bibliografía	77

CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 Conclusiones	79
4.2 Perspectivas	81

Anexo 1 82

Distribución de especies pertenecientes a la familia *Apiaceae* en la República mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por trabajar conmigo en el laboratorio durante toda esta investigación, incursionándome hacia el entendimiento de esta compleja, diversa y fascinante parte de la ciencia que no siempre es fácil comprender, aunado a su apoyo y su preocupación por mejorar siempre lo que pareciera estar correcto.

Al Dr. Germán Carnevali Fernández Concha, por demostrarme con su ejemplo que cuando los seres humanos amamos lo que hacemos, el resultado es un científico con su descripción, gracias por impulsarme siempre a seguir adelante y por enseñarme una nueva visión de la filogenia.

Al Dr. Edmundo Lozoya Gloria, por ser la primera persona que me abrió las puertas hacia el mundo científico, transmitiéndome pacientemente su valioso conocimiento, gracias por formar parte de esta nueva investigación.

Al Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y a la Dra. Patricia Delgado Valeiro, por toda su comprensión y sus valiosas observaciones, que enriquecieron en gran medida esta investigación.

Al Dr. Stephen Robert Dawnie por proporcionarnos toda la información filogenética de la familia Apiaceae.

Al Dr. Alberto Loyola (U. de Antofagasta, Chile) por proporcionarnos los metabolitos secundarios puros y los extractos de las especies sudamericanas en estudio.

Al Dr. Francisco Lorea Hernández (INECOL-Jalapa) y a los biólogos José Luis Tapia Muñoz (CICY) y Carlos Durán Espinosa (INECOL-Jalapa) por

su valiosa ayuda durante la colecta e identificación de las especies vegetales en el Cofre de Perote.

Al Dr. Alberto Giménez Turba (U. Mayor de San Andrés, Bolivia) y su grupo de trabajo (Grace Ruiz Pinell, Efraín Salamanca y David Gutiérrez Yapu), a la Dra. Gloria Maria Molina Salinas, al Dr. Salvador Said Fernández (CIBIN-IMSS) y al MC Manuel Jesús Chan Bacab (U.A. Campeche), por las evaluaciones de actividad biológica realizadas para esta investigación.

A la Dra. Susana de la Rosa García y a la Biol. Manuela de Jesús Reyes Estebanez por su valiosa ayuda durante la realización de la actividad antibacteriana y antifúngica llevada a cabo durante esta investigación.

QBB Fabiola Escalante Erosa, por su ayuda durante la parte final del trabajo de laboratorio.

Al M.C. Luis Wiliunfo Torres Tapia, por su ayuda durante el procesamiento del material vegetal.

A todos los técnicos, compañeros y doctores que integran el laboratorio de Química Orgánica por su amistad y apoyo.

Muy especialmente a **Martha Méndez, Merari Ferrer, Manuela Tamayo, Ricardo Balam, Manuelita Reyes, Susana de la Rosa, Gerardo Ramírez, Ignacio Hernández, Nubia Cantú, Alfredo de la Fuente, Jesús Alejandro Yam, Álvaro Arnés y Gimena Arnés**, por ser los arquitectos de mi vida cada vez que debía ser reconstruida, por compartir conmigo momentos indescriptibles durante tantas inolvidables aventuras y por quererme y cuidarme tanto, siempre estarán dentro de mi corazón y en mi mas profundo recuerdo.

Al CICY por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollar esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta investigación.

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
1.1	Ubicación de los ejemplares de herbario	43
3.1	Rendimeinto de los extractos orgánicos crudos de Apiaceas mexicanas	55
3.2	Extractos activos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas evaluados contra diferentes cepas antiprotozoarias	69
3.3	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Eryngium</i> y <i>Sanicula</i> .	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag.
1.1	<i>Eryngium monocephalum</i> Cav.	8
1.2	<i>Eryngium carlinae</i> Delar.	9
1.3	<i>Eryngium proteiflorum</i> Delar.	10
1.4	<i>Eryngium deppeanum</i> Cham. & Schltdl	10
1.5	<i>Sanicula liberta</i> Cham. & Schlencht	11
1.6	<i>Centella asiatica</i> (L.)	12
2.1	Ubicación del Cofre de Perote	42
2.2	Ubicación de la Laguna de Chichancanab	43
3.1	Árbol de relaciones filogenéticas de las Apioideae basado en evidencia combinada de secuencias de ADN	52
3.2	Árbol filogenético donde se muestra la subfamilia <i>Azorelloideae</i> , la cual agrupa a los géneros <i>Azorella</i> , <i>Laretia</i> y <i>Mulinum</i>	53
3.3	Rendimientos del extracto orgánico crudo de inflorescencias, tallos y hojas y raíz de especies del género <i>Eryngium</i> colectadas a diferentes altitudes	56
3.4	Rendimientos de extracto orgánico crudo de <i>S. liberta</i> y <i>C. asiatica</i>	57
3.5	Perfiles cromatográficos de las especies <i>E. deppeanum</i> y <i>S. liberta</i> eluidos en tres sistemas de disolventes a) CH ₂ Cl ₂ /Bn/MeOH (60:30:10); b) CH ₂ Cl ₂ /An (95:5); c) Bn/EtOAc/MeOH (80:10:10)	58
3.6	Perfiles cromatográficos de los extractos de Inflorescencias de <i>E. monocephalum</i> , <i>E. carlinae</i> , <i>E. deppeanum</i> , <i>E. proteiflorum</i> y frutos de <i>S. liberta</i> colectados a diferentes altitudes	59
3.7	Perfiles cromatográficos de los extractos de tallos y hojas de <i>E. monocephalum</i> , <i>E. carlinae</i> , <i>E. deppeanum</i> , <i>E. proteiflorum</i> , <i>S. liberta</i> y <i>C. asiatica</i> colectados a diferentes altitudes	60
3.8	Perfiles cromatográficos de los extractos de raíz de <i>E. monocephalum</i> , <i>E. carlinae</i> , <i>E. deppeanum</i> , <i>E. proteiflorum</i> , <i>S. liberta</i> y <i>C. asiatica</i> colectados a diferentes altitudes	61
3.9	Perfiles cromatográficos de los extractos de inflorescencias, tallo y hojas y raíz de <i>E. monocephalum</i> , <i>S. liberta</i> y <i>C. asiatica</i>	62

3.10	Cocromatografía entre las especies: <i>Azorella compacta</i> , <i>Eryngium monocephalum</i> , <i>Mulinum crassifolium</i> , <i>Centella asiática</i> y <i>Sanicula liberta</i> , eluida bajo el sistema de disolventes CH ₂ Cl ₂ /An (95:5)	63
3.11	Cocromatografía entre las especies: <i>Azorella compacta</i> , <i>Eryngium monocephalum</i> , <i>Mulinum crassifolium</i> , <i>Centella asiática</i> y <i>Sanicula liberta</i> , eluida bajo el sistema de disolventes Bn/EtOAc/MeOH (80:10:10)	64
3.12	Cocromatografía entre las especies: <i>Azorella compacta</i> , <i>Eryngium monocephalum</i> , <i>Mulinum crassifolium</i> , <i>Centella asiática</i> y <i>Sanicula liberta</i> , eluida bajo el sistema de disolventes CH ₂ Cl ₂ /Bn/MeOH (60:30:10)	64
3.13	Comparación de los perfiles cromatográficos de apiaceas sudamericanas, apiaceas mexicanas y metabolitos puros revelados con ácido Fosfomolibdico	66
3.14	Comparación de los perfiles cromatográficos de apiaceas sudamericanas, apiaceas mexicanas y metabolitos puros sin revelar	67
3.15	Actividad de los extractos de <i>Eryngium monocephalum</i> contra parásitos del género <i>Leishmania</i>	70
3.16	Actividad de los extractos de <i>Eryngium carlinae</i> contra parásitos del género <i>Leishmania</i>	70
3.17	Actividad de los extractos de <i>Eryngium deppeanum</i> contra parásitos del género <i>Leishmania</i>	71
3.18	Actividad de los extractos de <i>Eryngium proteiflorum</i> contra parásitos del género <i>Leishmania</i>	71
3.19	Perfiles cromatográficos de los extractos activos contra las cepas de <i>Leishmania</i>	72
3.20	Bioautografía de <i>E. monocephalum</i>	76
3.21	Bioautografía de <i>E. deppeanum</i>	77
3.22	Bioautografía de <i>E. carlinae</i>	78
3.23	Bioautografía de <i>E. proteiflorum</i>	79
3.24	Bioautografía de <i>S. liberta</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS

An
ác.
TSA
PDA
ØH
CCD
°C
ha
h
Km
Km²
MeOH
mg
mL
µg
µl
msnm
mm
nm
Rf
v/v
DPPH

Ácetona
Ácido
Agar soya tripticaseína
Agar papa y dextrosa
Benceno
Cromatografía en Capa delgada
Grados centígrados
Hectárea
Horas
Kilómetro
Kilómetro cuadrado
Metanol
Miligramo
Mililitro
Microgramo
Microlitro
Metros sobre nivel del mar
Milímetros
Nanómetro
Relación de frentes
Volumen a volumen
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

RESUMEN

El estudio filogenético de la familia Apiaceae permitió establecer que las especies de Apiaceas mexicanas mas cercanamente relacionadas con las Apiaceas sudamericanas pertenecientes a los géneros *Azorella*, *Laretia*, *Bolax* y *Mulinum*, se ubican dentro de los géneros *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella*. De las especies seleccionadas, *E. carlinae*, *E. proteiflorum*, *E. monocephalum*, *E. deppeanum*, *S. liberta* y *C. asiatica*, solo los extractos de raíz de *E. carlinae*, *E. proteiflorum* y *E. deppeanum* presentaron actividad leishmanicida importante. Por otro lado, los extractos de tallos y hojas de *C. asiatica* resultaron ser activos contra *T. cruzi*, mientras que los extractos de inflorescencias de *E. deppeanum*, así como los extractos de frutos de *S. liberta*, revelaron una inhibición de hasta el 100% de los parásitos del género *Plasmodium*. Con respecto a la actividad antibacteriana, se observó que los extractos de inflorescencias y tallos y hojas de todas las especies del género *Eryngium*, al igual que los extractos de tallos y hojas y frutos de *S. liberta*, fueron activos contra *S. aureus*. Sin embargo, a pesar de las coincidencias en cuanto a la actividad biológica detectada, la comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos de las especies mexicanas con los correspondientes de las especies sudamericanas, mostró diferencias significativas en composición. Por otra parte, los resultados obtenidos mostraron que los géneros *Eryngium* y *Sanicula*, ubicados dentro de la subfamilia *Saniculoideae*, poseen perfiles químicos similares, en tanto que *C. asiatica*, ubicada dentro de la subfamilia *Hidrocotiloideae*, difiere en cuanto a su composición química con respecto a estos dos géneros.

INTRODUCCION

La búsqueda de constituyentes bioactivos, tomando en cuenta el conocimiento etnobotánico o etnomédico de las plantas, se basa en el uso tradicional de las mismas por las poblaciones indígenas. Esta estrategia ha sido exitosa en la identificación de fármacos útiles en la medicina moderna; sin embargo, en épocas recientes el uso de las clasificaciones filogenéticas basadas principalmente en las relaciones de parentesco entre las especies, ha adquirido particular interés en la búsqueda de metabolitos secundarios bioactivos (Harborne & Turner, 1984).

Los caracteres químicos utilizados dentro de las clasificaciones filogenéticas se conocen como metabolitos secundarios; éstos incluyen alcaloides, glucosinolatos, glicósidos cianogénicos, poliacetilenos, terpenoides, betalainas y flavonoides (incluyendo antocianinas). Estos metabolitos son estructuralmente diversos y a menudo funcionan como elementos de defensa contra predadores y patógenos, como agentes allelopáticos, o como atrayentes para la polinización y la dispersión de semillas (Judd *et al.*, 2002).

Los metabolitos secundarios han sido de particular interés para el desarrollo de un número importante de productos farmacéuticos tales como la vinblastina, la vincristina (obtenidas de *Catharanthus roseus* L.), el taxol (obtenido de *Taxus brevifolia* Nutt.) y la artemisinina (obtenida de *Artemisia annua* L.), entre otros (Ntoumi *et al.*, 2004; Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001). Asimismo, la búsqueda continua de metabolitos secundarios bioactivos ha conllevado al descubrimiento de moléculas activas con nuevos esqueletos carbonados obtenidos de diferentes familias botánicas; un ejemplo de lo anterior es la familia Apiaceae, la cual agrupa a los géneros sudamericanos

Azorella Lam., *Bolax* Comm. ex Juss., *Laretia* Gillies & Hook y *Mulinum* Pers., reconocidos productores de metabolitos novedosos poseedores de un número importante de actividades biológicas, incluyendo antiprotozoaria (Loyola *et al.*, 2001), antituberculosa (Wachter *et al.*, 1998), antiviral (Andel-Marik *et al.*, 1996), espermaticida (Morales *et al.*, 2003) y citotóxica (Mongelli *et al.*, 1997).

Tomando en cuenta la importancia de las plantas como fuentes de nuevos y mas eficientes fármacos, la aplicación de estudios filogenéticos permite simplificar la búsqueda de constituyentes bioactivos, dado que las relaciones de parentesco establecen que las plantas relacionadas desde el punto de vista filogenético, suelen producir metabolitos secundarios estructuralmente similares (Chan-Bacab, 2000).

Sin embargo, aun cuando los metabolitos secundarios tienden a ser específicos para ciertas especies, su cantidad y naturaleza varía ampliamente dependiendo de la distribución espacial y temporal de las especies cuya falta de homogeneidad puede deberse a la influencia de factores genéticos, ontológicos y ambientales (e. g., intensidad luminosa, estrés hídrico, temperatura y altos niveles de contaminación, entre otros) (Lambers, 2001; Trease *et al.*, 1991).

Con base en lo anterior, y dado que en México existe un número importante de especies vegetales pertenecientes a la familia Apiaceae, en la presente investigación se pretende evaluar el potencial de un grupo de Apiaceas mexicanas relacionadas filogenéticamente con especies sudamericanas pertenecientes a los géneros *Azorella*, *Laretia*, *Mulinum* y *Bolax*, como posibles fuentes de metabolitos bioactivos.

Bibliografía

Andel-Marlk, S.; Bastien, J.; Mahler, F. W.; Manfred, Q. J.; Andel-Malek, S.; Reinecke, G.; Robinson, E. W.; Yong-Hua, S.; Zalles-Asin, J. (1996) Drug leads from the Kallawaya herbalists of Bolivia. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. *Journal of Ethnopharmacology* **50**:157-166.

Chan-Bacab M. (2000) Estudio del efecto de la variabilidad geográfica sobre la actividad Leishmanicida, en poblaciones de *Urechites andrieuxii* Muell-arg. existentes en la península de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Chan-Bacab, M and Peña-Rodríguez L. M. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* **18**: 674-688.

Judd, S. W.; Campell, S. C.; Kellogg, A. E.; Stevens, F. P.; Donoghue, J. M. (2002) Plant Systematics A Phylogenetic Approach. Academic Press. USA. Pp 95-104.

Harborne, J. B.; Turner, B. L. (1984) Plant Chemosystematics. Academic Press, London, UK. Pp. 9-15.

Lambers, H.; Chapin, F. S.; Pons, L.T. (2000) Plant Physiological Ecology. Academic Press. Springer Verlag. Pp. 427-433.

Loyola, L. A.; Bórquez, J.; Morales, G.; San-Martin, A.; Darias, J.; Flores, N.; Giménez, A. (2004) Muliane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiparasitic activity. *Phytochemistry* **65**:1931-1935.

Loyola, L. A.; Bórquez, J.; Morales, G.; Araya, J.; González, J.; Neira, I.; Sagua, H.; San-Martín A. (2001) Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonicidal activities. *Phytochemistry* **56** (2):177-180.

Loyola, L. A.; Bórquez, J.; Morales, G.; Araya, J.; González, J.; Neira, I.; Sagua, H.; San-Martín, A. (2001) Azorellane diterpenoids from *Laretia acaulis* and its toxoplasmodicidal activity. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **46** (1):9-13.

Mongelli, E.; Desmarchelier, C.; Coussio, J.; Ciccía, G. (1997) Biological studies of *Bolax gummifera*, a plant of the Falkland Islands used as a treatment of wounds. *Journal of Ethnopharmacology* **56** (2):117-121.

Morales, P.; Kong, M.; Pizarro, E.; Pasten, C.; Morales, G.; Borquéz, J.; Loyola, L. A. (2003) Effect of Azorellanone, a diterpene from *Azorella yareta*, on human sperm physiology. *Journal of Andrology* **24** (3):364-370.

Ntoumi, F.; Djimde, A.; bacham, M.; Egwang, T. (2004) The importance and future of malaria research in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **71** (2):4-6.

Trease, G. E and W.C Evans. (1991) Farmacognosia. Doceava edición. Interamericana, México, Pp. 86.

Wachter, G. A.; Franzblau, S. G; Montenegro, G.; Suárez, E.; Fortunato, R. H.; Savedra, E.; Timmermann, B. N. (1998) A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. *Journal of Natural Products* **61** (7):965-968.

CAPITULO I

Antecedentes

1.1 Familia *Apiaceae*

La familia *Apiaceae* comprende aproximadamente 300 géneros, con un total de 2500 a 3000 especies las cuales se encuentran distribuidas en casi todo el mundo, particularmente en zonas templadas, siendo menos frecuentes en zonas tropicales donde crecen usualmente en ambientes montanos. Esta familia se encuentra dividida en tres subfamilias que presentan una distribución característica: la más antigua, *Apioideae*, tiene una distribución bipolar aunque se desarrolla principalmente en el hemisferio norte del Viejo Mundo; la *Saniculoideae*, también bipolar y mejor representada que la *Apioideae*, en el hemisferio sur; y la *Hidrocotiloideae*, representada predominantemente por un grupo en el hemisferio sur (Heywood, 1978).

La subfamilia *Saniculoideae* comprende, entre otros, al género *Eryngium* L., considerado como el género más grande y distintivo de esta subfamilia. El género *Eryngium*, esencialmente cosmopolita, comprende de 200 a 250 especies ampliamente distribuidas en las zonas tropicales y templadas de prácticamente todo el mundo. Otro de los géneros más distintivos de esta subfamilia es *Sanicula* L., constituido por aproximadamente 40 especies, el cual posee una amplia distribución con diferentes taxa localizados en mas de un continente (e.g., *S. europea* L. en Europa, Asia, y Africa, y *S. elata* Buch-Ham en Asia y Africa). Los distintivos frutos de *Sanicula* generalmente poseen espinas en gancho que promueven la dispersión animal y que probablemente son los responsables de la amplia distribución del género. De todas las especies del género *Sanicula*, únicamente *Sanicula liberta*, ocurre en el continente americano, encontrándose a altitudes de 1000 a 2000 metros desde Chihuahua, México, hasta Córdoba, Argentina (Vargas *et al.*, 1999; Standley *et al.*, 1966).

Dentro de la subfamilia *Hidrocotiloideae*, uno de los géneros más representativos es *Centella* L., un género que comprende alrededor de 24 especies localizadas principalmente en Sudáfrica; de este género, *Centella asiatica* es la única especie encontrada en América (Standley *et al.*, 1966).

1.2 Botánica, Ecología y Etnobotánica de las Apiaceas mexicanas en estudio

1.2.1 *Eryngium monocephalum* Cav. (Fig.1.1)

Nombre(s) comun(es): Chicalotl, Hierba del sapo, Xukurhi kokiri (Michoacán).



Figura 1.1 *Eryngium monocephalum* Cav.

Botánica y Ecología: Hierba de 55 cm a 1.20 m de altura, sus hojas son alargadas y puntiagudas, sus inflorescencias son de color verde, con presencia de brácteas espinosas. Originaria de México, habita en clima templado entre los 2400 y los 3900 msnm. Asociada a terrenos agrícolas y bosque mixto de pino-encino (Argueta *et al.*, 1994).

Etnobotánica: La infusión de hojas, administrada oralmente, se emplea contra el dolor estomacal y el mal de orín, mientras que las flores son empleadas contra la tos (Argueta *et al.*, 1994).

1.2.2 *Eryngium carlinae* Delar. (Fig.1.2)

Nombre(s) comun(es): Hierba del sapo, Kokixukurhi (purépecha), motita de sapo, estrellita, mosquitas, perejil del monte, cabezona.



Figura 1.2 *Eryngium carlinae* Delar.

Botánica y Ecología: Hierba que en época de floración llega a medir hasta 25 cm de altura. Sus hojas se encuentran colocadas en forma de roseta, son alargadas y presentan un borde dentado y espinoso, con apariencia de lanzas. Las flores nacen en varios tallos que terminan en grupos de flores numerosas, de color azul o violáceo. Planta originaria de México, se presenta en clima templado, entre 1700 y 2400 msnm, crece en terrenos de cultivo abandonados, a orilla de caminos y es común en vegetación perturbada de bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino (Argueta *et al*, 1994).

Etnobotánica: La parte aérea de la planta se utiliza en padecimientos del riñón. Además el té se usa contra la congestión del pecho, el dolor de espalda y el de huesos. La parte aérea es usada en lavados vaginales y punzadas en el oído. La planta completa hervida se usa para combatir algunas enfermedades venéreas y para casos de fiebre y prurito; se utiliza también para trastornos gastrointestinales, contra la inflamación y los dolores de

estómago e intestino, para la bilis y contra la mordedura de serpientes venenosas (Argueta *et al*, 1994).

1.2.3 *Eryngium proteiflorum* Delar. y *Eryngium deppeanum* Cham. & Schltldl. (Figs. 1.3 y 1.4).



Figura 1.3 *Eryngium proteiflorum* Delar.

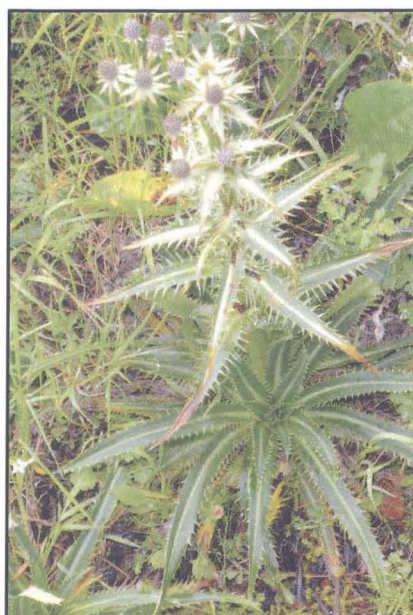


Figura 1.4 *Eryngium deppeanum* Cham. & Schltldl.

Botánica y Ecología: *E. proteiflorum* es una especie de aproximadamente 1m de altura, que presenta brácteas con inflorescencias de color verde que dan la apariencia de enormes flores, generalmente se originan tres de un mismo tallo. Esta especie presenta abundantes espinas que cubren toda la planta. Por su parte *E. deppeanum*, llega a medir hasta 1.5 m de altura y presenta numerosas brácteas, con apariencia de ramillete, hojas dentadas e inflorescencias con flores de color azul (Standley *et al.*, 1966). Ambas especies generalmente se encuentran en bosques de pino cerca de los 3000

msnm, en el caso de *E. proteiflorum*, y desde los 2000 msnm, en el caso de *E. deppeanum*.

Etnobotánica: No se detectaron antecedentes de uso medicinal para ninguna de las dos especies.

1.2.4 *Sanicula liberta* Cham. & Schltdl (Fig. 1.5).

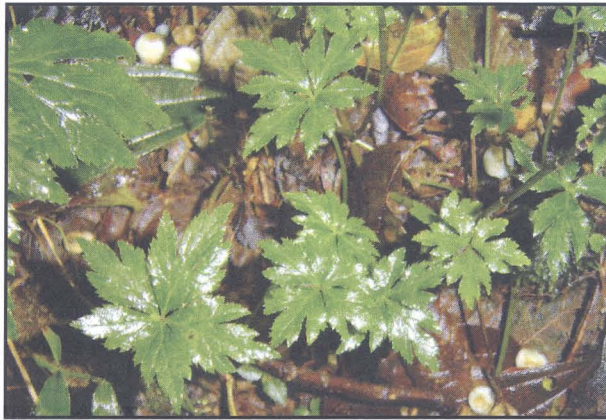


Figura 1.5 *Sanicula liberta* Cham. & Schlencht

Botánica y Ecología: Hierba perenne o bianual, ramificada, de aproximadamente 50 cm de altura, presenta hojas orbiculares a pentagonales, de 2.5 a 10 cm de diámetro, e inflorescencias con 8-15 flores de color blanco, amarillentas o blanco-verdosas. Esta especie es localizada comúnmente en nebliselvas a 900-1550 msnm (Standley *et al.*, 1966).

Etnobotánica: No se detectaron antecedentes de uso medicinal.

1.2.5 *Centella asiatica* (L.) Urban (Fig.1.6)

Nombre Nombre (s) comun(es) Hydrocotyle, Gota-Kola, Beng Da Wan, Ji Xue Cao.

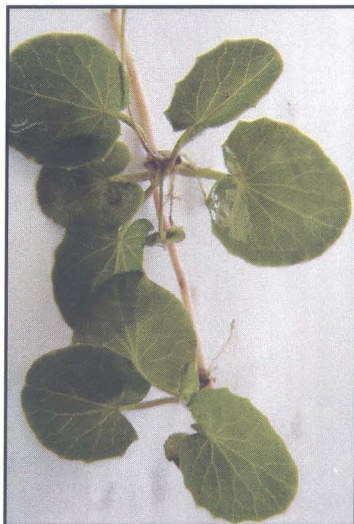


Figura 1.6 *Centella asiatica* (L.)

Botánica y Ecología: Hierba perenne, rastrera, con raíces en los nodos, hojas ovaladas de 2 a 10 cm de largo y de 0.8 a 9 cm de ancho, inflorescencias con 2 ó 3 flores blancas o matizadas de rosado. Común en lugares húmedos y bosques de pinos cercanos a la costa (Standley *et al.*, 1966).

Etnobotánica: Es utilizada contra la sífilis, el reumatismo, las enfermedades de tipo mental, la epilepsia, la histeria, la lepra, y las úlceras; asimismo, se emplea para curar el agotamiento físico y mental, la depresión, la diarrea, la cólera, las enfermedades de los ojos, los problemas de inflamación, el asma, la bronquitis, la tuberculosis, la hipertensión, la psoriasis, en el tratamiento de heridas y como cardiotónico (Matsuda *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 1999; Natarajan & Paily, 1973).

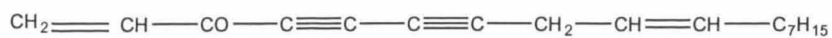
1.3 Estudios químicos y farmacológicos en apiáceas mexicanas (géneros *Eryngium*, *Sanicla* y *Centella*)

Una de las especies más estudiadas fitoquímica y farmacológicamente es *Centella asiatica* (L.) Urban; de esta especie se reportan saponinas triterpénicas pentaáclicas (contenido del 1 al 8%) como las responsables de la actividad biológica de esta especie; las principales saponinas de *C. asiatica* son el asiaticósido (éster del ácido asiático y un trisacárido) y el madecósido (éster del ácido madecásico y un trisacárido) (Inamdar *et al.* 1996). Otras saponinas minoritarias de *C. asiatica* incluyen al centellósido, al brahmósido, al brahminósido y a las centellosaponinas B, C y D (Matsuda *et al.*, 2001). La planta contiene también abundantes taninos (20-25%), aceites esenciales (0.1% de β -caridileno, *trans*- β -farneseno y germacreno D), fitoesteros (campesterol, sitosterol, estigmasterol), mucílagos, resina, aminoácidos libres (alanina, serina, aminobutirato, aspartato, glutamato, lisina y treonina), flavonoides (derivados de la quercetina y el kaempferol), un alcaloide (hidrocotilina), un principio amargo (vallerina), ácidos grasos (ácidos linoleico, linolénico, oleico, palmítico), y menos del 6% de los derivados triterpénicos totales, expresado como asiaticósido (Brinkhaus *et al.*, 2000).

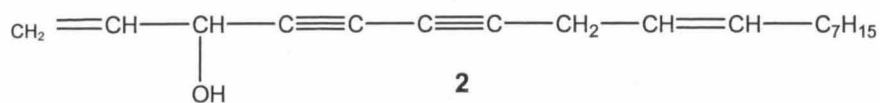
Por otro lado, el género *Eryngium*, pese al gran número de especies que lo componen, no ha sido exhaustivamente estudiado. Sólo una mínima parte de las especies descritas hasta ahora han sido objeto de algún tipo de investigación.

En los extractos radiculares de *E. campestre* se ha reportado la presencia de falcarinona (1), falcarinol (2) y un hidroxiacetato de falcarinona (3) (Bohlmann & Ziero, 1971). De la misma especie se ha obtenido aegelinol (4), aegesillina (5), grandivitina (6) y benzoato de aegelinol (7), considerados como derivados de cumarina, además de los glicósidos monoterpénicos del tipo ciclohexanona-3-(β -D-glucosidosiloximetil)-2,4,4-trimetil-2,5-ciclohexadien-

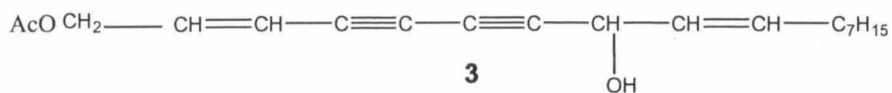
1-ona (**8**) y 3-(β -D-glucosidosiloximetil)-2,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-ona (**9**) (Erdelmeier & Sticher 1985, 1986).



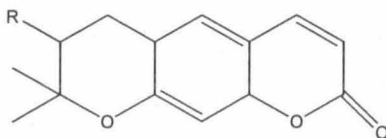
1



2

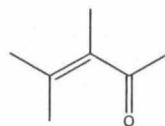


3

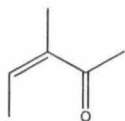


4. - R = H

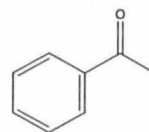
6. - R =

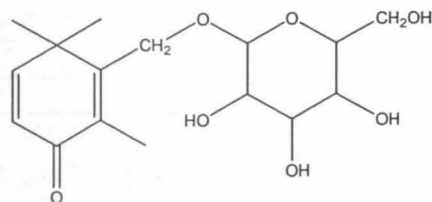


5. - R =

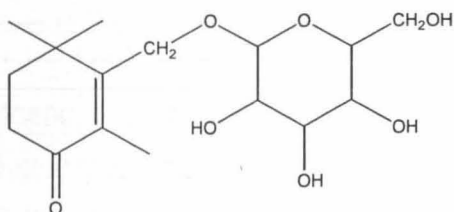


7. - R =





8



9

De las partes aéreas de *E. campestre* se han identificado astragalina, isoquercetina, isoramnetina, canferitrina, quercetina, rutina y diferentes glicósidos de kaempferol y quercetina (Kartnig & Wollf, 1993). Adicionalmente, se identificaron los ácidos cafeico, clorogénico, así como falcarinol (**2**), canferol y manitol (Hohmann *et al.*, 1997).

Por otra parte, el estudio fitoquímico de *E. maritimum* L. reveló la presencia de saponinas, triterpenos, flavonoides y tres ácidos orgánicos: pipécólico, tiglicico y angélico. A esta especie se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, posiblemente debido a algunos de estos metabolitos que actúan mimetizando esteroides o como estimuladores sobre las glándulas adrenales (Lisciani *et al.*, 1984).

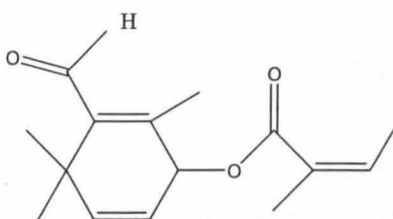
De la fracción hexánica de *E. foetidum* L. se aislaron un grupo de esteroides [colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol (componente

mayoritario 95%), clerosterol, sitosterol, 5-avenasterol, 5,24-estigmastadienol y 7-avenasteral] que, en conjunto, presentaron actividad antiinflamatoria en edemas inducidos de ratón y una potente reducción de la actividad mieloperoxidasa (García *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 2000). Adicionalmente, la alta capacidad de regeneración *in vitro* de *E. foetidum* L., a partir de raíces y hojas, lo convierten en una fuente potencialmente importante de los productos naturales anteriormente mencionados (Arockiasamy & Ignacimuthu, 1998).

Por otro lado, de los extractos de *E. creticum* Lam. una planta utilizada en tratamientos hipoglucemiantes en Israel, se identificaron diferentes metabolitos, incluyendo a la deltiona, la marmesina y el quercetol, además de diferentes esteroides, glicósidos y carbohidratos (Yahiv *et al.*, 1987; Al-khalil, 1994).

Para el caso de *E. heterophyllum* Eugelm, se han reportado efectos hipocolesterémicos, los cuales se atribuyen a la presencia de manitol, glucosa y β -sitosterol en la planta (Navarrete *et al.*, 1990).

Adicionalmente, se ha encontrado que la actividad alelopática mostrada por el extracto hexánico de las semillas de *E. paniculatum* Delar, contra *Abutilon theophrasti* Medic., se debe al angelato de 2,4,4-trimetil-3-formil-2,5-ciclohexadienilo (**10**) (Velasco-Negueruela *et al.*, 1998).

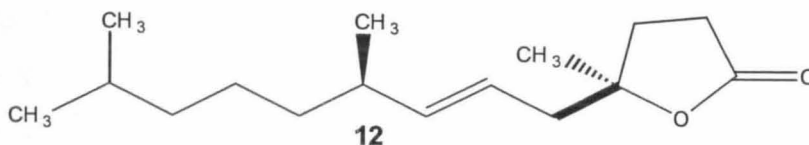
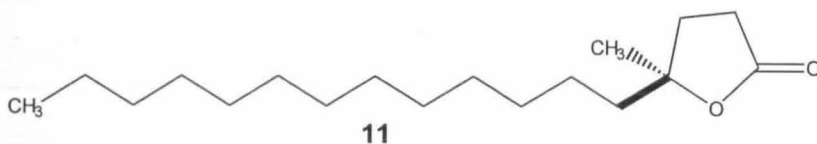


10

En los extractos radiculares de *E. agavifolium* Griseb, *E. alpinum* L., *E. amethystinum* L., *E. bromelifolium* Delar., *E. campestre* L., *E. caucasicum* Fisch, *E. coeruleum* LK., *E. giganteum* M. B., *E. planum* L. y *E. serbicum* Panc., se ha identificado la presencia de falcarinona (**1**) como metabolito común, además de algunos de sus derivados y ésteres terpénicos en concentraciones variables en cada una de estas especies (Bohlmann & Zdero, 1971).

La especie *E. ilicifolium* Lam, endémica de la Península Ibérica, mostró la presencia de un tigolato (50%), un angelato (17%) y un senecioato (33%) de marmesina, identificados tras su extracción con éter dietílico. Una saponificación metanólica posterior permitió la identificación de deltoina (Pinar & Galán, 1985).

Recientemente se reportó el aislamiento de dos γ -lactonas, 4-metiltridecenilutirolactona (**11**) y 4,8R,13-trimetil-6(Z)-enenonanebutirolactona (**12**), a partir del extracto metabólico de *Eryngium carlinae* Delar.; ambas lactonas poseen un efecto significativo antiespasmódico sobre las contracciones en el íleon de rata inducido por acetilcolina (Pérez & vargas, 2006).



Del género *Sanicula*, la especie más estudiada es *Sanicula europea* L.; el extracto de sus partes aéreas ha sido investigado por su actividad anti-VIH y de él se ha identificado una nueva saponina triterpénica, además de los ya conocidos ácidos rosmarínico y cafeico, obtenidos como componentes principales. De éstos, el ácido rosmarínico se ha identificado como el principal metabolito bioactivo (Nazlı *et al.*; Jacker & Hiller, 1997).

Se ha reportado también que los extractos de hojas y fracciones purificadas de *Sanicula europaea* L. inhiben la replicación del virus humano de parainfluenza tipo 2 (VIPH-2), sin ningún efecto tóxico contra las células Vero (Karagoz *et al.*, 1999).

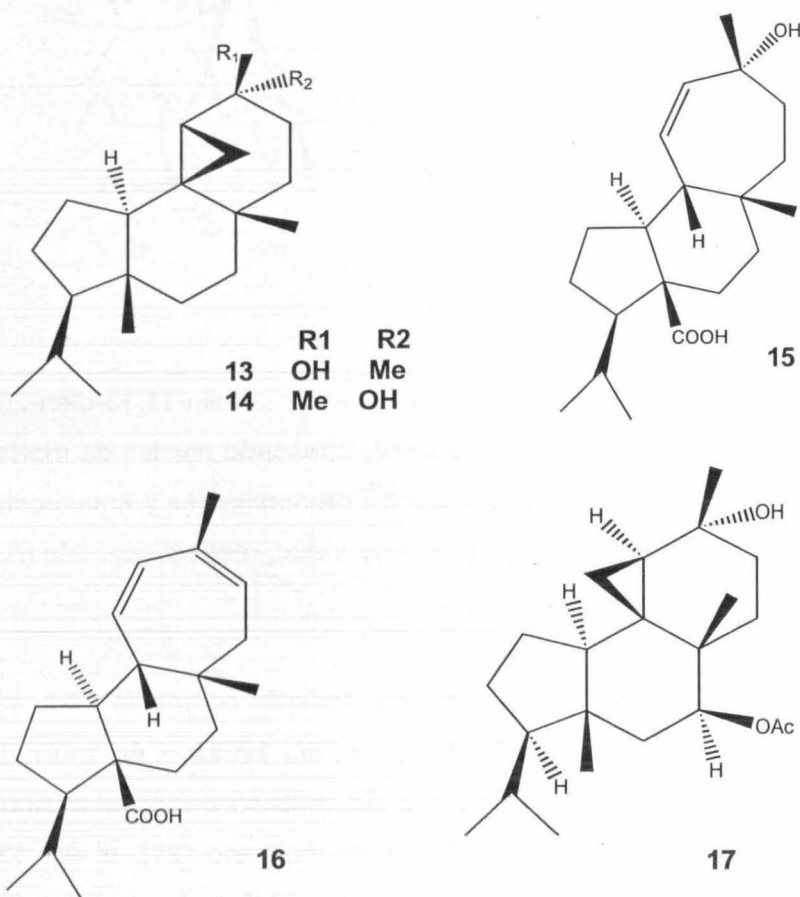
De los extractos metanólicos de *Sanicula elata* Ham. var. *chinensis* Makino, se han aislado once nuevas saponinas triterpénicas del tipo oleanano, además de las nuevas saponinas saniculasaponinas y la ya conocida saponina sandrosaponina (Matsushita *et al.*, 2004).

Finalmente, el extracto acuoso de *Sanicula graveolens* mostró actividad antioxidante en el bioensayo de decoloración del DPPH. La purificación biodirigida del extracto permitió el aislamiento e identificación de derivados del ácido cafeico y de flavonoides como la quercetina, como los principales metabolitos bioactivos de la especie (Viturro *et al.*, 1999).

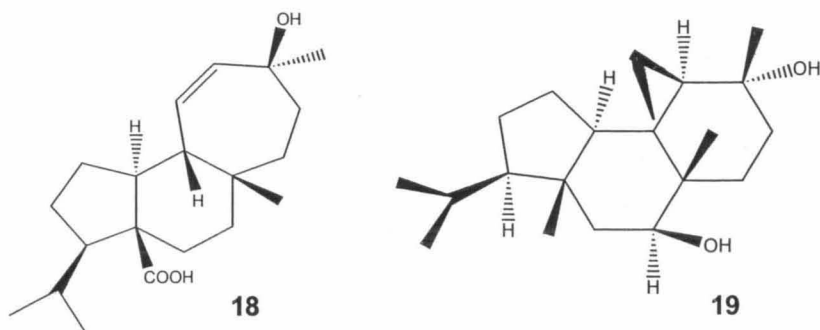
1.4 Estudios químicos y farmacológicos en apiáceas sudamericanas (géneros *Bolax*, *Laretia*, *Azorella* y *Mulinum*)

Los estudios químicos realizados a las especies sudamericanas pertenecientes a los géneros *Azorella*, *Laretia*, *Mulinum* y *Bolax* han revelado la presencia de diterpenos con esqueletos carbonados novedosos; entre los metabolitos de este tipo producidos por *Azorella yareta* Hauman se encuentran el 13β-hidroxiazurellano (**13**), el 13α-hidroxiazurellano (**14**), el ác.

mulinólico (**15**), el ác. mullin-11,13-dien-20-oico (**16**) y el azurellanol (**17**) (Loyola *et al.*, 2001).

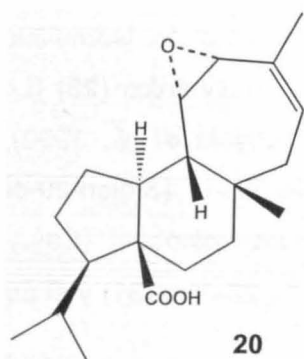


Por otro lado, del extracto de éter de petróleo de *Laretia acaulis* (Cav.) se han aislado, además del ác. mullinólico (**15**), el ác. mullin-11,13-dien-20-oico (**16**) y el azurellanol (**17**), el ác. 13-epimullinólico (**18**) y el derivado 7-deacetilazorellanol (**19**) (Loyola *et al.*, 2001). Cabe mencionar que los diterpenos **17** y **19** presentan un marcado efecto contra cepas de *Toxoplasma gondii*, causando niveles de mortalidad de entre el 85.0% y el 92.0% (Loyola *et al.*, 2001).

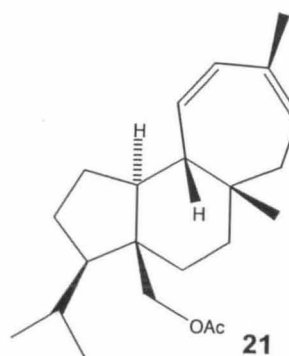


Adicionalmente, el azurellanol (**17**) y el á. mulin-11,13-dien-20-oico (**16**) han demostrado actividad leishmanicida, causando niveles de mortalidad de un 98% y un 75% al ser evaluados contra promastigotes y amastigotes de las cepas *Leishmania brasiliensis* y *Leishmania major*, respectivamente (Alberto Loyola, comunicación personal).

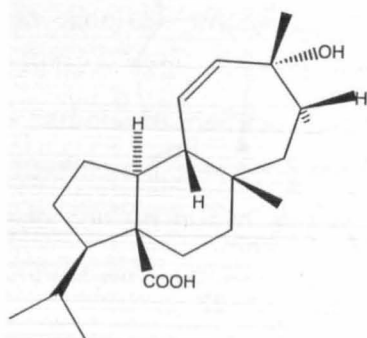
Del extracto de éter de petróleo de *Azorella compacta* Phil. se han aislado, además del azurellanol (**17**) (Loyola *et al.*, 1998), el á. mulin-11,13-dien-20-oico (**16**) (Loyola *et al.*, 1996), y el á. mulinólico (**15**), el mulinol (**20**) (Loyola *et al.*, 1998), el 17-acetoxi-11,13 dien-mulinano (**21**), el á. 13, 14-dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**22**) (Loyola *et al.*, 2004), el á. mulinico (**23**), el á. 11,12-epoxi-mulin-13-en-20-oico (**24**) (Loyola *et al.*, 1997), el á. mulin-12,14-dien-11-ona-20-oico (**25**) y el á. mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**26**) (Loyola *et al.*, 2004). De estos productos, los diterpenos **21** y **23** mostraron actividad antimalárica, inhibiendo en un 77% y un 60% el crecimiento de cepas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium berghei*, respectivamente (Alberto Loyola, comunicación personal); asimismo los productos **16** y **17** mostraron actividad contra *T. cruzi* (Cepa Brener) inhibiendo en un 60% el crecimiento de los protozoarios (Araya *et al.*, 2003).



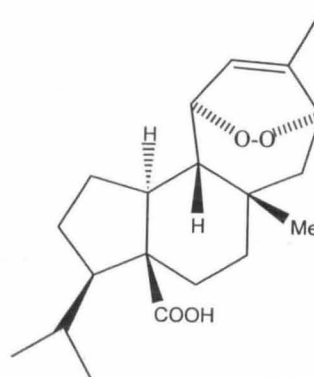
20



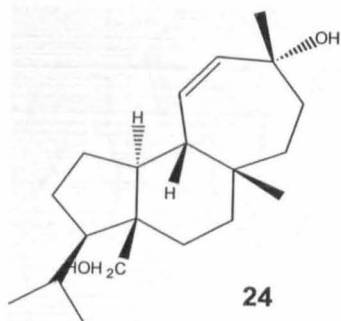
21



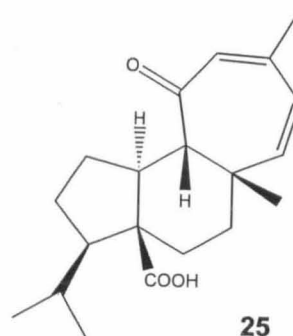
22



23

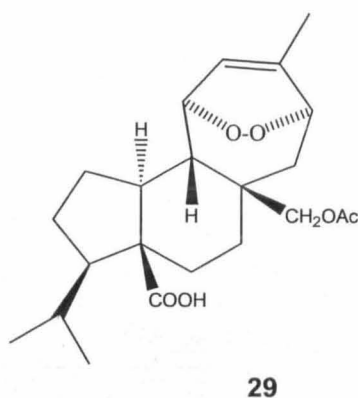
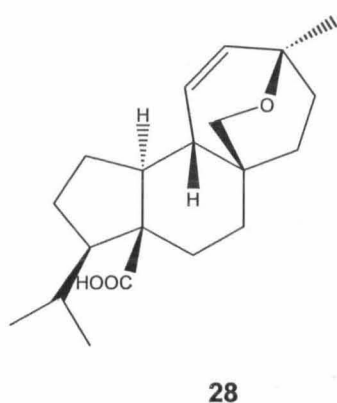
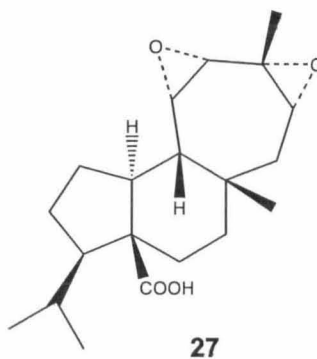
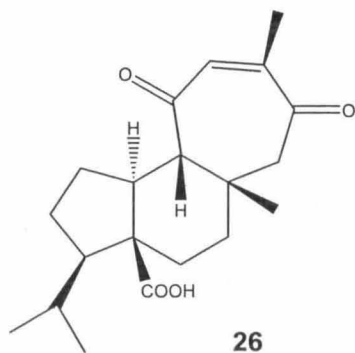


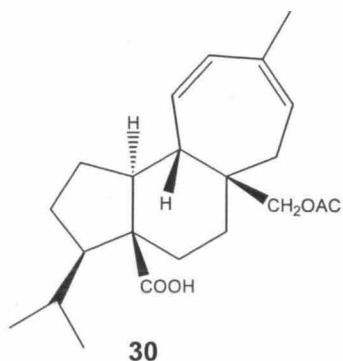
24



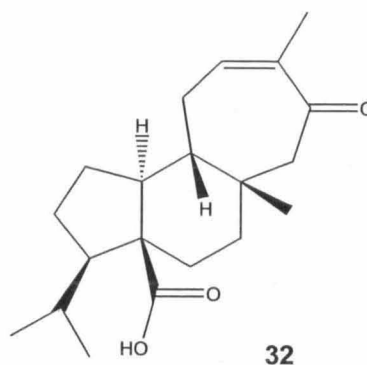
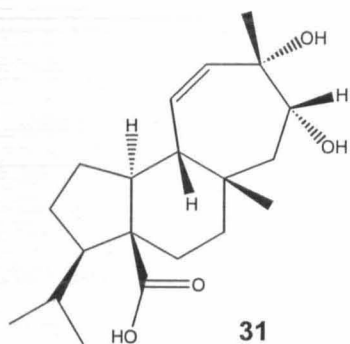
25

Por otra parte, del extracto de éter de petróleo de *Mulinum crassifolium* Phil., se aislaron seis diterpenoides del tipo mulinano: el ácido isomulínico (**27**), el ácido mulinólico (**15**) (Loyola *et al.*, 1996), el ácido mulinénico (**28**) (Loyola & Morales., 1991), el ácido 17-acetoximulínico (**29**) (Loyola *et al.*, 1990), el ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**16**) y el ácido 17-acetoximulin-11,13-dien-20-oico (**30**) (Loyola *et al.*, 1997); en tanto que de *Mulinum spinosum* (Cav.) se ha identificado el ácido mulin-11-ene-13- α ,14- α -dihidroxi-20-oico (**31**) y el ácido mulin-12-ene-14-ona-20-oico (**32**) (Chiaramello, 2003).

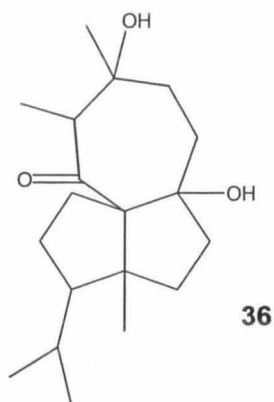
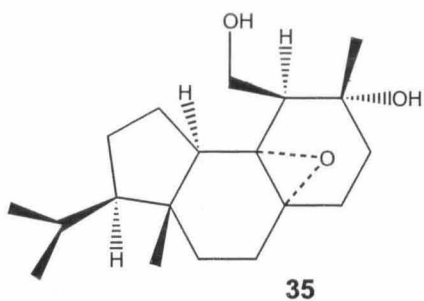
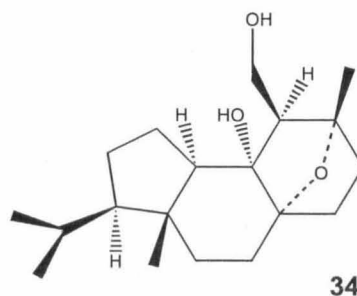
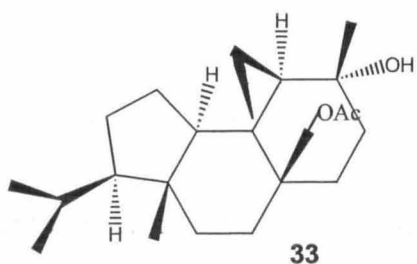




Finalmente, el estudio de *Azorella madreporica* Clos resultó en el aislamiento de un diterpeno de tipo azorellano, el 17-acetoxi-13 α -hidroxiazorellano (**33**), además de dos nuevos norditerpenoides con un esqueleto carbonado tricíclico de yaretano: 9,11-dihidroxi-8,13-epoxiyaretano (**34**), 11,13-dihidroxi-8,9-epoxiyaretano (**35**) y la madreporanona (**36**), un norditerpeno con un nuevo esqueleto carbonado de madreporano (Alberto Loyola, comunicación personal).



Además de la actividad antiprotozoaria mostrada por los diferentes diterpenos descritos hasta ahora, el extracto de *Azorella madreporica* Clos ha presentado también actividad antituberculosa (Wachter *et al.*, 1998), en tanto que el extracto de *Mulinum ulicinum* Kuntz ha demostrado poseer actividad antiviral al inhibir el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) (Andel-Marik *et al.*, 1996). Por otra parte, el extracto de *Bolax gummifera* (Lam.) Spreng se ha reportado con actividad antimicrobiana, citotóxica (Mongelli *et al.*, 2000, 1997) y espermaticida (Morales *et al.*, 2003).



1.5 La filogenia como una herramienta dirigida hacia la búsqueda de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

El principal objetivo de la filogenia es reconstruir la historia evolutiva de un grupo de organismos. Si se considera que esta historia evolutiva es única, entonces es posible pensar que cualquier fuente de información que se utiliza para reconstruirla debe llevar a la misma historia; razón por la cual, la filogenia posee un gran poder predictivo de particular utilidad dentro de las ciencias biológicas. La filogenia permite explorar la evolución de caracteres y dirigir la búsqueda de genes de interés, de agentes de control biológico, de plantas potencialmente cultivables y de metabolitos secundarios de interés biológico (Hillis *et al.*, 1991).

Downie (2000, 2001) ha logrado el mayor aporte filogenético con respecto a la familia Apiaceae, estableciendo las relaciones entre los miembros de la subfamilia Apioideae, mediante datos moleculares basados en secuencias de ADN obtenidas a partir de núcleo y de cloroplasto; estas secuencias han permitido examinar las relaciones evolutivas en 119 especies pertenecientes a 99 géneros de la subfamilia *Apioideae* y 28 especies de las subfamilias *Saniculoidae* e *Hidrocotiloideae*. Lo anterior ha permitido ubicar siete grandes linajes dentro de la subfamilia *Apioideae*, referidos como las tribus *Heretomorpheae*, *Bupleureae*, *Oenantheae*, *Pleurospermeae*, *Smyrnieae*, *Aciphylleae* y *Scandiceae*, confirmadas como monofiléticas.

Aun cuando, hasta ahora, no se tienen reportes de búsquedas de metabolitos secundarios de interés farmacológico producidos por especies de la familia Apiaceae utilizando estudios filogenéticos, existen trabajos que describen la aplicación de la distribución de componentes químicos en diferentes jerarquías taxonómicas, como apoyo a propuestas de clasificación,

incluyendo, en algunos casos, propuestas de una posible evolución de los caracteres químicos en estudio.

De esta manera, se ha analizado la distribución de fenilpropanos como la miristicina, reportada por primera vez en tres especies [*Daucus glochidiatus* (Labill.) Fisco., Mey. & Lallemont., *Pseudorlaya pumila* (L) y *P. minuscula* (Pau & Font Quer)] de la tribu Caucalideae, que ocurre en la tribu Peucedaneae y en siete géneros de la tribu Apieae, incluyendo *Pastinaca* L., *Levisticum* Hill., *Anethum* L., *Foeniculum* Mill., *Apium* L., *Daucus* L. y *Ligusticum* L., (Harborne *et al*, 1969).

Por otro lado, se ha analizado la presencia de sulfatos de flavonoides en 250 taxa representativos de la familia *Apiaceae* encontrándose presentes en los géneros, *Ammi* L., *Daucus*, y *Oenanthe* L. En la especie *Ammi visnaga* L., la presencia de quercetina, rhamnicitrina, rhamnetina e isorhamnetina-3-sulfato, permitió distinguirla de la especie *A. majus* L., que carece de estos metabolitos. Por otra parte, en *Daucus carota* L., se reportó la presencia de 7- y 4-sulfatos de luteolina, considerándose estos dos caracteres como polimórficos. Finalmente, en *O. stolonifera* (Roxb.), se encontraron isorhamnetin-3-sulfato, quercetina-3-sulfato y luteolina-7-sulfato (Jeffrey *et al.*, 1976).

Asimismo, se han realizado estudios sobre los productos fenólicos en diferentes géneros de la familia *Apiaceae*, encontrándose la presencia de flavonoles y flavonas, principalmente. Los flavonoles se encontraron presentes en todas las especies de los géneros examinados incluyendo *Carum* L., *Eryngium* L., *Hydrocotyle* L., *Peucedanum* L., *Pimpinella* L. y *Sanicula* L., mientras que las flavonas se encontraron presentes en *Chaerophyllum* L., *Conopodium* W.D.J. Koch y *Torilis* Adans; estos resultados permitieron

concluir que las flavonas son encontradas en taxa que se consideran más especializados o avanzados (e.g. *Daucus*, *Torilis*), mientras que los flavonoles predominan en géneros menos avanzados (e.g. *Hydrocotyle*), sugiriendo al mismo tiempo que el reemplazo de flavonoles por flavonas tiene un significado evolutivo dentro de la familia. En los géneros analizados en donde no se encontró la presencia de estos metabolitos, las diferencias pueden ser relacionadas con características de tipo morfológico, e.g. la única especie (*O. fistulosa* L.) de las once especies del género *Oenanthe*, que mostró la presencia de flavonas en lugar de flavonoles en sus hojas, presenta una morfología floral altamente especializada. A nivel subfamilia, la presencia de flavonas separa a las Apioideae de las otras dos subfamilias. Dentro de las Apioideae, la presencia de flavonas varía dependiendo de las tribus; en la tribu Peucedaneae sólo se han detectado en una de 46 especies, mientras que en la tribu Dauceae son más comunes en siete de once especies, y se les considera predominantes en la tribu Caucalineae (21 de 23 especies) (Crowden, 1969).

Con respecto a la subfamilia Apioideae, se ha reportado que ésta posee una gran cantidad de metabolitos secundarios, siendo algunos de ellos considerados como constituyentes químicos generales, sino es que universales, dentro de la subfamilia. Estos metabolitos incluyen poliacetilenos, mono y triterpenos, y los oligosacáridos raros apiosa y umbelífera. Los componentes químicos que tienen una distribución restringida dentro de la subfamilia incluyen sesquiterpenlactonas, alcaloides, lignanos, 2-metil-cromonas, flavonoides y fenilpropanos. Adicionalmente, las especies de esta subfamilia son especialmente ricas en diversidad estructural de coumarinas, incluyendo coumarinas simples, dihidrofurancoumarinas, dihidropirancoumarinas, pirancoumarinas y furancoumarinas; estos dos últimos grupos de metabolitos ocurren en dos formas estructurales: lineales y

angulares. Deborah *et al.* (1999) analizó la presencia de estos constituyentes en 49 especies de la subfamilia Apioideae encontrando coumarinas simples en los géneros *Ferula* L., *Crithmum* L., *Carum*, *Falcaria* Fabr., *Scandix* L., *Smyrniium* L., *Ligusticum*, y *Heteromorpha* Cham. & Schltldl., y furanocoumarinas lineales en *Angelica* L., *Conium* L., *Pimpinella*, *Ammi* L., *Apium*, *Aegopodium* L., en tanto que en los géneros *Heracleum* L., *Pastinaca* y *Zosima* Phil., se encontraron tanto coumarinas lineales como angulares, además de la esporádica ocurrencia de ambas dihidrospiranocoumarinas en tres especies de *Angelica* L., *Seseli* L., *Capnophyllum* Gaertn. y *Anethum* L. y de piranocoumarinas angulares en *Foeniculum* Mill y *Apium*.

Cabe mencionar que las furanocoumarinas angulares son formadas por una ruta biosintética distinta de las furanocoumarinas lineales, aunque ambos grupos muestran el mismo precursor biosintético que las coumarinas simples, la umbeliferona. En este caso las plantas que mostraron la presencia de furanocoumarinas angulares pertenecen a tres géneros (*Heracleum*, *Pastinaca* y *Zosima*), indicando que la biosíntesis de estos metabolitos es más reciente que la de las furanocoumarinas lineales; estas últimas se encontraron en especies pertenecientes a nueve géneros (*Angelica*, *Conium*, *Pimpinella*, *Ammi*, *Apium*, *Aegopodium*.), incluyendo *Heracleum*, *Pastinaca* y *Zosima*. Si se toma en cuenta que furanocoumarinas lineales como la xantotoxina son tóxicas para las larvas de los herbívoros, es posible que la ruta biosintética para la síntesis de furanocoumarinas angulares se haya originado como parte de una repuesta evolutiva de las plantas ante la presión selectiva de los herbívoros adaptados a las furanocoumarinas lineales (Berenbaum, 1978; Fenny, 1981).

1.6 Factores que influncian la producción de metabolitos secundarios

Existen tres factores principales que provocan que la cantidad y naturaleza de los constituyentes químicos de una especie vegetal dada, varíen ampliamente: el medio ambiente, el genotipo y la ontogenia. Un número importante de trabajos dirigidos al estudio de la influencia de estos factores sobre la composición química en las diferentes especies vegetales, ha dado como resultado el hallazgo de razas químicas o quimiotipos en diferentes taxa de plantas. Las razas químicas se han definido como poblaciones de una especie las cuales poseen fenotipos semejantes pero genotipos distintos, por lo que son idénticas en apariencia externa, pero diferentes en sus constituyentes químicos. Un ejemplo de lo anterior es *Thymus vulgaris* L., una especie que posee una amplia distribución en el mediterráneo y que es de gran interés por su contenido de alcoholes y fenoles mayoritarios, por lo que los quimiotipos se han designado tomando en cuenta el producto principal, e.g. 1,8-cineol, geraniol, linalol, α -terpineol, *trans*-tuyan-4-ol/terpinen-4-ol, carvacrol y timol. Estas razas químicas son de origen genético, ya que se ha podido establecer que una serie de pares de genes determinan la naturaleza no fenólica (dominante) o fenólica (recesiva) de la esencia. En el caso de la naturaleza fenólica de la esencia, otro par de genes determina si el producto fenólico principal es carvacrol (dominante) o timol (recesivo) (Vanhalen *et al.*, 1991; Chan-Bacab & Peña Rodríguez, 2001).

Entre los factores ambientales capaces de inducir variabilidad en la concentración de los metabolitos secundarios se encuentran la intensidad luminosa, el estrés hídrico, la temperatura, la altitud y el tipo de suelo, entre otros (Lambers *et al.*, 2000). Se ha reportado que la formación de productos orgánicos sulfurosos (COS y CS₂) en las raíces de *Leucaena retusa* Benth., aumenta cuando los niveles de sulfato son incrementados. Igualmente la concentración de cafeína en los brotes de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, es

más alta en plantas que crecen bajo altos niveles de irradiación solar, en tanto que los pinos en condiciones de estrés hídrico producen menores cantidades de resina, haciéndolos más susceptibles al ataque de escarabajos herbívoros. Por otro lado, en especies de *Festuca* L. y *Lolium* L., la concentración de alcaloides disminuye cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés hídrico, mientras que en *Nicotiana tabacum* L., bajo las mismas condiciones, el contenido de alcaloides aumenta (Lambers *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha observado que la altitud influencia la producción de alcaloides en especies de *Cinchona* L., aun cuando *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotzsch, crece adecuadamente a bajas altitudes, su producción de alcaloides en estas condiciones es prácticamente nula. De la misma manera durante la época de lluvias, se ha encontrado que las diferentes especies de *Cinchona* no sintetizan quinina (Vanhalen *et al.*, 1991).

Dado que hasta ahora no existen reportes sobre estudios basados en filogenia molecular para monitorear metabolitos secundarios activos en especies vegetales pertenecientes a la familia *Apiaceae*, y debido a que las especies sudamericanas son reconocidas por su producción de metabolitos secundarios con actividad relevante, en este trabajo se planteó la posibilidad de llevar al cabo una evaluación de la actividad biológica en extractos crudos de *Apiaceae* mexicanas relacionadas filogenéticamente con *Apiaceae* sudamericanas como posibles fuentes de metabolitos secundarios bioactivos.

1.7 Hipótesis

Los extractos obtenidos a partir de Apiaceas mexicanas relacionadas filogenéticamente con especies de los géneros sudamericanos *Azorella*, *Laretia*, *Mulinum* y *Bolax*, deben mostrar perfiles cromatográficos similares y/o metabolitos secundarios en común a los correspondientes de estas últimas, lo cual debe reflejarse en una actividad biológica similar.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de actividad biológica en extractos de especies mexicanas pertenecientes a la familia Apiaceae, que se relacionan filogenéticamente con las especies sudamericanas pertenecientes a los géneros *Azorella*, *Laretia*, *Bolax* y *Mulinum*.

1.8.2 Objetivos específicos

- Identificar las especies de la familia *Apiaceae* que se localizan en México.
- Analizar la información filogenética de la familia *Apiaceae*.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos orgánicos crudos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas.
- Comparar los perfiles cromatográficos entre las Apiaceas mexicanas y Apiaceas sudamericanas.

1.9 Bibliografía

Andel-Marlk, S., Bastien, J., Mahler, F.W., Manfred, Q.J., Andel-Malek, S., Reinecke, G., Robinson, E.W., Yong-hua, S., Zalles-Asin, J. (1996) Drug leads from the Kallawaya herbalists of Bolivia. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. *Journal of Ethnopharmacology* **50**: 157-166.

Al-Khalil, S. (1994) Phytochemistry of *Eryngium creticum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **8**: 73-75.

Araya, J.E., Neira, I., Silva, S., Mortara, R.A., Manque, P., Cordero, E., Sagua, H., Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., González, J. (2003) Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* **98**: 413-418.

Argueta, A.V., Cano, M.L., Rodarte, M.A. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. Instituto Nacional Indigenista 1ª ed. 405-781 págs.

Arockiasamy, S. and S. Ignacimuthu. (1998) Plant regeneration from mature leaves and roots of *Eryngium foetidum* L., a food flavouring agent. *Current Science* **75**: 664-666.

Berenbaum, M.R. (1978) Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science* **201**: 532-534.

Bohlmann, F. and Zdero, C. (1971) Terpene derivatives from higher plants, XII. On new terpene aldehyde esters from *Eryngium* species. *Chemische Berichte* **104**: 1957-1961.

Brinkhaus, B., Lindner, M., Shuppan, D., Hahn, E.G. (2000) Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* **7**: 427-448.

Chan-Bacab, M. and Peña-Rodríguez, L. M. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural product Reports* **18**: 674-688.

Chiaramello, A., Ardanaz, C., García, E., Rossomando, P. (2003) Mulinane-type diterpenoids from *Mulinum spinosum*. *Phytochemistry* **63**: 883-886.

Crowden, R. K., Harborne, J. B., Heywood, V.H. (1969) Chemosystematics of the Umbelliferae a general survey. *Phytochemistry* **8**: 1963-1984.

Deborah, S., Katz-Downie, C., Valiejo-Roman, E., Terentieva, A., Troitsky, M., Pimenov, B., Downie, S.R. (1999) Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* **216**: 16-195.

Downie, R.S., Katz-Downie, D., Watson, M.F. (2000) A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl6* and *rpoc1* intron sequences: Towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany* **87** (2): 273-292.

Downie, R.S., Plunkett, M.G., Watson, M.F., Spalik, K., Katz-Downie, D.S., Valiejo-Roman, M.C., Terentieva, I.E., Troitsky, V.A., Lee, J., Lahham, S., El-Oqlah, A. (2001) Tribes and CLADES within Apiaceae subfamily Apioideae: the contribution of molecular data. *Journal of Botanical* **58** (2): 301-330.

Erdelmeier, C.A. and Sticher, O. (1985) Coumarin derivatives from *Eryngium campestre*. *Planta Medica* **5**: 407-409.

Erdelmeier, C.A. and Sticher, O.A. (1986) Cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. *Phytochemistry* **25**: 741-743.

Fenny, P. (1981) Toxicity of angular furanocoumarins to swallowtail butterflies: escalation in acoevolutionary arms race? *Science* **212**: 927-929.

García, V.M., Sanz, J., Bernabé, M., Velasco-Negueruela, A. (1999) Necrodane (1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane) derivatives in *Lavandula luisieri*. New compounds in the plant kingdom. *Phytochemistry* **36**: 43-45.

Harborne, J.B., Heywood, V.H. and Williams, C.A. (1969) Distribution of myristicin in seeds of the Umbelliferae. *Phytochemistry* **8**: 1729-1732.

Heywood, V.H. (1978) Flowering plants of the world. 1st edition. Englewood Cliffs New Jersey Press.

Hillis, D.M., Moritz, C., Porter, C.A. and Baker, R.J. (1991) Evidence for based gene conversion concerted evolution of ribosomal RNA. *Science* **251**: 308-310.

Hohmann, J., Páll, Z., Günther, G., Máthe, I. (1997) Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*. *Planta Medica* **5**: 63-96.

Inamdar, P.K., Yeole, R.D., Ghogare, A.B., Souza, N.J. (1996) Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography* **742**: 127-130.

Jacker, H.J. and Hiller, K. (1976) The antiexudative effects of sapoinin-5 from *Eryngium planum* L. and *Sanicula europaea* L. *Pharmazie* **31**: 747-748.

Jeffrey, B., Harborne and King. (1976) Flavonoid Sulphates in the Umbelliferae. *Biochemical Systematics and Ecology* **4**: 111-115.

Karagoz, A., Arda, N., Goren, N., Nagata, K., Kuru, A. (1991) Antiviral activity of *Sanicula europea* L. Extracts on multiplication of human parainfluenza virus type 2. *Phytotherapy Research* **5**: 436-8.

Kartnig, T.H. and Wolf, J. (1993) Flavonoide aus den oberirdischen Teilen von *Eryngium campestre*. *Planta Medica* **4**: 59-285.

Lambers H., Chapin F.S., Pons L.T. (2000) Plant Physiological Ecology. Springer Verlag. Pp. 427-433.

Lisciani, R., Fattorusso, E., Surano, V., Cozzolino, S., Giannattasio, M., Sorrentino, L. (1984) Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of Ethnopharmacology* **12**: 263-270.

Loyola, L.A., Morales, G., De La Torre, M., Pedreros, S., Rodríguez, B. (1990) 17-Acetoxyulinic acid, a rearranged diterpenoids from *Mulinum crassifolium*. *Phytochemistry* **29** (12):3950-3951.

Loyola, L.A. and Morales, G. (1991) Mulinenic acid a rearranged diterpenoid from *Mulinum crassifolium*. *Journal of Natural Products* **54** (5):1404-1408.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1996) Diterpenoids from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* **44** (4):649-651.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1996) Mulinolic acid, a diterpenoid from *Mulinum crassifolium*. *Phytochemistry* **43** (1):165-168.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1997) Mulinol, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* **45** (7): 465-1467.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1997) A new diterpenoide from *Mulinum crassifolium*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **42**: 311-315.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1998) Azorellanol: a diterpenoid with a new Carbon Skeleton from *Azorella Compacta*. *Tetrahedron* **54**: 15533-15540.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (1998) 11, 12-epoxi-mulin-13-en-20-oic acid, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* **49** (4):1091-1093.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., Araya, J., González, J., Neira, I., Sagua, H., San-Martín, A. (2001) Azorellane diterpenids from *Laretia acaulis*, and its toxoplasmodicidal activity. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **46**: 9-13.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., Araya, J., González, J., Neira, I., Sagua, H., San-Martín, A. (2001) Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry* **56** (2):177-180.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A. (2001) Mulinane-type diterpenoids from *Laretia acaulis*. *Phytochemistry* **53** (8): 961-963.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A., Darías, J., Flores, N., Giménez, A. (2004) Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *Phytochemistry* **65**: 1931-1935.

Matsuda, H., Morikawa, T., Ueda, H., Yosikawa M. (2001) Medicinal foostuffs XXVII. Saponins constituents of gotu kola: structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides centellasaponins B, C, and D, from *Centella asiatica* cultivated in Sri Lanka. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **49**: 1368-1371.

Matsushita, A., Miyase, T., Noguchi, H., Vander, V.D. (2004) Oleanane saponins from *Sanicula elata* var. *chinensis*. *Journal of Natural Products* **3**: 377-83.

Mongelli, E., Pampero, S., Coussio, J., Salomon, H., Ciccía, G. (2000) Citotoxic and DNA interaction activities of extracts from medical plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* **7**: 45-151.

Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J., Ciccía, G. (1997) Biological studies of *Bolax gummifera*, a plant of the Falkland Islands used as a treatment of wounds. *Journal of Ethnopharmacology* **56** (2): 117-121.

Morales, P., Kong, M., Pizarro, E., Pasten, C., Morales, G., Borquéz, J., Loyola, L.A. (2003) Effect of Azorellanone a diterpene from *Azorella yareta*, Huaman, on Human Sperm Physiology. *Journal of Andrology* **24** (3): 364-370.

Natarajan, S. and Paily, P. (1973) Effect of topical *Hydrocotyle asiatica* in psoriasis. *Indian Journal of Dermatology* **18** (4):82-85

Navarrete, A., Niño, D., Reyes, B., Sixtos, C., Aguirre, E., Estrada, E. (1990) On the hypocholesteremic effect of *Eryngium heterophyllum*. *Fitoterapia* **61**: 182-184.

Nazlı, A., Nezhun, G., Avni, K., Thitima, P., John, M., Sheng-Xiang, P. and Geoffrey, A.C. (1997) Saniculoid N from *Sanicula europaea* L. *Journal of Natural Products* **60**: 1170-1173.

Pérez-Gutiérrez, R.M. and Vargas-Solís, R. (2006) γ -lactone isolated from methanol extract of the leaves of *Eryngium carlinae* and their antispasmodic effect on rat ileum. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **5**: 51-56.

Pinar, M. and Galan, M.P. (1985) Coumarins from *Eryngium ilicifolium*. *Journal of Natural Products* **48**: 853-854.

Shukla, A., Rasik, A.M. and Dhawan, B.N. (1999) Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytotherapy Research* **13** (1):50-54

Standley P.C. and L. Williams. (1996) Flora de Guatemala. 24: part VIII. Published by Chicago Natural History Museum.

Vargas, P., Bruce, G., Lincoln, C. (1999) A Phylogenetic Study of *Sanicula* sect. *Sanicoria* and S. sect. *Sandwicensis* (Apiaceae) Based on Nuclear rDNA and Morphological Data. *Systematic Botany* **24** (2):228-248.

Vanhallen, M., Lejoly J., Hanocq M and L Molle. (1991) Climatic and Geographical Aspects of Medical Plant Constituents. In the Medical Plant Industry (Wijesekera, R.O.B., ed.), pp. 59-76. CRC Press, Florida.

Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Palá-Paúl, J., Camacho, A., Fernández, A.M., Fernández-López, C., Altarejos, J. (1998) Chemical

composition of the essential oils from the aerial parts of *Bupleurum ium* Lam. *Journal of Essential Oil Research* **10**: 9-19.

Vituro, C., Molina, A., Schmeda-Hirschmann, G. (1999) Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). *Phytotherapy Research* **5**: 422-452.

Wachter, G.A., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suárez, E., Fortunato, R.H., Savedra, E., Timmermann, B.N. (1998) A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. *Journal of Natural Products* **61** (7): 965-968.

Wolfe, E.A., Sherwood, G.A., Mitchell, K.A., Browne, M.P. (2000) Antiinflammatory and analgesic properties from the stems of *Eryngium foetidum* (Shadow Benny). *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 220th Ched-127.

Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D. (1987) Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, **19**: 145-151.

CAPITULO 2

Materiales y Métodos

2.1 Evaluación de la información filogenética de la familia *Apiaceae*

La búsqueda bibliográfica relacionada con la filogenia de la familia *Apiaceae* se realizó con la colaboración del Dr. Stephen Robert Downie del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign. En este contexto se eligió la hipótesis más actual sobre las relaciones filogenéticas del grupo, la cual sirvió en primer lugar para dirigir y ubicar los géneros sudamericanos en estudio (*Bolax*, *Laretia*, *Molinum*, *Azorella*), y posteriormente para identificar las especies mexicanas mas cercanamente relacionadas a dichos géneros.

2.2 Ubicación geográfica de *Apiaceas* mexicanas

La distribución geográfica de los géneros *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella* fue establecida a partir de los datos de ubicación proporcionados por el Herbario del Instituto de Ecología, A.C., de la ciudad de Xalapa, Veracruz y del Herbario del CICY.

2.3 Sitios de colecta del material vegetal

Las especies *E. carlinae*, *E. monocephalum*, *E. deppeanum*, *E. proteaeflorum* y *S. liberta*, fueron identificadas y colectadas tomando en cuenta los datos de ubicación proporcionados por el herbario del Instituto de Ecología, A.C., en tanto que *C. asiatica* se ubicó y colectó con base en los datos proporcionados por el herbario del CICY.

2.3.1 Cofre de Perote

El Cofre de Perote se encuentra ubicado en los estados de Puebla y Veracruz, entre las coordenadas geográficas extremas: 18°37'12" a 19°56'24" LN y 96°48'00" a 97°45' 38" LO, y cuenta con una extensión de 11,700 ha (Fig.2.1).

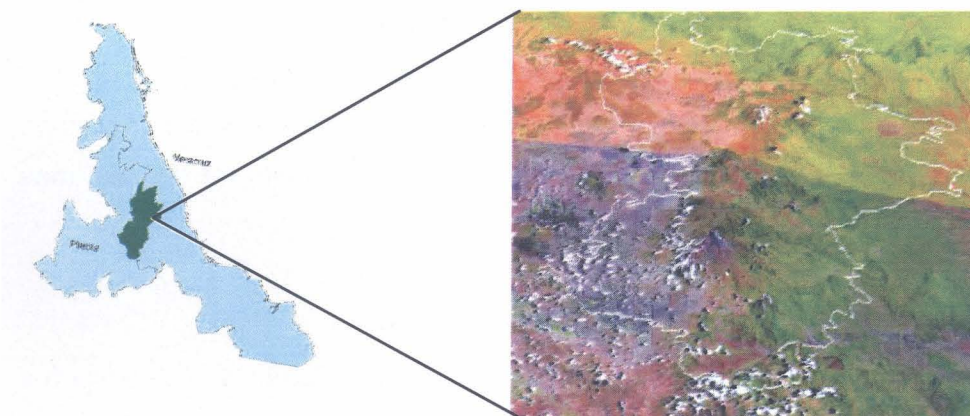


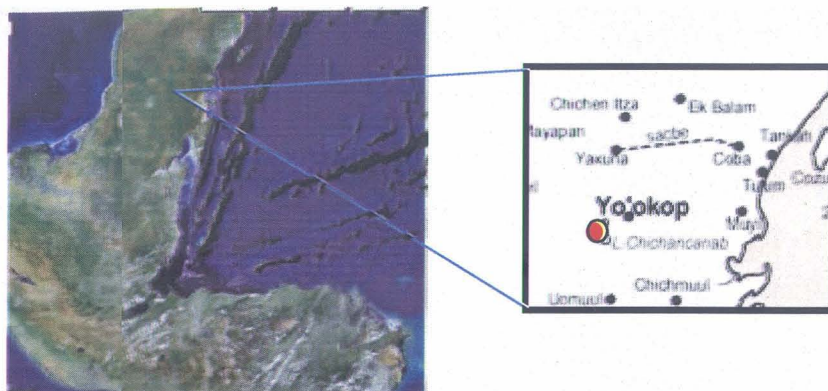
Figura. 2.1 Ubicación del Cofre de Perote.

2.3.2 Municipio de Acajete

El Municipio de Acajete se ubica a orillas del río de la Joya Chica a 1 Km al sur de dicho poblado y 1 Km al sureste de la joya, 19°35'27" N, 97°01'28" W.

2.3.3 Laguna de Chichancanab

La laguna de Chichancanab, con una extensión de 627.88 km², se ubica entre los estados de Yucatán y Quintana Roo a una latitud de 20°01'37" - 19°42'14" N y una longitud de 88°51'25" - 88°34'40" W. (Fig.2.2) (Padilla *et al.*, 1992).



Fira 2.2 Ubicación de la Laguna de Chichancanab

La identificación del material vegetal se llevó al cabo en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C. en la ciudad de Xalapa, Ver. y en el Herbario del CICY. De cada especie colectada se preparó un ejemplar de herbario, el cual fue depositado en el Herbario del CICY (Tabla 2.1).

Tabla 2. Ubicación de los ejemplares de herbario.

Colector (es)	Especie
J. L. Lajonigro & C. Guizar G 1698 (CICY)	<i>Eryngium carlinae</i> Delar.
J. Lajonigro & C. Guizar G 1689 (CICY)	<i>Eryngium</i> <i>monocephalum</i> Cav.
J. Lajonigro & C. Guizar G 1713 (CICY)	<i>Eryngium</i> <i>deppeanum</i> Cham. & Schltdl.
J. Lajonigro & C. Guizar G 1714 (CICY)	<i>Eryngium</i> <i>proteiflorum</i> Delar.
J. Lajonigro & C. Guizar G 1718 (CICY)	<i>Sanicula libertia</i> Cham & Schltdl.
G. Carnevali, F. May Pat, C. Guizar G & L. M. Peña R 7049 (CICY)	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.

2.4 Preparación y extracción del material vegetal

El material vegetal fue separado en raíz, tallo y hojas e inflorescencias y brácteas y sometido a un proceso de secado en una estufa a 50 °C durante 72 h. El material seco fue molido en un Molino Granulador Pagani de 5 HP con una malla de 6 mm de diámetro y extraído tres veces con etanol a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, el disolvente fue evaporado a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi 461, hasta la obtención del extracto orgánico crudo correspondiente. Para evaporar volúmenes pequeños de disolventes se empleó un flujo de nitrógeno y/o una bomba de alto vacío (Labconco High Vacuum Puma, modelo E2m5).

2.5 Comparación de los perfiles cromatográficos entre Apiaceas mexicanas y Apiaceas sudamericanas

La comparación de perfiles cromatográficos se llevó al cabo utilizando los extractos de las especies mexicanas, de las especies sudamericanas y los metabolitos secundarios puros obtenidos de estas últimas. Para ello, las muestras de cada extracto fueron disueltas al 1% con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (70:30, v/v) y aplicadas en placas cromatográficas (Merck 60 DC Alufolien) con ayuda de un capilar; la elución se realizó en una cámara de vidrio utilizando mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Bn}/\text{MeOH}$ (60:30:10); $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5); $\text{Bn}/\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ (80:10:10) como sistemas de disolventes. Para visualizar los cromatogramas éstos se sumergieron en una solución de ácido fosfomolibdico, en ácido sulfúrico al 5%, se secaron y se calentaron suavemente con una pistola de aire (Pamran modelo HJ 300), hasta la aparición de las manchas.

2.6 Evaluación de la actividad biológica en extractos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas

2.6.1 Actividad antiprotozoaria

Los diferentes extractos orgánicos crudos fueron evaluados contra cepas de *P. falciparum*, *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en el laboratorio de Quimioterapia Experimental, del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés en La Paz, Bolivia por Grace Ruíz Pinell y Efraín Salamanca, siguiendo el protocolo reportado por Chataing *et al.*, (1998).

2.6.1.1 Actividad contra *L. mexicana*

Para la evaluación contra la cepa de *L. mexicana* se trabajó en colaboración con el M. en C. Manuel Chan Bacab del Programa de Corrosión del Golfo de México de la Universidad Autónoma de Campeche. La evaluación se llevó al cabo utilizando promastigotes de las cepas Indre LDL-003 (PC) e Indre LDL-036 (GS), cultivadas en medio Schneider, suplementado con suero fetal bovino al 5% e incubadas a 26 °C. Los extractos orgánicos crudos fueron disueltos a una concentración de 2 mg/mL en DMSO al 0.5% y diluídos en medio líquido a una concentración de 400 µg/mL; 100 µl de esta disolución fueron colocados en cada pozo de una microplaca de titulación y se combinaron con 100µl de medio de cultivo (concentración final de extracto: 200µg/ mL) conteniendo 1×10^5 parásitos. La placa fue incubada a 25°C durante 72 h. Como control positivo se utilizó pentamidina a una concentración de 5 µg/mL. La actividad de las muestras fue evaluada de manera cualitativa por observación directa de cada pozo, en un microscopio de fase invertida, utilizando los siguientes parámetros:

- 0 Parásitos con movimiento igual al control sin extracto
- + Parásitos móviles y algunos muertos
- ++ Parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles
- +++ Todos los parásitos muertos, actividad igual a la pentamidina.

2.6.2 Actividad antibacteriana

El bioensayo se llevó al cabo utilizando el método de difusión en disco de papel-agar propuesto por Bauer (1966). Las cepas utilizadas fueron *Bacillus subtilis* (ATCC-6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6536), *Erwinia carotovora* (ATCC 138), *Xanthomona campestris* (ATCC 10547) y *Candida albicans* (ATCC-10231). Los extractos orgánicos crudos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas fueron disueltos a una concentración final del 4% y de esta disolución se aplicaron 12.5 µL en discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 1 (500 µg de extracto por disco).

Las cepas microbianas fueron primero cultivadas en cajas con medio TSA durante un período de 18 a 24 h. De cada cepa a evaluar se tomó una muestra representativa y se colocó en un tubo con disolución salina previamente esterilizada, hasta obtener una turbidez igual a la del tubo 0.5 NTU (nephelometric turbidity units) del Nefelómetro de McFarland (Forbes, 2002) (concentración aproximada de 1.5×10^8 cel/mL). La suspensión bacteriana fue aplicada en placas de TSA con ayuda de un hisopo estéril, procurando distribuir el inóculo de manera homogénea sobre la superficie de la placa; la placa se dejó reposar durante 5 min y enseguida se colocaron sobre la superficie los discos previamente impregnados con los extractos. Las placas fueron incubadas durante un período de 12 a 24 h a 37 °C y la actividad se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición en mm. Como controles positivos se utilizaron amikacina (0.5 µg/µL por disco) y Neomicol (1 µg/µL por disco). Como control negativo se utilizaron discos

previamente impregnados con metanol. Todos los bioensayos fueron realizados por triplicado. Cabe mencionar que aunque *C.albicans* es un hongo, la metodología a seguir para su análisis es la misma que se lleva a cabo para el análisis de bacterias, por ello fue colocada dentro de este apartado.

2.6.2.1 Bioautografía

Esta técnica se llevó al cabo siguiendo el método de Hamburger (1987), utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6536) como organismo de prueba. Para este bioensayo, los extractos orgánicos crudos fueron disueltos al 1% con metanol y aplicados en placas cromatográficas de gel de sílice (G₆₀ EM Merck). Los cromatogramas fueron eluidos utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/An (95:5) como fase móvil. Después de la elución, los cromatogramas fueron secados hasta eliminar el disolvente. Una suspensión de *S. aureus* fue preparada en solución salina a una concentración aproximada de 1.5×10^8 cel/mL (por comparación con el Nefelómetro de McFarland), la cual fue utilizada para cubrir de manera homogénea el cromatograma. Como control positivo se utilizó Amikacina al 0.5%, la cual fue aplicada después de la elución del cromatograma. La placa con el cromatograma impregnado fue incubada a 36°C durante 24 h y posteriormente revelada con una solución de 2, 3,5-trifeniltetrazolio (0.05%). La inhibición del crecimiento bacteriano fue observada como zonas claras en el cromatograma. Todos los bioensayos fueron realizados por duplicado.

2.6.3 Actividad antifúngica

Las evaluaciones se llevaron a cabo utilizando las cepas de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tagetica* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Para el bioensayo se agregaron 10 mL de solución salina (0.85%) con Tween 20 (0.05%) a una caja de Petri conteniendo el cultivo del fitopatógeno correspondiente; las esporas fueron removidas con ayuda de un portaobjetos

y la suspensión resultante fue recuperada y transferida a un tubo Falcon, tomándose una alícuota de 250 μ L para realizar el conteo del número de esporas en la cámara de Newbauer. La concentración final se ajustó a 8×10^5 esporas/mL (Petrikoi *et al.*, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 1995) y 700 μ L de esta suspensión fueron colocados en placas con PDA y distribuidos de manera homogénea con ayuda de una varilla de vidrio. Las placas se dejaron reposar durante 15 minutos antes de colocar los discos de papel filtro Whatman No.1 previamente impregnados con 12.5 μ L de cada extracto al 4% (500 μ g/disco). Las placas fueron incubadas durante 24-72 h a 25 °C. El nivel de actividad fue reportado en mm, midiendo el diámetro de los halos de inhibición formados. Como control positivo se utilizó Ricoil al 0.2% y como control negativo se utilizaron discos de papel impregnados con 12.5 μ L de acetona. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Para el caso de *A. tagetica* no se realizó el ajuste del número de esporas.

2.6.4 Actividad Antioxidante

Se llevó al cabo utilizando el ensayo cualitativo de reducción del radical DPPH. Para este bioensayo las muestras a evaluar se aplicaron a placas cromatográficas con ayuda de un capilar y se eluyeron con los sistemas de disolventes CH₂Cl₂/Bn/MeOH (60:30:10); CH₂Cl₂/An (95:5) y Bn/EtOAc/MeOH (80:10:10). Después de eliminar el disolvente a temperatura ambiente, las placas cromatográficas fueron rociadas con una disolución de DPPH al 0.2% en Metanol. Como control positivo se utilizó una disolución acuosa de ácido ascórbico al 1%, del cual se aplicó 1 μ L en cada placa; de esta manera, se tomaron como positivas las zonas que presentaron un color amarillo claro contra un fondo púrpura.

2.7 Bibliografía

Bauer, A.W., Kirby, W., Sherris, M.M., Turck, M. (1996) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Diag. Microbiol. Epidemiol* **36** (3): 41-44.

Chataing, B., Concepcion, J.L., Lobaton, R., Usubillaga, A. (1998) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in vitro by *Solanum* alkaloids: a comparison with ketoconazole. *Planta Medica* **64** (1): 31-36.

Espinel-Ingroff, A., Dawson, K., Pfaller, M., Anaissie, E., Breslin, B., Dixon, D., Fothergill, A., Paetzinck, V., Peter, J., Rinaldi, M, Walsh, T. (1995) Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 314-319.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., Baiyle and Scott's (2002) *Diagnostic Microbiology* 11th. Mosby, St Louis.

Hamburger, M.O., Cordell, G.A. (1987) A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products* **50**: 19-22.

Padilla, R. and F. Aceves. (1992) Atlas Nacional de México. Sección IV. Instituto de Geografía, UNAM, México, D.F.

Petrikkoi, E., Rodríguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Gómez, A., Molleja, A., Mellado, E. (2001) Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 1345-1347.

Collins, L. and Franzblau, S.G. (1997) Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **41**: 1004-1009.

Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. (2003) Activity against multidrug-resistant *Micobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res* **17**: 903-938.

CAPITULO 3

Resultados y discusión

3.1 Diversidad y distribución de Apiaceas en México

Con la ayuda de la base de datos del Instituto de Ecología, A.C. se ubicaron 115 especies de la familia *Apiaceae*, pertenecientes a 34 géneros, distribuidas en la República Mexicana (Maricruz Peredo Nava, comunicación personal) (Anexo 1).

3.2 Delimitación de grupos taxonómicos

El estudio de la hipótesis filogenética más reciente sobre las relaciones dentro de las *Apiaceae*, permitió identificar los taxa mexicanos más cercanamente relacionados con los géneros andinos de interés (*Bolax*, *Laretia*, *Mulinum* y *Azorella*). El análisis del cladograma de consenso, resultante del análisis de parsimonia total de las cuatro regiones de ADN propuesto por Downie *et al.* (2001), ubica al clado *Azorella*, que incluye taxa como *Bolax* y *Eremocharis* Phil., entre la parafilética subfamilia *Saniculoideae*, conformada por los géneros *Eryngium*, *Petagnaea* y *Sanicula*, y la subfamilia *Hydrocotyloideae*, que comprende los géneros *Centella* y *Aralia* L., (Fig. 3.1).

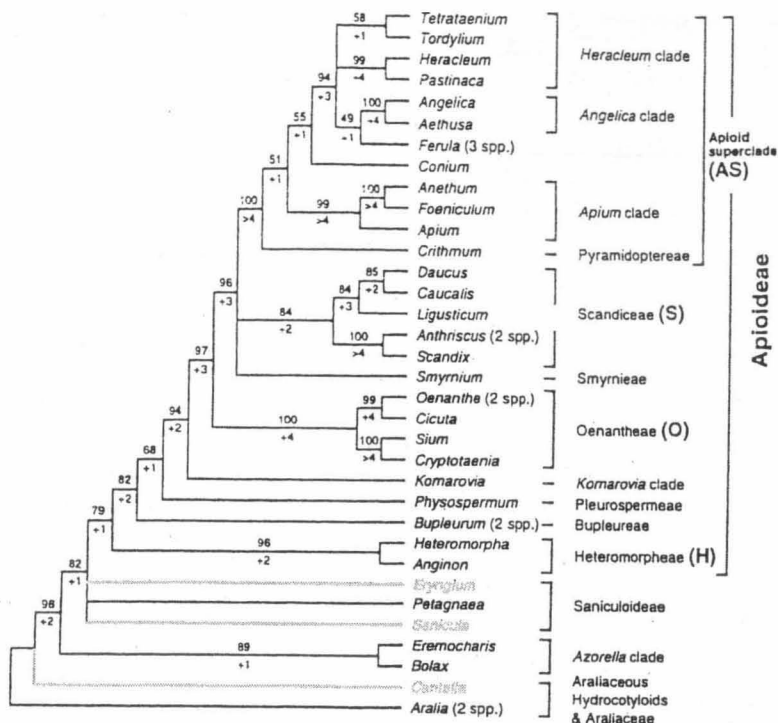


Figura 3.1 Árbol de relaciones filogenéticas de las Apioideae basado en evidencia combinada de secuencias de ADN (*intron rpl16*, *rps16*, *rpoC1*, e ITS) (Downie *et al*, 2001).

Aun cuando el género *Bolax* es el único representante de los géneros andinos de interés en el cladograma del llamado “Clado *Azorella*”, los géneros *Azorella*, *Laretia* y *Mulinum* han sido ubicados dentro del mismo clado y forman parte de la misma subfamilia *Azorelloideae* (Fig. 3.2) (Plunkett & Lowry, 2001).

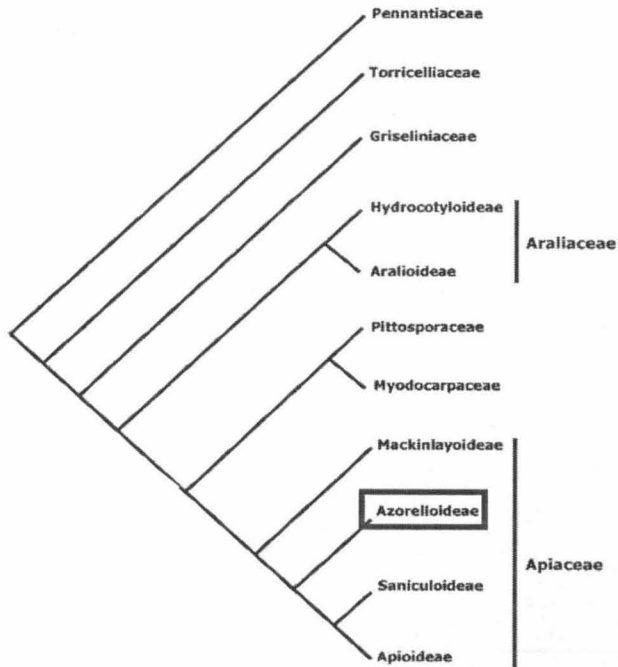


Figura 3.2 Árbol filogenético donde se muestra la subfamilia *Azorelloideae*, la cual agrupa a los géneros *Azorella*, *Laretia* y *Mulinum* (Stevens, P. Apiales in Angiosperm Phy. web).

Con base en lo anterior se identificaron los géneros *Eryngium*, *Petagnaea*, *Sanicula*, *Eremocharis* y *Centella*, como los más cercanamente relacionados a los géneros andinos *Azorella*, *Laretia*, *Mulinum* y *Bolax*. Sin embargo, los géneros *Eremocharis* y *Petagnaea*, a pesar de su estrecha relación filogenética con el género *Bolax*, no fueron tomados en cuenta para este trabajo, ya que estos géneros no están representados en México. De esta manera se seleccionaron, como objeto de estudio para este trabajo, los géneros *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella*.

De acuerdo a las especies enlistadas en el Anexo 1, en México han sido localizadas 34 especies del género *Eryngium*, una del género *Sanicula* y una del género *Centella*. Con el fin de reducir el número de especies de estudio, y tomando en cuenta que las especies de los géneros andinos de interés ocurren a mas de 3000 msnm, se incluyó una altitud mínima de ubicación de 2000 msnm como criterio de selección adicional. De esta manera, y de acuerdo a la base de datos del INECOL, las especies seleccionadas para este trabajo fueron *Eryngium monocephalum* Cav, *Eryngium carlinae* Delaroche, *Eryngium proteiflorum* Delaroche, *Eryngium deppeanum* Cham. & Schltdl, *Sanicula liberta* Cham. & Schlencht y *Centella asiatica* (L.) Urban. Cabe mencionar que la especie *C. asiatica*, aunque no ocurre por encima de los 2000 msnm fue seleccionada dada su ocurrencia en la Península de Yucatán.

3.3 Rendimientos de los extractos orgánicos crudos

Cada una de las especies colectadas fue separada en tallos y hojas, inflorescencias y raíz; una vez seco y molido, el material vegetal fue extraído por maceración con etanol. Los rendimientos correspondientes a cada uno de los diferentes extractos orgánicos crudos se enlistan en la tabla 3.1, que también incluye los datos acerca de la altitud, la parte vegetal utilizada y las claves de identificación correspondientes.

Tabla 3.1. Rendimiento de extractos orgánicos crudos de Apiaceas mexicanas.

Especie	Parte vegetal	Altitud (msnm)	Clave	Rendimiento (mg ext/mat veg)
<i>E. monocephalum</i>	Inflorescencias	3950	AP-2C-1	54.16
<i>E. monocephalum</i>	Tallos y hojas	3950	AP-2B-1	40.96
<i>E. monocephalum</i>	Raíz	3950	AP-2A-1	77.09
<i>E. monocephalum</i>	Inflorescencias	3700	AP-2C-2	51.76
<i>E. monocephalum</i>	Tallos y hojas	3700	AP-2B-2	12.77
<i>E. monocephalum</i>	Raíz	3700	AP-2A-2	67.41
<i>E. monocephalum</i>	Inflorescencias	3300	AP-2C-3	89.11
<i>E. monocephalum</i>	Tallos y hojas	3300	AP-2B-3	13.58
<i>E. monocephalum</i>	Raíz	3300	AP-2A-3	27.25
<i>E. carlinae</i>	Inflorescencias	3300	AP-3C-3	54.85
<i>E. carlinae</i>	Tallos y hojas	3300	AP-3B-3	77.85
<i>E. carlinae</i>	Raíz	3300	AP-3A-3	73.05
<i>E. carlinae</i>	Inflorescencias	3000	AP-3C-4	112.9
<i>E. carlinae</i>	Tallos y hojas	3000	AP-3B-4	75.77
<i>E. carlinae</i>	Raíz	3000	AP-3A-4	82.07
<i>E. deppeanum</i>	Inflorescencias	3000	AP-4C-4	23.74
<i>E. deppeanum</i>	Tallos y hojas	3000	AP-4B-4	7.45
<i>E. deppeanum</i>	Raíz	3000	AP-4A-4	10.62
<i>E. deppeanum</i>	Inflorescencias	2100	AP-4C-5	99.5
<i>E. deppeanum</i>	Tallos y hojas	2100	AP-4B-5	9.4
<i>E. deppeanum</i>	Raíz	2100	AP-4A-5	48.07
<i>E. proteiflorum</i>	Inflorescencias	3000	AP-5C-4	49.74
<i>E. proteiflorum</i>	Tallos y hojas	3000	AP-5B-4	22.68
<i>E. proteiflorum</i>	Raíz	3000	AP-5A-4	20.03
<i>S. liberta</i>	Frutos	2100	AP-6C-5	52.5
<i>S. liberta</i>	Tallos y hojas	2100	AP-6B-5	63.06
<i>S. liberta</i>	Raíz	2100	AP-5A-5	34.83
<i>C. asiatica</i>	Tallos y hojas	8	AP-7B-6	71.09
<i>C. asiatica</i>	Raíz	8	AP-7A-6	6.49
<i>C. asiatica</i>	Pecíolo	8	AP-7C-6	27.83

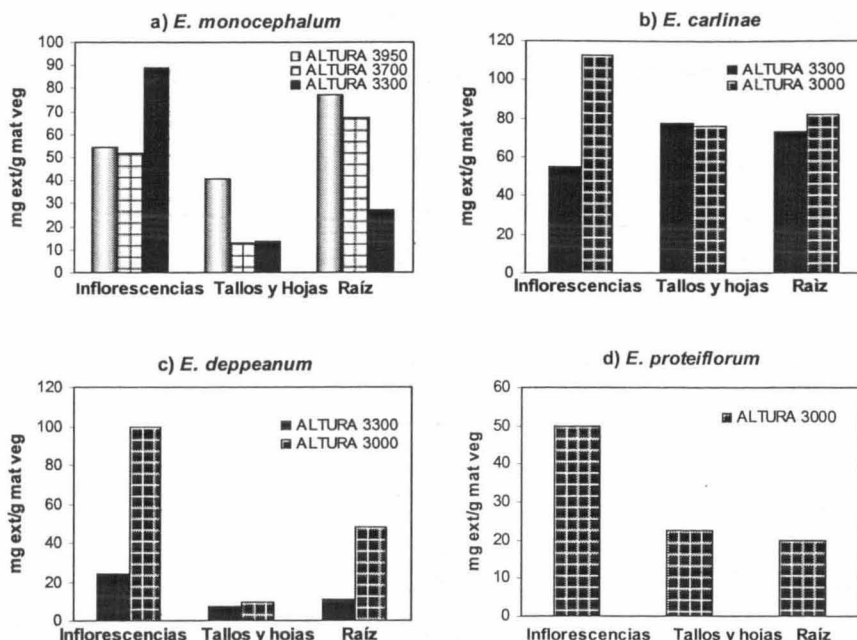


Figura 3.3 Rendimientos del extracto orgánico crudo de inflorescencias, tallos y hojas y raíz de especies del género *Eryngium* colectadas a diferentes altitudes. a) *E. monocephalum* colectado a 3950, 3700 y 3300 msnm; b) *E. carlinae* colectado a 3300 y 3000 msnm; c) *E. deppeanum* colectado a 3000 y 2100 msnm y d) *E. proteiflorum* colectado a 3000 msnm.

De acuerdo a los resultados mostrados en las gráficas de la figura 3.3, los mayores rendimientos de extracto orgánico crudo se obtuvieron a partir de las inflorescencias de las diferentes especies del género *Eryngium*, mientras que los rendimientos menores, se obtuvieron a partir de tallos y hojas. Cabe mencionar que en el caso de la especie *E. carlinae*, no se observaron diferencias significativas entre los rendimientos de los extractos de tallos y hojas y raíz. Por otra parte, es interesante hacer notar que mientras los rendimientos obtenidos a partir de las inflorescencias disminuyeron a medida que aumentó la altitud, los obtenidos a partir de tallos y hojas no mostraron diferencias significativas y en el caso de las raíces, los efectos de la altitud

fueron variables. A diferencia de lo anterior, las especies *S. liberta* y *C. asiatica* presentaron un mayor rendimiento en extractos orgánicos crudos de tallos y hojas, y un menor rendimiento en los extractos orgánicos crudos de raíz (Fig. 3.4).

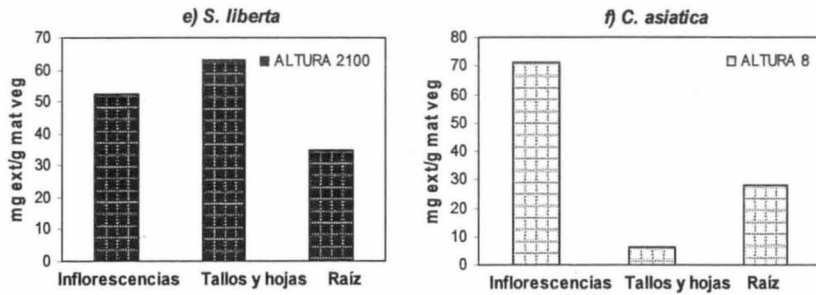


Figura 3.4 Rendimientos de extracto orgánico crudo de *S. liberta* (e), colectada a 2100 msnm; y *C. asiatica* (f), colectada a 8 msnm.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible observar que para el caso de las especies de *Eryngium*, no existe una correlación entre el rendimiento de extracto orgánico crudo de las diferentes especies analizadas, con respecto a la altitud a la cual fueron colectadas.

3.4 Análisis de los perfiles cromatográficos de Apiaceas mexicanas

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico de los diferentes extractos orgánicos crudos, se llevó al cabo un análisis preliminar por CCD de los extractos de inflorescencias de *E. deppeanum* y *S. liberta*, utilizando diferentes sistemas de elución. Los mejores resultados se muestran en la Fig. 3.5.

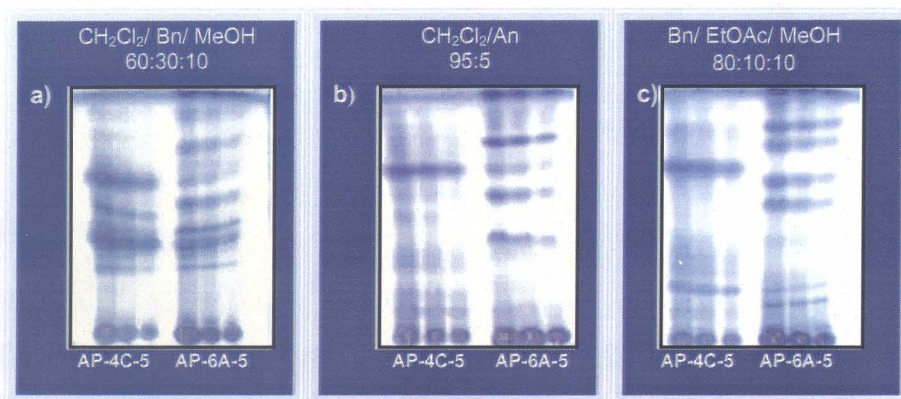


Figura 3.5 Perfiles cromatográficos de Apiaceas mexicanas. **a)** CH₂Cl₂/Bn/MeOH 60:30:10; **b)** CH₂Cl₂/An 95:5; **c)** Bn/EtOAc/MeOH 80:10:10. **AP-4C-5** (inflorescencias, *E. deppeanum*, 2100 msnm); **AP-6A-5** (raíz, *Sanicula liberta*, 2100 msnm).

Una vez elegidas las condiciones de elución se prosiguió con el análisis de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos crudos de inflorescencias (Fig. 3.6), tallos y hojas (Fig. 3.7) y raíz (Fig. 3.8) de las diferentes especies de los géneros *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella*.

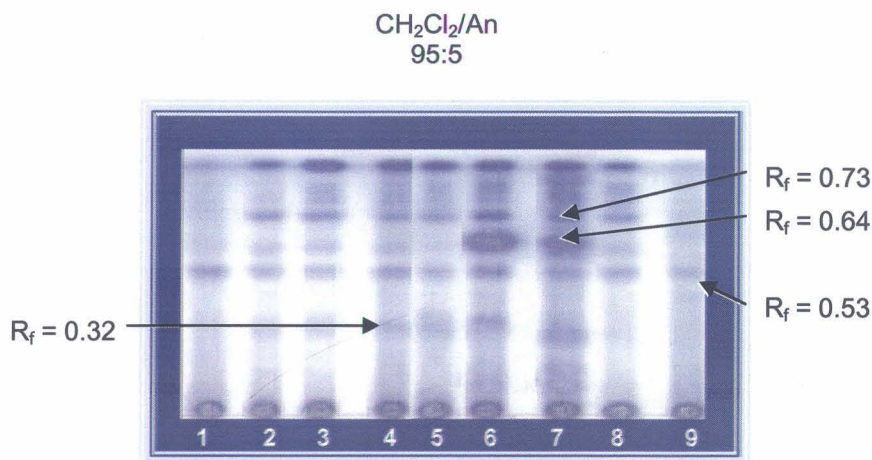


Figura 3.6 Perfiles cromatográficos de los extractos de inflorescencias de *E. monocephalum* colectados a 3950 msnm (1), 3700 msnm (2), 3300 msnm (3); de *E. carlinae* colectados a 3300 msnm (4) y 3000 msnm (5); de *E. deppeanum* colectados a 3000 msnm (6) y 2100 msnm (7); de *E. proteiflorum* colectado a 3000 msnm (8); y de *S. liberta* colectada a 2100 msnm (9).

El perfil cromatográfico de los extractos de las inflorescencias, de las diferentes especies de *Eryngium* y de frutos de *Sanicula* muestra una similitud evidente (Fig. 3.6), aunque para el caso del extracto de *Sanicula* la coincidencia se limita al componente a R_f 0.53 (Aplicación 9). Los metabolitos de menor polaridad a R_f 0.73 y 0.64 varían en concentración siendo ésta mayor para el caso de *E. deppeanum* a 3000 msnm (Aplicación 6) y a 2100 msnm (Aplicación 7) y menor para el caso de *E. monocephalum* a 3950 msnm (Aplicación 1). Finalmente, la presencia del componente polar a R_f 0.32 sólo se observa con suficiente concentración en los extractos de la especie *E. carlinae* a 3300 msnm (Aplicación 4).

CH₂Cl₂/An
95:5

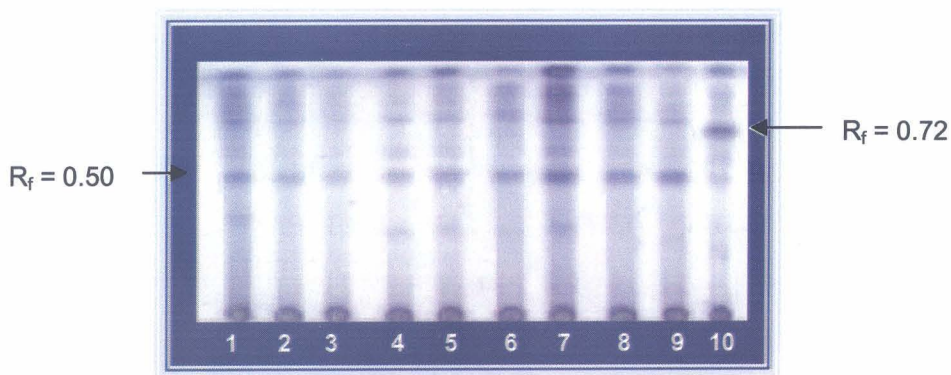


Figura 3.7 Perfiles cromatográficos de los extractos de tallos y hojas de *E. monocephalum* colectado a 3950 msnm (1), 3700 msnm (2), 3300 msnm (3); de *E. carlinae* colectados a 3300 msnm (4) y 3000 msnm (5); de *E. deppeanum* colectado a 3000 msnm (6) y 2100 msnm (7); de *E. proteiflorum* colectado a 3000 msnm (8); de *S. liberta* colectada a 2100 msnm (9); y de *C. asiatica* colectada a 8 msnm (10).

Por otro lado, los perfiles cromatográficos de los extractos de tallos y hojas de las diferentes especies de *Eryngium* y *Sanicula* muestran una clara similitud, particularmente en cuanto a la presencia del componente a R_f 0.50. Este metabolito se observa a muy baja concentración en los extractos de *Centella* (Aplicación 10), mismos que muestran un producto de menor polaridad (R_f 0.72) y de mayor abundancia. Este último componente no aparece en los extractos de *Eryngium* ó *Sanicula* (Fig. 3.7).

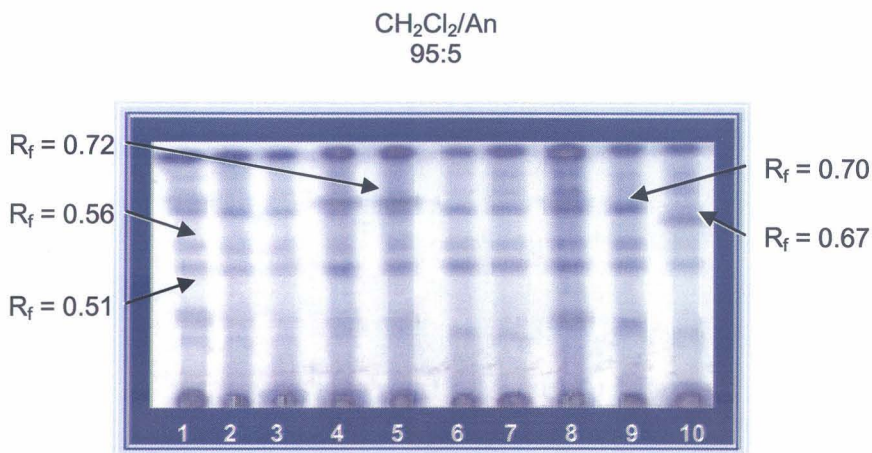


Figura 3.8 Perfiles cromatográficos de los extractos de raíz de *E. monocephalum* colectados a 3950 msnm (1), 3700 msnm (2), 3300 msnm (3); de *E. carlinae* colectado a 3300 msnm (4) y 3000 msnm (5); de *E. depeanum* colectado a 3000 msnm (6) y 2100 msnm (7); de *E. proteiflorum* colectado a 3000 msnm (8); de *S. liberta* colectada a 2100 msnm (9); y de *C. asiatica* colectada a 8 msnm (10).

La mayor similitud en cuanto a perfiles cromatográficos se observó en los correspondientes a extractos de raíz de las diferentes especies de *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella*. Todos los extractos mostraron la presencia de dos componentes a R_f 0.51 y 0.56; dos componentes de menor polaridad, a R_f 0.70 y 0.72, presentes en todos los extractos de *Eryngium* y *Sanicula*, no se observaron en el extracto de *C. asiatica* (Aplicación 10), el cual mostró un componente diferente a R_f 0.67 (Fig. 3.8).

De acuerdo al análisis de los perfiles cromatográficos presentados, es posible establecer que las especies de un mismo género, o de géneros relacionados filogenéticamente, producen metabolitos secundarios similares y que éstos se distribuyen de acuerdo al tipo de tejido analizado (Fig. 3.9). Sin embargo, es importante mencionar que un mismo tipo de extracto, aun perteneciendo a especies de un mismo género, puede mostrar diferencias con respecto a la concentración y naturaleza de los diferentes componentes (e.g.

Aplicaciones 1 y 6, Fig. 3.6); por otra parte, existen metabolitos que sólo se encuentran presentes en una sola especie, e. g. *Centella asiatica*.

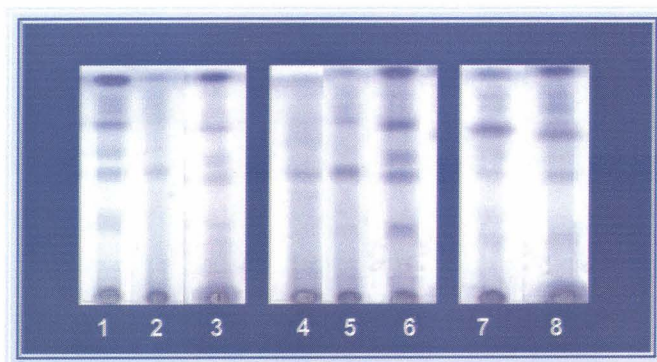


Figura 3.9 Perfiles cromatográficos de los extractos de inflorescencias, tallo y hojas y raíz de *E. monocephalum* colectado a 3300 msnm (1,2,3) ; de frutos, tallos y hojas y raíz de *S. liberta* colectada a 2100 msnm (4,5,6); y de tallos y hojas y raíz de *C. asiatica* colectada a 8 msnm (7,8).

Finalmente, los resultados obtenidos permiten establecer que la especie *S. liberta* guarda una relación química más estrecha con las especies del género *Eryngium* que con la especie *C. asiatica*; lo anterior confirma la hipótesis filogenética propuesta por Downie (2001), en cuyo cladograma (Fig. 3.1) se ubica a los géneros *Eryngium* y *Sanicula* dentro de la subfamilia *Saniculoideae* y a *Centella* dentro de la subfamilia *Hydrocotiloideae*.

3.5 Comparación de perfiles cromatográficos de extractos obtenidos a partir de apiaceas mexicanas y apiaceas sudamericanas

Con el fin de explorar posibles similitudes en perfiles cromatográficos, se compararon por CCD los extractos orgánicos crudos de las diferentes especies de *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella*, con los correspondientes de *Azorella compacta* y *Mulinum crassifolium* (Figs. 3.10-3.12).

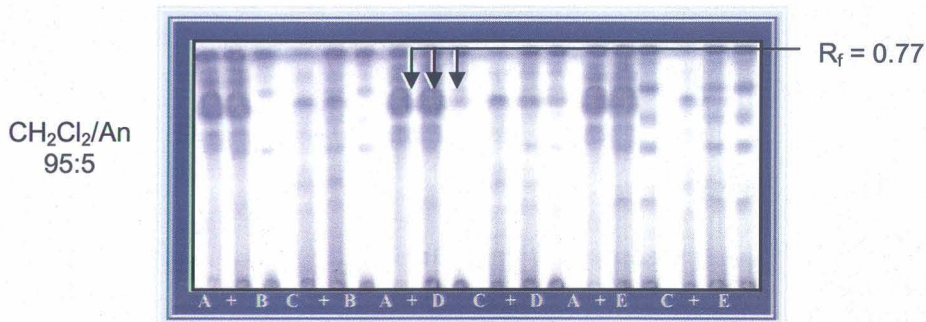


Figura 3.10 Perfiles cromatográficos de extractos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas. **A** (*Azorella compacta*); **B** (*Eryngium monocephalum*); **C** (*Mulinum crassifolium*); **D** (*Centella asiática*); **E** (*Sanicula liberta*); + (cocromatografía).

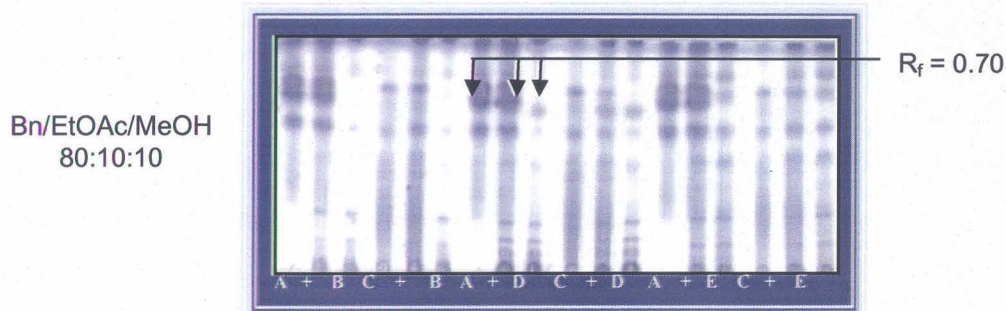


Figura 3.11 Perfiles cromatográficos de extractos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas. **A** (*Azorella compacta*); **B** (*Eryngium monocephalum*); **C** (*Mulinum crassifolium*); **D** (*Centella asiática*); **E** (*Sanicula liberta*); + (cocromatografía).

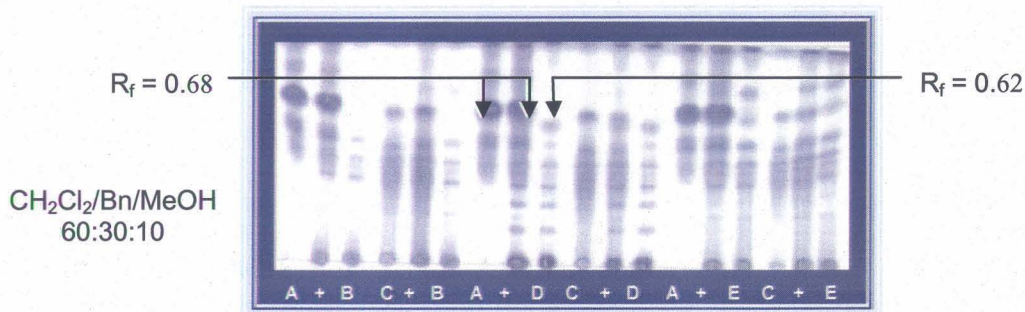


Figura 3.12 Perfiles cromatográficos de extractos de Apiaceas mexicanas y sudamericanas. **A** (*Azorella compacta*); **B** (*Eryngium monocephalum*); **C** (*Mulinum crassifolium*); **D** (*Centella asiática*); **E** (*Sanicula liberta*); + (cocromatografía).

Aun cuando los perfiles cromatográficos observados con el sistema de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5) (Fig. 3.10) muestran la presencia de componentes en común entre las diferentes especies, e.g. el componente a R_f 0.77 en los extractos de *Azorella* y *Centella*, al comparar los perfiles cromatográficos de los mismos extractos en los sistemas de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Bn}/\text{MeOH}$ (60:30:10) (Fig. 3.12) y $\text{Bn}/\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ (80:10:10) (Fig. 3.11) se observa que el componente mayoritario de *A. compacta* no coincide con el de *C. asiatica*. Estos resultados sugieren que entre los géneros *Azorella* y *Mulinum* y los de *Centella*, *Sanicula* y *Eryngium* no existen metabolitos en común.

3.6 Comparación de los perfiles cromatográficos entre Apiaceas mexicanas y metabolitos secundarios de Apiaceas sudamericanas

La comparación directa por CCD de los diferentes extractos de *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella* con muestras puras de azorellanos y mulinanos obtenidos de apiaceas sudamericanas demostró que ninguno de los metabolitos puros aparentemente ocurre en los extractos de las apiaceas mexicanas (Fig. 3.13).

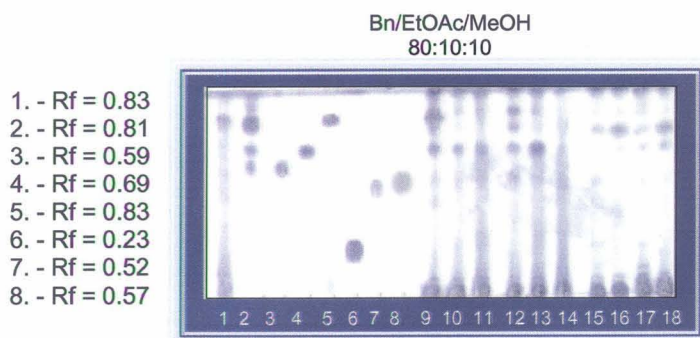
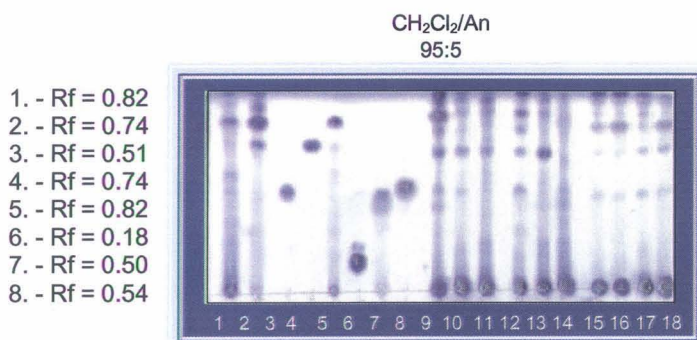
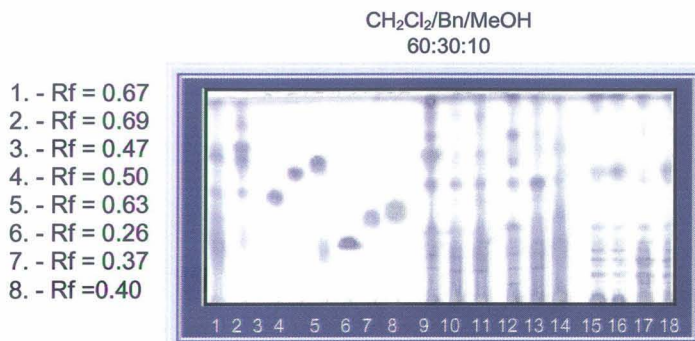


Figura 3.13 Comparación de los perfiles cromatográficos de apiaceas sudamericanas, apiaceas mexicanas y metabolitos puros. **1** (*Mulinum crassifolium*); **2** (*Azorella compacta*); **3** (Azorellanol); **4** (ác. mulin-12-en-14-ona-20-oico); **5** (ác. mulin-11,13-dien-20-ico); **6** (7-desacetilazorellanol); **7** (9-11-dihidroxi- α -13-epoxiazorellano); **8** (17-acetoximulinico); **9, 10, 11** (inflorescencias, tallos y hojas y raíz de *E. carlinae*); **12, 13, 14** (frutos, tallos y hojas y raíz de *S. liberta*); **15, 16, 17, 18** (tallos, hojas, pecíolo y raíz de *C. asiatica*).

Sin embargo, al observar los cromatogramas bajo luz UV de onda larga (365 nm) (Fig. 3.14), se detectó la presencia de un metabolito en común, con un Rf de 0.40 (CH₂Cl₂/ Bn/ MeOH), Rf 0.58 (CH₂Cl₂/ An) y Rf 0.38 (Bn/ EtOAc/ MeOH) en todos los extractos, con excepción de los de *C. asiatica*.

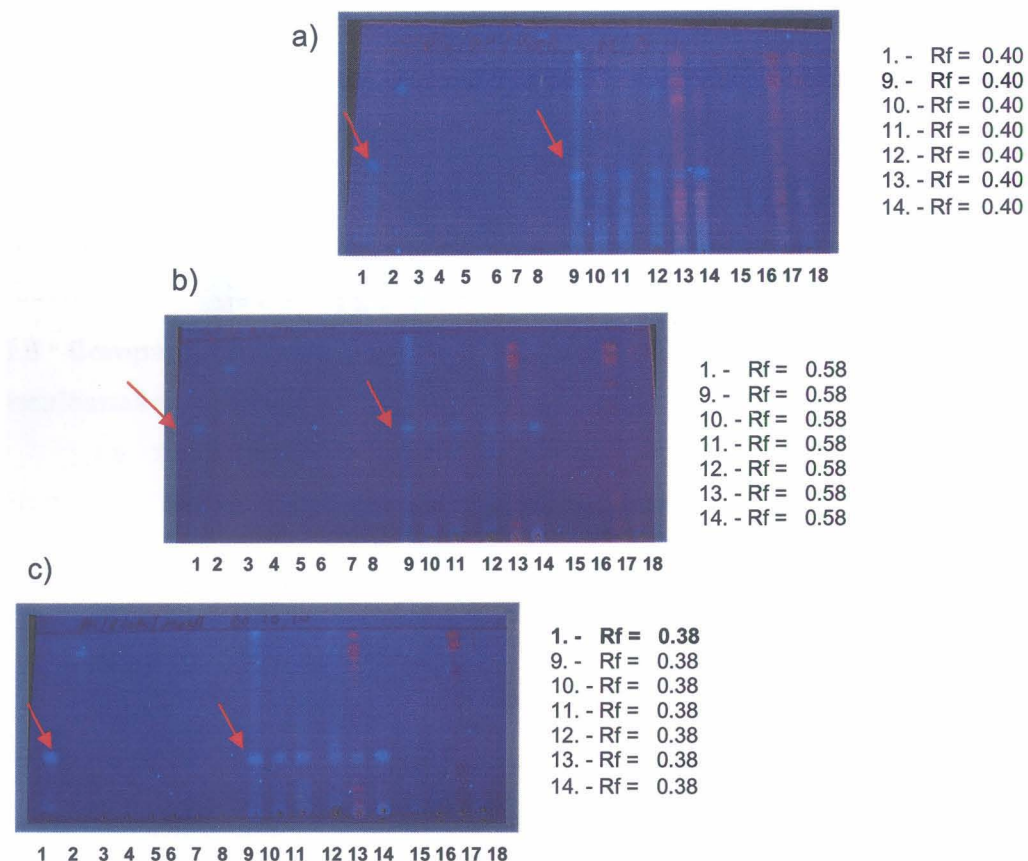


Figura 3.14 Comparación de los perfiles cromatográficos de apiáceas sudamericanas, apiáceas mexicanas y metabolitos puros. **1** (*Mulinum crassifolium*); **2** (*Azorella compacta*); **3** (Azorellanol); **4**(mulin-12-en-14-ona-20-oico); **5**(mulin-11,13-dien-20-ico); **6** (7desacetilazorellanol); **7** (9-11-dihidroxi- α -13-epoxiazorellano); **8**(17-acetoximulinico); **9, 10, 11** (inflorescencias, tallos y hojas y raíz de *Eryngium carlinae*); **12,13,14** (frutos, tallos y hojas y raíz de *Sanicula liberta*); **15,16,17,18** (tallos, hojas, pecíolo y raíz de *Centella asiatica*), **a)** CH₂Cl₂/Bn/MeOH 60:30:10; **b)** CH₂Cl₂/An 95:5; **c)** Bn/EtOAc/MeOH 80:10:10.

Lo anterior sugiere que aunque las especies de los géneros *Eryngium* y *Sanicula* no producen los derivados de azorellano o mulinano utilizados como referencia, es posible que existan metabolitos en común con esqueletos similares, entre especies de Apiaceas mexicanas y sudamericanas.

3.7 Extractos con actividad biológica

3.7.1 Antiprotozoaria

La evaluación de la actividad antiprotozoaria de los diferentes extractos reveló que las Apiaceas mexicanas, al igual que las Apiaceas sudamericanas (Araya *et al*, 2003; Loyola *et al*, 2001, 2004), poseen metabolitos con actividad importante contra parásitos de *Leishmania*, *Tripanosoma* y *Plasmodium* (Tabla 3.2).

Tabla.3.2 Extractos activos de apiaceas mexicanas y sudamericanas evaluados contra diferentes cepas antiprotozoarias.

Extracto	Leishmania			T.cruzi		P. falciparum			
	IC50 µg/mL			IC100 µg/mL		IC 50 µg/mL	% inhibición	IC 50 µg/mL	
	L.donovani	L.amazonensis	L.braziliensis	L.mexicana (GS)	L.mexicana (PC)	Epimastigotes	10 µg/mL		
AP-2A-1	3.1	2.1	3.1	+++	+++	Inactivo	2	>10	Inactivo
AP-2A-2	10.9	11.7	12.3	-	-	Inactivo	6	>10	Inactivo
AP-2A-3	3.1	3.1	3.1	+	+	Inactivo	5	>10	Inactivo
AP-2B-1	11.3	15.2	16.3	-	-	Inactivo	0	>10	Inactivo
AP-2B-2	15.3	14.7	16.9	-	-	Inactivo	2	>10	Inactivo
AP-2B-3	12.9	15.3	14.7	-	-	Inactivo	4	>10	Inactivo
AP-2C-1	13.8	15.8	19.5	-	-	Inactivo	9	>10	Inactivo
AP-2C-2	8.2	10.9	12.6	-	-	Inactivo	2	>10	Inactivo
AP-2C-3	5.1	10.4	12.5	-	-	Inactivo	9	>10	Inactivo
AP-3A-3	2.7	2.8	3.1	-	-	Inactivo	5	>10	Inactivo
AP-3A-4	2.6	2.7	2.8	-	-	Inactivo	26	>10	Inactivo
AP-3B-3	63.9	66	83.3	-	-	26.3	100	7	ACTIVO
AP-3B-4	15.1	16.3	16.3	-	-	Inactivo	26	>10	Inactivo
AP-3C-3	10.9	12.9	15.2	-	-	Inactivo	87	7	ACTIVO
AP-3C-4	15.3	17.2	18.5	-	-	Inactivo	4	>10	Inactivo
AP-4A-4	69.8	69	69.8	-	-	Inactivo	7	>10	Inactivo
AP-4A-5	4.7	4.7	4.1	-	-	Inactivo	75	7	ACTIVO
AP-4B-4	13.9	15.2	17.2	-	-	Inactivo	6	>10	Inactivo
AP-4B-5	17.4	18.9	25.3	-	-	Inactivo	2	>10	Inactivo
AP-4C-4	14.5	15.8	23.6	-	-	10.7	9	>10	Inactivo
AP-4C-5	3	3	3.4	-	-	Inactivo	100	0.8	ACTIVO
AP-5A-4	10.9	11.7	11.9	+++	+++	23.7	25	>10	Inactivo
AP-5B-4	15.3	15.3	25	-	-	Inactivo	7	>10	Inactivo
AP-5C-4	15.9	17.8	18.8	-	-	16.8	0	>10	Inactivo
AP-6A-5	10.8	10.8	11.7	-	-	26.2	0	>10	Inactivo
AP-6B-5	15.9	21.4	31.2	-	-	30.5	8E	>10	Inactivo
AP-6C-5	9.6	13.9	15.2	-	-	16.8	98	1.8	ACTIVO
AP-7A	50.4	9.9	50	-	-	29.1	P/E	P/E	P/E
AP-7B	50	28	30.5	-	-	10.4	P/E	P/E	P/E
AP-7C	33	6.7	22.9	-	-	18.7	P/E	P/E	P/E
AP-7D	29.1	23.8	23.8	-	-	3.8	P/E	P/E	P/E
Mulinum Sp.	N/E	N/E	N/E	++	++	N/E	N/E	N/E	N/E
Azorella Sp.	N/E	N/E	N/E	+++	+++	N/E	N/E	N/E	N/E
Y-2	N/E	N/E	N/E	-	-	N/E	N/E	N/E	N/E
AY-4	N/E	N/E	N/E	+++	+++	N/E	N/E	N/E	N/E
Y-5	N/E	N/E	N/E	+++	+++	N/E	N/E	N/E	N/E
Y-6	N/E	N/E	N/E	-	-	N/E	N/E	N/E	N/E
AZM-5	N/E	N/E	N/E	-	-	N/E	N/E	N/E	N/E
MC-E	N/E	N/E	N/E	-	-	N/E	N/E	N/E	N/E
Anfotericina IC50 0.2 µg/ml			Pentamidina (+++) 10 µg/mL			Cloroquina CI 50=30 nM			

Antofotericina IC50 0.2 µg/ml

Pentamidina (+++) 10 µg/mL

Cloroquina CI 50-30
nM

AP-2: *E. monocephalum*, **AP-3:** *E. carlinae*, **AP-4:** *E. deppeanum*, **AP-5:** *E. proteiflorum*, **AP-6:** *S. liberta*, **AP-7:** *C. asiatica*; **A:** raíz, **B:** tallos y hojas, **C:** inflorescencias, Pecíolo; **1:** 3950 msnm, **2:** 3700 msnm, **3:** 3300 msnm, **4:** 3000 msnm, **5:** 2100 msnm, **6:** 8 msnm; **Y-2:** Azorellanol, **AY-4:** Mulin-12-en-14-ona-20-oico, **Y-5:** Mulin-11,13-dien-20-ico; **Y-6:** 7-desacetilazorellanol, **Az-m5:** 9-11-dihidroxi- α -13-epoxiazorellano, **MC-E:** 17-acetoximulinico; N/E: no evaluada; P/E: pendiente de evaluar.

Como se observa en la tabla 3.2, la mayoría de los extractos activos contra las cepas sudamericanas de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*), fueron los de raíz de todas las especies del género *Eryngium* (Figs. 3.15-18), con excepción de los extractos de *E. monocephalum* colectado a 3700 msnm (AP-2A-2; Fig. 3.15) y *E. deppeanum* colectado a 3000 msnm (AP-4A-4; Fig. 3.16). Por otra parte, el extracto de inflorescencias de *E. deppeanum* colectado a 2100 msnm (AP-4C-5; Fig. 3.16), fue el único que mostró una actividad leishmanicida comparable a la observada en los extractos de raíz, en tanto que el extracto de raíz de *E. proteiflorum* (AP-5A-4), aunque ligeramente más activo que los correspondientes extractos de tallos y hojas e inflorescencias, mostró una menor actividad que el mismo tipo de extracto en las demás especies de *Eryngium* (Fig. 3.17).

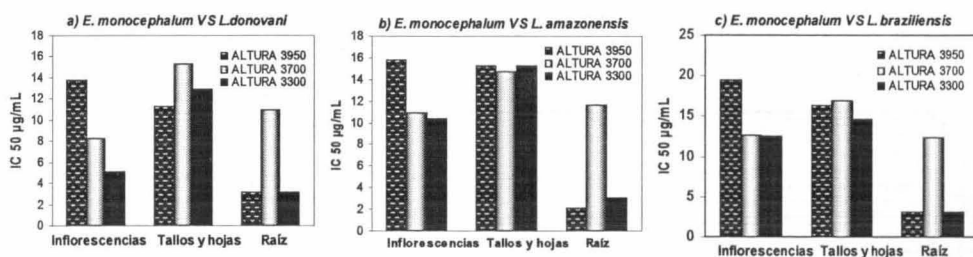


Figura 3.15 Actividad de los extractos de *Eryngium monocephalum* contra parásitos del género *Leishmania*. a) *L. donovani*; b) *L. amazonensis*; c) *L. braziliensis*.

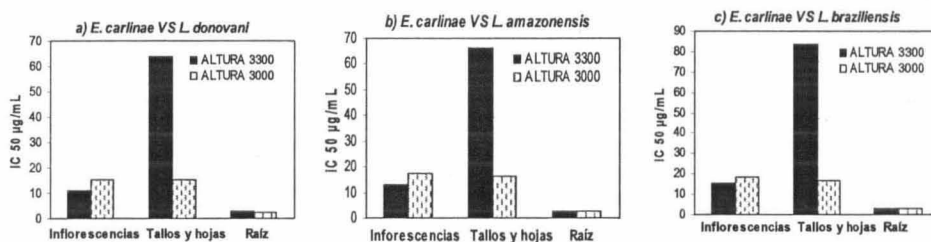


Figura 3.16 Actividad de los extractos de *Eryngium carlinae* contra parásitos del género *Leishmania*. a) *L. donovani*; b) *L. amazonensis*; c) *L. braziliensis*.

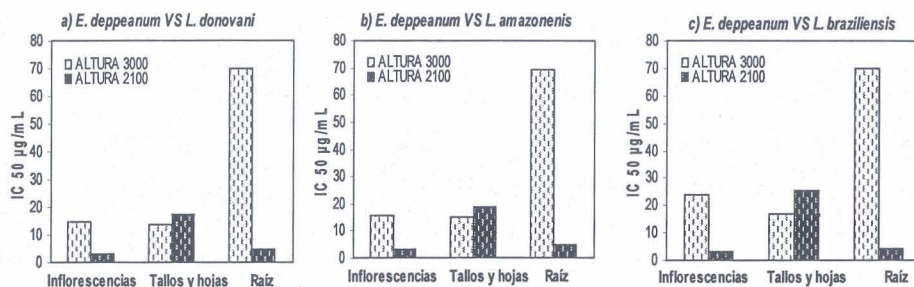


Figura 3.17 Actividad de los extractos de *Eryngium deppeanum* contra parásitos del género *Leishmania*. **a)** *L. donovani*; **b)** *L. amazonensis*; **c)** *L. braziliensis*.

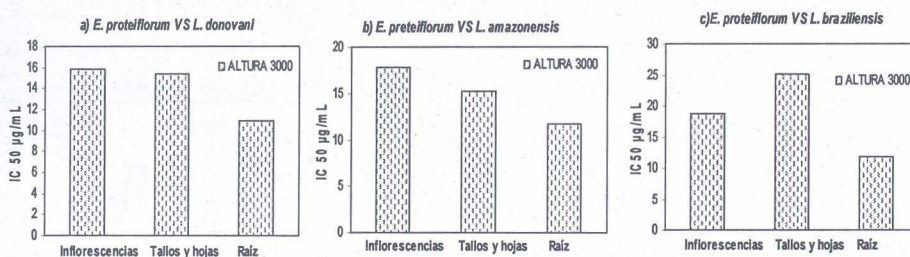


Figura 3.18 Actividad de los extractos de *Eryngium proteiflorum* contra parásitos del género *Leishmania*. **a)** *L. donovani*; **b)** *L. amazonensis*; **c)** *L. braziliensis*.

Como ya se mencionó anteriormente, los perfiles cromatográficos de cada uno de los tipos de extracto de las diferentes especies de *Eryngium* mostraron un perfil cromatográfico muy similar por CCD, con ligeras diferencias en la concentración de algunos de los componentes (e. g. componentes a Rf 0.50 en aplicaciones 1-5 y 7, Fig. 3.19). Sin embargo, la actividad leishmanicida observada para el caso del extracto de inflorescencias de *E. deppeanum* a 2100 msnm, sugiere la posibilidad de que existan metabolitos en común entre los diferentes tipos de extractos pertenecientes a

especies de un mismo género, aun cuando sus perfiles cromatográficos muestren diferencias significativas (Fig. 3.19). La variabilidad en la concentración de los componentes en los diferentes extractos podría explicar las diferencias en la actividad biológica observada en algunos casos, e.g. los extractos de raíz (AP-4A-5) e inflorescencias (AP-4C-5) de *E. deppeanum* colectados a 2100 msnm, ya que fueron los únicos extractos que mostraron actividad contra las tres cepas sudamericanas de *Leishmania* y los parásitos protozoarios del género *Plasmodium* (Tabla 3.3).

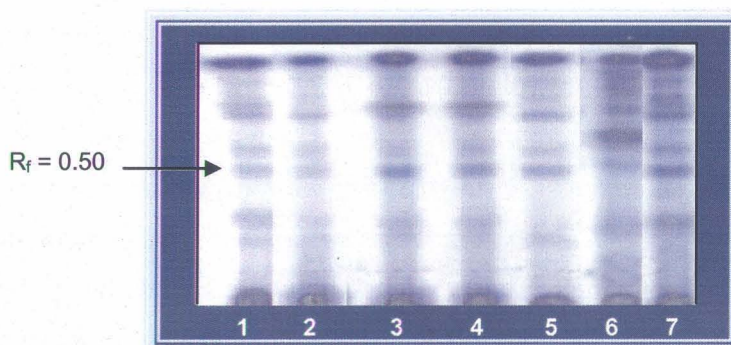


Figura 3.19 Perfiles cromatográficos de los extractos activos contra las cepas de *Leishmania*. 1 (*E. monocephalum*, raíz a 3950 msnm); 2 (*E. monocephalum*, raíz a 3300 msnm); 3 (*E. carlinae*, raíz a 3300 msnm); 4 (*E. carlinae*, raíz a 3000 msnm); 5 (*E. deppeanum*, raíz a 2100 msnm); 6 (*E. deppeanum*, inflorescencias a 2100 msnm); 7 (*E. proteiflorum*, raíz a 3000 msnm) eluidos bajo el sistema de disolvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ 95:5.

De la misma forma, el extracto de raíz de *E. monocephalum* colectado a 3950 msnm (AP-2A-1) mostró actividad contra las cuatro cepas de *Leishmania*, en tanto que el extracto de raíz de *E. proteiflorum* colectado a 3000 msnm (AP-5A-4), que no mostró actividad contra las cepas sudamericanas de *Leishmania*, presentó una importante actividad contra las cepas de *L. mexicana* (Tabla 3.3).

Cabe mencionar que dos extractos de *E. carlinae* [tallos y hojas (AP-3B-3) e inflorescencias (AP-3C-3), colectados a 3300 msnm] y el extracto de frutos de *S. liberta* (AP-6C-5), mostraron una actividad significativa contra *Plasmodium*. Estos resultados, combinados con la presencia de componentes en común en los perfiles cromatográficos de estos extractos, apoyan nuevamente la relación filogenética entre las especies de *Sanicula* y *Eryngium*. Al mismo tiempo, la actividad tripanocida observada casi exclusivamente en extractos de *C. asiatica* confirman las diferencias evidentes en términos de perfil cromatográfico entre esta especie y el resto de las Apiaceas mexicanas, reafirmando al mismo tiempo su separación en el cladograma propuesto por Downie (2001) (Fig.3.1).

Finalmente es importante mencionar que aun cuando se ha reportado que en especies como *Cinchona succirubra* la producción de metabolitos secundarios se ve influenciada por el gradiente de altitud (Vanhalen et al, 1991), la variación en la actividad biológica de los extractos de las especies de *Eryngium*, *Sanicula* y *Centella* colectadas a diferentes altitudes, sugiere que la altitud, en este caso, no representa un factor importante en la producción o concentración de los diferentes componentes en los tejidos de la planta. Sin embargo, tomando en cuenta que la altitud es un gradiente que se compone de factores ambientales como temperatura, velocidad del viento, disponibilidad de agua, de CO₂ e irradiación solar, y que además existen factores de tipo biótico como infecciones fúngicas, bacterianas y virales, presencia de herbívoros, competencia, capacidad de aclimatación y estrategias de adaptación, que también son determinantes en la producción de metabolitos secundarios (Lambers, 2000), es difícil pensar en el gradiente altitud como el único factor de variación (Alonso Rodríguez-Amelot, comunicación personal).

3.7.2 Actividad microbiana

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos contra tres cepas patogénicas a humanos, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Candida albicans* y las cepas fitopatogénicas *Xanthomonas campestris*, *Alternaria tagetica*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, se encontró que únicamente los extractos de tallos y hojas e inflorescencias de todas las especies del género *Eryngium* y de *S. liberta*, mostraron actividad y sólo contra *S. aureus* (Tabla 3.4). Los extractos de *Centella*, los derivados puros de azorellano y mulinano, los extractos de las Apiaceas sudamericanas, así como los de raíz de *Eryngium* y de *S. liberta*, no mostraron capacidad para limitar o inhibir el crecimiento de las cepas antes mencionadas. Estos últimos resultados son opuestos a los encontrados para el caso de la actividad leishmanicida, donde los extractos de raíz de *Eryngium* y de *S. liberta* fueron los de mayor actividad. Estos resultados demuestran también que las diferencias en el contenido y naturaleza de metabolitos secundarios en el extracto de cada uno de los diferentes tejidos de las plantas, pueden reflejarse en la expresión de una actividad en particular. Finalmente, estos resultados confirman también la cercanía filogenética entre los géneros *Eryngium* y *Sanicula*.

Tabla. 3.3 Actividad antimicrobiana de los extractos de *Eryngium* y *Sanicula*.

Extracto	<i>S. aureus</i> mm de inhibición
AP-2B-1	12.3
AP-2C-2	10.8
AP-2B-2	11.6
AP-2C-3	10.8
AP-2B-3	11.6
AP-3C-3	10.1
AP-3B-3	10.5
AP-4C-4	11.5
AP-4B-4	12.5
AP-5C-4	10.6
AP-5B-4	10.6
AP-3C-4	15.5
AP-4C-5	14.8
AP-4B-5	11.1
AP-6C-5	12.5
AP-6B-5	11.1
Amikacina 0.5 µg/µl (control)	14.4

Como se observa en la tabla 3.3, el nivel de actividad, reflejado en el diámetro del halo de inhibición, es muy similar entre las diferentes especies del género *Eryngium*; siendo los extractos de inflorescencias de *E. carlinae* (AP-3C-4) y de *E. deppeanum* (AP-4C-5) los más activos, seguidos de los extractos de tallos y hojas de *E. monocephalum* (AP-2B-1) y de *E. deppeanum* (AP-4B-4) y el extracto de frutos de *S. liberta* (AP-6C-5). Esta similitud en actividad biológica de los diferentes extractos puede atribuirse a la similitud previamente observada en sus perfiles cromatográficos.

Al igual que en el caso de la actividad leishmanicida, los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados demostraron que la altitud no es un factor que determine la actividad contra *S. aureus*; los

extractos activos se obtuvieron de especies colectadas a diferentes altitudes y el nivel de actividad fue muy similar en la mayoría de los casos.

3.7.2.1 Bioautografía

Con el fin de establecer la naturaleza, en términos de polaridad, de los metabolitos bioactivos contra *S. aureus*, cada uno de los extractos bioactivos fue evaluado mediante un procedimiento de bioautografía. De esta manera se pudo establecer que la actividad antimicrobiana de los extractos de tallos y hojas e inflorescencias de *E. monocephalum*, puede atribuirse a un metabolito de polaridad media alta (Rf 0.40; Fig. 3.20).

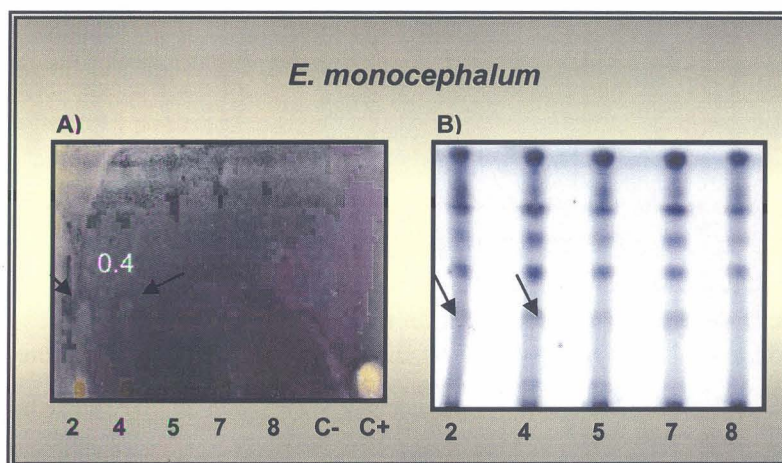


Figura 3.20 Actividad antibacteriana de *E. monocephalum* [Cromatograma eluido con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5)]. A) Bioautografía; B) Cromatograma revelado con disolución de ácido fosfomolibdico. **2** (tallos y hojas colectados a 3950 msnm, AP-2B-1); **4** (inflorescencias colectados a 3700 msnm, AP-2C-2); **5** (tallos y hojas colectados a 3700 msnm, AP-2B-2); **7** (Inflorescencias colectados a 3300 msnm, AP-2C-3); **8** (tallos y hojas colectados a 3300 msnm, AP-2B-3); **C-** (Control negativo, metanol); **C+** (control positivo Amikacina al 0.5%).

Por otra parte, la bioautografía de los extractos de inflorescencias de *E. deppeanum* mostró la presencia de varios componentes (Rf 0.75, 0.70, 0.47, 0.33; Fig. 3.21) con una fuerte actividad antimicrobiana. De la misma forma, la bioautografía de los extractos de tallos y hojas de *E. deppeanum* evidenció la presencia de una menor actividad debida a productos de polaridad media y media alta (Rf 0.47 y 0.33, respectivamente; Fig. 3.21).

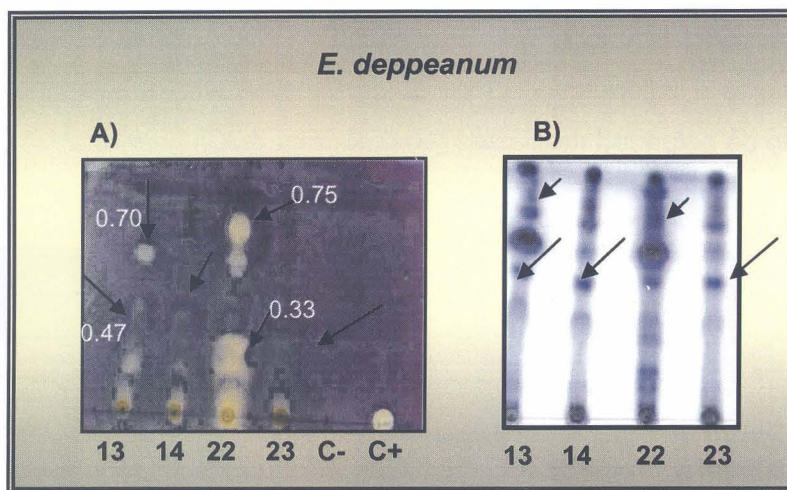


Figura 3.21 Actividad antibacteriana de *Eryngium deppeanum*. [Cromatograma eluido con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5)]. A) Bioautografía; B) Cromatograma revelado con disolución de ácido fosfomolibdico. **13** (Inflorescencias colectadas a 3000 msnm, AP-4C-4); **14** (Tallos y hojas colectados a 3000 msnm, AP-4B-4); **22** (Inflorescencias colectadas a 2100 msnm, AP-4C-5); **23** (Tallos y hojas colectados a 2100 msnm, AP-4B-5); **C-** (control negativo, metanol); **C+** (control positivo Amikacina al 0.5%).

La bioautografía del extracto de inflorescencias de *E. carlinae* colectada a 3000 msnm, permitió ubicar la presencia de un producto fuertemente antimicrobiano a Rf 0.43 (Fig. 3.22), en tanto que el extracto del mismo tipo de tejido y de la misma especie, pero colectada a diferente altitud (3300 msnm), mostró una posible concentración menor del componente antimicrobiano de polaridad media (Rf 0.45) y una mayor concentración de productos bioactivos en la región de alta polaridad. Al mismo tiempo, la

bioautografía del extracto de tallos y hojas de *E. carlinae* colectada a 3300 msnm, mostró una baja concentración de componentes bioactivos, tanto de polaridad media como en la región de polaridad alta (Fig. 3.22).

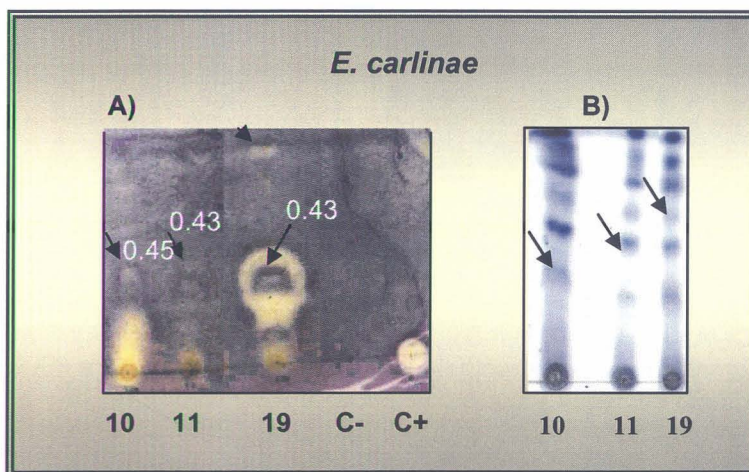


Figura 3.22 Actividad antibacteriana de *E. carlinae*. [(Cromatograma eluido con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ 95:5]. A) Bioautografía; B) Cromatograma revelado con disolución de ácido fosfomolibdico. **10** (Inflorescencias colectadas a 3300 msnm, AP-3C-3); **11** (Tallos y hojas colectados a 3300 msnm, AP-3B-3); **19** (Inflorescencias colectadas a 3000 msnm, AP-3C-4); **C-** (Control negativo, metanol); **C+** (control positivo Amikacina al 0.5%).

Para el caso de la bioautografía de los extractos de tallos y hojas e inflorescencias de *E. proteiflorum* se observó la presencia de componentes con actividad antimicrobiana en la zona de polaridad media alta (R_f 0.37, Fig. 3.23); la mayor actividad observada en el extracto de inflorescencias sugiere una mayor concentración de los metabolitos bioactivos en este extracto.

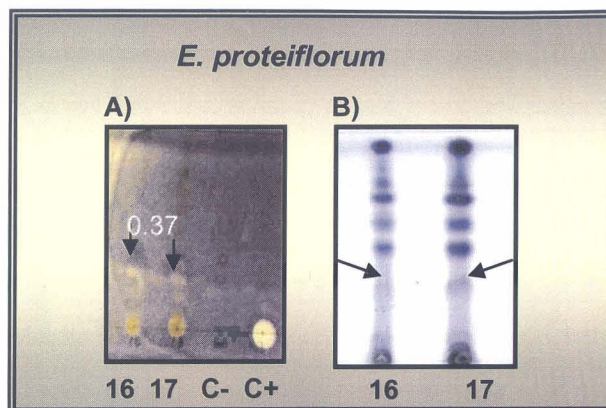


Figura 3.23 Actividad antibacteriana de *E. proteiflorum*. [Cromatograma eluido con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5)]. A) Bioautografía; B) Cromatograma revelado con disolución de ácido fosfomolibdico. **16** (extracto de inflorescencias colectadas a 3000 msnm, AP-5C-4); **17** (extracto de Tallos y hojas colectadas a 3000 msnm, AP-5B-4); **C-** (Control negativo, metanol); **C+** (control positivo Amikacina al 0.5%).

Finalmente, la bioautografía de los extractos de frutos y de tallo y hojas de *S. liberta* reveló la presencia de dos áreas de actividad antimicrobiana, una de baja polaridad con productos a R_f 0.78 y 0.85 (Fig. 3.24) y otra de alta polaridad con componentes a R_f 0.37 y 0.23 (Fig. 3.24). En este caso, el extracto de frutos mostró una mayor intensidad en la actividad, sugiriendo que posee una mayor concentración de productos con actividad antimicrobiana.

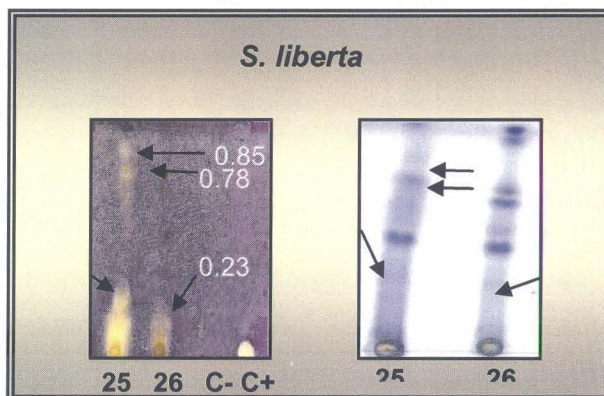


Figura 3.24 Actividad antibacteriana de *S. liberta*. [Cromatograma eluido con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{An}$ (95:5)]. A) Bioautografía; B) Cromatograma revelado con disolución de ácido fosfomolibdico. **25** (extracto de frutos colectados a 2100 msnm, AP-6C-5); **26** (extracto de Tallos y hojas colectadas a 2100 msnm, AP-6B-5); **C-** (Control negativo, metanol); **C+** (control positivo Amikacina al 0.5%).

Es importante mencionar que la mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* detectada mediante los halos de inhibición de los extractos de inflorescencias de *E. carlinae* (AP-3C-4) y *E. deppeanum* (AP-4C-5) (Tabla 3.4), correlaciona con la presencia de metabolitos con una fuerte actividad antimicrobiana en la bioautografía contra el mismo microorganismo (Figs. 3.21 y 3.22). De igual forma, el resto de los extractos de *E. deppeanum*, *E. carlinae* y *S. liberta* que muestran menores halos de inhibición, muestran también una actividad menos intensa en la bioautografía.

3.7.3 Otras evaluaciones de actividad biológica

Contrariamente a lo esperado, ninguno de los extractos de las diferentes especies de los géneros *Eryngium*, *Sanicula*, *Centella*, *Mulinum* y *Azorella* mostraron la presencia de metabolitos con actividad antioxidante al ser evaluados mediante el bioensayo de reducción del radical DPPH. Estos resultados sugieren que aun cuando estas especies ocurren y se desarrollan en ambientes de gran altitud, todas ellas utilizan estrategias alternas que no incluyen la producción de metabolitos con actividad antioxidante para la protección del tejido vegetal contra los efectos de la radiación.

3.8 Bibliografía

Araya, J.E., Neira, I., Silva, S., Mortara, R.A., Manque, P., Cordero, E., Sagua, H., Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., González, J. (2003) Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* **98** (3): 413-418.

Downie, R.S., Katz-Downie, D., Watson, M.F. (2000) A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl6* and *rpoc1* intron sequences: Towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany* **87** (2):273-292.

Lambers, H., Chapin F.S., Pons L.T (2000) Plant Physiological Ecology. Springer Verlag. pp. 427-433.

Loyola, L.A, Bórquez, J., Morales, G., San-Martin, A., Darias, J., Flores, N., Giménez, A. (2004) Muliane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *Phytochemistry* **65**:1931-1935.

Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., Araya, J., González, J., Neira, I., Sagua, H., San-Martín, A. (2001) Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry* **56** (2): 177-180.

Vanhalen, M., Lejoly, J., Hanocq, M. and L. Molle. (1991) Climatic and Geographical Aspects of Medical Plant Constituents. In the Medical Plant Industry (Wijesekera, R.O.B., ed.), pp. 59-76. CRC Press, Florida.

CAPITULO 4

Conclusiones

► Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la filogenia puede ser utilizada como una herramienta para orientar la búsqueda de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

► En ninguna de las especies de *Eryngium* se pudo establecer una relación directa entre la altitud a la cual se colectó la planta y los rendimientos de los extractos orgánicos crudos correspondientes.

► El análisis de los perfiles cromatográficos de los diferentes extractos reveló que existen diferencias claras en cuanto a la concentración y naturaleza de los productos por especies en los géneros *Centella*, *Sanicula* y *Eryngium* y que las especies de *Sanicula* y *Eryngium*, agrupadas dentro de la subfamilia *Saniculoideae*, poseen una mayor similitud química, en tanto que los extractos de *C. asiatica*, agrupada dentro de la subfamilia *Hidrocotiloideae*, posee un perfil cromatográfico completamente distinto.

► Asimismo, el análisis de los diferentes extractos mostró que aunque los géneros *Eryngium* y *Sanicula* no producen los derivados de azorellano o mulinano utilizados como referencia, es posible que entre las especies sudamericanas y mexicanas existan metabolitos en común, con esqueletos similares, como se confirma con la detección de un producto visible a la luz ultravioleta en los perfiles cromatográficos de los extractos de *M. crassifolium*, de *S. liberta* y de las cuatro especies del género *Eryngium*.

► De las especies seleccionadas, sólo los extractos de raíz de las especies *E. carlinae*, *E. proteaeflorum* y *E. deppeanum* presentaron actividad

leishmanicida importante aunque esta última especie también reveló compuestos activos en inflorescencias. Por otro lado, los extractos de tallos y hojas de *C. asiatica* resultaron ser activos contra *T. cruzi*, mientras que los extractos de inflorescencias de la especie *E. deppeanum*, así como los extractos de frutos de *S. liberta*, revelaron una inhibición de hasta el 100% de los parásitos del género *Plasmodium*.

► Ninguno de los extractos evaluados resultó activo contra las cepas fitopatogénicas *Xanthomonas campestris*, *Alternaria tagetica*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Asimismo, ninguno de los extractos evaluados inhibieron el crecimiento de las cepas *Candida albicans* y *Bacillus subtilis*; sin embargo, los extractos de tallos y hojas e inflorescencias de todas las especies del género *Eryngium* y los de *S. liberta*, mostraron actividad contra *S. aureus*, confirmándose la cercanía filogenética entre ambos géneros.

► Los resultados obtenidos de la bioautografía mostraron que la actividad antimicrobiana de los extractos de inflorescencias de *E. carlinae* y tallos y hojas e inflorescencias de *E. monocephalum* y *E. proteiflorum* puede atribuirse a metabolitos de polaridad media y media alta. Asimismo, los extractos de frutos y de tallo y hojas de *S. liberta* revelaron la presencia de dos áreas de actividad antimicrobiana, una de baja polaridad y otra de alta polaridad.

► La variabilidad observada en la concentración de los componentes de los diferentes extractos, puede explicar las diferencias en la actividad biológica observada.

► Ninguno de los extractos presentó actividad antioxidante.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este proyecto, tanto los relacionados con el establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de los diferentes perfiles cromatográficos, como los relacionados con la expresión de actividad biológica de cada uno de los extractos evaluados, permitirá el desarrollo de futuros proyectos enfocados hacia la purificación biodirigida de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica detectada. Al mismo tiempo, el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos de las especies de *Sanicula* y *Eryngium*, permitirá comprobar la hipótesis de que los constituyentes de las Apiaceas mexicanas poseen esqueletos carbonados similares a los de las Apiaceas sudamericanas. Asimismo, dado que el conocimiento fitoquímico sobre *Sanicula liberta* y las cuatro especies de *Eryngium* es limitado o inexistente, la identificación de metabolitos secundarios, bioactivos o no, producidos por estas especies contribuirá al conocimiento fitoquímico de la familia Apiaceae en general y de las diferentes especies en particular. Finalmente, el aislamiento y purificación de los metabolitos bioactivos de los géneros *Eryngium* y *Sanicula*, permitirá la evaluación de los diferentes productos de manera individual y la exploración de su posible sitio o mecanismo de acción.

ANEXO

Distribución de especies pertenecientes a la familia *Apiaceae* en la República mexicana.

Género	Especie	Estado
<i>Ammi</i>	<i>majus*</i>	EDO MEX, OAX, TAM, VER.
<i>Anethum</i>	<i>graveolens</i>	CHIS, TAB, VER.
<i>Angelica</i>	<i>mexicana</i>	VER.
	<i>nelsonii</i>	CHIS, EDOMEX, HID, QRO, VER.
<i>Apium</i>	<i>graveolens</i>	COAH, HID, MICH.
	<i>leptophyllum</i>	CHIS, DF, EDO MEX, HID, JAL, PUE, TAM, TLAX, VER, YUC.
<i>Arracacia</i>	<i>aegopodioides*</i>	GTO, HID, MICH, VER.
	<i>atropurpurea</i>	COAH, CHIS, DF, EDO MEX, JAL, MICH, OAX, VER.
	<i>bracteata*</i>	TAB.
	<i>fruticosa</i>	CHIS, JAL, NL, TAB, VER.
	<i>guatemalensis</i>	TAM.
	<i>hemsleyana</i>	GRO, VER.
	<i>liemsleyana*</i>	OAX.
	<i>longipedunculata</i>	GTO, MICH.
	<i>nelsonii*</i>	CHIS, OAX, VER.
	<i>pringlei</i>	CHIS.
	<i>rigida</i>	CHIS, MICH, QRO, VER.
	<i>schiedei</i>	VER.
	<i>tolucensis</i>	COAH, DF, GTO, MICH, PUE, QRO, VER.
<i>Berula</i>	<i>erecta</i>	DF, EDO MEX, GTO, JAL, MICH, NL, TLAX, VER.
	<i>pusilla</i>	VER.
<i>Bowlesia</i>	<i>flabilis</i>	MICH.
<i>Centella</i>	<i>asiatica</i>	VER.
<i>Cicuta</i>	<i>maculata</i>	VER.
	<i>mexicana</i>	VER.
<i>Conium</i>	<i>maculatum</i>	EDO MEX, TLAX, VER.
<i>Coriandrum</i>	<i>sativum*</i>	CHIS, HID, TAB, VER, YUC.
<i>Coulterophytum</i>	<i>brevipes</i>	QRO.
	<i>laxum</i>	QRO.
<i>Cyclospermum</i>	<i>leptophyllum</i>	VER.
<i>Daucus</i>	<i>carota*</i>	CHIS, GTO, MICH, NL, VER, YUC.
	<i>montanus</i>	COL, CHIS, JAL, MICH, OAX, PUE, QRO, VER.
<i>Donnellsmithia</i>	<i>junceae</i>	CHIS, GTO, JAL, MICH, NAY, OAX.

<i>Enantiophylla</i> <i>Eryngium</i>	<i>mexicana</i>	EDO MÉX, JAL, MICH, QRO.
	<i>pinnatisecta</i>	NAY.
	<i>serrata</i>	OAX.
	<i>tuberosa</i>	MICH, MOR, VER.
	<i>heydeana</i>	JAL, MICH, NAY.
	<i>alternatum</i>	MICH.
	<i>beecheyanum</i>	GTO, HID, JAL, MICH, NAY, OAX, VER.
	<i>bonplandii</i>	MICH.
	<i>bromeliaefolium</i>	MOR.
	<i>carlinae</i>	DF, DGO, EDO MÉX, HID, JAL, MICH, OAX, PUE, TAB, TAM, TLAX, VER.
	<i>cervantesii</i>	EDO MÉX, MICH, QRO.
	<i>columnare</i>	JAL, VER.
	<i>comosum*</i>	EDO MÉX, MICH, PUE, TLAX, VER, TAM.
	<i>cymosum</i>	COAH.
	<i>depeanum</i>	HID, OAX, VER.
	<i>fluitans</i>	MICH.
	<i>foetidum*</i>	CHIS, TAB, VER, CAM.
	<i>ghiesbreghtii*</i>	CHIS, GRO.
	<i>gracile</i>	CHIS, GTO, JAL, MICH, OAX.
	<i>hemsleyanum</i>	NL, COAH, EDO MÉX, MOR.
	<i>involucratum</i>	OAX.
	<i>jaliscense</i>	JAL.
	<i>lemmani</i>	CHIH.
	<i>longifolium</i>	MICH, CHIS.
	<i>mexiae</i>	MICH.
	<i>monocephalum</i>	MICH, PUE, VER.
	<i>nasturtiifolium</i>	CHIS, JAL, VER.
<i>Foeniculum</i> <i>Hydrocotyle</i>	<i>palmeri</i>	JAL.
	<i>pectinatum</i>	EDO MÉX, JAL, MOR.
	<i>phyteumae</i>	MICH.
	<i>proteiflorum</i>	EDO MÉX, VER.
	<i>ranunculoides</i>	DF, HID, JAL, VER.
	<i>rosei</i>	DGO, OAX.
	<i>scaposum</i>	CHIS, OAX, VER.
	<i>serratum</i>	EDO MÉX, GTO, HID, QRO, VER.
	<i>sparganophyllum</i>	MICH.
	<i>stenolobum</i>	MICH.
<i>Lilaeopsis</i>	<i>subacaule</i>	MICH, VER.
	<i>venustum</i>	VER.
	<i>vulgare*</i>	EDO MÉX, HID, VER.
	<i>bonariensis</i>	CAM, TAM, VER.
	<i>mexicana</i>	CHIS, JAL, OAX, PUE, QRO, VER.
	<i>ranunculoides</i>	EDO MÉX, GTO, HID, MICH, TLAX, VER.
	<i>umbellata</i>	COL, HID, MICH, NAY, TAB, VER, YUC.
	<i>verticillata</i>	VER, MICH.
	<i>schaffneriana</i>	HID, MICH, VER.

<i>Meliocarpus</i>	<i>occidentalis</i>	GRO.
<i>Micropleura</i>	<i>renifolia</i>	CHIS, JAL, MICH, QRO, VER.
<i>Neogoezia</i>	<i>gracilipes</i>	MICH.
	<i>planipetala</i>	JAL, MICH, NAY.
<i>Oreomyrrhis</i>	<i>orizabae</i>	VER.
<i>Osmorhiza</i>	<i>mexicana*</i>	DF, EDO MÉX, JAL, NL, OAX, VER.
<i>Ottoa</i>	<i>oenanthoides</i>	OAX, VER.
<i>Petroselinum</i>	<i>crispum</i>	CHIS, OAX, VER.
<i>Prinosciadium</i>	<i>acuminatum</i>	JAL.
	<i>diversifolium</i>	HID, JAL, NAY.
	<i>gomez-pompae</i>	VER.
	<i>madrense</i>	JAL.
	<i>megacarpum*</i>	MICH.
	<i>thapsoides</i>	DF, GTO, MICH, NAY, PUE, VER.
<i>Rhodosciadium</i>	<i>longipes</i>	VER.
	<i>montanum</i>	GTO.
	<i>pringlei</i>	GRO, JAL, MICH.
	<i>purpureum</i>	HID.
	<i>tolucense</i>	CHIS, DF, EDO MÉX, MICH, PUE, QRO, VER.
	<i>tuberosum</i>	EDO MÉX, GTO, MICH, NL.
<i>Sanicula</i>	<i>liberta*</i>	VER, CHIS, QRO, TAM, HID, GTO.
<i>Spananthe</i>	<i>paniculata</i>	CHIS, JAL, MICH, NAY, PUE, QRO, VER.
<i>Tauschia</i>	<i>decumbens</i>	EDO MÉX, GTO, JAL, MICH.
	<i>hintoniana*</i>	COAH.
	<i>humilis</i>	EDO MÉX.
	<i>nudicaulis</i>	GTO, QRO, VER.
	<i>seatonii</i>	COAH, GTO, QRO, VER.
<i>Torilis</i>	<i>nodosa</i>	GTO, OAX, VER.

* Especies con ejemplares de respaldo en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).