

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y APROXIMACIÓN GENÉTICA EN ESPECIES DE LA  
SECCIÓN *PLINTHINE* DEL GÉNERO *ARENARIA* (*CARYOPHYLLACEAE*)**

ELOÍSA LÓPEZ-CASAMAYOR JUSTICIA

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2007

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Eloísa López Casamayor Justicia  
D.L.: Gr. 1357 - 2007  
ISBN: 978-84-338-4380-7

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y APROXIMACIÓN GENÉTICA EN ESPECIES DE LA  
SECCIÓN *PLINTHINE* DEL GÉNERO *ARENARIA* (*CARYOPHYLLACEAE*)**

Memoria para optar al grado de Doctor  
presentada por la licenciada  
Eloísa López-Casamayor Justicia

DIRECTORES:

Dra. M<sup>a</sup> Reyes González-Tejero García

Dr. Manuel Miró Jodral

Dr. Joaquín Molero Mesa

Granada, 2007



## AGRADECIMIENTOS

*“No sabré hacerlo, no ha producido jamás buen resultado. Probaré a hacerlo, ha obrado casi siempre maravillas. Lo haré, ha conseguido milagros”.* (Anónimo)

Durante el tiempo transcurrido en la elaboración de la siguiente Memoria, ha habido muchas personas que me han ofrecido su ayuda. Desde aquí me gustaría, con estas pocas letras, reflejar toda la gratitud que siento hacia ellas y decir que sin su ayuda, de una forma u otra, no habría sido posible la elaboración de este trabajo.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo de investigación, al Dr. Joaquín Molero Mesa, por su apoyo y dedicación desde el comienzo, al Dr. Manuel Miró Jodral y a la Dra. M<sup>a</sup> Reyes González-Tejero García, por ofrecerme la oportunidad de realizar este estudio y darme una guía para comenzar este trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia por su disposición y ayuda siempre que la he necesitado. A los doctorandos Rosa Fernández y Guillermo Benítez, con los que he compartido el día a día y que tantos ánimos me han dado en los últimos momentos y A Esther por hacerme sonreír por las mañanas y por su ayuda impagable.

A los doctores Manuel Ruiz Rejón y Manuel Ángel Garrido Ramos del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias por el interés que han demostrado siempre y por guiarme en este mundo tan desconocido para mí hasta el comienzo de esta Memoria. A Rafael Navajas por ser mi “profe” en todo momento y por animarme siempre.

A Mercedes González Herrera, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, por hacer mi estancia allí más agradable y por su amabilidad.

A la Dra. Inmaculada Saura y al Dr. Eduardo Ortega del Departamento de Edafología, por el fantástico trato que he recibido y por su ayuda en las determinaciones de iones.

A los Dres. Encarnación Jurado y Pedro González Tello del Departamento de Ingeniería Química, por “prestarme” el liofilizador y por su amable trato en cada una de mis visitas.

Al Dr. Domínguez del Departamento de Química Farmacéutica por sus correcciones y por dejarme utilizar su laboratorio y a Javier Galindo por el apoyo técnico prestado y por su disponibilidad siempre.

A todos mis amigos, que de cualquier forma siempre han estado presentes, a Cris, a Mercedes, Nuria y Ele, a Laurita y a Pilar, y a Pedro. A Daniel, por su generosa ayuda, apoyo y comprensión.

A mis padres por su apoyo y cariño sin límites, por animarme en todo momento y por la educación que me han dado.

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>atm.</b>	Atmósferas
<b>B.M.</b>	Baño María
<b>C</b>	Citosina
<b>CLAR</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>cf.</b>	Revisado en ( <i>Confer</i> )
<b>CTAB</b>	Hexadeciltrimetil-amonio-bromuro
<b>d</b>	Distancia
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxi-nucleósidos-trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetraacético
<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<b>ETS</b>	Espaciador transcrito externo ( <i>External Transcribed Spacer</i> )
<b>Fam.</b>	Familia
<b>FE</b>	Fase estacionaria
<b>FM</b>	Fase móvil
<b>g</b>	Gramo
<b>G</b>	Guanina
<b>H</b>	Hidrógeno
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>IGS</b>	Espaciador intergénico ( <i>InterGenic Spacer</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
<b>ITS</b>	Espaciador intergénico transcrito ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
<b>h</b>	Horas
<b>H2O<sub>dd</sub></b>	Agua ultrapura doble destilada
<b>kb</b>	Kilobases
<b>λ</b>	Tasa evolutiva
<b>LB</b>	Medio de cultivo <i>Luria Bertani</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad
<b>M</b>	Moles/litro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	milímetros
<b>m/m</b>	masa/masa
<b>ML</b>	Máxima verosimilitud ( <i>Maximum Likelihood</i> )
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MP</b>	Maxima parsimonia ( <i>Maximum Parsimony</i> )
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>ng</b>	Nanogramos (10 <sup>-9</sup> gramos)

<b>NJ</b>	Neighbor joining
<b>NTS</b>	Espaciador no transcrito ( <i>Non-Transcribed Spacer</i> )
<b>O</b>	Oxígeno
<b>p</b>	Porcentaje de diferencias
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pg</b>	Picogramo ( $10^{-12}$ gramos)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>Pm</b>	Peso molecular
<b>pmol</b>	Picomoles ( $10^{-12}$ moles)
<b><math>\pi</math></b>	Diversidad nucleotídica
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>QP</b>	Químicamente Puro
<b>R.F.E.</b>	Real Farmacopea Española
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SINEs</b>	Elementos dispersos cortos ( <i>Short Interspersed Element</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SIG</b>	Sistemas de Información Geográfica
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNV</b>	Sistema Nervioso Vegetativo
<b>SSC</b>	Citrato sódico salino
<b>T</b>	Timina
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TAE</b>	Tris-acético-EDTA
<b>Taq</b>	Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography
<b>Tris</b>	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
<b>TrnL/C</b>	Gen codificador para el ARN transferente de la Leucina/Citosina
<b>U</b>	Unidad
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v.g.</b>	Por ejemplo ( <i>Verbi gracia</i> )
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo ( $10^{-6}$ gramos)
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro ( $10^{-6}$ litros)
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido
<b>&gt;</b>	Mayor que
<b>&lt;</b>	Menor que



# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

<b>I.1. Caracterización de los taxones objeto de estudio .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Fitoquímica .....</b>	<b>27</b>
<b>I.2.1. Contenido en iones sodio y potasio.....</b>	<b>29</b>
<b>I.2.2. Compuestos del metabolismo primario .....</b>	<b>30</b>
<b>I.2.2.1. Glúcidos .....</b>	<b>30</b>
I.2.2.1.a. Generalidades .....	30
I.2.2.1.b. Detección .....	31
I.2.2.1.c. Distribución .....	32
I.2.2.1.d. Aplicaciones terapéuticas .....	32
<b>I.2.2.2. Gomas y Mucílagos .....</b>	<b>32</b>
I.2.2.2.a. Definición .....	32
I.2.2.2.b. Detección .....	33
I.2.2.2.c. Distribución .....	33
I.2.2.2.d. Aplicaciones terapéuticas .....	33
<b>I.2.2.3. Lípidos y Ceras .....</b>	<b>34</b>
I.2.2.3.a. Definición .....	34
I.2.2.3.b. Detección .....	35
I.2.2.3.c. Distribución .....	35
I.2.2.3.d. Aplicaciones terapéuticas .....	36
<b>I.2.3. Compuestos fenólicos.....</b>	<b>36</b>
<b>I.2.3.1. Cumarinas .....</b>	<b>36</b>
I.2.3.1.a. Generalidades .....	36
I.2.3.1.b. Detección .....	37
I.2.3.1.c. Distribución .....	38
I.2.3.1.d. Aplicaciones terapéuticas .....	38
<b>I.2.3.2. Flavonoides.....</b>	<b>39</b>
I.2.3.2.a. Generalidades .....	39
I.2.3.2.b. Detección .....	41
I.2.3.2.c. Distribución .....	41
I.2.3.2.d. Aplicaciones terapéuticas .....	42
<b>I.2.3.3. Antocianinas .....</b>	<b>43</b>
I.2.3.3.a. Generalidades .....	43
I.2.3.3.b. Detección .....	44
I.2.3.3.c. Distribución .....	45
I.2.3.3.d. Aplicaciones terapéuticas .....	45

<b>I.2.3.4. Taninos</b> .....	<b>46</b>
I.2.3.4.a. Generalidades .....	46
I.2.3.4.b. Distribución .....	49
I.2.3.4.c. Aplicaciones terapéuticas .....	49
<b>I.2.3.5. Antraquinonas</b> .....	<b>50</b>
I.2.3.5.a. Generalidades .....	50
I.2.3.5.b. Detección .....	52
I.2.3.5.c. Distribución .....	52
I.2.3.5.d. Aplicaciones terapéuticas .....	53
<b>I.2.4. Terpenos y esteroides</b> .....	<b>53</b>
I.2.4.1. Isoprenoides .....	53
I.2.4.2. Triterpenos .....	54
<b>I.2.4.3. Esteroles</b> .....	<b>56</b>
I.2.4.3.a. Generalidades .....	56
I.2.4.3.b. Detección .....	57
I.2.4.3.c. Aplicaciones terapéuticas .....	57
<b>I.2.4.4. Saponinas</b> .....	<b>57</b>
I.2.4.4.a. Generalidades .....	57
I.2.4.4.b. Detección .....	60
I.2.4.4.c. Distribución .....	63
I.2.4.4.d. Aplicaciones terapéuticas .....	65
<b>I.2.5. Alcaloides</b> .....	<b>66</b>
I.2.5.a. Generalidades .....	66
I.2.5.b. Detección .....	70
I.2.5.c. Distribución .....	71
I.2.5.d. Aplicaciones terapéuticas .....	72
<b>I.3. Perspectiva genética</b> .....	<b>73</b>
I.3.1. El ADN ribosómico .....	76
I.3.2. Género <i>Arenaria</i> sección <i>Plinthine</i> .....	80
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>83</b>
<b>III. FITOQUÍMICA</b>	
<b>III. 1. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	

III.1.1. Material utilizado.....	85
III.1.2. Tratamiento previo de las muestras .....	86
III.1.2.a. Desecación .....	86
III.1.2.b. Molturación .....	86
III.1.2.c. Conservación.....	86
III.1.3. Determinación de humedad y sustancias volátiles .....	86
III.1.3.a. Reactivos .....	87
III.1.3.b. Material.....	87
III.1.3.c. Método.....	87
III.1.4. Determinación de cenizas.....	87
III.1.4.a. Reactivos .....	87
III.1.4.b. Material.....	88
III.1.4.c. Método.....	88
III.1.5. Determinación del contenido en sodio y potasio inorgánicos.....	89
III.1.5.a. Reactivos .....	89
III.1.5.b. Material.....	89
III.1.5.c. Método.....	89
III.1.6. Preparación de extractos .....	90
III.1.6.a. Método.....	91
III.1.7. Screening fitoquímico .....	92
III.1.7.a. Detección de glúcidos.....	93
III.1.7.b. Detección de gomas y mucílagos.....	93
III.1.7.c. Detección de lípidos y ceras.....	94
III.1.7.d. Detección de cumarinas .....	94
III.1.7.e. Detección de flavonoides.....	94
III.1.7.f. Detección de antocianinas .....	95
III.1.7.g. Detección de leucoantocianos.....	95
III.1.7.h. Detección de taninos .....	95
III.1.7.i. Detección de antraquinonas .....	96
III.1.7.j. Detección de terpenos y esteroides .....	96
III.1.7.k. Detección de saponinas .....	96
III.1.7.l. Detección de alcaloides.....	97
III.1.8. Purificación por cromatografía en columna.....	98
III. 2. RESULTADOS.....	101
III.2.1. Normalización del material vegetal.....	101
III.2.2. Determinación del residuo seco de los extractos .....	101

III.2.3. Determinación de humedad y sustancias volátiles.....	102
III.2.4. Determinación de cenizas .....	104
III.2.5. Screening fitoquímico.....	105
III.2.6. Determinación del contenido en iones sodio y potasio .....	121
III.2.7. Purificación de las muestras.....	122

#### IV. GENÉTICA

IV. 1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	125
IV.1.1. Material empleado y procedencia .....	125
IV.1.2. Obtención del ADN .....	126
IV.1.3. Amplificación de la región ITS de <i>Arenaria</i> utilizando la técnica de PCR.....	128
IV.1.4. Clonación de la región ITS y síntesis del recombinante.....	131
IV.1.5. Secuenciación y análisis de las secuencias .....	137
IV.1.5.a. Secuenciación de los clones recombinantes positivos.....	137
IV.1.5.b. Análisis de las secuencias .....	138

#### IV. 2. RESULTADOS

IV.2.1. Análisis de las secuencias de espaciadores ribosómicos (ITS) en el género <i>Arenaria</i> L.....	141
IV.2.1.a. Análisis de la región ITS-1.....	141
IV.2.2.b. Análisis de divergencia interespecífica de la región ITS1.....	146
IV.2.1.c. Análisis de la región ITS-2.....	149

#### V. DISCUSIÓN

V.1. Caracterización de las muestras .....	155
V.2. Screening fotoquímico .....	156
V.3. Contenido en sodio y potasio.....	161
V.4. Aproximación genética al estudio de especies del género <i>Arenaria</i> sección <i>Plinthine</i> (Caryophyllaceae) .....	163

VI. CONCLUSIONES .....	167
------------------------	-----

VII. BIBLIOGRAFÍA .....	169
-------------------------	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Provincias y subprovincias biogeográficas de la Península Ibérica (Rivas Martínez et al., 2002).....	8
<b>Figura 2:</b>	Sectores y subsectores biogeográficos presentes en Andalucía (Rivas Martínez, 2007). ....	9
<b>Figura 3:</b>	<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 184. ....	11
<b>Figura 4:</b>	<i>Arenaria tetraquetra</i> L. subsp <i>amabilis</i> (Bory) H. Lindb. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 186 y dibujo de Boissier, tabla 29b (1840).....	13
<b>Figura 5:</b>	<i>Arenaria tetraquetra</i> L. subsp. <i>murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 186.....	14
<b>Figura 6:</b>	<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> . Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 184 y dibujo de Boissier, tabla 30(1840). ....	16
<b>Figura 7:</b>	<i>Arenaria armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 184. ....	18
<b>Figura 8:</b>	<i>Arenaria tomentosa</i> Willk. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 189 y dibujo de Willkomm, tabla 65D (1856).....	20
<b>Figura 9:</b>	<i>Arenaria arcuatociliata</i> G. López & Nieto Feliner. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 190. ....	22
<b>Figura 10:</b>	<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 196 y dibujo de Boissier, tabla 29a(1840).....	24
<b>Figura 11:</b>	<i>Arenaria delaguardiae</i> G. López & Nieto Feliner. Detalle de Flora Ibérica Vol. II: 201. ....	26
<b>Figura 12:</b>	Estructura básica de una cumarina.....	36
<b>Figura 13:</b>	2-fenilbenzo- $\gamma$ -pirona, núcleo básico de los flavonoides .....	40
<b>Figura 14:</b>	Estructura de la molécula de antociano .....	44
<b>Figura 15:</b>	Estructura general de una antraquinona .....	51

<b>Figura 16:</b>	Moléculas de triterpenos tetracíclicos (I) y pentacíclicos tipo $\beta$ -amirina (II).....	55
<b>Figura 17:</b>	Estructura general de los esteroides .....	56
<b>Figura 18:</b>	Estructura general de las saponinas esteroidicas espirostánicas (I) y furostánicas (II).....	58
<b>Figura 19:</b>	Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S completa de planta .....	77
<b>Figura 20:</b>	Esquema del proceso de extracción fraccionada de las muestras.....	93
<b>Figura 21:</b>	Espectro de absorbancia de <i>A. erinaceae</i> Boiss. comprendido entre las longitudes de onda de 200-400 nm .....	122
<b>Figura 22:</b>	Representación tridimensional del espectro de absorbancia de <i>Arenaria erinacea</i> Boiss. ....	122
<b>Figura 23:</b>	Espectro de absorbancia de <i>A. erinaceae</i> Boiss. a una longitud de onda = 254nm.....	123
<b>Figura 24:</b>	Alineamiento de las secuencias del ITS-1 de <i>Arenaria</i> . Delección para la posición (-). Coincidencia nucleotídica (*). Nomenclatura: <i>alfacarensis</i> ( <i>A. alfacarensis</i> Pamp.), <i>tetraquetraamabilis</i> ( <i>A. tetraquetra</i> L. subsp. <i>amabilis</i> (Bory) H. Lindb.), <i>armerinaarmerina</i> <i>A. armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> , <i>armerinacaesia</i> ( <i>A. armerina</i> Bory subsp. <i>caesia</i> (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle), <i>tomentosa</i> ( <i>A. tomentosa</i> Willk.), <i>arcuatociliata</i> ( <i>A. arcuatociliata</i> G. López & Nieto-Feliner), <i>delaguardiae</i> ( <i>A. delaguardiae</i> G. López & Nieto-Feliner). Se encuentran enmarcadas las dianas de restricción para las enzimas de restricción: XmnI (GAANN <sup>^</sup> TTC), RsaI (GT <sup>^</sup> AC), HaeIII (RGCGC <sup>^</sup> Y), HinfI (G <sup>^</sup> ANTC), XcmI (CCANNNN <sup>^</sup> NNNNTGG), HaeII (RGCGC <sup>^</sup> Y), NspII (GDGCH <sup>^</sup> C).....	145
<b>Figura 25:</b>	Árbol de Neighbor-Joining de todas las secuencias del ITS-1 analizadas en esta Memoria para especies del género <i>Arenaria</i> .....	45
<b>Figura 26:</b>	Alineamiento de las secuencias del ITS-2 de <i>Arenaria</i> . Delección para la posición (-). Coincidencia nucleotídica (*). Nomenclatura: <i>alfacarensis</i> ( <i>A. alfacarensis</i> Pamp.),	

tetraquetraamabilis (*A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb.), armerinaarmerina *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, armerinacaesia (*A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle), tomentosa (*A.tomentosa* Willk.), arcuatociliata (*A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner),delaguardiae (*A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner). Se encuentran enmarcadas las dianas de restricción para las enzimas de restricción: NspII(GDGCH<sup>^</sup>C), BstXI (CCANNNNN<sup>^</sup>NTGG), SacII (CCGC<sup>^</sup>GG), Cfo (G<sup>^</sup>CGC), HaeIII (GG<sup>^</sup>CC) y AluI (AG<sup>^</sup>CT) ..... 152

**Figura 27:** Árbol de Neighbor-Joining de todas las secuencias del ITS-2 analizadas en esta Memoria para especies del género *Arenaria*..... 153





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Localización y fecha de recolección de las especies objeto de estudio.....	86
<b>Tabla 2:</b>	Método instrumental de elución en HPLC: A (H <sub>2</sub> O 0,1% TFA), B (CH <sub>3</sub> CN 0,1% TFA) .....	99
<b>Tabla 3:</b>	Rendimientos obtenidos de cada uno de los extractos de las especies de <i>Arenaria</i> .....	102
<b>Tabla 4:</b>	Resultados de la determinación de humedad. ....	103
<b>Tabla 5:</b>	Resultados de la determinación de cenizas. ....	104
<b>Tabla 6:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.....	106
<b>Tabla 7:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb. ....	107
<b>Tabla 8:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria tetraquetra</i> subsp. <i>murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner.....	108
<b>Tabla 9:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (1) .....	109
<b>Tabla 10:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (2) .....	110
<b>Tabla 11:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (1).....	111
<b>Tabla 12:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (2).....	112
<b>Tabla 13:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria tomentosa</i> Willk.....	113
<b>Tabla 14:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria arcuatociliata</i> G. López & Nieto Feliner.....	114
<b>Tabla 15:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria erinaceae</i> Boiss. (1).....	115

<b>Tabla 16:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria erinaceae</i> Boiss. (2).....	116
<b>Tabla 17:</b>	Resultados del screening fitoquímico de <i>Arenaria delaguardiae</i> G. López & Nieto Feliner. ....	117
<b>Tabla 18:</b>	Resumen del screening fitoquímico. Abreviaturas: Glúc. (Glúcidos), Gom. (Gomas y mucílagos), Lip. (Lípidos), Cum. (Cumarinas), Flav. (Flavonoides), Antoc. (Antocianinas), Leuc. (Leucoantocianos), Tan. (Taninos), Antraq. (Antraquinonas), Triterp. (Triterpenos), Ester. (Esteroles), Sapon. (Saponinas), Alc. (Alcaloides), F1 (Flavonas), F2 (Flavonoles), F3 (Flavanonas), T1 (Taninos condensados), T2 (Taninos hidrolizables), B (Bouchardat), M (Mayer), D (Dragendorff), P (ácido pícrico).....	119
<b>Tabla 19:</b>	Resultados de la determinación del contenido en iones sodio y potasio.....	121
<b>Tabla 20:</b>	Localidades donde han sido recogidas las muestras.....	125
<b>Tabla 21:</b>	Secuencias de las parejas de cebadores empleadas para la amplificación.....	129
<b>Tabla 22:</b>	Presencia o ausencia de ITS-1 gene indel events en especies de <i>Arenaria</i> que poseen variación intraindividual del espaciador ITS-1. (a) Las posiciones diagnósticas están numeradas con referencia a la secuencia del ITS-1. (b)(-) indica la ausencia de un nucleótido en la posición diagnóstica, (*) Indica coincidencia nucleotídica. ....	146

## **I. INTRODUCCIÓN**



El Grupo de investigación del Departamento de Botánica denominado “Flora, Vegetación y Etnobotánica” desarrolla su trabajo sobre la definición ecológica y dinámica de las comunidades vegetales, la determinación y taxonomía de las plantas y el estudio del uso dado a los vegetales por el hombre.

Por otro lado, en el Departamento de Farmacología, una de sus líneas de trabajo, con una larga y fructífera trayectoria, se basa en la determinación fitoquímica de los componentes vegetales, con especial dedicación a los de origen silvestre y de uso (o posible uso) medicinal.

La Memoria de Investigación que presentamos como resultado de las actividades realizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral se incluye en las líneas sobre taxonomía y etnobotánica en cuanto al aspecto botánico y en el estudio fitoquímico, con sus posibles usos terapéuticos-medicinales, en lo referido a la línea de trabajo farmacológico.

De acuerdo con lo expuesto, se ha pretendido realizar un estudio fitoquímico sobre un grupo de taxones del género *Arenaria*, perteneciente a la familia *Caryophyllaceae*, incluyendo aspectos morfológicos y ecológicos, así como la detección y caracterización de grupos fitoquímicos. A ello se ha añadido un análisis sobre variabilidad genética entre poblaciones y entre taxones próximos con ITS (*Internal Transcriber Spacers*) (Susanna et al., 1999), en un intento de realizar una correcta tipificación de los taxones.

Dada la importancia que en la actualidad organismos internacionales como la O.M.S. conceden a la medicina tradicional y a las fitomedicinas y remedios de origen vegetal utilizados en ella, hemos considerado interesante avanzar en el conocimiento de estas especies de ámbito mediterráneo utilizadas en la fitoterapia popular y que han pasado desapercibidas para los investigadores, siendo seguramente una fuente potencial de nuevos principios de interés medicinal.

Un número relativamente elevado de especies de la familia *Caryophyllaceae*, correspondientes a diferentes géneros, se utilizan en el tratamiento de diversas afecciones relacionadas fundamentalmente con disfunciones renales. Es muy característica en esta familia la presencia de sales de potasio y saponinas (Cart et al., 1992; Fulcheri et al., 1998; Gunimka & Oleszek, 1998; Koike et al., 1994, 1999; Li et al., 1994; Mahato et al., 1988; Mbark et al., 2000; Schoröder et al., 1993) que en principio, pueden favorecer un efecto diurético.

Sin embargo, aunque son escasos los estudios fitoquímicos y farmacológicos previos sobre taxones de esta familia, se puede señalar algún ejemplo que pone de manifiesto tal relación, como en el caso de *Dianthus superbis* Herbs, que tiene actividad analgésica, antihepatotóxica (Hikino et al., 1984), y se muestra especialmente útil en el tratamiento de patologías renales, en la mayor parte de las ocasiones provocando un aumento de la diuresis (Rhiouani et al., 1999). En relación al género *Arenaria*, los estudios farmacológicos son muy escasos, aunque existen referencias de estudios fitoquímicos que demuestran la presencia de saponinas (Elgamal et al., 1997, 1998; Jia et al., 1998, 1999; Soliman et al., 2001).

Por otra parte, tras la experiencia acumulada en estudios etnobotánicos en cuanto a la observación del uso de plantas silvestres por la población andaluza, se ha constatado que existe una preferencia o discriminación en cuanto al uso de unas poblaciones respecto a otras, bien en una misma especie, bien en taxones muy próximos, diferenciados por los botánicos pero no así por los usuarios. Ello nos indica que, posiblemente, existe cierta variabilidad en la composición fitoquímica o porcentual de los compuestos químicos responsables de la acción y que es intuida por el uso popular.

Con el objetivo inicial de hacer un estudio en el seno de la familia *Caryophyllaceae*, la tradición en medicina popular que presentan algunas especies del género *Arenaria* (González-Tejero et al., 1995; Blanca & Valle, 1988), unido a su complejidad taxonómica y, en muchas ocasiones, al área sumamente restringida de sus taxones, ha decidido que fuese en este grupo donde hiciésemos un estudio que lo caracterizase de la forma más completa

posible. Esto implica una definición botánica (morfológica, biogeográfica, ecológica) y la caracterización fitoquímica y farmacológica (principios activos) y genética (estableciendo la variabilidad genética y la relación entre especies). Se ha pretendido, por tanto, estudiar desde estos tres niveles la mayor parte de los taxones incluidos en la sección *Plinthine* (Reichenb.)Pau, dentro del género *Arenaria*.

### I. 1. Caracterización de los taxones objeto de estudio

La familia *Caryophyllaceae* constituye el tipo del orden *Caryophyllales*, un importante grupo de taxones (más de ocho mil quinientas especies) que engloba a familias tan interesantes como las *Aizoaceae*, *Amaranthaceae* (incluidas *Chenopodiaceae*), *Cactaceae*, *Molluginaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolacaceae*, *Portulacaceae* y *Simmondsiaceae*. Comprende unos setenta géneros y dos mil doscientas especies distribuidas por todos los continentes (cosmopolita), teniendo representación incluso en la Antártida (*Colobanthus*). Son especialmente frecuentes en las zonas templadas y, entre ellas, en la Región Mediterránea, donde algunos de sus taxones (géneros, subgéneros, secciones) se han diversificado de manera notable.

En conjunto es una familia bastante natural y sus especies son, en su inmensa mayoría, plantas herbáceas (rara vez sufruticosas), anuales o perennes, con hojas opuestas, simples y enteras, que en muchos casos presentan vainas perfoliadas y que nacen de zonas hinchadas del tallo (nudos). No tienen estípulas o si las presentan, suelen ser escariosas y soldadas alrededor del nudo. Las inflorescencias, simples o compuestas, son siempre de tipo cimoso. Las flores, hermafroditas (excepcionalmente unisexuales), actinomorfas, tetrámeras o pentámeras, con periantio que puede ser homoclamídeo (falta la corola) o más usualmente, heteroclamídeo, con 4 o 5 sépalos, libres o soldados, a veces con cálculo (*Dianthus*) y 4 o 5 pétalos, libres, a menudo escotados, lobulados o laciniados; estambres en número de 4 a 8, en dos verticilos; ovario generalmente súpero, unilocular, con 2 a 5 carpelos y estilos. Fruto en cápsula pluriseminada, a veces sobre un carpóforo, dehiscente por dientes apicales, en número igual o doble al de estilos (rara vez el fruto es

una baya o una núcula monosperma). Tradicionalmente se han reconocido en la familia tres subfamilias: *Alsinoideae*, sin estípulas y con sépalos libres, donde se incluye el género *Arenaria*; *Silenoideae*, sin estípulas, con los sépalos soldados y *Paronychioideae*, con estípulas y sépalos libres.

**El género *Arenaria* L.** quedó recogido en la obra de Linneo, *Species Plantarum* (1763), con el número 423, incluyendo la planta a la que J. Bauhín le atribuyó este nombre en 1631. Proviene la palabra del latín *arenarius* -a -us = de arena, arenoso, haciendo referencia a que vive en terreno arenoso.

La Península Ibérica constituye un importante centro de diversificación del género, ya que en el territorio que abarca la obra *Flora Ibérica* (Península e Islas Baleares), se incluyen hasta 38 especies, que corresponden a 50 taxones si incluimos las subespecies (Vol. II, 1990). En un ámbito muy superior, como es Europa, en 1964 se censaron 51 especies, más unas 15 subespecies (*Flora Europaea*, Vol. I, 1964), mientras que para todo el norte de Marruecos se han identificado solo 10 especies, mas dos subespecies (Valdés, B et al., 2002).

Las plantas que comprende este género en su inmensa mayoría son hierbas, anuales, bienales o perennes, aunque también existen algunas sufruticosas. Las hojas son opuestas y enteras y no existen estípulas. Inflorescencias cimosas o solitarias, alguna vez en racimos. Flor hipógina con 5 sépalos (muy raramente 4), libres, persistentes, los internos con un margen membranoso; pétalos 5 (a veces 4), en general blancos, en alguna ocasión rosa o púrpura, enteros, retusos o emarginados; estambres 10, raramente 8, uniseriados, insertos en un disco glanduloso perígino; estilos usualmente 3, aunque pueden ser también 2, 4 o 5. Fruto en cápsula, dehiscente por doble número de dientes que el de estilos, en general 3 ó 6, bidentados. Semillas reniformes o globosas, algo comprimidas, en general negras; la testa rara vez es lisa y brillante, sino con células anchas y redondeadas, prominentes (testa coliculada), las dorsales o todas ellas a veces provistas de prominencias mamiformes, cónicas o cónico-cilíndricas.



De acuerdo, básicamente, con la clasificación infragenérica de McNeill (1962) y con la obra botánica de referencia *Flora Iberica*, de las 38 especies de *Arenaria* recogidas por G. López en *Flora Iberica* (Vol. II, 1990), 37 de ellas se incluyen en el subgénero tipo, y sólo *A. purpurascens* Ramond, una planta cespitosa de hojas sésiles, pétalos purpúreos, cápsula cilíndrica con semillas brillantes y lisas, propia del Pirineo y una estación en los Alpes, queda dentro del subgénero *Porphyrantha* (Fenzl) McNeill.

**El subgénero *Arenaria*** se caracteriza porque sus especies son hierbas, anuales o perennes, con hojas inferiores usualmente pecioladas y las caulinares sésiles, en muchas ocasiones con un nervio marginal engrosado. Las inflorescencias son cimosas, en ocasiones contraídas en glomérulos, o flores solitarias. Las flores son pentámeras o tetrámeras, con pétalos blancos, raramente rosados. La cápsula es ovoidea u ovoideo-oblonga, cuyo tamaño proporcional es variable; desde más corta hasta dos veces más larga que el cáliz. Las semillas presentan testa coliculada y muy rara vez es lisa.

La variabilidad en el subgénero es grande, por lo que los distintos taxones se agrupan en hasta 9 secciones: *Rariflorae* F. N. Williams (1 especie), *Grandiflorae* McNeill (2 especies), *Plinthine* (Reichenb.) Pau (14 especies), *Rotundifoliae* MacNeill (2 especies), *Planosepalae* McNeill (1 especie), *Orientalis* McNeill (10 especies), *Africanae* McNeill (2 especies), *Arenaria* (4 especies) y *Pungentes* McNeill (1 especie).

Cabe comentar que McNeill (*loc. cit.*: 127) incluyó la sección *Pungentes*, con especies sufruticosas de hojas punzantes, sépalos acuminados y pétalos más cortos que el cáliz, en un subgénero aparte (*Eremogone* (Fenz) Fenz), donde estaría el endemismo nevadense *Arenaria pungens* Clemente. G. López (*Flora Ibérica* vol II: 222) no está de acuerdo con ello y aunque estima que es un taxon notablemente diferente y posiblemente, incluíble en un subgénero distinto. Provisionalmente lo incluye, como hemos visto, en el subgénero *Arenaria*. Por otro lado, tanto McNeill como mas tarde, G. López & Nieto Feliner (1986: 360) dudan de la idoneidad de incluir al también endemismo nevadense *Arenaria nevadensis* Boiss. & Reuter en la sección *Arenaria* donde finalmente la incluyen, al presentar rasgos originales. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia de las sierras

Béticas como centro de diversidad del género *Arenaria* y, como veremos más adelante, especialmente en la sección *Plinthine*.

**La sección *Plinthine*** (Reichenb.) McNeill es un grupo bien delimitado morfológica y biogeográficamente, hasta el punto de haber recibido el rango taxonómico de género por parte de algunos autores, entre ellos Reichenbach (1837). La mayoría de sus especies son endemismos de la Península Ibérica, territorio que constituye indudablemente el centro de diferenciación del grupo, ya que a la riqueza de taxones hay que añadir la gran variabilidad de algunos de ellos y el que la distribución de los taxones no restringidos a la Península se localicen en su entorno inmediato (sureste de Francia, noroeste de Italia y norte de África).

Las especies de la sección *Plinthine* son hierbas perennes, cuyos tallos poseen, generalmente, un denso indumento de pelos cortos, retrorsos y sin ningún tipo de glándulas. Las hojas son sésiles, rígidas, connatas en la base, ciliadas, conduplicadas y canaliculadas, arqueadas en mayor o menor grado, con tres gruesos nervios, uno en posición central y dos laterales, hacia el margen. Flores sésiles, solitarias o en glomérulos, involucradas por pares de brácteas, pentámeras o, raramente, tetrámeras; sépalos libres similares a las brácteas y a las hojas; pétalos blancos (raramente rosas), enteros, en general mayores que los sépalos.

A esta descripción genérica habría que añadir la tendencia de muchas de sus especies a contraer sus tallos, dando lugar a plantas densamente cespitosas o pulvinulares, formando compactas almohadillas, lo que ha provocado su denominación común (papo, piel de león) y que tienen su máxima expresión en *A. alfacarensis* Pamp.

Como se ha señalado, es esta sección la más numerosa del género en taxones, ya que a las 14 especies hay que sumar otros 4 con el rango de subespecie. El estudio que hemos realizado se ha circunscrito a 9 de estos 18 taxones, centrándonos en las poblaciones existentes en las sierras Béticas, donde abundan los endemismos, con el objetivo de establecer posibles relaciones entre los taxones. En este conjunto no hemos podido trabajar con *A. racemosa* Willk., especie escasa de las sierras de Tejada y Almirajara

al no poder localizar ninguna población. Por otro lado, se ha incluido una población alejada del sudeste ibérico, concretamente una muestra de *A. erinacea* Boiss., procedente del noreste de la Península. Con ello se ha tratado de hacer una comparación entre ésta y las muestras andaluzas.

De esta forma, no se han incluido, además de *A. racemosa* Willk.: *A. vitoriana* Uribe-Echebarría & Alejandre, endemismo de la Serranía de Cuenca, la Alcarria y montes de Álava, donde se encuentra en poblaciones dispersas y reducidas; *A. tetraquetra* L. subsp. *tetraquetra*, propia de los Pirineos centrales; el complejo de *A. aggregata* (L.) Loisel, que comprende la subespecie tipo, propia de la franja del suroeste de Europa comprendida entre los Alpes Marítimos y la Provenza hasta Albacete, y la subsp. *pseudoarmeriastrum* (Rouy) G. López, endemismo que sustituye al tipo en las montañas sublitorales de Valencia y Alicante; *A. querioides* Pourret ex Willk., endemismo de las montañas silíceas del cuadrante noroccidental y central de la Península, en cuyo seno algunos autores distinguen la subsp. *fontiqueri* (Pinto da Silva) Rocha Afonso, de suelos serpentínicos; *A. favargerii* (Nieto Feliner) G. López & Nieto Feliner, endemismo de los cerros de la mitad sur de la Mancha ricos en yesos y *A. cavanillesiana* (Font Quer & Rivas Goday) Nieto Feliner, endemismo de los cerros de la mitad norte de la Mancha ricos en yesos.

El estudio lo hemos centrado en los taxones que a continuación se describen de forma más detallada, siguiendo el criterio taxonómico de *Flora Iberica*, aún cuando algunos taxones subespecíficos pensemos que merecerían el tratamiento específico, como es el caso de *A. murcica* y *A. caesia*. Las referencias ecológicas, biogeográficas y bioclimáticas tienen su base en los trabajos de Rivas Martínez et al. (2001, 2002a, 2002b, 2007).

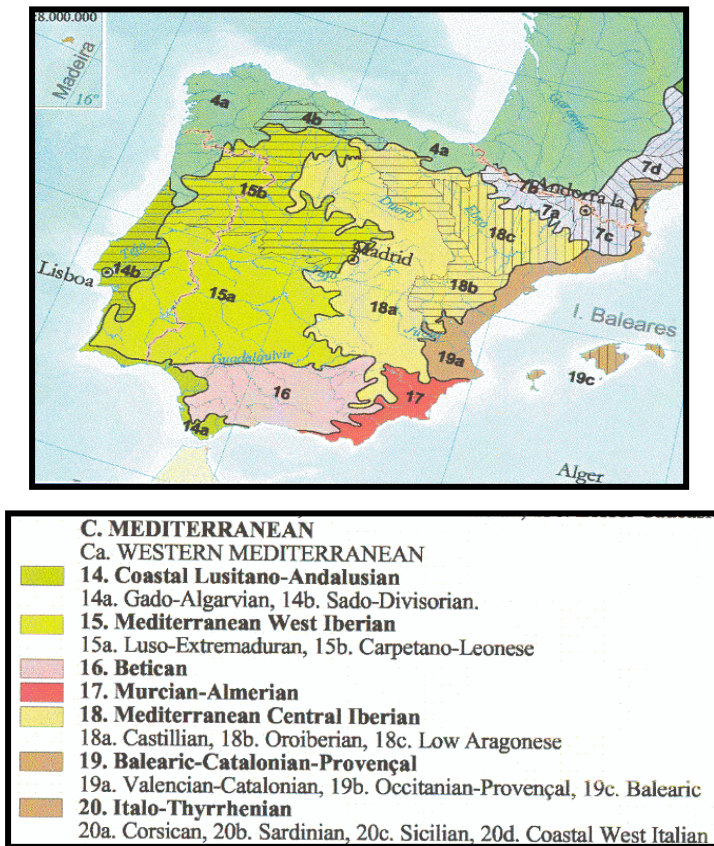
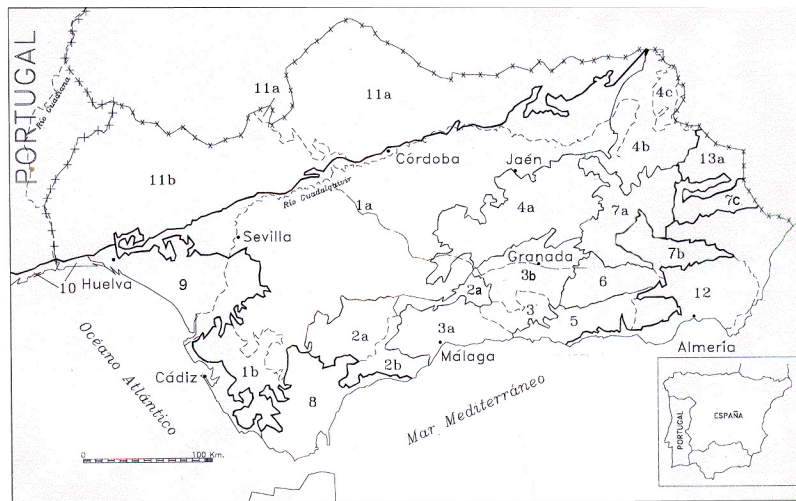


Figura 1: Provincias y subprovincias biogeográficas de la Península Ibérica (Rivas Martínez et al., 2002).



**Figura 2:** Sectores y subsectores biogeográficos presentes en Andalucía (Rivas Martínez, 2007). **Provincia Bética** 1. Sector Hispalense, 1.a. Subsector Guadalquivireño-Campiñes 1.b. Subsector Jerezano-Campiñes, 2. Sector Rondeño 2.a. Subsector Rondeño 2.b. Subsector Aloreño-Bermejense, 3. Sector Granadino-Almijareense 3.a. Subsector Almijareense 3.b. Subsector Granadino, 4. Sector Subbético 4.a. Subsector Subbético Occidental 4.b. Subsector Cazorlense 4.c. Subsector Subbético Oriental, 5. Sector Alpujarreño-Gadoreense, 6. Sector Nevadense, 7. Sector Accitano-Baztetano 7.a. Subsector Hoyano-Accitano-Baztetano 7.b. Subsector Orofilábrico-Baztetano 7.c. Subsector Oroestaciano-Mariense; **Provincia Lusitano Andaluza Litoral, Subprovincia Gaditano Algarviense** 8. Sector Aljibico, 9. Sector Gaditano-Onubense-Litoral, 10. Sector Algarviense; **Provincia Mediterránea Ibérica Occidental, Subprovincia Luso Extremadureense** 11. Sector Mariánico-Monchiquense 11.a. Subsector Marianense 11.b. Subsector Araceno Pacense; **Provincia Murciano Almeriense** 12. Sector Almeriense; **Provincia Mediterránea Ibérica Central, Subprovincia Castilla** 13. Sector Manchego.

1. - *Arenaria alfarensis* Pamp. in Boll. Soc. Bot. Ital. 1915:66 (1915)

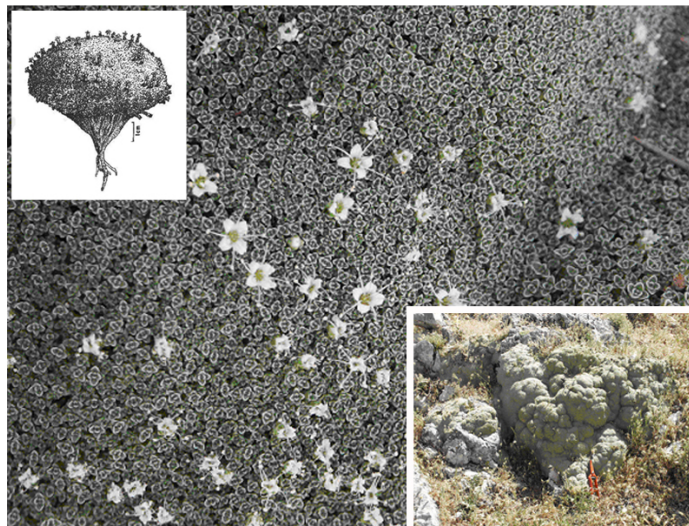
Este taxon fue denominado por primera vez, en 1904, por Huter, aunque de forma ilegítima, como *A. pulvinata* Huter. En la revisión del género de McNeill (1962: 113), se incluye el nombre de *A. lithops* Heywood, que posteriormente aparece en la obra *Flora Europea* y que conduce a numerosos autores a denominarla así. Sin embargo, ya en 1915, en una publicación que había pasado desapercibida para los autores británicos, Pampanini la había denominado correctamente, con el nombre de la localidad en donde supuestamente (Sierra de Alfacar) se había recolectado. La localidad exacta, en realidad, era las cercanías de la Cueva del Agua, término municipal de Iznalloz (Granada), en la conocida como Sierra Harana.

Especie densamente pulviniforme, que forma grandes almohadillas entre las rocas, a veces tapizándolas en superficies superiores al metro de ancho. Presenta en el interior del pulvínulo unos tallos con entrenudos glabros y lustrosos. Las hojas miden entre 0,8 y 2 mm de largo, por 0,5 a 1,2 mm de ancho y son ovado- orbiculares u ovadas, obtusas, pelosas por el haz, glabras por el envés y densamente imbricadas. Las flores son tetrámeras, solitarias, quedando, al final de los tallos, empotradas entre las hojas terminales. Es una especie funcionalmente dioica, en la que las flores masculinas son más grandes y vistosas. El cáliz oscila entre 1,5 y 3,5 mm de longitud y presenta sépalos ovados, obtusos, gruesos, con nervadura poco marcada. Los pétalos alcanzan hasta los 4 mm en las flores masculinas y apenas los 2 mm en las femeninas. Las anteras tienen entre 0,5 y 0,6 mm, mientras que la cápsula puede llegar a los 4 mm, con un contorno ovoideo-elipsoidal, siendo algo más corta a poco más larga que el cáliz. La dehiscencia de la cápsula se produce solo cuando se humedece por la lluvia. Las semillas, de hasta 0,9 mm son reniforme-orbiculares, con las células de la testa obtusas y pequeñas. Dotación cromosómica,  $2n = 40$ .

De acuerdo con lo expresado por Goyder (1987), el escaso nivel de variación en esta especie, comparado con otras especies de la sección *Plinthine*, sugiere un origen común de sus poblaciones, tratándose, probablemente, de un taxon paleoendémico, estable, restringido a un hábitat y ámbito geográfico muy definido, donde quedó refugiado como relictos. Señala, además, que la planta alberga en el pulvínulo semillas (a modo de banco) que pueden permanecer viables durante más de 10 años, estimando que los individuos pueden vivir más de 50, con un promedio anual de crecimiento de 3,8 mm.

Tanto las plantas vivas como las muertas son colonizadas por otros individuos. Heywood, en su tesis doctoral sobre la sierra de Cazorla (1953) observó la existencia de distintas "generaciones" creciendo sobre plantas viejas, mientras que Goyder (1987: 296) señala en Sierra Mágina que el 70% de los cojines de *A. alfacarensis* estaban invadidos por otras especies. Este hecho es común en plantas que forman almohadillas, como el mismo autor señala para *A. tetraquetra* y refiere de Gibbs (1950) para *Silene acaulis*.

*A. alfacarensis* es un endemismo de las provincias políticas de Granada y Jaén (posiblemente adentrándose en la de Albacete) y se localiza en contadas sierras pertenecientes todas ellas al Sector Subbético al que caracteriza, dentro de la Provincia biogeográfica Bética, de acuerdo con Rivas Martínez et al. (1991, 1997). Vive, entre los 1.500 y 2.200 m, en la sierra de Harana (Granada) y Mágina, la Cabrilla, del Pozo, Cazorla, Segura y Alcaraz (Jaén). Forma parte y caracteriza en parte (Rivas Martínez & al., 2002: 528), al matorral de caméfitos almohadillados Béticos y de las montañas del Atlas en Marruecos perteneciente a la alianza *Xeroacantho-Erinaceion* (Quézel) O. Bolós, que se desarrolla en el horizonte superior del piso supramediterráneo y en el oromediterráneo, en ombroclimas que van desde el seco al subhúmedo, en sustratos calcáreos, dentro del orden *Erinaceetalia anthyllidis* Quézel (*Rosmarinetea officinalis* Rivas-Martínez, T.E. Díaz, F. Prieto, Loidi & Penas). No obstante, por su forma de vida, sobre suelos esqueléticos, suele ser compañera, allí donde vive, de las comunidades rupícolas supra-oromediterráneas Béticas sobre socas calcareas pertenecientes a la alianza *Saxifragión camposii* Cuatrecasas ex Quézel (*Potentilletalia caulescentis*, *Asplenietea trichomanis*).



**Figura 3:** *Arenaria alfacarensis* Pamp. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 184.

Hemos estudiado y recogido muestras de la población existente en los alrededores de la Cueva del Agua, término municipal de Iznalloz (Granada), en la Sierra Harana a 1730

m de altitud. Población donde se recogieron los ejemplares para la descripción de la especie y que debido al reciente acondicionamiento de la carretera que accede a la cueva, ha sufrido el aniquilamiento de muchos ejemplares.

2.- *Arenaria tetraquetra* L., Sp. Pl.: 423 (1753) **subsp** *amabilis* (Bory) H. Lindb. fil. in Acta Soc. Sci. Fenn., Ser. B, Opera Biol. 1(2): 45 (1932).

Este taxon fue denominado *A. amabilis* por el oficial médico napoleónico Jean Batiste Bory de Saint Vincent. Pero años antes, en 1802, los botánicos del Real Jardín Botánico de Madrid, Mariano Lagasca y José Demetrio Rodríguez ya la habían descrito con el nombre de *A. imbricata* Lag. & Rodr. y aunque dicho nombre no se ha conservado oficialmente, se ha usado por numerosos autores.

Planta que forma almohadillas densas, hemisféricas, con cepa leñosa, muy ramificada. Entrenudos de los tallos glabros o casi glabros, lustrosos. Hojas de 1,5 a 2,5 (a veces hasta 4) mm de largas por 0,6 a 1,7 de anchas, glabras o pelosas por el envés, de triangular-ovadas a ovado-lanceoladas, obtusas, arqueado-patentes, con nervio marginal muy grueso, densamente imbricadas. Flores pentámeras o, muy raramente, tetrámeras, solitarias o, a veces, en racimos densos de 3 a 5 flores, sobresaliendo casi por completo de la almohadilla. Cáliz de entre 4 y 6 mm, con sépalos ovado-lanceolados, ciliados, con nervadura neta. Pétalos de 5 a 8 mm, más largos que los sépalos. Anteras hasta de 0,8 mm. Cápsula de 4 a 5,5 mm, ovoideo-oblonga, submembranácea, de poco más corta a poco más larga que el cáliz. Semillas de 0,7 a 1mm, reniformes, negras, con las células de la testa pequeñas y poco prominentes. Dotación cromosómica,  $2n = 20$ .

Endemismo de Sierra Nevada, donde es frecuente y vive entre los 2.400 y 3.400 m de altitud, tanto en la provincia de Granada como la de Almería (sector biogeográfico Nevadense, provincia Bética), en suelos silíceos poco evolucionados (esquistos, cuarcitas...). Es un taxon característico del pastizal psicroxerófilo oro y crioromediterráneo que se incluye en la alianza *Nevadension purpureae* Quézel (*Festucetalia indigestae* Rivas Goday & Rivas Martínez; *Festucetea indigestae* Rivas Goday & Rivas Martínez), pastizal



silicícola, de suelos geliturbados, con especies gramínoideas y camefíticas, constituyendo una etapa serial de los enebrales oromediterráneo y formando parte del pastizal climácico crioromediterráneo.



**Figura 4:** *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 186 y dibujo de Boissier, tabla 29b(1840).

Nuestras muestras proceden de Sierra Nevada (Granada), de la vertiente norte, en el paraje conocido como Lavadero de la Reina, a 2650 m.

3.- ***Arenaria tetraquetra* subsp. *murcica*** (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner in Bot. J. Linn. Soc.97: 3 (1988)

La descripción inicial del taxon fue hecha por Font Quer, que en 1948 la denominó *A. aggregata* var. *murcica* Font Quer. En la consideración, como opinan otros autores, de constituir una especie independiente, la nomenclatura del taxon debe ser: *A. murcica* (Font Quer) Rivas Martínez, A. Asensi, Molero Mesa & Valle.

Taxon de porte pulvinular, forma almohadillas densas, hemisféricas, a veces algo laxas, en general de menor tamaño que el taxon precedente, con cepa leñosa, ramificada. Entrenudos superiores de los tallos, al menos de los floridos, más alargados, densamente pelosos. Hojas de 1,5 a 2,5 (a veces hasta 3) mm de largas por 0,6 a 1,5 de anchas, pelosas o glabras por el haz, de triangular-ovadas a ovado-lanceoladas, obtusas, en raras ocasiones mucronadas o agudas, arqueado-patentes, con nervio marginal muy grueso, densamente imbricadas. Flores pentámeras, solitarias o, a veces, geminadas o 3 a 5. Cápsula de 4 a 6,5 mm, ovoideo-oblonga, submembranácea, de poco más corta a poco más larga que el cáliz. Semillas de 1 a 1,2 mm, reniformes, negras, con las células de la testa grandes y prominentes. Dotación cromosómica,  $2n = 60$ .

Es un endemismo de las montañas Béticas de naturaleza calcárea, extendiéndose por las sierras de Granada, Jaén y Albacete (La Sagra, Baza, Orce, Mágina, Cazorla, Las Villas, Segura y Alcaraz), extendiéndose, por tanto, por los sectores Subbético y Accitano-Baztetano (provincia Bética), en altitudes comprendidas entre los 1.600 y 2.250 m, desarrollándose entre el matorral cacuminal y de laderas expuestas, sobre suelos poco evolucionados. Es un taxon característico de la alianza *Xeroacantho-Erinaceion* (Quézel) O. Bolós (*Erinaceetalia anthyllidis* Quézel; *Rosmarinetea officinalis* Rivas-Martínez, T.E. Díaz, F. Prieto, Loidi & Penas).



**Figura 5:** *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 186.

La población en que recogimos las muestras se localiza en la Sierra de Baza (Granada), en el cerro denominado Calar de Santa Bárbara, a 2.140 m de altitud.

4.- ***Arenaria armerina*** Bory in Ann. Gén. Sci. Phys. 3: 5 (1820) **subsp. *armerina***

Bory describió el taxon en la misma publicación en que dio a conocer *A. amabilis*. En este caso la señaló creciendo entre el matorral, en frente de Güejar Sierra (Sierra Nevada, Granada). No obstante, su área de distribución es bastante amplia, llegando hasta el otro lado del Mediterráneo.

Es una planta muy variable, cespitosa, a veces subpulviniforme, que alcanza hasta los 35 cm, sufruticulosa, con cepa muy ramosa. Tallos alargados, gráciles, densamente pelosos, con indumento de pelos cortos, retrorsos, no lanosos, de menos de 0,2 mm. Hojas de 2 a 5 (o hasta 7,5) por 0,5 a 1,5 mm, linear-lanceoladas u oblongo-lanceoladas, a veces suborbiculares, obtusas o, muy raro, agudas, arqueadas, glabras o glabrescentes por el envés, pelosas en el ápice o raramente glabras por el haz. Inflorescencias en glomérulos terminales, con 2 a 12 flores, rara vez flores solitarias; brácteas en general mucho más cortas que las flores. Flores pentámeras. Cáliz de (3,5)4 a 6,5(7,5) mm, peloso o glabrescente; sépalos de ovado-lanceolados a oblongo-lanceolados, obtusos, contraídos o atenuados en el ápice de manera algo brusca, con márgenes curvados. Anteras de 0,6 a 1 mm. Cápsula de 4 hasta 7,5 mm, fusiforme u ovoideo-oblonga, subcoriácea, mayor o igual que el cáliz. Semillas de 1 a 1,3 mm, reniformes, negras, con las células de la testa obtusas, redondeadas, raramente mamiformes. Dotación cromosómica,  $2n = 30, 60$

Se distribuye por las provincias del sudeste peninsular, desde Alicante hasta Málaga, incluyendo Albacete, Murcia, Jaén, Almería, Córdoba y Granada, y el norte de Marruecos. Es el único taxon de la sección *Plinthine* presente en ambos lados del Estrecho de Gibraltar. En nuestro territorio se sitúa en las sierras Béticas, en altitudes comprendidas entre 1000 y más de 3.000 (3.400) m en Sierra Nevada. Presente en los sectores Rondeño, Subbético, Granadino-Almijareense, Accitano-Baztetano, Nevadense y Alpujarreño-

Gadorensis Es indiferente en cuanto al tipo de sustrato, aunque prefiere los de naturaleza básica. Vive entre el matorral camefítico en zonas de suelo pedregoso o poco desarrollado, formando parte de las comunidades de tomillares meso y supramediterráneos, secos a subhúmedos, calcícolas Béticos, propios de la alianza *Lavandulo-Echinopartion boissieri* Rivas Goday & Rivas Martínez (*Rosmarinetales officinalis*; *Rosmarinetea officinalis*) y en los piornales xeroacánticos calcícolas de la alianza *Xeroacantho-Erinaceion* (Quézel) O. Bolós (*Erinaceetales anthyllidis*; *Rosmarinetea officinalis*). En sustratos silíceos, se la considera característica de la subalianza *Thymenion serpylloidis* (Rivas Goday & Rivas Martínez) Rivas Martínez, Fernández González & Sánchez Mata, que comprende el tomillar-pastizal de la montaña nevadense en su piso oromediterráneo. Se incluye en la alianza *Nevadension purpureae* (*Festucetales indigestae*; *Festucetea indigestae*).



**Figura 6:** *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina*. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 184 y dibujo de Boissier, tabla 30(1840).

Hemos obtenido dos muestras de este taxon: una de la Cueva del Agua de Iznalloz (Granada), a 1.600 m. y otra de la Sierra de Orce (Granada), a 1.540 m. de altitud.

5.- ***Arenaria armerina* subsp. *caesia*** (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle in Biol.-Écol. Médit. 9: 165 (1982)

Taxon descrito inicialmente por Boissier quien, tras el análisis de las recolecciones efectuadas durante su viaje de 1837, originalmente publicó muchas novedades en su famosa obra en que describe su trayectoria en el Reino de Granada (*Voyage Botanique dans le midi de l'Espagne*) y otras, como esta, fue adelantada a la comunidad científica. Así, en 1838 publica una obra (Boissier, 1838) en que, entre las novedades señala *A. armeriastrum* var. *caesia* Boiss., localizando la planta en el Dornajo de Sierra Nevada a unos 6.500 pies (alrededor de dos mil metros de altitud).

Morfológicamente parece estrechamente emparentada con la subsp. *armerina*, pero su número cromosómico cuestiona el parentesco (Nieto Feliner, 1985) y apoya la decisión de adoptar el rango subespecífico, reconociéndose frente al tipo por el tomento que cubre la mayoría de sus órganos. Otros autores, sin embargo, apoyan su definición como rango específico (*A. caesia* (Boiss.) Rivas-Martínez, A. Asensi, Molero Mesa & Valle, in Rivas Martínez et al., 1991), además de por lo expuesto, por presentar una ecología claramente distinta.

Planta laxamente cespitosa, glauco-cenicienta, con tallos difusos de hasta 20 cm., sufruticulosa, con cepa ramosa. Tallos alargados, gráciles, densamente pelosos, con indumento de pelos crespos, sublanosos, densos, de hasta 0,6 mm en la inflorescencia. Hojas de 2 a 4,5 (o hasta 5) por 0,5 a 1,2 mm, linear-lanceoladas u oblongo-lanceoladas, a veces suborbiculares, obtusas o, muy raro, agudas, arqueadas, con pelos largos por el haz y algo pelosas por el envés. Inflorescencias a menudo ramosas, en glomérulos terminales de hasta 12 flores; brácteas en general mucho más cortas que las flores. Flores pentámeras. Cáliz de (4)4,5 a 7 mm, lanuginoso; sépalos de ovado-lanceolados a oblongo-lanceolados, obtusos, gradualmente estrechados hacia el ápice, con la mitad superior casi linear. Anteras de 0,6 a 1 mm. Cápsula de 6 a 7 mm, fusiforme u ovoideo-oblonga, subcoriácea, mayor o igual que el cáliz. Semillas de 0,9 a 1 mm, reniformes, negras, con las células de la testa mamiformes u obtusas. Dotación cromosómica,  $2n = 36$ .

Es un endemismo cuya área de distribución se extiende por las sierras de Granada y, posiblemente, en alguna de Málaga (sector Granadino-Almijarense, dentro de la provincia Bética.), en altitudes comprendidas entre los 1.000 y 2.000 m: Sierra Nevada, Cázulas, Alfacar, Huetor, Harana, Tejada. Vive exclusivamente sobre sustratos dolomíticos, sobre todo en arenas cristalinas, formando parte del pequeño matorral camefítico de la alianza supra y oromediterránea Bética *Andryalion agardhii* Rivas Martínez, a la que caracteriza (orden *Convolvuletalia boissieri* Rivas Martínez, Pérez Raya & Molero Mesa, clase *Rosmarinetea officinalis*).

Dos poblaciones de este taxon se han estudiado, la de la Cortijada de los Agustinos en Quéntar (Granada), a 1.400 m, y la de las cercanías a la Ermita de Nuestra Señora del Pilar en el Colmenar de Huetor Santillán (Granada), a 1.070 m. de altitud.



**Figura 7:** *Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 184.

6.- ***Arenaria tomentosa*** Willk. in *Linnaea* 25: 15 (1852)

Especie muy escasa desde que se describió, con un solo ejemplar, “entre Las Vertientes y Chirivel” (Willk, loc. cit.). Posteriormente han sido localizadas poblaciones en un área más amplia.

Es una planta cespitosa, sufruticosa, pequeña, que alcanza los 10 cm., de color verde ceniciento, muy pelosa. Tallos con escaso tomento, cortos, con numerosos restos foliares. Hojas de 1 a 2 (2,5) por 0,8 a 1,2 mm, ovadas o elípticas, subimbricadas, obtusas, arqueadas, pelosas por el haz y pelosas o glabrescentes por el envés, con nervadura gruesa. Las hojas de los renuevos de 0,5 a 1 mm, subconformes. Flores pentámeras, en glomérulos de 2 a 4 (5) o solitarias, a menudo con flores axilares debajo del glomérulo; brácteas mucho más cortas que las flores. Cáliz de 4 a 5,5 (6) mm, con escaso tomento; sépalos lanceolados, subobtusos o agudos, ciliados, con nervio central grueso. Pétalos de (4) 5 a 6,5 mm, poco más largos que el cáliz. Anteras de 0,6 a 0,7 mm. Cápsula de 2 a 4 mm, oblonga, inclusa, membranácea. Semillas de 0,7 a 0,9 (1) mm, reniformes-orbiculares, negras, con las células de la testa obtusas. Dotación cromosómica,  $2n = 30$ .

Endemismo que vive en zonas montañosas de las provincias de Granada y Almería, entre 1.000 y 2.200 m de altitud (sierra de Baza, Lúcar, Gádor), correspondientes a los sectores Accitano-Baztetano y Alpujareño-Gadoreense, dentro de la provincia Bética. Forma parte de los pequeños matorrales y pastos sobre suelos calcáreos, pedregosos, correspondientes a las alianzas *Lavandulo-Echinopartion boissieri*, meso-supramediterránea bética en ombroclima seco-subhúmedo (orden *Rosmarinetalia officinalis*) y *Xeroacantho-Erinaceion*, supra superior y oromediterránea seco-subhúmedo de las altas montañas béticas (orden *Erinaceetalia anthyllidis*). Clase *Rosmarinetea officinalis*.

Se han estudiado muestras de la población existente en el Calar de Santa Bárbara de la Sierra de Baza (Granada) a 2.140 m. de altitud.



**Figura 8:** *Arenaria tomentosa* Willk. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 189 y dibujo de Willkomm, tabla 65D (1856).

7.- ***Arenaria arcuatociliata*** G. López & Nieto Feliner in *Anales Jard. Bot. Madrid* 42: 353 (1986)

Descrita sobre muestras recogidas por Pallarés en 1973, entre Chirivel y Contador, provincia de Almería, junto al camino, hacia el kilómetro 132, a 1.100 m, en matorral calcáreo junto a encinar.

Especie sufruticosa o fruticulosa, de hasta 18 cm., cespitosa, muy pelosa, estrigulosa. Los tallos son erectos o ascendentes, con entrenudos usualmente más cortos que las hojas. Estas son de 2 a 3 (4) por 1 a 2 (2,5) mm, ovadas u ovado-lanceoladas, obtusas, netamente arqueado-recurvadas y ciliadas hasta la mitad, pelosas por el haz, pelosas o glabrescentes por el envés, con nervadura gruesa; hojas de los renuevos imbricadas, de cerca de 1 mm, subconformes. Flores pentámeras, en glómérulos de 2 a 6 (10) flores, frágiles, densamente pelosos, rara vez alguna flor solitaria; brácteas arqueado-patentes, carinadas, con el nervio medio grueso y superando un tercio de la longitud de las



flores. Cáliz de 4 a 5 (5,5) mm, con escaso tomento; sépalos lanceolados, subagudos o mucronados, arqueados en el ápice, largamente ciliados. Pétalos de 6,5 a 7 mm, más largos que los sépalos. Cápsula de 2,5 a 4 (4,5) mm, oblonga, inclusa, submembranácea. Semillas de 1 a 1,2 mm, reniformes, negras, con las células de la testa obtusas, pequeñas. Dotación cromosómica  $2n = 30$ .

Convive frecuentemente con *A. tomentosa* y se diferencia de ella (G. Lòpez & Nieto Feliner, 1986) por sus hojas netamente mayores, de 2-3 (-4) mm, arqueado recurvas-ciliadas hasta cerca de la mitad, así como por sus glomérulos plurifloros, que se desarticulan fácilmente, sus brácteas mucho mayores, de hasta 3,5 x 2,5 mm, con nervadura más prominente, sus sépalos arqueado patentes y sus semillas más grandes, de 1-1,2 mm frente a 0,8-0,9(-1) mm de *A. tomentosa*. La fenología parece ser también algo diferente, floreciendo en general antes *A. arcuatociliata* en una misma localidad.

De *A. armerina* se diferencia fácilmente por su cápsula pequeña, membranácea, inclusa, de menos de 4,5 mm, (igualando o superando al cáliz en *A. armerina*), por sus hojas y sépalos mucho más recurvados, ciliados más largamente, por sus entrenudos constantemente abreviados, poco más largos que las hojas y su indumento.

Endemismo de las zonas montañosas de Andalucía oriental (provincias de Granada y Almería), en las sierras de Baza, Orce, la Sagra, Lúcar, etc., entre los 800 y 1.200 m de altitud. Sectores biogeográficos Accitano-Baztetano y Subbético, dentro de la provincia Bética. Vive entre los tomillares que se desarrollan en suelos poco evolucionados sobre sustratos calcáreos. Caracteriza a la alianza *Lavandulo- Echinopartion boissieri*, que comprende este tipo de matorral de los pisos meso y supramediterráneo en ombroclima seco a subhúmedo y que engloba a las asociaciones béticas (*Rosmarinetalia officinalis*, *Rosmarinetea officinalis*).



**Figura 9:** *Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 190.

Se localizó una población y se recogieron las muestras necesarias en la denominada Casa del Bosque, en la Sierra de Orce (Granada), a 1.110 m. de altitud.

8.- ***Arenaria erinacea*** Boiss., Voy. Bot. Espagne 2: 103, tab. 29<sup>a</sup> (1840)

Especie descrita por Boissier tras su recorrido por el Reino de Granada en 1836, la refiere de la Sierra Tejada a unos 2.000-2.200 m. de altitud, e indica que la conoce también de los montes del reino de León, al haber observado pliegos del herbario de De Candolle recogidos por Lagasca.

Es una planta pulviniforme o densamente cespitosa, con cepa leñoso-tortuosa muy ramificada. Tallos pelosos con entrenudos generalmente más cortos que las hojas. Hojas de 2 a 6 (7) por 0,7 a 1,2 (1,7) mm, lanceoladas u oblongo-lanceoladas, agudas, aristadas (arista de 0,2 a 0,5 (0,6) mm), más o menos arqueadas, glabras o escasamente pelosas por el envés, principalmente en el nervio medio. Flores pentámeras, solitarias o en glomérulos de 2 a 4 (5), a menudo con flores o glomérulos axilares por debajo del terminal; brácteas más cortas que las flores. Cáliz de 4,5 a 7 (8,5) mm, peloso o glabro; sépalos oblongo-

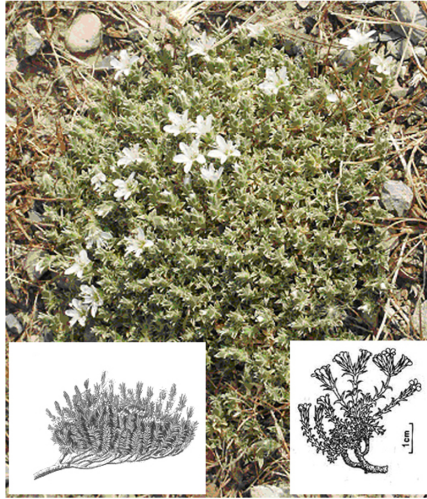
lanceolados, agudos, largamente atenuados en el ápice. Pétalos 6 a 9,5 (10) mm, mayores que el cáliz. Anteras 0,6-0,8 mm. Cápsula 3 a 4,5 (5) mm, ovoideo-oblonga, submembranácea, más corta o casi igualando al cáliz. Semillas 1 a 1,3 (1,4) mm, reniformes, negras, con las células de la testa obtusas y relativamente pequeñas. Dotación cromosómica  $2n = 20, 28$ .

Incluye una serie de poblaciones, adaptadas al clima mediterráneo continental extremado, que se distribuyen por todo el arco de montañas calizas más o menos interiores del norte, este y sur de la Península Ibérica, desde las montañas próximas a Grazalema en Cádiz hasta la Cordillera Cantábrica y este de Galicia, en matorrales nanocamefíticos más o menos pedregosos y comunidades de tomillar-pradera coincidiendo en gran parte con el área de *Festuca hystrix* y *Poa ligulata*. Ya Boissier, al describirla de la Sierra Tejada, la consideró idéntica a las poblaciones orocantábricas. Resulta en efecto muy difícil establecer una separación morfológica satisfactoria entre las distintas razas de la *A. erinacea*, a pesar de que ésta presenta una gran diversidad e inestabilidad cromosomática (Nieto Feliner 1985) Sus apetencias ecológicas (coloniza antiguas zonas sometidas a enfriamientos periglaciares) y su inestabilidad cariológica hacen pensar en un taxon joven en vías de diferenciación.

En el sur de la Península se localiza en las altas montañas calcareas de los sectores Rndeño y Granadino-Almijareense (sólo en el subsector Almijareense), de la Provincia Bética).

De este taxon hemos incluido una muestra procedente de las Tierras de Ágreda en Soria (Subsector Celtibérico, Sector Celtibérico-Alcarreño, Subprovincia Castellana, Provincia Mediterránea Ibérica Central), a 1.650 m de altitud, donde se desarrollaba en comunidades pertenecientes a *Sideritido fontquerianae* – *Arenarion microphyllae* Rivas Goday & Borja (*Festuco hystricis* – *Poetalia ligulatae* Rivas Goday & Rivas Martínez, *Festuco hystricis* – *Ononidetea striatae* Rivas Martínez, T. E. Díaz, F. Prieto, Loidi & Penas). El objetivo ha sido observar posibles diferencias en cualquier aspecto respecto al resto de taxones estudiados y, especialmente, respecto a *A. erinacea*, ya que la muestra soriana

corresponde a una variedad que ha sido denominada *A. aggregata* var. *microphylla* Pau y *A. erinacea* subsp. *microphylla* (Pau) Rivas Martínez & Costa.



**Figura 10:** *Arenaria erinacea* Boiss. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 196 y dibujo de Boissier, tabla 29a(1840).

Es un endemismo peninsular que, como se ha indicado, vive en montañas calcáreas continentales, entre los 800 y 2.300 m de altitud, en suelos crioturbados. Nuestras muestras proceden de la Cañada del Cuerno en la Sierra de las Nieves (Málaga), 1.540 m. de altitud.

10.- *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner in Anales Jard. Bot. Madrid 42: 351 (1986)

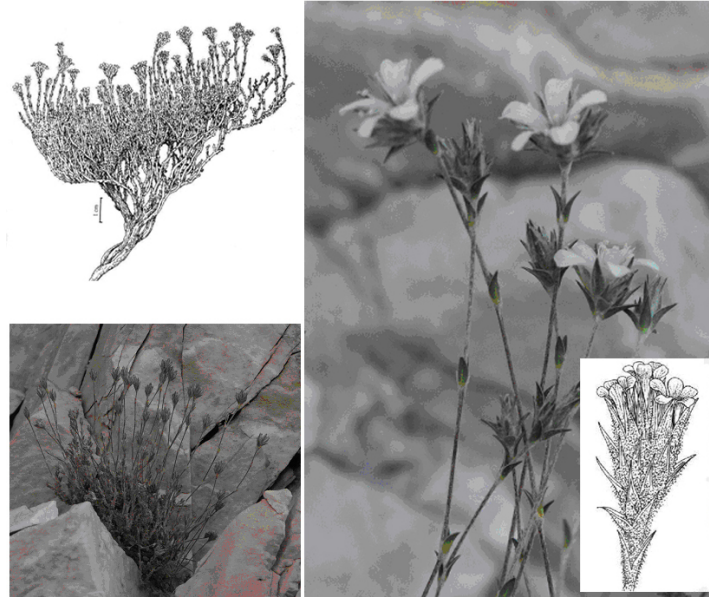
Taxon descrito de la Sierra de Cázulas en la provincia de Granada, en la junto a la carretera de Granada a Almuñecar. Nombre específico dedicado a D<sup>a</sup> Consuelo Díaz de la Guardia, profesora del departamento de Botánica de la Universidad de Granada.

Especie sufruticosa, de hasta 12 cm, con cepa leñoso-tortuosa, densamente flocoso-tomentosa, con pelos muy largos, araneosos. Hojas dimorfas, las inferiores (de los renuevos) de 1 a 1,5 (2) por 0,6 a 0,8 (1) mm, netamente obtusas, imbricadas, recurvadas, a veces mucronadas; las de los tallos floridos 2 a 3 (4) por 0,6 a 1,2 mm, ovado-lanceoladas u

oblongo-lanceoladas, netamente agudas o subaristadas, algo arqueadas. Flores pentámeras, en glómérulos terminales de 2 a 6 o solitarias; brácteas de hasta 4 mm, subuladas, subaristadas. Cáliz 4,5 a 5 (5,5) mm, flocoso-tomentoso; sépalos oblongo-lanceolados, subulados, subaristados. Pétalos 5 a 6,5 mm, mayores que los sépalos. Anteras 0,6 a 0,7 mm. Cápsula 2,5 a 3,5 (4) mm, oblongo-elipsoidal, membranácea, inclusa. Semillas 0,7 a 1 mm, subreniformes, negras, con las células de la testa obtusas o con prominencias elevadas que le confieren a la superficie aspecto equinado. Dotación cromosómica  $2n = 30$ .

Esta especie es uno más de los muchos endemismos béticos localizados en las arenas dolomíticas de las sierras de Granada y Málaga. Su indumento y su peculiar dimorfismo foliar, con hojas de las innovaciones obtusas y hojas caulinares superiores agudas e incluso subaristadas, le confieren un carácter singular y la hacen muy diferente de las otras especies de la sección. Sus hojas basales y su indumento pueden recordar los de *A. tomentosa*, pero las hojas caulinares y la inflorescencia la alejan ostensiblemente de dicha especie. Algunas formas extremas, en las que las hojas obtusas tienden a predominar en la mayor parte del tallo, se parecen a *A. armerina* subsp. *caesia*, de la que difieren no obstante por las cápsulas pequeñas e inclusas, membranáceas, así como por la forma ovalada u ovado-lanceolada de las hojas, a lo que hay que añadir el diferente número de cromosomas (G. López & Nieto Feliner, 1986).

Endemismo, muy restringido, de las sierra de Cázulas, de los Guájares y de Almijara en la provincia de Granada (sector Granadino - Almijarense, dentro de la provincia Bética), donde vive entre los 500 y 1.500 m de altitud, entre el tomillar, en litosuelos dolomíticos. Es especie característica de la alianza *Lavandulion lanatae* (Martínez Parras, Peinado & Alcaraz) Rivas Martínez, Molero Mesa & Pérez Raya, que comprende las asociaciones del matorral bético desarrollado sobre dolomías, en ambientes seco a subhúmedos de los pisos meso y supramediterráneo inferior (orden *Convolvuletalia boissieri*, clase *Rosmarinetea officinalis*).



**Figura 11:** *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner. Detalle de Flora Iberica Vol. II: 201.

Se ha estudiado la población del Cerro Cañuelo en Otívar, Sierra de Cázulas (Granada), a 1.180 m de altitud.

## I.2. Fitoquímica

Las drogas vegetales se obtienen de plantas medicinales que pueden ser silvestres (crecen espontáneamente) o cultivadas (controlando todo el proceso de producción). En nuestro caso, nos ocupan las plantas silvestres, por lo que nos centraremos en ellas, en sus características y condiciones. Originalmente, todas las plantas recolectadas eran silvestres, pero en la actualidad y debido a los inconvenientes que tiene el uso de plantas silvestres para la obtención de drogas vegetales, su uso se ha visto disminuido.

Hay hechos como la baja concentración de componentes, con los que hemos lidiado, dado que este trabajo no va dirigido a la obtención de grandes cantidades de principios activos, sino al hecho de comprobar la existencia de los mismos. Hemos tenido en cuenta que las plantas silvestres tienen un contenido variable de principios activos, sin embargo el hecho de que sea variable no quiere decir que esas diferencias sean demasiado marcadas, simplemente es algo que se ha considerado y tenido en cuenta en el momento del análisis de los resultados y que no nos afecta, pues como ya hemos comentado se trata de un estudio fundamentalmente cualitativo y no cuantitativo.

Otro hecho importante es la posibilidad de que haya confusiones en el momento de la recolección, por lo que hemos puesto un gran interés en la correcta clasificación botánica de los taxones. Al tratarse de especies silvestres, es necesario planificar y controlar el proceso de recolección con la finalidad de que ésta se produzca de forma que no se vea alterado el crecimiento de otras especies cercanas o el desarrollo de las mismas.

Hay que tener en cuenta que el momento de la recolección puede condicionar la calidad y cantidad de los principios activos. Por ello se han tenido en cuenta una serie de factores tales como la edad de la planta (especies demasiado jóvenes tienen un contenido no adecuado en principios activos) o el ciclo evolutivo del vegetal (era necesario tener las partes aéreas, por lo que se han recolectado en la época de floración: las hojas se deben recolectar cuando la fotosíntesis es más activa, que es antes o durante la floración y antes de la maduración de los frutos, y las flores antes o durante la época de polinización).

La conservación de las drogas es de vital importancia debido a que los vegetales, al ser arrancados de su medio natural, alteran su equilibrio metabólico y se producen reacciones que degradan la droga vegetal recolectada. Las causas de alteración interna más frecuentes son las reacciones enzimáticas, que se producen de forma más marcada cuando el contenido en agua de la planta es superior al 10%; y dentro de las causas de alteración externa, el calor, las radiaciones, la humedad, ataque de microorganismos, parásitos... son las más comunes.

Para evitar la degradación de las muestras se realiza una inhibición enzimática, que es un proceso reversible que consiste en eliminar el agua del vegetal hasta valores inferiores al 10%. Al descender la cantidad de agua, las enzimas detienen su actividad y el vegetal se conserva. El procedimiento que se ha utilizado ha sido la desecación al aire libre.

Para su conservación, las condiciones de almacenamiento han sido muy controladas para evitar alteraciones posteriores. El almacenamiento se ha hecho en lugar fresco, porque la temperatura es un factor importante en la conservación debido a que el calor puede producir pérdidas de principios activos y favorece la alteración de la droga. A su vez, éste debe ser también seco ya que la humedad excesiva lleva consigo la activación de procesos de hidrólisis y degradación de la droga, como ya hemos visto anteriormente. Es necesario preservar de la luz para que no se produzcan decoloraciones y procesos de degradación de la planta, causados fundamentalmente por la luz ultravioleta.

El tiempo de conservación de las muestras es variable según las características de cada una, pero en general no suele superar el año. Una droga pulverizada no debería conservarse demasiado tiempo, ya que ofrece una mayor superficie de contacto con el medio exterior, lo cual facilita su degradación.

La extracción de la droga, previamente pulverizada, se ha realizado en dispositivos soxhlet de extracción continua.



Para la purificación de las muestras se realizaron estudios de cromatografía preparativa en columna tipo flash y se comprobó la pureza por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

### I.2.1. Contenido en iones sodio y potasio

El cloruro de sodio es la sal más importante en la dieta humana. En la actualidad se sabe que el contenido en cloruro de sodio de la dieta está directamente relacionado con el desarrollo de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Karppanen, 2006; Das, 2001). El interés radica en el posible empleo de estas drogas como remineralizantes. En la actualidad existe un gran número de especies de origen vegetal que están siendo estudiadas por su contenido en sodio y potasio y la relación de éstos con la aplicación de la misma en terapéutica (Ajay et al., 2007; Haloui et al., 2000; Rajurkar et al., 1998).

La espectrometría de absorción atómica y, dentro de ella, la espectrofotometría de llama es un método para la detección de iones tales como el sodio y el potasio inorgánicos, y consiste en obtener los espectros de ambos iones introduciendo la solución de cenizas vegetales en una llama (Moreno Rojas et al., 2004; Kawashima et al., 2003).

El contenido en sales de potasio en muestras de origen vegetal se ha comprobado que está directamente relacionado con la aplicación de las mismas en alteraciones relacionadas con la diuresis, provocando un aumento de la misma. Tal es el caso de *Artemisia thuscula* Cav. (Benjumea et al., 2005) y *Equisetum arvense* L., al que se le atribuyen propiedades farmacológicas como diurético por las sales de potasio, y también es utilizado como remineralizante y útil en estado de fatiga (Fernández et al., 1982). Junto con la presencia de sales minerales, ciertas especies vegetales en ocasiones, presentan otros componentes que favorecen esta acción diurética, como es el caso de *Urtica urens*, L. -ortiga-, que posee sales minerales y ácidos orgánicos que determinan su acción diurética uricosúrica, colagoga, hemostática y antidiabética. Se indica principalmente en oligurias, urolitiasis, nefritis, hiperuricemias etc. (Vanaclotxa in Arteché; 1992), *Smilax aspera* L. -zarzaparrilla-, contiene sales minerales, sobre todo potásicas, y saponinas (sarsapogenina),

tiene acción farmacológica como diurética uricosúrica y está indicada en oliguria, litiasis renal, cistitis y como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión (Vanaclotha in Arteche; 1992), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. contiene sales de potasio y fructosano abundante y, derivado de esta composición, acción diurética (Benigni & col., 1962), *Prunus avium* (L.) L., *Zea mays* L. y *Petroselinum crispum* (Miller) A. W. Hill contienen sales potásicas que le confieren propiedades diuréticas, se indica en oliguria, urolitiasis, cistitis... (Martínez Lirola et al., 1997) y *Arundo donax* L. -caña-, contienen sales minerales de distinto origen (sílice, calcio, potasio), pero comparten la acción farmacológica como diurético (Vanaclotha in Arteche, 1992).

A continuación se muestra un estudio bibliográfico acerca de las técnicas de detección más utilizadas en los trabajos de investigación publicados hasta ahora.

## **I.2.2. Compuestos del metabolismo primario**

### **I.2.2.1. Glúcidos**

#### **I.2.2.1.a. Generalidades**

Los glúcidos representan el grupo químico más importante en los vegetales en cuanto a su capacidad plástica y energética. Se clasifican en “osas” (azúcares simples) y “ósidos”, en los que el grupo reductor se encuentra combinado, formando holósidos y heterósidos.

Los heterósidos se obtienen por la combinación de un azúcar reductor y una molécula no azucarada (genina) con la formación de una unión glicosídica que comporta siempre la eliminación de una molécula de agua. Los heterósidos son las sustancias más importantes entre las farmacológicamente activas de origen vegetal y se engloban dentro del grupo más amplio de azúcares de origen vegetal.

Los azúcares más simples (osas) son las pentosas y las hexosas, especialmente abundantes en las frutas y responsables de su sabor dulce. A partir de estos azúcares

simples se forman moléculas más complejas por unión o ramificación, como los ácidos urónicos (ácido glucurónico presente en el regaliz; ácido manurónico, en muchas algas y el ácido galacturónico, que se encuentra en numerosos frutos). Todos estos compuestos son bastante comunes en numerosas especies vegetales pero presentan escasa actividad farmacológica en general.

También se puede hablar de holósidos (*holos*, “todo” y -ósido, que denota la estructura química del azúcar), sustancias compuestas enteramente por azúcares. También existen largas cadenas de más de diez azúcares simples (polisacáridos), que forman entre otros las gomas, los mucílagos y las pectinas (fibra vegetal soluble), presente en numerosas plantas.

El nombre de heterósidos deriva de *hetero*, “diferente” y -ósido. Su estructura genérica se basa en la unión de un “glicón” (azúcar) con un “aglicón” (genina, molécula sin azúcar). Se clasifican, según el tipo de enlace entre la glicona y la aglicona, en O-heterósidos (el enlace es un puente de oxígeno, suelen ser estables en un ambiente básico y pueden ser hidrolizados si se someten a un pH ácido), S-heterósidos (puente de azufre), N-heterósidos (puente de nitrógeno), como ocurre en los nucleósidos, que tienen como genina una base purínica (adenina o guanina) o pirimidínica (timina, uracilo o citosina) y C-heterósidos (unión carbono-carbono directa).

#### **1.2.2.1.b. Detección**

La detección de azúcares reductores se suele realizar empleando el reactivo de Fehling ( $\text{Cu}^{2+}$  amoniacal), apareciendo un precipitado rojo ladrillo de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . La mayor parte de las osas y ósidós ofrecen una coloración violeta con el reactivo de Molish ( $\alpha$ -naftol y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), que sirve para diferenciar glúcidos solubles e insolubles, pues aparece un color púrpura sin agitación en los glúcidos solubles (la mayoría) y con agitación en los glúcidos insolubles. El ensayo de Keller-Kiliani ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HCl}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) es específico para detectar 2-desoxiazúcares, dando un color pardo-rojizo en la interfase.

#### **I.2.2.1.c. Distribución**

Los glúcidos son constituyentes universales de los seres vivos, encontrándose osas como la glucosa en todas sus células. Los holósidos también son frecuentes, tanto los oligoholósidos (lactosa, maltosa) como los poliholósidos (gomas, mucílagos y pectinas de muchas algas y vegetales superiores).

Los heterósidos se localizan fundamentalmente en los vegetales que contienen terpenos iridoides (olivo), polifenoles (cumarinas, flavonoides, antocianos), quinonas (antraquinonas) y heterósidos cardiotónicos (digitálicos).

#### **I.2.2.1.d. Aplicaciones terapéuticas**

La importancia farmacognóstica de las osas y holósidos radica principalmente en su poder alimenticio y en que algunos son portadores de acciones farmacodinámicas específicas: laxantes mecánicos y demulcentes (gomas y mucílagos), hemostáticos externos y protectores gástricos (pectinas), colagogos (sorbitol), laxantes suaves (manitol, glicerol), inmunoestimulantes en el caso de ciertas especies como *Plantago major* L. (Samuelsen, 2000). Pueden tener cierta actividad diurética actuando junto con las saponinas como es el caso de *Asparagus officinalis* L., cuyas raíces y rizomas contienen glúcidos (fructosanós) (Fernández y col., 1982) o actuando junto con las sales de potasio como es el caso de la grama -*Cynodon dactylon* (L.) Pers.- que contiene sales de potasio y fructosano abundante y, como consecuencia de esta composición, acción diurética (Benigni & col., 1962).

### **I.2.2.2. Gomas y Mucílagos**

#### **I.2.2.2.a. Definición**

Se designan gomas y mucílagos a las macromoléculas osídicas que se disuelven más o menos en contacto con el agua para formar disoluciones coloidales o geles, también se han denominado últimamente polisacáridos vegetales. Las gomas son moléculas complejas, siempre heterogéneas y ramificadas, que contienen ácidos urónicos, azúcares y polisacáridos metilados, según los casos. Son exudados vegetales de carácter patológico,

es decir, son el resultado de la agresión al vegetal por una picadura de insecto, una incisión natural o artificial, un ataque bacteriano, desecación de la savia, etc. Son ópticamente activas y el valor de su poder rotatorio es un elemento importante para su identificación.

En cuanto a los mucílagos, son productos fisiológicos, es decir, son propios del vegetal y se han localizado en células especializadas (células mucilaginosas). Estructuralmente son polisacáridos heterogéneos formados por una mezcla de pentosas, hexosas y ácidos urónicos; pueden poseer carácter neutro o ácido, lo cual permite su clasificación. En las especies marinas se encuentran mucílagos como el ácido alginico, que es capaz de absorber hasta doscientas veces su peso en agua. Sus funciones en el vegetal son la retención de agua y colaborar en el proceso de germinación.

#### **1.2.2.2.b. Detección**

La mayoría de las gomas son hidrosolubles y forman soluciones viscosas, algunas incluso, son incompletamente solubles formando geles. Del mismo modo, los mucílagos poseen la propiedad de hincharse en contacto con el agua y formar masas gelatinosas o soluciones coloidales. Ambos forman precipitados floculentos al adicionar etanol a una solución acuosa.

#### **1.2.2.2.c. Distribución**

Las gomas se localizan fundamentalmente en la familia *Papilionaceae* (acacia, tragacanto o *Astragalus gummifer* Labill.), aunque también están presentes en otras familias como *Mimosaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*... Los mucílagos suelen estar presentes en algas (*Laminariaceae*, fucus, agar-agar...), líquenes (*Cetriaria islandica* (L.) Ach., *Cetriaraceae*) y plantas superiores (*Plantago sp.*, *Malva sylvestris* L., *Althaea officinalis* L.).

#### **1.2.2.2.d. Aplicaciones terapéuticas**

Las gomas se utilizan frecuentemente en las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria, textil, etc. También son interesantes por sus propiedades terapéuticas. Como es el caso de la goma arábiga que es antitusiva y antiinflamatoria. Otras acciones interesantes son su actividad como laxante mecánico y espesante.

Los mucílagos neutros en general y, en concreto, los que poseen especies del género *Lavatera* (Martínez Lirola et al., 1997) tienen actividad como espesante, laxante, carminativo, digestivo... Los ácidos, sin embargo, se utilizan como emolientes, antitusígenos y protectores de las mucosas del tracto digestivo. Existen mucílagos que tienen propiedades hipocolesterolemiantes, hipoglucemiantes e inmunoestimulantes de tipo inespecífico. La carragenina (*Chondrus crispus* Stackhouse) posee propiedades antiinflamatorias sobre el aparato digestivo. Los mucílagos de *Adiantum capillus-veneris* L. -culantrillo-, la hacen un excelente emoliente con acción antiinflamatoria, béquica y expectorante, y está indicado en bronquitis, catarros e infecciones urinarias (Fernández y Nieto, 1982; Vanacloxta in Arteché y col., 1992). La especie *Tilia platyphyllos* Scop. contiene mucílagos en su inflorescencia al igual que *Malva sylvestris* L. (con un 15-20% de mucílagos), por lo que se utilizan como emolientes (Martínez Lirola et al., 1997).

### **1.2.2.3. Lípidos y Ceras**

#### **1.2.2.3.a. Definición**

Los lípidos son ésteres entre un ácido graso de cadena larga y un alcohol o poliol. Son sustancias de reserva energética de la planta y existen en prácticamente todas las células vegetales, constituyendo pequeñas granulaciones de complejos lípido-proteicos (lipoproteínas).

Están constituidos por un ácido graso (de cadena abierta o parcialmente ciclada) y un alcohol (glicerol, alcoholes alifáticos de peso molecular elevado y esteroides). Se clasifican en simples (aceites, mantecas y ceras) y complejos (fosfolípidos).

De forma general, se puede señalar que los lípidos son sustancias insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos apolares, propiedad que los caracteriza. Ha de tenerse en cuenta que no son compuestos volátiles, lo que los diferencia de las esencias.

Dentro de los lípidos vegetales se incluyen las ceras, son ésteres de ácidos (carnaúbito, cerótico) y alcoholes (cetílico, cerílico...), todos de elevado peso molecular, que forman mezclas complejas. Frecuentemente suelen contener estéridos (ésteres de ácidos grasos y esteroides -alcoholes esteroídicos-), alcoholes libres, ácidos libres e hidrocarburos (alquenos, alcanos).

Suelen encontrarse en la superficie de los órganos, como las hojas o los frutos, y desempeñan una función protectora frente a las agresiones del medio ambiente.

#### **1.2.2.3.b. Detección**

Los triacilgliceroles son solubles en disolventes orgánicos. Tratados con un hidróxido alcalino, liberan una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. A temperatura ambiente, los ácidos grasos son líquidos si su cadena carbonada tiene menos de 10 átomos de carbono; en caso contrario, son sólidos. Todos ellos son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Por ser ácidos formarán sales y serán esterificables: la volatilidad de los ésteres metílicos, mayor que la de los ácidos, permite su estudio por cromatografía gaseosa.

#### **1.2.2.3.c. Distribución**

Se encuentran en los frutos y semillas de los vegetales. Aunque ciertas raíces como el helecho macho (*Aspidium filix-mas* (L.) Sw.) o las de la polígala (*Polygala virginiana*) contienen una abundante cantidad de lípidos, es sin duda en las semillas donde más hallamos, tanto en cantidad como en variedad. Su concentración puede llegar al 50% en las semillas oleaginosas (ricino, almendras, cacahuete). Las grasas que se acumulan en las semillas desempeñan una función esencial en la germinación, mientras que las que se localizan en el pericarpio de los frutos, como es el caso de la oliva (*Olea europaea* L.), se pierden cuando éste madura.

En el reino vegetal podemos hallar ácidos grasos saturados en cantidad moderada (ácidos palmítico, mirístico, esteárico, láurico, araquídico) y, en mayor abundancia, ácidos grasos insaturados (oleico, erúcido, linoleico, linoléico...).

#### I.2.2.3.d. Aplicaciones terapéuticas

Diversos aceites tales como el de almendra (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) o avellana (*Corylus avellana* L.) se utilizan en cosmética y dermatología, otros como el aceite de oliva (*Olea europeae* L.) (González Herrera, 1992) son coleréticos y colagogos, o el aceite de sésamo que se obtiene a partir de las semillas de *Sesamun indicum* L. y que se utiliza como laxante suave o disolvente de medicamentos en la industria farmacéutica.

#### I.2.3. Compuestos fenólicos

Se denominan sikimatos todos los compuestos derivados del ácido sikímico. En general, se considera que para la biosíntesis de los ácidos cinámicos y derivados (ácido benzoico, fenoles simples, cumarinas, lignanos y ligninas) son los hidratos de carbono los compuestos precursores de su formación. La ruta biosintética más aceptada es la del ácido sikímico.

##### I.2.3.1. Cumarinas

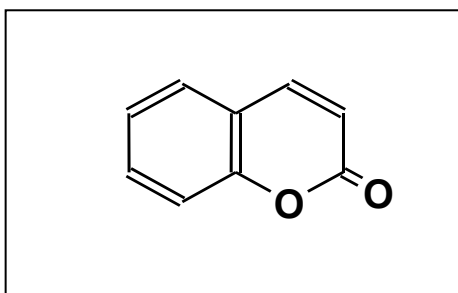


Figura 12: Estructura básica de una cumarina.

##### I.2.3.1.a. Generalidades

Se emplea el término “cumarina” para referirnos tanto a las geninas como a sus heterósidos. El origen del nombre cumarina deriva del haba Tonka (“coumarona”, en indígena), de la cual se extrajo la primera de ellas. Éstas son derivados de la  $\alpha$ -benzo-pirona



y muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos. Presentan un olor característico a heno fresco.

Las cumarinas se clasifican, según la genina, en hidroxycumarinas, metoxicumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas, pudiendo encontrarse en el vegetal en forma de heterósidos.

Son sólidos cristalizables de color blanco o amarillento. Las hidroxycumarinas son solubles en disolventes orgánicos (éter, cloroformo y alcoholes), las furanocumarinas y piranocumarinas sólo son solubles en disolventes orgánicos apolares (éter etílico, cloroformo) y los heterósidos son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas.

Las cumarinas presentan fluorescencia a la luz ultravioleta (azul, amarilla, verde, púrpura), lo cual permite su reconocimiento.

#### **I.2.3.1.b. Detección**

Para llevar a cabo su detección, se tiene en cuenta el hecho de que son fluorescentes a la luz ultravioleta y para aumentar la intensidad, se tratan previamente con amoníaco. Un método simple para la detección de cumarinas en los vegetales consiste en introducir una pequeña cantidad de material humectado en agua, en un tubo de ensayo, el cual se cubre con un papel de filtro previamente humedecido con sosa diluida; se calienta el tubo al baño maría hirviendo durante varios minutos y se observa el papel de filtro a la luz ultravioleta, debiendo aparecer fluorescencia amarillo-verdosa. Sin embargo, este método es sólo válido para la cumarina y compuestos volátiles relacionados.

La mayoría de los métodos empleados para detectar derivados cumarínicos se basan en la cromatografía del extracto, pulverizando con reactivos como el ácido difenilbórico, éster  $\beta$ -aminoetílico, ácido sulfanílico diazotado y potasa o bien acetato de uranilo.

#### I.2.3.1.c. Distribución

Las cumarinas se hallan ampliamente distribuidas en el reino vegetal, aunque son especialmente frecuentes en *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Umbelliferae*, *Apocinaceae*, *Compositae*, *Orquidaceae*, *Rutaceae* y *Labiatae*.

Podemos citar la umbeliferona, hidroxycumarina que está presente en la vellosilla (*Hyeracium pilosella* L.) y en la asafétida (*Ferula asafoetida* L.), furanocumarinas como las que se aprecian en la bergamota (*Citrus bergamia* Risso et Poit.) o en la biznaga (*Amni visnaga* (L.) Lam.), piranocumarinas de la biznaga, heterósidos como el melilotósido del meliloto (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.), el esculósido del castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum* L.) o el fraxósido de la corteza de fresno (*Fraxinus excelsior* L.).

#### I.2.3.1.d. Aplicaciones terapéuticas

Las cumarinas tienen estructuras muy variadas, por lo que sus propiedades farmacodinámicas abarcan una amplia gama terapéutica. Entre todas ellas, podemos destacar la acción vitamínica P (disminuyen la permeabilidad capilar y refuerzan los capilares), como es el caso del esculetol que, en su forma glucosídica (esculósido), presenta efectos tónicos venosos (venotónicos); otras presentan actividad fotosensibilizante cutánea (furanocumarinas); algunas de ellas como la xantotoxina, psoraleno y el bergapteno son responsables de fenómenos de alergia y dermatosis; antiinflamatoria; antiespasmódica (piranocumarinas); vasodilatadora coronaria; sedante e hipnótica suave; anticoagulante (dicumarol, su presencia en el meliloto, si éste está mal conservado, puede provocar un síndrome hemorrágico); estrogénica; antihelmíntica; antibacteriana y antimicótica (Stein et al., 2006); analgésica e hipotérmica (Randrianarivelosia et al., 2006).

Se han descubierto actividades antioxidantes en extractos de ciertas especies de origen indio (*Terminalia chebula* Retz., *Punica granatum* L., *Myrica nagi* Thunb. y *Cassia auriculata* L.) debidas a la presencia en ellas de cumarinas (Surveswaran, 2006), también se ha comprobado este efecto antioxidante -relacionado de forma directa con el contenido en cumarinas- en el extracto resinoso de *Haplopappus multifolius* Phil. ex Reiche (Torres et al., 2006).

A su vez, se ha demostrado el efecto citotóxico sobre células tumorales de las cumarinas de *Calophyllum dispar* Da C. (Guilet, 2001) y *Calophyllum brasiliense* Cambess (Reyes-Chilpa, 2004), igual que en *Kayea assamica* (Lee et al, 2003), *Angelica keiskei* Koidzumi (Akihisa et al., 2003) y en especies de la familia *Goodeniaceae*, como *Scaevola frutescens* Krause (Ghisalberti, 2004). Se ha comprobado también actividad antiulcerosa en algunas cumarinas (Bighetti et al., 2005; Gonzales et al., 2000) tanto a nivel de protección celular como antisecretora.

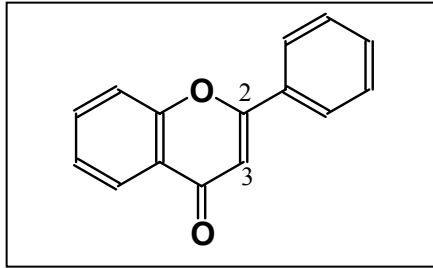
El extracto alcohólico de *Artemisia abrotanum* L. y el aceite de *Dianthus caryophyllum* L., ambos ricos en compuestos cumarínicos, han demostrado actividad repelente de mosquitos (Tunón, 2006).

### **I.2.3.2. Flavonoides**

#### **I.2.3.2.a. Generalidades**

Son un tipo de pigmentos vegetales cuya estructura, en un sentido amplio, se basa en el esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Su nombre deriva del latín *flavus*: “amarillo”. Los principales grupos estructurales que entran a formar parte del mencionado término genérico son: flavonas (leño de *Prunus*, perejil), flavonoles (sen), isoflavonas, flavanonas (regaliz), catequinas, leucoantocianos, antocianos, chalconas y auronas. Las catequinas, leucoantocianos y antocianos, aunque se pueden considerar incluidos dentro del amplio grupo de los flavonoides, se suelen estudiar como grupos fitoquímicos independientes.

La estructura presenta dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos, ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la  $\gamma$ -cromona (o benzo- $\gamma$ -pirona) con un fenilo en posición 2 y un carbonilo en posición 4. Son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por lo tanto, son polifenólicas. Se pueden encontrar como geninas libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a la glucosa, que es el azúcar más frecuente.



**Figura 13:** 2-fenilbenzo- $\gamma$ -pirona, núcleo básico de los flavonoides.

La clasificación habitual de los flavonoides es la siguiente:

1. Con doble enlace en la posición 2:
  - 1.1. Flavonas: con H en la posición 3.
  - 1.2. Flavonoles: con OH en la posición 3.
2. Sin doble enlace entre la posición 2:
  - 2.1. Flavanonas: con H en posición 3.
  - 2.2. Flavanoles: con OH en la posición 3.
3. Chalconas: con el anillo C abierto.
4. Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3 (3-fenil- $\gamma$ -cromona).

Su solubilidad dependerá de la forma en que se encuentren. Las geninas libres son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos apolares (éter etílico, cloroformo) y algunos polares (etanol, metanol). Los heterósidos son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Dependiendo del número de grupos OH libres que tenga la molécula varía la solubilidad: si son pocos o ninguno, será soluble en disolventes muy apolares, mientras que en el caso de tener más OH, será soluble en disolventes más polares.

Debido a las funciones fenol son ionizables en medio básico, lo cual permite su identificación porque tienen reacciones coloreadas con ciertos compuestos. Producen generalmente soluciones amarillentas que, al acidificar, viran a incoloras.

Ciertos grupos funcionales de los flavonoides son capaces de formar complejos con metales como el  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) o  $\text{Al}^{3+}$  ( $\text{AlCl}_3$ ), por lo que se consideran agentes quelantes.

Son sustancias fácilmente oxidables y, por lo tanto, antioxidantes naturales porque se oxidan con mayor rapidez que otro tipo de sustancias.

#### **1.2.3.2.b. Detección**

La prueba más empleada para la detección de los flavonoides es la reacción de la cianidina (o Shinoda). Ésta detecta los componentes con núcleo cromónico y consiste en la adición de un trozo de cinta de magnesio a un extracto alcohólico del vegetal, en medio ácido. Los flavonoides se reducen y dan compuestos coloreados y burbujas por el desprendimiento de  $\text{H}_2$  obteniéndose diversas coloraciones: las configuraciones de tipo flavona provocan la formación de un color anaranjado, los flavonoles dan una tonalidad rojo carmín y las flavanonas, rojo magenta. En casos muy particulares, pueden aparecer incluso coloraciones verdes o azules.

#### **1.2.3.2.c. Distribución**

Se encuentran ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores y prácticamente en todas las plantas superiores, sobre todo en partes aéreas: hojas, flores y frutos. Algunos flavonoides son responsables del color amarillo de algunas flores.

Los pigmentos flavónicos son los más extendidos en el reino vegetal aunque son menos frecuentes en vegetales inferiores. Son particularmente abundantes en ciertas familias: *Poligonaceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Poligonaceae*, *Umbeliferae* y *Compositae*. Los flavonoides suelen encontrarse en órganos aéreos y jóvenes como los botones florales y las hojas, donde se localizan en los tejidos superficiales (epidermis).

A nivel celular, suelen encontrarse en estado de heterósidos en las vacuolas, pero son más evidentes en las membranas de los cloroplastos. La luz no es un factor fundamental en su formación, pero influye cuantitativamente.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto en forma de heterósidos (O-heterósidos, más frecuentes, o C-heterósidos) como de geninas libres. Su presencia organográfica se detecta, sobre todo en las flores, frutos y hojas, mientras que sus bioprecusores son más frecuentes en otros órganos del vegetal.

Se encuentran en la familia de las *Rutaceae*, como en los cítricos (*Citrus sp.*), en formas complejas denominadas citroflavonoides (hesperidósido), en la ruda (*Ruta graveolens* L.), también en las *Rosaceae* (espino albar), *Poligonaceae*, *Equisetaceae* (cola de caballo), *Mirtaceae* (eucalipto)... Diversos flavonoides se han identificado y aislado a partir de las partes aéreas desecadas de la planta como es el caso de *Eschscholzia californica* Cham., *Chenopodium murale* L. y *Scutellariae radix*. Se han obtenido del extracto etanólico de *Eschscholzia californica* Cham. (Beck et al., 1999) y de *Chenopodium murale* L. (Gohar et al., 2000). Se ha descrito la presencia de una flavona (5, 7, 4'-trihidroxi-3',5'-metoxiflavona) (Goyder, 1986) en cinco especies de la sección *Plinthine*.

#### **1.2.3.2.d. Aplicaciones terapéuticas**

Tienen actividad como diuréticos (*Lespedecia capitata* Michx), hojas de *Aphloia*, retama), antiespasmódicas (regaliz y perejil) y propiedades vitamínicas P (aumentan la resistencia y disminuyen la permeabilidad de los capilares sanguíneos) como es el caso de *Camelia sinensis* L. (Martínez Lirola et al., 1997) y también son interesantes en dietética (frutos de *Citrus*).

Ciertas isoflavonas lipófilas tienen propiedades estrogénicas. Algunos derivados flavónicos como el rutósido y hesperidósido (citraflavonoides), son actualmente utilizados en terapéutica vascular.

La hidrogenación de las chalconas de *Citrus* da derivados azucarados empleados como edulcorantes.

Las tres actividades más importantes son la antivirásica (*Alkana orientalis* (L.) Boiss. -Suntornsuk, 2002-, *Geranium sanguineum* L. -Serkedjieva et al., 1999-), antiinflamatoria (*Haematoxylon campechianum* L., *Tanacetum vulgare* L., *Scutellaria baicalensis* Georgi. -Suntornsuk, 2002-) y citotóxica, de forma indirecta por medio de inhibición enzimática (Moon et al., 2006). En estudios previos se ha comprobado la actividad inhibitoria frente a patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* de extractos ricos en flavonoides de *Achillea clavennae* L. (Trifunovic, 2006). Otras acciones consideradas muy significativas por otros autores son sus efectos cardioprotectores, ya que reducen los daños post-isquémicos en el miocardio (Facino et al., 1999) y hay indicios probados de su uso para el tratamiento del asma, por su actividad espasmolítica (Hazekamp et al., 2001).

También se consideran hepatoprotectores (Oh et al., 2004) y antiespasmódicos.

Inhiben la hialuronidasa, potencian el ácido ascórbico y regulan la permeabilidad de las biomembranas (transporte de calcio intramembranoso).

Son antioxidantes con demostrada actividad (Dasgupta et al., 2007; Ielpo et al., 2000; Samuelsen, 2000; Heim et al., 2002; Hässig et al., 1999).

### **1.2.3.3. Antocianinas**

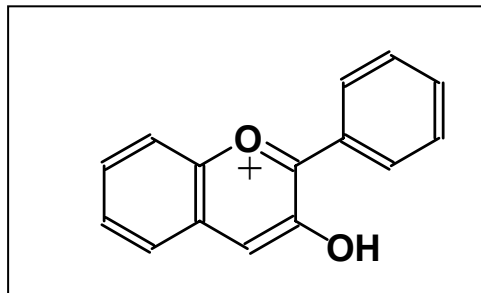
#### **1.2.3.3.a. Generalidades**

El nombre deriva del griego *anthos* -"flor"- y *kyanos* -"azul"-. Son pigmentos que se encuentran en la savia de la planta y son responsables del color del órgano, variando según el pH fisiológico, dando lugar a muchas de las coloraciones rojas, azules o malva de las flores y frutos. A los pigmentos antociánicos, deben sus intensos colores, entre otros, el fruto del cerezo (cianidina).

Podemos considerarlos incluidos dentro del amplio grupo de compuestos fenólicos denominados flavonoides, pues estructuralmente están relacionados con las flavonas.

Forman heterósidos, que se conocen con el nombre de antocianósidos, cuyas geninas son las antocianidinas. Se denomina antocianinas o antocianos al conjunto de antocianidinas y sus heterósidos. Las diferencias entre unas antocianinas y otras se deben al número de hidroxilos, la naturaleza y el número de azúcares unidos a la molécula, la posición de esta unión y la naturaleza y el número de ácidos aromáticos o alifáticos unidos a los azúcares en la molécula.

La estructura, como en los flavonoides típicos, conserva el sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> pero carecen de carbonilo en posición 4 porque forman, en medio ácido, sales de oxonio (ión flavinium), de color rojo. En medio neutro, la molécula es de color violeta y en medio básico tiene lugar la formación del anión, de color azul. Pueden tener en su estructura grupos hidroxilo o metoxilo. Se encuentran como geninas libres o más frecuentemente como heterósidos.



**Figura 14:** Estructura de la molécula de antociano.

Los heterósidos son solubles en disolventes polares (agua y alcohol) e insolubles en disolventes apolares y son inestables a cambios de pH, presentando coloración roja en medio ácido y azul en medio básico o neutro, lo cual permite su detección.

#### **1.2.3.3.b. Detección**

La extracción se puede llevar a cabo con agua y alcohol (metanol o etanol, en el caso de que se destine a fines alimenticios), añadiéndose un ácido diluido (HCl al 0,1-1%) porque se solubilizan con más facilidad. Para evitar la esterificación del carboxilo libre de los



antocianósidos acilados conviene utilizar otros ácidos débiles (acético, tartárico y cítrico) o volátiles (trifluoroacético) o trabajar en medio neutro (mezcla de alcoholes) y operar a baja T<sup>a</sup> (<30°C). Las disoluciones de antocianósidos son muy inestables y no pueden ser conservadas más que en atmósfera inerte, en frío y al abrigo de la luz.

La identificación de los mismos está basada en la coloración que presentan los extractos vegetales obtenidos en medio ácido (HCl) y posterior ebullición o por cromatografía, en el caso de las geninas.

#### **I.2.3.3.c. Distribución**

Los localizamos en los arándanos rojo y negro (*Vaccinium vitis-idaea* L., *V. myrtillus* L.), la malva (*Malva sylvestris* L.), las zarzamoras (*Rubus fruticosus* B.), las hojas de vid roja (*Vitis vinifera* L.) y en muchas otras especies, a las que los antocianósidos confieren un color rojizo oscuro, violeta e incluso negro.

#### **I.2.3.3.d. Aplicaciones terapéuticas**

Entre sus aplicaciones terapéuticas, podemos citar el empleo de algunos de ellos en afecciones capilares y venosas, así como en determinadas enfermedades oculares.

Los antocianósidos son muy utilizados en farmacognosia en las afecciones capilares y venosas. Los extractos de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* L. se utilizan para disminuir la permeabilidad y fragilidad capilar (Kong, 2003) y en trastornos oculares, sobre todo cuando hay problemas de visión nocturna, que la mejoran por actuar sobre la rodopsina, regenerando la pigmentación de la púrpura retiniana.

También ejercen una acción vitamínica P (disminuyen la permeabilidad capilar) y estimulante del tono nervioso). Reducen las glicoproteínas de las paredes de los vasos, por lo que se recomienda en la prevención de las alteraciones vasculares propias de la diabetes.

Se ha descubierto también una actividad antioxidante en ciertas antocianinas (Galvano et al., 2004) y efectos inhibidores de la peroxidación lipídica producida por la radicación ultravioleta (Kong, 2003).

#### **I.2.3.4.Taninos**

##### **I.2.3.4.a. Generalidades**

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos de origen vegetal, sin nitrógeno, hidrosolubles, con estructura polifenólica, capaces de precipitar las macromoléculas (proteínas, celulosa, gelatina), alcaloides y metales pesados. Esta capacidad para precipitar las proteínas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente. El curtido de la piel se basa en que los taninos se intercalan entre las fibras de colágeno, estableciendo uniones reversibles (interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, etc.) e irreversibles (enlaces covalentes), haciéndola impermeable e imputrescible. Dichas fibras adquieren así una gran resistencia frente al agua y el calor y la piel se convierte en cuero. Los taninos son capaces de precipitar las proteínas salivares y las glucoproteínas de la boca, por lo que la saliva pierde su poder lubricante y se obtiene un sabor astringente.

Para que una estructura polifenólica se pueda considerar tanino debe tener un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 aproximadamente. Por debajo o por encima de estos valores, la estructura no se intercala entre las macromoléculas, o si lo hace, no forma estructuras estables.

En los vegetales desempeñan una función protectora, ya que se ha comprobado que las plantas parasitadas tienen una mayor proporción de taninos que las no parasitadas, por lo que podrían ejercer una acción de tipo antibiótico y otra de tipo repelente, debido a su carácter ácido; a favor de ésta última cabe decir que las frutas verdes suelen contener muchos más taninos que las maduras, para prevenir que se ingieran antes que madure la semilla.

Estructuralmente, se clasifican en:

- Taninos hidrolizables o pirogálicos: los más importantes están combinados con el ácido gálico (galitaninos), que se encuentran en el ruibarbo (*Rheum sp.*), en el hammamelis (*Hamamelis virginiana* L.), en el castaño (*Castanea vesca* L.) o en las agallas del roble (*Quercus robur* L.). Otros forman complejos con el ácido elágico (elagitaninos), también se encuentran en el castaño y en la salicaria (*Lythrum salicaria* L.).

- Taninos no hidrolizables, condensados o catéquicos: algunas de las plantas que los poseen son el fresno (*Fraxinus excelsior* L.), el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), la nuez de cola (*Kola vera* Schum) o la ratania (*Krameria triandra* Ruiz et Pavon).

Los taninos hidrolizables son ésteres de ácidos fenólicos como el gálico y el elágico, que se unen por enlace éster a un núcleo central de glucosa. Pueden ser hidrolizados por ácidos o por enzimas, como la tanasa. Pueden establecerse dos tipos de taninos hidrolizables:

- Derivados del ácido gálico (galitaninos): son ésteres del ácido gálico y del ácido digálico con osas, generalmente la glucosa. Se encuentran en los clavos, hojas de gayuba, hammamelis, castaño, arce...

- Derivados del ácido elágico, dépsido del ácido gálico (elagitaninos): el ácido elágico se encuentra normalmente como diéster de su forma abierta o ácido hexahidroxidifénico. Los contienen las cortezas de granado, hojas de eucaliptos, corteza de roble...

Los taninos condensados (proantocianidinas) son polímeros de componentes fenólicos, menos solubles en agua que los pirogálicos y se oxidan en medio ácido a ebullición formando unos polímeros insolubles de color rojo conocidos como "flobafenos". Sus moléculas son más resistentes a la ruptura que los hidrolizables (no son hidrolizados por ácidos ni por la tanasa) y parecen ser intermediarios en su biosíntesis las catequinas y los flavan-3, 4- dioles, por tanto, están relacionados con los flavonoides.

Se encuentran en la canela, sauce, acacia, roble, hammamelis (en la corteza), krameria (ratania), helecho macho (en raíz y rizoma), cacao, guaraná, cola (en las semillas), hammamelis y té verde (en las hojas).

Se conocen como tanoides o pseudotaninos las moléculas con menor peso molecular y que no dan positivo el ensayo de la piel. Se localizan en el ruibarbo, cacao, guaraná, mate, café e ipecacuana (ácido ipecacuánico). Estos taninos se presentan en forma de moléculas complejas (usualmente combinados con ácidos clorogénico o cafeico, tal como sucede en el café, el té o el mate). Cuando están unidos a alguna molécula de azúcar, se denominan tanósidos.

Los taninos constituyen un grupo muy amplio de sustancias que poseen una serie de propiedades comunes, entre las que podemos destacar las siguientes:

- Son sólidos amorfos solubles en agua (forman soluciones coloidales) y en disolventes orgánicos polares (acetona, alcohol, glicerina), siendo insolubles en disolventes orgánicos apolares (éter etílico, cloroformo).

- Precipitan con soluciones de hidróxidos (cálcico, bórico), con metales pesados (wolframio, molibdato amónico), con alcaloides y con diversas macromoléculas (proteínas, celulosa).

- Forman complejos (son agentes quelantes) con metales pesados (cobre, mercurio, estaño, zinc), por lo que constituyen antídotos para intoxicaciones causadas por estas sustancias.

- Propiedades redox: se oxidan con facilidad en medio alcalino y sobre todo en medio ácido, pudiendo actuar como reductores de ciertos compuestos (ácido fosfowolfrámico, ferricianuro férrico).

- Son moléculas moderadamente estables. Los taninos hidrolizables se hidrolizan con facilidad en medio ácido, mientras que los taninos condensados son más resistentes a la hidrólisis. No obstante, algunos de sus enlaces pueden romperse y se produce una superpolimerización en la que se obtienen unos compuestos denominados "flobafenos" de mayor tamaño (Pm mayor de 3000, por lo que ya no son taninos y no precipitan las proteínas), insolubles en la mayoría de los disolventes y que dan un precipitado de color castaño.

- Tanto los hidrolizables como los catéquicos reaccionan con el  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  y forman precipitados, los primeros de color azul y los segundos, verde parduzco. Sólo los taninos condensados dan positiva la reacción de Stiasny.

#### **I.2.3.4.b. Distribución**

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran generalmente en mayor cantidad en las células muertas o enfermas y suelen estar combinados con otras sustancias tales como alcaloides, proteínas y osas. Ejercen un efecto inhibitor sobre muchas enzimas por la precipitación de las proteínas, por lo que contribuyen a la función protectora en cortezas y leños.

Existen familias que son particularmente ricas en taninos tales como las *Coniferae*, *Labiatae*, *Fabaceae* (roble, castaño), *Myrtaceae*, *Poligonaceae*, *Rosaceae* (zarzamora, agrimonia, tormentilla), *Rubiaceae*, *Ericaceae* (arándano, madroño), *Juglandaceae* (nogal), *Littraceae* (salicaria)... Pueden encontrarse en todos los órganos (eucalipto), cortezas (roble, castaño, granado, quina), madera (acacia), en raíces y rizomas (ratania, ruibarbo, fresal), hojas (zarzamora), flores (rosa roja), frutos (granadas, nuez, escaramujo), semillas (kola) y también se pueden acumular en tejidos viejos o en tejidos patológicos (agallas).

#### **I.2.3.4.c. Aplicaciones terapéuticas**

Se usan como antidotos en intoxicaciones por metales pesados y alcaloides, por su capacidad para formar estructuras complejas con estas sustancias.

Por sus propiedades astringentes (debido a su capacidad para precipitar proteínas de la piel y mucosas) se usan por vía externa como cicatrizantes y por vía interna como antidiarreicos. Ejercen el efecto antidiarreico en el intestino y, para evitar la hiperacidez gástrica que producirían, se administran combinados con albúmina o gelatina. De esta forma el tanino no se libera hasta llegar al intestino, donde hay un medio básico. Las cortezas de todas las especies del género *Quercus* (*Quercus coccifera* L. también llamado "chaparro") son ricas en materias tánicas y contienen cantidades variables de ácido elágico y gálico, del mismo modo que las hojas de *Juglans regia* L. son ricas en taninos gálicos y catéquicos. En

ambos casos, la presencia de taninos les confiere propiedades astringentes (Martínez Lirola et al., 1997). También, *Polygonum aviculare* L. posee una importante cantidad de taninos (Vanaclotxa in Arteché y col. 1992), los cuales justifican su acción tónica, astringente y hemostática (Martínez Lirola et al., 1997).

Tienen una acción bactericida y bacteriostática, por lo que son antisépticos. También ejercen un efecto antifúngico y antiviral (Serkedjieva et al., 1999).

Los taninos aplicados en pomada de uso externo impermeabilizan la piel y la protegen de los agentes externos, siendo útiles en numerosos problemas de la piel. Si hay una cicatriz favorecen la regeneración (re-epitelizantes) y tienen efecto analgésico. Aplicados sobre heridas sangrantes pueden tener una acción hemostática (antihemorrágica). Los taninos condensados son venotónicos, protectores de la pared venosa y hemostáticos y se usan en supositorios antihemorroidales.

Son capaces de captar radicales libres (Hässig et al., 1999) e inhibir la peroxidación lipídica. Inhiben la autooxidación del ácido ascórbico (vitamina C). Disminuyen los niveles de colesterol en sangre y aumentan su metabolismo.

Ciertos taninos interfieren en la nutrición, disminuyendo la eficacia de los alimentos, bien porque inhiben las enzimas metabólicas, bien porque precipitan las proteínas de la dieta.

### **1.2.3.5. Antraquinonas**

#### **1.2.3.5.a. Generalidades**

Son los componentes más frecuentes entre el grupo de las quinonas vegetales. Las antraquinonas son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, frecuentemente en para (1,4) y en muy pocos casos en orto (1,2). Están formadas por dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles. De todos los compuestos que presentan estructura quinónica, destacan las benzoquinonas (estructura derivada del benceno, con poco interés

en farmacia), naftoquinonas (estructura derivada del naftaleno, con poder antiséptico, de ahí su interés en farmacia tanto antibacteriano y antifúngico), antraquinonas (su estructura deriva del antraceno y las 1,8-dihidroxi-antraquinonas tienen propiedades laxantes) y fenantraquinonas (su estructura deriva del fenantreno y se encuentran en el hipérico).

La estructura química de las antraquinonas se caracteriza porque tienen el sistema tricíclico del antraceno, pero con el anillo central más o menos oxidado, lo cual permite diferenciar los distintos tipos de derivados antracénicos. Generalmente están en forma de heterósido. Hay O-heterósidos, C-heterósidos e incluso O y C-heterósidos a la vez.

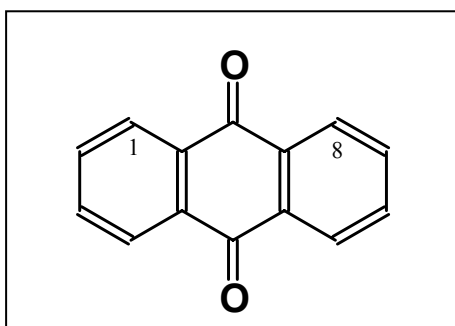


Figura 15: Estructura general de una antraquinona.

En función de la oxidación del anillo central se clasifican en antraquinonas (con dos funciones cetona en el anillo central) y oxantronas (con una función cetona en el anillo central), cuya forma tautomérica son los antranoles. Si están libres (genina libre), las antronas y antranoles se oxidan fácilmente a antraquinonas. Las antronas forman a menudo diantronas, compuestos dímeros que pueden ser homodiantronas (formadas por dos antronas iguales) o heterodiantronas (formadas por dos antronas diferentes). La unión es 10-10'. Los dihidroantranoles tienen sólo una función alcohol en el anillo central, son muy inestables y se degradan con facilidad.

Las geninas antraquinónicas son sólidos coloreados (amarillos, anaranjados, rojizos) poco solubles en agua fría y más solubles en agua caliente y mezclas hidroalcohólicas. Son solubles en disolventes orgánicos y en alcoholes y les dan color

amarillo, así como en soluciones alcalinas, tomando entonces color rojo. Las que tienen un grupo carboxilo se solubilizan en soluciones acuosas de bicarbonato sódico. Los heterósidos son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas. Éstos se pueden hidrolizar, pero depende de si se trata de O-heterósidos, que son más fáciles de romper (se rompe la unión heterosídica con un ácido fuerte) o de C-heterósidos, más difíciles de romper (se usa un medio ácido fuerte y  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ).

Para llevar a cabo la extracción hay que tener en cuenta el hecho de que sean O-heterósidos (se usa un ácido fuerte y se obtienen las geninas, que son solubles en disolventes orgánicos como hexano y éter) o C-heterósidos (se emplea además  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ).

#### **1.2.3.5.b. Detección**

La detección de las antraquinonas se lleva a cabo por medio de la reacción de Bornträger. Esta reacción sólo se da en las antraquinonas libres (formas oxidadas libres), que son solubles en un disolvente orgánico (color amarillo) y si le añadimos una solución acuosa de hidróxido potásico, se formará una capa de color rojo debido a las sales, que irá haciendo desaparecer el color amarillo (reacción positiva). Esas sales que se forman son fenatos. El color obtenido no es estable, pues se altera con la luz, siendo de mayor estabilidad el obtenido con el acetato de magnesio en solución metanólica. Para los heterósidos antraquinónicos y los derivados reducidos tipo antranol, la reacción de Bornträger es negativa.

#### **1.2.3.5.c. Distribución**

La distribución de las antraquinonas en el reino vegetal está limitada a una serie de familias. Abundan en los hongos, líquenes y plantas superiores, sobre todo en ciertas familias de dicotiledóneas como *Poligonaceae*, *Ramnaceae*, *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Ericaceae*, *Euforbiaceae*, *Cesalpiniaceae* y *Escrofulariaceae*. En monocotiledóneas sólo se han hallado derivados antracénicos en la familia *Liliaceae*.

Los encontramos en especies como los aloes (*Aloe sp.*) o en muchas plantas del género *Rhamnus*. Recordemos la aloína de diversas especies de aloes, el frangulósido de la



frángula (*Rhamnus frangula* L.), los heterósidos del ruibarbo (*Rheum officinale* Baillon.), los cascarósidos de la cáscara sagrada (*Rhamnus prusiana* L.) o los senósidos del sen (*Cassia* sp.).

#### **I.2.3.5.d. Aplicaciones terapéuticas**

Su principal empleo terapéutico radica en sus acciones evacuantes intestinales (laxante o purgante), según la dosis y el grado de envejecimiento de la droga. Los ejemplares frescos son irritantes, mientras que la desecación oxida los antranoles y los hace más suaves al tratamiento. También tienen aplicaciones industriales, en el campo de las sustancias colorantes.

Se ha demostrado la actividad antibacteriana de las quinonas sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus* (Machado et al., 2003).

### **I.2.4. Terpenos y esteroides**

#### **I.2.4.1. Isoprenoides**

Los terpenoides (isoprenoides) son compuestos no saturados, constituidos por C e H ó C, H y O, de estructura no aromática y que se encuentran sobre todo en aceites esenciales y en las resinas.

Son metabolitos secundarios formados a través de la ruta de la condensación isoprénica (ruta del ácido mevalónico). Son muy numerosos y de estructura diversa y se pueden encontrar en formas sencillas o en estructuras más complejas (v.g. saponinas) o en mezclas complejas (v.g. aceites esenciales). Algunos compuestos tienen sólo una parte de la estructura de naturaleza isoprenoide y se consideran de origen mixto.

Los terpenos poseen la fórmula general  $(C_5H_8)_n$ . Pueden ser acíclicos (con la cadena de carbono ramificada), monocíclicos, bicíclicos o policíclicos. Estos compuestos poseen generalmente uno o varios carbonos asimétricos. En la estructura de los terpenos,

en la mayoría de los casos, la cadena de carbonos está constituida teóricamente por la unión de dos moléculas o más de isopreno  $C_5H_8$ , que es considerado como un hemiterpeno (compuestos poliisoprenicos).

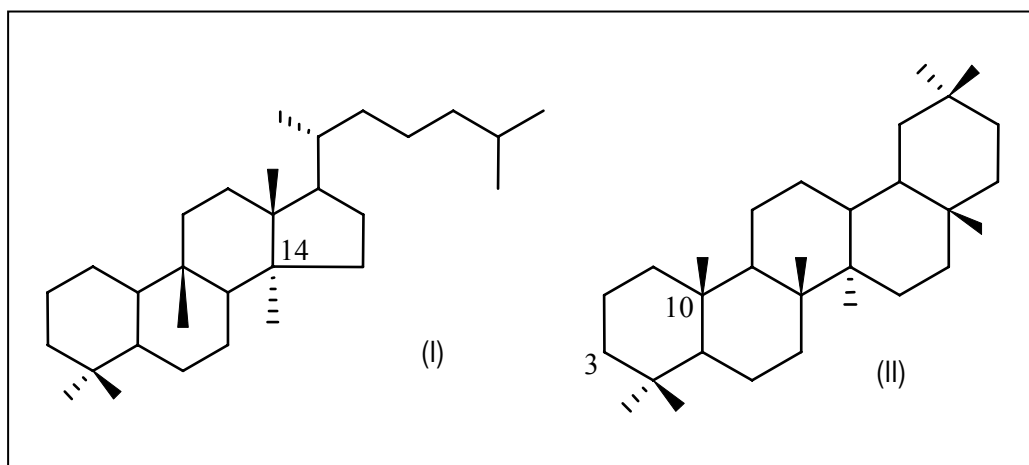
Según el número de unidades de  $C_5$  que forman la estructura isoprenoide, se pueden clasificar en:

- Hemiterpenos:  $C_5$ , de escaso valor farmacológico.
- Monoterpenos:  $C_{10}$ , (dos unidades de isopreno), frecuentes en aceites esenciales.
- Sesquiterpenos:  $C_{15}$ , se encuentran libres, formando parte de aceites esenciales o como lactonas sesquiterpénicas.
- Diterpenos:  $C_{20}$ .
- Triterpenos:  $C_{30}$ , frecuentes en el reino vegetal.
- Tetraterpenos:  $C_{40}$ .
- Poliisoprenoides:  $(C_5)_n$ .

#### **1.2.4.2. Triterpenos**

Son compuestos  $C_{30}$  biosintetizados por condensación isoprenica. Son muy importantes los triterpenos que forman parte de las saponinas.

Tienen 30 carbonos (6 restos de isopreno), suelen estar en las cutículas y en las resinas, bien en estado libre, bien esterificados o forma heterosidica. Pueden ser alifáticos, tetracíclicos o pentacíclicos (derivados de la  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina).



**Figura 16:** Moléculas de triterpenos tetracíclicos (I) y pentacíclicos tipo  $\beta$ -amirina (II).

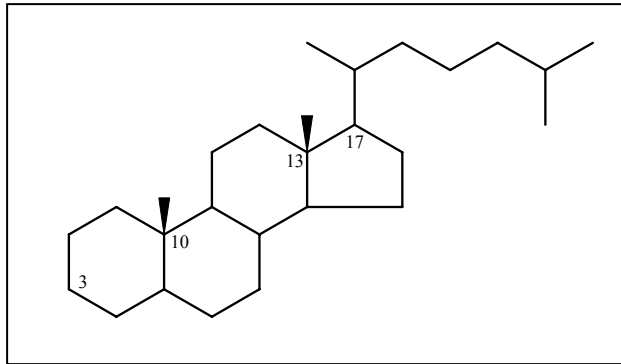
Estas sustancias poseen propiedades farmacodinámicas muy variadas, en relación con las diferentes funciones ligadas al esqueleto terpénico. Algunas de ellas son irritantes de la piel y mucosas por lo que son utilizadas como rubefacientes, antisépticos (geraniol), vermífugos, abortivos...

Los triterpenos tetracíclicos están presentes en cucurbitáceas y poseen gran toxicidad, de ahí sus propiedades necrosantes. Las geninas de los triterpenos pentacíclicos son activas al ser combinadas con azúcares (saponósidos), como ocurre en el ácido glicirrético (regaliz), que tiene propiedades antiinflamatorias. También existen triterpenos con actividad antiinflamatoria en *Polylepis racemosa* R.&P. y *Dyospiros leucomelas* (Suntornsuk, 2002). Recientemente se han detectado propiedades anticancerígenas en los triterpenos de *Scaevola spinescens* (Ghisalberti, 2004).

### I.2.4.3. Esteroles

#### I.2.3.4.3.a. Generalidades

Los esteroles son derivados alcohólicos de los esteroides. El nombre genérico “esteroide” se emplea para designar sustancias con estructura ciclopentanoperhidrofenantrénica, con dos restos metilo en las posiciones 10 y 13.



**Figura 17:** Estructura general de los esteroides.

Los esteroides se pueden clasificar según Fieser & Fieser en:

- Esteroles: esteroides que poseen una cadena lateral de ocho, nueve o diez átomos de carbono, siempre con un grupo oxhidrilo en posición 3.
- Estanoles: esteroides fuertemente saturados.
- Estenoles: se designan así a los estanoles que introducen en su molécula una insaturación y un grupo oxhidrilo en posición 3.
- Dihidroiestenoles: esteroides monoinsaturados con dos grupos oxhidrilo.

Esta estructura la poseen los estrógenos, andrógenos, gestágenos, corticoides, sapogeninas espiroestánicas, heterósidos cardiotónicos, ácidos biliares y determinados alcaloides.

#### **I.2.4.3.b. Detección**

El método más generalizado para la detección de esteroides es el test de Liebermann-Burchard, basado en las coloraciones azul-verdosas que desarrollan dichos componentes en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado. Se han llevado a cabo ensayos de esteroides de forma paralela a la detección de principios triterpénicos, ya que la misma reacción permite ponerlos de manifiesto simultáneamente.

#### **I.2.4.3.c. Aplicaciones terapéuticas**

Los esteroides y estanoles hacen decrecer el nivel de colesterol procedente de la dieta y biliar, lo que disminuye los niveles de LDL-colesterol (Neil et al., 2002). Al reducir la secreción biliar, los esteroides de la dieta disminuyen la absorción de los antioxidantes solubles en grasas, como algunos carotenoides y tocoferoles. También se han descubierto efectos en los cánceres de próstata y colon. En el cáncer de colon se ha visto que los ácidos biliares lo promueven y, de forma indirecta, los esteroides de origen vegetal lo inhiben al disminuir la secreción biliar, además del hecho de que se ha visto en cultivos celulares in vitro que el sitosterol parece tener un efecto protector en la proliferación de las células epiteliales del colon. En el caso del cáncer de próstata, el sitosterol se ha confirmado que mejora la hiperplasia benigna de próstata (De Jong et al., 2003).

#### **I.2.4.4. Saponinas**

##### **I.2.4.4.a. Generalidades**

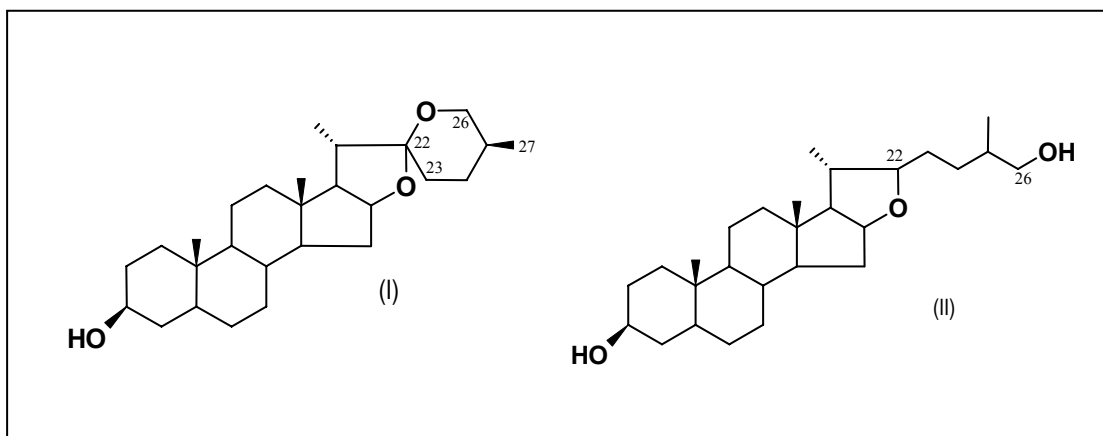
Son un grupo de metabolitos secundarios que aparecen normalmente como heterósidos y son encontrados mayoritariamente, pero no de forma exclusiva, en el reino vegetal, cuyas estructuras están formadas por una parte glucídica (azúcar o cadena azucarada) que puede ser neutra o ácida y otra no glucídica (aglicón o genina) denominada sapogenina.

Al ser heterósidos, son solubles en agua y en disolventes orgánicos polares (etanol, metanol) e insolubles en disolventes orgánicos apolares (éter de petróleo,

cloroformo, hexano). Los aglicones libres (sapogeninas) no son solubles en agua y sí en disolventes orgánicos apolares.

Según el número de unidades glucídicas unidas a la genina, se clasifican en saponinas monodesmosídicas (el azúcar o azúcares se unen a la genina por el OH de la posición 3), bidesmosídicas (el azúcar o azúcares se unen por dos puntos a la genina) y tridesmosídicas (en griego, *desmos* = "cadena").

De acuerdo con la naturaleza de las geninas pueden ser clasificadas como esteroídicas y triterpénicas. La genina de las saponinas triterpénicas tiene treinta átomos de carbono (triterpeno) y procede de la ruta biosintética de la condensación isoprénica, también denominada ruta del ácido mevalónico, por unión de seis unidades de C<sub>5</sub>. Las saponinas triterpénicas derivan todas del dammarano y se subdividen a su vez en pentacíclicas y tetracíclicas.



**Figura 18:** Estructura general de las saponinas esteroídicas espirostánicas (I) y furostánicas (II).

Las saponinas triterpénicas pentacíclicas son las más frecuentes y pueden derivar del oleano y del ursano, frecuentemente con alguna función carboxílica. Hay tres grupos, representados por la  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina y lupeol.

-  $\beta$ -amirina: es un derivado del oleano con cinco ciclos de seis átomos y dos metilos en la posición 20 del anillo E.

-  $\alpha$ -amirina: es un derivado del ursano con cinco ciclos de seis átomos y dos metilos en las posiciones 19 y 20 del anillo E.

- Lupeol: tienen también cinco ciclos pero el anillo E es de cinco miembros.

Las saponinas triterpénicas tetracíclicas conservan la estructura básica del dammarano, con tres ciclos de seis miembros y un ciclo de cinco miembros.

Las saponinas esteroídicas se biosintetizan también por la ruta del ácido mevalónico y son menos frecuentes que las saponinas triterpénicas pentacíclicas. Se clasifican en:

- Derivados del espirostanol: son estructuras hexacíclicas de veintisiete átomos de carbono. Su estructura fundamental es el ciclopentanoperhidrofenantreno, con una cadena lateral en posición 17 formada por dos heterociclos, uno metil-furánico y otro metil-piránico, con una unión espiránica.

- Derivados del furostanol: poseen un ciclo menos que el espirostanol, debido a apertura del ciclo metil-piránico, por lo que también tienen un esqueleto de veintisiete átomos de carbono.

Las saponinas (del latín *sapo*, "jabón") se caracterizan por producir una solución acuosa espumosa (propiedad afrógena) debido a sus propiedades tensioactivas, lo cual dificulta su extracción. Pueden formar emulsiones (emulgentes). Tienen un elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece dificultades. Algunas de ellas presentan actividad hemolítica.

El poder hemolítico es característico de las saponinas triterpénicas, pero es variable según los sustituyentes de la estructura. Las saponinas esteroídicas monodesmosídicas son hemolíticas, mientras que las bidesmosídicas no lo son. Por este poder hemolítico son muy tóxicas si se administran por vía intravenosa (contactan directamente con los hematíes) mientras que por vía oral su toxicidad es muy baja.

#### **I.2.4.4.b. Detección**

Para su extracción se utiliza agua o mezclas hidroalcohólicas (agua:alcohol 1:1) de elevada graduación (60°-70°) con objeto de evitar ciertos problemas que se producen cuando son de baja graduación, como son la pérdida de la unidad de azúcar y la ciclación del furostanol a espirostanol o el paso de saponinas bidesmosídicas a monodesmosídicas.

Los saponósidos son solubles en agua y, por lo tanto, se pueden extraer con este disolvente, generalmente a ebullición. A pesar de esto, si el medio acuoso se liofiliza posteriormente, también es posible la hidrólisis de los bidesmósidos y por ello es preferible recurrir a alcoholes (etanol, metanol) o a disoluciones hidrometanólicas tras una deslipidación previa por éter de petróleo. Puede resultar útil, para inactivar las esterases que suele haber en el material vegetal, realizar un tratamiento con HCl diluido. Variando las proporciones de agua y metanol, pueden obtenerse específicamente mono- y bidesmósidos.

Los disolventes polares, al solubilizar numerosos compuestos, hacen que sea frecuente, después de la extracción inicial, realizar una partición entre agua y *n*-butanol; este último solubiliza los saponósidos, que precipitan posteriormente por adición al medio de un disolvente como el éter etílico.

En nuestro caso, tras una primera extracción con agua a ebullición, se realizó una extracción con alcohol etílico al 96% (v/v). Para proceder a su extracción, a partir del material vegetal se hicieron varios extractos, pero basándonos en la bibliografía previa se puede afirmar que las saponinas triterpénicas se han encontrado en el extracto alcohólico en la familia *Acanthaceae* (*Monechma ciliatum* (Jacq.) Milne-Redh., Uguru et al., 2000); *Aquifoliaceae* (*Ilex kudincha* C. J. Tseng, Ouyang et al., 1996); *Araliaceae* (*Aralia chinensis* L., Miyase et al., 1996; *Polyscias fruticosa* (L.) Harms., Huan et al., 1997; *Scheffera arboricola* (Hay.) Hayata, Melek et al., 2003); *Asclepiadaceae* (*Gymnema silvestre* R.Br., Sahu et al., 1996); *Berberidaceae* (*Leontice kiangnanensis* PL Chiu; Chen et al., 1997); *Campanulaceae* (*Platycodon grandiflorum* Jacq. DC., He et al., 2005); *Caryophyllaceae* (*Silene jennisseensis* Willd., Lacaille-Dubois et al., 1997; *Silene jennisseensis* Willd., Lacaille-Dubois et al., 1995; *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke., Koike et al., 1998); *Compositae*



(*Aster bellidiastrum* (L.) Scop.; Schöpke et al., 1997 ; *Solidago gigantea* Ait.; Reznizec, et al., 1996); *Escrofulariaceae* (*Baccopa monniera* Brahmī ; Garai et al., 1996; *Mazus miquelii* Mak., Yaguchi et al., 1995); *Fabaceae* (*Albizia julibrissin* Durazz., Zou et al., 2005 ; *Gleditsia sinensis* Lam., Zhang et al., 1999); *Liliaceae* (*Asparagus africanus* Lam.; Debella, 1999); *Mimosaceae* (*Albizia gummifera* C.A. Smith, Debella, 2000); *Myrsinaceae* (*Ardisia mamillata* Hance; Huang et al., 2000); *Ranunculaceae* (*Clematis chinensis* Retz.; Shao et al.,1996); *Rubiaceae* (*Mussaenda pubescens* Ait.; Zhao, et al.1996b); *Sapotaceae* (*Mimusops laurifolia* (Forssk.) Friis; Eskander et al., 2005, 2006); *Zygophyllaceae* (*Fagonia mollis* Del., Melek et al., 1996 ; *Fagonia indica* Burm., Shaker et al.,1999; *Tribulus terrestris* L.; Wang, et al.,1997 y especies del género *Zygophyllum*; Pöllman, et al. 1997).

La mayoría de la literatura disponible sobre la detección de saponinas en el reino vegetal se basa el test del índice afrógeno (test cualitativo). En Oriente, estos compuestos son usados como jabón y muchas plantas con estas características tienen nombres comunes relacionados con él, tales como soapwort -palo jabonoso- (*Saponaria officinalis* L.), soaproot -raíz jabonosa- (*Chlorogalum pomeridianum* (DC.) Kunth), soapbark -corteza jabonosa- (*Quillaja saponaria* Mol.), soapberry -baya jabonosa- (*Sapindus saponaria* L.) y soapnut -nuez jabonosa- (*Sapindus mukurossi* Gaertn.). Algunos de ellos tienen aplicación comercial como drogas y medicamentos, adyuvantes, modificadores del sabor, emulsionantes, precursores en la síntesis de hormonas y edulcorantes (Oleszek et al., 2006).

La propiedad de hacer espuma, que es una característica muy conocida de la mayoría de las saponinas, fue usada para determinar la presencia de saponinas. La formación de espuma después de agitación en una solución acuosa es específica de la mayoría de las saponinas, pero la mayoría de ellas, especialmente aquellas que tienen una o dos ramificaciones azucaradas, no forman espuma estable. Además, algunas plantas que no contienen saponinas pueden formar espuma, dando información errónea (Oleszek, 2002).

Para la detección de las saponinas, el reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético en medio sulfúrico) es el más utilizado, porque permite una rápida detección a simple vista, ya que la presencia de saponinas esteroídicas se manifiesta con un color azul-verdoso, mientras que un color rosa-violáceo denota la presencia de saponinas triterpénicas.

La purificación se puede llevar a cabo por diferentes métodos cromatográficos, siendo la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa la más utilizada, igual que para a la detección y cuantificación del contenido en saponinas, según se observa en los ensayos realizados en especies de las familias *Amaranthaceae* (*Alternanthera repens* (L.) Link; Sanoko et al., 1999); *Aquifoliaceae* (*Ilex kudincha* CJ Tseng; Ouyang et al., 1996); *Araliaceae* (*Aralia armata* (Wall.) Seem., Hu et al., 1995; *Aralia chinensis* L., Miyase et al., 1996; *Aralia elata* (Miq.) Seem., Song et al., 2001; *Meryta lanceolata* Hort., Melek et al., 2004; *Panax notoginseng* (Burk.), Zhao et al., 1996a; *Polyscias fruticosa* (L.) Harms., Huan, et al., 1997; *Scheffera arboricola* (Hay.) Hayata, Melek et al., 2003); *Asclepiadaceae* (*Gymnema silvestre* R. Br.; Sahu et al. 1996); *Asteraceae* (*Aster ageratoides* var. *ovatus* Franch. & Sav., Sakai et al., 1999; *Aster bellidiastrum* (L.) Scop., Schöpke et al., 1995, 1997); *Berberidaceae* (*Leontice kiangnanensis* PL Chiu; Chen et al., 1997); *Campanulaceae* (*Platycodon grandiflorum* Jacq. DC.; He et al., 2005); *Caryophyllaceae* (*Silene jensisseensis* L., Lacaille-Dubois et al., 1995, 1997; *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke., Koike et al., 1998); *Compositae* (*Solidago gigantea* Ait.; Reznizec et al., 1996); *Escrofulariaceae* (*Baccopa monnieri* Brahma, Ganzera et al., 2004; *Mazus miquelii* Mak., Yaguchi et al., 1995); *Fabaceae* (*Albizia julibrissin* Durazz., Zou et al., 2005; *Gleditsia sinensis* Lam., Zhang et al., 1999; *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi., Ohri, et al., 1999); *Liliaceae* (*Asparagus dumosus* Baker, Ahmad et al., 1998; *Ruscus aculeatus*, Rawald et al., 1988); *Myrsinaceae* (*Ardisia mamillata* Hance; Huang et al., 2000); *Rubiaceae* (*Mussaenda pubescens* Ait.; Zhao et al. 1996b); *Sapotaceae* (*Mimusops laurifolia* (Forssk.) Friis; Eskander et al., 2006); *Umbeliferae* (*Bupleurum falcatum* L., Ebata et al., 1996); *Zygophyllaceae* (*Fagonia cretica* L., Abdel Khalik, et al., 2000; *Fagonia indica* Burm., Shaker et al., 1999; *Fagonia mollis* Del., Melek, et al., 1996; *Tribulus terrestris* L., Conrad et al., 2004; De Combarieu et al., 2003; Wang et al., 1997b) y especies del género *Zygophyllum*; Pöllman, et al. 1997).

#### I.2.4.4.c. Distribución

Las saponinas se encuentran tanto en vegetales inferiores (algas, líquenes, musgos y helechos) como en vegetales superiores. En dicotiledóneas hay principalmente saponinas triterpénicas y, ocasionalmente, saponinas esteroídicas. En monocotiledóneas hay casi exclusivamente saponinas esteroídicas (zarzaparrilla –sarsasaponósido–, rusco, digital –digitanósido–, dioscorea...) y rara vez se encuentran saponinas triterpénicas. Las saponinas pueden estar localizadas en cualquier parte del vegetal pero tienen tendencia a acumularse en mayor concentración en las partes subterráneas (raíz y rizoma).

Hay alrededor de cien saponinas esteroídicas identificadas y probablemente un número mucho mayor de triterpénicas. Esta diversidad puede incluso verse multiplicada por la composición de las cadenas de azúcares, los azúcares, los sustituyentes y el tipo de sustitución. Se ha visto que incluso algunas especies pueden tener un número importante de saponinas, como es el caso de las raíces de alfalfa, que contienen por lo menos veinticinco, entre las que se encuentran el ácido medicagénico, hederagenina, ácido zanhico, soyasapogenol y glicósidos de la bayogenina con un número de azúcares variable de uno a siete.

Estas estructuras y sus cantidades pueden variar dependiendo de la parte de la planta objeto de estudio. Esta diversidad estructural y el amplio rango de polaridades hacen que la determinación individual de saponinas sea complicada (Oleszek, 2002).

Las saponinas esteroídicas son de gran interés por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisonas, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos. Están presentes en familias de monocotiledóneas como la *Amarilidaceae*, *Dioscoreaceae* (*Dioscorea villosa* L., Sautour et al., 2006) y *Liliaceae* (*Asparagus officinalis* L., Huang et al., 2006; *Lilium candidum* L., Mimaki et al., 1999; *Ruscus aculeatus* L., Mimaki et al., 1998; *Smilax officinalis* Kunth., Bernardo et al., 1996) y dicotiledóneas como *Fabaceae*, *Ranunculaceae* (género *Helleborus*, Hardman, 1976); *Solanaceae* (*Solanum sisymbriifolium* Lam., Ferro et al., 2005; *Cestrum sendtenarianum*, Haraguchi, 2000). Un

ejemplo de saponinas esteroides es la digitonina (en las semillas de *Digitalis purpurea* L. y *Digitalis lanata* Ehrh.). La detección y determinación se puede hacer por espectrofotometría infra-roja, en solución de sus acetatos. También se han diseñado ensayos gravimétricos y colorimétricos. Para el fraccionamiento inicial puede usarse la cromatografía en columna (CGL) o la cromatografía en capa fina (CCF) preparativa.

Las saponinas triterpénicas pentacíclicas abundan en familias de dicotiledóneas, como *Caryophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Primulaceae*, *Oleaceae*, *Compositae*... Algunos ejemplos de ellas son la corteza de quilaya (palo de jabón), que es la corteza interna desecada de la *Quillaia saponaria* y otras especies de ese género (Fam. *Rosaceae*), el regaliz (orozuz, palo dulce), que está constituido por las raíces y estolones sin mondar de *Glycyrrhiza glabra* L. (Fam. *Papilionaceae*), la saponaria (*Saponaria officinalis* L.) y la raíz de polígala (*Senegae radix*), que está constituida por los rizomas y raíces desecados de la *Polygala senega* L. o *P. senega* var. *latifolia* Torr. et Gray (Fam. *Polygalaceae*).

El hecho de que especies vegetales ricas en saponinas triterpénicas se hayan utilizado y se utilicen en medicina tradicional como diuréticos, entre otras aplicaciones medicinales, está documentado en diversas familias: *Aquifoliaceae* (*Ilex kudincha* C. J. Tseng; Ouyang et al., 1996); *Amaranthaceae* (*Alternanthera repens* (L.) Link; Sanoko et al., 1999); *Araliaceae* (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms.; Huan, et al., 1997); *Asclepiadaceae* (*Gymnema silvestre* R.Br.; Sahu, 1996; Sahu et al., 1996); *Escrofulariaceae* (*Bacopa monniera* Brahma; Garai et al., 1996); *Liliaceae* (*Asparagus dumosus* Baker; Ahmad, et al., 1997,1998); *Ranunculaceae* (*Clematis chinensis* Retz.; Shao et al., 1996); *Rubiaceae* (*Mussaenda pubescens* Ait.; Zhao, et al. 1996b); *Zygophyllaceae* (género *Zygophyllum*; Elgamal et al., 1995; Pöllman et al., 1997).

En este sentido, la familia *Caryophyllaceae* presenta ejemplos de especies con ciertas propiedades curativas tales como la actividad analgésica, anticancerígena (*Dianthus superbus* L., Cai et al., 2004) y antihepatotóxica de *Dianthus superbus* Herbs. (Hikino et al., 1984). Aunque se muestra especialmente útil sobre patologías renales, en la mayor parte de las ocasiones provoca un aumento de la diuresis (Rhiouani et al., 1999). Esta familia se

caracteriza por su contenido en sales de potasio y saponinas, que en principio pueden favorecer el efecto diurético, como es el caso de estudios en el género *Dianthus*: *Dianthus caryophyllus* L. (Gunimka & Oleszek, 1998), *Dianthus chinensis* L. (Koike et al., 1994; Li et al., 1994); *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* (L.) (Maxim.) Will., (Mahato et al., 1988); el género *Gypsophila*: *Gypsophila bermejoi* G. López (Acebes et al., 1998), *Gypsophila paniculata* L. (Fulcheri et al., 1998), *Gypsophila arrostii* Guss. (Mostad et al., 1987); el género *Herniaria*: *Herniaria glabra* L. (Cart et al., 1992; Rhiouani et al., 1999; Schröder et al., 1993), *Herniaria hirsuta* L. (Mbark et al., 2000); el género *Polycarpon*: *Polycarpon sculentum* (Meselhy, 1998); el género *Silene*: *Silene cucubalus* Wibel. (Larhsini et al., 2003), *Silene jennisseensis* L. (Lacaille-Dubois et al., 1995, 1997); el género *Saponaria*: *Saponaria officinalis* L. (Koike et al., 1999; Jia et al., 1998, 1999; Fulcheri et al., 1998) y el género *Vaccaria*: *Vaccaria segetalis* Asch. (Koike et al., 1998).

En concreto, dentro del género *Arenaria*, se ha demostrado en varios casos la presencia de saponinas triterpénicas en *Arenaria filicaulis* Boiss. (Hani et al., 1997, 1998; Elgamal et al., 1998; Soliman et al., 1999) y *Arenaria juncea* (Gaidi et al., 2001).

#### 1.2.4.4.d. Aplicaciones terapéuticas

Las saponinas se utilizan en farmacia como expectorantes, venotónicas y diuréticas, como es el caso de *Eryngium campestre* L. -también conocido como “cardo cuco”- *Allium porrum* L. (Carotenuto et al., 1999) y *Agave americana* o “pita” (Martínez Lirola et al., 1997), las raíces y rizomas de *Asparagus officinalis* L. que contienen fructosanos junto con las saponinas (Fernández y col., 1982), *Smilax aspera* -“zarzaparrilla”-, que contiene junto con las saponinas (sarsapogenina), sales minerales potásicas y que está indicada en oliguria, litiasis renal, cistitis y como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión (Vanaclotxa in Arteche; 1992). En la industria farmacéutica se emplean como agentes espumantes y emulgentes. Las saponinas esteroídicas se utilizan sobre todo industrialmente para obtener las geninas esteroídicas, que son precursores por hemisíntesis de los fármacos esteroídicos (hormonas sexuales, glucocorticoides, etc.).

Tienen una serie de acciones características, como son la irritación celular que se manifiesta a nivel pulmonar (producen aumento de secreciones, por lo que son expectorantes y antitusivas), a nivel renal, aumentando la circulación sanguínea renal e incrementando consecuentemente la filtración glomerular, ejerciendo un efecto diurético y a nivel hemático porque lisan los hematíes, lo cual resulta tóxico si se administran por vía intravenosa.

También producen un efecto antiedematoso y antiinflamatorio, sobre todo en casos de insuficiencia venosa de las extremidades inferiores, así como acción hemorroidal y cicatrizante.

Las saponinas se han relacionado con un efecto estimulante, tónico y antiestrés, así como antimicrobiano, antivírico, antimicótico y molusquicida, debido mayoritariamente a las saponinas triterpénicas. Por otra parte, se ha demostrado que pueden producir un efecto citoprotector gástrico (Gonzales et al., 2000) y antifúngico (Escalante et al., 2002).

### **I.2.5. Alcaloides**

#### **I.2.5.a. Generalidades**

Fueron los primeros principios activos aislados de las plantas. Definirlos es difícil porque no existe una diferenciación clara entre el término alcaloide y aminas complejas de origen natural. Es un grupo muy variado y tan sólo las propiedades químicas debidas al nitrógeno básico unifican las numerosas clases de alcaloides. Los alcaloides típicos derivan de fuentes vegetales, son básicos, contienen uno o más átomos de nitrógeno (normalmente en el anillo heterocíclico).

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico (salvo excepciones, como es el caso de las bases xánticas) y mayoritariamente de origen vegetal. Tienen una estructura generalmente compleja y ejercen acciones farmacológicas diversas e

intensas, incluso a dosis muy bajas. Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos.

Las características generales de los alcaloides podríamos resumirlas en el hecho de que se forman a partir de aminoácidos, aunque los esteroídicos y los triterpénicos no lo hagan y contienen, en general, nitrógeno heterocíclico. Presentan gran cantidad de hidrógeno. Tienen capacidad para combinarse con sustancias de origen ácido para dar sales. Popularmente la palabra alcaloide se asocia con las drogas psicotrópicas. Algunos de los estupefacientes más poderosos deben su acción a la presencia de esta sustancia. Citemos la psilocibina del peyote mejicano (*Echinocactus williamsii* Lem.), especie que puede provocar intensas alucinaciones y alteraciones de la percepción orgánica y que se han empleado con fines mágico-religiosos desde los albores de la humanidad. Por tanto, son compuestos nitrogenados de composición diversa, con las siguientes propiedades comunes: origen vegetal, reacción alcalina e importantes acciones biológicas.

Se suelen ubicar en los jugos celulares, formando sales como malatos, citratos o tartratos (combinaciones con ácidos orgánicos como el málico, el cítrico o el tartárico, en estos casos), o combinados con los taninos. Cualquier parte de la planta puede contenerlos, así los detectamos en las raíces (acónito, belladona, rauwolfia), en cortezas (quina, yohimbo), en hojas (belladona, coca, beleño, tabaco, té), en frutos (adormidera) o en semillas (cacao, té, cólchico). En numerosas ocasiones encontramos el mismo alcaloide en especies botánicamente muy alejadas entre sí, o alcaloides de estructura química diferente en una misma planta.

Los alcaloides no heterocíclicos se denominan también aminos alcaloídicos o protoalcaloides. Algunos ejemplos son la colchicina y efedrina. Los heterocíclicos son los más numerosos, pudiendo ser monocíclicos o policíclicos. Los alcaloides son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras muy variadas y generalmente complejas. Todos contienen C, H y N, la mayoría tienen oxígeno y pocos de ellos, azufre. El nitrógeno que contienen puede formar parte de un ciclo (lo más habitual es con N-heterocíclico) o no (con N no heterocíclico), del que hay pocos casos (colchicina).

Según la estructura de su núcleo fundamental, éstos se pueden subdividir en los siguientes grupos no cerrados, ya que algunos de ellos presentan en su estructura química fundamental, dos núcleos cíclicos que los vinculan a dos clasificaciones diferentes:

- Pirrolidínicos: su núcleo principal es el pirrol o pirrolidina; a este grupo pertenecen las higrinas (presentes en las hojas de coca) y la estaquidrina.

- Imidazólicos: la pilocarpina y la pilocarpidina del jaborandi (*Pilocarpus jaborandi* Holmes.), con propiedades hipotensoras a nivel general y del globo ocular, en particular.

- Esteroides: el núcleo es el ciclopentanoperhidrofenantreno. Algunos de ellos son las protoveratrininas (*Veratrum album* L., sabadilla), jervina, solanina, germindina...

- Tropánicos: a este grupo pertenecen alcaloides con intensa acción sobre el sistema nervioso y son frecuentes en las solanáceas. Cabe citar los siguientes: atropina (*Atropa belladonna* L.), hiosciamina (*Hyoscyamus niger* L.), escopolamina (*Duboisia* sp., *Datura stramonium* L.). También encontramos aquí alcaloides pertenecientes a otras familias botánicas, como la cocaína (*Eritroxylon coca* Burk).

- Quinoleínicos: su nombre se debe a que la mayoría de los alcaloides de la quina se encuentran en este grupo. Los más conocidos son la quinina y la quinidina (*Cinchona calisaya* Weddl.).

- Isoquinolínicos: la hidrastina y la berberina las detectamos en el hidrastis o sello de oro (*Hydrastis canadensis* L.) y la narceína en la adormidera (*Papaver somniferum* L.).

- Bencil- isoquinoleínicos: su núcleo guarda una gran similitud con el anterior. Entre ellos se encuentran la papaverina y la narcotina del opio (*Papaver somniferum* L., *P. Nigrum* DC.).

- Fenantrénicos: la morfina, que es el alcaloide más conocido de la adormidera, presenta dos núcleos, uno isoquinoleínico y otro fenantrénico. Otros alcaloides fenantrénicos del opio son la codeína y la tebaína.

- Indólicos: son conocidos los derivados del cornezuelo de centeno (*Secale cereale* L.) como la ergometrina y ergotamina, utilizados en el tratamiento de las migrañas y en la inducción del movimiento uterino en el parto. También son indólicos los alcaloides de la rawolfia (*Rawolfia serpentina* Benth.), empleados en el tratamiento de la hipertensión



(reserpina); la yihimbina del yohimbo (*Pausynstalia yohimbe*), de potente actividad afrodisíaca; la estricnina o la brucina constituyen un potente veneno extraído de la nuez vómica (*Strychnos nux-vomica* L.), aunque en pequeñas dosis ha sido utilizado como estimulante. Otros alcaloides interesantes de este grupo proceden de la vincapervinca de Madagascar (*Vinca rosea* L.) y son utilizados en el tratamiento oficial del cáncer y especialmente de las leucemias.

- Piridínicos: su núcleo es la piridina. El más conocido es la nicotina del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y la arecolina (*Areca catechu* L. o nuez de areca).

- Piperidínicos: lobelina (*Lobelia inflata* L.), coniína (alcaloide de la cicuta o *Conium maculatum* L.). La pelletierina, localizada en el granado (*Punica granatum* L.), es un alcaloide que posee dos núcleos, uno piridínico y otro piperidínico.

- Purínicos: son muy conocidos por hallarse en el café, el chocolate o la cola. Se trata de metil-xantinas y son tres, la cafeína, la teobromina y la teofilina. Son estimulantes del sistema nervioso central y ejercen un efecto diurético discreto.

- Pirrolizidínicos: suelen ser alcaloides tóxicos. Los más conocidos se encuentran en el senecio y en la hierba cana (*Senecio sp.*) y en algunas plantas de las leguminosas o borragináceas.

- Terpénicos: aconitina, elatina.

- Nor-lupinánicos: en el núcleo hay un nor-lupinano (quinolizidina), como se aprecia en la esparteína o la genisteína de las retamas (*Spartium junceum* L.), en la citisina y en la lupanina.

- Apomorfínicos: presentan una estructura similar a la de la morfina, ya que tienen un núcleo isoquinoleínico y otro fenantrénico, aunque no ejercen la acción narcotizante de la primera. Entre ellos cabe destacar la boldina presente en el boldo (*Peumus boldus* Mol.) y la corydalina, en *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Körte.

Los alcaloides que carecen de oxígeno son líquidos a temperatura ambiente y frecuentemente son volátiles, presentando un olor característico. Los alcaloides oxigenados suelen ser sólidos cristalizables y generalmente incoloros o blancos. Todos son, en general, amargos. En su forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos apolares (éter, cloroformo, hexano) y algunos polares (alcoholes), aunque hay excepciones,

como las bases xánticas y las sales de amonio cuaternarias que son solubles en agua. Todos los alcaloides que están en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. La solubilidad depende del pH, ya que sus variaciones determinan que el nitrógeno básico está más o menos protonado. A pH ácido, predomina la forma protonada soluble en agua y mezclas hidroalcohólicas. A pH básico, los alcaloides están mayoritariamente en forma libre (no salina).

La mayoría de los alcaloides tiene actividad óptica (poder rotatorio), siendo las formas levóginas más activas que las dextróginas. El nitrógeno de su estructura, que suele pertenecer a un ciclo, posee un carácter más o menos básico. Hay alcaloides que son muy básicos (por ejemplo, la nicotina) pero también los hay que apenas lo son.

#### **1.2.5.b. Detección**

Existen reactivos generales que detectan alcaloides en general, otros que detectan grupos de alcaloides con una estructura determinada común y otros que son específicos para un alcaloide concreto.

Las reacciones para la detección de alcaloides se pueden clasificar en reacciones de precipitación, de cristalización y reacciones coloreadas. Las reacciones de precipitación se basan generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular como el reactivo de Hager (solución saturada de ácido pícrico en agua) y reactivos yodados como Dragendorff (yodobismutato potásico, precipitado rojo-naranja), Bouchardat (yodo/yoduro potásico, precipitado marrón-rojizo), Mayer (mercuriyoduro potásico, precipitado blanco-amarillento) y otros. La detección de los alcaloides mediante estas reacciones de precipitación puede dar falsos positivos y falsos negativos, por lo que conviene realizar varias reacciones de detección para confirmar los resultados. Entre las reacciones coloreadas, podemos citar la deshidratación con ácido sulfúrico o la oxidación con ácido nítrico, permanganato potásico o dicromato potásico.

### I.2.5.c. Distribución

Los principales productores de alcaloides son los vegetales, pero no están presentes en todos ellos. Se encuentran sobre todo en vegetales superiores. Entre los vegetales inferiores, los hongos, a excepción del cornezuelo de centeno (*Secale cornutum* Ergot.), contienen poca cantidad. Dentro de las gimnospermas, las *Efedraceae* cuentan con especies alcaloídicas de interés y entre las *Pteridophytae* se detectan alcaloides en las *Equisetaceae* como en la cola de caballo (*Equisetum* sp.) y *Lycopodiaceae*. Las monocotiledóneas, *Liliaceae* (eléboro) y *Amarilidaceae*, no producen casi alcaloides y, dentro de las angiospermas, las dicotiledóneas concentran prácticamente todas las especies que poseen alcaloides. En de las dicotiledóneas se pueden encontrar familias en las que abundan (*Solanaceae*, *Papaveraceae* –adormidera y amapola-, *Rubiaceae*, *Apocinaceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Loganiaceae*) y familias más pobres en alcaloides (*Rosaceae*, *Labiatae*, *Cruciferae*).

En los vegetales, los alcaloides suelen estar localizados en tejidos periféricos: corteza, raíces, hojas, frutos y semillas. Las proporciones varían desde partes por millón hasta valores que oscilan entre el 0,1% y el 3%, pudiendo ser incluso superiores en algunas drogas vegetales (como la corteza de quina, que puede tener hasta un 10%) o en determinadas razas químicas.

Las especies que contienen alcaloides rara vez contienen uno solo, habitualmente contienen varios de ellos, así como sustancias relacionadas. Hay alcaloides que son muy específicos y sólo se encuentran en individuos de una sola especie, en cambio, otros son inespecíficos y se pueden encontrar en varias especies e incluso, en varias familias.

Los alcaloides pueden encontrarse libres, en forma de sal (lo más habitual debido a su carácter básico) o unidos a taninos o a ácidos orgánicos. Su concentración depende en general del clima, ya que la flora originaria de zonas calurosas suele poseer una mayor cantidad que la de los climas fríos.

#### I.2.5.d. Aplicaciones terapéuticas

Los alcaloides son sustancias que suelen tener actividad farmacológica incluso a dosis muy bajas. Muchos de ellos son sustancias muy tóxicas, por lo que se deben extremar las precauciones cuando se empleen en terapéutica. Debido a la gran cantidad de compuestos que forman parte de este grupo y a sus estructuras tan variadas, sus aplicaciones son muy distintas, ya que los efectos farmacológicos también lo son. Podemos destacar alcaloides con efectos estimulantes del SNC (cafeína, estricnina) como la *Camelia sinensis* L. por la presencia en ella de alcaloides tales como teína, teofilina y teobromina (Martínez Lirola et al., 1997), depresores del SNC (morfina, psilocibina), estimulantes del SNV simpático (efedrina), inhibidores del SNV simpático (yohimbina), estimulantes del del SNV parasimpático (pilocarpina, eserina), inhibidores del SNV simpático (atropina), antifibrilantes (quinidina), espasmolíticos (papaverina), bloqueantes neuro-musculares (d-tubocurarina), antimaláricos (quinina), anticancerígenos (vincristina, vinblastina), etc., que van a ser responsables de muy variadas aplicaciones terapéuticas.

Como ejemplos, podemos citar *Ephedra fragilis* Desf., que contiene alcaloides simpaticomiméticos ( $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos) derivados de la feniletilamina, con una marcada acción estimulante de los centros nerviosos respiratorios a nivel bulbar, vasoconstrictora periférica e hipertensora, por lo que está indicada en asma e hipotensión. *Papaver rhoeas* L. -amapola- contiene alcaloides isoquinoleínicos y presenta una actividad ligeramente sedante y espasmolítica, se utiliza en estados de ansiedad, insomnio y tos espasmódica (Martínez Lirola et al., 1997).

En estudios recientes, se ha demostrado actividad antiinflamatoria, antipirética, antimalárica y antihiper glucémica en *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlecter debido a su contenido en alcaloides, también en *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. se ha demostrado actividad antipsoriática; actividad antihelmíntica en *Evodia rutaecarpa* Benth., antiagregante plaquetaria en *Melicope confusa* (Merr.) Liu y *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. & Zucc. y efecto antiséptico intestinal en *Corydalis pallida* var. *tenuis* Yatabe (Suntornsuk, 2002), además de antimicrobiana (Navarro et al., 1999; Colombo et al., 1996) y citotóxica frente a carcinoma humano (Sakurai et al., 2006; Colombo et al., 1996).

### I.3. Perspectiva genética

Hasta los años sesenta del pasado s. XX, la Sistemática -estudio de la clasificación de las especies con arreglo a su historia evolutiva o filogenia- se basaba en el análisis de la variación morfológica de las especies vegetales y del comportamiento de las mismas. Pero hay que tener en consideración que, con la aparición de los estudios moleculares, se ha producido un gran avance en este ámbito. La evolución molecular se encarga de la evolución de las macromoléculas y de los estudios evolutivos. En el caso de los estudios evolutivos, podemos decir que tratan de analizar las relaciones evolutivas entre los organismos haciendo uso de datos moleculares como son el ADN, las secuencias proteicas y otros marcadores moleculares (Graur y Li, 1999). Este tipo de estudios se encuadran dentro de lo que se conoce como Sistemática Molecular, que presenta un gran interés dado el desarrollo de las filogenias moleculares.

El uso de estas filogenias moleculares ha creado una gran polémica en cuanto a su relación con los datos morfológicos, en los cuales se habían basado todos los estudios realizados antes de la segunda mitad del s. XX. Qué duda cabe de que lo ideal es que ambos coincidan, cosa que no siempre ocurre. Una de las probables causas de la falta de congruencia de los datos morfológicos y moleculares puede ser la diferencia en la tasa evolutiva, porque en ciertos casos, pequeños cambios o mutaciones a nivel molecular pueden dar lugar a variaciones importantes en la morfología (Wendel y Doyle, 1998).

#### El uso de marcadores moleculares en la filogenia de las plantas

La célula vegetal contiene tres genomas distintos: el genoma mitocondrial, el cloroplastidial y el nuclear, los dos primeros son normalmente de herencia uniparental (en angiospermas suele ser materna) y en el caso del nuclear es de herencia biparental. En este último caso, el tamaño del genoma es de  $1.1 \times 10^6$ - $110 \times 10^9$  kb (Judd et al., 2002).

En cuanto a los estudios filogenéticos, los cambios en el genoma mitocondrial son lentos en cuanto a la secuencia nucleotídica en especies de origen vegetal (cf. Palmer y

Herbon, 1988) y también los reordenamientos en este genoma no diferencian grupos de especies o especies. Su uso principal se ciñe a estudios en animales.

El genoma cloroplastidial tiene un ritmo evolutivo mayor que el mitocondrial pero lleva consigo una serie de inconvenientes. Cuando trabajamos a nivel interespecífico, las regiones no codificadoras cloroplastidiales que se han utilizado como marcadores moleculares (intrón trnL (UAA) y el espaciador intergénico trnL (UAA)-trnF (GAA)), tienen una eficacia variable, dependiendo del grupo taxonómico objeto de estudio, además de que su poder resolutivo es comparativamente bajo con respecto a muchas de las secuencias no codificadoras del ADN nuclear. Por estos motivos, se prefieren como marcadores moleculares en estudios filogenéticos a nivel interespecífico las secuencias nucleares (Soltis y Soltis, 1998).

Se han realizado con éxito reconstrucciones filogenéticas en grupos de plantas en los últimos años por encima del nivel de género (Soltis et al., 1998). Previsiblemente, al bajar en la jerarquía sistemática, las filogenias resueltas y concluyentes, son raras.

Las causas pueden ser variadas, se puede destacar el hecho de la escasez de marcadores con un nivel de variabilidad apropiado o que la hibridación entre especies tiene restos comunes a niveles sistemáticos inferiores, se hacen más complejos los patrones de distribución de los marcadores en las especies y las áreas geográficas. También se podría considerar como causa, la discordancia entre los árboles de genes y los árboles de especies (Doyle, 1987).

En esta Memoria se ha tratado de hacer un estudio de táxones muy relacionados filogenéticamente, por lo tanto se requieren marcadores moleculares que presenten una elevada tasa de cambio, por este motivo, los marcadores moleculares escogidos para el presente trabajo han sido marcadores moleculares nucleares, en concreto, marcadores del ADN ribosómico.

Las secuencias espaciadoras que se transcriben del ADN ribosómico nuclear muestran en primer lugar, elevadas tasas evolutivas coherentes con los niveles de variabilidad y divergencia de los táxones comparados, en segundo lugar, un tipo de evolución no adaptativo (evolución concertada), en tercer lugar presentan un tamaño adecuado para facilitar la extracción y amplificación de ADN, lo cual es de gran importancia en el caso de los pliegos de herbario, porque el ADN suele encontrarse degradado y en cuarto lugar cabe destacar que el hecho de que sea positivo que existan sitios flanqueantes conservados que permitan el diseño de cebadores específicos. Estas características hacen de ellas buenos marcadores moleculares para resolver problemas filogenéticos entre especies estrechamente relacionadas como se demuestra en los numerosos estudios realizados al respecto.

El uso de la región ITS ha llegado a tal nivel de importancia que ha llegado a ser dominante en la inferencia intergenérica e intragenérica (cf. Álvarez y Wendel, 2003), mientras que el uso de la región ETS ha sido menor por la dificultad de diseñar cebadores que hibriden en el IGS o en su extremo 5', dada la gran variabilidad de estas regiones (Baldwin y Markos, 1998; Bena et al., 1998; Linder et al., 2000; Plovanich y Panero, 2004).

Baldwin et al. (1995), enumeraron una serie de ventajas que posee la región ITS para la reconstrucción filogenética, así entre ellas podemos destacar la herencia biparenteral, lo cual es útil en el caso de la especiación híbrida y origen de poliploides (Fuentes-Aguilar y Nieto-Feliner, 2003); universalidad, relacionado con la presencia de secuencias muy conservadas en sus extremos, lo cual facilita el diseño de cebadores para su amplificación mediante PCR; simplicidad, se considera simplicidad el hecho de que los ITS, al ser secuencias repetidas en el genoma y de pequeño tamaño, se vea facilitada la amplificación de gran variedad de material, incluso llegando al caso de los pliegos de herbario; uniformidad intragenómica, esta propiedad deriva de la rápida evolución concertada y posibilita la eliminación de secuencias parálogas; variabilidad intragenómica, en ciertos casos lleva a valores de divergencia muy elevados y con gran cantidad de sitios filogenéticamente informativos y escasa presión selectiva, lo que permite el acúmulo de mutaciones selectivamente neutras. Aunque a su vez, tienen una serie de limitaciones que

son el reducido grado de variabilidad en ciertos grupos, existencia de secuencias parálogas que requieren la secuenciación de múltiples copias, existencia de estructuras secundarias que dificultan la secuenciación y los frecuentes casos de contaminación ya sea endógena o exógena (Álvarez y Wendel, 2003). Nosotros en esta Memoria hemos utilizado como marcadores moleculares los espaciadores ITS-1 e ITS-2 del cistrón ribosómico 45S, que han sido los loci más empleados en estudios filogenéticos (Álvarez y Wendel, 2003; Nieto-Feliner et al., 2004). Se ha demostrado su utilidad en eucariotas fotosintéticos (excepto helechos) y hongos (Vargas et al., 2000; Schroeder et al., 2001).

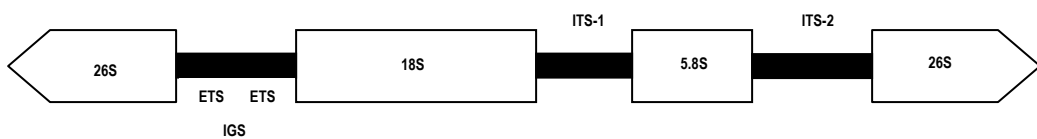
### **I.3.1. El ADN ribosómico**

Salvo excepciones como son algunos protozoos y hongos (De la Herrán et al., 2000), los ADNs ribosómicos de eucariotas se encuentran constituyendo dos familias multigénicas distintas cuyas unidades se repiten en tándem de cientos a miles de veces en el genoma nuclear. La familia representada por el ADN ribosómico 45S, que codifica para los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 26S ó 28S y la familia representada por el gen 5S, que codifica para el ARN ribosómico 5S. Ambas familias suelen encontrarse en cromosomas distintos (Drouin y Moniz de Sá, 1995; Lewin, 2004). Cada uno de estos loci está constituido por repeticiones de estas unidades ribosómicas dispuestas en tándem. En plantas, los genes de la unidad 45S son, el 18S, el 5.8S y el 26S y se encuentran constituyendo una única unidad de transcripción transcrita por la polimerasa ARN polimerasa I, cuya longitud oscila entre los 7.8 y 18.5 Kb según el grupo que hay que considerar (cf. Lapitan, 1992) y que se repite de 570 a 32.000 veces por genoma nuclear haploide (Rogerds y Bendich, 1987).

La estructura completa de esta unidad de transcripción se muestra en la Figura 1. Esta unidad incluye, aparte de los mencionados genes, dos espaciadores internos que se transcriben, ITS (Internal Transcribed Spacers); el ITS-1, que separa los genes 18S y 5.8S, y el ITS-2, que se encuentra entre los genes 5.8S y 26S. Cada una de estas unidades se encuentra a su vez separada de la contigua por dos tipos de espaciadores. Un espaciador externo que también se transcribe, ETS (External Transcribed Spacer) que flanquea el gen



18S en su extremo 5' y al 26S en el 3', y otra secuencia que en su origen se consideró como no transcrita, denominada NTS (Non-Transcribed Spacer), situada entre los dos ETSs. Con posterioridad se ha comprobado que esta última secuencia se transcribe a niveles bajos en algunas especies (Reeder, 1990) y que está implicada en la regulación de la transcripción de los genes ribosómicos, por lo que se ha procedido a un cambio en su nombre, pasando a denominarse IGS (Intergenic Spacer). Por su parte, los genes 5S se encuentran separados entre sí por secuencias espaciadoras NTSs (Non-Transcribed Spacers) (Lewin, 2004).



**Figura 19:** Representación esquemática de la organización de la unidad ribosómica 45S completa de planta.

Los genes ribosómicos mayores se localizan en regiones cromosómicas bien diferenciadas desde el punto de vista morfológico, denominadas regiones organizadoras nucleolares (NORs). La formación de los nucleolos tiene lugar durante la transcripción activa de los ARNs ribosómicos, el procesamiento de los precursores de ARN ribosómico y el ensamblaje de los ribosomas. Cada cluster de genes ribosómicos 45S repetidos da lugar a un nucleolo. Diversos estudios han confirmado que se trata de regiones muy variables, tanto en lo referente a su tamaño relativo y variación en su expresión (cf. Álvarez y Wendel, 2003), como en cuanto a su número y localización cromosómica dentro de familias y géneros. Normalmente estos dos últimos parámetros son variables incluso a nivel infragenérico (Garrido-Ramos et al., 1992; Cuñado et al., 2000). En la actualidad la secuencia de estas familias multiméricas se encuentra caracterizada para un amplio rango de especies (Opiola et al., 1996; Heslop-Harrison, 2000; Sumida et al., 2004). Globalmente, la secuencia de los genes se encuentra muy conservada en eucariotas, debido a su función crucial en el funcionamiento de la maquinaria celular (Barciszewska et al., 1985). Por ello, las variaciones observables en longitud o en secuencia nucleotídica, reside fundamentalmente en las secuencias espaciadoras. Así, por ejemplo, la longitud de las secuencias ITS varía

aproximadamente entre los 500 y 700 pb en angiospermas (Baldwin et al., 1995) y entre los 1,500 a 3,700 pb en gimnospermas (Bobola et al., 1992; Quijada y Linston, 1997; Maggini et al., 2000).

Las diferencias interespecíficas en la secuencia nucleotídica de los ITS en plantas, se calcula que puede llegar hasta un 39% entre especies muy emparentadas filogenéticamente (Baldwin et al., 1995). Estas diferencias se atribuyen a la alta tasa de cambio que presentan estas secuencias como consecuencia de estar sometidas a baja presión selectiva, en comparación con las secuencias génicas codificadoras. Este hecho les permite albergar cierto número de mutaciones neutras que dan lugar a la variación observable. No obstante, es necesario tener presente que estas secuencias se transcriben y están involucradas en ciertos procesos de la maduración del ARN (Van Nues et al., 1995; Bena et al., 1998), por lo que su tasa evolutiva es moderadamente rápida.

Por otro lado, debido al tipo de evolución molecular a la que están sometidas las secuencias de ADN ribosómico (evolución concertada), las secuencias ITS muestran uniformidad intraespecífica e intragenómica así como ciertos niveles de divergencia interespecífica. Todo ello las ha convertido en marcadores válidos para la inferencia de relaciones filogenéticas entre especies muy emparentadas (Desfeux y Lejeune, 1996; Navarro et al., 2004; Kyndt et al., 2005; Ronsted et al., 2005). Sin embargo, los datos que se han obtenido de este tipo de secuencias deben de ser combinados con otros caracteres o marcadores, ya que se han realizado estudios en los que se demuestra la existencia de polimorfismos a nivel intraespecífico e intraindividual (cf. Álvarez y Wendel, 2003; Nieto-Feliner, 2004). La variación de los ITS, tanto en secuencia como en longitud, a nivel intraespecífico e intraindividual, se ha relacionado con fallos en los mecanismos implicados en la evolución concertada y con la aparición de pseudogenes de ADN ribosómico (Buckler y Holtsford, 1996a, 1996b; Buckler et al., 1997; Muir et al., 2001; Wei et al., 2003; Ruggiero y Procaccini, 2004).

El inicio del ETS lo marca el lugar de inicio de la transcripción y su tamaño se encuentra entre 750 pb y 3.17 kpb (Bennett y Smith). A pesar de la variación que puedan

presentar los espaciadores ribosómicos que se transcriben, éstos poseen elementos estructurales muy importantes en la formación del precursor del ARN ribosómico, por lo que están sometidos a cierta presión selectiva. Por ello, se puede afirmar que la mayor heterogeneidad de las unidades de ADN ribosómico se encuentra en el espaciador intergénico (IGS), su tamaño en plantas oscila entre 1 kpb hasta 14 kpb (Rogerds & Bendich, 1987). Esta es una de las secuencias más estudiadas en plantas, pero los diferentes estudios realizados han puesto de manifiesto su alta heterogeneidad en longitud y en secuencia.

Se sabe que los ITS ribosómicos están sometidos a la evolución concertada (Dover, 1982; 1986), lo cual lleva a la homogeneidad intraespecífica de las repeticiones de ADN ribosómico porque requiere una transferencia horizontal entre los miembros de la familia de ADN ribosómico (homogeneización) y también la propagación de las mutaciones a todos los individuos que constituyen la población (fijación).

La tasa de evolución concertada depende de diferentes factores, entre los que se incluyen la tasa a la que se producen los procesos de homogeneización respecto a la tasa de mutación de las secuencias, el número y la estructura de las repeticiones, su distribución dentro del genoma... Las regiones espaciadoras ribosómicas, debido a la menor presión de selección a la que están sometidas respecto a las regiones codificadoras, pueden sufrir un número mayor de cambios que se fijarán o perderán por la actuación de los mecanismos homogeneizadores, de modo que se favorece la acumulación de diferencias interespecíficas. Además, la tasa a la que ocurre la homogeneización intraespecífica es mayor que la tasa a la que aparecen las mutaciones y, a la vez, menor que la tasa de fijación. Por lo tanto, se puede concluir que se producirá un menor grado de acumulación de diferencias interespecíficas en las regiones codificadoras de ADN ribosómico, aunque estos genes puedan sufrir tasas mutacionales y de homogeneización iguales a las de las secuencias espaciadoras.

### **I.3.2. Género *Arenaria* sección *Plinthine***

La sección *Plinthine* (Reichenb.) Mc Neill, incluida en el subgénero *Arenaria*, es un grupo bien delimitado desde el punto de vista morfológico y biogeográfico, hasta haber recibido el status de género (Reichenbach, 1837). Se puede afirmar que este grupo reúne un gran número de ventajas potenciales dirigidas a preguntas filogenéticas y filogeográficas. Está restringido geográficamente a la zona oeste del Mediterráneo, donde estas especies se dan desde los Alpes Marítimos (sureste de Francia, noroeste de Italia), al Norte de África (norte de Marruecos, noreste de Argelia), aunque la mayor parte de especies se encuentran en la Península Ibérica. Así, ésta se considera centro de diferenciación del grupo por su riqueza en táxones que, en su mayoría, se concentran en la zona sureste, la fuerte variabilidad exhibida por algunos de ellos y la distribución cercana de los pocos no circunscritos a ella (como ya se ha indicado, en países limítrofes con el territorio español). Consecuentemente, ni los límites geográficos ni los sistemáticos de la sección *Plinthine* son fuentes de incertidumbre.

Por lo menos, con las discrepancias taxonómicas, unidas a la complejidad citotaxonómica, anticipan una gran riqueza en los procesos evolutivos. De hecho, Font Quer (1948) se dio cuenta del interés de este grupo y propuso un elevado número de hipótesis acerca de la sección *Plinthine*. Consecuentemente, *Arenaria*, sect. *Plinthine* podría ofrecer información para comprender la historia evolutiva de un grupo Mediterráneo usando marcadores moleculares (Valcárcel & al., 2006).

En el campo taxonómico, el grupo ha sido estudiado en profundidad (Font Quer, 1948; López González & Nieto Feliner, 1986; Goyder, 1987, 1988; López G., 1990; Nieto Feliner, 1994). Se han llevado a cabo numerosos estudios desde el punto de vista citotaxonómico de la sección *Plinthine* centrados en la variación del número cromosómico y los mecanismos citológicos que parecen estar involucrados (Nieto Feliner, 1985; Favarger & Nieto Feliner, 1988). Estos estudios han revelado series poliploides (2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x) basadas en  $x = 20$  en las diferentes subespecies de *A. tetraquetra* y en *A. alfacarensis* y

cambios en la aneuploidía de *A. erinacea* mientras que en otras especies de la sección *Plinthine* no aparecen.

El encontrar datos tan dispares lleva a pensar que las posibilidades de obtener una filogenia bien resuelta no son muy elevadas, ya que surgen dudas acerca del nivel de divergencia genética que cabría esperar entre ciertas especies. Tras realizar alguna estimación previa de las relaciones filogenéticas basadas en la morfología, no se han producido resultados concluyentes (Valcárcel et al, 2006). Para intentar mejorar la falta de resultados concluyentes se han realizado estudios a partir de ADN ribosómico nuclear (ITS) y cloroplastidial. Pero aún así, los análisis filogenéticos de las secuencias de ITS no han producido una resolución lo suficientemente elevada en ciertos nodos del árbol. Los motivos que se pueden considerar como causantes de esto podrían ser procesos evolutivos a nivel de organismo, de gen o nivel de genoma.



## **II. OBJETIVOS**





Algunas especies del género *Arenaria* sección *Plinthine* (*Caryophyllaceae*) se han utilizado de forma continuada en medicina tradicional con fines terapéuticos. Esta utilización se ha considerado que está relacionada con la composición de las mismas en cuanto a su contenido en iones y otros principios activos. Desde estas premisas se han seleccionado nueve especies incluidas en esta sección para realizar un estudio cuyo objetivo principal es la identificación botánica, fitoquímica y genética de cada uno de los taxones. Concretamente en esta Memoria se han pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1.- Identificar las poblaciones de los taxones objeto de estudio desde el punto de vista botánico, determinando su ecología y estableciendo su distribución biogeográfica.

2.- Realizar un screening sobre principios activos y principales componentes para caracterizar a las especies desde el punto de vista fitoquímico, profundizando en determinados elementos cuya presencia permitan validar su utilización en la medicina popular.

3.- Analizar las posibles diferencias en relación a la composición fitoquímica de los taxones en diferentes poblaciones, de forma que permita justificar la discriminación que se realiza a nivel popular en cuanto a la actividad o eficacia en el uso medicinal.

4.- Avanzar en el conocimiento de estos taxones a partir de la realización de un estudio genético del ADN utilizando ITS como marcadores moleculares para determinar hasta qué punto son individualizables.



### **III. FITOQUÍMICA**



### **III.1. MATERIAL Y MÉTODOS**



### III.1.1. Material utilizado

El material vegetal objeto de estudio de este trabajo de Tesis Doctoral han sido individuos completos de las especies del género *Arenaria* (*Caryophyllaceae*) que se detallan en la siguiente tabla, donde se recogen además, las poblaciones de donde proceden y la fecha de recolección.

ESPECIE	LOCALIZACIÓN	FECHA
<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.	Cueva del Agua. Iznalloz, Sierra Harana (Granada) 30SVG5431. 1780 m	11 Junio 2003
<i>A.tetraquetra amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb.	Lavadero de la Reina, Sierra Nevada (Granada) 30SVG7508 2650 m	30 Agosto 2004
<i>A. tetraquetra murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	Calar de Santa Bárbara. Sierra de Baza (Granada) 30SWG1435. 2143 m	24 Mayo 2005
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1)	Cortijada de los Agustinos. Sierra de Quéntar. (Granada) 30SVG6919. 1400m.	10 Mayo 2005
<i>A.armerina caesia</i> (Boiss.)Díaz,Morales & Valle (2)	Vereda a la Ermita de Nª Sra. Del Pilar, El Colmenar. Sierra de Huetor Santillán. (Granada) 30SVG5520. 1065 m	15 Junio 2005
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (1)	Cueva del Agua. Sierra Harana (Granada) 30SVG5431. 1600 m.	11 Junio 2003
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (2)	Casa del Bosque. Sierra de Orce. (Granada) 30SWG5266. 1537 m	8 Junio 2005
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	Calar de Santa Bárbara. Sierra de Baza (Granada) 30SWG1435. 2143 m	24 Mayo 2005
<i>A. arcuatociliata</i> G. López & Nieto	Casa del Bosque. Sierra de Orce (Granada). 30SWG5268. 1112 m.	8 Junio 2005

<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (1)	Cañada del Cuerno. Sierra de las Nieves (Málaga). 30SUF1963. 1540 m	14 Mayo 2005
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (2)	Cueva de Ágreda (Soria). 30TWM92, 1650 m.	1 Julio 2003
<i>A. delaguardiae</i> G. López & Nieto	Cerro Cañuelo. Sierra de Cázulas (Granada) 30SVF3480 1180 m.	17 Junio 2003

**Tabla 1:** Localización y fecha de recolección de las especies objeto de estudio.

### III.1.2. Tratamiento previo de las muestras

#### III.1.2.a. Deseccación

Una vez recolectado, el material vegetal fue sometido a un proceso de desecación a temperatura ambiente con aireación. El intervalo de temperaturas máxima y mínima que soportaron las especies durante el período de desecación fue de 10 a 29°C.

#### III.1.2.b. Molturación

Una vez desecado el material, la planta completa fue pulverizada con la ayuda de un molinillo de café.

#### III.1.2.c. Conservación

Las especies molturadas se conservaron en recipientes cerrados herméticamente, a la temperatura ambiente y al abrigo de la luz hasta el momento de su utilización.

### III.1.3. Determinación de humedad y sustancias volátiles

En primer lugar y como medio para caracterizar el material vegetal se han realizado las determinaciones de humedad y cenizas.



El grado de humedad de las muestras se determinó por la técnica descrita en la Real Farmacopea Española 2005, con pequeñas variaciones, que se detallan a continuación.

#### **III.1.3.a. Reactivos**

- Deshidratante para el desecador ( $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ).

#### **III.1.3.b. Material**

- Pesasustancias con ajuste esmerilado.
- Desecador.
- Estufa de desecación.
- Balanza de precisión.

#### **III.1.3.c. Método**

La técnica utilizada es la descrita en la R.F.E. 2005 como Protocolo de Humedad (pérdida por desecación de extractos) aunque con ciertas modificaciones (Miró, 1981).

1. Pesar en pesasustancias tarado aproximadamente 1 gramo (con una aproximación de milésima) de la muestra, finamente pulverizada.
2. Desecar en una estufa a  $100^\circ\text{-}105^\circ\text{C}$  durante 2-3 horas y dejar enfriar durante 10 min en un desecador sobre  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .
3. Se pesa de nuevo cada hora, hasta conseguir dos pesadas seguidas que no difieran más de 0,001 g. Posteriormente se realizan los cálculos correspondientes para expresar la humedad (y sustancias volátiles) en porcentaje referido a la droga desecada.

#### **III.1.4. Determinación de cenizas**

Se determinaron las cenizas totales que proporcionaban las muestras, siguiendo el método descrito en la Real Farmacopea Española 2005 que se detalla a continuación:

#### **III.1.4.a. Reactivos**

- Deshidratante para el desecador ( $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ).
- Mezcla sulfocrómica

- Agua destilada.

#### **III.1.4.b. Material**

- Crisoles de porcelana de calcinación.

- Estufa de desecación.

- Balanza.

- Pinzas.

- Lápiz de grafito.

#### **III.1.4.c. Método**

1. Se lavan los crisoles con la mezcla sulfocrómica, se enjuagan con agua destilada y se dejan secar al aire o en estufa de desecación.
2. Pesar el material en crisoles tarados previamente y numerados con un lápiz de grafito en la parte inferior. Con la ayuda de unas pinzas (para evitar posibles errores posteriores), se colocan en el desecador siguiendo un orden, que luego se mantendrá al introducir en la mufla.
3. Calentar al rojo un crisol de sílice o de platino durante 30 min., antes de pesarlo dejar que se enfríe en un desecador.
4. Introducir en el crisol 1g de producto pulverizado, distribuir uniformemente la muestra en el interior del crisol.
5. Desecar durante 1h a 100°-105°C.
6. Calcinar en un horno mufla a  $600 \pm 25^\circ\text{C}$  (la muestra no debe incendiarse en ningún momento).
7. Después de cada calcinación dejar enfriar el crisol en el desecador.

8. Si las cenizas aún contienen partículas negras, suspender las cenizas en agua caliente y filtrar por un filtro sin cenizas. Calcinar de nuevo el residuo con el filtro. Reunir el filtrado y las cenizas, evaporar a sequedad y calcinar hasta masa constante.

Una vez que se completa el proceso, las muestras se pesan y se conservan en lugar fresco y seco, en ausencia de aireación.

### **III.1.5. Determinación del contenido en sodio y potasio inorgánicos**

La preparación de las muestras es la misma para ambas determinaciones, lo que varía son los patrones con los que posteriormente se realiza el ensayo.

#### **III.1.5.a. Material**

- Crisoles de porcelana.
- Mufla.
- Hornillo eléctrico con placa de amianto.
- Matraces de fondo redondo de 100 ml.
- Fotómetro de llama.

#### **III.1.5.b. Reactivos**

- Ácido clorhídrico concentrado.
- Agua destilada.

#### **III.1.5.c. Método**

El método seguido corresponde al expuesto en los Métodos de Referencia para la Determinación de Elementos Minerales en Vegetales (1969) con pequeñas modificaciones, introducidas con el fin de agilizar la obtención de resultados.

1. Las hojas lavadas con agua destilada, se mantienen a 60°C en estufa hasta que se sequen. A continuación se pulverizan.

2. De 1,5 a 2 g de muestra pulverizada se disponen en crisoles de porcelana y se introducen en el horno, se va subiendo la temperatura hasta 550°C, manteniendo 6 horas esta temperatura. Deben quedar cenizas blancas; si no lo están, se humedece en frío con agua y se vuelve a poner a 550°C.
3. Cuando las cenizas están blancas se humedecen, se añaden 2 ml de HCl concentrado y se lleva a ebullición (en un hornillo eléctrico con placa de amianto) durante 30 segundos, se vuelve a enfriar y se filtra.
4. Llevar a 100 ml en un matraz de fondo redondo. En esa disolución se determinan los cationes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> con la ayuda de un fotómetro de llama.

### **III.1.6. Preparación de extractos**

La droga, previamente desecada y conservada al abrigo del aire y de la luz, fue sometida a un proceso de extracción fraccionada, de gran utilidad para la posterior detección de los grupos fitoquímicos que se encuentran en la materia prima mediante un estudio de tipo prospectivo denominado "screening" fitoquímico.

En todos los casos y una vez terminada cada extracción, se procederá a la filtración. El filtrado se repartirá en partes alícuotas en varios tubos de ensayo, con el objeto de poder realizar todas las reacciones necesarias a cada una de las muestras. Es importante realizar siempre un ensayo blanco que informe en caso de error metodológico.

Cada muestra se fraccionó en una serie de extractos sucesivos, con la finalidad de disminuir su complejidad fitoquímica, empleando para ello los siguientes disolventes:

- Agua destilada
- Etanol 96% v/v
- Cloroformo

En los estudios fitoquímicos es habitual es comenzar las extracciones sucesivas con el disolvente de menor polaridad y terminar con el más polar. Nosotros hemos invertido el orden eluotrópico con objeto de obtener una mayor información de los componentes que se encuentran en el extracto acuoso inicial, para conseguir una mayor aproximación a lo que ocurre cuando una persona prepara una infusión o una decocción con alguna de estas especies.

### III.1.6.a. Método

La planta, previamente desecada, fue sometida a una decocción al 5% en un dispositivo para destilación a reflujo, como se observa en el esquema de la Fig. 20. Tras 15 min. a ebullición, se filtró sobre filtro de pliegues en caliente. De esta decocción se obtuvo un extracto acuoso 1 y un marco 1 ( $M_1$ ) sólido.

Una vez frío el extracto, se filtró de nuevo. De esta forma se obtiene finalmente un extracto acuoso 2 y un precipitado. El extracto acuoso 2 se liofiliza y se obtiene el residuo seco 1 ( $RS_1$ ), que se conservará en viales pequeños previamente tarados para que después se pueda calcular el peso del residuo seco. El precipitado se deseca a menos de 40 °C y lo denominamos residuo seco 2 ( $RS_2$ ).

De cada uno de los residuos secos se calcula su rendimiento en relación al peso de la droga de partida.

Por otra parte, el marco 1 fue sometido a un proceso extractivo en dispositivo soxhlet con etanol 96% hasta agotamiento del mismo, obteniéndose un extracto etanólico y un marco 2 ( $M_2$ ).

El extracto etanólico se concentra a sequedad en rotavapor a una temperatura de 40 °C y a presión reducida, originando el residuo seco 3 ( $RS_3$ ). Finalmente, el marco 2 ( $M_2$ ) se extrae con cloroformo en dispositivo soxhlet, de la misma forma que en el caso anterior, obteniéndose un extracto orgánico que se concentra a sequedad en rotavapor a una temperatura de 40 °C y a presión reducida, dando el residuo seco 4 ( $RS_4$ ).

El marco procedente de la extracción clorofórmica es desechado porque aparentemente no contiene ninguna sustancia de interés.

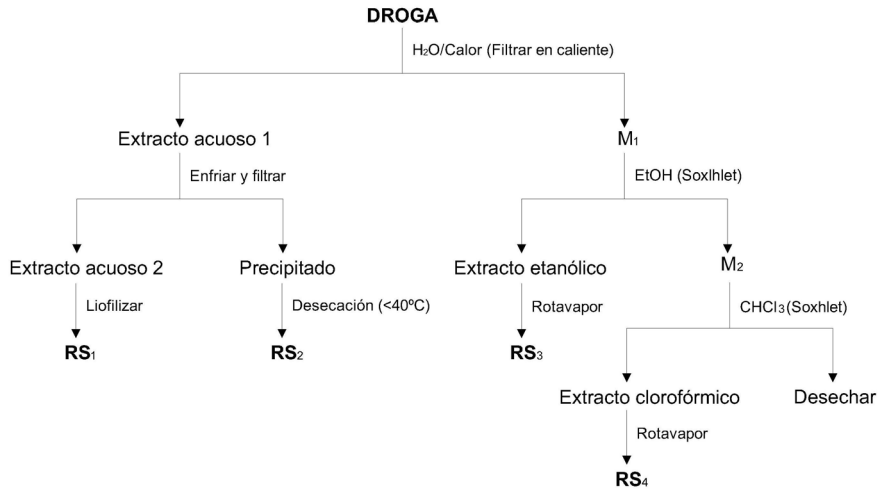


Figura 22: Esquema del proceso de extracción fraccionada de las muestras.

### III.1.7. Screening fitoquímico

En los residuos secos de las muestras se han ensayado una serie de reacciones analíticas encaminadas a poner de manifiesto, de forma cualitativa, la presencia de los distintos grupos fitoquímicos que caracterizan a los extractos objeto de nuestra investigación.

Estos ensayos se han realizado sobre los residuos secos, una vez redissueltos en su correspondiente disolvente extractivo, de acuerdo con la solubilidad de los grupos investigados:

- Extracto acuoso: alcaloides, antocianinas, glúcidos, esteroides, gomas y mucilagos, saponinas, taninos y triterpenos.
- Extracto etanólico: cumarinas, flavonoides y leucoantocianos.
- Extracto clorofórmico: antraquinonas, lípidos y ceras.

Para la realización del screening se han tenido en cuenta una serie de precauciones que son necesarias en este tipo de estudios.

La molturación de las muestras se realiza para poder extraer adecuadamente sus principios activos, pero hay que tener en cuenta que el polvo obtenido debe ser "grosero", pues los polvos finos forman barro e impiden la extracción.

Los principios activos suelen encontrarse en la droga en muy bajas concentraciones, por lo que tendremos que realizar una perfecta extracción de los mismos, ya que si ésta es deficiente, podemos dar como negativo un resultado que es positivo.

Otro aspecto importante es el tiempo de extracción, que ha de ser suficiente, ya que puede darse un resultado como falso negativo, en el caso de que el tiempo sea demasiado corto.

Terminada la extracción, hay que proceder a la filtración mediante filtro de pliegues, ya que lo que nos interesa es el filtrado.

Es fundamental añadir en todos los casos el reactivo gota a gota, ya que un exceso de reactivo puede ocasionar una coloración demasiado intensa o una redisolución del precipitado, en su caso.

#### **III.1.7.a. Detección de glúcidos**

Este amplio grupo fitoquímico se detecta mediante la reacción de Molish: a 0,5 ml de extracto acuoso se le añaden 11 gotas de una solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 10% y 0,5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado resbalando por las paredes, formándose dos capas. En caso de reacción positiva aparece en la interfase un anillo de color violeta (Galisteo Moya, 1997).

#### **III.1.7.b. Detección de gomas y mucílagos**

Estos grupos fitoquímicos se caracterizan por ser insolubles en etanol de 96°. El ensayo para detectarlos consiste en añadir un exceso de alcohol de 96° a 1 ml del extracto

acuoso. La aparición de un precipitado floculento confirma la existencia de este tipo de compuestos en la muestra analizada (Galisteo Moya, 1997).

### III.1.7.c. Detección de lípidos y ceras

A 1 ml del extracto clorofórmico se le añade 1 ml del reactivo de Serger (solución de molibdato sódico al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), preparado en el momento de hacer la prueba. La reacción se considera positiva cuando la capa inferior se colorea de gris azulado (Galisteo Moya, 1997).

### III.1.7.d. Detección de cumarinas

Se ensayan también en la disolución etanólica. Se añade 1 ml en un tubo de ensayo, el cual se cubre con un trozo de papel de filtro previamente impregnado con una solución diluida de KOH. Se calienta al baño maría durante 10-15 min. La presencia de cumarinas volátiles se pone de manifiesto por la fluorescencia azulada del papel de filtro a la luz UV (Galisteo Moya, 1997).

Se han escogido como control positivo las cápsulas de corteza de castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum* L.) de Arcochim, con un contenido en cumarinas superior al 2%, expresado en aesculósido.

### III.1.7.e. Detección de flavonoides

Se investigan en la disolución etanólica, mediante la reacción de la cianidina (prueba de Shinoda). A 1 ml del extracto etanólico se le adicionan II ó III gotas de HCl concentrado y un fragmento de cinta de magnesio. Dependiendo del tipo de flavonoide presente aparecerá una coloración diferente (Galisteo Moya, 1997):

- Anaranjado           ⇒     Flavonas
- Rojo                    ⇒     Flavanonas
- Rojo azulado        ⇒     Flavonoles
- Violeta               ⇒     Flavonoles y xantonas



En este caso se han utilizado varios controles positivos, todos ellos procedentes de Arcochim:

- Flavonas: sumidad florida de espino albar (*Crataegus oxycantha* L.), con un contenido superior al 2% en flavonoides totales.
- Flavonoles: frutos de cardo mariano (*Silybum marianum* Gaertn.), con un contenido en silimarina superior al 1%.
- Flavanonas: sumidad florida de tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

#### III.1.7.f. Detección de antocianinas

A 1 ml de extracto acuoso se le adicionan 2 ml de HCl al 37% QP. Se calienta al baño maría durante 30 minutos con objeto de producir la hidrólisis de los heterósidos. Una vez transcurrida la reacción se enfría el tubo y se le añade alcohol isoamílico, agitando vigorosamente para favorecer la extracción de las geninas. La aparición de color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianos (Galisteo Moya, 1997).

Se ha utilizado la vid roja (*Vitis vinifera* L.), de Arcochim, como control positivo, con un mínimo del 0,2% de antocianósidos.

#### III.1.7.g. Detección de leucoantocianos

Se basa en la propiedad de estas sustancias de transformarse en antocianidinas, compuestos de color rojo en presencia de un ácido fuerte.

Para ello, se calientan 2 ml de extracto etanólico en presencia de HCl concentrado, apareciendo color rojo o naranja en caso de reacción positiva (Ahmad Agil, 1991).

#### III.1.7.h. Detección de taninos

Se añaden a 1 ml del extracto etanólico o al acuoso, II ó III gotas de solución acuosa de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 1%. Una coloración azul o verde sería indicativa de una reacción positiva.

Para diferenciar taninos pirogálicos (hidrolizables) y catéquicos (condensados), se utiliza la reacción de Stiasny. Para ello, al extracto se le añaden unas gotas de HCl concentrado y 1 ml de formaldehído, hirviéndose durante varios minutos. La aparición de un

precipitado indicaría la presencia de taninos catéquicos. Se filtra y si al añadir unas gotas de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 1%, aparece de un color azul, indicaría la presencia de taninos pirogálicos (Ali Tahir, 1991).

En este caso también se han usado controles positivos procedentes de Arcochim:

- Para la detección de taninos hidrolizables se han utilizado las hojas de hamamelis (*Hamamelis virginiana* L.), con un contenido superior al 4,5% en polifenoles totales expresados en ácido gálico.
- Para confirmar la presencia de taninos condensados, se ha utilizado la sumidad florida de tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

#### **III.1.7.i. Detección de antraquinonas**

Se determina mediante la reacción de Bornträger: a 1 ml del extracto clorofórmico se le añade 1 ml de NaOH 1N, agitando para que se mezclen las fases. Tras dejar en reposo, la reacción es positiva si en la fase acuosa aparece una coloración rojiza debida a las sales de los compuestos 1,8- dihidroxiantraquinónicos (Galisteo Moya, 1997).

El control positivo escogido ha sido la corteza de frágula (*Rhamnus frangula* L.) de Arcochim, con un contenido del 4,8% en principios activos.

#### **III.1.7.j. Detección de terpenos y esteroides**

Estos grupos fitoquímicos se ensayan mediante la reacción de Liebermann-Burchard. Se parte de 1 ml del extracto acuoso, al que se le adiciona 1 ml de anhídrido acético y 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado dejándolo resbalar suavemente por las paredes del tubo. La presencia de un anillo rojizo en la interfase es indicativa de la existencia de triterpenos y siendo característica de los esteroides la coloración verdosa en la fase superior (Galisteo Moya, 1997).

#### **III.1.7.k. Detección de saponinas**

Este ensayo se basa en el poder afrógeno de estos compuestos. Para detectarlas se realiza una redisolución del residuo seco al 10% en agua a ebullición (extracto acuoso) y

se deja enfriar. Se agita vigorosamente durante 1 minuto, en tubos de ensayo de 15 mm de diámetro exterior, con la consiguiente formación de espuma. La reacción se considera positiva cuando dicha espuma persiste transcurridos 30 min ( $\pm 1$  cm) (Miró, 1981; Galisteo Moya, 1997).

Para el control positivo se han usado raíces secundarias de rusco (*Ruscus aculeatus* L.), de Arcochim, cuyo contenido en saponósidos expresados en ruscogenina es superior al 2,5%.

### III.1.7.I. Detección de alcaloides

Los reactivos generales de alcaloides, cuya composición se ha detallado anteriormente (pág. 70), se ensayan de forma independiente sobre 1 ml del extracto etanólico, dando lugar a precipitados de distinta coloración:

- Reactivo de Bouchardat  $\Rightarrow$  precipitado rojo ladrillo
- Reactivo de Mayer  $\Rightarrow$  precipitado blanco amarillento
- Reactivo de Hager  $\Rightarrow$  precipitado amarillo limón
- Reactivo de Dragendorff  $\Rightarrow$  precipitado castaño rojizo

La composición de cada uno de los reactivos anteriores se detalla a continuación:

- Reactivo de Bouchardat: 2 g de yoduro potásico en 100 ml de agua. Se añaden 2 g de yodo metálico. Agitar y filtrar.

- Reactivo de Mayer: 1,35 g de  $MgCl_2$  y 5 g de yoduro potásico se disuelven en 30 ml de agua. Diluir con agua hasta 100 ml.

- Reactivo de Hager: ácido pícrico acuoso al 1,3%.

- Reactivo de Dragendorff: 8 g de subnitrito de bismuto en 20 ml de ácido nítrico en caliente con agitador. Aparte, 27,2 g de yoduro potásico se disuelven en el mínimo de agua. Se vierte la solución bismútica lentamente y agitando sobre la de yoduro potásico dando un precipitado que se disuelve y da un líquido rojo-amarillento. Dejar en reposo (a baja  $T^a$ ) unas horas y filtrar. Diluir con agua hasta 100 ml.

Ninguno de estos reactivos es específico de alcaloides, ya que muchos compuestos nitrogenados pueden interferir en los ensayos, razón por la cual no nos podemos limitar a una sola de las reacciones citadas. Se considera positiva la presencia de alcaloides cuando en al menos tres de ellas hay una clara aparición del precipitado correspondiente (Galisteo Moya, 1997).

El control positivo utilizado ha sido las partes aéreas floridas de la amapola de California (*Eschscholtzia californica* Cham.), de Arcochim, con un contenido en alcaloides superior al 0,8% expresados en eschscholtzina.

### III.1.8. Purificación por cromatografía en columna

La planta completa de *Arenaria erinacea* Boiss. (1), seca y pulverizada (100 g) fue extraída exhaustivamente con etanol 95% (v/v). Una vez obtenido el extracto etanólico se procedió a su purificación siguiendo la metodología de extracción líquido-líquido. El residuo se disolvió en (2x) 8 ml de DCM y se lavó con (x2) 8 ml de agua. Las fases acuosas se reunieron y se procedió a lavar con (4x) 10 ml de *n*-butanol. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>). El extracto *n*-butanólico fue concentrado a sequedad en el rotavapor (Büchi R-200). Posteriormente, este residuo (60 mg) se purificó mediante cromatografía preparativa en columna tipo flash con relleno de sílica gel 60 (Merck) y eluido con la mezcla acetato de etilo-hexano (1:7). Todo el proceso de purificación se siguió por TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>). Se obtuvieron 2 mg de producto puro.

La fracción resultante de la elución de la columna, tras su desecado, se intentó caracterizar por sus propiedades espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H RMN). Para ello, la muestra se disolvió en metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) pero debido a la escasa cantidad de muestra obtenida no se pudo caracterizar de forma fehaciente ningún compuesto o estructura conocida.

La planta completa de *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner, seca y pulverizada (100 g) fue extraída exhaustivamente con etanol 95% (v/v). Una vez obtenido el extracto etanólico se procedió a su purificación siguiendo la metodología de extracción líquido-líquido. El residuo (34,7 mg) se disolvió en (2x) 8 ml de DCM y se lavó con (x2) 8 ml de agua. Las fases acuosas se reunieron y se procedió a lavar con (4x) 10 ml de *n*-butanol. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>). El extracto *n*-butanólico fue concentrado a sequedad en el rotavapor (Büchi R-200). Posteriormente, este residuo (45,8 mg) se purificó mediante cromatografía preparativa en columna tipo flash con relleno de sílica gel 60 (Merck). Las muestras fueron introducidas con un volumen de inyección de 50 µl, se eluyó con una mezcla inicial DCM:MeOH (20:1) hasta una mezcla final (7:3). Todo el proceso de purificación se siguió por TLC (Silicagel 60 F<sub>254</sub>).

Se obtuvo una cantidad final de 4,4 mg a la que se le realizó una comprobación de pureza por HPLC en fase reversa (acetonitrilo:agua, 15:85), dando un pico mayoritario a una  $\lambda = 254$  nm.

El Método instrumental de elución en HPLC se describe a continuación:

	Time (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0.01	0.80	85.0	0.0	15.0	0.0	6
2	5.00	0.80	85.0	0.0	15.0	0.0	6
3	25.00	0.80	0.0	0.0	100.0	0.0	6
4	30.00	0.80	0.0	0.0	100.0	0.0	6
5	40.00	0.80	85.0	0.0	15.0	0.0	6
6	45.00	0.80	85.0	0.0	15.0	0.0	6

**Tabla 2:** Método instrumental de elución en HPLC: A (H<sub>2</sub>O 0.1% TFA), B (CH<sub>3</sub>CN 0.1% TFA).

Instrumentación: la cromatografía líquida consistió en un inyector simple de muestra (WATERS 600) y un detector de fotodiodos (Waters 2996) conectado a un ordenador con monitor de parámetros cromatográficos y procesador de datos. Las columnas (XTerra, 250 x 4.6 mm I.D.) fueron pre-empaquetadas con partículas 5-µm C18. el flujo fue de 0,8 ml/min.

Al igual que en el caso anterior, se intentó su caracterización por espectrometría  $^1\text{H}$  RMN, disolviendo la muestra en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Se encontró finalmente que la cantidad de muestra no era suficiente para ser detectada por la sensibilidad habitual de trabajo del aparato.

## **III.2. RESULTADOS**





### III.2.1. Normalización del material vegetal

A continuación se detallan los resultados obtenidos en los ensayos realizados para la caracterización de los extractos acuoso (liofilizado), acuoso (precipitado en frío), etanólico y clorofórmico de *Arenaria alfacarensis* Pamp., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner, *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina*, *Arenaria armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *Arenaria tomentosa* Willk., *Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner, *Arenaria erinacea* Boiss. y *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner.

### III.2.2. Determinación del residuo seco de los extractos

Se determinó en un primer lugar, el porcentaje en peso del residuo seco obtenido tras la concentración a sequedad de cada extracto -acuoso liofilizado, etanólico y clorofórmico- en relación con el peso del material vegetal desecado del que se partió para la obtención del mismo.

En la Tabla 3 se detallan los rendimientos de cada uno de los extractos:

RS<sub>1</sub>: Extracto acuoso (liofilizado).

RS<sub>2</sub>: Extracto acuoso (precipitado en frío).

RS<sub>3</sub>: Extracto etanólico.

RS<sub>4</sub>: Extracto clorofórmico.

Las cantidades del RS<sub>2</sub> son muy pequeñas en todos los casos, lo que implica que la cantidad de compuestos en él incluidos también lo es, por lo que se ha procedido a la unión de los extractos RS<sub>1</sub> y RS<sub>2</sub>, ya que ambos constituyen en su totalidad el extracto acuoso.

	RS <sub>1</sub>	RS <sub>2</sub>	RS <sub>3</sub>	RS <sub>4</sub>
<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.	3,669%	0,025%	15,796%	5,459%
<i>A. tetraquetra amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb.	2,530%	0,099%	15,103%	5,321%
<i>A. tetraquetra murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	4,522%	0,395%	19,294%	6,456%
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1)	4,786%	0,158%	21,600%	5,021%
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.)Díaz,Morales & Valle (2)	8,511%	0,070%	34,434%	7,983%
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (1)	5,873%	0,191%	12,667%	4,869%
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (2)	7,775%	0,379%	17,923%	5,872%
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	7,495%	0,050%	24,391%	5,318%
<i>A. arcuatociliata</i> G. López & Nieto	6,914%	0,311%	37,204%	8,016%
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (1)	5,323%	0,808%	14,551%	5,650%
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (2)	6,732%	0,070%	11,414%	2,121%
<i>A. delaguardiae</i> G. López & Nieto	7,026%	0,006%	2,168%	3,312%

Tabla 3: Rendimientos obtenidos de cada uno de los extractos de las especies de *Arenaria*.

### III.2.3. Determinación de humedad y sustancias volátiles

En la Tabla 3 se expresa el porcentaje de humedad y sustancias volátiles a 100-105°C de las especies según la metodología anteriormente descrita (ver pág. 87).

	PESO INICIAL	PESO FINAL	PORCENTAJE	MEDIA PORCENTAJE
<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.	1,016	0,928	8,8%	8,20%
	1,011	0,932	7,9%	
	1,015	0,936	7,9%	
<i>A. tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb.	1,005	0,946	5,9%	5,87%
	0,996	0,939	5,7%	
	0,996	0,936	6,0%	
<i>A. tetraquetra</i> <i>murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	1,042	1,008	3,4%	3,57%
	1,017	0,983	3,4%	
	1,015	0,978	3,9%	
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle(1)	1,030	0,949	8,1%	6,93%
	0,999	0,937	6,2%	
	1,029	0,964	6,5%	
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.)Díaz, Morales & Valle(2)	1,012	0,952	6,0%	6,97%
	1,021	0,942	7,9%	
	1,039	0,969	7,0%	
<i>Arenaria armerina</i> <i>Bory</i> subsp. <i>armerina</i> (1)	0,992	0,915	7,7%	7,87%
	1,005	0,926	7,9%	
	1,025	0,945	8,0%	
<i>Arenaria armerina</i> <i>Bory</i> subsp. <i>armerina</i> (2)	1,045	0,975	7,0%	6,73%
	1,009	0,947	6,2%	
	1,047	0,977	7,0%	
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	1,019	0,963	5,6%	5,80%
	1,040	0,983	5,7%	
	1,038	0,977	6,1%	
<i>Arenaria</i> <i>arcuatociliata</i> G. López & Nieto	1,025	0,954	7,1%	6,10%
	1,049	0,995	5,4%	
	1,038	0,980	5,8%	
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (1)	0,936	0,850	8,6%	8,10%
	1,016	0,936	8,0%	
	1,013	0,934	7,7%	
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (2)	1,006	0,936	7,0%	7,90%
	1,015	0,932	8,3%	
	1,013	0,929	8,4%	
<i>Arenaria</i> <i>delaguardiae</i> G. López & Nieto	1,003	0,932	7,1%	7,03%
	0,998	0,930	6,8%	
	1,013	0,941	7,2%	

Tabla 4: Resultados de la determinación de humedad.

### III.2.4. Determinación de cenizas

En la tabla 4 figura el peso de las muestras antes y después de la calcinación, con el correspondiente porcentaje para cada una de las tres determinaciones realizadas y la media, según la metodología descrita (ver pág. 88).

	PESO INICIAL	PESO FINAL	PORCENTAJE	MEDIA PORCENTAJE
<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.	1,016	0,141	13,87%	14,63%
	1,011	0,149	14,74%	
	1,015	0,155	15,27%	
<i>A. tetraquetra amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb.	1,005	0,190	18,52%	17,00%
	0,996	0,170	17,35%	
	0,996	0,015	15,14%	
<i>A. tetraquetra murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	1,754	0,263	15,01%	16,55%
	1,725	0,314	18,21%	
	1,742	0,286	16,43%	
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle(1)	1,751	0,365	20,85%	12,77%
	1,723	0,153	8,86%	
	1,741	0,150	8,59%	
<i>A. armerina caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle(2)	1,735	0,138	7,95%	7,86%
	1,729	0,139	8,04%	
	1,803	0,137	7,60%	
<i>Arenaria armerina Bory</i> subsp. <i>armerina</i> (1)	0,992	0,095	9,58%	10,22%
	1,005	0,104	10,35%	
	1,025	0,110	10,73%	
<i>Arenaria armerina Bory</i> subsp. <i>armerina</i> (2)	1,801	0,152	8,44%	7,88%
	1,774	0,139	7,84%	
	1,782	0,131	7,35%	
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	1,730	0,266	15,39%	14,62%
	1,838	0,240	13,07%	
	1,793	0,276	15,39%	
<i>Arenaria arcuatociliata</i> G. López & Nieto	1,754	0,178	10,15%	10,68%
	1,765	0,205	11,62%	
	1,752	0,180	10,27%	
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (1)	0,936	0,195	20,83%	20,38%
	1,016	0,198	19,49%	
	1,013	0,212	20,82%	
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (2)	0,994	0,138	8,40%	8,10%
	1,078	0,203	7,90%	
	1,074	0,195	8,00%	
<i>Arenaria delaguardiae</i> G. López & Nieto	1,003	0,132	13,16%	13,33%
	0,998	0,146	14,63%	
	1,013	0,123	12,14%	

Tabla 5: Resultados de la determinación de cenizas.

### III.2.5. Screening fitoquímico

Los resultados del screening fitoquímico para cada una de las especies, con indicación del extracto en el que se ha realizado cada ensayo, se reflejan en las siguientes tablas:

*Arenaria alfacarensis* Pamp.: Tabla 6.

*Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb.: Tabla 7.

*Arenaria tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner: Tabla 8.

*Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (1): Tabla 9.

*Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (2): Tabla 10.

*Arenaria armerina* subsp. *armerina* (1): Tabla 11.

*Arenaria armerina* subsp. *armerina* (2): Tabla 12.

*Arenaria tomentosa* Willk.: Tabla 13.

*Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner: Tabla 14.

*Arenaria erinaceae* Boiss. (1): Tabla 15.

*Arenaria erinaceae* Boiss. (2): Tabla 16.

*Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner: Tabla 17.

En la Tabla 17 se recoge un resumen de todos los resultados obtenidos.

Los resultados se expresan con los siguientes símbolos:

Fuertemente positivo (+++)

Positivo moderado (++)

Positivo débil o dudoso (+)

Resultado negativo (-)

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	++	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	+
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	++		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 6:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria alfacarensis* Pamp.

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	+
			Flavonoles	+++
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	+
			Taninos 2	-
Antraquinonas	Clorofórmico	++		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1,6 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 7:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb.

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	+
			Flavonoles	++
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	++
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	++		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1,2 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 8:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner.



	Grupo fitoquímico	Extracto	Resultados	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	++	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	+
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (2 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 9:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (1).

	Grupo fitoquímico	Extracto	Resultados	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	++	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	++
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 10:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (2).

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	+
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	+	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1,2 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 11:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina* (1).

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	++
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	+	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1,1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 12:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina* (2).

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	++	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	++	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	-
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 13:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria tomentosa* Willk.

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	-
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	++
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 14:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner.

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	+
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	-
			Taninos 2	+
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	++	
	Esteroles	Acuoso	++	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1,4 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 15:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria erinaceae* Boiss. (1).

	<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Extracto</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	+
			Flavonoles	-
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	+	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	-
			Taninos 2	-
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	-	
	Saponinas	Acuoso	+++ (1 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 16:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria erinaceae* Boiss. (2).



	Grupo fitoquímico	Extracto	Resultados	
<b>Compuestos del metabolismo primario</b>	Glúcidos	Acuoso	+++	
	Gomas y mucílagos	Acuoso	+++	
	Lípidos y ceras	Clorofórmico	+	
<b>Compuestos fenólicos</b>	Cumarinas	Etanólico	+++	
	Flavonoides	Etanólico	Flavonas	+++
			Flavonoles	+
			Flavanonas	-
	Antocianinas	Acuoso	++	
	Leucoantocianos	Etanólico	-	
	Taninos	Acuoso	Taninos 1	+
			Taninos 2	-
Antraquinonas	Clorofórmico	+		
<b>Terpenos y esteroides</b>	Triterpenos	Acuoso	+	
	Esteroles	Acuoso	+	
	Saponinas	Acuoso	++ (0,8 cm)	
<b>Alcaloides</b>	Alcaloides	Acuoso	Bouchardat	-
			Mayer	-
			Dragendorff	-
			Ác. Pícrico	-

**Tabla 17:** Resultados del screening fitoquímico de *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner.



Fitoquímica: Resultados

	COMP. METABOLISMO PRIMARIO			COMPUESTOS FENÓLICOS								TERPENOS Y ESTEROIDES			ALCALOIDES				
	Glúc.	Gom.	Lip.	Cum.	Flav.			Antoc.	Leuc.	Tan.		Antraq.	Triterp.	Ester.	Sapon.	Alc.			
					F1	F2	F3			T1	T2					B	M	D	P
<i>A.alfacarensis</i> Pamp.	+++	+++	+	++	-	-	-	++	-	+	+	++	+	-	+++ (1 cm)	-	-	-	-
<i>A.tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i> (Boiss.) H. Lindb.	+++	+++	+	++	+	+++	-	+	-	+	-	++	+	-	+++ (1,6 cm)	B	M	D	P
<i>A.tetraquetra</i> subsp. <i>murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	+++	+++	+	++	+	++	-	+	-	++	+	++	+	-	+++ (1,2 cm)	B	M	D	P
<i>A.armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) Diaz, Morales & Valle (1)	+++	+++	+	+++	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+++ (2 cm)	B	M	D	P
<i>A.armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) Diaz, Morales & Valle (2)	+++	+++	+	+++	-	-	-	++	-	++	+	+	+	-	+++ (1 cm)	B	M	D	P
<i>A.armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (1)	+++	+++	+	+++	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+++ (1,2 cm)	B	M	D	P
<i>A.armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (2)	+++	+++	+	+++	-	-	-	+	-	++	+	+	+	+	+++ (1,1 cm)	B	M	D	P
<i>A.tomentosa</i> Willk.	+++	+++	++	+++	-	-	-	++	-	-	+	+	+	-	+++ (1 cm)	B	M	D	P
<i>A.arcuatociliata</i> G. López & Nieto	+++	+++	+	+++	-	-	-	+	-	++	+	+	+	-	+++ (1 cm)	B	M	D	P
<i>A.erinaceae</i> Boiss. (1)	+++	+++	+	++	+	-	-	+	-	-	+	+	++	++	+++ (1,4 cm)	B	M	D	P
<i>A.erinaceae</i> Boiss. (2)	+++	+++	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+++ (1 cm)	B	M	D	P
<i>A.delaguardiae</i> G. López & Nieto	+++	+++	+	+++	+++	+	-	++	-	+	-	+	+	+	+++ (0,8 cm)	B	M	D	P

**Tabla 18:** Resumen del screening fitoquímico. Abreviaturas: Glúc.(Glúcidos), Gom. (Gomas y mucilagos), Lip. (Lípidos), Cum.(Cumarinas), Flav. (Flavonoides), Antoc. (Antocianinas), Leuc. (Leucoantocianos). Tan. (Taninos), Antraq. (Antraquinonas), Triterp. (Triterpenos), Ester. (Esteroles), Sapon. (Saponinas), Alc. (Alcaloides), F1 (Flavonas), F2 (Flavonoles), F3 (Flavanonas), T1 (Taninos condensados), T2 (Taninos hidrolizables), B (Bouchardat), M (Mayer), D (Dragendorff), P (ácido pícrico).



### III.2.6. Determinación del contenido en iones sodio y potasio

Los resultados se han dado en partes por millón y en miligramos de sodio y potasio por 100 g de muestra, que es como se expresa el porcentaje foliar de iones. Los valores obtenidos indican que estas especies tienen un contenido en cada uno de estos iones que se especifica en la siguiente tabla:

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
<i>Arenaria alfacarensis</i> Pamp.	66 mg/100 g muestra	540 mg/100 g muestra
<i>Arenaria tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i> (Bory)H. Lindb.	29,5 mg/100 g muestra	231 mg/100 g muestra
<i>Arenaria tetraquetra</i> subsp. <i>murcica</i> (Font Quer) Favarger & Nieto	39 mg/100 g muestra	397 mg/100 g muestra
<i>Arenaria armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1)	44 mg/100 g muestra	558,6 mg/100 g muestra
<i>Arenaria armerina</i> subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (2)	36 mg/100 g muestra	413,7 mg/100 g muestra
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (1)	57 mg/100 g muestra	270 mg/100 g muestra
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i> (2)	48 mg/100 g muestra	368,55 mg/100 g muestra
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	67 mg/100 g muestra	703,5 mg/100 g muestra
<i>Arenaria arcuatociliata</i> G. López & Nieto Feliner	31,5 mg/100 g muestra	605 mg/100 g muestra
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (1)	35 mg/100 g muestra	260 mg/100 g muestra
<i>Arenaria erinacea</i> Boiss. (2)	59,25 mg/100 g muestra	3460 mg/100 g muestra
<i>Arenaria delaguardiae</i> G. López & Nieto	46 mg/100 g muestra	790 mg/100 g muestra

**Tabla 19:** Resultados de la determinación del contenido en iones sodio y potasio.

### III.2.7. Purificación de las muestras

Tras el proceso de purificación de las muestras *Arenaria erinacea* Boiss., la fracción resultante de la elución de la columna se intentó caracterizar por sus propiedades espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$  RMN), pero debido a la escasa cantidad de muestra obtenida no se pudo caracterizar de forma fehaciente ningún compuesto o estructura conocida. No obstante, se hicieron comprobaciones en cuanto a pureza mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Los espectros obtenidos se muestran a continuación (Figuras 21 y 22).

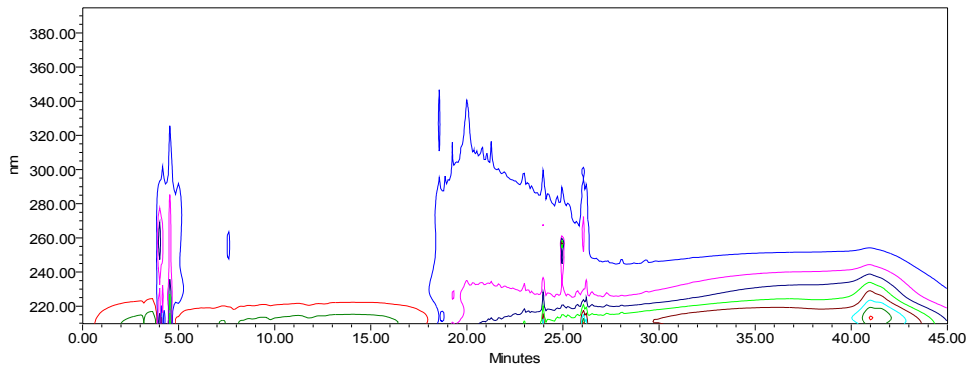


Figura 21: Espectro de absorción de *A. erinacea* Boiss. comprendido entre las longitudes de onda de 200-400 nm.

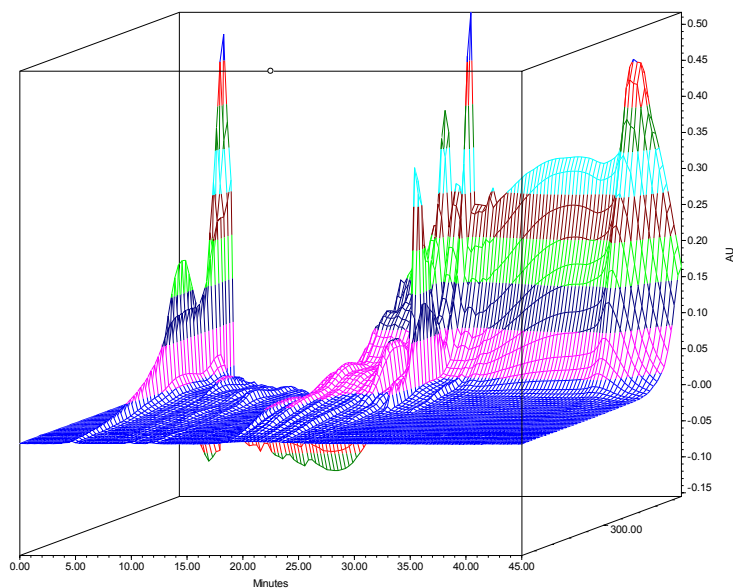
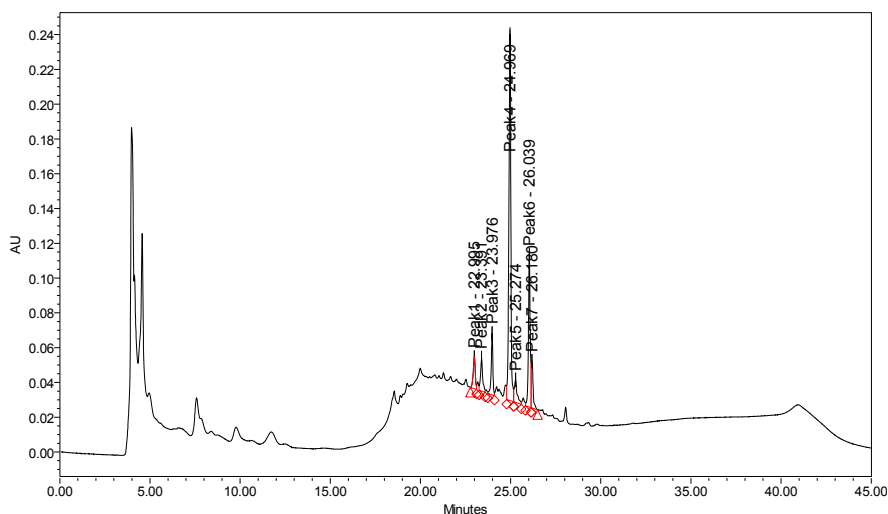


Figura 22: Representación tridimensional del espectro de absorción de *Arenaria erinacea* Boiss.

Se estudió el comportamiento de la absorbancia del compuesto entre las longitudes de onda comprendidas entre 200-400 nm. En la representación tridimensional mostrada en la figura 22, se puede apreciar que la longitud de onda óptima corresponde a 254 nm, ya que en esas condiciones, el compuesto mayoritario tiene un máximo de absorbancia.



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	Peak1	22.995	141684	4.62	18079
2	Peak2	23.391	157412	5.13	19109
3	Peak3	23.976	230530	7.52	35220
4	Peak4	24.969	1593336	51.94	211148
5	Peak5	25.274	140370	4.58	13031
6	Peak6	26.039	615040	20.05	87948
7	Peak7	26.180	189098	6.16	26847

**Figura 23:** Espectro de absorbancia de *A. emineae* Boiss. a una longitud de onda = 254nm.

Una vez integrados los picos del espectro (Figura 23), se observó que el pico 4 es el que comprende mayor área bajo la curva, proporcionando información acerca de su pureza.





## **IV. GENÉTICA**



## **IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS**



#### IV.1.1. Material empleado y procedencia

En este trabajo se ha empleado material de nueve especies pertenecientes al género *Arenaria*, con el objeto de hacer una caracterización genética de las mismas. Así, se han estudiado nueve especies de la sección *Plinthine*: *A. alfacarensis* Pamp., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner, *Arenaria armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina*, *Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner, *Arenaria erinacea* Boiss., *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner y *A. tomentosa* Willk. Como *outgroup* se ha utilizado la especie *Silene gallica* L.

Todo el material fue recolectado en el campo y conservado en las condiciones óptimas de temperatura y humedad para su posterior utilización.

ESPECIES	COORDENADAS
<i>A. alfacarensis</i> Pamp.	30S VG 5431
<i>A. tetraquetra</i> L. subsp. <i>amabilis</i> (Boiss.) Lindb.	30S VG 7508
<i>Arenaria armerina</i> Bory subsp. <i>armerina</i>	30S VG 5431; 30S WG 5266
<i>A. armerina</i> Bory subsp. <i>caesia</i> (Boiss.) Díaz, Morales & Valle	30S VG 6919; 30S VG 5520
<i>Arenaria tomentosa</i> Willk.	30S WG 1435
<i>Arenaria arcuatociliata</i> López & Nieto Feliner	30S WG 5268
<i>Arenaria delaguardiae</i> G. López & Nieto Feliner	30S VF 3480

**Tabla 20:** Localidades donde han sido recogidas las muestras.

#### IV.1.2. Obtención del ADN

Cada organismo transmite a su descendencia su material genético. A nivel molecular, el soporte físico de la información genética es el ADN.

Los ácidos nucleicos son polinucleótidos cuyas unidades, los nucleótidos, constan de una base nitrogenada, dos categorías: purinas y pirimidinas. Las dos purinas, adenina (A) y guanina (G) están presentes tanto en el ADN como en el ARN. En cuanto a las pirimidinas, el ADN posee citosina (C) y timina (T). Las bases son estructuras planas que, cuando se unen a la posición 1' de las pentosas por un enlace N-glicosídico, constituyen los nucleósidos. Cuando un grupo fosfato se une a un nucleósido se forma el nucleótido correspondiente.

Se ha utilizado el material seco de las especies *A. alfacarensis* Pamp., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *Arenaria tetraquetra* L. subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner, *Arenaria armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *Arenaria armerina* Bory subsp. *armerina*, *Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner, *Arenaria erinacea* Boiss., *Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner y *A. tomentosa* Willk.

Tras la determinación del material se procedió a la extracción de ADN a partir de las hojas y partes aéreas de las especies.

El ADN de este tipo de material se obtuvo con la utilización del kit comercial "Plant DNAzol® Reagent" (Invitrogen). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

1. Aproximadamente 0,2 g de tejido (preferentemente hojas) se pulverizan en morteros de porcelana, en presencia de nitrógeno líquido. Se colocan en tubos *Eppendorf* de 1,5 ml de capacidad y se ponen en contacto con 0,6 ml de tampón de extracción durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Tras ello, se

añaden 0,6 ml de cloroformo, se agita vigorosamente y se incuba otros 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga después a 13000 rpm durante 10 minutos.

2. El sobrenadante se separa en un tubo *Eppendorf* nuevo y se precipita el ADN con 0,5 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se mezcla por inversión suavemente y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugación posterior 5 minutos a 10000 rpm.
3. El pellet o precipitado se lava con una mezcla de etanol absoluto/tampón de extracción (1:0,75) y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 10000 rpm.
4. A continuación se procede al lavado con etanol al 70 %, se centrifuga 3 minutos a 10000 rpm, se deja secar al aire y el pellet se resuspende en el volumen adecuado de agua bidestilada.

En todos los casos, la cantidad de ADN obtenida y su calidad, se determinaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato 40mM, pH8, EDTA 1mM) en presencia de Bromuro de Etidio o de SYBR Green, con el uso de marcadores de peso molecular conocido (*Lambda* digerido con *Hind III*-Biotools). El ADN obtenido fue en general de alto peso molecular y adecuado para PCR.

En ciertos casos, como consecuencia de tratarse de material de herbario en el que el estado de degradación de éste es elevado, la extracción del ADN se realizó por el protocolo del CTAB (Doyle y Doyle, 1987) como se describe:

1. Se hidratan 0,01 g de tejido durante toda la noche en agua bidestilada.
2. Se tritura dicho material en presencia de nitrógeno líquido en un tubo de 2 ml y se añade 1ml de tampón de extracción (CTAB al 4% de PVP) incubar toda la noche a 60° C.

3. Añadir 1 ml de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v) y mezclar por inversión a T<sup>a</sup> ambiente durante 15 min. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml y repetir el proceso anterior.
4. Precipitar el ADN añadiendo 1/17 en  $\mu$ l del volumen final del sobrenadante de isopropanol agitar por inversión y dejar a -20°C una hora.
5. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado a T<sup>a</sup> ambiente.
6. Una vez seco el precipitado, resuspender en el volumen adecuado de agua bidestilada.

#### **IV.1.3. Amplificación de la región ITS de *Arenaria* utilizando la técnica de PCR**

En esta memoria se ha llevado a cabo un análisis de los espaciadores intergénicos de genes ribosómicos (ITS-1 e ITS-2), la obtención sistemática de los espaciadores ribosómicos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) implica un conjunto de tratamientos desarrollados *in vitro* sobre una región de DNA para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen a la que se pretende amplificar, estas regiones son utilizadas como cebadores en la reacción de elongación catalizada por la polimerasa, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al DNA molde desnaturalizado.

Con objeto de analizar la región ITS-1 e ITS-2 de ADN de *A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, *A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *A. tomentosa* Willk., *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner, *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner se desarrolló la PCR.



Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos denominados ITS 1 e ITS 4 (White et al. 1990), que son cebadores universales obtenidos a partir de hongos. Para las especies en las que se encontró dificultad para la amplificación, se hizo uso del 26 SE y 17 SE diseñados en el extremo 3' del gen 18S y 5' del gen 28S y que son específicos de plantas y han sido utilizados con anterioridad en estudios filogenéticos en especies del género *Arenaria* (Valcárcel et al., 2006) (Tabla 20).

<i>Nombre del cebador</i>	<i>Secuencia</i>
ITS 1	5' - TCCgTA ggT gAA CCTgCgg - 3'
ITS 4	5' - TCCTCCgCTTATTgATATgC - 3'
26 SE	5' -CCCggTTCgCTCgCCgTTAC - 3'
17 SE	5' - ATggTCCGGTgAAgTTCg -3'

**Tabla 21:** Secuencias de las parejas de cebadores empleadas para la amplificación.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l, conteniendo 100  $\mu$ g de muestra, 0,2 mM de cada dTNP (Roche), 0,2 de cada cebador y 1,25 unidades de *Taq* polimerasa (Biotools).

Así, tras optimizar las condiciones de la reacción, el perfil del ciclo consistió en 40 ciclos de: 1 minuto 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 1 minuto 30 segundos a 55° C (anillamiento) y 1 minuto 30 segundos a 72° C (extensión).

En determinados casos fue necesaria la preparación de una PCR de doble ciclo, que consistió en un primer período de 10 ciclo con las siguientes condiciones: 1 minuto 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 1 minuto 30 segundos a 42° C (anillamiento) y 1 minuto 30 segundos a 72° C (extensión) y un segundo período de 20 ciclos de: 1 minuto 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 1 minuto 30 segundos a 56° C (anillamiento) y 1 minuto 30 segundos a 72° C (extensión).

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400).

Los resultados de dichas amplificaciones fueron observados en geles horizontales de agarosa al 1%. Una vez comprobado que los amplificados correspondían al tamaño deseado, se procedió a la purificación de las bandas.

Para ello se empleó el kit de purificación “GTF™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech). El fundamento de este tipo de purificación, se basa en el uso de un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas y disuelve la agarosa y además promueve la unión de la doble hebra de ADN a una matriz de fibra de vidrio. El ADN se purifica posteriormente quedando libre de proteínas y sales, y se diluye en agua ultrapura estéril que lo arrastra desde la matriz.

Se siguió este protocolo:

1. Usando un bisturí estéril y sobre la lámpara de UV, cortar las bandas tan cerca como sea posible del ADN y pasarlas al tubo de 1,5 ml.
2. En el tubo de 1,5 ml, añadir al tubo 10  $\mu$ l de buffer de captura por cada 10 mg de peso de las bandas de agarosa. Agitar vigorosamente e incubar a 60° C hasta que la agarosa se disuelva completamente (10-15 minutos).
3. Después de que se disuelva la agarosa, centrifugar brevemente para llevar la muestra al fondo del tubo. Pasar la muestra a una columna GFX colocada sobre un tubo colector e incubar 1 minuto a T° ambiente. Centrifuga a 13000 rpm 30 segundos.
4. Descartar los restos de agarosa que han pasado al tubo colector y volver a colocar la columna GFX en el tubo colector. Añadir 500  $\mu$ l de buffer de lavado

(10mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 o agua ultrapura) directamente a la matriz de fibra de vidrio de la columna GFX. Incubar a temperatura ambiente 1 minuto. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto para eliminar la solución de lavado.

5. Pasar la columna que lleve el ADN purificado a un Eppendorff estéril. Añadir 25 µl de agua ultrapura sobre el centro de la fibra de vidrio para eluir el ADN desde la matriz. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos para recuperar el ADN purificado.

#### **IV.1.4. Clonación de la región ITS y síntesis del recombinante**

La reacción de amplificación de PCR produce material suficiente para muchas aplicaciones analíticas, pero cuando se necesitan mayores cantidades de producto, o cuando éste va a ser objeto de manipulación adicional, es necesario proceder a su clonaje.

La manifestación de la capacidad codificadora de las moléculas de ADN como portadoras de información genética sólo tiene lugar en el escenario celular natural, es decir *in vivo*, para lo cual se hace preciso introducir el ADN analizado y manipulado al interior de un sistema celular.

El ADN de los plásmidos bacterianos y de sus vectores derivados es una molécula de doble hebra y circular. Su naturaleza bicatenaria le hace ser sustrato de un gran número de enzimas que funcionan sobre ese tipo de moléculas, sobre todo endonucleasas de restricción que cortan la rotura por un único punto provoca la apertura del círculo y su conversión en una molécula lineal, lo que permitirá su unión a otro fragmento (inserto) en una reacción catalizada por la DNA-ligasa. El vector será tanto más versátil cuanto mayor sea el número de enzimas de restricción que sean capaces de abrir su molécula sin fragmentarla. Muchos de los vectores actuales tienen una serie de dianas únicas agrupadas en un sitio múltiple de clonaje.

Los amplificadores obtenidos por PCR y purificados a partir de geles de agarosa fueron ligados al vector pGEM-T Easy por medio del kit comercial “pGEM®-T Easy Vector System II” (Promega) y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Este plásmido está diseñado para la ligación de productos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se trata de un plásmido lineal al que se ha agregado una cola de poli-T en ambos extremos de su secuencia 3' de ADN. Así, se consigue que el vector presente extremos compatibles con los que tienen los productos de PCR amplificados mediante una *Taq* polimerasa (que añade una cola de poli-A). De la misma forma, la eficiencia de la ligación se mejora porque se impide la recircularización de los plásmidos no recombinantes. La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias ultracompetentes de la cepa JM109 de *Escherichia coli* (Promega) recomendada para este vector, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

La preparación de la molécula vector para la síntesis del recombinante implica su digestión con una enzima que la corte en un único sitio; una vez abierto el vector, se mezclará con el inserto preparado con extremos compatibles con los del vector; la incubación con DNA ligasa llevará a la formación de la molécula recombinante, que será de nuevo circular. En ella, el inserto aparecerá como una región insertada en el círculo del plásmido vector. El plásmido recombinante podrá ser introducido en las células del cultivo bacteriano y las células transformadas aisladas en un medio selectivo.

El procedimiento que se siguió en la ligación fue:

1. Calcular la cantidad óptima de producto de PCR para la reacción de ligación según la fórmula:

$$[ng \text{ vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)} / \text{tamaño del vector (kb)}] \times \text{ratio inserto: vector} = ng \text{ de inserto}$$

En este paso, con nuestro DNA en frío procederemos a la ligación con el plásmido p-GEM.

La reacción de ligación se lleva a cabo mezclando las cantidades calculadas de inserto con 50 ng de vector y 3 unidades de ligasa T4 en tampón de ligación 2x considerando un volumen final de 10  $\mu$ l. Esta mezcla de ligación se incuba durante 12 horas a 4° C.

Después se procede a la transformación de las bacterias ultracompetentes.

2. Añadir todo el volumen de la reacción de ligación a 50  $\mu$ l de células competentes de *Escherichia coli* de la cepa JM109 y mezclar con suavidad. Con cuidado poner 50  $\mu$ l de células competentes en el *Eppendorf* del paso anterior. Mezclar con cuidado y poner 20 minutos en hielo.
3. Producir un choque térmico a 42° C durante 40-50 segundos. No agitar. Inmediatamente volver el tubo al hielo 2 minutos.
4. Añadir 950  $\mu$ l de medio de cultivo SOC estéril (2 g de peptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 ml de ClNa 1 M, 0,25 ml de KCl en 97 ml de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). A esta mezcla se le añaden 1 ml de Mg<sup>2+</sup> 2M-20.33 g de MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 24.65 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O- y 1 ml de glucosa 2 M estéril por filtración, todo a ello un pH 7.0 y en un volumen final de 100 ml) al tubo que contiene la ligación y las células. Incubar 1,5 horas a 37° C con agitación.
5. Sembrar 100  $\mu$ l de bacterias transformadas por cada placa con medio LB sólido a H 7.0 (10g peptona, 5 g extracto de levadura, 5 g ClNa, 15 g agar por litro de H<sub>2</sub>O) con ampicilina (0.05 mg/ml), 40  $\mu$ l de sustrato cromogénico X-gal (USB) (0,02 g/ml de dimetilformamida) y 4  $\mu$ l del inductor IPTG (Roche) (0,2 /ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) e incubar a 37° C durante 16 horas.
6. Las colonias recombinantes son doblemente seleccionadas. En primer lugar crecen en un medio en presencia de ampicilina gracias a la resistencia que les concede un gen Amp<sup>r</sup> portado por el vector. Para esta selección de las bacterias que hayan

incorporado el ADN de interés formando el vector recombinante, se ha usado un método genético que consiste en la presencia de genes marcadores en el vector: se han incluido genes de resistencia a antibiótico (ampicilina). Este gen codifica a una proteína que permite el crecimiento de la célula anfitriona en presencia de ampicilina. Este gen codifica para una  $\beta$ -lactamasa, capaz de degradar la ampicilina.

7. Una segunda selección implica el color de las colonias. Éstas pueden ser blancas o azules. El vector p-Gem porta el gen LacZ que metaboliza los sustratos X-gal e IPTG dando lugar a un precipitado de color azul. Precisamente la ligación de los insertos se produce a este nivel del vector, de tal forma que los plásmidos recombinantes presentan genes LacZ inactivos con la consiguiente ausencia del precipitado azul. Así, seleccionaremos algunas de las colonias de color blanco de la placa y las inocularemos en 10 ml de medio líquido LB (extracto de levadura: CINA: peptona, 1:1:2) y se dejan crecer a 37°C durante toda la noche.
  
8. Algunos de estos clones se analizaron inmediatamente, el resto se conservaron a – 20° C en presencia de dimetilsulfóxido al 80% (Sigma).

El ADN recombinante (vector+inserto) se introduce en las bacterias. La transferencia de una molécula de ADN al interior de una célula hospedadora es el proceso denominado transformación (en bacterias), y se consigue por diferentes procedimientos entre los que se encuentra el empleado en nuestro caso, que ha sido la transformación por choque térmico. Consiste en la captura de ADN por células previamente tratadas con metales con el fin de alterar su envuelta (células competentes); la elevación momentánea de la temperatura de cultivo parece ser la causa de que la célula permita el paso de la molécula de ADN a su interior. La célula que resulta recibe el nombre de célula transformada.

El ADN recombinante, al encontrarse dentro de la bacteria, al dividirse ésta, el vector también se replica de forma autónoma, y con ello aumenta el número de copias.

Cada bacteria, haya incorporado o no un vector, se multiplica para dar lugar a un "clon" (población de bacterias con idéntico material genético incluido el recombinante).

Primero se hará un cultivo en agar para la formación de las colonias (cada colonia procede de una célula, son "clones") y, posteriormente las colonias seleccionadas se pasarán a un medio líquido, que forma poblaciones con múltiples copias de cada célula original (clones celulares).

Los plásmidos clonados se purificaron utilizando el kit "Perfect Prep® Plasmid Mini" (Eppendorf) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. El protocolo seguido fue:

1. Centrifugar todo el volumen líquido del cultivo de bacterias 1 minuto a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet añadiendo 100 µl de solución de resuspensión ( 10mM tris, 1mM EDTA, pH 8 ) y mezclar por vortex hasta que el pellet esté completamente resuspendido.
3. Añadir 100 µl de solución de lisis (25 mM tris, 10mM EDTA, 50 mM glucosa, pH 8) para lisar las bacterias y mezclar varias veces por inversión.
4. Añadir 100 µl de solución de neutralización (0.2 mM NaOH, 1% SDS) para neutralizar el lisado y mezclar por inversión del tubo. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un filtro en un tubo colector (Mezclar vigorosamente el DNA Binding Matrix).
5. Añadir 450 µl de DNA Binding Matrix al sobrenadante en la columna. Mezclar con la pipeta. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. Eliminar el filtrado y volver la columna al tubo.

6. Purificar el plásmido añadiendo 400  $\mu$ l de DPS. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. Decantar el filtrado y volver la columna al tubo. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm para eliminar los restos de etanol.
7. Transferir el filtro a un eppendorf nuevo de 1,5 ml y añadir 50  $\mu$ l de agua. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. Eliminar la columna y quedarse con el sobrenadante. Mantener a 4°C ó -20°C.

Los procedimientos de transformación son de una eficacia muy variable, las células transformadas son minoría y es muy difícil aislarlas del resto, este problema se ha resuelto con el uso de marcadores genéticos que permiten una selección fenotípica de las células transformadas. Tras la etapa de transferencia de DNA, se procede a analizar el resultado de ese proceso con el fin de aislar el clon.

Lo más frecuente es el uso de los genes que otorgan resistencia a antibióticos, su presencia en el DNA hace que todas las células transformadas sean resistentes a ese antibiótico y puedan ser seleccionadas en el cultivo haciendo crecer a éste en un medio con dicho agente: las células no transformadas morirán o no se dividirán y al cabo de un cierto período de crecimiento, el cultivo estará formado casi exclusivamente por células transformadas.

Los plásmidos son muy útiles para la clonación, secuenciación y expresión en *E. coli* de genes de otros organismos. Tienen, como se ha explicado con anterioridad, el gen de resistencia a ampicilina y parte del operón de la lactosa (región *lac*) que codifica a la región amino-terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Cuando estos plásmidos son utilizados para transformar cepas de *E. coli* *lac* negativas, se induce la síntesis de la enzima porque se produce complementación y cuando el medio de cultivo contiene el sustrato cromogénico X-gal y el inductor IPTG, se forman colonias azules.

Dentro de la región *lac*, existe una secuencia de 54 pb que presenta puntos de reconocimiento únicos para ciertas endonucleasas de restricción. Cuando algún fragmento



de ADN es clonado en esta región, se inactiva el gen lac y se obtienen colonias blancas. Así se identifican colonias recombinantes.

Se comprobó adicionalmente si el tamaño de los insertos clonados en cada uno de estos clones recombinantes era el esperado, mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI. La existencia de dianas de restricción para esta enzima flanqueando la zona de ligación del inserto, permite la liberación del mismo. Para ello, se pusieron en contacto 2 µg de ADN del plásmido purificado con 1 unidad de enzima durante 2 horas en un baño a 37°C. El resultado se analizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio.

#### **IV.1.5. Secuenciación y análisis de las secuencias**

##### **IV.1.5.a. Secuenciación de los clones recombinantes positivos**

Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método propuesto por Sanger et al. (1977) utilizando el kit comercial “ABI Prism® Big Dye® Terminator Cycle sequencing” (Applied Biosystems). Las dos cadenas de los insertos ligados en plásmidos recombinantes fueron secuenciadas utilizando el secuenciador automático multicapilar “ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyzer” (Applied Biosystems) del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, según las instrucciones del fabricante. Se han usado parejas de cebadores universales cuyas secuencias diana se encuentran presentes en los vectores de clonación empleados: T7-Sp6 para el vector de clonación pGEM T-easy (Promega).

Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 20 µl a partir de 200-400 ng de ADN, 3.2 pmoles de cebador, 2 µl de tampón 5x y 2 µl del reactivo BDT (Big Dye® Terminator), que contiene los dTNPs marcados y la polimerasa de ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 2700 de Applied Biosystems siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización de 3 minutos a 95° C seguida de 25 ciclos constituidos por: etapa de desnaturalización (95° C durante 10 segundos), etapa de

hibridación de cebadores (50° C durante 4 segundos) y etapa de elongación (60° C durante 4 minutos).

Una vez completadas las reacciones de secuenciación, éstas se precipitaron tras ser incubadas durante 15 minutos a Tª ambiente en una mezcla de 62,5 µl de etanol 95%, 3 µl de acetato sódico 3M y 14,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> por muestra. Se sometió a posterior centrifugación a 4° C durante 20 minutos a 14000 rpm. Los precipitados se lavaron con etanol 70% y se dejaron secar a 37° C. Los productos secuenciados se resuspendieron en 20 µl de formamida.

#### **IV.1.5.b. Análisis de las secuencias**

Los cromatogramas de las secuencias se pudieron interpretar y disponer de las secuencias en formato de texto para su procesamiento mediante el uso del programa Chromas v. 1.45 (Connor McCarthy, 1996-1998). El análisis comparativo de estas secuencias con respecto a otras depositadas en la base de datos de la EMBL y del GenBank, se realizó utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1997).

El programa GenePro fue utilizado para el análisis básico de las secuencias como el contenido en bases púricas y pirimidínicas o análisis de los sitios de restricción.

Para el alineamiento múltiple de las secuencias se utilizó el programa Clustal-X (Thompson et al., 1997) que utiliza el algoritmo Clustal (Higgins et al., 1988), habiéndose realizado los ajustes manuales pertinentes.

El cálculo de las distancias, así como la elaboración del árbol filogenético se llevaron a cabo utilizando el programa MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001). La divergencia entre las secuencias de ADN pertenecientes a distintas especies se calculó mediante el uso del programa informático Mega v. 2.1 (Kumar et al., 2001), siguiendo el modelo de cálculo de distancias Kimura Dos Parámetros propuesto por Saito et al. (1987). Las secuencias fueron analizadas desde el punto de vista filogenético utilizando la matriz de distancias obtenida

por el método de interferencia filogenético propuesto por Saito et al., (1987): el método del vecino más próximo (Neighbor-Joining). Como test filogenético se utilizó el método de remuestreo con reemplazamiento, Bootstrap (Felsenstein, 1985).



## **IV.2. RESULTADOS**



#### **IV.2.1. Análisis de las secuencias de espaciadores ribosómicos (ITS) en el género *Arenaria* L.**

En esta Memoria se han analizado un total de siete especies del género *Arenaria* (Tabla 19). Utilizando cebadores específicos hemos amplificado mediante PCR las regiones de espaciadores ribosómicos ITS y las hemos analizado con fines filogenéticos y taxonómicos tal y como se describe a continuación.

Mediante la técnica de PCR se han aislado y secuenciado posteriormente la región entre los genes ribosómicos nucleares 18S y 28S en siete especies del género *Arenaria*, Sect. *Plinthine* (*A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, *A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *A. tomentosa* Willk., *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner, *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner). Esta región comprende espaciadores intergénicos de los genes ribosómicos ITS-1 e ITS-2 así como el gen ribosómico 5.8S (ver figura 23). Los fragmentos fueron amplificados por el método Sanger mediante un secuenciador automático. La secuencia correspondiente a los genes 5.8S no se ha incluido en el análisis debido a que estos genes se encuentran muy conservados en todos los organismos, no encontrándose diferencia alguna entre las especies analizadas. A continuación se describen de forma detallada los resultados obtenidos en el análisis de los espaciadores ribosómicos.

##### **IV.2.1.a. Análisis de la región ITS-1**

El tamaño del ITS-1 es de 236 pb salvo en el caso de *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner en la que el tamaño es de 239 pb debido a la inserción de un nucleótido de citosina en posición 27 y dos nucleótidos de guanina en las posiciones 99 y 100 (Ver figura 24).

En el caso de los clones de *A. tomentosa* Willk. el tamaño de la secuencia es variable 237 pb (clones *A. tomentosa\_16*, *A. tomentosa\_42*, *A. tomentosa\_c1*, *A.*

*tomentosa\_c2*, *A. tomentosa\_c10* y *A. tomentosa\_c11*) en la que el tamaño es de 237 pb debido a la inserción de un nucleótido en posición 107 (Ver figura 24) a 238 pb para el clon *A. tomentosa\_47* por la inserción de dos nucleótidos de citosina y timina respectivamente en las posiciones 48 y 49 (ver figura 24) y 235 pb para *A. tomentosa\_18* debido a la delección de un nucleótido en posición 106 (ver figura 24).

El análisis de las secuencias ITS-1 de las diferentes especies mostró los siguientes porcentajes: el contenido en AT osciló entre el 44,4 % de *A. delaguardiae\_25* y el 47,1 % de *A. tomentosa\_47* respecto a los porcentajes de GC, oscilaron entre el 53,1 % de *A. armerinaarmerina*, *A. armerinaarmerina\_10*, *A. armerinaarmerina\_5*, *A. armerinaarmerina\_17*, *A. armerinaarmerina\_6* y el 55,1 % de *A. tomentosa\_50*.

En la figura 24 se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia ITS-1. Como se puede apreciar, el número de diferencias y de sitios informativos es relativamente bajo. Así, las distancias genéticas entre secuencias reflejan valores muy bajos con una señal filogenética escasa, lo que tiene como resultado un árbol filogenético que no resuelve las relaciones entre especies (Figura 25).

Como se aprecia en el árbol, cabe destacar que para el ITS-1 de la especie *A.tomentosa* Willk., no existe evolución concertada, algo que queda reflejado en dos hechos significativos: a) en algunas especies aparece una elevada variabilidad, existiendo distintos tipos de secuencias (*A.tomentosa* Willk.) y b) las secuencias no se agrupan en el árbol por afinidades taxonómicas, apareciendo en un mismo clado varias secuencias de distintos taxones.

alfacarensis_c	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACN-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
armerinacaesia_18	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tetraquetraamabilis_C	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_30	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_50	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-AGGTTCTATACTC--
tomentosa_C1	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_C2	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_C11	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_C10	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_16	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_42	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGNAC-ACGTTCTATACTC--
tomentosa_18	TCAAAA-CCTGCCCAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC--



```

arcuatociliata_26      TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGGGAAC-ACGTTCTGTACTC--
arcuatociliata_27      TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGGGAAC-ACGTTCTGTACTC--
arcuatociliata_28      TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGGGAAC-ACGTTCTGTACTC--
arcuatociliata_30      TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGGGAAC-ACGTTCTGTACTC--
arcuatociliata_44      TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGGGAAC-ACGTTCTGTACTC--
tomentosa_47           TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGGTTT TTTATTACT
delaguardiae_20        TC AAAAACCTTCCCAGCAGCATGCCCCAGCGAAC-ACGTTCTATACTC--
delaguardiae_25        TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACCCAGCGAACACCGTTCTATACTC--
delaguardiae_6         TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACCCAGCGAACACCGTTCTATACTC--
delaguardiae          TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACCCAGCGAACACCGTTCTATACTC--
tomentosa              TC AAAA-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGC-AAC-ACGTTCTATACTC-N
armerinaarmerina      --TAAN-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC-C
armerinaarmerina_17   --TAAN-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC-C
armerinaarmerina_10   --TAAN-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC-C
armerinaarmerina_6    --TAAN-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC-C
armerinaarmerina_5    --TAAN-CCTGCC CAGCAGCATGACC-AGCGAAC-ACGTTCTATACTC-C
                        **  ***  *****  *  **  *  *  *  *  *  *

```

```

alfacarensis_c        GGTNGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTCGCTCGNCCC-ACGAT
armerinacaesia_18    GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-ACGAT
tetraquetraamabilis_C GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-ACGAT
tomentosa_30          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-ACGAT
tomentosa_50          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTGGCTCGCCCC-ACGAT
tomentosa_C1          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_C2          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_C11         GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_C10         GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_16          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_42          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
tomentosa_18          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
arcuatociliata_46     GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTATGGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
arcuatociliata_27     GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTATGGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
arcuatociliata_28     GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTATGGTGCACTTGCTCGCCCC-ACGAT
arcuatociliata_30     GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTATGGTGCACTTGCTCGCCCC-ACCAT
arcuatociliata_44     GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTATGGTGCACTTGCTCGCCCC-ACGAT
tomentosa_47          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-ACAAT
delaguardiae_20       GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTATGCACTTGCTCGCCCCACGAT
delaguardiae_25       GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTATGCACTTGCTCGCCCCACGAT
delaguardiae_6        GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTATGCACTTGCTCGCCCC-NTC
delaguardiae          GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-NTC
tomentosa             GGTGTGGAGCGCTGTCGGG-TGTCTTGTGCACTTGCTCGCCCC-TCGAT
armerinaarmerina     NCTTGTGAGCGNNNAAAAAATGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-NTCNT
armerinaarmerina_17  NCTTGTGAGCGNNNAAAAAATGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-NTCNT
armerinaarmerina_10  NCTTGTGAGCGNNNAAAAAATGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-NTCNT
armerinaarmerina_6   NCTTGTGAGCGNNNAAAAAATGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-NTCNT
armerinaarmerina_5   NCTTGTGAGCGNNNAAAAAATGTCTTGTGCACTCGCTCGCCCC-NTCNT
                        *****  ***  *  ****  ****  **

```

```

alfacarensis_c        CG--GCCNGGGGG-TCTCTTTGAGAGACCACCC TAGCACAACAACAAAA
armerinacaesia_18    CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGACCACCC TAGCACAACAACAAAA
tetraquetraamabilis_C CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGACCACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_30          CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGACCACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_50          CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGACCACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_C1          CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_C2          CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_C11         CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_C10         CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_16          CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_42          CG--GCCGGGGGGTCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
tomentosa_18          CG--GCCGGGGG--TCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
arcuatociliata_46     CG--GCCGGGGGG-TCTTTCTTTGAGAGAACCCCT TAGCACAACAACAAAA
arcuatociliata_27     CG--GCCGGGGGG-TTTTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
arcuatociliata_28     CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA
arcuatociliata_30     CG--GCCGGGGGG-TCTCTTTGAGAGAACACCC TAGCACAACAACAAAA

```

arcuatociliata\_44 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGAACCCTAGCACAACAACAAAA  
 tomentosa\_47 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGAACCCTAGCACAACAGCAAAA  
 delaguardiae\_20 CGGGGCCGGGGGG-TCTCTCT-GAGAGA-CACCTAGCACAACAACAAAA  
 delaguardiae\_25 CGGGGCCGGGGGG-TCTCTCT-GAGAGANACCCTAGCACAACAACAAAA  
 delaguardiae\_6 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGAACCCTAGCACAACAACAAAA  
 delaguardiae CGG--CCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGAACCCTAGCACAACAACAAAA  
 tomentosa CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 armerinaarmerina CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 armerinaarmerina\_17 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 armerinaarmerina\_10 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 armerinaarmerina\_6 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 armerinaarmerina\_5 CG--GCCGGGGGG-TCTCTCTTGAGAGACCACCTAGCACAACAACAAAA  
 \*\* \* \*\*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*

alfacarensis\_c CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinacaesia\_18 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 tetraquetraamabilis\_C CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACATCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 tomentosa\_30 CCGGCGTGAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 tomentosa\_50 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 tomentosa\_C1 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_C2 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_C11 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_C10 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_16 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_42 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_18 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 arcuatociliata\_46 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 arcuatociliata\_27 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 arcuatociliata\_28 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 arcuatociliata\_30 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 arcuatociliata\_44 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 tomentosa\_47 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAAACTCCCA  
 delaguardiae\_20 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 delaguardiae\_25 CCGGCGCGAA-GCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 delaguardiae\_6 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAGATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 delaguardiae CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 tomentosa CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinaarmerina CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinaarmerina\_17 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinaarmerina\_10 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinaarmerina\_6 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 armerinaarmerina\_5 CCGGCGCGAAAGCGTCAAGGAAAATAACTTCAATGTGTGCAACCTCCCA  
 \*\* \*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \*\*

alfacarensis\_c TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 armerinacaesia\_18 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tetraquetraamabilis\_C TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_30 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_50 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_C1 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_C2 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_C11 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_C10 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_16 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_42 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_18 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 arcuatociliata\_46 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 arcuatociliata\_27 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 arcuatociliata\_28 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 arcuatociliata\_30 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 arcuatociliata\_44 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 tomentosa\_47 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 delaguardiae\_20 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA  
 delaguardiae\_25 TGCCAGGTAATCCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA

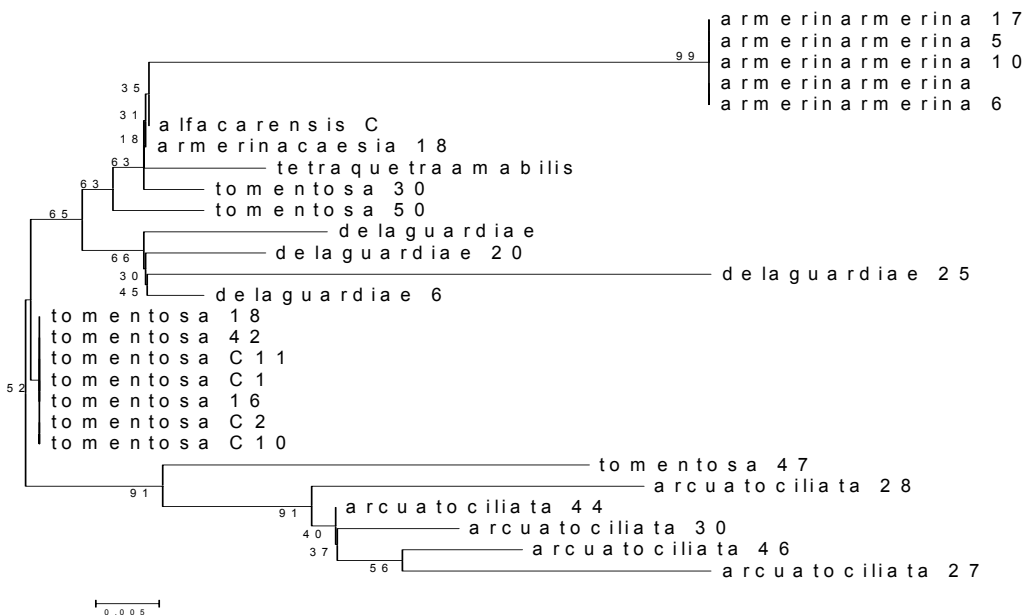
```

delaguardiae_6          TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
delaguardiae           TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
tomentosa              TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
armerinaarmerina       TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
armerinaarmerina_17   TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
armerinaarmerina_10   TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
armerinaarmerina_6     TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
armerinaarmerina_5     TGCCAGGTAATTCGGGCACGGGTGTGATGCCATGTAATAACAATA
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

**Figura 24:** Alineamiento de las secuencias del ITS-1 de *Arenaria*. Delección para la posición (-). Coincidencia nucleotídica (\*). Nomenclatura: alfacarensis (*A. alfacarensis* Pamp.), tetraquetraamabilis (*A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb.), armerinaarmerina *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, armerinacaesia (*A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Diaz, C. Morales & F. Valle), tomentosa (*A.tomentosa* Willk.), arcuatociliata (*A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner),delaguardiae (*A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner). Se encuentran enmarcadas las dianas de restricción para las enzimas de restricción: **XmnI** (GAANN<sup>^</sup>TTC), **RsaI** (GT<sup>^</sup>AC), **HaeIII** (RGCGC<sup>^</sup>Y), **HinfI** (G<sup>^</sup>ANTC), **XcmI** (CCANN<sup>^</sup>NNNNTGG), **HaeII** (RGCGC<sup>^</sup>Y), **NspII** (GDGCH<sup>^</sup>C)

En la figura 25 se muestra el árbol de secuencias obtenido mediante el método de interferencia filogenético del vecino más próximo (Neighbor-Joining) a partir de la matriz de distancias obtenida según el modelo de Kimura Dos Parámetros (Saito et al., 1987).



**Figura 25:** Árbol de Neighbor-Joining de todas las secuencias del ITS-1 analizadas en esta Memoria para especies del género *Arenaria*.

En el árbol se puede apreciar como existen varios clados claramente diferenciados: en primer lugar se comprueba que el clado que contiene a *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, se separa del resto con un valor de bootstrap del 98%; en segundo lugar, el valor de bootstrap para *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner es del 91% y para *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner, del 66%. Aparte, se comprueba que existe separación entre especies, ya que aparecen en clados diferentes aunque no con valores de bootstrap muy significativos, para *A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb. y *A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle. Por último, se comprueba para el taxon *A. tomentosa* Willk. cuyos clones aparecen a la vez en varios clados, lo cual lleva a pensar que la variabilidad existente entre las distintas secuencias es elevada.

#### IV.2.2.b. Análisis de divergencia interespecífica de la región ITS-1.

Se hizo un estudio posición a posición que permitiera dar un tipo de información al menos taxonómica que implicara encontrar algunas posiciones diagnósticas con valor identificativo para los taxones analizados (Tabla 22).

<b>Especies</b>	<b>Posición Nucleotídica<sup>(a)</sup></b>					
	3	27	30	43	50	54
<i>A. alfacarensis</i>	A	-	C	A	-	(N)
<i>A. tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i>	A	-	C	A	-	T
<i>A. armerina</i> subsp. <i>armerina</i>	<b>T</b>	-	C	A	<b>G</b>	<b>C</b>
<i>A. armerina</i> subsp. <i>caesia</i>	A	-	C	A	-	G
<i>A. tomentosa</i> *	A	-	C	A/T	T/-	G/T
<i>A. arcuatociliata</i>	A	-	<b>G</b>	<b>G</b>	-	T
<i>A. delaguardiae</i>	A	<b>C</b>	C	A	-	T

Posición nucleotídica <sup>(a)</sup>					
<b>Especies</b>	55	56	75	77	78
<i>A. alfacarensis</i>	G	T	C	T	G
<i>A. tetraquetra</i> subsp. <i>amabilis</i>	G	T	C	T	G
<i>A. armerina</i> subsp. <i>armerina</i>	<b>T</b>	T	C	T	G
<i>A. armerina</i> subsp. <i>caesia</i>	G	T	C	T	G
<i>A. tomentosa</i> *	G	T	C	T	G
<i>A. arcuatociliata</i>	G	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	G
<i>A. delaguardiae</i>	G	T	C	T	<b>A</b>

**Tabla 22:** Presencia o ausencia de ITS-1 gene indel events en especies de *Arenaria* que poseen variación intraindividual del espaciador ITS-1. (a) Las posiciones diagnósticas están numeradas con referencia a la secuencia del ITS-1. (b)(-) indica la ausencia de un nucleótido en la posición diagnóstica, (\*) Indica coincidencia nucleotídica.

Existen unas mutaciones puntuales que se refieren a la inserción o a la supresión de una base nucleotídica en la secuencia del ADN. En este caso cambia la secuencia de codones que debe ser leída durante la traducción, resultando en un polipéptido completamente diferente, el cual frecuentemente no es funcional. Tales inserciones y supresiones nucleotídicas se conocen como indel.

El examen de las secuencias permitió hacer un mapa de las localizaciones de la mayoría de los indel en la localizaciones de los indels encontrados en las especies de *Arenaria* estudiadas está clara la presencia de seis puntos calientes en la secuencia del ITS-1.

Las posiciones de estos puntos calientes indel, que están referidos a la secuencia de la secuencia del gen ITS-1, junto con la información acerca de la presencia de o ausencia de un indel esos sitios en cada especie, se muestran en la tabla 22.

Así, se observa que en las posiciones 3, 50, 54 y 55 del ITS-1 de *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, el nucleótido que aparece (T, G, C y G, respectivamente) es identificativo de esta especie puesto que en el resto de los casos no coincide. Para *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner son posiciones diagnósticas 30, 43, 56, 75 y 77 del ITS-1 (G, G, G, A y G) y 27 y 78 (C y A respectivamente) para *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner.

Además, estos sitios alteran dianas de restricción en diferentes casos. Entre ellos, la diana para *XmnI* (GAANN<sup>TTC</sup>), localizada en las posiciones 28-41 del ITS-1 de todas las especies estudiadas salvo en el caso de *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner. La sustitución de una citosina por una guanina en la secuencia de bases para ésta última en posición 30 origina la pérdida de la diana para la enzima *XmnI* presente en el resto de las especies (Figura 24); la diana para *RsaI* (GT<sup>AC</sup>) se encuentra en las posiciones 43-46 del ITS-1; en este caso, para *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner se produce la variación en el nucleótido 34 y aparece sólo para esta especie una nueva diana para la enzima *RsaI*. Para las enzimas *HaeIII* (RGCGC<sup>AY</sup>), *HinI* (G<sup>ANTC</sup>) coinciden los sitios de restricción -posiciones de la 50 a 55-; *XcmI* (CCANNNN<sup>NNNNTGG</sup>) -posiciones 53 a 58- y *HaeII* (RGCGC<sup>AY</sup>) -posiciones 52 a 57- encontrándose tan sólo las dianas para la especie *A. armerina* Bory subsp. *armerina*. Por último, se ha localizado una diana para la enzima *NspII* (GDGCH<sup>AC</sup>), localizada en las posiciones 78 a 83 en *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner y en *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb. La variación en la secuencia de bases para la primera especie en la posición 78 donde un nucleótido de guanina ha sido sustituido por una adenina, mientras que para la segunda especie ha sido sustituida en posición 83 una citosina por una timina.

Todo esto permite diseñar un test molecular de identificación específica mediante PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). A partir del corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR.

Como los amplificadores presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, se generarán distintos patrones de fragmentos. Con *XmnI* es posible la identificación de *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner); de igual forma, con *RsaI* de *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner; *HaeIII*, *HinfI*, *XcmI* y *HaeII* de *A. armerina* Bory subsp. *armerina* y *NspII* de *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner y *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb.

#### IV.2.1.a. Análisis de la región ITS-2

El tamaño del ITS-1 es de 232 pb salvo en el caso de *A. tomentosa* y *A. tomentosa\_47*, donde el tamaño corresponde a 233 pb por una inserción de una guanina y una citosina en posiciones 101 y 127 respectivamente; para *A. arcuatociliata\_28* la secuencia del ITS-1 tiene 231pb por una delección en posición 52; para *A. armerinaarmerina\_10* el tamaño es de 234 pb por dos inserciones en las posiciones 30 y 93 de dos nucleótidos de adenina; y la secuencia de *A. tomentosa\_18* en la que el tamaño es de 238 pb debido a la inserción de varios nucleótidos en las posiciones a partir de la 126 (Ver figura 26).

El análisis de las secuencias ITS-2 de las diferentes especies mostró los siguientes porcentajes: el contenido en AT osciló entre el 39,5% de *A. tomentosa* y el 41,9% de *A. armerinaarmerina\_10* y *A. armerinaarmerina\_5* respecto a los porcentajes de GC, oscilaron entre el 51,9% de *A. delaguardiae\_6* y el 60,5% de *A. tomentosa\_50*.

Además se ha detectado la presencia de dianas para diferentes enzimas de restricción. Entre ellas, la diana para *BstXI* localizada en las posiciones 25-30 del ITS-2. La variación en la secuencia de bases (el cambio de un nucleótido de timina por otro de citosina) para *A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, *A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle y *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner (*A. arcuatociliata\_30*) y tres clones de *A. tomentosa* Willk., en posición 31 origina la pérdida de la diana para las enzima *BstXI* (CCANNNN<sup>^</sup>NTGG), presente en el resto de las especies (Figura 26).

La diana para NspII localizada en las posiciones 71-76 del ITS-2. La variación en la secuencia de bases (el cambio de un nucleótido de citosina por otro de timina) para *A. tomentosa* Willk., en posición 76 origina la pérdida de la diana para las enzima NspII (GDGCH<sup>A</sup>C), presente en el resto de las especies (Figura 26).

Aparte de ellas, también se han localizado enzimas de restricción que cortan en posiciones muy concretas dentro del ITS-2, como son SacII, que actúa sobre las posiciones 116-121, Cfo 61-64, HaeIII 80-84 y AluI 96-99.

alfacarensis_C	TCACGCATCGCATCTCCCCATTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
tetraquetraamabilis_C	TCACGCATCGCATCTCCCCATTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
arcuatociliata_28	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
arcuatociliata_44	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinatomentosa_11	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinatomentosa_10	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
arcuatociliata_46	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
arcuatociliata_27	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_42	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_18	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_47	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_16	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_C1	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_C2	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
delaguardiae_20	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
delaguardiae_25	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
delaguardiae_6	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
delaguardiae	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
arcuatociliata_30	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinaesia_18	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTTGTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinaarmerina	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinaarmerina_17	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinaarmerina_10	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
armerinaarmerina_16	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTAGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_30	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG
tomentosa_50	TCACGCATCGCATCTCCCCATTTCCACCTCGTTGGGAAGGGGAAGGAGG

\*\*\*\*\* \*\*

alfacarensis_C	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TTGG-	AGCTT
tetraquetraamabilis_C	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TTGG-	AGCTT
arcuatociliata_28	A-GGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
arcuatociliata_44	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
armerinatomentosa_11	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
armerinatomentosa_10	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
arcuatociliata_46	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
arcuatociliata_27	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_42	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_18	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_47	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_16	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_C1	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
tomentosa_C2	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
delaguardiae_20	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT
delaguardiae_25	ATGGCTTCCCGCGCCTCACC	GGGCACGGTT	GGCC	TAAAAA-TCGG-	AGCTT



```

delaguardiae_6      ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TCGG-AGCTT
delaguardiae      ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TCGG-AGCTT
arcuatociliata_30  ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TCGG-AGCTT
armerinacaesia_18 ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
armerinaarmerina  ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
armerinaarmerina_17 ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
armerinaarmerina_10 ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAAATGG-AGCTT
armerinaarmerina_16 ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
tomentosa_30      ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
tomentosa         ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAAA-TTGG-AGCTT
tomentosa_50      ATGGCTTCCCCGGCCTCACCGGGCACGGTTGGCCTAAA--TTGG-AGCTT
* *****

```

```

alfacarensis_C    TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tetraquetraamabilis_C TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
arcuatociliata_28  TAGG-CTCTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
arcuatociliata_44  TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinatomentosa_11 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinatomentosa_10 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
arcuatociliata_46  TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
arcuatociliata_27  TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_42      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_18      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_47      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_16      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGGGTGAACAAGGCA-----T
tomentosa_C1      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_C2      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
delaguardiae_20   TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
delaguardiae_25   TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
delaguardiae_6    TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
delaguardiae     TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
arcuatociliata_30 TAGG-CACTGAGTTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinacaesia_18 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinaarmerina  TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinaarmerina_17 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinaarmerina_10 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
armerinaarmerina_16 TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_30      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa         TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCA-----T
tomentosa_50      TAGG-CACTGAGCTGCCGCGGCGATAGGTGG-TGAACAAGGCAGAGGCAT
**** * *****

```

```

alfacarensis_C    CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCCCTTTGACCTTTGAGCTCGAC
tetraquetraamabilis_C CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCCCTTTGACCTTTGAGCTCGAC
arcuatociliata_28  CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
arcuatociliata_44  CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
armerinatomentosa_11 CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
armerinatomentosa_10 CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
arcuatociliata_46  CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
arcuatociliata_27  CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_42      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_18      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_47      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_16      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_C1      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
tomentosa_C2      CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
delaguardiae_20   CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
delaguardiae_25   CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
delaguardiae_6    CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
delaguardiae     CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
arcuatociliata_30 CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCCCTTTGACCTTTGAGTTCGAA
armerinacaesia_18 CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAC
armerinaarmerina  CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAC
armerinaarmerina_17 CTGCCATGCAAGCAAACCCGTCGCGCAGCTCTTTGACCTTTGAGTTCGAC

```

```

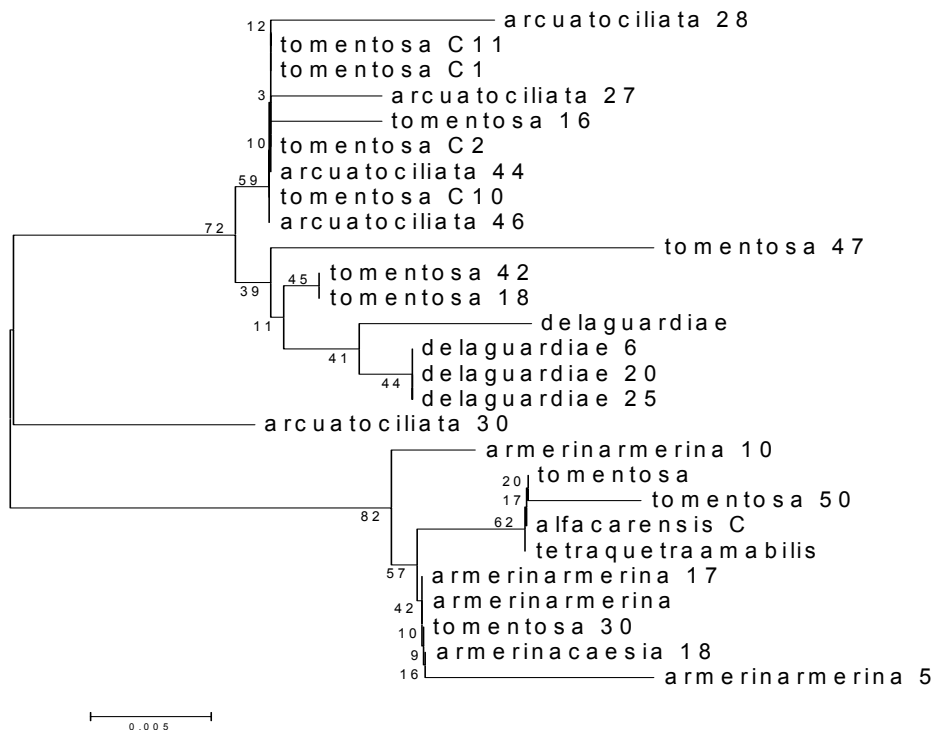
armerinaarmerina_10      CTGCCATGCAAGCAACCCGTCGGCGAACTCTTTGACCTTTGCAGCTCGAC
armerinaarmerina_16      CTGCCATGCAAGCAACCCGTCGGCGANCTCTTTGACCTTTGCAGCTCGAC
tomentosa_30             CTGCCATGCAAGCAACCCGTCGGCGAGCTCTTTGACCTTTGCAGCTCGAC
tomentosa                 CTGCCATGCAAGCAACCCGTCGGCGAGCCCTTTGACCTTTGCAGCTCGAC
tomentosa_50             CTGCCATGCA-GCA-CCCGTCGGCGAGCCCTTTGAC-TTTGCAGCTCGAC
***** ** * ***** * ** * ** * ** * ** * ** *

alfacarensis_C          GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
tetraquetraamabilis_C  GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
arcuatociliata_28       GGACCCACTGA-GTTGCC- ATGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
arcuatociliata_44       GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinatomentosa_11    GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinatomentosa_10    GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
arcuatociliata_46       GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCNATCT-GTTGCGAC-----
arcuatociliata_27       GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCNATCT-GTTGCGAG-----
tomentosa_42            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCATCT-GTTGCGNGAANCA
tomentosa_18            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCATCT-GTTGCGNGAANCA
tomentosa_47            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCCTCGT-GTTGCGGGAG-----
tomentosa_16            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGNNAACCAATCT-GTTGCGAC-----
tomentosa_C1            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
tomentosa_C2            GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
delaguardiae_20         GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGGG-----
delaguardiae_25         GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGGG-----
delaguardiae_6         GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAG-----
delaguardiae           NGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAA-----
arcuatociliata_30       GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinacaesia_18      GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinaarmerina       GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinaarmerina_17    GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
armerinaarmerina_10    GGACCCACTGAAGTTGCC- TTGGNAACC-AATNTGTTGCGAA-----
armerinaarmerina_16    GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCTGTTGCGAC-----
tomentosa_30           GGACCCACTGA-GTTGCC- TTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
tomentosa               GGACCCACTGA-GTTGCCCTTGGCAACCCAATCT-GTTGCGAC-----
tomentosa_50           GGACC-TACTGA-GTTGCC- TTGGCAACC-AATCT-GTTGCGAC-----
*** ***** ** ***** ** * * * *****

alfacarensis_C          -
tetraquetraamabilis_C  -
arcuatociliata_28       -
arcuatociliata_44       -
armerinatomentosa_11    -
armerinatomentosa_10    -
arcuatociliata_46       -
arcuatociliata_27       -
tomentosa_42            -
tomentosa_18            G
tomentosa_47            -
tomentosa_16            -
tomentosa_C1            -
tomentosa_C2            -
delaguardiae_20         -
delaguardiae_25         -
delaguardiae_6         -
delaguardiae           -
arcuatociliata_30       -
armerinacaesia_18      -
armerinaarmerina       -
armerinaarmerina_17    -
armerinaarmerina_10    -
armerinaarmerina_16    -
tomentosa_30           -
tomentosa               -
tomentosa_50           -

```

**Figura 26:** Alineamiento de las secuencias del ITS-2 de *Arenaria*. Delección para la posición (-). Coincidencia nucleotídica (\*). Nomenclatura: *alfacarensis* (*A. alfacarensis* Pamp.), *tetraquetra* (*A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb.), *armerina* (*A. armerina* Bory subsp. *armerina*, *armerinacaesia* (*A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle), *tomentosa* (*A. tomentosa* Willk.), *arcuatociliata* (*A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner), *delaguardiae* (*A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner). Se encuentran enmarcadas las dianas de restricción para las enzimas de restricción: *NspII* (GDGCH<sup>^</sup>C), *BstXI* (CCANNNN<sup>^</sup>NTGG), *SacII* (CCGC<sup>^</sup>GG), *CfoI* (G<sup>^</sup>CGC), *HaeIII* (GG<sup>^</sup>CC) y *AjuI* (AG<sup>^</sup>CT).



**Figura 27:** Árbol de Neighbor-Joining de todas las secuencias del ITS-2 analizadas en esta Memoria para especies del género *Arenaria*.

Para el ITS-2, al igual que ocurría con el ITS-1 se establecen varios clados que permiten la separación de ciertas especies con un valor de inferencia elevado, así se repite la presencia de un clado que agrupa los clones de *A. armerina* Bory subsp. *armerina* con un valor de bootstrap del 82%. *A. alfacarensis* Pamp. y *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb. se agrupan en un clado (62%) al igual que ocurría para el ITS-1. *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner y *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner, también se separan del resto y se agrupan sus clones. Y por último se comprueba, como para el estudio del ITS-

1, que para el taxon *A.tomentosa* Willk. cuyos clones aparecen a la vez en varios clados, lo cual lleva a pensar que la variabilidad existente entre las distintas secuencias es elevada.

Como se puede comprobar, los árboles de los ITS-1 y ITS-2 son similares, manteniéndose los clados filogenéticos; sin embargo, dentro de cada clado, las ramas (relación entre estas secuencias), varían entre los dos marcadores, lo cual se puede achacar a la poca información filogenética de estas secuencias, lo que se ve reflejado en los bajos valores de bootstrap observados.

De la misma forma que para el ITS-1, se realizó un estudio posición a posición que permitiera dar información taxonómica y encontrar posiciones diagnósticas con valor identificativo en el ITS-2. Pero tras el examen detenido no se encontraron mutaciones puntuales, referidos a inserción o supresión de ninguna base nucleotídica, que permitiesen hacer ningún mapa de restricción.

## **V. DISCUSIÓN**



## V.1. Caracterización de las muestras

Entre los valores aceptados por la Real Farmacopea Española para la pérdida por desecación, se pueden tomar como referencia porcentajes en torno al intervalo del 6 al 15%, como es el caso de *Artemisia absinthium* L. (hojas basales o sumidades floridas) de *Althaea officinalis* L. (hojas), *Angelica archangelica* L. (raíz), *Crataegus monogyna* Jacq., (Lindm) o *C. laeviagata* (Poir.) DC y sus híbridos; más raramente, con un porcentaje permitido no superior al 10%, se encuentran especies como *Hamamelis virginiana* L. (hoja) u otras especies de *Crataegus* de ámbito europeo.

En relación a las especies objeto de estudio y teniendo en cuenta los valores a los que se ha hecho referencia con anterioridad, se puede considerar que sus porcentajes de humedad se encuentran dentro de unos límites muy frecuentes, en torno a un 4-8%, ya que los valores obtenidos oscilan entre el 3,57% de *Arenaria tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner y 8,20% de *Arenaria alfacarensis* Pamp., valores que se consideran aptos para otras drogas vegetales incluidas en la Real Farmacopea Española.

En cuanto a las cenizas totales, en las drogas vegetales presentes en la Real Farmacopea Española, los valores permitidos oscilan entre un 5-24%, pero los valores más frecuentes, dependiendo de las características de la planta están alrededor del 8-10%, con ejemplos tales como *Árnica montana* L. -flor de árnica-, *Foeniculum vulgare* Miller sp. *vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung -fruto de hinojo dulce-, *Citrus aurantium* -flor de naranja amargo- con un porcentaje permitido no superior al 10%, *Peumus boldus* Molina -hoja de boldo-, *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* (L.)(Rauschert) -flor de manzanilla común, no más del 13%, con casos excepcionales como *Fucus vesiculosus* L. o *F. serratus* L. o *Ascophyllum nodosum* Le Jolis -fucus-, en el que está permitido un valor no mayor del 24%.

En nuestro caso, los valores extremos obtenidos han sido de 7,86% para *Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle y de 20,38% en *Arenaria erinacea* Boiss.(1), siendo en ambos casos similares a los permitidos en la Real Farmacopea Española. Por lo tanto, y como conclusión a los resultados obtenidos para la

determinación de humedad y cenizas de estas especies, se considera que son unos valores que se encuentran dentro de los límites normales para drogas de origen vegetal.

Las muestras con mayor contenido en cenizas son, además de la citada *Arenaria erinacea* Boiss.(1), las especies *A. tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb. (17,00%) y *A. tetraquetra murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner (16,55%) y, curiosamente, ninguna de ellas se encuentra entre las de mayor contenido en iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por lo que probablemente sean ricos en otras sustancias minerales tales como la sílice.

## V.2. Screening fitoquímico

A continuación, se hará un estudio detallado de los resultados obtenidos para cada especie:

*Arenaria alfacarensis* Pamp.: presenta un elevado contenido en azúcares y gomas y mucílagos, en ambos casos se trata de compuestos azucarados derivados del metabolismo primario. La presencia de lípidos y ceras no se ha demostrado de forma clara, puesto que se obtuvo un resultado dudoso, al igual que en el caso de los taninos. Se ha confirmado la ausencia de alcaloides, flavonoides, esteroides y leucoantocianos. Para las antocianinas, antraquinonas y cumarinas, el resultado es positivo moderado, mostrando para las últimas, una fluorescencia no muy intensa. La presencia de saponinas ha dado un resultado positivo con un valor de 1 cm para el anillo de espuma.

*Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb.: los resultados son muy similares a los obtenidos para la especie anterior, pero es necesario hacer referencia al anillo obtenido en la detección de saponinas, puesto que llegó a ser de 1,6 cm lo que sitúa a esta muestra en la segunda posición en cuanto al posible contenido en estos componentes. Se comprobó además, la presencia de flavonoles y resultó dudoso el ensayo de flavonas, mientras que las flavanonas resultaron negativas. En cuanto a los taninos, es negativa la presencia de pirogálicos y dudosa la de condensados.



*Arenaria tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner: en esta especie cabe destacar la presencia de saponinas (anillo de 1,2 cm). La detección de flavonoles no ha sido tan clara como para *Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb., resultando positiva moderada. Se aprecia la presencia de taninos condensados, a diferencia del caso anterior y es probable que se encuentran también taninos hidrolizables.

*Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (1): en relación con las especies ya analizadas, llama la atención el hecho de que es clara la ausencia de flavonoides y alcaloides, y la presencia de cumarinas con un resultado fuertemente positivo. Las pruebas para la detección de antraquinonas, al igual que para taninos -tanto condensados como pirogálicos-, dieron un resultado dudoso. El anillo de espuma formado en la detección de saponinas es de 2 cm, siendo, por tanto la muestra con mayor contenido en estos principios. La presencia de cumarinas es claramente positiva.

*Arenaria armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) C. Díaz, C. Morales & F. Valle (2): al tratarse de una población diferente de la misma especie comentada con anterioridad, se hará referencia exclusivamente a las variantes que presenta con respecto a aquella. El ensayo para antocianinas dio un resultado débilmente positivo, del mismo modo que la detección de taninos condensados. El anillo de espuma obtenido en la detección de saponinas fue de 1 cm lo cual revela la incidencia de la zona de recogida en el contenido en principios fotoquímicos.

*Arenaria armerina* subsp. *armerina* (1): la presencia de glúcidos, gomas y mucílagos, cumarinas y saponinas fue comprobada con un resultado fuertemente positivo, el anillo para éstas últimas fue de 1,2 cm. Se han obtenido resultados dudosos para los ensayos de lípidos y ceras, antocianinas, taninos (hidrolizables y catéquicos), antraquinonas, triterpenos y esteroides. Han sido negativos para flavonoides, leucoantocianos y alcaloides.

*Arenaria armerina* subsp. *armerina* (2): al igual que en el caso anterior se repiten todos los resultados, sólo cabe señalar el hecho de que para la prueba de taninos

condensados, la respuesta fue positiva dudosa y en la detección de saponinas, el anillo formado fue ligeramente más estrecho que para la otra población de la misma especie, teniendo en este caso 1,1 cm.

*Arenaria tomentosa* Willk.: la presencia, con un resultado fuertemente positivo, de glúcidos, gomas y mucílagos, cumarinas, y saponinas (1 cm) ha sido comprobada. Es necesario hacer referencia a que a diferencia del resto de especies, para *Arenaria tomentosa*, se ha obtenido un resultado positivo moderado para la detección de lípidos y ceras. El contenido en taninos de esta especie se ha visto confirmado de forma dudosa para el caso de taninos hidrolizables mientras que para los catéquicos ha resultado negativo. Respecto al resto de principios activos estudiados, se han obtenido también resultados negativos para flavonoides, leucoantocianos, esteroides y alcaloides.

*Arenaria arcuatociliata* G. López & Nieto Feliner: las pruebas para la detección de lípidos y ceras, antocianos, taninos hidrolizables, y antraquinonas dieron un resultado positivo dudoso. El anillo obtenido en la detección de la presencia de saponinas fue de 1 cm.

*Arenaria erinaceae* Boiss. (1): ha sido la única especie en la que se han detectado triterpenos (positivo moderado) en esta especie de entre todas las analizadas. La misma respuesta se obtuvo para la presencia de esteroides. Positivos dudosos para flavonas, antocianinas, taninos hidrolizables y antraquinonas. Destacar que el anillo obtenido para saponinas fue de 1,4 cm, lo cual sitúa a esta especie entre las tres con mayor contenido, supuestamente, en saponinas.

*Arenaria erinaceae* Boiss. (2): por tratarse de una especie que no pertenece al grupo de especies presentes en el sureste de la península, podría llamar la atención que los resultados obtenidos son muy similares a los analizados hasta el momento. Como en todas las ocasiones, fueron negativas las pruebas para la detección de alcaloides, leucoantocianos, flavonoles y flavanonas. Los lípidos y ceras, flavonas, antocianos, antraquinonas y triterpenos dieron un positivo débil o dudoso. Positivo moderado para

cumarinas y fuertemente positivo para glúcidos, gomas y mucílagos y saponinas, con 1 cm de anillo de espuma.

*Arenaria delaguardiae* G. López & Nieto Feliner: se obtienen respuestas fuertemente positivas para gomas y mucílagos, a la vez que para azúcares, cumarinas y flavonas. Un resultado positivo moderado fue el obtenido para antocianinas y saponinas, llamativo este último por no ser fuertemente positivo como en el resto de las especies, con un anillo de 0,8 cm. Positivos débiles han sido los que se han dado para lípidos y ceras, flavonoles, taninos condensados, antraquinonas, triterpenos y esteroides. Y negativos, como en todos los casos, para leucoantocianos, flavanonas y alcaloides.

Según lo anterior, se puede concluir que los ensayos encaminados a elucidar los grupos fitoquímicos presentes en los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de la planta completa de las especies objeto de estudio han revelado la presencia de glúcidos, gomas y mucílagos y saponinas en todos los casos con unas reacciones fuertemente positivas y, de forma contraria, se han obtenido resultados negativos para el análisis de flavanonas, leucoantocianos y alcaloides. Para los lípidos y ceras, los resultados son dudosos para todas las especies. Estos datos indican una similitud cualitativa en la composición de todas las especies.

Podemos subrayar los siguientes puntos:

En todos los casos se ha obtenido un resultado fuertemente positivo para la presencia de glúcidos, gomas y mucílagos y saponinas (con un anillo de espuma considerable). También para todas las muestras, pero con resultado negativo, ha sido la respuesta a la detección de flavanonas, leucoantocianos y alcaloides.

Los aspectos más interesantes en cuanto a la presencia del resto de principios activos, son los siguientes:

Los lípidos y ceras han dado una respuesta dudosa para todas las especies estudiadas salvo para *A. tomentosa* Willk., donde se ha obtenido un resultado positivo moderado.

Las cumarinas se encuentran en todas las especies objeto de estudio de forma clara (fuertemente positivo) y para *A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb., *A. tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner. El resultado ha sido positivo moderado.

Los flavonoles sólo aparecen con un positivo intenso en *A. delaguardiae*, así como las flaconas en *A. tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb., siendo éstas positivo débil en *A. tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto Feliner.

Aparecen como positivos débiles, los antocianos en *A. tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb., *A. tetraquetra* subsp. *murcica* (Font Quer) Favarger & Nieto, *A. armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (1), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (2), *A. arcuatociliata* G. López & Nieto, *A. erinaceae* Boiss. Y *A. erinaceae* Boiss. así como los taninos condensados en *A. alfacarensis* Pamp., *A. tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb., *A. armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (1) y *A. delaguardiae* G. López & Nieto, las antraquinonas en *A. armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (1), *A. armerina* subsp. *caesia* (Boiss.) Díaz, Morales & Valle (2), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (1), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (2), *A. tomentosa* Willk., *A. arcuatociliata* G. López & Nieto, *A. erinaceae* Boiss.(1), *A. erinaceae* Boiss. (2) y *A. delaguardiae* G. López & Nieto y los triterpenos en todas las especies menos en *A. erinaceae* Boiss.(1) y esteroides en *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (1), *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (2) y *A. delaguardiae* G. López & Nieto.

De otra parte, en relación con la posible actividad terapéutica de las especies seleccionadas, una parte fundamental de este trabajo ha sido comprobar la presencia de saponinas. Los estudios previos en el género *Arenaria* con respecto a la riqueza en

saponinas (Soliman et al., 1999; Elgamal et al., 1998; Hani et al., 1997) han demostrado la presencia frecuente de saponinas triterpénicas, como era de esperar al tratarse de especies de Dicotiledóneas. También es importante hacer referencia a que la presencia de estos compuestos no se ciñe sólo a este género, sino que se extiende a otros géneros de la misma familia con los que se encuentra relacionado como es el caso del género *Herniaria*, especies como *Herniaria hirsuta* (L.) Kuntze (Mbarck et al., 2000) y *Herniaria glabra* L. (Rhiouani et al. 1999; Schröder, et al., 1993); el género *Saponaria*, la especie *Saponaria officinalis* L. (Koike et al., 1999; Jia et al., 1999, 1998; Fulcheri et al., 1998); el género *Gypsophila*, *G. paniculata* L. (Fulcheri et al., 1998), *G. bermejoi* G. López (Acebes et al., 1998) y *G. arrostii* Guss. (Mostad et al., 1987); *Dianthus*, con especies como *Dianthus caryophyllus* L. (Gunimka et al., 1998), *Dianthus superbus* L. (Hikino et al., 1984) y *Dianthus chinensis* L. (Koike et al., 1994; Li et al., 1994); el género *Silene*, *S. jensseensis* Willd. (Lacaille et al., 1997, 1995) y *S. cucubalus* Wibel (Lahrsini et al., 2003) y el género *Vaccaria*, con la especie *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke (Koike et al., 1998).

#### V.4. Contenido en sodio y potasio

El contenido de los iones alcalinos sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) de las especies de *Arenaria* objeto de estudio, ha resultado ser, como se pensaba al comienzo de este trabajo de investigación, elevado con respecto a otras especies de origen vegetal. Trabajos publicados con anterioridad (Guil Guerrero et al., 1998) acerca del contenido en ión sodio ( $\text{Na}^+$ ) en plantas silvestres utilizadas en alimentación tales como *Verbena officinalis* L. ( $58 \pm 7 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ), *Plantago major* L. ( $100 \pm 30 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ), *Amaranthus viridis* L. ( $56 \pm 8 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ), *Cardaria draba* L. ( $55 \pm 4 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ), *Rumex crispus* L. ( $110 \pm 12 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ) o *Stellaria media* (L.) Vill. ( $67 \pm 8 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$ ), entre otras, expresan que valores del orden de  $50\text{-}60 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$  son valores elevados, por lo que las cantidades obtenidas en este trabajo para las especies de *Arenaria* de la sección *Plinthine* entre los  $29,5 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$  de *Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb. y los  $67 \text{mg Na}^+ / 100 \text{g}$  de *Arenaria tomentosa* Willk., se pueden considerar elevadas.

El contenido del ión potasio ( $K^+$ ) es el que más interés tiene para este trabajo de investigación, ya que las cantidades del mismo pueden ser de gran importancia para aclarar la posible relación entre la aplicación de estas especies en medicina tradicional como diuréticos y el contenido de las mismas en sales de potasio, que era uno de los objetivos que se plantearon al comienzo de este trabajo de investigación.

Para otras especies silvestres utilizadas en alimentación tales como *Verbena officinalis* L. ( $280\pm 24$  mg  $K^+$  /100g), *Plantago major* L. ( $320\pm 37$  mg  $K^+$  /100g), *Amaranthus viridis* L. ( $670\pm 50$  mg  $K^+$  /100g), *Cardaria draba* L. ( $620\pm 60$  mg  $K^+$  /100g), *Rumex crispus* L. ( $510\pm 54$  mg  $K^+$  /100g) o *Stellaria media* (L.) Vill. ( $465\pm 35$  mg  $K^+$  /100g), entre otras (Guil Guerrero et al., 1998), que en relación con los valores extremos obtenidos en esta investigación, 231 mg  $K^+$  /100 g para *Arenaria tetraquetra* subsp. *amabilis* (Boiss.) H. Lindb. y los 3460 mg  $K^+$  /100 g de *Arenaria erinacea* (2) Boiss. Monts se puede decir que, al igual que en los casos expuestos con anterioridad, son valores elevados.

Es necesario considerar el hecho de que el contenido en iones depende de varios factores, entre ellos la capacidad de cada planta de absorber en mayor o menor grado un determinado ión y la composición mineral del suelo en el que crece la planta así como las condiciones climatológicas.

El contenido de sodio en el organismo humano es del orden de 1,4 g/kg. El principal papel del sodio, que es en gran parte un ion extracelular, es actuar teniendo como contra-ión al cloro, regulando la presión osmótica de los líquidos extracelulares. Además, activa algunas enzimas como la amilasa. La absorción de sodio se produce rápidamente (en 3-6 minutos) y es total a las tres horas. El consumo de sodio es de 1,7 a 6,9 g/día. Las necesidades de sodio de un adulto pueden alcanzar un valor medio de unos 460 mg/día (Belitz et al., 1992).

El contenido en potasio del organismo humano es de unos 2 g/kg. El potasio se encuentra localizado principalmente en las células. Regula la presión osmótica celular, participa en la excitabilidad de la célula y activa una serie de enzimas de la glicólisis y la

cadena respiratoria. El consumo de potasio alcanza en la alimentación ordinaria 2-5,9 g/día. Las necesidades medias son del orden de 782 mg (Belitz et al., 1992).

El contenido en sodio y potasio de algunos alimentos de origen vegetal tales como las endivias (53mg Na<sup>+</sup>/100g), espinacas (65mg Na<sup>+</sup>/100g) y repollo (43mg Na<sup>+</sup>/100g) o el contenido en potasio de las mismas endivias (346 mg K<sup>+</sup> /100 g), espinacas (633 mg K<sup>+</sup> /100 g) y repollo (490 mg K<sup>+</sup> /100 g) (Belitz et al., 1992), por lo que en relación con las especies objeto de estudio, se deduce que sus contenidos respectivos son muy similares, de modo que, en conclusión, se puede afirmar que el contenido en iones sodio y potasio de estas especies de *Arenaria* se encuentran muy cercanos a los de especies vegetales que se utilizan en alimentación y que se consideran fuentes ricas en estos iones.

#### **V.5. Aproximación genética al estudio de especies del género *Arenaria* sección *Plinthine* (*Caryophyllaceae*).**

Partimos de una secuencia de *A. affacarensis* Pamp., *A. armerina* Bory subsp. *caesia* (Boiss.)C. Díaz, C. Morales & F. Valle, *A. tetraquetra* L. subsp. *amabilis* (Bory) H. Lindb., once secuencias de *A. tomentosa* Willk., cinco de *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner, *A. armerina* Bory subsp. *armerina* y de *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner. Se ha trabajado con siete especies de la sección.

En un principio se consideró el estudio de estas especies con ITS, por su rápida evolución, como marcadores moleculares. Ya Valcárcel et al. (2004, 2006) habían planteado el estudio de estas especies con marcadores cloroplastidiales y nucleares. Así, como resultado de este trabajo de investigación, no se ha encontrado variación suficiente para realizar una filogenia completa y obtener resultados concluyentes partiendo de los resultados mostrados en los árboles. De esta forma se deja una puerta abierta a la continuación de este estudio haciendo uso de otros marcadores moleculares que evolucionen más rápido (ADN satélites, intrones nucleares...).

Por otra parte, se han realizado un estudio más completo acerca de las posibles variaciones intraindividuales del espaciador ITS-1 y se ha llegado a la conclusión de que existen posiciones diagnósticas en las que, por ausencia de algún nucleótido o coincidencia de los mismos, se puede establecer una diferenciación a nivel genético entre los taxones objeto de estudio (Krieger et al., 2006).

De esta forma se puede afirmar que en posición 3 del ITS-1 para la especie *A. armerina* Bory subsp. *armerina* existe un nucleótido de timina, mientras que para el resto aparece una adenina. De la misma manera ocurre para *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner en posición 27, para ella hay una citosina, mientras que en esa posición hay una delección para el resto. En *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner en la posición 43 hay un nucleótido de guanina. En posición 50 existe un nucleótido de guanina para *A. armerina* Bory subsp. *armerina* mientras que para el resto de especies aparece una delección en esa posición, aunque hay que destacar el hecho de que para *A. tomentosa* Willk. puede aparecer la delección o un nucleótido de timina. En la posición 54 sólo aparece una citosina para *A. armerina* Bory subsp. *armerina*, para el resto en esa posición hay nucleótidos de timina o de guanina. En la posición 55 sólo *A. armerina* Bory subsp. *armerina* presenta una timina –el resto tienen una guanina-. Para *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner, la posición 56, 75 y 77 es diagnóstica por tener una guanina, adenina y guanina en vez de un nucleótido de timina, citosina y timina respectivamente. *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner en posición 78 posee una adenina en lugar de una guanina.

De esta forma podemos concluir que para *A. armerina* Bory subsp. *armerina* existen variaciones de nucleótidos con respecto al resto de las especies en posiciones 3, 50, 54 y 55. Para *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner son posiciones diagnósticas 30, 43, 56, 75 y 77 y *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner, lo son 27 y 78 del ITS-1.

Es interesante el hecho de que ciertas enzimas de restricción corten en sitios específicos. Esto permite el diseño de un test molecular de identificación específica mediante PCR-RFLP. De este modo, la enzima XmnI permitirá la identificación de *A. arcuatociliata* G.



López & Nieto-Feliner (por la variación en la posición 30); RsaI en *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner (posición 43); HaeIII, HinfI XcmI HaeII *A. armerina* Bory subsp. *armerina* (posiciones 50, 54 y 55) y NspII en *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner (posición 78).

Como se aprecia en el árbol, cabe destacar que para el ITS-1 de la especie *A. tomentosa* Willk. no existe evolución concertada, algo que queda reflejado en dos hechos significativos. En primer lugar, en algunas especies aparece una elevada variabilidad, existiendo distintos tipos de secuencias (*A. tomentosa* Willk.) y en segundo lugar, las secuencias no se agrupan en el árbol por afinidades taxonómicas. Esto puede deberse a poliploidía e hibridación o por escasa divergencia entre táxones, apareciendo en un mismo clado varias secuencias de distintos taxones.

Para el ITS-2, los resultados obtenidos llevan consigo un estudio más complicado. De igual forma que en el caso anterior, se comprueba que no existe evolución concertada. En el árbol se puede observar que las secuencias no se agrupan por afinidades taxonómicas y que no existe evolución concertada.



## **VI. CONCLUSIONES**



- PRIMERA.- Se han estudiado desde los puntos de vista botánico, fitoquímico y genético un total de nueve taxones de la sección *Plinthine* del género *Arenaria*, presentes en el sistema Bético, en el sureste de la Península Ibérica. Se han identificado y delimitado las áreas de distribución y ecología específica de cada una de ellas, poniéndose de manifiesto que, en general, están muy restringidas, tratándose de endemismos en la mayoría de los casos.
- SEGUNDA.- Se ha comprobado la presencia en cantidades apreciables de sales de  $K^+$  y  $Na^+$  en todas las especies. De la misma manera, la detección de saponinas ha resultado positiva o fuertemente positiva. La presencia de estos elementos podría justificar la utilización medicinal de estas especies como diuréticos.
- TERCERA.- Para todos los taxones se ha obtenido un resultado fuertemente positivo en relación a la presencia de glúcidos, gomas y mucilagos.
- CUARTA.- La detección de flavanonas, leucoantocianos y alcaloides ha resultado negativa en todas las muestras.
- QUINTA.- Desde el punto de vista fitoquímico no existen diferencias apreciables entre las distintas poblaciones, por lo que en principio, la selección poblacional realizada popularmente no puede ser validada en relación con el contenido en principios activos.
- SEXTA.- Se ha comprobado que el ITS no es un buen marcador filogenético en este grupo de especies, pero sí taxonómico. El análisis genético permite identificar a partir de una serie de posiciones diagnósticas en el ITS-1, las especies *A. armerina* Bory subsp. *armerina* considerando los nucleótidos presentes en las posiciones 3, 50, 54 y 55; *A. arcuatociliata* G. López & Nieto-Feliner (nucleótidos en las posiciones 30, 43, 56, 75 y 77) y *A. delaguardiae* G. López & Nieto-Feliner. ( 27 y 78).

SÉPTIMA.- La presencia de enzimas de restricción que cortan la secuencia exactamente en las posiciones diagnósticas, permite diseñar un test molecular de identificación específica mediante PCR-RFLP.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





- ABDEL KHALIK, S.M.; MIYASE, T.; EL-ASHAAL, H.A.; MELEK, F.R. (2000) "Triterpenoid saponins from *Fagonia cretica*". **Phytochemistry** 54: 853-859.
- ACEBES, B.; DÍAZ-LANZA, A.M.; BERNABÉ, M. (1998) "Saponin from the roots of *Gypsophila bermejoi*". **Phytochemistry** 49(7): 2077-2079.
- AHMAD, V. U.; KHALIQ-UZ-ZAMAN, S. M.; SHAMEEL, S.; PERVEEN, S.; ALI, Z. (1997) "Steroidal saponins from *Asparagus dumosus*". **Phytochemistry** 44: 137-140.
- AHMAD, V.U. ; KHALIQ-UZ-ZAMAN, S.M. ; SHAMEEL, S. ; PERVEEN, S.; ALI, Z. (1998) "Steroidal saponins from *Asparagus dumosus*". **Phytochemistry** 50: 481-484.
- AJAY, M.; CHAI, H. J.; MUSTAFA, A. M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. (2007) "Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces". **Journal of Ethnopharmacology** 109: 388-393.
- AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; UKIYA, M.; IIZUKA, M.; SCHNEIDER, S.; OGASAWARA, K.; MUKAINAKA, T.; IWATSUKI, K.; SUZUKI, T. & NISHINO, H. (2003) "Chalcones, coumarins and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects". **Cancer Letters** 201: 133-137.
- ALI TAHIR, H.M. (1991) "Estudios sobre *Lavanda multifida* L." Tesis Doctoral. Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A., ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. Y LIPMAN, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic Acids Research** 25: 3389-2402.
- ALVAREZ, I. Y WENDEL, F.J. (2003) "Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference". **Molecular Phylogenetics and Evolution** 20 (1): 41-46.
- BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S. Y DONOGHUE, M.J. (1995) "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny". **Ann. Miss. Bot. Gard.** 82: 247-277.
- BALDWIN, B.G. & MARKOS, S. (1998) "Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (*Compositae*)". **Molecular Phylogenetics and Evolution** 10: 449-463.
- BARCISZEWSKA, M.Z.; MASHKOVA, T.D.; KISSELEV, L.L. Y BARCISZEWSKA, J. (1985) "The primary structure of maize and tobacco 5S rRNA." **FEBS Lett.** 192: 289-293.
- BECK, M.A.; HÄBERLEIN, H. (1999) "Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*". **Phytochemistry** 50(2): 329-332.

BENNETT, R. I. & SMITH, A. G. (1991) "The complete nucleotide sequence of the intergenic spacer region of an rDNA operon from *Brassica oleracea* and its comparison with other crucifers". **Plant Molecular Biology** 16: 1095-1098.

BELITZ, H.D. Y GROSCH, W. (1992) "Química de los Alimentos". Ed. Acribia S.A. Zaragoza. 2ª Ed. 1087 pp.

BENA, G.; JUBIER, M.F.; OLIVIERI, I. Y LEJEUNE, B. (1998) "Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic análisis of *Medicago* (*Leguminosae*)". **J. Mol. Evol.** 46: 299-306.

BENIGNI, R.; CAPRA, C. & CATTORINI, P.E. (1962) "*Plante Medicinali. Chimica Farmacologia e Terapia*". Ed. Inverni & Della Beffa. Milano.

BENJUMEA, D.; ABDALA, S.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; PÉREZ-PAZ, F. & MARTÍN HERRERA, D. (2005) "Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species". **Journal of Ethnopharmacology** 100: 205-209.

BERNARDO, R. R.; VENTURA, A.; PARENTE, J. P. (1996) "Steroidal saponins from *Smilax officinalis*". **Phytochemistry** 43(2): 465-469.

BLANCA LÓPEZ G. & VALLE TENDERO, F. (1988) "Origen de la flora nevadense, Especiación. Endemismo." **Monografías de Flora y Vegetación Béticas** 3: 99-110.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; KOHN, L.K.; REHDER, V.L.G.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L. & CARVALHO, J.E. (2005) "Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip." **Phytomedicine** 12: 72-77.

BOBOLA, M.S.; SMITH, D.E. & KLEIN, A.S. (1992) "Five major nuclear ribosomal repeats represents a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *Picea mariana*". **Molecular Biology and Evolution** 9(1): 125-137.

BOISSIER, E. (1838) "*Elenchus Plantarum Novarum minusque cognitarum quas ib itinere hispanico legit*". Genève.

BOISSIER, E. (1839-1845) "*Voyage Botanique dans le midi de l'Espagne pendant l'année 1837*". París.

BORY, J. B. (1820) "*Florule de la Sierra Nevada ou catalogue des plantes observées dans une reconnaissance militaire, faite de Grenade aut sommet appelé Veleta*". **Ann. Gén. Sci. Phys.** 3 : 3-16.

- BUCKLER, E.S. IV Y HOLTSFORD, T.P. (1996a) "Zea systematics: ribosomal ITS evidence". **Molecular Biology and Evolution** 13: 612-622.
- BUCKLER, E.S. IV Y HOLTSFORD, T.P. (1996b) "Zea ribosomal repeat evolution and substitution patterns". **Molecular Biology and Evolution** 13: 623-632.
- BUCKLER, E.S. IV, IPPOLITO, A. & HOLTSFORD, T.P. (1997) "The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications". **Genetics** 145: 821-832.
- BRITTEN, R.J. Y KOHNE, D.E. (1968) "Repeated sequences in DNA". **Science** 161: 529-540.
- CAI, Y.; LUO, Q; SUN, M. & CORKE, H. (2004) "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer". **Life Sciences** 74: 2157-2184.
- CAROTENUTO, A.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MAGNO, S. (1999) "Spirostanol saponins of *Allium porrum* L.". **Phytochemistry** 51: 1077-1082.
- CART, J.; REZNICEK, G.; KORHAMMER, S. & col. (1992) "The first spectroscopically confirmed saponin from *Herniaria glabra*". **Planta Medica** 58: A575-A724.
- CASTROVIEJO, S. et al. (1986-2001) "Flora iberica". Volúmenes I a XIV. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid
- CHEN, M.; WU, W.W.; NANZ, D.; STICHER, O. (1997) "Leonticins D-H, five triterpene saponins from *Leontice kiangnanensis*". **Phytochemistry** 44(3): 497-504.
- COLOMBO, M.L. & BOSISIO, E. (1996) "Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (*Papaveraceae*)". **Pharmacological Research** 33(2): 127-134.
- CONNOR McCARTHY (1996-1998) "Chromas 1.45". School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus. Southport, Queensland, Australia.
- CONRAD, J.; DINCHEV, D.; KLAIBER, I.; MIKA, S.; KOSTOVA, I.; KRAUS, W. (2004) "A novel furostanol saponin from *Tribulus terrestris* of Bulgarian origin". **Fitoterapia** 75: 117-122.
- CUÑADO, N. DE LA HERRÁN, R.; SANTOS, J.L.; RUIZ-REJÓN, C. GARRIDO-RAMOS, M.A. Y RUIZ-REJÓN, M. (2000) "The evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons". **Molecular Biology and Evolution** 18 (1): 432-436.
- DAS, UNDURTI N. (2001) "Nutritional factors in the pathobiology of human essential hypertension". **Nutrition** 17(4): 337-346.
- DASGUPTA, N. & DE, B. (2007) "Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study". **Food Chemistry** 101: 471-474.

DEBELLA, A.; HASLINGER, E.; KUNERT, O.; MICHL, G.; ABEBE, D. (1999) "Steroidal saponins from *Asparagus africanus*". **Phytochemistry** 51: 1069-1075.

DEBELLA, A.; HASLINGER, E.; SCHMID, M.G.; BUCAR, F.; MICHL, G.; ABEBE, D.; KUNERT, O. (2000) "Triterpenoid saponins and sapogenins lactones from *Albizia gummifera*". **Phytochemistry** 53(4): 885-892.

DE COMBARIEU, E.; FUZZATI, N.; LOVATI, M.; MERCALLI, E. (2003) "Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*". **Fitoterapia** 73: 583-591.

DE JONG, A.; PLAT, J. & MENSINK, R.P. (2003) "Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review)". **Journal of Nutritional Biochemistry** 14: 362-369.

DE LA HERRÁN, R.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; NAVAS, J.I.; RUIZ-REJÓN, C. Y RUIZ-REJÓN, M. (2000) "Molecular characterization of the ribosomal gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for molecular diagnosis". **Parasitology** 120: 345-353.

DESFEUX, C. Y LEJEUNE, B. (1996) "Systematics of Euromediterranean *Silene* (*Caryophyllaceae*): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequences". **C.R. Acad. Sci. III** 319: 351-358.

DÍAZ DE LA GUARDIA, C; MORALES, C. & VALLE, F. (1982) "Nota sobre algunas *Arenarias* endémicas de España". **Biologie-Écologie Méditerranéenne** 9 : 161-168.

DOVER, G. (1982) "Molecular drive: a cohesive mode of species evolution". **Nature** 299: 111-117.

DOVER, G. (1986) "Molecular drive in multigenic families: how biological novelties arise, spread and are assimilated". **Trends in Genetics** 2 : 159-165.

DOYLE, J.J & DOYLE, J.L. (1987) "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.

DROUIN, G. & MONIZ DE SÁ, M. (1995) "The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families". **Mol. Biol. Evol.** 12 (3): 481-493.

EBATA, N.; NAKAJIMA, K.; HAYASHI, K.; OKADA, M.; MARUNO, M. (1996) "Saponins from the root of *Bupleurum falcatum*". **Phytochemistry** 41(3): 895-901.

ELGAMAL, M. H. A.; SHAKER, K. H.; PÖLLMAN, K.; SEIFERT, K. (1995) "Triterpenoid saponins from *Zigophyllum* species". **Phytochemistry** 40(4): 1233-1236.

ELGAMAL, M.H.A.; SOLIMAN, H.S.M.; ELMUNAJJED, D.T.; TOTH, G.; SIMON, A.; DUDDECK, H. (1997) "Structures of two novel triterpene saponins from *Arenaria filicaulis* (Boiss.)". **Magnetic Resonance in Chemistry** 35: 637-642.

- ELGAMAL, M. H. A.; SOLIMAN, H.S.M.; ELMUNAJJED, D.T.; TOTH, G.; SIMON, A.; DUDDECK, S. (1998) "Two triterpene saponins from *Arenaria filicaulis*". **Phytochemistry** 49(1): 189-193.
- ESCALANTE, A. M.; SANTECHI, C. B.; LOPEZ, S.; GATTUSO, M. A.; GUTIÉRREZ-RAVELO, A.; DELLE MONACHE, F.; GONZÁLEZ-SIERRA, M.; ZACCHINO, S. A. (2002) "Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk". **Journal of Ethnopharmacology** 82(1): 29-34.
- ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; ABDEL-KHALIK, S.M.; SOLIMAN, H.S.M.; MAHMOUD, I.; LONG, C. (2005) "Saponins from the leaves of *Mimusops laurifolia*" **Journal of Natural Products** 68(6): 832-841.
- ESKANDER, J.; LAVAUD, C.; POUNY, I.; SOLIMAN, H.S.M.; ABDEL-KHALIK, S.M.; MAHMOUD, I.I. (2006) "Saponins from the seeds of *Mimusops laurifolia*". **Phytochemistry** 67(16): 1793-1799.
- FACINO, R.M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; BERTI, F.; ROSSONI, G.; BOMBARDELLI, E. & MORAZZONI, P. (1999) "Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischæmic damage in rats". **Life Science** 64: 627-642.
- FAVARGER, C. (1962a) "Contribution à l'étude cytologique des genres *Minuartia* et *Arenaria*". **Bull. Soc. Neuchateloise Sci. Nat.** 85 : 53-81.
- FAVARGER, C. (1962b) "L'évolution parallèle du caryotype" **Rev. Cytol. Biol. Vég.** 25: 277-286.
- FAVARGER, C. (1972) "Sur quelques *Arenaria* d'Europe et d'Asie occidentale". **Bot. Not.** 125 : 465-476.
- FELSENSTEIN, J. (1985) "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap". **Evolution** 39: 783-791.
- FERNÁNDEZ, M. & NIETO, A. (1982) "Plantas Medicinales". Ed. Eunsa. Pamplona.
- FERRO, E.A.; ALVARENGA, N.L.; IBARROLA, D.A.; HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; RAVELO, A.G. (2005) "A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots". **Fitoterapia** 72: 577-579.
- FLAVELL, R.B. (1986) "Repetitive DNA and chromosome evolution in plants". **Phil. Trans. Roy. Soc.** 312B: 227-242.
- FONT QUER, P. (1946a) "Acerca de dos arenarias litigiosas". **Collect. Bot. Barcelona** 1: 33-39.

FONT QUER, P. (1946b) "*Sertulum Cavanillesianum enneanthum*". **Anales Jardín Botánico Madrid** 6 : 487-489.

FONT QUER, P. (1948) "Morfología, nomenclatura y geografía de l'*Arenaria aggregata* (L.) Loisel". **Arxivs Secc. Ci. Inst. Estud. Catalans** 15: 1-45.

FUERTES AGUILAR, J. & NIETO-FELINER, G. (2003) "Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Plumbaginaceae*)". **Molecular Phylogenetics and Evolution** 28(3): 430-447.

FULCHERI, C.; MORARD, P.; HENRY, M. (1998) "Stimulation of the growth and the triterpenoid saponin accumulation os *Saponaria officinalis* Cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media". **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46(5): 2055-2061.

GAIDI, G.; MIYAMOTO, T. Y LACAILLE-DUBOIS, M.A.. (2001) "Juncenosides A-C, new triterpene saponins from *Arenaria juncea*". **Journal of Natural Products** 64: 1533-1537.

GALISTEO MOYA, M. M. (1997) "*Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire: Estudio Farmacognóstico". Tesis Doctoral Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N.C.; TAVAZZI, B. & GALVANO, G. (2004) "Cyanidins: metabolism and biological properties". **Journal of Nutritional Biochemistry** 15: 2-11.

GANZERA, M.; GAMPENRIEDER, J.; PAWAR, R.S.; KHAN, I.A.; STUPPNER, J. (2004) "Separation of the major saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography". **Analytica Chimica Acta** 516: 149-154.

GARAI, S.; MAHATO, S. B.; OTAN, K.; YAMASAKI, K. (1996) "Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*". **Phytochemistry** 42(3): 815-820.

GARRIDO-RAMOS, M.A.; JAMILINA, M.; LOZANO, R.; RUIZ-REJÓN, C. Y RUIZ-REJÓN, M. (1992) "A cytogenetical and molecular análisis of the ribosomal cistrons of *Allium sphaerocephalon* L. (*Liliaceae*)". **Heredity** 69: 43-49.

GHISALBERTI, E.L. (2004) "The *Goodeniaceae*". **Fitoterapia** 75: 429-446.

GIBBS, R.D. (1950) "Botany, an evolutionary approach", Blakiston, Philadelphia. Cited in Brodie, H.J. (1951) *op. cit.*

GOHAR, A. A.; MAATOOQ, G. T. & NIWA, M. (2000) "Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*". **Phytochemistry** 53: 299-303.

- GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E. & VILLAR, A. (2000) "Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants". **Journal of Ethnopharmacology** 70: 329-333.
- GONZÁLEZ HERRERA, M. (1992) "Estudio farmacognóstico de la hoja de *Olea europaea* L.". Tesis Doctoral Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- GONZÁLEZ-TEJERO GARCÍA, M.R. (1989) "Investigaciones etnobotánicas en la provincia de Granada". Tesis Doctoral Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. 451 pp.
- GONZÁLEZ-TEJERO, M.R. (1989) "New contribution to the Ethnopharmacology of Spain" **Journal of Ethnopharmacology** 43 (157-165): 1995.
- GOYDER, D. J. (1986) "Biosystematics and pollination ecology of *Arenaria* sect. *Plinthine* Reichenb. Mc Neill." Unpublished Ph. D. Thesis. University of Reading.
- GOYDER, D.J. (1987) "Observations on the geographical distribution, reproductive biology of *Arenaria alfacarensis* Pamp". **Anales del Jardín Botánico de Madrid** 44(2): 285-297.
- GOYDER, D. J. (1988) "A revision of *Arenaria* sect. *Plinthine* (*Caryophyllaceae*)". **Botanical Journal of the Linnean Society** 97: 9-32.
- GRAUR, D. Y LI, W.H. (1999) "Fundamentals of molecular evolution". 2<sup>nd</sup> Edition, Sinauer Associates, inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- GREUTER, W., BURDET, H. M. & LONG, G. (Eds.)(1984) Med. Checklist 1. *Pteridophyta* (ed. 2), Gymnospermae, Dicotyledones (*Acanthaceae-Cneoraceae*). Genève.
- GUIL GUERRERO, J.L.; GIMÉNEZ MARTÍNEZ, J.J. Y TORIJA ISASA, M.E. (1998) "Mineral nutrient composition of edible wild plants". **Journal of Food Composition and Analysis** 11: 322-328.
- GUILLET, D.; SÉRAPHIN D.; RONDEAU, D.; RICHOME, P. & BRUNETON, J. (2001) "Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*". **Phytochemistry** 58: 571-575.
- GUNIMKA, O.; OLESZEK, W. (1998) "Triterpene saponins from the aerial parts of *Dianthus caryophyllus* var. *remontant* Hort". **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 67(1): 65-68.
- HALOUI, M.; LOUEDEC, L.; MICHEL, J.B. Y LYOUSSI, B. (2000) "Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*". **Journal of Ethnopharmacology** 71: 465-472.
- HARAGUCHI, M.; M.; MIMAKI, Y.; MOTIDOME, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. (2000) "Steroidal saponins from the leaves of *Cestrum sendtnerianum*". **Phytochemistry** 55: 715-720.

HARDMAN, R.; BENJAMÍN, T. V. (1976) "The co-occurrence of ecdysones with bufadienolides and steroidal saponins in the genus *Helleborus*." **Phytochemistry** 15(10): 1515-1516.

KARPPANEN, H. & MERVAALA, E. (2006) "Sodium Intake and Hypertension". **Progress in Cardiovascular Diseases** 49(2): 59-75.

HÄSSIG, A.; LIANG, W.X.; SCHWABL, H. & STAMPFLI, K. (1999) "Flavonoid and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character". **Medical Hypotheses** 52(5): 479-485.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R. & PANTHONG, A. (2001) "Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*". **Journal of Ethnopharmacology** 78: 45-49.

HE, Z.; QIAO, C.; HAN, Q.; WANG, Y.; YE, W.; XU, H. (2005) "New triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*". **Tetrahedron** 61: 2211-2215.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R. & BOBILYA, D.J. (2002) "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships". **Journal of Nutritional Biochemistry** 13: 572-584.

HEYWOOD, V.H. (1953) "Studies of the flora and vegetation of the Sierra de Cazorla". Unpublished PhD. thesis, University of Cambridge.

HESLOP-HARRISON, J.S. (2000) "Comparative genome organization in plants: from sequence amd makers to chromatin and chromosomes". **Plant Cell**. 12(5): 617-636.

HIGGINS, D.G. Y SHARP, P.M. (1988) "CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer". **Gene** 73: 237-244.

HIKINO, H.; OHSAWA, T.; KISO, Y.; OSHIMA, Y. (1984) "Analgesic and antihepatotoxic actions of dianosides, triterpenoid saponins of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* Herbs." **Planta Medica** 50(4): 353-355.

HU, M. ; OGAWA, K. ; SASHIDA, Y. ; XIAO, P.G. (1995) "Triterpenoid saponins from root bark of *Aralia armata*". **Phytochemistry** 39(1): 179-184.

HUAN, V.D.; YAMAMURA, S.; OHTAN, K.; KSAI, R.; YAMSAKI, K.; NHAM, N.T.; CHAU, H.M. (1997) "Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa*". **Phytochemistry** 47(3): 451-457.

HUANG, X; KONG, L. (2006) "Steroidal saponins from the roots of *Asparagus officinalis*". **Steroids** 71: 171-176.

HUANG, J.; OGIHARA, Y.; ZHANG, H.; SHIMIZU, N. ; TAKEDA, T. (2000) "Triterpenoid saponins from *Ardisia mamillata*". **Phytochemistry** 54: 817-822.



- IELPO, M.T.L.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M.M.; RICCIARDI, L. & VUOTTO, M.L. (2000) "Immunopharmacological properties of flavonoids". **Fitoterapia** 71: S101-S109.
- JIA, Z.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T. (1998) "Mayor triterpenoid saponins from *Saponaria officinalis*". **Journal of Natural Products** 61: 1368-1373.
- JIA, Z.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T. (1999) "Saponarioside C, the first  $\alpha$ -D-galactose containing triterpenoid saponin, and five related compounds from *Saponaria officinalis*". **Journal of Natural Products** 62: 449-453.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. (2002) **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. U.S.A.
- KAWASHIMA, L. M. & VALENTE SOARES, L. M. (2003) "Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil". **Journal of Food Composition and Analysis** 16: 605-611
- KINGSTON, D.G.I. (1979) "High Performance Liquid Chromatography of Natural Products". **Journal of Natural Products** 42(3): 237-260.
- KOIKE, K.; LI, H.; JIA, Z.; MURAKOA, H.; FUKUI, S.; INOUE, M.; OHMOTO, T. (1994) "Triterpenoid saponins from *Dianthus chinensis*". **Tetrahedron** 50(45): 12811-12820.
- KOIKE, K.; JIA, Z.; NIKAIDO, T. (1998) "Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*". **Phytochemistry** 47(7): 1343-1349.
- KOIKE, K.; JIA, Z.; NIKAIDO, T. (1999) "New triterpenoid saponins and sapogenins from *Saponaria officinalis*". **Journal of Natural Products** 62: 1655-1659.
- KONG, J.M.; CHIA, L.S.; GOH, N.K.; CHIA, T.F. & BROUILLARD, R. (2003) "Analysis and biological activities of anthocyanins". **Phytochemistry** 64: 923-933.
- KRIEGER, J.; HETT, A. K.; FUERST, P.A.; BIRSTEIN, V.J. & LUDWIG, A. (2006) "Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the *Acipenseridae*". **Journal of Heredity** 97: 218-225.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JACOBSEN, I.B. & NEI, M. (2001) "MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software", Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- KYNDT, T.; VAN DROOGENBROECK, B.; ROMEIJN-PEETERS, E.; ROMERO-MOTOCHI, J.P.; SCHEDELMAN, X.; GOETGHEBEUR, P.; DAMME, P.V. & GHEYSEN, G. (2005) "Molecular phylogeny and evolution of *Caricaceae* based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast séquence data." **Mol. Phyl. Evol.** 37 (2): 442-459.

LACAILLE-DUBOIS, M.A., HANQUET, B.; CUI, Z.H.; LOU, Z.C.; WAGNER, H. (1995) "Acylated triterpene saponins from *Silene jensseensis*". **Phytochemistry** 40(2): 509-514.

LACAILLE-DUBOIS, M.A., HANQUET, B.; CUI, Z.H.; LOU, Z.C.; WAGNER, H. (1997) "Jensseensosides C and D, biologically active acylated triterpene saponins from *Silene jensseensis*". **Phytochemistry** 45(5): 985-990.

LAGASCA, M. & RODRÍGUEZ, J.M. (1802) "Descripción de algunas plantas que colectó D. Guillermo Thalacker en Sierra Nevada". **Anales Ci. Nat.** 5 :263-278.

LAPITÁN, N.L. (1992) "Organization and evolution of higher plant nuclear genomes". **Genome** 35: 171-181.

LARHSINI, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. (2003) "Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*". **Fitoterapia** 74: 237-241.

LEE, K.H.; CHAI, H.B.; TAMEZ, P.A.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A.; WIN, K.K. & TIN-WA, M. (2003) "Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*". **Phytochemistry** 64: 535-541.

LEWIN, B. (2004) Genes VIII. Pearson/Prentice may, Upper Saddle River, New York.

LI, H-Y. ; KOIKE, K. ; OHMOTO, T. (1994) "Triterpenoid saponins from *Dianthus chinensis*". **Phytochemistry** 35: 751-756.

LINDER, C. R.; GOERTZEN, L. R.; HEUVEL, B. V.; FRANCISCO ORTEGA, J. & CANSEN, R. K. (2000) "The complete external transcribed spacer of 18S-26S r DNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in *Asteraceae* and closely allied families". **Molecular Phylogenetics and Evolution** 14: 285-303.

LINNÉ, C. von. (1762-63) "*Species Plantarum*". Ed. 2. Holmiae.

LÓPEZ GONZÁLEZ, G. (1982) "Una nueva subespecie de *Arenaria armerina* Bory [Subgen. *Arenaria* Sect. *Plinthine* (Reichenb.) Mc Neill]". **Anales del Jardín Botánico de Madrid** 39 (1): 207-208.

LOPEZ GONZÁLEZ, G. (1990) *Arenaria* in Castroviejo, S.; Lainz, M.; López González, G.; Monserrat, P.; Muñoz Garmendia, F.; Paiva, J. Y Villar, L. (Eds.). **Flora Ibérica** Vol. II: 183-202. CSIC, Real Jardín Botánico de Madrid, Madrid. España.

LÓPEZ, G. & NIETO-FELINER, G. (1983) "*Arenaria tetraquetra* L., s.str., en el Sistema Central (Sierra de Pela)". **Anales del Jardín Botánico de Madrid** 40(1): 282-283.

LÓPEZ, G. & NIETO-FELINER, G. (1986) "Apuntes para un tratamiento taxonómico del género *Arenaria* L. en la Península Ibérica y Baleares". **Anales Jardín Botánico de Madrid** 42 (2): 343-361.

- MBARK, AN.; CHAROUF, Z.; WRAY, V.; NIMTZ, M. & SCHOPKE, T. (2000) "Monodesmosidic saponins from *Herniaria hirsuta*". **Pharmazie** 55(9): 690-692.
- MACHADO, T.B.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.; LEAL, I.C.R.; SILVA, M.G.; AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M. & NETTO-DOSSANTOS, K.R. (2003) "In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". **International Journal of Antimicrobial Agents** 21: 279-284.
- MAGGINI, F.; FREDIANI, M. Y GELATI, M.T. (2000) "Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Picea abies* Karst." **DNA seq.** 11(1-2): 87-89.
- MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. (1988) "Triterpenoid saponins". **Phytochemistry** 2(10): 3037-3067.
- MARTÍNEZ LIROLA, M.J.; GONZÁLEZ-TERJERO GARCÍA, M.R. & MOLERO MESA, J. (1997) "Investigaciones etnobotánicas en el Parque Natural del cabo de Gata-Níjar". **Sociedad Almeriense de Historia Natural**. 472 pp.
- MC NEILL, J. (1962) "Taxonomic studies in *Alsinoidea*: I. Generic and Infrageneric groups". **Notes Roy. Bot. Gard. Edinburg** 24(2): 79-155.
- MESELHY, M. (1998) "Hopane-type saponins from *Policarpon succulentum*-II". **Phytochemistry** 48(8): 1415-1421.
- MELEK, F.R.; MIYASE, T.; EL-GINDI, O.D.; ABDEL-KHALIK, S.S.; HAGGAG, M.Y. (1996) "Saponins from *Fagonia mollis*". **Phytochemistry** 42(5): 1405-1407.
- MELEK, F.R.; MIYASE, T.; ABDEL KHALIK, S.M.; EL-GINDI, M.R. (2003) "Triterpenoid saponins from *Scheffera arboricola*". **Phytochemistry** 63: 401-407.
- MELEK, F.R.; MIYASE, T.; GHALY, N.S.; YOUSIF, M.F. (2004) "Further saponins from *Meryta lanceolata*". **Phytochemistry** 65: 909-914.
- MESELHY, M. (1998) "Hopane-type saponins from *Policarpon succulentum*-II" **Phytochemistry** 48(8): 1415-1421.
- C.I.I. (Comité Inter-Institutos para el estudio de técnicas analíticas) (1969) "Métodos de referencia para la determinación de elementos minerales en vegetales. I. N, P, K, Na, Ca y Mg". **Anales de Edafología y Agrobiología** 28: 409-430.
- MIMAKI, Y.; KURODA, M.; KAMEYAMA, A.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. (1998) "Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells". **Phytochemistry** 48(3): 485-493.

MIMAKI, Y.; SATOU, T.; KURODA, M.; SASHIDA, Y.; HATAKEYAMA, Y. (1999) "Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium candidum*". **Phytochemistry** 51, 567-573.

MIRÓ JODRAL, M. (1981) "Screening fitoquímico en plantas superiores. Detección de su actividad antiinflamatoria y antimicrobiana". Tesis Doctoral. Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

MIYASE, T.; SUTOH, N.; ZHANG, D.M.; UENO, A. (1996) "Araliasaponins XII-XVIII, triterpene saponins from the roots of *Aralia chinensis*". **Phytochemistry** 42(4): 1123-1130.

MORENO-ROJAS, R.; DÍAZ-VALVERDE M. A.; MORENO ARROYO, B.; JARILLO GONZÁLEZ, T.; & BARBA CAPOTE, C.J. (2004) "Mineral content of gurumelo (*Amanita ponderosa*)". **Food Chemistry** 85: 325-330.

MOSTAD, H.; DOEHL, J. (1987) "Separation and characterization of oleanene-type pentacyclic triterpenes from *Gypsophila arrostii* by liquid chromatography-mass spectrometry". **Journal of Chromatography** 396, 157-168.

MOON, Y.J.; WANG, X. & MORRIS, M.E. (2006) "Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism". **Toxicology in vitro** 20: 187-210.

MUIR, G.; FLEMING, C. C. & SCHLOTTERER, C. (2001) "Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L." **Molecular Biology and Evolution** 18: 112-119.

NAVARRO, V. & DELGADO, G. (1999) "Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*". **Journal of Ethnopharmacology** 66: 223-226.

NAVARRO, F. B., SUÁREZ-SANTIAGO, V. N. Y BLANCA, G. (2004) "A new species of *Haplophyllum* A. Juss. (*Rutaceae*) from the Iberian Peninsula: evidence from morphological, karyological and molecular analyses". **Ann. Bot (Lond)** 94(4): 571-582.

NEIL, H.A.W. & HUXLEY, R.R. (2002) "Efficacy and therapeutic potential of plant sterols". **Atherosclerosis Supplements** 3: 11-15.

NIETO FELINER, G. (1985) "Datos citotaxonómicos sobre *Arenaria* Sect. *Plinthine* (Reichenb.) McNeill". **Candollea** 40: 471-483.

NIETO FELINER, G. (1994) "Growth-form and taxonomy in *Arenaria* sect. *Plinthine* (Caryophyllaceae)". **Taxon** 43: 45-50.

NIETO FELINER, G.; GUTIÉRREZ-LARENA, B. Y FUERTES AGUILAR, J. (2004) "Finescale geographical structure, intraindividual polymorphism and recombination in nuclear ribosomal internal transcribed spacers in *Armeria* (*Plumbaginaceae*)". **Ann. Bot. (Lond)**. 93(2): 189-200.

- OH, H.; KIM, D.H.; CHO, J.H. & KIM, Y.C. (2004) "Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*". **Journal of Ethnopharmacology** 95: 421-424.
- OHRUI, H.; KINJO, J.; NOHARA, T. (1999) "Triterpenoid saponins from *Vigna angularis*". **Phytochemistry** 51: 1055-1058.
- OLESZEK, W.A. (2002) "Chromatographic determination of plant saponins". **Journal of Chromatography A** 967: 147-162.
- OLESZEK, W.A.; BIALI, Z. (2006) "Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005)". **Journal of Chromatography A** 1112 (1-2): 78-91.
- OPIOLA, T.; SZKARADKIEWICZ, K. Y BARCISZEWSKA, M.Z. (1996) "The nucleotide sequence of ribosomal 5S RNA from sorrel". **Biochimie** 78 (2): 108-110.
- OUYANG, M.A.; WANG, H.Q.; CHEN, Z.L.; YANG, C.R. (1996) "Triterpenoid saponins from *Ilex kudincha*". **Phytochemistry** 43(2): 443-445.
- PALMER, J. D. & HERBON, L. A. (1988) "Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence". **Journal of Molecular Evolution** 28: 87-97.
- PLOVANICH, A. E. & PANERO, J. L. (2004) "A phylogeny of the ITS and ETS for *Montanoa* (Asteraceae: Heliantheae)". **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 815-821.
- PÖLLMAN, K.; GAGEL, S.; ELGAMAL, M.H.A.; SHAKER, K.H.; SEIFERT. (1997) "Triterpenoid saponins from the roots of *Zygophyllum* species". **Phytochemistry** 44(3): 485-489.
- QUIJADA, A. Y LINSTON, A. (1997) "The ribosomal ITS region as a maker to detect hybridization in pines". **Mol. Ecol.** 6 (10): 995-996.
- RAJURKAR, N.S. Y DAMAME, M.M. (1998) "Mineral content of medicinal plants used in the treatment of diseases resulting from urinary tract disorders". **Appl. Radiat. Isot.** 49: 773-776.
- RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; LANGLOIS, A. & MULHOLLAND, D.A. (2006) "Investigations of the Malagasy species *Tachiadenus longiflorus* Grisebach (Gentianaceae): Linking chemical finding and traditional usage". **Journal of Ethnopharmacology** 105: 456-458.
- RAWALD, H.W.; JANBEN, B. (1988) "Improved isolation and HPLC/TLC analyses of major saponins from *Ruscus aculeatus*". **Planta Medica** 54(6): 581.
- Real Farmacopea Española 3º Ed. (2005). **Real Academia Nacional de Medicina**. 3398 pp.
- REEDER, R.H. (1990) "rRNA synthesis in the nucleolus". **Trends in Genetics** 12: 390-395.

REICHENBACH, H.G.L. (1837) "Handbuch des natürlichen Pflanzensystems...". Dresden und Leipzig.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; RAMÍREZ-APAN, T.; AMEKRAZ, A.; AMUELAS, A.; JANKOWSKI, C.K. & VÁZQUEZ-TORRES, M. (2004) "Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*". **Life Sciences** 75: 1635-1647.

REZNIZEC, G.; FREILER, M.; SCHADER, M.; SCHMIDT, U. (1996) "Determination of the content and the composition of the main saponins from *Solidago gigantea* AIT. using high-performance liquid chromatography". **Journal of Chromatography A** 755: 133-137.

RHIOUANI, H.; SETTAF, A.; LYOUSSE, B.; CHERRAH, Y.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; HASSAR, M. (1999) "Effects of saponins from *Herniaria glabra* on blood pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats". **Thérapie** 54: 735-739.

RIVAS MARTÍNEZ, S.; ASENSI, A.; MOLERO MESA, J. & VALLE, F. (1991) "Endemismos vasculares de Andalucía". **Rivasgodaya** 6: 5-76

RIVAS MARTÍNEZ, S.; ASENSI, A.; DÍEZ, B.; MOLERO MESA, J. & VALLE, F. (1997) "Biogeographical synthesis of Andalusia (southern Spain)". **Journal of Biogeography** 24: 915-928.

RIVAS MARTÍNEZ, S.; DÍAZ, T.E.; FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, F.; IZCO, J.; LOIDI, J.; LOUSA, M. & PENAS, A. (2002a) "Vascular plant communities of Spain and Portugal". **Itinera Geobot.** 15 (1): 5-432.

RIVAS MARTÍNEZ, S.; DÍAZ, T.E.; FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, F.; IZCO, J.; LOIDI, J.; LOUSA, M. & PENAS, A. (2002b) "Vascular plant communities of Spain and Portugal". **Itinera Geobot.** 15 (2): 433-922.

RIVAS MARTÍNEZ, S. Y COAUTORES (2007) "Mapa de series, geoseries y geopermaseries de vegetación e España". **Itinera Geobotánica** 17: 5-436.

ROGERDS, S.O. Y BENDICH, A.J. (1987) "Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer". **Plant Mol. Biol.** 9 : 509-520.

RONSTED, N.; LAW, S., THORNTON, H.; FAY, M.F. Y CHASE, M.W. (2005) "Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lillium* (*Liliaceae*, Liliales) and the infragenicclassification of *Fritillaria*". **Mol. Phyl. Evol.** 35(3): 509-527.

RUGGIERO, M.V. & PROCACCINI, G. (2004) "The rDNA ITS region in the lessepsian marine angiosperm *Halophila stipulacea* (Forssk.). Aschers (*Hydrocharitaceae*): intragenomic variability and putative pseudogenic sequences". **Journal of Molecular Evolution** 58: 115-121.

- SAHU, N.P. (1996) "Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*". **Phytochemistry** 41(3): 883-886.
- SAHU, N.P.; MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. (1996) "Triterpenoid saponins from *Gymnema sylvestre*". **Phytochemistry** 41(4): 1181-1185.
- SAITO, N. Y NEI, M. (1987) "The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". **Molecular Biology Evolution** 4: 406-425.
- SAKAI, K.; NAGAO, T.; OKABE, H. (1999) "Triterpenoid saponins from the ground part of *Aster ageratoides* var. *ovatus*". **Phytochemistry** 51: 309-318.
- SAKURAI, N.; NAKAGAWA-GOTO, K.; ITO, J.; SAKURAI, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.F.; GRAGG, G. & LEE, K.H. (2006) "Cytotoxic *Alangium* alkaloids from *Alangium longiflorum*". **Phytochemistry** 67: 894-897.
- SAMUELSEN, A.B. (2000) "The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review". **Journal of Ethnopharmacology** 71: 1-21.
- SANGER, F.; NIKLEN, S. Y COULSON, A.R. (1977) "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 74: 5463-5467.
- SANOKO, R.; SPERANZA, G.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. (1999) "Triterpene saponins from *Alternanthera repens*". **Phytochemistry** 51: 1043-1047.
- SAUTOUR, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE-DUBOIS, M.A. (2006). "Steroidal saponins and flavan-3-ol glycosides from *Dioscorea villosa*". **Biochemical Systematics and Ecology** 34: 60-63.
- SCHÖPKE, T.; AL-TAWAHA, C.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; MEYER, A.; HILLER, K. (1995) "Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Aster bellidiastrum*". **Phytochemistry** 40(5): 1489-1492.
- SCHÖPKE, T.; AL-TAWAHA, C.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; HILLER, K. (1997) "Triterpenoid saponins from *Aster bellidiastrum*". **Phytochemistry** 45(1): 125-132.
- SCHRÖDER, H.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; REZNICEK, G.; CART, J.; JURENITSCH, J.; HASLINGER, E. (1993) "A triterpene saponin from *Herniaria glabra*". **Phytochemistry** 34: 1609-1613.
- SCHROEDER, S.; KIM, S.H.; CHEUNG, W.T.; ATERFLINGER, K. Y BREUIL, C. (2001) "Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene". **FEMS Microbiol. Lett.** 195 (2): 163-167.
- SERKEDJIEVA, J. & IVANCHEVA, S. (1999) "Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L.". **Journal of Ethnopharmacology** 64: 59-68.

SHAKER, K.H.; BERNHART, M.; ELGAMAL, M.H.A.; SEIFERT, K. (1999) "Triterpenoid saponins from *Fagonia indica*". **Phytochemistry** 51: 1049-1053.

SHAO, B.; QIN, G.; XU, R.; WU, H.; MA, K. (1996) "Saponins from *Clematis chinensis*". **Phytochemistry** 42(3): 821-825.

SINGER, M.F. & BERG, P. (1991) "Genes and Genomes". University Science Books, California.

SLUPSKI, J.; LISIEWSKA, Z. Y KMIĘCIK, W. (2005) "Contents of macro and microelements in fresh and frozen dill (*Anethum graveolens* L.)". **Food Chemistry** 91: 737-743.

SOLIMAN, H.; ELGAMAL, M.H.A.; SIMON, A.; TOTH, G.; HORVATH, G.; DUDDECK, H. (1999) "A new gypsogenin saponin from *Arenaria filicaulis*". **Journal of Natural Products** 62(6): 885-888.

SOLTIS D. E. & SOLTIS, P. S. (1998) "Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis". En: D.E. Soltis, P.S. Soltis y J.J. Doyle (eds.), *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Pp. 1-42. Chapman and Hall, New York, U.S.A.

SOLTIS D. E.; SOLTIS, P. S. & DOYLE, J. J. (1998) "Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing". Chapman and Hall, New York, U.S.A.

SONG, S.J.; NAKAMURA, N.; MA, C.M. ; HATTORI, M. ; XU, S.X. (2001) "Five saponins from the root bark of *Aralia elata*". **Phytochemistry** 56: 491-497.

STEIN, A.C.; ÁLVAREZ, S.; AVANCINI, C. ; ZACCHINO, S. & VON POSER, G. (2006) "Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae)". **Journal of Ethnopharmacology** 107: 95-98.

SUMIDA, M.; KATO, Y. Y KURABAYASHI, A. (2004) "Sequencing and analysis of the Internal Transcribed Spacers (ITSs) and coding regions in the EcoR I fragment of the ribosomal DNA of Japanese pond frog *Rana nigromaculata*". **Genes Genet. Syst.** 79 (2): 105-118.

SUNTORNUSUK, L. (2002) "Capillary electrophoresis of phytochemical substances". **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 27: 679-698.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y-Z.; CORKE, H. & SUN, M. (2007) "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants". **Food chemistry** 102(3): 938-953.

SUSANNA, A.; GARNATJE, T. & GARCÍA-JACAS, N. (1999) "Molecular phylogeny of *Cheirolophus* (Asteraceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA". **Plant Systematics and Evolution** 214: 147-160.



- TORRES, R.; FAINI, F.; MODAK, B.; URBINA, F.; LABBÉ, C. & GUERRERO, J. (2006) "Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*". **Phytochemistry** 67: 984-987.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. Y HIGGINS, D.G. (1997) "The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". **Nucleic Acid Research** 24: 4876-4882.
- TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; JURANIC, Z.; ZIZAC, Z.; TESEVIC, V.; MACURA, S. & MILOSAVLJEVIC, S. (2006) "Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro". **Phytochemistry** 67: 887-893.
- TUNÓN, H.; THORSELL, W.; MIKIVER, A. & MALANDER, I. (2006) "Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*". **Fitoterapia** 77: 257-261.
- TUTIN, T. G.; HEYWOOD, V. H.; BURGESS, N. A.; MOORE, D. M.; VALENTINE, D. H. WALTERS, S.M. & WEBB, D. A. eds. (1964-1980) "*Flora Europaea I-V*". Cambridge University Press.
- UGURU, M.O.; EVANS, F. (2000) "Phytochemical and pharmacological studies on *Monechma ciliatum*". **Journal of Ethnopharmacology** 73: 289-292.
- VALCÁRCEL, V.; VARGAS, P. & NIETO FELINER, G. (2004) "Phylogeny of the W Mediterranean *Arenaria* section *Plinthine* (Caryophyllaceae) based on nuclear, chloroplast and morphological markers". Systematics and Phylogeny of vascular plant groups with Mediterranean Diversification. **Congress Communication**.
- VALCÁRCEL, V.; VARGAS, P. & NIETO FELINER, G. (2006) "Phylogeny of the W Mediterranean *Arenaria* section *Plinthine* (Caryophyllaceae) based on nuclear, chloroplast and morphological markers". **Taxon** 55 (2): 297-312.
- VALDES, B.; REJDALI, M.; ACHHAL EL KADMIRI, A.; JURY, J. L. & MONTSERRAT, J. M. (2002) "Catalogue des plantes vasculaires du nord du Maroc, incluant des clés d'identification". Vol. I y Vol. II. CSIC. Madrid.
- VAN NUES, R.W.; VENEMA, J.; RIENTJES, M.J.; DIRKS-MULDER, A. Y RAUE, H.A. (1995) "Processing of eukariotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers". **Biochem. Cell. Biol.** 73(11-12): 789-801.
- VANACLOTXA, B. (1992) Plantas Medicinales in ARTECHE, A. & al. "Fitoterapia, Vademécum de Prescripción". Pp. 53-307. Ed. Cita, Bilbao.
- VARGAS, J.; TOH, B.; RIGO, K.; TEREN, J.; HOEKSTRA, R.F. Y KOZAKIEWICZ, Z. (2000) "Phylogenetic análisis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on the sequences of the

internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene". **Fungal Genet. Biol.** 30 (1): 71-80.

WANG, Y.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. (1997) "Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*". **Phytochemistry** 45(4): 811-817.

WEI, X.X.; WANG, X.Q. Y HONG, D.Y. (2003) "Marked intragenomic heterogeneity and geographical differentiation of nrDNA ITS in *Larix potaninii* (Pinaceae)". **Journal of Molecular Evolution** 57: 623-635.

WENDEL, J. F. & DOYLE, J. J. (1998) "Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution". En: D.E. Soltis, P.S. Soltis y J.J. Doyle (eds.), *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Pp. 265-296. Chapman and Hall, New York, U.S.A.

WILLKOMM, H. M. (1855) "*Icones et Descriptiones Plantarum Novarum criticarum et rariorum Europae austro-occidentales praecipue Hispaniae*". 1: 90-101. Lipsiae.

WILLKOMM, H. M. (1878) *Arenaria* L. In: H. M. Willkomm & J. Lange, **Prodromus Florae Hispanicae** 3: 618-622. Stuttgart.

YAGUCHI, E.; MIYASE, T.; UENO, A. (1995) "Mazusaponins I-IV, triterpene saponins from *Mazus miquelii*". **Phytochemistry** 39(1): 185-189.

ZHANG, Z.; KOIKE, K. ; JIA, Z. ; NIKAIDO, T.; GUO, D.; ZHENG, J. (1999) "Triterpenoidal saponins from *Gleditsia sinensis*". **Phytochemistry** 52: 715-722.

ZHAO, P.; LIU, Y.Q.; YANG, C.R. (1996a) "Minor dammarane saponins from *Panax notoginseng*". **Phytochemistry** 41(5): 1419-1422.

ZHAO, W.; XU, R.; QIN, G. ; VAISAR, T.; LEE, M.S. (1996b) "Saponins from *Mussaenda pubescens*". **Phytochemistry** 42(4): 1131-1134.

ZOU, K.; TONG, W.; LIANG, H. ; CUI, J. ; TU, G. ; ZHAO, Y. ; ZHANG, R. (2005) "Diastereoisomeric saponins from *Albizia julibrissin*". **Carbohydrate Research** 340: 1329-1334.