



1 de agosto de 2014 | Vol. 15 | Núm. 8 | ISSN 1607 - 6079

ARTÍCULO

BIOTECNOLOGÍA PARA PRODUCIR MEDICINAS DE PLANTAS MEXICANAS

*María Luisa Villarreal, Alexandre Cardoso-Taketa,
Anabel Ortíz y Ashutosh Sharma*

BIOTECNOLOGÍA PARA PRODUCIR MEDICINAS DE PLANTAS MEXICANAS

Resumen

Las plantas son una fuente natural para la obtención de compuestos que pueden ser usados como medicamentos. Estos se encuentran en bajas concentraciones y su presencia y acumulación dependen de la genética de la planta y de variables ecológicas. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de estandarizar las materias primas vegetales para fabricar productos herbolarios de alta calidad. La biotecnología proporciona herramientas metodológicas útiles a través del cultivo de tejidos vegetales para producir los compuestos activos de las plantas en forma homogénea y controlada, y para incrementar su producción. El análisis computacional de los perfiles metabólicos ofrece un camino innovador para la estandarización de los extractos vegetales ya que facilita la detección simultánea y rápida de un amplio rango de compuestos en un momento del desarrollo de una planta. México es poseedor de una gran biodiversidad vegetal y las plantas medicinales ocupan un lugar preponderante en las prácticas médicas tradicionales de un amplio sector de la población. En este trabajo se presenta la investigación científica de la planta *Galphimia glauca* productora de compuestos sedantes y ansiolíticos. Este estudio ilustra los beneficios de realizar un trabajo experimental multidisciplinario con enfoque en la biotecnología, para investigar una planta endémica de México.

Palabras clave: plantas medicinales, biotecnología, cultivo de tejidos, metabólica.

BIOTECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF MEDICINES FROM MEXICAN PLANTS

Abstract

*Higher plants are a major source of compounds which can be used as medicines. These are produced in very small amounts and their synthesis depends on genetic and environmental factors. Hence, it is required to standardize and increase the production levels of active compounds in plants. Biotechnology offers novel procedures to adequately exploit the medicinal flora by using in vitro cultures systems of plant cells, tissues and organs, that produce these compounds. In silico procedures as metabolic profiling are leading technologies for the analysis of plant extracts that offered a fast and simultaneous detection of a high number of metabolites. México possess an enormous plant diversity, and herbal medicines are widely used for health-care needs. In this work we present the scientific investigation of the species *Galphimia glauca* which produce important sedative and anxyolitic metabolites. This study reflects the benefits of a multidisciplinary project focused in biotechnological procedures for the study of a native plant from México.*

Keywords: medicinal plants, biotechnology, in vitro cultures, metabolic profiling.

BIOTECNOLOGÍA PARA PRODUCIR MEDICINAS DE PLANTAS MEXICANAS

Introducción

Desde el inicio de su existencia el hombre ha buscado en la flora de su entorno plantas que le ayuden a tratar sus problemas de salud. En tiempos antiguos el reino vegetal representó la principal fuente para la obtención de medicamentos y una variedad de plantas fue utilizada en forma empírica para el tratamiento de diversas enfermedades.

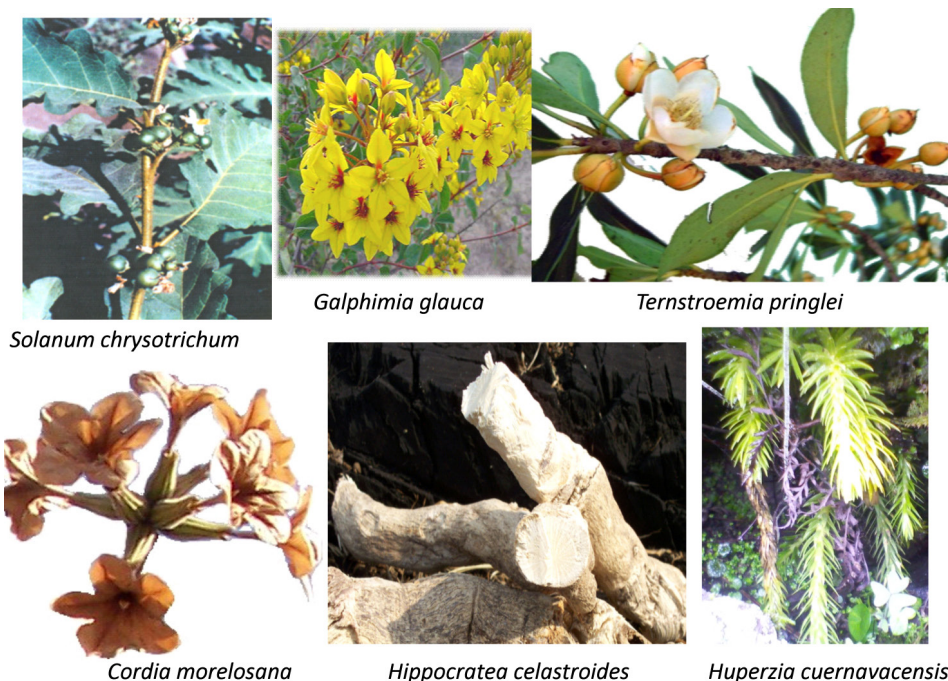
A través de los años, y con la ayuda de la investigación científica, ha sido posible validar experimentalmente los beneficios curativos de muchas plantas mediante protocolos de investigación que incluyen ensayos de laboratorio, pruebas en animales y estudios clínicos controlados practicados en humanos. Por otro lado, el uso de procedimientos químicos ha permitido aislar y purificar compuestos valiosos de las plantas que se emplean para tratar diversas enfermedades, lo que ha contribuido a mejorar sustancialmente la calidad de vida de muchos pacientes. Entre algunos de los compuestos de origen vegetal con alto valor que son utilizados hoy en día se pueden mencionar: el digital cardiotónico para tratar problemas cardíacos, la artemisina utilizada contra la malaria, la codeína y morfina que son dos poderosos analgésicos; así como un grupo de antineoplásicos entre los que se encuentran la vincristina, la camptotecina, la podofilotoxina y el taxol, mismos que representan los medicamentos de elección para tratar ciertos tipos de cáncer.

Actualmente el 30 por ciento de los fármacos utilizados en medicina proceden del reino vegetal, y hay una tendencia notable a elevar esta cifra, debido al constante descubrimiento de nuevos principios activos de origen botánico. La síntesis y acumulación de la mayoría de los compuestos con relevancia médica presentes en las plantas, varía de acuerdo a diversos factores ecológicos y ambientales. Con el propósito de elevar la calidad y eficacia de los medicamentos herbolarios y de los fitofármacos, es importante establecer protocolos de control de calidad y de estandarización de sus principios activos.

Herbolaria en México

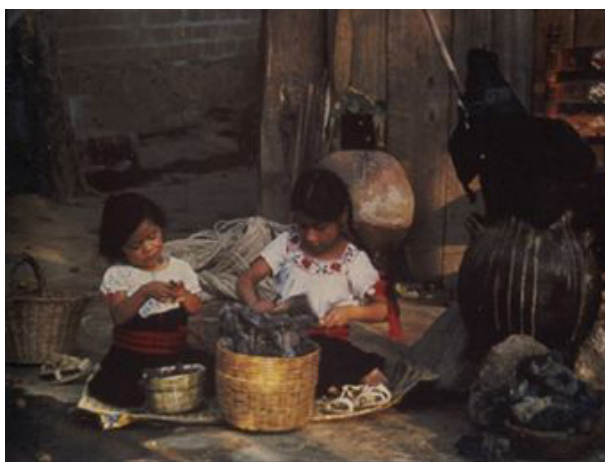
México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con mayor diversidad vegetal, además de contar con gran riqueza en flora medicinal (Fig. 1). El uso de las plantas medicinales en México representa un valioso elemento cultural que nos identifica como nación y que ha sido resguardado durante siglos por los médicos tradicionales y por los habitantes de nuestros pueblos indígenas (Fig. 2).

Figura 1. Algunas plantas medicinales de México.



Esta práctica se inició antes de la invasión de los españoles, y desde entonces ha jugado un papel notable en el combate de muchas enfermedades. Sin lugar a dudas, el testimonio más significativo de la medicina herbolaria de esa época está representado por el Códice de la Cruz Badiano, cuyo título en latín es *Libellus de medicinalibus indorum herbis* que significa "Libro de las Hierbas Medicinales de los Indios" (Fig 3). Este texto que fue escrito en 1552 por el médico xochimilca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, también xochimilca y estudiante del Colegio de Santa Cruz, es considerado como el primer *vademecum* que contiene la sabiduría herbolaria precolombina que fue heredada a los mexicanos (AGUIRRE BELTRÁN Y MORENO DE LOS ARCOS, 1990). Además de ilustrar con gran belleza las plantas medicinales de esa época, proporciona fórmulas de aplicación, ingredientes y dosis para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Figura 2. Niñas preparando plantas medicinales



Actualmente, de acuerdo con los reportes del Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social, existen más de 6000 especies de plantas medicinales que son utilizadas por amplios sectores de la población (AGUILAR CONTRERAS Y MARTÍNEZ ALFARO, 1993). Es evidente que el uso de las plantas medicinales, desde el México prehispánico hasta nuestros días, es una práctica que ha tenido gran relevancia en los esquemas de salud pública de nuestro país.

Necesidad de regular los medicamentos herbolarios

Es frecuente encontrar que la presencia y concentración de estos compuestos dependen de la edad de la planta, la composición del suelo, el clima, la genética de la planta, el lugar de la colecta y hasta la forma de almacenarla. Aun cuando la herbolaria está presente en casi todo el mundo y con ello la comercialización de materias primas con muy diversas presentaciones, que incluyen desde hierbas secas, polvos, infusiones, pomadas, ungüentos, o bien suplementos vegetales,

Figura 3. Una ilustración del Códice de la Cruz-Badiano

Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis



el control de calidad y la regulación de estos productos siguen siendo escasos. Un control de calidad adecuado que permita incorporar los medicamentos herbolarios a los sistemas de salud, tendría que basarse en el conocimiento de la naturaleza química de los compuestos activos que están presentes en la materia prima vegetal, además de conocer la concentración de los mismos y la eficacia que mantienen durante su almacenamiento. En cuanto a la comercialización de los medicamentos herbolarios, en algunos países aún se debate de si debe hacerse libremente como suplementos alimenticios, o bien someterse a las regulaciones aplicadas a los fármacos sintetizados químicamente. Por ejemplo, en los Estados Unidos se permite el consumo y la venta del material vegetal con valor medicinal que haya sido clasificado como suplemento nutricional, siempre y cuando las agencias regulatorias asociadas a la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en Inglés) no hayan detectado que contengan principios tóxicos.

Investigación científica de plantas medicinales: un trabajo multidisciplinario

El estudio científico de las plantas medicinales requiere de la participación de varias disciplinas, que permitan integrar los perfiles químicos completos de una especie, e identificar aquellos compuestos que ejercen una actividad farmacológica específica. En muchas ocasiones la etnobotánica nos orienta en la selección de plantas idóneas, ya que estudia e identifica las plantas de amplio uso popular para tratar ciertos padecimientos. Los ensayos farmacológicos utilizando tanto modelos *in vitro* en el laboratorio como modelos *in vivo* con animales, permiten confirmar las actividades farmacológicas atribuidas a las plantas, de las cuales se estudian sus extractos, fracciones o bien los compuestos puros. La fitoquímica se encarga de investigar los compuestos presentes en las plantas, y para ello se utilizan habitualmente procedimientos cromatográficos especializados que permiten su aislamiento y purificación, para más adelante elucidar sus estructuras usando

para ello técnicas espectroscópicas convencionales como son la resonancia magnética nuclear o la cristalografía de rayos X. La información anterior es necesaria para llevar a cabo estudios clínicos controlados donde se pueda establecer, en función de la dosis, la actividad y seguridad del medicamento herbolario estandarizado. El concurso de otras disciplinas de frontera como son la biología molecular, la biotecnología, la fisiología molecular y la biología de sistemas entre otras, está permitiendo elucidar los mecanismos de acción de los fármacos vegetales, establecer las rutas metabólicas de síntesis y diseñar procedimientos para lograr la producción controlada de los principios activos.

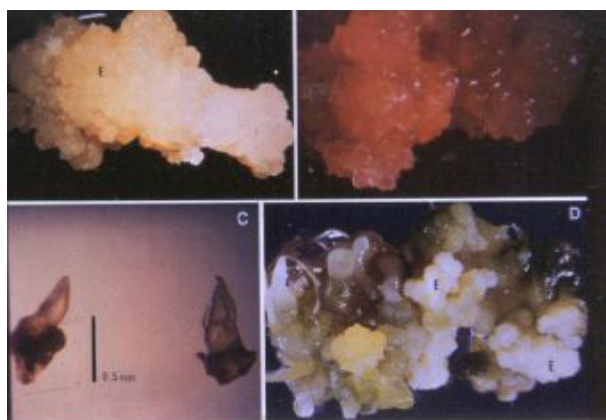
Biotecnología para la producción de fármacos vegetales

El empleo de procedimientos de "cultivo *in vitro*" ha permitido crecer células, tejidos y órganos provenientes de las plantas en condiciones controladas de laboratorio. Estos cultivos integran un conjunto de metodologías especializadas usadas para cultivar el material vegetal en forma estéril con medios nutritivos sólidos o líquidos, a los que se les adicionan reguladores de crecimiento vegetal. Utilizando estos cultivos, se ha logrado producir de manera homogénea y controlada algunos compuestos de alto valor agregado que habitualmente se encuentran en la planta de origen.

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ofrecer muchas ventajas para la producción de los compuestos activos, entre las que se pueden mencionar las siguientes: 1) un suplemento continuo de compuestos en forma óptima y bajo condiciones controladas; 2) la independencia de factores climáticos y de plagas presentes en plantas silvestres; 3) la propagación de especies con crecimiento muy lento o que se encuentran en peligro de extinción; y 4) la acumulación de compuestos que no se han podido identificar en la planta de origen. Por otro lado, y al ser los cultivos *in vitro* sistemas altamente controlados, éstos pueden constituir modelos adecuados para realizar investigaciones bioquímicas y fisiológicas que ayuden a entender el metabolismo secundario de las plantas; así como a investigar aspectos básicos sobre sus mecanismos de especialización o diferenciación. Actualmente, algunos de los cultivos vegetales más utilizados en investigación y producción de fármacos son los cultivos de callos, de células en suspensión y de raíces transformadas (Fig. 4).

- **Cultivos de callos.** Los callos son agregados de células proliferantes no especializadas que crecen en medios semisólidos en presencia de carbohidratos, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, y que son suplementados con reguladores de crecimiento vegetal del grupo de las auxinas y las citocininas. Estas últimas son las responsables de mantener el crecimiento no diferenciado. Los callos crecen bajo condiciones estériles y usualmente se inducen a partir de tejidos jóvenes de la planta. En teoría es posible obtener callos de todas las especies vegetales; sin embargo, las condiciones óptimas para su crecimiento dependen de cada especie y requieren ser determinadas. Los callos pueden variar en su textura, desde duros y compactos, a tejidos friables. Los tejidos callosos constituyen el material primario que permitirá establecer cultivos de células en suspensión.

Figura 4. Fotografía que ilustra el cultivo de callos, células en suspensión y raíces transformadas.



a) cultivo de callos



b) células en suspensión



c) raíces transformadas

- Cultivos de células en suspensión.** Los cultivos de células en suspensión se establecen a partir de callos finamente fragmentados y transferidos a medios nutritivos líquidos conteniendo reguladores de crecimiento vegetal, y creciendo bajo condiciones controladas de iluminación (oscuridad, luz continua, o fotoperiodo) y temperatura (25°C a 28°C). Los cultivos en suspensión crecen en agitación continua utilizando agitadores orbitales, lo que permite un suplemento continuo de nutrientes y oxígeno disuelto. Las suspensiones celulares se subcultivan a medios nuevos con regularidad. Diversos factores físico-químicos, nutricionales y hormonales juegan un papel crucial para lograr la producción óptima de los compuestos de interés. Aun cuando hay muchos problemas que solucionar en relación con estos cultivos, los procesos industriales actuales se basan en cultivos de células en suspensión.

- Cultivos de raíces transformadas.** Estos cultivos son altamente diferenciados y potencialmente producen una mayor concentración de metabolitos secundarios. Las raíces transformadas crecen en ausencia de reguladores vegetales y generalmente se obtienen por transformación genética a través de genes contenidos en plásmidos de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Se ha demostrado que estos cultivos poseen una mayor capacidad de biosíntesis

de algunos metabolitos secundarios. Ofreciendo de esta manera, un repertorio más amplio de producción de compuestos naturales al compararse con cultivos indiferenciados de las mismas especies vegetales como son los callos y las células en suspensión (GIRI y NARASAU, 2000).

Figura 5. Producción del taxol en biorreactores de 70,000 L.

- Cultivos en biorreactores.** Los cultivos celulares que crecen en medios líquidos pueden escalarse a volúmenes mayores empleando dispositivos que reciben el nombre de biorreactores, de los que existen diversos modelos y tamaños. A la fecha, muy pocos procedimientos que utilizan células u órganos vegetales se han establecido en una escala comercial. Algunos ejemplos se refieren a la producción de los colorantes chiconina y purpurina y de compuestos con valor medicinal como son la berberina, la sanguinarina, los gíngenos y el taxol (PAYNE *et al.*, 1991). Sin lugar a dudas, el ejemplo más notable ha sido la producción del taxol, potente anticancerígeno para tratar cáncer de ovario y de mama, que es producido en Alemania por la Compañía Phyton, utilizando tanques de 70,000 litros (Fig. 5). Aun cuando existen diversos problemas asociados con la explotación racional del cultivo de células y órganos, esta estrategia de producción ofrece beneficios importantes que justifican su estudio y su implementación.
- Análisis metabolómico.** Los avances tecnológicos en la detección y análisis masivo de compuestos de plantas y en el campo de la informática aplicada a sistemas biológicos han permitido la obtención de información valiosa sobre el perfil de producción de compuestos al interior de una planta. Esta información puede utilizarse como un excelente instrumento en el análisis de extractos vegetales con aplicaciones comerciales importantes, como es el caso de la industria farmacéutica y la alimentaria. La aplicación del análisis metabolómico en el estudio de los vegetales es relevante y es posible utilizarla en aspectos tales como: el control de calidad de materias primas, el monitoreo de procesos industriales y en la elaboración de productos herbolarios terminados. Por otro lado, esta metodología de vanguardia, permitirá desarrollar investigación básica en farmacología, biotecnología y quimiotaxonomía de las plantas. La metabolómica de plantas representa una nueva área que analiza el conjunto de metabolitos vegetales como resultados de las características fenotípicas de las especies vegetales. El análisis metabolómico basado en los registros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN1H) de un extracto vegetal, permite generar datos multi y megavariados, que resultan de la presencia de miles de metabolitos secundarios. La integración de estos datos es compleja y se logra mediante un proceso estadístico conocido como Análisis del Componente Principal (PCA), que reduce la complejidad y los procesa en función de sus similitudes y diferencias. Además facilita la rápida detección de un amplio rango de metabolitos primarios y secundarios en un determinado momento del desarrollo de una planta (Fig. 6). Estos patrones químicos, finalmente reflejan los cambios relacionados con el medio ambiente o con variaciones genéticas en el perfil de metabolitos de una planta (WANG *et al.*, 2004).



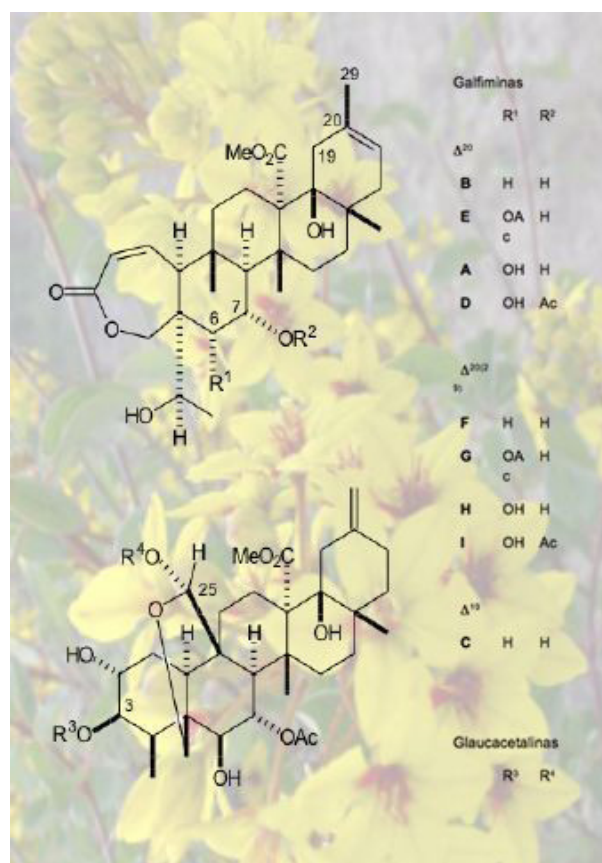
Figura 6. Procedimiento de análisis metabólico.



Investigaciones biotecnológicas de la planta mexicana *Galphimia glauca*

Figura 7. *Galphimia glauca* en época de floración y estructura química de los compuestos sedantes: galfiminas (A-I) y glaucacetalinas (A-C).

Nuestro grupo de investigación del Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos ha realizado investigación biotecnológica de la planta mexicana *Galphimia glauca* (Cav) Kuntze de la familia Malpighiaceae que aborda el cultivo *in vitro* (empleando células, tejidos y órganos), y el análisis metabólico de esta especie. *G. glauca* se distribuye en varios estados de la República Mexicana y ha sido ampliamente estudiada por grupos nacionales e internacionales debido a que ejerce una potente actividad sobre el sistema nervioso central. Inicialmente nuestro grupo realizó estudios que integran aspectos fitoquímicos y farmacológicos de esta planta endémica de México. Se han aislado y elucidado los principios biodinámicos de *G. glauca* que corresponden a una familia de



nueve triterpenos del tipo de los nor-secofridelanos que han sido denominados como galfiminas A-I (fusionar Fig.7), y que presentan una potente actividad sedante y ansiolítica (CARDOSO-TAKETA *et al.*, 2004). Dichas actividades han sido demostradas en diversos modelos celulares y animales, así como en estudios clínicos realizados en humanos (HERRERA-RUIZ *et al.*, 2006). Las galfiminas se acumulan en concentraciones pequeñas en las plantas silvestres y su concentración varía notablemente de acuerdo con la edad de la planta y de factores estacionales.

- Cultivos in vitro.** Con el propósito de establecer modelos de producción controlados de las galfiminas que sirvan para el estudio de sus rutas biosintéticas, iniciamos cultivos *in vitro* de callos de *G. glauca* que fueron capaces de sintetizar galfimina B (el compuesto mayoritario) con un rendimiento similar a la planta silvestre, así como cultivos de células en suspensión en los que se logró un rendimiento superior en 36% de la galfimina B (OSUNA *et al.*, 2002). Sin embargo, y a pesar de que la acumulación del principio sedante bajo estas condiciones experimentales es del mismo orden de magnitud que el observado en la planta silvestre, estos valores continúan siendo bajos para lograr su escalamiento industrial. Más adelante, y con la intención de establecer genotipos estables, iniciamos cultivos de raíces transformadas, al inocular explantes estériles con la cepa bacteriana ATCC 15834 de *A. rhizogenes*. Los explantes infectados se sembraron en un medio nutritivo sólido y se incubaron en condiciones controladas de luz y temperatura. Después de diez a doce subcultivos diarios consecutivos, emergieron las raíces, y transcurridas nueve semanas de la inoculación, se observó el crecimiento de raíces pilosas, es decir la aparición de raíces cubiertas de pelo. También se establecieron cultivos de raíces en medios líquidos que fueron mantenidos en agitación, los cuales presentaron un crecimiento abundante (Fig. 8),

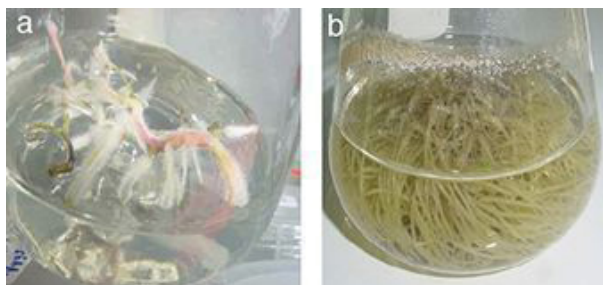


Figura 8. Raíces pilosas de *Galphimia glauca* creciendo en medio sólido (a) y en medio líquido (b)

después fueron subcultivados hasta que se realizó la cosecha de las biomasas y la separación de sobrenadantes.

- Aislamiento y elucidación de compuestos sedantes producidos por cultivos de raíces transformadas.** A partir de las biomasas de raíces fue posible aislar el principio

sedante galfimina B, que fue identificado utilizando métodos cromatográficos convencionales y cuya concentración fue del mismo orden de magnitud al de la planta silvestre. Adicionalmente del medio líquido, se aislaron tres compuestos de estructura novedosa que fueron purificados mediante cromatografía líquida de alta presión y elucidados mediante la aplicación de resonancia magnética nuclear. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los nuevos compuestos son triterpenos que se enmarcan en el tipo de nortriterpenos derivados del friedelano y que guardan una similitud estructural muy cercana con las galfiminas sedantes obtenidas de la planta de origen. Estos compuestos fueron denominados como glaucacetalinas A-C (NADER *et al.*, 2004). En un trabajo posterior utilizando callos que emergieron del cultivo de raíces, se aisló la cuarta glaucacetalina (ORTÍZ *et al.*, 2010). Utilizando un ensayo practicado en ratones, se comprobó que estas glaucacetalinas poseen una actividad sedante tan potente como las galfiminas obtenidas a partir de la planta (ORTÍZ *et al.*, 2010). Es importante señalar que las glaucacetalinas nunca han sido identificadas en la planta silvestre, lo que indica que es probable que las condiciones de cultivo y de transformación propicien favorablemente su síntesis. Por otro lado, la excreción de las glaucacetalinas al medio de cultivo en el que se encuentran creciendo las raíces, facilita su recuperación y permite una mayor producción de dichos compuestos sedantes.

- Análisis metabolómico.** Los estudios científicos de *G. glauca* referidos en párrafos anteriores se realizaron con ejemplares de la planta colectados en el municipio de Doctor Mora, en el estado de Guanajuato. Como también fue previamente indicado, esta especie crece en varios estados de la República Mexicana, y las poblaciones naturales que habitan en estas entidades no habían sido investigadas en relación con la presencia de compuestos activos. Con el propósito de realizar un análisis comparativo y sentar las bases para realizar un control de calidad adecuado de los extractos de la planta, se diseñó un estudio metabolómico que permitió un análisis global de los extractos crudos de *G. glauca* recolectada en seis localidades distintas de la República Mexicana. Para realizar este trabajo pionero se colectaron individuos de las siguientes localidades: Doctor Mora, Gto. (GM); Jalpan de Serra, Qro. (QJ); Guadalajara, Jal. (JG); Cuernavaca (MC), San Andrés de la Cal (MS) y Tepoztlán (MT), Mor., con un mínimo de 6 individuos por sitio de recolección, lo que resultó en un total de 39 muestras. Una muestra de cada localidad fue autenticada y depositada en el Herbarium HUMO-CEAMISH. A partir de las hojas, se prepararon extractos de cada muestra utilizando disolventes deuterados para el registro de espectros de RMN1H. Para la obtención del perfil metabolómico mediante PCA y análisis discriminatorio de mínimos cuadrados (PLS-DA), se empleó el programa SIMCA-P 11.0, Umetrics (CARDOSO-TAKETA *et. al.*, 2008). En la figura 9 se observa claramente una discriminación entre las diferentes poblaciones analizadas. Es importante señalar que el posicionamiento de cada extracto crudo en la gráfica PC-1 vs. PC-2 dependió de las señales de RMN1H que generaron cada muestra y su relación con las señales de los otros 36 extractos. Las señales de RMN1H de las galfiminas fueron las cruciales en la diferenciación de las poblaciones GM y QJ de las demás (lado derecho de la figura).

Figura 6. Procedimiento de análisis metabolómico.

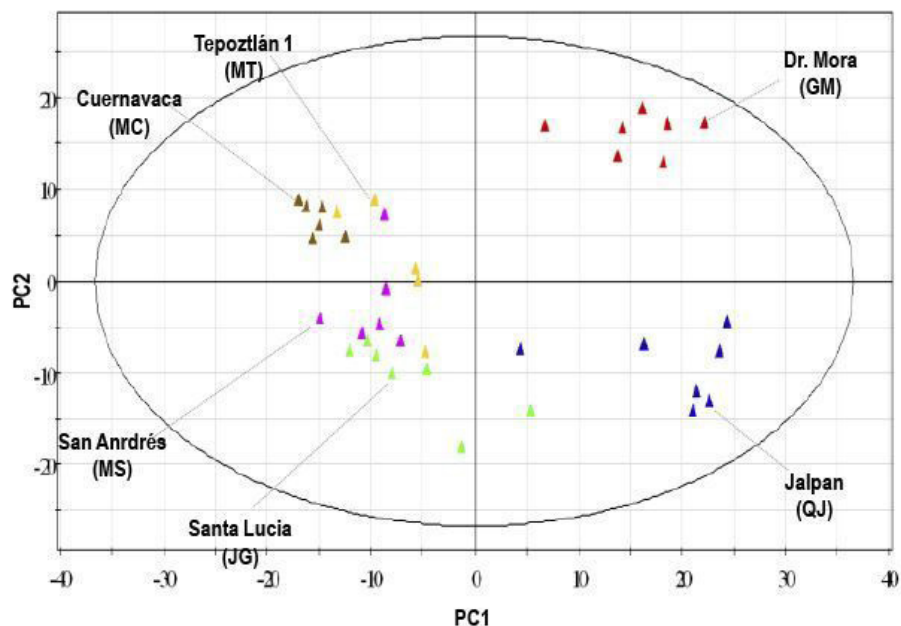


Figura 10. Prueba de la cruz elevada (a) y prueba de potenciación del sueño por barbituratos para determinar el efecto ansiolítico y sedante respectivamente, de diferentes poblaciones de *Galphimia glauca*.

- Actividades farmacológicas en seis poblaciones de *G. glauca*.**

El perfil metabólico basado en los espectros de RMN1H y análisis por PCA sugirió entonces que las diferencias químicas obtenidas entre las poblaciones podrían tener un impacto directo en las actividades farmacológicas. Las evaluaciones farmacológicas de los extractos crudos de dichas poblaciones se llevaron a cabo en ratones de laboratorio utilizando el modelo de la cruz elevada y el modelo de la potenciación de hipnosis por barbituratos (SHARMA *et al.*, 2012), los cuales son los ensayos neurofarmacológicos más validados para medir actividades ansiolíticas y sedantes respectivamente. El modelo de la cruz elevada mide los niveles de ansiedad en un ratón en un nuevo ambiente de exploración, con la expectativa de que los ratones no tratados permanecerán más tiempo en los brazos cerrados de la cruz elevada que en los brazos abiertos. El modelo de hipnosis inducida por pentobarbital permite registrar el tiempo de duración del sueño que se potencializa en presencia de una sustancia con actividad sedante. Al utilizar el ensayo de ansiedad se observó una diferencia significativa entre los animales inyectados con vehículo y aquellos inyectados con diazepam (control positivo), en relación con el porcentaje de permanencia en los brazos abiertos. En relación con los extractos evaluados, solamente los provenientes de GM y QJ se mostraron activos. El modelo de sedación indicó que las muestras GM y QJ presentaron valores de actividad estadísticamente diferentes al vehículo, siendo que la muestra MT se consideró con actividad intermedia (Fig. 10). Los resultados anteriores son acordes con el análisis metabólico aplicado a estas poblaciones, lo que indicó que sólo las poblaciones GM y QJ contienen las galfiminas. Con el propósito de demostrar una correlación mutua directa entre perfil metabólico y las actividades ansiolítica y sedante, se empleó un método de análisis multivariado supervisado mediante análisis discriminador del modelado de regresión de los mínimos cuadrados (PLS-DA). Los resultados de dicho análisis indicaron claramente que las señales de RMN1H de las galfiminas contribuyeron en forma decisiva para dicha discriminación, resultando en una máxima separación entre poblaciones activas e inactivas (Fig. 11).

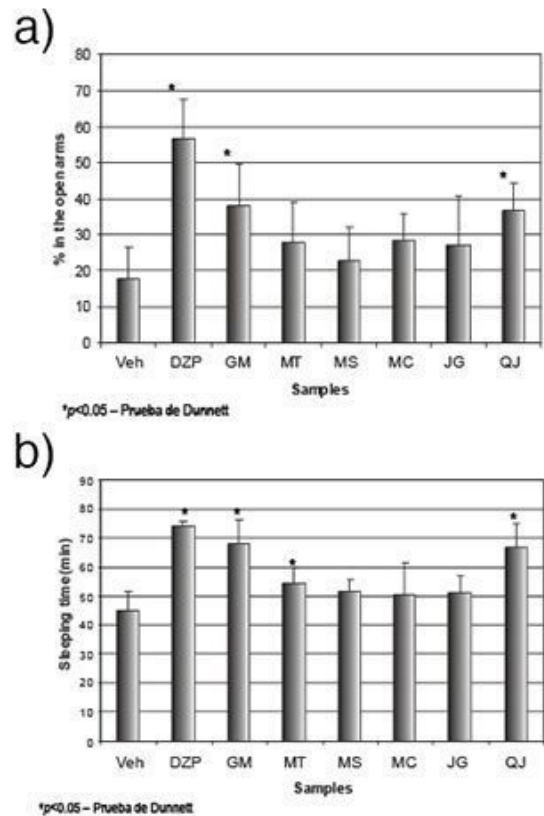


Figura 11. Perfil metabolómico y actividades ansiolíticas y sedantes de los extractos de diferentes poblaciones de *Galphimia glauca*.

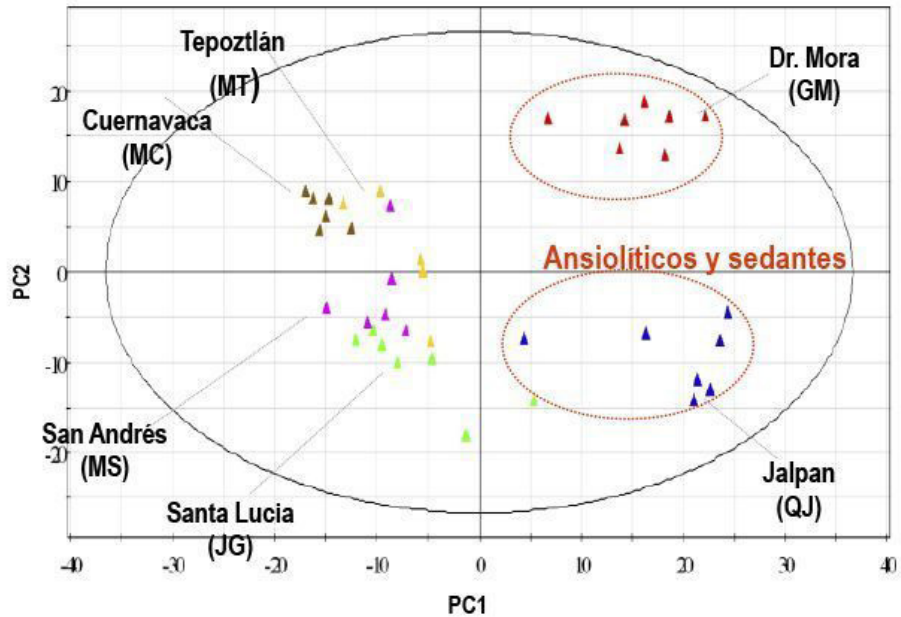
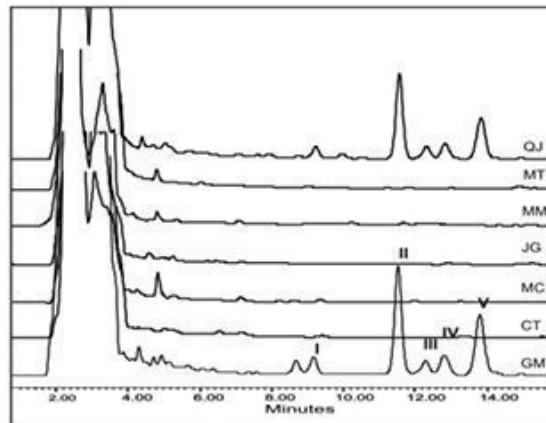


Figura 12. Perfiles cromatográficos de diferentes poblaciones de *Galphimia glauca*.



- Identificación de galfiminas.** La identificación y cuantificación de las galfiminas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Los cromatogramas que se presentan en la figura 12 indican la presencia de galfiminas solamente en las poblaciones recolectadas en GM y en QJ, estando ausentes en las plantas de las demás localidades. Las muestras de Guanajuato (GM) presentaron un promedio de 6.58mg de galfiminas (picos I-V) por

gramo de peso seco de hojas, rendimiento mayor que los 5.66mg/g PS de galfiminas presentes en el material de Querétaro (QJ) (CARDOSO-TAKETA *et al.*, 2008).

Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante el análisis metabolómico realizado en diferentes poblaciones de *G. glauca* ponen en evidencia una vez más, la necesidad de estandarizar las materias primas vegetales para los productos herbolarios y los fitofarmacos, ya que el contenido de metabolitos en una planta puede variar mucho en función del sitio de recolección o de características ontogenéticas. Las investigaciones con *G. glauca* representan el primer estudio metabolómico de una planta mexicana utilizando RMN y análisis multivariado. El enfoque de este trabajo permitió diferenciar poblaciones con

contenidos variables de principios activos que se correlacionan con los datos farmacológicos. La información obtenida podrá ser utilizada en el futuro para establecer los requerimientos analíticos encaminados a lograr la estandarización adecuada y el control de calidad en la producción de un fitomedicamento a base de este importante recurso herbolario de México. ❄

Bibliografía

- [1] AGUILAR CONTRERAS, A. y Martínez Alfaro, M.A. "Los Herbarios Medicinales de México", *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. México, DF: Secretaría de Salud, 1993, pp. 89-102.
- [2] AGUIRRE BELTRÁN, G. y Moreno de los Arcos, R. *Historia General de la Medicina en México*, 1990, pp. 250.
- [3] CARDOSO-TAKETA, A.T. *et al.* "Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*", *Journal of Natural Products*, 2004, 67, pp. 644-649.
- [4] CARDOSO-TAKETA, A.T., *et al.* "Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis", *Planta Medica*, 2008, 74, pp. 1295-1301.
- [5] GIRI, A. y Narasau, L.M. "Transgenic hairy roots: recent trends and applications", *Biotechnology Advances*, 2000, 18, pp. 1-22.
- [6] HERRERA-RUIZ, M., *et al.* "Anxiolytic and antidepressant-like activity of standardized extracts from *Galphimia glauca*", *Phytomedicine*, 2006, 13, pp. 23-28.
- [7] NADER, B., *et al.* "Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of norfriedelanes", *Planta Médica*, 2004, 70, pp. 1174-1179.
- [8] ORTÍZ, A., *et al.* "Transformed cell suspension cultura of *Galphimia glauca* producing sedative nor-friedelanes", *Planta Médica*, 2010, 76, pp. 386-392.
- [9] OSUNA, L., Pereda-Miranda, R., Villarreal M.L. "In vitro production of sedative galphimine B by cell suspension cultures of *Galphimia glauca*", *Biotechnology Letters*, 2002, 24, pp. 257-261.
- [10] PAYNE, C., Prince, C., Schuler, M. *Plant Cell Tissue and Organ Culture in Liquid Systems*. Munich: Hanser Publisher, 1991, pp. 177-224.
- [11] SHARMA, A., *et al.* "A comparison on the metabolic profiling of the Mexican

anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later", *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 141, pp. 964-974.

- [12] WANG, Y.H., *et al.* "Metabolomics strategy for the classification and quality control of phytomedicine: a case study of chamomile flower (*Matricaria recutita*)", *Planta Medica*, 2004, 70: pp. 250-255.