

QUINOLIZIDINE ALKALOIDS IN *Calia secundiflora* (FABACEAE)

ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS EN *Calia secundiflora* (FABACEAE)

Rosario García-Mateos¹, Marcos Soto-Hernández², Fernando Zavala-Chávez³ y Geoffrey Kite⁴

¹Preparatoria Agrícola y ³División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ²Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (msoto@colpos.mx). ⁴Royal Botanical Gardens Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK.

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the alkaloid profile in different tissues analyzed by GC/MS and to contribute to the ecological knowledge of *Calia secundiflora* (patol). Samples of leaves, root and seeds of patol (mescal bean) were collected and field information was recorded in the States of Hidalgo and Querétaro, México, using the point-centered quartered method. Species dominance was calculated (value of importance) and the two locations were compared in species richness, similarity index, and soil data. Seventeen species of plants were found in Hidalgo and 21 in Querétaro; *Flourensia resinosa* and patol dominated the vegetation in Hidalgo, while patol and *Dodonaea viscosa* dominated in Querétaro. The profile of the quinolizidine alkaloids of the samples from Hidalgo was different from that of Querétaro. In the Hidalgo samples, a larger number of structures were identified, of which some had not been detected before in *C. secundiflora*.

Key words: *Dodonaea viscosa*, *Flourensia resinosa*, ecology, fabaceae, habitat, toxicity.

INTRODUCTION

C *alia secundiflora* (Ortega) Yakovlev is a woody member of the Fabaceae distributed in Africa, America and Asia. On the American continent its range extends from the Southwest United States (Hatfield *et al.*, 1977) to the mountains of Oaxaca and Puebla in Southern México (García *et al.*, 1994) and it is relatively abundant in canyons and on slopes in hot, arid and semiarid climates. In México it is recorded in the States of Nuevo León, Coahuila, Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, and Hidalgo (Aguilar and Zolla, 1982). In the last two States it forms part of juniper (*Juniperus* spp.) and pinion pine (*Pinus cembroides* Zucc.) forests, and is given the common names colorín, patol, and pitol. In other States of México it is also called coca, chocolón, frijolillo, and frijolito (Martínez, 1978), while

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue comparar el perfil de alcaloides en diferentes tejidos analizados por CG/EM y contribuir al conocimiento ecológico de *C. secundiflora* (patol). Se recolectaron muestras de patol (hojas, raíz y semillas) y se registró información de campo en Hidalgo y Querétaro, con el método de cuadrantes centrados en un punto a través de transectos. Se calculó la dominancia de especies (valor de importancia) y se compararon ambas localidades mediante riqueza de especies, índice de similitud y datos de suelo. Se registraron 17 especies de plantas en Hidalgo y 21 en Querétaro; *Flourensia resinosa* y el patol dominaron la vegetación en la primera entidad, en tanto que el patol y *Dodonaea viscosa* lo hicieron en la segunda. El perfil de alcaloides quinolizidínicos de muestras de Hidalgo fue diferente de las de Querétaro. En las primeras se identificó un número mayor de estructuras, de las cuales se identificaron algunas no detectadas antes para *C. Secundiflora*.

Palabras clave: *Dodonaea viscosa*, *Flourensia resinosa*, ecología, fabaceae, habitat, toxicidad.

INTRODUCCIÓN

C *alia secundiflora* (Ortega) Yakovlev comprende plantas leñosas de la familia de las leguminosas, distribuidas en África, América y Asia. En el continente americano se encuentra desde el sudoeste de Estados Unidos (Hatfield *et al.*, 1977) a las montañas de Oaxaca y Puebla en el sur de México (García *et al.*, 1994), donde es relativamente abundante en cañones y pendientes en zonas cálidas y áridas y semiáridas. En México se registra en Nuevo León, Coahuila, Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro e Hidalgo (Aguilar y Zolla, 1982). En estos dos últimos Estados forma parte de bosques de enebros (*Juniperus* spp.) y pinos piñoneros (*Pinus cembroides* Zucc.), recibiendo los nombres comunes de colorín, patol y pitol. En otros Estados también se le conoce como coca, chocolón, frijolillo y frijolito (Martínez, 1978), mientras que su nombre en inglés es mezcalt bean. Se le considera una planta medicinal en México, pero se usa escasamente debido a su toxicidad (Aguilar y Zolla, 1982).

Recibido: Abril, 2006. Aprobado: Noviembre, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 161-167. 2007.

the English name is mescal bean. It is considered a medicinal plant in México, but has scarcely been used due to its toxicity (Aguilar and Zolla, 1982).

The phytochemical aspects of *C. secundiflora* in North America and Asia have been widely studied, and its medicinal and toxic properties have been documented since the 1970s. Its main compounds reported are carbohydrates, flavonoids and alkaloids, specifically the toxic alkaloid cytisine and other derivatives of quinolizidine (Hatfield *et al.*, 1977). Goats grazing in piñon pine forests in some areas of Hidalgo and Querétaro are often poisoned when they consume the leaves and seeds of *C. secundiflora* (data not published); intoxications are infrequent in humans but common in cattle, goats, sheep, and horses (Aguilar and Zolla, 1982). However, the phytochemistry of *C. secundiflora* growing in México has not been studied and it is not known whether the chemistry of Mexican populations differ from those of other regions or vary in response to ecological conditions. The ecology of *C. secundiflora* in México has neither been studied specifically, although it is often mentioned in Floras or works on vegetation.

Therefore, the objectives of this study were to compare general ecological characteristics and the quinolizidine alkaloids of *C. secundiflora* at two sites in México in the States of Hidalgo and Querétaro.

MATERIALS AND METHODS

Field work

The site at Hidalgo is on the Cardonal-Santuario Highway in the municipality of Cardonal. The site has secondary vegetation, possibly derived from the disturbance of the *Pinus cembroides* forest, with evidence of intensive grazing principally by goats, resulting in large areas without vegetation. The site is at an altitude of 2130 m on a slope facing SSE and SE with a gradient of about 40°. The site in Querétaro is on the Vizarron-San Joaquin Highway in the municipality of Cadereyta. This is a disturbed piñon forest (*Pinus cembroides*, *P. pinceana* with *Juniperus flaccida*) with evident grazing mainly by cattle and there are few areas with no vegetation. This site has an altitude of 2070 m on a slope facing SE with a gradient of about 45°.

Data of the communities were taken using the point-centered quartered method. The sites were transected along the distribution of *C. secundiflora* and 60 stations were located in each transection. At each station the density, frequency and dominance of each species were recorded from which their index of importance was calculated (Mueller-Dombois and Ellenberg, 1974). The two sites were compared using this index as well as the richness of species and the similarity of their indices of Sorensen to deduce differences between habitats and the sites in general.

At each site, ten *C. secundiflora* individuals spaced at least 50 m apart along a transect were selected and marked. From each

C. secundiflora ha sido ampliamente estudiada en sus aspectos fitoquímicos, en Norteamérica y Asia sus propiedades medicinales y tóxicas se han documentado desde la década de 1970. Sus principales compuestos son carbohidratos y alcaloides, específicamente los alcaloides tóxicos citisina y otros derivados de la quinolizidina (Hatfield *et al.*, 1977). En algunos lugares de Hidalgo y Querétaro las cabras que pastorean en áreas de bosque de pino piñonero suelen envenenarse al consumir hojas o semillas de *C. secundiflora* (datos no publicados). Las intoxicaciones en humanos son poco frecuentes pero son comunes en bovinos, caprinos, ovinos y equinos (Aguilar y Zolla, 1982). Sin embargo, la fitoquímica de *C. secundiflora* que se ubica en México no se ha estudiado y no se sabe si la química de las poblaciones mexicanas difiere de aquellas de otras regiones o varía en respuesta a condiciones ecológicas. La ecología de *C. secundiflora* en México no se ha estudiado específicamente aunque se menciona frecuentemente en trabajos florísticos y de vegetación.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron comparar las características ecológicas generales y los alcaloides quinolizidínicos de *C. secundiflora* entre dos localidades (Hidalgo y Querétaro).

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

El sitio en Hidalgo está en la Carretera Cardonal-Santuario, municipio de Cardonal, y presenta vegetación secundaria con evidencia de pastoreo intensivo por caprinos principalmente, con grandes espacios desprovistos de vegetación. Está a una altitud de 2130 m, en ladera con exposición al SSE y SE con pendiente aproximada de 40°. El sitio en Querétaro está en la carretera Vizarrón-San Joaquín, municipio de Cadereyta, Querétaro, la vegetación es bosque de pinos piñoneros (*Pinus cembroides*, *P. pinceana* con *Juniperus flaccida*) perturbado, con evidencia de pastoreo por bovinos principalmente, con escasos espacios desprovistos de vegetación. Tiene una altitud de 2070 m, en ladera con exposición al SE, con pendiente aproximada de 45°.

Se tomaron datos de las comunidades mediante el método de cuadrantes centrados en un punto, aplicados a través de un transecto en cada localidad a lo largo de la distribución de *C. secundiflora* en cada sitio y 60 estaciones en cada transecto. En cada estación se registró la densidad, frecuencia, y dominancia, de cada especie, de lo cual se calculó el índice de importancia (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Se hicieron comparaciones entre sitios mediante dicho índice, así como de riqueza de especies y el índice de similitud de Sorensen para deducir diferencias entre hábitats y de los sitios en general.

Además, se seleccionaron y marcaron 10 individuos de *C. secundiflora* en cada localidad, todos ellos espaciados al menos 50 m

individual, samples of leaves, roots, and seeds were collected. Environmental data (vegetation, disturbance, and soil) were taken from the communities where the plant grows to estimate density values and make comparisons between the two sites. The comparisons were performed using the variables mentioned and the indices of similarity of Sorensen (Mueller-Dombois and Ellenberg, 1974).

Phytochemical work

Preparation of crude alkaloid extracts

Extracts were prepared following the method described by Games *et al.* (1974). Powdered dry samples (depending on the availability of tissue, Table 1) were defatted with hexane and the dried residue was extracted with methanol in a Soxhlet for 48 h; the methanolic extract was evaporated under vacuum, and the residue taken up in sulphuric acid. The acidic solution was extracted with CH_2Cl_2 to remove traces of fat. The aqueous phase was basified with NaHCO_3 to pH 8, and was extracted with CH_2Cl_2 (100 mL 3 \times) to give a CH_2Cl_2 fraction of the free alkaloids. The solvent of the sample was evaporated and the residue was dried in a desiccator.

Analysis and identification of alkaloids

Thin-layer chromatography (TLC) was used for the preliminary confirmation of the presence of alkaloids. TLC was undertaken using silica gel 60 GF₂₅₄ aluminium plates (Merck) and a mobile phase of 8:2 dichloromethane/methanol. The plates were observed under ultraviolet light and then developed with the Dragendorff reagent. Alkaloids were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Perkin-Elmer Turbo Mass quadrupole GC-MS fitted with a 30 m \times 0.25 mm (i.d.) \times 0.25 μm DB1-MS (J & W Scientific) capillary column. Injections of 1 μL each (split 1:10) were vaporized at 250 °C using a temperature gradient of 120-320 °C at 6 °C min⁻¹ with 1 mL min⁻¹ helium carrier gas. Mass spectra following electron ionization (70 eV; source temperature 180 °C) were recorded at 0.75 s/scan in the range *m/z* 38-600. To identify the quinolizidine alkaloids, the mass spectra and retention indices were compared with published data (Table 2) (Wink, 1993; Wink *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

In the two sites, 33 species from 26 genera of 14 families were recorded. Along the transection in the Hidalgo site, 17 bushy and herbaceous plant species were recorded. According to the data of value of importance (V.I.), the vegetation was dominated by *Flourensia resinosa* (25% dominance) and *C. secundiflora* (21% dominance). In the Querétaro transection, 21 bushy and herbaceous species were recorded with the dominant species being *C. secundiflora* (V.I.=30%) and *Dodonaea viscosa* (V.I.=12%) (Table 1). Several authors (Hiriart and Gonzalez, 1983; Argüelles *et al.*, 1991; Zamudio *et*

entre sí a través de un transecto. De cada uno se seleccionaron muestras de hojas, raíces y semillas. Se tomaron datos ambientales (vegetación, disturbio y suelo) de las comunidades donde crece con la finalidad de estimar valores de densidad y hacer comparaciones entre ambas localidades. Las comparaciones se realizaron mediante las variables mencionadas e índices de similitud de Sorensen (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974).

Trabajo fitoquímico

Preparación de extractos crudos de alcaloides

Los extractos se prepararon conforme al método descrito por Games *et al.* (1974). La muestra en polvo (dependiendo de la cantidad de tejido, Cuadro 1), se desgrasó con hexano y el residuo seco se extrajo de metanol en un Soxhlet durante 48 h; el extracto metanólico se evaporó con vacío y el residuo se tomó en ácido sulfúrico. La solución ácida se extrajo con CH_2Cl_2 para eliminar trazas de grasa. La fase acuosa se basificó con NaHCO_3 hasta pH 8 y se extrajo con CH_2Cl_2 (100 mL \times 3) para dar la fracción de alcaloides libres en CH_2Cl_2 . Se evaporó el disolvente y el residuo se secó en un desecador.

Análisis e identificación de alcaloides

La confirmación preliminar de la presencia de alcaloides se hizo con cromatografía en capa fina (CCF). Para CCF se usaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 GF₂₅₄ (Merck); el eluyente fue diclorometano: metanol 8:2. Las placas se observaron con luz ultravioleta y luego se revelaron con el reactivo de Dragendorff. Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-EM) usando un cromatógrafo Perkin Elmer Turbo Mass cuadrupolo DB1-MS 0.25 μm (J & W Scientific) equipado con una columna capilar de 30 m \times 0.25 mm (di) \times 0.25 μm . Se vaporizaron inyecciones de 1 μL (split 1:10) a 250 °C y se usó un gradiente de temperatura de 120 a 320 °C a 6 °C (min⁻¹) con una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ con helio como gas acarreador. Los espectros de masas por ionización de electrón (70 eV; temperatura de la fuente 180 °C) se registraron a 0.75 s/scan en un rango *m/z* de 38-600. Para identificar los alcaloides quinolizidínicos se compararon los espectros de masas y los índices de retención con datos publicados (Cuadro 2, Wink 1993; Wink *et al.* 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registraron 33 especies de 26 géneros de 14 familias en ambos sitios. En el transecto trazado en el sitio de Hidalgo se registraron 17 especies de plantas arbustivas y herbáceas. De acuerdo con los datos de valor de importancia (V.I.), la vegetación estuvo dominada por *Flourensia resinosa* (25% de dominancia) y *C. secundiflora* (21% de dominancia). En el transecto del sitio de Querétaro se registraron 21 especies de plantas arbustivas y herbáceas; las especies dominantes

Table 1. Value of importance (%) figures for species at Cardonal, Hidalgo and Cadereyta, Querétaro.
Cuadro 1. Valor de importancia (%) para especies en Cardona, Hidalgo y Cadereyta, Querétaro.

| Species | Hidalgo | Querétaro |
|---|---------|-----------|
| <i>Calia secundiflora</i> (Ort.) Yakovlev | 21 | 30 |
| <i>Flourenzia resinosa</i> (Brandege) Blake | 25 | - |
| <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. | 6 | 12 |
| <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Mart.) Cons. | 13 | - |
| <i>Portlandia ghesbreghtiana</i> Baill. | 10 | - |
| <i>Jatropha dioica</i> Cerv. | 1 | 6 |
| <i>Montanoa tomentosa</i> Cerv. | 1 | 6 |
| <i>Mammillaria</i> sp. (1) | 6 | - |
| <i>Mimosa biuncifera</i> Benth. | - | 5 |
| <i>Sclerocarpus uniserialis</i> (Hook) Benth. | - | 5 |
| <i>Zinnia peruviana</i> (L.) L. | - | 5 |
| <i>Eupatorium spinosarum</i> A. Gray. | - | 4 |
| <i>Verbesina parviflora</i> (HBK.) Blake | - | 4 |
| <i>Erioneuron pulchellum</i> (HBK.) Teteuka | - | 3 |
| <i>Karwinskia mollis</i> Schlecht. | - | 3 |
| <i>Lantana velutina</i> Mart. & Gal. | 3 | - |
| <i>Setaria grisebachii</i> Fourn. | - | 3 |
| <i>Eupatorium calophyllum</i> (Greenr.) H. Rob. | - | 2 |
| <i>Opuntia tunicata</i> (Lehm.) Link & Otto | 3 | - |
| <i>Bouvardia terniflora</i> (Cav.) Schlecht. | 2 | 3 |
| <i>Opuntia rastrera</i> Web. | 2 | - |
| <i>Machaonia coulterii</i> (Hook f.) Steud | 2 | - |
| <i>Ferocactus</i> sp. | 2 | - |
| <i>Randia capitata</i> DC. R. T. | - | 2 |
| <i>Tecoma stans</i> (L.) HBK. | - | 2 |
| <i>Forestiera cf. angustifolia</i> Torr. | - | 1 |
| <i>Krameria cysthoides</i> Cav. | - | 1 |
| Labiatae (<i>unknown</i>) | - | 1 |
| <i>Mammillaria</i> sp. (2) | 1 | - |
| <i>Nissolia schottii</i> Torr. | - | 1 |
| <i>Salvia aff. Keerli</i> Torr. | - | 1 |
| <i>Salvia</i> sp. | 1 | - |
| <i>Karwinskia humboldtiana</i> Roem. & Schult.) Zucc. | 1 | - |
| Total | 100 | 100 |

fueron *C. secundiflora* (V.I.=30%) y *Dodonaea viscosa*, (V.I.=12%) (Cuadro 1). Según varios autores (Hiriart y González, 1983; Argüelles *et al.*, 1991 y Zamudio *et al.*, 1992), hay al menos 41 especies de 35 géneros de plantas con las cuales *C. secundiflora* co-existe en México, compartiendo o no la dominancia.

La composición de especies en los dos sitios fue significativa ($p \leq 0.05$) (índice de similitud de Sorensen 36%) con solo cuatro especies, además de *C. secundiflora*, comunes en ambos sitios: *Bouvardia ternifolia*, *Dodonaea viscosa*, *Jatropha dioica* y *Montanoa tomentosa*. Esta diferencia se debe probablemente a la mayor perturbación en Hidalgo y su sucesión más temprana, así como a las características edáficas

Los rendimientos promedio de alcaloides (peso seco) obtenidos de *C. secundiflora* en Hidalgo fueron 0.039 g 100 g⁻¹ (0.04%) y 0.040 g 100 g⁻¹ (0.04%) para semillas y hojas, y 1.326 g 100 g⁻¹ (1.33%) para raíces, mientras que los rendimientos promedio para Querétaro fueron 0.028, 0.115 y 0.026 g 100⁻¹ g para semillas, raíces y hojas (Cuadro 3). Una planta puede considerarse fuente de alcaloides cuando contiene más de 0.05% (peso seco); Robinson (1979) y Hegnauer (1963) indican un límite de 0.01%. También se estudiaron los niveles de alcaloides en semillas y pericarpio de vainas inmaduras de *C. secundiflora* de Querétaro. La concentración de alcaloides en el pericarpio fue mayor (0.31% peso seco) que en la semillas inmaduras (0.13%). La mayor concentración de alcaloides en semillas inmaduras comparada con la de semillas maduras (0.03%) fue diferente al de otra leguminosa mexicana, *Erythrina americana* en la cual se encontró que la concentración de alcaloides es mayor en semillas maduras (García Mateos *et. al.* 1996).

Table 2. Retention indices and molecular and fragment ions of alkaloids detected in *Calia secundiflora* by CG/EM†
Cuadro 2. Indices de retención e iones moleculares y de fragmento de alcaloides detectados en *Calia secundiflora* mediante CG-EM.

| Compound | RI | MS m/z (%) | Tissue |
|-----------------------|------|--|--------|
| Lupinine/epilupinine | 1422 | 169 (M ⁺ ,45) 168 (45) 83 (100) 152 (82) 138 (71) 97 (79) | s,1,r |
| Sparteine | 1745 | 234 (M ⁺ ,18) 193 (30) 137 (97) 98 (100) | s,1,r |
| Ammodendrine | 1856 | 208 (M ⁺ ,49) 191 (64) 165 (100) 136 (76) 110 (90) | 1 |
| N-methylcytisine | 1986 | 204 (M ⁺ ,22) 58 (100) | s,1,r |
| Cytisine | 2043 | 190 (M ⁺ ,57) 147 (80) 146 (100) | s,1,r |
| 5,6-Dehydrolupanine | 2155 | 246 (M ⁺ ,28) 98 (100) | s,1 |
| Lupanine | 2188 | 248 (M ⁺ ,37) 149 (54) 136 (100) 98 (37) | s,1,r |
| Unidentified | 2195 | 244 (M ⁺ ,3) 203 (100) 160 (23) 146 (15) 98 (13) | s,1,r |
| Unidentified | 2300 | 230 (M ⁺ ,8) 189 (100) 160 (13) 146 (33) 80 (17) | s,1 |
| Anagyryne/thermopsine | 2442 | 244 (M ⁺ ,28) 146 (18) 98 (100) | s,1,r |
| N-acetoxyanagyryne | 2808 | 302 (M ⁺ ,18) 243 (20) 146 (18) 96 (100) | s |

†Column: DB1-MS s= seeds; 1=leaves; r=root

al., 1992) have reported that there are at least 41 species from 35 genera of plants with which *C. secundiflora* coexists in México, sharing or not sharing dominance.

The composition of species at the two sites was significant ($p \leq 0.05$) (Sorensen index of similarity 36%) with only four species, in addition to *C. secundiflora*, being common to both sites: *Bouvardia ternifolia*, *Dodonaea viscosa*, *Jatropha dioica*, and *Montanoa tomentosa*. This difference is probably due, principally, to the greater disturbance in Hidalgo and the earlier succession as well as to edaphic characteristics.

The mean yields of alkaloids (dry weight) obtained from *C. secundiflora* at Hidalgo were $0.039 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (0.04%) and $0.040 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (0.04%) for seeds and leaves, and $1.326 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (1.33%) for roots, while the mean yields from Querétaro were 0.028, 0.115, and $0.026 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ for seeds, roots and leaves (Table 3). A plant can be considered a source of alkaloids when it contains more than 0.05% (dry weight); Robinson (1979) and Hegnauer (1963) state a limit of 0.01%. The levels of alkaloids in seeds and pericarp of immature pods of *C. secundiflora* from Querétaro were also studied. The concentration of alkaloids in the pericarp was higher (0.31% dry weight) than in the immature seeds (0.13%). The greater alkaloid concentration in immature seeds compared to mature seeds (0.03%) was different with another Mexican legume, *Erythrina americana*, for which it was found that the alkaloid concentration is higher in mature seeds (García-Mateos *et al.*, 1996).

The detected alkaloids in *C. secundiflora* are shown in Table 2. All the identified alkaloids have been reported previously from *C. secundiflora* (Southon *et al.*, 1994; Kite and Pennington, 2003). While the seeds from plants growing at the two sites showed a similar range of alkaloids, the profile of alkaloids in the leaves and roots was different. The leaves of plants from

Los alcaloides detectados en *C. secundiflora* se muestran en el Cuadro 2. Todos los alcaloides identificados se han descrito previamente en *C. secundiflora* (Southon *et al.*, 1994, Kite and Pennington, 2003). Mientras que las semillas de plantas de los dos sitios mostraron un rango similar de alcaloides, el perfil de alcaloides en las hojas y las raíces fue diferente. Las hojas de plantas de Hidalgo acumularon un rango similar de alcaloides al de semillas, siendo citisina ó N-metil-citisina ó ambas las más abundantes. En contraste las hojas y raíces de plantas de Querétaro acumularon lupinina/epilupinina con otros alcaloides como constituyentes menores. El rango de esparteína/lupanina, lupanina bicíclica y los alcaloides tipo α -piridona identificados en las plantas de Hidalgo y semillas de las plantas de Querétaro fue generalmente similar al que describe la literatura para semillas y hojas de *C. secundiflora* recolectadas en América, pero diferente del rango de alcaloides en semillas recolectadas de plantas de Pakistán donde no se reportaron alcaloides del tipo esparteína-lupanina (Murakoshi *et al.* 1986). Las hojas y raíces de Querétaro al acumular lupanina/epilupinina representan otra variación.

Eventos fisiológicos como florecimiento, desarrollo y maduración del fruto afectan la formación y concentración de alcaloides (Mears y Mabry 1971; Waller y Nowacki, 1978; Robinson 1979). En el presente estudio se encontró que el pericarpio de vainas inmaduras de plantas de Querétaro contenía el mismo rango de alcaloides que las semillas maduras, pero en las semillas inmaduras solo se detectó lupanina/epilupinina y esparteína. Las diferencias en las condiciones ecológicas entre los dos sitios pueden también explicar la variación en el perfil de alcaloides, pero esta variación puede ser también controlada genéticamente. Además, para investigar esto se necesitaría que plantas de los dos sitios crecieron en las mismas condiciones ambientales Ohmiya *et al.* (1995) y Kinghorn y Balandrin (1983) revisaron la literatura de la actividad biológica de varios alcaloides quinolizidinicos e indicaron que alcaloides α -piridona como la citisina y anagirina son más tóxicos que los correspondientes alcaloides saturados, como la esparteína y lupanina. Así, se puede anticipar que las hojas de plantas de Hidalgo son más tóxicas que las de Querétaro debido a la mayor abundancia de alcaloides α -piridona en las primeras. Seguramente la presencia de alcaloides quinolizidinicos en *C. secundiflora* puede explicar por qué la planta es una especie dominante en estos habitats con intenso pastoreo.

CONCLUSIONES

Hidalgo fue la más perturbada de las dos regiones. Se observó un pastoreo intenso y grandes espacios sin

Table 3. Yield of total alkaloids of *C. secundiflora* collected in two sites of México.

Cuadro 3. Rendimiento de alcaloides totales de *C. secundiflora* recolectada en dos sitios de México.

| Yield | Hidalgo | | | Querétaro | | |
|---|---------|--------|-------|-----------|--------|-------|
| | Seeds | Leaves | Root | Seeds | Leaves | Root |
| Tissue [†] (g) | 202.1 | 103.5 | 80.7 | 101.5 | 60.6 | 79.5 |
| Methanolic extract (g 100 g ⁻¹) | 10.94 | 30.05 | 17.84 | 17.48 | 30.07 | 9.20 |
| Alkaloids fraction (g 100 g ⁻¹) | 0.039 | 0.040 | 1.326 | 0.028 | 0.115 | 0.026 |

[†] Initial amounts of tissue used to obtain the alkaloid extracts.

Hidalgo accumulated a similar range of alkaloids to the seeds, with the most abundant being cytosine or N-methylcytosine or both. The leaves and roots of plants from Querétaro accumulated lupinine/epilupinine, with other alkaloids present as minor constituents in comparison. The range of sparteine/lupanine-, bicyclic lupinine- and α -pyridone-type alkaloids identified in the Hidalgo plants and seeds of the Querétaro plants was generally similar to that reported in the literature for seeds and leaves of *C. secundiflora* collected from America, but differ from the range of alkaloids in seeds collected from plants in Pakistan in which sparteine- and lupinine-type alkaloids were not reported (Murakoshi *et al.*, 1986). In accumulating lupinine/epilupinine, the leaves and roots of plants from Querétaro represent another variation.

Physiological events such as flowering, fruit growth, and ripening can affect the formation and concentration of alkaloids (Mears and Mabry, 1971; Waller and Nowacki, 1978; Robinson, 1979). In the present study it was found that the pericarp of immature pods from the Querétaro plants contained the same range of alkaloids as the mature seeds, but in the immature seeds only lupinine/epilupinine and sparteine were detected. Differences in the ecological conditions between the two sites may also account for the variation in alkaloid profiles, but this variation may also be controlled genetically. To further investigate this, plants from the two sites would need to be grown under the same environmental conditions.

Ohmiya *et al.* (1995) and Kinghorn and Balandrin (1983) reviewed the literature of the biological activity of several quinolizidine alkaloids, indicating that α -pyridone alkaloids such as cytosine and anagryne are more acutely toxic than the corresponding saturated alkaloids such as sparteine and lupanine. Thus, it might be anticipated that the leaves of the Hidalgo plants would be more toxic than those from Querétaro due to the greater abundance of α -pyridone alkaloids in the former. Certainly, the presence of quinolizidine alkaloids in *C. secundiflora* may explain why the plant is one of the dominant species in these heavily grazed habitats.

CONCLUSIONS

Hidalgo was the more disturbed of the two regions. Intensive grazing was observed and there were large spaces with no vegetation. The vegetation comprised a smaller number of species, and *C. secundiflora* dominated. The roots of *C. secundiflora* at Hidalgo accumulated a greater range of quinolizidine alkaloids than those at Querétaro, but the concentration of alkaloids in the leaves of the plants growing in the latter site was higher.

vegetación. La vegetación comprendió un pequeño número de especies dominando *C. secundiflora*. Las raíces de *C. secundiflora* en Hidalgo acumularon mayor rango de alcaloides quinolizidínicos que las de Querétaro, pero la concentración de alcaloides en las hojas de plantas en el último sitio fue mayor.

—Fin de la versión en Español—



LITERATURE CITED

- Aguilar, C. A., y C. Zolla. 1982. Plantas Tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. 271 p.
- Argüelles, E., R. Fernández, y S. Zamudio. 1991. Listado Florístico Preliminar del Estado de Querétaro. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario II. Instituto de Ecología A. C., Consejo de Ciencias y Tecnología del Estado de Querétaro. Pátzcuaro, Michoacán, México. 155 p.
- Games, D. E., A. H. Jackson, N. A. Khan, and D. S. Millington. 1974. Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia* 37: 581-588.
- García, M. A., L. P. Tenorio, y S. J. Reyes. 1994. El endemismo en la flora fanerogámica de la mixteca alta, Oaxaca-Puebla, México. *Acta Bot. Mex.* 27: 53-73.
- García-Mateos, M. R., B. Lucas, M. Zendejas, M. Soto-Hernández, M. Martínez, and A. Sotelo. 1996. Variation of total nitrogen, non-protein nitrogen content, types of alkaloids at different stages of development in *Erythrina americana* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2987-2991.
- Hatfield, G. M., L. J. Valdes, W. J. Keller, W. L. Merrill, and V. H. Jones. 1977. An investigation of *Sophora secundiflora* seeds (mescal beans). *Lloydia* 40: 374-383.
- Hegnauer, R. 1963. The taxonomic significance of alkaloids. *In: Chemical Plant Taxonomy*. Swain, T. (ed). Academic Press. New York. pp: 389-427.
- Hiriart, V. P., y M. F. González. 1983. Vegetación y fitogeografía de la barranca de Tolantongo, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 54: 29-96.
- Kinghorn, A. G., and M. F. Balandrin. 1983. Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. *In: The Alkaloids Vol. 2*. Pelletier, W. (ed). Pergamon Press. London. pp: 105-148.
- Kite, G., and R. T. Pennington. 2003. Quinolizidine alkaloid status of *Styphnolobium* and *Cladrastis* (Leguminosae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 1409-1416.
- Martínez, M. 1978. Catálogo de Nombres Comunes, Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 1182 p.
- Mears, J. A., and T. J. Mabry. 1971. Alkaloids in the Leguminosae. *In: Chemotaxonomy of Leguminosae*. Harborne, J. B., D. Boulter, and B. L. Turner (eds). Academic Press. Great Britain. pp: 73-168.
- Mueller-Dombois, D., and H. E. Ellenberg. 1974. Aims and Methods of Vegetation Ecology. John Wiley & Sons. New York. 376 p.
- Murakoshi, I., H. Kubo, M. Ikram, M. Israr, M. Shafi, S. Ohmiya, and H. Otomasu. 1986. (+)-11-Oxocytisine, a lupin alkaloid from leaves of *Sophora secundiflora*. *Phytochemistry* 25: 2000-2002.
- Ohmiya, S., K. Saito, and I. Murakoshi. 1995. Lupine alkaloids. *In: Alkaloids. Vol. 47*. Cordell, G. (ed). Academic Press. New York. pp: 1-114.

- Robinson, T. 1979. The evolutionary ecology of alkaloid. *In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal, G. A., and D. H. Janzen (eds). Academic Press. New York. pp: 413-448.
- Southon, I. W., F. A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne. 1994. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. Vol. I and II. Chapman & Hall. London. 1161 p.
- Waller, G. R., and E. K. Nowacki. 1978. Metabolic (catabolic) modifications of alkaloids by plants. *In: Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Waller, G. R., and E. K. Nowacki. (eds). Plenum Press. New York. pp: 219-221.
- Wink, M. 1993. Quinolizidine alkaloids. *In: Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 8. Waterman, P. G. (ed). Academic Press. New York. pp: 197-239.
- Wink, M., C. Meissner, and L. Witte. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 38: 139-153.
- Zamudio, R. S., J. Rzedowski, G. E. Carranza, y G. Calderón. 1992. La Vegetación en el Estado de Querétaro. Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán, México. 92 p.