



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EXTRACCIÓN AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE
ALCALOIDES DEL EXTRACTO DEL TALLO DE ZARAGOSA
(*Aristolochia elegans*)”**

Tesis de grado presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: HUEBLA QUISHPE DANIEL EDUARDO

TUTOR: BQF. FAUSTO CONTERO

RIOBAMBA – ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A mi Dios el creador de esta humanidad por brindarme el preciado e invaluable don de la vida y permitirme contemplar y exponer las maravillas de su creación.

*Con todo cariño y mi amor para las personas que sacrificaron su vida para hacer posible lograr mis metas, por motivarme y darme su apoyo cuando sentía que ya no lo lograría, a ustedes mi cariño y agradecimiento.
Papá y Mamá.*

A Doris y Mirian, por ayudarme a conservar mi espíritu de lucha firme, sin importar el obstáculo que se presente.

A toda mi familia por ser el eje esencial en la integridad de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco de todo corazón a Dios en primer lugar por la bendición y la fortaleza que me dio para alcanzar esta meta. A mis padres, abuelitos y toda mi familia, por impulsarme y darme su apoyo a pesar de las dificultades económicas y familiares

A mis maestros quienes formaron el pilar fundamental de mis conocimientos, tener la palabra de aliento en el momento preciso, por sus consejos, apoyo, sabiduría, cooperación, sentido del humor y gran amistad que surgió.

Por brindarme sus conocimientos, prepararme académicamente, por compartir su experiencia, por su tiempo aún fuera del horario de trabajo, por su exigencia y sus consejos para poder enfrentarme al mundo que me espera.

A mis grandes amigos y de manera especial a ti Liliana G. por ser partícipe activo en toda circunstancia personal y académica.

Y a todos quienes formaron una parte fundamental en el desarrollo de este proyecto.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**EXTRACCIÓN AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ALCALOIDES DEL EXTRACTO DEL TALLO DE ZARAGOSA (*Aristolochia elegans*)**” de responsabilidad del señor egresado Daniel Eduardo Huebla Quishpe ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Fausto Contero
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Diego Vinuesa, M. Sc.
COLABORADOR

Lic. Karen Acosta, M. Sc.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, **Daniel Eduardo Huebla Quishpe**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

DANIEL EDUARDO HUEBLA QUISHPE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	xv
JUSTIFICACIÓN	xvi
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	
1.1. Aristolochiaceae.....	1
1.1.1. Aristolochias.....	2
1.1.2. Aristolochia.....	2
1.1.2.1. Clasificación botánica.....	3
1.1.2.2. Forma de preparación.....	5
1.1.2.3. Preparación casera.....	5
1.1.2.4. Constitución química.....	5
1.1.2.5. Ácidos aristolóquicos.....	5
1.2. Alcaloides en farmacoterapia.....	7
1.2.1. Alcaloides.....	7
1.2.2. Metabolismo.....	7
1.2.3. Tipos de alcaloides.....	8
1.2.4. Importancia farmacológica.....	9
1.3. Procesos extractivos de las plantas.....	10
1.3.1. Maceración.....	10
1.3.2. Extracción con solventes.....	11
1.3.2.1. Extracción líquido-líquido.....	11
1.4. Técnicas analíticas.....	12

1.4.1. Cromatografía en capa delgada.....	12
1.4.2. Adsorbentes y eluyentes	13
1.5. Fármacos contra el cáncer nefrótico.....	13
1.6. Fisiología del cáncer.....	13
1.6.1. Cáncer de riñón.....	14
1.6.1.1. El riñón.....	15
1.6.1.2. La nefrona.....	15
1.6.2. Tratamientos para el cáncer nefrótico.....	16
1.6.3. Alcaloides en el tratamiento del cáncer nefrótico.....	16
1.6.4. Inhibidores de la topoisomerasa.....	17

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de la investigación.....	18
2.2. Materiales, equipos y reactivos.....	18
2.3. Técnicas y Métodos.....	19
2.3.1. Recolección.....	19
2.3.2. Datos de recolección de la zaragosa <i>Aristolochia sp.</i>	19
2.3.3. Características.....	20
2.4. Identificación botánica.....	20
2.5. Preparación de la muestra.....	20
2.6. Preparación del extracto crudo de Ácidos aristolóquicos.....	20
2.7. Aislamiento del ácido aristolóquico.....	21
2.8. Purificación del Ácido aristolóquico.....	21
2.9. Citotoxicidad en Artemia Salina.....	21
2.9.1. Ensayo de letalidad.....	22

CAPÍTULO III

3. Resultados y discusión.....	23
3.1. Recolección.....	23
3.1.1. Datos de recolección de la zaragosa (<i>Aristolochia sp.</i>).....	23
3.1.2. Características.....	23
3.2. Identificación botánica.....	23

3.3.	Separación e Identificación de la fracción alcaloidea del extracto de Zaragosa (<i>Aristolochia sp.</i>) mediante cromatografía de capa fina (TLC)....	24
3.4.	Resultados del tamizaje fitoquímico.....	25
3.5.	Citotoxicidad en <i>artemia salina</i>	26

CAPÍTULO IV

4.	Conclusiones	28
4.1.	Recomendaciones.....	29
5.	Anexos.....	30
6.	Referencias bibliográficas.....	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

mL	Mililitros
μL	Microlitros
mg/mL	Miligramo por mililitro
μg/mL	Microgramos por mililitros
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
ppm	Partes por millón
g	Gramos
°C	Grados Celsius
TLC	Cromatografía en Capa Fina
DMSO	Dimetilsulfóxido

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2 Materiales y reactivos usados en la investigación.....	18
Tabla 2-3 Identificación botánica.....	23
Tabla 3-3 Resultados del tamizaje fitoquímico.....	25
Tabla 4-3 Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución].....	26
Tabla 5-3 Estadísticos de Regresión.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1-1 Ruta biosintética del ácido aristolóquico	6
Fig. 2-1 Aspectos biogénicos para la clasificación de los alcaloides.....	9
Fig. 3-1 Cáncer de riñón y de pelvis renal.....	14
Fig. 4-1 Anatomía del riñón	15
Fig.5-1 Nefrona yuxtamedular e irrigación.....	16
Fig. 6-3 Curva de análisis Probit	27

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1-1 Flor corte sagital	3
Foto 2-1 Tallo, hojas, flores	3
Foto 3-1 Flor, vista frontal.....	3
Foto 4-3 Desarrollo de la placa TLC.....	24
Foto 5-3 Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico.....	24

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I.- Informe de identificación Botánica.....	30
ANEXO II.- Certificado de entrega recepción del espécimen <i>Aristolochia sp.</i>	31
ANEXO III.- Fotografías de campo, recolección, conservación.....	32
ANEXO IV.- Cromatografías	33

RESUMEN

El consumo de especies vegetales del género *Aristolochia* está relacionado con el desarrollo de cierto tipo de cánceres, como nefrótico. Dos trabajos internacionales demostraron que estas especies son utilizadas en la medicina tradicional china. Estudios fueron publicados consideran al ácido aristolóquico como un genotóxico aún más potente que el tabaco y la luz ultravioleta.

En la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se realizó el estudio titulado “Extracción aislamiento y purificación de alcaloides del extracto del tallo de zaragosa (*Aristolochia sp.*)” con el fin de obtener el extracto estandarizado del tallo de zaragosa e identificar y aislar el ácido aristolóquico presente en el extracto y posteriormente determinar la toxicidad y dosis letal media *in vitro* del ácido aristolóquico aislado. La especie vegetal se recolectó en la provincia de Pastaza a 16 kilómetros de la ciudad del Puyo. El muestreo y la preparación del vegetal se realizaron evitando provocar daños al material vegetal para no alterar su perfil fitoquímico. El estudio fitoquímico del extracto evidenció que existían compuestos alcaloideos. Posteriormente mediante cromatografía en capa fina se logró identificar un concentrado de ácidos aristolóquicos los cuales se sometieron a una evaluación de citotoxicidad *in vitro* en *Artemia salina*. La prueba de citotoxicidad determinó que la concentración letal media (CL50) de la fracción de ácidos aristolóquicos soluble en dimetilsulfóxido fue de 214,12 ppm en *A. salina*.

Se determina entonces que la toxicidad de este compuesto es peligrosamente elevada, y es muy probable que según estos datos las personas quienes lo estén consumiendo estén expuestas al riesgo de desarrollar daños irreversibles en el sistema renal. Se recomienda ejecutar análisis más avanzados con el fin de descubrir innovadores usos farmacológicos de este compuesto, así como también dar aviso a las autoridades regionales que puedan alertar a la población del peligro que corren al usar indiscriminadamente la zaragosa.

PALABRAS CLAVE: <ZARAGOSA> <CÁNCER RENAL> <ARISTOLOCHIA>
<CARCINOGENICO> <TAMIZAJE> <ARTEMIA> <CITOTOXICIDAD>

ABSTRACT

Consumption of plant species of the genus *Aristolochia* is related to the development of certain cancers, including nephrotic renal cancers. Two international studies have demonstrated that these species are utilized in traditional Chinese medicine. The studies published found that aristolochic acid is genotoxic and can be considered to be more potent than tobacco or ultraviolet light.

In the Faculty of Sciences at the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Higher education) a study was carried out titled 'Extraction, Isolation and Purification of alkaloids from the extract of the *Aristolochia* stem (*Aristolochia sp.*)'. The aim of this study was to obtain a standardized extract of the *Aristolochia* stem and identify and isolate the aristolochic acid present in the extract and subsequently determine the toxicity and average lethal doses of isolated *in vitro* aristolochic acid. The plant species were collected in the province of Pastaza to 16 kilometers from the city of Puyo. The sampling and preparation of the plant were carried out in such a way as to avoid damage to the material and thus not alter its phytochemical profile. The phytochemical study of the extract showed that alkaloid compounds existed in the extract. Subsequently by using thin layer chromatography it was possible to identify concentrated aristolochic acids which were subject to *in vitro* cytotoxicity testing in *Artemia salina* (shrimp brine). The cytotoxicity testing determined that the median lethal concentration (LC50) of the fraction of soluble aristolochic acids in dimethyl sulfoxide was 214.12 ppm in *Artemia salina*.

It was thus determined that the toxicity of this compound is dangerously high, and that it is very likely that according to this data people who are consuming this plant are being exposed to the risk of irreversible damage to the renal system. It is recommended that a more advanced analysis is now carried out in order to find innovative pharmacological uses of this compound as well as to notify regional authorities so that they can alert the population to the dangers of the indiscriminate use of plants belonging to the *Aristolochia* genus.

KEY WORDS: <ARISTOLOCHIA> <RENAL CANCER> <ARISTOLOCHIA>
<CARCINOGENIC> <SCREENING> <ARTEMIA> <CYTOTOXICITY>

INTRODUCCIÓN

En el 2012 las enfermedades no transmisibles causaron más de 68 % de las muertes en el mundo, el cáncer se encuentra en una de las cuatro primeras enfermedades dentro de un grupo de cuatro causantes de esta cantidad de muertes y estas son las enfermedades cardiovasculares, **el cáncer**, la diabetes y las neumopatías crónicas. **(OMS, 2012)**

Es así como el cáncer ha adquirido una marcada importancia durante los dos últimos años ya que debido a su gran incidencia los científicos han demostrado enormes avances en los tratamientos contra esta enfermedad, de entre estos avances se ha demostrado que la dieta mantiene una gran relación con las enfermedades antes mencionadas, como por ejemplo, una alimentación pobre en grasas, rica en fibras, abundante fruta, y legumbres en la disminución del riesgo de contraer cáncer. **(CHLORELLA. G, 2012)**

Así como también el incremento del porcentaje de pacientes con cáncer de pulmón es mayor en personas fumadoras. Existen una gran variedad de tipos de cáncer relacionados con el estilo de vida que mantiene cada individuo y de entre ellos uno de los tipos que también se han robado la atención de los expertos es el cáncer a nivel del sistema endocrino y de forma aún más específica el cáncer al riñón cuyas unidades funcionales afectadas se les denomina nefronas, de ahí su nombre cáncer nefrótico. Esta enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 3 nuevos casos por año por 100.000 adultos. **(ULRICH, 2006)**

JUSTIFICACIÓN

Es conveniente tener claridad sobre el problema planteado y sus posibles causas porque de este conocimiento depende el correcto diagnóstico y posible tratamiento, además de que siendo el cáncer uno de los primeros problemas de salud a nivel mundial y responsable del incremento de la tasa de mortalidad. En la lucha contra esta enfermedad toda la que conocemos de esta ciencia tenemos la obligación ética y moral de retribuir a la humanidad con investigaciones que pueden ser las posibles soluciones a este problema. **(FERNANDEZ I, 2013)**

Al hablar del estilo de vida de un individuo engloba a toda actividad que este desarrolle así como también sus factores externos como el medio ambiente y muchos aspectos imperceptibles a simple observación, un factor al que expertos se han referido es la alimentación y dentro de esta están inmiscuidos los denominados remedios caseros a los que la mayor parte de personas acude en caso de alguna afección. **(FERNANDEZ I, 2013)**

Los remedios caseros, como así lo llaman comúnmente, se han constituido en su gran mayoría una espada de doble filo porque sus principios activos pueden ser curativos pero también los mismos sometidos al metabolismo humano producen compuestos levemente o altamente tóxicos según sea la droga vegetal que se administre. **(FERNANDEZ I, 2013)**

En la región amazónica a aproximadamente 954 msnm que corresponde a la ciudad del Puyo en la provincia de Pastaza las personas usan una planta como parte de su vida cotidiana usándola como remedio casero según recomiendan para infecciones intestinales, diabetes, obesidad e inclusive hipertensión, el desconocimiento de la composición química de este vegetal, a la que se le nombró como “Zaragosa”, hace de su ignorancia un peligro para su salud ya que en el transcurso de esta investigación se descubre que esta planta pertenece a una especie que en su composición química contiene un poderoso carcinógeno. **(FERNANDEZ I, 2013)**

Este carcinógeno ya ha sido usado en la parte oriental de nuestro globo terráqueo e inclusive ya ha sido retirado del mercado así lo afirman:

“Dos trabajos internacionales demuestran que una sustancia presente en una planta utilizada en la medicina tradicional china es el carcinógeno más potente descubierto hasta la fecha. Causa más mutaciones que el tabaco o la radiación ultravioleta” **(FERNANDEZ I, 2013)**

Toda metodología explicada en el desarrollo de esta investigación, así como Material bibliográfico, bases de datos, revistas, journals de ciencia y tecnología de forma física y digital además de contar con herbarios nacionales e internacionales que colaboran con la identificación botánica de esta planta, son herramientas que permitirán elucidar datos que en nuestra hipótesis se ha planteado y cubriendo todos y cada uno de los objetivos. **(FERNANDEZ I, 2013)**

Al final de este documento el lector tendrá un amplio conocimiento de esta planta y podrá ser consiente la próxima vez que este frente una planta que pertenece a este género, así como también como el conocimiento se multiplica por la información en cadena todo esto se hará saber a el sector donde se inició la investigación in situ teniendo como finalidad prevenirlos del peligro a largo plazo al que se enfrentan. **(FERNANDEZ I, 2013)**

Objetivos

Objetivo general:

- Prevenir a las personas de la inseguridad en la que se encuentran al consumir la zaragosa demostrando la presencia del ácido aristolóquico, potente carcinógeno, en el extracto del tallo.

Objetivos específicos:

- Obtener el extracto estandarizado y caracterizado del tallo de zaragosa (*Aristolochia sp.*)
- Identificar y aislar el ácido aristolóquico presente en el extracto de la zaragosa (*Aristolochia sp.*).
- Determinar la toxicidad y dosis letal media in vitro del ácido aristolóquico aislado.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aristolochiaceae

Familia que comprende seis géneros y unas 625 especies características de las regiones templadas y tropicales. Se han encontrado hallazgos en el continente africano, americano, asiático y europeo, en Europa esta familia está representada únicamente por los géneros *Aristolochia* y *Asarum*. (CASTROVIEJO, S. 1985).

La mayoría de esta familia es de clima tropical aunque varios de ellos se han ubicado al norte de este continente como Canadá Escandinavia e inclusive el norte de Japón. Pueden crecer como enredaderas hierbas cortas rastreadas y algunas arbustivas las especies que corresponden a la familia *aristolochia* son herbáceas perennes, arbustos bajos o a veces arbustos ricos en vegetación algunos de estos forman lianas tuberosas que se distribuyen por el suelo por numerosas rizo más con hojas alternas, que son ricas en aceites esenciales cada una tiene un olor característico en función de su concentración. (CASTROVIEJO, S. 1985).

Los miembros de esta familia también son cultivados en jardines por su característica ornamental debido a sus hojas atractivas y flores coloridas a menudo con patrones y colores extraños. Muchos de estos ejemplares se han utilizado en la medicina tradicional como medicamentos y tónicos especialmente en China donde se enmarca una larga tradición siendo usadas estas en formas de fármacos en bruto y también procesados, uno de los usos que le dan es el de los frutos maduros mediante una preparación empírica la recomienda para las mordeduras de serpiente, tuberculosis e inclusive antihipertensivo, así también lo utilizan las raíces secas como un abortivo. La medicina tradicional también les atribuye a esta familia actividades biológicas contra enfermedades como disentería, dermatitis, infecciones gastrointestinales, coadyuvante en el tratamiento de la artritis, intoxicaciones, prurito entre otras. (TIAN-SHUNG, 1992).

Estudios realizados en el Ecuador y América del Sur han revelado que las partes aéreas de *A. constricta* son usadas empíricamente en la medicina popular como antiespasmódico, antihelmíntico, y también contra mordeduras de serpiente. *A. grandiflora* también es otro ejemplar que la utilizan como útero tónico. (CABELLOS. N, 2007)

1.1.1. Aristolochias

Son plantas herbáceas con flores de diversa morfología propias de zonas tropicales, su origen se le atribuye a las regiones del Mediterraneo, la medicina tradicional les atribuye numerosas propiedades terapéuticas como por ejemplo dolencias relativas al parto, de hecho procede del griego *αριστος*: aristos que significa útil y *λοχέα*: locheia que significa nacimiento, regula la fiebre, regula la regla, curar los trastornos biliares e inclusive como antídoto contra veneno de serpiente. (CABELLOS. N, 2007)

El fundamento curativo de esta planta como remedio es que en sus tejidos está presente un alcaloide nefrotóxico denominado Acido aristolóquico como el más representativo además también se manifiestan compuestos como magnoflorina, terpenoides como el alcanfor y bases nitrogenadas como trietilamina, estos compuestos confieren a esta planta una toxicidad considerable y al mismo tiempo propiedades febrífugas, purgantes, hematoprotectoras y abortivas. (CABELLOS. N, 2007)

1.1.2. Aristolochia

Durante mucho tiempo han sido conocidos por su amplio uso en la medicina tradicional y han despertado el interés de investigación intensa a causa de sus numerosos informes de actividad biológica y componentes únicos, ácidos aristolóquicos. Son fuentes de un número de compuestos fisiológicamente activos de diferentes clases. Dentro de su composición química existen derivados del ácido aristolóquico con varios esqueletos de carbono, aporfina, quinolinas benziliso-, isoquinolinas, protoberberinas, amidas, clorofilas, mono, sesqui- y diterpenoides, lignanos, éteres de bifenilo, flavonoides, tetralonas, enzenoids y esteroides han sido identificados a partir diferentes especies *Aristolochia*. (AMOORU G. 2001)

El enfoque principal de la investigación reciente está direccionada a los aspectos negativos de los ácidos aristolóquicos debido a la nefrotoxicidad de algunos ácidos aristolóquicos. (AMOORU G. 2001)

1.1.2.1. Clasificación botánica

Reino: *Plantae*

Clado: *Magnoliide*

Orden: *Piperales*

Familia: *Aristolochiaceae*

Género: *Aristolochia*

Especie: *Aristolochia spp.*

(CASTRVIEJO S. 1994)

Es una planta trepadora que alcanza hasta los tres metros de altura y más sin dificultad, sus hojas mantienen su forma acorazonada y flores de hasta 10 cm de ancho de forma tubular de color amarillo y con las extremidades del tubo floral de color morado con un matizado y con nervaduras blancas, florece en los meses entre julio – septiembre. (HUEBLA. D. 2014)



1



2



3

FOTOS: 1-1. Flor corte sagital 2-1. Tallo, hojas, flores 3-1. Flor, vista frontal

Fuente: Huebla D. 2015.

La Zaragosa carece de un registro de estudios científicos en el Ecuador, sólo se encuentra información sobre otras especies congénéricas. Su especie más similar es la *Aristolochia elegans*, según las investigaciones realizadas por otros países como Brasil, México. No se encuentra información a nivel nacional de su uso y su composición química, de modo

que se presentará una recopilación personal basada en experiencias y relatos que se han podido compilar de los grupos étnicos que la han utilizado durante todo este tiempo. **(HUEBLA D. 2014)**

El grupo étnico del que se ha compilado estos datos son en su mayoría Nativos Shuar, que se han civilizado e inclusive llegan hasta la ciudad del Puyo a promover sus plantas medicinales como zarzaparrilla, sangre de drago, chuchuwaza y entre ellas la zaragosa, como fuente de ingreso económico. **(HUEBLA D. 2014)**

Esta planta es de tipo enredadera, siempre se reproduce junto a una planta arbórea superior aprovechando su tamaño, la usa para alcanzar alturas aproximadas de 4 a 5 metros en su estadio joven, requiere de 9 a 15 meses para que su bejuco este en el estadio de cultivo óptimo para poder preparar el extracto, se ha identificado su clasificación botánica, y corresponde a la familia *Aristolochia* ampliamente distribuida en la región amazónica. **(FREIRE E. 2015)**

Su hábitat de reproducción se encuentra en la Provincia de Pastaza que corresponde a un clima ecuatorial, posee una temperatura entre 18-24°C con precipitación promedio anual que supera los 3000 mm; con humedad oscilante entre 87 y 89 %, su altura sobre el nivel del mar aproximada entre 300 y 1100m, bosque muy húmedo pluvial pre montado, el suelo es irregular formado por sedimentos de arcilla y areniscas, algo gredoso y de escaso drenaje, poco profundos, de entre estas características se forman lugares donde se acumulan hojas y materia orgánica en descomposición proveyendo a nuestra planta un hábitat característico para su reproducción. **(PUYO INF, 2014)**

Se caracteriza por sus hojas de forma acorazonada, con bordes regulares unidas a su tallo por un peciolo alargado, el tallo es característico a la especie de enredaderas y sus hojas se distribuyen por todo el tronco, se une a su raíz que a su vez se alimenta de los restos vegetales en proceso de descomposición, tronco u hojas de plantas que habitan en su alrededor. Se ha popularizado por sus usos etnobotánicas para enfermedades como diarrea, dolor estomacal, e hipoglucemiante, también sus pobladores nativos lo reconocen como un potencial toxico si se lo administra de manera muy continua. **(HUEBLA D. 2014)**

1.1.2.2. Forma de preparación

En Respecto a su forma de preparación, un conocedor de plantas medicinales nativas, Don José Parra, dueño de AMBI WASI, hace muchos años ha conseguido determinar una dosis empírica, conocimiento que ha sido heredado de sus antepasados. **(PARRA J. 2014)**

1.1.2.3. Preparación casera

Se toman un pedazo (2cm) del bejuco maduro, hervirlo por 5 minutos en tres litros de agua, tomarla como agua de tiempo, en la mañana y por la tarde con intervalos de una semana de toma y otra de descanso, no por más de nueve días ya que después de estos puede causar reacciones adversas. **(PARRA J. 2014)**

1.1.2.4. Constitución química

Durante los setenta años pasados más de sesenta especies de Aristolochia ha sido explotada para el examen químico por grupos de investigación en todo el mundo y una variedad de compuestos ha sido aislada. El espectro de metabolitos fisiológicamente activo de la especie Aristolochia cubre 14 grupos principales basados en la estructura, entre ellos están los derivados de ácidos aristolóquicos, aporfinas, amidas, benzilisoquinolinas, isoquinolinas, clorofila, terpenoides, lignanos, bifenil éteres, flavonoides, tetralones, benzenoides, esteroides, y similares. **(LI-SHIAN S. et al, 2004)**

1.1.2.5. Ácidos aristolóquicos

Los constituyentes de la Aristolochia se han convertido en el sujeto activo de la fitoquímica y farmacéutica desde el descubrimiento de compuestos que pertenecen al grupo de los ácidos aristolóquico. La forma natural en la que se presentan los ácidos aristolóquicos, son como 3,4-metilendioxi-10-nitronitrofenantreno-1-ácido su esqueleto es típico de los componentes de la Aristolochia. . **(LI-SHIAN S. et al, 2004)**

Son un grupo de compuestos que poseen propiedades farmacológicas muy interesantes, pero escasos químicos farmacéuticos con vasta experiencia se han interesado en desarrollarlos como agentes de uso terapéutico, debido en su estructura se encuentra dos

toxicóforos. Estos al ingresar al hígado pueden activarse por el efecto de ciertas enzimas y provocar una reacción con las mismas, producto de esto es posible que provoquen la inactivación permanente de algunas enzimas hepáticas e inclusive causar necrosis al tejido hepático. La exposición continuada de estos ácidos al organismo, siendo de manera intencional o accidental puede causar nefropatías de riñón. (JORDAN. S et al. 2014)

La forma natural en que estos ácidos se presentan en la naturaleza son como 3,4-metilendioxi-lo-nitrophenanthrenic-1-ácido cuyo esqueleto es típico de la Aristolochia, así el primer documento donde trata acerca de los ácidos aristolóquicos del género *Aristolochia* data desde el año 1943 por Rosenmund y Reichstein recuperados desde la *A. clematidis*, dicha especie se usaba en China y Taiwan para contrarestar casos de cáncer, problemas en la etapa menstrual, úlceras dérmicas y algunos tumores. Tomita y Sasagawa lo nombraron como Ácido aristolóquico A. En la actualidad se han logrado aislar aproximadamente 16 Ácidos aristolóquicos y de entre ellos el Ácido aristolóquico I es el ácido más abundante en las Aristolochias con muy escasas excepciones. (AMOORU G. et al. 1992)

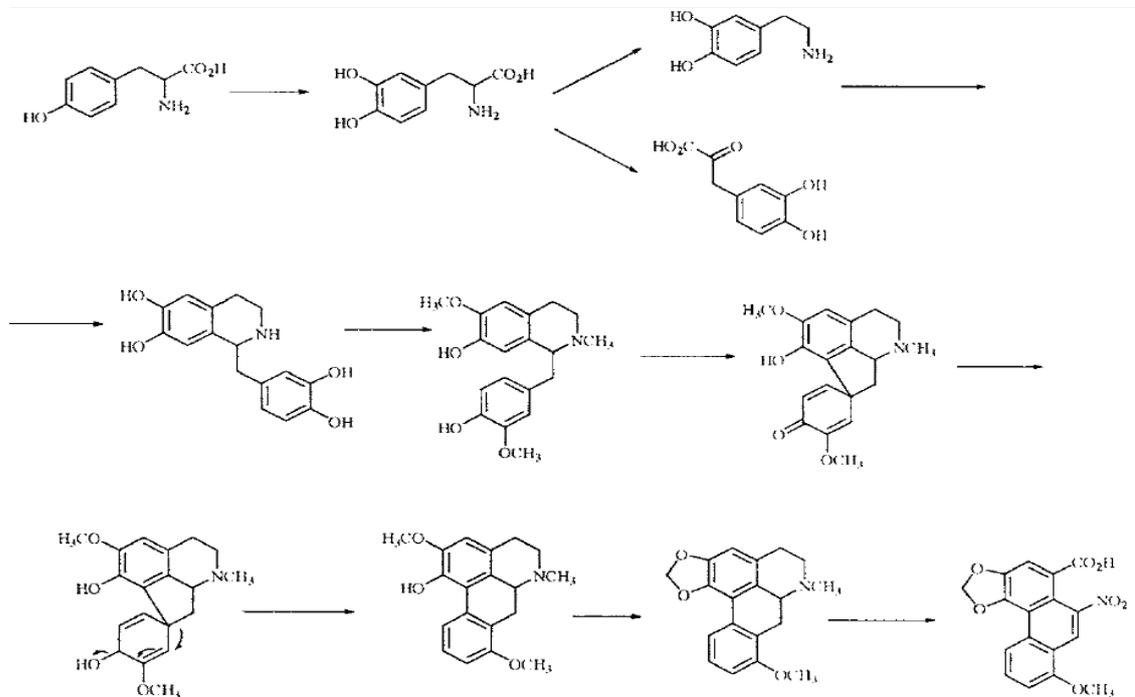


Fig.1-1 Ruta biosintética del ácido aristolóquico

Fuente: Hou, D, 1996

1.2. ALCALOIDES EN FARMACOTERAPIA

1.2.1. Alcaloides

Estos metabolitos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal corresponden a uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios en 1783 a 1841 un joven boticario llamado Friedrich Wilhelm de profesión químico farmacéutico elaboró innovadores inventos uno de ellos y el más importante fue lograr aislar ácidos orgánicos es así que descubrió la morfina que desde el principio activo más importante del opio de la amapola avances como estos fueron trascendentales en el desarrollo de la farmacología durante el siglo XIX donde los alcaloides fueron el punto de atención, los extraían de varias plantas, la diversidad estructural y la variedad de su actividad biológica hacen de este grupo uno de los más importantes entre las sustancias de interés terapéutico. **(XORGE D, 1979).**

Desde 1806, año en el que se descubrió la morfina ya son más de 120,000 alcaloides y miles de ellos ya tienen estructura definida, según Pelletier (1883) *"un alcaloide es un compuesto orgánico cíclico que contienen nitrógeno en un estado de oxidación negativo con una distribución limitada entre organismos vivos"*. **(XORGE D, 1979).**

Los alcaloides no son sólo característicos en el reino vegetal también se presentan en un número aproximado de cientos tipos de alcaloides en órganos de animales de los cuales 12 no se han encontrado en vegetales. Los alcaloides del reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas específicamente en las monocotiledóneas. **(XORGE D, 1979).**

1.2.2. Metabolismo

Son considerados productos finales del metabolismo del nitrógeno, también se les asocia como sistemas de protección vegetal contra animales e insectos predatorios, dentro de estos alcaloides existen los que son tóxicos para animales superiores pero no son tóxicos para los insectos. **(XORGE D, 1979).**

Se le atribuye también que los alcaloides tienen un papel importante en el proceso de crecimiento de la planta por su capacidad de formar relatos o intervenir en fenómenos de óxido reducción, es por ello que no sólo se encuentra en todas las partes de la planta a veces se restringe a algunos órganos y muchas de las veces se encuentran en toda la planta. **(XORGE D, 1979).**

Los alcaloides forman un grupo muy amplio de bases nitrogenadas cuyo origen es vegetal, y su acción fisiológica es sobre los animales para mayor entendimiento se los ha clasificado en tres grupos principales. **(XORGE D, 1979).**

1.2.3. Tipos de alcaloides

- a) Alcaloides verdaderos: poseen un anillo heterocíclico y en su interior está en nitrógeno que está formando parte de este 1000 su actividad farmacológica es significativamente alta y su biosíntesis es a partir desde los aminoácidos.
- b) Protoalcaloides: su característica que les diferencia de los alcaloides verdaderos es que los átomos de nitrógeno no forma parte del anillo heterocíclico, son de característica básica y también son obtenidos in vivo a partir de aminoácidos.
- c) Pseudoalcaloides: de características similares a los alcaloides verdaderos con la diferencia de que éstos no se derivan de los aminoácidos. **(ARANGO G, 2008)**

Su clasificación es en base al átomo de nitrógeno y entre ellos se debe diferenciar si el átomo de nitrógeno forma o no parte del anillo heterocíclico, como por ejemplo la efedrina y la mezcalina están unidas a un grupo como foro (benceno) y su átomo de nitrógeno no está incorporado al anillo y de esto depende si es neutro o está cargado electrónicamente es el caso de la ricina que contiene dos átomos de nitrógeno amídico de características neutras y están incorporados al anillo. **(ARANGO G, 2008)**

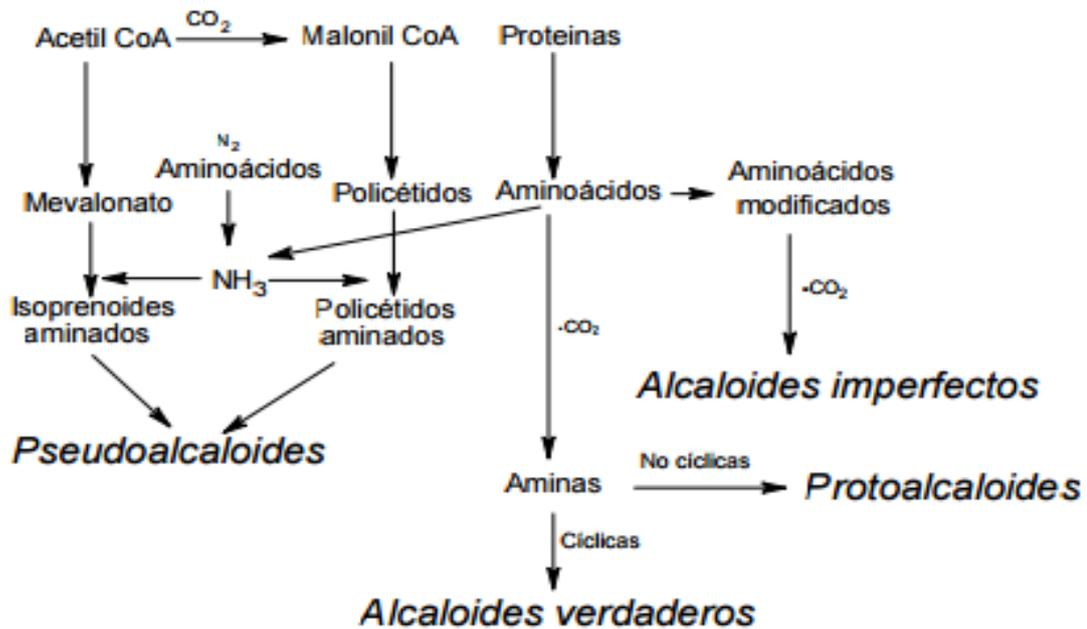


Fig. 2-1 Aspectos biogénicos para la clasificación de los alcaloides.

Fuente: Arango, G. 2008.

1.2.4. Importancia farmacológica

Siendo el grupo de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal no cabe duda también que éstas están dentro de los alimentos que consumimos a diario, aproximadamente en el 25% de las plantas que los contienen e inclusive en algunos vegetales llegan a una concentración de un 10% de la totalidad de sus metabolitos. **(DERACHE J, 1990)**

Su complejidad molecular hace que este tipo de compuestos produzcan potentes efectos fisiológicos, la mayor parte de estos son venenos vegetales muy activos y una ínfima cantidad de este produce grandes defectos en el organismo que se lo administra. Su verdadero valor terapéutico sólo puede ser evaluado y asegurado por un profesional que conoce de la ciencia es decir un médico o un químico farmacéutico espacio debido a que pueden ser excelentes medicamentos que inclusive son capaces de resolver enfermedades muy graves, su uso indebido sin el conocimiento apropiado hace que este tipo de compuestos se conviertan en un peligro inminente porque se expondría el paciente a causarse asimismo intoxicaciones graves que inclusive podría llevarlo a la muerte y en vez de ser una solución se convertiría en un problema.

En la actualidad se utilizan muchos de estos en terapéutica usándolos como estimulantes cardíacos, estimulantes cerebrales, y si se los reduce su dosis pasan de tener actividad tóxica a una acción narcótica es decir que tan sólo en los provoca sueño, si la dosis se incrementan gradualmente puede provocarse un estado de inconsciencia. Y la administración continua provoca dependencia. **(ASOCAE O.N.G.D, 2008)**

1.3. Procesos extractivos de las plantas

Para lograr una concentración adecuada de los principios activos contenidos en las plantas y que su acción sea más efectiva es necesario realizar diversos procedimientos mediante los cuales sean extraídos aquellos con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias beneficiosas. **(DERACHE J, 1990)**

Estas preparaciones son conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, densos o secos (según su contenido de líquidos) y las tinturas. A partir de estos procedimientos se han perfeccionado técnicas extractivas que permiten obtener las sustancias activa en forma pura para la elaboración más sofisticada de medicamentos en forma de tabletas, líquidos, ungüentos, cápsulas, etc, pero que no han logrado desplazar las preparaciones originales las cuales han tomado mayor auge en la actualidad, por su inocuidad y menores reacciones no deseadas. **(GONZALEZ, F. 1999)**

Estas extracciones se diferencian de las soluciones verdaderas en que están presentes sustancias en suspensión.

1.3.1. Maceración

Para iniciar el proceso de maceración del material vegetal se coloca en piezas o en polvo, dependiendo de la comodidad, en un recipiente lleno de disolvente y dejar reposar tres o más días, agitar con frecuencia hasta la completa extracción del material vegetal. Después de esto, el material se filtra y el sólido restante se exprime para eliminar todo el líquido restante. El líquido obtenido se clarifica por decantación o filtración. **(GONZALEZ, F. 1999)**

La maceración se realiza a temperatura ambiente y líquidos que se utilizan con más frecuencia son agua y alcohol o combinación de ambos, aunque también pueden ser usados los vinos rojos o blancos. **(BRUNETON, J. 1995)**

No prolongar la maceración en agua durante demasiado tiempo, como esto puede presentar contaminación por hongos, que no ocurre en soluciones de alcohol o hidroalcohólico. El tiempo de maceración total depende del tipo de planta o la parte de la misma o el ingrediente activo para extraer. **(BRUNETON, J. 1995)**

1.3.2. Extracción con solventes

1.3.2.1. Extracción líquido-líquido

Es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. Este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Cuando se agita un compuesto con dos disolventes inmiscibles, el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre constante, y esta constante es lo que se denomina coeficiente de distribución o de reparto ($K = \text{concentración en disolvente 2} / \text{concentración en disolvente 1}$). **(CHIEREGHIN, P. 2000)**

Después de agitar la mezcla de las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer entre las dos fases, se producirá una transferencia del producto deseado desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico de extracción elegido y el agua. Unos minutos después de la agitación, las dos fases se separan de nuevo, espontáneamente por decantación, debido a la diferencia de densidades entre ellas, con lo que la fase orgánica que contiene el producto deseado se podrá separar mediante una simple decantación de la fase acuosa conteniendo impurezas. **(CHIEREGHIN, P. 2000)**

La posición relativa de ambas fases depende de la relación de densidades. Dado que después de esta extracción, la fase acuosa frecuentemente aún contiene cierta cantidad

del producto deseado, se suele repetir el proceso de extracción un par de veces más con disolvente orgánico puro. **(DOMÍNGUEZ S. et al. 1973)**

1.4. Técnicas analíticas

1.4.1. Cromatografía en capa delgada

La cromatografía de capa fina es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. En la biología celular se utiliza frecuentemente para separar azúcares simples, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, metabolitos, y ocasionalmente para separar cadenas cortas de polipéptidos y ácidos nucleicos. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. **(RUBINSON, et al. 2000)**

La fase estacionaria puede ser variada. Puede ser de papel, de celulosa o de un gel de silicato (vidrio molido bien fino) unido a una superficie sólida (una placa de vidrio, aluminio, plástico o papel). Esta superficie sólida puede ser rígida o flexible. El tipo de fase estacionaria que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar. Incluso vienen algunas placas con indicadores fluorescentes. La fase estacionaria consiste de un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos. **(ÁVILA Z. G. et al. 2001)**

El procedimiento es sencillo: Se colocan las muestras a un centímetro del borde en uno de los extremos de la placa, se deja secar, se coloca la placa en un envase (tanque de desarrollo) que ya contiene una pequeña cantidad del solvente, se tapa y se deja correr por un rato. El solvente subirá por capilaridad e irá arrastrando las moléculas, las cuales se moverán según la afinidad que muestren por la fase estacionaria. Si la mezcla de muestras que se está analizando presenta color, se verán los distintos colores migrando a distintas velocidades. Si son incoloras hay que someter la placa a algún tratamiento con una sustancia desarrolladora (developer) para poder determinar la presencia de sustancias sobre el silicato. El tipo de desarrollador dependerá del tipo de moléculas que se analizan. **(CARVAJAR, P. 1960)**

1.4.2. Adsorbentes y eluyentes

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO₂) y la alúmina (Al₂O₃), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). **(GAVILÁNEZ J. 2000)**

El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interacciona con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan. **(GAVILÁNEZ J. 2000)**

1.5. Fármacos contra el cáncer nefrótico

La gama de fármacos usados para combatir el cáncer es muy amplio en estos últimos tiempos, pero de entre ellos los seleccionados como más eficaces hasta el momento para el cáncer del riñón son los siguientes:

Pazopanib (Votrient), Sorafenib (Nexavar) y Sunitinib (Sutent), éstos pueden causar efectos secundarios como diarrea, y molestias y sensibilidad en las manos y los pies. **(CANCER.NET, 2014)**

1.6. Fisiología del cáncer

El cáncer se origina dentro de un organismo cuando las células indistintamente de cualquier parte del cuerpo empiezan a crecer descontroladamente. Muchos tipos de cáncer se han manifestado pero entre si tienen en común que todos inician con un crecimiento descontrolado diferenciándose así del crecimiento de las células normales, cuando la fisiología normal de esta célula es morir estas continúan su crecimiento y debido a que es de forma acelerada su multiplicación es inminente formando así más células anormales. **(AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014)**

Otra característica que las diferencia de las células normales es que pueden invadir o propagarse con facilidad a otros tejidos, el hecho que estas tengan esta capacidad hace que se denominen cancerosas. La alteración del ADN es el motivo por el cual estas se tornan una amenaza para el organismo vivo, siendo que el ADN es el material genético que se encuentra en el interior celular y es el que dirige todas las funciones su alteración se convierte en una modificación muy peligrosa e irrevocablemente mortal. (NCCN, 2014)

1.6.1. Cáncer de riñón

Es un tipo de enfermedad que ataca a la unidad funcional del riñón es decir a la nefrona, también es llamado adenocarcinoma renal, en esta anomalía se encuentran células malignas o cancerosas que se origina en el revestimiento de los túbulos del riñón también llamada corteza renal. Hay que diferenciar que el cáncer que comienza por los uréteres o pelvis renal es muy diferente al cáncer de células renales y su tratamiento es con un aparato diferente. (GONZALEZ A, 2015)

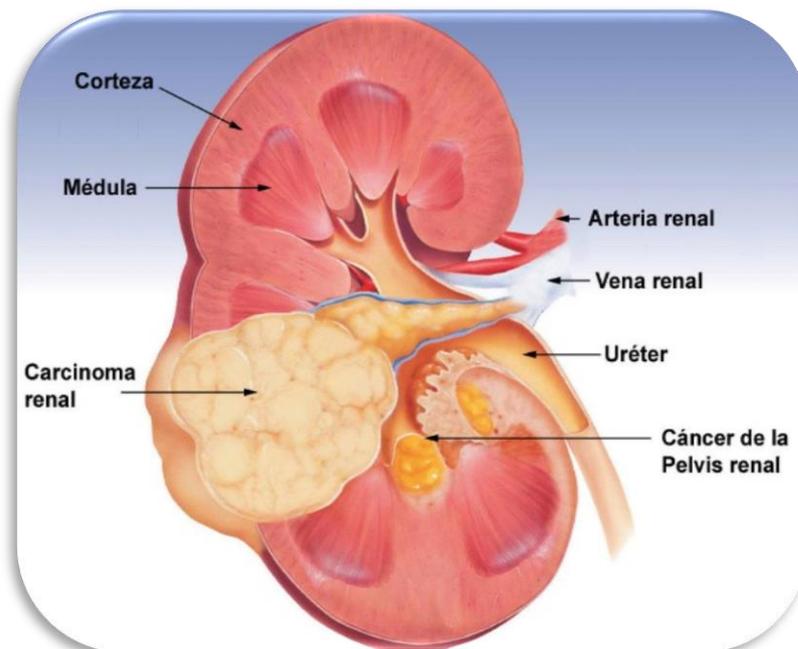


Fig. 3-1 Cáncer de riñón y de pelvis renal.

Fuente: Ecuador ciencia.

1.6.1.1. El riñón

Son órganos excretores de los vertebrados, mantienen una forma de judía o habichuela, en el ser humano el tamaño de su puño es proporcional al de su riñón y se ubican en la parte posterior del abdomen. Hacia abajo en la dirección del hígado se encuentra el riñón derecho y el izquierdo esta debajo del diafragma y adyacente al bazo, cada riñón está provisto de una glándula suprarrenal. (GONZALEZ A, 2015)

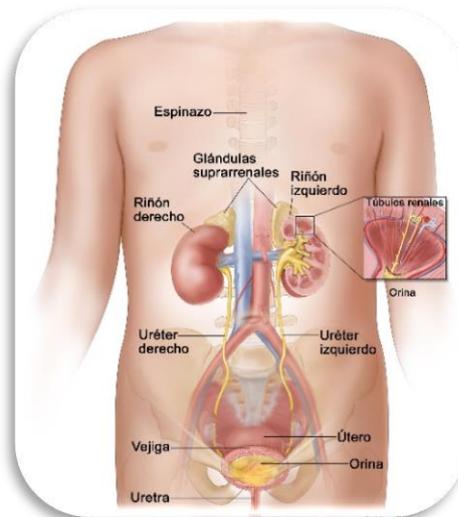


Fig. 4-1 Anatomía del riñón

Fuente: National Cancer Institute.

1.6.1.2. La nefrona

“Unidad estructural y funcional del riñón y está constituida por el corpúsculo renal, el túbulo proximal y túbulo distal. Los túbulo proximal y distal tienen una porción contorneada, que se denomina túbulo contorneado proximal y distal respectivamente y una porción recta que se le denomina túbulo recto proximal y distal respectivamente”. (SALAZA A, 2014)

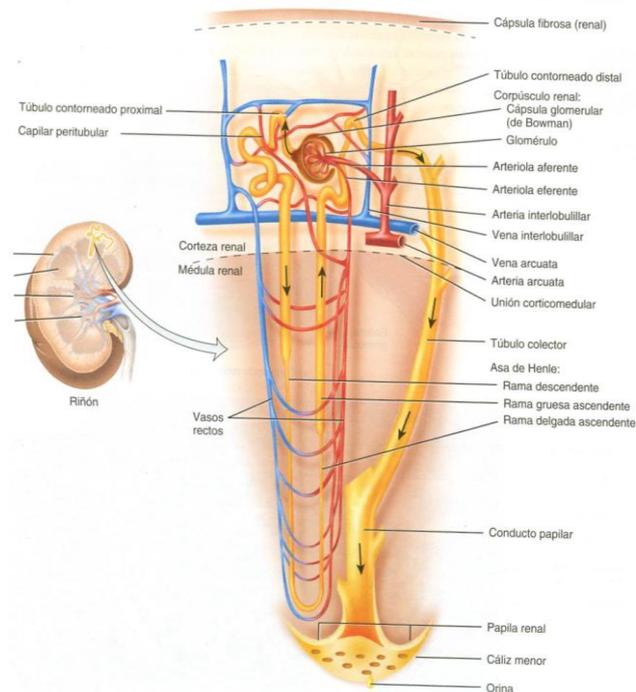


Fig. 5-1 Nefrona yuxtamedular e irrigación

Fuente: Ravens L

1.6.2. Tratamientos para el cáncer nefrótico

El cáncer de riñón es tratado frecuentemente con cirugía, terapia dirigida o inmunoterapia. La radioterapia y la quimioterapia son usadas con poca frecuencia. Los pacientes con cáncer del riñón que se ha propagado es decir si ya es un cáncer metastásico, este tipo de pacientes reciben múltiples líneas de tratamiento que son administrados de forma sistemática, a continuación se mencionan algunos de ellos. **(PDQ, 2014)**

1.6.3. Alcaloides en el tratamiento del cáncer nefrótico

La principal fuente de alcaloides son los vegetales, estos compuestos son utilizados en tratamientos de quimioterapia, por ejemplo los taxanos se producen a partir de la corteza del árbol tejo del pacífico (Taxus). Los alcaloides de la vinca y los taxanos también se conocen como agentes anti micro tubulares. Este compuesto así como también sus análogos son conocidos como inhibidores de la topoisomerasa , que se usan en determinados tipos de tratamientos de quimioterapia, se ha determinado que los alcaloides vegetales tiene una elevada especificidad al ciclo celular esto significa que intervienen a las células durante diversas fases de la división. **(PDQ, 2014)**

Se pueden citar muchos de estos alcaloides de entre ellos se destaca los alcaloides de la vinca: vincristina, vinblastina y vinorelbina.

También se puede mencionar a los antibióticos anti tumorales los cuales son parte de los tratamientos químicos que se realizan con productos naturales producidas por una especie de hongo del suelo Streptomices. Su fase de actividad biológica se enfoca en las fases del ciclo celular y se consideran específicos a este ciclo, de entre los varios antibióticos anti tumorales mencionamos a las Antraciclinas y Cromomicinas. **(CHEMOCARE. 2002)**

1.6.4. Inhibidores de la topoisomerasa

Este tipo de fármacos interviene a nivel genético ya que interfiere en la acción de las enzimas topoisomerasas I y II, ya que estas son las encargadas de la manipulación de la estructura del ADN de la cual es necesaria para su replicación, dentro de estos podemos mencionar los siguientes:

Inhibidores de la topoisomerasa I: irinotecán, topotecá.

Inhibidores de la topoisomerasa II: a los msacrina, etoposida, fosfato de etoposida, teniposida. **(CHEMOCARE. 2002)**

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de la investigación:

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 1-2 Materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación.

MATERIALES	EQUIPOS
RECOLECCION Y CONSERVACIÓN	TAMIZAJE
Prensa de campo	Molino
Cartón	Estufa
Papel periódico	EXTRACCION
Tijeras de podar	Agitador magnético
Libreta de campo	Ultrasonido
Marcador permanente	Espectrofotómetro
Cámara fotográfica	REACTIVOS
TAMIZAJE	TAMIZAJE
Reverbero	R. Sudan
Tubos de ensayo	R. Dragendorf
Gradilla	R. Mayer
Vasos de precipitado	R. Wagner
Pipeta 5 mL	R. Baljet
EXTRACCION Y CUANTIFICACION UV	R. Lieberman Buchard
Frascos de vidrio ámbar	R. Catequinas
Probeta	R. para resinas
Vasos de 50 mL	R. Felhing
Balones aforados de 100 mL – 1000 mL	R. FeCl ₃
PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	R. Ninhidrina
Tubos 10mL	R. Shinoda
Balones 100 mL	EXTRACCION
Gradilla	Etanol 96%

Soporte universal	Metanol 98%
Reverberos	Agua destilada PA
Frasco de vidrio	Cloroformo
CITOTOXICIDAD	
Dimetil sulfoxido	Agua destilada
	Sal marina

Realizado por: Daniel Huebla

2.3. Técnicas y Métodos:

2.3.1. Recolección

La muestra vegetal seleccionada cuidadosamente fue la más vigorosa para la posterior conservación, de preferencia sin daño por insectos u otros organismos. El material incluye su inflorescencia ya que la Zaragosa es una planta de más de un metro de altura y florece solo en tallos maduros, esta muestra se logró conservar completa y siendo dispuesta en forma de “N” en un contenedor cumpliendo su primera etapa en el esquema de conservación de materia vegetal.

La florescencia central es recogida, desprendida, de los tallos ya maduros y en épocas estrictas de floración, esto es entre los meses de Julio –Agosto, los tallos comúnmente denominados bejucos, termino de la zona, se recolectan tan solo los que han alcanzado su etapa de madurez los cuales son usados en la medicina tradicional local.

2.3.2. DATOS DE RECOLECCIÓN DE LA ZARAGOSA *Aristolochia sp.*

País de recolección: ECUADOR

Provincia: Pastaza

Ciudad: Puyo (Km 15 vía Puyo - Macas)

Comunidad: El Talín (“Finca Alegre”)

Altura: 934-963 msnm

Fecha de recolección: 28/12/2014

2.3.3. CARACTERISTICAS

Bejuco de más de 2 m de altura

Flores: Moradas

Familia: Aristolochiaceae

Género: *Aristolochia sp.*

Recolector: Daniel Huebla

2.4. Identificación botánica

Con la ayuda del especialista Efraín Freire curador del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales en conjunto con el Herbario Nacional de la ciudad de Quito, previa obtención de todos los permisos legales correspondientes a la presente investigación, se procede a depositar e identificar la respectiva muestra, dicha muestra reposa en las colecciones del Herbario Nacional en la ciudad de Quito.

2.5. Preparación de la muestra

Se seleccionan las muestras cuidadosamente, es decir libre de tierra u otra materia vegetal que pueda causar interferencia en y durante el análisis, se lo deja secar a temperatura ambiente por 30 días. Posteriormente se procede a la triturar con la ayuda de un molino adecuado para triturar materias vegetales, se dispone con 1000g de muestra seca y molida.

2.6. Preparación del extracto crudo de Ácidos aristolóquicos

200g de polvo seco obtenido por molienda de los tallos desprovistos de hoja se extraen en un Soxhlet con cloroformo, posteriormente expone la muestra al ultrasonido, se filtra la muestra y el polvo se deseca a 40°C durante toda la noche, 199,2g se extraen con alcohol al 96% con agitación constante durante 40 minutos posteriormente es colocado en el ultrasonido por 40 minutos, se filtra el extracto.

Los extractos alcohólicos se concentran en el evaporador rotatorio hasta consistencia de jarabe. Se lava con n-hexano, las dos primeras porciones extraen algo de color, no así la

última, que se decanta en su mayor parte, y el resto, que permanece en el extracto, se evapora al vacío hasta que el extracto no huele a n- hexano.

2.7. Aislamiento del ácido aristolóquico

El extracto alcohólico siruposo se lava con éter etílico en una relación de 1:4 es decir por cada mL de extracto alcohólico se añaden 4 mL de éter etílico, posteriormente se extrae cinco veces consecutivas con CO_3HNa al 6%.

Las capas acuosas reunidas que mantienen un aspecto rojizo, se acidulan por adición lenta de HCl al 2% y se deja reposar en un ambiente frío y aislado de la luz por una noche, del reposo resulta un precipitado amarillo. Se decanta el líquido rojo y el precipitado se recoge sobre un papel filtro previamente tarado.

2.8. Purificación del Ácido aristolóquico

El precipitado de ácido aristolóquico bruto se disuelve en cloroformo caliente (25 mL), se preparan placas cromatográficas de gel de sílice las cuales se dejan secar al aire y se pulverizan con solución de CO_3HNa al 6%, antes de aplicar el extracto. Sobre esta placa se disponen la solución clorofórmica de ácido aristolóquico bruto, las placas se la desarrollan con una solución de acetonitrilo – di etilamina – agua (8:1:1).

La banda amarilla se raspa de los cromatogramas y el polvo se extrae con metanol hasta agotamiento, se evapora el metanol dejando un residuo que posteriormente se comporta como un compuesto unitario cromatograficamente en el sistema de solventes antes mencionados. Al último polvo se lo re disuelve en la mínima cantidad de dimetilformamida y se le añade agua caliente, el ácido que precipita es de color amarillo, se lo filtra en un papel filtro previamente tarado.

2.9. Citotoxicidad en Artemia Salina

Los huevos de A. salina se adquirieron de un proveedor adecuado y deben ser incubados durante 48 h en un recipiente de cultivo adecuado que contiene agua salada (1% de NaCl), preparada a partir de sal marina (exenta de nitrato, fosfato, y silicato) y agua destilada (35

g/L) a (26-30) °C, bajo iluminación constante con la ayuda de una lámpara de luz blanca. La solución de agua salada se aireó continuamente durante la incubación con una bomba de aire de acuario. Después de 48 h las larvas-nauplios deben ser recolectadas del recipiente de cultivo en uno nuevo que contenga agua salada.

2.9.1. Ensayo de letalidad

Preparación de la solución madre: 25mg del extracto se disolvieron en 0,25 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) y se aforó a 25 mL con agua marina. Se trabajó solamente con la parte soluble.

Preparación del control positivo (Blanco): Se disolvieron 0,25 mL de DMSO en 25 mL de agua marina. Ensayo: Se prepararon concentraciones de 0; 31; 62; 125; 250; 500; 1000 ppm (partes por millón).

Treinta larvas de *A. salina* se colocan en tubos de ensayo individuales usando una pipeta plástica. Se debe liberar a las larvas sobre la superficie con mucho cuidado para evitar matarlas atrapando el aire bajo sus caparazones.

La prueba concluye en 24 horas después de haber liberado las larvas en la superficie, al final de este tiempo se contabiliza el número de supervivientes, determinando así un número específico de muertes para cada concentración, Todos los ensayos se realizaron por triplicado, evitando las pseudoréplicas.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCION

3.1.1. DATOS DE RECOLECCIÓN DE LA ZARAGOSA *Aristolochia sp.*

País de recolección: ECUADOR

Provincia: Pastaza

Ciudad: Puyo (Km 15 vía Puyo - Macas)

Comunidad: El Talín ("Finca Alegre")

Altura: 934-963 msnm

Fecha de recolección: 15/05/2015

3.1.2. CARACTERISTICAS

Bejuco de más de 2 m de altura

Flores: Moradas

Familia: Aristolochiaceae

Género: *Aristolochia sp.*

Recolector: Daniel Huebla

3.2. IDENTIFICACION BOTANICA

Tabla 2-3 Identificación botánica de la Zaragosa.

Nº Muestra	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO
1	<i>Aristolochiaceae</i>	<i>Aristolochia sp.</i>

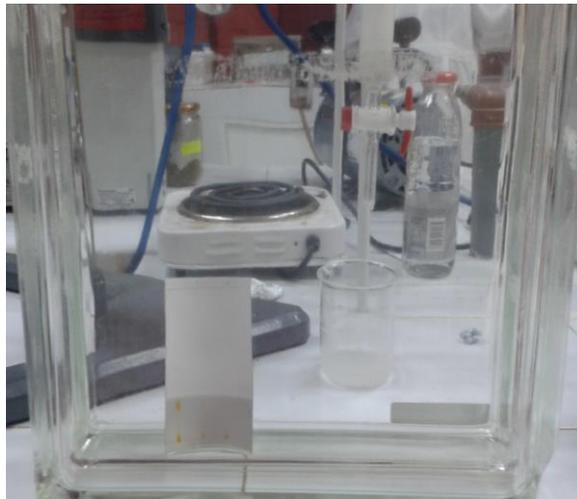
Fuente: Freire E. 2015.

La muestra colectada fue revisada e ingresada en las colecciones del MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES en conjunto con el HERBARIO

NACIONAL DE QUITO, cuyas dependencias expiden un informe de identificación botánica de la muestra conservada y su respectiva certificación. (Ver ANEXO I, II).

3.3. Separación e Identificación de la fracción alcaloidea del extracto de Zaragosa (*Aristolochia sp.*) mediante cromatografía de capa fina (TLC).

En la FOTO N° 3,4 se puede observar la cromatografía de la fracción extraída del A. aristolóquico. A partir de éstas, se puede identificar que los extractos clorofórmico y etéreo, obtenidos a partir del filtrado, muestran mejor resolución siendo la más resolutive el extracto clorofórmico. Con este resultado, se consideró continuar con la última fracción para posteriores análisis.



3



4

FOTOS. 4-3. Desarrollo de la placa TLC. 5-3. Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico.

Fuente: Realizado por Daniel H. 2016.

3.4. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Tabla 3-3 Resultados del tamizaje fitoquímico

ENSAYO	METABOLITO ENSAYADO	TIPO DE EXTRACTO			
		ETEREO	ALCOHOLICO	ACUOSO	OTRO
Sudan	Aceites y grasas	+	N/A		
Baljet	Lactonas y cumarinas	-	-		
Dragendorf	Alcaloides	++	+++	+	
Mayer	Alcaloides	++	+++	+	
Wagner	Alcaloides	++	+++	+	
Liebermann Buchard	Triterpenos - esteroides	+	+		
Catequinas	Catequinas		-		
Felhing	Az. reductores		+	-	
Resinas	Resinas		-		
ClFe	Fenoles y Taninos		-	+	
Espuma	Saponinas		-	-	
Nihidrina	Aminoácidos		+		
Borntrager	Quinonas		-		
Shinoda	Flavonoides		+	+	
Mucilagos	Mucilagos				
Princ. Amarg	Princip. Amarg.	N/A	N/A	+++	

Fuente: Realizado por Daniel Huebla, 2015.

3.5. Citotoxicidad en Artemia Salina

El análisis estadístico se lo obtiene con ayuda de un software especializado en análisis estadístico orientado a bioensayos.

Tabla 4-3 Análisis Probit – Mínimos cuadrados

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
62	0,2333	30	4,2723	4,0447
150	0,4	30	4,7471	4,7471
250	0,6	30	5,2529	4,7471
500	0,9	30	6,2817	2,6548
1.000	0,9917	30	7,3944	1

Fuente: Realizado por Daniel Huebla

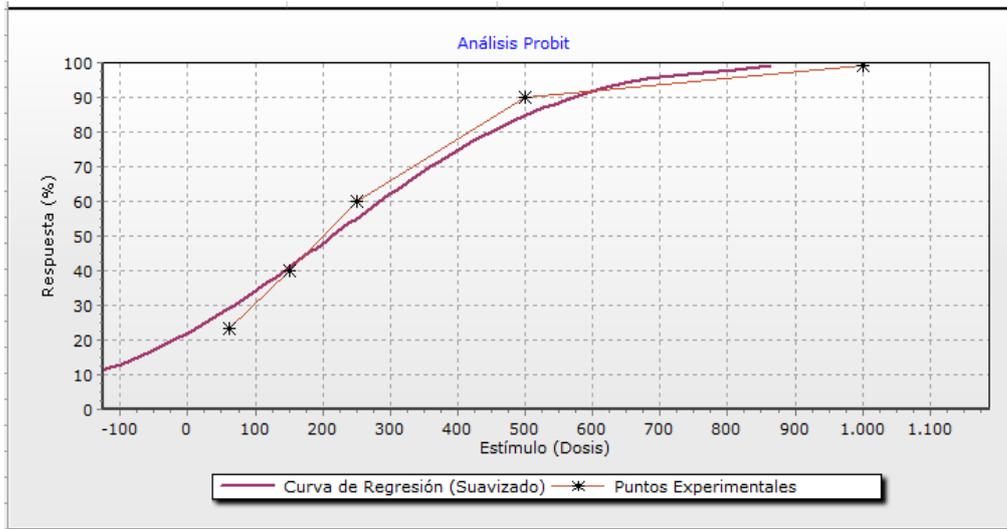
Tabla 5-3 Estadísticos de regresión

Estadísticos de Regresión			
LD50	214,1245	LD50 Error Estándar	35,9804
LD50 LCL	142,8797	LD50 UCL	285,3693
Beta	0,0036	Intercepto	4,2317
Beta Error Estándar	0,001		
LD10	-143,0972	LD16	-64,5785
LD84	492,8275	LD90	571,3462
LD100	632,179		

Fuente: Realizado por Daniel Huebla

En el TABLAS N° 04, 05, se presenta las diferentes Dosis a la que se utilizó el extracto y el porcentaje de mortalidad en Artemia salina. Los resultados promedio se representaron utilizando la herramienta de Análisis Probit del software estadístico BIOSTAT v.5, de la que la concentración letal media (CL50). Por lo que se determinó que la concentración a la que el 50% de las larvas mueren dentro de las 24 h de contacto con las diluciones es de 214,12 ppm con un intervalo de confianza de 0,05.

Fig. 6-3 Grafica de la curva análisis Probit



Fuente: Realizado por Daniel Huebla

Mediante la extrapolación de resultados (FIGURA N°06) se pudieron determinar que existe una relación proporcional entre la concentración del extracto de ácidos aristolóquicos de la zaragosa y el porcentaje de mortalidad en *Artemia salina*. Es así que al extracto se le consideró tóxico.

Estudios anteriores, *New England Journal of Medicine* junto con un Editorial muy interesante titulado “Cáncer y Hierbas” en la flora de Brazil demuestran que es muy tóxico. Peña JM et al. 1996 “*Los cuadros de nefropatía y enfermedad renal terminal asociados con el uso de estas especies vegetales que contienen ácidos aristolóquicos, han requerido en algunos casos la implantación de diálisis o trasplante renal*”

En relación a la LC50 del extracto de la Zaragosa (*Aristolochia sp.*) la dosis a la que el 50 por 100 unidades experimentales logras sobrevivir es a 214,12 ppm. Se determina así que los presentes resultados nos guían a decir que existen la presencia de estos ácidos y por ende su severa toxicidad, que producen la muerte de los nauplios. Esto se debe a que estos crustáceos ingieren el extracto produciendo severas irritaciones con posibles perforaciones en el sistema digestivo. (Peña JM et al. 1996)

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

- No se pudo identificar la especie exacta, los profesionales en el área del Museo Nacional de Ciencias de Quito certifican tan solo el género y la familia quedando como "*Aristolochia sp*".
- Se obtuvo el extracto estandarizado de los tallos de la zaragosa cuya importante utilidad nos ayudó a determinar cualitativamente que tipos de compuestos están presentes en el extracto y así poder eliminar al máximo las interferencias en los siguientes análisis de carácter específico.
- El extracto de la Zaragosa, *Arisolochia sp*, fue identificado y aislado por técnicas cromatográficas, la que más se usó fue la cromatografía en capa delgada la cual presenta simplicidad y efectividad en su ejecución ya que presenta grupos cromóforos en su estructura y al momento de revelar adquiere un color amarillo característico.
- El perfil cromatográfico experimental manifiesta un R_f de 0,51 siendo así el más próximo a los de bibliografía ya que estos dicen que para el ácido aristolóquico su R_f es de 0,58, lo que nos permite concluir que se trata del mismo ácido aristolóquico.
- El extracto bruto de ácidos aristolóquicos aislados presenta actividad citotóxica sobre *A. salina*, debido a que el análisis estadístico mediante el software Biostat con un nivel de confianza del 0,05 da como resultado que a la dosis de 214,12ppm el 50% de los crustáceos sobreviven, concluyendo así que estos compuestos son altamente tóxicos.

4.1. RECOMENDACIONES

- Profundizar en el estudio de las especies dispersas en nuestra amazonia para poder determinar que especies se han asentado así como también que nuevas especies han surgido.

- Continuar con los análisis aún más específicos para determinar más parámetros que nos ayuden a prevenir el riesgo que provocan estos compuestos y a su vez adquirir conocimiento para redirigirlos de manera adecuada a favor de la humanidad.

- Ejecutar análisis sofisticados como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, para poder elucidar estructuras que nos orienten a más estudios y así fijar diversos usos que se le pueda dar a estos compuestos.

- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana de los ácidos aristolóquicos extraídos de la Zaragosa (*Aristolochia sp.*)

ANEXOS

ANEXO I

Informe de identificación botánica

**MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES (MECN)
HERBARIO NACIONAL (QCNE)**

Avenida Río Coca, E6-115 e Isla Fernandina
Casilla Postal 17-07-8976. Tel/Fax (593-2) 2441-592, 2449 824
Quito-Ecuador

Informe de identificación taxonómica de especímenes vegetales

SOLICITANTE: ESPOCH
Sr. Daniel Eduardo Huebla Quishpe
CI: 0604375162
FECHA: 05 de junio del 2015

N° Muestra	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO
1	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia sp.</i>

Total de especies: 1

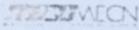
Fuente para nomenclatura
1. www.tropicos.org.

Identificado por: Efraín Freire



ANEXO II

Certificado de entrega – recepción del espécimen Zaragosa (*Aristolochia sp.*)

 Instituto Nacional de Biodiversidad


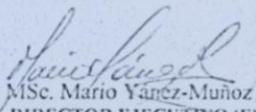
CERTIFICADO

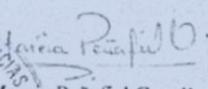
Quito, 9 de Junio 2015

El Herbario Nacional (QCNE), Sección Botánica del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN) del Instituto Nacional de Biodiversidad, certifica que el señor Daniel Eduardo Huebla Quishpe con C. I. 060437516-2, Tesista de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, entrega 1 espécimen con número de colección: Daniel Huebla 001 El espécimen fue revisado e ingresado para su procesamiento de acuerdo a los estándares del Herbario Nacional.

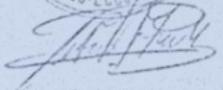
Estas muestras fueron colectadas en el proyecto de investigación “Extracción, aislamiento y purificación de alcaloides del extracto del tallo de la Zaragosa *Aristolochia elegans* Mast.”, que corresponde a la Autorización de Investigación Científica No MAE-DPAP-PIC-FLO-2015-007 emitida por la Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza.

Atentamente,


MSc. Mario Yáñez-Muñoz
DIRECTOR EJECUTIVO (E)


Dra. Marcia Peñafiel Cevallos
ADMINISTRADORA DE COLECCIONES
HERBARIO NACIONAL


MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL
QUITO - ECUADOR


Dr. Efraim Freire.
CURADOR HERBARIO NACIONAL

Nota.- El Herbario Nacional (QCNE), se reserva el derecho de procesar solo las muestras fértiles, endémicas, o en alguna categoría de amenaza UICN y CITES, especies nuevas para la ciencia, de importancia ancestral, económica, medicinal o que procedan de lugares no explorados.

ANEXO III

Fotos de Campo



Flor de Zaragosa, corte sagital



Flor de Zaragosa vista frontal



Flor y semillas colgando del tallo (bejuco)



Especimen conservado (Herbario Nacional)



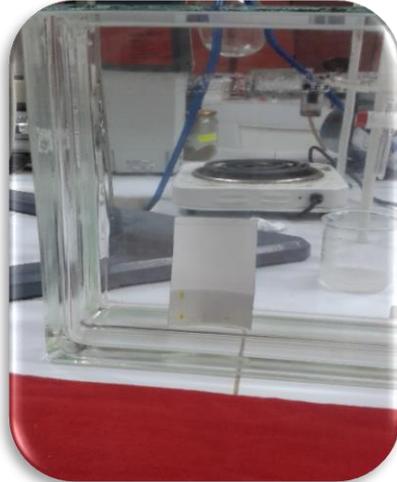
Hojas en etapa de maduración



Recolección de partes aéreas

ANEXO IV

Cromatografía TLC de los extractos alcohólico y clorofórmico



Placa cromatográfica (extracto alcohólico)



Placa cromatográfica (extracto clorofórmico)



Vista al fotómetro UV Placa cromatográfica (extracto alcohólico)



Vista al fotómetro UV Placa cromatográfica (extracto clorofórmico)

BIBLIOGRAFIA

FUENTES BIBLIOGRAFICAS

1. **AMORU G, 2001**, CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGY OF *ARISTOLOCHIA* SPECIES, Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 32, pp. 855-900.
2. **ÁVILA Z G, et al, 2001**, Química Orgánica. Experimentos con un enfoque ecológico. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México, 2001.
3. **CASTROVIEJO S, 1985, ASARUM L. (ARISTOLOCHIACEAE)**, género, al parecer, extrapeninsular Anales Jard. Bot. Madrid 41(2): 467
4. **CARVAJAR P, 1960**, Plantas que Curan, Plantas que Matan P. A. Carvajar - México Tecnilibro 1960.
5. **CHIEREGHIN P, 2000**, Farmacia Verde: Manual práctico de herboristeía P. Chiereghin - Madrid Mundi-Prensa 2000.
6. **COSTA A, 2008**, Taxonomy of an endemic Aristolochia (Aristolochiaceae) from the Iberian Peninsula. Anales Jard. Bot. Madrid, pp: 173-178
7. **DOMÍNGUEZ S, XORGE A. 1973**, Métodos de investigación fitoquímica Xorge A. Domínguez S. - México.D.F. Limusa 1973.
8. **GONZALEZ, F. 1999**, Phylogenetic analysis of the Aristolochioideae (*Aristolochiaceae*), Ph. D thesis. The City University of New York, 1999.
9. **HOU D, 1996**, *Flora of Taiwan*, 2º Ed., Editorial Committee of the Flora of Taiwan: Taipei, 1996; Vol 2, pp. 636-642.

10. LI-SHIAN S. et al, 2004, ELSEVIER, Bioorganic & Medicinal Chemistry, The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*, Vol.12, pp. 439–446.

11. TIAN-SHUNG, 1992, CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGY OF ARISTOLOCHIA SPECIES, Editorial: Elsevier, Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 32.

12. ULRICH, 2009, HISTOLOGIA, Sistema Endocrino, Germany: Editorial medica Panamericana. p. 408

FUENTES DE INTERNET

1. AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014, Cáncer de origen primario desconocido, Cancer Facts and Figures 2014. Atlanta, Ga: American Cáncer Society, 2015/07/25, Sitio web:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002285-pdf.pdf>

2. ARANGO G, 2008 ALCALOIDES Y COMPUESTOS NITROGENADOS, Facultad de Química Farmacéutica Medellín, junio de 2008. Sitio web:

<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>

3. ASOCAE O.N.G.D, 2008, PLANTAS MEDICINALES, LOS ALCALOIDES, Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación, 2015/07/28, Sitio web:

http://www.natureduca.com/med_sustanc_alcaloides.php

4. BRUNETON, J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Intercept Ltda, Hampshire, England, U.K. D, Sitio web:

http://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/pharmacognosy-s-topics/extraction-methods/maceration/20151205_

5. CABELLOS, N. 2007, TAXOFOTOORG, BIODIVERSIDAD VIRTUAL, Familia Aristolochiaceae Clave de las especies, 2015/07/28, Sitio web:

<http://www.yuribass.com/Taxofichas/Aristolochiaceae.pdf>

6. **CHEMOCARE. 2002, Tipos de quimioterapia**, 2015/07/27, Sitio web:
<http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/tipos-de-quimioterapia.aspx>

7. **CANCER.NET, 2014, Cáncer de riñón: Opciones de tratamiento**. American Society of Clinical Oncology (ASCO). 2015/07/27 Sitio web:
<http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-ri%C3%B1%C3%B3n/opciones-de-tratamiento>

8. **GAVILÁNEZ J. 2000**, Texto Básico: Farmacognosia: De los Vegetales a las Medicinas, de la cinchona a la quinina Cumandá Beatriz Játiva Gavilánez - Riobamba CDR-XEROX 2000. Sitio web:
<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>

9. **GONZALEZ A. 2015**, Cáncer renal. Sociedad Española de Oncología Médica, Vol. I, 1-3, (2015/07/21), Sitio web:
<http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/genitourinario/renal>

10. **JORDAN. S, PERWAIZ. 2014**; Reference module in Biomedical Sciences from encyclopedia of toxicology; third Edition, 2014, Pgs. 298-301, Current as of 1 September 2014. Sitio web:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543011647>

11. **NATIONAL CANCER INSTITUTE PHYSICIAN DATA QUERY (PDQ), 2014**. Carcinoma of Unknown Primary: Treatment. 2015/07/25. Sitio web:
www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/unknownprimary/HealthProfession

12. **NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, NCCN. Practice Guidelines in Oncology: Occult primary**. Version 3.2014. 2015/07/25, Sitio web:
www.nccn.org.

13. RUBINSON, JUDITH F. 2000, Química analítica contemporánea Judith F. Rubinson - México.D.F. Prentice Hall Hispanoamericana 2000. Sitio web:
<http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/fina.htm> 20151123

14. SALAZA A, 2014, citología e histología, Aparato Urinario, Universidad de Murcia, 2015/07/25, Sitio web:
<http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema28-urinario.pdf>