



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE LA HIERBA DEL SAPO (*Eryngium carlinae* DELAR F.)
(UMBELLIFERAE)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

GISELA TORO RIVERA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

VOCAL: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SECRETARIO: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

1° SUPLENTE: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR

2° SUPLENTE: DR. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

GISELA TORO RIVERA

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y enseñarme el inmenso valor de la educación. Por mi raza hablara el espíritu.
- A la **Dra Isabel Aguilar Laurents** por su apoyo incondicional, su indiscutible pasión por la enseñanza, sus valiosos consejos, y su indudable calidad moral y ética.
- Al M. en C. Gonzalo Rodolfo Lara Issasi por su ayuda y consejos durante todo el proceso de obtención de los compuestos.
- A los miembros del jurado Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano, Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar y al Dr. Abraham Madariaga Mazón.
- A la DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM) proyecto IN225017.

DEDICATORIAS



ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Familia Umbelliferae.....	3
2.2 Género <i>Eryngium</i>	3
2.2.1 Características del género.....	5
2.2.2 Distribución.....	5
2.2.3 Composición química.....	6
2.2.4 Compuestos polifenólicos.....	11
2.2.4.1 Ácidos fenólicos.....	12
2.2.4.2 Ácido rosmarínico.....	13
2.2.5 Actividad farmacológica del género <i>Eryngium</i>	15
2.2.5.1 Actividad anti inflamatoria.....	15
2.2.5.2 Actividad antibacterial y antifúngica.....	15
2.2.5.3 Actividad contra el veneno de escorpión y serpiente.....	15
2.2.5.4 Actividad antioxidante.....	15
2.2.5.5 Actividad antimutagénica y antitumoral.....	16
2.3 <i>Eryngium carlinae</i> D.....	16
2.3.1 Nombres comunes.....	16
2.3.2 Clasificación taxonómica.....	16
2.3.3 Sinonimia.....	17
2.3.4 Distribución geográfica.....	17



	Paginas
2.3.5 Descripción.....	18
2.3.6 Usos.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo principal.....	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
5. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1 Material y equipo utilizado.....	22
5.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD).....	22
5.1.2 Cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP).....	22
5.1.3 Cromatografía en columna abierta (CCA),.....	22
5.2 Recolección e identificación del material vegetal.....	22
5.3 Extracción.....	23
5.4 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria [CMI (mg/mL)].....	24
5.4.1 Microorganismos utilizados	24
5.4.2 Preparación de las muestras.....	25
5.4.3 Preparación del inóculo.....	25
5.4.4 Bioensayo.....	25
5.5 Análisis químico del extracto orgánico total	26
5.5.1 Fraccionamiento vía partición líquido-líquido.....	26
5.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano.....	27
5.6.1 Aislamiento y purificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.....	28
5.6.2 Aislamiento y purificación de una mezcla de ácidos grasos.....	29
5.7 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo.....	30



	Paginas
5.7.1 Aislamiento y purificación de ácido rosmarínico.....	32
5.7.2 Aislamiento y purificación del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.....	33
6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	
6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria.....	34
6.2 Identificación de la mezcla de β - sitosterol y estigmasterol.....	35
6.3 Identificación de la mezcla de ácidos grasos	37
6.4 Identificación del ácido rosmarínico.....	40
6.5 Identificación del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.....	42
7. CONCLUSIONES.....	46
8. PERSPECTIVAS.....	48
9. BIBLIOGRAFIA.....	49
10. ANEXOS.....	53



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados Centígrados
4CL	Hidroxicinamato:coenzima A ligasa
AcOEt	Acetato de etilo
BF ₃	Trifluoruro de Boro
CAH	Ácido cinámico 4-hidroxilasa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCI ₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear de hidrógeno
δ	Desplazamiento químico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectroscopía de masas
FA	Fracción del extracto de acetato de etilo
FH	Fracción del extracto de hexano
g	Gramos
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico



HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a multiples ligaduras
HSQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a una ligadura
HPPD	Hidroxifenil piruvato dioxidasa
HPPR	Hidroxifenil piruvato reductasa
iNOS	Oxido nítrico sintasa
IR	Infrarrojo
KOH	Hidróxido de potasio/ potasa
M⁺	Ión molecular
MeOH d4	Metanol deuterado
MEXU	Herbario Nacional de México
mg	miligramos
µg	micro gramos
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
mL	mililitros
mm	Milímetros
N	Concentración Normal
nm	Nanómetros
NOESY	Espectroscopía bidimensional homonuclear de interacciones incrementadas por efecto nuclear Overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	Fenilalanina amonio-transferasa
RMN -¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN -¹H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
SSP	Secretaria de Salud Publica
TAT	Tirosina amino-transferasa
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultra violeta
v_{max}	Frecuencia máxima



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Taxonomía del género <i>Eryngium</i> .	4
Figura 2. Clasificación de los compuestos polifenólicos	12
Figura 3. Ácido rosmarínico	13
Figura 4. Ruta biosintética del ácido rosmarínico	14
Figura 5. Distribución geográfica de <i>Eryngium carlinae</i>	17
Figura 6. <i>Eryngium carlinae</i>	18
Figura 7. Muestra de herbario de (<i>Eryngium carlinae</i>)	23
Figura 8. Espectro de IR de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.	53
Figura 9. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.	54
Figura 10. Espectro de IR de la mezcla constituida por: Deca-2,4-dienal (1), 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletildieno), (4aR-trans)-naftaleno (2), los ésteres metílicos de los ácidos hexadecanoico (3), octadecanoico (4), y tricosanoico (6), así como el ácido docosanoico (5), la triaracina (7), y el ácido hexacosanoico (8).	55
Figura 11. Cromatograma de gases de la mezcla de ácidos grasos de la fracción FH-9 del extracto de hexano.	56
Figura 12. Espectro de masas por impacto electrónico de deca-2,4-dienal (1).	56
Figura 13. Espectro de masas por impacto electrónico del 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletildieno), (4aR-trans)-naftaleno.	57
Figura 14. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido hexadecanoico (3).	57
Figura 15. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido octadecanoico (4).	58



Figura 16.	Espectro de masas por impacto electrónico del ácido docosanoico (5).	58
Figura 17.	Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido tricosanoico (6).	59
Figura 18.	Espectro de masas por impacto electrónico de la triaracina (7).	59
Figura 19.	Espectro de masas por impacto electrónico del ácido hexacosanoico (8).	60
Figura 20.	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	61
Figura 21.	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	62
Figura 22.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad COSY (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	63
Figura 23.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad COSY (Expansión) (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	64
Figura 24.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad NOESY (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	65
Figura 25.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad HMBC (400M Hz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	66
Figura 26.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad HMBC (Expansión) (400 MHz MeOH -d ₄) del ácido rosmarínico.	67
Figura 27.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad HSQC (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	68
Figura 28.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad HSQC (Expansión) (400 MHz MeOH-d ₄) del ácido rosmarínico.	69
Figura 29.	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	70
Figura 30.	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	71
Figura 31.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad COSY (400 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	72
Figura 32.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad COSY (Expansión) (400 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	73
Figura 33.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad NOESY (400 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	74
Figura 34.	Espectro de RMN- ¹ H modalidad HMBC (400 MHz MeOH-d ₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina	75



- Figura 35.** Espectro de RMN-¹H modalidad HMBC (Expansión) (400 MHz MeOH-d₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina **76**
- Figura 36.** Espectro de RMN-¹H modalidad HSQC (400 MHz MeOH-d₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina **77**

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Pag.
Tabla 1. Composición química del género <i>Eryngium</i>	6
Tabla 2. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana	24
Tabla3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano.	27
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo.	31
Tabla 5. Actividad antimicrobiana, determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, mg/mL), de diferentes extractos de <i>Eryngium carlinae</i> .	34
Tabla 6. Ácidos grasos identificados de la fracción FH-9 mediante CG/EM.	38

**INDICE DE ESQUEMAS**

	Pag.
Esquema 1. Procesamiento de la planta completa de <i>Eryngium carlinae</i> .	24
Esquema 2. Fraccionamiento primario por reparto del extracto orgánico total de <i>Eryngium carlinae</i> .	26
Esquema 3. Aislamiento y purificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol del extracto de hexano.	29
Esquema 4. Aislamiento y purificación de la mezcla de ácidos grasos.	30
Esquema 5. Aislamiento y purificación del ácido rosmarínico y del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina proveniente del extracto de acetato de etilo.	32

**INDICE DE CUADROS**

	Pag.
Cuadro 1. Constantes espectroscópicas de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.	36
Cuadro 2. Constantes de (IR) de los ácidos grasos constituyentes de la fracción FH-9 proveniente del extracto de hexano.	39
Cuadro 3. Constantes de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del ácido rosmarínico.	41
Cuadro 4. Constantes de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.	43



1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales para el alivio de diversos malestares de salud es una práctica común en diversos países. Según la OMS la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales que incluyen hierbas, material de herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos ingredientes (OMS, 2013).

En México según la Ley General de Salud los productos elaborados a base de plantas medicinales se clasifican en dos tipos:

- a) Medicamentos herbolarios: Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional (SSP, 2014).
- b) Remedios herbolarios: al preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad (SSP, 2014).



En México según datos de la Secretaría de Salud por lo menos el 90% de la población utiliza plantas medicinales y el 45% específicamente “hierbas”; de ese 90% una parte de la población cuenta únicamente con los beneficios que les aporta la medicina tradicional y la otra la utiliza como un complemento al tratamiento alopático. México cuenta con el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas registradas con más de 4500, sólo detrás de China (Muñetón, 2009).

La OMS desarrolló una estrategia sobre la medicina tradicional la cual consta en brindar apoyo a los Estados Miembros para el aprovechamiento del bienestar brindado por la medicina tradicional a la salud, así como promover su utilización segura y eficaz a través de la reglamentación y la investigación, para su incorporación al sistema de salud (OMS 2013).

Debido a lo mencionado anteriormente es de suma importancia la investigación en el campo de la medicina tradicional mexicana para poder hacer recomendaciones a la población sobre su uso, mediante un respaldo científico sobre la seguridad y eficacia de los productos herbolarios.



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Umbelliferae

La familia Umbelliferae Juss es también conocida como Apiaceae Lindley, y dentro de las angiospermas es una de las más conocidas por sus características inflorescencias, e infrutescencias y su particular composición química la cual se manifiesta en el olor, sabor y toxicidad de muchas de sus especies. Comprende unos 300 géneros con un total de 2500 a 3000 especies, distribuidas prácticamente por todo el mundo, con preferencia por zonas templadas de cierta altura y, con menos frecuencia, por zonas tropicales (Heywood, 1979).

En general, la mayoría de las umbelíferas son herbáceas fistulosas anuales, bianuales o perennes.

2.2 Género *Eryngium*

El género *Eryngium* L agrupa alrededor de 230 a 250 especies, se han desarrollado trabajos taxonómicos en los cuales se presentan las relaciones entre taxones del viejo mundo y taxones del nuevo mundo mediante estudios moleculares del DNA de cloroplastos, en los que se confirma la monofilia de este género y una relación de grupo hermano con el género *Sanicula* L. En el esquema 1 se muestra una división propuesta por Calviño et al.,(2010).

Algunas de las especies presentes en nuestro país son: *E. alternatum*, *E. beecheyanum*, *E. bonplandii* Delar., *E. carlinae*, *E. cervantesii* , *E. cymosum*, *E. ghiesbreghtii* Decaisne, *E. gracile*, *E. longifolium* Cav., *E. mexiae*, *E. mexicanum* S. Wats., *E. phyteumae* Delar., *E. proteaeflorum* Delar., *E. serratum* Cav., *E. spiculosum* y *E. subacaule* (Garcia, 2013).

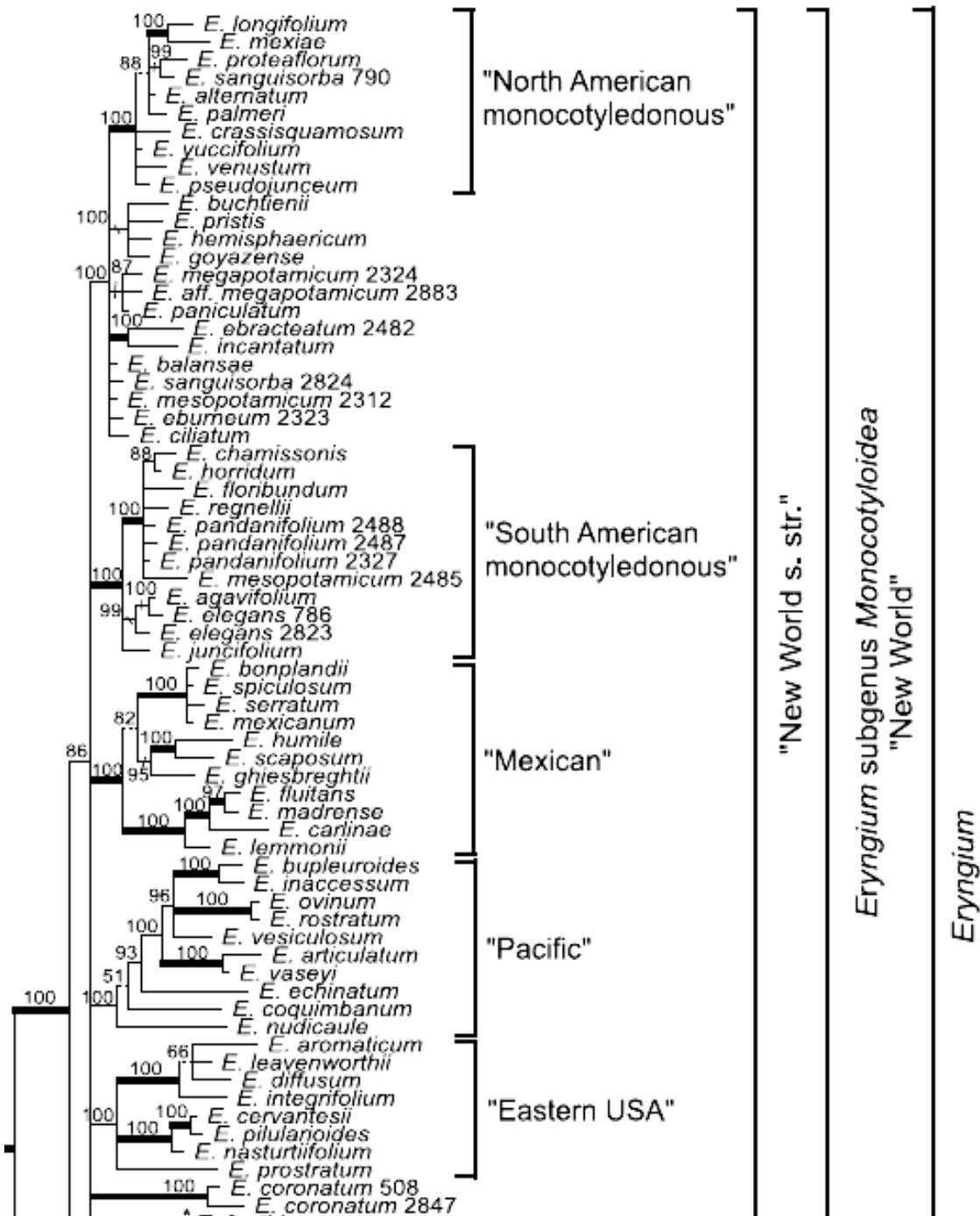


Figura 1. Taxonomía del género *Eryngium* (Calviño et al., 2010)



2.2.1 Características del género

Presenta plantas herbáceas bianuales o perennes, caulescentes o acaulescentes, usualmente glabras y erectas. Tienen raíces fuertes o raicillas fibrosas. Las hojas son simples, lobadas o espinoso-dentadas a lineares, de venación variable, desde reticuladas hasta paralelinervias y con aspecto semejante al de algunas monocotiledóneas. Las flores se encuentran dispuestas en cabezuelas bracteadas, el cáliz generalmente está mejor desarrollado que la corola, los pétalos son de color blanco a púrpura y sésiles. El fruto es globoso u ovoide, cubierto con escamas o tubérculos (Mathias & Constance, 1941).

Eryngium es fácilmente distinguible de otros miembros de las Apiaceae por sus inflorescencias capitadas y por tener una sola bracteola por flor. Algunas plantas son postradas o de sólo unos pocos centímetros de alto, y otras son erectas de hasta 3 m de alto (Calviño et al., 2008).

2.2.2. Distribución

Se distribuye en las regiones templadas y tropicales del planeta (García 2013). Su distribución es muy variada, ya sea comparando su presencia en ambos hemisferios (oriental y occidental) o dentro de cada uno de ellos. En el hemisferio oriental se encuentran dos centros de diversidad: en el oeste de la región del Mediterráneo y el suroeste de Asia, mientras que en el hemisferio occidental en la zona centro-occidente de México y centro-oriente de Sudamérica (Turmel, 1948).

Cerca de dos tercios de las especies de *Eryngium* crecen en el norte, centro y sur de América (Calviño et al., 2008).



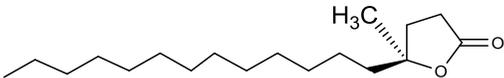
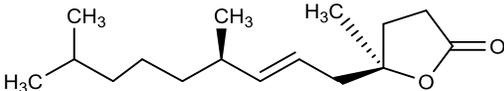
2.2.3. Composición química

La composición química del género *Eryngium* (Tabla 1) es muy variada entre una especie y otra, debido a que son utilizadas en las diferentes partes del mundo para tratar padecimientos muy diversos (Palá, 2002).

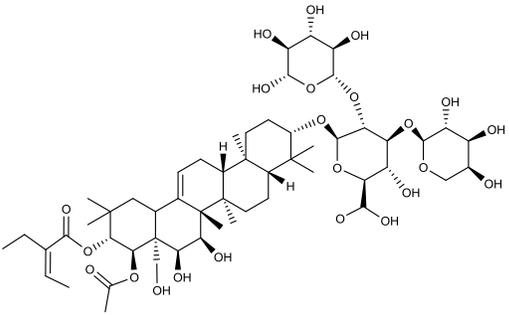
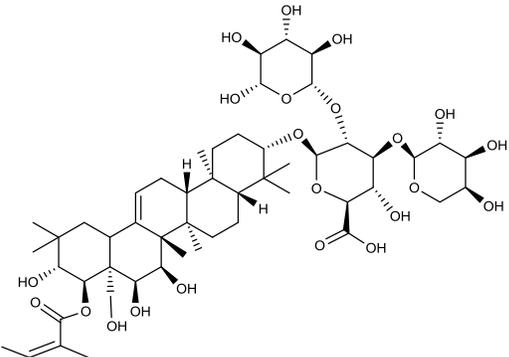
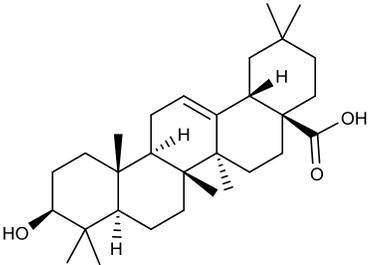
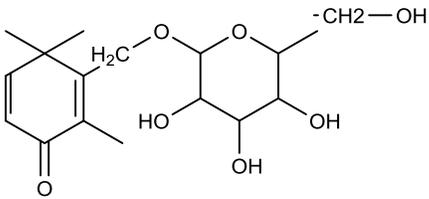
Las características químicas del género no han sido estudiadas lo suficientemente ya que estos se han centrado principalmente en aquellas especies que son más populares en la medicina tradicional de cada país, en el caso de México las especies más utilizadas son *E. carlinae* y *E. heterophyllum*, y aún no existen reportes sobre algún estudio realizado con este propósito.

La variedad de compuestos presentes en el género es muy amplia; en la siguiente tabla se muestran algunos de estos.

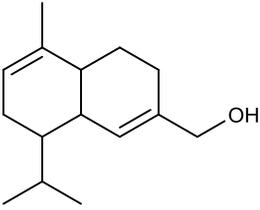
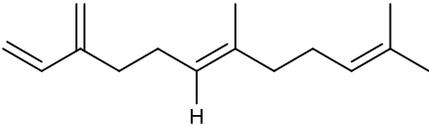
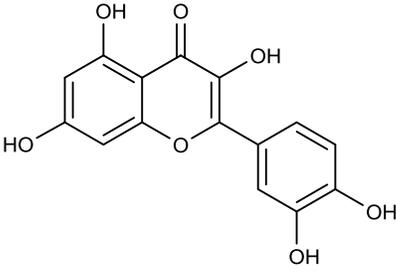
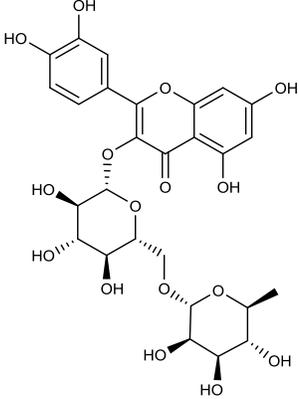
Tabla 1. Composición química del género *Eryngium*

ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE	ESPECIE REPRESENTATIVA
	γ - lactona 4-metil-tridecenilbutirolactona	<i>Eryngium carlinae</i> (Pérez & Vargas, 2006)
	4,8R, 12-trimetil,6(Z)eno-butylactonanonano	<i>Eryngium carlinae</i> (Pérez & Vargas, 2006)

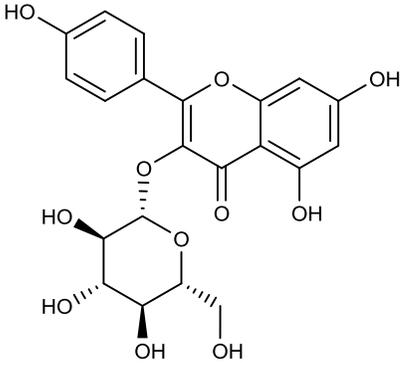
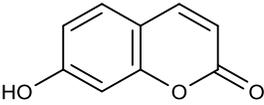
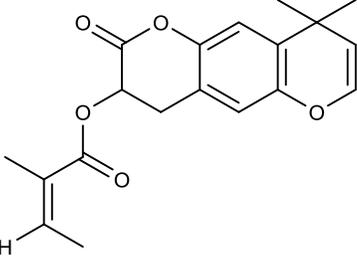
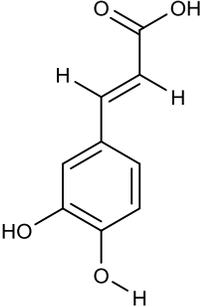


	<p>Saniculasaponina III</p> <p><i>E. yuccifolium</i> (Zhang et al., 2008)</p>
	<p>Eringiósido E</p> <p><i>E. yuccifolium</i> (Zhang et al., 2008)</p>
	<p>Ácido oleanólico</p> <p><i>E. macrocalyx</i> (Ikramov et al., 1976)</p>
	<p>3-(β-D-glucopiranosiloximetil)-2,4,4-trimetil-2,5-ciclohexadien-1-ona</p> <p><i>E. campestre</i> (Clemens & Otto, 1986)</p>

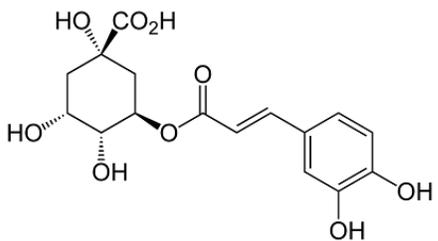
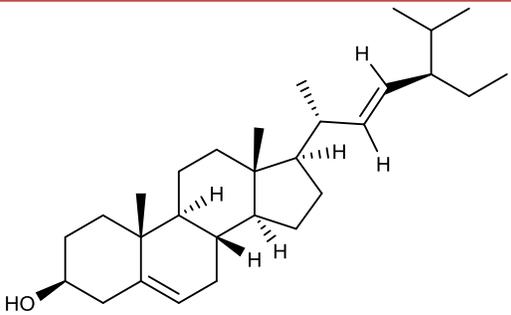
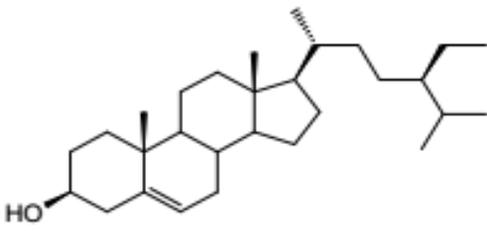
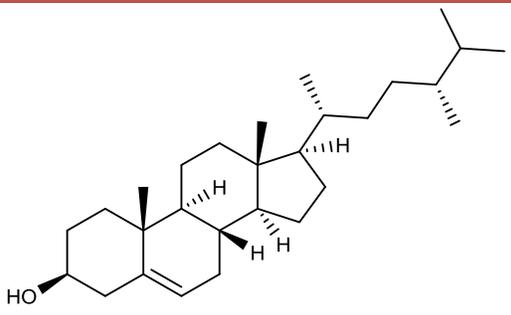


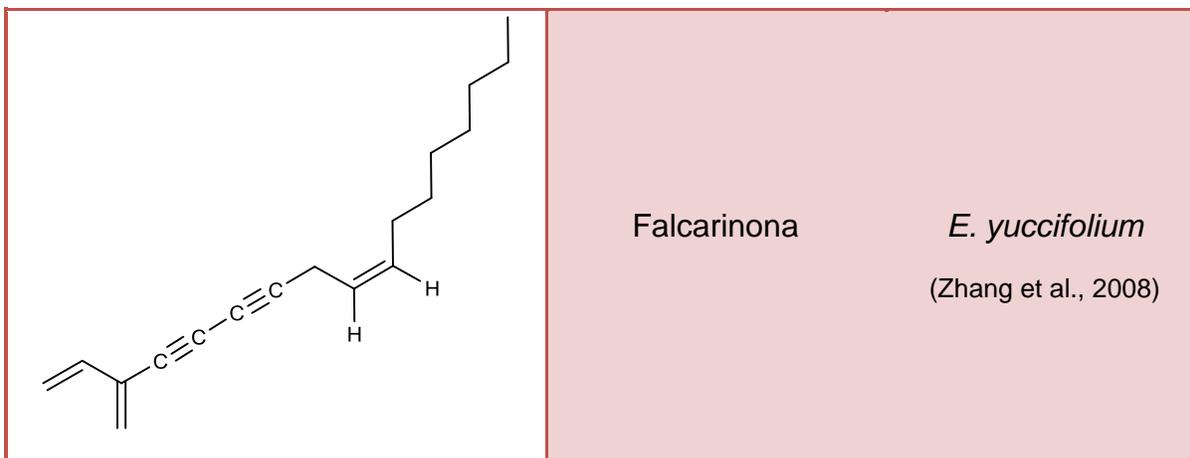
	<p>15-hidroxi-α-muuroleno</p> <p><i>E. giganteum</i> (Muckensturm et al., 2010; Zamack, 1979)</p>
	<p><i>Trans</i>-β-farneseno</p> <p><i>E. giganteum</i> (Muckensturm et al., 2010; Zamack, 1979)</p>
	<p>Quercetina</p> <p><i>E. campestre</i> (Clemens & Otto. 1986; Kartal et al., 2006)</p>
	<p>Rutina</p> <p><i>E. campestre</i> (Clemens & Otto. 1986; Kartal et al., 2006)</p>



	<p>Astragalina</p> <p><i>E. campestre</i> (Clemens & Otto. 1986; Kartal et al., 2006)</p>
	<p>Umbelliferona</p> <p><i>E. biebersteinianum</i> (Abyshev et al., 1977)</p>
	<p>Agasilina</p> <p><i>E. campestre</i> (Clemens & Otto. 1986; Kartal et al., 2006)</p>
	<p>Ácido caféico</p> <p><i>E. yuccifolium</i> (Zhang et al., 2008)</p>



	<p>Ácido clorogénico</p> <p><i>E. alpinum</i></p> <p>(Le Claire et al., 2005)</p>
	<p>Estigmasterol</p> <p><i>E. foetidum</i></p> <p>(Wolfe et al., 2000; García et al., 1999)</p>
	<p>β-sitosterol</p> <p><i>E. foetidum</i></p> <p>(Wolfe et al., 2000; García et al., 1999)</p>
	<p>Campesterol</p> <p><i>E. foetidum</i></p> <p>(Wolfe et al., 2000; García et al., 1999)</p>

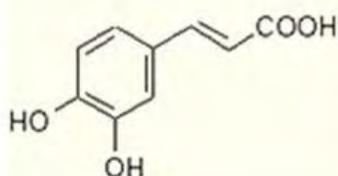


2.2.4 Compuestos polifenólicos

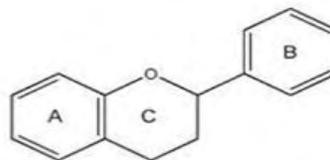
Se han identificado alrededor de 8,000 compuestos polifenólicos de origen vegetal identificados en varias especies de plantas. Estos compuestos fenólicos se sintetizan a partir de un intermediario común: la fenilalanina, o bien comparten un precursor de cierre llamado ácido siquímico y generalmente se encuentran conjugados con uno o más restos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque también existen vínculos directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) a un carbono aromático. Existen asociaciones con otros compuestos como lo son los ácidos carboxílicos, aminas, lípidos, y con otros fenoles o polifenoles (Bhooshan & Syed, 2009).

Los polifenoles se pueden clasificar en diversos grupos dependiendo de su función, el número de anillos que lo conforman, o dependiendo de los elementos estructurales que presente (Bhooshan & Syed, 2009).

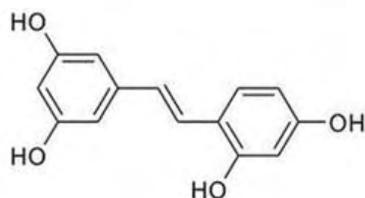
Existe una clasificación que divide a los compuestos fenólicos en cuatro grandes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos; en la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de esta clasificación (Bhooshan & Syed, 2009).



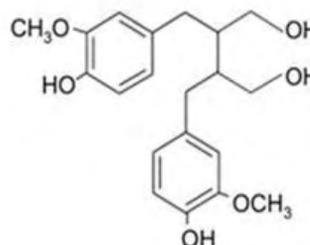
Ácidos fenólicos



Flavonoide



Estilbenos



Lignan

Figura 2. Clasificación de los compuestos polifenólicos (Bhooshan & Syed, 2009).

Los compuestos polifenólicos se encuentran de manera natural en frutas, verduras, cereales, etc. Diversas investigaciones aseguran que los polifenoles presentes en las plantas, frutas, verduras y cereales consumidos ayudan a la protección del organismo contra padecimientos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades degenerativas (Bhooshan & Syed, 2009).

2.2.4.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos están presentes de manera abundante en la naturaleza y se dividen en dos grandes clases: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. El contenido de ácido hidroxibenzoico en las plantas es generalmente bajo, con la excepción de ciertos frutos rojos, el rábano negro y la cebolla. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que el hidroxibenzoico, entre ellos se encuentran principalmente los ácidos cinámico, ferúlico, caféico, *p*-cumárico y rosmarínico (Bhooshan & Syed, 2009).



2.2.4.2 Ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico (Figura 3) es un éster del ácido caféico y del ácido 3,4-dihidroxifenilacético, presente en plantas, fue inicialmente aislado de la planta conocida como *Rosmarinus officinalis* y se encuentra comúnmente en la especie Boraginaceae y la subfamilia Nepetoideae de la familia Lamiaceae (Bora de Oliveira, 2010).

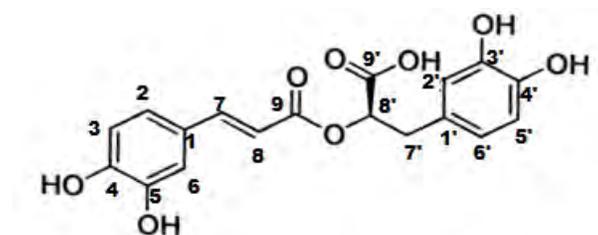


Figura 3. Ácido rosmarínico (Ávila et al., 2011).

El ácido rosmarínico se sintetiza mediante la ruta de los fenilpropanoides (Bok Kim et al., 2013). Dicha ruta biosintética se puede observar detalladamente en la Figura 4.

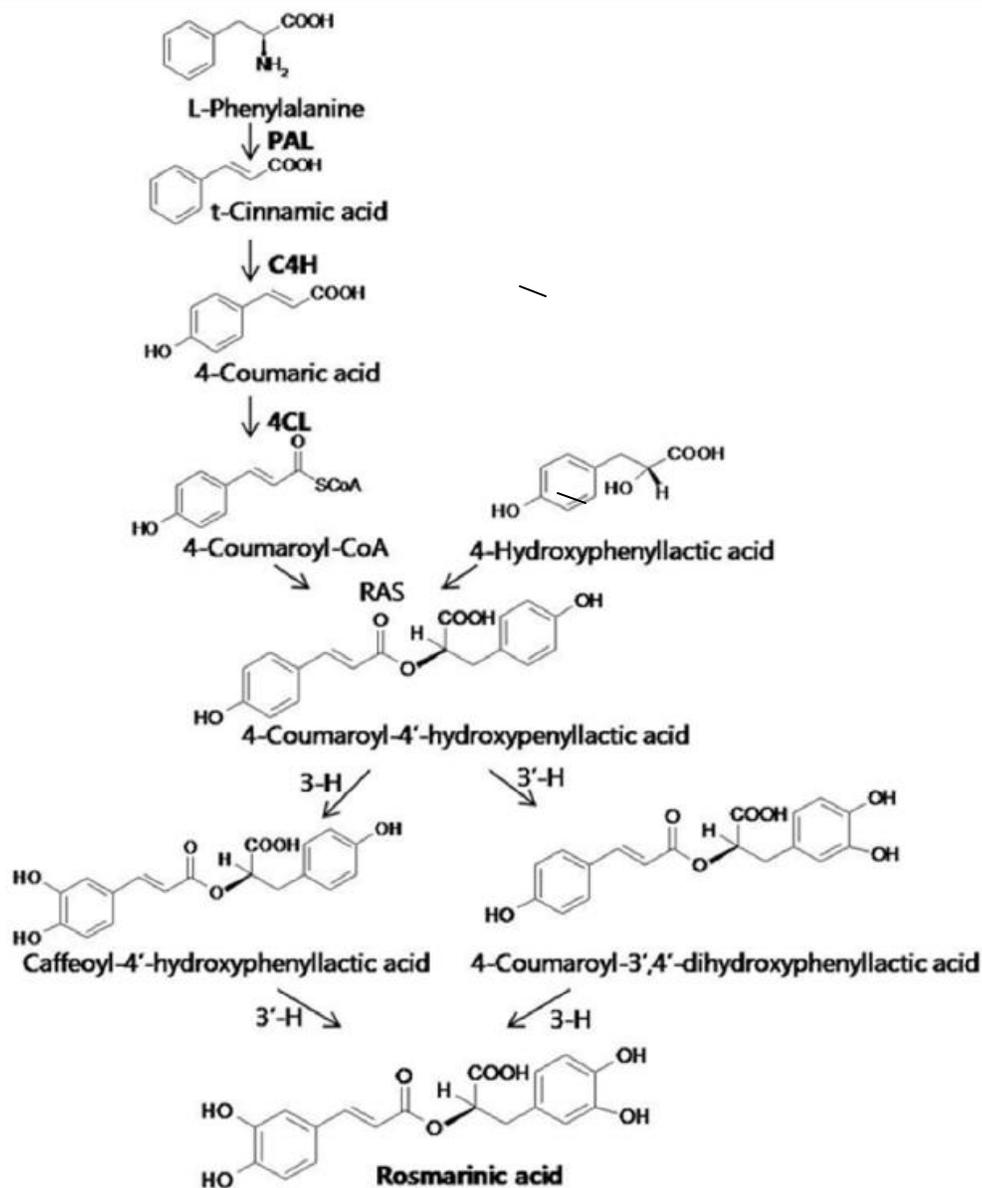


Figura 4. Ruta biosintética del ácido rosmarínico (Bora de Oliveira, 2010).

El ácido rosmarínico tiene un gran número de actividades biológicas, entre las cuales se destacan las siguientes: antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias, y antioxidantes (Al Dhabí et al., 2014), por lo que las plantas medicinales con gran cantidad de ácido rosmarínico son reconocidas por sus efectos benéficos en la salud humana (Ávila Sosa et al., 2011).



2.2.5. Actividades farmacológicas del género *Eryngium*

2.2.5.1 Actividad antiinflamatoria

Los extractos y los esteroides polares actúan inhibiendo la estimulación de citocinas mediante la síntesis de iNOS dependiente de óxido nítrico, sin afectar la viabilidad de las células. En un modelo de inflamación aguda realizado en 2012 con respecto al género *Eryngium* se observó una reducción en la actividad de la enzima mieloperoxidasa que tuvo como consecuencia la disminución del tejido inflamado (Wang et al., 2012).

2.2.5.2. Actividad anti bacterial y anti fúngica

Presenta actividad contra aproximadamente 12 bacterias, hongos y algunos parásitos como tripanosomas y nemátodos del ser humano y otros mamíferos. En cuanto a su actividad anti fúngica presentó una CMI de 0.16-0.32 µg/mL contra (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum*; *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes var interdigitale*, *Microsporum canis* y *M. gypseum*) (Wang et al., 2012).

2.2.5.3. Actividad contra el veneno de escorpión y serpiente

Los extractos acuosos de hojas y raíces son los encargados de inhibir la actividad hemolítica de los venenos de escorpión y víbora, además de inhibir la contracción muscular (Wang et al., 2012).

2.2.5.4. Actividad antioxidante

Los extractos de etanol y metanol presentan principalmente actividad antioxidante mediante la captación de radicales libres en ensayos in vivo (Wang et al., 2012).



2.2.5.5. Actividad antimutagénica y antitumoral

Extractos de etanol de diferentes especies del género presentaron actividad anti mutagénica en hepatocitos de rata y provocaron apoptosis en líneas celulares leucémicas de humano (Wang et al., 2012).

2.3. *Eryngium carlinae* D.

2.3.1 Nombres comunes (UNAM, 2016).

- Hierba del sapo
- Cabezona
- Cardón
- Espinosa, estrellita, mosquitas
- Perejil
- Perejil de monte

Estado de México:

- Shibidi (mazahua);

Michoacán

- Tsatsékua azul (purhépecha);

Nayarit:

- Juvac (tepehuano),
- Soíwarí (raramurí).

2.3.2. Clasificación taxonómica (CONABIO, 2016).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Umbelliferae o Apiaceae



Género: *Eryngium*

Especie: *Eryngium carlinae* D.

2.3.3. Sinonimia (UNAM, 2016).

- *E. radiatum* Willd. 1825.
- *E. coquimbanum* Phil. ex Urban 1879.
- *E. affine* H. Wolff 1909.

2.3.4. Distribución geográfica

Eryngium carlinae crece en praderas, pastizales, habitats perturbados del bosque de encino, pino-encino y de coníferas, entre los 1900-3500 m de altitud. Florece de mayo a julio y fructifica de agosto a enero. Se conoce su distribución en la Ciudad de México, Durango, Estado de México, Michoacán, Hidalgo y hasta el sur de México; Guatemala, Costa Rica y Sudamérica. En Michoacán se registra a lo largo y de ambos lados de la Sierra del Centro y región de los Valles y Ciénagas. (García, 2013). En la Figura 5 se puede ver la distribución geográfica de la especie marcada con círculos de color rojo.



Figura 5. Distribución geográfica de *Eryngium carlinae* (CONABIO, 2016).



2.3.5. Descripción (CONAPO, 2016).

Eryngium carlinae D. (Figura 6) Es una planta espinosa sin tallo aparente, llega a crecer de 10 a 50 cm de altura, de raíces largas y pueden llegar a medir 5 m. Sus hojas son basales en una roseta densa de, 3-10 cm de largo y 0,5-2 cm de ancho, La inflorescencia compuesta de cabezuelas ovoides de 5-10 mm de largo y 5-7 mm de diámetro, azules, violetas o blancas, crecen sobre pedúnculos; en el ápice del pedúnculo hay 8-12 brácteas extendidas; son cabezuelas con numerosas flores sésiles acompañadas por una sola bractéola en su base. Flores pequeñas, simétricas radial, hermafroditas, blancas, azules, moradas. Fruto aquenio esquizocarpo ovoide o subgloboso, de 1-2 mm de largo, aplanado lateralmente, y 2 mericarpos (cada una de las partes separables del fruto) cada uno con una semilla.



Figura 6. *Eryngium carlinae*. (CONABIO, 2016).



2.3.6. Usos

En la medicina tradicional mexicana *Eryngium carlinae* (Hierba del sapo) es una planta de gran uso debido a que se le atribuyen diversas funciones terapéuticas. En la zona centro del país es empleada para tratar problemas renales, como son los cálculos renales, e infecciones urinarias, debido a su efecto diurético. También se utiliza para tratar problemas de inflamación estomacal, para la bilis, en dolores de espalda, de huesos, pecho, hernias, ayuda en el momento del parto, contra mordeduras de serpiente y calentura (UNAM, 2016).

Es más comúnmente utilizada para disminuir los niveles de glucosa en sangre, así como los niveles de colesterol y triglicéridos (Noriega et al., 2012).

Se usa principalmente de manera oral, a través de una infusión de toda la planta o bien mediante el uso de fomentos en el caso de tratamiento tópico (UNAM, 2016).



3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas producen una gran cantidad de sustancias, producto de su metabolismo secundario, algunas de ellas son responsables del color y aromas de flores y frutos, mientras que otras están vinculadas con interacciones ecológicas.

Múltiples investigaciones han demostrado que la mayoría de estos compuestos, participan en el mecanismo de defensa de las plantas, lo que ha redituado en su uso dentro de la industria agricultora. Por otra parte muchos compuestos procedentes de plantas han servido como base en la preparación de medicamentos en la industria farmacéutica.

Estrictamente hablando, la fitoquímica estudia los metabolitos secundarios extraídos de las plantas. Esta rama de la química aporta los conocimientos necesarios para la realización del aislamiento e identificación de los compuestos químicos presentes en las mismas, entre los cuales se destacan aquellos con importante actividad biológica, como los encontrados en un gran número de plantas medicinales. Muchos de estos principios activos constituyen nuevas fuentes de materia prima para el desarrollo de medicamentos o para terapias alternativas en la medicina actual con mayor eficacia y/o potencia terapéutica.

Un punto importante en el conocimiento de las moléculas provenientes de plantas con actividad biológica, es la determinación de su estructura y de su comportamiento químico, para establecer parámetros utilizables para un control de calidad de la planta, así como optimizar los procesos extractivos y también, en otros casos prever la actividad farmacológica.

Por lo descrito anteriormente, se presenta en esta tesis el estudio fitoquímico de la planta *Eryngium carlinae* D., como parte de un proyecto que permita contribuir a su conocimiento metabólico y a su potencial antimicrobiano para eventualmente integrar estos resultados dentro de una monografía de la planta.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal.

Llevar a cabo el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios contenidos en la planta medicinal *Eryngium carlinae* D. (Umbelliferae) y ponderar el potencial antimicrobiano de sus extractos orgánicos.

4.2 Objetivos particulares:

1. Obtener el extracto total por medio de un proceso de maceración ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1) y el acuoso mediante una decocción, a partir de la planta completa de *E. carlinae* D. (Umbelliferae).
2. Realizar pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como con un hongo levaduriforme.
3. Realizar el aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos orgánicos que se obtengan en el "punto 1" por combinación de métodos de reparto y cromatográficos e identificación de los mismos por medios espectroscópicos.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y equipo utilizado.

5.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD).

Se emplearon cromatofolios de gel de sílice MACHEREY-NAGEL Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, una cámara con lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF240c a dos longitudes de onda, 254 y 365 nm. Se utilizaron sistemas de elución variables y como revelador químico una solución de sulfato sérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4 \text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en H_2SO_4 2N seguido de calentamiento en parrilla eléctrica.

5.1.2 Cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP).

Para la cromatografía en capa delgada de tipo preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm de 1 mm de grosor (Merck 60 F₂₅₄).

5.1.3 Cromatografía en columna abierta (CCA).

La cromatografía en columna abierta se efectuó utilizando columnas de vidrio, como adsorbente gel de sílice 60 marca Merck (malla 0.063-0.200 mm) y diversas fases móviles

5.2 Recolección e identificación del material vegetal.

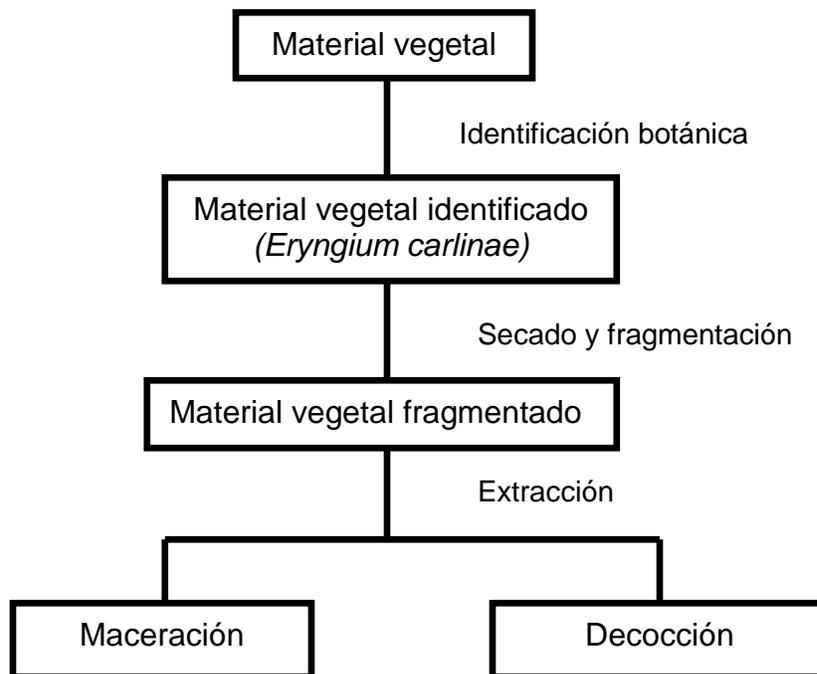
El material vegetal utilizado se recolectó en el municipio de Huixquilucan de Degollado, Estado de México el 13 y 27 de agosto del 2015 y la identificación botánica fue determinada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU), registrado con folio 1417576 por el M. en C. Rafael Torres Colín. En la Figura 7 se presenta la muestra de herbario.



Figura 7. Muestra de herbario de *Eryngium carlinae*.

5.3 Extracción

El material vegetal (toda la planta) fue sometido a secado al aire libre y a la sombra. El material vegetal seco (265.4 g) se fragmentó mediante el uso de una licuadora, se dividió en dos partes, la primera (200.0 g) se extrajo por el método de maceración en una mezcla de disolventes con proporción 1 a 1 (diclorometano /metanol) y la segunda (65.4 g) se sometió a decocción durante 30 minutos a 80°C. En ambos casos los extractos resultantes se llevaron a sequedad por presión reducida mediante el uso de rota evaporador obteniéndose 28.2 g de extracto orgánico y de la decocción 6.3 g (Esquema 1).

**Esquema 1. Procesamiento de la planta completa de *Eryngium carlinae*.**

5.4 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria [(CMI, mg/mL)].

5.4.1 Microorganismos utilizados

Tabla 2. Microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana.

Microorganismo	ATCC	Descripción
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	Bacteria Gram (+)
<i>Streptococcus faecalis</i>	29212	Bacteria Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bacteria Gram (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Bacteria Gram (-)
<i>Candida albicans</i>	10231	Hongo levaduriforme



5.4.2 Preparación de las muestras

Los extractos (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de DMSO. A partir de esta disolución, se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 1.0 a 4.0 mg/mL.

5.4.3 Preparación de inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo y se incubaron durante 48 horas a 37°C, mientras que el hongo levaduriforme se desarrolló en agar Sabouraud y se incubó por 7 días a 28°C.

El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. El inóculo de *Candida albicans* tenía una concentración de 10^5 células/mL. Las concentraciones de los inoculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland) (Morales, 2009).

5.4.4 Bioensayo

Las muestras preparadas a diferentes diluciones se mezclaron con el medio de cultivo apropiado, en el cual se inoculó previamente el microorganismo de prueba; después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento del microorganismo en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de la muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible será considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI).



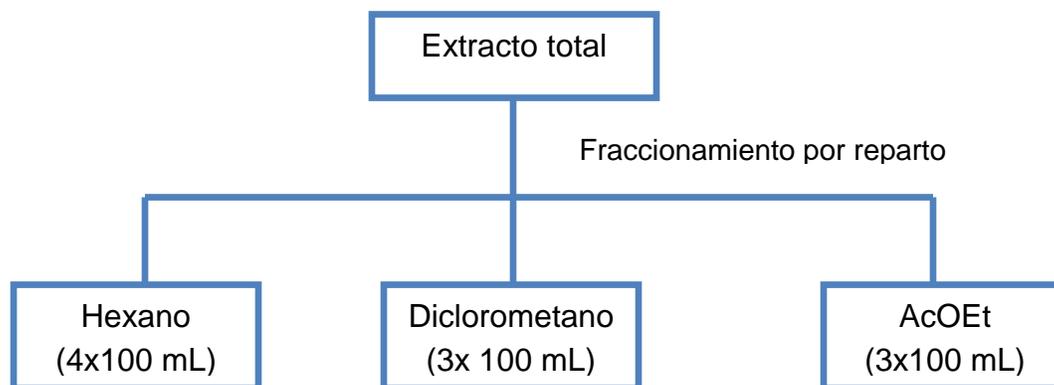
Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias Gram (+) y Gram (-) y nistatina contra el hongo levaduriforme. Adicionalmente se preparó un control de crecimiento negativo (Morales, 2009).

5.5 Análisis químico del extracto orgánico total.

5.5.1 Fraccionamiento vía partición líquido-líquido

El extracto orgánico total se disolvió en 200 mL de agua destilada, y se realizó un fraccionamiento vía extracción por reparto (líquido-líquido) con hexano (4 x 100 mL), diclorometano (3 x 100 mL) y acetato de etilo (3 x 100 mL) obteniéndose así los correspondientes extractos de hexano, de diclorometano y de acetato de etilo (Esquema 2).

Esquema 2. Fraccionamiento primario por reparto del extracto orgánico total de *Eryngium carlinae*.





5.6 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano

5 gramos del extracto de hexano fueron adsorbidos en 5 gramos de gel de sílice y aplicados en una columna cromatográfica abierta de vidrio, la cual fue empacada con 50 gramos de gel de sílice suspendidos en hexano. Se aplicó el extracto adsorbido y se eluyó con mezclas de hexano/cloroformo de polaridad creciente y posteriormente con mezcla de cloroformo/ acetona en proporciones de menor a mayor polaridad (recolectando fracciones de 75 mL cada una).

Las fracciones obtenidas (103 fracciones) se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina y se juntaron aquellas con contenido químico con Rf similar como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano

Fracciones	Sistema de elución	Volumen de fracción	Clave
2	Hexano	50 mL	FH-1
3	Hexano	50 mL	FH-2
4-8	Hexano	75 mL	FH-3
9-11	Hexano	75 mL	FH-4
12-18	Hexano	75 mL	FH-5
19-26	Hexano	75 mL	FH-6
27-34	Hexano	75 mL	FH-7
35-38	Hexano/cloroformo 8:2	75 mL	FH-8



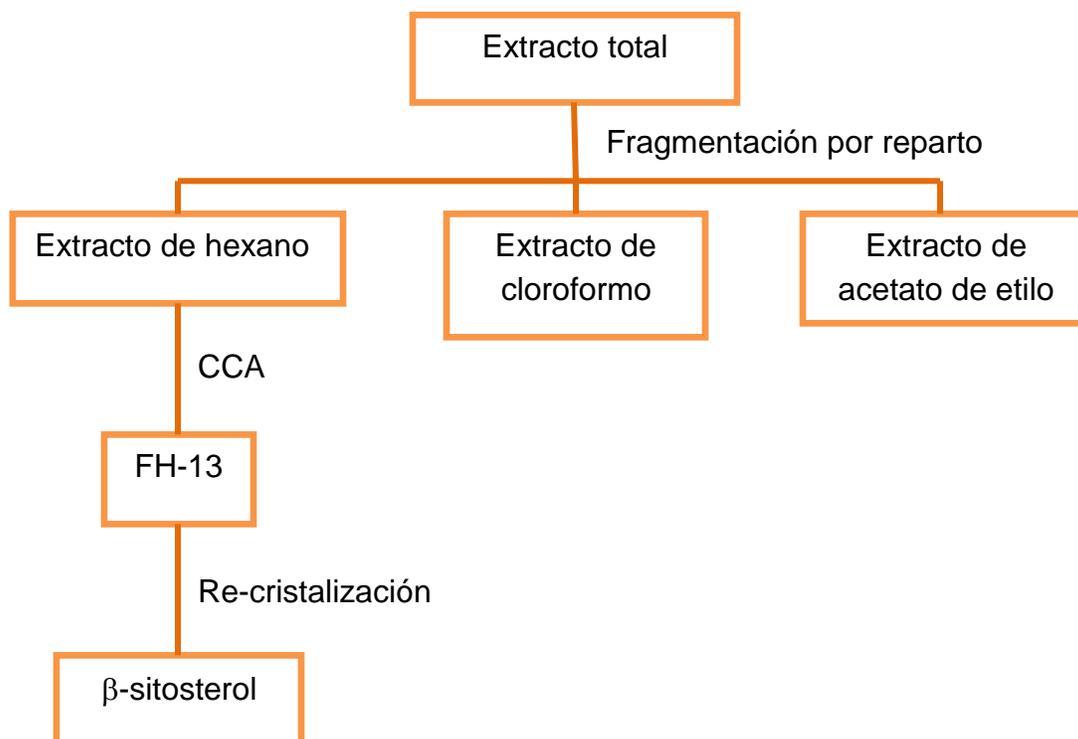
39	Hexano/cloroformo 1:1	75 mL	FH-9
40-41	Hexano/cloroformo 1:1	75 mL	FH-10
42-43	Cloroformo	75 mL	FH-11
44-45	Cloroformo	75 mL	FH-12
46	Cloroformo	75 mL	FH-13
47-49	Cloroformo	75 mL	FH-14
50-54	Cloroformo	75 mL	FH-15
55-59	Cloroformo	75 mL	FH-16
60-66	Cloroformo	75 mL	FH-17
67-69	Cloroformo	75 mL	FH-18
70-81	Cloroformo	75 mL	FH-19
82-91	Cloroformo	75 mL	FH-20
92-93	Cloroformo/acetona 9:1	75 mL	FH-21
94-103	Acetona	75 mL	FH-22

5.6.1 Aislamiento y purificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol

De la fracción FH-13 de la columna cromatográfica eluida con cloroformo 100% se aisló un compuesto cristalino blanco en forma de agujas, el cual como se muestra en el Esquema 3 fue re-cristalizado con cloroformo, finalmente de acuerdo con sus características físicas, y espectroscópicas se caracterizó como una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.



Esquema 3. Aislamiento y purificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol del extracto de hexano.

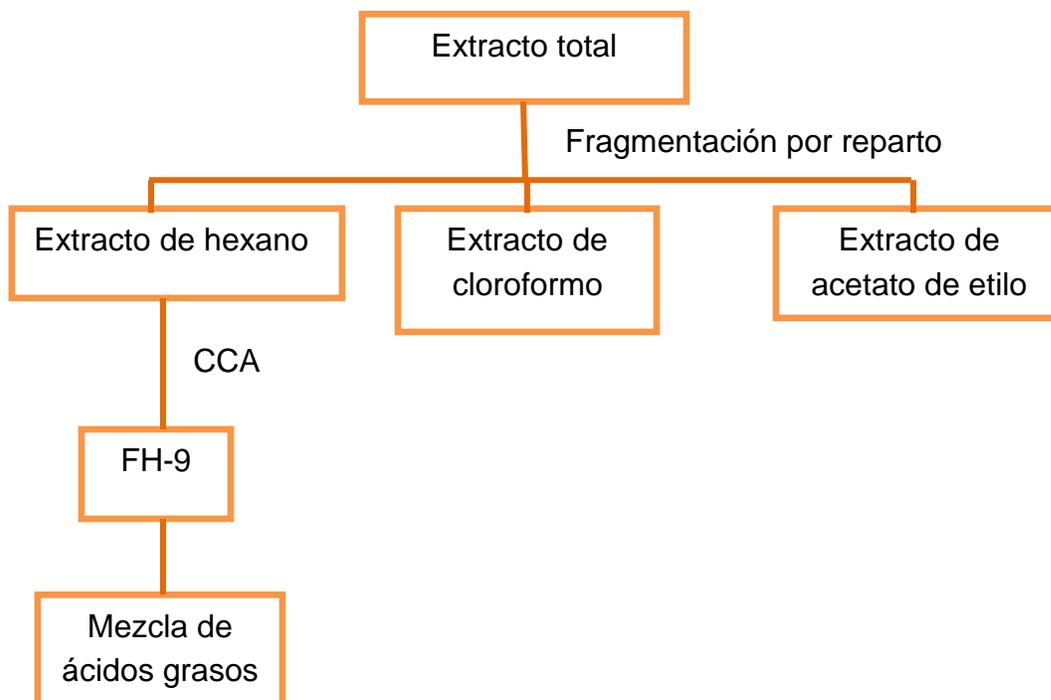


5.6.2 Aislamiento y purificación de los ácidos grasos

La fracción FH-9 tomada del extracto de hexano (Esquema 4), eluida con una mezcla de hexano/cloroformo 1:1, presentó un sólido color amarillo, el cual se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas (CG/EM), siendo identificados diversos compuestos cuyas características espectroscópicas se mostrarán más adelante en la sección de resultados.



Esquema 4. Aislamiento y purificación de la mezcla de ácidos grasos



5.7 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo

0.8 g del extracto de acetato de etilo fueron adsorbidos en 0.8 g de gel de sílice y se aplicaron a una columna cromatográfica abierta de vidrio, la cual contenía 16 gramos de gel de sílice. La muestra se eluyó con mezcla de cloroformo/metanol de polaridad creciente (recolectando fracciones de 25 mL cada una).

Se obtuvieron 132 fracciones las cuales fueron monitoreadas por medio de cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas con contenido químico con R_f similar como se muestra en la Tabla 4.



Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo

Fracciones	Sistemas de elución	Volumen de fracción	Clave
1-2	Cloroformo	75 mL	FA-1
3	Cloroformo/metanol (98:2)	50 mL	FA-2
4	Cloroformo/metanol (98:2)	50 mL	FA-3
5	Cloroformo/metanol (98:2)	25 mL	FA-4
6	Cloroformo/metanol (98:2)	25 mL	FA-5
7	Cloroformo/metanol (97:3)	25 mL	FA-6
8-9	Cloroformo/metanol (97:3)	25 mL	FA-7
10-11	Cloroformo/metanol (97:3)	25 mL	FA-8
12-13	Cloroformo/metanol (96:4)	25 mL	FA-9
14-15	Cloroformo/metanol (95:5)	25 mL	FA-10
16	Cloroformo/metanol (95:5)	25 mL	FA-11
17-21	Cloroformo/metanol (95:5)	25 mL	FA-12
22-32	Cloroformo/metanol (95:5)	25 mL	FA-13
33-53	Cloroformo/metanol (95:5)	25 mL	FA-14
54	Cloroformo/metanol (90:10)	25 mL	FA-15
55	Cloroformo/metanol (90:10)	25 mL	FA-16
56	Cloroformo/metanol (90:10)	25 mL	FA-17
57-83	Cloroformo/metanol (75:25)	25 mL	FA-18

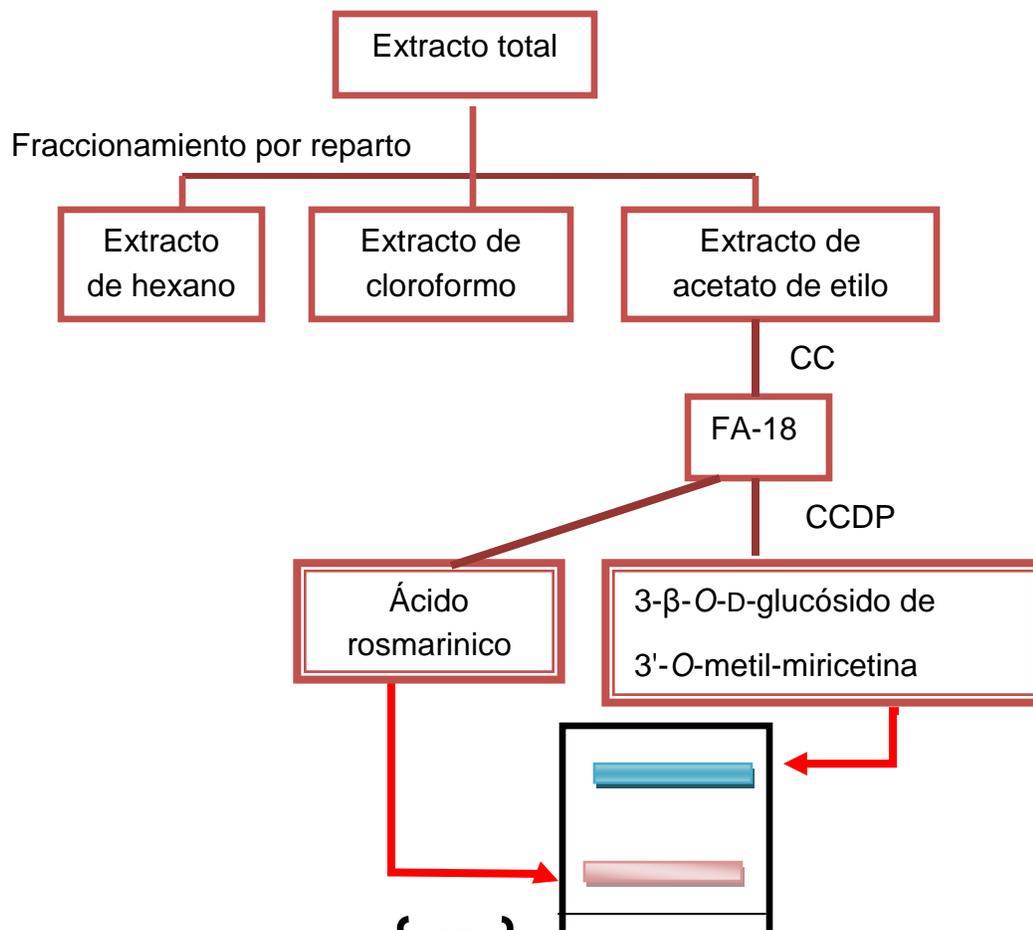


84-98	Cloroformo/metanol (60:40)	25 mL	FA-19
99-119	Cloroformo/metanol (30:70)	25 mL	FA-20
120-132	Metanol	25 mL	FA-21

5.7.1 Aislamiento y purificación del ácido rosmarínico

La fracción cromatográfica FA-18 eluida con una mezcla de cloroformo/metanol (75:25), presentó un color amarillo verdoso, se sometió a una CCDP para separar los posibles compuestos presentes, eluyéndose con la misma mezcla con la cual se colectó la fracción. De este tratamiento resultó el aislamiento de un compuesto mayoritario que por sus características espectroscópicas y espectrométricas se identificó como ácido rosmarínico (Esquema 5).

Esquema 5. Aislamiento y purificación del ácido rosmarínico y del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina proveniente del extracto de acetato de etilo.





5.7.2 Aislamiento y purificación del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

De la fracción cromatográfica FA-18 que fue sometida al proceso descrito en el punto anterior también resultó el aislamiento de un compuesto (polvo amarillo) que por sus características espectroscópicas y espectrométricas se identificó como (Esquema 5).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria.

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos: total, acuoso, hexano, de diclorometano y de acetato de etilo utilizando cepas de microorganismos Gram (+) y Gram (-), así como en un hongo levaduriforme representativo.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana, determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, mg/mL), de diferentes extractos de *Eryngium carlinae*.

<i>Extracto</i>	Valores de CMI (mg/mL)				
	<i>Sa</i>	<i>Sf</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Ca</i>
Total	4	4	>4	>4	>4
Hexánico	0.250	1	>4	>4	>4
Diclorometano	2	2	>4	>4	>4
Acetato de etilo	1	1	2	2	2
Acuoso	>4	>4	>4	>4	>4

Sa: *Staphylococcus aureus*; **Sf** *Streptococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **Ca:** *Candida albicans*.



En la Tabla 5 se describe el valor de la CMI de los extractos obtenidos de la planta completa de *Eryngium carlinae*; con base se observa que los extractos de hexano, de diclorometano, de acetato de etilo y el total presentaron actividad contra microorganismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*), siendo el extracto de hexano el de mayor actividad antimicrobiana, seguido del de acetato de etilo, el de diclorometano y por último el correspondiente al extracto total.

El extracto de acetato de etilo mostró el mayor espectro de inhibición de los 5 extractos analizados, además de inhibir las bacterias Gram positivas ya mencionadas, resultando ser activo contra *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* (bacterias Gram negativas), y para el hongo levaduriforme *Candida albicans*.

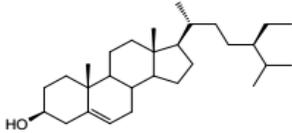
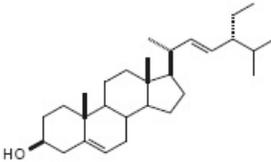
En cuanto al extracto acuoso, resultó no ser activo contra ninguno de los microorganismos utilizados.

6.2 Identificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

El producto recristalizado de la fracción primaria FH-13 obtenido de extracto de hexano mostró pureza cromatográfica (hexano/AcOEt 85:15) y fue identificado como una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol de acuerdo a las siguientes características (Cuadro 1). Se obtuvo como cristales blancos en forma de aguja solubles en cloroformo.



Cuadro 1. Constantes espectroscópicas de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

Datos	
Estructuras	 β-sitosterol  estigmasterol
IR Figura 8:	ν_{\max} (pastilla) cm^{-1} : 3419, 3082, 2932, 2865, 1713, 1644, 1457 y 1380.
RMN-¹H Figura 9:	300 MHz, CDCl_3 , δ : 5.34 (1H, <i>t</i> $J = 6.27$ Hz, H-6), 3.51 (1H, <i>td</i> , $J = 5.13, 5.19$ y 5.6 Hz, H-3), 1.00 (3H, <i>s</i>), 0.93 (3H, <i>d</i> , $J = 6.75$ Hz, H-19), 0.84 (3H, <i>d</i> , $J = 6.3$ Hz, H-26), 0.83 (3H, <i>d</i> , $J = 6.45$ Hz, H-27) y 0.69 (3H, <i>s</i> , H-28).

En el espectro de IR (Figura 8) se observa una banda de tensión O-H alrededor de 3419 cm^{-1} , bandas de tensión en 2932 y 2865 cm^{-1} que indican la presencia de grupos metilos, metilenos y metinos; de igual forma se aprecian bandas de tensión de enlaces $=\text{C-H}$ a 3082 cm^{-1} , y dos bandas de flexión de enlaces saturados C-H a 1457 y 1380 cm^{-1} .

Observando el espectro de RMN-¹H (Figura 9) en la región de campo alto se puede ver un patrón muy complejo de señales con un desplazamiento químico que van de 0.5 a 2.5 ppm, destacando dos singuletes, un dobletes que integró para nueve hidrógenos y un triplete que integró para tres hidrógenos atribuibles a seis grupos metilos.



En δ 5.34 ppm se aprecia una señal doble de dobles correspondiente al hidrógeno vinílico H-6 y en 3.51 ppm se observa una señal múltiple la cual corresponde al hidrógeno H-3 geminal a grupo hidroxilo. La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura, permitió establecer la identidad del compuesto procedente de la fracción FH-13 como β -sitosterol.

Por la comparación realizada con la literatura (Prakash Chaturvedula & Prakash, 2012), se infiere que la muestra contiene trazas de otro esteroles llamado estigmasterol, estando el β -sitosterol en mayor proporción de acuerdo a la intensidad de sus señales con respecto a las del estigmasterol. Esta última muestra señales características encontradas en δ 5.01 correspondientes a los hidrógenos vinílicos en las posiciones 20 y 21.

El β -sitosterol y el estigmasterol son los principales fitoesteroles encontrados en la mayoría de las plantas superiores (Pérez, 2013). Se les atribuyen actividades antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, quimiopreventivas, antihelmínticas, antimutagénicas, antiulcerativas, antidiabéticas, antioxidantes, angiogénicas (Cuca, et al., 2004) además de disminuir los niveles de colesterol. Esta última es una de las propiedades por las cuales es consumida la planta medicinal objeto de este estudio.

6.3 Identificación de la mezcla de ácidos grasos

La fracción FH-9 proveniente del extracto de hexano presentó un color amarillo y una consistencia aceitosa; se analizó mediante CG/EM, lográndose identificar los compuestos descritos en la Tabla 6 por comparación de sus espectros de masas con la base de datos del equipo utilizado para dicho análisis.



Cuadro 2. Constantes espectroscópicas (IR) de los ácidos grasos constituyentes de la fracción FH-9 proveniente del extracto de hexano.

Datos	
IR Figura 10:	v_{\max} (pastilla) cm^{-1} : 3455, 2923, 2853, 3008, 1732, 1463, 1377, 1095 y 721

El análisis infrarojo de la fracción FH-9 mostró (Figura 10) una señal de poca intensidad en 3455 cm^{-1} , la cual corresponde a grupos hidroxilo, también se pueden observar bandas a 2923 , 2853 , 1463 y 1377 cm^{-1} que indican la presencia de metilos, metilenos y metinos, a 721.72 cm^{-1} está presente una banda, que indica que existen cadenas de metilenos en un número mayor a cuatro, finamente se observa una banda a 1734 cm^{-1} que es característica del grupo carboxilo y una banda en 1095 cm^{-1} que indica una vibración entre carbonos y oxígenos.

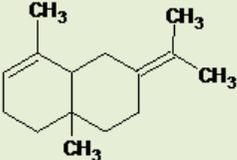
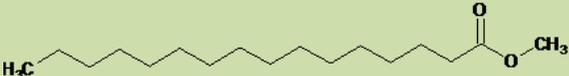
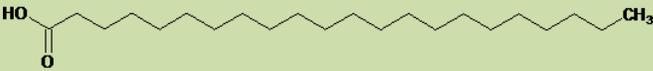
Por otra parte, de acuerdo a la Figura 11 donde se ilustra el cromatograma de la fracción FH-9 se observaron diversos picos, correspondientes a diferentes compuestos, mostrándose en la Tabla 6 los picos cuya abundancia relativa era mayor. Se ve de manera muy clara que la fracción FH-9 en su gran mayoría se encontraba conformada por ácidos grasos o esteres metílicos de los mismos, de cadena larga.

Los espectros de masas de los ocho compuestos (Figuras de la 12 a la 19) se compararon con la biblioteca del equipo y como resultados se determinaron los siguientes compuestos:

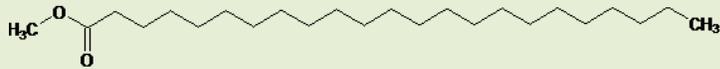
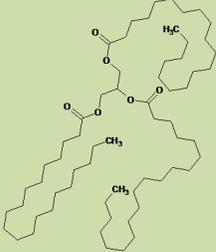
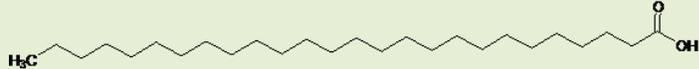
- Deca-2,4-dienal 30.9%, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletildieno), (4a*R*-trans)-naftaleno 6.32%, ester metílico del ácido hexadecanoico 28.4%, ester metílico del ácido octadecanoico 62.4%, ácido docosanoico 59.9%, ester metílico del ácido tricosanoico 45.5% la Triaracina 12.2%, y el ácido hexacosanoico 71.8%.



Tabla 6. Ácidos grasos identificados de la fracción FH-9 mediante CG/EM.

No. de pico	Nombre del compuesto	Tiempo de retención
1	Deca-2,4-dienal 	6.03
2	1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletildieno), (4a <i>R</i> -trans)-naftaleno 	7.73
3	Ester metílico del ácido hexadecanoico 	8.38
4	Ester metílico del ácido octadecanoico 	8.88
5	Ácido docosanoico 	11.55



6	<p>Ester metílico del ácido tricosanoico</p> 	12.80
7	<p>Triaracina</p> 	14.53
8	<p>Ácido hexacosanoico</p> 	17.13

6.4 Identificación de ácido rosmarínico

El producto aislado mediante una CCDP de la fracción primaria FA-18 del extracto de acetato de etilo mostró pureza cromatográfica (cloroformo/metanol 75:25) y fue identificado de acuerdo a sus características de RMN (Cuadro 3 y Figuras 20 y 21).

Cuadro 3. Constantes de RMN-¹H y RMN-¹³C del ácido rosmarínico.

Datos	
Estructura	
RMN-¹H Figura 20:	400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ : 7.48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15.9 Hz, H-7), 7.00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.0 Hz, H-2), 6.89 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.2, 2.0 Hz, H-6), 6.74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.9 Hz, H-2'), 6.74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.1 Hz, H-5), 6.65 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz, H-5'), 6.60 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.1, 2.0 Hz, H-6'), 6.24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15.9 Hz, H-8), 5.06 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.8, 3.3 Hz, H-8'), 3.07 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 14.24, 3.3 Hz, H-7'), 2.90 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 14.24, 9.8 Hz, H-7'')
RMN-¹³C Figura 21:	100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ , δ : 117.65 (C9'), 167.0 (C-9), 147.88 (C-4), 145.26 (C3), 145.04 (C-7), 144.48 (C3'), 143.31 (C-4'), 131.30 (C1'), 128.02 (C-1), 122.85 (C-6), 121.73 (C-6'), 116.02 (C-2'), 114.99 (C-5), 114.72 (C-5'), 114.33 (C-8), 113.63 (C-2), 77.80 (C-8'), 38.87 (C-7').

El espectro de RMN-¹H (Figura 20) evidenció la presencia de dos anillos bencénicos sustituidos en las posiciones 1,3,4, con sistemas ABX. Los protones 2 y 2', presentaron dos señales dobles a 7.00 y 6.74 ppm respectivamente, con un acoplamiento meta (*J*= 2.0 Hz) cada uno, mientras que los protones 5 y 5' mostraron dos señales dobles a 6.74 y 6.65 ppm con un acoplamiento orto (*J*= 8.0 Hz) cada una; por su lado, los protones 6 y 6' mostraron dos señales doble de dobles en 6.89 y 6.60 ppm, con un acoplamiento orto y meta, (*J*= 8.0 Hz, y *J*= 2.0 Hz) cada una.



En 7.48 y 6.25 ppm se localizan dos protones vinílicos (H-7 y H-8) como dos señales dobles cuya constante de acoplamiento ($J=15.9$ Hz) indica que se encuentran en posición *trans*.

Las señales en 3.07 ppm ($J= 14.2$ y 3.3 Hz) y 2.90 ppm ($J=14.2$ y 9.8 Hz) como dos dobles de dobles corresponden a los protones geminales H_a-7' y H_b-7' interaccionando con un grupo metino vecino, que se observa como una señal doble de dobles, cuyo desplazamiento químico es de 5.03 ppm ($J= 9.8$ y 3.3 Hz).

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura 21) mostró la presencia de 18 señales de las cuales 2 carbonos cuaternarios se asignaron a dos carboxilos, de ácido (177.7 ppm) y de éster (167 ppm) respectivamente (C-9 y C-9'); 4 carbonos bencénicos base de oxígeno (147.88, 145.26, 144.48 y 143.31 ppm) asignados a C-4, C-3, C-3' y C-4'), 6 carbonos sp^2 de anillos aromáticos protonados en δ 113.63, 114.99, 122.85, 116.02, 114.72, 121.73 asignados a 2, 5, 6, 2', 5' y 6'; dos carbonos vinílicos en δ 145.04 y 114.33, dos carbonos sp^3 en δ 38.87 y 77.80.

El espectro HSQC presenta conectividades C-H, y el espectro HMBC correlaciones C-H a dos y tres enlaces, que permitieron confirmar los desplazamientos y las uniones entre carbonos e hidrógenos presentes en la molécula.

Con base en los espectros de RMN de 1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HMBC y HMBC (Figuras 20 a 28) que se encuentran en la parte de los apéndices y comparándolo con la literatura (Le Claire et al., 2005) se pudo establecer que el compuesto aislado correspondía al nombre de ácido rosmarínico.

6.5 Identificación del 3- β -D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

El producto aislado mediante una CCDP de la fracción primaria FA-18 del extracto de acetato de etilo mostró pureza cromatográfica (cloroformo/metanol 75:25) y fue



identificado de acuerdo a sus características de RMN (Cuadro 4) que a continuación se analizan.

Cuadro 4. Constantes de RMN-¹H y RMN-¹³C del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

Datos	
Estructura	
RMN-¹H Figura 20:	400 MHz, MeOH-d ₄ , δ: 12.16 (1H, s, OH-5), 7.68 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.54 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6'), 6.47 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.03 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1''), 4.59 (1H, s, Hz, OH), 3.98 (1H, d, J = 1.8 Hz, Ha), 3.80 (1H, dd, J = 11.8 Hz, Hb),
RMN-¹³C Figura 21:	100 MHz, MeOH-d ₄ , δ: 177.53 (C-4), 165.83 (C-7), 162.51 (C-5), 158.26 (C-8a), 152.20 (C-3'), 151.77 (C-5'), 146.52 (C-1'), 140.08 (C-4'), 138.27 (C-3), 128.09 (C-2), 111.37 (C-6'), 108.94 (C-2'), 104.58 (C-4a), 102.91 (C-1''), 99.36 (C-6), 94.58 (C-8), 78.34 (C-4''), 78.21 (C-3''), 74.95 (C-2''), 71.25 (C-5''), 62.50 (C-6''), 61.65 (OCH ₃).

El espectro de RMN-¹H (Figura 29) mostró la presencia de dos pares de señales doblete de hidrógenos bencénicos, cada par acoplado entre sí en 7.68 y 7.54 ($J = 2.1$ Hz) y en 6.47 y 6.21 ppm ($J = 2.1$ Hz), respectivamente. La constante de acoplamiento observada indicó que cada par de hidrógenos guardan una posición meta entre sí, en dos anillos bencénicos. En el mismo espectro también se observaron señales pertenecientes a hidrógenos de una molécula de glucosa, con



el hidrógeno anomérico centrado en 5.03 como un doblete con constante de acoplamiento de 7.4 Hz, indicando una orientación beta en la molécula. El resto de las señales de la glucosa se observó en 3.98 y 3.8 como un par de señales dobles de dobles, adjudicadas a los hidrógenos de un grupo metileno en la posición H-6' y de 3.49 a 3.57 señales múltiples que integraron para 4 hidrógenos que fueron asignados a los hidrógenos H-2'', 3'', 4'' y 5'' de la molécula de glucosa. También en este espectro se observó un singulete en 3.98 sobrelapado con uno de los hidrógenos H-6, que integró para tres hidrógenos, asignado a un grupo metoxilo bencénico.

El espectro de RMN-¹³C (Figura 30) mostró la presencia de 22 señales, que descontando seis de la molécula de glucosa en δ_C 62.50 (C-6 gluc), 71.2, 57.4, 74.95, 78.21, 78.34 y 102.91 (C-anomérico) y una del metoxilo en 61.65 ppm, restan 15, lo que dio evidencia de que se trataba de un flavonoide. El análisis de éstas últimas señales detectó un grupo carbonilo α,β -insaturado en 177.53 ppm, nueve carbonos bencénicos cuaternarios de los cuales dos pertenecen a carbonos no oxigenados en 104.58 ppm y en 128.09 ppm asignados a C-4a y C-1'; las señales restantes fueron de once carbonos cuaternarios bencénicos en δ_C 165.83 (C-7), 162.51 (C-5), 158.26 (C-8a), 152.20 (C-5'), 151.77 (C-3'), 146.52 (C-2), 140.08 (C-4'), y en 138.27 ppm el carbono en la posición 3 del anillo de cromona. Este último desplazamiento, indicó que el carbono está oxigenado, tratándose de un flavonol. Las señales restantes pertenecen a carbonos doblete bencénicos en las posiciones C-6 (99.36 ppm), C-8 (94.58 ppm), C-2' (108.94 ppm) y C-6' (111.37 ppm). La posición glucosidada en la molécula del flavonoide se determinó por las correlaciones en el espectro HMBC a tres enlaces entre el hidrógeno anomérico (5.03 ppm) y el carbono en C-3' (151.77 ppm) y a su vez éste correlacionó a dos enlaces con H-2' (7.54 ppm) (Figuras 34 y 35). Un dato adicional es la correlación observada en el espectro NOESY entre el hidrógeno anomérico y el hidrógeno H-2' (7.54 ppm, Figura 33). Por otra parte, la posición del grupo metoxilo se determinó por la correlación en el espectro HMBC entre los hidrógenos del grupo metilo a tres enlaces con C-4' (140.0 ppm) y a su vez éste correlaciona a tres enlaces tanto con H-2' (7.54 ppm) como con H-6' (7.68 ppm, Figuras 34 y 35). Las



señales en 6.21 y 6.46 ppm se asignaron a H-6 y a H-8 por comparación con datos de la literatura para este tipo de flavonoides.

El espectro HSQC permitió confirmar los desplazamientos y las uniones entre carbonos e hidrógenos presentes en la molécula (Figura 36) y el espectro COSY (Figuras 31 y 32) la vecindad entre los hidrógenos H-6 y H-8, H-2' y H-6' y por otra parte entre el hidrógeno anomérico y H-2 de la glucosa.

De esta manera, se pudo establecer que el compuesto aislado corresponde al nombre de 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina no reportado en la literatura.



7. Conclusiones

- La metodología empleada permitió la obtención de un extracto orgánico total y uno acuoso a partir de la utilización de toda la planta de *Eryngium carlinae* D, así como la obtención de los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo, por fraccionamiento por reparto del extracto orgánico total.
- Dentro del contenido metabólico de *Eryngium carlinae* se encontraron los fitosteroles β -sitosterol y estigmasterol. Esto a su vez demuestra una vez más que estos fitosteroles son compuestos ubicuitos en las plantas.
- La parte poco polar de los extractos está constituida por aldehídos y ácidos grasos saturados de cadena larga.
- Se identificó al ácido rosmarínico y el 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina, en el extracto de acetato de etilo.
- De acuerdo con la literatura consultada, este es el primer trabajo en donde se reportan características químicas y antimicrobianas de la planta medicinal conocida como "hierba del sapo" (*Eryngium carlinae* D.). A pesar de que el extracto acuoso fue inactivo contra los microorganismos Gram (+), Gram (-) y el hongo levaduriforme utilizados; el de hexano, mostró mayor actividad inhibitoria de crecimiento hacia *S. aureus* y *S. faecalis* mientras que el extracto de acetato de etilo inhibió moderadamente el crecimiento de todos los microorganismos utilizados.



- En general, los compuestos mayoritarios aislados en este trabajo, están relacionados con algunas de las actividades medicinales descritas popularmente.



8. Perspectivas

Durante la recopilación bibliográfica realizada para este trabajo y en el transcurso del mismo, se abrió la posibilidad de abrir diversas líneas de investigación, enfocadas al estudio de los diversos usos dados a esta planta medicinal. A continuación se mencionan los más importantes tomando como referencia lo ya estudiado en este trabajo:

Evaluar los efectos de los extractos obtenidos en una prueba de diuresis, ya que el principal uso de esta planta es para tratar problemas renales.

El estudio del extracto de diclorometano y el acuoso para lograr el aislamiento de una mayor cantidad de metabolitos que justifiquen su uso.



9. Bibliografía

Abyshev A. Z., Denisenko P. P., Abyshev D. Z., Kerimov Y. B., 1977. "Chemical study of some species of the Caucasus flora of the umbellate family". *Farmastsia (Moscow)*, Volumen 26, pp. 42-44.

Al Dhab N. A., Valan A. M., Park C. H., Park S. U., 2014. "Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities". *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 30 Octubre, Volumen 13, pp. 1192-119.

Avila S. R., Navarro C. A. R., Vera L. O., Dávila M. R. M., Melgoza P. N., Mesa P. R., 2011. "Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): Una revisión de sus usos no culinarios". *Ciencia y Mar*, Volumen 43, pp. 23-36.

Bhooshan, K. & Syed, I. R., 2009. "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*". November/December, Volumen 2, pp. 270-278.

Bok Kim Y., Kwang K. J., Xu H., Tae P. W., Anh T. P., Li X., Chung E., Lee J. H., Park S. U., 2013. "Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in agastache rugosa kuntze treated with methylc". *Plos ONE*, Mayo, Volumen 8, pp. 1-8.

Bora de Oliveira, K., 2010. "*Determinação do ácido rosmarínico em salvia officinalis L., lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese*". Tesis Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

Calviño I. C., Martinez G. S., Downie R. S., 2010. "Unraveling the taxonomic complexity of *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae): Phylogenetic analysis of 11 non-coding cpDNA loci corroborates rapid radiations". *Plants Diversity and Evolutions*, Volumen 128, pp. 137-149.

Calviño I. C., Martinez G. S., Downie R. S., 2008. "The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations". *Mol. Phylogenetics and Evolutions.*, Volumen 46, pp. 1129-1150.



Clemens & Otto, S., 1986. "Cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*". *Phytochemistry*, Volumen 25, pp. 741-743.

CONABIO, 2016. "Biblioteca digital: Monografía de *Eryngium carlinae*". Disponible en línea en: <http://conabio.inaturalist.org/taxa/143907-Eryngium-carlina>

CONAPO, 2016. "Biblioteca digital de *Eryngium carlinae*". Disponible en línea en: [http://iztapopo.conanp.gob.mx/documentos/fichas de especies/Eryngium carlinsa e.pdf](http://iztapopo.conanp.gob.mx/documentos/fichas_de_especies/Eryngium_carlinsa_e.pdf)

Cuca S. L. E., Coy B C. A., Orozco C. I., 2004. "Isolation and structural elucidation of some major metabolites in ethanolic extract from *Solanum cornifolium*". *Revista Colombiana de Química*, volumen 33, pp. 7-12.

García Ruíz, I., 2013. "Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el Estado de Michoacán. *Acta Botanica Mexicana*". Volumen 118, pp. 65-118.

García M. D., Sáenz M. T., Gómez M. A., Fernández M. A., 1999. "Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models". *Pytothe.*, Volumen 13, pp. 78-80.

Ikramov M. T., Kharlamov I. A., Khazanovich R. L., Kharlamov K. K., 1976. "Sapogenins of *Eryngium macrocalyx*". *Him. Prir. Soedin*, Volumen 3, p. 401.

Kartal, M., Mitaine O. A. C., Paululat T., Abu-Asaker M., Wagner H., Mirjolet J. F., Guilbaud N., & Lacaille-Dubois M. A., 2006. "Triterpene Saponins from *Eryngium campestre*". *Journal of Natural Products*, Volumen 69, pp. 1105-1108.

Le Claire E., Schwaiger S., Banaigs B., Stuppne H., Gafner F., 2005. "Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and Other Apiaceae". *Agric. Food Chem.*, Volumen 53, pp. 4367-4372.

Mathias, M. E. & Constance L., 1941. "A synopsis of the North American species of *Eryngium*". *Amer. Midl. Nat.*, Volumen 25, pp. 361-387.



Morales Reyna, A., 2009. "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carilona* L. (Verbenaceae)" Tesis de licenciatura Químico farmacéutico Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. pp. 24-28.

Muckensturm B. Boulanger A., Farahi M., Reduron J. P., 2010. "Secondary metabolites from *Eryngium* species". *Nat. Prod. Res.*, Volumen 24, pp. 391-397.

Muñetón Pérez, P., 2009. "*Plantas Medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos. entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo*, Mexico D.F.". Revista digital universitaria, UNAM., Volumen 10, pp. 2-9.

Noriega C. R., Ortiz A. O., Esquivel G. E., Clemente G. M., Manzo A. S., Salgado G. R., Cortés R. C., Boldogh I., Saavedra M. A., 2012. "Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats". *Biochem.*, pp. 1-5.

OMS, 2013. "*Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*". Hong Kong SAR, China: OMS.

Palá, P. J., 2002. "Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género *Eryngium* L, en la península Ibérica". *Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Biología*. Madrid.

Pérez, A., 2013. "Aislamiento y caracterización estructural de nuevos Inhibidores de α -glucosidasa a partir de las raíces de *Smilax* sp.". Nuevo León, México: s.n.

Pérez, R. & Vargas, R., 2006. "Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas". *BLACPMA*, Volumen 5, pp. 42-66.

Prakash C. V. S. & Prakash I., 2012. "Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*". *International Current Pharmaceutical Journal*, Volumen 9, pp. 239-242.

SSP, 2014. "*Reglamento de Insumos para la Salud*"., México D.F.: Diario Oficial de la Nación.



Turmel, J. M., 1948. "Répartition géographique des *Eryngium*". *Ancien Monde. Bull. Mus. Hist. Nat*, Volumen 20, pp. 395-401.

UNAM, 2016. " Biblioteca de Medicina Tradicional Mexicana UNAM, Monografía *Eryngium carlinae*". Disponible en:

[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Eryngium carlinae&id=7585](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Eryngium%20carlinae&id=7585)

Wang P., Su Z., Yuan W., Deng G., Li S., 2012. "Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium L.* (Apiaceae)". *Pharm. Crop.*, Volumen 3, pp. 99-120.

Wolfe E. A., Sherwood G., Mitchell K. A., Browne M. P., 2000. "Antiinflammatory and analgesic properties from the stems of *Eryngium foetidum* (Shadow Benny)". *ACS National Meeting*.

Zarnack J., Hildebrandt B., Hiller K., Otto A., 1979. "To the knowledge of the compounds contained in some Saniculoideae. part XXXIII. isolation of flavonol glycosides from *Eryngium giganteum*". *Zeitschrift fuer Chemie.*, Volumen 19, pp. 214-215.

Zhang Z. Z., Li S. Y., Ownby S., Wang P., Yuang W., Zhang W. L., Beasley R. S., 2008." Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*". *Phytochemistry*, Volumen 69, pp. 2070-2080.

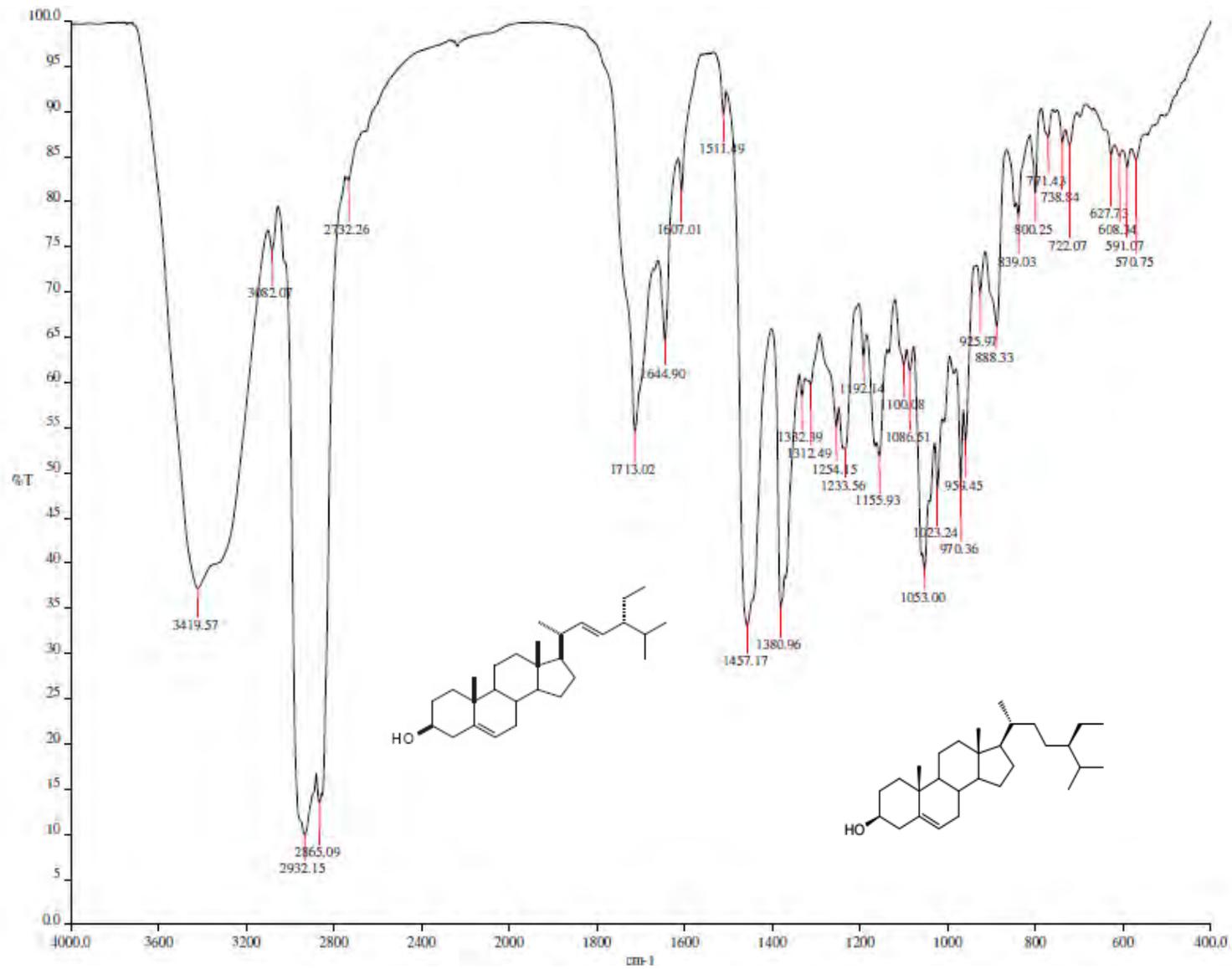


Figura 8. Espectro de IR de la mezcla de β-sitosterol y estigmasterol.



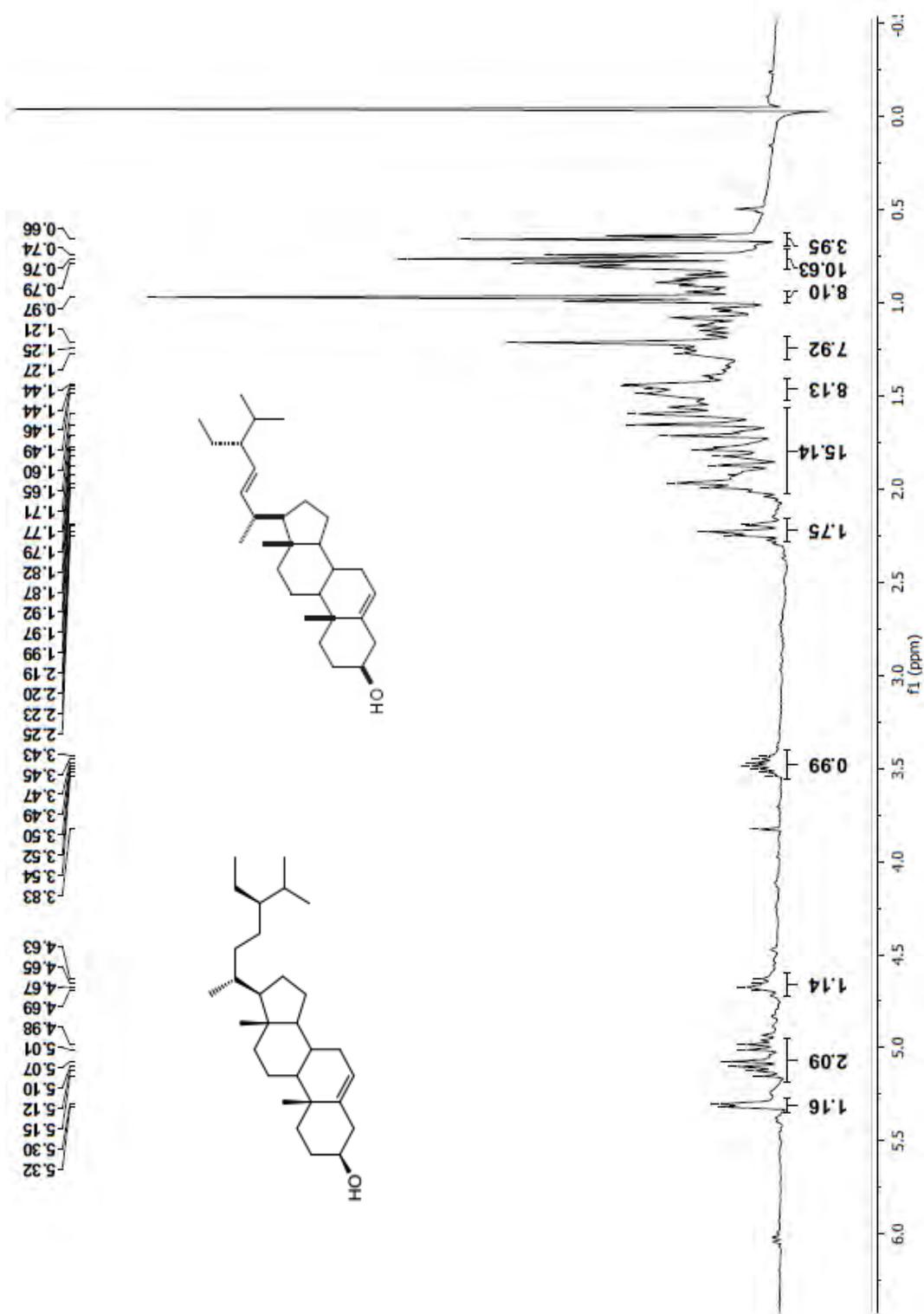


Figura 9. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.

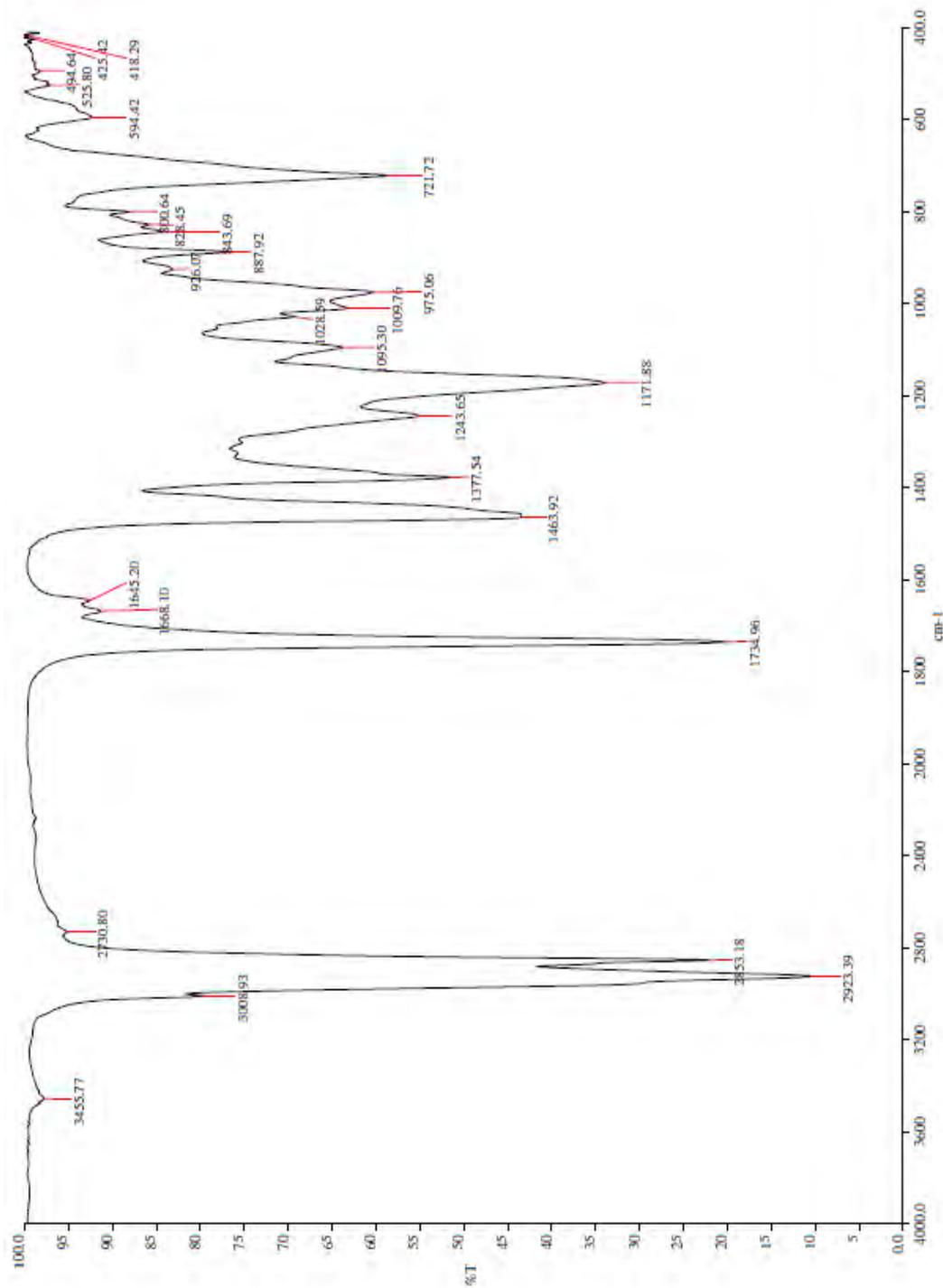


Figura 10. Espectro de IR de la mezcla constituida por Deca-2,4-dienal **(1)**, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletilidieno), (4aR-trans)-naftaleno **(2)**, los esteres metilicos de los acidos hexadecanoico **(3)**, octadecanoico **(4)**, y tricosanoico **(5)**, así como el ácido docosanoico **(6)**, la triaracina **(7)**, y el ácido hexacosanoico**(8)**

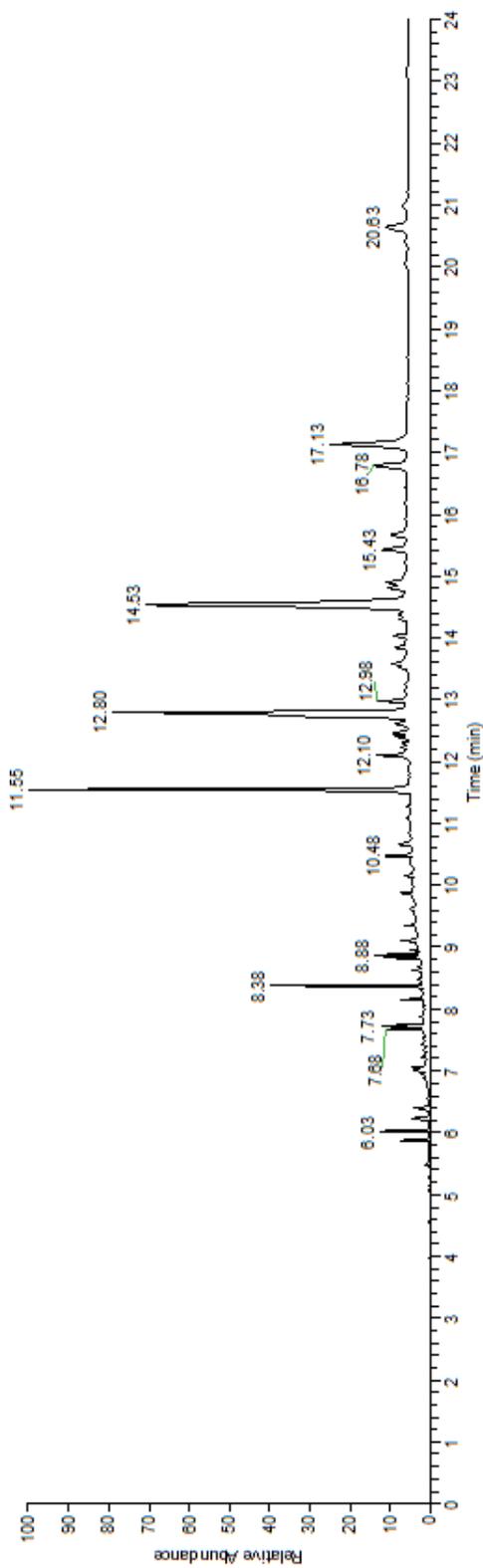


Figura 11. Cromatograma de gases de la mezcla de ácidos grasos de la fracción FH-9 del extracto de hexano.

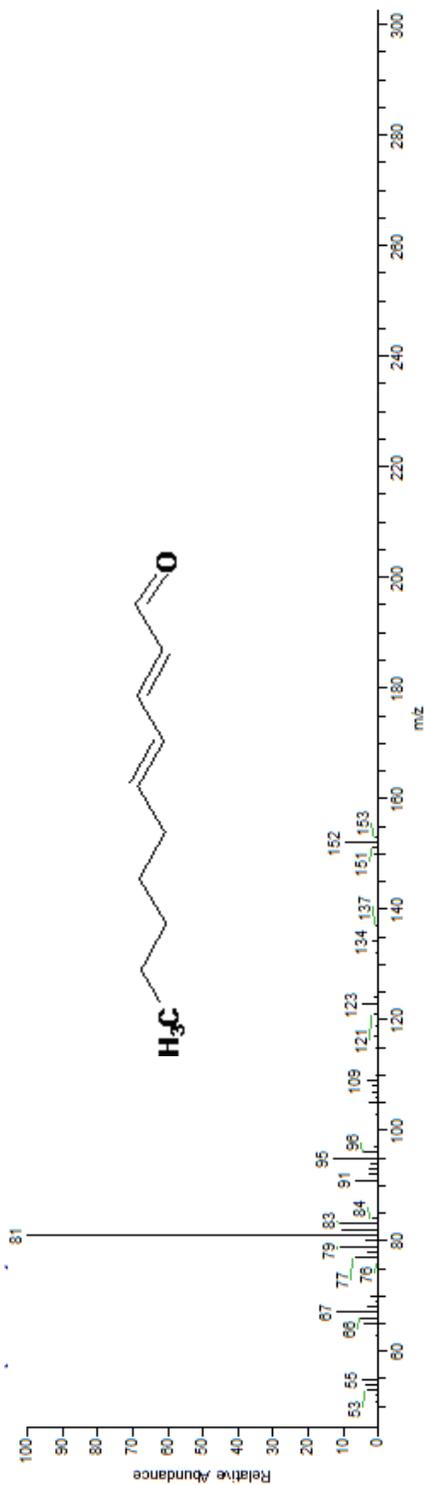


Figura 12. Espectro de masas por impacto electrónico de deca-2,4-dienal (1).

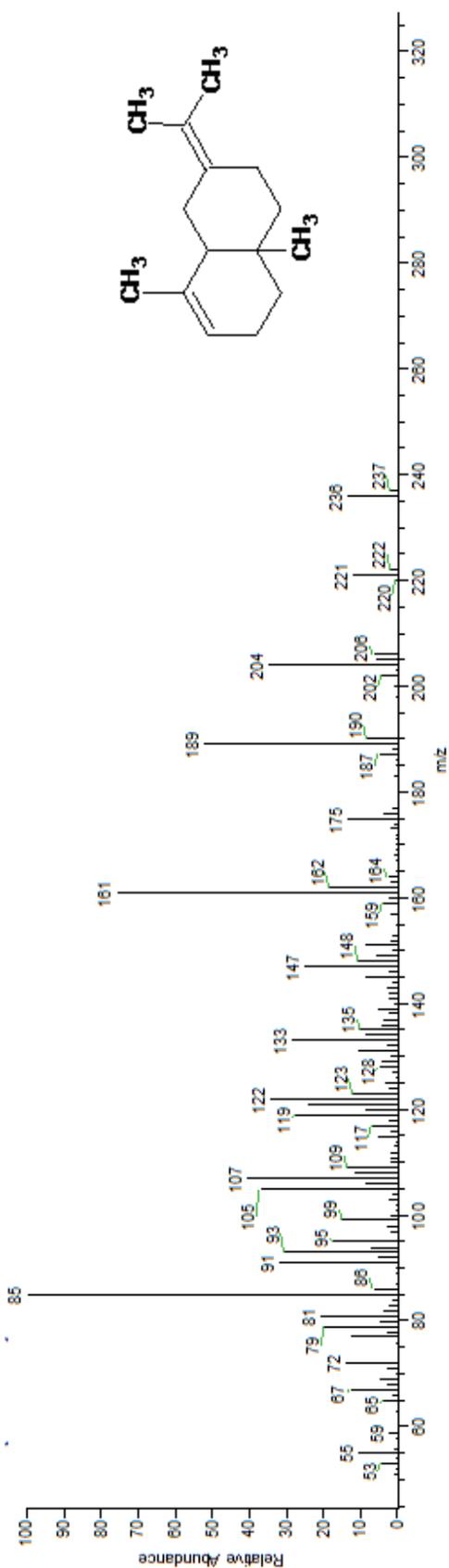


Figura 13. Espectro de masas por impacto electrónico del 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletilidieno), (4aR-trans)-naftaleno (2).

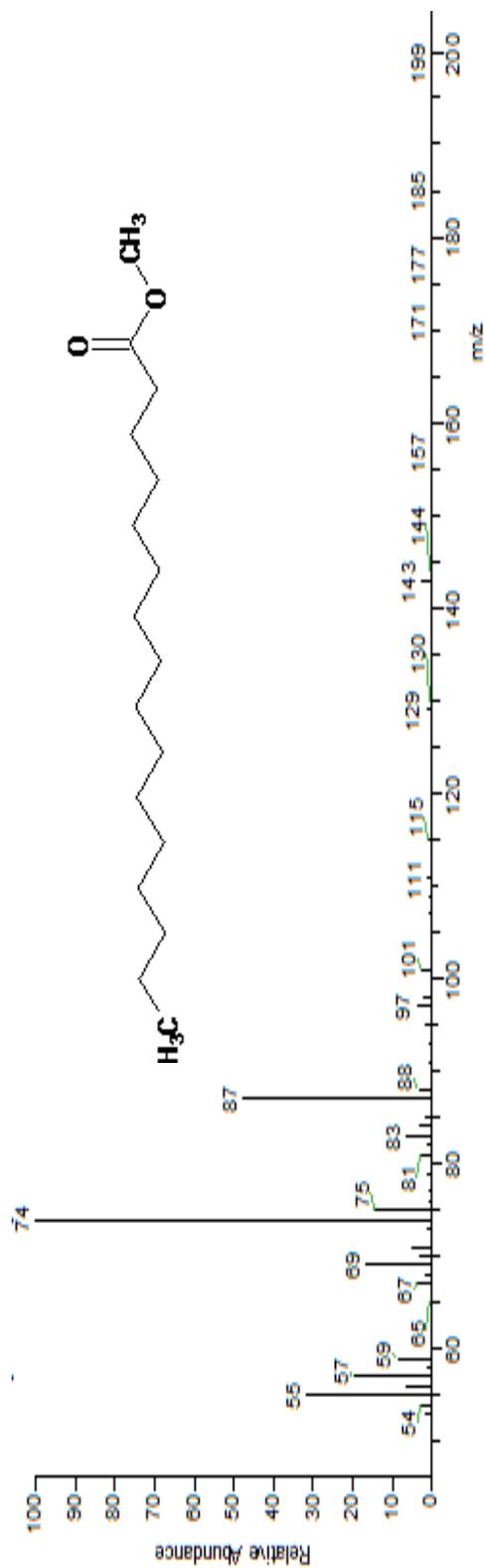


Figura 14. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido hexadecanoico (3).

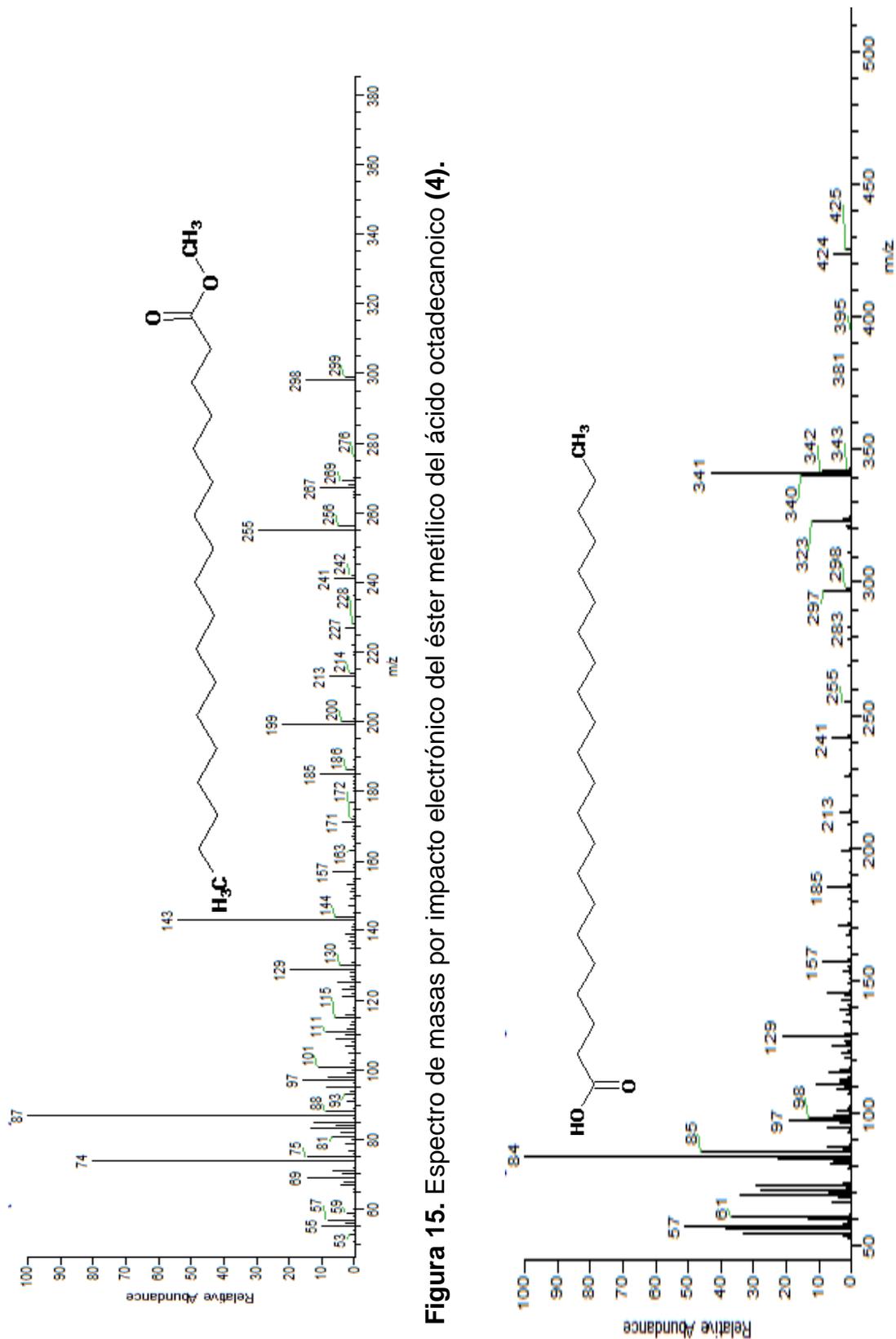


Figura 16. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido docosanoico (5).

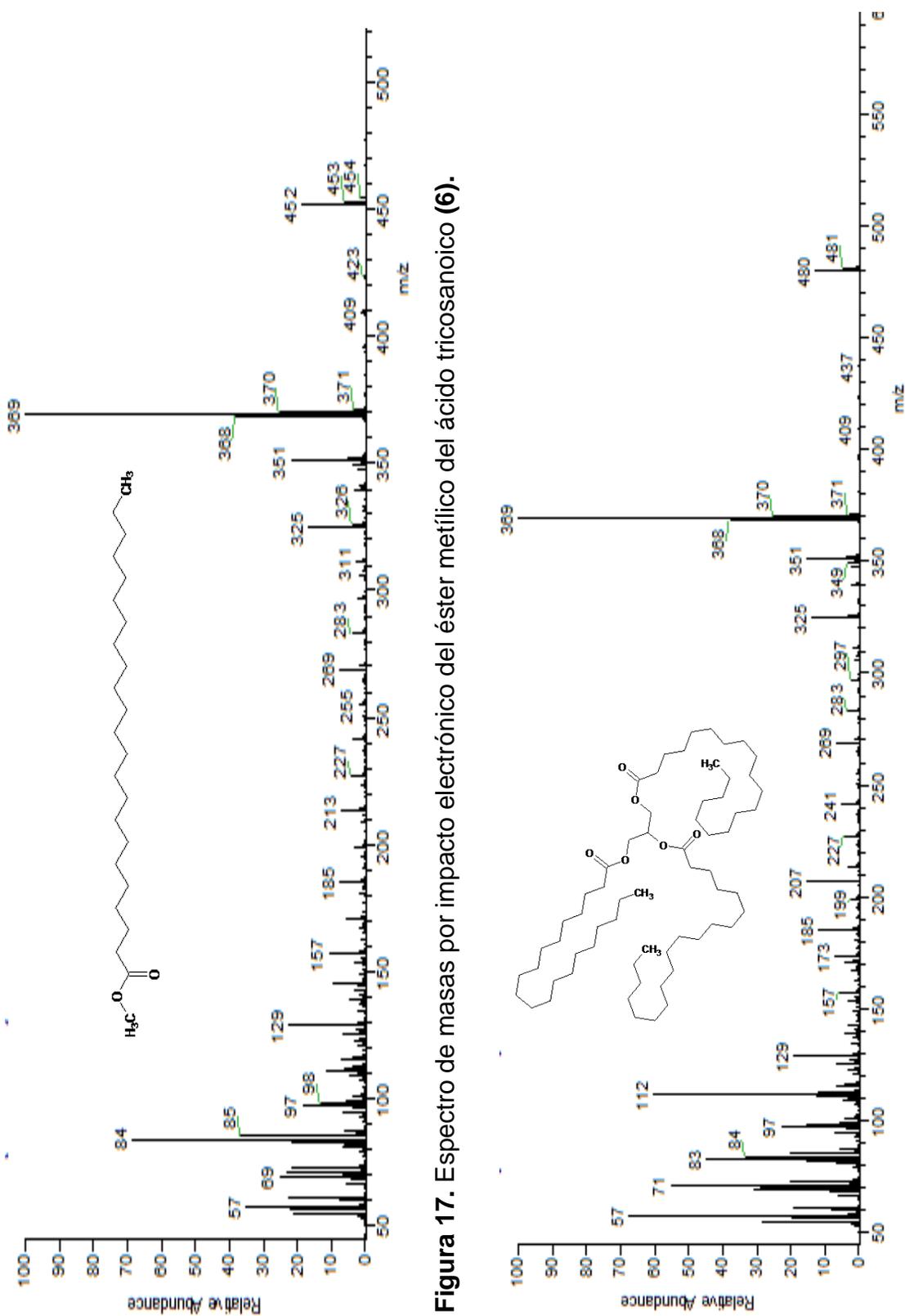


Figura 17. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido tricosanoico (6).

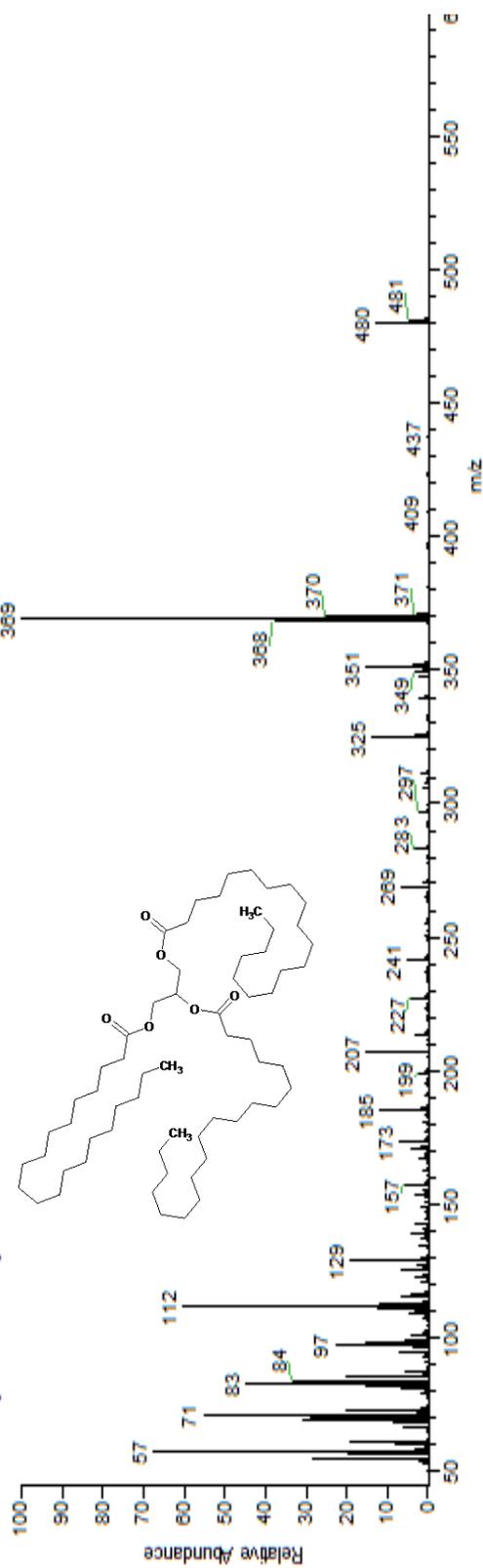


Figura 18. Espectro de masas por impacto electrónico de la triaracina (7).

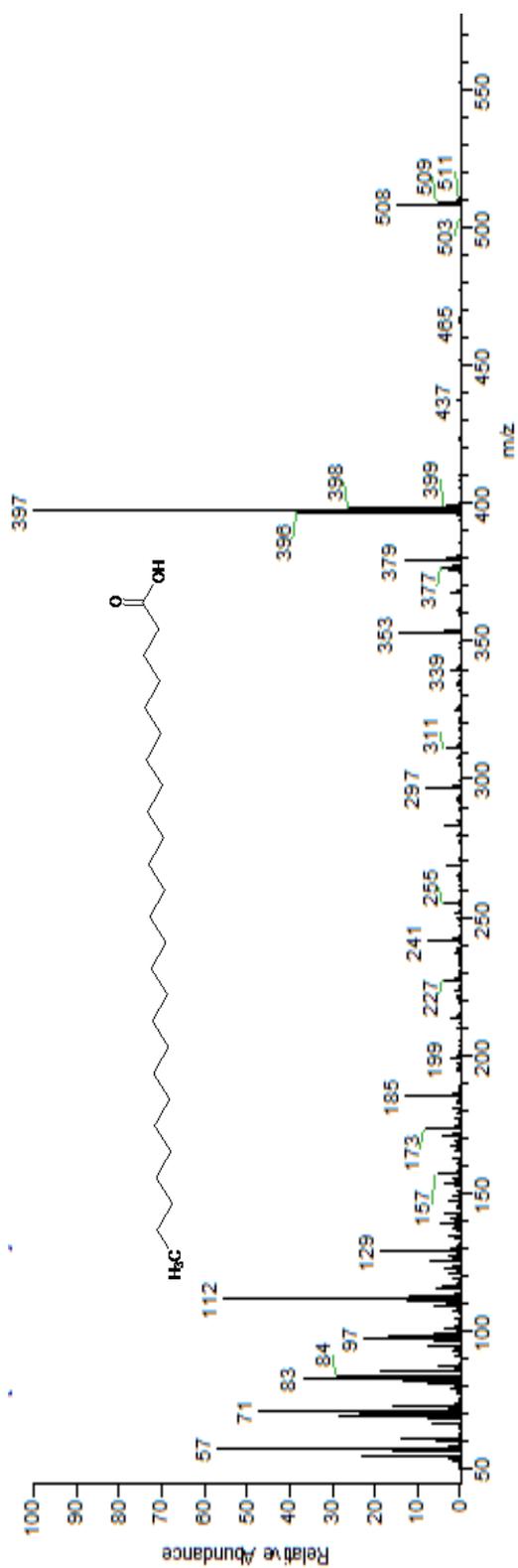


Figura 19. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido hexacosanoico (8).

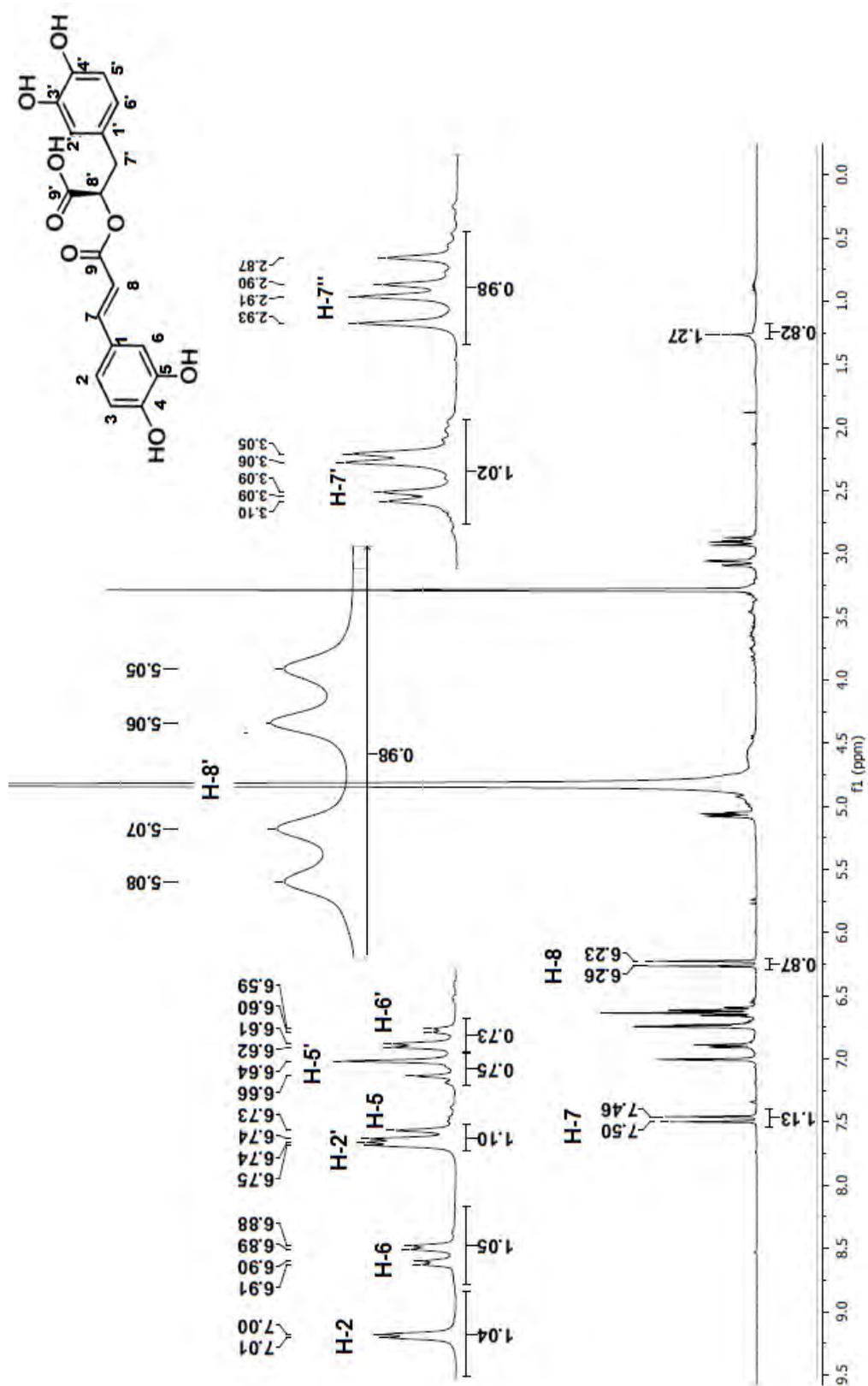


Figura 20. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico.

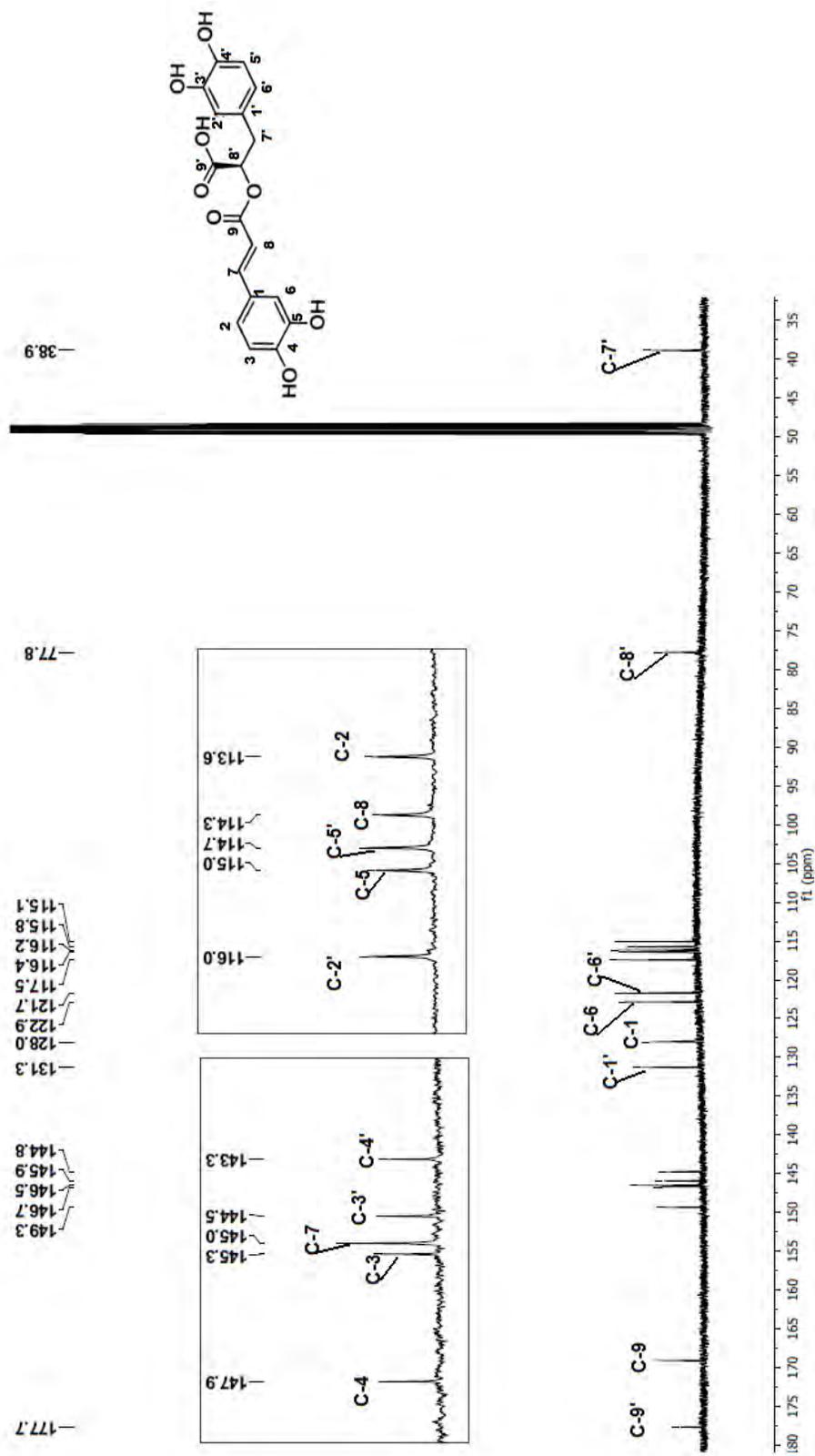


Figura 21. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz MeOH-d_4) del ácido rosmarínico.

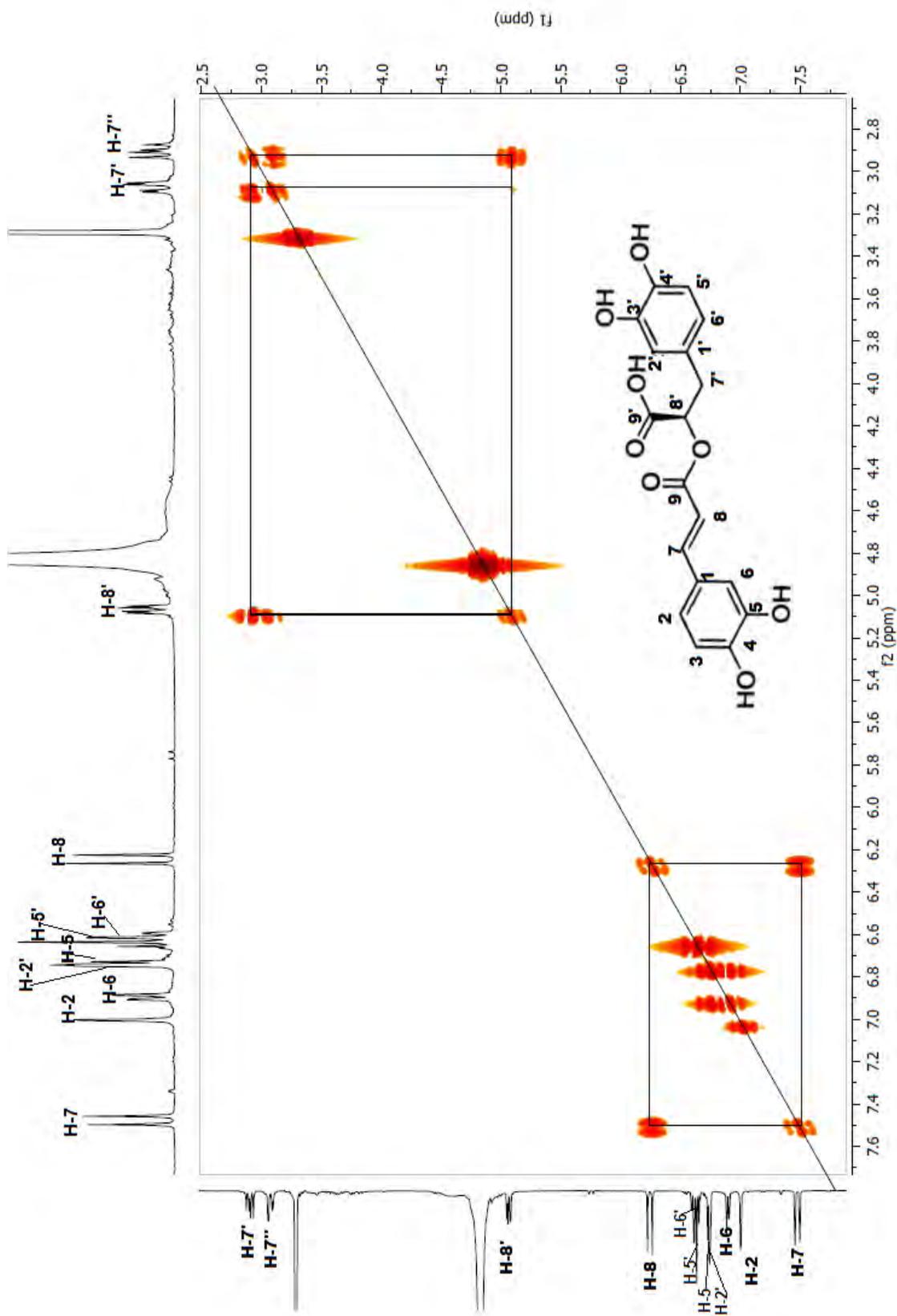


Figura 22. Espectro de RMN-¹H modalidad COSY (400 MHz MeOH-d₄) del ácido rosmarínico.

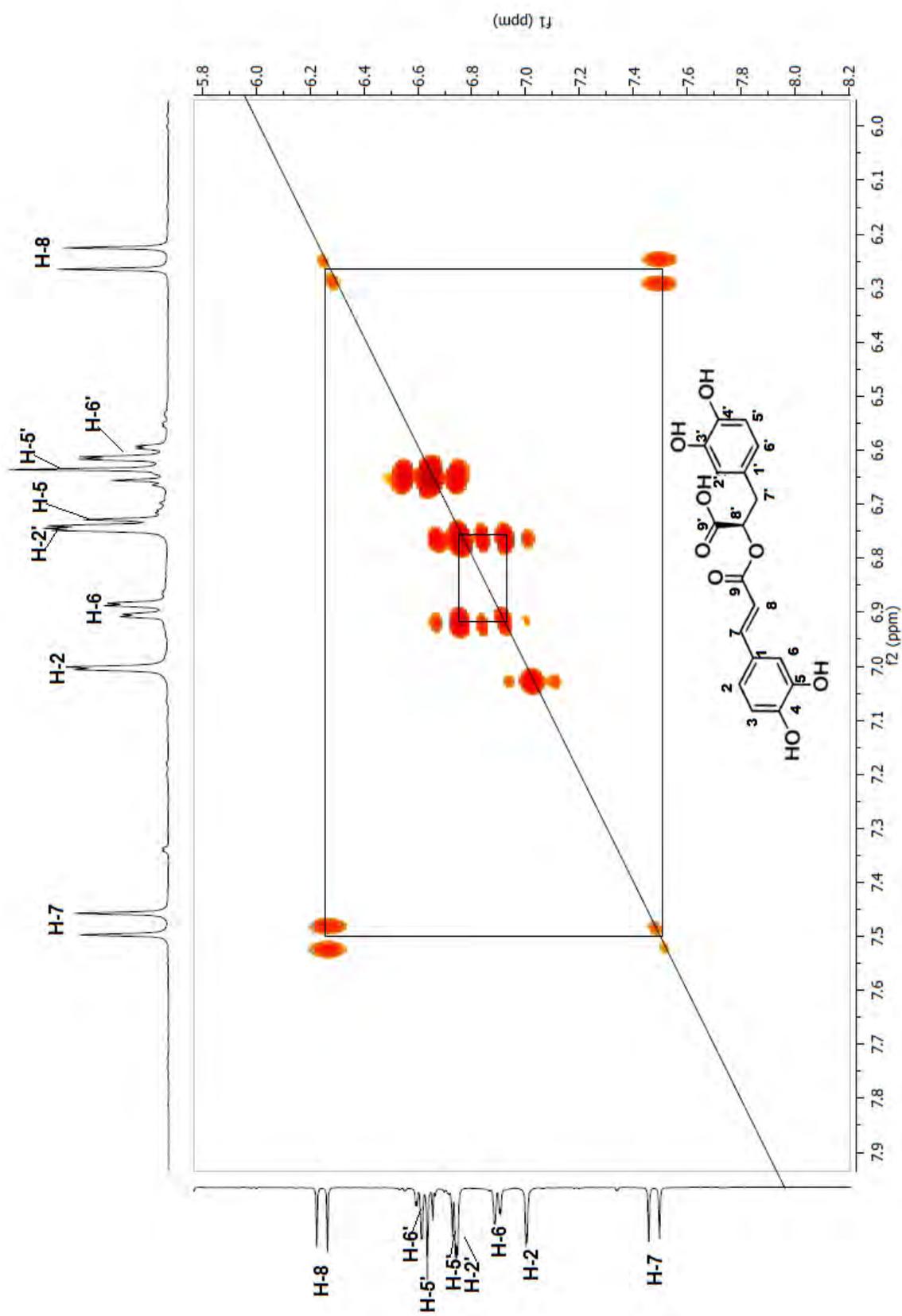


Figura 23. Espectro de RMN- ^1H modalidad COSY (Expansión) (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico.

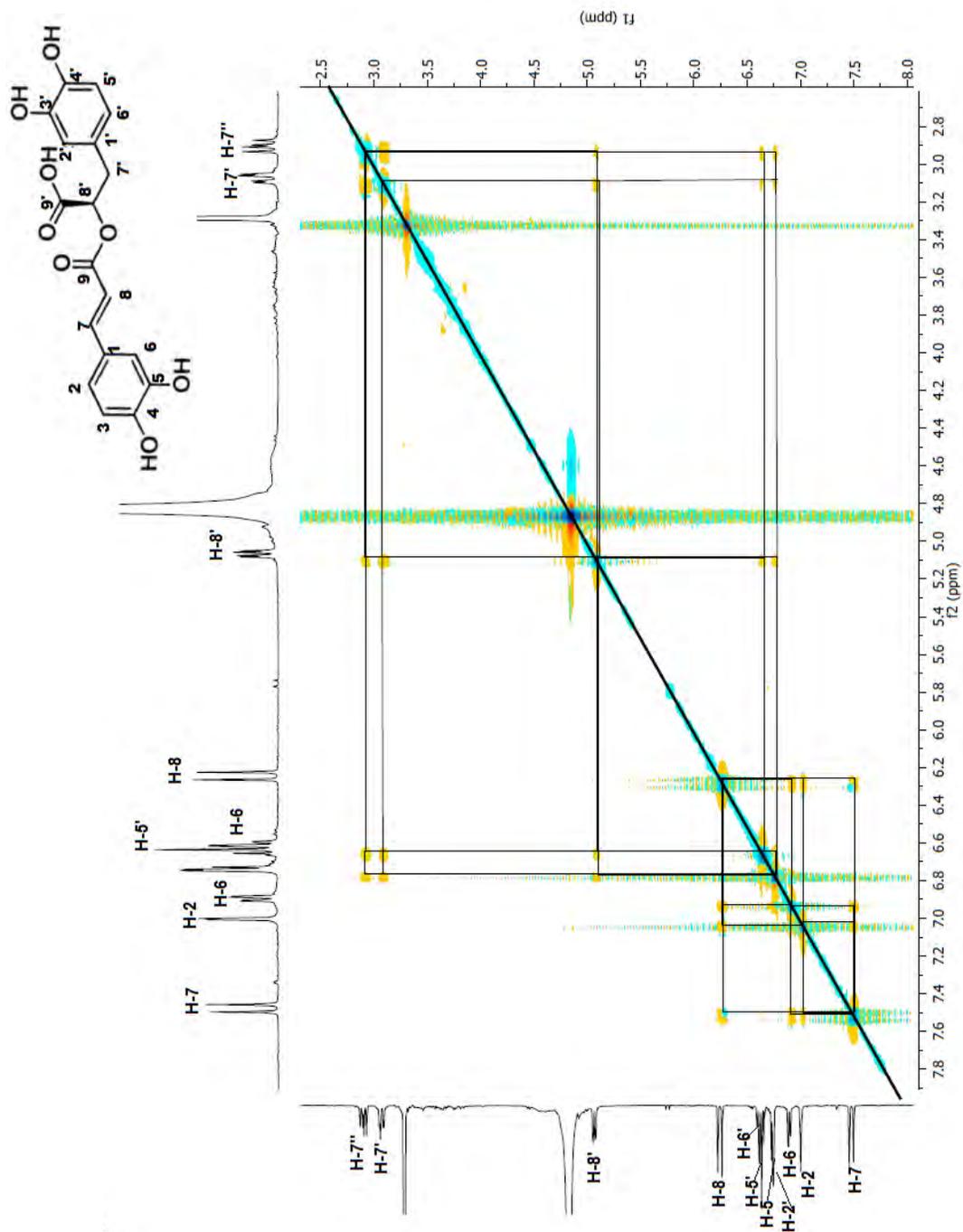


Figura 24. Espectro de RMN-¹H modalidad NOESY (400 MHz MeOH-d₄) del ácido rosmarínico

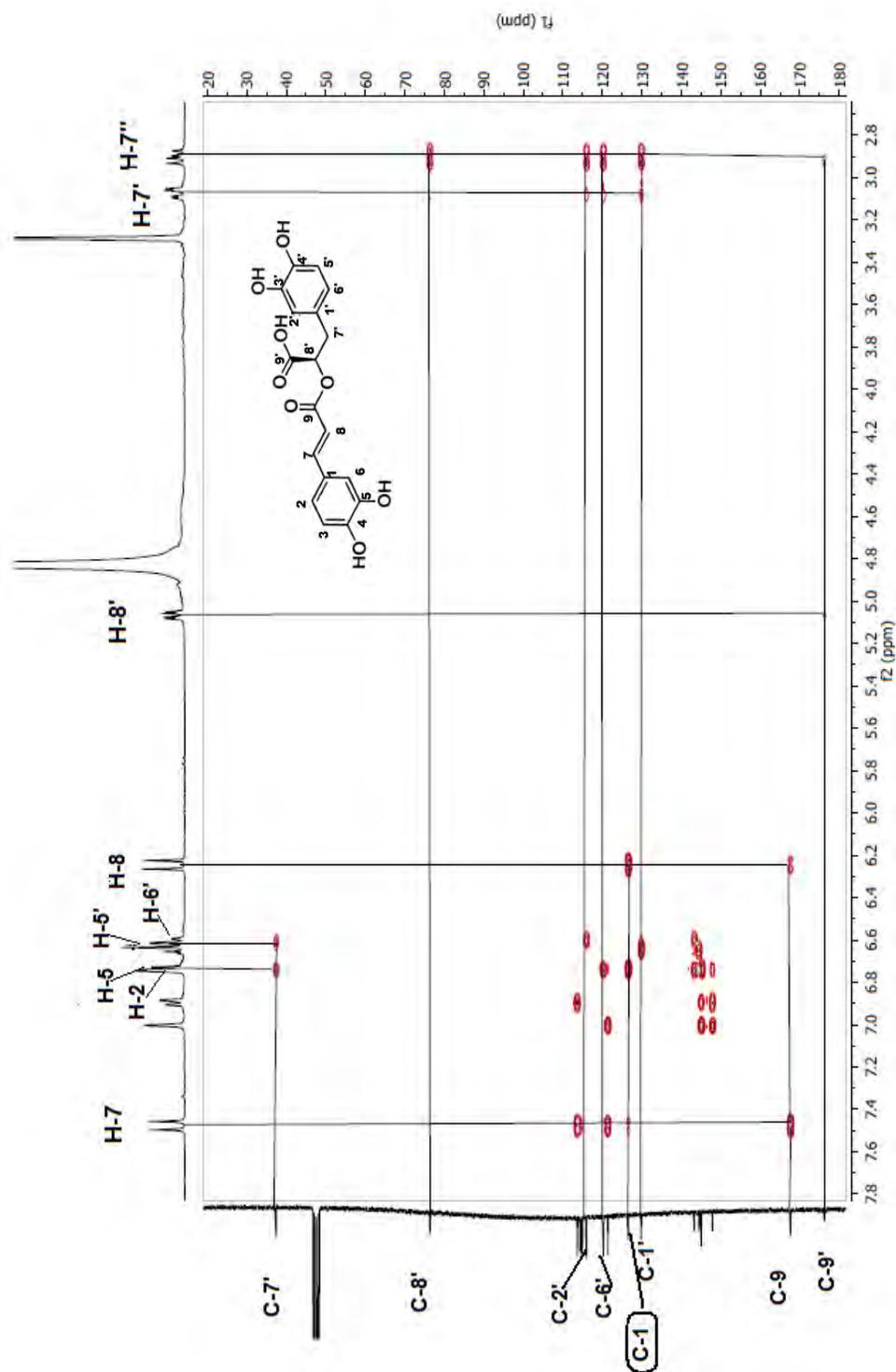


Figura 25. Espectro de RMN- ^1H modalidad HMBC (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico

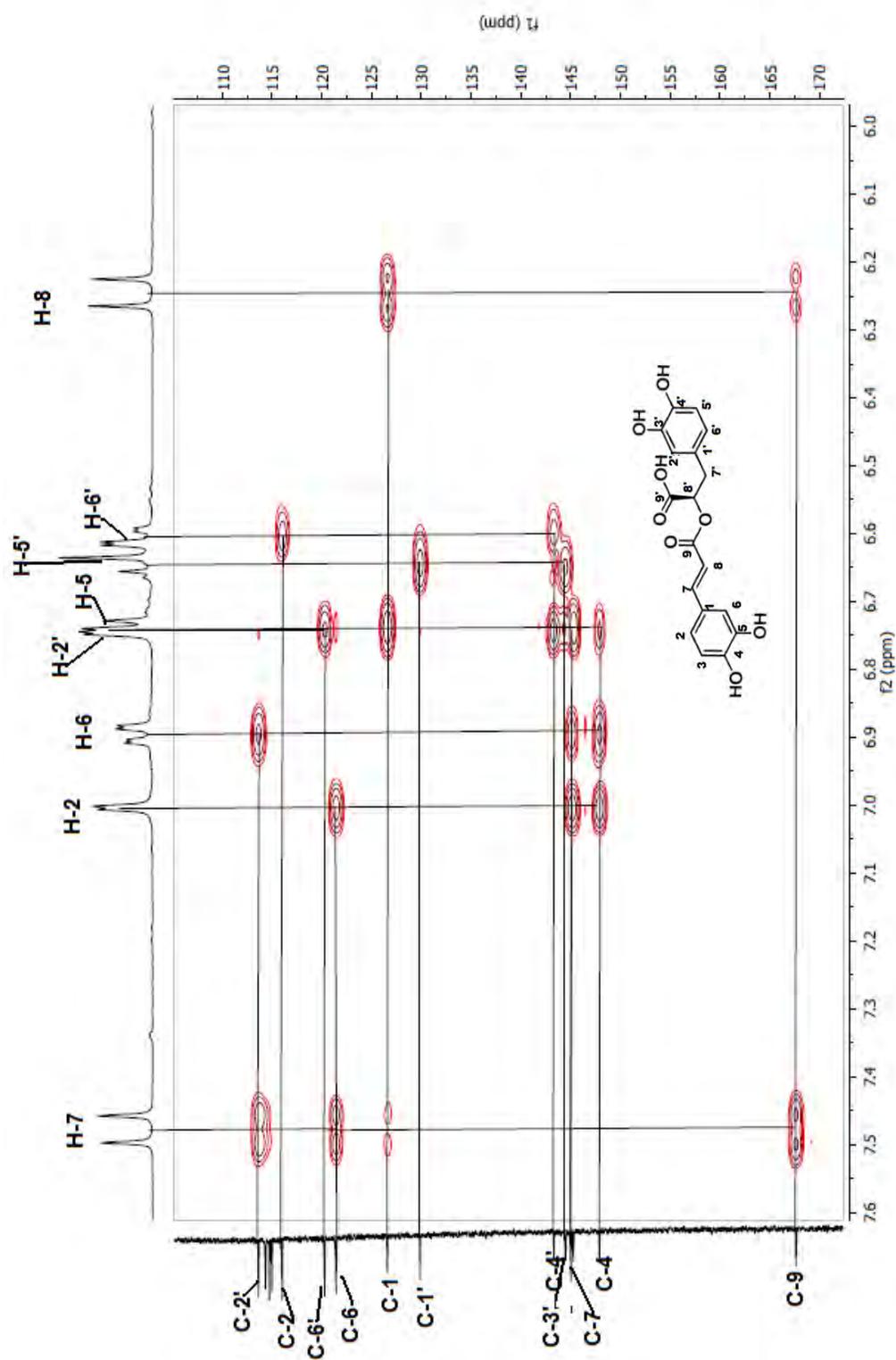


Figura 26. Espectro de RMN- ^1H modalidad HMBC (Expansión) (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico

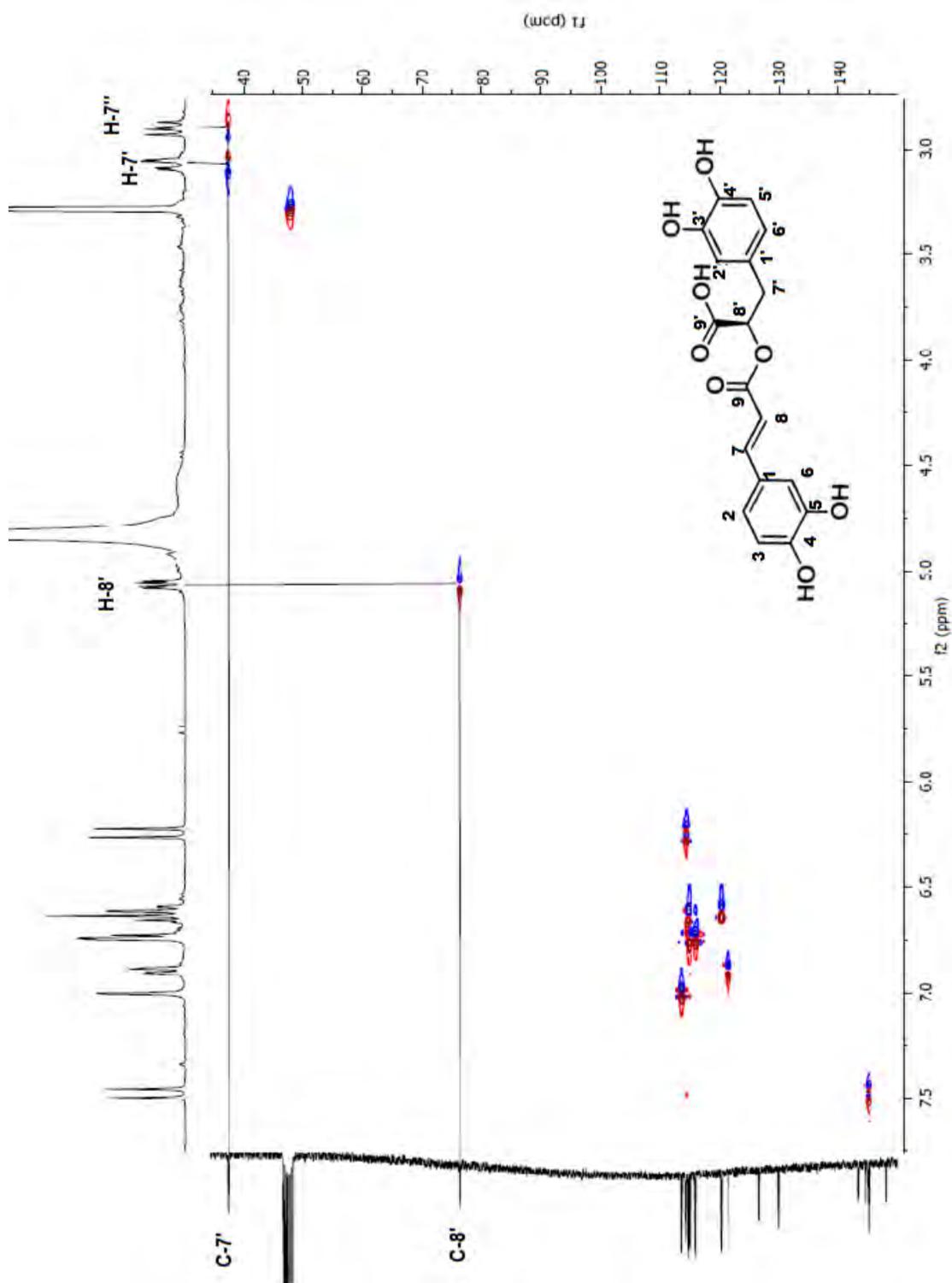


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H modalidad HSQC (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico

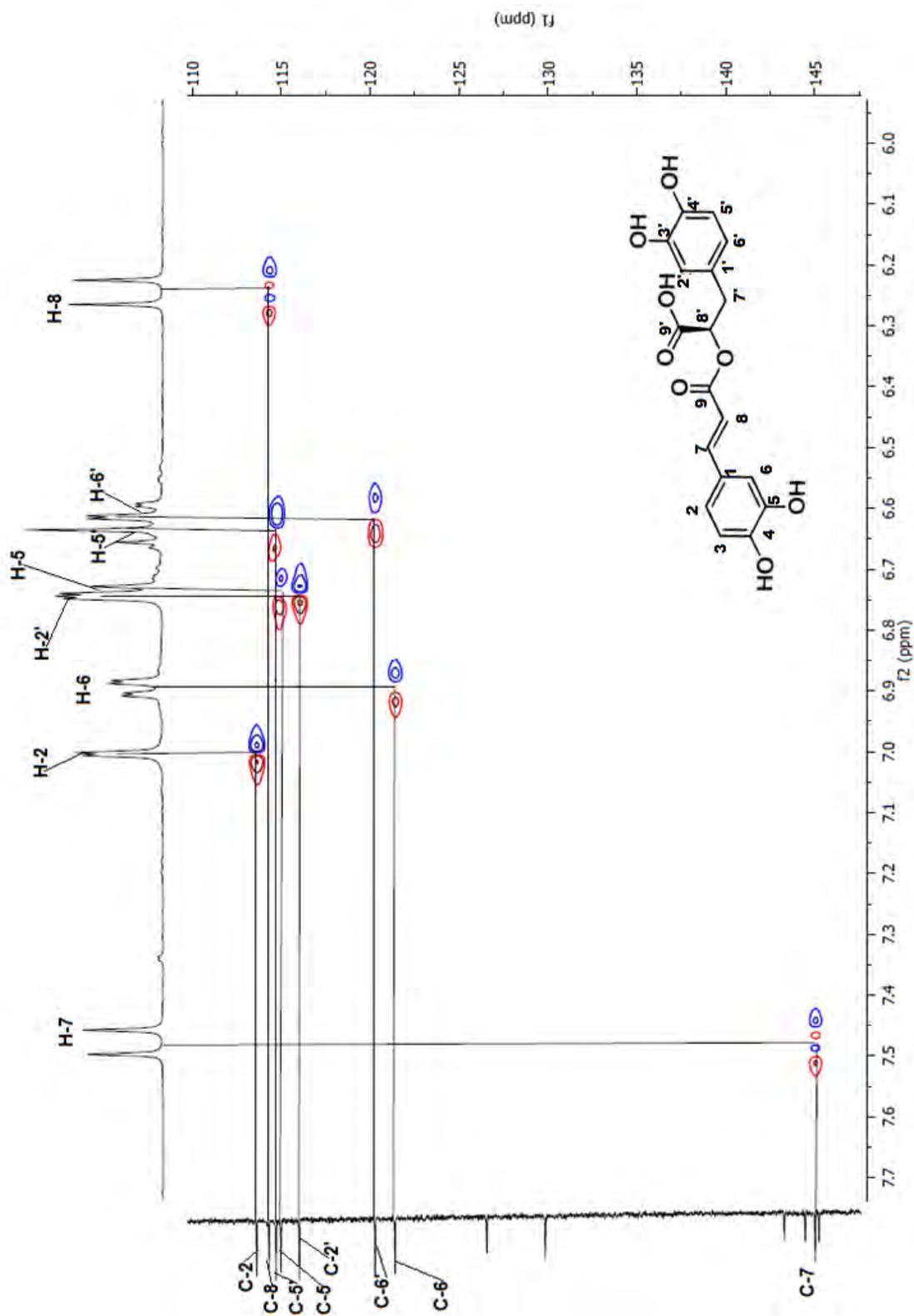


Figura 28. Espectro de RMN- ^1H modalidad HSQC (Expansión) (400 MHz MeOH- d_4) del ácido rosmarínico

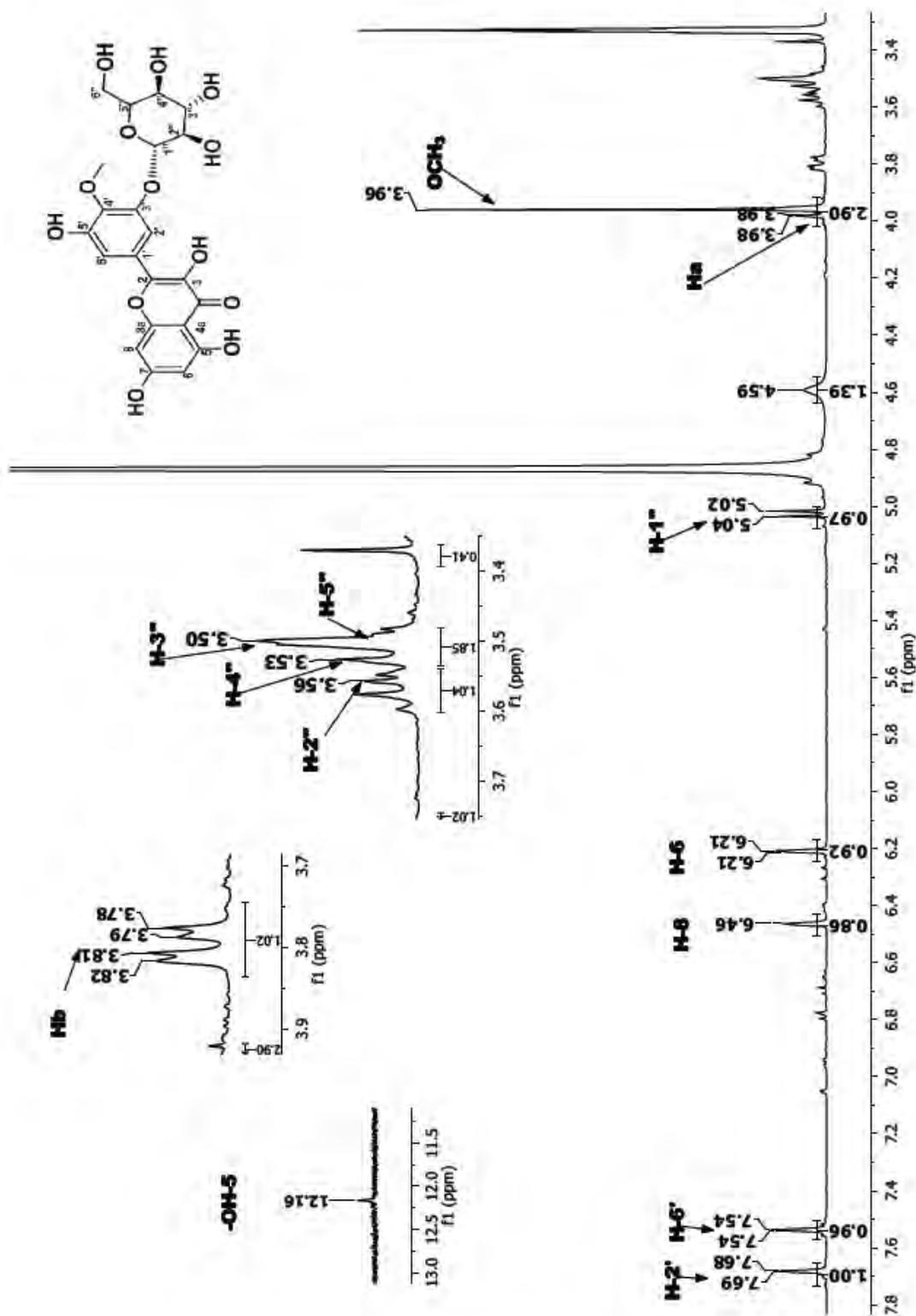


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz MeOH-d_4) del 3- β -D-glucosido de 3'-O-metil-miricetina.

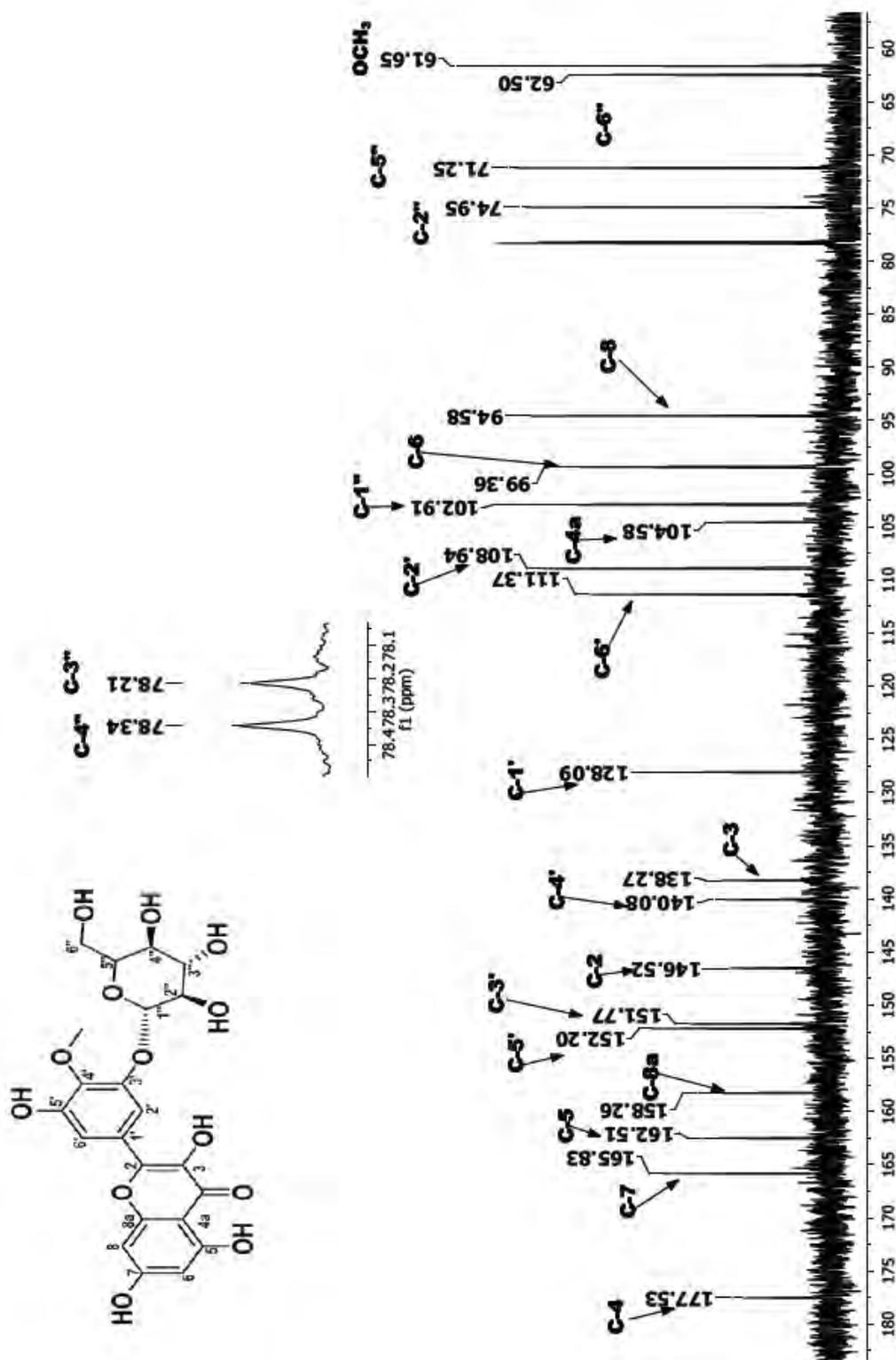


Figura 30. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz MeOH- d_4) del 3- β -D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

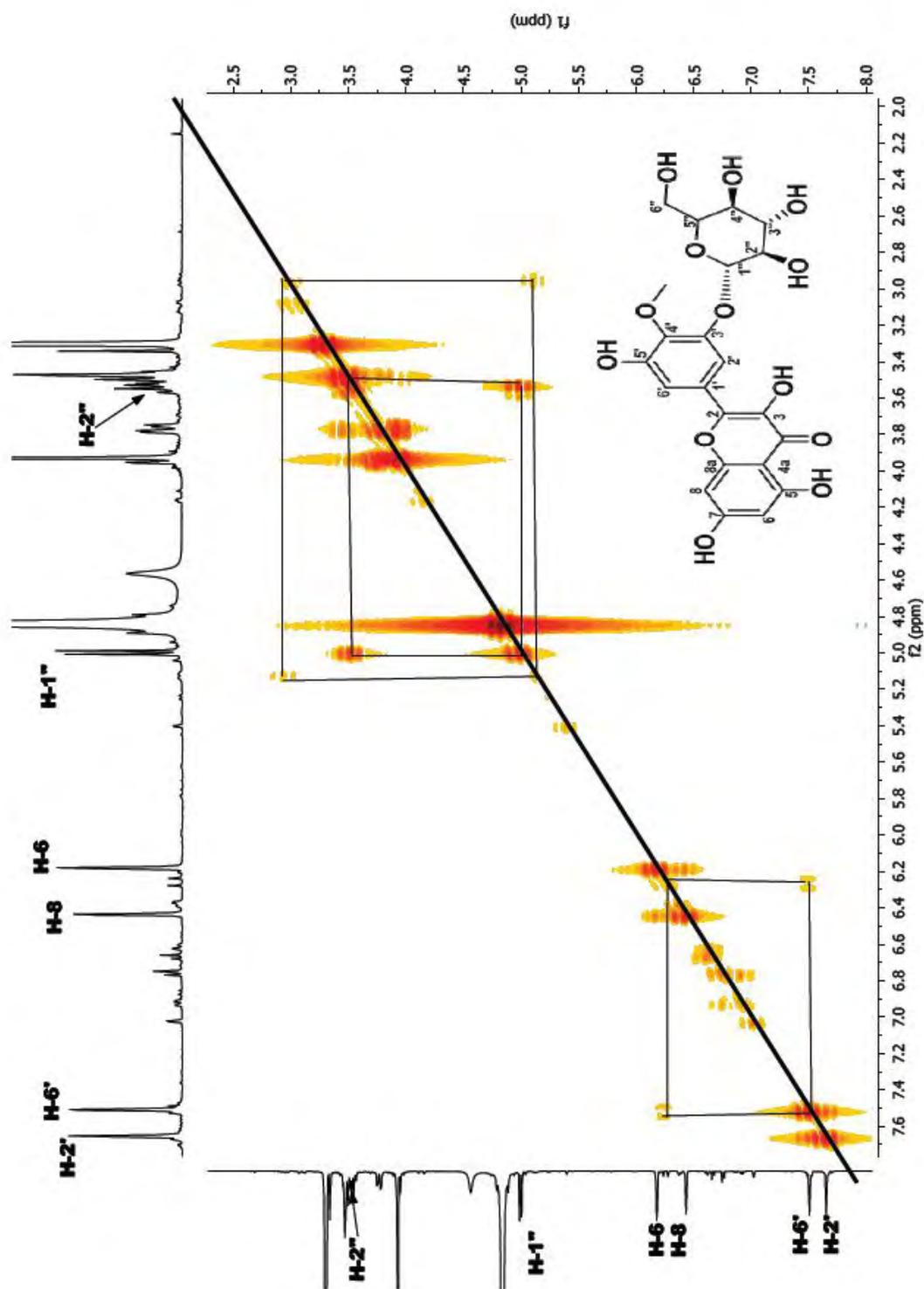


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H modalidad COSY (400 MHz MeOH- d_4) del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

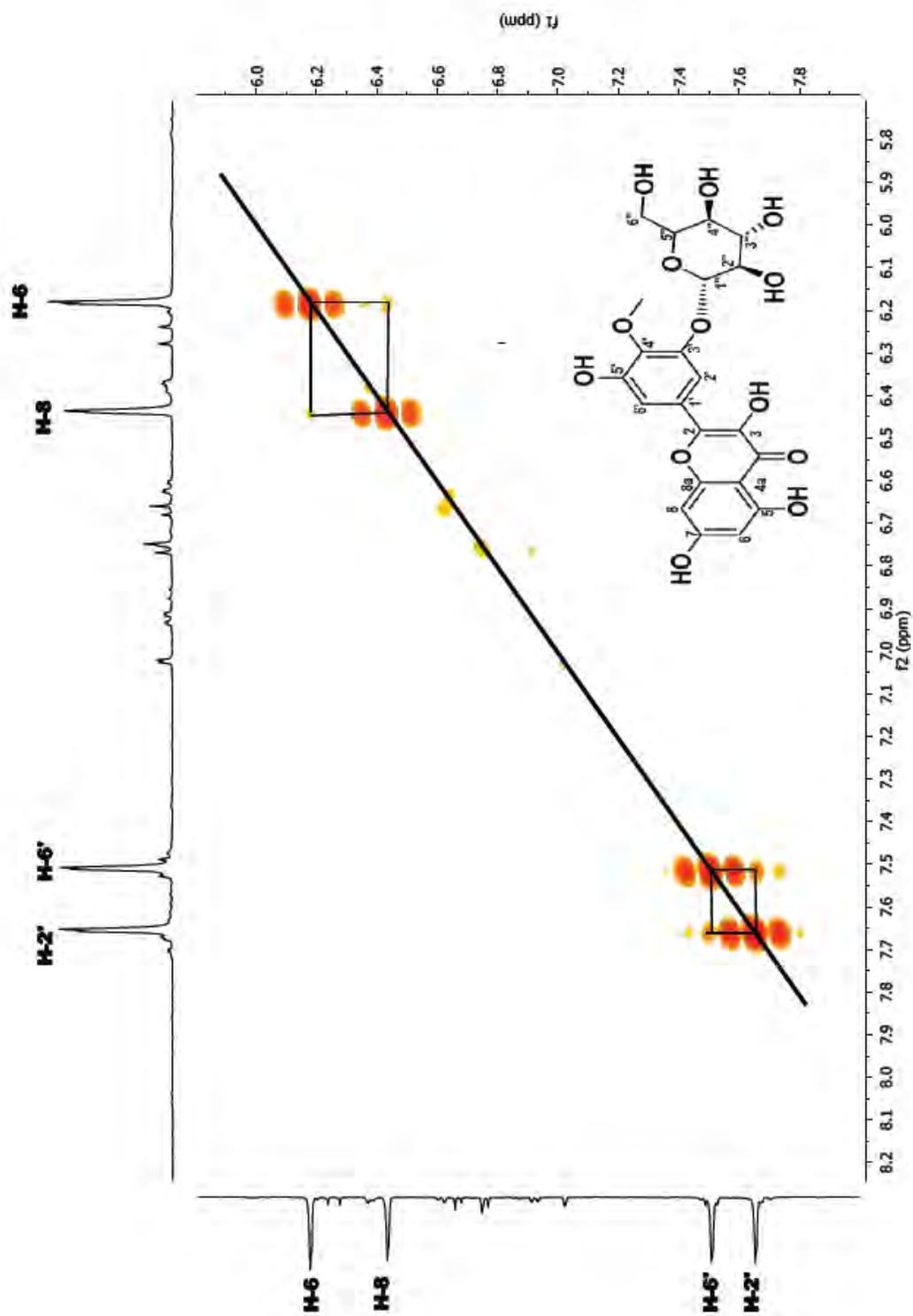


Figura 32. Espectro de RMN- ¹H modalidad COSY (Expansión)(400 MHz MeOH-d₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

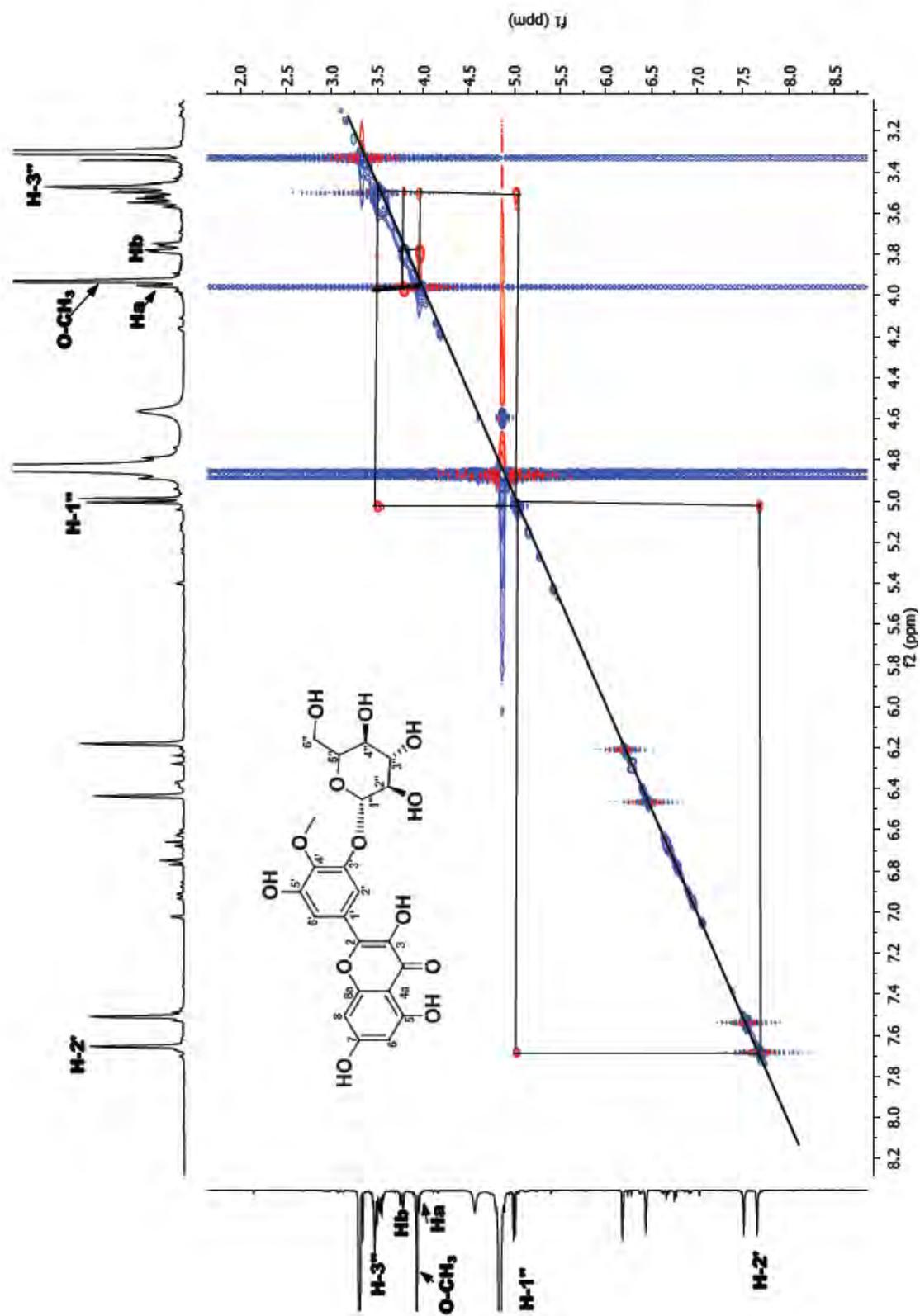


Figura 33. Espectro de RMN-¹H modalidad NOESY (400 MHz MeOH-d₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

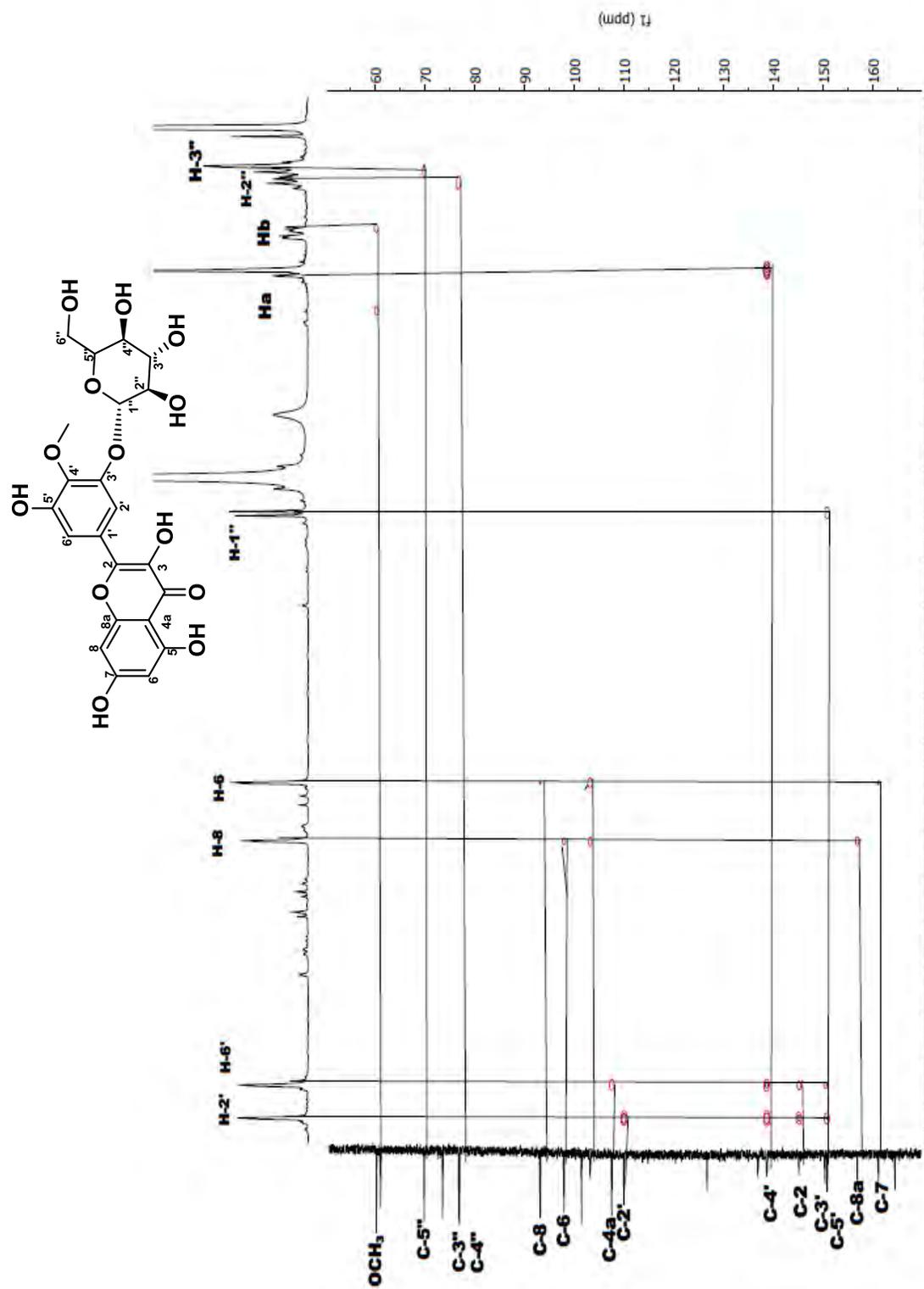


Figura 34. Espectro de RMN-¹H modalidad HMBC (400 MHz M MeOH-d₄) del 3-β-O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

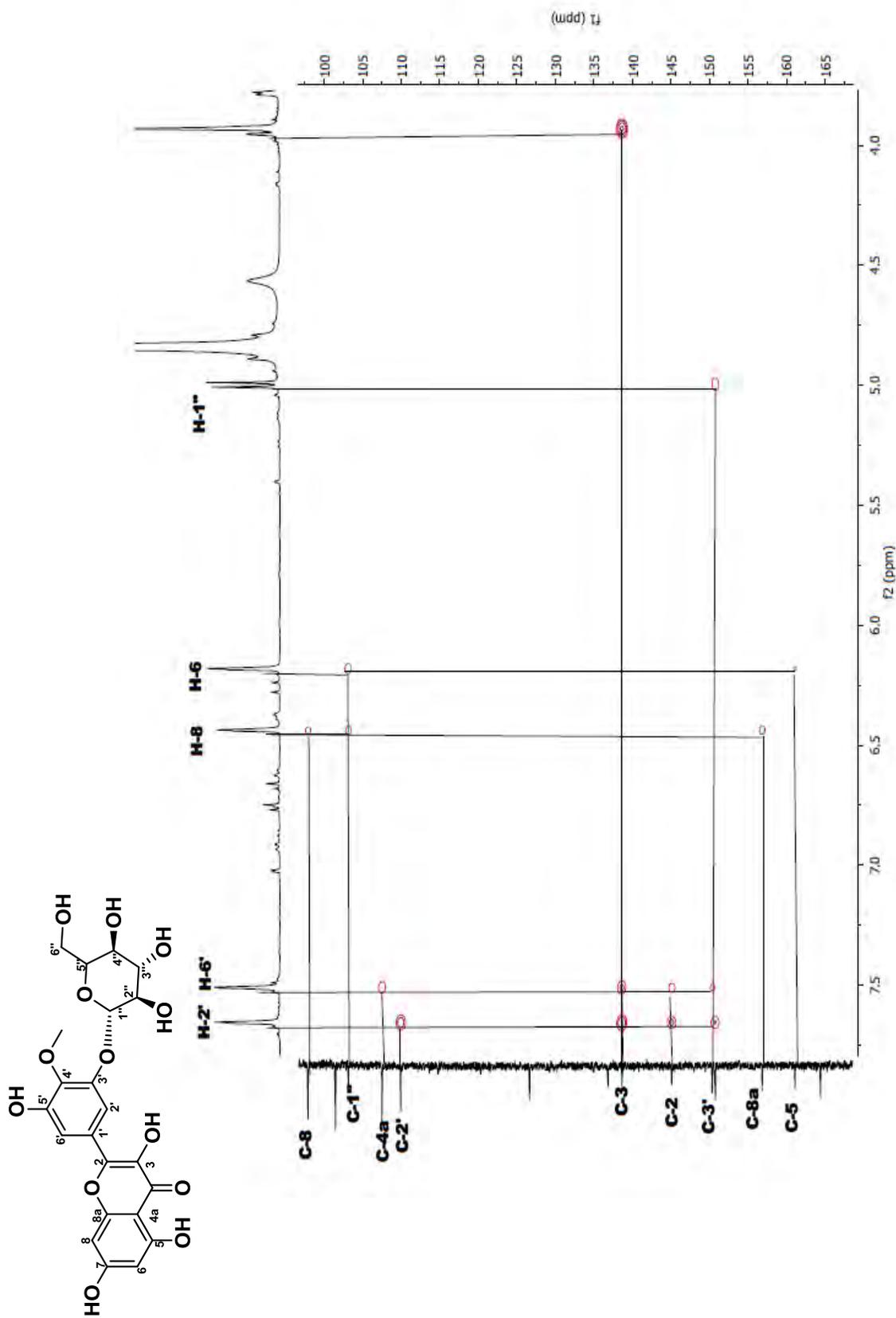


Figura 35. Espectro de RMN- ^1H modalidad HMBC (Expansión) (400 MHz MeOH- d_4) del 3- β -O-D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.

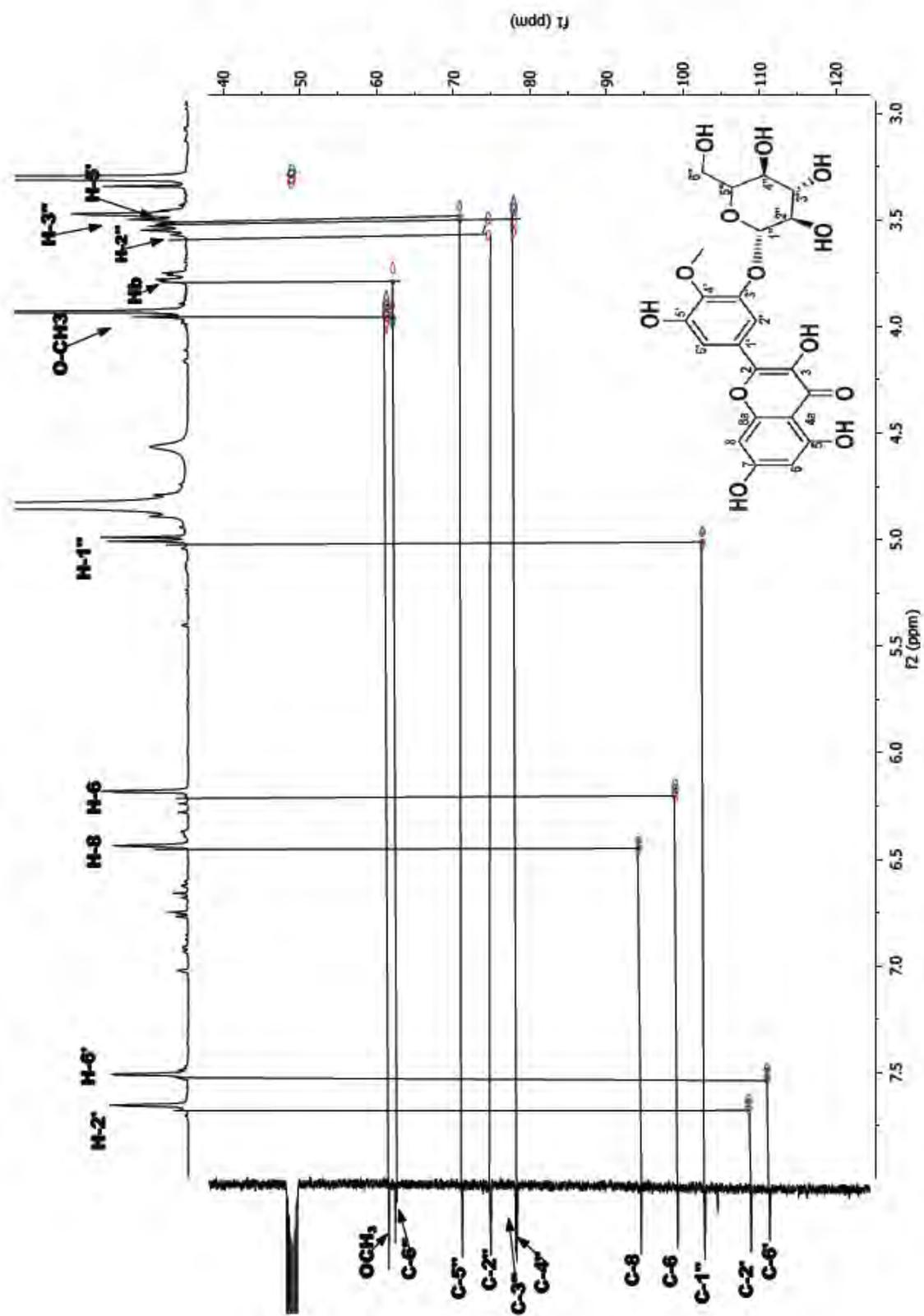


Figura 36. Espectro de RMN- ^1H modalidad HSQC (400 MHz MeOH- d_4) del 3- β -D-glucósido de 3'-O-metil-miricetina.