

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Caracterización etnofarmacológica de especies
de *Eupatorium* nativas de Michoacán**

TESIS

**Para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta

M. C. Edgar García Sánchez,

Asesores

**Mauro Manuel Martínez Pacheco, Doctor en Ciencias en Biología Experimental
(Bioquímico),**

**Rosa Elva Norma del Río Torres, Doctora en Ciencias Químicas en el área de
Química Orgánica,**

AGOSTO DE 2014

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| RESUMEN..... | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA | 5 |
| 1.1.1 Los antibacterianos en el sector clínico: un factor importante de resistencia..... | 6 |
| 1.1.2 Efectos adversos de los antimicrobianos en el sector agrícola..... | 8 |
| 1.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA DE LOS PRODUCTOS NATURALES EN LA BÚSQUEDA DE NUEVAS DROGAS..... | 9 |
| 1.2.1 La relevancia de la investigación de fármacos de origen natural..... | 10 |
| 1.3 BIODIVERSIDAD VEGETAL EN MÉXICO..... | 12 |
| 1.3.1 El potencial farmacológico de las plantas..... | 12 |
| 1.4 EL GÉNERO <i>EUPATORIUM</i> Y SU RELEVANCIA ETNOFARMACOLÓGICA EN MÉXICO..... | 13 |
| 1.4.1 Importancia etnofarmacológica de las especies de <i>Eupatorium</i> nativas de Michoacán..... | 15 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 16 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 16 |
| 4. OBJETIVOS..... | 16 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 16 |
| 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 16 |
| 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 17 |
| 6. RESULTADOS..... | 18 |
| 6.1 CAPÍTULO 1. PRESENCIA DE <i>EUPATORIUM</i> SPP EN MICHOACÁN..... | 19 |
| 6.2 CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>EUPATORIUM</i> SPP NATIVAS DE MICHOACÁN..... | 27 |
| 6.2.1 Antibacterial activity of some medicinal <i>Eupatorium</i> species against antibiotic resistant pathogenic bacteria | 27 |
| 6.2.2 Antimicrobial activity of <i>Eupatorium</i> species native to Michoacan, Mexico..... | 43 |
| 6.2.3 Anti- <i>Phytophthora</i> activity of <i>Eupatorium</i> species native to Michoacan state, Mexico | 73 |
| 6.2.4 Actividades complementarias..... | 86 |
| 6.2.4.1 Perspectiva fitoquímica de <i>Eupatorium</i> spp..... | 86 |
| 6.2.4.2 Efecto analgésico del extracto de hojas de <i>Ageratina glabrata</i> en el ensayo de plato caliente..... | 95 |
| 6.3 CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ANTIMICROBIANOS DE <i>EUPATORIUM</i> SPP..... | 103 |
| 6.3.1 Absolute configuration of (13 <i>R</i>)- and (13 <i>S</i>)-labdane diterpenes coexisting in <i>Ageratina jocotepecana</i> | 103 |
| 6.3.2 Phytochemical study of <i>Ageratina jocotepecana</i> | 111 |
| 7. DISCUSIÓN GENERAL..... | 117 |
| 8. REFERENCIAS GENERALES | 123 |

Resumen

La resistencia microbiana a los antibióticos tiene un efecto global, específicamente en los sectores clínico y agrícola, con consecuencias económicas y en la salud del ser humano. Una alternativa para ayudar en la resolución del problema es la búsqueda de nuevas moléculas en especies vegetales de *Eupatorium* nativas, por la diversidad y complejidad de sus metabolitos secundarios. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de metabolitos secundarios antimicrobianos contra patógenos de importancia clínica y agrícola de especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán, México. La investigación incluyó, el conocimiento de la diversidad de este género en Michoacán, el escrutinio de la actividad antimicrobiana y la caracterización espectroscópica de los metabolitos activos. Los resultados demuestran que en Michoacán habitan 69 especies escasamente estudiadas desde el punto de vista químico y de principios activos, así como el potencial antimicrobiano “*in vitro*” de once especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán. Además, el estudio fitoquímico biodirigido permitió el aislamiento y elucidación estructural de 23 compuestos la mayoría con propiedades antimicrobianas. Asimismo, se determinó la coexistencia de diterpenos antimicrobianos tipo labdano (13*R*) y (13*S*) en *Ageratina jocotepecana* por Dicroísmo Circular Vibracional (DCV). La caracterización etnofarmacológica de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán las ubica como especies promisorias de metabolitos secundarios antimicrobianos y se valida el uso etnomedicinal del género *Eupatorium* en Michoacán. Al mismo tiempo se crean distintas perspectivas como la preparación de derivados de los metabolitos secundarios antimicrobianos y continuar con el estudio fitoquímico y de principios activos con técnicas rápidas y eficientes.

Palabras clave: *Eupatorium*, compuestos antimicrobianos, dicroísmo circular vibracional

Abstract

The microbial resistance to antibiotics has a global effect, specifically in clinical and agricultural sectors, with economic repercussions in human health. An alternative for solving these problems is the investigation of new compounds from vegetal species, taking advantage of its diversity and complexity. A promissory plant genus with antimicrobial molecules is *Eupatorium*, based on the ethnopharmacological uses of several of its species. The aim of this work was the characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Eupatorium* species native to Michoacan, Mexico, against clinical and agricultural pathogens. The investigation included knowledge of the diversity of this genus in Michoacan, the screening of antimicrobial activity, and the spectroscopic characterization of active metabolites. The results exhibited that sixty-nine species grow in Michoacan which are scarcely studied from the chemical and pharmacological points of view. The antimicrobial potential of eleven *Eupatorium* species native to Michoacan was demonstrated *in vitro* while, the phytochemical bioguided investigation allowed isolated and structural elucidation of twenty-three compounds, most of them with antimicrobial properties. Also, the coexistence of antimicrobial diterpene labdanes in *Ageratina jocotepecana* with the 13*R* and 13*S* configuration was determined by Vibrational Circular Dichroism (VCD). The ethnopharmacological characterization of the *Eupatorium* species native to Michoacan contributed to establish promissory species with antimicrobial secondary metabolites and validated their ethnomedicinal uses. At the same time, several perspectives can be envisaged in relation to the preparation of new derivatives from antimicrobial secondary metabolites and the phytochemical study of active principles using faster and more efficient techniques.

Keywords: *Eupatorium*, antimicrobial compounds, vibrational circular dichroism

1. Introducción

1.1 Resistencia antimicrobiana

El desarrollo de los antimicrobianos inicia a finales de 1920s con el descubrimiento de la penicilina por el microbiólogo escocés Alexander Fleming, al observar que una cepa de *Penicillium notatum* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. En 1941 con la introducción clínica y utilización masiva de la penicilina se pensó que el problema de las enfermedades infecciosas estaba resuelto, pero no fue así, poco tiempo después se detectó la primera cepa resistente a este antibiótico (Levy, 2001; Zurita *et al.*, 2005). Una manifestación similar se observó con la introducción clínica de nuevos antibióticos (Tabla 1).

Tabla 1. Descubrimiento de antibióticos y desarrollo de resistencia

| Antibiótico | Descubierto | Introducción clínica | Resistencia identificada |
|----------------|-------------|----------------------|---------------------------|
| Penicilina | 1928 | 1940 | 1943 (meticilina 1965) |
| Estreptomicina | 1944 | 1947 | 1947, 1965 |
| Tetraciclina | 1948 | 1952 | 1956 |
| Eritromicina | 1952 | 1955 | 1956 |
| Vancomicina | 1956 | 1972 | 1987 |
| Gentamicina | 1963 | 1967 | 1970 |

Modificada de Levy, 2001.

En décadas posteriores a la introducción clínica de la penicilina, la industria farmacéutica inició una importante investigación para obtener nuevas moléculas a partir de microorganismos y preparación de derivados semisintéticos de los mismos. El descubrimiento de una gran variedad moléculas pertenecientes a distintas familias como: beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y macrólidos, fue la era dorada de los antimicrobianos. Actualmente, el ritmo del descubrimiento de nuevas moléculas

antimicrobianas se ha detenido y esto representa un problema, teniendo en cuenta el incremento alarmante de cepas microbianas resistentes.

Las enfermedades infecciosas generan más de 13 millones de muertes anuales a nivel mundial. De las cuales 3.5 millones fueron por neumonía, 2.2 millones por enfermedades diarreicas, 1.5 millones por tuberculosis, 2.3 millones por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y 1.1 millones por malaria (Barrett, 2001). La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública a nivel mundial, involucra dos aspectos fundamentales, la presión de selección y la biología del microorganismo. Por ejemplo, la biología de las bacterias está representada por tres aspectos importantes: la velocidad de reproducción, el tamaño poblacional en cada generación y métodos únicos de adquisición de genes (transformación, conjugación y transducción). Además de los factores humanos como el uso excesivo y en la mayoría de los casos inadecuado de los antimicrobianos que genera una presión selectiva. Son los eventos que favorecen la selección natural de cepas de microorganismos resistentes a los antimicrobianos convencionales de importancia en la medicina y agricultura (Rivera-Tapia, 2003).

1.1.1 Los antibacterianos en el sector clínico: un factor importante de resistencia

El problema de cepas bacterianas resistentes a los antibacterianos de uso comercial prevalece en los países desarrollados y en vías de desarrollo como México (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014). Amabile-Cuevas (2010) reportó que en México el 70% de cepas aisladas de *Escherichia coli* son resistentes a levofloxacina y 36% producen ESBL (beta-lactamasas de espectro extendido), el 28% fueron resistentes a amoxicilina-clavulanato; el 32% de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* fueron resistentes a levofloxacina y el 28% producen ESBLs; el 48% de los aislados de *Staphylococcus aureus* presentaron resistencia a oxacilina y el 49% resistentes a levofloxacina; el 33% de los aislados de *Enterococcus faecium* fueron resistentes a vancomicina mientras que el 20% de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* fueron resistentes a amikacina, 39% a ceftazidima, 43% imipenems, 40% a levofloxacina y 28% a piperacilina-tazobactam.

Las enfermedades respiratorias son la principal causa de consulta médica, las bacterias patógenas más comunes son *Streptococcus pneumoniae*, seguida de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y algunos casos de neumonía atípica de la cual los

agentes causales son *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*. *S. pneumoniae* y *H. influenzae* son los que presentaron mayor resistencia a los antibacterianos que se utilizan para su control con 70 y 33%, respectivamente.

Los microorganismos enteropatógenos con mayor resistencia antimicrobiana a tetraciclinas durante 2001-2002, fueron *Salmonella* spp y *Shigella* spp con un 82 y 100% respectivamente. El patógeno bacteriano Gram negativo aislado con mayor frecuencia (62.9%) de niños que presentaban bacteremia en el Hospital General de San Luis Potosí, México 1991-2005 fue *Klebsiella pneumoniae* y el Gram positivo fue *Staphylococcus aureus* (36%), así como especies del hongo dimórfico *Candida* (12.5%) (Chávez, 2004; Pérez-González *et al.*, 2007). La mortalidad en pacientes infectados por *S. aureus* osciló entre 5 y 70%, según información de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades en el periodo 1993-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad (Velázquez-Meza, 2005). Uno de los efectos negativos de la resistencia microbiana es el económico, en Estados Unidos de Norte América se invierten 35 mil millones de dólares anuales. Mientras que la disposición de antibióticos en países en vías de desarrollo se ha limitado debido al poco recurso económico que se invierte en la atención integral de este tipo de infecciones, lo que hace el problema aún más grave, además de aumentar la tasa de mortalidad y morbilidad, así como la estancia hospitalaria de los pacientes. En México, se requiere un programa que estudie el fenómeno de resistencia en el sector salud y agrícola, así como sus consecuencias en la población. Sin embargo, el problema a nivel local es posible visualizarlo, ya que en aislados bacterianos silvestres de pacientes del “Hospital Infantil Dra. Eva Samano de López Mateos” se evidencia la multiresistencia a antibióticos (Tabla 1).

Tabla 1. Resistencia a antibióticos de aislados clínicos bacterianos patógenos.

| Bacteria | Resistencia a antibióticos | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|-----|
| | AM | CF | CL | NET | CB | SXT | NF | CRO | CTX | PE | CAZ | GE | DC | TE | AK | CXM |
| <i>Citrobacter freundii</i> | R | R | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | R | | | R | R | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | R | R | R | | R | R | | | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | R | | | R | | | | | | | | | | | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | | R | | | R | | R | | | | | | | | | |
| <i>P. vulgaris</i> | | R | | | | | R | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | | R | | | | R |
| <i>Salmonella</i> sp | R | R | | R | | R | | R | R | | | | | | | |
| <i>Shigella sonnei</i> | R | R | | R | | R | | R | R | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | R | | | | | R | | | | R | R | R | R | | | |
| <i>S. epidermidis</i> | R | | | | | | | | | R | R | | | | | |
| <i>S. saprophyticus</i> | R | | | | | | | | R | R | R | | R | R | | R |

Resistencia (R); Ampicilina 10 µg (AM); Amikacina 30 µg (AK); Cefalotina 30 µg (CF); Cloranfenicol 30 µg (CL); Netilmicina 30 µg (NET); Carbencilina 100 µg (CB); Trime/sulfa 1.25/23.75 µg (SXT); Nitrofurantoina (NF); Ceftriaxona 30 µg (CRO); Cefotaxima 30 µg (CTX); Penicilina 10 unit (PE); Ceftazidima 30 µg (CAZ); Gentamicina 10 µg (GE); Dicloxacilina (DC); Tetraciclina 30 µg (TE); Cefuroxima 30 µg (CXM).

1.1.2 Efectos adversos de los antimicrobianos en el sector agrícola

Los antimicrobianos de igual forma son útiles para controlar enfermedades en cultivos agrícolas. Sin embargo, las enfermedades microbianas en plantas son severas y existen pocas sustancias efectivas o disponibles para su control. Más del 50% de la producción de antibióticos, son utilizados en animales y plantas como promotores de crecimiento, prevención y tratamiento de enfermedades, como estreptomicina, tetraciclina, oxitetraciclina y gentamicina principalmente, muchos de los cuales son de uso humano lo que genera resistencia cruzada a los antimicrobianos (McEwen, 2001; Stockwell y Duffy, 2012). Michoacán ocupa los primeros lugares en producción de cultivos económicamente importantes como aguacate, fresa, mango, jitomate y papa. La importancia que tiene el cultivo de aguacate en Michoacán es de tipo económica y social. México produce 1 162 606 toneladas, Michoacán es el principal productor a nivel mundial con 1 028 291 toneladas (APEAM, 2010) Además, genera 40 000 empleos permanentes y 60 000

temporales (Guillén-Andrade *et al.*, 2007). Con estos dos indicadores socioeconómicos se justifica la importancia del cuidado de este cultivo, que es susceptible a varios patógenos. Uno de los más importantes por la severidad de afección del aguacatero es *Phytophthora cinnamomi* que causa la enfermedad conocida como “La tristeza del aguacate” y en la mayoría de los casos letal para el aguacatero. Este microorganismo patógeno de cultivos económicamente importantes presenta resistencia a los antimicrobianos convencionales utilizados para su control (Espinoza-Madrigal, 2009). El problema de cepas resistentes en la clínica y en el sector agrícola aunado al impacto económico y social que conlleva, fortalece nuestro interés de buscar nuevas estrategias para su control.

Los microorganismos únicamente buscan la supervivencia al estar bajo una presión de selección, por lo que han desarrollado diversos mecanismos para evadir la acción de los antimicrobianos convencionales, un evento biológico que todos los organismos vivos realizan. Las cepas microbianas patógenas de cultivos económicamente importantes provocan pérdidas millonarias en la producción de cultivos y un incremento en la cantidad de plaguicidas para su control directamente relacionada con la prevalencia de cánceres, principalmente leucemia.

1.2 Perspectiva histórica de los productos naturales en la búsqueda de nuevas drogas

Las fuentes naturales como las plantas, insectos, hongos, bacterias y organismos marinos son potenciales alternativas para la búsqueda de moléculas bioactivas. Las especies vegetales son quizá la fuente natural que ha coevolucionado con el ser humano. Desde la era de la Mesopotamia (2600 a. C.) ya eran utilizadas al menos cinco especies vegetales *Cedrus spp*, *Commiphora spp*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra* y *Papaver somniferum*. La conformación de varios sistemas de medicina tradicional en el mundo indica que las especies vegetales son herramientas terapéuticas para el ser humano. La medicina Egipcia que data del año 2900 a. C. posee “El Papiro de Ebers” creado en 1500 a. C, en donde se describen más de 700 drogas, la mayoría de especies vegetales. La medicina china con su tratado “Materia Médica” que data del año 1100 a. C. un tratado que fue enriquecido y que establece más de 1000 drogas. En el año 1000 a. C. el sistema Ayurvédico que conserva más de 800 drogas. De igual forma, la medicina Griega y Romana contribuyeron de manera importante en la medicina tradicional de plantas con

Hipócrates (460-377 a. C.) considerado el padre de la medicina con su tratado “Corpus Hippocraticum” en donde establece el uso de mezclas a base de plantas. Dioscórides (100 d. C.) publica su famoso trabajo botánico “De Materia Médica” en donde el 80% de las drogas son elaboradas a base de plantas. Durante la edad oscura y edad media (400-1100 d. C.) los árabes conservaron las experiencias Greco-Romanas y enriquecieron el uso de nuevas especies vegetales medicinales, un médico árabe importante en ésta época fue Avicenna (Newman *et al.*, 2010). El primer documento científico sobre plantas americanas lo publicó el médico sevillano Nicolás Monardes en 1569, en donde se describen por primera vez la pimienta gorda, la caña fístula, la raíz de Michoacán, el tabaco, el sasafrás, la piña, la guayaba, la coca y la escorzonera. El médico indígena Martín de la Cruz y el traductor Juan Badiano, un indígena de Xochimilco, escribieron un documento notable sobre las plantas medicinales americanas conocido como el “Codice de la Cruz-Badiano”. En 1555 el fraile franciscano Bernardino Sahagún escribió un documento etnobotánico “El Códice Florentino” en el cual muestra evidencias del uso y mejoramiento de la agricultura, así como de la botánica por las culturas indígenas prehispánicas. En 1571 el protomédico general de las Indias, Islas, Tierra Firme y Océano, Francisco Hernández, realizó una expedición botánica financiada por el emperador Felipe II con la finalidad de escribir la historia natural de la Nueva España y estudiar la medicina indígena. Un segundo auge del estudio de las especies vegetales en México surge con la creación del Instituto Médico Nacional en 1890, con una misión de estudiar científicamente las plantas medicinales. En donde sobresalen brillantes investigadores de plantas medicinales como Leopoldo Río de la Loza, Fernando Altamirano, Alfonso Herrera y Francisco Río de la Loza. Alfonso Herrera publica en 1921 la Farmacopea Latino Americana (Gómez-Pompa, 1993). Actualmente el Centro Médico Nacional Siglo XXI alberga cerca de 17 mil plantas medicinales (IMSS, 2012).

1.2.1 La relevancia de la investigación de fármacos de origen natural

Desde tiempos milenarios la medicina y los productos naturales han estado estrechamente relacionados, por el uso de medicinas tradicionales o preparaciones de origen natural para mantener el confort del ser humano. Los productos naturales han sido útiles para resolver necesidades básicas del hombre como calzado, vestido, refugio, alimento y medicinas. Los trabajos interdisciplinarios han contribuido fuertemente para el

descubrimiento de principios activos de origen natural. Por ejemplo, la farmacología, química y toxicología fueron importantes para el descubrimiento de los primeros fármacos como la aspirina, la digitoxina, la morfina, la quinina y la pilocarpina (Butler, 2004).

En la era del auge de los antibacterianos a partir de 1928 con el descubrimiento de la penicilina del hongo *Penicillium notatum* por Fleming, se han descubierto algunas otras también de origen natural como la cefalosporina C, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina y vancomicina, todos ellos de uso actualmente (Newman y Cragg, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional como primera elección para el cuidado de la salud. Los países no desarrollados y en vías de desarrollo como México son los que más utilizan este recurso tradicional, esto es consecuencia de la falta de servicios de salud y el elevado costo de medicamentos principalmente, por lo tanto, inaccesibles para la mayor parte de la población (OMS, 2004; Damián-Badillo *et al.*, 2008). En Estados Unidos de Norte América el 25% de las prescripciones médicas entre 1959-1980 contenían extractos de plantas o principios activos derivados de éstas. Al menos 119 sustancias químicas derivadas de 90 especies de plantas son consideradas como drogas importantes con uso en uno o más países. De las cuales 74% fueron descubiertas del estudio químico que consiste en la purificación y evaluación de su efecto biológico de plantas medicinales (Newman *et al.*, 2000).

En México el uso de plantas medicinales se ubica también como primera elección en el cuidado de la salud. Un indicador que manifiesta la utilidad de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional son las 3000 especies presentes en el atlas de plantas medicinales mexicanas utilizadas por diversos grupos étnicos. Damián-Badillo *et al.*, (2008) validaron el uso medicinal de tres especies vegetales ampliamente utilizados en la medicina tradicional mexicana para tratar padecimientos de etiología infecciosa e identificaron doce metabolitos secundarios mayoritarios como responsables de la actividad antimicrobiana *in vitro*.

1.3 Biodiversidad vegetal en México

La República Mexicana posee una diversidad biológica importante debido a su ubicación latitudinal y dos regiones biogeográficas: la neártica y la neotropical. Además de una compleja historia geológica y una accidentada topografía, estos factores son los que explican la diversidad de climas responsables de la riqueza biológica Mexicana.

México es reconocido como un país megadiverso, ocupa el quinto escalafón dentro de 17 países que son los que albergan el 75% de todas las especies de plantas vasculares que se conocen en el mundo (CONABIO, 2000). También, se localiza el 10% de las plantas superiores del planeta y más de 40% de ellas son habitantes exclusivas del territorio nacional. El número de especies vegetales presentes en los países más ricos son Brasil (53 000), Colombia (48 000), Indonesia (35 000), China (28 000) y México (26 000).

La megadiversidad florística de nuestra República Mexicana crea un amplio campo para realizar estudios fitoquímicos y caracterizar metabolitos secundarios como potenciales candidatos terapéuticos, es importante mencionar que *Arabidopsis thaliana* una planta con genoma pequeño y conocido, produce una gran variedad de metabolitos secundarios no identificados, inferimos que especies vegetales con genomas e historias de vida complejos, presentan mayor diversidad de metabolitos secundarios (Giavalisco *et al.*, 2008).

1.3.1 El potencial farmacológico de las plantas

En una estimación conservadora, existen de 250 000 a 500 000 especies de plantas sobre la tierra (Borris, 1996), de éstas 1650 especies han sido usadas por grupos nativos del continente Americano como alimento y 2564 se han usado como drogas. En tanto que del total de especies vegetales estimadas, únicamente el 6% se conoce su actividad biológica y del 15% se ha estudiado su fitoquímica (Ramirez *et al.*, 2010).

Las experiencias históricas del uso de plantas como herramientas terapéuticas han contribuido a la introducción de nuevas moléculas en la medicina moderna. El 80% de las drogas de uso clínico provienen de plantas, con uso etnofarmacológico. Ejemplos de drogas aprobadas de origen vegetal son: clorhidrato de apomorfina (Apokyn, Bertek, 2004) usado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, una droga derivada la morfina de *Papaver somniferum*; bromuro de tiotropio (Spiriva, Boehringer Ingelheim, 2004) con prescripción

en obstrucción pulmonar, es un derivado de la atropina a partir de *Atropa belladonna*; nitisinona (Orfadin, Swedish Orphan, 2002) indicado en tirosinemia hereditaria tipo 1 y aislado de *Callistemon citrinus*; bromhidrato de galantamina (Reminyl, Janssen, 2001) indicado contra el Alzheimer, obtenido de *Galanthus nivalis*; Artemotil (Artecef, Artecef BV, 2000) usado como antimalárico, y derivado de la artemisina aislada de *Artemisia annua* (Chin *et al.*, 2006). Alrededor de 12 000 compuestos procedentes de organismos vegetales se han aislado, constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios, lo que demuestra que se conoce poco de la fitoquímica de las especies y en consecuencia, su espectro de actividades biológicas. En la actualidad las plantas medicinales continúan siendo importantes para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas y posibles candidatos terapéuticos.

1.4 El género *Eupatorium* y su relevancia etnofarmacológica en México

El género *Eupatorium* pertenece a la familia vegetal más abundante sobre la tierra, la Asteraceae que agrupa más de 1700 géneros y de 24 000-30 000 especies distribuidas en los continentes, excepto en la Antártida (Katinas *et al.*, 2007). La tribu Eupatorieae fue estudiada por Robert M. King y Harlod Robison, dos botánicos Estadounidenses especialistas en Asteráceas, que entre 1967 y 1976 publicaron cerca de 170 trabajos científicos sobre Eupatorieae, los cuales concluyeron en la división del género *Eupatorium* en diversos géneros menores (Mc Vaugh, 1982).

El género *Eupatorium* está conformado por cerca de 1200 especies, muchas especies son aromáticas y por décadas algunas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional como antimaláricos, antibacterianos, antifúngicos y antiinflamatorios (Zhang *et al.*, 2008). Esta revisión se limitó a 22 especies de *Eupatorium* nativas de la región Euroasiática.

En México al menos 12 especies de *Eupatorium* tienen uso en la medicina tradicional, por su uso etnobotánico se infiere que son utilizadas en padecimientos de etiología infecciosa causados por bacterias, hongos y virus (ver tabla 1) (Ramirez *et al.*, 2010).

Tabla 1. Especies de *Eupatorium* con uso en la medicina tradicional mexicana

| Espece | Nombre Común | Uso | Metabolitos identificados |
|--|--|---|--|
| <i>E. albicaule</i> Schultz Bip. ex Klantt | Midracia | Dolores | β -sitosterol, flavonoides, taninos |
| <i>E. albicaule</i> Schultz-Bip | Okiny, vishé, tokaban, tok'te', yaxal | Asma, cálculos renales, diarrea, fiebre | Flavonoides, flavonoides glicosilados |
| <i>E. areolare</i> DC | Borreguillo | Desórdenes digestivos, Diarrea | Sesquiterpenlactonas, ácido hidroxicinámico, germacranólidas (heliangólidas), derivados de timol (areolal) |
| <i>E. aschenbornianum</i> S. Schauer | Axihuitl | Problemas de la piel, tumores, heridas, aftas | 5-acetil-3 β -angeloiloxi-2 β -(1-hidroxiisopropil)- 2,3-dihidrobenzofurano, 5-acetil-3 β -angeloil 2 β -(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3- dihidrobenzofurano, espeletona, enecalinal, O- metil enecalinal, enecalina, sonorol, taraxerol, (+)- β -eudesmol, β -sitosterol, estigmasterol, encecanescina. |
| <i>E. daleoides</i> (D.C.) Hemsley | Palo de lodo | Disentería, antiprotozoario | Ácidos diterpénicos, derivados de euparina, guaianólidos, compuestos de tipo labdano |
| <i>E. glabratum</i> Kunth | Chamisa, Hierba de la paloma, hierba verde, Jesús, sopilla, Jesús deni | Dolor estomacal, baños postparto | Acetina, ácido eupaglábrico |
| <i>E. morifolium</i> Miller | Callotillo. | Dolor reumático, prurito | Morifolina, eudesmanólidos, rinderina |
| <i>E. odoratum</i> L. | Tokaban, Cruz dulce grande, te kaban, tok, tok'aban, xtok'aban, tok'ja'aban, xtok'ja'aban; krus tok'te' | Fiebre puerperal, retención urinaria, hepatoprotectora y molusquicida. | Eupatenol, sakuranetina, <i>iso</i> -sakuranetina, salvigenina, odoratina, acetina, velutina, tamerixetina, mikanina |
| <i>E. petiolare</i> Moc. | Hierba del ángel or yolochíchitl, Amargocilla, coñesdá, co-ye-sa, coyes-da, cunisha, peshtó, ejutho, pechto, colochichi, yolochichi, huirapen | Trastornos digestivos, cólicos, cálculos biliares, padecimientos hepáticos, laxante, dismenorrea, baños postparto, nerviosismo, tos, sobrepeso, diabetes. | Ácido 2 α - <i>iso</i> -valeroiloxi eperuico, ácido kaurénico, taraxasterol, 6-metoxi-salicilato de bencilo, 11,13-dihidro-eupatoriopirina, ácido 2- hidroxi-6-metoxi-benzoico. |
| <i>E. pycnocephalum</i> Less. | Hierba de la cruz, Hierba del burro, Cruz dulce chica | Baños postparto, Fiebre puerperal, erisipela, resfriado. | Derivados de cariofileno |
| <i>E. quadrangulare</i> D.C. | Carrizo, Tabaquillo | Dolores corporales, inflamación, recuperación postparto. | Sesquiterpenlactonas (Quadrangulin A) |
| <i>E. squarrosium</i> Cav. | Prodigiosa | Malestar estomacal, diarrea, antiparasitario. | Flavonas (atanasina, eupatolina), 5,4'-dihydroxy- 3,6,7-trimethoxyflavone (pendulina), glucoferida, santina, derivados del ácido catívico |

Tomado y modificado de Ramirez-Lopez *et al.*, 2010

1.4.1 Importancia etnofarmacológica de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán

Michoacán cuenta con cerca de 5 000 especies vegetales, que lo ubica como uno de los Estados de la República Mexicana más ricos florísticamente hablando (Villaseñor *et al.*, 1998). El Estado presenta una ubicación geográfica singular, variedad de climas, así como un intervalo de altitud de 0 a 3840 msnm, estos factores son responsables de una diversidad biológica abundante. El primer registro de especies de *Eupatorium* en Michoacán fue a finales del siglo diecinueve con la colecta y autenticación de *E. areolare* (Espinosa y Rodríguez, 1995). En Michoacán habitan al menos 69 especies de *Eupatorium* distribuidas en el 70% del Estado, cinco especies con uso en la medicina tradicional *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. glabratum*, *E. petiolare* y *E. pycnocephalum*. Esto es importante desde el punto de la adaptabilidad de las especies de este género. Una de las regiones con mayor presencia de especies de *Eupatorium* es la parte de la Cuenca del Río Balsas, la cual está delimitada por el eje neovolcánico y la Sierra Madre del Sur.

En la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas como posibles candidatos terapéuticos se realizó un estudio exploratorio para conocer las especies de *Eupatorium* que habitan en Michoacán (García-Sánchez *et al.*, 2011).

Once especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán son usadas en la medicina tradicional mexicana, siete de ellas con estudiadas en este trabajo *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. glabratum*, *E. mairetianum*, *E. petiolare*, *E. pichinchense* y *E. pycnocephalum*. La investigación fitoquímica de las especies vegetales sigue y seguirá siendo relevante para la caracterización de metabolitos bioactivos. En el caso particular de Michoacán existen especies de *Eupatorium* que no ha sido estudiada su fitoquímica y actividad biológica. Michoacán cuenta con al menos 69 especies nativas de este género. De once especies en este trabajo hemos iniciado su estudio fitoquímico. Las 58 especies restantes constituyen, un campo rico de metabolitos químicos por descubrir, aun cuando algunas especies cuenten con algún estudio químico, debido a que las reinvestigaciones a menudo generan nuevo conocimiento, al encontrar moléculas que anteriormente no habían sido descritas (García-Sánchez *et al.*, 2011).

2. Justificación

Los microorganismos patógenos presentan resistencia a un nuevo antibiótico en corto intervalo de tiempo. Ante ello, el anhelo humano de controlar el daño microbiano establece una competencia sin fin, con la sobrevivencia de los microorganismos patógenos. Por lo que el control de la enfermedad y del daño microbiano debe anticiparse mediante la propuesta de nuevas moléculas vegetales para su potencial uso como antimicrobianos donde el ámbito de búsqueda es la diversidad biológica y química que poseen las especies del género *Eupatorium* nativas de Michoacán.

3. Hipótesis

Especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán presentan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia clínica y agrícola

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar los metabolitos secundarios de *Eupatorium* spp nativas de Michoacán con actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia clínica y agrícola.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la presencia de *Eupatorium* spp en el Estado de Michoacán
2. Determinar la actividad antimicrobiana de *Eupatorium* spp nativas de Michoacán
3. Caracterizar espectroscópicamente los metabolitos secundarios antimicrobianos de *Eupatorium* spp.

5. Estrategia experimental



Revisión bibliográfica y colecta de *Eupatorium* spp
nativas de Michoacán



Determinación de la actividad antibacteriana, antifúngica
y antioomicética de los extractos de *Eupatorium* spp



Caracterización espectroscópica por RMN ^1H , ^{13}C y 2D de
los metabolitos antimicrobianos

Nota: Los resultados de esta investigación están organizados en capítulos y en formato de publicación; Algunos publicados, en revisión y en construcción

6. Resultados

6.1 Capítulo 1. Presencia de *Eupatorium* spp en Michoacán

ΦΥΤΟΝ

REVISTA INTERNACIONAL DE BOTÁNICA EXPERIMENTAL
INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY

FUNDACION ROMULO KAGGIO
Caspa' Campos 86', 1618 Vicente López (BA), Argentina
www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar

A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan

Una revisión de *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) de Michoacán

García Sanchez E^{1,2}, CB Ramirez Lopez^{1,2}, REN del Río Torres², MM Martínez Pacheco²

Abstract. An important study in species of the genus *Eupatorium*, that inhabits other parts of the world, was conducted in the search for new molecules with pharmacological activities, thus showing that it is a potential source of novel secondary metabolites. We reviewed the number of *Eupatorium* species that have been described in the State of Michoacan, and that can be available for harvesting, to make a phytochemical screening. It was found that 69 *Eupatorium* spp are growing in 69% of the Michoacan territory. Within this group there are ten species used in Mexican traditional medicine. It was evident the difficulty in taxonomic classifying these species since several *Eupatorium* spp have synonyms. It appeared that the number of native members should be reduced in the genus. A preliminary chemical analysis was conducted on the flowers of nine native *Eupatorium* spp by nuclear magnetic resonance of hexane extracts. It was determined that the major secondary metabolites belonged to the chemical families of terpenes and chromenes.

Keywords: Biodiversity, *Eupatorium*, Phytochemistry, Michoacan, Terpenes.

Resumen. En la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica se efectuó un estudio de revisión importante en especies del género *Eupatorium* que habitan otras latitudes del mundo. Se obtuvo con ello que este género es una fuente potencial de metabolitos secundarios novedosos. Este hecho nos condujo a conocer el número de especies de *Eupatorium* que fueron descritas en el Estado de Michoacan, y cuáles estaban accesibles para su recolección e iniciar un escrutinio fitoquímico. Se detectaron 69 *Eupatorium* spp creciendo en el 69% del territorio, incluyendo diez especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Debido a que especies de este género presentan sinonimia, se evidenció la dificultad para clasificar taxonómicamente a las especies de este género, todo indicó que se reduciría el número de integrantes nativos. Un análisis químico preliminar de las flores de nueve *Eupatorium* spp nativas por resonancia magnética nuclear de los extractos hexánicos permitió determinar que las familias químicas principales fueron: terpenos y cromenos.

Palabras clave: Diversidad biológica, *Eupatorium*, Fitoquímica, Michoacán, Terpenos.

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B 3, Cd. Universitaria, Francisco J. Mujica s/n, Col. Felicitas del Río, Morelia, Mich. C.P. 58060, Mexico.

² NOTE: CBRL and EGS shared equity in credits in the first authorship on the paper. Address Correspondence to: M.M. Martínez Pacheco, e-mail: mpacheco@umich.mx
Recibido / Received 22 IV 2011. Aceptado / Accepted 13 VI 2011.

INTRODUCTION

In the Michoacan State, there are sharp contrasts among different environments. This results in an extraordinary genetic wealth, with variations within and between species in the various ecosystems. It occupies the fifth place in national biodiversity (*Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán*, 2007). In this web of life, man is another member that depends of it for its welfare and survival. He makes use of plant natural resources such as species of the *Eupatorium* genus, which has approximately 1200 species and is one of the largest in the Family Asteraceae. It is widely distributed in five continents; however, the highest number of species is in the tropical, subtropical and temperate Americas (Katinas et al., 2007).

Several species of this genus are used in traditional medicine to relieve various illnesses of humans, animals and plants (Zardini, 1984; Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine 1998; Rondina et al., 2003; Sasikumar et al., 2005). It is estimated that in the different native Mexican pharmaceutical products and traditional uses, there is a core group of approximately 3000 medicinal plants used for treatment of common diseases. Only 1000 medicinal plants have been used for over 400 years, where several species of the genus *Eupatorium* have been used for the same purpose (Lozoya, 1994; Deciga et al., 2007; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Acronym BDMTM-UNAM, 2009).

The ethnopharmacological information about medicinal plants has been an important basis for research and development of new drugs that currently contribute to human welfare by alleviating pain and improving their economy. Recurring research themes in the plant kingdom, as well as their economic impact for man, include the unabated search for new molecules (1) with specific non-toxic pharmacological effects, and (2) effective in controlling human diseases. In this respect, considerable phytochemical studies have been done in *Eupatorium* spp, as demonstrated by Zhang et al. (2008). They compiled 149 purified compounds during the past twenty years, some of which are immunomodulatory, cytotoxic and antimicrobial agents.

Obtaining phytochemical knowledge of the genus has various purposes such as (1) chemotaxonomy in fundamental plant biology, and (2) an important plant source in the search for new bioactive molecules against resistant organisms to conventional pesticides (e.g., weeds, insects, fungi, oomycetes, bacteria) (Assie et al., 2007; Sosa & Torr, 2008). *Eupatorium* spp. has provided various biotechnological uses: (1) essential oils to deter insects, (2) had a lethal effect at the larval stage in the vector mosquito *A. aegypti*, and (3) has been used as feedstock for the production of petroleum substitutes (Belter, 2009). Eight oz (227 g) of *Eupatorium* essential oil have been offered at US\$ 10 for use in aromatherapy in alternative and

complementary medicine. These last uses lead to place *Eupatorium* diversity at an ecological risk in this region. Most species of the genus *Eupatorium*, however, have not been used in traditional medicine, and they have been considered as weeds. These species have been phytochemically unstudied and they might yield products of great importance to humans. Here is where the ethnobotanical knowledge becomes particularly important for a rational use of natural resources. These are arguments for knowing and conserving plant biodiversity. However, the link between undiscovered biodiversity and potential usefulness is largely conjectural. It is necessary to re-evaluate the biodiversity, and its associated potential phytochemistry, in any area of the planet (e.g., the Michoacan territory).

The objectives of this study were (1) to be aware of the *Eupatorium* species that have been described in the State of Michoacan, and which of them are accessible for harvesting, and (2) to conduct a qualitative, phytochemical screening in the collected plants.

MATERIALS AND METHODS

Study area. Three areas were studied: (1) the area where the genus *Eupatorium* has been historically present (20° 24', 17° 55' N; 100° 04', 103° 44' W; State of Michoacan, Mexico) (Fig. 1); (2) the harvesting area of *Eupatorium* spp., a circumference with a radius of 100 km, with central point at 19° 42' 10" N, 101° 11' 32" W. This point is located on Madero avenue, in front to the Cathedral of Morelia, State Capital; interval altitude 1400 – 3090 m.a.s.l., and (3) the extraction site of plants, adjacent to highways and main roads that converge to the State capital. All these study sites include disturbed ecosystems. Climate is temperate (6 to 28 °C) and rainfall varies between 700 to 1000 mm per year.

Fig. 1. State of Michoacan de Ocampo, Mexico (17° 55' - 20° 24' N; 100° 04' - 103° 44' W). The shaded area corresponds to the Michoacan territory where *Eupatorium* spp have been collected for over 100 years. Modified from <http://www.michoacan.gob.mx>
Fig. 1. Estado de Michoacán de Ocampo, México. Coordenadas geográficas, (20° 24' - 17° 55' N; 100° 04' - 103° 44' O). El área sombreada corresponde al territorio michoacano donde *Eupatorium* ha sido colectado por más de 100 años. Modificación de <http://www.michoacan.gob.mx>



Collection of information. It was compiled from various historical databases to determine the distribution and presence of *Eupatorium* spp in the state of Michoacan. Information was obtained from the Herbarium of the Faculty of Biology at the University of Michoacan; the first plant collection date was Nov 01, 1978 (Voucher 3067): it corresponded to *Eupatorium petiolare* Moc ex DC to this date with a total of 216 records. We also relied on the written record of phytochemistry research, obtained during 15 years, compiled in the Chemistry of Natural Products Laboratory of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Any report of *Eupatorium* spp presence on any study area is considered within the geographical distribution of this species

Collection and identification of the study plant species. Plant harvesting was guided by REN del Río, and carried out by the authors of this work. Harvesting of specimens and plants of *Eupatorium* spp used for qualitative phytochemical analysis in this work was made at the flowering developmental morphology stage between October to April 2004 to 2010 (Table 1). Plants were prepared for botanical determination by botanists and further photographic records were taken. Plant species were herborized, authenticated and deposited in the Herbarium of the Facultad de Biología, UMSNH.

Obtaining extracts from the flowers of *Eupatorium* spp. *Eupatorium* spp flowers used in the qualitative chemical study were successively macerated with hexane. Maceration time was 3 days at room temperature, and it was protected from light. Each extraction stage within this process was done 3 times until exhaustion of all components. The flower extracts obtained from each stage were first mixed and then concentrated on a rotary evaporator.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). NMR Spectra of ^1H and ^{13}C were obtained on a Varian Mercury plus 400 spectrometer. The spectra of Hydrogen (^1H) were obtained at 400 MHz using eight repetitions. The spectral window was 6000 Hz.

RESULTS AND DISCUSSION

Distribution of *Eupatorium*. Michoacan has an important physiographic complexity, a variety of climates and soils, and about five thousand plant species that makes it an invaluable natural resource (Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacan, 2007). Little is known about the chemical and biological wealth of this genus, which in some cases has been used improperly. Within the geographical distribu-

tion of *Eupatorium* spp, physiographic conditions, climate and soils are important factors for the species establishment in the territory of Michoacan. Generally, *Eupatorium* spp have been collected near water bodies or on the banks of streams and rivers in temperate, subtropical and tropical climates, with high relative humidity. They have also been collected at the margin of forests and at different forest types (Espinosa & Rodríguez, 1995; Fernández et al., 1998; Medina et al., 2000; Herbario de la Fac. de Biología-UMSNH; Laboratorio de Química de Productos Naturales-IIQB; Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán, 2007).

Sixty nine percent of the Michoacan territory was inhabited by some species initially reported as *Eupatorium* (Fig. 1). Of 113 municipalities of Michoacán, 42 of them did not have any reports of the presence of *Eupatorium*: these are marked as white areas in Figure 1. It appears that there have not been any explorations in these areas for harvesting *Eupatorium* spp. However, the presence of *Eupatorium* spp has been reported around these areas, and it is likely that this genus inhabited them. We must keep in mind that the geographical distribution of *Eupatorium* species within the territory of Michoacan is specifically associated with the delimitation of natural regions.

***Eupatorium* spp.** The study of the genus *Eupatorium* in Michoacan begins in the last decade of the XIX century. This is evidenced by the earliest historical record made by the botanist C. Pringle, who collected a plant specimen in 1891 in Patzcuaro, Michoacan. This is the first occasion that the presence of *E. areolare* was reported (Espinosa & Rodríguez 1995). Since then, 69 plant species of *Eupatorium* have been described, which still survive in Michoacan state. The number of species presented in this work was obtained from approximate floristic inventories and plant species initially classified as *Eupatorium* (Table 1). We found the remarkable presence of members of this genus given by the number of species. However, today is not yet feasible to make a direct and accurate calculation of the number of *Eupatorium* spp at the taxonomic level, and the possibility of relocating and finding new *Eupatorium* spp is not ruled out. The approximate floristic inventories that describe the plants in this area of Mexico allowed us to study the *Eupatorium* spp diversity in the region in detail. However, sources of false estimates and imprecise analysis of the geographical distribution and partitioning of the number of species present in this territory include: relocation of species; absence of information from remote areas; little or no dissemination of existing information, and unpublished plant research. The distribution and habitats of *Eupatorium* spp are clearly segregated from each other, and seem to depend on environmental factors.

Table 1. Eupatorium species recorded in Michoacán. Synonyms are indicated in brackets; ◀ = Medicinal; ‡ = Single Registration; ■ = Species with qualitative phytochemistry study in this work.

Tabla 1. Especies de Eupatorium registradas en Michoacán. Sinónimos están indicados entre corchetes; ◀ = Medicinal; ‡ = Registro único; ■ = Especies en estudio fitoquímico cualitativo en este trabajo.

| Eupatorium spp | | |
|---|---|--|
| <i>E. adenophorum</i> ■ Spreng [<i>E. glandulosum</i> HBK; <i>Ageratina adenophora</i> (Spreng) King & Rob] | <i>E. dolichobasis</i> ■ Mc Vaugh [<i>Ageratina dolichobasis</i> (Mc Vaugh) King & Rob] | <i>E. odoratum</i> ◀ L [<i>Chromolaena odorata</i> (L) King & Rob] |
| <i>E. adenospermum</i> Sch Bip [<i>Dyscritogyne adenosperma</i> (Sch Bip) King & Rob] | <i>E. aff. dolichobasis</i> Mc Vaugh | <i>E. oligocephalum</i> DC [<i>E. erythrocomum</i> Rob; <i>Ageratina oligocephala</i> (DC) King & Rob] |
| <i>E. ageratifolium</i> ‡ DC | <i>E. epilobioides</i> ‡ HBK | <i>E. oresbium</i> BL Rob |
| <i>E. albicaule</i> ◀ Sch Bip ex Klatt [<i>E. leucoderme</i> BL Rob] | <i>E. etlense</i> ‡ BL Rob | <i>E. palmeri</i> ‡ A Gray |
| <i>E. ageratoides</i> ‡ L f | <i>E. geminatum</i> Mc Vaugh | <i>E. pazcuarensis</i> HBK [<i>E. grandidentatum</i> DC; <i>E. skutchii</i> BL Rob; <i>Ageratina pazcuarensis</i> (HBK) King & Rob] |
| <i>E. areolare</i> ◀ ■ DC [<i>Piptothrix areolare</i> (DC) King & Rob; <i>Ageratina areolaris</i> (DC) Gage] | <i>E. glabratum</i> ◀ ■ HBK [<i>Ageratina glabrata</i> (HBK) King & Rob] | <i>E. peltophum</i> ‡ BL Rob |
| <i>E. aff. areolare</i> ‡ DC | <i>E. glomeratum</i> ‡ DC | <i>E. petiolare</i> ◀ Moc ex DC [<i>Ageratina petiolaris</i> Moc ex DC King & Rob] |
| <i>E. arsenei</i> ■ BL Rob [<i>Ageratina arsenei</i> (Rob) King & Rob] | <i>E. gracilicaule</i> ‡ Sch Bip ex BL Rob | <i>E. polybotryum</i> DC [<i>Ophryosporus petraeus</i> BL Rob; <i>Dechachaeta ovatifolia</i> (DC) King] |
| <i>E. cf. arsenei</i> BL Rob | <i>E. halbertianum</i> Mc Vaugh [<i>Ageratina halbertiana</i> (Mc Vaugh) King & Rob] | <i>E. prunellifolium</i> HBK [<i>E. saltivarrii</i> Sch Bip; <i>Ageratina prunellifolia</i> (HBK) King & Rob] |
| <i>E. aschenbornianum</i> ◀ ■ S Schauer [<i>E. picbinchense</i> HBK; <i>E. aschenbornianum</i> Schauer; <i>E. bustamenta</i> DC; <i>Ageratina aschenborniana</i> (Schauer) King & Rob; <i>A. bustamenta</i> (DC) King & Rob; <i>A. picbinchensis</i> (HBK) King & Rob] | <i>E. hebebotryum</i> (DC) Hems! [<i>Critonia hebebotrya</i> DC] | <i>E. pulchellum</i> HBK [<i>Chromolaena pulchella</i> (HBK) King & Rob] |
| | <i>E. hymenolepis</i> ‡ BL Rob | <i>E. pulchellum</i> var <i>angustifolium</i> ‡ Watson |
| | <i>E. incarnatum</i> ‡ Walter | <i>E. pycnocephalum</i> ◀ ■ Less [<i>Fleischmannia pycnocephala</i> (Less) King & Rob] |
| <i>E. bellidifolium</i> ‡ Benth | <i>E. incomptum</i> DC | <i>E. quadrangulare</i> DC [<i>E. thyrsoides</i> DC] |
| <i>E. bertholdii</i> var <i>stenophyllum</i> ‡ BL Rob | <i>E. isolepis</i> ‡ BL Rob [<i>Ageratina isolepis</i> (BL Rob) King & Rob] | <i>E. ramireziorum</i> Esp [<i>Ageratina ramireziorum</i> (Esp) Turner] |
| <i>E. blepharilepis</i> Sch Bip [<i>Ageratina blepharilepis</i> (Sch Bip) King & Rob] | <i>E. lasioneuron</i> ■ Hook & Arn [<i>Ageratina lasioneura</i> (Hook & Arn) King & Rob] | <i>E. rhomboideum</i> HBK [<i>Ageratina rhomboidea</i> (HBK) King & Rob] |
| <i>E. brevipes</i> DC [<i>Ageratina brevipes</i> (DC) King & Rob] | <i>E. lasium</i> ‡ BL Rob | <i>E. rivale</i> Greenm |
| <i>E. calophyllum</i> (Greene) BL Rob [<i>Ageratina calophylla</i> (Greene) King & Rob] | <i>E. ligustrinum</i> DC [<i>E. erythropappum</i> BL Rob; <i>Ageratina ligustrina</i> (DC) King & Rob] | <i>E. rubricaulis</i> HBK [<i>E. cylindricum</i> Mc Vaugh; <i>E. amplifolium</i> A Gray; <i>Ageratina rubricaulis</i> (HBK) King & Rob; <i>A. cylindrica</i> (Mc Vaugh) King & Rob] |
| <i>E. cardiophyllum</i> BL Rob [<i>Ageratina mcvaughii</i> (King & Rob)] | <i>E. longipes</i> A Gray [<i>Brickellia pedunculosa</i> (DC) Harc & Bearman; <i>Phanerostylis pedunculosa</i> (DC)] | <i>E. scabrellum</i> ‡ BL Rob |
| <i>E. ceriferum</i> Mc Vaugh [<i>Ageratina cerifera</i> (Mc Vaugh) King & Rob] | <i>E. macrophyllum</i> ‡ L | <i>E. schaffneri</i> Sch Bip ex BL Rob [<i>Ageratina schaffneri</i> (Sch Bip) King & Rob] |
| <i>E. choricephalum</i> BL Rob [<i>E. ciliatum</i> Less; <i>Ageratina coricephala</i> (BL Rob)] | <i>E. mairetianum</i> ◀ DC [<i>Ageratina mairetiana</i> (DC) King & Rob] | <i>E. aff. schaffneri</i> ‡ Sch Bip ex BL Rob |

| | | |
|---|--|--|
| <i>E. collinum</i> ◀ DC [<i>Chromolaena collina</i> (DC) King & Rob] | <i>E. aff. mairetianum</i> † DC | <i>E. solidaginifolium</i> † A Gray |
| <i>E. collinum</i> var <i>mendezii</i> Mc Vaugh | <i>E. malacolepis</i> BL Rob | <i>E. sordidum</i> Less |
| <i>E. conspicuum</i> Kauth & Bouche [<i>Ageratina conspicua</i> (Kunth & Bouché) King & Rob] | <i>E. mariarum</i> † BL Rob | <i>E. squarrosum</i> ◀ Cav [<i>Brickellia squarrosa</i> (Cav) BL Rob] |
| <i>E. crassirameum</i> BL Rob [<i>Ageratina crassiramea</i> (BL Rob) King & Rob] | <i>E. monanthum</i> Sch Bip | <i>E. triangulare</i> † (DC) BL Rob |
| <i>E. cremastum</i> BL Rob | <i>E. muelleri</i> Sch Bip ex Klatt [<i>Ageratina muelleri</i> (Sch Bip ex Klatt) King & Rob] | <i>E. vernicosum</i> † Sch Bip ex BL Rob |
| <i>E. deltoideum</i> Jacq [<i>Ageratina deltoides</i> (Jacq) King & Rob] | <i>E. nelsonii</i> BL Rob | <i>E. cf. vernicosum</i> † Sch Bip Ex Green |

Eupatorium taxonomic considerations. The genus *Eupatorium* belongs to the tribe Eupatorieae, one of the thirteen tribes of the Asteraceae family. It brings together nearly 1200 species distributed mainly in tropical regions of America, Europe, Africa and Asia (Zhang et al., 2008). This genus has been under intense and critical taxonomic revision. The morphological features of the plant are often indistinguishable, and give rise to synonymous species (e.g. see Table 1). For example, the case of the medicinal plant *E. albicaule* Sch. Bip. ex Klatt which is synonymous with *E. leucoderme* B.L. Rob., or *E. quadrangulare* D.C. which is synonymous with *E. thyrsoides* D.C. To date, a taxonomic level of species does not allow to make a direct and accurate calculation of the number of *Eupatorium* spp that inhabit the Michoacan territory. This is because, at least in part, species already identified as *Eupatorium* had been recently relocated to other taxa: for example, *E. adenophorum* Spreng has been relocated to the genus *Ageratina* as *A. adenophora* (Spreng) King & Rob., or *E. areolare* DC. has been relocated to the genus *Piptobrixis* as *P. areolare* (DC.) King & Rob.

We demonstrated that 31 species referred to as *Eupatorium* have been recorded only once in the last 120 years (‡) (see Table 1). How do we explain it? It might be that (1) they have been transferred to other genera, (2) known as synonyms, or (3) have been true native, extinct plants. The evidence based on morphological characters indicates that the large plant group historically referred to as *Eupatorium* sp tends to decrease in Michoacán. Thirty eight species initially recorded as *Eupatorium* have been relocated into the genera *Ageratina* (28); *Brickellia* (2); *Chromolaena* (3); *Critonia* (1); *Dyscritogyne* (1); *Fleischmannia* (1); *Ophryosporus* (1), and *Piptobrixis* (1), and the taxonomical position is doubtful for six of them (aff.; cf) (see Table 1).

This review of the genus *Eupatorium* has led to the generation of new genera, new species and new names. This was an activity that is currently enhanced by the advent of molecular taxonomy, complemented by cytologic examination to determine the ploidy [minimum level of ploidy = 10 chromosomes], hybrid derivatives, as well as the strategies of reproduction (apomixes and agamospermy) (Sullivan, 1972).

Therefore, we do not rule out the possibility of finding more species of this genus inhabiting in Michoacan. Currently, we are working on the biology of *Eupatorium* supported by molecular approaches using markers such as ITS, RFLP and other strategies of molecular biology and genetics (Ito et al., 2000, Peters et al., 2008).

Eupatorium spp in traditional medicine. Most *Eupatorium* species include plants with a large colonizing ability. However, some of them are considered weeds, and in some instances, a pest (*E. odoratum*) (Mori & George, 1959; Lvens, 1974; FAO). Other species have been incorporated into the human lifestyle with different applications, one of which is medicinal. In Mexico, at least 12 *Eupatorium* spp have been described with uses in traditional medicine (Table 1). *Eupatorium daliodes* DC Hemsley and *E. morifolium* Mill were not included in this study as they have not been detected in Michoacan (Magaña et al., 2010). All of them are used for the treatment of various human ailments with signs of microbial infection, parasites, stomach ache, body aches (head, muscle), central nervous system and liver disorders, as laxatives and antihistamines, cardiac stimulant, anticoagulant, astringent, antirheumatic, antiviral and immunostimulants (Zardini, 1984; Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, 1998; Rondina et al., 2003; Sasikumar et al., 2005). For example, *E. squarrosum* (common name, prodigiosa) and *E. petiolare* (common names, amargocilla, angel herb) are used with the above mentioned purposes in Michoacan.

These two species are often misidentified, and confused with *E. aschenbornianum* and *E. pazcuarensis*. Thus, plants of both species can be considered as medicinal plants. However, it appears that many species have no historical records of their medicinal uses. This observation is extended to many traditional medicinal plants; that is, there are no chemical studies and pharmacological effects that give occidental medical support to its therapeutic use.

In this study, at least 10 *Eupatorium* spp with medicinal use grew and prospered in this territory; 8 of them are used with the same medicinal purpose in other states, and they

are part of the local Mexican indigenous pharmacology. The lack of medicinal use given to some *Eupatorium* species in other Mexican latitudes might be the inhabitant ignorance or idiosyncrasy in that region because they are attached to tradition.

Michoacan has enough habitats conducive to the spread of *Eupatorium* spp used in traditional medicine without a negative impact on the native ecosystem. This can be considered an opportunity to (1) improve income through a systematic production in backyards at the rural environment, and (2) contribute to social rooting. Such activity can potentially prevent frequently observed rural conflicts derived from the harvest of this natural resource, disturbance of local growing sites and natural spreading, possible predation and extinction in the region. The major conflict with farm owners where they spread these species is theft (Darnian et al., 2008).

Phytochemistry of the genus *Eupatorium*. The biological diversity in *Eupatorium* spp is the result of billions of years of evolution under the increasing pressures of human activities. The chemical constituents reported in the genus *Eupatorium* is good enough. However, Zhang et al. (2008) reported purified components of two species that grow in Michoacan, *E. adenophorum* and *E. odoratum*. Some *Eupatorium* sp are having little information on their phytochemistry: eg. *E. petiolare* (2- α -isovaleroyl-oxy-epirucic and kaurenoic acids, taraxasterol, benzyl 6-methoxy-salicylate, 11,13-dihydro-eupatoriopicrin and 2-hydroxy-6-methoxy-benzoic acid); *E. squarrosom* (atanasin, eupatolin, 5-hydroxy-4',6,7,8-trimethoxyflavone, gardenin B, glucoferido and santin, three derivatives from cativic acid and angeloyl-oxy-epoxy-brickelliol); *E. aschenbornianum* (encecanechine), *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta* (synonyms: *E. pichinchense*, *E. bustamenta*) (5-acetyl-3- β -angeloyl oxy-2- β -(1-hydroxy isopropyl)-2,3-dihydro benzofurane, 5-acetyl-3- β -angeloyloxy-2- β -(1-hydroxy isopropyl)-6-methoxy-2,3-dihydrobenzofurane, espeleton, encecalinol, O-methylencecalinol, encecaline, sonorol, taraxerol, (+)- β -eudesmol and a mixture of β -sitosterol/estigamasterol (Aguilar et al., 2009; Sanchez et al., 2010).

As suggested by botanists, phytochemical studies are needed for wild *Eupatorium* specimens harvested from sites located on the outskirts of Morelia, Michoacan. The plant species under study were marked with (■) in Table 1. Six of them are used in Mexican traditional medicine. Also, all of them are (1) members of non-timber forest, (2) weeds in agricultural and farm lands, and (3) predominant inhabitants of disturbed ecosystems. Preliminary chemical studies of *Eupatorium* species growing in Michoacan were done with the flowers. This was made for two reasons: flowers are an important organ for species identification, and the fact that they are rich in chemical compounds is of interest to establish chemical markers between species. A variety of chemical families were present in the hexanic extracts from

Table 2. ^1H NMR signals of the hexanic extracts from flowers of *Eupatorium* spp.

Tabla 2. Señales ^1H RMN de los extractos hexánicos obtenidos de flores de *Eupatorium* spp.

| Species | ^1H NMR signal (ppm) | Chemical family |
|-------------------------|---|-----------------|
| <i>E. adenophorum</i> | 7.2 - 7.5; 6.3 - 6.4; 5.5 - 5.6; 3.7; 0.8-2.6 | Chromenes |
| <i>E. areolare</i> | 7-8; 4-6.5; 0.9-3.7 | Terpenes |
| <i>E. arsenei</i> | 6.3-7.8; 4.8-5.8; 3-3.8; 1-2.9 | Chromenes |
| <i>E. dolichobasis</i> | 5-6; 3.5-4.6; 0.8-2.9 | Terpenes |
| <i>E. glabratum</i> | 7-8.2; 4-6.4; 0.9-3.2 | Terpenes |
| <i>E. lasioneuron</i> | 5-5.7; 0.8-2.8 | Diterpenes |
| <i>E. pichinchense</i> | 6-8.5; 3-5.5; 0.8-3 | Terpenes |
| <i>E. pycnocephalum</i> | 7-7.3; 4.4-5.5; 3.4-3.6; 0.7-2.8 | Terpenes |

Eupatorium spp flowers. In a qualitative chemical analysis using hydrogen (^1H) nuclear magnetic resonance techniques on flower extracts showed strong characteristic signals of terpenes and chromenes (Table 2). The presence of several species of the genus *Eupatorium* is a hint that they are successful colonizers and have few predators. However, an exhaustive study is required to know the exact number of species, and the possible existence of endemisms in the territory of Michoacan. With this in mind, it is necessary to take precautions in the harvesting processes, and to define the ecological environment for the botanical and molecular identification of species. Although most of this extraordinary plant richness is apparently not in danger of disappearing, it is possible that endemic *Eupatorium* species are already extinct.

In Mexico, the federal government has established that 2583 species are endangered in some categories. Also, it recognizes that most Michoacan ecosystems are severely degraded, and some of them, such as mangroves and reefs, are even in danger of disappearing (Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacan, 2007).

This indicates that it is necessary to pay attention to the standard norms of use, production, handling, processing, distribution and marketing of each of *Eupatorium* species. This attitude will help to use this natural resource rationally (Mexican Official Standards related to this topic).

Of the species of *Eupatorium* without synonymy detected, it is necessary to know their natural abundance and accessibility, and make a taxonomic revision. These species, and all the native species of this genus, are ideal candidates for further biodirected phytochemical studies in the search for novel molecules with pharmacological action.

The study results of the phytochemical study on a species of successful propagation, easy access and harvesting as *Eupatorium* spp. suggest that it is potentially possible to find

new active ingredients of secondary metabolites belonging to major chemical families like terpenes and chromenes. Our study provided complementary information on *Eupatorium* spp, an important member of the native Mexican flora.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the UMSNH and CONACYT 118287. EGS and CBRL are fellows of CONACYT. We are grateful to Jerzy Rzedowsky, PhD in Botany, for the taxonomic identification of *Eupatorium* spp. This paper is a result of a link between academic groups through RENdRT and MMPM. We also thank Mr. Martin Calderon Raya Bsc. for English language corrections.

REFERENCES

- Aguilar B., V. Navarro, I. Leon & M.Y. Rios (2009). Active compounds against *tinea pedis* dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. *Natural Products Research* 23: 1559-1565.
- Assié, I.L.K., F. Francis, N. Gengler & F. Hauhrige (2007). Response and genetic analysis of malathionspecific resistant *Tribolium castaneum* (Herbst) in relation to population density. *Journal of Stored Products Research* 43: 33-34.
- Belter, R.K. (2009). Patent application title 20090100748: Petroleum substitutes from the essential oils of *Eupatorium* species. BIDM/IM UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- Encuesta en médicos tradicionales de localidad.
- CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Gobierno Federal. México. <http://www.conabio.gob.mx>
- Damian L.M., R.M. Espinosa, R.E. Martínez Muñoz, O.A. Ron, R. Salgado, A. Flores, D. Raya & M.M. Martínez-Pacheco (2008). The Mexican medical plants with antifungal properties are an economic and health opportunity area. *Pharmacologyonline* 3: 61-77.
- Deciga-Campos, M., I. Rivero-Cruz., M. Arriaga-Alba., G. Castañeda Corral., G.E. Angeles Lopez., A. Navarrete & R. Mata (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 334-342.
- Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine (1998). Chinese Materia Medica (Zhonghua Bencao), Vol. 7. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. pp. 839-841.
- Espinosa G.J & L.S. Rodriguez Jimenez (1995). In: Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario VII. Listado Florístico del Estado de Michoacan. Sección II (Angiospermae: Compositae). pp 84-103.
- Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacan (2007). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente (SUMA) y Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEIDAGRO). Mexico. Ed. Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo ISBN: 970-9000-48-9.
- FAO. Depósito de documentos de la FAO. Capítulo 5. Malezas de hoja ancha. In: Manejo de malezas en países en desarrollo. <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s09.htm>
- Fernández, R., C. Rodríguez, M.L. Arreguín & A. Rodríguez (1998). Listado florístico de la cuenca del río Balsas, México. *Polibotanica* 9: 1-151.
- Herbario de la Facultad de Biología-UMSNH.
- Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo. <http://www.michoacan.gob.mx>
- Ito M., T. Yahara, R.M. King, K. Watanabe, S. Oshita, J. Yokoyama & D.J. Crawford (2000). Molecular phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae) estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. *Journal of Plant Research* 113: 91-96.
- Katinas, L., D.G. Gutierrez, M.A. Grossi & J.V. Crisci (2007). Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la Republica Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 42: 113-129.
- Laboratorio de Química de Productos Naturales-IIQB.
- Lancelle, H.G., O.S. Giordano, M.F. Sosa & C.E. Tonn (2009). Chemical composition of four essential oils from *Eupatorium* spp. Biological activities toward *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 68: 329-338.
- Lvens, G.W. (1974). The problem of *Eupatorium odoratum* in Nigeria. *PLANS* 20: 76-77
- Lozoya, X. (1994). Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs Research Unit in Pharmacology of Natural Products, National Medical Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City. Ciba Found Syrup.
- Magaña Alejandro, M.A., L.M. Gama Campillo & R. Mariaca Mendez (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Mayas-Chontales de Najuca, Tabasco, México. *Polibotanica* 29: 213-262.
- Medina, C., F. Guevara, M.A. Martínez, P. Silva & M.A. Chavez (2000). Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacan, Mexico. *Acta Botánica Mexicana* 52: 5-41.
- Moni, N.S & M.P. George (1959). *E. odoratum* L. - A common weed found in the teak plantations of Kerala State. *Indian Forester*: 85: 728-730.
- Normas Oficiales Mexicanas. NOM 059 SEMARNAT 2001; referente a especies con algún grado de riesgo. NOM-005-REC-NAT-1997; referente a la regulación para el uso ornamental. NOM 009 REC-NAT 1996; para regular el uso medicinal de plantas y derivados. Diario Oficial de la Nación, México. Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas. <http://www.economia.noms.gob.mx>
- Peters, M.B., C. Hagen, D.W. Trapnell, H. Hamrick, O. Rocha, P.F. Smouse & T.C. Glenn (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum*. *Molecular Ecology Resources* 8: 129-131.
- Rondina, R., A. Bandoni & J. Coussio (2003). Plantas silvestres argentinas con reconocidas propiedades medicinales o tóxicas. OEA-CYTED, Buenos Aires (CD-ROM).
- Sanchez M.F., B. Reyes, P. Sanchez, J. Rodriguez, C. Castillo, H. Cervantes & J. Arrieta (2010). Bioassay guided isolation of an antiulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulphydryls. *Fitoterapia* 81: 66-71.
- Sasikumar, J.M., P.A. Doss & A. Doss (2005). Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. *Fitoterapia* 70: 240-243.

- Sullivan, V.I. (1972). Investigations of the breeding systems, formation of auto- and allopolyploids and the reticulate pattern of hybridization in North American *Eupatorium* (Compositae). Ph.D. dissertation. Florida State University.
- Zardini, E.M. (1984). Etnobotánica de Compuestas Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico (Primera parte). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 3: 77-99.
- Zhang, M.L., M. Wu., J.J. Zhang, D. Irwin, Y.C. Gu & Q.W. Shi (2008). Chemical constituents of plants from the Genus *Eupatorium*. *Chemistry and Biodiversity* 5: 40-55.

6.2 Capítulo 2. Actividad antimicrobiana de *Eupatorium* spp nativas de Michoacán

6.2.1 Antibacterial activity of some medicinal *Eupatorium* species against antibiotic resistant pathogenic bacteria

POLIBOTÁNICA

13. Junio. 2014

DR. MAURO M. MARTÍNEZ-PACHECO
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México.

PRESENTE

Por medio de este conducto me permito comunicar a usted que su artículo: **"ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME MEDICINAL *Eupatorium* SPECIES AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT PATHOGENIC BACTERIA"**, teniendo como co-autores a: **EDGAR GARCÍA-SÁNCHEZ, CESAR B. RAMÍREZ-LÓPEZ, ROSA E. MARTÍNEZ-MUÑOZ, ALBERTO FLORES GARCÍA, y ROSA E. DEL RÍO.** ha sido revisado por parte de nuestros árbitros y estos opinan que el trabajo esta bien estructurado y es una aportación importante, por lo tanto el artículo arriba mencionado se acepta para su publicación en el Núm. 39 de *POLIBOTÁNICA* que saldrá en el periodo septiembre-octubre de 2014.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dr. Rafael Fernández Nava,
Editor en Jefe de *POLIBOTÁNICA*



Article

Antibacterial activity of some medicinal *Eupatorium* species against antibiotic resistant pathogenic bacteria

Actividad antibacteriana de algunas especies medicinales de *Eupatorium* contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos

Edgar García-Sánchez, Cesar B. Ramírez-López, Rosa E. Martínez-Muñoz, Alberto Flores García, Rosa E. Del Río, Mauro M. Martínez-Pacheco

*Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B-3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán 58030, Mexico.
e-mail: mpacheco@umich.mx*

Summary. Thirty six samples arising from hexane, dichloromethane, and methanol extracts from four medicinal *Eupatorium* species were screened against Gram positive and Gram negative resistant bacteria associated with nosocomial infections by disk diffusion method. The best antibacterial extracts were selected by correspondence analysis. The hexane extracts showed high inhibition against clinical isolated bacteria. The qualitative chemical analysis was realized in the best antibacterial hexane extracts. The main components identified are pentacyclic triterpenes and benzopyran compounds which of extensively had been reported their antibacterial activities. Our results showing that medicinal *Eupatorium* species studied in this work have metabolites secondary antibacterial particularly against antibiotic resistant strains, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* and validate their uses in folkloric medicine.

Key words: *Eupatorium*, antibacterial, secondary metabolites, *K. pneumoniae*, *S. aureus*.

Resumen. Treinta y seis extractos hexánicos, diclorometanólicos y metanólicos de cuatro especies medicinales de *Eupatorium* fueron ensayados contra bacterias resistentes Gram positivas y Gram negativas asociadas con infecciones nosocomiales por el método de difusión en disco. Los mejores extractos antibacterianos fueron seleccionados por un análisis de correspondencia. Los extractos hexánicos mostraron mejor inhibición de los aislados clínicos. El análisis químico cualitativo fue realizado a los extractos con mejor actividad antibacteriana. Los principales componentes identificados fueron triterpenos pentacíclicos y benzopiranos los cuales han sido extensamente reportados por sus actividades antibacterianas. Nuestros resultados muestran que las especies medicinales de *Eupatorium* estudiadas en este trabajo tienen metabolitos secundarios antibacterianos contra bacterias resistentes a antibióticos tales como, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, y se validan sus usos en la medicina folklórica.

Palabras clave: *Eupatorium*, antibacteriano, metabolito secundario, *K. pneumoniae*, *S. aureus*.

1. Introduction

In Mexico, the increased incidence of nosocomial infections by multi-drug resistant bacteria is a health problem with approximately 35000 annual cases. All cases have epidemiologic importance, but pathogenic agents with clinical relevance are *Klebsiella pneumoniae* isolated from persons with infectious pneumonia and *Staphylococcus aureus* mainly detected in deep wound infections, both are the main bacteria associated with 80% of nosocomial cases (RHOVE, 2009).

The resistance to the antibiotics is the natural response of microbial survival front a selective pressure such as conventional antibiotics. From the anthropocentric point of view, also, it's a continuous competition between the microbial survival and its control, maybe, with novel molecules of plant origin. Often, by means of ethnomedical and ethnobotanical knowledge and the phytochemical search is obtaining novel molecules with antibacterial activities. In this regard, the chemical study the plant species that are successful colonizers, particularly those used in traditional medicine and native to the Michoacan territory, appear to be promissory as sources of bioactive molecules (Damian Badillo *et al.*, 2008).

A search in national and local herbarium found that in this region the Tribe Eupatorieae is present and its plant genera are abundant (Ramirez Lopez *et al.*, 2010; Garcia Sanchez *et al.*, 2011). The tribe Eupatorieae comprises about 1200 species mainly distributed in tropical America. Some of them species have medicinal properties which are used to relieve ailments of infections, some are weeds and are associated with disturbed ecosystems (Rzedowski and Calderon, 2005; Guilherme *et al.*, 2002; Katinas *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2003). Therefore, the importance is greater in the case of a genus that groups important species in traditional medicine of several societies in five continents, in South America and

Asia they are used to relieve maladies associated with signs and symptoms of microbial and parasitic infection (Ramirez Lopez *et al.*, 2010).

The importance of *Eupatorium* spp in Mexican traditional medicine is given by the use of thirteen medicinal plants distributed in several ethnic pharmacopeias (Garcia Sanchez *et al.*, 2011). They are: *E. albicaule*, *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. aschenbornianum*, *E. daleoides*, *E. glabratum*, *E. morifolium*, *E. odoratum*, *E. petiolare*, *E. pulchellum*, *E. pycnocephalum*, *E. quadrangulare* and *E. squarrosum*. With the exception of *E. daleoides* of the rest of species have been reported as plant natives of Michoacan but not all of them are used as medicinal plants. However, some of them by their medicinal properties both for ancestral as modern medical practices and scarce or null chemical studies are *in focus* such as *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. glabratum* and *E. pulchellum*: they are plants that successfully spread in this region of the world. Their use is to relieve pain, gastrointestinal, respiratory, and renal disorders associated with bacterial infections (Magaña *et al.*, 2010). Few pharmacological studies have been done to corroborate their biological actions due to scarce phytochemical information. Also, in others Mexican cultures they are used with the same purpose; *E. areolare* (borreguillo) is used by the Maya-Chontal culture, *E. arsenei* (falso Tabardillo), *E. glabratum* (Chamizo, Jesus deni) is used in the Otomí culture and *E. pulchellum* are used in traditional medicine Purepecha culture (i.e. oral lore).

Although there is phytochemistry information about bioactive components in the Tribe Eupatorieae, there remain many species native and endemic to explore by their bioactive components. An exciting field to phytochemical exploration biodirected is generated (Ramirez Lopez *et al.*, 2010). The phytochemical investigation of medicinal plants is explored. All the species are used in different Mexican ethnic groups and cultures to treat

symptoms associated with bacterial infections. This study was conducted for to do a chemical exploration into of the plant extracts from *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. glabratum*, and *E. pulchellum* that affect the growth of nosocomial bacterial isolates that exhibit an important resistance to conventional antibiotics.

2. Results and Discussion

2.1. Antibacterial activity

Thirty six samples arising from hexane, dichloromethane, and methanol extracts were screened against four Gram positive and nine Gram negative resistant bacteria associated with nosocomial infections, by disk diffusion method. Wild microbial isolated were identified by biochemical tests and their antibiotic resistance were determinate, see Table 1. The effect of plant extracts on bacterial growth is variable as a function of the group's bacteria, plant extract, and type of effect. The zones of inhibition ranged from 1 to 20 mm in diameter.

Plant extracts are grouped to discriminate those that would have a prominent antibacterial effect and the most sensitive bacterium. Antibacterial activity of medicinal plant extracts, which increased in the following order: hexane > dichloromethane > methanol. The correspondence analysis displayed three groups. In the group 1 are located plant extracts that affect the growth of Gram negative bacteria. They were the dichloromethane and methanol extracts from *E. arsenei* and *E. pulchellum*. As well as hexane extracts of *E. areolare*. These extract exhibited antibacterial activity against *C. freundii*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp, and *S. sonnei*. The isolated Gram negative bacteria were most resistant than

Gram positive bacteria to the plant extracts tested. In group 2 are included the plant extracts that affect the growth of *B. subtilis* and found some hexane extracts. In group 3, the plant extracts that affect the growth of *Staphylococcus*, such as, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. The hexane extracts from *E. areolare*, *E. glabratum* and *E. pulchellum* are the most effective to inhibit the bacterial growth (Figure 1).

The hexane extracts from four medicinal plants showing antibacterial components. In order of importance the best antibacterial effects is observe in hexane > dichloromethane > methanol plant extracts. Also, it notes that the Gram positive bacteria are more sensitive to the plant extracts tested. Our results with hexane extracts are consistent with the observation of non-polar extracts of *E. ayapana* and *E. glandulosum* that inhibited the growth of Gram positive bacteria, all of them human pathogens (Sasikumar *et al.*, 2005). As well as were reported that hexane extracts of leaves and stems of *E. glutinosum* affected the growth of two Gram positive and two Gram negative (El-Seedi *et al.*, 2002).

2.2. Qualitative chemical analysis of antibacterial extracts.

The NMR spectra of antibacterial extract from *E. areolare* and *E. glabratum* showing signals characteristic of triterpenes. The major signals observed were located between δ 5.36 and 5.12; Also, δ 4.69 and 4.45. These signals are representative of the vinylic hydrogen atoms and exocyclic methylene group. Moreover, were observed signals located between δ 2.0 and 0.8 common signals of pentacyclic triterpenes. The qualitative chemical analysis of non-polar extracts from *E. pulchellum* leaves showing the presence of terpene-type components. However, the main signals of active extract from *E. arsenei* were detected between δ 7.0 and 6.5; as well, δ 3.7. These signals are typical of the hydrogen

aromatic atoms and methoxyl group. Also, exhibited signal at aliphatic region δ 2.6-0.8 distinctive signal of benzopyran compounds.

The phytochemical knowledge of these species is scarce. In *E. arsenei* have been identified a chromene compound (García-Velgara, 1996). In *E. glabratum* (chamizo) has been reported eleven thymol derivatives, a flavone (acacetin) and eupaglabric acid (Guerrero *et al.*, 1978; Bohlmann *et al.*, 1977; García *et al.*, 2011). In *E. pulchellum* has been identifying type pyrrolyzin alkaloids. It is infer that some of these plant metabolites are responsible for the observed antibacterial effect (Gómez-Hurtado *et al.*, 2011). Also, it is known that *E. areolare* (borreguillo) have the following main compounds: sesquiterpenlactones, cinnamic acid, germacranolides and thymol derivatives (Hernández *et al.*, 1986).

The plant extracts exhibited antibacterial effect against two of thirteen clinically important bacteria tested, they are *K. pneumoniae* and *S. aureus*. For these bacteria, it is observe low values of MICs when are treated with hexane and methylenic chloride extracts from *E. pulchellum* leaves. However, the main components identified in hexane extracts from *E. areolare*, *E. arsenei*, and *E. glabratum* have also been reports to have antibacterial activity in many medicinal plants (Abreu *et al.*, 2011; Kiplimo *et al.*, 2011). As well, benzopyran compounds have been indentified major compounds in essential oils and extracts plants whit remarkable activity antibacterial (Patil *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 1996; Mihailovic *et al.*, 2011).

Our results showing that medicinal *Eupatorium* species studied in this work present metabolites secondary antibacterial and validate their uses in folkloric medicine. As well, motivates us to continue the study to find a compound responsible for the antibacterial

activity. These results suggest that we should revised and extended phytochemical screening of these species with a new experimental design and with robust electronic infrastructure.

The need for new molecules effective to control of human pathogen bacteria given by high incidence of resistant strains, the medicinal plant species of the genus *Eupatorium* that we report are promising for the identification of molecules with antibacterial effect with emphasis special on those affecting the survival of two pathogenic bacteria involved in nosocomial infections; *K. pneumoniae* and *S. aureus*.

3. Experimental

3.1. General

¹HNMR spectra were recorded at 400 MHz on a Varian Mercury 300 spectrometer using CDCl₃ as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference; chemical shift values are reported in parts per million (ppm, δ scale).

3.2. Plant material

Eupatorium areolare (**E. are**) [*Piptothrix areolare* (DC.) King & Rob., *Ageratina areolaris* (DC.) Gage] (Voucher number 04135), *E. arsenei* (**E. ars**) [*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob] (voucher number 04143), *E. glabratum* (**E. gla**) [*Ageratina glabrata* (H.B.K.) King & Rob] (Voucher number 04204) and *E. pulchellum* (**E. pul**) [*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob.] (Voucher number 04330). All of them were collected between October and March (2006 – 2007) near at Morelia, Mich., the collecting area was done into circle at 200 km diameter with reference point is 19° 39.938' N and 101° 00.300' W., the interval of 2069 to 2304 m.a.s.l.

They were taxonomically determined by the botanist, retaining a specimen in the herbarium of the Instituto de Ecología de Pátzcuaro and one more in the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas at the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

3.3. Elaboration of extracts

Leaf (105 g), flower (285 g), stem (310 g) from *E. arsenei*; leaf (155 g), flower (135 g), stem (1,229 g) from *E. areolare*; leaf (225 g), flower (90 g), stem (625 g) from *E. glabratum*; and leaf (120 g), flower (355 g), stem (260 g) from *E. pulchellum* were macerated with hexane, dichloromethane, and methanol at room temperature (3 x 1.5 L). Extractions yield are leaf (4.36 %), flower (10.75 %) and stem (3.38 %). We performed column chromatography of leaf extract (2 g), flower (1 g) and stem (2 g).

3.4. Used bacteria

The bacteria tested were biochemically characterized and their antibiotic resistance (Table 1). The wild Gram-negative and Gram-positive bacteria and ATCC bacteria used were obtained from Laboratorio Estatal de Salud Pública, Michoacán, Mexico.

3.5. Antibacterial test

Antibacterial test was carried out by the disc diffusion method. It was performed using an 18 h culture growth at 37 °C with 10^6 CFU/ml. The inoculums were spread over plates containing Mueller-Hinton agar and paper filter disc (6 mm) impregnated with the extracts 1mg/ μ l, the plates were incubated at 37 °C for 18h. At the end of the period, the inhibition zone around the disc was measured. Two controls were also included in the test, the first,

was a positive control (cefotamixime 0.125 mg/μl) and a negative control ethanol 96 % (0.8 mg/μl).

3.6. Data analysis

Experiments were evaluated by correspondence analysis (CA) to visualize the between variables. CA was carried out in two dimensions. The first dimension makes discrimination on bacteria and the second dimension on vegetal extract. We analyzed 13 rows and 72 columns with a total of 936 observations. The matrix was built in Excel program, considering bactericidal (bc) or bacteriostatic (bt) effect, Gram positive/Gram negative bacterial, zone inhibition of each plant extract and each bacterial isolate.

4. Conclusions

Medicinal *Eupatorium* spp exhibited antibacterial activity against antibiotic resistance strains specifically against *K. pneumoniae* and *S. aureus*. This work showed four examples the importance of following up leads from Michoacan traditional medicine. These results contribute to the knowledge of the secondary metabolites of species growing in Michoacan State and validate the medicinal uses of the plants in folkloric medicine.

5. Acknowledgements

The authors thank USMNH funding this work. EGS and CBRL are fellows of CONACYT. Also, to Jerzy Rzedoswzky Botanist from Instituto of Ecología A.C. Campus Pátzcuaro, Mich

6. References

- Abreu, V; J. Takahashi; L. Duarte; D. Pilo-Veloso; P. Junior; R.O. Alves; A.J. Romanha; and A.F.C. Alcantara; 2011; Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems and flowers of *Lychnophora pinaster*; *Braz. J. Pharmacogn.* **21**; 615-621.
- Bohlmann, F; J. Jakupovic; and M. Lonitz; 1977; Über inhaltsstoffe der *Eupatorium*-Gruppe; *Chem. Ber.* **110**; 301-314.
- Damian Badillo L.M.; R.M. Espinosa Madrigal; R.E. Martinez Muñoz; O.A. Ron Echeverria; R. Salgado Garciglia; A. Flores Garcia; D. Raya Gonzalez; and M.M. Martinez Pacheco; 2008; The mexican medical plants with antifungal properties are an economic and health opportunity area; *Pharmacologyonline*, **3**; 61-77.
- El-Seedi, H.R.; T. Ohara; N. Sata; and S. Nishiyama; 2002; Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae); *J. Ethnopharmacol.* **81**; 293-296.
- Garcia Sanchez, E.; C.B. Ramirez Lopez; R.E.N. del Rio; and M.M. Martinez Pacheco; 2011; A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan; *Phyton* **80**; 4-11.
- García, P.G.; T.R.E.N. del Río; M.R. Guzmán; G. Ma. I. Martínez; and R.F.T. Scior; 2011; Preliminary studies on the analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in two thermal models of acute pain; *Rev. Mex. Cienc. Farmaceut.* **42**; 22-28.
- García-Velgara M.; **1996**; Tesis de Licenciatura. Estudio Químico de la parte aérea de *Bursera cuneata* y *Eupatorium arsenei*. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, Mexico.

- Gómez-Hurtado, M.A.; J.M. Torres-Valencia; J. Manríquez-Torres; R.E. del Río; V. Motilva; S. García-Mauriño; J. Avila; E. Talero; C.M. Cerda-Garcia-Rojas; and P. Joseph-Nathan; 2011; Absolute configuration of labdanes and *ent*-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism; *Phytochemistry* **72**; 409-414.
- Guerrero, C.; M. Silva; E. Maldonado; and M. Martínez; 1978; Eupaglabric acid a new compound isolated from *Eupatorium glabratum* H.B.K.; *Rev. Latinoamer. Quim.* **9**; 71-75.
- Guilherme, S.M.J.; B.Z.M. das Gracias; A.A.E. Helena; L.S.M. Helio; R.L.A. Iran; and J. Domingos; 2002; Essential oils composition of *Eupatorium* species growing wild in the Amazon; *Biochem. Syst. Ecol.* **30**; 1071-1077.
- Hernández, J.D.; L.U. Román; M.J. Rodríguez; J. Espiñeira; and P. Joseph-Nathan; 1986; Areolal, a thymol from *Piptotrix areolare*; *Phytochemistry* **25**; 1743-1744.
- Katinas, L.; D.G. Gutierrez ; M.A. Grossi ; and J.V. Crisci; 2007; Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina; *Bol. Soc. Argent. Bot.* **42**; 113-129.
- Kiplimo, J.; N.A. Koorbanally; and H. Chenia; 2011; Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity; *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **5**; 1150-1156.
- Magaña, A.M.A.; C.L.Ma. Gama; and M.R. Mariaca; 2010; El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajunca, Tabasco, México; *Polibotánica* **29**; 213-262.
- Mihailovic, V.; N. Vukovic; N. Niciforovic; S. Solujic; M. Mladenovic; P. Maskovic; and M. Stankovic; 2011; Studies on the antimicrobial activity and chemical of the

- essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L; *J. Med. Plant Res.* **5**; 1164-1174.
- Navarro, G.V.M.; A. González; M. Fuentes, M. Aviles; M.Y. Ríos; G. Zepeda; and M.G. Rojas; 2003; Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants; *J. Ethnopharmacol.* **87**; 85-88.
- Patil, R.P.; M. Nimbalkar; U. Jadhav; V. Dawkar; and S. Govindwar; 2010; Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L; *Journal Sci. Food Agric.* **90**; 608-614.
- Ramirez Lopez, C.B.; E. Garcia Sanchez; A. Leon Hernandez; D. Raya Gonzalez; R.E. del Rio; A. Flores Garcia; and M.M. Martinez Pacheco; 2010; Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline* **3**; 682-690.
- RHOVE, 2009. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, de Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaria de Salud. www.rhove.gob.mx
- Rzedowski J. and G.Rzedowski; 2005; Tribu Eupatorieae. En Flora fanerogámica del Valle de México, 2nd ed., Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 781-800.
- Sasikumar, J.M.; A.A.D. Pichai; and A. Doss; 2005; Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves; *Fitoterapia* **70**; 240-243.
- Satoh, A.; H. Utamura; M. Ishizuka; N. Endo; M. Tsuji; and H. Nishimura; 1996; Antimicrobial benzopyrans from the receptacle of sunflower; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**; 664-665.

Table 1. Antibiotic resistance of clinical isolates bacterial pathogens.

| Bacteria | Antibacterial resistance | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|-----|
| | AM | CF | CL | NET | CB | SXT | NF | CRO | CTX | PE | CAZ | GE | DC | TE | AK | CXM |
| <i>Citrobacter freundii</i> | R | R | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | R | | | R | R | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | R | R | R | | R | R | | | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | R | R | | | R | | | | | | | | | | | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | | R | | | R | | R | | | | | | | | | |
| <i>P. vulgaris</i> | | R | | | | | R | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | | R | | | | R |
| <i>Salmonella</i> sp | R | R | | R | | R | | R | R | | | | | | | |
| <i>Shigella sonnei</i> | R | R | | R | | R | | R | R | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | R | | | | | R | | | | R | R | R | R | | | |
| <i>S. epidermidis</i> | R | | | | | | | | | R | R | | | | | |
| <i>S. saprophyticus</i> | R | | | | | | | | R | R | R | | R | R | | R |

R = Resistance; Ampicillin 10 µg (AM); Amikacin 30 µg (AK); Cephalothin 30 µg (CF); Chloramphenicol 30 µg (CL); Netilmicin 30 µg (NET); Carbenicillin 100 µg (CB); Trimeth/sulfa 1.25/23.75 µg (SXT); Nitrofurantoin (NF); Ceftriaxone 30 µg (CRO); Cefotaxime 30 µg (CTX); Penicillin 10 unit (PE); Ceftazidime 30 µg (CAZ); Gentamicin 10 µg (GE); Dicloxacillin (DC); Tetracycline 30 µg (TE); Cefuroxime 30 µg (CXM).

Table 2. Antibacterial activities of hexane extract and dichloromethane extract of leaves from *E. pulchellum*
Accession number of American Tissue Cell Culture; Wild isolated = wi

| Extract | MIC (mg/mL) | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|------|----------------------|------|----------------------|------|------------------|------|-----------------------|------|
| | <i>E. coli</i> | | <i>K. pneumoniae</i> | | <i>P. aeruginosa</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>S. epidermidis</i> | |
| | 25922 | wi | 10031 | wi | 25619 | wi | 25923 | wi | 12228 | wi |
| Hexane | > 12 | > 12 | > 12 | > 12 | 12 | > 12 | 1.2 | > 12 | 0.12 | > 12 |
| Dichlorometane | > 12 | > 12 | > 12 | > 12 | 1.2 | > 12 | 1.2 | > 12 | 1.2 | > 12 |
| Cefotaxime | Nd | | 0.0125 | | Nd | | 0.125 | | Nd | |

Nd = No determined

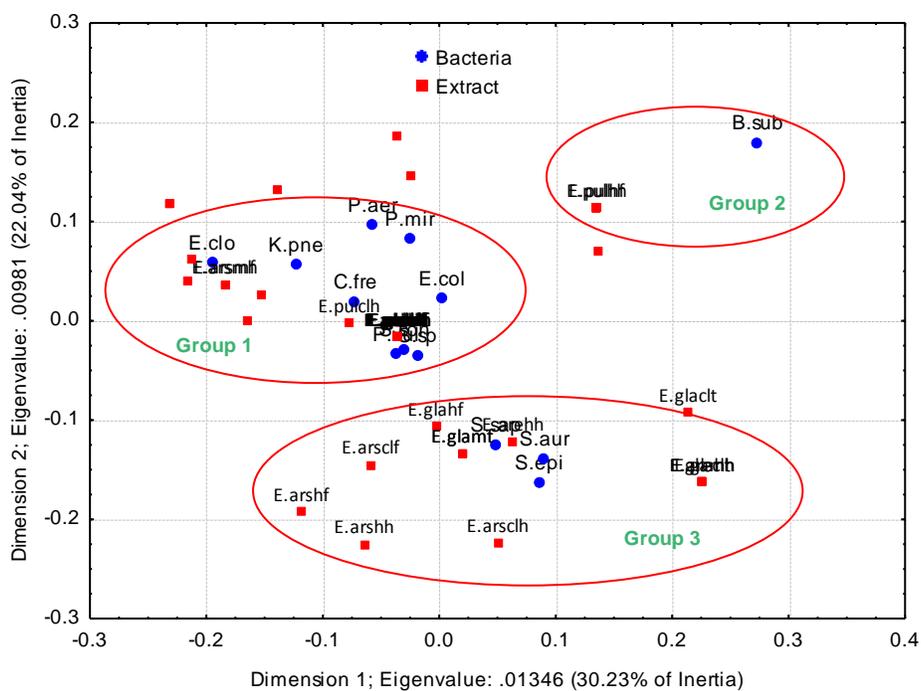


Figure 1. Selection of the best antibacterial extract from medicinal *Eupatorium* spp. Group 1 = extracts whit inhibitory activity against Gram-negative bacteria, Group 2 = extracts whit inhibitory activity against *B. subtilis*, Group 3 = extracts whit inhibitory activity against *Staphylococcus* spp.

6.2.2 Antimicrobial activity of *Eupatorium* species native to Michoacan, Mexico (EN PREPARACIÓN)

Edgar García-Sánchez, Cesar B. Ramírez-López, Rosa E. Martínez-Muñoz, Alberto Flores García, Rosa E. Del Río, Mauro M. Martínez-Pacheco

*Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B-3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán 58030, Mexico.
e-mail: mpacheco@umich.mx*

ABSTRACT

The inappropriate and excessive use of antimicrobial agents in medicine and agriculture has resulted in the frequent emergence of resistant strains. The Antibiotic resistance problem produces adverse effects in human and environment. The fungal and bacterial diseases are the most significant cause of serious diseases in humans and economic importance of crops is due to resistant strains. *Eupatorium* species native to the Michoacan are used in Mexican traditional medicine, this historical experiences with plant as therapeutic tools lead to phytochemical investigation for found antimicrobial molecules. The antimicrobial activity of ninety organic extracts from ten *Eupatorium* species and some major isolated compounds was evaluated against *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Colletotrichum acutatum* by disk diffusion method. Hexane extracts showed better antimicrobial activity than dichloromethane and methanol extracts against microorganisms tested. The active extracts against *S. aureus* isolated exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.06 to 1 mg/ μ L. The main components are pentacyclic triterpenes and benzopyran compounds, which had been reported their antibacterial and antifungal activities. Benzopyran compounds isolated from *Eupatorium* species showed moderate antifungal activity.

Resumen

El uso inapropiado y excesivo de agentes antimicrobianos en la medicina y agricultura contribuye al surgimiento de cepas resistentes. El problema de resistencia a los antibióticos produce efectos adversos en humanos y el ambiente. Las infecciones fúngicas y bacterianas son la causa más significativa de enfermedades en humanos y cultivos económicamente importantes debido a cepas resistentes. Especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán son usadas en la medicina tradicional mexicana, esta experiencia histórica de plantas como herramientas terapéuticas conduce a una investigación fitoquímica para encontrar moléculas antimicrobianas. La actividad antimicrobiana de 90 extractos orgánicos de 10 especies de *Eupatorium* y algunos componentes mayoritarios fue evaluada contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Colletotrichum acutatum* por el método de difusión en disco. Los extractos hexánicos exhibieron mejor actividad antimicrobiana más que los clorometilénicos y metanólicos contra los microorganismos ensayados. Los extractos activos contra *S. aureus* presentaron una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.06 a 1 mg/μL. Los componentes mayoritarios son triterpenos pentacíclicos y benzopiranos, de los cuales se ha reportado su actividad antibacteriana y antifúngica. Los compuestos bezopiranos aislados de las especies de *Eupatorium* muestran moderada actividad antifúngica.

1. Introducción

El uso excesivo e inapropiado de antimicrobianos en la medicina y agricultura es uno de los factores de mayor contribución en la selección de cepas microbianas resistentes a los antimicrobianos convencionales. Las enfermedades de etiología bacteriana y fúngica generan efectos adversos en humanos y cultivos agrícolas económicamente importantes. En México los principales microorganismos resistentes patógenos de humano son *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Zurita *et al.*, 2005; Díaz Ramos, 2006; Pérez-González *et al.*, 2007). El principal agente fúngico fitopatógeno de cultivos como aguacate y cítricos es *Colletotrichum acutatum* (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005). El cultivo de aguacate en Michoacán tiene un impacto económico y social relevante, debido

a que Michoacán es el primer productor a nivel mundial de éste cultivo. El valor de producción de en el año 2012 fue de 16 608 146 000 pesos (SAGARPA, 2012). En los escenarios clínico y agrícola el surgimiento de cepas de microorganismos resistentes a los antimicrobianos convencionales prevalece, y Michoacán no esta exento.

La prevalencia de *C. albicans* en los últimos 4 años causó 54% de los casos, así como también la incidencia de la infecciones causadas por *C. glabrata* con un 22%, además de un 14% de cepas fúngicas resistentes al fluconazol (Pfaller y Diekema, 2007). Algunos factores predisponentes importantes es el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, el incremento de pacientes inmunocomprometidos (pacientes con Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, cáncer y pacientes transplantados) (Beck-Sague y Jarvis, 1993). Un aspecto que hace más complicado el problema de las infecciones fúngicas es las pocas alternativas terapéuticas, en los 1970's existían pocos compuestos, incluyendo los polienos (nistatina y anfotericina B) y la flucitocina. Aunque el desarrollo de los azoles iniciaba su uso era restringido. Además los efectos adversos como la nefrotoxicidad de la anfotericina B y la resistencia fúngica a los azoles. Desde el año 2000 a la fecha tres drogas antifúngicas derivadas de origen natural han sido aprobadas para uso humano, la caspofungina, micafungina y anidulafungina (Newman y Cragg, 2010).

Adicionalmente, la prevalencia de cepas de *C. acutatum* resistentes a los fungicidas como benzimidazoles, carbamatos y triacetato de iminotadina (Peres *et al.*, 2004), provoca un impacto económico devastado debido a la pérdida de más del 50% de la producción de algunos cultivos. Por ello es importante encontrar nuevas moléculas de origen vegetal para controlar a los patógenos antes mencionados. Una estrategia es la exploración en los recursos naturales vegetales que cuenta Michoacán, como el género *Eupatorium*. La riqueza y biodiversidad del género en Michoacán se demuestra con las 70 especies nativas en el Estado (Ramirez *et al.*, 2010). Al menos cuatro especies con uso etnofarmacológico en Michoacán (García-Sánchez *et al.*, en revisión). En este trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de 90 extractos orgánicos de 10 especies de *Eupatorium* y algunos componentes mayoritarios contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Colletotrichum acutatum* por el método de difusión en disco.

2. Resultados

Los noventa extractos orgánicos de diez especies de *Eupatorium* fueron evaluados para determinar su efecto antibacteriano sobre dos aislados bacterianos *Staphylococcus aureus* (S. a) y *Klebsiella pneumoniae* (K. p). Se observó que los extractos fueron más efectivos para inhibir el crecimiento de *S. aureus* con un halo de inhibición promedio de 3.4 mm, el promedio del halo de inhibición de los extractos sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* fue de 0.06 mm. Sin embargo, los extractos hexánicos de flor y tallo de *E. mairitianum*, *E. lasioneuron*, *E. pycnocephalum*, así como el extracto hexánico de flor de *E. adenophorum* fueron los extractos que afectaron el crecimiento de *K. pneumoniae*. El efecto antibacteriano de los extractos por especie vegetal en orden de importancia fueron los extractos de *E. areolare* con un halo de inhibición promedio de 3.6 mm, *E. lasioneuron* con 2.8 mm, *E. mairitianum* con 2.2 mm, *E. adenophorum* 2.1 mm, *E. arsenei* 2.2 mm, *E. glabratum* 1.5 mm, *E. dolichobasis* 1.0 mm, *E. pycnocephalum* 0.7 mm, *E. petiolare* 0.6 mm y *E. pichinchense* 0.4 mm. El efecto antibacteriano de los extractos orgánicos en orden de importancia por órgano vegetal es como sigue, los extractos de tallo fueron los que presentaron mejor actividad antibacteriana con un halo de inhibición promedio de 2.7 mm, los extractos de flor con 1.4 mm de halo de inhibición y por último los de hoja con un promedio de 1.0 mm. El efecto antibacteriano por tipo de disolvente en orden de importancia fueron los extractos hexánicos con un halo de inhibición promedio de 3.5 mm, los extractos cloruro metilénicos con 1.2 mm y los extractos metanólicos con un halo de inhibición promedio de 0.5 mm. Se observa entonces que los extractos hexánicos de tallo y flor de las diez especies de *Eupatorium* son los mejores para afectar el crecimiento bacteriano (Figuras 1 y 2). El efecto observado en *Klebsiella pneumoniae* fue en todos los casos bacteriostático, mientras que en *Staphylococcus aureus* un efecto bactericida fue observado. Los extractos más efectivos fueron los extractos hexánicos al presentar menores concentraciones inhibitorias. El extracto hexánico de hojas de *E. areolare* presentó una CMI de 0.0625 mg/μl sobre *S. aureus*, el resto de las concentraciones mínimas inhibitorias están en el intervalo de 0.125-0.25 mg/μL (Tabla 1). El mayor efecto fungicida sobre *C. albicans* fue observado por los extractos de *E. lasioneuron*, con un halo de inhibición promedio de 6.33 mm, las especies *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. dolichobasis*, *E. mairitianum*, *E. petiolare* y *E. pycnocephalum* presentaron un halo de inhibición de 3.07-

3.81 mm, *E. glabratum* presentó un efecto fungicida menor con un halo de 2.1 mm, las especies de *E. adenophorum* y *E. pichinchense* no presentaron actividad contra este microorganismo. El efecto general de los noventa extractos ensayados se observó que los extractos hexánicos fueron los mejores con un halo de inhibición de 6.05 mm, seguido de los cloruro metilénicos con un halo de inhibición de 2.35 mm, los extractos metanólicos fueron los menos activos. El efecto fungicida por órgano vegetal se observó que los extractos de tallo fueron los que presentaron mayor actividad fungicida con un halo promedio de 5.14 mm, seguido de los de flor con un halo promedio de inhibición de 2.02 y por último los de hoja con 1.23 mm de halo de inhibición (Figura 3 y 4). El efecto observado sobre el crecimiento de *C. acutatum* fue bacteriostático. El criterio para determinar la efectividad de los extractos fue en función del estudio *in vitro* de sensibilidad a los fungicidas de uso comercial que se utilizan para controlar a *C. acutatum*, en donde se observó que la solución más concentrada de Tecto 60 (Tiabendazol) proporcionó un Índice de Crecimiento (IC) de 0.7, en consecuencia, se seleccionaron los extractos con un IC menor o igual a 0.7. El efecto antifúngico promedio representado por el IC, observado por especie vegetal en orden de importancia fue *E. adenophorum* (0.60), *E. glabratum* (0.62), *E. lasioneuron* (0.67), *E. pichinchense* (0.70), *E. arsenei* (0.71), *E. mairitianum* (0.77), *E. areolare* (0.78), *E. dolichobasis* (0.79), *E. petiolare* (0.83), *E. pycnocephalum* (0.90). El efecto antifúngico por órgano vegetal se observó que los extractos de hoja y flor son los mejores al presentar un IC de 0.72, le siguen los de tallos con 0.77. El efecto antifúngico por tipo de disolvente en orden de importancia son los hexánicos (0.53), cloruro metilénicos (0.76) y metanólicos (0.93) (Figura 5 y 6).

Los extractos con mejor actividad antifúngica sobre *C. acutatum* fueron los hexánicos de flores y de hojas de las especies de *Eupatorium* estudiadas. Se decidió iniciar el estudio fitoquímico de los extractos de flores.

El análisis fitoquímico preliminar por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Hidrógeno de los extractos hexánicos totales de tallos de las especies de *Eupatorium* mostró en su mayoría señales características de compuestos tipo triterpeno. Las señales observadas fueron entre δ 5.36 y 5.12; 4.69 y 4.45 atribuibles a átomos de hidrógeno de tipo vinílico. Además de señales observadas entre δ 2.0 y 0.8 señales comunes de terpenos. Las

señales identificadas en los extractos hexánicos de tallos de con mejor actividad antibacteriana y antifúngica es como sigue: El espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de tallos muestra señales en la región alifática entre δ 2.0 y 0.8, también señales entre δ 4.7 y 4.5, por último de δ 5.36 y 5.12. Lo que indica que los principales componentes del extracto son de tipo triterpeno, como lupeol, stigmasterol y sitosterol. De igual forma, el extracto hexánico de tallos de *E. lasioneuron* mostró señales entre δ 2.0 y 0.8; 4.8 y 4.45, así como también entre δ 6.0 y 5.0, además de una señal simple en δ 2.07 característica de un grupo acetilo. Lo que indica que contiene triterpenos acetilados. Señales similares fueron observadas en el extracto de tallos de *E. mairetianum*. Sin embargo, en los extractos hexánicos de tallos de *E. adenophorum* y *E. arsenei* se observaron señales de hidrógenos aromáticos entre δ 7.0 y 6.5, además de una señal simple en δ 3.7 típica de un grupo metoxilo, así como algunas señales en la región alifática, características de compuestos de tipo benzopiranos metoxilados (Tabla 2).

El mejor efecto antimicrobiano sobre los patógenos ensayados fue observado en los extractos hexánicos de tallos y flores de las especies de *Eupatorium*. Siguiendo la estrategia biodirigida se seleccionaron en un primer evento los extractos hexánicos de tallos de las especies de *E. lasioneuron* y *E. mairetianum*, así como los extractos hexánicos de flores de *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. adenophorum* y *E. pycnocephalum* para su separación por cromatografía en columna. Las fracciones cromatográficas del extracto hexánico de tallos de *E. lasioneuron* mostraron mezclas complejas, sin embargo se lograron aislar dos fracciones, la F-36 compuesta de una mezcla de triterpenos, como lupeol y amirina; la F-46 de la cual se aisló timol. Del extracto de tallos de *E. mairetianum* se logró la obtención de la fracción 20 que contenía una mezcla de lupeol y amirina, de las fracciones 27 y 29 del extracto hexánico de flores de *E. pycnocephalum* se purificó acetato de lupeol (Tabla 3). Así como del extracto hexánico de flores de *E. adenophorum* se purificó el cromeno enecalina, de igual forma del extracto hexánico de flores de *E. arsenei* se purificaron los cromenos: enecalina, desmetilencecalina, ripariocromeno A, metilripariocromeno A y hidroxitrementona, Además de *E. pichinchense* los compuestos estigmasterol y enecalinol fueron purificados (Tabla 4).

Los componentes mayoritarios presentes en los extractos hexánicos son de naturaleza triterpénica principalmente, como estigmasterol, lupeol y sitosterol. Sin embargo los extractos de *E. adenophorum* y *E. arsenei* presentan componentes de tipo benzopirano.

3. Discusión

Se ha reportado que triterpenos presentan actividad antibacteriana, la investigación fitoquímica de las partes aéreas de *Lychnophora pinaster* Mart. generó el aislamiento de diez compuestos triterpénicos, como α -amirina, que presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Abreu *et al.*, 2011). Además de *Vernonia auriculifera* se aislaron ocho componentes triterpénicos, los cuales exhibieron moderada actividad antibacteriana, la mezcla de α y β -amirina presentó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *S. aureus* de 0.25 mg/mL (Kiplimo *et al.*, 2011). Así también, del extracto hexánico de *Moringa pregrina* Forssk se aislaron los triterpenos, acetato de lupeol, α -amirina, β -amirina, y β -sitosterol, exhibieron actividad antibacteriana. El β -sitosterol presentó mayor actividad sobre la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* (Abdel-Rahman *et al.*, 2010).

Con los datos anteriormente mencionados se observa que los componentes de tipo triterpeno presentan propiedades antibacterianas. Se infiere que los componentes triterpénicos identificados en los extractos hexánicos de la mayoría de las especies de *Eupatorium* son los responsables de la actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

El timol purificado del extracto hexánico de tallo de *E. lasioneuron* uno de los que presentó mayor actividad antibacteriana ha sido ampliamente reportado y se le atribuyen actividades antimicrobianas. El timol es el componente mayoritario de aceites esenciales de varias especies vegetales, un ejemplo representativo son las especies de *Thymus* con más del 50% de abundancia, así como también se le atribuyen actividades antibacterianas (Ghasemi *et al.*, 2011; Koba *et al.*, 2011). Las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán son una fuente importante de metabolitos secundarios antibacterianos, presentes en distintas especies vegetales con uso en la medicina tradicional como *Lychnophora*, *Moringa*, *Thymus* y *Vernonia*, por citar algunos.

El estudio fitoquímico de los extractos hexánicos de flores de *Eupatorium* spp dio como resultado el aislamiento y purificación de los siguientes compuestos: enecalina (*E. adenophorum* y *E. arsenei*), desmetilencecalina, ripariocromeno A, metilripariocromeno A y hidroxitrementona (*E. arsenei*), estigmasterol, enecalinol (*E. pichinchense*), ácido 3-oxo- γ -cóstico (*E. glabratum*) (Tabla 4). Los componentes purificados de extractos con actividad entibacteriana han sido reportados en géneros distinto con uso en la medicina tradicional (Tabla 5).

Seis componentes aislados de los extractos hexánicos de flores de *Eupatorium* spp fueron ensayados para determinar su actividad antifúngica sobre el crecimiento de *Colletotrichum acutatum* a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se observó que el componente más activo fue el cromeno desmetilencecalina al segundo, tercer y cuarto día, al presentar un Índice de Crecimiento (IC) promedio de 0.72, seguido de la enecalina, ripariocromeno A, metilripariocromeno A, enecalinol y ácido 3-oxo-costico con IC de 0.84, 0.82, 0.92, 0.95 y 0.97 respectivamente (Figura 7).

Se ha reportado que triterpenos presentan actividad antifúngica de *Moringa pregrina* Forssk se aislaron los triterpenos, acetato de lupeol, α -amirina, β -amirina, y β -sitosterol, exhibieron actividad antifúngica. La CMI antifúngica sobre dermatofitos del β -sitosterol, fue ligeramente mayor que la observada con fluconazol (Abdel-Rahman *et al.*, 2010). El palmitato de β -amirina aislado de *Diospyros blancoi* presentó actividad antifúngica sobre *Candida albicans* (Ragasa *et al.*, 2009).

Con los datos anteriormente mencionados se observa que los componentes de tipo triterpeno presentan propiedades antifúngicas. Se infiere que los componentes triterpénicos identificados en los extractos hexánicos de la mayoría de las especies de *Eupatorium* son los responsables de la actividad antifúngica sobre *C. albicans*.

El timol purificado del extracto hexánico de tallo de *E. lasioneuron* uno de los que presentó mayor actividad antifúngica sobre el hongo dimórfico *C. albicans* ha sido ampliamente reportado y se le atribuyen actividades antimicrobianas.

El timol se ha identificado como componente mayoritario en aceites esenciales de especies del género *Satureja*, los cuales presentan actividad antifúngica sobre el

crecimiento de *Candida albicans* (Piras *et al.*, 2011), además el timol ha demostrado sinergia con anfotericina B, fluconazol, e itraconazol sobre el crecimiento de éste hongo dimórfico (Faria *et al.*, 2011).

Los componentes químicos de baja polaridad presentes en los extractos hexánicos de hoja y flor de las especies vegetales de *Eupatorium* son los que presentan mayor actividad, lo que sugiere que los componentes no polares de *E. adenophorum*, *E. glabratum*, *E. lasioneuron*, *E. arsenei* y *E. pichinchense* son más activos.

Se ha reportado la actividad antifúngica sobre *Trichophyton mentagrophytes* de desmetilencecalina y enecalina con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 58 y 29 µg/mL (Castañeda *et al.*, 1996; Aguilar-Guadarrama *et al.*, 2009). De la raíz de *Eupatorium riparium* se aisló metilripariocromeno A, presentó actividad antifúngica sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporoides* con una CMI de 125 µg/mL (Bandara *et al.*, 1992). El componente desmetilencecalina presentó actividad antifúngica sobre *Pyricularia oryzae* con una CMI de 50 µg/disco (Sato *et al.*, 1996). El compuesto enecalinol aislado de *Ageratina pichinchensis* presentó actividad antifúngica sobre patógenos de humano con CMI de 12.5-200 µg/mL (Rios *et al.*, 2003).

De *E. aschenbornianum* se han aislado dos benzofuranos activos contra *Trychophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Rios *et al.*, 2003), el aceite esencial de *E. laciniatum* en donde su componente mayoritario es metiltimol (23%), presentó actividad moderada contra *T. mentagrophytes* (Inouye *et al.*, 2006).

El aceite esencial de *E. cannabinum* protege al fruto de mango del ataque de los hongos fitopatógenos, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*, inhibiendo el crecimiento de estos hongos hasta un 100% (Dubey *et al.*, 2007). El timol y carvacrol aislados de *Ageratina ibaguensis* son las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana (Sanabria-Galindo *et al.*, 1999). *E. arnottianum* conocida como “clavel” o “uoué” es un subarbusto usado en medicina tradicional Argentina contra dolor de estómago, antiinflamatorio. Cimenol, α - pineno, acetato de timol y β - cariofileno han sido identificados como los principales componentes del aceite esencial (Zygodlo *et al.*, 1995).

Actividades antimicrobianas, antivirales y antinociceptivas (contra el dolor) han sido bien reportadas en diferentes extractos de esta planta (Clavin *et al.*, 2000).

E. buniifolium es usado contra problemas reumáticos (Rios *et al.*, 1993) y como desinfectante (Rojas- Acosta, 1905) especies comúnmente conocidas como “romerillo”, “romerillo colorado” o “chilca” muestran la presencia de flavonoides y derivados del ácido hidroxicinámico (Muschiatti *et al.*, 1990), actividades antioxidantes (Paya *et al.*, 1996) y antivirales (García *et al.*, 1990), se han identificado al menos tres compuestos con actividad antiinflamatoria (Muschiatti *et al.*, 2001), es considerada una planta medicinal en la región central y noreste de Argentina. Las partes aéreas son usadas como colorante, propiedades hepatoprotectoras y desinfectantes.

Los componentes del aceite esencial de *Ageratum conyzoides* son cromenos, como enecalina. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana contra 15 cepas bacterianas tipificadas, las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron las que presentaron mayor sensibilidad a los extractos de *A. conyzoides* con halos de inhibición de 19-30 mm (Patil *et al.*, 2010). Además, los extractos orgánicos de *Helianthus annuus* L. ricos en compuestos del tipo benzopirano mostraron actividad antibacteriana y antifúngica, *S. aureus* fue sensible a los extractos (120 µg/disco). Desmetoxiencecalina y desmetilencecalina fueron aislados de los extractos de *H. annuus* L. (Sato *et al.*, 1996).

El compuesto desmetilencecalina (Eupatoriocromeno) es uno de los componentes mayoritarios (3.47%) en el aceite esencial de *Gentiana asclepiadea* L. el cual presentó actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, siendo más sensible el primer microorganismo bacteriano (Mihailovic *et al.*, 2011). Así mismo, en el aceite esencial de *Hofmeisteria schaffneri*, en donde uno de los componentes es la desmetilencecalina presentó actividad contra bacterias Gram positivas entre ellas *S. aureus* (Pérez-Vásquez *et al.*, 2011).

El ácido 3-oxo- γ -cóstico ha sido aislado de *Varthemia iphionoides*, se evaluó su actividad antibacteriana contra cuatro bacterias Gram positivas y dos Gram negativas, las Concentraciones Mínimas Inhibitorias fueron en el intervalo de 250-500 µg/mL.

Escherichia coli fue el microorganismo más sensible al presentar una CMI de 250 µg/mL y *Staphylococcus aureus* de 500 µg/mL (Al-Dabbas *et al.*, 2005).

Los extractos hexánicos de tallo y flor son los mejores para inhibir el crecimiento bacteriano, por lo que inferimos que componentes de baja polaridad presentes en los órganos flor y tallo son los más activos para inhibir el crecimiento bacteriano, además el comportamiento diferencial observado por especie vegetal nos pone de manifiesto que pudieran contener diferentes metabolitos secundarios o diferente concentración de los metabolitos secundarios activos. Con respecto al efecto diferencial observado por bacteria, nos sugiere que las bacterias Gram positivas son más sensibles, probablemente por que presentan una pared celular menos compleja que las bacterias Gram negativas, el presentar una barrera biológica menos, una membrana externa.

Esta observación es comparable con lo que reporta (Gupta *et al.*, 2002), quienes de hojas de *E. ayapana*, hicieron extracciones con metanol y éter de petróleo observaron que los extractos con éter de petróleo presentaron un mayor espectro antibacteriano con concentraciones mínimas inhibitorias de 250 a 1000 µg/mL, con un efecto diferencial, únicamente afectando el crecimiento de bacterias Gram positivas.

(Sasikumar *et al.*, 2005), determinaron la actividad antibacteriana de las hojas de *E. glandulosum*, los extractos no polares contienen compuestos de tipo terpénico e inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, *B. subtilis*, *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, así como también de bacterias Gram negativas, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, a concentraciones mínimas inhibitorias de 1 mg/mL.

4. Conclusión

Las especies de *Eupatorium* endémicas de Michoacán contienen metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos de importancia clínica y agrícola. Los extractos no polares exhiben mejor efecto inhibitorio, los principales constituyentes son compuestos triterpénicos y benzopiranos.

5. Material y Métodos

5.1 General

Los compuestos de plantas fueron purificados por cromatografía en columna usando gel de sílice (230-400 mesh) MERCK como fase estacionaria y mezclas de hexano y acetato de etilo en polaridad ascendente como fase móvil, las fracciones fueron monitoreadas por TLC.

Los espectros de ^1H RMN fueron obtenidos a 300 MHz en un espectrómetro Varian Mercury 300 usando CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos son reportados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. La multiplicidad de las señales son expresadas como: s: singulete, d: doblete, t: triplete. Los espectros de ^{13}C RNM fueron obtenidos a 75.4 MHz en el mismo equipo.

5.2 Material vegetal

E. adenophorum Spreng (No. colector 173), *E. aff. lasioneuron* Hook. & Arn. (123), *E. areolare* DC.(No. voucher 04135), *E. arsenei* Rob. (04143), *E. dolichobasis* McVaugh (147), *E. glabratum* H.B.K.(04204), *E. mairetianum* DC.(146), *E. petiolare* Moc (151), *E. pichinchense* H.B.K.(128), *E. pycnocephalum* Less (170).

E. adenophorum, *E. dolichobasis*, *E. glabratum*, *E. mairetianum*, fueron colectadas en Marzo-Abril del 2010, Carretera Pátzcuaro-Tacámbaro, en las siguientes coordenadas N $19^\circ 17.517'$, W $101^\circ 27.876'$, 2143 msnm, N $19^\circ 29.027'$, W $101^\circ 35.694'$, 2357 msnm, N $19^\circ 40.898'$, W $100^\circ 54.024'$, 2534 msnm y N $19^\circ 24.497'$, W $101^\circ 35.009'$, 2394 msnm, respectivamente.

E. aff. lasioneuron Hook. & Arn. fue colectada el 27 de febrero del 2010, Carretera Morelia-Zacapu, en las coordenadas N $19^\circ 42.229'$, W $101^\circ 36.001'$, 2238 msnm.

E. areolare y *E. arsenei* fueron colectadas el 16 de octubre del 2010, Carretera México-Morelia, vía mil cumbres, en las coordenadas N $19^\circ 40.171'$, W $100^\circ 54.445'$, 2480 msnm y N $19^\circ 39.414'$, W $100^\circ 59.719'$, 2124 msnm, respectivamente.

E. petiolare fue colectada en la Ciudad de Pátzcuaro, Michocán, el 13 de Marzo del 2010, en las coordenadas N 19° 30.511', W 101° 35.578', 2243 msnm.

E. pichinchense y *E. pycnocephalum* fueron colectadas en la Comunidad de San Juan de Viña, el 27 de Marzo del 2010, en las coordenadas 19° 20.817', W 101° 28.915', 2335 msnm y N 19° 20.149', W 101° 28.663', 2268 msnm, respectivamente.

Cada uno de los ejemplares vegetales fue depositado en el Herbario del Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México.

5.3 Extracción de compuestos

Hojas (105 g), flores (285 g), tallos (310 g) de *E. arsenei*; hojas (225 g), flores (90 g), tallos (625 g) de *E. glabratum*; hojas (200 g), flores (100 g), tallos (440 g) de *E. pichinchense*. Los órganos de cada especie vegetal fueron separados y secados a la sombra, posteriormente fueron macerados con hexano a temperatura ambiente (3 x 1.5 L).

Encecalina. (2.3% en flores de *E. arsenei*); RMN ^1H δ 7.54 (1H, s, H-5), 6.38 (1H, s, H-8), 6.30 y 5.52 (1H, *dd*, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 3.87 (3H, s, OMe-7), 2.54 (3H, s, Ac-6), 1.44 (6H, s, Me-9, Me-10). RMN ^{13}C δ 77.6 (C-2), 129.1 (C-3), 121.3 (C-4), 114.0 (C-4a) 128.4 (C-5), 120.6 (C-6), 161.1 (C-7), 99.6 (C-8), 158.4 (C-8a), 28.4 (C-9, C-10), 197.6 (C-11), 31.9 (C-12).

Desmetilencecalina. (1.1% en flores de *E. arsenei*); RMN ^1H δ 12.71 (1H, s, Ar-OH), 7.31 (1H, s, H-5), 6.31 (1H, s, H-8), 6.27 y 5.57 (1H, *dd*, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 2.55 (3H, s, Ac-6), 1.45 (6H, s, Me-9, Me-10). RMN ^{13}C δ 77.8 (C-2), 128.9 (C-3), 121.0 (C-4), 113.5 (C-4a), 128.6 (C-5), 113.9 (C-6), 165.1 (C-7), 104.5 (C-8), 160.4 (C-8a), 28.5 (C-9,10), 202.3 (C-11), 26.2 (C-12).

Metilripariocromeno A. (3.0% en flores de *E. arsenei*); RMN ^1H δ 7.23 (1H, s, H-5), 6.57 y 5.70 (1H, *dd*, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 3.87 (3H, s, OMe-7), 3.77 (3H, s, OMe-8), 2.64 (3H, s, Ac-6), 1.50 (6H, s, Me-9, Me-10). RMN ^{13}C δ 77.4 (C-2), 130.5 (C-3), 123.4 (C-4), 116.9 (C-4a), 115.4 (C-5), 123.4 (C-6), 151.2 (C-7), 147.2 (C-8), 145.0 (C-8a), 27.9 (C-9, 10), 197.8 (C-11), 30.5 (C-12), 61.5 y 60.9 (OMe-7, 8).

Ripariocromeno A. (1.5% en flores de *E. arsenei*); RMN ^1H δ 12.80 (1H, s, Ar-OH), 7.04 (1H, s, H-5), 6.71 y 5.61 (1H, dd, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 3.85 (3H, s, OMe-8), 2.55 (3H, s, Ac-6), 1.51 (6H, s, Me-9, Me-10). RMN ^{13}C δ 76.6 (C-2), 128.4 (C-3), 116.0 (C-4), 113.4 (C-5), 111.9 (C-6), 141.2 (C-7), 150.4 (C-8), 155.0 (C-9), 110.33 (C-10), 202.3 (C-11), 26.3 (C-12), 28.2 (C-13), 57.2 (C-14).

Ácido 3-oxo-cóstico. (1.2% en flores de *E. glabratum*); RMN ^1H δ 6.42 y 5.76 (1H, s, H-13, H-13'), 2.87 (1H, d, $J = 14.3$, H-6), 2.59-2.38 (3H, m, H-2, H-7), 2.05 (1H, t, $J = 14.3$, H-6), 1.85-1.65 (4H, m, H-1, H-9), 1.78 (3H, s, Me-14), 1.51 (1H, td, H-8), 1.25 (3H, s, Me-15). RMN ^{13}C δ 37.3 (C-1), 33.7 (C-2), 199.3 (C-3), 129.2 (C-4), 161.2 (C-5), 33.3 (C-6), 39.6 (C-7), 27.1 (C-8), 41.7 (C-9), 35.8 (C-10), 143.8 (C-11), 171.7 (C-12), 125.8 (C-13), 10.9 (C-14), 22.4 (C-15).

Encecalinol. (4.1% en flores de *E. pichinchense*); RMN ^1H δ 6.94 (1H, s, H-5), 6.36 (1H, s, H-8), 6.27 y 5.46 (1H, dd, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 5.01 y 1.46 (1H, dd, $J = 10$ Hz, H-3, H-4), 3.87 (3H, s, OMe-7), 1.45 (6H, s, Me-9, Me-10). RMN ^{13}C δ 77.5 (C-2), 129.1 (C-3), 121.9 (C-4), 114.0 (C-4a), 128.4 (C-5), 120.6 (C-6), 161.1 (C-7), 99.6 (C-8), 158.4 (C-8a), 28.4 (C-9, C-10), 197.6 (C-11), 31.9 (C-12)

5.4 Ensayos antimicrobianos

Noventa extractos orgánicos de maceraciones hexánicas, clorometanólicas y metanólicas de hojas, flores y tallos de diez especies de *Eupatorium* fueron ensayados para determinar su actividad antifúngica sobre un patógeno de importancia clínica *Candida albicans* y un patógeno de importancia agrícola *Colletotrichum acutatum*. Alícuotas de (6 μL) de soluciones etanólicas de cada extracto (1 mg/ μL) y compuestos puros (0.02 mg/ μL) fueron ensayados por el método de difusión en agar. Se determinó el halo inhibición a las 18 h de incubación a 37 °C, para el caso de *C. albicans*. Para el microorganismo filamentoso *C. acutum* se determinó el Índice de Crecimiento (IC) al segundo, tercer y cuarto día. El análisis de los datos se realizó con el software Statistic 7.0, la significancia de los datos experimentales por una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

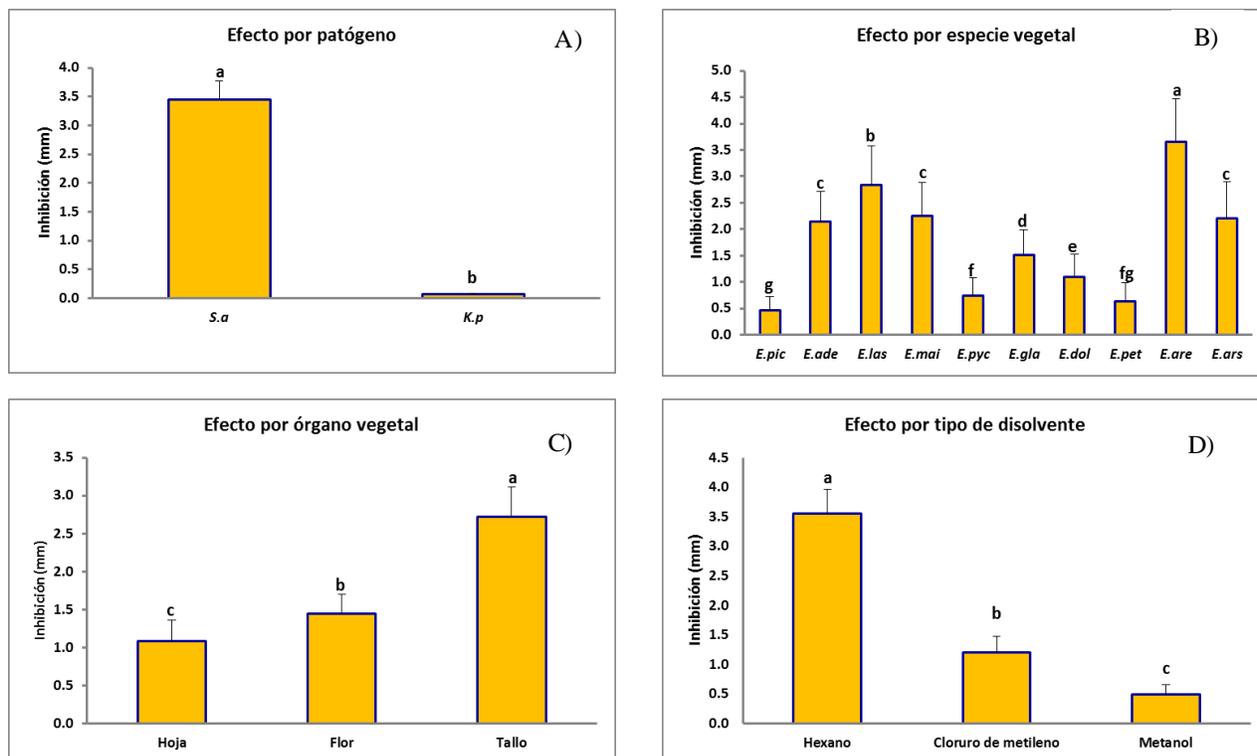


Figura 1. Efecto antibacteriano de *Eupatorium* spp. A). Sensibilidad bacteriana a los extractos de *Eupatorium* spp., B). Efecto por especie vegetal, C). Efecto por órgano de la planta, D). Efecto por tipo de disolvente.

Tabla 1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *Eupatorium* spp. 1 = hexánico, 2 = cloruro metilénico, 3 = metanólico

| <i>Eupatorium</i> spp | Extracto | MIC (mg/μL) | |
|-----------------------|----------|---------------------------|-----------------------|
| | | <i>K. pneumoniae</i> (bt) | <i>S. aureus</i> (bc) |
| <i>E. areolare</i> | Hoja 1 | >1 | 0.0625 |
| | Hoja 2 | >1 | 0.25 |
| <i>E. arsenei</i> | Hoja 1 | >1 | 0.125 |
| | Flor 1 | >1 | 0.25 |
| | Hoja 3 | >1 | 0.25 |
| | Flor 3 | >1 | 1 |
| <i>E. glabratum</i> | Flor 1 | >1 | 0.125 |
| | Tallo 1 | >1 | 0.125 |
| | Hoja 3 | >1 | 0.5 |

bt=bacteriostático; bc=bactericida

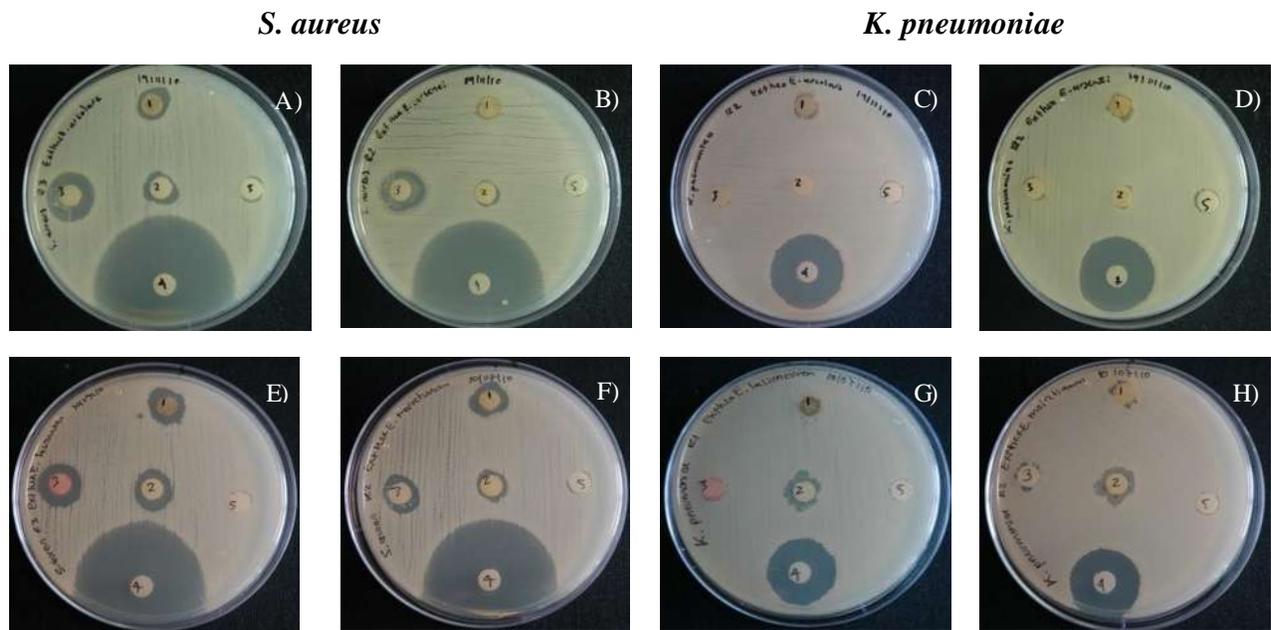


Figura 2. Efecto antibacteriano de los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp. A) y C). *E. areolare*, B) y D). *E. arseni*, E) y G). *E. lasioneuron*, F) y H). *E. mairitianum*.

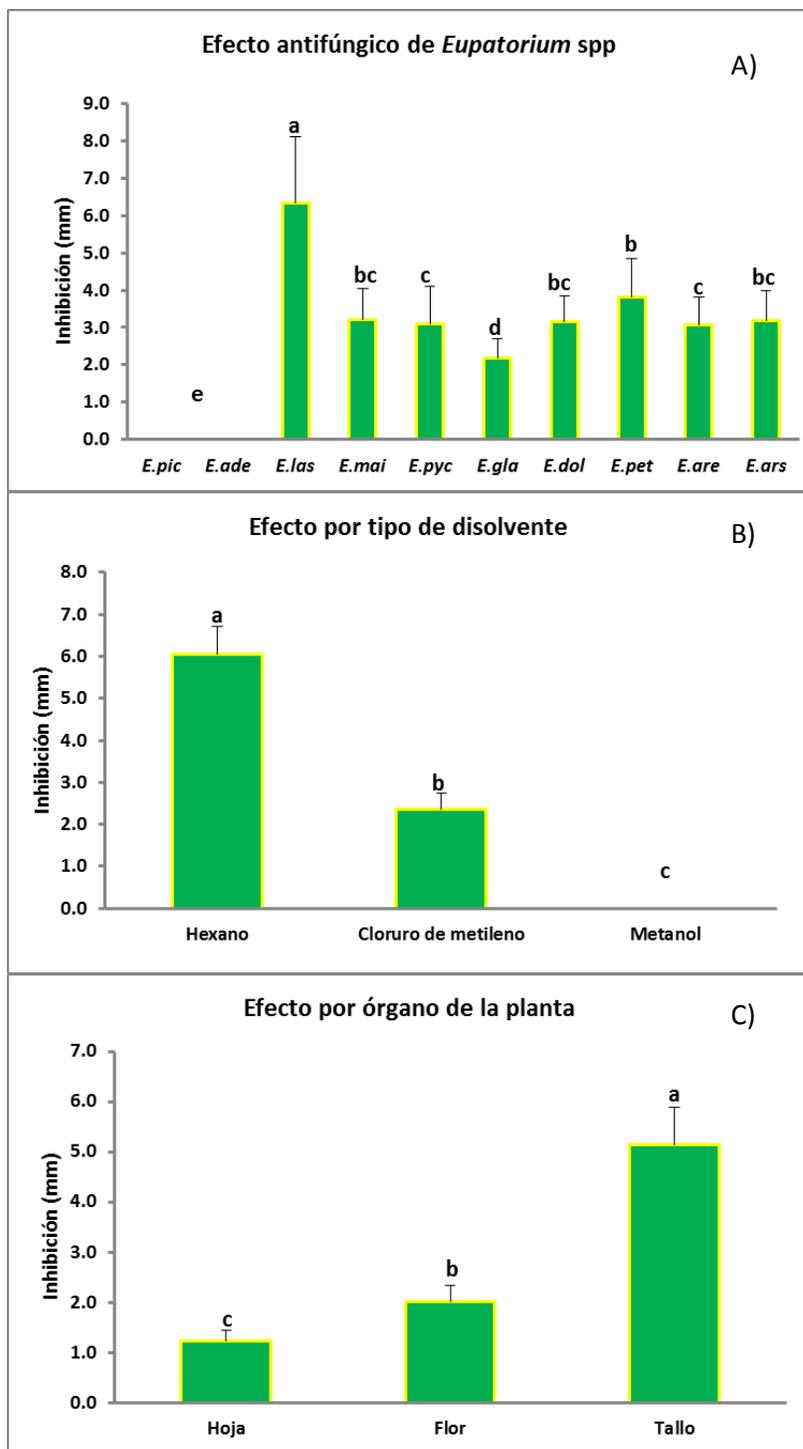


Figura 3. Efecto antifúngico de *Eupatorium* spp sobre el crecimiento de *Candida albicans*. A). Efecto por especie vegetal, B). Efecto por tipo de disolvente, C). Efecto por órgano de la planta.

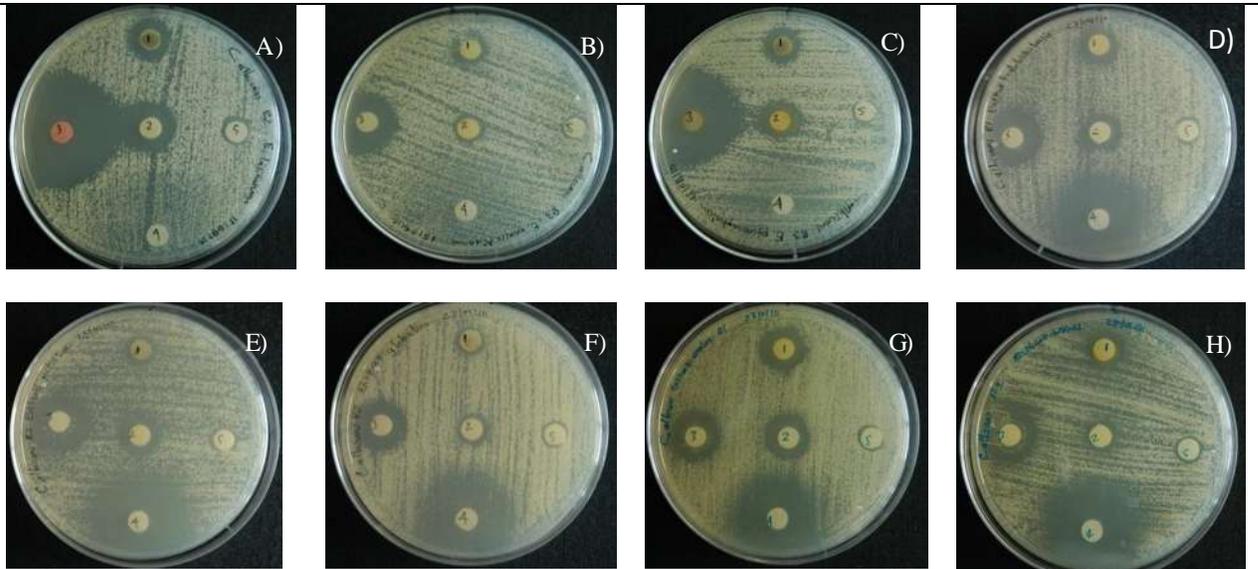


Figura 4. Efecto fungicida de los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp contra *C. albicans*. A). *E. lasioneuron*, B). *E. mairetianum*, C). *E. pycnocephalum*, D). *E. dolichobasis*, E). *E. petiolare*, F). *E. glabratum*, G). *E. areolare*, H). *E. arsenei*.

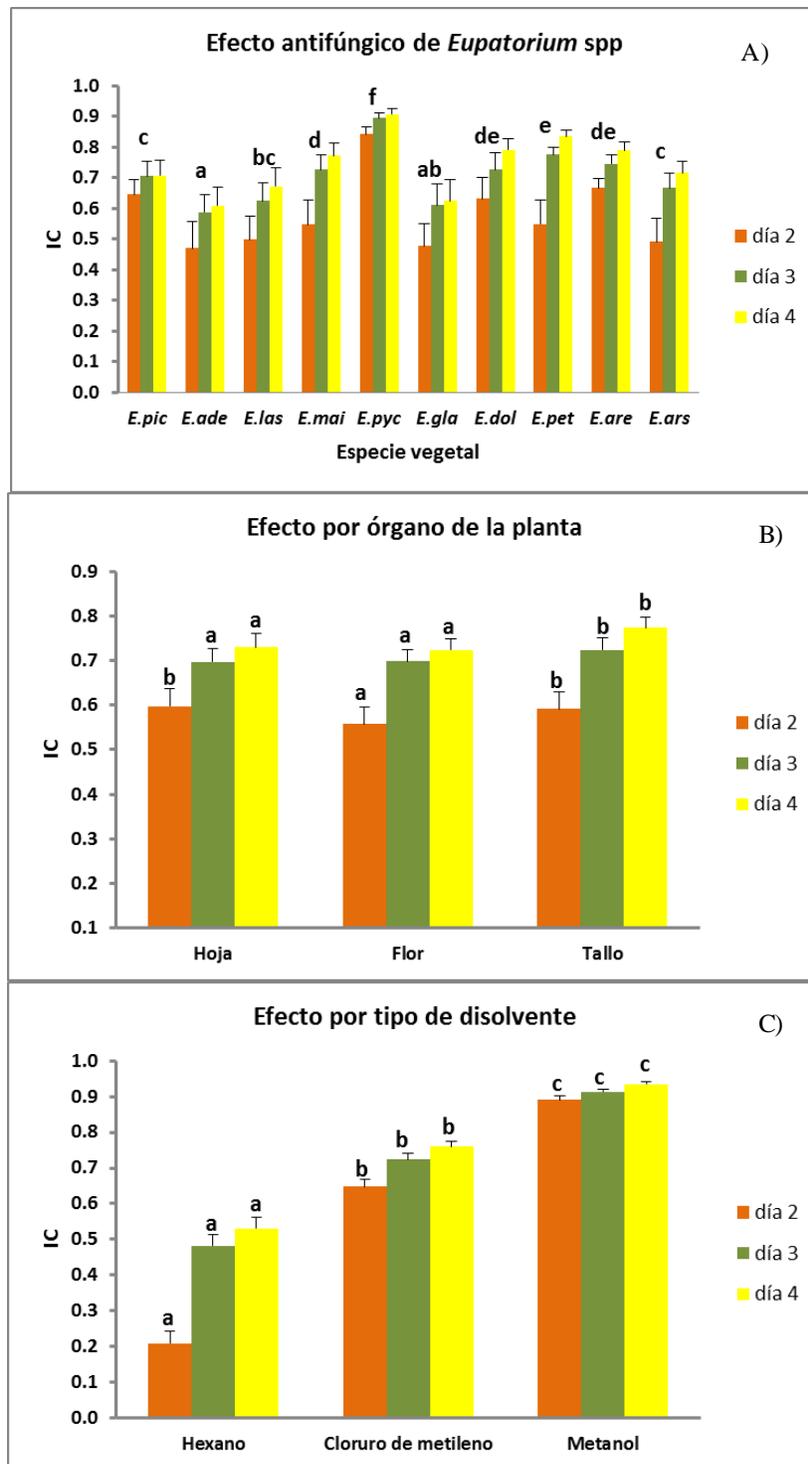


Figura 5. Efecto antifúngico de los extractos de *Eupatorium* spp sobre el crecimiento de *C. acutatum*. A). Efecto por especie vegetal, B). Efecto por órgano de la planta, C). Efecto por tipo de disolvente.

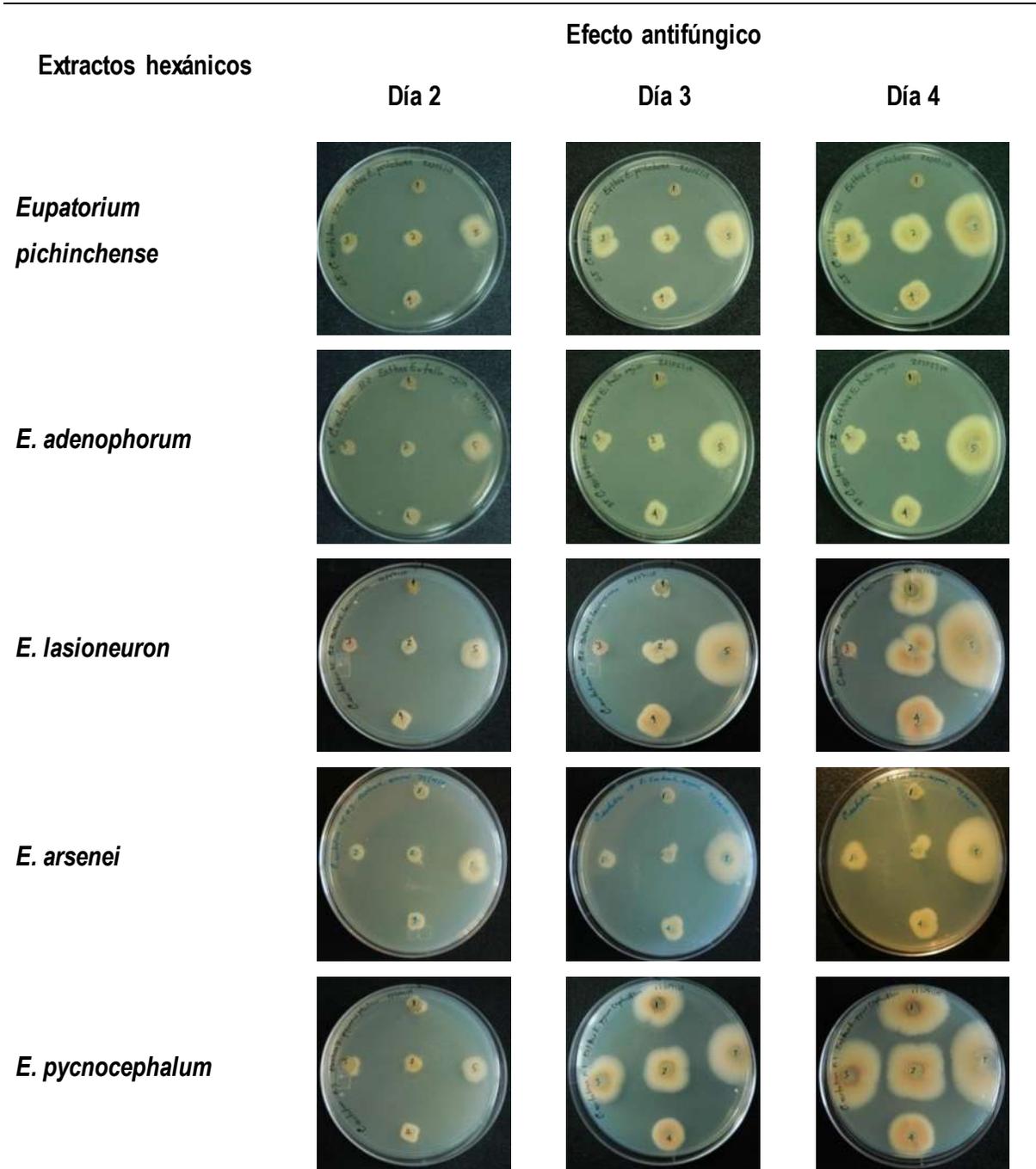


Figura 6. Efecto antifúngico sobre el crecimiento de *C. acutatum* de los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp.

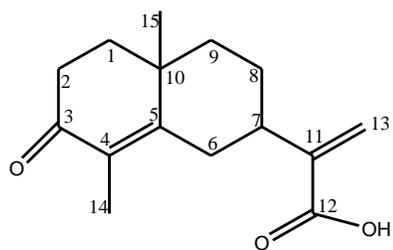
Tabla 2. Análisis de los principales componentes en los extractos hexánicos de tallo de *Eupatorium* spp por RMN ¹H.

| Especie vegetal | δ_H | Familia química/compuesto |
|---------------------------------|--|--|
| <i>Eupatorium pycnocephalum</i> | 5.4-4.5; 3.9-3.5; 2.0-0.8 | Lupeol, sitosterol |
| <i>E. petiolare</i> | 5.5-5.1; 4.7-4.4; 3.8 (s); 3.0-3.8 | Acetato de lupeol, sitosterol, estigmasterol |
| <i>E. lasioneuron</i> | 8.0-6.0; 4.8-4.45; 2.0-0.8 | Triterpenos pentacíclicos acetilados |
| <i>E. areolare</i> | 5.4-4.2; 2.0-0.8 | Lupeol, estigmasterol, sitosterol |
| <i>E. glabratum</i> | 5.36-5.12; 4.65-4.45; 4.5 (m); 2.2-0.8 | Acetato de lupeol, α y β amirina |
| <i>E. dolichobasis</i> | 6.2-4.4; 3.7-3.5; 2.0-0.8 | Triterpenos petacíclicos |
| <i>E. adenophorum</i> | 7.0-6.5; 3.7 (s); 2.6-0.8 | Benzopiranos |
| <i>E. pichinchense</i> | 2.4-0.8; 4.75-4.45; 5.4-5.1 | Triterpenos |
| <i>E. arsenei</i> | 7.0-6.5; 3.7 (s); 2.6-0.8 | Benzopiranos |
| <i>E. mairetianum</i> | 7.2-7; 6.0-5.1; 4.65-4.45; 4.2-4.0; 2.9-0.8 | Triterpenos, componentes aromáticos |

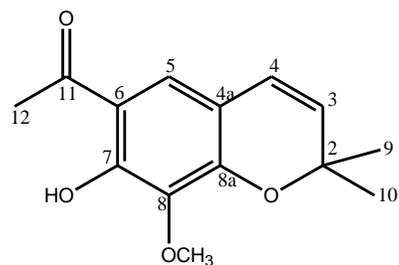
Tabla 3. Compuestos aislados de los extractos hexánicos de *E. areolare*, *E. lasioneuron*, *E. mairitianum* y *E. pycnocephalum*

| Espece vegetal / Extracto | δ_H | Compuestos |
|----------------------------------|---|--|
| <i>E. areolare</i> / Flores | 5.36-5.12; 4.7-4.45; 0.8-2.0 | Lupeol, β -sitosterol |
| | 5.4-5.1; 4.7-4.5; 2.05 (s); 0.8-2.0 | Acetato de lupeol, α y β - amirina |
| <i>E. lasioneuron</i> / Tallos | 7.1(d); 6.60 (s); 4.65 (s); 3.15 (m); 2.25 (s); 1.25 (s); 1.2 (s) | Timol |
| <i>E. mairitianum</i> / Tallos | 5.3-5.15; 4.7-4.4; 0.8-2.0 | Lupeol, α y β -amirina |
| | 4.47 (dd, $J= 3.4, 0.3$ Hz); | |
| <i>E. pycnocephalum</i> / Flores | 2.37 (m); 4.69 (brs); 2.05 (s); 1.68-0.83 | Acetato de lupeol |

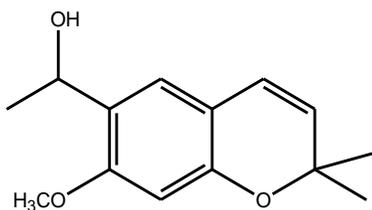
Tabla 4. Compuestos aislados de los extractos hexánicos de flores de *Eupatorium* spp



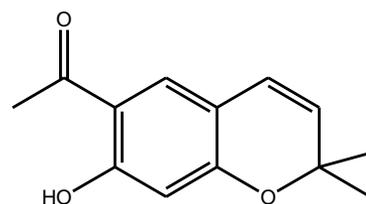
Ácido 3-oxo- γ -cástico (*E. glabratum*)



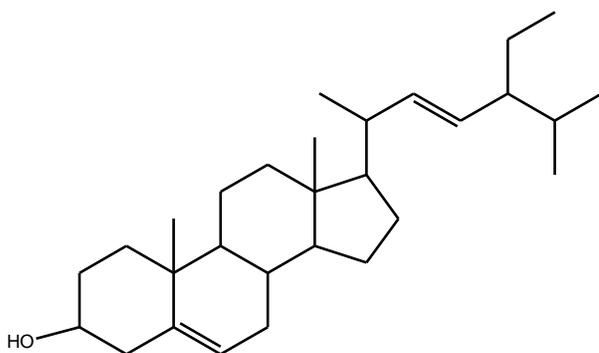
Ripariocromeno A (*E. arsenei*)



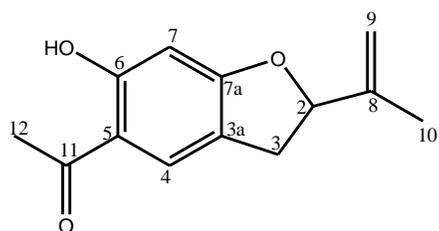
Encecalinol (*E. pichinchense*)



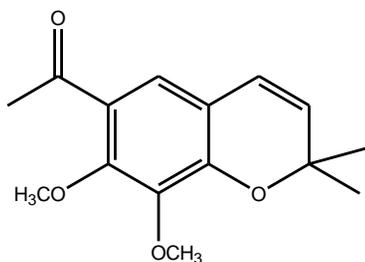
Desmetilencecalina (*E. arsenei*)



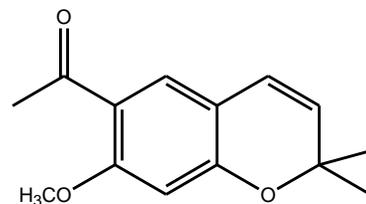
Estigmasterol (*E. pichinchense*)



6-hidroxitremetona (*E. arsenei*)



Metilripariocromeno A (*E. arsenei*)



Encecalina (*E. arsenei* y *E. adenophorum*)

Tabla 5. Actividad antibacteriana reportada en la literatura contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* de los compuestos aislados e identificados de *Eupatorium* spp.

| Compuesto | Especie vegetal | Tipo de extracto /órgano | Aislado o identificado | Espectro antibacteriano | CMI (µg/mL) | Referencia |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------------|
| Ácido catívico | <i>E. lasioneuron</i> | Hexánico flores | identificado | Gram + | 146-780 | No publicados |
| Encecalina | <i>Ageratum conyzoides</i> | Aceite esencial | identificado | Gram + Gram – | 120 | Patil <i>et al.</i> , 2010 |
| Desmetil encecalina | <i>Helianthus annuus</i> L. | Extracto | aislado | Gram + | ND | Sato <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>Gentiana asclepiadea</i> L. | Aceite esencial | identificado | Gram + Gram – | 0.65-2.5 | Mihailovic <i>et al.</i> , 2011 |
| 3-oxo-γ-cóstico | <i>Varthemia iphionoides</i> | Extracto de AcOEt | aislado | Gram + Gram – | 250-500 | Al-Dabbas <i>et al.</i> , 2005 |

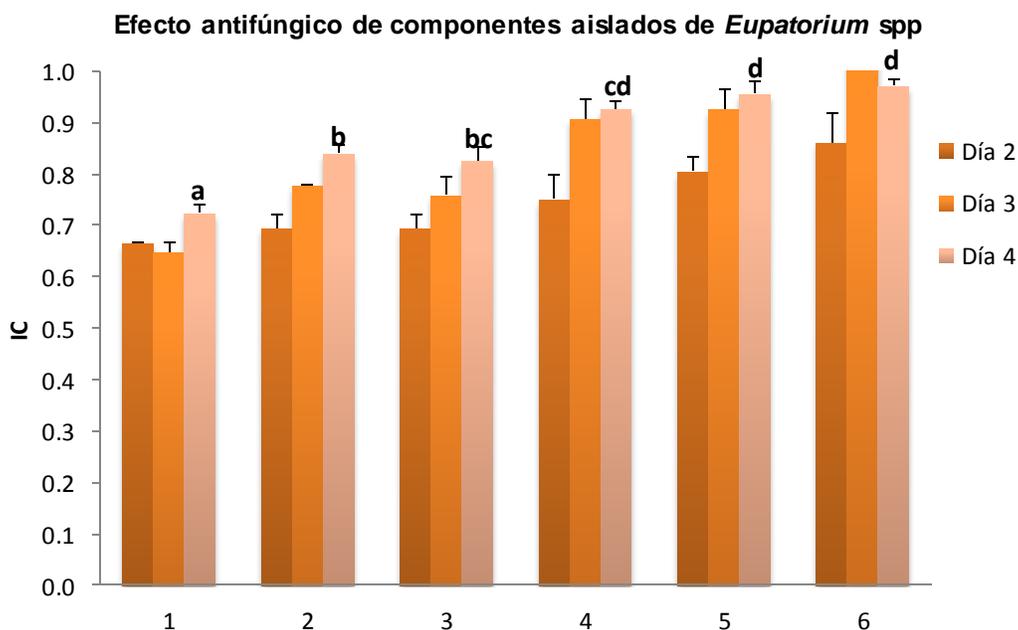


Figura 7. Efecto antifúngico de componentes de *Eupatorium* spp. 1 = Desmetilencecalina; 2 = Encecalina; 3 = Ripariocromeno A; 4 = Metilripariocromeno A; 5 = Encecalinol; 6 = Ácido 3-oxo-costico. Todos los componentes fueron ensayados a una concentración 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6. Bibliografía

- Abdel-Rahman, T., Hegazy, A., Mohsen, S., Kabil, H., El-Alfy, T., El-Komy, S. (2010). Study on combined antimicrobial activity of some biologically active constituents from wild *Moringa peregrina* Forssk. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1, 15-24.
- Abreu, V., Takahashi, J., Duarte, L., Pilo-Veloso, D., Junior, P., Alves, R.O.; Alcantara, A.F.C.; Romanha, A.J. (2011). Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems and flowers of *Lychnophora pinaster*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 615-621.
- Aguilar-Guadarrama, B., Navarro, V., León-Rivera, I., Rios, M. (2009). Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. bustamenta. *Natural Product Research*, 23, 1559-1565.
- Al-Dabbas, M., Hashinaga, F., Abdelgaleil, S., Suganuma, T., Akiyama, K., Hayashi, H. (2005). Antibacterial activity of an eudesmane sesquiterpene isolated from common *Varthemia*, *Varthemia iphionoides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 237-240.

- Bandara, B., Hewage, C., Karunaratne, V., Wannigama, G., Adikaram, N. (1992). An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. *Phytochemistry*, 31, 1983-1985.
- Beck-Sague, C., Jarvis, W. (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. 1980-90. *The Journal of Infectious Diseases*, 167, 1247-1251.
- Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R. (1996). Phyto-growth-Inhibitory and Antifungal Constituents of *Helianthella*. *Journal of Natural Products*, 59, 323-326.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Miño, J., Kadarian, C., Martino, V., Ferraro, G., Acevedo, C. (2000). Antinociceptive effect of some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. *Phytotherapy Research*, 14, 275-277.
- Díaz Ramos, R. (2006). Principales microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48, 105-112.
- Dubey, R. K., Kumar, R., Dubey, N. (2007). Evaluation of the *Eupatorium cannabinum* Linn. oil in enhancement of shelf life of mango fruits from fungal rotting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 467-473.
- Faria, N. C., Kim, J. H., Goncalves, L. A., Martins, M. L., Chan, K. L., Campbell, B. C. (2011). Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 506-513.
- García, G., Campos, R., de Torres, R., Broussalis, A., Ferraro, G., Martino, V., Coussio, J. (1990). Antiherpetic activity of Argentine medicinal plants. *Fitoterapia*, 6, 542-546.
- García-Sánchez, E., Ramírez-López, C., del Rio, R., Martínez-Pacheco, M. (2011). A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. *Phyton*, 80, 139-146.
- Ghasemi, P., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics*, 4, 209-214.
- Gupta, M., Mazumder, U., Chaudhuri, I., Chaudhuri, R., Bose, P., Bhattacharya, S., Manikandan, L. (2002). Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia*, 73, 168-170.
- Inouye, S., Uchida, K., Abe, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12, 210-216.

- Koba, K., Nenonene, A., Sanda, K., Garde, D., Millet, J., Chaumont, J.P., Raynaud, C. (2011). Antibacterial activities of *Coleus aromaticus* Benth (Lamiaceae) essential oil against oral pathogens. *Journal of Essential Oil Research*, 23, 13-17.
- Kiplimo, J., Koorbanally, N., Chenia, H. (2011). Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 1150-1156.
- Mihailovic, V., Vukovic, N., Niciforovic, N., Solujic, S., Mladenovic, M., Maskovic, P., Stankovic, M. (2011). Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1164-1174.
- Muschietti, L., Gorzalczany, S., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V. (2001). Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium bunnifolium*. *Planta Medica*, 67, 743-744.
- Muschietti, L., Martino, V., Ferraro, G., Coussio, J. (1990). Compuestos polifenólicos aislados de *Eupatorium buniifolium*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 78, 329.
- Newman, D., Cragg, G. (2010). Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. En A. Buss, & M. Butler, *Natural Product Chemistry for Drug Discovery* (págs. 17-19). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Patil, R. P., Nimbalkar, M., Jadhav, U. U., Dawkar, V. V., Govindwar, S. P. (2010). Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 608-614.
- Paya, M., Coussio, J., Ferraro, G., Martino, V., Hnatyszyn, O., Debenedetti, S., Broussalis, A., Muschietti, L., Silla, M., Vaya, E., Alcaraz, M. (1996). Inhibitory effects of various extracts of Argentine species on free radical-mediated reactions and human neutrophil functions. *Phytotherapy Research*, 10, 228-232.
- Peres, N., Souza, N., Peever, T., Timmer, L. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 88, 125-130.
- Pérez-González, L., Ruíz-González, J., Noyola, D. (2007). Nosocomial Bacteremia in Children: A 15-Year Experience at a General Hospital in Mexico. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28, 418-422.

- Pérez-Vásquez, A., Capella, S. L., Bye, R., Angeles-López, G., Mata, R. (2011). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Hofmeisteria schaffneri*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 579-586.
- Pfaller, M., Diekema, D. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 133-163.
- Piras, A., Cocco, V., Falconieri, D., Porcedda, S., Marongiu, B., Maxia, A., Frau, M.A., Goncalves, M.J., Calveiro, C., Salgueiro, C. (2011). Isolation of the volatile oil from *Satureja thymbra* by supercritical carbon dioxide extraction: chemical composition and biological activity. *Natural Product Communications*, 6, 1523-1526.
- Ragasa, C., Puno, M., Sengson, J., Shen, C., Rideout, J., Raga, D. (2009). Biactive triterpenes from *Diospyros blancoi*. *Natural Product Research*, 23, 1252-1258.
- Ramirez-Lopez, C., Garcia-Sanchez, E., Leon-Hernandez, A., Raya-Gonzalez, D., del Rio-Torres, R., Flores-Garcia, A., Martinez-Pacheco, M.M. (2010). Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline*, 3, 682-690.
- Rios, J., Condori, L., Muñoz, S., Loayza, I., Soriano, J. (1993). The extraction of the essential oil of romerillo. *Actes du colloque de Chicoutimi, 22 au 25*, 111-117.
- Rios, M., Aguilar-Guadarrama, A., Navarro, V. (2003). Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity. *Planta Medica*, 69, 967-970.
- Rojas- Acosta, N. 1. (1905). Plantas Medicinales de Corrientes. *Revista Farmacéutica*, 45, 115-145.
- SAGARPA. (2012). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. Recuperado el 05 de Julio de 2013, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: <http://www.siap.gob.mx>
- Sanabria-Galindo, A., Arciniegas, N., Suárez, I. (1999). Timol y Carvacrol como sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 28, 83-88.
- Sasikumar, J., Pichai, A., Doss, A. (2005). Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. *Fitoterapia*, 70, 240-243.
- Sato, A., Utamura, H., Ishizuka, M., Endo, N., Tsuji, M., Nishimura, H. (1996). Antimicrobial benzopyrans from the receptacle of sunflower. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 664-665.

- Sreenivasaprasad, S., Talhinhos, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology*, 6, 361-378.
- Zurita, J., Márquez, C., Espinoza, Y., Vargas, A. C. (2005). Infecciones por *Staphylococcus aureus* oxacilino-resistentes provenientes de la comunidad en un hospital de Quito. *Revista Médica Vozandes*, 16, 46-51.
- Zygadlo, J., Lamarque, N., Grosso, N., Ariza, E. (1995). Analysis of the essential oil of the leaves of *Eupatorium arnottianum* Griseb. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 677-678.

6.2.3 Anti-*Phytophthora* activity of *Eupatorium* species native to the Michoacan, Mexico. (EN PREPARACIÓN)

Edgar García-Sánchez, Cesar B. Ramírez-López, Rosa E. Martínez-Muñoz, Alberto Flores García, Rosa E. Del Río, Mauro M. Martínez-Pacheco

*Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B-3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán 58030, Mexico.
e-mail: mpacheco@umich.mx*

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi Rands is an oomycete pathogen of causal agent of tristeza, one of the most devastating of diseases of avocado. The prevalence of metalaxyl-resistant *Phytophthora* spp in avocado fields has resulted in important crop losses. In this investigation, we screened ten *Eupatorium* species native to the Michoacan for anti-*Phytophthora* activity by disk diffusion method. Hexane extracts showed better anti-*Phytophthora* activity than dichloromethane and methanol extracts. The main components identified are pentacyclic triterpenes and benzopyran compounds. Benzopyran compounds the major isolated from *Eupatorium* spp showed moderate anti-*Phytophthora* activity.

Actividad anti-*Phytophthora* de especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán, México

Resumen

La prevalencia de especies de *Phytophthora* resistentes a metalaxyl en los cultivos de aguacate ha provocado importantes pérdidas. En esta investigación, nosotros estudiamos la actividad anti-*Phytophthora* de diez especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán por el método de difusión en disco. Los extractos hexánicos mostraron mejor actividad inhibitoria que los extractos clorometilénicos y metanólicos. Los principales componentes identificados son triterpenos pentacíclicos y benzopiranos. Los componentes mayoritarios de tipo benzopirano aislados de *Eupatorium* spp exhiben moderada actividad anti-*Phytophthora*.

1. Introducción

Al nivel global, los oomicetos patógenos de plantas causan enfermedades devastadoras en cultivos de plantas dicotiledóneas económicamente importantes. En ellos, se incluyen al menos 60 especies del género *Phytophthora* consideradas como las más virulentas y devastadoras (Kamoun, 2008). *Phytophthora capsici*, *P. cinnamomi*, *P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. ramorum* y *P. sojae* son algunas especies relevantes por su versatilidad de infección y resistencia a mefenoxam. Por ejemplo, *P. cinnamomi* infecta aproximadamente 3000 especies vegetales de distribución geográfica mundial, es un oomiceto devastador de cultivos agrícolas tales como alfalfa, frijol, jitomate, mango, papa, pimienta, tomate y particularmente importante el de aguacate (Agrios, 1997). Asimismo, en 1977 se introdujo el mefenoxam como agente oomicetocida y dos años después, por primera vez se detectó la presencia de aislados de *Phytophthora* resistentes (Taylor, 2006). A partir de entonces, la prevalencia de enfermedades y el aumento en la incidencia de especies de *Phytophthora* resistentes a mefenoxam continúa. En un estudio realizado en América del Norte de 150 aislados de *P. capsici* en 17 de campos y ocho regiones agrícolas. Por región estudiada se observó que la proporción de aislados resistentes a mefenoxam fue de 28-100 % (Parra y Ristaino, 2001).

La incidencia de la enfermedad causada por oomicetos en cultivos económicamente importantes continúa, así como la identificación de especies como *Phytophthora bohemeriae*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. citrícola* en cultivos tales como aguacate, anturio y arándano como principales agentes causales. Una de las enfermedades devastadoras causada por *P. cinnamomi* es la “tristeza del aguacatero”. En las zonas productoras de aguacate esta enfermedad es una amenaza constante, prevaleciente y temida; tal como sucede en la franja aguacatera ubicada en Michoacán, México. A nivel mundial la producción de aguacate en esta región ocupa el primer lugar y por ello en la zona, este cultivo representa el principal soporte económico y social (FAOSTAT, 2011; SAGARPA, 2012).

Los agentes convencionales para el control de enfermedades causadas por oomicetos siguen siendo efectivos y con certeza se utilizarán por varias décadas. Sin embargo, ellos rápidamente van perdiendo efectividad por lo que es importante anticiparse y usar nuevas alternativas de control de la enfermedad con la propuesta de novedosas moléculas vegetales

con actividad antioomicética: el cual es un hecho inevitable. Por ello, las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán son el recurso natural promisorio en donde es mayor la probabilidad de descubrir nuevas moléculas anti-*Phytophthora*. En este trabajo se inició la búsqueda de moléculas vegetales antioomicéticas con la determinación de la sensibilidad de aislados silvestres de *Phytophthora* spp a noventa extractos orgánicos obtenidos de diez especies de *Eupatorium*.

2. Resultados

Se determinó el efecto antioomicético de los noventa extractos de *Eupatorium* spp sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. Se observó un comportamiento diferencial, las especies vegetales con mejor efecto antioomicético al segundo, tercer y cuarto día es como sigue, *E. mairetianum*, *E. lasioneuron*, *E. glabratum*, *E. areolare*, *E. arsenei*, *E. adenophorum*, *E. pycnocephalum*, *E. petiolare*, *E. pichinchense*, *E. dolichobasis*. Los extractos de flor fueron los que presentaron mayor actividad, le siguen los extractos de tallo y por último los de hoja. Con respecto al efecto observado por tipo de disolvente los extractos hexánicos fueron los mejores, seguidos de los cloruro metilénicos y por último los metanólicos. Este escrutinio fue útil para seleccionar los mejores extractos y ampliar el escrutinio con ocho aislados de *Phytophthora*.

Los extractos hexánicos de flor de las especies de *Eupatorium* son los mejores para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*, lo que sugiere los componentes de baja polaridad presentes en flor de las diez especies presentan mejor actividad antioomicética (Figura 1). Además, el efecto antioomicético diferencial observado por especie vegetal sugiere que las especies contienen distintos metabolitos secundarios o una diferencia en la concentración de los mismos, que afectan en distinto grado el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. Con el objetivo de determinar el espectro antioomicético de los extractos con mejor actividad, los extractos hexánicos de las especies de *Eupatorium* fueron ensayados con ocho oomicetos aislados de aguacate. Los resultados exhiben diferente sensibilidad de los oomicetos a los treinta extractos hexánicos de *Eupatorium* spp, el oomiceto más sensible fue *P. citrícola* al presentar los menores Índices de Crecimiento (IC) que fueron de 0.19, 0.20 y 0.25 al segundo tercer y cuarto día respectivamente. El segundo oomiceto más sensible fue *P. boehmeriae* 9 (*P. bo9*) al presentar un IC promedio de 0.1, le sigue, *P. capsici* (*P. cap*) con

un IC promedio de 0.12, una sensibilidad similar fue observada en los oomicetos *P. cinnamomi* (*P. cin*) y *P. boehmeriae* 8 (*P. bo8*) con Índices de Crecimiento promedios de 0.17 y 0.15 respectivamente. *P. boehmeriae* 4 (*P. boe4*) presentó IC promedio de 0.25, *P. capsici* 617 (*P. cap2*) presentó IC promedio de 0.36, por último *P. boehmeriae* 6 (*P. bo6*) presentó IC promedio de 0.44. El efecto antioomicético en orden de importancia por especie vegetal es como sigue, se observó que los extractos hexánicos de *E. arsenei* (*E. ars*) presentaron un efecto oomiceticida, al presentar Índices de Crecimiento de 0 al segundo, tercer y cuarto día. Los extractos de *E. glabratum* (*E. gla*) y *E. areolare* (*E. are*) presentaron Índices de Crecimiento promedio de 0.06 y 0.05 respectivamente, los extractos de *E. lasioneuron* (*E. las*) y *E. mairertianum* (*E. mai*) con Índices de Crecimiento promedio de 0.15 y 0.16 respectivamente, le siguen en importancia los extractos hexánicos de *E. adenophorum* (*E. ade*) y *E. dolichobasis* (*E. dol*) que presentaron Índices de Crecimiento de 0.23 y 0.21 respectivamente, *E. pichinchense* (*E. pic*) y *E. petiolare* (*E. pet*) mostraron Índices de Crecimiento promedio de 0.36, los extractos que presentaron mayor IC fueron los de *E. pycnocephalum* (*E. pyc*) con un IC promedio de 0.48. El análisis del efecto antioomicético por órgano de la planta se observó que los extractos hexánicos de flor de las diez especies vegetales son los que presentan mejor efecto al presentar menor Índice de Crecimiento que fue de 0.11, los extractos de tallo y hoja presentaron Índices de Crecimiento de 0.26 con un efecto oomiceticida al segundo, tercer y cuarto día que fue se monitoreo el experimento, le siguen los extractos *E. areolare*, *E. glabratum*, *E. lasioneuron*, *E. mairertianum*, *E. adenophorum*, *E. dolichobasis*, *E. pichinchense*, *E. petiolare* y *E. pycnocephalum*, se observó que los extractos de flor fueron los mejores para afectar el crecimiento de los ocho aislados (Figura 2 y 3). El componente enecalina fue más activo al inhibir el crecimiento del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* al segundo, tercer y cuarto día. En segundo orden de efectividad se encuentra el cromeno desmetilencecalina y metilripariocromeno A al presentar un IC de 0.6 al cuarto día. El componente ripariocromeno, enecalinol y el ácido 3-oxo-cóstico presentaron menor actividad antioomicética al segundo, tercer y cuarto día (Figura 4). Los extractos hexánicos flores de *Eupatorium* spp fueron los que presentaron mejor inhibición de los ocho aislados de *phytophthora*.

3. Discusión

Los resultados indican distinta sensibilidad de los aislados de *Phytophthora* a los extractos ensayados, lo que pone de manifiesto una respuesta temprana y tardía a los extractos vegetales. Además, podrían estar presentes distintos mecanismos de evasión o tolerancia de los metabolitos secundarios activos presentes en los extractos. Los extractos hexánicos con mejor actividad antioomicética fueron los de *E. arsenei*, lo que nos indica que probablemente estos extractos contienen metabolitos de baja polaridad más efectivos para controlar a estos oomicetos que el resto de extractos

Los bezopiranos desmetilencecalina (1), encecalina (2) y metilripariocromeno (4) aislados de los extractos hexánicos de *E. arsenei*, presentan actividad anti-*Phytophthora* al ser evaluados de manera aislada. Inferimos que una muestra reconstituida de los tres benzopiranos con mejor actividad, mejorará el efecto antioomicetico observado de forma independiente. Desde el punto químico, los compuesto 1, 2 y 4 comparten radicales químicos con el mefeneoxam, como lo es el anillo aromático, grupos carbonilo y grupos metoxilos. Es probable que debido a la analogía estructural con el mefenoxam sea la actividad observada. Además, es interesante indagar el mecanismo de acción de los componentes tipo benzopirano, ya que es posible que se han inhibidores de alguna enzima esencial para la sobrevivencia de los oomicetos. Componentes de tipo benzopirano son inhibidores de enzimas esenciales en los organismos (Tabla 1).

4. Conclusión

Las especies de *Eupatorium* endémicas de Michoacán contienen metabolitos secundarios con actividad anti-*Phytophthora*, sobre aislados de aguacate principal cultivo agrícola generador de divisas para Michoacán. Los extractos no polares exhiben mejor efecto inhibitorio, los principales constituyentes aislados que presentan moderada actividad anti-*Phytophthora* sobre *P. cinnamomi* son encecalina, desmetilencecalina, ripariocromeno A, metilripariocromeno A y encecalinol.

5. Material y Métodos

5.1 General

Los compuestos ensayados son los mismos que se purificaron y caracterizaron en el subcapítulo anterior.

5.2 Material vegetal

Las especies vegetales ensayadas corresponden a las mencionadas en el subcapítulo anterior, así como su número de voucher y coordenadas de colecta.

5.3 Obtención de extractos y compuestos aislados

Hojas (105 g), flores (285 g), tallos (310 g) de *E. arsenei*; hojas (225 g), flores (90 g), tallos (625 g) de *E. glabratum*; hojas (200 g), flores (100 g), tallos (440 g) de *E. pichinchense*. Los órganos de cada especie vegetal fueron separados y secados a la sombra, posteriormente fueron macerados con hexano a temperatura ambiente (3 x 1.5 L).

Los componentes ensayados fueron: Encecalina, Encecalinol, Estigmasterol, Desmetilencecalina, Metilripariocromeno A, Ripariocromeno A, Ácido 3-oxo-cóstico, descritos en el subcapítulo anterior.

5.4 Ensayo antioomicético

Noventa extractos orgánicos de maceraciones hexánicas, clorometanólicas y metanólicas de hojas, flores y tallos de diez especies de *Eupatorium* fueron ensayados para determinar su actividad anti-*Phytophthora*. Alícuotas de (6 µL) de soluciones etanólicas de cada extracto (1 mg/µL) y compuestos puros (0.02 mg/µL) así como el ácido-(*R*)-2{(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino}metil éster propiónico (Mefenoxam 0.001 mg/µl) y etanol al 96 % (0.8 mg/µl) control positivo y negativo respectivamente, fueron ensayados por el método de difusión en agar. Se determinó el Índice de Crecimiento (IC) al segundo, tercer y cuarto día. El análisis de los datos se realizó con el software Statistic 7.0, la significancia de los datos experimentales por una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Los oomicetos utilizados fueron *Phytophthora cinnamomi* (*P.cin*), *P. capsici* (*P.cap*), *P. capsici* 617(*P.cap2*), *P. bohemeriae* 4 (*P.bo4*), *P. bohemeriae* 6 (*P.bo6*), *P. bohemeriae* 8 (*P.bo8*), *P. bohemeriae* 9 (*P.bo9*) y *P. citrícola* (*P.cit*) aislados de árboles de aguacate en la región de Uruapan, Michoacán. Fueron resembrados en placas de agar papa dextrosa, se crecieron por siete días a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

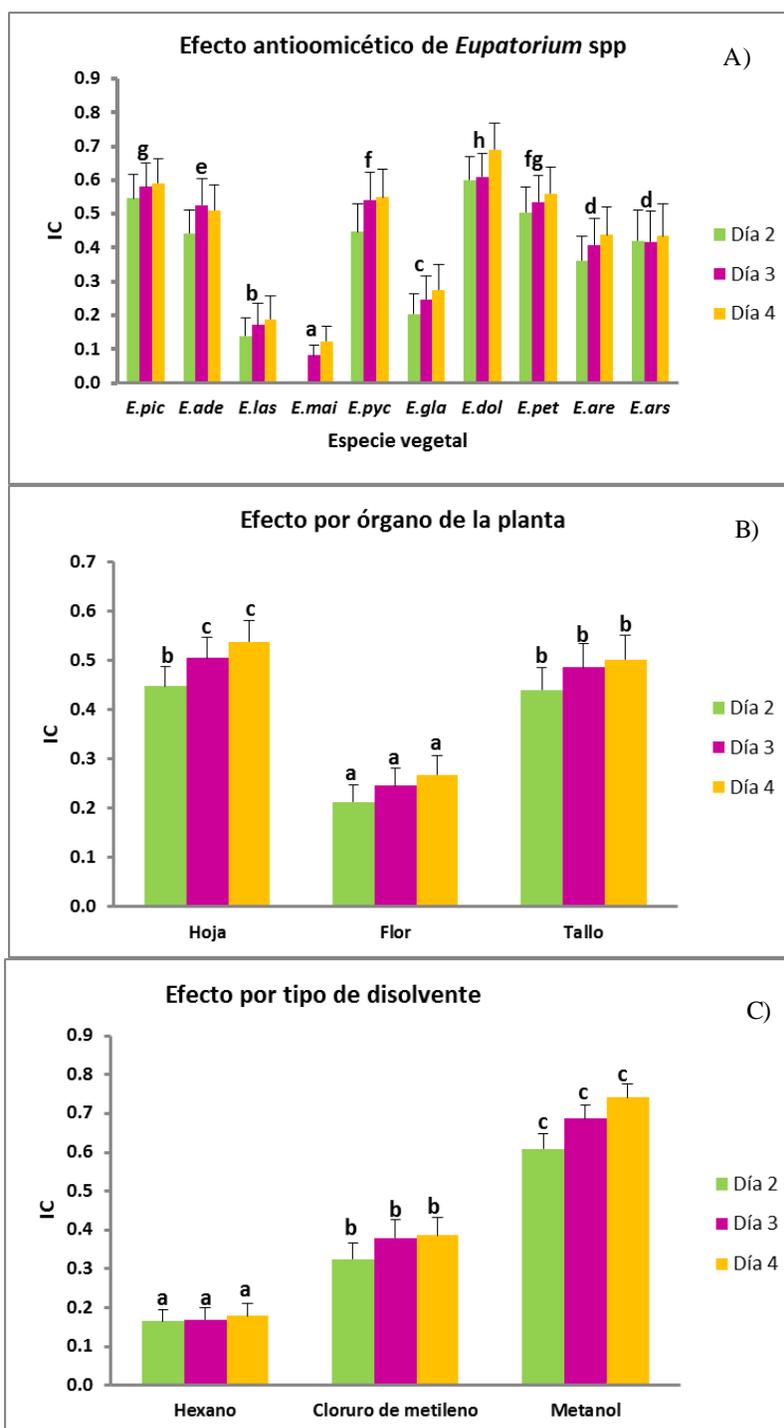


Figura 1. Efecto antioomicético de los extractos de *Eupatorium* spp contra *P. cinnamomi*. A). Efecto por especie vegetal, B). Efecto por órgano de la planta, C). Efecto por tipo de disolvente.

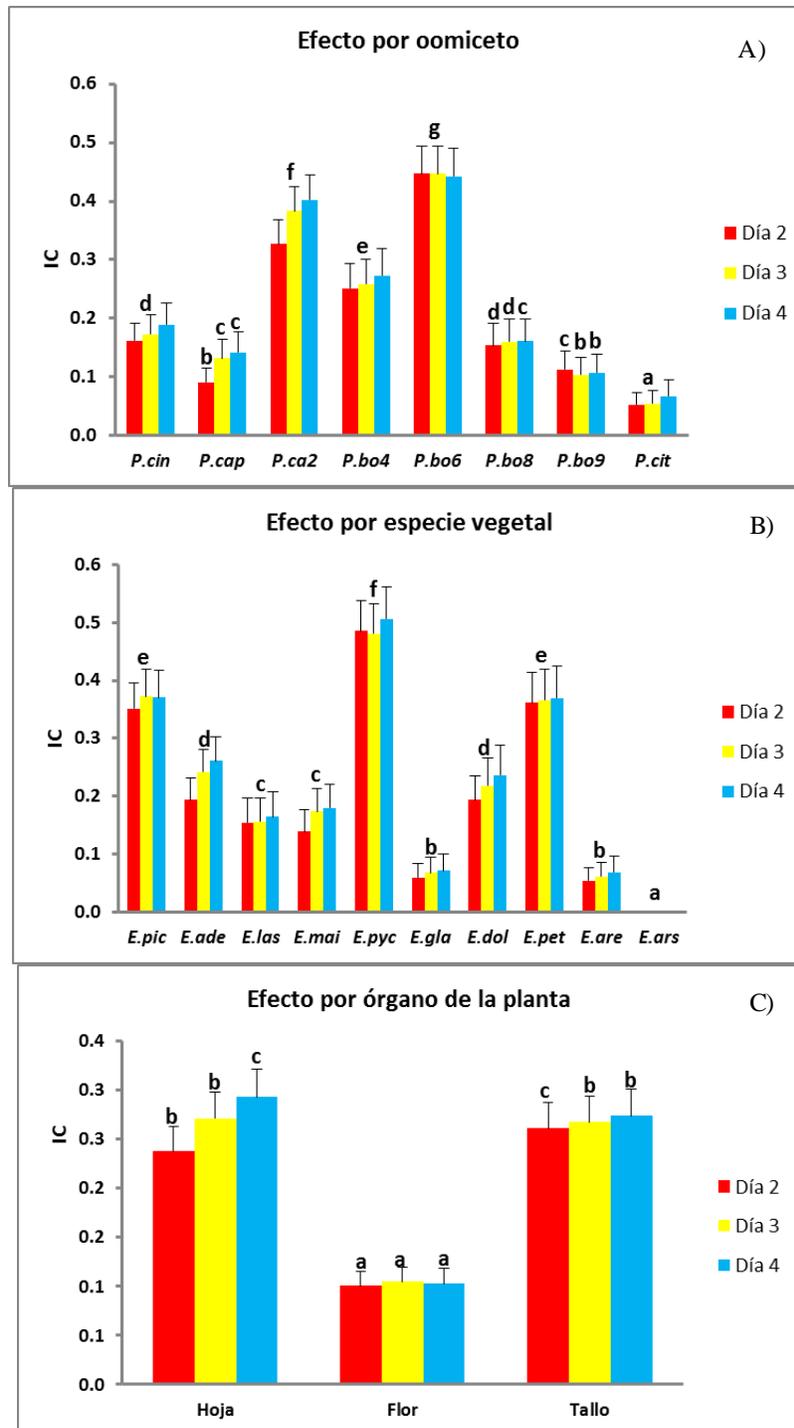


Figura 2. Efecto antioomicético de los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp. A). Sensibilidad de los oomicetos a los extractos, B). Efecto antioomicético por especie vegetal, C). Efecto antioomicético por órgano de la planta.

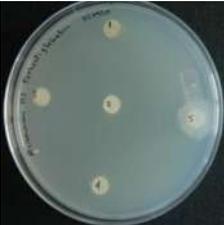
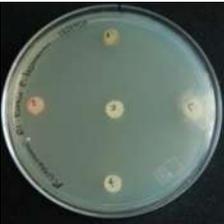
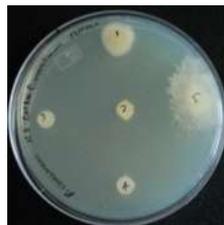
| Extractos hexánicos | Efecto antioomicético | | |
|----------------------------|---|--|---|
| | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
| <i>Eupatorium areolare</i> |  |  |  |
| <i>E. arsenei</i> |  |  |  |
| <i>E. glabratum</i> |  |  |  |
| <i>E. lasioneuron</i> |  |  |  |
| <i>E. mairetianum</i> |  |  |  |

Figura 3. Efecto antioomicético sobre el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* y *P. capsici* de los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp.

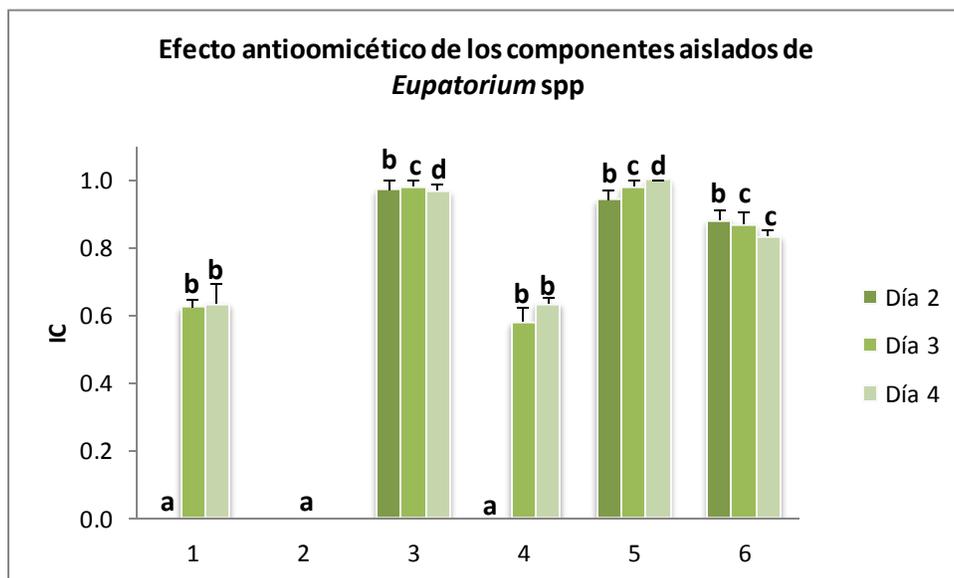
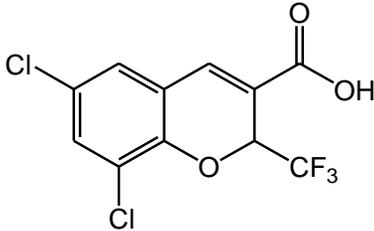
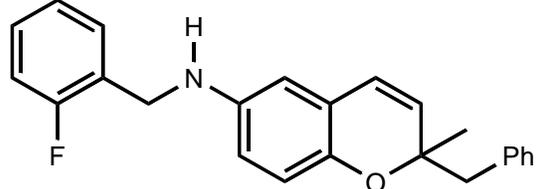
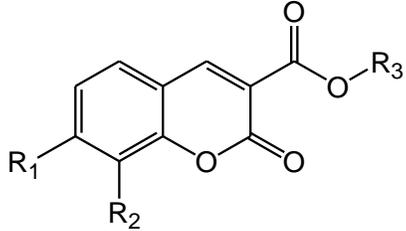
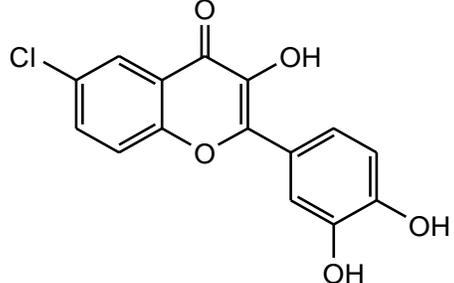
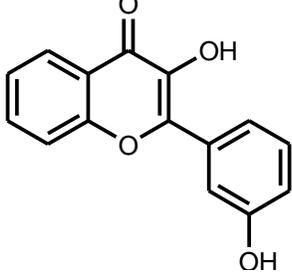


Figura 4. Efecto antioomicético de los componentes aislados de *Eupatorium* spp. 1 = Desmetilencecalina; 2 = Encecalina; 3 = Ripariocromeno A; 4 = Metilripariocromeno; 5 = Encecalinol; 6 = Ácido 3-oxo-cóstico. Ensayados a la concentración de 20 µg/µL.

Tabla 1. Inhibidores enzimáticos tipo benzopirano

| Estructura/Nombre | Blanco de acción | Referencia |
|---|---|-----------------------------|
|  SD-8381 | Ciclooxigenasa-2 | Carter <i>et al.</i> , 1998 |
|  KRH-102140 | Lipooxigenasa-5 | Gong <i>et al.</i> , 2005 |
|  Cumarinas 38 derivados | Gliceraldehído-3- fosfato- deshidrogenasa | Alvim <i>et al.</i> , 2005 |
|  | Proteincinasas | Yuan <i>et al.</i> , 2009 |
|  Flavonoides | | |

Bibliografía

- Agrios, G. (1997). *Plant pathology*. San Diego, California: Academic Press.
- Alvim, J.Jr.; Dias, R.L.A.; Castilho, M.S.; Oliva, G.; Corrêa, A.G. (2005). Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 763-773.
- Carter, J.S.; Obukowicz, M.G.; Devadas, B.; Talley, J.J.; Brown, D.L.; Graneto, M.J.; Bertenshaw, S.R.; Rogier, D.J.; Nagarajan, S.R.; Hanau, C.E.; Hartmann, S.J.; Ludwig, C.L.; Metz, S. (1998). Substituted benzopyran derivatives for the treatment of inflammation. Número de patente: 6,034,256.
- FAOSTAT. (2011). *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases*. Recuperado el 05 de Julio de 2013, de Producción país por producto: <http://www.fao.org>
- Taylor, R.J., Pasche, J.E., Gudmestad, N.C. (2006). Biological significance of mefenoxam resistance in *Phytophthora erythroseptica* and its implications for the management of pink rot of potato. *Plant Disease*, 90, 927-934.
- Parra, G., Ristaino, J.B. (2001). Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease*, 85, 1069-1075
- Naik, R.G.; Lal, B.; Rupp, R.H.; Sedlacek, H.H.; Dickneite, G. (1994). Oncogene-encoded kinases inhibition using 4-H-1-Benzopyran-4-one derivatives. Número de patente: 5,284,856.
- SAGARPA. (2012). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. Recuperado el 05 de Julio de 2013, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: <http://www.siap.gob.mx>
- Téliz, O., Marroquín, P. (2007). Importacia histórica y socioeconómica del aguacate. En O. Téliz, P. Marroquín, *El Aguacate y su Manejo Integral Parcial* (págs. 3-28). México, D.F.: Mundi-Prensa.
- Yuan, L.; Seo, J.S.; Kang, N.S.; Keinan, S.; Steele, S.E.; Michelotti, G.A.; Wetsel, W.C.; Beratan, D.N.; Gong, Y.D.; Lee, T.H.; Hong, J. (2009). Identification of 3-hydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-ones as isoform-selective PKC- ζ inhibitors and potential therapeutics for psychostimulant abuse. (2009). *Molecular BioSystems*, 5, 927-930.

6.2.4 Actividades complementarias

6.2.4.1 Perspectiva fitoquímica de *Eupatorium* spp

Pharmacologyonline 3: 682–690 (2010) Newsletter Ramírez Lopez *et al.*

PHYTOCHEMICAL PERSPECTIVE OF *EUPATORIUM* SPP.

^{1,2}Cesar B. Ramírez Lopez, ^{1,2}Edgar García Sánchez, ²Alejandra Leon Hernández, ³David Raya González, ²Rosa E. del Río, ²Alberto Flores García, ²Mauro M. Martínez Pacheco

²Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, ³Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, UMSNH, Ed. B-3, Cd. Universitaria, Francisco J. Mujica s/n, Col. Felicitas del Río, Morelia, Mich. C.P. 58060, Mexico. e-mail: mpacheco@umich.mx

Summary

In the span of more than a century, seventy-three *Eupatorium* species inhabiting the geographical coordinate extremes: 20°24' to 17°55' North latitude, 100°04' to 103°44' West longitude have been collected and recorded. They are members of the diverse ecosystems located in tropical, subtropical and temperate regions, some of which are used in Mexican traditional medicine. The genus *Eupatorium* is the biggest of the tribe Eupatorieae, contains approximately 1,200 species largely distributed throughout the American continent, and has been subject to an intense and critical taxonomic revision. Given the scarce phytochemical and pharmacological information on the reported *Eupatorium* spp in this region of the world, the purpose of this work is to put into perspective the importance of the phytochemical study of *Eupatorium* spp as an opportunity to find novel molecules that can potentially contribute to the wellbeing of mankind in terms of healthcare and of the conservation of economic, environmental and cultural patrimonies.

Key words. *Eupatorium*, Michoacan, Mexico, secondary metabolites, biodiversity

Plants are sessile organisms that possessing physiological mechanism to detect and process information and then to discern and respond to environmental stimuli, they doing throughout their life cycles. In each step of the process of plant development (germination, growth, reproduction, and defense), the plant produces secondary metabolites that act as chemical messengers, which are the basis for the establishment of defense mechanisms and communication within and between species, forming a phytochemical arsenal that offers an excellent opportunity for the isolation, purification, and identification of chemical compounds for their potential application.

¹NOTE. CBRL and EGS, they are sharing the first authorship of this manuscript.



Figure 1. State of Michoacán de Ocampo. Extreme geographic coordinates: 20°24' to 17°55' North latitude, 100°04' to 103°44' West longitude. The shaded area corresponds to the territory in Michoacán where *Eupatorium spp* have been collected for over 100 years.

A possible approach is to use socio-cultural and botanical knowledge of native plants of the vast Mexican flora with or without biological or pharmacological relevance. It is common knowledge that government institutions and pharmaceutical industries around the world have had successful programs in the search for new drugs based on natural products and in particular on secondary metabolites of plants. In a general overview it is important to note that this potential source of new molecules and new sources of secondary vegetal metabolites is still unknown. Some observations supporting such lack of knowledge of the vegetal metabolome and that show the opportunity to find novel molecules that can potentially contribute to the wellbeing of mankind in terms of healthcare and

of the conservation of economic, environmental and cultural patrimonies are described below.

The growing and increasingly reliable ethnobotanical and ethnopharmacological information on plants and on certain plant genera important in traditional medicine, as well as of related species and genera that can be sources of metabolites of pharmacological interest, has been compiled in a useful form, since there are regional floristic studies that represent an approximation of the plant biodiversity in the region, but not so in the case of ethnic or regional pharmacopeias. Therefore, in some region of Mexico, there are approximations of the floristic richness and thus the lack of knowledge of the potential phytochemicals, which could be of economic, cultural, and academic interest or in conservation manifests itself. It also enables the development of appropriate programs and plans for the protection of regional and national biodiversity.

The floristic studies show that Mexico is a country rich in biodiversity, its flora being 20 to 30 thousand species. Among these, it was found that the largest number of vegetal species is located in the Family Asteraceae. It was also noted that Michoacán is one of the Mexican states with a vast flora, location where we did this study (Figure 1) [1-3]. The ten families with the greatest diversity in the division Magnoliophyta [Format: Family (genus and species) in Mexico are: Asteraceae (402 and 3084), Poaceae (207 and 1,317), Fabaceae s. I. (164 and 2,028), Orchidaceae (156 and 1,062), Cactaceae (76 and 836), Euphorbiaceae (56 and 816), Rubiaceae (94 and 639), Lamiaceae (42 and 530), Solanaceae (34 and 458) and Cyperaceae (22 and 438), including non-native species [1].

The intrinsic central importance in the search of new drugs based on ethnomedical information on plants used in traditional medicine and its great value in the daily lives of native of any earth place is based on the fact that 65 % of the world's population makes use of medicinal plants [4,5]. In Mexico, the importance of using medicinal plants can be visualized by comparing the proportion of physicians using Western medicine with that of traditional physicians, healers, and shamans using medicinal plants for healing; the ratio is 1 to 4 [6]. It is also estimated that in Mexican traditional medicine there is a core group of approximately 3,000 medicinal plants used for the treatment of common diseases, of which approximately 1,000 have been used for over 400 years [7,8]. However, most of these plant species have not been subjected to phytochemical, toxicological, or pharmacological research.

The search for new active principles based on traditional use of plants, assumes that, both medicinal plants and those incorporated in the daily lives of the natives, provides evidence of biological activities with the likelihood of success in finding new active principles. It is known that plants have a great biological and chemical variability, which will directly modify the quantity of potential active principles. Such chemical heterogeneity in different groups of plants relocated and collected at different places and times of the year is this fact a problem in the process of identification, isolation and purification of plant components of interest [9,10]. Such salient fact leads to the pursuit of the same active principles in closely related vegetal species. This circumstance leading to another specific interest, which focuses on those plant species of same genus with no predation as it follows that they produce metabolites toxic to plants, microorganisms, insects, and vertebrates, of which there is scientific evidence that some of these metabolites are bioactive in humans.

The lack of full knowledge of the vegetal metabolome is demonstrated with the metabolomic analysis of *Arabidopsis thaliana*, the widely used biological model for the study of fundamental plant biology and whose genome is small and known, although its metabolome is unknown. Giavalisco et al. using the stable ¹³C isotope in this plant showed the lack of knowledge of its secondary metabolism [11]. This research group obtained 1,024 chemical formulae, of which 12.5 % (128 metabolites) were registered and corresponded to metabolites of the primary metabolism but surprisingly 896 condensed formulae were not registered in databases such as: AraCyc, KNApSAcK, KEGG and NIST. All these databases are specific to plants, containing the information of metabolites reported in the literature with and without any biological or pharmacological significance including metabolic maps and information on the metabolic enzymes involved.

The central vision that the vegetal metabolome is composed of a large number of metabolites that remain to be discovered is strengthened adding to the possibility of finding new molecules, considering the conservative estimate that there are 250,000 terrestrial plants (angiosperms and gymnosperms), 15 % of which have been subject to phytochemical study and 6 % have been scrutinized for any biological activity [12,13]). Strengthening the observation with the fact of the persistence of medicinal plants in homes and popular markets is an indicator of the cultural value and an example of the effectiveness of this resource in healthcare. In Mexico, the State of Michoacan has more than 5,000 plant species [1,14]. Some of them are beginning to be subjected to studies of their pharmacological properties for example the determination of the antifungal and antioomycete properties of some medicinal plants used in traditional medicine in western Mexico [15,16]). While Morales Lopez et al. determined the effect of Bornyl-*O*-Deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienate obtained from *H. longipes*, a plant endemic to the central Mexican plateau, on the growth of pathogenic organisms [17]. Similarly, Raya Gonzalez et al. isolated a cyclitol from the *Enterolobium cyclocarpum* tree (common name, parota), pinitol—a molecule that induces biological effects of interest, specifically in glucose metabolism [10]. It is estimated that the phytochemistry of 5 % of the plants that inhabiting in the State of Michoacan is known; although the medicinal plants used by natives of these lands have not been validated pharmacologically. In this area of the country many species of the genus *Eupatorium* grow and propagate and some of them have medicinal uses.

Eupatorium genus belongs to the tribe Eupatorieae, Subfamily Asteroideae and Family Asteraceae. It is a genus complex with respect to its taxonomic classification. It 1,200 species have been described, suggesting that the center of origin of *Eupatorium* spp is the American continent

[18]. Therefore, the importance is greater in the case of a genus that groups important species in traditional medicine of several societies in five continents, in South America and Asia they are used to relieve maladies associated with signs and symptoms of microbial and parasitic infection.

Table 1. Use in traditional medicine, common name, organs used, and place of some species of the genus *Eupatorium* [19-30].

| Species | Common Name | Use in traditional medicine | Part used | Country |
|-------------------------|--|--|------------------|------------------|
| <i>E. buniifolium</i> | Romerillo romerito | Antiprotozoal, disinfectant and to treat disorders of the Central Nervous System, digestive system, treatment of liver | Aerial | Argentina |
| <i>E. candolleianum</i> | Tabaco del monte | Laxative | Aerial | Argentina |
| <i>E. lindleyanum</i> | Ye Ma Zhui | Antihistamine and antibacterial | Whole | China |
| <i>E. capillifolium</i> | Dogfennel | Applied externally on insect and reptile bites | Aerial | Asia |
| <i>E. inulaefolium</i> | Sanalotodo | Washing bile and injuries | Aerial | Colombia |
| <i>E. glandulosum</i> | Mexican devil | Disinfecting injuries and to deparasitize | Leaves | India |
| <i>E. ayapana</i> | Snakeroot | Cardiac stimulant, laxative and anticoagulant | Leaves | India |
| <i>E. glutinosum</i> | Matico Serrano | Astringent, antirheumatic, antimicrobial, to treat ulcers, diarrhea and headaches | Leaves and stems | Ecuador and Perú |
| <i>E. arnotianum</i> | Clavel or uoué | Gastric pains, antimicrobial, antiviral, and contraceptive | Leaves | Argentina |
| <i>E. hecatanthum</i> | Uoué | Analgesic, antitusive and antispasmodic | Aerial | Argentina |
| <i>E. salvia</i> | Salvia macho, pagajosa, pega- pega | Antiseptic and treatment of insect bites | Whole | Chile |

Another use is to treat disorders of the Central Nervous System and of the liver, as laxative and antihistaminic (Argentina), cardiac stimulants, laxative and anti-coagulants (India), astringent, antirheumatic (Peru) and as antiviral (Argentina) (Table 1).

The presence of species of *Eupatorium* in Michoacan territory dates from the late nineteenth century with the recollection and report in 1891 of a sample of *E. areolare*. Since then, plant specimens have been collected on near bodies of water or on the banks of streams and rivers, and all of them early have been taxonomically placed in the genus *Eupatorium* [31].

This territory has a range of 0 to 3,840 meters above sea level, has a great variety of climates, soils and vegetation types, which generate a variety of environmental conditions occurring in this region of the world, hosting an enormous biodiversity. In a conservative approximation of the presence of species of *Eupatorium* in this region, a group of 69 species of *Eupatorium* successfully thrive in 70 % of the territory. Also, it was detected a subgroup of ten species of the Mexican core group of *Eupatorium* with folk medicinal uses, see Table 2. Only, three of them are used in the region and another seven are used in other regions of the country.

Into Michoacan territory there are zones where various species of the genus *Eupatorium* are found, e.g. the Cuenca del Rio Balsas, considered one of the regions with the greatest biodiversity and of economic importance in Mexico, is limited by the neovolcanic axis and the Sierra Madre del Sur.

Table 2. *Eupatorium* spp in Mexican traditional medicine [32-45].

| Species | Common Name | Use | Chemistry |
|---|---|--|---|
| <i>E. albicaule</i> Schultz Bip. ex Klant | Midracia | Pain | β -sitosterol, flavonoids, tannins |
| <i>E. albicaule</i> Schultz-Bip | Okiny, vishé, tokaban, tok'te', yaxal | Asthma, dissolution of renal calcium, diarrhea, fever | Flavonols, flavonol glycosides |
| <i>E. areolare</i> DC | Borreguillo | Digestive disorders, Diarrhea | Sesquiterpene lactones sharing unusual C ₁₀ diester side chain, 7-acetoxytinifoline, <i>cis</i> -hydroxy cinnamic acid, germacranolides, heliangolides, thymol derivative, areolal |
| <i>E. aschenbornianum</i> S. Schauer | Axihuitl | Skin problems, tumors, injuries and thrushes | 5-acetyl-3 β -angeloyloxy-2 β -(1-hydroxy isopropyl)-2,3-dihydro benzofurane, 5-acetyl-3- β -angeloyl oxy-2 β -(1-hydroxy isopropyl)-6-methoxy-2,3-dihydrobenzo furane, espeletone, encecalinol, O-methyl encecalinol, encecalin, sonorol, taraxerol, (+)- β -eudesmol, a mixture of β -sitosterol and stigmasterol, encecanescin |
| <i>E. daleoides</i> (D.C.) Hemsley | Palo de lodo | Dysentery, antiparasitic | Diterpenic acids, euparine derivatives, guaianolides, labdane derivatives, furano diterpenes. |
| <i>E. glabratum</i> Kunth | Chamisa, Hierba de la paloma, hierba verde, Jesús, sopilla, Jesús deni | Stomachache, postpartum bath | Acacetin, eupaglabric acid |
| <i>E. morifolium</i> Miller | Callotillo. | Rheumatic pain and itching | Morifoline, eudesmanolides, rinderine, 12-acetylrenderine, |
| <i>E. odoratum</i> L. | Tokaban, Cruz dulce grande, te kaban, tok, tok'aban, xtok'aban, tok'ja'aban, xtok'ja'aban; krus tok'te' | Puerperal fever, retention of urine, Pharmacology: Aqueous and methanol extract, spasmogenic action, antihepatotoxic, molluscicidal, | Eupatenol, sakuranetin, <i>iso</i> -sakuranetin, salvigenin, odoratin, acacetin, velutin, tamerixetin and mikanin |
| <i>E. petiolare</i> Moc. | Hierba del ángel or yolochichitl, Amargocilla, coñesdá, co-ye-sa, coyés-da, cunisha, peshtó, ejutho, pechto, colochichi, yolochichi, huirapen | Digestive disorders, colics, gallstones, liver disease, purgative, dysmenorrheal postpartum baths, nervousness, cough, weight gain, diabetes | 2 α - <i>iso</i> -valeroyl oxyeperuic acid, kaurenic acid, taraxasterol, 6-methoxy-benzyl salicylate, 11-13-dihydro-eupatoriopicrin and 2-hydroxy-6-methoxy-benzoic acid |
| <i>E. pycnocephalum</i> Less. | Hierba de la cruz, Hierba del burro, Cruz dulce chica | Postpartum baths, puerperal fever, inducing labor, erysipelas, cold | Caryophyllene derivative, deoxyptiolasides |
| <i>E. quadrangulare</i> D.C. | Carrizo, Tabaquillo | Body aches, swelling, postpartum recovery | Quadrangulin A, quadrangolide, sesquiterpene lactones |
| <i>E. squarrosum</i> Cav. | Prodigiosa | Stomach ailments, diarrhea, vermifuge | Atanasin, eupatolin, 5-hidroxy-4',6,7,8-trimethoxy flavone, gardenin B, glucoferide, santine, three derivatives of caticvic acid and angeloyl-oxy-epoxy-brickelliol. |

It has aprox. 58,643 km² that is shared with territories of several Mexican states, a fraction of land of 12,000 km² belong to Michoacan state and it has been explored for 30 years. During this period ten new species belonging to this genus and found only in this territory have been reported [46].

Eupatorium spp have been relocated to new genera and have given rise to synonyms such as *E. arsenei* [*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob.] and *E. pulchellum* H.B.K. [*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob], since they have organs with similar morphological characteristics, mainly the flowers and leaves [47]. Hence, it is feasible to make a first approximation of the phylogenetic relationships of *Eupatorium* spp growing in Michoacan through the boarding molecular (ITS, RFLPs, microsatellite loci). Frequently the *Eupatorium* species having medicinal use are confused by the general population, for example *Eupatorium arsenei* known as the "angel herb" (hierba del angel; in Spanish language) used to relieve upset stomach and is commonly confused with *E. aschenbornianum*, *E. pazcuarensis* and *E. petiolare*. While all these plants are used medicinally since prehispanic age, these uses do not coincide with current registries and none of their therapeutic applications have been confirmed experimentally. There is not mention of other *Eupatorium* sp from Michoacan of which there has not been detected a history of the medicinal use, nor chemical or pharmacological studies.

Isolated compounds from *Eupatorium* spp include monoterpenes, sesquiterpenes (guaianes, germacrenes, and cadinanes), diterpenes, triterpenes, flavanoids, and alkaloids of the pyrrolizidine type, specific examples of secondary metabolites purified from species of this genus have been integrated in the excellent revision by Zhang and colleagues, where the phytochemical potential of this genus is demonstrated [48].

However, with the information obtained relating to chemical, ethnobotanical, ethnopharmacological and traditional use of species in this genus it has become clear that the number of species of *Eupatorium* present in Michoacan is unknown and that the reported species are frequently re-classified. Likewise there is the exciting possibility of finding in species of the genus *Eupatorium* new molecules with biological activity, which serves as molecule prototypes for therapeutic candidates. Currently we give continuity to the phytochemical studies of *Eupatorium* spp that grow and thrive in Michoacan in the form of phytochemical studies biodirected in the search for secondary metabolites with biological activities of us interest such as; antimicrobial, cytotoxic and anticancer, antitermites, antioxidant, antiviral, vasodilatator and allelochemical.

Conclusion

The central idea of this work is that the metabolome of *Eupatorium* spp inhabiting in this region of the world is composed of a great number of metabolites that remain undiscovered is strengthened with the possibility of success in finding molecules that could potentially be therapeutic candidates in the near future.

Acknowledgements

The authors thank UMSNH for the funding of this work. Likewise, to CONACYT for the scholarships awarded to EGS, CBRL, and ALH. A special thanks to Mr. Martin Calderon Raya Biologist for the manuscript revision of English language.

References

1. Villaseñor JL, Ibarra G, Ocaña D. Strategies for the conservation of Asteraceae in Mexico. *Conservation Biology*, 1997; 12: 1066 – 1075.
2. Rzedowski J. *Vegetacion de Mexico*. Limusa Ed. México. 1978. (Spanish language).
3. Toledo VM. La diversidad biologica de Mexico. *Ciencia y Desarrollo*, 1988; 81:17-30. (Spanish language)
4. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull. WHO*, 1985; 63:965-981.
5. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 2001; 109:69-75.
6. Damian Badillo LM, Espinosa Madrigal RM, Martinez Muñoz RE, Ron Echeverria OA, Salgado Garciglia R, Flores Garcia A, Raya Gonzalez D, Martinez Pacheco MM. The mexican medical plants with antifungal proprieties are an economic and health opportunity area. *Pharmacologyonline*, 2008; 3:61-77.
7. Lozoya X. Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs Research Unit in Pharmacology of Natural Products, National Medical Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City. *Ciba Found Symp*. 1994.
8. Deciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-Lopez GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 110:334-342.
9. Rivero Cruz B, Rivero Cruz I, Rodriguez JM, Cerda Garcia Rojas CM, Mata R. Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Natural Products*, 2006; 68:1172-1176.
10. Raya-Gonzalez D, Pamatz-Bolaños T, del Rio-Torres RE, Martinez-Muñoz RE, Ron-Echeverria O, Martinez-Pacheco MM. D-(+)-pinitol a component of heartwood from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 2008; 63C: 922-924.
11. Giavalisco P, Hummel J, Lisek J, Cuadros Inostroza A, Catchpole G, Willmitzer L. High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole ¹³C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Analytical Chemistry*, 2008; 80:9417–9425.
12. Ayensu ES, DeFilipps RA. *Endangered and threatened plants of the Unites States*. Washington D.C. Smithsonian Institution. 1978.
13. Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: Leandfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2000; 52: 253-262.
14. Villaseñor Gomez L. Introduccion a biodiversidad. En: *La biodiversidad en Michoacan: Estudio de Estado*. Villaseñor Gomez Ed. 2005; pp 18 (Spanish language).
15. Damian-Badillo LM, Salgado-Garciglia R, Martinez-Muñoz RE, Martinez Pacheco MM. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*, 2008; 1: 27-33.

16. Damian Badillo LM, Martinez Muñoz RE, Salgado Garciglia R, Martinez Pacheco MM. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2010; 9:136-142.
17. Morales-Lopez ME, Martinez-Muñoz RE, Ron-Echeverria O, Rubio Morales NA, Martinez Pacheco MM, Salgado Garciglia R. Effect of bornyl-*O*-deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienate on growth of several pathogens. Pharmacologyonline, 2007; 3: 96-103.
18. Katinas L, Gutiérrez DG, Grossi M.A, Crisci JV. Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la Republica Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 2007; 42: 113 –129. (Spanish language).
19. Chiari E, Duarte D, Raslan D, Saude D, Perry K, Boaventura MA, Grande T, Stehmann J, Anjos A, Oliveira A. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Tripanosoma cruzi*. Phytotherapy Research. 1996; 10: 636-638.
20. Zardini EM. Etnobotánica de *Compuestas* Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico (Primera parte). Acta Farmaceutica Bonaerense, 1984; 3:77-99. (Spanish language).
21. Rondina R, Bandoni A, Coussio J. Plantas silvestres Argentinas con reconocidas propiedades medicinales o toxicas. OEA-CYTED, Buenos Aires (CD-ROM). 2003. (Spanish language).
22. Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Médica (Zhonghua Benchao), Vol. 7. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. 1998. pp. 839-841.
23. Usher G. A dictionary of plants used by man. Constable, 1974. ISBN 0094579202
24. Ferraro GE, Martino VS, Cousio JD. New flavonoids from *Eupatorium inulaefolium*. Phytochemistry, 1977; 16:1618-1619.
25. Sasikumar JM, Pichai A, Doss A. Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. Fitoterapia, 2005; 70:240-243.
26. Gupta M, Mazumder UK, Chaudhuri I, Chaudhuri RK, Bose P, Bhattacharya S, Manikandan L, Patra S. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. Fitoterapia, 2002; 73: 168-170.
27. Solis MA. Plantas medicinales del Ecuador. Abya-Ayala Ed, Quito, 1992. p. 80. (Spanish language)
28. Clavin M, Gorzalczany S, Miño J, Kandarian C, Martino V, Ferraro G, Acevedo C, Antinociceptive effect of some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. Phytotherapy Research, 2000; 14: 275-277.
29. Filipov A. Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. Journal of Ethnopharmacology, 1994; 44: 181-193.
30. Zin J, Weiss C. La salud por medio de las plantas medicinales. Ed. Salesiana, Santiago de Chile. Chile, 1980. p. 130. (Spanish language).
31. Espinosa Garduño J, Rodríguez Jimenez LS. En: Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario VII. Listado Florístico del Estado de Michoacán. Sección II (Angiospermae: Compositae). 1995. pp 84-103. (Spanish language).
32. Argueta A, Cano L, Rodarte M, Tomo 1-3. Instituto Nacional Indigenista En: Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Mexico D.F. 1994. pp. 1786. (Spanish language)

33. Aviles M, Suarez G, Catalogo de plantas medicinales jardín etnobotanico centro. INAH, Cuernavaca, Morelos, Mexico, 1994. pp 47. (Spanish language)
34. Fuentes M, Aviles M. Informe registro de las plantas medicinales reportadas en el Estado de Morelos. Centro INAH. Cuernavaca, Morelos, Mexico, 1997. pp 125. (Spanish language).
35. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana-UNAM.
www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx
36. Aguilar Guadarrama B, Navarro V, Leon Rivera I, Rios MY. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. Natural Products Research, 2009; 23:1559-1565.
37. Sanchez Mendoza ME, Reyes Trejo B, Sanchez Gomez P, Rodriguez Silverio J, Castillo Henkel C, Cervantes Cuevas H, Arrieta J. Bioassay guided isolation of an antiulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. Fitoterapia, 2010; 81:66-71.
38. Yu SG, Gage DA, Fnag N, Mabry TJ. Flavonols and flavonol glycosides from *Eupatorium areolare* var *leiocarpum*. Journal of natural Products, 1986; 49:181-182.
39. Fang N, Gage DA, Mabry TJ. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Piptothrix areolare*. Phytochemistry, 1988; 27:203-205.
40. Guerrero C, Silva M, Maldonado E, Martinez M. Acido eupaglabrico un nuevo compuesto aislado de *Eupatorium glabratum* H.B.K. Revista Latinoamericana de Quimica, 1978; 9:71-75 (Spanish lenguaje).
41. Wiedenfeld H, Andrade Cetto A. Pyrrolizidine alkaloids from *Critonia morifolia*. Phytochemistry, 1998; 49:1463-1465.
42. Gonzalez AG, Bermejo Barrera J, Yanes Hernandez AC, Estevez Rosas F, Dominguez XA. Eudesmanesquiterpenes from *Eupatorium quadrangulare*. Phytochemistry, 1985; 24:1847-1848.
43. Flores SE, Herran J. Atanasin: a new flavone isolated from *Brickellia squarrosa* (Cav.) Robinson. Chem. & Ind. 1960; 12:291.
44. Hernandez JD, Roman LU, Rodriguez M, Espinera J, Joseph-Nathan. Areolal, a thymol from *Piptothrix areolare*. Phytochemistry 1986; 1743-1744.
45. Bohlmann F, Zitzkowski P, Suwita A, Diedler L. 1978. *Cis*-kolaveninsäure und weitere inhaltsstoffe aus vertrettern der tribus eupatorieae. Phytochemistry, 1978; 17: 2101-2105.
46. Fernandez R, Rodriguez C, Arreguin ML, Rodriguez A. Listado floristico de la cuenca del Rio Balsas, Mexico. Polibotanica, 1998; 9:1-151. (Spanish language).
47. Rzedowski J., Calderon de Rzedowski, G. 2005. Tribu Eupatorieae En: Flora fanerogamica del Valle de Mexico. Instituto de Ecologia A. C. Centro Regional del Bajio, Comision Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
48. Zhang Man-Li, Wu Ming, Zhang Jian-Jian, Irwin Dianne, Gu Yu-Cheng, Shi Qing- Wen. Chemical constituents of plants from the Genus *Eupatorium*. Chemistry & Biodiversity 2008; 5: 40-55.

6.2.4.2 Efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en el ensayo de plato caliente.

Revista Brasileira de Farmacognosia
Brazilian Journal of Pharmacognosy
21(5): 928-935, Sep./Oct. 2011

40
ANOS

Article

Received 20 Dec 2010
Accepted 20 Jun 2011
Available online 2 Sep 2011

Keywords:

Ageratina glabrata
10-benzoiloxo-6,8,9-trihidroxi-
timol isobutirato
analgésia
rats
extract
pain
nociception

ISSN 0102-695X
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000158>

Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test

Guadalupe García P,¹ Edgar García S,³ Isabel Martínez G,¹
Thomas R. F. Scior,² José L. Salvador,³ Mauro M. Martínez P,³
Rosa E. del Río^{*,3}

¹Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico,

²Laboratorio de Farmacomodelaje, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico,

³Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico.

Abstract: *Ageratina glabrata* (Kunth) R.M. King & H. Rob., Asteraceae (syn. *Eupatorium glabratum* Kunth) is widely distributed throughout Mexico and popularly known as “chamizo blanco” and “hierba del golpe” for its traditional use as external analgesic remedy. Though *glabrata* species has been chemically studied, there are no experimentally asserted reports about possible analgesic effects which can be inferred from its genus *Ageratina*. To fill the gap, we evaluated *A. glabrata* extracts in an animal model of nociception exploiting thermal stimuli. NMR and mass analyses identified a new thymol derivative, 10-benzoiloxo-6,8,9-trihidroxi-timol isobutirato (1), which was computationally converted into a ring-closed structure to explain interaction with the COX-2 enzyme in a ligand-receptor docking study. The resulting docked pose is in line with reported crystal complexes of COX-2 with chromene ligands. Based on the present results of dichloromethane extracts from its dried leaves, it is safe to utter that the plant possesses analgesic effects in animal tests which are mediated through inhibition of COX-2 enzyme.

Introduction

Pain is a subjective experience that is the result of the perception of an injurious stimulus and includes an emotional component that requires that the individual is conscious so that this happens. In 1986, the International Association for the Study of Pain (IASP) defined pain as an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage (Merskey & Bogduk, 1994). But, the pain has a physiological component, which is called nociception. That is the process by which intense thermal, mechanical or chemical stimuli are detected by a subpopulation of peripheral nerve fibers, called nociceptors (Basbaum & Jessell, 2000). The information is processed via specialized central nervous system pathways (Danneman, 1997).

The animal models for the study of the pain measure the latency time and/or the threshold of the escape responses evaluating the effect of several drugs in the nociceptive responses that are those associated with the injurious stimulation perceived by the nociceptors (Danneman, 1997). The models of acute pain by application of intense stimuli of short duration induce

changes in motor reflexes or behavior such as retirement reflexes, vasomotor changes and vocalization, besides not requiring the accomplishment of a previous injury in the animal (González-Darder, 2000). Therefore, nociception is susceptible to a pharmacological blockade for the treatment of the pain and the common analgesic drugs are opioids and non-opioids drugs. But these drugs have disadvantages in the dosage, gastrointestinal problems, dependence and others. Different species of plants are used in folk medicine as an alternative for treatment of diseases and the traditional uses of plants as herbal remedies have played a vital role in the discovery of new molecules as therapeutic agents.

In general, species of the genus *Ageratina* possess therapeutic properties, such as the concerned analgesic effect which in turn was reported by Mandal et al. (2005) and Chakravarty et al. (2010). The species belongs to the well-known plant family of Asteraceae, and *Ageratina* is a member of the tribe Eupatorieae. *Ageratina* constitutes a medium-sized shrub growing from 1 to 2 m with dense branches. The leaves are opposite, lamina narrowly deltoid to elliptical and the capitula densely corymbose. The genus comprises nearly 146 species according to King &

Robinson (1970). It is found in the tropical and temperate regions of Europe and America, especially Mexico.

The plant under investigation, *Ageratina glabrata* (Kunth) R.M. King & H. Rob. (syn. *Eupatorium glabratum* Kunth) (King & Robinson, 1970), is popularly known as “chamizo blanco” or “hierba del golpe” which means “white greasewood” and “contusion herb”. The rural population recognizes its pain-relief effects in external remedies. Reports from the literature describe flavones, thymol derivatives and other phenolic terpenoids (Romo de Vivar et al., 1971; Bohlmann et al., 1977; Guerrero et al., 1978). Though *A. glabrata* has been chemically studied, there are no scientific reports about its analgesic effects. Therefore, we studied this Mexican plant extract in a hot plate model of nociception exploiting distinct thermal stimuli.

Materials and Methods

General

NMR measurements, including DEPT experiments, were performed at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C on a Varian Mercury Plus 400 spectrometer, using CDCl_3 as the solvent and TMS as internal reference. Mass spectra were recorded at 20 eV on a Hewlett-Packard 5989B Series II Plus spectrometer adapted to a HP 5890 gas chromatography. Column chromatography was carried out on Merck silica gel grade 60 (70-230 mesh).

Plant material

Specimens of *Ageratina glabrata* (Kunth) R.M. King & H. Rob., Asteraceae, were collected on January 4, 2006 near km 191 of México-Morelia state road No.15, in the municipality of San José de la Cumbre, State of Michoacán, México (N 19°40'859", W 100°50'423" and 2,234 meters above sea level). A voucher specimen (No. 188319) is deposited at the Herbarium of the Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, Mexico, where Prof. Jerzy Rzedowski kindly identified the plant material (Figure 1).



Figure 1. Photos of *A. glabrata* by Dr. Rosa E. del Río. The rhomboid-shaped leaves and flower grouping are clearly visible.

Preparation of plant extract

Air-dried leaves of *A. glabrata* (200 g) were extracted with CH_2Cl_2 (1.5 L) at room temperature for three days, three consecutive times. Filtration and evaporation of the extract afforded green viscous oil (19 g).

Isolation of the thymol derivative (1) from dichloromethane extract

The dichloromethane extract (0.5 g) was chromatographed on silica gel column using *n*-hexane and ethyl acetate mixture of increasing polarity, and finally pure ethyl acetate. Elution with hexane:EtOAc (9:1) afforded a mixture of thymol derivatives. The sub-fraction 30-32 (100 mg) was subjected to rechromatography on silica gel (5 g). Elution with *n*-hexane-AcOEt (8:2) afforded pure 10-benzoiloxo-6,8,9-trihydroxy-thymol isobutyrate (1) (20 mg). Identification was supported by spectroscopic analyses.

Animals

Female Sprague Dawley rats (180-200 g) were used for the study. The animals were housed in rooms maintained at 24 ± 2 °C, twelve-hours-light-darkness cycle and maintained with *ad libitum* access to Harlan Tekland Global Diets® and bottled water. The animals were handled 3 min a day for four weeks until the experiment day. All animal experiments complied with recommendations of the Regulation of the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla in 2007, which provides for compliance with Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) appendix A, about the “Specifications for the production, care and use of laboratory animals” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001).

Hot plate test

The extract was dissolved in sesame oil and administered to animals intraperitoneally at doses of 100 mg/Kg (n=9) and 150 mg/kg (n=10). The control group (n=8) was intraperitoneally exposed to a vehicle (0.7 mL) of pure sesame oil. In addition, independent groups of rats received, meloxicam intraperitoneally (n=8) at a dose of 4 mg/kg and nalbuphine (n=8) at a dose of 5 mg/kg. The control group (n=7) received isotonic saline solution (SSI, 0.4 mL). In the hot plate test, all animals were placed on a hot plate maintained at a temperature of 40 °C. The antinociceptive effect was quantified by measuring latency times for kicking or licking of hind paw. In addition, prior to the aforementioned verum and

control test, all animals had just been exposed to the hot plate in order to observe the so-called pre-injection-latency times, of which three measurements were taken. Each animal was repeatedly placed on the hot plate in time intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 min after injection. The observation series of each animal was continued in order to collect data for every other hour until reaching the defined limit of 12 h evaluation time.

Docking simulations

The chromene derivative computationally modified and the control structure meloxicam (Engelhardt et al., 1995) were docked manually into the COX-2 catalytic site. This study was performed with the Sybyl[®]X software suite (Tripos International, 2010).

Vaginal smears

The vaginal smears were used to detect the phase of the estrous cycle during the hot plate test. We used this method as a control to determine whether the estrous cycle has influence on the latency times in the hot plate test.

Autopsy

The rats were observed for ten days after the nociception test in order to determine possible changes in the intake of food and water. On day eleven, animals were randomized and sacrificed using an overdose of sodium pentobarbital (55 mg/kg intraperitoneally). At autopsy the organs (heart, liver, kidneys, lungs, spleen, intestine and adjacent tissue to the administration area of *A. glabrata*) were given a macroscopic examination about their size, shape, color and texture.

Statistical analysis

Data were analyzed by one way ANOVA and were expressed as the means and respective standard deviation. This analysis allows checking as to whether there are any statistically significant differences ($p < 0.05$) between the mean latency times of the groups. To determine which groups are different, the data were analyzed by Tukey test. In addition, Dunnett test was used to compare the experimental groups versus respective control group using Statistica program.

Results and Discussion

The dichloromethane extract of *A. glabrata* leaves was fractionated by column chromatography affording a pure compound 10-benzoiloxo-6,8,9-trihydroxy-thymol isobutyrate (**1**). The mass spectrum

indicated a molecular ion at m/z 388 in agreement with the molecular formula $C_{21}H_{24}O_7$, m/z 370 (12%) $[M-H_2O]^+$, 178 (46%), 165 (43%), 150 (15%), 137 (5%), 122 (23%), 105 (100%), 91 (5%), 71 (40%). The 1H NMR spectrum (Figure 2) indicates the presence of a benzoate group at 7.98, 7.55 and 7.40 ppm; singlets at 6.65 and 6.58 ppm for 2 and 5 aromatic hydrogens, respectively. The signals for the isopropyl group at 2.52 and 1.09 ppm. A singlet at 4.64 ppm for two hydrogens of methylene group in the 10-position of the molecule and the hydrogens of methylene group in C-9 were observed as a doublet each at 4.56 and 4.49 ppm. The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) was in agreement with the proposed structure. Eleven thymol derivatives have been obtained by Bohlmann et al 1977 from *A. glabrata*, but all of them differ from the new thymol derivative **1**.

Table 1. NMR data for compound **1** in $CDCl_3$.

| Position | ^{13}C | DEPT | 1H |
|----------|----------|--------|--|
| 1 | 149.2 | C | - |
| 2 | 120.0 | CH | 6.65 (s) |
| 3 | 129.2 | C | - |
| 4 | 146.9 | C | - |
| 5 | 112.8 | CH | 6.58 (s) |
| 6 | 126.0 | C | - |
| 7 | 15.7 | CH_3 | 2.16 (s) |
| 8 | 78.2 | C | - |
| 9 | 67.9 | CH_2 | 4.64 (s) |
| 10 | 67.3 | CH_2 | 4.56 (d), $J=12.0$ Hz 4.49 (d), $J=12.0$ Hz |
| 1' | 177.7 | C | - |
| 2' | 33.9 | CH | 2.52 (sep), $J=7.0$ Hz |
| 3' | 18.8 | CH_3 | 1.09 (d), $J=7.0$ Hz |
| 4' | 18.8 | CH_3 | 1.09 (d), $J=7.0$ Hz |
| 1'' | 166.9 | C | - |
| 2'' | 130.12 | C | - |
| 3'' | 129.8 | CH | 7.98 (dd), $J=7.0$ and 1.3 Hz |
| 4'' | 128.5 | CH | 7.40 (dd), $J=7.9$ and 7.7 Hz |
| 5'' | 133.5 | CH | 7.55 (dddd), $J=7.9, 7.7, 1.3, 1.3$ Hz |
| 6'' | 128.5 | CH | 7.40 (dd), $J=7.9$ and 7.7 Hz |
| 7'' | 129.8 | CH | 7.98 (dd), $J=7.9$ and 1.3 Hz |

The results obtained from this study reflect an analgesic effect for *A. glabrata* (100 mg/kg), meloxicam (4 mg/kg) and nalbuphine (5 mg/kg). The analysis of the data has revealed that a significant difference exists between control (vehicle and SSI) and experimental (verum) groups at doses of 100 mg/kg ($p < 0.05$). The injected extract produced a significant increase in reaction times in all verum animals upon exposure to the thermal stimuli (Figure 3). The apex of this increase was found

during the eighth hour after injection at a dose level of 100 mg/kg. Intriguingly, dose augmentation did not enhance protective effects (a higher level of 150 mg/kg).

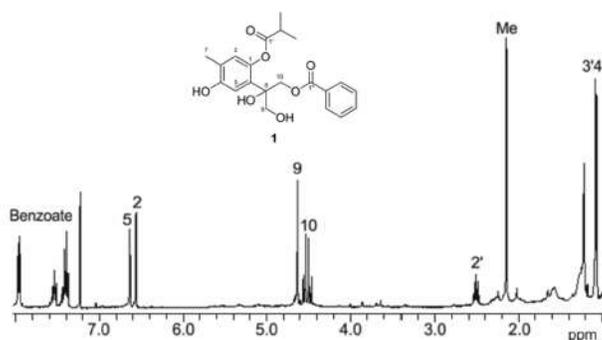


Figure 2. 400 MHz ¹H-NMR spectrum of 10-benzoiloxy-6,8,9-trihydroxy-thymol isobutyrate (1).

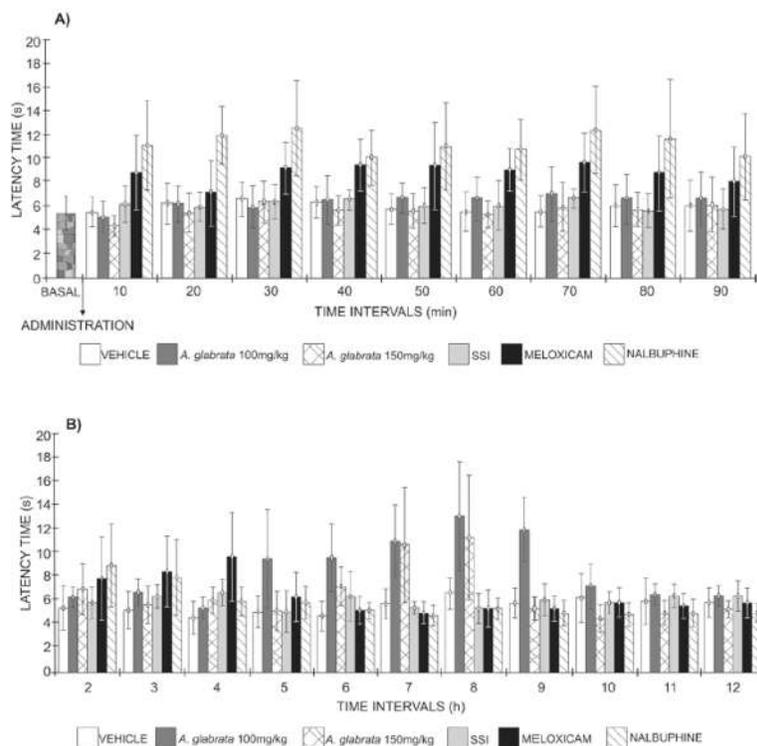


Figure 3. The latency times of the substances and analgesics during the hot plate test for A. the first 90 minutes and B. continuous hourly sampling until reaching 12 h evaluation time. Each point represents the mean values of the latency time group and respective standard deviation. One way ANOVA tests show statistically significant differences ($p < 0.05$) between all groups. On the other hand, the Tukey test finds no statistically significant difference between the verum group of *A. glabrata* (100 mg/kg), and both positive controls (meloxicam and nalbuphine) but in contrast to the *A. glabrata* 150 mg/kg group which does show a statistically significant difference with both controls (logically, vehicle and SSI do show). The basal first sample point in A. represents the latency time means for all groups before the intraperitoneally administration. In addition, Dunnett's test was applied for each time interval, comparing vehicle versus *A. glabrata* 100 and 150 mg/kg and SSI versus meloxicam and nalbuphine ($*p < 0.05$).

The analgesia of the non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) like meloxicam which was used as positive control, is longer than that seen under opioid analgesic drugs application (positive control nalbuphine). NSAID inhibit the synthesis of prostaglandins by cyclooxygenase (COX) enzymes. Certain prostaglandins mediate pain processes (Vanegas & Schaible, 2001). Therefore, the observed analgesic effect of the leaf extract from *A. glabrata* suggests that the underlying molecular mechanism is mediated via COX because of its duration and pain-suppressing character.

The COX enzyme is divided into two isoforms. COX-1 is expressed constitutively throughout the body while the expression of COX-2 is inducible. However in spinal cord and brain, particularly in hippocampus, cortex and amygdala, both isoforms are expressed constitutively. This finding supports the idea that NSAID also act in the spinal cord by inhibiting prostaglandin synthesis and their effect is demonstrated in models of supraspinal analgesia as the hot plate test (Vanegas & Schaible, 2001).

Contemporary research and development for potential new analgesics focus on selective COX-2 inhibition, in order to lower the incidence of gastrointestinal and renal side effects ascribed to COX-1 inhibition (Gajraj, 2003). Hence a docking study was conducted to dock meloxicam and the proposed chromene derivative into the active site of COX-2 target. The chromene structure was hypothetically designed based on the extracted thymol derivative **1** which was identified through NMR analyses.

Based on theoretical grounds and known literature the thymol derivative **1** is converted into a bicyclic system via a ring closure reaction of condensation type (Paredes & Clemente, 2005; Tenorio et al., 2006; Chemler et al., 2009). This occurs on the original thymol derivative **1** which was identified through NMR by our group. We postulate that it is chemically converted into a compound similar to positive control meloxicam which itself is a known COX-2 inhibitor (Engelhardt et al., 1995, Gris et al., 2009). To determine whether this plausible compound (Figure 4) could also block the enzyme COX-2 a docking study was conducted by Sybyl® X software suite (Tripos International, 2010) to position the chromene derivative into the binding pocket of meloxicam, exploring the interacting amino acids and complementary shape information (Wang et al., 2007). The target structure is a human COX-2 enzyme, also called prostaglandin synthase-2 (Padhye et al., 2009). The target receptor was downloaded from the Protein Data Bank site (Berman et al., 2000). Its entry code is 3LN0 (Wang et al., 2010). As a result, both the chromene derivative and the meloxicam ligands were successfully docked into the same orientation and position as seen on the experimental chromene-COX-2 complex. The crystal chromene ligand, meloxicam and our ring-closed chromene derivative have an analogous bicyclic system in common (Figure 4). Hence, the orientation and binding mode of our computed models are in good agreement with the related crystallographic structure (Figure 5).

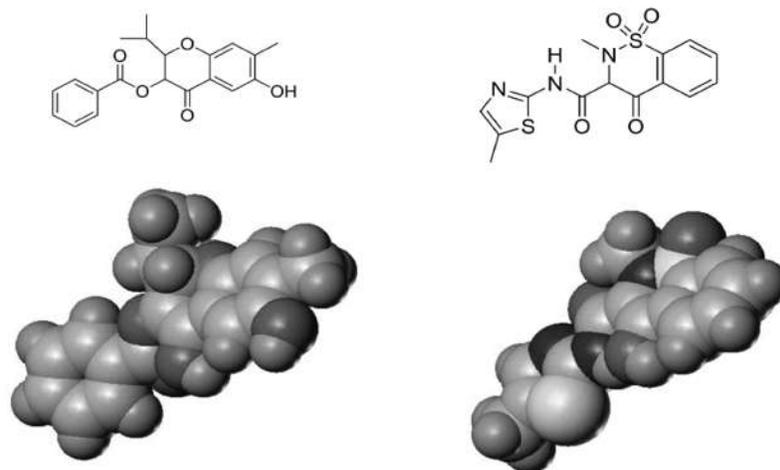


Figure 4. The drawing show structures of chromene derivative and meloxicam in plane molecules (above) and in 3D (below) display. Although both molecules present different functional groups, there is a spatial and structural similarity.

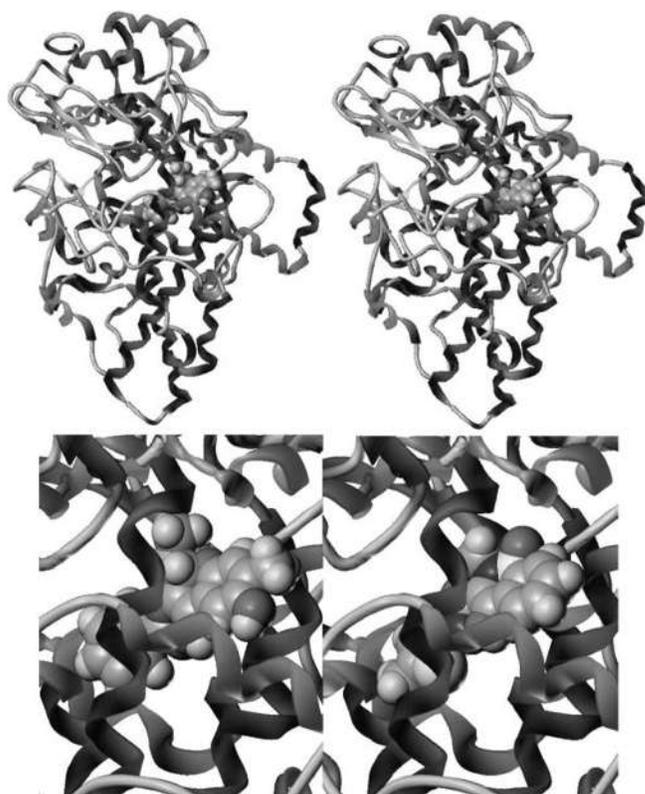


Figure 5. Computational model of chromene derivative (left) and meloxicam (right) docked into the active site of prostaglandin synthase-2 (COX-2). The parallel view allows the comparison and conclusion that the ligands' orientation and binding mode is the same because of the highly similar overall shape and electronic properties in space. The target enzyme is displayed in ribbon mode with its helical parts and beta strands. The entry to the ligand cavity is from the right toward center in each protein model. The entire enzyme is depicted above and the detail of the cavity is displayed below.

On the other hand, there is controversy concerning the use of female rats in models of pain with regard to missing data about the hormonal action mechanism (Gordon & Soliman, 1996; Vinogradova et al., 2003; Kuba et al. 2006). The estrous cycle lasts on average four days. It consists of four phases which are proestrus, estrus, metaestrus and diestrus. In each stage variable hormone concentrations are found such as prolactin, LH, FSH, estradiol, or progesterone. Each phase of the estrous cycle is determined by a ratio of three types of cells obtained by vaginal smears (Marcondes, 2002): epithelial cells, cornified cells and leukocytes (Figure 6A-D).

The influence of the phases of estrous cycle on the latency times in hot plate test, vaginal smears was performed in rats of the negative controls (vehicle and

SSI). During the hot plate test vaginal smears were performed, one at ninety minutes and again at seven hours. The statistical analysis shows no significant difference between the latency times and the phases of the estrous cycle (proestrus, estrus, and diestrus metaestrus). There is no correlation or trend between values of latency times and the phases of the estrous cycle of female rats. Hence, the latency time values of four groups with either *A. glabrata* 100 mg/kg, 150 mg/kg, meloxicam or nalbuphine treatments are not influenced by hormonal stages but only due to full drug effects either through the extract itself or the positive controls (Figure 6E, F). Our study design allows similar interpretation about "no hormonal influence" as earlier reported by Ratnasooriya et al. (2002) and Kiasalari et al. (2010).

At autopsy there were no injuries during the

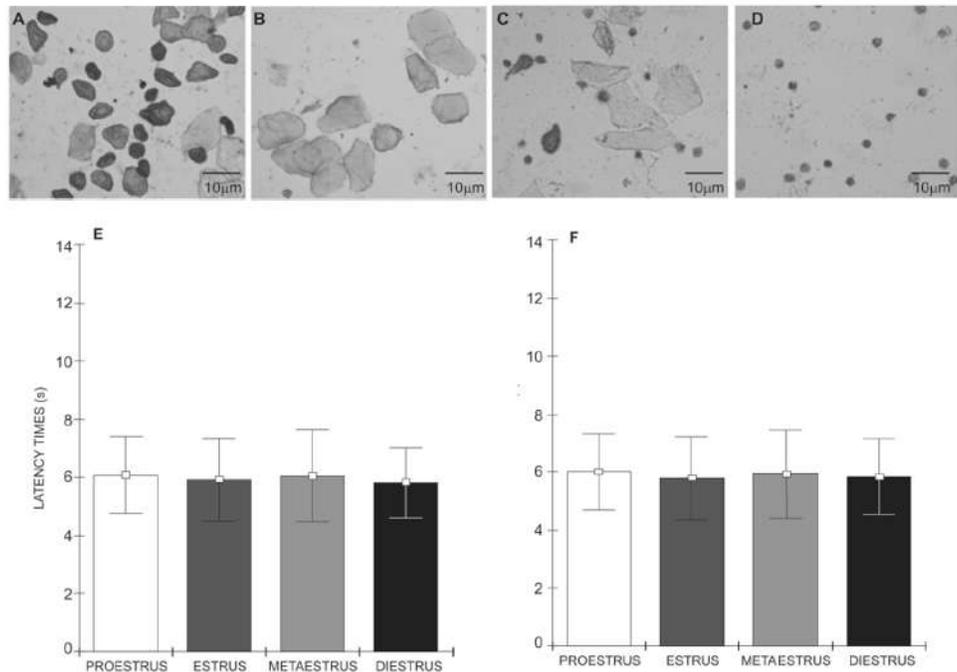


Figure 6. The phases of the estrous cycle: A. proestrus (n=4); B. estrus (n=4); C. metaestrus (n=4) and D. diestrus (n=3). Samples were prepared with hematoxylin and eosin stain under 40-fold microscopic magnification. The histogram bars show the mean and respective standard deviation values of the latency times for the control groups (vehicle and SSL) according to the phase of the estrus cycle at 90 minutes (E) and 7 h (F). Statistical analysis (one way ANOVA) does not show statistically significant difference between the groups ($p < 0.05$).

macroscopic examination in the heart, liver, kidneys, lungs, spleen, intestine and adjacent tissue to the administration area of leaves extract of *A. glabrata* or vehicle. This reflects that the extract formulation is well-tolerated and administration is well performed. In addition, during the hot plate test, all animals did not show specific signs of pain such as piloerection, aggression, hunched posture, abdominal writhing, squeals on handling or pressure on administration area. They are exhaustively described by the Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals and Institute for Laboratory Animal Research (2008). Moreover, no animal died during or after treatment.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Carlos Escamilla Weinmann, director of the Bioterium Claude Bernard of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla and his staff for the animals provided. Thanks are given to Dr. Jerzy Rzedowski for identifying of *A. glabrata*. Also thanks for Prof. Dr. U. Zaehring, Forschungszentrum

Borstel, Germany, for the Sybyl licencing at our site. Partial financial support from CIC-UMSNH and CONACYT (118287), Mexico, is acknowledged Edgar García S. thank CONACYT for fellowship No. 205612.

References

- Basbaum AI, Jessell TM 2000. *Perception of pain*. In: Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (eds). *Principles of Neural Science*. 4. ed. New York: The McGraw-Hill, p 474-492.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.
- Bohlmann F, Jakupovic J, Lonitz M 1977. Über Inhaltsstoffe der Eupatorium-Gruppe. *Chem Ber* 110: 301-314.
- Chakravarty AK, Mazumder T, Chatterjee SN 2010. Anti-inflammatory potential of ethanolic leaf extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng. Through Alteration in Production of TNF- α , ROS and expression of certain genes. *Evid-based Compl Alt*, Article ID 471074, doi:10.1093/ecam/neq033.
- Chemler JA, Leonard E, Koffas MAG 2009. *Flavonoid*

- biotransformation in microorganisms. In: Gould K, Davies K, Winefield C (eds) *Anthocyanins: biosynthesis, functions and applications*. New York: Springer, p.191-256.
- Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research 2008. *Recognition and alleviation of distress in laboratory animals*. Washington, DC: The national Academies Press.
- Danneman PJ 1997. Monitoring of Analgesia. In: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson GJ (eds). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. New York: Academic Press, p.83-103.
- Engelhardt G, Homma D, Schlegel K, Utzmann R, Schnitzler C 1995. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflamm Res* 44: 423-433.
- Gajraj NM 2003. Cyclooxygenase-2 inhibitors. *Anesth Analg* 96: 1720-1738.
- González-Darder JM 2000. Animal pain models and ethical issues regarding animal experimentation. *Rev Soc Esp Dolor* 7: 313-318.
- Gordon FT, Soliman MRI 1996. The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. *Horm Behav* 30: 244-250.
- Gris JH, Dragonetti MA, Fernández BM, Moglioni AG 2009. Molecular modelling and docking studies of antiinflammatory derivatives of 4-hydroxi, 1,2-benzothiazine 1,1-dioxide. *Inf Tecnol* 204: 51-61.
- Guerrero C, Silva M, Maldonado E, Martínez M 1978. Eupaglabric acid a new compound isolated from *Eupatorium glabratum* H.B.K. *Rev Latinoamer Quím* 9: 71-75.
- Kiasalari Z, Khalili M, Ashrafi M 2010. Anti-nociceptive effect of alcoholic extract of henbane seed on the different phases of estrous cycle of female rats. *J Gorgan Uni Med Sci* 11: 1-7.
- King RM, Robinson H 1970. Studies in the Eupatorieae (Compositae) new combinations in *Ageratina*. *Phytologia* 19: 208-229.
- Kuba T, Wu HBK, Nazarian A, Festa ED, Barr GA, Jenab S, Inturrisi CE, Quinones-Jenab V 2006. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. *Horm Behav* 49: 441-449.
- Mandal SK, Boominathan R, Parimaladevi B, Dewanjee S, Mandal SC 2005. Analgesic activity of methanol extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng. leaves. *Indian J Exp Biol* 43: 662-663.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62: 609-614.
- Merskey H, Bogduk N 1994. *Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage*. Seattle: IASP Press.
- Padhye S, Banerjee S, Chavan D, Pandye S, Swamy KV, Ali S, Li J, Dou QP, Sarkar FH 2009. Fluorocurcumins as cyclooxygenase-2 inhibitor: molecular docking. *Pharm Res* 26: 2438-2445.
- Paredes SF, Clemente FA 2005. Polifenoles de aplicación en farmacia: metabolismo y acción biológica. *OFFARM* 24: 85-94.
- Ratnasooriya WD, Dharmasiri MG, Rajapakse RA, De Silva MS, Jayawardena SP, Fernando PU, De Silva WN, Nawela AJ, Warusawithana RP, Jayakody JR, Digana PM 2002. Tender leaf extract of *Terminalia catappa* antinociceptive activity in rats. 2002. *Pharm Biol* 40: 60-66.
- Romo de Vivar A, Cuevas LA, Guerrero C 1971. Eupaglabrin a terpene from *Eupatorium glabratum*. *Rev Latinoamer Quím* 2: 32-34.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación de México*. United Mexican States.
- Tenorio LFA, Del Valle ML, Pastelín HG 2006. Flavonoids and the cardiovascular system: can they be a therapeutic alternative? *Arch Cardiol Mex* 76: 33-45.
- Tripes International 2010. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- Vanegas H, Schaible HG 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64: 327-363.
- Vinogradova EP, Zhukov DA, Batuev AS 2003. The effects of stages of the estrous cycle on pain thresholds in female white rats. *Neurosci Behav Physiol* 33: 269-272.
- Wang JL, Limburg D, Graneto MJ, Springer J, Hamper JRB, Liao Subo, Pawlitz JL, Kurumbail RG, Maziasz T, Talley JJ, Kiefer JR, Carter J 2010. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 7159-7163.
- Wang M, Hampson DR, Kotra LP 2007. In silico molecular homology modeling of neurotransmitter receptors. In: Lajtha A, Baker G, Dunn S, Holt A, Wang M, Hampson D, Kotra L (eds). *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*. 3. ed. New York: Springer, p. 294-304.

***Correspondence**

Rosa E. del Río
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Ed. B-1, C.U. Morelia, Mich., 58030, Mexico.
ndelrio@umich.mx
Tel. +52 443 3265790 ext. 102; 3265790 ext. 103.

6.3 Capítulo 3. Caracterización espectroscópica de los metabolitos secundarios antimicrobianos de *Eupatorium* spp

6.3.1 Absolute configuration of (13R)- and (13S)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocoltepecana*

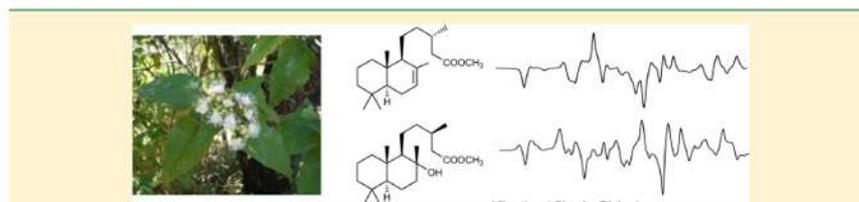
Absolute Configuration of (13R)- and (13S)-Labdane Diterpenes Coexisting in *Ageratina jocoltepecana*

Edgar García-Sánchez,[†] César B. Ramírez-López,[†] Armando Talavera-Alemán,[†] Alejandra León-Hernández,[†] Rosa E. Martínez-Muñoz,[†] Mauro M. Martínez-Pacheco,[‡] Mario A. Gómez-Hurtado,[†] Carlos M. Cerda-García-Rojas,^{*,‡} Pedro Joseph-Nathan,[‡] and Rosa E. del Río^{*,†}

[†]Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán 58030, Mexico

[‡]Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, México, D. F. 07000, Mexico

Supporting Information



ABSTRACT: Chemical investigation of the hexanes extracts of *Ageratina jocoltepecana* afforded (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oic acid (1), methyl (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oate (2), (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxyabdan-15-oic acid (3), and (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oic acid (5). The coexistence of (13R)- and (13S)-labdanes in this member of the Asteraceae family was demonstrated by vibration circular dichroism measurements of ester 2 and methyl (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxyabdan-15-oate (4) in comparison to the DFT B3LYP/DGDZVP-calculated spectra. In addition, transformation of 1 and 3 with HClO₄ in MeOH yielded epimeric methyl (+)-(5S,10S,13S)-labd-8-en-15-oate (6) and methyl (+)-(5S,10S,13R)-labd-8-en-15-oate (7), respectively, confirming the presence of C-13 epimers in this plant. Diterpene 1 showed remarkable antibacterial activity against *Bacillus subtilis* (MIC 0.15 mg/mL) and *Staphylococcus aureus* (MIC 0.78 mg/mL), while diterpene 3 exhibited moderate activities against the same organisms.

Labdane diterpenoids are abundantly distributed in nature, where they exhibit a variety of biological properties, including antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities.¹ In view of the pharmacological impact of these diterpenes, it becomes relevant to determine their absolute configurations since they may constitute the molecular basis of new drugs, including selective antibacterial substances. In continuation of our research on the stereochemical assignment of bioactive components isolated from native plants of Mexico,²⁻⁴ a study of the major components of *Ageratina jocoltepecana* was conducted, allowing the isolation, absolute configuration determination, NMR spectroscopic assignment, and evaluation of the antibacterial activity of their constituents.

A. jocoltepecana is one of the 28 *Ageratina* species found in western Mexico,^{5,6} which was classified for the first time by Turner⁷ using a sample collected from Jocoltepec, Jalisco, Mexico. In the present study, chemical analysis of this plant revealed the coexistence of labdane diterpenes belonging to the normal (5S,10S)-series and as C-13 epimers. This unusual

finding led us to reexamine the stereochemical assignment of the isolated compounds using vibrational circular dichroism (VCD) measurements in combination with chemical transformations, information that could be crucial to understand the biosynthesis pathways for the isolated compounds. This work, in combination with previous reports, also permitted increased knowledge of the plant metabolome⁸ for the genus *Ageratina*, which could be useful in constructing phytochemical indicators for chemotaxonomic purposes.⁹

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical study of the flowers and leaves of *A. jocoltepecana* afforded four diterpenoids (Figure 1), namely, (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oic acid (1), methyl (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oate (2), (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxyabdan-15-oic acid (3), and

Received: January 10, 2014

Published: April 4, 2014

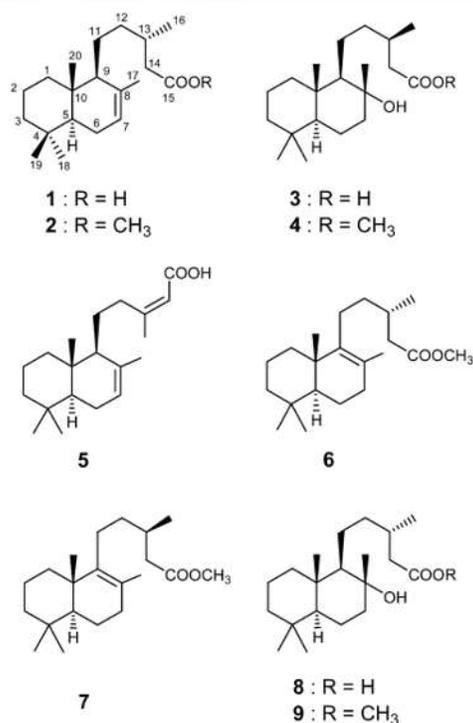


Figure 1. Labdane diterpenes isolated from *Ageratina jocotepecana* 1–3 and 5 and derivatives 4 and 6–9.

(–)-(5*S*,9*S*,10*S*,13*Z*)-labda-7,13-dien-15-oic acid (5), whose identity was established by comparison of the experimental spectroscopic data with literature values.^{10–13} The presence of (1*S*)-1 and (1*S*)-2, together with (1*R*)-3 in the same species, was unexpected and encouraged a detailed stereochemical study to discern if either the plant possesses the capability for synthesizing both epimers or there was an inconsistency in the previous stereochemical assignments of 1–3.

(–)-(5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-Labd-7-en-15-oic acid (1), known as cativic acid, was first isolated in 1938 from *Prioria copaifera*, commonly named the cativa tree, which is extensively found in the lowlands bordering the Caribbean Sea from Mexico to northern Colombia.¹⁴ In the 1950s, its specific rotation ($[\alpha]_D = -6.5$) as well as its structure and the stereochemistry of the bicyclic moiety were determined by comparison of its degradation product with a product derived from manool.^{15,16} Almost a decade later, the 13*S*-configuration was proposed on the basis of an optical activity review for a series of labdanes.¹⁷ In 2007, cativic acid (1) was also isolated from *Eperua falcata*; however, the authors depicted its structure as derived from the *ent*-labdane series and, invoking biosynthesis considerations, they assumed that the absolute configuration was the same as that of eperuic acid, which was isolated from the same species.¹⁸ In turn, the stereochemical scenario for methyl (–)-(5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-labd-7-en-15-oate (2) was comparable to that for 1. Although this is the first time that ester 2 has been obtained as a natural product, the compound has been prepared previously by treatment of 1 with diazomethane,^{15,16,19} by dehydration of methyl labdanolate,¹⁰ and by isomerization and

methylation of labd-8(17)-en-15-oic acid.¹¹ However, the C-13 configuration remained undetermined in all these studies.

In addition, (+)-(5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-8-hydroxylabdan-15-oic acid (3), also named (+)-13-*epi*-labdanolic acid, is a natural product from *Espeletiopsis muiska*.¹² This compound was previously obtained by oxidation of (–)-13-*epi*-labdan-8*α*,15-diol isolated from *Oxylobus glanduliferus*.²⁰ In the same study, (–)-labdan-8*α*,15-diol was also found, constituting a particular example in which a pair of C-13 epimers was obtained as natural products. The absolute configuration of 3 was assigned²⁰ by comparison of its melting point and spectroscopic (IR and ¹H NMR) properties of the derived ester, methyl (+)-13-*epi*-labdanolate (4), with those of the antipodal structure, methyl (–)-8*β*-hydroxyperuan-15-oate, while the absolute configuration of (–)-labdan-8*α*,15-diol was assigned²⁰ by oxidation to (–)-labdanolic acid (8) and comparison with literature data.^{21,22} In turn, (–)-labdanolic acid (8) was first isolated from the Spanish gum labdanum obtained from *Cistus ladaniferus*.²¹ The structure of this diterpenoid was determined by chemical degradation and comparison with the specific rotation of sclareol and manool, but the configuration at C-13 remained undefined.²³ Subsequent investigations showed controversial arguments in assignment of the C-13 configuration,^{22,24–27} which was assigned as *S* by X-ray analysis of its *p*-bromophenacyl derivative.²⁸

After the aforementioned evaluation, we opted to acquire independent cogent evidence regarding the absolute configuration of diterpenoids 1–4 using direct and reliable methodologies, as was achieved for the C-13 epimer of compound 3, i.e., (–)-labdanolic acid (8).²⁸ Therefore, to support the absolute configuration of (–)-(5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-labd-7-en-15-oic acid (1) and (+)-(5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-8-hydroxylabdan-15-oic acid (3), their methyl esters 2 and 4 were studied by VCD spectroscopy.²⁹ This spectroscopic technique has been successfully employed to determine the absolute configuration of other labdanes and *ent*-clerodanes³⁰ and involved comparison of experimental and calculated spectra. The calculated graphics may be obtained by adding the weighted-average vibrational plots including all significantly populated conformations for a given stereoisomer obtained by density functional theory (DFT) calculations.

Molecular models of (5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-2 and (5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-4, as well as those of their corresponding epimers 13-*epi*-2 (5*S*,9*S*,10*S*,13*R*) and 13-*epi*-4 (5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*), were built and then conformationally explored with the Monte Carlo protocol using the Merck Molecular Force Field (MMFF).³¹ An energy window of 0–5 kcal/mol gave 45 conformers for 2, 57 for 13-*epi*-2, 33 for 4, and 40 for 13-*epi*-4. These conformations were subjected to single-point DFT energy calculation at the B3LYP/6-31G(d) level of theory followed by geometry optimization at the B3LYP/DGDZVP level^{32,33} for those structures within an energy range of 0–3 kcal/mol. This procedure yielded 15 conformers for 2, 17 for 13-*epi*-2, 10 for 4, and 12 for 13-*epi*-4. Tables 1 and 2 summarize the thermochemical data for the six more relevant conformers of 2 and 4, respectively, while Tables S1–S4 (Supporting Information) contain the full thermochemical data for 2, 4, 13-*epi*-2, and 13-*epi*-4, respectively. The IR/VCD frequencies were calculated for all these structures, and the conformational populations were obtained by means of the $\Delta G = -RT \ln K$ equation to generate the Boltzmann-averaged IR and VCD spectra.

Table 1. Thermochemical Analysis of Methyl (-)-(5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-labd-7-en-15-oate (2)

| conformer | ΔE_{MMFF}^a | % $_{\text{MMFF}}^b$ | ΔE_{DFT}^c | % $_{\text{DFT}}^d$ | ΔG_{OPT}^e | % $_{\text{OPT}}^f$ |
|-----------|----------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 2a | 0.00 | 15.3 | 0.00 | 29.1 | 0.00 | 67.0 |
| 2b | 0.80 | 4.0 | 0.49 | 10.6 | 1.39 | 6.4 |
| 2c | 0.66 | 5.0 | 0.48 | 8.1 | 1.45 | 5.8 |
| 2d | 0.51 | 6.4 | 0.53 | 12.9 | 1.57 | 4.8 |
| 2e | 0.57 | 5.8 | 0.82 | 5.4 | 1.80 | 3.2 |
| 2f | 0.54 | 6.1 | 0.82 | 6.1 | 2.13 | 1.9 |

^aMolecular mechanics energies relative to 2a with $E_{\text{MMFF}} = 70.129$ kcal/mol. ^bPopulation in % calculated from the MMFF energies according to $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^cSingle-point B3LYP/6-31G(d) energies relative to 2a with $E_{6-31G(d)} = -629\,651.512$ kcal/mol. ^dPopulation in % calculated from B3LYP/6-31G(d) energies according to $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^eGibbs free energies relative to 2a with $G_{\text{DGDZVP}} = -629\,484.989$ kcal/mol. ^fPopulation in % calculated from Gibbs free energies according to $\Delta G = -RT \ln K$. ^gThe six main conformers account for 89.1% of the total Boltzmann distribution; a detailed listing is given in the Supporting Information.

Table 2. Thermochemical Analysis of Methyl (+)-(5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-8-Hydroxyabdan-15-oate (4)

| conformer | ΔE_{MMFF}^a | % $_{\text{MMFF}}^b$ | ΔE_{DFT}^c | % $_{\text{DFT}}^d$ | ΔG_{OPT}^e | % $_{\text{OPT}}^f$ |
|-----------|----------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| 4a | 2.60 | 0.7 | 2.29 | 1.5 | 0.00 | 29.7 |
| 4b | 2.35 | 1.0 | 1.73 | 1.5 | 0.48 | 13.2 |
| 4c | 1.90 | 2.2 | 1.57 | 5.0 | 0.54 | 11.9 |
| 4d | 2.28 | 1.2 | 1.71 | 4.0 | 0.65 | 9.9 |
| 4e | 0.00 | 55.3 | 0.62 | 12.4 | 0.67 | 9.6 |
| 4f | 2.26 | 1.2 | 1.78 | 2.1 | 0.70 | 9.2 |

^aMolecular mechanics energies relative to 4a with $E_{\text{MMFF}} = 70.129$ kcal/mol. ^bPopulation in % calculated from the MMFF energies according to $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^cSingle-point B3LYP/6-31G(d) energies relative to 4a with $E_{6-31G(d)} = -629\,651.512$ kcal/mol. ^dPopulation in % calculated from B3LYP/6-31G(d) energies according to $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^eGibbs free energies relative to 4a with $G_{\text{DGDZVP}} = -629\,484.989$ kcal/mol. ^fPopulation in % calculated from Gibbs free energies according to $\Delta G = -RT \ln K$. ^gThe six main conformers account for 83.5% of the total Boltzmann distribution; a detailed listing is given in the Supporting Information.

The six lowest-energy conformers of 2 and 4 are represented in Figures 2 and 3, respectively, while those for 13-*epi*-2 and 13-*epi*-4 are included in Figures S1 and S2 (Supporting Information), respectively. All structures display the same conformational arrangement in the bicyclic system but with many conformational variants in the C-9 side chain. Figures 4 and 5 show the good agreement between calculated and experimental VCD spectra for 2 and 4, respectively. The corresponding IR spectra are included in the same figures. Quantitative estimation of this concordance was accomplished by using the CompareVOA algorithm³⁴ (BioTools Co., Jupiter, FL, USA), which compares the integrated overlap of the experimental and calculated data. The optimal anharmonicity factors (anH) and the VCD spectroscopic similarities for the correct (S_E) and the incorrect enantiomers (S_{-E}) of each stereoisomer are listed in Table 3, together with the enantiomer similarity index (ESI) values, indicating that the structures of 2 and 4 have the correct absolute configuration [100% confidence (C)] according to the employed algorithm.³⁴ The same analyses carried out for the corresponding C-13 epimers (13-*epi*-2 and 13-*epi*-4) showed confidence levels for the absolute configuration determination of only 45% and 49%, respectively. Although this protocol was originally designed for the absolute

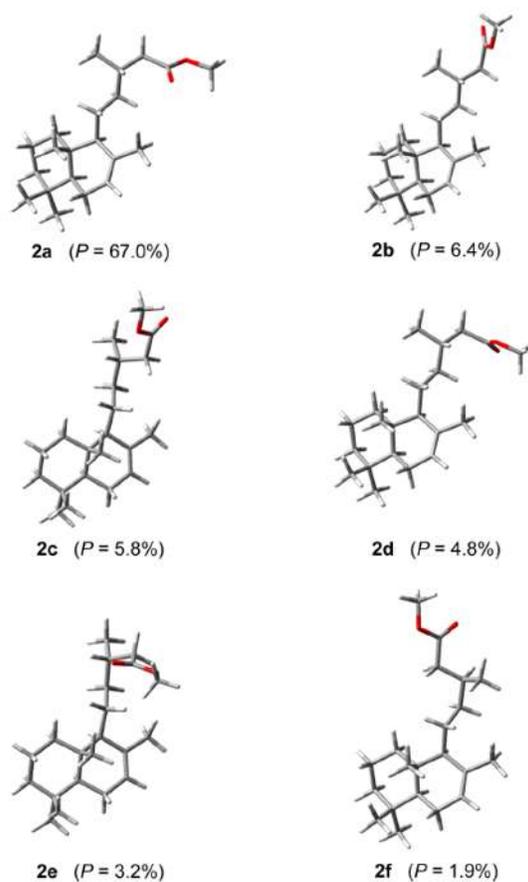


Figure 2. The six most populated conformers of methyl (5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-(-)-labd-7-en-15-oate (2), accounting for 89.1% of the conformational population.

configuration determination of enantiomers, it has proven to be useful in studying diastereomeric relationships.^{35–39} The efficacy of this methodology was evidenced for leubethanol,³⁵ whose absolute configuration was later confirmed by total synthesis.⁴⁰ Successful examples of the above-mentioned approach include the distinction between (13*R*)- and (13*S*)-salvic acid methyl esters³⁶ and the differentiation of (20*S*)- and (20*R*)-20,29-epoxylupanone.³⁷ Both cases were confirmed by X-ray diffraction analysis. In all cases the S_E , S_{-E} , ESI, and C values followed the same trends as those observed in Table 3 for 1 and 3 versus their 13-epimers.

In order to collect chemical evidence for demonstrating the differences in the configuration at C-13 between natural products 1 and 3, and thus reinforce the VCD results, they were transformed into the closely related compounds methyl (+)-(5*S*,10*S*,13*S*)-labd-8-en-15-oate (6) and methyl (+)-(5*S*,10*S*,13*R*)-labd-8-en-15-oate (7), respectively, by treatment with HClO_4 in MeOH. Under these conditions, compound 1 underwent a double-bond migration to afford the thermodynamically more stable tetrasubstituted olefin 6, while dehydration of compound 3 afforded the tetrasubstituted alkene 7. In both cases $\text{HClO}_4/\text{MeOH}$ also promoted methylation of the carboxylic group. If the configurations at

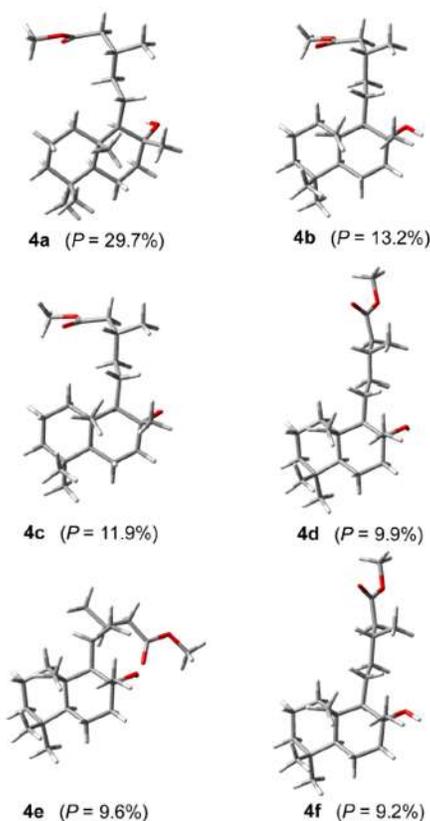


Figure 3. The six most populated conformers of methyl (5S,8R,9R,10S,13R)-(+)-8-hydroxy-labd-15-oate (4), accounting for 83.5% of the conformational population.

C-5, C-10, and C-13 in 1 and 3 were the same, substances formed during acid treatment would be identical. However, compounds 6 and 7 showed noticeable ^1H NMR spectroscopic changes (Experimental Section and Supporting Information) at CH_2 -11 (δ_{H} 1.91/1.91 in 6 and 2.05/1.82 in 7), at CH_2 -12 (δ_{H} 1.30/1.30 in 6 and 1.34/1.25 in 7), and at CH_3 -16 (δ_{H} 0.96 in 6 and 0.97 in 7). These differences corroborated the presence of 1 and 3 as natural epimers in *A. jocotepecana*. The specific rotation values were also different in magnitude, showing $[\alpha]_{\text{D}} = +53$ for 6 and $[\alpha]_{\text{D}} = +72$ for 7. Interestingly, the ^{13}C NMR chemical shifts were similar, showing only small differences (Table 4). This result is of particular relevance since it reveals the inability of ^{13}C NMR spectroscopy to distinguish these C-13 epimers. The gHMBC correlations, in combination with a gHSQC plot, allowed the full assignment of the ^{13}C NMR spectra of 6 and 7. A methyl labd-8-en-15-oate of unknown configuration at C-13, previously prepared from labd-8(17)-en-15-oic acid,¹¹ displayed chemical shifts corresponding with those of either 6 or 7. However, according to the 2D experiments, the assignment of resonances for C-1, C-3, C-6, C-7, C-11, C-12, C-14, C-16, C-17, C-19, and C-20 should be revised.

Our literature searches revealed serious deficiencies in the NMR data of compounds 1–4. Therefore, a detailed spectroscopic study for these substances was undertaken, including 2D experiments. Although (–)-(5S,9S,10S,13S)-

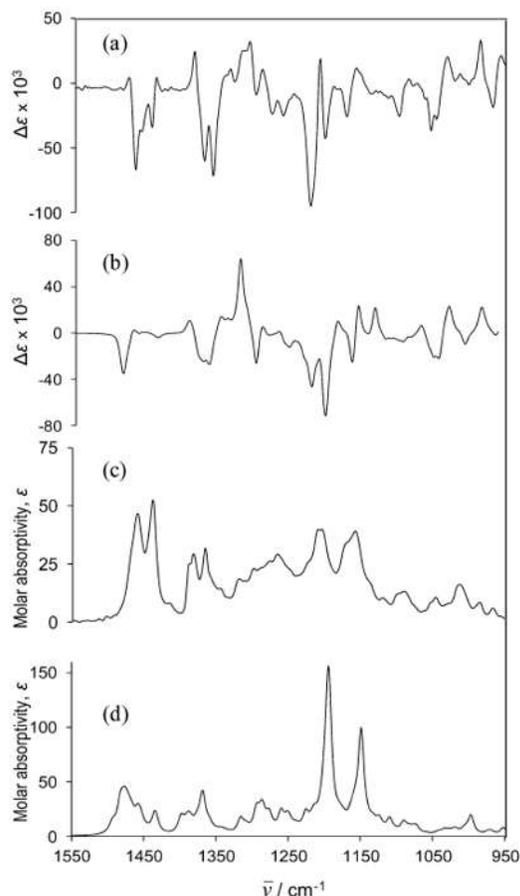


Figure 4. Vibrational spectra of methyl (5S,9S,10S,13S)-(–)-labd-7-en-15-oate (2). (a) Experimental VCD in CDCl_3 , (b) calculated VCD at the B3LYP/DGDZVP level, (c) experimental IR in CDCl_3 , and (d) calculated IR at the B3LYP/DGDZVP level.

labd-7-en-15-oic acid (1) and its methyl ester 2 have been studied extensively, their ^{13}C NMR data have not yet been reported. Exhaustive 1D and 2D NMR analysis, including COSY, NOESY, HETCOR, and gHMBC experiments, permitted the spectroscopic assignments for 1, as collated in the Experimental Section and Table 4. A methyl labd-7-en-15-oate of unknown configuration at C-13, isolated from *Moldenhawera nutans*,¹¹ displayed close chemical shifts to those of 2 with the exception of C-11, C-12, and C-16, showing chemical shift differences of $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0.8, 2.3, and 1.4 ppm, respectively. Also, the specific rotation exhibited differences in sign and magnitude ($[\alpha]_{\text{D}} = +30.2$) with respect to that of 2 ($[\alpha]_{\text{D}} = -7$). This analysis suggests that the labdane from *M. nutans* is the C-13 epimer of compound 2. In addition, our NMR data suggest that the ^{13}C NMR assignments for CH-5 and CH-9 are interchanged with respect to reported values.¹¹

A literature search indicated that the ^{13}C NMR chemical shifts of (+)-13-*epi*-labdanolic acid (3) were available¹² only in pyridine- d_5 , but not in CDCl_3 . In order to secure the identity of this substance, the ^{13}C NMR of 3 in pyridine- d_5 and its specific rotation were compared with reported data¹² and found to be identical. Next, we registered the ^1H and ^{13}C NMR data of 3 in

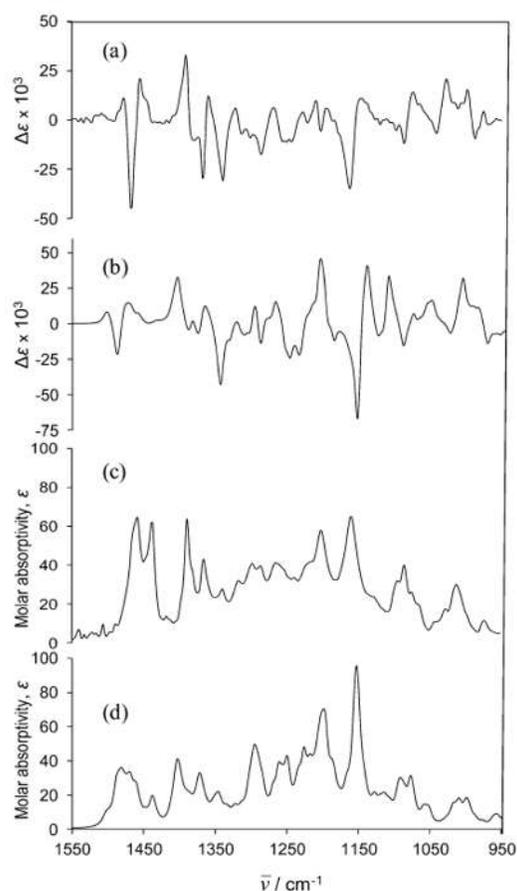


Figure 5. Vibrational spectra of methyl (5S,8R,9R,10S,13R)-(+)-8-hydroxyabdan-15-oate (4). (a) Experimental VCD in CDCl_3 , (b) calculated VCD at the B3LYP/DGDZVP level, (c) experimental IR in CDCl_3 , and (d) calculated IR at the B3LYP/DGDZVP level.

CDCl_3 (Experimental Section and Table 4). The ^{13}C NMR chemical shift differences between (+)-13-*epi*-labdanolic acid (3) and (–)-labdanolic acid (8)^{41,42} in CDCl_3 were minor. Most of the chemical shifts were similar, with the exception of those for CH_2 -11, CH_2 -12, and CH_2 -14, showing differences of $\Delta\delta_{\text{C}}$ 1.09, 0.65, and 0.59 ppm, respectively, in agreement with the stereochemical change at CH-13. Similar magnitudes (0.6–1.1 ppm) have also been reported⁴³ for C-13 epimeric labdane derivatives isolated from *Marrubium anisodon*. Interestingly, the specific rotation sign and magnitude for (+)-13-*epi*-labdanolic

Table 4. ^{13}C NMR Data for Compounds 1–4, 6, and 7^a

| position | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 39.1 | 39.1 | 39.6 | 39.6 | 37.0 | 36.9 |
| 2 | 18.8 | 18.8 | 18.4 | 18.4 | 19.1 | 19.0 |
| 3 | 42.3 | 42.3 | 41.9 | 41.9 | 41.8 | 41.7 |
| 4 | 32.9 | 33.0 | 33.2 | 33.2 | 33.3 | 33.3 |
| 5 | 50.1 | 50.2 | 56.0 | 56.1 | 51.9 | 51.8 |
| 6 | 23.8 | 23.8 | 20.4 | 20.5 | 19.1 | 19.0 |
| 7 | 122.1 | 122.2 | 44.2 | 44.4 | 33.6 | 33.6 |
| 8 | 135.3 | 135.3 | 74.6 | 74.2 | 125.6 | 125.5 |
| 9 | 55.2 | 55.2 | 61.7 | 62.0 | 140.6 | 140.4 |
| 10 | 36.8 | 36.8 | 39.1 | 39.1 | 39.0 | 38.9 |
| 11 | 24.5 | 24.5 | 21.9 | 22.3 | 25.5 | 25.4 |
| 12 | 39.3 | 39.4 | 39.8 | 40.2 | 37.3 | 37.2 |
| 13 | 31.1 | 31.3 | 30.7 | 31.1 | 31.4 | 31.4 |
| 14 | 41.3 | 41.4 | 40.9 | 41.2 | 41.5 | 41.4 |
| 15 | 179.7 | 173.8 | 178.4 | 174.0 | 173.7 | 173.7 |
| 16 | 19.9 | 19.9 | 19.9 | 19.9 | 19.6 | 19.6 |
| 17 | 22.1 | 22.1 | 23.8 | 23.9 | 19.4 | 19.4 |
| 18 | 33.2 | 33.2 | 33.3 | 33.4 | 33.3 | 33.3 |
| 19 | 21.8 | 21.8 | 21.4 | 21.4 | 21.7 | 21.6 |
| 20 | 13.5 | 13.5 | 15.4 | 15.4 | 20.1 | 20.0 |
| OCH_3 | | 51.4 | | 51.4 | 51.3 | 51.3 |

^aMeasured at 75.4 MHz using TMS as the internal reference.

acid (3), isolated from *A. jocotepecana* ($[\alpha]_{\text{D}} = +5$), were the opposite of those for (–)-labdanolic acid (8) ($[\alpha]_{\text{D}} = -6.6$), which is the diastereoisomer most commonly found in Nature.

Treatment of 3 with diazomethane afforded methyl (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxyabdan-15-oate (4), which exhibited ^1H NMR resonances for one methoxy group at δ_{H} 3.66, as well as two doublets of doublets at δ_{H} 2.36 and 2.11 for H-14a and H-14b, one methyl geminal to a hydroxy group at δ_{H} 1.15, and a secondary methyl group at δ_{H} 0.95. Its ^{13}C NMR spectrum, reported for the first time, displayed 21 resonances (Table 4), which were assigned via gHMBC spectroscopy. The ^{13}C NMR chemical shift differences between compound 4, also named methyl (+)-13-*epi*-labdanolate, and those of methyl (–)-labdanolate (9)⁴¹ were almost indistinguishable, showing differences of only $\Delta\delta_{\text{C}}$ 0.4 ppm for C-11 and C-12 in CDCl_3 . The reported NMR data for the diterpenoid (–)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oic acid (5)¹³ were confirmed by our 2D NMR experiments.

The present study revealed that labdane-type compounds containing a carboxylic acid group affected the growth of Gram-positive bacteria with respect to cefotaxime [MIC of 12.50 mg/mL for *Bacillus subtilis* and 0.13 mg/mL for *Staphylococcus aureus*]. Thus, (–)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oic acid (1) showed an MIC of 0.15 mg/mL for *B. subtilis* and 0.78 mg/mL for *Staph. aureus*, (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxyabdan-15-

Table 3. Experimental and Calculated IR and VCD Spectra Comparison of 2 and 4 and their Calculated 13-Epipimers

| compound | configuration | anH^a | S_{IR}^b | S_{E}^c | S_{-E}^d | ESI^e | C^f |
|-------------------|------------------|---------|-------------------|------------------|------------|---------|-------|
| 2 | 5S,9S,10S,13S | 0.971 | 84.2 | 72.5 | 14.5 | 58.0 | 100 |
| 13- <i>epi</i> -2 | 5S,9S,10S,13R | 0.961 | 85.7 | 59.1 | 28.1 | 31.0 | 45 |
| 4 | 5S,8R,9R,10S,13R | 0.973 | 93.4 | 73.5 | 24.8 | 48.7 | 100 |
| 13- <i>epi</i> -4 | 5S,8R,9R,10S,13S | 0.980 | 89.7 | 57.4 | 30.3 | 27.1 | 49 |

^aAnharmonicity factor. ^bIR spectral similarity in percentage. ^cVCD spectral similarity for the correct stereoisomer in percentage. ^dVCD spectral similarity for the incorrect stereoisomer in percentage. ^eEnantiomer similarity index, calculated as the $S_{\text{E}} - S_{-E}$ difference. ^fConfidence level for the absolute configuration determination in percentage.

oic acid (3) exhibited an MIC of 1.56 mg/mL for *B. subtilis* and 2.34 mg/mL for *Staph. aureus*, and (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oic acid (5) showed an MIC of 1.00 mg/mL for *B. subtilis* and 10.00 mg/mL for *Staph. aureus*, while Gram-negative bacteria were insensitive to the three substances. Labdanes have also been reported to have antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities.^{12,44} Cativic acid, which was identified in the trees of *Prioria* and *Eperua* species, inhibited the growth of the wood-degrading fungus *Coriolus versicolor*.¹⁸ Plant components such as labdane derivatives may, therefore, constitute the molecular basis of new drugs including selective antibacterial substances.

In conclusion, the chemical study of *A. jocotepecana*, carried out for the first time, yielded four labdane diterpenoids (1–3 and 5) as the major components. The coexistence of (13R)- and (13S)-labdanes in this plant was demonstrated by the absolute configuration assignment of the natural products using VCD spectroscopy and molecular transformations of 1 and 3 into 6 and 7, respectively. These substances were extensively studied by 1D and 2D NMR spectroscopy, allowing the complete assignment of the ¹³C signals of 1–4, 6, and 7. The ¹³C NMR spectra of the C-13 epimers 6 and 7 are essentially identical, while their ¹H NMR spectra permit their differentiation. (-)-(5S,9S,10S,13S)-Labd-7-en-15-oic acid (1) showed selective activity against Gram-positive microorganisms.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were recorded in CHCl₃ solutions on a Perkin-Elmer 341 polarimeter using quartz cells of 1 dm path length. 1D and 2D NMR spectra were recorded at 300 MHz for ¹H and 75.4 MHz for ¹³C on a Varian Mercury 300 spectrometer using CDCl₃ as the solvent and TMS as the internal reference. Chemical shift values are reported in parts per million, and coupling constants (*J*) are in Hz. LRMS were measured on a Varian Saturn 2000 GC-MS system, while HRESIMS were measured on a Bruker micrOTOF-Q II system at CNMN-IPN, Mexico City. Silica gel 230–400 mesh (Merck) was used for column chromatography.

Plant Material. *A. jocotepecana* (B.L. Turner) specimens were collected during the flowering stage, on February 22, 2006, near km 51 of the Morelia-Carapan federal road no. 15. A voucher specimen (No. 188459) is deposited at the Herbarium of Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, Mexico, where Prof. Jerzy Rzedowski identified the plant material.

Extraction and Isolation. Leaves (255 g), flowers (240 g), stems (320 g), and roots (1065 g) from *A. jocotepecana* were individually macerated with hexanes at room temperature (3 × 1.5 L) for three days. Extract yields were as follows: leaves 4.4%, flowers 10.8%, stems 3.4%, and roots 1.3%. Aliquots of extracts from leaves (2 g), flowers (1 g), and stems (2 g) were column chromatographed using mixtures of hexanes–EtOAc in ascending polarity to afford compounds 1 (best yield from flowers 10.1%), 3 (best yield from leaves 14.1%), 5 (best yield from flowers 5.6%), and 2 (best yield from flowers 1.1%).

Isomerization Reactions. Solutions of (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oic acid (1) or (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hydroxylabdan-15-oic acid (3) (60 mg) in MeOH (3 mL) were treated with 70–72% HClO₄ (100 μL). The reaction mixtures were refluxed for 1 h, concentrated under reduced pressure, and extracted with EtOAc. Each organic layer was washed with aqueous NaHCO₃ and H₂O, dried, filtered, and evaporated. The oily residue (50 mg) was applied on TLC plates impregnated with 20% AgNO₃ and developed four times with hexanes–EtOAc (100:1), followed by extraction with EtOAc. Each extract was washed with aqueous NaHSO₃ and H₂O, dried, filtered, and evaporated to afford 6 and 7 (11% and 10%, respectively).

(-)-(5S,9S,10S,13S)-Labd-7-en-15-oic acid (1): colorless oil; [α]_D²⁵ -5, [α]_D²⁵ -5, [α]_D²⁵ -6, [α]_D²⁵ -14, [α]_D²⁵ -28 (c 1.1, CHCl₃); IR ν_{\max} 2927, 1707, 1648, 1459, 1387 cm⁻¹; ¹H NMR δ 5.38 (1H, br s, H-7), 2.39 (1H, dd, *J* = 14.9, 5.8 Hz, H-14a), 2.14 (1H, dd, *J* = 14.9, 8.3 Hz, H-14b), 1.94 (1H, m, H-13), 1.93 (1H, m, H-6a), 1.89 (1H, m, H-6b), 1.83 (2H, m, H-1a), 1.65 (3H, br s, H-17), 1.57 (1H, m, H-9), 1.56 (1H, m, H-12a), 1.52 (1H, m, H-2a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.46 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.18 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, m, H-5), 1.16 (1H, m, H-3b), 1.13 (1H, m, H-11b), 0.99 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-16), 0.94 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-20); ¹³C NMR data, see Table 4.

Methyl (-)-(5S,9S,10S,13S)-Labd-7-en-15-oate (2): colorless oil; [α]_D²⁵ -7, [α]_D²⁵ -9, [α]_D²⁵ -10, [α]_D²⁵ -19, [α]_D²⁵ -36 (c 0.1, CHCl₃); IR ν_{\max} 2955, 1728, 1658, 1650, 1643, 1440, 1380, 1368 cm⁻¹; ¹H NMR δ 5.37 (1H, br s, H-7), 3.66 (3H, s, OCH₃), 2.33 (1H, dd, *J* = 14.6, 6.0 Hz, H-14a), 2.11 (1H, dd, *J* = 14.6, 8.2 Hz, H-14b), 1.94 (1H, m, H-13), 1.92 (1H, m, H-6a), 1.84 (1H, m, H-6b), 1.83 (1H, m, H-1b), 1.65 (3H, s, H-17), 1.56 (1H, m, H-9), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.51 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.16 (2H, m, H-3b and H-5), 1.14 (1H, m, H-12b), 1.12 (1H, m, H-11b), 0.95 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-16), 0.94 (1H, m, H-1a), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-20); ¹³C NMR data, see Table 4.

(+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-Hydroxylabdan-15-oic acid (3): colorless oil; [α]_D²⁵ +5, [α]_D²⁵ +5, [α]_D²⁵ +6, [α]_D²⁵ +10, [α]_D²⁵ +14 (c 0.9, CHCl₃); IR ν_{\max} 3591, 3505, 2931, 1706, 1459, 1389, 1083 cm⁻¹; ¹H NMR δ 2.39 (1H, dd, *J* = 14.7, 6.4 Hz, H-14a), 2.13 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.6 Hz, H-14b), 1.97 (1H, m, H-13), 1.85 (1H, dt, *J* = 12.2, 2.9 Hz, H-7a), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.60 (1H, m, H-1a), 1.58 (1H, m, H-2a), 1.42 (2H, m, H-2b and H-11a), 1.40 (2H, m, H-12a and H-12b), 1.35 (2H, m, H-3a and H-7b), 1.25 (1H, m, H-6b), 1.24 (1H, m, H-11b), 1.15 (3H, s, H-17), 1.13 (1H, m, H-3b), 1.03 (1H, m, H-9), 0.98 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-16), 0.93 (1H, m, H-1b), 0.91 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (6H, s, H-19 and H-20); ¹³C NMR data, see Table 4.

Methyl (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-Hydroxylabdan-15-oate (4): A solution of 3 (8 mg) in ether (1 mL) was treated with an ethereal diazomethane solution. The reaction mixture was evaporated, and the residue was subjected to silica gel column chromatography, eluting with hexanes to give 4 (6 mg, 73%) as a colorless oil; [α]_D²⁵ +5, [α]_D²⁵ +6, [α]_D²⁵ +6, [α]_D²⁵ +9, [α]_D²⁵ +14 (c 0.7, CHCl₃); IR ν_{\max} 3610, 2967, 1870, 1716, 1707, 1455, 1435, 1385, 1367, 1141, 1110, 1067, 992, 974, 943 cm⁻¹; ¹H NMR δ 3.66 (3H, s, OCH₃), 2.36 (1H, dd, *J* = 14.7, 6.5 Hz, H-14a), 2.11 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.6 Hz, H-14b), 1.95 (1H, m, H-13), 1.86 (1H, m, H-7a), 1.63 (1H, m, H-6a), 1.61 (1H, m, H-1a), 1.56 (1H, m, H-2a), 1.42 (1H, m, H-2b), 1.41 (1H, m, H-11a), 1.38 (3H, m, H-3a, H-12), 1.34 (1H, m, H-7b), 1.27 (1H, m, H-6b), 1.21 (1H, m, H-11b), 1.15 (3H, s, H-17), 1.11 (1H, m, H-3b), 1.01 (1H, m, H-9), 0.96 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-16), 0.91 (1H, m, H-5), 0.90 (1H, m, H-1b), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (6H, s, H-19 and H-20); ¹³C NMR data, see Table 4.

Methyl (+)-(5S,10S,13S)-Labd-8-en-15-oate (6): colorless oil; [α]_D²⁵ +53, [α]_D²⁵ +56, [α]_D²⁵ +75, [α]_D²⁵ +128, [α]_D²⁵ +194 (c 0.2, CHCl₃); IR ν_{\max} 1731, 1460, 1377, 1207 cm⁻¹; ¹H NMR δ 3.66 (3H, s, OCH₃), 2.33 (1H, dd, *J* = 14.7, 6.2 Hz, H-14a), 2.14 (1H, dd, *J* = 14.7, 8.0 Hz, H-14b), 1.95 (2H, m, H-7), 1.93 (1H, m, H-13), 1.91 (2H, m, H-11), 1.76 (1H, m, H-1a), 1.61 (1H, m, H-2a), 1.54 (3H, s, H-17), 1.48 (2H, m, H-6), 1.43 (1H, m, H-2b), 1.38 (1H, m, H-3a), 1.30 (2H, m, H-12), 1.13 (H, m, H-3b), 1.11 (2H, m, H-5 and H-1b), 0.96 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-16), 0.93 (3H, s, H-20), 0.87 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19); ¹³C NMR data, see Table 4; HRESIMS *m/z* 343.2609 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₁H₃₆O₂ + Na⁺, 343.2608).

Methyl (+)-(5S,10S,13R)-Labd-8-en-15-oate (7): colorless oil; [α]_D²⁵ +72, [α]_D²⁵ +74, [α]_D²⁵ +85, [α]_D²⁵ +151, [α]_D²⁵ +266 (c 0.2, CHCl₃); IR ν_{\max} 1731, 1463, 1379, 1205 cm⁻¹; ¹H NMR δ 3.66 (3H, s, OCH₃), 2.34 (1H, dd, *J* = 14.7, 5.9 Hz, H-14a), 2.13 (1H, dd, *J* = 14.9, 8.5 Hz, H-14b), 2.05 (1H, m, H-11a), 1.95 (2H, m, H-7), 1.93 (1H, m, H-13), 1.82 (1H, m, H-11b), 1.77 (1H, m, H-1a), 1.62 (2H, m, H-6), 1.53 (3H, s, H-17), 1.45 (2H, m, H-2), 1.39 (1H, m, H-3a), 1.34 (1H, m, H-12a), 1.25 (1H, m, H-12b), 1.15 (1H, m, H-3b), 1.12 (1H, m, H-1b), 1.10 (1H, m, H-5), 0.97 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-16), 0.93 (3H, s, H-

20), 0.87 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19); ¹³C NMR data, see Table 4; HRESIMS *m/z* 343.2609 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₁H₃₆O₂ + Na⁺, 343.2608).

Vibrational Circular Dichroism. VCD and IR measurements were done on a BioTools dualPEM ChiralIR FT spectrophotometer. Samples of 2 and 4 (12 and 6 mg, respectively) were dissolved in CDCl₃ (150 μL) and placed in BaF₂ cells with a path length of 100 μm. Data for 2 and 4 were acquired at a resolution of 4 cm⁻¹ for 6 and 11 h, respectively. For the calculated spectra, Monte Carlo search protocols were carried out for 2, 13-*epi*-2, 4, and 13-*epi*-4 using MMFF94 calculations and considering an energy cutoff of 10 kcal/mol. The single-point energy of each conformer was calculated with the DFT B3LYP/6-31G(d) level of theory in the Spartan'04 program. The structures were geometry optimized with DFT at the B3LYP/DGDZVP level employing the Gaussian 03W program. Molecular visualization was carried out with the GaussView 3.0 program. Geometry optimization and vibrational calculations required some 65 h computational time per conformer when using a desktop computer operating at 3 GHz with 8 Gb RAM.

Antibacterial Tests. The 12 aforementioned extracts, arising from the hexanes, dichloromethane, and methanol macerations of flowers, leaves, stems, and roots of *A. jocotepecana*, were screened against four Gram-positive and nine Gram-negative bacteria. Aliquots (6 μL) of ethanolic solutions of all extracts (1 mg/μL) and pure compounds (0.01 mg/μL) were deposited over solidified agar. After 18 h incubation at 37 °C, the inhibition zone diameter was determined. Cefotaxime and EtOH treatments were analyzed as positive and negative controls, respectively. The minimal inhibitory concentrations^{45,46} (MICs) were determined by the agar diffusion method, starting with a maximum concentration of 0.01 mg/μL and then reducing it by successive 2-fold dilutions. Samples that showed no antimicrobial activity at concentrations of 0.01 mg/μL were considered inactive. Wild microbial isolates were identified by biochemical tests: Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*). Experiments were carried out independently three times and each one with three replicates. The Statistic 7.0 software was used to calculate the significance of the experimental data with the Tukey test ($\alpha = 0.05$).

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Thermochemical analysis for 2, 4, 13-*epi*-2, and 13-*epi*-4. The most populated conformers of 13-*epi*-2 and 13-*epi*-4 and copies of 1D and 2D NMR spectra of 1–4, 6, and 7. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

✉ Corresponding Authors

*(C. M. Cerda-García-Rojas) E-mail: ccerda@cinvestav.mx. Tel: +52 55 5747 4035. Fax: +52 55 5747 7137.

*(R. E. del Río) E-mail: ndelrio@umich.mx. Tel: +52 443 326 5788. Fax: +52 443 326 5790.

📝 Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank CONACYT-Mexico for grant 152994 and CIC-UMSNH for financial support. E.G.S., C.B.R.L., and A.L.H. are grateful to CONACYT-Mexico for scholarships 205612, 299963, and 231189, respectively. We are grateful to Prof. J. Rzedowski, Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, Mexico, for identifying the plant material. Financial support from ICYTDF grant 337/2010 is acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Chinou, I. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 1295–1317.
- (2) Gómez-Hurtado, M. A.; Aviña-Verduzco, J. A.; González-Campos, J. B.; López-Castro, Y.; Rodríguez-García, G.; Cerda-García-Rojas, C. M.; del Río, R. E. *Rev. Latinoam. Quím.* 2012, 40, 199–209.
- (3) García, G.; García, E.; Martínez, I.; Scior, T.; Salvador, J. L.; Martínez, M. M.; del Río, R. E. *Braz. J. Pharmacogn.* 2011, 21, 928–935.
- (4) Raya-Gonzalez, D.; Pamatz-Bolaños, T.; del Río-Torres, R. E.; Martínez-Muñoz, R. E.; Ron-Echeverría, O.; Martínez-Pacheco, M. M. *Z. Naturforsch. C* 2008, 63, 922–924.
- (5) Rzedowski, G. C.; Rzedowski, J. *Flora Fanerogámica del Valle de México*; Instituto de Ecología A. C. y Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Pátzcuaro, México, 2005; pp 781–800.
- (6) Villaseñor, J. L. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 2004, 75, 105–135.
- (7) Turner, B. L. *Phytologia* 1996, 80, 128–132.
- (8) Giavalisco, P.; Hummel, J.; Liseic, J.; Inostroza, A. C.; Catchpole, G.; Willmitzer, L. *Anal. Chem.* 2008, 80, 9417–9425.
- (9) Ramirez-Lopez, C. B.; Garcia-Sanchez, E.; Leon-Hernandez, A.; Raya-Gonzalez, D.; del Río, R. E.; Flores-García, A.; Martínez-Pacheco, M. M. *Pharmacologyonline* 2010, 3, 682–690.
- (10) De Pascual, T. J.; Bellido, I. S.; Basabe, P.; Marcos, I. S.; Ruano, L. F.; Urones, J. G. *Phytochemistry* 1982, 21, 899–901.
- (11) David, J. P.; Ferrari, J.; David, J. M.; Guimarães, A. G.; de M. Lima, F. W.; de Souza, G. L. S. *J. Braz. Chem. Soc.* 2007, 18, 1585–1589.
- (12) Ramírez, M. B.; Téllez, A. N.; Torrenegra, R. D. *Rev. Latinoam. Quím.* 2000, 28, 119–124.
- (13) Tsichritzis, F.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* 1991, 30, 211–213.
- (14) Kalman, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, 60, 1423–1425.
- (15) Grant, F. W.; Zeiss, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, 76, 5001–5002.
- (16) Zeiss, H. H.; Grant, F. W., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 1201–1205.
- (17) Carman, R. M. *Aust. J. Chem.* 1966, 19, 629–642.
- (18) Amusant, N.; Moretti, C.; Richard, B.; Prost, E.; Nuzillard, J. M.; Thévenon, M. F. *Holz. Roh. Werkst.* 2007, 65, 23–28.
- (19) Pinto, A. C.; Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Garrido, F. M. S.; Veiga, V. F., Jr.; Bergter, L.; Patitucci, M. L.; Antunes, O. A. C. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 355–360.
- (20) Amaro, J. M.; Adrian, M. *Rev. Latinoam. Quím.* 1982, 13, 110–113.
- (21) Cocker, J. D.; Halsall, T. G.; Bowers, A. *J. Chem. Soc.* 1956, 4259–4262.
- (22) Graham, E. M.; Overton, K. H. *J. Chem. Soc.* 1965, 126–130.
- (23) Cocker, J. D.; Halsall, T. G.; Bowers, A. *J. Chem. Soc.* 1956, 4262–4271.
- (24) Bory, S.; Lederer, E. *Croat. Chem. Acta* 1957, 29, 157–161.
- (25) Bigley, D. B.; Rogers, N. A. J.; Bailtrap, J. A. *J. Chem. Soc.* 1960, 4613–4627.
- (26) Baker, A. J.; Eglinton, G.; Gonzalez, A. G.; Hamilton, R. J.; Raphael, R. A. *J. Chem. Soc.* 1962, 4705–4709.
- (27) Overton, K. H.; Renfrew, A. J. *J. Chem. Soc. C* 1967, 10, 931–935.
- (28) Bjamer, K.; Ferguson, G.; Melville, R. D. *Acta Crystallogr. B* 1968, 24, 855–865.
- (29) Freedman, T. B.; Cao, X.; Dukor, R. K.; Naife, L. A. *Chirality* 2003, 15, 743–758.
- (30) Gómez-Hurtado, M. A.; Torres-Valencia, J. M.; Manriquez-Torres, J.; del Río, R. E.; Motilva, V.; García-Mauriño, S.; Ávila, J.; Talero, E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry* 2011, 72, 409–414.
- (31) Hóltje, H. D.; Folkers, G. In *Molecular Modeling. Basic Principles and Applications*; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H., Eds.; Methods and Principles in Medicinal Chemistry; VCH: Weinheim, 1996; Vol. 5, Chapter 2, p 29.
- (32) Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. *Can. J. Chem.* 1992, 70, 560–571.

- (33) Andzelm, J.; Wimmer, E. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1280–1303.
- (34) Debie, E.; De Gussem, E.; Dukor, R. K.; Herrebout, W.; Nafie, L. A.; Bultinck, P. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1542–1549.
- (35) Molina-Salinas, G. M.; Rivas-Galindo, V. M.; Said-Fernández, S.; Lankin, D. C.; Muñoz, M. A.; Joseph-Nathan, P.; Pauli, G. F.; Waksman, N. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1842–1850.
- (36) Muñoz, M. A.; Urzúa, A.; Echeverría, J.; Bucio, M. A.; Hernández-Barragán, A.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry* **2012**, *80*, 109–114.
- (37) Gutiérrez-Nicolás, F.; Gordillo-Román, B.; Oberti, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 669–676.
- (38) Gordillo-Román, B.; Camacho-Ruiz, J.; Bucio, M. A.; Joseph-Nathan, P. *Chirality* **2012**, *24*, 147–154.
- (39) Gordillo-Román, B.; Camacho-Ruiz, J.; Bucio, M. A.; Joseph-Nathan, P. *Chirality* **2013**, *25*, 939–951.
- (40) Lu, J. M. H.; Perkins, M. V.; Griesser, H. J. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6468–6473.
- (41) Urones, J. G.; Basabe, P.; Marcos, I. S.; González, J. L.; Jiménez, V.; Sexmero, Ma. J.; Lithgow, A. M. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9991–9998.
- (42) Castro, J. M.; Salido, S.; Altarejos, J.; Noguera, M.; Sánchez, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5941–5949.
- (43) Hussain, A.; Perveen, S.; Malik, A.; Khan, A. N.; Tareen, R. B. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1101–1104.
- (44) Haridy, M. S. A.; Ahmed, A. A.; Doe, M. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1455–1459.
- (45) Raahave, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *6*, 603–605.
- (46) Kronvall, G.; Giske, C. G.; Kahlmeter, G. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 281–290.

6.3.2 Phytochemical study of *Ageratina jocotepecana* (EN PREPARACIÓN)

Article

Phytochemical study of *Ageratina jocotepecana*

Edgar García-Sánchez¹, César B. Ramírez-López¹, Alejandra León-Hernández¹, Rosa E. Martínez-Muñoz¹, Marcos Cajero-Juárez², Mauro M. Martínez-Pacheco¹, Carlos M. Cerda-García-Rojas³ and Rosa E. del Río¹

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B-1 Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México, 58030

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-CMEB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Michoacán, México, 58893

³Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. 07360

Abstract: Twelve samples arising from the hexane, dichloromethane, and methanol extracts of flowers, leaves, stems and roots of *Ageratina jocotepecana* were screened against four Gram positive and nine Gram negative bacteria, revealing a remarkable antibacterial activity in all the hexane extracts. Phytochemical investigation of the hexane extracts afforded (–)-caryophyllene oxide, 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone, thymol, thymol isobutyrate, squalene, dammara-20,24-dien-3β-yl acetate, β-amyrin palmitate and lupeol acetate. The structures of the compounds were verified by NMR.

Key words: *Ageratina jocotepecana*; antibacterial activity; secondary metabolites; NMR

1. Introduction

In Mexico, there are 143 living species of *Ageratina*, including 28 in Western Mexico [1-3]. This is the case of *Ageratina jocotepecana* initially collected near Jocotepec, Jalisco, Mexico in 1989 and classified by B.L. Turner [4]. This species has few collection reports, although there are records for *Ageratina* species from the same region since the 70s in the twentieth century [5]. The presence of *A. jocotepecana* in the state of Michoacan suggests that this plant is endemic to West Central Mexico. Its complete geographical distribution, its basic biology and its phytochemistry is still unknown. In continuation of our research on bioactive components from native plants in Western Mexico [6-8], the chemical study of the major components of *A. jocotepecana* was conducted, allowing their isolation, spectral characterization and evaluation of their antibacterial activity. This study, in combination with previous reports, also represents an opportunity to increase the knowledge of plant metabolome [9] for the genus *Ageratina* that could be useful in constructing phytochemical indicators for chemotaxonomic purposes [10] as well as for obtaining bioactive compounds.

2. Results and Discussion

2.1. Compounds isolated from *A. jocotepecana*

The chemical study of flowers, leaves, stems, and roots of *Ageratina jocotepecana*, carried out, afforded (-)-caryophyllene oxide [11], 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone [12], thymol, thymol isobutyrate [13,14], squalene [15], dammara-20,24-dien-3 β -yl acetate [16], β -amyrin palmitate [17], and lupeol acetate [18]. Our previous investigations carried out, four labdanes; (5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-(-)-labd-7-en-15-oic acid, (5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-(+)-8-hydroxylabdan-15-oic acid, (5*S*,9*S*,10*S*)-(-)-(13*Z*)-labda-7,13-dien-15-oic acid, methyl (5*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-(-)-labd-7-en-15-oate [19]. The ¹H and ¹³C NMR data of compound were fully assigned NMR spectroscopy.

2.3. Antibacterial activity

Labdanes have also been reported to have antibacterial activities [19]. Therefore, the role of the isolated components from *A. jocotepecana* may be involved in the processes of plant defense and communication. Concerning other metabolites isolated from this species, they also correlate with antibacterial activity shown by its hexane extracts. Thymol and thymol isobutyrate showed antibacterial and antiseptic activities [21-23]. Caticic acid, which was identified in the trees of *Prioria* and *Eperua*, inhibited the growth of the wood-degrading

fungus *Coriolus versicolor* [11]. Squalene, is widely distributed in nature, and exhibited activity against *Mycobacterium tuberculosis* [24]. β -Amyrin has been also isolated from different plant extracts that show antimicrobial activities [25], while 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone, isolated from the aerial parts of *Tamarix gallica* L. showed antimicrobial activity using the disk diffusion method against five human pathogenic bacteria and the fungus *Aspergillus niger* [26], *Candida albicans*, and *Trichophyton mentagrophytes* [17]. Caryophyllene oxide was identified as the major component in the essential oil of the aerial parts of *Eupatorium triplinerve* Vahl, a species taxonomically related to *Ageratina*. This oil showed antibacterial and antifungal activity [27]. Plant components, as labdane derivatives, may therefore constitute the molecular basis of new drugs including selected antibacterial substances.

3. Experimental

3.1. General

Plant compounds were purified by column chromatography using silica gel as stationary phase (230-400 mesh) Merck and mixtures of hexane and EtOAc in ascending polarity as the mobile phase, monitoring the chromatographic separations by TLC. Optical rotations ($[\alpha]_D$) were recorded on a Perkin-Elmer 341 polarimeter using quartz cells of 1 dm path length, in CHCl_3 solutions. The concentration (c , expressed in cg/mL) is given in parentheses. Infrared (IR) spectra were recorded on a Buck Scientific 500 spectrometer; only characteristic absorptions (ν , cm^{-1}) are reported. ^1H NMR spectra were recorded at 300 MHz on a Varian Mercury 300 spectrometer using CDCl_3 as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as the internal reference.

3.2. Plant material

Ageratina jocotepecana (B.L. Turner) specimens were collected during the flowering stage, on February 22, 2006 at coordinates $19^\circ 42.821' \text{ N}$ and $101^\circ 36.711' \text{ W}$ at 2266 m.a.s.l. A voucher specimen (No 188459) is deposited at the Herbarium of Instituto de Ecología de Pátzcuaro, Michoacan, Mexico, and one more sample is kept at Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico.

3.3. Extraction and isolation of pure compounds

Leaves (255 g), flowers (240 g), stems (320 g) and roots (1065 g) from *A. jocotepecana* were macerated with hexane at room temperature ($3 \times 1.5 \text{ L}$). Extract yields were: leaves (4.36%), flowers (10.75%), stems (3.38%), and roots (1.28%). Column chromatography of

leaves (2 g), flowers (1 g) and stems extract (2 g) was performed using mixtures of hexane-ethyl acetate in ascending polarity.

4. Conclusions

The phytochemical study of *Ageratina jocotepecana*, carried out for the first time, eighth antimicrobial compounds. These substances were studied by NMR spectroscopy. These results contributed to phytochemical knowledge of *A. jocotepecana*. Also, its chemical study exhibited potential antimicrobial.

5. Acknowledgements

The authors thank USMNH funding this work. EGS, CBRL and ALH are fellows of CONACYT.

6. References

1. Rzedowski, J.; Calderón de Rzedowski, G. Tribu Eupatorieae. En *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2nd ed.; Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, **2005**; pp. 781-800.
2. Fernández, R.; Rodríguez, C.; Arreguín, M.L.; Rodríguez, A. Listado florístico de la cuenca del Río Balsas, México. *Polibotánica* **1998**, *9*, 1-151.
3. Villaseñor, J.L. Los géneros de las plantas vasculares de la flora de México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **2004**, *75*, 105-135.
4. Turner, B.L. A new species of *Ageratina* (Asteraceae, Eupatorieae) from Jalisco, Mexico. *Phytologia* **1996**, *80*, 128-132.
5. Espinosa, G.J.; Rodríguez, J.L.S. Listado Florístico del Estado de Michoacán. Sección II (Angiospermae: Compositae). En: *Flora del bajío y de regiones adyacentes*, México, 1995; fascículo complementario VII, pp. 1-244.
6. Morales, M.E.; Martínez, R.E.; Ron, O.; Rubio, N.A.; Martínez, M.M.; Salgado, R. Effect of bornyl-*O*-deca-*2E,6Z,8E*-trienate on growth of several pathogens. *Pharmacologyonline* **2007**, *3*, 96-103.
7. García, G.; García, E.; Martínez, I.; Scior, T.; Salvador, J.L.; Martínez, M.M.; del Río, R.E. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 928-935.

8. Raya, D.; Pamatz, T.; del Rio, R.E.; Martinez, R.E.; Ron, O.; Martinez, M.M. D-(+)-pinitol a component of heartwood from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. *Z. Naturforsch. C* **2008**, *63C*, 922-924.
9. Giavalisco, P.; Hummel, J.; Lisec, J.; Cuadros, I.A.; Catchpole, G.; Willmitzer, L. High resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole ¹³C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9417-9425.
10. Ramirez, C.B.; Garcia, E.; Leon, A.; Raya, D.; del Rio, R.E.; Flores, A.; Martinez, M.M. Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline* **2010**, *3*, 682-690.
11. Krebs, H. C.; Rakotoarimanga, J. V.; Habermehl, G. G. Isolation of spathulenol and (-)-caryophyllene oxide from *Vernonia mollissima* Don and ¹H and ¹³C reassignment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 124-128.
12. Ragasa, C. Y.; Lapina, M. C.; Lee, J. J.; Mandia, E. H.; Rideout, J. A. Secondary metabolites from *Tectona philippinensis*. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 820-824.
13. Bohlmann, F.; Kumar, M. P.; Suwita, A.; Suwita, A.; Anant, N. A.; Zdero, Christa.; Dorner, W.; Ehlers, D.; Grenz, M. Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoffe aus vertretern der *Eupatorium*-Gruppe. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1973-1981.
14. Bohlmann, F.; Zdero, C. Neue thymol-derivative aus *Arnica Amplexicaulis* *Tetrahedron Lett.* **1972**, *28*, 2827-2828.
15. He, H. P.; Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H.; Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* Grain. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 368-372.
16. Talapatra, S.K.; Bhar, D.S.; Talapatra, B. Dammaradienyl acetate and taraxasterol from *Eupatorium cannabinum*: Mass Spectrometric study of dammaradienyl acetate and its derivatives. *Aust. J. Chem.* **1974**, *27*, 1137-1142.
17. Mendes, C.C.; Cruz, F.G.; David, J. M.; Nascimento, I.P.; David, J.P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Quim. Nova.* **1999**, *22*, 185-188.
18. Ajithabai, M.D.; Sreedevi, S.; Jayakumar, G.; Mangalam, S. N.; Deepa, P. N. N.; Sunitha Rani, S. P. Phytochemical analysis and radical scavenging activity of the extracts of *Costus picatus* Linn and *Coccinia indica* W & A, two ethnic medicinal plants used in treatment of diabetes mellitus. *Free Radicals and Antioxidants*, **2011**, *1*, 77-83.
19. García-Sánchez, E.; Ramírez-López, C.B.; Talavera-Alemán, A.; León-Hernández, A.; Martínez-Muñoz, R.E.; Martínez-Pacheco, M.M.; Gómez-Hurtado, M.A.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Joseph-Nathan, P.; del Río, R.E. Absolute configuration

- of (13R)- and (13S)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocospecana*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1005-1012.
20. Haridy, M.S.A.; Ahmed, A.A.; Doe, M. Microbiological transformation of two labdane diterpenes, the main constituents of *Madia* species, by two fungi. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1455-1459.
 21. Hanbali, F.E.L.; Akssira, M.; Ezoubeiri, A.; Gadhi, C.A.; Mellouki, F.; Benherra, A.; Blazquez, A.M.; Boira, H. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 399-401.
 22. Paolini, J.; Costa, J.; Bernardini, A.F. Analysis of the essential oil from the roots of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18*, 235-244.
 23. Mathela, C.S.; Tiwari, A.; Padalia, R.C.; Chanotiya, C.S. Chemical composition of *Inula cuspidata* C.B. Clarke. *Indian J. Chem.* **2008**, *47B*, 1249-1253.
 24. Yenjai, C.; Pitchayawasin, S.; Bunsupa, S.; Sangkul, S. Phytochemical study of *Hymenocardia wallichii* Tul. *Acta Hortic.* **2005**, 127-129.
 25. Sarg, T.M.; Abbas, F.A.; El-Sayed, Z.I.; Mustafa, A.M. Two new polyphenolic compounds from *Ficus retusa* L. "variegata" and the biological activity of the different plant extracts. *J. Pharm. Phytoth.* **2011**, *3*, 89-100.
 26. Lefahal, M.; Benahmed, M.; Louaar, S.; Zallagui, A.; Duddeck, H.; Medjroubi, K.; Akkal, S. Antimicrobial Activity of *Tamarix gallica* L. extracts and isolated flavonoids. *Adv. in Nat. Appl. Sci.* **2010**, *4*, 289-292.
 27. Begum, J.; Bhuiyan, N.I.; Taznin, T. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Eupatorium triplinerve* Vahl. aerial parts. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* **2010**, *12*, 543-547.

7. Discusión general

Es ineludible la necesidad de nuevas moléculas bio-activas para controlar diversos problemas que afectan al ser humano: los paradigmas son la morfina, emetina, quinina, colchicina, cafeína, atropina, codeína y papaverina. Con esto se manifiesta la importancia farmacológica de los productos naturales vegetales para la obtención de nuevos principios activos. La obtención de moléculas antimicrobianas en el metaboloma de especies del género *Eupatorium* es un hecho promisorio.

En el desarrollo de esta investigación se determinó que la diversidad del género *Eupatorium* en Michoacán consta de al menos 69 especies en el 70% del territorio, algunas con uso etnomedicinal y la clasificación botánica compleja. Esta complejidad taxonómica generada por la similitud de sus caracteres morfológicos entre especies del género ha sido descrita por autoridades botánicas y corroborada en esta investigación. Consecuencia de ello es que algunas especies presentan sinonimias y han sido reubicadas. En nuestra investigación una especie de *Eupatorium* fue reexaminada botánicamente y clasificada en el género *Ageratina*. Esta similitud en caracteres morfológico entre especies puede generar una equivocación en la selección de una especie medicinal por los médicos tradicionales, lo que repercute directamente en la recuperación de la salud del paciente, en donde en el menor de los casos no existirá recuperación o puede representar consecuencias fatales.

La investigación fitoquímica y de principios activos se inició con la colecta de once especies vegetales, la identificación por un botánico experimentado, la obtención de extractos, ensayos antimicrobianos, selección de extractos, aislamiento, purificación, elucidación estructural, preparación de derivados y configuración absoluta de dos diterpenos antibacterianos, los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico, por dicroísmo circular vibracional.

La estrategia utilizada para el estudio fitoquímico tuvo un esquema de biodirección lo que permitió generar criterios de selección de los extractos más activos. Los extractos hexánicos de *Eupatorium* spp exhibieron mejor actividad antimicrobiana *in vitro* contra los patógenos resistentes ensayados. El estudio químico se inició con ocho extractos de cuatro especies vegetales, lo que permitió el aislamiento, purificación y elucidación estructural de

23 componentes con propiedades antimicrobianas reportadas o determinadas en este trabajo. Asimismo se demuestra fehacientemente por primera vez la configuración absoluta por dicroísmo circular vibracional de los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico.

Los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico se han aislado especies arbóreas. El ácido catívico fue aislado por primera vez en 1938 de *Prioria copaifera* Griseb y en 2007 de *Eperua falcata* principal componente de los exudados resinosos producidos por éstas especies vegetales. En el año 2000 fue aislado por primera vez el ácido 13-*epi*-labdanólico de *Espeletiopsis muiska* (Cuatrec.). Debido al potencial farmacológico de los labdanos, en particular a su actividad antibacteriana demostrada en este trabajo se buscó la información molecular existente. Sin embargo, se encontró que no existían datos espectroscópicos consistentes que definieran la estereoquímica correcta, por ello en esta investigación se demuestra fehacientemente por primera vez la configuración absoluta por dicroísmo circular vibracional de los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico. Es posible que existan otros estereoisómeros que no se detectaron. La importancia de conocer la configuración absoluta de las moléculas es por el impacto biomédico que causó el uso de la talidomida, un fármaco suministrado de 1958 a 1963 a las pacientes con tres meses de embarazo como sedante y disminución de náuseas.

Con la determinación de la configuración absoluta de estos diterpenos antibacterianos, motiva a conocer su posible interacción con blancos biológicos mediante una análisis “*in silico*” de los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico con un modelo de enzima óxido-reductasa ya que se ha observado que los labdanos afectan enzimas de óxido reducción y funciones antioxidantes (Liu y Nair, 2010) (Zheng *et al.*, 2010).

Adicionalmente se encontró que no existe una base de datos actualizada de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán. Algunas especies tienen usos etnomedicinales, de éstas y otras *Eupatorium* spp se han identificado y purificado algunos metabolitos secundarios, algunos de ellos con propiedades bioactivas (Ramírez *et al.*, 2010; García-Sánchez *et al.*, 2011). En ellos se manifiesta la importancia de tener una base de datos actualizada de las especies que habitan en Michoacán para conocer el número de especies, su distribución geográfica, uso etnomedicinal y etnobotánico. Los resultados motivan a continuar con el estudio biogeográfico, etnobotánico y etnomedicinal, incluyendo la

extensión territorial no estudiada (30%), lo que proporcionaría una actualización del número de especies nativas, su uso tradicional y medicinal. La actualización iniciaría con la búsqueda de información en bases de datos y publicaciones científicas preexistentes, centros de medicina tradicional, organizaciones y entrevistas de médicos tradicionales y herbarios locales. Con esta investigación se conocerá su ubicación, evolución y diversidad biológica, así como el tipo de suelo que habitan, el tipo de clima y altitud; información relevante para la domesticación de especies con propiedades etnomedicinales. Así como su información del uso tradicional de las especies como: nombres comunes, órgano usado, la forma de preparación y aplicación en enfermedades y síntomas. Con ello se fortalecerá una base de datos de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán con potencial antimicrobiano.

Además en esta investigación fitoquímica se observa que los componentes de baja polaridad son los más activos, por lo que al continuar el estudio fitoquímico es posible encontrar principios activos que presenten poca promiscuidad farmacológica y permita dilucidar de forma rápida un posible blanco de acción. La continuación del estudio químico del resto de los extractos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos, segundos y terceros en importancia antimicrobiana con el objetivo de caracterizar los metabolitos secundarios y principios activos; debe ser una acción inmediata.

En la necesidad de controlar la rápida manifestación de la resistencia microbiana a los antibióticos convencionales se requiere la elucidación de nuevas moléculas de origen vegetal en un periodo de tiempo corto. Los metabolitos identificados y purificados en este trabajo indican que es grande la probabilidad de encontrar nuevas moléculas antimicrobianas con mejores características a las convencionales. Por ello es posible cumplir temporalmente el anhelo del ser humano de controlar a los microorganismos infecciosos. Es indispensable utilizar herramientas relativamente modernas para agilizar la elucidación de principios activos. Recordemos que la forma tradicional para el aislamiento de compuestos puros y elucidación estructural es una labor ardua e intensa que consume mucho tiempo, requiere personal excepcional con habilidades y pericia en la toma de decisiones para llegar a los resultados esperados. Algunos métodos que facilitarían el proceso identificación de moléculas no descritas y principios activos son métodos

cromatográficos acoplados a detectores espectroscópicos como DAD, espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear, además, apoyado con la utilización de métodos modernos de tamizaje químico como HTS (High Throughput Screening) por sus siglas en el idioma Inglés, lo que permitirá el análisis de cientos de muestras en un periodo de tiempo corto y un posible blanco biológico. Además, la utilización de la técnica de microdilución en placa para evaluar el efecto antimicrobiano de los metabolitos secundarios, permitirá realizar un escrutinio amplio con 5 mg de extractos crudos y 1 mg de compuestos puros, así se disminuirá el tiempo de identificación de moléculas de interés y de consumibles. La importancia del conocimiento químico de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán radica en la creación de una base de datos fitoquímica y botánica, en donde se establezca la diversidad y complejidad de sus metabolitos secundarios, así como su actividad biológica. En la medida de lo posible estos datos permitirán crear un patrón quimiotaconómico preliminar, conocer posibles metabolitos que sean usados como base molecular para la síntesis de nuevas drogas, proporcionar valor agregado especies consideradas como malezas y conocer especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán como potenciales fuentes de moléculas con aplicaciones terapéuticas.

Las posibilidades de encontrar nuevas moléculas es grande debido a que se han reportado aproximadamente 10^7 moléculas compuestas de los elementos C, H, O, N y S con un peso menor a 500 Daltons de en la base de datos SciFinder, de las 10^{200} moléculas estimadas. Adicionalmente, en *Arabidopsis thaliana*, una especie vegetal con un genoma pequeño y conocido, aún no ha sido posible identificar la totalidad de metabolitos secundarios (Giavalisco *et al.*, 2008). Por lo que, en especies vegetales más complejas por el tamaño de su genoma, se estima que sintetizan una mayor cantidad de componentes químicos. La continuación del estudio del metaboloma de *Eupatorium* spp exhibirá la diversidad y complejidad química de sus metabolitos, y algunos de ellos serán posibles principios activos con un posible valor clínico de candidato terapéutico o fármaco. Donde evidentemente será de importancia la vinculación con epidemiólogos y especialistas fitosanitarios para conocer y dirigir la investigación fitoquímica contra los principales patógenos de interés clínico y agrícola.

Hoy en día se ha ampliado el conocimiento de la biología fundamental de la interacción entre la planta y otros organismos. En la interacción se comparten moléculas las cuales no son sintetizadas por la planta o por el organismo interactuante. Sin lugar a dudas, el potencial terapéutico de los metabolitos secundarios de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán es desconocido. Sin embargo, los benzopiranos como enecalina así como los diterpenos tipo labdano como los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico, presentan propiedades antimicrobianas y su mecanismo de acción es desconocido. Por la naturaleza química lipofílica de estas moléculas se infiere que afectan el funcionamiento de las membranas celulares, una hipótesis a comprobar en el corto plazo.

La síntesis de estos diterpenos se realiza en los plástidos por la vía desoxixylulosa fosfato, ampliamente estudiada en modelos de plantas alejados filogenéticamente, a partir del geranilgeranildifosfato (GGPP) (Guo y Wagner, 1995; Springob y Kutchan, 2009). Es posible que los ácidos catívico y 13-*epi*-labdanólico sean producidos en *Eupatorium* por esta vía biosintética.

La co-existencia de (13*R*) y (13-*S*) labdanos se puede explicar mediante un mecanismo de regulación metabólica por compartimentación. La presencia de estos labdanos epiméricos puede explicarse por una reducción en C-13 del ácido labda-7,13-dien-15-oico el cual puede llevarse a cabo por la presencia de dos isoenzimas “reductasas estereoespecíficas” o bien por la participación de una reductasa que genera uno de los isómeros y una epimerasa que dan lugar a su epímero (13*R*) o (13-*S*) labdanos (Fig. 1).

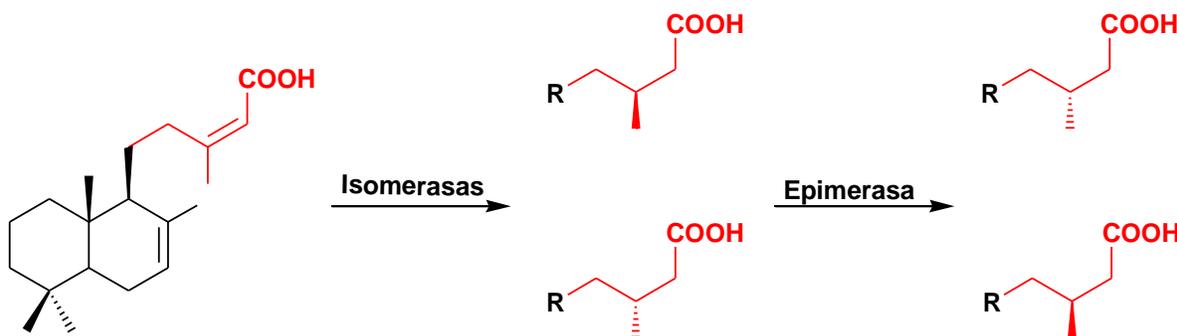


Figura 1. Reacciones biosintéticas propuestas de la co-existencia de epímeros

De igual forma los metabolitos secundarios pueden transformarse durante el proceso de extracción y purificación, es por ello que el aislamiento de compuestos puros bioactivos está

íntimamente relacionado con la constitución de los extractos crudos. Algunas consideraciones son las siguientes: La variación geográfica, estacional y ecológica en el contenido de los principios activos de plantas, la co-ocurrencia de componentes indeseables capaces de modular la biactividad y cambios de bioactividad durante el almacenaje y extracción. Por ello, es importante indagar sobre el origen de los metabolitos antimicrobianos identificados en las especies de *Eupatorium*.

Es inevitable la lucha por la supervivencia de todos los organismos para adaptarse a su ambiente, por tanto los microorganismos patógenos del ser humano y de cultivos económicamente importantes persistirá. Ante ello, la mejor forma de coadyuvar al control de estos patógenos es la anticipación, mediante la dilucidación de nuevas fuentes y moléculas antimicrobianas para controlar y prevenir la enfermedad por éstos patógenos y así mantener el confort humano y evitar pérdidas millonarias en cultivos económicamente importantes.

Con estos resultados se demuestra que el metaboloma de las especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán es un recurso promisorio escasamente explorado en la búsqueda de moléculas antimicrobianas. Aunque nuestra población de estudio ha iniciado con once especies, cuatro de ellas con uso etnomedicinal, la mayoría de los metabolitos aislados presentan propiedades antimicrobianas. Además, se valida el uso de las especies de este género en la medicina tradicional mexicana. Así como se contribuye con el enriquecimiento de la base de datos fitoquímica y de principios activos. El conocimiento de la disposición espacial de los radicales químicos es determinante para obtener un efecto farmacológico deseado. El potencial de las moléculas descritas aquí nos obligó a conocer inequívocamente la configuración absoluta por dicroísmo circular vibracional.

Las perspectivas en esta investigación son: 1.- Preparar derivados de los ácidos catfívico y 13-*epi*-labdanólico y evaluar su actividad antimicrobiana. 2.- Continuar el estudio fitoquímico y de principios activos con técnicas rápidas, eficientes y confiables para el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios antimicrobianos para postularlos como candidatos terapéuticos. 3.- Aportar evidencia científica para la actualización de la base de datos botánica y de compuestos antimicrobianos de las especies nativas de Michoacán de la Tribu Eupatorieae.

8. Referencias generales

- Amabile-Cuevas. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4, 126-131.
- APEAM, 2. (12 de Abril de 2010). APEAM. Recuperado el 2010, de Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México A.C.: <http://www.apeamac.com>
- Barrett, J. F. (2001). Encourage research and product development. En J. Avorn, J. Barrett, P. Davey, S. McEwen, T. O'Brien, & S. Levy, *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups* (págs. 53-64). Boston, M.A., United States of America: World Health Organization.
- Borris, R. P. (1996). Natural products research: perspectives from major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.*, 5, 29-38.
- Butler, M. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.
- Chávez, P. (2004). Infecciones intrahospitalarias ¿Qué ha pasado durante 23 años? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24, 89-92.
- Chin, Y., Balunas, M., Chai, H., Kinghorn, A. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8, 239-253.
- CONABIO. (2000). *Estrategia nacional sobre biodiversidad de México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Damián-Badillo, L., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Muñoz, R., Martínez-Pacheco, M. (2008). Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*, 1, 27-33.
- Espinosa, G., Rodríguez, J. (1995). Listado florístico del Estado de Michoacán. En *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* (págs. 84-103).
- Espinoza-Madrigal, R. (2009). Tesis de Maestría. *Escrutinio del efecto microbicida de *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Willd y *C. platyloba* S. Watson sobre microorganismos que afectan el aguacate*. Morelia, Michoacán.
- García-Sánchez, E., Ramírez-López, C., del Rio, R., Martínez-Pacheco, M. (2011). A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. *Phyton*, 80, 139-146.

- Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A., Catchpole, G., Willmitzer, L. (2008). High-Resolution Direct Infusion-Based Mass Spectrometry in Combination with Whole ^{13}C Metabolome Isotope Labeling Allows Unambiguous Assignment of Chemical Sum Formulas. *Anal. Chem*, 80, 9417-9425.
- Gómez-Pompa, A. (1993). Las Raíces de la Etnobotánica Mexicana. *Acta Biologica Panamensis*, 1, 87-100.
- Guillén-Andrade, H., Lara-Chávez, B. N., Gutiérrez-Contreras, M., Ortíz- Caton, M., Ángel-Palomares, M. E. (2007). *Cartografía Agroecológica del Cultivo del Aguacate en Michoacan*. México: Morevallado Editores de Morelia.
- Guo, Z., Wagner, J. G. (1995). Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana glutinosa*. *Planta*, 197, 627-632.
- IMSS. (2012). *Herbario Nacional de Plantas Medicinales IMSS*. Recuperado el 26 de mayo de 2014, de <http://leonardobeltrann.blogspot.mx/2012/04/el-herbario-nacional-de-plantas.html>
- Katinas, L., Gutierrez, D., Grossi, M., Crisci, J. V. (2007). Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la Republica Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 42, 113-129.
- Levy, S. (2001). Introduction. En J. Avorn, J. Barrett, P. Davey, S. McEwen, T. O'Brien, & S. Levy, *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups* (pág. 11). Boston, M.A., United States of America: World Health Organization.
- Liu, Y., Nair, M. (2010). Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. *Food Chemistry*, 124, 527-532.
- Mc Vaugh, R. (1982). The new synantherlogy vs. *Eupatorium* in Nueva Galicia. *Contr. Univ. Mich. Herb*, 15, 181-190.
- McEwen, S. (2001). Improve antibiotic use in animals. En J. Avorn, J. Barrett, P. Davey, S. McEwen, T. O'Brien, & S. Levy, *Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups* (págs. 65-79). Boston, M.A.: World Health Organization.
- Newman, D., Cragg, G. (2010). Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. En A. D. Butler, *Natural Product Chemistry for Drug Discovery* (págs. 3-4). Royal Society of Chemistry.

- Newman, D., Cragg, G. (2010). Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. En A. Buss, & M. Butler, *Natural Product Chemistry for Drug Discovery* (págs. 17-19). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Newman, D., Cragg, G., Snader, K. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports*, 17, 215-234.
- OMS. (22 de junio de 2004). *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales*. Recuperado el 26 de mayo de 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- Pérez-González, L., Ruíz-González, J., Noyola, D. (2007). Nosocomial Bacteremia in Children: A 15-Year Experience at a General Hospital in Mexico. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28, 418-422.
- Ramirez-Lopez, C., Garcia-Sanchez, E., Leon-Hernandez, A., Raya-Gonzalez, D., del Rio-Torres, R., Flores-Garcia, A., Martinez-Pacheco, M.M. (2010). Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline*, 3, 682-690.
- Rivera-Tapia, J. A. (2003). Antibiotic resistance, public health problem. *Anales Médicos Hospital ABC*, 48, 42-47.
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfin, S., Pérez-Gómez, H., González-Díaz, E., Morfin-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34, 1-34.
- Springob, K., Kutchan, T. M. (2009). Introduction to the different Classes of Natural Products. En A. E. Osbourn, & V. Lanzotti, *Plant-derived Natural Products Synthesis, Function, and Application*.
- Stockwell, V., Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et technique de l'Office International des Epizooties*, 31, 199-210.
- Velázquez-Meza, M. E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Pública de México*, 47, 381-387.
- Villaseñor, J. L., Ibarra, G., Ocaña, D. (1998). Strategies for the Conservation of Asteraceae in Mexico. *Conservation Biology*, 12, 1066-1075.
- Zhang, M., Wu, M., Zhang, J., Irwin, D., Gu, Y., Shi, Q. (2008). Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. *Chem Biodivers*, 5, 44-55.
- Zheng, C., Huang, B., Wang, Y., Ye, Q., Han, T., Zhang, Q.Y., Zhang, H., Qin, L.P. (2010). Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 175-181.

Zurita, J., Márquez, C., Espinoza, Y., Vargas, A. C. (2005). Infecciones por *Staphylococcus aureus* oxacilino-resistentes provenientes de la comunidad en un hospital de Quito. *Revista Médica Vozandes*, 16, 46-51.