

06377

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**"POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO DE DOS
ESPECIES MEDICINALES DEL GENERO Aristolochia.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

BIOL. ROSALBA LEON DIAZ.

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ADELINA JIMENEZ ARELLANES.



MEXICO D.F.

FEBRERO DE 2005

COORDINACIÓN

m. 341429



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **León Díaz Rosalba** con número de cuenta **503006989**, con la tesis titulada: **"Potencial antimicrobacteriano de dos especies medicinales del género Aristolochia"**, bajo la dirección del(a) **Dra. María Adelina Jiménez Arellanes**.

Presidente:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal:	Dra. Yolanda López Vidal
Secretario:	Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
Suplente:	Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón
Suplente:	Dr. Mariano Martínez Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 16 de febrero del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Fomento a la Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS) por el financiamiento otorgado al proyecto objeto de esta tesis. No. 009/2003.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (número de becario 172436), para realizar los estudios de posgrado.

Al los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo

Dr. Mariano Martínez Vázquez

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

por todas las observaciones, sugerencias y comentarios a lo largo de la realización del proyecto, así como su valioso tiempo invertido en él.

A la Jefa de la UIM-FPN, Dra. Mariana Meckes Fischer, por el apoyo brindado para la realización de la parte química del proyecto, y la Quím. Teresa Álvarez, y la M. en C. Ruth Parra Maldonado, por las facilidades dadas para la realización de la parte biológica del proyecto en la UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

DEDICATORIA

A mi Creador y Salvador,

Esta tesis es fruto de las muchas circunstancias que utilizaste para

llevarme a Ti.

Gracias Señor porque desde el día en que te encontré has estado

conmigo.

Gracias Amado Señor, porque sin Ti, no sería, ni soy nada

Gracias Amado Señor porque a tu lado soy feliz.

Gracias Amado Señor por ser mi todo.

Gracias por ser Fiel y Verdadero.

Gracias, por ser mi amor.

Gracias Jesús.

GRACIAS

Mamá, tu apoyo incondicional, tu esperanza y amor han sido impulso constante para mí. Gracias por estar aquí... siempre.

Papá, tú eres ánimo! Gracias por tu confianza, cuidado y amor, eres único.

Isabel, Pablo, Ana y Marisol, es complicado expresar todo lo que me inunda al pensar en ustedes, son una promesa preciosa, gracias por sus enseñanzas y oraciones.

A la CWA y al Consejero, por todos esos momentos inigualables, nunca había reído tanto como con ustedes, aun en medio del dolor.

Tufiño y Jerry mis "nitos", por su existencia, constancia y ejemplo, ¡gracias!

Nallely e familia, hermosos todos, muestra de los milagros de Dios.

Cindy, Loyola, Cristina, Liliana y Tamara, mis compañeros de obra y desmañanadas, por permitirme compartir esta parte de la trinchera.

GRACIAS

Dra. Adelina Jiménez Arellanes, ~~quien~~ quien confió en mí para dar su cara y su firma, más de una vez. Su paciencia y dedicación en este proyecto (de formar una "científica") la han englobado en mi vida. Gracias por los buenos y malos momentos, sus enseñanzas y apreciaciones.

Dra. Mariana Meckes Fischer, jefa de la IUM en Farmacología de Productos Naturales, ejemplo de tenacidad y constancia en el campo científico. Gracias por incluirme en su equipo.

Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo y Dr. Mariano Martínez, miembros del Comité Tutorial, por todas sus observaciones y consideraciones a lo largo del proyecto y su participación activa en el escrito del documento.

Dr. Roberto Martínez, quién más de una vez escucho mi final de semestre, gracias por su tolerancia, respeto y paciencia, por sus comentarios en el escrito de la tesis y su disposición a enseñar. Dios lo bendiga.

Rosy, Manu, Martita y Terre, compañeras de "dolor" en el laboratorio que ayudaron a que el "ambiente" fuera más que tolerable.

Fernanda, Vianey y Connie, compañeras del corre-corre de la maestría, gracias por compartir conmigo esta experiencia y por hacer de ella algo...

Dra. Carolina Barriendo Salcedo y Dra. Socorro Fernández, propiciadoras de esta aventura científica.

INDICE

Lista de abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Antecedentes	
Generalidades de la Tuberculosis	7
Epidemiología	9
Tratamiento actual de la <i>tuberculosis</i>	11
Plantas medicinales como fuente potencial de principios activos	12
Compuestos de origen natural activos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
Antecedentes químicos y biológicos de las especies a investigar	18
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	23
Objetivos	
General	24
Particulares	24
Material y Método	
Selección de las especies	25
Colecta del material vegetal y operaciones preeliminares	25
Preparación de extractos	26
Ensayo biológico	27
Fraccionamiento químico biodirigido	28
a) <i>A. taliscana</i>	29
Aislamiento de compuesto A	30
Fraccionamiento secundario F8-10	30
Aislamiento del compuesto B	31
Aislamiento del compuesto C	33
b) <i>A. elegans</i>	34
Determinación estructural de los compuestos activos	36
Reactivos y condiciones de seguridad	37
Resultados	
Estudio químico biodirigido de <i>Aristolochia taliscana</i>	38
Elucidación estructural de los compuestos puros	40
Estudio químico biodirigido de <i>A. elegans</i>	51
Discusión	54
Conclusiones	59
Referencias bibliográficas	60

ANEXO: Espectros y Cromatogramas

Índice de Tablas

- Tabla 1: Peso y rendimiento de los extractos de *A. taliscana*.
Tabla 2: Peso y rendimiento de los extractos de *A. elegans*.
Tabla 3: Fraccionamiento primario del extracto Hex de *A. taliscana*.
Tabla 4: Recromatografía de la fracción primaria F8-10 de *A. taliscana*.
Tabla 5: Recromatografía de la fracción secundaria FF de *A. taliscana*.
Tabla 6: Recromatografía de la fracción secundaria FJ de *A. taliscana*.
Tabla 7: Fraccionamiento primario del extracto Hex del rizoma de *A. elegans*.
Tabla 8: Porcentaje de inhibición de los extractos Hex y MeOH de *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
Tabla 9: Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
Tabla 10: Porcentaje de inhibición de las fracciones secundarias *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
Tabla 11: Desplazamiento químico en ppm de RMN-¹H para los compuestos A, B y C (Referencia TMS, disolvente CDCl₃).
Tabla 12: Desplazamiento químico en ppm de RMN-¹³C para los compuestos A, B y C (Referencia TMS, disolvente CDCl₃).
Tabla 13: Porcentaje de inhibición de los extractos Hex y MeOH de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
Tabla 14: Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv, a 100 µg/mL.
Tabla 15: Porcentaje de inhibición de FVII de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv en el rango de concentración de 100-6.25 µg/mL.

Índice de Figuras

- Figura 1: Estructura química de la isoniazida.
Figura 2: Estructura química de la pirazinamida.
Figura 3: Estructura química del etambutol.
Figura 4: Estructura química de la rifampicina.
Figura 5: Estructura química de 12β-hidroxikulactona y 6β-hidroxikulactona.
Figura 6: Estructura química del ergosterol-5,8-endoperóxido.
Figura 7: Estructura química del lecheronol.
Figura 8: Compuestos aislados del extracto MeOH de *A. taliscana*.
Figura 9: Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto A.
Figura 10: Estructura química de la Licarina B.
Figura 11: Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto B.
Figura 12: Estructura química del Eupomatenoide-7.
Figura 13: Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto C.
Figura 14: Estructura química de la Licarina A.

Índice de Gráficas

- Gráfica 1: Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
- Gráfica 2: Porcentaje de inhibición de las fracciones secundarias *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.
- Gráfica 3: Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL.
- Gráfica 4: Porcentaje de inhibición de la fracción primaria FVII de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100-6.25 µg/mL.

Índice de Cromatogramas

- Cromatograma 1: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción primaria F6 de *A. taliscana*.
- Cromatograma 2: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción secundaria FF de *A. taliscana*
- Cromatograma 3: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción secundaria FJ de *A. taliscana*
- Cromatograma 4: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción primaria FIV de *A. elegans*.

Índice de Espectros

- Espectro 1: Infrarrojo del compuesto A.
- Espectro 2: Ultravioleta del compuesto A.
- Espectro 3: Espectro de Masas, por Impacto Electrónico, del compuesto A.
- Espectro 4: Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto A.
- Espectro 5: Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del compuesto A.
- Espectro 6: Infrarrojo del compuesto B.
- Espectro 7: Ultravioleta del compuesto B.
- Espectro 8: Espectro de Masas, por Impacto Electrónico, del compuesto B.
- Espectro 9: Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto B.
- Espectro 10: Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del compuesto B.
- Espectro 10-a: RMN- ^1H del compuesto B, ampliación de la zona de aromáticos.
- Espectro 11: Infrarrojo del compuesto C.
- Espectro 12: Ultravioleta del compuesto C.
- Espectro 13: Espectro de Masas, por Impacto Electrónico, del compuesto C.
- Espectro 14: Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto C.
- Espectro 15: Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del compuesto C.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Amstrongs
°C	Grados Celsius.
%	Por ciento
λ	Longitud de onda
δ	Desplazamiento químico
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
$^{14}\text{CO}_2$	Dióxido de carbono marcado isotópicamente
AcAc	Ácido acético
AcOEt	Acetato de Etilo
ATCC	American Type Culture Collection
c	Concentración
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl_3	Deuterocloroformo
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH_2Cl_2	Cloruro de metileno
CHCl_3	Cloroformo
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMN S XXI	Centro Médico Nacional "Siglo XXI"
Co	Company: Compañía
CO_2	Dióxido de Carbono
c/u	Cada uno
d.i.	Diámetro interno
DC	Dicroísmo circular
DGE	Dirección General de Epidemiología
dm	Decímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido.
E	Etambutol
EM	Espectro de masas
EtOH	Etanol
eV	Electron volts
FM	Fórmula molecular
FR	Farmacoresistencia
g	Gramos
h	Horas
H	Isoniazida
H_2O	Agua
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
He	Helio
Hex	Hexano
Hz	Hertz

IC	Índice de Crecimiento
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
lb	Libras
m	Metros
MABA	Microdilution Alamar Blue Assay: Ensayo de Microdilución con Alamar Azul
MC ₁₀₀	Concentración Mínima de inmovilización de epimastigotes
MeOH	Metanol
MFR	Multifarmacoresistencia
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa/carga
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido para-aminosalicílico
pf	Punto de fusión
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
R	Rifampicina
RA	Reactivo analítico
Rf	Factor de referencia
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
S	Estreptomina.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
SS	Secretaría de Salud
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado.
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis multifarmacoresistente
TMS	Tetrametilsilano
Tol	Tolueno
TR	Tiempo de retención
UIM-FPN	Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
Z	Pirazinamida

RESUMEN

La tuberculosis constituye un grave problema de salud mundial. En 1993 la OMS la declaró enfermedad reemergente, constituyendo la segunda causa de muerte debida a un sólo agente patógeno. Cada año 8 millones de personas son infectadas y 2.3 millones mueren por esta enfermedad. En México se registraron 15,357 y 13,743 casos en el 2001 y 2002, respectivamente por lo que es prioridad de atención en salud. Veracruz, Chiapas y Baja California los estados con el mayor número de casos. Para su control se estableció el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), a nivel mundial en 1996, garantizando la administración de los fármacos de primera elección: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol o estreptomina. Actualmente el aumento en los casos de Tuberculosis se debe a diversos factores: tratamientos inadecuados y/o prolongados, abandono del mismo, diagnóstico tardío, enfermedades que compromete el sistema inmunológico, presencia de cepas farmacoresistentes, encontrándose que el 2% de casos nuevos son causados por ellas, lo que incide en el fracaso de los tratamientos; por ello es urgente buscar fuentes alternas de moléculas prototipo y/o compuestos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antifímicos, o bien que coadyuven en el mismo.

En este trabajo se realizó la evaluación antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico de dos especies medicinales del género *Aristolochia*. Los criterios de selección de las especies fueron el quimiotaxonómico y etnobotánico. Algunas especies de este género son conocidas como "guaco" y tienen diversos usos en la medicina tradicional. *A. taliscana* se emplea para tratar infecciones de la piel, mordeduras de serpiente y tos; *A. elegans* es una especie de ornato y se utiliza contra mordeduras de serpientes. Los extractos se prepararon vía maceración y se evaluaron *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por el método radiorespirométrico BACTEC 460. Los extractos más activos se fraccionaron químicamente; las fracciones y compuestos puros (aislados por diversos métodos cromatográficos), fueron evaluados biológicamente, de los últimos se determinó la concentración mínima inhibitoria. La caracterización química de los compuestos químicos se realizó por análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos

ABSTRACT

Tuberculosis constitutes a very serious worldwide health problem. In 1993, WHO declared it as a reemerging disease, being the second cause of death due to a single pathogenic agent. Each year 8 million people are infected by *Mycobacterium tuberculosis* and 2.3 million die from the disease. In México were registered 15,357 and 13,743 in 2001 and 2002 cases, respectively, thus the TB problem requires urgent attention as a priority health problem. Veracruz, Chiapas, Monterrey, Distrito Federal and Baja California are the states with largest number of cases. The program DOTS, established by OMS, for its control guarantees the administration of first line drugs as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, ethambutol and streptomycin. However actual tuberculosis is caused by drug-resistant strains that do not respond to the treatments. The multidrug-resistant levels found of 2% among new cases in México (Baja California, Oaxaca and Sinaloa). In this scenario it is urgent to search for new alternate sources of prototype molecules and/or useful compound for its treatment.

In this work, the antimycobacterial activity of the hexane and methanol extracts of two medicinal species of the *Aristolochia* genus was evaluated. The selection criteria were chemiotaxonomic and ethnobotanical. The *Aristolochia* species are known as "guaco" and have several uses in traditional medicine. *A. taliscana* is used to treat skin infections, snake bites and cough. *A. elegans* is an ornamental plant and also used in the treatment of snake bites. The extracts of each species were prepared through maceration and were evaluated *in vitro* against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by the Bactec 460 radiorespirometric method. The most active extracts were fractionated by traditional chemical methods; pure fractions and compounds were biologically evaluated and their minimum inhibitory concentration was determined. The chemical characterization of the active substances was performed by the analysis of their spectroscopic and spectrometric data.

INTRODUCCIÓN

El uso de los recursos naturales como fuente de agentes medicinales ha sido una práctica continua a lo largo de la historia de la humanidad. Muchos de los principios activos de las preparaciones farmacéuticas utilizadas hoy en día, se obtuvieron en su momento de fuentes naturales (plantas y/o microorganismos), constituyendo un instrumento útil y esencial en el desarrollo farmacéutico de la era moderna. Sin embargo, un número considerable de especies utilizadas en la medicina tradicional no han sido objeto de investigaciones químicas y/o farmacológicas, por lo que su potencial es actualmente desconocido (**Balandrin et al., 1993**).

El éxito de la atención primaria de salud depende del empleo y disponibilidad de medicamentos apropiados. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que 80% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales para tratar y aliviar sus principales problemas de salud, por lo que en la actualidad han recobrado importancia en la terapéutica (**Farnsworth et al., 1985**).

El resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas, como la tuberculosis (TB) y el problema de fármacoresistencia, ha propiciado un auge en las investigaciones sobre plantas medicinales y otras fuentes naturales, con miras a encontrar agentes terapéuticos o moléculas prototipo para desarrollar fármacos útiles el tratamiento de ésta y otras enfermedades (**Cantrell et al., 2001; König et al., 2000; Newton et al., 2000; Okunade et al., 2004**).

En la década de los 50's se declaró oficialmente que México era un país sin problemas de TB. Sin embargo, anualmente se presentan en promedio 16,000 nuevos casos, de los cuales el 12.9% presenta resistencia primaria y el 2.4%, en multifarmacoresistente (MFR), por lo que actualmente se observa un aumento alarmante en el número de casos MFR a nivel mundial y nacional (**Granich et al., 2000, SS, 2005, OPS, 2004**). A largo de la historia el tratamiento de la TB ha pasado por diferentes etapas; la quimioterapia inició con el uso de estreptomicina (S) y se mejoró con el descubrimiento y aplicación en la terapéutica de la rifampicina (R) (fármaco de primera elección en los

casos de primer diagnóstico). A pesar de estos notables avances, por más de tres décadas no hubo desarrollo de nuevos agentes anti-TB; aunado a que esta epidemia tiene como una de sus características principales la presencia de cepas MFR difíciles de tratar; aun contando con antifímicos de primera y segunda línea, además de la escasez y desabasto de medicamentos, principalmente en países en vías de desarrollo. En este contexto, las plantas usadas en la medicina tradicional constituyen una alternativa importante para la probable obtención de compuestos o moléculas prototipo útiles en tratamiento de la enfermedad y/o que coadyuven a su erradicación.

En este sentido, en la UIM en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del CMN S XXI, se desarrolla una línea de investigación encaminada a evaluar las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como fuente potencial y poco explorada de compuestos activos contra *M. tuberculosis* y otras cepas de micobacterias. A la fecha nuestro grupo (IUM-FNP), ha evaluado alrededor de 40 especies medicinales, encontrándose que el 22% resulto activo contra *M. tuberculosis* H37Rv (*Juniperus communis*, *Lantana hispida*, *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Achillea millefolim*, *Malva parviflora*), y cuatro de ellas fueron activas contra cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003), mismas que fueron ya objeto de investigación químico-biodirigida, lográndose aislar los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano (Álvarez, 2002; Fragoso, 2003; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003). En el presente estudio se seleccionaron las especies *Aristolochia taliscana* y *A. elegans* para evaluar su potencial antimicobacteriano, bajo criterio etnobotánico y quimitaxonómico; siendo sus usos tradicionales contra mordeduras de serpientes, infecciones cutáneas y tos, aunque este último no es un uso generalizado.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

La TB es una enfermedad infectocontagiosa, transmitida por vía aérea y su principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo ácido alcohol resistente). La pared celular de este microorganismo es rica en lípidos: ácidos micólicos, ceras, y fosfátidos, causantes de la virulencia de la micobacteria, además del "factor de cuerda" (trehalosa-6,6'-dimicolato) que impide la migración de leucocitos, causa granulomas crónicos, y puede actuar como un "coadyuvante" inmunitario (Jawetz et al., 1996). Existen además otras especies causantes de este padecimiento como: *M. bovis*, *M. africanum* y *M. avium* (oportunistas particularmente en individuos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida-SIDA), el complejo *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, entre otras (Fischer, 1996, 1998; Copp, 2003, Frieden, et al., 2003).

La manifestación clínica más común de la TB es la enfermedad pulmonar, pero puede presentarse la extrapulmonar afectando otros aparatos y sistemas (ap. genitourinario, sist. óseo, sist. linfático, etc), donde el 20% de los casos se presenta en individuos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana –VIH- (Frieden et al., 2003).

La enfermedad se desarrolla fácilmente en personas con el sistema inmunológico comprometido (pacientes con diabetes, cáncer, SIDA, linfoma de Hodking, lupus, tratamiento con inmunosupresores) y/o desnutrición. Se sospecha en situaciones como: reciente inmigración, hacinamiento, consumo de drogas, SIDA y contacto cercano con pacientes diagnosticados con TB. Los primeros síntomas suelen ser sistémicos, fiebre, mareo, pérdida de peso, delirio nocturno, dolor en el pecho y espalda, entre otros (Brändli, 1998).

La quimioterapia surge en 1940 con el descubrimiento de la estreptomina (S) y del ácido *para*-aminosalicílico (PAS). Entre 1950 y 1960 hubo gran desarrollo en la obtención de fármacos contra TB, descubriéndose la isoniazida (H) (Figura 1), pirazinamida (Z) (Figura 2), etionamida, cicloserina,

viomicina, capreomicina, etambutol (E) (Figura 3) y uno de los últimos y grandes avances fue el descubrimiento de la rifampicina (R), iniciando su uso en 1967 - Figura 4- (Bastian y Portaels, 2000; Cantrell et al., 2001).

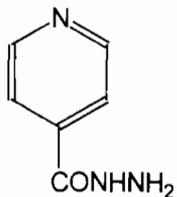


Figura 1. Isoniazida

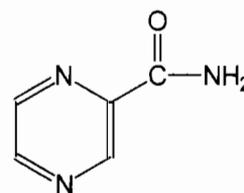


Figura 2. Pirazinamida

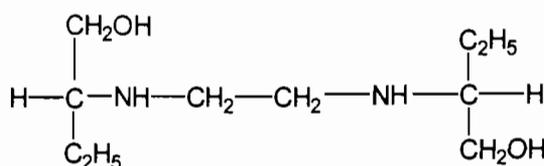
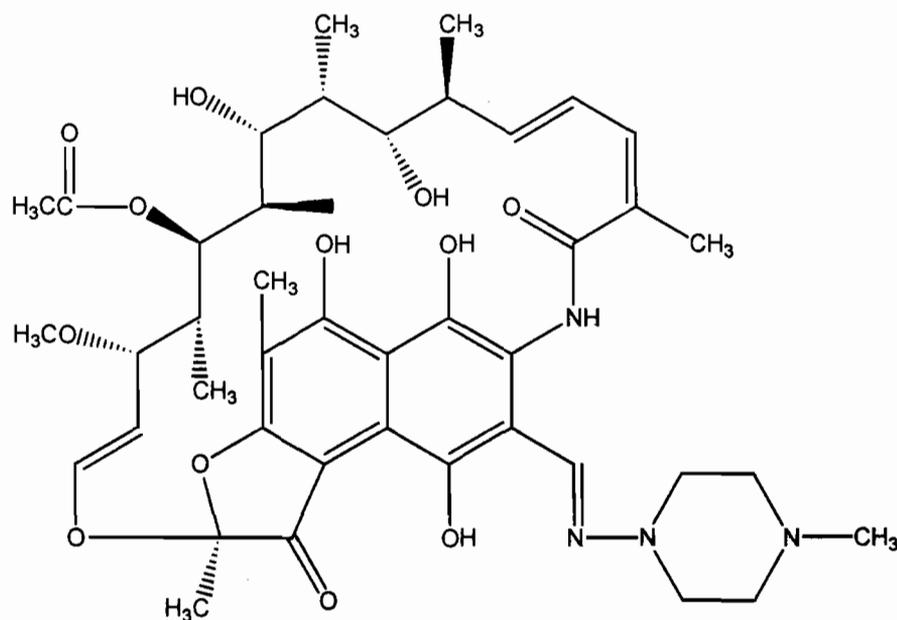


Figura 3. Etambutol



**Rifampicina
Figura 4.**

EPIDEMIOLOGÍA

Después del VIH/SIDA, la TB es la segunda enfermedad infectocontagiosa que causa el mayor número de muertes en el mundo (Frieden *et al.*, 2003). Algunos epidemiólogos estiman que los casos aumentarán de 7.5 millones (1990) a 11.9 millones para el 2005, lo que representa un incremento del 58%; del cual el 77% se atribuye a factores demográficos como aumento de población, cambio en los rangos de edad, etc., mientras que los factores epidemiológicos como MFR, infecciones con el VIH, y pobreza, significan sólo del 2-3% (Amaya-Tapia *et al.*, 2000; Bastian y Portaels, 2000). Por otro lado, la OMS reportó que en la década de los 90's habían 90 millones de enfermos por TB, y posiblemente murieron 30 millones en el 2000 (Granich *et al.*, 2000). Otros autores, estiman que una tercera parte de la población mundial ha estado expuesta al agente causal de la TB y sólo el 10% está en riesgo de desarrollar la enfermedad (Cantrell *et al.*, 2001; Fischer, 1998; Newton *et al.*, 2000, Orme *et al.*, 2001).

Entre las patologías causadas por un sólo agente infeccioso, la TB es la que provoca mayor número de muerte en los adultos. En países industrializados el 50% de individuos infectados con *M. tuberculosis* es mayor de 50 años, mientras que en países en vías de desarrollo el 77% de los casos es en menores de ésta edad (Raviglione *et al.*, 1995). En el caso específico de nuestro país, recientemente se informó que el promedio de edad para pacientes infectados con TB es de 36 años, y el 69% de ellos son varones (DGE, 2001; 2002; Granich *et al.*, 2000; IMSS, 2003). Este dato nos refleja la urgente necesidad de dar tratamiento y seguimiento adecuado a las personas infectadas, ya que la gran mayoría se encuentran en edad económicamente activa.

El VIH ha surgido como el factor de riesgo más importante para la diseminación de la TB; en países en vías de desarrollo, esta última se presenta como la enfermedad oportunista más común en pacientes infectados. En 1990, el 4.6% de muertes por TB fueron en personas co-infectadas y para mediados de 1994 habían 5.6 millones de casos VIH/TB. El riesgo anual de progreso de

la infección por TB en personas infectadas con VIH es de 5-15%, dependiendo de su inmunosupresión (**Raviglione et al., 1995**). Para el año 2000, a nivel mundial se reportó que en promedio el 11% de los casos nuevos de TB presentaban VIH (**Frieden et al., 2003**)

El 76.7% de las muertes por padecimientos infecciosos se deben a TB. En 1997, la OMS contabilizó 16.2 millones de casos, de los cuales 7.96 millones eran de diagnóstico nuevo, y de estos últimos el 45% era de tipo pulmonar (la forma más contagiosa). Para México la TB es la tercera causa de muerte después de neumonía e infecciones intestinales, pero ocupa el primer lugar en mortalidad causada por un solo agente infeccioso, provocando una pérdida anual de aproximadamente 96,000 años potenciales de vida (**Sada-Díaz, 2003**). En un estudio realizado en 1997 en México, se encontró que Baja California presenta 6.5% de resistencia a fármacos de primera línea, Oaxaca el 10.0% y Sinaloa el 6.7%, en un total de 614 casos, siendo el promedio de TB-MFR de 2% en casos nuevos; estos autores sugirieron una revisión de los datos epidemiológicos de otros estados para tener la dimensión real del problema a nivel nacional (**Espinal, 2000; Granich et al., 2000**). Otro estudio realizado entre junio de 1995 y mayo de 1998 en Huauchinango, Puebla, mostró que de 1347 pacientes con los 269 (20%) presentaba TB; de estos, el 12% presentó resistencia primaria H, el 4% a R; y 2.5% fue MFR (**Kato-Maeda et al., 1999**).

Los datos epidemiológicos para nuestro país describen que en 1997 habían 23,575 casos de TB registrados oficialmente, que significan un índice de 25 casos por cada 100,000 habitantes (**Granich et al., 2000**). En el 2001, la Dirección General de Epidemiología (DGE) registró 15,357 casos siendo Veracruz, Chiapas y Baja California los estados con el más elevado índice; y para el 2002 (semana 48) se registraron 13,742 casos, siendo Veracruz, Baja California Norte, Chiapas, Guerrero, Nuevo León y Tamaulipas, los estados con mayor índice (**DGE., 2001, 2002**). En el 2003 (IMSS) hasta la semana 29 se registraron 2,606 casos acumulados hasta esa fecha.

Uno de los graves problemas que se presenta en la actualidad es la aparición de cepas de *M. tuberculosis* MFR, efecto que se presentó

inmediatamente después de la introducción del uso de S; aunque, no se tomó en cuenta hasta en fechas recientes cuando se detectaron casos de TB-MFR, definida como resistencia al menos a dos de las fármacos de primera línea (H y R). Los primeros casos fueron reportados en personas infectadas con VIH La OMS y la IUATLD reportan que el 2.5% de los casos de TB son MFR (**Bastian y Portaels, 2000; Espinal, 2000**).

La TB-MFR provoca serias consecuencias tanto en el paciente como para los programas oficiales (TAES) de control, incidiendo en el fracaso del tratamiento, costo del mismo y transmisión de la enfermedad, ya que un paciente con enfermedad activa infecta de 10 a 15 personas por año (**Granich et al., 2000; Lall y Meyer, 1999**). Los factores de riesgo para su desarrollo son tratamientos inadecuados y abandono del mismo, además se incluyen tratamientos incompletos, tardíos y/o prolongados, falta de apego al tratamiento recomendado por la OMS, coinfección con VIH, acceso limitado a los sistemas oficiales de salud y baja cobertura del TAES, aunado a vivir en países con alta incidencia de TB (**Raviglione et al., 1995; Amaya-Tapia et al., 2000; García-García et al., 2001**).

Cabe mencionar que a pesar de contar con el programa mundial para el control de la TB (DOTS), actualmente el 77% de los casos en el mundo no son tratados bajo este régimen (**Sterling et al., 2003**); en el caso de México la cobertura del mismo es del 60% (**OPS, 2003**).

TRATAMIENTO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

Dada la problemática epidemiológica de la TB en la última década del siglo XX, la OMS diseñó programas estratégicos para el control y prevención de la enfermedad a nivel mundial. En el caso de Latinoamérica el programa actual es conocido como TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado), el cual es un paquete de diagnóstico, tratamiento y organización coordinada entre paciente y personal de salud (**Bastian y Portaels, 2000**). El TAES garantiza la administración del medicamento bajo una estricta supervisión médica con la respectiva tarjeta de registro y diagnóstico por enfermo.

Los sistemas oficiales de salud en México recomiendan para casos nuevos un tratamiento primario acortado que consiste en la administración combinada de cuatro fármacos (H, R, Z, E), durante dos meses, y cuatro meses con 3 tomas semanales de H y R (**SS, 2000**).

Para los casos de TB-MFR existen medicamentos de segunda línea (amikacina, ofloxacina, rifabutina, esparfloxacina, ciprofloxacina, etionamida, cicloserina), pero estos sólo se distribuyen en países en donde el programa TAES está funcionando al 100% y en el caso de México esta estrategia aun está en áreas piloto, alcanzando una cobertura aproximada del 60%. Las causas principales por las que un paciente presenta FR son: dosis inadecuada, tiempo insuficiente de tratamiento, falta de supervisión (de deglución de la cápsula), abandono del tratamiento y falta de medicamentos. Para los casos persistentes de TB-MFR, la OMS ha diseñado la estrategia TAES-plus en la que se utilizan fármacos de segunda línea y medidas de control de la infección. Esta estrategia maneja el tratamiento individualizado, previa determinación del patrón de FR ante los antifímicos de 1ª y 2ª línea (**Farmer et al., 2000**). El manejo de los antifímicos de segunda línea requiere de personal experto y comprometido con el paciente. El costo del retratamiento es cien veces mayor que el tratamiento primario -\$150,000.00 pesos-, (Comunicación del personal de la SS experto en el tratamiento de TB, 2002).

PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE POTENCIAL DE PRINCIPIOS ACTIVOS.

El uso de las plantas medicinales se remonta a los inicios de la civilización humana. Grandes culturas como la china, india y nor-africana proporcionaron evidencia escrita de la utilización de las plantas para tratar una gran variedad de enfermedades (**Phillipson, 2001**).

Las plantas constituyen una fuente importante de principios farmacológicamente activos o moléculas prototipos para la síntesis de nuevos fármacos y en muchos casos estos compuestos sirven como materia prima o intermediarios en la semisíntesis de agentes terapéuticos (**Balandrin et al.,**

1993), como ejemplo de esto podemos citar al Taxol que fue obtenido de *Taxus brevifolia* y que actualmente se utiliza en el tratamiento del cáncer de seno y ovario, o bien la podofilotoxina (obtenida de *Podophyllum peltatum*) a partir de la cual se desarrollo el etopósido, fármaco de primera elección para el tratamiento de cáncer de pulmón y testicular. Así mismo, de *Artemisia annua* (especie utilizada en la medicina tradicional china) se obtuvo artemisinina, de la cual se derivó al artemeter que se utiliza para el tratamiento de la malaria cerebral (Phillipson, 1999), o la galegina (obtenida de *Galega officinalis*) de la cual sintetizaron el metmorfin, un fármaco antidiabético utilizado actualmente en la clínica. Un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal son resultado de un proceso de investigación científica de plantas bien conocidas y empleadas en la medicina tradicional (Farnsworth et al., 1985).

Por otro lado, para los países en desarrollo el costo en la importación y producción de medicamentos en grandes cantidades es muy elevado, por lo que éstos hacen uso de la información que poseen sobre plantas medicinales y frecuentemente recurren a ellas para solucionar sus problemas primarios de salud, aunado a que éstas son abundantes, de bajo costo y con aceptación popular. (Farnsworth et al., 1985; Eloff, 1998).

La medicina tradicional de muchos países incluyendo México hace uso de una gran cantidad de plantas cuyas propiedades fueron descubiertas y son hasta hoy en día muy utilizadas por los aborígenes. Por ejemplo, las especies *Echinacea angustifolia* y *Podophyllum peltatum*, han sido "redescubiertas" por los científicos, pero de una gran mayoría de especies se desconoce la composición química y su potencial farmacológico (Balandrin et al., 1993; McCutcheon et al., 1992).

En el caso de México, se tiene una amplia tradición en el uso de plantas medicinales, debido a la presencia de 42 grupos étnicos distribuidos a lo largo y ancho de la República Mexicana, aunado a la gran diversidad de ecosistemas favorecidos por la ubicación geográfica del país, que nos ubica en el cuarto

lugar de biodiversidad mundial, aproximadamente el 25% de los mexicanos usan plantas medicinales (Argueta y Cano, 1994). Se han descrito alrededor de 5000 especies medicinales, cuyos usos principales son para tratar padecimientos gastrointestinales (uno de las principales causas de muerte en nuestro país), cardiovasculares, inflamatorios y de vías respiratorias; de este último, específicamente para el tratamiento de la tuberculosis, el grupo del Herbario de Plantas Medicinales del IMSS ha identificado 10 especies, entre ellas podemos mencionar a *Crescentia cujete* (BIGNONACEAE), conocida como guaje, a *Struthanthus densiflorus* (Benth) Santdl (LORANTACEAE), conocida como injerto y a *Lantana hispida*, conocida como orozus (**Aguilar-Contreras et al., 1998**). A la fecha estas tres especies han sido objeto de evaluación antimicobacteriana, y de una de ellas (*L. hispida*), mediante fraccionamiento químico-biodirigido se obtuvieron los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicobacteriana. Otras especies como *Artemisia ludoviciana* (especie ampliamente utilizada) y *Chamaedora tepejilote*, empleadas para problemas de vías respiratorias, pero no para tuberculosis, contienen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Estos resultados nos indican que es importante continuar explorando el potencial antimicobacteriano de las especies medicinales en México, ya que constituyen un recurso importante en la búsqueda de compuestos farmacológicamente activos.

COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL ACTIVOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*.

Las terapias contra la TB han evolucionado y los regímenes de tratamiento implementados por la OMS, están basados en multiterapia, es decir la administración de tres o cuatro antifímicos simultáneamente. Sin embargo, la falta de adherencia a los tratamiento propicia la aparición de cepas MFR por lo que numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de explorar diversos fuentes naturales (hongos, bacterias, levaduras, algas y plantas superiores) con miras a encontrar compuestos nuevos o moléculas prototipo

útiles en el tratamiento de la TB o bien que coadyuven en el mismo (**Cantrell et al., 2001; Kanokmedhakul et al., 2002; König et al., 2000; Lall y Meyer et al., 1999; Seephonkai et al., 2002**).

El descubrimiento de nuevos compuestos, a través de investigaciones estratégicas, en plantas y microorganismos ha dado resultados fructíferos en la industria farmacéutica y biotecnológica (**Hostettman et al., 1997; Phillipson, 2001**). La rápida detección de productos naturales biológicamente activos, mediante el empleo de métodos modernos de fitoquímica, y ensayos biológicos sencillos, rápidos y reproducibles, juegan un papel clave en la investigación de los extractos crudos de plantas (**Alvi, 2000; Hostettman et al., 1997**).

Cabe mencionar, que para obtener un compuesto con utilidad terapéutica, puro, explotable y comercial, es necesario la formación de grupos de trabajo interdisciplinario donde participan botánicos, farmacólogos, químicos, toxicólogos, farmacógnostas, biotecnólogos, entre otros (**Hostettman et al., 1997**).

Mediante el empleo de diversas metodologías enfocadas a la búsqueda de nuevos fármacos contra TB, grupos de investigadores y estudiosos en el tema han propuesto diferentes plantas (principalmente las empleadas en la medicina tradicional) para buscar compuestos activos contra *M. tuberculosis*.

Las estrategias que se han desarrollado para obtener compuestos biológicamente activos se basan en la realización de estudios de tipo químico-bidirigido. A través de este esquema de trabajo, a la fecha se han realizado investigaciones encaminadas a la búsqueda de compuestos con posible actividad anti-TB y otras actividades biológicas (**Cantrell et al., 2001, Phillipson, 1999; 2001**).

Las investigaciones de tipo químico-bidirigido han demostrado que existen metabolitos secundarios, obtenidos de plantas, activos contra diversas especies de *Mycobacterium*. De estos trabajos podemos citar que *Allium sativum* (extracto de ajo) mostró actividad antimicobacteriana *in vitro* contra 30 diferentes cepas de micobacterias en un rango de concentración de 1.34 a 3.35 mg/mL (**van Puyvelde et al., 1994**).

Por otro lado, el extracto MeOH de las semillas de *Melia volkensii* Gürke (Meliaceae) mostró un 99% de inhibición contra *M. tuberculosis* a la concentración de 100 µg/mL. El fraccionamiento biodirigido permitió obtener 2 triterpenos nuevos: 12β-hidroxikulactona y 6β-hidroxikulactona (Figura 5), además de los compuestos kulactona y kulonato. Los dos primeros fueron los responsables de la actividad antimicrobacteriana mostrada por el extracto original, presentando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 16 y 4 µg/mL respectivamente, al ser evaluado por el método radiorespirométrico BACTEC 460 (Cantrell et al., 1999a).

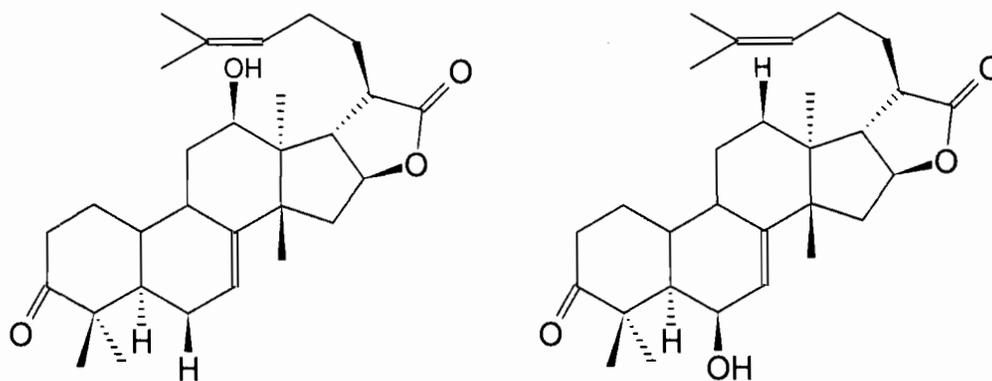


Figura 5: 12β-hidroxikulonato y 6β-hidroxikulonato.

También se ha reportado que el extracto MeOH de las partes aéreas de *Ajuga remota* Benth (Labiatae) presentó un 97% de inhibición contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL. Mediante una separación cromatográfica de líquidos al vacío se obtuvo un triterpeno conocido: ergosterol-5,8-endoperóxido (Figura 6), mas los diterpenos clerodina, ajugarina-I y II. Los compuestos se probaron mediante el bioensayo radiorespirométrico contra *M. tuberculosis*. El primer compuesto mostró una CMI de 1 µg/mL, mientras que el acetato de ergosterol-5,8-endoperóxido, ergosterol y ergosta-5,7,9 (11),22-tetraen-3β-ol presentaron CMI's de 8, <128 y 128 µg/mL. Clerodina, ajugarina-I y II fueron inactivos con CMI >128 µg/mL (Cantrell et al., 1999b).

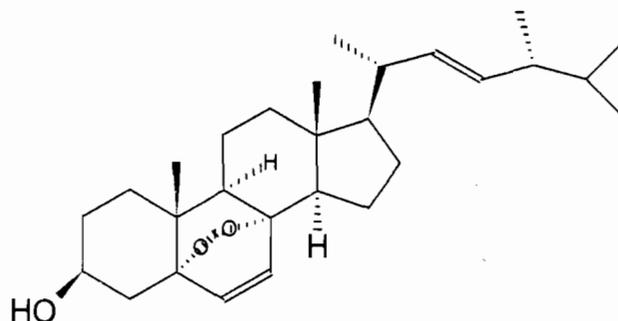


Figura 6. Estructura química del Ergosterol-5,8-endoperóxido.

Este mismo compuesto (Figura 6) se aisló del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de *Ruprechtia triflora* Grises, y presentó una CMI de $2 \mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis* H37Rv (Woldenmichael et al., 2003). Es mismo grupo evaluó el extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) de *Sapium haematospermum* que mostró una CMI de $25 \mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis* H37Rv. Mediante un fraccionamiento químico biodirigido obtuvieron los compuestos responsables de la actividad biológica, de los cuales el lecheronol A [$1\beta,12\beta$ -dihidroxi-($5\alpha,9\alpha,20\alpha$)-13-epi-pimara-8(14),15-dien-3-ona] -Figura 7- presentó una CMI de $4 \mu\text{g/mL}$; en ambos trabajos los compuestos fueron evaluados por el método MABA (Woldenmichael et al., 2004).

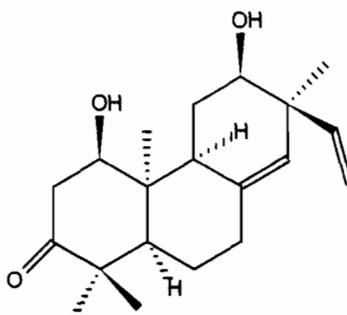


Figura 7: tructura química del Lecheronol A.

Del extracto hexánico y CH_2Cl_2 de las raíces de *Dendrolobium lanceolatum* (Duna) Schindl (Leguminosidae-Papilionidae), se aisló al 5,7,3'-trihidroxi-4',5'-(2''',2''''-dimetilpiran)-8-2'-di-(3-metil-2-butenil)-(2S)-flavanona, CMI es de $6.3 \mu\text{g/mL}$, contra *M*

MABA (Kanokmedhakul *et al.*, 2004). Así mismo, de *Chrysanthemum morifolium* se aislaron maniladiol, 3-epilupeol y 4-epoxihelianol, cuyas CMI's fueron de 4,4 y 6 $\mu\text{g/mL}$ al ser evaluados por MABA contra *M. tuberculosis* H37Rv (Akihisa *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS ESPECIES A INVESTIGAR.

Las especies pertenecientes al género *Aristolochia* (ARISTOLOCHIACEAE Juss), son hierbas trepadoras de tallos simple o ramificado con hojas alternas, simples, perennes y aromáticas. Las inflorescencias son axilares, con flores actinomorfas o zigomorfas, pediceladas, el cáliz gamosépalo, inflado basalmente, formando un utrículo, el limbo de colores vistosos, de purpúreo a amarillo, entero a 3 lobado, algunas veces unido al tubo en la parte central o peltado, la corola generalmente ausente, raramente con 3 pétalos; los estambres varían de 5 a 6, los filamentos están libres o unidos a la columna estilar o ginostemo, en 1-2 series, las anteras con ditécicas, con decencia longitudinal, ovario ínfero, apocarpico o sincarpico, 5-6 locular, 5-6 carpelar, la placentación axilar, óvulos numerosos anátropos, el estilo solitario; engrosado, el estigma 3-6 lobado. El fruto es una cápsula o folículo, 5-6 valvada, la dehiscencia septicida, semillas numerosas, triangulares, el endospermo abundante, el embrión pequeño.

Este género comprende alrededor de 500 especies, la mayoría se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales y muy pocas en regiones templadas. En el continente Americano el género se encuentra distribuido desde la vertiente sur y oriental de los Estados Unidos a través de México, Antillas y América Central hasta Sudamérica (Argentina). En México se han descrito 64 especies (Ortega-Ortiz y Ortega-Ortiz., 1997).

En diversas especies de este género se ha reportado la presencia de lignanos, diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides de diferentes partes vegetales (Wu *et al.*, 1999; 2000, 2002).

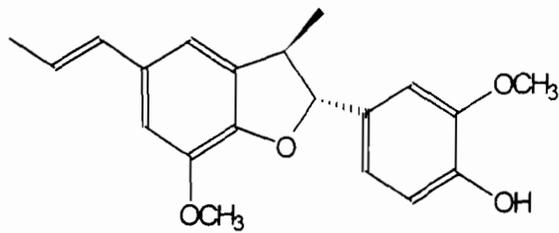
Algunas especies del género son comúnmente utilizadas en la medicina tradicional de diferentes latitudes para el tratamiento de mordeduras de serpientes, por ejemplo en Colombia, *A. grandiflora* es utilizada como antihemorrágico en el caso de la mordedura de *Bothrops atrox*, y la investigación biológica del extracto EtOH (96%) reveló que posee moderada neutralización sobre la toxina de *B. atrox* (Otero *et al.*, 2000).

Algunas otras como *A. paucinervis* son utilizadas para el tratamiento de infecciones en la piel, dolor abdominal e infecciones en las vías respiratorias altas. La investigación biológica del extracto metanólico presenta actividad antibacteriana contra gram positivos (Gadhi *et al.*, 1999). Así mismo, las hojas de *A. bracteolata* ("worm killer"), poseen actividades antihelmínticas y anticatárticas; también es útil en el tratamiento de la sífilis, gonorrea, nacidos, úlceras infectadas y otras enfermedades de la piel; el extracto EtOH posee actividad cicatrizante (Shirwaikar *et al.*, 2003). Por otro lado, el extracto MeOH (raíz) de *A. brevipes* Beth posee actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Encarnación y Keer, 1991). En la medicina tradicional china *A. heterophylla* es empleada como expectorante, antitusiva, analgésico, antihistamínico, antiasmático, tratamiento de mordeduras de serpiente y antiinflamatorio, y compuestos aislados del extracto metanólico mostraron actividad citotóxica contra las células G2, 2, 15 -hepatoma (Wu *et al.*, 1999).

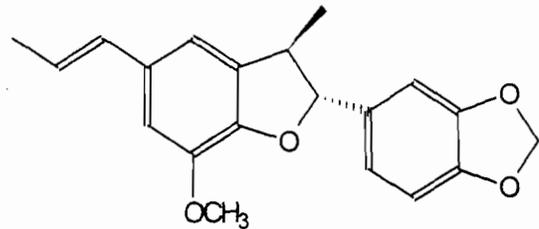
Respecto a *Aristolochia taliscana*, llamada comúnmente "guaco", se utiliza como remedio contra la diarrea, mordeduras de serpientes, y afecciones dermatológicas. Es una planta trepadora, de tallos delgados de 2-3 m de largo, se distingue por un cáliz límbico no bilobado, obtuso, y cápsula de 3 cm En México se distribuye en Sinaloa, Nayarit y Jalisco (Standley, 1920, Martínez, 1979).

Se ha informado que el extracto MeOH de la raíz posee actividad tripanocida, y como responsables de la actividad biológica se encontraron al eupomatenoide-7, la licarina A, el austrobailignano-7, y la fragransina E₁, en un

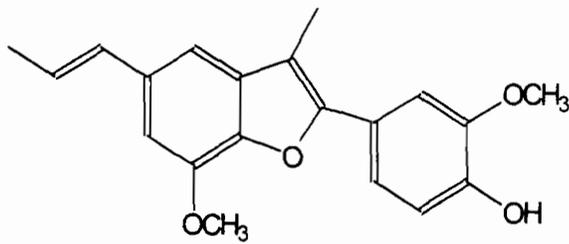
rango de MC_{100} de 25-75 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). También se aislaron el eupomatenoide-1 y licarina B (Abe *et al.*, 2002, Enríquez *et al.*, 1984). Por otra parte, del extracto EtOH:H₂O (1:1), se aisló el dehidrodiisoeugenol (Ionescu *et al.*, 1977), y de las fracciones polares del extracto bencénico de raíz se aisló la taliscanina –Figura 8- (Maldonado *et al.*, 1966).



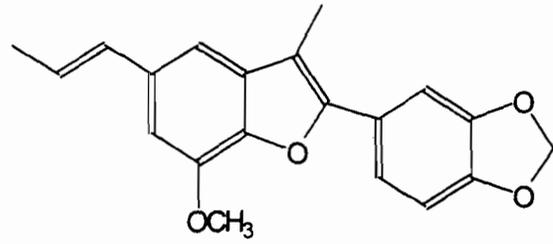
Licarina A



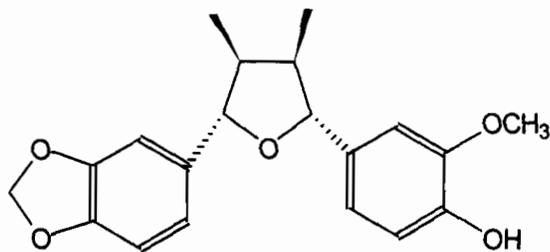
Licarina B



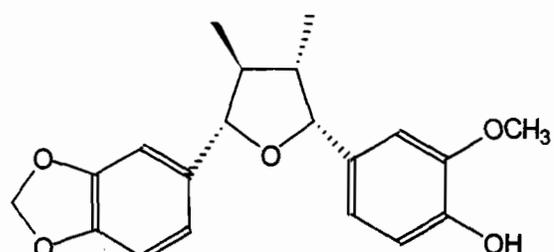
Eupomatenoide-7



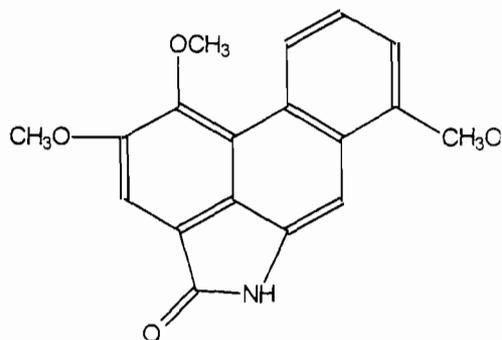
Eupomatenoide-1



Fagransina E1



Austrobailignano-7



Taliscanina

Figura 8. Compuestos aislados del extracto MeOH de *A. taliscana*.
(Abe et al., 2002, Maldonado et al., 1966)

Cabe mencionar que en la evaluación preliminar de los extractos Hex y MeOH de las partes aéreas de la planta, se encontró, que inhiben ca. 100% y 43.7%, respectivamente, el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, al ser evaluadas por el método radiorespirométrico a la concentración de 100 µg/mL.

La *Aristolochia elegans* Mast., se conoce comúnmente como “Patito”, y se utiliza como planta ornamental por sus flores vistosas. Las características morfológicas que distinguen a *A. elegans* son: hojas cordiformes, seudostípulas orbiculares o reniformes, limbo peltado, ovado y vistoso, fruto con una prolongación rectilínea, circular en el ápice surgiendo desde el ovario (hipanto). Se encuentra desde los 380 hasta los 700 msns, en forma silvestre en hábitats tan diferentes como el matorral submontano en Nuevo León, la selva mediana espinosa de Tamaulipas y la selva alta perennifolia de Chiapas, además del bosque caducifolio, bosque de encino, ecotonía de selva mediana subperennifolia y selva baja caducifolia. Su floración es de marzo a julio (Ortega-Ortiz y Ortega-Ortiz., 1997).

El estudio fitoquímico muestra que posee diterpenos, lignanos y alcaloides obtenidos a partir de los extractos de hojas, tallo y raíces. Wu, reporta la presencia de bifenil éter y porfirinas en el extracto MeOH de las hojas, además de fitol, β-sitosterol, (-)-pinoresinol, metilparabeno, ácido *p*-hidroxibenzoico, coridaldina, talifolina, nortalifolina, *N*-metilcoridaldina y *N*-metil-6,7-dimetilisoquinolona. En Taiwan este arbusto se cultiva como planta

ornamental (**Wu et al., 2000**). En la raíz y tallo de esta especie se encontraron 4 tetralonas, aristolegona-A, -B, -C, -D, una isoquinolona, pericampilinona-A, cuatro éteres bifenílicos, aristogina-A, -B, -D, y -E, tres lignanos, aristogina-A, -B, y -C y un dímero, aristolina que es un diterpeno unido al ácido aristolóquico (**Wu et al., 2002**). Desde el punto biológico esta especie no ha sido objeto de investigación alguna y tampoco existen trabajos que describan su actividad antimicobacteriana.

PLANTEAMIENTO

La tuberculosis es una de las grandes epidemias mundiales y al encontrarse dentro de las primeras 20 causas de muerte en México, constituye una enfermedad reemergente. Hoy en día los países desarrollados han retomado dentro de sus objetivos de salud erradicarla y para ello han planteado diferentes programas de tratamiento y control. Sin embargo, no se han obtenido resultados favorables que disminuyan los casos de TB, y peor aun se ha incrementado la presencia de cepas MFR de *M. tuberculosis*; lo que agrava mucho el perfil epidemiológico de la enfermedad. Dada esta problemática, en los últimos años la investigación científica se ha enfocado a la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la enfermedad y las plantas utilizadas en la medicina tradicional representan un recurso potencial para encontrar nuevos compuestos con importante actividad antimicobacteriana o bien obtener moléculas prototipo que permitan el desarrollo de nuevos agentes antifímicos. En la literatura existen trabajos donde se describen investigaciones de tipo químico-biodirigido realizados sobre especies vegetales seleccionadas con base a su uso tradicional; mediante el cual se han aislado compuestos con importante actividad antimicobacteriana. Sin embargo, a la fecha son escasos los trabajos de esta naturaleza realizados sobre especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana, por lo que este proyecto propone investigar de manera química biodirigida dos especies vegetales del género *Aristolochia*, como fuente potencial de principios con actividad antimicobacteriana.

HIPÓTESIS

Las investigaciones de tipo químico biodirigido realizadas en especies vegetales usadas para el tratamiento de la tuberculosis y/o síntomas relacionados con la enfermedad, conllevan a la obtención de compuestos activos contra *M. tuberculosis* u otras cepas de micobacterias.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico de las especies medicinales *Aristolochia taliscana* y *A. elegans*, y obtener los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica, mediante investigación químico-biodirigida.

Objetivos específicos

1. Colectar las especies vegetales, preparar ejemplar de herbario para su identificación botánica y realizar operaciones preliminares.
2. Preparar los extractos hexánico y metanólico de las especies *Aristolochia taliscana* (partes aéreas) y *A. elegans* (partes aéreas, rizoma y semillas).
3. Determinar la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico y metanólico de cada especie vegetal mediante el método radiorespirométrico BACTEC 460.
4. Realizar el fraccionamiento químico de los extractos más activos, vía cromatografía en columna fase normal.
5. Evaluar las fracciones primarias obtenidas para determinar la actividad antimicobacteriana, por el método radiorespirométrico BACTEC 460.
6. Aislar los compuestos presentes en las fracciones activas y que son responsables de la actividad antimicobacteriana, mediante el empleo de diversas técnicas cromatográficas.
7. Establecer la concentración mínima inhibitoria de los compuestos activos por el método radiorespirométrico BACTEC 460.
8. Determinar la estructura química de los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

MATERIAL Y MÉTODO

SELECCIÓN DE LAS ESPECIES

Las especies en estudio fueron seleccionadas bajo criterio etnobotánico, tomando en cuenta el uso popular en la medicina tradicional mexicana para tratar padecimientos relacionados con la TB, además del criterio quimiotaxonómico. En una investigación preliminar se encontró que los extractos Hex y MeOH de las partes aéreas de *Aristolochia taliscana* inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la concentración de 50 µg/mL al ser evaluados por MABA, y estos mismos extractos (Hex y MeOH), presentan ca. 100% y 43.7% de inhibición respectivamente sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* al ser evaluados por el método radiorespirométrico BACTEC 460 a la concentración de 100 µg/mL.

COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL Y OPERACIONES PREELIMINARES

- a) *Aristolochia taliscana*: Se adquirieron 1.3 k (peso seco) de las partes aéreas de la especie en el Mercado de Sonora, en el Distrito Federal. La identificación botánica de la especie lo realizó el grupo del herbario IMSSM.
- b) *Aristolochia elegans*: el material vegetal se colectó en Piedra Parada, municipio de Teocelo, Ver., en mayo del 2003. Un ejemplar de herbario, se depositó en el herbario IMSSM. El material limpio (de tierra y materiales extraños) se seco a temperatura ambiente y a la sombra, para detener los procesos enzimáticos, se pesó y fragmentó manualmente.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

La preparación de los extractos se realizó vía maceración, sumergiendo el material vegetal en Hex y MeOH (Mallinckrodt) de manera sucesiva y exhaustiva. Posteriormente, se filtró y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador Buchi Water Bath acoplado a una bomba de vacío Buchi Vac V-513, y a un recirculador ECO 20 a 40°C.

Para el extracto Hex de *A. taliscana* se realizaron 4 maceraciones de una duración aproximada de 15 días cada una. Posterior a este procedimiento, el mismo material se maceró cuatro veces con MeOH por el mismo tiempo. Los rendimientos de cada extracto se muestran en la Tabla 1.

Para la obtención de los extractos de *A. elegans* se separó el material vegetal en: partes aéreas (hojas y tallos), rizoma y semillas. Cada una se sumergió en el disolvente correspondiente (Hex y MeOH) de manera consecutiva y exhaustiva. Posteriormente, el disolvente fue eliminado a 40°C al vacío (en un rotaevaporador acoplado a una bomba de vacío y a un recirculador). Los pesos y rendimientos de cada extracto se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Peso y rendimiento de los extractos de *A. taliscana*.

Extracto	Peso (g)		Rendimiento (%)
	Material seco	Extracto obtenido	
Hex	1300	34.9	2.32
MeOH	1300	14.4	0.96

Tabla 2. Peso y rendimiento de los extractos de *A. elegans*.

Extracto		Peso (g)		Rendimiento (%)
		Material seco	Extracto obtenido	
Hex	Semillas	15.0	0.10	0.69
	Hojas	191.3	0.38	0.31
	Rizoma	121.0	2.52	1.32
MeOH	Hojas	6.0	0.05	0.95
	Rizoma	191.3	16.2	8.46*

*dato por corroborar.

Como primer paso, los extractos Hex y MeOH fueron sometidos a un análisis en Cromatografía de capa fina (CCF) para detectar la presencia de alcaloides (ácido aristolóquico), usando como sistema de elusión $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcAc}$ (65:20:2) y como agente revelador solución de ninhidrina al 5% en H_2SO_4 al 60% (**Wagner et al., 1984**).

ENSAYO BIOLÓGICO

La actividad antimicobacteriana de los extractos, fracciones y compuestos puros fue evaluada por el método radiorespirométrico BACTEC 460, según lo descrito por **Cantrell** y colaboradores (1996, 2001), y **Collins** y **Franzblau** (1997). Este método es considerado por la FDA como el estándar de oro para determinar la actividad antimicobacteriana de sustancias de origen natural o sintético y para determinar farmacosenibilidad -CMI para las cepas que se sospechan resistentes- (**Heifets, 2000**). Para este ensayo biológico se emplea medio líquido 7H12 o 12B Middlebrook (Becton Dickinson, Cockesville, MD, USA) enriquecido con ácido palmítico marcado isotópicamente, mismo que es metabolizado por la micobacteria liberando $^{14}\text{CO}_2$, el cual se cuantifica de manera automática en el equipo BACTEC 460, las lecturas obtenidas nos indican el Índice de Crecimiento (IC) de la micobacteria, que mediante la siguiente fórmula se expresa como porcentaje de inhibición:

$$1- (\text{IC de la muestra problema} / \text{IC de la muestra control}) \times 100$$

En este ensayo se empleo como control positivo un fármaco de primera línea R con CMI *in vitro* de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Cantrell et al., 2001**). El microorganismo de prueba fue *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27244). Cada ensayo se realizó por duplicado, y el resultado es el promedio de las lecturas. Se consideraron activos aquellos extractos que presentaron más del 90% de inhibición sobre le crecimiento del microorganismo de prueba. En el caso de compuestos puros se realizaron las diluciones correspondientes para determinar la CMI. El ensayo biológico se realizó en una campana de flujo laminar, tipo III, con luz UV y bajo estrictas condiciones de esterilidad.

El cultivo semilla del *M. tuberculosis* H37Rv se preparó inoculando un vial (medio 12B, Middlebrook) con 100 μ L de micobacterias (cultivo reciente) con un IC de 999. Una vez inoculado el vial se incubó a 37°C con 5% de CO₂, durante 7 días o hasta que este vial alcanzó un IC de 999 (máximo 10 días). Las lecturas se toman cada 24 h después del tercer día de incubación.

Las muestras a evaluar (extractos, fracciones y compuestos puros) se solubilizaron en dimetil sulfóxido (DMSO) a la concentración de 4 mg/mL (solución stock) para obtener una concentración final de 100 μ g/mL en el vial de prueba y se preparan al momento de utilizarse esterilizándose por filtración empleando una membrana estéril de 0.22 μ m de diámetro (Millex-FG, Millipore, Bedford, MA), depositándola en un tubo Eppendorf estéril. De la solución stock se realizan diluciones seriadas (1-1/16) para obtener las concentraciones deseadas (100-1.3 μ g/mL); de cada solución se toman 100 μ L y se colocan en un vial con medio 7H12 ó 12B, Middlebrook, posteriormente se inocula este medio con 100 μ L del cultivo semilla de micobacterias, se agita para uniformar la solución y los viales se incuban a 37°C durante 7 días o hasta que vial del cultivo control alcance un IC de 999; tomando lectura cada 24 h después del tercer día de incubación.

En cada ensayo se colocan tres controles: uno de vehículo (DMSO), uno con medio de crecimiento, y control positivo (R).

Como primer paso se evaluaron los extractos a la concentración inicial de 100 μ g/mL. Posteriormente, se realizaron diluciones (50, 25 μ g/mL) para determinar la CMI de cada extracto.

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO-BIODIRIGIDO

Aquellos extractos que inhibieron más del 90% el crecimiento de *M. tuberculosis* a la concentración evaluadas (25-100 μ g/mL) fueron objeto de un fraccionamiento químico.

a) *Aristolochia taliscana*:

El extracto Hex (15 g) se fraccionó químicamente, utilizando CC fase normal empacada con 150 g de gel de sílice 60 de 70-230 Å de malla, (Merck). Como fase móvil se utilizó Hex, CHCl₃ y MeOH y mezcla de ellos con grado de polaridad creciente. Los 15 g de extracto se solubilizaron en CHCl₃ y fueron adsorbidos en el 10% de sílica (15 g). Se colectaron 72 fracciones de 250 mL cada una, mismas que fueron reunidas en 15 grupos de acuerdo con su perfil químico al realizarles cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) y como agente revelador H₂SO₄ (Merck) acuoso al 10%.

En la Tabla 3 se describen los sistemas de elución utilizados, las fracciones colectadas y reunidas y el porcentaje de rendimiento de cada uno de ellos. Una vez agrupadas las fracciones se realizaron placas comparativas con estándares (como β-amirina, β-sitosterol, taraxesterol, fitol, quercetina y camperol) para detectar la presencia de estos compuestos en las fracciones obtenidas.

Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto Hex de *A. taliscana*.

Sistema (%)	Fracciones		Clave	Peso (mg)	Rendimiento %
	Colectadas	Reunidas			
Hex 100	1-14	1	F1	22.9	0.15
		2-5	F2	91.4	0.61
		6-13	F3	6.9	0.06
Hex:CHCl ₃ 90:10	15-48	14-22	F4	917.4	6.12
		23-25	F5	455.1	3.01
		26-30	F6	975.1	6.50
		31-35	F7	1562.7	10.42
		36-40	F8	1513.2	10.09
		41-46	F9	2624.9	17.50
Hex:CHCl ₃ 75:25	49-58	47-50	F10	2070.6	13.80
		51-54	F11	1738.3	11.58
		55-56	F12	397.2	2.65
Hex:CHCl ₃ 50:50	59-64	57-60	F13	643.3	4.29
		61-64	F14	783.3	5.22
CHCl ₃ 100	65-69	65-68	F15	271.1	1.81
CHCl ₃ :MeOH 50:50	70-71	70-72			
MeOH 100	72				

Las fracciones primarias (F2, F4, F6, F8, F9, F10, F12 y F14) fueron objeto de evaluación antimicobacteriana. Un segundo grupo de fracciones evaluadas fueron las F2, F5, F6, F7, F8-10, F12 y por último se evaluaron las fracciones F1, F2, F3, F5, F8-10, y F12. Las fracciones primarias que inhibieron más 95% el crecimiento de *M. tuberculosis* a la concentración 50 µg/mL fueron evaluadas a concentraciones menores (50-6.25 µg/mL) para determinar su CMI y sometidas a diversos procesos cromatográficos para aislar los compuestos presentes en dichas fracciones.

Aislamiento del compuesto A

En la fracción primaria F6 precipitaron 975 mg de un compuesto mayoritario y puro (compuesto **A**) de color amarillo que cristalizó en forma agujas transparentes, con pf de 82-86°C (Fisher-Johnes Melting Point Apparatus), sin corregir, Rf = 0.55 en el sistema Tol:AcOEt 97:3 y soluble en CHCl₃. Este compuesto se comparó con los estándares de fitol, taraxasterol, β-sitosterol y β-amirina. Además, se obtuvieron los espectros de IR, UV, DC, RMN-¹H y ¹³C, EM y CG-EM para su identificación química. El compuesto fue sometido a evaluación antimicobacteriana por el método radiorespirométrico Bactec 460 en diluciones seriadas (100-12.5 µg/mL) para determinar su CMI.

Fraccionamiento secundario de F8-F10

Debido a la similitud en CCF y a los resultados de la actividad biológica, las fracciones F8, F9 y F10 se reunieron. De esta reunión se tomaron 2.5 g que fueron recromatografiados en CC (fase normal) empacada con gel de sílice 75 g y adsorbida en 7.5 g. Mediante este proceso se obtuvieron 93 fracciones de 150 mL que se reunieron en 14 grupos de acuerdo al perfil mostrado en CCF. Los sistemas de elución empleados, las fracciones eluidas, el agrupamiento de las mismas, así como el peso y el rendimiento de los grupos se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Recromatografía de la fracción primaria F8-10 de *A. taliscana*.

Sistema (%)	Fracciones		Clave	Peso (mg)	Rendimiento %
	Colectadas	Reunidas			
Hex 100	1-6	1-19	FA	15.5	0.62
Hex:CHCl ₃ 90:10	7-13	20-24	FB	5.9	0.23
Hex:CHCl ₃ 80:20	14-19	25-28	FC	5.0	0.2
Hex:CHCl ₃ 70:30	20-26	29-31	FD	41.1	1.64
Hex:CHCl ₃ 60:40	27-31	32-34	FE	12.5	0.5
Hex:CHCl ₃ 50:50	32-34	35-40	FF	403.1	16.12
Hex:CHCl ₃ 40:60		41-43	FG	391.7	15.66
		44-47	FH	459.3	18.37
		48-55	FI	257.2	10.28
		56-63	FJ	357.2	14.28
		64-67	FK	5.2	0.20
Hex:CHCl ₃ 25:75	72-77	69-76	FL	82.8	3.28
CHCl ₃ 100	78-89	78-89	FM	34.2	1.36
CHCl ₃ :MeOH 50:50	90-93	90-93	FN	189.4	7.57

En la fracción secundaria FD se obtuvo 40 mg del **compuesto A** y en la fracción secundaria FF se detectó la presencia de compuesto mayoritario (**compuesto B**) con Rf fue 0.55 usando el sistema de elución CHCl₃:MeOH 97:03, esta fracción fue sometida a un análisis de CG-EM donde se observan tres compuestos, uno de ellos mayoritario con TR 18.82 min.

En la fracción secundaria FJ se detectó un compuesto mayoritario (**compuesto C**) con Rf de 0.38 en el sistema de elución CHCl₃:MeOH 97:3.

Las fracciones secundarias FD, FF, FG y FJ fueron sometidas a evaluación antimicobacterina (100-12.5 µg/mL) con la finalidad de determinar su CMI, dado que presentaban compuestos mayoritarios e inhibían mas del 90 % el crecimiento de *M. tuberculosis* a 100 µg/mL, en una primera evaluación.

Aislamiento del compuesto B

En las fracciones secundarias (activas) FF, FG, y FH, se detectó la presencia de un compuesto mayoritario **B** que se sospechaba correspondía al diterpeno fitol, por lo que se realizó una co-cromatografía de la fracción FF con una referencia comercial de fitol (Sigma Co) usando como sistema de elución CHCl₃:MeOH 10mL:40 µL, observándose que existe diferencias en el Rf, siendo

para el primero de 0.55 y para el fitol de 0.38. Por lo que se procedió a purificar el compuesto mediante re-cromatografía en columna fase normal, sometiendo a purificación 400 mg de FF. Para ello se emplearon 12 g de gel de sílice como fase estacionaria (proporción 1:30), y como fase móvil, Hex, CHCl₃, MeOH y mezclas de ellos en grado de polaridad creciente. Se colectaron 78 fracciones, las cuales se agruparon en 8 grupos de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCF (Tabla 5).

Tabla 5. Recromatografía de la fracción secundaria FF de *A. taliscana*

Sistema (%)	Fracciones		Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)
	Colectadas	Reunidas			
Hex 100	1-19	1-29	Fa	3.3	0.825
Hex: CHCl ₃ 98:2	20-25	30-31	Fb	1.5	0.375
Hex: CHCl ₃ 90:10	26-30	32-42	Fc	90	22.5
Hex:CHCl ₃ 95:5	31-36	43-45	Fd	175.6	43.9
Hex:CHCl ₃ 93:7	37,39	46-62	Fe	66.3	16.57
Hex:CHCl ₃ 90:10	40	63-67	Ff	19.8	4.95
Hex:CHCl ₃ 80:20	41	68-75	Fg	18.2	4.55
Hex:CHCl ₃ 75:25	42-61		Fh	**	
Hex:CHCl ₃ 50:50	62-65				
Hex:CHCl ₃ 25:75	66-67				
CHCl ₃ 100	67-75				
CHCl ₃ :MeOH 50:50	76-77				
MeOH 100	78				

** no está seca

En las subfracciones Fc y Fe se detectó la presencia del **compuesto B**, como compuesto mayoritario, pero presentaba compuestos adicionales con R_f similar; por lo que se probaron diversos sistemas de elusión (CHCl₃:MeOH 97:3, Hex:CHCl₃:MeOH 7:90:3, Hex:CHCl₃:MeOH 9:99:1, Hex:CH₂Cl₂ 95:5, CH₂Cl₂:EtOH 97:3, Hex:CHCl₃ 95:5, Hex:CHCl₃ 25:75, Hex:CHCl₃ 50:50) para lograr la mayor separación posible de los compuesto presentes y someterlos a cromatografía en placa preparativa. De los sistemas probados el que presentó mejor resolución fue Hex:CHCl₃:MeOH: 9:99:1, este sistema fue utilizado para realizar la CCF tipo preparativa; para ello se utilizaron 4 placas de 20x20 cm (Kieselgel 60 F₂₅₄, MERCK). Se utilizaron 80 mg de Fc y Fe, obteniéndose 67 mg de compuesto puro. Este compuesto se obtuvo como un polvo marrón, con punto de fusión de 100-104°C (soluble en CHCl₃). Para la identificación

estructural de este compuesto se obtuvieron los espectros de IR, UV, DC, EM, RMN-¹H y RMN-¹³C y CG-EM.

Aislamiento del compuesto C

En la fracción secundaria FJ se detectó la presencia de un compuesto mayoritario, por lo cual se sometió a re-cromatografía en CC para su purificación. Para ello se sembraron 300 mg de muestra en 9.0 g de gel de sílice, usando como fase móvil Hex, CHCl₃ y MeOH, y mezclas de ellos en grado de polaridad creciente. En la Tabla 6 se describen los sistemas de elusión, fracciones colectadas, las reuniones de las mismas, su peso y su rendimiento.

Tabla 6. Recromatografía de la fracción secundaria FJ de *A. taliscana*.

Sistema (%)	Fracciones		Clave	Peso (mg)	Rendimiento (%)
	Colectadas	Reunidas			
Hex 100	1-18	1-40	Fa'	4.8	1.6
Hex:CHCl ₃ 95:5	19-29				
Hex:CHCl ₃ 90:10	30-78	41-57	Fb'	249.1*	83.03
		58	Fc'	5.9	1.96
		59-61	Fd'	6.8	2.26
		62-69	Fe'	11.3	3.76
		70-78	Ff'	1.9	0.66
Hex:CHCl ₃ 75:25	79-89	79-97	Fg'	5.6	2.16
Hex:CHCl ₃ 50:50	90-97				
CHCl ₃ 100	98-103	98-102	Fh'	8	2.66
CHCl ₃ :MeOH 50:50	104-107	103-107	Fi'	11.5	3.83

*Peso de aguas madres (53.1mg) y precipitado (196 mg).

En la subfracción Fb' se obtuvieron cristales de color blanco al momento de eliminar el solvente, por lo que esta fracción se lavo con Hex bidestilado (100%) para eliminar las impurezas presentes, y posteriormente fue recristalizada con CHCl₃, obteniéndose 196 mg de compuesto puro (**compuesto C**). Este compuesto se obtuvo en forma de polvo blanco con pf de 107-110°C, soluble en CHCl₃, además se obtuvieron sus espectros de IR, UV, DC, EM, RMN-¹H y RMN-¹³C, para su identificación química.

Tanto los compuestos B y C fueron objeto de evaluación antimicrobacteriana en el rango de concentraciones de 50-6.25 µg/mL para determinar su CMI.

b) *Aristolochia elegans*:

El extracto Hex del rizoma de *A. elegans* (2.2 g) fue fraccionado en CC de fase norma, en 6.6 g de gel de sílice (malla de 0.063-.0200, proporción 1:30, Merck). Se utilizó como fase móvil Hex, CHCl₃ y MeOH, y mezclas de ellos en grado de polaridad creciente. Se obtuvieron 85 fracciones de 100 mL c/u, que se reunieron en 13 grupos, de acuerdo a su perfil cromatográfico mostrado en CCF. Se realizaron placas comparativas entre las fracciones primarias de *A. elegans* y *A. taliscana* para detectar la presencia de compuestos activos afines (previamente aislados de *A. taliscana*). Los pesos y rendimientos de las fracciones colectadas, así como los sistemas de elución empleados se expresan en la Tabla 7.

Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto Hex del rizoma de *A. elegans*.

Sistema (%)	Fracción	Grupo	Peso (mg)	Rendimiento (%)
Hex 100	1	FI	355.6	16.16
Hex 100	2-7	FII	72.1	3.28
Hex:CHCl ₃ 95:5	8-13	FIII	475.7	21.62
Hex:CHCl ₃ 90:10	14-22	FIV	49.9	2.27
Hex:CHCl ₃ 80:20	23-31	FV	12.2	0.55
Hex:CHCl ₃ 80:20	32-33	FVI	11.8	0.53
Hex:CHCl ₃ 80:20	34-38	FVII	169.4	7.7
Hex:CHCl ₃ 70:30	39-45	FVIII	53.4	2.42
Hex:CHCl ₃ 50:50	46-51	FIX	129.0	5.86
Hex:CHCl ₃ 50:50	52-59	FX	65.7	2.98
Hex:CHCl ₃ 25:75	60-72	FXI	396.	18.00
CHCl ₃ 100	73-75	FXII	58.1	2.640
CHCl ₃ :MeOH 80:20	76-85	FXIII	189.5	8.6136

La comparación nos permitió detectar que en las fracciones FVII y F-X se encuentran los compuestos B y C respectivamente. En la fracción F-I están presentes los compuestos de la F2 de la primera especie investigada. En la F-

IV se detectó la presencia de una mezcla de compuestos diferente a los previamente detectados en las fracciones de *A. taliscana*; esta fracción fue enviada a un análisis de CG-EM, para detectar los compuestos presentes en ella. Además, se detectó la presencia de β -sitosterol en las fracciones F-IX y X. Dada las características químicas de estas fracciones (F-I, III, IV, VII, y X) se sometieron a evaluación antimicobacteriana.

DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS.

Para determinar las estructuras químicas de los compuestos activos se obtuvieron los espectros de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) y de carbono trece (RMN-¹³C), espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), dicroísmo circular (DC) y espectro de ultravioleta (UV).

El DC se determinó en un polarímetro marca Perkin Elmer, modelo 345, usando como disolvente MeOH. Los espectros de IR se obtuvieron en el espectrómetro Bruker Mod Tensor 27, celda NaCl de 5 mm de ancho, en película y los espectros de UV se obtuvieron en un Shimadzu UV160U, en MeOH.

Los espectros de RMN-¹H se obtuvieron en espectrómetro Eclipse de 300 MHz Joel (E) y Bruker-Avance 300 MHz utilizando como referencia interna TMS y como disolvente CDCl₃. Los espectros de RMN-¹³C se obtuvieron en el espectro Variant Unity de 300 MHz, usando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna TMS. Los EM fueron obtenidos en un espectrómetro Jeol AX 505 HA a 70 eV.

Los espectros de CG-EM fueron obtenidos en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II, usando una Columna capilar HP-5MS (5% fenilmetil polisiloxano) de 30 m largo, 0.25 mm d.i. y de 0.25 μm de espesor de película y He (Praxair, grado 5.0 -ultra alta pureza-) como gas transportador, con flujo de 1 mL/min., tipo de inyección split 1:30, y el volumen inyectado 1 μL.

La pureza de los compuestos se determinó empleando cromatoplasmas de sílica gel, 60 F₅₂₄ (Merck).

Los puntos de fusión se tomaron un aparato Fisher-Johns Melting Point Apparatus, y se reportan sin corregir.

REACTIVOS Y CONDICIONES DE SEGURIDAD

Los disolventes usados fueron grado reactivo analítico (RA) marca Mallinckrodt, destilados o bidestilados y la eliminación de los mismos se realizó mediante los servicios de la compañía Manejo Integral de Residuos, S.A. de C.V.

Todo el material utilizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana fue desechado en contenedores adecuados previa esterilización (15 lb por 1 h), además estos ensayos se realizaron bajo estrictas condiciones de bioseguridad e higiene, en una campana de flujo laminar (tipo III) con luz UV, usando bata de seguridad, guantes y cubrebocas.

RESULTADOS

ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *A. taliscana*.

La evaluación biológica de los extractos, fracciones y compuestos puros se realizó por el método radiorespirométrico Bactec 460, usando *M. tuberculosis* H37Rv como microorganismo de prueba, según lo descrito por **Cantrell et al., 1996, 2001; Collins y Franzblau, 1997.**

La maceración del material vegetal de *A. taliscana* permitió la obtención de 34.9 g del extracto Hex y 14.4 g del extracto MeOH, obteniéndose rendimientos del 2.32 y 0.96 %, respectivamente (Ver Tabla 1 de Metodología).

Una vez obtenidos los extractos se realizó la evaluación antimicobacteriana donde se encontró que el extracto Hex es activo, presentando un 99.99% de inhibición sobre *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL y una CMI de 50 µg/mL, mientras que el extracto MeOH fue poco activo presentando un 46.34% de inhibición sobre el crecimiento de la micobacteria a 100 µg/mL por el método antes mencionado (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de los extractos Hex y MeOH de *A. taliscana*, contra *M. tuberculosis* H37Rv, a 100 µg/mL.

<i>A. taliscana</i>	Concentración evaluada (µg/mL)	Ext. Hex	Ext. MeOH
Partes aéreas	100	99.99	46.34
	50	96.64	0.0
	25	62.11	0.0

Con base en estos resultados decidimos fraccionar químicamente el extracto Hex para aislar los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana.

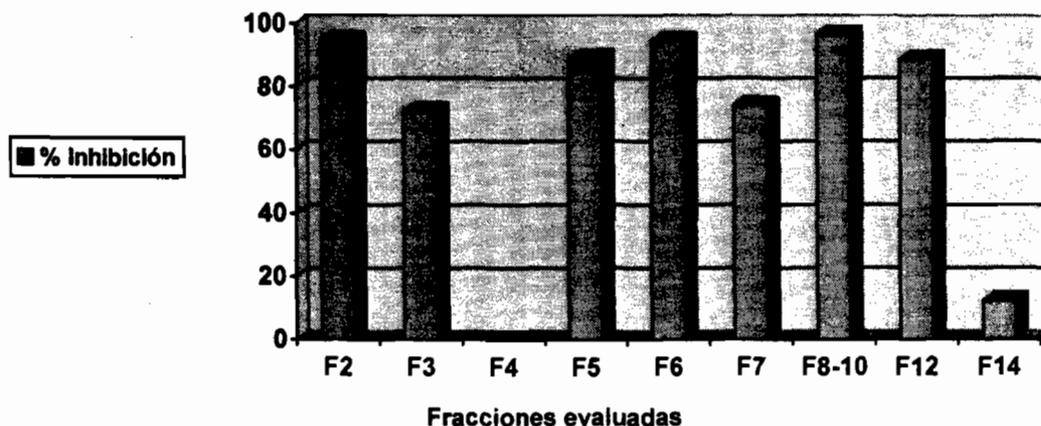
Este fraccionamiento permitió la obtención de 15 grupos (F1-F15) mismos que se agruparon de acuerdo al perfil mostrado en CCF y fueron evaluadas mediante el método radiorespirométrico Bactec 460®. El primer lote de fracciones evaluadas fue: F2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, posteriormente fueron evaluadas las fracciones las F2, F5, F6, F7, F8-10, F12 y por último se evaluaron las fracciones F1, F2, F3, F5, F8-10, y F12. La evaluación por etapas

de las fracciones se hizo por dos razones, una por el costo del ensayo radiorespirométrico, y la segunda y más importante fue la de explorar la actividad biológica de las fracciones. En el primer lote resultaron activas las fracciones F2, 6, 8, 9, 10 y 12 e inactivas la F4 y 14, por lo que en el segundo lote se confirmó la actividad de las fracciones activas y se evaluaron adicionalmente la F5 y F7, resultando poco activas estas últimas. En el tercer lote se evaluaron nuevamente las fracciones F2, F8-10 y F12 y las que faltaban, F1, 3 y 5, que no presentaron actividad importante.

Las fracciones activas F2 y F6 fueron objeto de dilución para determinar la CMI; dado que de F2 se contaba con escasa cantidad (91.4 mg) y F6 presentaba un compuesto puro y mayoritario, el resto de las fracciones fueron evaluadas a 100 µg/mL. Los porcentajes de inhibición se muestran en la Tabla 9 y Gráfica 1.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv.

Clave	Concentración (µg/mL)	% de inhibición
F1	100	94.59
F2	100	95.40
	50	94.93
	25	73.64
	12.5	77.45
F3	100	72.18
F4	100	0.0
F5	100	88.88
F6	100	94.39
	50	89.95
	25	85.0
F7	100	74.07
F8-10	100	96.23
F12	100	88.47
F14	100	12.3



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. taliscana*, contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL. Método radiorespirométrico Bactec 460. Control positivo: rifampicina (CMI *in vitro* 0.25 µg/mL)

Las fracciones que presentaron más del 95% de inhibición fueron F2 y F8-10. El primer grupo (F2) no fue fraccionado químicamente por falta de muestra ya que en el proceso de fraccionamiento se obtuvieron 91.4 mg de muestra. Esta fracción inhibe en un 95.40% el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL y su CMI es de 50 µg/mL (94.93%). El análisis por CG-EM mostró que esta fracción presenta un compuesto mayoritario con TR de 17.22 min y PM de 272, que corresponde a la FM C₂₀H₃₂. Además, se observan dos picos minoritarios con TR de 10.97 min y 16.29. Falta enriquecer la fracción para realizar la identificación de los compuestos.

Elucidación estructural de los compuestos puros.

En la fracción primaria F6 al momento de eliminar el disolvente se obtuvieron 975 mg de compuesto puro (**compuesto A**), de color amarillo que cristalizó en forma de agujas transparentes en CHCl₃, con un punto de fusión de 82-86°C y soluble en CHCl₃. Este compuesto presentó un 94.39% de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a 100 µg/mL, y su CMI fue 25 µg/mL. La identificación química del compuesto se realizó mediante el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos.

En el espectro de IR (Espectro 1) se observan señales para carbonos de tipo alifático (2900 cm^{-1}), carbonos de tipo aromático (1600 cm^{-1}) y señales para grupo éter ($1050\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$). En espectro de UV se observan que el compuesto absorbe a las longitudes de onda (λ)_{MeOH} de 208, 218 y 270 nm (Espectro 2). En el CG-EM (Cromatograma 1) se observa la presencia de un sólo compuesto con TR de 15.02 min y PM de 324, este peso molecular se corroboró al realizar el EM-IE (Espectro 3). En EM se observa el ion molecular a m/z 324. Otros fragmentos importantes que permitieron la identificación de la molécula fueron a m/z 202 (Fragmento A), 121 y 75 (Fragmento B) –Figura 9.

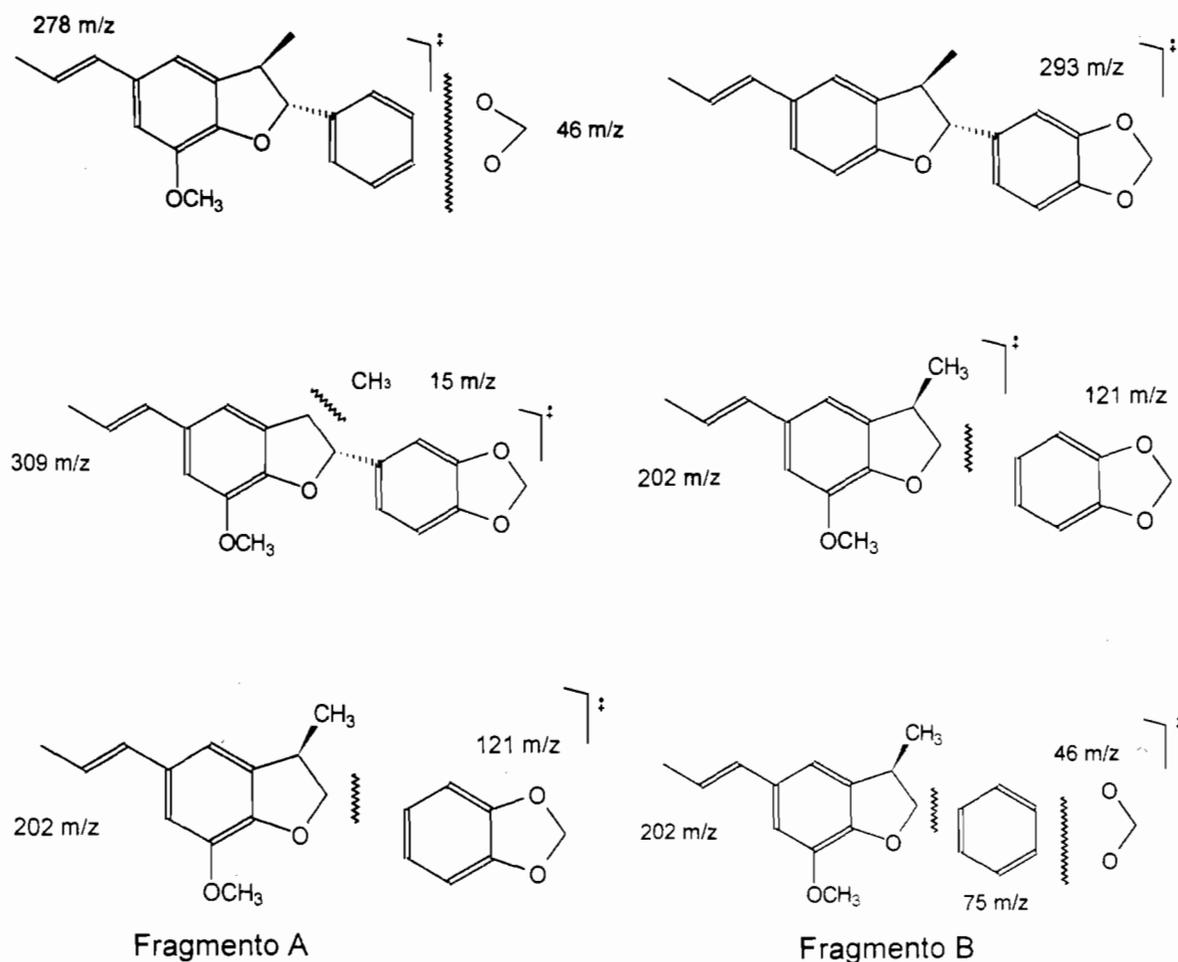


Figura 9. Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto A.

En el espectro RMN-¹³C modalidad DEPT (Espectro 4) se observan señales para 20 átomos de carbono, que corresponden a 9 metinos, un metilendioxi, un metoxilo, 2 metilos y siete carbonos cuaternarios (Tabla 12). Con los datos de EM y RMN-¹³C, y la comparación con lo reportado en la literatura (Enríquez *et al.*, 1984) se pudo determinar que la molécula presenta una FM de C₂₀H₂₀O₄.

En la RMN-¹H (Espectro 5) se observaron las siguientes señales:

- a) Un doble en δ_H 1.37 con $J_{3-Me} = 6.8$ Hz, que integra para tres protones, y fue asignado al metilo ubicado en el C-3. Además, se observa un doble de doble (dd) en δ_H 1.86, que integra para tres protones, con $J_{\alpha-\gamma} = 1.6$ Hz y $J_{\beta-\gamma} = 6.6$ Hz y fue asignado a un metilo (γ) unido a una doble ligadura.
- b) Un singulete en δ_H 3.88, que integra para tres protones, y que corresponde a los protones del grupo OCH₃ ubicado en el C-7
- c) Una señal múltiple en δ_H 3.37-3.45, que integra para un protón con $J_{3-Me} = 6.8$ Hz que corresponde al protón (H-3) que interacciona con los protones de un metilo y con el protón del metino (H-2).
- d) Un doble en δ_H 5.09 con $J_{2-3} = 8.97$ Hz, que integra para un protón y que corresponde al metino ubicado en C-2, cuyo valor de J nos ayudo a determinar la estereoquímica de este centro quiral. Además se observa un singulete en δ_H 5.95 que integra para dos protones y que corresponde a los dos hidrógenos del grupo metilendioxi.
- e) Un cuarteto dobleteado centrado en δ_H 6.04-6.15 con $J_{\beta-\alpha} = 15.9$ y $J_{\beta-\gamma} = 6.6$ Hz, que integra para un protón. Por el desplazamiento químico de la señal esta corresponde a un H de doble ligadura del grupo propenilo ubicado en el C-5 y fue asignado al protón β .
- f) Un doble de doble en δ_H 6.35 con $J_{\alpha-\beta} = 15.87$ Hz y $J_{\alpha-\gamma} = 1.7$ Hz que integra para un protón y corresponde a un metino de doble ligadura del grupo propenilo ubicado en el C-5 y fue asignado al protón α .

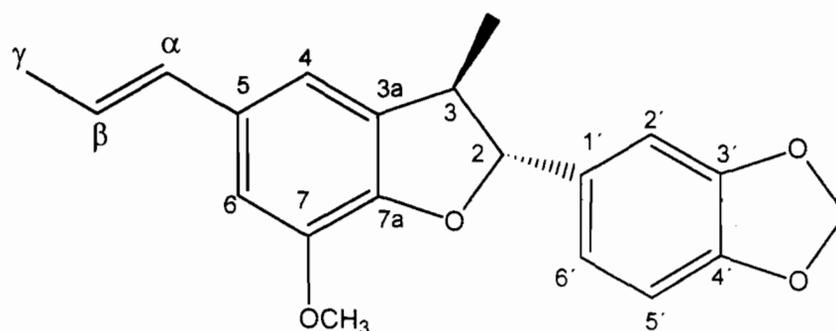
g) En la zona de protones aromáticos se observan las señales que se describen a continuación:

g.1) en δ_H 6.79 se observa una señal simple, que integra para un protón y fue asignada al protón H6. En δ_H 6.72-6.79 se observa una señal múltiple, que integra para un protón, con $J_{4-6} = 1.5$ Hz y fue asignado a H-4.

g.2) en δ_H 6.87 se observa un doble de doble, que integra para dos protones y fue asignado a los metinos H-5' y H-6' con $J_{5'-6'} = 8.3$ Hz y $J_{2'-6'} = 0.44$ Hz.

g.3) en δ_H 6.92 se observa una señal doble que integra para un protón, misma que fue asignada al metino H-2' cuya $J_{2'-5'} = 1.6$ Hz.

Con estos datos se pudo corroborar que el compuesto A corresponde a la Licarina B (Figura 10), cuyo punto de fusión reportado es de 89-90°C, (Enríquez *et al.*, 1984) y de 91-92°C (Aiba *et al.*, 1973). Este compuesto se aisló previamente en el extracto de éter de petróleo y del MeOH de *A. taliscana*, (Enríquez *et al.*, 1984, Abe *et al.*, 2002). La estereoquímica del centro quiral C-2, se determinó mediante la J que presentan los hidrógenos 2 y 3 ($J_{2-3} = 8.97$ Hz), y el valor de $[\alpha]_D^{25} = -0.262$.



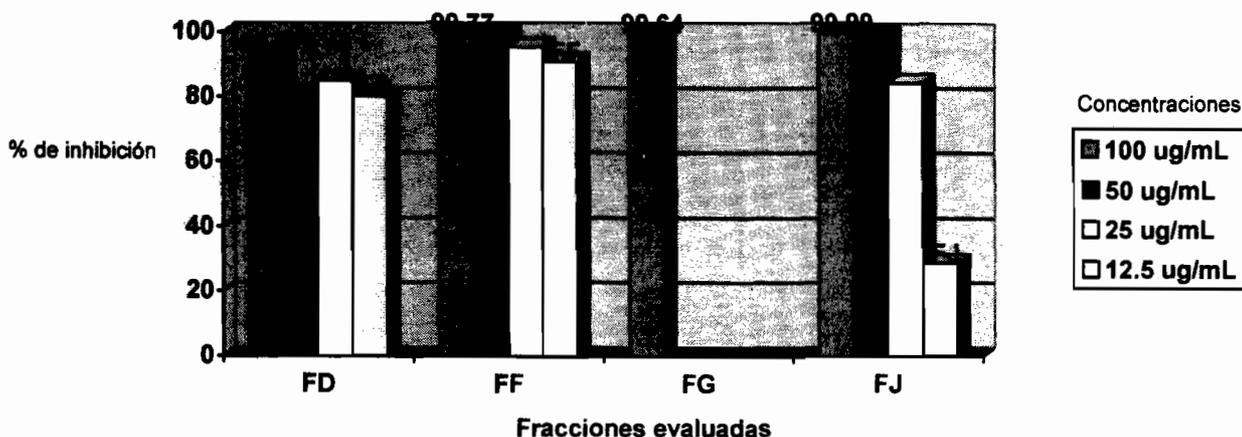
Licarina B

Figura 10.

Otro grupo de fracciones activas fue F8-10 (96.23% inhibición a 100 $\mu\text{g/mL}$). En esta fracción se detectó la presencia de β -amirina, β -sitosterol y fitol (que no fueron aislados pero fueron comparados con estándares comerciales); además de otros compuestos. En la recromatografía en CC de este grupo permitió la obtención de 14 grupos de fracciones secundarias (Tabla 4 de Metodología). En la fracción secundaria FD se detectó la presencia del **compuesto A** (41.1 mg). En la FF se detectó la presencia de β -sitosterol y un compuesto mayoritario con Rf diferente al fitol. En las fracciones FG, FH y FI se detectó la presencia de β -sitosterol y fitol. Las fracciones con compuestos mayoritarios (FD, FF, FG y FJ), fueron sometidas a evaluación antimicrobacteriana obteniéndose los resultados descritos en la Tabla 10 y Gráfica 2.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de las fracciones secundarias de *A. taliscana*.

Fracción	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de inhibición	Compuestos detectados
FD	100	93.37	A
	50	81.0	
	25	85.0	
	12.5	80.1	
FF	100	99.77	B y fitol
	50	99.7	
	25	95.4	
	12.5	90.89	
FG	100	99.64	
FJ	100	100	C, β -sitosterol
	50	98.9	
	25	84.4	
	12.5	28.82	

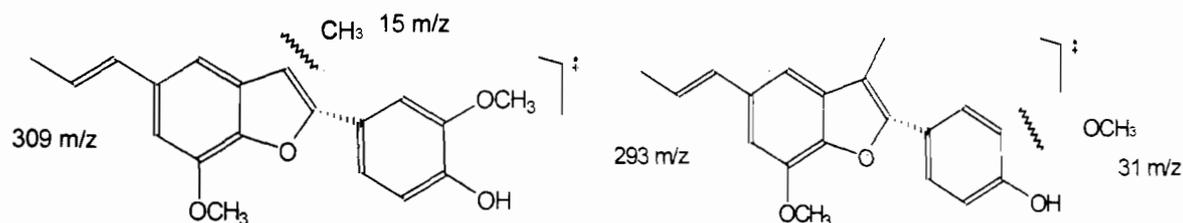


Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de las fracciones secundarias de *A. taliscana* contra *M. tuberculosis* H37Rv. Método radiorespirométrico Bactec 460. Control positivo: R (CMI *in vitro* 0.25 $\mu\text{g/mL}$).

Con estos datos se pudo determinar que la actividad se encontraba en dichas fracciones, por lo que se procedió a aislar los compuestos mayoritarios presentes y responsables de la actividad biológica mediante diversos métodos cromatográficos.

La recromatografía en CC de la FF (400 mg) permitió obtener 9 grupos de fracciones. En las fracciones terciarias Fc (90 mg) y Fe (66.3 mg) se realizó CCF preparativa (80 mg) con la finalidad de aislar el compuesto mayoritario. Con este procedimiento se obtuvieron 67 mg de compuesto puro (**compuesto B**) que es un polvo color marrón, soluble en CHCl_3 y con pf de 100-104°C.

Es espectro se IR y UV (Espectro 6 y 7) se observaron las mismas señales que en el compuesto anterior. En el EM-IE (Espectro 8) se observa el mismo peso molecular a m/z 324. Otros fragmentos que permitieron la identificación de la molécula se describen en la Figura 11.



Fragmentos C

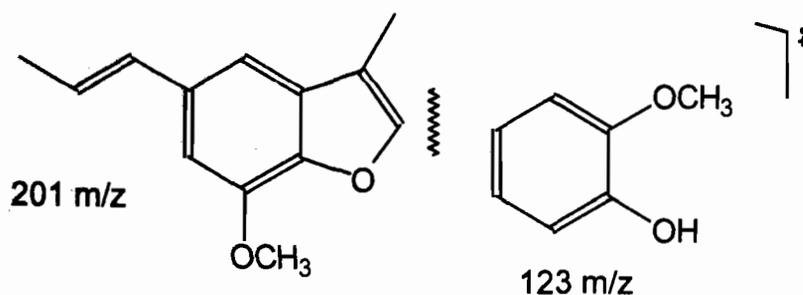


Figura 11. Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto B

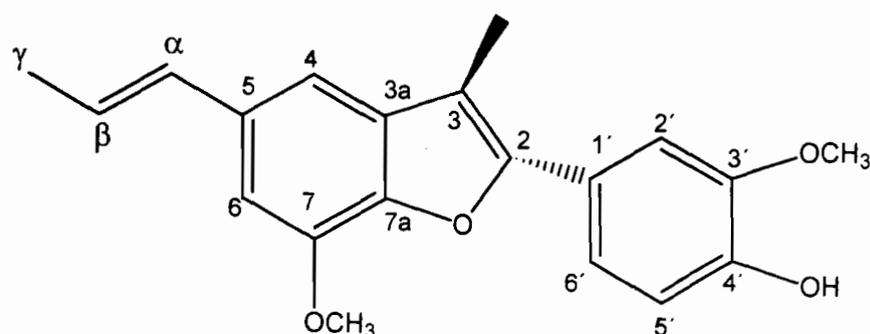
En el espectro de RMN-¹³C, modalidad DEPT (Espectro 9), se observan señales para 20 átomos de carbono, que corresponde para 2 metoxilos (uno más que el compuesto A), 2 metilos (los dos sobre doble ligadura), 7 metinos (dos menos que el compuesto A) y 9 carbonos cuaternarios (dos más que el compuesto A (Tabla 12). Con los datos de EM y de RMN-¹³C se pudo determinar que la molécula presenta una FM de C₂₀H₂₀O₄ y PM de 324. Esta FM es la misma que presentó el compuesto A.

El espectro de RMN-¹H (Espectro 10) es muy similar al del compuesto A con las siguientes diferencias:

- un doble de doble en δ_H 1.90, que integra para un protón, con $J_{\alpha-\gamma} = 1.5$ Hz y $J_{\beta-\gamma} = 6.6$ Hz y fue asignado al metilo (γ). Además, se observa una señal simple en δ_H 2.4, que integra para tres hidrógenos y corresponde al CH₃ ubicado sobre el C-3 (cuaternario); esta señal se observa como un doble para el compuesto A (ya que este metilo se ubica sobre el C-3 e interacciona con su metino). Además, en este espectro desapareció la señal para el metino en C-2.
- dos señales simples en δ_H 3.97 Hz y 4.035 que corresponden a los grupos metoxilo (OCH₃) ubicados en C-7 y C-3', respectivamente. En este caso se observa un metoxilo adicional ubicado en C-3', que en el caso del compuesto A se tiene un grupo metilendioxi en C3' y C4'.
- una señal simple en δ_H 5.75 típica para OH fenólico.

En la zona de protones aromáticos se observan las mismas señales que se describieron para el compuesto A.

Con estos datos se pudo corroborar que el compuesto B corresponde al Eupomateniodes-7 (Figura 12) previamente reportado en la especie por **Enríquez et al., 1984**, **Abe et al., 2002**, del cual se han descrito los pf 105-106°C y 106-107°C **Bowden et al., 1972**; **Enríquez et al., 1984**).



Eupomateniodes-7

Figura 12.

Además, la fracción secundaria FF fue objeto de un análisis CG-EM (Cromatograma 2), donde se observa un pico mayoritario con TR de 18.82 min y en su EM se observa el ion molecular para el Eupomateniodes-7 (324). Los picos 1 y 2 presentan TR de 10.22 min (PM= 222) y 17.90 (PM de 324) respectivamente, pero están en muy pequeña cantidad. Esta fracción mostró 100% de inhibición a 100 µg/mL y una CMI 6.25 µg/mL sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv.

La fracción secundaria FJ presentó ca. 100% de inhibición a 100 µg/mL y su CMI fue de 25 µg/mL. En la recromatografía (CC) se obtuvieron 9 grupos de fracciones terciarias. En la subfracción Fb' se obtuvieron 196 mg del **compuesto C**, que cristalizó en forma de un polvo blanco al momento de eliminar el solvente, presentando pf de 107-110°C. Su Rf es de 0.55 en el

sistema elusión Hex:CHCl₃ 97:3. Este compuesto mostró un 100% de inhibición a 100 µg/mL y al realizarle diluciones seriadas se encontró que presenta una CMI de 25 µg/mL (93% de inhibición). La identificación química se realizó mediante el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos.

En el espectro de IR y UV (Espectro 11 y 12) se observan las mismas señales que en los compuestos anteriores. En el CG-EM (Cromatograma 3) se observa la presencia de un sólo compuesto con TR de 0.70 min y PM de 326, este peso molecular se corroboró en al realizar el EM-IE (Espectro 13). En el espectro RMN-¹³C modalidad DEPT (Espectro 14) se observan señales para 20 átomos de carbono, que corresponden a 9 metinos, 2 metoxilo (uno más que el compuesto A), 2 metilos (uno sobre doble ligadura) y siete carbonos cuaternarios, en este caso no se observa la señal para el grupo metilendioxi (Tabla 12). Con los datos de EM y RMN-¹³C se pudo determinar que la molécula presenta una FM de C₂₀H₂₂O₄; con la diferencia que este compuesto presenta dos una más que el compuesto A y B.

El espectro de RMN-¹H (Espectro 15) para este compuesto (C) presenta prácticamente las mismas señales observadas para el compuesto A. Las diferencias son las siguientes.

- a) la señal simple correspondiente al grupo metilendioxi ($\delta_H=5.95$) esta ausente, y en su lugar aparece una señal simple en δ_H 3.89 que corresponde a un metoxilo adicional que se ubica en el C-3'; además, se observa la presencia de una señal simple en δ_H 5.63 que corresponde al grupo OH fenólico ubicado en C-4'. La presencia de estos grupos se confirma en el EM (Espectro 13) al observar picos de m/z 203 y de m/z 123 que corresponde a la perdida de los fragmentos E y F.

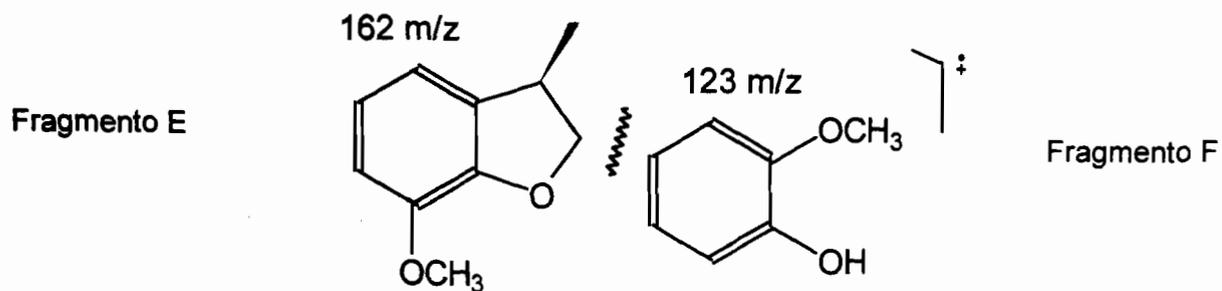
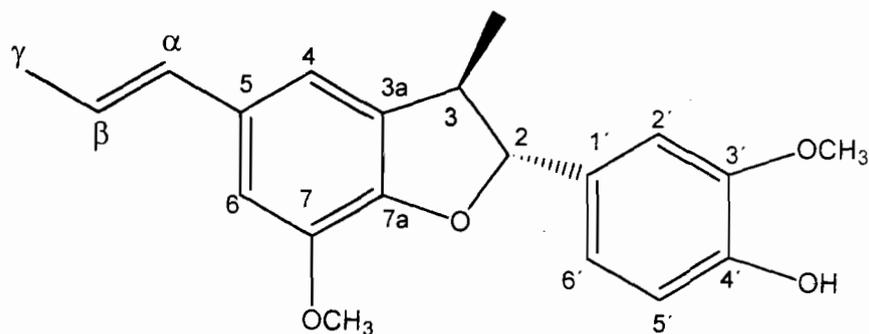


Figura 13. Fragmentos observados en el EM-IE del compuesto C.

Con estos datos se pudo corroborar que el compuesto C corresponde a la Licarina A (Figura 14) para la cual se han descrito los pf de 133-134°C (Aiba *et al.*, 1973), 136°C (Enríquez *et al.*, 1984); 102-104°C, (Achenbach *et al.*, 1987). La estereoquímica del carbono quiral C-2 de este compuesto se determinó por el valor de la $J_{2,3} = 9.36$ Hz y el valor de $[\alpha]^{25}_D = -0.15$.



Licarina A

Figura 14.

Tabla 11. Datos de desplazamiento químico en ppm de RMN-¹H para los compuestos A, B y C (Referencia TMS, disolvente CDCl₃)

Protón	A	B	C
2	5.09; $J_{2-3} = 8.97$ Hz	-----	5.09
3	3.37-3.45; $J_{3-Me} = 6.8$ Hz	-----	3.39-3.47; $J_{3-Me} = 6.72$ Hz
4	6.72-6.79; $J_{4-6} = 1.5$ Hz	7.03; $J_{4-6} = 1.5$ Hz	6.77; $J_{4-6} = 6.15$ Hz
6	6.79	6.82; $J_{6-4} = 1.5$ Hz	6.77; $J_{6-4} = 6.15$ Hz
2'	6.92	7.01	6.97
5'	6.87; $J_{5'-6} = 8.3$ Hz, $J_{2'-6} = 0.44$ Hz	7.25-7.32	6.897
6'	6.87; $J_{5'-6} = 8.3$, $J_{2'-6} = 0.44$ Hz	6.98	6.892
α	6.35; $J_{α-β} = 15.87$ Hz, $J_{α-γ} = 1.7$ Hz	6.49; $J_{α-β} = 15.9$ Hz, $J_{α-γ} = 1.5$ Hz	6.36; $J_{α-β} = 15.84$ Hz, $J_{α-γ} = 1.77$ Hz
β	6.04-6.15; $J_{β-α} = 15.9$ Hz, $J_{β-γ} = 6.5$ Hz	6.15-6.27; $J_{β-α} = 15.9$ Hz, $J_{β-γ} = 6.6$ Hz	6.04-6.16, $J_{β-α} = 15.7$ Hz, $J_{β-γ} = 6.45$ Hz
γ	1.86; $J_{γ-α} = 1.6$ Hz, $J_{γ-β} = 6.6$ Hz	1.90; $J_{γ-α} = 1.15$ Hz, $J_{γ-β} = 6.6$ Hz	1.86; $J_{γ-α} = 1.74$ Hz, $J_{γ-β} = 6.72$ Hz
CH ₃ (3)	1.37; $J_{3-Me} = 6.84$ Hz	2.40	1.37; $J_{3-Me} = 6.75$ Hz
OCH ₃	3.88	3.97	3.87
OCH ₃ (3')	-----	4.03	3.89
OCH ₂	5.95	-----	-----
OH (4')	-----	5.75	5.62

Tabla 12. Datos de desplazamiento químico en ppm de RMN-¹³C para los compuestos A, B y C (Referencia TMS, disolvente CDCl₃).

Carbono	A	B	C
2	93.38	151.48	93.77
3	45.75	110.19	45.61
3 ^a	133.08	133.05	133.28
4	113.34	109.16	113.32
5	132.21	133.61	132.20
6	109.29	104.42	109.29
7	144.10	177.82	144.43
7 ^a	146.50	142.09	146.58
1'	134.32	123.67	132.11
2'	106.77	109.43	108.94
3'	147.87	146.58	146.66
4'	147.58	109.43	145.58
5'	108.04	114.44	114.07
6'	120.18	120.62	119.95
α	130.91	131.46	130.93
β	123.44	124.36	123.45
γ	17.87	18.41	18.33
CH ₃	18.33	9.57	17.56
OCH ₃	55.94	56.05	55.93
OCH ₃ (3')	-----	56.09	55.97
OCH ₂	101.06	-----	-----

ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DE *A. elegans*.

Se prepararon los extractos de semillas, hojas y rizoma con Hex y MeOH de manera consecutiva y exhaustiva, obteniéndose los pesos y rendimientos descritos en la Tabla 2 de Metodología.

Posteriormente se llevo a cabo la evaluación biológica por el método previamente descrito, observándose que el extracto Hex del rizoma fue el más activo, siguiéndole el MeOH. El extracto Hex de las semillas presentó moderada actividad (76.90% a 100 $\mu\text{g/mL}$). El resto de los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de los extractos Hex y MeOH de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv.

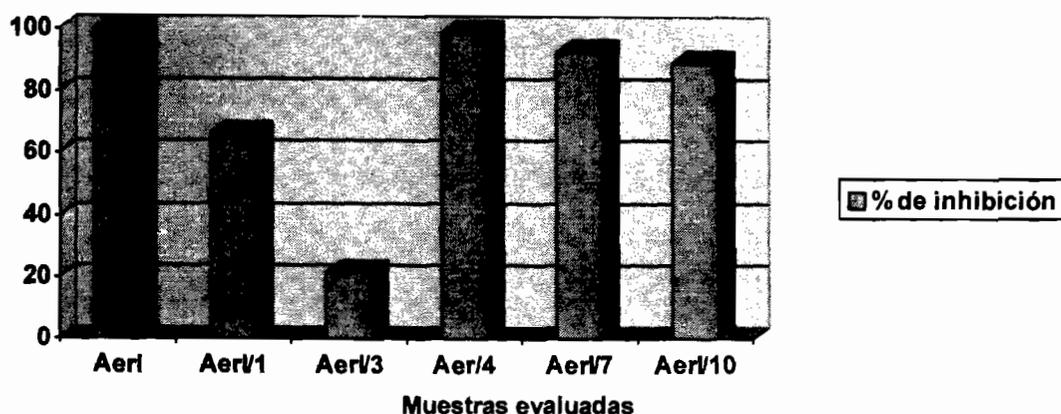
Especie <i>A.elegans</i>	Concentración evaluada ($\mu\text{g/mL}$)	Extracto Hex	Extracto MeOH
Hojas y tallos	100	22.0%	32.00%
Rizoma	100	99.870%	90.10%
Semillas	100	76.90%	Nd

nd: no determinado

Basándonos en estos resultados decidimos fraccionar químicamente el extracto Hex del rizoma, del cual se obtuvieron 107 fracciones, reunidas en 15 grupos. Mediante comparación en CCF con fracciones y compuestos previamente obtenidos de *A. taliscana* decidimos someter a evaluación 5 fracciones (FI, FIII, FIV, FVII y FX), a 100 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose los resultados expresados en la Tabla 14.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Fracción	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de inhibición
FI	100	66.36
FIII	100	21.52
FIV	100	98.47
FVII	100	92.52
FX	100	89.01



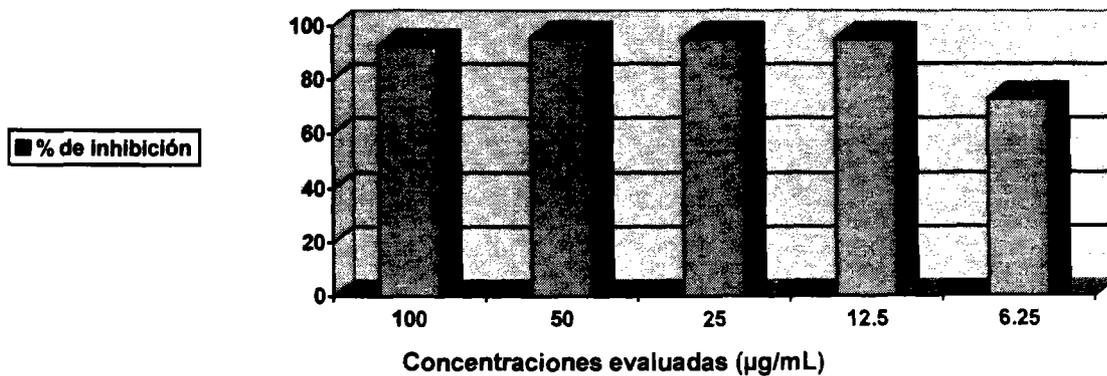
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de las fracciones primarias de *A. elegans* 100 $\mu\text{g/mL}$. Método radiorespirométrico Bactec 460. Control positivo: rifampicina (CMI *in vitro* 0.25 $\mu\text{g/mL}$).

Como se observa, a la concentración evaluada (100 $\mu\text{g/mL}$) las fracciones más activas fueron FIV y FVII, y FX presentando 98.5, 92.5 y 89.01% respectivamente. En la FIV se detectó la presencia de un compuesto mayoritario al revelar la CCF con H_2SO_4 (acuoso al 10%) sin calentamiento, por lo que se envió a análisis por CG-EM (Cromatograma 4), donde se observó que la fracción presenta un compuesto mayoritario con TR de 13.78 min y PM de 274. Por la cantidad obtenida de esta fracción (49.9 mg) no fue posible determinar la estructura química del mismo. Para la identificación química se requiere enriquecer dicha fracción y purificar el compuesto.

En la Fracción F VII (activa) se detectó la presencia del Eupomatenoide-7 (aislado de *A. taliscana*), y de ella se realizaron diluciones seriadas para determinar su CMI, que fue de 12.5 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en la Tabla 15 y Gráfica 4.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de FVII de *A. elegans* contra *M. tuberculosis* H37Rv, en el rango de concentración de 100-6.25 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12.5	6.25
Porcentaje de inhibición	97.54	95.54	95.43	95.20	72.85



Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de las fracción primaria FVII de *A. elegans* a 100-6.25 µg/mL Método radiorespirométrico Bactec 460. Control positivo: rifampicina (CMI *in vitro* 0.25 µg/mL).

Otra fracción activa fue FX (89 %), y por CCF se detectó la presencia la Licarina A y de β-sitosterol. En está especie no se encontró Licarina B.

DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevos agentes antifímicos es urgente debido a la alta incidencia de la TB y a la aparición de cepas MFR, que son difíciles de tratar con fármacos actuales. Por otro lado, el difícil diagnóstico (inadecuado y tardío), la presencia de TB extrapulmonar que en muchas ocasiones son provocadas por cepas diferentes de *M. tuberculosis*, el fracaso de los tratamientos y el costo elevado del mismo aunado, a los diversos efectos secundarios que provocan; hacen que cada vez sea más difícil tratar este padecimiento. Además, la OMS ha implementado diversas estrategias (como el TAES) para eliminar la enfermedad y dentro de ellas está la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos antituberculosos; que acorten la duración del tratamiento, que sean activos contra cepas MFR, de menor costo, más eficaces y menos tóxicos.

En México, la TB es un problema prioritario de salud, por su elevada incidencia, siendo Veracruz, Chiapas, Baja California, los estados con mayor número de casos. Los sistemas oficiales de salud nacionales (SSA, ISSSTE, IMSS, PEMEX) han implementado la estrategia TAES; sin embargo, la cobertura es de aproximadamente el 60%. Por lo que la búsqueda de sustancias antituberculosas en diversas fuentes naturales (hongos, algas, bacterias y plantas) y/o sintéticas son de interés internacional y nacional.

De las plantas medicinales se han aislado compuestos farmacológicamente activos, entre los que podemos mencionar: el taxol, etopósido, artemeter y metmorfin, actualmente de uso clínico. La investigación sobre agentes anti-TB ha permitido encontrar compuestos con importante actividad *in vitro*, por ejemplo, el ergosterol-5,8-endoperóxido, 12-demetilmulticaulina, fitol, lecheronol cuyas CMI's son de 1, 0.46, 2 y 4 µg/mL, respectivamente (Cantrell *et al.*, 1996, 2001; Wätcher *et al.*, 1998, 1999; Woldemichael *et al.*, 2004).

Los resultados del presente trabajo son continuación de una línea de investigación donde se explora el potencial antimicobacteriano *in vitro* de

plantas medicinales mexicanas, obteniéndose mediante fraccionamiento químico-biodirigido los compuestos responsables del efecto biológico.

La evaluación preliminar de los extractos hexánico y metanólico de *A. taliscana*, demostró que ambos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, siendo más activo el extracto hexánico, por lo que se aislaron los compuestos responsables del efecto antimicobacteriano mediante un fraccionamiento químico biodirigido. La actividad se concentraba en las fracciones primarias F1, F2, F6, F8-10 y F12 con los que suponemos que dicho efecto no se debe a un sólo compuesto. Las fracciones F1 (22.9 mg) y F2 (91.4 mg) presentaron un buen porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv pero la cantidad obtenida mediante el fraccionamiento fue escasa por lo que no se pudieron identificar los compuestos; cabe mencionar que de la fracción F2 se realizó la CG-EM, donde se observa la presencia de un compuesto mayoritario con TR de 17.22 min y PM de 272, que al parecer corresponde un diterpeno con núcleo *ent*-kaureno; este tipo de metabolitos no se ha descrito en *A. taliscana* pero si en *A. elegans* (Vila et al., 1997, Shi et al., 2004). En la literatura se ha descrito que numerosos diterpenos presentan importante actividad antimicobacteriana, como la 12-demetilmulticaulina, obtenida de *Salvia multicaulis*, con MIC de 0.46 µg/mL; por lo que es necesario enriquecer la fracción y aislar los compuestos activos.

Otra de las fracciones activas fue F6, de donde se obtuvieron 975 mg de Licarina B en forma casi pura. La elucidación estructural de este compuesto se hizo mediante el análisis de sus datos de IR, UV, DC, EM-IE, RMN-¹³C y RMN-¹H, y por comparación con lo reportado en la literatura (Enríquez et al., 1984), la evaluación antimicobacteriana *in vitro* permitió determinar su CMI (25 µg/mL). Este compuesto fue previamente aislado del extracto MeOH y éter de petróleo de *A. taliscana* (Abe et al., 2002, y Enríquez et al., 1984) de *Myristica fragrans* (Kim et al., 1991), *Machilus thunbergii* y *M. obovatifolia* (Park et al., 2004; Tsai et al., 2001), y fue inactivo *in vitro* contra los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Abe et al., 2002); otra actividad que se ha reportado es el efecto insecticida contra *Bombyx mori* (Lewis y Davin, 1999).

En la recromatografía en CC de la fracción F8-10 se obtuvieron cantidades adicionales de Licarina B, además se aisló el Eupomatenioide-7 (67 mg) y la Licarina A (249.1 mg). La determinación de las estructuras químicas se realizó mediante el análisis de sus datos de IR, UV, DC, EM-IE, RMN-¹³C y RMN-¹H, y por comparación con lo reportado en la literatura (**Enríquez et al., 1984**), la evaluación antimicobacteriana *in vitro* permitió determinar su CMI, siendo de 6.25 y 25 µg/mL, respectivamente. Estos dos compuestos fueron aislados de *A. arcuata* y *A. taliscana* (**Francisco et al., 2003; Abe et al., 2002; Enríquez et al., 1984**) y presentan actividad tripanocida, siendo su concentración mínima de inmovilización de epimastigotes de 25 y 40 µg/mL, para cada uno (**Abe et al., 2002**). La licarina A fue aislada de *Machilus thunbergii*, *M. obovatifolia*, *Piper kadsura* (**Park et al., 2004; Tsai et al., 2001, Ma et al., 1993**) y presenta efecto neuroprotector en el modelo de neurotoxicidad en células corticales de rata inducida con glutamato (**Ma et al., 2004**), induce fragmentación del DNA internucleosomal en células HL-60 – leucemia promieloide de humano- (**Park et al., 2004**), e insecticida contra *Spodoptera litura* (**Lewis y Davin, 1999**).

La actividad antimicobacteriana *in vitro* de los tres neolignanios aislados de *A. taliscana* es de: 25 µg/mL para licarina A y B (Figura 10 y 14) y de 6.25 µg/mL para el Eupomatenioide-7 (Figura 12). Mediante la observación de las estructuras químicas vemos que la presencia de la doble ligadura entre C2-C3, contribuye de manera importante al incremento del efecto antimicobacteriano. Por otro lado, la presencia del grupo metilendioxi entre C3' y C4' en la Licarina B, al parecer no juega un papel importante en la actividad antimicobacteriana de este tipo de compuestos, porque a diferencia de la Licarina A que presenta un grupo metoxilo y un grupo OH fenólico en las mismas posiciones (C3' y C4'), no cambia el efecto biológico, siendo para ambos compuestos la CMI de 25 µg/mL. En el Eupomatenioide-7, también están presentes los grupos metoxilo y OH fenólico en C3' y 4', como en la Licarina A, pero la diferencia de actividad es notoria, ya que para el primero la CMI es de 6.25 µg/mL, mientras que para el último fue de 25 µg/mL, lo que sugiere que el efecto biológico esta

determinado por la presencia de otra diferencia química estructural, como la doble ligadura presente en C2-C3 para el Eupomatenoide-7, y ausente en la Licarina A.

Dentro de la búsqueda de agentes antimicrobianos en plantas medicinales se reportan que los compuestos responsables de este efecto son mayormente terpenos (triterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (**Cantrell et al., 2001, Okunade et al., 2004**) y algunos alcaloides (**Okunade et al., 2004**). En la revisión realizada por Copp (2003), se reporta que el único neolignano con actividad antimicrobiana (CMI de 64 µg/mL) es el derivado dehidrobenzofurano del 14-acetilviscidona, aislado de propoleo chileno. Por lo que, los resultados reportados en el presente trabajo constituyen los primeros que describen el efecto antimicrobiano de Licarina A, Licarina B y Eupomatenoide-7.

Aristolochia elegans fue seleccionada en primera instancia con base en el criterio quimiotaxonómico, dado que la especie biosintetiza lignanos y ha sido poco investigada (**Vila et al., 1997, Wu et al., 2002**). Se utiliza tradicionalmente para mordeduras de serpientes y como ornamental; a la fecha se ha descrito su potencial antibacteriano, contráctil y antiviral; sin embargo, no se ha explorado el potencial antimicrobiano, por lo que se realizó el fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico del rizoma (más activo). Se detectaron algunos compuestos previamente aislados en *A. taliscana*; *ent*-kaureno en la FI (al igual que el F2 de *A. taliscana*), el Eupomatenoide-7 en la FVII y en la FIX la Licarina A. Estas fracciones presentaron importante actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, especialmente la FVII, cuya CMI fue de 6.25 µg/mL. Cabe mencionar que en ninguna de las fracciones primarias de *A. elegans* se detectó la presencia de Licarina B y que en la FIV se detectó un compuesto mayoritario que en el EM-IE presenta un PM de 274 (ausente en *A. taliscana*) y se presume que es el responsable de la actividad antimicrobiana, sin embargo falta por identificarlo.

Con esto podemos concluir que el efecto antimicrobiano en el extracto hexánico del rizoma de *A. elegans* se debe a la presencia de la

Licarina A, y Eupomatenoides-7, previamente aislados en *A. taliscana*. Este trabajo constituye el primer reporte que describe la presencia de estos compuestos en esta especie, además del importante efecto biológico.

Por último, es importante mencionar que en los extractos investigados (hexánicos) de *A. elegans* y *A. taliscana* no se detectó la presencia de Ácido aristolóquico y/o derivados.

CONCLUSIONES

- El estudio químico biológico de especie medicinales mexicanas contribuye a explorar el potencial de este recurso natural como fuente de agentes farmacológicamente activos.
- La selección de especies basada en el criterio etnobotánico y quimiotaxonómico, constituye un buen punto de partida para obtener sustancias con importante actividad antimicobacteriana.
- Los extractos Hex de las especies *Aristolochia taliscana* y *A. elegans* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv casi al 100%, lo que indica que contienen compuestos activos contra el microorganismo.
- Mediante el fraccionamiento químico-bidirigido de los extractos activos, se obtuvieron tres compuestos responsables del efecto antimicobacteriano; y mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, fueron caracterizados como Licarina B, Licarina A y Eupomatenoides-7.
- Los compuestos aislados son de tipo neolignano, y la CMI para la Licarina A y Licarina B fue de 25 µg/mL, mientras que el más activo fue el Eupomatenoides-7 con una CMI de 6.25 µg/mL.
- Este es el primer trabajo que describe el potencial antimicobacteriano de las especie *A. taliscana* y *A. elegans*, así como el efecto contra *M. tuberculosis* de los neolignanos aislados en los extractos activos.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A. Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., 2002. Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of some Mexican Plants for their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, 25, 1188-1191.
- Achenbach, H., Grob, J., Dominguez, X.A., Cano, G., Verde Star, J., Brussolo, L del C., Muñoz, G., Salgado, F., Lopez, L., 1987. Lignans, neolignans, and norneolignans from *Krameria cystisoides*. **Phytochemistry**, 26, 1159-1166.
- Aguilar-Contreras, A.; Camacho-Pulido, J.R.; Chino-Vargas, S.; Jáquez-Ríos, P.; López-Villafranco, M.A. 1998. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS: Su distribución por enfermedades. IMSS-Roche Syntex. México, D.F. pp. 29, 114-115.
- Aiba, C.J., Campos Correa R.G., Gottlieb, O.R., 1973. Natural occurrence of Erdtman's dehydrodiisoeugenol. **Phytochemistry**, 12, 1163-1164.
- Akihisa, T., Franzblau, S.G., Ukiya, M., Okuda, H., Zhang, F., Yasukawa, T., Suzuki, T., Kimura, Yumiko. 2005. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, 28, 150-160.
- Alvarez, P. V.H., 2002. Estudio Químico de *Chamaedora tepejilote* con actividad antituberculosa. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, UNAM. Junio, 2002.
- Alvi, K.A., 2000. A Strategy for Rapid Identification of Novel Therapeutic Leads from Natural Products. Ed. by Cutler, S.J. y Cutler, H.G in: Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. CRC Press. p 185-195.
- Amaya-Tapia, G., Martín-del Campo, L., Aguirre-Avalos, G., Portillo-Gómez, L., Covarrubias-Pinedo, A., Aguilar-Benavides, S., 2000. Primary and Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Mexico. **Microbial Drug Resistance**. 6, 143-145.
- Argueta, V., A., Cano, A. L. M. Rodarte, M. E., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I-III. Instituto Nacional Indigenista.
- Balandrin, M.F., Kinghorn, D.A., Farnsworth, N.R., 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development. Human Medicinal Agents from Plants. American Chemical Society. p. 2-12.

- Bastian, I., Portaels F., 2000. Multidrug-resistant tuberculosis: past, present and future. Ed. by Bastian, I. and Portaels F. in: *Multidrug-Resistant Tuberculosis*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. p 1-15.
- Bowden, B.F., Ritchie, E., Taylor, W.C., 1972. Constituents of *Eupomatia* species II. *Isolation and structure determination of further lignans from the bark of *Eupomatia laurina*. **Australian Journal of Chemistry**, 25, 2659
- Brändli, O., 1998. The Clinical Presentation of Tuberculosis. **Respiration**, 65, 97-105.
- Cantrell, C.L., Lu, T., Fronczek, F.R., Fischer N.H., Adams, L.B., Franzblau, S.G., 1996. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescens*. **Journal of Natural Products**, 59, 1131-1136.
- Cantrell, C.L., Rajab, M.S., Franzblau, S.G., Fischer, N.H., 1999a. Antimycobacterial triterpenes from *Melia volkensii*. **Journal of Natural Products**, 62, 546-548.
- Cantrell, C.L., Rajab, M.S., Franzblau, S.G., Fronczek F.R., Fischer, N.H., 1999b. Antimycobacterial Ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. **Planta Medica**, 65, 732-734.
- Cantrell, C.L.; Franzblau, S.G Fisher, N.H. 2001. Antimycobacterial Plant Terpenoids. **Planta Medica**, 67, 685-694.
- Collins, L.A., Franzblau, S.G. 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 41, 1004-1009.
- Copp, B.R., 2003. Antimycobacterial Natural Products. **Natural Products Reports**, 20, 535-557
- Delormann, D., Ergun, F., Sener, B., Palittapongarnpim, P., 2001. Evaluation of Antimycobacterial activity of *Viscum album* subspecies. **Pharmaceutical Biology**. 39:5:381-383.
- Dirección General de Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. 2001. Prevención y Control de la Tuberculosis en México. Semana 43. 18 (43) 10-11.
- Dirección General de Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. 2002. Prevención y Control de la Tuberculosis en México. Semana 39.
- El-Sebakhy, N., Waterman, P.G., 1984. (-).(R,R)-7'-O-methylcuspidaline from leaves of *Aristolochia elegans*. **Phytochemistry**, 23, 2706-2707.

- Eloff, J.N., 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, 60, 1-8.
- Encarnación, R., Keer, G.S., 1991. Antimicrobial screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, México. **Journal of Ethnopharmacology**, 31, 181-192.
- Enríquez, R.G., Chavez, M.A., Reynolds, W.F., 1984. Phytochemical investigation of plants of the genus *Aristolochia*, 1. Isolation and NMR spectral characterization of eupomatenoid derivatives. **Journal of Natural Products**, 47, 896-899.
- Espinal, M.A., 2000. Epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in low and middle-income countries. Ed. by Bastian, I. and Portaels F. in: *Multidrug-Resistant Tuberculosis*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. p 29-40.
- Farmer, P.E., Shin, S.S., Bayona, J., Kim, J.Y., Furin, J.J., Brenner, J.G., 2000. Making DOTS-Plus work. Ed. by Bastian, I. and Portaels F. in: *Multidrug-Resistant Tuberculosis*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. p 286.
- Farnsworth, N.R., Akerele O., Bingel A.S.; Soejarto D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal Plants in Therapy. **Bulletin of the World Health Organization. WHO**, 64, 965-981.
- Fischer, N.H., 1996. Structure and activity of Anti-Tuberculosis Natural Products. **Revista Latinoamérica de Química**, 24, 65-68.
- Fischer, N.H., Lu, T., Cantrell, C.L., Castañeda-Acosta, J., Quijano, L., Franzblau, S.G., 1998. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. **Phytochemistry**, 49, 559-564.
- Fragoso, A.I.A., 2003. Estudio químico y actividad antimicobacteriana de *Juniperus communis*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, UNAM. Marzo 2003.
- Francisco, M.C., Nasser, A.L., Lopes, L.M., 2003. Tetrahydroisoquinoline alkaloids and 2-deoxyribolactones from *Aristolochia arcuata*. **Phytochemistry**, 62, 1265-70.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., Dye, C., 2003. Tuberculosis. **The Lancet**, 362, 887-899.
- Gadhi, C.A., Weber, M., Mory, F., Benharref, A., Lion, C., Jana, M., Lozniewski, A., 1999. Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel. **Journal of Ethnopharmacology**, 67, 87-92.

- García-García, M. de L., Sifuentes-Osornio, J., Jiménez-Corona, M.E., Ponce-de-León, A., Jiménez-Corona, A., Bobadilla-del-Valle, M., Palacios-Martínez, M., Canales, G., Sanginés, A., Jaramillo, Y., Martínez-Gamboa, A., Balandrano, S., Valdespino-Gómez, J.L., Small, P., 2001. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. **Revista de Investigación Clínica**, 53, 315-323
- Granich, R.M., Balandrano, S., Santaella, A.J., Binkin, N.J., Castro, K.G., Marquez-Fiol A., Anzaldo, G., Zarate, M., Jaimes, M. L., Velázquez-Monroy, O. Salazar, L., Álvarez-Lucas, C., Kuri, P., Flisser, A., Santos-Preciado, J., Ruiz-Matus, C., Tapia-Conyer, R., Tappero, J. W., 2000. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. **Archives of Internal Medicine**, 60, 639-644.
- Heifets L., 2000. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Ed. by Bastian, I. and Portaels F. in: Multidrug-Resistant Tuberculosis. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. p 133-143.
- Hernández, T., Canales, M., Ávila, JG., Durán, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in tradicional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, 88, 181-188.
- Hostettman, K., Wolfender, J-L, Rodríguez, S., 1997. Rapid detection and subsequent isolation of Bioactive Constituents of Crude Plant Extracts. **Planta Medica**, 63, 2-10.
- I.M.S.S. 2003. Boletín semanal de vigilancia epidemiológica. Semana 29. p. 13.
- Ionescu, F., Jolad, S.D., Cole, J.R., 1977. Dehydrodiisoeugenol: a natural occurring lignan from *Aristolochia taliscana* (Aristolochiaceae). **Journal of Pharmacological Sciences**, 66, 1489-90
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S., y L.N. Ornston., 1996. Micobacterias. En: Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15ª Edición. Manual Moderno. México, D.F: pp. 326.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramírez, R., J., Torres, J., Luna-Herrera, 2003. Activity againts multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants used to treat respiratory diseases. **Phytotherapy Research**, 17, 903-908.

- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Luna-Herrera, J., Torres, J., 2004. Antimycobacterial compounds from *Lantana hispida* (Verbenaceae). **Phytotherapy Research**. (IN PRESS).
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Phonkerd, N., Soyong, K., Kongsaree, P., Suksamrarn, A., 2002. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta Medica**, 68, 834-836.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Nambuddee, K., Kongsaree, P. 2004. New bioactive prenylflavonoids and dibenzocycloheptene derivate from roots of *Dendrolobium lanceolatum*. **Journal of Natural Products**, 67, 968-972
- Kato-Maeda, M., Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-del-Valle, M., Ruiz-Palacios, G.M., Ponce-de-León, A., 1999. Drug resistance among acid-fast bacilli. **The Lancet**, 35, 1709.
- Kim, Y.B., Park, I.Y., Shin, K.H., 1991. The crystal structure of licarin-B, (C₂₀H₂₀O₄), a component of seeds of *Myristica fragrans*. **Archives of Pharmacological Research**, 14, 1-6.
- König, G. M., Wright, A. D., Franzblau, S.G., 2000. Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products. **Planta Medica**, 66, 337-342.
- Lall, N., Meyer, J.M., 1999. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 66, 47-354.
- Lewis, N.G., Davin, L.B., 1999. Lignans: Biosynthesis and function, in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol 1. ed Sir D.H.R. Barton, K. Nakanishi and O. Meth-Cohn, Elsevier, London, pp 639-712.
- Ma, J.C., SPNG, S.H., Kim, Y.C., 2004. Neuroprotective lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. **Planta Medica**, 70, 79-80
- Ma, Y., Han, G.Q., Wang, Y.Y., 1993. PAF antagonistic benzofuran from *Piper kadsura*. **Yao Xue Xue Bao**, 28, 370-3.
- Maldonado, L.A., Herrán, J., Romo, J., 1966. La taliscanina, un componente de *Aristolochia taliscana*. **Ciencia México**, XXIV, 237-240.
- Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económico, México.

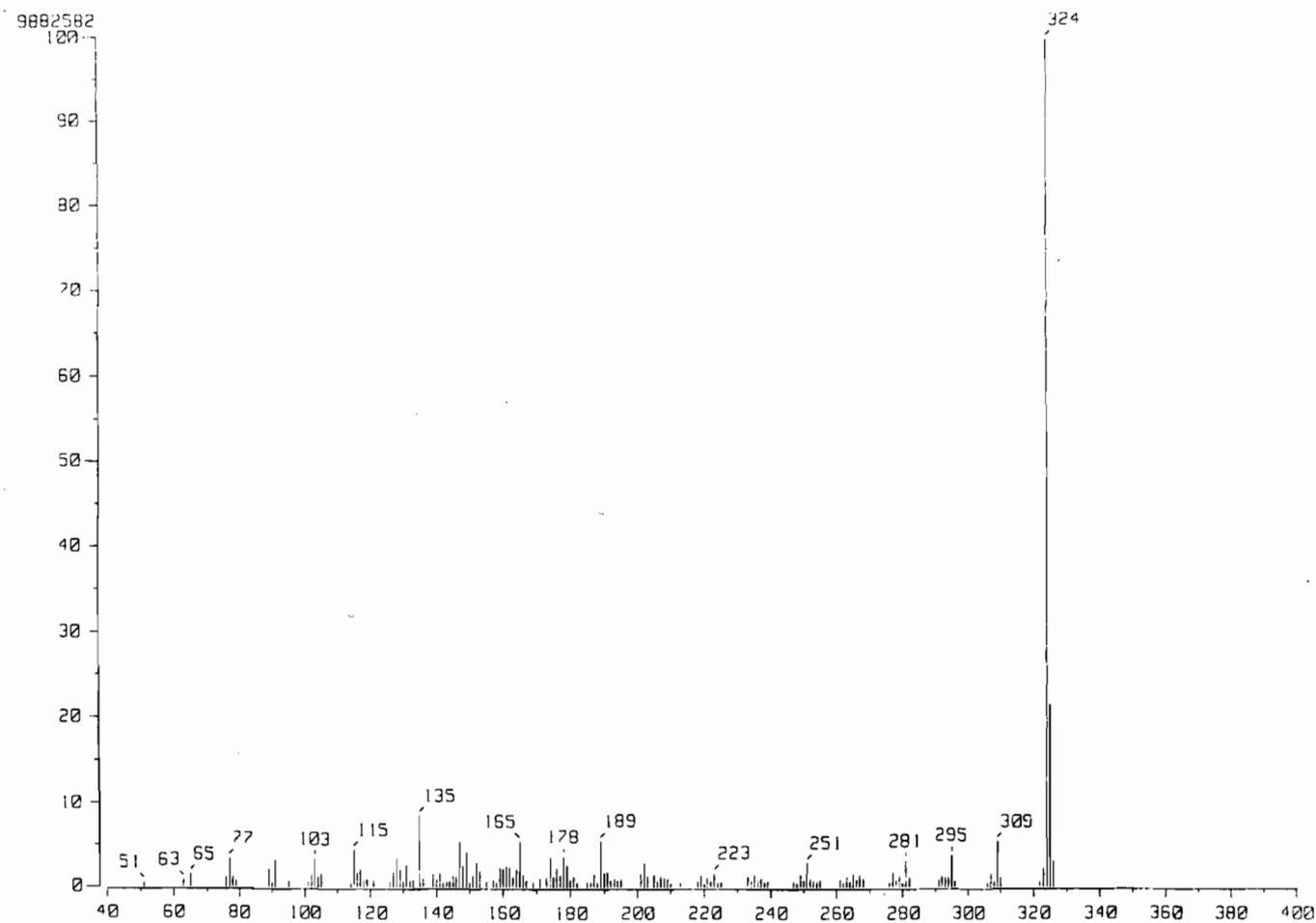
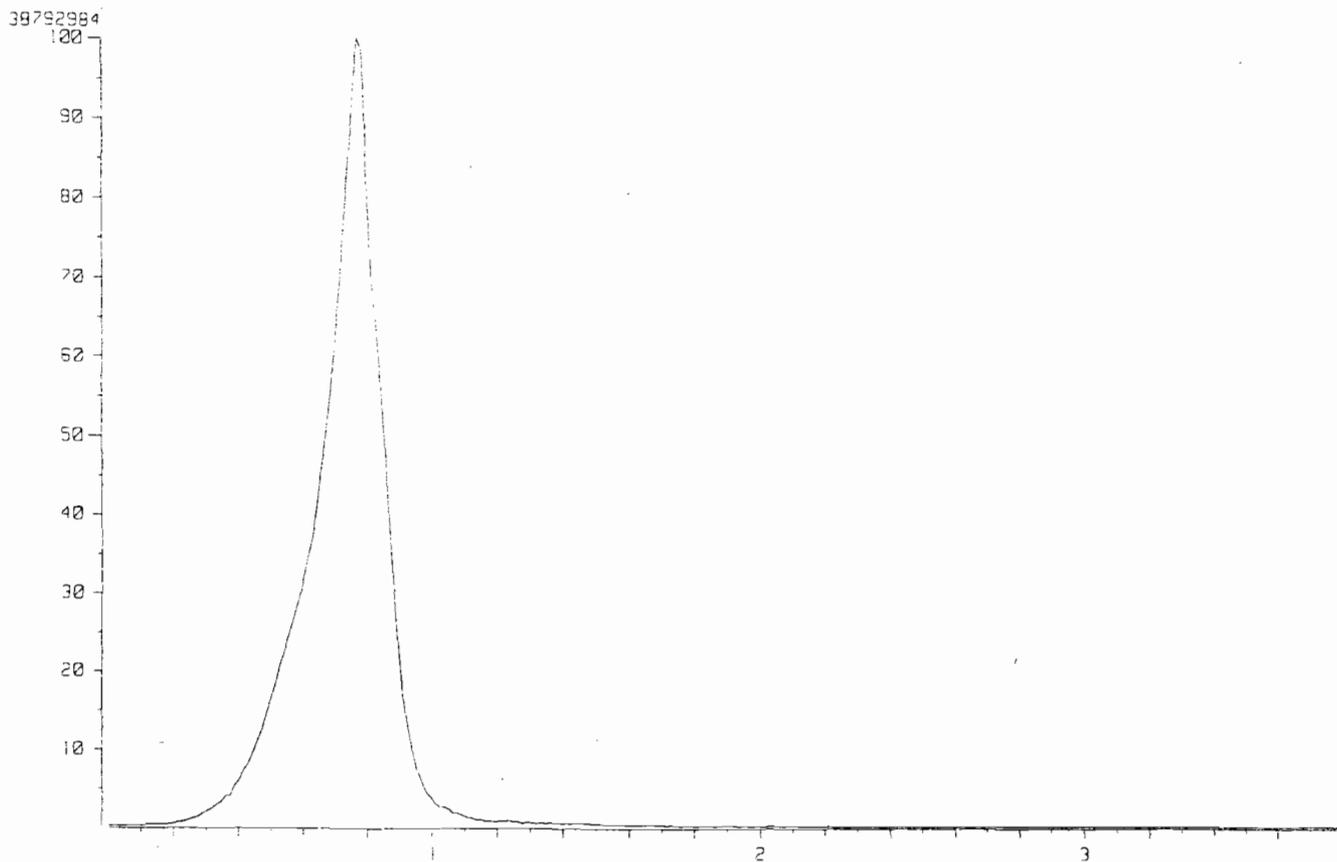
- Newton, S.M., Lau, C., Wrigth, C.W., 2000. A review of antimycobacterial natural products. **Phytotherapy Research**, 14, 303-322.
- Okunade, A. L., Elvin-Lewis, M.P.F., Lewis, W.H., 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, 65, 1017-1032.
- Organización Panamericana de la Salud. 2003. Taller sobre la coinfección TB/VIH, 2003. San Pedro, Honduras. Agosto, 2003.
- Organización Panamericana de la Salud. 2004. Situación Epidemiológica de la Tuberculosis en las Américas, 2004.
- Orme, I., Secrits, J., Anathan, S., Kwong, C., Maddry, J. Reynolds, R.; Poffenbergen, A., Michael, M., Miller, L., Krahenbuh, J., Adams, L., Biswas, A., Franzblau, S., Rouse, S., Winfield, D., Brooks, J. 2001. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45, 1943-1946.
- Ortega-Ortiz, J.F., Ortega-Ortiz, R.V., 1997. ARISTOLOCHIACEAE. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología. A.C. FASCÍCULO 99.
- Otero, R., Nuñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Ososrio, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A., 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest regions of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Botrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, 73, 233-41.
- Park, B.Y., Min, B.S., Kwon, O.K., Oh, S.R., Ahn, K.S., Kim, D.Y., Bae, K., Lee, H.K., 2004. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, 27, 1305-7.
- Phillipson, J.D., 1999. New Drugs from nature - It could be yew. **Phytotherapy Research**, 13, 2-8.
- Phillipson J.D., 2001. Phytochemistry in Medicinal Plants. **Phytochemistry**. 56, 237-243.
- Raviglione M.C., Snider D.E., Kochi A., 1995. Global Epidemiology of Tuberculosis. Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. **Journal of American Medical Association**, 273, (3) 220-226.
- Sada-Díaz, E. 2003. IV. La respuesta inmune en la tuberculosis. **Gaceta Médica México**, 139:481-486.
- Seephonkai, P., Isaka, M., Kittakoop, P., Palittapongarnpim, P., Kamchonwongpaisan, S., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y., 2002. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the

- lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. **Planta Medica**, 68, 45-48.
- Shi, L-S., Kuo, P-C., tsai, Y-L., Damu, A.G., Wu, T-S., 2004. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 12, 439-446.
- Shirwaikar, A., Soashekar, A.P., Udupa, A.L., Udupa, S.L., Somashekar, S., 2003. Wound healing studies of *Aristolochia bracteolata* Lam. with supportive action of antioxidant enzymes. **Phytomedicin**. 10, 558-562.
- Secretaría de Salud. 2000. Norma Oficial Mexicana-006- Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. Diario Oficial de la Federación. 31 de agosto de 2000, pp. 34-53.
- Secretaría de Salud. 2005. México registra 16 mil casos nuevos de Tuberculosis cada año. Comunicado de Prensa No. 034. 29/Enero/2005
- Standley, P.C., 1920. Trees and shrubs of Mexico. (Gleicheniaceae-Betulaceae). Contributions from the United States National Herbarium. Vol. 23. Part 1. Washington Government Printing Office. p. 241.
- Sterling, TR., Lehmann, HP., Frieden, TR. 2003. Impact of DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis. **British Medicinal Journal**, 326:574-86
- Tsai, I.L., Chen, J.H., Duh, C.Y., Chen, I.S., 2001. Cytotoxic neolignans and butanolides from *Machilus obovatifolia*. **Planta Medica**, 67, 559-61.
- van Puyvelde, L., Natwukiliyayo, J.D., Portaels, F., 1994. *In vitro* inhibition of Mycobacterial by Rwandese Medicinal Plants. **Phytotherapy Research**, 8, 65-69.
- Vila, R., Mundina, M., Muschietti, L., Priestap, H.A., Bandoni, A.L., Adzet, T., Cañigual, S., 1997. Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. **Phytochemistry**, 46, 1127-1129.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag. Berlin. p. 320
- Wächter, G.A., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suárez, E., Fortunato, R.H., Saavedra, E., Timmermann, B.N., 1998. A New Antitubercular Mulinane Diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. **Journal of Natural Products**. 61, 965-968.

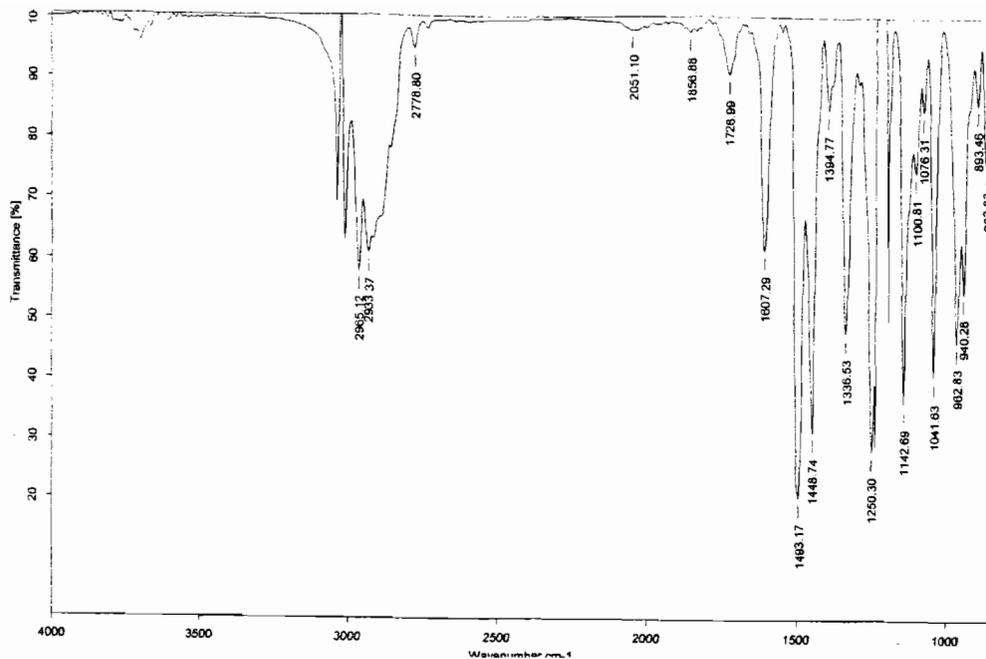
- Wächter, G.A., Valcic, S., Flagg, M.L., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suarez, E., Timmerman, B.N., 1999. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. **Phytomedicine**, 6, 341-345.
- Woldenmichael, G.M., Franzblau, S.G., Zhang, F., Wang, Y., Timmermann, B.N., 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* in the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Planta Medica**, 69, 628-631.
- Woldenmichael, G.M., Gutierrez-Lugo, M-T., Franzblau, S.G., Wang, Y., Suarez, E., Timmermann, B.N., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haemospermum*. **Journal of Natural Products**, 67, 598-603.
- Wu, T-S., Chan Y-Y., Leu, Y-L., Chan, Z-T., 1999. Sesquiterpene Esters of Aristolochic Acid from the root and stem of *Aristolochia heterophylla*. **Journal of Natural Products**, 62, 415-418.
- Wu, T-S., Tsai, Y-L., Wu, P-L., Lin, J-K., 2000. Constituents from the leaves of *Aristolochia elegans*. **Journal of Natural Products**, 63, 692-693.
- Wu, T-S., Tsai, Y-L., Damu, A.G., Kuo, P-C., Wu, P-L., 2002. Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. **Journal of Natural Products**, 65, 1522-1525.

Anexo:

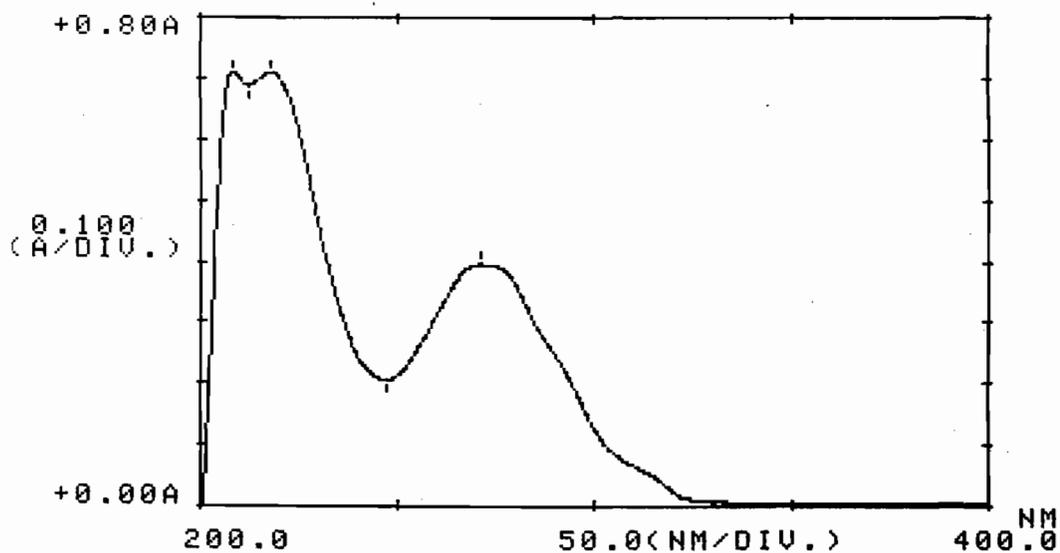
Espectros y Cromatogramas



Cromatograma 1: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción primaria F6 de *A. taliscana*.

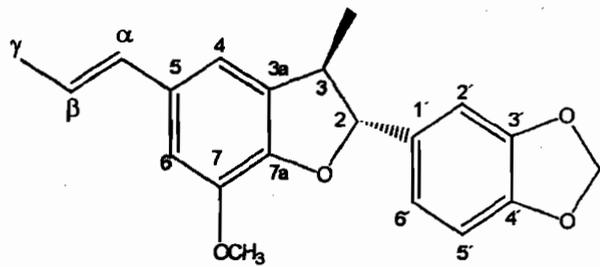


Espectro 1: Infrarrojo del compuesto A.

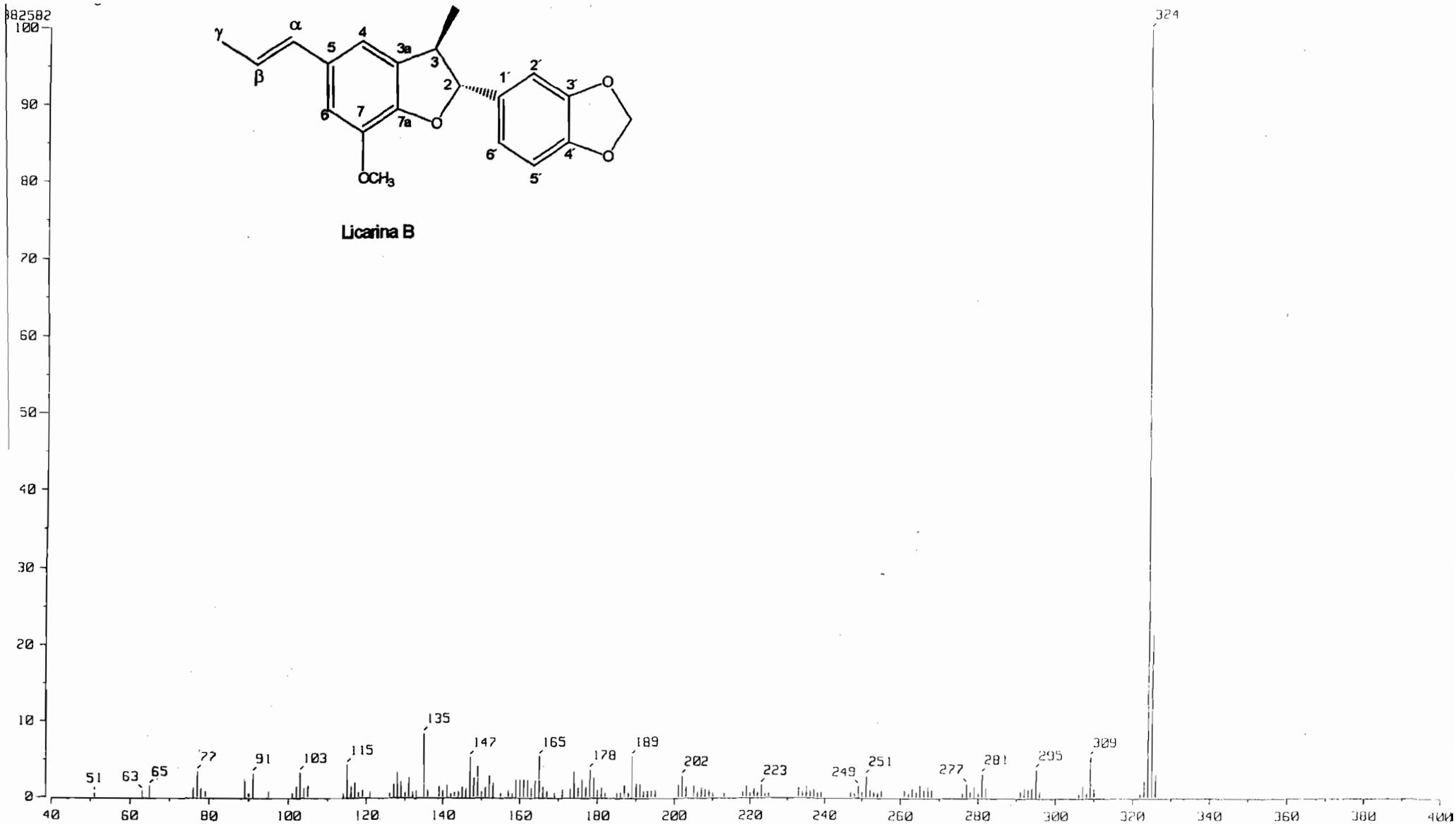


λ	ABS	λ	ABS
270.8	0.396	247.4	0.205
218.0	0.709	212.2	0.687
208.4	0.709		

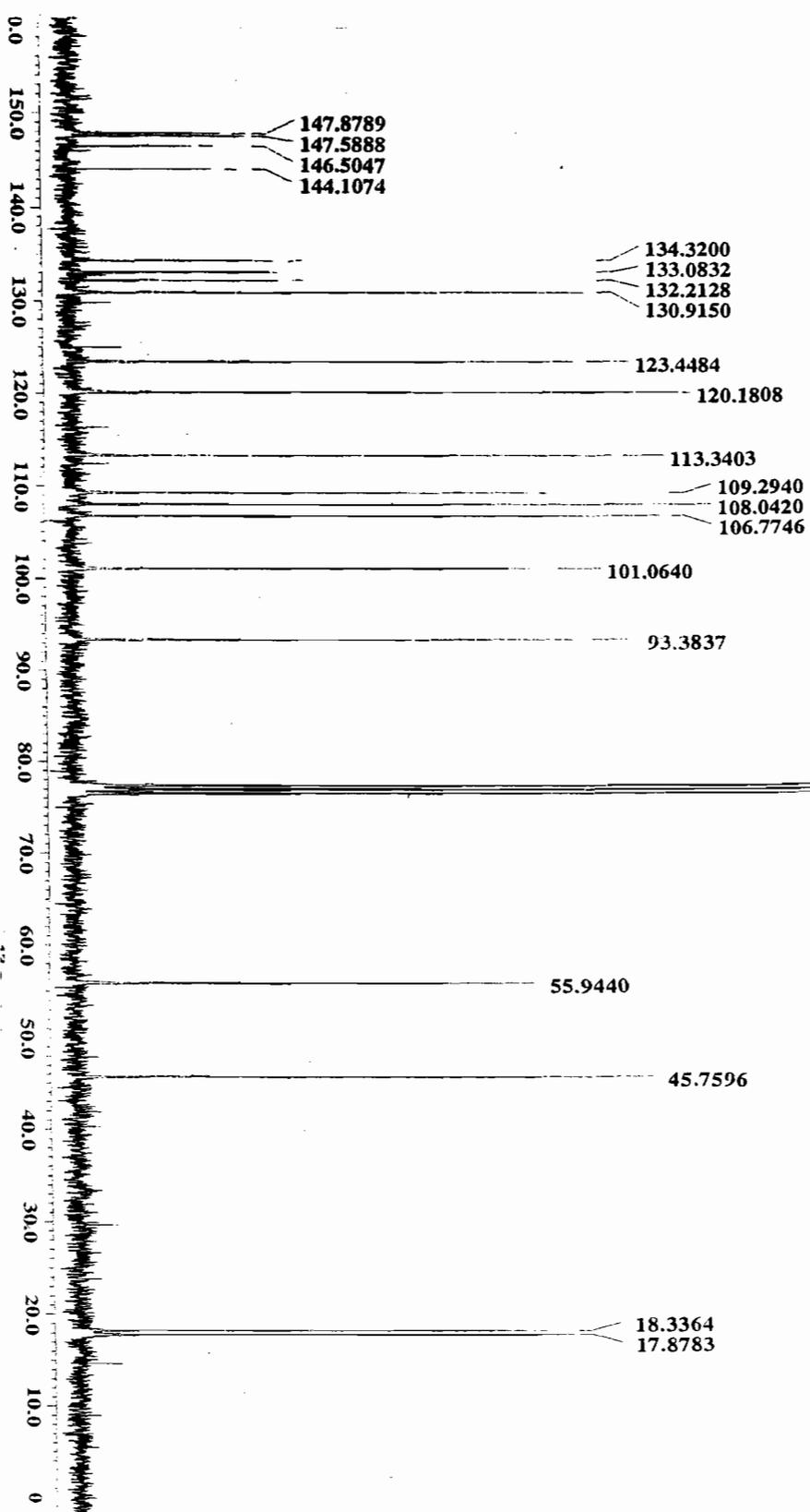
Espectro 2: Ultravioleta del compuesto A.



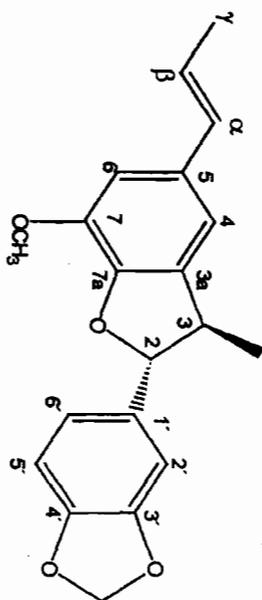
Licarina B



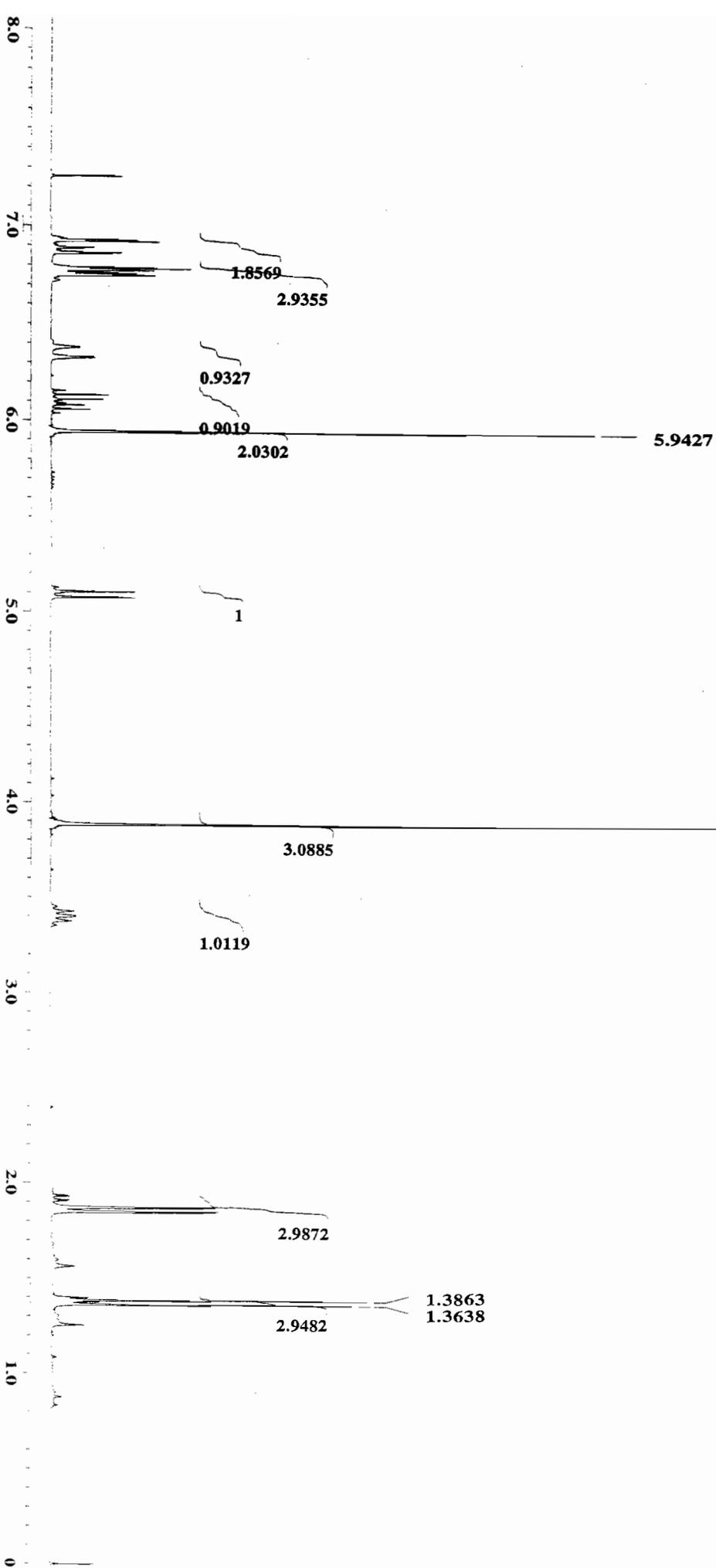
Espectro 3: Espectro de masas, por Impacto Electrónico, del compuesto A.



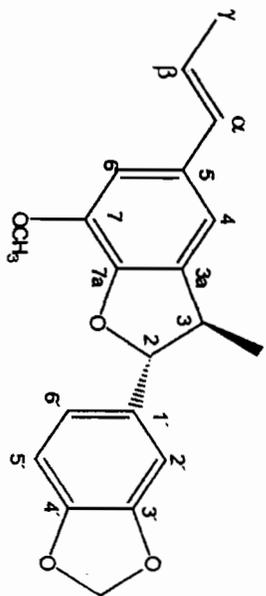
Licarina B



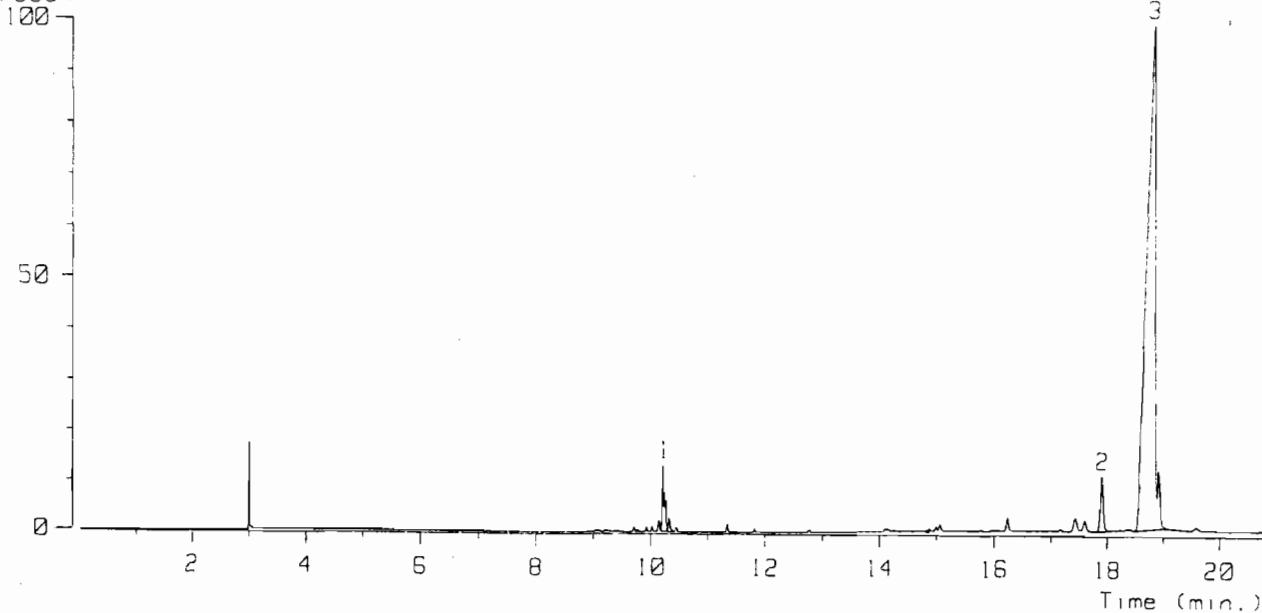
Espectro 5: Resonancia Magnética Nuclear de ¹H del compuesto A.



Licarina B

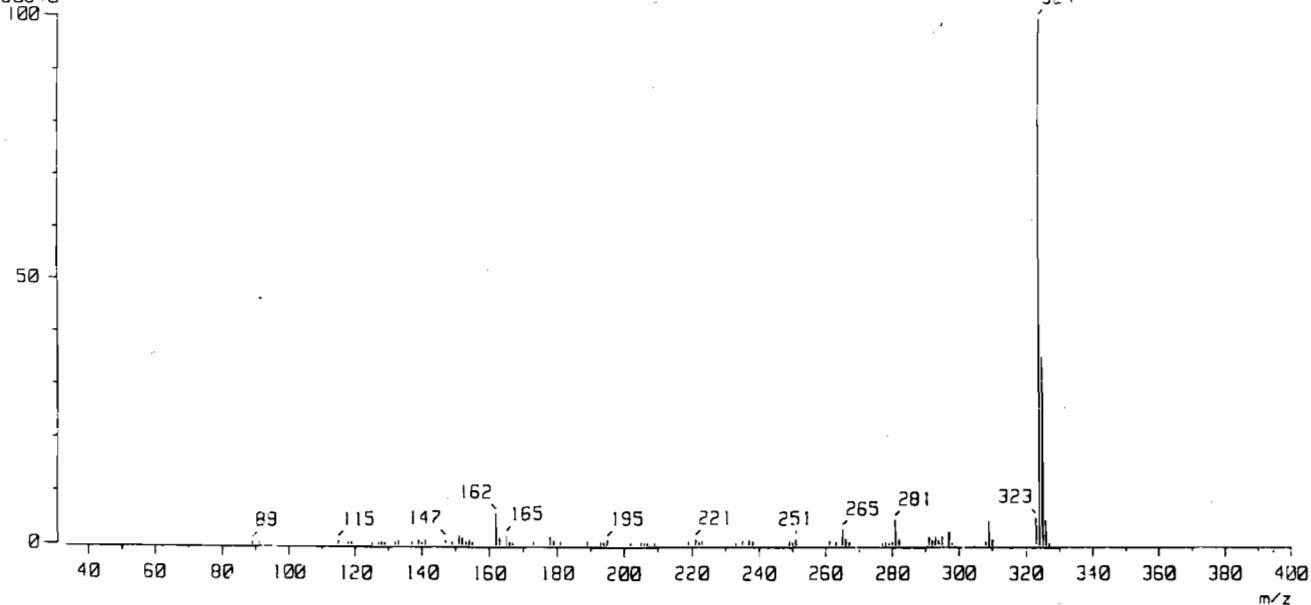


203873584



No.	RT [min]	Area	Area%	Height	Height%	Width [sec]	INTEG
1	10.22	8319.39	3.72	2560.61	10.71	3.05	BB
2	17.90	8176.30	3.65	2145.94	8.97	3.58	BB
3	18.82	207238.44	92.63	19211.28	80.32	10.13	BB

6360840



Cromatograma 2: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción secundaria FF de *A. taliscana*

Transmittance [%]

40 50 60 70 80 90 100

4000

3500

3000

2500

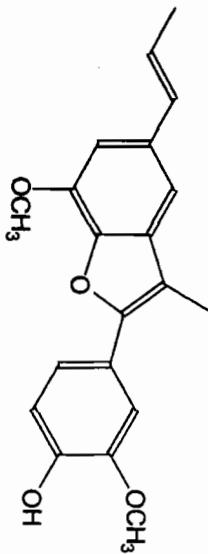
2000

1500

1000

Wavenumber cm⁻¹

Eupomatenoide-7



3429.54

3016.21

2937.08

2849.93

1725.23

1604.47

1513.99

1452.01

1483.78

1371.85

1391.15

1314.50

1267.65

1221.27

1147.77

1095.89

1056.45

961.39

920.43

855.14

883.72

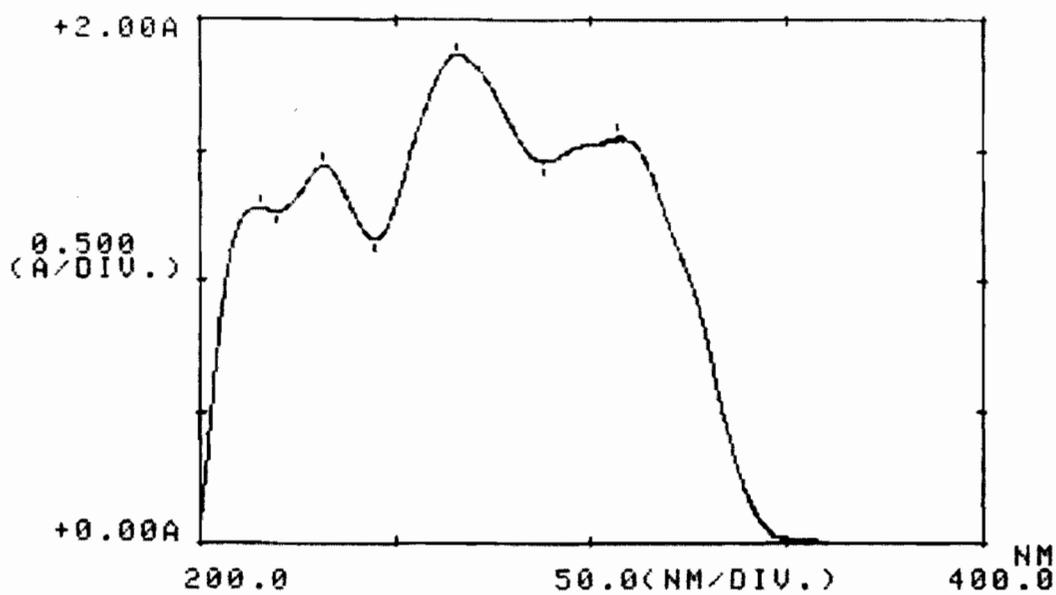
788.73

820.82

755.52

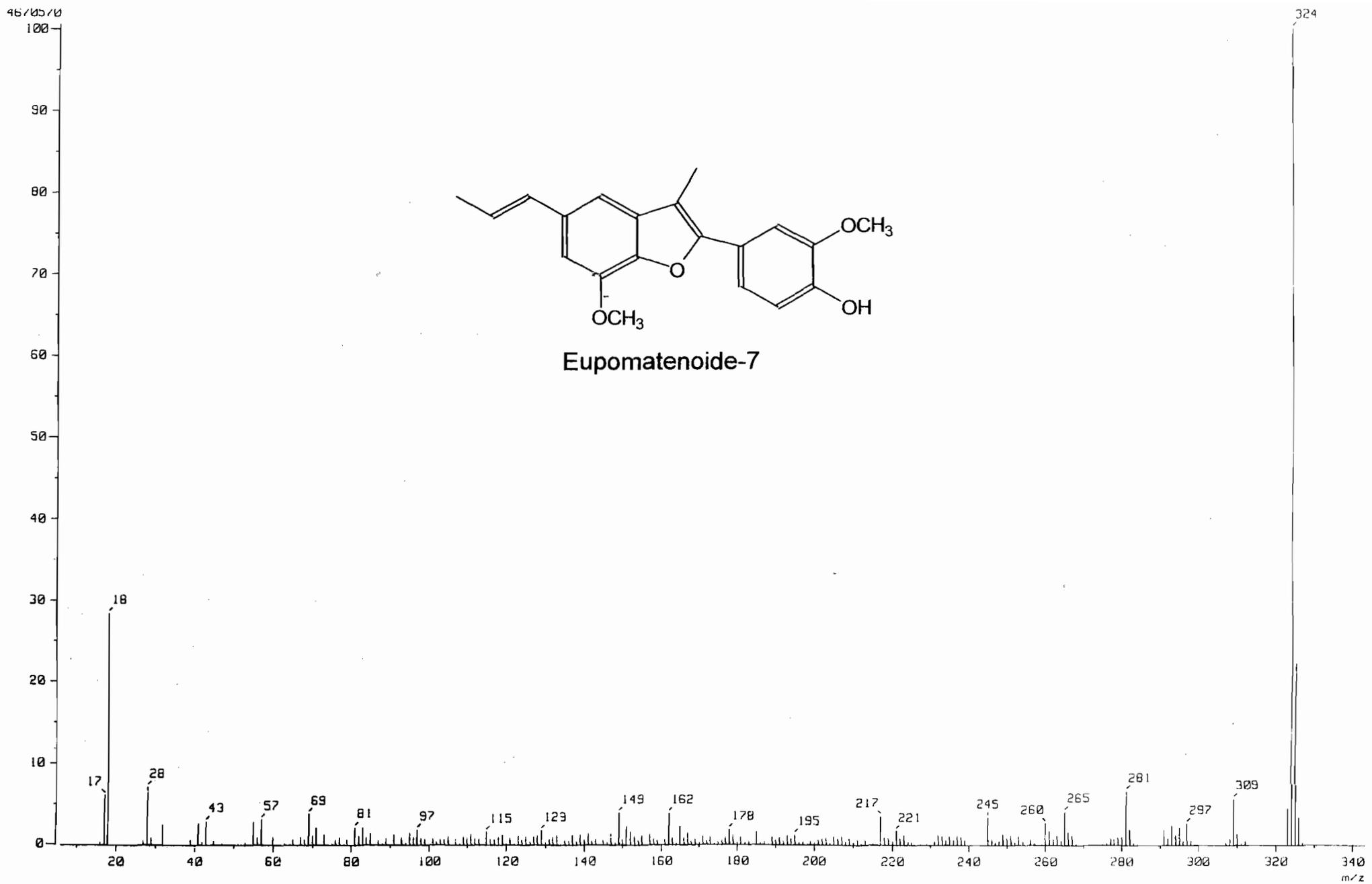
682.97

Espectro 6: Infrarrojo del compuesto B.

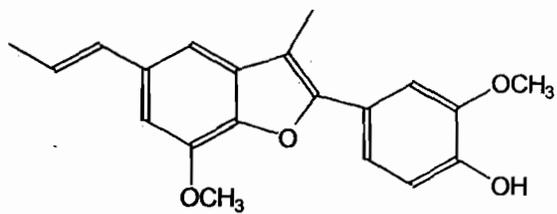


λ	ABS	λ	ABS
306.4	1.552	288.0	1.457
265.6	1.865	244.8	1.161
231.6	1.443	219.4	1.267
215.0	1.283		

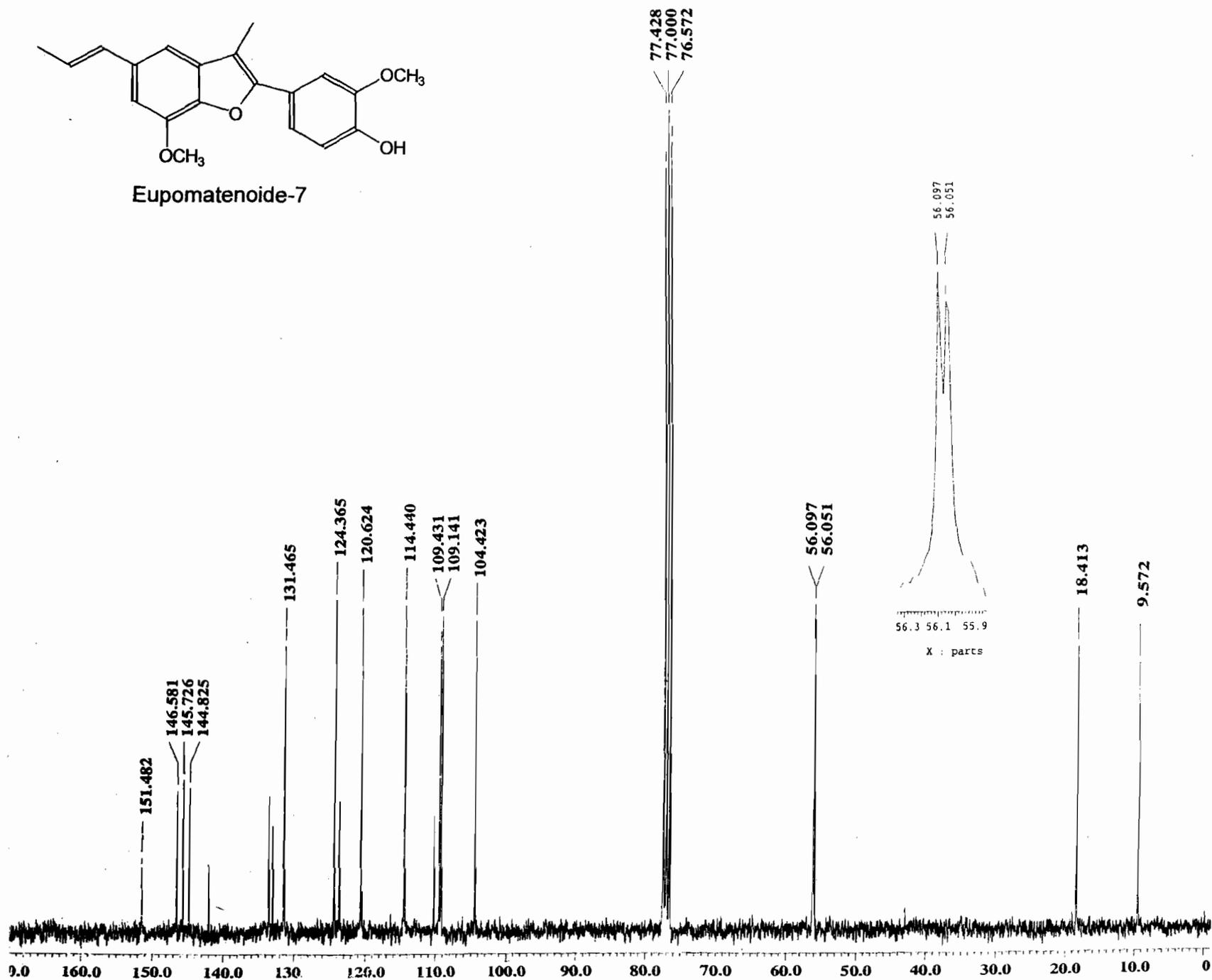
Espectro 7: Ultravioleta del compuesto B



Espectro 8: Espectro de masas, por Impacto Electrónico, del compuesto B.

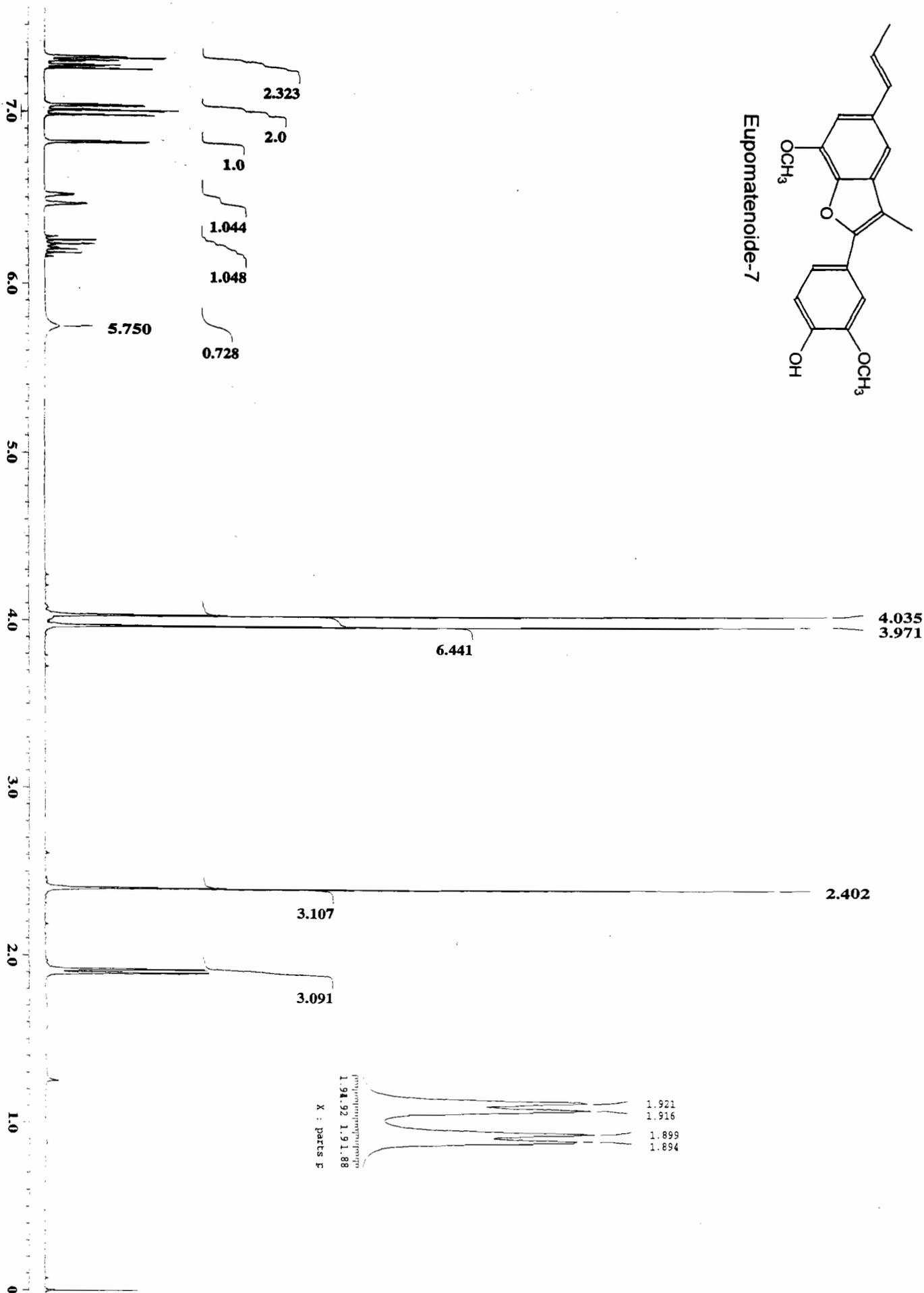
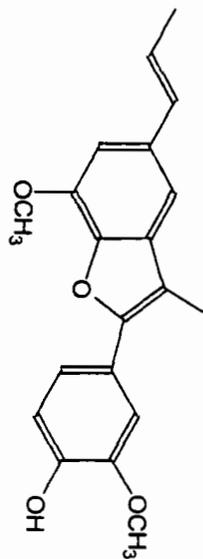


Eupomatenoide-7

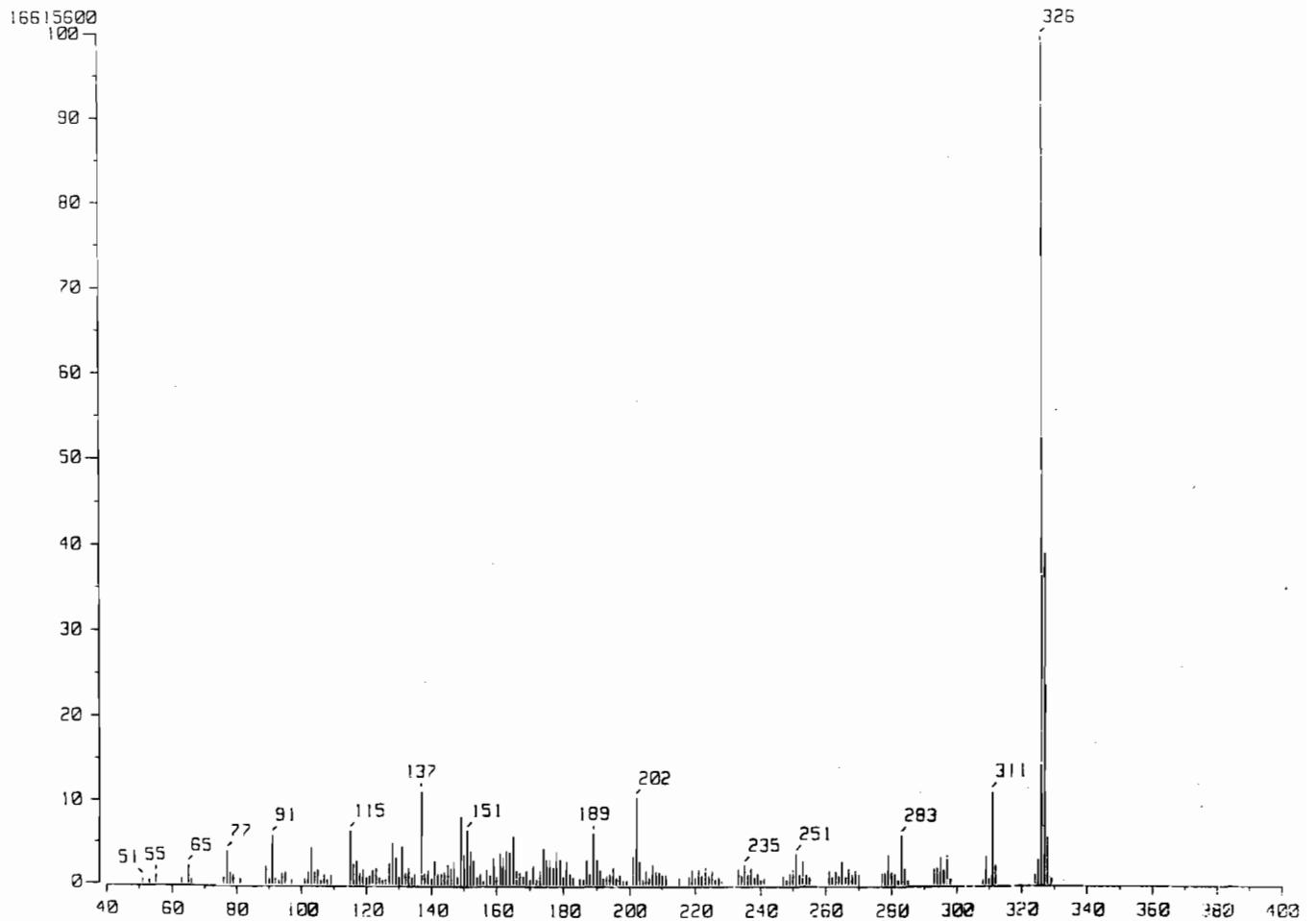
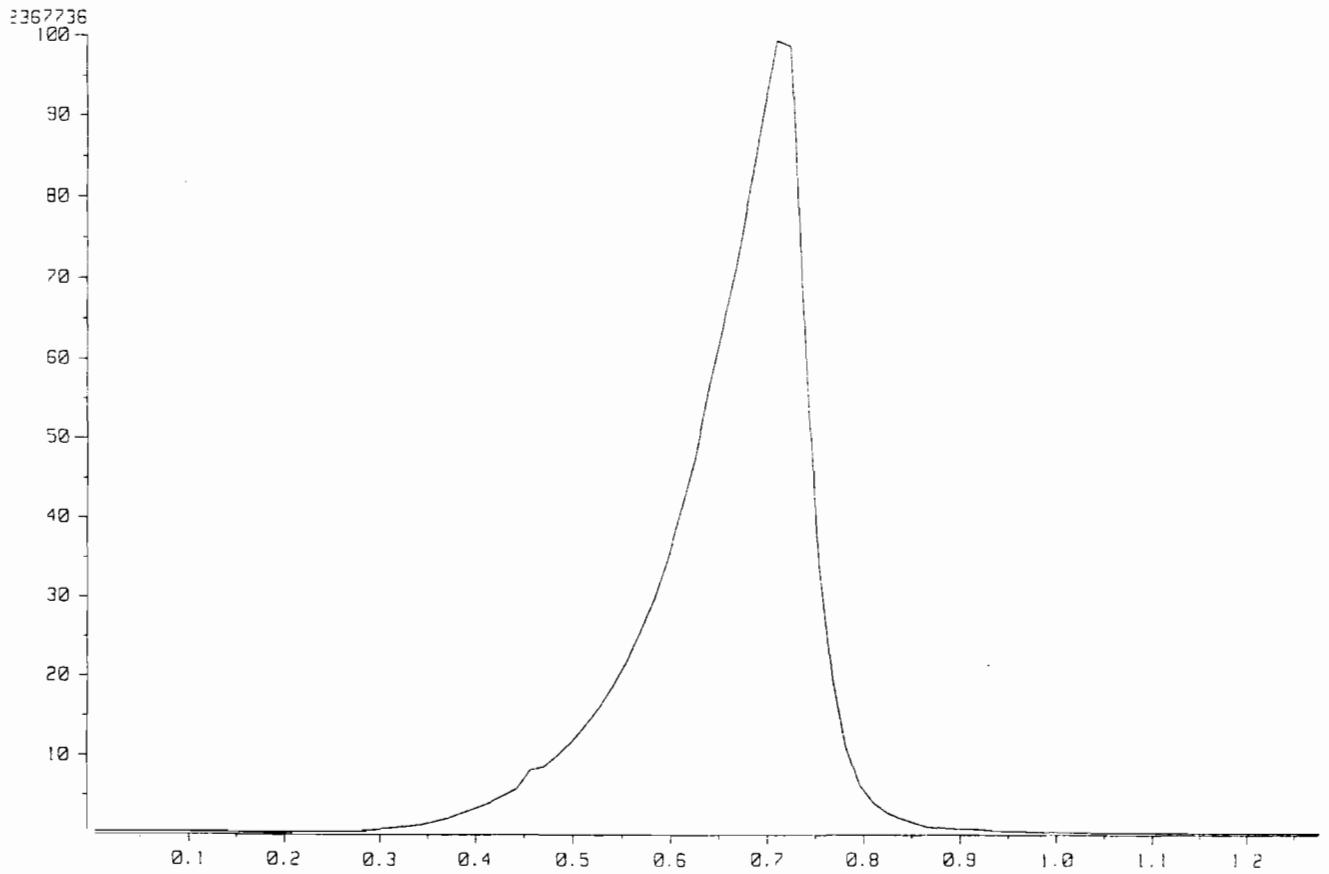


Espectro 9: Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto R

Eupomatenoide-7

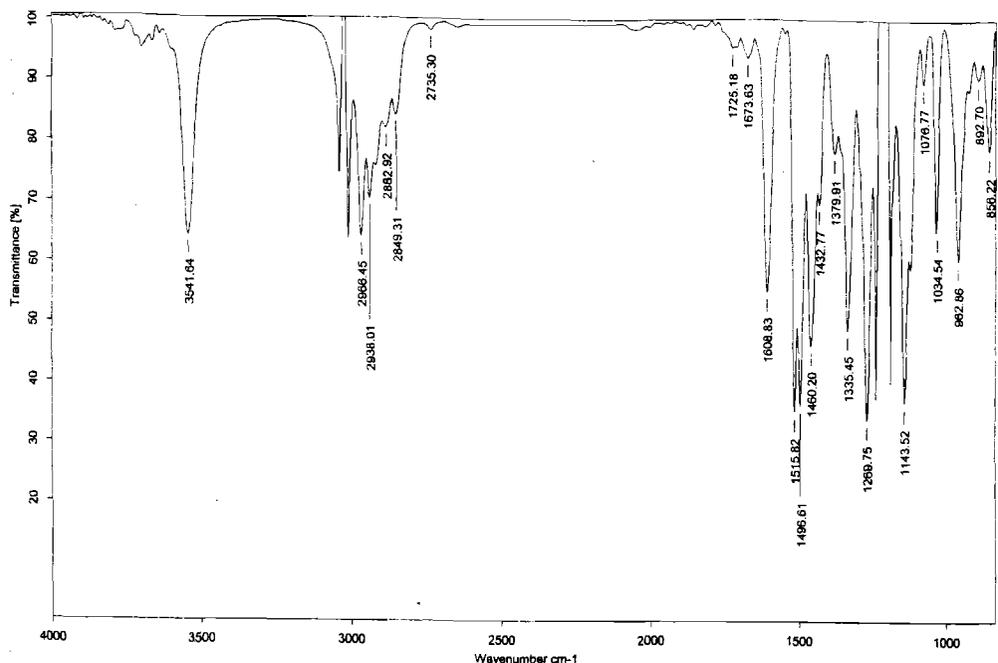


Fenactin 10: Pasnanaria Mannáquina Nivlanar de IU del comunitate n

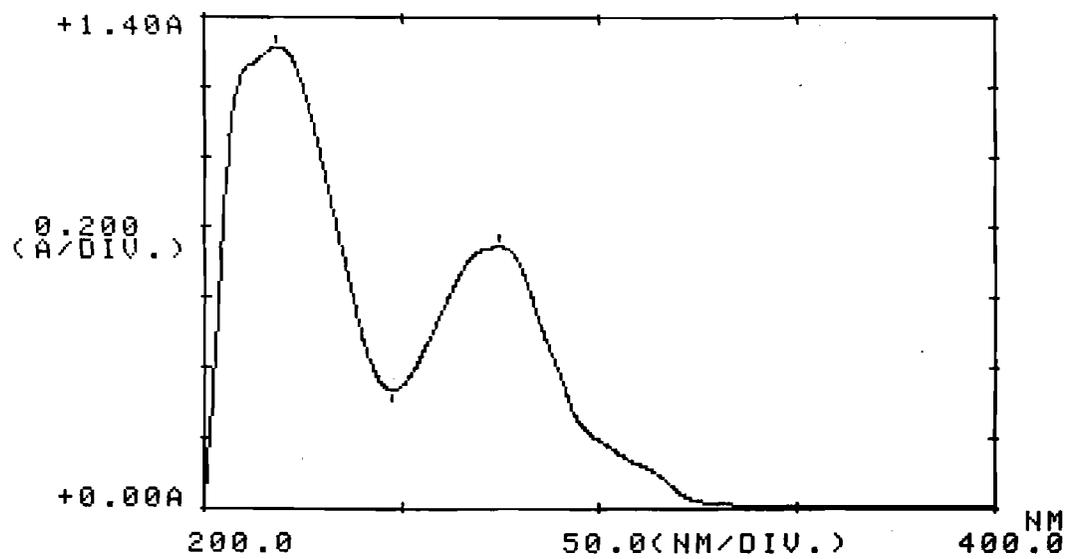


Cromatograma 3: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de

masas de la fracción secundaria FJ de *A. taliscana*

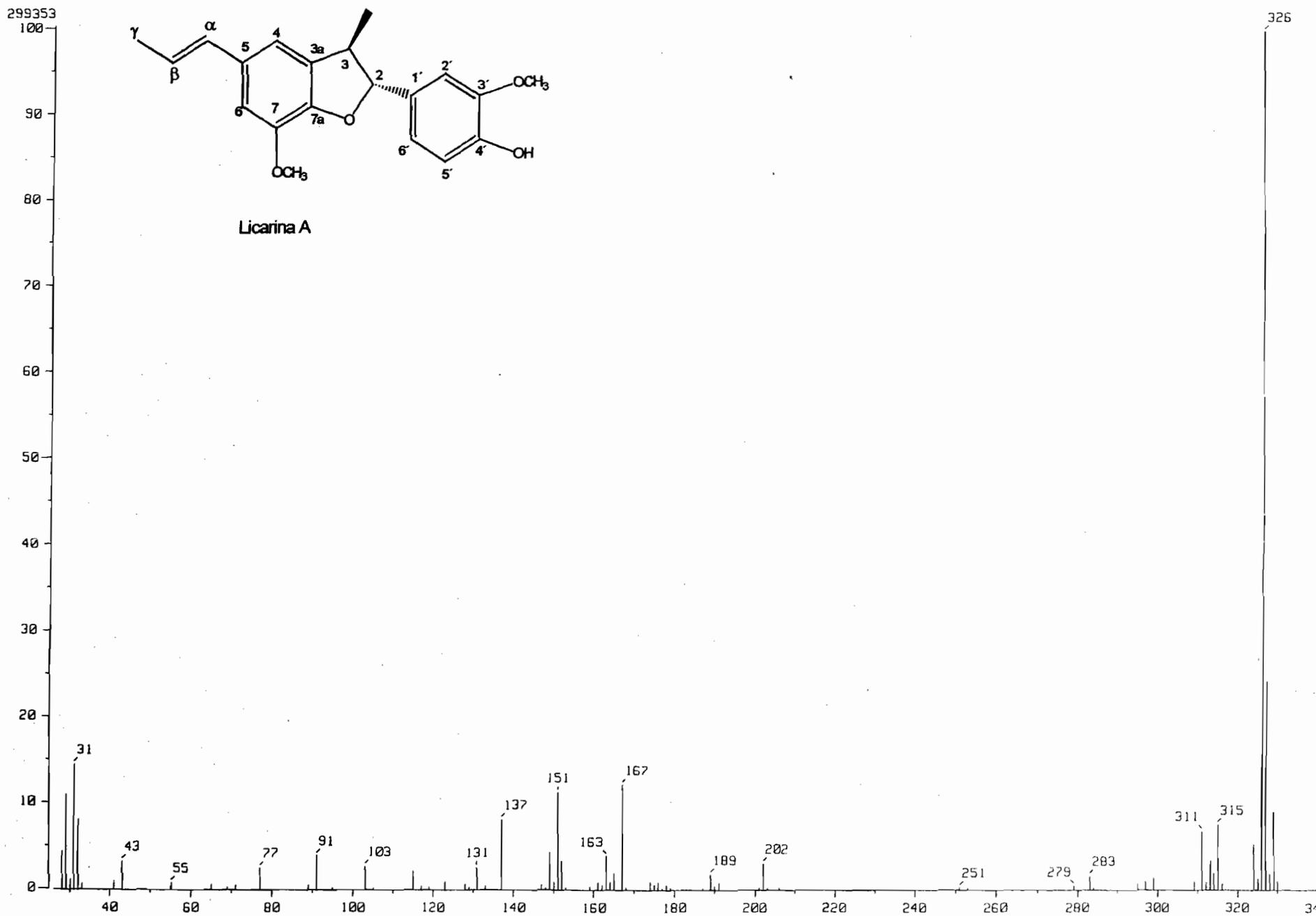


Espectro 11: Infrarrojo del compuesto C.



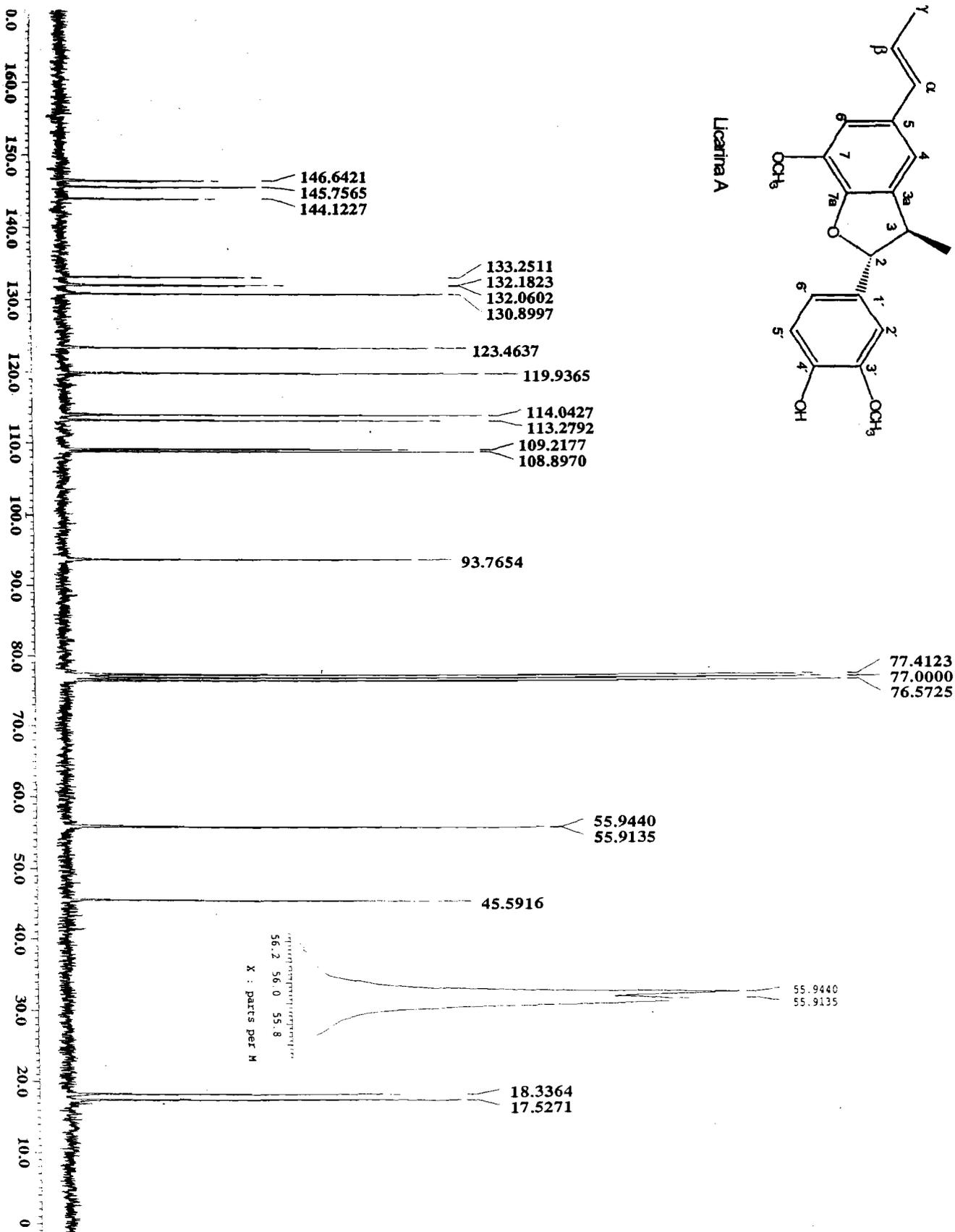
λ	ABS	λ	ABS
274.4	0.741	247.6	0.333
218.4	1.315		

Espectro 12: Ultravioleta del compuesto C.

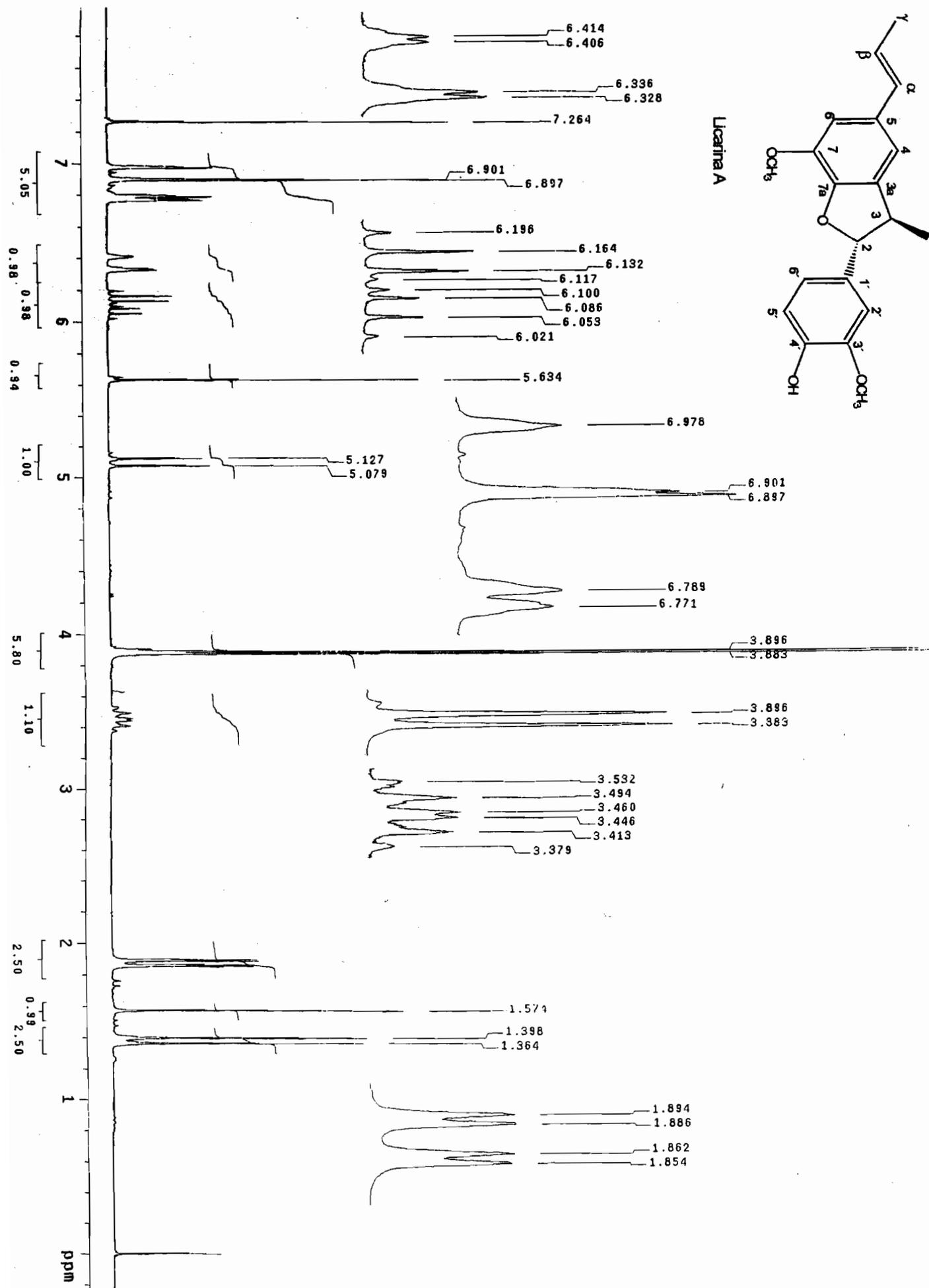
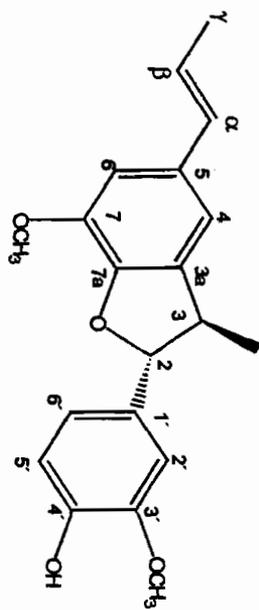


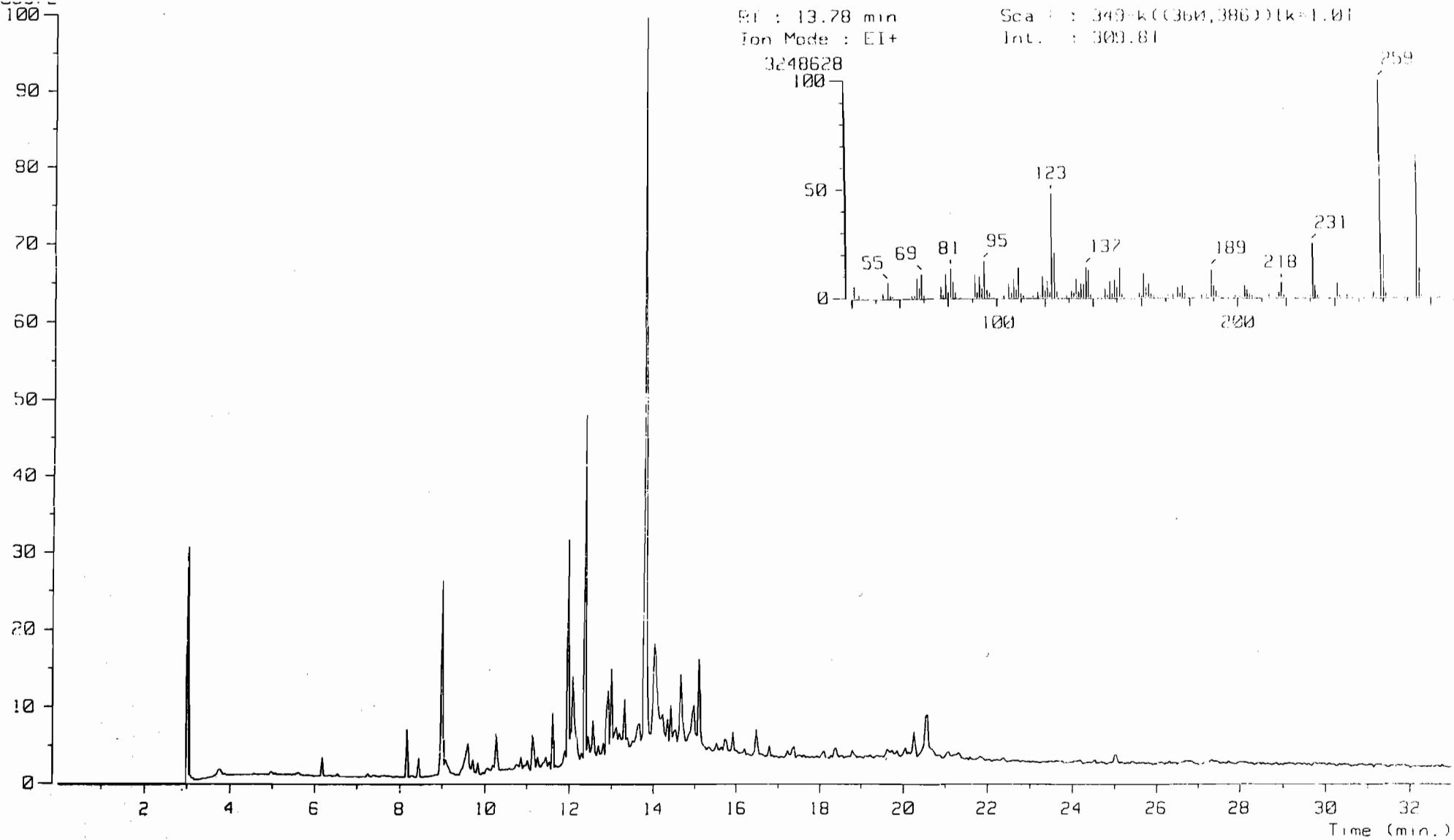
Espectro 13: Espectro de masas, por Impacto Electrónico. del compuesto C.

Espectro 14: Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto C.



Lucarina A





Cromatograma 4: Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción primaria FIV de *A. elegans*.