



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Determinación de la actividad antihipertensiva de los constituyentes de

Aristolochia orbicularis Duch. (Aristolochiaceae).

T E S I S

P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JACQUELINE PAOLA MARTINEZ MARES

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

ASESOR INTERNO: M. en C. Ramiro Ríos Gómez

MEXICO, D. F., ABRIL DE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) ya que durante la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo económico a través de una beca del proyecto de Ciencia Básica No. 79584-Q.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las siguientes instituciones:

El Centro de Investigaciones Químicas, UAEM, que me abrió las puertas para realizar el estudio fitoquímico, en el área de química orgánica y a la Facultad de Farmacia, UAEM, que me brindó las facilidades para hacer las pruebas biológicas.

También quiero agradecer a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, porque tuve la oportunidad de lograr una de mis metas al concluir mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez, Directora de Tesis y al M. en C. Ramiro Ríos Gómez, Asesor Interno, por darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su orientación y supervisión. Gracias por todo el conocimiento compartido, por los consejos y el apoyo que me brindaron.

También quiero agradecer al Dr. Eloy Solano Camacho quien me asesoró durante el ciclo final de la carrera.

A la Dra. Berenice Aguilar que me orientó y aclaró mis dudas tantas veces, al Dr. Samuel Enoch, que me permitió hacer las pruebas biológicas en su laboratorio y a Oswaldo Hernández, por su participación en ellas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, gracias por todo el apoyo, por los valores que me han inculcado y por estar a mi lado en cada paso que doy. En gran parte esto lo he logrado gracias a ustedes. Su amor es lo que me ha impulsado y gracias a ello he llegado donde estoy. Los amo.

A Felipe de Jesús, tu también haz sido un gran apoyo para mi, gracias por estar a mi lado en todo momento, por estar siempre dispuesto a ayudarme y brindarme todo lo que está a tu alcance, esto es muy valioso para mí. Te amo.

CONTENIDO	PÁGINA
FIGURAS	iii
CUADROS	iv
1. RESUMEN	v
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Las plantas medicinales y su estudio	1
3. ANTECEDENTES	2
3.1 Hipertensión Arterial	2
3.2 Los constituyentes químicos de las plantas y su investigación	3
3.3 Como se sintetizan los constituyentes químicos en las plantas	8
3.4 La familia Aristolochiaceae Juss.	11
3.4.1 El género <i>Aristolochia</i> L.	12
3.4.2 Antecedentes etnobotánicos del género <i>Aristolochia</i> L.	13
3.4.3 Estudios químico-farmacológicos del género <i>Aristolochia</i> L.	17
3.4.4 Bloques de construcción en compuestos del género <i>Aristolochia</i>	18
3.5 <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	20
3.5.1 Antecedentes etnobotánicos de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	21
3.5.2 Estudios químico-farmacológicos de <i>A. orbicularis</i> Duch.	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	24

6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos específicos	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1 Recolecta del material vegetal	25
7.2 Obtención del extracto hexánico de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	25
7.3 Evaluación Farmacológica	26
7.3.1 Aislamiento de aorta	26
7.3.2 Sistema de registro	27
7.3.3 Evaluación de la actividad antihipertensiva del extracto hexánico de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	27
7.4 Análisis Estadístico	28
7.5 Estudio fitoquímico de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
8.1 Estudio Fitoquímico Biodirigido por la actividad antihipertensiva de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch. (Elucidación Estructural de los constituyentes puros de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.)	41
9. CONCLUSIONES	65
10. PERSPECTIVAS	66
11. BIBLIOGRAFÍA	67

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Ejemplos representativos de algunos terpenos	4
Figura 2. Ejemplos representativos de algunos alcaloides	5
Figura 3. Ejemplos representativos de algunos fenoles	6
Figura 4. Ejemplos representativos de algunos pigmentos	7
Figura 5. Ejemplos representativos de algunos flavonoides y antocianos	7
Figura 6. Bloques de construcción de los productos naturales	10
Figura 7. La franja roja indica la distribución de <i>Aristolochia</i> en el mundo	14
Figura 8. Tipos de terpenos en plantas del género <i>Aristolochia</i>	19
Figura 9. Tipos de compuestos aromáticos en plantas del género <i>Aristolochia</i> y sus bloques de construcción	19
Figura 10. Aspectos morfológicos de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	20
Figura 11. Distribución de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch. en México	21
Figura 12. Localización del sitio de colecta de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch. en Xochicalco, municipio de Temixco, Morelos.	25
Figura 13. Efecto vasorrelajante inducido por el extracto hexánico de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch., carbacol y nifedipina en anillos de aorta de rata	42
Figura 14. Efecto vasorrelajante inducido por los grupos 2-12 en anillos de aorta de rata	43
Figura 15. Compuestos obtenidos del extracto hexánico de <i>Aristolochia orbicularis</i> Duch.	64

CUADROS	PÁGINA
Cuadro 1. Usos en la medicina tradicional de algunas especies del género <i>Aristolochia</i>	15
Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de <i>A. orbicularis</i>	31
Cuadro 3. Grupos de fracciones que serán analizados químicamente	31
Cuadro 4. Columna cromatográfica del grupo 2	33
Cuadro 5. Columna cromatográfica del grupo 5	33
Cuadro 5.1. Columna cromatográfica de las fracciones 28-80 del grupo 5	34
Cuadro 5.2. Columna cromatográfica de las aguas madres de las fracciones 28-80 del grupo 5	35
Cuadro 6. Columna cromatográfica de los grupos 7 y 8	37
Cuadro 7. Columna cromatográfica de los grupos 9 y 10	38
Cuadro 7.1. Columna cromatográfica de las fracciones 34-62 de los grupos 9 y 10	39
Cuadro 8. Columna cromatográfica de las fracciones 34-62 de los grupos 9 y 10	40
Cuadro 9. Composición química del aceite esencial del grupo 1 de <i>A. orbicularis</i>	45

Aristolochia orbicularis Duch. es una planta mexicana utilizada en la medicina tradicional a la que se le atribuyen varias propiedades terapéuticas, entre ellas la de regular la hipertensión arterial sistémica (HTAS). Hasta ahora, no hay estudios que respalden su actividad, por esta razón, el presente trabajo se realizó con la finalidad de conocer la composición química de esta especie, asociada a la determinación de su actividad antihipertensiva.

Se obtuvo y analizó el extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch., se encontró en el fraccionamiento primario 14 grupos de fracciones, de las que se purificaron 22 compuestos de los cuales el β -cubebeno, el α -cadinano y el β -eudesmol no han sido identificados en otras especies del género *Aristolochia*. Por otra parte, el análisis de las fracciones por cromatografía en capa fina (CCF) demostró que la fracción uno solo contenía ácidos grasos, y que las 13 y 14 estaban constituidas por resinas propias de las fracciones polares de la planta. Por esta razón, en el presente trabajo únicamente se evaluaron las fracciones 2 a 12. Las pruebas de evaluación del extracto *in vitro* se realizaron en el modelo de relajación de músculo liso en aorta, con y sin endotelio, aislada de ratas Wistar, e indicaron una concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de 122.47 $\mu\text{g/mL}$. Con base en este dato se realizaron las mismas pruebas para las fracciones 2 a 12, demostrándose que las fracciones 2 a 5 son prácticamente inactivas y que la actividad se encuentra concentrada en las fracciones 6 a 11, siendo precisamente la 6 y la 11 las más activas. Las fracciones 1 a 5 se encuentran constituidas por terpenos (mono-, sesqui-, di- y triterpenos), así como triacilglicéridos y esteroides. El análisis químico de las fracciones 6 a 12 indica la presencia de *N*-formilnornanteína y aristololactama B1, ambos derivados del ácido aristolóquico. Estos últimos dos constituyentes son los responsables de la actividad antihipertensiva, y actualmente se encuentran en evaluación farmacológica, a fin de determinar su CI_{50} .

2.1 Las plantas medicinales y su estudio

Desde la antigüedad se ha empleado la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades y aliviar malestares, haciendo uso de recursos materiales, simbólicos, religiosos y plantas con cualidades medicinales. En México por ejemplo, los aztecas y los mayas tenían extensas farmacopeas. El primer libro de herbolaria medicinal azteca (y una de las principales fuentes bibliográficas e históricas de medicina en México) lleva por título *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, conocido cuatro siglos después como Códice Badiano. De ésta manera, los conocimientos para la identificación de estas plantas, así como su preparación y aplicación en cualquier tipo de enfermedad, constituyen la gama de prácticas culturales que han sido desarrolladas y transmitidas de generación en generación por los antiguos mexicanos hasta nuestros días. De esta manera, son ellos los que poseen el conocimiento y ponen en práctica esta medicina con sus variantes, según la enfermedad de que se trate. El uso de plantas medicinales representa en muchas ocasiones, un recurso de sobrevivencia, ya que es frecuente que esta alternativa represente la única opción disponible para atender su salud.¹⁻²

La riqueza florística de México y su antigua herencia cultural, dan como resultado una lista de plantas con uso etnomédico tan larga, que ofrece prácticamente una fuente inagotable para el estudio tanto fitoquímico como farmacológico, a pesar de que gracias a las culturas indígenas han llegado a nosotros muchos fármacos y agentes de control de plagas que se usan en la actualidad.³ Se calcula que anualmente se gastan más de mil millones de dólares en el mundo en el comercio e investigación de plantas medicinales. Actualmente las investigaciones científicas sobre constituyentes han generado importantes contribuciones en la búsqueda de alimentos y fármacos potenciales.⁴ Sin embargo el potencial de las plantas medicinales de México como una fuente de compuestos bioactivos sigue siendo en gran parte inexplorado, ya que aproximadamente el 95% de las plantas existentes en el mundo permanece sin recibir ningún tipo de estudio;⁵ entre ellas *Aristolochia orbicularis*, utilizada en la medicina tradicional.

3.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial sistémica (HTAS) es un problema de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el límite para definir a un paciente como hipertenso es ≥ 140 mm Hg en la presión sistólica (presión cuando el corazón late) y/o una elevación \geq de 90 mm Hg en la diastólica (presión cuando el corazón se relaja) medida en tres o más ocasiones en un lapso de 4 a 6 semanas. En México, para 1993 se registró que el 25% de la población padecía hipertensión, sin embargo, en el año 2000 la prevalencia informada de HTAS entre los 20 y 69 años fue del 30.05%, es decir, más de 15 millones de mexicanos que se encuentran en dicho grupo de edad .⁶

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 informó 31%, es decir, para 2007 se estimó que aproximadamente 17 millones de adultos mayores de 20 años fueron portadores de HTAS. Los estados del norte de nuestra república alcanzan cifras de prevalencia aún mayores. Aunque se ha mejorado la detección, lamentablemente alrededor del 61% de las personas detectadas con HTAS en la encuesta nacional 2000, desconocían padecer este mal, situación que es de extrema importancia ya que, en general, en México el paciente acude al médico cuando han transcurrido varios años desde el inicio de su HTAS y, probablemente, ya habrá en la mayoría de los casos, algún grado de daño al órgano blanco. De los portadores que fueron detectados como conocedores de su enfermedad, sólo la mitad estaba bajo tratamiento farmacológico antihipertensivo, y de éstos, sólo el 14.6% mostró cifras consideradas de control ($< 140/90$ mm Hg).⁷ También es común que las personas recurran a la medicina tradicional para tratar esta enfermedad. Una de las plantas utilizadas con este fin es *Aristolochia orbicularis* Duch.

Para el estimado real de estas cifras debe tomarse en consideración además, que el criterio reciente para control en la persona diabética o con daño renal debe ser más estricto (< 130/80 mm Hg). De manera que, se estima que solo aproximadamente el 10% de la población hipertensa en México está realmente en control óptimo. Lo anterior podría contribuir a explicar el porqué nuestra tasa de urgencias hipertensivas y eventos vasculares cerebrales, diabetes, insuficiencia renal crónica, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca y retinopatía hipertensiva, entre otros, van en aumento y no en reducción. La prevalencia de HTAS guarda estrecha relación con la edad, medio ambiente, estilo de vida, género y factores co-mórbidos, tales como diabetes, obesidad, dislipidemias, tabaquismo y predisposición genética.⁷

3.2 Los constituyentes químicos de las plantas y su investigación

Algunos constituyentes químicos de las plantas poseen propiedades terapéuticas, ya que las sustancias químicas presentes en el tejido producen efectos fisiológicos. Por esta razón, se han aislado constituyentes activos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química, para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y/o menor toxicidad.⁸ Desde antes del siglo XVIII, los productos orgánicos habían sido aislados de organismos vivos. El químico alemán Karl Wilhelm Scheele (1742-1786) fue capaz de extraer algunos constituyentes simples, como glicerol y los ácidos oxálico, láctico, tartárico y cítrico, de varias fuentes orgánicas, animales y vegetales. Friederich W. Sertürner (1783-1841) obtuvo morfina del opio en 1806, Pierre Joseph Pelletier (1788-1842) y Jean Bienaime Caventou (1795-1887) aislaron estrocnina, brucina, quinina, cinconina y cafeína en los siguientes quince años.⁹ En la actualidad casi el 25% de los fármacos que se prescriben

contienen uno o más principios activos^a derivados de alguna planta². De entre ellos sobresalen los terpenos, alcaloides y fenoles.

Los terpenos son hidrocarburos de fórmula general $C_{10}H_{16}$ que poseen un esqueleto carbonado formado por la condensación de dos o más unidades de isopropeno. De acuerdo al número de carbonos que incorporan en su estructura se clasifican como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y terpenos superiores. Ejemplos representativos de estos compuestos se ilustran en la figura 1.

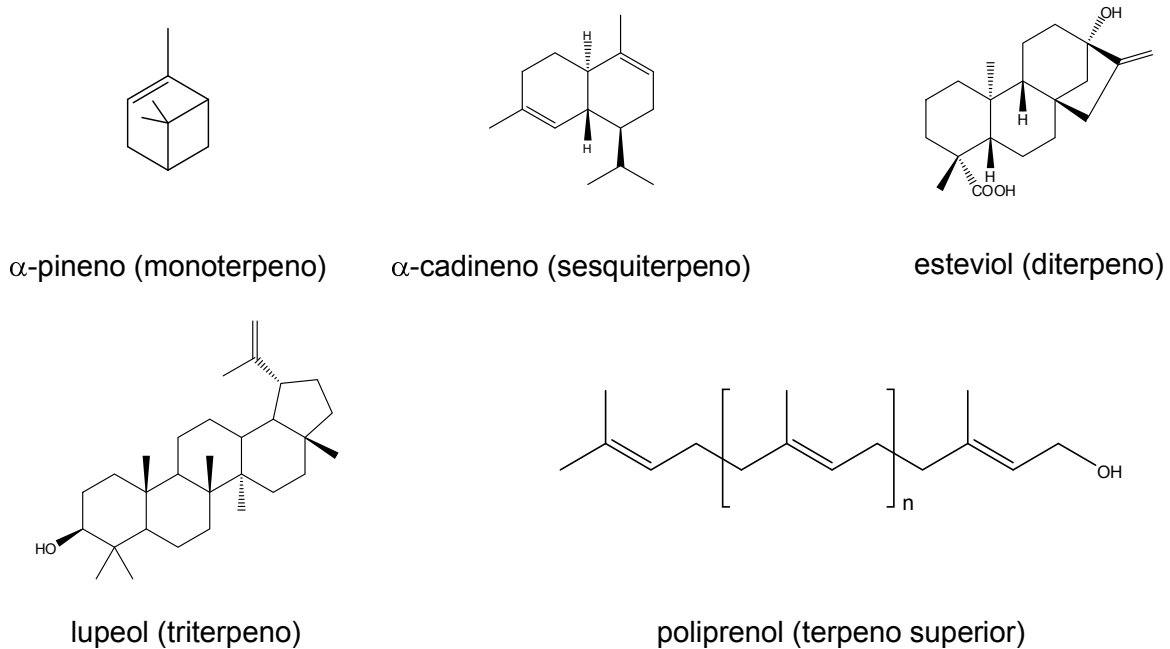
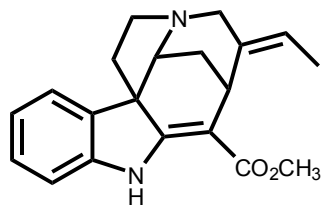


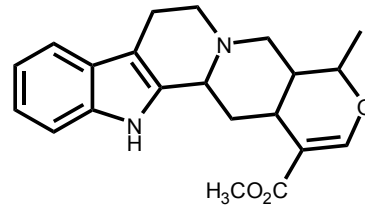
Figura 1. Ejemplos representativos de algunos terpenos

^a Principios activos: Sustancias con actividad farmacológica a los cuales se debe su empleo terapéutico.¹⁰

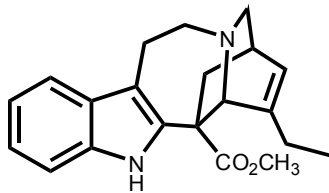
Los alcaloides se caracterizan por presentar un sistema heterocíclico que contiene nitrógeno y muestran propiedades fisiológicas muy intensas. Derivan de sustancias diversas como la piridina, quinoleína, isoquinoleína, pirrol, entre otros. Se encuentran principalmente en dicotiledoneas, entre ellas las familias Papaveraceae, Rubiaceae y Solanaceae. La mayoría de los alcaloides son sólidos cristalinos, insolubles en agua y solubles en ácidos orgánicos (figura 2).



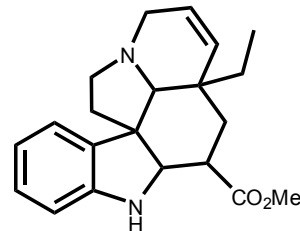
aquamicina



ajmalicina



Catarantina



tabernosina

Figura 2. Ejemplos representativos de algunos alcaloides

Los fenoles son compuestos formados por al menos un núcleo bencénico y un grupo hidroxilo. De acuerdo con número de grupos hidroxilo incluidos en su estructura, estos se clasifican en fenoles monovalentes o polivalentes. Protegen a las plantas de daño por oxidación y realizan la

misma función en los humanos. Estas moléculas son las responsables de los colores azul, violeta y rojo de algunos frutos como uvas, arándano y berenjena (figura 3).

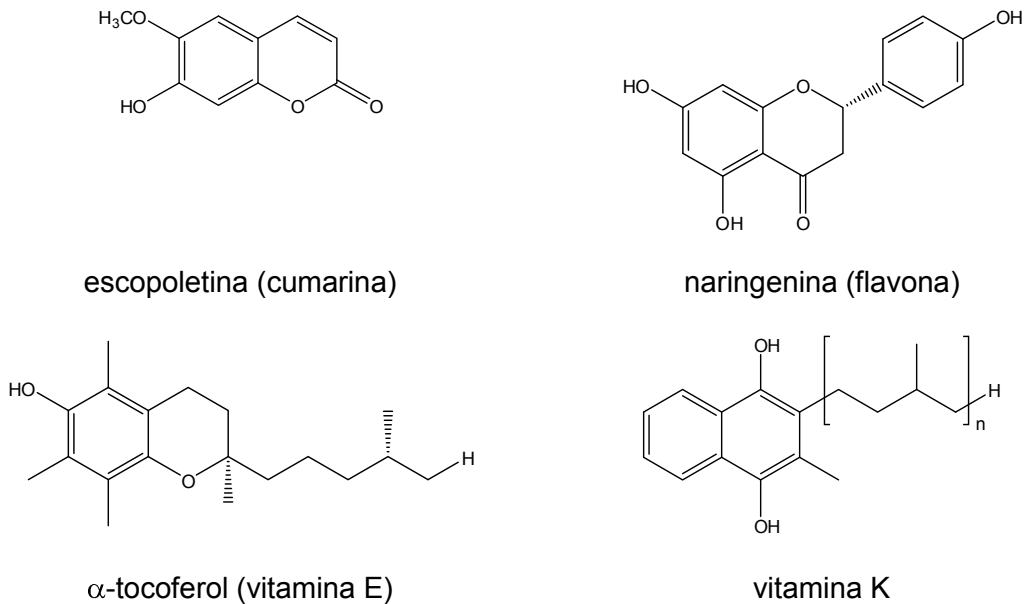


Figura 3. Ejemplos representativos de algunos fenoles

Los pigmentos son constituyentes químicos muy importantes en las plantas; los más comunes son las clorofilas, pigmentos fotosintéticos verdes. Presentan cuatro anillos pirrólicos en su estructura, formando un macrociclo que contiene el catión magnesio. En las plantas hay dos tipos de clorofila: α y β . Estas moléculas están relacionadas con la absorción de algunos compuestos cancerígenos, tienen actividad bactericida y son reconstituyentes sanguíneos, entre otras actividades asociadas a las mismas. El caroteno es uno de los compuestos más importantes del grupo de los carotenoides. Estos deben su color a un gran número de átomos de carbono coordinativamente insaturados dispuestos sucesivamente, se presenta fundamentalmente en tres formas α , β y γ , y se encuentran en la zanahoria y asociada a la clorofila de las hojas verdes, en la leche y la sangre¹¹ (figura 4, página 7).

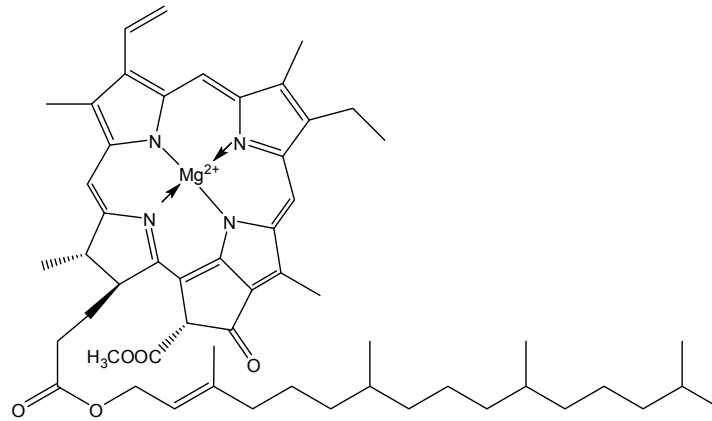
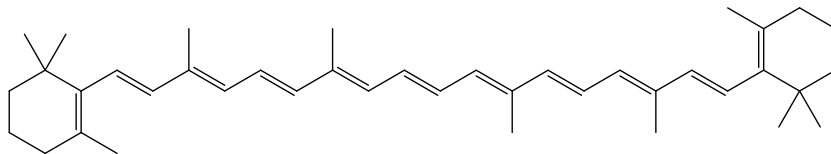
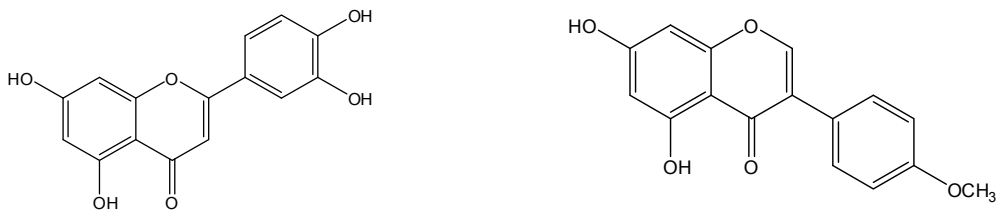
Clorofila α  β -caroteno

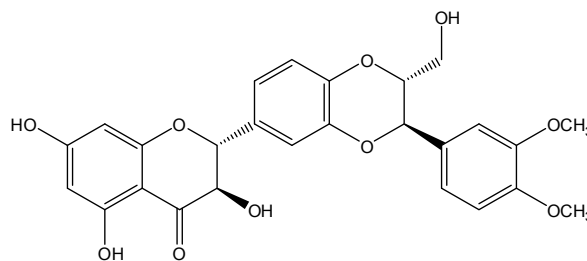
Figura 4. Ejemplos representativos de algunos pigmentos

Las flavonas y antocianos derivan de la cromona. Los pigmentos amarillos de las plantas son flavonas y se encuentran principalmente en flores a las que confieren su color. Los pigmentos rojos y azules de flores y frutos están relacionados estructuralmente con algunos flavonoides y antocianos. Las antocianidinas se hallan en la naturaleza en forma de glucósidos, conocidos como antocianos. Proporcionan enlaces que conectan cadenas de colágeno, la proteína más abundante en el cuerpo humano (figura 5).¹¹⁻¹²



luteolina (flaona)

formononetina (isoflavona)



silibina (flavonolignanos)

Figura 5. Ejemplos representativos de algunos flavonoides y antocianos

3.3 Como se sintetizan los constituyentes químicos en las plantas

Se define como metabolitos primarios a aquellos productos naturales aislados de un ser vivo y cuya presencia resulta indispensable para su vida. Son compuestos de amplia distribución en los seres vivos, es decir todos los contienen independientemente de si se habla de un animal, planta o microorganismo. Ejemplo de metabolitos primarios son los polisacáridos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos. Estos son fundamentales para generar los bloques de construcción de toda materia viva, por ello resultan indispensables para la vida. Los procesos que implican la síntesis de estas sustancias, constituyen el metabolismo primario. Sin embargo, existen otros procesos químicos únicos en ciertas especies, y mediante ellos se sintetizan diferentes productos de acuerdo al tipo de especie. Estas reacciones no son esenciales para la existencia de los organismos y son llamadas metabolismo secundario. Algunos de los productos que resultan de este proceso son terpenos, alcaloides, compuestos aromáticos y pigmentos (figuras 1-5, *vide supra*).

Los bloques de construcción de los metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario, estos bloques son la base de muchas de las estructuras de los productos naturales y son nueve (figura 6, página 10):

C₁, está compuesto por un solo átomo de carbono, usualmente en forma de un grupo metilo, y se asocia con más frecuencia al oxígeno o nitrógeno, ocasionalmente al carbono.

C₂, dos átomos de carbono pueden ser suministrados a los compuestos naturales como acetil-CoA, este podría ser un grupo acetilo simple, como en un éster, pero con mayor frecuencia como parte de una larga cadena de alquilo, también puede ser parte de un sistema aromático.

C₅, (o unidad de isopreno) fragmento característico de los compuestos formados a partir de mevalonato o fosfato deoxilulosa.

C₆C₃, que se refiere a la unidad de fenilpropilo, y es obtenida del esqueleto de carbono de L-fenilalanina o L-tirosina. **C₆C₃** da origen a dos bloques de construcción adicionales, el **C₆C₂** y **C₆C₁**, incorporados en una gran cantidad de derivados del fenol. También derivado del esqueleto de carbono de L-fenilalanina o L-tirosina se encuentra en fragmento **C₆C₂N**, que se encuentra formando parte de una gran cantidad de alcaloides. Derivados de los aminoácidos L-ornitina (aminoácido no protéico) y L-lisina, respectivamente, las unidades **C₄N** y **C₅N** se encuentran formando parte de alcaloides pirrolisidínicos y piridínicos.^{5, 13}

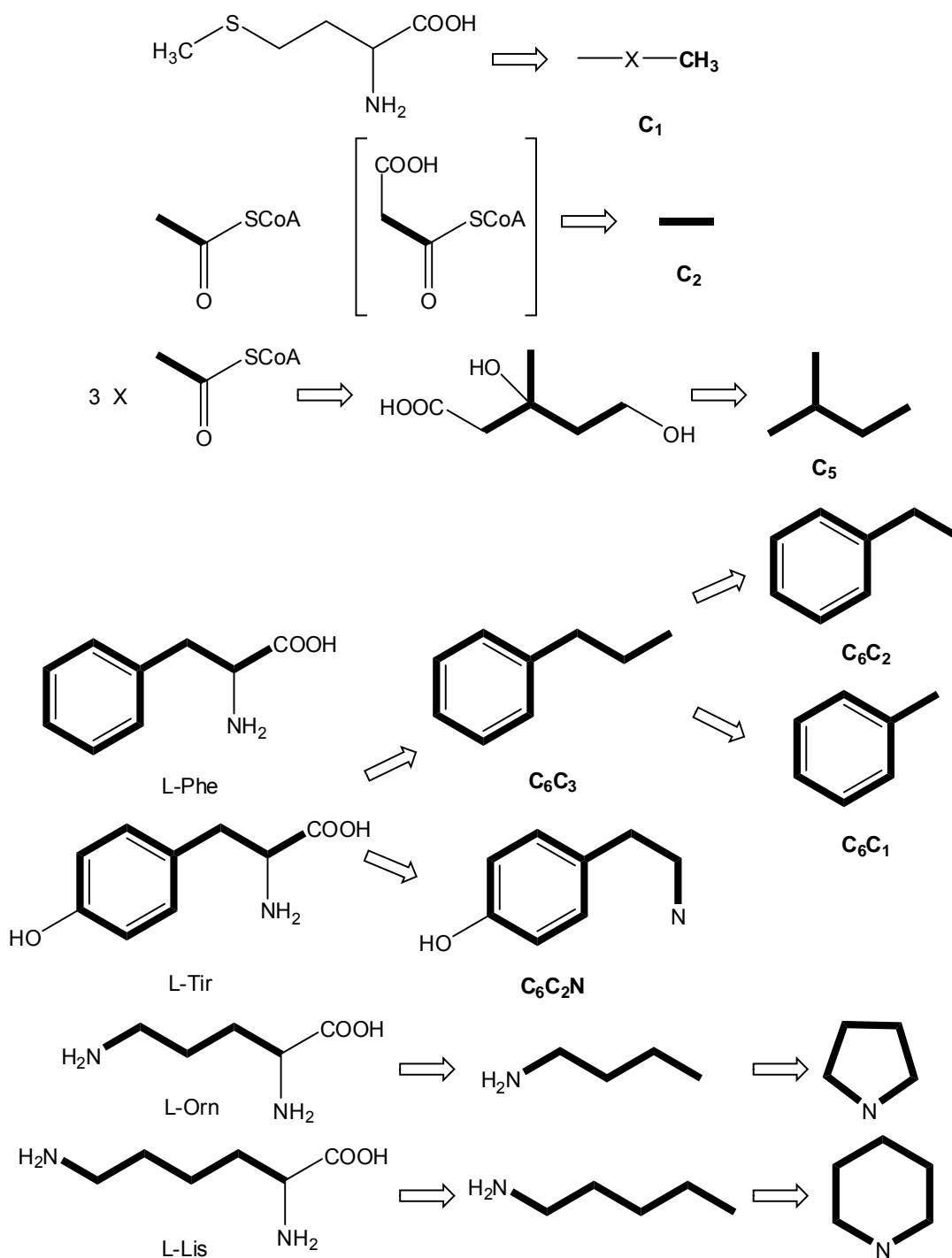


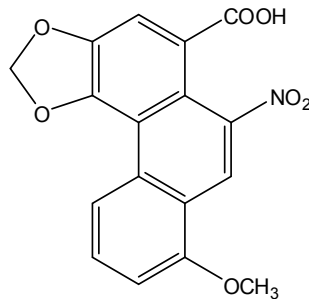
Figura 6. Bloques de construcción de los productos naturales

3.4 La familia Aristolochiaceae Juss.

Tradicionalmente se ha considerado a la familia Aristolochiaceae como la única del orden Aristolochiales, en la clase Magnoliidae. Las características morfológicas de esta familia son: hierbas frecuentemente trepadoras, rara vez arbustos pequeños o árboles, aromáticas, con tallo simple o ramificado. Hojas alternas, simples pecioladas o subsésiles, enteras o a menudo lobuladas, cordiformes exestipuladas, la nervación actinódroma o pinnada. Inflorescencias axilares, rara vez caulifloras a veces terminales racemosas o cimosas o con flores solitarias, flores actinomorfas o zigomorfas; pediceladas, gamosépala (*Aristolochia* y *Euglypha*) cáliz inflado basalmente formando un utrículo, el tubo recto, arqueado o geniculado, 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 (*Saruma* y *Asarum*); estambres 5-6 (-40), los filamentos libres o unidos a la columna estilar o ginostemo, en 1-2 series, las anteras ditécicas, con dehiscencia longitudinal; ovario ínfero raramente semi-ínfero, apocárpico o sincárpico, 5-6-ocular, 5-6-carpelar, la placentación axilar, los 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, septifraga o irregular, semillas numerosas, triangulares, el endospermo abundante, el embrión pequeño. La familia cuenta con 7 géneros y aproximadamente 625 especies (la mayoría pertenecen al género *Aristolochia*), distribuidas en los trópicos y las zonas templadas de Europa, Asia, África, Australia y América. Los géneros de esta familia están subdivididos en 3 tribus: *Sarumeeae*, *Bragantieae*, *Aristolochieae*.¹⁴⁻¹⁶

3.4.1 El género *Aristolochia* L.

Pocas especies de *Aristolochia* son usadas en horticultura, entre ellas *A. grandiflora*, *A. labiata* y *A. littoralis*. La búsqueda constante de productos derivados de plantas que actúen sobre el metabolismo y enfermedades humanas ha llevado al estudio del ácido aristolóquico (**1**). Esta sustancia, presente en el tejido de muchas especies de la familia, posee la capacidad de reducir ciertos tipos de cáncer en ratones.



1

Cerca de 550 especies pertenecen a éste género y para México hay 64 registradas. Son lianas o hierbas volubles, con rizomas o raíces tuberosas, rara vez pequeños arbustos. Hojas alternas variables en forma, pero generalmente cordiformes, exestipuladas, algunas veces con pseudoestípulas reniformes u orbiculares. Inflorescencias axilares a veces caulifloras; flores solitarias o agregadas, formando un racimo o un monocasio, zigomórficas, el cáliz generalmente tubular, de aspecto geniculado o rectilíneo, la base inflada formando un utrículo, la parte media prolongada, angosta, formando el tubo, algunas veces con estructuras o siringe proyectada hacia el interior del utrículo, el limbo ensanchado y expandido, 1-3-lobado, los lóbulos algunas veces con apéndices apicales, raramente un anillo interno presente entre el

tubo y el limbo, la corola ausente; estambres 6, raramente 5, unidos en un ginostemo (fusión del estilo, estigma y estambres en forma de una columna); ovario ínfero 5-6-locular, la placentación axilar, el estilo con lóbulos estigmáticos coroniformes o subcapitados. El fruto es una cápsula septicida o septifraga; semillas numerosas, generalmente triangular-cordiformes, el endospermo abundante, el embrión diminuto, apical. *Aristolochia* es el género más diverso con aproximadamente 500 especies. Es el único representante mexicano de la familia, con cerca de 65 especies en el país, la mayoría de ellas se distribuyen en zonas tropicales del mundo, aunque algunas alcanzan las regiones templadas¹⁴⁻¹⁵ (figura 7, página 14).

3.4.2 Antecedentes etnobotánicos del género *Aristolochia* L.

Debido a su belleza, varias especies del género *Aristolochia* se utilizan como ornamentales y de manera muy destacada, son utilizadas en la medicina tradicional como medicamentos y tónicos para tratar diversas enfermedades, las cuales se encuentran descritas en el cuadro 1 (página 15).



Figura 7. La franja roja indica la distribución de *Aristolochia* en el mundo

Cuadro 1. Usos en la medicina tradicional de algunas especies del género *Aristolochia*¹⁶

Nombre botánico	Nombre común	Parte utilizada	Uso popular
<i>Aristolochia acuatifolia</i>	Jiquiro, jarrinha	Toda la planta	Tratamiento de erisipelas
<i>A. albida</i>		Rizomas	Disentería, cólicos gastrointestinales y mordeduras de serpientes
<i>A. argentina</i>	Charrua, charruga	Hojas, tallos	Emenagogo, antiséptico, diurético, tratamiento de artritis, envenenamiento y pruritos
<i>A. baetica</i>		Raíz	Emenagogo, en cáncer
<i>A. birostris</i>	Capivara, angilico, jarrinha	Raíz	En cáncer
<i>A. bracteata</i>	Ukulwe, bracteated birthwort	Toda la planta	Emenagogo, antihelmíntico, purgante, repelente de moscos e insecticida
<i>A. brevipes</i>	Guaco	Rizoma	Tratamiento de artritis, heridas, mordeduras de serpiente, dolor de muelas, tos
<i>A. chamissonis</i>		Toda la planta	En debilidad
<i>A. chilensis</i>	Oreja de zorro, hierba de la virgen María	Raíz	Tratamiento para el puerperio, como emenagogo
<i>A. cinnabarina</i>	Sichuan zhusalian	Raíz	Analgésico, calmar dolor
<i>A. clematitis</i>	Upright birthwort	Raíz	Tratamiento de cáncer, problemas menstruales, heridas, tumores, depurativo, repelente de insectos
<i>A. contorta</i>	Pipevine, ma dou ling, tian xian teng	Raíz	En cáncer
<i>A. constricta</i>	Saragez	Hojas, tallos	Antiespasmódico, analgésico, anticarcinogénico, antimalaria y antiinflamatorio; emenagogo; mordeduras de serpientes
<i>A. cucurbitifolia</i>	Qing muxiang	Frutos, raíz	Expectorante, antitusivo y antiasmático; para el tratamiento de la inflamación de los pulmones
<i>A. debilis</i>	Ma dou ling, qing muxiang, seimokkou, birthwort long, chinese fairly vine, birthwort	Raíz	Para disminuir la presión arterial
<i>A. gibertii</i>	Mil hombres hembra, contrayerba, patito	Toda la planta	Tratamiento de hinchazón, dolor de estómago y malestares
<i>A. gigantea</i>		Toda la planta	Emenagogo, abortivo y antiséptico, tratamiento de heridas y enfermedades de la piel
<i>A. grandiflora</i>		Hojas, tallos	Uterotónico, citotóxico y antimicrobiano; tratamiento de mordeduras de serpientes y repelente de moscas y gusanos
<i>A. heterophylla</i>	Yellowmouth, dutchman's pipe	Frutos, raíz	Expectorante, antitusivo, antiasmático y analgésico; tratamiento de mordeduras de serpientes
<i>A. indica</i>	Indian birthwort	Raíz	Emenagogo, cardiotónico, diurético,

Continúa cuadro 1

			antiinflamatorio, abortivo, sedativo, contra gusanos intestinales, mordeduras y picaduras venenosas
<i>A. kaempferi</i>	Yellowmouth, dutchman's pipe	Toda la planta	Tratamiento de asma, tos, hemorroides, como antiveneno, agente antibacterial, hipotensión antipruriginoso, expectorante y emético
<i>A. kankauensis</i>		Frutos y raíz	Expectorante, antitusivo, analgésico y antiasmático
<i>A. liukiensis</i>		Raíz	Antiflogístico, desintoxicante y anodino
<i>A. longa</i>	Tian xian teng	Toda la planta	Tratamiento de cáncer, esclerosis, tumores de útero y cáncer de nariz
<i>A. macroua</i>	Mil hombres, patito coludo, jarrinha, isipomilhombres	Toda la planta	Tratamiento para mordedura de serpiente y reumatismo, como estimulante circulatorio, antiinflamatorio, antiséptico y abortivo
<i>A. manshuriensis</i>	Manchurian birthwort, manchurian guan mu tong, kan-mokutsu, mokuboi,	Toda la planta	Para disminuir la HTAS
<i>A. maurorum</i>	Zarand	Raíz	Antiséptico, para cicatrización de heridas y roña de ovejas
<i>A. mollissima</i>	Xun gu feng	Frutos, raíz	Analgésico, anticáncer, antimalarial, antiinflamatorio y antirreumático, para disminuir la HTAS, tratamiento de dolor de estómago y malestar abdominal
<i>A. paucinervis</i>	Barraztam	Toda la planta	Infecciones de la piel, dolor abdominal, infecciones de las vías respiratorias superiores
<i>A. rotunda</i>		Toda la planta	En cáncer, como depurativo
<i>A. rodriguesii</i>	Sangue-de-Cristo	Raíz, hojas, tallos	Abortivo y antiinflamatorio, tratamiento de mordeduras de serpientes
<i>A. triangularis</i>	Mil hombres	Corteza	Antirreumático, agente antifertilidad, diaforesis, diurético, antiséptico, emenagogo, antídoto y abortivo; tratamiento y heridas de la piel
<i>A. tuberosa</i>		Raíz	Tratamiento de dolor de garganta, mordedura de serpientes venenosas tuberculosis
<i>A. yunnanensis</i>	Yunnan ma dou ling, nan mu xiang	Raíz	Tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tricomoniasis y varios dolores
<i>A. zollingeriana</i>	Madouling	Frutos, raíz	Expectorante, analgésico, antitusivo, antiasmático; tratamiento de mordeduras de serpientes

3.4.3 Estudios químico-farmacológicos del género *Aristolochia* L.

El género *Aristolochia* es una fuente importante de compuestos activos fisiológicamente, que pertenecen a diferentes clases químicas. Contiene una gran cantidad de terpenos, particularmente diterpenos.¹⁷ Los trabajos que aportan un valor significativo son numerosos, sin embargo, los estudios van dirigidos sólo a algunas especies. De 1973 a la fecha únicamente hay 19 especies que cuentan con un estudio fitoquímico: *A. argentina* Gris., *A. bracteata* Retz., *A. clematitis* L., *A. cymbifera* Mart., *A. debilis* Sieb. & Zucc, *A. indica* L., *A. kaempferi* Willd., *A. longa* L., *A. maxima* L., *A. pandurata* Jacq., *A. reticulata* Nutt., *A. rotunda* L., *A. serpentaria* L., *A. shipo* L'Herit., *A. taliscana* Hook & Arn., *A. tomentosa* Sims., *A. zenkeri* Engl., *A. mexicana* A. Doetr., (y de una especie china («Mu-Tong») de la cual no se da mayor precisión taxonómica).¹⁸

En la actualidad ha aumentado el número de especies que cuenta con un estudio químico y/o farmacológico. Por citar algunas especies, están las que han registrado una actividad insecticida y repelente de insectos. Por ejemplo, *Aristolochia clematitis* se utiliza como repelente de insectos, *A. grandiflora* es usada contra moscas y gusanos; y el extracto de *A. bracteata* muestra actividad contra mosquitos. El aceite esencial de *A. indica* tiene actividad antibacterial, además, uno de sus extractos mostró tener actividad inhibitoria de tumores en el sistema de prueba adenocarcinoma 755. Los extractos de petróleo crudo (hexano), de cloroformo y alcohólico de la raíz de *A. indica* son abortivos al 100 % en ratones hembra maduras. El extracto metanólico de *A. macroura* muestra citotoxicidad contra carcinoma hepatocelular humano, de la línea celular HepG2. La fracción de cloroformo obtenida de los rizomas de *A. paucinervis* tiene alta actividad bacteriostática contra cepas bacterianas como *Clostridium perfringens* ATCC13124 y *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus lutens* y *Bacillus subtilis*. Una fracción similar de las hojas de esta planta, también presenta alta actividad bactericida contra cepas aerobias y anaerobias. El resultado de este estudio apoya el uso en la

medicina tradicional marroquí para tratar infecciones de piel y tejidos blandos, especialmente gangrena y enfermedades intestinales. *A. triangularis* presenta actividad citotóxica contra células KB e inhibe el crecimiento de tumores en la vesícula biliar. Los extractos hexánicos de hojas y corteza de *A. trilobata* fueron muy activos contra *Staphylococcus aureus* y esto valida su uso tradicional en curación de heridas profundas y superficiales. El extracto de cloroformo de *A. trilobata* mostró un efecto antiinflamatorio con un valor de ID_{50} de $108 \mu\text{g cm}^{-2}$ comparable con el de la indometacina ($93 \mu\text{g cm}^{-2}$).¹⁹

La desventaja de este género, es que la mayoría cuenta con derivados de nitrofenantreno y particularmente ácido aristolóquico,²⁰ el cual induce nefrotoxicidad, mutagenicidad,^{17,21} y tiene actividad carcinogénica en el ser humano,^{17,22} provoca paro respiratorio y cardíaco en animales de experimentación, y diarrea y debilidad de las extremidades en el ganado.^{9,23} Su ingestión se ha asociado a un cuadro clínico caracterizado por fibrosis intersticial renal rápidamente progresiva que conduce de forma rápida a la insuficiencia renal crónica, junto con la aparición de tumores uroteliales del tracto urinario superior. El ácido aristolóquico, también reacciona con el ADN y forma aductos que se asocian con la transformación maligna del tejido epitelial.²³⁻²⁵ Por ello, la Comunidad Europea ha prohibido la comercialización de especies del género *Aristolochia*²³ y la Food and Drug Administration (FDA) ha retirado del mercado 13 productos herbolarios que contienen ácido aristolóquico.²⁶

3.4.4 Bloques de construcción en compuestos del género *Aristolochia*.

Químicamente, las plantas pertenecientes al género *Aristolochia* se caracterizan por la presencia de dos grandes grupos de compuestos: terpenos y derivados aromáticos.

El grupo de terpenos incluye desde monoterpenos hasta terpenos superiores y se esquematizan en la figura 8, en la que se remarca con líneas más intensas el bloque de construcción C_5 que les da origen.

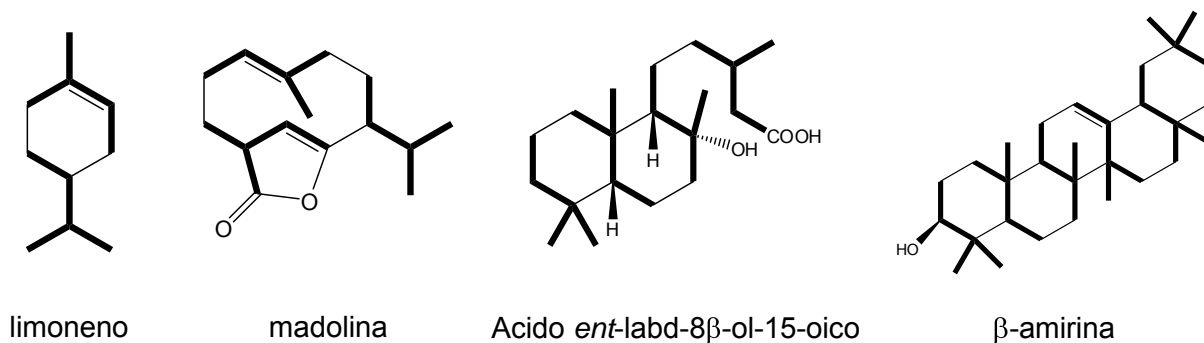


Figura 8. Tipos de terpenos en plantas del género *Aristolochia*

Los compuestos aromáticos aislados de plantas de este género se caracterizan por incluir dos o más ciclos en su estructura (figura 9).

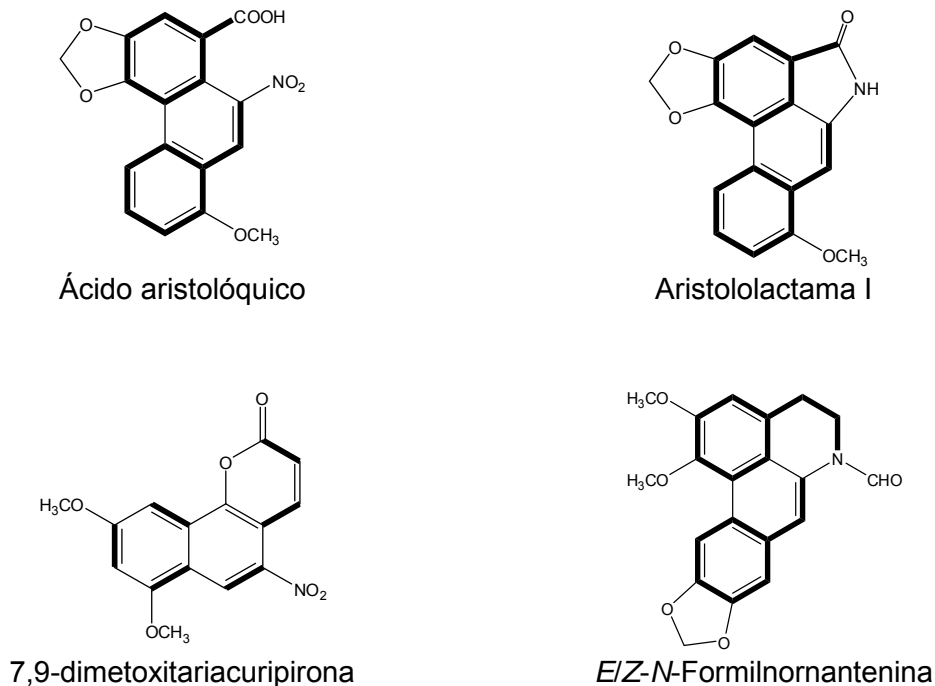


Figura 9. Tipos de compuestos aromáticos en plantas del género *Aristolochia* y sus bloques de construcción

3.5 *Aristolochia orbicularis* Duch.

Los estudios realizados sobre esta especie en realidad son pocos, en uno de ellos se describe la estructura histoquímica de la semilla.¹⁶ *Aristolochia orbicularis* Duch, es una hierba perenne, puberulenta a glabra. Hojas suborbiculares, emarginadas a redondeadas en el ápice, profundamente cordadas en la base, 2-7 cm de ancho, 3-9 cm de largo, suaves, envés finamente puberulento a glabro. Pseudoestípulas ausentes. Flores solitarias en axilas foliares, ebracteoladas, rectilíneas, verde-amarillentas y púrpura oscuro, el utrículo subsférico, 5 mm de largo, tubo recto, 4 mm de largo, limbo 1-lobado, linear, 4 mm de ancho, 3 cm de largo, subemarginado en el ápice. Ginostemo 6-lobado, 1.2 mm de largo, 1 mm de ancho, 6 anteras, equidistantes. Fruto elipsoide, 14 mm de largo, 11 mm de ancho, dehiscencia basipetal, septifraga. Semillas numerosas, 3 mm de ancho, 4 mm de largo, 0.2 mm. Habita zonas rocosas y bosques de México; se distribuye en Guerrero, México, Morelos, Nayarit, San Luis Potosí y Tamaulipas. Esta planta es fácilmente identificada por sus flores pequeñas, el limbo largo, linear y por su hábitat. Hinton registró el nombre nativo de “cuajo” (figura 10).²⁷



Raíces de *A. orbicularis*



Hojas, flores y fruto *A. orbicularis*

Figura 10. Aspectos morfológicos de *Aristolochia orbicularis* Duch.

Se tiende a confundir a *A. styoglossa* Pfeifer con *A. orbicularis* Duch., es muy difícil distinguirlas, por lo que se requiere de un estudio taxonómico que encuentre caracteres o evidencia taxonómica que a delimitarlas. Generalmente *A. styoglossa* se distingue por su cáliz ancho y espatulado, en

contraste con el cáliz más largo y lineal de *A. orbicularis*. *A. styoglossa* está más ampliamente distribuida en el rango del complejo *Orbicularis-Styoglossa*, que se encuentra en los estados de Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí.¹⁵ (figura 11).



Figura 11. Distribución de *Aristolochia orbicularis* Duch. en México

3.5.1 Antecedentes etnobotánicos de *Aristolochia orbicularis* Duch.

El único antecedente documentado es el uso de la raíz de esta planta para dolor estomacal y óseo en la región de Xochipala, Guerrero, donde crece abundantemente; sin embargo, se desconoce el modo de empleo.¹⁶ Mediante comunicación verbal, los miembros de la comunidad rural de Xochicalco, en el estado de Morelos, refieren su uso en el tratamiento de la diabetes y para bajar la presión.

3.5.2 Estudios químico-farmacológicos de *Aristolochia orbicularis* Duch.

A. aff. orbicularis solamente cuenta con un estudio químico, en el que se aisló el aceite esencial de la raíz y se evaluó su efecto repelente contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). De este aceite fueron identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y otros métodos espectroscópicos, aproximadamente cuarenta constituyentes. Algunas fracciones cromatográficas tuvieron mayor repelencia que el aceite total.²⁷

4. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial sistémica (HTAS) es un problema de salud pública a nivel mundial. En México la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 estimó que en el año 2007, aproximadamente 17 millones de adultos mayores de 20 años fueron portadores de HTAS.

En la actualidad, algunas comunidades indígenas siguen recurriendo a la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, entre ellas la HTAS, haciendo uso de plantas con propiedades medicinales, que representan en muchas ocasiones un recurso de supervivencia, ya que es frecuente que esta alternativa represente la única opción disponible para atender su salud. Una de las plantas comúnmente usadas con este fin es *Aristolochia orbicularis* Duch.

Aunque se han atribuido diferentes propiedades terapéuticas a *Aristolochia orbicularis*, no existe ninguna evidencia científica que soporte tal actividad y su potencial uso terapéutico. Por esta razón es importante el presente estudio químico-farmacológico, que evalúa la actividad antihipertensiva de la planta y valida su uso popular.

Si *Aristolochia orbicularis* es utilizada en la medicina tradicional mexicana como agente antihipertensivo, entonces debe contener algún o algunos constituyentes químicos que presenten esta propiedad farmacológica.

6.1 Objetivo general

Realizar el estudio biodirigido de *Aristolochia orbicularis* Duch., evaluando su actividad antihipertensiva, así como establecer la estructura molecular de sus constituyentes químicos.

6.2 Objetivos específicos

1. Obtener el extracto hexánico de la raíz de *Aristolochia orbicularis*.
2. Evaluar la actividad antihipertensiva en el extracto total.
3. Realizar la separación cromatográfica del extracto total en fracciones menos complejas que el extracto original.
4. Evaluar las fracciones obtenidas a partir del extracto original para determinar la actividad antihipertensiva.
5. Obtener constituyentes puros a partir de las fracciones.
6. Determinar la estructura molecular de los constituyentes puros aislados.
7. Identificar los constituyentes responsables de la actividad antihipertensiva mostrada por la planta.
8. Validar el uso popular de *Aristolochia orbicularis* como antihipertensiva en la medicina tradicional mexicana.

7.1 Recolección del material vegetal

Las raíces de *Aristolochia orbicularis* fueron recolectadas el día 14 de octubre de 2008 en Xochicalco, en el estado de Morelos por la M. en C. Patricia Álvarez Fitz, y fue determinado por la M. en C. Margarita Avilés y la M. en C. Macrina Fuentes. El sitio se localiza en los 18°48.383 norte, 99°17.6640 oeste; a una altitud de 1309 msnm, en el municipio de Temixco (figura 12). Se prepararon especímenes de herbario y fueron depositados en el Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia Morelos (INAHM). Su número de herbario es INAHM-2032.

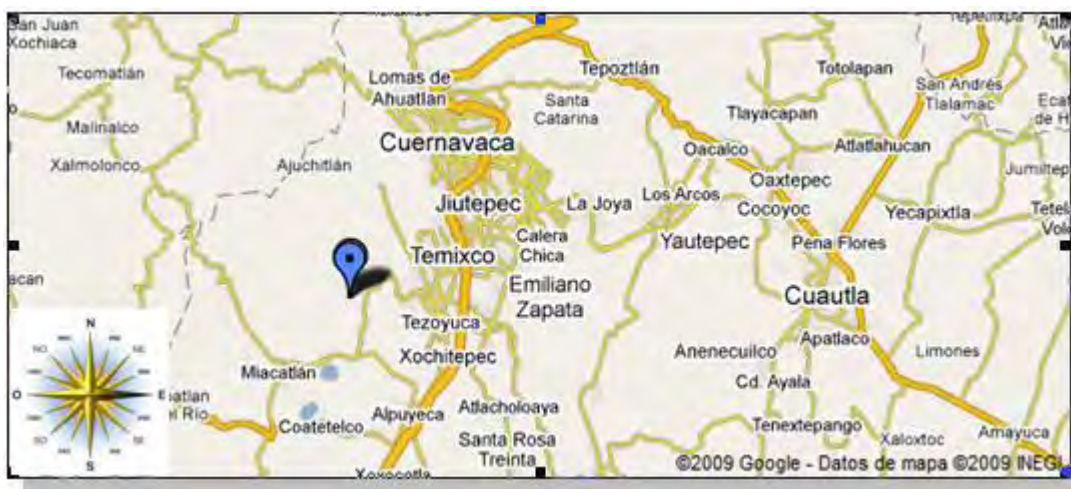


Figura 12. Localización del sitio de colecta de *Aristolochia orbicularis* Duch., en Xochicalco, municipio de Temixco, Morelos.

7.2 Obtención del extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch.

El material vegetal de *Aristolochia orbicularis* (raíces) se secó a temperatura ambiente y a la sombra durante 30 días. Posteriormente se pulverizó en un molino de martillos (THOMAS modelo 3383-L10). Se obtuvieron 670 g de material molido, que se envasaron para su

extracción en un matraz de 3 L. A partir de este material se obtuvo, mediante maceración, el extracto de *n*-hexano. El disolvente de extracción (maceración) se recuperó por destilación a presión reducida a una temperatura de 69°C, utilizando un rotaevaporador Büchi modelo R-115. Al final de este proceso se obtuvieron 28.4 g de extracto *n*-hexánico total.

7.3 Evaluación Farmacológica

La actividad vasorrelajante del extracto y fracciones de *Aristolochia orbicularis* fue evaluada en intervalo de concentración de 0.01-1000 µg/mL, distribuidos en 10 diluciones en ½ de logaritmo. La actividad se determinó en anillos de aorta de rata precontraídos con noradrenalina (NA) con y sin endotelio, utilizando la metodología previamente descrita por Estrada-Soto (2000)²⁹ y Hernández-Abreu *et al.* (2009)³⁰ y que se describe en los siguientes puntos:

7.3.1 Aislamiento de aorta

Se utilizaron ratas macho adultas de 250 a 300g de peso de la cepa Wistar, que fueron alimentadas *ad libitum* con libre acceso de agua. Los animales se sacrificaron por sobredosis en una cámara de éter etílico. Posteriormente se realizó una disección en su abdomen para aislar la aorta, la cual se liberó de tejido remanente evitando hacer algún daño al endotelio (cuando el experimento lo requería, fue necesario removerlo). La aorta se colocó en solución Ringer-Krebs, con la siguiente composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 2.5; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.026 y glucosa 11.4. La solución Ringer Krebs se preparó con agua destilada, a pH 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (19:1), a 37°C. La aorta aislada se cortó en segmentos de 3 a 5 mm.

7.3.2 Sistema de registro

Para determinar el efecto sobre la contracción inducida por NA en los anillos de aorta, los segmentos de ésta se colocaron en una cámara de incubación con 10 mL de solución Ringer-Krebs burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa al 5% de CO₂ en O₂ a 37°C (mantenida mediante un baño recirculador). En estas condiciones el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor de fuerza Grass Modelo FT 03, el cual registra constantemente las señales mecánicas de las contracciones y las envía a un polígrafo Grass modelo 7D de 6 canales.

7.3.3 Evaluación de la actividad antihipertensiva del extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch.

Para estabilizar el tejido en las condiciones *in vitro*, cada segmento del mismo se incubó y mantuvo en solución Ringer-Krebs durante un periodo de 30 minutos, con una tensión inicial aproximada de 3 g. Posteriormente, se continuó con un periodo de sensibilización del tejido con NA 1x10⁻⁷M, y después de 15 minutos, cada tejido fue lavado con solución Ringer-Krebs (todo esto por triplicado); en la última estimulación se agregó carbacol (1x10⁻⁶M) para corroborar la presencia o ausencia de endotelio.

Para determinar la actividad antihipertensiva del extracto *n*-hexánico, el tejido fue precontraído con una concentración 1x10⁻⁷M de NA para los anillos con y sin endotelio. El tono muscular fue calculado con el programa Acknowledge (BIOPAC, CO., USA). Finalmente, se construyeron curvas acumulativas concentración-respuesta de las muestras de prueba, con el programa Origin 6.0, para determinar el efecto relajante demostrado después de aplicar cada muestra.

Como controles positivos se utilizó carbacol (agonista competitivo de acetilcolina) y nifedipina (bloqueador irreversible de canales de calcio) en presencia y ausencia de endotelio.

Para evaluar las fracciones se siguió el mismo procedimiento hasta la sensibilización. A continuación se agregó la $CI_{50} = 122.47 \mu\text{g/mL}$ (calculada del gráfico concentración respuesta), y al cabo de 15 minutos, el tejido fue precontraído con NA ($1 \times 10^{-7} \text{M}$). Se observa la actividad que presentan las fracciones en un lapso de 15 minutos y se grafican con el programa Origin 6.0.

7.4 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antihipertensiva son expresados como la media de 6 animales \pm el error estándar de la media (EEM). Las curvas concentración-respuesta (CCR) fueron elaboradas en el programa Origin 6.0. El análisis estadístico fue realizado en el programa SPSS 10.0, estableciendo una significancia estadística entre las diferencias de las medias de $p < 0.05$ mediante ANOVA y la prueba de Tukey.

7.5 Estudio fitoquímico de *Aristolochia orbicularis* Duch.

Para obtener los constituyentes bioactivos de *A. orbicularis*, el extracto *n*-hexánico (28.4 g adsorbidos en 28 g de gel de sílice) fue sometido a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta (fase normal, columna de vidrio de 5.5 cm de diámetro interno). El procedimiento general para purificar un extracto vegetal por cromatografía en columna abierta es:

1. El extracto a resolver se analiza en cromatografía en placa fina (CCF) con diferentes fases móviles hasta encontrar aquella en la que se observa la mayor separación de sus constituyentes y en la que el R_f del componente menos polar sea de 0.5 (esta será la fase móvil inicial para el proceso de cromatografía en columna).
2. Se calcula la cantidad de fase estacionaria a utilizar (gel de sílice), la cual es función de la cantidad de extracto que se desea purificar. Para gel de sílice 0.063-0.200 mm Kieselgel 60, esta cantidad se calcula multiplicando la cantidad de extracto en gramos por 30.
3. La gel de sílice calculada en el punto número 2 se suspende en el disolvente que se usará como fase móvil inicial del proceso (elegido en el punto número 1).
4. La suspensión de fase estacionaria en fase móvil se adiciona en una columna de vidrio con llave de teflón, en la que se ha colocado un algodón en la parte final a modo de tapón. Esta columna debe tener el diámetro interno (di) y altura adecuados para empacar en ella toda la gel de sílice calculada.
5. Se adiciona el extracto a la columna, con ayuda de una pipeta Pasteur si es líquido o adsorbido sobre gel de sílice si es sólido. El proceso de adsorción consiste en solubilizar el extracto en la menor cantidad posible de aquel disolvente que permita su disolución total, y adicionarle la misma cantidad que su peso de gel de sílice de tamaño de partícula 60:230; el extracto se deja secar sobre esta gel de sílice, moviéndolo continuamente con una espátula a fin de lograr una distribución homogénea sobre las partículas de la misma.
6. Después de la adición del extracto a la columna cromatográfica se adiciona sulfato de sodio anhidro (1.5 cm de altura), que tiene como función atrapar la posible humedad contenida en la fase móvil.

7. Sobre la capa de sulfato de sodio anhidro se coloca una capa de algodón.
8. Se inicia la elución de la columna con la fase móvil elegida, obteniendo fracciones del volumen variable dependiente de la cantidad del extracto a purificar.
9. Cada fracción obtenida del proceso cromatográfico se analiza mediante CCF (placas de Kieselgel de base de aluminio de 4 x 5 cm y 1 mm de espesor) con el propósito de establecer el número de compuestos que contienen y su similitud con el resto de las fracciones obtenidas. Para la visualización de los compuestos en las mismas se utilizan como reveladores una lámpara de luz ultravioleta (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm) y solución de sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ 2N.
10. Las fracciones similares se reúnen en grupos para obtener extractos secundarios, que serán sometidos a sucesivas columnas cromatográficas mediante este mismo procedimiento, hasta la obtención de los compuestos puros que contienen.

De esta manera, el proceso cromatográfico primario del extracto de *n*-hexano de *Aristolochia orbicularis* se inicio en una columna de vidrio empacada con 568 g de gel de sílice. La fase móvil inicial fue diclorometano 100%, y se fue aumentando la polaridad gradualmente mediante adiciones de acetato de etilo: CH₂Cl₂-AcOEt (95:5, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 40:60), finalmente la columna se lavó con metanol 100%. Durante todo el proceso cromatográfico se obtuvieron fracciones de 150 mL, que fueron concentradas en un rotaevaporador (Büchi, modelo R115) para recuperar y reciclar la fase móvil. La composición de cada fracción obtenida fue monitoreada mediante CCF. Las fracciones obtenidas se reunieron de acuerdo a la similitud cromatográfica observada en este análisis. Este fraccionamiento primario, y el análisis de las fracciones obtenidas del mismo condujeron a la formación de catorce grupos de fracciones (cuadro 2, página 31).

Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis*

Grupo	Fase móvil	Proporción	Fracción
1	CH ₂ Cl ₂	100%	1-2
2	CH ₂ Cl ₂	100%	3-4
3	CH ₂ Cl ₂	100%	5-6
4	CH ₂ Cl ₂	100%	7-8
5	CH ₂ Cl ₂	100%	9-18
6	CH ₂ Cl ₂	100%	19-45
7	CH ₂ Cl ₂	100%	46-89
	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	95:5	90-100
8	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	90:10	101-114
	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	80:20	115-124
9	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	80:20	125-155
	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	75:25	156-167
10	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	70:30	168-175
11	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	60:40	176-222
12	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	40:60	223-270
13	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	20:80	271-303
14	Metanol	100%	304-312

Los 14 grupos descritos en el cuadro 2 fueron analizados mediante CCF, demostrando que 13 y 14 no contenían ningún compuesto homogéneo, por lo que ya no fueron analizadas. La actividad antihipertensiva de los grupos 2-12 fue evaluada como se describe en la sección 7.3 (*vide supra*). El análisis de la composición química y de los resultados de esta actividad, fueron los criterios utilizados para decidir reagrupar las fracciones obtenidas como se indica en el cuadro 3. Con base en ella se describirán los métodos de purificación empleados para la obtención de sus compuestos puros:

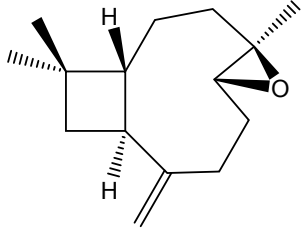
Cuadro 3. Grupos de fracciones que fueron analizados químicamente

Grupo	Fase móvil	Proporción	Fracción
1	CH ₂ Cl ₂	100%	1-2
2-4	CH ₂ Cl ₂	100%	3-8
5	CH ₂ Cl ₂	100%	9-18
6	CH ₂ Cl ₂	100%	19-45
7-8	CH ₂ Cl ₂	100%	46-124
	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	80:20	
9-10	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	80:20 a 70:30	125-175
11	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	60:40	176-222
12	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	40:60	223-270

Grupo 1. Corresponde a 685 mg de residuo obtenido a partir de las fracciones 1 y 2 del proceso cromatográfico primario, las que fueron eluidas con CH_2Cl_2 100%. Estas fracciones se caracterizaron por presentar una consistencia aceitosa de color amarillo intenso, y poseer un olor penetrante y muy agradable. Debido a que presentaba las características clásicas de un aceite esencial, se decidió llevar a cabo su análisis y caracterización mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890 acoplado a un detector selectivo de masas marca Agilent modelo 5973, con un voltaje de ionización de 70 eV y modo de impacto electrónico (IE). La composición química de este aceite se indica en el cuadro 9 (ver sección de resultados y discusión, página 45).

Grupos 2-4. Estuvieron constituidos por las fracciones 3-8 del proceso cromatográfico primario. Su análisis en CCF indica que este grupo de fracciones contiene varios constituyentes minoritarios que se encontraban presentes en el grupo 1 (por lo que ya no se les dio importancia), además de un compuesto mayoritario, cuya purificación se constituyó como el objetivo de este proceso cromatográfico. Para ello, 4.0 g del residuo aceitoso que se obtuvo de las mismas fueron sometidos a proceso cromatográfico en columna abierta. El residuo fue aplicado con ayuda de una pipeta Pasteur (no fue necesario adsorberlo por tratarse de un aceite) en una columna de vidrio de 3 cm de diámetro interno empacada con 120 g de gel de sílice (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck). La columna se eluyó con una mezcla de *n*-hexano- CH_2Cl_2 (7:3). A lo largo de todo este proceso se obtuvieron un total de 92 fracciones de 100 mL. A partir de la fracción 16 y hasta la 48 fue posible obtener epóxido de cariofileno (**2**) (cuadro 4, página 33) como un aceite incoloro de olor muy agradable, el cual fue identificado mediante resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono trece (RMN ^{13}C), y por comparación en CCF con una muestra auténtica del mismo. Se utilizó un equipo Varian de 200 megahertz (MHz) y Varian-Unity de 400 MHz para ^1H , mientras que para ^{13}C a 50 MHz y 100 MHz respectivamente, las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3).

Cuadro 4. Columna cromatográfica del grupo 2

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	1-15	----	----
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	16-48	Epóxido de cariofileno (2)	
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	49-92	Resinas	----

Grupo 5. Es un residuo aceitoso de color amarillo intenso, con un peso de 4.9 g, el cual fue obtenido a partir de las fracciones 9-18 del proceso primario. Este se aplicó directamente en una columna cromatografía abierta empacada con 90 g de gel de sílice (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck) suspendida en *n*-hexano-CH₂Cl₂ (7:3), mezcla que fue utilizada como sistema eluyente. A lo largo de todo este proceso de purificación se obtuvieron 186 fracciones de 50 mL. Las fracciones 28-80 incluían tres compuestos, las fracciones 81-100 contenían dos compuestos, y finalmente las fracciones 101-127 contenían un componente más (cuadro 5). Debido a la dificultad que se presentó para separar los constituyentes de estas fracciones, se realizaron procesos cromatográficos adicionales.

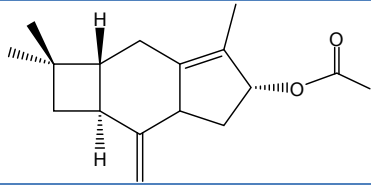
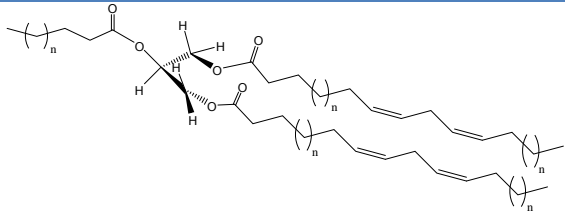
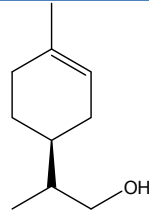
Cuadro 5. Columna cromatográfica del grupo 5

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	1-27	----
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	28-80	acetato de cariofilenol (3) triacilglicérido (4) <i>p</i> -mentanol (5)
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	81-100	triacilglicérido (4) ácido ferúlico (6)
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	101-127	ácido ferúlico (6)
Hexano-CH ₂ Cl ₂	6:4	128-182	----
CH ₂ Cl ₂	100%	183-186	Resinas

Purificación de acetato de cariofilenol (3), triacilglicérido (4) y *p*-mentanol (5) a partir de la fracción 28-80 del proceso cromatográfico del grupo 5.

Se empaquetó una columna con 72g de sílica gel (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck) mezclada con hexano-diclorometano 9:1. No fue necesario adsorber el extracto (2.38 g) por tratarse de un aceite, el cual se aplicó directamente sobre la gel de sílice húmeda. Se utilizó como fase móvil inicial hexano-diclorometano 9:1. Se obtuvieron 262 fracciones, las cuales fueron reunidas por similitud cromatográfica (CCF). Las fracciones 112-131 mostraron un solo compuesto en cromatografía en capa fina, que fue identificado como acetato de cariofilenol (3), en las fracciones 132-165 eluyó triacilglicérido (4), y finalmente, en las fracciones 156-165 se aisló *p*-mentanol (5) (cuadro 5.1).

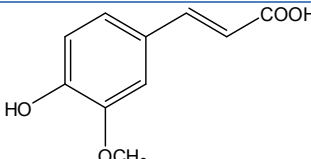
Cuadro 5.1. Columna cromatográfica de las fracciones 28-80 del grupo 5

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	1-111	----	----
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	112-131	acetato de cariofilenol (3)	
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	132-165	Triacilglicérido (4)	
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	166-183	----	----
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	184-191	<i>p</i> -mentanol (5)	
Hexano- CH ₂ Cl ₂	7:3	192-262	----	----

Purificación de acetato de triacilglicérido (4) y ácido ferúlico (6) a partir de la fracción 81-100 del proceso cromatográfico del grupo 5.

En las fracciones 81-100 del proceso cromatográfico del grupo 5 se formaron sólidos. Estos se filtraron y se lavaron con *n*-hexano. Su análisis en RMN y su comparación con una muestra autentica en cromatografía en capa fina permitió identificarlo como ácido ferúlico (6). Con las aguas madres resultantes de la filtración (aceite) se montó la siguiente columna cromatográfica. Esta se empaquetó con 7 g de gel de sílice (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck) mezclada con *n*-hexano-diclorometano 8:2. 0.219 g del aceite se aplicaron directamente en la gel de sílice húmeda. Como fase móvil inicial se uso la mezcla hexano-diclorometano 8:2. Se obtuvieron 85 fracciones. En las fracciones 27-60 eluyó un compuesto puro, que fue identificado como triacilglicérido (4), y en las fracciones 61-85, se obtuvo nuevamente ácido ferúlico (6). El cuadro 5.2 resume este proceso cromatográfico.

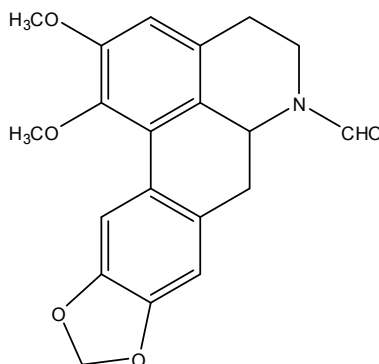
Cuadro 5.2. Columna cromatográfica de las aguas madres de las fracciones 28-80 del grupo 5

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
Hexano-CH ₂ Cl ₂	8:2	1-26	----	----
		27-60	acetato de Triacilglicérido	(4)
		61-85	ácido ferúlico (6)	

Purificación de ácido ferúlico (6) a partir de la fracción 101-127 del proceso cromatográfico del grupo 5.

Los sólidos que se formaron en las fracciones 101-127 del proceso cromatográfico del grupo 5 se filtraron y lavaron con *n*-hexano. Su análisis en RMN y comparación con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina permitió identificarlo como ácido ferúlico (6).

Grupo 6. El residuo de la reunión 6 se lavó con 1:1 hexano-CH₂Cl₂ para separar los cristales [*N*-formilnornanteína (7)] de las aguas madres. Las aguas madres (2.5 g) se analizaron mediante cromatografía en capa fina, mostrando contener exclusivamente al compuesto (7) por lo que no fueron analizadas posteriormente.

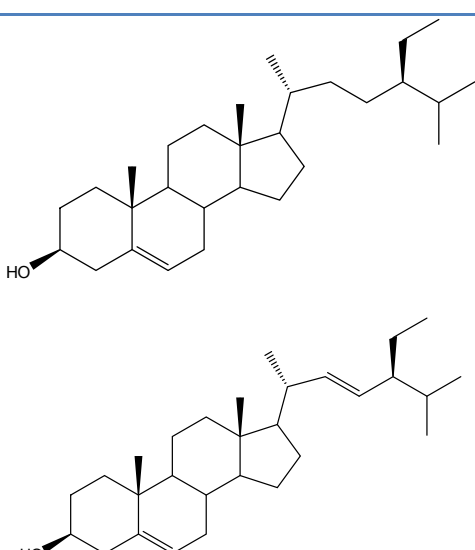
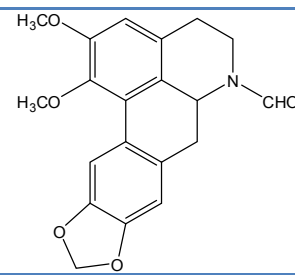


7

Grupo 7 y 8. *A. orbicularis* demostró tener una composición química rica en compuestos de baja polaridad, por lo que las fracciones de polaridad intermedia, incluidas en estos dos grupos de fracciones, contuvieron no solo pocos constituyentes químicos, sino que estos fueron obtenidos en baja cantidad. Los 996 mg del residuo contenido en estas fracciones se disolvieron en la mínima cantidad posible de CH₂Cl₂ para adsorberlos sobre 1 g de gel de sílice

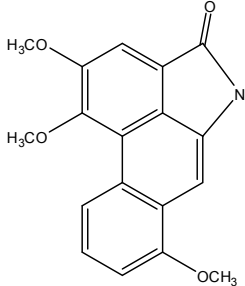
(0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck). El extracto adsorbido fue aplicado en una columna cromatográfica de 1 cm de diámetro con 9 pulgadas de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck), y se humedeció con hexano-AcOEt 85:15. Se aplicó la fase móvil inicial hexano-AcOEt 85:15. Se obtuvieron 278 fracciones de 5 mL. En las fracciones 60-197 se formaron cristales, que se separaron de las aguas madres y se etiquetaron para su análisis en RMN, lo que confirmó su identidad como la mezcla de los esteroides β -sitosterol (**8**) y estigmasterol (**9**). Las fracciones 215-268 permitieron obtener un poco más de *N*-formilnornanteína (**7**) (cuadro 6).

Cuadro 6. Columna cromatográfica de los grupos 7 y 8

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
Hexano- CH ₂ Cl ₂	85:15	1-59	----	----
Hexano- CH ₂ Cl ₂	8:2	60-197	β -sitosterol (8) estigmasterol (9)	
		198-214	----	----
		215-268	<i>N</i> -formilnornanteína (7)	
Acetona	100%	269-278	Resinas	----

Grupo 9 y 10. El análisis por cromatografía en placa fina del residuo obtenido de estas fracciones indicó la presencia de tres compuestos, los dos de menor polaridad como minoritarios y el más polar como el componente principal. Para su purificación se empaquetó una columna de 1.8 cm de diámetro con 9 pulgadas de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck) y se humedeció con CH₂Cl₂-acetona 98:2. Los 920 mg del extracto se disolvieron en la mínima cantidad posible de CH₂Cl₂ para adsorberlo con 920 mg de sílica gel (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck), y una vez adsorbidos se aplicaron en la columna. A lo largo de todo el proceso cromatográfico se utilizó la fase móvil CH₂Cl₂-acetona 98:2. Como resultado de su desarrollo se obtuvieron 63 fracciones de 5 mL. Las fracciones 5-13 permitieron aislar nuevamente la mezcla de esteroides β-sitosterol (**8**) y estigmasterol (**9**), y en las fracciones 14-17 se obtuvo una cantidad adicional de *N*-formilnornanteína (**7**). Finalmente, la Aristololactama B1 (**10**) se obtuvo en forma pura en las fracciones 18-33 y en forma impura en las fracciones 34-62 (cuadro7).

Cuadro 7. Columna cromatográfica de los grupos 9 y 10

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
CH ₂ Cl ₂ - acetona	98:2	1-4	---	---
		5-13	β-sitosterol estigmasterol	(8) (9)
		14-17	<i>N</i> -formilnornanteína	(7)
		18-33	Aristololactama B1 (10) pura	
		34-62	Aristololactama B1 (10) impura	
Acetona	100%	63-66	Resinas	---

Columna cromatográfica de la fracción 34-62 obtenida del proceso cromatográfico de los grupos 9 y 10.

En este grupo de fracciones se formaron cristales de color amarillo-naranja, los cuales se lavaron con *n*-hexano, recuperándose las aguas madres. El análisis espectroscópico mediante RMN de estos cristales y la comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura permitió identificarlos como Aristololactama B1.

Con las aguas madres de dicha fracción se montó una columna de 1 cm de diámetro, que se empaquetó con 9 pulgadas de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck), y se humedeció con hexano-acetona 8:2. 191 mg de aceite se aplicó directamente sobre la gel de sílice húmeda utilizándose hexano-acetona 8:2 como fase móvil inicial. Se obtuvieron 16 fracciones de 5 mL como se indica en el cuadro 7.1.

Cuadro 7.1. Columna cromatográfica de las fracciones 34-62 de los grupos 9 y 10

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
Hexano- acetona	8:2	1-5	----	----
		6-12	Aristololactama B1 (10)	
		13-16	----	----

Grupo 11. Se empaquetó una columna de 1 cm de diámetro con 9 pulgadas de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck) y se humedeció con CH₂Cl₂-AcOEt 9:1. 729 mg del extracto contenido en las fracciones 176-210 del proceso cromatográfico inicial se disolvieron en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y se adsorbieron con 729 mg de sílica gel (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck). Una vez adsorbidos se vertieron en la columna cromatográfica, utilizándose CH₂Cl₂-AcOEt 9:1

como fase móvil inicial. Se obtuvieron 136 fracciones de 5 mL, las cuales fueron reunidas como se indica en el cuadro 8.

Cuadro 8. Columna cromatográfica de las fracciones 34-62 de los grupos 9 y 10

Fase móvil	Proporción	Fracción	Compuesto	Estructura
	9:1	1-105	----	----
Hexano- acetona	85:15	106-121	Aristolactama B1 (10)	
	7:3	122-134	----	----

Grupo 12. Las fracciones contenidas en este grupo fueron analizadas mediante CCF. Este análisis permitió demostrar que contenían aristolactama B1 como único componente homogéneo, acompañado de una gran cantidad de colorante y resina. La aristolactama B1 contenida en el mismo fue obtenida mediante sucesivos procesos de recristalización fraccionada.

Como se indicó anteriormente, los **grupos 13 y 14** no fueron analizados ya que no mostraron constituyentes químicos homogéneos en el análisis por cromatografía en capa fina.

8.1 Estudio fitoquímico biodirigido por la actividad antihipertensiva de *Aristolochia orbicularis* Duch. (Elucidación estructural de los constituyentes puros)

Las raíces de *Aristolochia orbicularis* Duch. son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la hipertensión y la diabetes. A pesar de ello, hasta ahora no existen estudios científicos sobre cuál es la composición química de la especie, y menos aun aquellos que permitan establecer las bases moleculares que aseguren a cual o a cuales de sus componentes químicos pueden atribuirse estas actividades. El presente trabajo de investigación se inició con el propósito de contribuir a esclarecer estos aspectos, y pretende establecer la composición química de esta especie de una manera biodirigida, mediante la actividad antihipertensiva, la cual correlaciona de manera directa con la actividad vasorrelajante. En la figura 13 se muestran los resultados de esta actividad para el extracto *n*-hexánico; la que se determinó en anillos de aorta de rata con y sin endotelio precontraídos con noradrenalina (página 42). Se hizo de esta manera con el fin de conocer cuál es el comportamiento del extracto y saber si es dependiente de la presencia de endotelio. En esta figura el eje X expresa el porcentaje de contracción de los anillos de aorta, tanto del extracto como de los controles a diferentes concentraciones, la cual se encuentra en el eje Y. Los controles positivos en presencia y ausencia de endotelio fueron carbacol (análogo de acetilcolina) y nifedipina (antagonista de canales de calcio), respectivamente. Cabe mencionar que muchas sustancias vasodilatadoras comunes, como la acetilcolina, la histamina, la bradicinina y otros péptidos, producen este efecto solo en los vasos que poseen un endotelio intacto. El efecto relajante desaparece si se elimina el endotelio por frotación suave de la parte interna del vaso.³¹

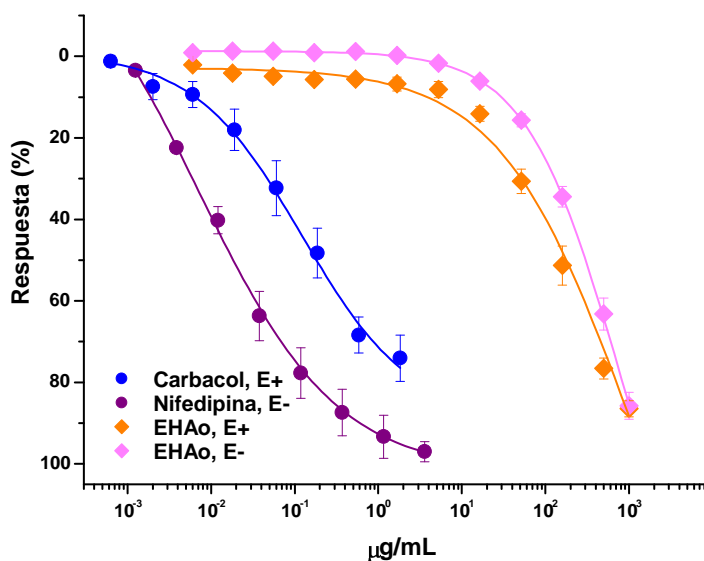


Figura 13. Efecto vasorrelajante inducido por el extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch., carbacol y nifedipina en anillos de aorta de rata

El extracto *n*-hexánico mostró un efecto vasorrelajante significativo, dependiente de la concentración y parcialmente dependiente de endotelio. Este efecto puede estar relacionado con la participación de las células endoteliales, que liberan prostaciclina y óxido nítrico, que actúan como vasodilatadores y que pueden facilitar el efecto vasorrelajante actuando sinérgicamente con el extracto. La $CI_{50} = 122.47 \mu\text{g/mL}$, fue obtenida extrapolando los datos de la curva concentración-respuesta y se utilizó para evaluar los grupos de fracciones.

Una vez demostrada la actividad antihipertensiva del extracto *n*-hexánico, se procedió a la purificación de sus constituyentes a partir de 28.4 g del mismo. Esta se inició mediante un fraccionamiento primario en columna cromatográfica abierta. La columna se empaquetó con 568 g de gel de sílice (0.063-0.200 mm Kieselgel 60 Merck) humedecida con diclorometano (ver sección de material y métodos, página 28). En este fraccionamiento primario, el análisis mediante cromatografía en placa fina de las fracciones obtenidas del mismo, y los datos de su actividad vasorrelajante condujeron a catorce grupos de fracciones (cuadro 2, página 31).

Sólo se evaluaron las fracciones 2-12, debido a la similitud que el grupo 1 mostró con el grupo 2 en su análisis mediante cromatografía en capa fina. La figura 14 muestra los resultados de esta evaluación. El eje X indica la contracción del músculo y el eje Y la respuesta de cada fracción, el control positivo solo fue contraído con $NA\ 1 \times 10^{-7}$. Las fracciones que muestran los niveles más bajos de contracción son aquellas que tuvieron mejor actividad vasorrelajante.

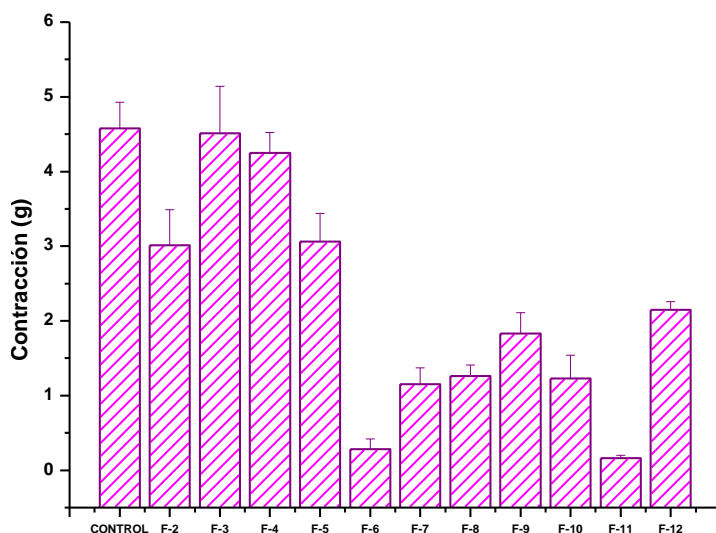


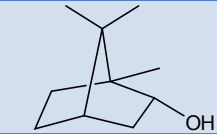
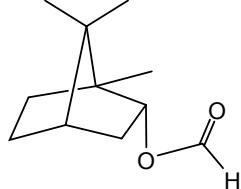
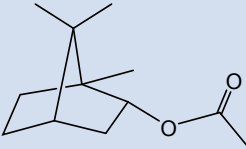
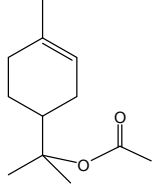
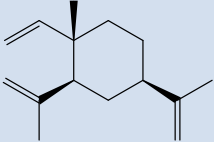
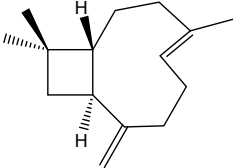
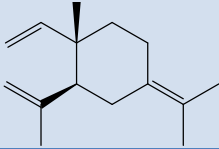
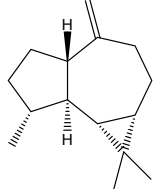
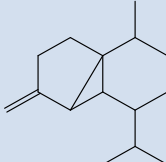
Figura 14. Efecto vasorrelajante inducido por los grupos 2-12 en anillos de aorta de rata

Como puede observarse en la figura 14, los grupos 2 a 5 tienen actividad nula a casi nula, mientras que, los grupos 6 a 11 son los de mayor actividad. La comparación de la magnitud de esta actividad, así como de la composición química de cada fracción determinada mediante cromatografía en capa fina, fueron los criterios que permitieron concluir sobre la conveniencia de reunir los grupos 2-4, 7-8 y 9-10 para continuar con su estudio químico biodirigido. De esta manera, solo se describirán ocho procesos de purificación.

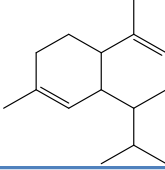
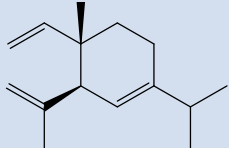
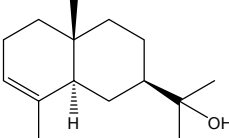
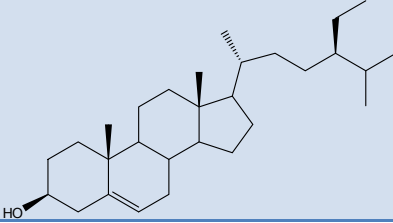
Análisis del grupo 1 (fracciones 1-2) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Las fracciones 1-2 del proceso cromatográfico inicial (grupo 1) estuvieron constituidas por un aceite esencial incoloro, de olor muy fuerte y agradable. La técnica de elección para el análisis de aceites esenciales, es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Esta técnica consiste en desarrollar un método cromatográfico adecuado que permita la separación del mayor número de los constituyentes presentes en la muestra, los que serán detectados y analizados por un espectrómetro de masas. La comparación de los tiempos de retención y del patrón de fragmentación para cada componente analizado, con los de la biblioteca incluida en el equipo, son los criterios utilizados para la identificación de los compuestos. De esta manera la composición química de este aceite esencial se indica en el cuadro 9 (página 45).

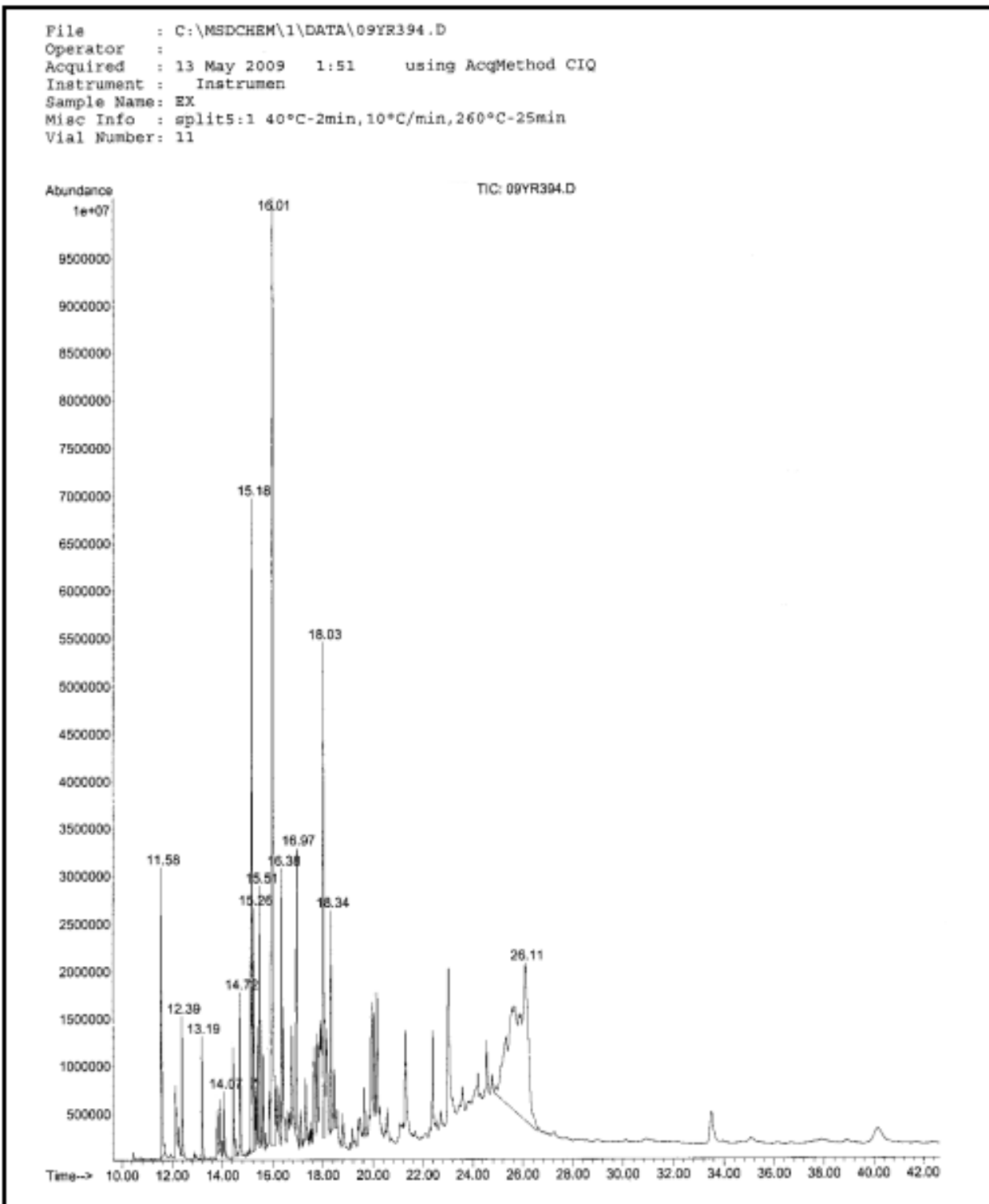
Cuadro 9. Composición química del aceite esencial del grupo 1 de *Aristolochia orbicularis*

1	Compuesto	Estructura	Tiempo de retención (min)
1	Borneol		11.58
2	Formato de isoborneilo		12.39
3	Acetato de borneilo		13.19
4	Acetato de α -terpineilo		14.07
5	β -Elemeno		14.72
6	β -Cariofileno		15.18
7	γ -Elemeno		15.26
8	β -Aromadendreno		15.51
9	β -Cubebeno		16.01

Continúa cuadro 9

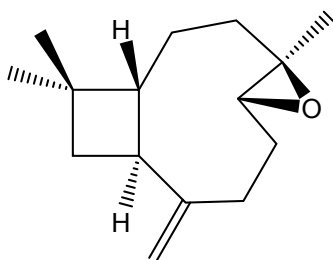
10	α -Cadinano		16.38
11	δ -Elemeno		16.97
12	β -Eudesmol		18.03
13	β -Sitosterol		26.11

La mayoría de los componentes del aceite esencial de este extracto (cromatograma, página 47) han sido identificados previamente como componentes de aceites esenciales de otras especies de *Aristolochia*. Por ejemplo, el borneol ha sido aislado del aceite esencial de *Aristolochia asclepiadifolia*, *A. brevipes*, *A. debilis*, *A. elegans*, *A. heterophylla*, *A. mollissima*, *A. ovalifolia*, *A. reticulata* y *A. zenkeri*; el acetato de borneilo se encontró en *A. longa* y *A. debilis*; el formato de isborneilo se ha encontrado en el extracto de *A. argentina* y *A. gihertii*; el acetato de α -terpineilo se ha identificado en *A. argentina*; los β -, γ - y δ -elemenos, así como el β -cariofileno son conocidos constituyentes de los aceites esenciales de *A. acutifolia*, *A. argentina*, *A. brevipes*, *A. chilensis*, *A. debilis*, *A. elegans*, entre otras; y el β -aromadendreno se localizó en *A. chilensis*. Finalmente, el β -cubebeno, el α -cadinano y el β -eudesmol son componentes del aceite esencial de *A. orbicularis* que no han sido descubiertos en especies de este género, sin embargo, estos tres compuestos comparten el mismo esqueleto fundamental que otros constituyentes aislados de las mismas.¹⁹ Como puede observarse en el cromatograma, el β -cariofileno, el β -cubebeno, y β -eudesmol (tiempo de retención: 15.18, 16.01 y 18.03, respectivamente) son los tres constituyentes mayoritarios del aceite esencial.

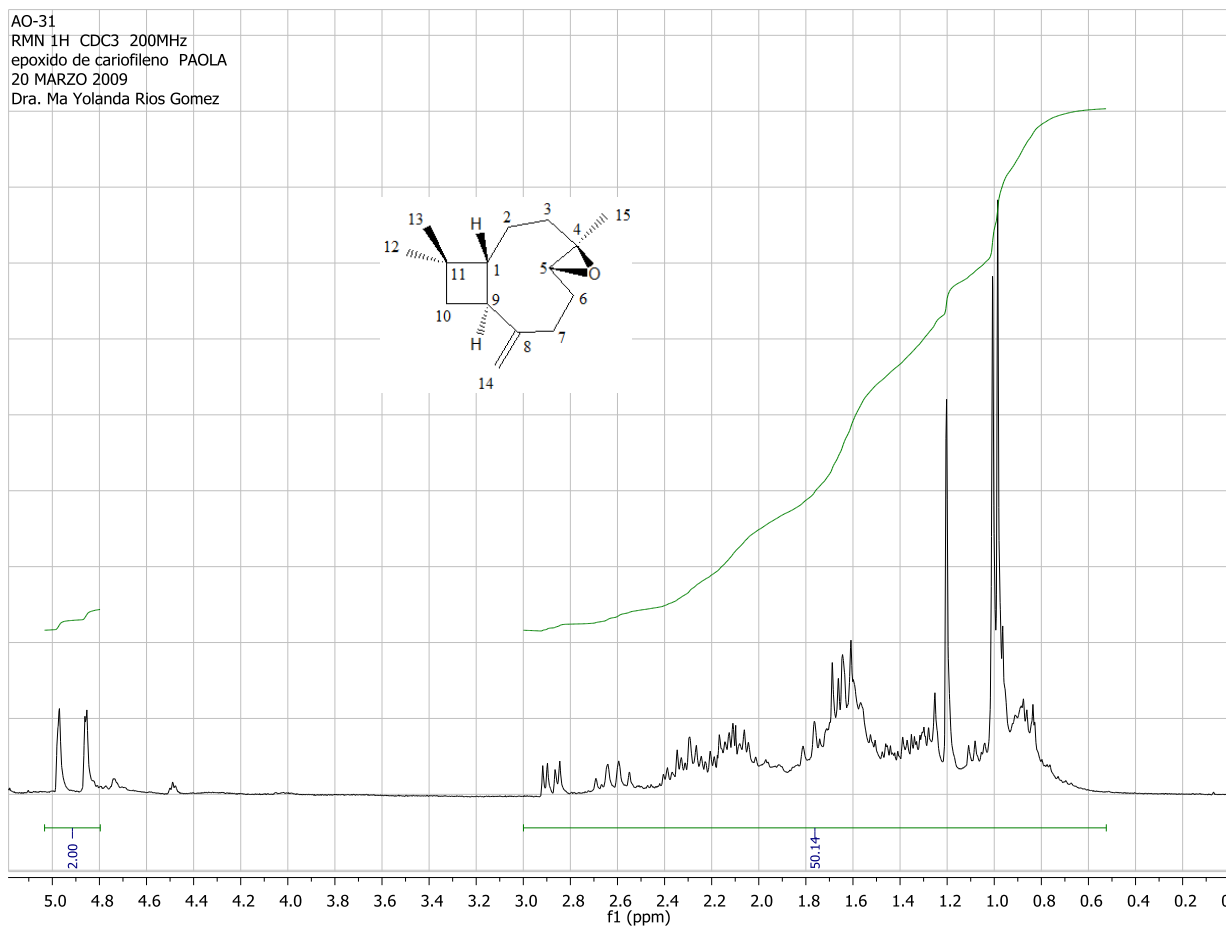
Cromatograma del aceite esencial de *Aristolochia orbicularis*

Columna cromatográfica de los grupos 2-4 (fracciones 3-8, cuadro 3 de la sección de material y métodos, página 31)

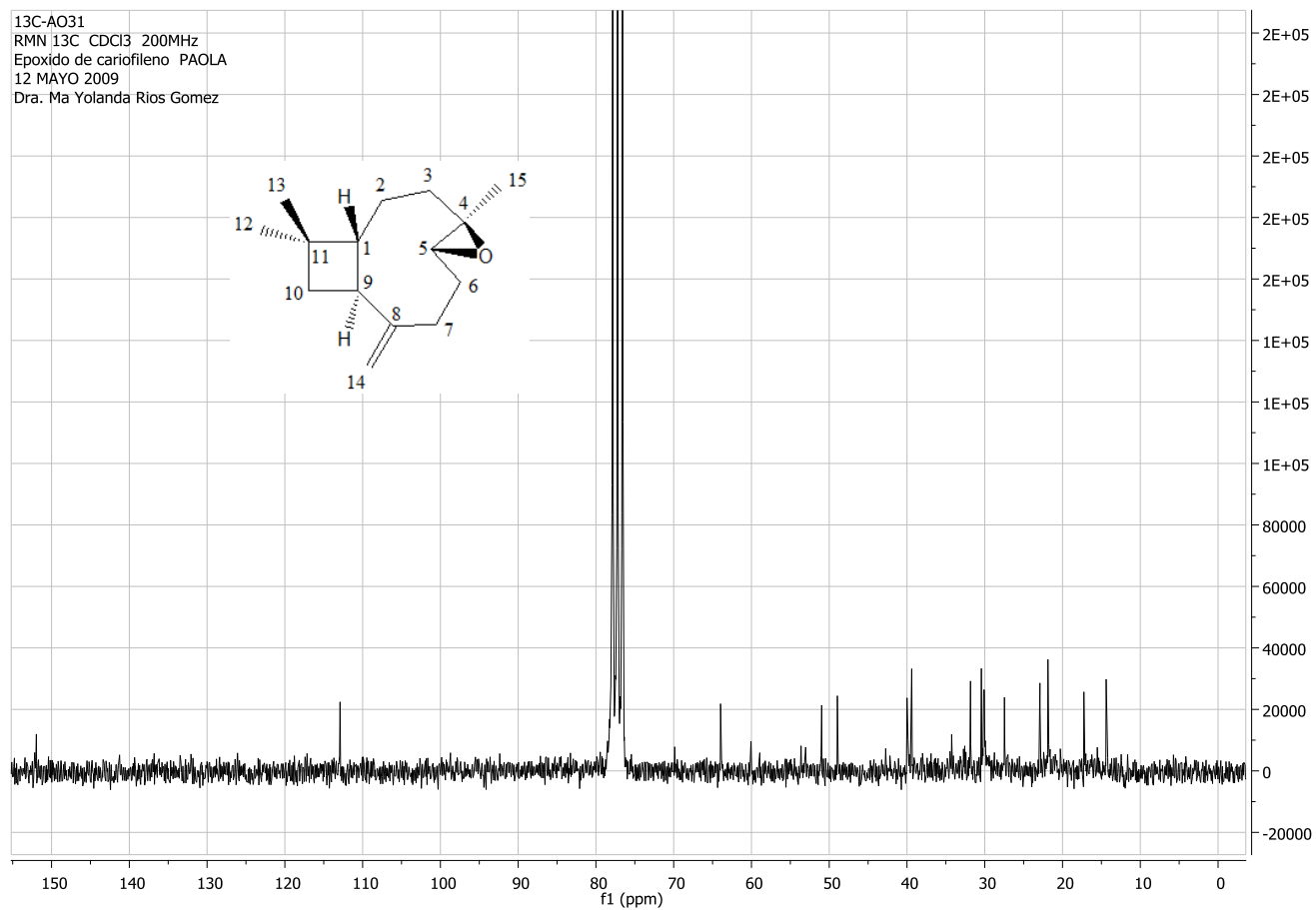
El proceso de purificación del compuesto mayoritario presente en los 4 g de residuo contenido en las fracciones que conforman los grupos 2-4 se llevó a cabo como se indica en el cuadro 4 (página 33). Su análisis estructural mediante RMN, y los datos obtenidos del mismo fueron comparados con los reportados en la literatura, lo que permitió identificarlo como epóxido de cariofileno.³² La identidad de este compuesto fue corroborada mediante su comparación en CCF con una muestra auténtica (2) del mismo.



Epóxido de cariofileno (muestra auténtica, 2)



Espectro 1. RMN ¹H de epóxido de cariofileno (2)



Espectro 2. RMN ¹³C de epóxido de cariofileno (2)

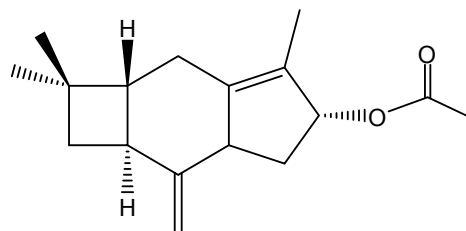
El epóxido de cariofileno ha sido aislado en otras especies de *Aristolochia*, entre ellas podemos mencionar a *A. acutifolia*, *A. elegans*, *A. indica*, *A. longa*, *A. melanoglasa* y *A. peltato-deltoidea*.³²

Columna cromatográfica del grupo 5 (fracciones 9-18, cuadro 5 de la sección de material y métodos, página 33).

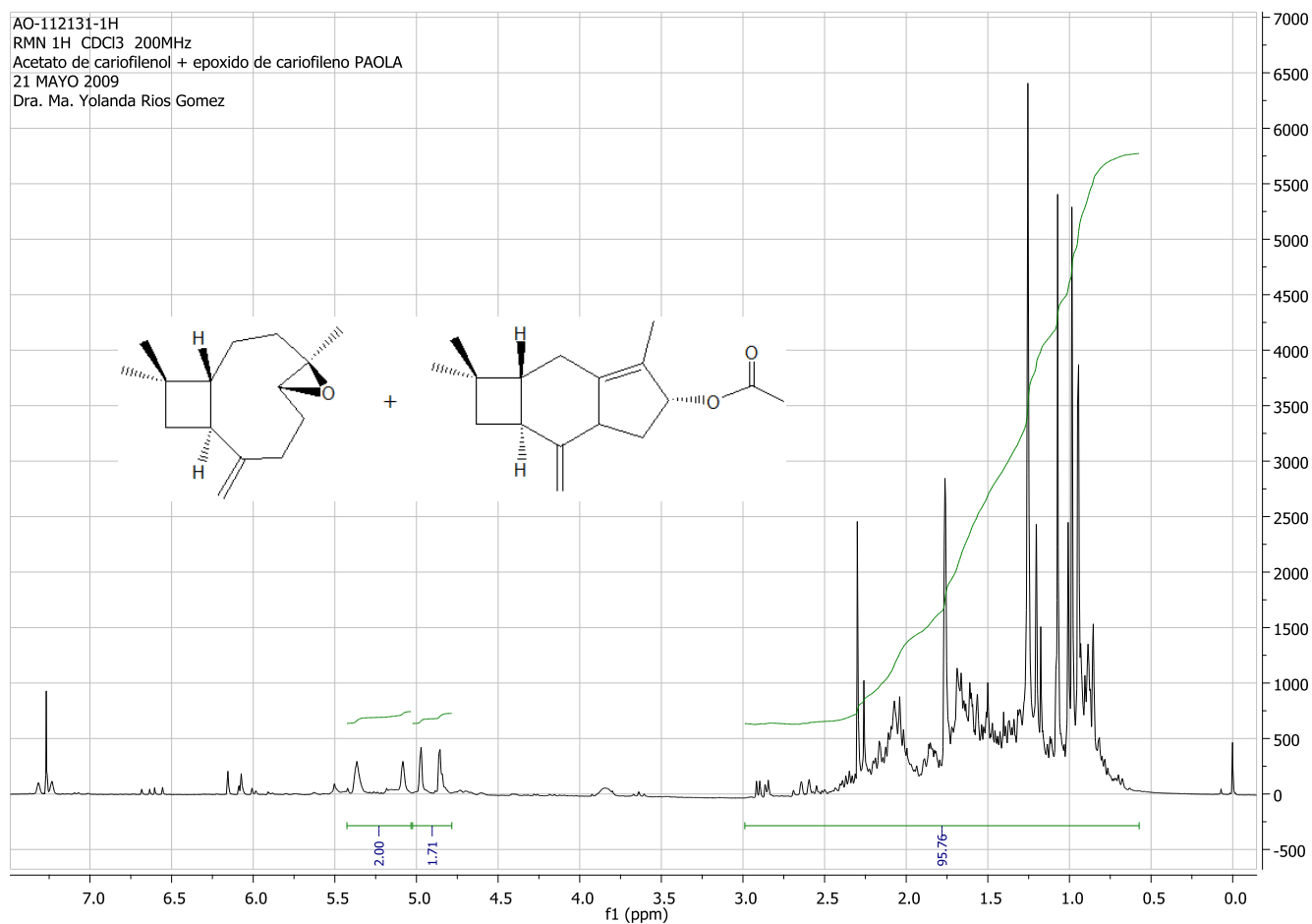
Las fracciones comprendidas en este grupo muestran gran complejidad en su composición química, por lo que después de realizar este segundo proceso cromatográfico fueron necesarios procesos cromatográficos terciarios. Así, las fracciones 28-80 estuvieron compuestas por tres compuestos, las fracciones 81-100 contenían dos compuestos, y finalmente las fracciones 101-127 un solo componente. A continuación se describe la identificación de cada uno de estos compuestos a partir de sus fracciones secundarias:

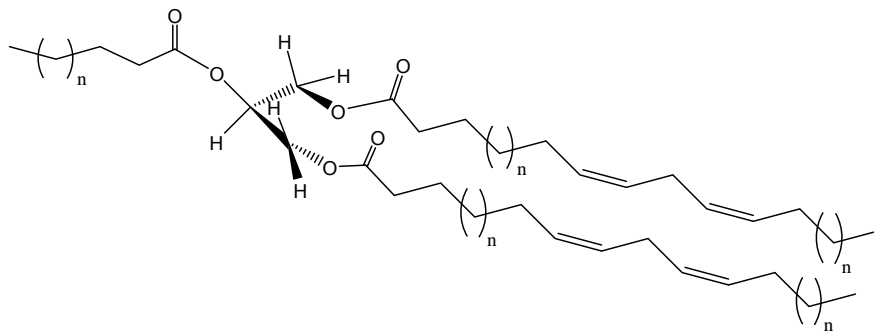
Constituyentes de las fracciones 28-80: acetato de cariofilenol (3), triacilglicérido (4) y *p*-mentanol (5) (cuadro 5.1 de la sección de material y métodos, página 34).

El cuadro 5.1 resume el proceso cromatográfico llevado a cabo para lograr la purificación de los compuestos incluidos en estas fracciones. En las fracciones 112-131 del tercer proceso de purificación fue posible aislar e identificar una mezcla de epóxido de cariofileno y acetato de cariofilenol (**3**, espectro 3), en las fracciones 132-165 eluyó el triacilglicérido (**4**, espectro 4), y finalmente, en las fracciones 156-165 se aisló *p*-mentanol (**5**, espectro 5).

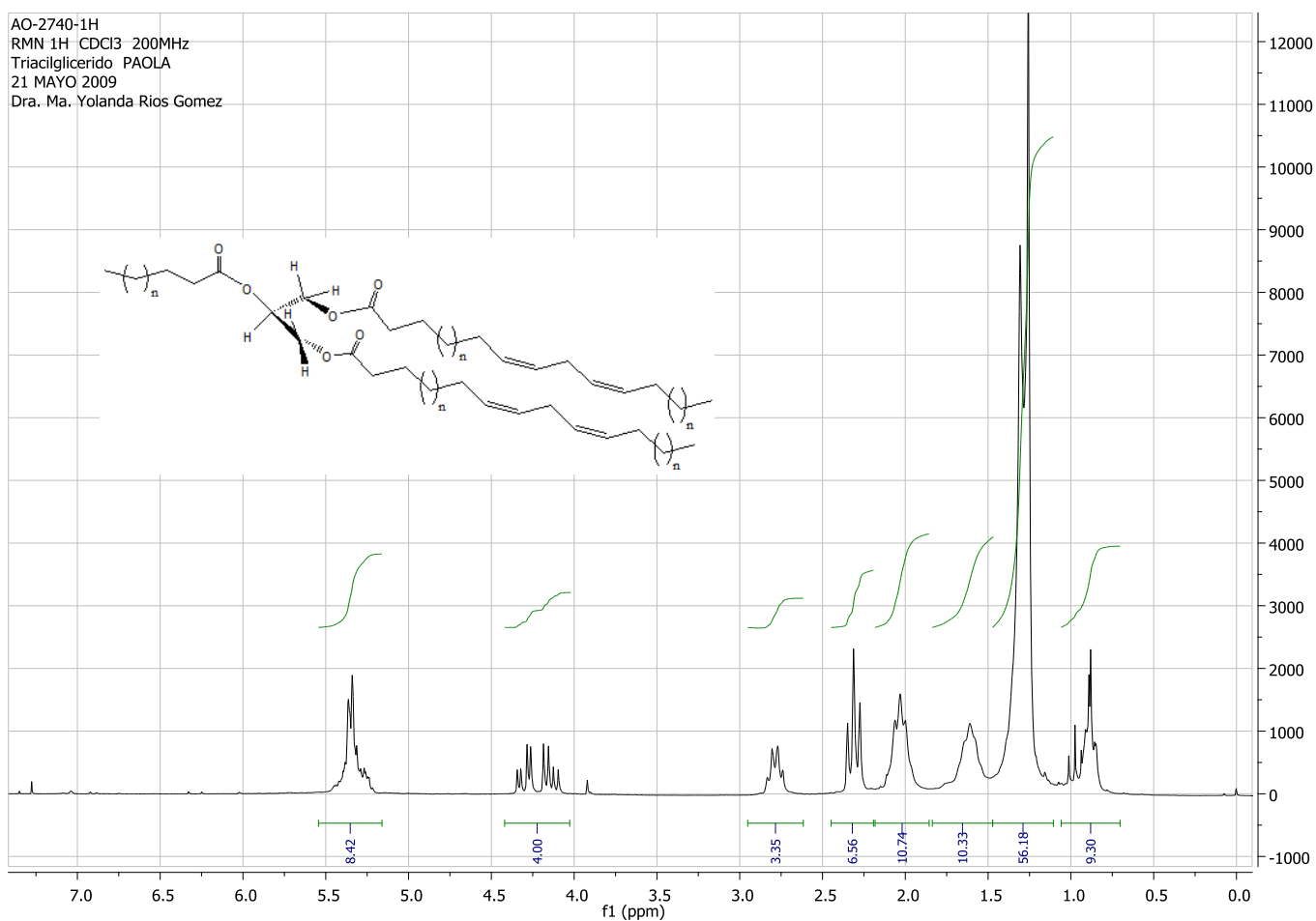


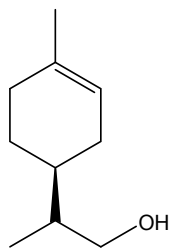
3

Espectro 3. RMN ^1H de epóxido de cariofileno (2) + acetato de cariofilenol (3)

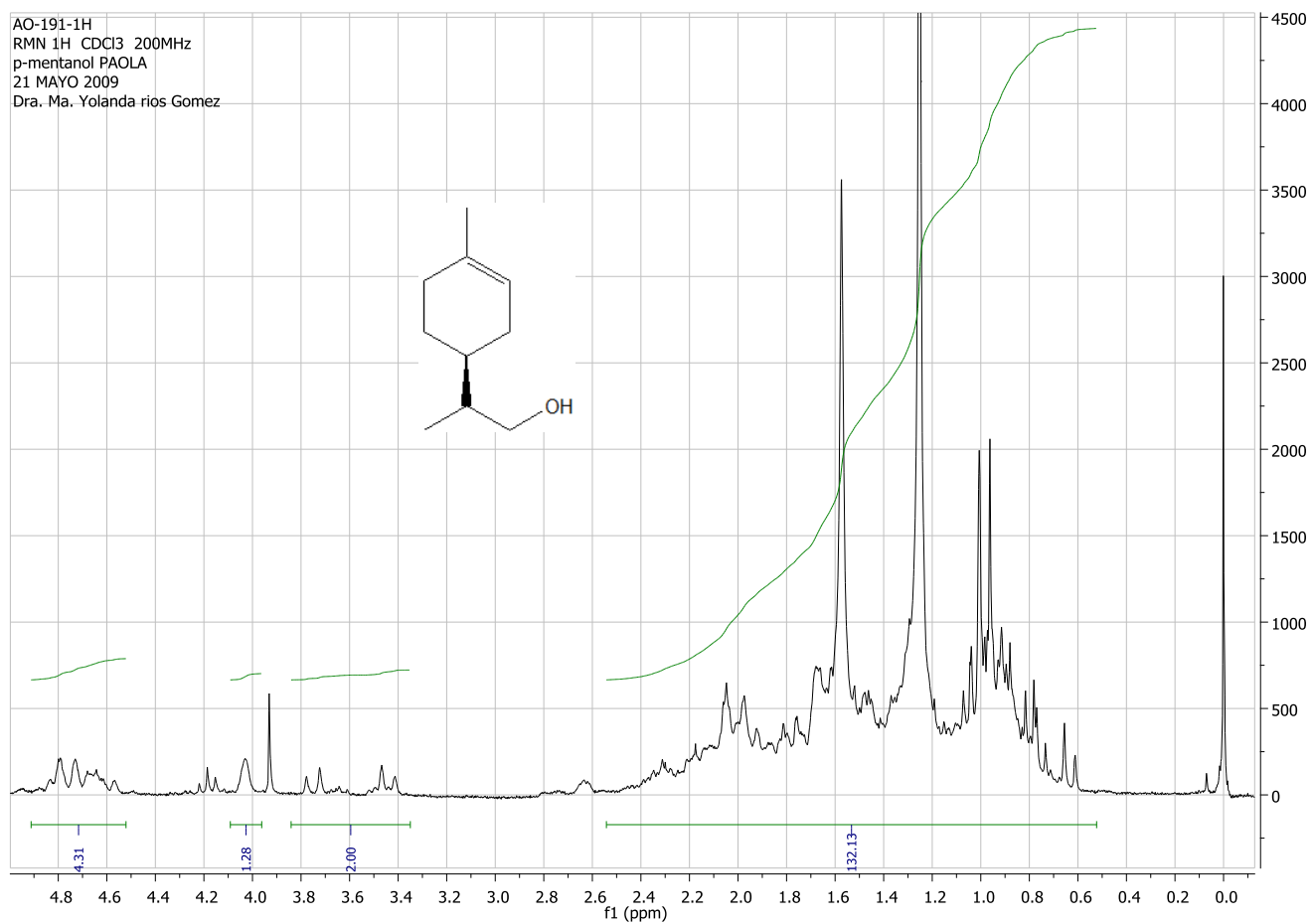


4

Espectro 4. RMN ^1H del triacilglicérido (4)

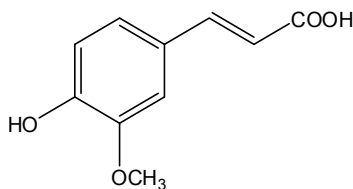


5

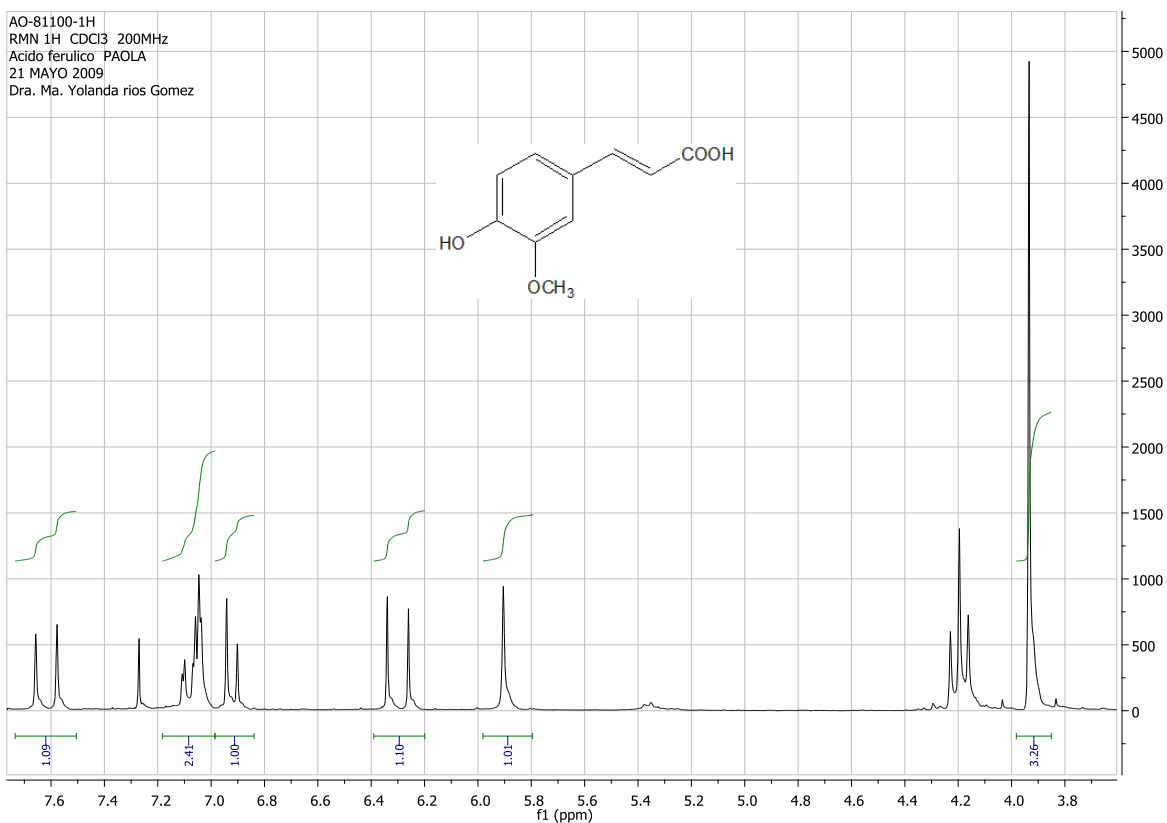
Espectro 5. RMN ^1H de *p*-mentanol (5)

Constituyentes de las fracciones 81-100: triacilglicérido (4) (cuadro 5.2 de la sección de material y métodos, página 35).

Los sólidos que se formaron en las fracciones 81-100 del proceso cromatográfico del grupo 5 se filtraron y lavaron con *n*-hexano. Su análisis en RMN y su comparación con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina permitió identificarlo como ácido ferúlico (6, espectro 6).



6



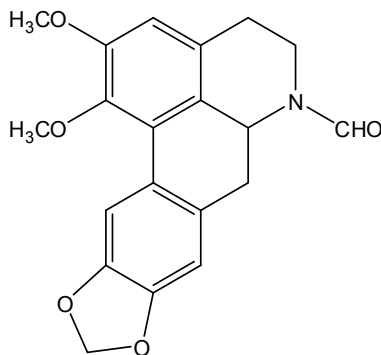
Espectro 6. RMN ^1H de ácido ferúlico (6)

Purificación de ácido ferúlico (6) a partir de la fracción 101-127 del proceso cromatográfico del grupo 5.

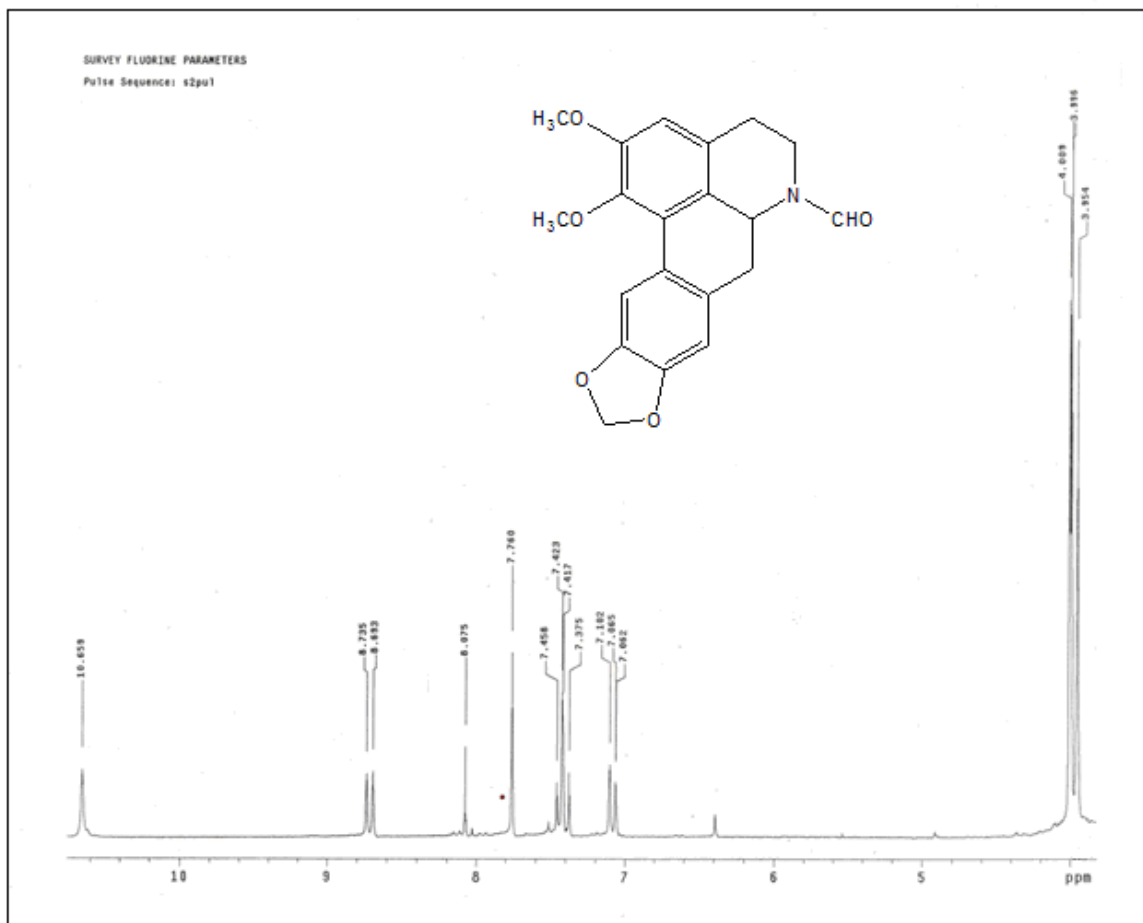
Los sólidos que se formaron en las fracciones 101-127 del proceso cromatográfico del grupo 5 se filtraron y lavaron con *n*-hexano. Su análisis en RMN y su comparación con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina permitió identificarlo nuevamente como ácido ferúlico (6).

Reunión 6 (fracciones 19-45)

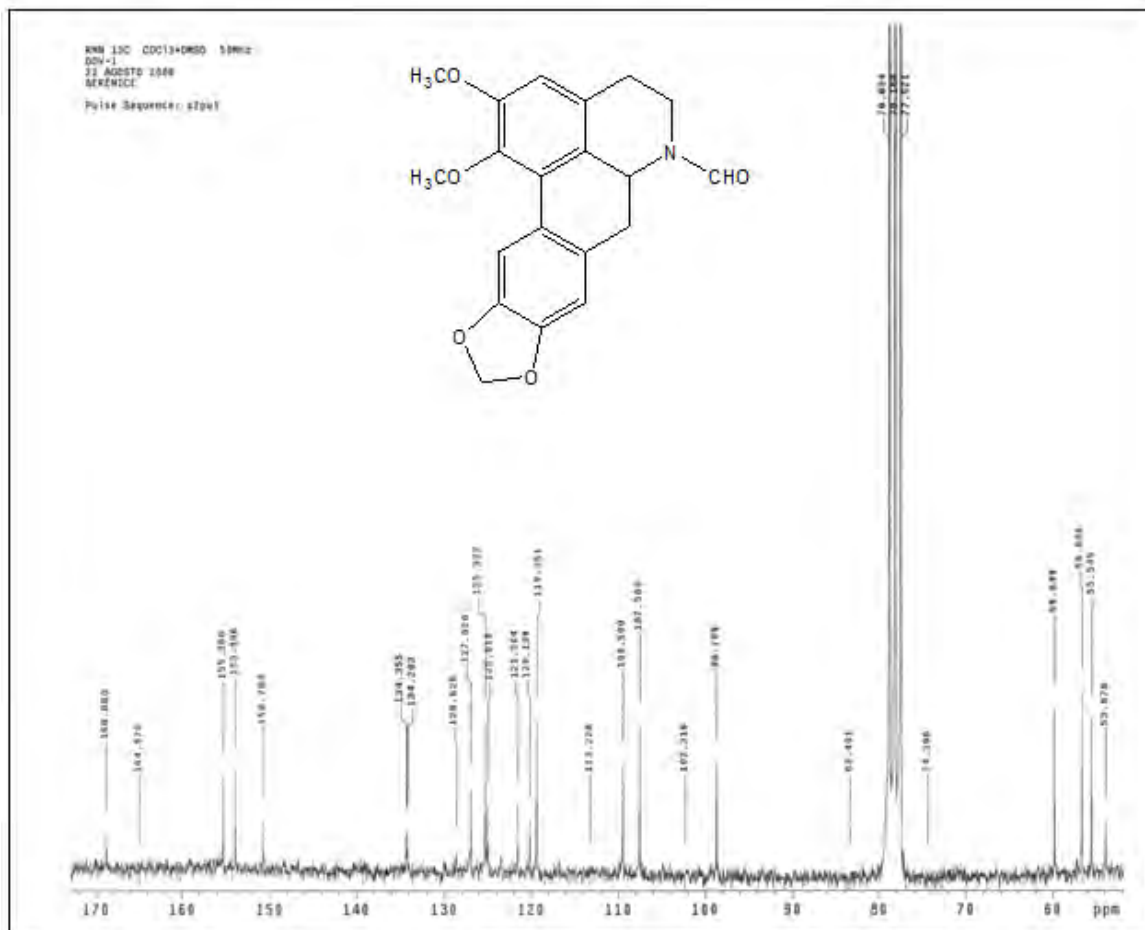
Desde la obtención de las fracciones que conforman este grupo fue posible observar la formación de un sólido cristalino de color amarillo brillante. La filtración del mismo y su lavado con *n*-hexano-CH₂Cl₂ (1:1) permitió separar los cristales en forma pura. Su análisis mediante RMN, la comparación de sus datos espectroscópicos con los registrados en la literatura, y con una muestra auténtica en cromatografía en placa fina, permitió establecer su identidad como *N*-formilnornanteína (7, espectros 7 y 8).



7



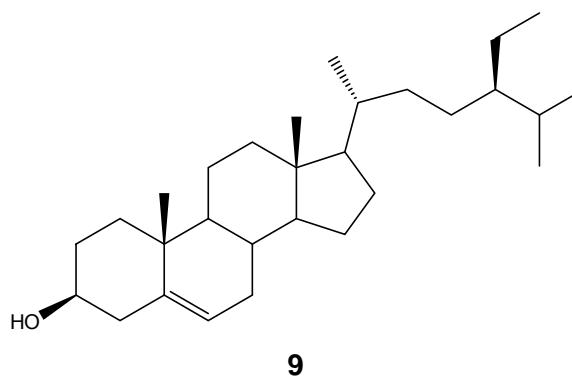
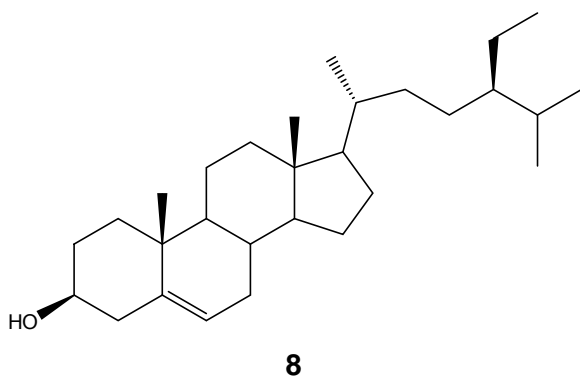
Espectro 7. RMN ¹H de N-formilnornanteina (7)

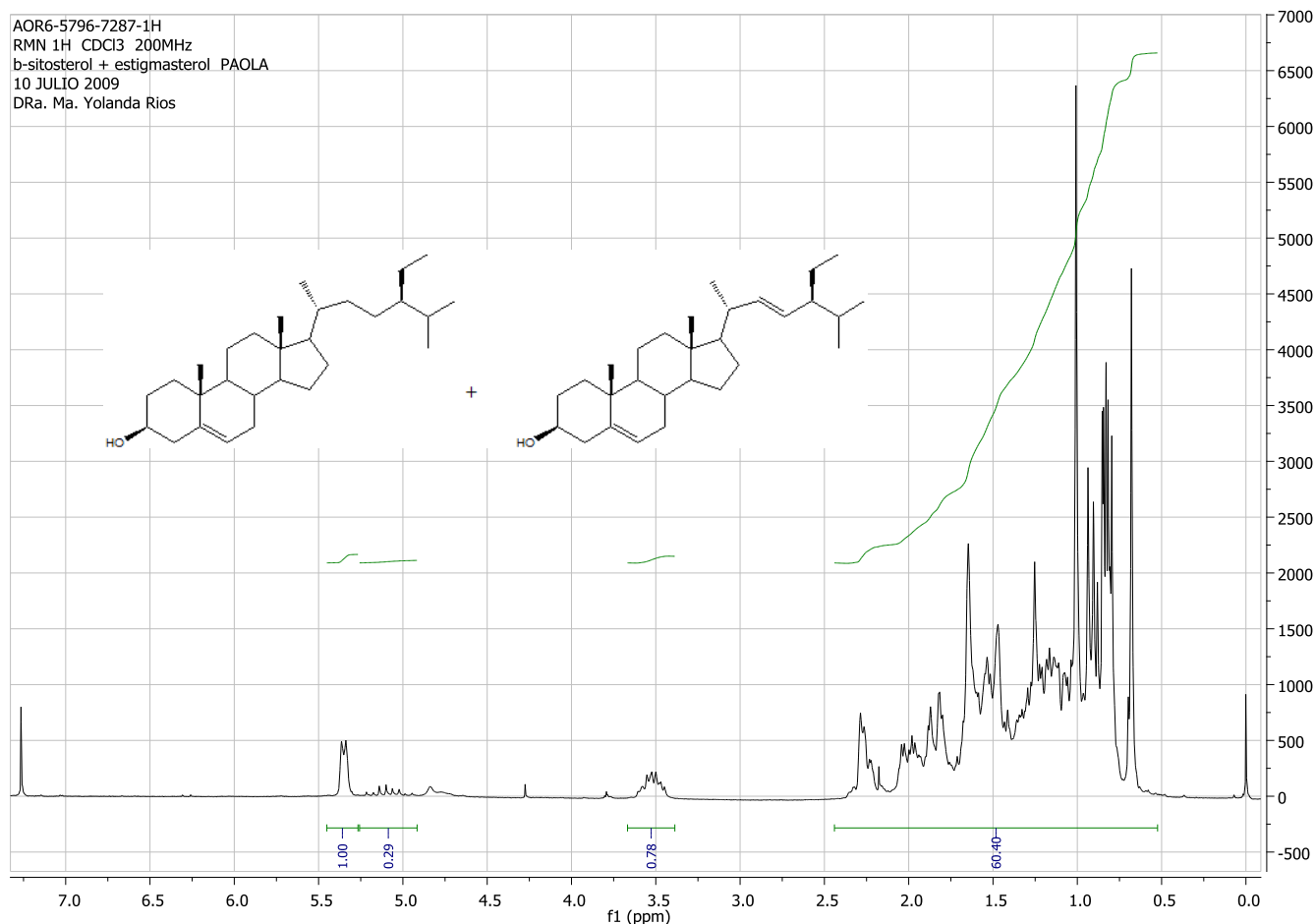


Espectro 8. RMN ^{13}C de *N*-formilnoranteina (7)

Columna cromatográfica de los grupos 7 y 8 (fracciones 46-124, cuadro 6 de la sección de material y métodos, página 37)

Aristolochia orbicularis demostró tener una composición química rica en compuestos de baja polaridad, por lo que las fracciones de polaridad intermedia, incluidas en estos dos grupos de fracciones, contuvieron pocos constituyentes químicos y en baja cantidad. El análisis de este residuo permitió obtener tres productos naturales: la mezcla de los esteroides β -sitosterol (**8**) y estigmasterol (**9**), y una cantidad adicional de *N*-formilnornanteína (**7**). El proceso cromatográfico que permitió el aislamiento de estos compuestos se indica en el cuadro 6, página 37.

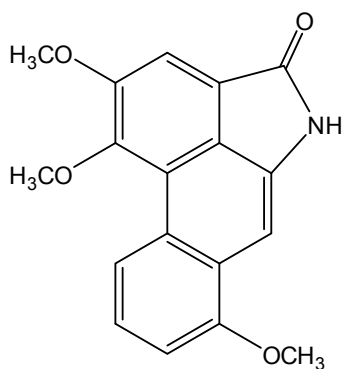
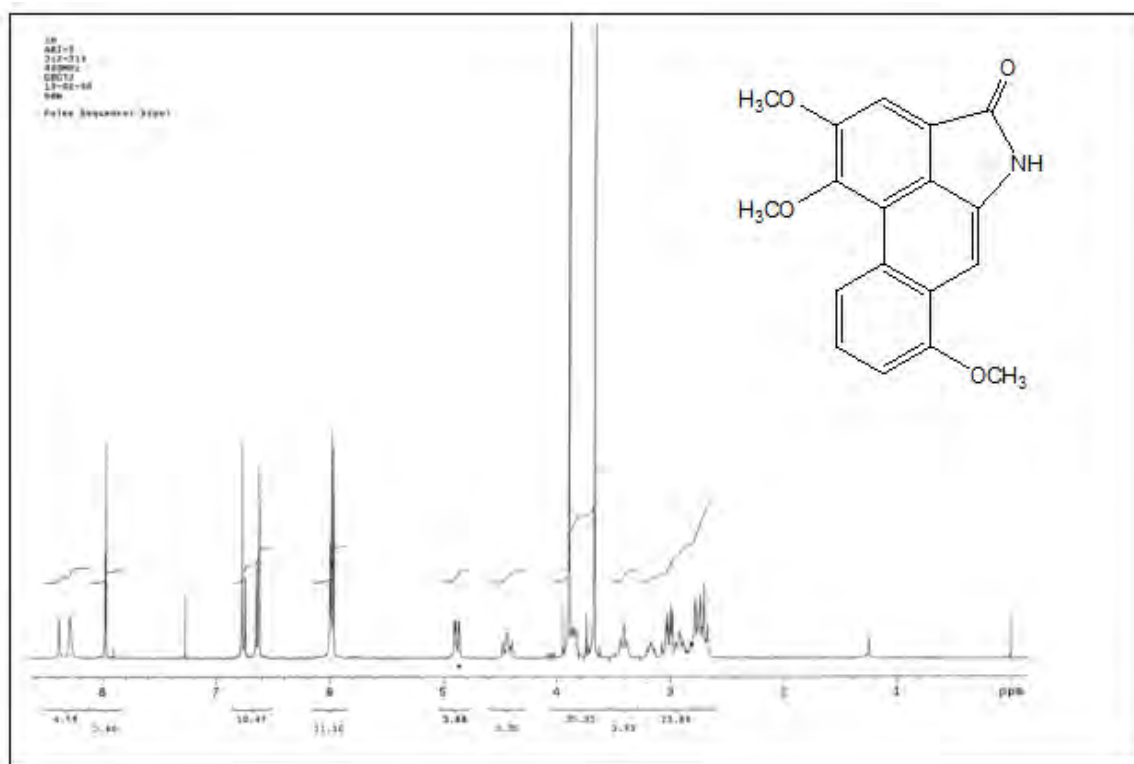


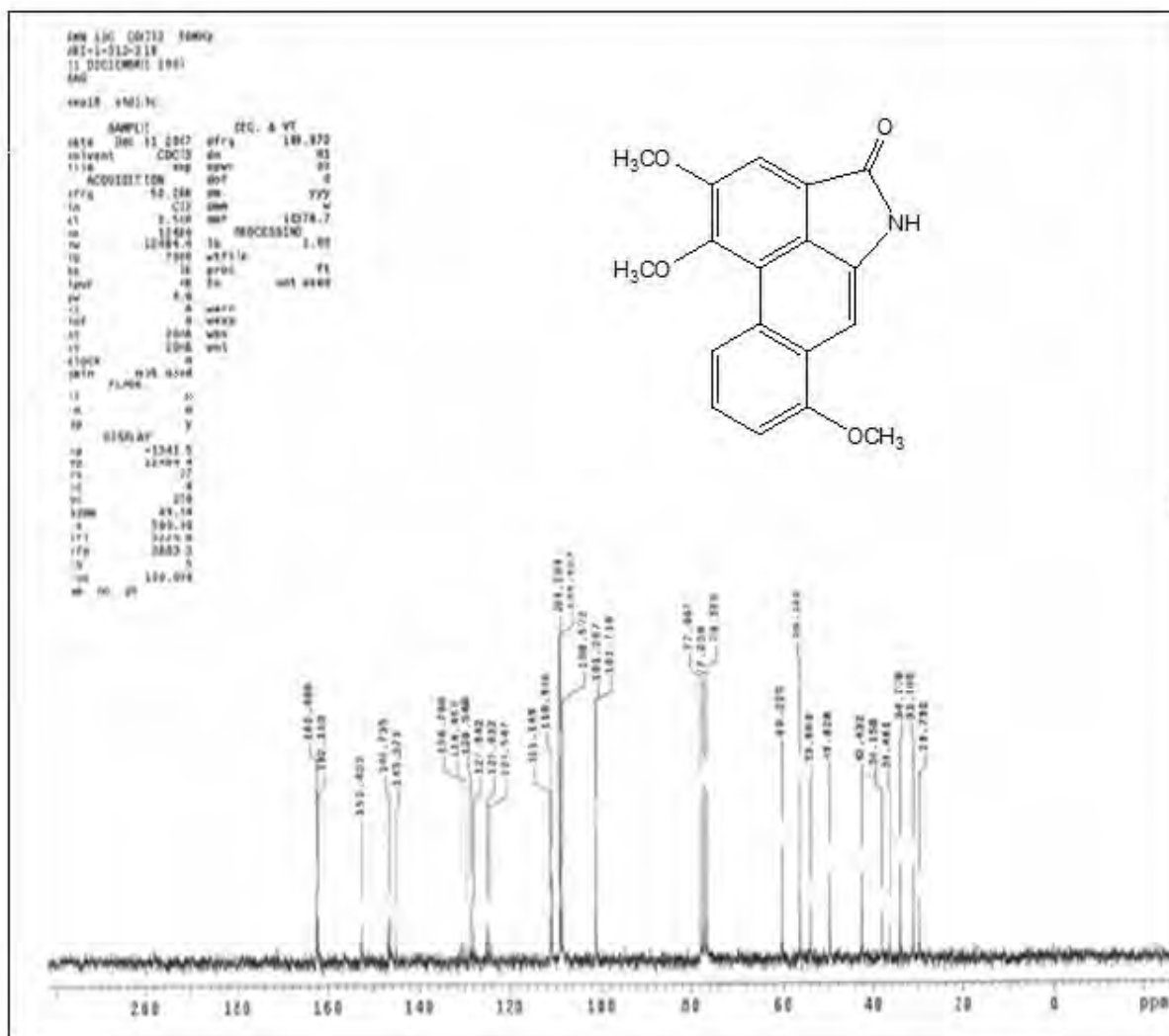


Columna cromatográfica de los grupos 9 y 10 (fracciones 125-175, cuadro 7 de la sección de material y métodos, página 38)

La resolución cromatográfica de este grupo de fracciones permitió aislar un componente adicional respecto de los aislados en las fracciones previas de este estudio químico. El cuadro 7 muestra la resolución de esta mezcla de productos naturales. Así, las fracciones 5-13 permitieron aislar nuevamente la mezcla de esteroides β -sitosterol (8) y estigmasterol (9), una cantidad adicional de *N*-formilnornanteína (7) en las fracciones 14-17, y al producto natural

Aristolactama B1 (**10**, espectros 9 y 10), que se obtuvo puro, en forma de cristales de color amarillo-naranja, en las fracciones 18-33.

**10****Espectro 10.** RMN ¹H de Aristolactama B1 (**10**)

Espectro 11. RMN ^{13}C de Aristolactama B1 (10)

Columna cromatográfica de la fracción 34-62 obtenida del proceso cromatográfico de los grupos 9 y 10 (cuadro 7.1 de la sección de material y métodos, página 39).

En este grupo de fracciones también se formaron los cristales de color amarillo-naranja característicos de la Aristololactama B1, los cuales se lavaron con *n*-hexano, recuperándose las aguas madres. Estas se sometieron a un proceso cromatográfico en columna, del que se obtuvieron 16 fracciones de 5 mL, que fueron reunidas por similitud cromatográfica (TLC) como se indica en el cuadro 7.1. Este proceso permitió obtener en forma pura nuevamente a la Aristololactama B1 (10).

Columna cromatográfica del grupo 11 (fracciones 176-222)

Como se indica en la sección experimental, la recromatografía de este grupo de fracciones permitió obtener cantidades adicionales de Aristololactama B1 (10).

Columna cromatográfica del grupo 12 (fracciones 223-270)

Este grupo de fracciones permitió obtener cantidades adicionales de Aristololactama B1 (10) mediante recristalización fraccionada.

La figura 14 muestra un resumen de los grupos que fueron fraccionados y los compuestos que se obtuvieron de ellos.

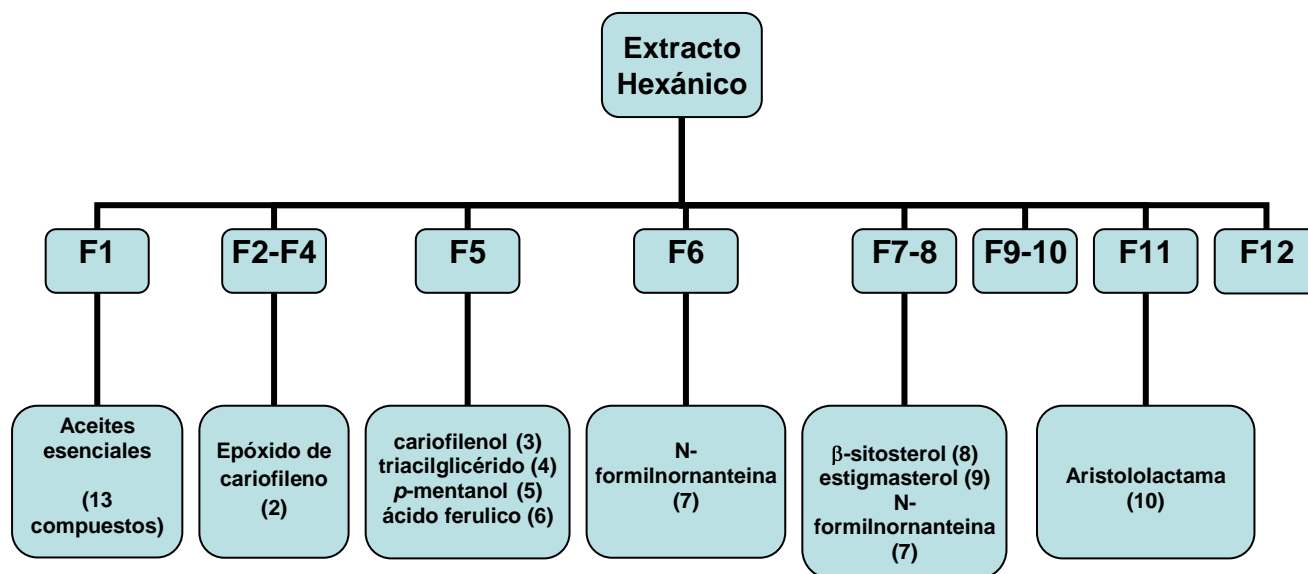


Figura 15. Compuestos obtenidos del extracto hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch.

Como puede observarse en la figura 15, los grupos 2 a 5, que manifestaron actividad nula a casi nula, están constituidos por sesquiterpenos, triacilglicéridos y compuestos aromáticos. Por ello, se descarta que estos constituyentes estén relacionados con la actividad antihipertensiva que muestra el extracto. La actividad se encuentra entre los grupos 6 y 11, siendo éstas las más activas. Su análisis químico indica la presencia de N-formilnornanteína y aristololactama, ambos derivados del ácido aristolóquico. Estos dos constituyentes son los responsables de la actividad antihipertensiva y actualmente se encuentran en evaluación farmacológica a fin de determinar su concentración inhibitoria 50 (IC₅₀).

1. *Aristolochia orbicularis* Duch., es una especie de actual uso popular a la cual se le atribuyen varias propiedades terapéuticas, sin embargo, no cuenta con estudios químico-farmacológicos registrados en la literatura, por lo que el presente trabajo de investigación hizo una aportación importante respecto al conocimiento químico-farmacológico de la especie y del género.
2. La evaluación farmacológica del extracto *n*-hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch. manifiesta actividad vasorrelajante significativa, dependiente de la concentración y parcialmente dependiente del endotelio, la cual esta asociada a la actividad antihipertensiva.
3. Las primeras cinco fracciones obtenidas del extracto hexánico (que contienen los compuestos mayoritarios y menos polares del mismo), resultaron inactivas y están constituidas por mono- y sesquiterpenos, triacilglicéridos, y compuestos aromáticos, entre ellos se encuentran aceites esenciales, epóxido de cariofileno, acetato de cariolandiol, triacilglicéridos, *p*-mentol y ácido ferulico. Ninguno de estos compuestos puede asociarse a la actividad antihipertensiva mostrada por el extracto que los contiene.
4. Los grupos de fracciones activas son 6-12 (que contienen los compuestos minoritarios del extracto y los más polares del mismo), de éstas, la 6 y la 11 son las de mayor actividad. Sus componentes son el β -sitosterol, estigmasterol, la N-formilnornantenina y la aristololactama β 1. Estos dos últimos compuestos son los responsables de la actividad antihipertensiva observada para el extracto y la planta.

1. Evaluar la actividad antihipertensiva de los constituyentes puros aislados de los grupos de fracciones activas del extracto *n*-hexánico de *Aristolochia orbicularis* Duch.
2. Debido a que en las fracciones activas se aislaron derivados de ácido aristolóquico, se hace necesario determinar su posible toxicidad.
3. Evaluar la actividad hipoglucemiante de aquellos compuestos puros que fueron obtenidos en la cantidad apropiada para el ensayo.
4. Obtener el extracto metanólico de la raíz de *Aristolochia orbicularis* Duch.
5. Evaluar la actividad antihipertensiva e hipoglucemiante del extracto metanólico.
6. Fraccionar y purificar los constituyentes presentes en los extractos *n*-hexánico y metanólico, con las técnicas cromatográficas ya mencionadas.
7. Realizar las actividades sugeridas en los puntos 1 a 3 para el extracto metanólico.

1. Anónimo. 2004. Medicina Tradicional: Patrimonio Cultural Indígena. Instituto Mexicano de la Juventud. México D. F.
2. Barquero A. A. 2007. Plantas Sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química Viva* 6(2):19-35.
3. Rojas V. M. 2002. Validación de actividad biológica y caracterización de componentes del género *Aristolochia*. Tesis. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM. México, D. F. 74 pp.
4. Pérez R. M. 2002. Compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria, antiviral e hipoglucemiante. Instituto Politécnico Nacional. México D. F. 192 pp.
5. Corrado T. 2007. Bioactive Compounds From Natural Sources. Isolation, characterization and biological properties. Taylor & Francis. London. 693 pp.
6. Rosas M., Pastelín G., Martínez R. J., Herrera-Acosta J. y Attie F. 2004. Hipertensión arterial en México. *Archivos de Cardiología de México* 74:134-157.
7. Lomelí C., Rosas M., Mendoza-González C., Méndez A., Lorenzo J. A., Buendía A., Férrez-Santander S. M. y Attie F, 2008. Hipertensión arterial sistémica en el niño y adolescente. *Archivos de Cardiología de México* 78:(Supl. 2) 82-93.
8. Castaldi J. L. 2009. <http://www.provefarma.com.ar/novedadesnaturales/pdf/articulo-4.pdf>.
Los Principios Activos Vegetales
9. Manitto P. 1981. Biosynthesis of Natural Products. Ellis Horwood Limited. Chichester. 548 pp.

10. Kuklinski C. 2003. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona. 515 pp.
11. Babor. J. A. y Ibarz A. J. 1997. Química General Moderna. Época. México, D. F. 902 pp.
12. García I. M. 2009. <http://www.casapia.com/informaciones/Fitoquimicos-Nutrientes-Futuro>. Fitoquímicos: Nutrientes del Futuro.
13. Dewick P. M. 1997. Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons, Chichester. 361 pp.
14. Ortega-Ortiz J. F. y Ortega-Ortiz R. V., 1997. Flora de Veracruz. Aristolochiaceae. Instituto de Ecología. Xalapa, Ver. Fascículo 99:1-4.
15. Kelly L. M. 2000. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Aristolochiaceae. Fascículo 29:1-8.
16. Guillén T. R. M., Osuna F. H. R., Laguna H. G. y Gómez C. A. 2004. Estudio estructural e histoquímico de la semilla de *Aristolochia aff. orbicularis* Tlacopatli. Facultad de Ciencias UNAM. Memorias del Congreso Nacional de Histología XXVIII. UAM-I.
17. Wan Chan, Hai-Bin Luo, Yufang Zheng, Yuen-Kit Cheng and Zonqwei Cai. 2007. Investigation of the Metabolism and Reductive Activation of Carcinogenic Aristolochid Acids in Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 35:866–874.
18. Geraldo P. A., Machado P., Piló-Veloso D. y de Carvalho F. 2009. ¹³C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species. *Molecules* 14:1245-1262.
19. Carreras L. M. 1973. Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica* L. *Anales del Instituto Botánico Cavanilles* 30:253-265.

20. Tian-Shung Wu, Amooru G. Damus, Chung-Ren Su y Ping-Chung Kuo. 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Natural Product Reports* 21:594-624.
21. Calderón C. A. 2008. Obtención y evaluación toxicológica de compuestos antimicrobianos en especies del género *Aristolochia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D. F. 85 pp.
22. Dorland S., Luna R., Álvarez I. y Thomas E. 2005. Dorland Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina. 30 ed. Elsevier. Madrid. 2210 pp.
23. Waizel-Bucay J. y Martínez I. M., 2007. Plantas empleadas en odontalgias I. *Revista ADM LXIV* (5):173-186.
24. Hernández G. 2000. El Guaco (*Aristolochia fanghi*). De un remedio tradicional a un peligro latente. Revista de Divulgación Científico-Tecnológica del Gobierno del Estado de Morelos Hypatia. En <http://www.hypatia.morelos.gob.mx>.
25. Yun-Tian Zhang y Jiang-Qin Jiang 2006. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). *Helvetica Chimica Acta* 89:2665-2670.
26. Programa de Medicamentos Esenciales y Tecnología para la Salud (HSE) de la OPS. 2002. Información farmacológica. *Revista Panamericana de Salud Pública* 11(4):266-272.
27. Rauscher J., Guillén R. M., Albores-Velasco M., González G., Vostrowsky O., y Bestmann H. J. 2001. The repellence of *Aristolochia aff. orbicularis* roots against the corn borer *Sitophilus zeamais*. *Zeitschrift fur Naturforschung section C, Journal of biosciences* 56(7-8):575-580.

28. Pfeifer H. W. 1966. Revision of the North and Central American Hexandrous Species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 53(2):116-185.
29. Estrada-Soto S. 2000. Estilbenoides espasmolíticos de *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr (Orchidaceae) y *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae). Efecto del 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibencilo sobre el sistema óxido nítrico / GMP cíclico. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas. UNAM. México, D. F. 212 pp.
30. Hernández-Abreu O., Castillo-España P., León-Rivera I., Ibarra-Barajas M., Villalobos-Molina R., González-Christen J., Vergara-Galicia J. y Estrada-Soto S., 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology* 78:54-61.
31. Rang H. P. y Dale M. M. 1992. Farmacología. 2ª ed. Churchill Livingstone. Madrid. 1023 pp.
32. Bohlmann F., Zdero Ch. 1978. Neue furanoeremophilane und andere sesquiterpene aus vertretern der gattung Euryops. *Phytochemistry* 17:1135-1153.