

00570

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE UN α -FENIL ESTIRENO AISLADO
DE HINTONIA LATIFLORA (RUBIACEAE). EVALUACION DEL
EFECTO DE CINCO ESPECIES VEGETALES SOBRE LA
CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA EN
AORTA TORAXICA AISLADA.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-QUIMICA FARMACEUTICA)

P r e s e n t a

Sandra O. Mendoza Díaz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS
MAL
COMPAGINADA

INDICE

Lista de Cuadros

Lista de Figuras

Lista de Gráficas

Lista de Tablas

CAPITULO I

1. Antecedentes

1.1. Generalidades de *Hintonia latiflora*

1

1.2. Justificación y objetivos

9

2. Materiales y métodos

2.1. Análisis cromatográficos analíticos y preparativos en capa delgada

11

2.2. Aislamiento y purificación del compuesto

2.2.1. Obtención de 6-O- β -D-glucopiranosil-2,3,4'-trihidroxi-4-metoxi-*o*-feril estireno. 15

12

2.3. Caracterización del compuesto

2.3.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

12

2.3.2. Hidrólisis ácida de 15 para obtener los compuestos diacetil-*o*-catecol 15A y metil diacetil
flavoglucinol 15B

13

2.3.3. Obtención de los derivados diacetilados 6-O-(tetraacetil- β -D-glucopiranosil)-2,3,4'-triacetoxi-4-

13

metoxi-*o*-fenil estireno 15C y diacetil catecol 15A

2.3.4. Hidrólisis enzimática del 6- α - β -D-glucopiranosil-2,3,4'-trihidroxí-4-metoxi- <i>o</i> -fenil estireno con β -glucosidasa y celufasa	14
2.3.5. Prueba de Molisch para carbohidratos	14
2.3.6. Cristalización de 4-[3,4-dihidroxí]-5-[α - β -D-galactopiranosil]-7-metoxi cumarina <u>5</u>	14
3. Resultados y discusión	15
4. Resumen y conclusiones	27

CAPITULO II

1. Antecedentes

1.1. Antecedentes botánicos, etnobotánicos y fitoquímicos de *Chiranthodendron*

pentadactylon, *Galphimia glauca*, *Ipomoea stans*, *Juglans regia* y *Taxodiem mucronatum*

1.1.1. Antecedentes de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	45
1.1.2. Antecedentes de <i>Galphimia glauca</i>	50
1.1.3. Antecedentes de <i>Ipomoea stans</i>	55
1.1.4. Antecedentes de <i>Juglans regia</i>	59

1.1.5. Antecedentes de <i>Taxodium mucronatum</i>	67
1.2. El aislamiento de la aorta torácica de rata como una prueba general para efectos farmacológicos	
1.2.1. Anatomía de la aorta de rata	71
1.2.2. Estructura fina del músculo liso vascular	72
1.2.3. Actividad contractil de la aorta torácica <i>in vitro</i>	72
1.2.4. Ensayo	73
1.2.5. Ventajas y limitaciones del método	73
2. Justificación y objetivos	74
3. Material y métodos	
3.1. Recolección y extracción	76
3.2. Dirección de la aorta torácica aislada	77
3.3. Sistema de registro	77
4. Desarrollo experimental	
4.1. Estandarización de la respuesta a noradrenalina	80

4.2. Evaluación del efecto de los extractos acuosos	80
4.3. Análisis de los datos	81
5. Resultados	-
5.1. Estandarización de la respuesta a noradrenalina	82
5.2. Evaluación del efecto de los extractos acuosos	82
6. Discusión de resultados	97
7. Conclusiones	99
8. Alternativas a futuro	99
Bibliografía	100

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1. Especies vegetales que constituyen el complejo "Copalchi"	2
Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de <i>Hintonia latiflora</i>	6
Cuadro 3. Resumen de la columna de separación de las fracciones 311-324 del extracto metanólico de <i>Hintonia latiflora</i>	8
Cuadro 4. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	11
Cuadro 5. Constantes físicas y espectroscópicas del 6-O- β -D-glucopiranosil-2,3,4-trihidroxi-4-metoxi- α -fenil estireno <u>15</u>	30
Cuadro 6. Constantes físicas y espectroscópicas del 6-O-(tetraacetil- β -D-glucopiranosil)-2,3,4-triacetoxi-4-metoxi- α -fenil estireno <u>15C</u>	35
Cuadro 7. Constantes físicas y espectroscópicas del 2,6-diacetil-4-metil fluoroglucinol <u>15B</u>	39
Cuadro 8. Constantes físicas y espectroscópicas del diacetil catecol <u>15A</u>	41
Cuadro 9. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O- β -D-galactopiranosil-3,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilbunovina	43

CAPITULO II

Cuadro 10. Metabolitos secundarios descritos para <i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	49
Cuadro 11. Metabolitos secundarios aislados de <i>Iponoea stans</i>	58
Cuadro 12. Metabolitos secundarios descritos para <i>Juglans regia</i>	60
Cuadro 13. Metabolitos secundarios descritos para <i>Taxodium mucronatum</i>	69

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Hintonia latifolia</i>	3
Figura 2. Ampliación del intervalo δ 4-6 del Espectro ^1H	18
Figura 3. Espectro COSY	20
Figura 4. Espectro HETCOR	21
Figura 5. Estructuras parciales	22
Figura 6. Experimentos de desacoplamiento C-H selectivos	24
Figura 7. Moléculas A y B de la 5-[β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcuparina	26
Figura 8. Intermediario biogénico	27
Figura 9. Mecanismo propuesto	28

CAPITULO II

Figura 10. Localidades de <i>Chiastodonton pentactylon</i>	47
Figura 11. Localidades de <i>Galphimia glauca</i>	51
Figura 12. Localidades de <i>Ipomoea stans</i>	56
Figura 13. Acute toxicologic studies	78
Figura 14. Sistema de registro	79

Figura 15. Comportamiento de los extractos acuosos de las cinco especies objeto de estudio sobre la contracción inducida por noradrenalina en la aorta torácica	83
Figura 16. Comportamiento de los extractos acuosos de <i>Galphimia glauca</i> (flores y hojas) sobre la contracción inducida por noradrenalina en aorta torácica	85

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE TABLAS

CAPITULO I

Tabla 1. Datos de RMN ¹³ C de los compuestos 15 y 15G	17
--	----

CAPITULO II

Tabla 2. Nombres comunes de <i>Galphimia glauca</i>	53
---	----

Tabla 3. Usos medicinales de <i>Galphimia glauca</i>	54
--	----

Tabla 4. Usos medicinales de <i>Tanacetum mucronatum</i>	68
--	----

Tabla 5. Resumen de los datos de recolección de las especies vegetales	76
--	----

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la contracción inducida por noradrenalina (10^{-5} M) sobre aorta torácica de rata <i>in vitro</i> .	93
--	----

Tabla 7. Valores de las concentraciones inhibitorias de las especies vegetales sobre la contracción inducida por noradrenalina (10^{-5} M) sobre la aorta torácica de rata <i>in vitro</i>	95
---	----

Tabla 8. Concentración que induce la mitad de la respuesta máxima de noradrenalina (10^{-5} M) sobre la contracción de la aorta torácica de rata <i>in vitro</i>	96
---	----

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	86
Gráfica 2. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Galphimia glauca</i> (flor)	87
Gráfica 3. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Galphimia glauca</i> (hojas)	88
Gráfica 4. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Ipomoea stans</i>	89
Gráfica 5. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Juglans regia</i>	90
Gráfica 6. Comportamiento del extracto acuoso de <i>Taxodium mucronatum</i>	91
Gráfica 7. Gráfica comparativa	92

RESUMEN

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional la investigación fitoquímica convencional de las fracciones polares 279 y 290 del extracto metanólico de la corteza de *Hintonia latiflora* permitió el aislamiento y caracterización de un α -fenil estireno, el cual fue identificado como el 6-O- β -D-galactopiranosil-2,3',4'-trihidroxi-4-metoxi- α -fenil estireno, un nuevo producto natural y el primer reporte de un fenilestireno aislado de una fuente natural. Dicho compuesto no presentó actividad contra los microorganismos Gram positivos y Gram negativos de ensayo.

Los estudios de rayos X del compuesto 5 corroboraron inequívocamente que la estructura correspondía a la 5-O- β -D-galactopiranosil-2',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.

Adicionalmente la evaluación farmacológica del efecto de las especies vegetales *Chiranthodendron pentadactylon*, *Taxodium mucronatum*, *Galphimia glauca*, *Pomoea stans*, *Juglans regia* mostró que los extractos acuosos exhiben una actividad relajante sobre la contracción inducida por noradrenalina (10^{-5} M) en aorta torácica aislada de rata. La diferencia observada en el comportamiento de los extractos acuosos de *Galphimia glauca* de las flores y de las hojas, permitió concluir que la mayor cantidad de los principios activos se encuentran en la flor.

ABSTRACT

As a part of a systematic study of Mexican plants used in Traditional Medicine, the phytochemical investigation of the methanolic extract of the bark of *Hintonia latiflora* was carried out with the polar fractions 279 and 290. In this study there was isolated and characterized an α -feruloyltyrosin which was identified as 5-O- β -D-glucopyranosyl-2,3,4-trihydroxy-4-methoxy- α -feruloyltyrosin, a new natural product and being the first α -feruloyltyrosin isolated from a natural source. This compound didn't show activity against the microorganisms gram + and gram - of essay.

The IR rays study of compound 5 showed that its structure corresponds to 5-O- β -D-galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-feruloyltyrosin.

In addition to the pharmacological evaluation of the vegetable species: *Chiranthodendron pentadactylon*, *Taxodium mucronatum*, *Galphimia glauca*, *Pomacea stans* and *Juglans regia* the aqueous extracts of the above mentioned species exhibited a relaxing activity on the contraction of toraxic aort of rats induced by noradrenaline (10^{-5} M). In the case of the *Galphimia glauca*, the flower extract showed a much higher activity than that of the leaves, which indicates that the flowers of this specie contain a higher concentration of the active compound.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 1

1. Antecedentes

1.1. Generalidades de *Hintonia latiflora*

El género *Hintonia* pertenece a la familia Rubiaceae y comprende cuatro especies las cuales se encuentran distribuidas en el oeste y suroeste de México y Guatemala.

Desde el punto de vista medicinal la especie más importante es la *Hintonia latiflora* (Sesse et Mocino ex D:C.) Bullock [Sinonimia: *Coultarea latiflora* (Sesse et Mocino ex D:C.)], la cual se caracteriza por ser un arbusto de siete metros de altura, de hojas opuestas ovadas ú ovals de 4 a 12 cm; flores acompañadas blancas, aromáticas de 5 a 7 cm, fruto capsulado oval o abovado, angulosos con semillas pequeñas y aladas (Martínez, M; 1989).

La *Hintonia latiflora* está incluida en un conjunto de plantas que constituyen el complejo "Copalchi", estas plantas pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae y se caracterizan por poseer una corteza amarga y por su empleo en el tratamiento del paludismo. El cuadro 1 enlistan las especies vegetales que constituyen el complejo.

El uso folclórico medicinal de *Hintonia latiflora* incluye además de su actividad antipalúdica, su empleo como antiperiódico, febrífugo, antiséptico, tranquilizante e hipoglucemiante (Bye, 1986; Díaz, 1976).

Desde el punto de vista fitoquímico, la *Hintonia latiflora* ha sido objeto de varias investigaciones, las cuales han permitido el aislamiento e identificación de una flavona 1 (Camacho, 1990; Mata et al, 1990), siete fenil cumarinas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (Soto, et al; 1988; Camacho, 1990; Mata et al, 1990; Cruz y Mendoza, 1991), manitol 9, β -sitosterol 10 (Camacho, 1990), una oxidocumarina 11 (Reher, et al; 1983) y tres triterpenos tetracíclicos del tipo cucurbitano 12, 13, y 14 (Reguero, et al, 1987; Camacho, 1990; Mata, et al, 1990). La fig. 1 presenta las estructuras de los metabolitos secundarios aislados.

Con relación al aspecto biológico, el extracto metanólico de la corteza, las fenilcumarinas y la glucocucurbitacina aisladas de la especie (Camacho, 1990; Mata, et al, 1990), fueron evaluadas in

Cuadro 1 Especies vegetales que constituyen el complejo "Copalchi"

COMPLEJO COPALCHI

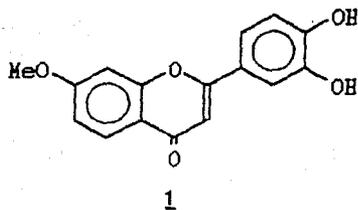
1. FAMILIA RUBIACEAE

- 1.1 *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex D.C.) Bullock
- 1.2 *Exostema mexicanum* Gray
- 1.3 *Exostema caribaeum* Jacq.
- 1.4 *Simira mexicana* (Bullock) Steyermark

2. FAMILIA EUPHORBIACEAE

- 2.1 *Croton glabellus* L.
- 2.2 *Croton draca* Schlecht
- 2.3 *Croton reflexifolius* H.B.K.
- 2.4 *Croton subfragilis* Muell.
- 2.5 *Croton niveus* Jacq.

Fig.1 Metabolitos secundarios aislados de *Hintonia latiflora*



CH₂OH

CHOH

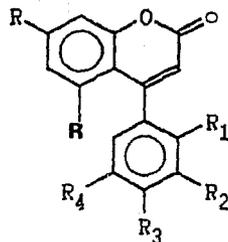
CHOH

CHOH

CHOH

CH₂OH

9



2 R=OMe, R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H,
R₅=glucosa

3 R=OMe, R₁=OH, R₂=H, R₃=OH, R₄=OH,
R₅=glucosa

4 R=OMe, R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H,
R₅=6-acetil glucosa

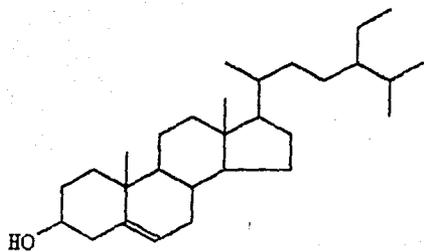
5 R=OH, R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H,
R₅=galactosa

6 R=OMe, R₁=H, R₂=H, R₃=OH, R₄=H,
R₅=galactosa

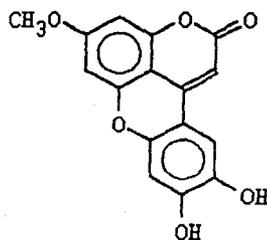
7 R=OH, R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H,
R₅=glucosa

8 R=OH, R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H,
R₅=6-acetil glucosa

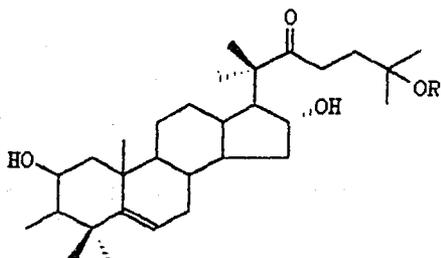
Figura 1 Metabolitos secundarios aislados de *Hintonia latiflora* (Continuación)



10



11



12 R=Ac, R₁=H

13 R=H, R₁=H

14 R=H, R₁=Glucosa

in vitro como agentes potencialmente antipalúdicos. El método de evaluación se basó en la inhibición de la toma de hipoxantina radiactiva por el parásito *Plasmodium falciparum*, en todos los casos se utilizó difosfato de cloroquina como control positivo; el extracto y la 5-O-β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina **2**, presentaron una concentración inhibitoria media (CI₅₀) igual a 12.5 ppm y la 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidro cucurbitacina **12**, mostró una CI₅₀ igual a 31 ppm [Camacho, 1990].

En relación a la actividad hipoglucemiante de *H. latiflora*, en 1960 Paris y Bastien demostraron que un extracto metanólico de la especie no ejercía influencia alguna sobre los niveles sanguíneos de azúcar en conejos normales. Sin embargo, cuando el extracto se administraba seguido de una dosis de glucosa por vía oral, el pico de hiperglicemia de los animales de prueba era menor en relación al exhibido por los control. Por otra parte, el coutareosido, un producto no identificado aislado por estos mismos autores, presentó un efecto similar sobre la glicemia inducida en conejos [Paris, R.R.; Bastien, M. 1960].

La actividad potencial antimicrobiana de *Hintonia latiflora* también fue objeto de estudio. Como resultado de las investigaciones, se encontró que aunque el extracto no presenta actividad alguna sobre los microorganismos de prueba, la 5-O-β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina **5** es activa contra *Candida albicans* [Rojas, 1990] y la 5-O-(6"-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina **8**, posee moderada actividad contra *B. subtilis* y *S. aureus* [Cruz y Mendoza, 1991].

Un estudio fitoquímico previo de las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico de la planta condujo al aislamiento de una fenilcumarina adicional. La metodología utilizada en este estudio es descrita a continuación: El material vegetal pulverizado procedente de Jolalpan, Puebla [Voucher: Bye y Linares No. 15516], fue sometido a un desengrase con hexano y posteriormente extraído con metanol. El extracto metanólico fue fraccionado de manera preliminar mediante un proceso de partición entre acetato de etilo-metanol acuoso; el extracto de acetato de etilo resultante se fraccionó vía una cromatografía preparativa en columna sobre gel de sílice obteniéndose un total de 470 fracciones. Ver Cuadro 2.

Cuadro 2 Resumen del fraccionamiento via cromatografia en columna del extracto de acetato de etilo de *Hintonia latiflora*

Eluyente	Proporcion	No. de Fracciones	Fracciones combinadas
Hex:CHCl ₃	50:50	1-18	1-74
Hex:CHCl ₃	30:70	19-14	75-120
CHCl ₃	100	75-108	121-133
CHCl ₃ -MeOH	99:1	109-118	134-158
CHCl ₃ -MeOH	98:2	119-139	159-165
CHCl ₃ -MeOH	97:3	140-153	166-174
CHCl ₃ -MeOH	96:4	154-175	175-185
CHCl ₃ -MeOH	95:5	176-185	186-204
CHCl ₃ -MeOH	94:6	186-208	205-211
CHCl ₃ -MeOH	92:8	209-248	212-220, 221-251, 252-288
CHCl ₃ -MeOH	90:10	249-398	289-293, 294-301, 302-310, 311-324, 325-329, 330-338, 339-364
CHCl ₃ -MeOH	85:15	399-417	365-398
CHCl ₃ -MeOH	80:20	418-431	
CHCl ₃ -MeOH	70:30	432-455	399-470
CHCl ₃ -MeOH	50:50	456-470	

Las fracciones polares 311-324 del Cuadro 2 se recromatografiaron en una columna abierta sobre gel de sílice (Cuadro 3). El estudio de las fracciones combinadas 228-238 del Cuadro 3 permitió el aislamiento y caracterización de la 5-O-(6''-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina β (Cruz y Mendoza, 1991).

Finalmente cabe destacar que en las fracciones 279-290 del Cuadro 3 se detectó cromatográficamente la presencia de un cromóforo rojo cuyo comportamiento cromatográfico difiere del observado para numerosas fenilcumarinas.

En todos los estudios previos la caracterización de las fenilcumarinas se realizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales y por métodos químicos (degradaciones y derivatizaciones), sin embargo a la fecha no se ha realizado ningún estudio de difracción de rayos X

de alguna fenilcumarina aislada.

Cuadro 3 Resumen de la columna de separación de las fracciones 311-324 del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas
CHCl ₃	100	1-21	1-7, 8, 9-24
CHCl ₃ -MeOH	99:1	22-34	25-38
CHCl ₃ -MeOH	98:2	35-59	39-44, 45, 46-54, 55, 56-58, 59
CHCl ₃ -MeOH	97:3	60-90	60-68, 69, 70-82, 83-90
CHCl ₃ -MeOH	96:4	91-118	91-100, 101-114, 115
CHCl ₃ -MeOH	95:5	119-146	116-124, 125, 126, 127-133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140-150
CHCl ₃ -MeOH	94:6	147-173	151-163, 164-174
CHCl ₃ -MeOH	93:7	174-194	175-187
CHCl ₃ -MeOH	92:8	185-275	188-222, 223-224, 225-227, 228-238, 239-240, 241-242, 243, 244-247, 248, 249-253
CHCl ₃ -MeOH	80:20	301-319	254-255, 259-260, 261-262, 263, 264-265, 266-268
CHCl ₃ -MeOH	70:30	320-355	269-272, 273-274, 275-276, 277, 278, 279-290

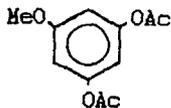
1.2. Justificación y objetivos.

Con el propósito de ampliar el conocimiento del contenido metabólico de la especie medicinal *Hintonia latiflora*, se consideró pertinente por una parte proseguir con el estudio fitoquímico de las fracciones previamente no investigadas de los Cuadros 2 y 3 y por otra obtener cristales adecuados de las fenilcumarinas aisladas anteriormente, con la finalidad de realizar análisis de difracción por rayos X que permitan establecer inequívocamente las estructuras de las mismas.

Es importante destacar que el trabajo forma parte de un estudio sistemático de las especies pertenecientes a la familia de las Rubiaceas que integran el Complejo "Copalchi". Las consideraciones en las que se basa la propuesta de la presente investigación son las siguientes:

1. Las plantas utilizadas en medicina tradicional constituyen fuentes potenciales y valiosas de principios activos.
2. Las investigaciones químicas y farmacológicas relacionadas con la medicina tradicional mexicana son muy escasas y, por lo tanto, la información disponible que permitiría su eventual adaptación a los programas de salud oficiales es prácticamente inexistente.
3. Considerando que algunas de las fenilcumarinas previamente aisladas tanto de *Hintonia latiflora* como de *Exostema caribaeum* presentaron buena actividad antimicrobiana, es conveniente demostrar inequívocamente su estructura propuesta por análisis de difracción de rayos X o por síntesis.
4. Finalmente, es importante enfatizar que cualquier proyecto encaminado a la resolución de problemas de salud pública nacional, ya sea encontrando nuevos principios activos a partir de materias primas nacionales o mediante el estudio sistemático de la flora medicinal mexicana, esta por sí mismo justificado.

Cuadro 7 Constantes físicas y espectroscópicas del 2,6-diacetil-4-metil fluoroglucinol 15B



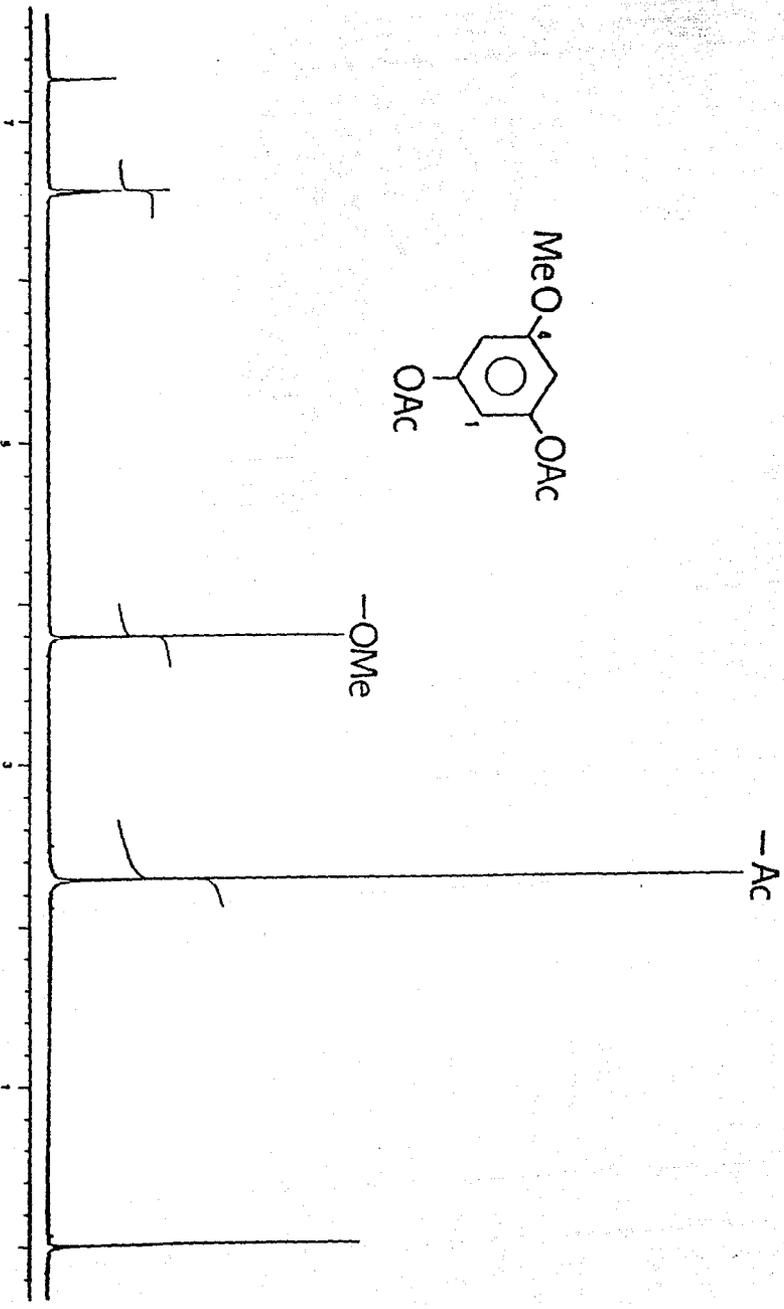
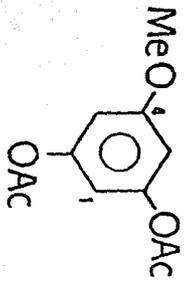
F.M.: $C_{11}H_{12}O_5$

P.M.: 224 g/mol

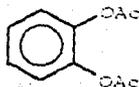
I.R: ν cm-1: 3100, 1750, 1600, 1575, 1190, 810

RMNH 6.55-6.53 (m, 3H), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 2.28 (s, 6H, CH₃CO-)
[Espectro 8]

EIMS, m/z 204 (M+, 25), 189 (30), 144 (12), 43 (100)



Cuadro 8 Constantes físicas y espectroscópicas del diacetil catecol 15A



F.M.: $C_{10}H_{10}O_4$

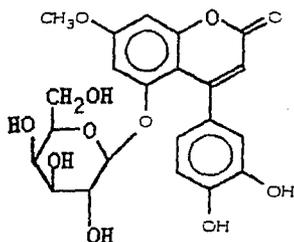
P.M.: 203 g/mol

P.F.:

Análisis elemental

IR ν cm^{-1}

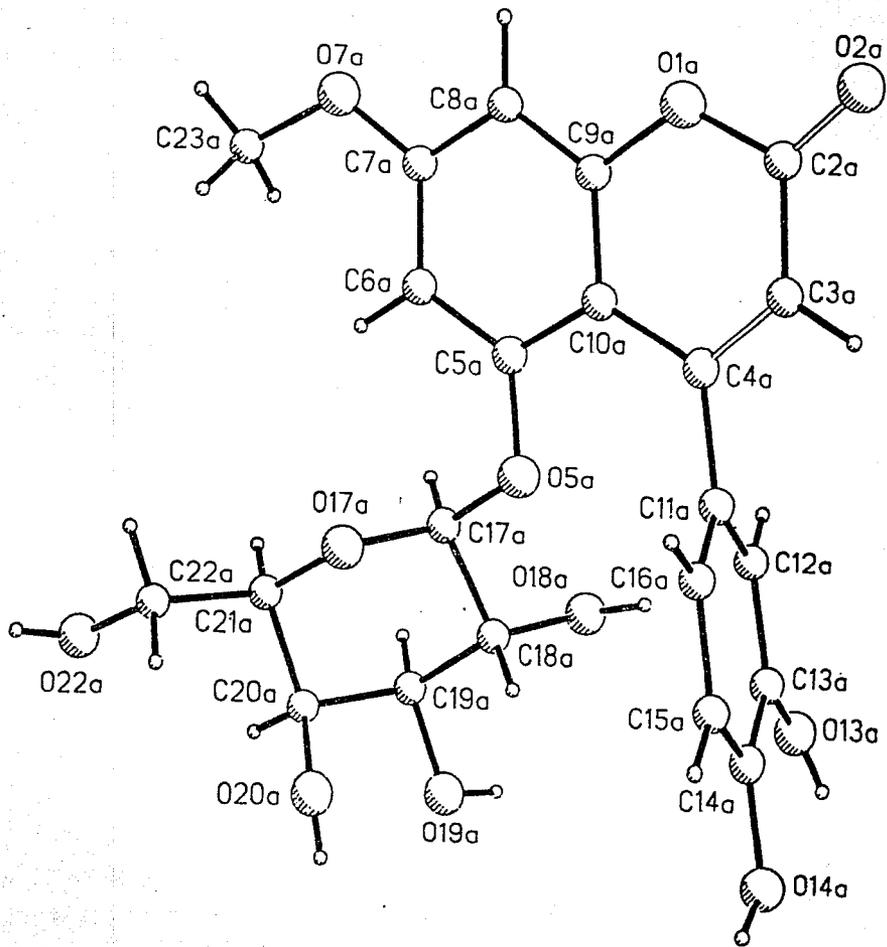
Cuadro 9 Contantes físicas y espectroscópicas de la 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina



F.M.: C₂₂H₂₂O₁₁

P.M.: 516.4 g/mol

P.F.: 228 – 231 °C



CAPITULO 2

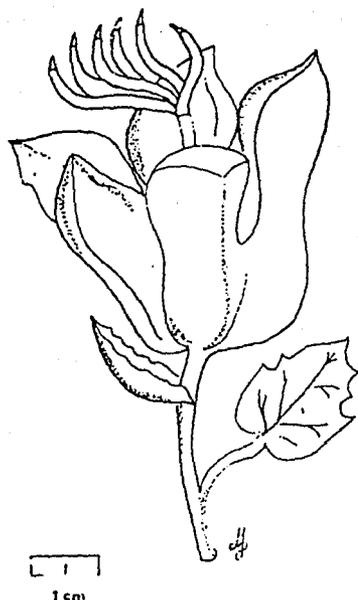
1. Antecedentes botánicos, etnobotánicos y fitoquímicos de: *Chiranthodendron pentadactylon*,
Galphimia glauca, *Ipomoea stans*, *Juglans regia* y *Toxicarium mucronatum*.

1.1. Antecedentes de *Chiranthodendron pentadactylon*

Chiranthodendron pentadactylon Larr, familia: Sterculiaceae es una planta mexicana que crece silvestre en los estados de Chiapas y Oaxaca y es cultivada en el estado de México y el D.F. (Figura 10); se le conoce con los siguientes nombres:

1. Macpakóchitl (nombre náhuatl que significa flores de mano)
2. Mapitxóchitl (nombre náhuatl que significa flor de palma de la mano)
3. Mapastúchitl
4. Mano de diagón
5. Mano de león
6. Palo de tayuco

Se caracteriza por ser un árbol de 12 a 15 m de altura, con hojas simples, alternadas, anchamente abovadas, 3 a 7 lobuladas, galabrescente en la cara superior, vellosa ferrugínea en la cara inferior, con pecíolo; sus flores son bisexuales, zigomorfas, solitarias, sin corola; cáliz sinsépalo, campanulado, profundamente 5-lobulado, de color verde, rojizo o rojo de 3.5 a 4.5 cm de largo; cinco estambres unidos en columna y hacia afuera se extienden dando un aspecto de los dedos de la mano, de color rojo; estilo exerto de la columna de los estambres, ovario súpero; los frutos son cápsulas leñosas, duras, con cinco costillas de 10 a 15 cm de largo (Linares, Bye y Flores; 1990).



Antiguamente la especie era utilizada para la curación de la región púbica en combinación con otras plantas (Linares, Flores y Bye; 1988), en la actualidad se le conocen otros usos medicinales, entre los que destacan: antiepiléptico, antiinflamatorio, antidontológico, astringente, caláptico, emoliente, en afecciones del corazón, analgésico, humores, para el tratamiento de infecciones de los ojos; cabe destacar que la parte consumida de la especie es la flor (Díaz, 1976).

El Cuadro 10 presenta los metabolitos secundarios aislados de *Ch. pentadactylon* en estudios fitoquímicos previos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

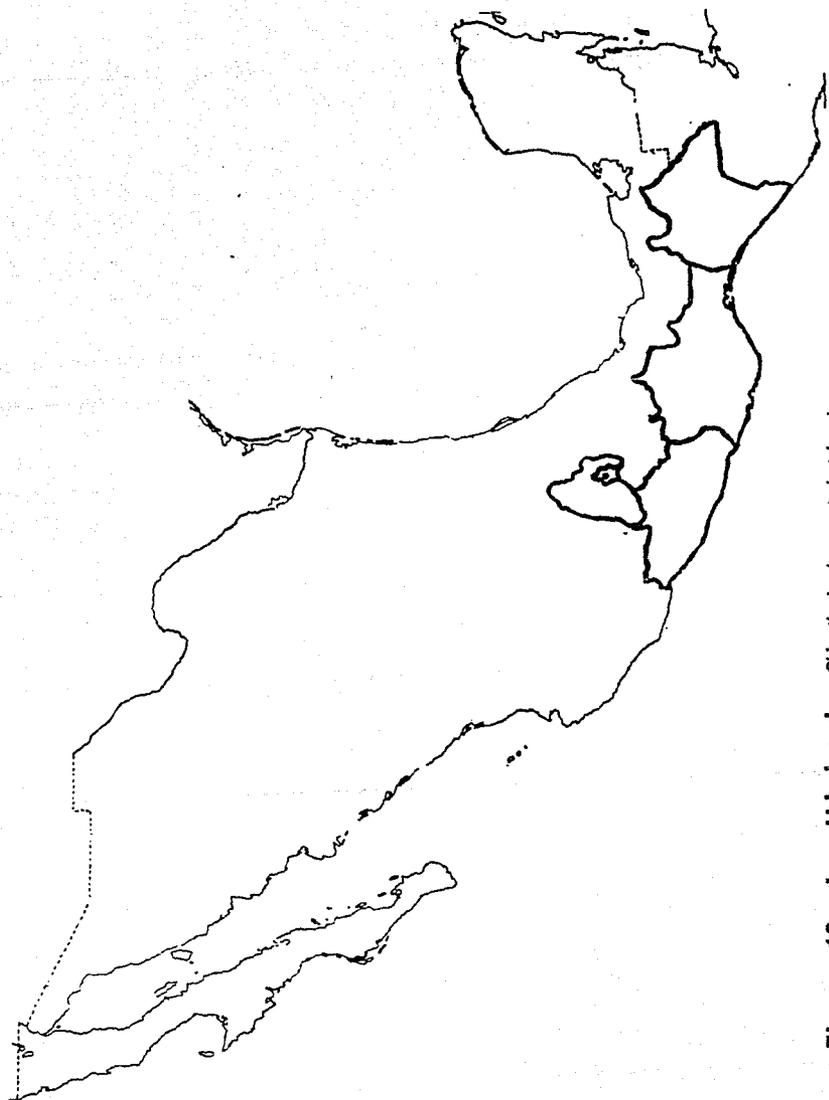
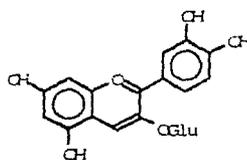
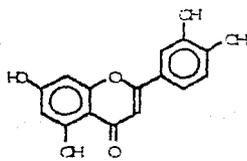
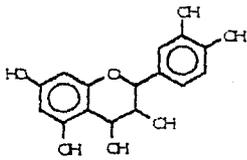
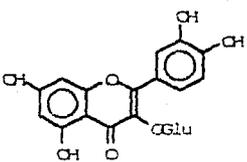
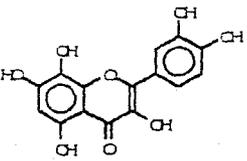


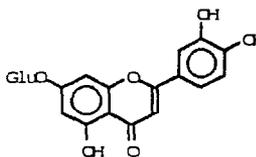
Figura 10 Localidades de *Chiranthodendron pentadactylon* Latr.

Cuadro 10 Metabolitos secundarios descritos para *Ch. pentadactylon*

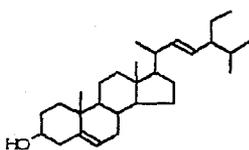
Constituyente	Estructura	Referencia
3-glucosil cianidina		Harborne, J.B.: 1972
Luteolina		"
Leucocianidina		"
3-glucosil quercetina		"
Gosipetina		"

Cuadro 10 Metabolitos secundarios descritos para *Ch. pentadactylon* (Continuación)

7-glucosil luteolina



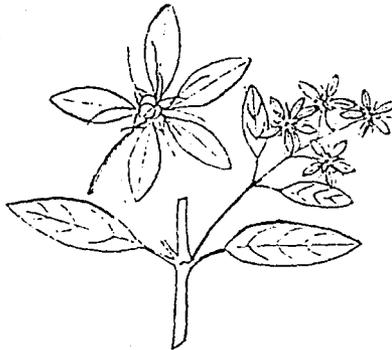
β -sitosterol



Domínguez, X. A.; 1972

1.2. Antecedentes de *Galphimia glauca*

La *Galphimia glauca* Cav. (Sinonimia: *Thryallis glauca* Cav.), conocida en Guerrero como Corpiochi (ver Tabla 2) pertenece a la familia Malpigiaceae; se localiza principalmente en la región boscosa de pino-encino del Suroeste de México así como en la selva baja caducifolia de Chihuahua y Sonora (Figura 11). Se caracteriza por ser un arbusto hasta de 5m con hojas alternas, ovadas con pequeñas glándulas en la base de la lámina o en el ápice del pecíolo; flores amarillas, estrelladas en grandes racimos (Martínez, M; 1973).



Las bondades medicinales que se han atribuido a *G. glauca* se enumeran en la tabla 3, destacando su uso en afecciones del corazón y nerviosas; adicionalmente en Chihuahua y en San Luis Potosí se le conoce como una planta tóxica.

Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio por lo que se desconoce su contenido metabólico secundario.

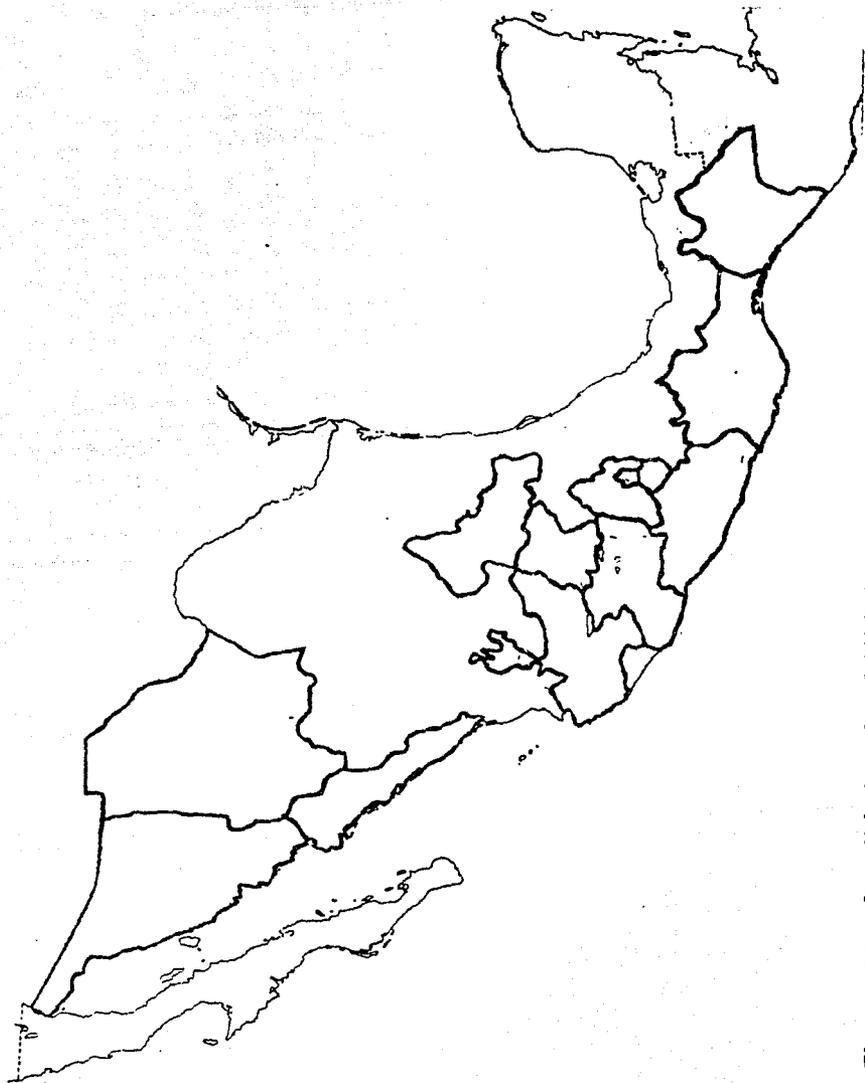


Figura 11 Localidades de *Graphimnia glauca*

Tabla Nombres comunes de *Galphimia glauca*

Nombre común	Distribución
Cahal Ch'ihl (tzeltal)	Chiapas
Calderona amarilla	Guanajuato, Guerrero y Michoacán
Ciruelo de campo	Chihuahua
Consulita	
Corpiochi	Guerrero
Cortinchi	Guerrero
Flor de caballo	Oaxaca
Flor de chinche	Chiapas
Flor de Diciembre	Guerrero y Michoacán
Flor de muelas	Oaxaca
Flor de nochebuena	Guerrero
Flor de panal	Oaxaca
Flor de rosario	Chiapas
Flor de vela	Oaxaca
Fumete	Chihuahua
Garbancillo	Sonora
Garbansilla	Sonora
Ghandela (zapoteca)	Oaxaca
Hierba de hormiga	San Luis Potosí
Hierba del piojo	San Luis Potosí
Hierba del venado	Sinaloa
Huachata	Guerrero y Michoacán
Humete	Chihuahua
Ita kil? (mixteco)	Oaxaca
Ita quite (mixteco)	Oaxaca

Tabla 2 Nombres comunes de *Galphimia glauca* (Continuación)

Leichi (guaríño)	Sonora
Leychi (guaríño)	Sonora
Mazorquitas	Michoacan
Nachacata	Michoacan
Nancin (Tzeñal)	Chiapas
Palo de muerto	Jalisco, México
Palo de San Vicente	Sinaloa
Petajoyo (zoque)	Chiapas
Ramo de oro	Jalisco
San Vicente	
Shanin-tzitziki (purecha)	Michoacan
Shanin-tzizuec (purecha)	Michoacan
Totoncapalli	
Tsalaam Kubí	San Luis Potosí
Tzalam-cubic	
Vachacata	Michoacan
Xanin-tzinziki	Michoacan
Xaxaxacotic	Michoacan
Xaxaxaoti	Morelos

Tabla 3 Usos medicinales de *Galphimia glauca*

Parte del vegetal	Vía de administración	Usos populares	Estado
Flores	oral	empacho bñs corazón nervios	Guerrero
	local	hongos	San Luis Potosí
Hojas	oral	emofente antidiarreico embarazadas que sufren de "flores blancas"	Guanajuato Chihuahua Morelos
		enfermedades mentales	Guanajuato
	local	heridas	Chihuahua, Sinaloa y Guanajuato
Raíz	oral	obstrucción de orina	Sonora
*	oral	antiblenorreico	
	varios	antidisentérico	
	varios	antipaludico	
	varios	gastroenteritis	

* No hay información.

1.3. Antecedentes de *Ipomoea stans*

La *Ipomoea stans* Cav. pertenece a la familia de las Convolvulaceas, posee una amplia distribución en México (Figura 12), crece en pastizales, matorrales xerófilos y terrenos de cultivo, es conocida con los nombres vulgares de tlaxcapan, espantalobos, tanibata, pegajosa, cacastlapa, tripa de vaca, hierba de buey, tripa de Judas, melenqui y temecate.

La especie vegetal se caracteriza por ser una hierba perenne, de rizoma leñoso de 50 a 80 cm de largo, 0.5 a 2 cm de diámetro; tallo rañoso, hojas simples, alternas, oblongas u oblongo-lanceoladas, de 1.5 a 6 cm de largo, de 1 a 3 cm de ancho, ápice obtuso atruncado, margen irregularmente dentado, base atenuada, truncada o semicordada, con pecíolo de 3 a 5 mm de largo, flores solitarias o en pares en las axilares foliares, bisexuales, actinomorfas, cáliz de cinco sépalos; corola simpétala, de color púrpura con el tubo blanco, infundibuliforme, de 5 a 7.5 cm. de largo, cinco estambres unidos a la base de la corola; ovario súpero; frutos cápsulados ovoides, de 1 a 2 cm. de largo, de 7 a 16 mm de diámetro, galabras; semillas de color café de 4 a 10 mm de largo, de 5 a 6 mm de ancho y finamente pubescentes (Linares, Bye y Flores; 1990).



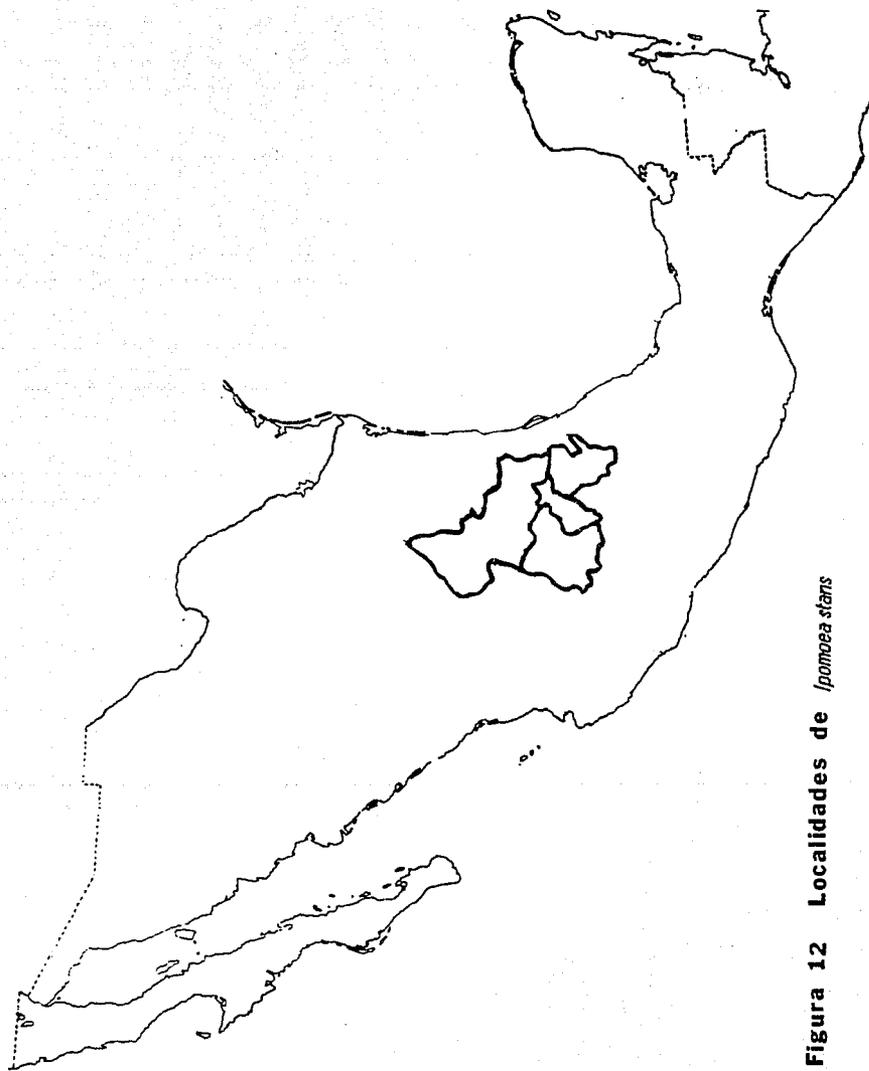


Figura 12 Localidades de *Ipomoea stans*

I. stans es utilizada folclóricamente contra el mal de San Vito, ataques epilépticos, purgante (Martínez, M; 1990), en combinación con flor de azahar, flor de manita, palo de Brasil, salvia y tila para los nervios (Linares, Bye y Flores;1990) antiespásmico, contra la bñs, catártico, nefritis, oftalmia, sedante (Díaz, 1976), clorético (Gonzalez, 1984) y golpes (Castro, 1988). La parte utilizada del vegetal es el rizoma.

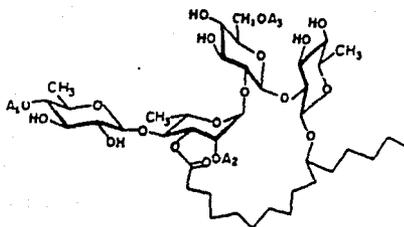
Aunque desde el punto de vista fitoquímico el género ha sido investigado ampliamente, la literatura reporta escasas investigaciones acerca de la especie. El Cuadro 11 señala el contenido metabólico de la especie vegetal.

Cuadro 11 Metabolitos secundarios aislados de *Ipomoea stans*

Constituyente

Estructura

Acido (s)-11-hidroxi palmítico-11-O- β -
 quinovopiranosil-1,4- α -ramnopiranosil-1,2- β -
 glucopiranosil-1,2- β -quinovopiranosido



A₁+A₂ 2-METHYLBUTANOIC ACID
 A₃ 3-HYDROXY-2-METHYL BUTANOIC ACID

1.4 Antecedentes de *Juglans regia*

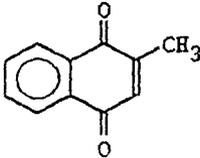
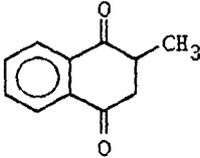
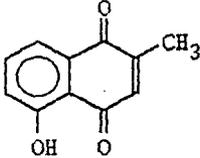
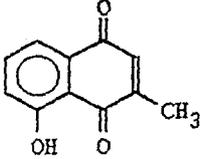
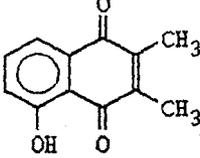
Juglans regia L. (Familia Juglandaceae) es conocida popularmente como Nogal de castilla, es originario de Europa y Asia, se cultiva en climas templados. Se caracteriza por ser un árbol grande de 5-13 m., hojuelas oblongas u oblongo ovadas de 7-12 cm.; flores masculinas en amentos; las femeninas en racimos; fruto globoso con semilla redonda de cáscara rugosa. (Martínez, M., 1979).



El cocimiento de las hojas del nogal de castilla se utiliza como antiescrofuloso, en lavados vaginales contra leucorrea y depurativo. El té combinado con zarzaparrilla se prescribe para purificar la sangre, aumentar los glóbulos rojos y en afecciones del corazón (Martínez, M., 1990). Díaz ha reportado su uso como agente astringente, antiblenorreico, cicatricial y regenerativo, eupeptico, en otitis y para las pústulas malignas. Maldonado (1989) menciona su utilidad para curar granos y salpullido.

Juglans regia ha sido una especie vegetal estudiada ampliamente desde el punto de vista fitoquímico, el Cuadro 12 enumera los metabolitos secundarios aislados de la especie.

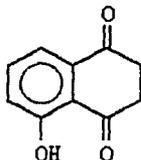
Cuadro 12 Metabolitos secundarios descritos para *Juglans regia*

Constituyente	Estructura	Referencia
2-metil-1,4-naftoquinona		Blinder, R., 1989
2,3-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona		"
5-hidroxi-3-metil-1,4-naftoquinona		"
5-hidroxi-3-metil-1,4-naftoquinina		"
2,3-dimetil-5-hidroxi-1,4-naftoquinina		"

Cuadro 12 Metabolitos secundarios descritos para *Juglans regia* (Continuación).

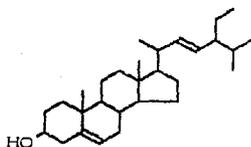
Juglona

Lemberkovic, 1987



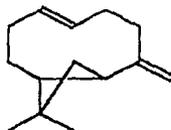
Estigmasterol

Wang, H.: 1986



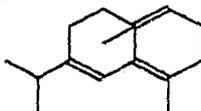
Cariofileno

Buttery, R.: 1986



Germacreno D

"



β -pineno

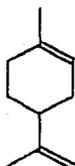
"



Cuadro 12 Metabolitos secundarios descritos para *Juglans regia* (Continuación)

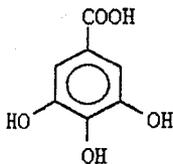
Limoneno

Buttery, R. G.; 1986



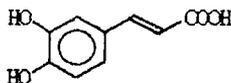
Acido galico

Grčić-Vasić, 1981



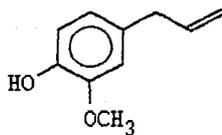
Acido cafeico

"



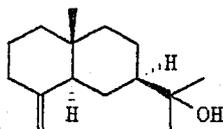
Eugenol

Nahrstedt, A.; 1981



β-Eudesmol

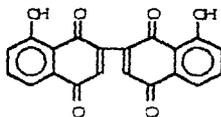
"



Cuadro 12 Metabolitos secundarios descritos para *Juglans regia*

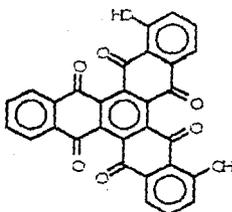
3,3'-bisjuglona

Pardhasaradhi, 1970



Trisjuglona

Sidhu, G. S.; 1975



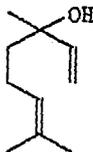
Borneol

Popescu, H.; 1974



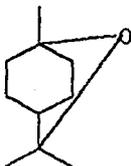
Linolool

"



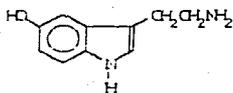
Cuadro 12 Metabolitos secundarios descritos para *Juglans regia*

1,8- Cineol



Popescu, H.; 1974

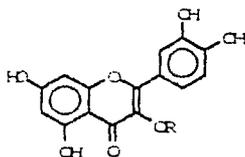
Serotonina



Bergmann, L.; 1976

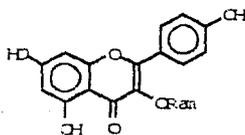
Quercetina

R= 3-ramnosido
3-galactosido



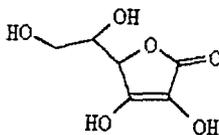
Spiegl, P.; 1969

3-ramnosil kaempferol



"

Acido ascorbico

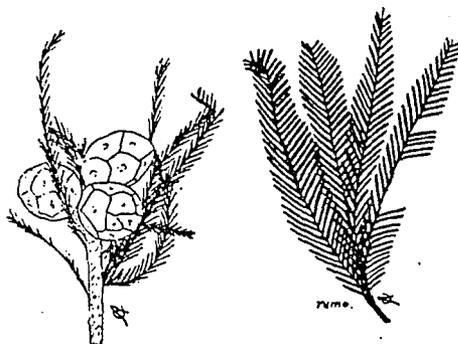


Istratescu, 1969

Los estudios farmacológicos del género reportan actividad antimutagénica (Ruan, C.;1989), propiedades antivirales (Hussun, G. P.;1986), efectos alelopáticos (Rietveld, W. J.;1983), efecto hipocolesterolemico (Revel, A. 1982), supresión de la transformación linfocítica (Oppenheim, J.; 1974), efecto goitrogénico (Linazasoro, J. M.; 1970), actividad antitumoral (Bhargava, U. C.; 1968), efecto espasmodico (Izzet, K.; 1966) y acción bactericida (Lagrange, E.; 1954).

1.5. Antecedentes de *Taxodium mucronatum*

Taxodium mucronatum Ten. pertenece a la familia de las Pináceas, se le identifica con los nombres vulgares de Penhamú, Yaga guichiciña (zapoteca) y sabino, se distribuye en lugares de clima cálido o semicálido a orillas de los ríos. Se caracteriza por ser un árbol corpulento, de 20 a 30 m de altura, de tronco recto ensanchado cerca de la base, hojas de 6 a 12 mm de largo, conos subglobosos de 1.5 a 2.5 cm de diámetro (Martínez, M.; 1990).



La Tabla 4 resume el uso folclórico medicinal de *T. mucronatum*. Desde el punto de vista fitoquímico se han realizado varias investigaciones, el Cuadro 13 presenta los metabolitos secundarios aislados de esta fuente natural.

Tabla 4 Usos medicinales de *Taxodium mucronatum*.

Parte del vegetal	Vía de administración	Uso popular	Referencias
Corteza	local	astringente	1
		quemaduras	1
		cutis escamoso	1
		herpes	1
	oral	antidiarreico	1
		emenagogo	1
		bronquitis	1
Hoja	local	antiodontalgico	1
		antiescabiatico	1
	oral	elefantiasis	2
		diurético	2
Planta entera	oral	varices	1
		padecimientos hepáticos	2
		digitalico	2
		diurético	2
		hemorroides	2
		hipotensor	2
		varices	2
Semilla	oral	antidiarreico	2
Tallo	*	astringente	2
		cicatrical y regenerativo	2
		ositocico	2
		quemaduras	2

1. Martínez, M.; 1990; 2. Díaz; 1976; * no hay información.

Cuadro 13 Metabolitos secundarios descritos para *Taxodium mucronatum*

Nombre y Referencia

Estructura

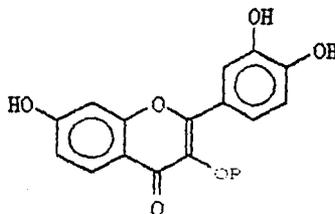
3-O- β -D-glucopiranosil quercetina

R= glucosa

3-O- β -D-galactopiranosil quercetina.

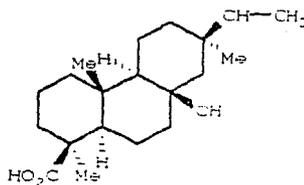
R= galactosa

(Khabir, M.; 1986)



Acido 8- β -hidroxipimar-15-en-19-oico

(Ramos, A. R.; 1985)



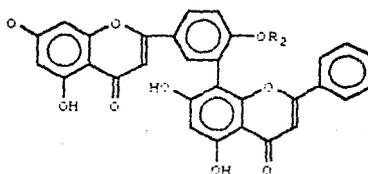
Podocarpus flavona A

R₁=R₂=H

Sciadoplisina

R₁=H, R₂=Me

(Ishratullah, K.; 1978)



Cuadro 13 Metabolitos secundarios descritos para *Taxodium mucronatum*

Hinokilavona

$R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$

Cytomecina A

$R_1=R_2=R_3=R_4=H, R_5=Me$

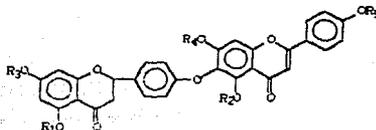
Isocytomecina

$R_1=R_2=R_3=R_5=H, R_4=Me$

Cytomecina B

$R_1=R_2=R_3=H, R_4=R_5=Me$

(Ishratullah, K.; 1978)



1.2. El aislamiento de la aorta torácica de rata como una prueba general para efectos farmacológicos

1.2.1. Anatomía de la aorta.

La aorta es un músculo liso vascular que se divide en aorta ascendente y aorta descendente. La aorta ascendente es la porción que inicia desde el pericardio y da ascenso a dos ramificaciones denominadas arterias coronarias derecha e izquierda, las cuales salen de la aorta cerca de su origen y corren hacia abajo sobre el corazón.

El arco de la aorta cruza ventral a la traquea, luego la dobla dorsal y posteriormente a la izquierda continuando hacia abajo como aorta descendente. Del arco ascienden las siguientes ramificaciones: la innominata, la carótida izquierda y la subclavia izquierda.

Debido a que la aorta descendente pasa a través del tronco, se ha dividido para propósitos descriptivos en la porción torácica y abdominal.

La aorta torácica se extiende desde el arco aórtico hasta el diafragma, inicia ligeramente a la izquierda de la columna vertebral, pero se aproxima a la línea media conforme alcanza el diafragma.

La característica de la aorta de rodear estructuras es similar a la presentada en el hombre, excepto por el hecho de que en la rata, la vena cava superior izquierda cruza la aorta para alcanzar el corazón y la vena azigos se encuentra a la izquierda en lugar de a la derecha de la aorta. Las ramificaciones de la aorta torácica son las intercostales, las subcostales y la frénica superior.

La aorta abdominal comienza desde el punto donde penetra al diafragma y termina dividiéndose en las arterias ilíacas izquierda y derecha. Se encuentra sobre la línea media de la columna vertebral ligeramente dorsal a la vena cava inferior y es atravesada por la vena renal izquierda. Las ramificaciones de la aorta abdominal se dividen en ramificaciones viscerales (superior mesentérica, inferior mesentérica, superior e inferior suprarenal, renal, espermática interna, ovárica) y ramificaciones parietales (lumbares, ilíacas, media caudal, ilíaca). (Greene, E.: 1963).

1.2.2. Estructura fina del músculo liso vascular.

La superficie membranal del músculo liso vascular es una estructura trilaminar de aproximadamente 8 nm., se caracteriza por poseer una serie de invaginaciones y vesículas de 50 a 80 nm, las cuales contienen glicosaminoglicanos. El retículo sarcoplásmico liso (R.S.L.) es libre de ribosomas, en contraste con el retículo sarcoplásmico rugoso (R.S.R.). El R.S.R. es más prevalente en los polos nucleares, mientras que el R.S.L. es mayoritario en la superficie membranal. La mitocondria se encuentra localizada en los polos del núcleo, los granulos invaginados en ella contienen iones divalentes (Ca^{2+} , Si^{2+}). El aparato de Golgi se compone de membranas laminares y vacuolas, se encuentra en la región perinuclear. Hay tres tipos de filamentos presentes: densos, delgados e intermedios

1.2.3. Actividad contractil en la aorta torácica *in vitro*

La actividad contractil de la aorta torácica *in vivo*, esta mediada por la actividad neuronal (noradrenalina), hormonal (angiotensina II) y por factores locales (adenosina). *In vitro* la actividad contractil del tejido puede inducirse con un neurotransmisor, por ejemplo noradrenalina o adrenalina

La noradrenalina es una catecolamina liberada de la varicosidad, estimulando los receptores α_1 situados en el músculo. Los receptores adrenérgicos presinápticos α_2 localizados en la membrana de la varicosidad controlan la liberación del neurotransmisor, la presencia y la funcionalidad de la pequeña población de receptores adrenérgicos presinápticos α_1 todavía no se ha establecido.

La estimulación vascular de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 por noradrenalina induce una respuesta vasoconstrictora lo que sugiere que los receptores α_2 son predominantemente adrenérgicos mientras que los receptores α_1 son de naturaleza noradrenérgica.

1.2.4. Ensayo

La aorta torácica aislada de rata es una preparación que puede ser usada como un escrinin no específico para efectos farmacológicos de los extractos de plantas (Galey, F.D.: 1989, Aquel, M.: 1991)

El ensayo consiste en aislar la aorta torácica, limpiarla de tejido conectivo , cortarla en espiral y montarla en una cámara de incubación con una solución fisiológica, después de la estabilización del tejido se induce una contracción tónica sostenida con una solución de noradrenalina; sobre dicha contracción se prueba la capacidad de los extractos de inhibir o estimular la contracción inducida por noradrenalina sobre el tejido.

1.2.5. Ventajas y limitaciones del método.

La ventaja de usar un método inespecífico para detectar actividad farmacológica de un extracto de una droga cruda es principalmente que diferentes tipos de actividad puedan ser detectadas con una prueba. La prueba es ideal para monitorear un proceso para la obtención de compuestos farmacológicamente activos.

Una seria desventaja del método es la dificultad de obtener información acerca del mecanismo que produce la respuesta observada . Un compuesto activo del extracto puede causar una inhibición de la contracción por actuar sobre diferentes sistemas receptores, alguna información se puede obtener aplicando el conocimiento de agonistas y antagonistas , pero esto es difícilmente práctico cuando un extracto contiene un sin número de compuestos, muchos de los cuales pueden tener influencia sobre los resultados.

2. Justificación y Objetivos

Las consideraciones en las que se fundamenta la propuesta de la presente investigación son las siguientes:

1. Actualmente la creciente necesidad de encontrar principios activos conlleva a la búsqueda y diseño de evaluaciones farmacológicas primarias que permitan por una parte el seguimiento de estudios fitoquímicos biodirigidos y por otra la posibilidad de correlacionar la actividad farmacológica observada con actividades más complejas.
2. Siendo que el común en el uso folclórico medicinal de las cinco especies objeto de estudio es señalado en afecciones sobre el sistema vascular, se consideró pertinente determinar el efecto de los extractos acuosos de las especies vegetales sobre la contracción inducida por noradrenalina en aorta torácica aislada de rata.

Para el cumplimiento de los objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos particulares

1. Realizar una revisión bibliográfica de los aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de las especies a estudiar.
2. Preparación de los extractos acuosos vía una extracción continua
3. Evaluación del efecto de los extractos acuosos sobre la contracción inducida por noradrenalina en aorta torácica aislada de rata.
4. Establecer las curvas concentración-respuesta para cada una de las especies.
5. Obtener las CI_{16} , CI_{50} y la CI_{84}
6. Obtener la relación de la potencia del efecto de cada especie.

Con base en los antecedentes la hipótesis de trabajo plantea:

Encontrar una modificación de la actividad contractil del músculo liso vascular (aorta torácica).

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. Recolección y extracción

Las especies utilizadas en este estudio fueron recolectadas en varias partes del Estado de México y Guerrero. La tabla 5 presenta el lugar de origen, la parte del vegetal recolectada y el Voucher correspondiente a cada especie.

Tabla 5. Resumen de los datos de recolección de las especies vegetales

Nombre científico	Localización	Parte del vegetal	Voucher
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	Guerrero	Flor	18127
<i>Galphimia glauca</i>	Guerrero (Ayutla)	Flor y hoja	18095
<i>Ipomoea stans</i>	Puebla (El seco) Morelos (Cuñingo)	Raíz	18126
<i>Juglans regia</i>	México (Ozumba y Amecameca)	Hojas	18129
<i>Taxodium mucronatum</i>	Estado de México	Tallo y follaje	18128

Una muestra de referencia de cada vegetal se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional, Instituto de Biología, U.N.A.M.

Los materiales vegetales secos, se cortaron en pequeños trozos y se trituraron utilizando un mortero; 20 g de la parte del vegetal especificada en la tabla 5 de cada especie se extrajeron

mediante una extracción continua vía Soxhlet con 120 ml de agua bidestilada por un período de 2 1/2 hr.

El extracto acuoso resultante se concentró *in vacuo* hasta sequedad.

5.2. Disección de la aorta torácica aislada.

Para el estudio se utilizaron ratas macho adultas (200-250 g) de la cepa Wistar, alimentadas *ad libitum* con Purina Chow y mantenidas en un bioterio con un ciclo luz/obscuridad de 12hr/12hr.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente se diseccionó la aorta torácica la cual se colocó en una solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): Glucosa, 12.2, NaHCO_3 , 25, NaCl, 119, KCl, 4.6, KH_2PO_4 , 1.2, MgSO_4 , 1.2, y CaCl, 1.5. La solución se preparó con agua bidestilada, el pH fue ajustado a 7.4 mediante burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5 % CO_2 en 95 % O_2 .

La aorta torácica fue limpiada de grasa, sangre y tejido conectivo, posteriormente fue cortada en espiral y finalmente se cortó en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud (ver Figura 13).

5.3. Sistema de registro

Para el estudio se empleó un sistema de registro isométrico vertical de tejido aislado. Cada segmento de tejido se colocó en una cámara de incubación, la cual contenía 10 ml de la solución Ringer Krebs-Henseleit burbujada continuamente con una mezcla gaseosa de 5 % de CO_2 en O_2 y mantenida a una temperatura de 37°C. En estas condiciones el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor Grass modelo FT 03C, el cual detectó las señales mecánicas de las contracciones y las envió a un polígrafo Grass de ocho canales modelo 7D. La figura 14 muestra el sistema de registro.

La fuerza de tensión empleada en el tejido fue de 10 mN (1g), lo cual corresponde a dos centímetros de desplazamiento de la pajilla.

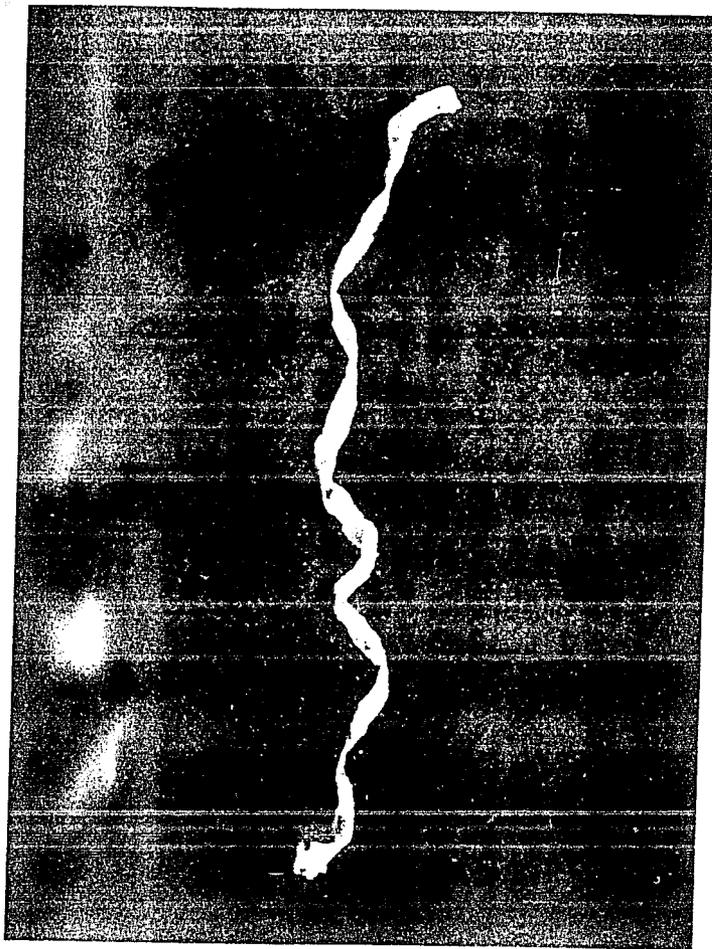


Figura 13 Aorta torácica aislada

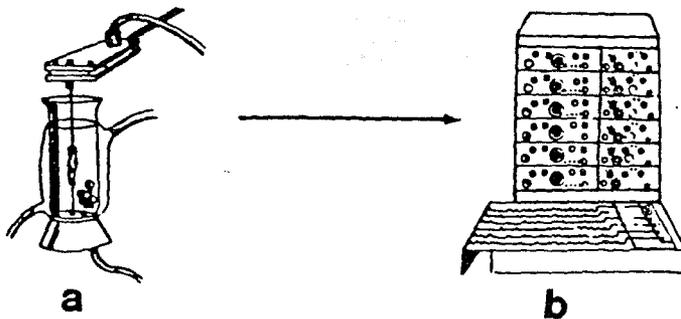


Figura 14 Sistema de registro

a) Cámara de incubación y transductor

b) Poligrafo

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Estandarización de la respuesta a noradrenalina.

Con la finalidad de estabilizar el tejido cada segmento de aorta torácica fue mantenido en solución Ringer Krebs-Henseleit durante 30 min. Después de este período, se adicionó al baño una solución en agua bidestilada de Noradrenalina (* Arterend Sigma Chemical Co., Sn. Luis Mo.) a una concentración final de 10^{-5} M. La contracción tónica sostenida inducida por noradrenalina fue registrada durante 40 minutos, período después del cual los tejidos fueron lavados con solución Ringer Krebs-Henseleit. Cuando la contracción regresó a la línea basal y con la finalidad de observar la viabilidad del tejido y la reproducibilidad de la respuesta a noradrenalina, se hizo una segunda adición de este compuesto a la misma concentración de la primera adición (10^{-5} M), esta contracción también se registro durante 40 minutos.

4.2. Evaluación del efecto de los extractos acuosos.

Para determinar el efecto de los diferentes extractos acuosos sobre la contracción inducida por noradrenalina de los segmentos aorticos, se diseño el siguiente experimento: Después de un período de estabilización del tejido de 30 minutos se indujo una contracción tónica por noradrenalina 10^{-5} M, la cual fue registrada durante 20 minutos y tomada como valor control. Inmediatamente después se adicionaron directamente al baño los extractos acuosos de: *Chiranthodendron pentadactylon*, *Taxodium mucronatum*, *Galphimia glauca*, *Ipomoea stans* y *Juglans regia* los cuales fueron probados por separado a tres diferentes concentraciones (en un intervalo de 0.5-12 mg/ml). Sólo una concentración por experimento fue probada. El efecto se registro durante 20 minutos y este valor fue comparado con el control. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con solución Ringer Krebs-Henseleit con el objeto de alcanzar la línea basal, finalmente se adicionó una segunda

aplicación de noradrenalina a la misma concentración del control (10^{-5} M) y la contracción fue registrada también por 20 minutos para observar la viabilidad y recuperación del tejido.

4.3 Análisis de los datos

Los efectos de los extractos acuosos de las diferentes especies se determinaron midiendo el área bajo la curva en cm^2 de las contracciones inducidas por noradrenalina durante intervalos de 20 minutos en ausencia del extracto (control) y 20 minutos en presencia del extracto (efecto). Para estas determinaciones se utilizó un planimetro digital Tamaya, modelo Planix 7. Los datos fueron cuantificados en porcentaje de inhibición inducido por los extractos en relación al control, considerado como 100%. Los resultados fueron las medias \pm D.E. de ocho experimentos. Con estos valores se graficaron las curvas concentración-respuesta, así por interpolación de tales curvas se obtuvieron las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50} a la mitad de la respuesta máxima de noradrenalina 10^{-5} M en ausencia del extracto), sus límites de confianza, las CI_{16} y CI_{84} , y el valor de la pendiente de la recta. Todos estos valores fueron obtenidos por el método de Litchfield y Wilcoxon, (1949).

Con base a la especie con mayor actividad se hizo la relación de potencia del efecto de los extractos, la cual fue obtenida por la fórmula:

$$\text{Potencia} = \frac{\text{CI}_{50} \text{ de X especie vegetal}}{\text{CI}_{50} \text{ de la especie más activa}}$$

dando valor de 1.00 a la especie con mayor actividad.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de la respuesta a noradrenalina

En este estudio se observó que la contracción tónica sostenida inducida por noradrenalina fue inmediata y se mantiene constante durante el tiempo de experimentación.

El área bajo la curva de las respuestas a noradrenalina fueron comparadas entre sí, observándose que no se modifica la amplitud de la contracción inducida por noradrenalina, siendo esta reproducible (Ver Figura 15, parte superior).

5.2. Evaluación del efecto de los extractos acuosos.

Los extractos acuosos de las cinco especies vegetales objeto de estudio a diferentes concentraciones fueron capaces de inducir inhibición sobre la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-5}M$) de la aorta torácica aislada de rata. Cabe destacar que en todos los casos se observa recuperación del tejido. (Figura 15).

La tabla 6 muestra las concentraciones a las cuales se trabajó cada extracto y su respectivo porcentaje de inhibición, estos resultados permitieron la construcción de las curvas concentración-respuesta para cada uno de los extractos. En todos los casos se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, inducido por los extractos acuosos de las diferentes especies.

La gráfica 1, muestra la inhibición producida por el extracto acuoso de *Chiranthodendron pentadactylon*. Sin embargo se observó que a la concentración de 3 mg/ml, el efecto fue exitatorio mientras que a concentraciones mayores (6,12 mg/ml) resultó un efecto inhibitorio de la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-5}M$).

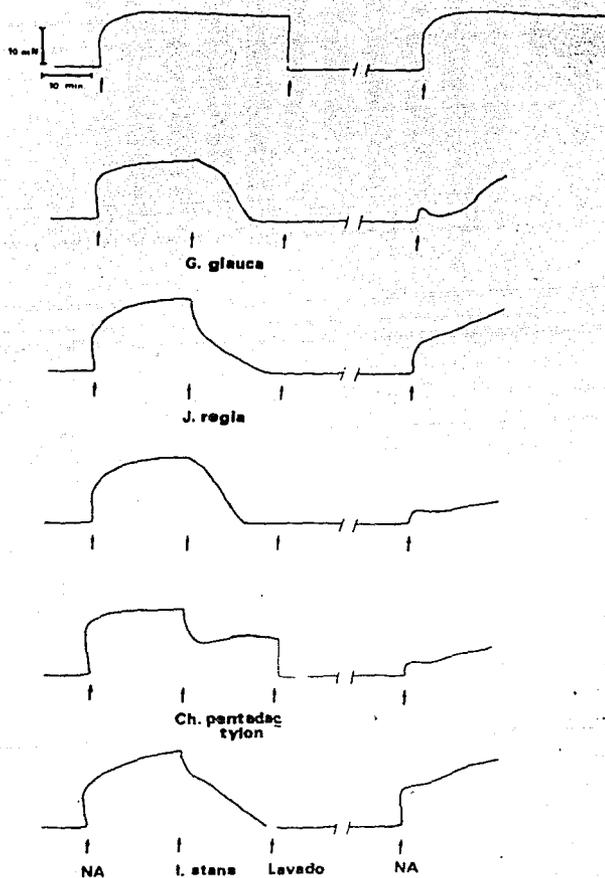


Figura 15 Registro del efecto de los extractos

Con respecto a *Galphimia glauca* se evaluaron los extractos acuosos de las flores y de las hojas encontrándose un efecto relajante sobre la contracción de noradrenalina (Gráfica 2 y 3), hay que señalar que se observó mayor actividad para el extracto de las flores (Ver Figura 16).

Las gráficas 4 y 5 representan el comportamiento de los extractos acuosos de *Ipomoea stans* y *Juglans regia* respectivamente .

El comportamiento de la especie *Taxodium mucronatum* se muestra en la gráfica 6 donde se observa un efecto relajante de la contracción inducida por noradrenalina. Cabe destacar que durante el desarrollo del experimento, el extracto acuoso mostró polimerización por lo que fue necesario evaluarlo inmediatamente después de concentrarlo.

Con el objeto de comparar el comportamiento del efecto inhibitorio de cada uno de los extractos acuosos de las cinco especies estudiadas, se construyó la gráfica 7. En ella se puede observar claramente que el extracto de *Galphimia glauca* (flores) requiere de una menor concentración con respecto a las demás para producir la mitad de la respuesta máxima de noradrenalina 10^{-5} M. En esta gráfica se muestra que el porcentaje de inhibición inducido por los extractos de las cinco especies tuvo un comportamiento lineal dependiente de la concentración.

La tabla 7 muestra los valores obtenidos para la CI_{16} , CI_{50} y CI_{84} con su respectivo valor de la pendiente de la recta.

La tabla 8 resume los valores de la CI_{50} , sus límites de confianza y los valores de la potencia de cada especie vegetal; cabe mencionar que los valores de potencia fueron obtenidos con relación al extracto de *G. glauca* (flores) al cual se le asignó una potencia igual a 1. Se puede observar que en orden de mayor a menor potencia se encuentran los extractos de: *G. glauca* (flores) > *T. mucronatum* y *G. glauca* (hojas) > *J. regia* > *I. stans* > *Ch. pentadactylon*.

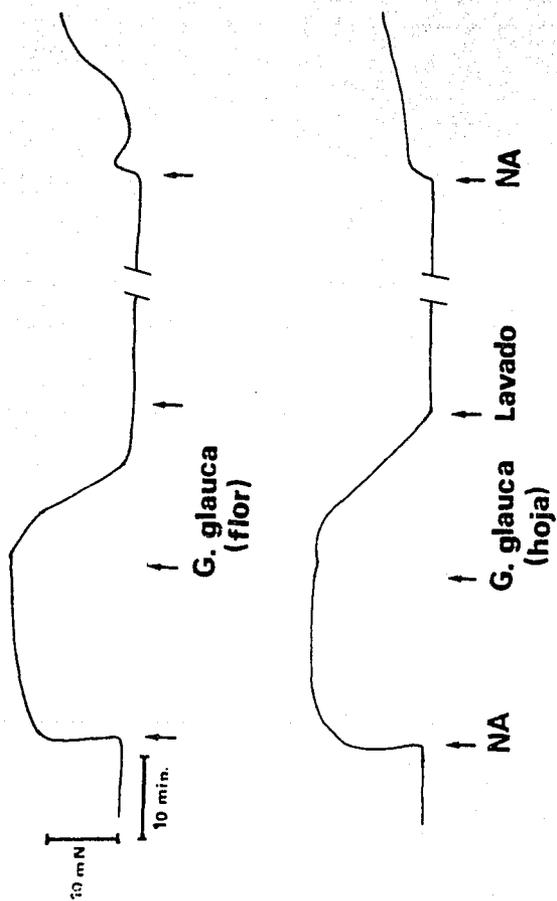
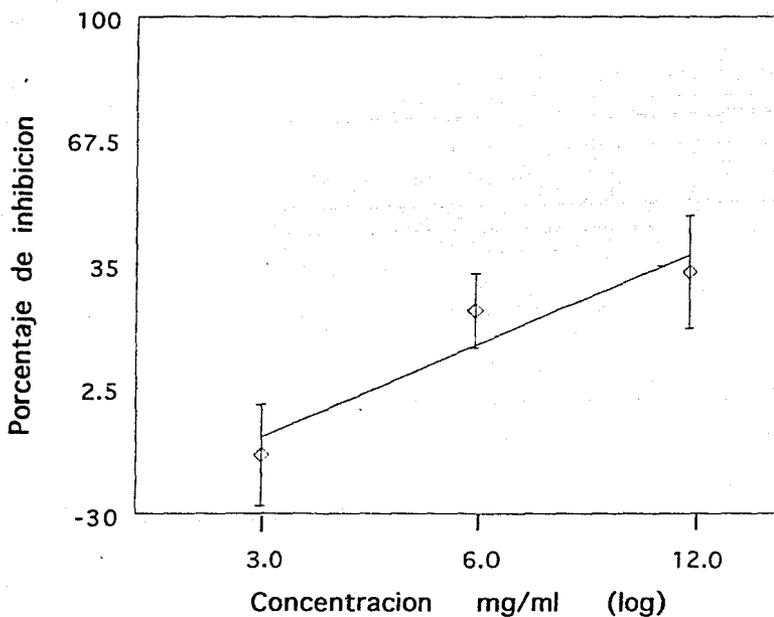
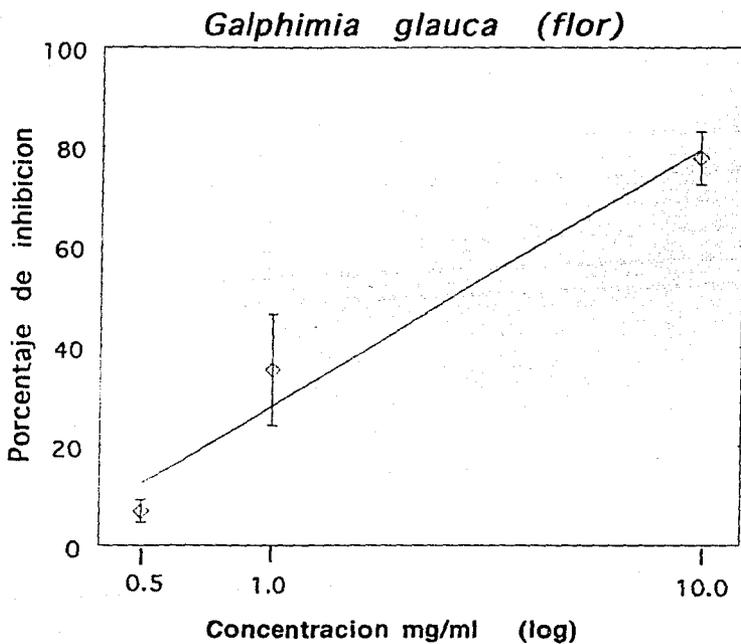


Figura 16 Registro del efecto de los extractos de *Galphimia glauca*

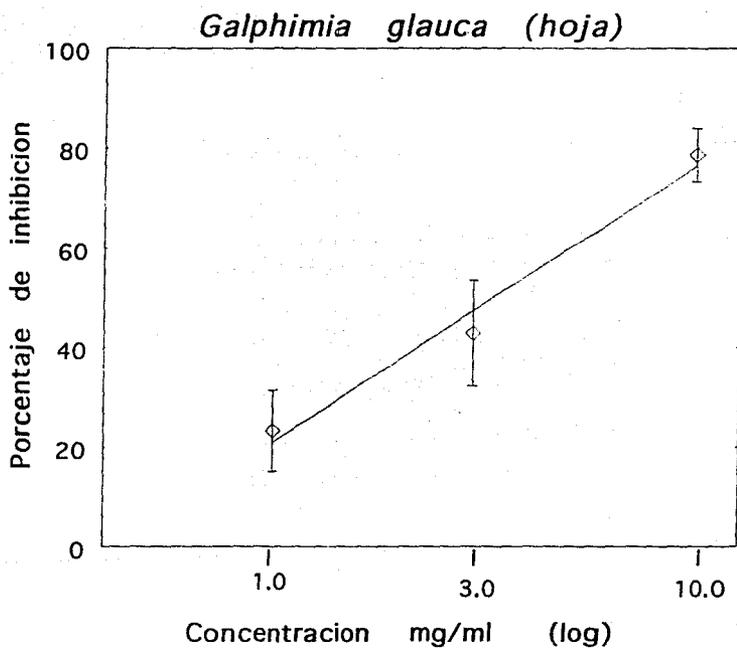
Chiranthodendron pentadactylon



Gráfica 1 Curva concentración – respuesta del efecto inhibitorio sobre la contraccion inducida por noradrenalina

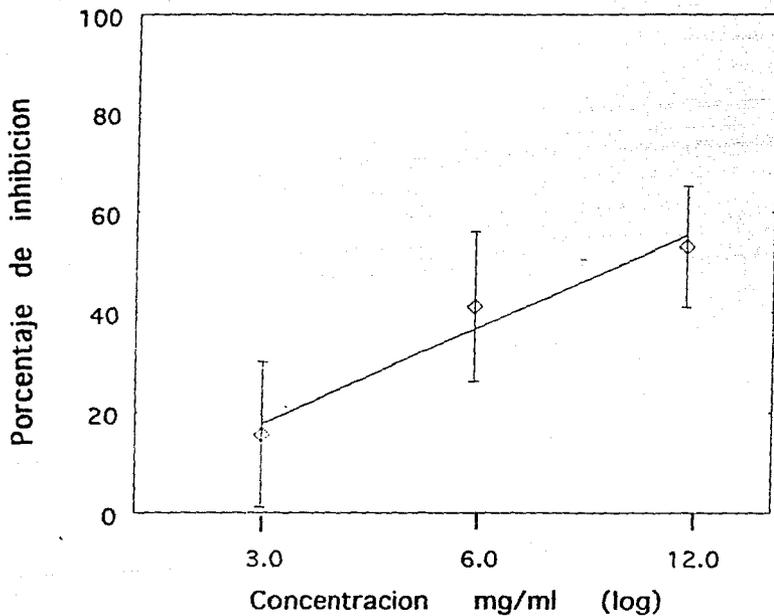


Gráfica 2 Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por noradrenalina



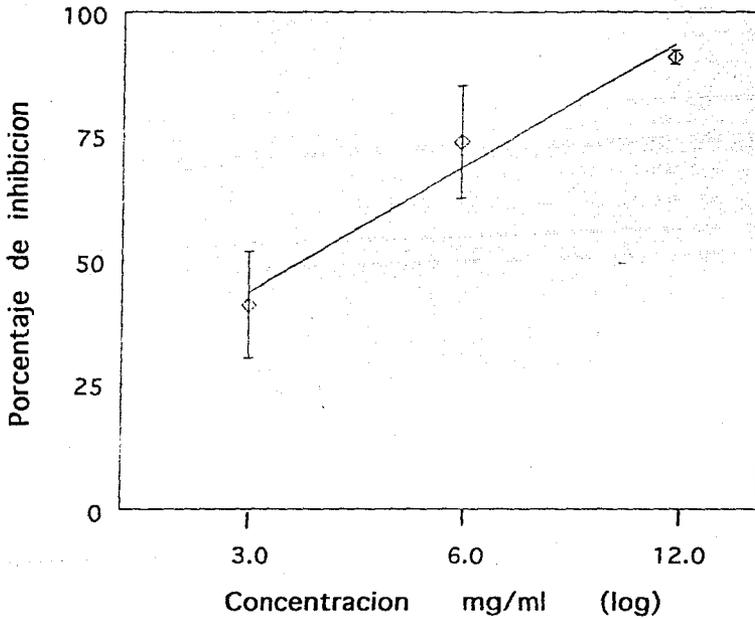
Grafica 3 Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre la contraccion inducida por noradrenalina

Ipomoea stans



Gráfica 4 Curva concentración – respuesta del efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por noradrenalina

Juglans regia



Grafica 5 Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por noradrenalina

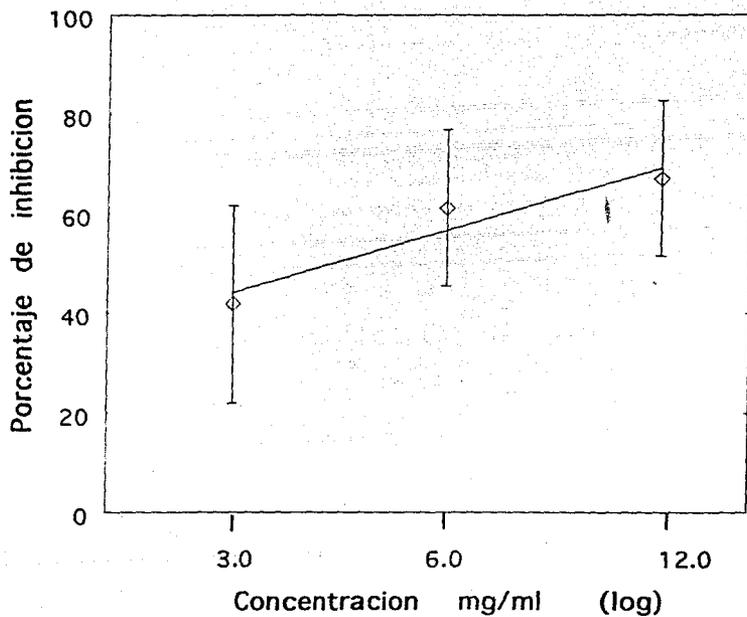
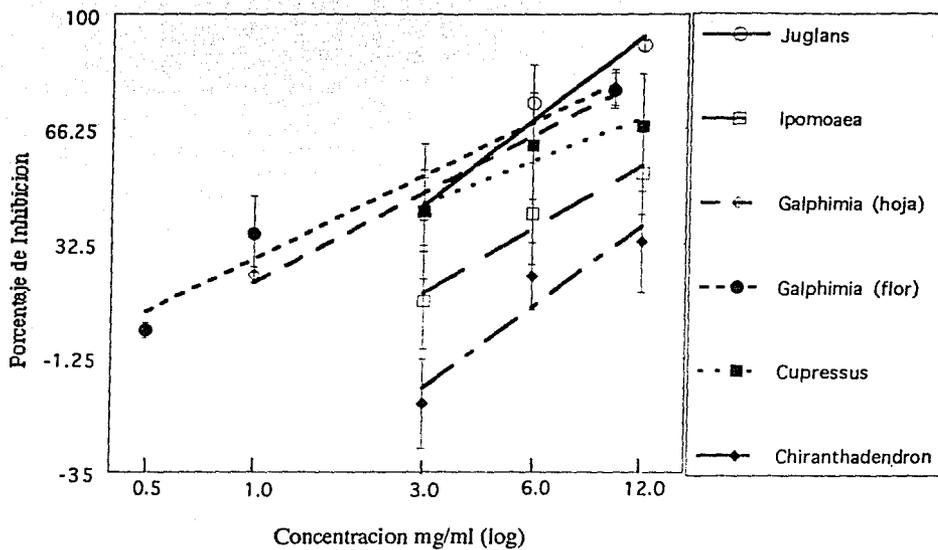


Grafico 6 Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por noradrenalina



Grafica 7 Grafica comparativa

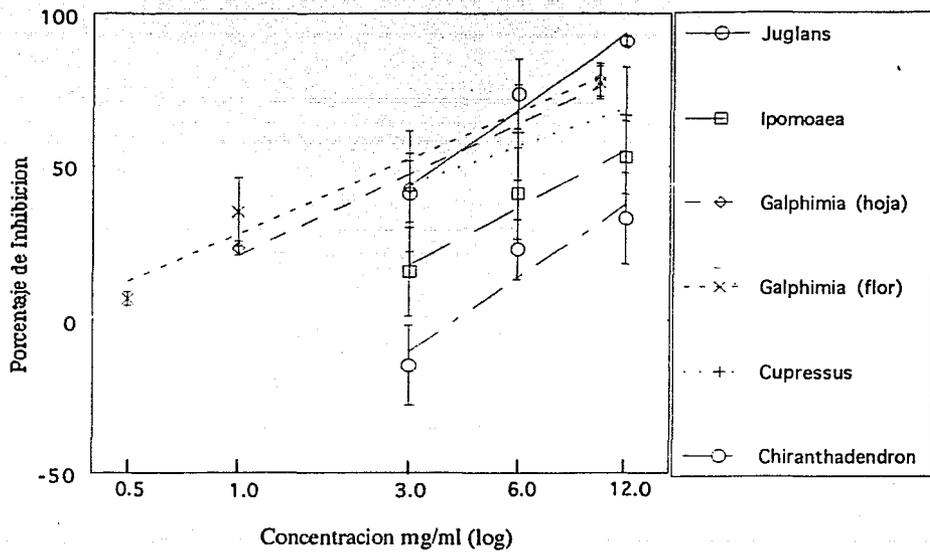


Tabla 6: % de inhibición de la contracción inducida por noradrenalina (10⁻⁵M) sobre aorta torácica de rata in vitro

ESPECIE	CONCENTRACION (mg/ml)	% DE INHIBICION
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	3	-14.83 ± 13.1
	6	22.91 ± 9.8
	12	33.10 ± 14.8
<i>Cupressus sp.</i>	3	41.86 ± 19.8
	6	61.20 ± 15.7
	12	67.72 ± 15.6
<i>Galphimia glauca (flores)</i>	0.5	6.89 ± 2.2
	1	35.18 ± 11.2
	10	77.67 ± 5.3

Tabla 6: % de inhibición de la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-5}M$) sobre aorta torácica de rata in vitro (continuación)

ESPECIE	CONCENTRACION (mg/ml)	% DE INHIBICION
<i>Galphimia glauca</i> (hojas)	1	23.29 ± 8.1
	3	42.91 ± 10.6
	10	78.55 ± 5.5
<i>Ipomoea stans</i>	3	15.56 ± 14.3
	6	41.22 ± 14.9
	12	63.16 ± 12.1
<i>Juglans regia</i>	3	40.96 ± 10.8
	6	73.38 ± 11.4
	12	91.05 ± 1.4

Tabla 7: Valores de las concentraciones inhibitorias de las especies vegetales sobre la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-5}M$) sobre la aorta torácica de rata in vitro

ESPECIE	CI 16 (mg/ml)	CI 50 (mg/ml)	CI 84 (mg/ml)	PENDIENTE
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	7.4	18	44	79.61
<i>Cupressus sp</i>	0.6	4.2	30.5	42.9525
<i>Galphimia glauca</i> (flores)	0.5	2.6	13.8	51.4111
<i>Galphimia glauca</i> (hojas)	0.7	3.35	15	55.4707
<i>Ipomoea stans</i>	3.0	8.2	22.5	79.0618
<i>Juglans regia</i>	1.35	3.4	8.8	83.1976

Tabla 8 : Concentración que induce la mitad de la respuesta máxima de Noradrenalina (10^{-5} M) sobre la contracción de la aorta torácica -de rata in vitro

ESPECIE	CI 50 (mg/ml)	LIMITE INFERIOR- LIMITE SUPERIOR	POTENCIA
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	18.0	10.87 - 29.79	6.92
<i>Cupressus sp,</i>	3.35	1.39 - 8.05	1.28
<i>Galphimia glauca (flores)</i>	2.6	1.00 - 6.78	1
<i>Galphimia glauca (hojas)</i>	3.35	1.39 - 8.05	1.28
<i>Ipomoea stans</i>	8.2	4.64 - 14.49	3.15
<i>Juglans regia</i>	3.4	2.00 - 5.77	1.31

6. DISCUSION DE RESULTADOS.

Las cinco especies estudiadas mostraron una actividad relajante sobre la contracción inducida por noradrenalina en la aorta torácica aislada de rata. El efecto inhibitorio que produjeron los extractos sobre la contracción de noradrenalina fue reversible.

Ch. pentadactylon sugiere un efecto bifásico relacionado con la concentración, ya que a bajas concentraciones induce excitación y a concentraciones altas produce relajación.

Colateralmente se ha reportado en la literatura que el extracto acuoso de otra especie del género *Juglans* presenta un antagonismo de la contracción inducida por noradrenalina en la arteria digital equina (Galey, et al: 1989), lo cual concuerda con el efecto inhibitorio que induce *Juglans regia* en el presente estudio.

La comparación de la potencia entre las cinco especies objeto de estudio, permitió observar que el extracto acuoso de *Ch. pentadactylon* es 6.9 veces menos activo que el extracto acuoso de *G. glauca* (flores) el cual posee la mayor actividad; los extractos de las especies *T. mucronatum* y *G. glauca* (hojas) fueron equipotenciales ($P= 1.28$); las especies vegetales *I. stans* y *J. regia*, resultaron ser respectivamente 1.3 y 3.5 veces menos potentes que el extracto de *G. glauca* (flores).

De manera adicional se observó diferencia, aunque no significativa, entre los extractos de *G. glauca* de flores y de hojas, lo cual podría sugerir la existencia de una diferenciación en cuanto a la cantidad de principio o principios activos en los diversos órganos de la planta.

Considerando que las cinco especies poseen actividad relajante sobre este tipo de músculo liso vascular se podría correlacionar con el uso etnomédico que se le atribuye en afecciones sobre el sistema cardiovascular validando así su uso como agente terapéutico en afecciones cardíacas.

La acción relajante que los extractos acuosos produjeron sobre la contracción de noradrenalina en la aorta torácica aislada de rata sugiere un efecto vasodilatador. Así cabría considerar a estos vegetales como fuentes potenciales de principios activos con propiedades vasodilatadoras que disminuyen la resistencia vascular periférica y que pueden ser utilizados con fines

terapéuticos en el tratamiento de padecimientos como: angina de pecho, insuficiencia vascular e hipertensión arterial

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cupressus* sp, *Galphimia glauca*, *Pomoea stans* y *Juglans regia* exhibieron una actividad relajante sobre la contracción inducida por noradrenalina en aorta torácica aislada de rata.
2. La diferencia observada en el comportamiento de los extractos acuosos de *Galphimia glauca* de las flores y de las hojas, permitió concluir que la mayor cantidad del o los principios activos se encuentran en la flor.

ALTERNATIVAS A FUTURO

1. Considerando la importancia en la realización de estudios fitoquímicos biodirigidos, es necesario la evaluación de los extractos metanólicos de las especies objeto de estudio a fin de determinar la presencia de una actividad farmacológica comparable a la de los extractos acuosos.
2. Aislar en lo posible los principios activos responsables de la inhibición de la contracción inducida por noradrenalina sobre la aorta torácica de rata.

Bibliografía

- Bergmann, L.; Grosse, W.: Planta, 94, 47-59 (1976)
- Binder, R. G.: Phytochemistry, 28 (10), 2794-801 (1989)
- Bhandari, K. S.; Gupta, Y. N.: Nat. Appl. Sci. Bull. 26 (2), 31-2 (1974)
- Bhargava, U. C.; Westfull, B. A.: J. Pharm. Sci. 57 (10), 1674-7 (1968)
- Buttery, R. G.; Flath, R. A.: J. Agric. Food Chem., 34 (5), 820-2 (1986)
- Eye, R.: Comunicación personal (1986)
- Camacho, C. M.: Tesis de Maestría, Facultad de Química, U.N.A.M., México (1990)
- Castro, A. E. R.: Tesis, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Iztacala; U.N.A.M., México (1988)
- Cruz, M. C.; Mendoza, S. D.: Tesis de licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M., México (1991)
- Díaz, J. L.: Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México (Monografías científicas I), México, D. F. IMEPLAN (1976)
- Dominguez, X. A.; Gutierrez, A.: Phytochemistry; 11 (19), 2895 (1972)
- Enriquez, R. G.; León, I.; Pérez, F.; Walls, F.; Carpenter, K. A.; Puzzuoli, F. V.; Reynolds, W. F.: Can J. Chem., 70, 1000 (1992)
- Fessenden, R.J.; Fessenden, J. S.: Techniques and experiments for Organic Chemistry, Ed. Willard Grant Press, Boston, 37-39 (1983)
- Galey, F. D.; Beasley, V. R.; Schaeffer, D. J.; Davis, L. E.: J. Vet. Pharmacol. Therap. 12, 411-420 (1989)

González, E. M.; Las plantas medicinales de Durango: Inventario básico -Vicente Guerrero, Durango: CIIDIR-IPN-Unidad Durango (1984)

Grčić-Vasić, J.; J. Arb. Farm., 31, 5-6 (1981)

Harborne, J. B.; Smith, D. M.; Z. Naturforsch., 27 (2), 210 (1972)

Hussun, G. P.; Vilagines, R.; Delaveau, P.; Ann. Pharm., 44(1), 41-8 (1986)

Ishratullah, K.; Rahman, W.; Okigawa, M.; Kawano, N.; Photochemistry, 17 (2), 335 (1978)

Istratescu, G. L.; Farmacia, 17 (9), 539-42 (1969)

Izzet, K.; Acta Med. Turc., 3 (1), 1-15 (1966)

Khabir, M.; Khatoun, F.; Ansari, W.H.; J. Indian Chem. Soc., 63 (8), 781-2 (1986)

Lagrange, E.; Compt. Rend. Soc. Biol., 148, 2097-8 (1954)

Leonard, J.; J. Am. Chem. Soc., 80, 2249-52 (1958)

Lemberkovic, E.; Hethelgi, E.; Acta Pharm. Hung., 57 (3-4), 133-42 (1987)

Linares, E.; Flores, B. P.; Bye, R.; Selección de plantas medicinales de México, Ed. Limusa, México, D. F. (1986)

Linares, E.; Bye, R.; Flores, B.; Tes curativos de México (Segunda edición revisada), Instituto de Biología, U.N.A.M., México (1990)

Litchfield y Wilcoxon

Linazasoro, J. M.; Sánchez, M.; Jiménez, J. A.; Endocrinology, 86 (3), 696-700 (1970)

Maldonado, P.J.; Barriga, R. G.; Contribución al estudio etnobotánico de plantas medicinales en la localidad de Zumpango de Nevi, Gro. Chilpancingo, Gro.; Universidad Autónoma de Guerrero, Escuela de Ciencias Químico Biológicas, p.117 (1989)

Manito, P.; Biosynthesis of natural products, Ed. Ellis Horwood, New York, p. 378 (1981)

Markham, K. R.; Techniques of flavonoid identification, Academic Press, London y New York, p.8 (1982)

Martínez, M.; Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas; Fondo de Cultura Económica, México (1979)

Martínez, M. P.; Las plantas medicinales de México; Ed. Botas, México (1989, 1990)

Mata, R.; Camacho, M.R.; Cervera, E.; Bye, R.; Linares, E.; Phytochemistry, 29 (6), 2037-40 (1990)

Nahrstedt, A.; Velter, U.; Planta Med. 42 (4), 313-32 (1981)

Oppenheim, J. J.; Sandberg, A. L.; Altman, L.; Hook, W. A.; Dougherty, S. F.; Proc. Leucocyte Cult. Conf., 8, 79-84 (1974)

Pardhasatadhi, M.; Hari, B. M.; Phytochemistry, 17 (11), 2042-3 (1970)

Paris, R. R.; Bastien, M.; Ann Pharm. Franc., 18, 205-219 (1960)

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Introduction to Organic Laboratory Techniques; Ed. Saunders, W. B. Saunders Co., Philadelphia, p 419 (1976)

Popescu, H.; Rev. Chim., 25 (3), 242-4 (1974)

Ramos, A. R.; Escamilla, E. M.; Calderón, J.; Rodríguez, B.; Phytochemistry, 23 (6), 1329-30 (1984)

Reguero, M. T.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G.; J. Nat. Prod., 50, 315 (1987)

Reher, G.; Kraus, J. L.; Sinnwell, V.; Kanin, W. A.; Phytochemistry, 22, 1524 (1983)

Revel, A.; Roussel, A. M.; Decoux, G.; Gras Lambert, P.; Briel, H.; Bortard, M.; Cartier, G.; Med. Nutr., 18 (5), 303-15 (1982)

Rietveld, W. J.; J. Chem. Ecol., 9 (2), 295-308 (1983)

Rojas, A.; Tesis de Maestría, Facultad de Química, U.N.A.M., México (1990)

Ruan, C.; Liang, Y.; Liu, J.; Liu, Z.; Zhonghua Yufang Yixue Zazhi, 23 (3), 160-2 (1989)

Sidhu, G. S.; Pardhesarachi, M.; Babu, M. M.; Indian J. Chem., 13 (7), 749 (1975)

Silverstein, Bassler y Meroiff; Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos ; Ed. Diana, México (1981)

Soto, R. B.; Díaz, C. F.; Yañez, R. O.; Collera, C. O.; García, F. J.; Spectros Int. J., 6, 123, (1988)

Spiegel, P.; Chikdjan, J. J.; Pharmazie, 24 (12), 780-1 (1969)

Stahl, E.; Thin layer chromatography, Ed. Bollinger, H. R.; Brenner, M.; Gashit, H. Berlin (1969)

Wang, H.; Coa, Z.; Zhiwu Shengli Xuebao, 12 (3), 218-23 (1986)