



136
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TEJES CON
FALLA DE ORIGEN

CONTRIBUCION AL ESTUDIO
QUIMICO DE LAS RAICES DE
Aristolochia asclepiadifolia

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

ELISA SANDOVAL FRAUSTO



MEXICO, D.F.

1990

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
Introducción.	
I. Generalidades.	1
El género Aristolochia.	1
Acido Aristolóquico.	10
Biosíntesis del ácido aristolóquico.	14
Síntesis de ácido aristolóquico.	17
Farmacología general de aristoloquias	
y del ácido aristolóquico.	23
Otros componentes químicos.	27
Esteroides de aristoloquias.	27
Aceites esenciales de aristoloquias.	32
Alantoina.	39
II. Parte Experimental.	42
Material vegetal.	47
Procedimiento I.	47
Procedimiento II.	52
Fracción hexánica.	53
Fracción éterea.	61
Aceite esencial.	64
Discusión de resultados.	68
Anexo.	
Espectros y cromatogramas	84
Resumen y Conclusiones.	85
Bibliografía.	87

INTRODUCCION

Desde la antigüedad el hombre se ha abastecido de alimentos y ha procurado la curación de sus enfermedades a partir de productos naturales, tanto vegetales como animales, valiéndose únicamente del conocimiento empírico para detectarlos. Ha sido necesario un extenso estudio científico para conocer la actividad y beneficios que cada uno de ellos puede proporcionar, para lograr un avance en cuanto a su industrialización y uso intensivo.

México es un país de gran riqueza florística y en especial rico en flora medicinal. Un gran porcentaje de ésta no ha sido estudiado, a pesar de que hasta hoy gran parte de la población sigue utilizando las plantas como único medio de curación. No sólo las llamadas comunidades indígenas hacen uso de las plantas, sino también un gran número de personas de otros niveles socioculturales las -- utilizan como remedio casero. Por ello y por otras razones, principalmente de orden médico y económico, es importante aumentar la investigación química y farmacológica de los recursos naturales de México.

Por otra parte la química farmacéutica tiene como una de sus ramas más importantes el estudio de los productos naturales, ya que de los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas se pueden obtener grandes benefi-

cios. Entre éstos se puede nombrar la obtención de prototipos que servirán para la síntesis de moléculas con una actividad farmacológica diferente, o bien para detectar algunas otras propiedades farmacológicas no conocidas.

La utilidad de los compuestos aislados de los productos naturales no se limita únicamente a su actividad farmacológica ya que puede también encontrarse materiales útiles en otros campos como son la industria alimenticia, las de productos químicos, etcétera.

Entre la flora medicinal con la que cuenta el país están las aristoloquias, plantas muy utilizadas por los indígenas para contrarrestar el veneno de serpiente y alacrán, para el tratamiento de enfermedades intestinales como la disentería, o bien como ayuda en el momento del parto. La mayoría de las aristoloquias reciben el nombre vulgar de "guacos".

El objetivo de este trabajo es contribuir al estudio químico de las aristoloquias, especialmente de Aristololoquia asclepiadifolia especie no estudiada anteriormente. El trabajo se enfocó principalmente al aislamiento y estudio químico del ácido aristolóquico y derivados del mismo presentes en la planta. El ácido aristolóquico es un

metabolito secundario considerado como marcador taxonómico de estas plantas y al cual se le atribuye la mayoría de las actividades farmacológicas que poseen, a pesar de que de acuerdo a lo reportado en la literatura, de algunas de ellas, no ha sido aislado ni identificado.

1. GENERALIDADES

1.1 El género Aristolochia.

Las aristoloquias pertenecen a la familia Aristolochiaceae. Los géneros importantes son Aristolochia y Asarum. Las aristoloquias forman parte del orden de las dicotiledóneas-monocamídeas. La mayoría de estas especies son herbáceas o leñosas, a menudo trepadoras. Sus flores son solitarias, hermafroditas, dispuestas en grupos, siendo de tamaño variado, algunas flores llegan a medir hasta 50 cm de diámetro, como es el caso de A. grandiflora. Las hojas son alternas y simples. Sus frutos son capsulares y vasiformes. Las raíces son de sabor amargo y aromático, contienen células secretoras de aceites volátiles generalmente amarillo y/o líquidos oleosos no volátiles (1,2,3).

El género Aristolochia cuenta con 350 especies, las cuales crecen especialmente en zonas tropicales o templadas. México es un país en donde existen un gran número de especies de aristoloquias, la mayor parte aún no han sido estudiadas químicamente. Lo anterior es el resultado de que el país cuente en su territorio con una gran zona forestal de condiciones climatológicas ideales para el crecimiento de las plantas de este género. En el cuadro I se muestran algunas especies de aristoloquias originarias de México.

Los nombres vulgares con los que se conoce y la entidad federativas específicas donde habitan (3,4).

El término aristoloquia deriva del griego Aristokos y quiere decir que da a luz a los mejores hijos, aristos significa óptimo y tokos significa hijos (5).

Las aristoloquias son plantas que se han caracterizado por la presencia del ácido aristolóquico, considerándose a esta sustancia como un marcador taxonómico. Como se mencionó anteriormente, en algunas de las aristoloquias no ha podido ponerse de manifiesto la presencia de éste y en cambio se ha hecho evidente en otras especies del género Annonaceae, morfológicamente muy parecidas a las aristoloquias, de los géneros Menispermaceae y Minimlaceae (6). El ácido aristolóquico ha sido extraído también de una mariposa del género Leptilópteri cuyas larvas se alimentan de estas plantas (7).

Las aristoloquias parecen ser plantas de gran interés para los investigadores de productos naturales. Ésto se ha reflejado en la gran información bibliográfica que existe sobre sus diferentes especies. Las especies más estudiadas de este género son A. indica, A. argentina y A. debilis entre otras. De la mayoría de las especies

que han sido investigadas, se han aislado diferentes compuestos químicos, entre los cuales se encuentran varios tipos de ácidos aristolóquicos o diferentes sustancias de naturaleza alcaloidea como son la magnoflorina y la taliscanina. En ocasiones un sólo compuesto ha sido identificado en una sola especie, por ejemplo la Taliscanina (fig. 1-2) únicamente ha sido aislada de A. taliscana.

En el cuadro 2 se muestran diferentes especies estudiadas y los compuestos aislados y/o identificados. En las figuras I, II y III se presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos más relevantes separados por semejanza en su estructura. Se advierte que no son todos los compuestos encontrados en la bibliografía para una sola especie. Un caso particular lo representa el ácido aristolóquico y sus derivados que son tratados en la parte 1.2 del presente trabajo.

Cuadro 1: Aristolochias presentes en la flora mexicana
habitat y nombre(s) vulgar(es).

Especie	Nombre(s) vulgar(es)	Entidad federativa
<u>Aristolochia angustida.</u>	Guaco	Chiapas
<u>Aristolochia asclepiadifolia.</u>		Veracruz
<u>Aristolochia caribaea.</u>	Gallinitas, garcitas, ipaca, patito, raíz del indio, tacopaxtle.	Guerrero, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, México.
<u>Aristolochia grandiflora.</u>	Bonete, Chan-wa-k'el, flor de pato, guaco, hierba del indio, pato, Som- brero de don Jope, Vahkuñ.	Yucatán, Veracruz, Tabasco, Chiapas.
<u>Aristolochia laxiflora.</u>	Cocolmeca	Oaxaca, Sinaloa, San Luis Potosí.
<u>Aristolochia longipes.</u>	Pipilos	Guerrero, Durango, Jalisco.
<u>Aristolochia maxima.</u>	Canastilla, farolito, guaco del sur.	Chiapas, Tabasco, Veracruz, Yucatán.
<u>Aristolochia mexicana.</u>	Chanuan-k'ohi, guacil, raíz del fiesto, tacopucle	Yucatán, Morelos, Guerrero.
<u>Aristolochia odoratissima.</u>	Cocoba, hierba del indio, tacopale, tacopate, tacopaxtle, tacopastle.	Colima, Chiapas, Jalisco, Tabasco, Veracruz.
<u>Aristolochia pardina.</u>	Bejuco amargo.	Colima, Guerrero, Sinaloa, Veracruz.
<u>Aristolochia pentandra.</u>	Chan-wah-k', Mehen-wah-k'el	Yucatán
<u>Aristolochia pilosa.</u>	Curarina	Oaxaca, Chiapas.
<u>Aristolochia Pringii Rose.</u>	Zapato del diablo	Sinaloa.
<u>Aristolochia quercetorum.</u>	Hierba del indio	Chihuahua.
<u>Aristolochia schlothei.</u>	Contra yerba	Isms de Tehuantepec, Oaxaca.
<u>Aristolochia sp.</u>	Hierba de v(bora, pata de elefan- te, pehuame, pipilos.	Navarrit, Jalisco, Veracruz, Michoa- cán, Cañon del zapilote, Guerrero
<u>Aristolochia serpentaria.</u>		Navarrit
<u>Aristolochia subclausa.</u>	Tacopiatle, tlacopaxtle	Guerrero.
<u>Aristolochia taliscana.</u>	Canastilla, guacho, guaco, patito, zapalito, mataneno del mar.	Colima, Navarrit, Sinaloa.
<u>Aristolochia Wrightii.</u>	Hierba del indio	Coahuila, Chihuahua, Durango.

Cuadro'2: Algunas especies de aristolochias y sus metabolitos secundarios aislados y/o identificados.

Especie	Compuestos aislados (numero)
<i>A. argentina</i> (1,5,8,9)	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,16,43,44
<i>A. haetica</i> (1,5,10)	1,12
<i>A. biacata</i> (1,6)	1,17,18,19,20,21,28
<i>A. clematitis</i> (1)	12,16,17,19,22,23,24,25,26,27
<i>A. cymbifera</i> (1)	27,37
<i>A. debilis</i> (1,6,11)	1,11,12,27,29,30,38,49
<i>A. indica</i> (1,6,12,13,14,15,16)	5,12,14,17,18,19,20,21,24,27,30,31,36,42
<i>A. italica</i> (1)	1
<i>A. kaemferi</i> (1,6)	1,12
<i>A. longa</i> (6,17,18)	1,6,7,43,46,47,48
<i>A. maxima**</i> (1,6)	1
<i>A. mexicana**</i> (1)	41
<i>A. pendulata</i> (1,6)	1,28
<i>A. reticulata</i> (1,6)	1,13,17,28,34
<i>A. rotunda</i> (1,5,6)	1,6,17,35,36,46
<i>A. surinensis**</i> (1,6)	1,17,28
<i>A. siphu</i> (1,6)	1,6,26,33,39,40
<i>A. taliscana**</i> (1,6,19,29)	15,35
<i>A. tomentosa</i> (1)	30
<i>A. zenkeri</i> (1)	17,20,30,32,34,35,37

Notas: * Se identificaron los triglicéridos de estos ácidos.

** Especies presentes en la flora mexicana.

Relación número - compuestos para el cuadro 2.

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Ac. aristolóquico I. | 26. Rutina (fig. III-3). |
| 2. Ac. aristolóquico III. | 27. Alantoina (fig. I-4). |
| 3. Ac. aristolóquico IIIa. | 28. Rojo de aristoloquia (fig. I-3). |
| 4. Ac. aristolóquico IV. | 29. Amarillo de aristoloquia. |
| 5. Ac. aristolóquico IVa. | 30. Ishwarone. |
| 6. Ac. aristolóquico II. | 31. Ishwarona. |
| 7. Ac. aristolóquico Ia. | 32. Kaemferol. |
| 8. Ac. aristolóquico V. | 33. Quercetina. |
| 9. Ac. aristolóquico Va. | 34. Borneol. |
| 10. Ac. aristolóquico VIa. | 35. Asparagina. |
| 11. Ac. aristolóquico VIIa. | 36. Ac. cimilíferico. |
| 12. Magnoflorina (fig. I-1). | 37. Crocetina (fig. II-2). |
| 13. Aristolactona (fig. II-6). | 38. Aristolactama (fig. I-5). |
| 14. Aristolochina. | 39. Esculetina (fig. III-4). |
| 15. Taliscanina (fig. I-2). | 40. Pinitol (fig. III-5). |
| 16. Aristolósido. | 41. Sustancias antibacterianas. |
| 17. β -sitosterol (fig. II-1). | 42. Glucósido de aristolactama. |
| 18. Ac. oléico. | 43. Éster metílico de A.A. I. |
| 19. Ac. mirístico. | 44. Éster metílico de A.A. II. |
| 20. Ac. palmítico. | 45. Dehidroisoeugenol (fig. XII-1). |
| 21. Ac. esteárico. | 46. Acetato de bornilo (fig. II-3). |
| 22. Alcohol cetílico. | 47. Linalol (fig. II-4). |
| 23. Colina. | 48. 2-pine-8-ol. |
| 24. trans-p-cumárico (fig. III-1). | 49. Aristolona (fig. II-3). |
| 25. Ac. cinápico (fig. III-2). | |

Nota: La estructura química de estos ácidos se obtiene al relacionar la figura IV con el radical correspondiente que se encuentra en el cuadro 3.

Figura 1: Algunos derivados nitrofenólicos y derivados nitrogenados diversos contenidos en el cuadro 2.

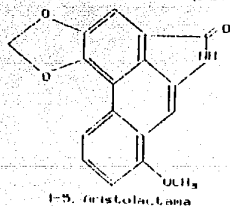
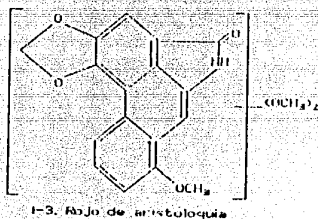
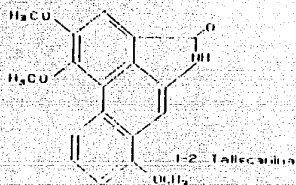
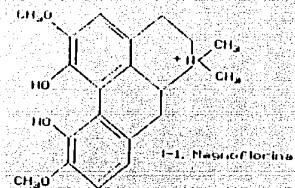


Figura II: Algunos compuestos de naturaleza esteroide o terpenoide contenidos en el cuadro 2.

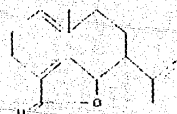
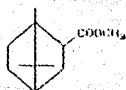
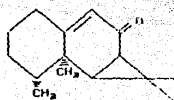
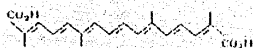
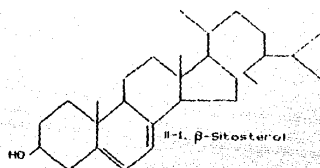
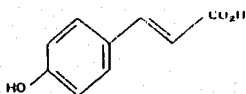
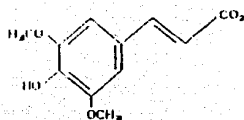


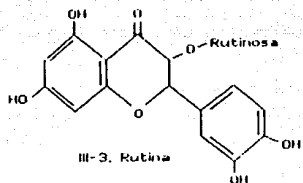
Figura III: Algunos compuestos aromáticos, flavonas y alcoholes contenidos en el cuadro 2.



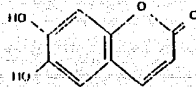
III-1. Trans-p-cumárico.



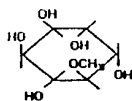
III-2. Ácido sinápico.



III-3. Rutina



III-4. Esculetina



III-5. Pinitol

1.2 Ácido aristolóquico.

El ácido aristolóquico es un derivado nitrofenantrénico de estructura poco común en la naturaleza. Cada especie de aristoloquia puede poseer uno o varios tipos de ácidos aristolóquicos.

Los ácidos aristolóquicos tienen en común la estructura del anillo A,B,C, presentan en la posición 3 y 4 un grupo metilendioxi, un grupo nitró en la posición 10 y un grupo carboxilo en 1. (Fig. IV).

Los ácidos aristolóquicos difieren en los sustituyentes (R) 1,2,3,4,5, de la estructura nitrofenantrénica que pueden ser: radicales $-H$, $-OH$, $-OCH_3$, $-CH_2CH_3$ o bien $-OCH_2CH_3$. Los ácidos aristolóquicos pueden ser clasificados como fenólicos o no fenólicos de acuerdo a la presencia o ausencia de un grupo $-OH$ en la molécula (cuadro 3 (B)).

El ácido aristolóquico I es el ácido que se ha encontrado en la mayoría de las especies de aristoloquias. En una sola especie de aristoloquias, puede existir uno o varios tipos de ácidos.

En la planta, el ácido aristolóquico es sintetizado, principalmente, en raíces, rizomas y semillas, en una

etapa especial de su desarrollo y en una época definida - (1-10).

El ácido aristolóquico fue estudiado desde 1853. En 1955 Pailer y sus colaboradores efectuaron varias reacciones para la identificación de cada grupo funcional de su molécula (23).

Para la detección del ácido aristolóquico, Castille en 1921 reporta una reacción colorida específica, la cual consiste en agregar H_2SO_4 concentrado a una solución acética de posible ácido aristolóquico. Si la reacción es positiva se observa una coloración verde (23).

Las propiedades físicas reportadas para el ácido aristolóquico son las siguientes : Ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol, en $CHCl_3$, éter etílico, acetona, ácido acético, anilina, alcalis, prácticamente insoluble en benceno y disulfuro de carbono. Precipita en agujas de color amarillo-naranja de metanol caliente y de dimetilformamida-agua caliente en medio ácido. Tiene un punto de fusión de $281^{\circ}C$ y un peso molecular de 341.21 (24).

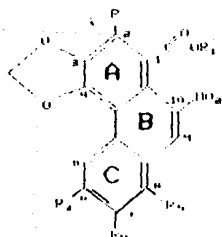
Existe mucha información bibliográfica de las características espectroscópicas de los diferentes tipos de ácidos-

aristolóquicos aislados de varias especies. El ácido aristolóquico I, el cual se aisló de la planta estudiada en este trabajo (además de ser uno de los ácidos presentes en la mayoría de las plantas del género Aristolochia), tiene las siguientes características espectroscópicas:

UV: (EtOH) máx. (nm) 221 (4.47) 250 (4.51) 317 (4.05) 390 -
(3.78) IR: máx. KBr (cm^{-1}) 1695, 1515, 1340, 1266, 1036, --
952. ^1H RMN: $\text{DMSO}-d_6$ (ppm), 7.76 (s, H-4), 7.73 (t, H-6),
8.48 (s, H-7) 7.22 (d, H-9), 7.70 (t, H-10), 8.45 (d, H-11),
4.04 (s, OMe-8), 6.45 (s, OCH_2O). EM: (m/z, % relativo), 341
(35) 296 (36), 295 (100), 75 (52), 74 (36), 69 (31), 63 --
(35), 53 (36). Las diferentes bibliografías consultadas para obtener estos datos varían ligeramente en algunos valores de la ^1H RMN: De Pascual en 1982 no reportó la señal para el H-6 mientras que Priestaf en 1986 sí reporta su valor (6.8, 17, 40).

Cuadro 3: Clasificación de los ácidos aristolóquicos.

Ácido aristolóquico		R 1	Sustituyentes		R 4	R 5
			R 2	R 3		
N	I	H	H	H	H	OMe
O	II	H	H	H	H	H
F	III	H	H	OMe	H	H
L	IV	H	H	OMe	H	OMe
C	V	H	H	OMe	OMe	H
B						
F	Ia	H	H	H	H	OH
E						
N	IIIa	H	OH	H	H	H
O	IVa	H	H	OH	H	OMe
L						
C	Va	H	H	OH	OMe	H
D						
S	VIa	H	OH	H	H	OMe
	VIIa	H	H	H	OH	OMe

Figura IV: Estructura general de los ácidos aristolóquicos.

1.2.1. Biosíntesis del Ácido aristolóquico.

F. Comer y H.P. Tiwar: en 1968 realizaron un estudio sobre la biosíntesis del Ácido aristolóquico: en *A. síphu*, efectuaron experimentos incorporando muestras marcadas de tirosina, dopa, dopamina y noradrenalina, encontrando que éstos son precursores específicos del Ácido aristolóquico.

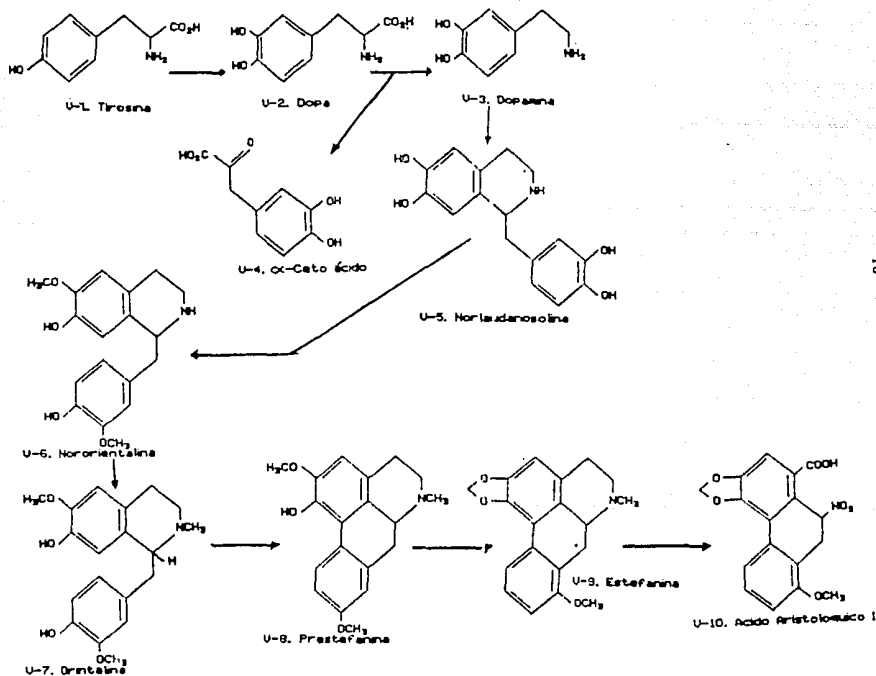
La incorporación de (β - ^{14}C) tirosina (fig. V-1) muestras que el 70% de la reactividad se localiza en el grupo carboxilo del Ácido aristolóquico y la incorporación de (β - ^{14}C , ^{15}N) tirosina prueba que el grupo nítro proviene del grupo amino de la tirosina. Al incorporar (2 - ^{14}C) noradrenalina se obtiene ácido aristolóquico marcado específicamente en el grupo carboxilo por lo que se supone que la noradrenalina es un precursor obligatorio del ácido aristolóquico y sugiere la presencia de un grupo hidroxibencílico que predispone un intermediario a la conversión oxidativa dentro de un ácido aristolóquico. Lo anterior queda únicamente como una hipótesis ya que los investigadores no encontraron trazas de noradrenalina en *A. síphu* (21).

Vidur Sharma y colaboradores en 1982 incorporaron muestras radiactivas de tirosina, (3,4-dihidroxifenil) alantana, nororientalina (fig. V-6), orientalina (fig. V-7),

prestefanina (fig. V-8) y estefanina (fig. V-9) dentro del ácido aristolóquico en A. bracteata. Demostraron que la nororientalina es un intermediario en la ruta biosintética; con lo que afirmaron la hipótesis propuesta por F. Comer y H.P. Tiwari. Todas las evidencias obtenidas de los resultados de cada experimento apoyan fuertemente la hipótesis de que el acoplamiento oxidativo de orientalina - (fig. V-7) prestefanina (fig. V-8) y ésta se convierte en estefanina (fig. V-9) y ésta a su vez por ruptura oxidativa da el ácido aristolóquico (fig. V-9).

Las investigaciones anteriores también confirman que el grupo metilendioxi está formado por un precursor metoxifenol (22). En la figura V se muestra la secuencia biosintética para la obtención de ácido aristolóquico. El esquema presenta como el precursor originario a la tirosina y si las enzimas que catalizan normalmente la condensación de dopa con α -ceto ácido (fig. V-4) no fuesen del todo específicas, una dopamina (fig. V-3) análoga no presente en la planta podría servir como sustrato (22). La secuencia queda conjuntada con los resultados obtenidos por F. Comer, H.P. Tiwari y por Vidur Sharma y colaboradores.

Figura U: Origen biosintético del ácido aristolúgico I.



1.2.2. Síntesis del ácido aristolóquico.

Kupchan y Wormser en 1965, sintetizaron el ácido aristolóquico y otros derivados. Primero formaron compuestos fenantrénicos por medio de la fotólisis con luz ultravioleta de 2-Indoestilbeno. Los resultados obtenidos, fueron utilizados para realizar la síntesis de los ácidos aristolóquicos I y II.

Para la síntesis efectuaron una serie de reacciones las cuales llevaban a la formación del anillo A y el anillo C de la estructura fenantrénica del ácido aristolóquico.

Para obtener el anillo A se utilizó el piperonal (fig. VI-1), el cual proporcionó la adecuada base para el esqueleto del anillo A para ambos ácidos. El piperonal se reduce al alcohol piperonílico (fig. VI-2) con hidruro de aluminio y litio en éter anhidro. El alcohol piperonílico se broma con bromo en ácido acético glacial, obteniendo el compuesto bromo 6-bromopiperonil bromuro (fig. VI-3). Este compuesto se hidrogenoliza con hidruro de litio y aluminio en un reflujo con tetrahidrofurano para obtener el 2-bromo-4,5-metilendioxitolueno (fig. VI-4). Posteriormente se obtiene el ácido o-tolúico (fig. VI-5) usando la carbonilación con n-butilitio. El compuesto de la fig. VI-5 se convierte al cloruro del ácido de la fig. VI-6 por la acción de oxalilcloruro en

benzono, después el compuesto se broma y se obtiene de esta forma el compuesto de Ia (fig. VI-7). Al agregar metanol anhidro a la mezcla de reacción cristaliza el éter del compuesto de Ia (fig. VI-8).

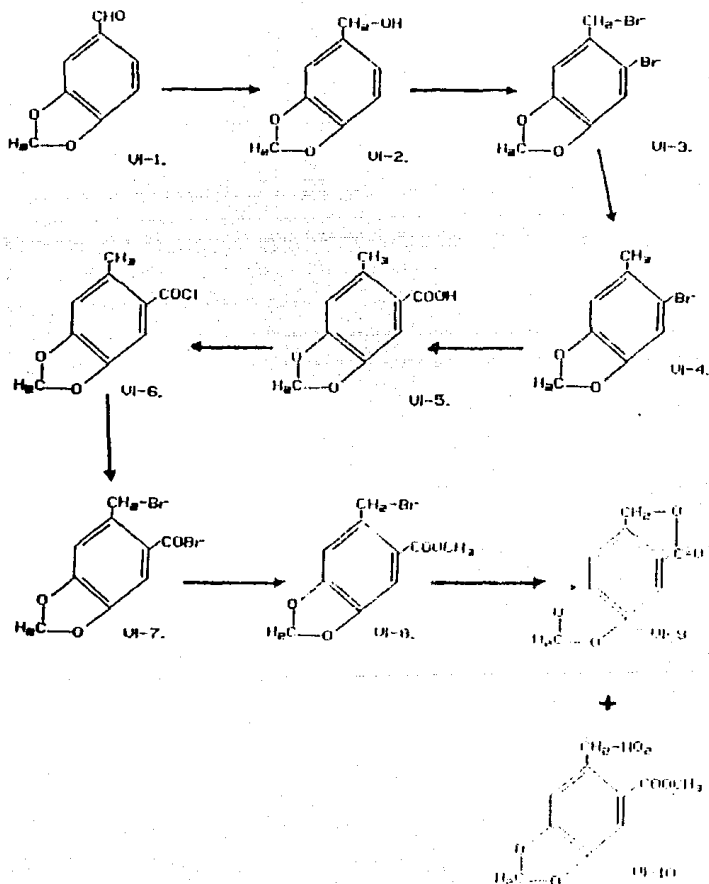
El tratamiento del compuesto VI-8 con nitrato de plata en éter anhidro proporciona dos compuestos: el primero que se obtiene, es el de Ia (fig. VI-9), el cual se caracteriza como 4,5-metilendioxi-flalida; el segundo compuesto obtenido es el de Ia (fig. VI-10).

La síntesis del anillo C de la estructura nitrofenantrénica de los ácidos involucra la secuencia desde VII-1 hasta VII-14.

El 2-nitro-6-metoxitolueno (fig. VII-4) se oxida al nitroaldehído (fig. VII-8) por reacción Brönkko (24). La reacción del nitroaldehído a la amina (fig. VII-11) y la conversión de Sandmeyer a el nitriloaldehído (fig. VII-12) fueron efectuados por el método general de Mayer.

La función aldehído es protegida, convirtiendo el compuesto a una oxima. Se obtiene dos oximas isoméricas que se observan en las figuras VII-9 y VII-10. Cuando la mezcla de oximas fue reducida con hidróxido ferrroso alcalino, se obtiene únicamente el 2-amino-6-metoxibenzaldoxima.

Figura VI: Síntesis del anillo A del ácido aristolóquico.



(fig. VII-11). Esta es convertida a la 2,4-dinitrofenil-hidrozona (fig. VII-12) por una reacción tipo Sandmeyer. La mezcla de reacción proporciona un segundo producto caracterizado como el 2-ácido-6-metoxibenzaldehído (fig. - VII-13).

La condensación del compuesto de la (fig. VI-10) con la base n-propilideno (fig. VII-14), es efectuada en ácido acético glacial con lo que se obtuvo el 2-carbometoxi-2-iodo-6-metoxi-nitro-clis-estilbena (fig. VII-15). La condensación fotocíclica del estilbena proporciona el metilester del ácido artilolóquico (fig. VII-16) en un 54% de rendimiento (22).

Figura VII: Síntesis del anillo C del ácido aristolóquico y unión con el anillo A para formar el éster del ácido.

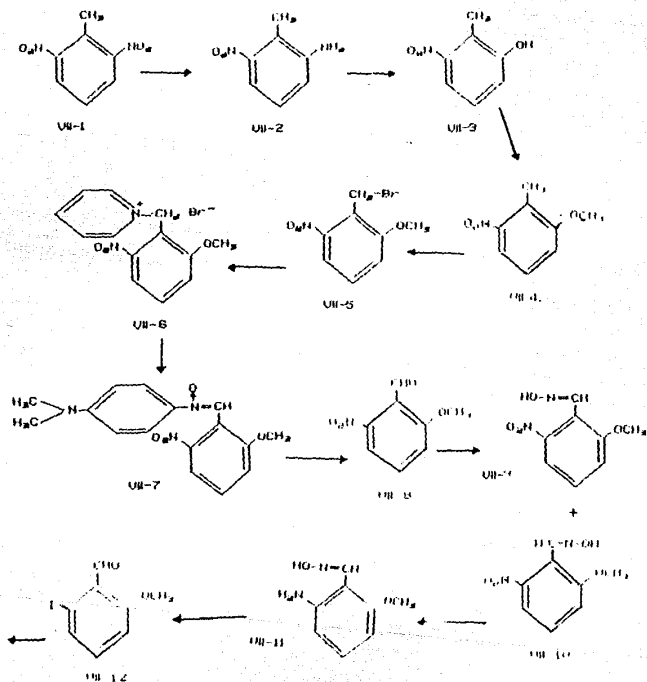
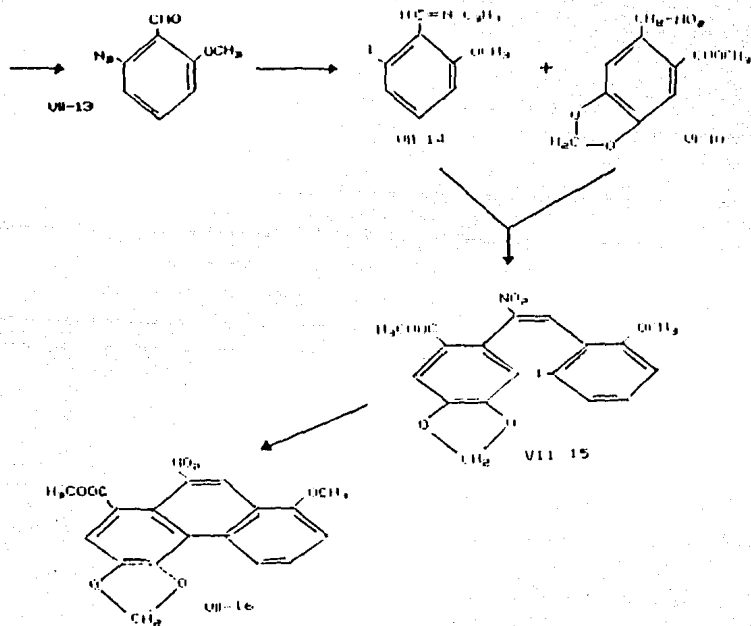


Figura VII: Continuación.



1.2.3. Farmacología general de aristoloquias y del ácido aristolóquico.

Las aristoloquias son muy utilizadas en medicina indígena y algunas de ellas por su belleza se emplean en jardinería.

El género aristoloquia se caracteriza por tener una gran cantidad de actividades farmacológicas como son: antibiótica, antidisentérica, como antidoto para el veneno de la picadura de alacrán (alexitéro) y la mordedura de serpientes (anticrolálica). También presentan actividades uterocinética, emenagoga y antitumoral. En medicina tradicional mexicana, se emplean estas plantas en afecciones dermatológicas (20).

En las pruebas farmacológicas que se han realizado, se han utilizado principalmente los extractos de las plantas, más que las sustancias aisladas de las mismas por ejemplo, el extracto metanol-agua de A. taliscana presenta una actividad farmacológica antitumoral sobre linfocitos P.388, en enfermos de leucemia (19). El extracto etéreo de A. indica ha presentado una actividad antifertilidad (25).

La actividad antitumoral de la aristoloquia se ha estudiado desde 1949. Bernard realizó las primeras investigaciones, para ello utilizó un extracto de A. elegans, el cual le hizo actuar sobre las células de semilla de cebolla en germinación. Además, dicho extracto causa contracción del útero y posee actividad mitótica (33). Posteriormente, en 1962, se realiza un estudio del extracto de A. indica (actualmente, la más estudiada en actividad farmacológica) donde se demuestra que el ácido aristolóquico es el responsable de la actividad antitumoral que se manifiesta sobre el adenocarcinoma CA 755 (12). En 1984 Chun-fao Che y colaboradores estudiaban el extracto etanólico de A. indica y observaron que éste tiene actividad antifertilidad cuando se inyecta poscoitalmente, de 1-10 días después del coito, en ratones hembra (15). En el cuadro 4 se presentan las actividades farmacológicas que se han encontrado o atribuido a algunas especies de aristoloquias (15).

En la farmacología de sustancias puras aisladas de las plantas del género aristoloquia, se ha encontrado que varias de ellas poseen propiedades específicas. La sustancia más importante en este aspecto es el ácido aristolóquico, éste aumenta la capacidad fagocítica de leucositos y presenta actividad antitumoral (17).

la actividad antibacteriana y fagocitaria del ácido aristolóquico I y II se demostró in vivo sobre neumococo. El ácido aristolóquico prolonga la vida de los ratones infectados por este agente microbiano. En cobayos infectados con Mycobacterium tuberculosis, el ácido estimula la fagocitosis; por lo que la sobrevivencia de los cobayos es significativamente mayor en los tratados con ácido -- aristolóquico que en los cobayos tratados con el bacilo de Calmette y Guérin (1).

Cuadro 4: Actividad farmacológica de algunas especies de plantas del género Aristologuia.

Especie	Acción farmacológica
<u>A. argentina</u> (1,8)	Emenagogo, tratamiento de artritis, envenenamiento y antiprurítico.
<u>A. bracteata</u> (1).	Oritótico.
<u>A. clematitis</u> (1).	Tónico, emenagogo, expectorante, uterocinético y antiespasmódico.
<u>A. elegans</u> (1,33).	Uterocinético, mitótico.
<u>A. indica</u> (15,25,26).	Antifertilidad, antitumoral y abortivo.
<u>A. longa</u> (1)	Tónico y emenagogo.
<u>A. rumicifolia</u> (1).	Hipotensor y curarizante.
<u>A. serpentaria</u> (1).	Sudorífico, febrífugo y antiespasmódico.
<u>A. taliscana</u> (19).	Antitumoral.
<u>A. tuberosa</u> (1,33).	Anticrotático, antituberculoso y antifaringítico.

1.3. Otros componentes químicos del género *Aristolochia*.

1.3.1 Esteroides de aristoloquias.

Los esteroides más comúnmente encontrados en este género son los esteroides, los cuales son alcoholes cristalinos-que se encuentran libres o esterificados en ácidos grasos de alto peso molecular. Han sido aislados de vegetales y animales, los esteroides vegetales se denominan fitosteroides. Son ejemplos de esteroides libres: el ergosterol (fig. VIII-4), aislado del carnezuelo de centeno, o bien el estigmasterol (fig. VIII-3), extraído del aceite de soya (26).

La palabra esteroide deriva del griego y significa "sólido" químicamente están caracterizados por una estructura formada por un núcleo de ciclopentano perhidrofenantreno -- (anillos A, B, C, D figura VIII-1). Poseen un grupo hidróxilo en posición 3, en ocasiones presenta dobles enlaces en cualquier parte del núcleo o en la cadena lateral que se encuentra en la posición 17. La mayor parte de los esteroides son compuestos de C_{27} - C_{29} Algunos ejemplos de esteroides son: el colesterol (fig. VIII-1) que presenta una doble ligadura en los C_5 y C_6 y un β -hidróxilo en posición 3, el β -sitosterol (fig. II-1) tiene una doble ligadura en la misma posición que el colesterol, sin embargo, varía en la cadena lateral ya que en el C_{24} pre

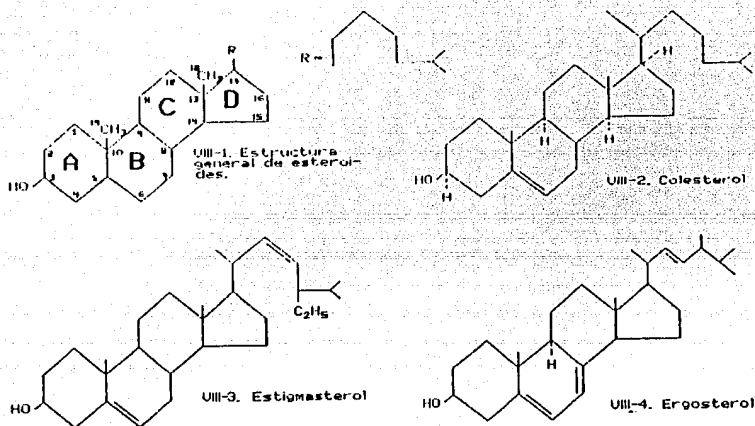
senta un grupo etil (27, 28, 29).

Los esteroides tienen un punto de fusión de 100°C a 200°C . Cuando se encuentran puros, forman cristales. Las impurezas presentes pueden afectar sus propiedades físicas, por lo que el punto de fusión no es suficiente para asegurar que el compuesto está puro.

Para la identificación de esteroides se han utilizado pruebas cualitativas y cuantitativas que se basan en reacciones coloridas, en donde el color obtenido puede indicar características de la estructura molecular. En el cuadro 5 se resumen algunas de ellas (29, 30, 31).

En las plantas del género *Aristolochia*, el compuesto esteroide más encontrado es el Δ -sitosterol (1). En 1980 Basideb y colaboradores obtuvieron del extracto de petróleo de *A. indica* dos esteroides isoméricos, la 3-hidroxi-5,7-estigmastenona (fig. IX-1), y la 6-hidroxi- Δ ,3-estigmastenona (fig. IX-2) (13).

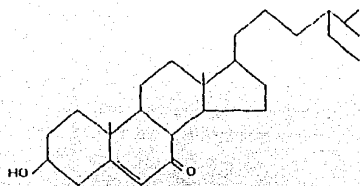
Figura VIII: Estructura general de esteroides y esteroides más comunes.



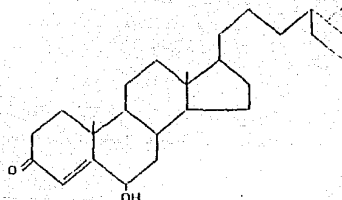
Cuadro 5: Reacciones de coloración para esteroides.

Nombre de la reacción	Reactivos	Coloración	Parte estructural identificada
Lieberman-Burchard	Anhídrido acético + cloroformo + ácido sulfúrico.	Colores transitorios, rojo azul y café	Insaturaciones
Trinitrometano (TNM)	Cloroformo + 1 ml de trinitrometano.	Amarillo a amarillo ladrillo.	Insaturaciones.
Rosenheim	Cloroformo + sol. aq. de ácido tricloroacético	Morado rojizo.	Sistema diénico.
Tortelli-Jaffe	Se forma una capa de ácido acético sobre una solución al 2% de bromo en cloroformo.	Color verde en la superficie intermedia.	Dobles enlaces entre átomos de carbono terciario.
Zimmermann	Alcohol + m-dinitrobenzenceno + hidróxido de potasio.	Violeta.	Formación de nitrona

Figura IX: Esteroides isoméricos aislados de *A. indica*.



IX-1. 3-Hidroxi-5,7-estigmastenona



IX-2. 6-Hidroxi-4,3-estigmastenona

1.3.2. Aceites esenciales de las aristoloquias.

Los aceites esenciales son mezclas de muchos compuestos, pero los más comunes son los terpenos. Estos se dividen en monoterpenos y sesquiterpenos, compuestos de cadena ramificada y otros. Se derivan teóricamente de la condensación de unidades de isopreno, o bien son metabolitos secundarios originados por la ruta del ácido shikímico.

Los compuestos monoterpénicos se dividen en acíclicos, como geraniol (fig. X-1), monocíclicos limoneno (fig. X-2) o bicíclicos α -pineno (fig. X-3), pueden poseer grupos funcionales como alcoholes, geraniol, aldehídos, vainillina (fig. X-4), cetonas, mentona (fig. X-5), fenoles, eugenol, (fig. X-6), éteres fenólicos, safrol (fig. X-7) óxidos, 1,8-cineol (fig. X-8), y éteres, acetato de geraniol (fig. X-9). Los sesquiterpenos pueden ser de cadena abierta como el farnesol (fig. X-10) y bicíclicos como el β -cadineno (fig. X-11) (31).

Los aceites esenciales son segregados en células olfectorias, en conductos o cavidades secretoras, o bien en pelos glandulosos. Muchos de éstos son mezclas de sustancias volátiles, las cuales proporcionan el olor característico de la planta. Pueden ser extraídos de varias partes de la planta, como son: pétalos, hojas, corteza, la-

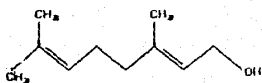
llo, frutos, etcétera.

Una de las propiedades que presentan es un elevado índice de refracción, son ópticamente activos, poseen olor y sabor característicos, son incoloros o ligeramente amarillos, se oscurecen con la luz del sol y se oxidan en presencia de aire. Son extraídos de la planta por arrastre con vapor de agua, o por extracción con disolventes orgánicos ya que poseen una alta solubilidad en ellos (32).

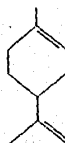
Los aceites esenciales extraídos de *aristolochias* presentan características estructurales importantes. Por ejemplo de las hojas de *A. longa* se ha separado de la fracción hexánica (por arrastre con vapor de agua) dos sesquiterpenos, el cariofileno (fig. XI-1) y el óxido de cariofileno (fig. XI-2), también se obtuvo linalol (fig. XI-4) y acetato de bornilo (fig. XI-5). Del aceite esencial obtenido de las raíces se aislaron (por cromatografía en capa fina) el calareno (fig. XI-3), el maaliol (fig. XI-4) y el 1(10)-2- aristolona (fig. XI-5) (18).

F. Ionescu y colaboradores en 1977 reportan la presencia de un compuesto aislado del extracto etanol-agua identificado como dehidroisoeugenol (fig. XII-1) de *A. taliscana* (19).

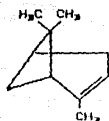
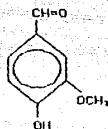
Figura X: tipos de terpenos.



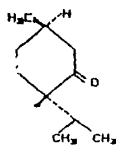
X-1. Geraniol



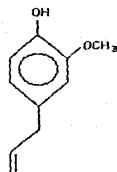
X-2. Limoneno

X-3. α -Pineno

X-4. Vanilina

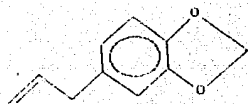


X-5. Mantonona

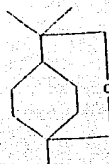


X-6. Eugenol

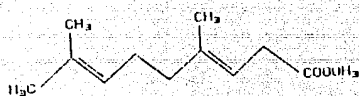
Figura X: Continuación.



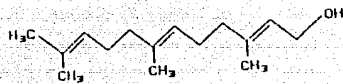
X-7. Safrol



X-8. 1,8-Cineol



X-9. Acetato de Geraniol



X-10. Farnesol

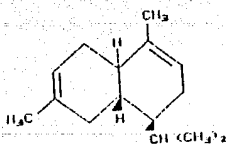
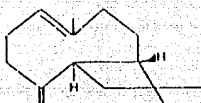
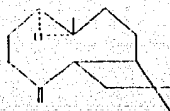
X-11. β -Cadineno

Figura XI: Compostos terpenóicos isolados de *A. longi*.



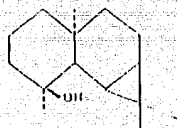
XI-1. β -Cariofileno



XI-2. Oxido de cariofileno



XI-3. Calareno



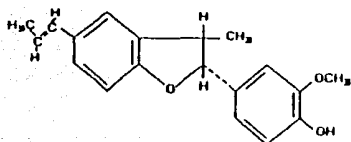
XI-4. Mastirol



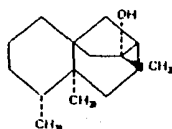
XI-5. 1(10)-Aristole-2-ona

Del extracto de éter de petróleo de A. indica se extrajo e identificó el (12 S)-7, 12 selcolswaranol-12 (fig. XII-2) y el (+)-ledol (fig. XII-3), dos nuevos sesquiterpenos -- (25).

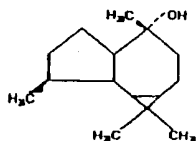
Figura XII: Compuestos terpenoides aislados de *A. taliscana* y *A. indica*.



XII-1. Dehidroisoeugenol



XII-2. (12S)-7,12-secoishwaranol 12



XII-3. (<=>) Ledol

1.3.3. Alantoina.

La alantoina ha sido aislada de A. Clematidis, A. debilis y A. indica. Fue identificada y aislada por primera vez por Vanquell en 1800. La primera obtención artificial fue realizada por Woher y Liebig en 1838, realizaron la oxidación del ácido úrico con plomo para obtenerla. Actualmente es preparada por la oxidación de ácido úrico con permanganato de potasio alcalino.

La alantoina es el producto final del metabolismo de las purinas en los mamíferos, a excepción del hombre y los monos antropoides (37,38).

La alantoina es un compuesto químico formado por la planta a partir del nitrógeno del NH_3 , que se obtiene de la degradación de proteínas y de amino ácidos. El NH_3 puede acumularse en la planta e inducir un envenenamiento gradual. La planta para evitarlo forma compuestos, como la alantoina y el ácido alantoico (constituyentes de la raíz) entre otros, para desintoxicar y almacenar al mismo tiempo el NH_3 (38,40).

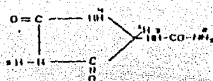
Se ha encontrado que en solución ácida la alantoina puede contener un isómero de estructura simétrica cerrada. Se debe tener en cuenta lo anterior porque adquiere una im-

portancia en el estudio químico o farmacológico.

La alantoina es obtenida como cristales blancos que precipitan de agua, con un punto de fusión de 238°C. Tiene peso molecular de 150.12. El análisis elemental da los siguientes Valores: C: 30.38 %, H: 3.82 %, N: 35.44 % y O: 30.36.

La alantoina es poco soluble en agua y alcohol frío, sin embargo, es soluble en agua y alcohol caliente, es prácticamente insoluble en éter.

Sus propiedades espectroscópicas en ^1H -RMN son: 5.26 ppm para un cuádruplete ($J=8$ Hz, $J=1$ Hz) que integra para un protón en la posición 1. Una señal a 5.76 ppm para un singlete correspondiente a dos protones en la posición-2. En 6.90 ppm aparece un doblete ($J=8$ Hz) que integra para un protón en la posición 3. A 8.03 ppm aparece un -doblete ($J=1$ Hz) para el protón en posición 4. El protón en la posición 5 aparece como una señal a 10.55 ppm para un singlete. El espectro de IR muestra a 3 440 y 3 550- cm^{-1} dos picos de absorción relativos a un grupo NH_2 .



Alantoina

La alantoina tiene una actividad farmacológica sobre las úlceras, tiene un buen poder cicatrizante en heridas difíciles de curar, además posee propiedades antisépticas --- (20, 24).

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato Thomas Hoover, Capillary Melting Point y en un Fisher Johns, no están corregidos.

2. Los espectros de IR fueron determinados en un espectro fotómetro Perkin-Elmer Mod. 599-B; en disco de KBr o en solución de CHCl_3 .

3. Los espectros de ^1H -RMN se determinaron en los siguientes aparatos:

a) Varian FT-80.

b) Varian EM-390.

Los desplazamientos químicos están reportados en partes por millón (p.p.m.) referidos a tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros se determinaron en solución de DMSO- d_6 .

4.- Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro de sistema acoplado de gases-masas Hewlett-Packard 598B A.

5.- Los espectros de ultravioleta se determinaron en espectrofotómetro UV-visible, Perkin-Elmer Mod. 202.

6. En técnicas cromatográficas se utilizaron los siguientes equipos y materiales:

a) Cromatografía de gases para esteroides:

Condiciones:

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de flama.

Columna capilar OV-101.

Programa: temperatura inicial = 230 °C durante 2 minutos, temperatura final 268 °C a una velocidad de 1.5 °C/min.

-Gas acarreador: nitrógeno.

-Temperatura detector: 300 °C

-Temperatura inyector: 300 °C.

b) Cromatografía de gases para aceite esencial.

Las condiciones para la cromatografía se detallan en la parte experimental correspondiente a el aceite esencial.

c) Cromatografía de placa o de columna:

-Gel de sílice GF.

-Gel de sílice Merck F-254, fluorescente.

-Alúmina neutra de actividad II, III-Brockman, Merck.

7. Reactivos empleados para revelar placas cromatográficas.

-Mayer.

-Dragendorff.

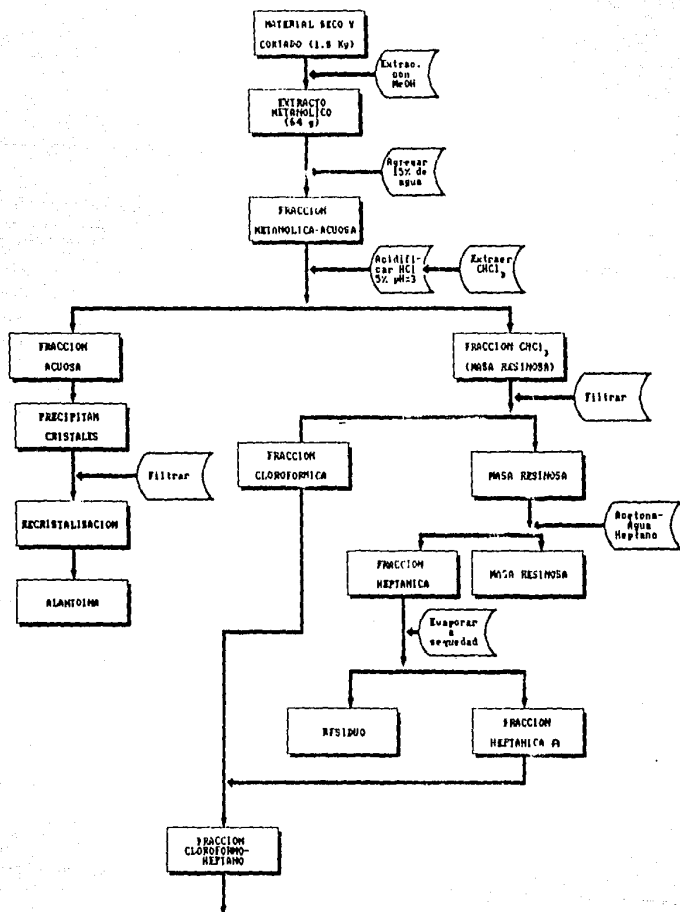
-Yodoplatinato de potasio.

-H₂SO₄ 5N.

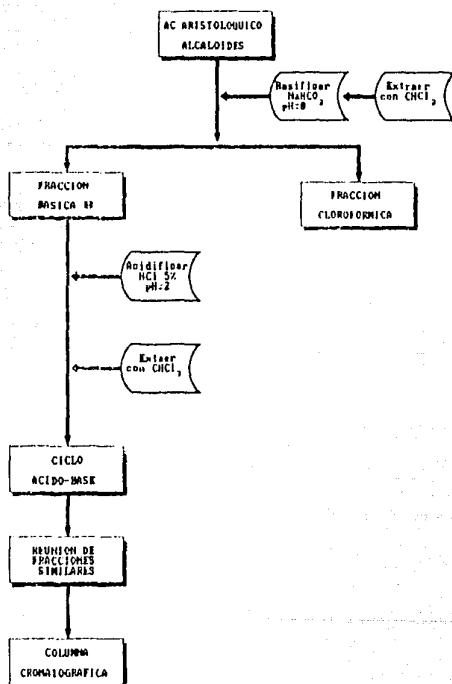
-Sulfato cálcico amoniacal.

-Anisaldehído-H₂SO₄.

Esquema A: Diagrama de extracción para el procedimiento 1.

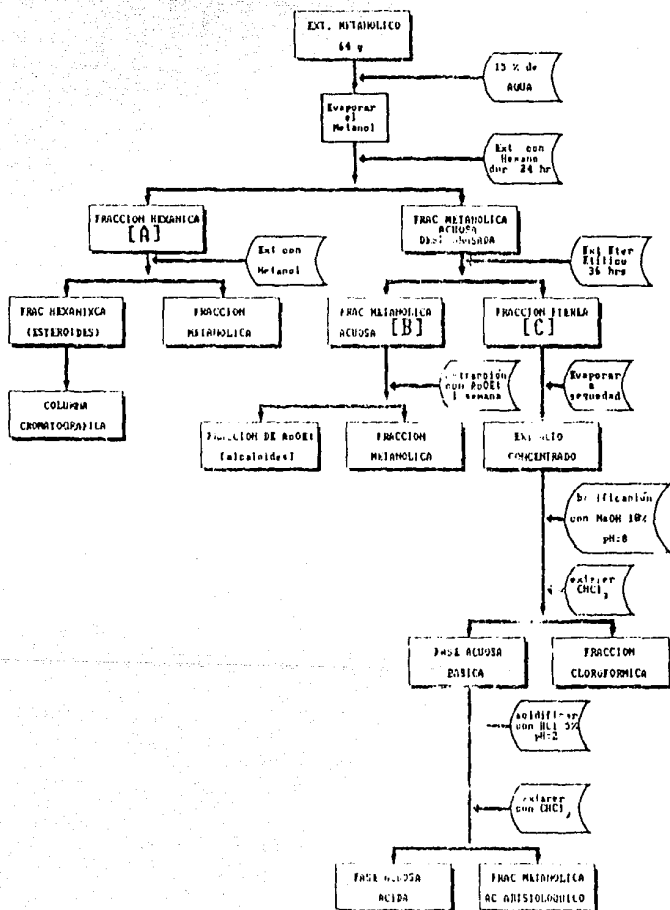


Continuacion esquema A:



Esquema B: Diagrama de extracción para el procedimiento II.

16



99

2.2.1. Procedimiento 1:

La fracción heptánica A₁, libre de la masa resinosa, se evaporó el heptano y se reunió con la fracción CHCl₃ áci-

da, quedando un residuo de color amarillo, que al ser analizado por cromatografía en capa fina desarrollada con $\text{MeOH-H}_2\text{O}(9:8:0.2)$ y revelada con luz ultravioleta muestra la presencia de una sustancia que revela como ácido aristolóquico. La misma placa fue revelada con reactivo de Dragendorff. Con este reactivo aparecieron manchas de color naranja característico de alcaloides, por lo que la fracción heptánica A_1 se concentró a sequedad y se le agregó agua basificándose posteriormente con NaHCO_3 hasta un pH entre 8 y 9 y extrayendo con CHCl_3 , obteniendo de esta forma una fracción básica B_1 . La fracción acuosa básica B_1 fue acidificada con HCl al 5% y extraída con CHCl_3 . El procedimiento anterior se repitió varias veces, reuniéndose las fracciones semejantes y de más importancia.

Cada fracción clorofómica obtenida tanto de la extracción básica como ácida, presentó por cromatografía en capa fina características distintas (R_f , color, absorción en luz ultravioleta): pudiéndose apreciar por una parte la presencia de ácido aristolóquico y por otra la de alcaloides -posiblemente de naturaleza fenólica- en cada fracción. De siete fracciones obtenidas la número 4 presentó mayor cantidad de ácido aristolóquico. Con objeto de aislar y purificar el ácido aristolóquico presente, la fracción 4 fue disuelta en la mínima cantidad de $\text{N-N Dimetilformamida}$ o

liente adicionando igual volumen de agua caliente y de 2 a 3 gotas de HCl para acidificar el medio, según el método reportado en la literatura para purificación del ácido aristolóquico (24). Sin embargo, de esta forma no pudo obtenerse, ya que no precipita, sino continúa mezclado con otros componentes.

En todos los casos, las fracciones de color amarillo parecen tener una mezcla de ácido aristolóquico y alcaloides (posiblemente bases cuaternarias o alcaloides fenólicos). Nuevamente se reunieron las fracciones similares y se trató de separar el ácido de los alcaloides por medio de un ciclo ácido-base semejante a los anteriores; en esta ocasión alcalinizando con NaOH 2N hasta alcanzar un pH de 10. La fracción acuosa se saturó con NaCl, con objeto de separar el ácido aristolóquico de los demás componentes. Tampoco en esta ocasión se obtuvo una buena separación.

De nuevo las fracciones semejantes fueron reunidas (se obtuvo 1.64 g de muestra) y colocadas en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice. La columna se corrió con una mezcla de CHCl_3 -MeOH en proporción 8:2 aumentando la polaridad cada 5 volúmenes. No fue posible lograr una separación.

Cuando se acidificó el extracto metanólico-acuoso para extraer el ácido aristolóquico precipitó un polvo de color blanco, se extrajo con cloroformo y en la fracción acuosa quedaron los cristales blancos, que se separaron por filtración. Los cristales se recrystalizaron de agua caliente y etanol. Se trató de obtener derivados del posible ácido. Primero se trató de acetylar con diazometano y posteriormente de esterificar con alcoholes ácidos. En este paso no se obtuvieron resultados.

Posteriormente se identificó nitrógeno por una prueba de la cual dió positiva. Se obtuvieron unos cristales blancos de características:

pf. = 230-234 °C con descomposición.

IR: máx. KBr. -3450, 3350, 3225, 3070, 1670, 1640, 1610, 1530, ---
(cm⁻¹) (ESPECTRO 1)

¹H RMN: (ppm)

δ 5.25 (d, H-1) J = 7.5 Hz (ESPECTRO 2)

δ 5.75 (s, 2H-2)

δ 6.7 (d, H-3) J = 7.5 Hz

δ 8.02 (s, H-4)

un H¹ fuera del campo. δ 10.5 (s, H-5)

EM: M/z = 158 (intensidad relativa) (ESPECTRO 3)

158 (4.7), 141 (7.2), 130 (5), 115 (26.2), 87 (73.8),
70 (12), 60 (11.9), 44 (100).

Analysis elemental: C: 30.62%, H: 37.54%, N: 4.11%, O: 27.73%

U.V. λ 241 nm

(ESPECTRO 4)

2.2.2. Procedimiento II:

La mitad del extracto original se sometió al proceso mostrado en el esquema II.

El extracto metanólico se diluyó con agua y se sometió a una extracción líquido-líquido con hexano durante 24 hrs. se eliminaron con ello grasas y clorofilas. El extracto hexánico (A) fue separado y conservado para trabajarlo posteriormente. El extracto metanólico-acuoso se sometió a una nueva extracción con éter etílico durante 36 hrs. empleando la misma técnica.

Se obtuvieron de esta manera una fase hexánica (A), una fase acuosa-metanólica (B) y una fase etérea (C).

La fracción (B) se extrajo con acetato de etilo durante 24 hrs. en un extractor líquido-líquido. La operación se repitió hasta que se tuvieron 10 extracciones. Cada fracción obtenida se concentró y se analizó por placa cromatográfica eluyendo con CHCl_3 -Metil en relación 1:1 y revelando con reactivo de Dragendorff. Se observaron manchas de color naranja distintos (posibles alcaloides) en cada fracción. Después de analizada cada fracción se reunieron las más importantes, aquellas que mostraban una mayor pureza y se colocaron en una columna cromatográfica.

Los extractos que se reunieron de acetato de etílico, una vez evaporado el disolvente pesaron 360 mg; para esta cantidad se empleó gel de sílice en una proporción de 1:200. La columna se empacó con gel de sílice desactivada con una mezcla de acetona-agua al 10% y se eluyó utilizando gradiente de polaridad. La elución comenzó con una mezcla de CHCl_3 -acetona 1:1 y se cambió en un 5% cada 5 volúmenes de la columna hasta llegar a acetona. Después se introdujo MeOH hasta lograr una relación MeOH-acetona 95:5 y llegar a MeOH sólo. Por este procedimiento se esperaba la eliminación de los materiales menos polares que impurificaban a los alcaloides fenólicos más polares que se obtenían en el último término. Sin embargo, desafortunadamente la duración de este proceso dio como resultado la descomposición de la fracción alcaloidea que tampoco de esta manera pudo ser purificada.

2.2.2.1. Fracción hexánica (A):

La fracción hexánica (A) fue sometida a un análisis de cromatografía en capa fina, la muestra parecía tener compuestos esteroidales por lo que se comprobó con esteroides patrón, entre ellos β -sitosterol y colesterol. Se observó que algunas de las manchas de la placa coincidían con los patrones, sin embargo, fue necesaria una purificación posterior para asegurar una correlación más estrecha.

La fracción hexánica (A) fue trabajada 8 meses después del análisis anterior y presentaba consistencia viscosa y color café con un peso de 3.23 g. Se analizó nuevamente por cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente CHCl_3 y revelando con H_2SO_4 5 N se calentó para lograr la aparición de color. En la placa revelada se apreciaron varias manchas, una de las cuales resultaba por su poca polaridad y su mayor concentración. La fracción hexánica presentó las mismas características que al inicio de la extracción.

Separación de los componentes de la fracción hexánica A:

El extracto hexánico (A) fue precolado en el gel de sílice utilizando una columna de vidrio de 5 cm de diámetro por 20 cm de longitud, que se empacó con el gel de sílice para cromatografía en capa fina en una proporción de 1:10. La fracción hexánica (A) absorbida en celita en relación 1:3 fue colocada en la columna. El punto de aplicación se cubrió con una capa de aproximadamente de 1 cm de ancho de Na_2SO_4 anhidrido. La columna fue eluida con una mezcla de CHCl_3 -acetona en relación 9:1 y ayudada con vacío de la línea. Las fracciones obtenidas fueron de aproximadamente 50 ml cada una. La elución fue seguida por cromatografía en capa fina corrida con el mismo disolvente que la columna, revelada con H_2SO_4 5 N y calentamiento. Se reunieron las fracciones 1-14 con un peso de 1.1120 gms se colocó --

en una columna cromatográfica aproximadamente de 100 cm de largo por 3 cm de diámetro, se empacó con el gel de sílice para columna en una relación 7:3, se eluyó con CHCl_3 sólo. Se recolectaron fracciones de 50 ml cada una. A partir de la fracción 31 se eluyó con CHCl_3 -MeOH 8:2 aumentando la polaridad hasta MeOH sólo. Las fracciones importantes fueron 1-2 y 23-30.

Fracción 1-2: De la fracción 1-2 se obtuvieron 180 mg de un producto color amarillo transparente y consistencia viscosa, que contenía el compuesto mencionado anteriormente. Se comparó con los patrones que se incluyen en el cuadro 7 en una cromatoplaaca eluida con CHCl_3 -AcOEt en relación 8:2 y revelada con H_2SO_4 5 N y calentamiento. Se muestran los valores de R_f y las coloraciones adquiridas por cada uno de ellos. Ninguno de los valores de R_f ni las coloraciones fueron idénticos a la fracción ($R_f=0.899$ con coloración café - oscura).

Se realizaron posteriormente las siguientes pruebas para confirmar o descartar la presencia de esteroides, utilizando como patrones: diosgenina (sapogenina esteroide), colesterol (esterol) y ácido oleanólico (triterpeno).

Prueba 1: 2 ml de éter etílico se agregaron a 2 mg de muestra y 2 ml de metanol observándose ligera turbidez.

Por lo que la prueba se consideró parcialmente positiva para esteroides.

Prueba 2: La muestra se disolvió en CHCl_3 , se agregó --- 1 ml. de anhídrido acético y dos gotas de H_2SO_4 concentrado. La prueba se aplicó tanto a patrones como a la muestra y se compararon las coloraciones. La coloración que adquirió la muestra fue semejante a la coloración café del ácido oleoico.

La fracción 1-2 se analizó en cromatografía en capa fina, se desarrolló en dos direcciones con una mezcla de cloruro de metileno-acetona- MeOH en proporción 1:1:1, se reveló la placa con H_2SO_4 5 N y calentamiento, fue observada una sola mancha de color café oscuro. Posteriormente la fracción se comparó con los patrones que se muestran en el cuadro 7, se observan los valores de R_f y las coloraciones adquiridas por cada uno de ellos. Ninguno de los valores de R_f , ni las coloraciones fueron iguales a la fracción 1-2 ($R_f=0.89$, coloración café oscura). A la fracción 1-2 se le hicieron espectros de IR, ^1H RMN y además análisis en cromatografía de gases; éste último mostró que la fracción estaba formada por una mezcla de varios compuestos con una polaridad muy similar. La muestra no se purificó más debido a la pequeña cantidad con la que

Se contaba.

Aislamiento de β -sitosterol: la fracción 23-30 ($R_f = 0.7836$) se sometió a un análisis cromatográfico comparándola con β -sitosterol ($R_f = 0.7837$) y colesterol ($R_f = 0.7567$) como patrones y se eluyó con una mezcla de CHCl_3 -MeOH en relación 8:2 y se reveló con H_2SO_4 5 N y calentamiento. El análisis dió como resultado la identificación preliminar de β -sitosterol, tomando en consideración no sólo el valor del R_f , sino también las características del revelado (color rojo quemado tanto de la muestra como del patrón).

Purificación: La purificación del β -sitosterol se llevó a cabo disolviendo la fracción 23-30 en cloroformo (en el cual es poco soluble), se filtró, eliminándose así algunas impurezas. El residuo se disolvió en éter etílico caliente, se agregaron poco a poco unas gotas de etanol a la mezcla, se dejó enfriar y se filtró al vacío. Se obtuvieron 22 mg. de unos cristales blancos cuyas características son:

p.f.: 164-167°C.

R_f : 0.7840 (CHCl_3 -MeOH 8:2)

IR: a) fracción 23-30; max. $\text{KBr}(\text{cm}^{-1})$ 3450, 2920, 2820, --- 1450, 1368, 1045 (ESPECTRO 5)

b) patrón de β -sitosterol; max. (cm^{-1}) KBr 3450, 2925,

2020, 1450, 1370, 1043. (ESPECTRO 6).

$^1\text{H NMR}$: (ppm)

δ 0.69-1.1.41 (varias señales para metilos del iso-
propilo y metilos angulares).

δ 4.18 (hidrogeno vinilico).

δ 3.65 (-OH).

(ESPECTRO 7).

Cromatografía de gases:

a) Fracción 23-30: $t_r = 12.363$ (CROMATOGRAMA A)

b) Patrón β -sitosterol: $t_r = 12.047$ (CROMATOGRAMA B)

Cuadro 7: Valores de Rf. y coloraciones adquiridas de los patrones empínicos para la identificación de esteroides.

Compuesto	Valor de Rf.	Coloración
5,16-Pregnadien-3 β -ol-20-ona	0.39	café
Ecogenina.	0.23	amarillo
Prednisolona	0.02	café claro
Acetato de 16 β -metil-16 α ,17 α -epoxipregnenolona.	0.80	morado
4,9(11)-pregnadien-3,20-diona	0.58	beige
β -metasona.	0.04	
16-dehidropregnenolona	0.39	café-amarillo
Acetato de 16-dehidropregnenolona.	0.78	café-amarillo
Propionato de 5,16-pregnadien-3 β -ol-20-ona.	0.76	café oscuro
17 α ,epoxipregnenolona	0.41	guinda
Acetato 21-dexametasona.	0.08	-
5 α ,20 α ,22 α ,25D-espirostan-3 β -12 β -diol.	0.32	amarillo
Acetato de 21-prednisolona	0.06	rojo
Dexametasona	0.03	morado
Acetato 9(11),16,(5 α)-pregnadien-3 β -ol-20-ona.	0.70	marrón
Diacetato 5 α ,20 α ,22 α ,25D-espirostan-3 β ,12 β ,diol-11-ona.	0.60	café-amarillo
5 α ,20 α ,22 α ,25D-espirostan-3 β -ol-11-ona	0.26	amarillo.
9(11),16,(5 α)-pregnadien-3 β -ol-20-ona.	0.36	café-amarillo

Cuadro 7: Continuación.

1,4-pregnadien-17 α ,21-diol- 3,11,20-triona.	0.06	café
Acetato de ecogenina.	0.68	café-amarillo
16 β ,metil-16 α ,17 α -epoxi pregnenolona.	0.36	negro
16 α -metil-pregnenolona.	0.40	café-oscuro
Acetato 16 α ,metil- pregnenolona.	0.72	café
5 α ,20 α ,22 α ,25D-espirostan- 3 β -ol.	0.36	café-amarillo
Campesterol.	0.44	gris
Coolesterol.	0.46	negro
Kaempferol	0.12	amarillo claro
Stigmasterol	0.42	lila
Lanosterol	0.54	rojo-café
Ergosterol	0.46	gris
Sitosterol	0.42	café

2.2.2.1. Fracción éterea (C):

El extracto étereo (C) se concentró hasta la eliminación total de éter, se basificó con bicarbonato de sodio al 10% en agua, hasta alcanzar un pH de 8 y se extrajo con CHCl_3 .

La fracción acuosa básica se acidificó con HCl al 5% hasta tener un pH entre dos y tres. Extrayendo con CHCl_3 hasta que los extractos prácticamente no tenían coloración amarilla. Las fracciones clorofórmicas (amarillas) se concentraron, precipitando un compuesto color amarillo. Por la cromatografía en capa fina eluida con una mezcla de CHCl_3 - MeOH en relación 8:2 se observó una sola mancha color amarillo característica del ácido aristolóquico.

El precipitado obtenido se precipitó y se recrystalizó --- agregando una mínima cantidad de N-N-dimetilformamida caliente (suficiente para disolverlo) se agregó igual cantidad de agua caliente y dos o tres gotas de HCl para acidificar el medio, se obtuvo un precipitado que se filtró al vacío lavando varias veces con agua helada. La cristalización se repitió tres veces. Los cristales obtenidos fueron secados con ayuda de una bomba de vacío aproximadamente -- 8 hrs obteniéndose 55.4 mg.

Debido a que parte de la N-N-dimetilformamida queda absor-

bida en la masa cristalina oscureciendo los resultados espectroscópicos, la muestra recuperada de $^1\text{H-NMR}$ fue precolada. Para la percolación se usó una columna de 20 cm de largo por aproximadamente 5 cm de diámetro, se empacó con alumina neutra de actividad II y III. Se eluyó la columna con MeOH-CHCl_3 en relación 5:5 acidificada a un $\text{pH}=2$ con HCl al 5%. Gran parte del ácido fue absorbido por la alumina y no pudo ser recuperado totalmente.

La $\text{N-N-dimetilformamida}$ fue eliminada utilizando un desecador de Abdehalden con xilol ($\text{p.eb.}=139^\circ\text{C}$) y pentóxido de fósforo durante dos días. Se recuperaron 14 mg con las siguientes características:

pf: $278-280^\circ\text{C}$ (con descomposición).

Rf: 0.16 ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ en relación 8:2).

Solubilidad: Insoluble en agua, etanol e isopropanol. Soluble en acetona, MeOH , AcOEt , CHCl_3 , dimetilsulfóxido y heptanol.

Identificación por reacción colorida: coloración verde, -- considerada positiva.

IR. max: (cm-1) película CHCl_3 . 1686, 1520, 1539, 1262, ---

1034 y 938.

(ESPECTRO 8).

^1RMN : (ppm) Señal múltiple de δ 7.2 a δ 8.6

que integra para 5H^+ aromáticos:

δ 7.75 (s, H-2)

δ 8.60 (d, H-5) $J=6\text{Hz}$

δ 7.75 (t, H-6) $J=6\text{Hz}$

δ 7.23 (d, H-7) $J=6\text{Hz}$

δ 8.5 (s, H-9)

δ 6.46 (s, CH_2O_2)

δ 4.02 (s, MeO-8)

(ESPECTRO 9)

EM: $M/Z=341$ (intensidad relativa)

341 (11), 296 (12), 295 (51), 75 (21), 74 (28), 69 --

(13), 63 (30), 53 (47), 45 (100).

(ESPECTRO 10).

2.2.3. Aceite esencial:

El estudio del aceite esencial de A. asclepiadifolia se efectuó con una fracción obtenida anteriormente en nuestro laboratorio por otro investigador. Dicha fracción se obtuvo por un método común de separación por arrastre con vapor de agua de los tallos de la planta seca. Esta fracción posee un olor penetrante y aromático, tiene color amarillo claro y transparente, y una consistencia densa.

Se realizó primero un estudio de los componentes del aceite esencial por cromatografía de gases, comparado con varios patrones de componente comunes de aceite esenciales. Los patrones fueron seleccionados de acuerdo a los tipos de componentes aislados de aristoloquias, reportados en la bibliografía. Para este estudio se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Mod. 5890 con detector de ionización de flama. Se empleó una columna capilar de vidrio de 12 m x 0.143 mm de longitud con un diámetro interno de 0.2mm. Se empacó la columna con SE-54. El programa de temperaturas se realizó con una velocidad de 5°C/min. La temperatura inicial fue de 40°C hasta una temperatura final de 190°C. Posteriormente la temperatura varió a una velocidad de 15°C/min hasta 280°C la cual se mantuvo durante 5 min. Cada patrón se inyectó en el cromatógrafo de gases por separado obteniéndose tiempos de reten---

ción específicos para cada uno. Ninguno de los tiempos de retención coincidió con los de la muestra. (CROMATOGRAMA E)

Se realizó un segundo estudio utilizando un método de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. Se empleó un aparato Hewlett Packard 5988-A con un detector de ionización de flama. Se utilizó una columna de 25 m x 0.2 mm de longitud empacada por metilsilicona SE-30. El programa de temperatura se realizó con una velocidad de 8°C/min, la temperatura inicial fue de 70°C y la temperatura final fue de 220°C. Se empleó helio como fase móvil. La temperatura del inyector fue de 230°C.

Se corrieron tres experimentos diferentes empleando las mismas condiciones. Los resultados son reproducibles, con la excepción de que en el primer experimento aparece un grupo de picos separados de los componentes de la muestra, que posiblemente corresponden a una impureza de la columna. Los experimentos 2 y 3 son reproducibles por lo que sólo se presentan los resultados de uno de ellos (el experimento 1). (CROMATOGRAMA C)

Se realizó un análisis de cromatografía de gases y de espectroscopía de masa de los picos de los componentes mayoritarios, los resultados se muestran a continuación:

a) Cromatografía de gases: (CROMATOGRAMA D)

Componente	tiempo de retención min.	% Relativo
1	15.0	13.6
2	15.6	0.7
3	15.4	3.0

b) Espectroscopía de masas

Componente	Datos espectroscópicos M/z, (% relativo)
1	219 (0.002), 204 (0.24), 108 (97.5), 92 (36.6), 91 (9.5), 83 (4.1), 79 (12), 78 (41.4), 77 (9.7), 69 (4.8), 55 (9.7), 41 (100). (ESPECTRO 11)
2	221 (7), 203 (12.1), 108 (95), 93 (14.6), 92 (39), 69 (22), 55 (19.5), 43 (92.6), 41 (100). (ESPECTRO 12)
3	166 (7.3), 148 (14.6), 138 (26.8), 108 (56), 69 (22), 43 (92.6), 41 (100). (ESPECTRO 13).

Cuadro 8: Tiempos de retención de patrones de terpenos y compo-
nentes del aceite esencial de A. asclepiadifolia.
(CROMATOGRAFIA E)

terpeno	Distancia de retención % (cm)	Tiempo de retención
Borneol	6.3	6.121
Ladrol	12.2	12.133
Isoeugenol	9.9	9.884
Safrol	7.8	7.732
Cariofileno	4.9	4.887
Benzoato de bencilo	3.7	7.067
Carrona	4.5	9.185
ACEITE ESENCIAL	1.1	1.079
	11.85	11.61
	13.6	13.612
	16.0	17.73
	19.5	19.43
	20.4	20.30
	22.25	21.28
	22.00	21.95
	22.7	22.72
	23.5	23.49
	26.5	26.48

III. DISCUSION DE RESULTADOS

Aristolochia esclepiadifolia es una planta nativa del estado de Veracruz, químicamente no había sido estudiada y que se utiliza para contrarrestar el veneno de serpiente. De esta planta se estudiaron las raíces, las cuales son gruesas y duras, con un olor aromático y sabor amargo. De las raíces se obtuvo la alantoina (fig.1-4) que se encuentra presente en gran cantidad, el ácido aristolóquico I (fig.14), es el ácido nitrofenantrénico más común presente en este género, aunque es de suponerse por las características de los espectros de ^1H RMN obtenidos, que se encuentra acompañado de al menos otro ácido.

El extracto metanólico-acuoso obtenido por la maceración de las plantas se dividió en dos partes iguales, las cuales fueron tratadas con métodos distintos de separación.

3.1. Alantoina (fig. 1-4).

Previamente a la separación ácido-base, al concentrar el extracto metanólico-acuoso precipitó de éste una sustancia blanca, insoluble en casi todos los disolventes orgánicos y soluble en agua. Originalmente se pensó que se trataba de una sal inorgánica sin embargo se constató que tenía un punto de fusión de 230°C y se comportaba espectroscópicamente como una sustancia orgánica con una

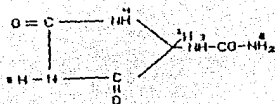
absorción en el UV a 241nm.

El IR muestra una relación C-H muy baja respecto a los grupos C=O presentes. Estos últimos con absorciones a 1725 cm^{-1} y a 1670 cm^{-1} , por lo que en un principio se pensó que se trataba de un anhídrido. Esto último apoyado por el espectro de $^1\text{H RMN}$ que presenta muy pocas señales.

El espectro de masas presentó un ión molecular de 158 (par). Al detectarse la presencia de nitrógenos por análisis elemental que mostró un alto contenido de éste (37.54%), pudo establecerse la estructura de este compuesto contenía -- uno o más grupos amida.

Las siguientes características espectroscópica permitió establecer que la substancia blanca cristalina aislada era - alantoina

El espectro UV presenta una λ máxima a 241 nm (ESPECTRO 4)
El espectro de IR presenta bandas de absorción (cm^{-1}) a --
3450 y 3350 (N-H alifático), 3225, 3070 (H-H), 1725 (-C-
amida primaria), 1670 (-C-NH₂), 1640, 1610, (NH₂ amida -
secundaria), 1530, 1290 (R-C-NH-R secundario)(ESPECTRO 14).



1-4. Alantoina

El espectro de ^1H RMN (espectro 2) presenta una señal doble ($J=7.5$ Hz) a δ 5.25 para un protón de carbono alifático -- del anillo señalado como 1. Aparece una señal simple en δ 5.75 que integra para dos protones del grupo NH_2 . La señal que aparece como un doblete a δ 6.7 ($J=7.5$ Hz) pertenece a un protón de grupo amida señalado como 3. Para protón del grupo amida del anillo a 4 aparece una señal simple a δ 8.02. El protón del anillo señalado como 5 aparece fuera del campo como un singulete a δ 10.5 (ver fig. 1-4).

El espectro de masas (ESPECTRO 3) presenta un M/z a 158 -- que representa el peso molecular de la alantoina. Presenta un pico en 130, por pérdida de 28 unidades de masa debido al grupo C=O . De 158 se pierden 17 unidades de masa -- probablemente de NH_3^+ dando un pico en 141. Existe también la pérdida de 26 unidades ($-\text{CN}$) por lo que presenta -

un pico a 115. El pico base es 41 que representa a la unidad de NH-C=O .

La presencia de alantoína es significativa para explicar algunos de los usos que también se dan a esta planta (curación de afecciones cutáneas) ya que es conocida la capacidad terapéutica de la alantoína para este tipo de enfermedades (20).

Una porción del extracto se trató por un método de separación ácido-base. La finalidad de este método era separar el ácido aristolóquico presente. El primer problema enfrentado fue la presencia de una masa resinosa cada vez que la fracción se acidificaba, lo que contribuyó a la mala separación del ácido y de otros compuestos presentes. En cada fracción ácida o básica, orgánica o acuosa, el ácido aristolóquico se encontraba acompañado por alcaloides, posiblemente bases cuaternarias o alcaloides fenólicos. Cada fracción ácido o básica fue seguida por cromatografía en capa fina revelando siempre con luz ultravioleta y reactivo de Dragendorff. Como único resultado se obtuvieron una gran variedad de fracciones impuras y en pequeñas cantidades.

En 1973 Carrera, así como otros investigadores informaron de la presencia de magnoflorina en Aristolochiaceae(10).

Este alcaloide en forma de sal cuaternaria de amonio acompaña siempre al ácido aristolóquico. Es de pensarse que -- uno de los alcaloides que acompañaron siempre al ácido -- aristolóquico en esta planta y que no lograron separarse sea magnoflorina.

El segundo procedimiento utilizado se encuentra consignado en el diagrama B de extracción. Se obtuvieron tres -- fracciones. Una fracción hexánica, una fracción éterea y una fracción de acetato de etilo. Para obtener cada fracción se utilizó un método de extracción líquido-líquido. Con el empleo de este método se obtuvieron resultados positivos.

3.2 Fracción hexánica.

La fracción hexánica se trabajó 8 meses después de ser obtenida. Un análisis por cromatografía en capa fina demostró que no hubo cambios durante este período. Puesto que en la fracción hexánica se encuentran además de grasas -- y/o clorofilas, sustancias de naturaleza terpénica o esterooidal. Se efectuaron una serie de pruebas preliminares -- para determinar la presencia de éstos; utilizando cromatografía en placa, diferentes combinaciones a base de CHCl_3 como eluyente y como reveladores, H_2SO_4 5 N, luz UV o sulfato cálcico amoniacal. Como consecuencia se detectaron -- varias mezclas de posible interés. Una comparación preli-

minar de colesterol y la probable presencia de β -sitosterol.

El extracto hexánico se cromatografió en columna de gel de sílice (las condiciones se dan en la parte experimental), se usó como eluyente CHCl_3 sólo. La elución con disolventes de mayor polaridad dió como resultado fracciones cromatográficas muy mezcladas.

De la fracción clorofórmica 1-2 se obtuvo un componente poco polar que se encontraba en mayor proporción en el extracto original. Para comprobar que la fracción obtenida podía ser un compuesto esteroide se realizaron varias pruebas.

El compuesto da positiva la prueba de Lieberman-Burchard para esteroides. En este último se utilizaron patrones, colesterol, β -sitosterol y ácido aleánico. El compuesto presentó mayor semejanza con este último. Se efectuaron también otras series de comparaciones empleando los compuestos del cuadro 7 como patrones. Los espectros de IR y ^1H RMN de este sólido, mostraron señales para un compuesto esteroide. Sin embargo, a pesar de que este compuesto muestra una sola mancha aún en cromatografía bidimensional en placa, al someterse en cromatografía en fase gaseosa mostró ser una mezcla de compuestos con tiempos -----

de retención relativamente cercanos. Debido a la pequeña cantidad con la que se contaba, no pudo ser establecido si la sustancia se descomponía en el proceso.

La fracción cloroformica 23-30 se comparó con patrones de colesterol y β -sitosterol, ya que se trataba de la mancha de la fracción hexánica que presentaba un parecido a estos patrones. El resultado obtenido de lo anterior fue una comparación positiva con el β -sitosterol, tanto en valor de R_f como en la coloración adquirida al revelar con H_2SO_4 .

La purificación de la fracción 23-30 se realizó por cristalización en cloroformo, posteriormente se recrystalizó con éter etílico-etanol. Se obtuvieron de esta manera unos cristales blancos cuyas características fueron muy semejantes a la del patrón de β -sitosterol: El punto de fusión fue de 164-167 °C (patrón 166). El valor de R_f en $CHCl_3$: MeOH (8:2) para la muestra 0.7839 y 0.7840 para el patrón la coloración que toma el compuesto al ser revelado es también muy parecida.

El análisis espectroscópico mostró que los cristales blancos obtenidos eran en efecto de β -sitosterol de acuerdo con las siguientes observaciones; El compuesto aislado presentó en el IR (ESPECTRO 5) bandas de absorción (cm^{-1}) a 3450 y 3300 (-OH libre), 2920, 2870 y 1450 ($-CH_3$), 1368 ---

(-CH₃ unido a un mismo carbono); El espectro de H¹RMN --- (ESPECTRO 7) presenta varias señales simples entre δ 0.69 y δ 1.41 ppm para los metilos del isorpropilo y los metilos angulares de una estructura molecular esteroideal. A δ 4.18 ppm se observa una señal simple que integra para un protón (protón vinílico) y a 3.65 ppm aparece una señal que integra para un protón y que se asignó al protón-base del alcohol secundario. Ambos espectros son superponibles con los respectivos espectros de β -sitosterol patrón.

El cromatograma de gases "A" que se obtiene utilizando -- una columna de OV 101 y nitrógeno como gas acarreador, -- muestra un tiempo de retención 12.047 para el producto obtenido de la fracción 23-30 y el cromatograma "B" muestra un tiempo de retención de 12.363 para el patrón (obtenido en las mismas condiciones). A pesar de la pequeña diferencia entre los tiempos de retención se comprobó que se trataba del mismo compuesto.

3.3 Fracción alcaloidea:

La fracción alcaloidea obtenida de las extracciones de -- acetato de etilo, estaban formadas por una mezcla de alcaloides diferentes. Se reunieron todas las fracciones más-

importantes y se colocaron en una columna cromatográfica-utilizando sílica gel desactivada como absorbente en proporción 1:200, se empleó como eluyente CHCl_3 -acetona en gradiente de polaridad hasta alcanzar acetona-MeOH y por último MeOH sólo. El tiempo utilizado en este análisis provocó que los alcaloides se degradaran y no se obtuviera algún resultado.

3.4 Aislamiento de ácido aristolóquico:

La fracción éterea C del diagrama de extracción B se sometió a un ciclo de purificación de ácido-base empleando NaHCO_3 (sol. al 10%) como base, HCl al 5% para acidificar y extrayendo con cloroformo; como se indica detalladamente en la parte experimental; de esta manera se obtuvo como producto un sólido amarillo amorfo que fue purificado por cristalización en DMF-agua-acidulado y secado al alto vacío por 8 hrs el producto se obtiene en forma de cristales amarillos que retienen una cantidad sustancial de DMF, lo que se muestra en el espectro de $^1\text{H RMN}$.

Se intentó eliminar la DMF pasando el compuesto por una pequeña columna de alúmina neutra grado 1-11, eluyendo con una mezcla de MeOH- CHCl_3 acidificado con HCl. A pesar de la polaridad del disolvente una buena parte del compuesto quedó retenido en la columna, disminuyendo el rendimiento --

del producto.

El ácido recuperado se secó en un desecador de Abderhalden a temperatura de ebullición del xilol y sobre P_2O_5 . Se obtuvieron así 14 mg de un producto cristalino de pf: 278-280°C que da positiva la prueba de Castille (23) específica para ácidos nitrofenantrénicos.

El espectro de IR (ESPECTRO 8) presenta una banda a (cm^{-1}) 1340 característica de grupos nitro. La H^1 RMN presenta una señal simple a 4.02 ppm asignada a un grupo metilo, una señal simple en 6.46 ppm correspondiente a un grupo metilendioxi y un multiplete entre 7.24 y 8.5 correspondiente a los protones de la porción fenantrénica de un ácido aristolóquico. Estos fueron asignados de la siguiente manera (valores en ppm) y referidos a la estructura de la figura IV- (pág.13): A δ 7.75 señal simple de -CH en 2, en 8.5 un protón aromático orto al grupo nitro (C-9). Las señales a los carbonos 5,6 y 7 se presentan como un conjunto de señales; señal doble correspondiente a CH-5 en δ 8.6 ($J=6$ Hz), una doble en δ 7.24 correspondiente a CH-7. Este sistema de tres protones contiguos sitúa al metoxilo en la posición 8 y por lo tanto caracteriza al compuesto obtenido de la fracción éterea como el ácido aristolóquico I. Esta estructura fue comparada con datos bibliográficos del ácido aris

tolóquico I y III (fig. xlv).

Figura XIII: Esquema de fragmentación de masas del ácido aristolóquico.

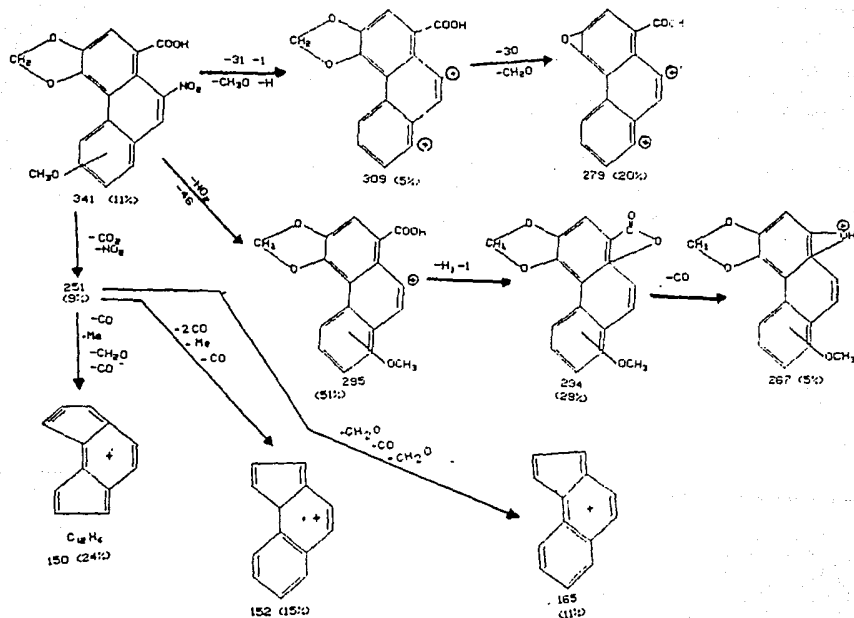
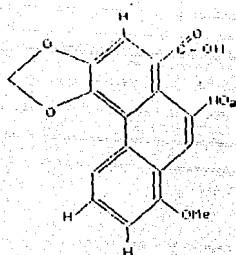
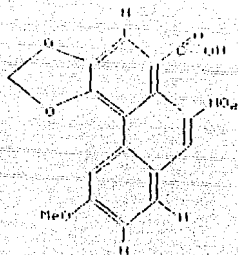


Figura XIV: Comparación de las señales espectroscópicas de ^1H RM del ácido aristolóquico I y del ácido aristolóquico III.



Ácido aristolóquico I

Protón	δ = (ppm)
H-2	7.77 s
H-5	8.45 dd
H-6	7.73 t
H-7	7.23 dd
H-8	-
H-9	8.46 s
-CH ₂ O ₂	6.46 s
-CH ₃ O-8	4.04 s



Ácido aristolóquico III.

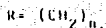
Protón	δ = (ppm)
H-2	7.77 s
H-5	8.52 d
H-6	-
H-7	7.45 dd
H-8	8.29 d
H-9	8.52 s
-CH ₂ O ₂	6.43 s
-CH ₃ O-6	3.99 s

3.4 Aceite Esencial:

El componente mayoritario con un tiempo de retención de -- 15.0 y un % relativo de 13.6, presentó un espectro de masas. (ESPECTRO II) con las siguientes características:

Ion molecular a M/z 219. Un pico base de M/z 41 característico de olefinas. Presenta picos a M/z 55, 69, 83 también característicos de olefinas. Existen cuatro agrupaciones de picos con una diferencia de 14 unidades de masa, lo que indica la pérdida de $-CH_2$ de hidrocarburos. Posee características de hidrocarburo aralquílico ya que presenta un pico en 91 derivado del ion tropilio, también un pico en 65 que resulta de la eliminación de acetileno neutro. El pico en 92 es notable e implica el rearrreglo del $-H$ con la eliminación de la olefina.

Otros picos importantes son 77, 78, 79 debido a fragmentos de fórmula $C_5H_5^+$, $C_6H_6^+$, $C_6H_7^+$, respectivamente. El rompimiento de la olefina con el fenol está dado por la presencia del pico a 77 y por la pérdida de 28 y 29 unidades de masa, $-CO$ y $-CHO$ respectivamente. El compuesto presenta un pico marcado en 108 característico de fenoles sustituidos, por lo que se supone se trata de un fenol con una olefina unida al grupo aromático. Se le asigna, a este compuesto, una estructura semejante a la del eugenol con una cadena -



El compuesto 2 (ESPECTRO 12) presenta las siguientes características espectroscópicas:

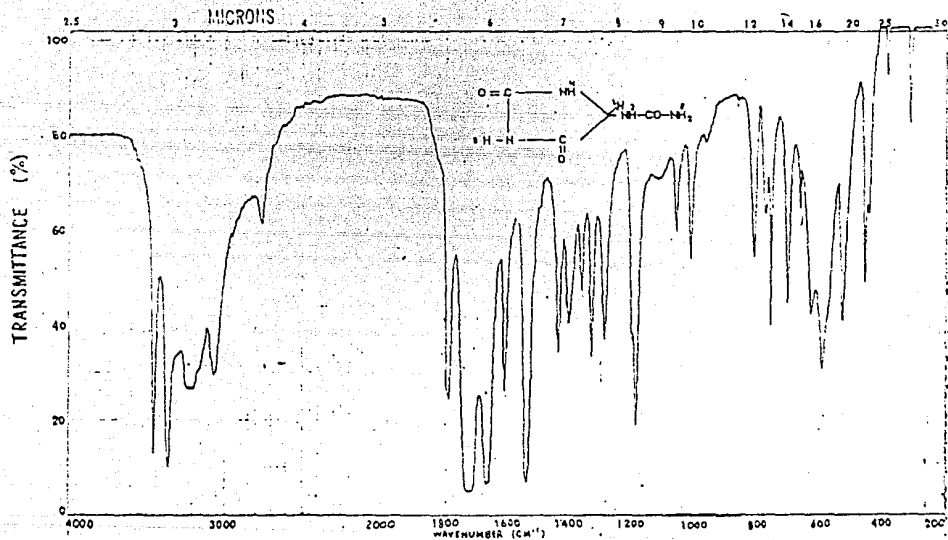
Un ión molecular a M/z 221 y un pico base M/z 41 típico para olefinas. Aparecen los picos de 55 y 69 también para olefinas. Las agrupaciones de 14 unidades de masa están bien definidas. Aparece la pérdida de 28 y 29 unidades para C_2H_4 y C_2H_5 respectivamente. El pico en los 108 es grande por lo que se supone la presencia de un grupo aromático (fenol). Para hidrocarburos arálicos aparecen los picos 91, 92 y 78. Hay pérdida de una molécula de agua por lo que aparece un pico en 203 lo que sugiere la presencia de un segundo grupo $-OH$ alifático. También en este caso se supone un compuesto de estructura fenólica con grupo aromático unido a una olefina.

El compuesto 3, con tiempo de retención de 15.4 y un I relativo de 3.0 (ESPECTRO 13) presenta un ión molecular de M/z 166 y un pico base de 41 típico para olefina, no aparecen los otros picos característicos para las mismas. No tiene agrupación de 14 unidades de diferencia. Pierde 18 unidades las cuales se podrían asignar a la pérdida de agua.

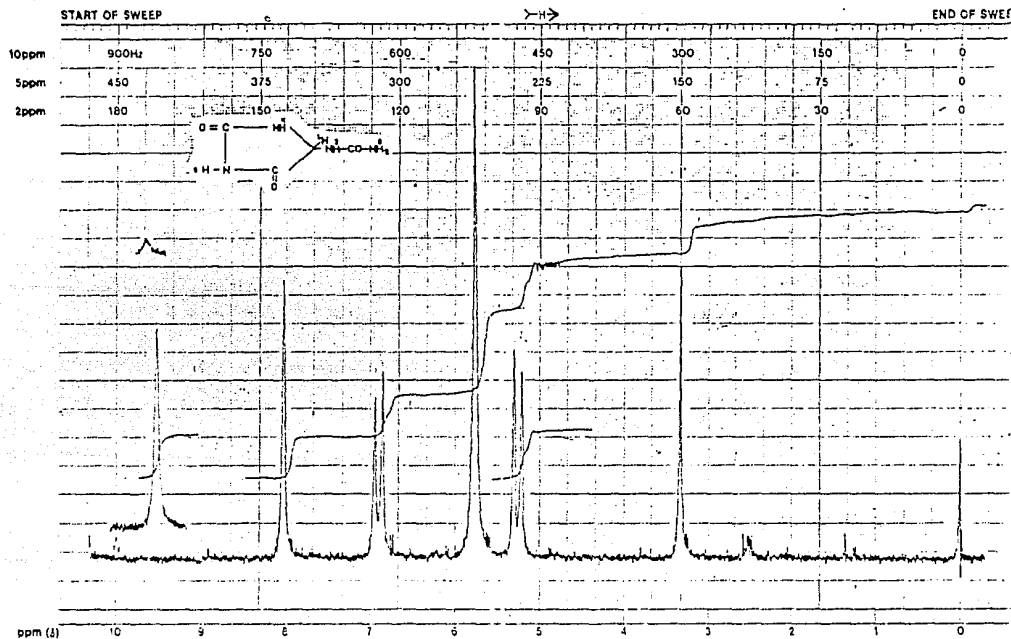
Los resultados obtenidos sólo permiten dar una idea preliminar de la estructura de los compuestos. En todos los casos el pico base es de 41 que es clásico de olefinas, por lo que se podría creer la presencia de componentes olefinicos unidos a un grupo aromático presentes en el aceite --- esencial de A. asclepiadifolia.

ESPECTROS Y CROMATOGRAMAS.

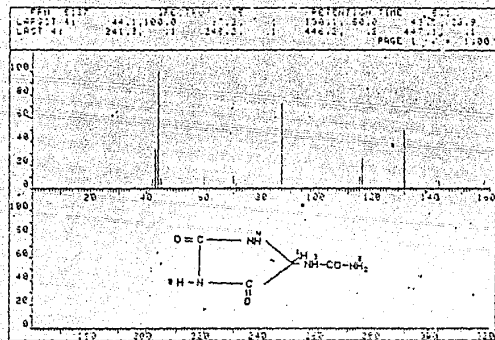
- ESPECTRO 1: ESPECTRO DE IR DE ALANINO.
- ESPECTRO 2: ESPECTRO DE ^1H RMN DE ALANINO.
- ESPECTRO 3: ESPECTRO DE MASAS DE ALANINO.
- ESPECTRO 4: ESPECTRO UV DE ALANINO.
- ESPECTRO 5: ESPECTRO IR DE β -SITOSTEROL (FRACCION 20-30).
- ESPECTRO 6: ESPECTRO IR DE β -SITOSTEROL (PATRON).
- CROMATOGRAMA A: β -SITOSTEROL (FRACCION 20-30).
- CROMATOGRAMA B: β -SITOSTEROL (PATRON).
- ESPECTRO 7: ESPECTRO DE ^1H RMN DE β -SITOSTEROL (FRACCION 20-30).
- ESPECTRO 8: ESPECTRO IR DEL ACIDO ARISTOLOQUICO.
- ESPECTRO 9: ESPECTRO DE ^1H RMN DEL ACIDO ARISTOLOQUICO.
- ESPECTRO 10: ESPECTRO DE MASAS DEL ACIDO ARISTOLOQUICO.
- ESPECTRO 11: ESPECTRO DE MASAS DEL COMPONENTE I DEL ACEITE ESENCIAL.
- ESPECTRO 12: ESPECTRO DE MASAS DEL COMPONENTE II DEL ACEITE ESENCIAL.
- ESPECTRO 13: ESPECTRO DE MASAS DEL COMPONENTE III DEL ACEITE ESENCIAL.
- CROMATOGRAMA C: ACEITE ESENCIAL PRIMER METODO.
- CROMATOGRAMA D: ACEITE ESENCIAL SEGUNDO METODO.
- CROMATOGRAMA E: COMPUESTOS PATRONES PARA ACEITE ESENCIAL.



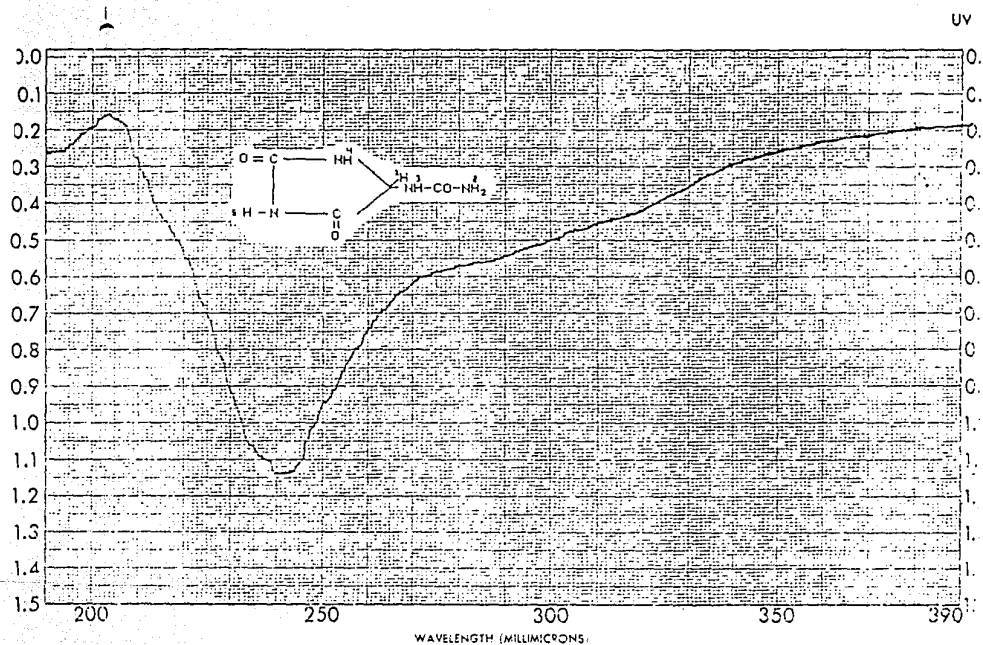
Espectro 1: Infrarrojo de alantoina.



Espectro 2: Resonancia magnética nuclear de alantoina.

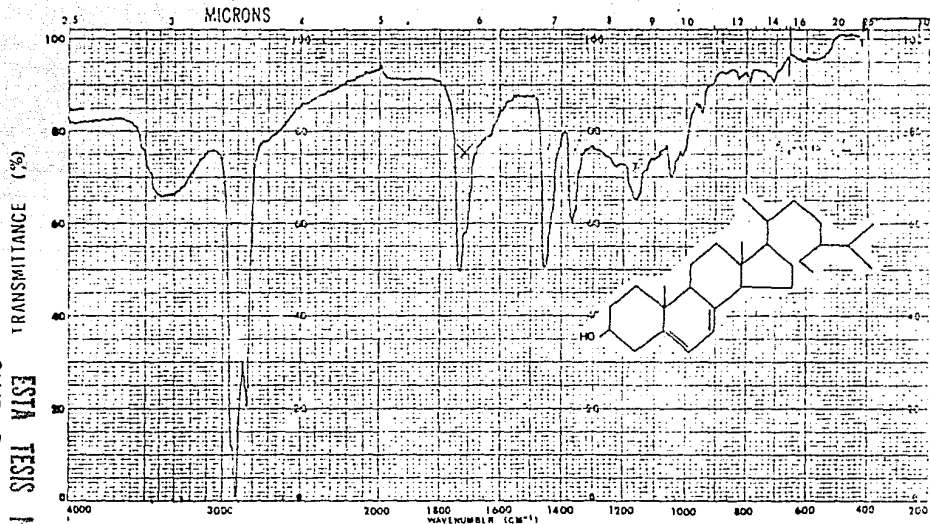


Espectro 3: Espectro de masas de alantoína.

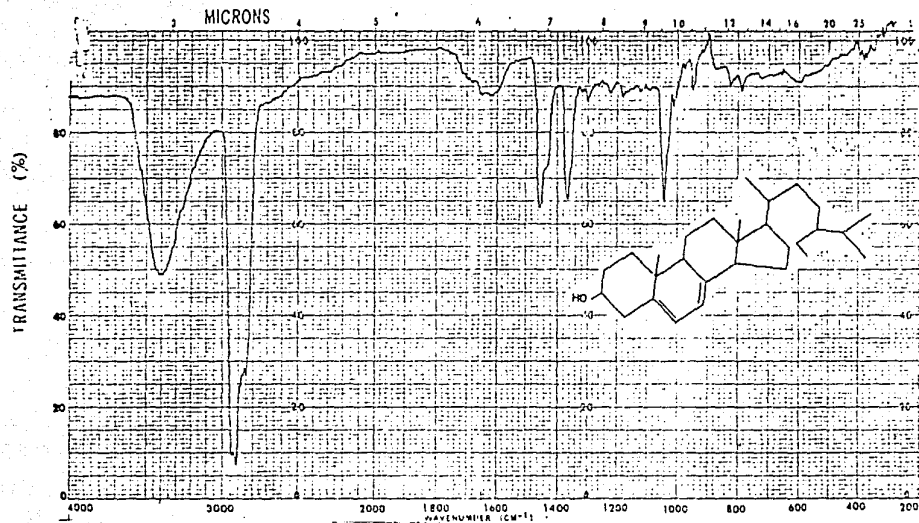


Espectro 4: Espectro UV de alantoína.

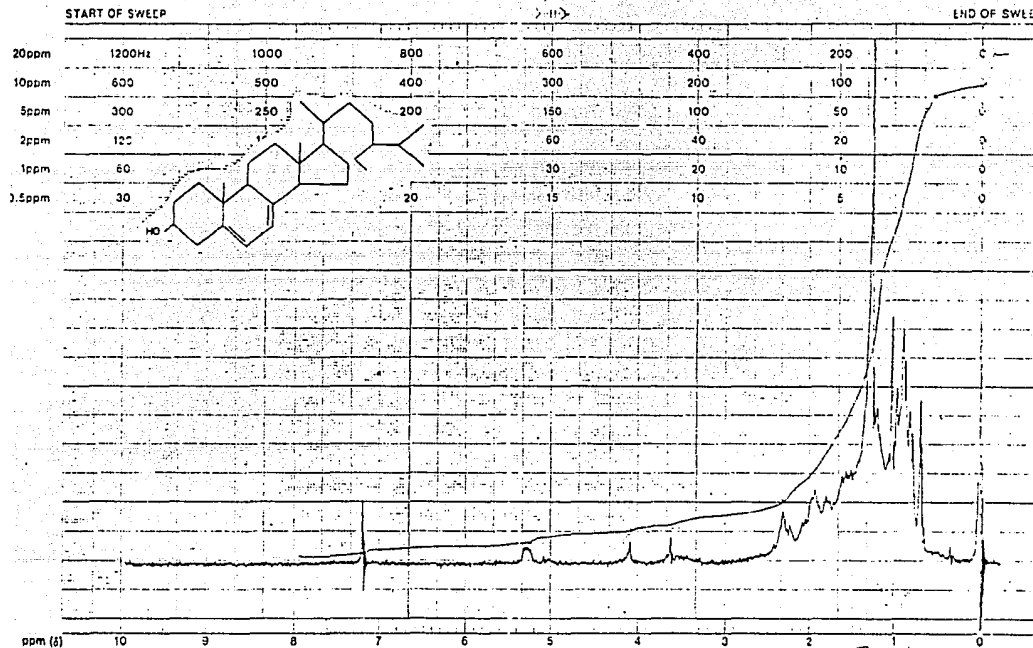
ESTÁ TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



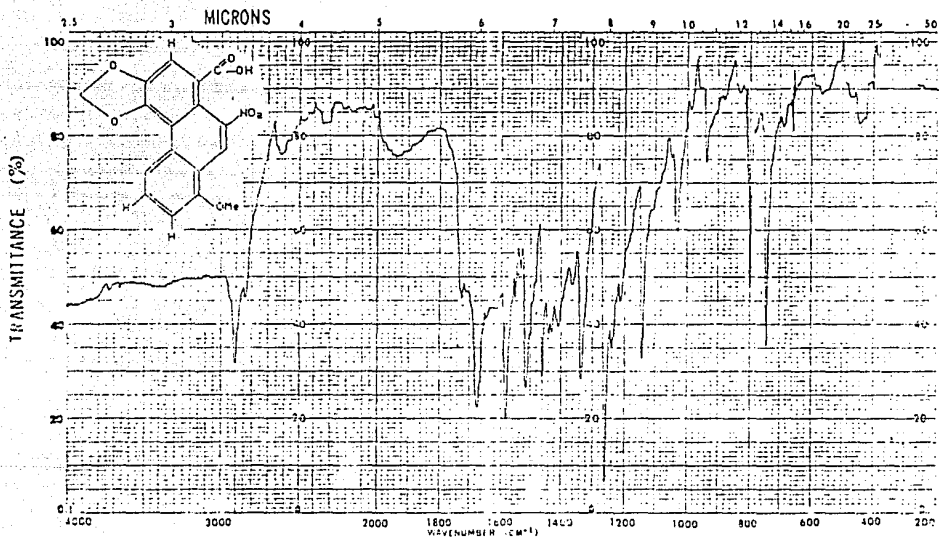
Espectro 5: Infrarrojo de p-sitosterol (fracción 28-32).



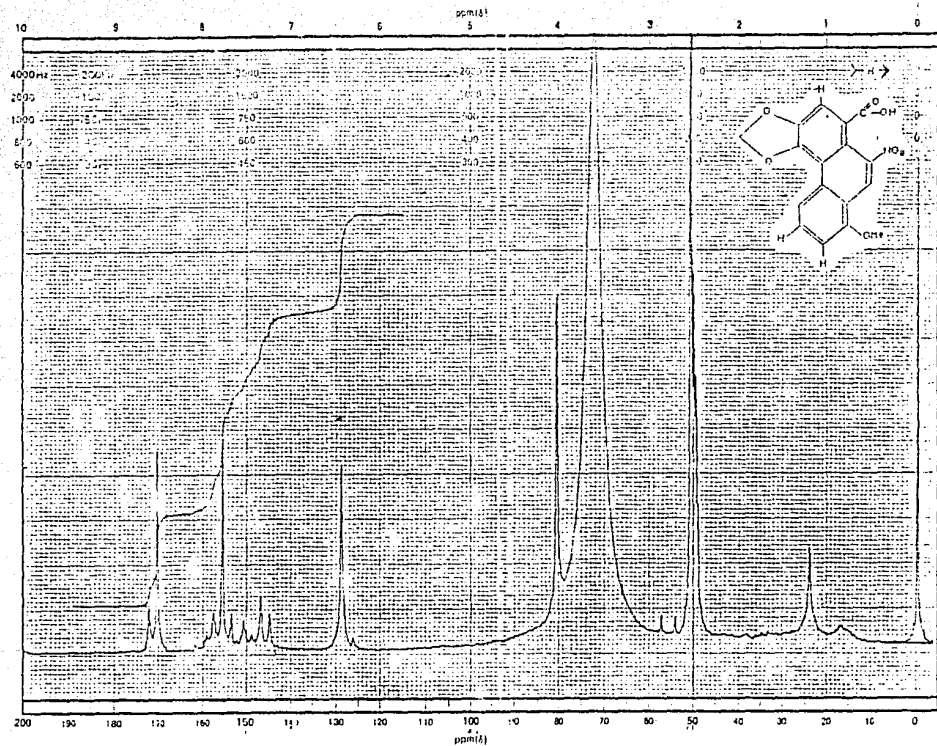
Espectro 6: Espectro infrarrojo de β -sitosterol (patrón).



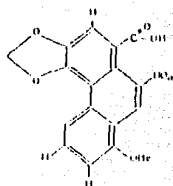
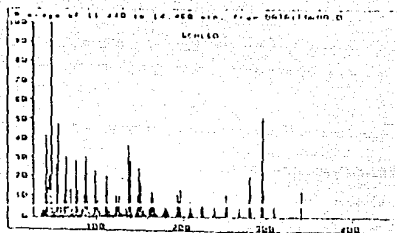
Espectro 7: Resonancia magnética nuclear de β -sitosterol (fracción 20-30).



Espectro 8: Infrarrojo de ácido aristolóquico.

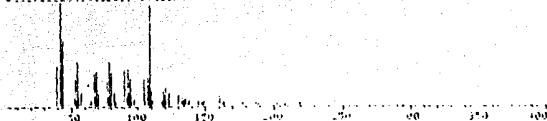


Espectro 9: Resonancia magnética nuclear del ácido aristoliquico.



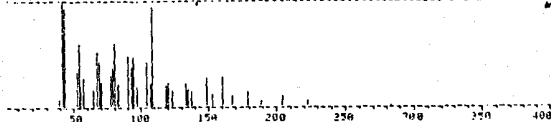
Espectro 10 : Espectro de masas del ácido aristolónico.

Spectrum # 11.001 Sample # 2 Retention Time = 10.0 minutes
 Scanned from 35 to 300 and Number of Peaks Detected = 12
 File Name = linear
 Base Peak = 40.70 Base Peak Abundance = 1000 Total Abundance = 1000



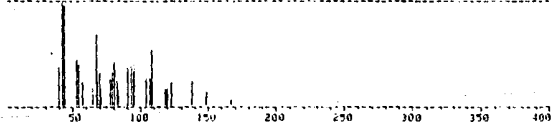
Espectro 11: Espectro de masas del componente I del aceite esencial.

Spectrum # 12.001 Sample # 2 Retention Time = 15.6 minutes
 Scanned from 35 to 300 and Number of Peaks Detected = 41
 File Name = linear
 Base Peak = 40.70 Base Peak Abundance = 91 Total Abundance = 1010



Espectro 12: Espectro de masas del componente II del aceite esencial.

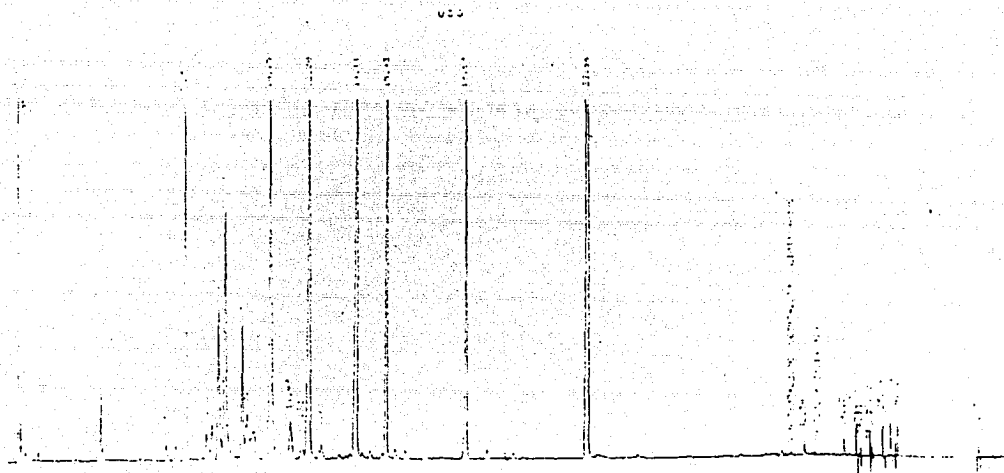
Spectrum # 13.001 Sample # 2 Retention Time = 15.4 minutes
 Scanned from 35 to 300 and Number of Peaks Detected = 23
 File Name = linear
 Base Peak = 40.70 Base Peak Abundance = 78 Total Abundance = 102



Espectro 13: Espectro de masas del componente III del aceite esencial.



Cromatograma D: Aceite esencial segundo método.



RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- Del extracto étereo de A. asclepiadifolia se aisló un ácido nitrofenantrénico caracterizado como el ácido -- aristolóquico I. sus propiedades espectroscópicas permitieron localizar el grupo $\text{CH}_3\text{O}-$ en la posición 8 (fig. IV- y XIV). El ácido aristolóquico I es uno de los ácidos - del tipo nitrofenantrénico más comunes presentes en el género Aristolochia.

2.- Del extracto metanólico acuoso ácido se aisló sustancia con propiedades espectroscópicas de amida y que se caracterizó como alontoína.

Este producto es importante para explicar una de las propiedades farmacológicas del género Aristolochia, como es la acción sobre afecciones dermatológicas.

3.- Se aisló un esteroide de la fracción hexánica, de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas se caracterizó como β -sitosterol.

4.- El estudio del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas permitió tener una -- idea preliminar del tipo de compuestos químicos presentes en el aceite. Se describe principalmente una estructura quími-

ca con un grupo unido a una cadena larga de olefina, estructura muy similar a la del eugenol.

5.- A. esclepiadifolia es una de las especies de la familia Aristolichiaceae que habita en nuestro país, es una de las plantas mas utilizadas por los indigenas para contrarrestar el veneno de serpiente y la picadura de alacrán, entre otras cosas. Esta especie no habia sido estudiada anteriormente, por lo que este trabajo constituye una introducción importante a la investigación química de esta planta y por lo tanto de las especies medicinales de la flora mexicana.

BIBLIOGRAFIA

1. S. Munavalli et Cl. Viel Ann. Pharm. Fr. Vol. 27, -- No. 6 pp. 449-464 (1969).
2. Dr. P. Font quer, Diccionario de botánica, Editorial Labor S. A., Barcelona, p.p. 235-239 (1973).
3. Howard W. Pfeifer, Ann. of the Missouri Botanical -- Garden, 53 (1) 1-144 (1966).
4. M. Martínez, Catálogo de nombres vulgares y cientifi de plantas mexicanas, fondo de cultura económica, México (1987).
5. S. cArboni, O. Livi, D. Segnini e L. Mazzanti Gazz - Chim. Ital 96 (5) 641-661 (1966).
6. D.B. Mix, H. Guinaudeau and M. Shamma J. Nat. Prod. - 45 (6) 657-666 (1982).
7. A. Urzúa, G. Salgado, B.K. Cassels and G. Eckhardt - Planta Médica, 45 51-52 (1982).
8. H.A. Priestap Phytochemistry, Vol. 26, No. 2 pp.519-529 (1987).
9. H.A. Priestap, Phytochemistry, 21 (11) 2755-2756 --- (1982).
10. L. M. Carrera Anal. Inst. Bot. A. J. Canav., 30, -- 253-265 (1973).
11. R. Nishida and Z. Kumazawa, Agr. Biol. Chem., 37 (2) 341-344 (1973).
12. S.M. Kupchan and J.J. Merlanos J. Org. Chem., 33 -- (10) 3735-3738 (1968).
13. B. Acharis, S. Chakrabarty, S. Bondyapadhyay and S.- C. Parkrash1, Heterocycles, 20 (6) 1444-1445 (1981).

14. B. Achari, S. Chakrabarty, S. Bondyapadhyay and S.C. Parkrashi Heterocycles, 19 (7) 1203-1206 (1982).
15. Chun-lao Che et al., J. Nat. Prod., 47 (2) 331--341 (1984).
16. A. K. Ganguly, K. W. Gopinath et al., Tetrahedron Lett.,
17. J. De Pascual Teresa, J.G. Urones and A. Fernández, Phytochemistry Vol. 22, No. 12 pp. 2745-2747 (1983).
18. J. De Pascual Teresa, J. G. Uroles and A. Fernández Phytochemistry, 22 (12) 2753-1754 (1983).
19. F. Ionescu, S. D. Jolad and J. R. Cole, J. Pharm. Sci., 66 (10) 1489-1490 (1977).
20. R. G. Enriquez, M. A. Chávez, J. Nat. Prod. 47 (5) 896-899 (1984).
21. F. Comer, H. P. Tiwari and I.D. Spencer Can. J. -- Chem., 47 481-487 (1969).
22. V. Sharma, S. Jain, D. S. Bhakuni and R. S. Kapil, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 (5) 1153 (1982).
23. S. Munavalli et. Cl. Viel Ann. Pharm. Fr., 27, - (7-8) 519-533 (1969).
24. Martha Windholz, INDEX MERCK, published by Merck -- C.O., N.J. U.S.A. pp. 144 (1983).
25. S. C. Parkrashi, P. P. Ghosh Dastidar, S. Chakrabarty and B. Achari, J. Org. Chem., 45 (3) 4765-4767 -- (1980).
26. S.M. Kupchan and H.C. Wormser Photochemical Synthesis of Phenanthrenes, 30 3792-3800 (1965).
27. R.T. Morrison y R.N. Boyd, Química Orgánica, 2- Edición en español (Ed. P. Fiedler y C. Rock), Fondo educa

tivo Interamericano, México, pp. 482-483 (1983).

28. Ma. del Pilar Buenfil Huerta, Estudio comparativo de la degradación de sapogeninas esteroideas, Tesis de Licenciatura, UNAM, 1979.

29. W. Klyne, Química de los Esteroides, Compañía Editorial Continental, S. A., pp. 9-85 (1979).

30. E. Kirk and F. Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, INC. New York, 12 917-955 (1960).

31. G.E. Trease, J. Evans, Farmacognosia, Compañía Editorial Continental, p.p. 115-685 (1977).

32. J. G. Ramírez Carreño, Estudio químico biológico de algunas plantas de selva alta perenifolia y "acahual", Tesis de Licenciatura, UNAM, 1981

33. H. El-Sabakhy and D.G. Waterman, Phytochemistry, 23 (11) 2706-2707 (1984).

34. Vogel's Arthur, Textbook of Practical Organic Chemistry, p.p. 933-936 (1978).

35. Robert T. Cornely, Infrared Spectroscopy, Allyn and Bacon, INC. Boston, p.p. 130-170 (1966).

36. Robert M. Silverstein, G. Clayton Bassler, Spectrometry Identification of Organic Compound, John Wiley and Sons, INC. New York, London (1974).

37. Dr. Gerhard Richter, Fisiología del Metabolismo de las Plantas, 1 Ed. en español, Compañía Editorial Continental, S. A., pag. 360, (1972).

38. Fco. Giral C.A. Rojahn, Productos Químicos y Farmacéuticos, 3, p.p. 1821-1823 (1946).

39. J. Abbiard et A. Maynaud, Bull. Soc. Chim. Fr: No. 3, p.p. 942-946 (1971).

40. S. Fujihara and M. Yamaguchi, Phytochemistry, Vol. - 17, p.p. 1239-1243 (1978).