



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Contribución a la monografía tipo FHEUM de la espinosilla (*Loeselia mexicana* (Lam.) Brand)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

BRISA ITZEL CHÁVEZ AYALA

Director de tesis:

Dr. Sol Cristians Niizawa



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos de la alumna

Brisa Itzel Chávez Ayala
5573905515
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
itzelbris@gmail.com
311185586

2. Datos del tutor

Dr. Sol Cristians Niizawa
Investigador Asociado C
Jardín Botánico, Piso 1: L105
Lab. de Etnobotánica
sol.critians@ib.unam.mx

3. Datos del sinodal 1

Dr. Robert Bye Boettler
Investigador Titular C
Jardín Botánico, Piso 1: L105
Lab. de Etnobotánica
rbyeunam@unam.mx

4. Datos del sinodal 2

Dra. Helia Reyna Osuna Hernández
Profesora de Carrera Titular A
Depto. de Ecología y Recursos Naturales
hrof@ciencias.unam.mx

5. Datos del sinodal 3

Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Investigador Titular A
Depto. de Productos Naturales
Instituto de Química
chilpa@unam.mx

6. Datos del sinodal 4

Dra. Carolina Granados Mendoza
Investigadora Asociada C
Instituto de Biología
carolina.granados@ib.unam.mx

7. Datos del trabajo escrito

Contribución a la monografía tipo FHEUM
de la espinosilla (*Loeselia mexicana* (Lam.) Brand). 88 páginas. 2020.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

Este trabajo se realizó dentro de las instalaciones del Laboratorio de Etnobotánica del Jardín Botánico, Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con asesoría y apoyo del Dr. Sol Cristians Niizawa.

Agradezco el apoyo a los siguientes proyectos y personas académicas:

-Al proyecto de investigación en plantas medicinales, 2016: Propagación y análisis farmacopéicos de espinosilla, *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand. (POLEMONIACEAE) y té tochel, *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze (LAMIACEAE). Secretaria de Desarrollo Rural y Equidad para las comunidades, Ciudad de México.

-Al proyecto PAPIIT, UNAM IN202015

-A los que nos ayudaron con las colectas de material vegetal silvestre en Milpa Alta, Ciudad de México.

-Al Dr. Robert Bye Boettler por prestarnos su laboratorio y apoyarnos en lo que necesitáramos.

-A la M. en C. Virginia Evangelista Oliva por su asistencia técnica en el desarrollo de mapas de distribución actual y potencial.

-A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por su asistencia técnica en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud.

-A la Dra. Lidia Cabrera Martínez por su asistencia técnica en el Laboratorio de Sistemática Molecular Botánica.

-A la Dra. Laura Guzmán y el Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su asistencia técnica en el desarrollo de identidad química de la espinosilla en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química.

-A la M. en C. Abigail Aguilar Contreras por proporcionarnos material vegetal de dos especies del género *Loeselia* para su extracción de DNA, Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM).

Personales

A mis papas, Pancho y Cheli por ser los mejores amigos y compañeros de vida. Muchas gracias por brindarme educación, apoyo y amor para salir adelante. Los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Lalito, por hacerme reír y también ser mi mejor amigo. Muchas gracias por escucharme y aconsejarme. Te amo muchísimo y sabes que siempre estaré para ti.

A mi pareja, Enrique. Gracias por haber estado conmigo cuando más lo necesitaba e impulsarme a continuar. Sé que ambos podremos realizar todo lo que nos propongamos con el corazón. Te amo.

Al Doctor Sol, por ser un excelente asesor y amigo. Gracias por motivarme a seguir creciendo académicamente y concluir esta importante etapa. En verdad valoro mucho que siempre me estuviera apoyando.

A mis sinodales, gracias por su tolerancia y apoyo en este proyecto.

ÍNDICE	Páginas
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
Medicina tradicional en el mundo	3
Estrategia OMS 2014-2023 sobre medicina tradicional	3
Medicina tradicional en México	4
Farmacopea	7
Historia de la Farmacopea Mexicana	7
Recolecta de material vegetal silvestre	11
Control de calidad	12
Seguridad y eficacia	13
Marcadores químicos	13
Cromatografía	13
MGA-FH 0050	14
Marcadores moleculares para control de calidad de plantas medicinales	14
Espinosilla [<i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brand]	16
Ubicación taxonómica	16
Basionimo	16
Sinonimias	16
Descripción botánica	17
Distribución	18
Historia y etnobotánica	18
Propagación sexual	25
Germinación	25
Propagación asexual (vegetativa)	25
Química	26
Farmacología	27
JUSTIFICACIÓN	31

OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
Revisión bibliográfica de <i>L. mexicana</i>	32
Revisión de herbarios y elaboración de mapas de distribución	32
Colecta de material vegetal	33
Muestras del mercado de Sonora	35
Propagación sexual	36
Ensayo de viabilidad por germinación	36
Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio	37
Siembra directa	37
Trasplante	37
Siembra al voleó	37
Propagación asexual (vegetativa)	37
Estacas	37
Trasplante	38
Experimento de aclimatación	38
Ciclo fenológico	39
Ensayo de identidad química	39
Extracto orgánico	39
Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	40
Placa preparativa	40
Ensayo de identidad molecular	42
Extracción de DNA	42
Amplificación de marcadores moleculares	43
Análisis bioinformático y determinación de la capacidad discriminativa	46
Construcción de código de barras molecular	46

RESULTADOS	
Depósito de herbario	47
Mapa de distribución (Algoritmo <i>Maxent</i>)	48
Resumen de datos obtenidos de herbarios	50
Propagación sexual	50
Ensayo de viabilidad por germinación	51
Ensayo de viabilidad con cloruro de tetrazolio	51
Siembra directa	52
Siembra al voleó	53
Trasplante	53
Propagación asexual (vegetativa)	54
Enraizamiento	54
Trasplante	54
Crecimiento de estacas	55
Experimento de aclimatación	56
Ciclo fenológico	57
Identidad química	58
Extracto orgánico	58
CCD	59
Análisis de fracciones aisladas	61
Identidad molecular	63
Extracción de DNA	63
Amplificación de marcadores moleculares	63
Evaluación de capacidad discriminativa	65
<i>matK</i>	65
<i>rbcL</i>	66
<i>rpl32-trnL</i>	67
<i>trnH-psbA</i>	68
<i>ITS2</i>	69

DISCUSIÓN	
Análisis histórico	71
Mapas de distribución	73
Propagación sexual	73
Ensayo de viabilidad por germinación	73
Prueba con cloruro de tetrazolio	73
Siembra directa	74
Trasplante	74
Propagación asexual (vegetativa)	74
Enraizamiento	74
Crecimiento de estacas	75
Trasplante	75
Experimento de aclimatación	75
Ciclo fenológico	75
Identidad química	76
Extracto orgánico	76
CCD	76
Análisis de fracciones aisladas	77
Identidad molecular	77
Extracción de DNA	77
Evaluación de capacidad discriminativa	78
Concatenado de marcadores moleculares para <i>L. mexicana</i>	80
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
LITERATURA CITADA	81
ANEXOS	
Método de extracción de DNA	87
Línea del tiempo	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. <i>L. mexicana</i> en Urique Chihuahua	16
Figura 2. <i>L. mexicana</i> (Lam.) Brand, descripción botánica.	17
Figura 3. <i>Huitzitzilxochitl</i> : Flor del colibrí	18
Figura 4. <i>Hoitzitzilxóchitl</i> origanino.	20
Figura 5. <i>Hoitzia coccinea</i> Cav.	23
Figura 6. Lámina de <i>L. mexicana</i> por Oropeza.	24
Figura 7. Quercetina y kaempferol	26
Figura 8. Escopoletina y umbelliferona	26
Figura 9. Localidad 1: Santa Ana Tlacotenco (Carretera México-Oaxtepec)	33
Figura 10. Localidad 2: Carretera Dentho	33
Figura 11. Localidad 3: Peña de Escandón	34
Figura 12. Localidad 4: Jardín Botánico de la Ciudad Universitaria, UNAM	34
Figura. 13. Local 190 (Mercado de Sonora)	35
Figura. 14. Local 179 (Mercado de Sonora)	35
Figura. 15. Local 338 (Mercado de Sonora)	35
Figura 16. Diagrama de condiciones para la germinación de semillas de <i>L. mexicana</i>	36
Figura 17. Estacas.	38
Figura 18. Obtención de extracto orgánico para CCD	40
Figura 19. Aislamiento de fracciones en placa preparativa	41
Figura 20. Mapa del cloroplasto	44
Figura 21. Ejemplar de Herbario de <i>L. mexicana</i> , voucher: 160159	47
Figura 22. Ejemplar de Herbario de <i>L. mexicana</i> , voucher: 160161	47
Figura 23. Ejemplar de Herbario de <i>L. mexicana</i> , voucher: 160158	47
Figura 24. Ejemplar de Herbario de <i>L. mexicana</i> , voucher: 160157	47
Figura 25. Mapa de distribución actual de <i>L. mexicana</i>	48
Figura 26. Modelo de distribución potencial de <i>L. mexicana</i> .	48
Figura 27. Mapa de distribución presencia/ausencia de <i>L. mexicana</i> .	49
Figura 28. Porcentaje de germinación de semillas en Buen Estado (BE) en Luz y Oscuridad	50
Figura 29. Porcentaje de germinación de semillas en Mal Estado (ME) en Luz y Oscuridad	50
Figura 30. Germinación de semillas de <i>L. mexicana</i>	51
Figura 31. Semillas de <i>L. mexicana</i>	51
Figura 32. Viabilidad de semillas	51
Figura 33. Porcentaje de emergencia de cotiledones a partir de siembra directa	52
Figura 34. Emergencia de cotiledones de espinosilla	52
Figura 35. Porcentaje de plántulas sobrevivientes	53
Figura 36. Plantas obtenidas por siembra al voleo	53
Figura 37. Porcentaje del enraizado de estacas usando diferentes sustratos (Agrolita y Vermiculita+ <i>Sphagnum</i>)	54
Figura 38. Enraizamiento en ambos sustratos	54
Figura 39. Porcentaje de enraizamiento a partir de distintas concentraciones de enraizador (1 500 ppm y 10 000 ppm)	55
Figura 40. Altura de plantas después de enraizar en distintos sustratos	55
Figura 41. Experimento previo a la floración	56

Figura 42. Ciclo fenológico de <i>L. mexicana</i> en condiciones diferentes (dentro y fuera de invernadero)	57
Figura 43. Seguimiento del ciclo fenológico de un individuo	57
Figura 44. Floración	58
Figura 45. Cromatografía en capa delgada del extracto orgánico de las partes aéreas de <i>L. mexicana</i> .	59
Figura 46. Cromatografía en Capa Delgada de las fracciones aisladas de <i>L. mexicana</i> .	61
Figura 47. Espectro de la RMN de la fracción I, flavonoide glicosilado	62
Figura 48. Gel de agarosa (1%) del gen <i>rbcL</i> del DNA de <i>L. mexicana</i>	63
Figura 49. Gel de agarosa (1%) del gen <i>rpl32-trnL</i> del DNA de <i>L. mexicana</i>	64
Figura 50. Gel de agarosa (1%) del gen <i>matK</i> del DNA de <i>L. mexicana</i>	64
Figura 51. Gel de agarosa (1%) del gen <i>trnH-psbA</i> del DNA de <i>L. mexicana</i>	64
Figura 52. Gel de agarosa (1%) del gen <i>ITS2</i> del DNA de <i>L. mexicana</i>	65
Figura 53. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de <i>matK</i>	65
Figura 54. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de <i>rbcL</i>	66
Figura 55. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de <i>rpl32-trnL</i>	67
Figura 56. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias del marcador <i>trnH-psbA</i>	68
Figura 57. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias del marcador <i>ITS2</i>	69
Figura 58. Cladograma del concatenado con marcadores identificadores de <i>L. mexicana</i> .	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios farmacológicos de <i>Loeselia mexicana</i>	30
Cuadro 2. Estacas por tratamiento (sustrato y enraizador)	38
Cuadro 3. Descripción de las muestras que se extrajo DNA	42
Cuadro 4. Marcadores moleculares utilizados en el estudio	43
Cuadro 5. Condiciones estandarizadas para cada marcador	45
Cuadro 6. Condiciones de temperatura para la PCR	45
Cuadro 7. Duración de cada etapa del ciclo fenológico de <i>L. mexicana</i>	56
Cuadro 8. Rendimiento del material vegetal.	58
Cuadro 9. R_f de marcadores y extractos	60
Cuadro 10. Resultados a partir de la cuantificación espectrofotométrica	63

RESUMEN

En México, la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos es el documento encargado de regular el uso de plantas medicinales; sin embargo, aún es insuficiente su cobertura respecto a la vasta flora medicinal nacional.

La espinosilla [*Loeselia mexicana* (Lam.) Brand] es una planta con reportes de uso medicinal que datan del siglo XVI. Actualmente, se usa para tratar trastornos diversos, destacando los gastrointestinales, ansiedad y alopecia. Su amplia comercialización es abastecida por ejemplares provenientes de la recolecta en poblaciones silvestres. Este estudio contribuyó con pruebas de identidad química y molecular de *L. mexicana*, así como ensayos de propagación (sexual y asexual) los cuales tienen como finalidad de proveer material vegetal regularizado.

Se determinó la identidad química por cromatografía en capa delgada según el Método General de Análisis 0050 descrito en la Farmacopea, proponiendo a la umbelliferona como compuesto marcador químico; se construyó su código de barras molecular, basado en la amplificación y concatenación de los marcadores: *ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL*, ambas pruebas están dirigidas a proveer valiosa información que permita su inclusión en la Farmacopea Herbolaria, y abra la posibilidad de contar con pruebas moleculares de identidad en este importante documento regulatorio.

Adicionalmente, se estableció un protocolo de propagación vegetativa por medio de estacas; y de propagación sexual, realizando ensayos de viabilidad y germinación de semillas. Estos resultados, aunados al conocimiento de su ciclo fenológico y la generación de mapas de distribución actual y potencial de la especie, permiten la generación de esquemas para el establecimiento de cultivos estandarizados y programas de reforestación enriquecida, asegurando la calidad del material vegetal destinado a la comercialización y producción de remedios y medicamentos herbolarios.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas durante siglos por distintos grupos humanos para tratar diversos padecimientos, debido a que representan la principal fuente de productos naturales con efectos terapéuticos (Figueroa, 2009). Se estima que entre el 70% y 80% de la población mundial recurre al uso de plantas medicinales (Gallardo *et al.*, 2006) y que al menos 3 500 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal (García de Alba *et al.*, 2012), por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Huerta, 1997).

México tiene una extraordinaria riqueza florística (23,314 especies, distribuidas en 2,854 géneros, 297 familias y 73 órdenes), lo cual ubica a nuestro país en el cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad vegetal y entre los países continentales ocupa el segundo lugar por el número de especies endémicas (alrededor de 50%) (Villaseñor, 2016). Además, la medicina tradicional es una parte importante de los sistemas de la salud no oficiales, representada por una gran riqueza en la práctica herbolaria (González, 2013); un componente básico y de bajo costo para la población usuaria (Gallardo *et al.*, 2006). Sin embargo, la investigación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo aproximadamente en el 5% de estas especies; es decir, existe un gran número de especies por estudiar y hay una falta significativa de regulación. No obstante, existen documentos como la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) que se encarga de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos con el propósito de contribuir al mejoramiento de este tipo de productos y uso adecuado. No obstante, aún es insuficiente su cobertura respecto a la vasta flora medicinal nacional (FHEUM, 2013).

Cerca del 99% de las especies medicinales que se usan en nuestro país son silvestres (Estrada, 1992). Generalmente, la colecta de estas plantas resulta ineficaz ya que es complicado satisfacer la demanda de materia prima del mercado, además, las prácticas tradicionales de recolección dejan de realizarse, tornándose en prácticas poco sustentables, que fomentan la sobreexplotación de las poblaciones silvestres (Hersh y Fierro, 2001).

La espinosilla, *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand, es una planta medicinal que se ha empleado en México desde el siglo XVI. Esta especie actualmente se usa para tratar: trastornos gastrointestinales, disentería, vómito, hinchazón, diarrea, como ansiedad, fiebre, para prevenir la obesidad, problemas de alopecia y caspa, por sus propiedades antifúngica y antibacterial y en enfermedades de filiación cultural como el espanto (Guzmán *et al.*, 2014; Herrera-Ruíz *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2011). Su demanda comercial actual es principalmente para combatir la alopecia, generando una extracción silvestre que ha provocado una notable disminución en sus poblaciones silvestres, según estudios previos, testimonios de algunos recolectores y agricultores beneficiarios de los programas de la Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC), vendedores de plantas medicinales y habitantes cercanos a poblaciones silvestres (Becerra *et al.*, 2013). Aunado a esto, no se cuentan con estudios sobre su propagación, por lo que es necesario generar un protocolo o programa a nivel nacional para abastecer de materia prima vegetal en cantidades suficientes según su demanda y evitar con ello la depredación y posible

desaparición de la especie; por otra parte, es necesario aportar parámetros preliminares que permitan realizar pruebas de identidad químicas y moleculares a esta especie enfocadas al control de calidad de la droga vegetal para incluir su monografía en la FHEUM.

ANTECEDENTES

Medicina tradicional en el mundo

Históricamente, la Medicina Tradicional (MT) ha jugado un papel importante para la población mundial, debido a que se ha utilizado desde tiempos remotos para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, en particular crónicas. Para muchos millones de personas, los productos a base de hierbas, tratamientos tradicionales y médicos tradicionales, representan la principal fuente de atención sanitaria e incluso en ocasiones la única, debido a que está más próxima a los hogares, es accesible y asequible. Además, culturalmente es aceptada y en ella confían muchísimas personas. Se practica en casi todos los países del mundo y su demanda va en aumento, no obstante, ha sido con frecuencia subestimada de los servicios de salud oficiales (OMS, 2013).

Muchos países han reconocido la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención de salud, que facilite a los gobiernos, los profesionales sanitarios y a los usuarios de los servicios de salud, el acceso a la MT de manera segura, respetuosa, asequible y efectiva. Por lo que una estrategia mundial destinada a promover la integración, reglamentación y supervisión apropiadas de la MT será de utilidad para los países que desean desarrollar políticas relativas a la atención de salud.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene la misión de ayudar a salvar vidas y mejorar la salud. Es por ello que la MT es un tema bajo su mando de regularización y define a esta como:

“La medicina tradicional tiene una larga historia. Es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales” (OMS, 2013).

Estrategia OMS 2014-2023 sobre Medicina tradicional

La estrategia de la OMS sobre MT 2014-2023 pretende ayudar a las autoridades sanitarias a encontrar soluciones que propicien una visión más amplia respecto del mejoramiento de la salud y la autonomía de los pacientes. La estrategia tiene dos objetivos principales:

- 1) Prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MT a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas.
- 2) Promover la utilización segura y eficaz de la MT mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales.

Lo anterior se pretende alcanzar, por medio del establecimiento de tres objetivos estratégicos:

- 1) Desarrollo de una base de conocimientos y formulación de políticas nacionales.
- 2) Fortalecimiento de la seguridad, la calidad y la eficacia mediante la reglamentación.
- 3) Fomento de la cobertura sanitaria universal por medio de la integración de servicios de MT y la auto atención de salud en los sistemas nacionales de salud.

Medicina tradicional en México

El conocimiento sobre las plantas que curan o dañan al organismo se ha generado por una serie de acumulaciones de experiencias obtenidas por los sabios o sacerdotes, quienes respondían a fenómenos naturales de la enfermedad y muerte. Es así como fue integrándose la medicina tradicional, basada sobre todo en la herbolaria. Sin embargo, las ideas y creencias en torno a la salud y la enfermedad dependían de la cosmovisión de cada cultura (Sierra, 2011).

En México el interés por el uso, estudio y descripción de la flora medicinal mexicana, ha sido constante a lo largo de la historia. Antes de la llegada de los españoles a nuestro territorio, existía un gran conocimiento y uso de las plantas (Zepeda y White, 2008). Ya que muchos de los pueblos que abarcaron la gran área cultural de Mesoamérica estaban posicionados en gran parte del país, compartiendo una visión unitaria sobre el vínculo del humano con el universo (Sierra, 2011). La enfermedad se creía concebir como el resultado de un desequilibrio corporal, que se mantenía gracias a la dualidad de los elementos vitales, y de los cuales tenían poder los dioses y seres que habitaban en el inframundo (Berenzon y Saavedra, 2002).

De acuerdo a esa cosmovisión, la medicina de los antiguos mexicanos, ayudaba al enfermo a recuperar el equilibrio perdido y había dos formas de hacerlo:

- 1) Por medio de las prácticas mágico-religiosas, rezos y encantamientos
- 2) A partir de las propiedades terapéuticas de la herbolaria y otros productos naturales.

Aunque generalmente, ambas formas se aplicaban simultáneamente (Berenzon y Saavedra, 2002) y la clasificación de las plantas iba más allá de características morfológicas, incluyendo posibles vínculos que tenían con otros sectores del universo (Sierra, 2011); y se usaban de distinta manera: ungüentos, pócmas, infusiones, vaporizaciones, etc. (Lozoya, 1998).

Las plantas medicinales eran un recurso indispensable para los antiguos médico-curanderos (“*ticitl*”), no sólo para corregir lo que diagnosticaban, sino también para resolver lo que el paciente decía que sentía (Heyden, 2002); existían, y aún hasta la fecha, médicos que dominaban alguna especialidad, *e.g.*, parteros, hueseros, yerberos. Además, el conocimiento era transmitido a jóvenes, a partir de escuelas donde se les enseñaba el uso y el arte de curar, así como mercados de plantas medicinales donde el pueblo podía visitar, comprar e incluso consultar a los médicos (Lozoya, 1998). Allí, posiblemente un buen médico nahua, tarasco, zapoteca o maya, conocía y manejaba entre 50 a 200 plantas medicinales (Sierra, 2011). Para la cultura mexicana el mundo vegetal constituía una fuente importante de elementos que satisfacían sus actividades y creencias, como la alimentación, religión y medicina (Heyden, 2002).

En Mesoamérica era tan importante la flora, que gobernantes crearon huertos y jardines botánicos con una gran variedad de plantas locales y otras traídas de diferentes regiones. Entre ellos destacan los de Atempán y Tezcutzingo, en Texcoco, pertenecientes a Ixtlilxóchitl y a Nezahualcóyotl. Posteriormente, durante el reinado de Moctezuma Ilhuicamina (1440-1469) se fundó un lugar de descanso para la nobleza indígena al sur del valle de Tenochtitlan, el Jardín de Oaxtepec (estado de Morelos), donde se cultivaron y conservaron las especies vegetales más importantes del Imperio Azteca, dejando un siglo después maravillados a los españoles quienes edificaron en el mismo cerro el Hospital de la Santa Cruz Oaxtepec, lugar donde en el siglo XVI se escribieron algunas de las obras más importantes de la herbolaria de nuestro país (Sierra, 2011; Lozoya, 1998).

No obstante, con la llegada de los españoles, la antigua sociedad mexicana sufrió una gran transformación cultural, así como cambios políticos, sociales, económicos y religiosos que condujeron a una pérdida brusca de los conocimientos y de personas responsables de ellos (Zepeda y White, 2008). Sin embargo, el interés de los saberes nativos, los naturalistas y religiosos europeos empezaron a reunir los conocimientos importantes de la antigua cultura indígena, sobre todo de las plantas medicinales ya que en ese tiempo en Europa la medicina estaba basada también en plantas medicinales (Gómez-Pompa, 1993).

A mediados del siglo XVI y con ayuda de indígenas “adestrados” se comenzaron a escribir las obras que conforman la literatura médica novohispana de México, entre estas obras destacan:

- El Códice de la Cruz-Badiano o *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Librito de las yerbas medicinales de los indios)

Fue escrito en 1552 por el médico náhua Martín de la Cruz y traducido al latín por el indígena Juan Badiano, dos de los alumnos más notables del Colegio de Santa Cruz de Tlatelolco en la Ciudad de México; obra que inicialmente sería un obsequio para los altos funcionarios. Sin embargo, fue descubierta en la biblioteca del Vaticano hasta 1929 y posteriormente estudiada en 1990 por Emmart (Gómez-Pompa, 1993). Este manuscrito, redactado después de la conquista española, es una de las fuentes más antiguas de la medicina mesoamericana siendo considerado como el primer libro de herbolaria medicinal mexicana y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas de la materia médica en México (Lozoya, 1998).

Contiene ilustraciones de gran interés sobre las plantas y otros elementos que encierran la expresión indígena (Turner, 2007); integrado con una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas originarias de México y que se empleaban en la medicina prehispánica (Lozoya, 1998).

- El Códice Florentino o también conocido como Historia general de las cosas de la Nueva España

Fue escrito por el fraile franciscano Bernardino de Sahagún, quien en 1569 recibió la orden de escribir en lengua mexicana aquello que pudiera ser útil para la evangelización de los indígenas. Sahagún, en su calidad de instructor del Colegio Imperial de Santa Cruz de Tlatelolco, produjo una de las más grandes obras etnográficas de México en el inicio de la Colonia, recaudando evidencia de la sofisticación de la ciencia agrícola y botánica de las culturas indígenas prehispánicas (Gómez-Pompa, 1993). Es un manuscrito bilingüe

(español y náhuatl); compuesto de 12 libros que tratan de valores históricos, arqueológicos, lingüísticos, zoológicos y datos etnológicos, obtenidos directamente de los indígenas (Barbero, 1997). Además, contienen una amplia sección dedicada exclusivamente a las plantas medicinales de los indígenas mexicanos. Una de las características sobresalientes de esta obra, es que parte de la información fue obtenida de los ancianos de esa época, gozando de abundante información sobre los usos medicinales de las plantas, propiedades y características de los medicamentos, que hacen reconocer en esa época la riqueza medicinal mexicana (Lozoya, 1998).

- La Historia Natural de las plantas de la Nueva España

Obra escrita por el protomédico general de las Indias, tierra firme y océano Francisco Hernández, después de haber realizado la primera exploración en territorio mexicano de 1571-1576 y bajo la encomienda del rey Felipe II para estudiar la historia natural de la Nueva España, así como la medicina indígena, cultura prehispánica, la historia y las condiciones políticas de los nuevos territorios.

El producto final de todo el viaje de Hernández fueron 38 libros, de los cuales, los 16 primeros volúmenes que envió al rey se perdieron durante el incendio de la biblioteca del Escorial (1671) junto con 68 talegas de semillas y raíces para sembrar, 8 barriles y 4 cubetas con árboles para trasplantar; además de otros materiales y documentos (Gómez-Pompa, 1993).

Gracias a la recopilación hecha por el Instituto de Biología (IB) de la Universidad Nacional Autónoma de México se sabe que se descubrieron más de 3 000 especies de plantas, así como la traducción de sus nombres, terapéutica y usos de las plantas mexicanas al lenguaje de la tradición científica occidental. Las “*Obras completas de Francisco Hernández*” son siete tomos, publicados de 1959-1985 (disponibles en línea). En esta edición se tienen las descripciones de la edición Matritense traducidas al español, con las ilustraciones de la edición romana. Además, el séptimo tomo “*Comentarios a la obra de Francisco Hernández*” (1984) contiene identificaciones propuestas por los principales estudiosos de las plantas descritas por Francisco Hernández a través de la historia, incluyendo las de la edición del IB (1942-1946, bajo la dirección del Dr. Isaac Ochotorena Mendieta).

- “Cuatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España” o “*Cuatro libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas y Animales que están reunidos en el uso de Medicina en la Nueva España y la methodo, y corrección, y preparación, que para administrarlas se requiere con lo que el Doctor Francisco Hernández escribió en Lengua Latina*” (Gómez-Pompa, 1993).

Escrito en 1615 por el fray franciscano Ximénez de Oaxtepec fue realizada a partir de la traducción de la primera parte de la obra española de Francisco Hernández (16 libros) que sintetizó el médico italiano del rey Felipe II, Nardo Antonio Recco, y publicó como “*Rerum Medicarum. Novae Hispaniae. Thesaurus seu Plantarum Animalium Mineralium Mexicanorum*” (1649-1650); (Gómez-Pompa, 1993) y a la cual añadió también sus propias observaciones cotidianas como enfermero y preparador de medicamentos en la botica del hospital de Oaxtepec, en el actual estado de Morelos (Sanfilippo, 1997).

- La Real Expedición Botánica a Nueva España

Expedición realizada por José Mariano Mociño y Martín Sessé en el periodo 1787-1803 por orden del rey Carlos III. Estudió Centroamérica, las islas del mar caribe y México con el objetivo de conocer, estudiar e investigar las plantas mexicanas, así mismo describirlas y clasificarlas bajo el sistema Lineano (clases, órdenes y géneros) que se extendía en todo el mundo, representando el antecedente más importante del conocimiento de la diversidad vegetal de México (Aceves, 2010). Dos notables pintores Atanasio Echeverría y Juan Cerdá realizaron cientos de dibujos a color que estuvieron perdidos por cerca de 200 años y que aparecieron recientemente en España y fueron adquiridos por la Biblioteca Hunt de Pittsburgh (Gómez-Pompa, 1993).

Farmacopea

Las farmacopeas son textos de mayor jerarquía en el área de reglamentación de materias primas y productos farmacéuticos. Proveen información acerca de los medicamentos con el propósito de asegurar la calidad de los productos en circulación. Sin embargo, son también un reflejo de los criterios terapéuticos de cada país (Aceves, 2014). La OMS está encargada de la regularización de estos textos, ya que la seguridad por la salud y bienestar es indispensable (OMS 2013).

En el contexto nacional, de acuerdo al Reglamento de Insumos para la Salud en su título primero, artículo 2, fracción IX, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se define como:

“al documento expedido por la Secretaría que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y demás insumos para la salud”.

La FEUM permite contar con una farmacopea nacional que en un principio considera la naturaleza de la industria mexicana, y que, por cuestiones económicas, tecnológicas, sociales y culturales, genera necesidades un tanto diferentes a las de otros países que han alcanzado un mayor desarrollo. Permite entonces obtener una relativa independencia científica y tecnológica en la elección de sus materias primas y herramientas científicas. Además, la farmacopea mexicana ha sido clara en su motivación nacionalista de mantener un código farmacéutico oficial incluyente de productos vegetales de nuestro país y especialmente en los textos del siglo XIX y principios del siglo XX, ya que en ese periodo inicio el surgimiento de la nueva nación mexicana (Aceves, 2014).

Historia de la Farmacopea Mexicana

El final de la guerra de Independencia en 1821 dio lugar a una nueva etapa de inestabilidad política, social y económica que se extendió durante la mayor parte del siglo y que tuvo repercusiones en el ámbito farmacéutico. Los problemas que se enfrentaron en este último periodo fueron: la competencia desleal de los médicos que preparaban y dispensaban sus propios medicamentos, la existencia de herbolarios, curanderos y mercaderes que abundaban en calles y mercados, así como la falta de regularización y vigilancia en boticas para asegurar la calidad y pureza de los medicamentos dispensados y la metodología empleada en su preparación (Aceves, 2009).

La Farmacopea Mexicana (1846) pretendía armonizar la práctica farmacéutica en todo el territorio y desterrar las divergencias y confusiones derivadas de la utilización simultánea de códigos farmacéuticos de procedencias diversas. Así como, la sustitución máxima de plantas de origen extranjero por las nacionales, como manifestación del espíritu

nacionalista. Además, fue la segunda farmacopea en publicarse en el continente americano, después de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en 1820 (Aceves, 2014).

Para la edición de la farmacopea mexicana participaron médicos y farmacéuticos convocados por el destacado farmacéutico y químico mexicano Leopoldo Río de la Loza (1807-1876), que tenía la inquietud de editar una farmacopea nacional, actualizar y modernizar un formulario de manera exclusiva de la materia médica nacional y se uniformaran de una vez la nomenclatura y metodología para elaborar los medicamentos. El 28 de febrero de 1839 solicitaron un permiso al gobierno para fundar la Academia de Farmacia, la cual fue aceptada quedando como presidente de la Loza.

Las fuentes principales de la sección de productos naturales de la Farmacopea Mexicana de 1846 fueron:

-*El ensayo a la materia médica vegetal de México* (1791) escrita por el español Vicente Cervantes (1758-1829); quien recogió 293 plantas para las cuales proporcionó información necesaria para su óptima recolección, conservación y utilización (Aceves, 2010). Su estudio fue facilitado debido a que los usos y abusos eran bien conocidos por los antiguos mexicanos y habitantes de la Nueva España. Muchas de las plantas que describió hoy en día forman parte de la terapéutica nacional. Cervantes también tuvo como objetivo la recolecta de conocimiento botánico local, con la finalidad de sustituir las drogas provenientes del extranjero.

-*El ensayo para la materia médica mexicana* (1832) publicado en Puebla y escrita por el alumno de Cervantes, el español Antonio de la Cal y Bracho (1766-1853). Dicho autor describió 180 plantas medicinales, con su respectivo nombre vulgar y científico, hábitat, usos y aplicaciones más conocidas. Treinta y dos no se incluyeron en el código de 1846 (Aceves, 2010).

En el siglo XIX se publicaron tres ediciones de la Nueva Farmacopea Mexicana (1874, 1884 y 1896), todas bajo el auspicio de la Sociedad Farmacéutica Mexicana y con el mismo orden de contenido: productos naturales, productos químicos y preparaciones farmacéuticas con las reglas generales para ejecutarlas. Estas ediciones fueron sobresalientes porque la primera edición fue acreedora a la medalla de oro en la Exposición de Farmacopeas de Buenos Aires; la edición de 1884 fue calificada por la *Société de Pharmacie de Paris* como “obra modelo de su clase”, y el jurado de la exposición de Farmacopeas que se llevó a cabo en Chicago la premio con un diploma de honor; los editores veían en las plantas indígenas la promesa para un mejor futuro. Por último, con la edición de 1896 el número de especies vegetales recogidas aumentó y hubo aportaciones destacadas de Alfonso Herrera, distinguido alumno de la Loza y titular de la cátedra de historia de las drogas simples de la Escuela Nacional de Medicina, donde pudo impulsar la investigación de muchas plantas medicinales mexicanas, ya que sus alumnos desarrollaron trabajos sobre ellas como materia de tesis para recibir el título de farmacéuticos (Aceves, 2014).

Para 1904 apareció la cuarta edición, la cual fue arreglada de acuerdo a los planes de la Convención de Bruselas y propuestas por la Secretaría de Gobernación como libro de consulta obligatorio para todas las oficinas de farmacia del Distrito Federal (hoy Ciudad de México) y territorios federales; siendo utilizado ampliamente entre médicos y farmacéuticos en todo el país. Los editores de la Farmacopea Mexicana trabajaron en

conjunto con otras instituciones científicas y sus aportaciones fueron clave para el desarrollo de la farmacología y la química analítica durante ese periodo. El Instituto Médico Nacional (IMN) fue creado el 1° de diciembre de 1888 por decreto del congreso de la unión. El Poder Ejecutivo autorizó la fundación de un Instituto Médico (Marcial-Avedaño, 2007) con el objetivo de investigar a las plantas medicinales locales, su aplicación y comercialización, además de coadyuvar a la creación de una terapéutica nacional (terapéutica farmacológica) con base en las plantas medicinales mexicanas (Aceves, 2014).

El IMN fue promovido por el general y exgobernador morelense Carlos Pacheco, secretario de gobierno y encargado de Fomento durante el periodo del Porfiriato quien fue considerado “militar ilustrado”, ya que fue partidario del uso de plantas medicinales debido a que es esa época se frecuentaba su uso entre los militares que intervenían en conflictos armados y en general la “medicina tradicional mexicana” era mucho más accesible para el grueso de la población (Méndez, s.a).

Una de las aportaciones del IMN fueron sus textos donde se dieron a conocer los resultados de sus investigaciones. Entre ellos los *Datos para la materia médica mexicana* consiste en cinco tomos (1894-1907) que recopilan y sintetizan el conocimiento sobre las plantas medicinales mexicanas. La cuarta edición de Farmacopea Mexicana fue enriquecida a partir de los estudios realizados en el IMN durante este periodo.

A partir de 1910 los trabajos del IMN se concentraron en la elaboración de una Farmacología Nacional, obra que fue publicada en 1913 y tuvo un gran impacto sobre la quinta y última edición de la Nueva Farmacopea Mexicana publicada en 1925. La estructura se realizó igual que la original. No obstante, como en los casos anteriores, se añadieron monografías nuevas de plantas y láminas ilustrativas. Dicho documento fue un texto cumbre de su tipo, no hubo otro igual después (Aceves, 2014), ya que las cosas cambiaría para 1930, cuando el Estado asumió la publicación y financiamientos del texto.

Después de 1930, las diferencias con las ediciones anteriores fueron notorias. Hubo un cambio radical entre la Farmacopea Mexicana y la Farmacopea Nacional, respecto a las preparaciones farmacéuticas, en especial al espacio destinado a las plantas medicinales en el texto, el cual se redujo drásticamente, pues los gobiernos post-revolucionarios no tenían interés en el desarrollo de los recursos medicinales nacionales. Además, la popularización de las medicinas de patente o especialidades farmacéuticas como resultado de su alta rentabilidad para la industria, precisamente por sus características patentables, provocó que estas últimas remplazaran a las plantas medicinales y sus extractos de todos los espacios legítimos de la terapéutica nacional.

El criterio principal para la selección de los artículos en la obra del Departamento de Salubridad fue el conocimiento de la composición de los agentes curativos en cuestión y su acción farmacológica. Este requisito fue difícil de cumplir en el caso de extractos vegetales dada su complejidad, por lo que aquellos cuya utilidad o aplicación terapéutica no estuviese validada por sus métodos, eran excluidos. Esta medida de control de calidad básica y en cierto punto necesaria fue un filtro por el cual no pudieron pasar muchas plantas medicinales que ya estaban incluidas en farmacopeas anteriores y eran utilizadas en boticas (Aceves, 2010).

Para 1952 apareció la primera edición de la *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (FNEUM)*, con cuatro secciones. La primera incluyó información acerca de los miembros que conforman la Comisión Permanente, así como la lista de las monografías que se omitieron en la edición anterior y las que se adicionaron. La segunda incluyó monografías de todos los productos de origen natural, químicos y preparaciones farmacéuticas; en total suprimiendo 407 monografías que habían estado en códigos farmacéuticos nacionales desde hacía más de un siglo. La tercera consistió en métodos para determinaciones físicas y químicas y características de los equipos e instrumentos destinados para tal fin. La cuarta incluyó tablas de equivalencia y constancias físicas y químicas otras de pesos y medidas métricas oficiales (Aceves, 2014).

La tercera edición de la Farmacopea Nacional apareció en 1962, donde se excluye nuevamente a más plantas medicinales, ya que se había comprobado su toxicidad y por ende riesgos en el empleo terapéutico, o por ser medicamentos en desuso o con actividad farmacológica no verificada.

En 1974 apareció la cuarta edición de la Farmacopea Nacional. Aquí el Departamento de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos adscrito a la Secretarías de Salubridad y Asistencia fue responsable de las modificaciones. Se dividen dos secciones: una “Parte analítica” donde están métodos de valoración y análisis de medicamentos y una segunda sección que abarca las monografías de fármacos. A partir de este punto, los productos de origen animal también han desaparecido, por lo menos de forma original. Esto detonó una mayor influencia de la USP en la farmacopea mexicana, disminuyendo la presencia de plantas medicinales en futuras ediciones (Aceves *et al.*, 2009).

En 1988, la FEUM es actualizada por la Comisión Permanente de la Farmacopea (CPFEUM). Esta edición está dividida en cuatro secciones: consejo directivo, dirección ejecutiva, consejo técnico y asociaciones de la FEUM A.C. En la sección dedicada a monografías de fármacos, solo el 6.5% son de plantas o productos que proceden de ellas, como aceites esenciales. Aquí siguen evolucionando las pruebas de identidad y pureza de los principios activos en las distintas preparaciones y se incluyen novedoso procedimientos de evaluación (Aceves, 2014).

En 1994 aparece la siguiente edición comprendida por pocas plantas medicinales y únicamente una de origen mexicano, el epazote (*Chenopodium ambrosioides*), a pesar de que para el caso de México están en uso más de 6 mil especies diferentes. También se presentan procedimientos de elaboración, control de calidad y se aprecia claramente que el cometido inicial de generar recursos herbolarios mexicanos va desapareciendo (Aceves, 2010).

Evidentemente de 1846 a 1925 se presencia un aumento de plantas con actividad terapéutica incluida en distintas ediciones de la farmacopea mexicana. Sin embargo, en el periodo de 1930 a 1994 la considerable diversidad biológica de la flora local y su reconocida utilidad terapéutica sobre todo en el ámbito popular, no se encontró reflejada en sus ediciones (Aceves *et al.*, 2009). Sin embargo, para el año 2000 apareció una edición de la FEUM con tres tomos independientes, el primero se denomina *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* y contiene las monografías de fármacos, excipientes y medicamentos alopáticos junto con los métodos de análisis validados para su estudio; y el segundo y tercer tomo, corresponden a la primera edición de la *Farmacopea Herbolaria de*

los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) y a la segunda edición de la *Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos*, respectivamente.

La edición del año 2000 marca un cambio al introducir nuevamente a la escena las plantas medicinales ya que se modifica la tendencia iniciada con la farmacopea de 1930 y se retoma el criterio de reconocer a la medicina herbolaria como parte de los fármacos oficiales en México. En la FHEUM se recogen las monografías de 76 plantas medicinales, gran parte de ellas presentes en la edición de la *Farmacopea Mexicana* de 1846; además, se incluye un apartado con el nombre de *Extrafarmacopea*, dedicado a aquellas plantas de uso popular pero sin estudios químicos y clínicos pero con potencial de uso como recurso terapéutico; incluye 19 monografías (Aceves, 2014).

Para el 2004 se presenta la octava edición de la FEUM, convirtiéndose en una de las farmacopeas más completas a nivel mundial, abarcando controles de calidad, para los medicamentos alopáticos, homeopáticos, herbolarios, dispositivos y controles de calidad para los establecimientos como son la farmacia. La novena edición para 2008 consistió en dos volúmenes, uno donde hay métodos generales de análisis y monografías de fármacos oficiales y el otro donde recoge preparados farmacéuticos y productos biológicos. Posteriormente, la décima edición en 2011 tuvo mayor contenido (Aceves, 2014).

Finalmente, en el 2013 se hizo la reciente actualización de la FHEUM indicando la continuidad del proyecto y vigencia. La segunda edición de FHEUM incluye 51 monografías nuevas de plantas medicinales y 14 aceites esenciales de utilidad farmacéutica. La sección *Extrafarmacopea* incorporó 4 nuevas monografías al texto y la relación de especies de uso etnobotánico se incrementó hasta alcanzar las 213 especies. El contenido definido es el siguiente (FHEUM, 2013):

Novedades

- 26 Métodos generales de análisis
- 51 Monografías de drogas vegetales
- 14 Monografías de aceites esenciales
- 4 Monografías de la *Extrafarmacopea*

Actualizaciones

- 4 Métodos generales de análisis
- 43 Monografías de drogas vegetales
- 10 Monografías de aceites esenciales
- 9 Monografías de aceites fijos
- 4 Apéndices
- 14 Monografías dadas de baja

Por último, se continúa haciendo estudios de más plantas para su inclusión en la farmacopea, lo cual es necesario porque a nivel mundial, el número de monografías de productos vegetales es bajo; de manera independiente, el código de Alemania y Francia rebasan las 1000 monografías de especies vegetales. Incluso la USP tiene más monografías de origen vegetal (76) que México (Aceves *et al.*, 2009).

Recolecta de material vegetal silvestre

En el ámbito nacional, la comercialización de plantas medicinales y aromáticas endémicas funciona en mercados locales y puede ser de gran importancia económica en el ámbito

extranjero por la amplia gama de principios activos. Debido a la alta demanda de estas, su recolección se ha convertido en una actividad estable. Se ha documentado que más del 85% de las especies que se comercializan en los mercados locales y tiendas naturistas provienen de recolección silvestre, sin contar con programas de manejo, ni de control por parte de dependencias gubernamentales como la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) o la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

Esta situación ha generado riesgos para la salud al ser administrados por personas sin capacitación en medicina tradicional, aunado a que los nombres de las plantas varían considerablemente en cada región, provocando confusión al identificar especies. Por lo que son necesarios estudios sistemáticos para un mejor aprovechamiento de las especies nativas y el establecimiento de parámetros de control de calidad que aseguren la seguridad y eficacia terapéutica (Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

El escenario antes descrito hace que el cultivo de especies con utilidad aromática y medicinal sea cada vez más necesario para: 1) evitar la sobreexplotación de los recursos silvestres, y en el caso de algunas especies, la extinción; 2) asegurar la disponibilidad de la materia prima vegetal homogénea y libre de contaminantes; 3) mejorar la calidad y cantidad de los principios activos; y 4) estandarizar la materia prima para los laboratorios fabricantes de medicamentos, cosméticos, perfumes, entre otros.

Control de calidad

La calidad de medicamentos a base de plantas medicinales es indispensable al igual que los fármacos sintéticos. Sin embargo, la problemática es más compleja debido a las siguientes particularidades:

- Los sistemas multicomponentes, que presentan una composición compleja, mucho más difícil de caracterizar que un compuesto puro, sea sintético o natural.
- El desconocimiento de los constituyentes químicos responsable del efecto terapéutico.
- Material biológico, con la variabilidad que ello entraña.
- Los procesos de recolección, tratamiento post-cosecha (desección, almacenamiento, etc.) y procesos de extracción.

No obstante, esos inconvenientes son superables si se controla la calidad del proceso productivo desde el inicio. Aplicando, por ejemplo las normas de buenas prácticas agrícolas de recolección (GACP *Good Agriculture and Collection Practices*) cuya utilización en el ámbito de las plantas medicinales ya están propugnando tanto la OMS, como la Agencia Europea de Medicamentos, así como la suma de la investigación científica (química, farmacológica y clínica) y un adecuado control de calidad durante el proceso.

El control de calidad de las drogas vegetales y derivados es fundamental, ya que garantiza su identidad, pureza (ausencia de contaminantes, falsificaciones o adulteraciones) y contenido en principios activos o marcadores.

Es por ello que las exigencias concernientes al control de calidad de las drogas vegetales y productos extractivos así como los métodos a utilizar, se recogen principalmente en las Farmacopeas (Cañigueral y Vila, 2005).

Seguridad y eficacia

Si bien, el uso de una determinada planta no constituye por sí sola una prueba de su eficacia terapéutica, al ser utilizada durante siglos mediante la Medicina Tradicional sugiere su inocuidad, al menos en lo que a toxicidad aguda se refiere. Sin embargo, a pesar de que las drogas vegetales y derivados suelen presentar un margen terapéutico ancho, no están exentos de posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones.

Existen diferentes parámetros que contribuyen a demostrar la eficacia de un preparado de fitoterapia, pero no todos tienen la misma relevancia. Entre estas se encuentra el conocimiento de los parámetros activos, los resultados obtenidos en ensayos farmacológicos experimentales y la experiencia clínica (donde se sustenta la evidencia de la eficacia).

La necesidad de compilar con espíritu crítico la información científica sobre la química, farmacología, toxicología y clínica de las drogas vegetales y derivados, para elaborar monografías de seguridad y eficacia rigurosas y contrastadas, ya generó actuaciones institucionales importantes desde hace un par de décadas. En este sentido, destaca el esfuerzo realizado por la Comisión E del Ministerio de Sanidad Alemán, que fue la pionera en este tipo de análisis y por algunos organismos internacionales como OMS y especialmente por ESCOP (European Scientific Cooperative for Phytotherapy) a nivel europeo (Cañigüeral y Vila, 2005).

Marcadores químicos

Cromatografía

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre de cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban con bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

1) Cromatografía de gases

Mecanismo de separación	Tipo de muestra
Gas-líquido (partición)	Fase de vapor
	Líquida
Gas-sólido (adsorción)	Fase de vapor
	Líquida

2) Cromatografía de líquidos

Cromatografía	Mecanismos de separación
Plana	En capa delgada (adsorción)
	En papel (partición)
En columna	Líquido-sólido (adsorción)
	Líquido-sólido (partición)
	De intercambio iónico
	De exclusión

Método General de Análisis de la Farmacopea Herbolaria (MGA-FH) 0050.

Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada es una técnica particularmente valiosa para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de compuestos o impurezas. Esta técnica es fácil de realizar, es efectiva y requiere de equipo poco costoso; por lo tanto es utilizado frecuentemente para la evaluación de plantas medicinales y de sus preparaciones.

Los siguientes parámetros deben determinarse con base en las monografías de la Farmacopea o establecidas experimentalmente por el análisis de cada material vegetal individual:

- El tipo de adsorbente y método de activación; si no se menciona, calentar a 110°C durante 30 minutos.
- El método de preparación y concentración de la solución de prueba y la solución de referencia.
- El volumen de la solución que se aplicará a la placa.
- La fase móvil y distancia de migración.
- Las condiciones de secado, la temperatura y el método de detección.
- Para los resultados observar en las manchas.

-Número y posición aproximados o el valor de *R_f*, si es necesario.

-Fluorescencia y color.

- Detección bajo lámpara de luz UV (254 nm o 365 nm) o visible.

Marcadores moleculares para control de calidad de plantas medicinales (Código de barras - DNA Barcode)

Existen diferentes técnicas o métodos para identificar especies de plantas, pero en algunos casos, la identificación es basada principalmente en identificaciones taxonómicas, lo cual puede llegar a ser un problema por la alta variación fenotípica entre taxas, la

caracterización cruda de plantas procesadas o partes de plantas no identificadas, así como la ausencia de capacitación profesional en taxonomía de plantas.

Actualmente, el control de calidad de drogas vegetales es realizado de acuerdo a los métodos regulatorios establecidos en cada país. Sin embargo, El código de barras puede ser una poderosa herramienta para el control de calidad mundial. Utilizando una o más regiones pequeñas de DNA estandarizadas, se puede identificar material vegetal altamente procesado a nivel de familia, género o especie, dependiendo de su variación molecular. Adicionalmente puede ser aplicado para direccionar problemas taxonómicos, la identificación de especies en peligro de extinción o muestras de investigaciones forenses (Palhares *et al.*, 2015).

Desde el 2009 el Grupo de Trabajo de Plantas (Plant Working Group) para el proyecto de Código de barras de Vida (Barcode of Life), estableció que las regiones oficiales para el código de barras de plantas eran *rbcL* y *matK*. No obstante, se ha observado que esas regiones no son 100% eficientes discriminando especies de plantas, por lo que otras regiones han sido empleadas en distintas investigaciones para mejorar la eficiencia del Código de Barras oficial (Pennisi, 2007) Por lo que posteriormente se comenzaron a emplear otras regiones de DNA como *ITS2*, *trnH-psbA*, *rpl32-trnL*, entre otras (Kress y Erickson, 2012).

***Loeselia mexicana* (Lam.) Brand**

Ubicación Taxonómica

Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Polemoniaceae
Nombre Científico:	<i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brand
(Das Pflanzenreich 27[IV,250]: 174. 1907.)	



Figura 1. *Loeselia mexicana* de Chihuahua (Foto: Sol Cristians)

Basionimo: *Hoitzia mexicana* Lamarck, Jean Baptiste Antoine Pierre de Monnet de allí (Encyclopédie Méthodique, Botanique 3(1): 134–135. 1789.)

Sinonimias: *Cantua coccinea* (Cav.) Poir Poiret, Jean Louis Marie (Encyclopédie Méthodique. Botanique ... Supplément 2(1): 80. 1811.); *Cantua hoitzia* Willd Willdenow, Carl Ludwig von (Species Plantarum. Editio quarta 1: 878. 1797.); *Hoitzia coccinea* Cav. Cavanilles, Antonio José (Joseph) (Icones et Descriptiones Plantarum 4: 44, pl. 365. 1797.); *Loeselia coccinea* (Cav.) G. Don Don, George (A General History of the Dichlamydeous Plants 4(1): 247. 1837.) (*Tropicos.org*)

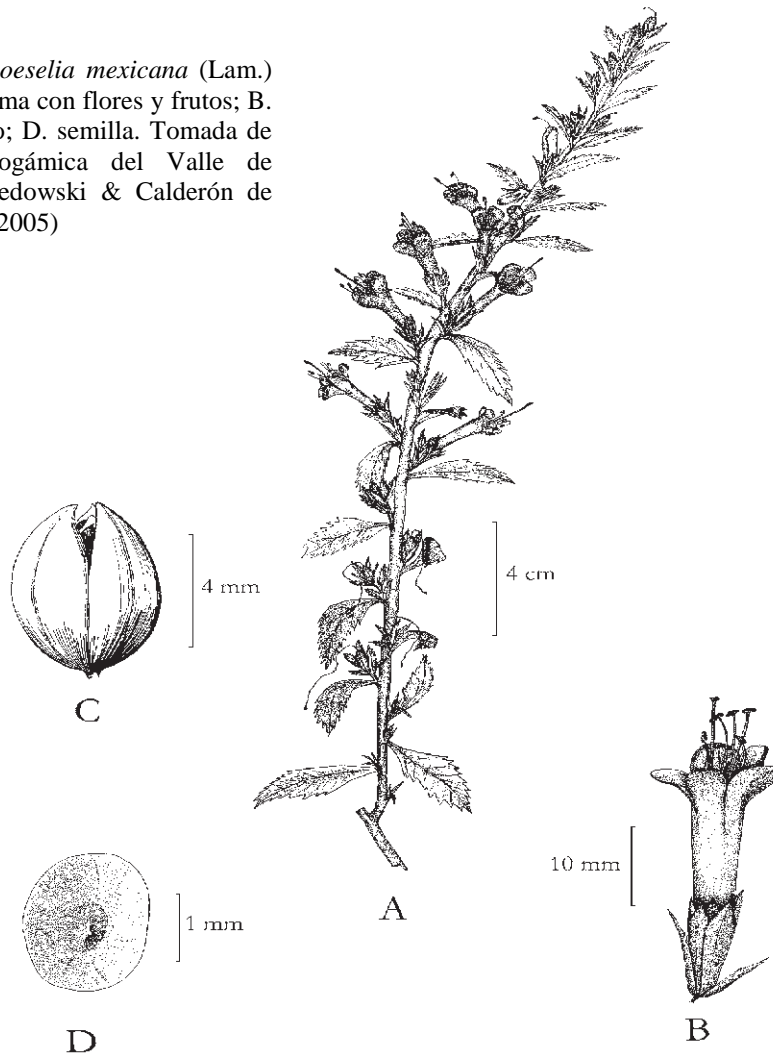
Nombres populares: Espinosilla, chuparroza, gallina ciega, hierba de la virgen, hierba de San Antonio, huachichile, huasicil, maraduz.

- Edo. de México: *binyené* (mazahua), *huihuisyocen*
 - Michoacan: *tarepi* (purepecha), *chacamicua*, *chakamiti jukarati*
 - Nayarit: *basil* (tepehuano)
 - Puebla: *huitzitzixochid* (nahua), *necaxanil* (totonaco)
 - Tlaxcala: *huitzitziquitl* (náhuatl)
- (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)

Descripción Botánica

Loeselia mexicana (Lam.) Brand es un subarbusto o arbusto, por lo general de 1 a 1.5 m de alto, erecto, densamente glanduloso-pubescente; tallos profusamente ramificados desde la base; hojas por lo general alternas (las inferiores en ocasiones opuestas y a veces las hojas jóvenes que van desarrollándose de yemas y se presentan aglomeradas), subsésiles, ovadas a lanceoladas, de 1.5 a 4 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde aserrado-espinoso, base cuneada; flores solitarias o agrupadas por varias en las axilas de las hojas, rodeadas de aproximadamente unas 10 brácteas lanceoladas, las exteriores foliáceas pero que paulatinamente se van haciendo escariosas; cáliz también escarioso, de unos 8 mm de largo, con las divisiones puntiagudas y aristadas; corola roja (excepcionalmente amarillenta a blanca), de 2.5 a 3.5 cm de largo, incluyendo los lóbulos redondeados, de alrededor de 5 mm de largo; estambres y estilos largamente exsertos; cápsula subglobosa a elipsoide, de 4 a 6 mm de largo; semillas 2 a 5 por lóculo, pequeñas, aplanadas, circulares u oblongas, de 1.5 a 2 mm de diámetro (o largo), aladas (Figura 2) (Rzedowski & Calderón de Rzedowski, 2005).

Figura 2. *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand. A. rama con flores y frutos; B. flor; C. fruto; D. semilla. Tomada de Flora fanerogámica del Valle de México (Rzedowski & Calderón de Rzedowski, 2005)



Distribución

Especie ampliamente distribuida en el país, presente entre altitudes cercanas a 2250-2800 msnm y de manera escasa en Texas, EUA. Habita en lugares abiertos, con frecuencia perturbados; principalmente en matorrales y zacatales, también en bosques de *Juniperus* o en bosques abiertos de encinos, a veces en campos de cultivo abandonados. Se encuentra en los estados de Sonora, Chihuahua, San Luis Potosí, Puebla, Hidalgo, Chiapas, Durango, Guerrero, Jalisco, Oaxaca y Veracruz (Rzedowski *et al.*, 2005; *Tropicos.org*).

Historia y etnobotánica

Loeselia mexicana tiene una extensa historia y uso ancestral, desde la cultura mexicana se hacía uso de esta planta, que reconocían como “*huitzitzilxóchitl*”, que en náhuatl significa flor de colibrí *huitzitzil* o *huitzil*= colibrí y *xochitl* o *xuchitl*= flor; (Diccionario de Aztequismos). Bajo este nombre náhuatl se encuentra descrita por primera vez en el siglo XVI en el *Códice de la Cruz Badiano* (1552) donde se receta para tres padecimientos:

1) Contra el Cansancio (Figura 3):

“Se recobra el cansado si se lava los pies en líquido especial, que se prepararon con las hierbas *ahuiyac xihuitl*, o si no, *tlatlancuaye* (pimienta negra), *tlatlaolton*, *itzcuinpahtli*, *xiuhehecapahtli*, *iztauhyatl* (estafiate), con flor de ***huitzitzilxochitl***, y las piedras *tetlahuitl*, *tlacalhuatzin*, y todo eso molido en agua caliente” (De la Cruz, 1964).



Figura 3. *Huitzitzilxochitl*: Flor del colibrí.
Tomada de *Códice de la Cruz-Badiano*, 1964.

2) Para la Herida del rayo:

*“El tocado por el cielo, o fulminado, beba esta poción, bien preparada con las ramas de estos árboles: ayauhcuahuitl, tepapaquilti cuauhuitl, ciprés muy verde, ramas de itzauhyatl, hierba cuauhiyauhtli y teamoxtli. Siempre que se haya de dar esta poción, caliéntese al fuego. El cuerpo únjase con una cataplasma de papa, loquilitl, tlalehecapahtli, cuauhiyauhtli, tlatlancuaye, **huitzitzilxochitl**, iztac ocoxochitl, y en suma todas las hierbas sobre las cuales cayó el rayo. Pasados unos días, beba agua que haya tenido un poco de incienso blanco. Ahora bien, esta agua con incienso blanco e incienso blancuzco ha de cocerse y se le agregará un hueso de zorruela hecho cenizas. También se le agregará un poquito de pulque. Además, hay que destilarse en la nariz una medicina compuesta de perla blanca, raíz de tlatlacotic y toda clase de hierbecillas que nazcan en algún jardín que alguna vez se haya quemado. También se le darán sahumeros con el buen olor de incienso blanco, una pasta que se llama xochiocoztol, y la hierba cuauhiyauhtli, muy olorosa, todo echado en el fuego (García y Blanco, 2004).”*

3) Para las Quemaduras de los niños:

*“La siriasis, que es una quemadura de los niños, se cura con unguirlos de una cataplasma confeccionada de semilla del muy conocido michihuauhtli, trigo e incienso rojizo. Todo eso se quema. Y en agua agria deben licuarse la hierba tlatlancuaye, con hojas de **huitzitzilxochitl**, raíz de tlahuehuetl, y tlayapaloni, hojas de laurel y ramas de xiuhehecapahtli. El niño ha de beber una medicina hecha de tierra blanquecina, o piedras blanquecinas, que se recogen en el fondo del cauce de los ríos, piedra acamallotetl y coltotzin, tallo de tlalmizquitl y espigas. Todo eso molido en agua.”(García y Blanco, 2004).*

Ese mismo siglo, el protomédico general de las Indias, Islas, Tierra Firme y Océano, Francisco Hernández durante su exploración en el territorio mexicano (1571-1576), recopiló información acerca de esta planta. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, hubo algunas pérdidas de información en esa época de este personaje (los primeros 16 libros). No obstante, para 1942-1946 el Instituto de Biología (IB) de la UNAM hizo una recopilación de su obra *“Historia de las plantas de Nueva España”* donde se encontró lo siguiente:

“Del HOITZOCUITLAPILXOCHITL primero o flor de cola punzante

Tiene raíces fibrosas, de donde nacen tallos de cinco codos de largo, y en ellos hojas como de melocotón, ralas, angostas y largas, y cerca de la punta flores grandes y redondas, blancas con rojo y contenidas en cálices escariosos y espinosos, de donde toma el nombre. Dicen que el vapor de esta hierba ahuyenta las moscas, y nada más supe acerca de esta planta que debe tal vez clasificarse entre las especies de centauro menor. Nace en *Tetzococo*, en lugares templados.

Huitzoewitlapilxochitl: de *huitzo*, punzante, espinoso (de *huitz (tli)*, espina, y o, partícula posesiva), *cuitlapilli*, cola, y *xochitl*, flor. Flor de cola punzante o espinosa.

Salvo lo de las hojas, los caracteres mencionados por Hernández recuerdan a los de *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand. Sin embargo, esta planta conocida con el nombre de "huitzitzilxochitl" es descrita más adelante (Libro IX, Cap. XLVIII)... "(Miranda *et al*, 1946).

Posteriormente la UNAM publicó entre 1959-1985 toda la información previamente fragmentada que había de las aportaciones de Hernández (se recopiló información de la edición Romana y Matritense), creando una nueva edición titulada "*Obras completas de Francisco Hernández*" donde se encuentran descritas ocho plantas bajo el mismo nombre náhuatl, pero con ciertas variaciones en su descripción, estas son:

1. Del primer HOITZITZILXÓCHITL (Cap. XLV)

"Es una hierba con hojas como de alsine acuático, pero mayores y más puntiagudas. Es de temperamento caliente y seco en tercer grado, sabe a orégano y es un poco amargo. Machacado y mezclado con tuétano de venado limpia el cutis de las mujeres, y quita y corrige las manchas y defectos del rostro. Nace en los montes de Tlacubaya, que tiene un clima semejante al de México."

2. Del segundo HOITZITZILXÓCHITL (Cap. XLVI)

"Es una hierba de raíz ramificada, tallos cuadrados, nudosos a trechos y de cuatro palmos, hojas como de albahaca blandas, vellosas, blanquecinas por debajo, flores purpúreas, largas y delicadas, y ningún fruto. Las hojas son calientes y secantes en tercer grado. Tomadas en cantidad de un puñado con agua alejan los fríos de las fiebres. La raíz no tiene ningún uso. Nace en lugares montuosos y rocosos y también junto a las aguas de regiones templadas, como es la mexicana."

3. Del HOITZITZILXÓCHITL origanino (Cap. XLVII)

"Es un arbusto que de una sola raíz echa muchas ramas leñosas, y en ellas hojas como de orégano, de donde se le ha puesto el sobrenombre, y flores escarlata, encorvadas y con figura de la lanza que llaman alabarda. El olor es como de salvia, el sabor amargo, el temperamento caliente y seco en tercer grado y de partes sutiles. Dicen algunos que quitan los puntos de las fiebres, fortaleciendo quizás el corazón y expeliendo el humor por los poros del cuerpo, o bien por alguna propiedad oculta y desconocida. Es propio de esta planta quitar la flatulencia, ayudar la digestión, aliviar los miembros enfriados, calmar los dolores que provienen de causa fría y expeler los excrementos retenidos en los intestinos" (Figura 4).



Figura 4. Hoitzitzilxóchitl origanino.
Tomada de "*Obras completas de Francisco Hernández*".

4. Del HOITZITZILXÓCHITL mexicano (Cap. XLVIII)

“Echa raíz grande, ramificada y de un amarillo pálido, y de ella tallos amarillos ornados de hojas como de albahaca, aserradas, pero menores y agrupadas a intervalos; flores escarlata y oblongas con forma de cálices. Sólo se usa la flor. Nace en los campos mexicanos, de donde le dimos el sobrenombre.”

5. Del HOITZITZILXÓCHITL tepoztlánico (Cap. XLIX)

“Echa raíz como de rábano y ramificada, y de ella ramas delgadas con hojas largas, puntiagudas, angostas, y cerca del extremo flores escarlata con el centro ceniciento, que son lo único que se utiliza de esta planta.”

6. Del sexto HOITZITZILXÓCHITL (Cap. L)

“El sexto HOITZITZILXÓCHITL, que otros llaman hoitzitziuilxóchitl, es una hierba con raíces fibrosas de donde echa tallos delgados, cilíndricos y purpúreos, hojas como de sauce, pero menores y más angostas, y flores escarlata, colgantes y contenidas en cálices oblongos y pequeños. La raíz es de naturaleza caliente y seca y de sabor amargo con cierto dulzor. Alivia el pecho y las afecciones frías, provoca la orina, limpia el vientre, conteniendo así el flujo si lo hay, ya sea que se introduzca o bien que se tome en dosis de dos o tres onzas.”

7. Del segundo HOITZITZILXÓCHITL tepoztlánico (Cap. LI)

“Es una hierba que echa un tallo único de seis codos de largo, y en él hojas como de marrubio, aserradas y ásperas pero mayores y vellosas, que rodean el tallo a intervalos en toda su extensión, brotando del nacimiento de cada una de ellas dos ramillas llenas de hojitas menores dispuestas a intervalos de igual manera; las flores ocupan el extremo de las ramillas y tienen forma de tubos alargados, amarillos con rojo y agrupados como en capítulos. Es hierba de hermoso aspecto, sin sabor ni olor notables y de naturaleza fría y húmeda; no averigüé ninguna propiedad medicinal suya. Nace en Tepoztlan, de donde toma el sobrenombre y donde lo llaman papátlac, que quiere decir amplio. Hay otra hierba llamada tlaztalehualhoitzitzilxóchitl o sea blanco con rojo, de raíz fibrosa, hojas como de lino largas y angostas en grupos de cuatro o de seis a intervalos, y flores blancas con rojo, de donde el nombre, largas, con forma de cápsulas y dispuestas en grupos, las cuales son, que yo sepa, lo único que se utiliza.”

8. Del octavo HOITZITZILXÓCHITL (Cap. LII)

“Es una hierba con raíz gruesa y ramificada, de donde nacen tallos delgados y purpúreos ornados de hojillas aserradas con figura de corazón, y flores escarlata, pilosas y redondas. Nada notable desde el punto de vista médico supe acerca de ella. Vimos cerca del volcán mexicano otra planta del mismo nombre, pero de forma diferente, que llaman también chichiónticy contiene el flujo de vientre, la cual sin embargo no juzgué que debiera pintarse.”

Primero hace referencia indirectamente a *hoitzitzilxochitl* en su obra *Historia de las plantas de la Nueva España*, en el capítulo CLXII- Del tercer Moyoayacahtli,

*“tiene raíz ramificada, de donde nacen tallos purpúreos , delgados, redondos, pero tendiendo un poco a la forma cuadrada, huecos y lisos, con hojas como albahaca aserradas, y flores escarlata, pequeñas y hasta cierto punto radiadas en forma de estrellas. Es de naturaleza fría, húmeda y salivosa. Su jugo cura los ojos afectados de inflamación aplicado en gotas y tomado cura puntos, principalmente si se mezcla con **huitzitzilxóchitl**. Algunos dicen que provoca sudor a los que tienen fiebre, sea mitigándola o aumentando las fuerzas, sea por cierto calor de que aparece participar...”* (Tomo I, Libro 1y 2, *Historia de las plantas de la NE*).

Además, en el tomo siete “Comentarios de la Obra de Francisco Hernández” donde fueron vertidas identificaciones propuestas por los principales estudios de las plantas descritas por Francisco Hernández a través de la historia, incluyendo las de la edición del IB; comentaron lo siguiente de *hoitzitzilxochitl* (cuadro 1):

La obra “*Cuatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España*”; donde se refiere a la espinosilla de la siguiente forma:

“Cap. IIII. De la mata que llaman *Huitzitzilxochitl*, que es como el oregano...es una mata, que de una raíz, produce muchos tallos y ramos leñosos, en ellos tiene las hojas de oregano, por lo cual se puso este nombre; tiene las hojas rojas y encorvadas, muy semejantes en la figura a aquel genero de arma que llaman alarbado; tiene olor de salvia, sabor es amargo, de temperatura de tercer grado y de partes sutiles. Dicen algunos que socorre a las mordeduras de los animales ponzoñosos, lo cual debe de hacer confortando el corazón y expeliendo el mal humor por los poros y vías más secretas del cuerpo, por alguna virtud y propiedad oculta. Tiene particular facultad de resolver ventosidades de ayudar a la digestión, de curar los miembros resfriados, y de mitigar los dolores nacidos de causa fría y de evacuar las heces detenidas en los intestinos”.

(Información tomada y traducida del Capítulo IV. De la mata que llaman *Huitzitzilxochitl*, que es como oregano. Dentro de la Tercera parte del libro primero de *La Materia medicinal* en que trata de las matas y de sus frutos, pág. 78).

Para el siglo XVIII, Mociño y Sessé durante la Real Expedición a la Nueva España, clasificaron esta planta con el nombre de *Phlox spinosilla* (Figura 5). Atribuyéndole las siguientes propiedades: “*La cocción de toda la planta es administrada en fiebres producidas por catarro, con un resultado muy afortunado y bastante estable. Las mujeres se lavan la cabeza para que crezcan los cabellos*” (La Real Expedición Botánica a Nueva España por José Mociño y Martín Sessé, 2010).



Figura 5. *Loeselia mexicana* (sin. *Hoitzia coccinea* Cav). Colección Torner 1562. Dibujo a lápiz y acuarela sobre papel; medidas 35x24 cm; Parte inferior: escrito en lápiz 55 y por DC. Tomada de “La Real Expedición Botánica a Nueva España por José Mociño y Martín Sessé”, 2010.

Para 1791, Cervantes, en el “*Ensayo a la Materia Médica vegetal de México*”, se refiere a la espinosilla como *Phlox mexicana*. Menciona que crece en San Ángel y muchas otras partes y que en herbolarias la venden bajo el nombre de *Huitzitziltzin*, siendo usada para calenturas catarrales, fiebres ardientes y enfermedades de pecho (Datos para la materia médica, 2ª parte, 1898).

Consecutivamente, su alumno Antonio de la Cal y Bracho en 1832 publica el “*Ensayo para la Materia Médica Mexicana*” donde clasifica a la espinosilla como *Hoitzia coccinea* Cav. La describe como planta abundante en los contornos del valle de México, usada como poderoso sudorífico y buen diurético (Datos para la materia médica, 2ª parte, 1898).

Posteriormente, en 1873 Marcial Oropeza (alumno de Leopoldo Río de la Loza y Alfonso Herrera de la Escuela Nacional de Medicina) realizó su tesis para obtener el grado de Farmacéutico acerca de la espinosilla (Figura 6). Recopilando la siguiente información histórica como: “*Hernández describió ligeramente a esta planta, donde los indígenas la empleaban para limpiar el pelo de las mujeres, mezclándolo contundida con medula de ciervo, así como para hacer desaparecer las manchas de la piel, cosechada en las lomas de Tacubaya; Conocida por los españoles como Huachichile, pero pronunciada por indígenas como Cuachichili, palabra mexicana que en castellano significa gorrión; debido a la semejanza que existe entre el color de la flor, con el de las plumas que cubren la cabeza del pájaro mencionado*”. Sin embargo, Oropeza menciona que otras personas hablantes del verdadero náhuatl aseguran que el verdadero nombre es *Cuachile* y no los anteriores; además que este último se refiere a un pato que tiene la cabeza roja. No obstante, Oropeza creía que mucha de la discordancia en la información respecto a la planta, era resultado de una adulteración en el idioma mexica (náhuatl); Planta natural de nuestro país, abundante en muchas partes, principalmente puntos cercanos a la capital; comercializada con mucho aprecio e inicialmente por gente pobre.



Figura 6. Lámina de *L. mexicana* por Oropeza. Tomada de “*Datos para la Materia Médica Mexicana* de 1898”.

Usos antiguos (Oropeza, 1873):

1) Atacar calenturas

“Toman un puño de espinosilla en cada mano, restregándola en agua o pulque, hasta que el líquido se colorea intensamente en verde, se cuele por un cedazo, endulzan y dan a beber al enfermo cada vez que la sed lo molesta, se repite el tratamiento para que el paciente quede completamente curado. En caso de estar seca, se muele en un metate, formando una papilla que diluyen en el líquido”.

2) Diaforético

“Se hace un cocimiento fuerte, agregándole algunas veces tamarindo, lo endulzan y toman, se “arropan” perfectamente y les viene un sudor muy copioso. Se toma caliente la bebida pero también puede ser frío, pero obra en menor proporción”.

3) Cataplasma para curar infecciones en la garganta

Según Oropeza, presencio en varias ocasiones su buen efecto tópico usado de esta manera, tanto para esta enfermedad como en las fluxiones de cara.

4) Sustituto de jabón

“Los antiguos mexicas usaron distintas plantas como sustituyentes de jabón, la espinosilla la usaron para uso personal, la agitaban dentro de agua hasta formar espuma persistente y con el agua preparada de ese modo se lavaban, sirviéndose de la misma planta para restregarse; de un modo semejante a la que emplean hoy muchas mujeres, para impedir la caída de cabello y desarrollo de orzuela, lo cual consiguen satisfactoriamente”.

Incluso menciona que esta especie es solo usada en México, pero que en diferentes puntos de la Republica hay otras como: *Loeselia glandulosa*, que crece en tierra caliente; *L. coerulea*, en los alrededores de la capital, llamada vulgarmente banderilla; *L. rupestris*, en Oaxaca; *L. ciliata*, Veracruz; *L. involucrata*, Acapulco (Oropeza, 1873), los cuales comparten nombres comunes con *L. mexicana*.

Finalmente, toda la información anterior, se siguió considerando en estudios posteriores. En el Instituto Médico Nacional (IMN) se continuaron haciendo pruebas químicas y farmacológicas con la planta y se incluyó en la *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México*(1874, 1884, 1896), *Anales del IMN*, tomo II (1896)-IX (1907), *La Farmacología Nacional formada por el IMN* (1913), 2ª Parte de los *Datos para la Materia Médica Mexicana* de 1898, *La Naturaleza, Periódico Científico de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, Tomo III (1876) y V (1881). Así como el la *Farmacopea Latino-Americana* por el profesor Alfonso L. Herrera en 1921 e incluso en el *The Pharmaceutical Journal and Transactions* (1876-77) y *The American Journal of the Pharmacy* (1891); No obstante, para posteriores ediciones de Farmacopeas, ya no se tienen registros para esta especie.

Propagación sexual

Es un proceso que se realiza a través de las semillas que derivan de un proceso de reproducción sexual. La semilla es una de estructura de resistencia, que permite la dispersión de la especie y a partir de la cual surge la información de material genético (Osuna, 1997). En las plantas propagadas por semilla la descendencia no es clónica ya que cada semilla tiene su propia variabilidad genética, lo cual permite mantener la variabilidad biológica de las poblaciones vegetales (González, 2013).

Germinación

Puede llevarse a cabo cuando se presentan las condiciones ambientales propicias: luz, temperatura y humedad. Al igual como los requerimientos internos de la semilla. Este proceso está sujeto a una regulación muy precisa donde ciertos factores del medio juegan un papel importante. La germinación comienza con la inhibición y finaliza con el alargamiento de la radícula. Incluye numerosos eventos como son la hidratación de proteínas y otras moléculas, cambios estructurales, respiración, etc. (Osuna, 1997).

Propagación asexual (vegetativa)

Es un proceso de propagación vegetativo; se utiliza para producir una planta que contenga el mismo genotipo de la planta madre y esto sucede ya que todas las células vegetales poseen la información genética necesaria para reproducir la planta entera (totipotencialidad). La propagación asexual por estacas es una técnica sencilla, rápida y barata que además de conservar la información. Genética de la planta madre es una de los métodos más utilizados. Los factores más relevantes a tener en cuenta para realizar el enraizamiento por estacas son: fuentes de material vegetativo, medios para enraizamiento, tratamiento con estimuladores de enraizamiento (auxinas) y condiciones ambientales adecuadas (González, 2103).

Química

Los primeros reportes de la composición química de la espinosilla datan desde el siglo XIX. Oropeza (1873) realizó pruebas químicas con la parte aérea de la planta de estudio y aisló un extracto por distintas lixiviaciones con éter, agua y alcohol obteniendo, de manera general, resina, huella de taninos, materia azucarada y goma. De la raíz obtuvo albumina, materia amarilla, mucilago, azúcar y extracto amargo.

Oliva (1854), maceró las hojas en alcohol del 35° (tintura verde esmeralda), posteriormente en agua (moreno-verduzco) y otra porción fue incinerada; obteniendo: un resina de color negro-verduzca, taninos, ácido gálico, materia colorante verde, materia azucarada, fibra leñosa y sales formadas de clorhidrato de carbono y sulfato de calcio. Menciona que sus principios activos son solubles en alcohol y sobre todo en agua. Sin embargo, reconoce no haber emprendido experimentos en indagación de su principio activo, pero cree que presente alguno.

Después, en 1898 en el IMN se realizó el análisis químico y se empleó un método con disolventes neutros, donde se encontró lo siguiente: grasa sólida, resina neutra soluble en regolina, clorofila, caucho, aceite esencial (huellas), materia colorante amarilla, resina ácida número 1, tanino, alcaloide (*Leselina*), resina ácida número 2, saponina, celulosa, leñosa, almidón y sales minerales (Datos para la Materia Medica Mexicana, 1898).

En 1989 se aisló por primera vez un triterpeno pentacíclico (Jiménez *et al.*, 1989). También se infiere la presencia de flavonoides, aunque actualmente no hay estudios que demuestren con exactitud qué tipo de flavonoides, pero Herrera-Ruíz *et al.*, (2011), menciona que *L. mexicana* puede presentar dos tipos de flavonoles: quercetina y kaempferol (Fig. 7)

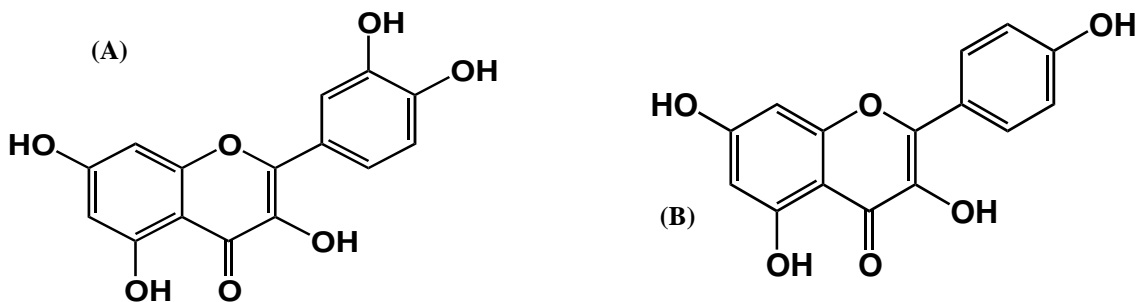


Figura 7. Quercetina (A) y Kaempferol (B)

También se reporta en la espinosilla, la presencia de tres cumarinas (Navarro-García *et al.*, 2007): dafnoretina así como dos precursores monómeros (Fig. 8): escopoletina y umbeliferona (Herrera-Ruiz *et al.*, 2011).



Figura 8. Precursores monómeros: escopoletina (C) y umbeliferona (D)

Farmacología

Los primeros reportes farmacológicos datan del siglo XIX, donde se utilizaron perros, conejos e incluso humanos para evaluar las patologías sobre las que la planta tiene acción. Se encontró de manera general, actividad purgante y emética, en el caso del tratamiento; para alopecia, no se generó ningún método. Sin embargo, Herrera y Oropeza opinaban que posiblemente pueda ayudar a la conservación de cabello por contener saponinas. Además, algunos investigadores tuvieron distintas respuestas de sus pacientes, poniendo en duda la efectividad de sus ciertas acciones terapéuticas, como su propiedad febrífuga y diurética, tal es el caso de Alfonso L. Herrera y Oliva (Oropeza, 1873; Datos para la materia médica mexicana, 1898; Herrera, 1921).

En el siglo XX se realizaron otros estudios farmacológicos que han demostrado inclusive nuevas propiedades de *L. mexicana* utilizando extractos similares (Cuadro 1). A continuación se detallan algunos de dichos estudios:

Rojas y colaboradores (1999) calcularon el efecto de inhibición de contracciones espontáneas del íleon en ratas masculinas Sprague-Dawley (200-250 g) con el empleo del extracto cloroformo-metanol (proporción 1:1) en varias plantas usadas por el pueblo Otomí de Querétaro, entre ellas *L. mexicana*. Además, se analizó la actividad de extractos en algunas enterobacterias patógenas como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp. y *Vibrio cholerae*. En este estudio los extractos se evaluaron usando placas de agar que contenían 1 mL (10^6 bacterias), las cuales fueron empapadas con 100 y 50 μ l de extracto crudo o una concentración de 10 mg/mL y secado al aire libre. De esa manera, la acción farmacológica vista en los extractos de las plantas de selección, apoyaron el uso etnomédico de las plantas, incluyendo *L. mexicana* para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales.

Pérez (2005), estudió el efecto antidiarreico de *L. mexicana* con distintos extractos orgánicos (hexano, cloroformo, metanol y extracto acuoso), usando como modelo a ratones machos cepa CDI (20-25 g) y ratas macho Wistar (200-250 g). Se observó que en dosis de 100 mg/Kg peso corporal, el extracto metanol disminuye la diarrea inducida en ratones con $MgSO_4$. Por otra parte, el extracto acuoso (dosis 50 mg/Kg) redujo el tránsito intestinal elevado por la inducción con aceite de ricino (4 mL/ Kg) e inhibió la evacuación de ratones normales. Los resultados mostraron un alivio sintomático de la diarrea. Por último con los extractos hexano y cloroformo no se observó algún efecto.

Navarro y colaboradores (2006), realizaron un estudio a partir de la recolección de la especie en el centro y sur de México, donde obtuvieron extractos de diclorometano y hexano, los cuales presentaron una importante actividad contra dermatofitos (hongos hialinos que parasitan el tejido queratinizado). Se realizó un ensayo antifúngico, mediante el método de dilución en agar utilizando placas Petri. La solución madre de extractos y compuestos de referencia, nistatina y miconazol, fueron aplicados a dos concentraciones de dilución seriadas en intervalos de 8.0 a 0.125 mg/mL y de 128 a 1 μ g/mL, respectivamente. Las concentraciones finales de DMSO en el ensayo fueron inferiores al 2% (v/v). Se colocó inóculo final de 10^5 células/mL para hongos filamentosos sobre la parte superior del agar solidificado con un bucle calibrado para suministrar 0,005 mL. Los experimentos se realizaron por duplicado e incubación a 29° C. El crecimiento fúngico se comprobó, primero en placas de control preparadas sin muestra de ensayo, después de 24, 28 y 72

horas, dependiendo del período de incubación requerido para un crecimiento visible: 72 horas para dermatofitos.

Navarro y colaboradores (2007), demostraron un efecto contra ansiedad utilizando el extracto crudo etanólico y la dafnoretina pura, obtenidos de esta planta, en ratones machos ICR (2-38 g) y con el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (EPM). Donde se hizo una administración intraperitoneal de 1.8, 3.7, 7.5 y 15.0 mg/Kg. También se realizó la prueba de campo abierto (OFT) con el fin de determinar el efecto de la administración de la dafnoretina sobre la actividad motora espontánea. Sin embargo las diferentes dosis de este compuesto (1.8, 3.7, 7.5 y 15.0 mg/Kg) y el grupo DZP (Diazepam, ansiolítico), no indujeron cambios estadísticamente significativos con respecto al grupo control ($p > 0.05$) sobre el número total de cruces y levantamientos en la prueba de campo abierto, es decir que diferentes tratamientos de dafnoretina no modifican la actividad motora espontánea medida con el método de campo abierto. Este es el primer estudio que describe el efecto ansiolítico de la dafnoretina.

Navarro y colaboradores (2011), investigaron propiedades antifúngicas con los compuestos dafnoretina, umbeliferona y escopoletina, aislados con el extracto diclorometánico (2 x 600 mL) de las partes aéreas de *L. mexicana*, en contra de tres hongos filamentosos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus niger*) y una levadura (*Candida albicans*). Dichos hongos son agentes comunes de varias enfermedades infecciosas. Se observó que *L. mexicana* tiene una importante actividad contra dermatofitosis o tiña (*Tinea*), micosis superficiales causadas por un grupo de hongos queratinofílicos estrechamente relacionados, denominados dermatofitos.

Herrera- Ruíz y colaboradores (2011), demostraron que la administración del extracto metanólico de la parte aérea de *L. mexicana* tiene un marcado efecto ansiolítico en las dosis de 200 y 400 mg/Kg en ratones albinos (cepa ICR) con un peso de 30-36 g, comparado con el modelo Diazepam en el modelo EPM. Además, el extracto no cambió el comportamiento de los animales por someterlos a la prueba de campo abierto (OFT) comparado con los controles. En esta prueba, el aumento en la locomoción se considera un efecto estimulante, mientras que una disminución se relaciona con un efecto sedante. Sin embargo, este modelo no es suficiente para establecer el mecanismo de acción por el cual es ejercido el efecto, se sugiere que probablemente resulte de una interacción entre la actividad de componentes del extracto con el sistema GABAérgico a través de la activación de los receptores GABA, los cuales pueden inducir hiperpolarización de la membrana neuronal, de manera similar a las benzodiazepinas (Rodgers, 1997). También se confiere el efecto ansiolítico por la unión a las proteínas plasmáticas, porque tres de los cuatro antagonistas GABAérgicos probados (FLU, PTX y BIC) abaten la actividad biológica de esta planta. Sin embargo, aún es necesario continuar con el detallado estudio de toxicología y farmacología para demostrar la seguridad del extracto para uso clínico.

En una revisión de estudios experimentales de plantas mexicanas con actividad ansiolítica, se menciona a *L. mexicana* y se le atribuye un efecto ansiolítico con extracto metanólico que fue evaluado en ratones con la prueba de EMP. Además se menciona que el extracto metanólico fue estandarizado basado en su concentración de dafnoretina (HPLC) y que fue suministrado de manera oral por 24, 18 y 1 hora previamente de la prueba biológica. Se examinó si el efecto se debe a la interacción con el sistema GABAérgico por administrar un

antagonista GABAA. Los 200 y 400 g (Kg de extracto contienen 3.14 y 6.28 de dafnoretina, respectivamente inducido y efecto ansiolítico en ratones sin modificación en la actividad motora espontanea (Guzmán *et al.*, 2014).

Finalmente, Castro y colaboradores (2015) realizaron un estudio metabólico donde se demostró que esta planta tiene actividad “anti-obesidad” *in vitro*. Usando el extracto etanólico de la parte aérea de la planta se realizaron dos pruebas básicas para evaluar esta actividad: la inhibición de acumulación de lípidos en adipocitos y la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática. Fueron probados 100 µg/mL del extracto etanólico para su efecto inhibidor de la lipasa, y el rango de su actividad fue de 6,3% a 53,4%.

Cuadro 1. Estudios farmacológicos en *Loeselia mexicana*

Acuoso	Etanol	Metanol	Diclorometano	Cloroformo-metanol (1:1)	Cloroformo	Hexano
*Disminución de efectos de diarrea, inducida por aceite de ricino (Palombo, 2006).	*Actividad “anti-obesidad” <i>in vitro</i> (Alonso-Castro <i>et al.</i> , 2015). *Efecto ansiolítico en ratones macho con prueba EPM (Navarro-García <i>et al.</i> , 2007).	*Inhibición de diarrea inducida por MgSO ₄ (Palombo, 2006). *Efecto ansiolítico en ratones con prueba EPM (Guzmán <i>et al.</i> , 2014). *Actividad en el sistema GABAérgico a través de la activación de receptores GABAA (reduce nervios, como lo hace benzodiazepina) (Herrera-Ruíz <i>et al.</i> , 2011).	*Propiedades antifúngicas (Navarro <i>et al.</i> , 2011). *Actividad contra dermatofitos (Navarro <i>et al.</i> , 2006).	*Inhibición de contracción espontánea en íleon aislado de rata (Herrera-Ruíz <i>et al.</i> , 2011). *Actividad antimicrobiana (enterobacterias patógenas) (Rojas <i>et al.</i> , 1999). *Actividad antifúngica (Navarro <i>et al.</i> , 2006).	No presento efecto antidiarreico (Pérez <i>et al.</i> , 2005) (Palombo, 2006).	*Actividad contra dermatofitos (Navarro <i>et al.</i> , 2006)



JUSTIFICACIÓN

La estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional (MT) 2014 – 2023, tiene como meta la evaluación completa de los sistemas de medicina tradicional de los países miembro; plantea cuatro objetivos:

- **Política:** integrar la MT en los sistemas nacionales de salud mediante el desarrollo y la aplicación de políticas y programas nacionales.
- **Seguridad, eficacia y calidad:** promover la seguridad, eficacia y calidad de la MT a través de investigación que permita establecer normas reglamentarias y de garantía de la calidad.
- **Acceso:** mejorar la disponibilidad y asequibilidad de la MT y
- **Uso racional:** promover el uso terapéutico racional de la MT entre los profesionales y los usuarios.

¿Cómo conseguirlo? La construcción de conocimientos permitirá gestionar activamente la MT por medio de políticas nacionales apropiadas reconociendo el papel y las posibilidades de la MT; fortaleciendo los parámetros de calidad, seguridad, uso adecuado y eficacia de la MT mediante la reglamentación, capacitación, y monitoreo constantes; y fomentando la cobertura sanitaria universal a través de la integración de la MT en la prestación de servicios y la auto atención de salud.

Debido a la pérdida de diversidad biológica como objeto de la extracción indiscriminada y su cosecha irracional, es indispensable elaborar una estrategia de conservación; la cual consiste en elaborar un protocolo de propagación de la especie *L. mexicana*, ampliamente comercializada como planta medicinal.

Por otra parte, dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos que representa la respuesta de la Secretaría de Salud a las demandas de la Organización Mundial de la Salud, existe todavía una baja representatividad de monografías de plantas medicinales mexicanas, siendo este el caso de *L. mexicana*; es por esto mismo que se pretende hacer una contribución con datos de identidad química y molecular de dicha especie medicinal que ayuden a la elaboración de una monografía de esta especie.

OBJETIVOS

- **General**

Establecer los protocolos de propagación sexual y vegetativa de *Loeselia mexicana*; así como la generación de ensayos de control de calidad químico y molecular para la contribución a su monografía tipo FHEUM.

- **Particulares**

- Hacer una recopilación de la información etnobotánica de la espinosilla.
- Generar el mapa de distribución actual y potencial de la especie de estudio.

- Establecer el método de propagación sexual, analizando la respuesta germinativa de *L. mexicana* y el método de propagación vegetativa por medio de estacas.
- Realizar ensayo de identidad química en cromatografía en capa delgada (CCD) según el MGA-FH 0050 descrito en la FHEUM.
- Determinar la huella molecular a través de la amplificación de los marcadores propuestos por CBOL.

MATERIALES Y MÉTODO

El procedimiento se divide en ocho partes:

1. Revisión bibliográfica de *L. mexicana*

Con el fin de recapitular la información que se ha reportado desde tiempo atrás de la especie de estudio, se hizo una búsqueda en fuentes como libros, artículos, tesis y páginas web.

2. Revisión de herbarios y elaboración del mapa de distribución

Para la elaboración de un mapa de la distribución actual y potencial de la planta de estudio, así como para conocer su fenología, se consultaron los siguientes herbarios:

-Herbario Nacional de México (MEXU), Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Datos proporcionados por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Virginia Evangelista.

-Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FCME)

-Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM)

Con la asesoría de la M. en C. Virginia Evangelista, se georreferenciaron y analizaron con el programa ArcGIS a través del algoritmo *Maxent* los datos obtenidos en herbario, para obtener el mapa de distribución de *L. mexicana*.

Para la construcción del mapa de distribución actual se utilizó el software ArcGis, donde se introdujeron los puntos de colecta de *L. mexicana* registrados en Excel como coordenadas, en el eje de las “x” la latitud y el eje de las “y” la longitud, proyectadas sobre un mapa del territorio nacional para su observación. El mapa de distribución potencial se generó el algoritmo de Máxima Entropía implementado en el programa Maxent para predecir las áreas de distribución no observadas. Se introdujo la información de la distribución inicial de la especie en formato “.cvs” y se introdujo información de 10 variables o modelos ambientales (provenientes de WorldClim) dependientes de la especie en formato “.ascii”, obteniendo así datos cuantitativos en tablas y gráficas, así como un archivo “raster” descriptivo del mapa de distribución potencial.

3. Colecta de material vegetal

El material vegetal se colectó de poblaciones silvestres de *L. mexicana*, distribuidas en distintas localidades de la Ciudad de México e Hidalgo:

Localidad 1. Lugar: Santa Ana Tlacotenco. A partir de la carretera México-Oaxtepec (Fig. 9). Delegación Milpa Alta, Cd. de México. Fecha de colecta: 10-jun-16. Altitud: 2485 msnm. Coordenadas: 19° 11' 16.7" N y 99° 02' 05.7" W. Material recolectado: Estacas, semillas y ejemplar para herbario, Brisa Chávez # (FCME-160159).



Figura 9. Localidad 1: Santa Ana Tlacotenco (Carretera México-Oaxtepec)
(Foto: Brisa Chávez).

Localidad 2. Lugar: Denthó, pasando la cerca de piedra que está justo en la curva de la carretera Vicente Villagrán hacia Nopala. Mpio. Nopala de Villagrán, Hidalgo (Fig. 10). Fecha de colecta: 17-sep-16 y 16-oct-16. Altitud: 2438 msnm. Coordenadas: 20°14'49.098" N y 99°38'19.218" W. Material colectado: Semillas y ejemplar para herbario, Brisa Chávez # (FCME-160158) y Brisa Chávez # (FCME-160161).



Figura 10. Localidad 2: Carretera Dentho (Foto: Brisa Chávez)

Localidad 3. Lugar: Peña de San José “El Marqués” (Escandón) (Fig. 11). Mpio. Chapantongo, Hidalgo. Fecha de colecta: 16-oct-16. Altitud: 2363 msnm. Coordenadas: 20°12'35.364" N y 99°33'31.806" W. Material colectado: Semillas y ejemplar para herbario, Brisa Chávez # (FCME-160157).



Figura 11. Localidad 3: Peña de Escandón con dos habitantes de la zona: Caritina Martínez y Francisco Chávez (Foto: Brisa Chávez)

Localidad 4. Lugar: Al fondo del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, Cd. de México (Fig. 12). Fecha de colecta: 29-oct-16. Altitud: 2280 msnm. Coordenadas: 19° 18' 44.28" N y 99° 11' 46.07" W. Material colectado: Semillas.



Figura 12. Localidad 4: Jardín Botánico de la Ciudad Universitaria, UNAM (Foto: Brisa Chávez)

4. Muestras de mercado

Con la finalidad de poner a prueba los marcadores de identidad químicos y moleculares, se adquirió material vegetal comercializado bajo el nombre de espinosilla, en el centro de acopio y venta de plantas medicinales de la Ciudad de México: Mercado Sonora.



Figura. 13. Local 190 “El ¼ a \$15, planta para crecimiento de cabello, caída y caspa. Material proveniente de estado de Puebla”.



Figura. 14. Local 179 “El ¼ a \$20, planta buena para el crecimiento de cabello”. No se reveló la procedencia del material vegetal.

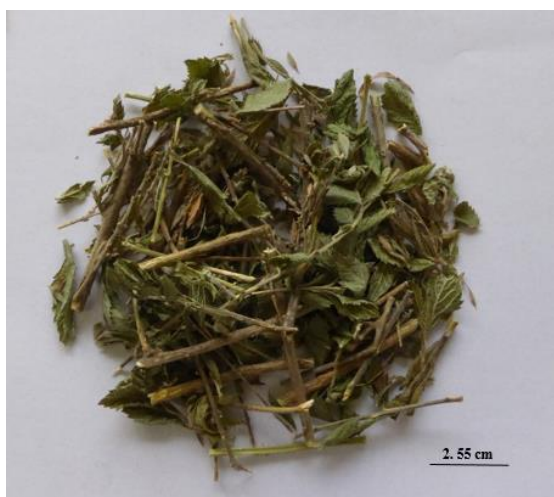
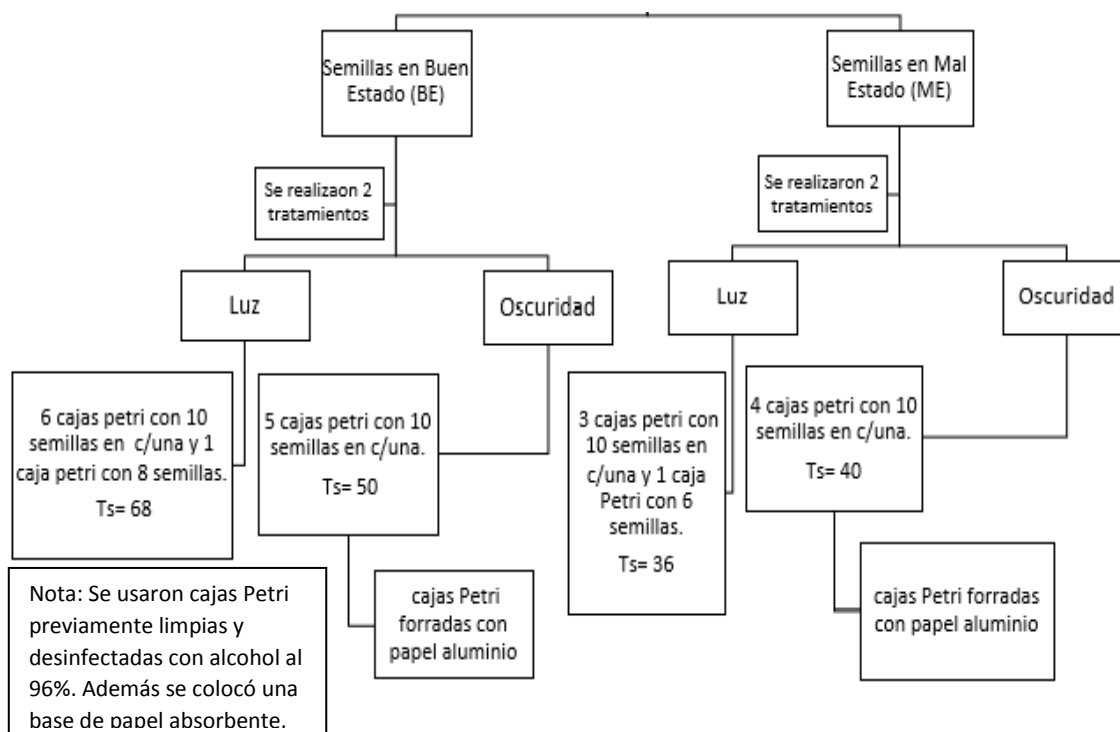


Figura. 15. Local 338 “A \$20 la bolsa (aprox. un kilo) planta buena para evitar caída de cabello, bueno para riñones, ácido úrico. Material proveniente del Edo. De México”.

5. Propagación sexual

Ensayo de viabilidad por germinación y fotoblastismo

Primero se hizo la revisión de cada fruto recolectados en la localidad de Milpa Alta, de los cuales se extrajeron semillas y se separaron dos lotes de semillas, uno en Buen Estado (BE) y otro en Mal Estado (ME), este último se determinó así por el aspecto de las semillas (presencia de hongos). Para cada lote se realizaron 2 tratamientos: luz y oscuridad. En el siguiente diagrama resume las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo (Fig. 16).



Nota: Ambos tratamientos se depositaron en una incubadora por cinco días a una temperatura de 20°C

Figura 16. Diagrama de condiciones para la germinación de semillas de *L. mexicana*

Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio

Se utilizaron 112 semillas recolectadas de las plantas propagadas de manera vegetativa dentro del invernadero.

Las semillas se embebieron durante 24 horas en agua destilada a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron en una solución de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio preparado en agua al 0.1% por 24 horas a temperatura ambiente.

La evaluación de semillas se realizó con un microscopio estereoscópico donde se cortó por la mitad cada semilla y se observó la tinción del embrión.

La tinción de color rosado-rojo en todo el embrión se tomó como indicio de alta viabilidad, mientras que la ausencia de tinción en todo el embrión se tomó como no-viable (Gallo *et al.*, 2016).

Siembra directa

Para esta prueba se utilizaron 100 semillas, también, a partir de plantas propagadas dentro del invernadero.

Primeramente, se colocaron las semillas en germinadores de espuma fenólica; en cada pozo se colocó vermiculita, una semilla y se cubrió con el mismo sustrato inerte.

Los germinadores se cubrieron con un domo plástico transparente, y se dejaron dentro del invernadero que tiene una temperatura en promedio 7.5° C mayor en el interior y filtra un 40% de luz. Se hizo el seguimiento de esta prueba por un mes, hasta observar la emergencia de cotiledones.

Trasplante

Se individualizaron los cubos de espuma fenólica que contenían cada plántula, se retiraron del domo y se transfirieron por separado a una maceta con mezcla de sustrato el cual consistió en tepojal, agrolita y *Sphagnum* (peat moss) (1:1:1). Las macetas permanecieron dentro del invernadero y se realizó el monitoreo de cada trasplante. También se les agregó dos meses después de su trasplante una solución nutritiva de hortalizas.

Siembra al voleo

En una maceta de aproximadamente 7 pulgadas se agregó una mezcla de tierra negra y agrolita (3:1) donde se aventaron al azar 20 semillas, con el fin de tener otra alternativa de propagación sin tener que invertir en otros materiales.

6. Propagación vegetativa (estacas)

Se llevó a cabo la técnica de estacas de madera suave (Gárate, 2010) y el material que se empleó fue el de la recolecta de la localidad de Milpa Alta, debido a su disponibilidad al inicio de este trabajo.

Primero, se obtuvieron de esta población de plantas, 93 estacas entre 7 y 12 cm, con cinco nudos de crecimiento como mínimo y se transportaron en papel absorbente humedecido hasta el área de trabajo, invernadero del Jardín Botánico, UNAM.

Dentro del invernadero se retiraron las hojas de los entrenudos de cada estaca, dejando solo las hojas de la parte apical; se desinfectaron con hipoclorito al 2% durante 10 minutos (Figura 14); se hizo un corte en diagonal de la parte inferior y se aplicó vaselina en los entrenudos que contenían brotes foliares como barrera ante microorganismos. Después, se

separaron dos lotes de estacas para colocarlos en sustratos diferentes: 1) agrolita y 2) vermiculita + *Sphagnum* (1:1).

En cada sustrato se utilizaron dos concentraciones de enraizador (Radix®, ácido indolbutírico): 1 500 ppm y 10 000 ppm. En la siguiente tabla (Cuadro 2), se muestra el número de estacas que se colocó en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 2. Estacas por tratamiento (sustrato y enraizador)

Tratamiento (sustrato)	Radix	# Estacas
Agrolita	1 500 ppm	41
	10 000 ppm	9
Vermiculita+ <i>Sphagnum</i> (1:1)	1 500 ppm	38
	10 000 ppm	5

Por último, se regó cada maceta que contenía cada conjunto de estacas, se cubrieron con bolsas de plástico que tenían orificios para mejorar la transpiración (Figura 17) y se dejaron dentro del invernadero.



Figura 17. Estacas. **A.** Desinfección de estacas. **B.** Macetas con diferentes sustratos (izquierda vermiculita+ *Sphagnum*, derecha Agrolita)

Trasplante

Este paso se realizó una vez que se obtuvo enraizamiento en las estacas, cada planta se colocó en una bolsa de plástico con tierra negra y posteriormente se hizo el registro de la altura y crecimiento vegetativo durante seis semanas.

Aclimatación

Se retiró la malla sombra dentro del invernadero para aumentar la luz que recibían las plantas. Debido a que las hojas estaban presentaban mayor elongación comparadas con las poblaciones silvestres. Además, se quiso observar si al colocarlas a una sección más iluminada se podría promover su floración.

Por otro lado, se tomaron al azar 21 plantas y se sacaron del invernadero para observar su resistencia al medio exterior y ver posibles diferencias en las fases fenológicas respecto a las plantas del interior del invernadero.

Ciclo fenológico

Con las plantas dentro del invernadero y fuera de este, se hizo el registro de las siguientes etapas fenológicas de *L. mexicana*: crecimiento vegetativo, floración, fructificación y maduración de semillas.

También durante esta vía de propagación se añadió al sustrato de las plantas solución nutritiva para hortalizas (Hydro environment) con el fin de proporcionar elementos esenciales a plantas, que necesitan para su desarrollo, especialmente después de la floración y fructificación donde la planta gasta mucha energía.

7. Ensayo de identidad química

Extracto orgánico

Este ensayo se hizo siguiendo el Método General de Análisis-FH 0050 establecido en la FHEUM (2013).

Se realizaron extractos orgánicos con el siguiente material vegetal:

- 1) Plantas recolectadas en la localidad de Milpa Alta (hojas y tallos)
- 2) Plantas propagadas vegetativamente dentro del invernadero (hojas, tallos y flores)
- 3) Muestra de mercado, local 179 (hojas, tallos y flores)
- 4) Muestra de mercado, local 190 (hojas, tallos y flores)
- 5) Muestra de mercado, local 338 (hojas y tallos)

El extracto orgánico se obtuvo por maceración se pesaron 20 g de material vegetal seco, los cuales se pulverizaron en un molino (Krups type 203) y se extrajeron en 200 mL de una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) durante 72 horas el disolvente se concentró a presión reducida a una temperatura de 40 °C (Büchi R100); (Figura 18). El mismo material vegetal se extrajo dos veces más. El extracto final se conservó en un matraz bola a temperatura ambiente y en oscuridad. El porcentaje (%) de rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{(100) * (\text{peso inicial de material vegetal seco})}{(\text{peso seco del extracto orgánico})}$$

Por otro lado, para la prueba de control de calidad, se generaron los extractos orgánicos de cuatro muestras: tres compradas en diferentes locales del Mercado de Sonora, Cd. de México y la última se tomó de individuos propagados en el invernadero. Para estas muestras se pesaron 10 g de material vegetal seco pulverizado. Cada muestra se colocó en matraces de 250 mL, donde se añadieron 100 mL de la mezcla de diclorometano:metanol (1:1). Se dejaron macerar por 72 horas (agitándolo suavemente cada día) y se concentró a presión reducida.

A diferencia del extracto obtenido de las plantas silvestre, se realizó una única extracción del material vegetal. Cada extracto concentrado se vertió en una caja Petri de vidrio y se dejó secar en un ambiente oscuro, para también calcular el porcentaje de rendimiento.



Figura 18. Obtención de extracto orgánico para CCD. A. Pesaje del material vegetal seco. B. Macerado de *L. mexicana*. C. Concentración a presión reducida

Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice (Merck 60 F_{254}) para evaluar algunos de los compuestos reportados en la literatura como parte de la composición química de *L. mexicana*: umbelliferona, quercetina y kaempferol. También se evaluaron los compuestos: rutina, ácido cafeico y ácido clorogénico, al 1% por experimentación.

La fase móvil consistió en la mezcla acetato de etilo:metanol:agua (83.8:11.3:4.9) (Morales, 2011). Las cromatoplasmas se observaron bajo luz UV a las longitudes de 254 nm (corta) y 366 nm (larga). Además, se utilizaron como soluciones reveladoras: sulfato cérico amoniacal y anisaldehído. Finalmente, se calculó el factor de retención (R_f) para todos los compuestos evaluados.

Placa preparativa

Al finalizar el ensayo de identidad por CCD, surgió el interés por un compuesto abundante en la espinosilla cuyo R_f no coincidía con ningún estándar evaluado y el cual, podría postularse como compuesto marcador de la planta. Por lo que con apoyo del Dr. Reyes Chilpa y la Dra. Laura Guzmán del Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Química, UNAM, se pudo profundizar un poco más en el estudio químico de *L. mexicana*.

Se utilizó una cromatoplasma de gel de sílice (60 F_{254}), de 20 x 20 cm. Se aplicaron 200 mg del extracto orgánico disueltos en 8 mL de mezcla diclorometano:metanol (1:1); se dejó secar la placa dentro de una campana de extracción durante 40 minutos. Posteriormente, se

corrió dentro de una cámara de elución ocupando la misma fase móvil de acetato de etilo:metanol:agua (83.8:11.3:4.9).

Además de observar a las longitudes de onda corta y larga, se reveló con solución de anisaldehído una pequeña sección de la parte izquierda de la cromatoplaaca para visualizar las fracciones, bandas, de interés y consecutivamente aislarlas.

Se identificaron cinco fracciones de interés (Figura 20). Con una espátula se retiraron las bandas correspondientes a cada fracción de la placa preparativa y se colocaron en un matraz de 50 mL. Después, se añadieron 20 mL de disolvente (diclorometano-metanol) para desadsorber los compuestos; se repitió la desadsorción con acetato de etilo (Figura 16).

Se concentró cada fracción a presión reducida y se visualizaron en una CCD para verificar la presencia de compuestos aislados (Figura 14). Las fracciones selectas se disolvieron en cloroformo deuterado y dimetilsulfóxido para enviarlas a un análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) en el Instituto de Química, UNAM.

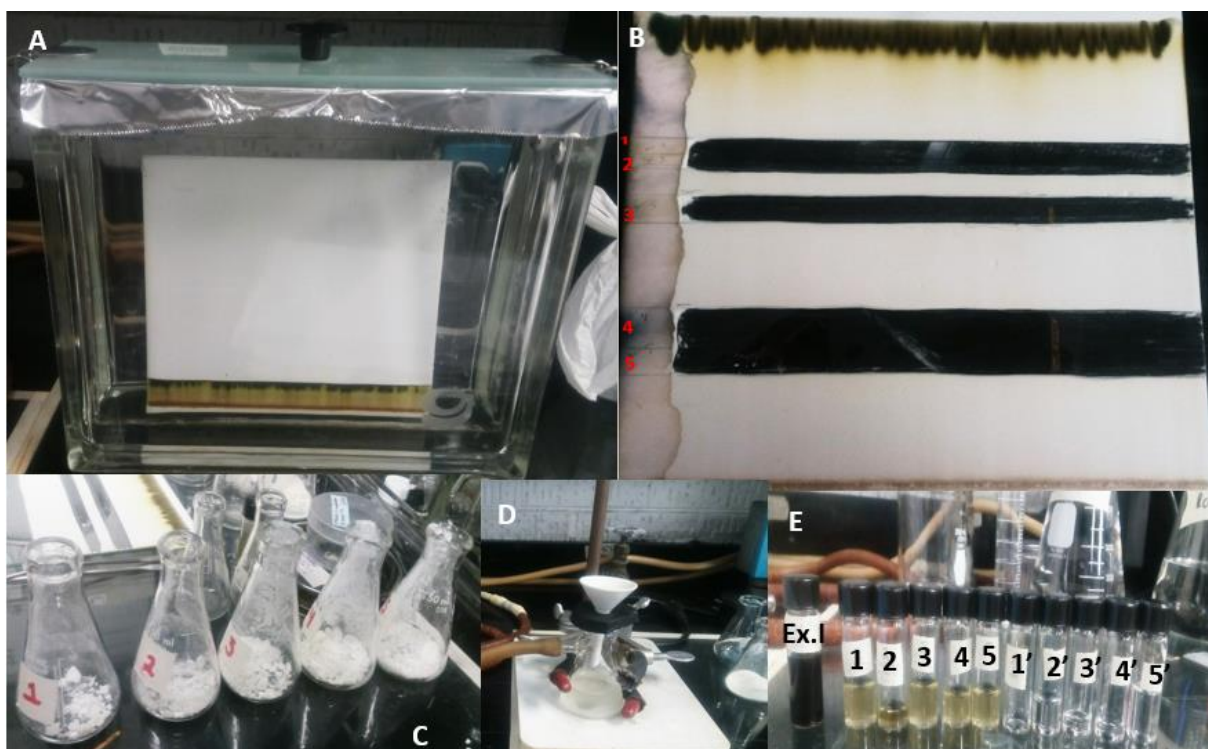


Figura 19. Aislamiento de fracciones en placa preparativa. **A.** Placa preparativa en cámara; **B.** Aislamiento de cinco fracciones; **C.** Matraces con las fracciones aisladas; **D.** Filtración de fracciones; **E.** Viales con fracciones (1-5 diclorometano-metanol y 1'-5' acetato de etilo).

8. Ensayo de identidad molecular

Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA genómico de 16 muestras correspondientes a nueve muestras de campo (tres por localidad), tres muestras de mercado y cuatro muestras de herbario de dos distintas especies del género *Loeselia* (cuadro 3).

De cada muestra se tomó tejido foliar joven, el cual se desecó en silica gel y se almacenó hasta su extracción.

Cuadro 3. Descripción de las muestras de donde se extrajo DNA

	Abreviación	Descripción
Localidad 1 (Milpa Alta)	M1	Individuo 1. Lugar de colecta: Santa Ana, Tlacotenco. Delegación: Milpa Alta, Edo. de México. Fecha: 10-jun-16 Brisa Chávez # (FCME-160159)
	M3	Individuo 3. Lugar de colecta: Santa Ana, Tlacotenco. Delegación: Milpa Alta, Edo. De México. Fecha: 10-jun-16
	M4	Individuo 4. Lugar de colecta: Santa Ana, Tlacotenco. Delegación: Milpa Alta, Edo. de México. Fecha: 10-jun-16
Localidad 2 (Dentho, Hgo)	D2	Individuo 2. Lugar de colecta: Pueblo: Denthó, Municipio: Nopala de Villagrán, Edo. de Hidalgo. Fecha: 17-sep-16 Brisa Chávez # (FCME- 160161)
	D3	Individuo 3. Lugar de colecta: Pueblo: Denthó, Municipio: Nopala de Villagrán, Edo. de Hidalgo. Fecha: 17-sep-16 Brisa Chávez # (FCME-160158)
	D4	Individuo 4. Lugar de colecta: Pueblo: Denthó, Municipio: Nopala de Villagrán, Edo. de Hidalgo. Fecha: 17-sep-16
Localidad 3 (Escandón)	E1	Individuo 1. Lugar de colecta: San José “El Marqués”, Municipio: Chapantongo. Edo. De Hidalgo. Fecha: 16-oct-16 Brisa Chávez # (FCME-160157)
	E2	Individuo 2. Lugar de colecta: San José “El Marqués”, Municipio: Chapantongo. Edo. de Hidalgo. Fecha: 16-oct-16
	E3	-Individuo 3. Lugar de colecta: San José “El Marqués”, Municipio: Chapantongo. Edo. de Hidalgo. Fecha: 16-oct-16
Mercado	Loc-179	Local 179. Mercado de Sonora, Cd. de México. Fecha: 2-ago-17

	Loc-190	Local 190. Mercado de Sonora, Cd. de México. Fecha: 2-ago-17
	Loc-338	Local 338. Mercado de Sonora, Cd. de México. Fecha: 2-ago-17
Herbario IMSS	L.c-1	<i>Loeselia coerulea</i> , Puebla (Voucher 11576)
	L.c-2	<i>Loeselia coerulea</i> , Hidalgo (Voucher 5953)
	L.g-3	<i>Loeselia glandulosa</i> , Chiapas (Voucher 9812)
	L.g-4	<i>Loeselia glandulosa</i> , Chiapas (Voucher 9108)

Se utilizó kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Se partió en todos los casos, de 20 mg de tejido de cada muestra a estudiar y se dejó aproximadamente 24 horas dentro de un ultracongelador a -70°C. El material congelado se pulverizó utilizando el disruptor de tejidos TissuLyser (QIAGEN) a 50 oscilaciones por segundo durante dos minutos.

Se hicieron algunas modificaciones al protocolo sugerido por el fabricante para obtener una mayor concentración de DNA y pureza (Anexo), esto último se valoró a partir de una espectrofotometría con NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Amplificación de marcadores moleculares

Para este estudio se amplificaron cinco marcadores moleculares (cuadro 4):

Cuadro 4. Marcadores moleculares utilizados en el estudio

Orgánulos	Marcador	Ubicación	
Cloroplasto	<i>matK</i> (maturasa K)*	Región intragénica	<i>matK</i> -KIM 1R: 5'- ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3'
			<i>matK</i> -KIM 3F: 5'- CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3'
	<i>rbcL</i> (Subunidad mayor de RuBisCo)**	Región intragénica	<i>rbcLa</i> -F: 5'- ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3'
			<i>rbcLa</i> -R: 5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3
	<i>rpl32-trnL</i> (espaciador intergénico)***	Espaciador intergénico	<i>rpl32</i> -Vc: 5'- CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C-3'
			<i>trnL</i> -Vd: 5'- CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3'
	<i>trnH-psbA</i> (espaciador intergénico) ****	Espaciador intergénico	<i>trnH</i> -2: 5'- CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC-3'
			<i>psbA</i> -F: 5'- GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3'

Por otra parte todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 30 μL y se emplearon dos distintas Taq polimerasa KAPA y Promega. Las condiciones que se utilizaron para cada uno de los marcadores evaluados fueron las siguientes (cuadro 5 y 6):

Cuadro 5. Condiciones estandarizadas para cada marcador (Cristians *et al.*, 2018)

Marcador	Concentración []	Buffer KCl	MgCl ₂	dNTP's	Oligo Fw (F8- N)	Oligo Rv (R13- N)	Taq Polim.	DNA
<i>matK</i>	Final	1x	1.5 mM	0.2 mM	0.1 μM	0.1 μM	0.625 u/ μL	10 ng/ μL
<i>rbcL</i>	Final	1x	1 mM	0.2 mM	0.1 μM	0.1 μM	0.625 u/ μL	10 ng/ μL
<i>rpl32-trnL</i>	Final	1x	1.5 mM	0.4 mM	0.25 μM	0.25 μM	1 u/ μL	10 ng/ μL
<i>trnH-psbA</i>	Final	1x	0.66 mM	0.4 mM	0.25 μM	0.25 μM	1 u/ μL	10 ng/ μL
<i>ITS2</i>	Final	1x	1.5 mM	0.2 mM	0.1 μM	0.1 μM	0.625 u/ μL	10 ng/ μL

Cuadro 6. Condiciones de temperatura para la PCR de los marcadores moleculares

	<i>matK y rbcL</i>		<i>rpl32-trnL</i>		<i>trnH-psbA</i>		<i>ITS2</i>	
	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2 min	95	2 min	94	2 min	95	5 min
Desnaturalización	94	30 seg	94	1 min	94	30 seg	94	30 seg
Alineamiento	52	40 seg	53	1 min	55	40 seg	56	30 seg
Extensión	72	40 seg	72	2 min	72	40 seg	72	45 seg
Extensión final	72	5 min	72	10 min	72	5 min	72	1 min

Los amplicones se mandaron secuenciar al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM; con la asistencia técnica de la M. en C. Laura Márquez.

Análisis bioinformático y determinación de la capacidad discriminativa

Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron para generar la secuencia consenso para cada uno de los productos de amplificación; la edición y curado se realizó con programas de edición especializados tales como DNADynamo (Versión 1.554 Blue Tractor Software) y Sequencher 5-4-6 (Gene Codes Corporation). La verificación de las secuencias obtenidas se realizó mediante la comparación de la base de datos GenBank (NCBI) a través de la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para evaluar la capacidad discriminativa de los marcadores se compararon contra las secuencias depositadas en el GenBank para los mismos marcadores amplificados pero de distintas especies e incluso géneros distintos a *Loeselia*, con las que se realizaron árboles filogenéticos usando el algoritmo de máxima verosimilitud con el software MEGA (Tamura *et al.*, 2013). También se realizó un análisis de distancia del código de barras (barcoding gap) con el programa ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) para ver si existe una separación significativa entre las distancias intra- e interespecíficas que permita reconocer a los taxa evaluados.

Construcción del código de barra molecular

Con la finalidad de incrementar el nivel de discriminación de cada marcador evaluado por separado se generó una sola secuencia concatenada, la cual será considerada como código de barras molecular que permita la identificación inequívoca de la especie de estudio *L. mexicana*.

RESULTADOS

Depósito de ejemplares en herbario

A partir de las colectas de campo, se hizo el depósito de cuatro individuos de las localidades Milpa Alta, Denthó y Escandón en el Herbario de FCME. A continuación se muestran los ejemplares de herbario depositados:

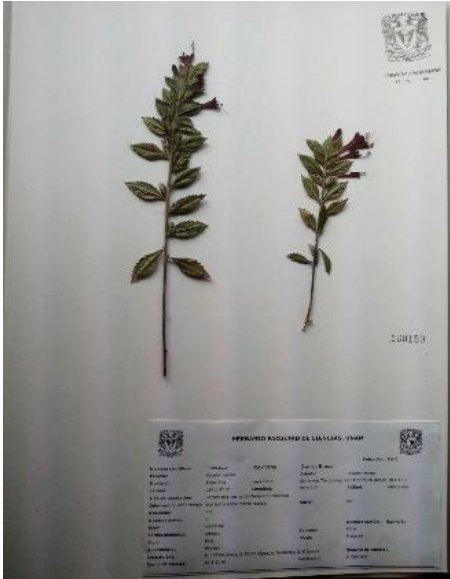


Figura 21. Ejemplar de Herbario de *L. mexicana*. Milpa Alta # de voucher: 160159



Figura 22. Ejemplar de Herbario de *L. mexicana*. Denthó # de voucher: 160161

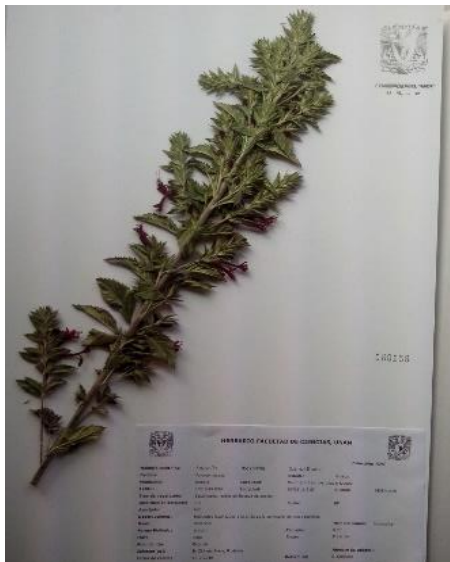


Figura 23. Ejemplar de Herbario de *L. mexicana*. Denthó # de voucher: 160158



Figura 24. Ejemplar de Herbario de *L. mexicana*. Escandón # de voucher: 160157

Mapa de distribución actual y potencial de *L. mexicana*

En el mapa de distribución actual de *L. mexicana* cada punto rojo representa a un ejemplar registrado en alguno de los tres herbarios consultados: MEXU, IMSSM y FCME (Figura 25).

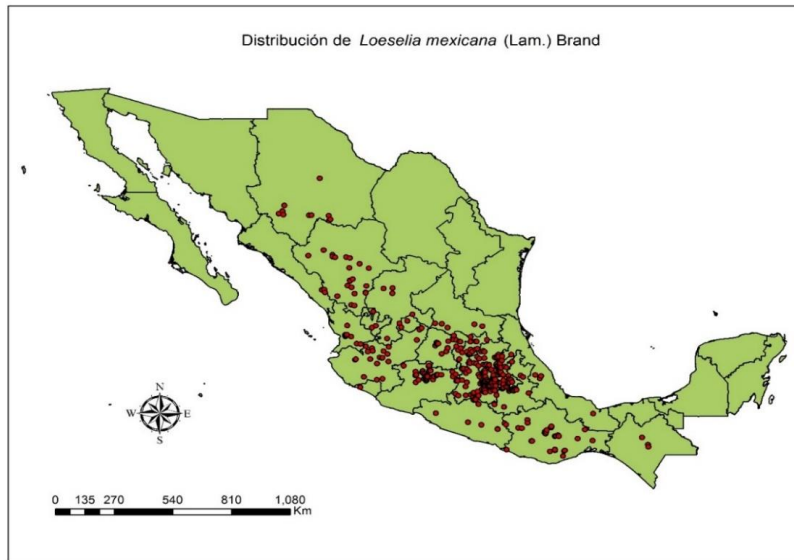


Figura 25. Mapa de distribución actual de *L. mexicana* en la República Mexicana con base en los ejemplares registrados en los herbarios visitados.

Aplicando el algoritmo *Maxent* se proporciona la probabilidad de distribución en el territorio mexicano basado en las características climatológicas y físicas de los puntos en los cuales potencialmente se encuentra distribuida la planta de estudio. Las áreas con coloración rojiza indican mayor probabilidad de encontrar distribuida a *L. mexicana*, mientras que las áreas en color azul representan una baja probabilidad (Figura 26).

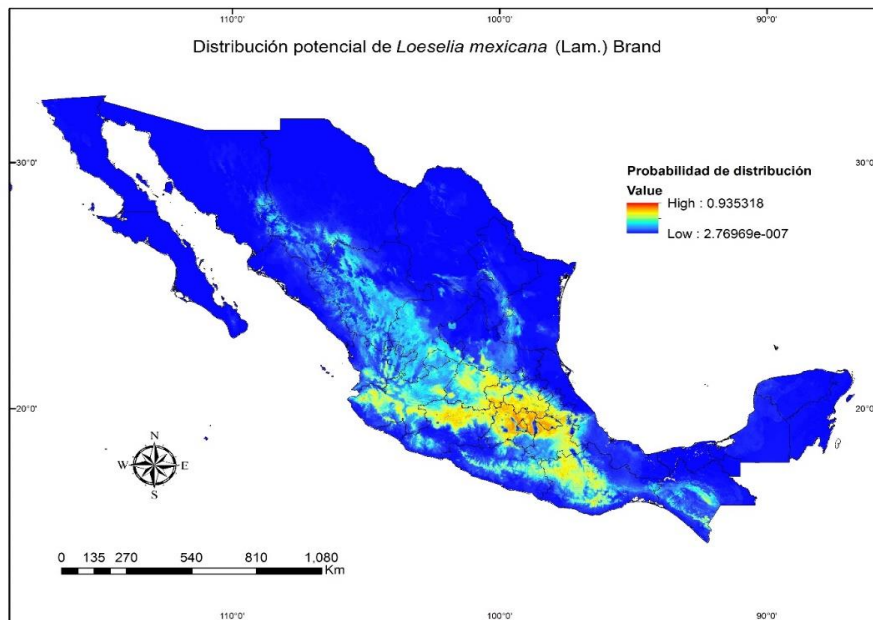


Figura 26. Modelo de distribución potencial de *L. mexicana*. En la escala de valores, el color rojo representa el valor con mayor probabilidad (0.935318) de encontrar a *L. mexicana* y en azul el valor con menor probabilidad (2.76969e-007).

El mapa de presencia y ausencia de *L. mexicana* en el territorio nacional se generó a partir del promedio de 10 modelos analizados por el algoritmo *Maxent*. En color rosa se muestran las zonas del país donde está presente la espinosilla; aquí se observa que esta especie abarca principalmente la zona del Eje Neovolcánico, parte de la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur.

Por otra parte, la variable que al parecer influye más en la distribución de esta especie es la capa BI04= Estacionalidad de temperatura, seguida de la capa BIO10=Temperatura media del trimestre más cálido.

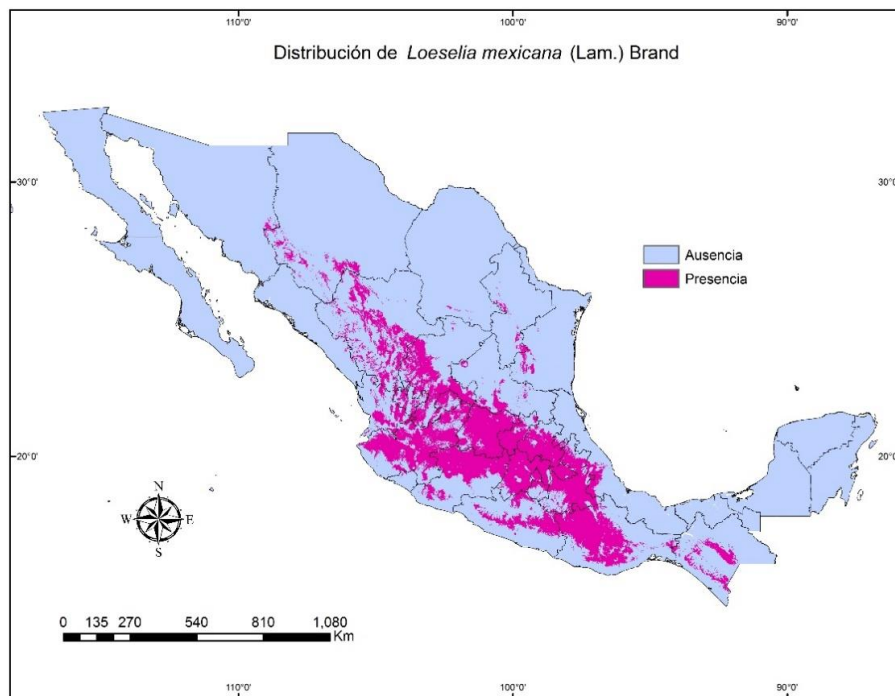


Figura 27. Mapa de distribución presencia (color rosa)/ausencia (color azul) de *L. mexicana*.

Resumen de datos obtenidos de herbarios

A partir de los datos recaudados de los tres herbarios, se obtuvo lo siguiente:

- De los 507 datos solo 51 presentan uso medicinal.
- Los usos medicinales que se le asocian son: control de coraje, enojo, bilis, problemas estomacales, problemas de piel, caída de cabello, gripa, infección de pies, baños después del parto, diarrea, dolor al orinar, susto, antipirético.
- El primer registro de esta planta es de 1885
- *Loeselia mexicana* se encuentra desde altitudes de 49 a 3027
- Los estados donde se ha encontrado presente son: Edo. de México, Michoacán, Veracruz, Nayarit, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Guanajuato, Durango, Guerrero, Oaxaca, Hidalgo, Chiapas, Jalisco, Ciudad de México, Chiapas, Colima. Sin embargo, donde más se han hecho registro de la especie son: Ciudad de México (62), Michoacán e Hidalgo (58) y en de menor registro es Aguascalientes (3).
- La vegetación en donde se ha colectado es Bosque de encino, matorral xerófilo, bosque de pino, vegetación secundaria, pastizal, selva caducifolia. Aunque la vegetación que predomina en su colecta es: bosque de encino o pino y matorral.
- Se encuentra generalmente todo el año y el pico de floración se observa en Noviembre (96), seguido del mes de octubre (94).

Propagación sexual

Ensayo de viabilidad por germinación

Los porcentajes obtenidos fueron los siguientes (Figuras 28 y 29):

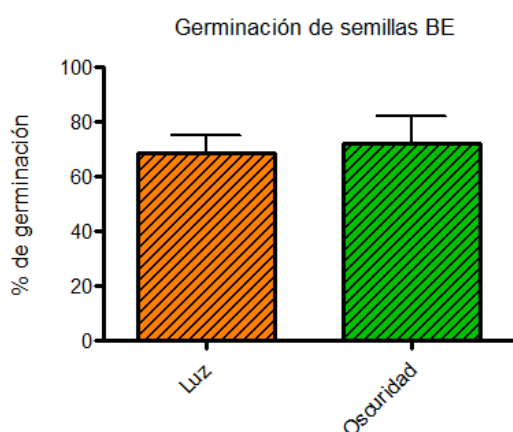


Figura 28. Porcentaje de germinación de semillas en Buen Estado (BE) de *L. mexicana* en condiciones de luz (n=68) y oscuridad (n=50). Prueba de t y prueba post hoc Mann Whitney, p=0.8653.

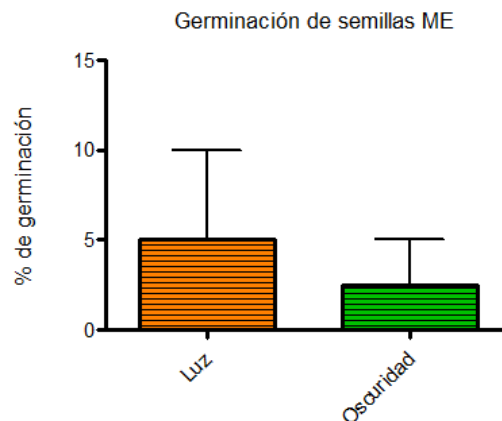


Figura 29. Porcentaje de germinación de semillas en Mal Estado (ME) de *L. mexicana* en condiciones de luz y oscuridad. Prueba de t y prueba post hoc Mann Whitney, p=1.000.

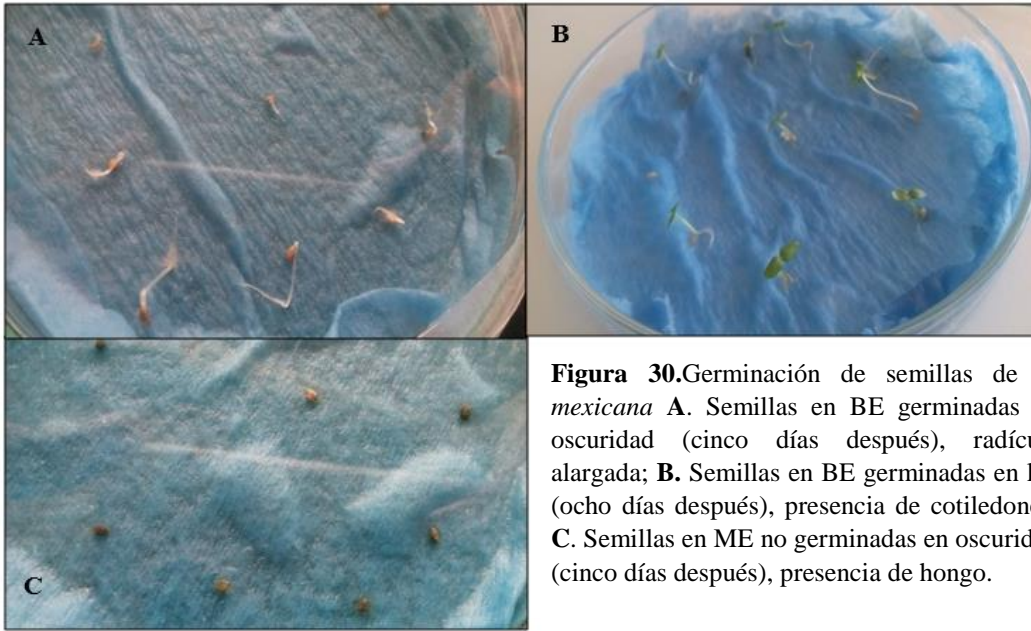


Figura 30. Germinación de semillas de *L. mexicana* **A.** Semillas en BE germinadas en oscuridad (cinco días después), radícula alargada; **B.** Semillas en BE germinadas en luz (ocho días después), presencia de cotiledones; **C.** Semillas en ME no germinadas en oscuridad (cinco días después), presencia de hongo.

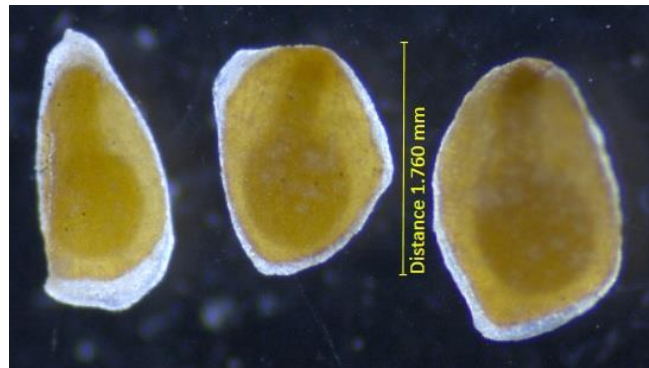


Figura 31. Semillas de *L. mexicana* observadas en estereomicroscopio

Ensayo de viabilidad por cloruro de tetrazolio

Las semillas de *L. mexicana* presentaron un porcentaje de viabilidad del 75% (Figura 32). El germoplasma analizado proviene de las plantas propagadas por estaca dentro del invernadero.



Figura 32. Viabilidad de semillas de *L. mexicana* **A.** Semillas viables (teñidas de rojo completamente); **B.** Corte de semilla, embrión teñido de rojo. Observación en microscopio de disección.

Siembra en sustrato

Se observó la emergencia de cotiledones (germinación epigea) sobre el sustrato en un lapso de 11 a 25 días después de sembrarlas (Figura 34), el porcentaje de emergencia de cotiledones fue del 71% (Figura 33).

% de emergencia de cotiledones a partir de siembra directa

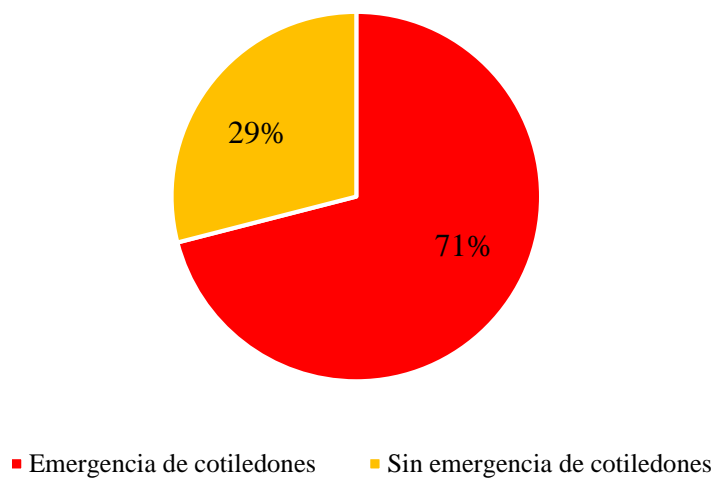


Figura 33. Porcentaje de emergencia de cotiledones a partir de siembra directa. n=99

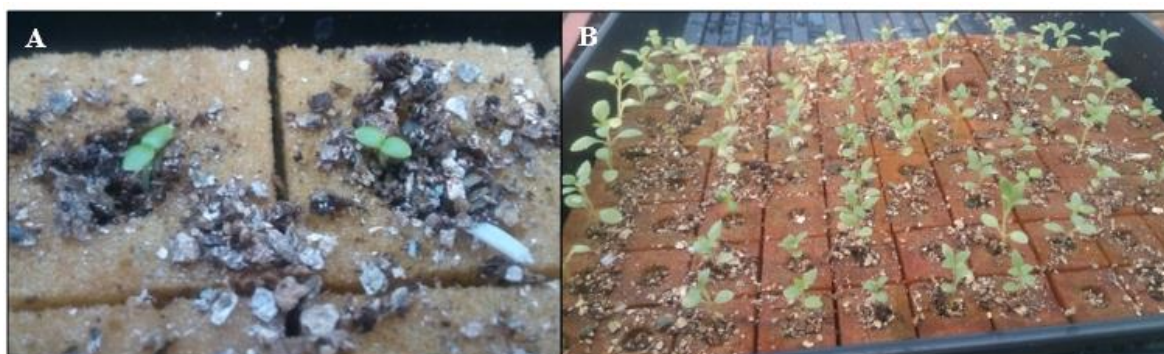


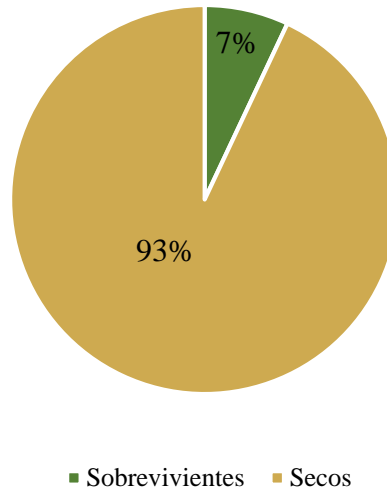
Figura 34. Emergencia de cotiledones de espinosilla **A.** Cotiledones de *L. mexicana*; **B.** Desarrollo de 71 plántulas en espuma fenólica

Trasplante

El 93% de las plántulas trasplantadas no sobrevivió (Figura 35).

Figura 35. Porcentaje de plántulas sobrevivientes. n= 99 plántulas

% de plántulas sobrevivientes



Con las semillas de plantas obtenidas vegetativamente se hizo una prueba de siembra al voleo; estas se sembraron el mes de abril-mayo; la emergencia de sus cotiledones se observó en seis días y el ciclo fenológico fue similar al obtenido con las estacas: seis meses después de su siembra se obtuvo floración y fructificación (octubre-noviembre) (Figura 36).

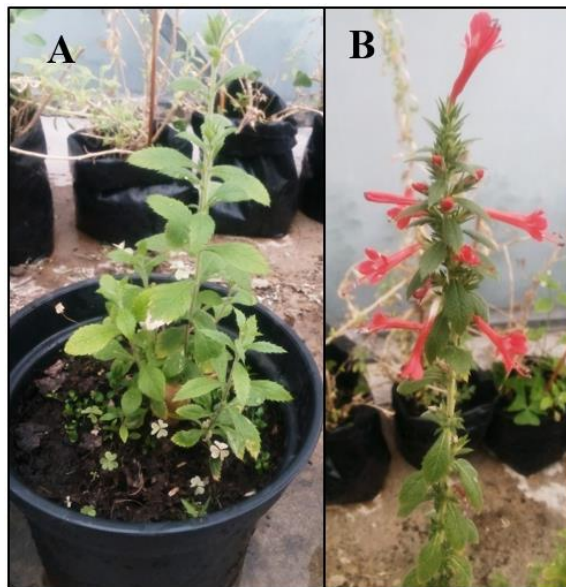


Figura 36. Plantas obtenidas por siembra al voleo **A.** Paso a la etapa vegetativa; **B.** Floración de plantas obtenidas por siembra al voleo

Propagación asexual Enraizamiento

Los distintos sustratos evaluados no tuvieron diferencias significativas ($P= 0.4423$) en el desarrollo de raíz de las estacas (Figura 37).

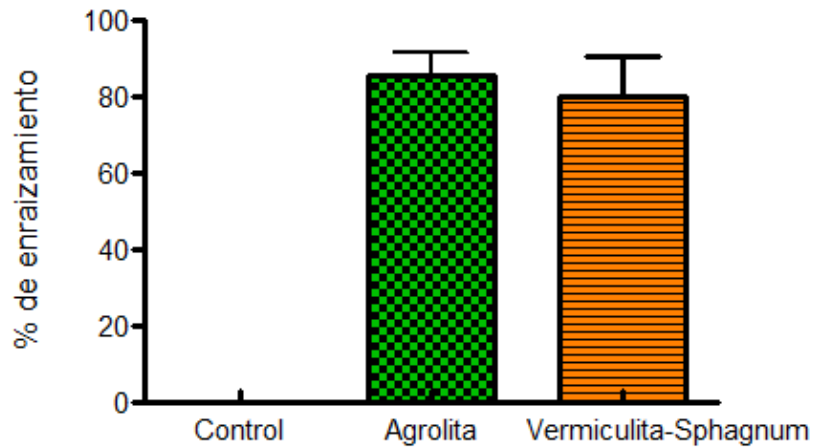


Figura 37. Porcentaje del enraizado de estacas usando diferentes sustratos (Agrolita $n=50$ y Vermiculita+ *Sphagnum* $n=43$ y control $n=10$); evaluado aproximadamente dos meses después. Prueba de t y prueba post hoc Mann Whitney ($p=0.4423$).

Sin embargo, de manera cualitativa se observó que la raíz generada en agrolita era más gruesa y abundante (Figura 38).



Figura 38. Enraizamiento en ambos sustratos **A.** Enraizamiento del individuo en sustrato Agrolita (aprox. mes y medio); **B.** Enraizamiento de un individuo en sustrato Vermiculita+*Sphagnum* (Aprox. mes y medio); **C.** Individuo de 53 cm (2 meses después); **D.** Individuo de 49 cm (2 meses después)

En esta prueba no se presentó diferencias significativas ($P= 0.5998$), ya que el empleo de Radix a una concentración de 1 500 ppm obtuvo un porcentaje de enraizamiento de $82.73 \pm 5.89 \%$, mientras que con una concentración de 10 000 ppm el porcentaje fue $64.44 \pm 24.44 \%$ (Figura 39).

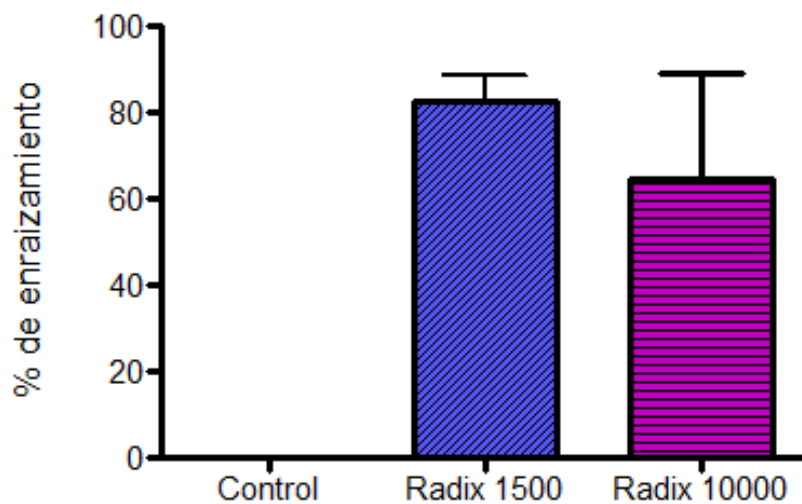


Figura 39. Porcentaje de enraizamiento a partir de distintas concentraciones de enraizador (1 500 ppm $n=79$ y 10 000 ppm $n=14$ Control $n=10$); evaluado aproximadamente durante dos meses. Se indica el error estándar en cada medición. Prueba de t, $p=0.5998$.

Crecimiento de estacas

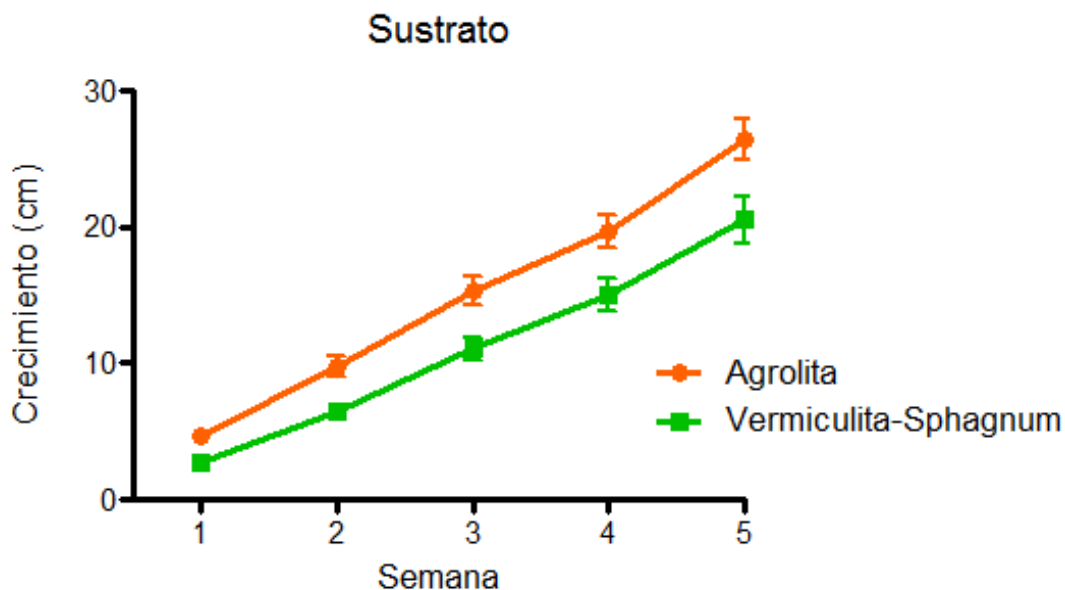


Figura 40. Altura de plantas después de enraizar en distintos sustratos (Agrolita $n=39$ y Vermiculita+Sphagnum $n=32$); evaluado en cinco semanas después de su trasplante. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

Experimento de aclimatación

Se observó que las plantas colocados fuera del invernadero sufrieron estrés abiótico y biótico; sus tallos se tornaron morados por el exceso de agua, sus hojas fueron atacadas por organismos e incluso algunos individuos murieron (Figura 41).

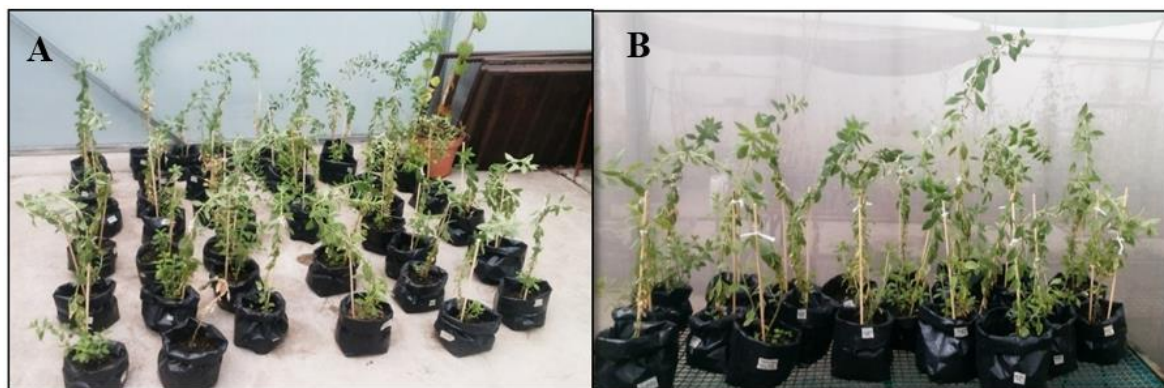


Figura 41. Experimento previo a la floración. **A.** Plantas dentro del Invernadero; **B.** Plantas fuera del invernadero

Ciclo fenológico

Se registró el desarrollo de las plantas propagadas asexualmente, permitiendo documentar el ciclo fenológico de *L. mexicana* (Cuadro 7):

Etapa	Tiempo (días)
Enraizamiento	49
Transición etapa vegetativa-reproductiva	52
Botón	2-5
Flor	7-10
Fruto	7
Semilla madura	60

Cuadro 7. Duración de cada etapa del ciclo fenológico de *L. mexicana*

El ciclo fenológico de *Loeselia mexicana* registrado a partir de la propagación vegetativa tiene una duración de aproximadamente 183 días (aprox. seis meses) (Fig. 42).

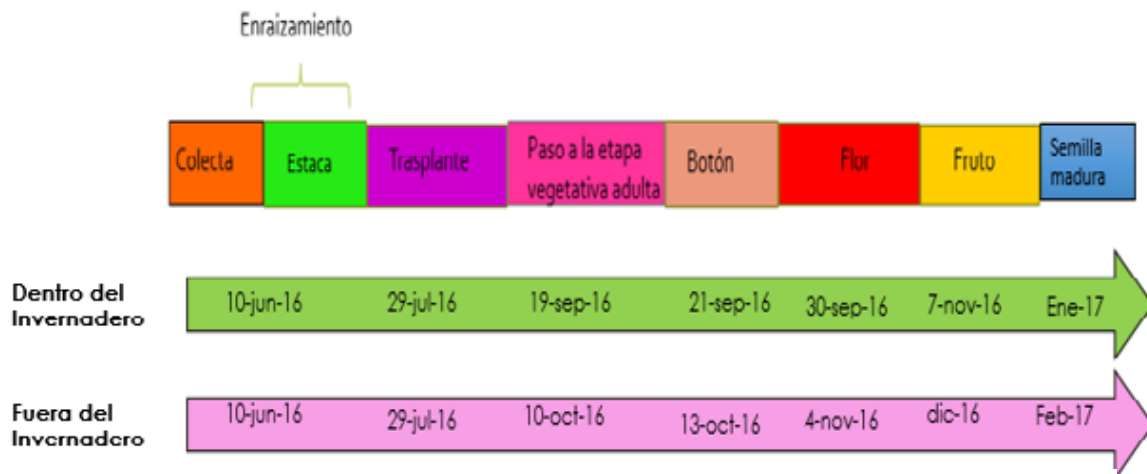


Figura 42. Ciclo fenológico de *L. mexicana* en condiciones diferentes (dentro y fuera de invernadero)

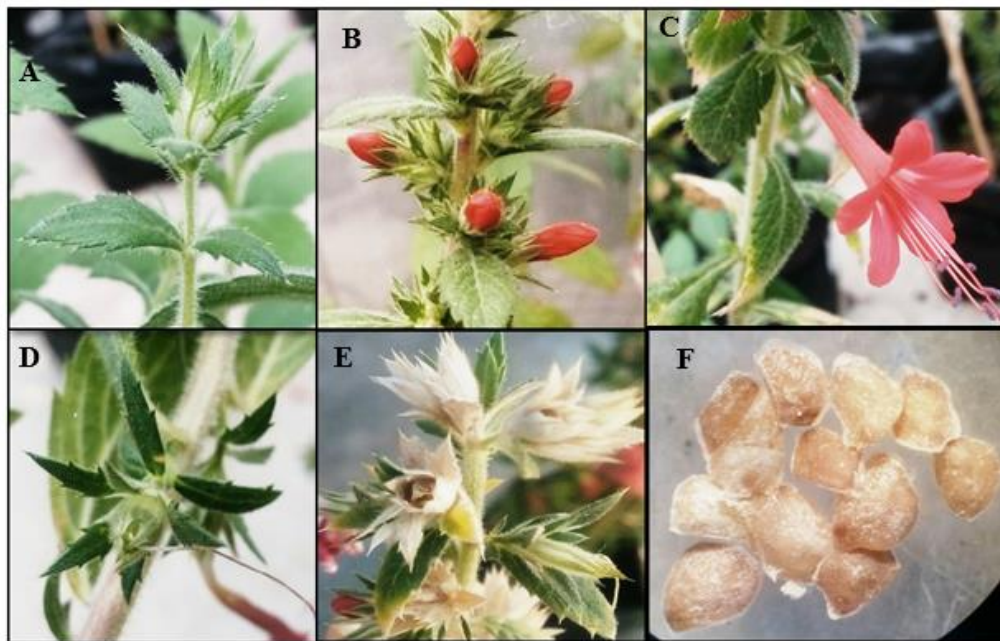


Figura 43. Seguimiento del ciclo fenológico de un individuo del tratamiento en agrolita y dentro del invernadero. **A.** Paso a la etapa vegetativa adulta; **B.** Botón; **C.** Flor; **D.** Fruto; **E.** Fruto seco; **F.** Semillas maduras y en BE

Las plantas desarrolladas dentro del invernadero fueron más favorecidas que las plantas de afuera, reduciendo el tiempo para florecer y fructificar (Figura 44).

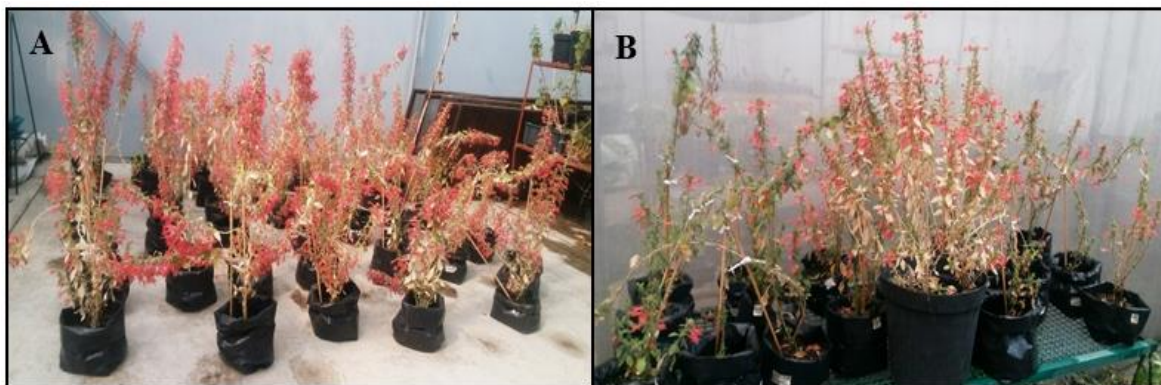


Figura 44. Floración **A.** Floración dentro del invernadero (octubre-noviembre); **B.** Floración fuera del invernadero (noviembre-diciembre)

Identidad química

Extracto orgánico

Los porcentajes de rendimiento fueron los siguientes (Cuadro 8):

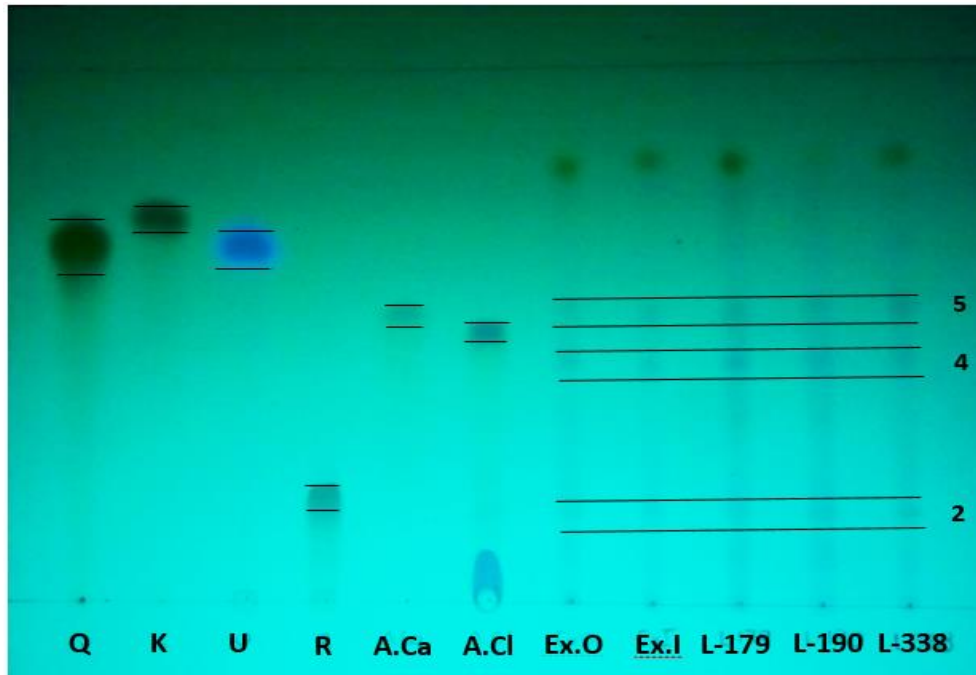
Cuadro 8. Rendimiento del material vegetal. *Método de extracción exhaustivo.

Material vegetal	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Recolecta de campo*	0.319	3.96
Local-179	0.238	2.96
Local-190	0.188	2.33
Local-338	0.195	2.42
Invernadero	0.205	2.54

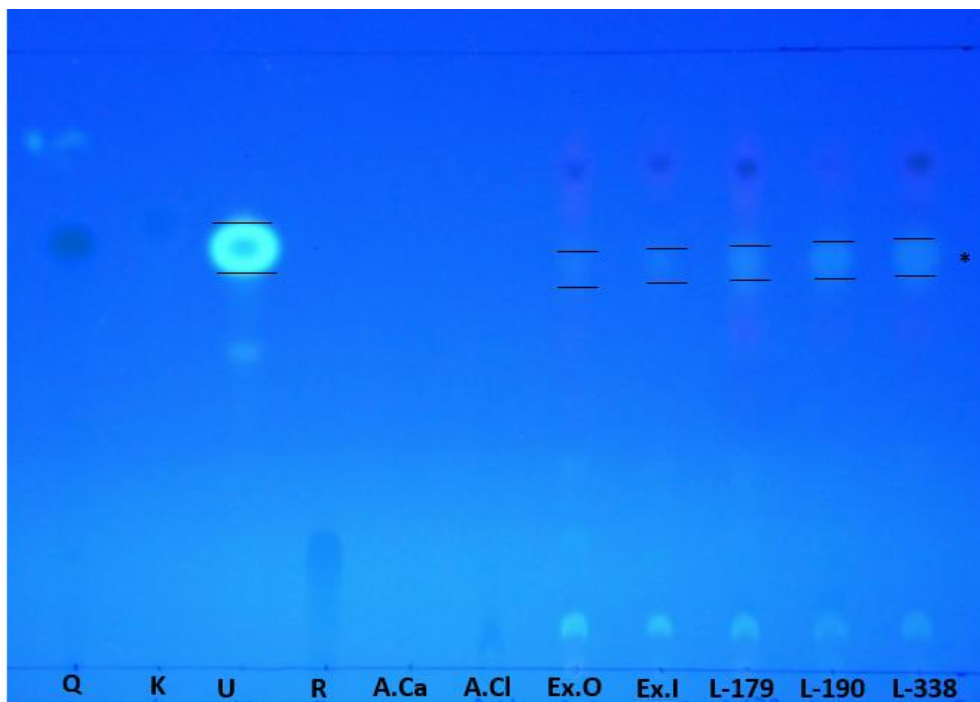
CCD

A continuación se muestran las cromatoplasmas resultantes de los análisis de las muestras comparadas con los estándares 1%

(A)



(B)



(C)

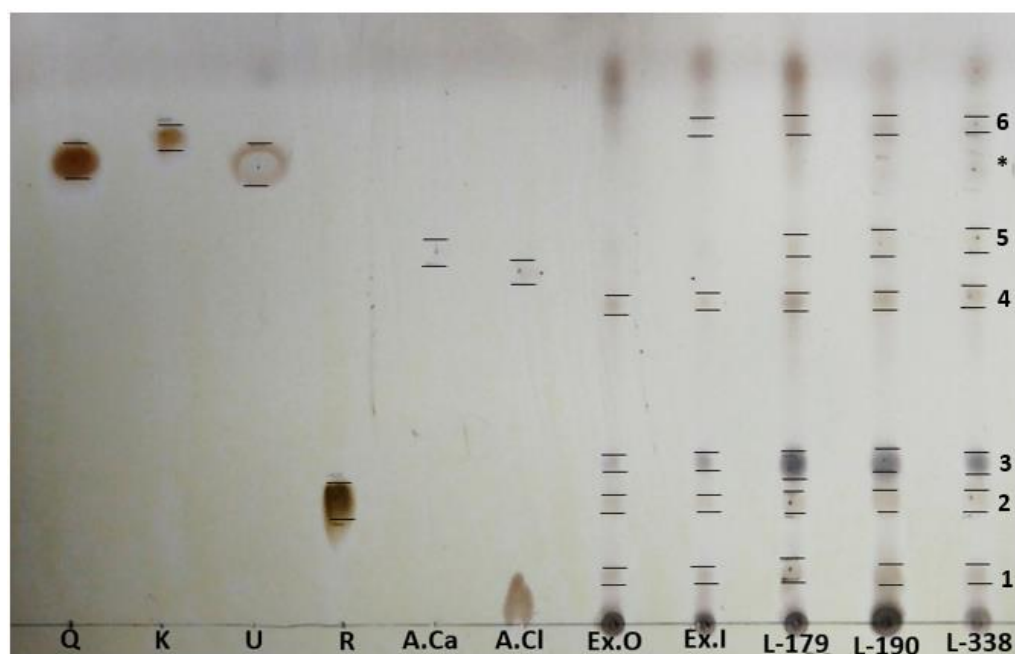


Figura 45. Cromatografía en capa delgada del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. mexicana* visualizado con Luz UV 254 nm (A) y Luz UV 390 nm (B); revelada con sulfato cérico amoniacal (C). De izquierda a derecha: **Q**= quercetina; **K**= kaempferol; **U**= umbelliferona; **R**= rutina; **A. Ca**= ácido cafeico; **A.Cl**= ácido clorogénico; **Ex.O**= extracto orgánico (recolecta de campo); **Ex. I**= extracto orgánico (Invernadero); **L-179**= extracto orgánico (Mercado de Sonora, Local 179); **L-190**= extracto orgánico (Mercado de Sonora, Local 190); **L-338**= extracto orgánico (Mercado de Sonora, Local 338).

Los valores de R_f fueron los siguientes (cuadro 9):

Cuadro 9. R_f de marcadores estándares y extractos orgánicos

R_f de los estándares	
Rutina	0.18
Ácido clorogénico	0.52
Ácido cafeico	0.54
Umbelliferona	0.68
Quercetina	0.69
Kaempferol	0.73*

R_f de los compuestos presentes en los extractos	
1	0.08
2	0.17
3	0.24
4	0.48
5	0.56
6	0.73*

Análisis de las fracciones aisladas

Se aislaron cinco fracciones de interés en la placa preparativa, se hizo una CCD de cada una de ellas (Fig. 46):

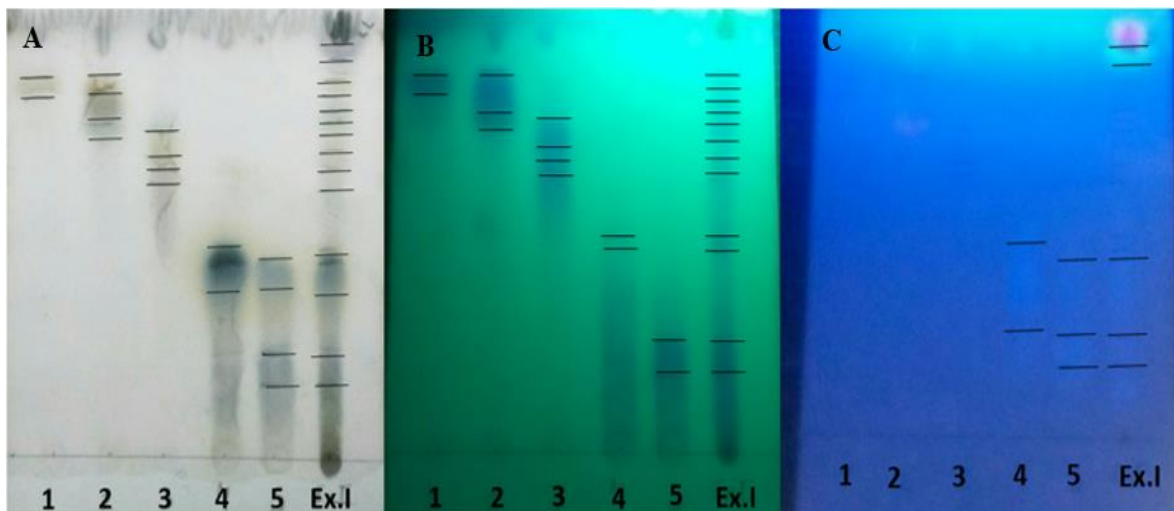


Figura 46. Cromatografía en Capa Delgada del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. mexicana* visualizado con Luz UV 254 nm (B) y Luz UV 390 nm (C); CCD revelada con anisaldehído(A). De izquierda a derecha: Fracciones uno, dos, tres, cuatro y cinco, **Ex. I**= extracto orgánico (Invernadero)

Posteriormente se enviaron a Resonancia Magnética Nuclear (RMN) donde se generaron algunos espectros. Sin embargo, el que arrojó más de una señal fue la fracción I (Fig. 47).

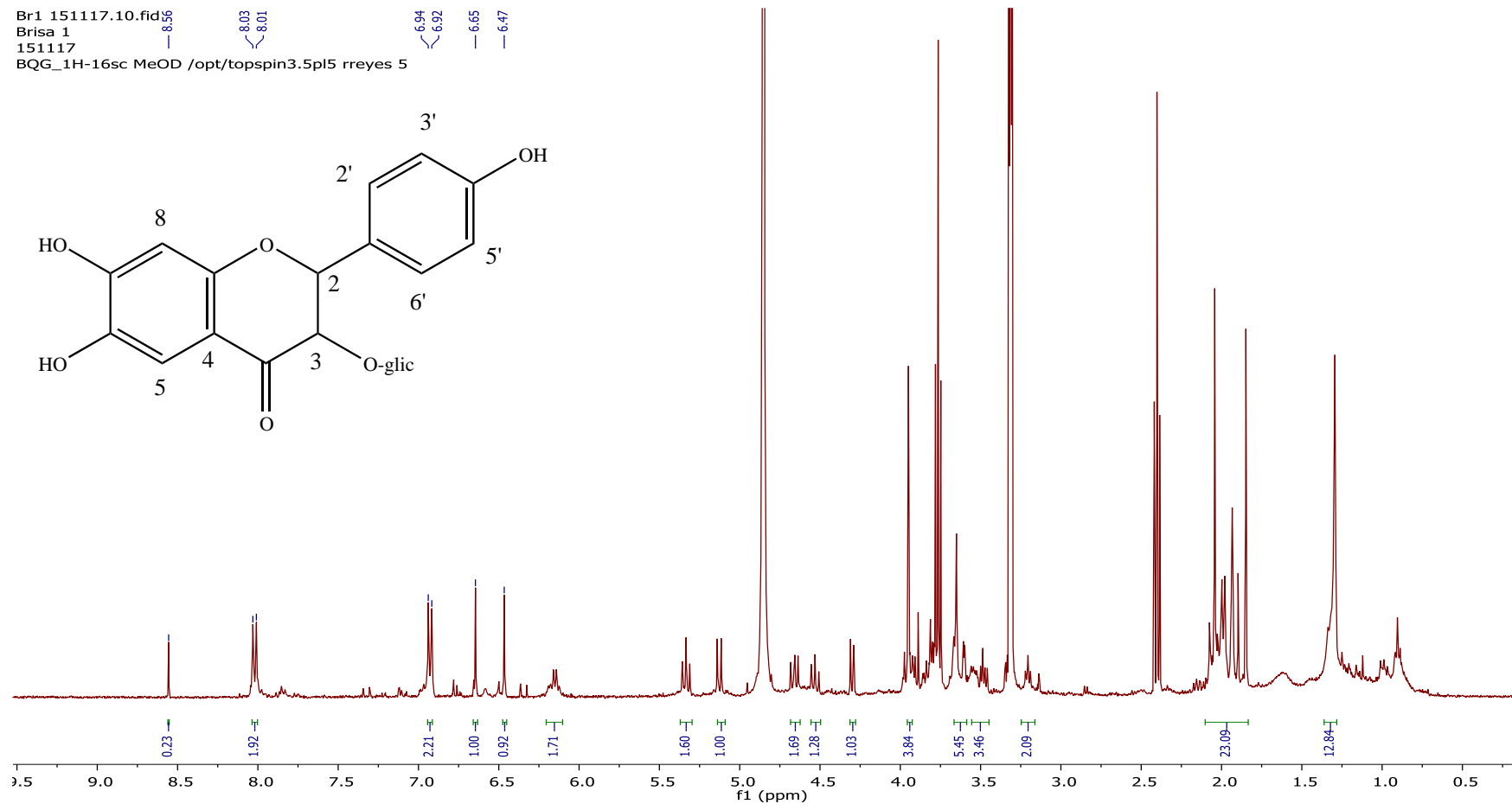


Figura 47. Espectro de la fracción I, flavonoide glicosilado.

Identidad molecular

Extracción de DNA

Las 16 muestras de *L. mexicana* evaluadas se cuantificaron con espectrofotometría (NanoDrop) presentando los siguientes resultados (Cuadro 10):

Cuadro 10. Resultados a partir de la cuantificación espectrofotométrica con NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)

Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280 Cociente de contaminación	260/230 Cociente de pureza
M1	7.8	2.39	2.84
M3	22.0	1.88	2.63
M4	6.1	2.16	-2.83
D2	117.6	1.21	0.76
D3	8.9	1.98	1.36
D4	1.9	2.92	-4.85
E1	79.3	1.50	0.51
E2	2.2	3.07	-0.17
E3	2.8	1.21	0.76
Local 179	9.6	1.83	0.45
Local 190	11.7	1.58	0.42
Local 338	13.2	1.91	0.49
<i>L. coerulea</i> -1	7.5	1.65	0.42
<i>L. coerulea</i> -2	23.4	1.37	0.79
<i>L. glandulosa</i> -3	16.7	1.66	1.48
<i>L. glandulosa</i> -4	22	1.63	1

Amplificación de marcadores

A continuación se muestran las amplificaciones correspondientes de cada marcador que se utilizó en las muestras de campo:

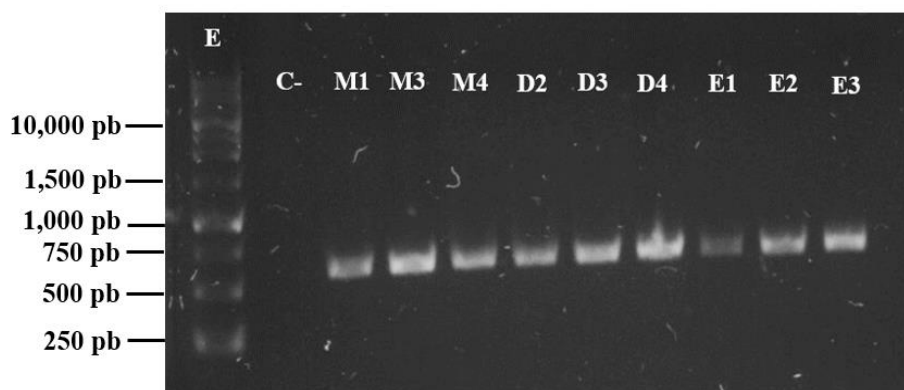


Figura 48. Gel de agarosa (1%) con los productos amplificados de la PCR para el gen *rbcL* del DNA de *L. mexicana* de tres localidades diferentes: Milpa Alta *M1*, *M3* y *M4*; Denthó, Edo. de Hidalgo *D2*, *D3* y *D4*; San José “El Marqués”, Edo. de Hidalgo *E1*, *E2* y *E3*.

Tamaño aproximado: 500-700 pb.

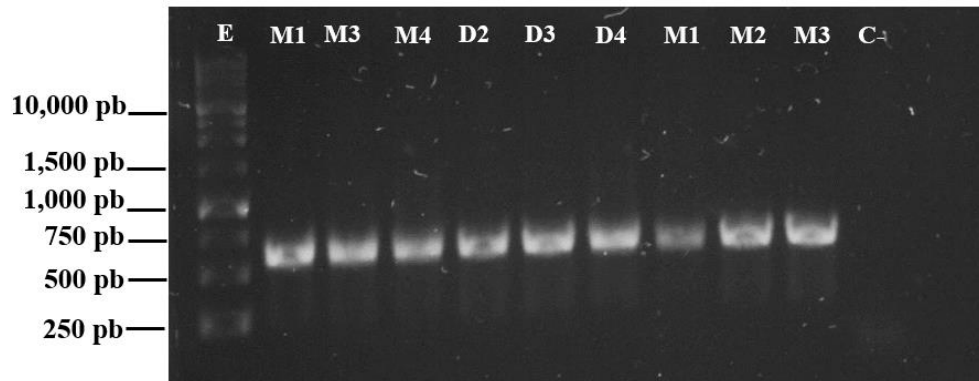


Figura 49. Gel de agarosa (1%) con los productos amplificados de la PCR para el gen *rpl32-trnL* del DNA de *L. mexicana* de tres localidades diferentes: Milpa Alta *M1*, *M3* y *M4*; Denthó, Edo. de Hidalgo *D2*, *D3* y *D4*; San José “El Marqués”, Edo. de Hidalgo *E1*, *E2* y *E3*.

Tamaño aproximado: 500-750 pb.

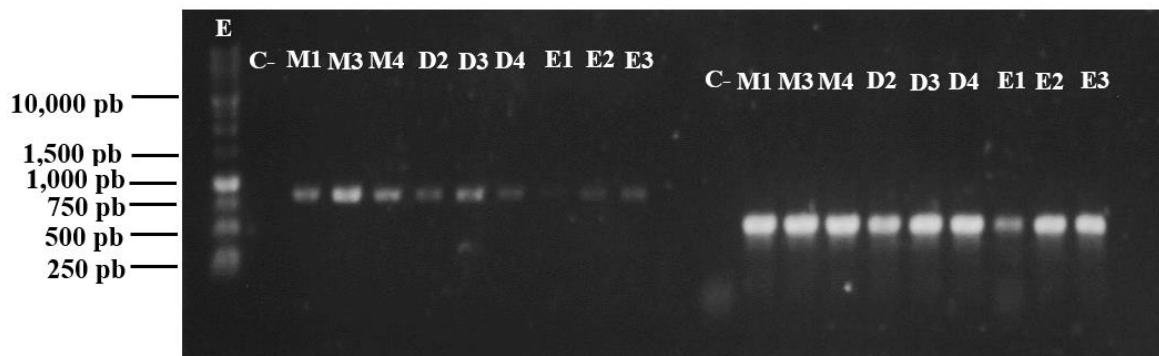


Figura 50. Gel de agarosa (1%) con los productos amplificados de la PCR para el gen *matK* del DNA de *L. mexicana* de tres localidades diferentes: Milpa Alta *M1*, *M3* y *M4*; Denthó, Edo. de Hidalgo *D2*, *D3* y *D4*; San José “El Marqués”, Edo. de Hidalgo *E1*, *E2* y *E3*.

Tamaño aproximado: 750-1000 pb.

Figura 51. Gel de agarosa (1%) con los productos amplificados de la PCR para el gen *trnH-psbA* del DNA de *L. mexicana* de tres localidades diferentes: Milpa Alta *M1*, *M3* y *M4*; Denthó, Edo. de Hidalgo *D2*, *D3* y *D4*; San José “El Marqués”, Edo. de Hidalgo *E1*, *E2* y *E3*.

Tamaño aproximado: 500 pb.

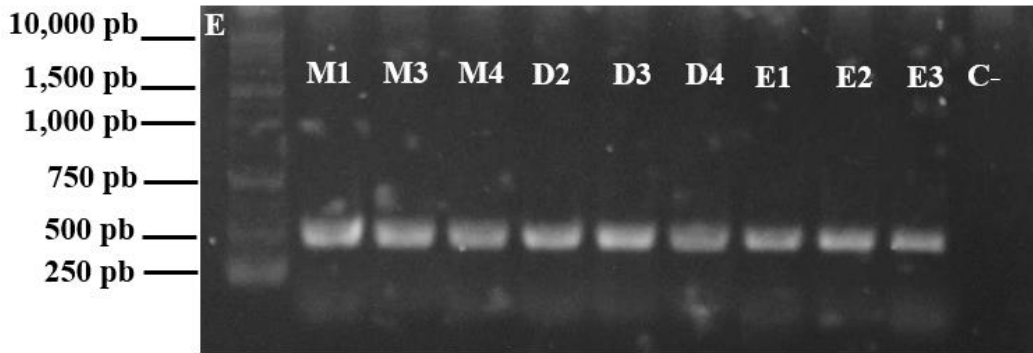


Figura 52. Gel de agarosa (1%) con los productos amplificados de la PCR para el gen *ITS2* del DNA de *L. mexicana* de tres localidades diferentes: Milpa Alta *M1*, *M3* y *M4*; Denthó, Edo. de Hidalgo *D2*, *D3* y *D4*; San José “El Marqués”, Edo. de Hidalgo *E1*, *E2* y *E3*. Tamaño aproximado: 500 pb.

Evaluación de capacidad discriminativa

Análisis filogenético y Barcoding gap

Se analizó la capacidad discriminativa de cada marcador a través de dos tipos de análisis distintos. 1) A través de una aproximación filogenética utilizando un análisis de Máxima verosimilitud, utilizando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), donde se calculó el mejor modelo estadístico de ajuste para cada marcador y 2) Un análisis de distancias, en los cuales se valoró la diferencia entre las distancias interespecífica e intraespecífica, también llamado barcoding gap; mismo que se realizó utilizando el programa Automatic Barcoding Gap Discovery (ABDG) (Puillandre *et al.*, 2012). Los resultados son los siguientes:

matK



Figura 53. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de *matK* de *L. mexicana* (Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4) y otras especies del género *Loeselia*. Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: T92 (Tamura 3-parámetros).

Barcoding gap:

Grupos	Especies
1	<i>Loeselia involucrata</i> , <i>Loeselia glandulosa</i> y <i>Loeselia coerulea</i>
2	<i>Loeselia mexicana</i> -M4, <i>Loeselia mexicana</i> -M3, <i>Loeselia mexicana</i> -M1, <i>Loeselia mexicana</i> -E2, <i>Loeselia mexicana</i> -E1, <i>Loeselia mexicana</i> -D4, <i>Loeselia mexicana</i> -D3 y <i>Loeselia mexicana</i> -D2

Valor de P=1.00^{e-01}

rbcL

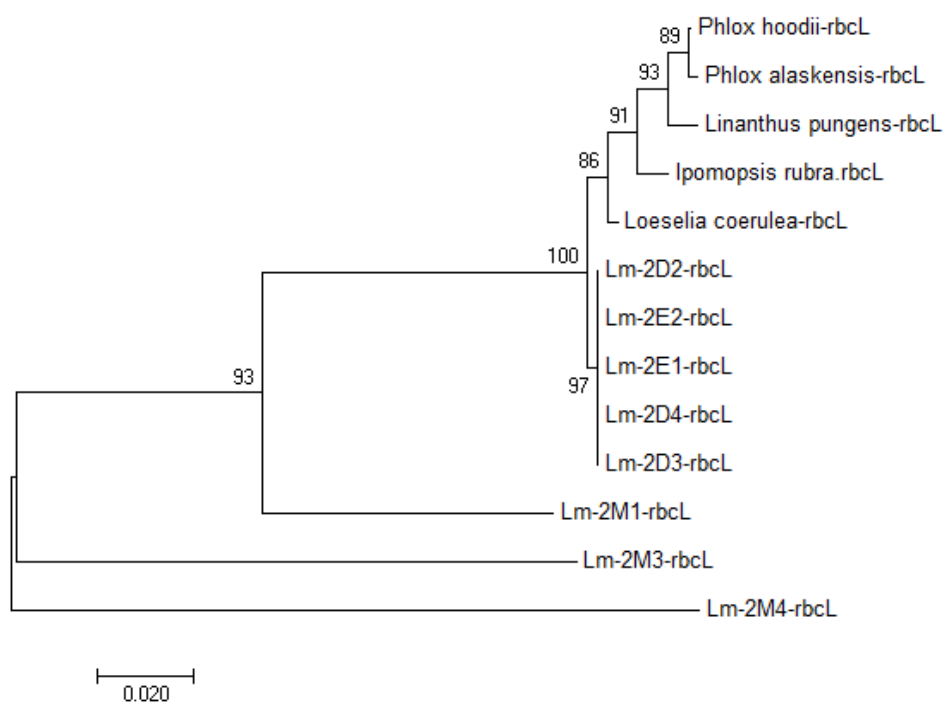


Figura 54. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de *rbcL* de *Loeselia mexicana* (Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4) y otros géneros de la familia Polemoniaceae. Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: JC (Jukes-Cantor).

Barcoding gap:

Grupo	Especies
1	<i>Phlox hoodii</i> y <i>Phlox alaskensis</i>
2	<i>Ipomopsis rubra</i>
3	<i>Loeselia coerulea</i>
4	<i>Linanthus pungens</i>
5	<i>Loeselia mexicana</i> -M4
6	<i>Loeselia mexicana</i> -M3
7	<i>Loeselia mexicana</i> -M1
8	<i>Loeselia mexicana</i> -E2, <i>Loeselia mexicana</i> -E1, <i>Loeselia mexicana</i> -D4, <i>Loeselia mexicana</i> -D3 y <i>Loeselia mexicana</i> -D2

Valor de P= 7.74×10^{-3}

rpl32-trnL

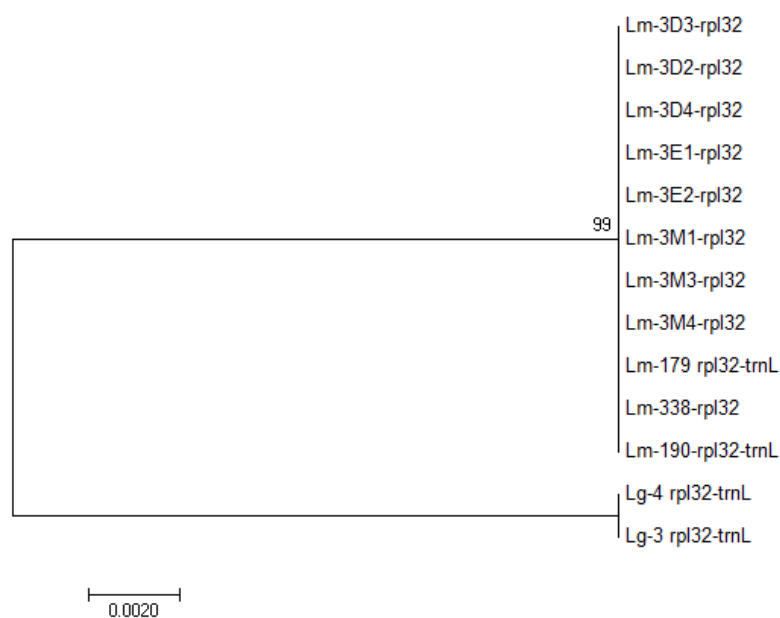


Figura 55. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de *rpl32-trnL* de *Loeselia mexicana* (Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4) y *L. glandulosa*. Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: T92 (Tamura 3-párametros).

Barcoding gap:

Grupo	Especies
1	<i>Loeselia glandulosa</i> -4 y <i>Loeselia glandulosa</i> -3
2	<i>Loeselia mexicana</i> -M4, <i>Loeselia mexicana</i> -M3, <i>Loeselia mexicana</i> -M1, <i>Loeselia mexicana</i> -E2, <i>Loeselia mexicana</i> -E1, <i>Loeselia mexicana</i> -D4, <i>Loeselia mexicana</i> -D3 y <i>Loeselia mexicana</i> -D2

Valor de P= 2.15×10^{-02}

trnH-psbA

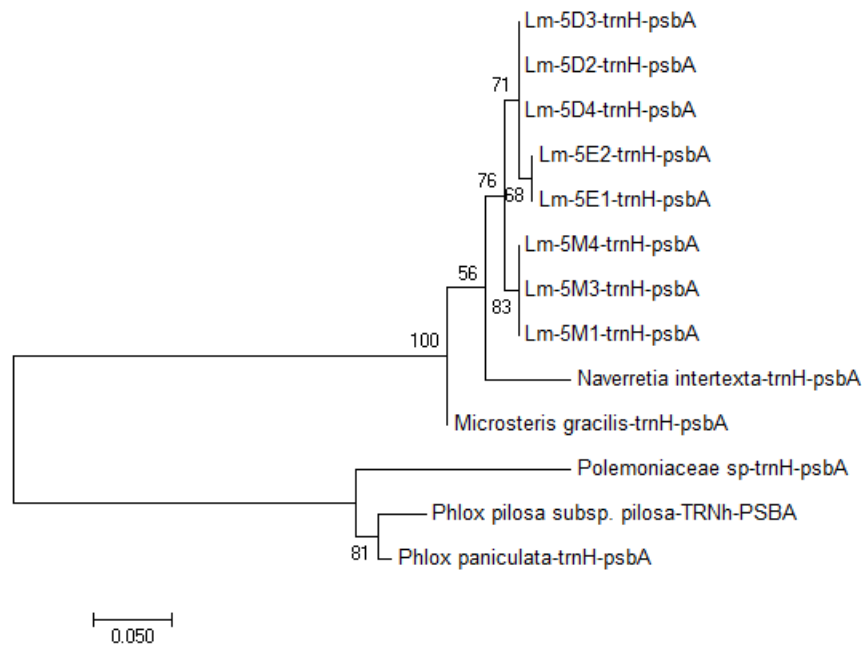


Figura 56. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de *Loeselia mexicana* (muestras de campo: Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4) y otros géneros de la familia Polemoniaceae (*Polemoniaceae* sp. y *Navarretia intertexta*) de *trnH-psbA*. Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: T92 (Tamura 3-parameter).

Barcoding gap

Grupo	Especies
1	<i>Polemoniaceae</i> sp
2	<i>Navarretia intertexta</i>
3	<i>Phlox pilosa</i> subs. <i>pilosa</i> y <i>Phlox paniculata</i>
4	<i>Microsteris gracilis</i>
5	<i>Loeselia mexicana</i> -M4, <i>Loeselia mexicana</i> -M3, <i>Loeselia mexicana</i> -M1
6	<i>Loeselia mexicana</i> -E2, <i>Loeselia mexicana</i> -E1
7	<i>Loeselia mexicana</i> -D4, <i>Loeselia mexicana</i> -D3 y <i>Loeselia mexicana</i> -D2

Valor de P= 1.00×10^{-03}

ITS2

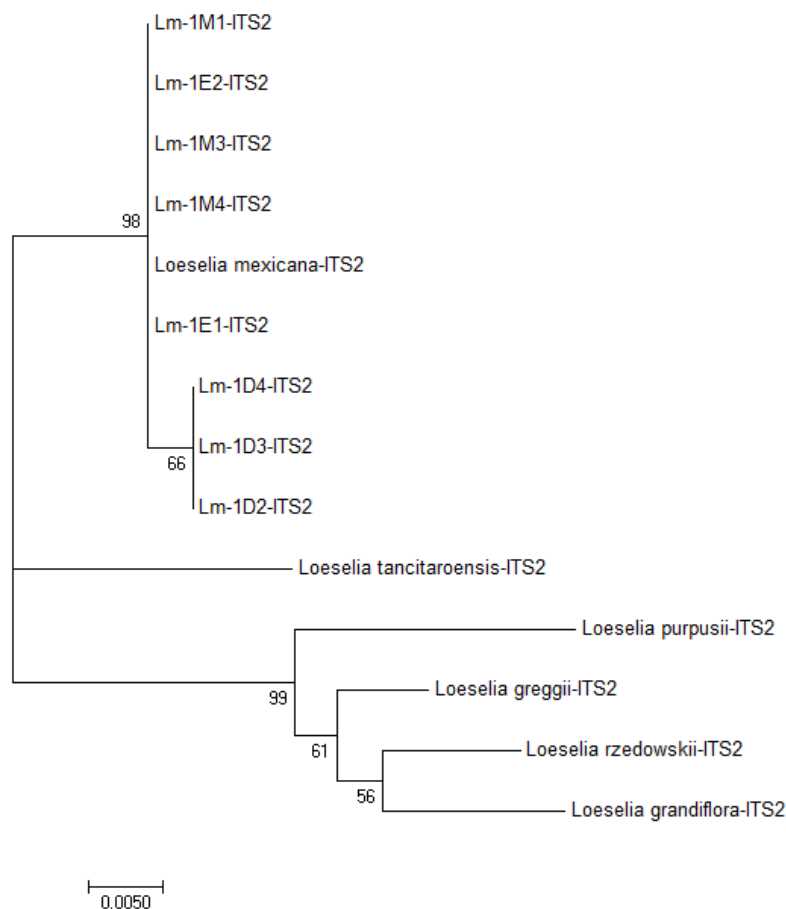


Figura 57. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias del marcador *ITS2* de *L. mexicana* (Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4 y otras especies del género *Loeselia*). Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: K2 (Kimura 2-parámetros).

Barcoding gap

Grupo	Especies
1	<i>Loeselia tancitaroensis</i>
2	<i>Loeselia rzedowskii</i>
3	<i>Loeselia purpusii</i>
4	<i>Loeselia mexicana</i> , <i>Loeselia mexicana</i> -M4, <i>Loeselia mexicana</i> -M3, <i>Loeselia mexicana</i> -M1, <i>Loeselia mexicana</i> -E2 y <i>Loeselia mexicana</i> -E1
5	<i>Loeselia greggii</i>
6	<i>Loeselia grandiflora</i>
7	<i>Loeselia mexicana</i> -D4, <i>Loeselia mexicana</i> -D3 y <i>Loeselia mexicana</i> -D2

Valor de $P=1.00^{e-03}$

Concatenado de marcadores de *L. mexicana*

Los marcadores seleccionados para la identificación de *L. mexicana* son: *ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL* y se pusieron a prueba para evaluar las muestras vegetales que venden en el mercado de Sonora (plantas vendidas bajo el nombre de espinosilla), así como una muestra de *L. glandulosa* que también es denominada popularmente como espinosilla. El resultado fue el siguiente:

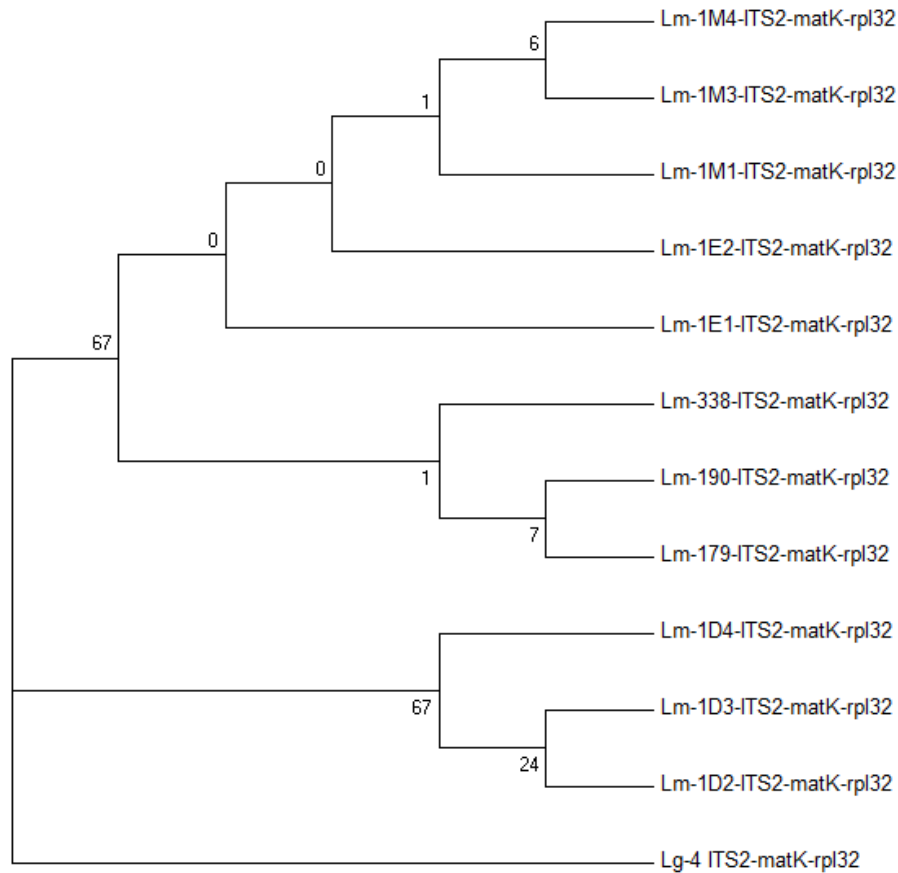


Figura 58. Cladograma estimado por el método de Máxima Verosimilitud para las secuencias de *Loeselia mexicana* (muestras de campo: Lm-D2, Lm-D3, Lm-D4, Lm-M1, Lm-M3, Lm-M4, Lm-E1, Lm-E4) de concatenado de marcadores identificadores (*ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL*). Las cifras representan el porcentaje de soporte de cada rama obtenido por Bootstrap a 1000 réplicas. Se utilizó el Modelo: **T92 (Tamura 3-párametros)**.

DISCUSIÓN

Análisis histórico

Respecto a toda la recopilación histórica que se hizo en este estudio, se puede destacar que nuestro país ocupa el segundo lugar mundial en el número de plantas medicinales registradas (3 500 spp.) y que tiene una gran variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana (García de Alba *et al.*, 2011); a pesar de que en el siglo XIX comenzó a haber un interés formal en el estudio de las plantas medicinales y su inclusión en farmacopeas, a inicios del siglo XX debido a intereses farmacéuticos extranjeros, comenzó el descarte de las monografías de los documentos regulatorios oficiales.

No obstante, la perseverancia de mantener una identidad nacional y los acuerdos internacionales que en materia de salud México ha firmado, han consolidado que poco a poco se retomó el estudio de plantas nativas que nuestros antepasados apreciaban, valoraban y empleaban para sus malestares; generando textos como la FHEUM que conllevan a un gran avance y esfuerzo por alinearse con la tendencia actual y que otorga a las plantas medicinales un lugar importante en la agenda de los próximos años como fuente importante de nuevos medicamentos en padecimientos universales e impulsando una industria farmacéutica nacional que realice el aprovechamiento de recursos naturales y sus derivados (Aceves, 2014).

Es por eso que *L. mexicana* debería incluirse nuevamente en la farmacopea, ya que tiene un acervo histórico destacable; fue ampliamente utilizada por nuestros antepasados, como la cultura mexicana (Oropeza, 1873) y que, gracias a la transmisión del conocimiento tradicional de generación en generación, es como hoy en día seguimos aprovechando sus propiedades curativas.

Como se sabe la espinosilla fue una planta nombrada por los mexicas con el nombre náhuatl *hoitzitzilxochitl*, de acuerdo con su propia clasificación e identificación de organismos, donde dependiendo del lugar en donde crecieran las plantas, alguna forma, uso, etc., se les consagraba el nombre; se referían del mismo modo a plantas de distintas especies que compartían alguna similitud morfológica o terapéutica. Además, durante la Colonia, la transmisión del conocimiento del náhuatl al español sufrió una tergiversación debido a las diferencias culturales.

Analizando con detalle las descripciones que se hicieron de *hoitzitzilxochitl* en algunas obras cabe mencionar lo siguiente:

En el Códice de la Cruz Badiano, si bien la ilustración de *hoitzitzilxochitl* difiere en las hojas aserradas que tiene *L. mexicana*, aunque recordemos que no son hechas por ilustradores botánicos. En cuanto a las propiedades que se mencionan en este escrito, parece coincidir con la planta de estudio ya que se aplicaba como cataplasma en problemas cutáneos y según estudios farmacológicos recientes, mencionan que tiene una actividad antifúngica (dermatofitos), ayudando posiblemente al mejoramiento de las heridas (Navarro *et al.*, 2006 y Navarro *et al.*, 2011); e incluso para la “enfermedad contra el cansancio” coincidente con la recientemente descrita actividad ansiolítica (Guzmán *et al.*, 2014).

En la obra Historia Natural de las Plantas de la Nueva España de Francisco Hernández, se muestra un claro ejemplo de las sinonimias que había antiguamente, pues se recopiló

información de ocho plantas que se nombraban bajo el mismo nombre *hoitzitzilxochitl*, algunas de las cuales fueron posteriormente identificadas botánicamente:

Planta	Texto donde se menciona
Cap. XLV <i>Del primer Hoitzitzilxóchitl</i>	En Datos para la materia médica mexicana 1898. II: 67; se indica que esta planta es <i>Loeselia coccinea</i> Don. (Polemoniaceas)
Cap. XLVII <i>Del Hoitzitzilxóchitl origanino</i>	Miranda F., y J. Valdés. 1964 dicen que indudablemente es una <i>Salvia</i> , posiblemente <i>S. gesneriflora</i> .
Cap. XLVIII <i>Del Hoitzitzilxóchitl mexicano</i>	Miranda <i>et al.</i> , 1946. III: 723 indica que la planta descrita en ese capítulo es <i>L. mexicana</i> (Lam.) Brand.
Cap. LII <i>Del octavo Hoitzitzilxóchitl</i>	En Plantas mexicanas (sf). 673 No está anotado ningún comentario botánico.

Sólo dos plantas (*Del primer Hoitzitzilxóchitl* y *Del Hoitzitzilxóchitl mexicano*) se identificaron como *L. mexicana*. Sin embargo, en trabajos posteriores a esta obra, tanto semejanzas morfológicas como propiedades terapéuticas, permiten postular a otras plantas como *L. mexicana*:

-Del *hoitzitzilxochitl* origanino, “Quita los puntos de las fiebres, fortaleza corazón y expele el mal humor por los poros del cuerpo; quita flatulencia, ayuda a la digestión, alivia miembros resfriados, calma dolores que provienen de causa fría y expele excrementos retenidos en los intestinos”.

-Del sexto *hoitzitzilxochitl*, “alivia pecho y afecciones frías y provoca orina, limpia vientre, conteniendo el flujo si lo hay”.

Sin embargo, las restantes *hoitzitzilxochitl* podrían corresponder a otras especies del género *Loeselia*, como *L. coerulea* o *L. glandulosa*, que comparten ciertas características morfológicas e incluso propiedades medicinales; y que también pudieran haberse confundido con *L. mexicana* al recetarlas en boticas, pues las tres son conocidas como “espinosilla” (Rzedowski & Calderon de Rzedowski, 1995); y en el caso especial de *L. coerulea* se le conocía también como “pico de gorrión” por su similitud al pico de esa ave (Oropeza, 1873).

Otro ejemplo de esta confusión nomenclatural se genera en el trabajo de Leonardo Oliva que mencionó a *L. mexicana* bajo el nombre *huichichile* con el que se conoce también a *L. coerulea* presentando propiedades para cicatrización, decaimiento, fiebre, diaforética, emotocatártica (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), nombre con el que se conocía a *L. glandulosa*.

Debido a que la obra *Cuatro libros de la Naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España* está basado en los trabajos de Hernández, pone en duda que la planta descrita como *hoitzitzilxochitl* origanino sea *L. mexicana*.

A pesar de la llegada del sistema binomial de Linneo en el siglo XIX, en las boticas de México se seguían recetando plantas bajo nombres vulgares (Ensayo para la materia médica, 1832) situación que no ha cambiado en los mercados hoy en día.

Por otro lado, a finales del siglo XIX los estudios de *L. mexicana* por el INM, a nivel químico y farmacológico corroboraron sus usos históricos, llegando a ser incluida en la Farmacopea Mexicana; sin embargo, después fue excluida como muchas plantas más después de 1930 por protocolos de calidad por el Departamento de Salubridad.

L. mexicana sin duda es una planta con gran potencial para ser incluida en la FHEUM ya que en estudios recientes se ha encontrado evidencia de nuevas actividades biológicas, su uso prolongado (más de 500 años) es un importante indicador de seguridad terapéutica (Cañigueral y Vila, 2005) y actualmente se sigue utilizando y vendiendo en los mercados.

Mapas de distribución

A partir de los datos recaudados de los tres herbarios visitados (501 ejemplares) y utilizando el algoritmo *Maxent* se obtuvieron distintos modelos de mapas de distribución potencial de la planta de interés. Esta información nos da un amplio panorama de las zonas del país que favorecerían al cultivo de *L. mexicana*, ya que presentan las condiciones idóneas que requiere la distribución de esta especie. Por ejemplo, el valle de México tiene la más alta probabilidad de distribución de la espinosilla, conformando una zona con alto potencial para el establecimiento de cultivos estandarizados respetando las condiciones medioambientales idóneas para esta especie (Fig. 26).

Además de los mapas se hizo un resumen de los datos obtenidos, donde el uso medicinal se reporta en pocos ejemplares. Sin embargo, esta planta sigue vendiéndose en el mercado y productos herbolarios que la contienen. Si bien, ya hay estudios que están reportando actividad de esta planta (artículos de farmacología); y los usos reportados siguen siendo los mismos como: problemas estomacales, problemas de piel, caída de cabello, diarrea, susto, entre otros.

Y finalmente es una planta que, si bien se puede conseguir todo el año, se utiliza durante el pico de floración, el cual se da presente en el mes noviembre.

Propagación sexual

Ensayo de viabilidad por germinación

Las semillas en BE de *L. mexicana* recolectadas en Milpa Alta germinaron en ambos tratamientos (luz 68.57% y oscuridad 72%), no presentando diferencias significativas ($p=0.8653$, por lo que se reconocieron como fotoblásticas neutras (Orozco-Segovia, 1989). Mientras que el porcentaje de germinación de semillas en ME fue del 5% para Luz y 1% para Oscuridad (sin diferencias significativas $p=1$), lo cual significa que la presencia de microorganismos en las semillas, o mutilación de estas, influirá en su germinación (Figuras 28 y 29).

La germinación se obtuvo 5 días posteriores de colocar los tratamientos (Fig. 30)

Ensayo de viabilidad por cloruro de tetrazolio

El porcentaje obtenido de esta prueba fue del 75% similar al ensayo anterior.

Se puede utilizar esta última prueba, rápida y conveniente, cuando se necesita conocer la calidad del lote e identificar otros factores que afecten a las semillas, entre ellos la dormición (Ruíz, 2009).

Siembra en sustrato

El porcentaje de siembra directa también coincide con las pruebas de viabilidad; sin embargo, la madurez de las semillas varía ya que no todas germinaron al mismo tiempo o llegando a tardar hasta 20 días en emerger del sustrato.

Es importante mencionar que los porcentajes de germinación no variaron a pesar de haber utilizado semillas provenientes de la recolecta de Milpa Alta y semillas obtenidas por propagación asexual en el invernadero.

A diferencia de otras especies, *L. mexicana* presenta frutos secos con dehiscencia del tipo dos; es decir, que procede de varios carpelos y es característico de frutos tipo cápsula (Megías *et al.*, 2018 y Rzedowski, 2005). Precisamente la dehiscencia de los frutos nos indicó cuando ya se tenían semillas maduras listas para germinar, ya que si no se esperaba ese momento se podían encontrar semillas inmaduras, de color verde. La recolecta de semilla tuvo que ser cuidadosa porque las semillas son aladas y podían dispersarse rápidamente una vez que el fruto estuviera en dehiscencia. Las semillas que se utilizaron midieron en promedio 1.760 mm (Fig. 31).

Por último, se llegaron a encontrar en algunos frutos hasta 18 semillas en cada uno de ellos, un poco más a las que menciona Rzedowski (2005) “*Loeselia mexicana*...presenta semillas 2 a 5 por lóculo, pequeñas, aplanadas, circulares u oblongas...”

Trasplante

Si bien la germinación es una vía factible de propagación de *L. mexicana*, pero la ausencia de aclimatación durante el trasplante de las plantas jóvenes (de un mes) provocó una pérdida del 93% de individuos. Recordemos que esta prueba se realizó dentro de un pequeño domo en donde las condiciones pueden variar un poco respecto a las del invernadero; la humedad es distinta al estar en esponja fenólica, la luz es menos intensa porque está dentro de un domo y el sustrato es inerte (vermiculita) es decir, que no tiene presencia de microorganismos como en las macetas con tierra negra a las que se trasladaron. Todo lo anterior provoca estrés debido al cambio de las condiciones de humedad, temperatura, etc., por lo que se sugiere aclimatarlas de manera gradual (Sánchez *et al.*, 2012) o sembrarlas sin protección de un domo, como se realizó en la siembra al voleo. Siendo una opción si se desea propagar económicamente y aumentar a variabilidad genética (Correa *et al.*, 2013).

Propagación asexual

Enraizamiento

Los resultados anteriores, muestran que la propagación por estacas es una buena alternativa para obtener una gran cantidad de individuos, ya que el 80.64% de las estacas desarrolló raíz. Aunque no hubo diferencias significativas entre los sustratos utilizados, cualitativamente las estacas en agrolita desarrollaron raíces más gruesas y largas. Esto podría deberse a que es un sustrato poroso y homogéneo, que mejora la aireación ayudando al desarrollo de raíces, es un sustrato inerte que no aporta nutrientes a la planta y cuya textura facilita que cualquier sustancia añadida del medio llegue íntegramente a la raíz con facilidad; mientras que la mezcla de vermiculita+ *Sphagnum* se compactaba mucho y retenía el agua.

Tampoco hubo diferencias significativas entre las concentraciones de enraizador evaluadas. Si bien la cantidad de estacas en esta prueba fue distinta, se observaron mayores pérdidas por pudrición en los esquejes con radix 10 000 ppm que contiene AIB. En el control que no tenía ninguna concentración de radix no presentó desarrollo de raíz y se notó también pudrición en el tallo, esto debido a los microorganismos presentes en la tierra que tuvieron contacto directo con el esqueje.

Esto puede ser el resultado de la concentración de enraizador que se ensayó. Los enraizadores están compuestos de algunas fitohormonas que aceleran o favorecen el desarrollo de raíces adventicias en los esquejes, modificando la arquitectura del sistema radicular de las plantas; generalmente se recurre al empleo de auxinas sintéticas, el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenoacético (ANA), similares a las que produce la planta de manera natural en los brotes terminales (Lema, 2012).

El enraizador a una concentración de 10 000 ppm es recomendado para esquejes con tallo duro o seco, mientras que el enraizador a 1 500 ppm se recomienda para propagar esquejes de plantas de tallo suave (ficha técnica de radix). Posiblemente la exposición a una mayor concentración de IBA en las estacas de tallo suave fue lo que provocó pudrición inhibiendo el desarrollo de raíz.

Crecimiento de estacas

El sustrato utilizado para enraizar las estacas influyó en el crecimiento vegetativo de las mismas; como se discutió anteriormente un mejor desarrollo de raíz permite una mayor absorción de nutrimentos minerales favoreciendo el crecimiento y desarrollo del individuo.

Experimento de aclimatación

Durante este experimento, las plantas que estuvieron en el exterior presentaron un retraso en la floración debido al estrés provocado por los cambios ambientales, alterando el estado fisiológico de las plantas (Basurto *et al.*, 2008), se observó etiolación, tallos morados, ataque de plagas, etc. Aquellos individuos que sobrevivieron continuaron con su ciclo fenológico presentando un desfase de un mes con respecto a los individuos que permanecieron al interior del invernadero. Cabe destacar que el número de flores, frutos y semillas fue menor en las plantas ubicadas en el exterior.

Se notó también el fenómeno de senescencia en partes aéreas de *L. mexicana* ya que después de la floración, las plantas se tornaron secas, sin embargo, tiempo después empezaron a surgir nuevos brotes. Al parecer utilizan mucha energía para generar semillas. Además, se agregó dos veces en el año una solución nutritiva que favoreció su desarrollo, por lo que se cree conveniente utilizar ya provee elementos esenciales, que permitirán sobrevivir a la planta como macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) que son los elementos más demandados para su desarrollo, y los micronutrientes (Cl, B, Fe, Mn, Zn y Mo) que son elementos que se requiere en menor proporción.

Ciclo fenológico

El ciclo fenológico de *L. mexicana* registrado a partir de la propagación vegetativa tiene una duración de aproximadamente 183 días (aprox. seis meses). Sin embargo, las plantas desarrolladas dentro del invernadero se vieron más favorecidas que las plantas de afuera, acortando el tiempo para florecer y fructificar.

Las etapas que se registraron e durante su ciclo fenológico fueron: enraizamiento, al ser esquejes, paso a la etapa vegetativa, botón, flor y fruto. Sin embargo, la etapa más duradera es la de semilla, ya que se tarda en madurar alrededor de tres meses.

Consultando el calendario botánico del valle de México de 1879, registró dos eventos de floración de *L. mexicana* en un año (marzo-mayo y septiembre-diciembre) (La Naturaleza, 1882). El registro que se obtuvo en este estudio coincidió con lo anterior (marzo-julio y septiembre-diciembre). Un reporte más reciente menciona un pico de floración en el mes de noviembre coincidiendo también en las obtenidas en este estudio (Becerra *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos muestran que *L. mexicana* puede propagarse de manera eficiente por la vía sexual y asexual. La propagación por estacas permite generar rápidamente varios individuos adultos, pero al ser clonal disminuye la variabilidad genética de la especie poniéndola en riesgo ante un ataque de alguna plaga, patógenos, etc.

Estos protocolos de propagación permiten el establecimiento de cultivos estandarizados permitiendo así un mayor control de calidad del material vegetal que se comercializa y contribuyendo a disminuir el problema de extracción silvestre de plantas medicinales; el cual se ha documentado que más del 85% de las especies que se comercializan en mercados o tiendas naturistas provienen de recolecciones silvestres, sin contar con problemas de manejo, ni de control por parte de la SEMARNAT o COFEPRIS (Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

Identidad química

Extracto orgánico

La diferencia en el rendimiento, un orden de magnitud mayor de los extractos orgánicos con respecto al material recolectado en el campo está relacionada al método de extracción, el cual debió modificarse para hacerlo práctico en condiciones analíticas rutinarias. No obstante, los menores rendimientos de los extractos no interfieren con el objetivo analítico para que fueron generados, presentando una composición química similar.

CCD

Se observa en los cinco extractos un compuesto con el mismo factor de retención ($R_f=0.68$) coincidente al de la umbelliferona. Además de presentar las mismas características de absorción a la luz UV larga (390 nm) que el estándar; en el caso de este compuesto, al observarse a luz UV corta (254 nm) y revelarse con sulfato cérico no se visualiza claramente en los extractos debido a su baja concentración. De manera cualitativa, la umbelliferona se visualiza de manera más intensa en los extractos obtenidos de mercado lo cual puede deberse a un menor tiempo de almacenamiento de las muestras.

Se reporta la presencia de kaempferol y quercetina en *L. mexicana* (Herrera *et al.*, 2011); sin embargo, en ninguno de los extractos evaluados se pudieron identificar estos compuestos. La cromatoplaqueta revelada con sulfato cérico presentó en tres de los extractos, un compuesto con el mismo factor de retención que el kaempferol ($R_f=0.73$), pero la coloración fue diferente poniendo en duda que realmente se trate de este compuesto.

Se evaluó el ácido cafeico debido a su disponibilidad, el cual presentó un factor de retención similar ($R_f = 0.54$) al de un compuesto que los cinco extractos tenían ($R_f= 0.56$); sin embargo, debido a la diferencia en el R_f y la manera en la que responde a la luz UV corta (254nm) se descarta su presencia en la composición química de *L. mexicana*.

También se evaluaron el ácido clorogénico y la rutina pero en ninguno de los casos se observó su presencia.

Estos resultados permiten proponer a la umbelliferona como compuesto marcador de *L. mexicana* ya que se encuentran presentes en los extractos orgánicos obtenidos a partir del material recolectado en campo y producido en invernadero, así como en las muestras adquiridas del mercado de Sonora, implementando de manera exitosa el análisis químico de control de calidad.

La umbelliferona además de ser el compuesto marcador podría ser propuesto como uno de los principios activos de *L. mexicana* ya que tiene propiedades antifúngicas, contra dermatofitos o tiña (Navarro et al, 2011), mismas que podrían estar explicando su amplia comercialización para problemas de alopecia y caspa. La caspa es una afección dermatológica provocada principalmente por un hongo (Allevato, 2008), además las saponinas podrían remover la obstrucción de grasa en los folículos.

Los otros compuestos que han sido reportados para esta especie medicinal al no haber sido identificados en las muestras analizadas no son candidatos a compuestos marcadores.

Por otra parte, no se utilizaron otros compuestos reportados en estudios químicos preliminares de la espinosilla debido a que no se comercializan, *e.g.* dafnoretina, lo que es una característica fundamental para ser propuesto para análisis farmacopeico.

Análisis de las fracciones aisladas

Las fracciones I, II y III presentan compuestos que revelaron de color amarillo con anisaldehído, lo cual podría deberse a la presencia de algunas flavonas o flavonoles (amarillo o rojo), así como su visualización a luz UV corta (254 nm). Posterior a su análisis en RMN de protones presentó características de un flavonoide glicosilado, pero se requieren más estudios para establecer su estructura química.

Las fracciones IV y V también fueron una mezcla de varios compuestos y sus espectros en RMN mostraron señales características a compuestos glicosilados, mismos que no fueron posibles identificar.

Identidad molecular

Extracción de DNA

A pesar de no haber obtenido una concentración homogénea de DNA en las muestras evaluadas, fue suficiente para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa necesarias para la amplificación de marcadores propuestos para el código de barras. La gran variabilidad obtenida podría deberse al origen del material o algún residuo de guanidina que no haya sido eliminado durante el proceso de extracción; sin embargo, más allá de la relación 260/280 y 260/230 que indican la pureza del ácido nucleico, su eficacia en la PCR es el parámetro final para considerar la calidad del DNA obtenido.

En todos los marcadores analizados se obtuvo un 100% de amplicones. Sin embargo, en general todos los individuos presentaron algunas inconsistencias entre las cadenas Fw y Rv, que fueron verificadas durante la generación de la secuencia consenso. Dichas inconsistencias fueron más abundantes en los marcadores *rbcL* y *trnH-psbA*.

En el caso del individuo E3, sólo se pudo analizar su secuencia Fw en los marcadores *ITS2* y *rbcL* la mala calidad de los amplicones obtenidos llevó a su descarte en análisis posteriores.

Evaluación de capacidad discriminativa

Análisis filogenético y Barcoding gap

Se analizó la capacidad discriminativa de cada marcador a través de dos tipos de análisis distintos. 1) A través de una aproximación filogenética utilizando un análisis de Máxima Verosimilitud, utilizando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), donde se calculó el mejor modelo estadístico de ajuste para cada marcador y 2) un análisis de distancias, en los cuales se valoró la diferencia entre las distancias interespecífica e intraespecífica, también llamado barcoding gap; mismo que se realizó utilizando el programa Automatic Barcoding Gap Discovery (ABDG) (Puillandre *et al.*, 2012).

El marcador *matK* discriminó en un solo clado a todas las muestras de *L. mexicana*, separándolas de otras especies del género *Loeselia* (Figura 52).

El análisis de barcoding gap (P entre 0.001 a 0.1) forma dos grupos; el primero agrupa a las especies del género *Loeselia* (*L. glandulosa*, *L. involucrata*, *L. coerulea*) y en el segundo grupo todas las secuencias de *L. mexicana*. Es decir, este marcador es capaz de separar a *L. mexicana* de otras especies del género; pero, no es capaz de discriminar entre las otras especies de *Loeselia*.

El marcador *rbcL* agrupa en un clado a los individuos de *L. mexicana* de las localidades Escandón y Denthó, junto con otros géneros de las polemoniáceas como *Phlox*, *Linanthus* y *Ipomopsis*. Los individuos recolectados en Milpa Alta quedan separados del clado antes descrito, pero tampoco son agrupados entre sí (Figura 53).

Por otra parte, en el análisis de barcoding gap se forman hasta ocho grupos (P de 0.001 a 0.007). El primer grupo incluye las secuencias del género *Phlox*, el segundo grupo a *Ipomopsis rubra*, en el tercero a *L. coerulea*, en el cuarto *Linanthus pugens*, las secuencias de Milpa Alta quedan divididas en tres grupos distintos y en el octavo grupo se localizan las secuencias de las localidades de Denthó y Escandón.

Entre un valor de P de 0.01 a 0.1 se forman cuatro grupos, en el primero engloba a las secuencias de los géneros *Phlox* e *Ipomopsis* a *L. coerulea* y a las secuencias de *L. mexicana* de las localidades Denthó y Escandón, mientras que los individuos de *L. mexicana* de la localidad Milpa Alta se encuentran divididos en tres grupos distintos.

Este marcador no es bueno para identificar a *L. mexicana*; sin embargo, esto puede atribuirse a que la calidad de las secuencias obtenidas fue deficiente, presentando varios nucleótidos ambiguos que ponen en duda las secuencias consenso analizadas.

En el caso del marcador *rpl32-trnL*, logra diferenciar en dos clados distintos a las secuencias de *L. mexicana* y *L. glandulosa*. Cabe destacar que no se encontró registro de otras especies de *Loeselia* o la familia Polemoniaceae dentro del GenBank, por lo que tuvo que analizarse solamente con las muestras obtenidas del herbario IMSS (Figura 54).

El análisis de barcoding gap también diferenció dos grupos entre los valores de P de 0.001 a 0.02; el primer grupo contiene las secuencias de *L. glandulosa* y el otro grupo las secuencias de *L. mexicana*.

rpl2-trnL es un buen candidato para discriminar a nuestra especie de interés, ya que mantiene su variación entre las secuencias de *L. mexicana*.

El marcador *trnH-psbA* logra discriminar a nivel de especie a *L. mexicana* ya que sus secuencias las separa por localidad de colecta, aunque las relaciona cercanamente con otros géneros de la familia Polemoniaceae (Figura 55).

Con el análisis barcoding gap (P 0.001 a 0.004) forman siete grupos, el primero formado por una especie no identificada de Polemoniaceae, segundo grupo por *Navarretia intertexta*, tercer grupo por las secuencias de *Phlox*, cuarto grupo por *M. gracillis*, quinto grupo por las muestras de *L. mexicana* de la localidad Milpa Alta, sexto grupo formado por *L. mexicana* de la localidad Escandón y séptimo grupo formado por *L. mexicana* de la localidad de Dentho.

Entre los valores de P de 0.007 a 0.05 se reconocen cinco grupos, el primero por una especie no identificada de la familia Polemoniaceae, el segundo por *N. intertexta*, tercer grupo por secuencias del género *Phlox*, cuarto grupo por *M. gracilis* y quinto grupo por todas las secuencias de *L. mexicana*.

Con el valor P muy laxo (P 0.1) se forman dos grupos, el primero contiene las especies los otros géneros de la familia Polemoniaceae; y el otro agrupa a *N. intertexta*, *M. gracilis* y muestras de *L. mexicana*, siendo un valor que anula la capacidad de discernir entre la especie de interés y otras.

trnH-psbA es un marcador que distingue como grupos separados a muestras de diferentes localidades de *L. mexicana*, pudiendo ser confuso en análisis de distintas localidades debido a que reconocería cada muestra como diferentes taxa.

Por último, el marcador *ITS2* logró discriminar a nivel de especie a las secuencias de *L. mexicana* del resto de las especies del género *Loeselia* (*L. tancitaroensis*, *L. purpusii*, *L. greggii*, *L. rzedoskii* y *L. grandiflora*) agrupándolas en dos clados distintos (Figura 56).

En cuanto al análisis de distancia de código de barras (barcoding gap) mediante el programa (ABGD) usando un límite de divergencia intraespecífica (P) establecido entre 0.001 a 0.002 se reconocieron siete grupos. Cada especie del género *Loeselia* conforma un grupo distinto, mientras que *L. mexicana* queda dividida en dos grupos, Milpa Alta y Escandón en uno y Dentho en otro distinto.

Entre los valores P de 0.004 a 0.01 se reconocieron seis grupos, nuevamente, cada especie del género *Loeselia* conforma un grupo distinto y en un solo grupo quedan todas las secuencias de *L. mexicana*, coincidiendo con su identidad taxonómica.

Ambas pruebas, análisis filogenético y barcoding gap, coinciden en el reconocimiento de las distintas especies del género *Loeselia*, por lo que *ITS2* se propone como un marcador molecular de identidad para *L. mexicana*.

Concatenado de marcadores para *L. mexicana*

Después de los resultados se consideró utilizar como marcadores moleculares para la identificación de *L. mexicana* a: *ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL* debido a que fueron los que mejor discriminaron a nuestra especie de estudio; se hizo un análisis de control de calidad, donde se evaluaron las muestras del mercado de Sonora (plantas vendidas bajo el nombre de espinosilla), así como una muestra de *L. glandulosa* que también es denominada popularmente como espinosilla (Figura 50).

La finalidad de concatenar los marcadores *ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL* es aumentar la capacidad discriminativa del código de barras, donde *L. glandulosa* queda completamente separada de *L. mexicana*; por otro lado, las muestras comercializadas bajo el nombre de espinosilla se agrupan entre sí y quedan incluidas en el gran clado que forman distintos individuos de *L. mexicana* (Figura 57).

El uso de técnicas moleculares, como el código de barras, puede ser una poderosa herramienta para el control de calidad; ya que utilizando una o más regiones pequeñas de DNA estandarizadas se puede identificar a algunas especies, e incluso podría resolver algunos problemas taxonómicos, filogenéticos e identificar materiales o productos de plantas altamente procesadas, mezcladas o adulterados (Palhares *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

- *Loeselia mexicana* es parte de nuestro patrimonio nacional que ha sido utilizada desde el siglo XVI para distintos padecimientos; incluida en las primeras farmacopeas mexicanas donde el saber de las plantas medicinales era una prioridad y la farmacéutica extranjera no dominaba aún (1846-1925); pero que fue excluida posteriormente junto con más de 100 plantas, que hoy en día siguen utilizándose.
- Con este trabajo se observó que la espinosilla es una especie fácil de propagar tanto por la vía sexual y asexual; sus semillas tienen alta viabilidad y se puede completar el ciclo de vida en seis meses; el mejor sustrato para propagar por estacas es agrolita y con una concentración de AIB a 1500 ppm se completa su ciclo de vida.
- Los mapas de distribución actual y potencial de la especie mostraron que es una planta que se distribuye ampliamente en nuestro país, principalmente en el valle de México, seguido por el Eje Neovolcánico Transversal, parte de la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur; siendo lugares ideales para establecer cultivos estandarizados de esta especie.
- Se sugiere a umbelliferona como compuesto marcador en la identidad química de la espinosilla en pruebas cromatográficas.
- Se construyó el código de barras molecular utilizando los marcadores *ITS2*, *matK* y *rpl32-trnL*. El uso complementario de los análisis químico y molecular permite identificar el material vegetal que se comercializa bajo el nombre de espinosilla, conformando una prueba de control de calidad robusta.

PERSPECTIVAS

- Profundizar en el estudio de la composición química de *L. mexicana*, en especial caracterizar los flavonoides detectados en el extracto orgánico.
- Desarrollar pruebas farmacológicas que permitan comprender la actividad biológica asociada al uso más popular que hoy en día tiene la espinosilla (problemas de alopecia).
- Evaluar la toxicidad de los extractos orgánico y acuoso para contrastarlo con los estudios de inicios del siglo XX que la excluyeron de la antigua Farmacopea Mexicana.
- Generar el análisis químico en otras especies del género *Loeselia* que reciben el nombre común de la espinosilla.

LITERATURA CITADA

- * Aceves, L., Sarmiento, J. y Pastrana, P. 2009. Las farmacopeas de México y Estados Unidos en el Nuevo Milenio: paralelismo y divergencias. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 75(4): 923-946.
- * Aceves, L. 2010. La farmacopea mexicana. Guardiania de un patrimonio nacional viviente. *Rev. Casa del Tiempo*, Universidad Autónoma Metropolitana, 29: 63-67.
- * Aceves, L. 2014. Las Farmacopeas Mexicanas en la construcción de la identidad nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45 (2): 43-54.
- * Aceves, M. 2010. Publicación de la obra La Real Expedición Botánica a Nueva España. *Nova tellus*, 28(2):313-316.
- * Alonso-Castro, A., Domínguez, F., Zapata-Morales, J. y Carranza-Álvarez, C. 2015. Plant used in the traditional medicine of Mesoamerica (México and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *Journal of Ethnopharmacology*, 175: 335-345.
- * Allevato, L. 2008. La caspa. *Act Terap Dermatol*, 31:54.
- * Anales del IMN. Continuación de “El Estudio”. 1896. Tomo II. 560 pp.
- * Anales del IMN. Continuación de “El Estudio”. 1897. Tomo III. 512 pp.
- * Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.
- * Barbero, M. 1997. Códices etnográficos: El código Florentino. *EHSEA*, 14: 349-379.
- * Basurto, M., Núñez, A., Pérez, R. y Hernández, O. 2008. Fisiología del estrés ambiental en plantas. Universidad Autónoma de Chihuahua. *Aventuras del pensamiento*, 48: 1-5.

- * Becerra, H., Varela, G y Martínez. Cárdenas, M. 2013. Fenología de *L. mexicana* en el Tehutli, Xochimilco, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Congreso Mexicano de Botánica, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- * Berenzon, S. y Saavedra, N. 2002. Presencia de la Herbolaria en el tratamiento de los problemas de la herbolaria en el tratamiento de los problemas emocionales: Entrevista a los ciudadanos urbanos. *Salud Mental*, 25 (1): 55-66.
- * Cañigueral, S. y Vila, R. 2005. La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Fitoterapia y ginecología*, 6(1): 43-51.
- * Correa, E; Espitia, M; Araméndiz, H; Murillo, O.; Patrana, I. 2013. Variabilidad genética en semillas de árboles individuales de *Tectona grandis* L.f en la conformación de lotes mezclados en Córdoba, Colombia. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación científica*, 16(2): 379-389.
- * Cristians, S., Madariaga, A. y Mendoza, K. 2015. Catálogo de Plantas Medicinales Selectas cultivadas en la Ciudad de México enfocado al Control de Calidad. SEDEREC, México.
- * Cristians S., Bye R. and Nieto-Sotelo, J. 2018. Molecular Markers Associated With Chemical Analysis: A Powerful Tool for Quality Control Assessment of Copalchi Medicinal Plant Complex. *Front. Pharmacol*, 9:666. doi: 10.3389/fphar.2018.00666.
- * De la Cruz, Martín.1964. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Manuscrito azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- * Datos para la materia médica, 2ª parte.1898. Secretaria de Fomento, México.
- * De la cuadra, Celia. 1993. Germinación, latencia y dormición de las semillas. Ministerio de agricultura pesca y alimentación, secretaria general de estructuras agrarias, Madrid. 3:1-24.
- * Estrada, E. 1992. Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio (4ta ed). Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- * Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional: 2014-2023, OMS, Ginebra, 75 pp.
- * Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2a. ed.). Secretaria de Salud Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2013.372 pp.
- * Figueroa, J. 2009. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Revisión Digital Universitaria*, 10(9): 2-12.
- * Gallardo, J., Esparza, M. y Gómez, A. 2006. Importancia Etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*, *Polibotánica*, 21:61-74.

- * Gallo, C.; França-Neto, J.B; Arango, M. 1; Gonzalez, S.; Francomano, V.; Carracedo, C.; Costa, O.; Alves, R.; Magnano, L.; Craviotto, R. 2016. Prueba de Tetrazolio como Método de Vigor para semillas de *Glycine max*.
- * Gárate, M. 2010. Técnicas de propagación por estacas. *Tesis para ingeniero agrónomo*. Universidad Nacional de Ucayali, Perú. 189 pp. Consultado en sitio web: <http://www.iiap.org.pe/cdpublicaciones2011/documentos/pdf/probosques/pu/76.pdf>
- * García de Alba García, Javier E.; Ramírez Hernández, Blanca C.; Robles Arellano, Gilberto; Zañudo Hernández, Julia; Salcedo Rocha, Ana L.; García de Alba Verduzco, Javier R. 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39:29-44.
- * García, C. y Blanco, F. 2004. La cirugía plástica y el códice De la Cruz-Badiano. *Medicina Universitaria*, 6(22): 51-54.
- * Gómez-Pompa, A. 1993. Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biologica Panamensis*, 1: 87-100.
- * González, J. 2013. Propagación sexual y asexual de *Moussonia deppeana* (tlachichinole), especie medicinal. *Tesis de licenciatura*, UNAM, 99 pp.
- * Guzmán, S., Reyes, R. y Bonilla, H. 2014. Medicinal plants for the treatment of “nervious”, anxiety and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 591-608.
- * Hersh, P. y Fierro, A. 2001. El comercio de plantas medicinales: algunos rasgos significativos en el centro de México. En el libro: *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los árboles del siglo XIX*. UAM-I SEMANART, México, 55 pp.
- * Herrera, A. 1921. *Farmacopea Latino-Americana*. 1º edc. Talleres graficos de Herrera Hermano Sucs, 304-305 pp.
- * Herrera-Ruíz, M., González-Carranza, A., Zamilpa, A., Jiménez, E., Huerta-Reyes, M. y Navarro, V. 2011. The standardized extract of *Loeselia mexicana* possesses anxiolytic activity through the γ -amino butyric acid mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 138: 261-267.
- * Hernández, F. 1946. *Historia de las plantas de Nueva España*. Imprenta Universitaria, México. Tomo III, 724 pp.
- * Heyden D., 2002. Jardines botánicos pre-hispánicos. *Arqueología Mexicana*. X (57): 18-25.
- * Huerta, C. 1997. La herbolaria: mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas*, 12:1-7.

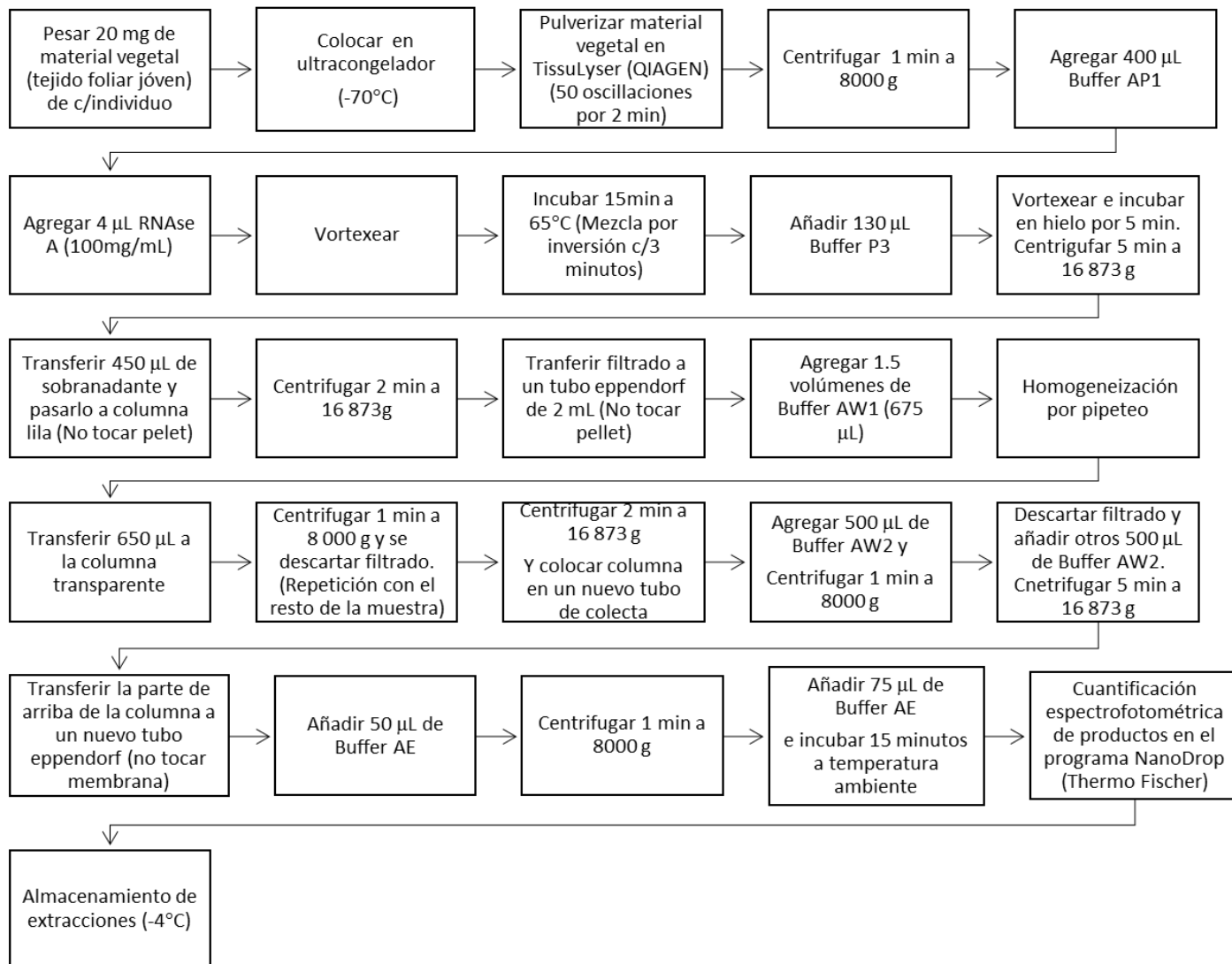
- * INM. Datos para la Materia Medica Mexicana (2ª Parte).1898. Oficinca Tip. de la Secretaria de Fomento. México. Pp. 67-86.
- * Jiménez, E., Velázquez, A., Lira-Rocha, A., Ortega, A. y Díaz, E. 1989. Structure of a pentacyclic triterpenyl angelate from *Loeselia mexicana* 1H2D-NMR data and stereochemistry. *Chem*, 67: 1-7.
- * Juárez-Rosete, CR; Aguilar-Castillo, JA; Juárez-Rosete, ME; Bulgarín-Montoya, R; Juárez-López, P; Cruz-Crespo, E. 2013. Hierbas Aromáticas y Medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3): 119-129.
- * Kress, W. y Erickson, D. 2012. DNA Barcodes. Humana Press, pp.470.
- * La Naturaleza, periódico científico de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Tomo V. 1882.
- * La Real expedición botánica a Nueva España/ por José Mociño y Martín Sessé; ilustraciones de Atanasio Echeverria y Godoy y Juan de Dios Vicente de la Cerda. México: Siglo XXI, 2010. 328 pp.
- * Lema, L. 2012. Evaluación de la eficacia de seis enraizadores y dos sustratos para la propagación de ramillas de café robusta (*Coffea canephora*) en vivero, Cantan Francisco de Orellana, provincia de Orellana. Escuela de ingeniería Agronomica, Ecuador. 100 pp.
- * Lozoya Xavier, La Herbolaria en México ED. CONACULTA, México, DF, 1998, 63 pp.
- * Marcial-Avedaño, .2007. Antecedentes del Instituto Médico Nacional y los primeros años de trabajo de la Sección 39 de Fisiología. *Bol Mex His Fil Med*, 10(1): 21-27.
- * Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. 2018. Atlas de Histología vegetal y animal. Organos vegetales, Fruto. Universidad de Vigo, España. 1-6 pp.
- * Méndez, A. sin año. El IMN y el desarrollo de la Ciencia en México. Pensamiento universitario. *Inventio*, 33:41.
- * Navarro, V., Rojas., G., Zapata, G., Aviles, M., Fuentes, M., Herrera, A. y Jiménez, E. (2006). Antifungal and Antibacterial Activity of Four selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, 44(4): 297-300.
- * Navarro-García, V., Herrera-Ruíz, M., Rojas, G. y Zepeda, G. 2007. Coumarin derivatives from *Loeselia mexicana*. Determination of the ansiolytic effect of daphnoretin on elevated plus-maze. *Journal of Mexican Chemical Society*, 51: 193-197.
- * Navarro, V., Rojas, G., Avilés, M., Fuentes, M. y Zepeda, G. 2011. In vitro antifungal activity of coumarin extracte from *Loeselia mexicana* Brand. *Mycoses*, 54: 569-571.

- * Oliva, L. 1854. Lecciones de Farmacología dadas por el catedrático del Ramo en la Universidad de Guadalajara. Tomo II. 67-68 pp.
- * Oropeza, M. 1873. La Espinosilla. *Tesis. México*. 4° con 19 pp. Reimp. En “La Naturaleza” y en “El Estudio”.
- * Orozco-Segovia, Alma. 1989. Fisiología y ecología del fitocromo: su función en la semilla. *Bol. Soc. Bot. México*, 49:71-84.
- * Osuna, R. 1997. Estructura y Respuesta germinativa se semillas de plantas medicinales. *Chiranthoderdron pentadactylon y Talauma mexicana. Tesis de doctorado*. UNAM, 132 pp.
- * Palhares RM, Goncalves Drummond M, dos Santos Alves Figueiredo Brasil B, Pereira Consenza G, das Gracias Lins Brandao M, Oliveira G. 2015. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. *PLOS ONE*, 10(5): 1-29.
- * Palombo, E. 2006. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. *Phytotherapy Research*, 20: 717-724.
- * Pennisi, E. 2007. Wanted: A barcode for plants. *New Focus*, 318: 190-191.
- * Pérez, GS., Pérez, GC. y Zavala, SMA. 2005. A study of the antidiarrheal properties of *Loeselia mexicana* on mice and rats. *Phytomedicine*, 12: 670-674.
- * Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. y Achaz, G. 2012. *ABGD*, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21: 1864-1877. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x
- * Rodgers, R., Cao, B., Dalvi, A. y Holmes, A. 1997. Animals models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289-304.
- * Rojas, A., Bah, M., Rojas, J., Serrano, V. y Pacheco, S. 1999. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 6(5): 367-371.
- * Ruíz, María de los Ángeles. 2009. El análisis de tetrazolio en la calidad de semillas, caso de estudio: cebadilla chaqueña. E.E.A INTA Anguil. *Publicación Técnica*, 7:1-18.
- * Rzedowski, G., C. de, J. Rzedowski y colaboradores. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. (2a. ed.). Instituto de Ecología, A.C., y Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- * Rzedowski, J. y Calderón de Rzedowski, G. 1995. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 33, 28-32 pp.

- * Sánchez, L; Saavedra, D; Romero, H. 2012. Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivos de tejidos vegetales. *PALMAS*, 33(4): 41-52.
- * Sanfilippo, J. 1997. Los Cuatro libros de la naturaleza, de fray Francisco Ximenez. *Boletín*, 11(2):31-43.
- * Sierra, D. 2011. La flora medicinal mexicana como patrimonio cultural. *Rev. Diario de campo*. INAH, 6:77-82.
- * Smith, D. (1977). Flavonoid diversification in the Polemoniaceae. *Biochemical systematics and Ecology*, 5:107-115.
- * Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis versión 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- * Turner, G. 2007. El códice de la Cruz-Badiano y su extensa familia herbaria. *Historias*, 68: 109-122.
- * Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 22 May 2017 <http://www.tropicos.org>
- * <http://www.worldclim.org/bioclim>
- * Villaseñor, 2016. Checklist of the nature vascular plants of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3): 559-902.
- * Zepeda, C. y White, L. 2008. Herbolaria y Pintura Mural: Plantas medicinales en los murales del convento del divino Salvador de Malinalco, Estado de México. *POLIBOTÁNICA*, 25.pp. 173-199.

ANEXOS

Método de extracción de DNA



Línea del tiempo

Siglo XVI (1501-1600)	Siglo XVII (1601-1700)	Siglo XVIII (1701-1800)	Siglo XIX (1801-1900)	Siglo XX (1901-2000)
<p>-De la Cruz Badiano, (1552) mencionan el nombre náhuatl de la espinosilla “Huitzitzilxóchitl” usado para el cansancio (flor), heridas de rayos y quemaduras de niños (hojas).</p> <p>-Francisco Hernández (1571-1576) mencionó que la planta se empleaba para limpiar el cabello de mujeres y para manchas de la piel.</p>	<p>-Fray Ximénez (1615) menciona a la espinosilla bajo el nombre de Huitzitzilxóchitl, “...que es como oregano” y utilizada para fiebre, corazón, digestión, y calmar dolores que provienen de causa fría.</p>	<p>-Mociño y Sessé durante la “Real Expedición de la Nueva España” clasificaron a la espinosilla con el nombre de <i>Phlox spinosilla</i>, usada para la fiebre producida por catarro y para el crecimiento de cabello.</p> <p>-Cervantes (1791) en su “Ensayo a la Materia Medica vegetal de México” se refiere a la espinosilla como <i>Phlox mexicana</i>; vendida como huitzitziltzin y usada para calenturas catarrales, fiebres ardientes y enfermedades de pecho.</p>	<p>-Antonia de la Cal y Bracho (1832) publicó “Ensayo para la Materia Médica Mexicana” donde clasifica a la espinosilla como <i>Hoitzia coccinea</i> Cav. Usada como sudorífico y diurético.</p> <p>-Marcial Oropeza (1873) estudió la espinosilla en el Instituto Médico Nacional, donde investigo que se usaba para calenturas, diaforético, cataplasma para infecciones de garganta y sustituto de jabón. Inicio los estudios químicos y farmacológicos de la planta. Además menciono que espinosilla es un nombre que comparten en común <i>L. glandulosa</i> y <i>L. coerulea</i>.</p> <p>-En 1874, 1884 y 1896 La espinosilla estaba dentro de las ediciones de la “Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México”.</p>	<p>-En 1913 aún permanecía en la Farmacología Nacional.</p> <p>-En 1921 la espinosilla también fue descrita en la Farmacopea Latino-Americana por el profesor Alfonso L. Herrera.</p> <p>-En 1942-1946 el IB de la UNAM hizo una recopilación de las obras de Francisco Hernández, creando la edición “Obras complementarias de Francisco Hernández” donde se encuentran descritas ocho plantas compartiendo el nombre náhuatl huitzitzilxóchitl; y “Comentarios de la obra de Francisco Hernández” donde se realizaron identificaciones de las plantas. Para Miranda <i>et al.</i>, 1946 <i>L. mexicana</i> corresponde a la planta <i>Hoitzitzilxóchitl mexicano</i> descrito en la obra de Hernández y “<i>Del primer huitzitzilxóchitl</i>” corresponde a <i>L. coccinea</i> Don (IMN, 1898).</p>